

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Eliška Kočířová

Biogeneze a funkce peroxisomů se zaměřením na parazitické prvoky
Biogenesis and function of peroxisomes, particularly in parasitic protists

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Ivan Hrdý Ph.D.

Praha, 2016

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Ivanu Hrdému, Ph.D., za cenné rady, motivaci a vstřícnost při psaní této práce, dále bych chtěla poděkovat RNDr. Zdeňku Vernerovi, Ph.D. a Mgr. Vojtovi Žárskému, celému týmu protozoologické laboratoře za přátelskou a podnětnou atmosféru a v neposlední řadě také celé své rodině za psychickou podporu a zázemí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30.07.2016

Podpis

Abstrakt:

Peroxisomy jsou eukaryotické buněčné organely oválného tvaru obalené jednoduchou membránou. Peroxisomy neobsahují DNA ani ribosomy a všechny peroxisomální proteiny jsou kódovány v jádře. Peroxisomální proteiny jsou do peroxisomů importovány posttranslačně pomocí skupiny peroxisomálních biogenetických faktorů zvaných peroxiny. Mezi nejčastější peroxisomální funkce patří beta-oxidace mastných kyselin, detoxifikace reaktivních forem kyslíku, metabolismus purinů a syntéza éterových lipidů. Některé specializované funkce nalézáme v odvozených peroxisomech – glykosomech, glyoxysomech a Woroninových tělískách. Do glykosomů vyskytujících se u skupiny Kinetoplastida je lokalizována podstatná část glykolýzy, Woroninova tělíska nacházející se u vláknitých hub mají mechanickou funkci a v rostlinných glyoxysomech probíhá glyoxylátový cyklus. Dříve se peroxisomy spolu s glyoxysomy a glykosomy označovaly názvem mikrotělíska.

Klíčová slova: peroxisom, Pex proteiny, glykosom, Trypanosoma, Leishmania

Abstract:

Peroxisomes are eukaryotic cellular organelles of a spherical shape surrounded by a single membrane. Peroxisomes contain no DNA nor ribosomes and all the peroxisomal proteins are encoded in the nucleus. Peroxisomal proteins are posttranslationally imported into peroxisomes via group of peroxisomal biogenetic factors called peroxins. The most common functions include peroxisomal beta oxidation of fatty acids, detoxification of reactive oxygen species metabolism of purines and synthesis of ether lipids. Some specialized functions are found in derived peroxisomes - glycosomes, glyoxysomech and Woronin bodies. Glycosomes, occurring in group Kinetoplastida, contains a substantial part of glycolysis, Woronin bodies, found in filamentous fungi, have a mechanical function and plant glyoxysomes contain the glyoxylate cycle. Previously, peroxisomes together with glyoxysomy and glycosomes were called microspheres or microbodies.

Key words: peroxisome, Pex proteins, glycosomes, Trypanosoma, Leishmania

Seznam použitých zkratk:

ER	endoplasmatické retikulum
ROS	reaktivní formy kyslíků
Pex	peroxiny - peroxisomální biogenetické faktory
PBDs	peroxisomální biogenetické poruchy
PTS	peroxisomální cílová sekvence
TPR	tetratrikopeptidová repetice
PPP	peroxisomální procesovací peptidáza
AAA-ATPázy	ATPázy asociované s různými buněčnými aktivitami
RADAR dráha	dráha spřažená s nahromaděním a následnou degradací receptoru
ERAD	degradační dráha spřažená s endoplasmatickým retikulem
mPTS	membránová peroxisomální cílová sekvence
PMP	peroxisomální membránové proteiny
pER	preperoxisomální doména endoplasmatického retikula
ppV	preperoxisomální váčky vzniklé v endoplasmatickém retikulu
MCSs	membránová kontaktní místa
EPCONS	kontaktní místa endoplasmatického retikula a peroxisomů
DLP	dynamamin-like proteiny
GAP	GTPázový activační protein
PPARs	"peroxisome proliferator-activated receptors"
LECA	poslední společný předek všech eukaryot
VLCFA	velmi dlouhé řetězce mastných kyselin
acetyl-CoA	acetyl koenzym A
CoA	koenzym A
SOD	superoxid dismutáza
HEX1	beta-hexosaminidáza

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Charakteristika peroxisomů.....	2
2.1 Objev peroxisomů.....	2
2.2 Obecná charakteristika	2
3. Biogeneze peroxisomů	4
3.1 Import peroxisomálních proteinů	4
3.1.1 Import matrixových proteinů	6
3.1.2 Import membránových proteinů.....	9
3.1.3 Modely biogeneze peroxisomů	11
3.2 Vznik peroxisomů dělením.....	14
3.3 Proliferace peroxisomů a pexofagie	16
4. Funkce peroxisomů	17
5. Peroxisomy protist.....	22
5.1 Kinetoplastida.....	23
5.2 Glykosomy.....	25
5.2.1 Glykolýza	25
6. Závěr.....	29
7. Použitá literatura/Citace	30

1. Úvod

Tato práce pojednává o buněčných organelách zvaných peroxisomy. Peroxisomy nalézáme u většiny organismů napříč celým eukaryotickým stromem. U některých organismů se vyskytují odvozené peroxisomy, do kterých se v evoluci přesunuly některé velmi zajímavé funkce a metabolické dráhy.

Nejprve se ve své práci zabývám obecnou charakteristikou peroxisomů, stručnou historií a objevem těchto organel. Dále se v práci věnuji dvěma hlavními tématům – biogenezi a funkci peroxisomů.

Na poli výzkumu biogeneze peroxisomů a importu proteinů do těchto organel byly v posledních letech učiněny markantní pokroky, které se snažím v této práci utřídit a shrnout. Nejzajímavějším objevem je schopnost vzniku nových peroxisomů jak dělením, tak tvorbou peroxisomů *de novo* z endoplasmatického retikula (ER). Další kapitola pojednává o modelech biogeneze peroxisomů, tvorbě peroxisomů *de novo* a transportu některých peroxisomálních proteinů přes ER, což je v posledních letech předmětem stálých výzkumů a debat. Na závěr této kapitoly popisují dělení peroxisomů, jejich proliferaci a také jejich zánik.

V peroxisomech je zastoupeno nepřeberné množství funkcí, které se navíc může lišit i u rozdílných typů buněk. Ve své práci se snažím popsat nejdůležitější a nejčastější funkce, jako je například beta oxidace mastných kyselin nebo detoxifikace reaktivních forem kyslíku. Závěrem bakalářské práce se věnuji výskytu peroxisomů u protist, kde se dále zaměřuji na skupinu Kinetoplastida a glykosomální glykolýzu.

Cílem této práce je tedy shromáždit a utřídit aktuální informace o biogenezi a funkcích peroxisomů se zaměřením na zvláštnosti nalézané u zástupců významných jednobuněčných patogenů člověka.

2. Charakteristika peroxisomů

2.1 Objev peroxisomů

Peroxisomy původně popsal Johannes Rhodin v roce 1954 jako speciální typ cytoplasmatických granulí během morfologické studie buněk proximálních a distálních tubulů z myších ledvin a pojmenoval je "microbodies" (Rhodin, 1954). Jedna z prvotních teorií mylně předpokládala, že tato mikrotělíška mohou být prekurzory mitochondrií (Rouiller a Bernhard, 1956). Následné studie pomocí elektronové mikroskopie odhalily přítomnost těchto tělíšek s jednou membránou a jemně zrnitou matrix v různých typech savčích tkání; u jiných peroxisomů, především v buňkách jater, pak byla patrná krystaloidní struktura (krystaloid), kterou mohou tvořit agregované proteiny či nerozpustný enzym urát oxidáza (oxidáza kyseliny močové), nicméně funkce peroxisomů zůstávala v té době neznámou.

První biochemickou charakterizaci těchto organel provedl Christian de Duve na přelomu 50. a 60. let, který tyto organely poprvé izoloval z krysích jater pomocí buněčné frakcionace a oddělil peroxisomální frakci od frakce mitochondriální a lysosomální. V peroxisomální frakci následně detekoval aktivitu enzymů oxidáz (oxidáza L- α -hydroxylových kyselin, oxidáza d-aminokyselin, NADP-dependentní izocitrát dehydrogenáza, urát oxidáza), a především katalázu a peroxidázy (de Duve, 1965). Tyto organely de Duve pojmenoval peroxisomy podle peroxidu vodíku, který se zde tvoří a zároveň je rozkládán pomocí katalázy (de Duve, 1966). V roce 1974 dostal za své objevy de Duve Nobelovu cenu; mimo objev peroxisomů se mu podařilo objevit a charakterizovat lysosomy, zavedl pojmy fagocytóza, endocytóza či autofagie.

2.2 Obecná charakteristika

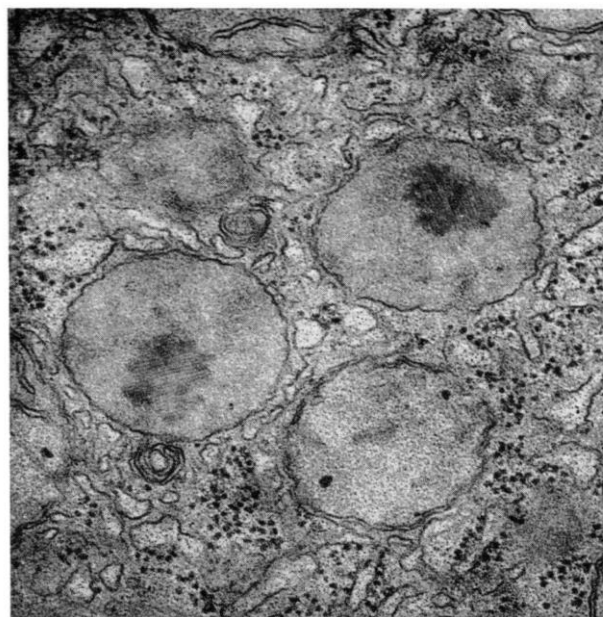
Jak již bylo zmíněno, peroxisomy jsou buněčné organely s amorfni či jemně zrnitou matrix obalené jednoduchou membránou. Mají obvykle oválný tvar a jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,1 až 1,5 μm . Uvnitř peroxisomů se mohou tvořit krystaloidní struktury, tzv. krystaloidy, které vznikají agregací proteinů (Obrázek 1). Peroxisomy neobsahují DNA ani ribosomy a všechny peroxisomální proteiny jsou kódovány v jádře. Do organel jsou tedy importovány posttranslačně pomocí skupiny peroxisomálních proteinů zvaných peroxiny

(zkratka Pex proteiny), jejich geny se nazývají *PEX* geny. V odborné literatuře se obvykle rozlišuje názvosloví peroxinů podle příslušnosti ke skupině studovaných organismů: *PEX* geny savců a *pex* geny kvasinek.

Peroxisomy byly zatím popsány pouze u aerobně žijících eukaryotických organismů. U savců se nejvíce peroxisomů vyskytuje v buňkách jater a ledvinných kanálcích, kde peroxisomy detoxifikují velké množství toxických látek z krve (Alberts et al., 2002). Vzhledem k podmínkám prostředí se v buňce jejich velikost, množství a funkce - včetně enzymatického obsahu - mohou výrazně lišit. Rozdílné peroxisomy nalezneme nejen mezi různými organismy, včetně jednobuněčných eukaryot vyskytujících se v rozdílných podmínkách, ale i dle typu buněk v rámci jednoho organismu.

Mezi nejčastější peroxisomální funkce patří beta-oxidace mastných kyselin, detoxifikace reaktivních forem kyslíku (ROS - reactive oxygen species), metabolismus purinů, syntéza éterových lipidů (plasmalogenů) a mnoho dalších funkcí.

Některé specializované funkce nalézáme v odvozených peroxisomech Kinetoplastid, které se nazývají glykosomy a ve kterých je mj. lokalizována podstatná část glykolýzy; dalšími odvozenými peroxisomy jsou tzv. Woroninova tělíska (Woronin bodies) nacházející se u vláknitých hub - tato tělíska mají převážně mechanickou funkci; a rostlinné glyoxysomy, ve kterých probíhá glyoxylátový cyklus. Dříve se peroxisomy spolu s glyoxysomy a glykosomy označovaly názvem mikrotělíska (microbodies).



Obrázek 1. Peroxisomy v buňce krysích jater. V peroxisomech jsou patrné elektrondensní krystaloidní struktury nahromaděného enzymu urát oxidázy. Zvětšení 75 000 x. (převzato z de Duve a Baudhuin, 1966).

3. Biogeneze peroxisomů

Biogeneze peroxisomů, tedy jejich růst, maturace, formování obsahu a dělení, je proces, který je zejména v posledních letech předmětem studií a častých diskusí. De Duve vyslovil teorii, že peroxisomy jsou semiautonomní organely, které vznikly endosymbioticky podobně jako mitochondrie a chloroplasty, a proto nové peroxisomy vznikají pouze dělením již existujících peroxisomů. Touto teorií by peroxisomy vznikly pohlcením prokaryotního organismu, který byl již schopen odbourávat ROS pomocí peroxidázy či katalázy a tím by bylo umožněno anaerobním organismům přizpůsobit se stoupajícímu množství kyslíku v prostředí (de Duve, 1996). Ovšem na rozdíl od mitochondrií a chloroplastů, neobsahují peroxisomy žádnou rudimentární genetickou informaci ani pozůstatky jader či vnitřních membrán, které by svědčily pro endosymbiotický původ. Novikoff a kol. poprvé pozorovali propojení mezi peroxisomy a ER (Novikoff et al., 1972). Později v 90. letech byly u *S. cerevisiae* objeveny peroxiny Pex3 a Pex19, esenciální biogenetické faktory (Hohfeld et al., 1991). Při genetických pokusech na kmenech *S. cerevisiae* s delecí genů *PEX3* či *PEX19* postrádaly buňky (funkční) peroxisomy, ale při opětovném vložení *PEX3* a *PEX19* byly peroxisomy znovu pozorovatelné. To vedlo k teorii, že peroxisomy musí být tvořeny jinou, alternativní cestou, nežli dělením. Dnes je již obecně přijímán názor, že peroxisomy se vyvinuly z membránového systému buňky (Tabak et al., 2003).

Podobně jako mitochondrie či chloroplasty mohou nové peroxisomy vznikat dělením již vzniklých peroxisomů; rovněž však vznikají *de novo* pučením ze specifických oblastí ER (Hoepfner et al., 2005, Tabak et al., 2013). Předmětem současných debat je, který způsob vzniku převládá; například u kvasinek vznikají nové peroxisomy hlavně dělením. Import proteinů do peroxisomů se liší od importu do jiných kompartmentů buňky. Všechny peroxisomální proteiny jsou importovány posttranslačně v jejich nativní konformaci pomocí peroxinů. Důležitost peroxinů je dokumentována výskytem několika většinou vážných onemocnění (PBDs - peroxisome biogenesis disorders) zapříčiněných poruchami v biogenezi či funkci peroxisomů.

