UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

KATEDRA BIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VĚD

FUNKCE CYTOCHROMU C V EUKARYOTICKÝCH BUŇKÁCH

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Martin Louša

VEDOUCÍ PRÁCE: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

KONZULTANT: Mgr. Jan Čapek

2017

UNIVERSITY OF PARDUBICE

FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY

DEPARTMENT OF BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL SCIENCES

ROLES OF CYTOCHROME C IN THE CELL

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Martin Louša

SUPERVISIOR: doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.

CONSULTANT: Mgr. Jan Čapek

2017

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: **2016/2017**

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Martin Louša**
Osobní číslo:	**C14301**
Studijní program:	**B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor:	**Zdravotní laborant**
Název tématu:	**Funkce cytochromu C v eukaryotických buňkách**
Zadávající katedra:	**Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování:

Zpracujte literární rešerši zaměřenou na popis funkce mitochondriálního cytochromu C v živočišné eukaryotické buňce. V kompilační práci se nejprve zaměřte na obecný popis funkcí a struktury mitochondrií, výpis biochemických dějů, které v nich probíhají, a to speciálně se zaměřením na děje spojené s přenosem elektronů v respiračním řetězci. Následně detailně popište strukturu, vznik a také přehled funkcí cytochromu C za fyziologických, ale i patofyziologických podmínek.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Ke zpracování kompilace využijte elektronických vědeckých databází, jako jsou např. ScienceDirect, HighWire, NCBI Pubmed, apod.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Jan Čapek**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **28. listopadu 2016**

Termín odevzdání bakalářské práce: **7. července 2017**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/200 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 21. 6. 2017

Martin Louša

Poděkování:

Tímto bych rád poděkoval doc. RNDr. Tomáši Roušarovi, Ph.D. a Mgr. Janu Čapkovi za vstřícný přístup, podporu a cenné rady, které mi poskytli během psaní bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval své rodině za podporu a motivaci ke studiu.

ANOTACE

Bakalářská práce se zabývá cytochromem c a jeho funkcí v eukaryotické buňce. V úvodu práce je popsána mitochondrie, její struktura a funkce. Další kapitoly jsou zaměřeny na elektron transportní řetězec a jeho jednotlivé komplexy jako jsou cytochrom c reduktáza/oxidáza a samotný cytochrom c. U cytochromu c je popsána jeho struktura, role v oxidační fosforylaci, stejně tak jako u cytochrom c reduktázy a oxidázy. Dále je popsána jeho konformační dynamika, antioxidační účinky, účast během apoptózy, a nakonec jeho interakce s toxiny. Vysvětleny jsou základní principy přenosu elektronů cytochromem c v dýchacím řetězci a vznik kyslíkových radikálů v mitochondrii. Velká pozornost je věnována účasti cytochromu c v apoptóze buňky. Podrobně je popsán mechanismus aktivace apoptózy, dále uvolnění cytochromu c z mitochondrie a tvorba apoptozomu. V závěru práce je objasněn princip ovlivnění cytochromu c a celého dýchacího řetězce toxiny.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mitochondrie, dýchací řetězec, cytochrom c, cytochrom c reduktáza, cytochrom c oxidáza, apoptóza.

ANNOTATION

The bachelor thesis deals with cytochrome c and its function in eukaryotic cells. The introduction describes mitochondria, its structure and function. Following chapters are focused on electron transport chain and respiratory complexes like cytochrome c reductase/oxidase and finally cytochrome c. The structure of cytochrome c as well as of cytochrome c reductase and oxidase is described including roles in oxidative phosphorylation. In addition, conformation dynamics of cytochrome c, antioxidant effects, participation in apoptosis and modulation of its activity by toxins are described. In the bachelor thesis, basic principles of electron transfer by cytochrome c in the respiratory chain are explained including reduction of oxygen radicals in mitochondria. Great attention is paid for participation of cytochrome c in apoptosis. The activation mechanism of apoptosis is described in detail, i.e. release cytochrome c from mitochondria and formation of apoptosome.

KEY WORDS

Mitochondria, respiratory chain, cytochrome c, cytochrome c reductase, cytochrome c oxidase, apoptosis.

OBSAH

Úvod 14

1. Mitochondrie 15

1.1. Struktura 15

1.2. Funkce 16

1.2.1. Oxidační fosforylace 16

1.2.1.1. Komplexy elektronového transportního řetězce 17

1.2.1.2. Cytochrom c reduktáza 19

1.2.1.3. Cytochrom c oxidáza 21

1.2.2. Kalciová signalizace 23

2. Cytochrom c 23

2.1. Struktura cytochromu c 24

2.2. Role cytochromu c v oxidační fosforylaci 25

2.3. Konformační dynamika cytochromu c 25

2.4. Cytochrom C jako antioxidant 26

3. Role Cytochromu C v apoptóze 27

3.1. Apoptóza 27

3.1.1. Vnější cesta aktivace 28

3.1.2. Vnitřní cesta aktivace 29

3.2. Uvolnění cytochromu c z mitochondrií 30

3.3. Interakce cytochromu c s kardiolipinem 31

3.4. Cytochrom c v cytosolu 32

3.5. Apoptozom 33

3.6. Dopad mutací cytochromu c na aktivaci kaspázy 34

3.7. Vazba cytochromu c s proteázu-aktivujícími faktory 35

4. Interakce cytochrom c oxidázy s toxiny 36

4.1. Kyanid 36

4.2. Oxid dusnatý 38

4.3. Akrolein 39
4.4. Ceramid....40
4.5. Oxid uhelnatý 41
4.6. Ethanol 41
5. Závěr 43
6. Zdroje 44

SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Mitochondriální struktura 16
Obrázek 2: Komplexy dýchacího řetězce 17
Obrázek 3: Reverzní redukce ubichinonu na ubichinol 18
Obrázek 4: Mechanismus Q-cyklu 20
Obrázek 5: Cytochrom c oxidáza 22
Obrázek 6: Molekulová struktura cytochromu c 24
Obrázek 7: Apoptická a nekrotická buňka 28
Obrázek 8: Schématické zobrazení apoptických cest 30
Obrázek 9: Proces změny struktury cytC během jeho vazby na CL 32
Obrázek 10: Cytochromem c podmíněná tvorba apoptozomu 34
Obrázek 11: Vazba cytC s Apaf-1 35
Obrázek 12: Kyanid inaktivující mitochondriální cytochrom c oxidázu 37
Obrázek 13: Prostředky k detoxikaci a odstranění kyanidu z organismu. 38

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

Acetyl-CoA	acetylkoenzym A
ADP	adenosindifosfát
ANT	adenin nukleotidová translokáza
Apaf-1	apoptické proteázy aktivující faktory
APT	adenosintrifosfát
Asp	kyselina asparagová
Bax	proapoptické proteiny
Bcl2	rodina Bcl proteinů
BH3	podjednotka proapoptických proteinů
CAD	kaspáza aktivující DNázu
CARD	kaspázu vázající doména
CL	kardiolipin
CO	oxid uhelnatý
Cox 1, 2, 3	podjednotky cytochrom c oxidázy
Cys	cystein
cytC	cytochrom c
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ETC	elektronový transportní řetězec
FADD	Fas-vázaný protein se smrtící doménou
$FADH_2$	flavinadenindinukleotid
Fas, CD95, APO-1	ligandy spouštějící apoptózu
Gln	glutamin
Glu	kyselina glutamová

Gly	glycin
GuHCl	guanidinhydrochlorid
His	histidin
HSPs	proteiny teplotního šoku
IAPs	kaspázy inhibující proteiny
Ile	isoleucin
Lys	lysin
Met	methionin
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
$NADH^+$	oxidovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NO	oxid dusnatý
NO^{2-}	dusitan
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
Phe	fenylalanin
Pro	prolin
Q_0	místo oxidace chinolu
Q_i	místo redukce chinolu
ROOH	organický hyrdoperoxid
ROS	reaktivní formy kyslíku
Thr	threonin
Trp	tryptofan
WD1, 2	podjednotky WD40
WD40	výběžky Apaf-1

ÚVOD

Buňka je základní funkční a stavební jednotkou všech živých organismů vyjma nebuněčných jako jsou viry, viroidy, virusoidy a priony. Každá buňka obsahuje množství organel, které jsou umístěné v cytoplazmě. Jednou z nejdůležitějších organel jsou mitochondrie, které jsou přítomny v každé eukaryotní buňce. V mitochondriích se uskutečňuje oxidační metabolismus eukaryotických buněk za účasti enzymů. Mitochondrie tedy představují jakousi buněčnou elektrárnu.

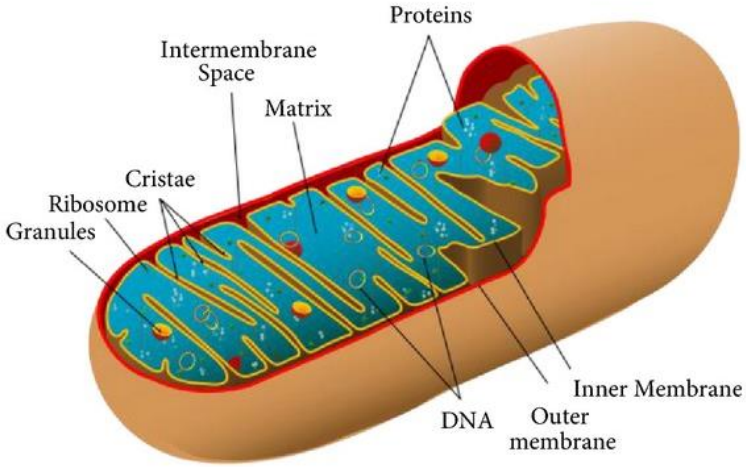
Cytochrom c (cytC) má důležitou úlohu při přenosu elektronů mezi komplexem III a IV v elektronovém transportním řetězci, díky tomu má nepostradatelné místo v buněčném metabolismu. Cytochrom c se dále účastní programované buněčné smrti a je antioxidantem.

1. MITOCHONDRIE

Mitochondrie jsou hlavním místem syntézy ATP v aerobních buňkách, kde jsou sledem oxidačních reakcí zpracovány substráty až na konečný produkt, kterým je již zmíněný ATP. Mitochondrie jsou tvořeny matrixovým prostorem, který obsahuje velké množství enzymů citrátového cyklu a beta-oxidace, v těsné blízkosti vnitřní membrány se nacházejí čtyři komplexy elektronového transportního řetězce, ATP syntáza a specifické přenašeče metabolitů. Mitochondrie mají, zejména pro ionty, velmi permeabilní vnější membránu a mezimembránový prostor. Syntéza ATP (oxidační fosforylace) je závislá na strukturální integritě mitochondrie. Elektrony vzniklé při oxidaci substrátu jsou přiváděny do elektronového transportního řetězce na komplexy I, II a poté jsou přenášeny na komplex III, IV a konečným akceptorem elektronu je kyslík. Komplexy I, III a IV jsou tzv. redox pumpy a přenos elektronů přes tyto jednotlivé komplexy způsobuje přesun protonů z matrix přes vnitřní mitochondriální membránu do mezimembránového prostoru za vzniku elektrochemického protonového gradientu. Posledním enzymem je ATP syntáza, díky které jsou syntetizovány molekuly ATP za využití proudu protonů z mezimembránového prostoru do matrix skrze tento enzym. Na tomto přenosu se podílí tzv. protonmotivní síla vznikající díky protonovému gradientu, který zde vznikl účastí předešlých enzymů. (Sherratt, 1991).

1.1. STRUKTURA

Mitochondrie jsou od cytoplazmy odděleny dvojitou membránou, která obklopuje matrixový prostor obsahující mitochondriální DNA. Vnitřní membrána tvoří vchlípeniny, tzv. kristy, a to z důvodu zvětšení reakčního povrchu membrány (obr. 1). Struktury kontaktních míst vnitřní a vnější membrány jsou variabilní a jejich počet je ovlivněn přítomností adenosindifosfátu (ADP) nebo například toxinů jako je atraktylosid (inhibitor oxidační fosforylace). Kontakty jsou tvořeny specifickými interakcemi mezi komponentami vnitřní a vnější membrány jako například napěťově řízenými iontovými kanály a adenin nukleotidovými translokázami (Brdiczka et al., 2006).



Obrázek 1: Mitochondriální struktura (Petersen, 2013).

