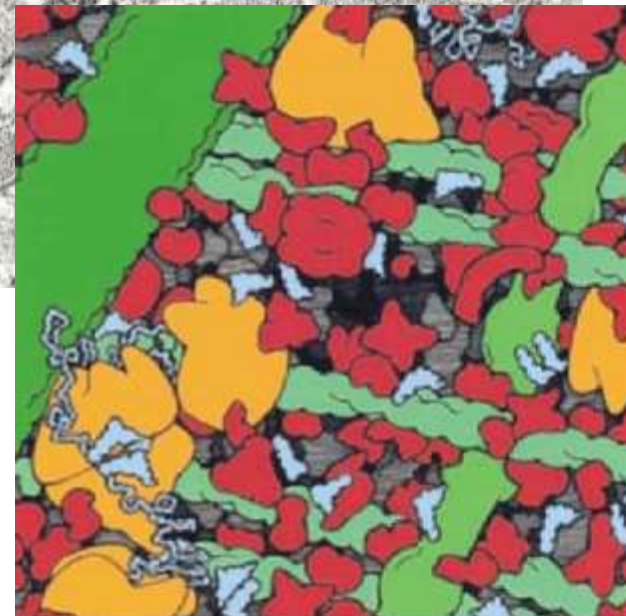
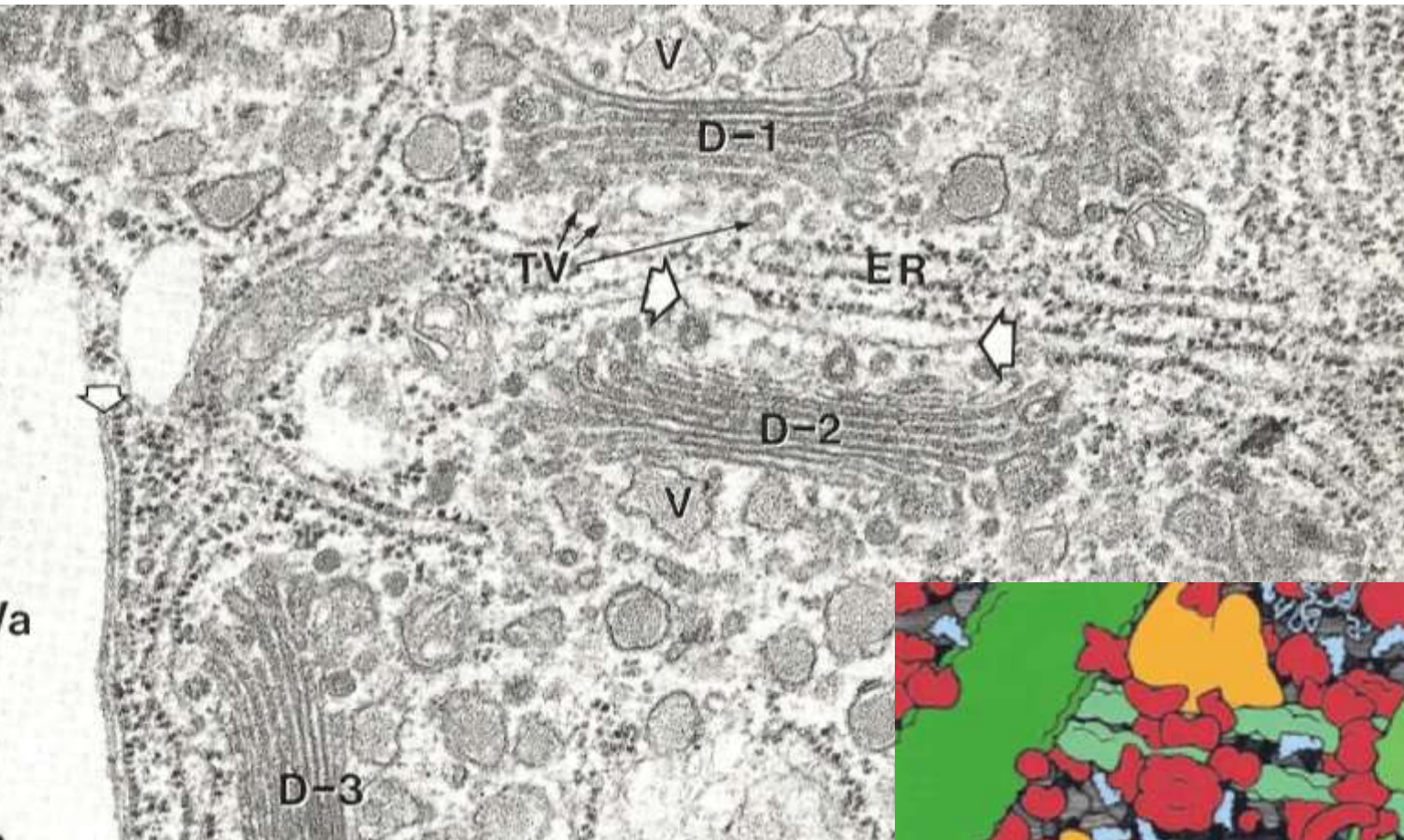


Cytoplazma, cytoskelet, ribozómy



- Ribosome
- Protein
- RNA
- Microtubule
- Intermediate filament
- Actin filament

CYTOPLAZMA

-Prostor mezi organelami, inkluzemi, ribozomy a jádrem

-Viskózní až gelový charakter

-Prostředí pro mnohé metabolické děje: např.

glykolýza

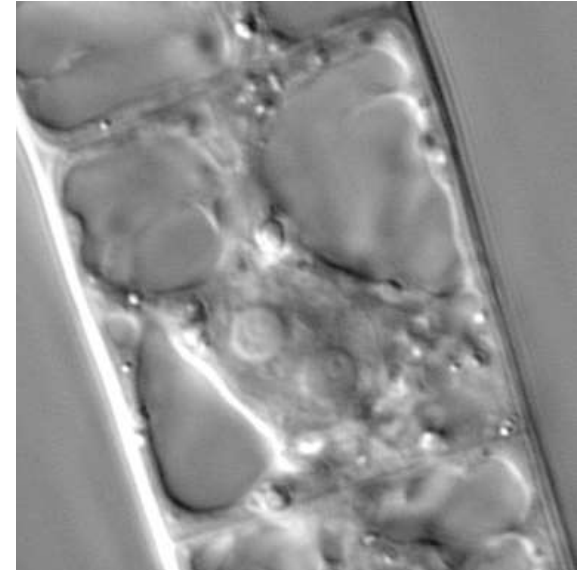
translace

syntéza sacharosy

pentózová cesta

počátky redukce nitrátu

syntéza četných sekundárních metabolitů



-Většina prostorových, fyzikálních i biochemických vlastností cytoplazmy je dána existencí cytoskeletu (viskózní charakter, rozvrstvení cytoplazmy v buňkách, pohyb organel, kompartmentace na metabolické oddíly).

CYTOSKELET

- Trojrozměrná síť **proteinových vláken** eukaryotické buňky
- Nejde o pevnou strukturu, ale o vysoce **dynamický** systém
- Charakteristická vysoká **konzervovanost** cytoskeletálních složek v rámci eukaryot
- FtsZ** a **bakteriální tubuliny**: vzdálení příbuzní tubulinů – počátky cytoskeletu již u prokaryot

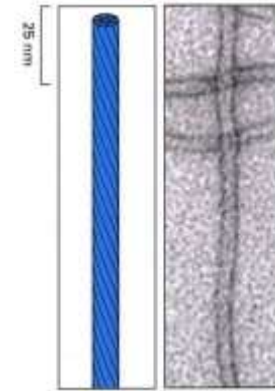
Základní funkce cytoskeletu

- **Udržení tvaru buněk**
- **Účast v jaderném a buněčném dělení**
- **Udržení vnitřní architektury buněk**
- **Udržení polohy organel a dalších buněčných struktur**
- **Pohyb organel a dalších buněčných struktur**
- **Transport vesikulů**
- **Pohyby bičíků a brv**
- **Připojení ribosomů – kompartmentace proteosyntézy.**
- **Připojení enzymů – kompartmentace metabolických procesů**
- **Účast v přenosu signálů**

Základní složky a vlastnosti cytoskeletu

Intermediární filamenta (IF):

- vlákna o průměru 10nm
- klasické „živočišné“ proteiny IF u rostlin nebyly identifikovány



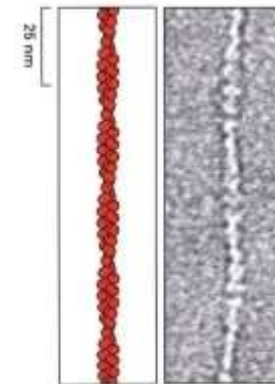
Mikrotubulární cytoskelet (MT):

- podjednotka heterodimer $\alpha\beta$ -tubulin
- vlákna o průměru 25nm



Aktinový cytoskelet (AF):

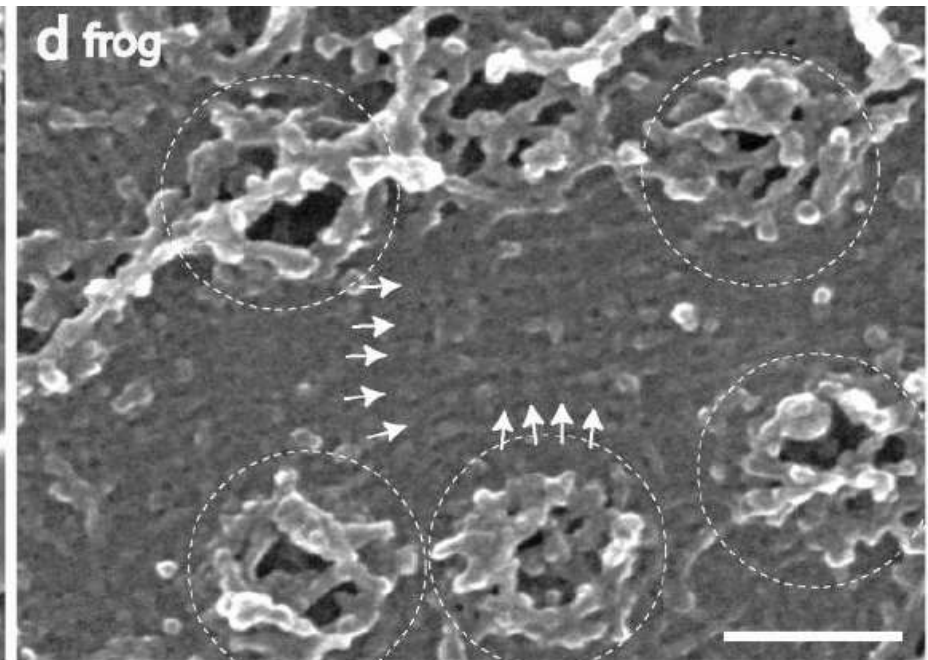
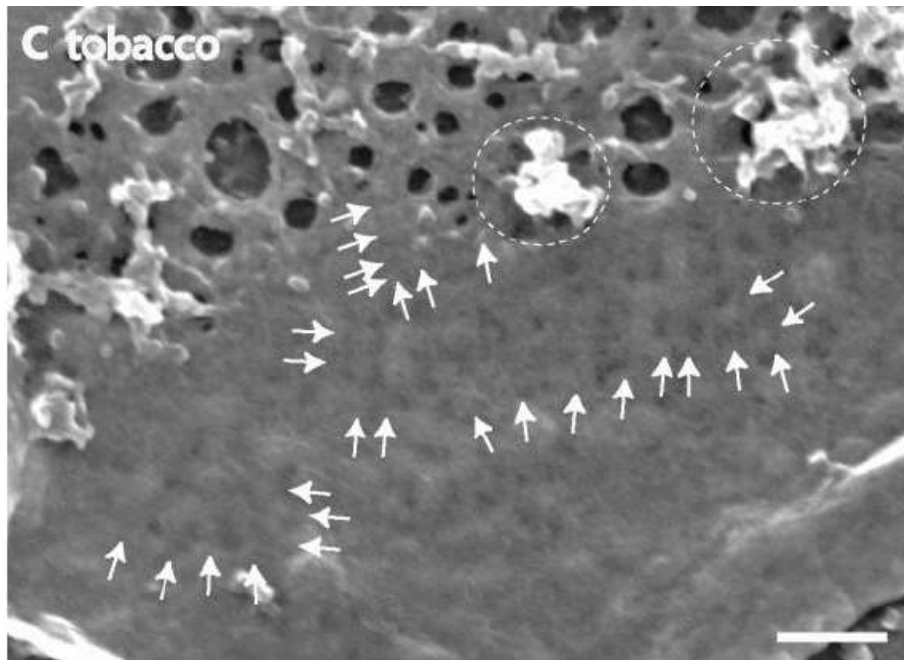
- podjednotka aktin
- vlákna o průměru 6-9nm



Základní složky a vlastnosti cytoskeletu

Intermediární filamenta (IF):

Rostlinná lamina – „klasické“ laminy u rostlin nejsou kódovány

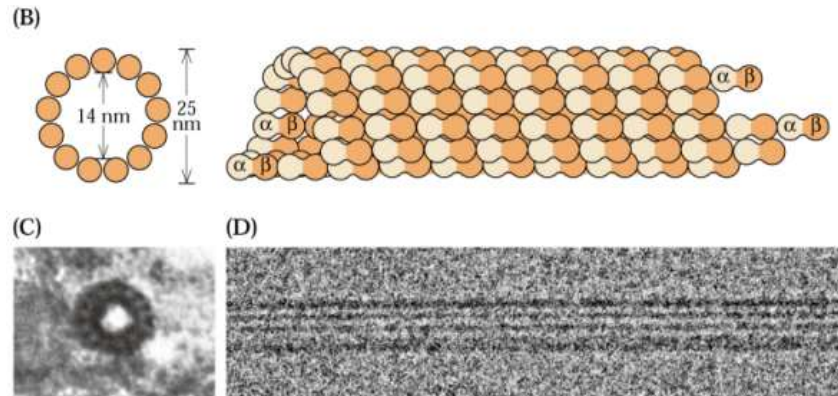


Základní složky a vlastnosti cytoskeletu

Společné vlastnosti MT a AF:

- vláknité polymery vznikají **polymerací** globulárních bílkovinných podjednotek
- schopnost rychlé polymerace a depolymerace – **dynamická síť**
- vlákna jsou **polarizovaná** (+ a – konec)
- monomery váží NTP** (ATP u AF a GTP u MT), které jsou hydrolyzovány po připojení monomeru k vláknu
- jejich interakce s okolím a funkci zajišťují **asociované proteiny**

Mikrotubuly



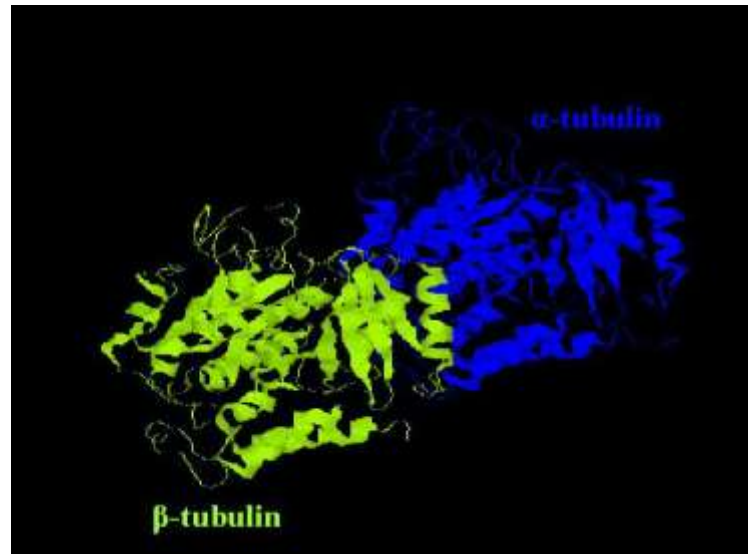
Mikrotubul:

Základní stavební jednotka mikrotubulů je **heterodimer α a β -tubulinu**.

Heterodimer polymeruje do vláknité struktury mikrotubulu o vnějším průměru cca 25 nm.

Mikrotubul je polarizovaná a vysoce dynamická struktura.

Mikrotubuly



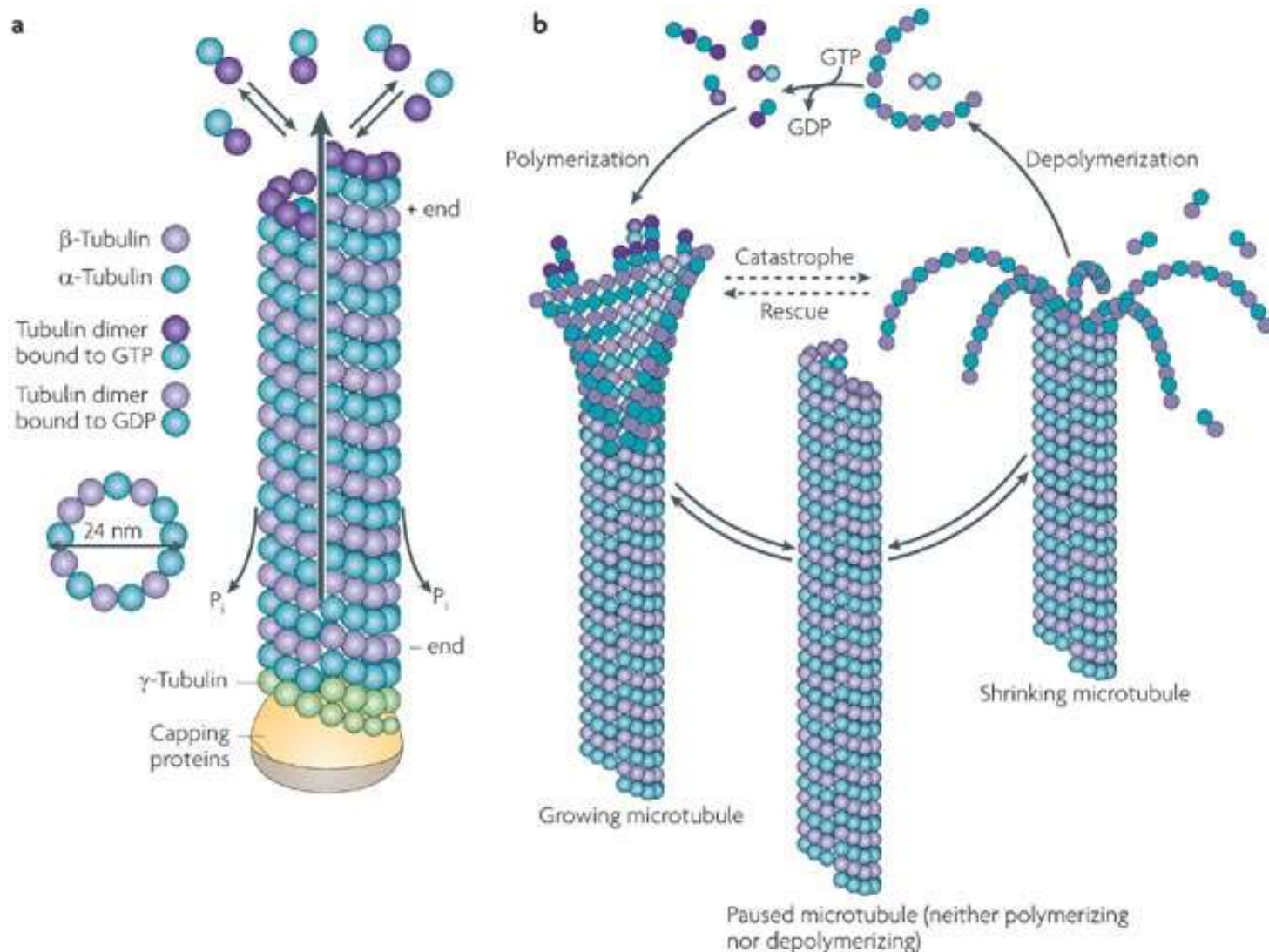
Tubuliny:

α i β tubulin má velikost okolo 50kDa a je složen z asi 450 AK

Sekvenční homologie mezi α a β tubulinem je asi 50%, mezi α -tubuliny či β -tubuliny z různých organismů až 99%.