3.1 Import peroxisomálních proteinů

Peroxisomální proteiny jsou syntetizovány v cytosolu na volných ribozomech a následně transportovány do peroxisomů. Peroxisomy jsou unikátní v tom, že jsou schopny

transportovat proteiny v jejich nativní konformaci. Takto se dokáží transportovat i celé oligomerní proteinové komplexy (McNew et al., 1994, Purdue et al., 2001). Schopnost transportu velkých struktur dokazuje pokus, kdy přes membránu peroxisomů procházejí až 9 nm velké částice koloidního zlata připojené k proteinu směřujícímu do peroxisomu (Walton et al., 1995).

Mezi peroxisomální proteiny patří mimo jiné peroxisomální biogenetické faktory – Peroxiny - nezbytné pro biogenezi peroxisomů. Peroxiny se nacházejí jak v membránách peroxisomů (většina), tak i v cytosolu, kde fungují jako solubilní receptory (Pex5 a Pex7) a také mohou být intraperoxisomální/matrixové (jediný Pex8). Doposud bylo nalezeno a popsáno 33 peroxinů u kvasinek, 23 v rostlinách a 20 v savcích, což poukazuje na přítomnost peroxinů specifických pro určité skupiny organismů. Peroxiny se dají rozdělit do tří hlavních skupin: peroxiny podílející se na regulaci velikosti a množství peroxisomů; peroxiny podílející se na biogenezi peroxisomálních membrán; a peroxiny účastnící se importu matrixových proteinů (Tabulka 1) (Yuan et al., 2016).

Tabulka 1.

peroxiny účastnící se importu matrixových proteinů	Pex5	PTS1 receptor
	Pex7	PTS2 receptor
	Pex18, 20, 21, Pex5L	Pex7 pomocné koreceptory pomáhající při jeho vazbě k membráně
	Pex13, 14, 17, 33	komponenty "docking" komplexu pro Pex5 a Pex7
	Pex8	pomáhá složení importomeru a uvolnění transportovaného proteinu
	Pex22	E2-konjugační komplex, kotví Pex4 v membráně
	Pex4	E2-konjugační komplex, předává ubiquitin RING komplexu
	Pex2, 10, 12	RING finger ligační komplex, ligují ubiquitin k receptoru
	Pex15, 26	kotví AAA-ATPázy Pex1 a Pex6
	Pex1, 6	AAA-ATPázy, recyklují ubiquitinem značený receptor za spotřeby ATP
peroxiny podílející se na regulaci velikosti a množství peroxisomů	Pex11	tubularizace a elongace membrány
	Pex23, 24, 28, 29, 30, 31, 32	tvoří komplex na endoplasmatickém retikulu
	Pex25	prodlužování a modelování membrány
	Pex27	negativní regulace dělení peroxisomů
	Pex34	pozitivní regulace dělení peroxisomů
peroxiny podílející se na biogenezi peroxisomálních membrán	Pex3, 16	komponenty "docking" komplexu pro Pex19
	Pex19	mPTS receptor, vycytává peroxisomální membránové proteiny v cytosolu

Tabulka 1. Popis funkcí všech kvasinkových 33 peroxinů. Peroxiny se dělí do tří hlavních skupin: peroxiny účastnící se importu matrixových proteinů; peroxiny podílející se na regulaci velikosti a množství peroxisomů; a peroxiny podílející se na biogenezi peroxisomálních membrán. Pex9 v tabulce není zmíněn, jelikož odpovídá Pexu26, jeho čtecí rámec byl jen nesprávně identifikován (Kiel et al., 2006). (Tabulka převzata a upravena z Yuan et al. a 2016 a Smith a Aitchison, 2013).

3.1.1 Import matrixových proteinů

Proteiny směřující do matrix peroxisomu na sobě nesou cílovou (targeting) peroxisomální sekvenci, tzv. PTS signál (Peroxisomal Targeting Signal). Rozlišují se dva typy PTS signálu: PTS1 signál ležící na C-konci proteinu (např. kataláza), většina proteinů nese tento signál; a PTS2 signál umístěný na N-konci (např. thioláza), výskyt peroxisomálních proteinů nesoucích PTS2 signál je méně častý. Zajímavostí je, že rozsivka *Phaeodactylum tricornutum*, nematod *Caenorhabditis elegans* či moucha *Drosophila melanogaster* PTS2 signál vůbec nemají (Gonzalez et al., 2011). Výjimku tvoří rostliny, jejichž peroxisomální proteiny obsahují převážně PTS2 signál. Vzácně se vyskytují proteiny nesoucí oba signály.

PTS1 signál se skládá ze tří aminokyselin (Serin, Lysin, Leuclin, SKL) ev. variant tohoto motivu ([S/A/C]-[K/R/H]-L). Ale i další pozice aminokyselin mohou napomáhat rozpoznání PTS1 signálu. Například oblast ležící před SKL tripeptidem směrem k N-konci zahrnující nejméně 12 aminokyselin, které interagují s receptorem Pex5 a pomáhají navázání peroxisomálního proteinu na receptor Pex5 (Neuberger et al., 2003). PTS1 signál může být tvořen ještě dalšími, neobvyklými variantami, např. lidská kataláza obsahuje KANL signál (Purdue a Lazarow, 1996).

PTS2 signální sekvence je složitější, delší a proměnlivá ([R/K]- [L/V/I]- [XXXXX]- [H/Q]- [L/A/F] (Purdue et al., 2001).

Některé proteiny jsou transportovány do peroxisomu, aniž by na sobě nesly nějaký rozpoznatelný PTS signál. Takové proteiny jsou schopné se fyzicky vázat a tvořit komplexy s proteiny nesoucími PTS signál a v podstatě se s nimi při transportu "svězt" ("piggybacking") (Yang et al., 2001). Takový způsob transportu využívá například Cu/Zn superoxid dismutáza 1, která je lokalizována hlavně v mitochondriích a cytosolu, ale také ji lze nalézt v peroxisomech (Islinger et al., 2009). Acyl-CoA oxidáza u kvasinek *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* a *Candida tropicalis* také postrádá PTS1 či PTS2 a je přenášena pomocí "piggybackingu" (van der Klei et al., 2006).

Transport proteinů do peroxisomu probíhá ve 4 krocích: (1) rozpoznání PTS signálu receptorem a utvoření komplexu receptor - transportovaný protein ("cargo"), (2) dopravení a navázání komplexu k "docking" proteinům v peroxisomální membráně, (3) rozpad komplexu receptor-transportovaný protein a import proteinu do matrix, (4) recyklace receptoru (Obrázek 3).

Peroxisomální proteiny nesoucí PTS1 nebo PTS2 signál jsou v cytosolu posttranslačně rozpoznávány a vychytávány odlišnými solubilními receptory: receptor Pex5 na sebe váže PTS1, zatímco PTS2 se váže na receptor Pex7 (Purdue et al., 2001). Rozpoznání a navázání receptorů na peroxisomální protein probíhá v místě s TPR (tetratricopeptide repeat) motivem umístěným na C-konci receptoru (Klein et al., 2001). Pex5 obsahuje 7 TPR domén, které jsou nezbytné pro navázání na PTS1 signál, z nichž šest přímo interaguje s PTS1 tripeptidem, zatímco TPR4 je důležitá pro strukturální spojení zbylých šesti TPR domén (Gatto et al., 2003)

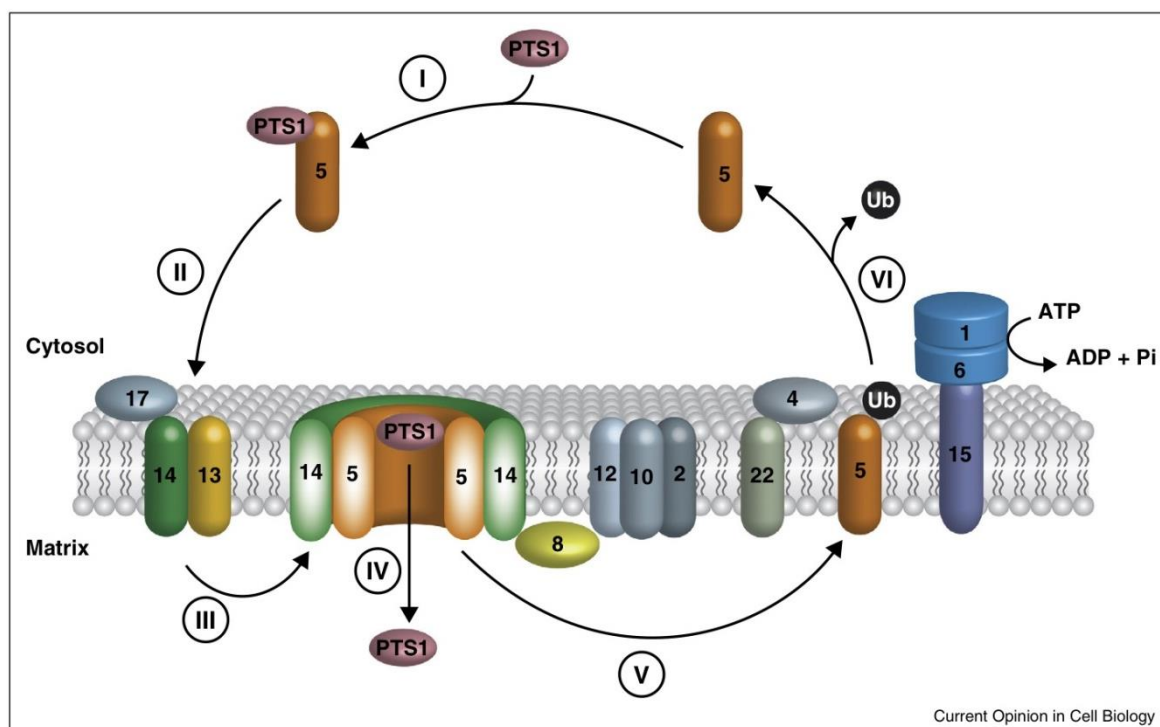
Navázáním receptoru (Pex5/7) k proteinu dojde k vytvoření komplexu, který putuje k peroxisomu. Receptor Pex5 tvoří ve většině případů tetramerní komplexy, ale například u *Leishmania donovani* bylo dokázáno, že po navázání na signální sekvenci PTS1 se tetramer rozpadá na dimerické struktury (Madrid et al., 2004). Na peroxisomální membránu se receptor váže pomocí "docking" komplexu tvořeného Pex13, Pex14 a u kvasinek navíc Pex17. Pex14 k sobě kotví receptor a Pex13 za pomoci Pex14 a Pex17. Zatímco Pex5 váže stejně dobře cílový protein i "docking" komplex, Pex7 potřebuje ke svému správnému navázání k "docking" komplexu a přenosu proteinu pomocné koreceptory. U kvasinek jsou to Pex18, Pex20 a Pex21 (Einwachter et al., 2001), se kterými Pex7 s navázaným proteinem tvoří tzv. preimportní komplex (Liu et al., 2012). U savců a rostlin jde o Pex5L či Pex5S, což jsou dlouhé a krátké, alternativně strižené isoformy Pex5 (Honsho et al., 2011). Je možné, že podobné isoformy receptoru Pex5 se vyskytují i u protist ze skupiny Kinetoplastida–*Trypanosoma brucei* a *Leishmania donovani*, kde mohou pomáhat importu proteinů s PTS2 signální sekvencí (Michels et al., 2005).

Dle modelu transientního póru, který navrhl Meinecke, spolu receptor a Pex14 utvářejí dočasný transportní kanál, který umožňuje přenos složeného proteinu přes membránu do matrix peroxisomu. Tento kanál se dokáže rozevřít až do velikosti o průměru 9 nm, což umožní průchod sbaleným proteinovým oligomerním komplexům (Meinecke et al., 2010). Protein je transportován do peroxisomální matrix a transportní kanál je zase rozložen. Při tom dochází k rozpadu komplexu receptor-transportovaný protein, čemuž u kvasinek napomáhá peroxisomální matrixový protein Pex8, který se zároveň podílí na stabilizaci Pex5 v membráně (Wang et al., 2003). Zatímco PTS1 sekvence zůstává součástí transportovaného proteinu, PTS2 signální sekvence je po transportu některých proteinů odštěpena peroxisomální peptidázou (PPP - peroxisomal leader-peptide processing peptidase) (Authier et al., 1995).

Posledním krokem je recyklace receptoru. Receptor je označen jedním ubiquitinem (monoubiquitinován) a translokován zpět do cytosolu buňky. Na ubiquitinaci receptoru se podílejí konjugační a ligační enzymy. Pex4, periferní membránový peroxin kotvený pomocí Pex22, je E2-konjugační enzym, který předává aktivovaný ubiquitin RING finger komplexu. RING finger komplex se skládá z E3-ligačních enzymů, tedy Pex2, Pex10 a Pex12, které navazují (ligují) ubiquitin na konzervovaný cystein ležící blízko N-konce receptoru, což slouží jako signál pro ATP-dependentní dislokaci receptoru z membrány do cytosolu (Platta et al., 2014). Zajímavou otázkou je, proč je u této dráhy evolučně konzervovaný cystein a ne lysin jak je tomu u ERAD dráhy v ER (popsána níže), jejíž mechanismus se velmi podobá popsané dráze recyklace receptoru. Monoubiquitinovaný receptor je rozpoznáván komplexem AAA-ATPáz (ATPase associated with diverse cellular activities) Pex1 a Pex6, které jsou v membráně ukotveny pomocí Pex15 u kvasinek či Pex26 u savců. Pex1 a Pex6 se skládají každý ze 2 ATPázových domén a fungují jako dislokázy uvolňující monoubiquitovaný receptor z membrány do cytosolu za hydrolýzy ATP (Platta et al., 2005, Miyata et al., 2005). Tyto AAA-ATPázy mohou indukovat konformační změny receptoru za spotřeby ATP, které umožňují uvolnění receptoru a translokaci přenášeného proteinu. Je možné, že uvolnění receptoru je hnací silou pro import proteinu, což je princip přenosu, který popisuje model importu poháněný exportem (export-driven import model) (Schliebs et al., 2010). Současně či ihned po exportu je receptor deubiquitinován ubiquitin hydrolázou Ubp15, čímž je recyklován a schopen účastnit se dalšího importu proteinů (Debelyy et al., 2011). Zajímavé je, že pomocné koreceptory jsou také monoubiquitinovány, opět na konzervovaném cysteinu, a recyklovány pro další kolo importu proteinů (Hensel et al., 2011).

Pokud má být receptor degradován z důvodů opotřebení a nefunkčnosti, následuje místo recyklace tzv. RADAR dráha (receptor accumulation and degradation in the absence of recycling). V této dráze je receptor polyubiquitinován pomocí E3-ligačního enzymu Pex2, což vede k degradaci receptoru v proteasomu (Léon et al., 2006).