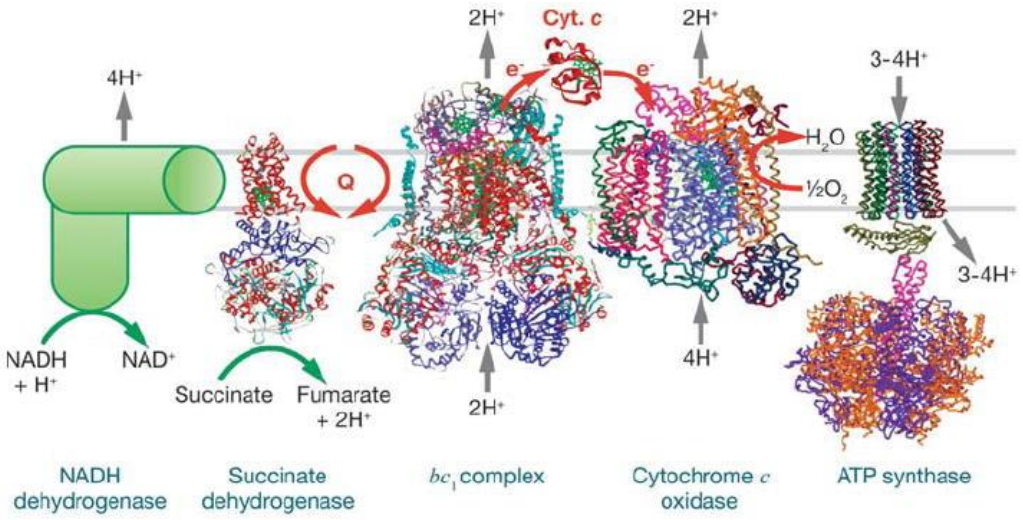
Další morfologické aspekty mitochondriální dynamiky zahrnují změny velikosti během procesu štěpení nebo fúze. Abnormality tohoto procesu vedou k vytvoření nadměrně velkých, segmentovaných mitochondrií. Tyto změny umožňují tvorbu sférické mitochondrie zvané mitochondriální sféroidy, které obklopují cytoplazmu a další organely (Ding et al., 2012).

1.2. FUNKCE

1.2.1. OXIDAČNÍ FOSFORYLACE

Mitochondrie jsou místem, kde se vyskytují hlavní enzymatické systémy zpracovávající produkty metabolických drah sacharidů, lipidů a proteinů vedoucí k získání energie ve formě ATP. Sacharidy, lipidy i proteiny mohou být katabolizovány na acetylkoenzym A (acetyl-CoA) vstupujícího do citrátového cyklu, který probíhá v matrix. Sacharidy vstupují do Krebsova cyklu ve formě pyruvátu, který vzniká po předchozí glykolýze v cytosolu. Pyruvát dehydrogenáza napomáhá za přítomnosti kyslíku přeměně pyruvátu na acetyl-CoA. Mastné kyseliny lipidů jsou převedeny beta-oxidací na acetyl-CoA v mitochondriích, u aminokyselin se uplatňují enzymy katalyzující jejich přeměnu na pyruvát, acetyl-CoA nebo přímo na meziprodukty citrátového cyklu. Produktem oxidace acetyl-CoA jsou mimo jiné tři molekuly $NADH^+$ a jedna

molekula $FADH_2$, které přinášejí elektrony do elektronového transportního řetězce (ETC). Elektronový transportní řetězec je tvořen komplexy, kterými jsou komplex I (NADH dehydrogenáza), komplex II (sukcinátdehydrogenáza), komplex III (cytochrom c reduktáza, bc_1 komplex) a komplex IV (cytochrom C oxidáza).

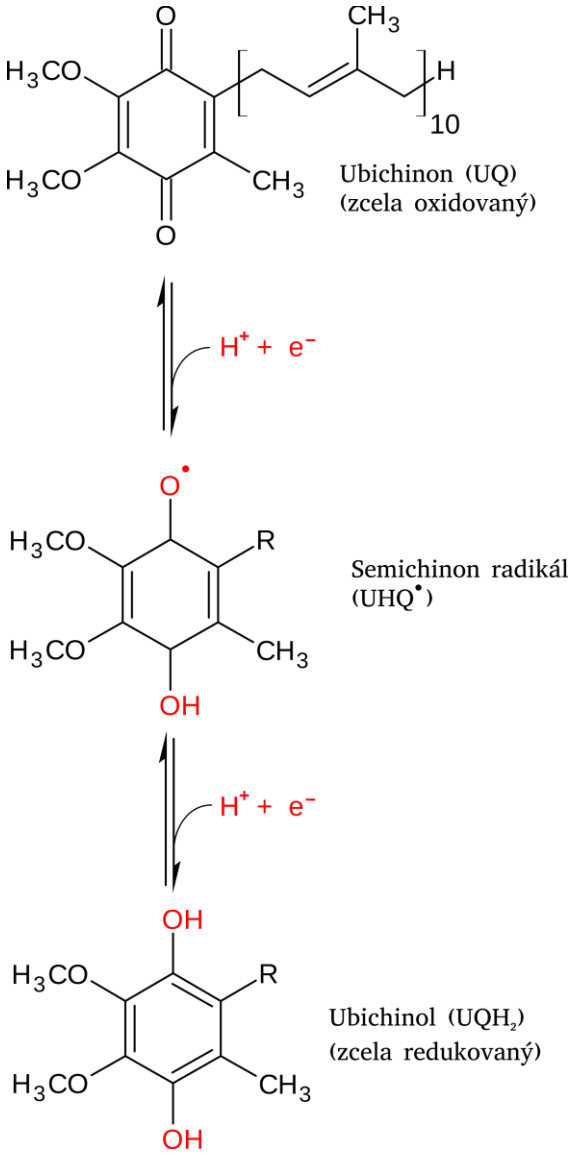


Obrázek 2: Komplexy dýchacího řetězce (Hosler et al., 2006).

Kromě komplexu II se všechny komplexy účastní přenosu protonů z matrix do mezimembránového prostoru (obr. 2). Rozložení protonů kolem vnitřní membrány vytváří silný protonový gradient, tzv. protonmotivní sílu, protony se vracejí z mezimembránového prostoru do matrix přes vnitřní membránu, konkrétně přes ATP syntázu a roztáčí její rotor za vzniku ATP z ADP a Pi (Stock et al., 1999).

1.2.1.1. Komplexy elektronového transportního řetězce

Komplex I je největším enzymem ETC tvarem připomínající písmeno L. Velká část je zakotvena ve vnitřní membráně a kratší raménko vyčnívá do matrix mitochondrie. Komplex I váže NADH na distální konec hydrofilního ramene a přenáší dva elektrony, jeden po druhém, pomocí flavinmononukleotidu a sedmi FeS klastrů na ubichinon, který leží mezi rameny. Redukce ubichinonu na ubichinol (obr. 3) vyvolá konformační změny v membránové části komplexu I jejichž výsledkem je přenos čtyř protonů přes membránu do mezimembránového prostoru (Lenaz et al., 2006).



Obrázek 3: Reverzní redukce ubichinonu na ubichinol.

Komplex II je dalším místem vstupu elektronů do dýchacího řetězce. Dochází k oxidaci sukcinátu na fumarát a přenosu elektronů přes tři FeS klastry na ubichinon. Komplex II není protonovou pumpou, a proto přímo nepřispívá k tvorbě elektronového protonového gradientu (Huang et al., 2013).

Komplex III, jak napovídá označení bc_1 komplex, je dimer složený z cytochromu c_1 a cytochromu b. V komplexu III je oxidován ubichinol díky čemuž jsou přenášeny 2 protony do mezimembránového prostoru. Elektrony z ubichinolu jsou přeneseny přes cytochrom c_1 a cytochrom b na transportní cytC, který transportuje elektrony na cytochrom c oxidázu (komplex IV). Komplex IV je akceptorem elektronů od cytC a předá je molekule kyslíku

za redukce na vodu. Během tohoto procesu jsou do mezimembránového prostoru přeneseny 4 protony (Crofts et al., 1998).

Komplex V využívá energii uloženou ve formě elektrochemického protonového gradientu k přeměně ADP na ATP. Jedná se o komplex tvořený 18 podjednotkami s celkovou hmotností 600 kDa. Část ATP syntázy s označením F_1 se skládá ze tří α a tří β katalytických podjednotek. Část F_1 je spojena s prstencovou podjednotkou c F_0 částí vloženou do membrány, složené z 12 částí, pomocí centrálního a periferního stonku. Protony procházejí membránou přes protonový kanál a roztáčí prstencovou podjednotku c a centrální stonek. F1 části je zabráněno rotaci zakotvením pomocí periferního stonku (Chaban et al., 2013).

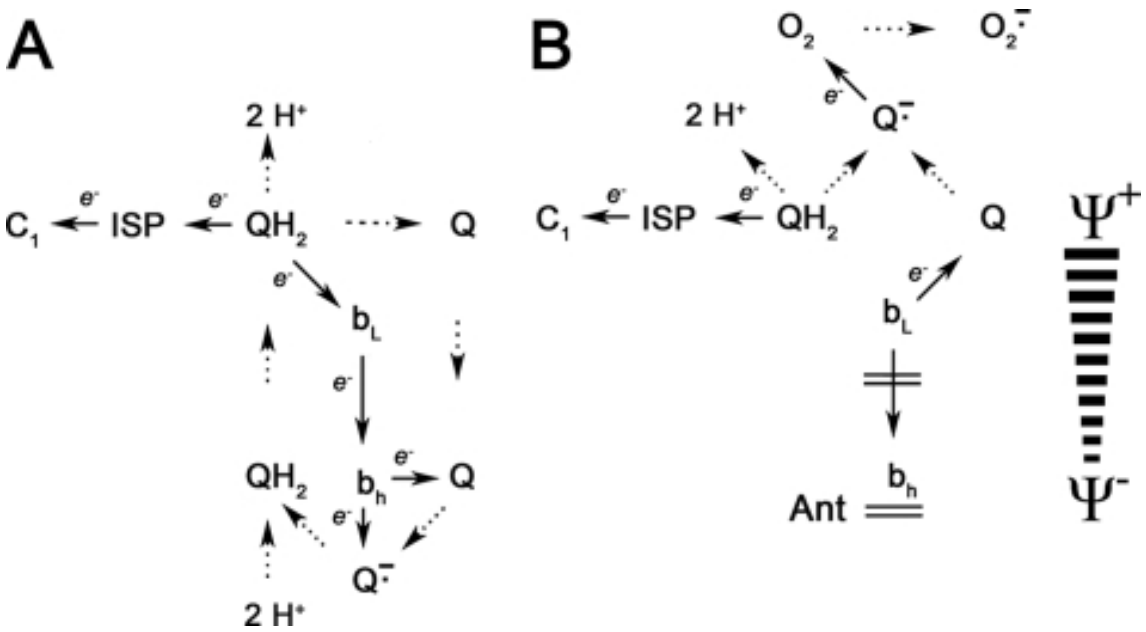
1.2.1.2. Cytochrom c reduktáza

Cytochrom c reduktáza (známá také jako komplex III, bc_1 komplex) je enzymem přenášejícím elektrony, za současné tvorby protonového membránového gradientu, nacházející se na vnitřní mitochondriální membráně. Tento enzym je střední složkou dýchacího řetězce. Komplex III obsahuje tři hlavní podjednotky s aktivními redox centry, kterými jsou cytochrom b, cytochrom c_1 a Rieskeho [2Fe-2S] protein. Mitochondriální bc_1 komplex je dimer, jehož každá část je složena z 11 různých polypeptidových podjednotek. Jádrem bc1 komplexu jsou podjednotky 1 a 2, které jsou členy rodiny proteinů zpracovávajících peptidy, což značí, že cytochrom c reduktáza by mohla mít dvě funkce včetně importu proteinů do matrix (Iwata et al., 1998).

Komplex III katalyzuje přenos elektronů z ubichinolu na cytC, který je schopen přenést vždy pouze jeden elektron, a spojuje tento elektronový přenos s přenosem protonů přes vnitřní mitochondriální membránu. Enzym má dvě oddělená chinonová vazebná místa (Q_0 – místo oxidace chinolu, Q_i – místo redukce chinolu), která jsou lokalizována na opačných stranách vnitřní membrány. Vazebné místo Q_0 se nachází na vnější a Q_i na vnitřní straně membrány a jsou vzájemně propojeny transmembránovou elektronovou drahou. Katalytický mechanismus komplexu III je poměrně složitý a je znám jako Q-cyklus (Crofts, 2003).

Mechanismus Q-cyklu spočívá v oxidaci ubichinolu v P-centru při vnějším povrchu vnitřní mitochondriální membrány v rozvětvené reakci, během které se přenáší jeden elektron na Rieskeho protein a druhý na b_L hem cytochromu b. Elektron na Rieskeho proteinu je následně přenesen na cytC a elektron b_L hemu je přenesen na b_H hem, který dále redukuje ubichinon na ubisemichinon v N-centru. Během oxidace druhé molekuly ubichinolu je ubisemichinon redukován na ubichinol elektronem přicházejícím z b_H (obr.4) (Rottenberg et al., 2009).

