

# **Mitochondriální genom, úloha mitochondrií v buněčném metabolismu, signalizaci a apoptóze**

MUDr. Jan Pláteník, PhD

březen 2007

## **Mitochondrie:**

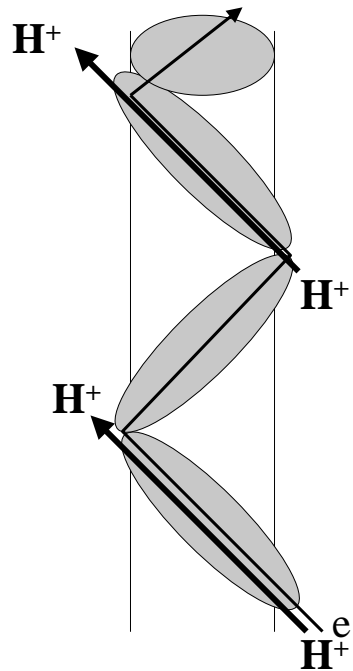
- ... původně fagocytované/parazitující bakterie
- čtyři kompartmenty:
  - vnější membrána
  - mezimembránový prostor
  - vnitřní membrána
  - matrix
- v živé buňce nejsou izolované, ale tvoří dynamickou síť - rovnováha mezi dělením („fission“) a spojováním („fusion“)

## Mitochondrie v buněčném metabolismu

- Dýchací řetězec: konečná oxidace substrátů a syntéza ATP (oxidativní fosforylace)
- Dekarboxylace pyruvátu
- Citrátový (Krebsův) cyklus
- Beta-oxidace mastných kyselin
- Produkce ketolátek
- Část reakcí syntézy močoviny
- Část reakcí syntézy porphyrinů

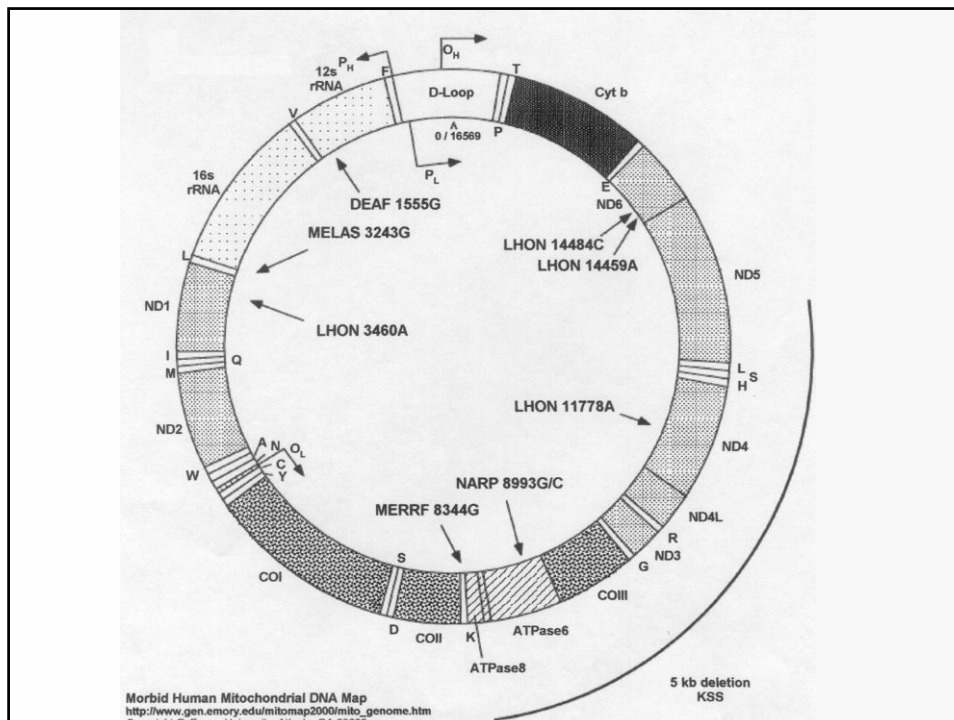
### Redoxní přenašeče v dýchacím řetězci:

- přenášejí vodík (protony+electrony):
  - NAD<sup>+</sup>
  - FAD (FMN)
  - Ubichinon (Koenzym Q)
- přenášejí pouze electrony:
  - Cytochromy
  - Fe-S centra