Označení substrátů mono- či polyubiquitinací, jejich rozpoznání a ATP-dependentní odstranění z membrány pomocí ATPáz AAA-typu se podobá mechanismu uvolňování proteinů z membrány při ER-asociované degradaci (ERAD), kdy celý proces začíná rozpoznáním špatně sbaleného proteinu, jeho ubiquitinací na lysinu, translokací proteinu do cytosolu a následnou degradací (Schliebs et al., 2010). Peroxiny RING komplexu a AAA-ATPázy jsou homologní proteinům této ERAD dráhy.



Obrázek 3. Schéma importu peroxisomálních matrixových proteinů na modelu *Saccharomyces cerevisiae*. (I) Peroxisomální proteiny nesoucí PTS1 signál jsou v cytosolu rozpoznávány a vázány receptorem Pex5. Peroxisomální proteiny tvoří komplex receptor - transportovaný protein ("cargo"). (II) Dopravení a navázání komplexu k "docking" proteinům v peroxisomální membráně (Pex13, Pex14, Pex17). (III) Pex5 a Pex14 tvoří transientní pór. (IV) Peroxisomální protein je transportován do matrix peroxisomu, jeho uvolnění napomáhá Pex8. (V) Receptor Pex5 je monoubiquitinován na konzervovaném cysteinu pomocí E2-konjuguačního komplexu (Pex4, Pex22) a RING finger ligačního komplexu (Pex2, Pex10 a Pex12). (VI) Receptor je za spotřeby ATP recyklován zpět do cytosolu pomocí AAA-ATPáz (Pex1 a Pex6) kotvených pomocí Pex15. Ubiquitin je z receptoru odštěpen a receptor je připraven na další kolo importu proteinů. (převzato z Hettema et al., 2014).

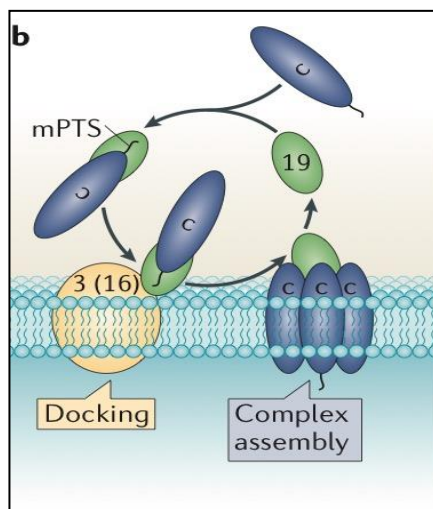
3.1.2 Import membránových proteinů

Existují dvě cesty importu peroxisomálních membránových proteinů (PMP) do membrány peroxisomu. Proteiny třídy I směřují po translaci do peroxisomální membrány. Proteiny, které procházejí nejdříve přes ER, se řadí do třídy II (Jones et al., 2004). Importní cesta třídy I se zdá být evolučně konzervovaná, zatímco import proteinů třídy II se při porovnání modelů kvasinek a savčích buněk liší (Kim a Hettema, 2015).

Třídou I reprezentuje většina PMP. Tyto PMP na sobě nesou cílovou peroxisomální sekvenci mPTS (membrane peroxisomal targeting signal), který je posttranslačně rozpoznáván chaperonem/receptorem Pex19 (Matsuzono et al., 2006) (Obrázek 4).

Pex19 je solubilní receptor, který pracuje na stejném principu jako receptory Pex5 a Pex7, tedy vychytává PMP v cytosolu a tvoří s nimi komplex. Pex19 má na svém C-konci globulární doménu, která rozpoznává a váže mPTS membránových proteinů (Sato et al., 2010). Pex19 má zároveň funkci chaperonu, zamezuje nestabilitě nově syntetizovaných PMP či jejich vzájemné agregaci a následné degradaci v cytosolu (Shibata et al., 2004, Kishiwayama et al., 2005). Pex19 je na svém C-konci farnesylován, což se ukazuje důležité, jelikož mutace ve farnesylování tohoto proteinu u kvasinek způsobují značné narušení importu a stability PMP. U savců bylo také prokázáno, že farnesylovaný Pex19 má výrazně větší schopnost se vázat k PMP (Rucktaschel et al., 2009, Liu et al., 2016).

Po vytvoření komplexu Pex19 – PMP dopravuje receptor PMP k membráně peroxisomu. Amfipatický helix na N-koncové části proteinu Pex19 interaguje s "docking" proteinem Pex3 (a Pex16 u savců) (Fransen et al., 2005, Sato et al., 2010). Pex19 je tedy schopen tvořit trimerní komplexy na obou svých koncích: s PMP na C-konci a s Pex3 na svém N-konci. Membránové proteiny jsou poté vloženy do membrány a složeny do komplexů pomocí Pex19. Přesný mechanismus inkorporace do membrány však zůstává stále nejasný. Chaperon/receptor Pex19 je v posledním kroku recyklován zpět do cytosolu a připraven pro další kolo importu PMP do peroxisomu.



Obrázek 4. Schéma importu peroxisomálních membránových proteinů (PMP) třídy I do peroxisomu. (I) Tyto PMP na sobě nesou cílovou peroxisomální sekvenci mPTS (membrane peroxisomal targeting signal), který je v cytosolu posttranslačně rozpoznáván chaperonem/receptorem Pex19. (II) Po vytvoření komplexu Pex19 – PMP dopravuje receptor PMP k membráně peroxisomu. (III) Pex19 interaguje s "docking" proteinem Pex3 (a Pex16 u savců). (IV) Membránové proteiny jsou poté vloženy do membrány a složeny do komplexů (complex assembly) pomocí Pex19. (V) Pex19 je recyklován a připraven pro další kolo importu PMP do peroxisomu. (převzato z Smith et al., 2013).

Peroxyiny třídy II postrádají mPTS signál a jejich import není závislý na receptoru Pex19. Do této třídy se řadí hlavně Pex3, Pex11 a Pex22 u kvasinek, ale recentní výzkumy ukazují, že tato třída bude nejspíše mnohem rozsáhlejší. Zatím je známo velmi málo o vkládání PMP nezávisle na Pex3-Pex19 komplexu.

PMP třídy II jsou postranslačně transportovány do ER stejným způsobem, jako se sem dostávají proteiny sekreční dráhy – pomocí Sec61 (Thoms et al., 2012) a GET (Golgi to ER trafficking) translokonů v ER (Schuldiner et al., 2008).

Transportované PMP prochází skrz ER a shlukují se ve specializované části hladkého retikula, tzv. preperoxisomální doméně (pER), odkud pučí preperoxisomální váčky (ppV) obsahující PMP. Tyto ppV poté mohou splývat dohromady a tvořit peroxisom či splývají s již existujícím peroxisomem a doplňují jej nejen o PMP, ale i o membránové fosfolipidy pro stavbu membrán (popsáno níže).

Spojení těchto tří mechanismů – transport membránových proteinů třídy I, třídy II a matrixových proteinů - umožňuje vytvořit plně funkční a metabolicky aktivní peroxisom. Do nově vznikajících peroxisomů obsahujících již PMP třídy II jsou transportovány PMP třídy I pomocí komplexu Pex3 – Pex19 a tím vznikají plně funkční peroxisomy. Následuje import matrixových proteinů pomocí importoméru/translokonu a peroxisomy se stávají metabolicky aktivními.

3.1.3 Modely biogeneze peroxisomů

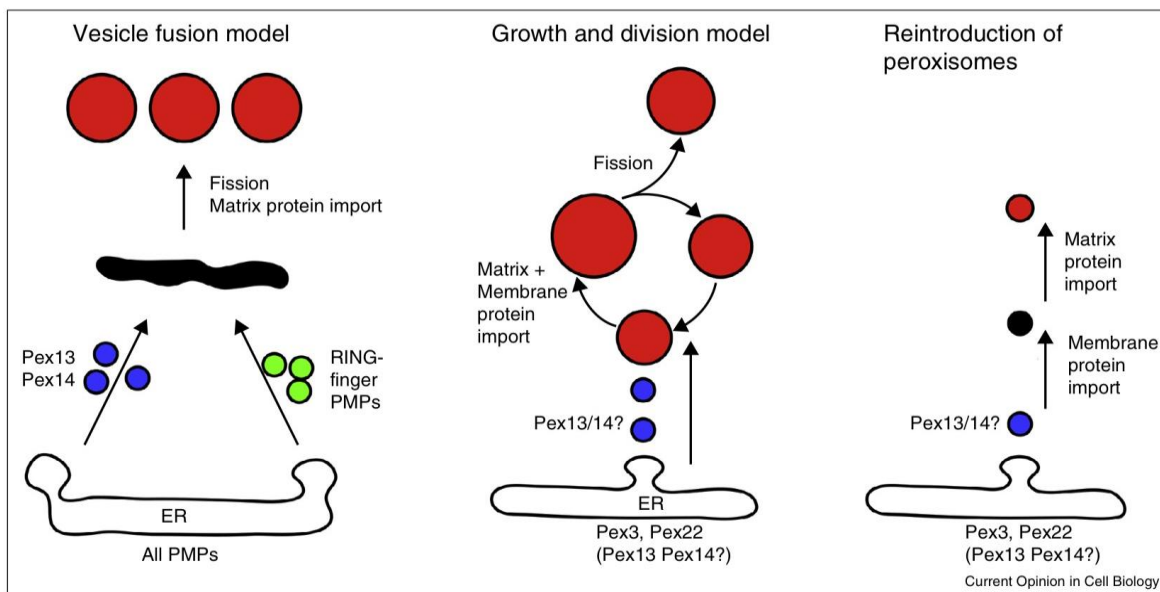
Pro import peroxisomálních proteinů bylo navrženo více modelů (Obrázek 5). Hlavním rozdílem těchto modelů je to, zda převládá tvoření peroxisomů *de novo* z ER pomocí ppV, které dále zrají do funkčních peroxisomů, či zda se peroxisomy hlavně dělí a pučení ppV z ER slouží jako doplňující cesta. Vědecké studie potvrzují obě varianty vzniku peroxisomů, navíc ukazují jejich vzájemnou provázanost a také to, že se funkčně doplňují, čímž zefektivňují tvorbu peroxisomů.

Model růstu a dělení (Growth and division model): Dnes již velmi dobře prozkoumaný a pokusy podložený "Growth and division" model podporuje členění PMP do zmíněných dvou tříd. Nové peroxisomy vznikají dělením stávajících peroxisomů. PMP třídy II jsou nejdříve vkládány do pER, odkud pučí jako ppV. Tyto váčky splývají s již vzniklými peroxisomy, což zajistí inkorporaci PMP třídy II do membrány a zároveň přísun lipidů pro růst membrány peroxisomu. Následuje import membránových proteinů Třídy I pomocí

komplexu Pex3 a Pex19. Tento model tedy postuluje, že nové peroxisomy vznikají dělením a pučení ppV z ER slouží jako doplňující cesta, kterou peroxisomy získávají další potřebné komponenty a membrány (Lazarow a Fujiki, 1984).

Model fúze vesiklů (Vesicle fusion model): Van der Zand a Tabak navrhli v roce 2012 model, kdy spolu splývají dva biochemicky (obsahující rozdílné proteiny) odlišné typy váčků odvozené od ER a obsahující rozdílné proteiny. Prohlásili, že všechny nově syntetizované PMP směřují nejdříve do ER. Poté se shlukují na dvou různých oddílech pER a tvoří zde biochemicky odlišné typy váčků. V prvním typu ppV se u kvasinek hromadí receptor "docking" proteiny, tedy Pex13, Pex14 a Pex17, zatímco druhý typ ppV obsahuje proteiny RING finger komplexu, Pex2, Pex10 a Pex12, přičemž každý z nich tvoří polovinu nefunkčního translokonu (Zand et al., 2012). Tento model elegantně vysvětluje i mechanismus zamezení transportu proteinů dovnitř peroxisomu, dokud nejsou váčky plně odděleny od ER a autonomní. Tyto ppV nejspíše nemohou fúzovat se zralými peroxisomy. V obou typech ppV se nachází Pex3. Váčky/PpV obsahující tyto poloviční importomerní komplexy se poté spojí heterotypickou fúzí závislou na Pex1 a Pex6, kdy se každý z nich vyskytuje v rozdílném typu váčku (Titorenko et al., 2015). Spojením AAA-ATPáz Pex1 a Pex6 se formují plně funkční peroxisomy s kompletními translokony. Do těchto již zralých peroxisomů následuje import matrixových proteinů (Tabak, 2013). Tento model fúze dvou biochemicky odlišných váčků je sice elegantní a smysluplný, ale má některé nedostatky, například nebere v úvahu dnes již dobře prostudovaný import PMP třídy I závislý na Pex3 a Pex19. Zand tvrdí, že ER prochází všechny PMP; kdyby tomu tak opravdu bylo, byla by u *PEX3* a *PEX19* deletních kmenů *S. cerevisiae* většina PMP lokalizována v cytosolu. Tento model také nepodporuje klasický vznik nových peroxisomů dělením. Navíc studie dokazují, že Pex1 a Pex6 spolu tvoří heterohexamerický komplex se střídavě uspořádanými podjednotkami, tedy jeho složení se zdá být mnohem složitější, nežli prostou fúzí dvou odlišných váčků a následnou interakcí těchto dvou ATPázových proteinů (Fujiki et al., 2012).

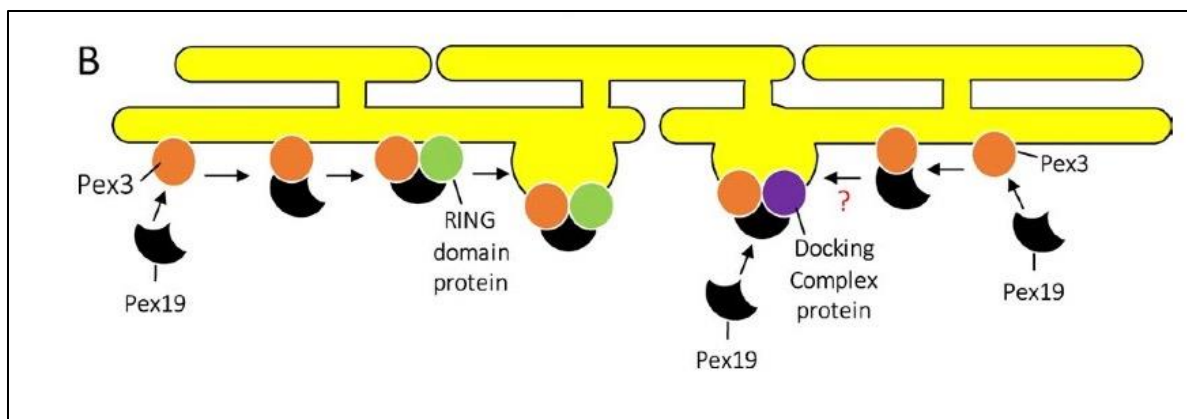
Obnovená tvorba peroxisomů (Reintroduction of peroxisomes): Tento model popisuje způsob tvorby peroxisomů *de novo* z ER při narušení klasické "Growth and division" cesty tvorby peroxisomů. Pex3 se klasicky dostává do pER, odkud pučí váček obsahující Pex3 (Tabak et al., 2006). Díky komplexu Pex3-Pex19 je možný import PMP třídy I a váček pomalu dozrává do funkčního peroxisomu. Vzniká funkční importomer/translokon a do peroxisomu jsou importovány matrixové proteiny. Poté se tyto nově syntetizované peroxisomy mohou dělit podle "Growth and division" modelu. Zda však Pex13 a Pex14 cestují přes ER, a řadí se tedy do třídy II PMP, zůstává nejasné.



