Vezikularni transport kloroplasta

Vučković, Nika

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:586241

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

VEZIKULARNI TRANSPORT KLOROPLASTA

CHLOROPLAST VESICLE TRANSPORT

SEMINARSKI RAD

Nika Vučković

Preddiplomski studij molekularne biologije

Undergraduate study of molecular biology

Mentor: izv. prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2016.

1. UVOD 1
2. KLOROPLASTI 2
3. VEZIKULARNI TRANSPORT 3
3.1. Vezikule COPII 4
3.2. Vezikule COPI 4
3.3. Vezikule CCV 4
4. VEZIKULARNI TRANSPORT KLOROPLASTA 4
4.1. Molekularne komponente vezikularnog transporta utvrđene eksperimentalno 5
4.2. Koji transportni sustav postoji unutar kloroplasta? 9
5. ZAKLJUČAK 10
6. LITERATURA 11
7. SAŽETAK 12
8. SUMMARY 12

1. UVOD

Eukariotske stanice sadrže sustav membrana koji razgraničava organele sa specifičnim funkcijama. Ti organeli mogu sintetizirati razne lipide i proteine, ali ne i sve molekule koje su im potrebne. Stoga se lipidi, proteini, hormoni i ostale potrebne molekule između orgnela prenose mjehurićima obavijenim membranom koji se nazivaju vezikule. U citosolu biljnih stanica vezikularni transport odvija se između endoplazmatskog retikuluma, Golgijevog aparata, endosoma, stanične membrane i sekretornih granula. Vezikule pupaju na donorskoj membrani pritom se obavijajući omotačem i stapaju se s akceptorskom membranom prije čega se omotač rastvara, prenoseći molekule jednim od tri sustava transporta (Karim i Aronsson, 2014).

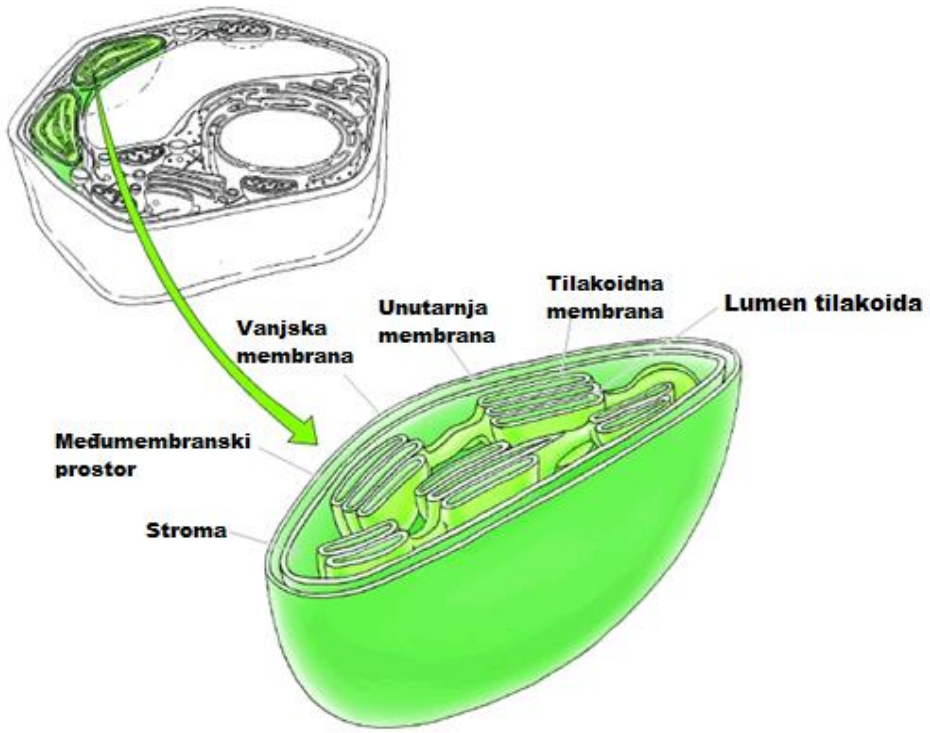
Skupina staničnih organela odgovorna za proizvodnju i pohranu hranjivih tvari u biljnim stanicama nazivaju se plastidi. Karakteristično za sve plastide je postojanje dvostruke membrane te vlastita kružna dvolančana molekula DNA, a razlikuju se na dva načina, po postanku te po pigmentima koje sadrže. Kloroplasti, plastidi s pigmentom klorofilom mjesto su fotosinteze (Cooper, 2000). Nesumnjiva prekretnica u evoluciji života na Zemlji je pojava sposobnosti fotosinteze u pretcima današnjih cijanobakterija. Procesom endosimbioze, ulaskom dotad slobodno živućeg fotosintetskog prokariota u prethodno heterotrofnu eukariotsku stanicu u kojoj dalje funkcionira kao organel, eukarioti su stekli sposobnost pretvaranja svjetlosne energije u energiju kemijske veze (Archibald, 2009).