## Mitochondriální genom

- Cirkulární molekula DNA, 16569 bp (člověk)
- Typicky 1000-10000 kopií v jedné buňce (2-10 v jedné mitochondrii)
- Kromě regulační oblasti D-loop žádné nekódující sekvence
- 37 genů:
  - 2 ribosomální RNA
  - 22 tRNA
  - 13 polypeptidů (podjednotky respiračních komplexů I, III, IV a V)



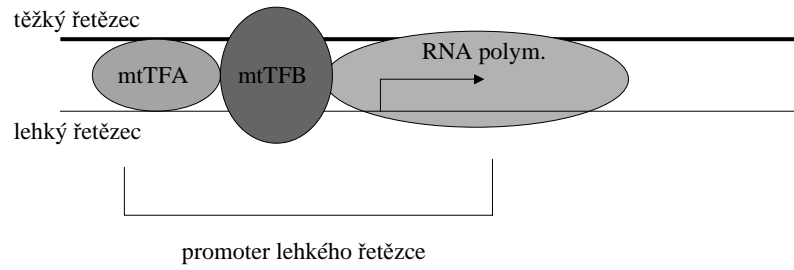
## Mitochondriální genom: **transkripce**

- Promotery pro lehký i těžký řetězec v oblasti D-loop (navzájem nezávislé)
- Zahájení: vazba transkripčního faktoru mtTFA a mtRNA polymerázy
- Oba řetězce mtDNA jsou přepisovány celé
- Lokus časté terminace na rozhraní genů 16S rRNA/Leu tRNA
- Polycistronické transkripty jsou štěpeny RNasou P na konečné tRNA, rRNA a mRNA (“čtyřlístky” tRNA slouží jako interpunkce ..?)

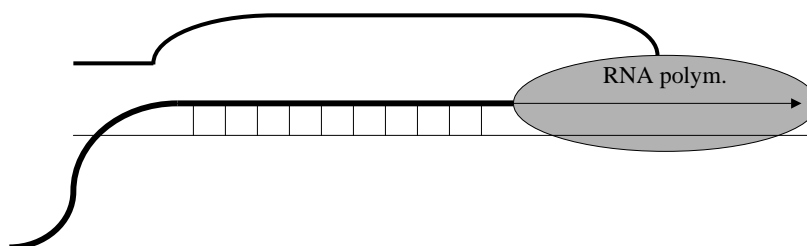
## Mitochondriální genom: **replikace**

- 1 Zahájení transkripce na promoteru lehkého řetězce
- 2 RNA/DNA hybrid (R-loop)
- 3 Štěpení RNasou MRP: ponechává RNA primer
- 4 Polymeráza  $\gamma$ : zahájení replikace těžkého řetězce (+helikáza, SSB)
- 5 Časné ukončení: zůstane D-loop; nebo pokračování

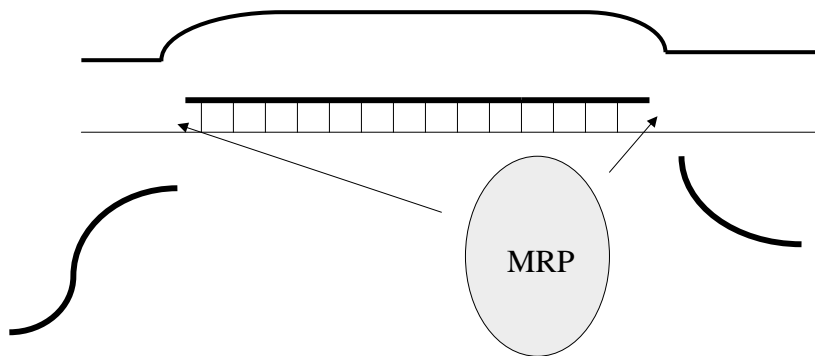
1. Zahájení transkripce na promoteru lehkého řetězce:



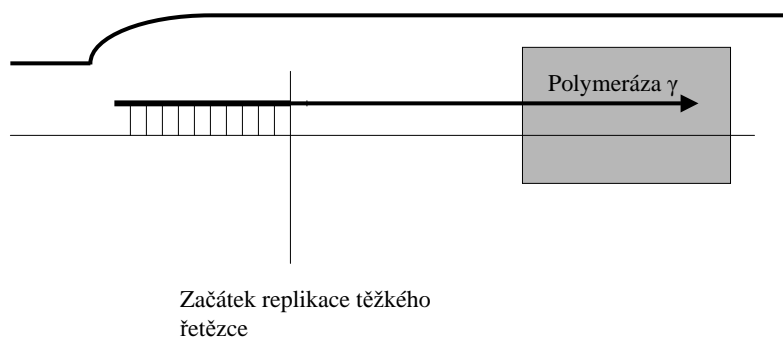
2. RNA/DNA hybrid (R-loop):



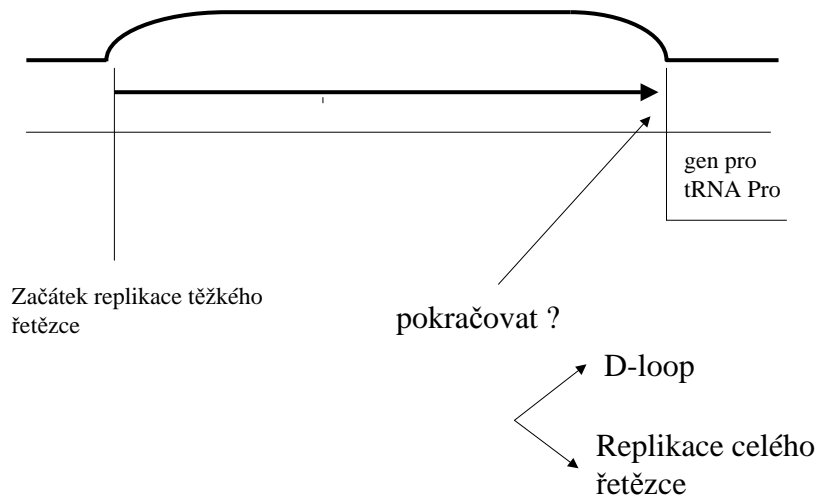
### 3. Štěpení RNAsou MRP: ponechává RNA primer



### 4. DNA Polymeráza $\gamma$ : zahájení replikace těžkého řetězce



## 5. Časné ukončení: zůstane D-loop; nebo pokračování



## Mitochondriální proteosyntéza

- Ribosomy v matrix: malé, 55S
  - 16S a 12S rRNA (není 5S rRNA)
- Citlivost na chloramfenikol, naopak rezistentní k cykloheximidu
- mRNA nemají 5'-cap
  - ... nízká účinnost translace
- Odlišnosti v genetickém kódu (!):
  - UGA: Trp (v cytosolu Stop)
  - AGA, AGG: Stop (v cytosolu Arg)
  - AUA, AUU: Met (v cytosolu Ile)

## Import proteinů do mitochondrie

- Mitochondrie: cca 1000 polypeptidů (dýchací řetězec cca 100 polypeptidů)
- MtDNA kóduje 13 polypeptidů
  - ... naprostá většina mito proteinů je kódována v jádře, syntetizována v cytosolu a importována do mitochondrie

**(Evoluce: postupný přenos mitochondriálních genů do jádra)**

## Import proteinů do mitochondrie

- N-terminální signální sekvence
- Chaperony v cytosolu + ATP brání svinutí proteinů
- Translokace skrz obě mito membrány:
  - receptory & proteinové kanály v místech kontaktu vnitřní a vnější membrány
  - závislé na protonmotivní síle
- Chaperony a chaperoniny v matrix + ATP zajišťují správné svinutí proteinů
- Proteiny do jiných částí mito než matrix: druhá signální sekvence



## Mitochondriální dědičnost

- Mitochondrie dědíme prakticky výlučně od matek
- Mitosa: distribuce mito náhodná
- Možnost heteroplasmie (různé mtDNA)
  - v tkáni
  - v buňce
  - v jedné mitochondrii
- Mitochondrie v buňce si mohou vyměňovat mtDNA
- mtDNA ale nerekombinují

