

Paweł Mariusz Głodowicz

Wykorzystanie katalitycznych kwasów nukleinowych do regulacji ekspresji genów mitochondrialnych



Poznań, 2021

Praca wykonana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej
Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Promotor:

dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICHB

Promotor pomocniczy:

dr Agnieszka Fedoruk-Wyszomirska

Praca przedstawiona Radzie Naukowej
Instytutu Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
w celu uzyskania stopnia doktora

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję

Wszystkim, którzy przyczynili się do powstania niniejszej pracy

dr hab. Katarzynie Rolle

składam podziękowania za wieloletnią opiekę i okazane wsparcie przez cały ten czas, zaufanie, cenne dyskusje i rady oraz stworzenie jedynej w swoim rodzaju atmosfery w miejscu pracy

Panu Prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu

Dziękuję za opiekę i wsparcie w rozwoju naukowym, przekazaną wiedzę, okazywaną życzliwość i zainteresowanie

dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej

Dziękuję za opiekę naukową, przekazaną wiedzę, wszechstronną pomoc oraz wiarę w moje możliwości

Współpracownikom z Zakładu Neuroonkologii Molekularnej

Dziękuję za wspianą, ciepłą i niepowtarzalną atmosferę oraz wszelką okazaną pomoc

Mojej Rodzinie za wspieranie mnie w dążeniu do celu odkąd tylko pamiętam

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	8
Streszczenie	11
1. Opracowanie literaturowe	15
1.1. Mitochondria	15
1.2. Genom mitochondrialny	16
1.2.1. Genom mitochondrialny protistów	16
1.2.2. Genom mitochondrialny ssaków	17
1.2.3. Genom mitochondrialny roślin	20
1.2.3.1. Składanie genów roślinnych	22
1.3. Import tRNA do mitochondriów	25
1.3.1. Import tRNA w organizmach roślinnych	26
1.3.2. Import tRNA w organizmach ssaków	27
1.3.3. Import tRNA jako potencjalna terapia chorób mitochondrialnych	28
1.4. Choroby mitochondrialne	29
1.4.1. MELAS	32
1.4.2. LHON	32
1.4.3. MERRF	33
1.4.4. Zespół Leigh'a	33
1.4.5. NARP/MILS	34
1.4.6. Cukrzyca mitochondrialna	35
1.4.7. Terapia chorób mitochondrialnych	37
1.5. Metody manipulacji mitochondrialnym DNA	39
1.5.1. Transfer genomu jądrowego	39
1.5.2. Redukcja heteroplazmi poprzez „wąskie gardło”	40
1.5.3. Nukleazy DNA i enzymy zdolne do edycji mtDNA	41
1.5.4. Import struktur podobnych do tRNA do mitochondriów	43
1.5.5. Transfer mitochondriów z komórki do komórki	48
1.5.6. Nanoostrze fototermiczne	49
1.6. Katalityczne kwasy nukleinowe	50
1.6.1. Charakterystyka rybozemu typu „hammerhead”	51
1.6.2. Wydłużony rybozy „hammerhead”	54
1.6.3. Reakcja transestryfikacji	56
1.6.4. Modyfikacje strukturalne rybozymów hammerhead	59
1.6.5. Rybozym HDV	60

1.6.5.1. Struktura rybozemu HDV	61
1.6.6. Czynniki determinujące aktywność rybozy mów	63
1.6.6.1. Jony metali	63
1.7. Antysensowe oligonukleotydy	65
1.7.1. Modyfikacje antysensowych oligonukleoydów	66
2. Cel pracy	69
3. Wyniki badań własnych	70
3.1. Badanie skuteczności wektora w układzie roślinnym	74
3.1.1. Charakterystyka funkcji genu matR z wykorzystaniem konstruktów zawierającego rybozym	74
3.1.1.1. Przygotowanie konstruktów	74
3.1.1.2. Transformacja roślin <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
3.1.1.3. Badanie zmian poziomu ekspresji mRNA	77
3.1.1.4. Badanie zmian poziomu ekspresji białka matR	78
3.1.1.5. Analiza specyficzności badanych konstruktów	80
3.1.1.6. Badanie zaangażowania genu matR w dojrzewanie tran skryptów	81
3.1.2. Badanie funkcji genu matR z wykorzystaniem antysensowych Oligonukleotydów	84
3.1.2.1. Przygotowanie konstruktów	84
3.1.2.2. Transformacja roślin <i>Arabidopsis thaliana</i>	86
3.1.2.3. Badanie zmian poziomu ekspresji mRNA	86
3.1.3. Analiza zmian ekspresji genu mttB pod wpływem rybozymów	90
3.2. Badanie skuteczności systemu do modyfikacji genomu mitochondrialnego w ludzkich liniach komórkowych	94
3.2.1. Ocena możliwości wykorzystanie strategii importu struktur podobnych do tRNA w ludzkich liniach komórkowych	94
3.2.1.1. Przygotowanie kostruktów do analiz <i>in vitro</i> weryfikujących transport tRNA z cytozolu do mitochondrium	95
3.2.1.2. Ocena transportu konstruktów zawierających struktury tRNA-podobne	98
3.2.2. Przygotowanie konstruktów transportujących cząsteczki aktywne katalitycznie do modyfikacji ludzkiego genomu mitochondrialnego	101
3.2.3. Wyprowadzenie linii komórkowej o stabilnej i indukowalnej ekspresji konstruktów zawierających struktury podobne do tRNA	104
3.2.3.1. Przygotowanie linii HepG2-Flp-In	107
3.2.4. Badanie wpływu tetracykliny na przeżywalność komórek.	108

3.2.5. Badanie integralności błony mitochondrialnej w liniach HepG2-Flp-In oraz 293-Flp-In	110
3.2.6. Ocena poziomu mRNA oraz białka pod wpływem aktywności katalitycznej rybozymów	114
3.2.6.1. Określenie zmian w poziomie ekspresji genu docelowego atp6 oraz wektora	116
3.2.6.2. Analiza zmian poziomu ekspresji docelowego genu atp6 oraz wektora w czasie	121
3.2.6.3. Określenie poziomu ekspresji genu docelowego atp6 na poziomie białka	124
3.2.6.4. Ocena specyficzności działania rybozy mów	126
4. Dyskusja	131
4.1. Wprowadzenie	131
4.2. Sekwencja pasażerska	131
4.2.1. Rybozomy	131
4.2.2. Oligonukleotydy antysensowe (AS-ON)	133
4.3. Indukcja ekspresji konstruktów	133
4.4. Sekwencje i geny docelowe	134
4.4.1. Zastosowanie wektora w układzie roślinnym	134
4.4.1.1. Maturazy	134
4.4.1.2. Gen mttB	136
4.5. Zastosowanie konstruktów do modyfikacji ludzkiego genomu mitochondrialnego	137
4.5.1. Mutacje w genomie mitochondrialnym oraz ich związek z występowaniem chorób	137
4.5.2. Dotychczasowe metody modyfikacji genomu mitochondrialnego	138
4.5.3. Wykorzystanie systemu transportu RNA w podejściach terapeutycznych	145
4.6. Podsumowanie badań własnych oraz perspektywy	145
5. Podsumowanie	150
6. Materiały i metody	152
6.1. Ważniejsze odczynniki, enzymy oraz zestawy gotowych odczynników	152
6.2. Bufory i pożywki wykorzystywane w pracy	152
6.3. Oligonukleotydy	155
6.4. Linie komórkowe i szczepy bakteryjne	157

6.5. Przygotowanie znakowanych radioaktywnie struktur podobnych do tRNA <i>in vitro</i>	157
6.6. Przygotowanie konstruktów do obniżenia ekspresji atp6 w liniach Komórkowych	157
6.7. Przygotowanie bakterii kompetentnych <i>Escherichia coli</i>	158
6.8. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego	158
6.9. Izolacja plazmidów w dużej skali	158
6.10. Izolacja białek HmIDPs	159
6.11. Metody rozdziału i analizy kwasów nukleinowych	159
6.11.1. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	159
6.11.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych	160
6.11.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworach	160
6.12. Metody rozdziału i analizy białek	160
6.13. Izolacja całkowitego RNA z hodowli komórkowych	161
6.14. Izolacja całkowitego RNA z materiału roślinnego	161
6.15. Hodowla linii komórkowych	162
6.16. Transfekcja komórek	163
6.17. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)	163
6.18. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)	164
6.19. Synteza cDNA do konstrukcji wektorów ekspresyjnych	164
6.20. Ligacja do wektora	164
6.21. Analiza konstruktów plazmidowych	165
6.22. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym	165
6.23. Test cytotoksyczności MTT	166
6.24. Test potencjału błony mitochondrialnej JC-1	167
6.25. Import struktur podobnych do tRNA do izolowanych mitochondriów ludzkich	167
6.26. Sterylizacja i hodowla nasion <i>Arabidopsis Thaliana</i>	167
6.27. Hodowla i indukcja nasion <i>Arabidopsis Thaliana</i> .	168
6.28. Analiza Western Blot	168
6.29. Analiza statystyczna	169
7. Bibliografia	170

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

AAV	technologie oparte o adenowirusy
ACTB	β -aktyna
APS	nadsiarczan amonu
AS-ON	antysensowe oligonukleotydy
ATP	5' trifosforan adenozyiny
BMV	wirus mozaiki rzepy
CoQ10	koenzym Q10
CTP	5' trifosforan cytydyny
DMSO	dimetylosulfotlenek
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe
dNTP	5' trifosforan nukleotydu
DTT	ditiotretol
EDTA	kwasy ecylenodiaminotetraoctowe
FBS	plodowa surowica bydlęca
GAPDH	dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego
GTP	5' trifosforan guanozyiny
HDV	wirus zapalenia wątroby typu D
HPRT	fosforybozylotransferaza hipoksantynowo-guaninowa
HSP1, HSP2	promotory transkrypcji dla nici ciężkiej mtDNA
IM	wewnętrzna błona mitochondrialna
iPSC	indukowane pluripotentne komórki macierzyste
KSS	zespół Kearnsa-Sayre'a
LHON	dziedziczna neuropatia wzrokowa Lebera
mat	maturaza
MELAS	zespół miopatii mitochondrialnej, encefalopatii, kwasicy mleczanowej, występowania incydentów podobnych do udarów
MERRF	padaczka miokloniczna z poszarpanymi czerwonymi włóknami mięśniowymi
MgCl ₂	chlorek magnezu
MILS/LS	zespół Leiga
mRNA	informacyjny RNA
mtDNA	mitochondrialne DNA

MTT	bromek 3-[4,5-dimetylotiazol-2-yol]-2,5-difenylotetrazolowy
NaCl	chlorek sodu
NARP	zespół neurogennej miopatii z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki
NGS	sekwencjonowanie następnej generacji
nić H	nić ciężka mtDNA
nić L	nić lekka mtDNA
nt	reszty nukleotydowe
OH	domniemane miejsce startu replikacji dla nici ciężkiej mtDNA
OL	domniemane miejsce startu replikacji dla nici lekkiej mtDNA
OM	zewnętrzna błona mitochondrialna
ORF	otwarta ramka odczytu
OXPPOS	mitochondrialny system fosforylacji oksydacyjnej
PAA	poliakrylamid
PCR	Reakcja łańcuchowa polimerazy
PKTLS	struktura podobna do tRNA z pseudowęzłem
PNK	kinaza polinukleotydowa faga T4
pz	par zasad
qPCR	ilościowy PCR w czasie rzeczywistym
RNA	kwasy rybonukleinowe
RNaza	rybonukleaza
RNaza A	rybonukleaza A
RNaza H	rybonukleaza H
RNazym	rybozym
ROS	reaktywne formy tlenu
rpm	obroty na minutę
rRNA	rybosomalne RNA
RT	odwrotna transkryptaza
Rybozym HH	RNAzym typu głowa młotka
SDS	dodecylosiarczan sodu
TALEN	nukleaza efektorowa podobna do aktywatora transkrypcji
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TLS	struktura podobna do tRNA
TMV	wirus mozaiki tytoniu

TNT	tunelowanie nanorurek
Tris	hydroksymetyloaminometan
tRNA	transportujące RNA
TYMV	wirus żółtej mozaiki rzepy
UPSK	struktura pseudowęzła
UTP	5' trifosforan urydyny
VDAC	zależny od napięcia kanał anionowy
ZFN	nukleazy palca cynkowego

Streszczenie

Informacja genetyczna w komórce eukariotycznych zawarta jest w sekwencji genomu jądrowego oraz w DNA organelli, takich jak mitochondria u zwierząt czy chloroplasty i mitochondria u roślin. Od prawidłowego funkcjonowania metabolicznych i sygnałowych szlaków łączących pomiędzy organellami i jądrem zależy homeostaza komórkowa. Mitochondria są niezbędne dla przeżycia komórki, jej aktywności, oddziaływania ze środowiskiem, odpowiedzi na stres, adaptacji czy tolerancji na czynniki środowiska. Ponadto są one również zaangażowane w procesy starzenia oraz odgrywają kluczową rolę w procesach programowanej śmierci komórki, apoptozy i nekrozy. Duża część białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowy, a następnie importowana do mitochondriom po translacji zachodzącej w cytozolu. Dotyczy to również kilku specyficznych RNA.

Mitochondria wykazują swoistą autonomię w związku z czym wciąż skonstruowanie i skuteczne zastosowanie metod interwencji w ich program genetyczny jest niezwykle trudne.

Rozwój metod wprowadzania nowego materiału genetycznego do poszczególnych kompartmentów komórkowych stał się podstawą do projektowania strategii transformacji mitochondriów przy zastosowaniu różnych markerów selekcyjnych. Pomimo wielu prób, system transformacji genetycznej mitochondrialnego DNA stworzono tylko dla dwóch organizmów jednokomórkowych (drożdże i glony *Chlamydomonas reinhardtii*). Nadal wielkim wyzwaniem pozostaje poszukiwanie skutecznych strategii dostarczania DNA i RNA do mitochondriów *in vitro* lub w systemie komórkowym. Transfekcja mitochondriów oraz poznanie genetyki tych organelli pozostaje w nurcie nowatorskich badań podstawowych, a także aplikacyjnych w kontekście terapii chorób o podłożu mitochondrialnym.

W związku z powyższym poszukiwanie i opracowywanie nowych strategii mających na celu dostarczenie katalitycznych RNA lub oligonukleotydów antysensowych do mitochondriów może być przełomem w badaniach genomów mitochondrialnych. Opracowanie i zbadanie takiej strategii stało się głównym celem badawczym niniejszej pracy doktorskiej.

W pierwszej jej części wykorzystano opracowany w naszym laboratorium system dostarczania cząsteczek aktywnych katalitycznie z wykorzystaniem struktur podobnych do tRNA (ang. *tRNA-like*) do modyfikacji genomu mitochondrialnego w komórkach roślinnych. Jako sekwencje docelowe wybrano geny, których funkcja w roślinach nie była dotychczas w pełni znana (*matR* oraz *mttB*). Jako aktywną sekwencję pasażerską w systemie roślinnym wykorzystano katalityczne kwasy nukleinowe (rybozomy typu *hammerhead*) oraz sekwencje

antysensowych oligonukleotydów. Uzyskane w toku realizacji pracy wyniki potwierdziły skuteczność opracowanej metody w obniżaniu ekspresji docelowych genów mitochondrialnych. Ponadto po zastosowaniu zbudowanego konstrukt w badaniach funkcjonalnych potwierdzono zaangażowanie genu matR w proces składania genów mitochondrialnych należących do intronów grupy II.

W drugiej części pracy podjęto próbę adaptacji opracowanego w modelu roślinnym systemu do modyfikacji ekspresji ludzkiego genomu mitochondrialnego. W tym podejściu wytypowano dwie sekwencje podobne do tRNA oraz wykazano ich zdolność do przechodzenia przez podwójną błonę mitochondriów komórek ludzkich w warunkach *in vitro* oraz *in vivo*. Wykorzystując tę możliwość, skonstruowano wektor zawierający jako sekwencję pasażerską aktywną katalitycznie cząsteczkę w postaci rybozymu. Potwierdzono potencjał transportowy konstrukt oraz efektywne obniżenia poziomu ekspresji genów mitochondrialnych. Nie obserwowano jednocześnie efektów niespecyficznych i cytotoksycznych w badanych liniach komórkowych.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że zaprojektowany i zmodyfikowany w ramach niniejszej pracy system może być z powodzeniem wykorzystany do badania funkcji genów mitochondrialnych zarówno w systemie roślinnym, jaki w ludzkich liniach komórkowych. To nowatorskie podejście otwiera nową drogę do badań genetycznych mitochondriów, odczytywania procesów regulacji i identyfikacji nierozpoznanych jeszcze funkcji genomu mitochondrialnego.

Abstract

Genetic information in eukaryotic cells is divided between the nucleus and cytoplasmic organelles, i.e. mitochondria in non-plant organism, mitochondria and chloroplasts in plants. Mitochondria carry the respiratory chain and ensure fundamental function in energy production, redox status, metabolic pathways, programmed cell death, aging and in signaling cascades involving reactive oxygen species. The vast majority of mitochondrial proteins is encoded by nuclear genes and imported into the organelles upon cytosolic translation, but the organelles cannot function without the contribution of their own genetic system.

Mitochondria show a specific autonomy therefore there are no effective methods of intervention in their genetic program. So far, attempts to use protein transport pathways have proved to be ineffective and non-specific.

The development of methods for introducing new genetic material into individual cell compartments has become the basis for the design of mitochondrial transformation strategies using various selection markers. Despite many attempts, the mitochondrial DNA genetic transformation system was developed for only two unicellular organisms (yeast and *Chlamydomonas reinhardtii* algae). The search for effective strategies to deliver DNA and RNA to the mitochondria in vitro or in the cellular system remains a great challenge. The transfection of mitochondria and the understanding of the genetics of these organelles remain in the mainstream of innovative basic research as well as applications in the context of the therapy of mitochondrial diseases.

Therefore, the search for and development of new strategies to deliver catalytic RNAs to mitochondria could be a breakthrough in the study of mitochondrial genomes. The introduction of in trans-acting ribozymes into the mitochondria will degrade the target RNA, resulting in functional changes in these organelles. This unprecedented and novel approach opens up a completely new path for the genetic study of organelle DNA, reading regulatory processes, and identifying unrecognized functions of certain regions of the mitochondrial genome.

In the first part of the work, the system of delivering molecular tools developed in our laboratory with the use of tRNA-like structures for the manipulation of plant cell mitochondria was used. Genes whose function in plants was not fully known so far (*matR* and *mttB*) were selected as target sequences. Catalytic nucleic acids (hammerhead ribozymes) and antisense oligonucleotide sequences were used as the passenger sequence in the plant system.

The results obtained in the course of the work confirmed the effectiveness of the method developed by us in reducing the expression of target mitochondrial genes. Moreover, it was possible to confirm the involvement of the matR gene in the splicing of mitochondrial genes belonging to group II introns.

In the second part of the work, an attempt was made to adapt the system for manipulating the human mitochondrial genome developed in a plant model. In this approach, two tRNA-like sequences were selected and their ability to penetrate the mitochondria of human cells in vitro and in vivo were tested. In this approach the catalytically active molecule was a hammerhead ribozyme. The obtained results confirmed the ability of tRNA-like molecules to penetrate into the mitochondria of human cells. It has also been shown that ribozymes carried by the transporter molecule are able to effectively reduce the level of expression of mitochondrial genes without showing non-specific and cytotoxic effects in the tested cell lines.

The obtained results confirmed that the system we use can be successfully used to study the functions of mitochondrial genes both in the plant system and in human cell lines. This innovative approach opens a new path for mitochondrial genetic research, reading regulatory processes and identifying as yet unrecognized functions of the mitochondrial genome.

1. Opracowanie literaturowe

1.1. Mitochondria

Mitochondria są wysoce wyspecjalizowanymi organellami obecnymi w niemal wszystkich komórkach eukariotycznych. Uważa się, że mitochondria wyewoluowały z wolno żyjących organizmów przypominających α -proteobakterie w wyniku endosymbiozy ponad 1,5 miliarda lat temu [Gray, 2001; Margulis, 2006; Wang, 2015]. Głównym zadaniem mitochondriów jest produkcja energii na drodze fosforylacji oksydacyjnej. Poza wytwarzaniem energii mitochondria odgrywają jednak, także ważną rolę w wielu szlakach metabolicznych i sygnałowych. Organelle te są kluczowe dla metabolizmu aminokwasów i lipidów, a także biosyntezy klastrów hemu i żelaza z siarką, biorą udział w homeostazie jonów wapnia i są głównym miejscem powstawania reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). W ostatnich latach pojawiły się także doniesienia o roli mitochondriów w inicjacji procesu programowanej śmierci komórki (apoptoza) [Chinnery, 2003; Greaves, 2012].

Są to organelle o wyraźnej ultrastrukturze. Zbudowane są z dwóch błon: zewnętrznej (ang. *outer membrane*, OM) oraz wewnętrznej (ang. *inner membrane*, IM). Błona zewnętrzna oddziela mitochondria od cytoplazmy natomiast wewnętrzna dzieli mitochondria na dwa przedziały: macierz mitochondrialną i przestrzeń międzybłonową. OM pełni funkcję bariery i zapobiega niekontrolowanemu przemieszczaniu się dużych cząsteczek do lub z mitochondriów. Import i uwalnianie tych cząsteczek jest ściśle regulowane przez określone kompleksy białkowe zwane translokazami. Jednak ze względu na obecność poryn błona zewnętrzna jest przepuszczalna tylko dla małych cząsteczek. OM służy również jako swoista platforma kontaktowa pomiędzy mitochondriami oraz innymi przedziałami komórkowymi w tym błonami retikulum endoplazmatycznego. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się również białka zaangażowane w kształtowanie błon takie jak mitofuzyna [Frey, 2000; Zick, 2009].

Ultrastruktura błony wewnętrznej jest cechą charakterystyczną mitochondriów. W przeciwieństwie do dość prostej morfologii błony zewnętrznej, IM dzieli się dalej na podstruktury. Część błony wewnętrznej sąsiadująca z OM nazywana jest wewnętrzną błoną graniczną. Dodatkowo błona wewnętrzna tworzy długie wgłębienia, które wystają do macierzy. Zmiany struktury błony wewnętrznej są często obserwowane w chorobach neurodegeneracyjnych, do których możemy zaliczyć zespół Bartha, chorobę Alzheimera, chorobę Parkinsona, stwardnienie zanikowe boczne czy chorobę Wilsona [Zick, 2009].

W wewnętrznej błonie mitochondrialnej znajdują się również kompleksy białkowe, które odpowiadają za kluczowe procesy biologiczne takie jak OXPHOS, translokacja białek, transport metabolitów czy biogenezę klastrów żelazowo-siarkowych. Błona wewnętrzna jest nieprzepuszczalna dla większości cząsteczek i dlatego zawiera specyficzne translokazy i transportery zarówno dla dużych białek jak i małych cząsteczek, ponadto występuje tu szereg białek działających na rzecz utrzymania prawidłowej morfologii samej błony wewnętrznej jak i całych mitochondriów. IM odgrywa również ważną rolę w procesie apoptozy [Frey, 2000; Mannella, 2006; Liesa, 2013; Jayashankar, 2016].

Mitochondria to bardzo dynamiczne organelle, które tworzą sieć w komórce. Aby spełnić swoje złożone zadania, muszą one być skutecznie przystosowane do zapotrzebowania energetycznego komórki. Sprawność komórki ściśle zależy od liczby i kształtu mitochondriów. Dlatego mitochondria ulegają dynamicznym zmianom, aby dostosować się do potrzeby chwili. Liczba mitochondriów w komórce jest stale regulowana przez procesy fuzji (łączenia dwóch mitochondriów w jedno) i rozszczepienia (podziału jednego mitochondrium na dwa oddzielne organelle). Ultrastrukturę wewnętrznej błony mitochondrialnej kształtuje kilka mechanizmów, w tym białko OPA1, syntaza ATP oraz kompleks mitochondrialnego miejsca kontaktu i systemu organizowania grzebienia (MICOS) [Vogel, 2006; Zick, 2009].

1.2. Genom mitochondrialny

Zdecydowana większość białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowy, pomimo tego mitochondria zachowały jednak własny materiał genetyczny (mtDNA), który ulega niezależnej replikacji zapewniając im swoistą autonomię. Do tej pory zsekwencjonowano genomy mitochondrialne bardzo wielu eukariontów. Uzyskane wyniki pokazują, że pomimo zachowania swoich podstawowych funkcji różnorodność genomów mitochondrialnych jest bardzo duża. Genomy mitochondrialne poszczególnych gatunków różnią się wielkością, zawartością genów oraz ich organizacją [Chen, 2010; Westermann, 2010; Palmer, 2011; Wai, 2016].

1.2.1. Genom mitochondrialny protistów

Protisty są uważane za jedne z tych organizmów, które rozwinęły mitochondria, dlatego dane uzyskane z genomów mitochondrialnych protistów mogą pomóc w lepszym zrozumieniu ich pochodzenia. Wielkość mtDNA protistów wynosi średnio 40 tys. zasad z czego niemal 70% stanowią A+T [Lang, 1997; Gray, 2013].

Genom mitochondrialny protistów koduje największą liczbę genów spośród wszystkich znanych eukariontów i występuje zarówno w formie liniowej jak i cyrkularnej, jednak forma cyrkularna jest przeważająca. mtDNA pierwotniaka *Reclinomonas americana* ma 97 genów kodujących białka i stabilne RNA. Genom *R. americana* można przedstawić jako unikalną mapę kołową o dużej gęstości genów, które znajdują się na obu niciach [Odintsova, 2002; Gray, 2013].

Sekwencjonowanie genomów mitochondrialnych kolejnych organizmów wykazało, że tylko niewielka część genów *Reclinomonas americana* jest w nich obecna. Przypuszcza się, że ten zestaw genów jest najbardziej zbliżony do genomu pro-mitochondrialnego. W trakcie ewolucji mitochondria utraciły większość swoich genów w wyniku redukcji lub migracji do genomu mitochondrialnego. Proces ten zachodził jednak różnie w różnych liniach ewolucyjnych. Uważa się, że dodatkowa liczba genów w *R. americana* pełni kluczową rolę w biogenezie mitochondriów. *R. americana* posiada 18 unikalnych genów, których obecność nie została dotychczas wykryta w innych genomach mitochondrialnych. Część z tych genów bierze udział w procesie fosforylacji oksydacyjnej niektóre jednak odgrywają kluczową rolę w innych procesach metabolicznych np. gen *tufA* będący czynnikiem translacji czy gen *secY* zaangażowany w proces translacji białka [Odintsova, 2002; Gray, 2013].

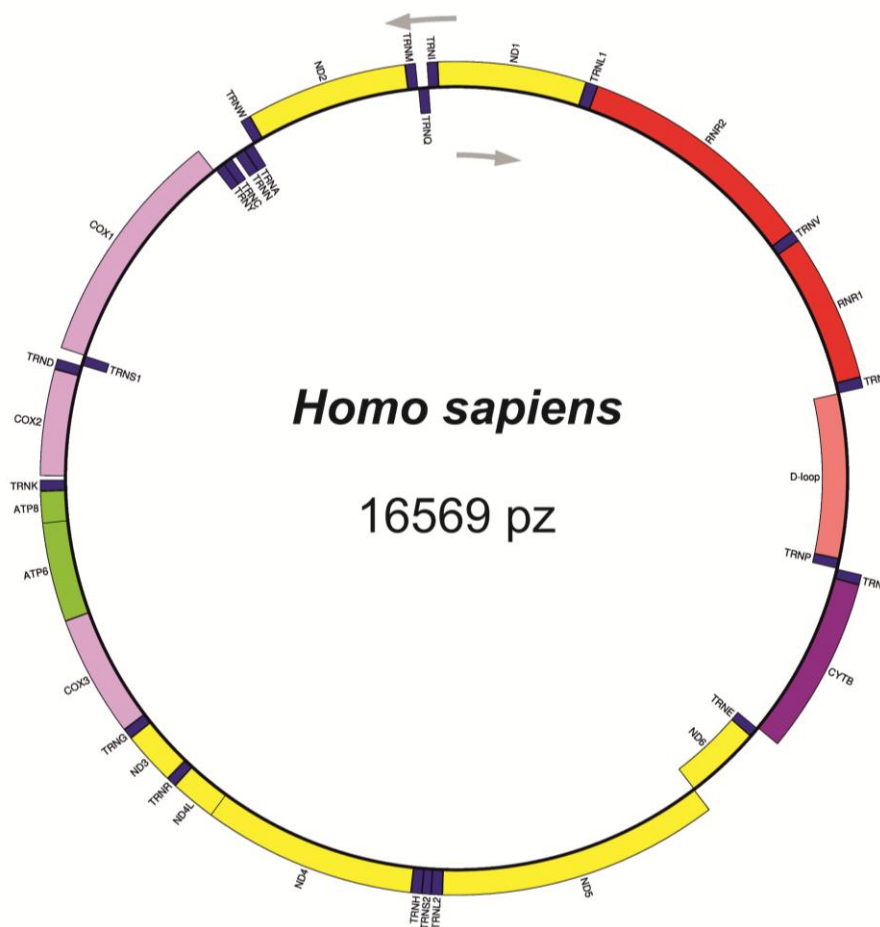
Transferowe RNA (tRNA) oraz rybosomalne RNA (rRNA) kodowane przez genom mitochondrialny protistów są zbliżone do ich eubakteryjnych przodków. Tylko niewielka grupa protistów posiada w swoim mtDNA sekwencje kodujące geny tRNA pozwalające na odczytywanie wszystkich kodonów. Większość z nich posiada niepełny zestaw tRNA w związku z czym brakujące transferowe RNA są kodowane w genomie jądrowym i muszą zostać zaimportowane do mitochondriów [Lang, 1997; Gray, 2013].

W genomie mitochondrialnym protistów rzadko występują introny jednakże niektóre zielone oraz czerwone algi posiadają introny, które są również dominujące w genomach mitochondrialnych roślin wyższych. Takie podobieństwo pomiędzy fotosyntetyzującymi protistami, a roślinami może wskazywać na wspólny rodowód ich genomów mitochondrialnych [Odintsova, 2002; Gray, 2013].

1.2.2. Genom mitochondrialny ssaków

Genom mitochondrialny ssaków jest zamkniętą, kolistą cząsteczką DNA. Zarówno struktura jak i organizacja genów w mtDNA jest silnie konserwatywna u wszystkich ssaków. Genom mitochondrialny człowieka ma wielkość 16,6 tys. par zasad, które kodują 37 genów (Ryc. 1). 13 z nich to geny kodujące białka, 22 kodują tRNA, a dwa ostatnie rRNA

[Gustafsson, 2016]. System OXPHOS składa się z około 90 białek o podwójnej podstawie genetycznej. Białka te są kodowane przez geny jądrowe, poddawane translacji na rybosomach cytozolowych, importowane do mitochondriów lub kodowane przez mtDNA, a na końcu podlegają translacji na rybosomach mitochondrialnych. Składniki kodowane przez mtDNA są uważane za niezbędne, do tworzenia kompleksów OXPHOS w mitochondriach, a co za tym idzie do produkcji ATP [Moraes, 2002; Krishnan, 2010; Chinnery, 2013].



Ryc. 1 Struktura i organizacja ludzkiego genomu mitochondrialnego.

Kolorem czerwonym oznaczono geny kodujące 2 cząsteczki rRNA (12S i 16S), granatowym – 22 cząsteczki tRNA, żółtym – 7 białek wchodzących w skład kompleksu I łańcucha oddechowego (ND1-6 i ND4L), fioletowym – 1 białko wchodzące w skład kompleksu III (CYTB), różowym – 3 białka wchodzące w skład kompleksu IV (COX1-3), zielonym – 2 białka wchodzące w skład syntazy ATP (ATP6 i 8) oraz łososiowym – główny region niekodujący mtDNA (region kontrolny). Strzałki skierowane zgodnie z ruchem wskazówek zegara oznaczają geny leżące na nici lekkiej mtDNA (oznaczenia wewnątrz koła), strzałki skierowane w przeciwnym kierunku – geny na nici ciężkiej (oznaczenia na zewnątrz koła).

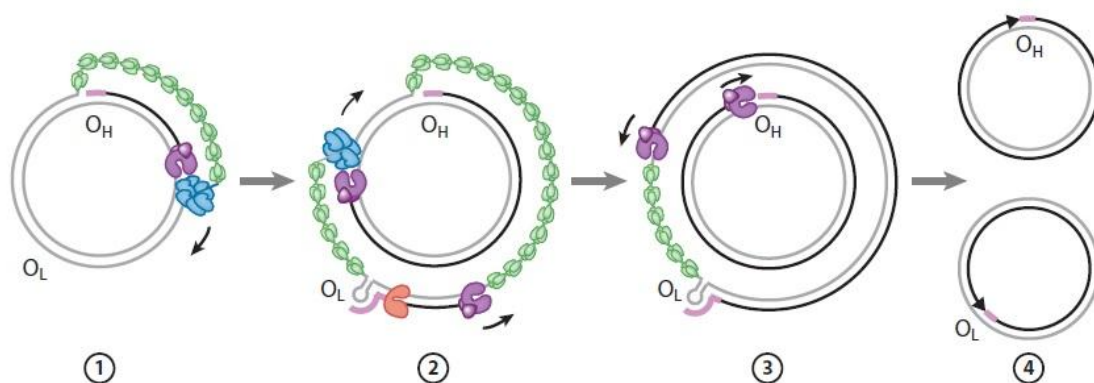
Ze względu na odmienną zawartość nukleotydów nici mtDNA różnią się masą cząsteczkową. Nić bogata w zasady purynowe (przede wszystkim G) nazywana jest ciężką H (ang. *heavy*, H), a nić bogata w zasady pirymidynowe (przede wszystkim C) - lekką L (ang. *light*, L) [Krishnan, 2010; Chinnery, 2013].

Region niekodujący (pętla D) znany jako region kontrolny obejmuje głównie elementy kontrolujące replikację i ekspresję genomu mitochondrialnego u ssaków. W zależności od gatunku rejon pętli D ma wielkość 880 – 1400 par zasad. Region kontrolny zawiera również promotory transkrypcji dla każdej nici. Promotory te są określane, jako promotory nici lekkiej (LSP) lub nici ciężkiej (HSP) w zależności od tego, która nić mtDNA służy jako matryca w reakcji transkrypcji. Po transkrypcji każdej nici powstają duże policistronowe transkrypty, będące dalej przetwarzane w celu wygenerowania dojrzałych cząsteczek tRNA, rRNA oraz mRNA. Sekwencja terminacji transkrypcji nie dopuszcza do transkrypcji regionu kontrolnego [Chinnery, 2013; Gustafsson, 2016].

Transkrypcja nici L odbywa się z jednego pojedynczego promotora (LSP) podczas gdy nici H rozpoczyna się od dwóch różnych miejsc promotorowych HSP1 i HSP2. Sekwencje te są precyzyjnie określone i różnie regulowane. Miejsce inicjacji transkrypcji HSP1 znajduje się około 100 par zasad przed HSP2 i generuje transkrypt, który pokrywa się z dwoma genami rRNA i kończy się na końcu 3' genu kodującego podjednostkę 16S rRNA. Miejsce inicjacji transkrypcji HSP2 ulokowane jest w pobliżu końca 5' genu 12S rRNA i generuje policistronowy transkrypt z prawie całej długości nici H obejmujący dwa geny rRNA i 12 mRNA. Prekursorowe RNA jest następnie procedowane w celu generacji poszczególnych cząsteczek. Wycięcie tRNA z transkryptów policistronowych służy do tworzenia dojrzałych mRNA i rRNA. Podejście to nazywane jest modelem interpunkcji tRNA (ang. *tRNA punctuation model*). Synteza RNA z nici lekkiej jest zależna od promotora LSP. W jej wyniku dochodzi do powstania transkryptu kodującego białko ND6, osiem tRNA, a ponadto prowadzi do powstania starterów niezbędnych do inicjacji replikacji mtDNA z nici ciężkiej. Replikacja mtDNA różni się od replikacji genomowego DNA jednakże dokładny mechanizm tego procesu nadal jest przedmiotem dyskusji wielu badaczy [Krishnan, 2010; Chinnery, 2013, Gustafsson, 2016].

W przeszłości mechanizm replikacji mitochondrialnego DNA badano z wykorzystaniem chlorku cezu i wizualizowano za pomocą mikroskopii elektronowej [McKinney, 2013]. Stosowany od ponad 35 lat model synchronicznej, dwukierunkowej replikacji mtDNA zakłada, że proces replikacji rozpoczyna się w miejscu startu replikacji nici ciężkiej (O_h) w pętli D, a synteza przebiega w jednym kierunku i prowadzi do powstania

nowej nici H tzw. nici wiodącej. Ponieważ synteza nici H przebiega wzdłuż matrycy, białko wiążące jednoniciowy DNA (ang. *mitochondrial single-stranded DNA binding protein*, mtSSB), pokrywa rodzicielską nić H (Ryc. 2). W ten sposób dochodzi do zahamowania możliwości losowej inicjacji replikacji na nici przesuniętej. W mniej więcej dwóch trzecich odległości od miejsca inicjacji replikacji nici wiodącej dochodzi do rozpoczęcia tego procesu na nici opóźnionej w ten sposób proces ten przebiega w sposób ciągły. Elongacja nici opóźnionej zachodzi w kierunku przeciwnym do nici wiodącej. Replikacja obu nici jest ze sobą powiązana, ponieważ synteza nici wiodącej jest niezbędna do syntezy nici opóźnionej. Proces ten trwa aż do momentu powstania dwóch nici potomnych. W zaproponowanym modelu miejsce inicjacji i terminacji są różne dla obu nici mtDNA [Clayton, 2000; McKinney, 2013; Gustafsson, 2016].



Ryc. 2. Model replikacji mitochondrialnego DNA.

Proces replikacji rozpoczyna się w miejscu startu replikacji nici ciężkiej (O_H). Nić ciężka jest wiązana i stabilizowana przez białko mtSSB (zielony). W momencie przechodzenia maszyneryj replikacyjnej przez miejsce inicjacji na nici L dochodzi to powstania struktury typu spinka do włosów. Regulowana przez mtDNA polimeraza POLRMT (pomarańczowy) syntetyzuje krótkie startery, które wykorzystywane są do inicjacji syntezy nici L. Po zakończeniu syntezy nici mtDNA dochodzi do terminacji replikacji.

1.2.3. Genom mitochondrialny roślin

Mitochondria roślinne mają złożony i specyficzny układ genetyczny. Genom mitochondrialny rośliny posiada szereg cech, które odróżniają go od genomów mitochondrialnych zwierząt i grzybów oraz innych istot żywych. Genom mitochondrialny roślin wyższych i fotosyntetyzujących glonów różni się bardzo pod względem wielkości, a także organizacji strukturalnej [Allen, 2007; Smith, 2010; Yurina, 2016]. mtDNA komórek

Pierwszym w pełni zsekwencjonowanym genomem mitochondrialnym był genom rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) o wielkości 367 tys. par zasad (Ryc. 3). Genom ten koduje 32 białka, 3 rRNA oraz 22 tRNA (Ryc. 3) [Mower, 2012; Sloan, 2012; Yurina, 2016]. Oznacza to tylko dwukrotny wzrost ilości kodowanych genów wobec blisko 22-krotnego wzrostu długości mtDNA wobec ludzkiego genomu mitochondrialnego. Różnice w wielkości genomu mitochondrialnego nie wynikają z ilości kodowanych genów ale z dużej ilości niekodujących fragmentów mtDNA takich jak introny. Przypuszcza się, że zaledwie 10% roślinnego mtDNA ma funkcję kodującą [Yurina, 2016].

1.2.3.1. Składanie genów roślinnych

Ekspresja genomów mitochondrialnych w organizmach roślinnych jest procesem złożonym w szczególności na poziomie potranskrypcyjnym [Liere, 2011; Small, 2013; Hammani, 2014]. Aby stać się funkcjonalnymi, pierwotne transkrypty przechodzą rozległe procesy dojrzewania w tym edycję RNA (zwykle konwersję C do U) oraz składanie licznych intronów, znajdujących się w regionach kodujących wielu podstawowych genów. Procesy dojrzewania są regulowane przez różne kofaktory białkowe mogące łączyć funkcje oddechowe z sygnałami środowiskowymi lub rozwojowymi. Dotychczas zidentyfikowano zaledwie kilka czynników zaangażowanych w proces składania mitochondrialnych intronów (Tab. 1) [Brown, 2014, Schmitz-Linneweber 2015].

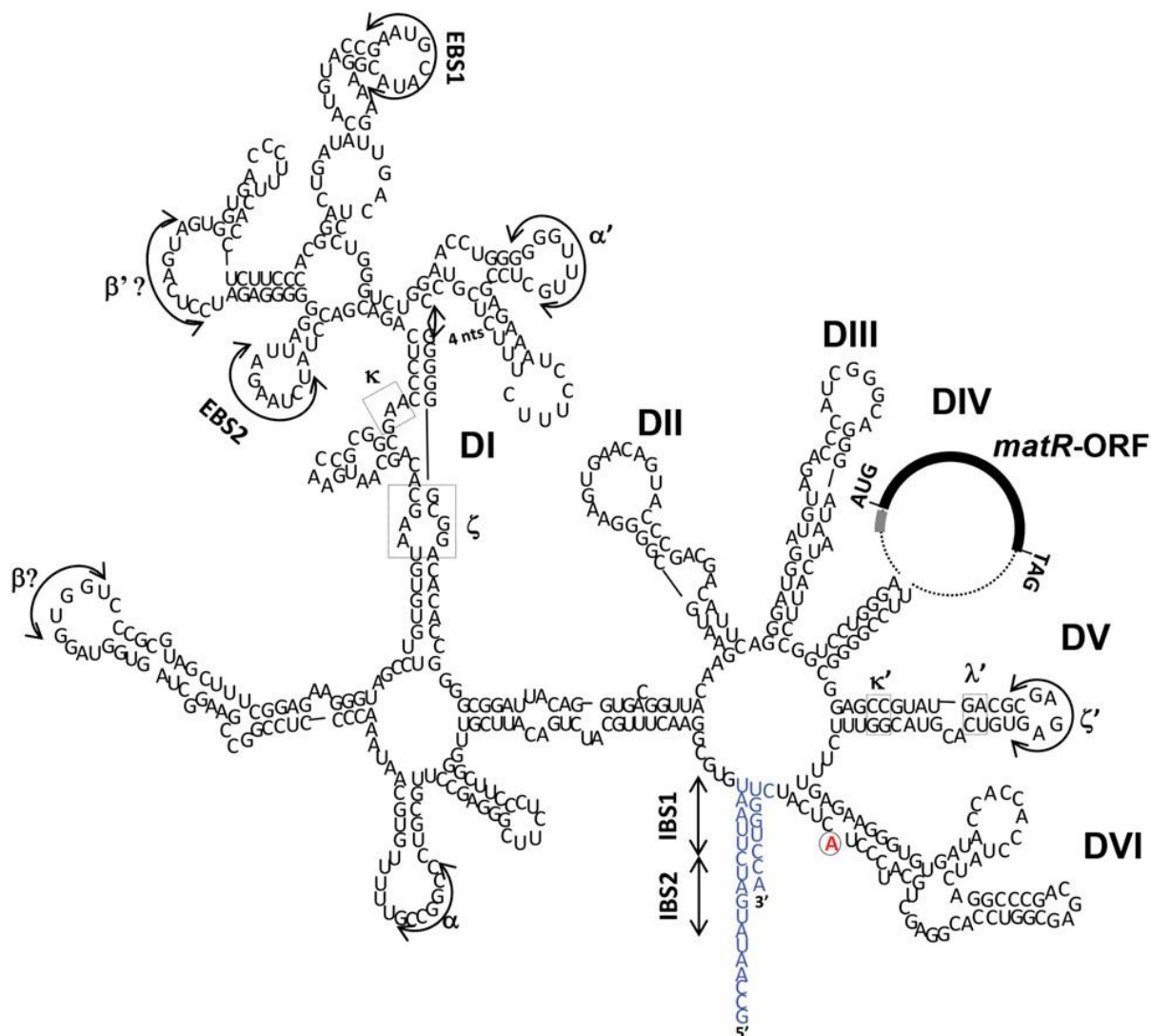
Genomy mitochondrialne roślin, protistów oraz grzybów zawierają różną ilość sekwencji intronowych, które zostały podzielone na dwie grupy: I i II. Obie klasy intronów mają odrębne struktury. Kodują również własną maszynę białkową niezbędną w procesie składania [Bonen, 2008].

Introny grupy II rozprzestrzeniają się poprzez tzw. retrohoming oraz retrotranspozycję. Procesy te wykorzystują kodowaną przez sekwencje intronowe aktywność odwrotnej transkryptazy/endonukleazy. Prowadzone na przestrzeni ostatnich lat badania pozwoliły na zbadanie mechanizmów związanych z samo-składaniem (ang. *self-splicing*) intronów grupy II [Bonen, 2008]. Jednakże zainteresowanie mitochondrialnymi intronami oraz ich składaniem wykroczyło poza samo zrozumienie podstawowych zdarzeń ekspresji na poziomie RNA, częściowo ze względu na potencjalne wykorzystanie ich właściwości autokatalitycznych (np. w terapii genowej), a częściowo ze względu na możliwość zdobycia nowej wiedzy na temat ewolucji katalitycznych RNA oraz pochodzenia intronów.

Tab. 1. Znane czynniki transkrypcyjne w genomie mitochondrialnym roślin.

Gen	Splicing	Znane czynniki transkrypcyjne
<i>rpl2</i>	<i>cis</i>	PMH2, WTF9, matR
<i>rps3</i>	<i>cis</i>	mCSF1, matR
<i>cox2</i>	<i>cis</i>	nMAT2, PMH2, mCSF1, matR
<i>ccmFc</i>	<i>cis</i>	WTF9, matR
<i>nad1</i>	i1 / <i>trans</i>	OTP43, nMAT1, nMAT4, ABO6
<i>nad1</i>	i2 / <i>cis</i>	nMAT2, PMH2, ABO6, mCSF1
<i>nad1</i>	i3 / <i>trans</i>	nMAT4, PMH2, ABO6, mCSF1, matR
<i>nad1</i>	i4 / <i>cis</i>	nMAT4, ABO6, matR
<i>nad2</i>	i1 / <i>cis</i>	MTSF1, nMAT1, PMH2, mCSF1
<i>nad2</i>	i2 / <i>trans</i>	PMH2, mCSF1
<i>nad2</i>	i3 / <i>cis</i>	ABO5, ABO6, mCSF1, RUG3, MTERF15
<i>nad2</i>	i4 / <i>cis</i>	PMH2, ABO6, mCSF1
<i>nad4</i>	i1 / <i>cis</i>	ABO6
<i>nad4</i>	i2 / <i>cis</i>	nMAT1, PMH2, ABO6
<i>nad4</i>	i3 / <i>cis</i>	PMH2, ABO6
<i>nad5</i>	i1 / <i>cis</i>	PMH2, ABO6, mCSF1
<i>nad5</i>	i2 / <i>trans</i>	OTP439, PMH2, ABO6, mCSF1
<i>nad7</i>	i3 / <i>trans</i>	TANG2, PMH2, ABO6, mCSF1
<i>nad7</i>	i4 / <i>cis</i>	matR
<i>nad7</i>	i1 / <i>cis</i>	BIR6, PMH2
<i>nad7</i>	i2 / <i>cis</i>	nMAT2, mCSF1, matR

Introny należące do grupy II to autokatalityczne RNA (rybozomy) i ruchome elementy genetyczne, które są zdefiniowane przez wysoce konserwatywną strukturę drugorzędową sześciu domen typu trzon-pętla (ang. *stemloop*) (DI do DVI) otaczających rdzeń centralny (Ryc. 4) [Bonen, 2008; Sultan 2016]. Chociaż niektóre modelowe introny z grupy II są w stanie katalizować auto-wycięcie *in vitro*, niezależnie od białek, warunki do samoskładania są generalnie нефизjologiczne (tj. wysokie temperatury i warunki zasolenia), a ich wydajne składanie *in vivo* zależy od interakcji z różnymi czynnikami białkowymi [Bonen, 2008; Sultan 2016]. W mitochondriach bakterii i drożdży białka, które biorą udział w składaniu intronów grupy II, zazwyczaj to maturazy (ang. *maturases*, MAT), które są kodowane w obrębie domeny czwartej (DIV) samych intronów. Wykazano, że MAT wiążą się z wysokim powinowactwem i swoistością ze swoimi własnymi pokrewnymi intronowymi RNA i postuluje się, że ułatwiają składanie intronów poprzez wspomaganie fałdowania tych wysoce ustrukturyzowanych RNA w ich katalitycznie aktywne formy w warunkach fizjologicznych [Huang, 2005; Ostersetzer, 2015; Sultan, 2016].



Ryc. 4. Model struktury drugorzędowej intronu 4 nad1 Arabidopsis thaliana.

Poszczególne subdomeny oznaczono odpowiedni DI, DII, DIII, DIV, DV oraz DVI. Kolorem czerwonym oznaczono konserwatywną resztę A. Miejsca wiązania egzonów oznaczono, jako EBS1/IBS1 oraz EBS2/IBS2. Literami greckimi oznaczono interakcje między różnymi regionami intonów. Sekwencja kodująca matR znajduje się w obrębie domeny IV (DIV). Struktura wygenerowana przez algorytmy przewidywania Alifold-Vienna RNAWebserver i MfoldWebserver, w oparciu o znane sekwencje nad1 i4 z różnych roślin okrytozalążkowych dostępnych na serwerze NCBI Organelle Genome Resources.

Maturazy grupy II zawierają kilka konserwatywnych motywów, które są wymagane zarówno do składania jak i ruchliwości intronów. Obejmują one regiony o sekwencji homologicznej do odwrotnych transkryptaz (ang. *reverse transcriptase*, RT) pochodzących z retrowirusów. Oprócz domen RT, białka te mogą zawierać również domeny wiążące C-końcowe DNA (ang. *C-terminal DNA binding*) oraz endonukleazy obecne w niektórych maturazach [Lembowitz, 2015; Zimmerly, 2015].

Badania filogenetyczne wykazują, że wszystkie obecne w organellach roślinnych introny wyewoluowały z intronów zawierających sekwencję MAT. Jednakże tylko jeden gen związany z mat urazą został zachowany w organellach roślin okrytozalążkowych. W plastydach gen ten to matK, którego sekwencja kodująca znajduje się w intronie genu trnK. W mitochondriach jest to matR zlokalizowana w czwartym intronie genu kodującego podjednostkę I dehydrogenazy NADH (nad1). Zarówno matK jak i matR charakteryzują się wysoce konserwatywną sekwencją w różnych gatunkach roślin jedno i dwuliściennych co może oznaczać, że pełnione przez nie funkcje są takie same w przypadku wszystkich roślin okrytonasiennych [Lembowitz, 2015; Sultan, 2016].

Doniesienia literaturowe wskazują, że matK zaangażowana jest w składanie plastydowych intronów grupy II [Schmitz-Linneweber, 2015]. Rośliny posiadające wadliwe rybosomy plastydowe nie są zdolne do łączenia intronów grupy IIA w chloroplastach [Jenkins, 1997]. Wykazano, że również niektóre pasożytnicze rośliny nieposiadające w swoim genomie maturazy K, utraciły introny grupy IIA ze swoich plastydowych DNA, podczas gdy rośliny zawierające w otwartej ramce odczytu (ang. *open reading frames*, ORF) zachowały niektóre introny podgrupy IIA w swoich zredukowanych genomach plastydowych. Wykorzystanie transgenicznych linii tytoniu (*Nicotiana tabacum*) wykazało, że matK jest związany z wieloma intronami podgrupy IIA w chloroplastach. Dane te silnie potwierdzają pogląd, że matK odgrywa znaczącą rolę w metabolizmie plastydowego RNA [Zoschke, 2010].

Przypuszcza się, że matR będzie również pełniła kluczową rolę dla biogenezy mitochondriów roślinnych. Maturaza R jest blisko spokrewniona z maturazami kodowanymi przez introny grupy II w bakteriach i została zachowana, jako sekwencja konserwatywna, w obrębie ORF mitochondrialnego DNA niemal wszystkich roślin okrytozalążkowych [Adams, 2002]. Badania prowadzone nad obniżeniem poziomu ekspresji matR wykazały, że niższy poziom ekspresji prowadzi do zaburzeń w procesie składania genów zawierających introny grupy II [Sultan, 2016].

1.3. Import tRNA do mitochondriów

Analizy bioinformatyczne są potężnym narzędziem pozwalającym na uzyskanie szczegółowych i kompletnych danych dotyczących importu tRNA do mitochondriów. Opierają się one na bazach danych zawierających ponad 2000 kompletnych sekwencji genomu mitochondrialnego i umożliwiają przewidywanie liczby genów mitochondrialnego tRNA w tych organizmach [O'Brien, 2009]. Zidentyfikowane w ten sposób sekwencje tRNA

można następnie dopasować do kodonów używanych w mitochondrialnych systemach translacji. Najbardziej prawdopodobnym wyjaśnieniem braku kompletnego zestawów tRNA jest jednak fakt, iż pozostałe transportujące RNA są importowane z cytoplazmy [Schneider, 2000].

Analizy wskazują także, że import tRNA do mitochondriów jest szeroko rozpowszechniony, a liczba genów mitochondrialnych kodująca transportujące RNA zachowana w poszczególnych gatunkach jest zmienna. Co ciekawe organizmy posiadające kompletny zestaw mitochondrialnych tRNA są ograniczone do eukariotycznej supergrupy Opisthokonta. Jednak również w tej grupie zdarzają się pojedyncze przypadki gatunków, które utraciły geny mitochondrialnego tRNA [Schneider, 2011].

Analizy bioinformatyczne zakładają, że dla dowolnego tRNA kodowanego w mitochondriach nie jest importowany jego cytozolowy odpowiednik, który jest w stanie odczytać te same kodony. Nie dla wszystkich przypadków założenie to jest jednak prawdziwe. Badania eksperymentalne wykazały, że pomimo posiadania pełnego zestawu genów kodujących tRNA mitochondria drożdży oraz komórek ludzkich zdolne są do importu cytoplazmatycznych tRNA [Tarassov 1992, Rubio, 2008].

Badania pokazują także, że nie tylko tRNA mogą być importowane do mitochondriów. Najlepiej udokumentowanym przypadkiem jest import 5S rRNA do mitochondriów ludzkich. Istnieją również badania wskazujące na możliwość importu podjednostek RNazy P oraz RNazy MRP [Chang, 1987; Puranam, 2001; Schneider, 2011].

1.3.1. Import tRNA w organizmach roślinnych

Mitochondria komórek roślinnych są zdolne do importu cytozolowych tRNA. Jednakże liczba oraz sekwencja importowanych tRNA jest różna nawet w blisko ze sobą spokrewnionych gatunkach [Glover, 2000; Vinogradova; 2009].

Badania *in vivo* na roślinach transgenicznym zidentyfikowały mutacje w tRNA (70U>C), które uniemożliwiają jego import oraz aminoacylację. Uzyskane wyniki sugerują także, że do prawidłowego import tRNA do mitochondriów niezbędne jest białko aaRS (ang. *aminoacyl-tRNA synthetase*) [Dietrich, 1996; Lund, 1998].

W przypadku niektórych roślin zaobserwowano zależność pomiędzy importem, a potrzebami mitochondriów. U *Chlamydomona reinhardtii* zaobserwowano korelację pomiędzy ilością importowanych tRNA, a ich wykorzystaniem w procesie translacji. Uzyskane wyniki wskazują, że mechanizm za pomocą, którego regulowany jest import tRNA musi podlegać kontroli sprzężenia zwrotnego z mitochondriów [Vinogradova, 2009].

Prowadzono również badania nad możliwością importu transkrybowanych tRNA do izolowanych mitochondriów ziemniaka. Proces ten był zależny od ATP oraz potencjału błony mitochondrialnej. Uzyskane wyniki wykazały, że import *in vitro* nie wymagał czynników cytozolowych i może być regulowany dostępnością substratowego tRNA. Jednakże sytuacja ta tylko w niewielkim stopniu odpowiada warunkom *in vivo* [Delage, 2003].

Import tRNA w warunkach *in vitro* można zahamować poprzez dodawanie monospecyficznych antysurowic skierowanych przeciwko zależnemu od napięcia kanałowi anionowemu (ang. *voltage-dependent anion channel*, VDAC) [Salinas, 2006]. Ten sam efekt można uzyskać poprzez zastosowanie przeciwciał przeciwko dwóm składnikom kompleksu TOM: Tom20 oraz Tom40 [Salinas, 2006]. Dalsze badania wykazały, że roślinny VDAC bezpośrednio wiąże tRNA. Fakt, że przeciwciała anti-Tom20 i anti-Tom40 hamuje wiązanie tRNA z mitochondriami sugeruje, że te dwa białka mogą działać jako receptory importu podczas gdy VDAC może tworzyć kanał translokacji. Dodatkowo wykazano, że dodanie syntetycznej presekwencji zakłóca import białek, ale w żaden sposób nie wpływa na import tRNA. Uzyskane wyniki mogą zatem wskazywać na niewielkie nakładanie się mechanizmów importu białek i tRNA, jednakże nie są one współimportowane [Kapushoc, 2000; Tan, 2002; Salinas, 2006].

1.3.2. Import tRNA w organizmach ssaków

Badania wykazały, że niewielka część cytozolowego 5S rRNA jest importowana do mitochondriów ssaków [Yoshionari 1994; Magalhaes, 1998]. Region 5S potrzebny do kierowania do mitochondriów wydaje się być ograniczony do dwóch odrębnych regionów strukturalnych tej cząsteczki [Smirnov, 2008]. W testach *in vitro* wykazano, że import 5S wymaga hydrolizy ATP, potencjału błonowego oraz cytozolowej frakcji białkowej. Zablockowanie mitochondrialnego kanału importu białek hamowało import 5S w warunkach *in vitro* co może sugerować, że do importu wymagana jest funkcjonalna maszyna importu białek. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na to, iż tRNA może być współimportowane z mitochondrialnymi białkami [Tarassov, 1995; Entelis, 2001].

5S rRNA jest uniwersalnym składnikiem rybosomów bakteryjnych, eukariotycznych i plastydowych, ale w mitochondriach jego gen znaleziono tylko w roślinach i kilku protistach [Gray, 1999; O'Brien, 2009]. U *S. cerevisiae* cytozolowy 5S rRNA nie jest ani kodowany w genomie mitochondrialnym, ani importowany z cytozolu, co ilustruje, że rybosomy mitochondrialne mogą w zasadzie funkcjonować bez 5S rRNA. Mimo że importowany 5S rRNA jest jednym z najliczniejszych RNA u ssaków, nie wykazano jeszcze, że jest fizycznie

związany z rybosomami mitochondrialnymi, w związku z tym jego znaczenie funkcjonalne pozostaje niejasne [Schneider, 2011].

Mitochondria ssaków, z wyjątkiem kilku torbaczy, kodują kompletny zestaw genów mitochondrialnego tRNA [Dörner, 2001]. Jednak ostatnie eksperymenty wykazały, że u ludzi cytozolowe tRNA^{Gln} są częściowo obecne w izolowanych frakcjach mitochondrialnych [Rubio, 2008]. Co więcej, transkrybowany *in vitro* tRNA^{Gln} może być importowany do izolowanych mitochondriów w procesie, który wymaga ATP, ale jest niezależny od czynników cytozolowych i potencjału błonowego. Tak więc możliwe jest, że mitochondria ssaków mają dwa odrębne mechanizmy importu tRNA. Jeden wymaga czynników cytozolowych i nienaruszonego systemu importu białka, przypominającego import tRNA^{Lys} (CUU) u drożdży, a drugi jest niezależny od czynników rozpuszczalnych, podobnie jak w przypadku importu tRNAs^{Gln} do mitochondriów drożdży [Schneider, 2011].

1.3.3. Import tRNA jako potencjalna terapia chorób mitochondrialnych

Duża część chorób mitochondrialnych związana jest mutacjami w genach kodujących mitochondrialne tRNA [Howell, 1999]. Dysfunkcje mitochondrialnie spowodowane tymi chorobami często zagrażają życiu, a leczenie jest czysto objawowe. Import tRNA do mitochondriów oferuje nową koncepcję terapii. Jeśli możliwe byłoby zaindukowanie importu cytozolowego tRNA zdolnego do zastąpienia wadliwego mitochondrialnego tRNA dysfunkcja mitochondrialna spowodowana upośledzeniem translacji mogłaby zostać złagodzona. Doniesienia literaturowe wskazują, że terapie te są skuteczne zarówno w warunkach *in vitro* jak i w liniach komórkowych [Kolesnikova, 2000; Kolesnikova, 2004; Mahata, 2006].

Indukcja importu mitochondrialnego tRNA w systemach, które w warunkach fizjologicznych nie importują tRNA może wydawać się zaskakująca, ale jest zgodna z postulowanym istnieniem wszechobecnego, jednakże dotychczas słabo poznanego systemu importu transportowych RNA. Dalszy postęp w tej dziedzinie wymaga dokładnego scharakteryzowania mechanizmów zaangażowanych w proces importu tRNA w różnych organizmach eukariotycznych [Schneider, 2011].

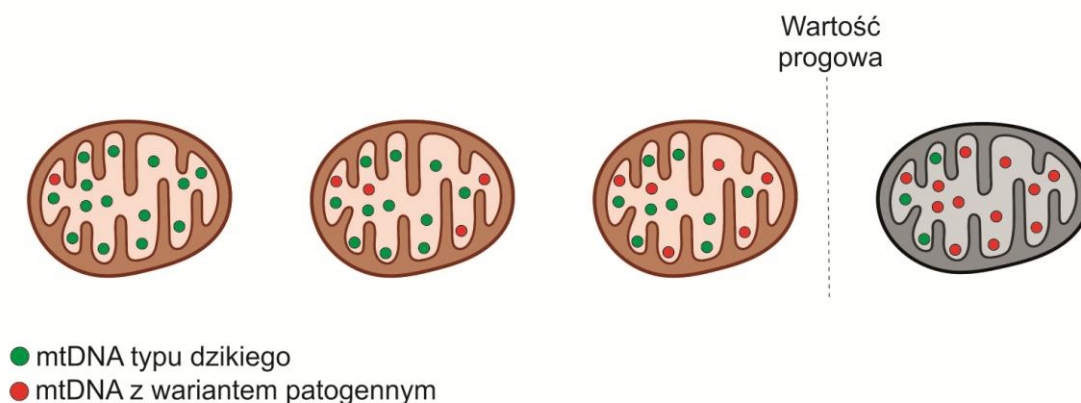
1.4. Choroby mitochondrialne

Choroby mitochondrialne należą do chorób o podłożu genetycznym i spowodowane są mutacjami zarówno w genomowym jak i mitochondrialnym DNA. Do tej pory opisano ponad 600 mutacji mtDNA, do których możemy zaliczyć delecje, rearanżacje oraz mutacje punktowe w genach kodujących rRNA, tRNA lub białka kompleksów oddechowych. Mutacje jądrowe występują w genach kodujących podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego jak również czynniki niezbędne do ich prawidłowego składania w błonie. Efektem tych mutacji jest nieprawidłowe działanie mitochondriów obejmujące również system OXPHOS, co leży u podstaw ponad 150 zdefiniowanych chorób genetycznych [Tuppen, 2010; Stewart, 2015].

Około 15% przypadków chorób mitochondrialnych spowodowanych jest mutacjami w mtDNA, co spowodowane jest jego narażeniem na bezpośredni kontakt z reaktywnymi formami tlenu (ROS) oraz niską wydajnością mitochondrialnego systemu naprawy (Ryc. 5) [Wallace, 2010].

Pomimo wielu charakterystycznych objawów defektów funkcji mitochondriów diagnoza tych chorób jest trudna. Powodem jest duża różnorodność i nasilenie zależne od rodzaju mutacji. Występowanie mtDNA w tysiącach kopii na komórkę, w stanie homoplazmatycznym (wszystkie kopie o jednakowej sekwencji) jak i heteroplazmatycznym (kopie różniące się pomiędzy sobą, powstałe na skutek mutacji występują w różnych proporcjach) oraz dziedziczenie po linii matki są jedną z przyczyn różnorodności fenotypowej [Stewart, 2005]. Ze względu na to, że prawie wszystkie patogenne mutacje mitochondrialnego DNA są funkcjonalnie recesywne, krytyczny stopień heteroplazmii jest przeważnie wysoki i wynosi minimum 70% (Ryc. 6). Po przekroczeniu tego progu pojawiają się charakterystyczne objawy towarzyszące chorobom mitochondrialnym do których możemy zaliczyć m. in.:

- Wady słuchu i wzroku
- Ataki epilepsji
- Osłabienie mięśni szkieletowych
- Encefalopatię
- Choroby serca i układu mięśniowo nerwowego
- Ataksje
- Zaburzenia metaboliczne
- Zaburzenia funkcji wątroby, nerek oraz gruczołów dokrewnych
- Cukrzyca



Ryc. 6. Wartość progowa heteroplazmii mutacji mtDNA.

Komórki mogą tolerować nawet wysoki poziom szkodliwego wariantu mtDNA zanim jego obecność doprowadzi do defektu funkcjonowania systemu fosforylacji oksydacyjnej. Wartość progowa jest różna dla różnych mutacji i zależy także od rodzaju tkanki (na podstawie Stewart i Chinnery, 2015).

Pojawienie się objawów oraz stopień ich nasilenia jest zależny od zapotrzebowania energetycznego danej tkanki lub narządu i w związku z tym w pierwszej kolejności pojawiają się w tkankach i narządach o dużej intensywności metabolizmu tlenowego takich jak mięśnie i układ nerwowy. Przebieg choroby jest zróżnicowany nawet w przypadku chorób spowodowanych tą samą mutacją. Przyczyna takiego stanu jest zależność nasilenia objawów od stopnia heteroplazmii, a także innych czynników genetycznych [Stewart, 2005].

Zespoły badawcze w różnych częściach świata prowadzą badania epidemiologiczne chorób mitochondrialnych. Uzyskane przez nie wyniki wykazały, że pełnoobjawowe choroby mitochondrialne spowodowane mutacjami w mtDNA występują ze średnią częstością 1/5000. O wiele częściej występują patogenne mutacje mtDNA nie dające zmian fenotypowych (niski stopień heteroplazmii) jest to jeden przypadek na kilkaset przebadanych osób [Skladal, 2003].

W ostatnich latach obserwuje się znaczny rozwój metod diagnostycznych chorób mitochondrialnych. Do najważniejszych z nich zaliczamy wysokoprzepustowe techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS, ang. *next generation sequencing*), zarówno sekwencjonowania panelowego jak i eksomowego (WES, ang. *whole exome sequencing*). Przez wzgląd na rosnącą liczbę wykrywanych mutacji mitochondrialnych i malejące koszty stosowania tych technik są one coraz powszechniejsze i dają bardzo dobre wyniki diagnostyczne. Skuteczność tych metod sięga 60% w przypadku bardzo precyzyjnie dobranych i scharakteryzowanych klinicznie grup pacjentów. Ogromne znaczenie mają też

coraz bardziej rozbudowane bazy danych pacjentów umożliwiające porównanie mutacji i objawów klinicznych, co przyspiesza badania i ułatwia postawienie prawidłowej diagnozy [Chinnery, 2015; Gorman, 2016].

1.4.1. MELAS

Jedną z najczęściej występujących chorób mitochondrialnych jest zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów). Dotychczas opisano około 30 różnych patogennych mutacji o obszarze mtDNA związanych z tą chorobą [Finsterer 2011]. Mutacje te występują w genach kodujących cząsteczki tRNA i niektóre podjednostki łańcucha oddechowego [Finsterer 2011].

Najczęściej występującą mutacją jest mutacja punktowa 3243A>G w genie mitochondrialnym kodującym tRNA^{Leu}, której obecność stwierdza się w około 80% zdiagnozowanych przypadków. Mutacja ta jest jedną z najczęściej występujących mutacji w obrębie genomu mitochondrialnego [Ayman 2015]. Z dużą częstotliwością pojawiają się również mutacje 3271T>C (tRNA^{Leu}) oraz 13513G>A w obrębie mitochondrialnego genu ND5.

Zespół MELAS występuje na świecie z różną częstością. W Europie odnotowano około 16, a w Australii 236 przypadków na 100000 osób.

Najczęściej objawy związane z zespołem MELAS pojawiają się pomiędzy 2 a 10 rokiem życia i obejmują:

- Toniczno – kloniczne napady padaczki
- Stany zagubienia
- Nawracające bóle głowy i wymioty
- Demencję
- Psychozę
- Utratę słuchu
- Karłowatość
- Polineuropatię

1.4.2. LHON

Dziedziczny zespół Lebera (LHON) charakteryzuje się zanikiem nerwów wzrokowych. Pierwsze objawy pojawiają się między 18a 30 rokiem życia. W niektórych przypadkach stwierdzono dodatkowo występowanie zaburzeń neurologicznych obejmujących drżenie, zburzenia motoryczne, obwodową neuropatię czy encefalopatie [Man, 2002].

W literaturze opisano około 60 mutacji punktowych w genach kodujących podjednostki kompleksów I, III, IV i syntazy ATP, które są związane z tą jednostką chorobową. Do najczęściej występujących zmian zaliczmy mutacje punktowe w genach kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego: 11778G>A (dominująca w populacji kaukaskiej i azjatyckiej), 3460G>A oraz 14484T>C (głównie populacja kanadyjska pochodzenia francuskiego). Częstość występowania zespołu LHON w Europie wynosi od 2 w Finlandii do 3,22 w Anglii przypadków na 100000 osób [Koilkonda, 2011].

