

Biologie rostlinné buňky

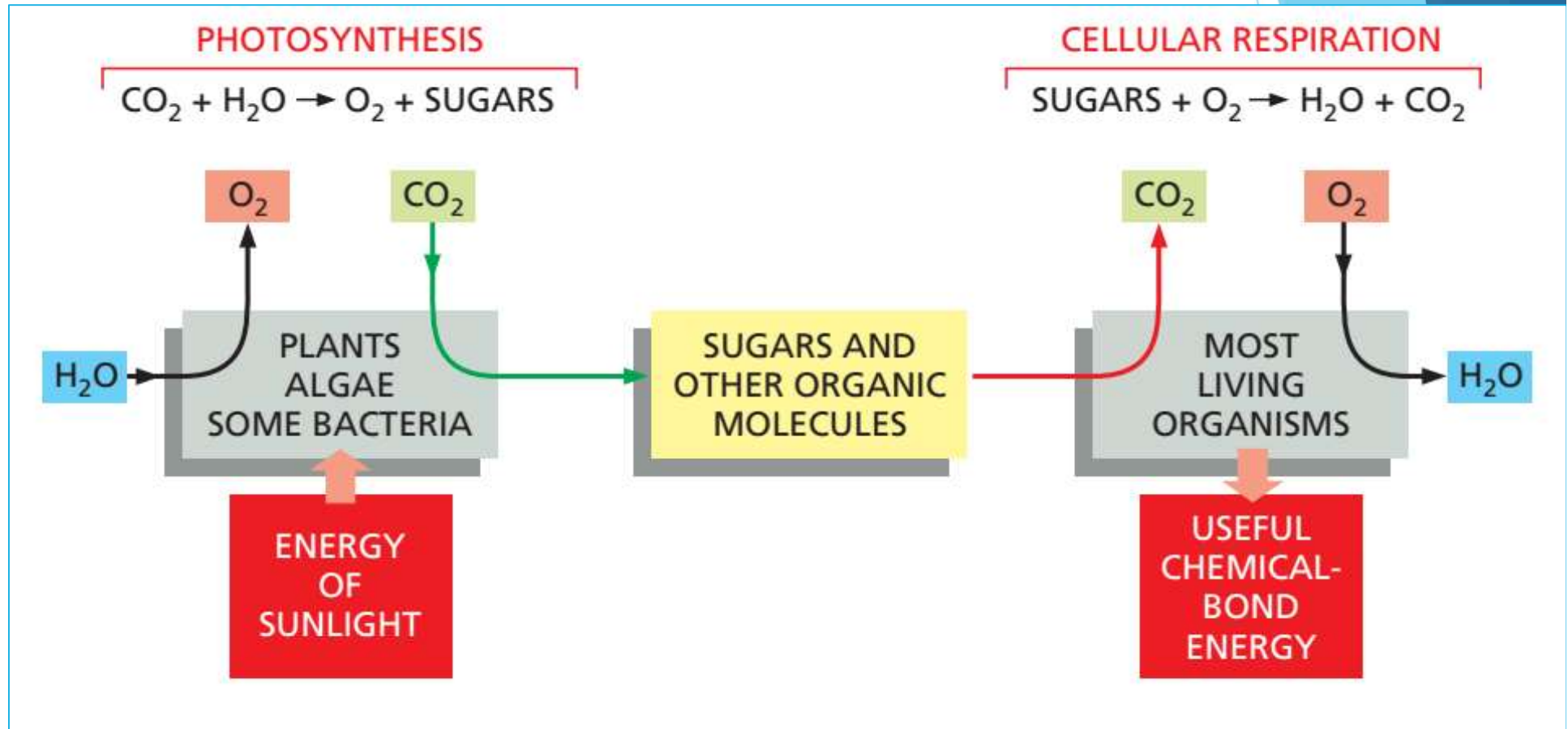


**Oddělení
experimentální
biologie rostlin**

8. Mitochondrie a peroxizómy

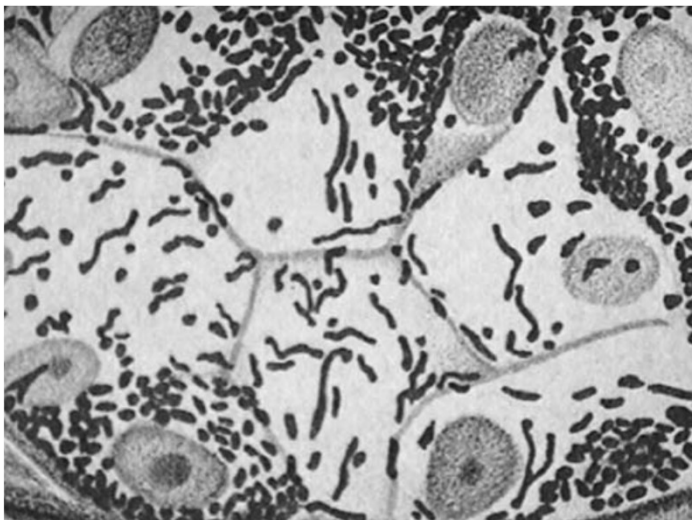
- ▶ **Objev mitochondrií a jejich funkce**
- ▶ **Struktura mitochondrií**
- ▶ **Izolace mitochondrií**
- ▶ **Složení mitochondrií**
- ▶ **Respirační procesy rostlin**
- ▶ **Bioenergetika respirace v mitochondriích**
 - ▶ **Citrátový (Krebsův) cyklus**
 - ▶ **Elektronový transportní řetěz a syntéza ATP**
- ▶ **Genetický systém mitochondrií**
- ▶ **Transport proteinů do mitochondrií**
- ▶ **Biogeneze mitochondrií**
- ▶ **Peroxisómy jsou multifunkční organely**
 - ▶ **Objev, vznik, složení, typy v rostlinách, funkce**
- ▶ **Olejová tělíska**

Fotosyntéza a respirace jsou komplementární procesy v živém světě



Objev mitochondrií a jejich funkce

- ▶ Robert Boyle v roce 1662 na základě svých experimentů dospěl k závěru, že vzduch je nezbytný pro dýchání, aby zvířata přežila...
- ▶ Stephen Hales (1727) navrhl, že vzduch může být důležitý i pro rostliny; po jejich spálení dospěl k zjištění, že se skládají ze vzduchu...
- ▶ Antoine Lavoisier (1789), zakladatel moderní chemie, věřil, že dýchání a spalování jsou *analogické reakce*, které potřebují O_2 a *kalorické* (spotřebují C, H) k výrobě CO_2 a H_2O a generování tepla - hlavní účel
- ▶ Na konci 19. století bylo jasné, že dýchání probíhá v každé buňce!
- ▶ strukturální studie mitochondrií začaly v mnoha typech buněk

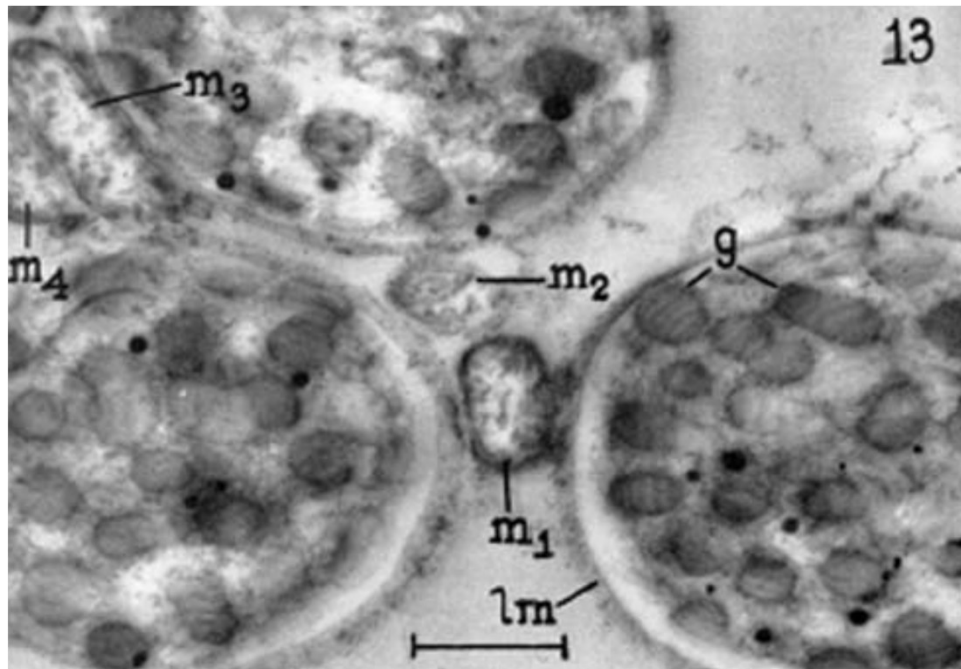


“Elementary organisms” v buňkách slizu žaludku kočky fixované směsí osmia
Altmann, R., 1890.

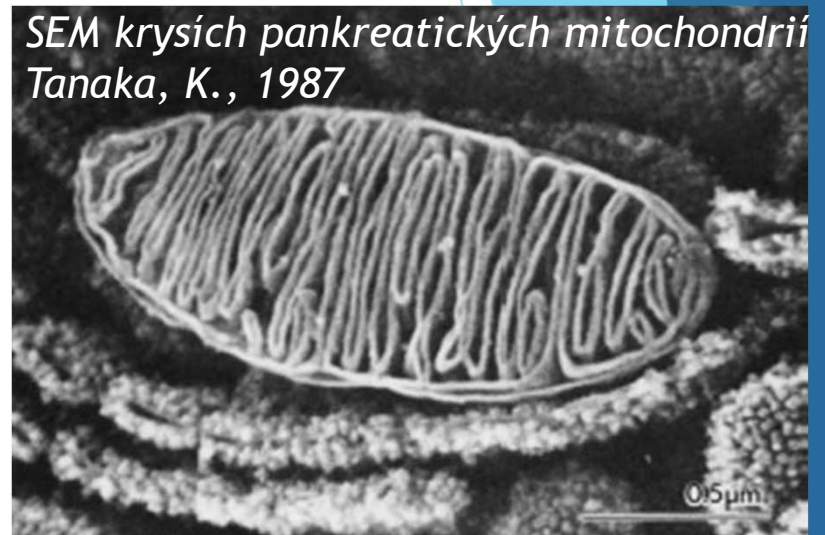
- ▶ 1899, cytoplazmatické vláknité granule s názvem „mitochondrie“
 - ▶ *mitos* z Řečtiny, znamená vlákno (thread)
 - ▶ *chondrin* z Řečtiny, znamená malé zrnko (a small grain)
- ▶ často mylně považovány za artefakt preparace, nikoli za skutečnou organelu...
- ▶ Kingbury (1912) navrhl, že mitochondrie byla dýchacím centrem buňky
 - ▶ schopnost mitochondrií oxidovat a redukovat různá barviva

Struktura mitochondrií

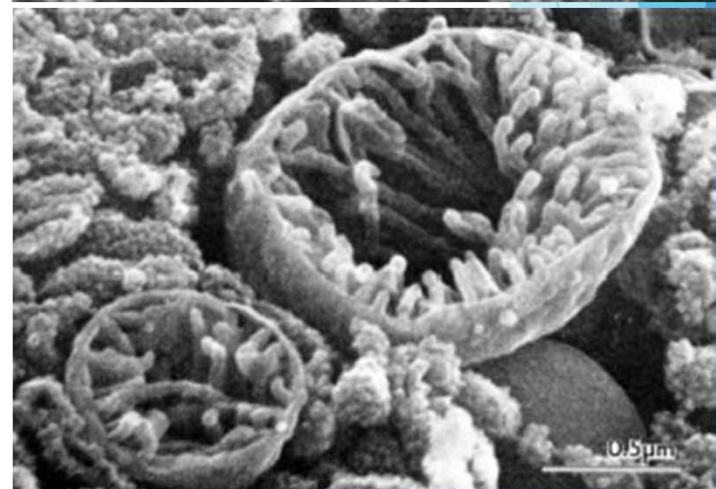
- ▶ Studie z elektronového mikroskopu ukázaly, že mitochondrie jsou membránou uzavřené organely; ultrastrukturu mitochondrií rostlin, živočichů a prvoků popsal George Palade v 1950 letech.



EM: tenký řez mitochondrií (m) v cytoplasmě buňky mezofylu tabáku. Chloroplasty obsahující membrány (lm) a grana (g). Palade, G.E., 1953.



