

2/ Struktura a funkce rostlinné buňky

Základní stavební a funkční jednotkou rostlin, jako i ostatních organismů, je buňka. Velikost, tvar a fyziologické funkce rostlinného těla vyplývají z vlastností jeho buněk a buněčných komplexů tvořících pletiva a orgány. **Buňky vytvářejí organismus, ale současně jsou organismem samy vytvářeny: ontogeneticky a funkčně mu jsou podřízeny,** jak to vyžaduje princip celistvosti organismů (viz Ontogeneze).

2.1 Přehled strukturních složek rostlinné buňky

Rostlinná buňka je tvořena protoplastem (2.1.1) ohraničeným cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou (2.1.2). Protoplast sestává z jádra, cytoplasmy, endomembránového systému, peroxisomů, mitochondrií, plastidů a cytoskeletu. Sousední buňky jsou propojeny plasmodesmy (2.1.3). Podrobnější přehled uvádí tabulka:

Tab. 1. Složky rostlinné buňky

Protoplast

A. Jádro (nucleus) ohraničené dvojitou membránou jaderného obalu (karyotheka)

- a) nukleoplasma
- b) chromatin
- c) jádérko (nucleolus)
- d) jaderný skelet

B. Cytoplasma (či cytosol) s plasmatickou membránou (plasmalemou)

C. Endomembránový systém

- a) endoplasmatické retikulum, proteinová tělíska a oleosomy
- b) Golgiho aparát (tvořený diktyosomy)
- c) vakuoly

D. Peroxisomy

E. Mitochondrie

F. Plastidy

G. Cytoskelet

- a) mikrotubuly
- b) mikrofilamenta

Buněčná stěna: 1) střední lamela, 2) primární a 3) sekundární stěna

Plasmodesmy

2.1.1 Protoplast

2.1.1.1 Jádro

Jádro je většinou kulovité těleso lokalizované v cytoplasmě. Obsahuje větší část buněčné DNA – jaderný genom. V dospělé rostlinné buňce se obvykle nachází u stěny, ke které je tlačeno vakuolou, a je

poněkud zploštělé. Uzavřeno je do jaderného obalu tvořeného dvojistou membránou, jejíž vnější složka navazuje na endoplasmatické retikulum. Jaderný obal má póry umožňující regulovatelné spojení jádra s cytoplasmou.

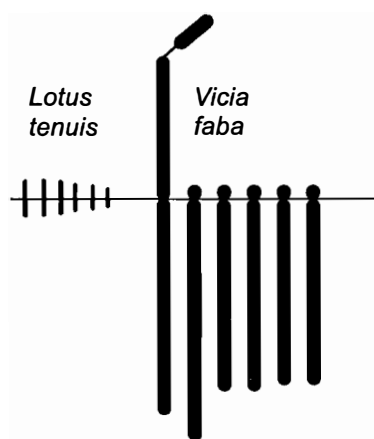
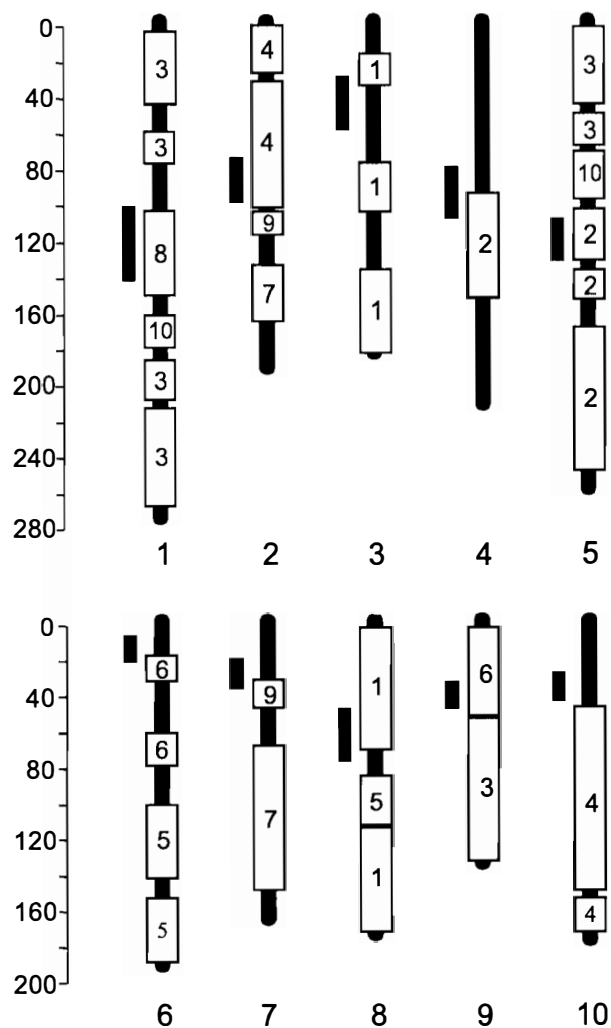
Jaderná hmota je tvořena základním mediem – **nukleoplasmou a vlákný chromatinu**, což je komplex DNA s bílkoviny. Podle barvitelnosti se dělí na slabě barvitelný dekondenzovaný (transkripčně aktivní) **euchromatin** a dobře barvitelný kondenzovaný (transkripčně inaktivní) **heterochromatin**. Na začátku buněčného dělení se vlákna chromatinu postupně shlukují (kondenzují) a vytvářejí chromosomy. Nedělicí se jádro obsahuje **jedno nebo několik jadérek**, která vznikla na oblastech chromosomů nesoucích **organizátory jadérka** (tandemové repetice obsahující rDNA, která kóduje ribosomální RNA). Počet a velikost jadérek závisí na druhu rostliny a syntetické aktivitě buněk. Syntetizuje se v nich ribosomální RNA. **Jaderný skelet** tvořený bílkoviny funkčně příbuznými laminám (patří mezi tzv. intermediální filamenta – viz cytoskelet) se nachází jako podpůrné lešení pod vnitřní jadernou membránou a propojuje komplexy jaderných pórů (viz dále). Jako součást jaderné matrix rozhodujícím způsobem určuje v interakci se specifickými sekvencemi DNA (MAR – matrix associated region) interfázni prostorové uspořádání chromatinu v jádře.

Jaderný obal (karyotheka) sestává ze dvou paralelních membrán oddělených perinukleárním prostorem. Vnější membrána je spojena s membránovým systémem endoplasmatického retikula a perinukleární prostor komunikuje s jeho vnitřním prostorem. Jaderný obal obsahuje velké množství pórů, které zabírají až 20 % jeho povrchu a umožňují regulovaný obousměrný transport makromolekul mezi jádrem a cytoplasmou. Vnitřní a vnější membrána jsou kolem každého póru spojeny a vytvářejí trubcovitou stěnu póru. Průchodnost pórů tvořených multiproteinovými komplexy, které jsou uspořádány do tvaru připomínajícího basketbalový koš, je regulována „zátkou“, jejíž funkční cyklus je spojen s hydrolýzou ATP. O funkci povrchu jaderné membrány jako nukleačního místa pro tvorbu mikrotubulů (MTOC) bude pojednáno v kapitole o cytoskeletu. Počet a rozmístění jaderných pórů jsou proměnlivé – závisí na typu buněk a jejich metabolické aktivitě.

Funkce jádra je v podstatě trojí: **1)** Nese a uchovává genetickou informaci a při buněčném dělení ji předává dceřiným buňkám. **2)** V procesu transkripce syntetizuje mRNA, která je pak v cytoplasmě translatována. **3)** Slouží jako skladovací a signální kompartment umožňující regulované uvolňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních regulačních faktorů (proteiny, RNA) do cytoplasmy, nebo naopak jejich přesun z cytoplasmy do jádra.

Jaderný genom

Velikostí jaderného genomu se jednotlivé druhy vyšších rostlin značně liší: u *Arabidopsis* jen $1,25 \times 10^8$ párů bazí, u některých liliovitých či nahosemenných 1×10^{11} . Genom *Arabidopsis thaliana* byl téměř celý osekvenován – současný odhad počtu genů přesahuje 25 000 na pěti chromosomech haploidní sady. Analýza sekvenčních dat ukázala, že tento malý genom je tetraploidního původu a velká část genů se tedy vyskytuje ve dvou a více příbuzných kopiích. Při srovnání genomů různých druhů v rámci čeledi (např. rýže a kukuřice, **obr. 1A**) se ukazuje, že jejich genomy obsahují rozsáhlé oblasti chromosomů ve kterých je pořadí genů identické. Tento jev se nazývá **syntenie** nebo **kolinearita genomů**. Poznání organizace genomu jednoho zástupce čeledi tak velmi usnadňuje analýzu organizace genomů dalších druhů. Rozdíly ve velikosti genomů jsou způsobeny hlavně rozdílným obsahem nekódující DNA (**obr. 1B**). Např. v kukuřici připadá na nekódující DNA asi 70 % genomu tvořeného převážně retrotransposony. Další příčinou značných rozdílů ve velikosti rostlinných genomů je hojně rozšířená hybridizace a polyploidizace, často spojená se speciací (vznikem nového druhu).



Obr. 1A – Kolinearita (syntenie) genomů kukuřice (*Zea mays*) a rýže (*Oryza sativa*). Na chromosomy kukuřice (1–10) jsou vyneseny části chromosomů rýže (čísla uvnitř obdélníčku udávají číslo příslušného chromosomu rýže), které mají stejné pořadí genů. Tmavý obdélník vedle chromosomů kukuřice udává polohu centromery, stupnice vlevo pak udává vzdálenosti v centimorganech. Řada úseků chromosomů rýže je přítomna dvakrát, neboť kukuřice je tetraploid. **B** – Srovnání chromosomů dvou příslušníků téže čeledi (*Viciaceae*) – *Lotus tenuis* a *Vicia faba* – kteří mají stejný počet chromosomů, ale liší se zásadně obsahem nekódující DNA.

rDNA

Jako u ostatních eukaryot, také u rostlin, DNA kódující ribosomální RNA, sestává ze dvou komponent – oddělených úseků kódujících 5S rRNA (transkribované RNA polymerázou III) a úseků prekurzorové 45S RNA. Ta „polycistronicky“ kóduje zbylé rRNA – tj. 5,8S, 18S a 28S a je přepisována RNA polymerasou I. Tím je zajištěna správná stechiometrie molekul v ribozomálních podjednotkách. rDNA se vyskytuje v genomu v mnohačetných, několik set čítajících, tandemových opakováních oddělených mezerníkem (spacer). V tomto nekódujícím mezerníku existuje nejen druhově, ale i populačně specifická variabilita sekvence DNA. Proto se sekvence rDNA často využívá v molekulární taxonomii. Vzhledem k nezbytnosti přizpůsobit intenzitu produkce rRNA translačním požadavkům dané buňky, existují mechanismy umožňující aktivovat či inaktivovat transkripci jednotlivých úseků rDNA. Nejdůležitější je v tomto směru methylace rDNA, která inaktivuje transkripci rDNA.

Podobně jako u ostatních eukaryot, fungují místa na chromosomech s rDNA jako organizátory jadérka. Jeho velikost závisí na intenzitě transkripce rRNA.

Transposony

Transposony (mobilní elementy DNA) byly poprvé objeveny u kukuřice **Barbarou McClintockovou** díky tomu, že svým pohybem po jaderné DNA (**obr. 2**) zapínají či vypínají expresi lokusů, v nichž jsou lokalizovány. Zde šlo o zapínání a vypínání syntézy anthokyanů v aleuronové vrstvě semen kukuřice, jež se projevuje vznikem barevných skvrn. Typickým znakem transposonů jsou obrácená opakování sekvence DNA na jejich hranicích, která mají důležitou úlohu v mechanismu transpozice (**obr. 2**).

Methylace DNA a kovalentní modifikace histonů ovlivňují transkripční aktivitu

Významnou funkční modifikací DNA u rostlin je **methylace cytosinu** postihující rozsáhlé oblasti genomu. Ty jsou pak většinou z hlediska genové exprese inaktivní, neboť se na ně vážou bílkoviny bránící transkripci. Během ontogeneze dochází k regulovaným změnám methylace genomu. Při klíčení semen probíhá demethylace rozsáhlých úseků genomu (např. také repetice rDNA), jako součást aktivace genové exprese v embryu. V přirozených populacích rostlin může být dědičný mutantní fenotyp spojen nikoliv se změnou sekvencí DNA, ale se změnou stavu methylace genů (a chromatinu vůbec), který se přenáší do dalších generací tzv. udržovací methylasovou aktivitou – je to případ **epigenetické dědičnosti**.

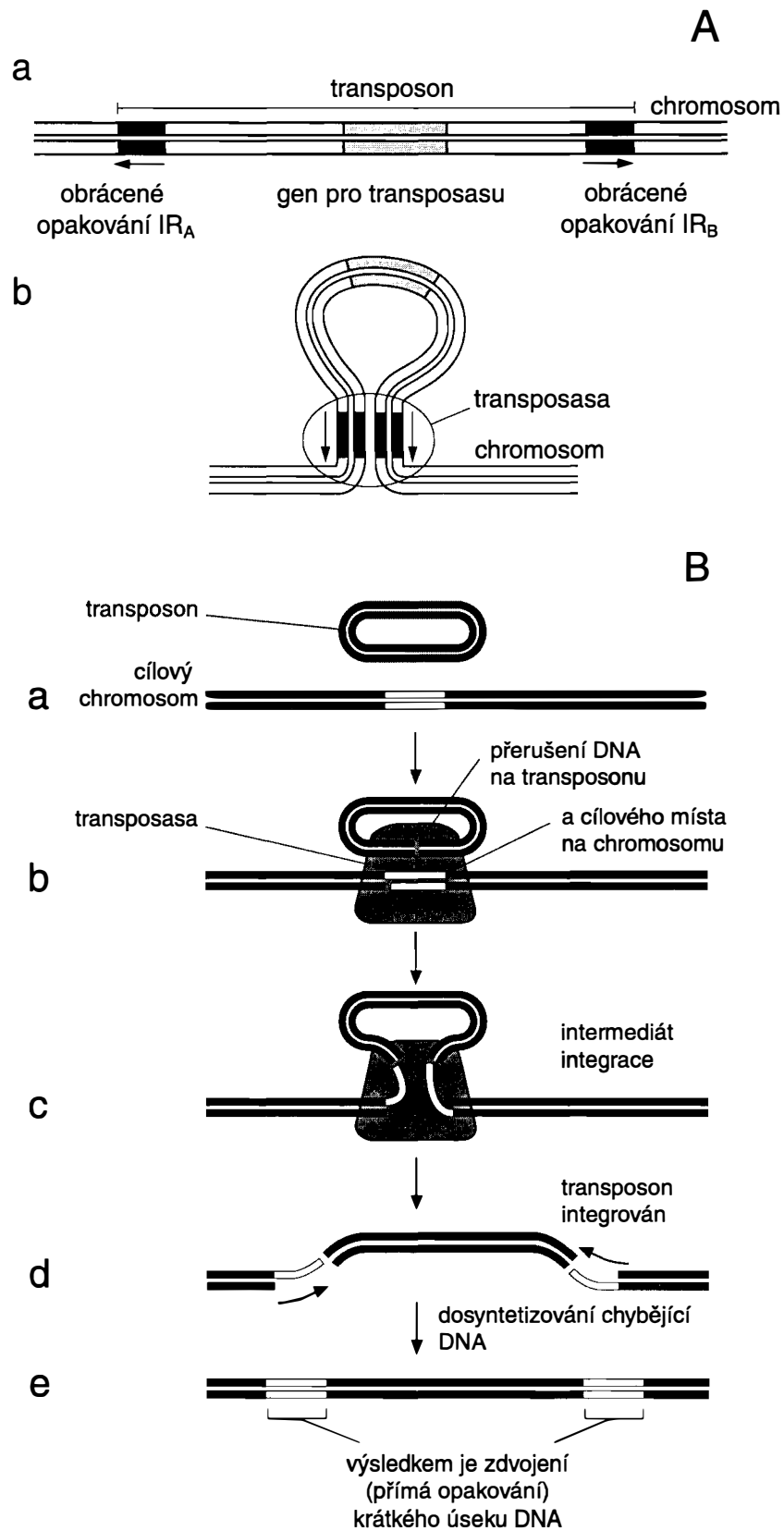
Transkripční aktivita jednotlivých oblastí jaderné DNA je také regulována kovalentními modifikacemi histonů. Acetylace stabilizuje transkripčně aktivní úseky (euchromatin), deacetylace a fosforylace (histonu H1) je spojena s inaktivací transkripce a kondenzací chromatinu.

Úrovně regulace genové exprese v jádře (**obr. 3**)

Transkripce (syntéza mRNA)

Tento krok má v genové expresi dominantní roli, neboť řídit genovou expresi na všech nižších úrovních je energeticky náročnější a regulačně složitější. Podmínkou účinné transkripce je rozvolněná (dekondenzovaná) konformace chromatinu, která je především závislá na kovalentních modifikacích histonů (viz nahoře). Vedle toho jsou známy bílkoviny, které působí jako globální transkripční genomové represory (např. rostlinné Polycomb bílkoviny jako Medea, která se účastní vývoje semene) či naopak stimulatory (např. faktory remodelující chromatin jako SWI2/ SNF2 v komplexu s ATPasou). V každém případě se funkce těchto bílkovin projeví také na struktuře a konformaci histonového oktameru (nukleosomu) vyšších úrovních skládání chromosomální DNA a následně také v účinnosti transkripce.

Transkripce je vysoce organizovaný a složitý pochod katalyzovaný multimerními bílkovinnými komplexy. Je možné rozdělit ji na fázi iniciace (zahájení), elongace mRNA (prodlužování) a terminace (ukončení transkripce). **Ve většině případů je genová exprese na transkripční úrovni regulována především**



Obr. 2A – Struktura a mobilizace transposonu typu En / Spm. Jeho hranice jsou charakterizovány obrácenými opakováními DNA, která umožňují vznik excizního intermediátu. **B** – Mechanismus jeho integrace vede ke vzniku krátkých obrácených opakování cílové sekvence DNA.

ve stádiu iniciace. Ta závisí na souhře tzv. **cis-DNA regulačních elementů** v promotorových oblastech genů a **bílkovinných transkripčních faktorů** (TF), které se na tato místa specificky vážou.

Transkripční faktory je možné rozdělit na **obecné TF**, které se účastní každé transkripce, a **specifické TF**, které odpovídají za přesné načasování transkripce specifických genů jen v určitém typu buněk, či v odpověď na specifický signál z okolí. Jim také odpovídají specifické cis-DNA elementy, které slouží jako jejich vazebná místa.

Transkripční komplexy obsahují také řadu bílkovin, které se nevážou přímo na DNA a jejichž funkce je nezbytná pro úspěšný průběh transkripce. Nejčastějším způsobem regulace specifických TF je, vedle jejich tkáňově specifické exprese, cyklus fosforylace a defosforylace, který ovlivňuje lokalizaci TF v jádře a cytoplasmě a také schopnost toho kterého TF interagovat s DNA.

Úpravy mRNA – sestřih (splicing) a editování v semiautonomních organelách

Již během elongační fáze transkripce jsou spliceosomem (multiproteinový komplex katalyzující sestřih) rozpoznávány hranice exonů a intronů syntetizovaného (nascentního) polynukeotidu mRNA – introny jsou vystřihovány a tak vzniká zralá kódující mRNA. Důležitým mechanismem regulace genové exprese je tzv. **alternativní splicing**, který vede k tomu, že jeden a tentýž primární transkript (mRNA) je sestřihován několika různými způsoby. To je umožněno různým „čtením“ hranic exonů a intronů spliceosomem např. v závislosti na typu buňky. Z téhož primárního transkriptu tak vznikají různě dlouhé mRNA, které kódují bílkoviny lišící se v některých oblastech primární sekvencí aminokyselin a tedy i konformací. Pravidlo „jeden gen – jedna bílkovina“ tak nemůže platit, považujeme-li za gen jen úsek DNA.

Hranice exonů a intronů nejsou u krytosemenných zcela jednotně sekvenčně determinovány, takže např. při expresi genů z trav (např. pšenice) v transgenní dvouděložné rostlině (např. tabáku) může dojít k chybnému sestřihu a tím k potlačení exprese transgenu.

Zrání mRNA je dokončeno posttranskripčními úpravami – na 5' konec je připojena methyl-guanosinová čepička a na 3' konec (po jeho zkrácení) dlouhá řada adeninových zbytků, tzv. poly(A) tail. U většiny transkriptů jsou tyto úpravy nezbytné pro stabilitu a translatovatelnost mRNA.