## Mitochondriální DNA mutuje 10x rychleji než jaderná

- Expozice kyslíkovým radikálům (mito hlavní zdroj)
- Mito DNA není obalena histony
- Méně dokonalý systém opravy mitochondriální DNA

## Mitochondriální medicína

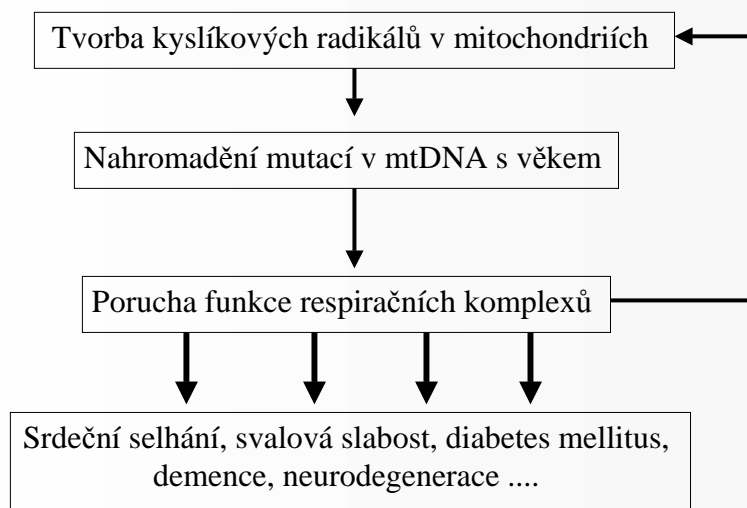
- Defekty oxidativní fosforylace v důsledku mutací v mitochondriální nebo jaderné DNA
- Výskyt nejméně 1 : 8500
- Mutace mtDNA:
  - bodové
    - geny pro podjednotky respiračních komplexů
    - geny pro tRNA
  - velké delece

- Popsáno přes 100 onemocnění-působících mutací mtDNA
- Obvykle heteroplasmie
- Postižení závisí na distribuci mutované mtDNA a na energetické spotřebě jednotlivých tkání - klinický obraz velmi variabilní
- Znevýhodnění postmitotických tkání s vysokou potřebou energie:
  - mozek
  - srdce
  - kosterní sval

## Příklady mitochondriálních chorob:

- Luftova nemoc: hypermetabolismus v důsledku rozpřažení oxidace a fosforylace
- LHON (Leber's Hereditary Optical Neuropathy):
  - slepota u mladých mužů, příč.: mutace v mito kódovaných podjednotkách komplexu I
- MELAS (Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes):
  - příč.: bodové mutace v mito tRNA genech

## Mitochondriální teorie stárnutí



Myši exprimující defektní mitochondriální  
DNA polymerasu (bez 'proof-reading')

...3-5x více bodových mutací v mtDNA, více  
delecí mtDNA

... zkrácená délka života a předčasné projevy  
stárnutí

(Nature 429, 2004, 417-423)

## **Mitochondrie a kalciová signalizace**

## **Calcium v buňce:**

- **V cytoplasmě jen 0.1-0.2  $\mu\text{M}$ , cca 1  $\mu\text{M}$  je již signál**
- **Zdroj signálu je:**
  - **zvnějšku:**
    - **ligandem aktivované  $\text{Ca}^{2+}$  kanály**
    - **napětím řízené  $\text{Ca}^{2+}$  kanály**
  - **ze zásob v ER:**
    - **PI3 receptor/kanál**
    - **ryanodinový receptor/kanál**
      - závislý na membránovém potenciálu (kosterní sval)
      - závislý na  $\text{Ca}^{2+}$  (srdce, CNS)

- **O tom jakou informaci  $\text{Ca}^{2+}$  signál nese, rozhoduje jeho**
  - **LOKALIZACE**
  - **FREKVENCE**
  - **AMPLITUDA**

## Import $\text{Ca}^{2+}$ do mitochondrie

- Regulace metabolismu: dehydrogenázy stimulované  $\text{Ca}^{2+}$ :
  - pyruvát dehydrogenáza
  - isocitrát dehydrogenáza
  - 2-oxoglutarát dehydrogenáza
- Sekvestrace/pufrování cytoplazmatického kalcia za určitých okolností