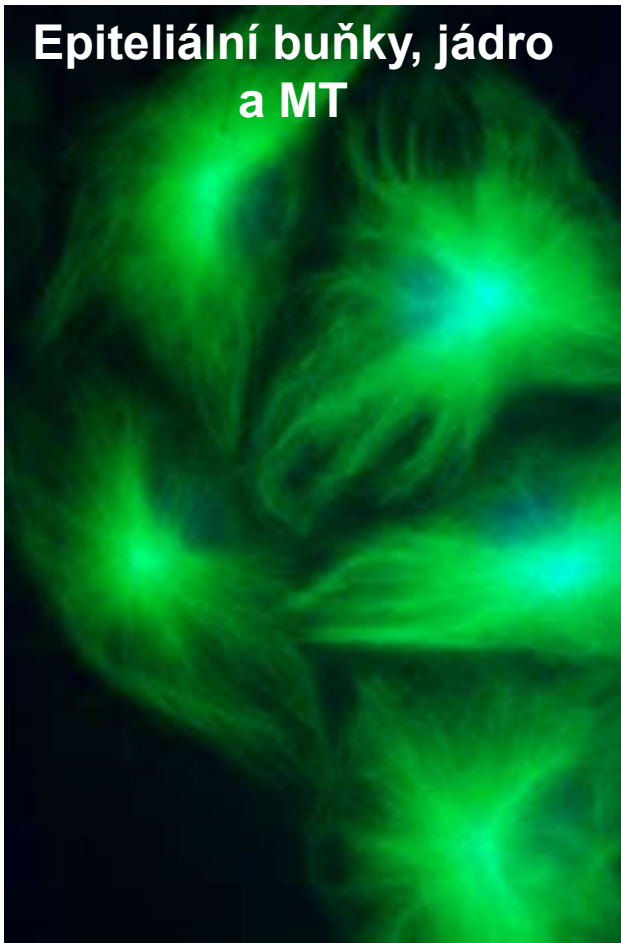
Kódovány genovými rodinami (\rightarrow izotypy tubulinů).

Cytoplasmatické mikrotubuly jsou dynamické struktury podléhající polymeraci a depolymeraci

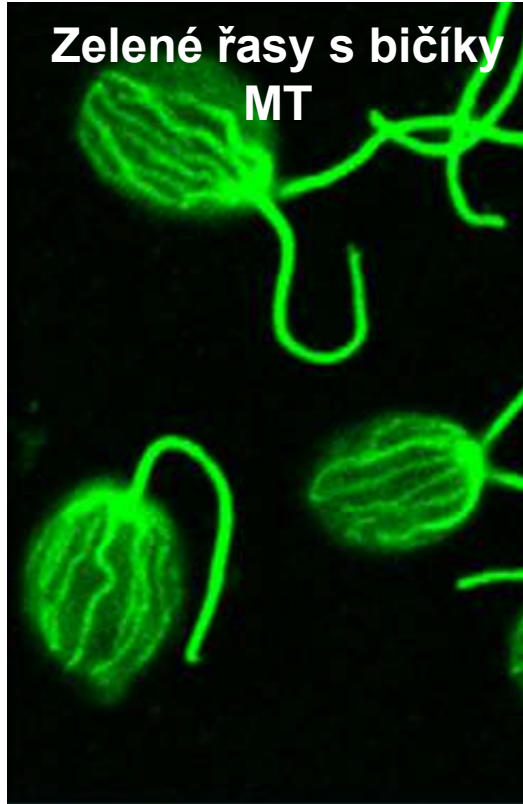


Nogales lab movie – polymerace a depolymerace mikrotubulů:
<https://www.youtube.com/watch?v=ZUIsHkeC-Fo>

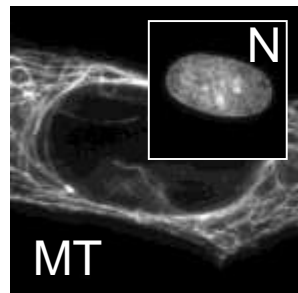
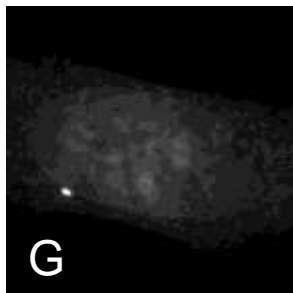
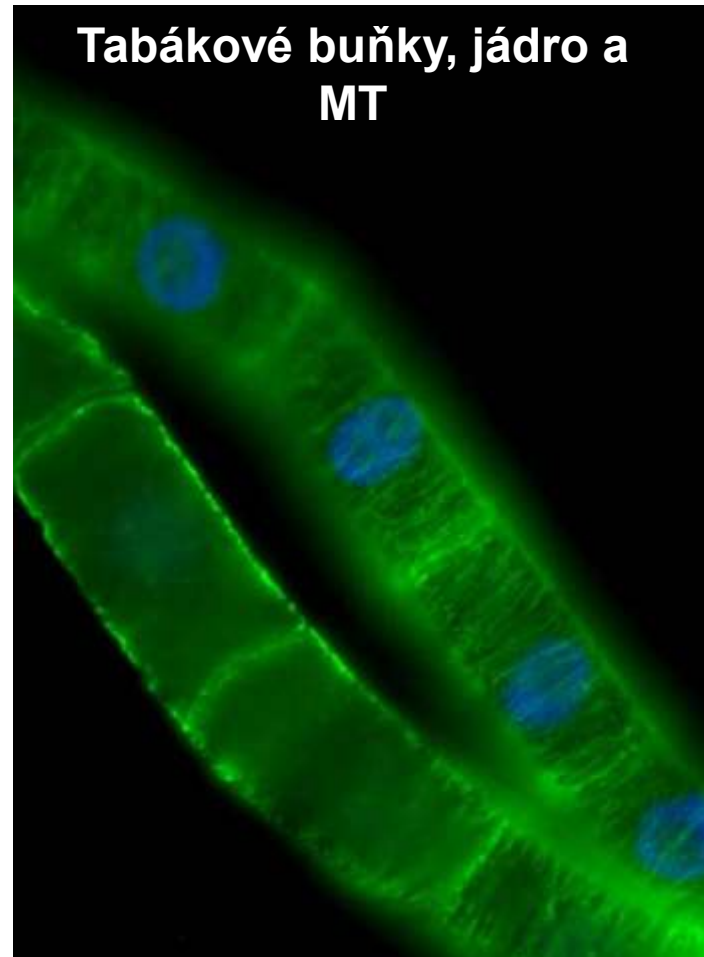
Epiteliální buňky, jádro
a MT



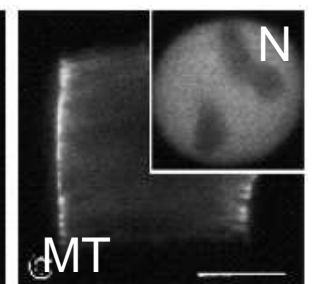
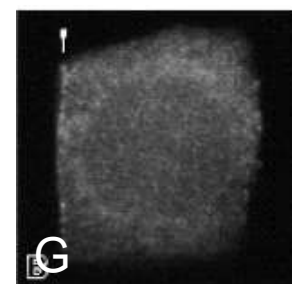
Zelené řasy s bičíky
MT



Tabákové buňky, jádro a
MT



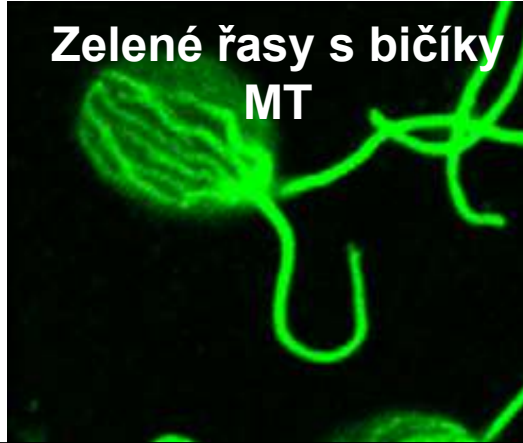
G = gama tubulin
MT = mikrotubuly
N = jádro



Epiteliální buňky, jádro
a MT



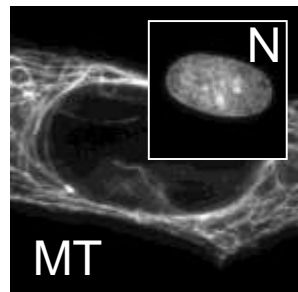
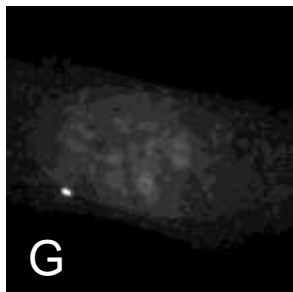
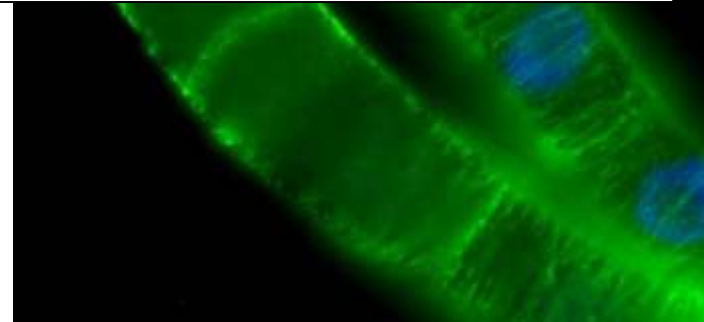
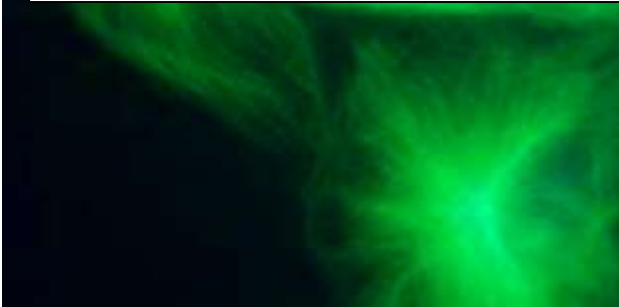
Zelené řasy s bičíky
MT



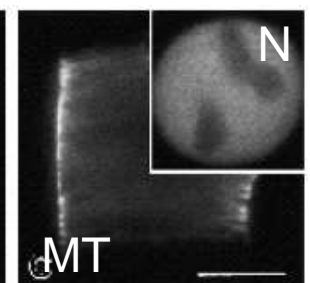
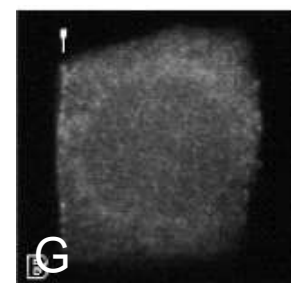
Tabákové buňky, jádro a
MT



Ztráta bičíku u vyšších rostlin vedla ke ztrátě centrozómu i bazálního tělíska, centrálních organizátorů mikrotubulů v cytoplasmě – vyšší rostliny jsou acentrozomální organismy



G = gama tubulin
MT = mikrotubuly
N = jádro



Nukleace rostlinných MT

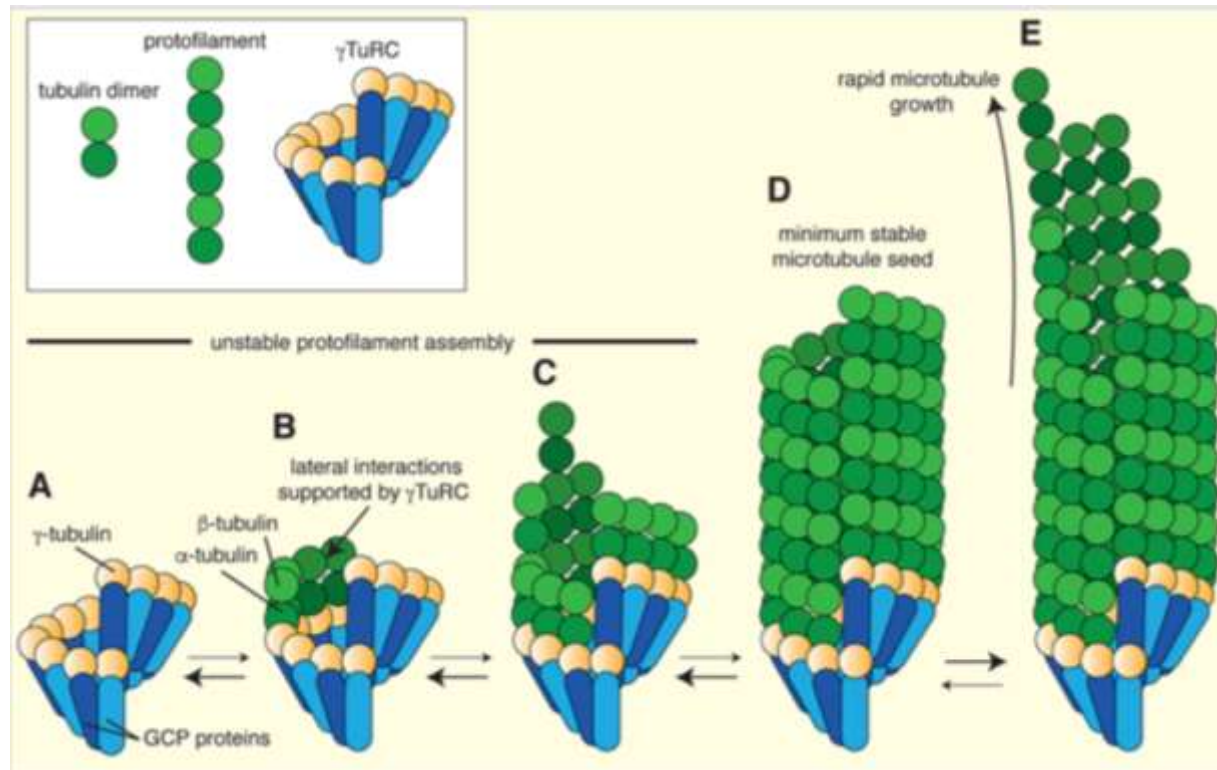
MTOC (mikrotubuly organizující centra)

γ -tubulin ring complex (TuRC):

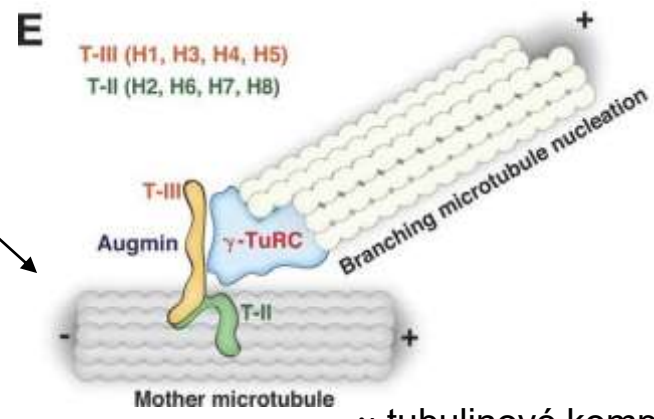
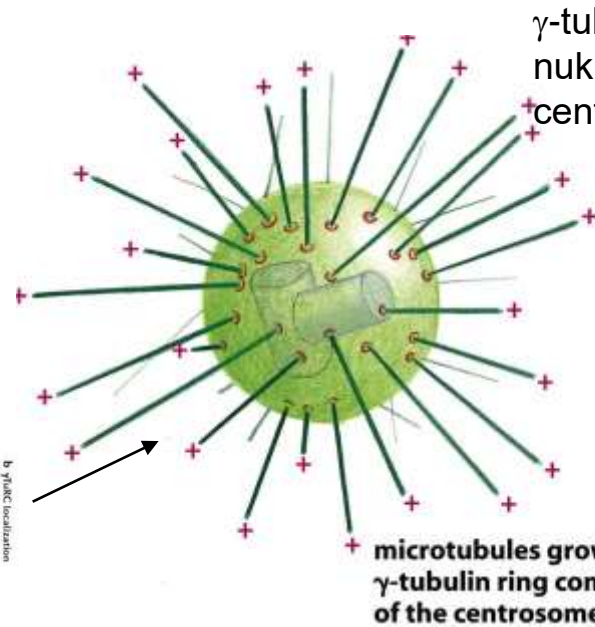
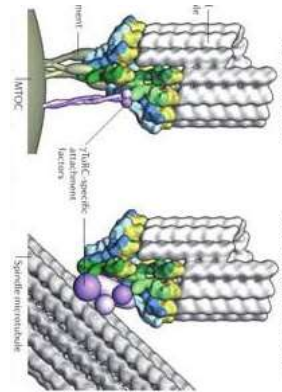
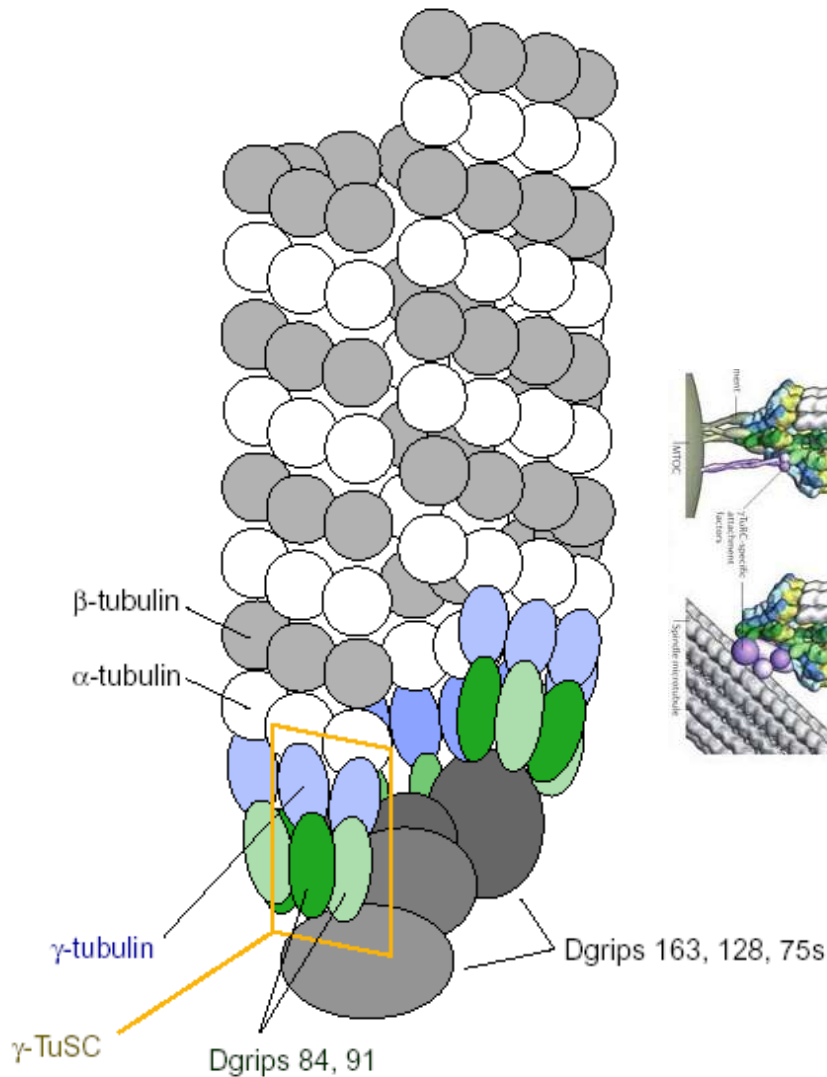
-nukleuje jednotlivé MT

-obsahuje 10-14 γ -tubulinů a alespoň 5 dalších proteinů (GCP – gamma tubulin complex proteins).