Další mechanismus, který mění primární sekvenci některých mRNA se nazývá **editování** a u rostlin se uplatňuje v plastidech a mitochondriích. Dochází při něm ke změně cytosinu na uracil (podrobněji viz Mitochondrie). Editování je nezbytné pro vznik funkční mRNA (tj. např. bez STOP kódonů).

Transport mRNA z jádra do cytoplasmy

Existence jaderného kompartmentu v buňce umožňuje časové a prostorové oddělení procesů transkripce a translace – rys, kterým se odlišují eukaryota od prokaryot. Transport mRNA z jádra do cytoplasmy tak může být využit jako další regulovatelný krok genové exprese. Většina mRNA je po zadržení v jádře rychle degradována, a tak je genová exprese příslušného lokusu posttranskripčně potlačena.

2.1.1.2 Cytoplasma a plasmalema

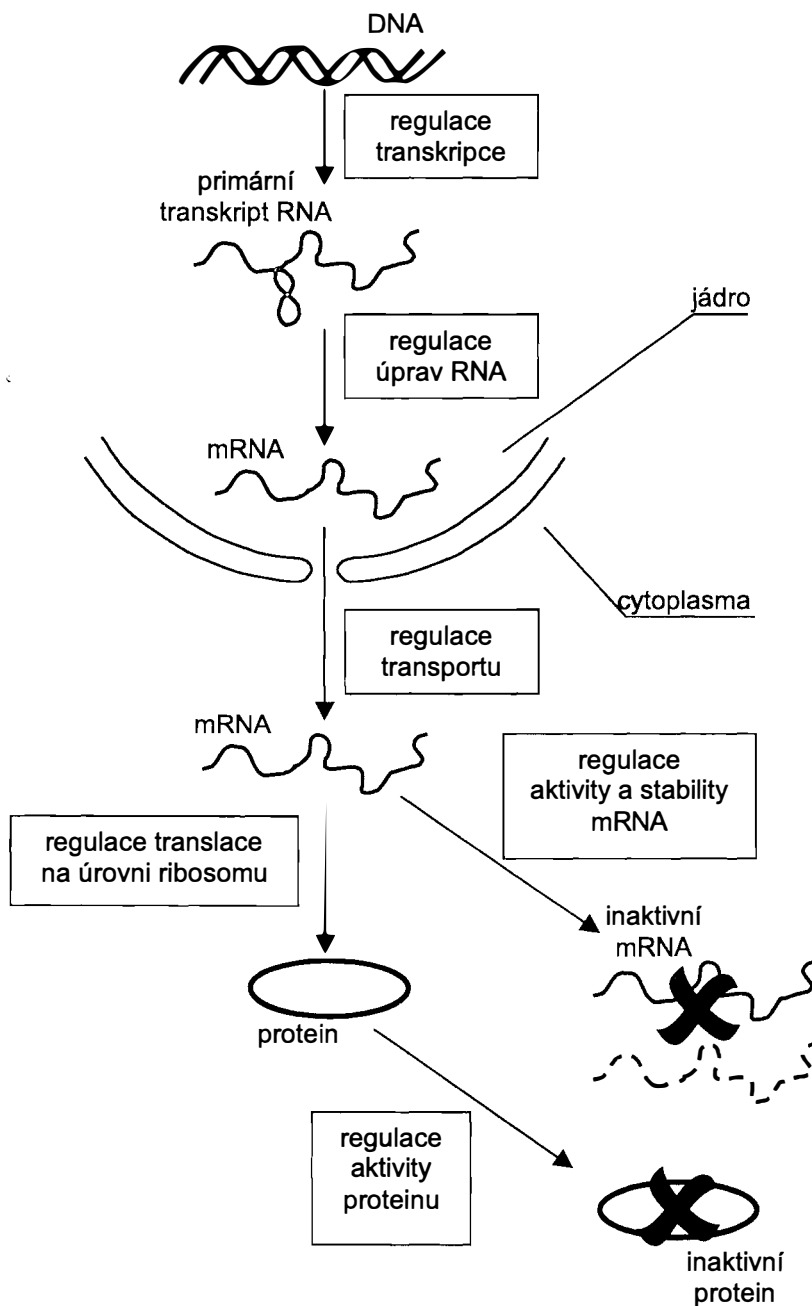
Cytoplasma je složitá, vysoce organizovaná základní výplň protoplastu, někdy označovaná jako **cytosol**. Jsou v ní lokalizovány cytoplasmatické organely a endomembránový systém. Je tvořena vodnými roztoky a koloidní disperzí různých látek. Obsahuje minerální ionty, metabolity, rozpuštěné plyny a makromolekuly (nukleové kyseliny, bílkoviny, polysacharidy, lipidy). Bílkoviny (enzymy) a nukleové kyseliny vytvářejí v cytoplasmě řadu funkčních komplexů, jejichž dobře viditelným (pomocí elektronového mikroskopu) příkladem jsou ribosomy.

Hustota strukturních útvarů a koloidních částic v cytoplasmě je obvykle tak vysoká, že přítomnost pravekých vodných roztoků reagujících látek je v ní téměř vyloučená. Kinetika cytoplasmatických enzymových reakcí *in vivo* se proto může značně odchylovat od kinetiky zjištěné *in vitro*.

Regulace genové exprese v cytoplasmě (obr. 3)

a) Lokalizace mRNA v buňce a její stabilita

Důležitým prvkem regulace genové exprese je specifická lokalizace některých mRNA do určitých oblastí buňky, ve kterých pak dochází k jejich translaci. Týká se to např. mRNA, které kódují bílkovi-



Obr. 3. Schématické znázornění úrovní na nichž je řízena genová exprese. Detailní rozbor jednotlivých kroků počínaje transkripcí je uveden v oddílech Jádro a Cytoplasma.

ny podílející se na vzniku a udržování buněčné polarity. Tato diferenciální lokalizace mRNA v buňce je většinou závislá na cytoskeletu.

Velmi důležitým parametrem exprese genu je stabilita jím kódované mRNA. V tomto ohledu se jednotlivé druhy mRNA velmi liší – labilní mRNA (často kódující signální bílkoviny) mají životnost několik minut, zatímco stabilní mRNA jsou funkční po řadu hodin a mohou tedy být častěji translatovány. Stabilita mRNA je závislá na stavu buněčného prostředí – např. během stresové odpovědi se životnost mRNA určitých druhů podstatně mění. Stabilita (labilita) mRNA je převážně řízena 5' a 3' nekódujícími úseky mRNA. Roli zde má také poly(A) – transkripty s krátkým poly(A) jsou snáze degradovány.

U rostlin se v ontogenezi také uplatňuje negativní regulace specifických mRNA – především transkripčních faktorů – krátkými úseky homologních antisens RNA. Těmto RNA se říká siRNA (small interfering). Tyto siRNA vytvářejí s cílovou mRNA dvoušroubovicovou RNA, která je degradována RNAasou typ III. U *Arabidopsis* je kódována genem CARPEL FACTORY (mutant vytváří, mimo jiné, ektopické pestíky). Tohoto procesu se dále účastní specializované translační faktory e/F2C (např. u *Arabidopsis* Zwille a Argonaut).

b) Ribosomy a translace (syntéza bílkovin)

Ribosomy jsou submikroskopické struktury tvořené velkým riboproteinovým komplexem, který obsahuje molekuly rRNA a velký počet bílkovinných molekul. Probíhá na nich **translace** – syntéza bílkovin na matrici mRNA. Každá rostlinná buňka obsahuje tisíce ribosomů přítomných v cytoplasmě, plastidech a mitochondriích. Ribosomy cytoplasmatické mají sedimentační konstantu 80 S, jsou větší než ribosomy mitochondriální (70 S, závisí na druhu) a plastidové (70 S). Ribosomy cytoplasmatické jsou označovány jako eukaryotické, mitochondriální a plastidové jako prokaryotické. U rostlin byla zjištěna tkáňově specifická exprese některých ribosomálních bílkovin, což ukazuje, že struktura a funkce ribosomů se tak přizpůsobuje specifickým požadavkům na translaci v daném pletivu.

c) Iniclace i další fáze translace probíhají u rostlin stejně, jako u ostatních eukaryot – podílejí se na nich translační bílkovinné faktory homologní k translačním faktorům živočichů a kvasinek. U *Arabidopsis* byly nalezeny velké rodiny translačních faktorů, které vedle své tkáňové specifity (jsou popsány např. pylově specifické) mají také specifitu pro určité typy mRNA. Translace probíhá na ribosomech drsného ER (viz 2.1.1.3), i na volných cytoplasmatických ribosomech nebo na ribosomech připojených k cytoskeletu. V mnoha případech dochází, díky specifické lokalizaci mRNA a translačního aparátu, k syntéze bílkovin v přesně vymezených doménách buňky.

Podobně jako u transkripce, také u translace je možné rozlišit fáze iniciace, elongace a terminace. Regulována je především iniciace translace. Účinnost iniciace je ovlivňována především sekvencemi v 5' nekódující oblasti mRNA (regulační elementy RNA). Celistvost translatované mRNA je kontrolována ribosomem mj. také prostřednictvím interakce čepičky na 5' konci s poly (A) na 3' konci. Na jednom transkriptu po přechodu ribosomu do elongační fáze dochází k iniciaci translace dalšími nasedajícími ribosomy – na jednom vlákně mRNA tak „visí“ více ribosomů. Tento útvar se nazývá **polysom**.

d) Posttranslační modifikace bílkovin

Existuje nepřehledné množství posttranslačních kovalentních modifikací bílkovin které většinou ovlivňují biologickou funkci či lokalizaci dané bílkoviny. K nejrozšířenějším patří glykosylace a fosforylace. Přidání hydrofobních skupin (farnesylace, myristoilace) umožňuje hydrofilním bílkovinám fungovat jako periferní membránové proteiny.

e) Degradace bílkovin

Včasně odstranění (likvidace) určité bílkoviny je stejně důležitým regulačním krokem jako její syntéza de novo. K tomu účelu v buňce slouží tzv. **proteasom** – multiproteinový komplex, který roz-

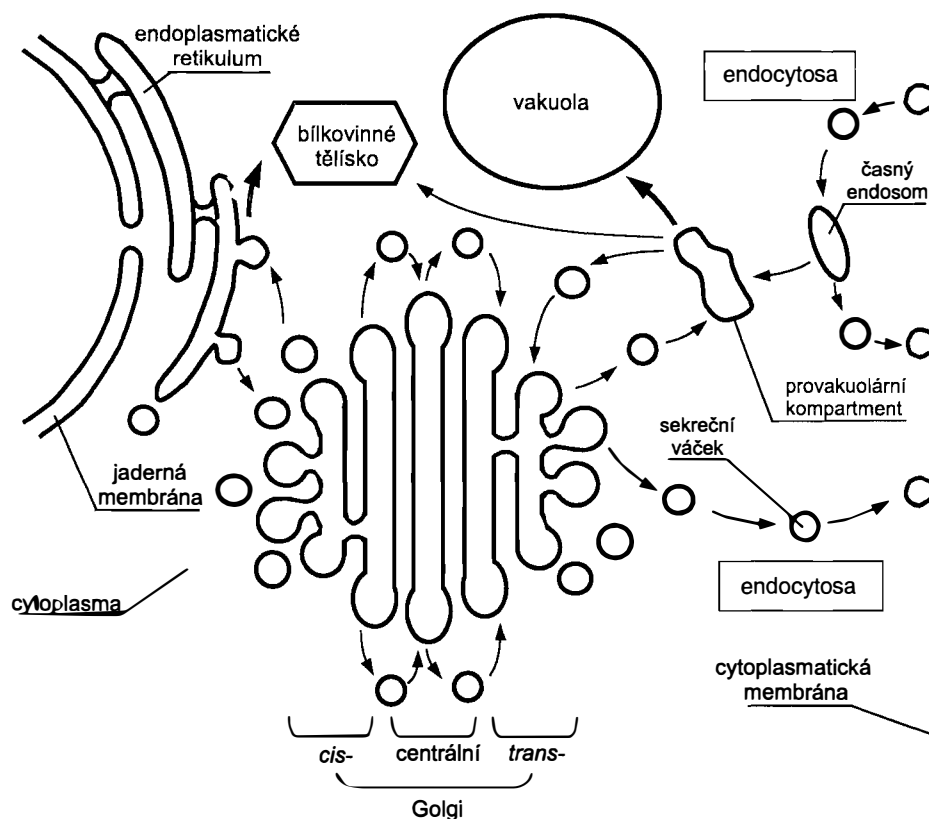
poznává a degraduje polypeptidové řetězce s kovalentně navázaným ubiquitinem (viz slovníček). U rostlin má důležitou signální úlohu signalosom (COP9 komplex), který je homologní k „víku“ proteasomu – účastní se např. fotomorfogeneze a reakce rostlinné buňky na auxin (viz 11.3).

Plasmalema

Plasmalema (cytoplasmatická membrána) je periferní membrána protoplastu, kterou cytoplasma přiléhá – tlačena turgorem – k buněčné stěně. Má charakter jednotkové membránové dvouvrstvy tvořené převážně fosfolipidy s různým podílem sterolů. Zhruba stejný molární podíl jako tuky tvoří různé bílkovinné komplexy, které fungují jako protonové pumpy, iontové kanály, přenašeče (viz 4.4.1), signální receptory (viz 11.2), nebo enzymy. Membránou buď **prostupují** z jedné strany na druhou jako tzv. **integrální membránové bílkoviny** s transmembránovou hydrofobní doménou, nebo jako tzv. **periferní membránové bílkoviny** jsou v membráně jen částečně zapuštěny hydrofobní doménou a interagují s ní prostřednictvím iontových vazeb nebo jsou napojeny na jinou membránovou bílkovinu.

Většina transportních procesů přes plasmalemu (viz Minerální výživa) je závislá **na transmembránovém protonovém gradientu** a s ním spojeném membránovém potenciálu (asi -150 mV), který vzniká u rostlin zvláště činností P-H⁺ATPasy (**obr. 6**). Ta pumpuje (na účet energie ATP) protony z cytoplasmy do vnějšího mezibuněčného prostoru.

Polotekutý stav membrán umožňuje volnou boční pohyblivost jejich složek. Poloha bílkovinných komplexů se v membráně mění v závislosti na změnách vnitřního a vnějšího prostředí buňky. Optimální konsistenci membrán si rostliny regulují také v závislosti na teplotě prostředí. Zvyšování podílu nena-



Obr. 4. Endomembránové kompartmenty rostlinné buňky se podílejí na biosynteticko-sekretorické a endocytotické dráze. Šipky značí směr transportu váčků a vzájemnou propojenost jednotlivých kompartmentů. *Trans*-Golgi síťovina na *trans*-Golgi cisterně není znázorněna.

sycených mastných kyselin ve fosfolipidech membrán je nejčastější reakcí na snižování teploty. (Dvojnásobné vazby snižují uspořádanost membránových lipidických řetězců, a tak snižují teplotu fázového přechodu z tekuté fáze do fáze gelu.)

Plasmalema plní tyto funkce: 1) Je bariérou pro volnou difuzi látek rozpustných ve vodě. 2) Svojí semipermeabilitou a přítomností různých transportních kanálů, pump a přenašečů řídí pasivní i aktivní transport látek mezi buňkou a jejím prostředím. 3) Podílí se na tvorbě buněčné stěny. 4) Prostřednictvím zvláštních receptorů přijímá signály z okolí a předává je do buňky. Nositeli těchto signálů mohou být např. molekuly fytohormonů a signálních bílkovin (viz kap. 11). Signálem může být také změna turgoru vyvolaná změnou vnějších osmotických poměrů. 5) Prostřednictvím specifických bílkovin je napojena jak na buněčnou stěnu, tak na cytoskelet a tímto spojením se podílí na přenosu a integraci mechanických i chemických signálů.

2.1.1.3 Endomembránový systém

Souhrn vnitřních cytoplasmatických membrán a jimi vymezených kompartmentů je označován jako endomembránový systém. Skládá se z endoplasmatického retikula, Golgiho aparátu a vakuol.

a) Endoplasmatické retikulum

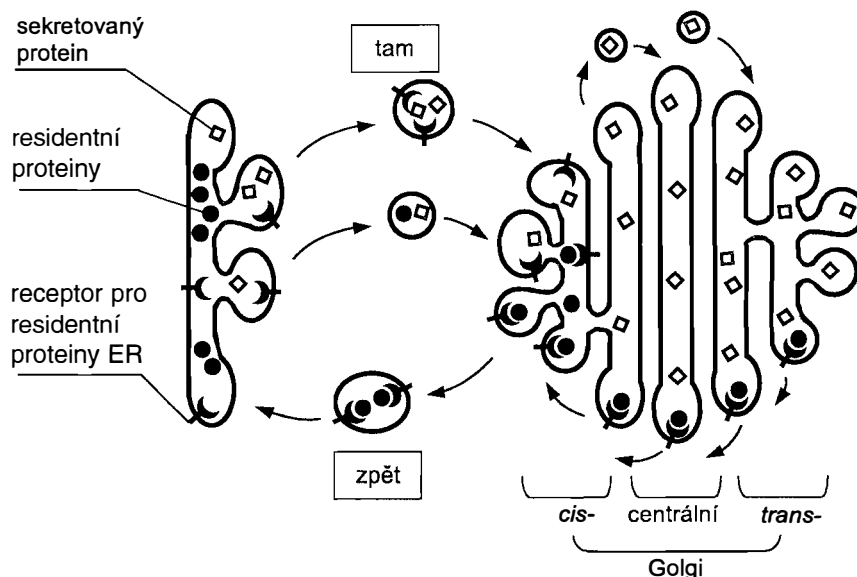
Endoplasmatické retikulum (ER) je výchozí kompartment endomembránového systému. Je tvořeno sítí trubicových útvarů či zploštělých cisteren odškrucujících na periferii vřetky. Je to **polyfunkční kompartment, který tvoří různé funkční domény v rámci jedné buňky**. ER je napojeno na vnější jadernou membránu, s níž tvoří jednotný membránový systém (**obr. 4**).

Subkortikální domény endoplasmatického retikula spojené bílkovinnými komplexy s plasmalemou (na **obr. 4** nejsou znázorněny) jsou důležitým stabilizačním (mechanicky podpůrným) prvkem aktinového cytoskeletu (viz Cytoskelet). Existuje tak **vzájemně závislá podpůrná interakce elementů cytoskeletu a rozsáhlých domén ER**. Vysoká dynamika ER – neustálé přetváření a pohyb tubulů a cisteren ER – je také částečně řízena interakcí mezi ER a cytoskeletem.

K povrchu určité části ER přisedají ribosomy, na kterých probíhá proteosyntéza. Je to tzv. **drsné endoplasmatické retikulum**. Bílkoviny vybavené na N-konci **signálním peptidem** jsou transportovány do lumen ER kotranslačně (neboli během translace) zvláštním translokátorem, jehož součástí je SRP-receptor, který váže komplex 6 bílkovin a krátké (300pb) RNA, anglicky zvaný Signal Recognition Particle – SRP, připojený na signální peptid. Specializovaná doména drsného ER se podílí na vzniku **proteinových tělísek** (viz kap. 8).

Část ER bez ribosomů, tzv. **hladké endoplasmatické retikulum**, se podílí na syntéze membránových lipidů. Probíhá v něm tzv. eukaryotická dráha syntézy fosfolipidů. Zdrojem mastných kyselin jsou plastidy (ve kterých také dochází k syntéze fosfolipidů, ale tzv. prokaryotickou dráhou). Fosfolipidy syntetizované v ER jsou základem membrán endomembránového systému a plasmalemy. Ve specializované membráně ER, charakterizované přítomností bílkovin oleosinů, dochází také k syntéze a hromadění triacylglyceridů. Vyplňováním prostoru mezi oběma složkami membránové dvojvrstvy vznikají kulovité útvary zvané **oleosomy** obsahující oleosiny a kryté pouze jednou vrstvou membránové dvojvrstvy (viz také Vakuola). V buňce dochází k čilé výměně lipidů, zvl. mezi plastidy a ER na které se podílí lipidové přenašeče LTPs (lipid transfer proteins).

Další důležitou funkcí ER je to, že slouží jako **zásobárna vápníku, který po stimulaci některými signály vytéká z ER do cytoplasmy, v níž funguje jako tzv. druhý posel** (viz 11.2).



Obr. 5. Mechanismus udržování retikuloplasmínů (či residentních bílkovin) v ER. Na cisternách Golgiho aparátu je symbolicky znázorněn receptor Erd2, který rozpoznává bílkoviny nesoucí aminokyselinovou značku KDEL/HDEL a třídí je do zpětného (retrográdního) toku váčků.