*SEM krysích pankreatických mitochondrií
Tanaka, K., 1987*

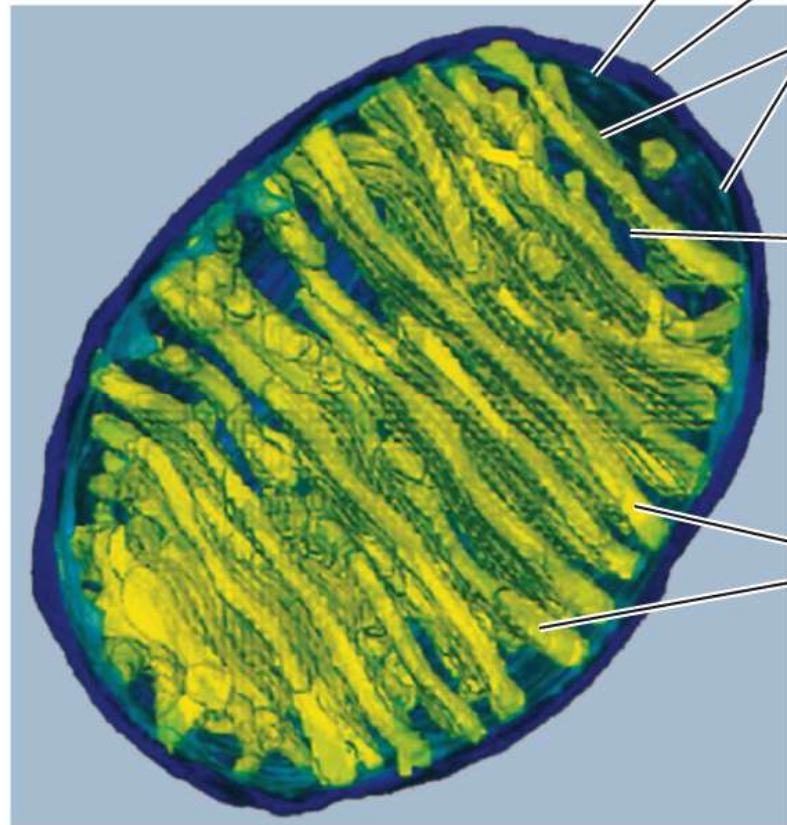


Struktura mitochondrií

► U živočichů: (A) 3D tomografický snímek mitochondrie kuřecího mozku

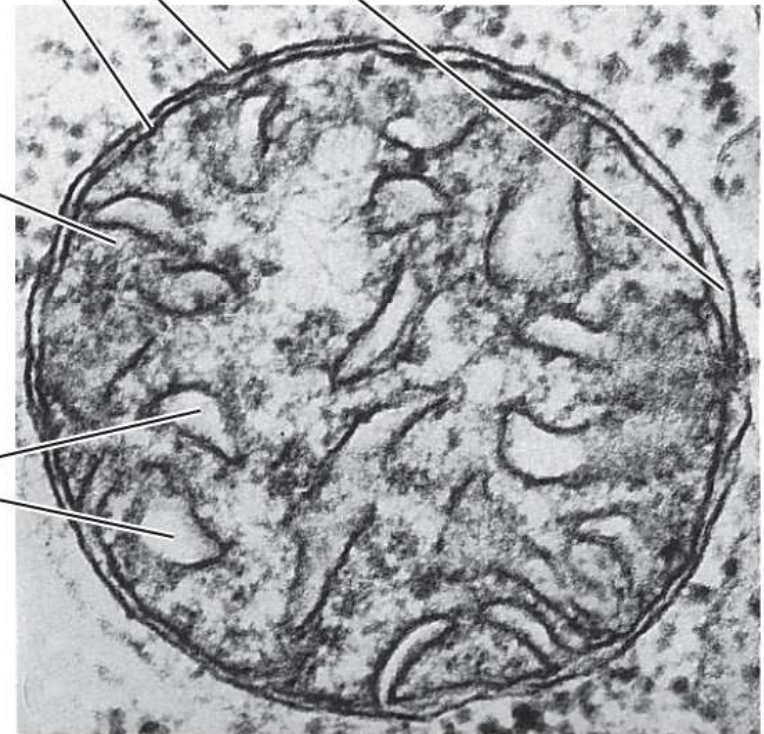
► U rostlin: (B) elektronová mikrofotografie mitochondrie bobu

(A)



0.5 μm

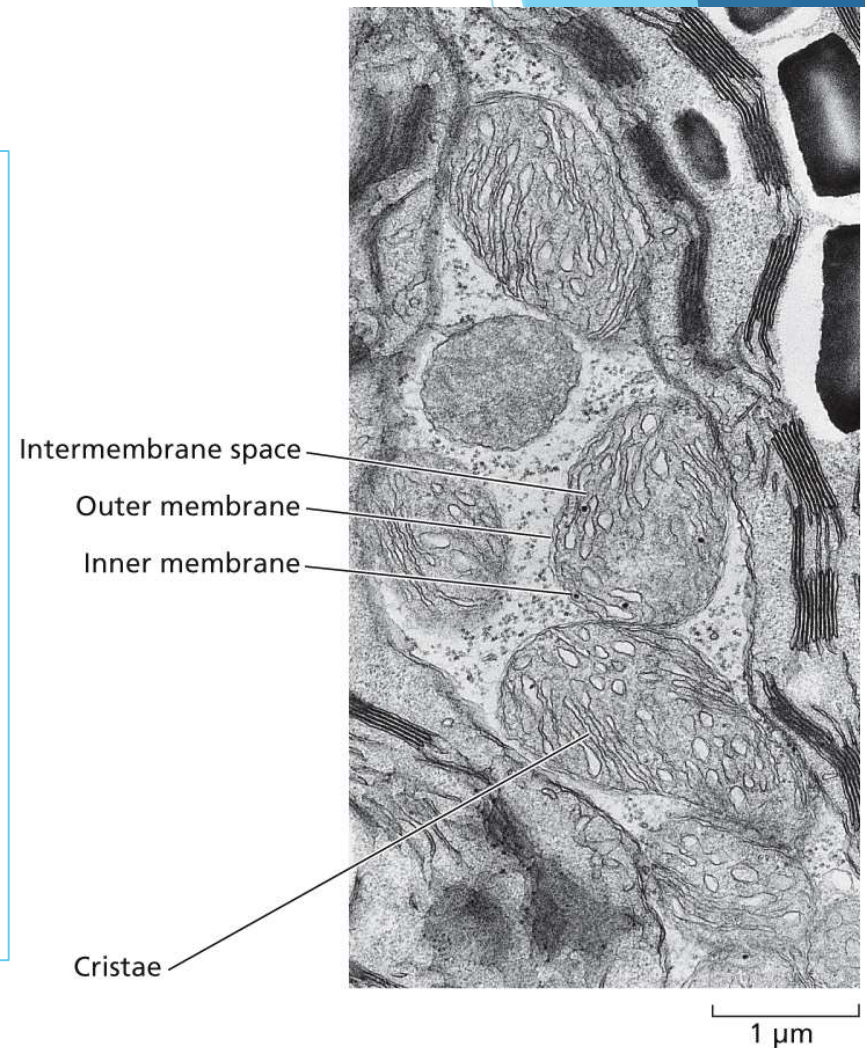
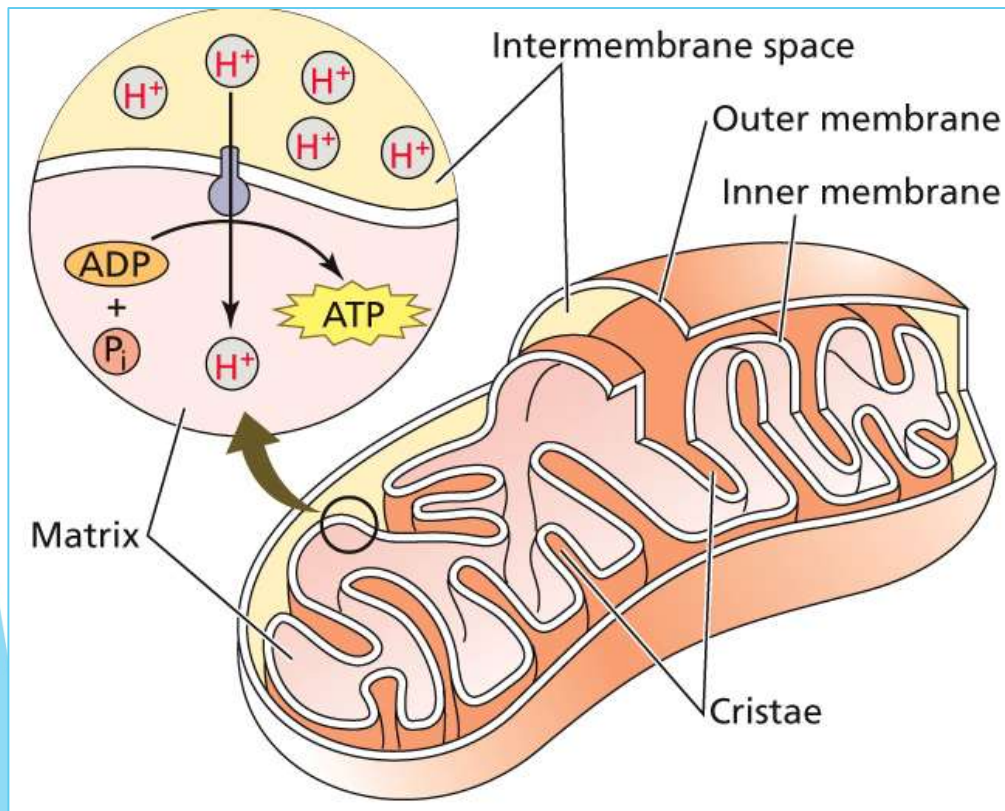
(B)



0.5 μm

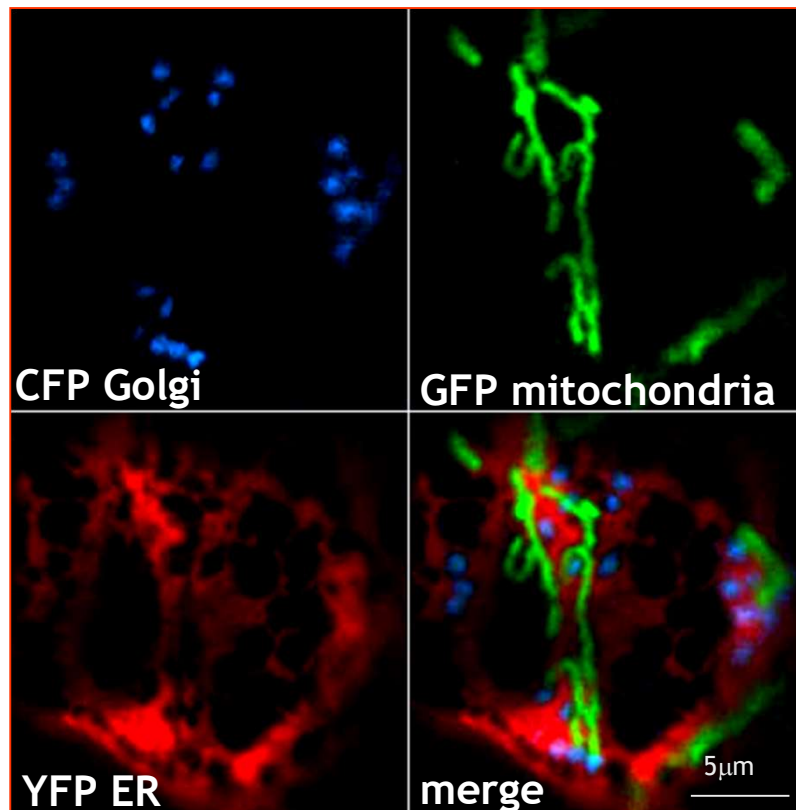
Struktura mitochondrií

- ▶ Krátká, bakterii podobná tělíska o průměru 1-3 μm
- ▶ Velmi dynamická (pohyblivá) a plastická (neustále měnící tvar, dělení a fúze)
- ▶ Umístění H^+ -ATPáz zapojených do syntézy ATP na vnitřní membráně



Izolace mitochondrií

- ▶ Pletivo se homogenizuje, přefiltruje a centrifuguje při nízké rychlosti (10 000g/20 min) a poté při 75 -100 000 g/ 2-4h v hustotním gradientu.
- ▶ Po obarvení se kontroluje neporušenost a čistota světelným mikroskopem.
- ▶ Pomocí laserové pinzety (*laser tweezers*) lze izolovat jednu mitochondrii.