U większości pacjentów z zespołem LHON stwierdza się bardzo wysoki stopień wkładu tych mutacji (homoplazmia). Tylko u około 10% kobiet i 50% mężczyzn obserwuje się objawy choroby co może wskazywać na istnienie innych czynników determinujących jej przebieg [Man, 2002; Koilkonda, 2011].

Badania wykazały, że zarówno przynależność pacjenta do określonej haplogrupy mtDNA (u człowieka wyróżnia się ponad 27 haplogrup) jak i działanie środowiska mają wpływ na prawdopodobieństwo wystąpienia i nasilenia objawów tej jednostki chorobowej [Koilkonda, 2011].

1.4.3. MERRF

Do równie często występującej jednostki chorobowej zaliczany zespół MERRF (padaczka miokloniczna z czerwonymi poszarpanymi włóknami mięśniowymi), w którym oprócz ataków epilepsji towarzyszy karłowatość, miopatia, ataksja mózdkowa, utrata słuchu, demencja i polineuropatia. Pierwsze objawy choroby pojawiają się w wieku dziecięcym [Remes, 2003; Catteruccia, 2015].

Dotychczas opisano 7 mutacji punktowych w obszarze mtDNA wywołujących zespół MERRF. Do najczęstszej mutacji zaliczamy 8344A>G w genie kodującym tRNA^{Lys}, która odpowiada za 80% przypadków tej choroby. Częstość występowania tej mutacji w Europie wynosi około 0,25 przypadków na 100000 osób [Remes, 2003; Catteruccia, 2015].

1.4.4. Zespół Leigh'a

Jedną z najcięższych chorób mitochondrialnych wieku dziecięcego jest zespół Leigh'a (ang. *Leigh syndrome*, LS). Choroba ta dotyka 1 na 36000 żywo urodzonych noworodków i powoduje kwasicę mleczanową oraz symetryczne zmiany w ośrodkowym układzie nerwowym głównie w jadrach podstawnych i pniu mózgu. Zmiany te prowadzą do niepełnosprawności intelektualnej i osłabienia mięśni [Darim, 2001; Lee, 2020]. Dzieci

dotknięte tą chorobą nie dożywają trzeciego roku życia, a główną przyczyną zgonu jest najczęściej niewydolność oddechowa [Baertling, 2014].

Dotychczas opisano ponad 75 mutacji w genach jądrowego oraz mitochondrialnego DNA związanych z tą chorobą. Mutacje te występują najczęściej w genach kodujących kompleks I i IV łańcucha oddechowego [Inak, 2021].

Do najczęstszych objawów zaliczamy:

- Napady drgawkowe
- Hipotonię
- Kwasicę mleczanową
- Trudności ze ssaniem
- Zaburzenia połykania
- Wiotkość mięśni
- Zahamowanie rozwoju psychoruchowego

1.4.5. NARP/MILS

Mutacje punktowe w obszarze genu MT-ATP6 kodującego podjednostkę α syntazy ATP są związane z występowaniem zespołu NARP/MILS (neurogenna miopatia z ataksją i zwyrodnieniem barwnikowym siatkówki/zespół Leigh'a). Po raz pierwszy choroba ta została opisana przez Holt i wsp. [Holt, 1990]. Najczęściej jest wywoływana mutacją 8993T>G. Do najczęściej towarzyszących zespołowi NARP objawów zaliczamy:

- Zwyrodnienie barwnikowe siatkówki
- Neurogenna wiotkość mięśni proksymalnych
- Ataksja
- Napady drgawek
- Opóźnienie rozwoju
- Neuropatia czuciowa

Występowanie i nasilenie objawów zależy od stopnia heteroplazmii. Jeśli poziom mutacji jest niższy niż 60% nie obserwujemy występowania objawów choroby. Przy 60-75% heteroplazmii obserwuje się retinopatię. Pełnoobjawowy zespół NARP obserwuje się przy 75-90% mutacji. W przypadku gdy 90% mtDNA uległo mutacji pojawia się dodatkowo zespół MILS, zwany również syndromem Leigh'a, charakteryzująca się postępującą encefalopatią prowadzącą do śmierci pacjenta w wieku niemowlęcym [DiMauro, 2004; Schon, 2010].

Badania wykazały, że nasilenie objawów nie zawsze koreluje z wysokim poziomem heteroplazmii, co podobnie jak w przypadku innych chorób mitochondrialnych wskazuje na

istnienie dodatkowych czynników wpływających na przebieg tej choroby. Jednym z tych czynników jest polimorfizm mtDNA warunkujący przynależność do określonej haplogrupy [D'Aurelio, 2009].

Za zespół NARP odpowiadają również inne mutacje w genie MT-ATP6: 8993T>C, 9176T>G, 9176T>C, 9185T>C. Mutacje T>G prowadzą do zmian Leu>Arg i towarzyszą im cięższe objawy niż w przypadku mutacji T>C, które prowadzą do substytucji Leu>Pro ponieważ substytucja T>G prowadzi do większego obniżenia poziomu ATP. Prawdopodobną przyczyną takiego stanu jest zmniejszenie przepływu protonów przez kanał jonowy znajdujący się w obszarze podjednostki α i upośledzenia sprzężenia przepływu protonów z ruchem obrotowym pierścienia c [Childs, 2007; Schon, 2010]. Spadek szybkości fosforylacji ADP może być spowodowany nieprawidłowym złożeniem i niestabilnością syntazy ATP [Nijtmans, 2001; Smet, 2009]. Badania prowadzone na materiale pochodzącym od pacjentów, a także na komórkach hybrydowych uzyskanych w wyniku fuzji cytoplazm (komórek pozbawionych jądra komórkowego pochodzących od pacjenta) z określoną mutacją w obszarze genomu mitochondrialnego z komórkami pozbawionymi mitochondriów oraz wykorzystanie modelu drożdżowego wykazały istnienie jeszcze innych bioenergetycznych i biochemicznych aspektów towarzyszących zespołowi NARP [King, 1996; Kucharczyk, 2009]. Zaliczamy do nich wzmożone wytwarzanie reaktywnych form tlenu, zmiany adaptacyjne systemu antyoksydacyjnego komórki, a także zaburzenia organizacji sieci mitochondrialnych oraz zaburzenia homeostazy jonów wapnia [Thorburn, 2004].

Zespół NARP występuje rzadziej niż 0,71 przypadku na 100000 osób jednakże dostępne dane epidemiologiczne są niepełne.

1.4.6. Cukrzyca mitochondrialna

Mutacja odpowiedzialna za występowanie zespołu MELAS 3243A>G jest również przyczyną występowania dziedziczonej w linii matczynej cukrzycy współistniejącej z upośledzeniem słuchu znanej jako zespół MIDD (ang. *Maternally- i nherited diabetes and deafnes*). Mutacja ta występuje w rejonie genu kodującego mitochondrialne tRNA^{Leu}. Częstość występowania mutacji u pacjentów chorych na cukrzycę jest w dużym stopniu zależna od grupy etnicznej. Najczęściej występuje w populacji japońskiej (1,5% wszystkich odnotowanych przypadków) podczas gdy w populacji europejskiej wynosi 0,8%, a w innych grupach etnicznych jest jeszcze niższa i wynosi około 0,6% [Murphy, 2008; Finsterer, 2011].

U pacjentów będących nosicielami mutacji 3243A>G występowanie cukrzycy jest częste (około 85%). Wiek pacjentów w chwili pojawienia się objawów jest bardzo

zróznicowany (od 11 do 68 lat). Ponad 75% pacjentów, u których pojawiła się cukrzyca cierpi również na niedosłuch lub całkowitą utratę słuchu. Inne objawy towarzyszące tej jednostce chorobowej obejmują: dystrofię w obszarze plamki żółtej, nadciśnienie i otyłość typu brzuszego, udary i bóle głowy, karłowatość, atrofia kory mózgowej i mózdzku, miopatia, niewydolność serca, niewydolność nerek, zaparcia oraz zaburzenia wchłaniania. U wielu pacjentów zaobserwowano również występowanie zaburzeń psychicznych takich jak depresja czy schizofrenia [Malecki, 2006; Murphy, 2008].

Mutacja 3243A>G powoduje zaburzenia w strukturze czwartorzędowej mitochondrialnego tRNA^{Leu} i dimeryzacji cząsteczek. Prowadzi to do obniżenia aktywności I i IV kompleksu łańcucha oddechowego i deficyt energetyczny w tkankach i narządach o wysokim poziomie metabolizmu takich jak trzustka, siatkówka, mięśnie, nerki i mózg. W trzustce dochodzi do obniżenia masy komórek β i niedoboru insuliny co w konsekwencji prowadzi do pojawienia się objawów cukrzycy, podczas gdy wrażliwość komórek docelowych na insulinę pozostaje niezmienną lub ulega bardzo nieznacznemu obniżeniu [Malecki, 2006; Murphy, 2008].

Niedosłuch lub całkowita utrata słuchu spowodowana jest przez deficyt energetyczny w komórkach budujących prążek naczyniowy, które zawierają dużą ilość mitochondriów. Komórki te produkują endolimfę wypełniającą przewód ślimaka w związku z tym ich dysfunkcja może zaburzać stężenie jonów w tym roztworze, co mogłoby utrudniać powstawanie potencjału czynnościowego w komórkach słuchowych narządu Cortiego leżących na granicy dwóch środowisk o krańcowo różnym składzie elektrolitowym. Analizy preparatów histopatologicznych pacjentów z zespołem MIDD wykazała atrofię prążka naczyniowego [Murphy, 2008].

Za występowanie cukrzycy o podłożu mitochondrialnym mogą być również odpowiedzialne inne mutacje punktowe w obszarze genów kodujących mitochondrialne tRNA^{Leu} (3256C>T, 3264T>G, 3254C>G ORAZ 3271T>C), tRNA^{Lys} (8296A>G, 8344A>G i 8356T>C), tRNA^{Arg} (10438A>G), tRNA^{Ser} (12258C>A), tRNA^{Gln} (14709T>C). W literaturze opisane są również przypadki cukrzycy mitochondrialnej spowodowanej mutacjami punktowymi w obszarze genu ND1 kodującego jedną z podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego (3394T>C i 3398T>C) oraz w obszarze pętli D (14577T>C). Badania epidemiologiczne pokazują, że mutacje w obszarze genomu mitochondrialnego są odpowiedzialne za około 1% wszystkich przypadków cukrzycy [Murphy, 2008].

W przypadku cukrzycy typu drugiego, która charakteryzuje się insulinoopornością komórek mięśni, wątroby i tkanki tłuszczowej również zaobserwowano zaburzenia funkcji

mitochondriów. Zmiany te były jednak niezwiązane z obecnością mutacji w obszarze mtDNA. Nie ma więc jednoznacznej odpowiedzi na to czy zaburzenia mitochondrialne są pierwotną przyczyną sprzyjającą rozwojowi insulino oporności czy mają charakter wtórny i wynikającą ze stresu oksydacyjnego spowodowanego hiperglikemią. Przypuszcza się, że pierwotna dysfunkcja mitochondriów, która polega na obniżonej wydajności utleniania kwasów tłuszczowych, może leżeć u podstawy dyslipidemii i insulinooporności. Bez względu na to co jest przyczyną a co skutkiem wraz z rozwojem cukrzycy obserwuje się nasilenia uszkodzeń mitochondriów, co zwiększa insulinooporność tworząc samonapędzające się błędne koło. Mechanizmy te są przedmiotem intensywnych badań ze względu na ich potencjalne znaczenie w terapii cukrzycy [Murphy, 2008].

1.4.7. Terapia chorób mitochondrialnych

Na chwilę obecną nie ma skutecznych metod leczenia chorób mitochondrialnych. W praktyce klinicznej stosuje się działania mające na celu spowolnienie postępu choroby, a także poprawę komfortu życia pacjentów. W tym celu podaje się pacjentom witaminy, prowadzi fizjoterapię oraz wykorzystuje leczenie paliatywne polegające na łagodzeniu objawów poprzez interwencję farmakologiczną, chirurgiczną jak również na usuwaniu szkodliwych dla organizmu metabolitów. Ze względu na towarzyszący chorobom mitochondrialnym niedobór energetyczny podaje się pacjentom metabolity i ko-faktory, do których zaliczamy koenzym Q10 (CoQ10), L-karnitynę. Chorobom mitochondrialnym towarzyszy również większa produkcja reaktywnych form tlenu, jak również stres oksydacyjny, któremu próbuje się przeciwdziałać poprzez podawanie akceptorów elektronów takich jak witamina E, C, bursztynian oraz związków o właściwościach antyoksydacyjnych [DiMauro, 2006; Keer, 2010].

Ze względu na brak skutecznych metod leczenia chorób mitochondrialnych nieustannie poszukuje się nowych strategii terapeutycznych. Obiecującym rozwiązaniem wydaje się być terapia genowa, której podstawowym ograniczeniem jest brak możliwości stabilnej transfekcji mitochondrialnego genomu komórek ssaków. Dużym sukcesem byłoby opracowanie strategii, która pozwoliłaby na przesunięcie heteroplazmii w taki sposób by zmniejszyć liczbę cząsteczek mtDNA zawierającą chorobotwórczą mutację poniżej wartości progowej. Wśród potencjalnych strategii terapeutycznych wymienia się regulację biogenezy mitochondriów, modulację sieci mitochondrialnej i regulację homeostazy jonów wapnia. Doniesienia literaturowe wykazały skuteczność tych strategii w warunkach laboratoryjnych.

Pomimo tego żadna z nich nie znalazła dotychczas powszechnego zastosowania w praktyce klinicznej [Gueven, 2013].

Badania nad zespołem LHON wykazały pozytywne efekty działania pochodnej koenzymu Q10 o nazwie idebenon. Związek ten jest od niedawna zarejestrowanym lekiem w Unii Europejskiej. Ponadto w przypadku tej choroby trwają obecnie badania kliniczne nad wykorzystaniem terapii genowej. Pacjentom podaje się konstrukt zawierający ramkę odczytu dla genu MT-ND4 poprzedzoną sekwencją aminokwasową kierującą do mitochondriów. Jako nośnik wykorzystano technologię adenowirusów (ang. *adeno-associated virus*, AAV) [Yu, 2012; Gueven, 2013].

Portal Mitochondrial Disease News (<https://mitochondrialdiseaseneeds.com>) zajmujący się chorobami mitochondrialnymi regularnie informuje o nowych próbach klinicznych głównie I fazy. W drugiej fazie badań klinicznych znajduje się obecnie związek niskocząsteczkowy KH176, który jest modyfikacją troloksu będący rozpuszczalną w wodzie pochodną witaminy E. Prowadzone nad tym związkiem badania pokazują jak wiele trudności spotyka się w trakcie prac nad terapią dla tak złożonych chorób. Do badania zakwalifikowano 18 pacjentów z jedną z najczęściej występujących mutacji mtDNA 3243A>G. Mutacja ta jest odpowiedzialna za ciężką postać zespołu MELAS jak również miopatię mitochondrialną oraz cukrzycę. Badania na modelach zwierzęcych wykazały, że KH176 stabilizuje chód. W badaniach klinicznych trudno było zaobserwować statystycznie istotne różnice. U 16 z 18 pacjentów nie zgłaszano problemów z niestabilnością chodu, co więcej nie odnotowano żadnego objawu, który był by obecny u wszystkich badanych. Najważniejszym wnioskiem z prowadzonych badań jest to, że KH176 jest lekiem bezpiecznym [Gueven, 2013; Janssen, 2018].

Dużym utrudnieniem w badaniach nad opracowaniem skutecznych strategii terapeutycznych jest zbyt mała liczba pacjentów z daną jednostką chorobową. Dobrym przykładem są tu zaburzenia puli nukleotydów. Niedobór któregoś z deoksynukleotydów w mitochondriach prowadzi do zaburzenia replikacji mtDNA, co w konsekwencji prowadzi do znacznego spadku liczby kopii i rozwoju zwykle ciężkiej miopatii lub encefalopatii. Jednym z przykładów takiej choroby jest miopatia wywołana mutacją w genie TK2 kodującym kinazę tymidynową. Obecnie znanych jest około 100 pacjentów z mutacjami w tym genie. Tylko nieliczni z nich są leczeni nukleozydami [Gueven, 2013; Janssen, 2018].

W przypadku encefalomiopatii powodowanej mutacją genu RRM2B, który koduje podjednostkę reduktazy rybonukleotydowej opisano jedynie 15 pacjentów. Pomimo, iż terapia nukleozydami mogłaby się okazać skuteczna także w ich przypadku, ze względu na brak

wcześniejszych badań na zwierzętach i właśnie bardzo małą grupę, pacjentom z mutacjami RRM2B nukleozydów się nie podaje [Janssen, 2018].

Spore nadzieje dla pacjentów z mutacjami mitochondrialnymi niesie terapia polegająca na przeniesieniu przedjądrzy lub wrzeciona kariokinetycznego do zygoty pozbawionej przedjądrzy lub oocytu pozbawionego wrzeciona kariokinetycznego pochodzącego od zdrowej dawczyni. Procedura ta przeprowadzana jest pozaustrojowo. W pierwszym przypadku już po zapłodnieniu, w drugim zapłodnienie następuje po transferze wrzeciona. Metoda ta uniemożliwia przekazanie dziecku przez kobietę mtDNA z patogennym wariantem gdyż cytoplazma, a wraz z nią mitochondria i mitochondrialny DNA pochodzi od zdrowej dawczyni. Metoda ta wywołuje jednak wiele kontrowersji na całym świecie. Procedura ta znana jako *mitochondrial replacement* jest dozwolona jedynie w Wielkiej Brytanii, gdzie uzyskała zgodę Human Fertilisation and Embryology Authority [Watts, 2012; Zhang, 2017].

1.5. Metody manipulacji mitochondrialnym DNA

1.5.1. Transfer genomu jądrowego

W celu zablokowania dziedziczenia zmutowanego mitochondrialnego DNA u kobiet, których rodziny zagrożone są chorobami opracowywane są procedury zastępowania mitochondriów. Metody te łączą przeniesienie nDNA w różnych formach z komórki jajowej zawierającej zmutowane matczyne mtDNA do oocyta dawcy lub komórki jajowej z mtDNA typu dzikiego. Techniki te obejmują przeniesienie nienaruszonego jądra, przedjądrza lub kompleksu mejotycznego wrzeciono-chromosom [Craven, 2010; Wnag, 2014; Ma, 2015]. Metoda ta została z powodzeniem przetestowana na myszach oraz makakach Rhesus jednak jej zastosowanie w przypadku ludzi może prowadzić do wielu niepożądanych efektów związanych z zastosowanymi odczynnikami oraz metodami izolacji i transferu nDNA [Wang, 2014; Wolf, 2014]. Obecnie techniki te wydają się być odległe i nie są przydatne w komórkach somatycznych jak również u osób z chorobami mitochondrialnymi [Ma, 2015].

Pomimo potencjalnego niedopasowania nDNA-mtDNA w ludzkich liniach komórkowych proces oddychania komórkowego wydaje się nienaruszony. Jednakże konsekwencje parowania genomów jądrowych i mitochondrialnych z różnych źródeł pozostają nieznane. Ponadto nadal pozostaje niejasne czy może to mieć wpływ na osoby urodzone z niedopasowaniem nDNA-mtDNA [Hamilton, 2015]. W przypadku krzyżówek wsobnych myszy z nDNA typu dzikiego C57BL/6J i mtDNA typu dzikiego 129S6 lub NZB

obserwuje się obniżenie aktywności, spożycia pokarmu, reakcji na stres oraz zaburzenia w procesie oddychania w porównaniu z myszami kontrolnymi Sharpley, 2012].

Metody te mogą stanowić również potencjalne wyzwanie etyczne gdyż materiał genetyczny różnych osób jest łączony w celu wygenerowania embrionów. W 2015 roku Brytyjska Izba Gmin zatwierdziła stosowanie metod terapii genowej opartej na IVF w leczeniu chorób mitochondrialnych. Decyzja ta wywołała debatę nad tożsamością jednostki i rozpowszechnianiem mtDNA dawcy w kolejnych pokoleniach [Vogel,2014; Herbert, 2015; Richardson, 2015].

1.5.2. Redukcja heteroplazmii poprzez „wąskie gardło”

Zmiana stosunku heteroplazmii w kierunku mtDNA typu dzikiego lub zmutowanego następuje przez zmniejszenie zawartości mtDNA spowodowane przez tzw. „genetyczne wąskie gardło” (ang. *genetic bottleneck*) podczas wczesnego różnicowania embrionalnego [Brown, 2001; Taylor, 2005]. Podobna redukcja „wąskiego gardła” może również wystąpić podczas przeprogramowania heteroplazmatycznych komórek somatycznych do indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (ang. *Induced pluripotent stem cell*, iPSC), co skutkuje powstaniem iPSC o różnych proporcjach mtDNA typu dzikiego do zmutowanego [Fujikura, 2012; Teslaa, 2015]. Nie ma pewności czy wszystkie pierwotne typy komórek heteroplazmatycznych i wszystkie mutacje przechodzą przez wąskie gardło podczas programowania w celu dostarczenia wzbogaconych lub homoplazmatycznych zmutowanych iPSC do modelowania choroby lub badań podstawowych. Interesujące jest to, że niedawne badania wykazały różne proporcje mtDNA typu dzikiego w porównaniu ze zmutowanym mtDNA w pojedynczych fibroblastach w populacji przed programowaniem, co sugeruje wybór, potencjalnego alternatywnego mechanizmu generowania iPSC o podwyższonych stosunkach mtDNA typu dzikiego lub zmutowanego. Wynik ten może wskazywać, że segregacja zmutowanych mtDNA może zachodzić szerzej w komórkach innych niż komórki zarodkowe. Dane te mogą stanowić potencjalną alternatywną strategię dla zarodków generowanych przez transfer genomu jądrowego, polegający na przeprogramowaniu komórek somatycznych od samicy w celu uzyskania iPSC pozbawionych zmutowanego mtDNA, a następnie różnicowaniu w funkcjonalne oocyty (jeśli to możliwe) dla różnych form transferu nDNA [Ma, 2015]. Teoretycznie opracowanie takiego podejścia wymagałoby materiału genetycznego tylko od dwóch osobników, a homoplazmatyczne iPSC typu dzikiego mogłyby znaleźć zastosowanie w medycynie regeneracyjnej [Park, 2009; Hayashi, 2013].

1.5.3. Nukleazy DNA i enzymy zdolne do edycji mtDNA

Wprowadzenie do komórki zmodyfikowanych konstruktów kodujących enzymy restrykcyjne skierowane do mitochondriów przyczyniło się do selektywnej eliminacji zmutowanych sekwencji mtDNA w komórkach heteroplazmatycznych i zmiany stosunków mtDNA. W liniach komórek hybrydowych gryzoni i ludzkich (cybrydy) enzymy PstI i SmaI przesunęły stosunki heteroplazmi mtDNA typu zmutowanego do dzikiego przyczyniając się tym samym do wzrostu oddychania komórkowego [Srivastava, 2001; Tanaka, 2002].

Mysie hepatocyty transfekowane ukierunkowanym na mitochondria enzymem ApaLI wykazywały szybkie przejście od heteroplazmi do homoplazmi. Proces ten trwał zaledwie 6 godzin [Bayona-Bafaluy, 2005].

Wprowadzony do komórek mięśni piszczelowych chomików enzym EcoRI obniżał aktywność kodowanej przez genom mitochondrialny oksydazy cytochromu c, nie powodując przy tym obniżanie ekspresji podobnych jądrowych pseudogenów [Tanaka, 2002].

Dużym sukcesem okazało się wykorzystanie technologii adenowirusów (ang. *adenovirus*, AAV), jako nośników enzymów restrykcyjnych. Transfekcja myszy NZB 3 BALB/c endonukleazami ukierunkowanymi na mitochondria zmieniła stosunek heteroplazmii mtDNA w obrębie całego organizmu [Bayona-Bafaluy, 2005].

Pomimo sukcesu wykorzystania endonukleaz ukierunkowanych na mitochondria pojawia się szereg problemów z jej szerszym zastosowaniem. Trudno jest zidentyfikować miejsca docelowe specyficznie występujące tylko w mtDNA typu dzikiego lub zmutowanego w komórce. Ponadto istnieje ograniczona liczba endonukleaz o znanych miejscach hydrolizy. Jak wykazały badania spośród 200 różnych mutacji mtDNA tylko dwie mają miejsca restrykcyjne, które może być selektywnie rozpoznawane przez istniejącą endonukleazę [Reddy, 2015].

W celu wyeliminowania ograniczeń enzymów restrykcyjnych podjęto próby łączenia sekwencji niespecyficznych nukleaz z rozpoznawanymi przez DNA domenami białek. Zabieg ten miał na celu zwiększenie zakresu rozpoznawania i hydrolizy sekwencji nukleotydowych w mitochondrialnym DNA. Przecięcie mtDNA powoduje pęknięcie dwuniciowego DNA co prowadzi do jego degradacji [Bayona-Bafaluy, 2005].

Jak wykazały badania niektóre białka palca cynkowego (ang. *zinc-finger proteins*) mogą się wiązać z trójnukleotydami zawierającymi kodon. Moduły palca cynkowego wiążące DNA zostały opracowane dla wszystkich 64 kombinacji kodonów. Dodanie ludzkiej metylotransferazy DNMT3a do specyficznego konstruktów palca cynkowego spowodowało metylację mtDNA we wcześniej określonym nukleotydzie [Minczuk, 2006].

Łącząc ze sobą specyficzne moduły palca cynkowego, sekwencję ukierunkowaną na mitochondria oraz nukleazę, uzyskano konstrukt ekspresyjny kodujący mitochondrialne nukleazy palca cynkowego (ang. *mitochondrial zinc-finger nucleases*, mitoZFN), które są zdolne do rozpoznawania i hydrolizy określonych sekwencji mtDNA [Minczuk, 2006; Gaj, 2013]. mitoZFN, zawierające niespecyficzną nukleazę FokI, zostały zaprojektowane tak, aby rozpoznawały sekwencję 12 par zasad i hydrolizowały zmutowane mtDNA, które różni się od mtDNA typu dzikiego tylko jedną parą zasad [Minczuk, 2008]. W ludzkich liniach komórkowych wprowadzenie mitoZFN skierowanych w mutację mtDNA 8993T>G, związaną z zespołem Leigh oraz zespołem NARP, skutkowało redukcją zmutowanych mtDNA i przejściem w kierunku mtDNA typu dzikiego [Gammage, 2014].

Nukleazy efektorowe podobne do aktywatorów transkrypcji ukierunkowanych na mitochondria (ang. *mitochondria-targeted transcription activator-like effector nucleases*, mitoTALENs) dostarczają innego rodzaju enzymy hydrolizujące sekwencje docelowe. System ten oparty jest na białkach efektorowych TAL zawierających 34 powtórzenia aminokwasowe, pierwotnie odkryte w proteobakteriach z gatunku *Xanthomonas*. Nukleazy TALE mogą rozpoznawać pojedyncze nukleotydy, co umożliwia rozpoznanie, wiązanie i cięcie prawie każdej sekwencji, o ile zaczyna się ona od tymidyny. Metoda mitoTALEN z powodzeniem została wykorzystana w mysich komórkach NZB 3 BALB/c eliminując mtDNA ze specyficznymi mutacjami punktowymi lub dużymi delecjami w komórkach pochodzących od pacjentów [Bacman, 2013; Reddy, 2015; Hashimoto, 2015].

Pomimo dużych nadziei związanych z wykorzystaniem metod mitoZFN oraz mitoTALEN metody te posiadają również swoje ograniczenia. W przypadku mitoZFN moduł palca cynkowego nie został zidentyfikowany dla wszystkich istniejących kodonów, co wyklucza wykorzystanie tej metody dla wybranych sekwencji. Takiego ograniczenia nie ma dla metody mitoTALEN, ponieważ każda nukleaza TALE rozpoznaje określony nukleotyd. Jednakże zarówno ZFN jak i TALEN są trudne do wygenerowania ze względu na znaczną modyfikację białek wymaganą do rozpoznawania sekwencji określonych sekwencji DNA. Co więcej dostarczanie dużych ilości prawidłowo skonstruowanych mitoZFN lub mitoTALEN do mitochondriów pozostaje dużym wyzwaniem [Moraes, 2014]. W przypadku mitoTALEN wektor, kodujący wszystkie niezbędne elementy, może mieć wielkość 5000 par zasad. Wielkość ta przekracza granicę, którą AAV są zdolne wprowadzić do infekowanych komórek [Hashimoto, 2015].

Nadzieją na rozwiązanie opisanych problemów wydaje się być stosunkowo nowa metoda edycji genomu CRISPR-Cas9. Metoda ta opiera się tylko na jednym białku (nukleazie

Cas9) i jednym kierującym RNA do selektywnego cięcia sekwencji DNA. Nie jest jednak do końca jasne czy CRISPR-Cas9 może ciąć lub edytować mtDNA, ponieważ import kierującego RNA do mitochondriów jest trudny [Doudna, 2014; Hashimoto, 2015 Liang, 2015].

W przypadku wszystkich opisanych powyżej metod pojawia się pytanie czy wprowadzenie do komórki tego typu narzędzi nie doprowadzi do obniżenia zawartości mtDNA poniżej progu funkcjonalnego, co w konsekwencji może doprowadzić do pojawienia się dodatkowych niepożądanych efektów [Moraes, 2014].

Alternatywą dla ekspresji genów mitochondrialnych w jądrze komórkowym jest ich bezpośrednie dostarczanie do mitochondriów. Duże nadzieje wiąże się w tym przypadku z technologią opartą o AAV. Ze względu na ich zdolność do transdukcji wielu różnych komórek oraz brak patogenności u ludzi, wektory AAV są bardzo przydatne w jądrowych terapiach genowych [Vasileva, 2005]. Włączenie do zewnętrznego białka kapsydu AAV sekwencji kierującej do mitochondriów umożliwiło wprowadzenie do mitochondriów ciała szklistego oka myszy sekwencji zmutowanego genu podjednostki 4 dehydrogenazy NADH (ang. NADH dehydrogenase subunit 4, ND4) [Yu, 2012]. Zabieg ten doprowadził do pojawienia się w myszach typu dzikiego objawów fenotypowych podobnych do tych obserwowanych w zespole LHON. Z kolei wprowadzenie do AAV prawidłowej kopii genu ND4 i podanie go myszom z objawami chorobowymi doprowadził do częściowego zaniku objawów chorobowych [Yu, 2012].

Wektory AAV mogą pomieścić sekwencję DNA o wielkości do 5 tysięcy par zasad, umożliwiając dostarczenie wszystkich 37 genów mitochondrialnych do komórek ludzkich. Mechanizm wnikania DNA, przenoszonego przez AAV, do mitochondriów nie został dotąd poznany. Nie ma również pewności czy dostarczanie AAV nie doprowadzi do zakłócenia funkcji mitochondriów niezależnych od łańcucha transportu elektronów (ang. electron transport chain, ETC) [Yu, 2012]. Ponadto ze względu na niski poziom procesów naprawczych w mitochondriach sekwencje dostarczane przez AAV nie integrują się do mtDNA i pozostają episomalne przez bliżej nieokreślony czas [Alexeyev, 2013].

1.5.4. Import struktur podobnych do tRNA do mitochondriów

Roślinne tRNA^{Leu} należy do grupy tRNA, która kodowana jest w jądrze komórkowym, a następnie importowana do mitochondriów. Analizy biochemiczne wykazały również, że te same syntetazy tRNA^{Leu} są obecne zarówno w cytozolu jak i w mitochondriach [Dahan, 2013]. Dlatego też podjęto próby wykorzystania, pochodzącego z *Phaseolus vulgaris*

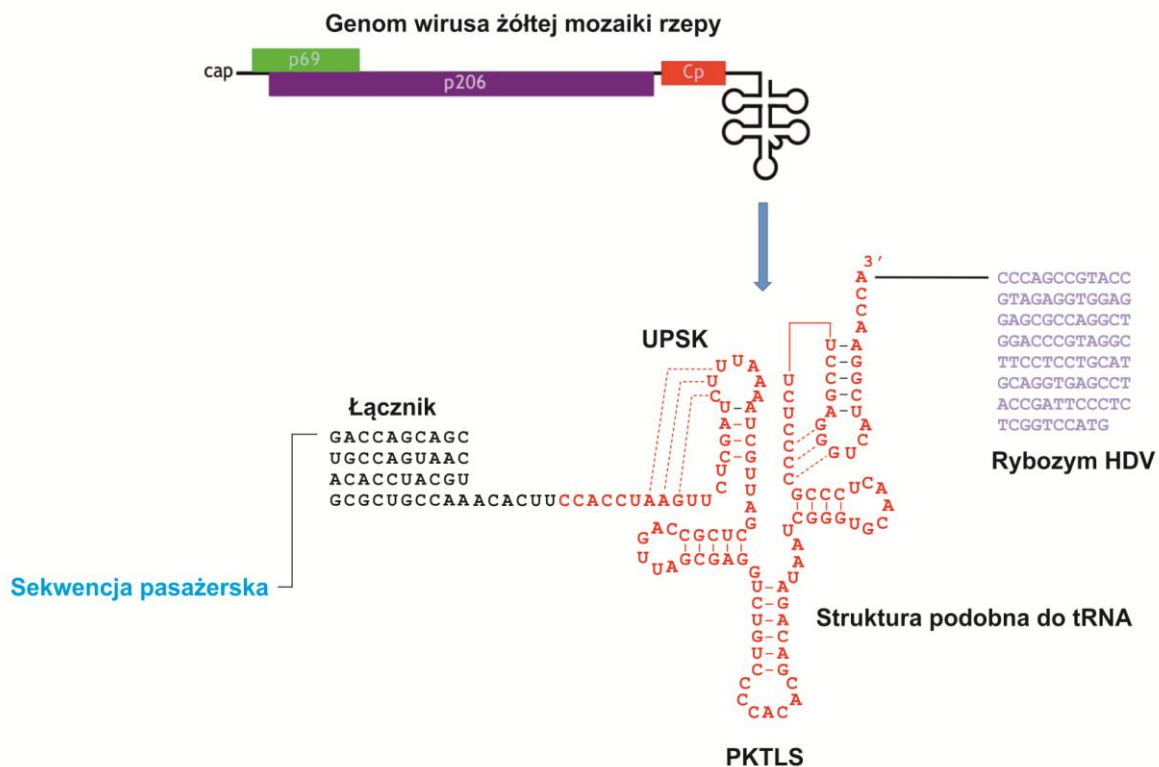
tRNA^{Leu} jako narzędzia do modyfikacji mitochondrialnego DNA. Wydłużony o 4 nukleotydy w pętli antykodonowej tRNA ulegający ekspresji z trans genu jądrowego był obserwowany w mitochondriach. Oznacza to, że tRNA nie musi być zaangażowane w proces translacji, aby mógł być importowany do mitochondriów. Strategia ta nie znalazła jednak dalszego zastosowania gdyż, wydłużanie sekwencji o kolejne nukleotydy prowadziło do zaniku stabilnej ekspresji w warunkach *in vivo* [Small, 1992].

Podjęto również próby dołączania krótkich dodatkowych sekwencji na końcu 5' tRNA. Jednakże sekwencje te były usuwane przez RNazę P, która rozpoznaje tylko strukturę tRNA i usuwa wszelkie sekwencje poprzedzające [Geiduschek, 1988].

Metody oparte o naturalny szlak transkrypcji jądrowego tRNA również nie przyniosły pozytywnych rezultatów. Transkrypcja jądrowego genu tRNA odbywa się poprzez polimerazę III i kierowana jest przez wewnętrzne promotory, a miejsce inicjacji transkrypcji znajduje się zaledwie kilka nukleotydów przed końcem 5' dojrzałej cząsteczki tRNA [Geiduschek, 1988].

Dużym sukcesem okazała się strategia oparta o wykorzystanie struktur podobnych do tRNA (ang. tRNA-like structure, TLS). Struktury te pochodzą z końca 3' genomowych RNA wirusów roślinnych i przyjmują strukturę tRNA. Ponadto ulegają aminoacylacji, ale nie są rozpoznawane przez RNazę P [Dreher, 2009; Dreher, 2010].

Szczególnym przykładem jest genomowy RNA wirusa żółtej mozaiki rzepy (ang. *turnip yellow mosaic virus*, TYMV). Genom TYMV stanowi jednoniciowy RNA o długości 6318 nukleotydów, na którego 3' końcu znajduje się 82 nukleotydowa sekwencja TLS o homologii do tRNA^{Val}. Badania wykazały, że tRNA^{Val} jest naturalnie importowane do mitochondriów wszystkich badanych dotychczas roślin wyższych, co pozwoliło przypuszczać, że będzie to również możliwe w przypadku TYMV TLS [Matsuda, 2004; Dreher, 2010].



Ryc. 7. Schemat przygotowania konstrukt PKTLS (na podstawie Val, 2011).

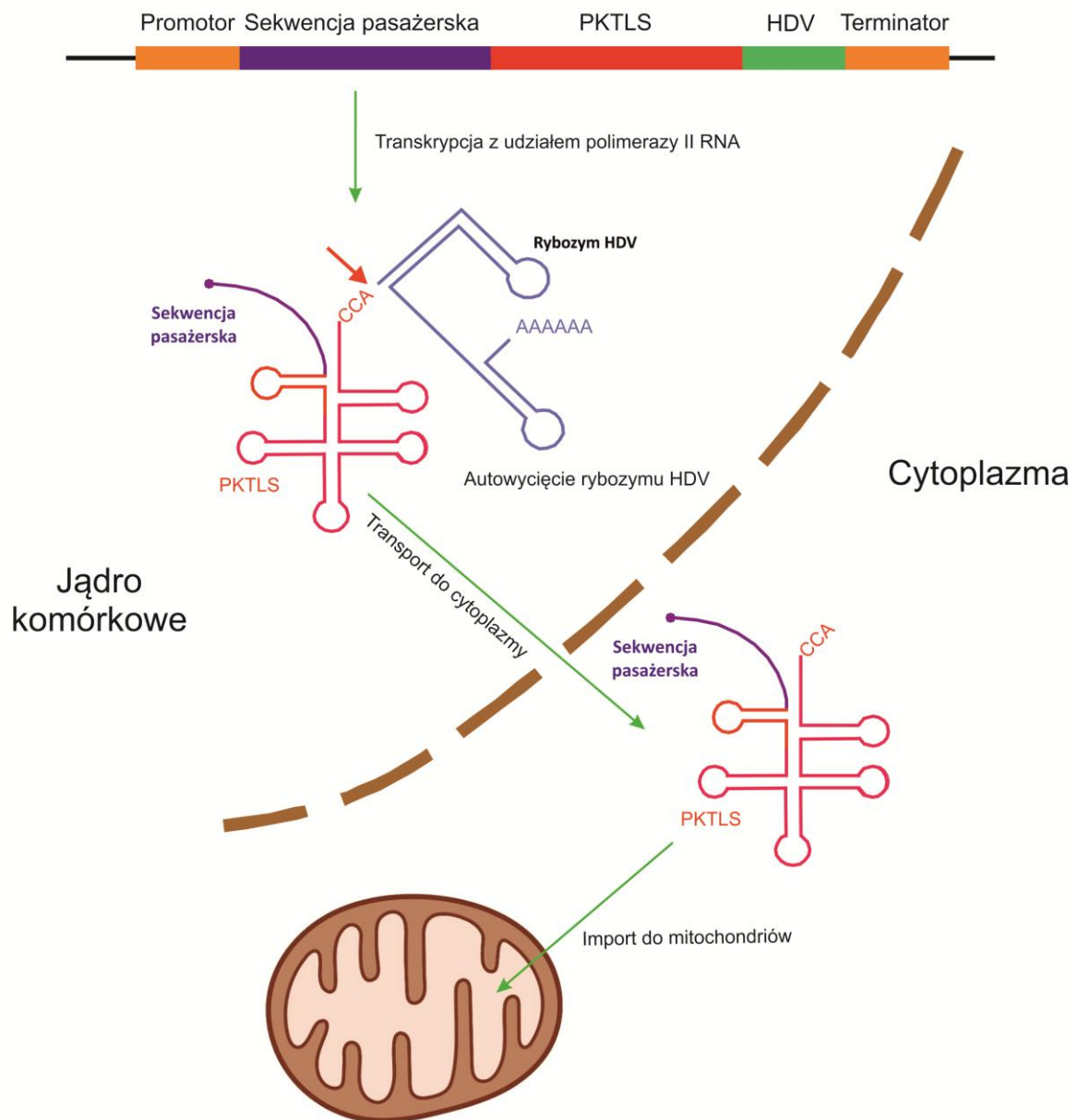
Rdzeń konstrukt stanowi struktura podobna do tRNA pochodząca z wirusa żółtej mozaiki rzepy. Na końcu 5' przyłączono sekwencję pasażerską oraz łącznik. Na końcu 3' dodano sekwencję kodującą rybozym HDV.

Podobnie, jak tRNA TYMV TLS przyjmuje strukturę liścia koniczyny jednakże pętla akceptorowa zawiera pseudowęzeł (ang. pseudoknot). Przypuszcza się, że struktura pseudowęzła obecna jest w prawie wszystkich strukturach podobnych do tRNA pochodzących z wirusów roślinnych. Pomimo obecności dodatkowego pseudowęzła wymodelowana struktura trzeciorzędowa TYMV TLS wykazuje silne podobieństwo do tRNA [Dreher, 2004]. Podobnie jak w przypadku tRNA istnieje bezpośrednia interakcja pomiędzy pętlami T i D. Sekwencja pomiędzy nukleotydami 83 i 109 powyżej sekwencji TLS w genomowym RNA TYMV przyjmuje strukturę pseudowęzła (ang. upstream pseudoknot, UPSK), która pozwala na rozpoznanie TLS przez syntetazę tRNA [Dreher, 2004; McCormack, 2007]. Struktury podobne do tRNA wraz z UPSK tworzą bardzo stabilną strukturę, której nie zaburza obecność reszty długiego genomowego RNA TYMV. W określonych warunkach *in vitro* TLS może być rozpoznawany i hydrolizowany przez

bakteryjną RNazę P, jednak w warunkach *in vivo* nie jest rozpoznawany przez roślinną RNazę P [Sieber, 2011].

Do stworzenia narzędzia umożliwiającego transport do mitochondriów sekwencji pasażerskich wykorzystano ostatnie 120 nukleotydów (6199-6318) z końca 3' genomowego RNA wirusa żółtej mozaiki rzepy. W celu zwiększenia rozpoznawania opracowywanego narzędzia przez syntetazę tRNA wykorzystano strukturę UPSK [Salinas-Giege, 2015]. Powstały w ten sposób konstrukt został nazwany PKTLS (Ryc. 7). Sekwencja pasażerska została przyłączona na końcu 5' z wykorzystaniem łącznika, którego sekwencja i długość została dobrana w taki sposób, aby nie tworzyła struktury drugorzędowej i uniemożliwiała interakcję pomiędzy sekwencją pasażerską a PKTLS. Cały konstrukt znajdował się pod kontrolą promotora i terminatora dla polimerazy RNA II. Dodatkowo na końcu 3' wprowadzono sekwencję kodującą rybozym HDV (ang. *Hepatitis delta virus*). Tak przygotowany konstrukt został wprowadzony do organizmu modelowego, jakim był *Arabidopsis thaliana* na drodze agrotransformacji z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens* [Val, 2011].

W wyniku działania polimerazy RNA II powstaje pierwotny transkrypt zawierający sekwencję pasażerską, sekwencję łącznika, PKTLS oraz działający *in cis* rybozym HDV. W wyniku samo wycięcia się rybozomu HDV dochodzi do uwolnienia, niezbędnego w procesie aminacylacji, końca 3'-CCA. Następnie dochodzi do eksportu dojrzałej cząsteczki z jądra do cytoplazmy gdzie zachodzi proces aminoacylacji, a następnie import do mitochondriów (Ryc. 8). Jako sekwencje pasażerskie wykorzystane zostały krótkie sekwencje wirusowe, rybozomy typu głowy młotka (ang. *hammerhead ribozymes*, HH) zaprojektowane do hydrolizy specyficznych sekwencji w obrębie mtDNA oraz substraty dla mitochondrialnego systemu edycji RNA [Val, 2011].



Ryc. 8. Schemat strategii wyciszania genów mitochondrialnych (na podstawie Val, 2011). Komórka roślinna została transformowana konstruktem zawierającym sekwencję dla struktury podobnej do tRNA (PKTLS). W celu wygenerowania końca 3' wolnego dla aminoacylacji w opisanym konstrukcie umieszczono sekwencję dla rybozomu HDV, działającego *in cis*. W wyniku działania polimerazy RNA II dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstrukt. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozomu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie PKTLS. Dojrzały konstruk, zawierający sekwencję pasażerską, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.

Strategia ta została zwalidowana w transformowanych roślinach *A. thaliana* gdzie, jako sekwencję pasażerską wprowadzono rybozym HH skierowany w sekwencję kodującą podjednostkę 9 ATPazy. Uzyskane wyniki pokazały, że zastosowane podejście jest skuteczne. Obserwowano znaczny spadek ekspresji docelowego genu zarówno na poziomie mRNA jak i na poziomie białka.

Opracowany w ten sposób system pokazał, że możliwe jest bezpośrednie oddziaływanie na mitochondrialny system genetyczny w komórkach roślinnych, otwierając drogę do analiz efektów molekularnych i fizjologicznych wynikających z manipulacji poziomami mitochondrialnego RNA.

1.5.5. Transfer mitochondriów z komórki do komórki

Jednym z najczęściej stosowany podejść do przenoszenia mitochondriów z jednej komórki do drugiej jest fuzja cytoplazmatyczna, która generuje komórki hybrydowe znane, jako cybrydy. Metoda ta polega na fuzji komórek dawcy, które zostały pozbawione jądra komórkowego, z komórkami ρ w celu uzyskania cybrydowych linii komórkowych. Linie te są następnie selekcjonowane poprzez wzrost na pożywce pozbawionej urydyny oraz zawierającej czynnik selekcyjny [Moraes, 2001; Vithayathil, 2012]. Cybrydy były wykorzystywane do badania chorób wynikających z mutacji mtDNA jak również w chorobach takich jak choroba Parkinsona czy Alzheimer. Jednakże wyniki badań z wykorzystaniem cybryd mogą być trudne w interpretacji ze względu na fakt iż wraz z mitochondriami do komórek biorcy przenoszone są również miRNA, lncRNA, białka sygnałowe oraz inne organelle [Wilkins, 2014].

Coraz więcej doniesień literaturowych wskazuje, że mitochondria mogą być przenoszone z komórki do komórki za pomocą innych mechanizmów. Jednym z nich jest tzw. tunelowanie nanorurek (ang. *tunneling nanotubes*, TNT), struktur komórkowych o średnicy 50-200 nm [Rustom, 2004]. Badania nad kontaktowymi interakcjami między progenitorowymi komórkami śródbłonna, a kardiomiocytami ujawniły znakowane mitochondria w TNT [Koyangi, 2005]. Dalsze prace wykazały, że transfer mitochondriów z komórki do komórki przez TNT zależy od wielu czynników, w tym białka p53, F-aktyny czy stresu [Domhan, 2011; Islam, 2012; Wang, 2011]. Niedawno wykazano, że transfer mitochondrialny z mezenchymalnych komórek macierzystych (ang. *mesenchymal stem cells*, MSC) do komórek nabłonkowych przez TNT jest zależny od mitochondrialnej Rho GTPazy 1, przy czym wzrost i obniżenie poziomu tego enzymu skutkuje odpowiednio zwiększonym lub zmniejszonym transferem mitochondrialnym [Ahmad, 2014]. TNT przenoszą

mitochondria między komórkami macierzystymi, komórkami śródbłonka, komórkami nabłonka barwnikowego siatkówki, komórkami mięśni gładkich oraz astrocytami [Domhan, 2011; Wittig, 2012; Vallabhaneni, 2012; Lou, 2012; Pasquier, 2013]

1.5.6. Nanoostrze fototermiczne

Rozwój nowych technologii pozwolił na opracowanie metod umożliwiających przenoszenie mitochondriów z pożądanymi haplotypami mtDNA do komórek ssaków. Do tego celu wykorzystywane są pipety mikrokalpilarnie o średnicy 3 μm . Końcówka pipety pokryta jest pochłaniającym światło tytanem. W celu pozyskania mtDNA pipetę umieszcza się w taki sposób, aby lekko dotykała błony komórkowej gdzie zostaje wystawiona na impuls laserowy o długości fali 532 nm. Taka długość fali jest nieszkodliwa dla komórek [Wu, 2010; Wu, 2011]. Impuls laserowy powoduje szybkie rozszerzenie się i zapadanie pęcherzyka pary na końcówce pipety i prowadzi do przejściowego nacięcia błony poprzez naprężenie ścinające, co umożliwia dostarczenie do komórki wprowadzanego ładunku. Dotychczas wykazano, że metoda ta może być z powodzeniem stosowana do dostarczania DNA, kropek kwantowych, żywych wewnątrzkomórkowych patogenów bakteryjnych, które zachowały wysoką żywotność [Chiou, 2012; Xu, 2012 Teh, 2014].

Technika nanoostrza została tak zmodyfikowana, aby umożliwić dostarczenie wyizolowanych, z linii komórkowej raka piersi MDA-MB-453, mitochondriów do komórek 143BTK-p0. Analiza otrzymanych w ten sposób linii nie wykazała żadnych niepożądanych efektów ubocznych. Komórki rosnące na pożywce selekcyjnej odznaczały się profilem metaboliczny porównywalnym z macierzystymi komórkami 143TBK [Wu, 2016].

Poważnym ograniczeniem tej metody jest jednak fakt, że można dostarczać ładunek tylko do jednej komórki na raz. W związku z tym podejście to pozostaje techniką niskoprzepustową, a ponadto skuteczne generowanie linii komórkowych jest wysoce zależne od precyzji operatora. W związku z tym, w oparciu o zasady nanoostrza, podjęto próby opracowania wysokowydajnej platformy, która miałaby umożliwić dostarczanie ładunków do około 100000 komórek na minutę, a ponadto byłaby mniej zależna od operatora [Wu, 2015]. Podobnie jak technika nanoostrza platforma biofotonicznego narzędzia do chirurgii wspomaganej laserowo (ang. *biophotonic laser-assisted surgery tool*, BLAST) może dostarczać nanocząstki, białka i inne ładunki do komórek ssaków z wysoką wydajnością, przy zachowaniu żywotności komórek [Wu, 2015].

W porównaniu z technikami mikroiniekcyjnymi nanoostrze i BLAST są narzędziami większymi i nigdy nie wchodzi do komórki, co zmniejsza uraz mechaniczny, a tym samym

zwiększa wydajność. Pęcherzyk kawitacyjny generowany przez te urządzenia lokalnie przecina błonę komórkową, a powstałe uszkodzenia jest szybko naprawiane. Obecnie platforma BLAST jest modyfikowana i testowana pod kątem wydajnego transferu mitochondriów do komórek somatycznych ssaków.

1.6. Katalityczne kwasy nukleinowe

W latach 80 XX wieku wykazano, że niektóre cząsteczki RNA zdolne są do reakcji katalitycznej bez udziału czynników białkowych [Cech, 1982]. Kwasy nukleinowe posiadające właściwości katalityczne i charakteryzujące się obecnością wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań trzeciorzędowych zostały nazwane rybozymami. Cząsteczki te katalizują reakcję transestryfikacji RNA, hydrolizy i ligacji, syntezy peptydów, fosforylacji, adenylacji aminokwasów, polimeryzacji RNA, reakcję aldolową, utlenianie alkoholi, redukcję aldehydów, syntezę nukleotydów pirymidynowych, aminoacylacji, a także wiele innych [Scott, 2007; Silverman, 2008, Gabryelska 2013].

Rybozomy możemy podzielić na trzy podstawowe grupy: niskocząsteczkowe, wielkocząsteczkowe oraz rybosomy, a dokładnie 23S rRNA wchodzący w skład dużej podjednostki budującej jej centrum katalityczne (Tab. 2) [Doudna, 2002]

Tab. 2. Podział naturalnie występujących rybozymów.

Grupa	Rybozym	Wielkość cząsteczki (nt)	Aktywność
Rybozomy małowcząsteczkowe	Hammerhead	40	Rybozomy samowycinające się w reakcji transestryfikacji
	Hepatis delta virus	90	
	Hairpin	70	
	Varkund satelite	160	
Rybozomy wielkocząsteczkowe	Introny grupy I	210	Rybozomy samowycinające się w reakcji trans estryfikacji
	Introny grupy II	500	
	RNaza P	300	Dojrzewanie transkryptu tRNA w reakcji hydrolizy
	snRNAs (U2, U6)	180, 100	Dojrzewanie RNA w reakcji transestryfikacji
Rybosom	23S RNA	2600	Aktywność transferazy peptydylowej

1.6.1. Charakterystyka rybozemu typu „hammerhead”

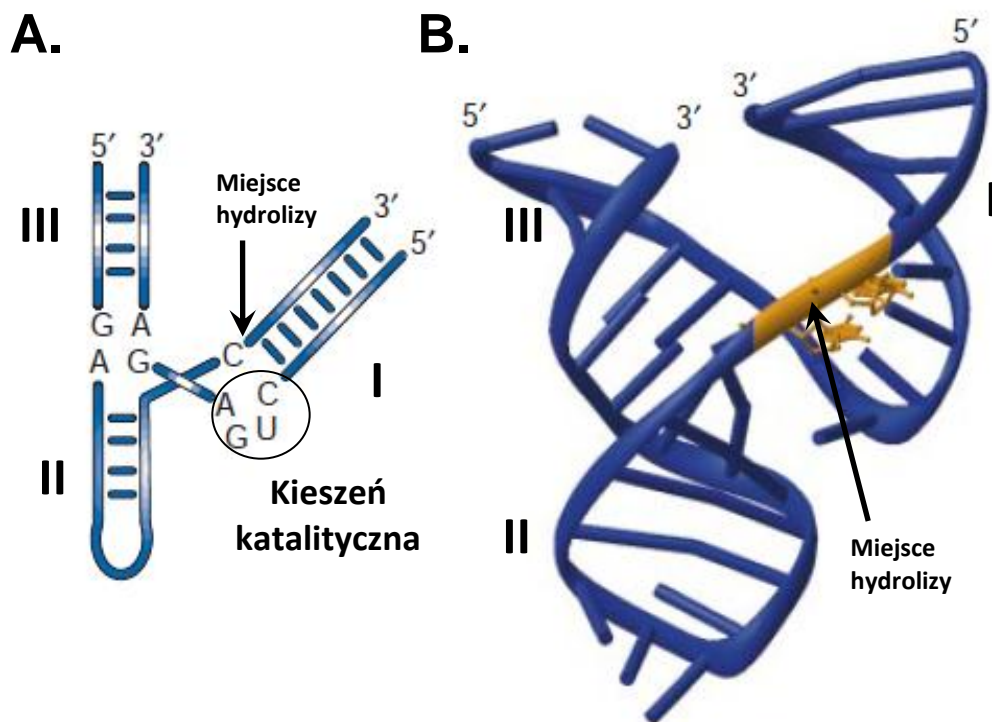
Rybozemy o strukturze głowy młotka (ang. *hammerhead*, HH) reprezentują jedną z pięciu zróżnicowanych strukturalnie klas samowycinających się RNA zidentyfikowanych do tej pory. Po raz pierwszy tego typu RNAzemy odkryto u wiroidów i satelitarnych wirusów roślinnych RNA. Udowodniono także, że rybozemy te występują u pasożytniczych robaków *Schistoma mansoni*, *Arabidopsis thaliana*, ludzi a także wielu innych gatunków (Tab. 3) [Perreault,2011; Gabryelska, 2013].

Badania nad rybozymami tej klasy prowadzone są od ponad 35 lat. Dzięki swoim niewielkim rozmiarom i właściwością katalitycznym rybozemy typu HH są doskonałym modelem badawczym budowy i funkcji cząsteczek RNA [Sun, 2000; Perreault, 2011].

Tab. 3. Przykłady organizmów eukariotycznych, u których zidentyfikowano rybozomy HH (na podstawie Gabryelska, 2013).

Grupa	Gatunek	Nazwa potoczna	Liczba motywów
Naczelne	<i>Homo sapiens</i>	Człowiek	2
	<i>Macaca mulatta</i>	Makak	3
	<i>Microbeus murinus</i>	Lemur mysy	3
	<i>Pan troglodytes</i>	Szympan	1
	<i>Tarsus Sorichta</i>	Lemur (Tarsie)	4
Gryzonie	<i>Cavia porcellus</i>	Świnka morska	2
	<i>Mus musculus</i>	Mysz	3
	<i>Ochotona princes</i>	Pika	2
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Królik	2
	<i>Raptus norvegicus</i>	Szczur	2
	<i>Spermophilus tridecemlineatus</i>	Wiewiórka	1
Laurasiatheria	<i>Bos Taurus</i>	Krowa	2
	<i>Canis familiaris</i>	Pies	4
	<i>Equus caballus</i>	Koń	3
	<i>Myotis lucifagus</i>	Nietoperz	1
	<i>Sorex araneus</i>	Ryjówka	1
	<i>Sus scrofa</i>	Świnia	1
	<i>Tursiops truncatus</i>	Delfin	1
Afrotheria	<i>Echinops telfairi</i>	Tenrek mniejszy	4
	<i>Loxodonta Africana</i>	Słoń	1
Xenartha	<i>Choloepus hoffmanni</i>	Leniwiec	2
	<i>Dasyopus novemcinctus</i>	Pancernik	2
Inne ssaki	<i>Macropus eugenii</i>	Walania	1
	<i>Manodelphis domestica</i>	Opos	3
Ptaki i gady	<i>Gallus gallus</i>	Kurczak	1
	<i>Taeniopygia guttata</i>	Zięba	2
Plazy	<i>Xenopus tropicalis</i>	Żaba afrykańska	8
Ryby	<i>Danio rerio</i>	Danio pręgowany	2
	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	Tetraodon	1
Owady	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Komar	2
	<i>Drosophila persimilis</i>	Muszka owocowa	3
	<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Muszka owocowa	5
	<i>Nasonia vitripennis</i>	Osa	2
	<i>Trifolium castaneum</i>	Trojszczyk gryzący	2
Rośliny	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Tasznik	3
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tasznik	3
	<i>Physcomitrella patens</i>	Mech	1
	<i>Vitis vinifera</i>	Winorośl	2
Grzyby	<i>Aspergillus flavus</i>	Żółta pleśń	1
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Pleśń Koji	1
	<i>Pichia stipitis</i>	Drożdże pichia	1
Inne wielokomórkowce	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	Nicień	1
	<i>Cacenorhabditis remanei</i>	Nicień	1
	<i>Hydra magnipapillata</i>	Stułbia	35
	<i>Ixodes scapularis</i>	Kleszcz jeleni	1
	<i>Schistosoma japonicum</i>	Przywra krwi	2
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Przywra krwi	24

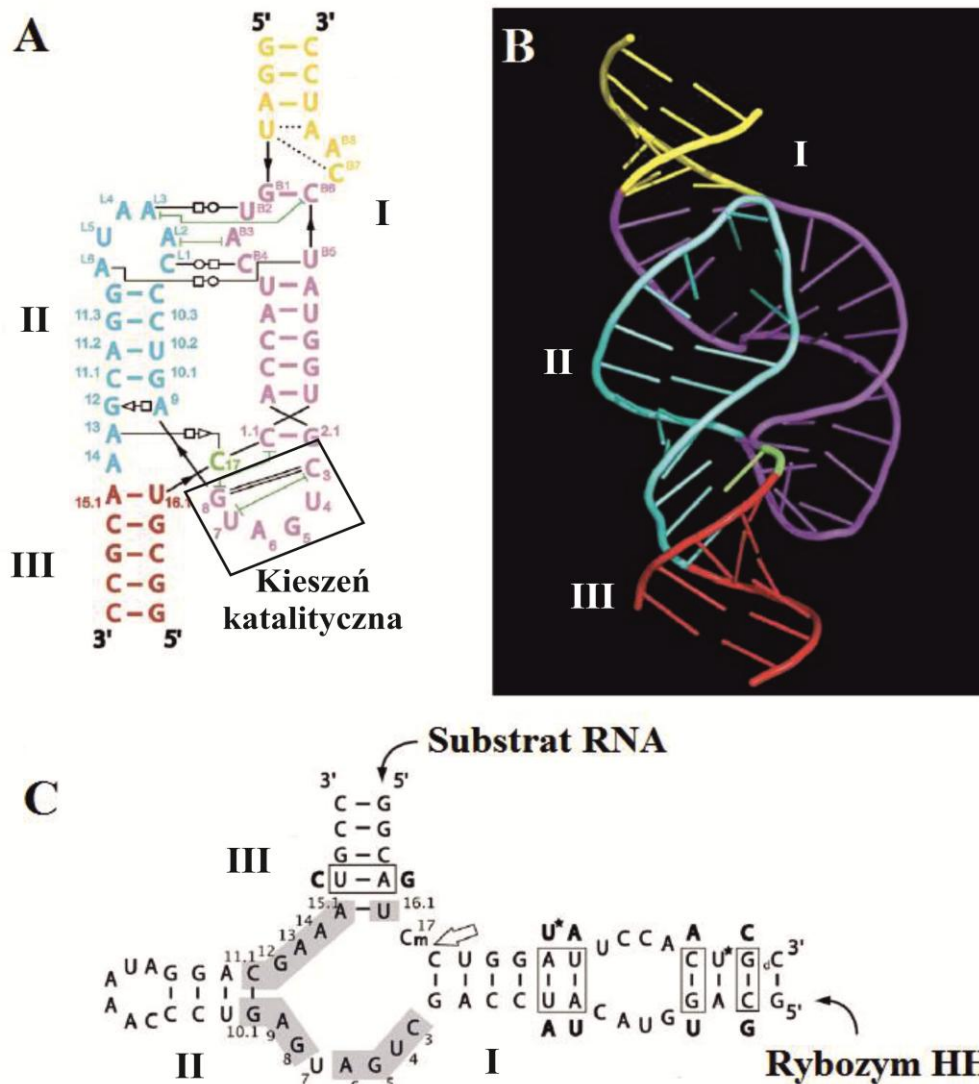
Redukując wielkość cząsteczki zidentyfikowano najprostszy aktywny wariant rybozomu HH tzw. minimalny (HH^M), katalizujący transestryfikację wiązania fosfodiesterowego w docelowym RNA *in trans* [Uhlenbeck, 1978]. Rybozym ten zbudowany jest z trzech dwuniciowych regionów (HI, HII, HIII), układających się w kształt litery „Y”, otaczających centralny rdzeń katalityczny o bardzo zachowawczej strukturze i sekwencji. Helisy II i III ułożone są współosiowo podczas gdy helisa I leży pod kątem ostrym do helisy II (Ryc. 9). Wszystkie występują w konformacji A RNA. Kieszon katalityczną tworzy sekwencja CUGA z charakterystycznym motywem U-skrętu między nukleotydami U4 i G5 oraz nukleotydy GAA [Carbonell, 2010; Scott, 2011].



Ryc. 9. Minimalny rybozym „hammerhead” (na podstawie [Doudna, 2002]). Struktura drugorzędowa (A) i trzeciorzędowa (B) rybozomu HH. Rybozym hammerhead składa się z trzech odcinków helikalnych (I, II, III) otaczających wysoce zachowawczą domenę katalityczną. Kieszon katalityczna utworzona jest z nukleotydów CUGA.

1.6.2. Wydłużony rybozym „hammerhead”

Badania wykazały, że dodatkowe elementy strukturalne występujące w naturalnych rybozymach HH odgrywają istotną rolę w stabilizacji aktywnej konformacji cząsteczki zwiększając tym samym ich aktywność katalityczną *in vitro* oraz *in vivo*. Warianty te nazwane zostały rybozymami pełnej długości (ang. *full-length*) lub wydłużonymi (ang. *extended*) (Ryc. 10).



Ryc. 10. Struktura wydłużonego rybozimu „hammerhead” (na podstawie Martick, 2006).

(A, B) Struktura trzeciorzędowa rybozimu HHW. Kieszeń katalityczna utworzona jest przez nukleotydy CUGAUG. (C) Struktura drugorzędowa wydłużonego rybozimu w kompleksie z substratem. Kolorem szarym zaznaczono zachowawcze nukleotydy w domenie katalitycznej. W ramkach umieszczono nukleotydy w naturalnie występującym rybozymie, które zostały podstawione w cząsteczce poddanej krystalografii.

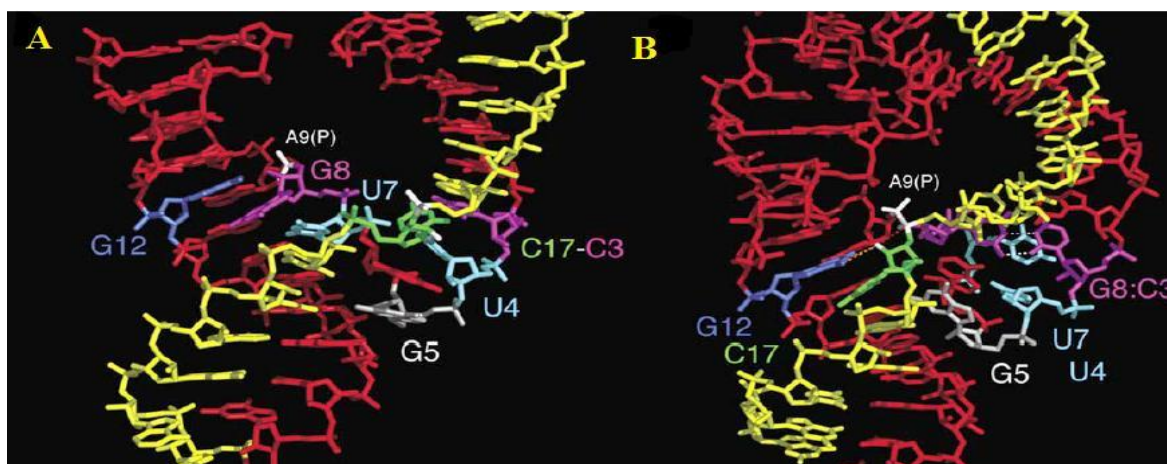
W roku 2006 zaprezentowano trzeciorzędową strukturę takiego rybozemu w kompleksie z RNA zawierającym grupę 2'-O-metylową w miejscu transestryfikacji. Cechą charakterystyczną pełnej długości rybozemu HH jest oddziaływanie pomiędzy pętlami II i wybrzuszeniem w ramieniu I, warunkujące tworzenie stabilnej i aktywnej konformacji domeny katalitycznej. Rybozym ten jest cząsteczką dwukrotnie większą niż wariant minimalny. Kształtem przypomina literę „γ” gdzie ramię II leży w jednej osi z ramieniem III. Zarówno kieszeń katalityczna jak i U-skręt różnią się znacznie od obserwowanych w wariacie minimalnym.

Tab. 4. Charakterystyka porównawcza minimalnego i wydłużonego rybozemu HH (na podstawie Gabryelska, 2013).

Cecha	Rybozym minimalny	Rybozym wydłużony
Ilość rozwiązanych struktur krystalicznych	6	3
Aktywność <i>in vitro</i> względem spontanicznej degradacji wiązania RNA	$\sim 10^6$	$\sim 10^6-10^9$
Aktywność <i>in vivo</i>	Niska	Wysoka
Rdzeń katalityczny	2 domeny C ₁₇ oddalona od centrum katalitycznego G ₈ oddziałuje z C ₃ C ₁₇ w pobliżu G ₁₂ , A ₁₃ , A ₁₄	zwarty C ₁₇ w centrum katalitycznym G ₈ oddziałuje z A ₁₃ C ₁₇ oddziałuje z C ₃ G ₁₂ oddziałuje z A ₉
Dominująca konformacja	otwarta, nieaktywna	zamknięta, aktywna
Zależność od jonów dwuwartościowych	wysoka (10mM <i>in vivo</i>)	niska (1 mM <i>in vitro</i>)
Oddziaływania współosiowe helisy	Tak	tak
Oddziaływania trzeciorzędowe	Brak	tak
Wielkość	~ 32 nt	~ 55 nt

Minimalny i wydłużony rybozym HH znacznie różnią się od siebie pod względem aktywności oraz właściwości strukturalnych (Tab. 4). Centrum katalityczne rybozemu wydłużonego związa się w jeden rdzeń, w którym atakowany fosforan sąsiaduje z resztami o potencjalnie katalitycznym charakterze. Obecność oddziaływań pomiędzy pętlą helisy II z wybrzuszeniem helisy I w rybozymie pełnej długości prowadzi do zmiany geometrii miejsca aktywnego. Zmiana ta następuje poprzez umieszczenie nukleotydów G₈ i U₇ w kieszeni katalitycznej. G₈ znajduje się w pozycji zajmowanej przez nukleotyd C₁₇ w strukturze rybozemu minimalnego tworząc wiązanie Watsona-Cricka z C₃, natomiast U₇ leży w bliskim sąsiedztwie U₄ w skutek czego dochodzi do przesunięcia miejsca hydrolizy w bezpośrednie sąsiedztwo centrum katalitycznego. Produkt 5' reakcji katalizowanej przez cząsteczki pozbawione oddziaływań trzeciorzędowych oddysocjowuje 100-300 razy szybciej niż w

przypadku wydłużonego rybozomu. W wydłużonym rybozomie rdzeń katalityczny zwija się wokół reszty C₁₇ utrudniając oddysocjowanie produktu. Dzięki usunięciu reszty C₁₇ dochodzi do oddysocjowania produktu reakcji z prędkością porównywalną do produktu 5' minimalnego rybozomu HH (Ryc. 11).



Ryc. 11. Struktura trzeciorzędowa domeny katalitycznej minimalnego i pełnej długości rybozomu HH (na podstawie [Martick, 2006]).