Molekularni, biokemijski i ultrastrukturalni dokazi ukazuju na postojanje vezikularnog transporta unutar kloroplasta. Bioinformatička istraživanja ukazuju na komponente homologne citosolnom sustavu transporta vezikula lokalizirane u kloroplastima i povezane sa potencijalnim kloroplastnim vezikularnim transportom. Nadalje, identificirani su i neki proteini koji su moguće predmeti prijenosa za koje se smatra da su sastavni dijelovi fotosintetskog aparata (Karim i Aronsson, 2014). No, zasad se još vrlo malo zna o vezikularnom transportu kloroplasta i njegovim proteinskim komponentama, a budući da se radi o krucijalnom organelu koji svojom funkcijom održava većinu života na Zemlji, nesumnjivo je da trebaju uslijediti mnoga iscrpna istraživanja.

2. KLOROPLASTI

Kompleksna struktura kloroplasta prikazana je na Slici 1. Osim spomenute dvostruke membrane koje čine ovojnicu kloroplasta, postoji dodatni, treći sustav membrana zvan tilakoidna membrana. Ona formira mrežu diskova zvanih tilakoidi koji se često nalaze u nakupinama pod nazivom grana. Ovaj sustav membrana dijeli unutrašnjost kloroplasta na tri odijeljka: međumembranski prostor između vanjskih membrana kloroplasta, prostor izvan tilakoidne membrane zvan stroma te lumen tilakoida (Cooper, 2000).

Kloroplasti koriste svjetlosnu energiju za proizvodnju ATP-a i NADPH, koji su pak korišteni u procesu pretvorbe ugljikovog dioksida u šećere, odnosno hranjive tvari. U tilakoidne membrane ugrađeni su pigmenti i enzimski kompleksi koji provode prijenos elektrona i sintezu ATP-a, dok se u stromi nalaze enzimi potrebni za asimilaciju ugljika (Lehninger, 2013).



Slika 1. Struktura kloroplasta. Osim vanjske i unutarnje membrane, koje su karakteristične za sve plastide, kloroplasti sadrže i tilakoidnu membranu. Navedene membrane dijele unutrašnjost kloroplasta na tri odijeljka. Preuzeto i prilagođeno iz Cooper, 2000.

3. VEZIKULARNI TRANSPORT

Jedno od obilježja eukariotskih stanica su organeli, područja sa specifičnim funkcijama i strukturama unutar citoplazme odijeljena membranom. Kako bi stanica mogla normalno funkcionirati potrebna je komunikacija i suradnja između organela. Smatra se da prijenosne vezikule ovdje igraju važnu ulogu u jednoj od glavnih staničnih funkcija, prometu molekula između cijelog niza specifičnih membranom odijeljenih kompartmenata. Vezikule pupaju i disociraju s membrana donorskih organela te pristaju i spajaju se s membranom akceptorskog organela, a specifičnost prijenosa temelji se na selektivnom pakiranju molekula namijenjenih za prijenos u vezikule koje prepoznaju isključivo odgovarajuće akceptorske membrane. S obzirom na važnost vezikularnog transporta, mehanizmi pakiranja molekula, pupanja i stapanja predmet su iscrpnih istraživanja (Cooper, 2000). Detaljna genetička i biokemijska istraživanja na stanicama kvasaca i sisavaca pokazuju da generalni mehanizam vezikularnog transporta uključuje nekoliko koraka. Proces stvaranja omotača iniciran je mobilizacijom velikog broja proteina pri donorskoj membrani koji uključuje GTP-aze vezane za membranu, transmembranske teretne proteine te receptore za topljive proteine koji sudjeluju u povezivanju vezikula na akceptorsku membranu (*Soluble NSF Attachment Protein Receptors*, SNARE). Okupljanjem komponenata omotača oko koncentriranih teretnih proteina izaziva se lokalno zakrivljenje membrane i pupanje nastajuće vezikule. Nakon odvajanja od donorske membrane, preko djelovanja pomoćničkih proteina, zrelim vezikulama rastvara se omotač inaktivacijom GTPaza i aktivacijom enzima rastvarača omotača. Gole vezikule vođene citoskeletom dalje bivaju privlačene ka akceptorskoj membrani aktivnošću GTP-vezujućih Rab GTPaza i privlačnih faktora. Potom se spajaju i fuzioniraju s akceptorskom membranom pomoću specifičnih proteina SNARE te se teretne molekule ispuštaju na ciljno mjesto (Bonifancino i Glick, 2004).