ER je vybaveno residentními bílkovinami (tj. bílkovinami setrvávajícími v ER), tzv. **retikuloplasmíny**, které pomáhají zaujmout správnou konformaci nově translatovaným polypeptidům. Např. BiP (binding protein, homolog HSP70 – viz Slovníček) patří mezi tzv. chaperony, které za spotřeby ATP katalyzují dosažení nativní (tzn. přirozeně funkční) konformace bílkovin. Další se podílejí na interakcích s vápníkem a kontrole správnosti glykosylace bílkovin a pod. **V ER je kontrolována kvalita nově syntetizovaných bílkovin.** Bílkoviny s poruchou konformace či glykosylace mohou být vyloučeny z ER zpět do cytoplasmy, kde dochází k jejich degradaci **proteasomem**. Bílkoviny, které mají zůstat v lumen (tj. uvnitř) ER jsou na C-konci vybaveny tzv. **retenčním signálem**. U rostlin převažuje, na rozdíl od tradičního živočišného signálu KDEL (Lys, Asp, Glu, Leu), sekvence aminokyselin **HDEL** (His, Asp, Glu, Leu). Pokud takto označená bílkovina unikne z ER, je navracena retrográdním (zpětným) transportem váčků (**obr. 5**) zpět do ER. To je zajištěno specifickým receptorem **Erd2** v Golgiho aparátu, který rozpoznává tento aminokyselinový motiv.

Transport mezi ER a Golgiho aparátem je zajišťován anterográdním (tj. směrem kupředu) a retrográdním (tj. zpětným) tokem váčků. Podobně jako u dalších eukryot je tvorba těchto váčků spojena se dvěma typy obalů **COP II** pro anterográdní a **COP I** pro retrográdní transport a transport mezi jednotlivými cisternami GA (coatomer proteins, koatomerový obal). Inicaci tvorby váčku – sestavování obalu – je řízena malými **GTPasami Arf** (ADP ribosylační faktory), které mají stejný funkční cyklus jako ostatní malé GTPasy (viz Příjem a přenos signálů). Mutace výměnného faktoru GEF pro Arf známá u *Arabidopsis* jako *EMB30/gnom* způsobuje poruchy sekrece v časně embryogenezi a vede k chaotickému a neúplnému ukládání buněčných stěn v embryu.

ER je konstitutivní součástí plasmodesmů, které symplasticky spojují sousední buňky pletiva (viz dále) – středem kanálku plasmodesmu (jehož stěny jsou tvořeny plasmalemou) prochází „potrubí“ ER, zvané **desmotubulus**, z jedné buňky do druhé (viz Plasmodesmy).

b) Golgiho aparát (GA)

Golgiho aparát je soustavou diktyosomů (elementů GA) tvořených baterií (5–8) zploštělých miskovitých měchýřků (tzv. cisteren), které na periferii často přecházejí v trubicovité větve. Z okrajů cisteren

se odškrucují váčky. Cisterny přijímající váčky z ER se nazývají **cis-cisterny**, uprostřed diktyosomu jsou **centrální cisterny** a na straně odvrácené od ER **trans-cisterny** (obr. 4). Cisterny nejbližší od ER a blízké plasmalemě přecházejí do silně tubulární **trans-Golgi sítě** (TGN – **trans-Golgi network**, viz dále), která odštěpuje sekretorické váčky.

Golgiho aparát rostlinné buňky sestává z jednoho (u některých jednobuněčných řas) až několika set (u vyšších rostlin) diktyosomů. Jednotlivé diktyosomy jsou obaleny bílkovinnou matrix z níž jsou vyloučeny ribosomy. Ta mj. brání předčasnému „vypadávání“ váček zajišťujících transport mezi jednotlivými cisternami diktyosomu ven do cytoplasmy. Tato matrix také pomáhá udržovat identitu GA (a u živočichů jeho znovusestavení po mitose).

Diktyosomy se množí zaškrcováním (štěpením) ve směru *cis-trans*, obvykle těsně před mitosou. U většiny rostlinných buněk není možno pozorovat trvalý prostorový vztah mezi ER a GA – **elementy GA se většinou přerušovaně pohybují po cytoskeletu. GA rostlinné buňky zůstává aktivní i během mitosy** (na rozdíl od živočichů) **a produkuje váčky fragmoplastu** (viz dále).

Funkce Golgiho aparátu v rostlinné buňce:

- 1) Je centrálou usměrněného transportu buněčných váček a tedy také membrán a bílkovin putujících ve váčkách.
- 2) Probíhá v něm syntéza, úpravy a třídění makromolekul. Golgiho aparát rostlinné buňky je především „továrnou“ na pektinové a xyloglukanové polysacharidy buněčné stěny a stejně jako u ostatních eukaryot je v něm dokončována glykosylace glykoproteinů.
- 3) Podílí se na tvorbě plasmalemy, buněčné stěny a tvorbě vakuol.

V cisternách diktyosomů dochází k úpravám glykoproteinů, jejichž syntéza začíná na ribosomech drsného ER. Upravené glykoproteiny se v odštěpených váčkách dostávají k povrchu buňky, kde mohou být exocytosou z protoplastu vyloučeny do buněčné stěny nebo jsou zabudovány do plasmalemy. Membrána váček se při exocytose stává součástí plasmalemy (čímž se plasmalema zvětšuje). V cisternách probíhá syntéza komplexních polysacharidů buněčné stěny, které jsou ve váčkách transportovány na povrch buňky. Membrána váček také obsahuje enzymové komplexy syntetizující celulosu, které se stávají aktivními po inkorporaci do plasmalemy.

Glykosylace bílkovin

Jednotlivé cisterny téhož diktyosomu se odlišují svým enzymatickým vybavením, což je dobře patrné na enzimech řídících glykosylační úpravy bílkovin. **Úprava N-glykoproteinů** (N proto, že ke glykosylaci v tomto případě dochází na NH_2 – skupině asparaginu) začíná v ER připojením lipidového prekursoru (dolicholu) přenášejícího komplexní oligosacharid **na NH_2 -skupinu asparaginu** právě translatovaného bílkovinného řetězce. Ještě v ER jsou odštěpeny z původního oligosacharidu některé glukosy a manosa. V *cis*-Golgi pokračuje dále zkracování původního oligosacharidu, ve středních cisternách je pak připojován na uvolněná místa N-acetylglukosamin. V *trans*-Golgi je glykosylace dokončena připojením zbytků galaktosy a kyseliny sialové. Tento proces má řadu variant, takže výsledná podoba oligosacharidového postranního řetězce glykoproteinu je velmi variabilní. Glykosylace má často vliv na biologickou aktivitu příslušného glykoproteinu. Glykosylace také chrání protein před proteasami.

Dynamika GA

Jednotlivé sousední cisterny diktyosomu jsou navzájem spojeny nejenom tokem váček; uplatňuje se také postupné dozrávání cisteren, kdy cisterna, která se vytvořila na *cis*-začátku diktyosomu přítokem váček z ER dozrává, posouvá se a stává se střední cisternou, až se nakonec rozplyne ve váčkách uvolňovaných z TGN. Je pravděpodobné, že u GA rostlinné buňky se mohou v závislosti na typu pletiva vyskytovat také přímé tubulární (kanálkovité) spoje sousedních cisteren diktyosomu.

Pro udržení identity *cis*, středních a *trans* cisteren diktyosomu má zásadní význam retrográdní (zpětný) tok váčků (**obr. 5**) vytvářených za pomoci COP I obalu, který umožňuje návrat např. specifických glykosyltransferas do příslušných cisteren GA.

Trans-Golgi síťovina (TGN)

TGN vzniká na *trans*-Golgi cisterně jako značně tubulosní rozvětvené membránové vychlípeniny, na jejichž výběžcích se odškrucují exocytotické váčky. Velikost TGN se mění podle specifických potřeb rostlinných buněk. U buněk vytvářejících vakuoly je tato síť velmi vyvinutá, zatímco tam, kde převažuje sekrece polysacharidů, je stěží detekovatelná. TGN u rostlin je kompartment s kyselým pH, podobně jako u živočichů. Protonový gradient membrány TGN (na jeho tvorbě se podílejí podobně jako v tonoplastu V-H⁺-ATPasy a H⁺-pyrofosfatasy, viz Vakuola) je nezbytným předpokladem pro správné třídění bílkovin. (Tento gradient může být narušen inhibítorem monensinem, který tak zastaví třídění bílkovin exportovaných z TGN.)

Přechodný kompartment mezi TGN a vakuolou je dnes u rostlin předmětem intenzivního studia. U kvasinek se nazývá časný endosom, neboť se zde sbíhá endocytotický transport z povrchu buňky s transportem z TGN do vakuoly (**obr. 4**). U rostlin mluvíme o provakuolárním kompartmentu. K biogenezi tohoto kompartmentu u rostlin významně přispívají také procesy autofagie („katabolismus cytoplasmy“) vyvolané např. nedostatkem živin vedoucí ke vzniku autofagosomů, které později splývají s centrální vakuolou. Tento proces umožňuje rostlinné buňce přestát období nedostatku živin.

Sekrece a třídění bílkovin

Na výstupu z TGN jsou bílkoviny určené k sekreci transportovány na povrch buňky tokem váčků, který je u rostlin obecně považován za neregulovaný, konstitutivní proces, nevyžadující specializovaný třídící aparát. Bílkoviny určené jinam, např. do vakuoly, nesou specifické **značkovací (lokalizační) sekvence aminokyselin**, které po rozpoznání specifickými receptorovými mechanismy zajišťují jejich „zabalení“ do váčků směřujících k vakuole. Na rozdíl od savčích buněk je vakuolární lokalizační značka u rostlin dosti proměnlivá jak co do pozice na polypeptidu (může být na C-konci, N-konci i uprostřed), tak co do aminokyselinové sekvence. „Spoluhráčem“ těchto lokalizačních sekvencí, jsou pak integrální membránové **třídící receptory**, které se vážou na vakuolární lokalizační značku a zajišťují hromadění vakuolárních bílkovin ve váčcích směřujících k vakuole. Mezi tyto receptory patří BP-80 (binding protein 80 kDa). Tvorbě váčků se v této fázi a při endocytose (vchlipování váčků plasmalemy obsahujících extracelulární molekuly) účastní u rostlin **klathrinový obal** (viz Slovníček), podobně jako u ostatních eukaryot.

Vápník, turgor a exocytosa – splývání membránových váčků s plasmalemou

Exocytosa je proces splývání váčků s plasmalemou doprovázený vylučováním solutů či složek buněčné stěny na povrch buňky. Důležitým faktorem ovlivňujícím exocytosu je koncentrace volného vápníku (Ca²⁺) v místě, kde exocytosa probíhá. Zvýšení koncentrace vápníku vede k jejímu zesílení. Působení vápníku prostředkují mj. bílkoviny zvané **annexiny**, které po jeho navázání usnadňují splývání membránového váčku s plasmalemou.

Na rozdíl od živočišných buněk jsou rostlinné buňky vystaveny turgoru a při splývání váčků s plasmalemou dochází vlivem tohoto tlaku k jejich stlačení, které urychluje vytlačení obsahu váčku na povrch buňky, ale zároveň brání jeho plnému splynutí s plasmalemou. O možném mechanismu recyklace membrán takto stlačených váčků, které nesplynuly plně s plasmalemou viz dále.

Endocytosa

Endocytosa je proces protichůdný exocytose. Dochází při ní ke vchlipování plasmalemy až je posléze do nitra buňky uvolněn endocytotický váček a buněčný povrch se zmenšuje. V endocytotickém váčku

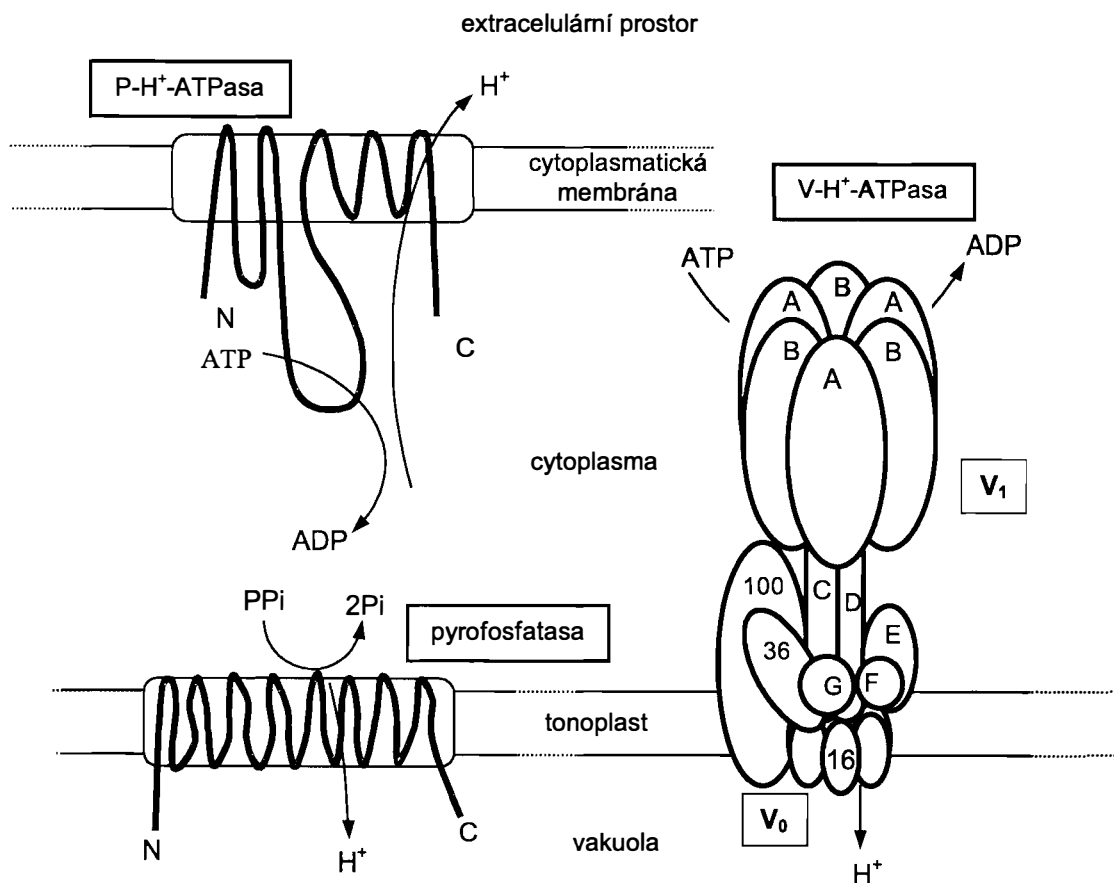
se mohou nacházet nejen molekuly připojené na povrch plasmalemy (např. ligand vázaný na receptor, viz kap. 11), ale také látky přítomné ve vnějším (apoplastickém) vodném prostředí buňky.

Intenzita endocytosy značně kolísá v závislosti na specifických potřebách buňky. Endocytosu je možno zviditelnit i v rostlinných buňkách pomocí specifických fluorescenčních barviv. Vchlípení endocytotických váčků je podmíněno vytvářením klathrinového obalu (viz Slovníček). Ukazuje se, že se nemusí vždy jednat o klasickou endocytosu. V některých případech bylo zjištěno, že po uvolnění obsahu exocytotického váčku na povrch buňky je váček ihned internalizován (opět vtažen do nitra buňky) a splývá tedy s plasmalemou jen přechodně.

Vedle endocytosy mají rostlinné buňky schopnost recyklovat neúplně splynuvší váčky (stlačené vchlípeniny plasmalemy – viz výše Vápník, turgor a exocytosa) přenosem jednotlivých molekul membránových fosfolipidů cytoplasmou (pomocí bílkovin přenášejících lipidy) do specializovaných oblastí kortikálního ER pod plasmalemou.

c) Vakuola

Vakuola je endomembránový kompartment vyplněný převážně vodným roztokem různých látek a ohraničený **tonoplastem**. Meristematické buňky obsahují více drobných vakuol, diferencované zralé buňky obsahují většinou velkou centrální vakuolu.

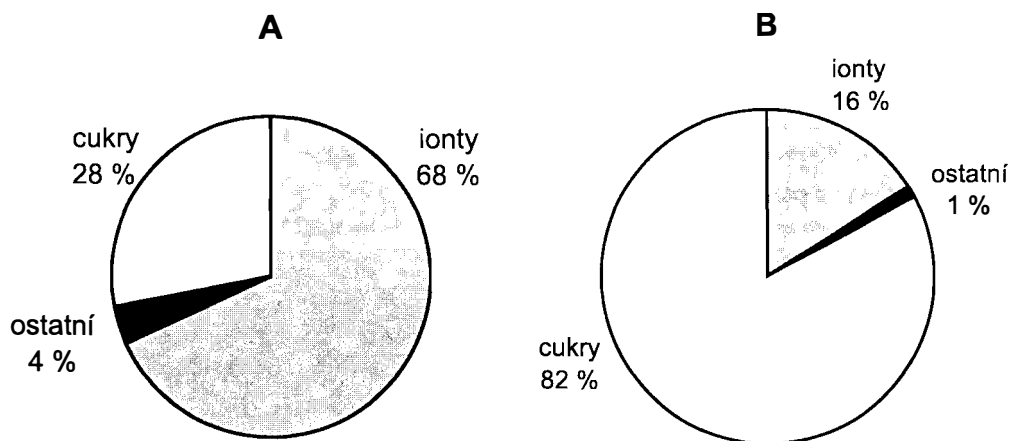


Obr. 6. Struktura 100 kDa P-H⁺-ATPasy (nahore, v plasmalemě), 81 kDa H⁺-pyrofosfatasy (v tonoplastu, vlevo dole) a 650 kDa multimerické V-H⁺-ATPasy (v tonoplastu, vpravo dole). Zatímco obě ATPasy jsou kódovány mnoha geny, je H⁺-pyrofosfatasa u *Arabidopsis* kódována jediným genem.

Vakuoly vznikají z váčků oddělených od Golgiho aparátu nebo od endoplasmatického retikula. Při vývoji buňky se zvětšují a nakonec splývají v jednu centrální vakuolu, která zaujímá až 90 % buněčného objemu. Cytoplasma je pak vytlačena na periferii protoplastu v podobě tenké vrstvy, přiléhající k buněčné stěně. Obsah látek ve vakuole závisí na typu buňky, na jejím prostředí a na etapě ontogeneze. **V jedné rostlinné buňce často existuje několik různých typů vakuol.**

Vakuoly mají řadu důležitých funkcí. Jsou to zejména:

- Funkce růstová.** Zvětšování buněk při růstu a vývoji rostlin je do značné míry výsledkem zvětšování jejich vakuol (10.1.3). Vakuoly se zvětšují příjmem vody na základě osmózy přes semipermeabilní tonoplast a voda tak díky vakuolám má u rostlin funkci stavebního materiálu (viz b). Osmóza závisí na aktivním transportu osmoticky aktivních iontů a molekul z cytoplasmy do vakuoly. Transport je poháněn transmembránovým gradientem protonů, vytvářeným protonovými pumpami, tj. tonoplastovou ATPasou a pyrofosfatasou (**obr. 6**, viz také 4.4.3). Osmoticky aktivní látky se tak mohou akumulovat ve vakuole v koncentraci mnohem vyšší, než jakou mají v cytoplasmě. Tím vzrůstá záporná hodnota osmotického potenciálu vakuoly a následně se zvětšuje turgor (až 2 MPa) nezbytný pro prodlužovací růst buněk (viz kap. 3).
- Funkce stavební.** Vakuoly jsou důležitým stavebním prvkem rostlinných buněk. Ve stavu turgescence významně přispívají k pevnosti struktury pletiv a orgánů.
- Funkce ve vodním hospodářství.** Tonoplastové pumpy, přenašeče a kanály se podílejí na zavírání a otvírání průduchů a tím na regulaci transpirace (viz 3.3.1.4 a 4.4.3).
- Funkce homeostatická a signální.** Protonové pumpy tonoplastu (H^+ -ATPasa a pyrofosfata **obr. 6**) udržují stabilní pH v cytoplasmě (kyselé pH ve vakuole) a vápníkové pumpy tonoplastu udržují (spolu s vápníkovými pumpami endoplasmatického retikula) cytoplasmatický vápník na stabilně nízké úrovni. Jak protonové, tak vápníkové pumpy pracují proti spádu elektrochemického potenciálu na účet energie ATP. Po přijetí specifických signálů na tonoplastu naopak vápník z vakuoly přechodně vytéká do cytoplasmy, kde se jako tzv. druhý posel podílí na regulaci proteinkinasových aktivit (viz kap. 4 a 11).
- Funkce zásobní.** Ve vakuolách jsou ukládány různé zásobní látky, např. sacharosa, fruktany, minerální živiny jako je draslík a u rostlin CAM (viz Fotosyntéza) organické kyseliny. Z vakuol naplněných zásobními bílkovinami se stávají proteinová tělíska (viz kap. 8).