Obrázek 5. Schéma modelů pro tvorbu peroxisomů *de novo* a import peroxisomálních proteinů. (převzato z Hettema et al., 2014).

Nejnovější model dopravy PMPs přes ER navrhl Agrawal v tomto roce (2016) (Obrázek 6). Tento model doplňuje model fúze váčků. Podporuje tedy tvorbu dvou odlišných typů váčků, ale udává, že vložení, rozřídění a pučení PMP RING komplexu, tedy Pex2, Pex10 a Pex12, je závislé na komplexu Pex3-Pex19. PMP "docking" komplexu, tedy Pex13, Pex14 a Pex17, jsou importovány a řazeny v pER nezávisle na komplexu Pex3-Pex19; tyto proteiny ale potřebují Pex19 pro vznik a odpučení ppV od ER. Proč je potřebný Pex19 a jakou roli v pučení hraje, zůstává záhadou. Tento rozdílný mechanismus vysvětluje, proč jsou PMP tříděny do dvou různých oblastí pER a jejich následné pučení v odlišných váčcích (Agrawal et al., 2016).

Tento model inkorporace PMP se dle mého názoru shoduje s dřívějšími poznatky, podporuje klasický model růstu a dělení závislý na importu PMP pomocí komplexu Pex3–Pex19, doplňuje některé nedostatky modelu fúze vesiklů a zároveň objasňuje nejasnosti, proč jsou některé proteiny inkorporovány do peroxisomální membrány nezávisle na Pex3 (dle těchto studií mají mutanti *Hansenula polymorpha* deletovaným *PEX3* a *PEX19* detekovatelné preperoxisomální váčky obsahující Pex13 a Pex14).



Obrázek 6. Agrawalův model tvorby peroxisomů *de novo*. (Agrawal et al., 2016).

3.2 Vznik peroxisomů dělením

Peroxisomy mohou vznikat *de novo* pučením z ER, nebo dělením. Vznik nových peroxisomů dělením zajišťuje vysoce konzervovaný membránový protein Pex11 (Li et al., 2002).

Rodina Pex11 se skládá z homologních proteinů zahrnujících kromě Pex11 ještě další proteiny, které byly nalezeny u kvasinek (Pex25, Pex27), trypanosom (pojmenované GIM5A, GIM5B) i savců (pojmenované Pex11 α , Pex11 β a Pex11 γ). Zatímco funkce proteinu Pex11 je vždy konzervovaná u všech organismů, funkce dalších homologů se liší a je specifická dle druhu organismu (Thoms et al., 2005). Protein Pex11 je nezbytný pro elongaci membrány i finální odštěpení dvou nově vzniklých peroxisomů. Funkční studie u *S. cerevisiae* ukázaly, že při delecii proteinu Pex11 dochází k úbytku peroxisomů a zároveň se zvětšuje jejich velikost. Naopak zvýšená exprese proteinu Pex11 vede k nárůstu počtu peroxisomů (Erdmann et al., 1995).

Dělení peroxisomů se skládá ze 4 hlavních kroků. Prvním je vložení Pex11 do membrány peroxisomu, následuje elongace peroxisomu a sevření membrány v místě rozdělení a nakonec samotné rozdělení peroxisomů. Dělení peroxisomu probíhá asymetricky.

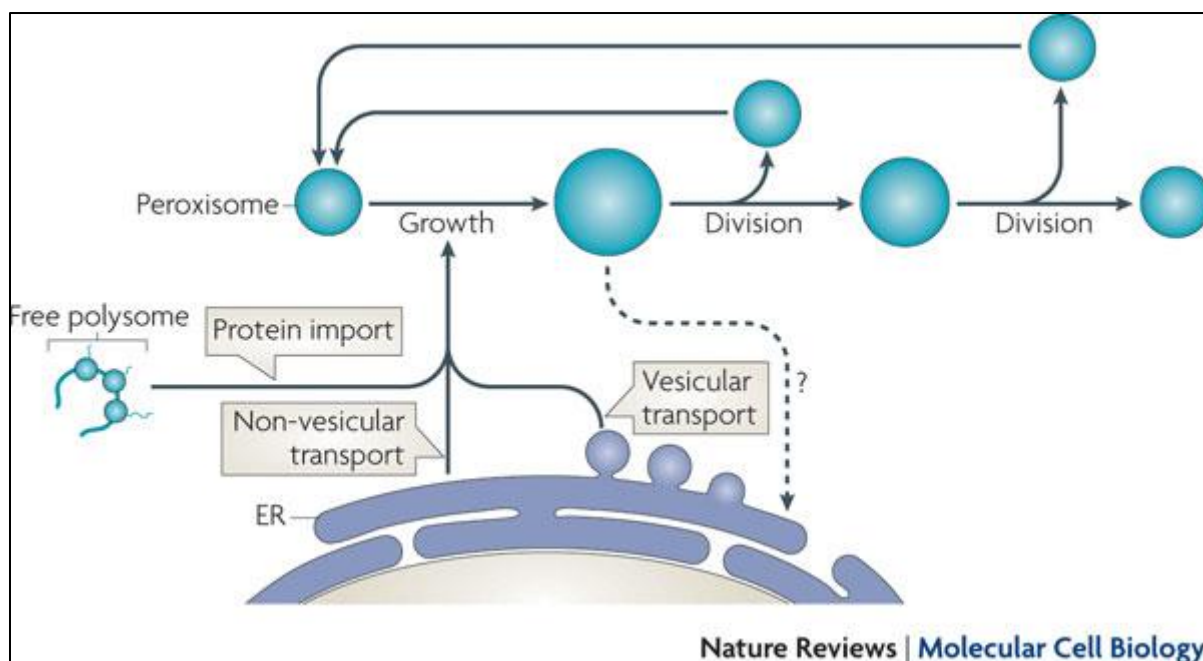
Funkce Pex11 je zprostředkována pomocí oblasti ležící na samotném N-konci proteinu, který má strukturu amfipatické šroubovice (helixu). Vložení těchto helixů do jednoho konce membrány způsobí její zatočení, které vede k tubularizaci membrány a její následné elongaci (Drin et al., 2010, Opalinski et al., 2011).

Jelikož si peroxisomy neumí syntetizovat lipidy samy, musí být všechny potřebné lipidy transportovány z ER. Elongace membrány probíhá pomocí vesikulárního i nevesikulárního transportu.

Vesikulární transport (Obrázek 7) lipidů do peroxisomu podporuje model vkládání proteinu Pex3 do ER a také vznik peroxisomů *de novo*. Jak již bylo zmíněno, Pex3 je vkládán do ER, odkud se dostává ve váčku, který poté splývá s dalšími ppV či přímo se zralými peroxisomy. Fúzí těchto váčků spolu či se zralým peroxisomem získávají peroxisomy lipidy potřebné pro svou elongaci (Schekman, 2005, Hoepfner, 2005).

Nevesikulární transport (Obrázek 7) dopravuje lipidy přímo z ER do membrány peroxisomu (Raychaudhuri et al., 2008). Tento přímý přenos lipidů by mohl být zprostředkován přes tzv. membránová kontaktní místa (MCSs – membrane contact sites). MCS jsou definována jako oblasti, kde se k sobě přiblíží dvě rozdílné membrány na vzdálenost menší než 30 nm. Tato místa se nazývají EPCONS (ER-to-peroxisome contact site) a jejich výskyt byl popsán mezi ER a peroxisomy kvasinek. Dále byla prokázána i interakce membrán peroxisomů s mitochondriemi (Cohen et al., 2014) (Neuspiel et al., 2008) nebo také s lysosomy či chloroplasty (Chu et al., 2015). Je tudíž možné, že dochází k výměně lipidů i mezi těmito organelami navzájem.

Do elongovaných membrán bohatých na Pex11 směřuje protein Dnm1. Dnm1 (či Drp1p u savců) je protein ze skupiny velkých GTPas, který se podílí na sevření a rozdělení peroxisomů. Molekulární mechanismus sevření, zúžení a následné zaškrcení membrány je stále málo prozkoumaný, ale je známo, že proteiny rodiny Pex11 interagují s dynamin-like proteiny (DLP). DLP proteiny se primárně účastní dělení mitochondrií, proto je zajímavý jejich výskyt i v peroxisomech. Mezi DLP proteiny řadíme například Dnm1. Dnm1 je schopen okolo zaškrcených míst na membráně utvořit oligomerní strukturu podobající se kruhu (Mears et al., 2011). Za hydrolyzy GTP se tato struktura mechanicky stahuje a zužuje průchod mezi mateřským a dceřiným peroxisomem, až se peroxisomy plně rozdělí. DLP jsou pro oddělení peroxisomů zásadní, neboť při jejich delecí k finálnímu odštěpení peroxisomů vůbec nedojde. Namísto toho vznikají tubulární peroxisomální útvary neschopné se oddělit (Koch et al., 2004, Williams et al., 2015). Pex11 přímo interaguje s Dnm1, interakce se uskutečňuje pomocí konzervované struktury na N-konci Pex11 (Opalinski et al., 2011). Pex11 ve spojení s Dnm1 funguje jako GAP (GTPase activating protein) a tím stimuluje GTPázovou aktivitu Dnm1 (Williams et al., 2015). Tato interakce byla pozorována u kvasinek i savčích buněk (Thoms et al., 2005, Williams et al., 2007). Na modelu kvasinky jsou k rozdělení zapotřebí kromě Dnm1 i další proteiny, ale jejich funkce při dělení peroxisomů zůstává zatím málo prozkoumaná. Jisté ale je, že ani jeden z nich neovlivňuje aktivitu Dnm1, tuto funkci ovládá jen Pex11. (Williams et al., 2015).



Obrázek 7. Vznik peroxisomů dělením, vesikulární transport, nevesikulární transport. (Fagarasanu et al., 2010).

3.3 Proliferace peroxisomů a pexofagie

Proliferace peroxisomů v buňce je řízena PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors). Tyto transkripční faktory indukují transkripci peroxisomálních genů a ovlivňují tedy množství peroxisomů v závislosti na podmínkách prostředí a dostupných zdrojích energie (Schrader et al., 2012). Jejich aktivace indukuje expresi *PEX11*, v důsledku čehož se peroxisomy více dělí, přesný mechanismus ale není znám (Cornwell et al., 2004). Dalším přirozeným faktorem zajišťujícím proliferaci peroxisomů je přítomnost polynenasycených řetězců mastných kyselin (Forman et al., 1997).

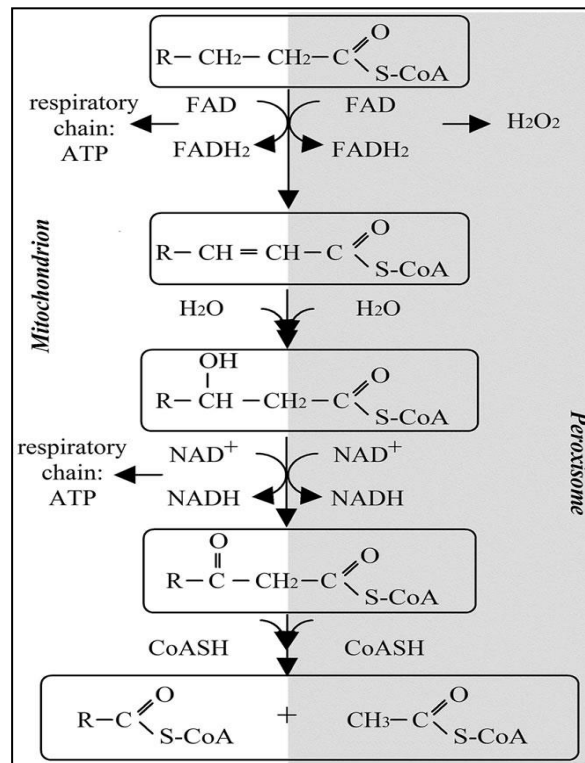
Pokud je peroxisomů naopak přebytek, jsou peroxisomy odbourány pomocí pexofagie. Pexofagie je druh autofagie, neboli degradace peroxisomů za účelem zachování buněčné homeostázy. Tento proces podobný fagocytóze spočívá v pohlcení a následné hydrolytické degradaci starých či přebytečných peroxisomů vakuolou. Pokud jde o neselektivní pohlcení peroxisomů, nazývá se mikropexofagie. Vysoce selektivní a specifická degradace jednotlivých peroxisomů se nazývá makropexofagie. V tomto procesu hrají roli Pex3 a Pex14, což jen potvrzuje, jak mohou být peroxiny funkčně všestranné. Pokud se z genomu deletují *PEX3* geny, tak se peroxisomy degradují právě pomocí makropexofagie, přítomnost Pex3 tedy zabraňuje degradaci peroxisomů (Bellu et al., 2002, Bellu a Kiel, 2003).

4. Funkce peroxisomů

Ačkoli mají peroxisomy jednotný původ, což dokazuje podobná morfologie, způsob biogeneze a konzervovanost importní dráhy peroxisomálních proteinů, jejich funkce se mohou značně lišit. A to nejen mezi živočišnými druhy, ale také v různých typech buněk v rámci mnohobuněčného organismu, nebo i u jednobuněčných eukaryot v závislosti na rozdílných podmínkách prostředí či fázi životního cyklu organismu. Poslední společný, předek eukaryot LECA (Last Eukaryotic Common Ancestor) měl ve své organelární výbavě již funkční peroxisom s některými funkcemi, jako je například beta-oxidace či detoxikace ROS. Většina dalších peroxisomálních funkcí, které si určité organismy získaly, se přesunula do peroxisomů až později (Gabaldon et al., 2006). Ztráty funkcí peroxisomů či jejich specializace také nejsou neobvyklé.

Peroxisomy se účastní mnoha katabolických i anabolických reakcí. Nejrozšířenější funkcí peroxisomů společnou pro většinu organismů je oxidace velmi dlouhých (VLCFA - very long chain fatty acids) a větvených řetězců mastných kyselin (MK). Většina MK je metabolizována pomocí beta-oxidace. Beta-oxidace MK je katabolický proces, při kterém jsou oxidovány různě dlouhé řetězce MK na acetyl koenzym A (acetyl-CoA). Beta-oxidace se skládá z cyklického opakování několika kroků, které vedou k postupnému odštěpování dvouuhlíkatých zbytků MK, při kterých vzniká příslušný počet acetyl-CoA. Acetyl-CoA je metabolizován v citrátovém cyklu, výsledným produktem je CO₂, redukované koenzymy přenášející elektrony a energie ve formě ATP. Na rozdíl od glykolýzy probíhá beta-oxidace jen za aerobních podmínek, úzce souvisí s dýchacím řetězcem, proto MK nemohou být zdrojem energie v anaerobním prostředí (Obrázek 8).