-velikost komplexu 1,5-2,2 MDa, struktura prstence s průměrem 25 nm

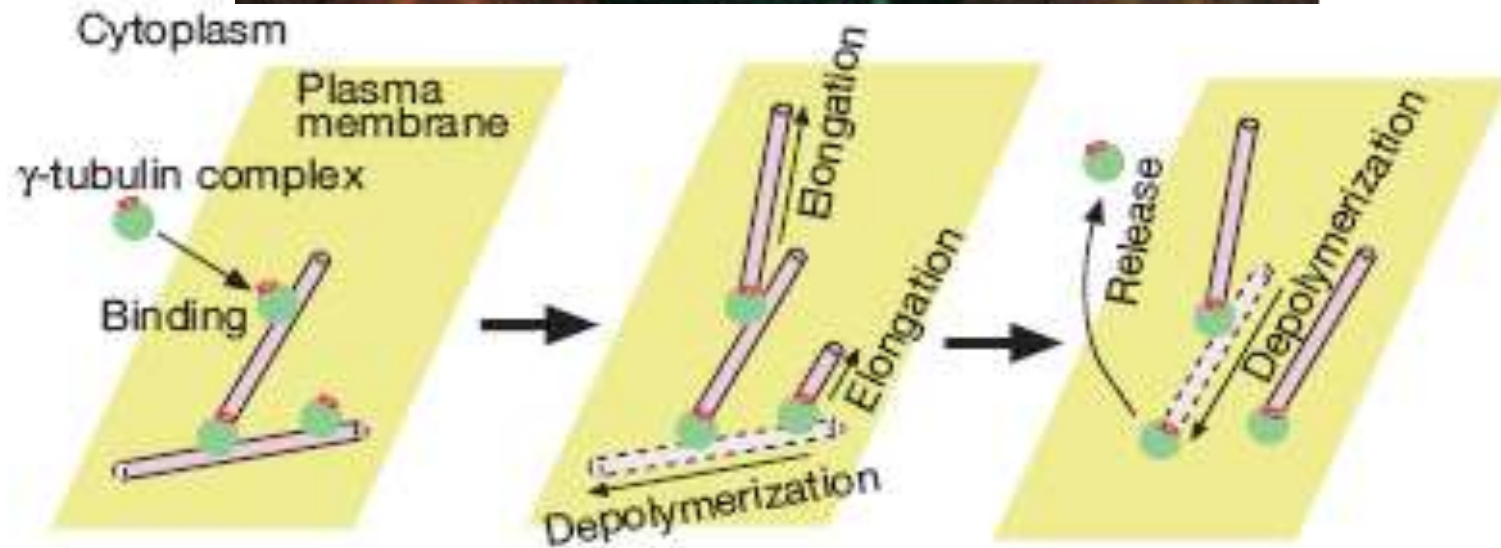
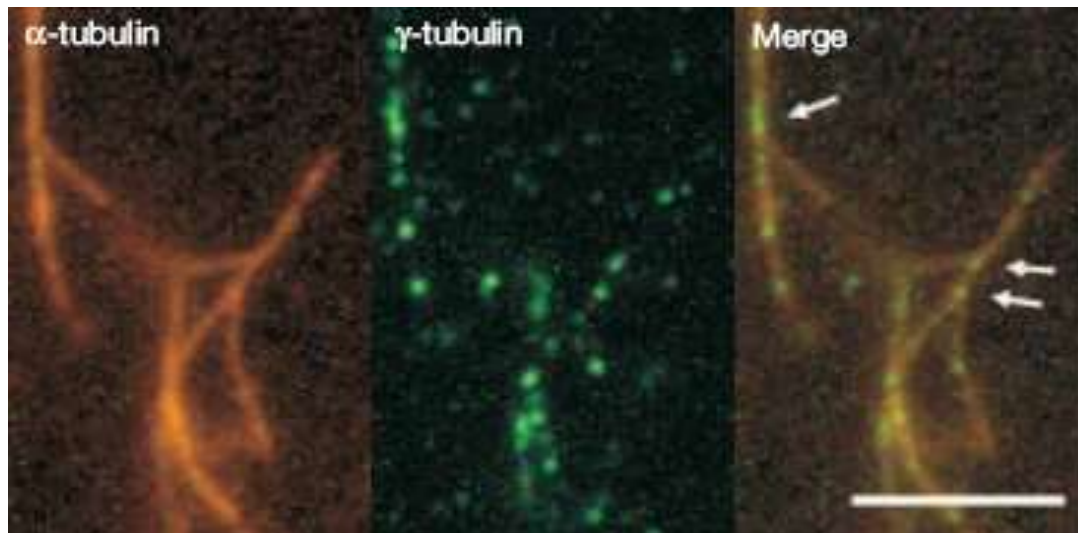


γ -tubulin ring complex (TuRC):



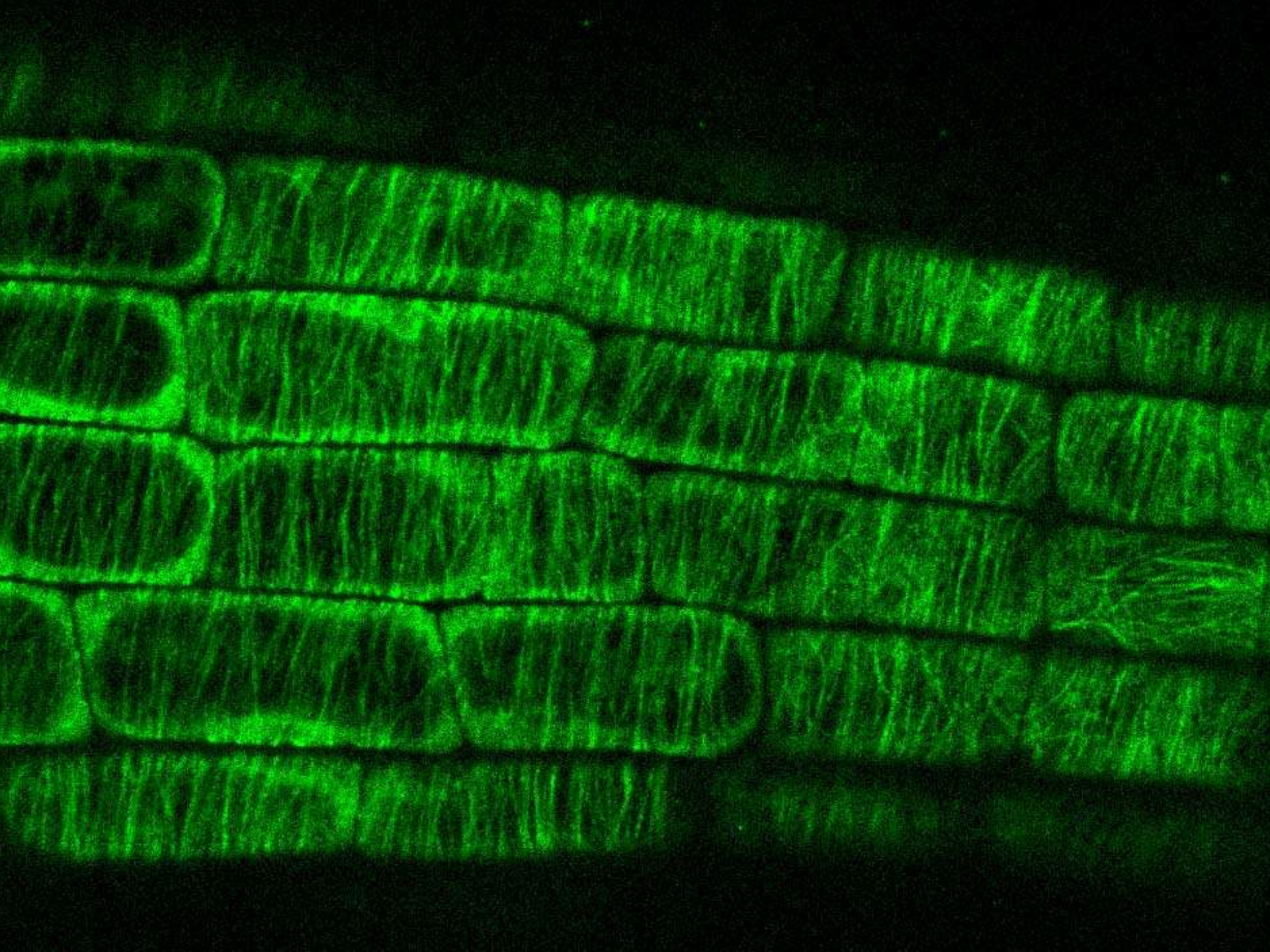
γ -tubulinové komplexy nukleují MT na stávajících MT

Nukleační centra distribuována podél mikrotubulů



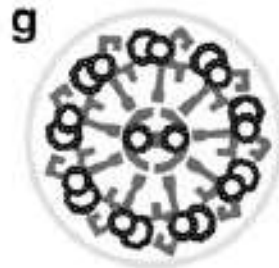
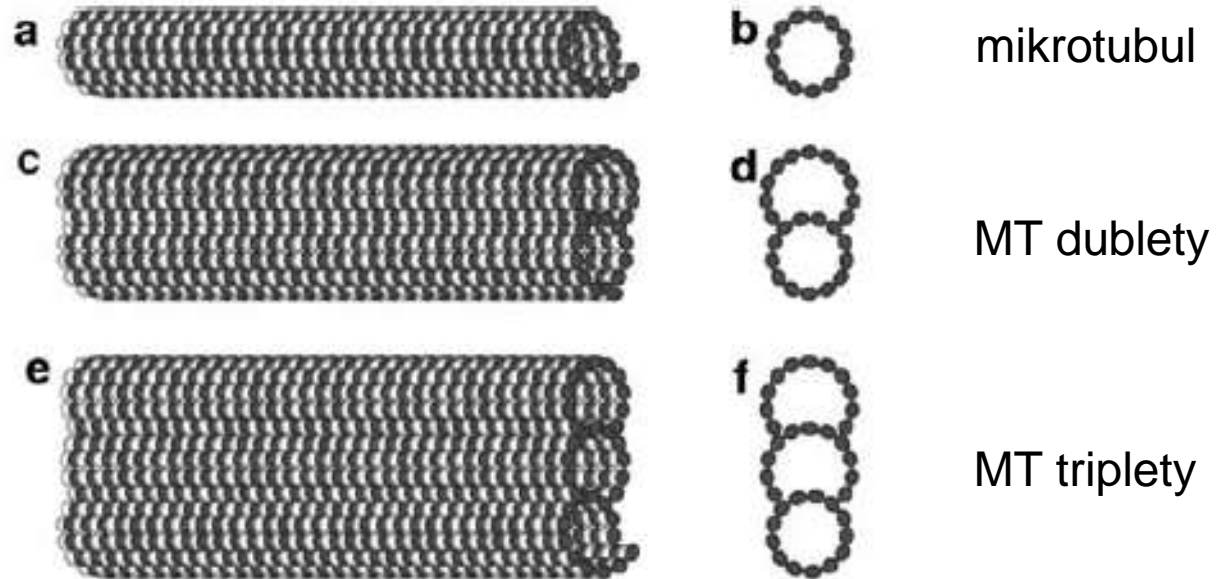
Dynamika kortikálních mikrotubulů v rostlinné buňce



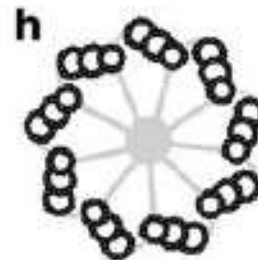


Bičíky a cilie

-stabilní formy mikrotubulů

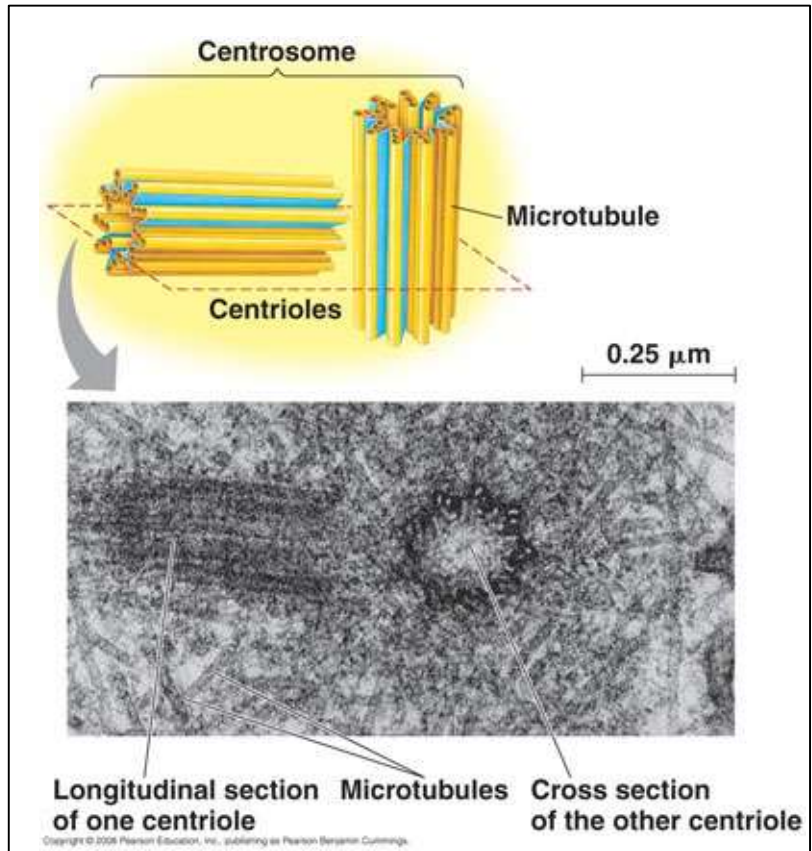


Bičík – 9+2

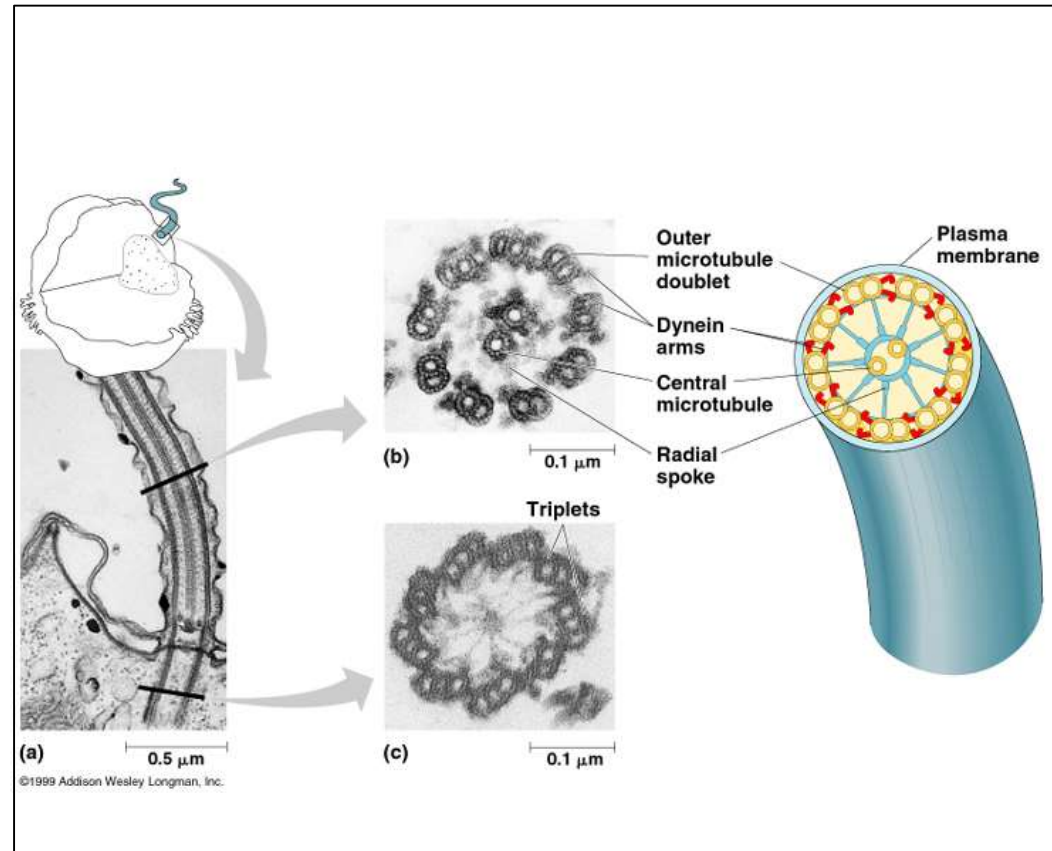


Centriola a bazální tělísko – 9 tripletů

centrioly



bičinky a bazální tělíska

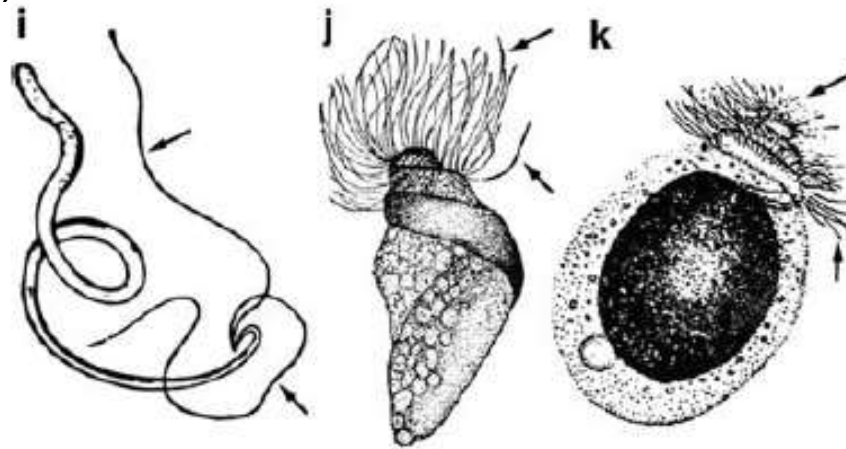


Bičíky a cilie u rostlin



- Pohyblivé buňky řas: bičíky (*Chlamydomonas*)
- Vyšší rostliny: ztráta pohyblivosti buněk – ztráta bičíků a cilií

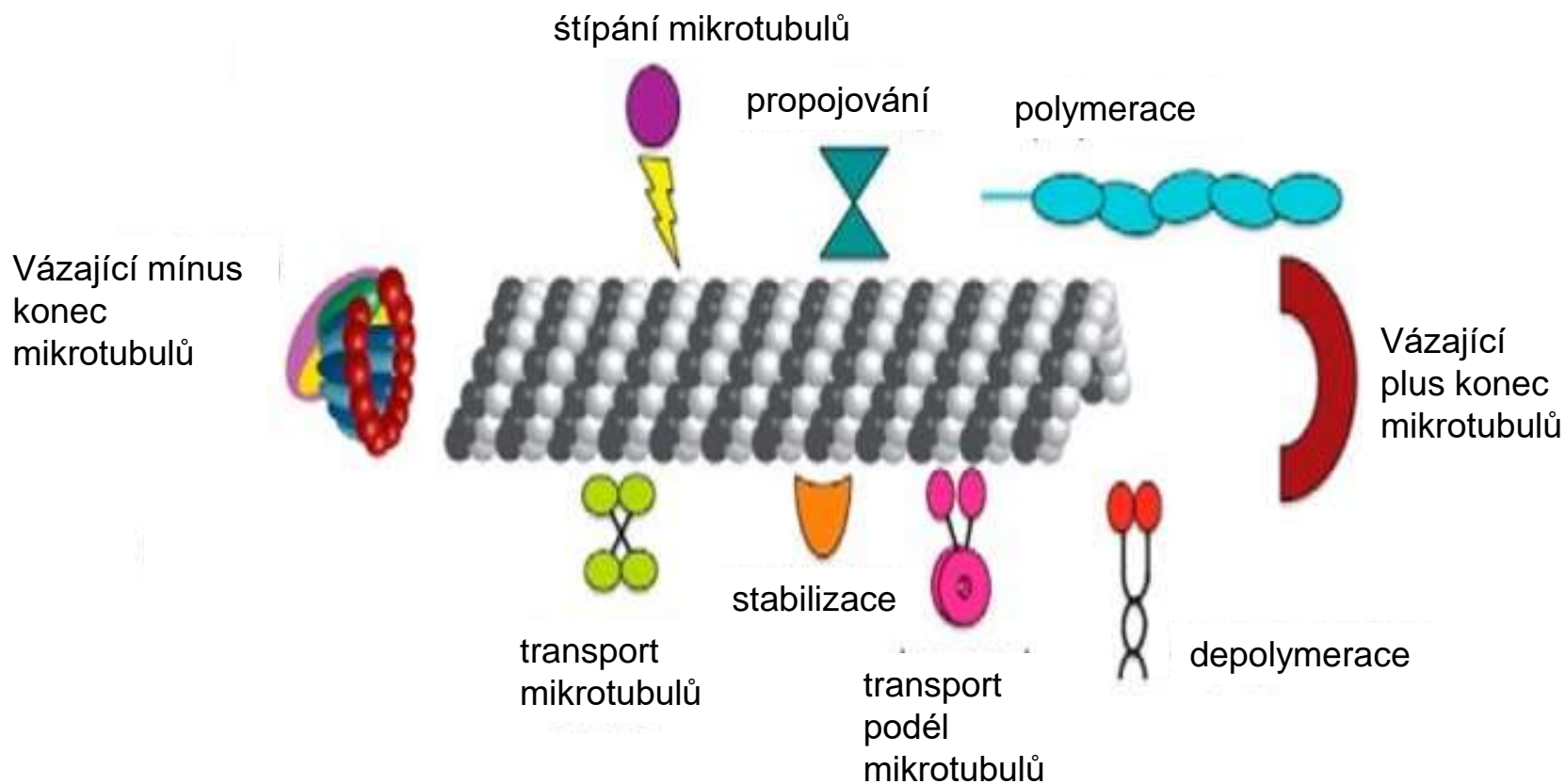
Výjimka: pohyblivé spermatické buňky s bičíky a ciliemi primitivnějších vyšších rostlin (mechy, kaprad'orosty, cykasy, *Ginkgo biloba*)



Spermatická buňka: játrovky kapradiny *Ginkgo biloba*

Cetrozóm a centrioly se u těchto rostlin vytvářejí *de novo* během posledních dělení před vznikem spermatické buňky. Někdy jsou nazývány **blefaroplast (blepharoplast)**.