Obr. 7. Závislost složení obsahu vakuoly na prostředí buňky. Explantáty mrkve byly pěstovány jeden týden v médiu s 1mM KCl a 1mM NaCl (A) a poté další týden v mediu se 60 mM sacharosou (B).

- f) **Funkce detoxikační a lytická (rozkladná).** Ve vakuolách se hromadí škodlivé nebo neúčinné produkty sekundárního metabolismu jako jsou alkaloidy, silice a kaučuk (viz Sekundární metabolismus). Nadbytečné vápenaté ionty jsou v nich převáděny v málo rozpustné krystaly šťavelanu vápenatého. Některé vakuoly se působením svých hydrolytických enzymů podílejí na odbourávání makromolekul a dalších látek, ale i celých organel jako jsou ribosomy, mitochondrie a plastidy. Produkty těchto rozkladných procesů mohou být v buňce znovu využity. Tento proces se nazývá autofagie.
- g) **Funkce lákadla.** Mnohé rostliny hromadí ve svých vakuolách barevné anthokyany a další flavonoidy. Tato barviva působí jako vizuální lákadla pro opylovače květů a konzumenty plodů. Jinou (signální) funkci mají flavony a flavonoly při interakci rostlin se symbionty (viz kap. 9).
- h) **Funkce ochranná.** Flavony a flavonoly přítomné ve vakuolách absorbují ultrafialové záření a působí proti němu jako ochranný filtr.
- Obsah vakuol je silně závislý na prostředí, ve kterém se buňky nacházejí (**obr. 7**).

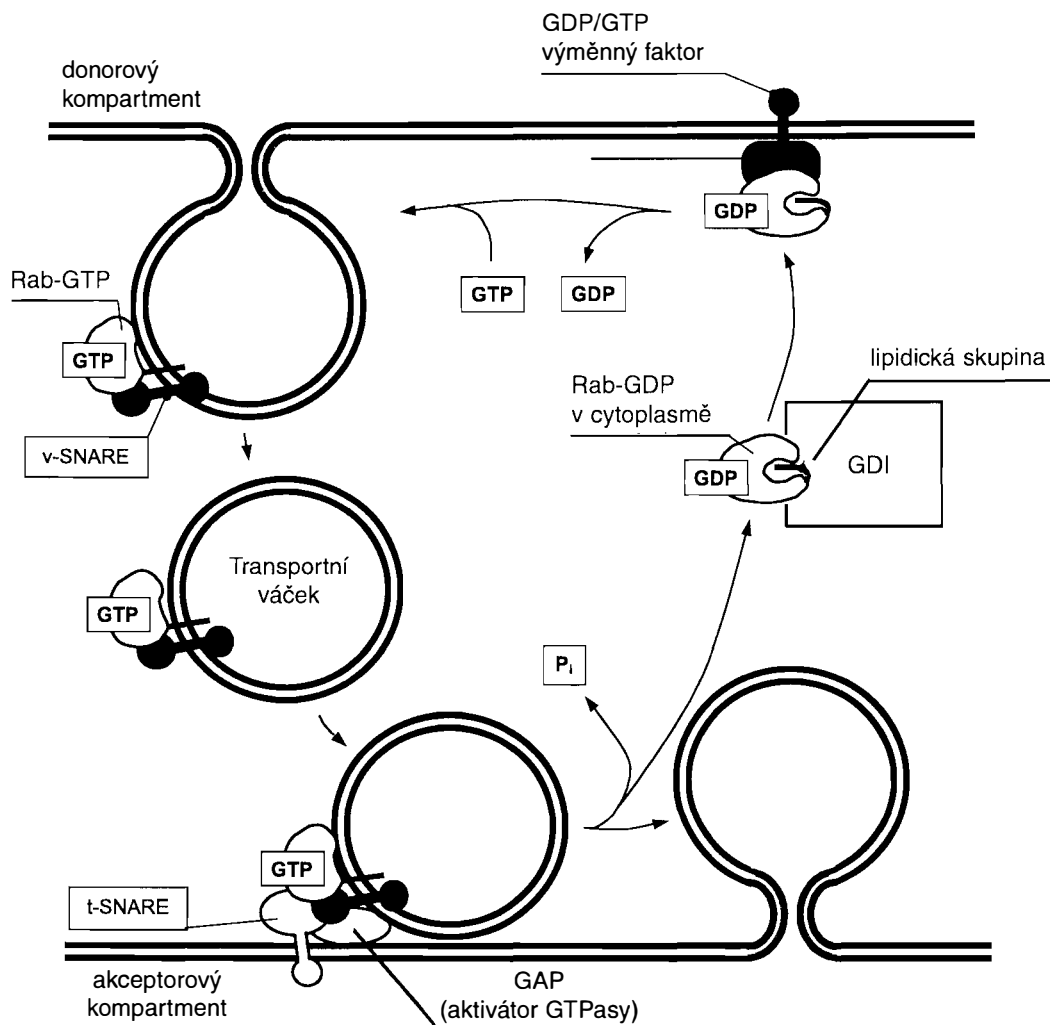
Transport bílkovin do vakuoly. Bílkoviny určené do vakuoly nesou specifické lokalizační sekvence aminokyselin, vakuolární třídící signál (VSS – vacuolar sorting signal), které zajišťují jejich „zabalení“ do váčků směřujících k vakuole. Na rozdíl od např. savčích buněk, je vakuolární lokalizační značka u rostlin dosti proměnlivá jak co do pozice na polypeptidu (může být na C-konci, N-konci i uprostřed), tak co do aminokyselinové sekvence. Spoluhráčem těchto VSS jsou pak integrační membránové třídící receptory, které se vážou na VSS a zajišťují hromadění vakuolárních bílkovin ve váčcích směřujících k vakuole. Mezi tyto receptory patří BP-80 (binding protein 80 kDa) původně charakterizovaný u hrachu. Homolog u *Arabidopsis* se jmenuje AtELP.

Adresování buněčných váčků a identita kompartmentů endomembránového systému

Odpověď na otázku, jak buňka udržuje složitou kompartmentaci endomembránového systému, jak zajišťuje identitu jednotlivých kompartmentů a správné adresování transportních membránových váčků, tak aby splynuly se správnou cílovou membránou, není zdaleka vyčerpávajícím způsobem zodpovězena. Ukazuje se však, že základní mechanismy, které odpovídají za organizaci endomembránového systému eukaryot, jsou vysoce evolučně konzervovány.

Výsledky pokusů prováděných převážně na savčích neuronech a kvasinkách vedly k vytvoření tzv. **SNARE hypotézy** o specifickém značení membránových kompartmentů a adresování buněčných váčků. Adresu na váček představuje specifická integrační membránová **v-SNARE** bílkovina (zkratka odvozena z dalších zkratk bílkovin účastnicích se splývání váčků), která na cílové membráně rozpoznává odpovídající **t-SNARE** bílkovinu (v = vesicle, t = target, **obr. 8**). Součástí rozpoznávacího komplexu jsou dále kompartmentově specifické malé **GTPasy podtřídy Rab** (viz Slovníček, **obr. 8**). Jsou to periferní membránové bílkoviny, které se uplatňují při tvorbě váčku, jeho transportu po cytoskeletu a zachycení na cílové membráně a také při aktivaci SNARE bílkovin. SNARE hypotéza předpokládá, že každý endomembránový kompartment je vybaven specifickou sestavou SNARE a Rab bílkovin. Váčky, které zajišťují transport mezi těmito kompartmenty, jsou vybaveny sestavou komplementární, zajišťující jednoznačné rozpoznání. Dominantní role SNARE bílkovin v rozpoznávací interakci vyplývá ze zjištění, že v- a t-SNARE jsou dostačující ke specifické fuzi váčků *in vitro*.

Význam SNARE bílkovin pro morfogenezi rostlinných buněk byl potvrzen zjištěním, že embryonální mutant *Arabidopsis* zvaný *knolle* má defekt právě v jedné z bílkovin patřících do rodiny SNARE (viz Ontogeneze). Bílkovina Knolle z rodiny SNARE se účastní fuze váčků fragmoplastu a její poškození se tedy projevuje poruchami v průběhu cytokineze již během raných stadií embryogeneze.



Obr. 8. SNARE hypotéza o adresování membránových váčků. Guaninnukleotidový výměnný faktor (guanin nucleotide exchange factor – GEF) na donorové membráně katalyzuje výměnu GDP za GTP na kompartmentově specifické GTPase z rodiny Rab. Ta je aktivována a svým na C-konci posttranslačně připojeným geranylgeranylovým hydrofobním řetězcem se zapojuje do membrány. S tím je spojena aktivace integrální membránové v-SNARE bílkoviny (je specifická pro daný donorový kompartment, v = vesicle) na tvořícím se váčku. Po odškrcení váček putuje po cytoskeletu buňkou a po rozpoznání komplementární t-SNARE bílkoviny (opět kompartmentově specifická, t = target) na cílovém kompartmentu dojde k jeho „zakotvení“. Bílkovinný komplex stimuluje fuzi membrán na účet energie ATP (tento komplex není na obr. uveden) pak spouští fuzi membrán váčku a cílového kompartmentu, při tom dochází také k hydrolyze GTP v Rab GTPase katalyzované GTPasovým aktivačním proteinem (GAP). Rab GTPasa je pak uvolněna z membrány GDP-disociačním inhibítoem (GDI) a v komplexu s ním se pak vrací k výchozímu kompartmentu.

2.1.1.4 Peroxisomy

Peroxisomy jsou orgány ohraničené jednotkovou membránou, specializované na oxidační reakce. **Při oxidacích katalyzovaných peroxisomálními flavoproteiny jsou přenášeny elektrony (jako atomy vodíku) ze substrátu na kyslík za vzniku peroxidu vodíku, jehož nadbytek je likvidován peroxisomálními katalasami.** Důležitou funkcí peroxisomů je katabolismus mastných kyselin β -oxidací, která u rostlin probíhá výlučně v peroxisomech (u živočichů v mitochondriích). Peroxisomy jsou velmi

proměnlivou organelou: Různé typy peroxisomů, dokonce v jedné buňce, obsahují velmi různou enzymatickou výbavu. V listech se podílejí na **fotorespiraci** (viz. Fotosyntéza). Projevuje se to těsným sousedstvím chloroplastu, peroxisomu a mitochondrie - kompartmentů, které se na fotorespiraci podílejí (viz Fotosyntéza).

Peroxisomy přítomné v semenech, zvané **glyoxysomy**, obsahují enzymy β -oxidace mastných kyselin a glyoxalátového cyklu a účastní se mobilizace zásobních tuků při klíčení. Těsně sousedí s dalšími zúčastněnými kompartmenty – oleosomy a mitochondriemi. Jejich koordinovanou činností jsou zásobní tuky transformovány v sacharosu (viz Tvorba a mobilizace zásobních látek).

Peroxisomy, podobně jako mitochondrie a plastidy, nevznikají *de novo* – množí se zaškrcováním. Nemají však vlastní DNA a všechny jejich membránové lipidy i bílkoviny jsou importovány z cytoplasmy. Jako hlavní „značka“ pro peroxisomální lokalizaci slouží specifická sekvence aminokyselin na C-konci bílkoviny (SKL – Ser, Lys, Leu), která se po importu neodštěpuje.

2.1.1.5 Mitochondrie

Mitochondrie jsou semiautonómni organely endosymbiotického původu (viz Plastidy), ve kterých probíhá aerobní respirace. Rostlinná buňka jich obvykle obsahuje několik set. Svou velikostí leží na prahu rozlišovací schopnosti světelného mikroskopu, v průměru měří kolem 1 μm . Jejich tvar je proměnlivý, např. z hruškovitého se může měnit v kulovitý nebo rohlíčkovitý. Proměnlivá je i jejich velikost. V jedné buňce může koexistovat několik různých, částečně specializovaných, typů mitochondrií. Mitochondriální obal je tvořen dvěma membránami obklopujícími vnitřní matrix, která obsahuje bílkoviny včetně enzymů, RNA, DNA, ribosomů, metabolitů, iontů a vody. Vnější membrána je dosti propustná a málo selektivní. Vnitřní membrána vybíhá četnými záhyby, zvanými **kristy**, hluboko do matrix. Vnitřní strana krist a tubulů nese četná stopkatá tělíska, **ATP syntasové komplexy**, někdy zvané oxisomy (viz Respirace).

Mitochondrie se v buňce neustále pohybují. Často dochází k jejich fuzi a dělení. Shlukují se na těch místech, kde je zvýšená spotřeba energie. Čím větší jsou energetické nároky buňky, tím více krist mitochondrie obsahují.

Respirační proces probíhající v mitochondriích můžeme rozdělit do tří základních etap:

- Krebsův cyklus fungující v matrix.
- Přenos elektronů respiračním řetězcem od redukováných koenzymů ke kyslíku.
- Oxidační fosforylace probíhající v kristách (viz Respirace).

Mitochondrie se také účastní fotorespirace a metabolismu aminokyselin (viz Fotosyntéza).

Narozdíl od mitochondrií živočišných buněk se **rostlinné mitochondrie významně podílejí na anabolických (biosyntetických) procesech**.

Mitochondriální genom (chondriom) vyšších rostlin je vázán na kruhovou dvouřetězcovou DNA, která se také může do různé míry linearizovat a vytvářet složité útvary. Vyznačuje se svou velikostí v rozmezí 250–2000 kb (u savců 16 kb, u kvasinek 80 kb). Struktura mitochondriální DNA (mtDNA) a uspořádání genů jsou značně variabilní, dokonce v rámci téhož rostlinného druhu. Jen malá část variant tzv. vzorové kopie (master copy) mitochondriálního genomu (které vznikají různými rekombinacemi) jsou varianty kruhové. Rekombinace mtDNA často vede ke vzniku chimerických otevřených čtecích rámečků (open reading frame-ORF) a tím ke vzniku potenciálně škodlivých mutantních chimerických bílkovin. Nejznámějším důsledkem toho je cytoplasmatická samčí (pylová) sterilita (CMS, viz Ontogeneze).

Chondriom vyšších rostlin kóduje jen asi 20 bílkovin, z nichž některé spoluvytvářejí strukturu mitochondriálních ribosomů, jiné jsou součástí respiračního řetězce a funkce dalších je neznámá. Ostatní mitochondriální proteiny, včetně enzymů Krebsova cyklu, jsou importovány z cytosolu. Také tRNA mitochondrií jsou kódovány v jádře a dosud neznámým mechanismem transportovány do mitochondrií.

Mitochondriální genová exprese. Geny chondriomu jsou přepisovány RNA polymerasou bakteriofágového typu kódovanou v jádře. Promotory mitochondriálních genů se však prokaryotnímu konsensu nepodobají. Proteosyntéza probíhá na 70 S ribosomech.

Editování mRNA. V mitochondriích a plastidech rostlin dochází k rozsáhlému **editování mRNA**. Je to řízený proces vedoucí k tomu, že v některých případech tam, kde je kódován v DNA cytosin, se objevuje po jeho deaminaci na molekule mRNA uracil (tzn. jakoby na úrovni DNA byl thymin). Existují také případy opačné, kdy po aminaci se na místě uracilu objevuje cytosin. U některých mRNA bylo zjištěno, že stupeň jejich editování závisí na buněčném typu a že také jen částečně editované transkripty mohou být translatovány. Z jedné sekvence DNA tak je odvozena celá řada různých bílkovin. Je-li editování zcela narušeno, vznikají při translaci nefunkční, mutantní bílkoviny.

Reprodukce mitochondrií. Mitochondrie se množí, podobně jako plastidy, zaškrcováním.

2.1.1.6 Plastidy

Plastidy jsou semiautonomní, typicky rostlinné orgány. Přítomné jsou v cytoplasmě většiny rostlinných buněk (v počtu několika desítek až set). Jsou to kulovitá, vřetenovitá, nebo diskovitá tělíska viditelná ve světelném mikroskopu. Jejich obal je tvořen dvojitou membránou. Zahrnují řadu typů, od proplastidů o průměru menším než 1 μm až k chloroplastům dlouhým kolem 10 μm . Podle obsahu převládajících barviv je dělíme na zelené **chloroplasty**, žluté až červené **chromoplasty** a bezbarvé **leukoplasty**. V meristematických buňkách jsou **proplastidy**, z nichž během vývoje vznikají plně diferencované typy plastidů. V etiolovaných listech nebo ve stonkové dřeni existují slabě nažloutlé **etioplasty**, které můžeme pokládat za potenciální předstupeň chloroplastů. Plastidy jednoho typu mohou přecházet v jiný typ (mluvíme o **metamorfóze plastidů**).

Chloroplasty jsou fyziologicky nejvýznamnějším druhem plastidů, neboť v nich probíhá fotosyntetická asimilace oxidu uhličitého. Jejich struktura a funkce jsou popsány v kap. Fotosyntéza.

Chromoplasty obsahují karoteny a xanthofyly (viz Fotosyntéza), které jim dodávají žluté, oranžové nebo červené zabarvení, ale i určitou strukturu. Přítomné jsou hlavně v květech a plodech.

Leukoplasty jsou bezbarvé plastidy s různými funkcemi. Jestliže se v nich hromadí zásobní škrob, nazývají se **amyloplasty**. Jsou zejména v hlízách, semenech a kořenech. Pokud v kořenech probíhá asimilace nitrátu, pak jsou leukoplasty kořenových buněk místem, kde dochází k redukci nitritu. (Tento proces probíhá ale převážně v chloroplastech, viz Minerální výživa.)

Prokaryotní (endosymbiotický) původ plastidů

Vlastnosti plastidů svědčící o tom, že jsou prokaryotního původu:

- Jsou obklopeny dvojitou membránou. Předpokládá se, že její vnitřní část kdysi tvořila povrchovou membránu prokaryonta, zatímco vnější, obalová část patřila buňce hostitelské.
- Mají cirkulární DNA prokaryotního typu.
- Jejich proteosyntéza je vázána na 70 S ribosomy.
- Rozmnožují se jednoduchým dělením – zaškrcováním, tak jako prokaryota.

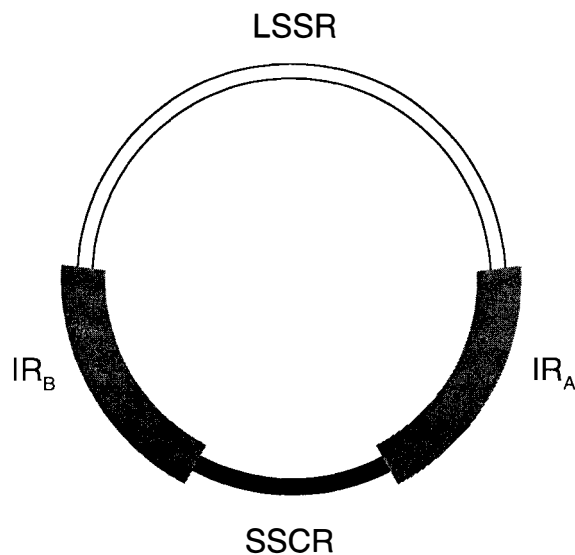
Vývoj endosymbiózy prokaryotního předka plastidů s eukaryotní buňkou byl procesem koordinace funkcí symbionta s jeho novým buněčným prostředím. Některé funkce se stávaly zbytečnými, což

vedlo k postupnému zmenšování genomu endosymbionta. Mnohé funkce bylo nutné sladit nejprve s procesy jednobuněčného hostitele, později i s vývojovými procesy mnohobuněčné rostliny. Hlavním způsobem řešení tohoto problému (který lze popsat jako problém koordinace procesů genové exprese) bylo „stěhování“ genů z prvotního plastidu do jaderného genomu. Dokladem toho je malá podjednotka enzymu Rubisko (viz Fotosyntéza), která je u zelených řas a vyšších rostlin kódována jádrem a u všech ostatních fototrofních eukaryot plastidem. Dvě třetiny ribosomálních bílkovin chloroplastu jsou kódovány v jádře. Výsledek vzájemných přesunů funkcí, genů a bílkovin mezi jádrem a plastidy je pak dokumentován na enzymech Calvinova cyklu, jenž je chimerou skládající se z komponent prokaryotického i eukaryotického původu.