U citosolu biljnih stanica okarakterizirana su tri sustava vezikularnog transporta temeljem proteina koji grade omotač, vrlo slična opisanom sustavu u kvasaca i sisavaca: klatrinom omotana vezikula (CCV), ovojni protein I (COPI) i ovojni protein II (COPII) (Kirchhausen, 2000).

3.1. VEZIKULE COPII

Sekretorni sustav kojim se prijenos molekula odvija između endoplazmatskog retikuluma (ER) i Golgijevog aparata uključuje pet esencijalnih citoplazmatskih proteina sa specifičnim funkcijama, Sar1, Sec13, Sec23, Sec24 i Sec31, koji kaskadnim djelovanjem stvaraju vezikulu sa specifičnim teretnim molekulama (Karim i Aronsson, 2014).

3.2. VEZIKULE COPI

Po principu stvaranja vezikula i prijenosu ovaj sustav vrlo je sličan sustavu COPII, no on modulira prijenos unutar Golgijevog aparata te prijenos od Golgijevog aparata do ER-a. Razlika leži u proteinima aktivatorima GTPaza (GAP) (Karim i Aronsson, 2014).

3.3. VEZIKULE CCV

Ovaj sustav kompleksniji je od sustava COPII i COPI, a posreduje endocitozu staničnom membranom i prijenos od *trans*-Golgijeve mreže do endosoma i lizosoma. Teški i laki lanac klatrina povezuju se u geometrijsku strukturu triskeliona oko vezikularne membrane i udružuju se sa kompleksima adapternih proteina kako bi vezali membranske komponente. Fuzija na ciljnoj membrani posredovana je interakcijom privlačnih faktora, GTPaza i topljivim SNARE proteinima kojih postoje dva tipa, v-SNARE djeluju na samoj vezikuli i t-SNARE koji djeluju na ciljnoj membrani (Karim i Aronsson, 2014).

4. VEZIKULARNI TRANSPORT KLOROPLASTA

Vezikulama slične tvorbe uočene su u ranim istraživanjima transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) u stromi između ovojnice kloroplasta i tilakoida nakon inkubacije tkiva lista pri niskoj temperaturi. Nadalje, kasnijim istraživanjima uočene su i vezikule pričvršćene za unutarnju membranu i tilakoide, što je upućivalo na događaje odvajanja i stapanja. U analizama nakon inkubiranja kloroplasta s radioaktivnim prekursorima lipida, signali radioaktivnosti uočeni su na lipidima u unutarnjoj membrani prije nego što se pojave u tilakoidnim membranama. To

upućuje na prijenos lipida sintetiziranih u ovojnici kloroplasta do tilakoidne membrane (Andersson i sur., 2001). Primijećeno je i da inhibitori vezikularnog transporta sekretornog puta koji djeluju na GTPaze imaju sličan učinak i na formiranje vezikula unutar kloroplasta, čime se sugerira kontrola pupanja vezikula GTPazama kao i u citosolu (Westphal i sur., 2001b).

Ukoliko je pretpostavljeni vezikularni transport kloroplasta srodan citosolnom, pretpostavlja se da su očuvane komponente takvog citosolnog transporta. Bioinformatička istraživanja potvrdila su postojanje proteina srodnih sustavu COPII koji većinom sudjeluju u inicijaciji i pupanju vezikule, a identificirane su i još neke komponente poput privlačnih faktora, proteina SNARE te proteina iz obitelji Rab odnosno G proteina, koji bi mogli zajedno činiti kompletan sustav za transport unutar kloroplasta (Kahn i sur., 2013).