Oddziaływania pętla:wybrzuszenie powodują istotne zmiany w obrębie miejsca aktywnego w rybozomie o pełnej długości (B) w porównaniu do wariantu minimalnego (A). Najważniejsze to oddziaływania typu Watson-Cricka pomiędzy G8 i C3 (kolor różowy), a także zmiana orientacji nukleotydu C17 – miejsce hydrolizy (kolor zielony) w pobliżu A9. W kieszeni katalitycznej wydłużonego wariantu rybozomu znajdują się dodatkowo nukleotydy U7 i G8.

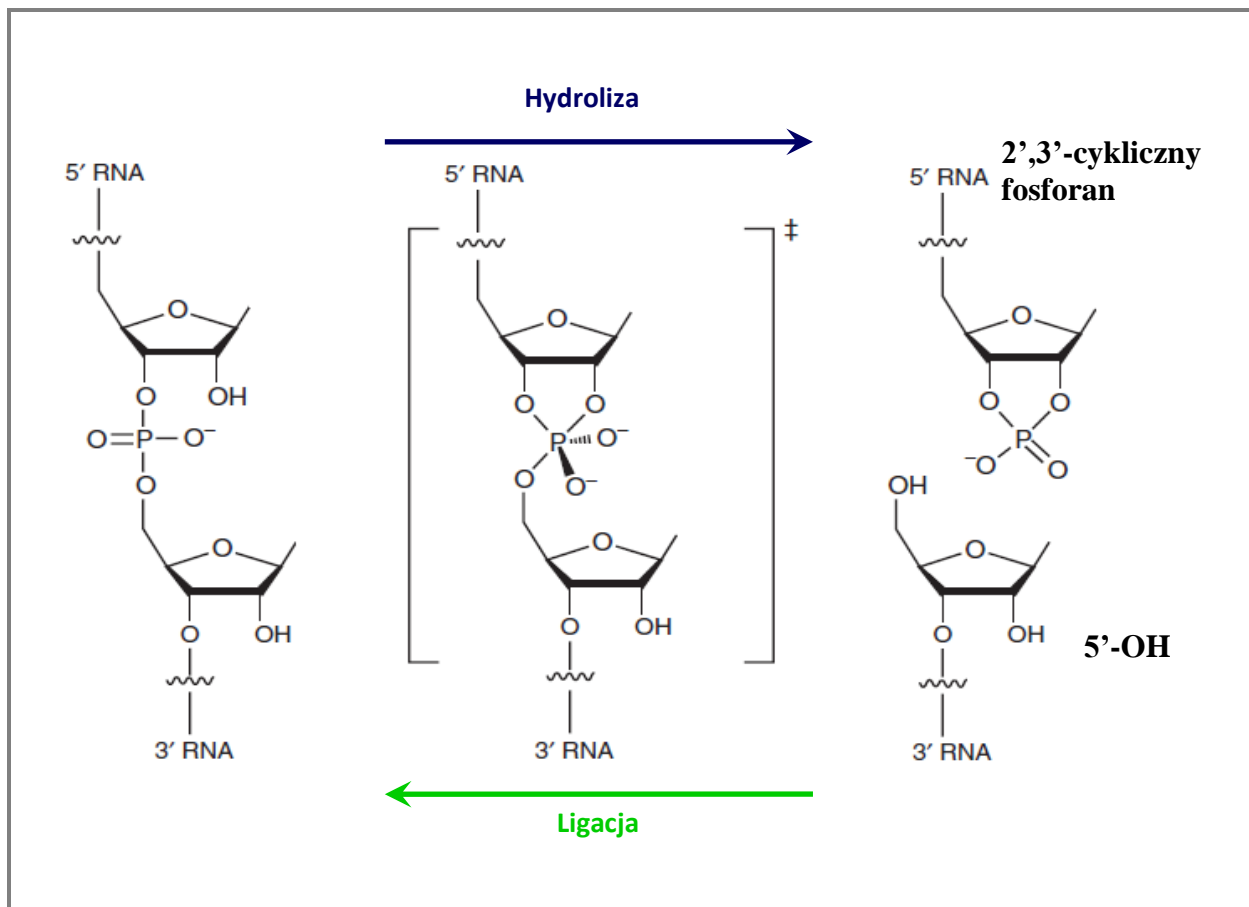
1.6.3. Reakcja transestryfikacji

Reakcja transestryfikacji spontanicznie zachodzi bardzo wolno. Jej szybkość wynosi ok 10^{-7} min^{-1} co odpowiada zerwaniu jednego wiązania fosfodiesterowego na rok. W przyrodzie z największą szybkością reakcję transestryfikacji katalizuje rybonukleaza A (RNazaA), przyspieszając ją 12-krotnie. Okres półtrwania wiązania RNA w obecności RNazy A wynosi kilka mikrosekund [Martick, 2008; Scott, 2011].. Enzym ten wykorzystuje aż cztery strategie działania:

- liniowe ułożenie atomów uczestniczących w reakcji
- neutralizacja ujemnego ładunku tlenu niskomostkowego przy atomie fosforu
- deptotonacja nukleofila 2'OH
- protonacja 5'O grupy odchodzącej.

Katalityczne kwasy nukleinowe wykorzystują kombinację wyżej wymienionych strategii, jednak szybkość reakcji nie przekracza $\sim 2 \text{ min}^{-1}$, co sugeruje, że korzystają w pełni jedynie z dwóch z nich.

Transestryfikacja z udziałem rybozymów HH odbywa się poprzez nukleofilowy atak grupy 2'-OH na wiązanie fosfodiesterowe. W wyniku tej reakcji powstają produkty posiadające 2',3'-cykliczny fosforan przy końcu 3' oraz wolną grupę OH przy końcu 5' (Ryc. 12) [Martick, 2008; Scott, 2011].

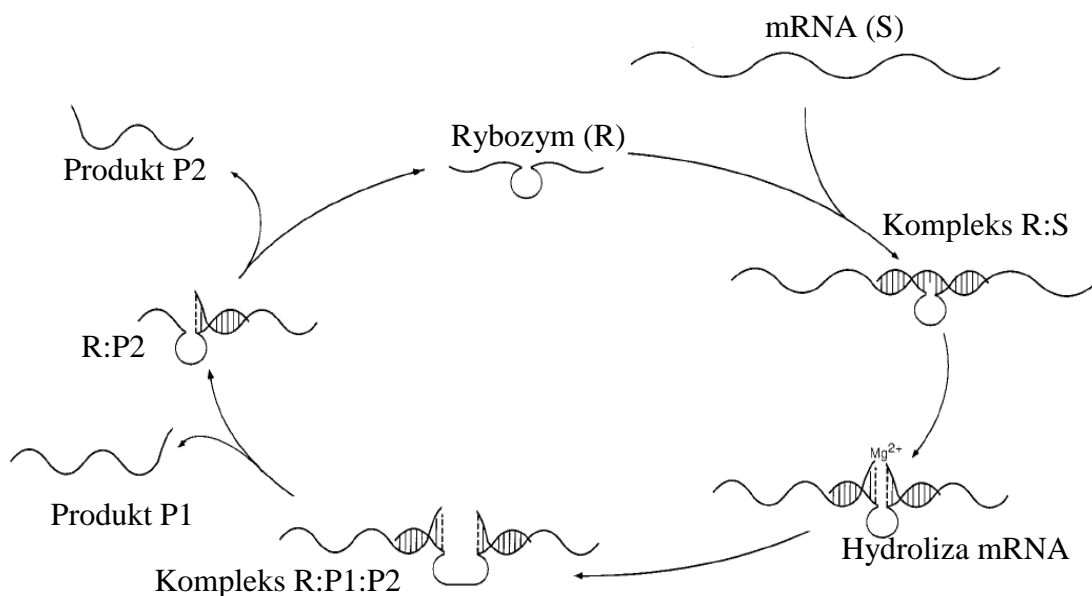


Ryc. 12. Schemat reakcji transestryfikacji katalizowanej przez rybozym HH.

W wyniku ataku nukleofilowego grupy 2'-OH rybozy w miejscu hydrolizy na sąsiadujące wiązanie fosfodiesterowe powstają produkty reakcji, z których jeden zakończony jest 2',3' – cyklicznym fosforanem, a drugi grupą 5'-OH.

Rybozomy HH rozpoznają sekwencję docelową w RNA poprzez wiązanie Watsona-Cricka i hydrolizują wiązania internukleotydydowe w obrębie każdego tripletu 5'NUH-3', w którym N jest dowolnym nukleotydem, U oznacza urydynę, natomiast H adenozyne, cytyzynie lub urydynę niezwiązaną wiązaniami wodorowymi.. W późniejszych badaniach wykazano, że

zasadę tę można zmodyfikować do NHH, gdzie H może być każdym nukleotydem za wyjątkiem G. Stała szybkości reakcji katalizowanej przez rybozym HH *in vitro* maleje w następującym porządku: GUC, AUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > GUU, CUA > UUU, CUU [Sun i in. 2000]. Szybkość reakcji jest także zależna od nukleotydu w pozycji -1 względem sekwencji 5'-NUH-3' zgodnie z preferencją U>C>A>G [Lee, 2011]. W przypadku rybozymów minimalnych obserwowano nawet 70-krotne różnice szybkości transestryfikacji *in vitro* dla różnych substratów [Fedor, 1990]. Rozbieżność ta może być związana z szybkością dysocjacji produktów oraz drobnymi zmianami w strukturze [Sawata i in. 1993]. Tolerancja podstawień niektórych nukleotydów rdzenia katalitycznego wskazuje, że system oddziaływań elementów struktury drugorzędowej oraz trzeciorzędowej mimo odległości moduluje lokalną strukturę centrum katalitycznego [Przybilski, 2007].



Ryc. 13. Schemat hydrolizy mRNA katalizowanej przez rybozym „hammerhead” (na podstawie [Sun, 2000]).

Rybozym (R) specyficznie przyłącza i hydrolizuje docelowy mRNA (S). Po reakcji oddysocjuje od produktów hydrolizy (P1, P2) i bierze udział w kolejnym cyklu.

Istotną rolę w rozpoznawaniu sekwencji docelowej odgrywają ramiona rybozemu otaczające rdzeń katalityczny. Wydłużenie ramion wpływa na stabilizację cząsteczki jednak może powodować obniżenie aktywności katalitycznej z kolei ich skrócenie powoduje spadek specyficzności substratowej. Większe znaczenie dla specyficzności rybozemu ma długość ramienia przy końcu 3' niż 5'. Wpływ długości ramion na aktywność rybozemu różni się dla procesów *in vitro* i *in vivo* [Sun, 2000].

RNazy katalizują reakcję hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w cząsteczce RNA z szybkością porównywalną do enzymów białkowych. Hydroliza wiązania internukleotydogo następuje po utworzeniu aktywnej katalitycznie konformacji kompleksu rybozym:substrat, następnie dochodzi do uwolnienia cząsteczki katalitycznego RNA umożliwiając jej udział w kolejnym cyklu katalizy (Ryc. 13) [Sun, 2000; Scott, 2011].

1.6.4. Modyfikacje strukturalne rybozymów hammerhead

Głównym ograniczeniem związanym z wykorzystaniem katalitycznych kwasów nukleinowych jako potencjalnych terapeutyków jest ich zależność od wysokiego stężenia jonów magnezu (10 – 25mM) [Eckstein, 2001; Carbonell, 2010]. W związku z tym przy projektowaniu nowych RNazymów zwraca się uwagę na obniżenie wymagań związanych z obecnością jonów Mg^{2+} przy jednoczesnym zachowaniu ich aktywności katalitycznej na wysokim poziomie [Eckstein, 2001; Carbonell, 2010].

Badania nad zwiększeniem aktywności katalitycznej rybozymów wykazały bardzo silny związek pomiędzy strukturą trzeciorzędową a aktywnością katalityczną w niskich stężeniach jonów magnezu (0,1 – 1mM). W związku z powyższym podjęto próby modyfikacji rybozymów w kierunku stabilizacji oddziaływań trzeciorzędowych poprzez wydłużenie rybozemu HH [Conaty, 1999; Khvorowa, 2003; Uhlenbeck, 2008)].

Jednym ze sposobów stabilizacji struktury trzeciorzędowej rybozymów jest wykorzystanie naturalnie występujących motywów TSM (ang. *tertiary stabilizing motif*), otaczających ich domenę katalityczną. TSM stabilizują wydłużone rybozemy zapewniając ich wysoką aktywność katalityczną zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*. Pomimo znaczących odległości od centrum katalitycznego rybozemu oddziaływania te powodują zmianę geometrii cząsteczki, co pośrednio wpływa na jego strukturę. Rybozemy nowej generacji projektowano poprzez wydłużenie helisy I i zastąpienie pętli wybrzuszeniem lub wprowadzenie do helisy I końców 5' i 3' odpowiednio rybozemu i substratu [Carbonell, 2011].

Stabilizację trzeciorzędowej struktury rybozymu można również uzyskać poprzez dołączenie motywów naturalnie występujących w innych cząsteczkach RNA takich jak receptory czteronukleotydowych pętli (TLR, ang. *tetra-loop receptor*) GNRA gdzie R oznacza dowolną purynę, a N jest dowolnym nukleotydem. TLR występują w intronach grupy I i II oraz RNazie P i zaangażowane są w oddziaływania trzeciorzędowe. Przypuszcza się, że oddziaływania pomiędzy pętlą i jej receptorem stabilizują aktywną katalitycznie konformację rdzenia podnosząc wydajność hydrolizy przy niskich stężeniach jonów magnezu [Costa, 1995; Fedoruk-Wyszomirska, 2009; Gabryelska 2013].

Inne badania pokazują, że wysoką aktywność rybozymów uzyskano zastępując pętlę II łącznikiem zawierającym pojedynczą parę zasad G-C. Metoda ta przyczyniła się do stworzenia nowej struktury przestrzennej. Uzyskany w ten sposób RNazym wykazywał wyższą aktywność katalityczną niż rybozym pełnej długości [Conaty, 1999; Nazari, 2008].

Wysoką aktywność hydrolityczną rybozymu otrzymano również poprzez skrócenie helisy II oraz zastąpienie pętli GAAA inną czteronukleotydową sekwencją. Najlepsze wyniki uzyskano dla rybozymów, w których zastosowano pętle UUUU, AAAA oraz UCCA [Eckstain, 2001].

Zwiększenie aktywności rybozymów próbowano również uzyskać poprzez łączenie kilku cząsteczek katalitycznych w jednym konstrukcje wzmacniając w ten sposób ich aktywność. Chimeryczny transkrypt zawierający shRNA (ang. *short hairpin RNA*) oraz rybozym skierowany przeciwko fragmentowi genomu wirusa grypy typu A odznaczał się wyższą aktywnością niż cząsteczki stosowane osobno [Kumar, 2010; Gabryelska, 2013].

Strukturę rybozymów próbowano również modyfikować poprzez dołączeni do końca 5' promotora dla tRNA^{Val} oraz sekwencji sygnałowej dla przyłączenia helikazy do końca 3'. Dołączenie helikazy powoduje rozplecenie mRNA umożliwiając rybozymowi dostęp do dowolnego miejsca w cząsteczce [Stobart, 2009, Gabryelska, 2013].

1.6.5. Rybozym HDV

Rybozym wirusa zapalenia wątroby (ang. *hepatitis delta virus*, HDV) został po raz pierwszy opisany niezależnie przez dwie grupy badawcze. Stwierdzono, że specyficzne podfragmenty każdej nici RNA zawierają zarówno miejsce cięcia, jak i sekwencje niezbędne i wystarczające do samowycięcia. Wykazano, że pomimo różnic w sekwencji miejsc hydrolizy pomiędzy rybozymami HDV oraz pozostałymi rybozymami mechanizm działania był taki sam: nukleofilowy atak grupy 2'-OH na wiązanie fosfodiesterowe. Wynikiem reakcji są produkty posiadające 2'3'-cykliczny fosforan przy końcu 3' oraz wolną grupę OH przy końcu

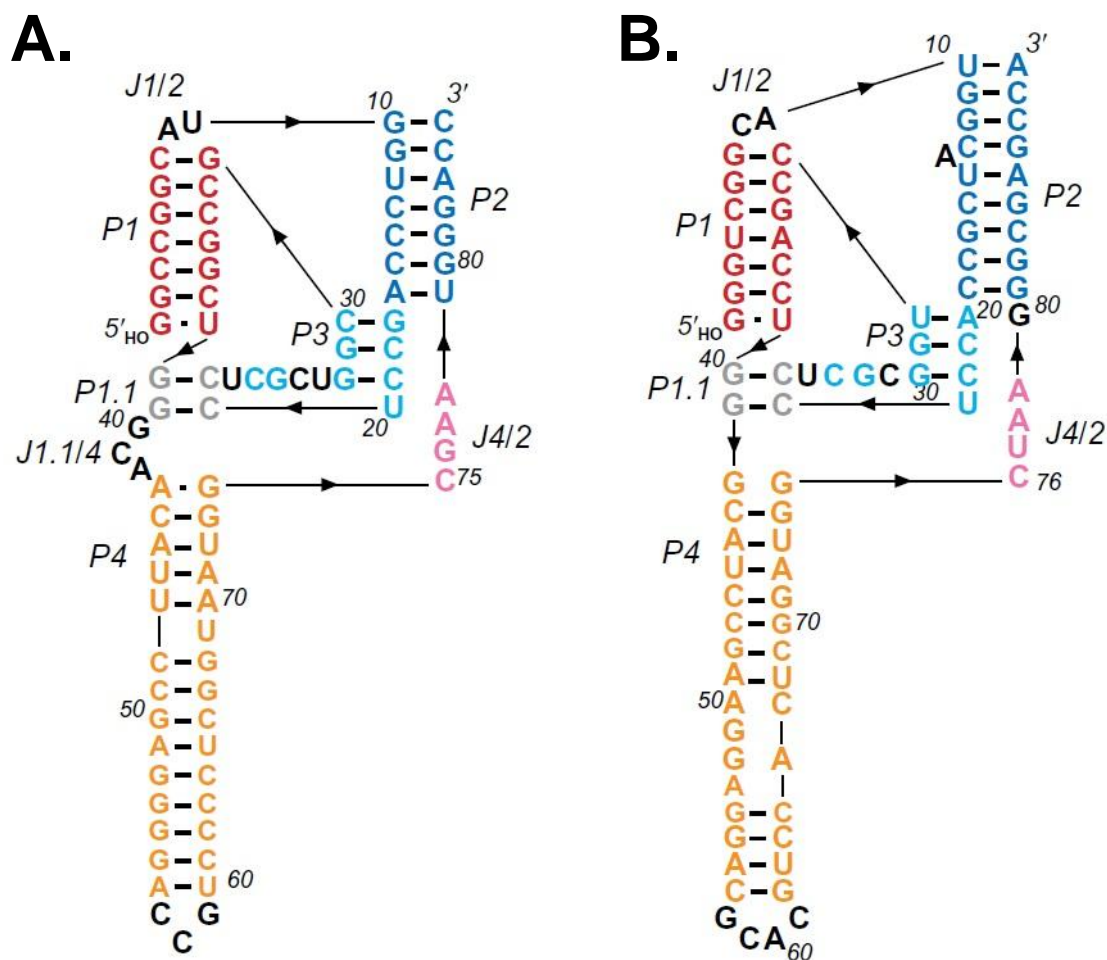
5'. Podobnie jak w przypadku pozostałych rybozymów rybozym HDV nie wymaga do swojej aktywności czynników białkowych ale obecność jonów metali dwuwartościowych znacznie przyspiesza przebieg reakcji [Salehi-Ashtiani, 2006; Eicbush, 2010; Perreault, 2011].

1.6.5.1. Struktura rybozemu HDV

Zarówno genomowe, jak i antygenomowe rybozomy HDV tworzą skomplikowane struktury drugorzędowe złożone z pięciu helikalnych regionów (P1, P2, P3, P1.1 i P4), które tworzą zagnieżdżony podwójny pseudowęzeł (ang. *pseudoknot*) (Ryc. 12) [Wadkins, 1999; Chen, 2010]. Pierwszy pseudowęzeł powstaje między helisami P1 i P2, a w obrębie tego pseudowęzła druga taka struktura jest tworzona między regionami P3 i P1.1. Układ ten jest dodatkowo stabilizowany przez spiralne stosy, w których helisy P1, P1.1 i P4 tworzą jeden stos współosiowy, a helisy P2 i P3 drugi. Długość helisy regionów P1 i P3 jest taka sama pomiędzy genomowymi i antygenomowymi rybozymami jednakże helisa P2 jest o kilka zasad dłuższa w rybozymie antygenomowym. W przypadku helisy P4 obserwuje się niższą zachowawczość sekwencji [Ferre-D'Amare, 1998; Ke, 2004].

Połączenia pomiędzy odcinkami helikalnymi tworzą regiony jednoniciowe, które są kluczowe dla aktywności katalitycznej rybozemu. Regiony te są nazywane zgodnie z helisami, które są nimi połączone np. J1/2 odnosi się do regionu łączącego pomiędzy helisą P1 i P2. Zachowawczość sekwencji w tym rejonie jest stosunkowo niska pomiędzy genomowym i antygenomowym rybozymem [Tanner, 1994; Perrotta 1996].

Rdzeń katalityczny rybozemu tworzy się wokół helisy P1.1 i P3 i składa się z regionów L3 i J4/2 (Ryc. 14). W strukturze genomowej helisa P3 jest wydłużona przez wysoce zachowawcze nukleotydy U₂₀ i G₂₅ tworzą odwróconą parę wahliwą (ang. *wobble pair*) i układają się na innym konserwatywnym nukleotydzie C₂₄ [Chen, 2010]. Zmiany nukleotydów U₂₀ lub G₂₅ wymuszające wiązanie typu Watsona-Cricka dają rybozym o znacznie niższej aktywności katalitycznej. Niewielkie modyfikacje w regionie rdzenia L3 są dozwolone ze względu na różnice w liczbie i składzie nukleotydów flankujących reszty C₂₄ i G₂₅ między genomowym i antygenomowym rybozymem HDV [Tanner, 1994].



Ryc. 14. Struktura drugorzędowa genomowego (A) i antygenomowego (B) rybozemu HDV.

Odpowiednimi kolorami zaznaczono poszczególne helisy: na czerwono P1, na ciemnoniebiesko P2, na jasnoniebiesko P3 na szaro P3, a na pomarańczowo P4. Na różowo zaznaczono jednoniciową część zawierającą katalityczną cytozynę. Kolorem czarnym oznaczono niekonserwatywne jednoniciowe regiony łączące.

Region J4/2 może wykazywać niewielkie różnice w długości jednakże niezbędna jest obecność motywu CNRA zwiększająca aktywność katalityczną rybozemu. Motyw ten ulokowany jest w obrębie N4 konserwatywnej reszty C₇₅ i tworzy dwa wiązania wodorowe. Jedno z niemostrkowanym atomem tlenu szkieletu fosforanowego łączącym reszty C₂₁ i C₂₂ tworzące koniec 5' helisy P1.1, a drugie z 2'OH U₂₀. Rdzeń J4/2 jest dodatkowo stabilizowany przez resztę A₇₈ poprzez oddziaływania trzeciorzędowe z resztami C₁₈ i G₂₉ tworzące środkową parę zasad helisy P3 [Ferre-D'Amare, 1998; Doherty, 2001; Chen, 2010].

1.6.6. Czynniki determinujące aktywność rybozymów

1.6.6.1. Jony metali

W warunkach *in vitro* aktywność rybozymów zależy od stężenia jonów magnezu, wody, siły jonowej, temperatury, pH, dostępności substratu, oddziaływań ze składnikami komórkowymi oraz kompartmentacji [Chen, 2009]. Utworzenie kompleksu jak również przyjmowanie złożonych struktur trzeciorzędowych jest możliwe dopiero po zrównoważeniu ujemnego ładunku łańcucha fosforanowo-cukrowego kwasów nukleinowych [Chen, 2009; Schnabl, 2010]. Z tego powodu RNA oraz DNA występuje w komórce w postaci zasocjowanej z kationami dwuwartościowymi, które biorą udział w oddziaływaniu elektrostatycznym. Oddziaływania te mogą mieć znaczący wpływ na aktywność katalityczną. Kationy wielowartościowe znacznie lepiej stabilizują RNA dzięki silniejszemu oddziaływaniu z ujemnie naładowanymi łańcuchami, a co za tym idzie mogą występować w mniejszej ilości [Leclerc, 2010; Woodson, 2010].

Obecność różnych jonów metali w mieszaninie prowadzi do zmiany aktywności rybozymów (Tab. 5). Wszystkie jony metalu (M^{n+}) mogą wpływać na przyjmowanie aktywnej katalitycznej konformacji przez rybozym HH. Różnice w przyspieszeniu reakcji katalitycznej pomiędzy różnymi jonami sięgają rzędu 10^4 . Badania wykazały, że najlepszym kofaktorem jest Mn^{2+} [Schnabl, 2010].

Tab. 5. Występowanie niektórych jonów w komórce i ich wpływ na aktywność katalityczną HH. B.d. – brak danych. [Na podstawie Boots, 2008; Schnabl, 2010; Williams, 2000].

Jon	Stężenie w cytoplazmie [M]	Stężenie toksyczne w cytoplazmie [M]	Główny przedział komórkowy, w którym występuje	k_{obs} (min^{-1})
Mg^{2+}	10^{-3}	10^{-1}	Cytoplazma	2,6
Mn^{2+}	10^{-6}	10^{-5}	Aparat Golgiego Mitochondria	200
Fe^{2+}	10^{-7}	10^{-5}	Cytoplazma	b.d.
Na^{+}	b.d.	10^{-1}	Zewnątrzkomórkowo	<0,02
Ca^{2+}	10^{-7}	10^{-3}	Retikulum endoplazmatyczne	0,14
Zn^{2+}	10^{-11}	10^{-9}	Pęcherzyki	82
Cu^{2+}	10^{-15}	10^{-9}	Aparat Golgiego Retikulum endoplazmatyczne Zewnątrzkomórkowo	b.d.
Ni^{2+}	10^{-16}	10^{-10}	Wakuole roślinne	b.d.
Co^{2+}	10^{-13}	10^{-10}	Cytoplazma	140

Analiza struktur krystalicznych rybozymów potwierdziła brak jonów magnezu zarówno w miejscu katalitycznym, jak i w jego najbliższym otoczeniu [Martick, 2006]. Obserwacja ta pozwoliła na przygotowanie modelu, w którym jony metalu wpływają na stabilizację struktury cząsteczki [O'Rear, 2001]. Aby potwierdzić prawidłowość modelu przeprowadzono eksperymenty z chemiczną modyfikacją wymienionych zasad. Zaobserwowano również, że rybozym jest aktywny w obecności jonów jednowartościowych takich jak Li^+ , Na^+ NH_4^+ czy poliamidów organicznych [Murray, 1998]. Ponadto wykazano związek pomiędzy aktywnością rybozymu, a zależnością G_8 i G_{12} od pH. Wpływ pH środowiska oraz grup funkcyjnych jest taki sam w przypadku transestryfikacji z udziałem katalitycznych kwasów nukleinowych w obecności kationów jedno- i dwuwartościowych [Curtis, 2001; O'Rear, 2001]

Badania wykazały, że w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (ang. *high hydrostatic pressure*, HHP) jony magnezu stabilizują strukturę rybozymu i nie są zaangażowane w katalizę. Taka reakcja może być rozpatrywana, jako kwasowa hydroliza estrów [Fedoruk-Wyszomirska, 2007]. Wysokie ciśnienie prowadzi do dysocjacji cząsteczek wody. W pierwszym etapie dochodzi do przyłączenia protonu do tlenu grupy fosforanowej, dzięki czemu staje się ona podatna na atak nukleofilowy grupy 2'-OH rybozy zawierającej wolną parę elektronową. W wyniku utworzenia pięcio-koordynacyjnego stanu przejściowego dochodzi do protonacji atomu 5'O, a w konsekwencji zerwania wiązania pomiędzy fosforem a tlenem [Fedoruk-Wyszomirska, 2007; Fedoruk-Wyszomirska, 2009].

Maksymalną efektywność zwijania rybozym osiąga przy stężeniu 2 – 3mM magnezu, natomiast szybkość transestryfikacji lub ligacji wzrasta wraz ze stężeniem jonów i nie zawsze ulega nasyceniu [Shepotinovskaya, 2010]. Przypuszcza się, że istnieje słabe miejsce wiązania magnezu prawdopodobnie w pobliżu centrum katalitycznego lub zachodzenie zmian strukturalnych przy wyższym stężeniu tych jonów [Shepotinovskaya, 2010]. Zaproponowany model sugeruje udział jonów metalu związanych koordynacyjnie i działających w bezpośredniej bliskości rdzenia katalitycznego, a także niespecyficznych, które oddziałują z zasadami w większej odległości od centrum katalitycznego. Sugeruje się, że kation może być wiązany koordynacyjnie przez nukleotyd odgrywający rolę kwasu w modelu kooperatywnego działania nukleotyd metal. Występowanie drugiego kationu w roli strukturalnej było by niezbędne do kształtowania centrum katalitycznego, przesunięcia równowagi w kierunku aktywnej konformacji lub stabilizacji ujemnego ładunku stanu przejściowego [Leclerc, 2010; Lee, 2010].

Przypuszcza się, że jony magnezu leżące na zewnątrz cząsteczki RNA są od niej oddalone o 3 – 5Å i związane koordynacyjnie, co moduluje jej dynamikę. Lokalnie zmieniają one konformację RNA, a globalnie spowalniają wahania cząsteczki. Dzięki temu odkryciu zmienił się ogólnie przyjęty model oddziaływań jonów magnezu z cząsteczkami RNA, w którym postulowano silne związanie kilku jonów z RNA podczas gdy pozostałe otaczają cząsteczkę w stanie rozproszonym [Hayes, 2012].

1.7. Antysensowe oligonukleotydy

W latach 70 XX wieku rozpoczęto badania nad możliwością wykorzystania syntetycznych jednoniciowych oligonukleotydów do skutecznego i specyficznego hamowania ekspresji określonych RNA. Pierwszy eksperyment, w którym wykorzystano krótki (13 nt) deoksyrybonukleotyd, dotyczył zahamowania replikacji wirusa mięsaka Rousa (ang. Rous sarcoma virus, RSV) w kulturze fibroblastów embrionalnych [Zamecnik, 1978]. Zaprojektowana cząsteczka wiązała się komplementarnie z 35S RNA. Sukces tego eksperymentu spowodował, że w kolejnych latach wiele grup badawczych skupiło się na wykorzystaniu antysensowych oligonukleotydów (AS-ONs) do aplikacji terapeutycznych [Rich, 1962; Krishnan, 2020].

Antysensowe oligonukleotydy to jednoniciowe cząsteczki DNA, RNA lub ich analogi. Wielkość takich cząsteczek waha się od 12 do 30 nukleotydów. Wprowadzenie AS-ONs do komórki prowadzi do jego związania z komplementarną sekwencją mRNA, pre-mRNA lub wirusowego RNA. Antysensowe oligonukleotydy przyłączają się do docelowego RNA poprzez wiązania Watsona-Cricka, co w konsekwencji prowadzi do specyficznego inaktywacji docelowego RNA poprzez [Kurreck, 2003; Krishnan, 2020]:

- zablokowanie fragmentu mRNA przez AS-ON i zatrzymanie translacji
- degradację heterodupleksu AS-ON:RNA poprzez komórkową RNazę H

Aktywność biologiczna antysensowych oligonukleotydów może być również oparta na inhibicji oddziaływań docelowego RNA z białkami albo kwasami nukleinowymi, hamowaniu składania transkryptów (ang. *splicing*) bądź transportu RNA, modyfikacji kowalencyjnych RNA czy indukcji RNAzy L. W większości przypadków zastosowanie AS-ONs sprowadza się do wykorzystania oligonukleotydów DNA, które wiążąc się do komplementarnej cząsteczki RNA rekrutują RNazę H [Baker, 1999; Krishnan, 2020].

Strategia antysensowych oligonukleotydów były bardzo obiecujące ze względu na wysoką specyficzność oddziaływań AS-ON:RNA oraz skuteczność inhibicji docelowych RNA w układach *in vitro*. Do popularności antysensów przyczynił się również rozwój technik

syntezy oraz coraz mniejszy koszt otrzymania oligonukleotydów. W latach 90-tych XX wieku prowadzono szereg badań klinicznych nad efektywnością i skutecznością antysensowych oligonukleotydów skierowanych na transkrypty białek onkogennych, wirusy RNA, czynniki patologiczne w chorobach sercowo-naczyniowych, stanach zapalnych, infekcjach bakteryjnych oraz wielu innych stanach patologicznych [Pirollo, 2003; Rayburn, 2008; Krishnan, 2020].

Badania prowadzone nad wykorzystaniem antysensowych oligonukleotydów do inhibicji RNA w organizmach ludzkich wykazały, że strategia ta niesie ze sobą szereg ograniczeń takich jak [Dove, 2002; Pirollo, 2003; Kurreck, 2003; Krishnan, 2020]:

- szybka degradacja antysensowych oligonukleotydów przez egzo- i endonukleazy, które są obecne w płynach ustrojowych
- brak penetracji błon biologicznych i transportu do wnętrza komórek
- trudność w specyficznym dostarczaniu do konkretnego organu, tkani czy grupy komórek
- trudności w projektowaniu AS-ON związane z niedoskonałością przewidywań *in silico* drugorzędowej struktury docelowych RNA
- wywoływanie odpowiedzi immunologicznej przez syntetyczne antysensowe oligonukleotydy, które zawierają niemetylowane dinukleotydy CpG będące markerem dla ludzkiego układu odpornościowego wskazującym na obecność obcego materiału genetycznego przeważnie wirusów i bakterii.

1.7.1. Modyfikacje antysensowych oligonukleotydów

Badania nad zastosowaniem antysensowych oligonukleotydów w warunkach klinicznych przyniosły szereg istotnych informacji na temat wykorzystania kwasów nukleinowych, jako potencjalnych terapeutyków i ujawniły, wymienione powyżej, problemy związane z wdrożeniem kwasów nukleinowych do potencjalnych terapii [Pirollo, 2003, Krishnan, 2020].

Mając na celu zwiększenie stabilności syntetycznych cząsteczek kwasów nukleinowych rozpoczęto badania na chemiczną modyfikacją oligodeoksynukleotydów tak aby zwiększyć ich odporność na działanie nukleaz.

Pierwsze modyfikowane antysensowe oligonukleotydy posiadały modyfikacje w obrębie reszt fosforanowych oligonukleotydów. Najpopularniejsze modyfikacje dotyczyły trifosforanowych pochodnych oligonukleotydów (PS-ONs) charakteryzujące się zwiększoną trwałością w płynach ustrojowych [Krishnan, 2020]. Tego typu cząsteczki spełniają

podstawowe założenia strategii antysensu: specyficznie hybrydują do wybranego fragmentu mRNA oraz aktywują RNazę H. Jednakże dalsze badania wykazały, że możliwe jest generowanie efektów „off-target” wiążących się z aktywacją receptorów TLR oraz stymulację odpowiedzi immunologicznej. Ponadto wykazano niespecyficzne wiązanie do niektórych białek i peptydów komórkowych, które wykazywały powinowactwo do polianionów. Spowodowane jest to wprowadzeniem modyfikacji która zwiększa ładunek ujemny na powierzchni PS-ONs. Zaobserwowano również zmniejszone powinowactwo do docelowych RNA jak również mniejszą stabilność kompleksów PS-ON:RNA w stosunku do niemodyfikowanych cząsteczek [Crooke, 1996]. Mając na celu eliminację niepożądanych efektów oraz poprawy stabilności zaproponowano AS-ONs zawierające modyfikację w pozycji 2' reszty cukrowej. Do najczęstszych należą substytucji grupy: 2'-O-akrylowej, 2'-O-metylowej, 2'-O-metoksyetylowej. Tego typu nukleotydy posiadają zwiększoną odporność na endo- i egz nukleolityczne degradacje [Kurreck, 2003; Krishnan, 2020]. Ponadto wykazano mniejszą toksyczość oraz silniejsze wiązanie docelowego RNA w porównaniu z tiofosforanowymi pochodnymi oligonukleotydów. Antysensowe oligonukleotydy drugiej generacji nie prowadziły jednak do aktywacji RNazy H, a inhibicja RNA z wykorzystaniem tych modyfikowanych oligonukleotydów odbywa się jedynie poprzez steryczne blokowanie translacji na matrycy docelowego RNA [Krishnan, 2020]. W celu aktywacji RNazy H stworzono chimeryczne AS-ONs. Uzyskane w ten sposób cząsteczki często nazywane były gapmerami. W części centralnej wprowadzono modyfikację typu PS natomiast w nukleotydach oskrzydających rdzeń modyfikację innego typu. Uzyskane w ten sposób cząsteczki łączą w sobie zalety obu stosowanych wcześniej strategii: większą stabilność kompleksu AS-ON:RNA, niższą toksyczość, wyższą odporność na degradację nukleolityczną a co najważniejsze zdolność do aktywacji RNazy H. wykazano, że do indukcji aktywności RNazy H niezbędne jest aby chimery zawierały przynajmniej 4 lub 5 centralnie położonych nukleotydów, które będą tri fosforanowymi pochodnymi nukleotydów [Kurreck, 2003; Krishnan, 2020].

Dalsze badania pozwoliły na otrzymanie analogów kwasów nukleinowych wykorzystywanych, jako AS-ONs trzeciej generacji. Do tego typu cząsteczek zaliczamy peptydowe kwasy nukleinowe (ang. *peptide nucleic acids*, PNA), w których szkielet cukrowo-fosforanowy został zastąpiony jednostkami N-(2-aminoetylo)-glicynowymi, morfolino-pochodne oligonukleotydów, w których rybozy zastąpiono podjednostkami morfolinowymi połączonymi wiązaniami fosfor amidowymi, N3'-P5' fosfor amidy, oligonukleotydy zbudowane z LNA (ang. *locked nucleic acids*) czyli rybonukleotydów

zawierających mostek metylenowy między 2'O a 4'C rybozy [Shen, 2018; Krishnan, 2020]. Wymienione wyżej modyfikacje w znaczący sposób wpływają na zwiększenie stabilności oraz odporności na trawienie nukleolityczne. Pomimo specyficznego wiązania do docelowego RNA AS-ON trzeciej generacji uniemożliwiają rekrutację RNazy H w związku z czym są najczęściej wykorzystywane do projektowania chimerycznych antysensowych oligonukleotydów [Crooke, 2017; Shen, 2018;].

2. Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było wykorzystanie strategii bezpośredniego importu cząsteczek aktywnych do mitochondriów oraz regulacja ekspresji wybranych genów mitochondrialnych.

Cel ten realizowany był z wykorzystaniem opracowanej w naszym laboratorium platformy do transkrypcji, obróbki i systemowego transportu cząsteczek z cytoplazmy do mitochondriów komórek roślinnych oraz ludzkich, opartej o sekwencję nośnikową (struktura podobna do tRNA) oraz sekwencję pasażerską (narzędzie do bezpośredniej regulacji ekspresji genów).

W ramach założonego celu głównego postawiono następujące hipotezy i cele badawcze:

1. Wykorzystanie i weryfikacja skuteczności opracowanego narzędzia do bezpośredniej modulacji genomu mitochondrialnego roślin w strategii typu „utrata funkcji” (ang. „loss of function”). W podejściu tym głównym założeniem było wykorzystanie opracowanej technologii jako nowego, niedostępnego dotychczas narzędzia, do badania genów, których funkcja nie została jeszcze dobrze poznana.
2. Weryfikacja i potwierdzenie uniwersalności wykorzystanego konstruktów poprzez wprowadzenie różnorodnych sekwencji pasażerskich – w pracy wykorzystano cząsteczki aktywne katalitycznie- rybozomy oraz oligonukleotydy antysensowe.
3. Adaptacja opracowanego i zweryfikowanego w modelu roślinnym systemu do modyfikacji poziomem ekspresji genomu mitochondrialnego w ludzkich liniach komórkowych.

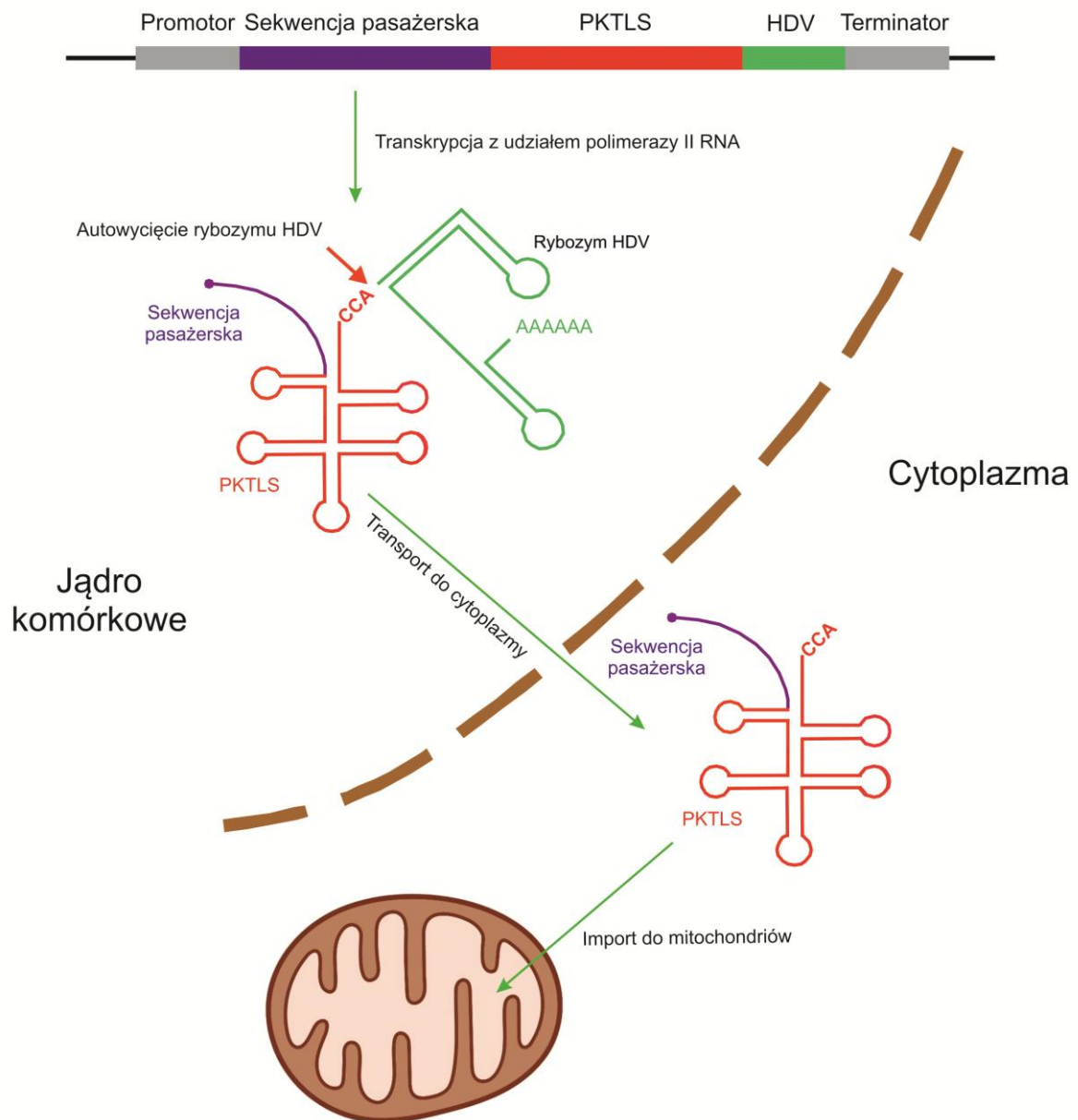
Założone cele zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w niniejszej pracy. Uzyskane wyniki potwierdziły, że opracowany system może być z powodzeniem stosowany do badania funkcji genów mitochondrialnych, a zastosowany nośnik w oparciu o strukturę podobną do tRNA może być uniwersalną platformą do dostarczania narzędzi opartych o kwasy nukleinowe do wnętrza mitochondriów. Ponadto udało się przenieść opracowaną strategię na mitochondria komórek ludzkich, co w przyszłości może przyczynić się do opracowania skutecznych metod modyfikacji genomu mitochondrialnego.

Część zagadnień omawianych w niniejszej pracy została opublikowana:

Sultan D., Mileschina D., Grewe F., Rolle K., Abudraham S., **Głodowicz P.**, Khan Niazi A., Keren I., Shevtsov S., Klipcan L., Barciszewski J., Mower J.P., Dietrich A., Ostersetzer-Biram O. (2016). The Reverse Transcriptase/RNA Maturase Protein MatR Is Required for the Splicing of Various Group II Introns in Brassicaceae Mitochondria. *Plant Cell*, 28: 2805-2829.

3. Wyniki badań własnych

Informacja genetyczna w komórka eukariotycznych zawarta jest w sekwencji genomu jądrowego oraz w DNA organelli, takich jak mitochondria u zwierząt czy chloroplasty i mitochondria u roślin. Od prawidłowego funkcjonowania metabolicznych i sygnałowych szlaków istniejących pomiędzy organellami i jądrem zależy homeostaza komórkowa. Mitochondria są niezbędne dla przeżycia komórki, jej aktywności, oddziaływania ze środowiskiem, odpowiedzi na stres, adaptacji czy tolerancji na czynniki środowiska. Ponadto są one również zaangażowane w procesy starzenia oraz odgrywają kluczową rolę w procesach programowanej śmierci komórki, apoptozy i nekrozy. Duża część białek mitochondrialnych kodowana jest przez genom jądrowy, a następnie importowana do mitochondriów po translacji zachodzącej w cytozolu. Dotyczy to również kilku specyficznych RNA. Mitochondria wykazują swoistą autonomię w związku z czym nie ma skutecznych metod interwencji w ich program genetyczny. Do tej pory próby wykorzystania szlaków transportujących białka okazały się nieefektywne i niespecyficzne. Na bazie współpracy naszego laboratorium oraz zespołu kierowanego przez prof. Andre Dietrich z Institut de Biologie Moléculaire des Plantes CNRS w Strasbourgu we Francji opracowano system transportu cząsteczek aktywnych pozwalających na modyfikację genomu roślinnego. System ten jest pierwszym, efektywnym narzędziem pozwalającym na kontrolowaną manipulację materiałem genetycznym mitochondriów roślinnych. Jego skuteczność zweryfikowano badając efekty ograniczenia ekspresji genu o poznanej funkcji, takiego jak *atp9* [Val, 2011]. W podejściu tym wykorzystano naturalny proces transportu cytoplazmatycznych tRNA do wnętrza mitochondriów i na nim oparto konstrukcję wektora „nośnikowego”. Sekwencja rybozomu HH została wbudowana w wektor w bezpośrednim sąsiedztwie sekwencji kodującej rybozom typu HDV, którego zdaniem było precyzyjne wycięcie dojrzałej cząsteczkę rybozomu HH oraz uwolnienie sekwencji CCA- niezbędnego „znacznika” sygnalizacyjnego dla systemów transportu mitochondrialnego. Osią i głównym elementem konstruktu jest sekwencja podobna do tRNA (ang. *tRNA-like sequence, TLS*), która w systemie tym pełni funkcję transportera dojrzałego rybozomu do wnętrza mitochondriów [Val, 2011] (Ryc. 15).



Ryc. 15. Schemat strategii wyciszania genów mitochondrialnych (na podstawie Val, 2011). Komórka roślinna została transformowana konstruktem zawierającym sekwencję dla struktury podobnej do tRNA (PKTLS). W celu wygenerowania końca 3' wolnego dla aminoacylacji w opisanym konstrukcie umieszczono sekwencję dla rybozomu HDV, działającego *in cis*. W wyniku działania polimerazy RNA II dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstrukt. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozomu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie PKTLS. Dojrzały konstrukt, zawierający sekwencję pasażerską, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.

Wyniki uzyskane w trakcie realizacji pracy można podzielić na dwie główne części obejmujące:

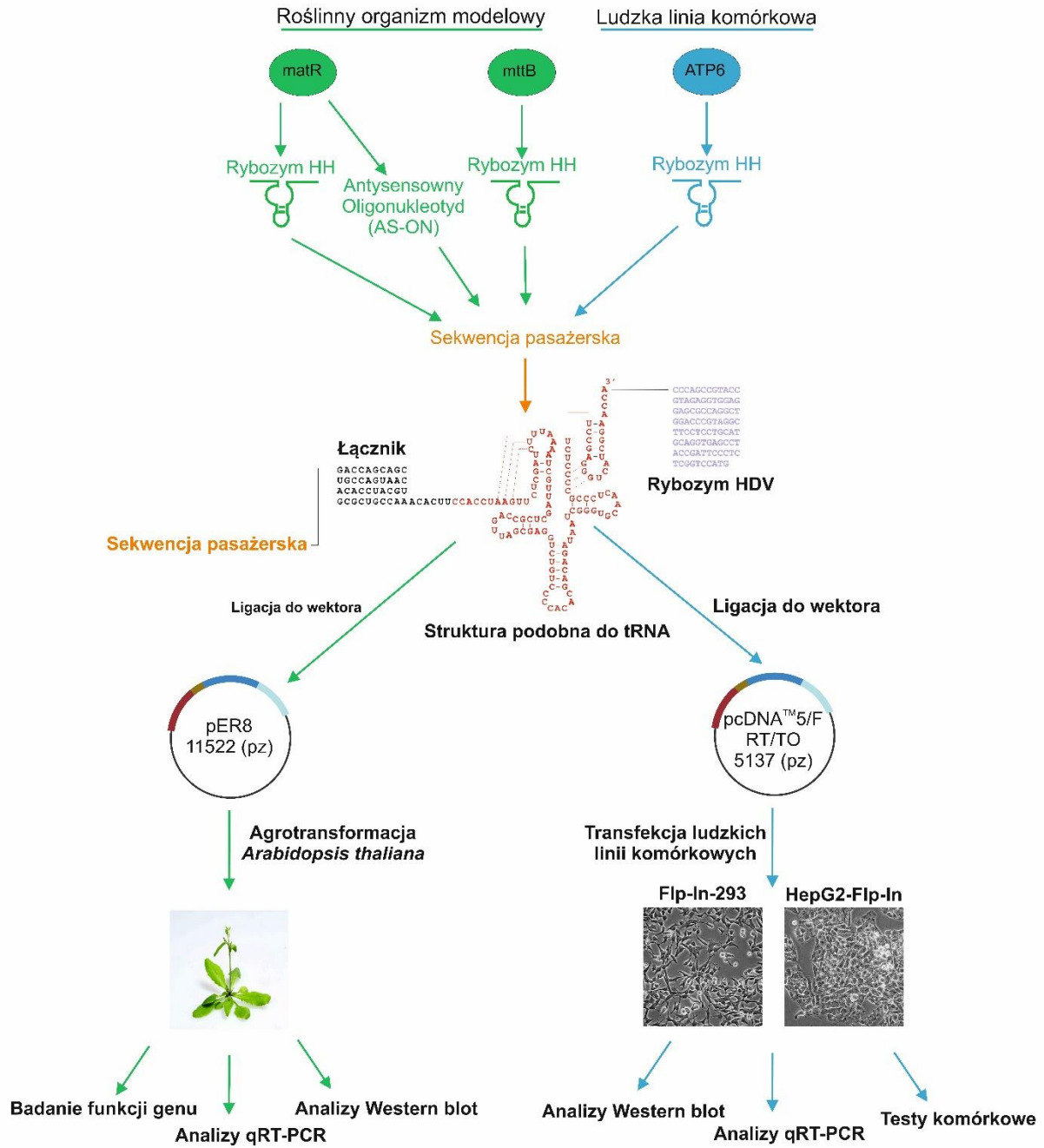
1. wykorzystanie konstruktów w układzie roślinnym oraz
2. wykazanie efektywności systemu w układzie modelowym komórek ludzkich.

W trakcie realizacji części pierwszej powyższy konstrukt wykorzystano do badania funkcji słabo poznanych dotychczas mitochondrialnych genów roślinnych, takich jak: matura matR oraz gen mttB. W przypadku badania funkcji matR wykorzystano wektor zawierający sekwencję aktywnego katalitycznie rybozomu, jak również zmodyfikowano konstrukt poprzez wprowadzenie do niego sekwencji dla oligonukleotydu antysensownego (Ryc. 16).

Wyniki badania funkcji matR w oparciu o konstrukt zawierający sekwencję dla rybozomu zostały opublikowane w pracy: *Sultan L., Mileshina D., Grewe F., Rolle K., Abudraham S., Głodowicz P., Khan Niazi A., Keren I., Shevtsov S., Klipcan L., Barciszewski J., Mower J.P., Dietrich A., Ostersetzer-Biram O. (2016). The Reverse Transcriptase/RNA Maturase Protein MatR Is Required for the Splicing of Various Group II Introns in Brassicaceae Mitochondria. Plant Cell, 28: 2805-2829* i zostaną w niniejszej rozprawie doktorskiej jedynie krótko omówione i podsumowane.

Wyniki realizacji części drugiej wykorzystującej modelowy układ komórek ludzkich obejmowały (Ryc. 16):

1. weryfikację hipotezy o aktywnym transporcie tRNA z cytoplazmy do mitochondriów, podobnie jak w przypadku roślin,
2. budowę nowego konstruktów transportującego aktywny katalitycznie rybozym do wnętrza mitochondriów,
3. weryfikację skuteczności narzędzia na poziomie ekspresji genów docelowych oraz
4. ocenę bezpieczeństwa konstruktów w stosunku do komórek ludzkich pod kątem jego ewentualnego wykorzystania w terapii chorób mitochondrialnych.



Ryc. 16. Ogólny schemat prowadzonych badań.

3.1. Badanie skuteczności wektora w układzie roślinnym

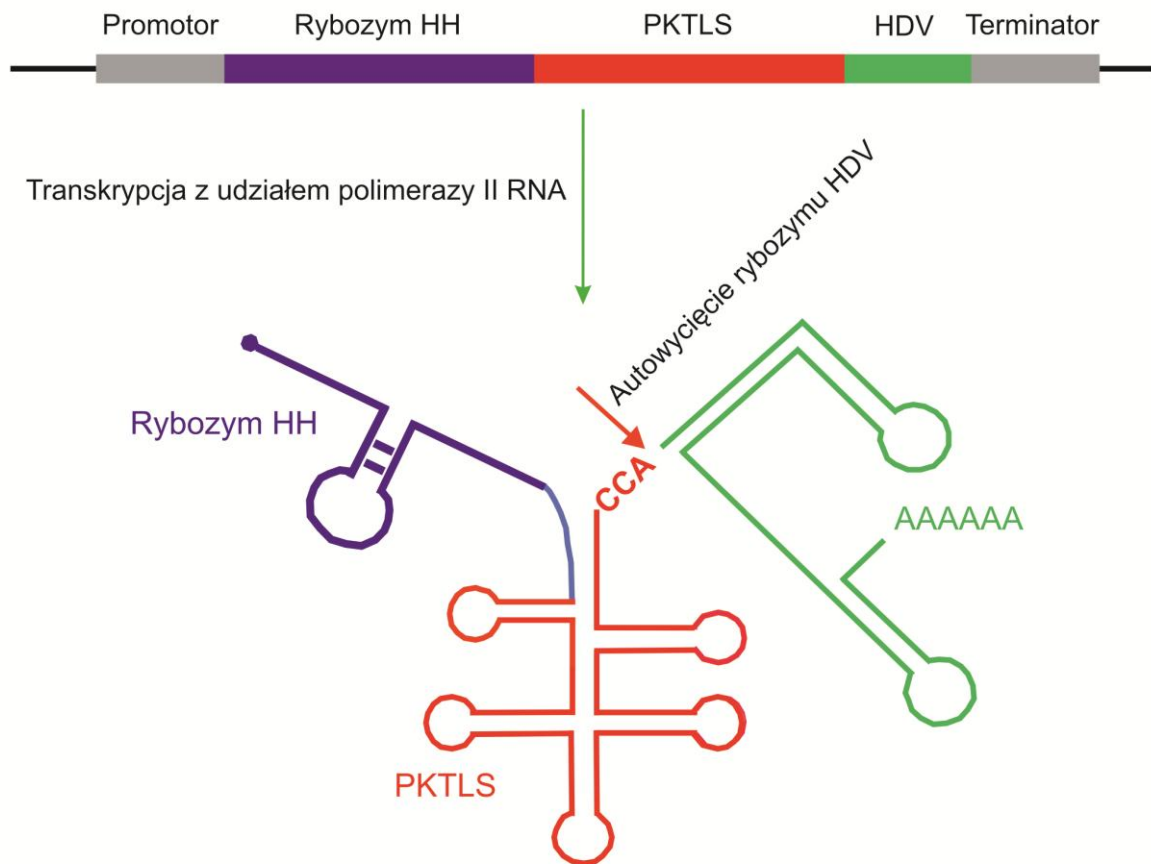
3.1.1. Charakterystyka funkcji genu matR z wykorzystaniem konstruktów zawierających rybozym

Uzyskane w podejściu pilotażowym wyniki [Val, 2011] pokazały, że metoda modyfikacji genomu mitochondrialnego jest skuteczna w odniesieniu do genu o opisanej funkcji. W związku z tym, jednym z celów mojej pracy doktorskiej była weryfikacja użyteczności opracowanej wcześniej strategii w podejściu typu „loss-of function”, którego głównym założeniem jest badanie funkcji genu poprzez wyciszenie jego ekspresji. W niniejszych badaniach, jako gen docelowy wybrano maturazę mitochondrialną matR, której funkcja nie została dotąd w pełni poznana [Sultan, 2016].

3.1.1.1. Przygotowanie konstruktów

W celu potwierdzenia zaangażowania genu matR w składanie transkryptów intronów grupy II w mitochondriach roślinnych zaprojektowane zostały dwa rybozomy HH (matRz1 oraz matRz2). Katalityczne kwasy nukleinowe rozpoznające i hydrolizujące sekwencje w obrębie genu MatR zostały wprowadzone do mitochondriów, jako sekwencje pasażerskie połączone z transporterem, którego funkcję w tym przypadku pełni struktura podobna do tRNA^{Val} pochodząca z wirusa żółtej mozaiki rzepy (ang. *Turnip yellow mosaic virus*) (Ryc. 17). Zaprojektowane rybozomy rozpoznawały sekwencje GUC w różnych miejscach genu matR (Ryc. 18).

Celem potwierdzenia specyficzności zaprojektowanych cząsteczek przygotowano również rybozym skierowany w sekwencję kodującą mitochondrialny gen *sdh3* tytoniu. Sekwencja kodująca ten gen nie jest obecna w roślinach z rodziny *Brassicaceae* w tym również w *Arabidopsis* i miała posłużyć za kontrolę negatywną eksperymentu.



Ryc. 17. Schemat strategii wyciszania genu *matR* z wykorzystaniem rybozymów (na podstawie Val, 2011). Komórka roślinna została transformowana konstruktem zawierającym sekwencję dla struktury podobnej do tRNA (PKTLS). W celu wygenerowania końca 3' wolnego dla aminoacylacji w opisanym konstrukcie umieszczono sekwencję dla rybozymu HDV, działającego *in cis*. W wyniku działania polimerazy RNA II dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstrukt. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozymu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie PKTLS. Dojrzały konstruk, zawierający sekwencję rybozymu, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.

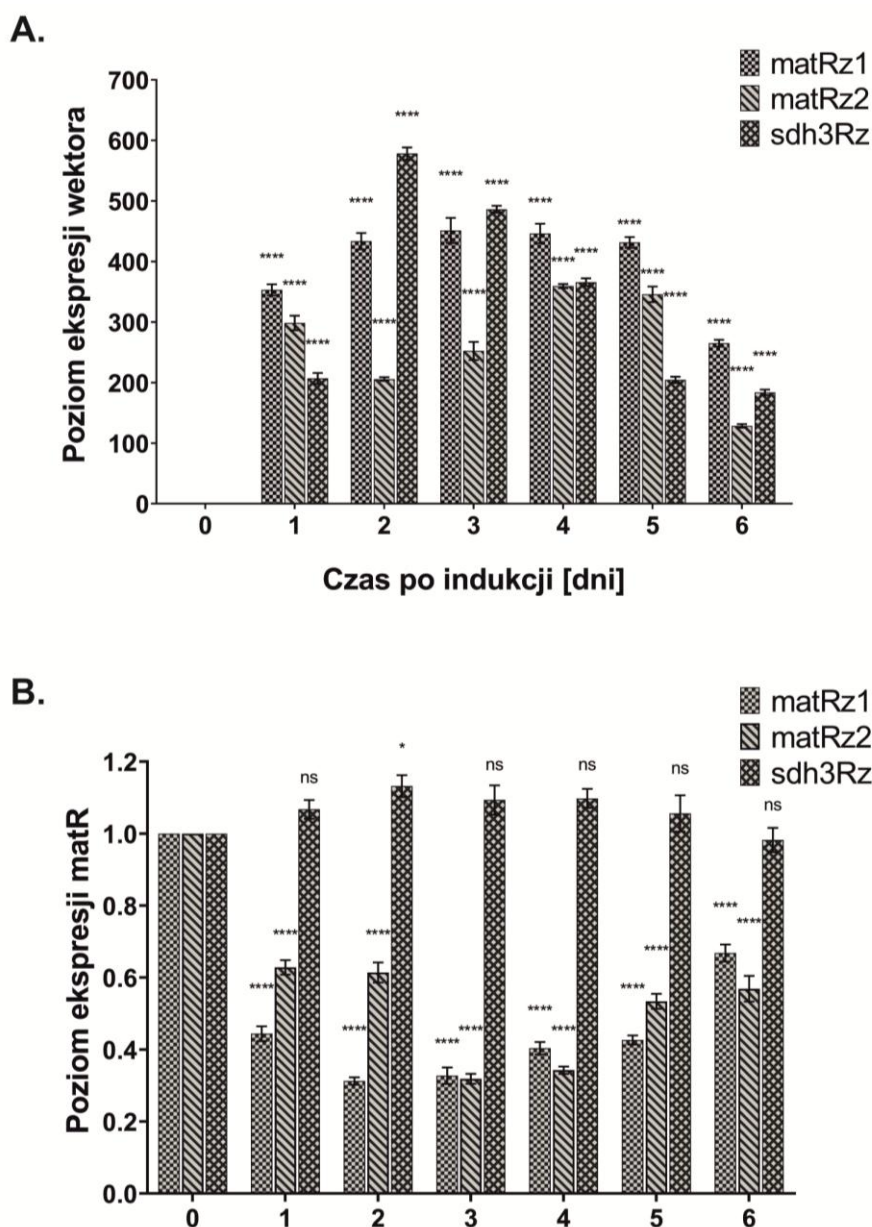
3.1.1.2. Transformacja roślin *Arabidopsis thaliana*

Uzyskany na poprzednim etapie wektor ekspresyjny został wprowadzony do rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* na drodze agrotransformacji z wykorzystaniem *agrobacterium tumefaciens*. Nasiona transformowanych roślin zostały zebrane i wysiane na płytce z podłożem stałym zawierającym antybiotyk selekcyjny (hygromycyna). Otrzymane w ten sposób rośliny z pokolenia F2 przenoszono następnie do szklarni i hodowano do uzyskania nasion, które wykorzystane zostały w dalszych badaniach. W wyniku agrotransformacji uzyskano trzy linie transgenicznych roślin, które nazwano matRz1, matRz2 oraz sdh3.

3.1.1.3. Badanie zmian poziomu ekspresji mRNA

W celu potwierdzenia ekspresji konstruktów ekspresyjnych we wnętrzu komórki, przeprowadzono indukcję ekspresji wektora za pomocą β -estradiolu. Następnie przeprowadzono izolację całkowitego RNA z młodych roślin oraz wykonano reakcję ilościowego PCR w czasie rzeczywistym. Uzyskane wyniki pokazują, iż w badanych roślinach konstrukt zawierający sekwencję kodującą rybozom HH ulega bardzo wysokiej ekspresji w porównaniu do poziomu kontrolnego w dniu 0 (Ryc. 19) [Sultan, 2016].

Po indukcji ekspresji wektora zawierającego sekwencje dla rybozomów, matRz1 oraz matRz2, poziom transkryptów matR zmniejszył się o 50 do 60% w przypadku linii matRz1 i matRz2. Niższy poziom ekspresji badanego genu utrzymywał się przez 5 dni od momentu dodania czynnika indukującego. W 6 dniu po indukcji obserwowano obniżenie poziomu ekspresji konstruktów matRz1 oraz matRz2, przy jednoczesnym wzroście poziomu ekspresji transkryptu docelowego matR. W przypadku kontrolnego rybozomu sdhRz nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w poziomie ekspresji mitochondrialnego genu matR (Ryc. 19) [Sultan, 2016].

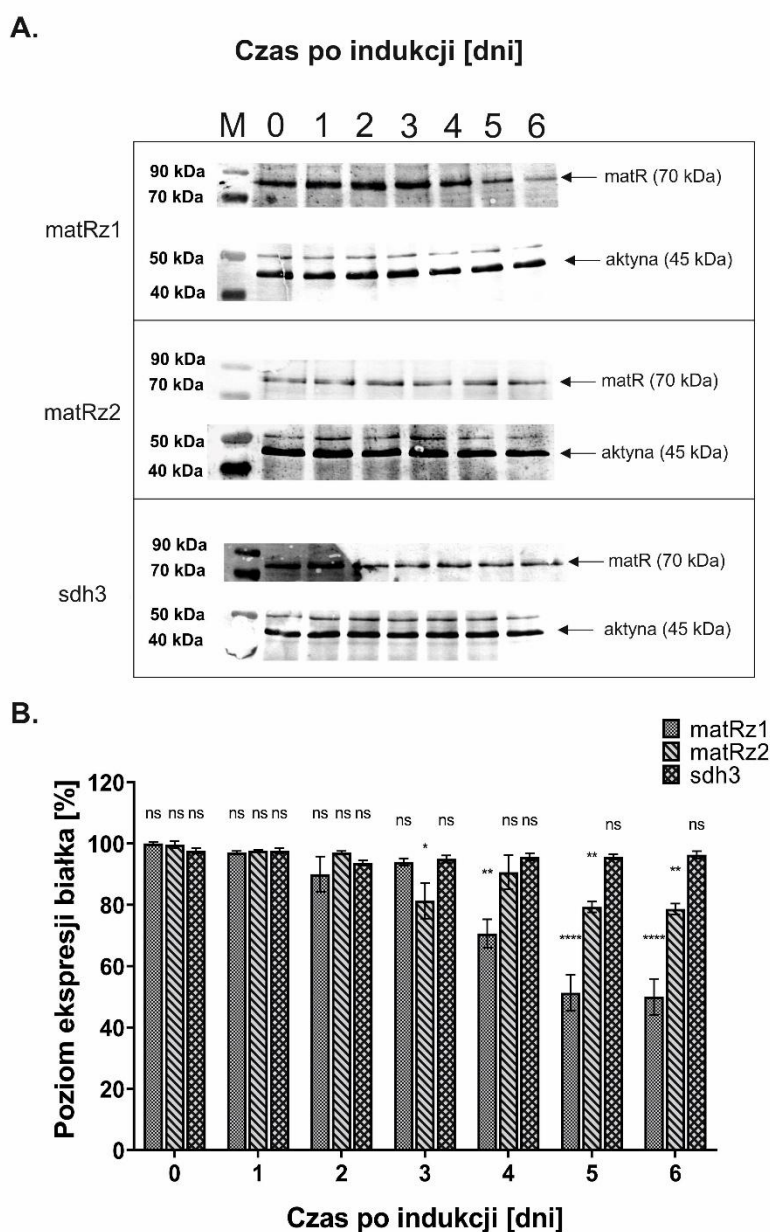


Ryc. 19. Analiza zmian poziomu ekspresji wektora (A) oraz genu matR (B) w agrotransformowanych liniach *Arabidhopsis thaliana*. 0 – rośliny nietraktowane β -estradiolem, 1 – 6 rośliny po indukcji β -estradiolem. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

3.1.1.4. Badanie zmian poziomu ekspresji białka matR

Równoległe do analizy poziomu transkryptów przeprowadzono analizę poziomu białka matR. W tym celu przeprowadzono izolację całkowitego białka oraz oszacowano jego ilość w celu wykonania analizy Western Blot. Analiza metodą Western Blot potwierdziła, że w wyniku działania zaprojektowanych rybozymów poziom białka ulega obniżeniu. W

przypadku matRz1 pierwsze efekty obniżenia poziomu ekspresji matR obserwowano już w drugim dniu, podczas gdy dla matRz2 w dniu 3. Najwyższe obniżenie poziomu białka wynoszące 50% dla matRz1 oraz 20% dla matRz2 zaobserwowano w 5 dniu po indukcji. Podobnie jak w przypadku mRNA w roślinach kontrolnych sdh3Rz nie obserwowano zmian poziomu białka matR (Ryc. 20).