- ▶ Mitochondrie v živých buňkách lze snadno pozorovat pomocí *vitálních* fluorescenčních barviv (např. Rhodamin 123 a MitoTracker) a GFP

Movie - Alberts 14-1
Plant Phys 12.3 Web essay

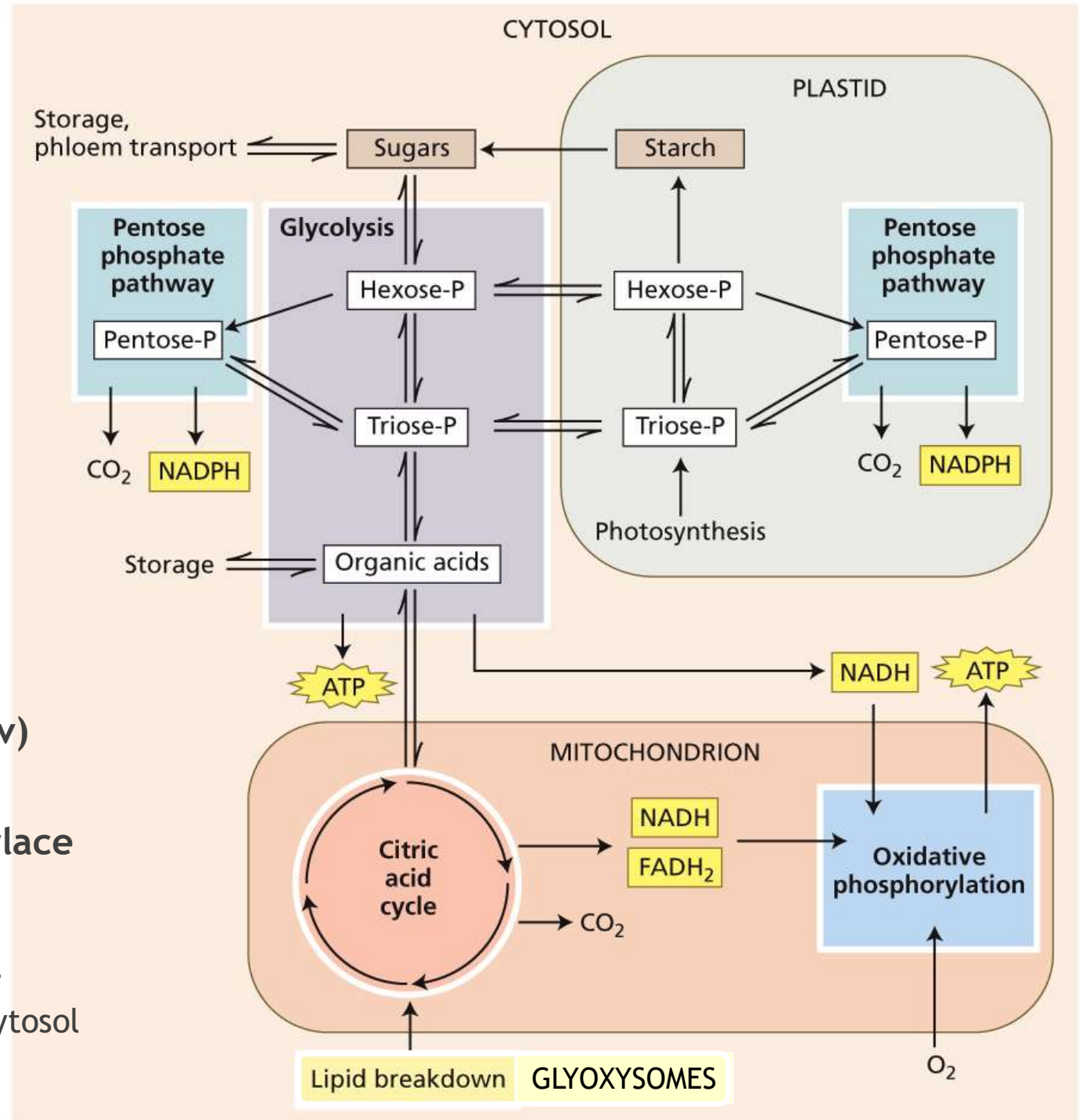
Složení mitochondrií

- ▶ Proteomická analýza ukazuje přítomnost 3 000 proteinů souvisejících s respirací
 - ▶ Vnější membrána ~ 7 % a vnitřní membrána ~ 30 % celkových proteinů
- ▶ Fosfolipidy tvoří až 90 % celkových mitochondriálních lipidů
- ▶ Vysoká koncentrace fosfatidylcholinu (PC), fosfatidylethanolaminu (PE) a také difosfatidylglycerolu (DPG = kardiolipin, lipid endemický pro mitochondrie)
 - ▶ kardiolipin se také nachází v PM bakterií (což podporuje hypotézu, že mitochondrie se vyvinuly z bakterií), přítomný pouze ve vnitřní membráně
- ▶ Lipidové složení vnitřní a vnější membrány je odlišné:
 - ▶ např. vnější membrána více nasycených lipidů; vnitřní více PE a méně PC
 - ▶ fosfolipidy rostlinných mitochondrií jsou mnohem méně nasycené než ty ze savčích mitochondrií (existují a fungují při 37°C).
- ▶ Mitochondrie zaujímají až 20% cytoplazmatického objemu eukaryotické buňky.
- ▶ Typicky stovky až tisíce mitochondrií v rostlinné buňce, ne náhodně uspořádané; např. v listech vedle peroxisomů a chloroplastů; u rostoucích pylových láček obohacené na špičce; seskupené kolem jádra

Respirační procesy rostlin

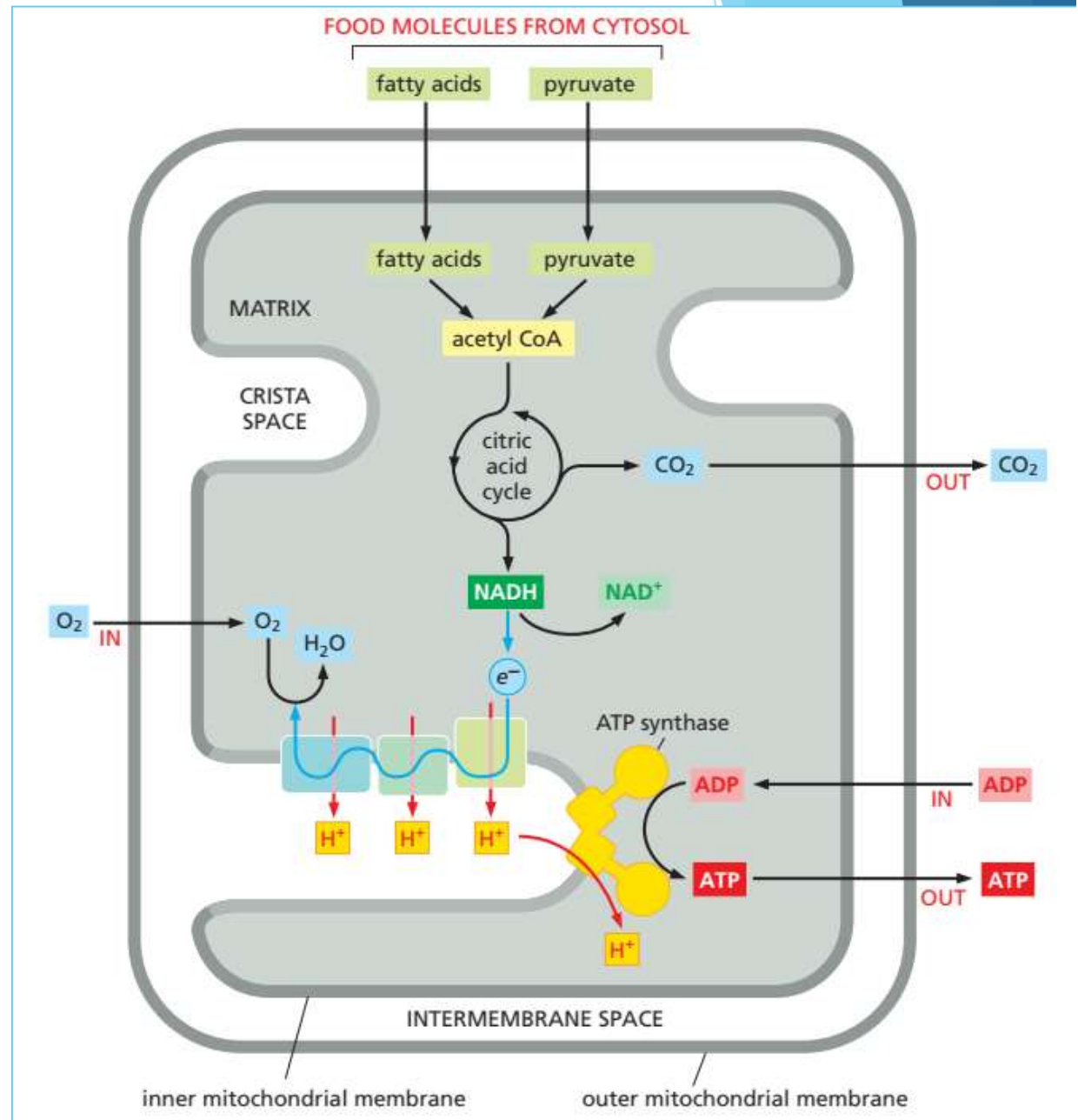
Aerobní respirace

- je biologický proces, při kterém jsou redukované organické sloučeniny řízeně oxidovány a uvolněná energie je přechodně uložena v ATP.
- Citrátový (Krebsův) cyklus
- Oxidativní fosforylace
- Glykolýza (cytosol)
- **Oxidative** Pentoso-fosfátová dráha (cytosol a plastidy)



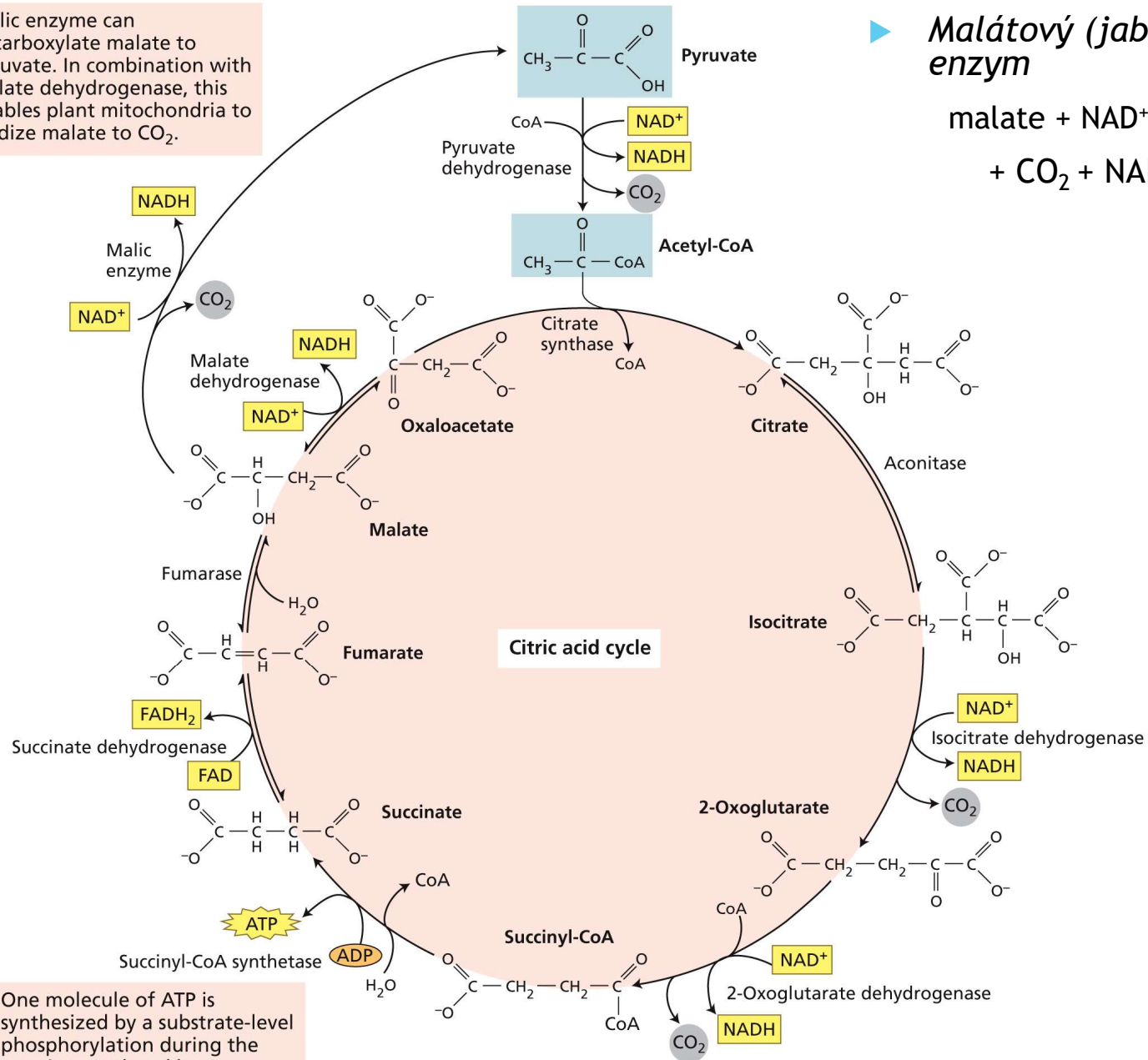
Bioenergetika respirace v mitochondriích

- ▶ Citrátový cyklus v matrici mitochondrií produkuje NADH a FADH₂
- ▶ Krysty vnitřní membrány obsahují mechanismus elektronového transportu a syntézy ATP
- ▶ $C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O$
- ▶ Maximální výtěžnost ATP v cytosolu z úplné oxidace molekuly sacharózy na CO₂ prostřednictvím aerobní glykolýzy a citrátového cyklu je 60 molekul ATP.



Citrátový cyklus v rostlinách

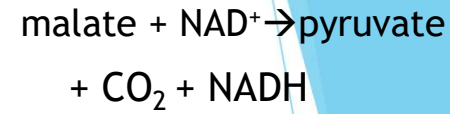
Malic enzyme can decarboxylate malate to pyruvate. In combination with malate dehydrogenase, this enables plant mitochondria to oxidize malate to CO₂.



