

Mitochondrie
esenciální organely eukaryotické buňky

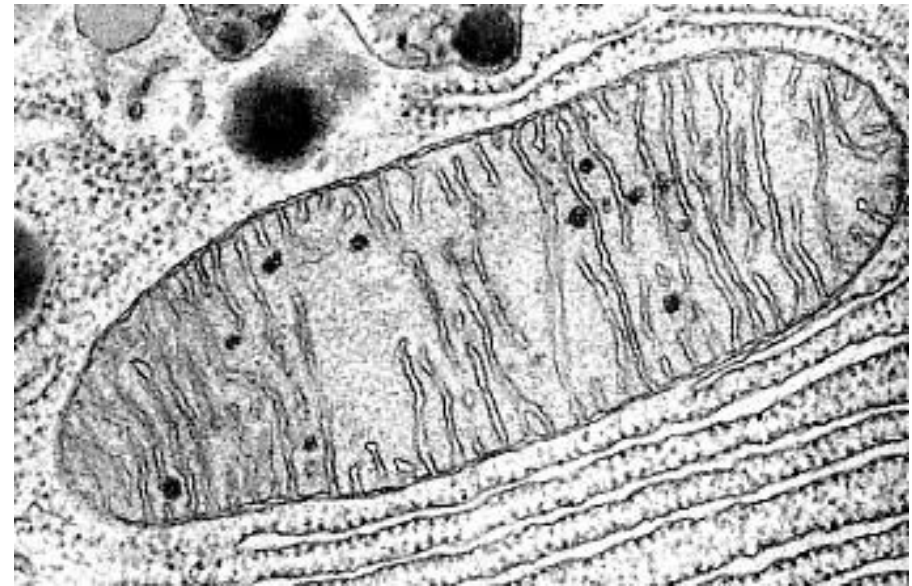
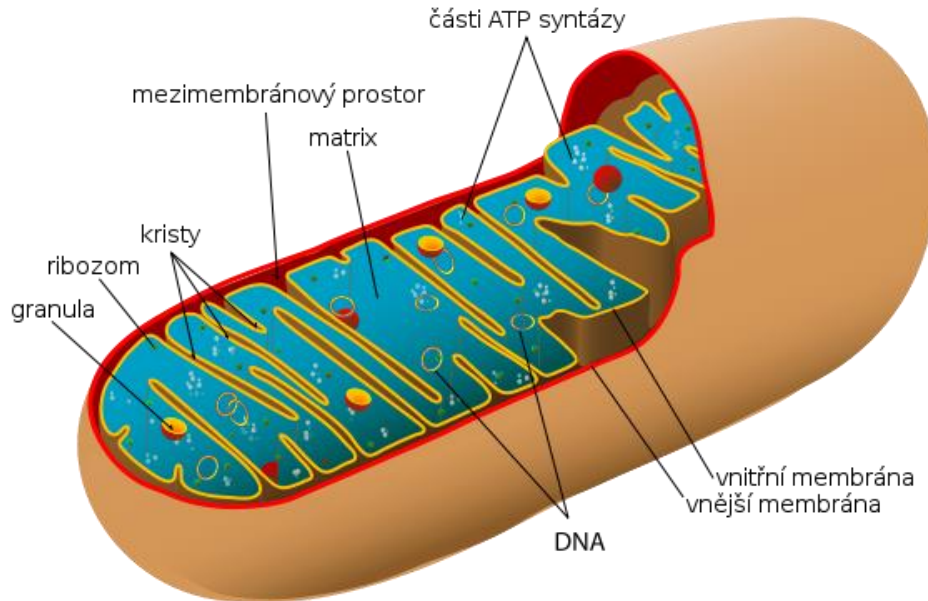
Mário Špírek
B07/305

Mitochondrie

Struktura: membránově obalená organela

Dedičná informace: extranukleární genom (mtDNA), nesoucí geny pro proteiny ale i RNA

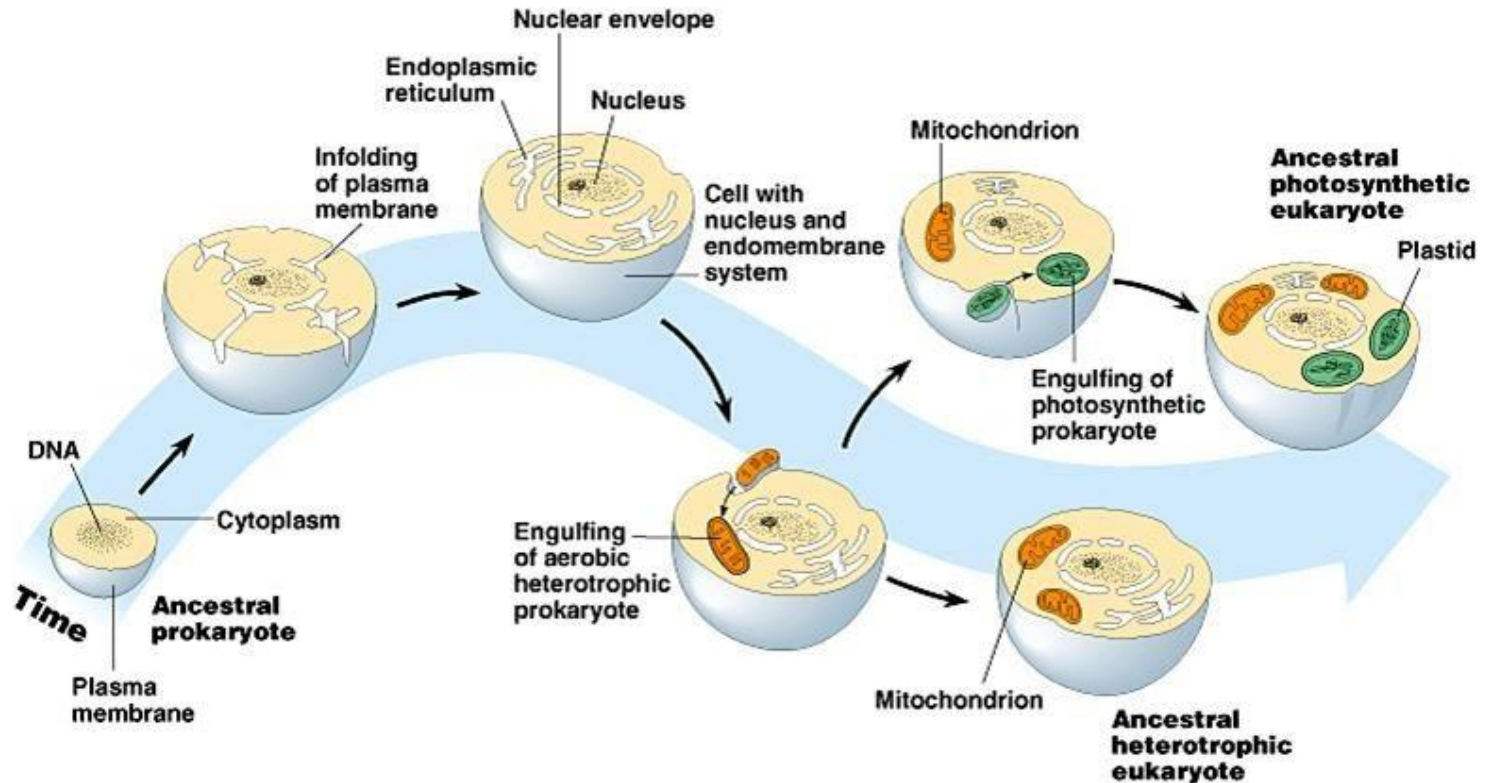
Metabolismus: Krebsův cyklus, dýchací řetězec, beta-oxidace mastných kyselin a jiné



Vznik mitochondrie

Endosymbiotická hypotéza:

potomek endosymbiotické bakterie (pravděpodobně alfaproteobakterií z příbuzenského okruhu rodu *Rickettsia*), která se v procesu vzniku eukaryotické buňky určitým způsobem transformovala v semiautonómní organelu (před 2 miliardy let)