Budući da se smatra da su kloroplasti nastali endosimbiozom cijanobakterija od strane eukariotske stanice i identificiran je faktor za koji se smatra da sudjeluje u formiranju kloroplastnih vezikula i u rodu *Arabidopsis* i u cijanobakterija, može se pretpostaviti da je sustav transporta u kloroplasta prokariotskog porijekla (Westphal i sur., 2001a). No, otkriće vezikularnog transporta kloroplasta samo u skupini *Embryophyta* pokazuje kako je on kasna evolucijska stečevina kopnenih biljaka. Smatra se kako je moguće da je porijeklo nekih proteina koji sudjeluju u transportu vezikula unutar kloroplasta prokariotsko, dok je porijeklo drugih eukariotsko (Westphal i sur., 2003).

4.1. MOLEKULARNE KOMPONENTE VEZIKULARNOG TRANSPORTA UTVRĐENE EKSPERIMENTALNO

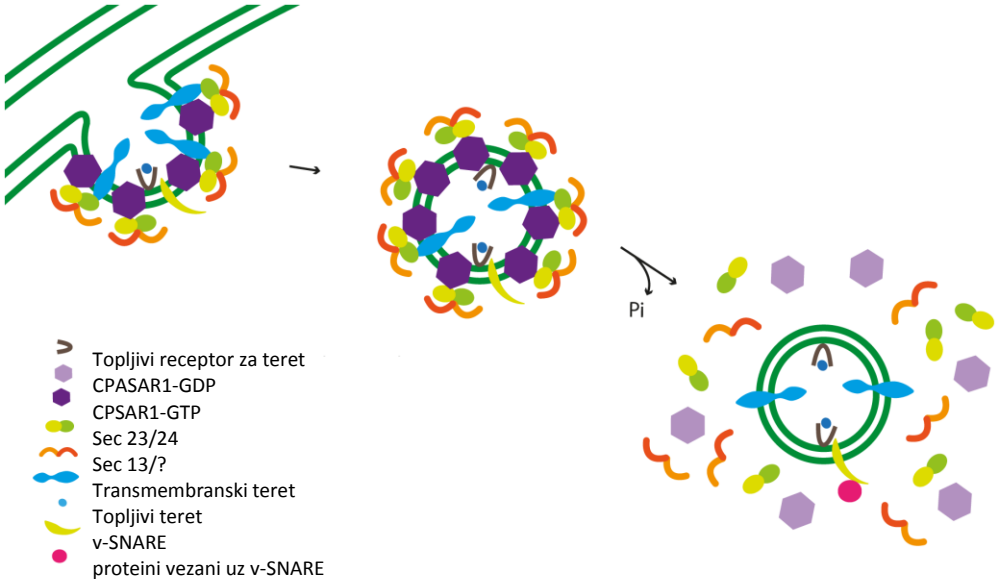
Za dvije komponente za koje se pretpostavljalo da sudjeluju u transportnom sustavu unutar kloroplasta utvrđeno je da su GTPaze lokalizirane u kloroplastu. To su proteini CPSAR1 i CPRabA5e (*chloroplast localized*, CP).

Rab proteini su GTPaze koji reguliraju gotovo cijeli proces transporta, uključujući odabiranje teretnih molekula, pupanje vezikula, poticanje pokretanja vezikula, prepoznavanja ispravnog mjesta vezanja te stapanje s membranom. Imaju GTP i GDP vezna mjesta i sposobnost hidrolize GTP-a, što ih čini molekularnim sklopkama i omogućuje im izvršavanje ovih funkcija (Karim i Aronsson, 2014). Nedavno otkriven protein CPRabA5e iz biljke *Arabidopsis thaliana* bliski je homolog kvaščevoj GTPazi Ypt31/32p koja sudjeluje u transportu proteina od stanične

