

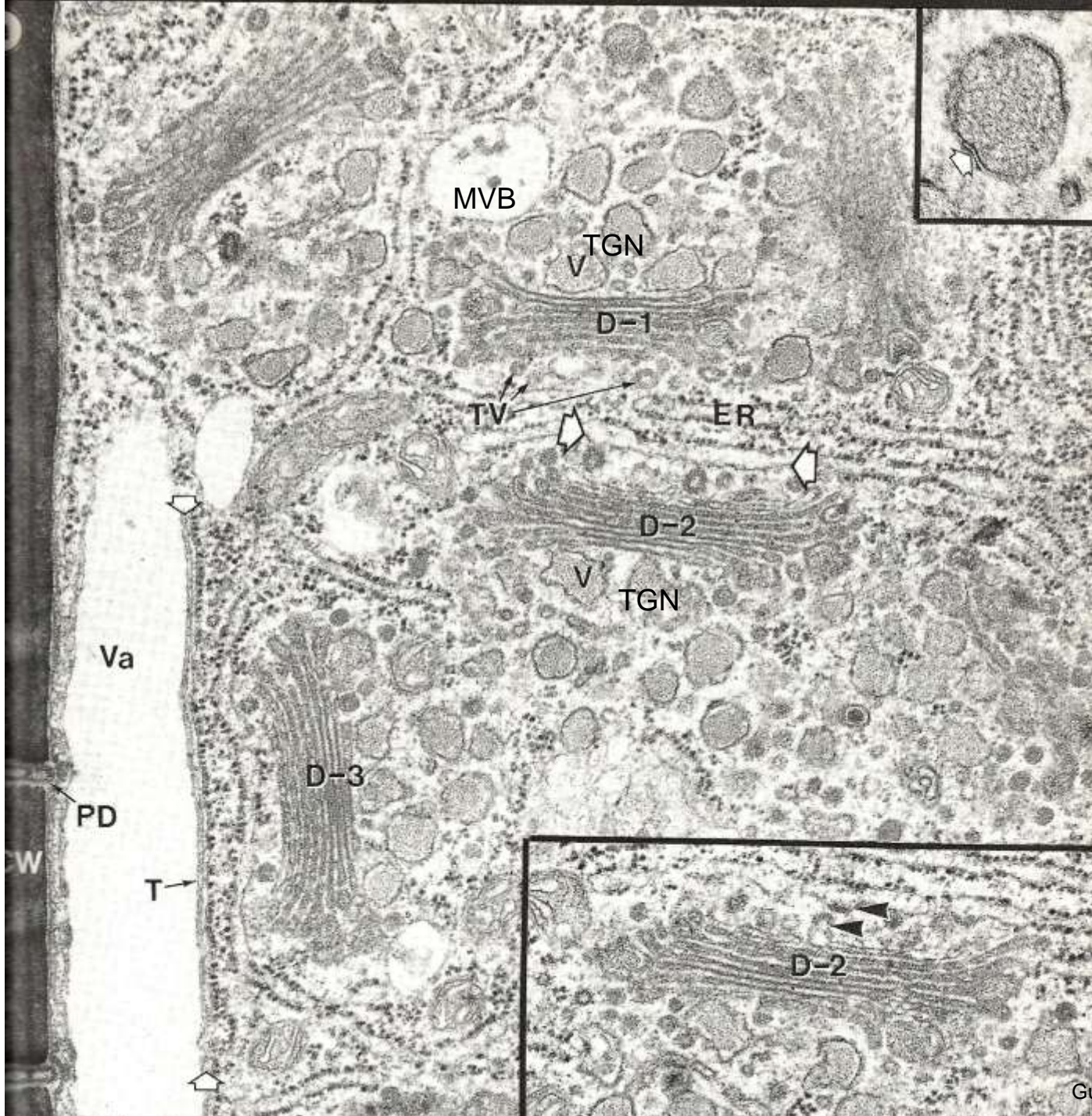
Endomembránový systém rostlinné buňky

Endomembránový systém: systém vnitřních membrán eukaryotické buňky

Součástí je:

- Jaderný obal
- Endoplazmatické retikulum (ER)
- Golgiho aparát (GA)
- Trans-Golgi systém (TGN z angl. trans-Golgi network)
- Endozóm (E), transportní, a endocytotické váčky
- Vakuola (V)
- Peroxisómy
- Plazmatická membrána (PM)

Vnitřní prostor: (to) lumen (z *lat. lumen, průsvit, dutina*), používáme tedy lumen, bez lumina... Nebo neskloňovat a používat jen lumen.



Kompartentační pravidla (Schnepf 1965):

Biologické membrány oddělují protoplazmatické a neprotoplazmatické fáze v buňce; membrány mají cytosolickou (protoplazmatickou) a extracelulární (neprotoplazmatickou) stranu; membrány jsou strukturně i funkčně asymetrické.

Neprotoplazmatické fáze:

Extracelulární prostor, **cisterny ER a GA**, mezimembránový prostor plastidů a mitochondrií, vnitřek thylakoidů. **vakuoly, perinukleární prostor**

Protoplazmatické fáze:

Cytoplazma, karyoplazma, chondrioplazma (mitoplazma) uvnitř mitochondrií, u rostlin navíc plastidoplazma.

Nukleové kyseliny se vyskytují vždy jen v protoplazmatických fázích.

Mezi protoplazmatickými a neprotoplazmatickými kompartmenty probíhá transport přes membránu.

Mezi kompartmenty neprotoplazmatickými probíhá **transport pomocí váčků.**

Transport mezi složkami endomembránového systému

Mezi kompartmenty neprotoplazmatickými probíhá transport pomocí váčků.

-**Sekretorická dráha:** výměna membrán a molekul mezi ER, GA, TGN, endozómy, PM a vakuolou