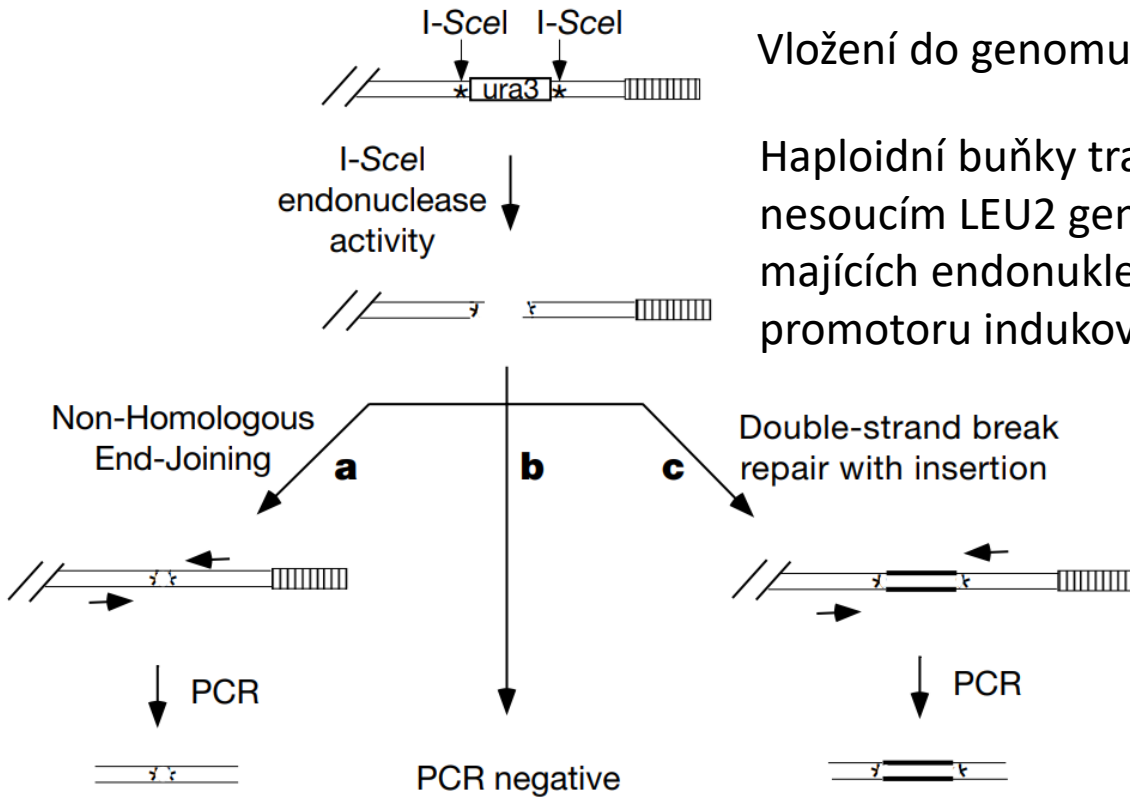


Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

mtDNA vznikla redukcí genomu symbiotické bakterie přičemž došlo také k tzv. horizontálnímu transferu, tedy přechodu části genů z mitochondrie do jádra. V současnosti je 600–1000 mitochondriálních proteinů kódováno jadernou DNA a v mitochondriích je uloženo nanejvýš několik desítek genů.

Mitochondrial DNA repairs double-strand breaks in yeast chromosomes

Ricchetti et al. NATURE | VOL 402 | 4 NOVEMBER 1999



Vložení do genomu kvasinky

Haploidní buňky transformované plazmidem nesoucím LEU2 gen pro selekci transformátů, majících endonukleázu Sce-I pod kontrolou promotoru indukovaného galaktózou

Buňky jsou vysévané na selekční médium bez leucinu a obsahující galaktózu jako jediný zdroj uhlíku

1% z celkové populace tvořilo kolonie v porovnání s kontrolními buňkami (růstem na stejném médiu ale z glukózou a tedy bez exprese Sce-I)

265 náhodně izolovaných přežívajících klonů byly analyzovány PCR, (c) 1 (0.4%) měl kratší insert (deleci) a 5 (1.9%) mělo delší PCR produkt (**mtDNA inzerce**), ostatní klony měli PCR fragmenty s předpokládanou délkou (a) anebo se neamplifikovali (b)

Kmen bez mtDNA (rho 0) neposkytl žádné inzerce mezi SceI místa

mtDNA

- Většina mtDNA genomu jsou cirkulární a superspiralizované (někteří prvoci a houby a tedy i kvasinky mají lineární mtDNA)
- mtDNA není vázaná histony nebo jim podobnými proteiny (podobně jako u bakterií)
- V jedné buňce je vícero kopií mtDNA v jedné mitochondrii
- Velikost mtDNA se liší mezi různými organizmy (i kvasinkami)

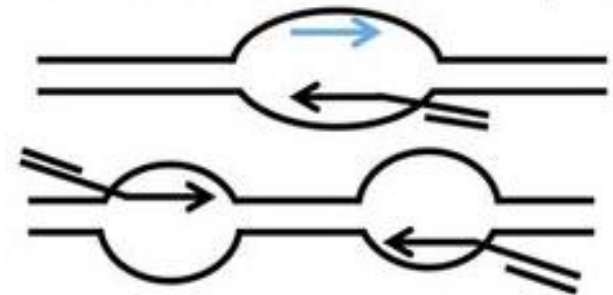
Organismus	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. sapiens</i>	<i>Reclinomonas americana</i> (bičíkatý prvok)
Velikost mtDNA (kb)	75	17	69
Počet genů	35	37	97
<i>Protein-kódující geny</i>	8	13	62
<i>Ribosomální proteiny</i>	1	–	27
<i>tRNA</i>	24	22	26
<i>rRNA</i>	2	2	4
Odhadovaná velikost proteomu mitochondrie	1000	1500	–

- Mutace v mtDNA genech vedou k respirační deficienci buněk – vznik petit buňek
- Některé kvasinky tolerují ztrátu celé mtDNA, rho0 mutace
- Existují též rho- mutanti, kde je zachován jen krátký úsek mtDNA (mt translace neběží)
- Mit- mutanti mají bodové mutace v genech pro oxidační fosforylaci (mt translace funguje)

Replikace mtDNA

- Replikace mtDNA je semikonzervativní (jako u jaderné DNA replikace) a využívá specifickou mitochondriální polymerázu γ (MIP1) a primázu (POLRMT)
- *S. cerevisiae* cca 8 ori/rep (300bp, \uparrow G+C), mt teloméry
- K replikaci dochází během celého buněčného cyklu podle potřeb buňky (nejen během S-fázy)
- Mitochondrie (jako organela) není syntetizována *de novo*, ale roste a dělí se podobně jako buňky, mtDNA je tak přenášena do nové buňky