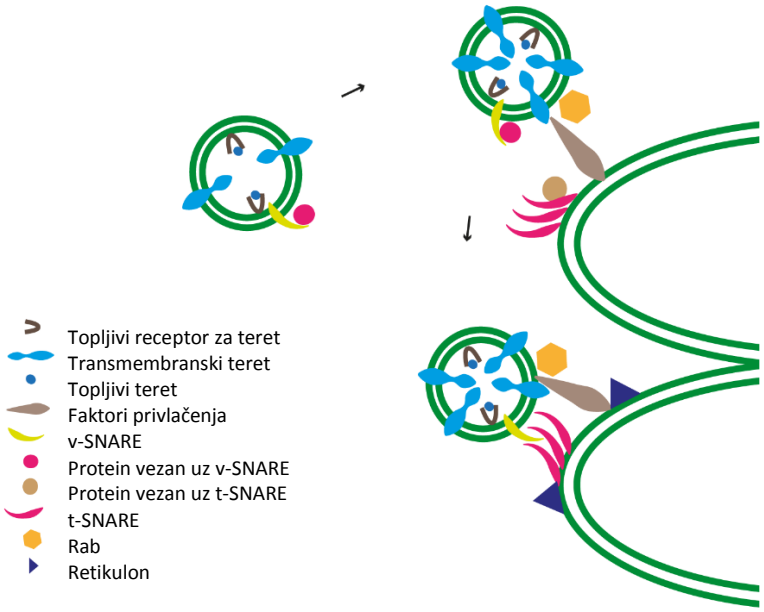
membrane do Golgijevog kompleksa. Jak dokaz za pretpostavke postavljene bioinformatičkim istraživanjima daju genetička istraživanja koja su pokazala da protein CPRabA5e uspostavlja rast kvaščevih mutanata s delecijama u genima za Ypt31/32p te sudjeluje u kontroli morfologije tilakoida. Komponenta CPSAR1 se smatra homologom proteina Sar1 koji je neophodan za stvaranje omotača COPII. Ima GTPaznu aktivnost te je prisutan i u stromi i na unutarnjoj membrani, a genetička istraživanja su pokazala da važnu ulogu ima i u biogenezi ribosoma koji se nalaze blizu tilakoida. Na Slikama 2.,3. i 4. prikazani su modeli faza vezikularnog transporta unutar kloroplasta koji uključuju i prikaze prepostavljanog smještaja i funkcija spomenutih molekula.

Za još jednu vrstu GTPaza smatra se da je povezana sa stvaranjem vezikula u kloroplastima, a to su dinaminu srodni proteini koji uređuju membrane. Protein FZL u rodu *Arabidopsis*, smatra se članom porodice dinamina, specifičnim za biljke, koji je povezan sa membranama tilakoida i ovojnice. Tome u prilog idu genetički dokazi koji su pokazali da kloroplasti u mutantima *fzl* stvaraju neorganizirane tilakoidne strukture i akumulaciju vezikula (Gao i sur., 2006).

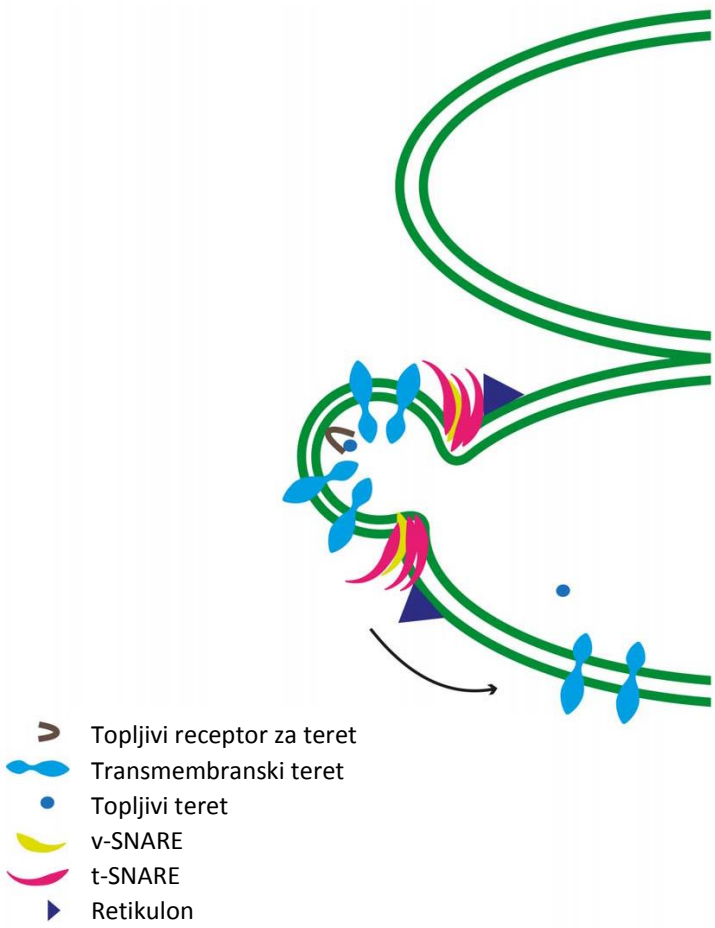
Osim GTPaza još su neki faktori od velike važnosti u vezikularnom transportu kloroplasta. Primjerice, plastidni protein koji inducira vezikule (VIPP1), nalazi se na unutarnjoj membrani ovojnice i na tilakoidnoj membrani i ključan je za formiranje tilakoida i održavanje ovojnice kloroplasta. Nadalje, protein tilakoidnog formiranja (THF1) za kojeg je utvrđeno da je lokaliziran u ovojnici, tilakoidnoj membrani i stromi kloroplasta, pretpostavlja se da je uključen u proces organizacije prijenosnih vezikula u zrele nakupine tilakoida. Treći važan faktor je disulfid izomeraza locirana u tilakoidima *Arabidopsisa* čijim isključivanjem dolazi do prekida formiranja vezikula za tilakoidne membrane u listovima embrija, što je rezultiralo njihovom akumulacijom (Karim i Aronsson, 2014).