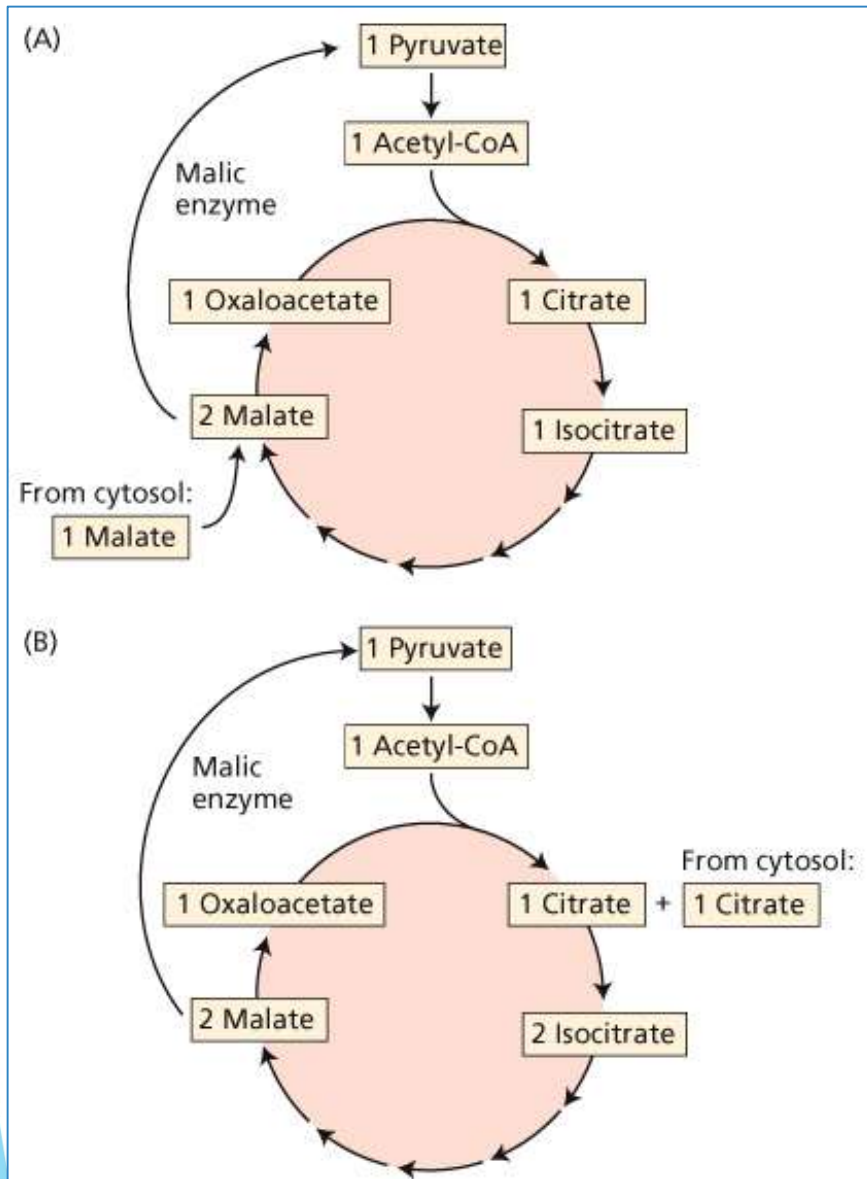
One molecule of ATP is synthesized by a substrate-level phosphorylation during the reaction catalyzed by succinyl-CoA synthetase.

► Jedinečné vlastnosti:

► *Malátový (jablečný) enzym*



Jablečný enzym a PEP karboxyláza poskytují rostlinám metabolickou flexibilitu

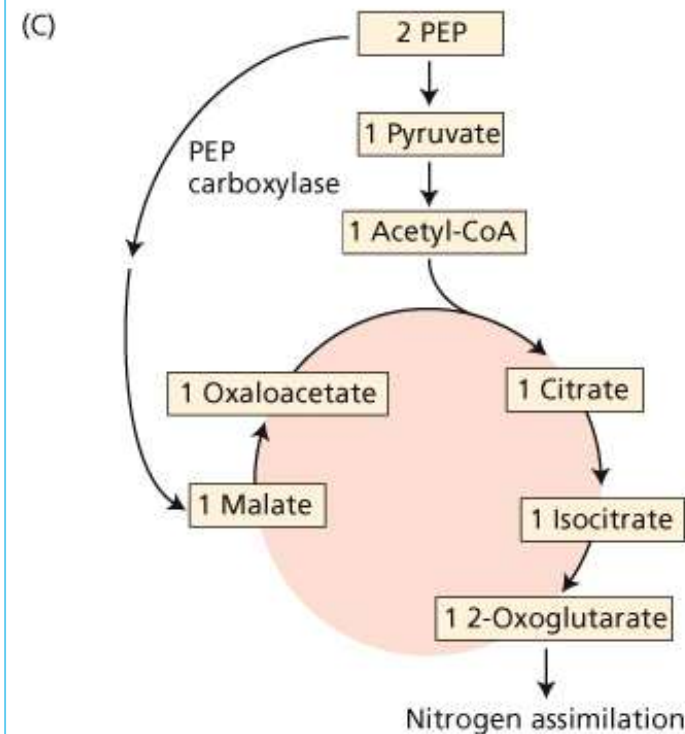


► Malic enzyme

- přeměňuje malát na pyruvát a umožňuje mitochondriím oxidovat malát (A) a citrát (B) na CO_2 bez pyruvátu z glykolýzy

► PEP carboxylases

- přeměňuje glykolytický PEP na 2-oxoglutarát používaný pro asimilaci dusíku



Organizace elektronového transportního řetězce a syntéza ATP na vnitřní membráně mitochondrií

cytosol pH 7.5

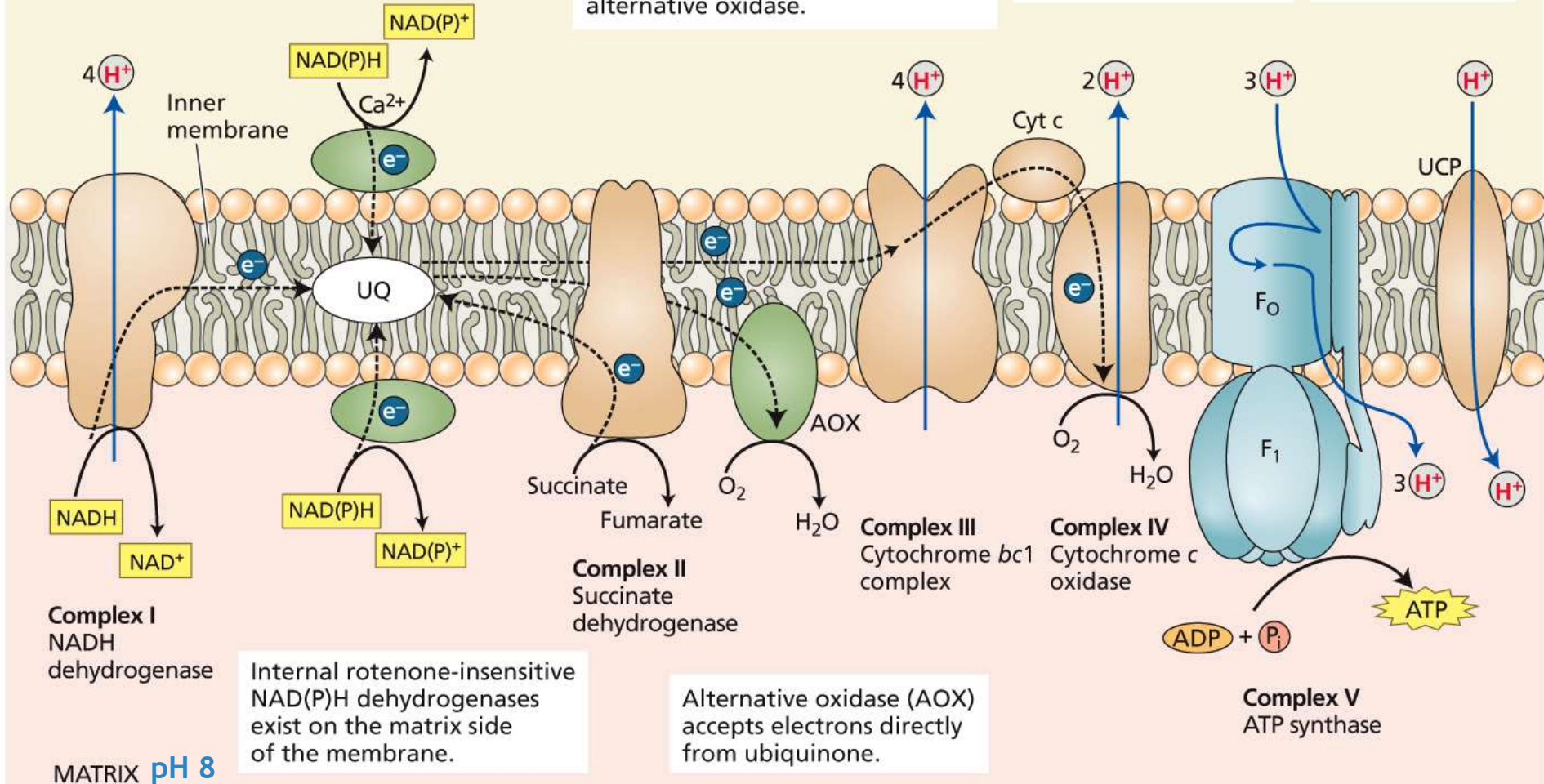
INTERMEMBRANE SPACE

External rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenases can accept electrons directly from NADH or NADPH produced in the cytosol.

The ubiquinone (UQ) pool diffuses freely within the inner membrane and serves to transfer electrons from the dehydrogenases to either complex III or the alternative oxidase.

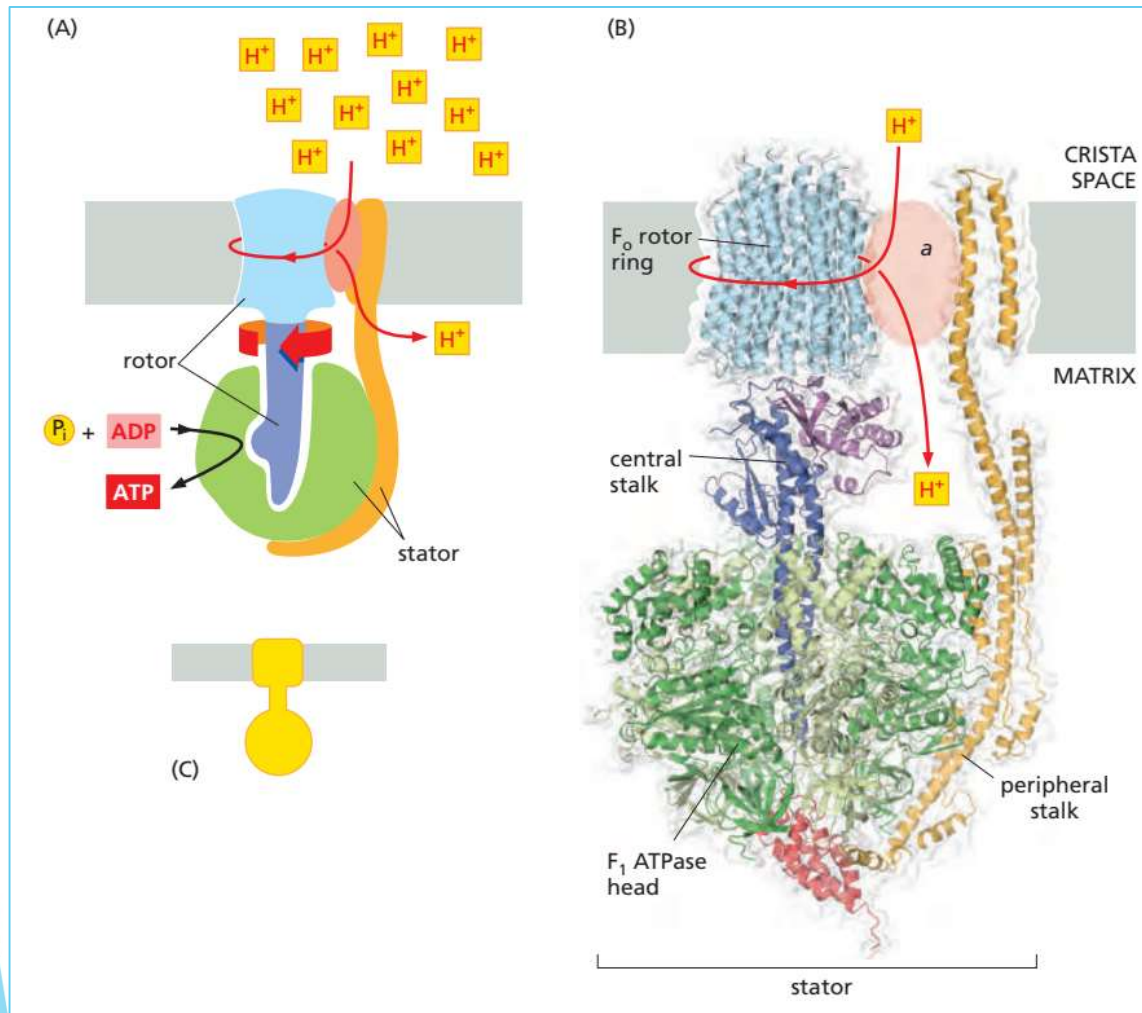
Cytochrome c is a peripheral protein that transfers electrons from complex III to complex IV.

Uncoupling protein (UCP) transports H^+ directly through the membrane.