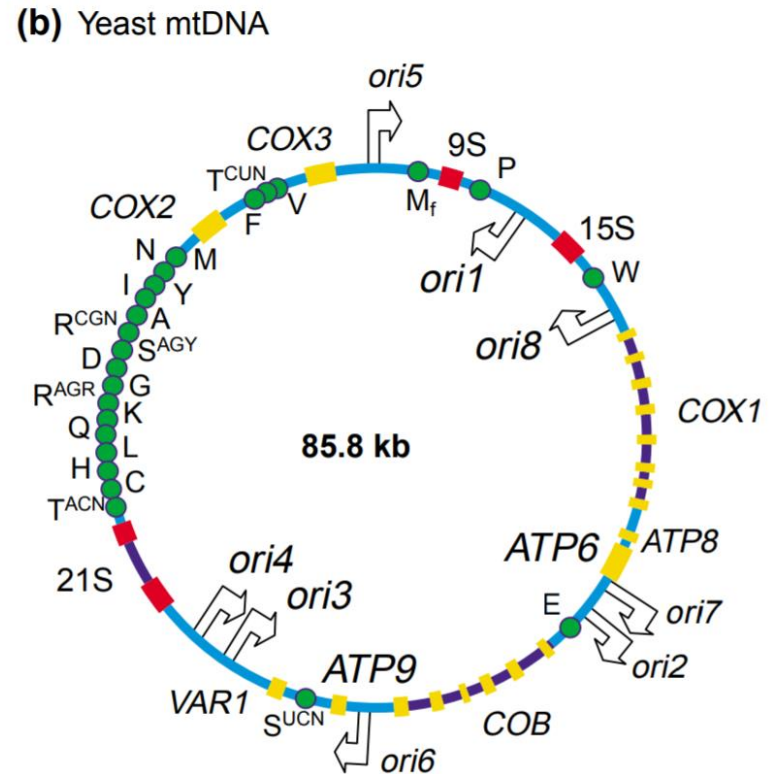
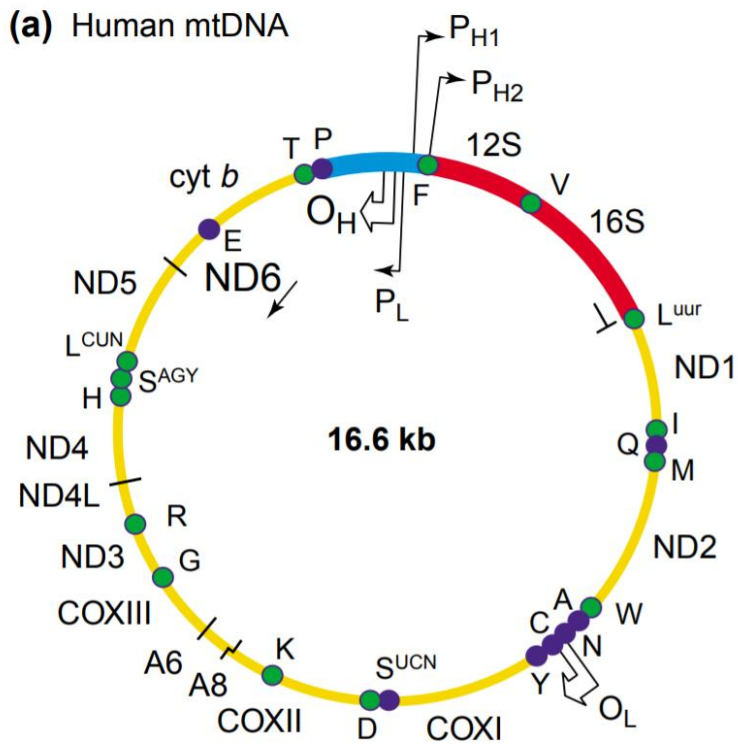
Recombination Driven (RDR)



PolRMT Primed



Rolling Circle



- tRNA (H, L strand)
- ▬ Protein coding
- ▬ rRNA
- ▬ Noncoding (D-loop)
- ⤴ Replication origin
- ▾ Promoter
- ⊣ Transcriptional terminator

- tRNA
- ▬ Protein coding
- ▬ rRNA and 9S RNA
- ▬ Noncoding
- ▬ Intron
- ⤴ Replication origin

TRENDS in Genetics

Transkripce mtDNA genomu:

mRNA je syntetizována z mtDNA a translatována v mitochondriích

tRNA geny pro tRNA u kvasinek neoddělují další mt geny na rozdíl od *H. sapiens*

Mezery mezi geny jsou u kvasinek mnohem větší

Mt geny u kvasinek mají introny

Některé geny u kvasinek nemají standardní stop kodon (5'-ATATAAGTA-3' - promotor *S. cerevisiae*)

Transkripce je monocistronická (u lidí je polycistronická)

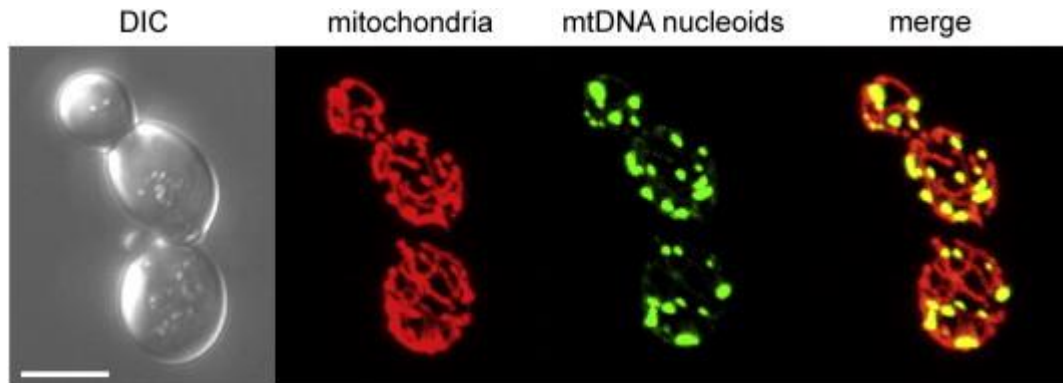
Translace mtDNA genomu:

- Mitochondriální mRNA nemá 5' čepičku, kvasinka má 5' netranslatovanou oblast
- Existují mtDNA-specifické iniciační faktory, elongační faktory a uvolňující faktory pro translaci, mitochondriální ribozomy
- AUG je startovací kodon (váže fMet-tRNA jako u bakterie).
- Není potřeba tolik tRNA genů jako u jaderního párování bází mezi tRNA a mRNA
- Mutace v genech potřebných pro translaci vedou k tvorbě respiračně deficientních buněk (petit, syn-)

TABLE 19-3 Alterations in the Standard Genetic Code in Mitochondria

Codon	Standard Code: Nuclear-Encoded Proteins	Mitochondria				
		Mammals	<i>Drosophila</i>	<i>Neurospora</i>	Yeasts	Plants
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp	Trp	Stop
AGA, AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Ile	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Met	Ile
CUU, CUC, CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

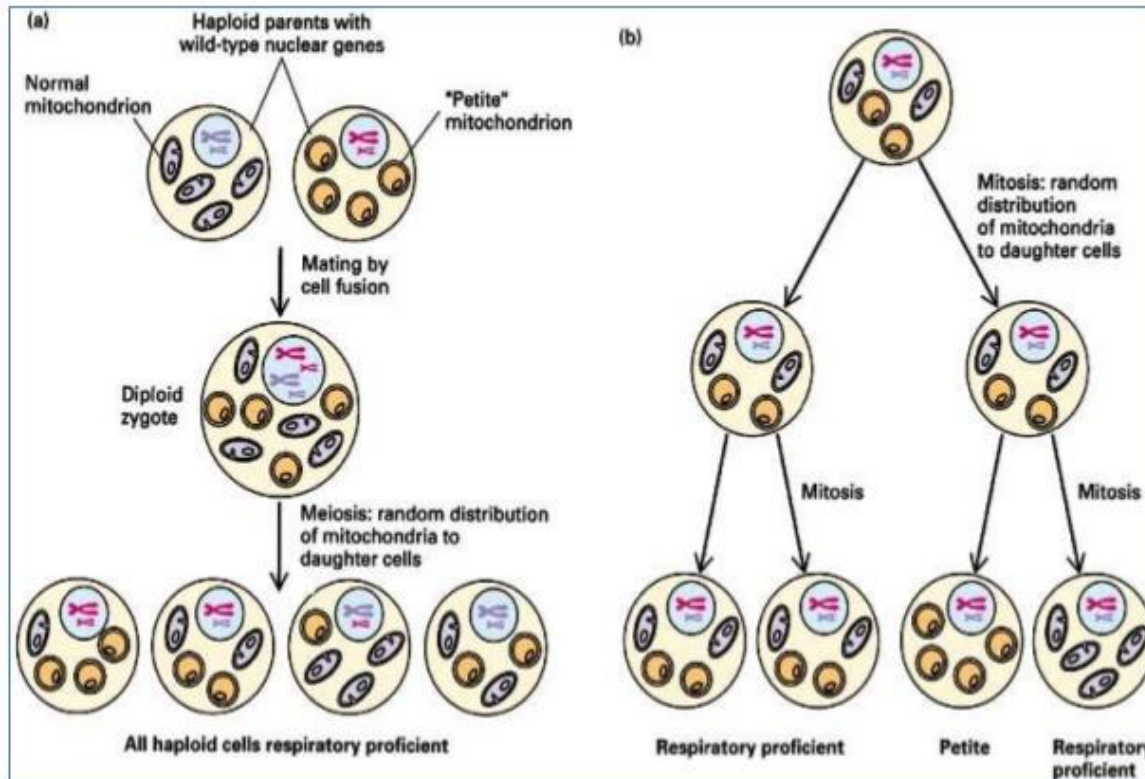
Kvasinkové mitochondrie – organelová síť