U savčích buněk se beta-oxidace odehrává převážně v mitochondrii, u rostlin a některých hub ale bývá výhradně peroxisomální funkcí (Poirier et al., 2006). Zpočátku se předpokládalo, že beta-oxidace probíhající v peroxisomech jen doplňuje tu mitochondriální a je využívána pouze při nedostatečné kapacitě mitochondrií. Bylo však dokázáno, že pacienti s peroxisomálními poruchami (Zellweger syndrom, X-vázaná adrenoleukodystrofie) mají v krevním séru zvýšené množství dlouhých řetězců MK obsahujících více než 22 uhlíků, tzv. VLCFA (very long chain fatty acids), a větvených MK, což vedlo k objevu, že VLCFA či větvené MK jsou štěpeny výhradně v peroxisomech (Bakkeren et al., 1984, Moser, 1997).



Obrázek 8. Schématická dráha mitochondriální a peroxisomální beta-oxidace. (Le Borgne, 2012).

Až na pár základních rozdílů je mechanismus mitochondriální a peroxisomální beta-oxidace v podstatě totožný (Obrázek 8). Nejprve je nezbytné aktivovat MK dodáním energie vzniklé hydrolýzou ATP (až na AMP). Aktivovaná forma se pomocí acyl-CoA syntetázy, která substituuje hydroxylovou skupinu MK na C1 za CoA, mění na acyl-CoA. Rozklad ATP až na pyrofosfát je silně exergonická reakce a tím pádem probíhá aktivace acyl-CoA spontánně a je nevratná. Aktivace MK se odehrává v cytosolu buňky. Jakmile je MK aktivována na acyl-CoA, může být acyl-CoA transportován do mitochondrií či peroxisomů a jeho oxidace může začít. Transport acyl-CoA se odehrává pomocí ABC transportérů (Hettema et al., 2000).

Beta-oxidace se skládá ze čtyř enzymatických kroků, které katalyzují čtyři enzymy. Prvním krokem je dehydrogenace, kdy dochází ke vzniku dvojně vazby mezi alfa a beta uhlíkem (C2 a C3) acyl-CoA, při čemž jsou odstraněny 2 atomy vodíku. Jako akceptor atomů vodíku slouží FAD. Reakce je katalyzována acyl-CoA oxidázou. Následuje hydratace dvojně vazby adicí vody pomocí enoyl-CoA hydratázy a tvorba 3-L-hydroxyacyl-CoA. Dalším krokem je dehydrogenace nově vytvořené hydroxylové skupiny a tvorba 3-ketoacyl-CoA. Dehydrogenace je zprostředkována hydroxyacyl-CoA dehydrogenázou. Akceptorem elektronů je NAD⁺. NADH zde není zpětně reoxidován, ale je transportován do cytosolu a

následně do mitochondrie. Posledním krokem je thiolýtické odštěpení koncové skupiny acetyl-CoA pomocí thiolázy a vznik acyl-CoA zkráceného o dva uhlíky. Následuje další oxidace acyl-CoA. Tento proces se cyklicky opakuje až na konečný, nejčastěji osmiuhlíkatý produkt octanoyl-CoA; thioláza dále nekatalyzuje štěpení kratších řetězců. Výsledný produkt přechází pasivně do cytosolu buňky a tam je dále zpracováván a přenesen do mitochondrie, kde se odehrává mitochondriální beta-oxidace, jejím výsledným produktem je energie ve formě ATP.

V peroxisomech se také odehrávají alfa-oxidace (oxidace rozvětvených MK) a omega-oxidace (vznik dikarboxylových kyselin), které štěpí acyl-CoA po jednom uhlíku. Při alfa-oxidaci je odštěpen alfa uhlík (C2) na C-konci MK. Produktem je 2-metyl MK, která již může být štěpena pomocí beta-oxidace (Wanders et al., 2001). Mezi větvené MK patří například fytanová kyselina vznikající z fytolu - části chlorofylu, která obsahuje na svém beta uhlíku metylovou skupinu, která blokuje štěpení mezi alfa a beta uhlíkem a tudíž beta-oxidace neprobíhá. Proto je tato MK metabolizována nejprve v peroxisomu: dekarboxylací (alfa-oxidací) je odebrán koncový CO₂ a stává se z ní kyselina pristanová, která už může být klasicky odbourána beta-oxidací v peroxisomu nebo mitochondrii (Brink et al., 2006). Alfa-oxidace se odehrává výhradně v peroxisomech. Proč mitochondrie schopnost alfa-oxidace postrádají, zůstává nejasné.

Velmi minoritní drahou je omega-oxidace MK, která probíhá, pokud je narušena beta-oxidace MK. Omega-oxidací jsou metabolizovány středně dlouhé řetězce MK a je při ní odštěpen omega uhlík ležící nejdále od C-konce. Dochází k hydroxylaci koncové metylové skupiny, ta je oxidována na karboxylovou. Výsledným produktem jsou dikarboxylové kyseliny. Na rozdíl od 3-metyl větvených MK jsou 2-metyl větvené MK v prvním kole také beta-oxidovány za vzniku propionyl-CoA místo acetyl-CoA (Verhoeven et al., 1998).

Mezi mitochondriální a peroxisomální beta-oxidací existují následující rozdíly:

- 1) Peroxisomální beta-oxidace využívá odlišné substráty a doplňuje tak mitochondriální beta-oxidaci. Substrátem pro peroxisomální beta-oxidaci jsou hlavně VLCFA a větvené MK, které mitochondrie oxidovat neumí, v mitochondriích probíhá oxidace středně dlouhých a dlouhých MK (řetězec delší než 8 C). Proto v peroxisomech neprobíhá beta-oxidace až do konce, ale jen nezbytně nutná část, například zkrácení VLCFA (Osumi et al., 1980). Z toho důvodu se liší i substráty těchto dvou typů beta-oxidace.
- 2) V prvním kroku beta-oxidace jsou využity jiné enzymy. V mitochondrii katalyzuje první krok beta-oxidace flavoprotein acyl-CoA dehydrogenáza, prostetickou skupinu

zde tvoří FAD. Při tomto ději se redukuje FAD na FADH₂, při jeho regeneraci jsou uvolněné elektrony využity dýchacím řetězcem pro tvorbu protonového gradientu a následnou syntézu ATP (za vzniku H₂O z O₂). Oproti tomu v peroxisomu je první krok katalyzován jiným flavoproteinem - acyl-CoA oxidázou - a jelikož peroxisomy postrádají dýchací řetězec, elektrony uvolněné při reoxidaci FADH₂ jsou přenášeny na kyslík za vzniku toxického H₂O₂, který je bezprostředně odbouráván katalázou na O₂ a H₂O. Energií uvolněnou touto reakcí nevzniká tedy ATP, ale jen energie (teplo).

- 3) Liší se způsob transportu acyl-CoA z cytosolu do organely. Do mitochondrie se acyl-CoA dostává pomocí karnitinového přenašeče (u savců). Pro transport acyl-CoA do matrix peroxisomu není karnitinový přenašeč potřeba. I přesto byla v peroxisomech pozorována karnitin acyltransferázová aktivita, jejíž funkcí se zdá být přenos acyl-CoA na karnitin, což umožní jeho transport do mitochondrií, kde pokračuje jeho oxidace (Wanders et al., 2013).

Další významnou funkcí peroxisomů je detoxifikace ROS (reactive oxygen species). Reaktivní formy kyslíku jsou volné radikály tvořené z molekul kyslíku, které obsahují alespoň jeden nepárový elektron (superoxidy, peroxid vodíku, epoxidy aj.). ROS jsou pro buňku toxické a tvoří se jako důsledek primárních metabolických aktivit peroxisomů. Vznikají redukcí O₂ při oxidačních reakcích závislých na kyslíku. Peroxisomy obsahují různé oxidázy, které svou činností oxidují substráty za spřažené redukce kyslíku na peroxid vodíku. Beta-oxidací MK vzniká pro buňku toxický peroxid vodíku, který je neprodleně rozkládán katalázou či využit ve spřažené reakci dalšími oxidázami pro oxidaci jiných substrátů. Kataláza katalyzuje přeměnu dvou molekul peroxidu vodíku na vodu a kyslík v reakci:

$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ (Chelikani et al., 2004). Peroxisomy obsahují i další enzymy, které likvidují ROS; jsou to např. xantin dehydrogenáza, Cu/Zn superoxid dismutáza (SOD), glutathion peroxidáza a další.

Většina peroxisomů obsahuje některé enzymy zapojené do biosyntézy éterových lipidů (plasmalogenů). Plasmalogeny jsou speciálním druhem fosfolipidů, které mají na C1 uhlíku/sn-1 pozici glycerolové kostry fosfolipidu vázán vinyl-éterovou vazbou alifatický nenasycený řetězec, zatímco obvyklé fosfolipidy (např. fosfatidylcholin, fosfatidylserin) mají na této pozici esterovou vazbou vázanou MK (Nagan et al., 2001). Plasmalogeny jsou častou složkou vnitřní vrstvy plasmatických membrán svalových buněk, především srdečního svalu, kde mohou zastupovat 30-40% celkového složení glycerolfosfolipidů (Farooqui et al., 2001).

Velmi důležitou funkci zastávají v mozku, kde tvoří až 90% celkového složení fosfolipidů myelinových vláken (Han et al., 2001).

V savcích buňkách jsou peroxisomy dále nezbytné pro biosyntézu cholesterolu, dolicholu, žlučových kyselin, rozklad polyaminů a D-aminokyselin, mohou obsahovat oxidativní složku pentózo-fosfátové dráhy, nebo oxidaci alkoholu a mnoho dalších procesů.

V peroxisomech probíhá také katabolismus purinů. Přebytečné puriny jsou v několika krocích postupně oxidovány až na konečné produkty. U člověka je v závěrečné fázi konečným produktem kyselina močová, která je dále vyloučena do moči. Tento krok katalyzuje xantin oxidáza, touto reakcí mimo jiné vzniká také peroxid vodíku. U většiny savců (ale ne u primátů) je kyselina močová dále rozkládána urát oxidázou za tvorby allantoinu, ale může být rozložena až na amoniak (u mořských bezobratlých).

U hub se v peroxisomech kromě oxidace mastných kyselin a metabolismu ROS vyskytují také další, velmi specifické funkce. V peroxisomech se hromadí například enzymy pro syntézu biotinu či řady sekundárních metabolitů, jako jsou antibiotika a toxiny, například polyketidy (Stehlik et al., 2014). Když mají methylotropní kvasinky (*Hansenula polymorpha*, *Pichia pastoris*) k dispozici pouze metanol jako jediný zdroj uhlíku a energie, akumulují v peroxisomech enzymy pro syntézu C3 sloučenin z metanolu (Yurimoto et al., 2011). U některých vřeckovýtrusných hub byly identifikovány další velmi specializované typy peroxisomů nazvané Woroninova tělíska (Woronin bodies). Tato tělíska nejsou metabolicky aktivní, ale slouží k mechanickému utěsnění septálních pórů poškozených hyf a zamezují tak unikání cytoplasmy (Jedd a Chua, 2000). Jejich hlavní komponentou je protein HEX1 (beta-hexosaminidáza), který se samovolně skládá a tvoří hexagonální krystaly, které jsou schopné póry utěsnit (Yuan et al., 2003). Kromě těchto Woroninových tělísek obsahují hyfy i klasické peroxisomy s typickými funkcemi beta-oxidace a detoxifikace ROS. V peroxisomech mnoha hub byly objeveny některé glykolytické enzymy. Zde je směřování do peroxisomů způsobeno přítomností neznámého cílového (targeting) signálu vzniklého alternativním sestřihem či po čtení příslušné mRNA za stop-kodon. Tyto enzymy mohou tvořit alternativní trasu pro glykolytickou dráhu, ale spíše se podílejí na udržování homeostázy ATP/ADP v peroxisomu.

Rostliny obsahují tři rozdílné typy peroxisomů. V klíčících semenech rostlin jsou přítomny specializované peroxisomy nazývané glyoxysomy. V glyoxysomech probíhá glyoxylátový cyklus. Během klíčení se zásobní zdroj energie – triacylglyceroly – metabolizují mimo jiné na MK. MK jsou aktivovány a poté oxidovány v glyoxylátovém cyklu. V tomto cyklu se acetyl-CoA přeměňuje pomocí isocitrát lyázy na sukcinát a glyoxylát, který je dále využíván k syntéze glukoneogenetického substrátu oxalacetátu (Breidenbach, 1968). Dalším

typem jsou peroxisomy nacházející se v listech rostlin. Tyto peroxisomy interagují s chloroplasty. Peroxisomy v okolí chloroplastů mění svůj tvar z kulovitého na eliptický a dochází k výměně metabolitů mezi těmito dvěma organelami (Oikawa et al., 2015). Třetím typem jsou klasické peroxisomy v ostatních částech rostlin, podílející se na obvyklých peroxisomálních funkcích a oxidativním metabolismu.

5. Peroxisomy protist

Skupina protista je parafyletickou skupinou jednobuněčných eukaryotních organismů, která zahrnuje zástupce všech dnešních eukaryotických skupin (Amorphea, Archaeplastida, SAR, Excavata) (Adl et al., 2012). Většina informací o biogenezi a funkcích peroxisomů byla studována na modelu kvasinek, rostlin či savčích buňkách, ale jen velmi málo ucelených informací je známo o peroxisomech protist. Relativně dobře prozkoumanými jsou zástupci skupin Kinetoplastida (*Trypanosoma* sp.) a Ciliata (modelový organismus *Tetrahymena pyriformis*). S příchodem možnosti kompletní sekvenace genomů v dnešní době narůstá i možnost studia evolučně konzervovaných peroxisomálních genů a jejich homologů ve většině skupin včetně jednobuněčných organismů. Ačkoli měl LECA ve své organelární výbavě již funkční peroxisom, výzkumy ukazují, že v evoluci proběhly u různých skupin opakované ztráty peroxisomů. Apicomplexa jsou první skupinou, kde byla dokázána absence peroxisomů (Schluter et al., 2006). Recentní výzkumy ale dokazují, že v kokcídii *Toxoplasma gondii* byly nalezeny typické peroxisomální enzymy (kataláza s cílovou peroxisomální sekvencí, enzymy účastnící se beta-oxidace) a také geny *PEX1* a *PEX5* (Kaasch et al., 2000). U skupiny Amoebozoa byly v modelovém organismu *Dictyostelium discoideum* peroxisomy identifikovány biochemicky i pomocí mikroskopie (Parish, 1975). V této skupině došlo také ke ztrátám peroxisomů zapříčiněným pravděpodobně parazitickým způsobem života, jak je tomu například u améby *Entamoeba histolytica*. Parazit *Giardia lamblia* či *Trichomonas vaginalis* patřící do skupiny Excavata peroxisomy také postrádají (de Souza et al., 2004). V kontrastu s těmito parazitickými zástupci, kteří peroxisomy ztratili, jsou velmi zajímavou skupinou Kinetoplastida, u kterých se naopak peroxisomy specializovaly v organely zvané glykosomy (Opperdoes a Borst, 1977, Michels et al., 2006).