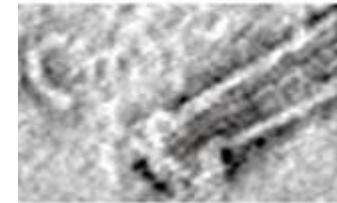
Mikrotubuly plní své funkce za pomoci dalších proteinů – proteinů asociovaných s mikrotubuly (MAPs)



Proteiny asociované s mikrotubuly (MAPs):

Vázající – konec MT:

γ -tubulin, Spc98, Spc97: vysoce konzervovaný

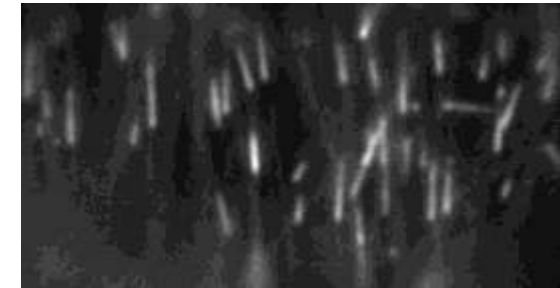


γ tubulin

Vázající + konec MT (tzv. +TIPs):

EB1 (end-binding protein 1); CLASP (CLIP-associated protein): vysoce konzervovaný

SPIRAL1: rostlinně specifický

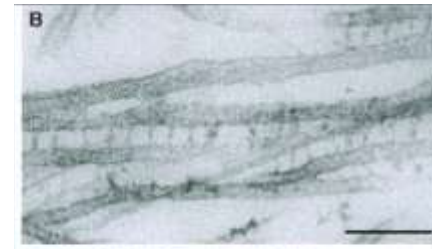


EB1

Stabilizující MT nebo urychlující polymeraci:

MAP200/MOR1: vysoce konzervovaný

MAP65: rostlinně specifický



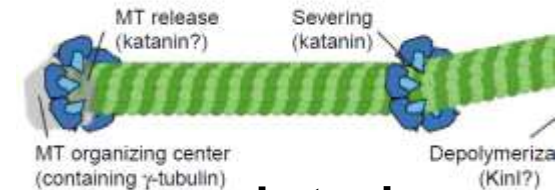
MAP65

Destabilizující MT:

Katanin: vysoce konzervovaný

Motory

Kinesin: vysoce konzervovaný, rostlinně specifické domény



katanin

Proteiny asociované s mikrotubuly

kineziny

Rostlinné buňky bez bičíků nekódují **dynein** (-konec translokující motor), ale redukce dyneinů je patrná i u zelených řas s bičíkem.

Rostlinné **kineziny**:

- Rozsáhlá rodina 61 členů (největší rodina v rámci eukaryot)
- Rodina rostlinných kinezinů obsahuje zástupce translokující k **+** i **- konci MT**

Mechanismus pohybu kinezinu:

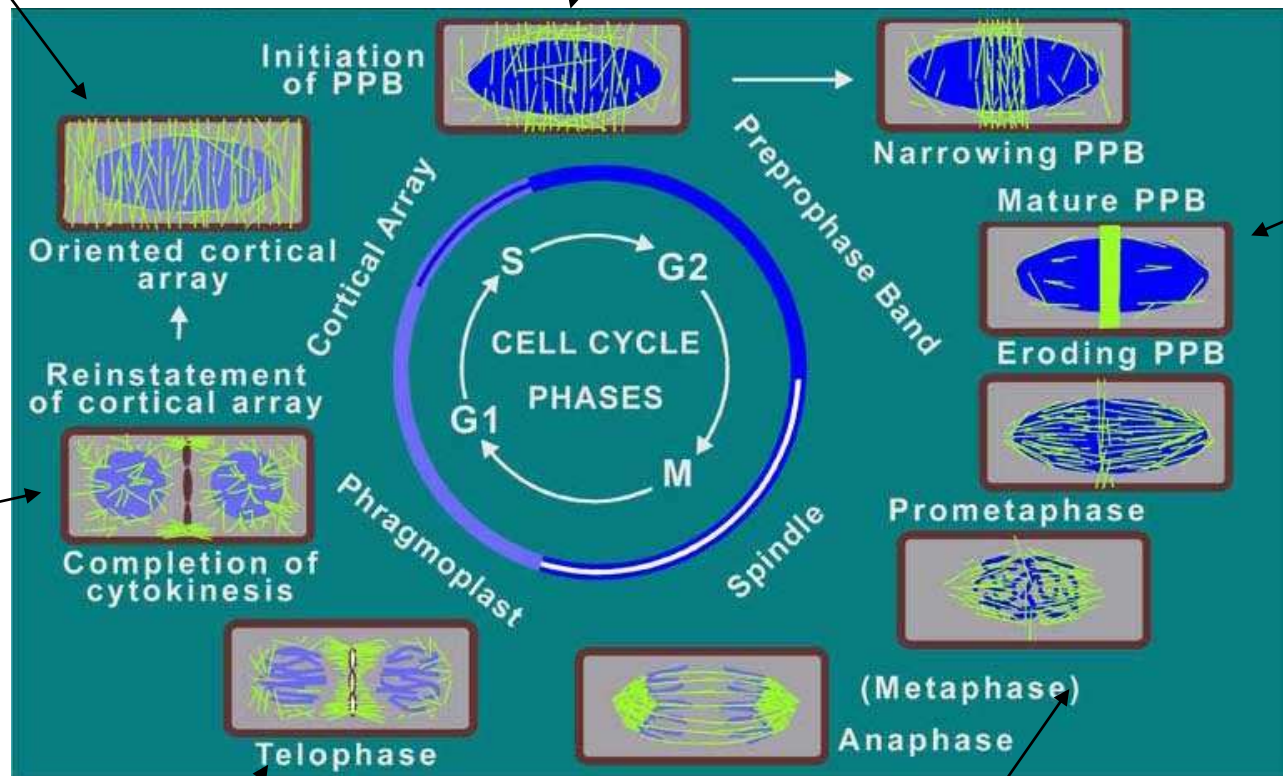
<https://www.youtube.com/watch?v=y-uuk4Pr2i8>

Pět mikrotubulárních struktur
v průběhu buněčného cyklu rostlinné buňky

Endoplazmatické MT

Kortikální MT

PPB

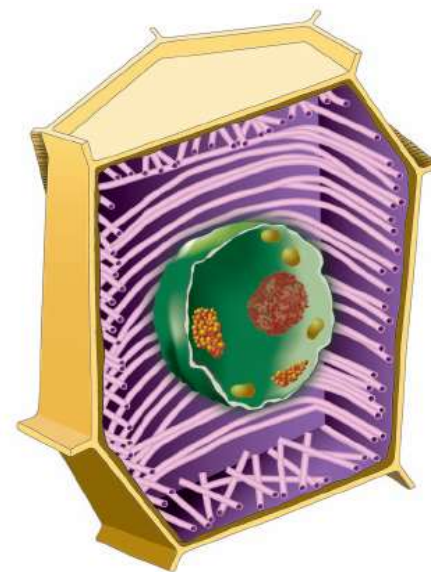
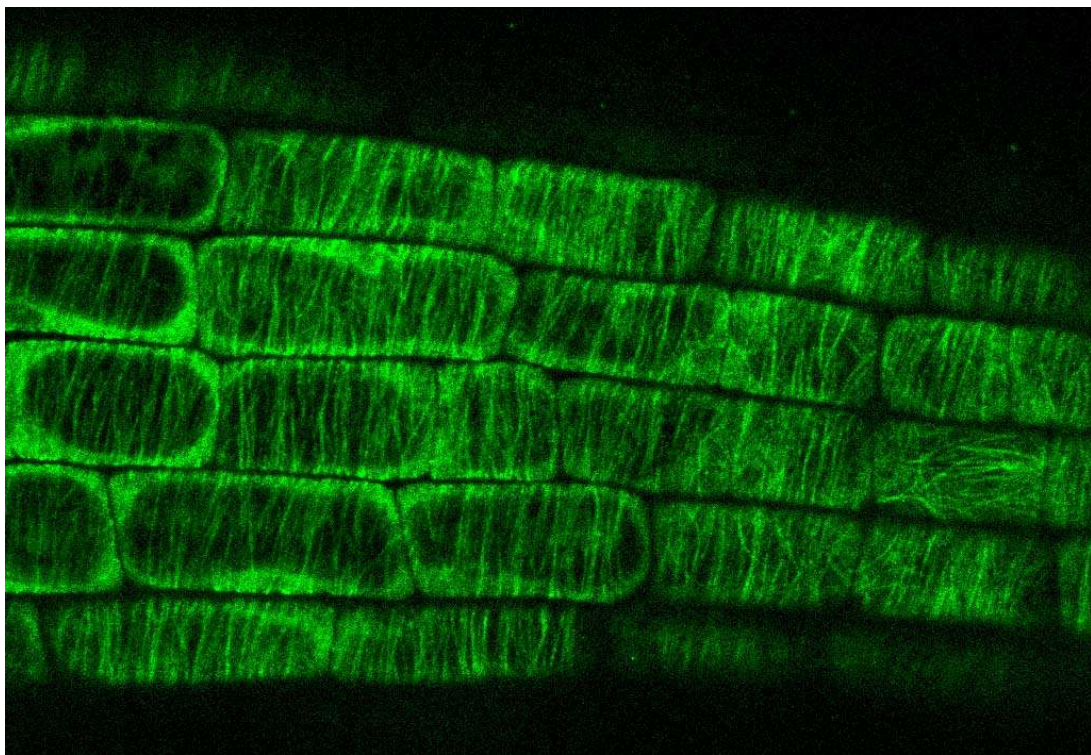


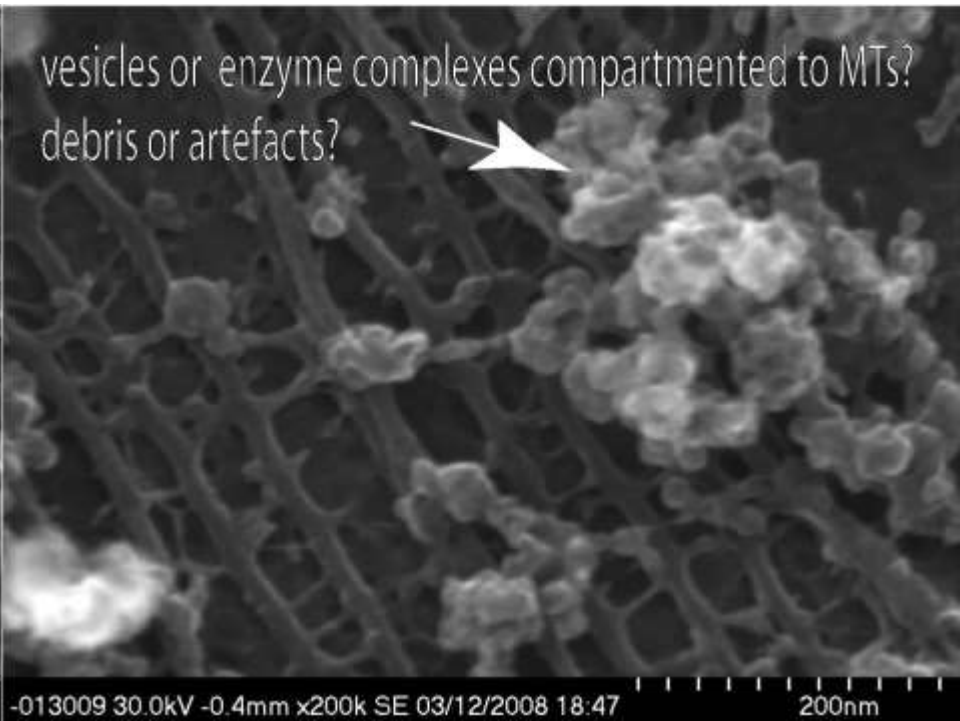
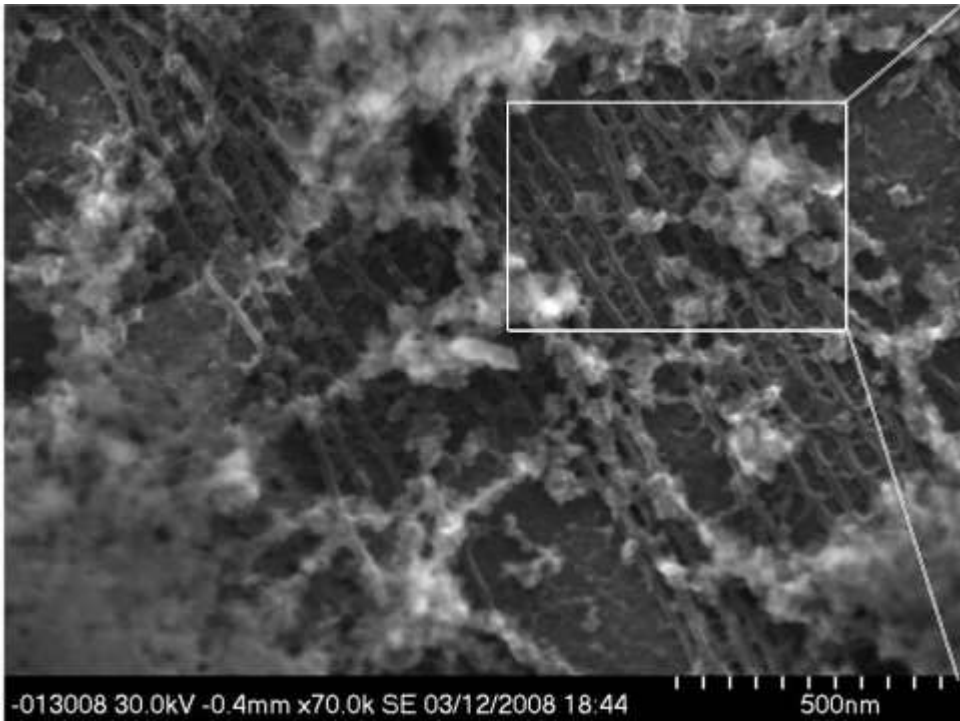
Endo-
plazmatické
MT

Fragmoplast

Vřeténko

KORTIKÁLNÍ MIKROTUBULY





Role kortikálních MT v syntéze buněčné stěny

1962 Paul B. Green: Mechanism for plant cell morphogenesis. Science 138:1404: **Kolchicin způsobuje stejnoměrné bubření buněk řas a ztrátu optických vlastností buněčné stěny v polarizovaném světle.**

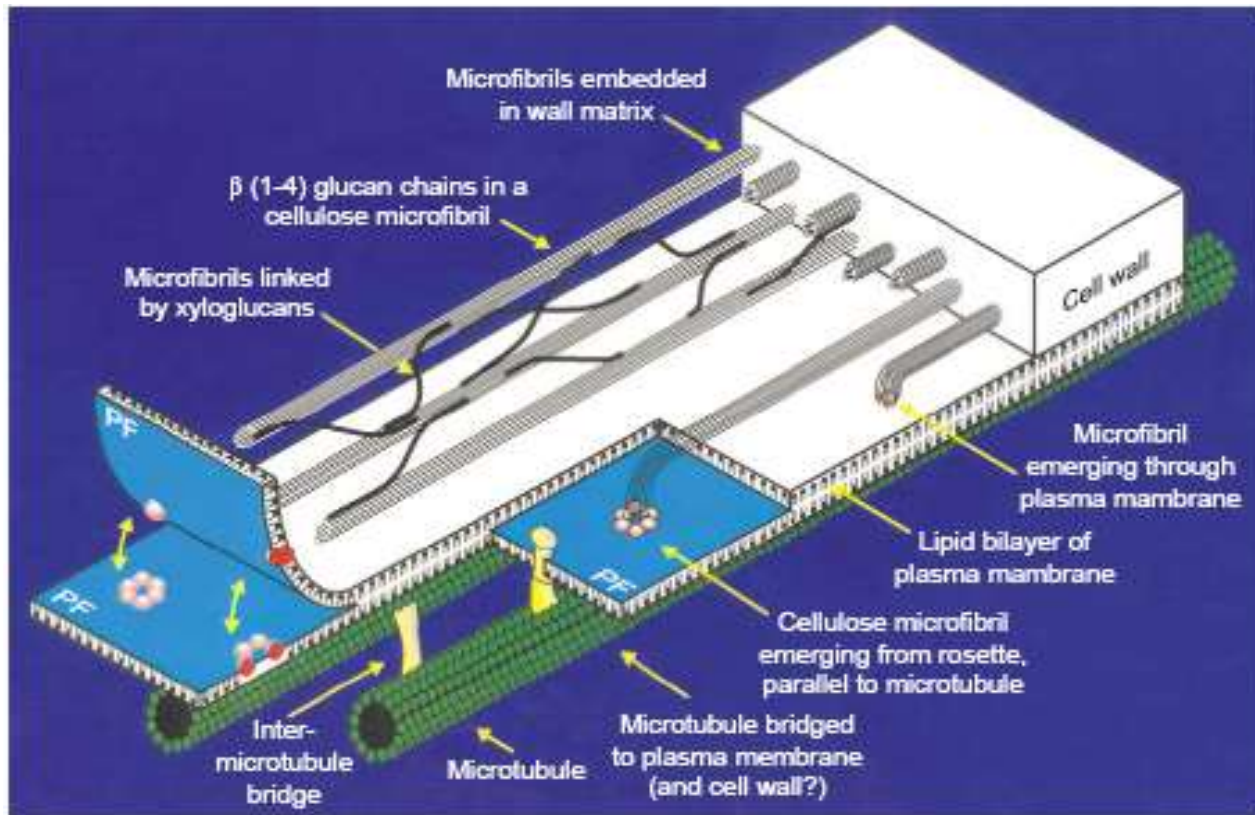
1963 Ledbetter MC, Porter KR: A 'microtubule' in plant cell fine structure. J Cell Biol 19:239-250: **Poprvé popsány mikrotubuly.**

1985 Lloyd CW, Clayton L, Dawson PJ, Doonan JH, Hulme JS, Roberts IN, Wells B: The cytoskeleton underlying side walls and cross walls in plants: molecules and macromolecular assemblies. J Cell Sci Suppl 2:143-155: **Mikrotubuly leží často paralelně s vlákny buněčné stěny.**