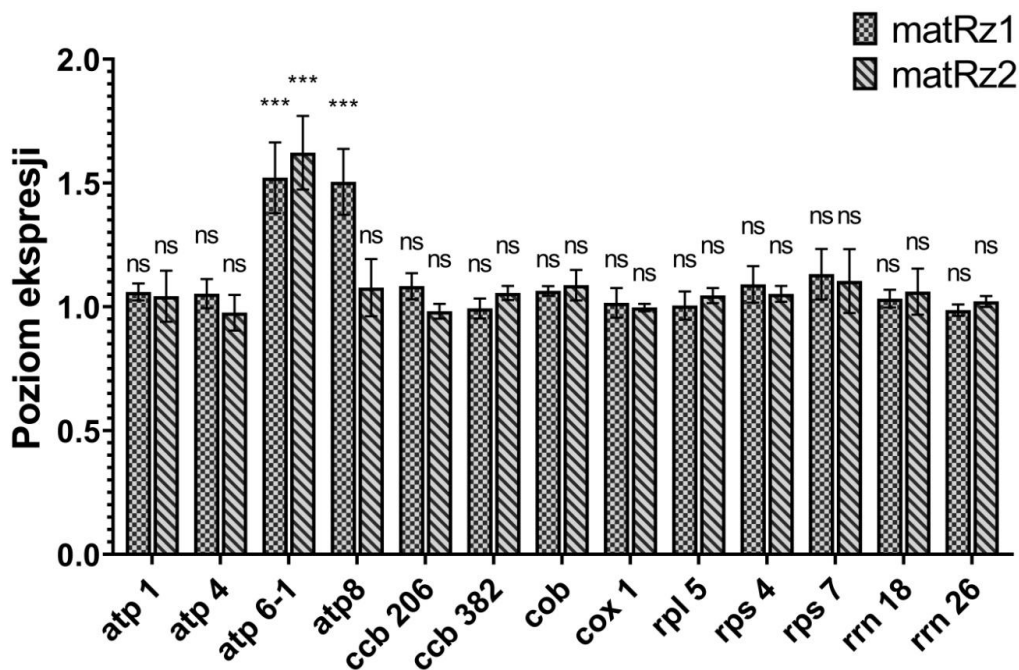


Ryc. 20. Analiza poziomu białka matR w agrotransformowanych roślinach *A. thaliana*. [Sultan, 2016].

A – reprezentatywne bloty dla wszystkich badanych transformantów. **B** - pomiar densytometryczny białka. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

3.1.1.5. Analiza specyficzności badanych konstruktów

W celu potwierdzenia specyficzności zaprojektowanych rybozymów zbadano poziom ekspresji wybranych genów mitochondrialnych. Ze względu na potencjalne zaangażowanie matR w proces składania intronów grupy II, do analizy specyficzności wprowadzonych rybozymów wybrano geny nie zawierające intronów. Poziom ekspresji wybranych genów analizowano metodą qPCR. Do badań wybrano rośliny, w których obserwowano najwyższy poziom obniżenia genu matR. W przypadku większości analizowanych genów nie zaobserwowano znaczących zmian w poziomie ich ekspresji. Wzrost poziomu atp6 oraz atp8 może być spowodowany próbą kompensacji działania mitochondriów, których genom został w niewielkim stopniu zmieniony (Ryc. 21).



Ryc. 21. Poziom ekspresji wybranych genów mitochondrialnych [Sultan, 2016].

Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

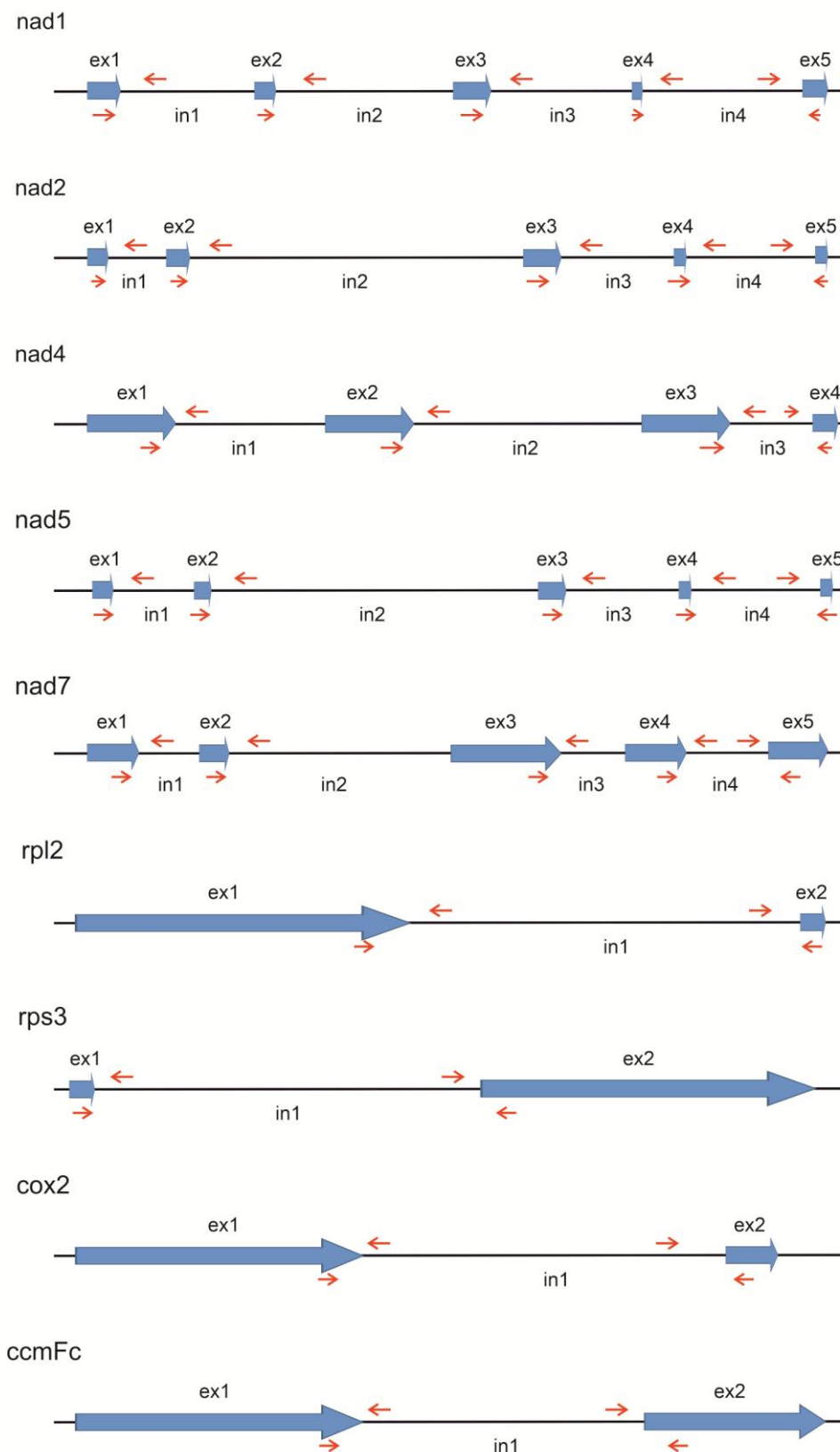
3.1.1.6. Badanie zaangażowania genu *matR* w dojrzewanie transkryptów

W celu potwierdzenia zaangażowania genu *MatR* w proces dojrzewania transkryptów zbadano efektywność składania w agrotransformowanych liniach *matRz* i *sdh3Rz* zarówno przed dodaniem czynnika indukującego jak również 5 dni po wystawieniu roślin na jego działanie. Badaniu poddano 23 introny grupy II w tym *nad1 i1-i4*, *nad2 i1-i4*, *nad4 i1-i3*, *nad5 i1-i4*, *nad7 i1-i4*, *cox2 i1*, *ccmFc i1*, *rpl2 i1*, *rps3 i1* oraz ich flankujące egzony (ryc 22). Całkowite RNA pozyskane z roślin analizowano metodą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych do specyficznej amplifikacji intronów, egzonów oraz połączeń intron-egzon lub egzon-egzon (Ryc. 22).

Obniżenie genu *matR* w szczególny sposób wpłynęło na obniżenie poziomu intronów genów *rpl2*, *rps3*, *cox2* oraz *ccmFc* jak również *nad1 i3*, *nad1 i4*, *nad5 i4*, *nad7 i2*. W mniejszym stopniu zmniejszoną efektywność składania, czyli wyższe stosunki pre-RNA do mRNA obserwowano również w przypadku *nad2 i4*, *nad4 i3* oraz *nad5 i3*. We wszystkich przypadkach akumulacja pre-mRNA, które nie uległo składaniu, korelowała z obniżeniem poziomu transkryptów w obu badanych liniach w porównaniu do roślin kontrolnych (Ryc. 23).

Akumulacja pre-mRNA w liniach z obniżoną ekspresją *matR* była również widoczna dla *nad2 i4*, *nad4 i3* i *nad5 i3* jednakże ze względu na brak większych zmian w poziomie mRNA w liniach *matRz* nie można wyciągnąć ostatecznych wniosków, co do roli *matR* w dojrzewaniu tych transkryptów.

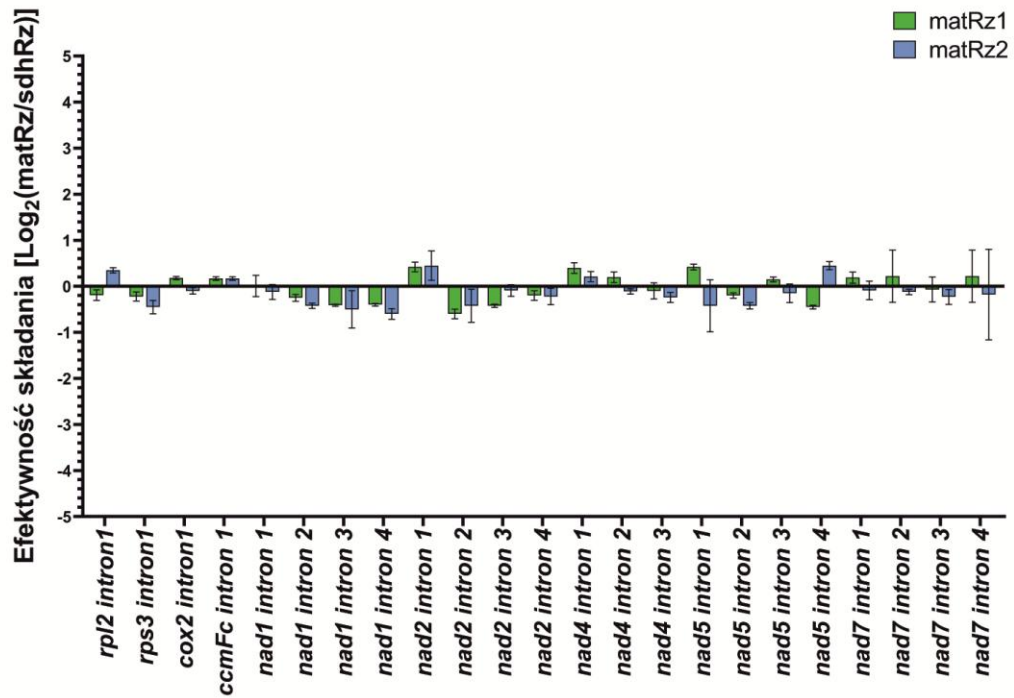
Poziomy mt-RNA odpowiadające *nad2* egzonom 2-3, 3-4, a także w pewnym stopniu egzonom 4-5 oraz *nad5* egzonom 1-2 były nieco wyższe w liniach *matRz*, podczas gdy pomiędzy liniami *sdhRz* i *matRz* nie zaobserwowano istotnych różnic w poziomach transkrypcji *nad1 i1* i *i2*, *nad2 i1*, *nad4 i1*, *nad7 i1*, *i3* i *i4* lub odpowiadających im RNA. W związku z tym można przyjąć, że *matR* nie jest zaangażowane w składanie wymienionych wyżej RNA mitochondrialnych [Sultan, 2016].



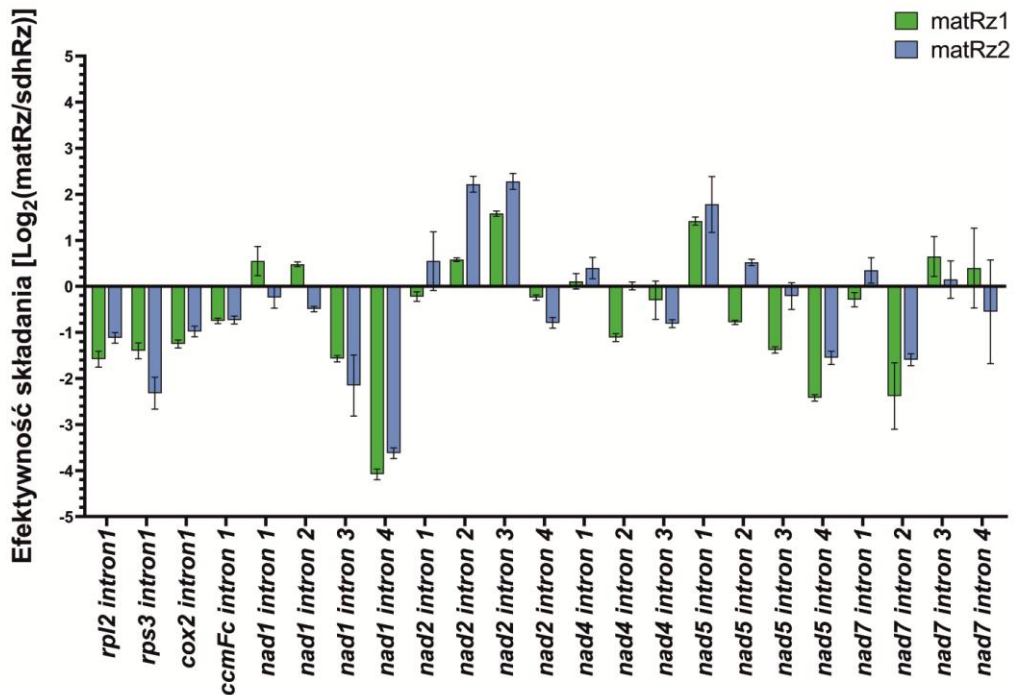
Ryc. 22. Schemat organizacji wybranych genów mitochondrialnych.

Czerwonymi strzałkami zaznaczono miejsca wiązania starterów zaprojektowanych do specyficznej amplifikacji intronów, egzonów oraz połączeń intron-egzon lub egzon-egzon.

A.



B.

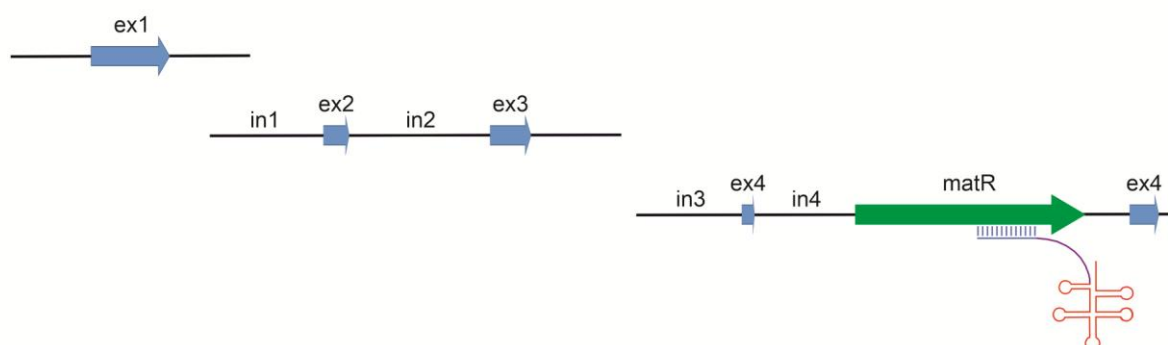


Ryc. 23. Analiza zmian efektywności składania 23 transkryptów zawierających introny grupy II [Sultan, 2016]. A – przed indukcją β -estradiolem B – 5 dni po indukcji β -estradiolem.

3.1.2. Badanie funkcji genu matR z wykorzystaniem antysensownych oligonukleotydów

Pozytywne wyniki uzyskane z zastosowaniem katalitycznych kwasów nukleinowych skłoniły do zadania pytania czy inne technologie oparte o kwasy nukleinowe, jednak działające w oparciu o inne mechanizmy, przyniosą również dobre rezultaty. W związku z tym w kolejnym etapie prowadzonych prac wykorzystano technologię opartą o antysensowne oligonukleotydy. Katalityczne RNA prowadzą do bezpośredniej degradacji docelowej cząsteczki mRNA, podczas gdy technologie oparte o AS-ON hybrydują do mRNA prowadząc do allosterycznej blokady translacji. Ponadto mogą prowadzić do inhibicji oddziaływań docelowego RNA z białkami i kwasami nukleinowymi jak również prowadzić do hamowania składania transkryptów.

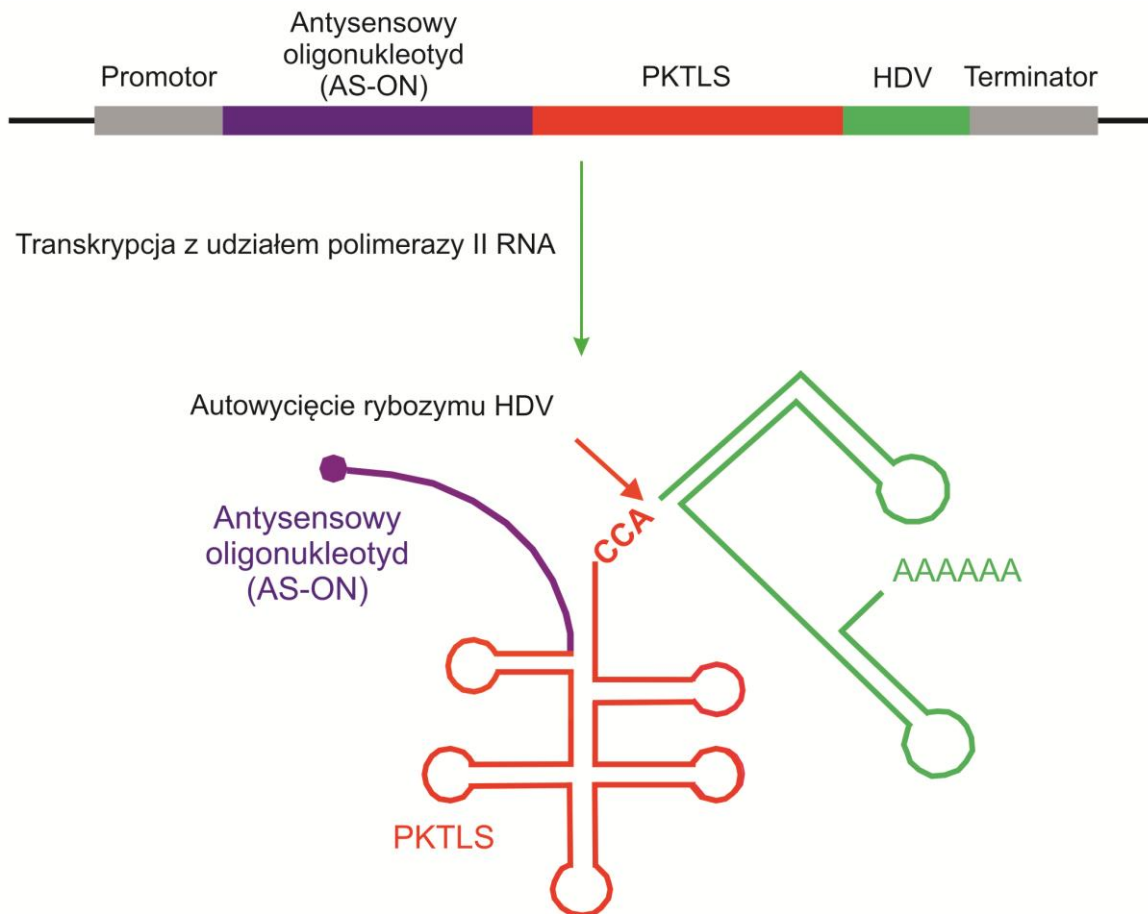
W przypadku wykorzystania antysensownych oligonukleotydów zaprojektowana została cząsteczka o sekwencji komplementarnej do intronu 4 genu kodującego podjednostkę I dehydrogenazy NADH (ang. NADH dehydrogenase subunit I, nad1) w obrębie, której znajduje się sekwencja dla genu maturazy roślinnej – matR (Ryc. 24).



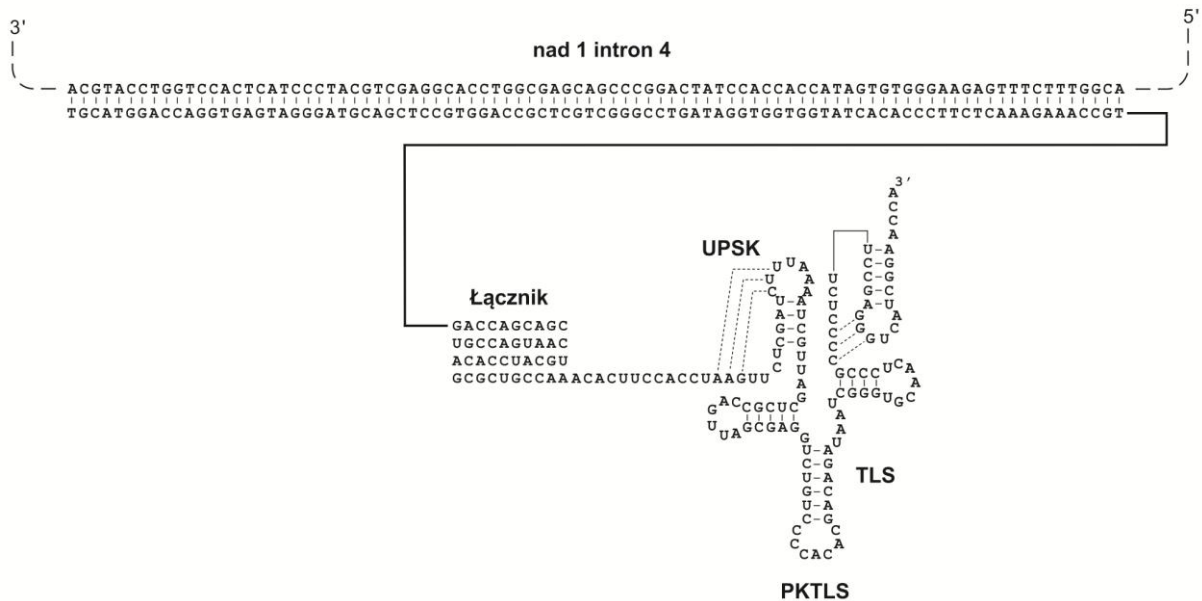
Ryc. 24. Schemat organizacji genu kodującego podjednostkę I dehydrogenazy NADH oraz miejsce działania AS-ON.

3.1.2.1. Przygotowanie konstruktów.

Antysensowny oligonukleotydy rozpoznający sekwencje w obrębie intronu 4 genu nad1, podobnie jak w przypadku rybozymów anty-matR, został wprowadzony do mitochondriów jako sekwencja pasażerska połączona z transporterem (Ryc. 25), którego funkcję w tym przypadku pełni struktura podobna do tRNA^{Val} pochodząca z wirusa żółtej mozaiki rzepy. (Ryc. 26). Przygotowano również konstrukt bez wprowadzonej sekwencji antysensownej, pełniący rolę kontroli.



Ryc. 25. Schemat strategii wyciszania genu *matR* z wykorzystaniem antysensownych oligonukleotydów (na podstawie Val, 2011). Komórka roślinna została transformowana konstruktem zawierającym sekwencję dla struktury podobnej do tRNA (PKTLS). W celu wygenerowania końca 3' wolnego dla aminoacylacji w opisanym konstrukcie umieszczono sekwencję dla rybozomu HDV, działającego *in cis*. W wyniku działania polimerazy RNA II dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstrukt. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozomu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie PKTLS. Dojrzały konstrukt, zawierający sekwencję AS-ON, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.



Ryc. 26. Schemat konstrukt dla AS-ON Nad.

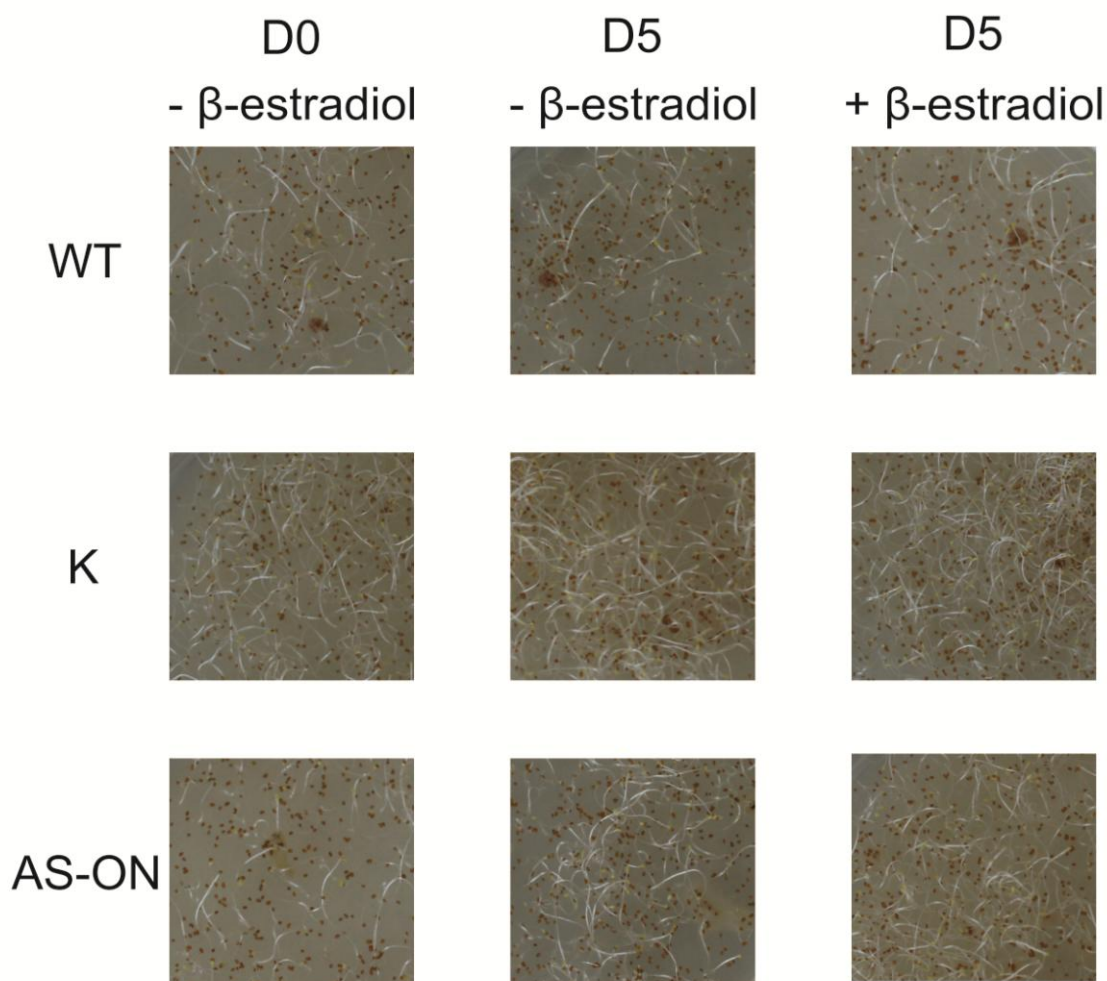
3.1.2.2. Transformacja roślin *Arabidopsis thaliana*

Uzyskany w ten sposób wektor ekspresyjny został wprowadzony do rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* na drodze agrotransformacji z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*. Nasiona transformowanych roślin zostały zebrane i wysiane na płytki z podłożem stałym zawierające antybiotyk selekcyjny (hygromycynę). Uzyskane w ten sposób rośliny przenoszono następnie do szklarni i hodowano do uzyskania nasion. W dalszych analizach wykorzystano rośliny z pokolenia F2.

3.1.2.3. Badanie zmian poziomu ekspresji mRNA

W celu uzyskania materiału do badania ekspresji genu *matR* oraz analizy za pomocą qPCR, nasiona roślin *Arabidopsis thaliana* poddawano procesowi sterylizacji a następnie wysiewano na szalki Petriego zawierającej stałą pożywkę Duchefa i umieszczano na 24 godziny w chłodni w celu synchronizacji ich kiełkowania. Po tym czasie nasiona umieszczano w komorach wzrostu na około 2-4 tygodni. Rośliny w odpowiednim stadium wzrostu poddawano działaniu β -estradiolu. Próby do badań zbierano w odstępach 24 – godzinnych.

Przed pobraniem materiału do izolacji RNA wykonano dokumentację fotograficzną, która potwierdza brak efektów fenotypowych działania β -estradiolu oraz ekspresji wprowadzonego plazmidu w porównaniu z roślinami typu dzikiego (Ryc. 27).

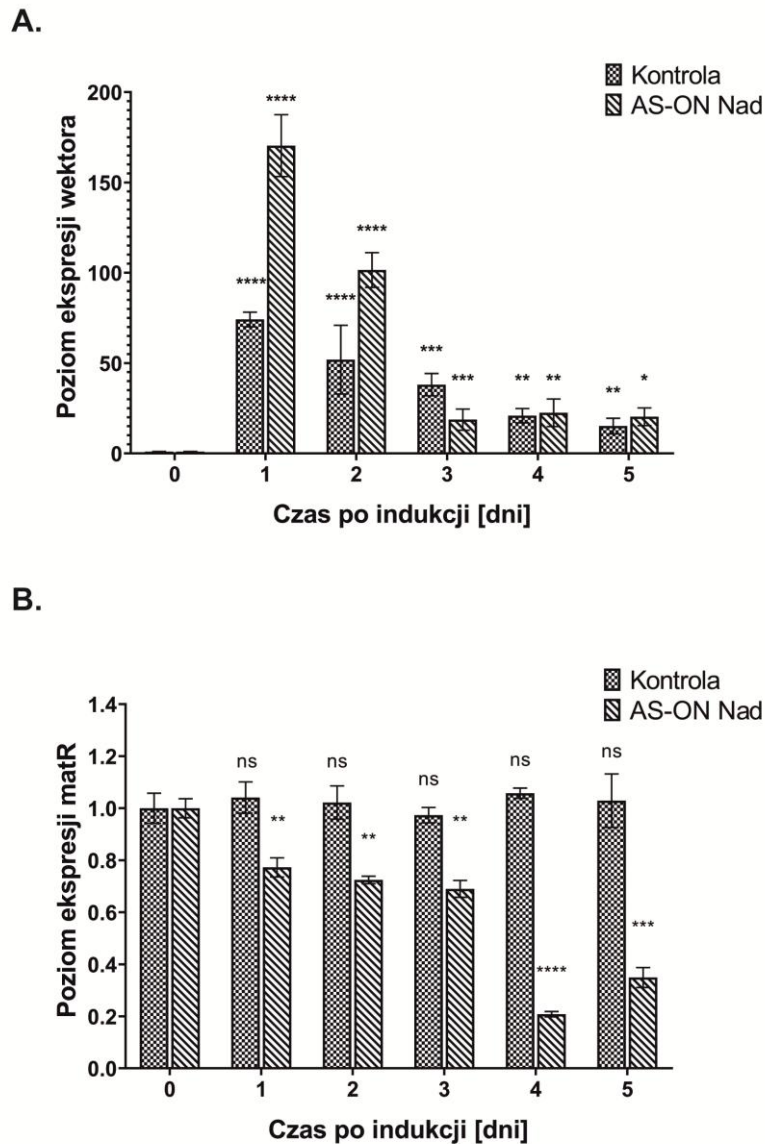


Ryc. 27. Fenotyp transgenicznych roślin *Arabidopsis thaliana* w porównaniu z roślinami typu dzikiego.

WT – rośliny typu dzikiego, K – rośliny kontrolne, AS-ON – rośliny transformowane konstruktem PKTLS. D0 – dzień 0 przed indukcją, D5 – dzień 5 po indukcji, - β -estradiol – rośliny nietraktowane czynnikiem indukcyjnym, + β -estradiol – rośliny traktowane czynnikiem indukcyjnym.

W kolejnym etapie dokonano izolacji całkowitego RNA z młodych roślin, a następnie przeprowadzono analizę jakościową uzyskanego materiału w żelu agarozowym. Uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji cDNA posłużył jako matryca dla reakcji qPCR. Analizie poddano poziom ekspresji wektora oraz docelowego genu *matR*. Wykorzystano również startery zaprojektowane do specyficznej amplifikacji intronów, egzonów oraz połączeń intron-egzon, egzon-egzon lub egzon-intron. Wszystkie zastosowane startery reakcji zaprojektowano i przetestowano na wcześniejszych etapach prac [Sultan, 2016].

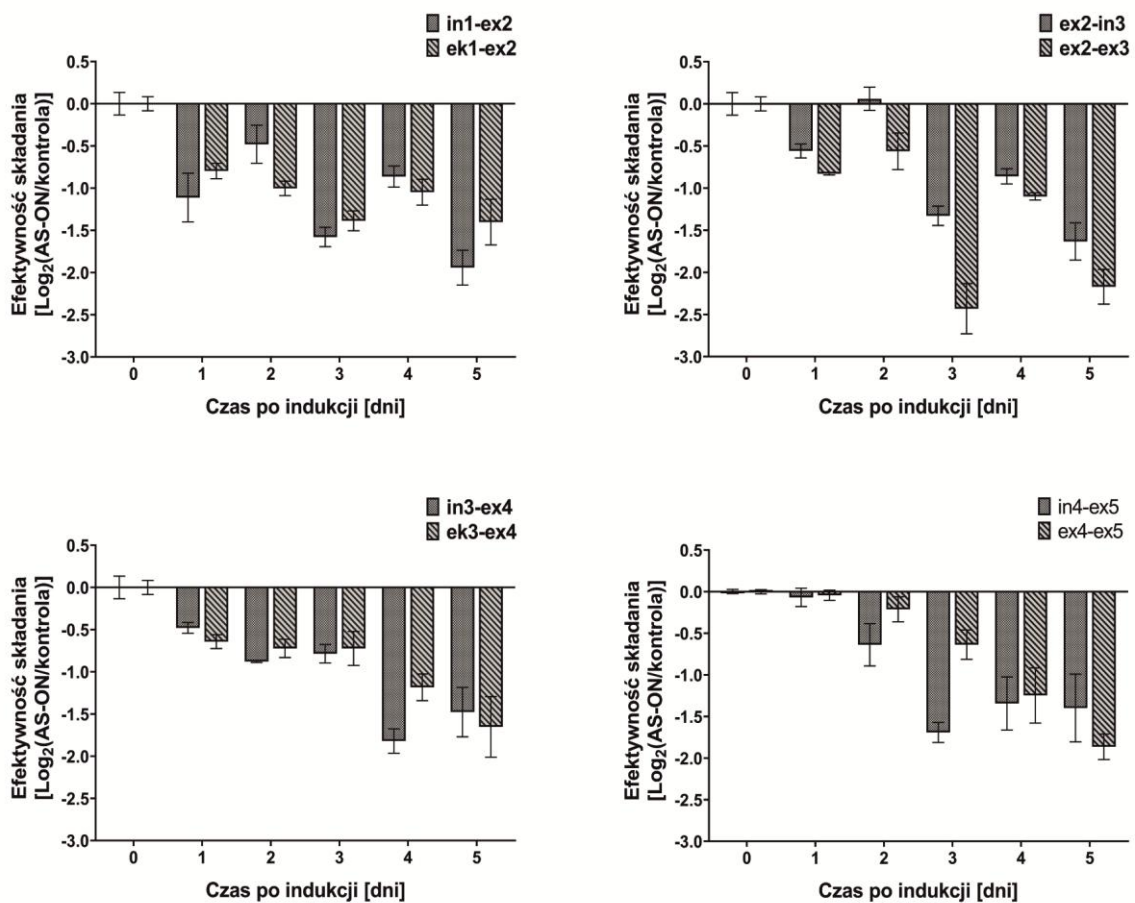
Uzyskane wyniki pokazują, iż w badanych roślinach, poddanych działaniu β -estradiolu, konstrukct zawierający sekwencję kodującą AS-ON ulega bardzo wysokiej ekspresji w pierwszych dwóch dniach po indukcji. W kolejnych punktach czasowych (3-5) obserwujemy spadek ekspresji wektora (Ryc. 28).



Ryc. 28. Analiza zmian poziomu ekspresji wektora (A) oraz genu matR (B) w agrotransformowanych liniach *Arabidopsis thaliana*. 0 – rośliny nietraktowane β -estradiolem, 1-5 rośliny po indukcji β -estradiolem. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ brak istotności statystycznej dla $p \geq 0,05$.

Po indukcji roślin poziom mRNA matR zmniejszył się o 20% w dniu pierwszym, 25% w dniu drugim i około 30% w dniu trzecim. Największe, wynoszące około 80%, obniżenie poziomu ekspresji badanego genu obserwujemy w dniu czwartym. W dniu piątym obserwowano niewielki wzrost poziomu ekspresji genu matR. Zgodnie z przewidywaniami w przypadku roślin kontrolnych nie zaobserwowano żadnych znaczących zmian w poziomie ekspresji mitochondrialnego genu matR (rys. 28). Również w przypadku strategii opartej o antysensowe oligonukleotydy zbadany został wpływ obniżenia mitochondrialnego matR na efektywność składania transkryptów genu nad 1 (Ryc. 29).

Wyniki uzyskane z zastosowaniem strategii antysensowej pokrywają się z tymi uzyskanymi w przypadku strategii opartej o katalityczne kwasy nukleinowe. Również w tym przypadku obserwowaliśmy obniżenie efektywności składania dla genu nad1 co po raz kolejny wskazuje na zaangażowanie mitochondrialnego matR w proces dojrzewania transkryptów intronów grupy II.

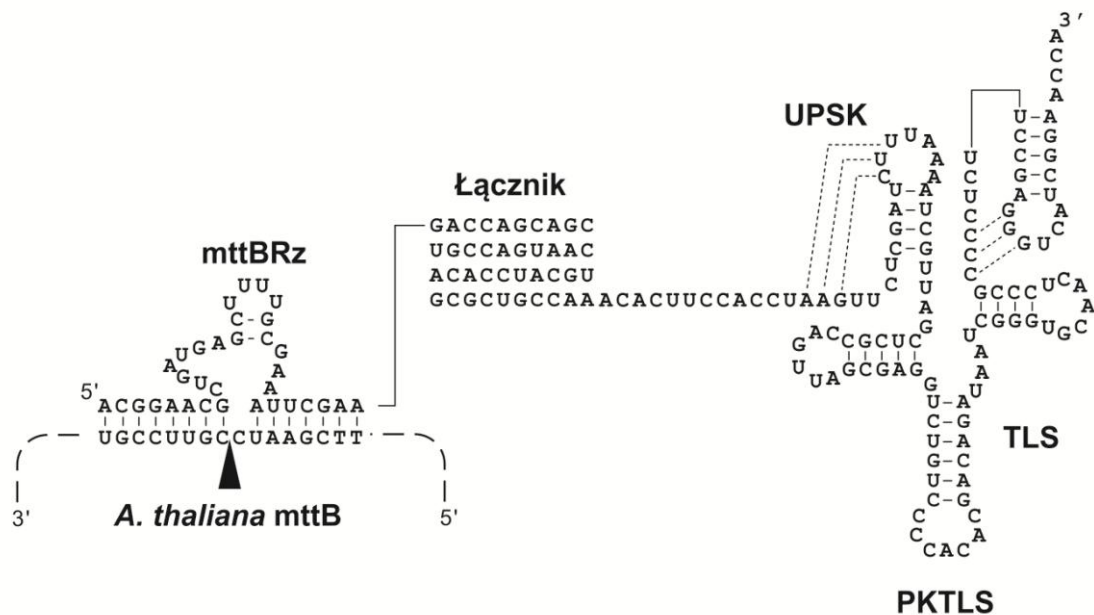


Ryc. 29. Analiza zmian efektywności składania genu nad1.

Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych.

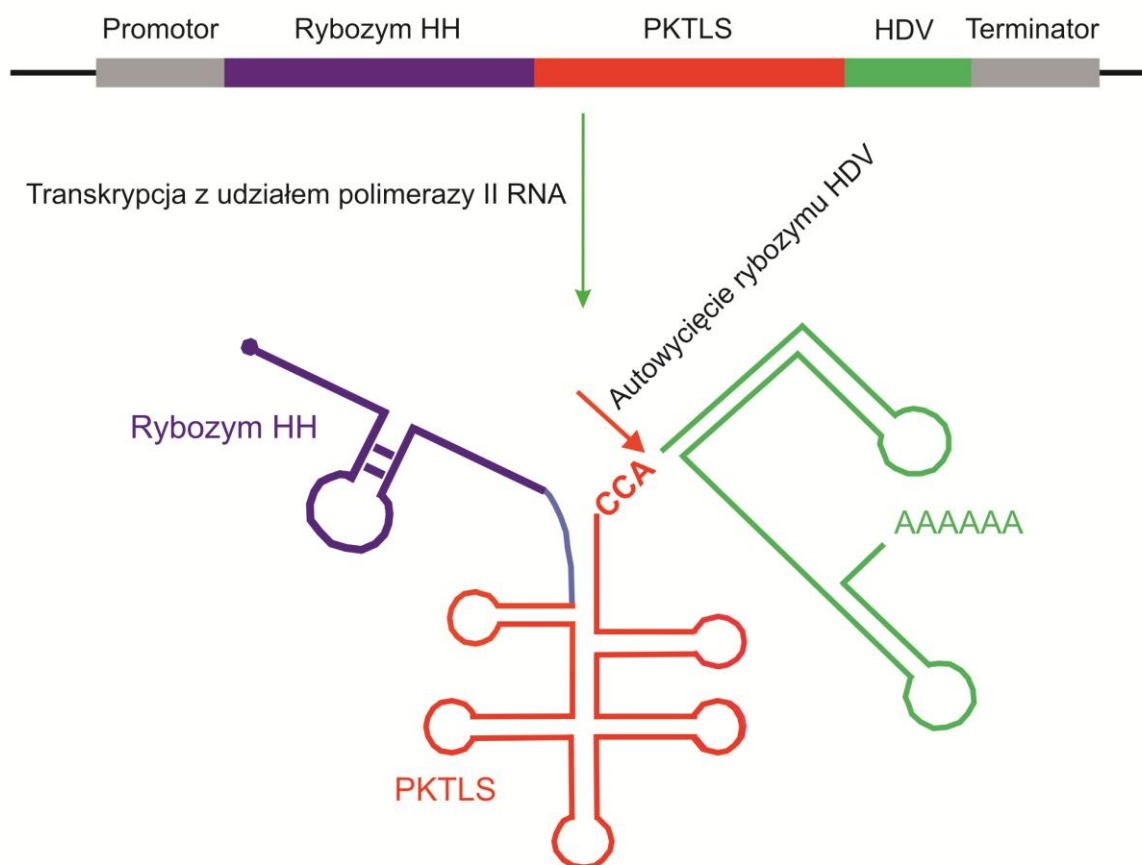
3.1.3. Analiza zmian ekspresji genu *mttB* pod wpływem rybozymów

W niniejszych badaniach zaprojektowano również rybozym skierowany w sekwencję kodującą mitochondrialny gen *mttB* (ang. *Transport membrane protein*). Gen ten koduje białko o homologii do TatC, będącego składnikiem systemu Tat (ang. *twin-arginine translocase*). System ten odpowiedzialny jest za transport oraz translokację białek natywnych, jak również oligomerów przez błony biologiczne. Przypuszcza się również, że ekspresja genu *mttB* może być związana z odpowiedzią rośliny na stres abiotyczny.



Ryc. 30. Struktura pierwszo- i drugorzędowa konstruktów zawierających rybozym HH dla mRNA *mttB*.

W przypadku podejścia badania funkcji *mttB* zaprojektowano wektor zawierający sekwencję rybozimu HH (Ryc. 30). Analogicznie, jak w przypadku poprzednich podejść zaprojektowana cząsteczka rybozimu została wprowadzona do mitochondriów, jako sekwencja pasażerska połączona z transporterem, którym jest struktura podobna do tRNA^{Val} pochodząca z wirusa żółtej mozaiki rzepy (Ryc. 31).

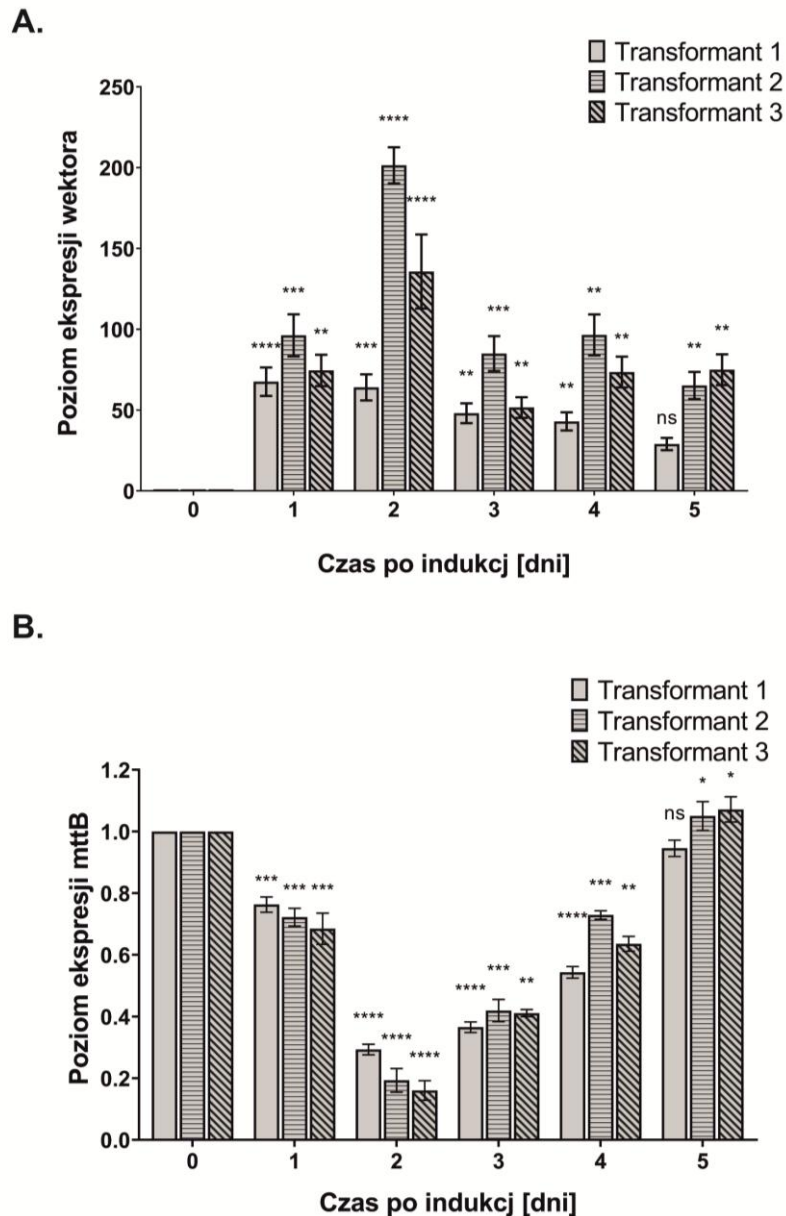


Ryc. 31. Schemat strategii wyciszania genu *mttB* z wykorzystaniem rybozymów (na podstawie Val, 2011). Komórka roślinna została transformowana konstruktem zawierającym sekwencję dla struktury podobnej do tRNA (PKTLS). W celu wygenerowania końca 3' wolnego dla aminoacylacji w opisanym konstrukcie umieszczono sekwencję dla rybozymu HDV, działającego *in cis*. W wyniku działania polimerazy RNA II dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstrukt. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozymu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie PKTLS. Dojrzały konstruk, zawierający sekwencję rybozymu, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.

Badania efektywności badanego konstrukt zostały w pierwszym etapie potwierdzone w warunkach *in vitro* [dane zespołu badawczego, niepublikowane). W następnym etapie, podobnie, jak w przypadku poprzednich podejść, modelowa roślina *A. thaliana* poddana została agrottransformacji. Rośliny z pokolenia F2 zostały wykorzystane w dalszych analizach. W tym przypadku w wyniku wstępnej selekcji uzyskano trzy transformanty oznaczone jako T1, T2, T3. Podobnie również, jak w poprzednich przypadkach w celu uzyskania materiału do analiz metodą qPCR nasiona transformowanych roślin poddano

procesowi sterylizacji, a następnie wysiewano na szalki Petriego ze stałą pożywką Duchefa i umieszczano na 24 godziny w chłodni w celu synchronizacji ich kiełkowania. Następnie szalki z nasionami przenoszono do komór wzrostu na około 2-4 tygodni. Rośliny, które osiągnęły odpowiednie stadium wzrostu poddawano działaniu czynnika indukcyjnego, a próby do badań pobierano w odstępach 24 – godzinnych. W kolejnym etapie dokonano izolacji całkowitego RNA z młodych roślin, a następnie przeprowadzono analizę jakościową uzyskanego materiału w żelu agarozowym. Uzyskany w wyniku odwrotnej transkrypcji cDNA posłużył, jako matryca dla reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym.

Uzyskane wyniki wskazują, że w badanych roślinach, poddanych działaniu β -estradiolu, konstrukt zawierający sekwencję kodującą rybozym HH ulega bardzo wysokiej ekspresji we wszystkich badanych transformantach. Najwyższą ekspresję obserwujemy w przypadku T2 w drugim dniu prowadzonych obserwacji. Najniższym poziomem ekspresji wektora odznacza się T1. Obserwacja to może wskazywać na fakt, że proces agrotransformacji przebiega z różną wydajnością. Podobnie jak w przypadku poprzednich analiz obserwowano spadek ekspresji wektora wraz z czasem. Po indukcji roślin obserwujemy obniżenie poziomu mRNA *mttB* już w pierwszym dniu. Spadek ten wynosi 24% dla T1, 28% dla T2 i 32% dla T3. Najwyższy spadek ekspresji obserwujemy w dniu 2 i w zależności od badanego transformantu wynosi od 70 – 85%. W kolejnych punktach czasowych obserwujemy stopniowy powrót ekspresji *mttB* do poziomu wyjściowego. W dniu 5 poziom mRNA jest minimalnie podwyższony dla T2 i T3 odpowiednio 5 i 7% oraz nieznacznie obniżony (6%) dla T1. W przypadku roślin kontrolnych nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji genu *mttB* (Ryc. 32).

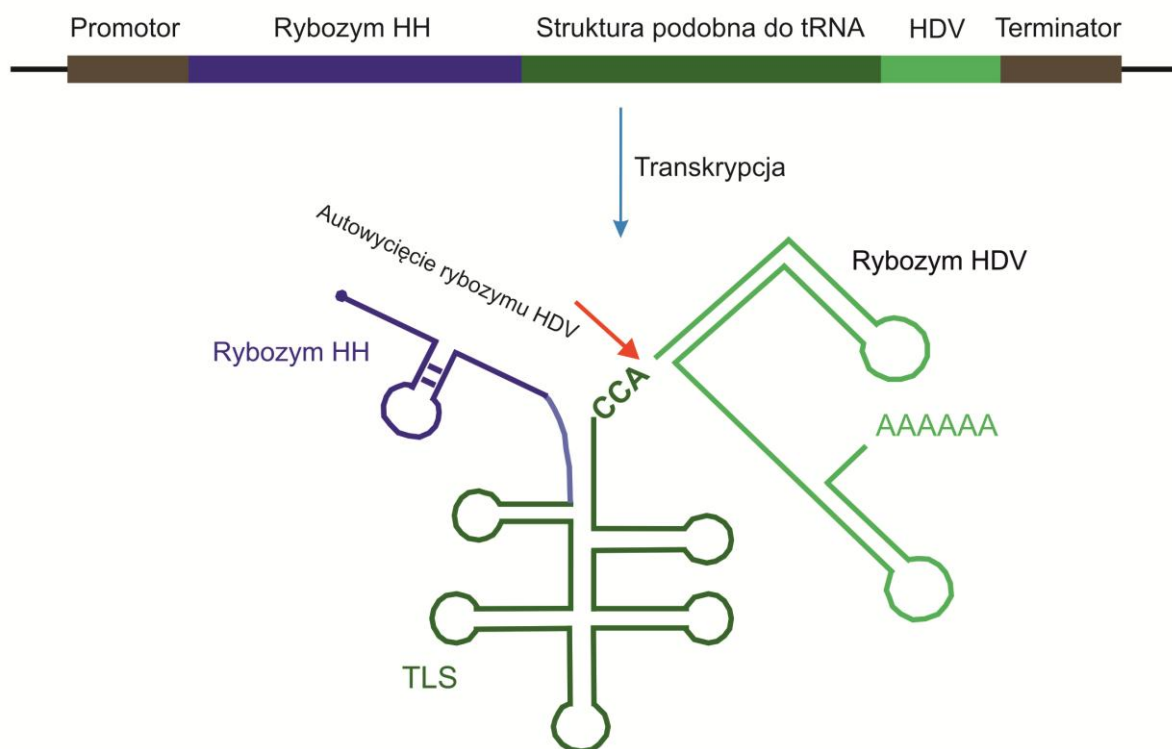


Ryc. 32. Analiza zmian poziomu ekspresji wektora (A) oraz genu *mttB* (B) w agrotransformowanych liniach *Arabidopsis thaliana*. 0 – rośliny nietraktowane β -estradiolem, 1 – 5 rośliny po indukcji β -estradiolem. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do roślin kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; * dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ brak istotności statystycznej dla $p \geq 0,05$.**

3.2. Badanie skuteczności systemu do modyfikacji genomu mitochondrialnego w ludzkich liniach komórkowych

3.2.1. Ocena możliwości wykorzystanie strategii importu struktur podobnych do tRNA w ludzkich liniach komórkowych

Wyniki uzyskane uprzednio wykazały, że opracowane narzędzie może zostać z powodzeniem wykorzystane do modyfikacji genomu mitochondrialnego, a także do badania genów których funkcja nie została jeszcze do końca poznana w układzie roślinnym [Sultan, 2016]. Wyzwaniem, które pojawiło się następnie, była odpowiedź na pytanie: czy opracowane narzędzie transportu cząsteczek aktywnych do modyfikacji genomu mitochondrialnego, będzie również efektywne w przypadku komórek ludzkich (Ryc. 33)?



Ryc. 33. Schemat strategii wyciszania genów mitochondrialnych komórek ludzkich z wykorzystaniem rybozymów (na podstawie Val, 2011). Ludzka linia komórkowa została transfekowana plazmidem pcDNA5/FRT/TO zawierającym konstrukcję, w której skład weszła sekwencja dla struktury podobnej do tRNA (TLS), sekwencja dla rybozemu HDV, działającego *in cis*, który pozwolił na wygenerowanie końca 3' wolnego dla aminoacylacji oraz sekwencję kodującą rybozym HH. Pod wpływem działania czynnika indukcyjnego (tetracykliny) dochodzi do transkrypcji wprowadzonego konstruktu. Następnie dochodzi do samowycięcia rybozemu HDV i uwolnienia końca 3'-CCA w obrębie TLS. Dojrzały konstrukc, zawierający sekwencję rybozemu, zostaje eksportowany do cytoplazmy, rozpoznany przez mitochondrialny system importu z udziałem tRNA, a następnie importowany do mitochondrium.

Opracowanie skutecznej strategii opartej o zbadany wcześniej system transportu wymagało:

1. weryfikacji hipotezy, iż w komórkach ludzkich zachodzi aktywny transport cząsteczek tRNA z cytoplazmy do mitochondriów,
2. stworzenia konstruktów przystosowanego do komórek ludzkich, niosącego odpowiednie narzędzie do modyfikacji genomu mitochondrialnego.

3.2.1.1. Przygotowanie konstruktów do analiz *in vitro* weryfikujących transport tRNA z cytozolu do mitochondrium

Mitochondria komórek ludzkich kodują kompletny zestaw genów mitochondrialnego tRNA. Ostatnie badania wykazały, że cytozolowe tRNA^{Gln} jest jednak obecne w izolowanych frakcjach mitochondrialnych. Wyniki te mogą wskazywać na istnienie mechanizmu importu tRNA z cytoplazmy do mitochondriów. Nie został on jednak w pełni poznany i opisany, dlatego też jednym z celów realizacji pracy doktorskiej, była weryfikacja hipotezy o możliwości aktywnego transportu cząsteczek tRNA z cytozolu do mitochondriów ludzkich. W pierwszym etapie badań, przeprowadzono więc analizę bioinformatyczną mającą na celu porównanie sekwencji cząsteczek tRNA-like z tRNA występującymi w komórkach ludzkich. Analizy te wykazały, że największą, wynoszącą 100%, homologią odznaczają się struktury podobne do tRNA pochodzące z wirusa mozaiki tytoniu (ang. *Tobacco mosaic virus*, TMV) oraz wirusa mozaiki stokłosa (ang. *Brome mosaic virus*, BMV) o charakterystyce i sekwencji odpowiadającej odpowiednio tRNA^{His} i tRNA^{Tyr} (Ryc. 34).

Brome mosaic virus RNA3, complete sequence

Sequence ID: [AB183261.1](#) Length: 2116 Number of Matches: 1

Range 1: 1917 to 2116 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	1e-106	200/200(100%)	0/200(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGCTTGTGGAATCAGTACAATAAAGTATAGTCGTGGTTGACACGCAGACCTCTTACAAGA	60		
Sbjct 1917	AGCTTGTGGAATCAGTACAATAAAGTATAGTCGTGGTTGACACGCAGACCTCTTACAAGA	1976		
Query 61	GTGTCTAGGTGCCTTTGAGAGTTACTCTTTGCTCTCTTCGGAAGAACCCTTAGGGGTTTCG	120		
Sbjct 1977	GTGTCTAGGTGCCTTTGAGAGTTACTCTTTGCTCTCTTCGGAAGAACCCTTAGGGGTTTCG	2036		
Query 121	TGCATGGGCTTGCATAGCAAGTCTTAGAATGCGGGTACCGTACAGTGTGAAAAACTG	180		
Sbjct 2037	TGCATGGGCTTGCATAGCAAGTCTTAGAATGCGGGTACCGTACAGTGTGAAAAACTG	2096		
Query 181	TAAATCTCTAAAAGAGACCA	200		
Sbjct 2097	TAAATCTCTAAAAGAGACCA	2116		

Tobacco mosaic virus, complete genome

Sequence ID: [X68110.1](#) Length: 6395 Number of Matches: 1

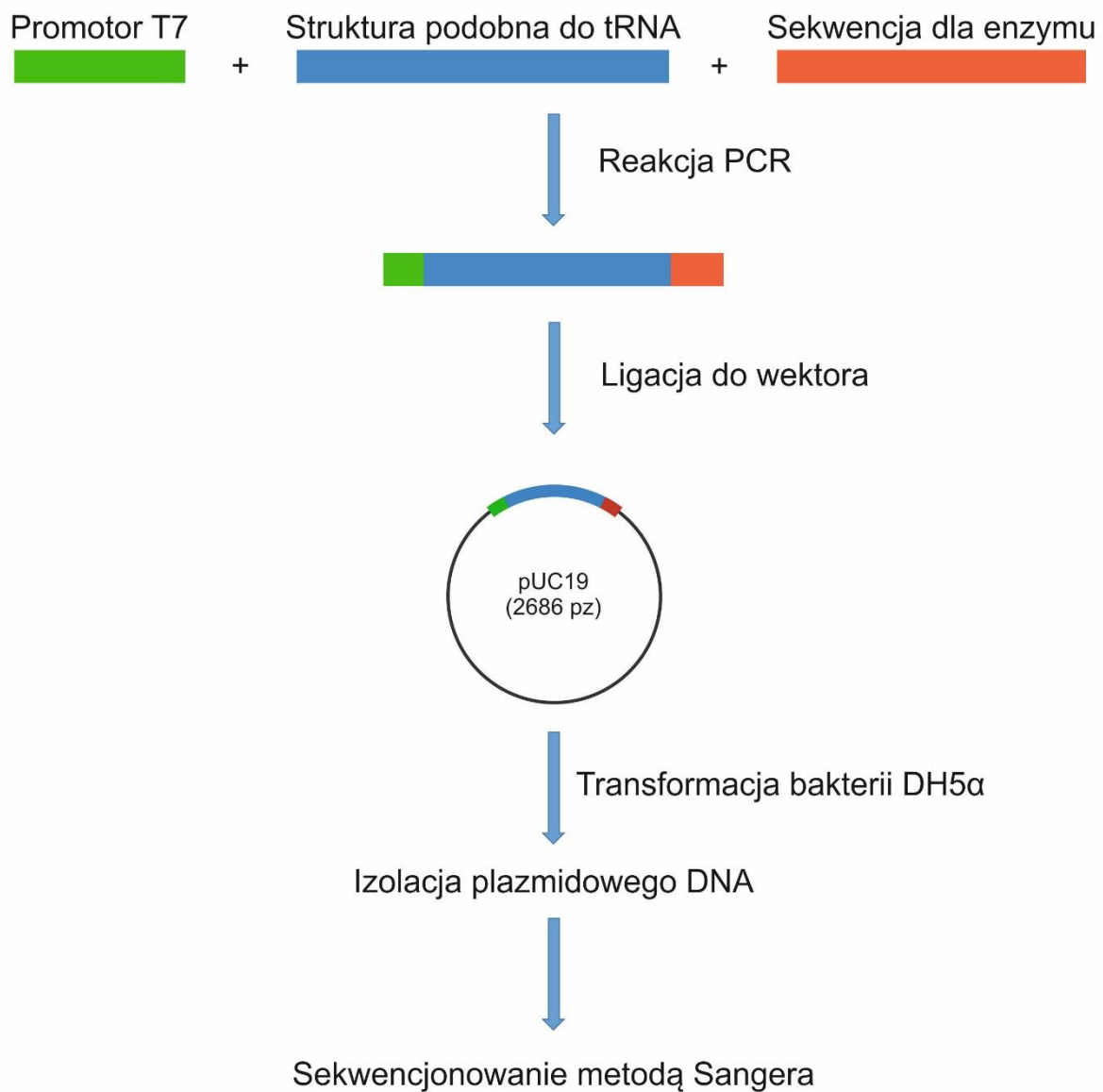
Range 1: 6196 to 6395 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	4e-106	200/200(100%)	0/200(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGTCCGTAATCACACGTGGTGCGTACGATAAC	60		
Sbjct 6196	GTCAAGATGCATAATAAATAACGGATTGTGTCCGTAATCACACGTGGTGCGTACGATAAC	6255		
Query 61	GCATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTGTCTTGGATCGCGGGTCAAA	120		
Sbjct 6256	GCATAGTGTTTTTCCCTCCACTTAAATCGAAGGGTTGTGTCTTGGATCGCGGGTCAAA	6315		
Query 121	TGTATATGGTTCATATACATCCGCAGGCACGTAATAAAGCGAGGGTTCGAATCCCCCG	180		
Sbjct 6316	TGTATATGGTTCATATACATCCGCAGGCACGTAATAAAGCGAGGGTTCGAATCCCCCG	6375		
Query 181	TTACCCCGGTAGGGGCCCA	200		
Sbjct 6376	TTACCCCGGTAGGGGCCCA	6395		

Ryc. 34. Porównanie sekwencji kodujących struktury podobne do tRNA BMV i TMV oraz tRNA^{His} i tRNA^{Tyr}.

Produkt reakcji PCR zawierający sekwencję kodującą struktury podobne do tRNA został zamplifikowany z wykorzystaniem starterów wprowadzających na końcu 5' sekwencję dla promotora polimerazy T7, a na końcu 3' sekwencję dla enzymu restrykcyjnego BstNI. Jako matrycę wykorzystano istniejące wcześniej plazmidy TLS-BMV oraz TLS-TMV zawierające sekwencje dla struktur podobnych do tRNA BMV i TMV. Oba plazmidy pozyskano w wyniku współpracy z zespołem kierowanym przez prof. Andre Dietrich z Institut de Biologie Moléculaire des Plantes CNRS w Strasbourgu we Francji. Tak przygotowany fragment DNA wbudowano do wektora ekspresyjnego pUC-19. Uzyskanymi w wyniku ligacji wektorami pUC-19-TMV i pUC-19-BMV transformowano bakterie kompetentne DH5 α (Ryc. 35).

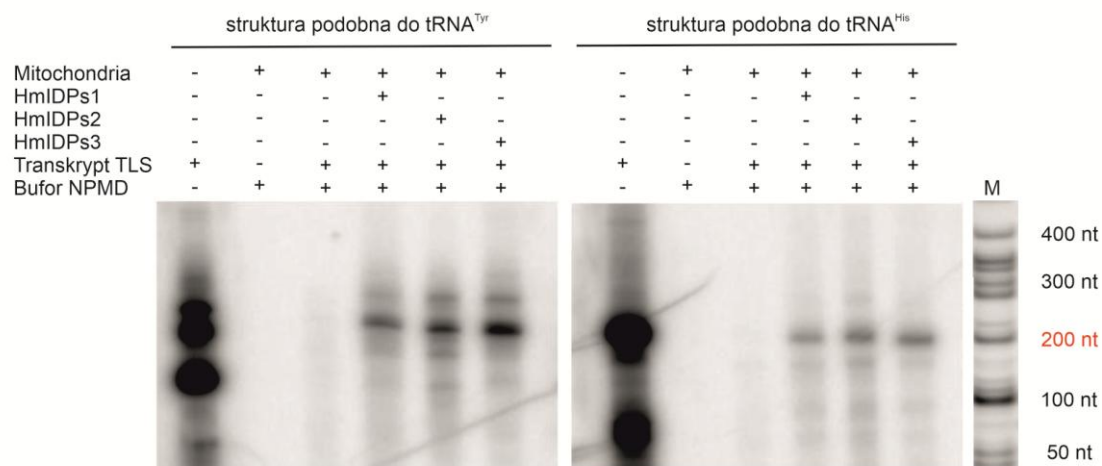


Ryc. 35. Schemat przygotowania plazmidu do analiz *in vitro*.

3.2.1.2. Ocena transportu konstruktów zawierających struktury tRNA-podobne

W celu oceny efektywności importu konstruktów do mitochondriów niezbędne było zbadanie czy zachodzi ich transport przez błony mitochondrialne. W pierwszym etapie sprawdzono więc tę możliwość w układzie modelowym w warunkach *in vitro* (Ryc. 36). W tym celu na matrycy wektora pUC-19 z wykorzystaniem polimerazy T7 dla obu sekwencji tRNA-podobnych (BMV oraz TMV) przeprowadzono transkrypcję *in vitro*, a uzyskane transkrypty RNA wyznakowano radioaktywnie wewnątrz ich sekwencji za pomocą radioizotopu [α -³²P]UTP. Przygotowano równocześnie frakcję izolowanych ludzkich mitochondriów pochodzącą z linii komórkowej HepG2. Następnie, do wyizolowanych z komórek ludzkich mitochondriów dodawano znakowane radioaktywnie transkrypty i inkubowano w obecności kompleksu białek umożliwiających import z cytoplazmy do mitochondriów (ang. *Human import direct proteins*, HmIDPs).

Białka HmIDP uzyskano poprzez frakcjonowanie również z lizatów komórek HepG2. Uzyskane w ten sposób frakcje 30% (HmIDPs1), 50% (HmIDPs2), 70% (HmIDPs3) dializowano wobec buforu NPMD zawierającego 50% glicerolu. Wszystkie uzyskane w ten sposób frakcje białkowe wykorzystano do importu struktur podobnych do tRNA do izolowanych mitochondriów ludzkich. W obecności HmIDPs w przypadku obu badanych cząsteczek zaobserwowano transport cząsteczek tRNA-podobnych do wnętrza mitochondriów, jednak z różną wydajnością zależną od zastosowanej frakcji białkowej. W przypadku obu badanych sekwencji najlepszy efekt osiągnięto po zastosowaniu frakcji HmIDPs3 wynoszącym 85,82% i 77,17% odpowiednio dla struktury tRNA BMV i TMV (rys 30). Większą wydajność reakcji importu osiągnięto dla sekwencji BMV niż TMV. Najniższą wynoszącą 42,38 % i 46,04 % obserwowano po dodaniu frakcji HmIDPs1. W reakcji kontrolnej, w której do mieszniny nie dodano frakcji białkowych, import struktur podobnych do tRNA nie zachodził dla żadnej z badanych cząsteczek.



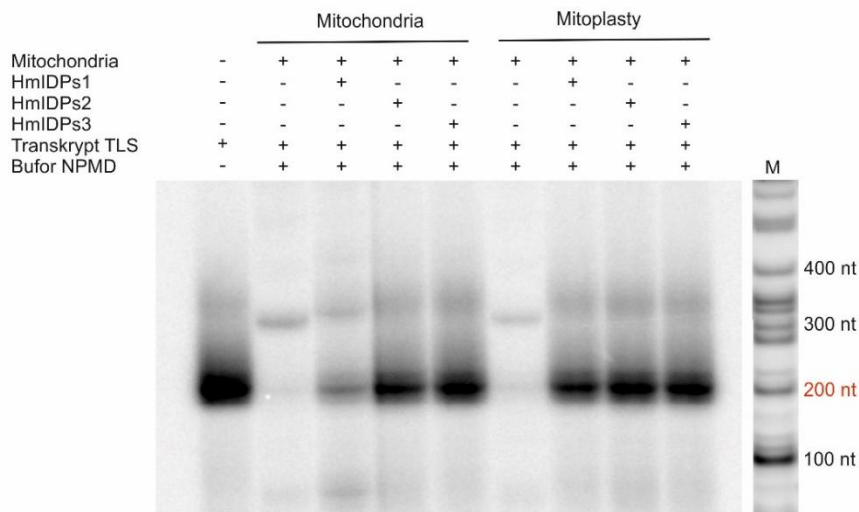
	BMV	TMV
HmIDPs1	42,38 %	46,04 %
HmIDPs2	60,51 %	57,35 %
HmIDPs3	85,82 %	77,17 %
Bez HmIDPs	-	-

Ryc. 36. Import struktur podobnych do tRNA do mitochondriów komórek ludzkich.