Mitochondriální e⁻ transport a syntéza ATP

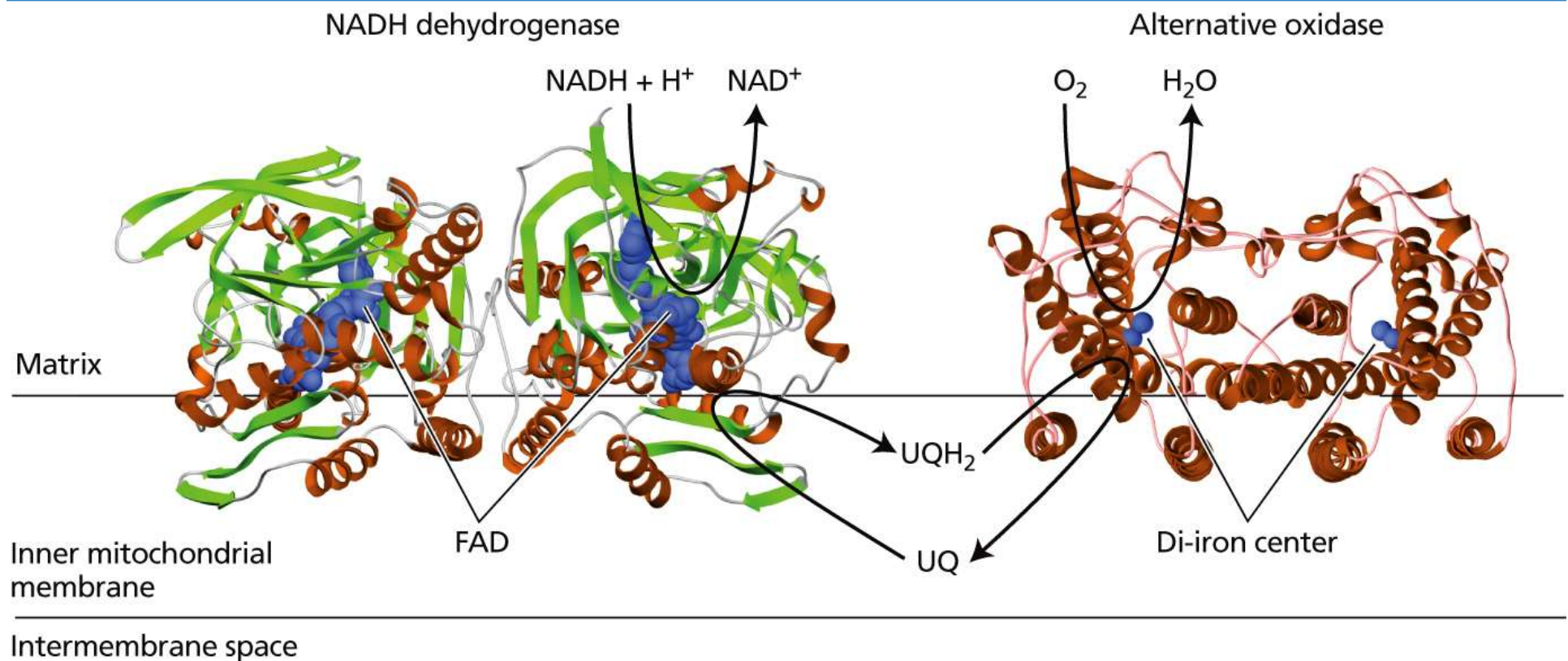
- ▶ Elektronový transportní řetězec katalyzuje tok e⁻ z NADH a FADH₂ na O₂
- ▶ Spřažen s enzymovými komplexy a transportem H⁺ přes vnitřní mitoch. Membránu
- ▶ Generování elektrochemického gradientu pro syntézu a export ATP



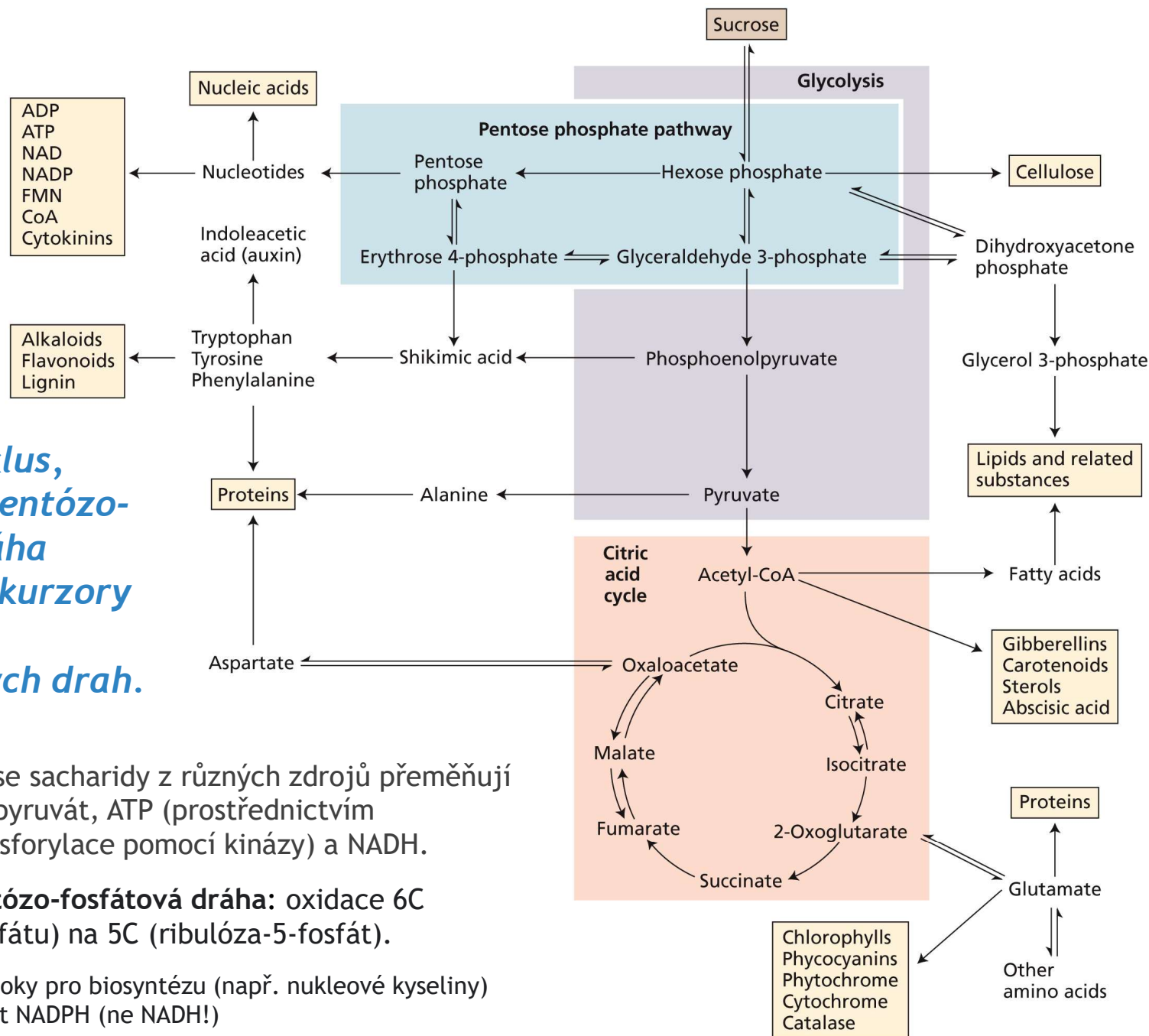
- ▶ **Protonové pumpy, ATPázy F-typu, jsou starobylého původu**
- ▶ 3D struktura F₁F_o ATP-syntázy (určena rentgenovou krystalografií) se skládá z F_o části v membráně a velké katalytické hlavy F₁ v matici.

Nefosforylující e⁻ transport snižuje rekuperaci energie

- ▶ Elektronový transportní řetězec má doplňkové větve:
 - ▶ NAD(P)H dehydrogenáza a alternativní oxidáza (nenachází se u zvířat)
 - ▶ Vázaný na vnitřní membrány, nepumpují protony, proto se uvolněná energie neuchovává jako ATP, ale uniká ve formě tepla... (p336 Plant Phys)



Shrnutí

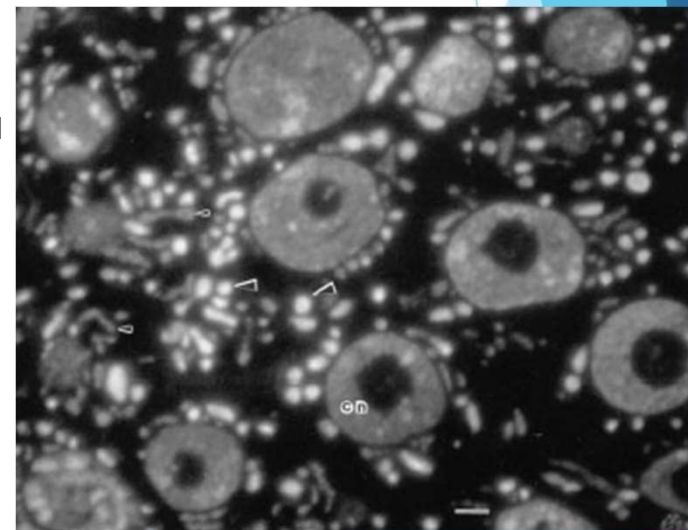


► **Citrátový cyklus, glykolýza a pentózo-fosfátová dráha vytvářejí prekurzory pro mnoho biosyntetických drah.**

- Při glykolýze se sacharidy z různých zdrojů přeměňují v cytosolu na pyruvát, ATP (prostřednictvím substrátové fosforylace pomocí kinázy) a NADH.
- **Oxidační pentózo-fosfátová dráha:** oxidace 6C (glukóza-6-fosfátu) na 5C (ribulóza-5-fosfát).
 - stavební bloky pro biosyntézu (např. nukleové kyseliny) a reduktant NADPH (ne NADH!)

Genetický systém mitochondrií

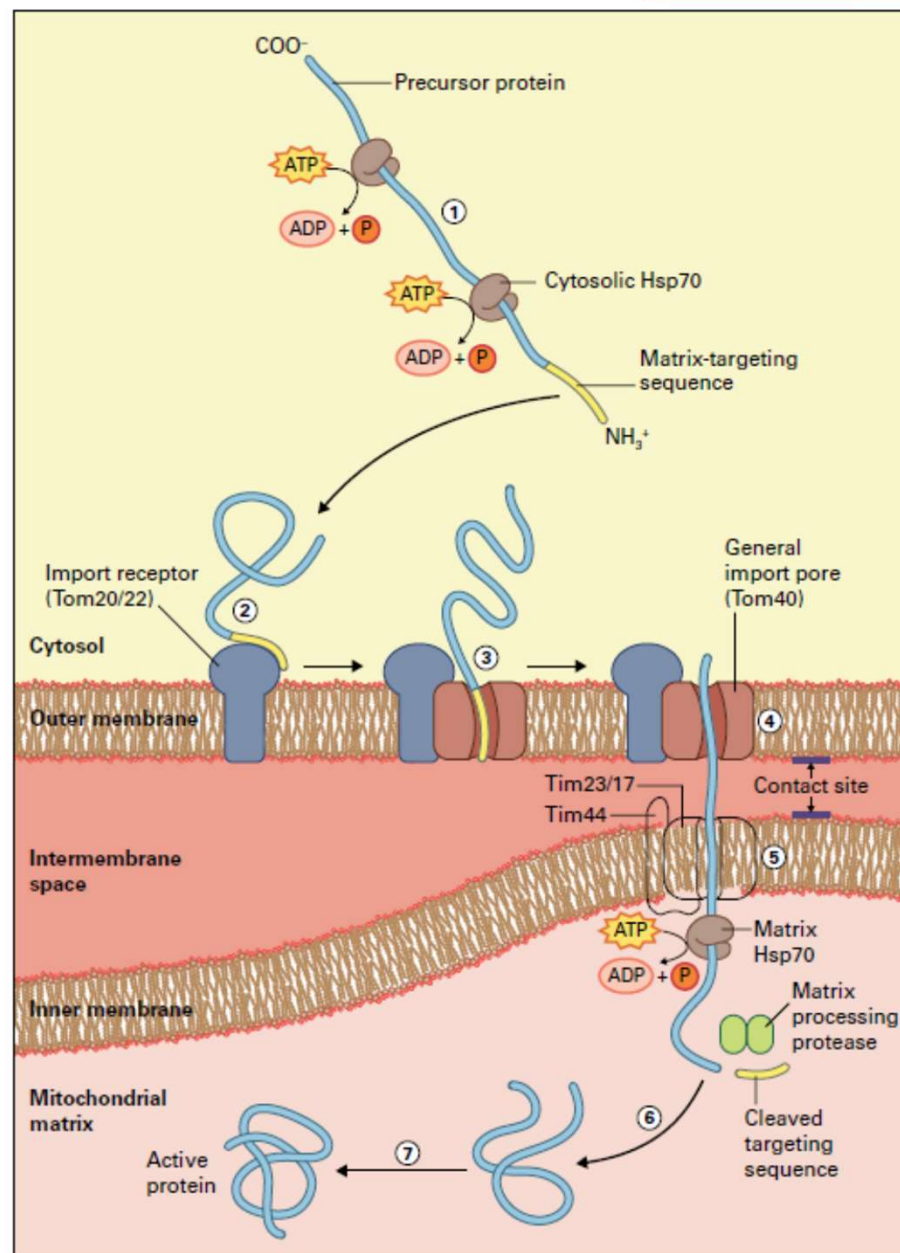
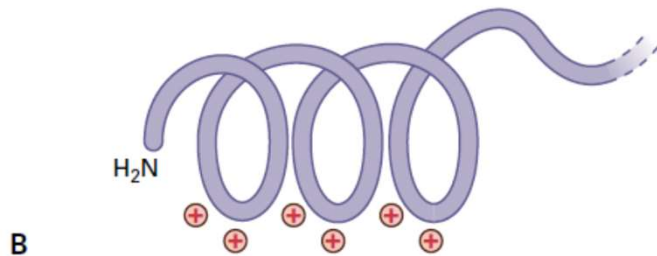
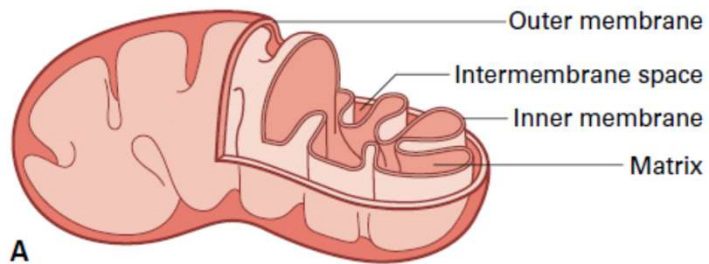
- ▶ Mitochondrie, obsahují kompletní genetický systém včetně DNA, enzymů pro syntézu DNA, ribozomů (70S), rRNA, tRNA a proteinů.
- ▶ Typicky 5-10 molekul DNA (kruhové nebo lineární) v mitoch. Matrix.
 - ▶ např. DNA játrovky (*Marchantia*) 150-2500 kbp (10-100x větší než živočišná mitoch. DNA)
- ▶ U některých rostlin se genom organizoval do kruhových „chromozomů“.
 - ▶ mitochondriální DNA asociovaná s proteiny podobnými histonům
- ▶ Tendence mitoch. genů časem se přesunout do jádra např. *coxII* (*Cytochrom oxididase*).
- ▶ Inhibován stejnými antibiotiky, která inhibují růst bakterií (e.g chloramphenicol, Tet).
- ▶ Cytoplazmatická dědičnost mitoch. DNA.
- ▶ Syntetizované proteiny závisí na rostlinném orgánu
 - ▶ genová exprese je regulována vývojem
- ▶ Některé mitoch. DNA mají introny!
- ▶ Většina mitoch. proteinů
 - ▶ kódované jadernou DNA,
 - ▶ syntetizované na cytoplazmatických ribozomech,
 - ▶ importovány prostřednictvím translokonů dovnitř