Pokud dojde k inhibici přenosu elektronů z b_L na b_H hem dochází ke vzniku superoxidových aniontů. Přenos elektronů je inhibován buď poruchou rozložení membránového potenciálu nebo antimycinem, který blokuje reoxidaci hemu b_H, což vede k hromadění elektronů na b_L hemu. Superoxidové anionty jsou tvořeny reakcí kyslíku s ubisemichinonem, který je formován buď přenosem jednoho elektronu z ubichinolu na Rieskeho protein nebo redukcí ubichinonu redukovaným b_L hemem (obr. 4) (Rottenberg et al., 2009).



Obrázek 4: Mechanismus Q-cyklu, A – normální funkce Q-cyklu. B – tvorba superoxidu při poruše přenosu elektronů mezi hemy b_L a b_H. Plné šipky znázorňují přenos elektronů v reakci, přerušované šipky naznačují pohyb ubichinonu a ubichinolu mezi reakčními centry komplexu bc_1, uvolnění a přijetí protonů v N- a P-centru nebo redox změny ubichinonu, ubichinolu a kyslíku. Dvojité čáry schématu B představují nemožnost přenosu elektronů z bL na bH díky změně membránového potenciálu a inhibici reoxidace bH antimycinem (Rottenberg et al., 2009).

Během kompletního Q-cyklu se dvě molekuly ubichinolu oxidují na dva ubichinony, ale jedna z molekul ubichinonu je redukována na ubichinol. Cytochrom c_1, FeS protein a dva hemy cytochromu b jsou dvakrát redukovány a reoxidovány. Reakce na P-centru je v první i druhé části Q-cyklu identická. Na N-centru b_H hemu je během první části cyklu redukován ubichinon na ubisemichinon a v průběhu druhé části cyklu je ubisemichinon redukuje na ubichinol (Brandt et al., 1994).

1.2.1.3. Cytochrom c oxidáza

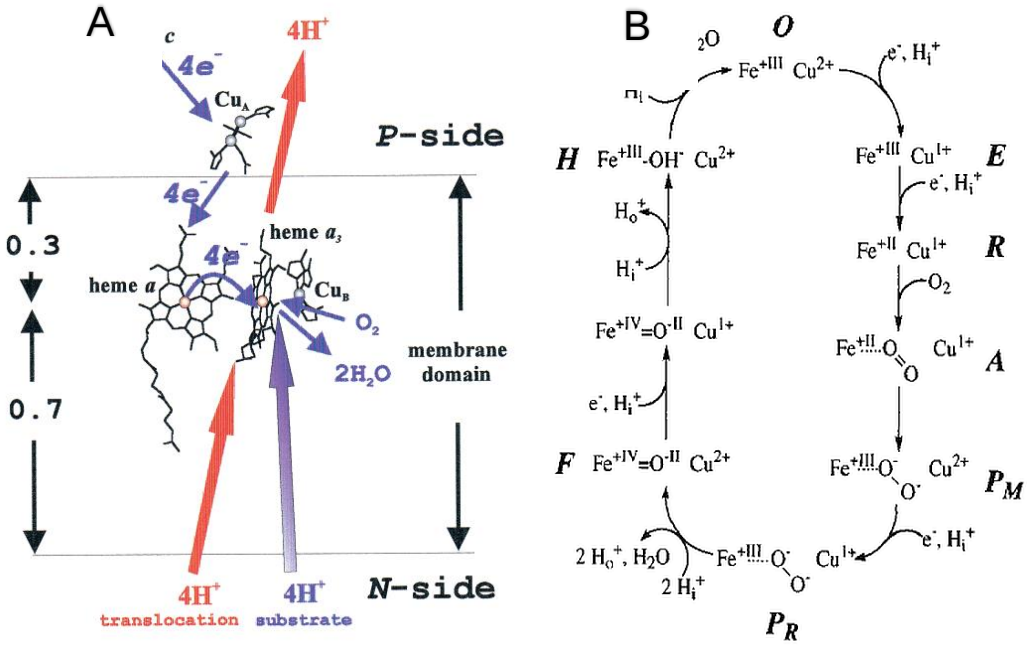
Cytochrom c oxidáza, zvaná také jako komplex IV, je složena ze 13 podjednotek s přibližnou hmotností 200 kDa, které katalyzují přenos elektronů z cytC na molekulový kyslík. CytC oxidáza je další podjednotkou elektronového transportního řetězce přispívající ke vzniku protonového gradientu, který má také zásadní význam pro zachování schopnosti mitochondrie vyměňovat metabolity a ionty s okolním cytosolem a ostatními organelami (Popovič, 2013).

Cytochrom c oxidáza je komplex oligomerních membránových proteinů složených z polypeptidových podjednotek kódovaných nukleárními i mitochondriálními geny. Nejrozsáhlejší 3 podjednotky cytC oxidázy tvoří katalytické a strukturní jádro enzymu zahrnující všechny redox aktivní koenzymy a jsou kódovány mitochondriální DNA (mtDNA). Tyto základní podjednotky obsahují hem a prostetické skupiny, obsahující ve své molekule atomy železa, potřebné pro katalýzu (Marceau et al., 2015).

Největší podjednotkou je Cox1 (cytochrom c oxidáza 1), jedná se o vysoce hydrofobní protein, který je složený ze 12 transmembránových helixů spojených krátkými extramembránovými smyčkami. Tato podjednotka koordinuje katalytickou stránku enzymu a tvoří dvě cesty přenosu elektronů, tzv. D- a K-cestu (Wikström, 2000). Nejmenší a nejméně hydrofobní podjednotkou jádra enzymu je podjednotka Cox2 (cytochrom c oxidáza 2). Skládá se z velkého polárního C-konce, který vyčnívá do mezimembránového prostoru, a transmembránového α-helixu kotvícího podjednotku ve vnitřní membráně. C-konec Cox2 je tvořen deseti spletenými β-barely koordinujícími CuA centrum a představuje vazebné místo pro cytC. Podjednotka Cox3 (cytochrom c oxidáza 3) je podobně jako Cox1 silně hydrofobní protein

procházející vnitřní membránou pomocí sedmi transmembránových helixů. Nenese žádné prostetické skupiny a přímo se neúčastní přenosu protonů (Tsukihara et al. 1996).

Cytochrom c oxidáza je důležitým enzymem v dýchacím řetězci. Katalyzuje přenos elektronů z cytC na molekulový kyslík, který je redukován na vodu. Reakce je poháněna přenosem čtyř protonů přes membránu (obr. 5A). Celkem je tedy přes vnitřní membránu přeneseno osm nabitých částic, protože cytochrom c přenáší elektrony z vnější strany vnitřní mitochondriální membrány, ale protony pohánějící redukci kyslíku na vodu pocházejí z matrix mitochondrie. Cytochrom c oxidáza obsahuje čtyři redox aktivní kofaktory, jmenovitě se jedná o dva atomy mědi tvořící tzv. Cu_A, nízkospinový hem-*a* a hemové a_3-Cu_B binukleární centrum. Cu_A je akceptorem elektronů z cytC, elektrony jsou přeneseny přes hem *a* na binukleární centrum kde dochází k vlastní redukci kyslíku na vodu.



Obrázek 5: Cytochrom c oxidáza. A – celková reakce, příjem elektronů z cytC je spojen s příjmem protonů z matrix, redukce kyslíku je doprovázena přenosem protonů přes membránu do mezimembránového prostoru, B – katalytický cyklus se znázorněním přesunu protonů a elektronů (Wikström, 2000).

Během katalytického cyklu (obr. 5B) přijímá plně oxidovaný enzym (O) jeden elektron, což vede k vytvoření jedno-elektronově redukovaného enzymu (E). Další přenos elektronu tvoří dvou-elektronově redukovaný stav (R),

který může vázat kyslík. Přes sloučeninu A dochází k vytvoření tzv. redox stavu (P), který existuje ve dvou formách. Dvou-elektronově redukovaný P_M a po třetí redukci se jedná o P_R. Následně cyklus pokračuje rozštěpením molekuly kyslíku na jednotlivé atomy a po přijetí dvou protonů se tvoří první molekula vody. Druhý atom kyslíku pokračuje dál za tvorby oxoferryl (F). Vstup čtvrtého elektronu do cyklu vede k postupnému zavedení dvou protonů do vznikající molekuly vody. Přes hydroxylový meziprodukt (H) dochází k tvorbě plně oxidovaného enzymu (O) a cyklus se opakuje (Michel, 1998).

1.2.2. KALCIOVÁ SIGNALIZACE

Mitochondrie komunikuje s cytosolem za účelem uzpůsobit tvorbu energie v závislosti na energetických potřebách buňky. Komunikace je primárně zajištěna kalciovou signalizací mezi cytosolem a matrix. Buněčná kalciová signalizace je nejrozšířenějším způsobem ovládání procesů, které jsou spojeny s vyššími energetickými nároky, jako jsou například sekrece, kontrakce, pohyblivost nebo elektrická vzrušivost buňky. Všechny tyto děje vyžadují zvýšený přísun energie, který je obvykle spojen se zvýšenou koncentrací vápníku v buňce. Mitochondrie jsou schopny vychytávat Ca^{2+} mitochondriálním kalciovým uniportem, což je selektivní kanál vnitřní membrány pro Ca^{2+}. Zvýšení lokální koncentrace Ca^{2+} podpoří jeho příjem mitochondriemi a sníží svůj elektrochemický potenciál přechodem do matrix. Zvýšení koncentrace Ca^{2+} v matrix aktivuje limitující složky Krebsova cyklu – například enzym isocitrátdehydrogenázu. Tyto procesy zvyšují tvorbu NADH, která vstupuje do dýchacího řetězce, dochází ke zvýšení respirace a zvýšené tvorbě ATP (Spät et al., 2009).

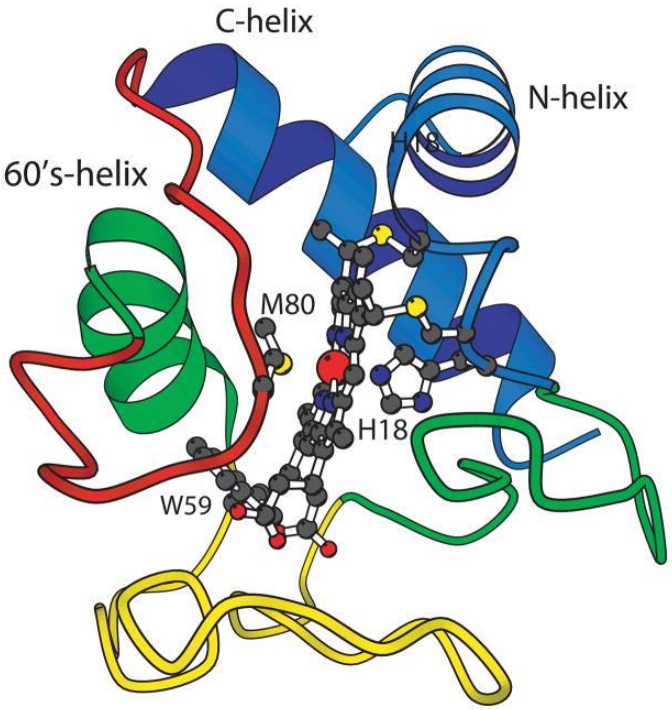
2. CYTOCHROM C

Cytochrom c je přibližně 12 kDa těžký, nukleárně kódovaný mitochondriální protein složený ze 104 aminokyselin s jednou hemovou skupinou, která nese atom železa. Jedná se o multifunkční enzym, který je zapojen do životně důležitých pochodů buňky. Účastní se přenosu elektronů v elektronovém dýchacím řetězci díky přechodu železa mezi oxidačními stavy

Fe^{2+} a Fe^{3+} a je tedy nezbytnou částí procesu získávání energie. Elektrony jsou pomocí cytC přenášeny mezi cytochromem bc1 (komplex III) a cytC oxidázou. Cytochrom c je rovněž nezbytným při tvorbě apoptozomu a rozvoji apoptózy. Mezi další funkce cytC patří například antioxidační aktivita v buňce (Babbitt et al., 2016).

2.1. STRUKTURA CYTOCHROMU C

Cytochrom c je malý protein obsahující charakteristickou sekvenci CxxCH, skládající se ze 104 aminokyselinových zbytků a hemovou skupinu. Dva hlavní helixy, N- a C- terminální helixy, se protínají v blízkosti svých center na jedné straně hemové roviny.



Obrázek 6: Molekulová struktura cytochromu c, v centru atom železa obklopený atomy dusíku ve vazbě na M80 a H18 (Hutchings et al., 2013).

Hemová prostetická skupina je kovalentně vázána prostřednictvím thioetherových vazeb na cysteiny 14 a 17 těsně za koncem N terminálního helixu. Terciární strukturu na této straně hemové roviny dotváří nepravidelně uspořádaná část řetězce tvořená zbytky 19 až 38 a proximální hemový ligand His 18. Na druhé straně hemové roviny je zakřivení tvořeno rozsáhlými

nepravidelně uspořádanými segmenty, dvěma krátkými helixy a distálním hemovým ligandem Met80 (obr. 6). Hemová skupina cytochromu c není pouze redox centrem proteinu, ale je také zásadní pro udržení struktury cytC. Odstranění hemu z molekuly způsobí narušení a ztrátu velké části sekundární struktury. Hemová skupina tvoří rozsáhlé interakce s okolním proteinem (Kang et al., 1999).