## Transport $\text{Ca}^{2+}$ v mitochondrii:

- $\text{Ca}^{2+}$  uniporter: facilitovaná difuze, kapacita obrovská ( $V_{\max}$  cca  $1000 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
- $\text{Ca}^{2+}/2 \text{ Na}^+$  exchanger: zejména mozek, srdce ( $V_{\max}$  až  $18 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )
- $\text{Ca}^{2+}$  eflux nezávislý na  $\text{Na}^+$ : zejména játra, ledviny ( $V_{\max}$   $1\text{-}2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )

(Gunter TE & Pfeiffer DR; Am.J. Physiol. 258, 1990, C755-C785)

## Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPT)

- Otevření “megakanálu” ve vnitřní mitochondriální membráně
- Propustnost pro všechny molekuly < 1500 Da
- Kolaps potenciálu vnitřní membrány, vyrovnání protonového gradientu a rozpřažení oxidace a fosforylace
- Zbobjtnání mitochondrie

## Otevření “megakanálu” (MPT)

- Spouští: matrix  $\text{Ca}^{2+}$
- Stimuluje:
  - oxidanty
  - depolarizace
  - fosfáty
- Inhibuje:
  - protony (nízké pH matrix)
  - ionty magnesia
  - ATP a ADP
  - Cyklosporin A

## Funkce MPT:

- Fyziologické (reversibilní) otevření MPT:
  - energeticky výhodný eflux  $\text{Ca}^{2+}$  z mitochondrie
  - Kalciová signalizace:
    - $\text{Ca}^{2+}$ -induced calcium release
    - ...mitochondrie jako “ $\text{Ca}^{2+}$  signalling storing memory device”
- Patologické (ireversibilní): buněčná smrt (apoptóza a nekróza)

## Struktura megakanálu:

- Hypotetická (různí autoři - různé názory)
- Adenylátový transporter (ATP/ADP exchanger) ve vnitřní membráně považován za nezbytnou součást
- ...Ale: myši s genetickým knock-out pro ANT mají stále mitochondrie schopné MPT (Nature 427, 2004, 461-465)
- Další asociované proteiny:
  - Mitochondriální porin (ve vnější membráně)
  - Cyclophilin D
  - Kreatinkináza
  - Periferní benzodiazepinový receptor



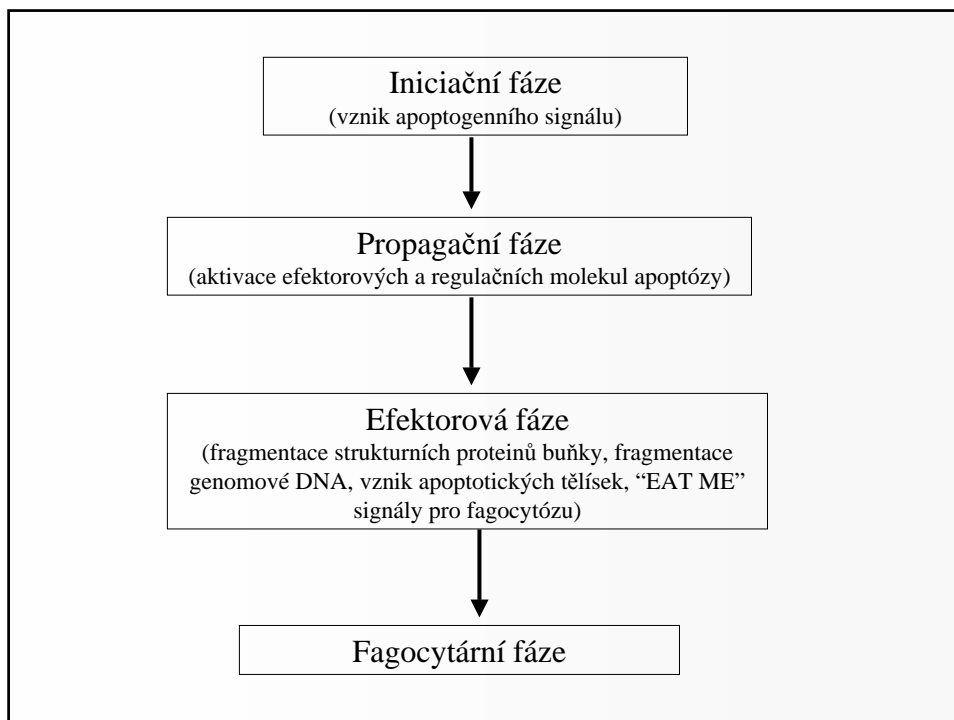
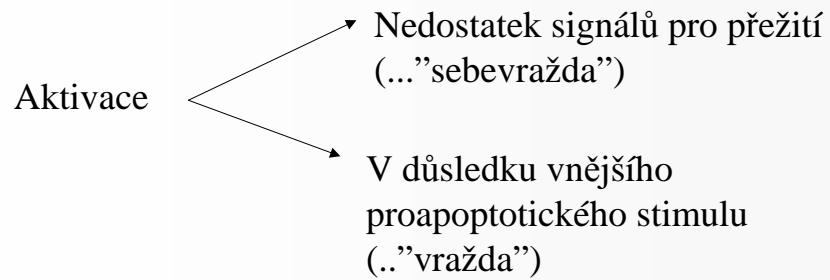
# Mitochondrie a buněčná SMRT