2006 Paredez AR, Somerville CR, Ehrhardt DW: **Vizualizace CESA *in vivo* a přímý důkaz kontroly pohybu CESA podél cMT.**

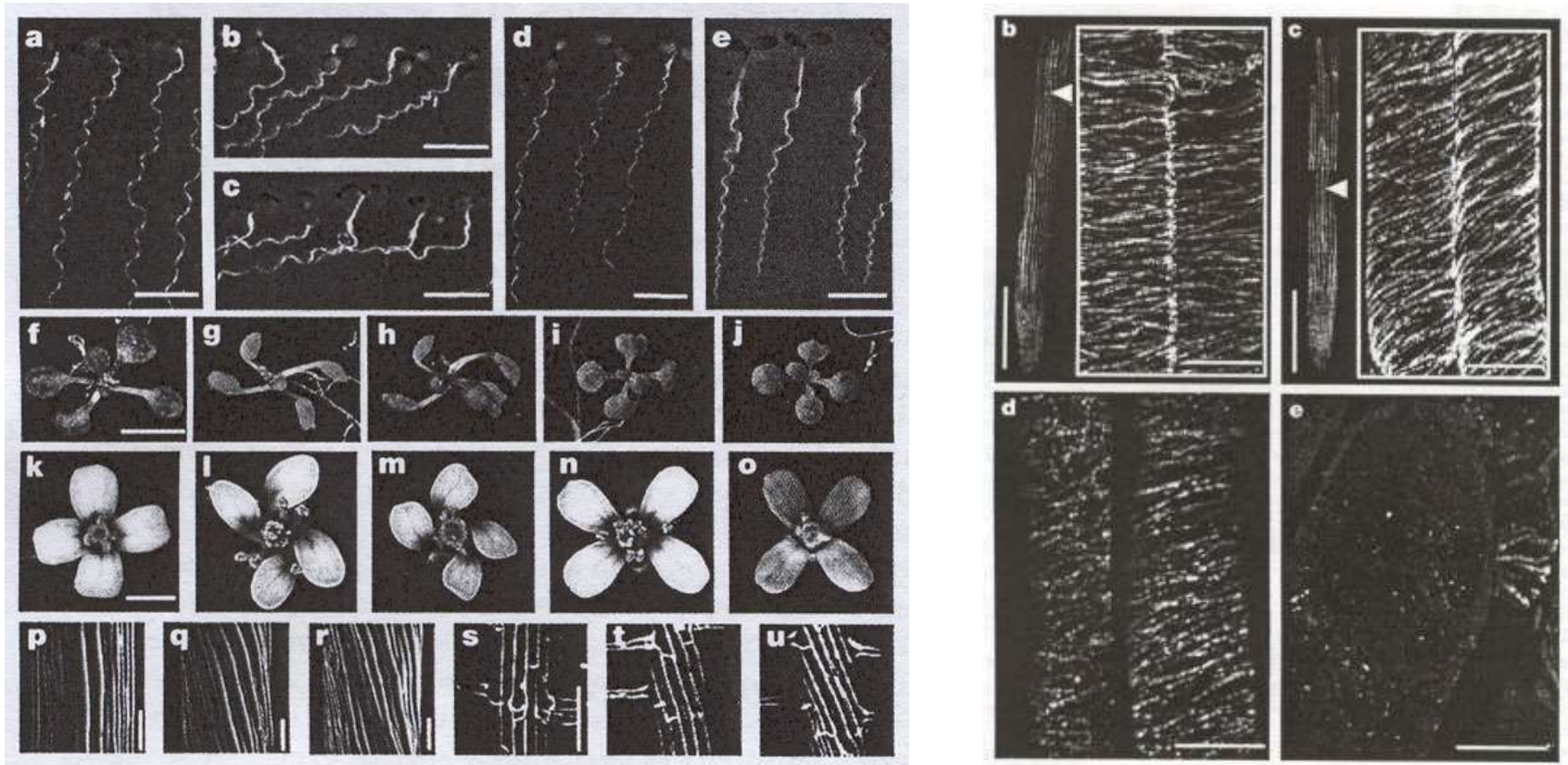
Kortikální mikrotubuly určují orientaci mikrofibril v buněčné stěně, avšak v mnohých případech je ukládání celulózy na mikrotubulech nezávislé.

Role kortikálních MT v syntéze buněčné stěny - model



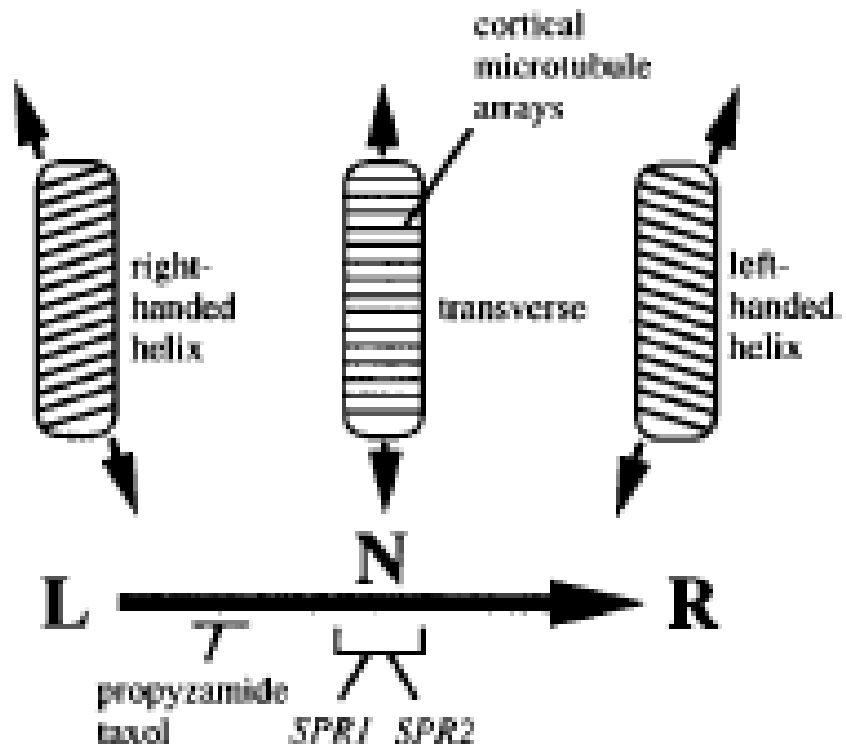
- MT a celulóza mají vzájemný vliv na své uspořádání, ale mohou operovat i nezávisle
- Molekulární podstata interakce mezi celulózosyntázovými komplexy a MT: protein CSI1 (publ. 2012)

LEFTY (lefty1 a lefty2)



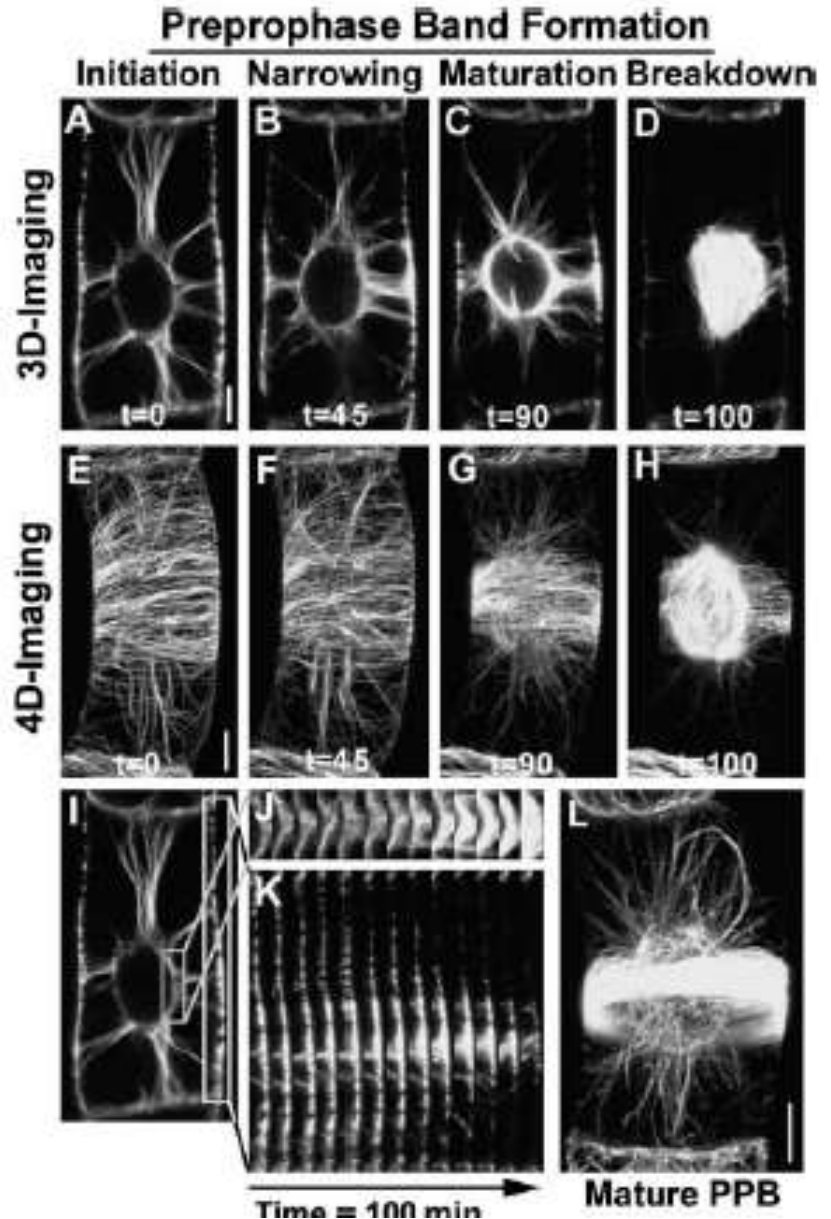
lefty1: Ser-180 → Phe, TUA6

lefty2: Ser-180 → Phe, TUA4

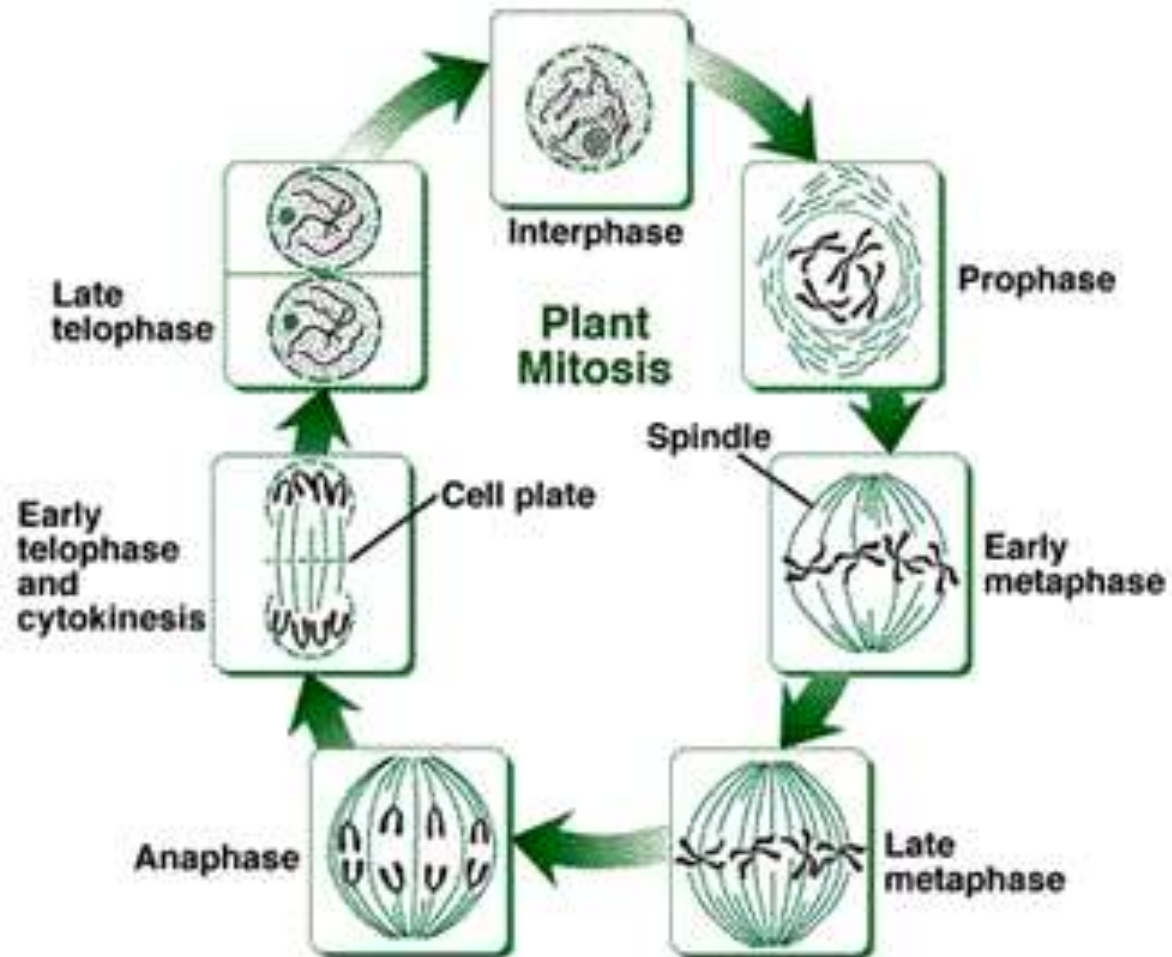


PŘEDPROFÁZOVÝ PRSTENEC (PPB)

- Tvoří se těsně před mitózou transformací kortikálních MT, rozpadá se během profáze.
- Určuje polohu budoucí přepážky mezi buňkami
- PPB zanechává „**paměťovou stopu**“ v podobě signálních molekul na membráně pro **budoucí fúzi přepážky**

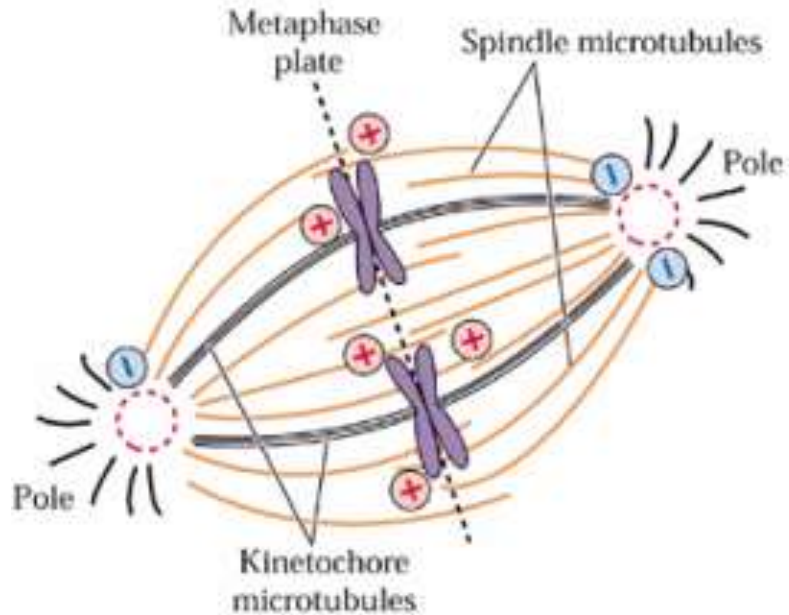


Mitóza

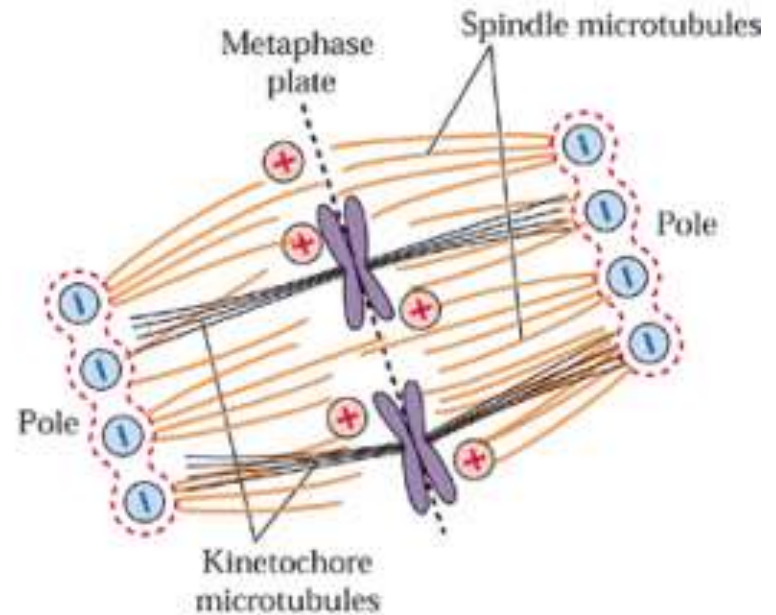


MITOTICKÉ VŘETÉNKO

(A) Animal spindle

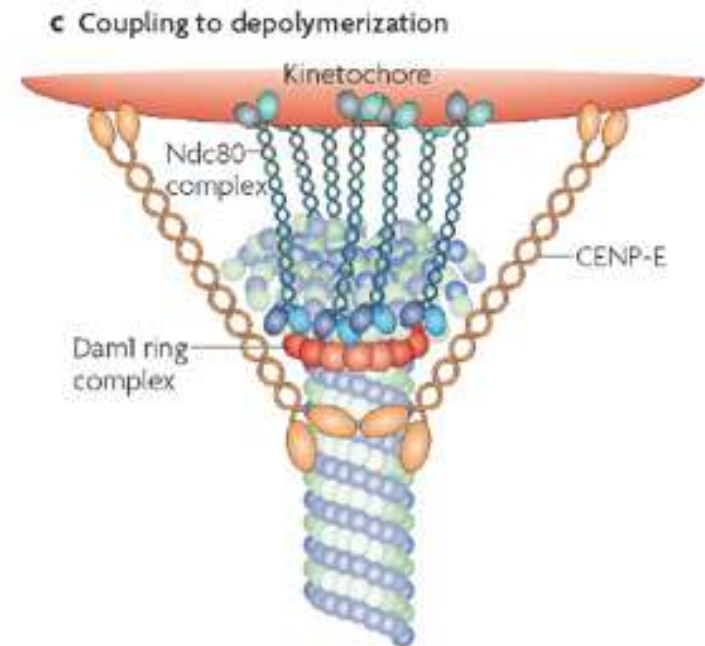
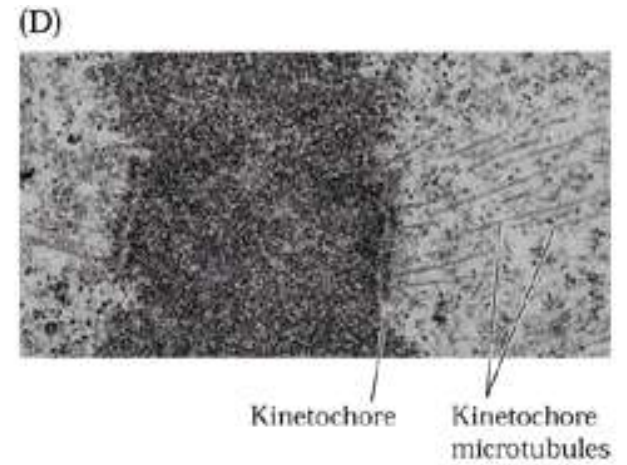
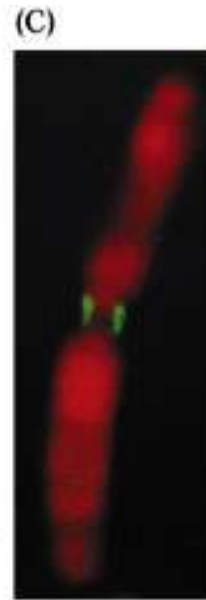
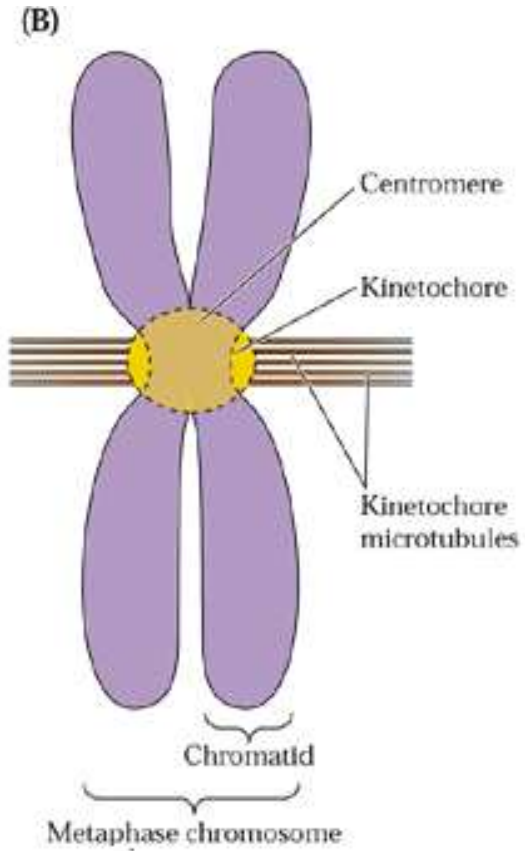
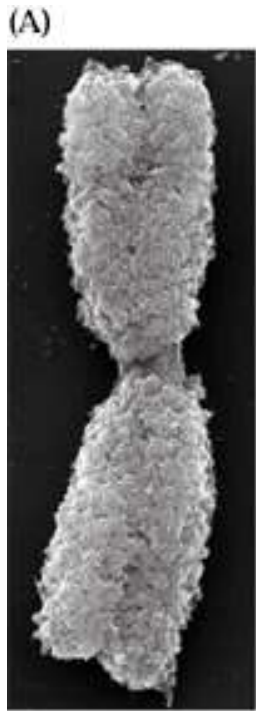