5.1 Kinetoplastida

Parazitičtí zástupci této skupiny mají komplikované životní cykly zahrnující rozdílná životní stadia ve dvou naprosto odlišných hostitelích, například v člověku či jiném savci a hmyzu (Simpson et al., 2006). Proto tyto organismy musí mít velmi důležitou schopnost přizpůsobit se a přeprogramovat svůj metabolismus podle toho, v jakém hostiteli se zrovna nacházejí, aby byly schopné v nich přežít a dále se množit.

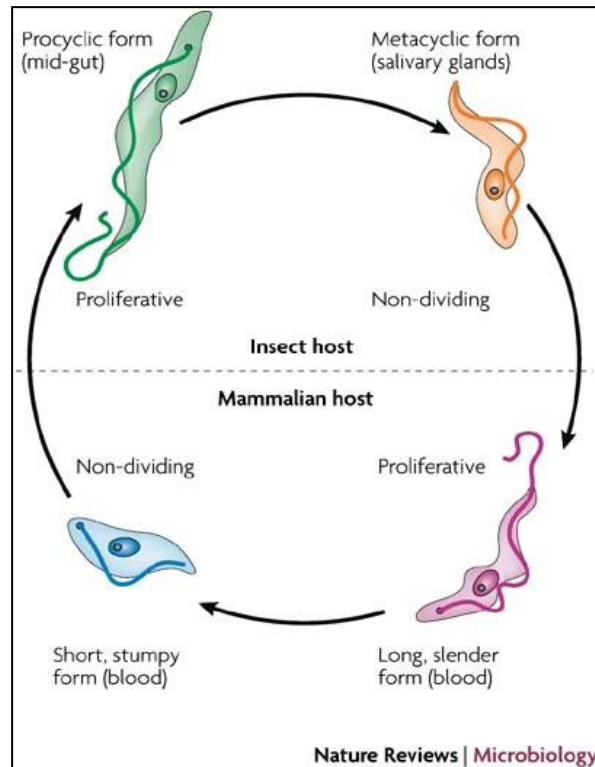
Trypanosoma brucei je africká trypanosoma způsobující spavou nemoc, je přenášena bodalkou rodu *Glossina* mezi člověkem. *T. brucei* má 4 životní stadia, při kterých probíhají morfologické i metabolické změny (Obrátek 9). Po kousnutí infikovanou mouchou se do krve člověka dostávají metacykličtí trypomastigoti, kteří se mění na krevní formu zvanou "long slender".

Long slender forma se vyskytuje v krevním řečišti. Má okolo sebe dostatek glukózy (stálá hladina glukózy v krvi je cca 5mM), proto jí stačí využívat pro získání energie jen aerobní glykolýzu, vzniklý pyruvát je exkretován do krevního řečiště. Pokud je v krvi nízké množství kyslíku, je schopna na krátkou dobu využívat anaerobní glykolýzu za vzniku glycerolu (Hammond et al., 1985, Kralova et al., 2000). Tou ale nezíská dostatečné množství ATP pro stálý růst a dělení (Helfert et al., 2001). Na získání energie z glykolýzy je slender forma plně závislá. Funkce mitochondrií je u tohoto stadia utlumená. Proliferace glykosomů naopak narůstá až na 250 glykosomů na buňku, což jsou 4% celkového buněčného obsahu (Opperdoes et al., 1984). Glykosomy krevní formy obsahují z více jak 90% enzymy glykolýzy, většina jejich dalších metabolických funkcí se u této formy nevyskytuje. Krevní formy například postrádají metabolismus éterových lipidů (Misset et al., 1984). Slender forma se dělí a diferencuje na "short stumpy" formu, která se dále nedělí. Pokud je tato slender forma nasáta vektorem, není schopna v něm přežít (Nolan et al., 2000).

Short stumpy forma se již začíná připravovat pro přechod do přenašeče. Je stále závislá na glykolýze, ale její mitochondrie začínají být metabolicky aktivní. Stumpy forma je nasáta bodalkou, v jejím střevě se formuje do procyklické formy, která se dělí.

Procyklické trypanosomy zůstávají ve střevě bodalky, kde je glukóza dostupná jen chvíli po nasátí, proto trypanosomy musejí plně aktivovat mitochondrie a získávat energii metabolismem aminokyselin, zejména prolinu, threoninu a glutaminu, kterých se vyskytuje v hmyzím střevě dostatek (Bursell, 1981). Enzymatický obsah glykosomů procyklických forem se skládá z glykolytických enzymů jen ze 40 – 50%, zbytek enzymů katalyzuje další funkce, například se zde odehrává pentosofosfátový cyklus.

Posledním stadiem jsou infekční metacyklické formy trypanosom vzniklé diferenciací procyklů. Metacyklické formy putují do slinných žláz bodalky, kde čekají na sání na hostiteli, pronikají do něj a infikují ho.



Obrázek 9. - Životní cyklus *Trypanosoma brucei* střídající savčí a vektorovou formu. (Lee et al., 2007).

Trypanosoma cruzi a *Leishmania* se musely adaptovat na ještě rozdílnější typy prostředí, jelikož ve svém vektoru žijí extracelulárně v trávicím traktu, zatímco v hostiteli jsou to intracelulární parazité.

Trypanosoma cruzi se vyskytuje v latinské Americe, způsobuje Chagasovu nemoc a je přenášena krevsajícími plošticemi. Vektorové stadium se nazývá epimastigot, při nakažení hostitele je přeměněn v trypomastigota, ten je schopen napadat hostitelské buňky a stává se z něj intracelulární parazit. V cytosolu buněk diferencuje v nepohyblivé amastigoty. Přeměnou amastigotů vznikají znovu trypomastigoti, kteří jsou uvolněni z buněk do krevního řečiště, tato stadia nakazí nové buňky či jsou nasáta vektorem.

Leishmania spp. způsobuje kožní, mukokutání a viscerálních formy leishmaniozy. Je přenášena krevsajícím hmyzem rodu *Phlebotomus*, který při kousnutí nakazí svého hostitele promastigoty. Ti jsou fagocytováni makrofágy a přeměněni v amastigoty, kteří se dělí. Infekční makrofágy jsou nasáta vektorem.

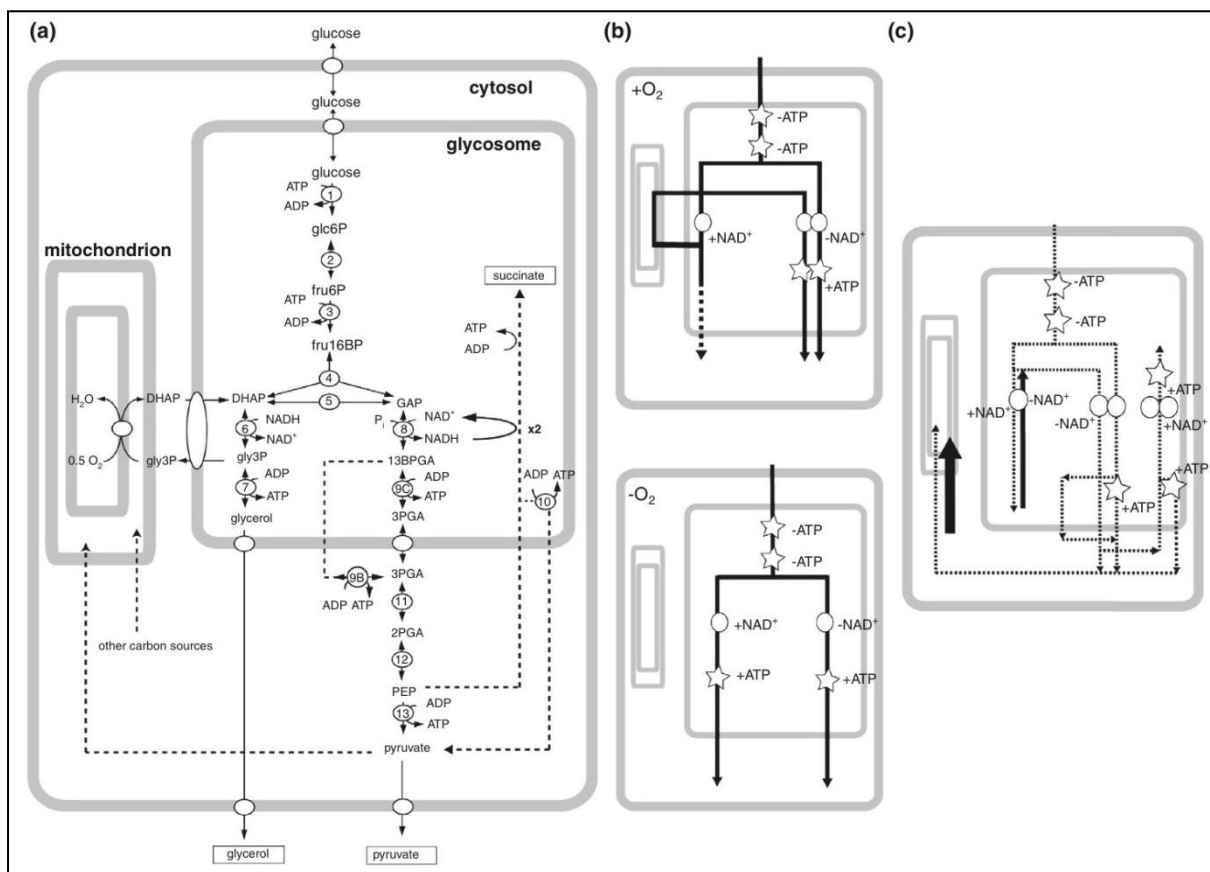
5.2 Glykosomy

Glykosomy byly poprvé popsány u *Trypanosoma brucei* v roce 1977, poté byly nalezeny i u dalších zástupců Kinetoplastid (Opperdoes a Borst, 1977). Glykosomy jsou velmi specializované peroxisomy vyskytující se u protist ze skupiny Kinetoplastida a Diplonemida. Jak napovídá jejich název, v průběhu evoluce se do glykosomů přesunula podstatná část glykolýzy, glukoneogenetické dráhy a pentosofosfátový cyklus. Glykosomy mohou kromě glykolýzy obsahovat i některé další funkce typické pro peroxisomy, například beta-oxidaci, detoxifikaci ROS, syntézu eterových lipidů. U některých zástupců Kinetoplastid glykosomy naopak postrádají funkce charakteristické pro peroxisomy, v glykosomech Kinetoplastid se například nevyskytuje kataláza (ale *Bodonida* ji naopak mají), proto nebyly dříve řazeny mezi peroxisomy, přestože morfologická podobnost mezi oběma organelami byla zřejmá (Hannaert et al., 2003, Moyersoen et al., 2004).

Biogeneze glykosomů je prakticky shodná s peroxisomální biogenezí, homologní jsou i peroxisomální proteiny, které se jí účastní (Hannaert a Michels, 1994, Parsons et al., 2001). V trypanosomách byly doposud objeveny peroxiny TbPex 2, 5, 6, 7, 10, 12, 13 (dvě různé isoformy TbPex13.1 a TbPex13.2) a Pex14 (Moyersoen et al., 2004, Galland et al., 2010, Gualdon-Lopez et al., 2013).

5.2.1 Glykolýza

Prvních sedm reakcí glykolýzy je kompartmentalizováno do matrix glykosomů. Glukóza je odbourávána postupně až na pyruvát či glycerol. Zahajujícím krokem glykolýzy je přeměna glukózy na glukozu-6-fosfát za spotřeby jedné molekuly ATP, fosforylaci katalyzuje enzym hexokináza. V další reakci dochází pomocí glukóza-6-fosfát izomerázy k přeměně glukózy-6-fosfátu na fruktózu-6-fosfát. Za spotřeby druhé molekuly ATP katalyzuje fosofruktokináza fosforylaci fruktozy-6-fosfátu na fruktozu-1,6-bisfosfát. Enzym aldoláza stěpí fruktozu-1,6-bisfosfát na dva tříuhlíkaté produkty - glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát. Tyto produkty jsou dále metabolizovány dvěma různými drahami.



Obrázek 9. Metabolismus glukózy probíhající v glykosomech. a) Detailní zobrazení degradace glukózy; čárkovaně vyznačeny dráhy a reakce specifické pro procytické stádium. b) schématické zobrazení degradace glukózy v krevní stádiu za aerobních (nahore) a anaerobních (dole) podmínek. c) schématické zobrazení degradace glukózy v procytickém stádiu. Převzato z (Szoor et al., 2014). Hvězdičkou označeny fosforylace, oválem spotřeba/regenerace kofaktorů.

Glyceraldehyd-3-fosfát je glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázou oxidován na 1,3-bisfosfoglycerát, oxidací vzniká mezi jeho fosfátem a karboxylem makroergní vazba. Při této reakci je redukován kofaktor NAD^+ na NADH . 1,3-bisfosfoglycerát je dále odbouráván glykosomální fosfoglycerát kinázou na 3-fosfoglycerát. Makroergní vazbana 1,3-bisfosfoglycerátu je přenesena na ADP za vzniku ATP . Konečným produktem glykosomální části glykolýzy je tedy 3-fosfoglycerát, který je transportován z glykosomu do cytosolu buňky. Zde je dále metabolizován fosfoglycerát mutázou na 2-fosfoglycerát. Z 2-fosfoglycerátu je enolázou odstraněna molekula H_2O a vzniká fosfoenolpyruvát. Fosfoenolpyruvát se mění pyruvát kinázou až na konečný produkt glykolýzy – pyruvát. Touto reakcí se fosforyluje jedna molekula ATP (Opperdoes a Borst, 1977).

V druhé dráze je dihydroxyacetonfosfát přeměněn na glycerol-3-fosfát. Při této reakci dochází k reoxidaci NADH na NAD^+ . Glycerol-3-fosfát putuje do mitochondrie, zde je

mitochondriální glycerol-3-fosfát dehydrogenázaou přeměněn znovu na dihydroxyacetonfosfát a transportován zpět do glykosomu (Chaudhuri et al., 2006). Tato část dráhy je podstatná pro zpětnou reoxidaci NADH na NAD^+ a tím vyrovnávání redox potenciálu v glykosomu (viz níže). Za anaerobních podmínek tato dráha neběží a vzniká přebytek glycerol-3-fosfátu. Ten je následně katalyzován glycerol kinázou na glycerol za vzniku jedné molekuly ATP. Glycerol je transportován do cytosolu buňky a následně metabolizován.