2.2. ROLE CYTOCHROMU C V OXIDAČNÍ FOSFORYLACI

Cytochrom c je lokalizován v mitochondriálním mezimembránovém prostoru a jeho funkcí je přenos elektronů z bc_1 komplexu na cytC oxidázu. V tomto kroku redukovaný cytC přenáší vždy jen jeden elektron. K redukci molekuly kyslíku na vodu jsou potřebné čtyři elektronové přenosy. V intaktní buňce je tento krok rozhodujícím o rychlosti ETC za fyziologických podmínek (Dalmonte et al., 2009). Přenos elektronu z cytC na kyslík přes cytC oxidázu vede ke konverzi kyslíku na vodu s uvolněním energie $\Delta G^{o'}$= -100 kJ/mol, která je přibližně dvojnásobná s porovnáním energie uvolněné při reakcích katalyzovaných komplexy I a III (Hinkle et al., 1991).

Mechanismus přenosu elektronů mezi proteiny a role proteinů v tomto procesu je oblastí aktivního výzkumu. Cytochrom c peroxidáza, katalyzuje redukci organického hydroperoxidu (ROOH) ve tříkrokové reakci, jejímž výsledkem je oxidace dvou molekul CytC (Voet et al., 1990).

2.3. KONFORMAČNÍ DYNAMIKA CYTOCHROMU C

Cytochrom c se skládá z pěti α-helixů vzájemně spojených Ω smyčkami. Hemová skupina je kovalentně vázaná k polypeptidu dvěma thioetherovými vazbami Cys14 a Cys17. Na atom železa v molekule hemu jsou vázány ligandy, čtyři atomy dusíku a zbytky His18 a Met80. Tyto strukturní prvky jsou běžné u všech mitochondriálních cytC. Cytochrom c je složen z pěti kooperativně složených podjednotek s různou termodynamickou stabilitou, které podstupují skládání a rozkládání stupňovitě. Terminální N- a C-helixy jsou místy největší stability, zatímco smyčka obsahující Met80 je nejlabilnějším úsekem. Cytochrom c je známý přijímáním různých alternativních konformací. Při nízkém

pH a vysoké salinitě se z cytC stává tzv. *molten globule* (skoro nativní konformace proteinu), což je stav, kdy dochází k přeměně terciární struktury, nicméně sekundární struktura zůstává do značné míry zachována. Substituce ligandů je často doprovázena konformačními změnami cytC. Pokud dojde ke zvýšení pH, slabě vázaný ligand Met80 je nahrazen Lys73 nebo Lys79, což má za následek vyšší stupeň odhalení hemové skupiny. V přítomnosti urea- nebo guanidinhydrochloridu je v rozloženém proteinu v blízkosti neutrálního pH Met80 nahrazen His26 nebo His33, zatímco His18 zůstává ve vazbě s hemovou skupinou. Kromě běžných denaturačních látek (kyseliny, močovina, GuHCl) má mnoho jiných látek schopnost destabilizovat nativní strukturu cytC (např. alkoholy, mastné kyseliny atd.) (Muenzner et al., 2014).

2.4. CYTOCHROM C JAKO ANTIOXIDANT

Mezi nejčastější reaktivní formy kyslíku patří superoxid (O_2^-), peroxid vodíku (H_2O_2) a hydroxylový radikál (•OH). Termín reaktivní formy kyslíku (ROS) zahrnuje některé z mnoha molekul obsahujících kyslík, které mají silný sklon k zaplnění svého valenčního orbitalu elektronem uvolněným z jiného alternativního zdroje, anebo těch, které jsou v přítomnosti přechodných kovů nestabilní (např. H_2O_2). Tyto molekuly jsou vysoce reaktivní a poškozují DNA i jiné struktury a v konečném důsledku celý organismus (Korshunov et al., 1999).

Reaktivní formy kyslíku jsou tvořeny v mitochondrii jako výsledek ETC. Reakce přenášející elektrony vyskytující se v jednotlivých komplexech ETC odhaluje redox meziprodukty vedlejším reakcím, které mohou mít za následek přímý přenos elektronů na kyslík. Hlavními místy produkce ROS jsou komplexy I, III a redukovaný ubichinolový zbytek (Han et al., 2003).

Bylo dokázáno, že volný cytC zastává také roli antioxidantu v rámci oblasti vnitřní membrány, díky tomu, že je schopen uvolnit volný nepárový elektron ze superoxidu a tímto způsobem obnovit molekulu kyslíku (O_2) (Korshunov et al., 1999). Extrahovaný elektron může být následně využit k tvorbě energie prostřednictvím převodu na cytC oxidázu, čímž se redukovaná forma cytC oxiduje. V kontrastu k neutralizaci superoxidu, která vyžaduje oxidovaný cytC, konverze peroxidu vodíku je efektivní v obou, oxidovaném i redukovaném

stavu cytC. Vzhledem k tomu, že cytC neustále prochází oxidačně/redukčním cyklem během respirace v buňce, mohou probíhat obě detoxikační reakce. Spojení neutralizace ROS s redox schopností cytC z něj činí jeden z nejlepších antioxidantů buňky (Hüttemann et al., 2011).

3. ROLE CYTOCHROMU C V APOPTÓZE

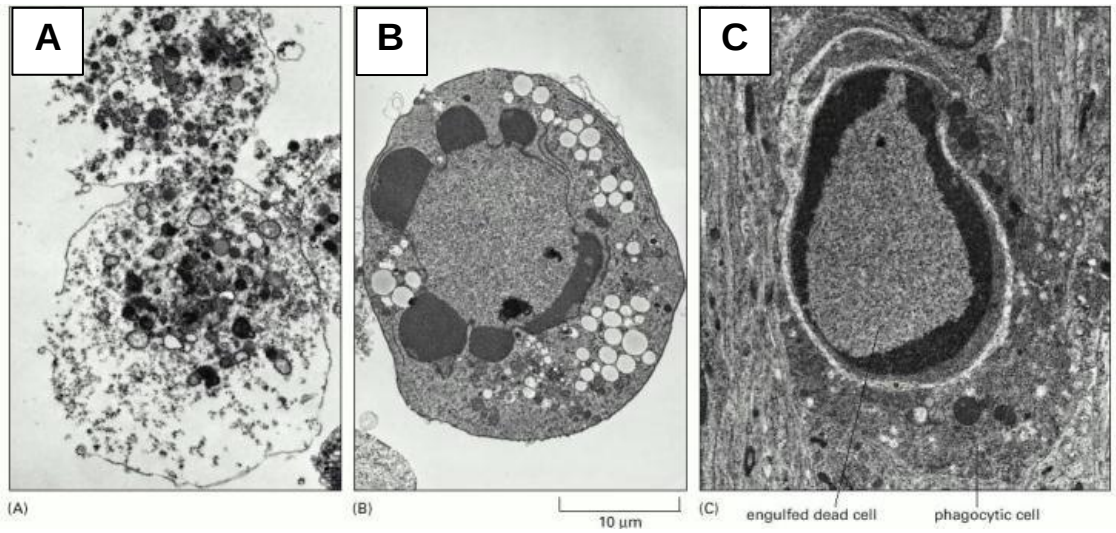
Cytochrom c kromě své účasti v oxidační fosforylaci vystupuje také jako proapoptický faktor, který je uvolňován ze svého místa na vnější straně vnitřní mitochondriální membrány do cytosolu v časné fázi apoptózy. Po uvolnění cytC z mitochondrií dochází k jeho vazbě s apoptickými proteázy-aktivujícími faktory (Apaf). V této podobě napomáhá konverzi prokaspázy 9 na její aktivní formu, která následně aktivuje kaspázovou kaskádu, což má za následek usmrcení buňky. Uvolnění cytC z mitochondrií je umožněno několika mechanismy, například působením proapoptického proteinu Bax z Bcl2 rodiny proteinů, které může být blokováno antiapoptickými proteiny Bcl2 nebo Bcl-xL (Cai et al., 1998).

3.1. APOPTÓZA

Jako apoptózu označujeme programovanou buněčnou smrt vyskytující se během vývoje, stárnutí buněk nebo jako homeostatický mechanismus udržující zdravou buněčnou populaci ve tkáních. Apoptóza se vyskytuje také jako obranný mechanismus během imunitních reakcí a při poškození buněk onemocněním nebo jinými škodlivými vlivy.

Během apoptózy se buňka smršťí, mění se tvar cytoplazmatické membrány, ve finální části se tvoří apoptická tělíska. Apoptická buňka nepoškozuje své okolí, na rozdíl od nekrotické, při které buňka bobtná a dochází k ruptuře, což způsobí vylití jejího intracelulárního obsahu do okolí a může způsobit zánětlivou odpověď (obr. 7). Při apoptóze se cytoskelet zhroutí, jaderná membrána je poškozena a jaderná DNA se fragmentuje. Součástí apoptózy je také změna povrchu buňky, jsou na něm vystaveny znaky, mezi které patří například fosfatidylserin, které jsou příčinou rychlé fagocytózy zprostředkované některou ze sousedních buněk nebo makrofágem dříve, než

dojde k úniku buněčného obsahu. Tím se zabrání poškození okolních buněk, ale také je umožněna „recyklace“ organických složek mrtvé buňky. Aktivace apoptózy je uskutečnitelná dvěma různými cestami, vnější a vnitřní cestou (Tait, 2008).



Obrázek 7: Fotografie elektronového mikroskopu, A – nekrotická buňka na kultivační misce, B – buňka po apoptóze na kultivační misce, C – buňka po apoptóze ve tkáni (Alberts et al., 2002).

3.1.1. VNĚJŠÍ CESTA AKTIVACE

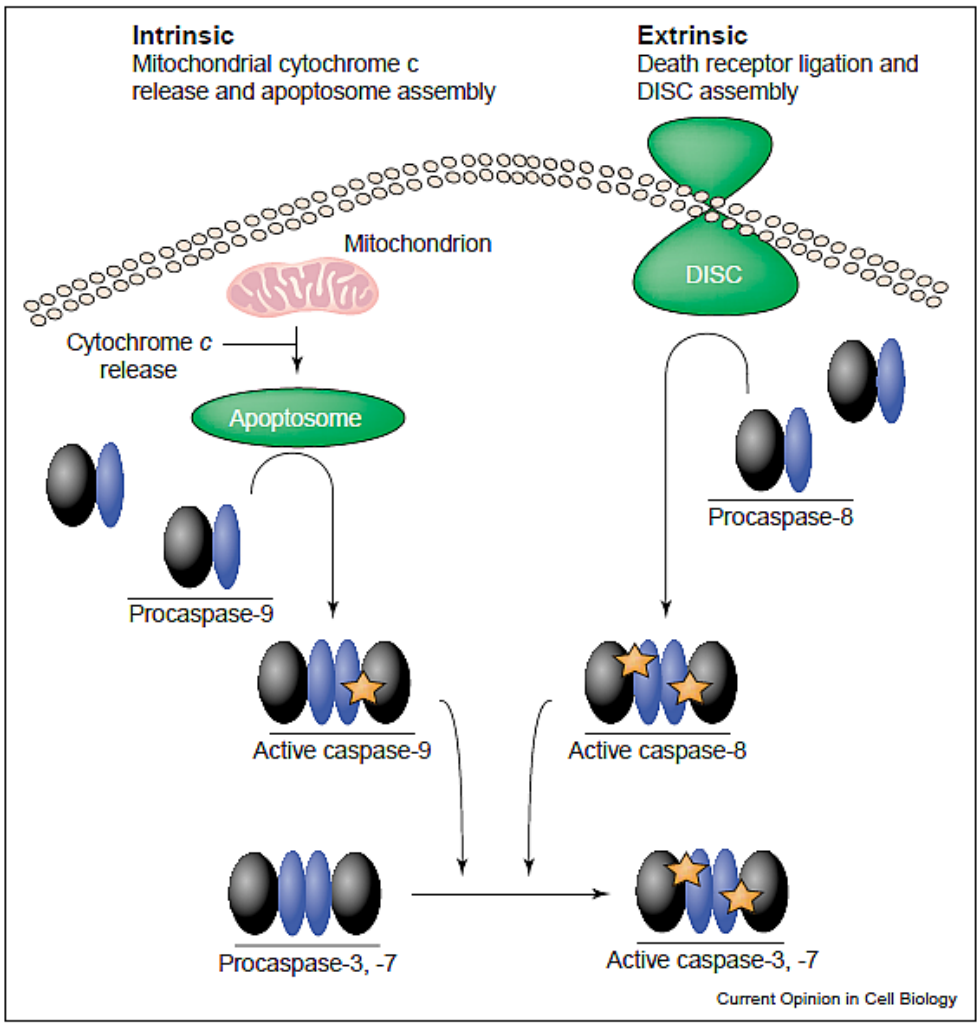
Vnější aktivační cesta je odpovědná za eliminaci nežádoucích buněk během vývoje, učení imunitního systému a imunitním systémem zprostředkované odstranění nádoru. Aktivace je iniciována ligací transmembránových smrtících receptorů. Konkrétním příkladem je Fas ligand, také znám jako CD95 nebo APO-1, který se stal základem pro studium vnější aktivační cesty. Během ligace vytváří Fas-receptor mikroseskupení na povrchu buňky, díky čemuž je umožněno několika krokové přijetí molekuly FADD (Fas-vázaný protein se smrtící doménou) na cytosolickou část Fas-receptoru. FADD váže pomocí homofilní interakce zymogeny kaspázy-8. Tímto způsobem vzniká smrt indukující signalizační komplex (DISC), který je iniciátorem aktivace kaspázy-8 (obr. 8). Kaspáza-8 je v inaktivním stavu monomer, při aktivaci se tvoří dimer, což tvoří kontrast s kaspázou-3 a -7, které jsou dimery již v latentní formě. Kaspáza-8 může být nahrazena kaspázou-10, která je také iniciátorem buněčné smrti zprostředkované smrtícími receptory (Boatright et al., 2003).