## Programovaná buněčná smrt (apoptóza)

- Nezbytná součást života
  - Regulace druhu a počtu buněk během vývoje
  - Eliminace lymfocytů reagujících proti vlastní tkáni, infikovaných buněk, nádorových buněk, atd.
- Program vyžadující genovou expresi, proteosyntézu a ATP.

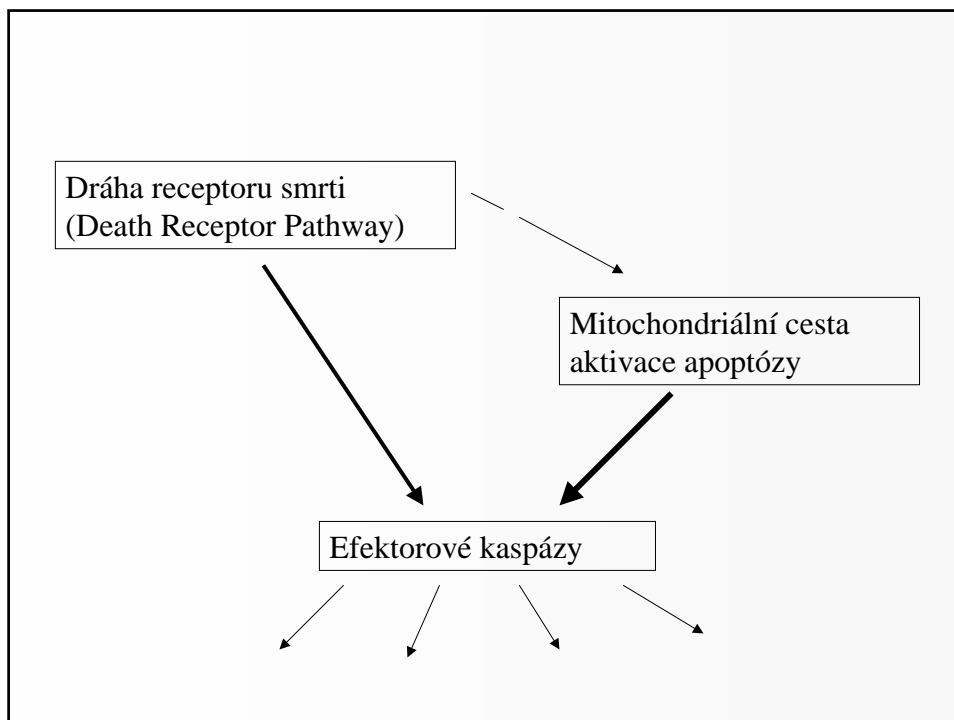
# Apoptotické signální dráhy

Konstitutivně přítomné v každé buňce



## Kaspázy (Cysteine Aspartate ProteASES)

- Rodina >10 proteáz, v každé buňce přítomné jako zymogeny (prokaspázy)
- Vlastní vykonavatelé apoptotické smrti
- Limitovaná proteolýza >100 substrátů v buňce (...změna funkce)
- Aktivace kaspáz:
  - Proteolýza (efektorové kaspázy, krátká prodoména, např. kaspáza-3, -6, -7)
  - Regulované protein-protein interakce (iniciační kaspázy, dlouhá prodoména, např. kaspáza-8, -9)