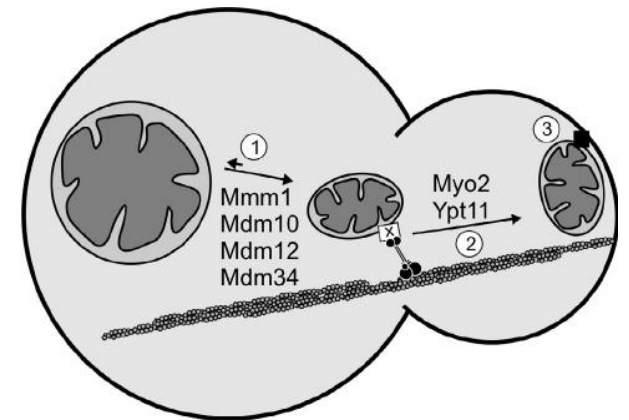
mitochondria targeted ERFP
červený signál

Abf2-GFP zelený signál

Mitochondrial Inheritance in Yeast



Ne-Mendelovská dědičnost

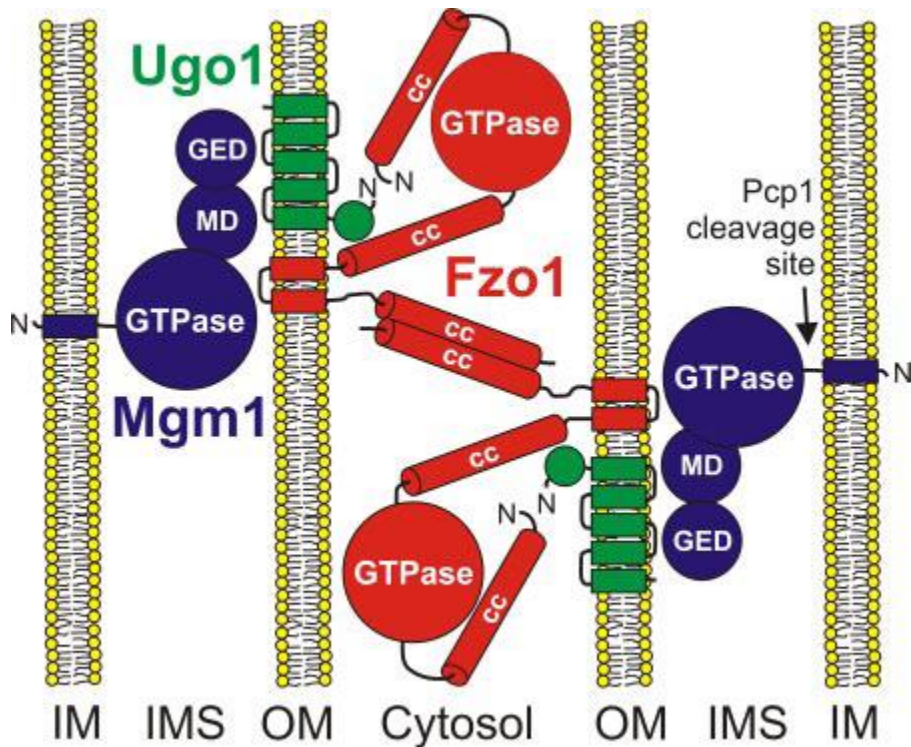


- 1) Udržování transportovatelých mitochondriálních jednotek
- 2) Transport mitochondrie do pupenu po mikrotubulech
- 3) Zachycení mitochondrie v špičce pupenu

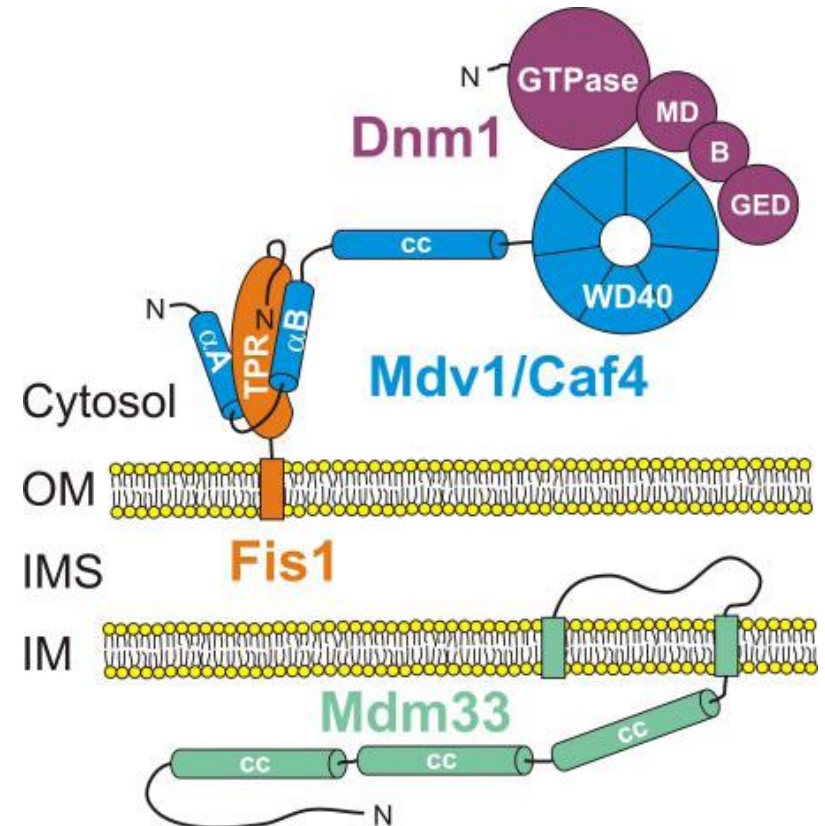
Fúze mitochondrií (fusion)

Rozdělení mitochondrií (fission)

IM vnitřní mt membrána, **IMS** mezimembránový prostor, **OM** vnější mt membrána



Ugo1 interaguje s Fzo1 a Mgm1 proteinem
Štěpení Mgm1 pomocí Pcp1 vede k fúzi
a je regulováno hladinou ATP



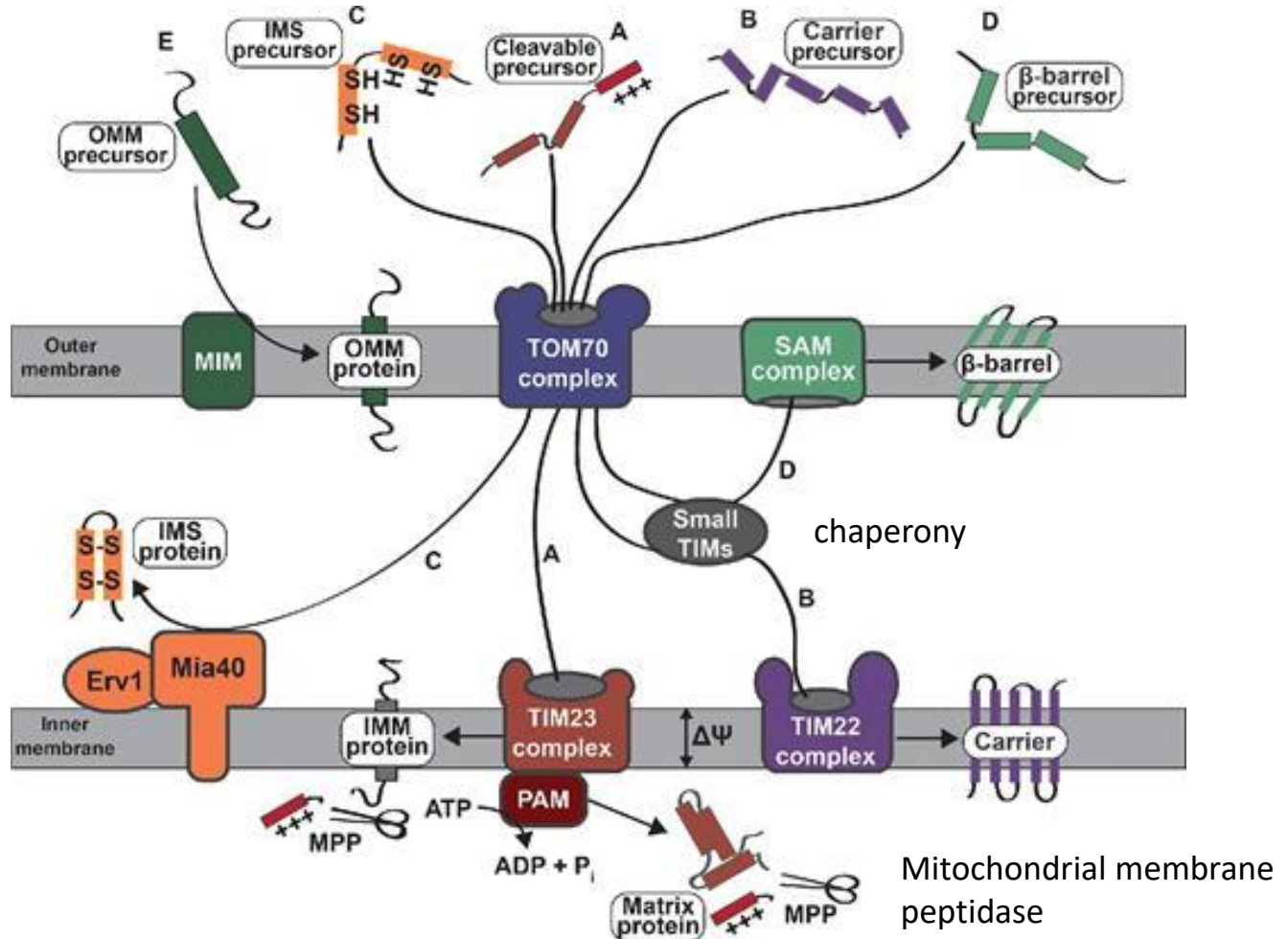
Mdv1 (anebo Caf4) slouží jako adaptor
spojující Dnm1 a Fis1, Dnm1 tvoří dynamické
oligomery obepínající mitochondrii což vede
k rozdělení, funkce Mdm33 není známa