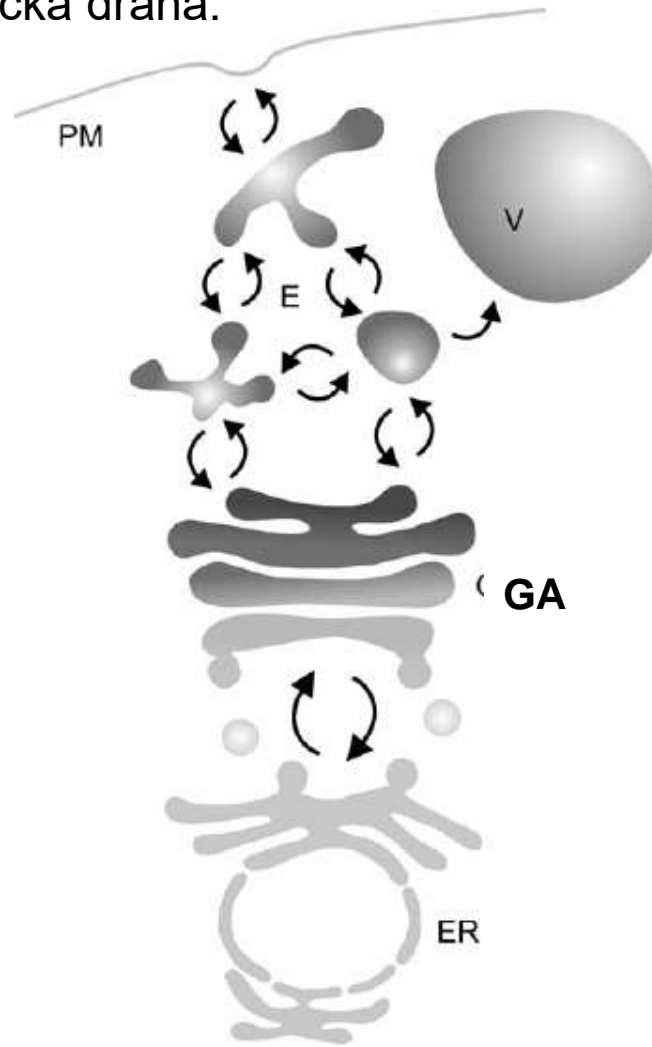
-Obousměrný transport

-**Endocytotická dráha:** internalizace membrán a molekul pomocí endocytózy směrem do endozómů

-Váčky

Sekretorická dráha

Minimální sekretorická dráha:



Sekretorická dráha u rostlin

-přehled rostlinných specializací

-GA je (kromě úpravy proteinů) **místem syntézy všech polysacharidů buněčné stěny** (kromě celulózy a kalózy)

-V rostlinných buňkách nebyl detekován tzv. střední kompartment (kompartiment mezi ER a GA živočišných buněk)

-GA tvoří samostatné mobilní jednotky – **diktyosomy**, a během dělení buňky se nerozpadá, ale **zůstává funkční**

-Vakuoly se **specializovanou funkcí**

-Primárním konečným cílem transportu je plazmatická membrána. Během dělení rostlinných buněk se tímto místem však stává **nově syntetizovaná buněčná deska** (dělení rostlinných buněk pomocí fúze váčků, nikoliv zaškrcováním).

Transport mezi složkami endomembránového systému

-Probíhá pomocí transportních váčků

-Probíhá v obou směrech

Anterográdní směr (ER→GA) – transport nově syntetizovaných molekul

Retrográdní směr (GA→ER) – recyklace a protein sorting

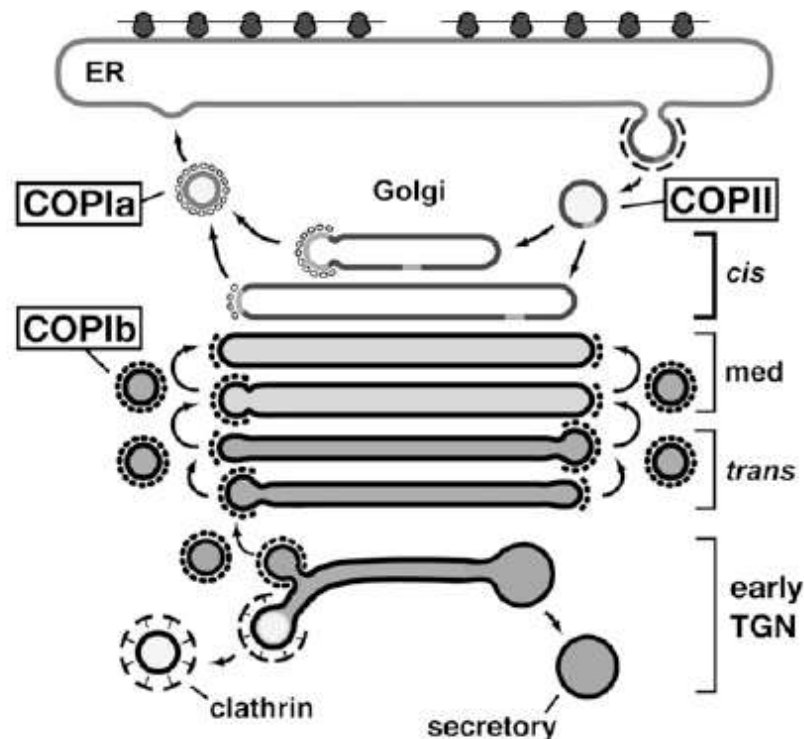
Transport pomocí transportních váčků

Anterográdní směr zajištěn **COPII (coat protein II) váčky**

Retrográdní směr zajištěn **COPI váčky**

Endocytóza a transport z TGN zajištěn **klathrinovými váčky**

Další typy váčků – např. neobalené váčky, méně prozkoumané



Transport pomocí transportních váčků:

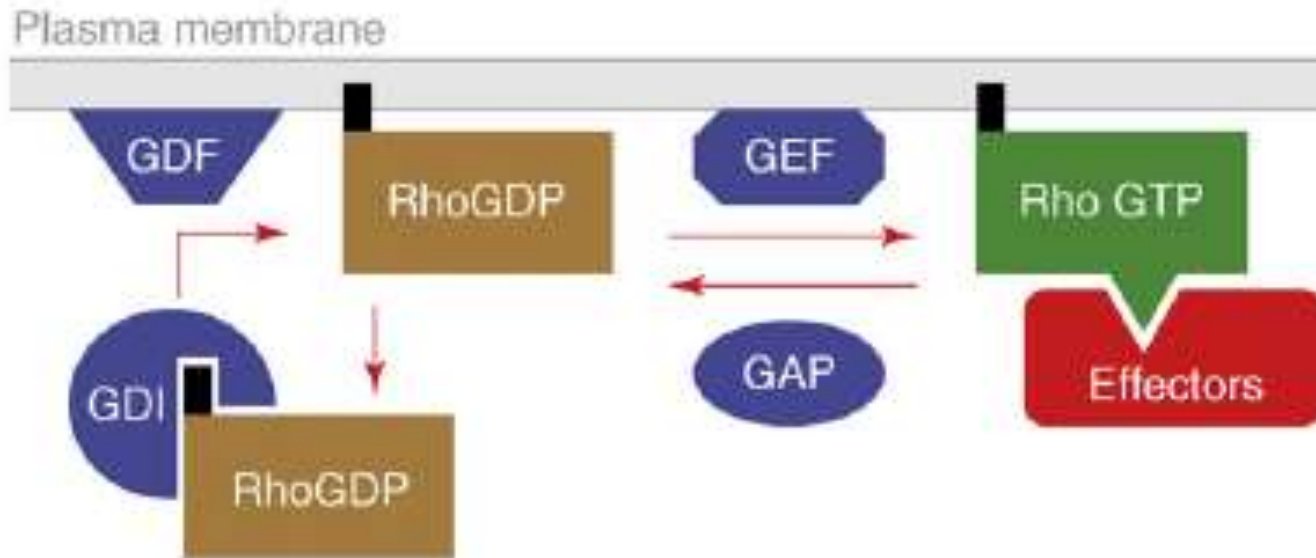
Regulace transportu: odkud a kam?