3.1.2. VNITŘNÍ CESTA AKTIVACE

Vnitřní aktivační cesta apoptózy zahrnuje řady receptory nezprostředkovaných podnětů produkujících vnitrobuněčné signály, kterými jsou například poškození DNA, poškození cytoskeletu, ztráta adheze, inhibice syntézy makromolekul a podobně. Podněty spouštějící vnitřní cestu apoptózy tvoří vnitrobuněčné signály, které mohou působit jak pozitivním, tak i negativním způsobem. Negativní signály působí omezením růstových faktorů, hormonů a cytokinů, což může vést k selhání mechanismů potlačujících apoptózu. Mezi podněty působící pozitivně můžeme mimo jiné zahrnout například radiaci, toxiny, hypoxii, virová onemocnění nebo volné radikály (Lawen, 2003).

Všechny podněty vedou ke změnám ve vnitřní mitochondriální membráně, jejichž výsledkem je otevření mitochondriálních pórů, ztrátě transmembránového potenciálu a vyplavení dvou hlavních pro-apoptických proteinů z mezimembránového prostoru do cytosolu. První skupina je tvořena cytochromem c, proteiny Smac/DIABLO a proteázou HtrA2/Omi. Tyto proteiny aktivují kaspázovou kaskádu. Cytochrom c váže a aktivuje apoptický proteáza-aktivující faktor 1 (Apaf-1) a stejně tak i prokaspázu-9 za tvorby apoptozomu (obr. 8) (Chai et al., 2000).

Druhá skupina tvořená endonukleázou G a kaspázou aktivující DNázu (CAD) je z mitochondrie uvolněna až během apoptózy, kdy už je jisté, že buňka apoptóze podlehne. Tyto apoptózu vyvolávající faktory jsou přemístěny do jádra, kde způsobují fragmentaci DNA a kondenzaci periferního jaderného chromatinu. Řízení a regulace těchto apoptických mitochondriálních pochodů je zajišťována pomocí Bcl2 rodiny proteinů, které jsou nejvýznamnější právě svou účastí v regulaci apoptózy (Elmore, 2007).



Obrázek 8: Schématické zobrazení apoptických cest. U vnější aktivační cesty je místem aktivace kaspázy-8 DISC. Aktivní místa jsou znázorněna hvězdou. Stimulace vnitřní cesty vede k aktivaci kaspázy-9 na apoptozomu (Boatright et al., 2003).

3.2. UVOLNĚNÍ CYTOCHROMU C Z MITOCHONDRIÍ

Důležitým krokem apoptózy je uvolnění cytC z mitochondrie, a to díky permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Permeabilizace vnější membrány je vysvětlena několika různými mechanismy. První z mechanismů, který se může uplatnit jak při apoptóze, tak i při nekróze, zahrnuje indukci změny permeability vnější mitochondriální membrány díky otevření nespecifických pórů vnitřní membrány následované zvýšeným příjmem tekutiny do matrix v důsledku zvýšení osmotického tlaku v matrix. Nárůst objemu matrix vede k ruptuře vnější mitochondriální membrány a uvolnění mezimembránových proteinů včetně cytC do cytosolu.

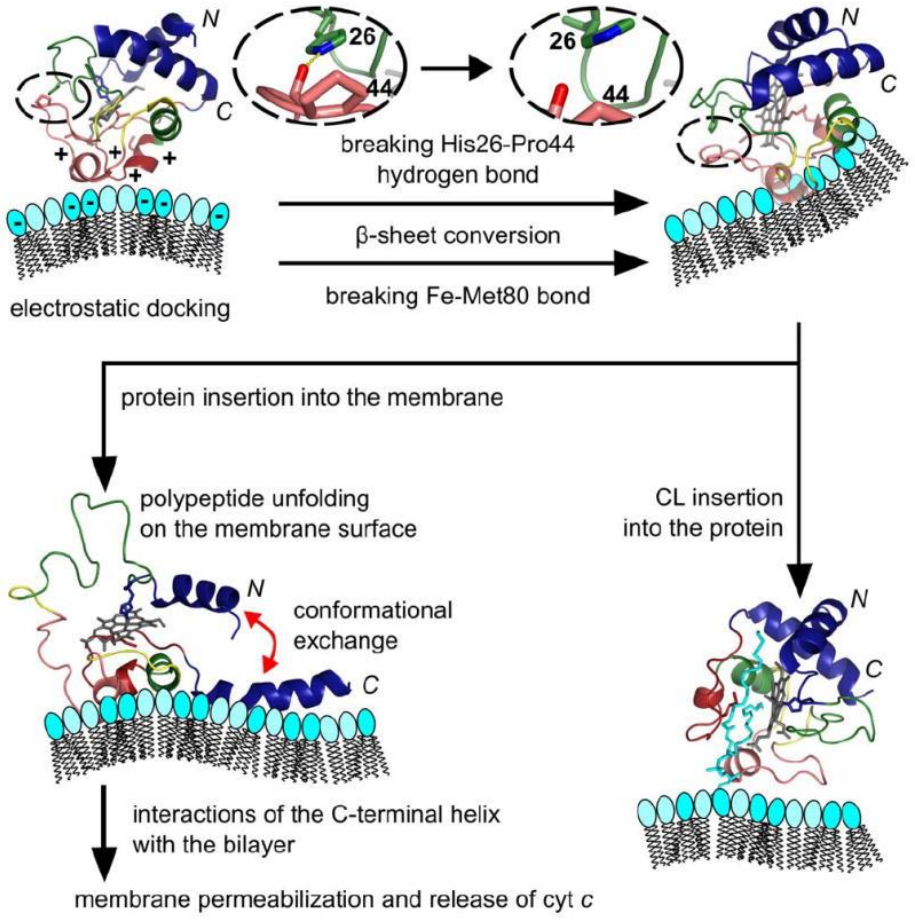
Další mechanismus permeabilizace vnější membrány zahrnuje účast proteinů Bcl2 rodiny. Bcl2 rodina sestává z více než třiceti proteinů, které můžeme rozdělit do tří skupin: Bcl2-*like* antiapoptické (např. Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 a A1/Bfl-1), Bax-*like* proapoptické (např. Bax, Bak a Bok/Mtd), které jsou složeny ze čtyř Blc2 homologních (BH) skupin a BH3-*only* proapoptické (např. Bid, Bim/Bod, Bad, Bmf, Bik/Nbk a Blk) skládající se pouze z krátkého motivu zvaného BH3, jak název napovídá. BH3 proteiny tvoří a přenášejí apoptické signály, které jsou tvořeny chybnými buněčnými procesy, na další členy Blc2 rodiny. Přestože nesou BH3 doménu, tyto proteiny interagují buď s antiapoptickými proteiny inhibujícími jejich aktivitu a/nebo probíhá jejich interakce přímo s multidoménovými proteiny, jako je například Bax nebo Bak a stimulují jejich aktivitu. Multidoménové proapoptické proteiny Bax, Bak a v některých tkáních pravděpodobně i Bok jsou odpovědné za permeabilizaci vnější mitochondriální membrány. Ovšem pouhá permeabilizace utvořením pórů ve vnější mitochondriální membráně nemusí být dostačující, protože cytC je vázán k povrchu vnitřní membrány prostřednictvím kardiolipinu (CL) (Martinou et al., 2011).

Během vazby cytC na mitochondriální glycerolfosfolipid kardiolipin je cytC schopen fungovat jako peroxidáza a podněcovat oxidaci CL, jedná se o dříve neznámý časný krok apoptózy. Narušení terciární struktury proteinu a ztráta vazby Met80 s hemovou skupinou dává cytC novou funkci, ale přesný mechanismus transformace zůstává dosud nejasný. Tato aktivita je spojena s uvolňováním cytC do cytosolu a následnou aktivací kaspáz (Sinibaldi et al., 2008).

3.3. INTERAKCE CYTOCHROMU C S KARDIOLIPINEM

Vazba cytC na CL obsažený ve vnitřní mitochondriální membráně je řízena elektrostatickými silami mezi negativně nabitými fosfáty na CL a pozitivně nabitými lyziny na cytC, ovšem svou roli hrají také hydrofobní interakce. Cytochrom c se váže na CL ve třech oddělených oblastech, jsou jimi A-oblast tvořená Lys72, Lys73, Lys86 a Lys87, dalším místem vazby je C-oblast (P-oblast) umístěná blízko Asn52. Poslední lokací je L-oblast složená z Lys22, Lys 27, His33, Lys25 a His26, která se uplatňuje při nižší hodnotě pH.

Spouštěcím signálem přeskupení, indukovaného CL, je rozpad vodíkové vazby mezi His26 a Pro44. Ztráta této vodíkové vazby vyvolává prudké formování β-skládaného listu podél 40S Ω-smyčky proteinu, následuje rozšíření struktury β-skládaného listu na přilehlé 60S a 70S helixy. Tyto změny vedou ke změně uložení hemu a k narušení vazby Met80 s hemovou skupinou. Výsledkem takového přeskupení je zvýšení mobility proteinu související se ztrátou jeho původní struktury (obr. 9) (Iverson et al., 2004).



Obrázek 9: Proces změny struktury cytC během jeho vazby na CL (Muenzner et al., 2014).

3.4. CYTOCHROM C V CYTOSOLU

Cytochrom c je jedním z proteinů vyvolávajících apoptózu vyskytujících se v mezimembránovém mitochondriálním prostoru. Po apoptickém stimulu je cytC uvolněn do cytosolu, kde v přítomnosti ATP (efektivněji v přítomnosti deoxyATP, dATP) zprostředkovává alosterickou aktivaci a hepta-oligomerizaci