Slika 2. Model odvajanja vezikule i rastvaranja omotača u koroplastima u roda *Arabidopsis.* Kada se formira omotač, zajedno s receptorima za teret i moguće teretnim proteinima, on pupa iz unutarnje membrane ovonice. Brzo nakon pupanja, vezikula gubi omotač uslijed disocijacije kompleksa CPSAR1-GTP i njegove inaktivacije poprimanjem CPSAR1-GDP stanja. Vezikula bez omotača, noseći protein v-SNARE i proteine vezani uz v-SNARE, kreće se prema tilakoidnoj membrani. Preuzeto i prilagođeno iz Kahn i sur., 2013.



Slika 3. Model privlačenja i spajanja u rodu Arabidopsis. Vezkula bez omotača kreće se prema tilakoidnoj membrani, bude privučena akceptorskoj membrani zajedničkom aktivnošću proteina Rab te privlačnih faktora. Proteini v-SNARE i t-SNARE čvrsto se povezuju u snop uz pomoć v-SNARE i t- SNARE vezanih proteina te retikulona, proteina vezanog uz endoplazmatski retikulum i vezikularni transport u citosolu. Preuzeto i prilagođeno iz Kahn i sur., 2013.



Slika 4. Model fuzije vezikule i dopremanje teretnih proteina u tilakodinu membranu u rodu Arabidopsis. Lipidi s vezikule stapaju se s lipidima tilakoidne membrane te su transmembranski teretni proteini preneseni na tilakoidnu membranu, dok se topljivi teretni proteini otpuštaju s receptora za teret i dopremaju u lumen. Preuzeto i prilagođeno iz Kahn i sur., 2013.

4.2. KOJI TRANSPORTNI SUSTAV POSTOJI UNUTAR KLOROPLASTA?

Ako je pretpostavka da je protein CPSAR1 uključen u vezikularni transport u kloroplastima točna, što sugerira njegova lokaliziranost i bioinformatičke indikacije, trebali bi postojati i homolozi ostalih komponenti sekretornih puteva. Bioinformatičkim analizama pronađeni su većinom homolozi komponenata povezanih sa sustavom COPII, dok su proteini homologni nekim podjedinicama sustava CCV i COPI u kloroplastima pridruženi funkcijama i putevima nevezanim za vezikularni transport. Osim ako transportni sustav unutar kloroplasta nije posve različit od citosolnog, nije vjerojatno da postoje sustavi CCV ili COPI za prijenos u kloroplastima. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se utvrdilo postojanje isključivo transportnog sustava srodnog sustavu COPII u kloroplastima ili se vezikularni transport obavlja još nekim, drugačijim sustavom u odnosu na citosolni. Također, iako su identificirani neki proteini uključeni u vezikularni transport kloroplasta srodan sustavu COPII, još treba rasvijetliti njihove točne funkcije (Karim i Aronsson, 2014).

5. ZAKLJUČAK

Kompleksnost forme i funkcije kloroplasta, organela u kojima se nalazi fotosintetski aparat, zahtijeva mehanizam kojim se potrebne molekule prenose na odgovarajuća mjesta. Ranijim istraživanjima uočene su strukture nalik vezikulama koje sudjeluju u vezikularnom transportu u citosolu, a nedavnom identifikacijom proteina potencijalnog vezikularnog transporta lokaliziranog u kloroplastima te empirijskim utvrđivanjem funkcija nekih od njih, potkrepljuje se pretpostavka postojanja transportnog sustava nalik citosolnom. Većinom su ustanovljeni homolozi komponentama sustava COPII transporta te se zasad sustav nalik tome smatra najvjerojatnijim unutar kloroplasta, no ne može se isključiti mogućnost da se transportni sustav unutar kloroplasta drastično razlikuje od onog u citosolu.