Tvorba a transport váčku zahrnuje:

1. Aktivace **obalových proteinů**, regulovaná specifickými malými **GTPázami**, vede k tvorbě obaleného váčku na donorové membráně. Obalové a adaptorové proteiny váček též **nakládají**.
2. transport váčku k místu určení (cytoskelet; fúze s blízkou membránou)
3. oddělení obalových proteinů a jejich recyklace zpět
4. rozpoznání **cílové membrány**
5. zakotvení na cílové membráně (**poutací komplexy**), párování **fúzních komplexů SNARE** na povrchu váčku a cílové membrány

Transport pomocí transportních váčků

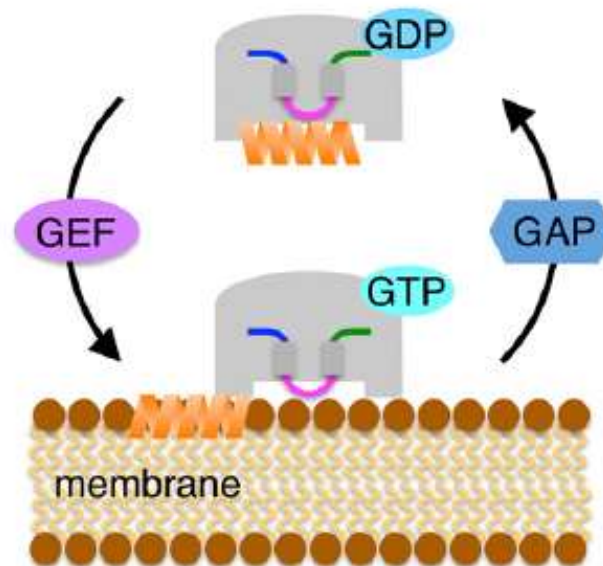
Funkční cyklus malých GTPáz



TRENDS in Cell Biology

- GAP: GTPase activating protein
- GDI: guanine nucleotide dissociation inhibitor
- GEF: guanine nucleotide exchange factor
- GDF: Rho-GDI displacement factor

Regulace tvorby COPII a COPII váčků Sar1 a Arf1 GTPázami

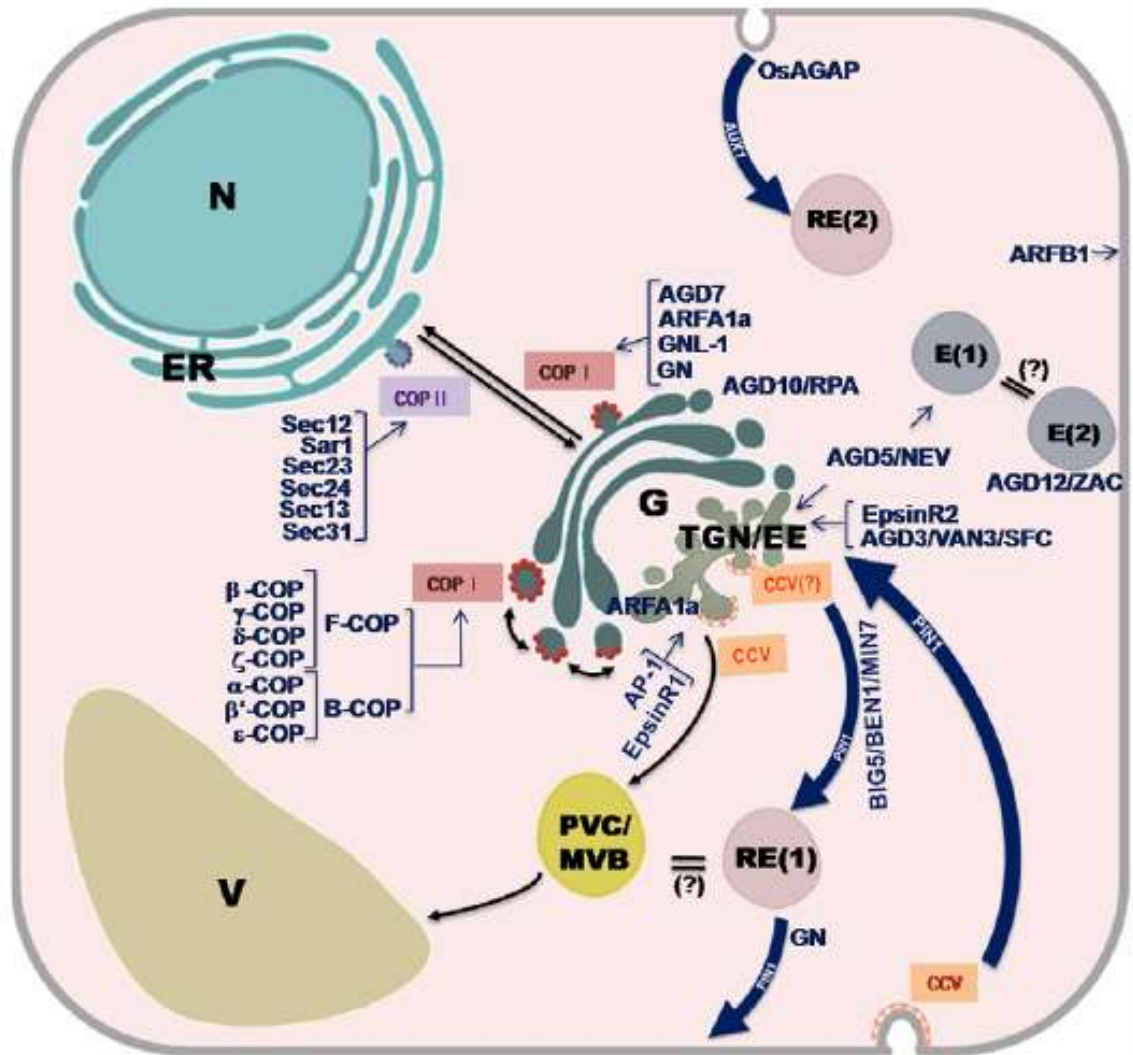


Regulace tvorby
COPII váčků:

SAR1 GTPázy

Regulace tvorby
COPI váčků:

ARF GTPázy



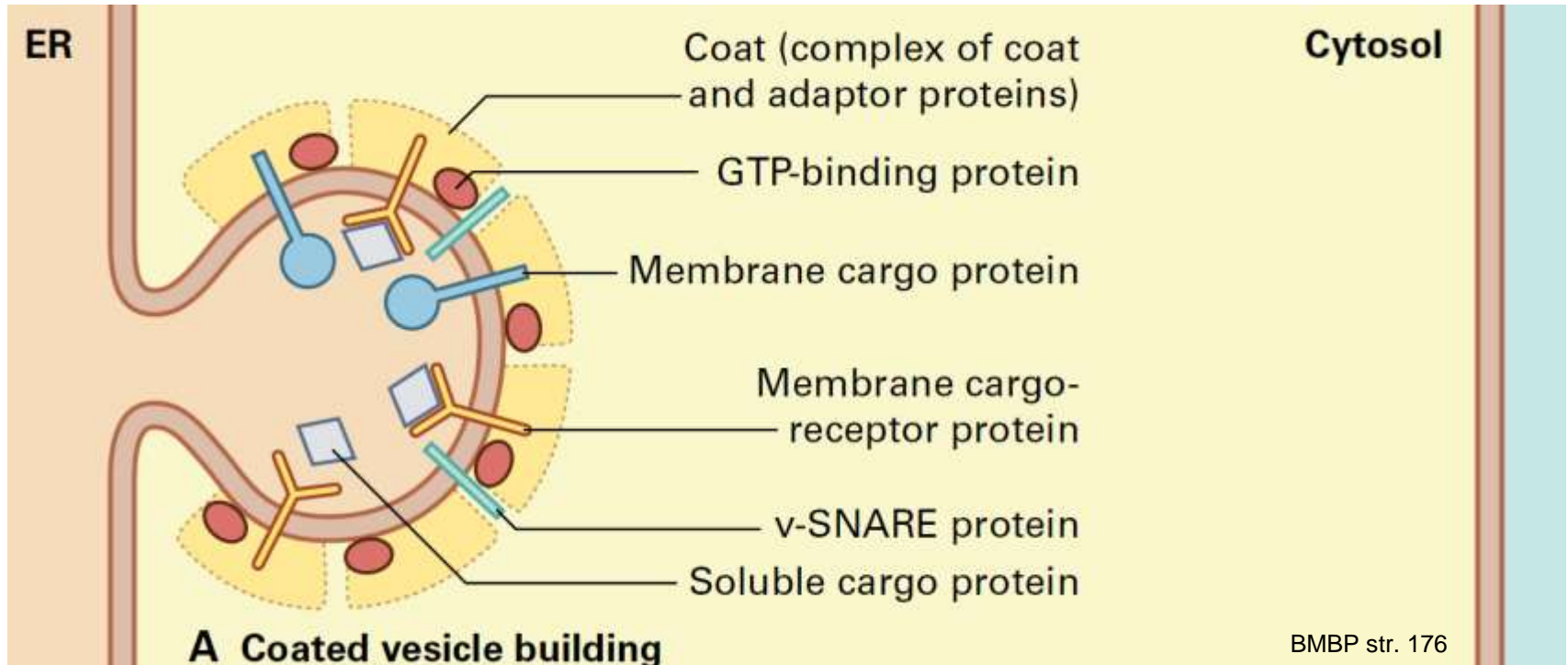
Current Opinion in Plant Biology

Current Opinion in Plant Biology 2009, 12:660–669

Location of vesicles and accessory proteins in the trafficking pathways. The three major vesicles, COPI, COPII, and CCV, are placed in their trafficking routes. Accessory and regulatory proteins of the vesicles also are included in association with their respective trafficking pathways. When the localization of proteins is known only by colocalization with the organellar markers, they are placed to their target organelles. Numbers in RE(1) and RE(2) are simply to indicate that they are not the same recycling endosomes. In addition, E(1) and E(2) are endosomes with no defined function. It is not known whether they are the same endosome or not. N, nucleus; G, Golgi apparatus; V, vacuole.

Transport pomocí transportních váčků

Obalové proteiny



Obalové proteiny:

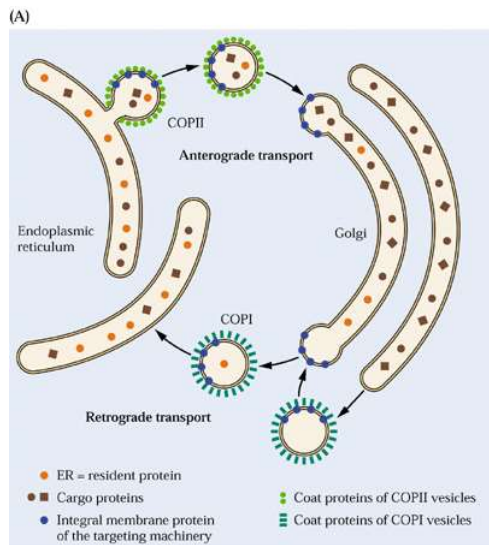
-Jsou rekrutovány aktivovanými malými GTPázami na membránu

Funkce obalových proteinů:

1. Napomáhají vytvoření **zakřivení membrány** a vzniku váčku
2. Zároveň zajišťují **specifické nakládání** váčku

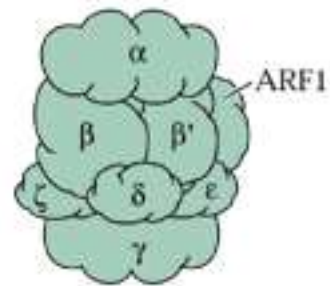
Transport pomocí transportních váček

COPI a COPII



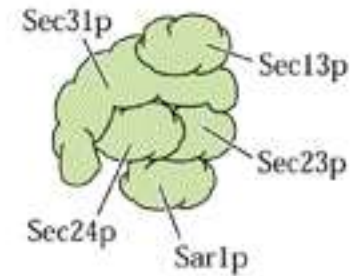
(B)