(B) Plant spindle



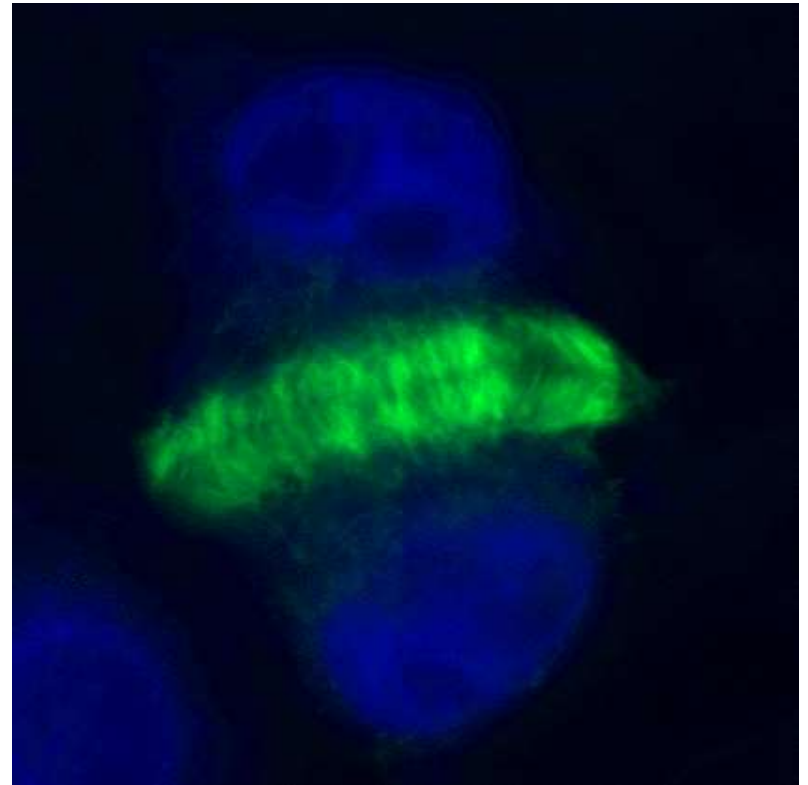
**Mitotické
vřeténko vyšších
rostlin:**

Mikrotubuly
vřeténka nejsou
koncentrované v
jednom bodě na
pólech; chybí
astrální mikrotubuly

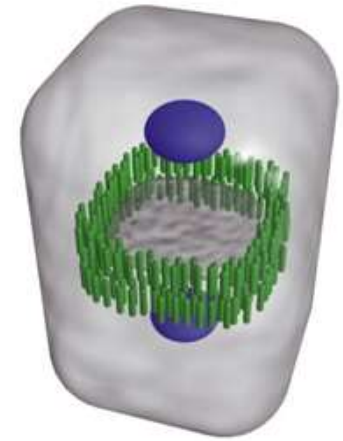


FRAGMOPLAST

- dvě antiparalelní řady mikrotubulů, tvořící prstenec rostoucí centrifugálně
- „lešení“ pro tvorbu buněčné přepážky
- kromě MT je tvořen aktinem, váčky GA, ER, a mnohými proteiny (např. motorové proteiny)
- Po fúzi nové přepážky s mateřskou BS fragmoplast mizí



Raná fáze dělení

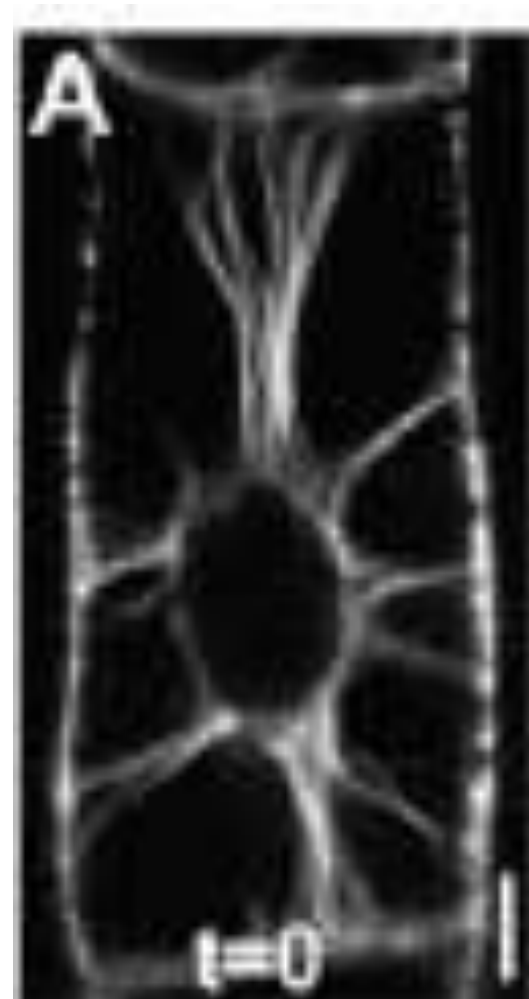


Rozvinutá fáze dělení

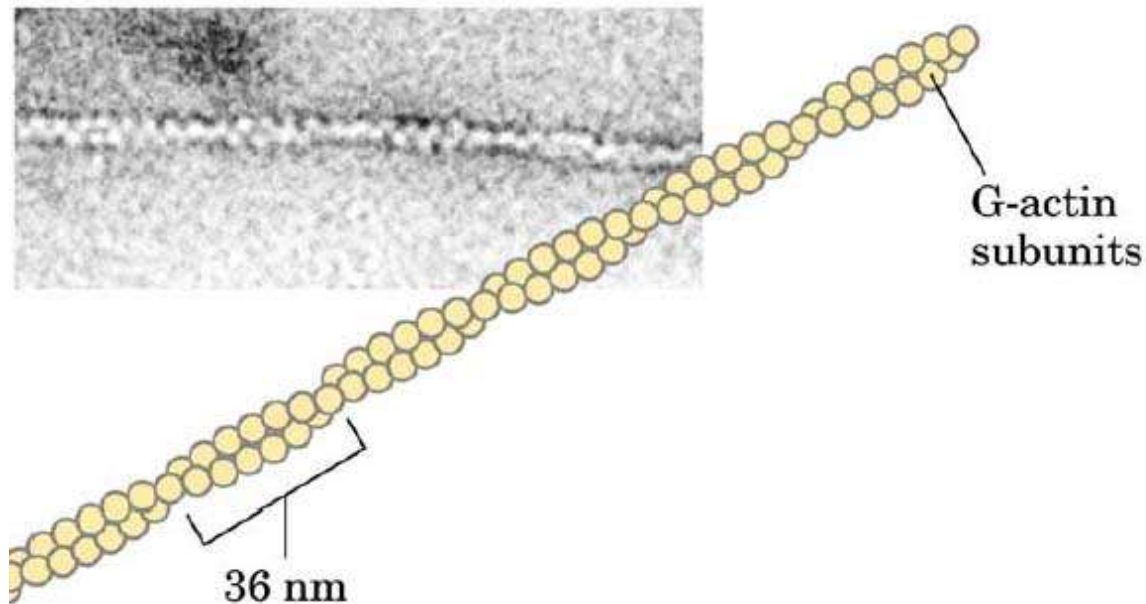
ENDOPLAZMATICÉ MIKROTUBULY

- nukleace MT na jaderné membráně

- Mikrotubuly nukleované na jaderné membráně
- Lze pozorovat v G2 fázi a přechodu do mitózy (kontrola pozice jádra)
- Těsně po obnovení jaderné membrány v telofázi, při přechodu od fragmoplastu ke kortikálnímu uspořádání MT
- Jaderná membrána je „**silným nukleátorem**“ MT též:
 1. Ve stresových situacích, kdy došlo k dočasné depolymeraci MT (chlad)
 2. V okamžicích, kdy není vytvořena BS



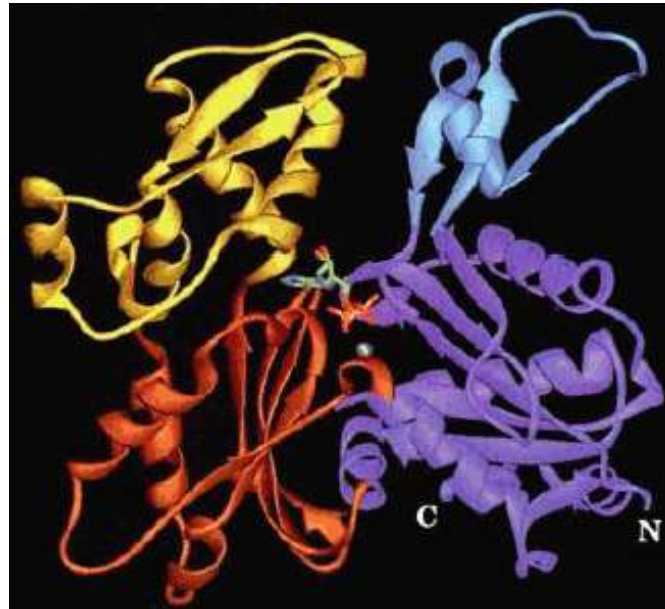
Aktin



Aktinová filamenta:

Základní stavební jednotka aktinových vláken je globulární protein aktin. Aktin polymeruje do vlákna: pravotočivé šroubovice o průměru cca 8 nm. Také aktinové filamentum je polarizovaná a vysoce dynamická struktura.

Aktin



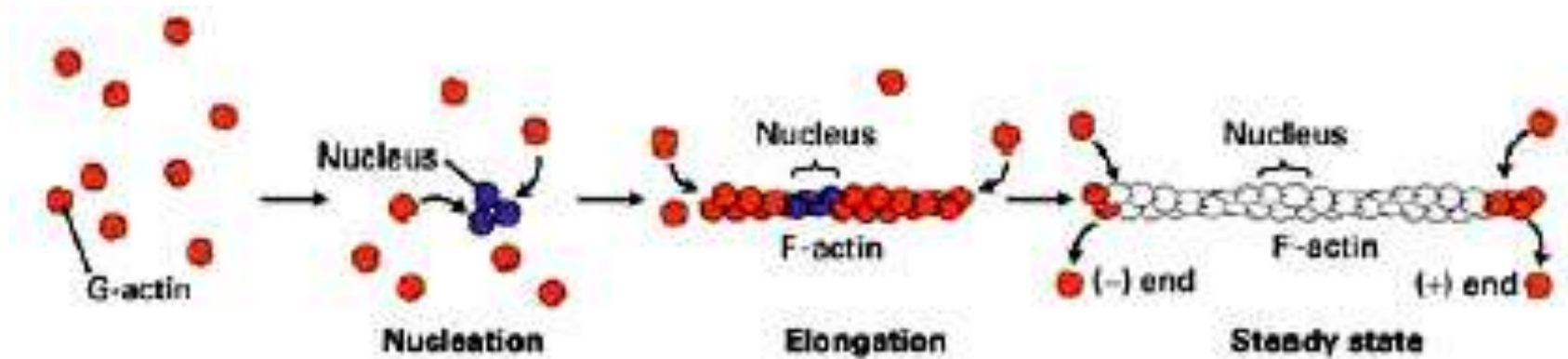
Aktin:

Aktin je globulární protein o velikosti asi 43 kDa a je složen z asi 375 AK.

Sekvenční homologie mezi různými aktiny je vysoká.

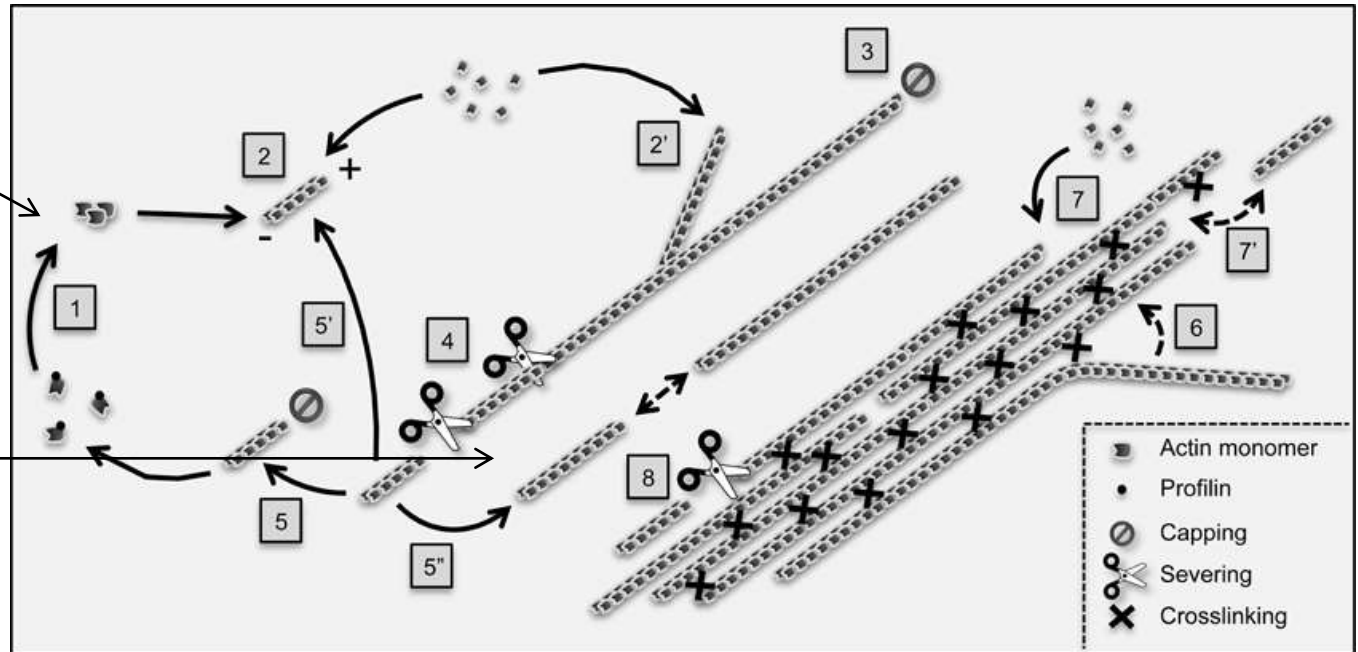
Kódován genovými rodinami.

Nukleace aktinu a dynamika v rostlinné buňce

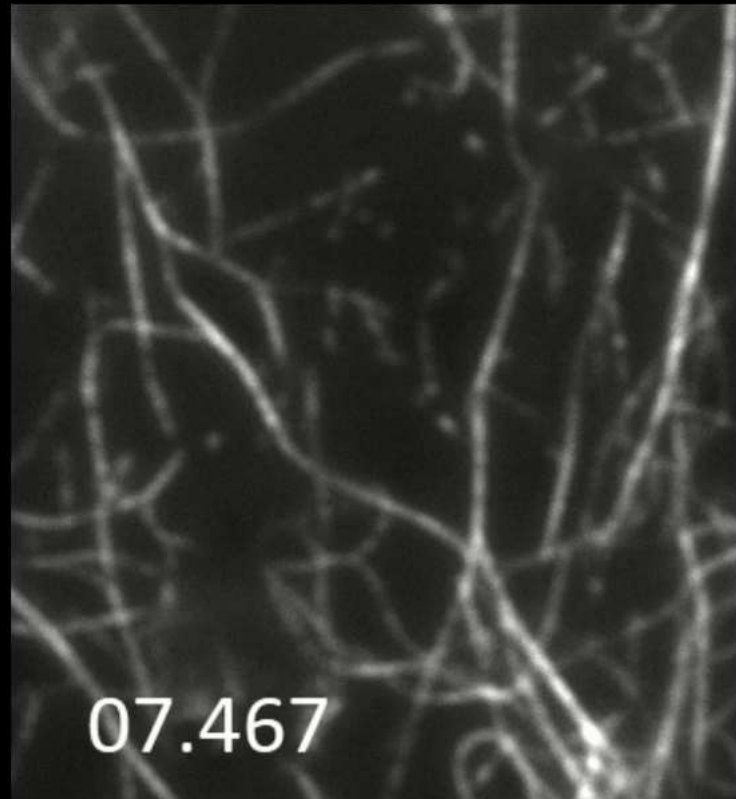


Nukleace de novo (z monomerů)

Polymerace elongací krátkých fragmentů aktinu



Dynamika aktinového cytoskeletu v rostlinné buňce



Proteiny asociované s aktinem (AAPs)

Profilin – malý, konzervovaný protein. Vazba aktinového monomeru. V přítomnosti volného +konce indukuje polymeraci; v případě čepičkovaného konce udržuje aktin v monomerní formě.

Rodina **ADF/cofilin** – zvyšují depolymeraci na -konci vlákna, vlákna štípají a tím zvyšují počet volných konců, zvyšují hydrolyzu ATP na jednotkách polymerovaných do vlákna.

Capping protein (CP) – stabilizuje vlákno, disociuje pomalu.

Vilin – indukuje tvorbu svazků AF. V závislosti na koncentraci Ca^{2+} má též aktivitu fragmentující a čepičkující.

Gelsolin – v závislosti na koncentraci Ca^{2+} aktinová vlákna štípe, nukleuje nebo čepičkuje.