DAPI (DNA sepcif.) barvení kořenového QC.
Velké šipky mitochondrie, malé plastidy.

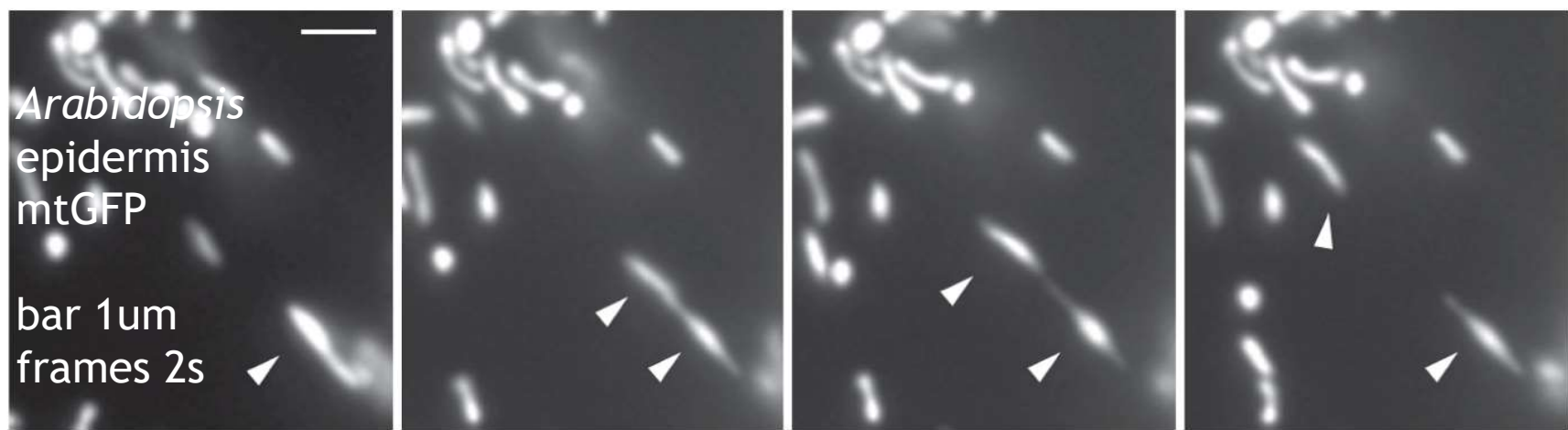
Transport proteinů do mitochondrií

- ▶ Záleží na targetující doméně (*presequence*) a importním aparátu



Biogeneze mitochondrií

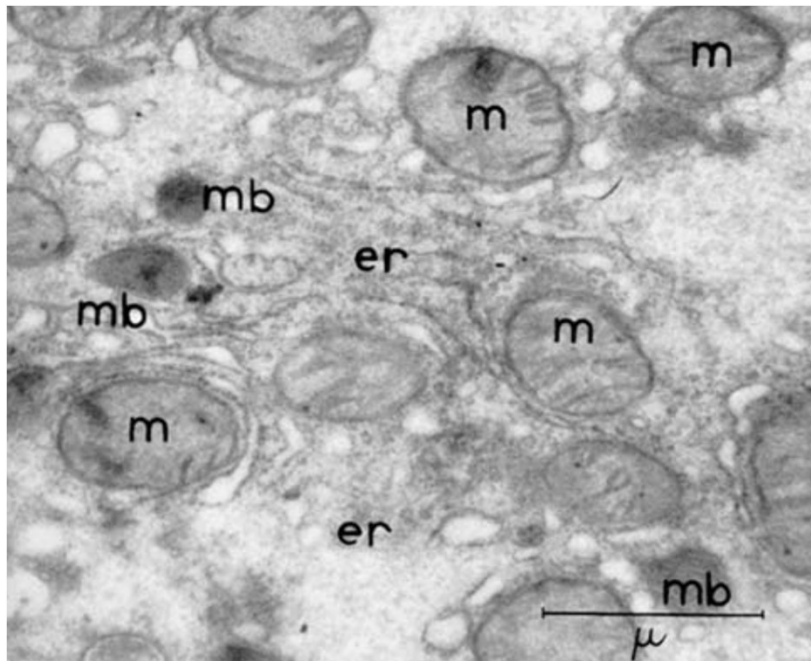
- ▶ Mitochondrie se se rozmnožují dělením
 - ▶ Před rozdělením se kulovitá mitochondrie prodlouží, zaškrtní a nakonec se oddělí.
 - ▶ Studie mitoch. exprimujících FP (GFP, RFP) ukazují, že mitochondrie mohou také fúzovat



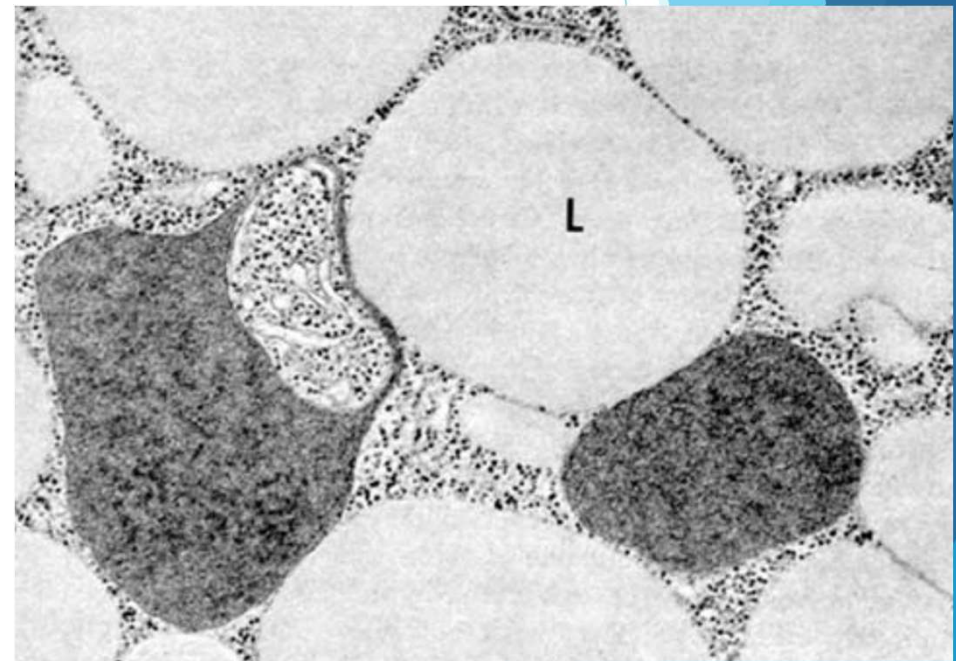
- ▶ Mitochondrie jsou sice **semiautonomní**, ale jejich aktivity a počty musí být koordinovány s aktivitami zbytku buňky.
- ▶ Proteiny kódované jadernými geny vstupují do speciálních oblastí, nazývaných kontaktní místa, kde se vnitřní a vnější membrány dotýkají = translokační komplexy
 - ▶ Pro translokaci proteinu do mitochondrií postačuje sekvence 12 aa na N-konci proteinu.
 - ▶ Mitochondriální tranzitní peptid se váže na receptor v kontaktním místě a následně je sekvence štěpena mitochondriální signální peptidázou.
 - ▶ Je vyžadován membránový potenciál přes vnitřní membránu a hydrolýza ATP.

Objev peroxizómů

- ▶ Poprvé pozorovány elektronovou mikroskopií v letech 1950
 - ▶ pojmenovaná mikrotělíska (*microbodies*) 0,2-1,5 μm (příliš obecné)
- ▶ po objevení jejich funkce přejmenovány na *peroxizómy*
 - ▶ také známé jako cytosomes, phragmosomes, spherosomes, glyoxysomes



Mikrotělíska (mb) v cytoplasmě jaterních buněk krysy. er, ergastoplasm; m, mitochondrie. Z Rouiller a Bernhard, 1956.

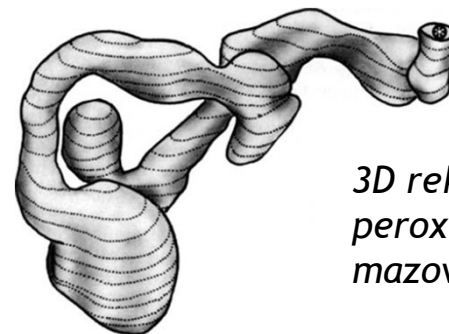


Peroxisóm vedle lipidového tělíska (L, lipid body) v buňce děložního listu rajčete. Všimněte si, jak peroxizóm nalevo uzavírá mitochondrii.

Evoluce peroxizómů

- ▶ Peroxizómy jsou přítomny ve všech eukaryotech kromě *Archaezoa*.
- ▶ Peroxizómy se mohly vyvinout endosymbioticky.
- ▶ Alternativně podobně jako ER, se mohly vyvinout invaginací oblastí membrán, které obsahovaly enzymy zapojené do peroxizomálních drah.
- ▶ Původně se myslelo, že peroxizómy byly vytvořeny přímo z ER procesem pučení (viditelné na 2D obrázcích), ale postrádají proteiny ER.