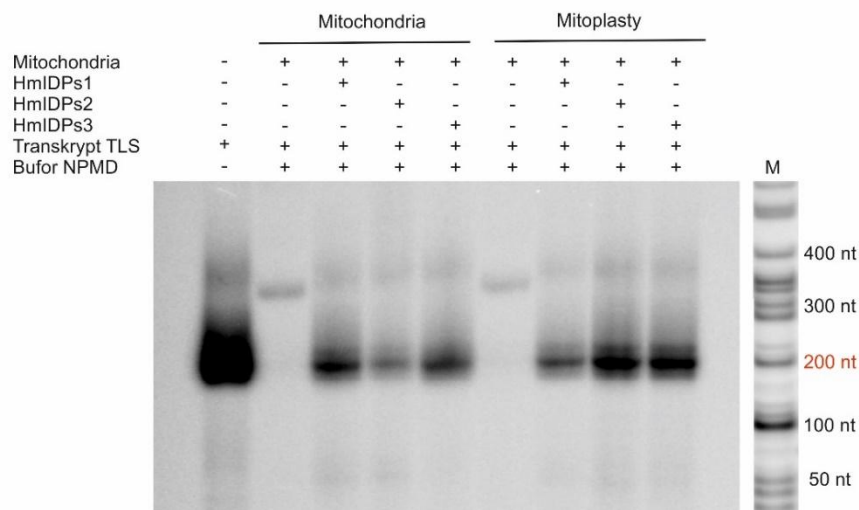
Autoradiogram 20% żelu PAA przedstawia wynik importu struktur podobnych do tRNA do mitochondriów komórek ludzkich. Kolorem czerwonym oznaczono oczekiwaną wielkość produktu. M – marker wielkości. W tabeli zestawiono wartości pomiarów densytometrycznych.

Do prawidłowego działania opracowanego narzędzia kluczowe jest jednak, aby dostało się ono do miejsca, w którym zachodzi proces transkrypcji genów mitochondrialnych czyli do macierzy mitochondrialnej. W celu potwierdzenia, że struktury podobne do tRNA przenikają przez obie mitochondrialne błony, zbadano obecność znakowanych cząsteczek w mitoplastach czyli mitochondriach pozbawionych zewnętrznej błony (Ryc. 37). Frakcję mitoplastów uzyskano również z linii komórkowej HepG2.

A



B



	BMV		TMV	
	Mitochondria	Mitoplasty	Mitochondria	Mitoplasty
HmIDPs1	39,26 %	55,55 %	79,15 %	35,89 %
HmIDPs2	77,41 %	86,90 %	27,84 %	88,99 %
HmIDPs3	89,65 %	83,71 %	57,18 %	81,25 %
Bez HmIDPs	-	-	-	-

Ryc. 37. Import struktur podobnych do tRNA^{His} (A) oraz tRNA^{Tyr} (B) do mitochondriów i mitoplastów komórek ludzkich.

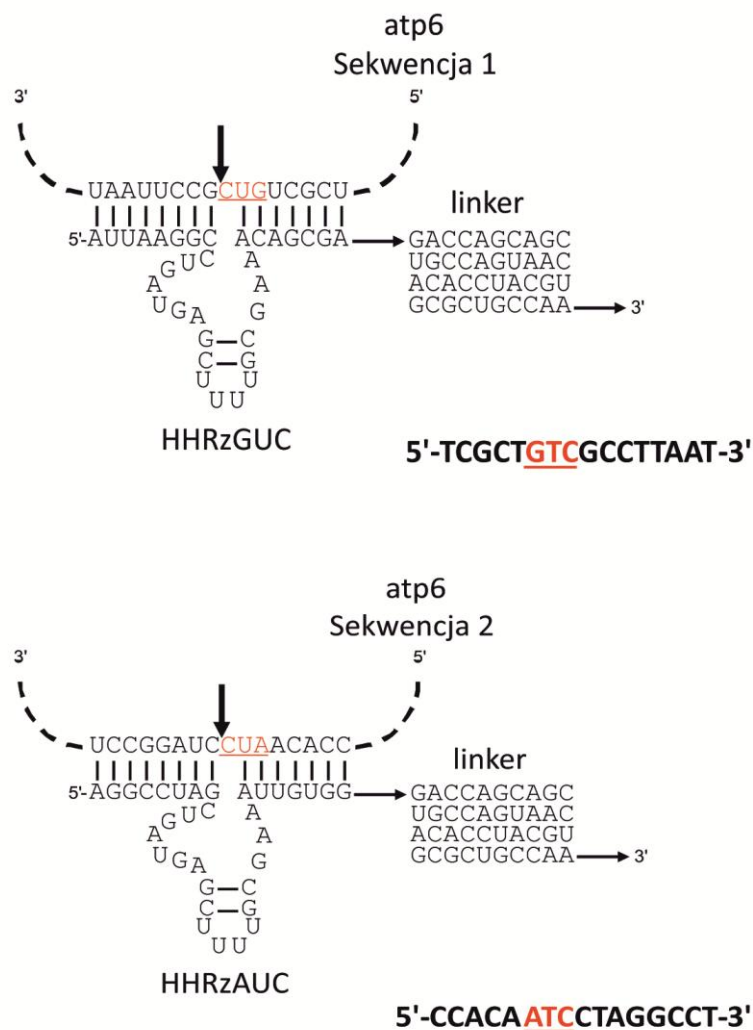
Autoradiogram 20% żelu PAA przedstawia wynik importu struktur podobnych do tRNA do mitochondriów i mitoplastów komórek ludzkich. Kolorem czerwonym oznaczono oczekiwaną wielkość produktu. M – marker wielkości. W tabeli zestawiono wartości pomiarów densytometrycznych.

Uzyskany wynik potwierdził, że struktury podobne do tRNA przenikają bezpośrednio do wnętrza mitochondriów i nie zatrzymują się w przestrzeni międzybłonowej. Również w tym przypadku nieobecność białek HmIDPs spowodowała brak importu RNA z cytoplazmy do badanych organelli.

Uzyskane wyniki pokazały, że zarówno struktura tRNA pochodzące od wirusa TMV, jak i BMV mogą z powodzeniem znaleźć zastosowanie jako nośniki do importu cząsteczek RNA do mitochondriów komórek ludzkich.

3.2.2. Przygotowanie konstruktów transportujących cząsteczki aktywne katalitycznie do modyfikacji ludzkiego genomu mitochondrialnego.

Do badań w układzie modelowym wykorzystującym ludzkie linie komórkowe zaprojektowano dwa rybozomy HH rozpoznające sekwencję docelową (GUC oraz AUC) w obrębie mitochondrialnego atp6 (Ryc. 38.).

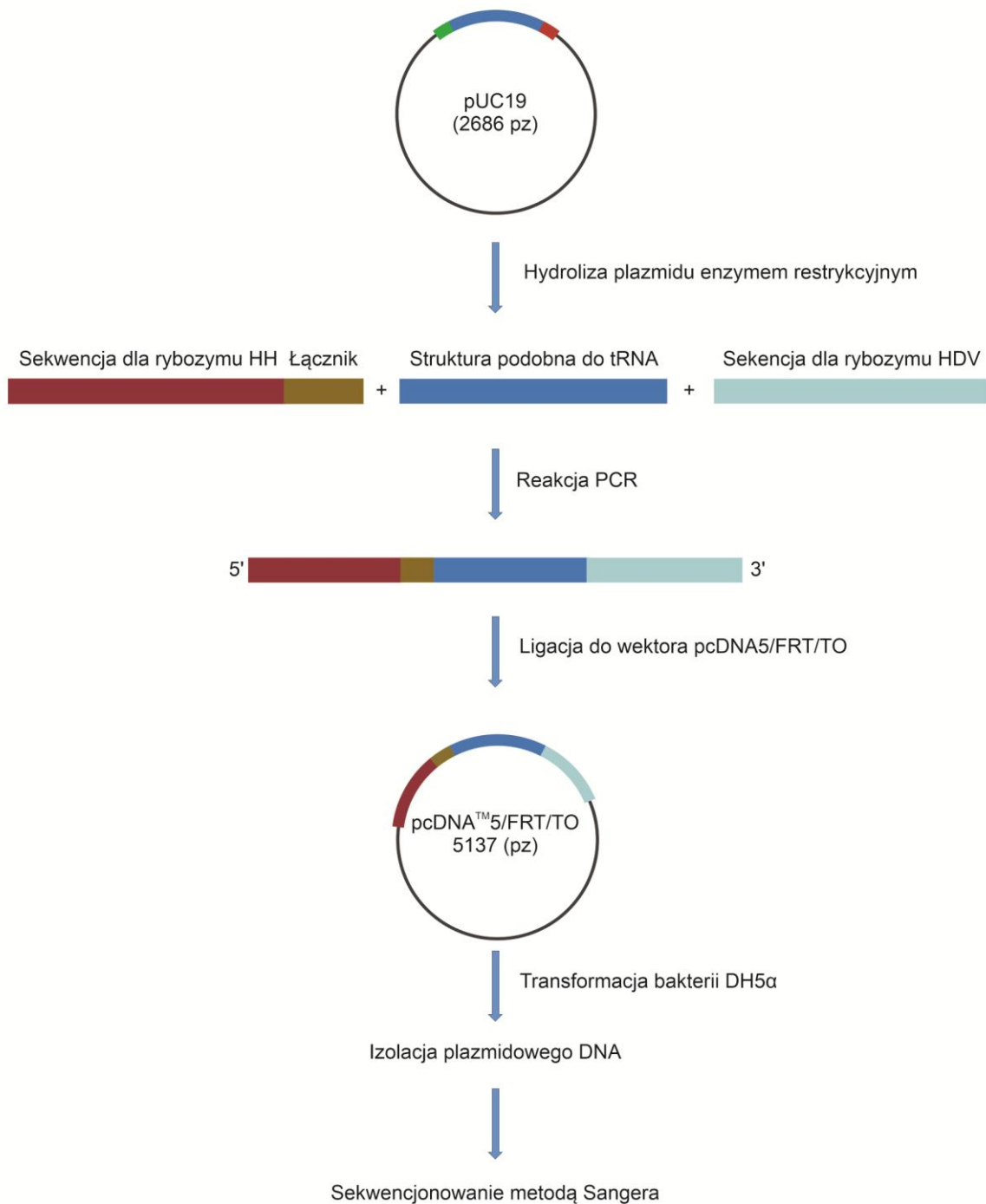


Ryc. 38. Struktura drugorzędowa rybozymów HH w kompleksie z substratem.

MT-ATP6 jest genem kodującym podjednostkę 6 syntazy ATP. Zbudowany jest z 226 aminokwasów, a jego masa cząsteczkowa wynosi 24,8 kDa. Białko kodowane przez gen *mt-atp6* odrywa kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mitochondriów. Mutacje w genie *mt-atp6* są jednak także związane z licznymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi oraz sercowo naczyniowymi takimi jak zespół MELAS (miopatia mitochondrialna, encefalopatia, kwasica mleczanowa, występowanie incydentów podobnych do udarów), zespół LHON (neuropatia nerwu wzrokowego), zespół Leigha i zespół NARP.

Uzyskane wcześniej wyniki potwierdziły, że zarówno cząsteczki BMV jak i TMV skutecznie wnikają do macierzy mitochondrialnej. W związku z tym obie struktury podobne do tRNA zostały wykorzystane w dalszych analizach.

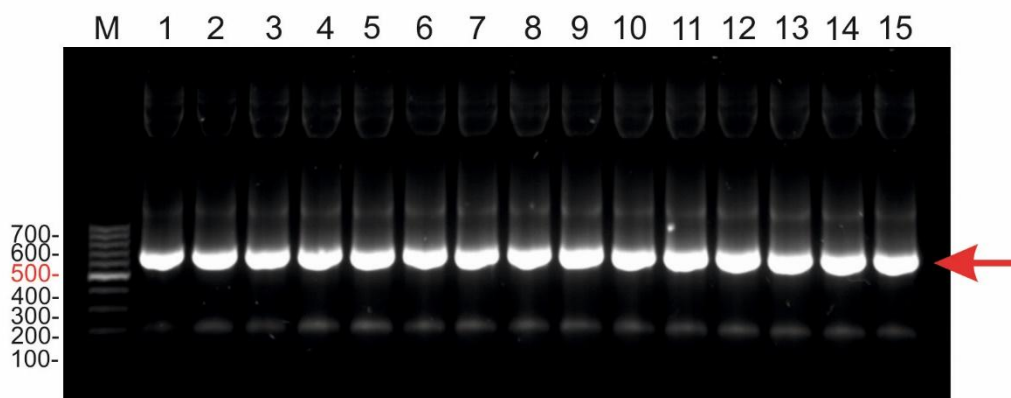
Do przygotowania konstruktów zawierających sekwencję pasażerską (rybozym HH), linker oraz sekwencję dla rybozomu HDV wykorzystano jako matryce uzyskane na wcześniejszym etapie wektory pUC19-TMV oraz pUC19-BMV. Produkt reakcji PCR uzyskano z wykorzystaniem starterów wprowadzających na końcu 5' sekwencję kodującą rybozym HH i linker oraz sekwencję dla rybozomu HDV na końcu 3' (Ryc. 39).



Ryc. 39. Schemat przygotowania plazmidu do transfekcji komórek ludzkich.

Uzyskane produkty reakcji analizowano w 1,5% żelu agarozowym (Ryc. 40), a cząsteczki o właściwej długości zostały wligowane do wektora ekspresyjnego pcDNA5/FRT/TO. Konstrukty zostały wprowadzone do bakterii kompetentnych DH5α z wykorzystaniem transformacji metodą szoku cieplnego. Prawidłowość uzyskanych sekwencji

potwierdzono za pomocą sekwencjonowania. Plazmidy o prawidłowej sekwencji zostały wykorzystane do transfekcji ludzkich linii komórkowych.



Ryc. 40. Analiza produktów reakcji PCR w żelu agarozowym. M – marker wielkości 100 bp, 1 – 4 – konstrukt AUC-BMV, 5 – 8 – konstrukt AUC-TMV, 9 – 12 – konstrukt GUC-BMV, 13 – 15 – konstrukt AUC-TMV. Strzałką zaznaczono produkt prawidłowej wielkości.

3.2.3. Wyprowadzenie linii komórkowej o stabilnej i indukowalnej ekspresji konstruktów zawierających struktury podobne do tRNA

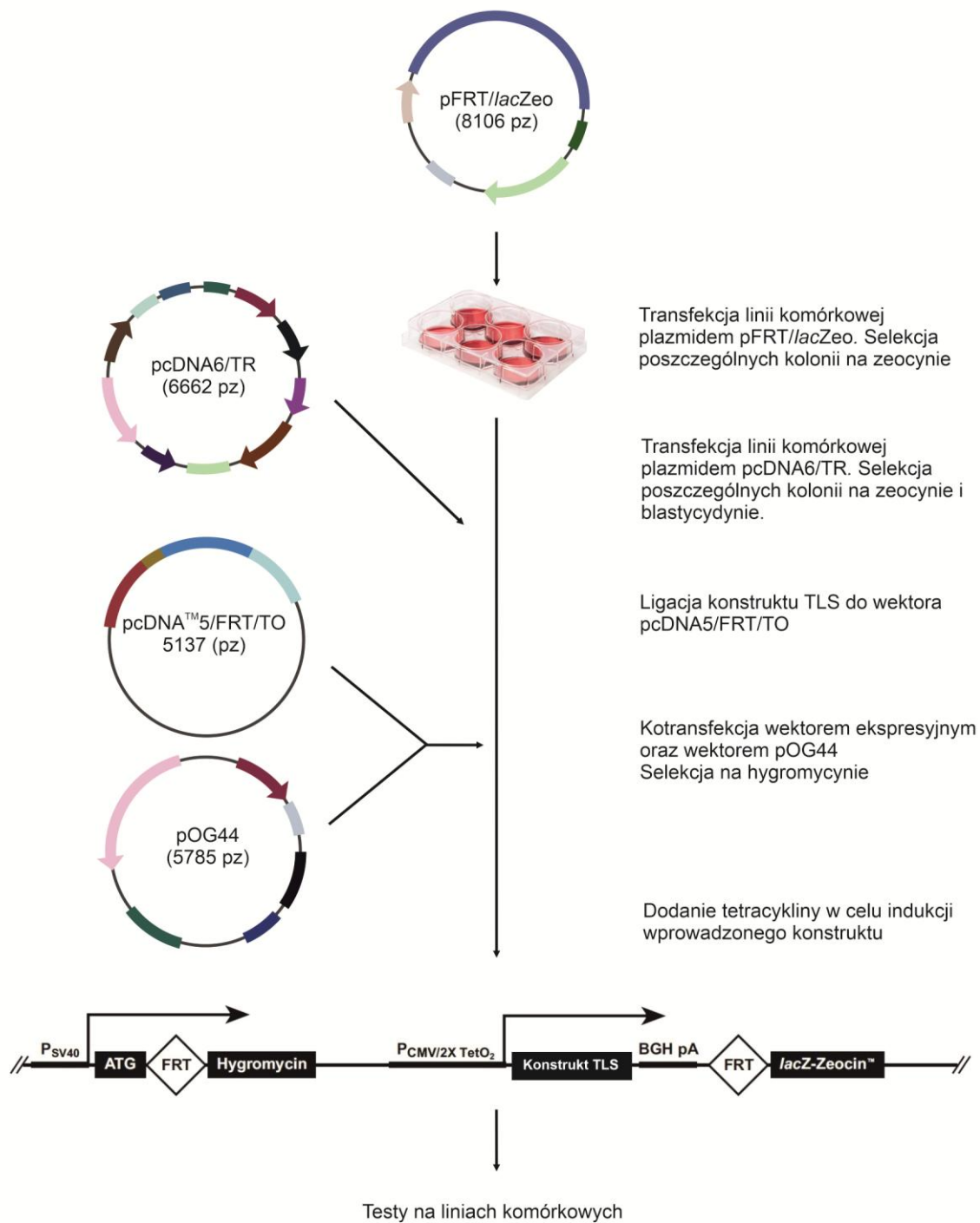
Do wprowadzenia konstruktów do komórek ludzkich zastosowano system Flp-In T-Rex firmy Life Technologies (Ryc. 41). Metoda ta pozwala na wyprowadzenie linii komórkowej o stabilnej i indukowalnej ekspresji wybranej sekwencji dzięki wykorzystaniu mechanizmu rekombinacji DNA pochodzącego z *Saccharomyces cerevisiae*. System ten oparty jest o rekombinazę Flp i prowadzi do miejscowo-specyficznej rekombinacji w celu ułatwienia integracji wprowadzanego genu w określonym miejscu w genomie komórek ssaków.

System Flp-In T-Rex oparty jest o cztery plazmidy: pFRT/lacZeo, pcDNA6/TR, pOG44 oraz pcDNA5/FRT/TO. Plazmid pFRT/lacZeo koduje sekwencję białka fuzyjnego zawierającego β -galaktozydazę oraz gen oporności na zeocynę. Sekwencja ta znajduje się pod kontrolą promotora SV40. Ponadto wektor ten wprowadza do komórek miejsce rozpoznawane przez rekombinazę Flp (ang. *Flp recombination target*, FRT), będące miejscem wiązania i hydrolizy dla Flp. Plazmid pcDNA6/TR wprowadza do komórki sekwencję kodującą dla represora Tet znajdującą się pod kontrolą dla promotora ludzkiego cytomegalwirusa (ang. *cytomegalovirus*, CMV). Integracja do genomu jądrowego pFRT/lacZeo oraz pcDNA6/TR jest losowa i przebiega niezależnie od siebie. Plazmid pOG44 pozwala na ekspresję rekombinazy Flp, której sekwencja znajduje się pod kontrolą promotora CMV.

pcDNA5/FRT/TO oprócz sekwencji wprowadzanego genu zawiera również sekwencję hybrydowego promotora CMV/tetO₂ zależnego od tetracykliny oraz gen oporności na hygromycynę.

Po transfekcji plazmidem pOG44 i wektorem pcDNA5/FRT/TO dochodzi do rekombinacji homologicznej między miejscem FRT w genomie, a tym obecnym w wektorze. W ten sposób dochodzi do włączenia sekwencji wektora pcDNA5/FRT/TO, zawierającego wprowadzony gen, do genomu komórki. W proces ten zaangażowana jest rekombinaza pochodząca z plazmidu pOG44. Po stabilnym zintegrowaniu wektora z genomem ekspresję wprowadzonej sekwencji można indukować poprzez dodanie tetracykliny.

Badania prowadzono równolegle na dwóch liniach komórkowych. Linia HepG2-Flp-In została wyprowadzona z czystej linii komórkowej HepG2 i została wybrana ze względu na stosunkowo dużą ilość mitochondriów w pojedynczej komórce. Stopień skomplikowania przygotowania komórek Flp-In i ryzyko niepowodzenia spowodowało, że do badań wybrano również komercyjnie dostępną linię Flp-In-293.



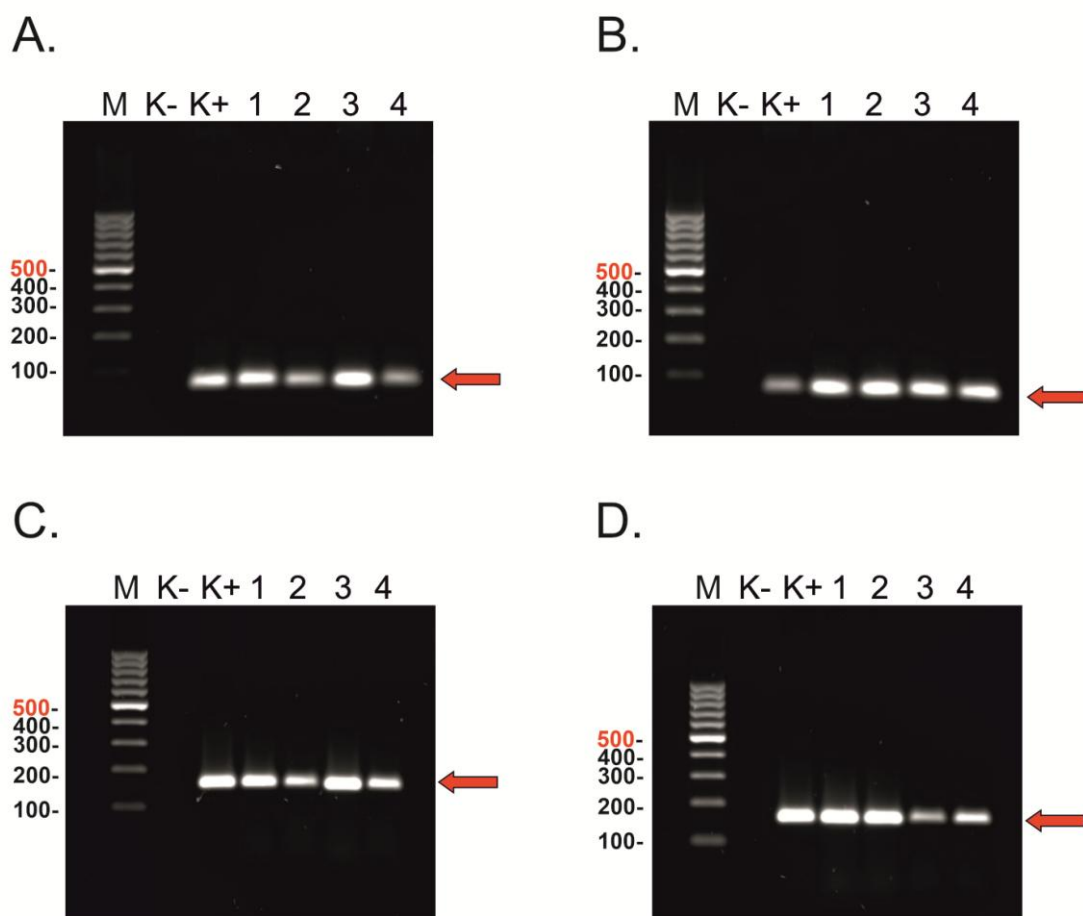
Ryc. 41. Schemat przygotowania linii komórkowej o stabilnej indukwalnej ekspresji transgenu.

3.2.3.1. Przygotowanie linii HepG2-Flp-In

W celu przygotowania linii komórkowej HepG2-Flp-In, komórki HepG2 wysiewano na płytki 6 – dołkowe i hodowano do momentu uzyskania 85-90% konfluencji, a następnie transfekowano plazmidem pFRT/lacZeo z wykorzystaniem Lipofectaminy 2000. Po 24 godzinach od transfekcji starą pożywkę usuwano i dodawano świeżą pożywkę z antybiotykiem selekcyjnym (zeocyna). Hodowle prowadzono przez okres 3 tygodni regularnie dokonując zmiany pożywki. Dla potwierdzenia prawidłowego przebiegu transfekcji wykonano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla zastosowanego plazmidu (rys. 42 A).

Komórki, w których stwierdzono obecność plazmidu pFRT/lacZeo ponownie wysiewano na płytki 6 – dołkowe. Po uzyskaniu 85-90% konfluencji linii HepG2 transfekowano plazmidem pcDNA6/TR, a następnie przez 3 tygodnie prowadzono hodowlę z dodatkiem antybiotyków selekcyjnych (zeocyna, blastycydyna). Prawidłowy przebieg transfekcji potwierdzono reakcją PCR z zastosowaniem starterów zaprojektowanych dla plazmidu pcDNA6/TR (Ryc. 42 B).

W ostatnim etapie obie badane linie poddano kotransfekcji plazmidem pcDNA5/FRT/TO z wklonowanym wektorem oraz plazmidem pOG44, a następnie poddano selekcji z wykorzystaniem Hygromycyny B. W celu potwierdzenia prawidłowego przebiegu transfekcji wykonano reakcję PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla plazmidu pcDNA5/FRT/TO (Ryc. 42 C, D). Uzyskane w ten sposób linie komórkowe wykorzystano w dalszych analizach.

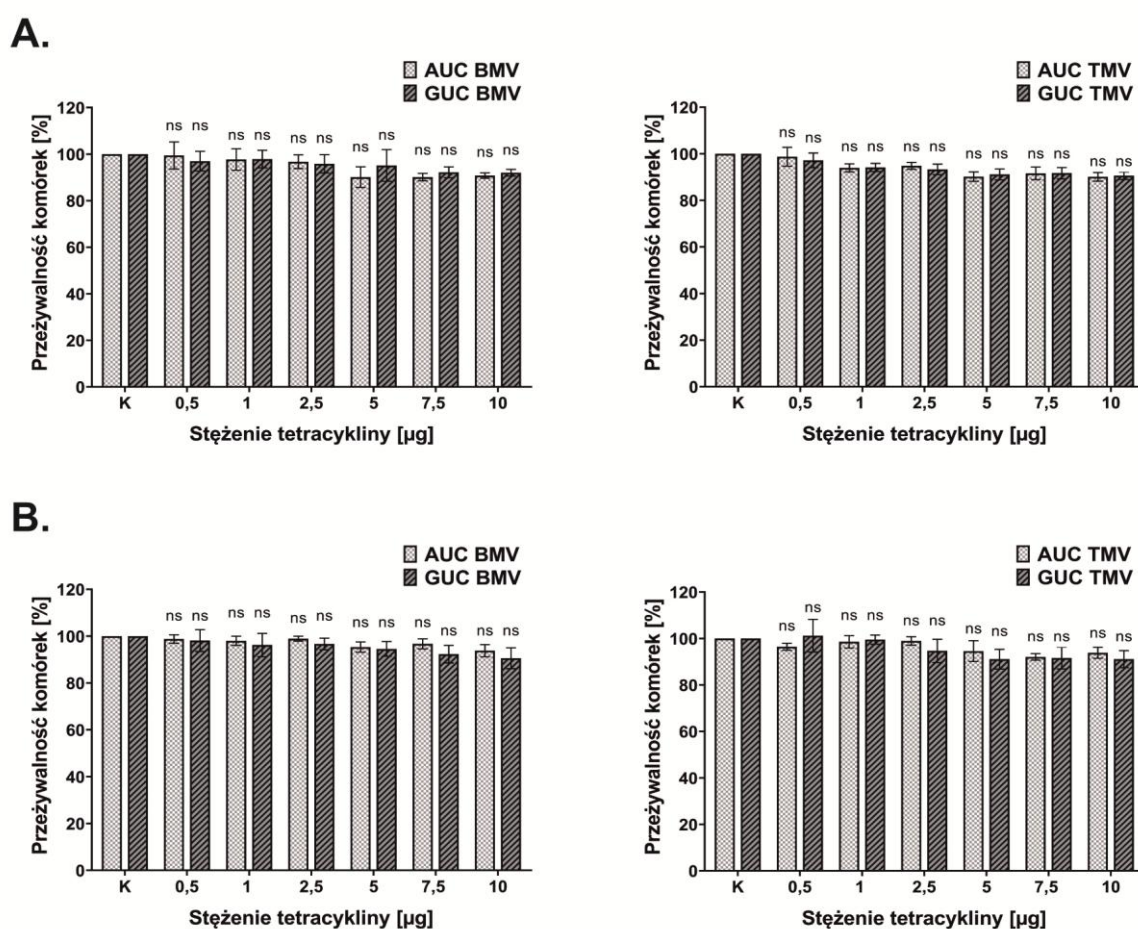


Ryc. 42. Analiza produktów PCR w żelu agarozowym. M – Marker wielkości 100 bp, K- - kontrola negatywna, K+ - kontrola pozytywna, 1 – 4 badane próby. Strzałką zaznaczono produkty prawidłowej wielkości. **A** – Analiza obecności sekwencji plazmidu pFRT/lacZeo w linii HepG2-Flp-In; **B** - Analiza obecności sekwencji plazmidu pcDNA6/TR w linii HepG2-Flp-In; **C** - Analiza obecności sekwencji plazmidu pcDNA5/FRT/TO w linii HepG2-Flp-In; **D** - Analiza obecności sekwencji plazmidu pcDNA5/FRT/TO w linii Flp-In-293.

3.2.4. Badanie wpływu tetracykliny na przeżywalność komórek.

Zastosowany w niniejszych badaniach system Flp-In T-Rex firmy Life Technological oparty jest o wektor pcDNA5/FRT/TO zawierający promotor dla tetracykliny. Jest to antybiotyk o szerokim spektrum działania polegającym na hamowaniu biosyntezy białka i zaburzeniu procesów energetycznych w komórkach bakteryjnych. W protokole załączonym przez producenta zaleca się zastosowanie stężeń tetracykliny w przedziale od 0,1 do 10 μg . Dlatego też, aby wyselekcjonować optymalne stężenie dla ludzkich linii komórkowych przeprowadzono badanie wpływu wzrastającego stężenia tetracykliny na przeżywalność

komórek. W tym celu wykorzystano test cytotoksyczności MTT. Metoda ta polega na zastosowaniu soli tetrazolowej MTT, która w wyniku działania dehydrogenazy bursztynianowej, obecnej w mitochondriach żywych i aktywnych metabolicznie komórek, ulega redukcji do formazanu. Powstałe w reakcji fioletowe kryształki formazanu ulegają rozpuszczeniu pod wpływem niektórych roztworów (np. DMSO), a intensywność zabarwienia powstałego roztworu jest wprost proporcjonalna do ilości formazanu oraz jest miarą aktywności oksydoredukcyjnej mitochondriów. Pomiar poziomu redukcji MTT jest zatem wyznacznikiem kondycji metabolicznej żywych komórek i udziału badanego związku w zahamowaniu proliferacji komórkowej.



Ryc. 43. Analiza wpływu stężenia tetracykliny na żywotność transfekowanych komórek Fp-In-293 (A) oraz HepG2-Fp-In (B).

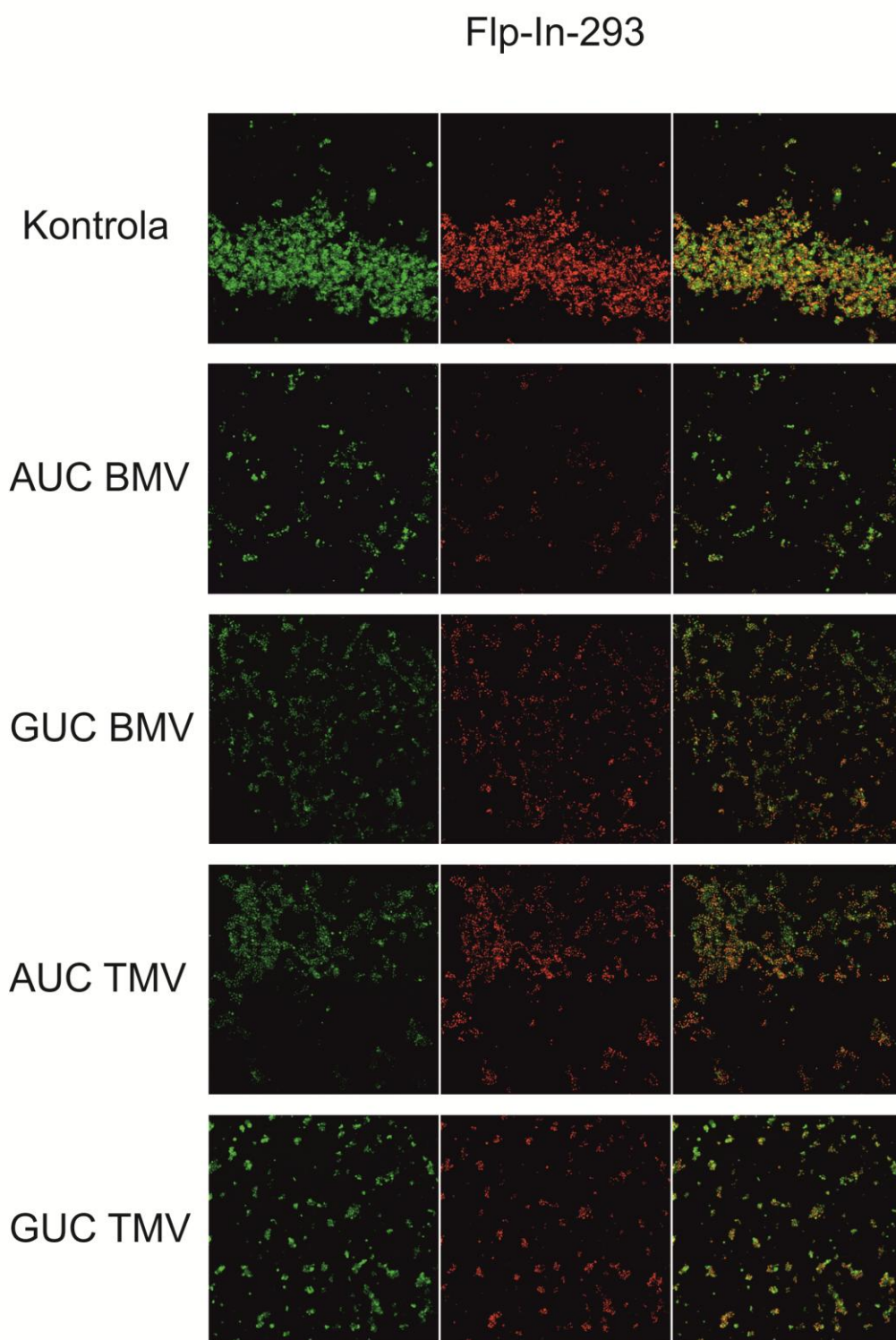
K – kontrola nietraktowana tetracykliną, 0,5µ-10µ - komórki poddane działaniu tetracykliny w stężeniu od 0,5 do 10 µg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

Komórki HepG2-Flp-In oraz 293-Flp-In hodowano na płytkach 96-dołkowych do uzyskania 85-90% konfluencji, a następnie dodawano tetracycline w badanym zakresie stężeń. Po upływie doby od traktowania badanym związkiem komórki poddawano analizie MTT. Ilość MTT zredukowanego do formazanu mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ 590 nm oraz normalizowano przy λ 620 nm. Wyniki pomiarów, odzwierciedlające aktywność metaboliczną komórek traktowanych tetracykliną w porównaniu do komórek kontrolnych wykazały brak znaczących zmian proliferacji w obu badanych liniach komórkowych (Ryc. 43). Niewielkie, sięgające około 5%-10% zmiany w przeżywalności komórek wynikają z zastosowanej metody analizy.

3.2.5. Badanie integralności błony mitochondrialnej w liniach HepG2-Flp-In oraz 293-Flp-In

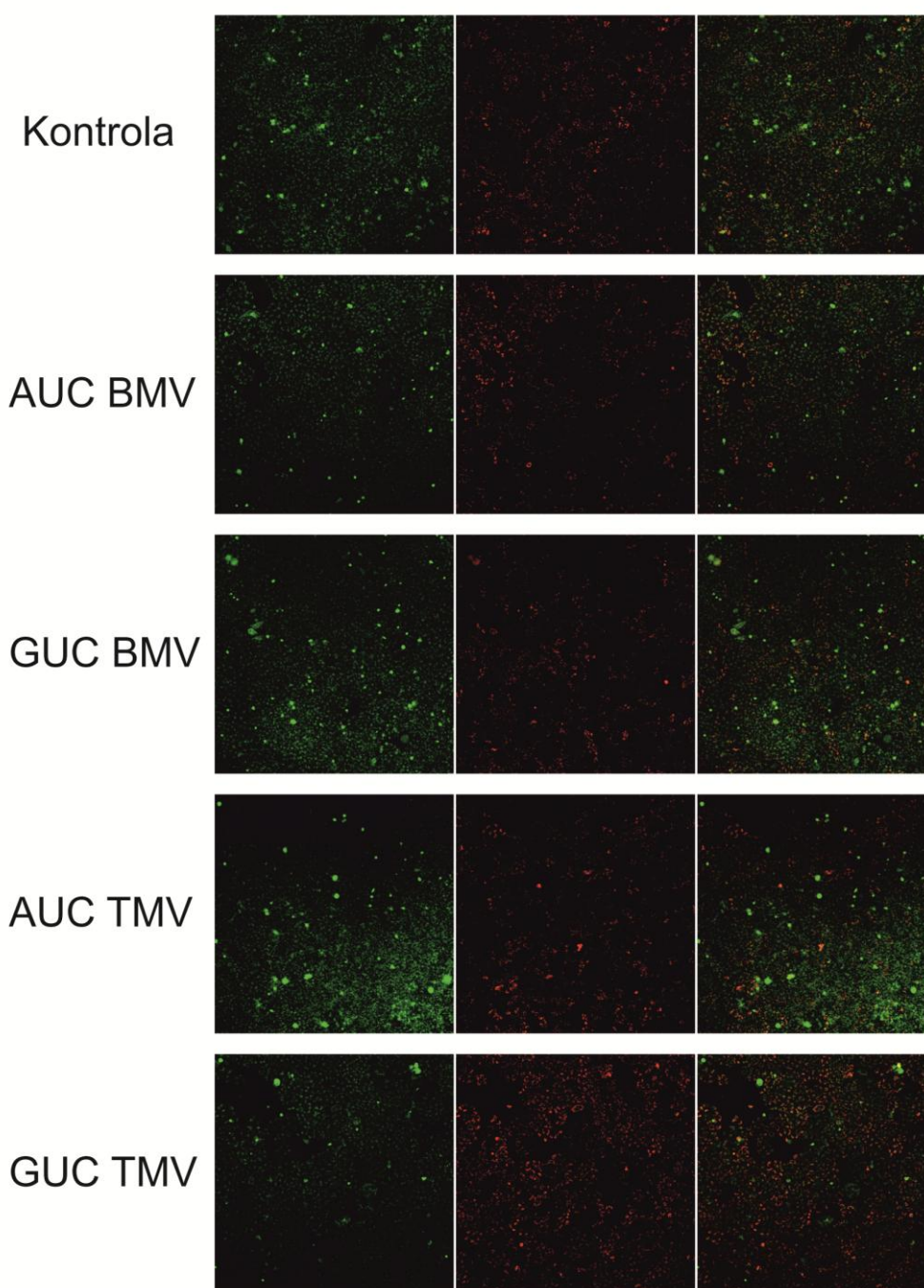
Wprowadzenie wektora do wnętrza mitochondriów może potencjalnie prowadzić do zaburzenia fizjologicznego statusu mitochondriów i upośledzenia integralności błony mitochondrialnej. W celu zbadania kondycji mitochondriów pod wpływem działania wprowadzonego konstruktu przeprowadzono więc ocenę integralności błony w obu modyfikowanych liniach za pomocą testu wykorzystującego barwnik JC-1. Komórki HepG2-Flp-In oraz 293-Flp-In hodowano na płytkach 96-dołkowych do uzyskania 85-90% konfluencji, a następnie dodawano tetracyklinę w badanym zakresie stężeń. Po 24 godzinach komórki poddawano analizie JC-1. Poziom fluorescencji barwnika mierzono przy dwóch długościach fali λ 530 oraz λ 590. W komórkach apoptotycznych oraz martwych barwnik pozostanie w formie monomerycznej i będzie emitował zieloną fluorescencję. W komórkach zdrowych barwnik będzie agregował w mitochondriach i emitował czerwoną fluorescencję. Stosunek fluorescencji czerwonej do zielonej określa wartość potencjału błony mitochondrialnej (Ryc. 44; Ryc. 45).

Do analiz potencjału błony mitochondrialnej wybrano cztery stężenia czynnika indukcyjnego 2,5; 5; 7,5 oraz 10 μ g. Wraz ze wzrostem czynnika indukcyjnego wzrastała ekspresja wprowadzonego konstruktu. Zdjęcia mikroskopowe wykonywano tylko przy stężeniu tetracykliny zapewniającym najwyższy wzrost ekspresji wektora (10 μ g).

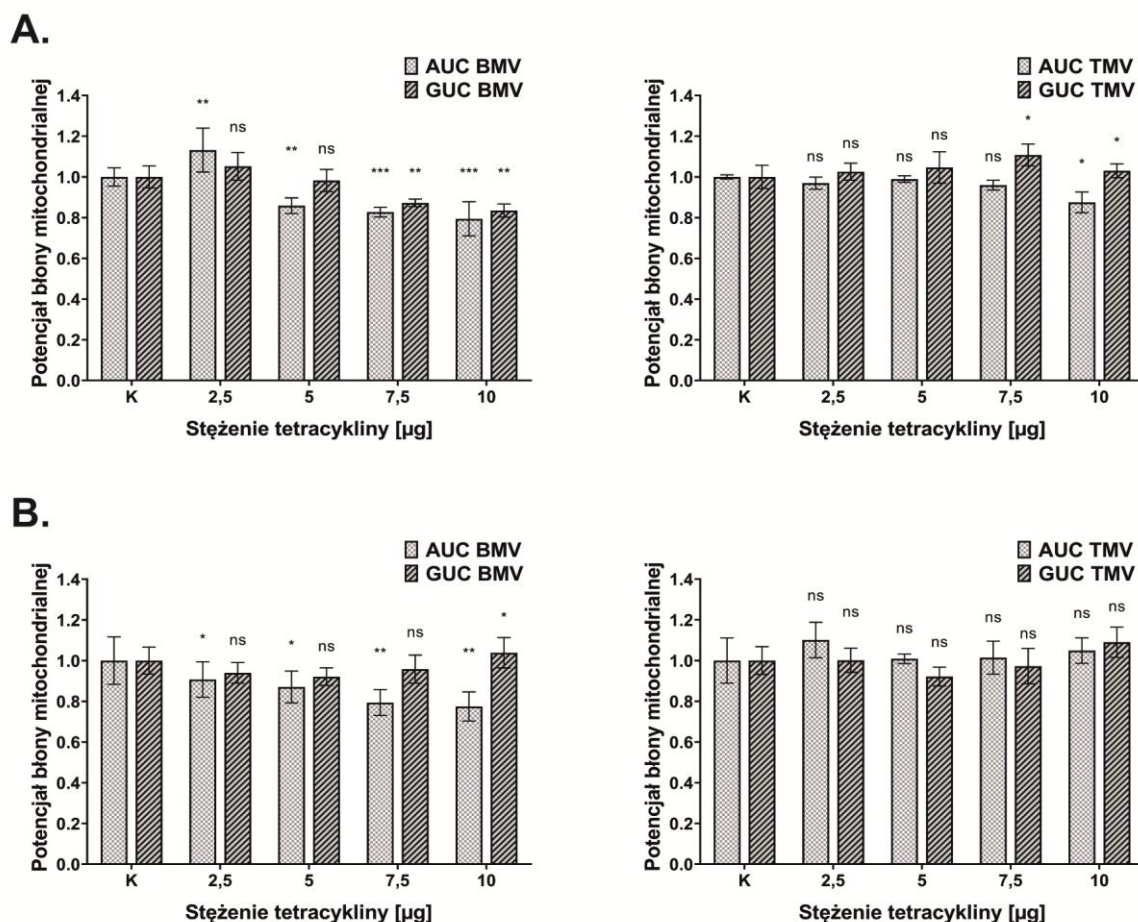


Ryc. 44. Ocena potencjału błony mitochondrialnej w modyfikowanej linii komórkowej. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego komórek Flp-In-293 barwionych barwnikiem JC-1 po traktowaniu tetracykliną. Potencjał błony mitochondrialnej określano mierząc intensywność zielonej fluorescencji przy długości fali $\lambda 530$ (mitochondria o niskim potencjale MMP) oraz czerwonej fluorescencji przy długości fali $\lambda 590$ (mitochondria o wysokim potencjale MMP). Rycina przedstawia reprezentatywne obrazy fluorescencyjne.

HepG2-Flp-In



Ryc. 45. Ocena potencjału błony mitochondrialnej w modyfikowanej linii komórkowej. Obrazy z mikroskopu fluorescencyjnego komórek HepG2-Flp-In barwionych barwnikiem JC-1 po traktowaniu tetracykliną. Potencjał błony mitochondrialnej określano mierząc intensywność zielonej fluorescencji przy długości fali $\lambda 530$ (mitochondria o niskim potencjale MMP) oraz czerwonej fluorescencji przy długości fali $\lambda 590$ (mitochondria o wysokim potencjale MMP). Rycina przedstawia reprezentatywne obrazy fluorescencyjne.



Ryc. 46. Analiza wpływu stężenia tetracykliny na potencjał błony mitochondrialnej komórek Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

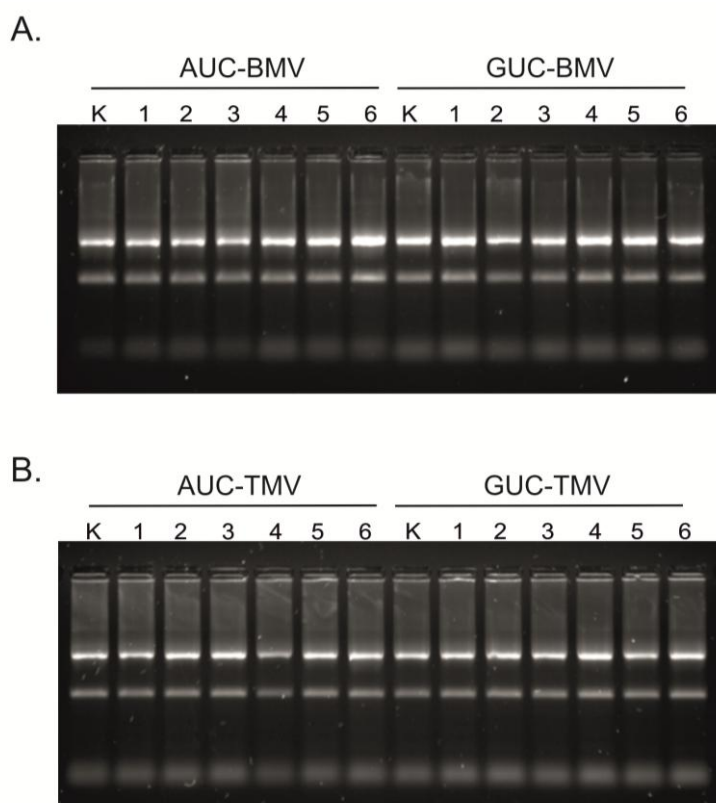
K – kontrola nietraktowana tetracykliną, 2,5 – 10 – komórki poddane działaniu tetracykliny w stężeniu od 2,5 do 10 µg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości stosunku intensywności czerwonej/zielonej fluorescencji ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotnie statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

Uzyskane wyniki wskazują, na niewielkie zmiany w potencjale błony mitochondrialnej pod wpływem ekspresji wprowadzonego konstrukt (Ryc. 46). We wszystkich badanych liniach komórkowych przy najniższej ekspresji wektora nie obserwowano zmian potencjału błony mitochondrialnej. Pierwsze zmiany obserwowane były przy zwiększeniu czynnika indukcyjnego do 5 µg, co w konsekwencji prowadziło do zwiększenia ekspresji wprowadzonego konstrukt. Zmiany te wynosiły od 5 -10% dla linii komórkowej zawierającej konstrukty BMV. Dalsze zwiększanie ekspresji wektora spowodowało dalsze obniżanie potencjału błony mitochondrialnej dla linii komórkowej HepG2-Flp-In z wprowadzonym konstruktem AUC-BMV, GUC-BMV oraz AUC-TMV i wynosiło

odpowiednio 20%, 17%, 15% (Ryc. 46). W przypadku linii Flp-In-293 zmiany potencjału obserwowano jedynie w przypadku linii zawierającej konstrukt AUC-TMV i wynosił jedynie 10% przy najwyższej ekspresji wektora. Większe zmiany potencjału błony mitochondrialnej były obserwowane w liniach komórkowych zawierających konstrukty, w których wprowadzono sekwencję podobną do tRNA pochodzącą z wirusa mozaiki stokłosa (BMV) (Ryc. 46).

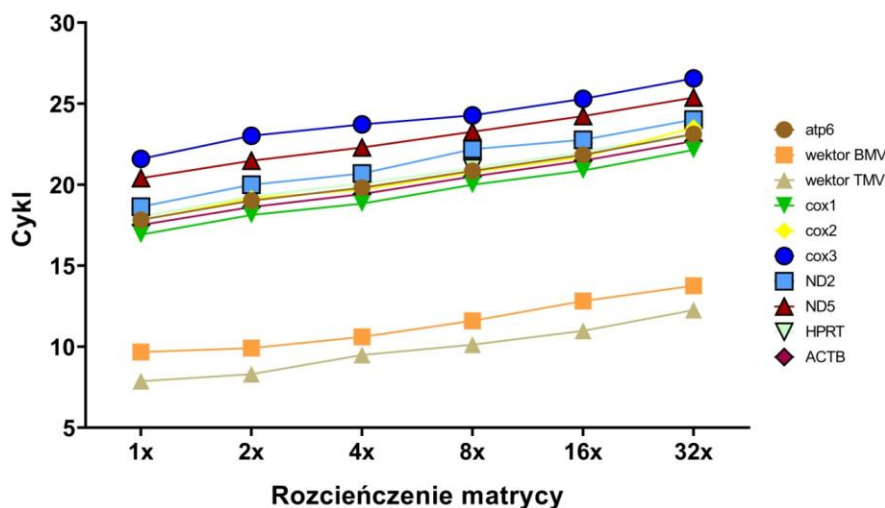
3.2.6. Ocena poziomu mRNA oraz białka pod wpływem aktywności katalitycznej rybozymów

W celu oceny efektywności działania konstruktów, w tym głównie działania rybozymu, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji docelowego genu atp 6 zarówno na poziomie RNA, jak i białka. W pierwszym etapie, przeprowadzono kontrolę jakości RNA po izolacji z modyfikowanych ludzkich linii komórkowych (Ryc. 47).



Ryc. 47. Elektroforeza RNA w żelu agarozowym, jako metoda analizy jakościowej. K – materiał kontrolny z komórek nietraktowanych tetracykliną, 1 – 6 materiał z komórek traktowanych badanymi stężeniami tetracykliny (0,5-10 μ g). **A** – linia komórkowa HepG2-Flp-In, **B**- linia komórkowa FLp-In-293.

A.



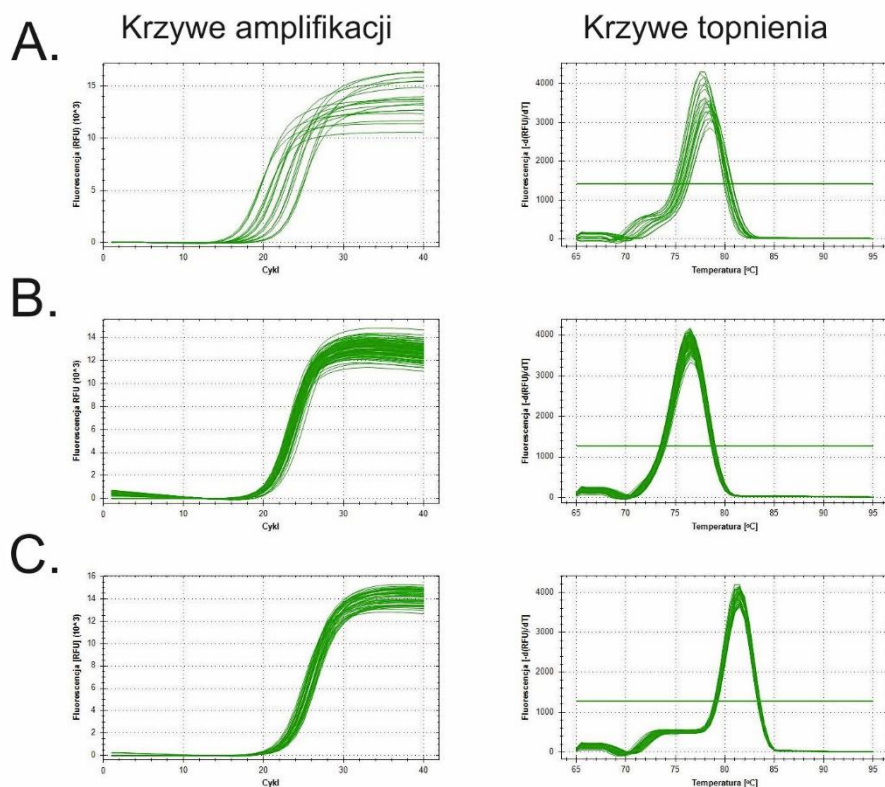
B.

Nazwa startera	Optymalna temperatura przyłączenia starterów (°C)	Efektywność (%)	Nachylenie krzywej	Współczynnik korelacji (R ²)
wektor-TMV	60	109	-3,111	0,983
wektor-BMV	60	101	-3,287	0,958
atp6	60	96	-3,415	0,990
cox1	57	98	-3,351	0,981
cox2	57	98	-3,499	0,975
cox3	60	102	-3,059	0,981
ND2	60	97	-3,485	0,991
ND5	60	103	-3,234	0,996
HPRT	60	95	-3,353	0,988
ACTB	59	97	-3,312	0,996

Ryc. 48. Analiza starterów do reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym metodą rozcieńczeń matrycy. (A) Krzywe standardowe dla wszystkich starterów wykorzystanych w analizach qPCR uzyskane przy rozcieńczeniach matrycy cDNA x1, x2, x4, x8, x16, x32. **(B)** Porównanie parametrów starterów wykorzystywanych w analizach qPCR.

Analizę ilościową qPCR przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej. Z tego względu przeprowadzenie reakcji zostało poprzedzone analizą wykorzystywanych starterów techniką rozcieńczeń matrycy. Polega ona na wykonaniu reakcji qPCR na wspólnej matrycy cDNA oraz jej rozcieńczeniach dla wszystkich par starterów. W wykonanych badaniach analizowano uzyskane krzywe standardowe zależności rozcieńczenia matrycy od cyklu, w którym obserwowano tzw. punkt odcięcia (Ct). Zastosowana metoda pozwoliła również na wyznaczenie efektywności zastosowanych starterów (Ryc. 48).

Do dalszych analiz wybrano tylko te startery, które odznaczały się wysoką efektywnością (powyżej 95%) oraz współczynnikiem korelacji zbliżonym do 1. Jakość uzyskanych produktów PCR oceniano poprzez analizę krzywych topnienia. Obserwowane na wykresie pojedyncze piki świadczyły o uzyskaniu produktów o wysokiej czystości (Ryc. 49)



Ryc. 49. Przykładowe krzywe amplifikacji reakcji qPCR i topnienia starterów dla wybranych eksperymentów. (A) Otrzymywanie krzywych standardowych do optymalizacji starterów metodą rozcieńczeń matrycy. **(B)** Analiza genów referencyjnych. **(C)** Analiza qPCR dla prób kontrolnych oraz poddanych działaniu tetracykliny.

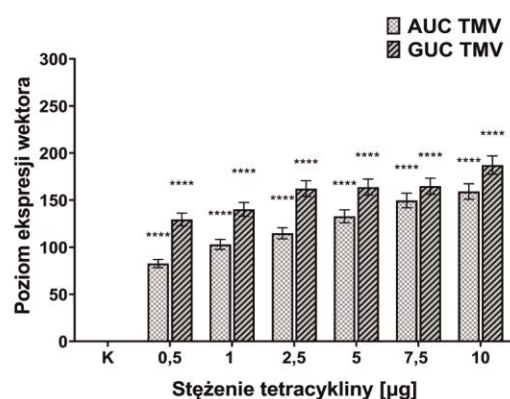
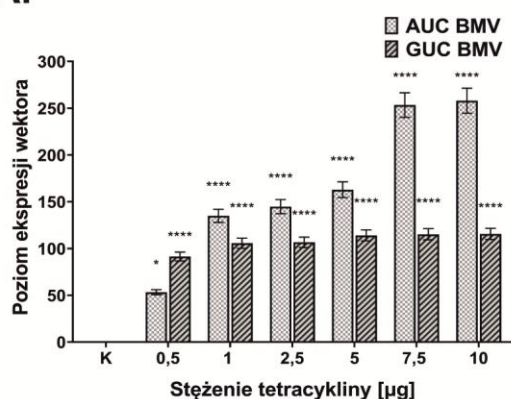
3.2.6.1. Określenie zmian w poziomie ekspresji genu docelowego *atp6* oraz wektora.

Analizę zmian poziomu ekspresji genu *atp6* oraz wprowadzonego do komórek narzędzia z HH wykonywano 24 godziny po indukcji ekspresji wektora w komórkach ludzkich roztworem tetracykliny w stężeniu od 0,5-10 μg prowadzonej na 24-dołkowych płytkach hodowlanych przy konfluencji komórek na poziomie 80-90%.

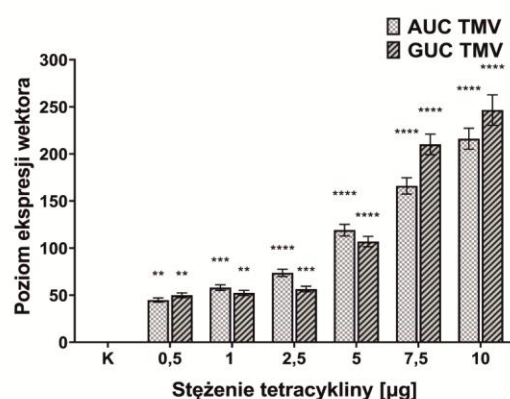
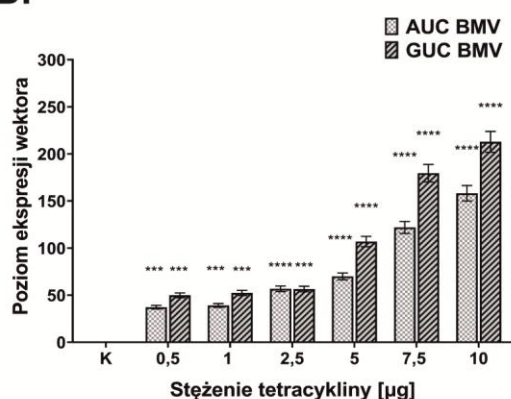
W przypadku badania poziomu ekspresji wprowadzonego konstrukt uzyskano znaczący wzrost (50 – 130 – krotny) we wszystkich badanych liniach komórkowych w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 43.). Poziom ten był jednak różny w zależności

od zastosowanych stężeń tetracykliny, a także różny w zależności od wprowadzonego konstruktów oraz badanej linii. Przy najniższym zastosowanym stężeniu tetracykliny najwyższy (130 – krotny) wzrost ekspresji wektora obserwowano dla linii Flp-In-293 zawierającej konstrukt GUC-TMV, a najniższy (37 – krotny) dla linii HepG2-Flp-In z konstruktem AUC-BMV. Wzrost stężenia tetracykliny powodował dalszy wzrost ekspresji wektora. Jedynie w przypadku linii Flp-In-293 zawierającej konstrukt GUC-BMV zaobserwowano, że zwiększenie stężenia czynnika indukcyjnego nie prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji wektora i utrzymuje się na stałym (ok. 100 – krotnym) poziomie w zakresie stosowanych stężeń. Najwyższy, 250 – krotny, wzrost ekspresji wektora obserwowano w przypadku linii komórkowej Flp-In-293 zawierającej konstrukt GUC-BMV oraz HepG2-Flp-In z ekspresją konstruktów GUC-TMV. W przypadku komórek nietraktowanych tetracykliną nie zaobserwowano zmian w ekspresji konstruktów, co wskazuje, że system ten jest efektywny, a czynnik indukujący jest niezbędny do jego aktywacji, co pozwala w pełni kontrolować wprowadzone do komórki narzędzie (Ryc. 50).

A.



B.

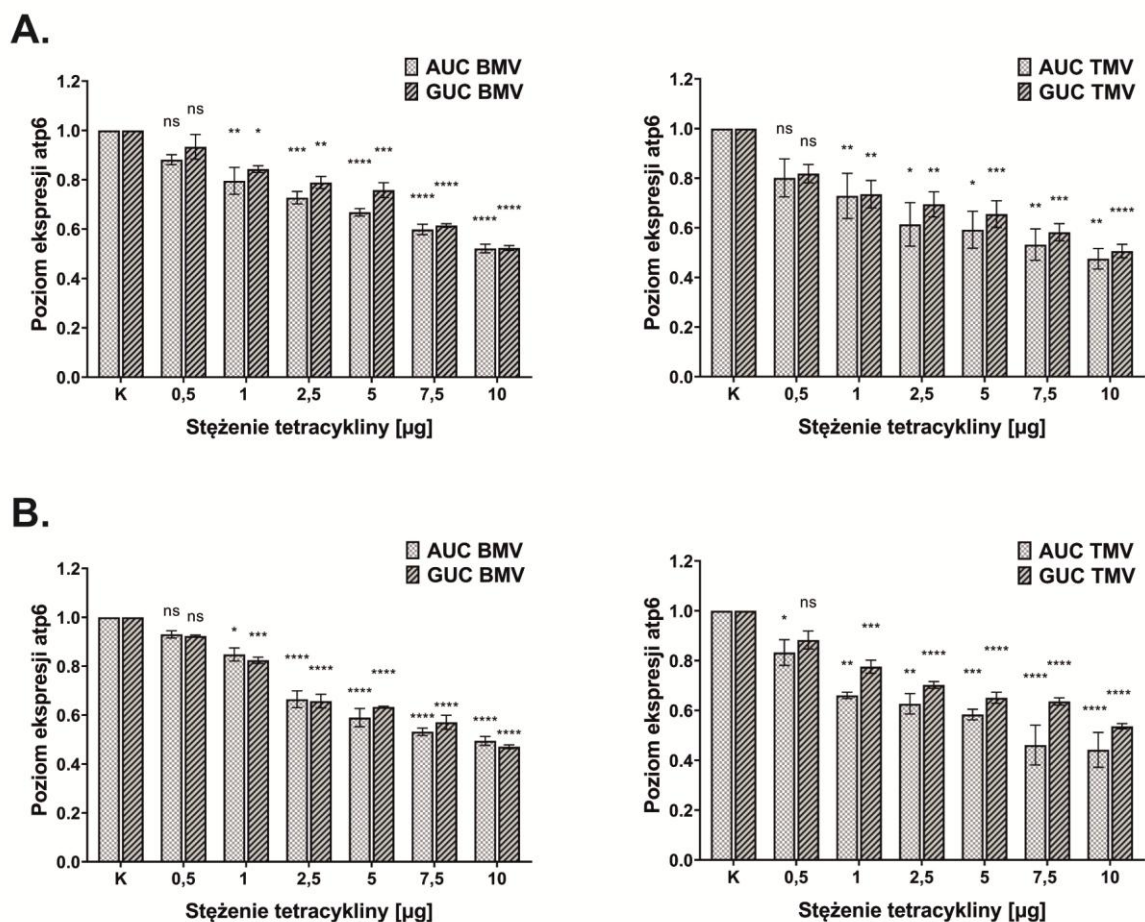


Linia komórkowa	Konstrukt	Stężenie tetracykliny [µg]						
		K	0,5	1	2,5	5	7,5	10
HepG2-Flp-In	AUC BMV	1,00	37,21	39,01	56,68	69,90	121,87	158,13
	AUC TMV	1,00	44,78	57,95	73,64	118,98	165,99	216,06
	GUC BMV	1,00	49,80	52,35	56,48	106,87	179,51	212,78
	GUC TMV	1,00	49,80	52,35	56,48	106,87	210,11	246,52
Flp-In-293	AUC BMV	1,00	53,31	134,92	144,78	162,85	253,35	258,00
	AUC TMV	1,00	82,72	102,99	114,79	132,79	149,63	159,20
	GUC BMV	1,00	91,39	105,65	106,62	114,01	115,23	115,57
	GUC TMV	1,00	129,47	140,21	162,26	163,84	164,83	187,20

Ryc. 50. Analiza poziomu ekspresji wektora w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

K – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 0,5µg-10µg - komórki traktowane tetracykliną w stężeniu od 0,5µg do 10µg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotne statystycznie; * dla p<0,05; ** dla p<0,01; *** dla p<0,001; **** dla p<0,0001. W tabelach zestawiono wartości ekspresji wektora dla poszczególnych linii komórkowych.

Analiza zmian poziomu mRNA genu *atp6* wykazała korelację z ekspresją wektora. Wraz ze wzrostem ekspresji plazmidu, a co za tym idzie, wzrostem poziomu narzędzia katalitycznego HH, obniżeniu ulegała ilość mRNA genu docelowego. Przy najniższym (0,5 μ g) zastosowanym stężeniu czynnika indukcyjnego poziom badanego genu ulegał obniżeniu o około 10-20% w zależności od konstruktów i linii komórkowej. Przy stężeniu 1 μ g spadek poziomu ekspresji genu docelowego wahał się w przedziale od 20-30% we wszystkich badanych liniach. Stężenie tetracykliny na poziomie 2,5 μ g i 5 μ g skutkowało obniżeniem ekspresji genu *atp6* odpowiednio o 30-35% oraz 35-40%. Natomiast przy najwyższych zastosowanym stężeniach spadek ten wynosił od 40-55%. Przy 10 μ g tetracykliny, w obu badanych liniach, najefektywniej zadziałał konstrukt GUC-TMV. Obniżenie poziomu ekspresji po jego zastosowaniu wynosiło 55% dla linii Flp-In-293 i 50% dla HepG2-Flp-In. Najmniej efektywny okazał się konstrukt AUC-BMV, po jego zastosowaniu obniżenie poziomu ekspresji genu *atp6* wynosiło 45% dla obu badanych linii komórkowych (Ryc. 51). Uzyskane wyniki wskazują, że opracowany system może być z powodzeniem stosowany w różnych liniach komórkowych z taką samą wysoką skutecznością. Zarówno w przypadku linii HepG2-Flp-In jak i Flp-In-293 obserwowano znaczny spadek ekspresji docelowego genu (Ryc. 51).



Linia komórkowa	Konstrukt	Stężenie tetracykliny [μg]						
		K	0,5	1	2,5	5	7,5	10
HepG2-Flp-In	AUC BMV	1	0,88	0,80	0,73	0,67	0,60	0,52
	AUC TMV	1	0,80	0,73	0,61	0,59	0,53	0,48
	GUC BMV	1	0,93	0,84	0,79	0,76	0,61	0,52
	GUC TMV	1	0,82	0,74	0,69	0,66	0,58	0,51
Flp-In-293	AUC BMV	1	0,93	0,85	0,66	0,59	0,53	0,49
	AUC TMV	1	0,83	0,66	0,63	0,58	0,46	0,44
	GUC BMV	1	0,92	0,82	0,66	0,63	0,57	0,47
	GUC TMV	1	0,88	0,78	0,70	0,65	0,64	0,54

Ryc. 51. Analiza zmian poziomu ekspresji genu atp6 w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

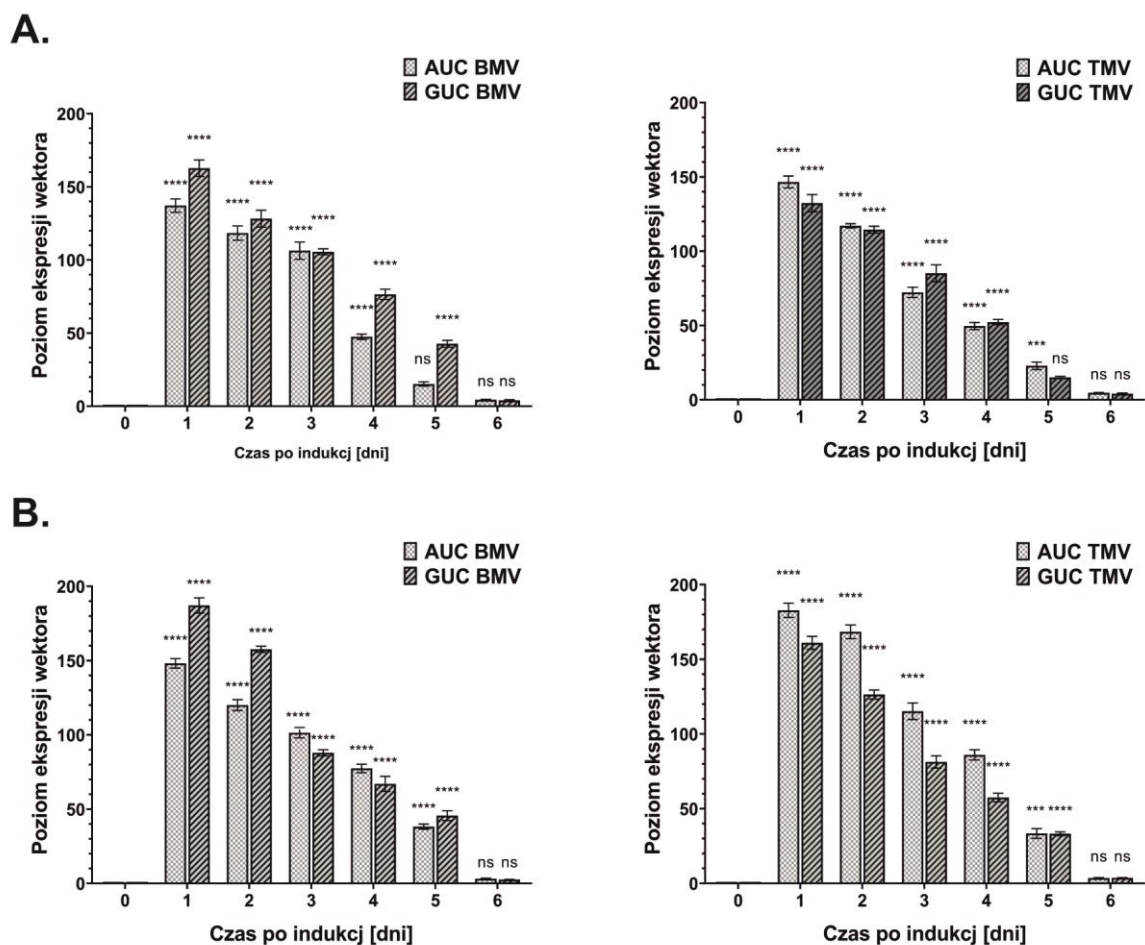
K – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 0,5μg-10μg - komórki traktowane tetracykliną w stężeniu od 0,5μg do 10μg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey’a: ns – nieistotne statystycznie; * dla p<0,05; ** dla p<0,01; *** dla p<0,001; **** dla p<0,0001. W tabeli zestawiono wartości ekspresji atp6 dla poszczególnych linii komórkowych.

