

MITOCHONDRIE

Historie

- 1886 Richard Altmann – pozoroval „bioblasty“ – místo buněčné oxidace;
- 1898 Michaelis – oxidoredukční změny v M (mitochondrie)
- 1949 Eugene Kennedy a Albert Lehninger: důkaz že mitochondrie jsou místem oxidačního energetického metabolismu
- po r. 1950 rozvoj elektronové mikroskopie; od r. 1992 s použitím GFP důkazy o tom, že M jsou dynamické struktury
-

chondriom = soubor všech M v b.

Struktura

- dvojitá membrána
- 2 kompartmenty – matrix a mezimembránový prostor
- Es původ – pravděpodobně jedinou Es událostí, před cca 1,5 mld. let – všechny jsou **monofyletické**
- veškeré eukaryotické b. obsahují M; nicméně u některých parazitů nejsou, ale máme důkazy o jejich druhotné ztrátě, nebo jsou u některých buněk drasticky redukovány
- předek M = předchůdce α -proteobakterií, pravděpodobně *Rickettsii*
- **pleomorfní struktury** – nabývají mnoha různých tvarů
- viz. obr. – různé tvary M, s typickým „buřtovitým“ tvarem → nicméně ve všech buňkách nebude stejný → meristem. b. lupiny – velmi protáhlá struktura
- tvary závisí na typu buňky, na metabolické aktivitě a na tom, zda-li se jedná o R či živočišnou b.
- kvasinky: M tvoří 5-10 tubulárních struktur, které v kortexu tvoří retikulum
- Žb: M diskrétní kulovité, buřtovité struktury; nicméně některé tvoří dlouhé tubulární útvary tvořící retikulum u jádra – kultivované buňky obecně
- Rb:
- viz. obr. nahoře mezofyl. b. *Arabidopsis* (červeně vidíme chloroplasty-autoflorescence) – zelené M; dole kultivované b. tabáku – zelená barva ER; červené M
- M jsou kulovitého až protáhlého tvaru
- struktura opět závisí na metabolické aktivitě b.; po držení v anaerobním prostředí M tvoří disky a složitější struktury → rostlina reaguje na změnu prostředí metabolicky
- mezofylová b. *Arabidopsis* obsahuje 200-300 M; u tabáku (větší b.) 500-600 M

- dynamicky se pohybující struktury; čím „zdravější“ a aktivnější buňka je, tím aktivnější jsou M
- **pohyb po drahách určených aktinovým cytoskeletem** (jeho zničením se omezí pohyb)
- mikrotubulární cytoskelet hraje roli při kotvení M na specifická místa
- **plastické organely** – velmi rychle dokáží měnit tvar
- dochází k neustálým fúzím, dělení a větvení M → vlastnost popsána u všech typů buněk
- u Žb popsáno jako dynamické syncytium → M tak v čase tvoří 1 rozlehlý prostor; bereme v úvahu celou dynamiku
- u Rb spíše tvoří oddělené diskrétní struktury; nicméně i zde je **charakterist. rychlá fúze a dělení** → navržena **hypotéza nespojitého celku**; vysvětluje že chondriom vytváří vnitřní prostor, který spolu ale v 1 okamžiku nesouvisí, v delším časovém úseku ale ano

- viz video: obarveno fluoresc. Proteinem Kaede, který je zelený a po ozáření světlem konvertuje na červenou b. – fotokonvertibilní protein; využito tak že v 1 okamžiku se některé ozářily a konvertovaly na červené → za chvíli červená zmizela a změnila se na oranžovou = výsledek fúze zelené a červené M – důkaz fúze M a výměny jejich obsahu
- viz. obr. – po prvotní fúzi velmi rychlé oddělení po výměně obsahu

V rostlinách v drtivé většině existence jako samostatné organely, ale v určitých situacích chondriom dokáže celkově fúzovat:

např. merist. b. Arabidopsis (elektronová tomografie pro rekonstrukci chondriomu v metabolicky aktivní b. meristému; modře – část chondriomu v tom okamžiku tvořící celek vs. zeleně distinktní M). V meristem. b. je většina M v jednom celku a jen minimum tvoří separátní organely. Dochází ke změnám fúzního kompartmentu chondriomu **v průběhu buněčného cyklu: během G1 a G1-S fáze – většina samostatně; G2 fáze (příprava na dělení) – zdvojení chondriomu; těsně před mitózou většina M tvoří jednu spojitou strukturu.** Prometafáze – M orientovány a tvoří klec kolem dělicího vřeténka, kdy na jeho pólech jsou M zfúzované – poskytují pro dělení nezbytnou energii. Pozdní cytokineze (buňky odděleny na 2 dceřinné) – většina M spíše jako samostatné organely opět. Důvod: **těsně před mitózou 80% M spolu sdílí svůj obsah** → předpoklad, že když se vyskytnou v 1 kompartmentu, umožňuje M DNA volnou rekombinaci; **rekombinace je nesmírně aktivní proces; → zabráněno hromadění mutací a totální ztrátě některých genů když spolu takto mohou všechny komunikovat, udržení stability mitochondriálního genomu.**