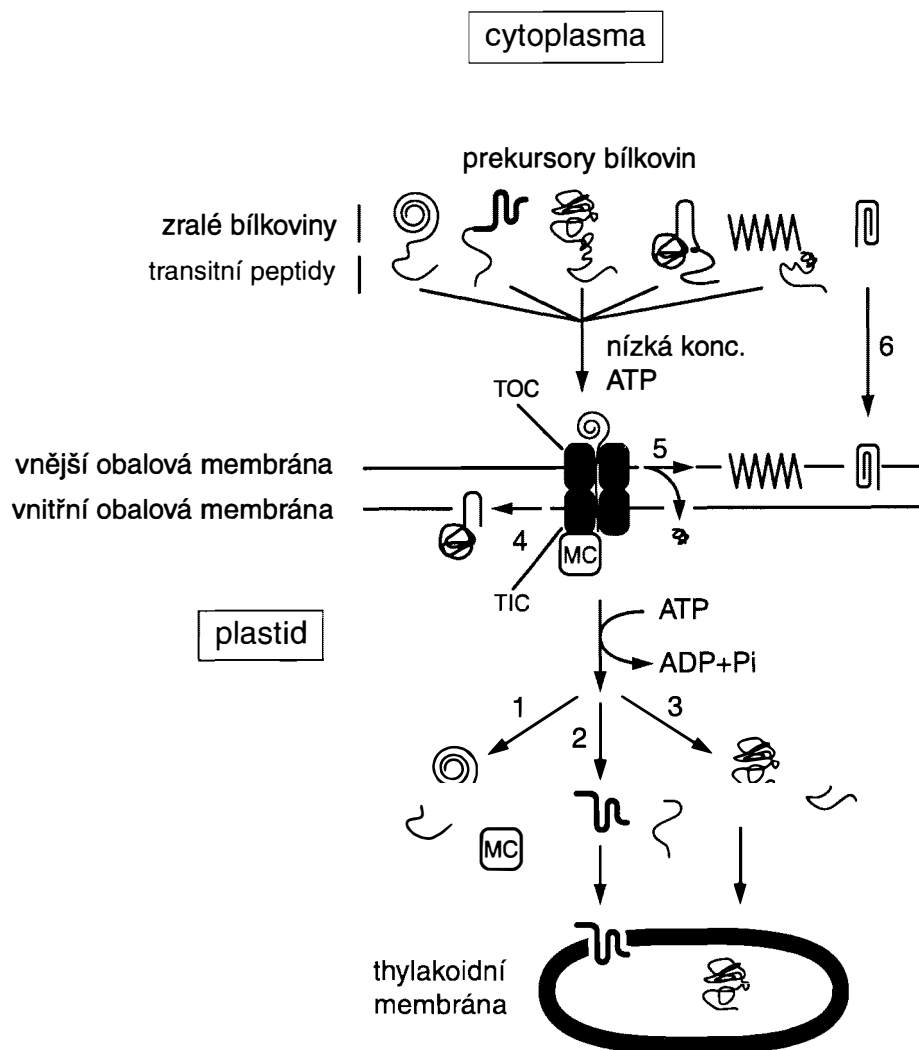
Plastidový genom (plastom) je vázán na cirkulární dvouřetězcovou DNA, na níž jsou geny po prokaryotickém způsobu uspořádány do operonů. Polycistronní mRNA je přepisována dvěma RNA polymerasami – nejprve jaderně kódovanou RNA polymerasou bakteriofágového typu a pak polymerasou kódovanou plastomem, funkčně identickou s polymerasou *Escherichia coli*. Také plastidové transkripty jsou v menší míře editovány (viz Mitochondrie).

Genom chloroplastů vyšších rostlin obsahuje asi 130 různých genů, které je možné rozdělit do dvou velkých funkčních kategorií: **1)** geny kódující bílkoviny fotosyntetického aparátu a **2)** geny kódující bílkoviny a RNA podílející se na genové expresi v plastidech (plastidová transkripce, translace).

Plastom vyšších rostlin (s výjimkou bobovitých) má velmi uniformní základní strukturu vyznačující se přítomností invertovaného opakování sekvence DNA. To znamená, že tento úsek DNA se vyskytuje v plastidovém genomu dvakrát. Mezi těmito identickými, pouze opačně orientovanými, úseky DNA se nacházejí dvě různě velké oblasti vyskytující se jen jednou – tzv. malá a velká oblast jedinečných genů (**obr. 9**). Každý plastid mesofylových buněk rychle rostoucího listu obsahuje asi 30 kopií plastidového genomu.



Obr. 9. Schéma plastidové DNA tabáku (*Nicotiana tabacum*). Úseky invertované duplikace IR_A a IR_B (zde lokalizované geny jsou v plastomu přítomny dvakrát) jsou vyznačeny jako šedé partie kruhu. Malá a velká oblast jedinečných genů (SSCR – small single copy region a LSSR – large single copy region) jsou vyznačeny jako černá a bílá část kruhu.



Obr. 10. Schéma importních mechanismů pro plastidové bílkoviny, které jsou syntetizovány v cytoplasmě. Většina importovaných bílkovin má transitní peptid (tj. lokalizační signál), který je po vtažení do nitra plastidu odštěpen. Chaperonové bílkoviny (MC), které využívají energie ATP, jsou hnací silou vtahovacího procesu. Bílkoviny bez dalších lokalizačních signálů zůstávají ve stromatu (1), membránové bílkoviny obsahují transmembránové domény (2, 4 a 5). Některé bílkoviny vnější membrány jsou inkorporovány přímo z cytoplasmy (6). Některé precursorové bílkoviny transportované do nitra (lumen) thylakoidů nesou další transitní peptid (3). TOC – transportní komplex vnější a TIC – transportní komplex vnitřní membrány chloroplastu.

Dělení plastidů

U vyšších rostlin neexistuje přímý vztah mezi buněčným cyklem a dělením plastidů. Plastidy mesofylových buněk se množí v závislosti na vývojovém stavu listu a intenzitě fotosyntézy. Přitom se značně mění množství kopií plastidového genomu připadajících na jeden plastid (u špenátu od 32 do 190 kopií).

Dělicí aparát plastidů je příbuzný bakteriálnímu. Příbuzní genů řídících buněčné dělení u bakterií označovaných jako FTS („filamentous temperature-sensitive“) byli zjištěni také u rostlin. Bílkovina *Arabidopsis* FtsZ (vzdálený příbuzný eukaryotického tubulinu) je kódována v jádře, ale nese plastidový lokalizační signál. Transgenní rostliny *Arabidopsis*, které mají potlačenou expresi bílkoviny FtsZ, mají snížený počet plastidů v mesofylových buňkách. Dělení plastidů zaškrcováním se účastní bílkovinné komplexy jak uvnitř, tak na povrchu plastidů.

Řídící úloha bílkovin kódovaných v jádře při biogenezi plastidů

Řídící úloha jaderného genomu při regulaci exprese plastidového genomu se uplatňuje zejména na posttranslační úrovni. Bílkoviny kódované v jádře ovlivňují stabilitu a úpravy plastidových mRNA (včetně editování, tj. záměny cytosinu za uracil v sekvenci mRNA, viz také kap. Mitochondrie), jejich translatovatelnost, stabilitu bílkovin a vznik bílkovinných komplexů.

Důležitou roli v interakci plastidů s „hostitelskou“ buňkou mají cesty, kterými jsou do plastidů dopravovány bílkoviny syntetizované v cytoplasmě (**obr. 10**). Většina prekursorů bílkovin transportovaných z cytoplasmy do plastidů má na N-konci **transitní peptid** nesoucí informaci pro transport do stromatu přes dvojitou plastidovou membránu. Někdy může být složen ze dvou částí, z nichž druhá zajišťuje lokalizaci např. do lumen thylakoidu. Tento transitní peptid je po vtažení bílkoviny translokačním pórem do plastidu odštěpen. Transitní peptid má velmi proměnlivou primární strukturu. Informace pro plastidovou lokalizaci je „nesena“ prostorovým uspořádáním této domény bílkoviny. Předpokládá se, že energii potřebnou ke vtažení prekursorové bílkoviny do plastidu poskytují chaperonové bílkoviny příbuzné HSP70, které jsou součástí multimolekulárních translokačních komplexů vnější (TOC, transport outer chloroplast membrane) a vnitřní (TIC, transport inner chloroplast membrane) plastidové membrány.

Vzájemná koordinace funkcí plastidů a mitochondrií

Fungování systému semiautonomních organel v rostlinné buňce je koordinováno řadou přímých či nepřímých interakcí v nichž koordináční úlohu má informace exprimovaná z jaderné DNA. Vzhledem k dominantnímu postavení obou těchto organel v energetickém metabolismu není překvapením, že při oslabení funkce plastidů (např. u mutanta ječmene *albostrians*) dochází ke kompenzačnímu posílení funkce mitochondrií počínaje množstvím počtu kopií DNA na organelu a jejich zvětšením. Buňka tak vyrovnává deficit produkce ATP v oslabené fotosyntéze posílením oxidační fosforylace v mitochondriích.

2.1.1.7 Cytoskelet

Cytoskelet je systém bílkovinných trubic – **mikrotubulů** a vláken – **mikrofilament** procházejících cytoplasmou a interagujících s endomembránovými kompartmenty i plasmalemou. Přítomen je ve všech eukaryotních buňkách. Tvoří vnitrobuněčný skelet, k němuž jsou přichyceny mnohé organely a makromolekulární útvary tak, že se po něm mohou pohybovat jako po vodících lištách nebo kolejkách. Cytoskelet má centrální úlohu při buněčném dělení. Determinuje tvar rostoucích buněk a prostorové rozmístění buněčných struktur.

Cytoskelet rostlinné buňky

Svéráz rostlinného cytoskeletu je dán tím, že je součástí buněk přisedlého organismu s rigidními buněčnými stěnami, neumožňujícími aktivní přesuny buněk a pletiv. Je odolný vůči stresům, zvláště chladovému šoku. Svým uspořádáním rozhodujícím způsobem ovlivňuje morfogenezi buňky. Sestává ze vzájemně propojených **sítí mikrotubulů a aktinových filament**.

a) Mikrotubulární cytoskelet

Mikrotubuly vznikají samsopřádáváním dimerů bílkovin α a β -tubulinů aktivovaných vazbou GTP. Rostlinné tubuliny jsou homologní k ostatním eukaryotním tubulinům a stejné jsou i stavba, dynamika a základní vlastnosti jimi tvořených mikrotubulů. **Rostliny mají velké rodiny α a β -tubulinů, které jsou často exprimovány tkáňově specificky.**

Mikrotubuly (a také aktinová mikrofilamenta) jsou polarizované – na jednom konci (+) jsou velmi dynamické, na druhém (-) jsou relativně stabilní. Mezi procesy růstu a rozpadu mikrotubulů

(a mikrofilament) existuje neustále proměnlivá dynamická rovnováha, která vede buď k růstu či spíše zkracování elementů cytoskeletu.

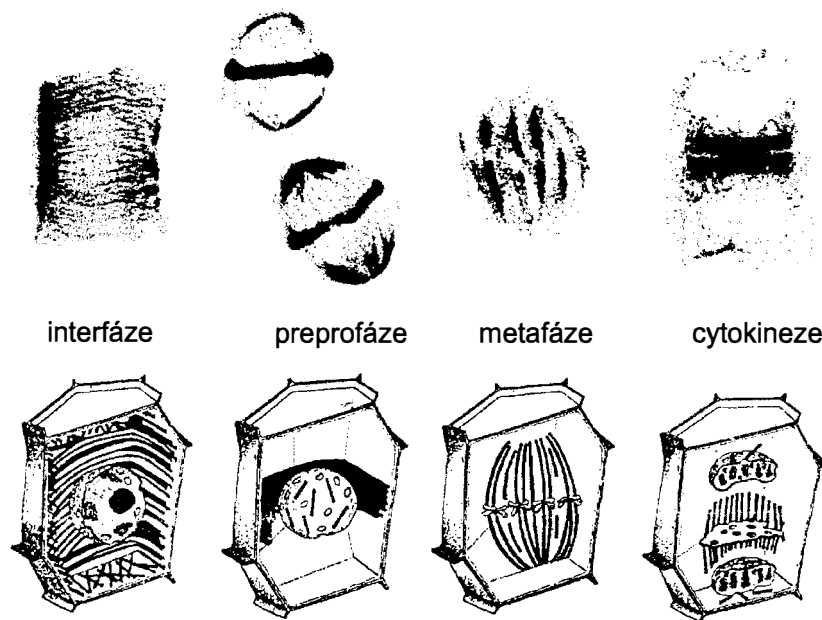
Mikrotubulární organizační centra – MTOC

Pro tvorbu tubulárního cytoskeletu jsou klíčová tzv. centra řídící mikrotubuly (microtubule organizing centers – MTOCs). Vyšší rostliny nemají centrosom (centriolu), který slouží jako dominantní MTOC u živočichů. U rostlin se vyskytuje mnoho domén na plasmalemě a jaderné membráně, které mohou iniciovat výstavbu mikrotubulů, zvláště v závislosti na fázi buněčného cyklu. Během interfáze slouží jako hlavní organizační centrum kortikálních mikrotubulů plasmalema. Při přechodu do mitózy se dominantními stávají MTOC na povrchu jaderné membrány případně na povrchu perinukleárních elementů GA. Tato MTOC organizují mikrotubuly mitotického vřetenka.

Podobně jako v centrosomu živočišných buněk, je klíčovou součástí MTOC u rostlin γ -tubulin, který má (na rozdíl od 50 kDa α a β -tubulinů) hmotnost 58 kDa. Tvoří nadmolekulární prstencovité komplexy, tzv. gamasomy, z nichž po napojení první α -tubulinové podjednotky dále roste od minus konce mikrotubulus na plus konci.

MAPs – bílkoviny asociované s mikrotubuly

Důležitou součástí mikrotubulárního cytoskeletu jsou bílkoviny spojené s mikrotubuly (microtubule-associated proteins, MAPs), které je spojují do svazků a sítí a umožňují jejich interakci s membránovým systémem a organelami. Nápadná odolnost rostlinných mikrotubulů vůči chladu je dána také přítomností specifických MAPs. U rostlin funguje jako MAP fosfolipasa D (PLD), která má schopnost připojovat mikrotubuly k cytoplasmatické membráně v závislosti na vápníku a fosfatidylinositolech (viz 11.2). U rostlin byly také nalezeny např. kateniny, bílkoviny, které katalyzují štěpení dlouhých mikrotubulů na kusy a tak se podílejí na regulaci jejich dynamiky.



Obr. 11. Čtyři hlavní způsoby uspořádání tubulinového cytoskeletu v průběhu buněčného cyklu rostlinné buňky. **A** – v interfázi dominují kortikální mikrotubuly; **B** – před nástupem mitózy se tvoří preprofázický pás mikrotubulů, který vyznačuje polohu fragmoplastu a tedy budoucí buněčné stěny; **C** – mitotické vřetenko; **D** – mikrotubuly fragmoplastu během cytokineze.

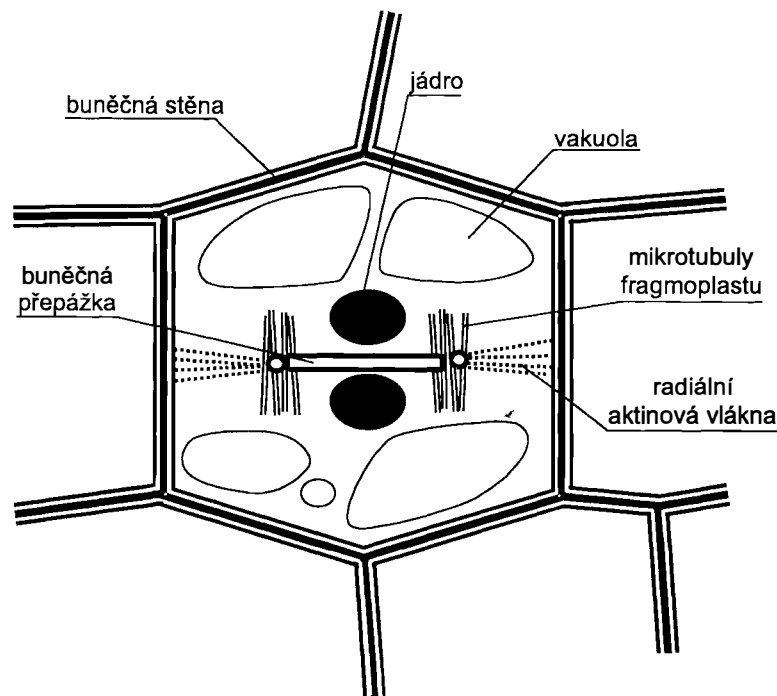
Mikrotubulární „motory“

Mikrotubuly slouží jako „koleje“ pro vnitrobuněčný provoz – zvl. transport buněčných váčků – díky tzv. **mikrotubulárním „motorům“**. To jsou bílkoviny, které mají schopnost pohybovat se za spotřeby ATP po mikrotubulech, ale pouze v jednom směru. Existuje jich proto v buňce více. Motory typu **kinesinu** (u *Arabidopsis* kolem 60 genů) se pohybují některé od minus konce mikrotubulů k plus konci, ale jiné ve směru opačném tj. od plus k minus (jako je tomu u živočišného dyneinu, který ovšem nebyl u *Arabidopsis* nalezen). Rostlinné kinesiny jsou strukturně i funkčně velmi rozrůzněné, jak odpovídá nárokům na dynamiku MT při regulaci buněčné morfogeneze. Některé typy jsou regulovány vápníkem spolu s kalmodulinem (viz vápník jako druhý posel – 11.2). Orientovaný transport buněčných váčků, ale také specifická lokalizace komplexů obsahujících mRNA, jsou závislé na těchto mikrotubulárních motorech.

b) Aktinový cytoskelet

F-aktinová mikrofilamenta (F od fibrilární, vláknitý) se skládají z monomerních podjednotek bílkoviny G-aktinu (G od globulární) aktivovaných navázáním ATP. Také aktinová vlákna mají + a – konec. I v případě aktinu nalézáme u rostlin rodiny genů, jejichž exprese je tkáňově specifická.

Existuje velká řada bílkovin, které interagují jak s G-aktinem tak s F-aktinem, nepočítaje v to aktinové „motory“. Jejich studium u rostlin je dosud v začátcích. Nejlépe prostudovaný je **profilin**, který váže monomerní G-aktin a *in vivo* katalyzuje výměnu ADP za ATP na aktinových podjednotkách a tak stimuluje skládání mikrofilament. Profilin ovšem váže také fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát a spojuje tak dynamiku aktinového cytoskeletu s fosfatidylinositolovou signální kaskádou (viz 11.2). **Faktory depolymerizující aktin (ADF)**, které stimuluji depolymeraci aktinového cytoskeletu, se podílejí na regulaci jeho dynamiky. Iniciační lokalizované tvorby aktinových vláken probíhá několika způsoby. Na tzv. Arp2/3 komplexech (Actin related protein) se mohou aktinová vlákna zároveň větvit. Na tzv. forminových komplexech začíná sestavování nevětvených vláken F aktinu. Tyto bílkovinné komplexy jsou regulovány signály malých GTPas typu Rac/Rho (u rostlin Rop/Rho).



Obr. 12. Cytokineze v rostlinné buňce – schéma fragooplastu. Aktinová vlákna propojují centrifugálně rostoucí okraj fragooplastu, tvořeného mikrotubuly a sekretorickými váčky, s kortikální oblastí buňky – budoucím místem splynutí mateřské a dceřinné buněčné stěny.

Podobně jako mikrotubuly mají i **aktinová mikrofilamenta své „motory“**. Ty jim umožňují měnit vzájemnou polohu, ale také transportovat náklad za spotřeby energie ATP. Aktinové motory se jmenují **myosiny**. Nejnápadnějším projevem pohybu založeném na aktinovém cytoskeletu je **proudění cytoplasmy, tzv. cyklosa**. Specifický typ myosinu se také podílí na regulaci průchodnosti plasmodesmů (viz dále).