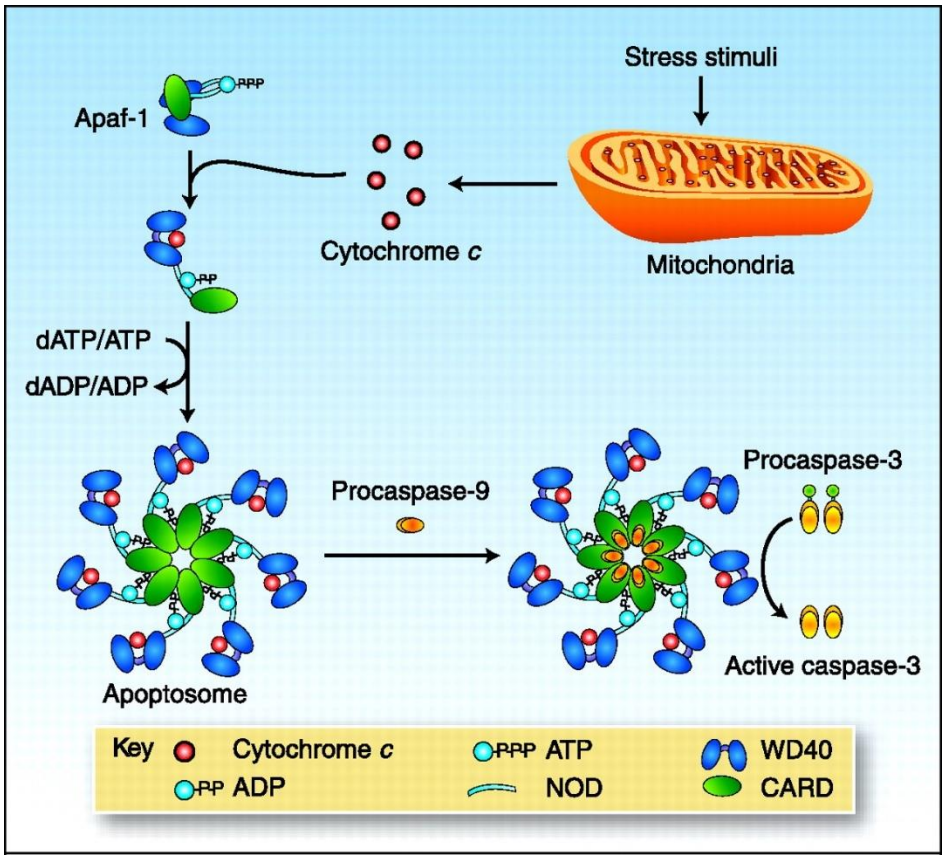
apoptického proteáza-aktivujícího faktoru 1 (Apaf-1), tvořícího komplex známý jako apoptozom (obr. 10). Apoptozom je schopen vázat sedm dimerů prokaspázy-9 a vést je k jejich vlastní částečné proteolýze čímž je aktivuje. Tyto procesy jsou přísně regulovány proteiny teplotního šoku (HSPs), a nakonec vedou ke katalytické přeměně prokaspázy-3 a dalších kaspáz na jejich aktivní formy, které eventuálně přispívají k morfologickým a biochemickým změnám doprovázejících apoptózu. Další proteiny uvolněné z mitochondrií během apoptózy usnadňují průběh kaspázové kaskády pomocí neutralizace kaspázy inhibujících proteinů známých jako IAPs (inhibitory apoptických proteinů). V závislosti na typu buňky, navíc mitochondrie obsahují prokaspázy v mezimembránovém prostoru. Proteolytická aktivace takových prokaspáz probíhá během jejich uvolnění do cytosolu a vyžaduje denitrosylaci katalytického cysteinového zbytku, tento proces může být usnadněn současným únikem HSPs. Ačkoliv aktivované kaspázy jsou významným mediátorem buněčné smrti a nezbytné pro získání několika charakteristických morfologických rysů apoptózy, jejich inhibice chrání buňku před smrtí pouze přechodně. Při ireverzibilní permeabilizaci vnější mitochondriální membrány probíhá buněčná smrt bez ohledu na kaspázovou aktivitu, nicméně při poruše kaspázové aktivity může být apoptóza opožděna (Ow et al., 2008).

Základní dvě funkce cytC (aktivace kaspáz a přenos elektronu) sídlí v různých částech proteinu. Substituce atomu železa v hemové skupině ruší cytochromem c zprostředkovaný přenos elektronů, ale nemá vliv na schopnost cytC spouštět kaspázovou aktivitu. Z toho vyplývá, že se redox a proapoptická aktivita cytC řídí odlišnými biochemickými principy (Garrido et al., 2006).

3.5. APOPTOZOM

Tvarem apoptozom připomíná sedmi paprsčité kolo s centrální osou, které obsahuje kaspázu-9 navázanou na doménu Apaf-1. V klidovém stavu je Apaf-1 kompaktní molekulou s kaspázu vázající doménou (CARD) skrytou mezi dvěma výběžky (dvěmi WD40 šroubovicemi). Cytochrom c, jehož velikost je srovnatelná s CARD, vytěsní CARD s následnou linearizací molekuly. Po navázání ATP dojde ke zformování apoptozomu, což je rozhodujícím krokem k aktivaci kaspázy (obr. 10). Ve stavu s navázanou kaspázou

je centrální část apoptozomu poměrně neuspořádaná, takže přesné umístění a vazba molekul kaspázy-9 nelze určit. Na určitých zobrazeních se objevuje tvarem hamburger připomínající částice vypadající jako dva apoptozomy svírající mezi sebou kaspázu-9. Tento mechanismus představuje aktivaci kaspázy-9 prostřednictvím dimerizace. Z toho důvodu je možné, že apoptozom funguje tak, že zvýšení lokální koncentrace kaspázy-9 překračující určitou hodnotu aktivuje tvorbu dimeru (Ledgerwood et al., 2009).



Obrázek 10: Cytochromem c podmíněná tvorba apoptozomu a aktivace kaspáz (Ledgerwood et al., 2009).

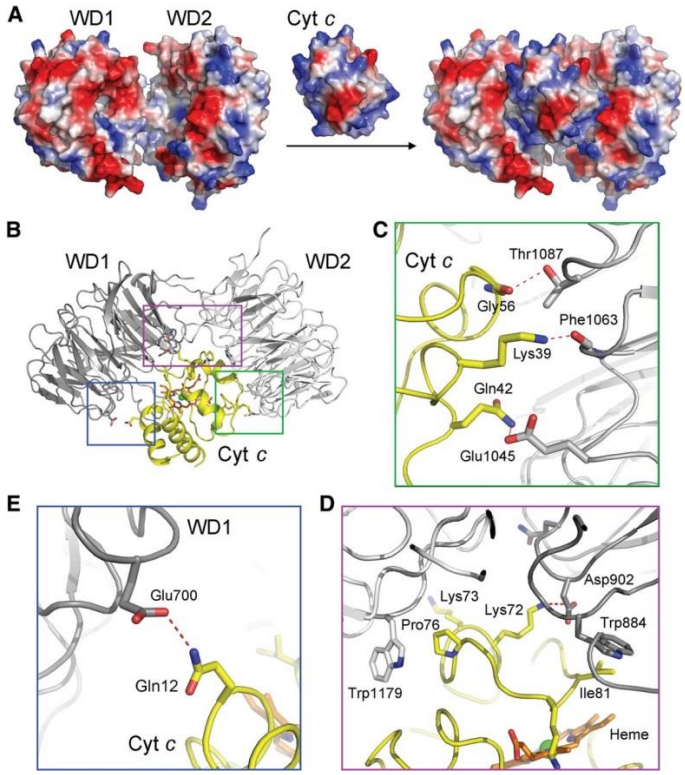
3.6. DOPAD MUTACÍ CYTOCHROMU C NA AKTIVACI KASPÁZY

Asociace cytC s Apaf-1 je příčinou změny nukleotidu a tvorby apoptozomu. Mutace cytC oslabující jeho interakci s Apaf-1 mají negativní následky na funkci apoptozomu. Mutace způsobená změnou aminokyseliny v řetězci cytC způsobují markantní snížení proteázové aktivity. Změna rozložení

povrchového náboje cytC, zejména zabudováním nabité aminokyseliny do převážně hydrofobního prostředí má na vazbu s Apaf-1 nepříznivé účinky. (Zhou et al., 2015).

3.7. VAZBA CYTOCHROMU C S PROTEÁZU-AKTIVUJÍCÍMI FAKTORY

Cytochrom c je sevřen na rozhraní oligopeptidů WD1 a WD2, které jsou součástí Apaf-1, konkrétně výběžků WD40, jejichž jednotlivé aminokyseliny jsou zakončeny tryptofan-asparagovou kyselinou. Tyto oligopeptidy se skládají z 1 až 7, respektive 8 až 15 podjednotek WD40 domény tvořící Apaf-1. Propojení mezi cytC a WD2 obsahuje specifičtější interakce, než spoj cytC s WD1 (obr.11).



Obrázek 11: Vazba cytC s Apaf-1. A) cytC přesně zapadající, jak tvarem, tak nábojem mezi WD1 a WD2. B) Schématické znázornění interakce mezi cytC a WD1 a WD2. C) Detail propojení cytC s WD2. D) Detail spojení mezi cytC a oblastí na rozhraní WD1 a WD2. E) Detail spojení cytC s WD1 (Zhou et al., 2015).

Na spojení cytC s WD2 mají podíl tři vodíkové vazby a van der Waalsovy síly. Největší význam má vodíková vazba mezi postranním řetězcem Thr1087

lokalizovaném na WD2 a karbonylovým kyslíkem Gly56 na cytC, které se vzájemně nacházejí v těsné blízkosti. Postranní řetězce Lys39 a Gln42 cytochromu c mohou poskytnout dvě vodíkové vazby s karbonylovým kyslíkem Phe1063 a postranním řetězcem Glu1045. Dále, Pro76 cytochromu c umožňuje přímé spojení van der Waalsovými interakcemi s indolovým kruhem Trp1179 z WD2. Propojení WD1 a cytC zahrnuje vodíkové vazby mezi Gln12, resp. Lys72 cytochromu c a Glu700, resp. Asp902 na WD1. Aminokyseliny Pro76 a Ile81 tvoří van der Waalsovy síly poutající přilehlé struktury WD2, respektive WD1. Navázání cytC k Apaf-1 je klíčové v procesu aktivace kaspáz a následné apoptóze (Cheng et al., 2015).

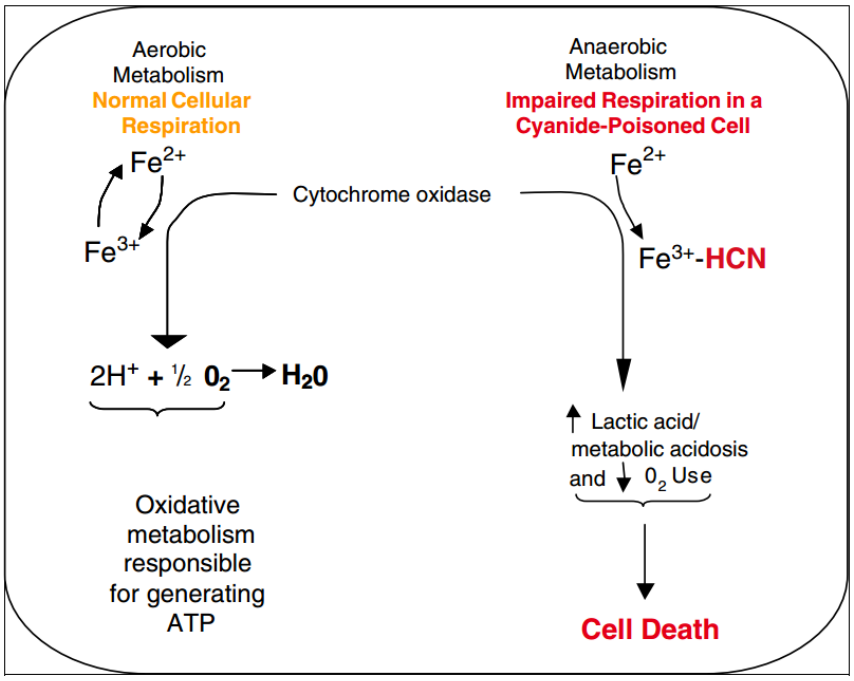
4. INTERAKCE CYTOCHROM C OXIDÁZY S TOXINY

4.1. KYANID

Kyanid může mít více toxických mechanismů. Nejlépe prozkoumaným a pravděpodobně nejdůležitějším působením kyanidu je jeho negativní vliv na využití kyslíku buňkou, což vede k chemické asfyxii. Otrava kyanidem je způsobená neschopností buněk využít kyslík, spíše než poruchou zásobování kyslíkem. V tomto ohledu se kyanid liší od oxidu uhelnatého, který způsobuje poruchy přenosu kyslíku ke tkáním. Poškození využití kyslíku buňkami způsobené kyanidem je paradoxně spojeno se zvýšenou koncentrací kyslíku v krvi a venózní krev je okysličená téměř stejně jako arteriální, protože buňky nejsou schopny tento kyslík využít (Nelson, 2006).