COPI/coatomer



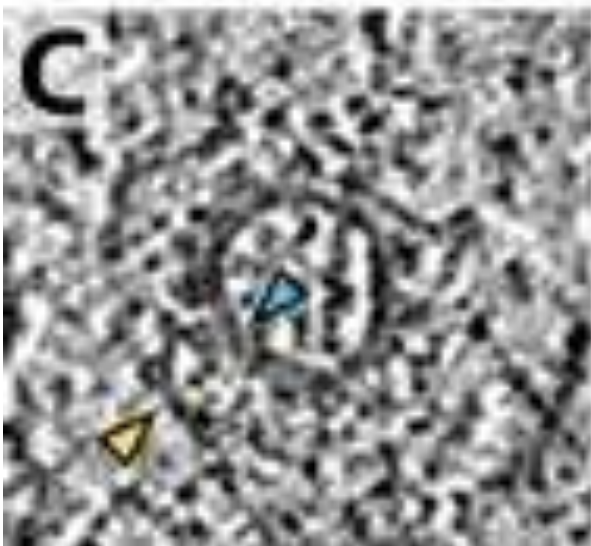
ER/Golgi, intra-Golgi pathways

COPII

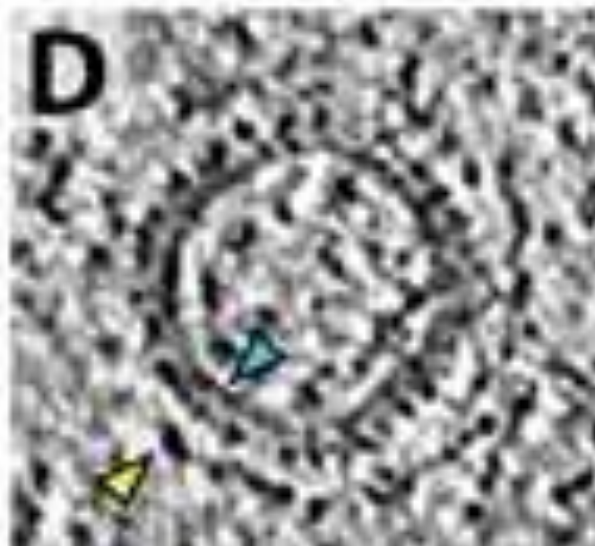


ER to Golgi pathway

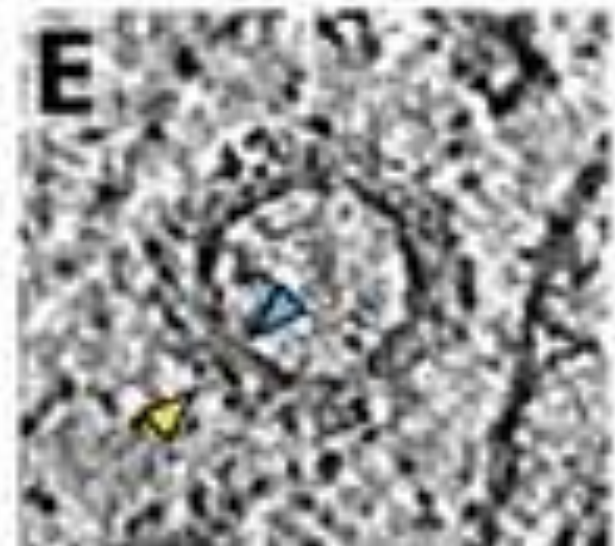
Clathrin



COPII

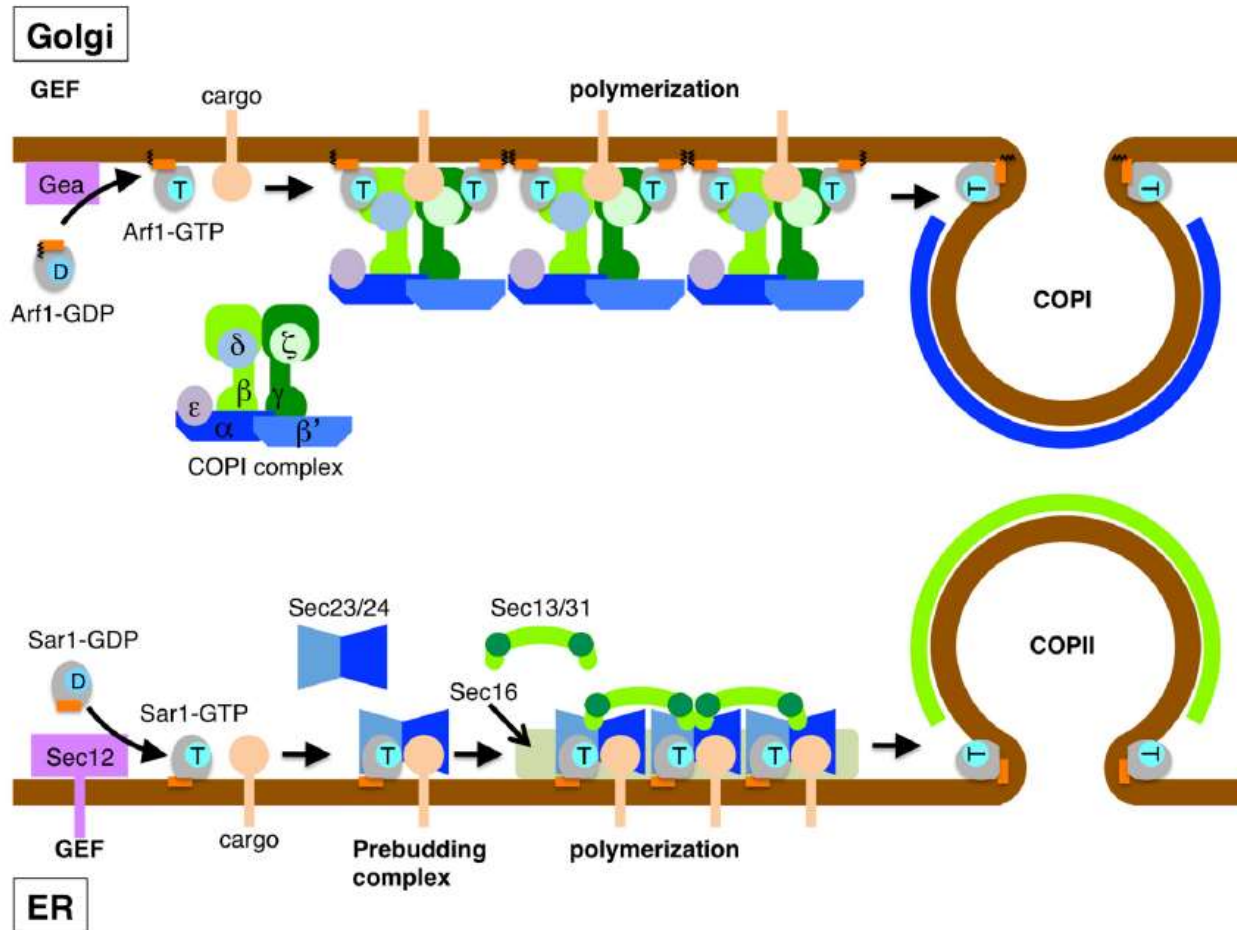


COPI



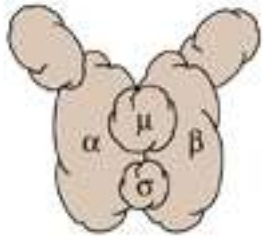
Transport pomocí transportních váčků

COPI

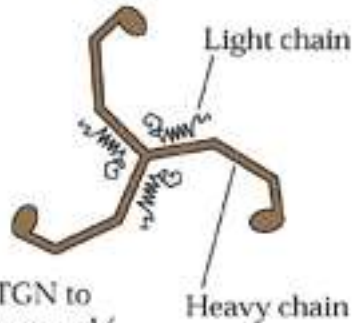


Transport pomocí transportních váčků

AP1/2

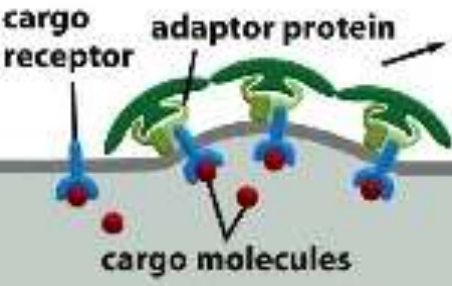
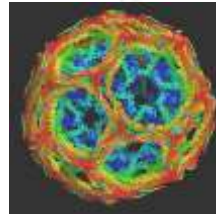