Fce rostlinných mitochondrií

- aerobní respirace
- podílí se na fotorespiraci
- veškeré metabolické děje v M poskytují buď energii a nebo i další molekuly využitelné v metabolismu → produkce sacharidových kamenů pro další biosyntézy

Kompartmenty (4) – klasická představa

- vnější a vnitřní membrána
- mezimembránový prostor
- matrix M
- viz. obr. – vnitřní mem. vybíhá v kristy – místo elektron transp. řetězce (ETŘ); kristy spojeny s mezimembr. prostorem úzkými kanálky – *crista junction model*
- možnost dalších 2 kompartmentů: *vnitřní obsah krist + membrána krist*

MICOS (mitochondrial contact site and cristae organizing system) zajišťují vznik krist a také transport proteinů do mitochondrie. Jde o proteinový komplex sestávající většinou z membránových proteinů. Kromě výše zmíněného má též další funkce: např. kontrola transportu lipidů do membrán mitochondrie (z ER), fúze mitochondrií, organizace genomu mitochondrie.

Vnější membrána M

- **vyšoká propustnost** dána poriny – nespecifické kanály (nalezeny i v bakteriích – prokaryotický původ)
- translokázy musí transportovat veškeré proteiny a jiné velké látky, které poriny neprojdou

Mezimembránový prostor

- souvisí s vnitřním prostorem krist přes úzké kanály → předpoklad kontrolované výměny metabolitů

Vnitřní membrána M

- **nepropustná** pro většinu látek
- další látky využívají specifické přenašeče; hmotnostní obsah proteinů vnitř. mem. Až 70 %
- **kardiolipin** – může být až 20 % všech lipidů; fce: protonová past – bicyklická struktura – může měnit konformace podle toho, co je na něj navázáno → schopen vázat H⁺ a navenek funguje elektronegativně (kryje jejich náboj) – **napomáhá rozdělení protonů přes vnitřní mem.**

M. Má též další funkce: ovlivňuje složení a stabilitu komplexů ETŘ ve vnitř. mem., podílí se na formaci krist, podíl v dělení mitochondrií.

- nachází se zde molekuly ETŘ a zajišťují oxidativní fosforylaci

Matrix

- původní prokaryotická cytoplasma; ribosomy prokaryot. typu
- enzymy energet. metabolismu – citrátového cyklu
- DNA ve formě nukleoidu (DNA s navázanými proteiny)

Aerobní respirace

- **účelem metabolických reakcí je oxidace organ. látek za vzniku CO₂ a H₂O, a uvolněná energie je uskladněna do ATP**

1. glykolýza – v cytosolu

- během G produkovány důležité molekuly pro ETŘ – redukované kofaktory a ATP
- pyruvát transportován do M

2. Krebsův cyklus – v M probíhá

- vstupuje pyruvát, ale mohou být metabolizovány i MK – β-oxidace probíhá i zde
- **pyruvát oxidativně dekarboxylován na acetyl-CoA**
- **cílem je oxidovat pyruvát za vzniku CO₂ a za účasti kofaktorů NAD⁺ a FAD (vznik NADH a FADH₂) a vzniku ATP**

3. Oxidativní fosforylace – vnitřní membrána M

- ETŘ = soubor proteinů na vnitřní straně membr.
- redukované kofaktory (nosiče protonů) – oxidovány ETŘ → konečný akceptor elektronu je kyslík
- **cíl: řízeně využít energii vznikající při oxidaci k přenosu H⁺ přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru, čímž vzniká gradient**
- **ATP syntáza využívá přenos H⁺ po koncentračním spádu pro vznik ATP**
- konzervovaná struktura u eukaryotických buněk
- nicméně v rostlinných b. jsou alternativní molekuly, které dokáží oxidovat NADH na obou stranách membrány a upouštět tak částečně energii
- **alternativní oxidáza – AOX - přenáší elektrony z ubichinolu na kyslík, čímž obchází IV. komplex cytochrom oxidázu → vzniká voda a energie je disipována jako teplo**
- fce termogeneze – popsána u květů čeledi Araceae;
- fce napomáhání k vyrovnávání uhlíkového metabolismu; upouští energii když je ETŘ zatížen
- fce přesunu NAD⁺, když je ETŘ přetížen NADH z fotosyntet. řetězce
- redukce ROS (reaktivní formy kyslíku)
- „energetický upouštěcí ventil“

Lokalizace ETŘ v membránách krist. Vnitřní membrána mitochondrie naopak obsahuje přenašeče.