Mitochondriální importní mašinerie

IMM
Inner mitochondrial
membrane

OMM
Outer mitochondrial
membrane

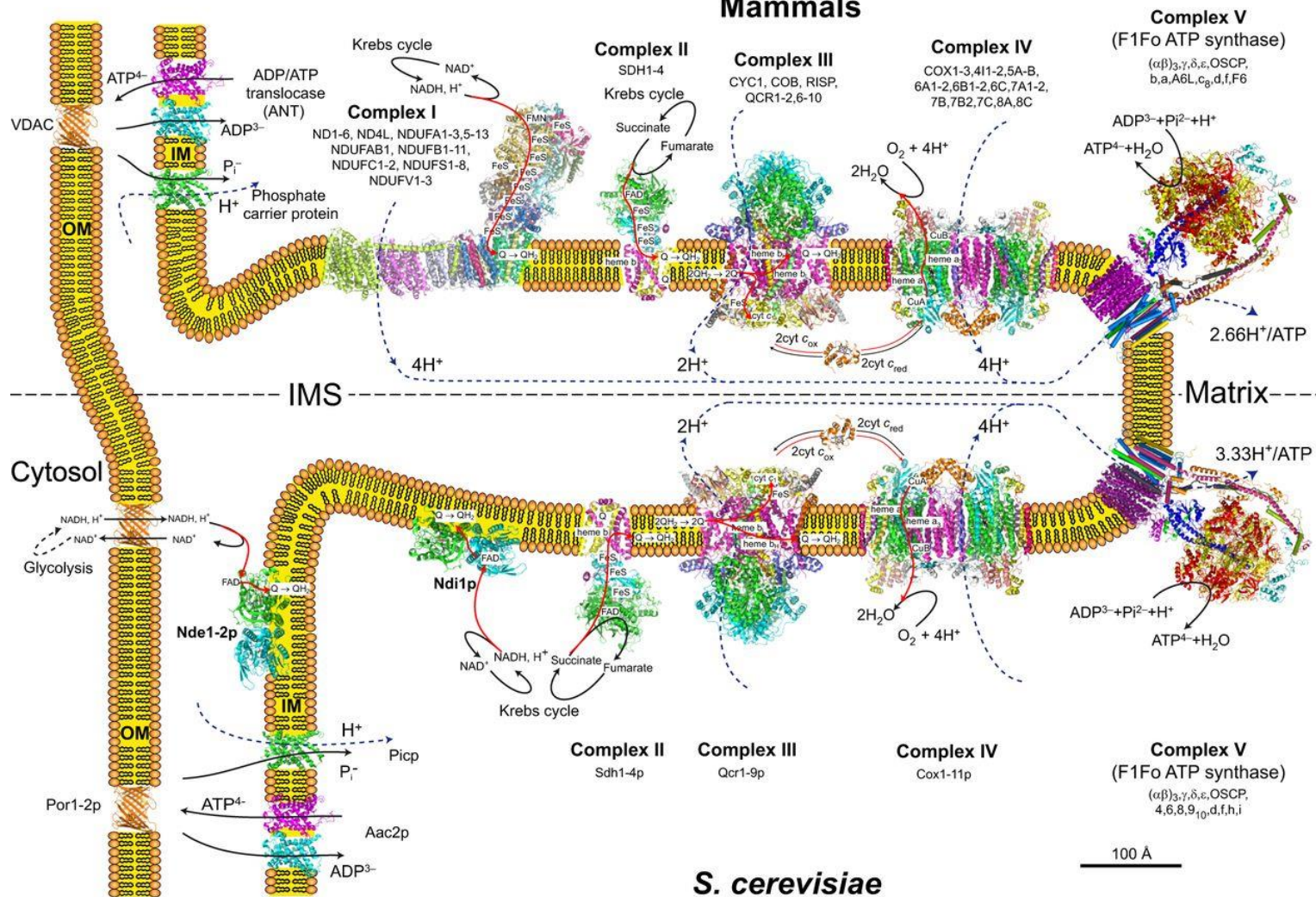
IMS
Inner membrane space



(A) Cesta využívající odštěpitelnou presekveni pro import prekurzorového proteinu do vnitřní membrány a matrixu (B) Importní cesta pro hydrofobní přenašeče metabolitů (C) Import prekurzoru bohatých na cystein do mezimembránového prostoru pomocí MIA mašinerie (D) Proteiny obsahující β -barely jsou translokovány přes TOM komplex a pak vázané na TIM šaperony a vložené do vnější mt membrány pomocí SAM komplexu (E) Několik dalších cest existuje pro import α -helikálních proteinu do vnější membrány, např. přes MIM komplex.

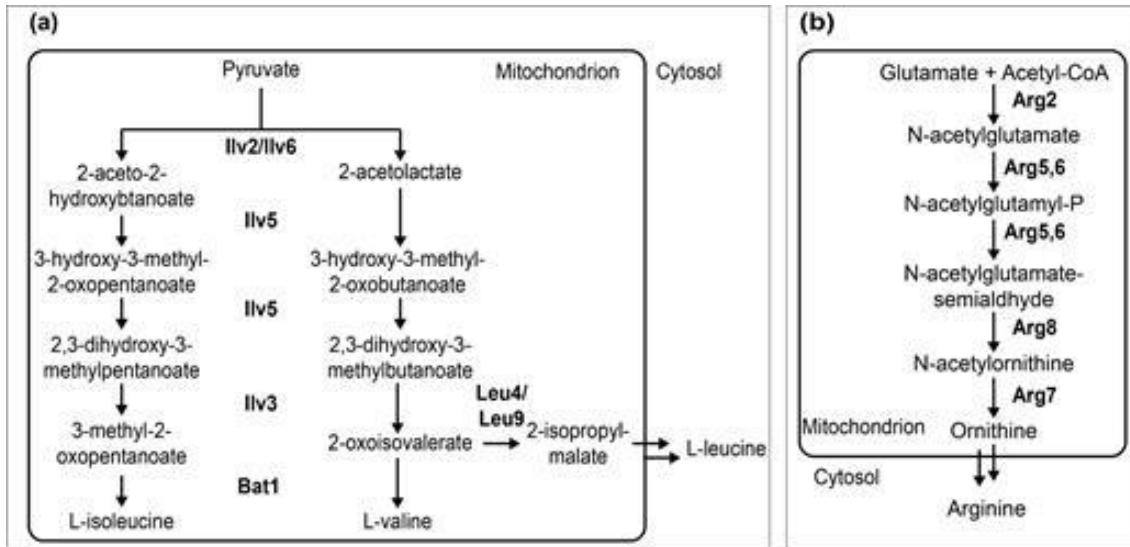
Oxidační fosforylace OXPHOS

Mammals



Komplexy I-IV spolu s ubiquinonem (Q) and cytochromem c (cyt c) přenášejí elektrony na kyslík pocházející z NADH a sukcinátu produkovaného v Krebsově cyklu, tento přenos je spřažen s translokací protonů přes mt matrix do mezimembránového prostoru, protonový gradient přes vnitřní membránu je pak dále využit komplexem V na produkci ATP z ADP a anorganického fosfátu. U kvasinek je komplex I zastoupen NADH dehydrogenázou (Ndi1p)