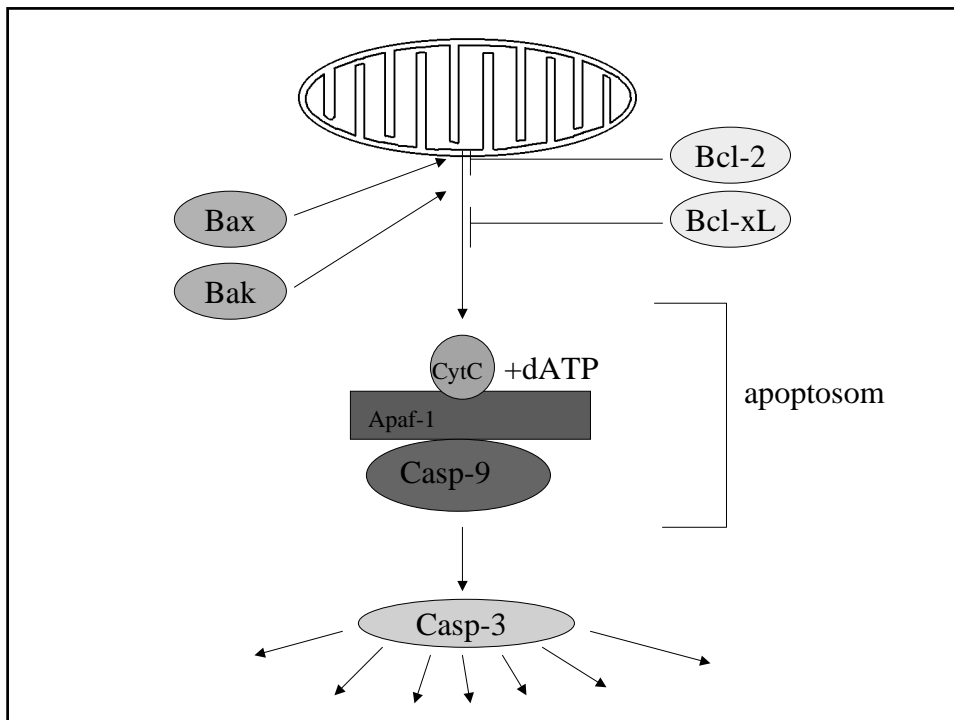


## Jak mitochondrie zabíjí buňku

- Uvolnění proapoptotických faktorů z intermembránového prostoru:
  - cytochrom c
  - AIF (apoptosis inducing factor)
  - endonukleasa G
  - Smac/Diablo (inhibitor IAPs)
  - Htra2/Omi (serinová proteasa, štěpí IAPs)
  - prokaspázy
- Narušení buněčné energetiky a produkce ATP (uvolnění cytochromu c, depolarizace)
- Nadprodukce kyslíkových radikálů