Clathrin

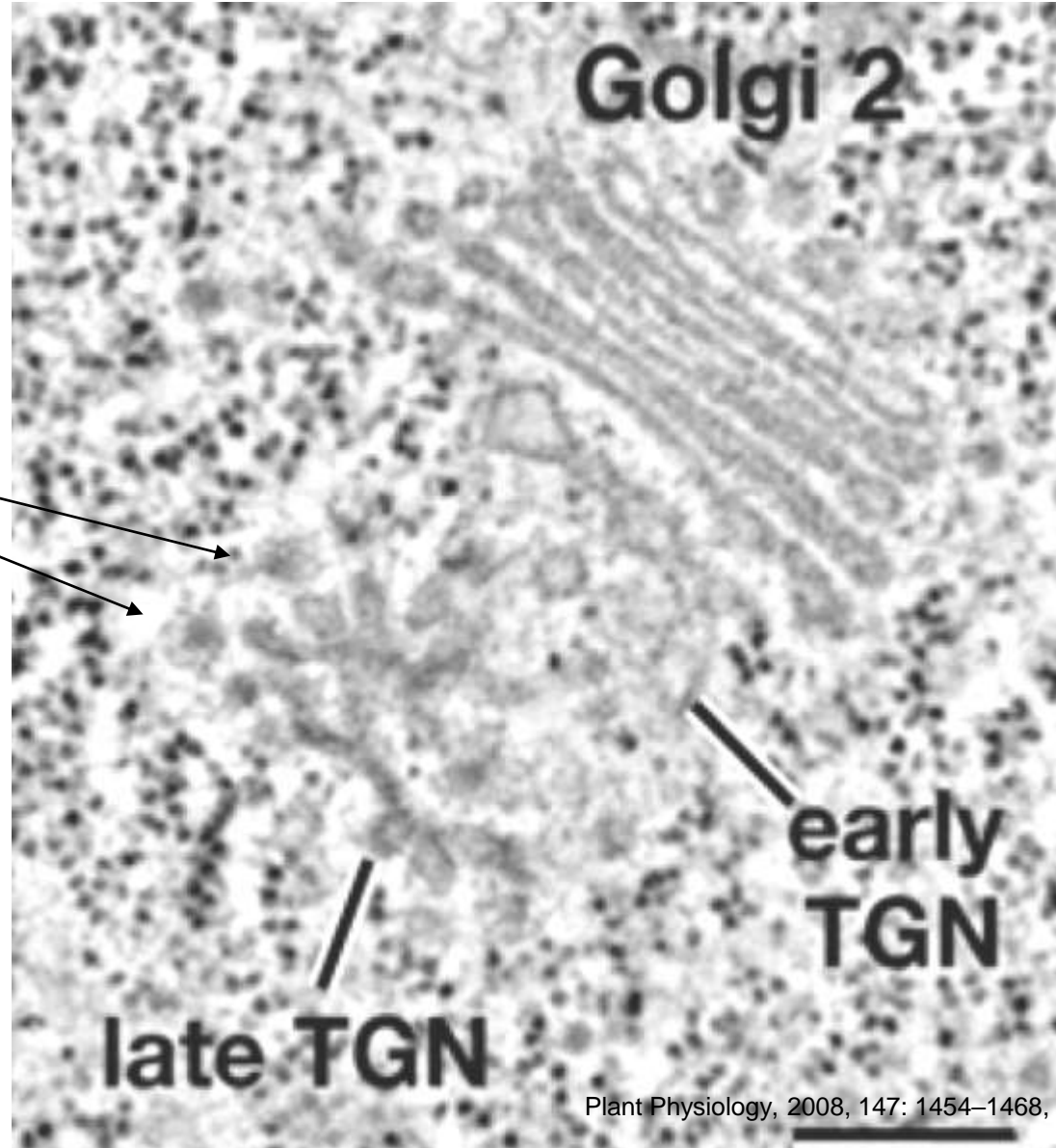
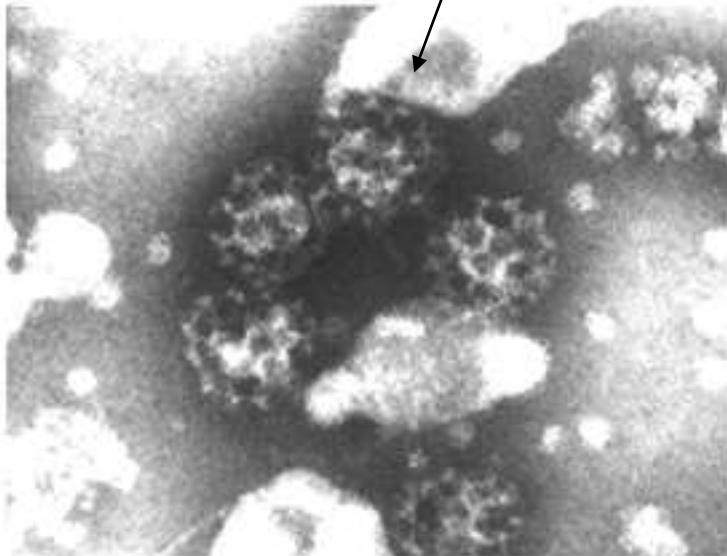