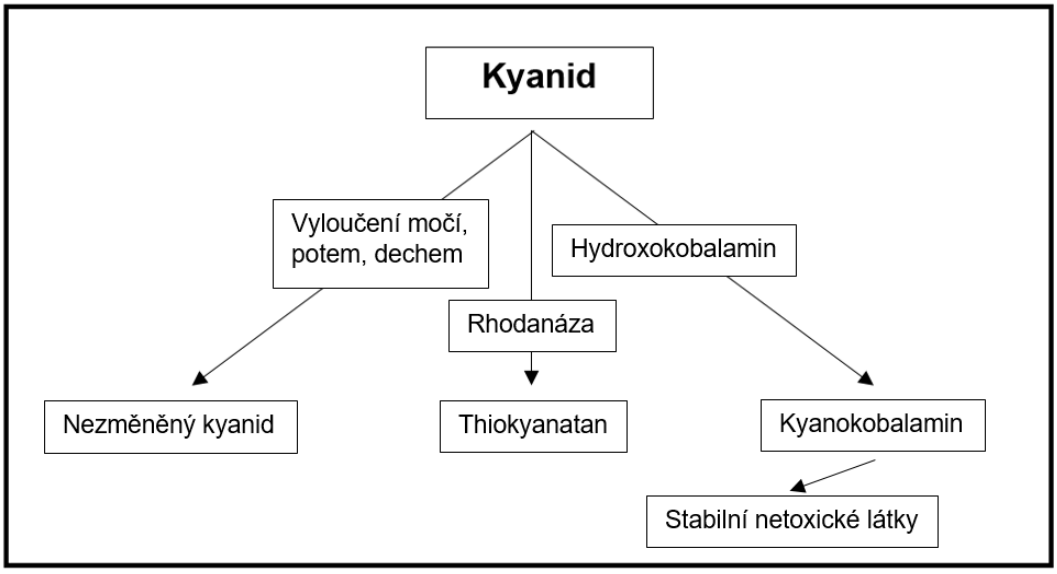
Kyanid je silně toxická látka způsobující histotoxickou anoxii s rychlým nástupem díky inhibici oxidační fosforylace. Kyanid se váže na a_3-Cu_B binukleární centrum cytC oxidázy, čímž inhibuje využití buněčného kyslíku a tvorbu ATP. Buňka se proto musí spolehnout na svůj anaerobní metabolismus, během kterého vzniká laktát uvolňovaný do krve a v porovnání s aerobním metabolismem vzniká malé množství energie ve formě ATP, což vede k buněčné smrti (obr. 12). Během inhibice cytC oxidázy iniciuje kyanid kaskádu reakcí vedoucích k poškození všech tkání v těle, nejvíce však funkce srdce, nervové soustavy, a nakonec i ke smrti, pokud není inhibice včas zvrácena. Výsledkem inhibice elektronového transportního řetězce kyanidem je

zvýšená produkce reaktivních forem kyslíku podjednotkami dýchacího řetězce I a III. V důsledku tvorby ROS vniká intenzivní oxidační stres, který přispívá k poškození buňky (Leavesley et al., 2008).



Obrázek 12: Kyanid inaktivuje mitochondriální cytochrom c oxidázu, čímž inhibuje buněčné dýchání (Nelson, 2006).

Většina lidí je vystavena velmi nízké koncentraci kyanidu z přirozených zdrojů, jako jsou kyanogenní potraviny (např. glykosidy) a z umělých zdrojů jako je cigaretový kouř. Například koncentrace kyanidu v krvi kuřáka je 2,5krát vyšší než u nekuřáka. Existence mechanismů detoxikace nejsou překvapující, vzhledem k tomu, že kyanid se přirozeně vyskytuje v prostředí. Primárním endogenním mechanismem detoxikace je metabolismus probíhající v játrech, kde z kyanidu za katalýzy rhodanázou (sulfotransferázou) vzniká thiokyanatan, což je netoxická sloučenina vyloučená močí. V další cestě metabolismu se kyanid váže na hydroxokobalamin (vitamin B_{12a}) a tvoří kyanokobalamin (vitamin B_{12}), který je vyloučen močí a kyanid se oxiduje na thiokyanatan a další netoxické látky (obr. 13) Tímto mechanismem lze detoxikovat pouze velmi malé množství kyanidu, přibližně 0,017 mg kyanidu na 1 kg tělesné váhy za minutu (Broderick et al., 2006).



Obrázek 13: Hlavní endogenní prostředky k detoxikaci a odstranění kyanidu z organismu.

Vazba kyanidu s cytC oxidázou je složitá a závisí na redoxním stavu enzymu. Za normálních podmínek cytC oxidáza redukuje kyslík na vodu na a_3 CuB binukleárním centru. Tato reakce tvoří membránový protonový gradient a tvoří membránový potenciál, který pohání tvorbu ATP v komplexu V. Binukleární centrum může existovat v oxidovaném, redukovaném anebo částečně redukovaném stavu. V plně redukovaném stavu s železem ve stavu Fe^{2+} a mědí ve stavu Cu^{+} se na cytC oxidázu váže kyslík a enzym přenáší elektrony z cytochromu c na molekulární kyslík. Přestože kyslík je schopen se vázat pouze na plně redukované binukleární centrum, kyanid interaguje s komplexem IV v oxidovaném, redukovaném i částečně redukovaném stavu. Nejsilnější vazbu tvoří kyanid s částečně redukovaným a3-CuB centrem, nejslabší s oxidovaným (Leavesley et al., 2008).

4.2. OXID DUSNATÝ

Oxid dusnatý (NO) je stejně jako kyanid schopný vázat se na binukleární centrum cytC oxidázy a za fyziologických podmínek se předpokládá, že NO je endogenním modulátorem oxidační fosforylace. V mitochondriích je NO produkován konstitutivně exprimovanou mitochondriální NO syntázou. Oxid dusnatý produkovaný mitochondrií se váže na redukovaný hem a_3 a inhibuje funkci cytC oxidázy. Inhibice je kompetitivní s kyslíkem a stoupá se snižující

se koncentrací kyslíku. Přestože se NO s vysokou afinitou váže na hem a_3, může se také vázat na oxidovaný Cu_B, kde je metabolizován na dusitan (Santi et al., 2003).

Nadbytek kyanidu antagonizuje vazbu NO na binukleárním centru cytC oxidázy. V přítomnosti kyanidu je tvorba vazby NO na cytC oxidázu 1000krát pomalejší než v jeho nepřítomnosti. Pokud jsou přítomny oba toxiny neinhibují cytC oxidázu aditivně, ale NO snižuje inhibici zprostředkovanou kyanidem. Kyanid je pomocí NO přesunut z binukleárního centra a NO je přeměněn na dusitan (NO^{2-}). Vazba kyanidu na cytC oxidázu je umožněna po přerušení vazby NO s cytC oxidázou nebo jeho přeměně na dusitan (Pearce et al., 2003).

4.3. AKROLEIN

Akrolein je všudypřítomnou toxickou látkou vyskytující se v prostředí, zejména v cigaretovém kouři. Jedna cigareta obsahuje 25–140 µg akroleinu. Akrolein je také toxickým metabolitem tvořeným biotransformací allylalkoholu (2-propen-1-ol) a allylaminu. Akrolein je také tvořen peroxidací lipidů, která je výsledkem poškození polynenasycených mastných kyselin díky působení volných radikálů. Tyto alkany vykazují cytotoxicitu a genotoxicitu odtažením buněčných nukleofilních skupin vyskytujících se na proteinech, aminofosfolipidech nebo nukleových kyselinách (Sun et al., 2006).

Tkáňové hladiny akroleinu bývají zvýšeny během neurodegenerativních onemocnění, jako je například Alzheimerova nemoc. Škodlivé účinky akroleinu se projevují prostřednictvím generování ROS a peroxidace lipidů. Antioxidanty mají schopnost redukovat akroleinem indukované poškození buněčné membrány a buněčnou smrt. Během normální buněčné respirace jsou z 1–2 % elektronů proudících do elektronového transportního řetězce tvořeny superoxidové radikály. Produkce radikálů se zvyšuje při poškození funkčnosti elektronového transportního řetězce. Akrolein narušuje správnou funkci dýchacího řetězce, z čehož vyplývá, že akrolein podporuje produkci ROS (Hochman et al., 2014).

Akrolein je schopen indukovat apoptózu prostřednictvím vnitřní aktivační cesty a způsobuje pokles membránového potenciálu, následovaný uvolněním cytC do cytosolu, kde tvoří apoptozom. Akrolein způsobuje kondenzaci

nukleárního chromatinu a také ovlivňuje schopnost mitochondrií podílet se na tvorbě energie prostřednictvím buněčného dýchání (Moghe et al., 2015).

Oxidační stres mitochondrií způsobený akroleinem je zprostředkovaný zvýšenou produkcí ROS a snížením koncentrace antioxidantů, jako je například glutathion. Konkrétně na glutathion je akrolein schopen se rychle navázat a způsobit jeho vyčerpání. Výrazné narušení aktivity adenin nukleotidové translokázy (ANT), nejhojněji se vyskytujícího jednoduchého proteinu v mitochondriální matrix, způsobené akroleinem doprovází oxidační stres a inhibice dýchacího řetězce. Deficit ANT může vést k inhibici mitochondriálního elektronového transportního řetězce, což má za následek dva přímé účinky na oxidační stres. Dochází k podpoře tvorby ROS a snížení rezistence mitochondrie vůči pro-oxidantům. Z toho vyplývá, že inaktivace ANT je důležitým faktorem, který přispívá k celkovému růstu ROS po vystavení buňky akroleinu. Vzhledem k tomu, že akrolein není schopen inhibovat přímo komplexy dýchacího řetězce (I–V), může být inhibice ANT hlavním, ne-li jediným mechanismem působení akroleinu na dýchací řetězec (Luo et al., 2005).

4.4. CERAMID

Přirozeně se vyskytující ceramidy tvoří velké kanály ve fosfolipidových membránách. Přítomnost ceramidu z jedné nebo obou stran fosfolipidové membrány vede ke zvýšení propustnosti membrány. Podobné kanály se tvoří také na mitochondriální vnější membráně. Ceramid neindukuje sekreci cytC, ale pouze zvyšuje propustnost vnější mitochondriální membrány prostřednictvím tvorby kanálů nespecifických pro cytC, těmito kanály mohou prostupovat všechny proteiny s nízkou molekulovou hmotností. Ceramidové kanály umožňují nejen uvolnění cytC do cytosolu, ale také jeho zpětný tok při jeho fyziologicky relevantních koncentracích. Kanály tvořené díky přítomnosti ceramidu v jeho nepřítomnosti zanikají. Uvolňování cytC indukované ceramidem je inhibováno zvýšenou tvorbou antiapoptických proteinů Bcl-2. Proapoptický protein Bax není nutný pro tvorbu kanálů, ovšem jeho přítomnost zvyšuje účinnost ceramidem indukované apoptózy (Siskind, 2005).

Ceramid může vyvíjet svůj účinek na komplexy dýchacího řetězce prostřednictvím změny hydrofobicity vnitřní mitochondriální membrány a modifikací protein-lipidových interakcí. Lipidová složka vnitřní mitochondriální membrány hraje zásadní roli v udržení struktury a funkčnosti komplexů dýchacího řetězce. Ceramidy pravděpodobně právě změnou lipidové složky membrány ovlivňují komplexy dýchacího řetězce podobně jako úbytek kardiolipinu. Další možností působení je, že ceramid může být alosterickým efektorem vázajícím se na jednotlivé komplexy dýchacího řetězce a tím měnit jejich konformaci a aktivitu. Konkrétním příkladem je podjednotka 2 cytC oxidázy, na kterou se váže ceramid a ovlivňuje tak její funkčnost (Kogot-Levin et al., 2014).

4.5. OXID UHELNATÝ

Oxid uhelnatý (CO) je bezbarvý, nedráždivý toxický plyn bez zápachu produkován nedokonalým spalováním uhlovodíků. Nicméně malé množství je produkováno v organismu v průběhu katabolismu hemoglobinu. Pokud se do těla dostane exogenně velké množství CO, může dojít k otravě, a nakonec i smrti. Oxid uhelnatý působí cytotoxicky díky jeho schopnosti inhibovat cytC oxidázu a tedy mitochondriální respiraci. Ovšem nízké množství CO podporuje cytoprotekci prostřednictvím modulace jeho enzymatické aktivity. Nízká koncentrace CO indukuje částečnou a/nebo reverzibilní inhibici aktivity cytC oxidázy, čímž dochází ke hromadění elektronů v komplexu III a tvoří se malé množství ROS, které jsou důležitými signalizačními molekulami. Produkce ROS v malém množství nezpůsobuje poškození buněk, které stále spotřebovávají kyslík a tvoří ATP (Almeida et al., 2015).

4.6. ETHANOL

Chronické požívání alkoholu (ethanolu) vede ke snížení obsahu a aktivity cytC oxidázy. Konzumace alkoholu snižuje syntézu třinácti mitochondriálně kódovaných proteinů, které jsou složkami komplexů I, III, IV a ATP syntázy. Inhibice syntézy mitochondriálních proteinů je způsobena defekty mtDNA a poklesem počtu funkčních mitochondriálních ribozomů, které jsou následkem

chronického požívání ethanolu. Během intoxikace ethanolem dochází ke vzniku nadměrného množství ROS, které hrají důležitou roli v poškození cytC oxidázy (Srinivasan et al., 2012).

5. ZÁVĚR

Cytochrom c je velice důležitá součást elektron transportního řetězce díky své schopnosti přenášet elektrony mezi cytochrom c reduktázou a cytochrom c oxidázou, čímž umožňuje buňkám tvorbu dostatečného množství energie ve formě ATP. Cytochrom c je ovšem důležitý i v mnoha dalších životních pochodech buňky. Cytochrom c je důležitou součástí kaskády procesů vedoucích k apoptóze a to během vnější i vnitřní cesty aktivace, kdy dochází k jeho uvolnění z mitochondrie do cytosolu za následné tvorby apoptozomu. Dále se cytochrom c podílí na antioxidační schopnosti buněk díky jeho schopnosti uvolnit volný nepárový elektron ze superoxidu a tím obnovit molekulu kyslíku.