Aktinový cytoskelet v mnoha fázích buněčného cyklu má částečně stejnou lokalizaci jako mikrotubuly a jako specifické úseky ER napojené na plasmalemu. Tím se aktinový cytoskelet stabilizuje.

c) Cytoskelet v buněčném cyklu

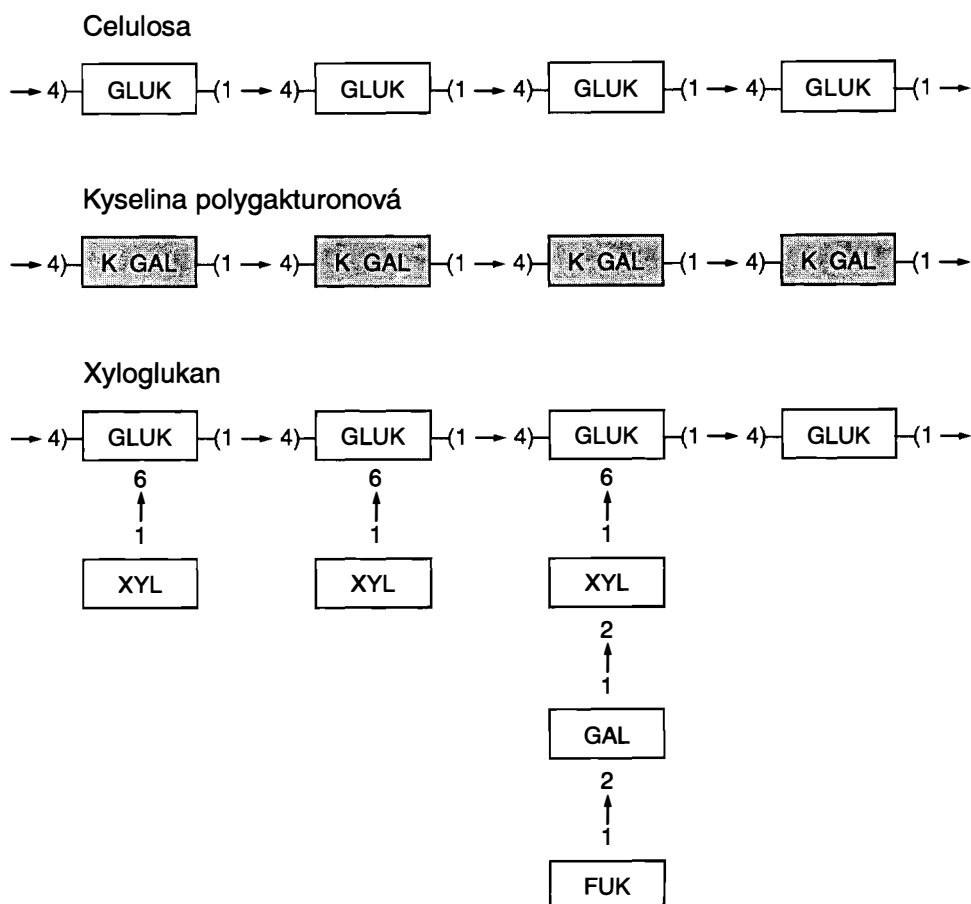
Jak bylo uvedeno, poloha a funkce MTOC se během buněčného cyklu mění. V jeho průběhu rozeznáváme čtyři základní konfigurace mikrotubulárního cytoskeletu (**obr. 11**):

1. Pro interfázickou buňku je typická **kortikální lokalizace** mikrotubulů. To znamená, že v buňce jsou mikrotubuly uspořádány převážně v blízkosti jejího vnitřního povrchu, v kontaktu s plasmalemou. Zpočátku většinou neuspořádaně či podélně, později příčně k ose prodlužování diferencující se buňky.
2. Před nástupem profáze dochází k reorganizaci kortikálního mikrotubulového cytoskeletu nejen pomocí depolymerace a repolymerace na novém místě, ale možná také „přetahováním“ celých mikrotubulů (pomocí aktinu) do roviny budoucího dělení buňky. Výsledkem je zaostřený prstenec mikrotubulů, který se nazývá **preprofázický pás mikrotubulů** („preprophase band“ PPB, **obr. 11**). Tato struktura chybí v některých buněčných typech spojených s generativní fází – při dělení buněk endospermu, při meiosi a pylových mitosách. Embryonální mutant *Arabidosis* zvaný *ton2/fass* nevytváří PPB, což vede k nepravdělnostem v morfogenezi buněk. V souladu s tím, co jsme napsali v úvodu o celistvosti rostlin, však takto postižené rostliny přesto vytvářejí všechny typy pletiv a orgánů na správném místě a tato mutace není letální. Zvláštností rostlinné mitosy je přechodná tvorba profázického vřeténka mikrotubulů kolem rozvolňující se karyotheky.
3. Nástup mitosy je doprovázen vznikem **dělicího vřeténka** (**obr. 11**), jež postupně nahrazuje PPB. Je tvořeno svazky tzv. kinetochorových mikrotubulů (připojených na kinetochor v centroměře chromosomů) a dalších volných mikrotubulů, které svým minus koncem končí na jednom z polů vřeténka, kde jsou značně difuzní MTOC. Základní mechanismus mitosy u rostlin odpovídá obecnému eukaryotickému schématu, detaily mechaniky pohybu rostlinných chromosomů během mitosy však zatím zůstávají nejasné.
4. Tam, kde později v telofázi a cytokinezi vzniká nová buněčná stěna, se organizují krátké **mikrotubuly fragmoplastu** (**obr. 11, 12**). Jsou uspořádány tak, že vytvářejí dva prstence mikrotubulů, které se překrývají svými plus konci a tvoří spolu jakýsi expandující supraprstenec. Mikrotubuly fragmoplastu slouží jako „koleje“ pro přísun membránových váčků, jejichž splýváním vznikají dceřinné plasmalemy a zároveň jejich pektinový obsah vytváří centrifugálně (tj. od středu k obvodu buňky) buněčnou přepážku – **střední lamelu** – po níž následuje tvorba primární buněčné stěny (srov. Buněčná stěna). Součástí fragmoplastu jsou také radiální aktinová mikrofilamenta, která jej na jeho okraji připojují k plasmalemě v místě, které bylo předurčeno PPB (**obr. 12**). Zdá se, že aktinový cytoskelet spoluřídí orientaci mitotického mikrotubulárního vřeténka vzhledem k povrchu buňky.

2.1.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna je vnější kompartment rostlinné buňky, vymezující její velikost a tvar. Složená je převážně z molekul **celulosity** uspořádaných do mikrofibril, z **xyloglukanů** (dříve hemicelulos) a z **pektinů** (polygalaktouronanů – **obr. 13**).

Minoritní složkou buněčných stěn je **kalosa**. Je to amorfni β -1,3-glukan, který je přechodně vytvářen kalosasyntasovými komplexy na plasmalemě při cytokinezi a je součástí buněčných stěn pylových



Obr. 13. Schématické uspořádání molekul základních polysacharidů buněčné stěny. Celulosa je tvořena molekulami glukosy spojenými vazbami 1–4. Polygalakturonan (kyselina polygalakturonová, příklad jednoduchého nevětveného pektinu) je tvořen molekulami kyseliny galakturonové spojenými vazbami 1–4. Příklad xyloglukanu (dříve hemicelulosa), jehož základní páteř je také tvořena molekulami glukosy z nichž některé jsou vazbou 1–6 spojeny s xylosou a ta dále spojena vazbami 1–2 se zbytky galaktosy a fukosy apod.

láček. Kalosa má velký význam při reakci rostlin na poranění, kdy je její syntéza aktivována zvýšením koncentrace volného cytoplasmatického vápníku (viz 10.1 – Hojení ran).

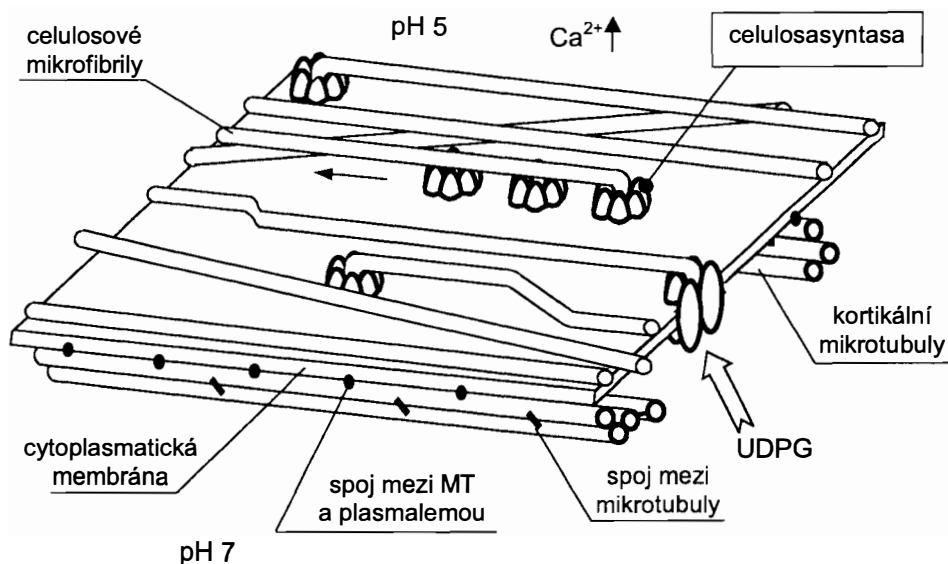
Buněčné stěny obsahují také řadu různých strukturních a regulačních **bílkovin**. Sekundární buněčné stěny jsou impregnovány **ligninem** a **suberinem**. Epidermis je kryta kutikulárními **vosky**.

U krytosemenných rozlišujeme dva základní typy buněčných stěn:

Stěny typu I (dvouděložné a jednoděložné kromě trav) mají vysoký obsah pektinů a zhruba stejný obsah xyloglukanů a celulosy.

Stěny typu II (trávy a příbuzné taxony) mají nízký obsah pektinů a obsahují celulosu spolu s glukuro-noarabinoxylany (viz dále).

Jestliže pomocí enzymů rozložíme buněčné stěny pletiva, získáme nahé kulové protoplasty, které mohou v isotonickém mediu přežít, ale bez buněčné stěny samostatně žít nemohou. Obvykle si velmi rychle vytvoří stěnu novou (viz 12.6).



Obr. 14. Úloha kortikálního mikrotubulového cytoskeletu při orientaci ukládání celulosy. Terminální komplexy se mohou pohybovat (tlačeny soukající se mikrofibrilou) v plasmalemě pouze ve směru paralelním ke kortikálním mikrotubulům. Tak vzniká paralelní uspořádání mikrotubulů a mikrofibril nejmladší vrstvy buněčné stěny. Gradient pH mezi vnitřkem a vnějškem buňky je nutný pro aktivitu celulosasyntasových komplexů.

Stavba buněčné stěny

Podle způsobu tvorby, chemického složení, struktury a funkce rozlišujeme tři složky buněčné stěny: **1) střední lamelu, 2) stěnu primární a 3) stěnu sekundární**, která je ale přítomná jen v určitých typech buněčných stěn, jako produkt tzv. druhotného tloustnutí.

a) Střední lamela

Střední lamela je ontogeneticky nejstarší součástí buněčné stěny a je spojovacím tmelem buněk, které k sobě přiléhají. Její tvorba začíná v poslední fázi jaderného dělení (v telofázi), kdy mikrotubuly v ekvatoriální oblasti buňky vytvářejí fragmoplast. Na začátku buněčného dělení (cytokineze) se do této oblasti přemísťují váčky Golgiho aparátu obsahující pektiny a zde splývají. Tím vzniká buněčná přepážka, která dále roste směrem ke stěnám (centrifugálně) a posléze se s nimi spojí (**obr. 12**). (U živočichů probíhá tento proces centripetálně, zaškrcováním aktinovým prstencem.) Tak vzniká střední lamela. Na počátku je střední lamela gelovitá, neboť je tvořena převážně pektiny (polymery kyseliny α -D-galakturonové). Na obou površích střední lamely vznikají plasmatické membrány dceřinných buněk.

b) Primární stěna

Mezi střední lamelou a plasmalemou dceřinných buněk se tvoří nové primární buněčné stěny sekrecí membránových váčků (s pektiny a xyloglukany) a syntézou celulosových mikrofibril na povrchu plasmalemy.

Primární stěna a expanzní růst buňky. Již během tvorby primární stěny nebo hned poté, dochází ke zvětšování objemu buňky. To je vyvoláno tlakem protoplastu přijímajícího vodu a umožněno plošným rozpínáním buněčné stěny, které je ve své první fázi vratné (podobně jako rozpínání gumového kroužku), v další fázi nevratné. První proces, při kterém jsou chemické vazby mezi různými složkami primární stěny zachovány, je projevem její **elasticity**. Druhý proces, při kterém jsou tyto vazby částečně rozrušeny a do rozvolněné struktury je ukládán nový stavební materiál, je projevem její **plasticity**, tj. roztažnosti nevratné (viz také Objemový růst buněk a Fytohormony). Když je expanzní růst ukončen, primární buněčná stěna je ve svém konečném stavu fixována křížovými chemickými vazbami.

Struktura primární stěny. Xyloglukany (hemicelulosa) a pektiny, syntetizované v Golgiho aparátu, jsou do rostoucí buněčné stěny transportovány sekretorickými váčky. Vytvářejí základní hmotu stěny, matrix (**obr. 15**). Xyloglukany nebo glukuronoarabinoxylany jsou elementy, které nekovalentně křížově propojují mikrofibrily celulosy. **Celulosa v podobě mikrofibril**, uložených v matrix, je syntetizována tzv. **terminálními komplexy** (rosetami složenými ze subkomplexů enzymu celulosasyntasy) lokalizovanými v plasmalemě (**obr. 14**). Bezprostředním **prekursorem** celulosy je uridindifosfoglukosa (**UDPG**). Tento nukleotidový substrát vstupuje do terminálního komplexu z cytoplasmatické strany plasmalemy, zatímco celulosové mikrofibrily jsou syntetisovány na její vnější povrch.

Orientaci právě ukládaných celulosových **mikrofibril** na povrchu plasmalemy určuje **systém kortikálních mikrotubulů** uložených pod jejím vnitřním povrchem (**obr. 14**). MT totiž vymezují směr pohybu terminálních komplexů v plasmalemě. Ty se pohybují v rovině membrány tlačeny syntetizovanou (vysouvanou) mikrofibrilou. Tento model není ovšem všeobecně přijímán. Existují alternativní hypotézy vysvětlující uspořádání mikrofibril na základě jejich vlastností a změn geometrie stěny během jejího růstu.

Uspořádání celulosových fibril v primární stěně se během vývoje buňky značně mění. V meristematických, ještě více méně isodiametrických buňkách, jsou většinou orientovány náhodně v rovině buněčné stěny. Při expanzním růstu se jednotlivé nově ukládané fibrily orientují vzájemně paralelně a to kolmo ke směru, ve kterém se buňka prodlužuje, neboť ve směru podélném nejsou roztažitelné. Způsobem jejich uložení tak je determinován směr buněčné expanze.

c) Sekundární stěna a její impregnace ligninem

Po ukončení expanzního růstu se v některých buňkách tvoří stěna sekundární – tím, že ze strany plasmalemy se na primární stěnu ukládají nové vrstvy. Ty obvykle obsahují, kromě celulosy, pektinů, xyloglukanů a dalších látek, také 20–35% ligninu. (Některé sekundární stěny, např. vlákna osemení bavlníku a sklereidy, jsou ale téměř výhradně složeny z celulosy.) Impregnace buněčných stěn ligninem je podstatnou součástí dřevnatění. Lignin stěnám dodává extrémní odolnost proti roztržení a rozlomení a přitom zachovává jejich pružnost. Také zmenšuje jejich prostupnost pro vodu.

Lignifikace

Lignifikace je nejrozšířenější způsob impregnace buněčných stěn. Lignin je polymer, tvořený různými monomery, odvozenými od kyseliny skořicové (viz Sekundární metabolismus). Ta je modifikována hydroxylací, methylací či redukcí a tak vznikají prekursory ligninu včetně kyseliny ferulové, hořčičné, kávové, coniferylalkoholů apod. To se děje v Golgiho aparátu, odkud jsou prekursory ligninu exportovány do stěny. Zde jsou dehydrogenovány peroxidasami za vzniku volných reaktivních radikálů. Ty pak samovolně polymerují a vytvářejí lignin. Rozsah lignifikace závisí na druhu pletiva. Nejvíce se uplatňuje u dřevin.

V sekundární stěně lze často rozlišit tři i více rozdílných vrstev, které se liší orientací celulosových mikrofibril. Takováto laminátová struktura dále značně zvyšuje pevnost stěny. Buňky s druhotně ztlustlými stěnami (např. elementy tracheí a tracheidy, dřevní vlákna a buňky kolenchymatické) často mají důležité speciální funkce.

Kutikula, korek, exina

Epidermis stonkových orgánů je pokryta kutikulou, která vzniká impregnací vnějších buněčných stěn hydrofobním **kutinem** a překrytím vrstvičkou vosku. Kutinu podobný **suberin** vytváří Caspariho proužky v kořenovém endodermis (viz Rostlina a voda) a ukládá se také ve z korkovatělých buněčných stěnách.

Exina pylových zrn je tvořena komplexním polymerem různých fenolů zvaným **sporopolenin**, který se vyznačuje mimořádně vysokou fyzikálně-chemickou odolností. Ta umožňuje **paleopalynologům** studovat povrchovou strukturu pylových zrn starých desítky miliónů let a rekonstruovat složení fosilních rostlinných společenstev.

d) Bílkoviny buněčné stěny

Buněčná stěna obsahuje kolem 100 různých bílkovin – enzymů a bílkovin strukturních i regulačních, které se do ní dostávají spolu s obsahem exocytotických váčků a mají většinou povahu glykoproteinů. Přesto, že všechny tyto bílkoviny tvoří jen zlomek hmotnosti stěny, mají často rozhodující vliv na její vlastnosti a funkce.

Většina bílkovin buněčné stěny ovlivňuje její mechanické vlastnosti. Pro funkci **extenzinů**, jež patří do **skupiny bílkovin bohatých na hydroxyprolin**, jsou důležité tyrosiny v jejich polypeptidových řetězcích, které umožňují četná kovalentní propojení (katalyzovaná peroxidasami) uvnitř i mezi jednotlivými molekulami extensinu prostřednictvím dityrosinových můstků. Tato modifikace se významně podílí na snižování elasticity buněčné stěny. Do této skupiny patří také bílkoviny bohaté na prolin a glycin.

Stěnové **pektinmethyltransferasy** katalyzují **methylaci pektinů**, která snižuje tvorbu vápníkových můstků a tím zvyšuje plasticitu stěny. **Pektinesterasy katalyzují jejich demethylaci**, která má účinek opačný. Vápník, jako dvojmocný kationt, má schopnost propojovat polysacharidové řetězce nemethylovaných kyselých pektinů.

Za důležité enzymy regulující mechanické vlastnosti buněčné stěny byly tradičně považovány vedle extensinu stěnové glukonasy a *trans*-glykosylasy, jako faktory ovlivňující rozvolnění stěny. Nedávno byla zjištěna nová třída bílkovin – **expansinů**, které mají schopnost velmi specificky ovlivňovat roztažnost stěny. Expansiny způsobují uvolnění nekovalentních vazeb mezi celulosou a xyloglukany. Expansiny exprimované jen v určitých typech pletiv přispívají ke specifickým rozdílům v mechanických vlastnostech buněčných stěn. Regulovanou lokalizací do ohraničených oblastí povrchu buněk (zvl. v oblasti epidermis), přispívají k morfogenezi buněk, pletiv a orgánů .

e) Spojení plasmalemy s buněčnou stěnou

Již jednoduchá mikroskopická pozorování buněk plasmolyzujících v hypertonickém prostředí (viz Rostlina a voda) vedla k odhalení pevných spojů mezi plasmalemou a buněčnou stěnou. Při odtržení povrchu protoplastu od buněčné stěny je možné pozorovat přetrvávající spojení mikrodomén plasmalemy se stěnou – vznikají tak tenká vlákénka plasmalematických tubulů, která spojují povrch kolabovaného protoplastu s buněčnou stěnou, tzv. **Hechtova vlákna**. Celé uspořádání vypadá jako centrální protoplast s paprčitými cytoplasmatickými „ostny“ přivěšenými k plasmalemě (obr. 25D).