V glykosomech se nacházejí další enzymy metabolismu pyruvátu - fosfoenolpyruvát karboxykináza a pyruvát fosfát dikináza, které pomáhají vyrovnání ATP/ADP a redox potenciálu v glykosomu. Vzniklý fosfoenolpyruvát se vrací z cytosolu zpět do glykosomu a je sledem reakcí odbourán až na sukcinát či pyruvát za vzniku ATP a NAD (především u procyklycké formy trypanosom).

Jelikož je dráha glykolýzy přesunuta do glykosomu, jeho enzymy jsou, na rozdíl od klasické glykolýzy odehrávající se v cytosolu, kompartmentalizovány membránou a tím odděleny od cytosolické regulace. Glykolýza probíhající v cytosolu je regulována pomocí zpětnovazebné inhibice hexokinázy a fosfofruktokinázy, jež jsou inhibovány zvýšenými koncentracemi svých fosforylovaných produktů. Inhibicí těchto enzymů je docíleno toho, že není zbytečně investována energie (hydrolyzou ATP při těchto reakcích), aniž by sled reakcí glykolytické dráhy pokračoval a končil ziskem energie (fosforylací ADP na ATP). V glykosomu tato zpětná regulace zcela chybí (Nwagwu a Opperdoes, 1982, Lopez et al., 2002).

Membrána glykosomů je nepropustná pro metabolity a koenzymy, proto musí být v glykosomech mimo jiné udržována rovnováha mezi poměrem ATP a ADP (Visser et al., 1981). Hned na začátku glykolýzy jsou spotřebovány dvě molekuly ATP pro aktivaci glukózy. V první reakci při přeměně glukózy na glukózu-6-fosfát je hexokinázou hydrolyzována jedna molekula ATP, další molekulu ATP využije ve třetí reakci fosfofruktokináza při přeměně fruktoza-6-fosfátu na fruktóza-1,6-bisfosfát. Spotřeba ATP je kompenzována fosfoglycerát kinázou při tvorbě 3-fosfoglycerátu z 1,3-bisfosfoglycerátu v posledním kroku odehrávajícím se v glykosomu. Jelikož z jedné šestiuhlíkaté glukózy vznikají dva tříuhlíkové zbytky, stačí teoreticky tato reakce pro doplnění spotřebovaného ATP. Přesto existuje v glykosomu ještě další reakce tvořící ATP a to při přeměně fosfoenolpyruvátu, jehož část se vrací z cytosolu zpět do glykosomu a je přeměněn až na sukcinát (především u procyklycké formy trypanosom).

Glykosomální membrána je nepropustná nejen pro ATP, ale pro většinu látek včetně NAD(H), proto je potřeba udržovat také redox potenciál v glykosomu v homeostáze (Michels

et al., 2000). Při redukci kofaktoru NAD^+ na NADH , kdy je glycerinaldehyd-3-fosfát přeměněn glykosomální dehydrogenázou na 1,3-bisfosfoglycerát, je vzniklý NADH zpětně reoxidován při přeměně dihydroxyaceton-fosfátu na glycerol-3-fosfát.

Předpokládalo se, že kompartmentalizace glykolýzy je pro Kinetoplastida evoluční výhodou. Enzymy nejsou volně rozptýlené v celé cytoplasmě, ale hromadí se v jedné organelle oddělené membránou, čímž dojde k urychlení sledu reakcí a zvýšení výtěžku ATP za jednotku času. Hypotézy tedy uvádějí, že glykosomy urychlují glykolytický tok. Ale dle výzkumů Bakkerové, Michelse a kolegů, kteří porovnávali množství glykolytických proteinů a glykolytický tok/výtěžek ATP za jednotku času u *T. brucei* a *S. cerevisiae* se ukázalo, že výtěžek je srovnatelný. Tento výsledek tedy vyvrací hypotézu, že glykosomy jsou evolučně výhodné, jelikož urychlují glykolytický tok. U organismů s potřebou vysokého výtěžku ATP, ale s glykolýzou odehrávající se v cytosolu, je totiž mnohem větší množství glykolytických enzymů vzhledem k celkovému objemu enzymů buňky. Pokud mají organismy potřebu navýšit glykolytický tok, navýší množství glykolytických enzymů a tím zvýší výtěžek ATP za jednotku času (Opperdoes a Fred, 1987). *S. cerevisiae* má ve srovnání s *T. brucei* dvakrát vyšší glykolytický tok nežli *T. brucei*, množství glykolytických proteinů je u *S. cerevisiae* také dvakrát tak vysoké. Pozorování tedy ukazuje, že i organismy postrádající glykosomy (*S. cerevisiae*) mohou mít větší výtěžek ATP za jednotku času nežli organismy s glykosomy (*T. brucei*) (Bakker et al., 2000).

V glykosomu dále probíhá pentosofosfátová dráha. Enzymy oxidativní větve této dráhy, které se také podílejí na oxidačně redukčních reakcích, mají v mnoha organismech duální lokalizaci: v cytosolu a peroxisomech. NADPH vyrobené v této cestě hraje důležitou roli v detoxikaci ROS, stejně jako v některých biosyntetických procesech, které se mohou objevit v organelách (Barrett, 1997).

6. Závěr

Práce shrnuje současné informace a poznatky o biogenezi a funkcích peroxisomů. Práce dokumentuje, že peroxisomy jsou velmi důležitou buněčnou organelou s některými nezastupitelnými funkcemi, například schopností metabolizovat VLCFA. I přes značnou odlišnost peroxisomálních funkcí nalézáných napříč eukaryotickým stromem, je mechanismus jejich biogeneze konzervovaný a u všech organismů velmi podobný proces.

U parazitických zástupců protist se výskyt peroxisomů v jednotlivých skupinách značně liší. Lze pozorovat ztráty peroxisomů nebo naopak jejich specializaci dokumentovanou glykosomy u Kinetoplastid. Naproti tomu jiní parazité patřící spolu s Kinetoplastidy do skupiny Excavata peroxisomy postrádají. Podobná situace je i u skupiny Apikomplexa, která je první skupinou, kde byla původně dokázána absence peroxisomů u patogena *Plasmodium falciparum*; recentní výzkumy ale dokazují, že v kokcídii *Toxoplasma gondii* se nacházejí typické peroxisomální enzymy. Z toho vidíme, že situace výskytu peroxisomů v parazitických protozoích je velmi diverzifikovaná a dožaduje se dalšího výzkumu.

7. Použitá literatura/Citace

- Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **59**: 429-514.
- Agrawal G, Fassas SN, Xia Z-J, Subramani S. 2016. Distinct requirements for intra-ER sorting and budding of peroxisomal membrane proteins from the ER. *The Journal of Cell Biology* **212**: 335-348.
- Agrawal G, Subramani S. 2016. De novo peroxisome biogenesis: Evolving concepts and conundrums. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**: 892-901.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. Peroxisomes.
- Authier F, Bergeron JJ, Ou WJ, Rachubinski RA, Posner BI, Walton PA. 1995. Degradation of the cleaved leader peptide of thiolase by a peroxisomal proteinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 3859-3863.
- Bakker BM, Mensonides FIC, Teusink B, van Hoek P, Michels PAM, Westerhoff HV. 2000. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 2087-2092.
- Bakkeren JAJM, Monnens LAH, Trijbels JMF, Maas JM. 1984. Serum very long chain fatty acid pattern in Zellweger syndrome. *Clinica Chimica Acta* **138**: 325-331.
- Barrett MP. 1997. The pentose phosphate pathway and parasitic protozoa. *Parasitology Today* **13**: 11-16.
- Bellu AR, Kiel JAKW. 2003. Selective degradation of peroxisomes in yeasts. *Microsc Res Tech* **61**.
- Bellu AR, Salomons FA, Kiel JA, Veenhuis M, Van der Klei IJ. 2002. Removal of Pex3p is an important initial stage in selective peroxisome degradation in *Hansenula polymorpha*. *Journal of Biological Chemistry* **277**: 42875-42880.
- Breidenbach R, Kahn A, Beevers H. 1968. Characterization of glyoxysomes from castor bean endosperm. *Plant physiology* **43**: 705-713.
- Bursell E. 1981. The role of proline in energy metabolism *Energy metabolism in insects*: Springer. 135-154.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in Parasitology* **22**: 484-491.
- Chelikani P, Fita I, Loewen PC. 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **61**: 192-208.
- Chu B-B, Liao Y-C, Qi W, Xie C, Du X, Wang J, Yang H, Miao H-H, Li B-L, Song B-L. 2015. Cholesterol transport through lysosome-peroxisome membrane contacts. *Cell* **161**: 291-306.
- Cohen Y, Klug YA, Dimitrov L, Erez Z, Chuartzman SG, Elinger D, Yofe I, Soliman K, Gärtner J, Thoms S. 2014. Peroxisomes are juxtaposed to strategic sites on mitochondria. *Molecular BioSystems* **10**: 1742-1748.
- Cornwell PD, De Souza AT, Ulrich RG. 2004. Profiling of hepatic gene expression in rats treated with fibric acid analogs. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **549**: 131-145.
- De Duve C. 1965. The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey lectures* **59**: 49.
- De Duve C, Baudhuin P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles).

- Physiological Reviews* **46**: 323-357.
- De Souza W, Lanfredi-Rangel A, Campanati L. 2004.** Contribution of microscopy to a better knowledge of the biology of *Giardia lamblia*. *Microscopy and Microanalysis* **10**: 513-527.
- Debelyy MO, Platta HW, Saffian D, Hensel A, Thoms S, Meyer HE, Warscheid B, Girzalsky W, Erdmann R. 2011.** Ubp15p, a ubiquitin hydrolase associated with the peroxisomal export machinery. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 28223-28234.
- Drin G, Antonny B. 2010.** Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Letters* **584**: 1840-1847.
- Einwächter H, Sowinski S, Kunau WH, Schliebs W. 2001.** *Yarrowia lipolytica* Pex20p, *Saccharomyces cerevisiae* Pex18p/Pex21p and mammalian Pex5pL fulfil a common function in the early steps of the peroxisomal PTS2 import pathway. *EMBO reports* **2**: 1035-1039.
- Erdmann R, Blobel G. 1995.** Giant peroxisomes in oleic acid-induced *Saccharomyces cerevisiae* lacking the peroxisomal membrane protein Pmp27p. *The Journal of Cell Biology* **128**: 509-523.
- Farooqui AA, Horrocks LA. 2001.** Book review: plasmalogens: workhorse lipids of membranes in normal and injured neurons and glia. *The Neuroscientist* **7**: 232-245.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. 1997.** Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors α and δ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 4312-4317.
- Fransen M, Vastiau I, Brees C, Brys V, Mannaerts GP, Van Veldhoven PP. 2005.** Analysis of Human Pex19p's Domain Structure by Pentapeptide Scanning Mutagenesis. *Journal of Molecular Biology* **346**: 1275-1286.
- Fujiki Y, Nashiro C, Miyata N, Tamura S, Okumoto K. 2012.** New insights into dynamic and functional assembly of the AAA peroxins, Pex1p and Pex6p, and their membrane receptor Pex26p in shuttling of PTS1-receptor Pex5p during peroxisome biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1823**: 145-149.
- Gabaldón T, Snel B, Van Zimmeren F, Hemrika W, Tabak H, Huynen MA. 2006.** Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biology Direct* **1**: 8.
- Galland N, Michels PAM. 2010.** Comparison of the peroxisomal matrix protein import system of different organisms. Exploration of possibilities for developing inhibitors of the import system of trypanosomatids for anti-parasite chemotherapy. *European Journal of Cell Biology* **89**: 621-637.
- Gatto GJ, Geisbrecht BV, Gould SJ, Berg JM. 2000.** Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nature structural & molecular biology* **7**: 1091-1095.
- Gatto GJ, Maynard EL, Guerrerio AL, Geisbrecht BV, Gould SJ, Berg JM. 2003.** Correlating structure and affinity for PEX5: PTS1 complexes. *Biochemistry* **42**: 1660-1666.
- Gonzalez NH, Felsner G, Schramm FD, Klingl A, Maier U-G, Bolte K. 2011.** A single peroxisomal targeting signal mediates matrix protein import in diatoms. *PLoS one* **6**: e25316.
- Gualdrón-López M, Chevalier N, Van Der Smissen P, Courtoy PJ, Rigden DJ, Michels PAM. 2013.** Ubiquitination of the glycosomal matrix protein receptor PEX5 in *Trypanosoma brucei* by PEX4 displays novel features. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**: 3076-3092.
- Hammond DJ, Aman RA, Wang C. 1985.** The role of compartmentation and glycerol kinase in the synthesis of ATP within the glycosome of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry* **260**: 15646-15654.

- Han X, Holtzman DM, McKeel DW. 2001.** Plasmalogen deficiency in early Alzheimer's disease subjects and in animal models: molecular characterization using electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of neurochemistry* **77**: 1168-1180.
- Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. 2003.** Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid biology and disease* **2**: 11.
- Hannaert V, Michels PA. 1994.** Structure, function, and biogenesis of glycosomes in Kinetoplastida. *Journal of bioenergetics and biomembranes* **26**: 205-212.
- Hannaert V, Saavedra E, Duffieux F, Szikora JP, Rigden DJ, Michels PAM, Opperdoes FR. 2003.** Plant-like traits associated with metabolism of Trypanosoma parasites. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**.
- Helfert S, Estévez AM, Bakker B, Michels P, Clayton C. 2001.** Roles of triosephosphate isomerase and aerobic metabolism in *Trypanosoma brucei*. *Biochemical Journal* **357**: 117-125.
- Hensel A, Beck S, El Magraoui F, Platta HW, Girzalsky W, Erdmann R. 2011.** Cysteine-dependent ubiquitination of Pex18p is linked to cargo translocation across the peroxisomal membrane. *Journal of Biological Chemistry* **286**: 43495-43505.
- Hettema EH, Erdmann R, van der Klei I, Veenhuis M. 2014.** Evolving models for peroxisome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **29**: 25-30.
- Hettema EH, Tabak HF. 2000.** Transport of fatty acids and metabolites across the peroxisomal membrane. *Biochim Biophys Acta* **1486**.
- Hoepfner D, Schildknegt D, Braakman I, Philippsen P, Tabak HF. 2005.** Contribution of the Endoplasmic Reticulum to Peroxisome Formation. *Cell* **122**: 85-95.
- Honsho M, Hashiguchi Y, Ghaedi K, Fujiki Y. 2011.** Interaction defect of the medium isoform of PTS1-receptor Pex5p with PTS2-receptor Pex7p abrogates the PTS2 protein import into peroxisomes in mammals. *Journal of Biochemistry* **149**: 203-210.
- Höhfeld J, Veenhuis M, Kunau W-H. 1991.** PAS3, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a peroxisomal integral membrane protein essential for peroxisome biogenesis. *The Journal of Cell Biology* **114**: 1167-1178.
- Islinger M, Li KW, Seitz J, Völkl A, Lüers GH. 2009.** Hitchhiking of Cu/Zn superoxide dismutase to peroxisomes—evidence for a natural piggyback import mechanism in mammals. *Traffic* **10**: 1711-1721.
- Jedd G, Chua N-H. 2000.** A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane. *Nature Cell Biology* **2**: 226-231.
- Jones JM, Morrell JC, Gould SJ. 2004.** PEX19 is a predominantly cytosolic chaperone and import receptor for class 1 peroxisomal membrane proteins. *The Journal of Cell Biology* **164**: 57-67.
- Kaasch AJ, Joiner KA. 2000.** Targeting and subcellular localization of *Toxoplasma gondii* catalase identification of peroxisomes in an Apicomplexan parasite. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 1112-1118.
- Kashiwayama Y, Asahina K, Shibata H, Morita M, Muntau AC, Roscher AA, Wanders RJA, Shimozawa N, Sakaguchi M, Kato H, Imanaka T. 2005.** Role of Pex19p in the targeting of PMP70 to peroxisome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1746**: 116-128.
- Kiel JA, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2006.** PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic* **7**: 1291-1303.
- Kim PK, Hettema EH. 2015.** Multiple Pathways for Protein Transport to Peroxisomes. *Journal of Molecular Biology* **427**: 1176-1190.
- Klein AT, Barnett P, Bottger G, Konings D, Tabak HF, Distel B. 2001.** Recognition of peroxisomal targeting signal type 1 by the import receptor Pex5p. *Journal of*