3.2.6.2. Analiza zmian poziomu ekspresji docelowego genu atp6 oraz wektora w czasie

W kolejnym etapie prac sprawdzono poziom zmian mRNA wektora oraz genu atp6 w czasie. Uzyskane we wcześniejszym etapie, selekcji optymalnego stężenia tetracykliny, wyniki wykazały, iż najlepszym z efektywnych stężeń tego antybiotyku jest 10 µg. Dlatego też to stężenie zostało wybrane do dalszych badań.

Uzyskane wyniki wskazują, że najwyższy, 130-190 – krotny, wzrost poziom ekspresji konstruktów obserwowany był w pierwszej dobie od indukcji. Wraz z upływem czasu obserwowano spadek poziomu ekspresji wprowadzonego narzędzia, co koreluje z okresem półtrwania tetracykliny wynoszącym 24 godziny. Po 6 dniach poziom ekspresji wektora jest zbliżony do komórek kontrolnych i wynosi od 2 – 5 – krotności ekspresji w komórkach kontrolnych (Ryc. 52).

Zmiana poziomu ekspresji mitochondrialnego genu atp6 wykazuje korelację z ekspresją wektora. Po 24 godzinach obserwujemy najwyższy spadek poziomu mRNA badanego genu wynoszący od 50-60% we wszystkich badanych liniach komórkowych. Wraz ze spadkiem ekspresji wektora obserwujemy wzrost poziomu ekspresji genu atp6. W ostatnim dniu analizy jest on zbliżony do komórek nietraktowanych tetracykliną i waha się od 95-98%. (Ryc. 53).

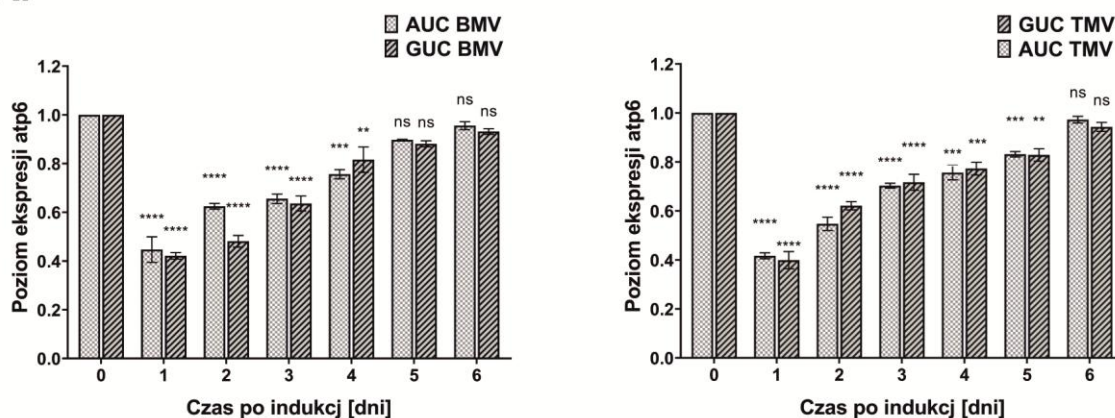


Linia komórkowa	Konstrukt	Czas po indukcji [dni]							
		0	1	2	3	4	5	6	
HepG2-Flp-In	AUC BMV	1	148,16	120,09	101,45	77,43	38,25	3,17	
	AUC TMV	1	182,79	168,43	115,22	86,02	33,43	3,58	
	GUC BMV	1	187,16	157,65	87,94	66,98	45,62	2,58	
	GUC TMV	1	161,03	126,44	81,30	57,51	33,22	3,67	
Flp-In-293	AUC BMV	1	137,19	118,43	106,39	47,50	15,23	4,38	
	AUC TMV	1	146,61	117,09	72,29	49,65	22,87	4,73	
	GUC BMV	1	162,77	128,28	105,64	76,53	42,71	3,98	
	GUC TMV	1	132,36	114,50	85,11	52,29	15,05	4,14	

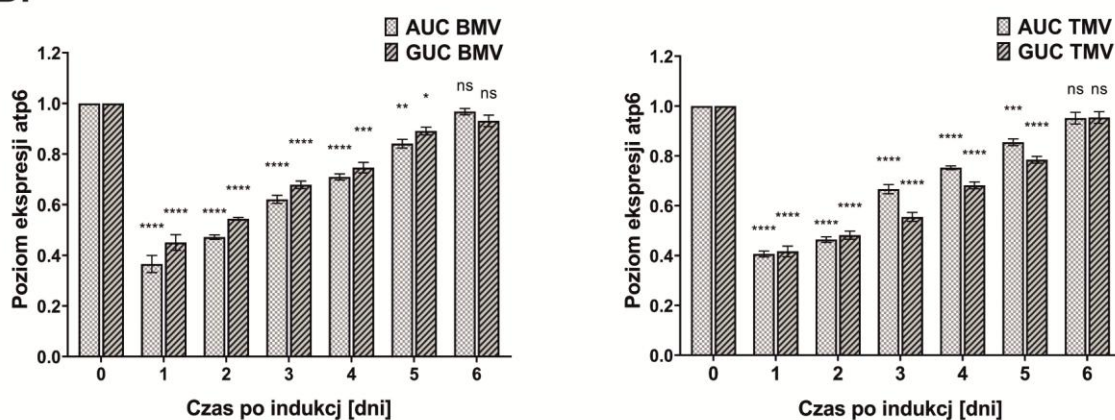
Ryc. 52. Analiza poziomu ekspresji wektora w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10µg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotnie statystycznie; * dla p<0,05; ** dla p<0,01; *** dla p<0,001; **** dla p<0,0001. W tabeli zestawiono wartości ekspresji wektora dla poszczególnych linii komórkowych.

A.



B.



Linia komórkowa	Konstrukt	Czas po indukcji [dni]						
		0	1	2	3	4	5	6
HepG2-Flp-In	AUC BMV	1	0,37	0,47	0,62	0,71	0,84	0,97
	AUC TMV	1	0,41	0,46	0,67	0,75	0,85	0,95
	GUC BMV	1	0,45	0,54	0,68	0,75	0,89	0,93
	GUC TMV	1	0,42	0,48	0,56	0,68	0,78	0,95
Flp-In-293	AUC BMV	1	0,45	0,62	0,66	0,76	0,90	0,96
	AUC TMV	1	0,42	0,55	0,70	0,76	0,83	0,97
	GUC BMV	1	0,42	0,48	0,64	0,82	0,88	0,93
	GUC TMV	1	0,40	0,62	0,72	0,77	0,83	0,94

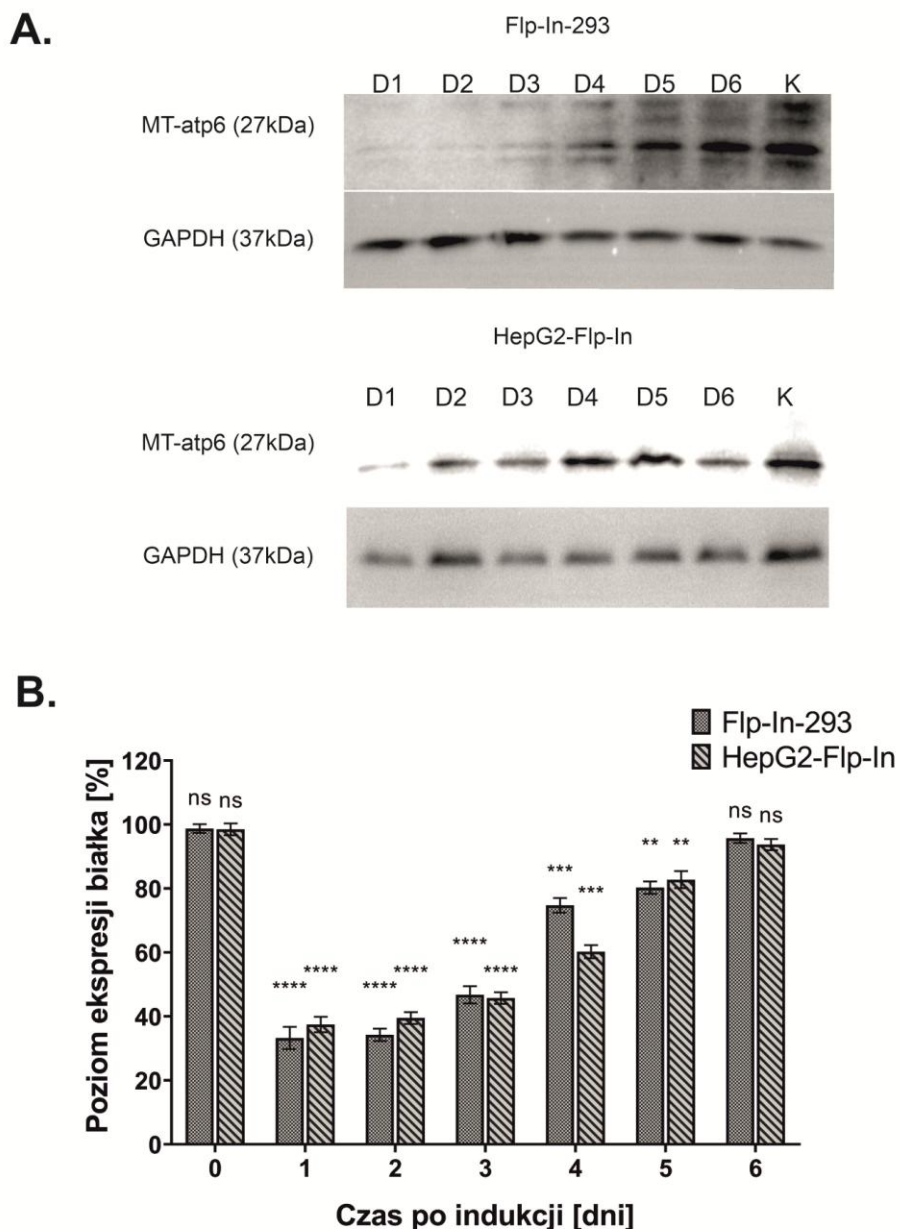
Ryc. 53. Analiza zmian poziomu ekspresji genu atp6 w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10µg. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a: ns – nieistotnie statystycznie; * dla p<0,05; ** dla p<0,01; *** dla p<0,001; **** dla p<0,0001. W tabeli zestawiono wartości ekspresji atp6 dla poszczególnych linii komórkowych.

3.2.6.3. Określenie poziomu ekspresji genu docelowego atp6 na poziomie białka

W równoległe prowadzonych eksperymentach zebrano komórki, przeprowadzono izolację całkowitego białka oraz oszacowano jego ilość w celu wykonania analizy Western Blot. Do analiz typu Western Blot wybrano komórki Flp-In-293 oraz HepG2-Flp-In zawierające konstrukty wykazujące najwyższą skuteczność obniżenia poziomu mRNA genu atp6. W przypadku linii Flp-In-293 był to konstrukt GUC-TMV, a w linii HepG2-Flp-In konstrukt AUC-BMV.

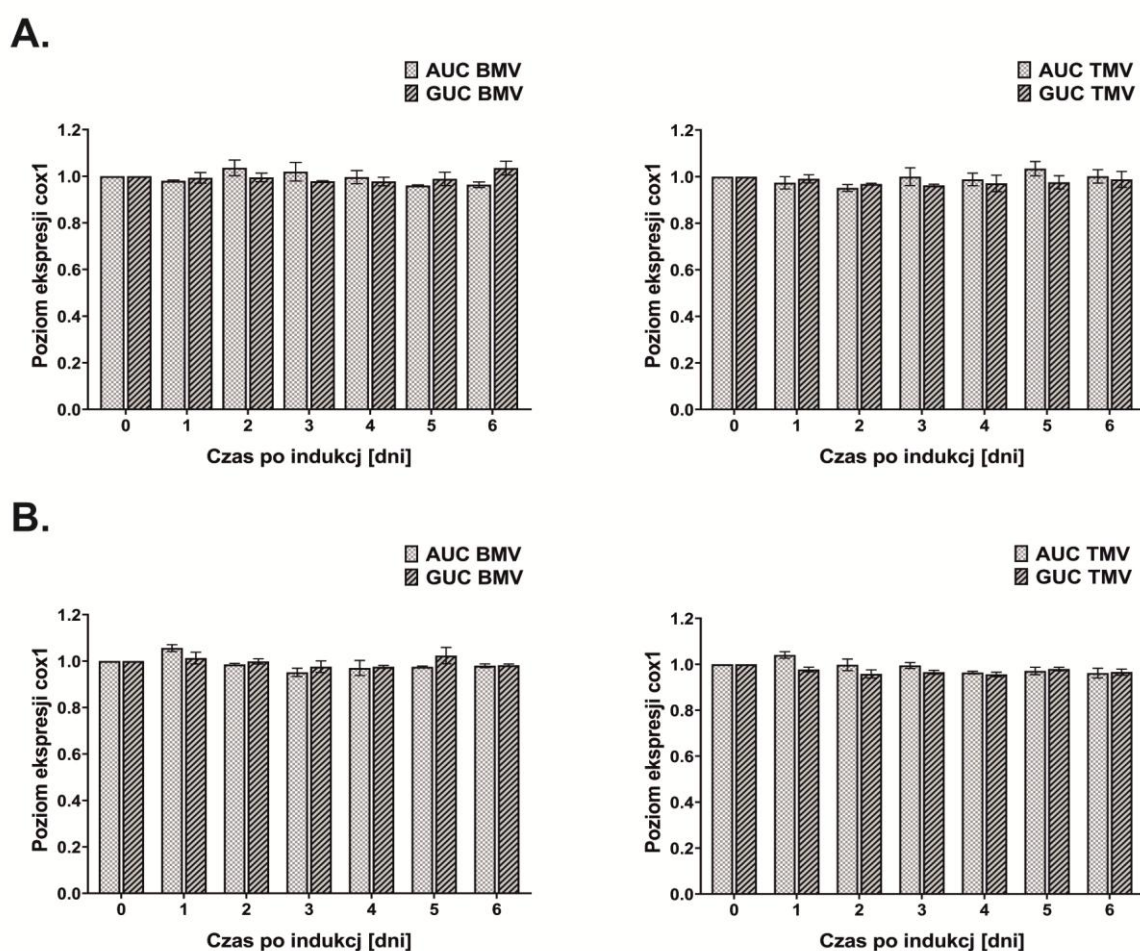
Uzyskane metodą Western Blot wyniki potwierdziły skuteczność opracowanego narzędzia w obniżaniu ekspresji docelowego genu również na poziomie białka. Po 24 godzinach od indukcji poziom białka atp6 spadał znacznie w obu badanych liniach komórkowych. W przypadku linii Flp-In-293 spadek ten wynosił blisko 75% podczas gdy dla linii HepG2-Flp-In około 70%. W obu badanych liniach komórkowych niski poziom białka utrzymywał się do dnia 3, a w kolejnych dniach wzrastał, osiągając odpowiednio 98 i 96% w ostatnim dniu obserwacji. Analiza poziomu białka kontrolnego GAPDH nie wykazała zmian w jego ekspresji we wszystkich punktach czasowych (Ryc. 54).



Ryc. 54. Analiza zmian poziomu białka atp6 w liniach komórkowych Flp-In-293 oraz HepG2-Flp-In. K – komórki nietraktowane tetracykliną, D1-D6 komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 0,5-10µg. Western Blot przeciwko genom atp6 oraz GAPDH (kontrola). **A** – Reprezentatywne bloty dla obu linii komórkowych, **B** – Pomiar densytometryczny białka. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości ± SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey’a: ns – nieistotne statystycznie; * dla p<0,05; ** dla p<0,01; *** dla p<0,001; **** dla p<0,0001.

3.2.6.4. Ocena specyficzności działania rybozymów

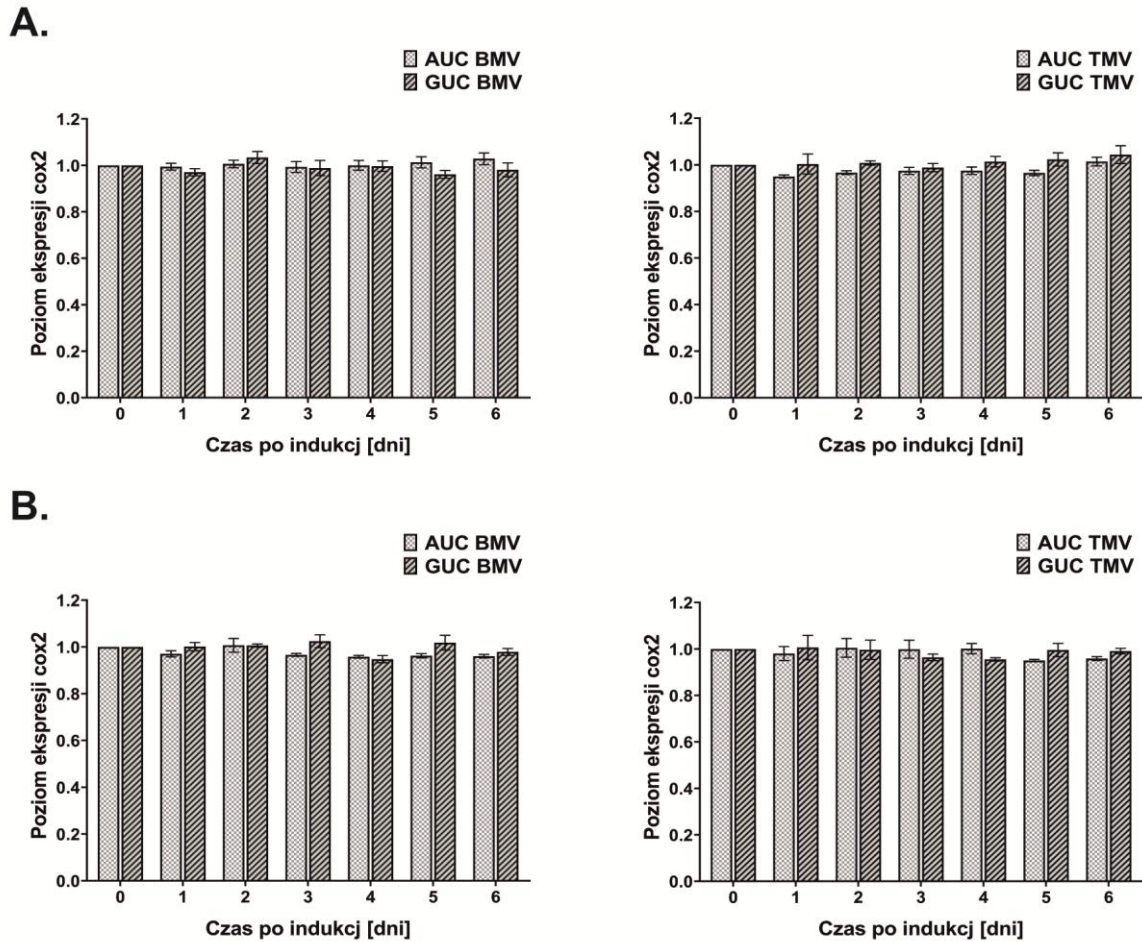
W celu potwierdzenia specyficzności zaprojektowanych rybozymów oraz braku oddziaływań niespecyficznych typu „off-target” zbadano poziom ekspresji następujących genów mitochondrialnych: *cox1*, *cox2*, *cox3*, ND2, ND5. We wszystkich analizowanych przypadkach nie obserwowano znacznych zmian w ekspresji badanych genów w trakcie trwania całego eksperymentu. Od dnia 1 do dnia 6 poziom ekspresji utrzymywał się na poziomie próby kontrolnej (Ryc. 55). Uzyskane wyniki potwierdzają specyficzność zaprojektowanych cząsteczek.



Ryc. 55. Analiza poziomu ekspresji genu *cox1* w linii komórkowej FLP-In-293 (A) oraz HepG2-FLP-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10 μ g. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey’a. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

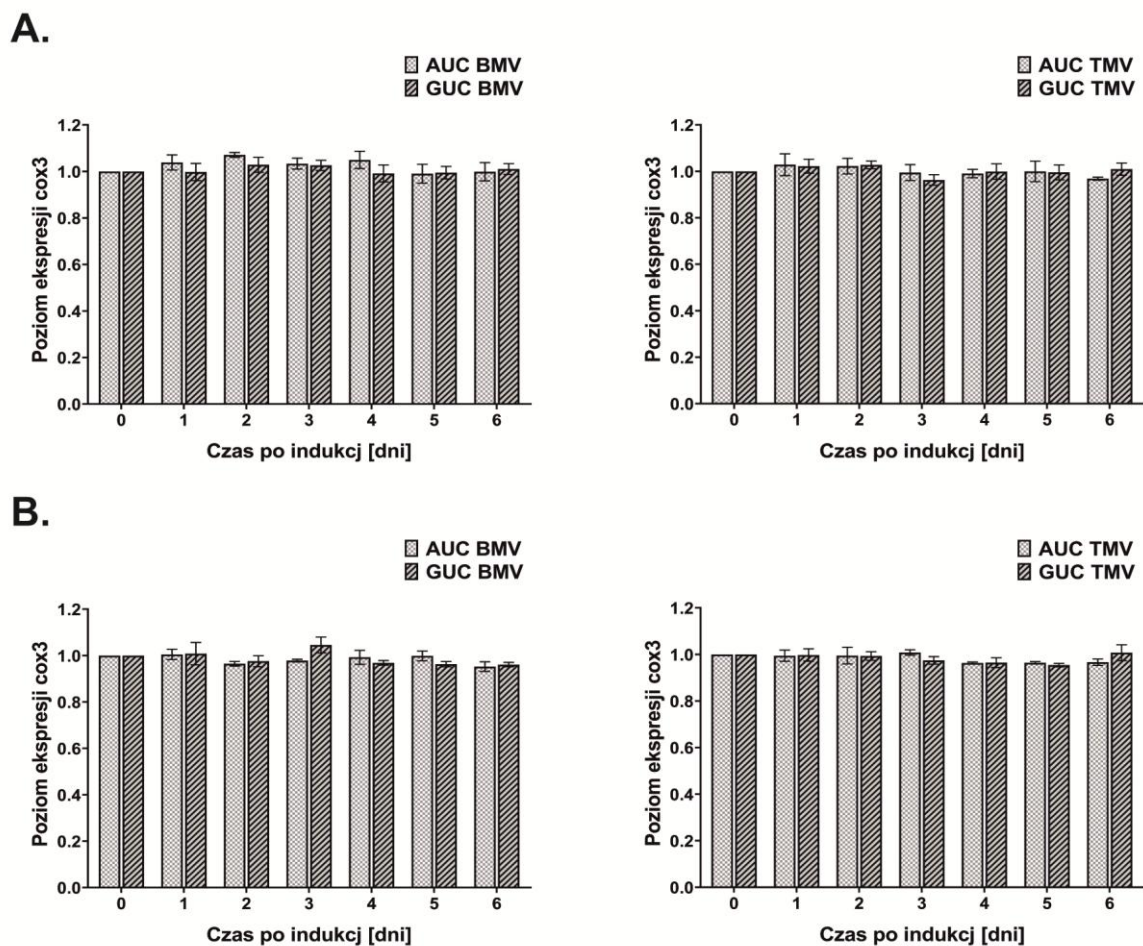
Analiza poziomu ekspresji genu *cox 2* również nie wykazała większych zmian w porównaniu z komórkami kontrolnymi. Niewielki sięgający jedynie około 5% spadek zaobserwowano w przypadku linii HepG2-Flp-In zawierającej konstrukty GUC-BMV oraz GUC-TMV a także linii Flp-In-293 z konstruktem GUC-TMV (Ryc. 56).



Ryc. 56. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *cox2* w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10 μ g. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

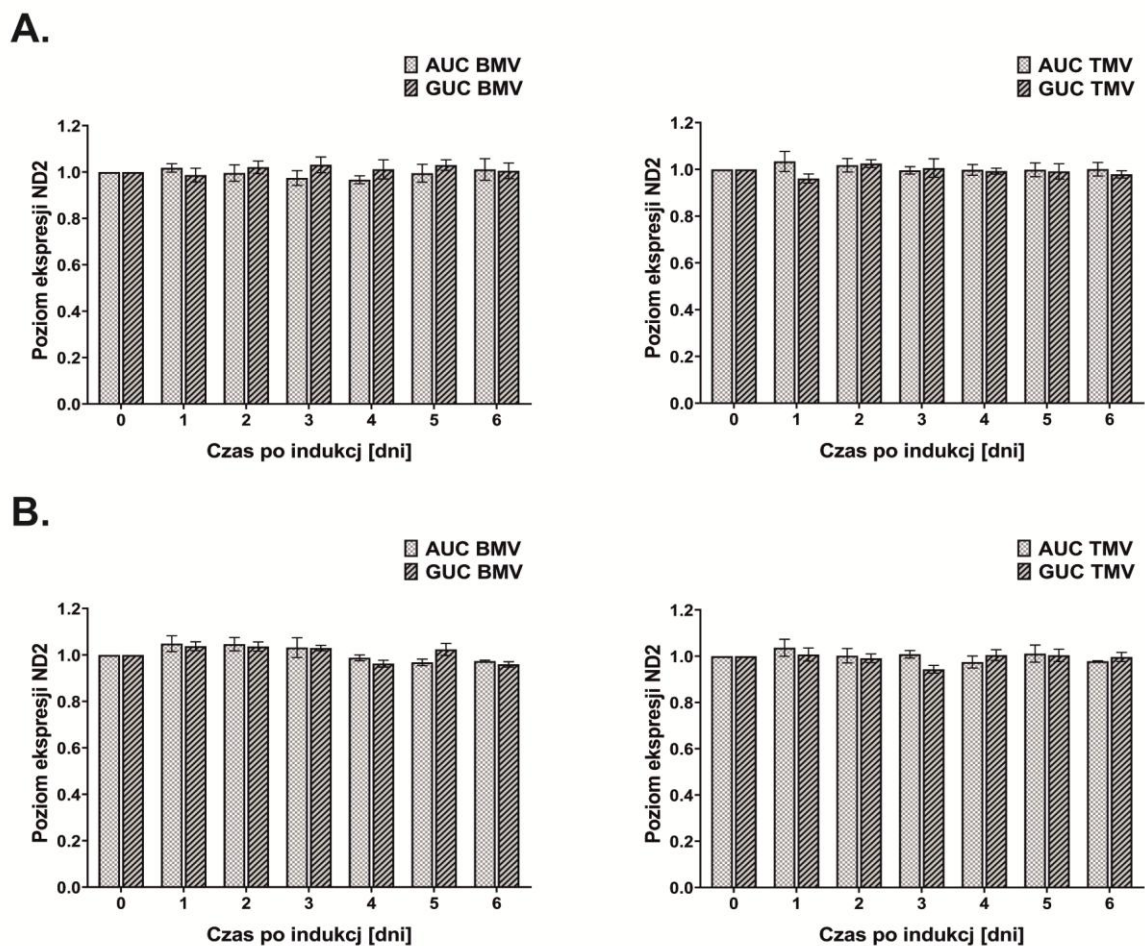
Przeanalizowany został także poziom ekspresji genu *cox 3*, w przypadku którego również nie zaobserwowano obniżenia poziomu ekspresji. Uzyskane wyniki wskazują na niewielkie sięgające zaledwie kilku procent odchylenia w porówniu z komórkami kontrolnymi (Ryc. 57).



Ryc. 57. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *cox3* w linii komórkowej FLP-In-293 (A) oraz HepG2-FLP-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10 μ g. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

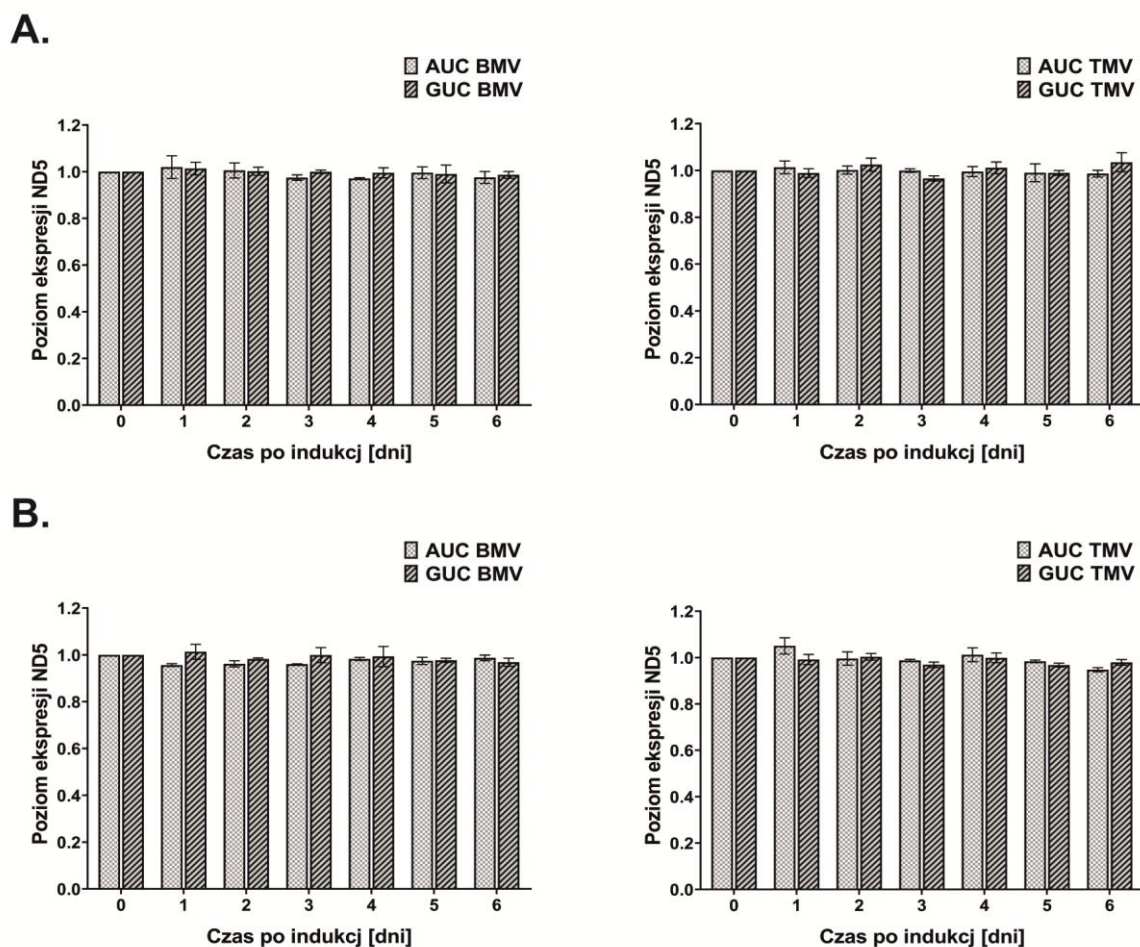
Podobnie jak w przypadku poprzednich badanych genów również poziom ekspresji genu ND2 nie uległ obniżeniu w badanych punktach czasowych. W niektórych z konstruktów takich AUC-BMV w linii Flp-In-293 czy AUC-BMV i GUC-BMV w linii HepG2-Flp-In obserwowano około 5% wzrost ekspresji badanego genu (Ryc. 58).



Ryc. 58. Analiza poziomu ekspresji genu ND2 w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10 μ g. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

Gen ND5 również nie wykazywał większych zmian w poziomie ekspresji (Ryc. 59).



Ryc. 59. Analiza poziomu ekspresji genu ND5 w linii komórkowej Flp-In-293 (A) oraz HepG2-Flp-In (B).

0 – komórki kontrolne nietraktowane tetracykliną, 1 – 6 – komórki traktowane tetracykliną w stężeniu 10 μ g. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM w odniesieniu do komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu One-way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

4. Dyskusja

4.1. Wprowadzenie

Jak pokazują badania blisko połowa sekwencji genomu mitochondrialnego roślin ma nieznaną pochodzenie oraz funkcje [Kubo, 2008]. Wbrew oczekiwaniom większość tych sekwencji ulega jednak transkrypcji [Holec, 2008]. Regulacja ekspresji takich transkryptów, może więc pozwolić na poznanie ich właściwości funkcjonalnych w genomie mitochondrialnym roślin.

Opracowana w naszym laboratorium strategia dostarczania aktywnych narzędzi do modyfikacji genomu mitochondrialnego umożliwia manipulowanie przepływem informacji genetycznej w tych organellach na niedostępnym do tej pory poziomie. Dotychczasowy brak skutecznych metod manipulacji materiałem genetycznym mitochondriów uniemożliwiał badanie ekspresji i metabolizmu RNA zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in organello*. Dzięki wykorzystaniu struktur podobnych do tRNA do importu narzędzi molekularnych do mitochondriów możliwe jest przeprowadzanie bezpośrednich analiz na poziomie *in vivo*. Innowacyjna strategia regulacji ekspresji genów mitochondrialnych z wykorzystaniem katalitycznych kwasów nukleinowych połączonych z sekwencją podobną do tRNA została po raz pierwszy wykorzystana do obniżenia ekspresji mitochondrialnego genu *atp9* [Val, 2011]. Uzyskane wyniki wskazują, że opracowany system może być z powodzeniem stosowany w badaniach funkcjonalnych.

4.2. Sekwencja pasażerska

4.2.1. Rybozomy

Rybozomy to katalityczne RNA działające jak enzymy i niewymagające do swojej aktywności czynników białkowych. Większość naturalnie występujących rybozymów to samo przetwarzające się cząsteczki, które katalizują reakcję hydrolizy i ligacji RNA. Badania prowadzone na rybozymach wykazały, że domena rozpoznająca substrat może być sztucznie zmodyfikowana w celu stymulowania specyficznego miejscowo cięcia *in cis* (ta sama nić kwasu nukleinowego) lub *in trans* (niekowalencyjnie połączony kwas nukleinowy). Ponadto rybozomy są podatne na selekcję *in vitro* i ukierunkowaną ewolucję w celu uzyskania ulepszonych właściwości i nowych funkcji, jako narzędzia terapeutyczne i diagnostyczne. RNazy można również zaprojektować w taki sposób, aby były allosterycznie aktywowane przez cząsteczki efektorowe, co w konsekwencji doprowadziło do rozwoju sztucznych ryboprzełączników (ang. *riboswitches*) wykorzystywanych, jako biocujniki i syntetyczne

narzędzia biologiczne. W przyrodzie istnieje wiele rodzajów rybozymów jednak większość cząsteczek terapeutycznych wywodzi się z rybozymów typu HH lub hairpin [Burnerr, 2012; Zhou, 2019]. Wykorzystywane w pracy doktorskiej rybozimy HH zostały zaprojektowane z krótszą domeną rdzenia katalitycznego. W obrębie helisy drugiej zastosowano 2 pary, zasad zamiast 4 [Persson, 2020]. Czteronukleotydomowa pętla GUGA została natomiast zastąpiona sekwencją UUUU [Nelson, 2005]. Modyfikacje te miały na celu zwiększenie aktywności katalitycznej rybozymów w niskich stężeniach magnezu. Tak przygotowany rybozym wykazywał wysoką skuteczność w obniżaniu docelowych genów w obrębie mitochondrialnego DNA. Inne badania wykazały odwrotną zależność wskazując, że wydłużanie naturalnie występujących rybozymów o dodatkowe sekwencje pozwala na zwiększenie ich aktywności w fizjologicznych stężeniach jonów magnezu poprzez stabilizację struktury trzeciorzędowej [Khvorova, 2003]. Zastosowanie rybozimu skróconego wydaje się jednak lepszą koncepcją na wykorzystanie go, jako sekwencji pasażerskiej do importu do mitochondriów. Taki rybozym jest mniej podatny na generowanie oddziaływań ze strukturą podobną do tRNA, które mogłyby wpływać na jego aktywność katalityczną. Ponadto, obecność dodatkowych sekwencji katalitycznych RNA mogłaby w niekorzystny sposób wpływać na wydajność procesu importu. Należy również zwrócić uwagę, że na aktywność katalityczną zastosowanych w naszym podejściu rybozymów nie miała wpływu dodatkowa sekwencja na końcu 5' powstała w wyniku transkrypcji konstruktów. Na badaną aktywność nie wpłynęły także - obecność łącznika oraz struktury podobnej do tRNA. Co więcej, można przypuszczać, że ich obecność może przyczyniać się do większej stabilności katalitycznego RNA w komórkach.

Prawidłowo zaprojektowana cząsteczka rybozimu odznacza się wysoką specyficznością a tak zwane efekty *off-target* są uważane za rzadkie [Schere 2003]. W celu zapewnienia wysokiej specyficzności rybozimy zostały zaprojektowane zgodnie z danymi literaturowymi, które wskazują na spadek specyficzności w przypadku, gdy region komplementarny pomiędzy rybozymem a docelowym RNA ma długość mniejszą niż 14 par zasad oraz spadek aktywności w przypadku, gdy rejon ten ma 18 lub więcej par zasad [Ellis, 1993]. Wydłużanie sekwencji sparowanej otaczającej miejsce hydrolizy poza optymalny próg nie było, zatem uważane za czynnik sprzyjający poprawie specyficzności [Hertel, 1996]. W niniejszych badaniach zastosowano rybozimy o długości rejonu komplementarnego wynoszącym 15 par zasad (8 na końcu 5' i 7 na końcu 3'). W oparciu o dostępne dane literaturowe wykazano, że taka długość sekwencji zapewnia wysoką specyficzność, a prawdopodobieństwo wystąpienia alternatywnej, idealnie dopasowanej sekwencji jest

niezwykle niskie. Sekwencje rozpoznawane przez zaprojektowane cząsteczki katalitycznych RNA zostały wybrane w oparciu o szybkość katalizowanej reakcji, która maleje w zależności od rozpoznawanej trójki nukleotydów w następującym porządku: GUC, AUC > GUA, AUA, CUC > AUU, UUC, UUA > CUA, CUU [Sun, 2000].

4.2.2. Oligonukleotydy antysensowe (AS-ON)

W celu potwierdzenia uniwersalności platformy do importu do mitochondriów w niniejszej pracy oprócz rybozymów postanowiono również wykorzystać inne podejście oparte o kwasy nukleinowe. W tym przypadku wybrano metodę antysensowych oligonukleotydów. AS-ON to syntetyczne, jednoniciowe cząsteczki DNA lub RNA, które selektywnie wiążą się z komplementarnymi mRNA lub pre-mRNA i wpływają na ich prawidłowe funkcjonowanie. Do ograniczania ekspresji genów antysensowe oligonukleotydy angażują enzymu rybonukleazy H (RNazy H) do hydrolizy dupleksów AS-ON-RNA. Powodują również przyspieszenie rozpadu RNA poprzez blokowanie poliadenylacji i niszczenie endogennych mikrona. Ponadto wykazano, że AS-ON hamują translację poprzez modulację procesu składania.

Podobnie jak w podejściu pilotażowym struktura podobna to tRNA pochodząca z wirusa żółtej mozaiki rzepy została połączona na końcu 5' z sekwencją pasażerską poprzez łącznik. Do prawidłowego przebiegu procesu importu do mitochondriów niezbędne jest, aby cząsteczka tRNA uległa aminoacylacji. Proces ten przebiega prawidłowo tylko pod warunkiem, iż cząsteczka posiada wolny koniec 3'CCA. Badania wykazały, że specyficzne podfragmenty każdej nici rybozemu HDV zawierają zarówno miejsce cięcia jak i sekwencje niezbędne do samo wycięcia. W związku z tym do zaprojektowanego konstrukt na końcu 3' wprowadzono sekwencję kodującą rybozym HDV, która umożliwi wygenerowanie wolnego dla aminoacylacji końca 3' [Val, 2011].

4.3. Indukcja ekspresji konstrukt

Ze względu na możliwość zaangażowania wybranych genów w kluczowe procesy rozwoju roślin przygotowany konstrukt został wprowadzony do wektora pER8, znajdującego się pod kontrolą promotora indukowanego β -estradiolem XVE. System ten składa się z domeny wiążącej DNA represora bakteryjnego LexA (X), kwasowej domeny transaktywującej czynnika VP16 (V) pochodzącą z wirusa opryszczki zwykłej (ang. *herpes simplex virus*, HSV) oraz regionu regulatorowego ludzkiego receptora estrogenowego (E). Aktywacja konstytutywnego promotora G10-90 zachodzi po związaniu β -estradiolu.

Kompleks XVE – β -estradiol aktywuje promotor docelowy składający się z ośmiu kopii operatora LexA i prowadzi do transkrypcji wprowadzonej sekwencji [Zuo, 2000]. Wykorzystanie takiego systemu pozwoliło w pełni kontrolować poziom ekspresji wprowadzonego narzędzia.

4.4. Sekwencje i geny docelowe

4.4.1. Zastosowanie wektora w układzie roślinnym

4.4.1.1. Maturazy

Sekwencje podobne do odwrotnych transkryptaz (ang. *reverse transcriptase*, RT) typu retrowirusowego są szeroko rozpowszechnione wśród różnych organizmów. U bakterii takie geny obejmują liczne ORF kodowane w wielu intronach grupy II określanych jako maturazy (mat). Wykazano, że działają one specyficznie na aktywność składania i ruchliwości własnych pokrewnych intronów RNA. Chociaż w reakcji składania pośredniczą same introny, pojawia się coraz więcej dowodów na to, że maturazy są wymagane do stabilizacji fałdowania wysoce ustrukturyzowanych intronów grupy II w ich katalitycznie aktywne formy (Lambowitz, 2011; Lambowitz, 2015; Zimmerly, 2015).

Genomy roślinne kodują kilka białek, które są blisko spokrewnione z białkami odwrotnej transkryptazy/maturazy bakteryjnej intronów grupy II (Mohr, 2003; Knoop, 2012; Brown, 2014; Schmitz-Linneweber, 2015). U roślin okrytonasiennych są to matK kodowane w intronach grupy II trnK w plastydach, cztery maturazy kodowane w jądrze (nMAT1 do 4), które jak wykazano, znajdują się w mitochondriach *Arabidopsis*, oraz mitochondrialny matR-ORF zlokalizowany w intronie 4 genu nad1 będący obiektem badawczym niniejszej pracy (Mohr, 2003). Przypuszcza się, że u roślin okrytozależkowych, wszystkie te maturazy będą zaangażowane w składanie różnych podzbiorów intronów grupy II w organellach roślinnych (Schmitz-Linneweber, 2015). Badania genetyczne i biochemiczne wskazują na rolę MatK w przetwarzaniu około połowy intronów plastydowych, z których wszystkie należą do podgrupy IIA (Zoschke et al., 2010). Podobnie obecność kodowanych w genomie jądrowym homologów nMAT, w tym nMAT1, nMAT2, nMAT4 jest niezbędna do składania różnych intronów grupy II w mitochondriach, z których wiele znajduje się w RNA kodujących podjednostki kompleksu I łańcucha oddechowego (Nakagawa, 2006; Keren, 2012; Cohen, 2014). Przypuszcza się, że inne roślinne maturazy, w tym nMAT3 oraz kodowane w mitochondriach białka matR będą również zaangażowane w proces składania mitochondrialnych pre-RNA. Sekwencja matR jest wysoce zachowawcza i obecna w niemal wszystkich roślinach okryto- i nagonasiennych [Guo, 2013]. W niniejszej pracy wykazano, że

gen matR koduje białko zaangażowane w przetwarzanie wielu mitochondrialnych RNA zawierających introny grupy II [Sultan, 2016].

Ekspresja genów mitochondrialnych jest mechanizmem złożonym i obejmuje szereg procesów takich jak edycja RNA, składanie intronów grupy II oraz liczne nukleacje prowadzące do uwolnienia mRNA z ich policistronowych transkryptów kodowanych w organellach [Germain, 2013; Small, 2013; Brown, 2014]. Sekwencja kodująca gen matR w mitochondriach roślin okrytozalążkowych zlokalizowana jest w intronie 4 genu nad1. matR jest najprawdopodobniej wymagany do dojrzewania własnego transkryptu, dlatego przypuszcza się, że ulega translacji bezpośrednio z prekursorowego transkryptu obejmującego egzon 4, intron 4 oraz egzon 5 genu nad1. Podobny mechanizm obserwujemy w kanonicznych maturazach kodowanych przez introny grupy II w genomach bakterii [Lambowitz, 2011, Zimmerly, 2015]. Przypuszcza się, że matR może być zaangażowany w dojrzewanie intronów grupy II w roślinnych mitochondriach. Uzyskane przez współpracującą z naszym zespołem grupę wyniki analiz RIP-chip pozwoliły na wyselekcjonowanie różnych tran skryptów, z których wszystkie zawierały introny grupy II, w tym nad1 i2, i3, i4; nad4 i1; nad5, i3, i,4; nad7 i2, rpl i1 oraz rps i1 [Sultan, 2016]. Przewidywano, że matR będzie łączyć się w warunkach *in vivo* z tymi intronami, których składanie jest ułatwione przez to białko. Założenie to wymagało jednak potwierdzenia eksperymentalnego.

W celu potwierdzenia funkcji genu matR zastosowaliśmy więc katalityczne kwasy nukleinowe oraz antysensowe oligonukleotydy połączone ze strukturą podobną do tRNA. Zastosowanie rybozymów matRz1 oraz matRz2 skutkowało obniżeniem ekspresji genu matR o 70%, na poziomie transkryptu i odpowiednio 50% i 20% na poziomie białka. Również w przypadku zastosowania antysensowych oligonukleotydów obserwowany był znaczny, wynoszący blisko 80%, spadek ekspresji transkryptu matR.

Zahamowanie ekspresji maturazy prowadziło do obniżenia efektywności składania mitochondrialnych RNA we wszystkich trzech badanych transformantach. W szczególności zmiany te dotknęły pre-RNA nad1 i3 oraz i4, jak również nad5 i4; nad7 i2; rpl2 i1 czy rps3 i1. Redukcja pre-RNA nad1 i3 może być związana z faktem, iż część 3' tego intronu ulega transkrypcji wraz z nad1 i4, a co za tym idzie sekwencją kodującą matR, co z kolei może prowadzić do niestabilności RNA nad1 i3. Wyniki uzyskane z wykorzystaniem technologii kwasów nukleinowych potwierdziły zaangażowanie genu matR w składanie intronów wyselekcjonowanych w analizach RIP-chip. Jednakże proces składania w transformowanych roślinach nie ulegał zmianie dla wszystkich pre-RNA, zidentyfikowanych w analizach RIP-chip. Takich zmian nie zaobserwowano między innymi dla nad1i1 czy nad4 i1. Obserwowane

różnice w analizach RT-qPCR i RIP-chip mogą wynikać z tylko częściowego obniżenia ekspresji genu *matR*.

Uzyskane wyniki wskazują tylko na częściowe zahamowanie efektywności składania w transgenicznym roślina. Obecność dojrzałych transkryptów takich genów jak *nad1*, *nad4*, *nad5*, *nad7*, *cox2*, *ccmFc*, *rpl* oraz *rps* może wskazywać, że w dojrzewanie niektórych z tych transkryptów mogą być zaangażowane również inne czynniki transkrypcyjne kodowane w jądrze [Brown, 2014; Schmitz-Linneweber, 2015]. Dane literaturowe wskazują, że *nMAT4* oraz *mCSF1* biorą udział w dojrzewaniu *nad1* i3, podczas gdy w składanie *nad1* i4 wymaga co najmniej *nMAT4* oraz *matR* [Zmudjak, 2013; Brown, 2014; Cohen; 2014]. Przymuszczenie za uzyskany fenotyp RNA może również odpowiadać tylko częściowe obniżenie ekspresji *matR* w badanych liniach. Całkowita utrata maturazy mitochondrialnej mogłaby doprowadzić do znacznie głębszych defektów w dojrzewaniu RNA a w konsekwencji zaburzeń rozwojowych prowadzących do śmierci roślin [Kühn, 2015; Fromm, 2016]. W przypadku niektórych mt-mRNA obniżenie poziomu ekspresji *matR* nie wpłynęło na poziom ich ekspresji, co więcej w kilku przypadkach zaobserwowano wzrost poziomu ekspresji tych genów. Taki wzrost zaobserwowano dla egzonów 3-4 *nad2* oraz egzonów 1-2 *nad5* w liniach *matRz1* i *matRz2*. Zmiana ta może sugerować, że dochodzi do akumulacji prekursorowych transkryptów, których dojrzewanie jest regulowane przez inne czynniki transkrypcyjne jednak nie mogą zostać połączone z innymi egzonami, za których dojrzewanie odpowiada *matR*. Podobne rezultaty uzyskano w badaniach z wykorzystaniem roślin, w których zahamowano ekspresję czynników transkrypcyjnych *nMAT1* (Keren, 2012) oraz *nMAT4* (Cohen, 2014), które również zaangażowane są w dojrzewanie *nad1*.

W liniach *matRz1* i *matRz2* obserwowano niewielkie wzrosty w ekspresji podjednostek syntazy ATP *atp6* (w obu liniach) oraz *atp8* (tylko linia *matRz1*). Zmiany te, wywołane zaburzeniem w genach zaangażowanych w kompleks oddechowy I mogą być wywołane efektem kompensacji z powodu zmienionych funkcji mitochondriów obejmujących zmniejszone oddychanie oraz zmieniony metabolizm komórkowy [Keren, 2012].

4.4.1.2. Gen *mttB*

W niniejszej pracy podjęto również próbę poznania funkcji genu *mttB*. Gen ten koduje białko o homologii do *TatC*, które jest składnikiem systemu *Tat* (ang. *twin-arginine translocas*) [Ding, 2019]. System ten jest obecny w prokariotach i organellach roślin wyższych i bierze udział w transporcie złożonych białek przez błony [Palmer, 2020]. Kierowanie substratów do układu *Tat* odbywa się za pośrednictwem N-końcowej sekwencji

sygnałowej, która zawiera wysoce konserwatywny motyw bliźniaczej argininy. Mechanizm transportu z wykorzystaniem systemu Tat jest procesem dynamicznym i odbywa się poprzez interakcję substratu z kompleksem receptora Tat [Palmer, 2020].

Pierwsze doniesienia na temat genu *mttB* pojawiły się pod koniec lat 90 XX wieku [Settles, 1997; Bogsch, 1998]. Wówczas to wykazano, że białko to może być zaangażowane w proces importu lub eksportu białek z macierzy mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej [Bogsch, 1998]. Ostatnie prace wykazały, że zmiany w sekwencji aminokwasowej białka *mttB* powodują zaburzenia funkcji mitochondriów [Ding, 2019]. Zaprojektowane w niniejszej pracy rybozomy skierowane w sekwencje kodującą gen *mttB* spowodowały obniżenie ekspresji genu docelowego. W ramach niniejszej pracy nie udało się jednak zbadać funkcji genu *mttB*. W tym celu prowadzone są jednak dalsze badania, które mogą przyczynić się do poznania jego funkcji, a także doprowadzić do pozyskania nowej wiedzy na temat transportu białek do i w obrębie mitochondriów.

4.5. Zastosowanie konstruktów do modyfikacji ludzkiego genomu mitochondrialnego

4.5.1. Mutacje w genomie mitochondrialnym oraz ich związek z występowaniem chorób

Dotychczas istniało przekonanie, że mutacje w obrębie mtDNA są bardzo rzadkie. Jednakże badania epidemiologiczne prowadzone m. in. w Wielkiej Brytanii wykazały, że 1 na 5000 osób cierpi na chorobę mitochondrialną lub jest zagrożona taką chorobą. Częstość występowania chorób mitochondrialnych wśród osób dorosłych szacuje się na 9,6:100000, w tym 1,5:100000 spowodowanych pojedynczymi, rozległymi delacjami w mitochondrialnym DNA. Dalsze analizy wykazały, że 1 na 200 osób jest nosicielem patogennego wariantu mtDNA, a u 1 na 1000 mutacja w mtDNA pojawiła się *de novo* [Elliot, 2008]. Uzyskane przez badaczy wyniki wskazują, że mutacje w mitochondrialnym DNA należą do jednych z najczęściej występujących zaburzeń genetycznych. Przypuszcza się, że mutacje w obrębie mtDNA, u osób dorosłych, odpowiadają za około 80% przypadków chorób mitochondrialnych i zaledwie 20% u dzieci. Choroby mitochondrialne wieku dziecięcego dziedziczone są w sposób autosomalny. Pomimo wielu lat prowadzenia badań nad chorobami mitochondrialnymi nie udało się opracować skutecznej metody ich leczenia, a stosowane obecnie terapie oparte są o łagodzenie objawów i poprawę komfortu życia pacjentów.

Rozwój terapii chorób mitochondrialny stoi przed poważnymi wyzwaniami. Kluczową kwestią jest trudność w nieinwazyjnej ocenie funkcji mitochondriów i ich uszkodzeń u pacjentów [Steele, 2017]. Obecnie nie ma pewności, kiedy leczyć pacjenta terapią mitochondrialną oraz czy domniemana terapia działa w mitochondriach. W związku z tym

istnieje pilna potrzeba opracowania specyficznych, skutecznych i małoinwazyjnych terapii chorób mitochondrialnych. Wiąże się to z koniecznością prowadzenia bardziej podstawowych badań w koordynacji z badaniami translacyjnymi i klinicznymi, aby opracować nowe strategie przywracania funkcji mitochondriów [Steele, 2017; Murphy, 2018]. Takie podejście pozwoli na identyfikację nowych obciążeń genetycznych oraz innych czynników mogących mieć wpływ na funkcjonowanie tych organelli. Postęp w dziedzinie medycyny mitochondrialnej może przyczynić się do opracowania podejść terapeutycznych zarówno do rzadkich jak i powszechnych chorób charakteryzujących się dysfunkcją mitochondriów, jednocześnie poprawiając ogólny stan zdrowia i długowieczność ludzi [Murphy, 2018]. Dotychczas opisano około 150 mutacji punktowych występujących w mtDNA i związanych z chorobami mitochondrialnymi. Mutacje te zlokalizowane są głównie w podjednostkach 1, 2, 5 i 6 dehydrogenazy NADH, podjednostkach 1 – 3 oksydazy cytochromu c, genach ATPazy 6 i cytochromu b oraz w genach kodujących mitochondrialne tRNA. W większości przypadków są to mutacje zmiany sensu. Jedynie w przypadku genów *cox1*, *cox3* i *nd4* mamy do czynienia z mutacjami typu nonsens, a jeden przypadek powoduje przesunięcie ramki odczytu i dotyczy genu *cytB*. Opracowanie skutecznej metody importu do mitochondriów mogłoby przyczynić się do powstania terapii genowych, opartych o supresorowe RNA. Głównym problemem tego podejścia jest skonstruowanie takich tRNA, które z powodzeniem mogłyby być importowane do mitochondriów komórek ludzkich.

4.5.2. Dotychczasowe metody modyfikacji genomu mitochondrialnego

Edycja genomu to procedura pozwalająca na dokonywanie modyfikacji miejscowych w genach dowolnego organizmu [Chen, 2014]. Manipulacja genomem ma dwa główne cele: pierwszym jest poznanie, jak funkcjonują nowe geny i jakie funkcje pełnią w regulacji komórkowej. Drugim głównym zastosowaniem manipulacji genomu jest tworzenie alternatywnych terapii leczenia zaburzeń genetycznych [Tschaharganeh, 2016]. Ewolucja inżynierii genomu przy użyciu nukleaz przyniosła zmianę paradygmatu w dziedzinie biotechnologii. Narzędzia te przyniosły obiecujące wyniki w wielu dziedzinach w tym w naukach medycznych i rolniczych [Li, 2020].

Genom jądrowy komórek wielu gatunków roślin i zwierząt może być modyfikowany z wykorzystaniem szeregu nowszych i starszych metod, do których możemy zaliczyć nukleazy palca cynkowego (ang. zinc-finger nucleases, ZFN), metody TALEN lub system CRISPR/Cas9 [Bhardwaj, 2021]. Metody oparte o ZFN były dotychczas z powodzeniem stosowane w organizmach zwierząt morskich, takich jak danio pręgowany oraz wielu

zwierząt hodowlanych [Mooney, 2019]. TALEN oraz CRISPR/Cas9 powszechnie stosowane są w różnych liniach komórkowych oraz w badaniach nad wieloma chorobami zakaźnymi i niezakaźnymi [Nain, 2010; Puria, 2012; Fernandez, 2018]. Techniki edycji genów zostały także wykorzystane do leczenia wielu nieprawidłowości genetycznych w ludzkich liniach komórkowych i modelach raka [Li, 2020; Doudna, 2014; Wu, 2018]. Pozytywne wyniki prowadzonych badań sugerują, że strategie edycji genomu mają ogromny potencjał w leczeniu chorób genetycznych, takich jak dystrofia mięśniowa Duchenne'a, mukowiscydoza, anemia sierpowata czy zespół Downa [Wu, 2018]. Podejścia typu CRISPR okazały się również być obiecujące w wykrywaniu i leczeniu śmiertelnych chorób, takich jak AIDS i rak [Cyranoski, 2016].

Szerokie zastosowanie w terapiach genowych znalazły również technologie oparte o katalityczne kwasy nukleinowe. Pierwszy stosowany w badaniach klinicznych rybozym wykorzystany został w terapiach leczenia raka nerki. Sekwencja RNazymu została tak dobrana, aby hydrolizował on sekwencję mRNA w obrębie receptora 1 czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (ang. *vascular endothelial growth factor receptor-1*, VEGFR-1). Tak skierowana cząsteczka prowadziła do przerwania angiogenezy i blokowała progresję nowotworu [Kobayashi, 2005]. Ponadto, ze względu na zdolność do hydrolizy cząsteczek RNA, rybozym jest również obiecującym narzędziem leczenia chorób wywoływanych przez wirusy, których informacja genetyczna jest przenoszona na RNA, a nie na DNA, takich jak HIV [Wyszomirska, 2009]. Również tak zaprojektowane cząsteczki RNazymów dotarły do fazy badań klinicznych. Rybozym o komercyjnej nazwie Heptazym został opracowany przez firmę Merc-Sirna do walki z wirusem HCV. Badania kliniczne fazy pierwszej wykazały dobrą tolerancję w szerokim zakresie dawek, a skuteczność wstrzykniętego samodzielnie lub w połączeniu z interferonem typu 1 Heptazymu jest obecnie oceniana w badaniach klinicznych fazy II [Tong, 2002; Sandberg, 2002; Zhou, 2019].

Sukcesy związane z wykorzystaniem powyższych strategii w edycji genomu jądrowego skłoniły badaczy do prób adaptacji tych metod do modyfikacji genomu mitochondrialnego. W przypadku ZFN selektywną degradację zmutowanych cząsteczek mtDNA osiągnięto poprzez ukierunkowanie enzymów restrykcyjnych na mitochondria. Metoda ta ma jednak swoje ograniczenia, do których możemy zaliczyć niewielką liczbę sekwencji obecnych w zmutowanych cząsteczkach mitochondrialnego DNA, które nie są obecne w mtDNA typu dzikiego. Ponadto metodę tą ogranicza dostępność restrykcyjnych endonukleaz rozpoznających sekwencję w genomie mitochondrialnym [Taylor, 2000; DiMauro, 2006]. Aby obejść te ograniczenia zaprojektowano ZFN ukierunkowane na

specyficzną degradację mtDNA [Minczuk, 2013]. Wstępne badania wykonano przy użyciu konwencjonalnej konfiguracji heterodimerskich ZFN gdzie jeden monomer wiąże się ze zmutowaną sekwencją mtDNA, podczas gdy jego partner wiąże się z sąsiednią sekwencją typu dzikiego (ang. *wild type*, WT) umożliwiając dimeryzację między dwiema domenami FokI. Taka konfiguracja prowadzi do przecięcia dsDNA między miejscami wiązania ZFP.

Opisane powyżej podejście ma jednak szereg potencjalnych ograniczeń w celowaniu wyłącznie w zmutowane sekwencje mtDNA. Po pierwsze, jeden z monomerów musi wiązać się bardzo selektywnie z sekwencją różniącą się od sekwencji typu dzikiego pojedynczą parą zasad [Minczuk, 2013]. Po drugie heterodimerski ZFN ukierunkowany na mutację w mtDNA może prowadzić do powstania monomeru, który wiąże sekwencję WT, tworząc aktywną nukleazę, która hydrolizuje mtDNA typu dzikiego. Taka sytuacja ma miejsce w momencie, gdy specyficzność zaprojektowanych ZFN była niewystarczająca, aby zapobiec tworzeniu homodimeru [Minczuk, 2013]. Wcześniejsze prace z wykorzystaniem ZFN wykazały również, że ekspresja komórkowa nieoptymalizowanych ZFN może wywoływać znaczną cytotoksyczność wprowadzonego narzędzia spowodowaną hydrolizą mtDNA w miejscach innych niż docelowe [Miller, 2007; Cornu, 2008].

Białka TALEN zostały po raz pierwszy opisane w 2009 roku i pochodzą z fitopatogennych bakterii z rodzaju *Xanthomonas* [Boch, 2009]. Jest to specjalna klasa białek, które mogą wiązać DNA. Metoda TALEN oferuje elastyczne zastosowanie w inżynierii genetycznej dzięki kompatybilności z wieloma domenami funkcjonalnymi. Różne asocjacje białek TALEN z aktywatorami, represorami lub endonukleazami prowadzą do potencjalnych zmian ich właściwości z modulatorów transkrypcji do narzędzi do modyfikacji genomu [Thakore, 2016]. Ze względu na wysoką specyficzność oraz precyzję w inżynierii genomu system TALEN został w 2011 roku wybrany narzędziem roku przez czasopismo *Nature Methods*. Metoda ta została z powodzeniem wykorzystana do modyfikacji komórek zawierających mutację w mitochondrialnym tRNA^{Ala} (5024C>T) [Bacman, 2018] oraz dużą delecję m.8483_13459del14977 [Bacman, 2013]. Delecja ta występuje w mitochondriach niemal 30% pacjentów z delecjami mitochondrialnymi jak również w normalnych starzejących się komórkach [Doudna, 2014].

Do wyeliminowania mtDNA zawierającego opisaną powyżej delecję zaprojektowano TALEN, który otrzymał nazwę $\Delta 5$ -mitoTALEN. Częsteczką tą została zaprojektowana w taki sposób, aby poszczególne monomery rozpoznawały sekwencje w obrębie mtDNA typu dzikiego. Jednak tylko w przypadku obecności delecji monomery znajdowały się wystarczająco blisko siebie, aby dochodziło do dimeryzacji i aktywacji nukleazy FokI.

Opracowane sekwencje zostały tak dobrane aby nie rozpoznawały regionów w obrębie genomowego DNA [Bacman, 2013]. $\Delta 5$ -mitoTALEN został przetestowany w linii ludzkiego kostniakomięsa BH10.9. Komórki transferowano dwoma niezależnymi plazmidami, z których każdy kodował jeden monomer mitoTALEN [Bacman, 2013]. Uzyskane wyniki potwierdziły skuteczność $\Delta 5$ -mitoTALEN w redukcji ilości zmutowanych cząsteczek mtDNA i zmianie poziomu heteroplazmi w kierunku przewagi mtDNA typu dzikiego [Bacman, 2013].

W przypadku drugiego podejścia z wykorzystaniem metody TALEN badania prowadzono na myszach, w których wprowadzono mutację 5024C>T w obrębie mitochondrialnego genu kodującego tRNA^{Ala} [Bacman, 2018]. W tym przypadku TALEN zostały tak zaprojektowane, aby jeden z monomerów preferencyjnie rozpoznawał sekwencję mutantu. Sekwencja DNA każdego monomeru została wklonowana do wektora za sygnałem lokalizacji mitochondrialnej oraz znacznikiem epitopowym [Bacman, 2018]. Aby potwierdzić skuteczność mitoTALEN mysie fibroblasty embrionalne (ang. *mouse embryonic fibroblasts*, MEF) pochodzące od myszy hetero plazmatycznych niosących mutację 5024C>T transfekowano obydwoma plazmidami kodującymi monomery mitoTALEN. Uzyskane wyniki wskazywały na zmiany w poziomie heteroplazmi oraz spadek ilości zmutowanych cząsteczek mtDNA [Bacman, 2018]. W celu wprowadzenia opracowanych cząsteczek do myszy wykorzystano wektor adenowirusowy AAV9. Cząsteczki wirusa niosące poszczególne monomery TALEN zostały wstrzyknięte do mięśni piszczelowych myszy z mutacją 5024C>T [Bacman, 2018]. Wykorzystując metodę analizy polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (ang. *restriction-fragment length polymorphism*, RFLP) wykazano silny spadek stosunku mtDNA zmutowanego do WT [Bacman, 2018]. Zmiany poziomu heteroplazmi były obserwowane u wszystkich analizowanych myszy już po pojedynczym wstrzyknięciu domięśniowym i utrzymywały się nawet do 24 tygodni od iniekcji [Bacman, 2018].

Pomimo pierwszych sukcesów w wykorzystaniu metod TALEN pozostaje wciąż wiele problemów w zastosowaniu tej metody w badaniach klinicznych. Dużym ograniczeniem w zastosowaniu metody TALEN jest to, że wymaga ona znacznych modyfikacji białek, które umożliwią prawidłowe rozpoznanie określonych sekwencji DNA. Ponadto sporym wyzwaniem pozostaje dostarczenie dużych ilości prawidłowo skonstruowanych mitoTALEN do mitochondriów [Moraes, 2014]. Prawidłowo zaprojektowany wektor niosący wszystkie niezbędne elementy TALEN może mieć wielkość nawet ponad 5000 par zasad. Wielkość ta

przekracza granicę, którą wektory adenowirusowe stosowane, jako główne nośniki, są zdolne wprowadzić do infekowanej komórki [Hashimoto, 2015].

Pomimo tego, że CRISPR/Cas9 znany jest z szerokiego zastosowania w dziedzinie edycji jądrowego DNA, badaczom trudno jest zaadaptować tę technologię do modyfikacji mtDNA. Głównym problemem tej technologii jest import składników białkowych i gRNA do mitochondriów z wydajnością wystarczającą do selektywnej eliminacji mutacji. W ostatnich latach poczyniono umiarkowane postępy w tym względzie. Wykazano, że odpowiednio zmodyfikowane gRNA oraz białko Cas9 zawierające mitochondrialną sekwencję kierującą mogą być importowane do mitochondriów [Loutre, 2018]. Stosowanie CRISPR/Cas9 w mitochondriach może być nieco bardziej złożone w porównaniu z tradycyjną technologią ukierunkowaną na jądrowe DNA, niemniej jednak wykazano eksperymentalnie możliwość działania tego systemu w ludzkich mitochondriach [Loutre, 2018]. Ostatnie badania wykazały również, że egzogenna sekwencja DNA wprowadzona do mtDNA danio pręgowanego, przy użyciu technologii CRISPR, została skutecznie przekazana z pokolenia F0 do F1 [Bian, 2019]. Dane te pozwalają mieć nadzieję, że wydajna wersja systemu CRISPR/Cas9 skierowanego do mitochondriów może być opracowana w przyszłości, a technologia ta może zapoczątkować rewolucję w inżynierii genomu mitochondrialnego i pozwoli na lepsze zrozumienie procesów zachodzących w tych organellach [Hashimoto, 2015]. Jednakże obecność układu endogennego, warunkującego edycję mitochondrialnego genu CRISPR/Cas9 w mitochondriach ssaków, wciąż pozostaje niejasna [Gammage, 2018].