## Bcl proteiny:

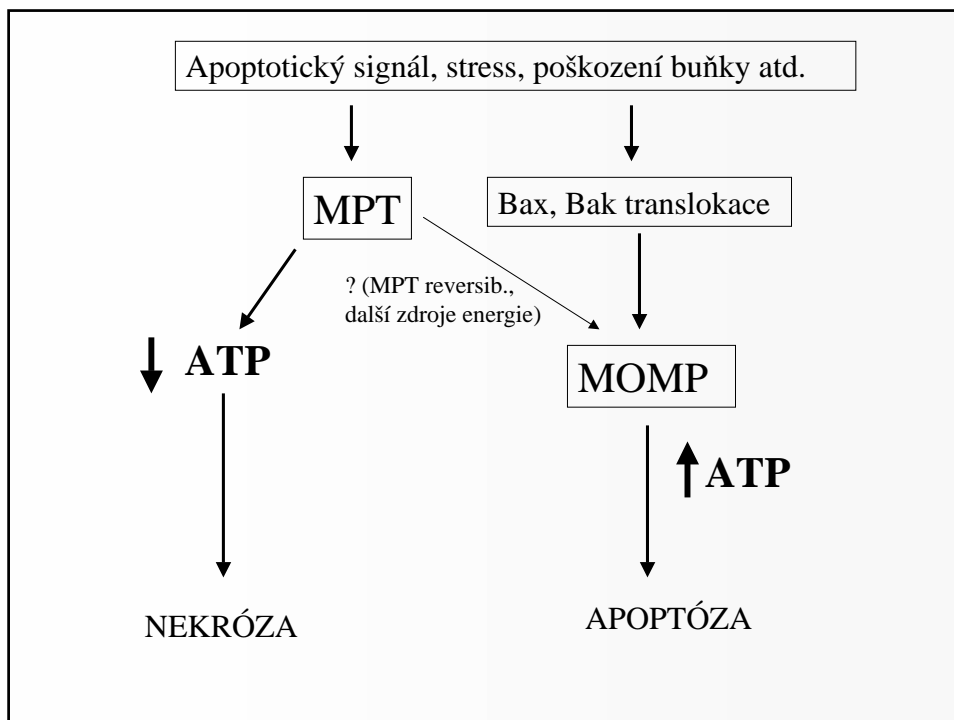
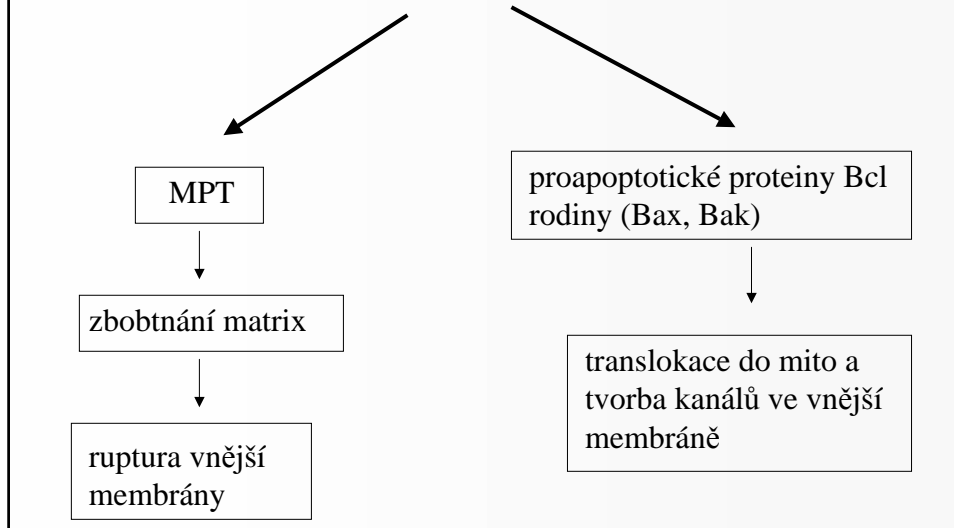
- Rodina >10 proteinů, prototypický člen: Bcl-2 (B-cell lymphoma... onkogen)
- Proteiny s antiapoptotickou aktivitou (Bcl-2, Bcl-xL), nebo naopak proapoptotické (Bax, Bak, Bad, Bid etc.)
- 1-4 BH domény... homo/hetero-oligomerizace
- C-terminální hydrofobní úsek ... lokalizace do membrán (vnější mito, jaderná m., ER)
- Schopnost agregovat a tvořit kanály v membránách - podobnost s bakteriálními toxiny *koliciny*



Uvolnění cytochromu c  
z mitochondrie ?

**MOMP**  
**(Mitochondrial Outer Membrane**  
**Permeabilisation)**

## Mechanismus uvolnění cytochromu c z mitochondrie ?



## Patogeneze chorob jako dysregulace apoptózy ?

- Neurodegenerace, ischemie, AIDS: buňky umírají když nemají...
- Autoimunita, nádory: neumírají buňky, které by měly...

- Nádorové buňky žijí z glykolýzy a mitochondrie „vypínají“ ....
- Dichloracetát:
  - inhibice PDH kinasy → aktivace PDH
  - aktivace mito respirace a produkce oxidantů
  - aktivace apoptotického programu
  - a nádorové buňky hynou ...

(Bonnet S et al. Cancer Cell. 2007 Jan;11(1):37-51).