- ▶ *Sériové řezy buněk ukazují, že peroxizómy skutečně existují jako “peroxisomal reticulum”*
- ▶ *ale zdánivé vazby na ER jsou propojení mezi samotnými peroxizómy (peroxules)...*

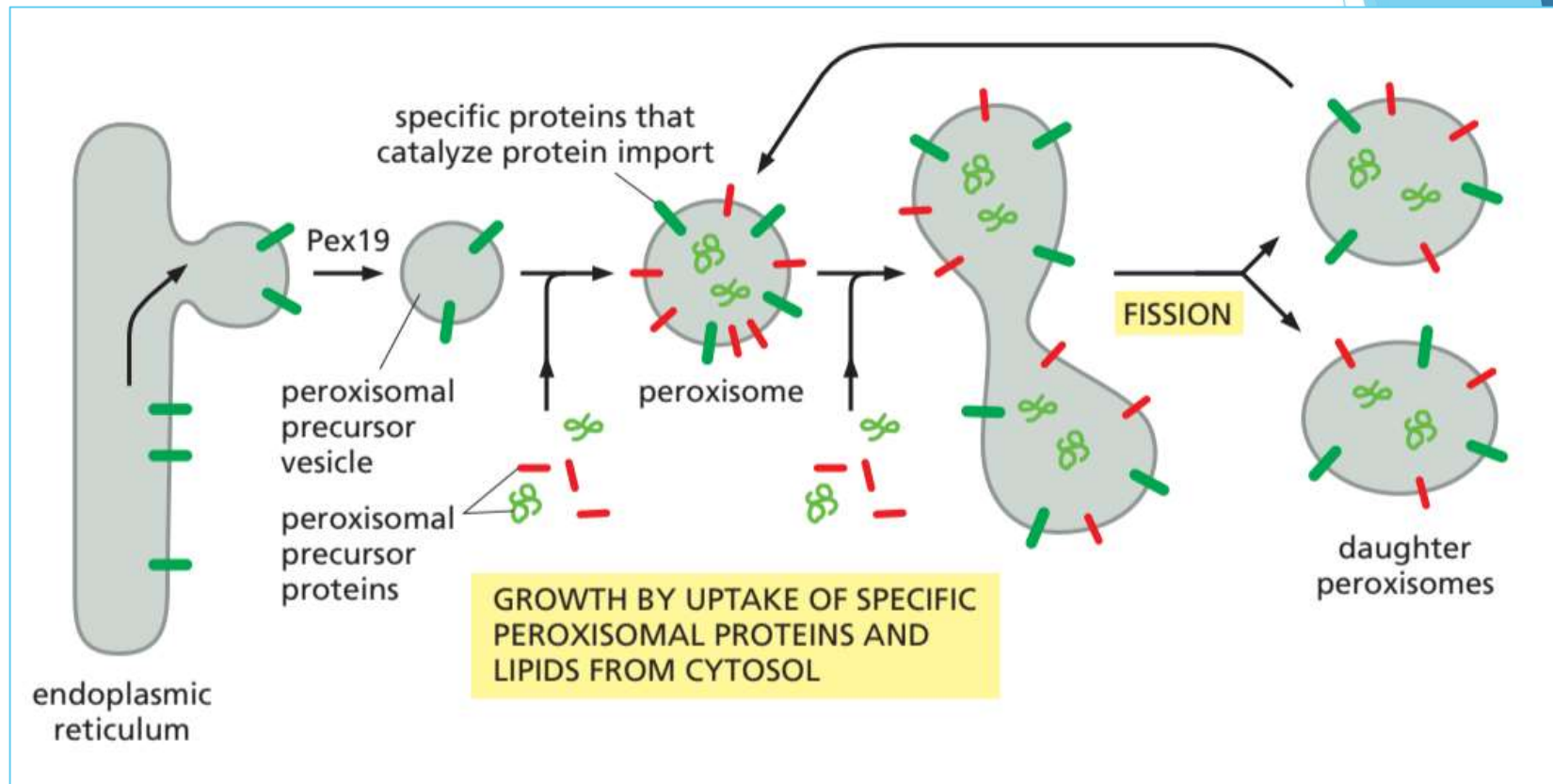


3D rekonstrukce peroxizómu z mazových žláz myši.

- ▶ Mezi funkcemi peroxizómů a mitochondrií existují podobnosti.
 - ▶ Obecně se zdá, že mitochondrie převzaly funkce peroxizómů, ale v některých případech je to naopak! (v průběhu evoluce)
- ▶ Morfologická i biochemická diverzita peroxizómů v různých druzích

Peroxisómy jsou samoreprodukcující se organely

- ▶ K růstu peroxizómů dochází inkorporací nového proteinu a lipidu do již existujících peroxizómů a jejich počet se zvyšuje štěpením (*by fission*).



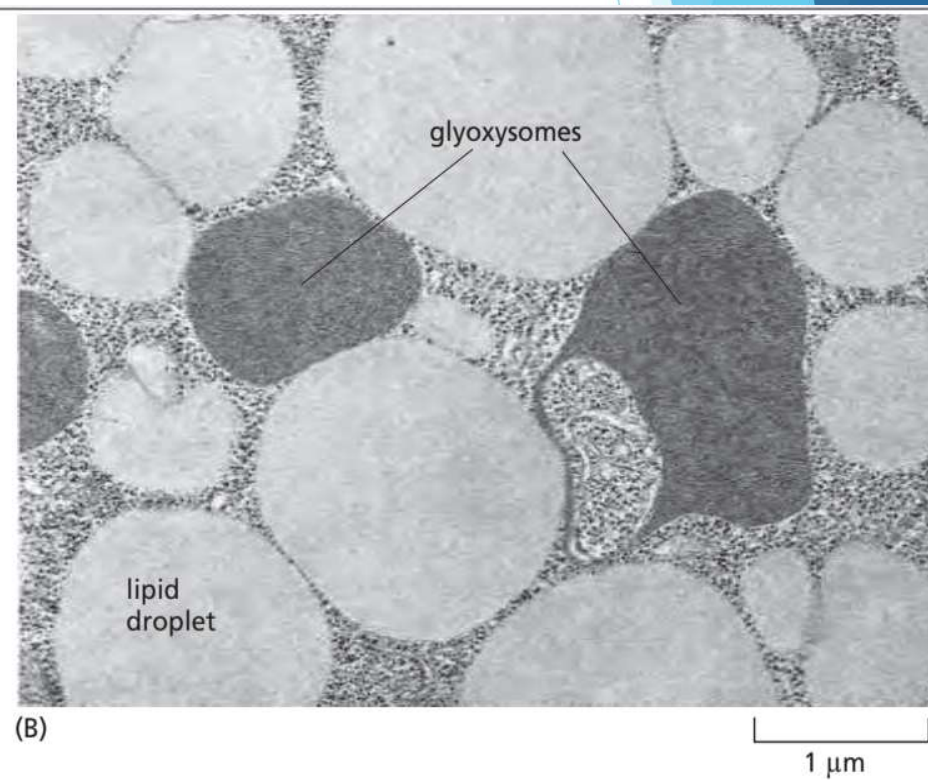
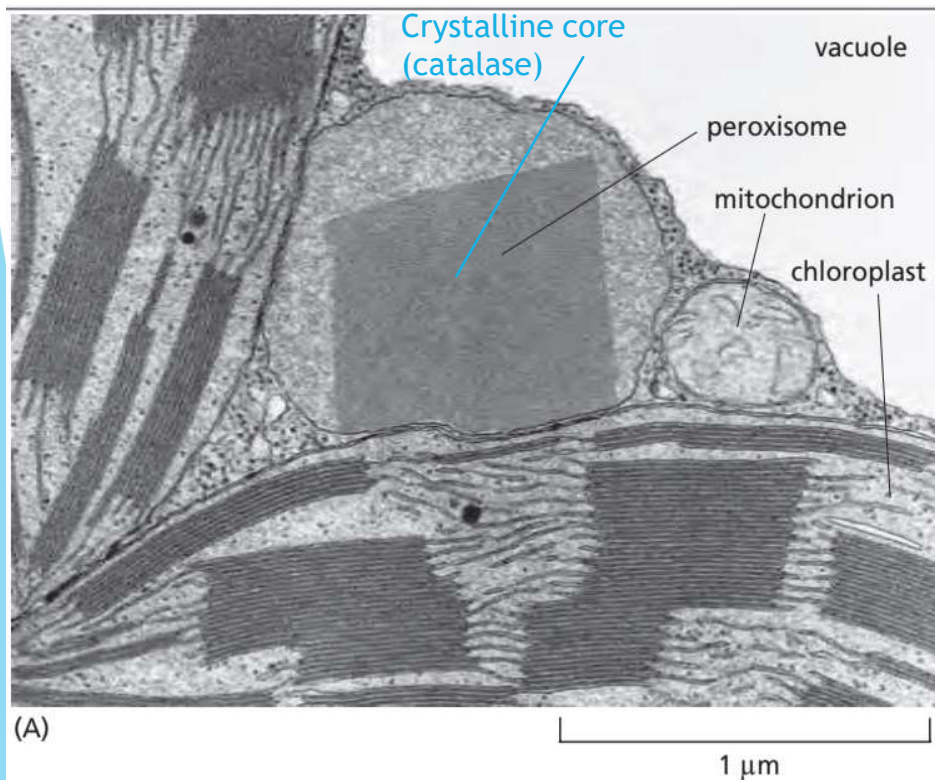
- ▶ Peroxizomální targetující sekvence (importní signál) je typicky SKL (serine-lysine-leucine) na C-konci matričních proteinů nebo arg-leu/gln/ile-X5-his-leu na N-konci.
 - ▶ Zajímavé je, že některé polypeptidy neobsahují targetující sekvence, jsou přeneseny do peroxizómu jako oligomery (což naznačuje, že proteiny-translokující póry jsou relativně velké).
 - ▶ Jiné vstupují do peroxizómů nepřímo prostřednictvím specializovaných vezikul odvozených z ER (posttranslačně vložených do ER).

Peroxisómy jsou multifunkční organely

- ▶ Obklopeny pouze jedinou membránou, neobsahují DNA ani ribozomy,
 - ▶ všechny jejich proteiny jsou kódovány v buněčném jádře.
- ▶ Obsahují asi 100 proteinů, vysoký obsah fosfolipidů (složení podobné ER a PM).
- ▶ Specializují se na provádění oxidačních reakcí pomocí O_2 a H_2O_2 .
- ▶ Téměř všechny obsahují *katalázu* a různé *oxidázy* (v závislosti na jejich funkci)
 - ▶ *Oxidázy* provádějí oxidační reakce pomocí kyslíku za vzniku peroxidu vodíku, který využívají pro oxidační účely: $RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$
 - ▶ *Catalázy* využívají generovaný H_2O_2 k oxidaci řady dalších substrátů a také ke zničení jeho přebytku: $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
- ▶ Účastní se rozmanitého souboru biochemických reakcí včetně:
 - ▶ **β -oxidace mastných kyselin, glyoxylátový cyklus & fotorespirace**
 - ▶ Respirace na bázi H_2O_2 , počáteční reakce v biosyntéze ether-glycerolipidů, syntéza cholesterolu a dolicholu, glyoxylátový cyklus, syntéza kyseliny jasmonové, oxidace alkoholu, transaminace, katabolismus purinů a polyaminů, syntéza oxidu dusnatého, biosyntéza antibiotik v houbách...
- ▶ Důkaz spolupráce různých organel při realizaci biochemických drah.
- ▶ Pohybují se uvnitř buněk (podél mikrofilament) na místa, kde jsou třeba...
- ▶ Peroxisomy odumírají v důsledku poškození H_2O_2 a v době omezení živin. Jsou ztráveny v procesu hromadné recyklace známém jako *pexophagy*.

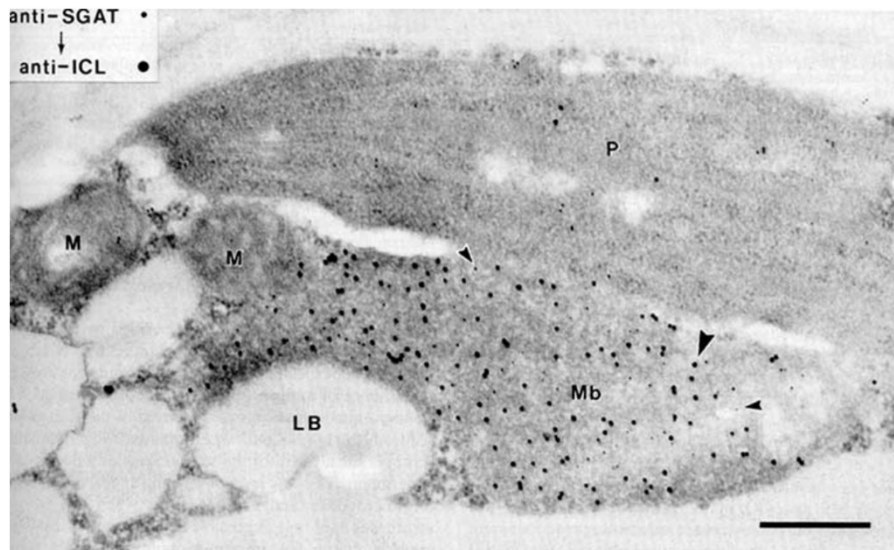
Dva typy peroxizómů v rostlinných buňkách

- ▶ Jeden typ je přítomen v listech, kde se účastní **fotorespirace**.
- ▶ Druhý typ je přítomen v klíčících semenech, kde přeměňuje mastné kyseliny uložené v lipidech semen na cukry potřebné pro růst mladé rostliny.
- ▶ Protože tato přeměna tuků na cukry je prováděna reakcemi známými jako **glyoxylátový cyklus**, tyto peroxizómy se také nazývají **glyoxyzómy**.
 - ▶ první glyoxyzómy izolovány z fazolí (*castor beans*)



Vztah mezi peroxizómy a glyoxyzómy

- ▶ Původně se předpokládalo, že existují 2 samostatné populace mikrotělísek, nicméně glyoxyzómy se během vývoje mění na peroxizómy, během zelenání děložních listků:
 - ▶ Na začátku klíčení přeměňují glyoxyzómy tuk na sacharidy prostřednictvím β -oxidace a glyoxylátového cyklu.
 - ▶ Po zezelenání děložních listů vytvářejí sacharidy prostřednictvím fotosyntézy a peroxizómy využívají fotorespirační dráhu