Pomimo szerokiego zakresu zastosowań CRISPR/Cas9 nie są uważane za wystarczająco bezpiecznie i precyzyjne, aby mogły być stosowane w terapiach ukierunkowanych, a w szczególności w terapii genowej [Bhardwaj, 2021]. Chociaż efekty niespecyficznego działania („off-target”) występują we wszystkich systemach edycji genomu, duża częstość ich występowania w technologii CRISPR ($\geq 50\%$) stanowi jej poważną wadę [Fernandez, 2018]. Wiele grup badawczych próbowało ograniczyć te niepożądane efekty tworząc nowe warianty Cas9 i ulepszając cząsteczki gRNA, ale metody nie okazały się zbyt wydajne [23]. Kolejną wadą tej technologii jest konieczność posiadania sekwencji PAM (ang. *protospacer-associated motif*) w pobliżu lokalizacji docelowej, jak również to, że białko Cas9, ze względu na swoje duże rozmiary, jest trudne do upakowania w wektorach AAV będących najpopularniejszym nośnikiem stosowanym w terapiach genowych [Park, 2017]. Dodatkowym ograniczeniem jest częste występowanie toksyczności komórkowej oraz pojawianie się pęknięć dwuniciowych DNA (ang. *double-strand break*, DSB) indukowanym przez CRISPR, które mogą prowadzić do apoptozy komórek [Robb, 2019]. Wszystkie

tradycyjne systemy edycji genomów mają wady techniczne i funkcjonalne, co budzi spore obawy dotyczące ich praktycznego zastosowania w terapiach genowych. Dlatego też stale poszukuje się mniej inwazyjnych i bezpieczniejszych metod edycji genomów, które oparte będą o naturalnie występujące w komórkach mechanizmy.

Spore nadzieje na opracowanie skutecznych terapii chorób mitochondrialnych wiąże się z mechanizmem importu RNA do mitochondriów komórek ludzkich [Kamenski, 2019]. Obecnie większość informacji na temat mechanizmów importu tRNA do mitochondriów pochodzi z badań na modelach drożdży i ludzi [Entelis, 2001]. Analizy importu tRNA do mitochondriów w warunkach *in vivo* wykazały, że specyficzność tego szlaku może być gruntownie modyfikowana, a cząsteczki normalnie nieimportowane mogą być kierowane do tych organelli [Entelis, 2001]. Taka elastyczność pozwoliła na zaproponowanie wykorzystania szlaku importu tRNA do modyfikacji ludzkiego mtDNA. Koncepcja ta wspierana jest przez badania, które wskazują na możliwość importu tRNA do izolowanych ludzkich mitochondriów, które w normalnych warunkach nie importują tych cząsteczek [Entelis, 2001; Alfonzo, 2009]. Ważnym krokiem w kierunku stworzenia modeli terapii genowej opartej na imporcie RNA byłoby wykazanie, że tRNA o różnych wariantach aminoacylacji zawierających dodatkową sekwencję mogą być skutecznie importowane do mitochondriów transgenicznych komórek ludzkich.

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy w roślinnym modelu pozwoliły także przypuszczać, że system importu do mitochondriów z wykorzystaniem struktur podobnych do tRNA będzie można zaadaptować do mitochondriów komórek ludzkich. Podejście takie mogłoby w przyszłości doprowadzić do opracowania skutecznej metody leczenia chorób mitochondrialnych lub ograniczenia negatywnych skutków pojawiania się w organizmie pacjenta mutacji w mtDNA. Pierwszym etapem opracowania systemu importu tRNA w komórkach ludzkich było więc także potwierdzenie importu struktur podobnych do tRNA do izolowanych mitochondriów. Uzyskane wyniki w pełni pokazały, że zaprojektowany konstrukt jest transportowany do wnętrza mitochondriów. Po raz pierwszy taki import RNA do mitochondriów zostało wykryty w komórkach niektórych pierwotniaków, a następnie opisano podobny mechanizm w komórkach drożdży [Martin, 1979]. Badania nad mitochondrialną frakcją tRNA, z wykorzystaniem metody elektroforezy 2D, wykazały obecność w niej tRNA^{Lys} pochodzenia jądrowego. Cząsteczka ta została nazwana tRK1. Przez wiele lat obserwacja ta była ignorowana przez badaczy zajmujących się badaniem mitochondriów. Wynika to z faktu, iż wielu z nich nie wierzyło w możliwość przenikania ujemnie naładowanej cząsteczki tRNA przez ujemnie naładowaną błonę mitochondrialną.

Jednakże późniejsze odkrycia wykazały istnienie mechanizmu importu tRNA w wielu innych organizmach [Verechshagina, 2018; Jeandrad, 2019].

Drożdże piekarskie zostały pierwszym organizmem modelowym, na którym prowadzono badania nad mechanizmem importu tRNA do mitochondriów [Tarassov, 1992]. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność tRK1 zarówno we frakcji cytozolowej jak i mitochondrialnej, podczas gdy pozostałe tRNA były obecne tylko we frakcji cytozolowej. Dalsze prace wykazały, że proces ten jest zależny od ATP i wymaga obecności białek cytozolowych [Tarassov, 1992], a w kolejnych wykazano zależność importu tRK1 od potencjału elektrochemicznego błony mitochondrialnej $\Delta\Psi$ [Tarassov, 1995]. Późniejsze badania wykazały ponadto, że wnikanie cząsteczek tRNA do mitochondriów może odbywać się również przez zależny od napięcia kanał anionowy (ang. *voltage-dependent anion channel*, VDAC). Mechanizm angażujący białko Tim40 oraz VDAC do importu tRNA do mitochondriów został opisany również dla roślin wyższych [Salinas, 2006].

Równie ważnym aspektem importu tRNA do mitochondriów są wymagania strukturalne cząsteczki RNA. Zdolność tRNA do fałdowania się do właściwej struktury trzeciorzędowej jest zatem warunkiem wstępnym dla jego importu. Wykazano, że warunkiem transportu RNA do mitochondrium jest tworzenie struktury typu tRNA oraz uzyskanie poprzez cząsteczkę alternatywnego parowania zasad między częścią rdzenia AA na końcu 3' a pętlą T [Entelis, 1998, Kolesnikova, 2010].

Biorąc pod uwagę, podobieństwo maszyn transportowych pomiędzy drożdżami i ssakami podjęto próby skierowania drożdżowych tRNA do ludzkich mitochondriów mając nadzieję, że będą one mogły brać udział w translacji wewnątrz organelli. Metoda ta mogłaby być wykorzystana do minimalizowania negatywnych skutków mutacji patogennych. Uzyskane w ten sposób wyniki potwierdziły, że drożdżowy tRK1 oraz jego warianty są importowane do izolowanych mitochondriów komórek ludzkich [Kolesnikova, 2000]. Wykazano również, że wszystkie wymagania importu tRNA do mitochondriów komórek ludzkich są podobne do tych opisanych dla mitochondriów drożdżowych [Entelis, 2001]. Ponadto potwierdzono zaangażowanie ludzkich ontologów preMsk1p oraz Eno2p w imporcie tRNA w warunkach *in vitro* [Gowher, 2013; Baleva, 2015]. Co więcej wspomniane wyżej małe syntetyczne RNA ze stabilnymi strukturami F ora D były również importowane do izolowanych mitochondriów ludzkich z wydajnością nawet kilkukrotnie wyższą niż w przypadku pełnowymiarowego tRK1 [Kolesnikova, 2010]. Obserwacja ta wskazuje na istnienie mechanizmu importu tRNA w komórkach ludzkich.

Pozytywne wyniki zaobserwowane w warunkach *in vitro* skłoniły badaczy do przetestowania pochodnych tRK1 pod kątem ich zdolności do przenikania przez błony mitochondrialne w liniach komórek ludzkich. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność drożdżowych tRNA we frakcji mitochondrialnej [Kolesnikova, 2004]. Wydaje się zatem, że możliwe jest wykorzystanie szlaku importu tRNA do ograniczania negatywnych skutków patogennych mutacji w mtDNA.

4.5.3. Wykorzystanie systemu transportu RNA w podejściach terapeutycznych

Pomimo posiadania przez mitochondria komórek ssaków pełnego zestawu tRNA badania wykazały obecność cytozolowego tRNA^{Gly} we frakcji mitochondrialnej [Schneider, 2011]. Ponadto wykazano również, że modyfikowane tRNA^{Lys} może wnikać do mitochondriów komórek ludzkich. Co więcej badania *in organello* pokazały, że tak zmodyfikowany tRNA bierze udział w procesie translacji wewnątrz mitochondriów [Entelis, 2001]. Może to sugerować istnienie mechanizmu pozwalającego na import tRNA z cytozolu do mitochondriów. Mechanizm ten nie został jednak jeszcze dobrze poznany. W ostatnich latach pojawiła się również praca, w której wykazano import dwóch tRNA^{Gln}. Autorzy sugerują, że te tRNA są importowane w celu złagodzenia braku szlaku transamidacji w mitochondriach ludzkich, który jest niezbędny do wytworzenia tych tRNA [Rubio, 2008].

Pierwsze badania nad wykorzystaniem importu tRNA do leczenia chorób mitochondrialnych dotyczyło mutacji 8344A>G w genie kodującym tRNA^{Lys}. Mutacja ta odpowiada za zespół MERRF. Importowalne pochodne drożdżowych tRK1 i tRK2 po wprowadzeniu do hodowanych komórek ludzkich z mutacją MERRF, częściowo przywróciły normalny fenotyp badanych komórek [Kolesnikova, 2004]. W późniejszych etapach prac skonstruowano inną pochodną drożdżowego tRK1, która zachowała wszystkie determinanty jej importu do mitochondriów ale zmieniono sekwencję odpowiedzialną za aminoacylację tak by zaprojektowana cząsteczka odpowiadała tRNA^{Leu} [Karicheva, 2011]. Zmiana ta pozwoliła na ograniczenie negatywnych skutków mutacji 3243A>G odpowiedzialnej za zespół MELAS.

4.6. Podsumowanie badań własnych oraz perspektywy

W niniejszej pracy wykorzystano dwie struktury podobne do tRNA pochodzące z wirusa mozaiki tytoniu (TMV) oraz wirusa mozaiki stokłosa (BMV) o charakterystyce odpowiadającej tRNA^{His} i tRNA^{Tyr}. Obie wybrane sekwencje odznaczały się 100% homologią sekwencji w stosunku do odpowiadających im tRNA. Uzyskane wyniki potwierdziły, że wybrane struktury podobne do tRNA z powodzeniem wnikają do macierzy mitochondrialnej.

Obserwacja ta pozwala przypuszczać, że przyłączona do nośnika sekwencja pasażerska zostanie przetransportowana do wnętrza mitochondriów by tam pełnić swoją funkcję.

Jako sekwencje pasażerskie do struktur podobnych do tRNA wprowadzono rybozomy typu głowa młotka rozpoznające sekwencje docelowe w obrębie mt-atp6. Katalityczne RNA zostały zaprojektowane zgodnie z założeniami opisanymi powyżej i hydrolizowały w obrębie trójnukleotydów AUC lub GUC. Zaprojektowane katalityczne RNA zostały połączone poprzez sekwencję łącznikową ze strukturami podobnymi do tRNA. Podobnie jak w przypadku modeli roślinnych na końcu 3' została przyłączona sekwencja dla rybozomu HDV.

W niniejszych badaniach, jako gen docelowy wybrano mt-atp6, kodujący podjednostkę 6 syntazy ATP. Mutacje w obrębie tego genu wpływają również na podjednostkę 8 syntazy ATP ze względu na to, że sekwencje kodujące obie podjednostki zachodzą na siebie 46 nukleotydami tak, że koniec genu atp8 stanowi początek genu atp6. Dysfunkcje genu atp6 powiązane są z licznymi zaburzeniami neurodegeneracyjnymi oraz sercowo naczyniowymi takimi jak zespół MELAS, zespół LHON, zespół Leigh'a i zespół NARP.

Katalityczne kwasy nukleinowe mogą być dostarczane do komórek docelowych w postaci cząsteczek RNA lub być transkrybowane z konstruktów genowych. Ze względu na słabą stabilność rybozymów, terapie oparte o bezpośrednie dostarczanie RNA często wymagają chemicznie stabilizowanych nukleotydów. Do najczęstszych tego typu modyfikacji należy wiązanie szkieletowe 5'PS, 2'OMe, 2'-deoksy-2'-C urydyna oraz terminalnie odwrócone 3'-3' deoksyzasadowe nukleotydy [Zhou, 2019]. Aby uniknąć konieczności wprowadzania do naszego narzędzia modyfikacji w obrębie sekwencji kodującej rybozym w niniejszych badaniach wykorzystano system wprowadzania oparty o konstrukt genowy.

Opracowane konstrukty zostały wprowadzone do komórek ludzkich z wykorzystaniem systemu Flp-In T-Rex. System ten pozwala na przygotowanie linii komórkowej o stabilnej i indukowalnej ekspresji interesującej nas sekwencji. Uzyskane w ten sposób linie komórkowe HepG2-Flp-In oraz Flp-In-293 charakteryzowały się wysoką ekspresją wprowadzonego konstruktów. System ten znajduje się pod kontrolą promotora zależnego od tetracykliny. Takie rozwiązanie pozwala w pełni kontrolować transkrypcję wprowadzonego narzędzia.

W stosowanym w niniejszej pracy systemie czynnikiem odpowiedzialnym za indukcję ekspresji wprowadzonego wektora jest tetracyklina. Jest to antybiotyk wytwarzany przez niektóre szczepy bakterii *Streptomyces*, o szerokim spektrum działania. Tetracyklina hamuje syntezę białek uniemożliwiając przyłączenie się aminoacylo-tRNA do łańcucha peptydowego poprzez wiązanie do podjednostek 30S i 50S rybosomów drobnoustrojów. Komórki ssaków są mniej podatne na działanie tetracykliny, pomimo faktu, że wiąże się ona z małą

podjednostką rybosomalną zarówno prokariotów jak i eukariotów (odpowiednio 30S i 40S) [Nguyen, 2014]. Istnieje jednak niewielkie prawdopodobieństwo pojawienia się niekorzystnych efektów w komórek ludzkich. Dlatego też zbadano wpływ tetracykliny na przeżywalność badanych linii komórkowych. Uzyskane wyniki potwierdzają, że opracowane przez nas narzędzia nie prowadzą do śmierci komórek, co daje obiecujące perspektywy na wykorzystanie ich w potencjalnych terapiach chorób mitochondrialnych.

Testy MTT pozwalają na określenie liczby aktywnych metabolicznie komórek w całej populacji. Nie dają jednak odpowiedzi na pytanie, w jakiej kondycji znajdują się mitochondria. W związku z tym, aby sprawdzić stan mitochondriów pod wpływem wprowadzonego narzędzia przeanalizowano również poziom zmiany potencjału błony mitochondrialnej po indukcji ekspresji wprowadzonego do komórek narzędzia. W tym celu wykorzystano oparty na barwnikach fluorescencyjnych test JC-1. Wyniki uzyskane w tej analizie wskazują, że ani czynnik indukcyjny ani wprowadzone narzędzie nie wpływają negatywnie na potencjał błony mitochondrialnej, a co za tym idzie nie prowadzą do zaburzeń w funkcjonowaniu tych organelli.

Zarówno wyniki uzyskane w analizie MTT jak i JC-1 wykazały brak negatywnych skutków wprowadzenia konstruktów do linii komórkowych. W związku z tym, w kolejnym etapie, przeanalizowano poziom ekspresji wprowadzonego wektora oraz docelowego genu. W przypadku wszystkich konstruktów obserwowano wzrost ekspresji wprowadzonego wektora, jak również wysoki poziom obniżenia ekspresji genu docelowego, co potwierdza skuteczność zaprojektowanych cząsteczek i daje nadzieję na przyszłe wykorzystanie ich w terapiach chorób mitochondrialnych.

W leczeniu chorób mitochondrialnych kluczowe znaczenie ma również fakt, jak długo w organizmie pacjenta będą utrzymywały się wprowadzone zmiany. W związku z tym w kolejnym etapie zbadano jak długo po indukcji utrzymywać się będą zmiany w poziomie ekspresji wektora i genu *mt-atp6*. Czas półtrwania tetracykliny w ludzkich liniach komórkowych wynosi 24 godziny, co oznacza, że po upływie tego czasu stężenie wyjściowe ulega obniżeniu o połowę [Nguyen, 2014]. Zgodnie z przewidywaniami najwyższy poziom ekspresji wektora i najwyższe obniżenie poziomu *mt-atp6* obserwowano po 24 godzinach od podania tetracykliny. W kolejnych dniach obserwowano spadek ilości wprowadzonego narzędzia, a także wzrost ekspresji docelowego genu. Uzyskane wyniki wskazują, że aby móc wykorzystać opracowany system dostarczania narzędzi terapeutycznych do mitochondriów należy opracować system, który pozwoli na utrzymanie stałego poziomu ekspresji wprowadzonego wektora przez cały okres terapii.

W przeciwieństwie do wielu metod regulacji ekspresji genów opartych o kwasy nukleinowe rybozomy odznaczają się najniższym stopniem występowania efektów niespecyficznych typu „off-target”. W celu potwierdzenia specyficzności zaprojektowanych rybozymów przeanalizowano poziom ekspresji wybranych genów mitochondrialnych. Analizy te wykonywano zarówno dla wszystkich badanych stężeń czynnika indukcyjnego jak również we wszystkich punktach czasowych. Do analiz wybrano gen *cox1*, *cox2*, *cox3*, *ND2* oraz *ND5*. We wszystkich analizowanych przypadkach nie obserwowano znacznych zmian w poziomie ekspresji badanych genów. Uzyskane wyniki potwierdzają specyficzność zaprojektowanych cząsteczek, a co za tym idzie możliwość zastosowania ich w potencjalnych terapiach chorób mitochondrialnych bez obawy o wywołanie niepożądanych skutków ubocznych w organizmie pacjenta.

Badania mające na celu wykorzystanie importu tRNA jako narzędzia terapii genowej są dość złożone i skomplikowane technicznie. Niemniej jednak w ciągu ostatnich 15-20 lat poczyniono w tej dziedzinie ogromne postępy. Udało się opracować kilka strategii tłumienia patogennych mutacji w ludzkim mtDNA opartych o import RNA. Metody te mają jednak wspólne wady, które zmniejszają ich potencjał terapeutyczny. Do najważniejszych z nich należy niska wydajność oraz przejściowy sposób działania omawianych podejść [Kamenski, 2019]. Trudności te zostały częściowo wyeliminowane. Wykazano, że wprowadzenie deoksyrybonukleotydów do sekwencji terapeutycznych RNA oraz chemiczne modyfikacje wydłużają żywotność tych cząsteczek [Tonin, 2014]. Opracowano również metodę beznośnikowego dostarczania RNA do mitochondriów, opartą na rozszczepialnej koniugacji RNA z cholesterolem [Dovydenko, 2016]. Podejścia te są ważne ze względu na możliwość zwiększenia skuteczności działania terapeutycznego szlaku importu RNA.

Szybki rozwój medycyny mitochondrialnej niesie ze sobą nowe nadzieje na leczenie wielu chorób, także tych, które wykraczają daleko poza klasycznie opisane choroby mitochondrialne. Znaczenie zrozumienia złożoności i elastyczności bioenergetyki mitochondrialnej, dynamiki mitochondrialnej, proteostazy i mitofagii zostało podkreślone przez spektrum korzyści zidentyfikowanych przez podejścia farmaceutyczne i nutraceutyczne celujące w stale rosnącą listę chorób typowych dla dysfunkcji mitochondriów w modelach zwierzęcych. Kluczowe pytania o to, w jaki sposób mitochondria koordynują się z jądrem poprzez metabolity sygnalizacyjne i efektorowe w celu regulacji produkcji energii, zawartości i dynamiki oraz utrzymania równowagi białek mito-jądrowych w celu zapewnienia homeostazy w warunkach naturalnych i stresowych, nadal są gorącymi tematami badań biomedycznych. Ponieważ każdy z tych procesów mitochondrialnych jest zjawiskiem

współistniejącym i współzależnym, specyficzne ukierunkowanie tych różnych procesów będzie równie trudne, jak podstawowe wysiłki badawcze mające na celu uzyskanie dalszego wglądu w zrozumienie funkcji mitochondriów. Opracowana w niniejszej pracy metoda modyfikacji mitochondrialnego DNA znakomicie wpisuje się temat tych badań. Uzyskane wyniki wskazują, że wykorzystanie struktur tRNA, jako nośników narzędzi molekularnych może przyczynić się do lepszego poznania funkcji mitochondriów, a w przyszłości doprowadzić do powstania terapii genowych opartych o ten system. Otwarta pozostaje nadal kwestia poznania dokładnego mechanizmu wnikania struktur podobnych do tRNA do mitochondriów komórek ludzkich jak również dokładne poznanie ograniczeń stosowanej metody.

5. Podsumowanie

Celem niniejszej pracy było wykorzystanie strategii bezpośredniego importu cząsteczek aktywnych do mitochondriów oraz regulacja ekspresji wybranych genów mitochondrialnych.

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów w modelu roślinnym:

1. Potwierdzono skuteczność systemu transportu opartego o strukturę tRNA do bezpośredniej modyfikacji genomu mitochondrialnego;
2. Wykazano obniżenie poziomu ekspresji genów mitochondrialnych (matR oraz mttB) na poziomie mRNA metodą PCR w czasie rzeczywistym oraz na poziomie białka (matR) metodą Western Blot, wskazując na efektywność transportu oraz specyficzność zastosowanych narzędzi;
3. Wykazano uniwersalność platformy opartej o importu struktur podobnych do tRNA do mitochondriów poprzez zastosowanie różnych sekwencji pasażerskich (rybozomy, antysensowe oligonukleotydy);
4. Potwierdzono zaangażowanie genu matR w składanie transkryptów intronów grupy II, wskazując jednocześnie, że opracowana metoda może być z powodzeniem stosowana jako uniwersalne narzędzie do badania genów mitochondrialnych, których funkcja nie została jeszcze dobrze poznana.

Badania wykonane na ludzkich liniach komórkowych pozwoliły na:

1. Wytypowanie struktur podobnych do tRNA oraz wykazanie ich zdolność do wnikania do macierzy mitochondrialnej komórek ludzkich w warunkach *in vitro*;
2. Zaprojektowanie i zbudowanie wektora ekspresyjnego zawierającego sekwencję opartego o strukturę tRNA z sekwencją pasażerską w postaci rybozomu HH;
3. Wyprowadzenie linii komórkowych o stabilnej i indukowalnej ekspresji przygotowanych konstruktyw.
4. Wykazanie braku efektów toksycznych wprowadzonych konstruktyw na badane linie komórkowe (test cytotoksyczności MTT).
5. Wykazanie braku negatywnych efektów wprowadzonych konstruktyw na integralność błony mitochondrialnej (test JC-1).

6. Potwierdzenie skuteczności zaprojektowanych rybozymów w obniżaniu poziomu ekspresji mitochondrialnego genu *atp6* na poziomie mRNA (metodą PCR w czasie rzeczywistym) oraz na poziomie białka (metoda Western Blot).
7. Wykazanie braku efektów niespecyficznych zaprojektowanych rybozymów poprzez badanie poziomu ekspresji wybranych genów mitochondrialnych.

6. Materiały i metody

6.1. Ważniejsze odczynniki, enzymy oraz zestawy gotowych odczynników

Tab. 6. Ważniejsze odczynniki stosowane w pracy.

Odczynnik	Producent
Bacto-Agar, Bacto-Trypton, ekstrakt drożdżowy, SDS	BioShop
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (zestaw do oczyszczania produktów PCR)	Machery-Nagel
Bakterie kompetentne JM109, wektor ekspresyjny pGEM [®] -T Easy, T4 DNA Ligase	Promega
HiSpeed Plasmid Maxi Kit (zestaw do izolacji plazmidowego DNA)	Qiagen
LightCycler [®] 480 SYBR Green I Master, Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (zestaw odczynników do odwrotnej transkrypcji)	Roche
2-propanol, chloroform,	Sigma
MEGAscript [®] High Yield Transcription Kit T7 (zestaw odczynników do transkrypcji <i>in vitro</i>), bufor obciążający do agarozy (Loading Buffet 6x), enzymy restrykcyjne XhoI, HindIII oraz bufor, standardy wielkości DNA (1 kpz, 10 pz), Flp-In [™] T-REx [™] Core Kit (zestaw do wyprowadzenia linii komórkowej o stabilnej ekspresji konstruktów), Lipofectamine 2000, Trizol Reagent, naczynia do hodowli komórkowych, Hygromycin B (50 mg/mL), Tetracycline Hydrochloride, Zeocin [™] Selection Reagent, GeneJET Plasmid Miniprep Kit (zestaw do izolacji plazmidowego DNA), SYBR [™] Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific
Naczynia do hodowli komórkowych	VWR

6.2. Bufory i pożywki wykorzystywane w pracy

6.2.1. Bufor do elektroforezy kwasów nukleinowych 10x TEB

- 500 mM Tris-HCl
- 500 mM H₃BO₃
- 10 mM EDTA
- pH 8,3

6.2.2. Bufor obciążający 1x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach PAA

- 25 mM cytrynian sodu pH 5,0
- 1 mM EDTA
- 7M mocznik
- 0,1% błękit bromofenolowy
- 0,1% cyjanol ksylenowy

6.2.3. Bufor obciążający 6x do elektroforezy kwasów nukleinowych w żelach

agarozowych

- 30 % glicerol
- 0,25% błękit bromofenolowy
- 0,25% cyjanol ksylenowy
- 1x bufor TEB pH 8,3

6.2.4. Pożywka do hodowli nasion stała

- MS0255 Duchefa
- 1% agar
- 1% sacharoza

6.2.5. Pożywka LB płynna

- 1% baktotrypton
- 0,5% ekstrakt drożdżowy
- 0,5% NaCl

6.2.6. Pożywka LB stała

- 1% baktotrypton
- 0,5% ekstrakt drożdżowy
- 0,5% NaCl
- 1,5% agar

6.2.7. Pożywka SOC

- 2% baktopepton
- 0,5% ekstrakt drożdżowy
- 2,5 mM KCl
- 20 mM glukoza

6.2.8. 5x bufor ligacyjny

- 250 mM Tris-HCl pH 7,5
- 25% PEG 8000
- 50 mM MgCl₂
- 5 mM ATP
- 5mM DTT

6.2.9. Bufor do elektrotransferu białek

- 25 mM Tris-HCl
- 190 mM Glicyna
- 20% metanol

6.2.10. Bufor do blokowania membrany po transferze Western Blot

- 10% mleko w proszku
- 1x PBS
- 0,05% Tween20

6.2.11. Bufor do inkubacji membrany z przeciwciałami Western Blot

- 1x PBS
- 0,05% Tween20
- 3% BSA

6.2.12. 10x Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelu białkowym

- 144g Glicyna
- 30,2g Tris-HCl pH 7,5
- 10g SDS

6.2.13. Pożywki do hodowli linii komórkowych

- OptiMEM (ThermoFischer Scientific)
- EMEM, Eagle's Minimum Essential Medium (ATCC)

6.2.14. Bufor BB (breakage buffer)

- 0,6 M mannitol
- 1mM EDTA
- 10 mM Na-PIPES pH 6,7
- 0,3% BSA

6.2.15. Bufor IB (import buffer)

- 0,44 M mannitol
- 20mM HEPES-KOH pH6,8
- 20 mM KCl
- 1 mM ATP
- 5 mM DTT
- 0,5 mM PMSF
- 0,1 mM DIFP
- 0,5 mM kwas fosfoenolopirogronowy
- 4 u kinaza pirogronianowa
- 0,1 mM tyrozyny
- 0,1 mM histydyny

6.2.16. Bufor do płukania membran Western Blot

- 1x PBS
- 0,05% Tween20

6.3. Oligonukleotydy

Oligonukleotydy DNA syntetyzowane były przez firmę Sigma-Aldrich oraz ThermoFischer Scientific.

Tab. 7. Zestawienie oligonukleotydów stosowanych w badaniach.

Nazwa	Charakterystyka	Sekwencja zapisana od końca 5' do końca 3'
ACTB F	Startery reakcji qPCR dla materiału roślinnego	TGCTCATACGGTCAGCGATA
ACTB R		TTGGTGACAACAGGTCAAGCA
GAPDH		AAACTTGTCGCTCAATGCAATC
GAPDH		GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC
EXP		GGTCCGACATACCCATGATCC
EXP		TGCTCATACGGTCAGCGATA
PKTLS F		TCGCCAGTTAGCGAGGTCT
PKTLS R		GTTCCGATGACCCTCGGAAG
<i>cox2</i> exon1-exon2 F		TGATGCTGTACCTGGTCGTT
<i>cox2</i> exon1-exon2 R		TGGGGGATTAATTGATTGGA
<i>cox2</i> intron1-exon2 F		AGCAGTACGAGCTGAAAGGC
<i>cox2</i> intron1-exon2 R		TGGGGGATTAATTGATTGGA
<i>nad1</i> exon1-exon2 F		TTGCCATATCTTCGCTAGGTG
<i>nad1</i> exon1-exon2 R		GACCAATAGATACTTCATAAGAGACCA
<i>nad1</i> intron1-exon2 F		CGTGCTCGTACGGTTCATAG
<i>nad1</i> intron1-exon2 R		GACCAATAGATACTTCATAAGAGACCA
<i>nad1</i> exon2-exon3 F		TCTGCAGCTCAAATGGTCTC
<i>nad1</i> exon2-exon3 R		ATTCAGCTTCCGCTTCTGG
<i>nad1</i> exon2-intron2 F		TCTGCAGCTCAAATGGTCTC
<i>nad1</i> exon2-intron2 R		GGTTGGGTTAGGGGAACATC
<i>nad1</i> exon3-exon4 F	TCCGTTTGATCTCCCAGAAG	
<i>nad1</i> exon3-exon4 R	AAAAGAGCAGACCCCATTGA	
<i>nad1</i> intron3-exon4 F	GGGAGCTGTATGAGCGGTAA	
<i>nad1</i> intron3-exon4 R	AAAAGAGCAGACCCCATTGA	
<i>nad1</i> exon4-exon5 F	TCTTCAATGGGGTCTGCTC	
<i>nad1</i> exon4-exon5 R	AGCCCGGGATCTTCTTGA	
<i>nad1</i> intron4-exon5 F	ACGGAGCTGCATCCCTACT	
<i>nad1</i> intron4-exon5 R	AGCCCGGGATCTTCTTGA	
<i>nad1</i> ex1 F	ATCCGAACGATCCCCTACTACA	
<i>nad1</i> ex1 R	TGGCTTTTGTGCAACGTAGA	
<i>nad1</i> ex2 F	ATGCCTTTCTAGGAGCATTACG	
<i>nad1</i> ex2 R	TTCATAAGAGACCATTGAGCTG	
<i>nad1</i> ex3 F	TTCTCGTCTAGCAGAACTAATCG	
<i>nad1</i> ex3 R	TTCTACATTATAGCCTGCAACTGATT	
<i>nad1</i> ex5 F	CCATGCACATTGTTCTTTCCA	
<i>nad1</i> ex5 R	AGCCCGGGATCTTCTTGA	
<i>cox2</i> F	TCCGATGAGCAGTCACTCAC	
<i>cox2</i> R	AATAAACGTGATTGACCCAATTCT	
ACTB_F	Startery reakcji qPCR dla materiału z komórek ludzkich	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC
ACTB_R		AGCACTGTGTTGGCGTACAG
HPRT F		TGACCTTGATTTATTTTGCATACC
HPRT R		CGAGCAAGACGTTCAAGTCTT
TMV_FW_1		ACACGTGGTGCGTACGATAA
TMV_RV_1		GCTTTATTACGTGCCTGCGG
TMV_FW_2		ATCGCGCGGGTCAAATGTAT
TMV_RV_2	GGATTCTGAACCCCTCGCTTTA	

BMV_FW_1		GGTTGACACGCAGACCTCTT
BMV_RV_1		CACTGTACGGTACCCGCATT
BMV_FW_2		ATAGTCGTGGTTGACACGCA
ATP6 F		GCCGCAGTACTGATCATTCTATT
ATP6 R		GGGTGGTGATTAGTCGGTTG
Cox1 F		TCCACGGAAGCAATATGAAA
Cox1 R		GGCCACCTACGGTGAAAAG
Cox2 F		GATCCCTCCCTTACCATCAAA
Cox2 R		GCCGTAGTCGGTGTACTCGT
Cox3 F		TGCTTCATCCGCCAACTAAT
Cox3 R		AACCACATCTACAAAATGCCAGT
ND2 F		GCCCCATCTCAATCATATACC
ND2 R		GTTTAATCCACCTCAACTGCC
ND5 F		AAATCCATTGTTCGCATCCA
ND5 R		TTGGTCTAGGCACATGAATATTGT
CMV F		CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG
BGH R		TAGAAAGGCACAGTCGAGG
M13F(-20)		GTA AACGACGGCCAG
M13R		CAGGAAACAGCTATGAC
pFRTlacZeo F	Startery reakcji PCR	CGTGACCACATGGTCCTTCT
pFRTlacZeo R		CACTGGCCGTCGTTTTACA
pcDNA6TR R	Startery reakcji PCR	CATTGAAAGAGCAACGGCTA
pcDNA6TR F		TGGCGACGCTGTAGTCTTC
RzGUC_TMV_FW_3Rz		AGCAATGGATCCAGATAATCTGATGAGTC CGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCG TCATTAAGGCCTGATGAGCTTTTGCGAAA CAGCGAGACCAGCAGCTGCCAGTAACAC ACCTACGTGCGCTGCCAAGTCAAGATGCA TAATAAATAACGG
RzAUC_TMV_FW_3Rz		AGCAATGGATCCAGAGCCTCTGATGAGTC CGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCG TCAGGCCTAGCTGATGAGCTTTTGCGAAA TTGTGGGACCAGCAGCTGCCAGTAACACA CCTACGTGCGCTGCCAAGTCAAGATGCAT AATAAATAACGG
RzGUC_BMV_FW_3Rz	Startery do reakcji PCR do przygotowania konstruktów struktur podobnych do tRNA. Startery zawierają sekwencję rybozymów HH, HDV, linkera, oraz miejsc dla enzymów restrykcyjnych.	AGCAATGGATCCAGATAATCTGATGAGTC CGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCG TCATTAAGGCCTGATGAGCTTTTGCGAAA CAGCGAGACCAGCAGCTGCCAGTAACAC ACCTACGTGCGCTGCCAAGCTTGTGAA TCAGTACAATAAC
RzAUC_BMV_FW_3Rz		AGCAATGGATCCAGAGCCTCTGATGAGTC CGTGAGGACGAAACGGTACCCGGTACCG TCAGGCCTAGCTGATGAGCTTTTGCGAAA TTGTGGGACCAGCAGCTGCCAGTAACACA CCTACGTGCGCTGCCAAGCTTGTGAA CAGTACAATAAC
HDV_TMV_RV		GTACAGCTCGAGTGGCTCTCCCTTAGCCA TCCGAGTGGACGACGTCCTCCTTCGGATG CCCAGGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAGA TGCCATGCCGACCCTGGGCCCTACCGGG GG
HDV_BMV_RV		GTACAGCTCGAGTGGCTCTCCCTTAGCCA TCCGAGTGGACGACGTCCTCCTTCGGATG CCCAGGTCGGACCGCGAGGAGGTGGAGA TGCCATGCCGACCCTGGTCTCTTTTAGAG ATTTACAG

6.4. Linie komórkowe i szczepy bakteryjne

- *Escherichia coli* **JM109** (Promega) – szczep bakteryjny wykorzystywany do transformacji wektorów ekspresyjnych metodą szoku cieplnego.
- *Escherichia coli* **DH5a** (Invitrogen) - szczep bakteryjny wykorzystywany do transformacji wektorów ekspresyjnych metodą szoku cieplnego.
- **HepG2** – linia komórkowa wyprowadzona z komórek nowotworu wątroby (ang. human hepatoma cells).
- **HEK 293 T-REX** – linia komórkowa wyprowadzona z ludzkich komórek nabłonkowych nerki (ang. human endothelial kidney cells) z wprowadzonym receptorem dla tetracykliny.

6.5. Przygotowanie znakowanych radioaktywnie struktur podobnych do tRNA *in vitro*

Struktury podobne do tRNA uzyskano w reakcji transkrypcji na matrycy plazmidowego DNA z dołączoną sekwencją promotorową dla polimerazy faga T7.

Tab. 8. Skład mieszaniny reakcyjnej.

Składnik	Ilość
Matryca DNA	1 µg
Bufor T7 10x	2 µl
ATP (75 mM)	2 µl
CTP (75 mM)	2 µl
GTP (75 mM)	2 µl
UTP (75 mM)	2 µl
[α - ³² P] UTP	10 µCi
Polimeraza T7	2 µl
Woda	do 20 µl

6.6. Przygotowanie konstruktów do obniżenia ekspresji atp6 w liniach komórkowych

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli. Reakcję transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu odczynników MEGAshortscript T7 Kit firmy ThermoFischer Scientific zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Produkt reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu NucAway Spin Column firmy ThermoFischer Scientific zgodnie z załączonym protokołem.

Konstrukty do obniżenia ekspresji atp6 w liniach komórkowych przygotowano w reakcji PCR. Do amplifikacji produktu wykorzystano startery RzGUC_TMV_FW_3Rz, RzAUC_TMV_FW_3Rz, RzGUC_BMV_FW_3Rz, RzAUC_BMV_FW_3Rz,

wprowadzające na końcu 5' sekwencję dla enzymu restrykcyjnego BamHI, sekwencję dla dwóch rybozymów HH oraz sekwencję dla łącznika. Do wprowadzenia na końcu 3' konstruktowi sekwencji kodującej rybozym HDV oraz sekwencji dla enzymu XhoI zastosowano startery HDV_TMV_RV i HDV_BMV_RV. Jako matrycę wykorzystano plazmid pUC-19-TMV oraz pUC-19-BMV zawierające sekwencję dla struktur podobnych do tRNA odpowiednio wirusa mozaiki tytoniu (TMV) i wirusa mozaiki stokłosa. Uzyskane w ten sposób konstrukty wprowadzono do wektora pGEM-T (Promega) w celu ich zsekwencjonowania. Produkty o prawidłowej sekwencji wycięto enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI i wprowadzono do wektora pcDNA5/FRT/TO.

6.7. Przygotowanie bakterii kompetentnych *Escherichia coli*

Szczepki bakterii *E. coli* DH5 α oraz JM109 przygotowano do transformacji wektorami ekspresyjnymi stosując metodę z wykorzystaniem chlorku wapnia. 100 ml płynnej pożywki LB zaszczipiono 1 ml nocnej hodowli, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200 rpm do uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,5 – 0,6. Kulturę wirowano przez 5 minut w 4°C przy 4000 rpm, pożywkę usuwano, a osad zawieszano w 4 ml schłodzonego w lodzie 100 mM chlorku wapnia, inkubowano w lodzie przez 25 minut, a następnie wirowano 5 minut w 4°C przy 4000 rpm i zawieszano w 2 ml 75 mM roztworu chlorku wapnia zawierającego 25% glicerolu. Tak przygotowaną zawiesinę rozdzielono na 100 μ l porcje i zamrażano w ciekłym azocie. Bakterie przechowywano w -80°C.

6.8. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego.

Do 100 μ l zawiesiny zawierającej bakterie kompetentne dodano 10-20 ng wektora ekspresyjnego lub 3 μ l mieszaniny ligacyjnej, inkubowano 30 minut w lodzie, a następnie 90 sekund w 42°C. Mieszaninę schładzano w lodzie przez 3 minuty. Do transformowanych komórek dodano 800 μ l pożywki SOC i inkubowano przez 60 minut w 37°C z wytrząsaniem 350 rpm. Bakterie wirowano 2 minuty przy 4000 rpm. Pożywkę usunięto, a osad zawieszono w 200 μ l pożywki LB. Zawiesinę bakteryjną w ilości 50 i 100 μ l nanoszono na płytki Petriego ze stałą pożywką LB zawierającą antybiotyk selekcyjny (ampicylinę o stężeniu 100 μ g/ml) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 godzin.

6.9. Izolacja plazmidów w dużej skali

10 ml pożywki LB zawierającej antybiotyk selekcyjny (ampicylina – 50 μ g/ml pożywki) zaszczipiono transformowanymi bakteriami z pojedynczych kolonii i inkubowano przez 14-16 godzin w temperaturze 37°C z wytrząsaniem 200 rpm. Inokulowano dwie kolby

płynnej pożywki LB (100 ml) z ampicyliną (50 µg/ml pożywki) 1 ml nocnej hodowli. Hodowlę bakterii prowadzono do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600}=1,5$. Hodowlę łączono i wirowano 20 minut w 4°C przy 4000 rpm. Izolację plazmidu przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. Pomiaru stężeń uzyskanych roztworów DNA dokonano spektrofotometrycznie przy długości fali λ_{260} nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000. Wydajność izolacji wynosiła około 150-200 µg plazmidowego DNA. Uzyskany materiał przechowywano w -20°C.

6.10. Izolacja białek HmIDPs

W celu izolacji HmIDPs komórki HepG2 zebrano i zawieszono w buforze NPMD (20mM bufor fosforanowy pH 6,5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT) zawierającym inhibitory proteaz, a następnie sonikowano (4 razy, 60 sekund przy maksymalnej częstotliwości). Resztki komórkowe usunięto przez odwirowanie (4000 g, 10 min.). W celu usunięcia pozostałości kwasów nukleinowych do mieszaniny dodano polietylenoiminę. HmIDPs frakcjonowano przez wytrącanie siarczanem amonu. Uzyskane w ten sposób frakcje 30%, 50%, oraz 70% dializowano wobec buforu NPMD zawierającego 50% glicerolu.

6.11. Metody rozdziału i analizy kwasów nukleinowych

6.11.1. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Analizę jakościową DNA i RNA prowadzono w 1,2 – 1,5% żelach agarozowych (Tab. 9) z dodatkiem SYBR™ Safe firmy ThermoFischer Scientific o wymiarach 11 x 7 cm w buforze 1x TBE. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążano 1/6 objętości buforem do elektroforezy agarozowej. Rozdział prowadzono przez 1 godzinę przy napięciu ok. 5V/cm i natężeniu prądu 50 – 70 mA w temperaturze pokojowej. Metodą tą analizowano całkowity RNA, produkty PCR oraz plazmidowy DNA. Do oznaczania długości fragmentów DNA używano markerów wielkości 100 i 1000 pz (ThermoFischer Scientific). Produkty rozdziału wizualizowano poprzez fluorescencję (system dokumentacji żeli G-BOX CHEMI XR5 firmy SYNGENE).

Tab. 9. Skład żeli agarozowych.

Składnik	1,2%	1,5%
Agaroza	0,72 g	0,9 g
1x TBE	60 ml	60 ml
SYBR™ Safe	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

6.11.2. Elektroforeza kwasów nukleinowych w żelach poliakrylamidowych

Analizę elektroforetyczną kwasów nukleinowych prowadzono w 10% żelach poliakrylamidowych z 7 M mocznikiem (Tab. 10) o wymiarach 30 cm x 40 cm i grubości 0,5 – 1 mm, przy napięciu 1000 V – 2000 V i natężeniu 5 – 35 mA w temperaturze pokojowej. Elektroforeza prowadzona była w buforze 1x TBE. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym do kwasów nukleinowych PAA w stosunku 1:1. Elektroforeza poprzedzona była 30 minutową preelektroforezą (ang. *pre-run electrophoresis*). Rozdział prowadzono przez około 4 – 6 godzin.

Tab. 10. Skład żeli poliakrylamidowych.

Składnik	10%
40% akrylamid/bisakrylamid (38:2)	25 ml
10x TBE	10 ml
Mocznik 7 M	42 g
Woda	do 100 ml
10% APS	700 μ l
100% TEMED	35 μ l

6.11.3. Identyfikacja kwasów nukleinowych w żelach i roztworach

Znakowany radioaktywnie RNA po rozdziale elektroforetycznym analizowano za pomocą autoradiografii. Ekspozycję żeli prowadzono w temperaturze -80°C stosując ekrany wzmacniające i błony rentgenowskie firmy KODAK. Analizę RNA znakowanego radioaktywnie prowadzono z wykorzystaniem pomiaru densytometrycznego przy użyciu urządzenia odwzorowującego FLA-5100 (FujiFilm) i oprogramowania Multit Gauge V3.0 (FujiFilm).

Kwasy nukleinowe w żelach agarozowych wybarwianych odczynnikiem SYBRTM Safe (ThermoFischer Scientific) wizualizowano fluorescencyjnie przy wykorzystaniu systemu dokumentacji żeli G-BOX CHEMI XR5 firmy SYNGENE.

Stężenie kwasów nukleinowych w próbach oznaczano na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali λ 260 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop firmy ThermoFischer Scientific.

6.12. Metody rozdziału i analizy białek

Analizę elektroforetyczną białek przeprowadzono w 15% żelu poliakryloamidowym z SDS o wymiarach 10 cm x 10 cm i grubości 0,4 – 0,8 mm przy napięciu 250 V i natężeniu prądu 40 mA w temperaturze pokojowej w buforze do rozdziału elektroforetycznego białek. Próby nakładano na żel w buforze obciążającym SBLU lub SBL (analizy Western Blot) w

stosunku 1:1. Rozdział prowadzono przez 1-2 godzin. Wielkość białek oznaczano z wykorzystaniem markerów PageRulerTM Plus. Po rozdziale białka uwidaczniano poprzez barwienie w roztworze Coomasi Brilliant R-250 z metanolem i kwasem octowym przez 2 godziny w temperaturze pokojowej i odbarwienie przez 16 godzin. Wybarwiony żel wizualizowano w świetle widzialnym z wykorzystaniem systemu dokumentacji żeli GelDoc (UVP).

6.13. Izolacja całkowitego RNA z hodowli komórkowych

RNA izolowano przy pomocy odczynnika Trizol Reagent (Invitrogen) zgodnie z załączoną przez producenta. Komórki z płytek 6, 12 i 24-dołkowych przemywano buforem PBS, a następnie poddawano lizie przy użyciu 1000µl Trizolu przez 5 minut.. Uzyskane lizaty zbierano do 1,5 ml probówek, a następnie dodawano 200 µl chloroformu, wytrząsano ręcznie przez 15 s i inkubowano 2-3 minut w temperaturze pokojowej. Próby wirowano 15 minut w 4°C przy 12000 rpm. Fazę górną przenoszono do nowej probówki, a RNA wytrącano przez dodanie 500 µl izopropanolu. Próby inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 10 minut w 4°C przy 12000 rpm. Supernatant usuwano, a uzyskany osad przemyto 750 µl 70% etanolu i wytrząsano. Całość wirowano 10 minut w 4°C przy 12000 rpm. Osad suszono na powietrzu 5-10 minut, a następnie zawieszano w 30 µl wody. Zawartość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali λ 260 nm. Krótkoterminowo RNA przechowywano w -20°C lub w -80°C przez dłuższy okres.

Do przechowywania RNA oraz reakcji z jego udziałem używano wody wolnej od RNaz. Do pozostałych reakcji używano sterylną wodę dejonizowaną (Mili-Q, Milipore).

Wyizolowany RNA poddawano działaniu DNazy I z wykorzystaniem zestawu odczynników DNA Free (ThermoFischer Scientific) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta.

6.14. Izolacja całkowitego RNA z materiału roślinnego

Do izolacji całkowitego RNA z materiału roślinnego tkanki zmielono na drobny proszek w obecności ciekłego azotu z wykorzystaniem aparatu do rozdrabniania tkanek TissueLyser firmy Qiagen. Tak przygotowany materiał lizowano odczynnikiem Trizol Reagent (Invitrogen) w ilości 1 ml na 100 mg próby przez 5 minut, a następnie dodawano 200 µl chloroformu, wytrząsano ręcznie przez 15 s i inkubowano 2-3 minut w temperaturze pokojowej. Próby wirowano 15 minut w 4°C przy 12000 rpm. Fazę górną przenoszono do nowej probówki, a RNA wytrącano przez dodanie 500 µl izopropanolu. Próby inkubowano 10

minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano 10 minut w 4°C przy 12000 rpm. Supernatant usuwano, a uzyskany osad przemyto 750 µl 70% etanolu i wytrząsano. Całość wirowano 10 minut w 4°C przy 12000 rpm. Osad suszono na powietrzu 5-10 minut, a następnie zawieszano w 30 µl wody. Zawartość RNA oznaczano spektrofotometrycznie przy długości fali λ 260 nm. Krótkoterminowo RNA przechowywano w -20°C lub w -80°C przez dłuższy okres.

Do przechowywania RNA oraz reakcji z jego udziałem używano wody wolnej od RNaz. Do pozostałych reakcji używano sterylną wodę dejonizowaną (Mili-Q, Milipore).

Wyzolowany RNA 3-krotnie poddawano działaniu DNazy I z wykorzystaniem zestawu odczynników DNA Free (ThermoFischer Scientific) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta.

6.15. Hodowla linii komórkowych

Do namnożenia komórek w celu przygotowania odpowiedniej ilości materiału do przesiania na płytki wielodółkowe wykorzystywane były butelki hodowlane o powierzchni 75 cm². Komórki wysiewano, a hodowle prowadzono w 10 ml pożywki EMEM z suplementami w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ do osiągnięcia konfluencji 80%. Co 48 godziny pożywkę wymieniano na świeżą. W celu odklejenia komórek od dna butelki hodowlę przemywano buforem PBS, a następnie dodawano 2 ml roztwory trypsyny-EDTA i inkubowano 5 minut w 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano 8 ml pożywki, a całość wirowano 3 minuty przy 1600 rpm w temperaturze pokojowej. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w 5 ml świeżego medium. Ilość komórek liczono przy użyciu automatycznego licznika komórek Luna II (Logos Biosystems).

Komórki HepG2 wysiewano na płytki wielodółkowe do hodowli komórkowej w ilości podanej w tabeli (Tab. 11). Hodowlę prowadzono w pożywce EMEM uzupełnionej suplementami w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po osiągnięciu przez komórki konfluencji 85-95% pożywkę usuwano, a komórki przytwierdzone do dna przemywano buforem PBS i umieszczano w świeżym medium. Tak przygotowane hodowle komórkowe wykorzystywane były do dalszych analiz.

Tab. 11. Ilość komórek wysiewanych na płytki wielodółkowe.

Wielkość płytki	Ilość komórek	Objętość pożywki
96-dółkowa	1×10^4	0,1 ml
24-dółkowa	$1,25 \times 10^5$	0,5 ml
6-dółkowa	4×10^5	2 ml

6.16. Transfekcja komórek

Komórki hodowano na płytce 6-dółkowej w pożywce z dodatkiem suplementów. Przed transfekcją zbierano pożywkę, a komórki płukano roztworem PBS. Następnie dodawano 1,5 ml pożywki bez suplementów. Do transfekcji przygotowywano roztwory plazmidów w stężeniu 1µg z pożywką Opti-MEM w objętości 250 µl. W osobnych probówkach przygotowywano roztwór 6,5 µl Lipofektaminy 2000 z 243,5 µl Opti-MEM. Mieszaniny inkubowano osobno w temperaturze pokojowej przez 5 minut, a następnie dodawano po 250 µl roztworu Lipofektaminy do każdego z roztworów plazmidów i inkubowano razem w temperaturze pokojowej przez kolejne 20 minut. 500 µl mieszaniny dodawano do komórek. Do dołków kontrolnych dodawano 493,5 µl Opti-MEM z 6,5µl Lipofektaminy. Po transfekcji komórki hodowano 24 godziny w 37°C przy 5% stężeniu CO₂.

6.17. Reakcja odwrotnej transkrypcji (RT)

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono z wykorzystaniem zestawu odczynników Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) zgodnie z opisem załączonym przez producenta w objętości 20 µl. Matrycę stanowił całkowity RNA wyizolowany z linii komórkowych. Skład mieszaniny reakcyjnej i poszczególne etapy reakcji przedstawiono w tabeli (Tab. 12.). Produkty reakcji przechowywano w -20°C. Uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji komplementarny DNA (c DNA) wykorzystywano jako matrycę w łańcuchowej reakcji polimeryzacji.

Tab. 12. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki odwrotnej transkrypcji.

Etap	Składnik	Ilość	Warunki
I	Matryca (całkowity RNA)	0,5-1 µg	Inkubowano w 65°C przez 10 minut, a następnie schłodzono na lodzie
	Starter (random hexamer primer) 600 pmol/µl	1 µl	
	Woda	do 13 µl	
II	Bufor reakcyjny 5x	4 µl	Inkubacja 10 minut w 25°C, a następnie 60 minut w 50 °C
	Inhibitor RNaz (Protector RNase Inhibitor 40U/µl)	0,5 µl	
	Deoxynucleotide Mix, 10 mM	2 µl	
	Odwrotna transkryptaza (Transcriptor Reverse Transcriptase, 20U/µl)	0,5 µl	
Denaturacja	-	-	5 min. 85°C
Przechowywanie	-	-	-20°C

6.18. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR)

Reakcje PCR przeprowadzono w objętości 50 μ l. Skład mieszaniny i warunki prowadzenia reakcji przedstawiono w tabelach (Tab. Tab.). W zależności od dalszego przeznaczenia produkty reakcji PCR poddawane były:

- analizie elektroforetycznej w żelu agarozowym,
- oczyszczaniu przy użyciu zestawu odczynników NucleoSpin Extract II (Marchery&Nagel) zgodnie z procedurami podanymi przez producentów.

Ilość uzyskanego DNA po oczyszczaniu oznaczano spektrofotometrycznie na podstawie pomiarów absorbancji przy długości fali λ 260 nm przy zastosowaniu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Tab. 13. Skład mieszaniny do reakcji PCR.

Składnik	Ilość
GoTaq G2 Master Mix, 2x	25 μ l
Starter 1 (5 pM)	5 μ l
Starter 2 (5 pM)	5 μ l
Matryca cDNA	100-150 ng
Woda	do 50 μ l

Tab. 14. Warunki prowadzonych reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	3 min	1
Denaturacja	95°C	30 s	35-40
Wiązanie starterów	60°C	30 s	
Synteza	72°C	45 s	
Synteza końcowa	72°C	5 min	1

6.19. Synteza cDNA do konstrukcji wektorów ekspresyjnych

Podczas syntezy cDNA metodą PCR stosowano polimerazę GoTaq G2 (Promega) oraz startery wprowadzające na obu końcach sekwencje wymagane w dalszej procedurze tworzenia konstruktów. Matrycę stanowiły plazmidy TMV oraz BMV. Mieszaninę reakcyjną przygotowywano zgodnie z opisem w tabeli.

6.20. Ligacja do wektora

Plazmid pcDNA5/FTR/TO i odpowiednie produkty PCR poddawano trawieniu enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI (ThermoFischer Scientific) (Tab. 15). Mieszaninę reakcyjną przygotowano zgodnie z opisem zawartym w tabeli. Całość inkubowano przez 16 h w 37°C a następnie 20 minut w 80°C w celu inaktywacji enzymów restrykcyjnych. Produkty

reakcji oczyszczano przy użyciu zestawu odczynników NucleoSpin Extract II (Marchery&Nagel) zgodnie z procedurami podanymi przez producentów.

Tab. 15. Skład mieszaniny do trawienia DNA enzymami restrykcyjnymi.

Składnik	Ilość
DNA	2-5 µg
Bufor G ThermoFischer Scientific	5 µl
Enzym BamHI (10U/µl)	2-5 µl
Enzym XhoI (10U/µl)	2-5 µl
Woda	do 50 µl

W celu otrzymania wektorów ekspresyjnych na bazie pcDNA5/FTR/TO prowadzono reakcję ligacji wektora i cDNA w stosunku molowym 3:1 według schematu zamieszczonego w tabeli (Tab. 16). Reakcję prowadzono w 16°C przez 16 godzin.

Tab. 16. Skład mieszaniny ligacyjnej

Składnik	Ilość
Wektor pcDNA5/FRT/TO	60 ng
Insert	15 ng
Bufor do ligacji, 5x	2 µl
Ligaza DNA T4 10U/µl (Promega)	1 µl
Woda	Do 10 µl

Po reakcji ligacji pobierano 3 µl mieszaniny reakcyjnej i transformowano nimi komórki bakteryjne JM109 (rozdział 2.5).

6.21. Analiza konstruktów plazmidowych

Obecność insertu w wektorze pcDNA5/FRT/TO wstępnie potwierdzano za pomocą cięcia enzymami restrykcyjnymi BamHI i XhoI (ThermoFischer Scientific) w buforze G (ThermoFischer Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

Wyselekcjonowane preparaty poddawane były sekwencjonowaniu w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej, Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

6.22. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym

W celu przeprowadzenia analizy ilościowej mRNA wykonano reakcję ilościowego PCR w czasie rzeczywistym dla wybranych genów. Matrycę stanowił cDNA uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. Analizę ilościową względem genów referencyjnych

przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej (metoda $\Delta\Delta Ct$). Każda próbka cDNA analizowana była trzykrotnie w termocyklerze CFX Connect (Bio-Rad). Mieszaninę reakcyjną o objętości 10 μl przygotowano z wykorzystaniem zestawu odczynników LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) (Tab. 17, Tab. 18) do reakcji wykorzystano startery pozwalające na amplifikację cDNA o określonej długości przy danej temperaturze wiązania.

Krzywe standardowe uzyskano poprzez amplifikację serii rozcieńczeń cDNA (x1, x2, x4, x8, x16, x32). Jakość uzyskanych produktów PCR sprawdzono poprzez analizę krzywych topnienia.

Tab. 17. Skład mieszaniny do reakcji PCR w objętości 10 μl

Składnik	Ilość
Master Mix 2x	5 μl
Starter 1 (5 pM)	1 μl
Starter 2 (5 pM)	1 μl
Matryca cDNA (mieszanina po reakcji RT)	1 μl
Woda	do 10 μl

Tab. 18. Warunki prowadzenia reakcji qPCR

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	10 min	1
Denaturacja	95°C	15 s	40
Wiązanie starterów	57-62°C	30 s	
Synteza	72°C	30 s	
Oznaczanie krzywej topnienia	95°C	1 min	1
	50°C	30 s	
	55-95°C	0,1°C/s	
	95°C	30s	

6.23. Test cytotoksyczności MTT

Komórki HepG2 hodowano na 96-dołkowych płytkach do uzyskania konfluencji na poziomie 85-90%, a następnie poddawano działaniu tetracykliny w różnych stężeniach. Po upływie 24h pożywkę zbierano, a do poszczególny dołków dodano po 100 μl roztworu MTT (sól tetrazolowa – 5 mg/ml) w pożywce EMEM. Płytki inkubowano przez 90 minut w 37°C. PO tym czasie zebrano pożywkę i dodano 100 μl DMSO (ang. *Dimetyl sulfoxide*) na dołek, a następnie wytrząsano przez 10 minut przy 230 rpm w celu równomiernego rozpuszczenia się Formazanu w DMSO. Ilość zredukowanego do formazanu MTT mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda 590$ nm z wykorzystaniem czytnika mikropłytek BioTek Synergy Microplate Reader.

6.24. Test potencjału błony mitochondrialnej JC-1

Komórki HepG2-Flp-In i Flp-In-293 hodowano na 96-dołkowych płytkach do osiągnięcia konfluencji na poziomie 85-90%, a następnie traktowano tetracykliną w stężeniach od 2,5-10 μg . Po 24h zebrano pożywkę i dodano barwnik JC-1 w stężeniu końcowym 2 μM . Płytki inkubowano przez 30 minut w 37°C. Po tym czasie zebrano pożywkę i dodano 100 μl PBS. Pomiaru fluorescencji dokonywano przy długości fali $\lambda 530$ oraz $\lambda 590$. W komórkach apoptotycznych barwnik JC-1 pozostanie w formie monomerycznej i będzie emitował zieloną fluorescencję, z kolei w komórkach żywych dochodzi do agregacji barwnika w mitochondriach co prowadzi do emisji czerwonej fluorescencji.

6.25. Import struktur podobnych do tRNA do izolowanych mitochondriów ludzkich

Mieszaninę reakcyjną zawierającą izolowane mitochondria, znakowane radioaktywnie struktury podobne do tRNA, białka HmIDPs oraz bufor IB inkubowano w 30°C przez 20 minut. Następnie niezaimportowane RNA usuwano poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej nukleaz (10u/ml micrococcal nuclease, 100 $\mu\text{g/ml}$ RNazy A oraz 25u/ml phosphodiesterase) i inkubowano w 20°C przez 5 minut w obecności 1 mM CaCl_2 . Po inkubacji mieszaninę rozcieńczano 5-krotnie przy użyciu buforu BB a następnie wirowano w 4°C przy 12000 rpm, supernatant usuwano a osad zawieszano w 100 μl buforu BB i rozcieńczano 10-krotnie w 10 mM roztworze HEPES pH 6,8. Po 10 minutowej inkubacji na lodzie do mieszaniny dodawano 0,25 M sucrose i wirowano w 4°C przy 12000 rpm. Po dwukrotnym przepłukaniu osadu buforem BB mitochondria poddano lizie w roztworze 1% SDS, 0,1 M octanu sodu oraz 0,05% pirowęglań dietylu i inkubowano w 100°C przez 1 minutę. RNA izolowano z wykorzystaniem metody Chomczyńskiego, rozdzielano w 10% żelu PAA i analizowano przy pomocy autoradiografii.

6.26. Sterylizacja i hodowla nasion *Arabidopsis Thaliana*.

Nasiona *A. thaliana* przed wysianiem na płytki poddawano procesowi sterylizacji. W tym celu niewielką ilość nasion umieszczano w 2 ml probówkach, zalewano 1 ml roztworu sterylizującego (70% etanol z dodatkiem 4% Tween20) i inkubowano z wytrząsaniem przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie supernatant usuwano, a nasiona 5 krotnie przepłukiwano 100% etanolem, zostawiano pod komorą laminarną do wyschnięcia i wysiewano na płytki z podłożem stałym.

6.27. Hodowla i indukcja nasion *Arabidopsis Thaliana*.

Płytki z nasionami umieszczano na 2 dni w ciemni w 4°C w celu synchronizacji ich kiełkowania, a następnie przenoszono je do komór wzrostu na 2-4 tygodni. Po osiągnięciu odpowiedniego stadium rozwoju młode rośliny poddawano działaniu 10 μm β -estradiolu. Próby do analiz pobierano w odstępach 24 godzinnych.

6.28. Analiza Western Blot

Komórki przemywano buforem PBS poddawano trypsynizacji, a następnie wirowano 3 minuty przy 1600 rpm. Supernatant usuwano, a osad zawieszano w buforze 10 mM TRis-HCl pH 7,5 i poddawano sonikacji w następujących warunkach: 3 x 10 sekund z 1 minutową przerwą przy amplitudzie 75% oraz wirowano 10 minut przy 13 tys. rpm w 4°C. Ilość białek mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali 280 nm z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000. Jakość uzyskanego materiału oceniano elektroforetycznie. Przed nałożeniem na żel każda próba poddawana była 10 minutowej denaturacji w 95°C. Uzyskany całkowity ekstrakt białkowy nakładano na żel poliakryloamidowy z SDS. Do każdej próby dodawano bufor obciążający SBL w stosunku 1:1. Rozdzielone białka przenoszone były na membranę PVDG w procesie elektrotransferu z wykorzystaniem urządzenia Western Unity (BioRad) w buforze Towbin. Membranę blokowano w roztworze mleka w proszku w PBS z dodatkiem 0,05% Tween20 w 4°C przez 16 godzin, a następnie odmywano trzykrotnie tym samym buforem przez 10 minut przy 350 rpm w temperaturze pokojowej. Membranę inkubowano z monoklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowymi specyficznymi wobec badanych białek przez 2 godziny w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po trzykrotnym przemyciu membranę inkubowano z biotynylowanym przeciwciałem drugorzędowym przez 2 godziny w temperaturze pokojowej przy 350 rpm, przepłukiwano, a następnie inkubowano z roztworem streptawidyny skoniugowanej z alkaliczną fosfatazą przez 15 minut w temperaturze pokojowej przy 350 rpm. Po przemyciu przyłączone przeciwciała uwidacziano w wykorzystaniem płynnego systemu BCIP/NBT (Sigma), a uzyskane prążki oceniano densytometrycznie przy wykorzystaniu programu ImageQuant (Molecular Dynamics).

6.29. Analiza statystyczna

Wyniki przedstawiano, jako wartość średnią \pm odchylenia standardowego. Dla wszystkich eksperymentów zastosowano przynajmniej trzy powtórzenia biologiczne. Istotność statystyczną uzyskanych wyników oceniano z wykorzystaniem programu GraphPad Prism ver. 5.1. Różnice pomiędzy wartościami średnimi testu, a próbami oceniano za pomocą wariancji ANOVA rozszerzonej testami Tukeya lub Bonferroniego. Wyniki istotne statystycznie opisano jako: * dla $p < 0,05$; ** dla $P < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ brak istotności statystycznej dla $p \geq 0,05$.

7. Bibliografia

1. Acquistapace, A., Bru, T., Lesault, P.F., Figeac, F., Coudert, A.E., le Coz, O., Christov, C., Baudin, X., Auber, F., Yiou, R., et al. (2011). Human mesenchymal stem cells reprogram adult cardiomyocytes toward a progenitor-like state through partial cell fusion and mitochondria transfer. *Stem Cells* 29, 812–824.
2. Adams, K.L., Qiu, Y.-L., Stoutemyer, M., and Palmer, J.D. (2002). Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 9905–9912.
3. Adhya S. (2008) Leishmania mitochondrial tRNA importers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 12:2681–85.
4. Ahmad, T., Mukherjee, S., Pattnaik, B., Kumar, M., Singh, S., Kumar, M., Rehman, R., Tiwari, B.K., Jha, K.A., Barhanpurkar, A.P., et al. (2014). Miro1 regulates intercellular mitochondrial transport & enhances mesenchymal stem cell rescue efficacy. *EMBO J.* 33, 994–1010.
5. Aleksandrowicz A., Fedoruk-Wyszomirska A., Barciszewska M. (2005). Struktura i właściwości białka 41 (gp41) ludzkiego wirusa niedoboru odporności immunologicznej. *Na pograniczu chemii i biologii*, Tom XII.
6. Alexeyev, M., Shokolenko, I., Wilson, G., and LeDoux, S. (2013). The maintenance of mitochondrial DNA integrity—critical analysis and update. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012641.
7. Allen J.O., Fauron C.M., (2007) Comparisons among two fertile and three male-sterile mitochondrial genomes of maize. *Genetics* 177(2): 1173-1192.
8. Ausländer S, Ketzer P, Hartig JS (2010) A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. *Mol BioSyst* 6: 807-814
9. Bacman, S.R., Williams, S.L., Duan, D., and Moraes, C.T. (2012). Manipulation of mtDNA heteroplasmy in all striated muscles of newborn mice by AAV9- mediated delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther.* 19, 1101–1106.
10. Bacman, S.R., Williams, S.L., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2010). Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther.* 17, 713–720.
11. Bacman, S.R., Williams, S.L., Hernandez, D., and Moraes, C.T. (2007). Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a differential multiple cleavage-site' model. *Gene Ther.* 14, 1309–1318.
12. Bacman, S.R., Williams, S.L., Pinto, M., Peralta, S., and Moraes, C.T. (2013). Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat. Med.* 19, 1111–1113.
13. Baertling, F. et al. (2014). A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 257–265.
14. Baker B.F., Monia B.P., (1999) Novel mechanism for antisense-mediated regulation of gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1489(1): 3-18.

15. Baleva M., Gowher A., Kamenski P., Tarassov I., Entelis N., Masquida B. (2015). A moonlighting human protein is involved in mitochondrial import of tRNA. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 9354–9367.
16. Baleva M.V., Meier M., Entelis N., Tarasov I., Kamenski P., Maskida B. (2017). Factors beyond enolase 2 and mitochondrial lysyltRNA synthetase precursor are required for tRNA import into yeast mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 82 (11), 1324–1335.
17. Balny C, Masson P, Heremans K (2002) High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes. *Biochim Biophys Acta* 1595: 3-10
18. Baracca A, Barogi S, Carelli V, Lenaz G, Solaini G (2000) Catalytic activities of mitochondrial ATP synthase in patients with mitochondrial DNA T8993G mutation in the ATPase 6 gene encoding subunit a. *J Biol Chem* 275: 4177-4182.
19. Baracca A, Sgarbi G, Mattiazzi M, Casalena G, Pagnotta E, Valentino ML, Moggio M, Lenaz G, Carelli V, Solaini G (2007) Biochemical phenotypes associated with the mitochondrial ATP6 gene mutations at nt8993. *Biochim Biophys Acta* 1767: 913-919.
20. Baranowska E, Rytka J, Kucharczyk R (2018) Molekularne podłoże chorób spowodowanych mutacjami w genach kodujących podjednostki syntazy ATP. *Postepy Biochem* 64: 304-317.
21. Bartnik E, Tońska K (2017) Choroby mitochondrialne. W: Jerzy Bal (red) *Genetyka medyczna i molekularna*. PWN Warszawa, str. 325-3372.
22. Bayona-Bafaluy, M.P., Blits, B., Battersby, B.J., Shoubridge, E.A., and Moraes, C.T. (2005). Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 14392–14397.
23. Behrouzi R, Roh JH, Kilburn D, Briber RM, Woodson SA (2012) Cooperative tertiary interaction network guides RNA folding. *Cell* 149: 348-357
24. Benz-Moy TL, Herschlag D (2011) Structure-function analysis from the outside in: long-range tertiary contacts in RNA exhibit distinct catalytic roles. *Biochemistry* 50: 8733-8755
25. Bertrand EL, Rossi JJ (1994) Facilitation of hammerhead ribozyme catalysis by the nucleocapsid protein of HIV-1 and the heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1. *EMBO J* 13: 2904-2912
26. Bhattacharyya SN, Adhya S. (2004) The complexity of mitochondrial tRNA import. *RNA Biol.* 1:84–88.
27. Bian W.P., Chen Y.L., Luo J.J., Wang C., Xie S.L., Pei D.S. 2019. Knock-in strategy for editing human and zebrafish mitochondrial DNA using mito-CRISPR/Cas9 system. *ACS Synth. Biol.* 8, 621–632.
28. Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C., Palmer, T. (1998). An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 18003–18006.
29. Bonen, L. (2008). Cis- and trans-splicing of group II introns in plant mitochondria. *Mitochondrion* 8: 26–34.