Vliv metabolické aktivity na morfologii M:

- **ortodoxní stav** – prostor matrix je zvětšen a krist je velmi málo; málo metabol. aktivní b. nepotřebují tak dýchat; → **stav kdy je b. málo metabolicky aktivní**
- **kondenzovaný stav** – u **metabolicky aktivních b.** – kristy jsou zvětšené a matrix je naopak málo

Transport proteinů do M:

- transport analogický s transportem do chloroplastů, ale sekvenčně nepříbuzné
- většina proteinů musí být do M dopravena

- proteiny překládány v eukaryot. cytoplasmě a → transport nesbalené či volně sbalené
- i s chaperony a **proteiny obsahují presekvenční**
- zaznamenán i transport nascentního proteinu z ribozomu
- **protein pro fci v matrix má 2 presekvenční** – odštěpení 1. presekvenční endopeptidázou v mezimembr. prostoru → odštěpení 2. presekvenční v matrix další endopeptidázou
- presekvenční může být i uprostřed proteinu
- systémy TOM a TIM

TOM – na vnější membráně M

- **centrální Tom40 transmembr. kanál** (konzervován mezi organismy)
- **Tom7/22** souvisí s Tom40 – konzervované
- receptory: Tom20/70 – zajišťují **rozpoznání presekvenční**; v rostlinách a řasách se vyskytují také, ale jde o sekvenčně nepříbuzné proteiny oproti živočišným; C-terminální kotvení u rostlin, zatímco N-kotvení u živočichů. Jde o příklad konvergentní evoluce: různé evoluční dráhy vedly ke vzniku struktury s totožnou fci.

SAM komplex (sorting and assembly machinery) – rozebírá proteiny v mezimembr. prostoru

- zajišťuje lokalizace do vnější membrány

TIM – transport do vnitřní membrány a nebo až do matrix

- **TIM22** transport do vnitřní membrány; závislý na existenci transmembr. potenciálu
- umístění proteinů do vnitřní membrány – především proteiny ETŘ
- **TIM23** transport do matrix a některé proteiny do vnitřní memb.
- obsahuje protein tvořící kanál + motor – musí překonávat transmembr. potenciál
- při transportu do matrix – TOM/TIM komplexy tvoří 1 komplex zajišťující transport až do matrix → *kontaktní místa*.

MICOS komplexy v místě kontaktních míst.

Genom

- podobný genomu dnešních bakterií
- geny, které zůstaly na prokaryot. chromozomu jsou sekvenčně příbuzné genům dnešních bakterií
- většina genů přesídlila do eukaryot. jádra
- **i pokud jsou geny kódovány M, jsou stále kontrolovány eukaryotickým jádrem**
- obrovský rozsah velikostí genomu mitochondrií u rostlin: 200 kb (Brassicaceae) – 2400 kb (meloun) → rozlišuje to velmi rostlinu od rostliny
- u rostlin je velmi plastický – **M genom má vysokou komplexitu**
- genom u rostlin rozsáhlejší, ale neznamená to, že kóduje o mnoho více genů
- **u rostlin** – 57 proteinů; není informačně kondenzován jako u živočichů → **obsahuje obrovské množství nekódující sekvencí; jen 10-30% genomu obsahuje překládané geny**
- nekódující sekvence se dostaly interorganelárním přenosem a díky vysoké duplikační aktivitě M genomu
- u rostlin nebyl detekován 1 kruhový chromosom – „masterchromosom“, na kterém by měly být všechny geny
- detekce mnoha subgenomických struktur – kruhy, sigma struktury, lineární struktury – mohou být menší ale i větší než předpokládaný masterchromosom
- **v M genomu tedy existuje soubor cirkulárních DNA struktur**
- **obsah repetitivních sekvencí** – desítky; (vs. plastidy 1-3). Množství repetitivních sekvencí je hnací motor vzniku různých subgenomických útvarů. Důvod: zvýšená rekombinační

aktivita, která souvisí s udržení stability genomu (vs. u živočichů je rekomb. aktivita velmi nízká) znamená stálou přestavbu mitochondriálního genomu pomocí homologní rekombinace. Rekombinací mezi **invertovanými** repetitivními sekvencemi → dojde pouze k obrácení pořadí na chromozómu. Rekombinací mezi **přímými** repetitivními sekvencemi → rozpad 1 chromosomu na 2 menší. Rekombinace též mezi různými subgenomickými útvary – vznik větších chromozomálních útvarů.