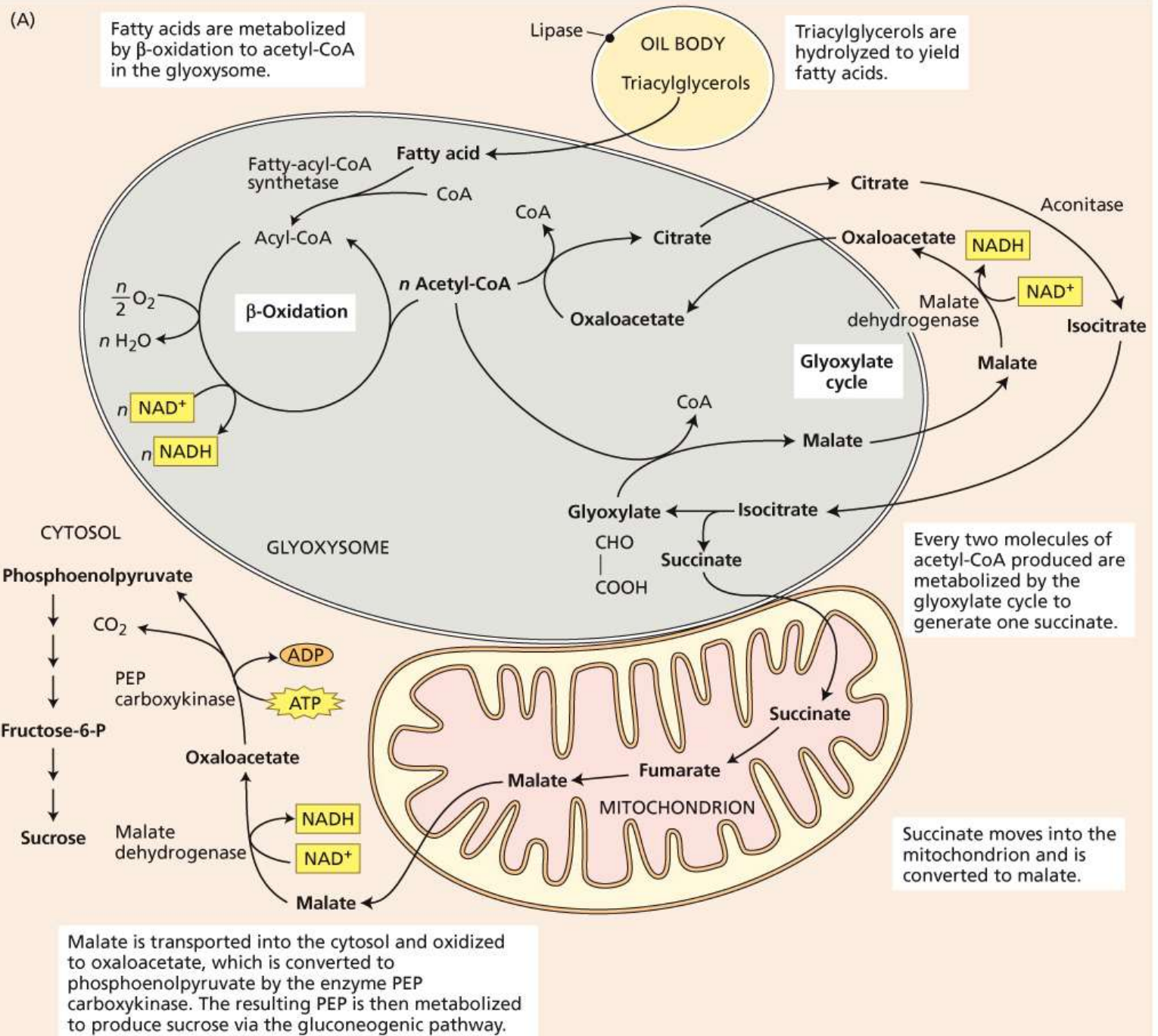
Cell of a 4-day-old cucumber cotyledon stained with 20-nm colloidal gold particles conjugated to an antibody directed against isocitrate lyase ICL (large arrowhead) and 10-nm against serine:glyoxylate aminotransferase SGAT (small arrowhead).

ICL glyoxysomal enzymes
SGAT peroxisomal enzymes

- ▶ Je zajímavé, že během stárnutí listů se peroxizómy transformují zpět na glyoxyzómy: pojmenované **gerontozómy** odpovědné za recyklaci mastných acylových řetězců v buňkách listu zpět do rostliny v translokovatelné formě (tj. cukry).

Přeměna tuků na cukry během klíčení semen, která ukládají tuky.

- Redukovaný C generovaný během rozkladu lipidů v glyoxysomu je v cytosolu přeměněn na sacharidy pomocí procesu **glukoneogeneze**.



β-oxidace mastných kyselin

- ▶ podílí se na tvorbě sacharózy z mastných acylových řetězců a je velmi důležitá při klíčení semen a spor bohatých na olej
- ▶ Peroxizómy v tukových buňkách obsahují lipázy, které štěpí uložené lipidy na jejich konstitutivní mastné acylové řetězce. Mastný acyl-CoA vstupuje do peroxizómů prostřednictvím transportního proteinu ABC (*ATP-binding cassette*).
- ▶ Mastné acylové řetězce pak podléhají β-oxidaci, sérii reakcí, které vedou k rozpadu dlouhých mastných acylových řetězců na mnoho acetyl-CoA molekul (zapojených do aktivace a přenosu acetátových skupin mezi molekulami).
- ▶ **Acetyl-CoA pro cyklus kyseliny glyoxylové**
 - ▶ Enzymy zapojené do β-oxidace zahrnují mastnou acyl-CoA syntetázu a mastnou acyl-CoA oxidázu (generuje peroxid vodíku).

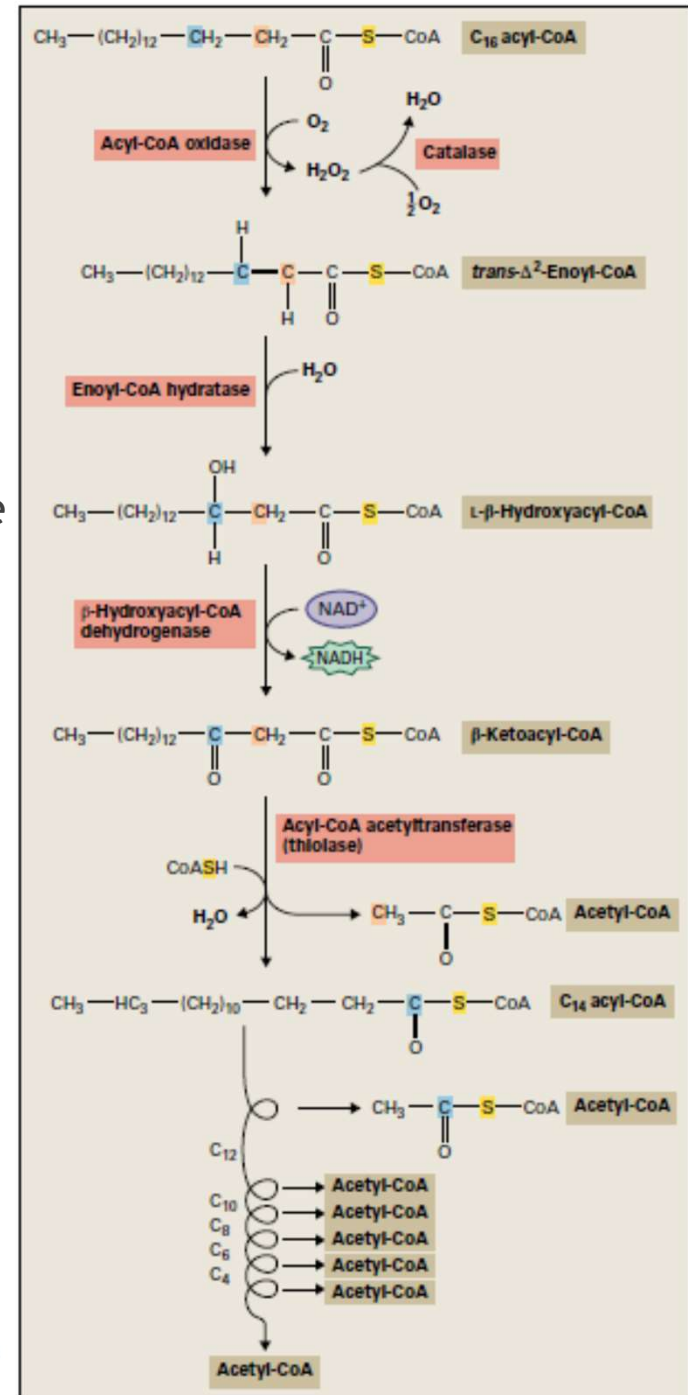
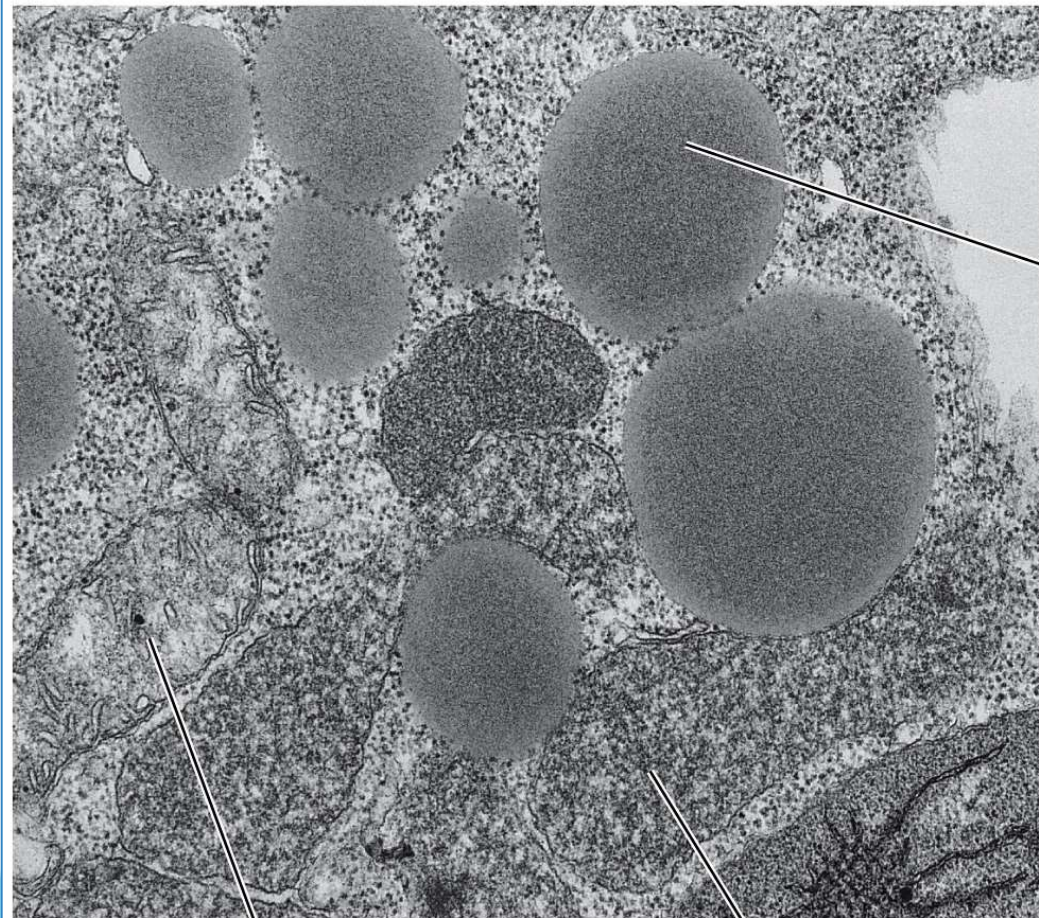


FIGURE 8.66 β-Oxidation pathway in peroxisomes. In each pass through the sequence, one acetyl residue is removed in the form of acetyl-CoA from the carboxyl end of an acyl-CoA. Seven passes through the cycle are required to oxidize a C₁₆ fatty acid to eight molecules of acetyl-CoA.

Olejová tělíska existují v rostlinách kromě peroxisomů

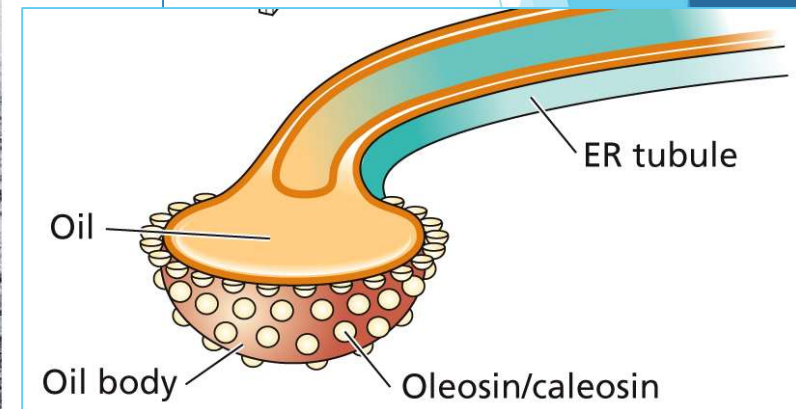
- ▶ Olejová tělíska (*oil bodies*) jsou organely ukládající lipidy (triglyceridy).
- ▶ Vznikají jako oblasti diferenciace v rámci ER.
- ▶ Obsahují vnější membránu fosfolipidů a speciálních proteinů:



Mitochondrion

Glyoxysome

- ▶ oleosin, caleosin a stereoleosin.



Oil

Oil body

Oleosin/caleosin

ER tubule