klathrin

Post-Golgi: TGN to endosome (lysosomal/vacuolar pathway) and endocytosis



Klathrinové váčky



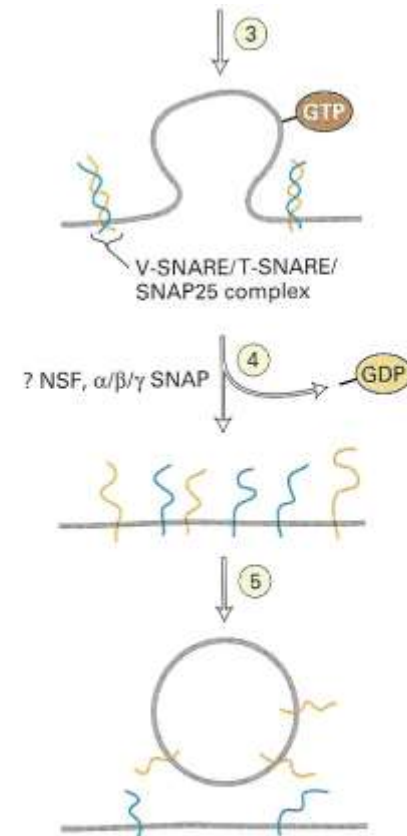
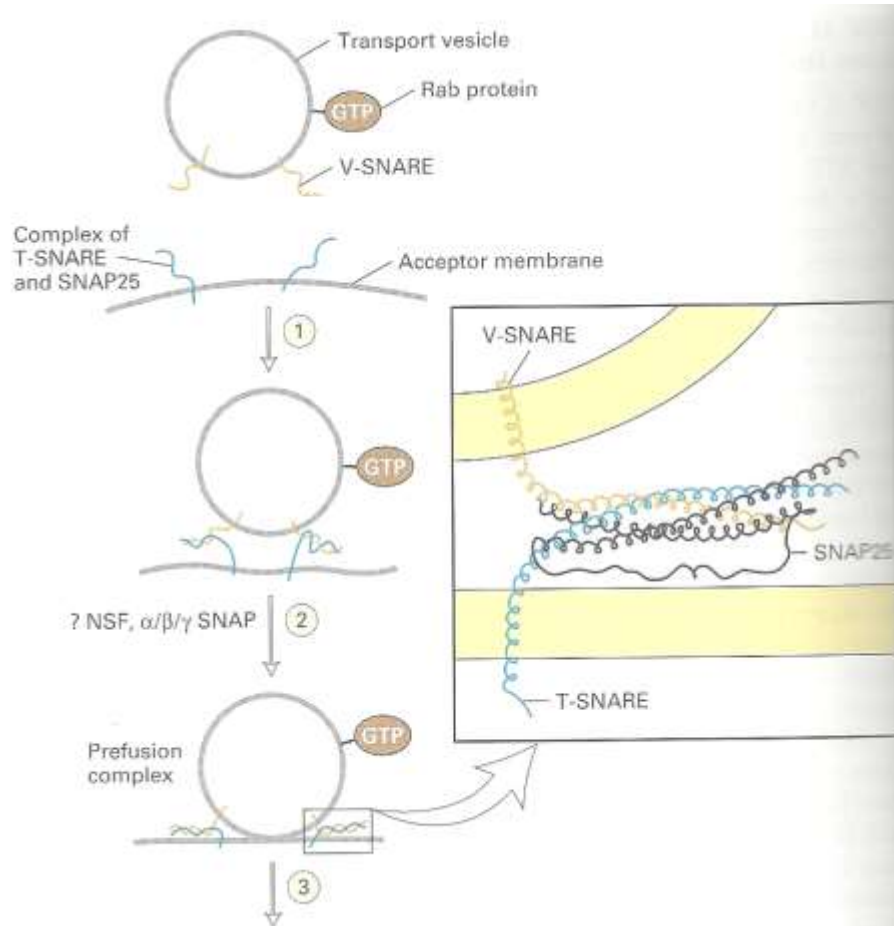
Golgi 2

early TGN

late TGN

Transport pomocí transportních váčků

SNARE komplexy (**S**oluble **N**SF **A**ttachment **P**rotein **R**eceptors)



V-SNARE: též synaptobrevin či VAMP (vesicle-associated membrane protein)

T-SNARE: syntaxin 1 a SNAP-25

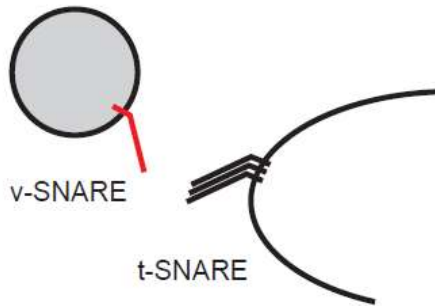
(54 různých SNARE proteinů u Arabidopsis)