Cytochrom c reduktáza (komplex III) přenáší protony do mezimembránového prostoru mitochondrie a předává elektron cytochromu c k přenosu na cytochrom c oxidázu (komplex IV). Cytochrom c oxidáza vedle komplexu III přenáší také protony do mezimembránového prostoru, čímž zvyšuje protonový koncentrační gradient, který je využit ATP syntázou (komplex V) k tvorbě ATP. Cytochrom c oxidáza je akceptorem elektronů od cytochromu c, které předává kyslíku za jeho současné redukce na vodu.

Elektronový transportní řetězec včetně cytochromu c může být ovlivňován mnoha toxiny. Nejdůležitějším a nejvíce prozkoumaným toxinem působícím na tyto struktury je kyanid, který inhibuje využití kyslíku komplexem IV. Dalšími toxiny jsou například oxid uhelnatý, oxid dusnatý, ethanol, nebo akrolein.

6. ZDROJE

1) Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., Molecular Biology of the Cell, 4th edition.
2) Almeida A. S., Figueiredo-Pereira C., Vieira H. L., Carbon Monoxide and Mitochondria—modulation of Cell Metabolism, Redox Response and Cell Death, Front Physiol., 6 (2015), 1–6.
3) Babbitt S. E., Sutherland M. C., Francisco B. S., Mendez D. L., et al., Mitochondrial Cytochrome c Biogenesis : No Longer an Enigma, 40 (2016), 446–55.
4) Beauchamp R. O., Andjelkovich D. A., Klingerman A. D., Morgan K. T., et al., A Critical Review of the Literature on Acrolein Toxicity, CRC Critical Reviews in Toxicology, 14 (1985), 309–80.
5) Boatright K. M., Salvesen G. S., Mechanisms of Caspase Activation, Current Opinion in Cell Biology, 15 (2003), 725–31.
6) Brandt U., Trumpower B., The Protonmotive Q Cycle in Mitochondria and Bacteria, Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 29 (1994), 165–97.
7) Brdiczka D. G., Zorov D. B., Sheu S. S.: Mitochondrial Contact Sites: Their Role in Energy Metabolism and Apoptosis, Biochimica et Biophysica Acta (BBA), 1762 (2006), 148–63.
8) Broderick K. E., Potluri P., Zhuang S., Scheffler I. E., et al., Cyanide Detoxification by the Cobalamin Precursor Cobinamide, Experimental Biology and Medicine, 231 (2006), 641–49.
9) Cai J., Yang J., Jones D. P., Mitochondrial Control of Apoptosis: The Role of Cytochrome c, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1366 (1998), 139–49.
10) Crofts A. R., Berry E. A., Structure and Function of the Cytochrome bc1 Complex of Mitochondria and Photosynthetic Bacteria, Current Opinion in Structural Biology, 8 (1998), 501–9.
11) Crofts A. R., The Cytochrome bc1 Complex: Function in the Context of Structure, Annual Review of Physiology, 66 (2003), 689–733.

12) Dalmonte M. E., Forte E., Genova M. L., Giuffrè A., et al., Control of Respiration by Cytochrome c Oxidase in Intact Cells: Role of the Membrane Potential., J Biol Chem., 284 (2009), 32331–35.
13) Ding W., Li M., Biazik J. M., Morgan D. G., et al., Electron Microscopic Analysis of a Spherical Mitochondrial, The Journal of Biochemical Chemistry, 287 (2012), 42373–78.
14) Elmore S., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, Toxicol Pathol, 35 (2007), 495–516.
15) Garrido C., Galluzzi L., Brunet M., Puig P. E., et al., Mechanisms of Cytochrome c Release from Mitochondria, Cell Death and Differentiation, 13 (2006), 1423-33.
16) Gogvadzea V., Orreniusa S., Zhivotovsky B., Multiple Pathways of Cytochrome c Release from Mitochondria in Apoptosis, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1757 (2006), 639–47.
17) Han D., Canali R., Rettori D., Kaplowitz N., Effect of Glutathione Depletion on Sites and Topology of Superoxide and Hydrogen Peroxide Production in Mitochondria., Mol Pharmacol., 64 (2003), 1136–44.
18) Hinkle P. C., Kumar M. A., Resetar A., Harris D. L., Mechanistic Stoichiometry of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation, Biochemistry, 30 (1991), 3576–82.
19) Hochman D. J., Collaco C. R., Brooks E. G., Acrolein Induction of Oxidative Stress and Degranulation in Mast Cells, Environ Toxicol., 29 (2014), 908–15.
20) Hosler J. P., Ferguson-Miller S., Mills D. A., Energy Transduction: Proton Transfer Through the Respiratory Complexes, Annu Rev Biochem., 75 (2006), 165–87.
21) Huang S., Millar A. H., Succinate Dehydrogenase: The Complex Roles of a Simple Enzyme., Curr Opin Plant Biol., 16 (2013), 344–49.
22) Hutchings R. L., Singh S. M., Cabello-Villegas J., Mallela K. M. G., Effect of Antimicrobial Preservatives on Partial Protein Unfolding and Aggregation, J Pharm Sci., 102 (2013), 365–76.
23) Hüttemann M., Pecina P., Rainbolt M., Sanderson T. H., et al., The Multiple Functions of Cytochrome c and Their Regulation in Life and

Death Decisions of the Mammalian Cell: From Respiration to Apoptosis, Mitochondrion, 11 (2011), 369–81.

24) Chaban Y., Boekemab E. J., Dudkinab N. V., Structures of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Supercomplexes and Mechanisms for Their Stabilisation, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1837 (2013), 418–26.

25) Chai J., Du C., Wu J. W., Kyin S., et al., Structural and Biochemical Basis of Apoptotic Activation by Smac/DIABLO', Nature, 406 (2000), 855–62.

26) Chan W. H., Citrinin Induces Apoptosis in Mouse Embryonic Stem Cells, IUBMB Life, 60 (2008), 171–79.

27) Cheng T. C., Hong C., Akey I. V., Yuan S., et al., A near Atomic Structure of the Active Human Apoptosome, eLife., 5 (2015), 1–28.

28) Iverson S. L., Orrenius S., The Cardiolipin–cytochrome c Interaction and the Mitochondrial Regulation of Apoptosis, Archives of Biochemistry and Biophysics, 423 (2004), 37–46.

29) Iwata S., Lee J. W., Okada K., Lee J. K., et al., Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc1 Complex, Science1, 281 (1998), 64–71.

30) Kagan V. E., Tyurin V. A., Jiang J., Tyurina Y. Y. et al., Cytochrome c Acts as a Cardiolipin Oxygenase Required for Release of Proapoptotic Factors., Nature Chemical Biology, 1 (2005), 223–32.

31) Kang X., Carey J., Role of Heme in Structural Organization of Cytochrome c Probed by Semisynthesis, Biochemistry, 38 (1999), 15944–51.

32) Kogot-Levin A., Saada A., Ceramide and the Mitochondrial Respiratory Chain, Biochimie, 100 (2014), 88–94.

33) Korshunov S. S., Krasnikov B. F., Pereverzev M. O., Skulachev V. P., The Antioxidant Functions of Cytochrome C., FEBS Lett., 462 (1999), 192–98.

34) Lawen A., Apoptosis—an Introduction, BioEssays, 25 (2003), 888–96.

35) Leavesley H. B., Li L., Prabhakaran K., Borowitz J. L., et al., Interaction of Cyanide and Nitric Oxide with Cytochrome c Oxidase: Implications for Acute Cyanide Toxicity, Toxicol Sci, 101 (2008), 101–11.

36) Ledgerwood E. C., Morison I. M., Targeting the Apoptosome for Cancer Therapy, Clinical Cancer Research, 15 (2009), 420–24.
37) Lenaz G., Fato R., Genova M. L., Bergamini C., et al., Mitochondrial Complex I: Structural and Functional Aspects, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 1757 (2006), 1406–20.
38) Ludwig B., Bender E., Arnold S., Huttemann M., et al., Cytochrome C Oxidase and the Regulation of Oxidative Phosphorylation., Chembiochem Eur J Chem Biol, 2 (2001), 392–403.
39) Luo J., Shi R., Acrolein Induces Oxidative Stress in Brain Mitochondria, Neurochemistry International, 46 (2005), 243–52.
40) Marceau K., Ruttle P. L., Shirtcliff E. A., Essex M. J., et al., Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency, HHS Public Access, 57 (2015), 742–68.
41) Martinou J. C., Youle R. J., Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 Family Members and Mitochondrial Dynamics, Dev Cell., 21 (2011), 92–101.
42) Mavridou D., Ferguson S. J., Stevens J. M., Cytochrome c Assembly, IUBMB Life, 65 (2013), 209–16.
43) Michel H., The Mechanism of Proton Pumping by Cytochrome c Oxidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 (1998), 12819–24.
44) Moghe A., Ghare S., Lamoreau B., Mohammad M., et al., Molecular Mechanisms of Acrolein Toxicity: Relevance to Human Disease, Toxicol Sci, 143 (2015), 242–55.
45) Muenzner J., Pletneva E. V., Structural Transformations of Cytochrome c upon Interaction with Cardiolipin, Chem Phys Lipids, 179 (2014), 57–63.
46) Nelson L., Acute Cyanide Toxicity: Mechanisms and Manifestations., Journal of Emergency Nursing, 32 (2006), 8–11.
47) Ow Y. P., Green D. R., Hao Z., Mak T. W., Cytochrome c: Functions beyond Respiration., Nat Rev Mol Cell Biol., 7 (2008), 532–42.
48) Pearce L. L., Bominaar E. L., Hill B. C., Peterson J., Reversal of Cyanide Inhibition of Cytochrome c Oxidase by the Auxiliary Substrate Nitric Oxide: An Endogenous Antidote to Cyanide Poisoning?, J. Biol. Chem., 278 (2003), 52139–45.
49) Petersen R. C., Free-Radical Polymer Science Structural Cancer Model: A Review, Scientifica (Cairo), 2013 (2013), 1–17.

50) Popovič D. M., Current Advances in Research of Cytochrome c Oxidase., Amino Acids, 45 (2013), 1073–87.
51) Rottenberg H., Covian R., Trumpower B. L., Membrane Potential Greatly Enhances Superoxide Generation by the Cytochrome bc1 Complex Reconstituted into Phospholipid Vesicles, J Biol Chem., 284 (2009), 19203–10.
52) Santi P., Giuffre A., Barone M. C., Forte E., et al., Nitric Oxide and Cytochrome Oxidase: Reaction Mechanisms from the Enzyme to the Cell, Free Radic. Biol. Med., 34 (2003), 509–20.
53) Sherratt S. H., Mitochondria: Structure and Function, Revue Neurologique, 147 (1991), 417–30.
54) Sinibaldi F., Fiorucci L., Patriarca A., Laureci R., et al., Insights into Cytochrome c−Cardiolipin Interaction. Role Played by Ionic Strength, Biochemistry, 47 (2008), 6928–35.
55) Siskind L. J., Mitochondrial Ceramide and the Induction of Apoptosis, J Bioenerg Biomembr., 37 (2005), 143–53.
56) Spät A., Szanda G., Csordás G., Hajnóczky G., High and Low Calcium-Dependent Mechanisms of Mitochondrial Calcium Signalling, Cell Calcium, 44 (2009), 51–63.
57) Srinivasan S., Avadhani N. G., Cytochrome c Oxidase Dysfunction in Oxidative Stress, Free Radic Biol Med., 53 (2012), 1252–63.
58) Stock D., Leslie A. G. W., Walker J. E., Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP Synthase, Science, 286 (1999), 1700–1705.
59) Sun L., Luo C., Long J., Wei D., et al., Acrolein Is a Mitochondrial Toxin: Effects on Respiratory Function and Enzyme Activities in Isolated Rat Liver Mitochondria, Mitochondrion, 6 (2006), 136–42.
60) Tait J. F., Imaging of Apoptosis, Journal of Nuclear Medicine, 49 (2008), 1573–76.
61) Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T. et al., The Whole Structure of the 13-Subunit Oxidized Cytochrome c Oxidase at 2.8 Å., Science, 272 (1996), 1136-44.
62) Voet D., Voet J. G., Biochemistry, New York: John Wiley and Sons, 4. (1990), 542 – 44. ISBN 0471303585.

63) Wikström M., Proton Translocation by Cytochrome c Oxidase: A Rejoinder to Recent Criticism., Biochemistry, 39 (2000), 3515–19.
64) Yu H., Lee I., Salomon A. R., Yu K., Hüttemann M., Mammalian Liver Cytochrome c Is Tyrosine-48 Phosphorylated in Vivo, Inhibiting Mitochondrial Respiration., Biochim Biophys Acta, 1777 (2008), 1066–71.
65) Zhou M., Li Y., Hu Q., Bai X., et al., Atomic Structure of the Apoptosome: Mechanism of Cytochrome c- and dATP-Mediated Activation of Apaf-1, Genes & Dev., 29 (2015), 2349–61.