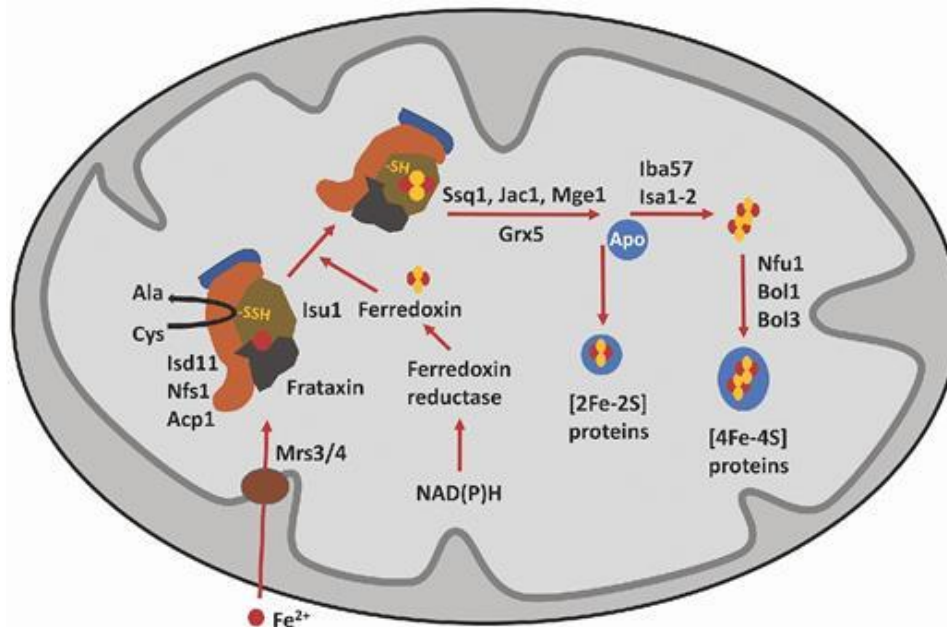
Kvasinkový mitochondriální metabolismus aminokyselin



(a) Syntéza leucinu, izoleucinu a valinu

(b) Syntéza ornitinu, meziprojektu při biosyntéze argininu

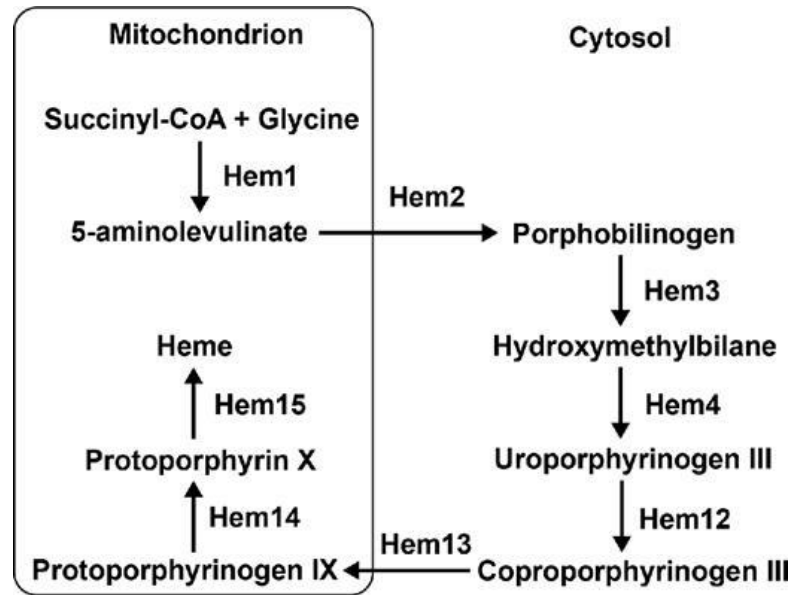
Biogeneze Fe/S železo-sulfidových klastrů u kvasinek



Fe²⁺ jonty jsou importované přes membránu skrze Mrs3/4, syntéza Fe/S klastrů na Isu1 proteine, použitím síry z cysteinu desulfurázového komplexu Nfs1-Isd11-Acp1 a elektronů z řetězce sestávajícího z NAD(P)H, ferredoxin reduktázy a ferredoxinu.

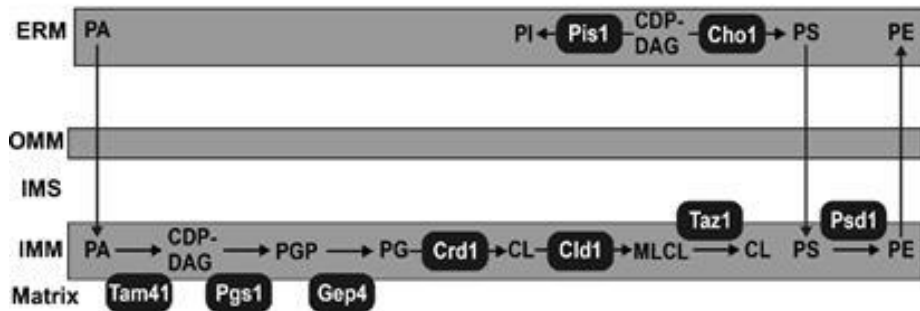
Klastry jsou pak přenášeny dále pomocí dalších faktorů na cílové proteiny

Biosyntéza hemu v kvasinkách



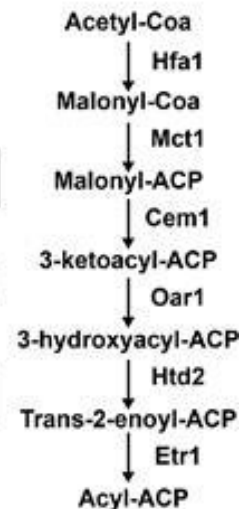
Metabolizmus lipidů v kvasinkové mitochondrii

PA: phosphatidic acid; **CDP-DAG:** CDP-diacylglycerol;
PGP: phosphatidylglycerolphosphate;
PG: phosphatidylglycerol; **MLCL:** monolysocardiolipin;
PS: phosphatidylserine; **PI:** phosphatidylinositol