Lze izolovat rostlinné M bez DNA tak i M s více kopiemi genomické DNA → potvrzení fúzování M a výměny DNA. Proto zřejmě dochází k rozsáhlým fúzím chondriomu rostlinné buňky před dělením meristematických buněk – zajištění stability genomu a též rovnoměrné distribuce DNA do každé mitochondrie.

Dělení M:

- **FtsZ protein** – předchůdce tubulinu, dokáže polymerovat ve filamentové struktury
- objev u E. coli, které nesly mutaci, která se projevila při zvýšené teplotě tím, že buňky tvořily dlouhé provazcovité struktury, které rostly ale nemohly se rozdělit
- při dělení plastidů přes PD prstenec – kombinace prokaryot. faktorů (Ftsz) a eukaryot. faktorů (př. dynamin)
- **zde přes MD - dělicí aparát odvozen a využívá eukaryotické faktory**
- *evoluční spojky* – nižší organismy, které mají stále zachované prokaryot./eukaryot. složení dělicího aparátu M; využití FtsZ (ale kódovaného eukaryot. jádrem) při dělení
- viz. obr. – vlevo MD řasy (mezi šipkami) – tvořen i vně M; vs. vpravo – v rané fázi pracuje FtsZ a dynaminy se k dělicímu aparátu přikládají až při konstrikci M

PEROXISÓMY

- evolučně konservované struktury; u všech eukaryot
- obsahují 1 membránu
- viz. obr. – MB – microbodies = peroxisomy; čtvercové struktury jsou krystaly enzymu katalázy (CAT)
- **dělí se zaškrcováním**
- transport proteinů se specifickou sekvencí přes přenašeče v membráně
- původ společný u všech eukaryot → teorie pro endosymbiotický vznik, jednalo by se tak o další semiautonómni organelu, jejíž fce je ochrana buněk před oxidativním reaktivním prostředím, O₂ a ROS (=reactive oxygen species)
- nicméně rekonstrukce peroxisomu z ER de novo tuto teorii vyvrací
- navíc na membráně peroxisomů jsou transport. systémy podobné těm na ER, a PX také neobsahují DNA.

Typy:

- **glyoxysómy** – obsahují enzymy pro β-oxidaci MK; výskyt v semenech ukládajících jako zásobní látky MK (proteinová analýza ukázala, že 28% veškerých proteinů je pro β-oxidaci MK a pouze 11% pro fotorespiraci)
- **peroxisómy** (v buňkách s aktivní fotosyntézou)
- Specializované peroxisómy v buňkách kořenů bobovitých rostlin (fixace N₂)
-

Fce peroxisómů: především fotorespirace

Rubisco v plastidech – **oxygénázová aktivita** převažuje nad karboxylázovou a projevuje se v přítomnosti molekulárního O₂

- 5C sloučenina tak není převedena na 6C molekulu karboxylací CO₂, která se pak rozpadne na dvě 3C mol 3-PGA (3-phosphoglycerát) = karboxylátová aktivita, ale **5C sloučenina se**

rozpadne na 3C 3-PGA využitelný v Calvinově cyklu a 2-fosfoglykolát, který není metabolizovatelný → ztráta energie a C

(Rubisco vzniklo ještě v anaerobním prostředí, kde případná oxygenázová aktivita neznamena problém → vznik kyslíkové atmosféry → zvýšená oxygenázová aktivita a ztráty. Rostliny se brání několika způsoby, např: **C4 metabolismus** – lokalizace Rubisca do míst s vyšší koncentrací CO₂, **fotospirace** – zpětná recyklace až 70% ztraceného C)

Fotospirace (neboli glykolátový cyklus)

- Hlavním smyslem fotospirace je přeměna v CC nemetabolizovatelného 2-fosfoglykolátu, vznikajícího oxygenázovou aktivitou Rubisco, na molekulu využitelnou v CC

- **Cyklus zahrnuje 3 kompartmenty: plastid (chloroplast) – peroxisom – mitochondrie**
Děje fotospirace: v plastidu vzniká 2-fosfoglykolát, který je transportován do peroxisomu, kde probíhá reakce s O₂: vznik H₂O₂ (následně rozložen katalázou (CAT) na neškodnou H₂O a ½ O₂) a 2 molekul **glyoxylátu** → z těch je syntetizován **glycin**, který je transportován do M: zde se z glycinu syntetizuje **serin**, který se vrací zpět do peroxisomu → je zde deaminován a vzniká tak **hydroxypyruvát** – ten je redukován na **glycerát** → transport glycerátu do plastidu (chloroplastu), kde glycerát již může být využit v reakcích Calvinova cyklu