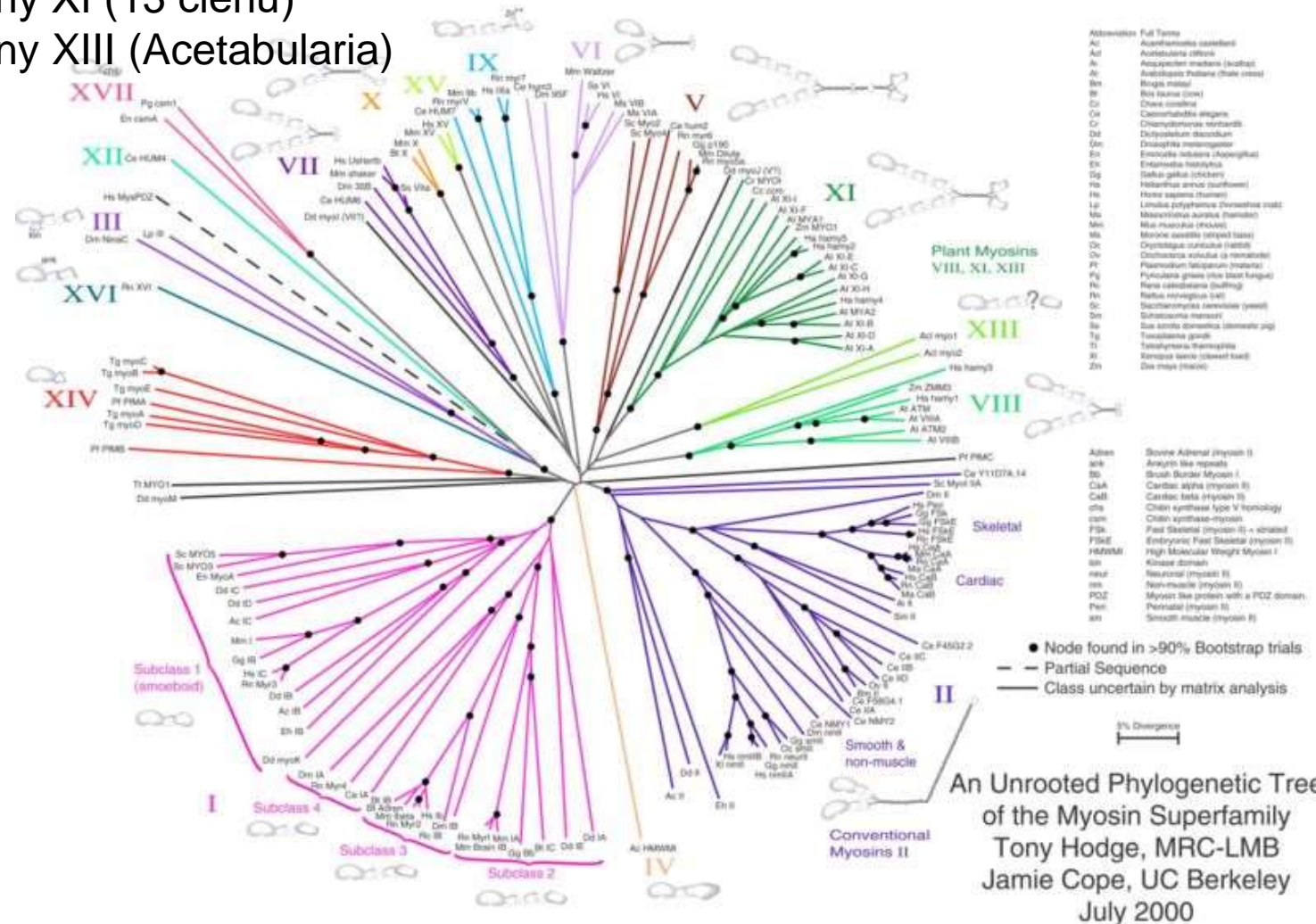
Fimbrin – tvoří svazky, které stabilizuje proti depolymeraci způsobované jinými AAP.

Arp2/3 a forminy: nukleace aktinu

Proteiny asociované s aktinem (AAPs) - myoziny

Rostlinné **myoziny** spadají do 2 rostlinně-specifických rodin:

- Myoziny VIII (4 členové)
- Myoziny XI (13 členů)
- Myoziny XIII (Acetabularia)



Proteiny asociované s aktinem (AAPs) - myoziny

Funkce myozinů:

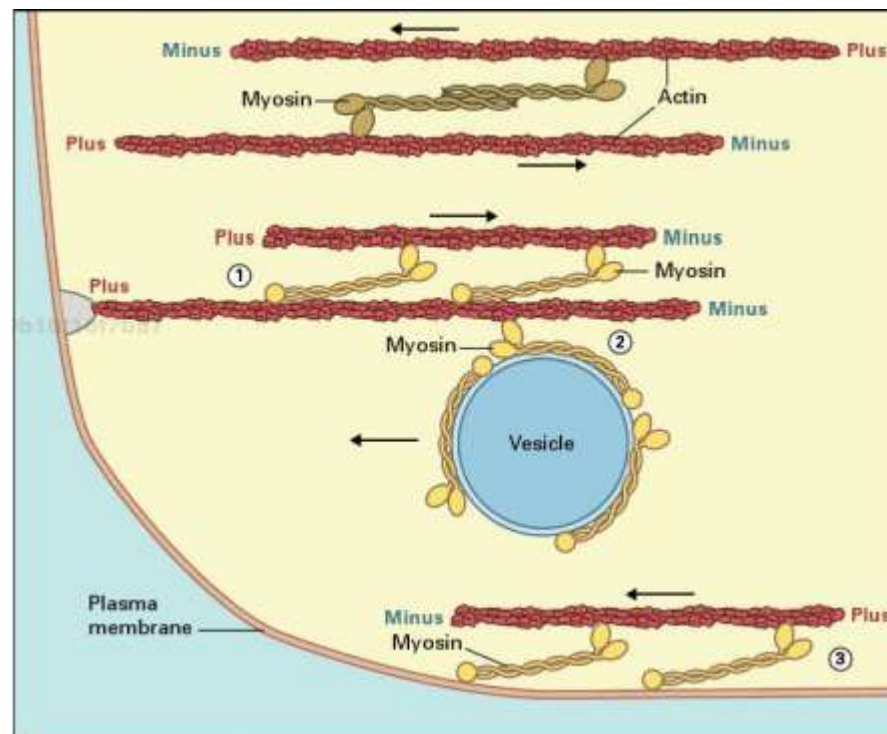
- Pohyb cytoplazmy

- Plazmodesmy, lokalizace na ER (rodina VIII)

- Interakce s organelami (podtřída myozinů XI)

MYA2 (rodina XI) – mutantní rostliny jsou zakrslé, trichomy nevětvené, porušen polární růst vlásků a pylových láček

Myozin z řasy *Chara corallina* (rodina XI) je nejrychlejší známý myozin.



Role aktinu

Proudění cytoplazmy – hlavní silou je aktomyozinem hnaný pohyb organel

Struktura cytoplazmy – architektura cytoplazmatických provazců a vakuoly – interakce s membránou

Pozice organel – jádro, chloroplasty, mitochondrie, ER

Kontrola expanze buňky – především pylová láčka a kořenové vlásky

Zprostředkování **gravitropické reakce**

Proudění cytoplazmy – jeden z prvních pozorovaných pohybů, založených na aktomyozinovém principu

Historie identifikace proudění cytoplazmy a jejího mechanismu:

Bonaventura Corti (1774) – popsáno poprvé **proudění cytoplazmy**

1945 – identifikace aktinu

Huxley & Huxley (1954) – teorie **svalového stahu**

Kamiya & Kuroda (1956) – teorie **cytoplazmatického proudění**

Nagai & Rebhun, Kamitsubo (1966) – objev **svazků vláken kolem chloroplastů**

Palewitz et al., Williamson (1974) – **identifikace aktinových vláken v buňkách řas**

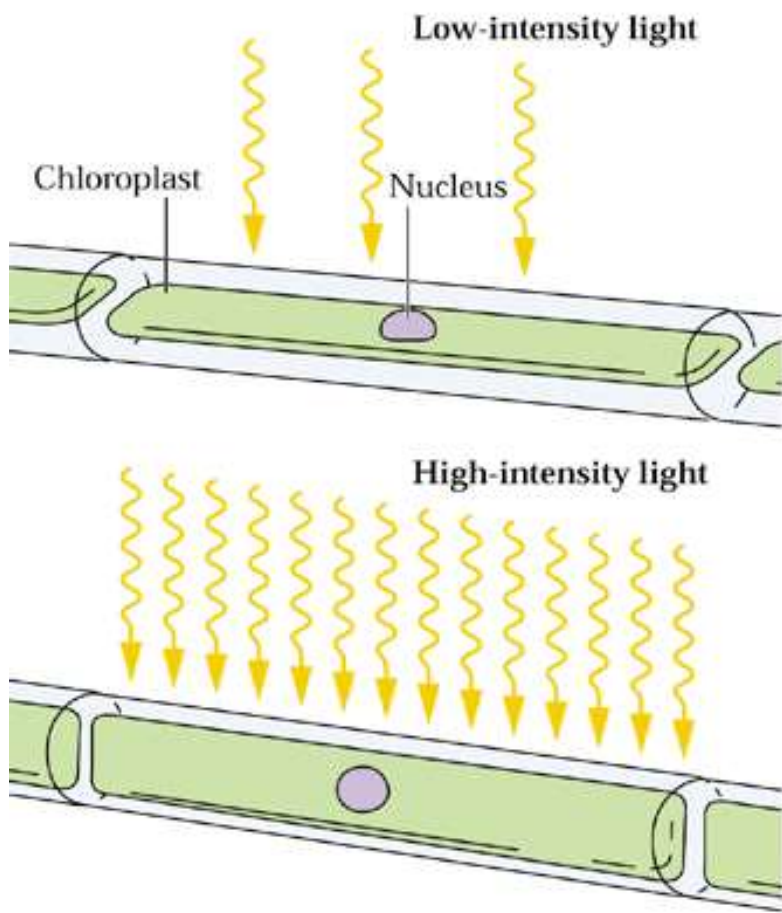
1986 – vývoj *in vitro* motility assay

1994 – purifikace myozinu XI

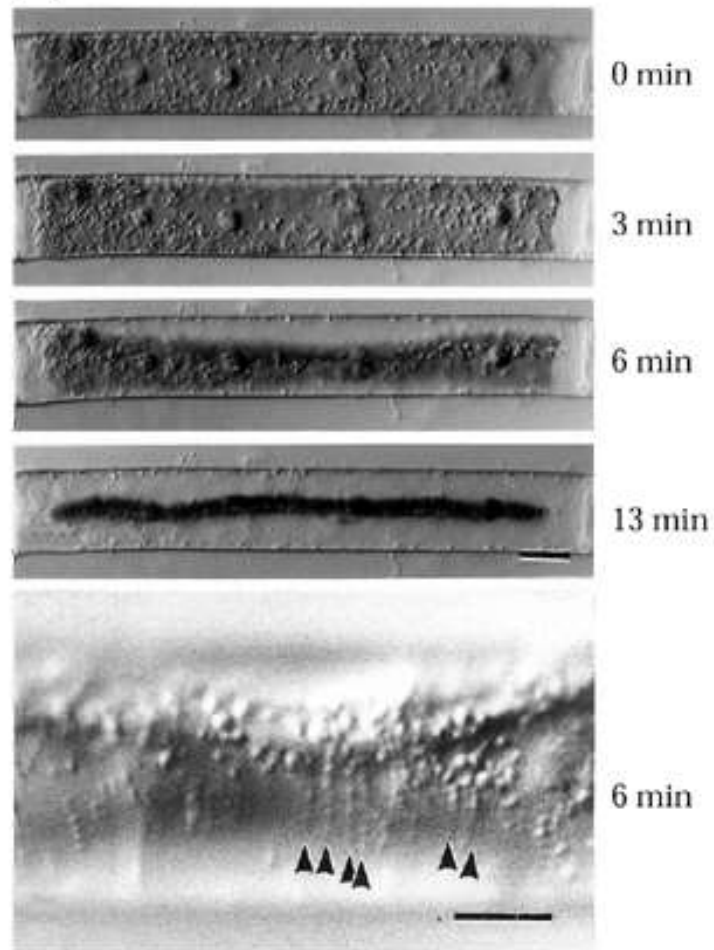


Pozice organel – pohyb chloroplastů v závislosti na světle

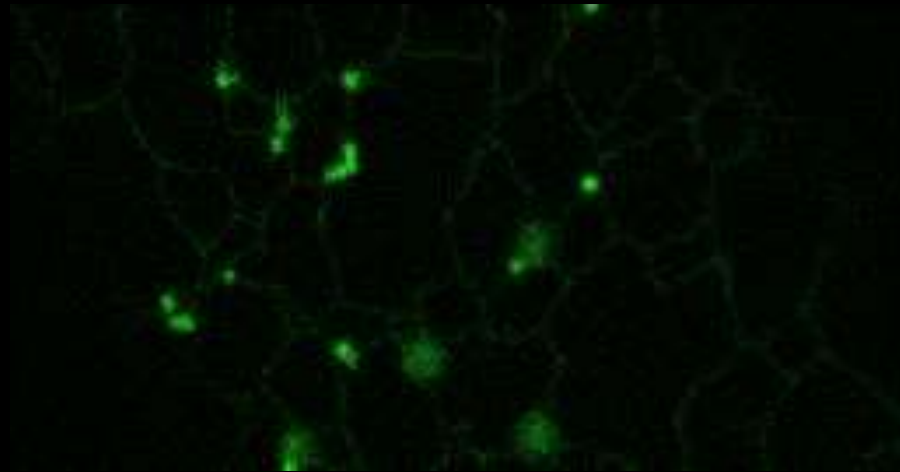
(A)



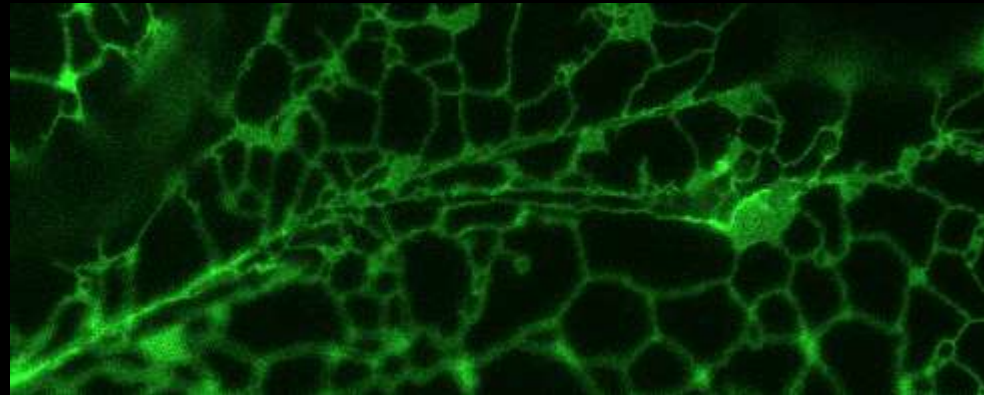
(B)



Pozice a motilita organel – ER a GA



GA



ER

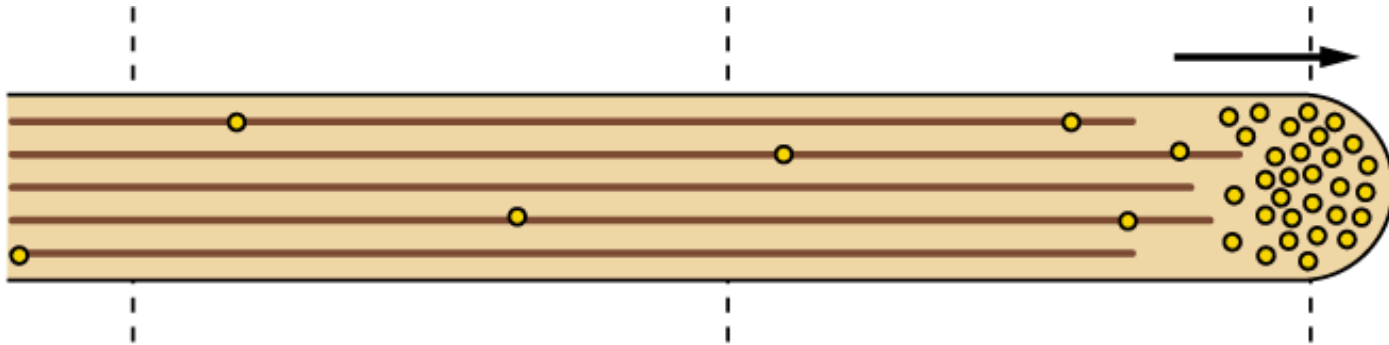
Apikální růst

Příklady apikálního růstu: kořenové vlásky a pylové láčky, rhizoidy řas

Pro apikální růst je nezbytný funkční **aktinový cytoskelet** a funkční **sekrece Golgiho váčků**.

Signalizace směřovanými toky Ca^{2+} iontů.

Regulace pomocí Rop GTPáz



Korenovy vlasek 1

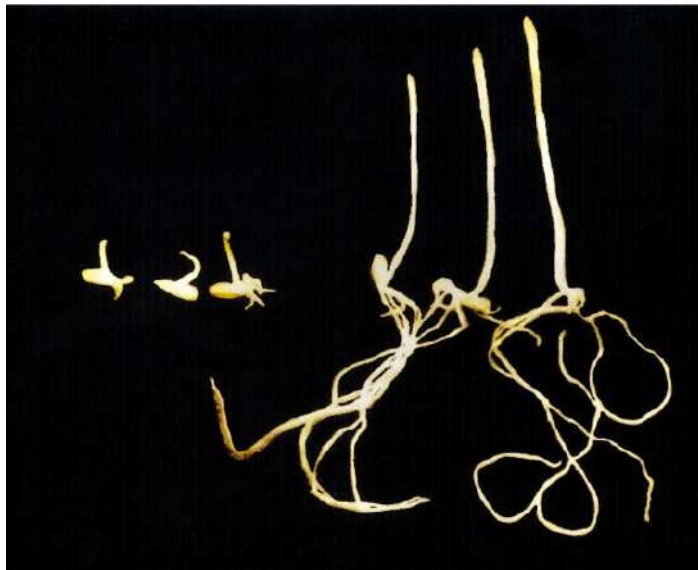
Korenovy vlasek 2

Difúzní růst rostlinných buněk

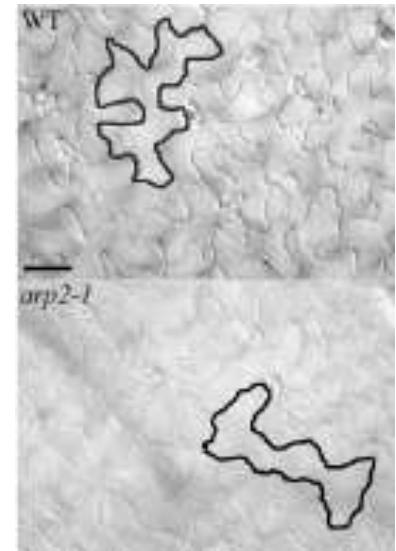
Role F-aktinu:

morfogeneze složitých tvarů (pokožkové buňky, trichomy)

Elongace buněk



Žito: Latrunkulin B kontrola



Vnímání geotropického signálu

Rhizoid řasy Chara: jednobuněčný model

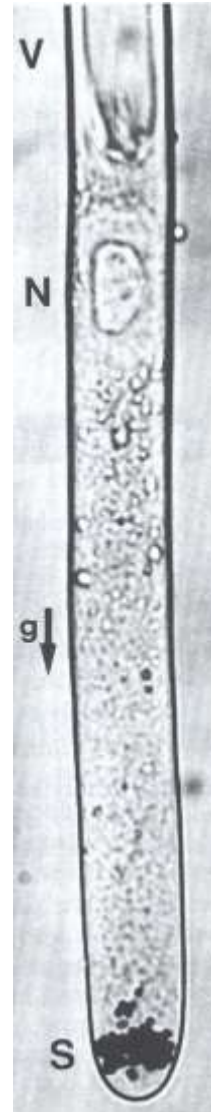
-zonálně uspořádané
organely

-základem komplexu
citlivého na gravitaci jsou
amyloplasty, cisterny ER
a aktinová vlákna

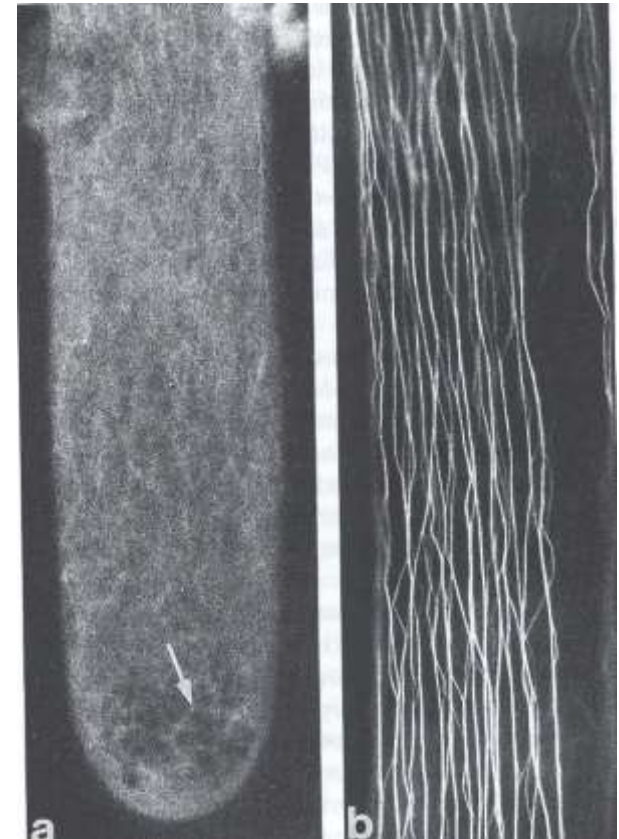
S statolith (amyloplasty)
N jádro
V vakuola

Bazální část

Apikální část



Uspořádání aktinu



v apikální
části

v bazální
části

Ribozómy

Ribozómy:

Makromolekulární komplexy
ribozomální RNA (rRNA) a
ribozomálních proteinů.