30. Boots JL, Canny MD, Azimi E, Pardi A (2008) Metal ion specificities for folding and cleavage activity in the *Schistosoma* hammerhead ribozyme. *RNA* 14: 2212-2222
31. Brandina I., Graham J., Lemaitre-Guillier C., Entelis N., Krasheninnikov I., Sweetlove L., Tarassov I., Martin R.P. (2006). Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757, 1217–1228.
32. Brandina I., Smirnov A., Kolesnikova O., Entelis N., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. (2007). tRNA import into yeast mitochondria is regulated by the ubiquitin-proteasome system. *FEBS Lett.* 581, 4248–4254.
33. Breaker RR, Emilsson GM, Lazarev D, Nakamura S, Puskarz IJ, Roth A, Sudarsan N (2003) A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. *RNA* 9: 949-957
34. Brown, D.T., Samuels, D.C., Michael, E.M., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2001). Random genetic drift determines the level of mutant mtDNA in human primary oocytes. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 533–536.
35. Brown, G.G., Colas des Francs-Small, C., and Ostersetzer-Biran, O. (2014). Group II intron splicing factors in plant mitochondria. *Front. Plant Sci.* 5: 35.
36. Bruske EI, Sendfeld F, Schneider A. (2009) Thiolated tRNAs of *Trypanosoma brucei* are imported into mitochondria and dethiolated after import. *J. Biol. Chem.* 284:36491–99.
37. Bullerwell CE, Lang BF. (2005) Fungal evolution: the case of the vanishing mitochondrion. *Curr. Opin. Microbiol.* 8:362–69.
38. Burke DH, Greathouse ST (2005) Low-magnesium, trans-cleavage activity by type III, tertiary stabilized hammerhead ribozymes with stem 1 discontinuities. *BMC Biochem* 6: 14
39. Buskiewicz IA, Burke JM (2012) Folding of the hammerhead ribozyme: Pyrrolo-cytosine fluorescence separates core folding from global folding and reveals a pH-dependent conformational change. *RNA* 18: 434-448
40. Butcher SE, Dieckmann T, Feigon J (1997) Solution structure of a GAAA tetraloop receptor RNA. *EMBO J* 16: 7490-7499
41. Butcher SE, Pyle AM (2011) The molecular interactions that stabilize RNA tertiary structure: RNA motifs, patterns, and networks. *Acc Chem Res* 44: 1302-1311
42. Campbell J.M., Bacon T.A., Wickstrom E., (1990) Oligodeoxynucleoside pjosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods* 20(3): 259-267
43. Carbonell A., Flores R., Gago S. (2010). Trans-cleaving „hammerhead” ribozymes with tertiary stabilizing motifs: in vitro and in vivo activity against a structured viroid RNA. *Nucleic Acids Research*, 39, 2432-2444
44. Carrozzo R, Wittig I, Santorelli FM, Bertini E, Hofmann S, Brandt U, Schägger H (2006) Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondria biosynthesis disorders. *Ann Neurol* 59: 265-275.
45. Celichowski J, Krutki P, Rogowski M (2010) *Fizjologia człowieka*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL.
46. Chang DD, Clayton DA. (1987) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* 235:1178–84.

47. Chang DD, Clayton DA. (1989) Mouse RNAaseMRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondria RNA substrate. *Cell* 56:131–39.
48. Chen JH, Yajima R, Chadalavada DM, Chase E, Bevilacqua PC, Golden BL. (2010) A 1.9 Å crystal structure of the HDV ribozyme precleavage suggests both Lewis acid and general acid mechanisms contribute to phosphodiester cleavage. *Biochemistry*.49:6508–6518.
49. Chen K, Gao C (2014) Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep* 33(4):575–583.
50. Chen SJ (2008) RNA folding: conformational statistics, folding kinetics and ion electrostatics. *Annu Rev Biophys* 37: 197-214
51. Chen X, Denison L, Levy M, Ellington AD (2009) Direct selection for ribozyme cleavage activity in cells. *RNA* 15: 2035-2045
52. Chen, H. & Chan, D.C., (2010) Physiological functions of mitochondrial fusion. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 21-5.
53. Chery J. (2016) RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. *Postdoctoral Journal*.4:35-50.
54. Chi X, Gatti P, Papoian T. (2017) Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics. *Drug Discov Today*. 22:823-33.
55. Chi Y, Martick M, Lares M, Kim R, Scott WG, Kim S (2008) Capturing hammerhead ribozyme structures in action by modulating general base catalysis. *PLoS Biol* 6: 2060-2068
56. Childs AM, Hutchin T, Pysden K, Highet L, Bamford J, Livingston J, Crow YJ (2007) Variable phenotype including Leigh syndrome with a 9185T>C mutation in the MTATP6 gene. *Neuropediatrics* 38: 313-316.
57. Chinnery, P.F., DiMauro, S., Shanske, S., Schon, E.A., Zeviani, M., Mariotti, C., Carrara, F., Lombes, A., Laforet, P., Ogier, H., Jaksch, M., Lochmüller, H., Horvath, R., Deschauer, M., Thorburn, D.R., Bindoff, L.A., Poulton, J., Taylor, R.W., Matthews, J.N.S., Turnbull, D.M., (2004) Risk of developing a mitochondrial DNA deletion disorder. *Lancet* 364, 592–596.
58. Chinnery, P.F., Elliott, H.R., Hudson, G., Samuels, D.C., Relton, C.L., (2012) Epigenetics, epidemiology and mitochondrial DNA diseases. *Int J Epidemiol* 41, 177–187.
59. Chinnery, P.F., Howell, N., Andrews, R.M., Turnbull, D.M., (1999). Mitochondrial DNA analysis: polymorphisms and pathogenicity. *J. Med. Genet.* 36, 505–510.
60. Chinnery, P.F., Hudson, G., (2013) Mitochondrial genetics. *Br. Med. Bull.* 106, 135–159.
61. Chinnery, P.F., Samuels, D.C., (1999) Relaxed replication of mtDNA: A model with implications for the expression of disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1158–1165.
62. Chinnery, P.F., Schon, E.A., (2003) Mitochondria. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74, 1188–1199.
63. Chinnery, P.F., Thorburn, D.R., Samuels, D.C., White, S.L., Dahl, H.M., Turnbull, D.M., Lightowlers, R.N., Howell, N., (2000) The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 16, 500–505.

64. Chinnery, P.F., Zwijnenburg, P.J., Walker, M., Howell, N., Taylor, R.W., Lightowers, R.N., Bindoff, L., Turnbull, D.M., (1999) Nonrandom tissue distribution of mutant mtDNA. *Am. J. Med. Genet.* 85, 498–501.
65. Chiou, P.Y., Wu, T.H., and Teitell, M.A. (2012). Photothermal nanoblade for single cell surgery and cargo delivery. *Proc. SPIE* 8460, 57–58.
66. Clayton D.A., (2000) Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Hum Reprod* 15:11-17.
67. Clayton, D.A., (1991) Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7, 453–478.
68. Cohen, S., Zmudjak, M., Colas des Francs-Small, C., Malik, S., Shaya, F., Keren, I., Belausov, E., Many, Y., Brown, G.G., Small, I., and Ostersetzter-Biran, O. (2014). nMAT4, a maturase factor required for nad1 pre-mRNA processing and maturation, is essential for holocomplex I biogenesis in Arabidopsis mitochondria. *Plant J.* 78: 253–268.
69. Conaty J, Hendry P, Lockett T (1999) Selected classes of minimised hammerhead ribozyme have very high cleavage rates at low Mg²⁺ concentration. *Nucleic Acids Res* 27: 2400-2407
70. Conaty J., Hendry P., Lockett T. (1999). Selected classes of minimized hammerhead ribozymes have very high cleavage rates at low Mg²⁺ concentration. *Nucleic Acid Res.*, 27, 2400-2407
71. Costa M, Michel F (1995) Frequent use of the same tertiary motif by self-folding RNAs. *EMBO J* 14: 1276-1285
72. Crausaz-Esseiva A, Naguleswaran A, Hemphill A, Schneider A. (2004) Mitochondrial tRNA import in *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* 279:42363–68.
73. Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., Harbottle, S.J., Murphy, J.L., Cree, L.M., Murdoch, A.P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowers, R.N., et al. (2010). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 465, 82–85.
74. Crooke S.T., (1998) Vitravene – another pieces in the mosaic. *Antisense Nucleic Acid Drug* 8(4): VII-VIII.
75. Crooke ST, Wang S, Vickers TA, Shen W, Liang X. (2017) Cellular uptake and trafficking of antisense oligonucleotides. *NatBiotechnol.* 35:230-7.
76. Curtis EA, Bartel DP (2001) The hammerhead cleavage reaction in monovalent cations. *RNA* 7: 546-552
77. Cyranoski D (2016) CRISPR gene-editing tested in a person for the first time. *Nature* 539(7630):479. 13. Greely HT (2019) CRISPR'd babies: Human germline genome editing in the “He Jiankui affair.”. *J Law Biosci* 6:111–183.
78. D’Aurelio M, Vives-Bauza C, Davidson MM, Manfredi G (2009) Mitochondrial DNA background modifies the bioenergetics of NARP/MILS ATP6 mutant cells. *Hum Mol Genet* 19: 374-386.
79. Dahan J., Mireau H. (2013). The Rf and Rf-like PPR in higher plants, a fast-evolving subclass of PPR genes. *RNA Biol* 10(9): 1469-1476.

80. Darin N., Oldfors A., Moslemi A. R., Holme E., Tulinius M. (2001). The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities. *Ann. Neurol.* 49, 377–383.
81. De la Pena M, Garcia-Robles I (2010) Ubiquitous presence of the hammerhead ribozyme motif along the tree of life. *RNA* 16: 1943-1950
82. de la Pena M, Garcia-Robles I. (2010) Intronic hammerhead ribozymes are ultraconserved in the human genome. *EMBO Rep.* 11:711–716.
83. De la Pena, M., Gago, S. and Flores, R. (2003) Peripheral regions of natural hammerhead ribozymes greatly increase their self-cleavage activity. *EMBO J.*, 22, 5561–5570.
84. de Smith M.H., Gultyaev A.P. (2002). Structural variation and functional importance of a D-loop-Tloop interaction in valine-accepting tRNA-like structures of plant viral RNAs. *Nucleic Acids Res* 30(19): 4232-4240.
85. Delage L, Dietrich A, Cosset A, Maréchal-Drouard L. (2003) In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into mitochondria of *Solanum tuberosum*. *Mol. Cell. Biol.* 23:4000–12.
86. Dias N, Stein CA. (2002) Antisense oligonucleotides: Basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther.* 1:347-355.
87. Dietrich A, Marechal-Drouard L, Carneiro V, Cosset A, Small I. (1996) A single base change prevents import of cytosolic anlyl-tRNA into mitochondria in transgenic plants. *Plant J.* 10:913–18.
88. DiMauro S (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658: 80-88
89. DiMauro S, Hirano M (1993-2001) MELAS. *GeneReviews*.
90. DiMauro S, Hirano M (1993-2003) MERRF. *GeneReviews*.
91. DiMauro S, Hirano M, Schon EA (2006) Approaches to the treatment of mitochondrial diseases. *Muscle Nerve* 34: 265-283.
92. Dimauro S, Rustin P (2009) A critical approach to the therapy of mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation diseases. *Biochim Biophys Acta* 1792: 1159-1767.
93. Ding S., Liu X., Wang H., Wang Y., Tang J., Yang Z., Tan B. (2019). SMK6 mediates the C-to-U editing at multiple sites in maize mitochondria. *Journal of Plant Physiology*, 240: 152992.
94. Doherty E.A., Doudna J.A.. (2000) Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biochem.* ;69:597–615.
95. Doherty EA, Doudna JA (2001) Ribozyme structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30: 457-475
96. Domhan, S., Ma, L., Tai, A., Anaya, Z., Beheshti, A., Zeier, M., Hlatky, L., and Abdollahi, A. (2011). Intercellular communication by exchange of cytoplasmic material via tunneling nano-tube like structures in primary human renal epithelial cells. *PLoS ONE* 6, e21283.
97. Dörner M, Altmann M, Pääbo S, Mörkl M. 2001. Evidence for import of a lysyl-tRNA into marsupial mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 12:2688–98.
98. Doudna J.A., Cech T.R., (2002). The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature*, 418, 222-228

99. Doudna JA, Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096.
100. Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1258096.
101. Dove A., (2002) Antisense and sensibility. *Nat Biotechnol* 20(2): 121-124.
102. Dovydenko I., Tarassov I., Venyaminova A., Entelis N. (2016). Method of carrier-free delivery of therapeutic RNA importable into human mitochondria: Lipophilic conjugates with cleavable bonds. *Biomaterials*. 76, 408–417.
103. Dreher T. W. (2009). Role of tRNA-like structures in controlling plant virus replication. *Virus Res* 139(2): 217-229.
104. Dreher T.W. (2004). Turnip yellow mosaic virus: transfer RNA mimicry, chloroplasts and a C-rich genome. *Mol Plant Pathol* 5(5): 367-375.
105. Dreher T.W. (2010). Viral tRNA and tRNA-like structures. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 1(3): 402-414.
106. Dufour D, de la Pena M, Gago S, Flore R, Gallego J (2009) Structure-function analysis of the ribozymes of chrysanthemum chlorotic mottle viroid: a loop-loop interaction motif conserved in most natural hammerheads. *Nucleic Acids Res* 37: 368-381
107. Eckstein F., Kore A.R., Nakamaye K.L. (2001). In vitro selection of hammerhead ribozyme sequence variants. *ChemBiochem*, 2, 629-635
108. Eickbush DG, Eickbush TH. (2010) R2 retrotransposons encode a self-cleaving ribozyme for processing from an rRNA cotranscript. *Mol Cell Biol*. 30:3142–3150.
109. Elcock AH (2010) Models of macromolecular crowding effects and the need for quantitative comparisons with experiment. *Curr Opin Struct Biol* 20: 196-206.
110. Elliott, H.R., Samuels, D.C., Eden, J.A., Relton, C.L., Chinnery, P.F. (2008). Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 254–260.
111. Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26: 597-604
112. Ellis RJ (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* 26: 597-604.
113. Ellis, J. and Rogers, J. (1993) Design and specificity of hammerhead ribozymes against calretinin mRNA. *Nucleic Acids Res.*, 21, 5171–5178.
114. Enriquez J.A., Chomyn A., Attardi G. (1995). MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat. Genet.* 10, 47–55.
115. Entelis N, Kolesnikova O, Kazakova H, Brandina I, Kamenski P, et al. (2002) Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet. Eng.* 24:191–213.
116. Entelis N., Brandina I., Kamenski P., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. 2006. A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 20, 1609–1620.
117. Entelis N., Kieffer S., Kolesnikova O., Martin R., Tarassov I. (1998). Structural requirement of tRNA^{Lys} for its import into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 2838–2843.

118. Entelis N.S., Kolesnikova O.A., Dogan S., Martin R.P., Tarassov I.A. (2001). 5S rRNA and tRNA import into human mitochondria: Comparison of in vitro requirements. *J. Biol. Chem.* 276, 45642–45653.
119. Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA. (2001) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J. Biol. Chem.* 276:45642–53.
120. Falk MJ, Shen L, Gonzalez M, Leipzig J, Lott MT, Stassen APM, Wong LJ (2015) Mitochondrial Disease Sequence Data Resource (MSeqDR): a global grass-roots consortium to facilitate deposition, curation, annotation, and integrated analysis of genomic data for the mitochondrial disease clinical and research communities. *Mol Genet Metab* 114: 388-396.
121. Fedor M.J., Uhlenbeck O.C. (1990). Substrate sequence effects on „hammerhead” RNA catalytic efficiency. *Biochemistry*, 87, 1668-1672
122. Fedorova O, Solem A, Pyle AM (2010) Protein-facilitated folding of group II intron ribozymes. *J Mol Biol* 397: 799-813
123. Fedoruk-Wyszomirska A, Giel-Pietraszuk M, Wyszko E, Szymański M, Ciesiołka J, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2009) The mechanism of acidic hydrolysis of esters explains the HDV ribozyme activity. *Mol Biol Rep* 36: 1647-1650
124. Fedoruk-Wyszomirska A, Wyszko E, Giel-Pietraszuk M, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2007) High hydrostatic pressure approach proves RNA catalytic activity without magnesium. *Int J Biol Macromol* 41: 30-35
125. Fernandez JP, Vejnar CE, Giraldez AJ, Rouet R, Moreno-Mateos MA (2018) Optimized CRISPR-Cpf1 system for genome editing in zebrafish. *Methods* 150:11–18.
126. Ferré-D’Amaré AR, Scott WG (2010) Small self-cleaving ribozymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2: a003574
127. Ferré-D’Amaré AR, Zhou K, Doudna JA. (1998) Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*.395:567–574.
128. Finsterer J (2011) Inherited mitochondrial neuropathies. *J Neurol Sci* 15: 9-16.
129. Frechin M., Senger B., Braye M., Kern D., Martin R.P., Becker H.D. (2009). Yeast mitochondrial Gln-tRNA (Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev.* 23, 1119–1130.
130. French, C.T., Toesca, I.J., Wu, T.H., Teslaa, T., Beaty, S.M., Wong, W., Liu, M., Schroder, I., Chiou, P.Y., Teitell, M.A., and Miller, J.F. (2011). Dissection of the Burkholderia intracellular life cycle using a photothermal nanoblade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 12095–12100.
131. Frey, T.G. & Mannella, C.A., (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25, 319-24.
132. Fujikura, J., Nakao, K., Sone, M., Noguchi, M., Mori, E., Naito, M., Taura, D., Harada-Shiba, M., Kishimoto, I., Watanabe, A., et al. (2012). Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. *Diabetologia* 55, 1689–1698.
133. Gabryelska M., Fedoruk-Wyszomirska A., Wyszko E., Barciszewski J. (2013). Architektura funkcjonalna rybozomu „hammerhead”. *Postępy biochemii*, 59 (1)

134. Gaj, T., Gersbach, C.A., and Barbas, C.F., 3rd (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31, 397–405.
135. Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M (2018) Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-Ized. *Trends Genet* 34(2): 101–110.
136. Gammage, P.A., Rorbach, J., Vincent, A.I., Rebar, E.J., and Minczuk, M. (2014). Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol. Med.* 6, 458–466.
137. García JJ, Ogilvie I, Robinson BH, Capaldi RA (2000) Structure, functioning, and assembly of the ATP synthase in cells from patients with the T8993G mitochondrial DNA mutation. Comparison with the enzyme in Rho(0) cells completely lacking mtDNA. *J Biol Chem* 275: 11075-11081.
138. Geiduschek E.P., Tocchini-Valentini G.P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Annu Rev Biochem* 57: 873-914.
139. Germain, A., Hotto, A.M., Barkan, A., and Stern, D.B. (2013). RNA processing and decay in plastids. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4: 295–316.
140. Giel-Pietraszuk M, Fedoruk-Wyszomirska A, Barciszewski J (2010) Effect of high hydrostatic pressure on hydration and activity of ribozymes. *Mol Biol Rep* 37: 3713-3719
141. Glover K, Spencer DF, Gray MW. (2000) Identification and structural characterization of nucleus-encoded transfer RNAs imported into wheat mitochondria. *J. Biol. Chem.* 276:639–48
142. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, Hirano M, Koga Y, McFarland R, Suomalainen A, Thorburn DR, Zeviani M, Turnbull DM (2016) Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2: 16080.
143. Gorman GS, Schaefer AM, Ng Y, Gomez N, Blakely EL, Alston CL, Feeney C, Horvath R, Yu-Wai-Man P, Chinnery PF, Taylor RW, Turnbull DM, McFarland R (2015) Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* 77: 753-759.
144. Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16080.
145. Gorman, G.S., Schaefer, A.M., Ng, Y., Gomez, N., Blakely, E.L., Alston, C.L., Feeney, C., Horvath, R., Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., McFarland, R. (2015). Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann. Neurol.* 77, 753–759.
146. Goswami S, Dhar G, Mukherjee S, Mahata B, Chatterjee S, et al. (2006) A bifunctional tRNA import receptor from *Leishmania* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:8354–59.
147. Gowher A., Smirnov A., Tarassov I., Entelis N. (2013). Induced tRNA import into human mitochondria: Implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase. *PLoS One.* 8, e66228.
148. Gray J.C., Sullivan J.A., (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 (1429): 135-144.

149. Gray M.W., Burger G., (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol* 2(6): 1011-1018.
150. Gray MW, Burger G, Lang BF. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:1476–81.
151. Greaves, L.C., Reeve, A.K., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., (2012). Mitochondrial DNA and disease. *J. Pathol.* 226, 274–286.
152. Gustafsson C.M., Falkenberg M., (2016) Maintenance and expression of mammalian mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 85: 133-160.
153. Gustincich S, Zucchelli S, Mallamaci A. (2017) The Yin and Yang of nucleic acid-based therapy in the brain. *Prog Neurobio.* 2017;155:194-211.
154. Hammani, K., and Giegé, P. (2014). RNA metabolism in plant mitochondria. *Trends Plant Sci.* 19: 380–389.
155. Hammann C, Lilley DM (2002) Folding and activity of the hammerhead ribozyme. *Chembiochem* 3: 690-700
156. Hashimoto M, Bacman SR, Peralta S, Falk MJ, Chomyn A, Chan DC, Williams SL, Moraes CT (2015) MitoTALEN: a general approach to reduce mutant mtDNA loads and restore oxidative phosphorylation function in mitochondrial diseases. *Mol Ther* 23(10):1592–1599.
157. Hashimoto, M., Bacman, S.R., Peralta, S., Falk, M.J., Chomyn, A., Chan, D.C., Williams, S.L., and Moraes, C.T. (2015). MitoTALEN: A general approach to reduce mutant mtDNA loads and restore oxidative phosphorylation function in mitochondrial diseases. *Mol. Ther.* 23, 1592–1599.
158. Hayashi, K., and Saitou, M. (2013). Generation of eggs from mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* 8, 1513–1524.
159. Herbert, M., and Turnbull, D. (2015). Mitochondrial replacement to prevent the transmission of mitochondrial DNA disease. *EMBO Rep.* 16, 539–540.
160. Herschlag D (1995) RNA chaperons and the RNA foldin problem. *J Biol Chem* 270: 20871-20874.
161. Herschlag D, Khosla M, Tsuchihashi Z, Karpel RL (1994) An RNA chaperone activity of non-specific RNA binding proteins in hammerhead ribozyme catalysis. *EMBO J* 13: 2913-2924.
162. Hertel KJ, Herschlag D, Uhlenbeck OC (1996) Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *EMBO J* 15: 3751-3757
163. Hertel,K.J., Herschlag,D. and Uhlenbeck,O.C. (1996) Specificity of hammerhead ribozyme cleavage. *EMBO J.*, 15, 3751–3757.
164. Holec,S., Lange,H., Canaday,J. and Gagliardi,D. (2008) Coping with cryptic and defective transcripts in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 1779, 566–573.
165. Holt IJ, Harding AE, Petty RK, Morgan-Hughes JA (1990) A new mitochondrial
166. Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmann W. (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135:462–74.
167. Huang, H.-R., Rowe, C.E., Mohr, S., Jiang, Y., Lambowitz, A.M., and Perlman, P.S. (2005). The splicing of yeast mitochondrial group I and group II introns requires a DEAD-box protein with RNA chaperone function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 163–168.

168. Hung MC, Link W (2011) Protein localization in disease and therapy. *J Cell Sci* 124: 3381-3392.
169. Inak G., Rybak-Wolf A., Lisowski P., M. Pentimalli T., Jüttner R., Glažar P., Uppal K., Bottani E., Brunetti D., Secker C., Zink A., Meierhofer D., Henke M., Dey M., Ciptasari U., Mlody B., Hahn T., Berruezo-Llacuna M., Karaiskos N., Di Virgilio M., Mayr J., Wortmann S., Priller J., Gotthardt M., Jones D., Mayatepek E., Stenzel W., Diecke S., Kuhn R., Wanker E., Rajewsky N., Schuelke M., Prigione A. (2021). Defective metabolic programming impairs early neuronal morphogenesis in neural cultures and an organoid model of Leigh syndrome. *Nature Communications*, 12: 1929.
170. Islam, M.N., Das, S.R., Emin, M.T., Wei, M., Sun, L., Westphalen, K., Rowlands, D.J., Quadri, S.K., Bhattacharya, S., and Bhattacharya, J. (2012). Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat. Med.* 18, 759–765.
171. Janssen MCH, Koene S, de Laat P, Hemelaar P, Pickkers P, Spaans E, Beukema R, Beyrath J, Groothuis J, Verhaak C, Smeitink J (2018) The KHENERGY Study: Safety and Efficacy of KH176 in Mitochondrial m.3243A>G Spectrum Disorders. *Clin Pharmacol Ther* doi: 10.1002/cpt.1197
172. Jayashankar, V., Mueller, I.A. & Rafelski, S.M., (2016) Shaping the multi-scale architecture of mitochondria. *Curr Opin Cell Biol*, 38, 45-51.
173. Jeandard D., Smirnova A., Tarassov I., Barrey E., Smirnov A., Entelis N. (2019). Import of non-coding RNAs into human mitochondria: A critical review and emerging approaches. *Cells*. 8, 1–27.
174. Jenkins, B.D., Kulhanek, D.J., and Barkan, A. (1997). Nuclear mutations that block group II RNA splicing in maize chloroplasts reveal several intron classes with distinct requirements for splicing factors. *Plant Cell* 9: 283–296.
175. Jonlin EC (2020) Informed consent for human embryo genome editing. *Stem Cell Rep* 14(4):530–537.
176. Kamenski P., Kolesnikova O., Jubenot V., Entelis N., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Tarassov I. (2007). Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol. Cell*. 26, 625–637.
177. Kamenski P., Smirnova E., Kolesnikova O., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. (2010). tRNA mitochondrial import in yeast: Mapping of the import determinants in the carrier protein, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase. *Mitochondrion*. 10, 284–293.
178. Kamenskia P. A., Krasheninnikova I. A., Tarassov I. (2019). 40 Years of Studying RNA Import into Mitochondria: From Basic Mechanisms to Gene Therapy Strategies. *Russian in Molekulyarnaya Biologiya*, 2019, Vol. 53, No. 6, pp. 924–932.
179. Karicheva O.Z., Kolesnikova O.A., Schirtz T., Vysokikh M.Y., Mager-Heckel A.M., Lombes A., Boucheham A., Krasheninnikov I.A., Martin R.P., Entelis N., Tarassov I. (2011). Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res.* 39, 8173–8186.

180. Kazakova H.A., Entelis N.S., Martin R.P., Tarassov I.A. (1999). The aminoacceptor stem of the yeast tRNA^{Lys} contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett.* 442, 193–197.
181. Ke A, Zhou K, Ding F, Cate JH, Doudna JA. (2004) A conformational switch controls hepatitis delta virus ribozyme catalysis. *Nature.* 429:201–205.
182. Keene, J.D., Komisarow, J.M., and Friedersdorf, M.B. (2006). RIPChip: the isolation and identification of mRNAs, microRNAs and protein components of ribonucleoprotein complexes from cell extracts. *Nat. Protoc.* 1: 302–307.
183. Keren, I., Bezawork-Geleta, A., Kolton, M., Maayan, I., Belausov, E., Levy, M., Mett, A., Gidoni, D., Shaya, F., and Ostersetzer-Biran, O. (2009). AtnMat2, a nuclear-encoded maturase required for splicing of group-II introns in Arabidopsis mitochondria. *RNA* 15: 2299–2311.
184. Keren, I., Tal, L., des Francs-Small, C.C., Araújo, W.L., Shevtsov, S., Shaya, F., Fernie, A.R., Small, I., and Ostersetzer-Biran, O. (2012). nMAT1, a nuclear-encoded maturase involved in the transsplicing of nad1 intron 1, is essential for mitochondrial complex I assembly and function. *Plant J.* 71: 413–426.
185. Kerr DS (2010) Treatment of mitochondrial electron transport chain disorders: a review of clinical trials over the past decade. *Mol Genet Metab* 99: 246-255.
186. Khvorova A, Lescoute A, Westhof E, Jayasena SD (2003) Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat Struct Biol* 10: 708-712
187. King MP, Attardi G (1996) Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* 264: 304-313.
188. Kinjo AR, Takada S (2003) Competition between protein folding and aggregation with molecular chaperones in crowded solutions: insight from mesoscopic simulations. *Biophys J* 85: 3521-3531.
189. Kirino Y., Goto Y., Campos Y., Arenas J., Suzuki T. (2005). Specific correlation between the wobble modification deficiency in mutant tRNAs and the clinical features of a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7127–7132.
190. Kirino Y., Yasukawa T., Ohta S., Akira S., Ishihara K., Watanabe K., Suzuki T. (2004). Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 15070–15075.
191. Kiss T, Filipowicz W. (1992) Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells. *Cell* 70:11–16.
192. Kobayashi H., Eckhardt S.G., Lockridge J.A., et al. (2005). Safety and pharmacokinetic study of RPI.4610 (ANGIOZYME), an anti-VEGFR-1 ribozyme, in combination with carboplatin and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*; 56(4): 329-36.
193. Koilkonda RD, Guy J (2011) Leber's Hereditary Optic Neuropathy-Gene Therapy: From Benchtop to Bedside. *J Ophthalmol* 2011: 179412.
194. Kolesnikova O., Entelis N., Kazakova H., Brandina I., Martin R.P., Tarassov I. (2002). Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion.* 2, 95–107.

195. Kolesnikova O., Kazakova H., Comte C., Steinberg S., Kamenski P., Martin R.P., Tarassov I., Entelis N. (2010). Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*. 16, 926–941.
196. Kolesnikova O.A., Entelis N.S., Jacquin-Becker C., Goltzene F., Chrzanowska-Lightowlers Z.M., Lightowlers R.N., Martin R.P., Tarassov I. (2004). Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum. Mol. Genet.* 13, 2519–2534.
197. Kolesnikova O.A., Entelis N.S., Mireau H., Fox T.D., Martin R.P., Tarassov I.A. (2000). Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science*. 289, 1931–1933.
198. Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, Goltzene F, Chrzanowska-Lightowlers ZM, et al. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum. Mol. Genet.* 13:2519–34.
199. Kolesnikova OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA. (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 289:1931–33.
200. Koyanagi, M., Brandes, R.P., Haendeler, J., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2005). Cell-to-cell connection of endothelial progenitor cells with cardiac myocytes by nanotubes: a novel mechanism for cell fate changes? *Circ. Res.* 96, 1039–1041.
201. Krishnan A., Mishra D., (2020) Antisense oligonucleotides: a unique treatment approach. *Indian Pediatr* 57(2): 165-171.
202. Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., Turnbull, D.M., (2008) What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat. Genet.* 40, 275–279.
203. Krishnan, K.J., Turnbull, D.M., (2010) Mitochondrial DNA and genetic disease. *Essays In Biochemistry* 47, 139–151.
204. Kubo,T. and Newton,K.J. (2008) Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. *Mitochondrion*, 8, 5–14.
205. Kucharczyk R, Rak M, di Rago JP (2009) Biochemical consequences in yeast of the human mitochondrial DNA 8993T>C mutation in the ATPase6 gene found in NARP/MILS patients. *Biochim Biophys Acta* 1793: 817-824.
206. Kumar P., Sood V., Vyas R., Gupta N., Banerjea A. C., Khanna M. (2010). Potent inhibition of influenza virus replication with novel siRNA-chimeric-ribozymes constructs. *Antiviral Res.*, 87, 206-212
207. Kumar R, Marechal-Drouard L, Akama K, Small I. (1996) Striking differences in mitochondrial tRNA import among different plant species. *Mol. Gen. Genet.* 252:404–11.
208. Kurreck J., (2003) Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270(8): 1378-1398.
209. Kyriakouli DS, Boesch P, Taylor RW, Lightowlers RN (2008) Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15: 1017-1023.

210. Lambowitz, A.M., and Zimmerly, S. (2011). Group II introns: mobile ribozymes that invade DNA. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a003616.
211. Lang B.F., Burger G., (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature*, 387 (6632): 493-497.
212. Lang B.F., Gray M.W., (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 351-397.
213. Leclerc F (2010) Hammerhead ribozyme: true metal or nucleobase catalysis? Where is the catalytic power from? *Molecules* 15: 5389-5407
214. Leclerc F (2010) Hammerhead ribozyme: true metal or nucleobase catalysis? Where is the catalytic power from? *Molecules* 15: 5389-5407.
215. Lee J. S. et al. (2020). Genetic heterogeneity in Leigh syndrome: highlighting treatable and novel genetic causes. *Clin. Genet.* 97, 586–594.
216. Lee T.S., Giambasu G.M., Sosa C.P., Martick M., Scott W.G., York D.M. (2009). Threshold occupancy and specific cation binding modes in the „hammerhead” ribozyme active site are required for active conformation. *J. Mol. Biol.*, 388, 195-206
217. Lee TS, Giambaşu G, Harris ME, York DM (2011) Characterization of the Structure and Dynamics of the HDV Ribozyme at Different Stages Along the Reaction Path. *J Phys Chem Lett* 2: 2538-2543
218. Li H, Yang Y, Hong W, Huang M, Wu M, Zhao X (2020) Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduct Target Ther* 5(1):1.
219. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., et al. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein Cell* 6, 363–372.
220. Liere, K., Weihe, A., and Börner, T. (2011). The transcription machineries of plant mitochondria and chloroplasts: Composition, function, and regulation. *J. Plant Physiol.* 168: 1345–1360.
221. Liesa, M. & Shirihai, O.S., (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 17, 491-506.
222. Lightowers R, Taylor R, Turnbull D (2015) Mutations causing mitochondrial disease: what is new and what challenges remain? *Sci-ence* 349: 1494-1499.
223. Lithgow T, Schneider A. (2010) Evolution of macromolecular import pathways in mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* 365:799–817.
224. Loutre R., Heckel A.M., Smirnova A., Entelis N., Tarassov I. 2018. Can mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and contra. *IUBMB Life.* 70, 1233–1239.
225. Lund E, Dahlberg JE. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science* 282:2082–84.
226. Ma, H., Folmes, C.D., Wu, J., Morey, R., Mora-Castilla, S., Ocampo, A., Ma, L., Poulton, J., Wang, X., Ahmed, R., et al. (2015a). Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature* 524, 234–238.
227. Ma, J., Purcell, H., Showalter, L., and Aagaard, K.M. (2015b). Mitochondrial DNA sequence variation is largely conserved at birth with rare de novo mutations in neonates. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 212, 530.e1–530.e8.

228. Magalhaes PJ, Andreu AL, Schon EA. (1998) Importation of 5S rRNA into human mitochondria in vivo. *Mol. Biol. Cell* 9:2375–82.
229. Mahata B, Bhattacharyya SN, Mukherjee S, Adhya S. (2004) Correction of translational defects in patient-derived mutant mitochondria by complex-mediated import of a cytoplasmic tRNA. *J. Biol. Chem.* 280:5141–44.
230. Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, Bandyopadhyay A, Adhya S. (2006) Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* 314:471–74.
231. Malecki MT, Skupien J, Klupa T, Naskalska A, Gorczynska-Kosiorz S, Moczulski DK, Sieradzki J (2006) Maternally inherited diabetes with deafness and obesity: body weight reduction response to treatment with insulin analogues. *Rev Diabet Stud* 3: 205-7.
232. Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF (2002) Leber hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 39: 162-9.
233. Mannella, C.A., (2006) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta*, 1762, 140-7.
234. Marienfeld J, Unseld M, Brennicke A. (1999) The mitochondrial genome of *Arabidopsis* is composed of both native and immigrant information. *Trends Plant Sci.* 12:495–502
235. Martick M., Lee T.S., York D.M., Scott W.G. (2008). Solvent structure and „hammerhead” ribozyme catalysis. *Chem Biol*, 15, 332-342
236. Martick M., Scott W. G. (2006). Tertiary contacts distant from the active site prime a ribozyme for catalysis. *Cell*, 126, 309-320
237. Martin R.P., Schneller J.M., Stahl A.J., Dirheimer G. (1979). Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysineaccepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry.* 18, 4600–4605.
238. Matsuda D., Dreher T.W. (2004). The tRNA-like structure of Turnip yellow mosaic virus RNA is a 3'-translational enhancer. *Virology* 321(1): 36-46.
239. Mattiazzi M, Vijayvergiya C, Gajewski CD, DeVivo DC, Lenaz G, Wiedmann M, Manfredi G (2004) The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. *Hum Mol Genet* 13: 869-879.
240. Mayr JA, Havlickova V, Zimmermann F, Magler I, Kaplanova V, Jesina P, Pecinova A2, Nuskova H, Koch J, Sperl W, Houstek J (2010) Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Human Molecular Genetics* 19: 3430–3439
241. McCormack J.C. (2007). An internal tRNA-like structure regulates the life cycle of a plus-sense RNA virus, University of Maryland, College Park.
242. McKinney E.A., Oliveira M.T., (2013) Replicating animal mitochondrial DNA. *Genet Mol Biol* 36(3); 308-315
243. Miller CM, Harris EN. (2016) Antisense oligonucleotides: Treatment strategies and cellular internalization. *RNA Dis* ;3:4.
244. Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P., and Klug, A. (2006). Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 19689–19694.

245. Minczuk, M., Papworth, M.A., Miller, J.C., Murphy, M.P., and Klug, A. (2008). Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.* 36, 3926–3938.
246. Mingjie Li, Haitang Li And John J. Rossi (2006). RNAi in Combination with a Ribozyme and TAR Decoy for Treatment of HIV Infection in Hematopoietic Cell Gene Therapy. *New York Academy of Science*, 1082, 172-179
247. Monia B.P., Lesnik E.A., Gonzalez C., Lima W.F., McGee D., Guinosso C.J., Kawasaki A.M., Cook P.D., Freier S.M., (1993) Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression. *J Biol Chem* 268(19): 14151-14522.
248. Mooney MR, Davis EE, Katsanis N (2019) Analysis of single nucleotide variants in CRISPR-Cas9 edited zebrafish exomes shows no evidence of offtarget inflation. *Front Genet* 10.
249. Mootha VK, Bunkenborg J, Olsen JV, Hjerrild M, Wisniewski JR, Stahl E, Bolouri MS, Ray HN, Sihag S, Kamal M, Patterson N, Lander ES, Mann M (2003) Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115: 629-640.
250. Moraes, C.T. (2014). A magic bullet to specifically eliminate mutated mitochondrial genomes from patients' cells. *EMBO Mol. Med.* 6, 434–435.
251. Moraes, C.T. (2014). A magic bullet to specifically eliminate mutated mitochondrial genomes from patients' cells. *EMBO Mol. Med.* 6, 434–435.
252. Moraes, C.T., Dey, R., and Barrientos, A. (2001). Transmitochondrial technology in animal cells. *Methods Cell Biol.* 65, 397–412.
253. Moraes, C.T., Srivastava, S., Kirkinezos, I., Oca-Cossio, J., vanWaveren, C., Woischnick, M., Diaz, F., (2002) Mitochondrial DNA structure and function. In: *International Review of Neurobiology*. Elsevier, pp. 3–23.
254. Morava E, van den Heuvel L, Hol F, de Vries MC, Hogeveen M, Rodenburg RJ, Smeitink JA (2006) Mitochondrial disease criteria: diagnostics applications in children. *Neurology* 67: 1823-1826.
255. Mower J.P., Case A.L., (2012) Evidence against equimolarity of large repeat arrangements and a predominant master circle structure of the mitochondrial genome from a monkeyflower (*Mimulus guttatus*) lineage with cryptic CMS. *Genome Biol Evol* 4(5): 670-686.
256. Mulhbach J, St-Pierre P, Lafontaine DA (2010) Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches. *Curr Opin Pharmacol* 10: 551-556
257. Mulhbach J., St-Pierre P., Lafontaine D. (2010). Therapeutic application of ribozymes and riboswitches. *Current Opinion in Pharmacology*, 10, 551-556
258. Murphy R, Turnbull DM, Walker M, Hattersley AT (2008) Clinical features, diagnosis and management of maternally inherited diabetes and deafness (MIDD) associated with the 3243A>G mitochondrial point mutation. *Diabet Med* 25: 383-99.
259. Murray J.B., Seyhan A.A., Walter N.G., Burke J.M., Scott W.G. (1998). The „hammerhead”, hairpin and VS ribozymes are catalytically proficient in monovalent cations alone. *Chem Biol*, 5, 587-595

260. Nain V, Sahi S, Verma A (2010) CPP-ZFN: a potential DNA-targeting antimalarial drug. *Malar J* 9(1):258.
261. Nakano S, Karimata HT, Kitagawa Y, Sugimoto N (2009) Facilitation of RNA enzyme activity in the molecular crowding media of cosolutes. *J Am Chem Soc* 131: 16881-16888
262. Nelson JA, Uhlenbeck OC (2008) Hammerhead redux: Does the new structure fit the old biochemical data? *RNA* 14: 605-615
263. Nelson JA, Uhlenbeck OC (2008) Minimal and extended hammerheads utilize a similar dynamic reaction mechanism for catalysis. *RNA* 14: 43-54
264. Nelson, J.A., Shepotinovskaya, I. and Uhlenbeck, O.C. (2005) Hammerheads derived from sTRSV show enhanced cleavage and ligation rate constants. *Biochemistry*, 44, 14577–14585.
265. Nijtmans LG, Henderson NS, Attardi G, Holt IJ (2001) Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene. *J Biol Chem* 276: 6755-6762.
266. Nissen P, Ippolito JA, Ban N, Moore PB, Steitz TA (2001) RNA tertiary interactions in the large ribosomal subunit: the A-minor motif. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 4899-4903
267. O'Brien EA, Zhang Y, Wang E, Marie V, Badejoko W, et al. (2009) GOBASE: an organelle genome database. *Nucleic Acids Res.* 37:D946–50.
268. Odintsova M.S., Iurina N.P., (2002) The mitochondrial genome of protists. *Genetika* 38(6): 773-788.
269. Olmos PR, Borzone GR, Olmos JP, Diez A, Santos JL, Serrano V, Cataldo LR, Anabalón JL, Correa CH (2011) Mitochondrial diabetes and deafness: possible dysfunction of strial marginal cells of the inner ear. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 40: 93-103.
270. O'Rear JL, Wang S, Feig AL, Beigelman L, Uhlenbeck OC, Herschlag D (2001) Comparison of the hammerhead cleavage reactions stimulated by monovalent and divalent cations. *RNA* 7: 537-545
271. Ostersetzer-Biran, O. (2016). Respiratory complex I and embryo development. *J. Exp. Bot.* 67: 1205–1207.
272. Palmer T., Stansfeld P.J. (2020). Targeting of proteins to the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol.* May; 113(5):861-871.
273. Palmer, C.S., Osellame, L.D., Stojanovski, D. & Ryan, M.T., (2011) The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal*, 23, 1534-45.
274. Paris Z, Rubio MA, Lukes J, Alfonzo JD. (2009) Mitochondrial tRNA import in *Trypanosoma brucei* is independent of thiolation and the Rieske protein. *RNA* 15:1398–406.
275. Park JY, Moon BY, Park JW, Thornton JA, Park YH, Seo KS (2017) Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 7(1):44929.
276. Park, T.S., Galic, Z., Conway, A.E., Lindgren, A., van Handel, B.J., Magnusson, M., Richter, L., Teitell, M.A., Mikkola, H.K., Lowry, W.E., et al. (2009). Derivation of

- primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 27, 783–795.
277. Penedo, J.C., Wilson, T.J., Jayasena, S.D., Khvorova, A. and Lilley, D.M. (2004) Folding of the natural hammerhead ribozyme is enhanced by interaction of auxiliary elements. *RNA*, 10, 880–888.
 278. Perham M, Stagg L, Wittung-Stafshede P (2007) Macromolecular crowding increases structural content of folded proteins. *FEBS Lett* 581: 5065-5069.
 279. Perreault J., Weinberg Z., Roth A., Popescu O., Chartrand P., Ferbeyre G., Breaker R.R., (2011) Identification of „hammerhead” ribozymes in all domains of life reveals novel structural variations. *PLoS Computational Biology*, 7
 280. Perrotta AT, Been MD. (1996) Core sequences and a cleavage site wobble pair required for HDV antigenomic ribozyme self-cleavage. *Nucleic Acids Res.* 24:1314–1321.
 281. Persson, T., Hartmann, R.K. and Eckstein, F. (2002) Selection of hammerhead ribozyme variants with low Mg²⁺-requirement: importance of stem-loop II. *Chembiochem.*, 3, 1066–1071.
 282. Piotrowska A, Jankauskaite E, Bartnik E (2016) Choroby mitochondrialne. *Postępy Biochem* 62: 111-115.
 283. Pley HW, Flaherty KM, McKay DB (1994) Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372: 68-74
 284. Prakash TP, Graham MJ, Yu J, Carty R, Low A, Chappell A., (2014) Targeted delivery of antisense oligonucleotides to hepatocytes using triantennary N-acetyl galactosamine improves potency 10-fold in mice. *Nucleic Acids Res.* 42:8796-807.
 285. Przybilski R, Hammann C (2007) The tolerance to exchanges of the Watson-Crick base pair in the hammerhead ribozyme core is determined by surrounding elements. *RNA* 13: 1625-1630
 286. Puranam RS, Attardi G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol. Cell. Biol.* 21:548–61.
 287. Puria R, Sahi S, Nain V (2012) HER21 breast cancer therapy: by CPP-ZFN mediated targeting of mTOR? *Technol Cancer Res Treat* 11(2):175–180.
 288. Pusnik M, Charrière F, Mäser P, Waller RF, Dagley MJ, et al. (2009) The single mitochondrial porin of *Trypanosoma brucei* is the main metabolite transporter in the outer mitochondrial membrane. *Mol. Biol. Evol.* 26:671–80.
 289. Reddy, P., Ocampo, A., Suzuki, K., Luo, J., Bacman, S.R., Williams, S.L., Sugawara, A., Okamura, D., Tsunekawa, Y., Wu, J., et al. (2015). Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell* 161, 459–469.
 290. Remes AM, Kärppä M, Moilanen JS, Rusanen H, Hassinen IE, Majamaa
 291. Rich A., (1962) On the problems of evolution and biochemical information transfer. In *horizons in biochemistry*. New York Academic Press, pp. 103-126.
 292. Richardson, J., Irving, L., Hyslop, L.A., Choudhary, M., Murdoch, A., Turnbull, D.M., and Herbert, M. (2015). Concise reviews: Assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Stem Cells* 33, 639–645.

293. Rinehart J., Krett B., Rubio M.A., Alfonzo J.D., Soll D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev.* 19, 583–592.
294. Rivas E, Eddy SR (1999) A dynamic programming algorithm for RNA structure prediction including pseudoknots. *J Mol Biol* 285: 2053-2068.
295. Rivas G, Ferrone F, Herzfeld J (2004) Life in a crowded world. *EMBO Rep* 5: 23-27.
296. Robb GB (2019) Genome editing with CRISPR-Cas: an overview. *Curr Protoc Essent Lab Tech* 19(1).
297. Rossi J.J., Sarver N. (1990). RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. *Biotechnol*, 8, 179-183
298. Rother M, Rother K, Puton T, Bujnicki JM (2011) RNA tertiary structure prediction with ModeRNA. *Brief Bioinform* 12: 601-613
299. Roychowdhury-Saha M, Roychowdhury S, Burke DH (2011) Conformational heterogeneity and the determinants of tertiary stabilization in the hammerhead ribozyme from *Dolichopoda* cave crickets. *RNA Biol* 8: 1-11
300. Roychowdhury-Saha M., Roychowdhury M., Burke D. H. (2011). Conformational heterogeneity and the determinants of tertiary stabilization in the hammerhead ribozyme from *Dolichopoda* cave crickets. *RNA Biol*, 8, 1-11
301. Rubin H. (2010). The primary role of intracellular free Mg^{2+} in regulation cell growth. *Cell Cycle*, 9:17, 3395-3400
302. Rubio M.A., Rinehart J.J., Krett B., Duvezin-Caubet S., Reichert A.S., Soll D., Alfonzo J.D. (2008). Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9186–9191.
303. RubioMA, Liu X, Yuzawa H, Alfonzo JD, Simpson L. (2000) Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae* RNA. *RNA* 6:988–1003.
304. RubioMA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, et al. (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:9186–91.
305. Sacconi S, Salviati L, Nishigaki Y, Walker WF, Hernandez-Rosa E, Trevisson E, Delplace S, Desnuelle C, Shanske S, Hirano M, Schon EA, Bonilla E, De Vivo DC, DiMauro S, Davidson MM (2008) A functionally dominant mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet* 17: 1814-1820.
306. Saksmerprome V, Roychowdhury-Saha M, Jayasena S, Khvorova A, Burke DH (2004) Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA* 10: 1916-1924
307. Saksmerprome,V., Roychowdhury-Saha,M., Jayasena,S., Khvorova,A. and Burke,D.H. (2004) Artificial tertiary motifs stabilize trans-cleaving hammerhead ribozymes under conditions of submillimolar divalent ions and high temperatures. *RNA*, 10, 1916–1924.
308. Salehi-Ashtiani K, Luptak A, Litovchick A, Szostak JW. (2006) A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science*. 313:1788–1792.
309. Salinas T, Duchêne AM, Maréchal-Drouard L. (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem. Sci.* 33:320–29.

310. Salinas T, Duchene AM, Delage L, Nilsson S, Glaser E, et al. (2006) The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:18362–67.
311. Salinas T., Duchene A.M., Delage L., Nilsson S., Glaser E., Zaepfel M., Marechal-Drouard L. (2006). The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 18362–18367.
312. Salinas-Giege T., Giege R. (2015). tRNA biology in mitochondria. *Int J Mol Sci* 16(3): 4518-4559.
313. Sandberg J.A., Rossi S.J., Gordon G.S., et al. (2001). Safety analysis of a phase I study of heptazyme (tm), a nuclease resistant ribozyme targeting hepatitis c (hcv) rna. *Hepatology*; 34 (4 Pt 2): 646.
314. Schekman R. (2010) Editorial expression of concern: a bifunctional tRNA import receptor from *Leishmania* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:9476.
315. Scherer LJ, Rossi JJ (2003) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol* 21: 1457-1465
316. Scherer,L.J. and Rossi,J.J. (2003) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat. Biotechnol.*, 21, 1457–1465.
317. Scherr M, Grez M, Ganser A, Engels JW (1997) Specific hammerhead ribozyme-mediated cleavage of mutant N-ras mRNA in vitro and ex vivo. *J Biol Chem* 272: 14304-14313
318. Schmitz-Linneweber, C., Lampe, M.-K., Sultan, L.D., and Ostersetzer-Biran, O. (2015). Organellar maturases: A window into the evolution of the spliceosome. *Biochim. Biophys. Acta* 1847: 798–808.
319. Schmitz-Linneweber, C., Williams-Carrier, R., and Barkan, A. (2005). RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17: 2791–2804.
320. Schnabl J, Sigel RKO (2010) Controlling ribozyme activity by metal ions. *Curr Op in Chem Biol* 14: 269-275
321. Schneider A, Marechal-Drouard L. (2000) Mitochondrial tRNA import: Are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol.* 10:509–13.
322. Schneider A., (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu Rev Biochem* 80:1033-1053.
323. Schon EA, DiMauro S, Hirano M, Gilkerson RW (2010) Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Trends Mol Med* 16: 268-276.
324. Scott A.S., Cochrane C.J. (2007). RNA catalysis: ribozymes, ribosomes and riboswitches. *Current option in structural Biology*, 11, 636-643
325. Scott W.G. (2007). Ribozymes. *Current option in structural Biology*, 17, 280-286
326. Scott W.G., Ferre-D'Amare A.R. (2011). Small self-cleaving ribozymes. Cold Spring Harbor Laboratory Press
327. Scott WG (2010) What can the new hammerhead ribozyme structures teach us about design? RNA technologies and their applications. Eds: VA Erdmann, J Barciszewski; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 305-323

328. Scott WG, Finch JT, Klug A (1995) The crystal structure of an all-RNA hammerhead ribozyme: a proposed mechanism for RNA catalytic cleavage. *Cell* 81: 991-1002
329. Scott WG, Martick M, Chi Y (2009) Structure and function of regulatory RNA elements: ribozymes that regulate gene expression. *Biochim Biophys Acta* 1789: 634-641
330. Scott WG, Murray JB, Arnold JR, Stoddard BL, Klug A (1996) Capturing the structure of a catalytic RNA intermediate: the hammerhead ribozyme. *Science* 274: 2065-2069
331. Seehafer C, Kalweit A, Steger G, Graf S, Hammann C. (2011) From alpaca to zebrafish: hammerhead ribozymes wherever you look. *RNA*. 17:21–26.
332. Settles, A.M., Yonetani, A., Baron, A., Bush, D.R., Cline, K., Martienssen, R., (1997). Secindependent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* 278, 1467–1470.
333. Shao Y., Wu S., Chan C.Y., Klapper R.J., Schneider E., Ding Y. (2007). A structural analysis of in vitro catalytic activities of „hammerhead” ribozymes. *BMC Bioinformatic*, 8:469
334. Shen X, Corey DR. (2018) Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Res.* 46:1584-600.
335. Shepotinovskaya I, Uhlenbeck OC (2010) Enhanced product stability in the hammerhead ribozyme. *Biochemistry* 49: 4494-4500
336. Sieber F., Duchene A.M. (2011). Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol* 287: 145-190.
337. Silverman S. K. (2008). Nucleic acid enzymes (ribozymes and deoxyribozymes): in vitro selection and application. *Wiley encyclopedia of chemical biology*. John Wiley & Sons, Inc.
338. Sioud M, Jespersen L (1996) Enhancement of hammerhead ribozyme catalysis by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* 257: 775-789.
339. Sloan D.B., Alverson A.J., (2012) Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. *PLoS Biol* 10(1): e1001241.
340. Small, I. (2013). Mitochondrial genomes as living ‘fossils’. *BMC Biol.* 11: 30.
341. Small, I.D., Rackham, O., and Filipovska, A. (2013). Organelle transcriptomes: products of a deconstructed genome. *Curr. Opin. Microbiol.* 16: 652–658.
342. Smet J, Seneca S, De Paepe B, Meulemans A, Verhelst H, Leroy J, De Meirleir L, Lissens W, Van Coster R (2009) Subcomplexes of mitochondria complex V reveal mutations in mitochondrial DNA. *Electrophoresis* 30: 3565-3572.
343. Smirnov A, Tarassov I, Mager-Heckel AM, Letzelter M, Martin RP, et al. (2008) Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* 14:749–59.
344. Smirnova E.V., Chicherin I.V., Baleva M.V., Entelis N., Tarasov I., Kamenski P.A. 2016. Procedure for purification of recombinant preMsk1p from *E. coli* determines its properties as a factor of tRNA import into yeast mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 81 (10), 1081–1088.

345. Smith D.R., Hura J., (2010) Evolution of linear mitochondrial DNA in three known lineages of *Polytomella*. *Curr Genet* 56(5): 427-438.
346. Solaini G, Harris DA, Lenaz G, Sgarbi G, Baracca A (2008) The study of the pathogenic mechanism of mitochondrial diseases provides information on basic bioenergetics. *Biochim Biophys Acta* 1777: 941-945.
347. Srivastava, S., and Moraes, C.T. (2001). Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum. Mol. Genet.* 10, 3093–3099.
- 348.** Stage-Zimmermann T.K., Unhlenbeck O.C. (1998). „hammerhead” ribozyme kinetics. *RNA*, 4, 875-889
349. Stobart M. J., Simon S. L. R., Plewa M., Lamoureux L., Konx J. D. (2009). Efficient knockdown of human prnp mRNA expression levels using hybrid hammerhead ribozymes. *J Tox. Env. Health Part A*, 72, 1036-1039
350. Sultan D., Mileshina D., Grewe F., Rolle K., Abudraham S., Głodowicz P., Khan Niazi A., Keren I., Shevtsov S., Klipcan L., Barciszewski J., Mower J.P., Dietrich A., Ostersetzer-Biram O. (2016). The Reverse Transcriptase/RNA Maturase Protein MatR Is Required for the Splicing of Various Group II Introns in Brassicaceae Mitochondria. *Plant Cell*, 28: 2805-2829.
351. Sun L. Q., Cairns M. J., Saravolac E. G., Baker A., Gerlach W. L. (2000). Catalytic Nucleic Acids: From Lab To Applications. *Pharmacological Reviews*, 52, 325-347
352. Suyama Y. (1967). The origins of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry*. 6, 2829–2839.
353. Symons RH. Plant pathogenic RNAs and RNA catalysis. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:2683–2689.
354. Szczepanowska J, Zabłocki K, Duszyński J (2004) Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells. *FEBS Lett* 578: 316-322.
355. Tanaka, M., Borgeld, H.J., Zhang, J., Muramatsu, S., Gong, J.S., Yoneda, M., Maruyama, W., Naoi, M., Ibi, T., Sahashi, K., et al. (2002). Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease *SmaI* into mitochondria. *J. Biomed. Sci.* 9, 534–541.
356. Tanner NK, Schaff S, Thill G, Petit-Koskas E, Crain-Denoyelle AM, Westhof E. (1994) A three-dimensional model of hepatitis delta virus ribozyme based on biochemical and mutational analyses. *Curr Biol.* 4:488–498.
357. Tarassov I, Entelis N, Martin RP. (1995) Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 14:3461–71.
358. Tarassov I., Entelis N., Martin R.P. (1995). An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *J. Mol. Biol.* 245, 315–323.
359. Tarassov I., Entelis N., Martin R.P. (1995). Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.* 14, 3461–3471.

360. Tarassov I.A., Entelis N.S. (1992). Mitochondrially-imported cytoplasmic tRNA(Lys)(CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro targetting systems. *Nucleic Acids Res.* 20, 1277–1281.
361. Tarassov IA, Entelis NS. (1992) Mitochondrially-imported cytoplasmic lysine tRNA (CUU) of *Saccharomyces cerevisiae*: in vivo and in vitro targetting systems. *Nucleic Acids Res.* 20:1277–81.
362. Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2005). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat. Rev. Genet.* 6, 389–402.
363. Teh, B.E., French, C.T., Chen, Y., Chen, I.G.J., Wu, T.H., Sagullo, E., Chiou, P.Y., Teitell, M.A., Miller, J.F., and Gan, Y.H. (2014). Type three secretion system-mediated escape of *Burkholderia pseudomallei* into the host cytosol is critical for the activation of NFκB. *BMC Microbiol.* 14, 115.
364. Teslaa, T., and Teitell, M.A. (2015). Pluripotent stem cell energy metabolism: an update. *EMBO J.* 34, 138–153.
365. Thorburn DR, Rahman S (1993-2003) Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. *GeneReviews*
366. Thorburn, D.R. (2004). Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27, 349–362.
367. Tong M., Schiff E., Jensen D.M., et al. (2002). Preliminary analysis of a phase II study of heptazyme (tm), a nuclease resistant ribozyme targeting hepatitis c virus (hcv) rna. *Hepatology*; 36 (4 pt 2): 788.
368. Tonin Y., Heckel A.M., Dovydenko I., Meschaninova M., Comte C., Venyaminova A., Pyshnyi D., Tarassov I., Entelis N. (2014). Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA. *Biochimie.* 100, 192–199.
369. Townley-Tilson, W.H.D., Pendergrass, S.A., Marzluff, W.F., and Whitfield, M.L. (2006). Genome-wide analysis of mRNAs bound to the histone stem-loop binding protein. *RNA* 12: 1853–1867.
370. Tsao CY, Mendell JR, Bartholomew D (2001) High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes. *J Child Neurol* 16: 533-535.
371. Tschaharganeh DF, Lowe SW, Garippa RJ, Livshits G (2016) Using CRISPR/Cas to study gene function and model disease in vivo. *FEBS J* 283(17):3194– 3203.
372. Tsuchihashi Z, Khosla M, Herschlag D (1993) Protein enhancement of hammerhead ribozyme catalysis. *Science* 262: 99-102.
373. Uhlenbeck O.C., Shepotinovskaya I.V. (2008). Catalytic diversity of extended hammerhead ribozymes. *Biochemistry*, 47, 7034-7042
374. Uimonen S, Sorri M, Salmela PI, Karvonen SL, Karvonen SL (2003) Epidemiology of the mitochondrial DNA 8344A>G mutation for the myoclonus epilepsy and ragged red fibres (MERRF) syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74: 1158-1159.
375. Umeda N., Suzuki T., Yukawa M., Ohya Y., Shindo H., Watanabe K. (2005). Mitochondria-specific tRNAmodifying enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J. Biol. Chem.* 280, 1613–1624.

376. Val R, Wyszko E, Valentin C, Szymanski M, Cosset A, Alioua M, Dreher TW, Barciszewski J, Dietrich A (2011) Organelle trafficking of chimeric ribozymes and genetic manipulation of mitochondria. *Nucleic Acids Res* 39: 9262-9274
377. Vasileva, A., and Jessberger, R. (2005). Precise hit: adeno-associated virus in gene targeting. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 837–847.
378. Vereshchagina N.A., Konstantinov Yu.M., Kamenski P.A., Mazunin I.O. (2018). Import of proteins and nucleic acids into mitochondria. *Biochemistry (Moscow)*. 83 (6), 643–661.
379. Verma A. (2018) Recent advances in antisense oligonucleotide therapy in genetic neuromuscular diseases. *Ann Indian Acad Neurol* 21:3-7.
380. Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Mar'échal-Drouard L. (2009) Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Res.* 37:1521–28
381. Vithayathil, S.A., Ma, Y.W., and Kaiparettu, B.A. (2012). Transmitochondrial cybrids: tools for functional studies of mutant mitochondria. In *Mitochondrial Disorders*, L.-J.C. Wong, ed. (Humana Press), pp. 219–230.
382. Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W. & Reichert, A.S., (2006) Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*, 175, 237-47.
383. Vogel, G. (2014). Assisted reproduction. FDA considers trials of ‘three-parent embryos’. *Science* 343, 827–828.
384. Vyssokikh M.Y., Schirtz T., Kolesnikova O., Entelis N., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Tarassov I. (2012). Isoform porin 2 is involved in tRNA(Lys) transport from cytosol to mitochondria in yeast. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenergetics.* 1817, S124–S125.
385. Wadkins TS, Perrotta AT, Ferre-D’Amare AR, Doudna JA, Been MD. (1999) A nested double pseudoknot is required for self-cleavage activity of both the genomic and antigenomic hepatitis delta virus ribozymes. *RNA.* 5:720–727.
386. Wai, T. & Langer, T., (2016) Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*, 27, 105-17.
387. Wang X, Lavrov DV. (2008) Seventeen new complete mtDNA sequences reveal extensive mitochondrial genome evolution within the Demospongiae. *PLoS ONE* 3:e2723.
388. Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M., et al. (2010). PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* 142, 456–467.
389. Wang, G., Shimada, E., Zhang, J., Hong, J.S., Smith, G.M., Teitell, M.A., and Koehler, C.M. (2012). Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 4840–4845.
390. Wang, T., Sha, H., Ji, D., Zhang, H.L., Chen, D., Cao, Y., and Zhu, J. (2014). Polar body genome transfer for preventing the transmission of inherited mitochondrial diseases. *Cell* 157, 1591–1604.
391. Wang, Y., Cui, J., Sun, X., and Zhang, Y. (2011). Tunneling-nanotube development in astrocytes depends on p53 activation. *Cell Death Differ.* 18, 732–742.

392. Wang, Y.E., Marinov, G.K., Wold, B.J., and Chan, D.C. (2013). Genome-wide analysis reveals coating of the mitochondrial genome by TFAM. *PLoS ONE* 8, e74513.
393. Watts G (2012) Novel techniques for the prevention of mitochondrial DNA disorders: an ethical review. Nuffield Council on Bioethics. [Lon-dyn nuffieldbioethics.org/project/mitochondrial-dna-disorders](http://nuffieldbioethics.org/project/mitochondrial-dna-disorders)
394. Webb CHT, Luptak A. (2011) HDV-like self-cleaving ribozymes. *RNA Biol.*8: 719–727.
395. Webb C-HT, Riccitelli NJ, Ruminski DJ, Luptak A. (2009) Widespread occurrence of selfcleaving ribozymes. *Science*. 326:953.
396. Westermann, B., (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 872-84.
397. Wilkins, H.M., Carl, S.M., and Swerdlow, R.H. (2014). Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol.* 2C, 619–631.
398. Wochner A. (2011). Ribozyme-catalyzed transcription of an active Ribozyme. *Science*, 332, 209-212
399. Wojewoda M, Duszyński J, Szczepanowska J (2010) Antioxidant Demence systems and generation of reactive oxygen species in osteosarcoma cells with defective mitochondria: effect of selenium. *Biochim Biophys Acta* 1797: 890-896.
400. Wolf, D.P., and Mitalipov, S. (2014). Mitochondrial replacement therapies can circumvent mtDNA-based disease transmission. *Cell Metab.* 20, 6–8.
401. Woodson SA (2010) Taming free energy landscapes with RNA chaperons. *RNA Biol* 7: 677-686.
402. Wu WH, Tsai YT, Justus S et al (2018) CRISPR repair reveals causative mutation in a preclinical model of retinitis pigmentosa: a brief methodology. In: *Methods Mol. Biol.* Humana Press Inc., pp 191–205.
403. Wu, T.-H., Sagullo, E., Case, D., Zheng, X., Li, Y., Hong, J.S., Teslaa, T., Patananan, A.N., McCaffery, J.M., Niazi, K., et al. (2016). Mitochondrial transfer by photothermal nanoblade restores
404. Wu, T.H., Teslaa, T., Kalim, S., French, C.T., Moghadam, S., Wall, R., Miller, J.F., Witte, O.N., Teitell, M.A., and Chiou, P.Y. (2011). Photothermal nanoblade for large cargo delivery into mammalian cells. *Anal. Chem.* 83, 1321–1327.
405. Wu, T.H., Teslaa, T., Teitell, M.A., and Chiou, P.Y. (2010). Photothermal nanoblade for patterned cell membrane cutting. *Opt. Express* 18, 23153–23160.
406. Wu, Y.C., Wu, T.H., Clemens, D.L., Lee, B.Y., Wen, X., Horwitz, M.A., Teitell, M.A., and Chiou, P.Y. (2015). Massively parallel delivery of large cargo into mammalian cells with light pulses. *Nat. Methods* 12, 439–444.
407. Xu, J., Teslaa, T., Wu, T.H., Chiou, P.Y., Teitell, M.A., and Weiss, S. (2012). Nanoblade delivery and incorporation of quantum dot conjugates into tubulin networks in live cells. *Nano Lett.* 12, 5669–5672.
408. Yermovsky-Kammerer AE, Hajduk S. (1999) In vitro import of a nuclearly encoded tRNA into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Cell. Biol.* 19:6253–59.
409. Yoshionari S, Koike T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T, et al. (1994) Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett.* 338:137–42.

410. Yu, H., Koilkonda, R.D., Chou, T.H., Porciatti, V., Ozdemir, S.S., Chiodo, V., Boye, S.L., Boye, S.E., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., and Guy, J. (2012a). Gene delivery to mitochondria by targeting modified adenoassociated virus suppresses Leber's hereditary optic neuropathy in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E1238–E1247.
411. Yu, H., Ozdemir, S.S., Koilkonda, R.D., Chou, T.H., Porciatti, V., Chiodo, V., Boye, S.L., Hauswirth, W.W., Lewin, A.S., and Guy, J. (2012b). Mutant NADH dehydrogenase subunit 4 gene delivery to mitochondria by targeting sequence-modified adeno-associated virus induces visual loss and optic atrophy in mice. *Mol. Vis.* 18, 1668–1683.
412. Yurina N.P., Odintsova M.S., (2016) mitochondrial genome structure of photosynthetic eukaryotes. *Biochem (mosc)* 81(2): 101-113.
413. Yu-Wai-Man P, Chinnery PF (1993-2000) Leber Hereditary Optic Neuropathy. *GeneReviews*.
414. Zamaratski E., Pradeepkumar P.I., Chattopadhyaya J., (2001) A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods* 48(3): 189-208.
415. Zamecnik P.c., Stephenson M.L., (1978) Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 75(1): 280-284.
416. Zhang J, Liu H, Luo S, Lu Z, Chávez-Badiola A, Liu Z, Yang M, Merhi Z, Silber SJ, Munné S, Konstantinidis M, Wells D, Tang JJ, Huang T (2017) Live birth derived from oocyte spindle transfer to prevent mitochondrial disease. *Reprod Biomed Online* 34: 361-368.
417. Zhou L., Qin Z., Zhu, Y., He Z., Xu T., (2019). Current RNA-based Therapeutics in Clinical Trials. *Current Gene Therapy*, 19, 172-196.
418. Zick M., Rabl R. & Reichert A.S., (2009) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1793, 5-19.
419. Zimmerly, S., and Semper, C. (2015). Evolution of group II introns. *Mob. DNA* 6: 7.
420. Zmudjak, M., Colas des Francs-Small, C., Keren, I., Shaya, F., Belausov, E., Small, I., and Ostersetzer-Biran, O. (2013). mCSF1, a nucleus-encoded CRM protein required for the processing of many mitochondrial introns, is involved in the biogenesis of respiratory complexes I and IV in Arabidopsis. *New Phytol.* 199: 379–394.
421. Zoschke, R., Ostersetzer-Biran, O., Börner, T., and Schmitz- Linneweber, C. (2009). Analysis of the regulation of MatK gene expression. *Endocytobiosis Cell Res.* 19: 127–135.
422. Zuo, J., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2000). Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J.* 24: 265–273.