- Biological Chemistry* **276**: 15034-15041.
- Koch A, Schneider G, Lüers GH, Schrader M. 2004.** Peroxisome elongation and constriction but not fission can occur independently of dynamin-like protein 1. *Journal of Cell Science* **117**: 3995-4006.
- Kralova I, Rigden DJ, Oppendoes FR, Michels PA. 2000.** Glycerol kinase of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* **267**: 2323-2333.
- Lazarow PB, Fujiki Y. 1985.** Biogenesis of Peroxisomes. *Annual Review of Cell Biology* **1**: 489-530.
- Lee SH, Stephens JL, Englund PT. 2007.** A fatty-acid synthesis mechanism specialized for parasitism. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 287-297.
- Li X, Gould SJ. 2002.** PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *The Journal of cell biology* **156**: 643-651.
- Liu X, Ma C, Subramani S. 2012.** Recent advances in peroxisomal matrix protein import. *Current Opinion in Cell Biology* **24**: 484-489.
- Liu Y, Yagita Y, Fujiki Y. 2016.** Assembly of Peroxisomal Membrane Proteins via the Direct Pex19p-Pex3p Pathway. *Traffic* **17**: 433-455.
- Lopez C, Chevalier N, Hannaert V, Rigden DJ, Michels PA, Ramirez JL. 2002.** *Leishmania donovani* phosphofructokinase. Gene characterization, biochemical properties and structure-modeling studies. *Eur J Biochem* **269**: 3978-3989.
- Léon S, Zhang L, McDonald WH, Yates J, Cregg JM, Subramani S. 2006.** Dynamics of the peroxisomal import cycle of PpPex20p ubiquitin-dependent localization and regulation. *The Journal of cell biology* **172**: 67-78.
- Madrid KP, De Crescenzo G, Wang S, Jardim A. 2004.** Modulation of the *Leishmania donovani* peroxin 5 quaternary structure by peroxisomal targeting signal 1 ligands. *Molecular and cellular biology* **24**: 7331-7344.
- Matsuzono Y, Matsuzaki T, Fujiki Y. 2006.** Functional domain mapping of peroxin Pex19p: interaction with Pex3p is essential for function and translocation. *Journal of Cell Science* **119**: 3539-3550.
- McNew JA, Goodman JM. 1994.** An oligomeric protein is imported into peroxisomes in vivo. *The Journal of cell biology* **127**: 1245-1257.
- Mears JA, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE. 2011.** Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nature structural & molecular biology* **18**: 20-26.
- Meinecke M, Cizmowski C, Schliebs W, Kruger V, Beck S, Wagner R, Erdmann R. 2010.** The peroxisomal importomer constitutes a large and highly dynamic pore. *Nat Cell Biol* **12**: 273-277.
- Michels PAM, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. 2006.** Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1463-1477.
- Michels PAM, Hannaert V, Bringaud F. 2000.** Metabolic Aspects of Glycosomes in Trypanosomatidae – New Data and Views. *Parasitology Today* **16**: 482-489.
- Michels PAM, Moyersoer J, Krazy H, Galland N, Herman M, Hannaert V. 2005.** Peroxisomes, glyoxysomes and glycosomes (review). *Molecular Membrane Biology* **22**: 133-145.
- Misset O, Bos OJ, Oppendoes FR. 1986.** Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* **157**: 441-453.
- Miyata N, Fujiki Y. 2005.** Shuttling mechanism of peroxisome targeting signal type 1 receptor Pex5: ATP-independent import and ATP-dependent export. *Molecular and cellular biology* **25**: 10822-10832.
- Moser HW. 1997.** Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy.

- Brain* **120**: 1485-1508.
- Moyersoen J, Choe J, Fan E, Hol WG, Michels PA. 2004.** Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target. *FEMS microbiology reviews* **28**: 603-643.
- Nagan N, Zoeller RA. 2001.** Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in Lipid Research* **40**: 199-229.
- Neuberger G, Maurer-Stroh S, Eisenhaber B, Hartig A, Eisenhaber F. 2003.** Motif Refinement of the Peroxisomal Targeting Signal 1 and Evaluation of Taxon-specific Differences. *Journal of Molecular Biology* **328**: 567-579.
- Neuspiel M, Schauss AC, Braschi E, Zunino R, Rippstein P, Rachubinski RA, Andrade-Navarro MA, McBride HM. 2008.** Cargo-selected transport from the mitochondria to peroxisomes is mediated by vesicular carriers. *Current Biology* **18**: 102-108.
- Nolan DP, Rolin S, Rodriguez JR, Van Den Abbeele J, Pays E. 2000.** Slender and stumpy bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* display a differential response to extracellular acidic and proteolytic stress. *European Journal of Biochemistry* **267**: 18-27.
- Novikoff PM, Novikoff AB. 1972.** Peroxisomes in absorptive cells of mammalian small intestine. *The Journal of cell biology* **53**: 532-560.
- Nwagwu M, Opperdoes FR. 1982.** Regulation of glycolysis in *Trypanosoma brucei*: hexokinase and phosphofructokinase activity. *Acta Trop* **39**: 61-72.
- Oikawa K, Matsunaga S, Mano S, Kondo M, Yamada K, Hayashi M, Kagawa T, Kadota A, Sakamoto W, Higashi S. 2015.** Physical interaction between peroxisomes and chloroplasts elucidated by in situ laser analysis. *Nature Plants* **1**.
- Opaliński Ł, Kiel JAKW, Williams C, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2011.** Membrane curvature during peroxisome fission requires Pex11. *The EMBO Journal* **30**: 5-16.
- Opperdoes FR. 1987.** Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annual Reviews in Microbiology* **41**: 127-151.
- Opperdoes FR, Baudhuin P, Coppens I, De Roe C, Edwards SW, Weijers PJ, Misset O. 1984.** Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. *The Journal of cell biology* **98**: 1178-1184.
- Opperdoes FR, Borst P. 1977.** Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett* **80**: 360-364.
- Osumi T, Hashimoto T, Nobuo U. 1980.** Purification and properties of acyl-CoA oxidase from rat liver. *Journal of Biochemistry* **87**: 1735-1746.
- Parish RW. 1975.** Mitochondria and peroxisomes from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *European Journal of Biochemistry* **58**: 523-531.
- Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P. 2001.** Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. *Mol Biochem Parasitol* **115**.
- Platta HW, Grunau S, Rosenkranz K, Girzalsky W, Erdmann R. 2005.** Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol. *Nat Cell Biol* **7**: 817-822.
- Platta HW, Hagen S, Reidick C, Erdmann R. 2014.** The peroxisomal receptor dislocation pathway: To the exportomer and beyond. *Biochimie* **98**: 16-28.
- Poirier Y, Antonenkov VD, Glumoff T, Hiltunen JK. 2006.** Peroxisomal beta-oxidation--a metabolic pathway with multiple functions. *Biochim Biophys Acta* **1763**: 1413-1426.
- Purdue PE, Lazarow PB. 1996.** Targeting of human catalase to peroxisomes is dependent upon a novel COOH-terminal peroxisomal targeting sequence. *The Journal of Cell Biology* **134**: 849-862.
- Purdue PE, Lazarow PB. 2001.** Peroxisome Biogenesis. *Annual Review of Cell and*

- Developmental Biology* **17**: 701-752.
- Raychaudhuri S, Prinz WA. 2008.** Nonvesicular phospholipid transfer between peroxisomes and the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 15785-15790.
- Rhodin J. 1954.** Correlation of Ultrastructural Organization and Function in Normal and Experimentally Changed Proximal Convolute Tubule Cells of the Mouse Kidney: an Electron Microscopic Study, Including an Experimental Analysis of the Conditions for Fixation of the Renal Tissue for High Resolution Electron Microscopy. Nord. bokh.
- Rouiller C, Bernhard W. 1956.** " Microbodies" and the Problem of Mitochondrial Regeneration in Liver Cells. *The Journal of biophysical and biochemical cytology* **2**: 355.
- Rucktaschel R, Thoms S, Sidorovitch V, Halbach A, Pechlivanis M, Volkmer R, Alexandrov K, Kuhlmann J, Rottensteiner H, Erdmann R. 2009.** Farnesylation of pex19p is required for its structural integrity and function in peroxisome biogenesis. *J Biol Chem* **284**: 20885-20896.
- Sato Y, Shibata H, Nakatsu T, Nakano H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H. 2010.** Structural basis for docking of peroxisomal membrane protein carrier Pex19p onto its receptor Pex3p. *The EMBO journal* **29**: 4083-4093.
- Schekman R. 2005.** Peroxisomes: another branch of the secretory pathway? *Cell* **122**: 1-2.
- Schliebs W, Girzalsky W, Erdmann R. 2010.** Peroxisomal protein import and ERAD: variations on a common theme. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 885-890.
- Schlüter A, Fourcade S, Ripp R, Mandel JL, Poch O, Pujol A. 2006.** The evolutionary origin of peroxisomes: an ER-peroxisome connection. *Molecular biology and evolution* **23**: 838-845.
- Schrader M, Bonekamp NA, Islinger M. 2012.** Fission and proliferation of peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1822**: 1343-1357.
- Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, Schwappach B, Weissman JS. 2008.** The GET Complex Mediates Insertion of Tail-Anchored Proteins into the ER Membrane. *Cell* **134**: 634-645.
- Shibata H, Kashiwayama Y, Imanaka T, Kato H. 2004.** Domain architecture and activity of human Pex19p, a chaperone-like protein for intracellular trafficking of peroxisomal membrane proteins. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 38486-38494.
- Simpson AGB, Stevens JR, Lukeš J. 2006.** The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* **22**: 168-174.
- Smith JJ, Aitchison JD. 2013.** Peroxisomes take shape. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**: 803-817.
- Stehlik T, Sandrock B, Ast J, Freitag J. 2014.** Fungal peroxisomes as biosynthetic organelles. *Current opinion in microbiology* **22**: 8-14.
- Tabak HF, Braakman I, Zand Avd. 2013.** Peroxisome Formation and Maintenance Are Dependent on the Endoplasmic Reticulum. *Annual Review of Biochemistry* **82**: 723-744.
- Tabak HF, Hoepfner D, Zand Avd, Geuze HJ, Braakman I, Huynen MA. 2006.** Formation of peroxisomes: Present and past. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1647-1654.
- Tabak HF, Murk JL, Braakman I, Geuze HJ. 2003.** Peroxisomes start their life in the endoplasmic reticulum. *Traffic* **4**: 512-518.
- Thoms S, Erdmann R. 2005.** Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS Journal* **272**: 5169-5181.
- Thoms S, Harms I, Kalies KU, Gärtner J. 2012.** Peroxisome formation requires the endoplasmic reticulum channel protein Sec61. *Traffic* **13**: 599-609.

- Titorenko VI, Rachubinski RA. 2015.** Origin and spatiotemporal dynamics of the peroxisomal endomembrane system. *Frontiers Media SA*.
- van den Brink D, Wanders R. 2006.** Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. *Cellular and molecular life sciences* **63**: 1752-1765.
- van der Klei IJ, Veenhuis M. 2006.** PTS1-independent sorting of peroxisomal matrix proteins by Pex5p. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1763**: 1794-1800.
- van der Zand A, Gent J, Braakman I, Tabak Henk F. 2012.** Biochemically Distinct Vesicles from the Endoplasmic Reticulum Fuse to Form Peroxisomes. *Cell* **149**: 397-409.
- Verhoeven N, Wanders R, Saudubray J-M, Jakobs C. 1998.** The metabolism of phytanic acid and pristanic acid in man: a review. *Journal of inherited metabolic disease* **21**: 697-728.
- VISSER N, OPPERDOES F, BORST P. 1981.** Subcellular compartmentation of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. *European Journal of Biochemistry* **118**: 521-526.
- Walton PA, Hill P, Subramani S. 1995.** Import of stably folded proteins into peroxisomes. *Molecular biology of the cell* **6**: 675-683.
- Wanders R, Vreken P, Ferdinandusse S, Jansen G, Waterham H, Van Roermund C, Van Grunsven E. 2001.** Peroxisomal fatty acid α - and β -oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochemical Society Transactions* **29**: 250-267.
- Wanders RJ. 2013.** Peroxisomes in human health and disease: metabolic pathways, metabolite transport, interplay with other organelles and signal transduction *Peroxisomes and their Key Role in Cellular Signaling and Metabolism*: Springer. 23-44.
- Wang D, Visser NV, Veenhuis M, Van der Klei IJ. 2003.** Physical interactions of the peroxisomal targeting signal 1 receptor pex5p, studied by fluorescence correlation spectroscopy. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 43340-43345.
- Williams C, Opalinski L, Landgraf C, Costello J, Schrader M, Krikken AM, Knoops K, Kram AM, Volkmer R, van der Klei IJ. 2015.** The membrane remodeling protein Pex11p activates the GTPase Dnm1p during peroxisomal fission. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 6377-6382.
- Yang X, Edward Purdue P, Lazarow PB. 2001.** Dci1p uses a PTS1 to enter peroxisomes: either its own or that of a partner, Dci1p. *European Journal of Cell Biology* **80**: 126-138.
- Yuan P, Jedd G, Kumaran D, Swaminathan S, Shio H, Hewitt D, Chua N-H, Swaminathan K. 2003.** A HEX-1 crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa*. *Nature Structural & Molecular Biology* **10**: 264-270.
- Yuan W, Veenhuis M, van der Klei IJ. 2016.** The birth of yeast peroxisomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**: 902-910.
- Yurimoto H, Oku M, Sakai Y. 2011.** Yeast methylotrophy: metabolism, gene regulation and peroxisome homeostasis. *International journal of microbiology* **2011**.