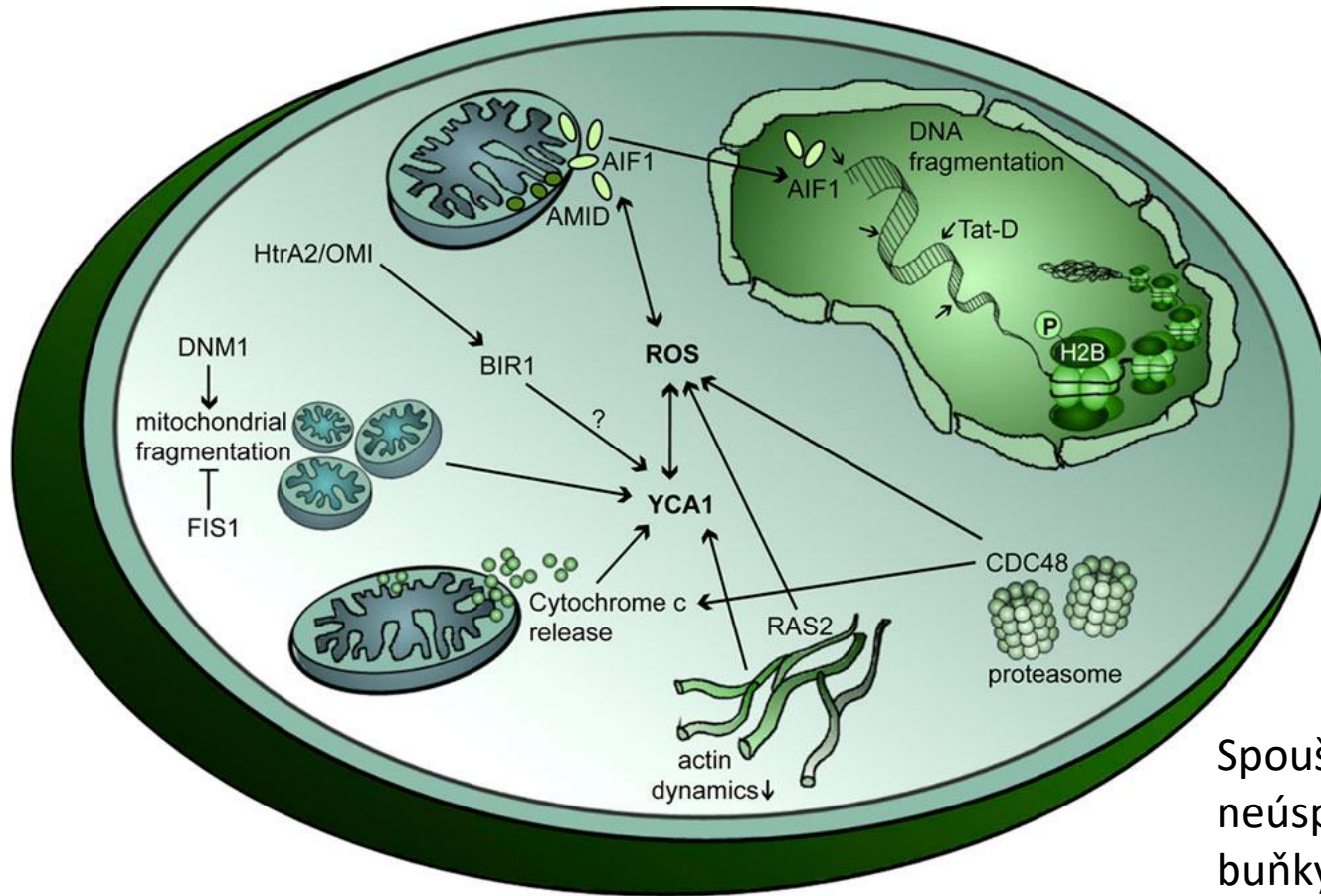


a) Biosyntéza fosfatidyletanolaminu (**PE**) a cardiolipinu (**CL**) ERM- membrána endoplazmatického retikulu

(b) Syntéza mastných kyselin v mitochondriích



Základní molekulární mašinerie kvasinkové apoptózy

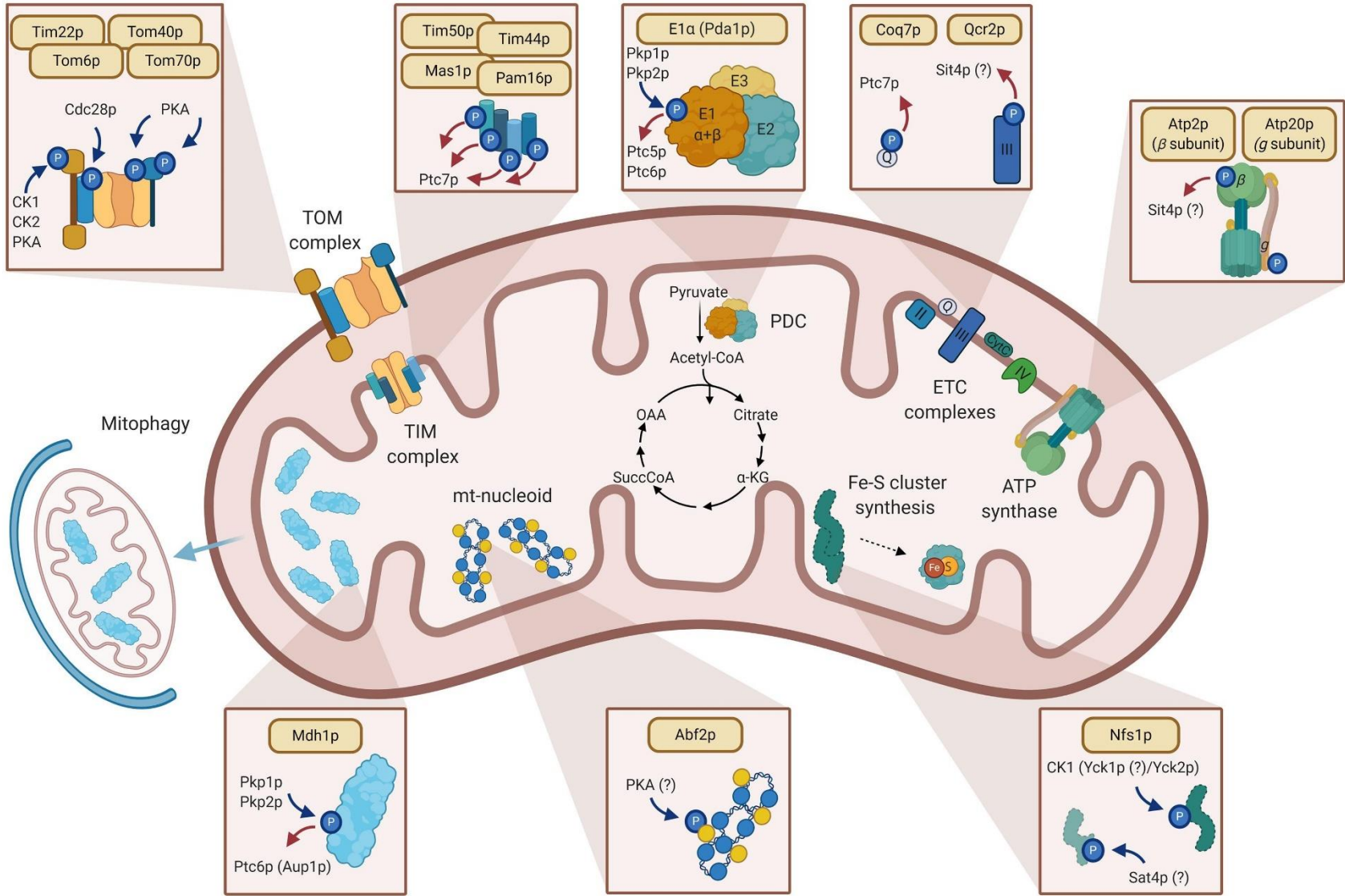


Spouštění apoptózy při neúspěšném páření, stárnutí buňky, napadení killer toxiny

Kritické proteiny spouštějící buňkovou smrt jsou konzervované i u kvasinek, kaspáza YCA1, mitochondriálně lokalizované proteiny: apoptosis-inducing factor 1 (AIF1), HtrA2/Omi (NMA111), a AMID (NDI1), a antiapoptotické proteiny CDC48 a BIR1. Kvasinková programovaná smrt je též spojená s fragmentací mitochondrií, uvolněním cytochromu c, cytoskeletálními turbulencemi, a fosforylací histonů H2B.