Pro přenos mechanických signálů mezi stěnou a protoplastem (mezi symplastem a apoplastem) jsou důležité nedávno objevené **membránové proteinkinasy asociované s buněčnou stěnou** (wall associated kinases – **WAKs**). Jejich extracelulární doména je napojena na pektiny v buněčné stěně a cytoplasmatická doména reagující na stav extracelulární domény funguje jako serin-threoninová kinasa. Dobře popsáním spojem mezi plasmalemou a stěnou jsou také **arabinogalaktanové bílkoviny**, které jsou zakotveny na vnější (extracelulární) straně plasmalemy přes tzv. **glykosylfosfatydilinositolovou (GPI) kotvu** a silně glykosylovanou N-doménou interagují s polysacharidy buněčné stěny.

f) Celkové uspořádání polymerů buněčné stěny rostlin (obr. 15)

Primární buněčná stěna je tvořena dvěma (někdy třemi) nezávislými, navzájem interagujícími sítěmi polymerů. Velmi zjednodušeně se část vlastností buněčné stěny dá přirovnat k železobetonu ovšem

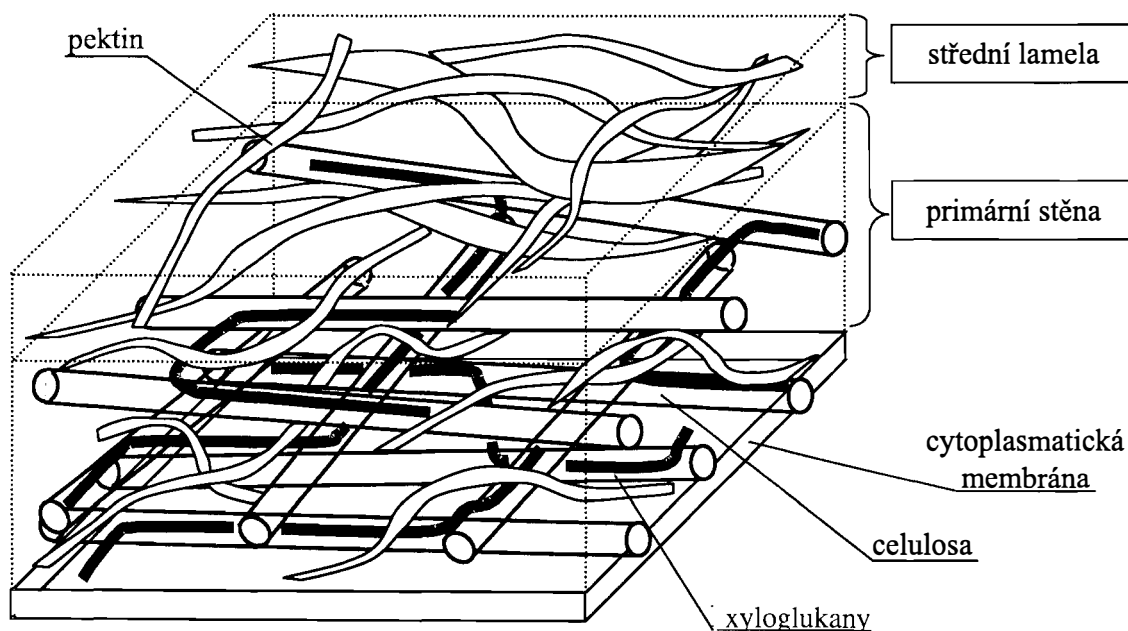
s tou výhradou, že buněčná stěna je nejen pevná, ale také pružná a propustná pro vodu a mnohé v ní rozpuštěné látky. Necelulosní matrix tvořená pektiny má funkci podobnou betonu a celulosní mikro-fibrily propojené xyloglukany mají funkci jako ocelové konstrukce zanořené v betonu. Jednotlivé mikro-fibrily celulosy jsou velmi pevné, ale nejsou dost dlouhé, aby vytvářely spojitou strukturu kolem celé buňky. Navzájem propojená struktura vzniká napojením xyloglukanů na mikro-fibrily prostřednictvím vodíkových můstků. Tato „kostra“ je ponořena do sítě (matrix) pektinů (**obr. 15**). **Roztažnost pektinové sítě závisí na tzv. vápníkových můstcích**, které mají schopnost nekovalentně křížově propojovat řetězce pektinů, nejsou-li methylovány. Vápník tak podporuje tuhnutí pektinů. Další, částečně nezávislou, síť mohou vytvářet bílkoviny typu extensinu.

g) Buněčná stěna a diferenciaci buněk

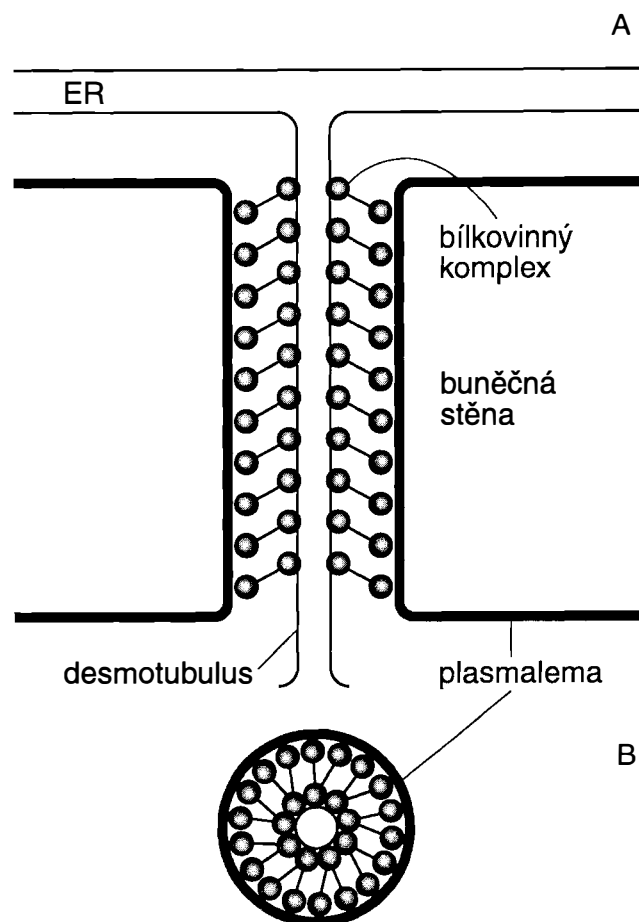
Různé druhy rostlin, pletiva téhož druhu, jednotlivé buňky téhož pletiva a dokonce různé oblasti buněčné stěny téže buňky se mohou značně lišit chemickým složením a prostorovým uspořádáním polymerů buněčných stěn. Tyto rozdíly jsou jedním z nejvýraznějších projevů diferenciaci rostlinných buněk (viz Ontogeneze).

h) Funkce buněčných stěn:

1. Zajišťují mechanickou stabilitu buněk, pletiv a orgánů a zabraňují prasknutí protoplastů v důsledku jejich turgorového tlaku.
2. Fungují jako permeabilní membrány (volně propustné pro vodu a v ní rozpuštěné živiny).
3. Vytvářejí strukturu vodivých pletiv sloužících k dálkovému transportu vodných roztoků v rostlině.
4. Na povrchu stonkových orgánů jsou pokryty kutikulou a vytvářejí bariéru pro únik vody z rostliny.
5. Účastní se procesů morfogeneze. Spolu s cytoskeletem a bílkovinami, spojujícími (přes plasmalemu) vnitřek buňky s povrchem, tvoří celistvý systém, důležitý pro vnímání polohové informace a řízení



Obr. 15. Zjednodušený model buněčné stěny, který ukazuje uspořádání tří základních stěnových polysacharidů. Xyloglukany (hemicelulosy) jsou napojeny na povrch celulosových mikro-fibril, propojují je a přispívají tak k celkové pevnosti této sítě buněčné stěny. Pektiny tvoří nezávislou síťovinu vláknitých molekul, která proniká sítí celulosy a hemicelulosy (zde jako základní hmota stěny). Střední lamela je ovšem tvořena pouze touto sítí. V obrázku není znázorněna další síťovina tvořená strukturálními bílkovinami buněčné stěny (zvl. extensiny).



Obr. 16. Model plasmodesmu. Jeho středem prochází tubulus ER (endoplasmatického retikula) – desmotubulus. Průchodnost plasmodesmů je regulována bílkovinnými komplexy, jejichž součástí je myosin. **A** – řez podélný, **B** – příčný.

polarity a diferenciaci buněk. K těmto funkcím patří vnímání a mezibuněčný přenos tlakových - mechanických signálů.

6. Jsou prostorem, do kterého buňka vylučuje přebytečné minerální sole a některé odpadní metabolity, případně i xenobiotika. Ve zvláštních případech může sloužit jako zásobárna metabolizovatelných (a mobilizovatelných) polysacharidů (viz kap. 8)
7. Chrání buňku před napadením houbovými a bakteriálními patogeny. Ochranný vliv má zvl. impregnace bílkovinami a ligninem. Fragments buněčné stěny mohou vyvolávat sekreci obranných látek a morfogenní reakce (viz Fyziologie stresu a Fytohormony).
8. Je zásobárnou apoplastického vápníku, který – v odpověď na specifické podněty – může jako tzv. druhý posel přecházet specifickými kanály ze stěny do cytoplasmy a zde aktivovat různé enzymy (viz 4.6 a 11.2).

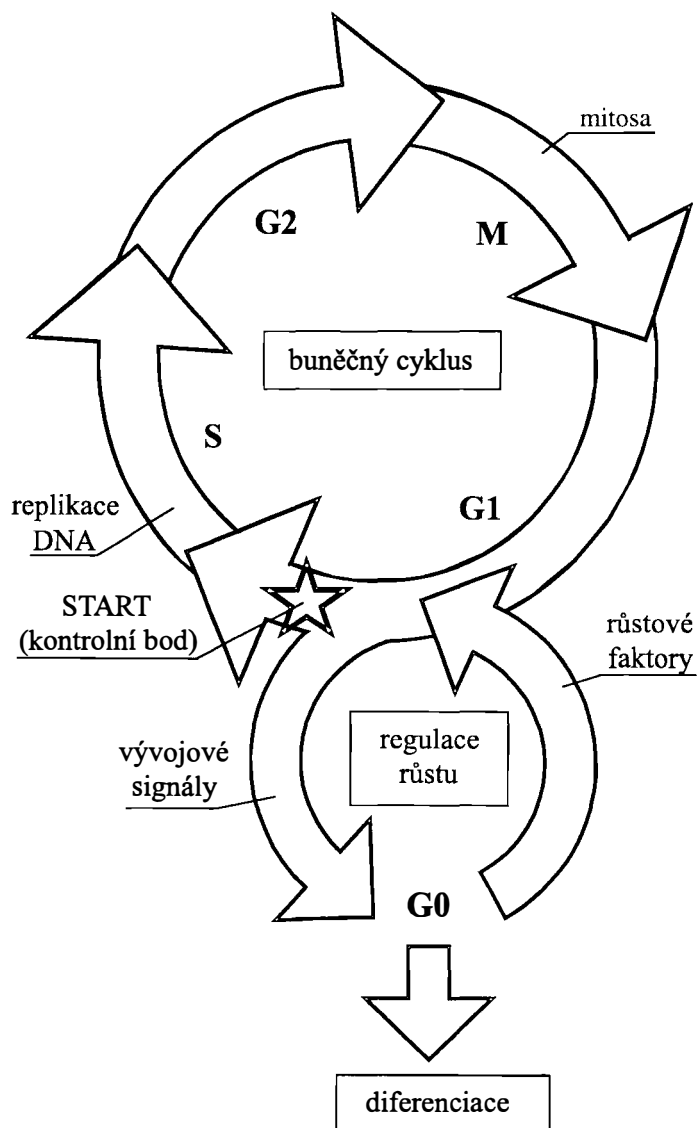
2.1.3 Plasmodesmy

Plasmodesmy jsou cytoplasmatická spojení protoplastů buněk, které spolu sousedí (**obr. 16**). Tvoří je kanálek v buněčné stěně „vystlaný“ plasmalemou, kterým prochází tubulus ER – tzv. desmotubulus. Na 1 mm² stěn, které jsou v kontaktu se stěnami sousedních buněk, připadá 10³–10⁵ plasmodesmů. Tak-

řka celá rostlina tak tvoří jeden protoplastický celek, tzv. **symplast**, od něhož vně je komplex buněčných stěn, obsahující i mezibuněčné prostory, označovaný jako **apoplast** (viz Rostlina a voda, **obr. 27**). Plasmodesmy umožňují symplastickou komunikaci, tj. mezibuněčný transport (a to i dálkový) metabolitů, signálních molekul a makromolekul včetně RNA a bílkovin.

Vznik a zánik plasmodesmů

Při tvorbě střední lamely a primární buněčné stěny zůstávají dceřinné buňky propojeny určitým počtem tubulů endoplasmatického retikula (desmotubuly, **obr. 16**), kolem nichž vznikají ve stěně póry. Na periferii jsou póry „vystlány“ plasmalemou, která tvoří kontinuum s plasmalemou obou sousedních buněk. Plasmodesmy mohou ale vznikat také *de novo* v již existujících buněčných stěnách. Plasmodesmy mohou být také uzavírány. Propojenost buněk v pletivech se velmi liší – v určitých



Obr. 17. Buněčný cyklus a jeho propojení s regulací buněčného růstu a diferenciace. Buňky nejčastěji opouštějí buněčný cyklus v G1 fázi v odpověď na vývojové a nutriční signály. Z G0 fáze se díky své totipotenci může vrátit většina rostlinných buněk zpět do buněčného cyklování po působení nejrůznějších signálů.

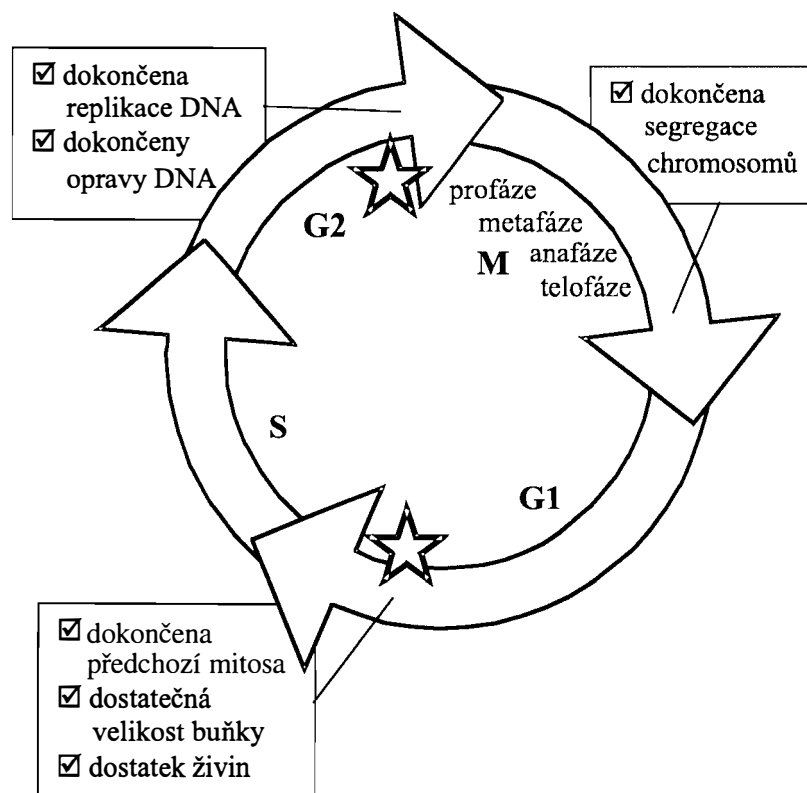
vývojových fázích dochází k úplné (někdy přechodné) symplastické izolaci buněk. Například když trichoblasty, ze kterých vyrůstají kořenové vlásky, vyvíjejí enormní turgorový tlak pohánějící jejich expanzi.

Průchodnost plasmodesmů

Rozhodujícím parametrem plasmodesmů je jejich průchodnost (mass exclusion limit – MEL), která se může měnit od méně než 1 kDa do více než 10 kDa. Plasmodesmy jsou průchodné nejen pro látky nízkomolekulární, jako jsou cukry, aminokyseliny nebo fytohormony, ale i pro makromolekuly. Transport některých bílkovin včetně transkripčních faktorů (např. STM či Leafy – viz Ontogeneze) skrz plasmodesmy z buňky do buňky je důležitou součástí signální organizace meristemů. Např. ve floemu (viz Dálkový transport) byla prokázána, mimo jiné, celá řada druhů mRNA, které se do něj dostávají symplastickou cestu přes plasmodesmy. *Floemem jsou transportovány v podobě ribonukleoproteinových částic a mohou se hromadit a být exprimovány v pletivu, které je vzdálené od místa jejich transkripce. Je pravděpodobné, že mezi těmito mRNA jsou důležité signální faktory působící na dálku a podílející se tak na regulaci celistvosti rostlinného organismu.* Bylo zjištěno, že symplastickou cestou se v rostlině šíří také viry.

2.2 Buněčný cyklus

Buněčný cyklus je sled procesů, které začínají rozdělením buňky na buňky dceřinné (cytokinezí) a končí jejich vlastním rozdělením. Jeho výsledkem je buněčná reprodukce, při které z jedné buňky mateřské vznikají dvě buňky dceřinné.



Obr. 18. Kontrolní body buněčného cyklu. Buňka monitoruje svůj stav hlavně na konci G1 a G2 fáze (hlavní kontrolní body rostlinné buňky označené hvězdičkou), ale také v dalších fázích cyklu.

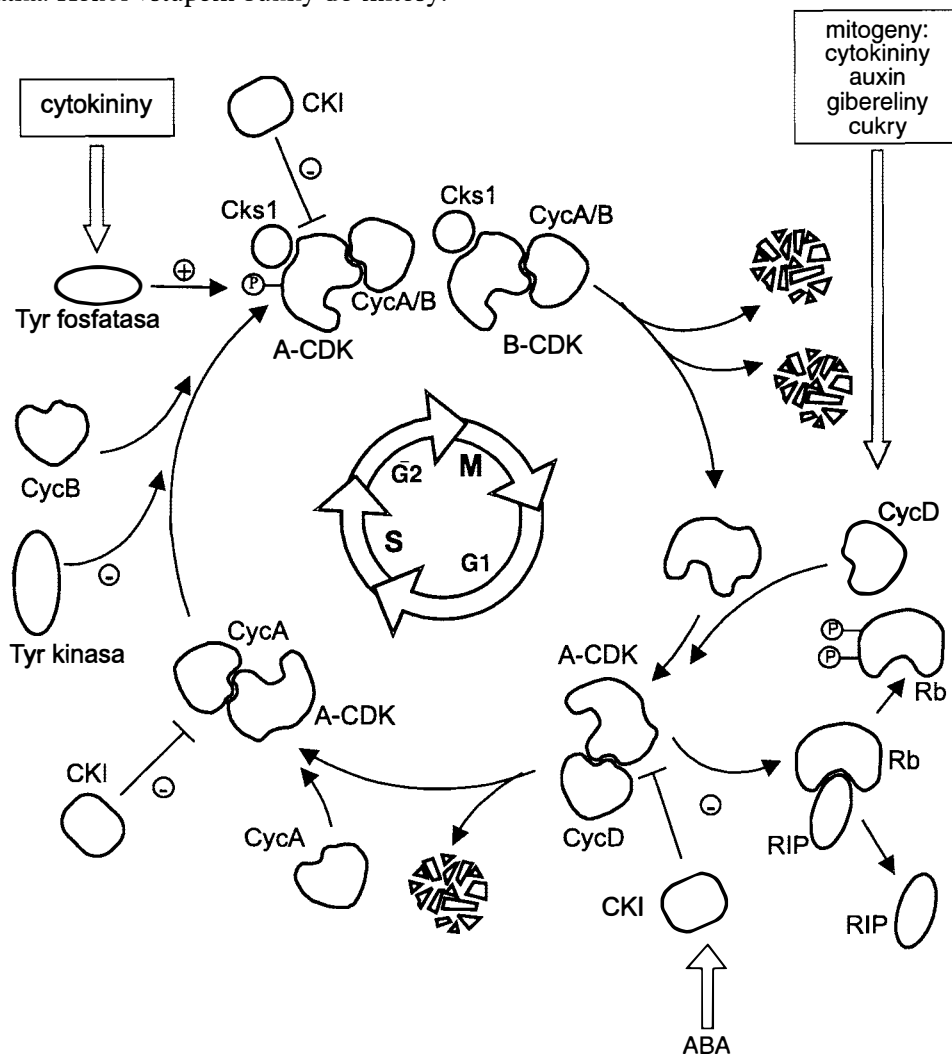
Buněčný cyklus je tvořen dvěma základními fázemi: interfází a fází mitotickou. **Interfáze** se dělí na G1 fázi, S fázi a G2 fázi. **Mitotická fáze** sestává z mitózy a cytokineze (**obr. 17**).

Charakteristické znaky jednotlivých fází

G1 fáze: Začíná po skončení cytokineze (rozdělení buňky) a končí zahájením replikace jaderné DNA. **Její trvání je velmi variabilní.** Intenzivně se syntetizují bílkoviny, RNA a nukleotidy. Zmnožují se buněčné struktury: ribosomy, mitochondrie a další součásti buňky.

S fáze: Je to období syntézy DNA (replikace), ve kterém se obsah DNA v jádře zdvojnásobuje (replikuje). S fáze trvá několik hodin a její délka je poměrně stabilní. Buňka je i během S fáze metabolicky (synteticky) aktivní.

G2 fáze: Probíhá intenzivní syntéza bílkovin a RNA a tvorba buněčných struktur. Tato fáze bývá poměrně krátká. Končí vstupem buňky do mitózy.