Nadalje, otkrivena je velika povezanost faktora koji sudjeluju biogenezi i održavanju struktura unutar kloroplasta, primjerice tilakoida i kloroplastne ovojnice s potencijalnim mehanizmom vezikularnog transporta kloroplasta. Daljnja istraživanja ovog područja mogla bi rasvijetliti ne samo transport molekula unutar kloroplasta nego i ključne značajke formiranja fotosintetskih struktura.

6. LITERATURA

Andersson M.X., Kjellberg J.M., and Sandelius A.S., 2001. Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea. *Plant Physiol.* **127**, 184–193.

Archibald J. M., 2009. The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* **19**, 81–88.

Bonifacino J.S., and Glick B.S., 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166.

Cooper GM., 2000. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Chloroplasts and Other Plastids. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9905/

Gao H., Sage T.L., and Osteryoung K.W., 2006. FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 6759–6764.

Karim S., Aronsson H, 2014. The puzzle of choroplast vesicle transport – involvement of GTPases, *Front. Plant Sci.*, **5**

Khan N.Z., Lindquist E., and Aronsson H., 2013. New putative chloroplast vesicle transport components and cargoproteins revealed using a bioinformatics approach: an *Arabidopsis* model. *PLoS ONE* **8**

Kirchhausen T., 2000. Three ways to make a vesicle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 187–198.

Lehninger A., Nelson D. L., Cox M. M., 2013. Lehninger's Principles of Biochemistry 6e , W. H. Freeman and Company, 799-812.

Westphal S., Heins L., Soll J., and Vothknecht U.C., 2001a. Vipp1 deletion mutant of Synechocystis: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4243–4248.

Westphal S., Soll J., and Vothknecht U.C., 2001b. A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett.* **506**, 257–261.

Westphal S., Soll J., and Vothknecht U.C., 2003. Evolution of chloroplast vesicle transport. *Plant Cell Physiol.* **44**, 217–222.

7. SAŽETAK

Kloroplasti su plastidi s pigmentom klorofilom, sposobni obavljati fotosintezu čime stvaraju hranu biljnim stanicama. Struktura im je kompleksna te osim dvostruke ovojnice koja obavija organel, postoji i unutrašnja, tilakoidna membrana. Prostori koji nastaju ovim membranama specifični su i mjesta su sinteze različitih molekula od kojih neke moraju biti prenesene u drugi prostor. Problem transporta molekula u citosolu biljnih stanica riješava se vezikularnim transportom što podrazumijeva pupanje vezikula ispunjenih teretnom molekulom na donorskoj membrani te stapanje s akceptorskom membranom i ispuštanje transportirane molekule u njenu unutrašnjost. Istraživanja su pokazala da postoji vezikularni transport i unutar kloroplasta. Ovim seminarom pokušavaju se obuhvatiti dosadašnje spoznaje o potencijalnim sustavima unutar kloroplasta homolognim citosolnom vezikularnom transportu. Iako su identificirane neke komponente potencijalnog vezikularnog transporta kloroplasta, nisu još posve utvrđene njihove uloge kao ni cjelokupni mehanizam.

8. SUMMARY

Chloroplasts are plastids containing the pigment chlorophyll, capable of photosynthesising by which they produce nutrients. Their structure is complex; in addition to the chloroplast envelope which is formed by a double membrane, chloroplasts have an internal, thylakoid membrane. Spaces that are formed by these membranes are places of synthesis of various molecules, some of which have to be transferred into a diffenrent space. Problem of transport of molecules in the cytosol of plant cells is solved by vesicular transport, which is perpetrated by budding of vesicles filled with cargo molecules from a donor membrane and fused with acceptor membrane resulting in releasing the cargo molecules inside. Research has shown presence of vesicular transport in chloroplasts. Aim of this review is to cover so far acquired knowledges of putative chloroplast transport system homologous to the vesicle transport in cytosol. Even though some of the componentes of putative chloroplast vesicle transport are identified, their roles are not precisely determined neither as the complete mechanism.