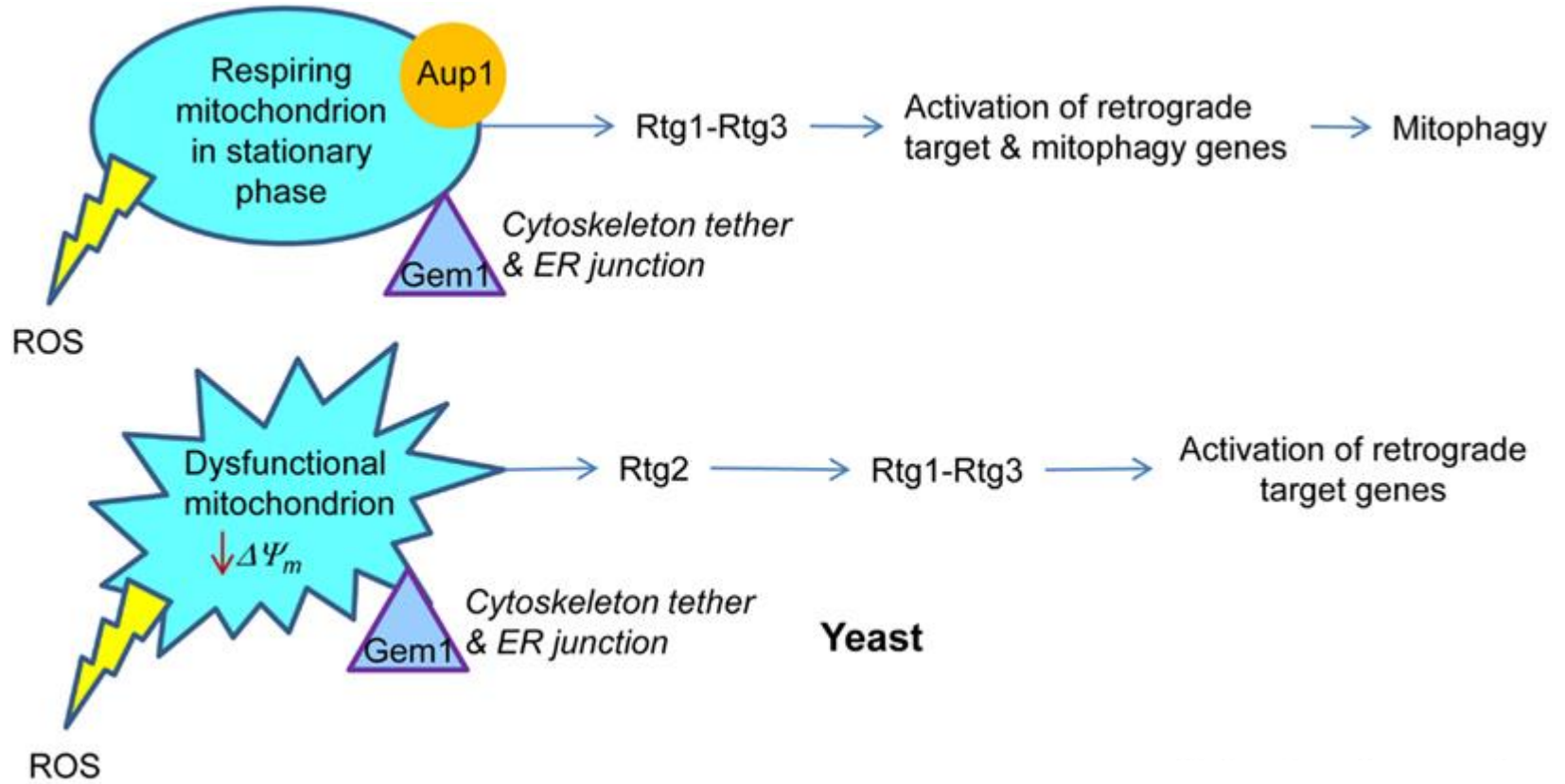
Mitochondrial protein phosphorylation in yeast revisited

(Frankovsky et al. Mitochondrion Volume 57, March 2021)



Aktivita komplexu pyruvát dehydrogenázy je regulovaná mitochondriálními PK (kinázemi) and PP (fosfatázama)
 Acylation v mitochondriích? non-enzymatic proces?

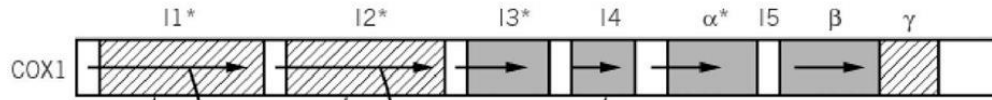
Retrográdní signalizace v kvasinkách



Respirující mitochondrie v nedělicí se buňce aktivuje retrográdní odpovědí specifické geny a geny pro mitofagii, buňka se adaptuje na stacionární fázi. Aup1, protein fosfatáza mezimembránového prostoru je esenciální pro tuto dráhu. RTG1-Rtg3 jsou retrográdní transkripční faktory.

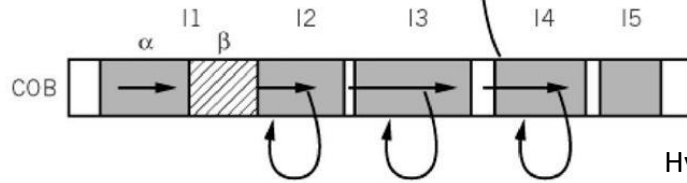
Dysfunkční mitochondrie v rostoucích mitochondriích spouštějí klasickou RTG dráhu, kde RTG2 hraje esenciální úlohu.

Mitochondriální introny



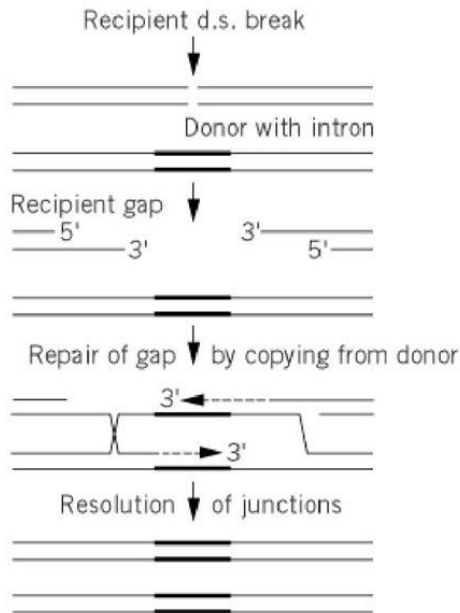
Prázdné pole-exon
šrafované pole - Intron I skupiny,
plné pole Intron II skupiny

Šipky představují ORF
Produkty stimulují splicing
- maturázy

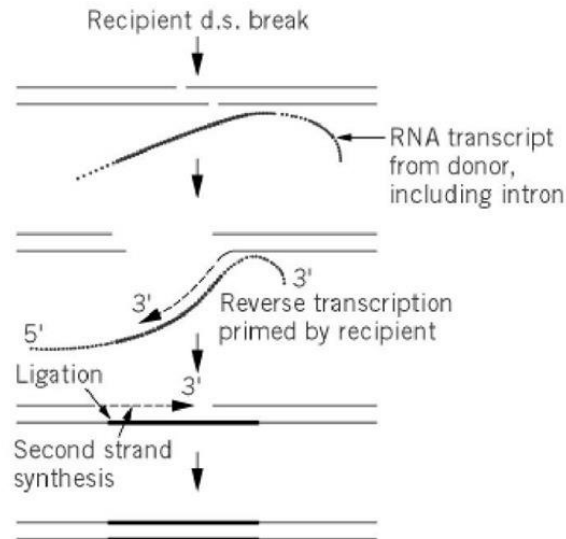


Hvězdička – introny
přeskakující do bezintronové
mtDNA „Homing“

Homing

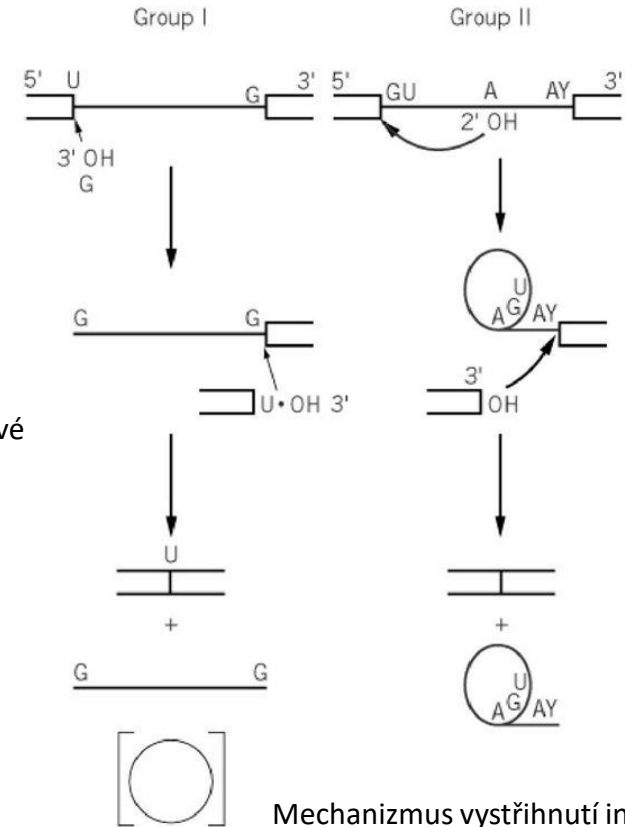


(a) Skupina I introny



(b) Skupina II introny

Splicing



Mechanismus vystřihnutí intronu
RNA funguje jako ribozym, má 3D
specifickou strukturu

Nukleární faktory potřebné pro splicing mtDNA
intronu

Např. Mss116, the DEAD-box RNA šaperon
Oxa1, inzertáza