Obr. 19. Model regulace buněčného cyklu rostlinné buňky. Po mitogenní stimulaci v G1(G0) fázi (vpravo nahoře) jsou produkovány cykliny typu D (CycD), které tvoří komplexy s CDK typu A(CDK-A). Tyto aktivní komplexy fosforylují retinoblastomový protein (Rb) z něhož se tím uvolňují interagující bílkoviny (RIP) stimující nástup S fáze. Cykliny CycD jsou díky přítomnosti sekvence aminokyselin PEST rychle rozkládány a CDK-A asociuje s třídou cyklinů A (CycA). Na konci S fáze je aktivita komplexu CDK/Cyc inhibována fosforylací tyrosinu. S nástupem G2 fáze se objevují vedle CycA také cykliny typu B (CycB) a vedle CDK-A také CDK-B. Obě tyto kinasy mohou tvořit komplexy jak s CycA tak CycB a ke své funkci potřebují lokalizační („docking“) bílkovinu Cks1. Aktivační defosforylace při spuštění mitózy je stimulována cytokininy. Na konci M fáze jsou mitotické cykliny degradovány. V obrázku jsou zachycena také místa možného inhibičního působení CKI (bílkovinný CDK).

Mitotická fáze (M fáze):

1) **Mitosa (karyokineze)** – dělení buněčného jádra. Probíhá v několika fázích (profáze, metafáze, anafáze, telofáze). Při mitose z každého chromosomu vznikají dva jednochromatidové chromosomy, které se rozcházejí k opačným polům buňky. Vytvářejí se tak dvě geneticky rovnocenná dceřinná jádra se stejnou sestavou chromosomů.

2) **Cytokineze** – rozdělení buňky, které začíná obvykle již na konci mitosy. Mezi nově vznikajícími dceřinnými buňkami se vytváří fragmoplast a poté buněčná stěna (viz Cytoskelet).

Molekulární analýza buněčného cyklu eukaryot ukázala, že klíčové bílkovinné regulátory buněčného cyklu a je kódující geny byly ve fylogenezi silně konzervovány. U tak vzdálených organismů jako jsou kvasinka, člověk a rostlina jsou velmi podobné. Některé rostlinné homology těchto genů mají schopnost regulovat buněčný cyklus kvasinek, jsou-li exprimovány v příslušných kvasničných *cdc* mutantech.

Zvláštnosti buněčného dělení u rostlin

Přesto, že buněčné dělení u vyšších rostlin se podobá obecnému eukaryotickému modelu vytvořenému zvláště při studiu živočichů (mikrotubuly jsou reorganizovány do mitotického vřeténka, rozpadá se jaderná membrána a dochází k výrazné kondenzaci chromatinu), je u rostlin mechanismus mitosy a cytokineze odlišný v tom, že (1) rostliny vytvářejí tzv. preprofázický pás mikrotubulů a profázové vřeténko (viz Cytoskelet), (2) nemají centrioly, (3) diktyosomy zůstávají funkční během mitosy a účastní se cytokineze tím, (4) že se podílejí na tvorbě fragmoplastu a buněčné přepážky přísunem váčků v interakci s cytoskeletem.

Koordinace procesů buněčného cyklu

Postup buněčného cyklu je možné chápat jako překonávání kontrolních bodů (checkpoints), v nichž buňka zjišťuje, zda byly úspěšně dokončeny předcházející fáze buněčného cyklu (**obr. 18**).

Koordinace procesů buněčného cyklu byla vysvětlována dvěma modely:

Model „domina“ předpokládá, že jeden úspěšně dokončený proces buněčného cyklu spouští proces následující. Alternativní **model centrálního regulátoru („hodiny“)** předpokládá, že procesy buněčného cyklu na sobě nejsou přímo závislé, že jejich správné časové řazení je řízeno centrálním regulátorem. Dnes se zdá, že v regulaci buněčného cyklu převažují mechanismy centrálního regulátoru s uplatněním aspektů modelu domina. Např. segregace chromatid nemůže začít dřív, než skončí replikace.

Cyklin dependentní kiny jsou jádrem regulace buněčného cyklu

Průchod kontrolními body buněčného cyklu vyžaduje aktivaci specifických proteinových kinas označovaných jako **CDK (cyclin-dependent kinases)** nebo $p34^{cdc2}$ (podle homologní bílkoviny a lokusu *Schizosaccharomyces pombe*), které jsou jádrem centrálního regulátoru buněčného cyklu (**obr. 19**). Tyto kiny fosforylují bílkoviny, jež regulují procesy důležité pro tu kterou fázi buněčného cyklu (např. replikaci DNA, rozpad jaderné membrány, kondenzaci chromatinu atd.). Substrátová specifita těchto kinas je určována regulačními podjednotkami **cykliny** (obsah některých z nich se v průběhu buněčného cyklu cyklicky mění). Dalšími regulačními bílkovinami jsou specifické kiny, fosfatasy, lokalizační faktory, inhibitory a proteasom, které regulují zejména stav fosforylace a aktivity celého komplexu CDK a cyklinů, jeho lokalizaci v buňce a řízenou proteolytickou degradaci mitotických cyklinů, ale i dalších regulačních bílkovin.

Zatímco u kvasinek byla popsána jedna CDK, u jednotlivých druhů mnohobuněčných rostlin existuje několik CDK a to jak s typickým N-terminálním místem pro vazbu cyklinů (PSTAIR), tak s jeho variantami. Je zajímavé, že jedna třída rostlinných CDK se specificky hromadí v G2/M fázi, což nebylo pozorováno u ostatních organismů. Předpokládá se, že tato třída rostlinných CDK by mohla regulovat procesy mitosy, které jsou specifické pro rostliny, jako je tvorba preprofázického pásu mikrotubulů a fragmoplastu.

Cykliny

Regulační podjednotky CDK cykliny je možné rozdělit do dvou velkých skupin: na cykliny mitotické a G1 cykliny. Mezi **mitotické cykliny (M cykliny)** patří **cykliny typu A a B** s typickými tzv. cyklinovými boxy (cyklin-box je doména proteinu odpovídající za interakci s CDK) a „destruction boxem“ (určuje degradaci cyklinu proteasomem v pozdní mitose). Cykliny typu A mají rozhodující úlohu v S fázi, cykliny typu B v přechodu z G2 do M fáze. Rostliny mají výrazně větší počet těchto cyklinů než ostatní eukaryota – kvasničné či savčí buňky jich kódují asi 10.

Druhá skupina zvaná **G1 cykliny** je u rostlin tvořena především **cykliny typu D** (a také E), které jsou syntetizovány v pozdní G1 a časně S fázi. Některé G1 cykliny jsou přítomny v malém množství v průběhu celého buněčného cyklu. Jejich cyklinový box je méně konzervován než je tomu u M cyklinů a místo „destruction boxu“ nesou tzv. PEST sekvenci (Pro, Glu, Ser, Thr) – jsou tedy velmi nestabilní. G1 cykliny jsou stimulovány působením růstových regulátorů (viz dále) a pravděpodobně se podílejí na koordinaci celkového růstu rostliny s buněčnými cykly.

Změna obsahu většiny cyklinů během buněčného cyklu je regulována jak řízenou transkripcí a translací, tak specifickou (na ubiquitinu závislou) proteolýzou.

Řízení fází buněčného cyklu

Jak je zajišťováno pořadí jednotlivých procesů buněčného cyklu? Tato otázka je nejlépe zodpovězena u kvasinek – geny pro mitotické cykliny jsou transkripčně aktivovány v průběhu S fáze a pozitivní zpětnou vazbou stimulují dále vlastní expresi. Zároveň potlačují transkripci G1 cyklinů. Akumulace malého množství mitotických cyklinů tedy vyvolává jejich prudké autokatalytické zmnožení a v komplexu s CDK „tlačí“ buňku směrem k mitose. Jak již bylo uvedeno, po průchodu mitosou jsou mitotické cykliny proteolyticky degradovány a uvolňují prostor pro působení G1 cyklinů (**obr. 19**). S tím souvisí otázka, jak je zajištěno zabrzdění cyklu, když například působením stresových faktorů není dokončena replikace či dojde k poškození metafázického vřeténka a chromosomů. Zde mají důležitou funkci signální dráhy (často MAPkinasové), které vedou k inhibici některé formy komplexu CDK a tím k pozastavení postupu buněčného cyklu. Specifické bílkovinné inhibitory (CKI) se vážou na komplex CDK-cyklin a inhibují jej.

Velikost buňky jako důležitá kontrolovaná veličina

Eukaryotická buňka je schopná se rychleji dělit než růst a musí proto mít možnost pozdržet průchod buněčným cyklem, než doroste náležité velikosti. (Jde o objem cytoplasmy – nikoliv vakuoly.) **Nutnost přizpůsobit rychlost průchodu cyklem rychlosti růstu je příčinou silně proměnlivé délky G1 fáze u rostlinných buněk.** Například zatímco G1 fáze v kořenové špičce mrkve trvá jen o něco víc než 1 hodinu, v pomalu rostoucí buněčné kultuře mrkve *in vitro* trvá až 40 hodin. Ostatní fáze buněčného cyklu jsou co do délky trvání daleko stabilnější.

Pro regulaci buněčného cyklu je rozhodující vztah mezi růstem buňky a jejím dělením: k dělení může dojít až po dosažení tzv. **kritické velikosti**, jejímž molekulárním projevem je především dosažení kritického množství G1 cyklinů v cytoplasmě ve vztahu ke konstantnímu množství chromatinu (jaderných vazebných míst). **Na rozdíl od ostatních cyklinů nemění některé G1 cykliny svou koncentraci v průběhu růstu buňky a jejich množství je tedy přímo úměrné objemu cytoplasmy.**

Pro buňku je důležité správně prostorově lokalizovat nové struktury při cytokinezi. Významnou úlohu v lokalizaci organel, mRNA a bílkovin má cytoskelet a s ním interagující bílkoviny a jejich regulátory. Nejvýraznějším projevem této prostorové koordinace je fragmoplast (viz Cytoskelet). Důsledek selhání tohoto systému pro normální vývoj raného embrya *Arabidopsis* ukazuje mutant *knolle* (má postiženou SNARE bílkovinu), který není schopen ustavit polaritu embrya.

Délka buněčného cyklu během ontogeneze

Je známo, že u živočichů se počáteční stadia embryogeneze vyznačují téměř úplnou nepřítomností G₁ fáze (a zkrácenou G₂ fází). Po replikaci následuje M fáze a po ní zase hned S fáze, což vede k postupnému zmenšování buněk. U rostlin je tento fenomen méně výrazný, zato ale **přetrvává embryonální charakter buněk v meristematických oblastech po celé období růstu rostliny** (viz Vegetativní vývoj). Délka buněčného cyklu somatických buněk (několik hodin až několik dnů) je různá v závislosti na pletivu jehož je součástí a na vnějších podmínkách.

Většina buněk dospělé rostliny se nedělí. Zůstávají mimo cyklus ve stavu podobném G₁ (tj. DNA před replikací), který se nazývá G₀ fáze (**obr. 17**). Buňka může vystoupit z cyklu jen před dosažením určitého bodu G₁ fáze, který je označován jako bod rozhodnutí (commitment point, START, **obr. 17**). Po průchodu tímto kontrolním bodem buňka již nezadržitelně postupuje do S fáze. V některých pletivech (např. v pericyklu kořenů) mohou buňky vystoupit z cyklu také v G₂ fázi.

U rostlin byl také zjištěn důležitý regulátor buněčného cyklu známý ze živočišných buněk – **homolog retinoblastové (RB) bílkoviny**, který potlačuje nádorové bujení u živočichů. RB je přítomen v buňce konstitutivně (stále), při přechodu z G₁ do S fáze je však silně fosforylován. Naopak **jeho defosforylace odpovídá přechodu buňky do diferenciaci a vystoupením z cyklu (do G₀)**. RB interaguje specificky s cykliny typu D (viz dále) a reguluje buněčné dělení inhibiční vazbou na transkripční faktor E2F, který aktivuje expresi enzymů nutných k syntéze DNA.

Ke změnám délky buněčného cyklu dochází při přechodu z vegetativní do generativní fáze. Např. několik hodin po květní indukci u rodu *Silene* nastává zrychlení replikace v apikálním meristemu, buňky se hromadí v G₂ fázi a buněčný cyklus se zkracuje z 20h na 13h. Předpokládá se, že hromadění buněk v G₂ fázi vytváří populaci kompetentní k přechodu do kvetení. Naopak jednotlivá stadia meiotického buněčného dělení při vzniku mikro- a makrospor mohou trvat celé týdny či měsíce (např. u jehličnanů).

Jak ukazují fenotypy meristemových mutantů (např. *clavata 1*, **obr. 80**), **buněčné dělení a diferenciaci jsou během ontogeneze přísně regulovány na základě mezibuněčné komunikace – polohové informace**. Rostlina jako celek určuje rozsah a směr diferenciaci domén (např. listového primordia) „vyplňovaných“ novými buňkami.

Polyploidizace diferencovaných buněk endoreduplikací

Ve starších diferencovaných pletivech rostlin se významně zvyšuje podíl buněk, které mají znásobený obsah DNA nad úroveň 2C (C od content – haploidní obsah DNA) a to až na 32C **procesem endoreduplikace – tj. opakovanými cykly S fáze bez M fáze**. V případě listových trichomů *Arabidopsis* bylo prokázáno, že znásobení obsahu jaderné DNA je předpokladem enormního objemového růstu buněk trichomů. Je pravděpodobné, že podobný vztah existuje i u dalších somatických buněk. Procesem endoreduplikace se znásobuje obsah genů, kterých je třeba k uspokojení metabolických požadavků objemově expandujících buněk (100–1000 ×) v prodlužovací a diferenciaci fázi růstu.

Fytohormony, sacharosa (zdroj energie) a buněčný cyklus

Fytohormony, jako jeden z dominantních faktorů utvářejících vnitřní prostředí rostliny a zároveň citlivě reagujících na změny vnějšího prostředí, podstatně ovlivňují průběh buněčného cyklu buněk v rostlinných pletivech. Poznání mechanismu jejich působení je teprve v začátcích, ale již dnes je zřejmé, že auxiny a cytokininy aktivují CDK a tím přispívají k buněčnému dělení, zatímco kyselina abscisová (ABA) CDK inhibuje (stimulací genové exprese CKI), zastavuje buněčný cyklus, jak lze předpokládat u jednoho z hlavních nízkomolekulárních regulátorů dormance (viz Fytohormony).

U rostlin existuje také **úzký vztah mezi průběhem buněčného cyklu a metabolismem polyaminů** (viz Fytohormony). Inhibitory syntézy polyaminů způsobují zástavu buněčného cyklu v G1 fázi. Hladina polyaminů stoupá v buňce před nástupem replikace a cytokineze. Klíčovou roli má zřejmě putrescin.

Cytokininy, jež dostaly své jméno díky schopnosti stimulovat buněčné dělení, působí pravděpodobně ve více regulačních bodech buněčného cyklu. Aktivují CDK a inaktivují bílkovinné inhibitory CDK tzv. **CKI (obr. 19)**, čímž umožňují návrat buňky z G0 do buněčného cyklu. U *Arabidopsis* byly dosud popsány 4 CKI. Ty se také podílejí na řízení výstupu z buněčného cyklu (přechod do G0), který je obvykle spojen s nástupem buněčné diferenciace.

Dalším místem, kde cytokininy vstupují do regulace buněčného cyklu, je stimulace defosforylace tyrosinu na CDK, která je nutná k aktivaci mitotického komplexu (u kvasinek je zajišťována specifickou fosfataseou známou jako cdc25). Je-li v transgenních rostlinách konstitutivně exprimována kvasinková fosfatasa cdc25, nevyžadují pro defosforylaci a přechod do M fáze zvýšení aktivity cytokininů. V genomu *Arabidopsis* byl nalezen jen částečný homolog této fosfatasy a je tedy pravděpodobné, že u rostlin je tento aktivační krok katalyzován poněkud jiným způsobem.

G1 cykliny jsou diferenciatně regulovány sacharosou a fytohormony

Cytokininy také silně stimulují expresi některých cyklinů v závislosti na přítomnosti cukrů (mechanismus aktivace genové exprese cytokininy – viz Fytohormony). Před rozhodnutím o vstupu do další fáze buněčného cyklu je pro rostlinnou buňku v kontrolních bodech důležité konfrontovat informaci o stavu živin s informací o přítomnosti růstových regulátorů. Důležitou úlohu při tom mají **cykliny typu D**, které se jako součást komplexu s CDK podílejí na klíčovém rozhodnutí v pozdní G1 fázi, v bodě start: opustit cyklus a přejít do G0 či pokračovat? U *Arabidopsis* byly v této souvislosti studovány cykliny D2 a D3, jež různě reagují na přítomnost cukrů a růstových regulátorů. **CycD2 není ovlivněn fytohormony**, ale pro udržení exprese **vyžaduje sacharosu** – je potlačen v její nepřítomnosti. Naproti tomu **cyklin D3 vyžaduje pro udržení své exprese jak sacharosu, tak fytohormony**. Odstranění jednoho z těchto faktorů vede ke snížení hladiny mRNA kódující cyklin D3. V přítomnosti sacharosy je u *Arabidopsis* tento cyklin indukován nejen cytokininy, ale také brassinosteroidy, auxiny či gibbereliny (viz Fytohormony). Indukce exprese tohoto cyklinu v pozdní G1 fázi urychluje vstup do S fáze. Tyto výsledky ukazují, že, podobně jako u živočichů, také u rostlin cykliny typu D jsou transkripčně indukovány fytohormony a živinami v závislosti na typu pletiva. Jsou to faktory, jejichž prostřednictvím může vnitřní prostředí rostliny (v reakci na vnější prostředí) koordinovat průběh buněčných cyklů v jednotlivých pletivech.

Jaký je vztah mezi buněčným dělením a regulací morfogeneze rostlinného organismu?

U mnohobuněčných organismů, jakými jsou rostliny, je třeba položit si otázku, jaký je vztah mezi dělením buněk a morfogenezí. Je meristem přesně naprogramován jak se má dělit, aby vznikl příslušný druhově či vývojově specifický tvar? Nebo je vztah mezi dělením buněk a morfogenezí volnější a meristem produkuje stavební materiál (buňky), jehož morfogeneze je určována procesy vyššího řádu, které závisejí na celistvosti mnohobuněčného rostlinného organismu?

Dnes je z mnoha pokusů a zejména ze studia některých rostlinných mutantů zřejmé, že u rostlin se uplatňuje především druhá možnost. To ze zkušenosti věděli už staří rostlinní fyziologové. Profesor Bohumil Němec cituje de Baryho: „Ne buňky produkují rostlinu, ale rostlina si produkuje buňky“.

Například transgenní rostliny tabáku, které silně exprimují CDK (zde Cdc2a), o které se předpokládá, že urychluje průběh buněčného cyklu, nejeví žádné fenotypické zvláštnosti. Naopak transgenní rostliny exprimující mutantní formu této bílkoviny, která brzdí průběh buněčného cyklu, mají skutečně

výrazně sníženou aktivitu CDK a obsahují výrazně méně buněk. Nicméně, tyto buňky jsou zároveň daleko větší a procházejí normální diferenciací: morfogeneze, histogeneze a časový průběh vývoje nejsou u těchto transformantů ovlivněny. Z toho vyplývá, že u rostlin může regulace vývoje určující tvar organismu působit nezávisle na rychlosti buněčného dělení. Podobně řada mutantů *Arabidopsis* se změněnou buněčnou morfologií (např. *ton2/fass* bez preprofázického pásu MT, viz kap. Cytoskelet) je schopna projít víceméně normální histogenezí a organogenezí.

Všechna tato pozorování ukazují, že **morfogeneze rostlinného organismu je řízena z vyšší než buněčné úrovně – z úrovně organizovaného pletiva, orgánu a celé rostliny. Osud jednotlivé buňky je pak určován její pozicí v rámci celku.** Soubor signálů přicházejících z blízkého i vzdálenějšího okolí buňky je označován jako poziční informace (viz 11.2).

Totipotence, diferenciaci a dediferenciaci (viz také 10.1)

S problematikou regulace buněčného cyklu jsou spojené také otázky totipotence, diferenciaci a dediferenciaci rostlinné buňky. **Totipotence** na buněčné úrovni souvisí se schopností diferencované rostlinné buňky, obvykle zastavené v G1 (G0) fázi buněčného cyklu, vrátit se za určitých podmínek do cyklu. **Tento návrat je vlastně podstatou dediferenciaci.** To znamená, že buňka musí nejprve projít kontrolním bodem START a přejít do replikace. Některé bílkoviny, které zde mají rozhodující úlohu jsou uvedeny v této kapitole. Jako indukční faktor má vedle fytohormonů důležitou roli vynětí (explantace) buňky z kontextu organismu (z jejího buněčného okolí), přechodné působení stresových faktorů (např. teplotního šoku) a změny v přísunu živin. Většina těchto faktorů aktivuje MAPkinasové dráhy, které dále aktivují CDK, především odblokováním jejich bílkovinných inhibitorů (CKI).