Biosyntéza proteinů.

2 podjednotky: velká a malá.

Velikost : S (Svedberg)

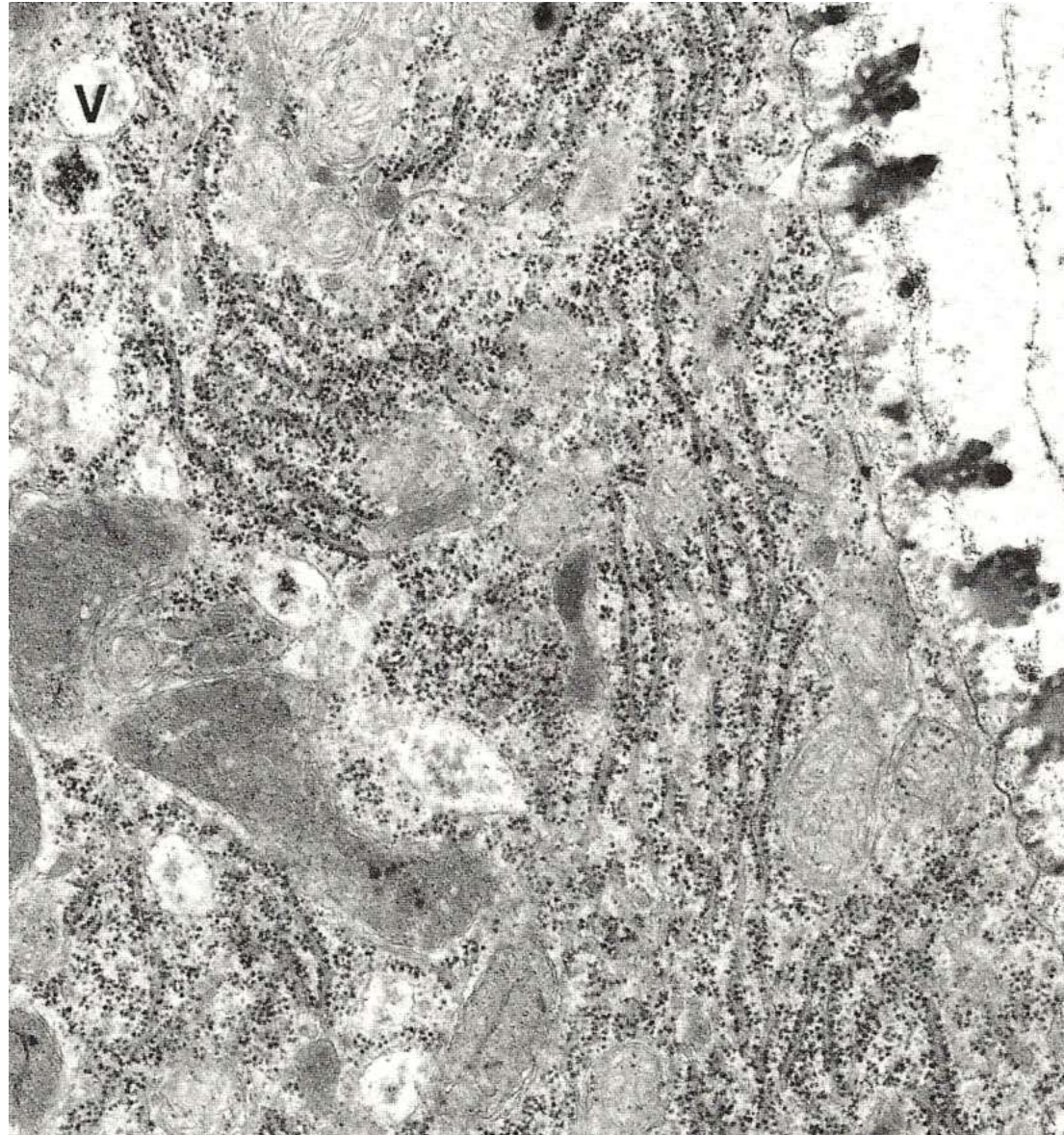
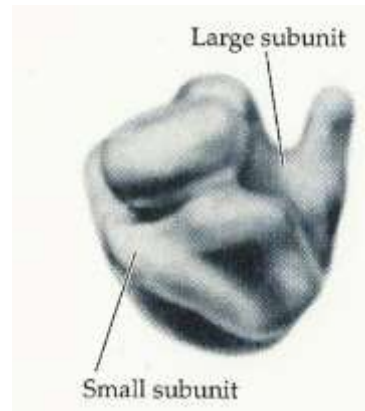
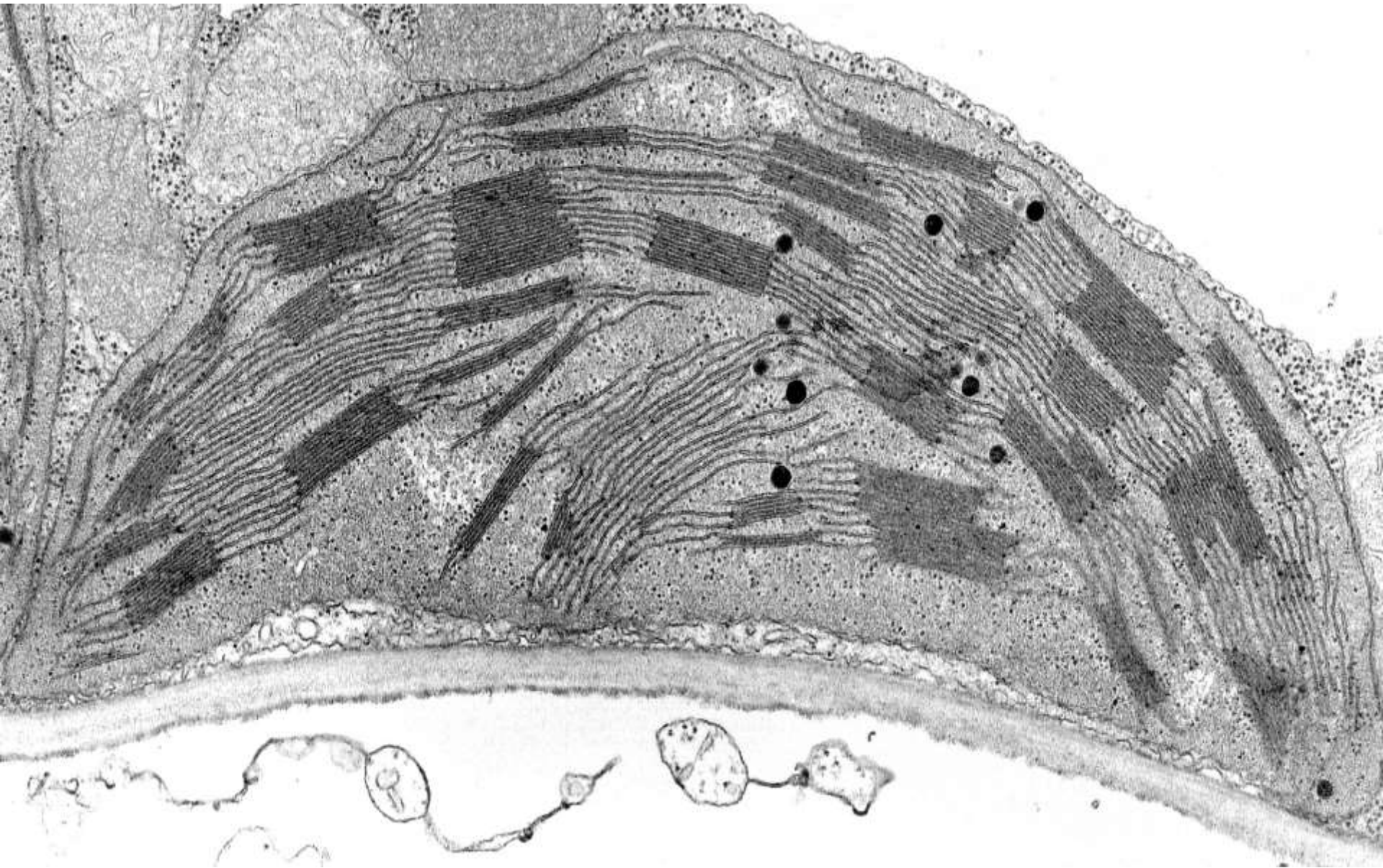


Table 9.1 Summary of the composition and properties of various ribosome types

	Svedberg units, S			
	Ribosome	Subunits	RNAs	Number of proteins
Plant cytosol	80	40	18	~35
		60	28, 5.8, 5	~50
Plant plastids	70	30	16	22-31
		50	23, 5, 4.5	32-36
Plant mitochondria	~70	30	18	>25
		50	26, 5	>30
Prokaryotic	70	30	16	21
		50	23, 5	31





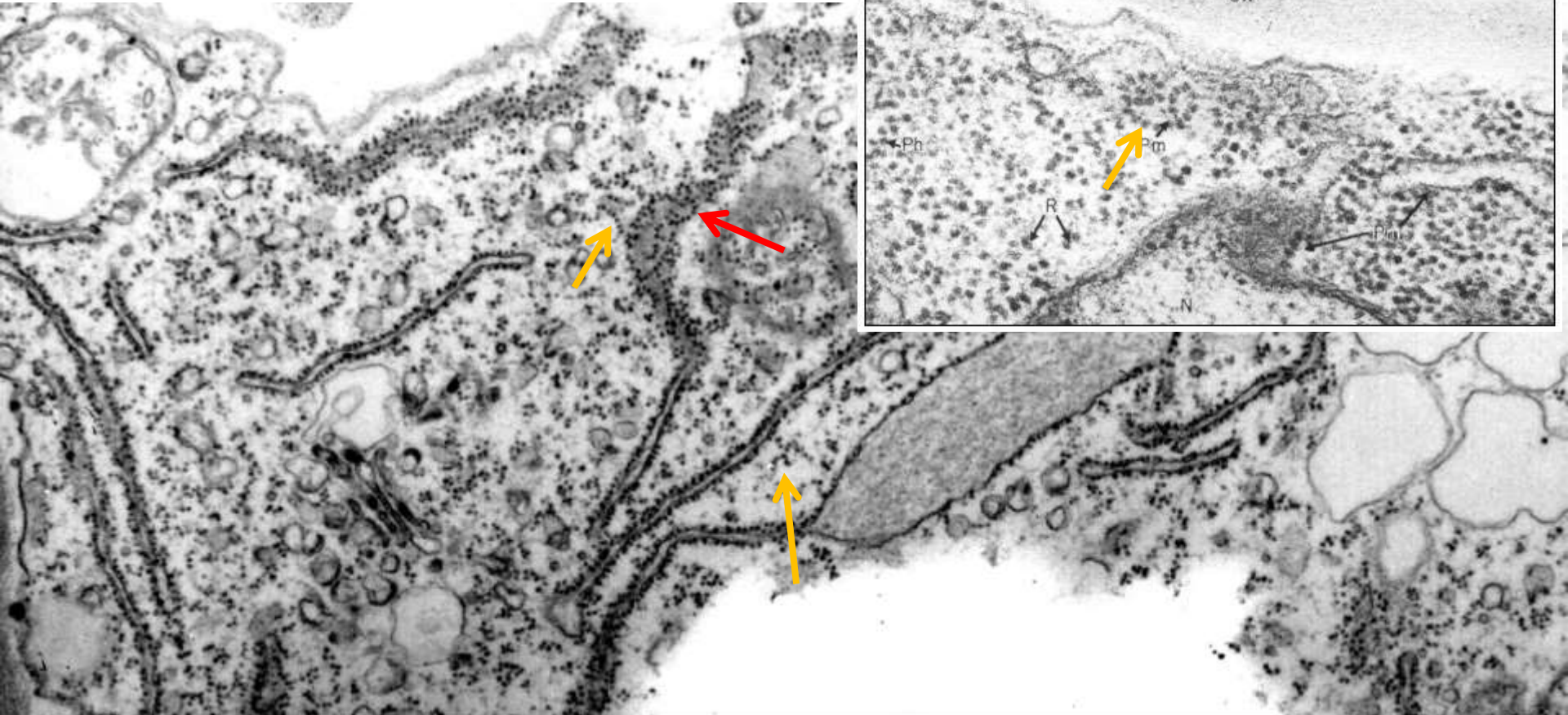
Polyzomy:

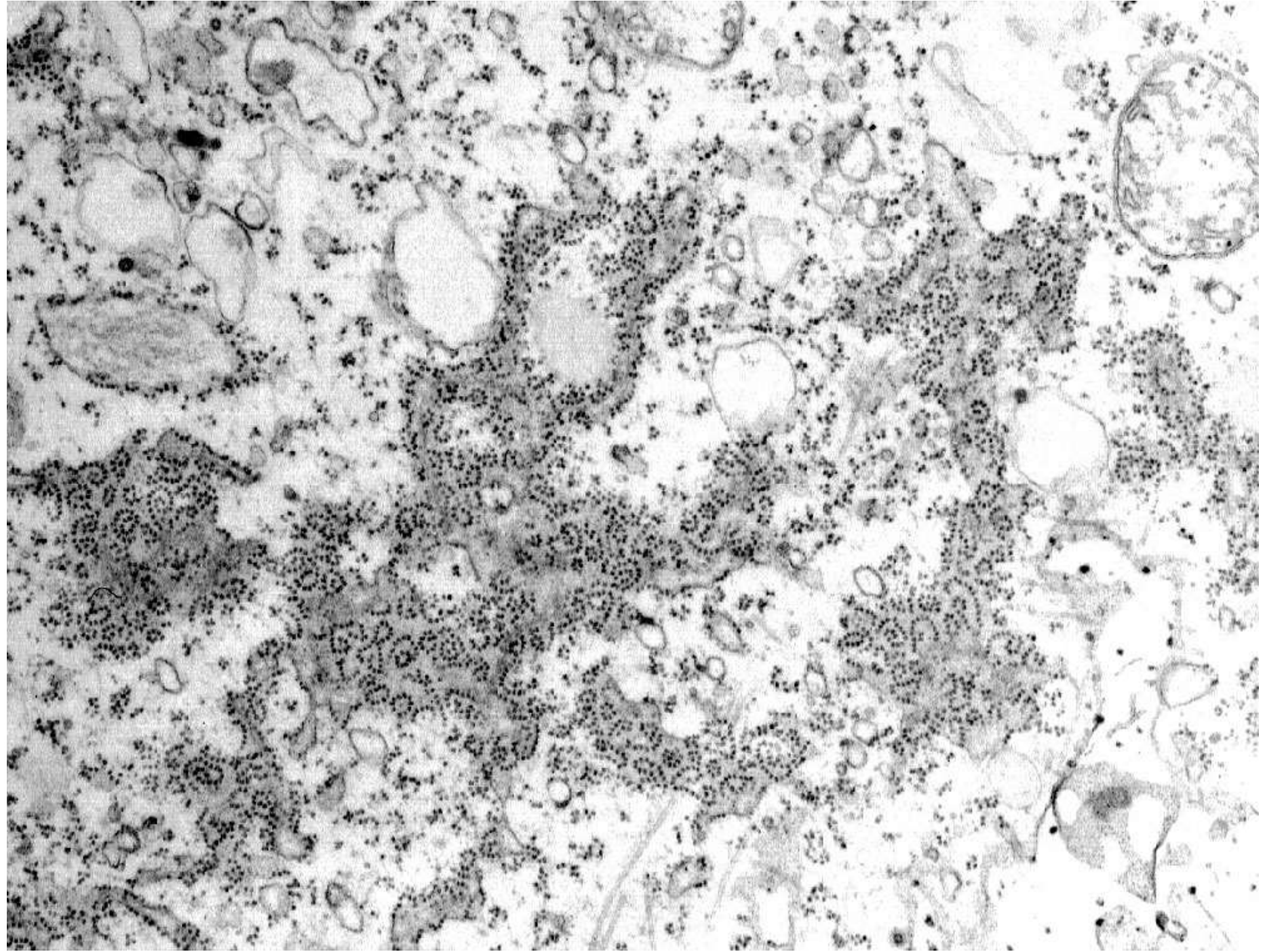
Při překlada RNA se na molekulu váže několik ribozómů – vzniká **polyzóm**

Polyzomy v cytoplazmě

Membránově vázané polyzomy

Polyzomy v semiautonomních organelách





Shrnutí:

Popsat strukturu aktinu a mikrotubulů, společné vlastnosti, odlišnosti (dynamika, asociované proteiny - vysvětlení jejich funkce)

Centrozomální a acentrozomální organismy

Struktura a funkce bičků

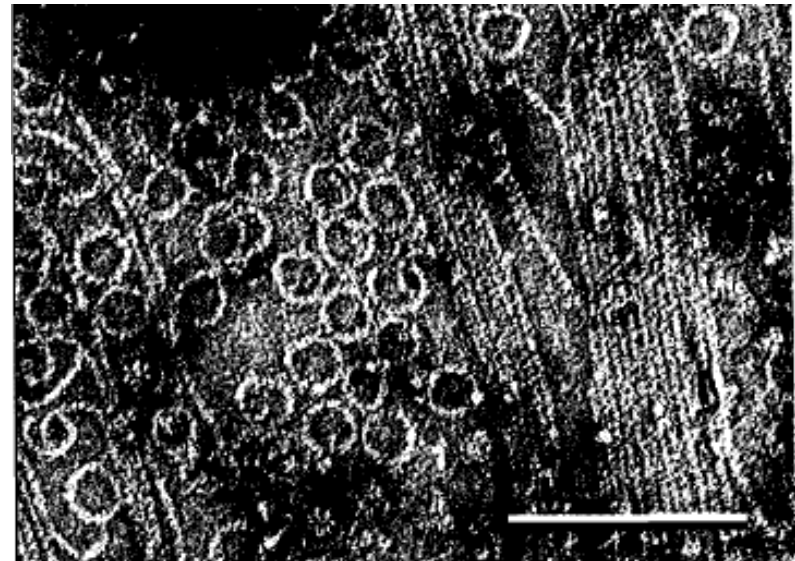
Změny mikrotubulů v průběhu buněčného cyklu rostlinné buňky, znát funkce jednotlivých formací (především roli v dělení jádra a buňky, a roli v syntéze buněčné stěny)

Funkce aktinového cytoskeletu v rostlinných buňkách

Ribozómy – struktura, polyzomy.

FtsZ – prokaryotní cytoskeletální protein

- Vysoce konzervovaný, nalezen v bakteriích, plastidech a mitochondriích
- Podobnost s tubulinem
- Štěpí GTP, schopnost samouspořádávání se do prstencových útvarů
- FtsZ endosymbiotických organel kódován genomem eukaryotické buňky
- Nezbytný pro **dělení** bakterií, plastidů i mitochondrií



Pozice organel – pohyb chloroplastů v závislosti na světle



Vallisneria gigantea:

Pohyb chloroplastů z míst silného ozáření do zastíněných míst (ochrana před poškozením pigmentů intenzivním světlem) je závislý na aktinu.