Transport pomocí transportních váčků

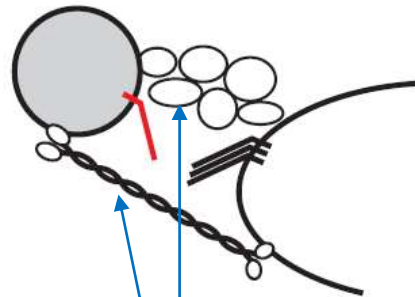
Poutací komplexy –

přemostují membránu váčku a cílovou membránu a napomáhají fúzi váčku

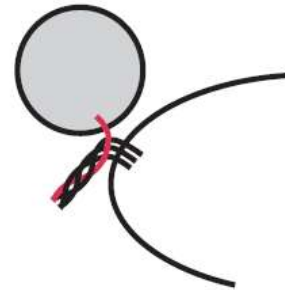
Přiblížení váčku



Zakotvení váčku



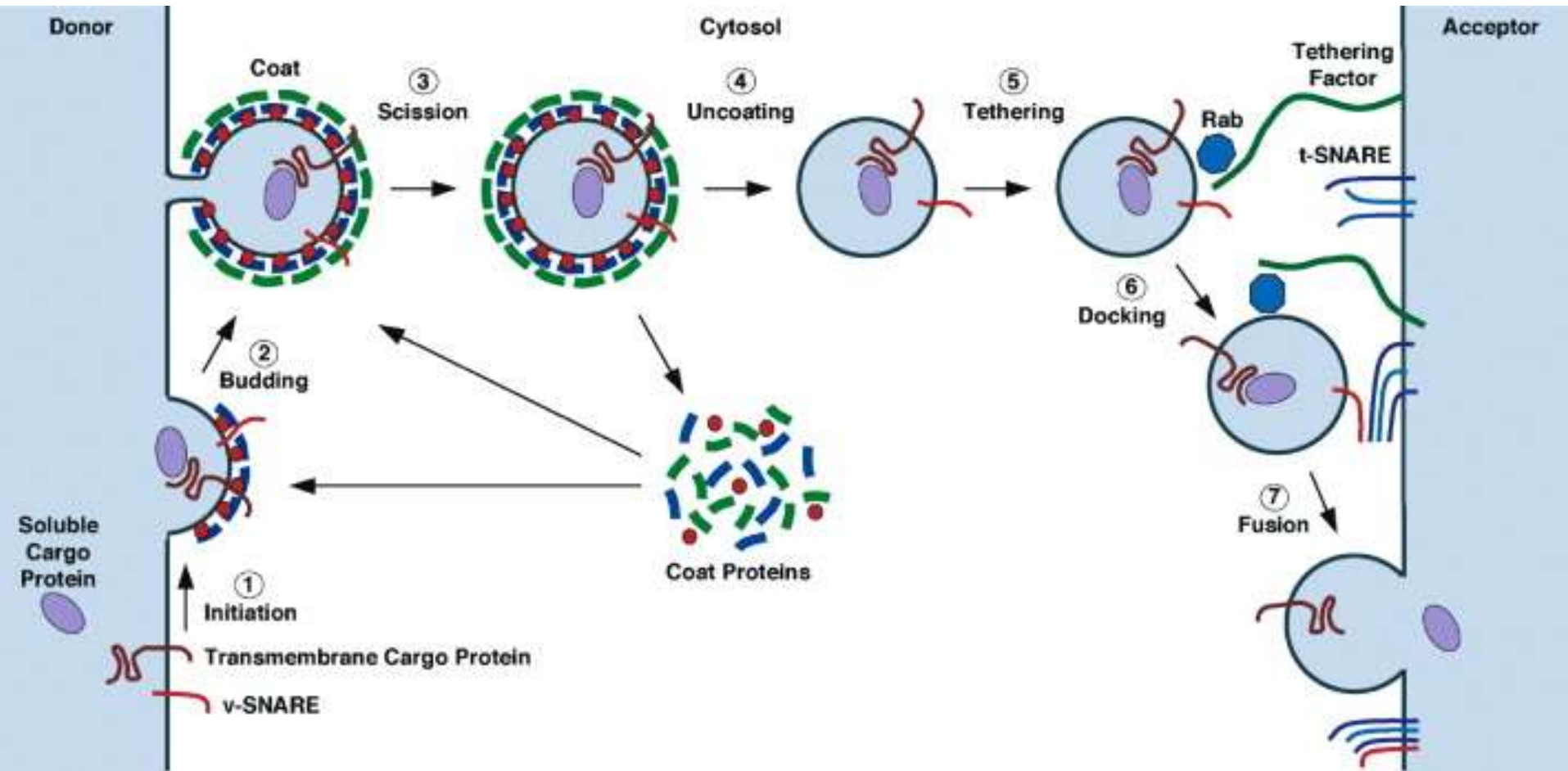
Sestavení SNARE komplexu



Fúze váčku



Poutací komplexy



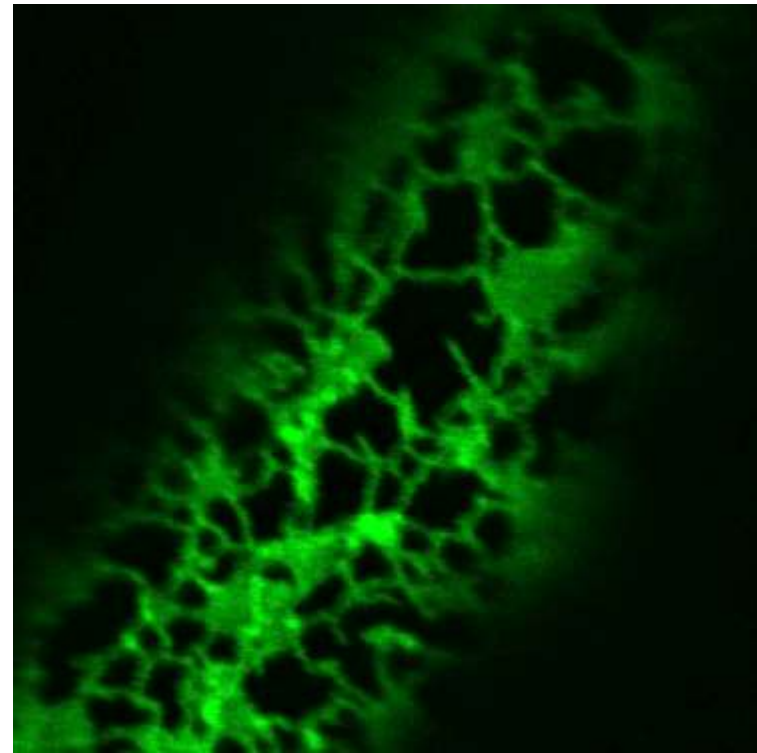
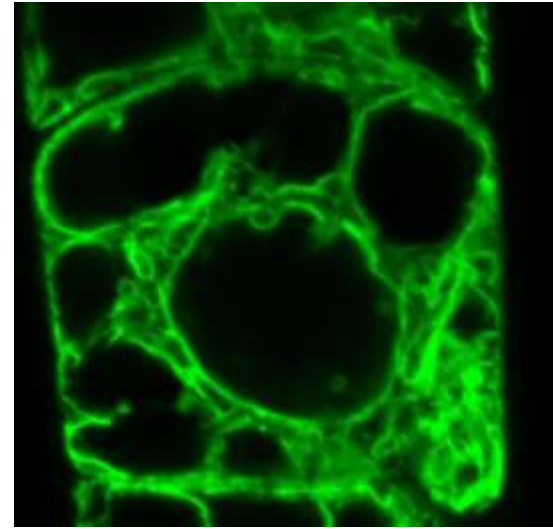
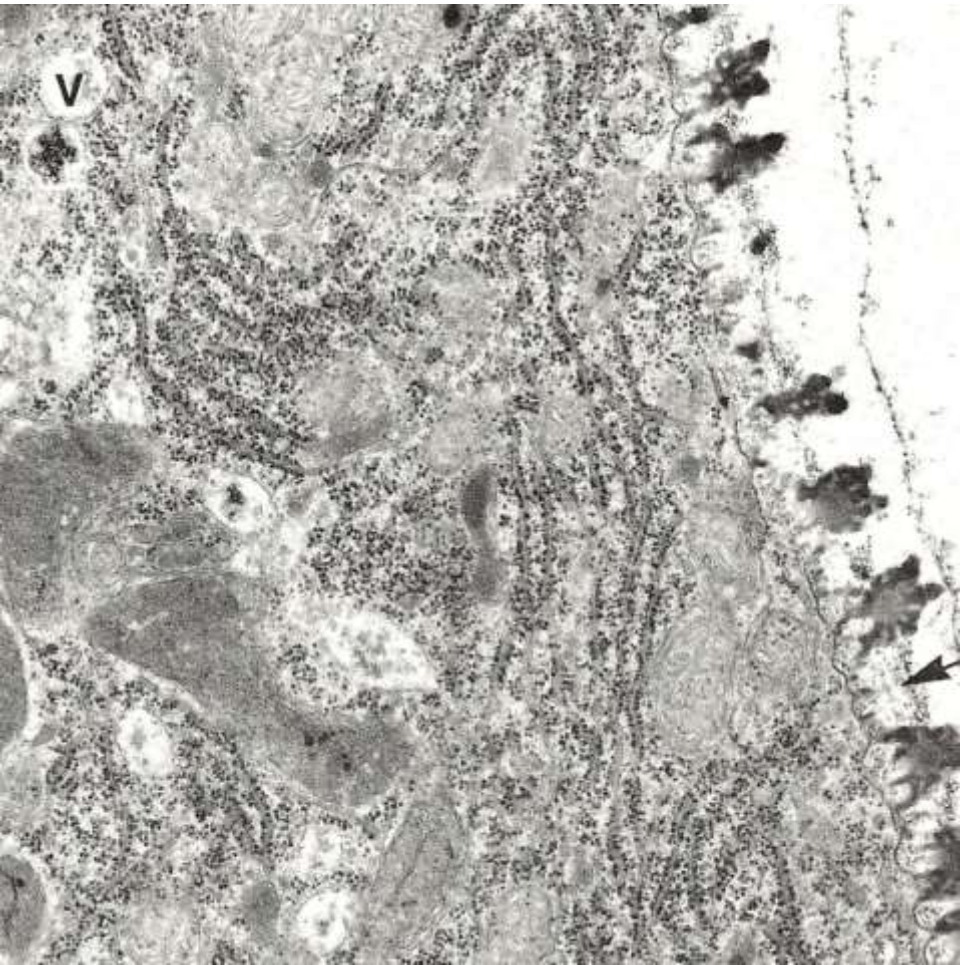
ENDOPLAZMATICKÉ RETIKULUM

Poprvé popsáno v 60. letech 20. století (elektronová mikroskopie)

Rozsáhlý, proměnlivý a dynamický systém membránových struktur

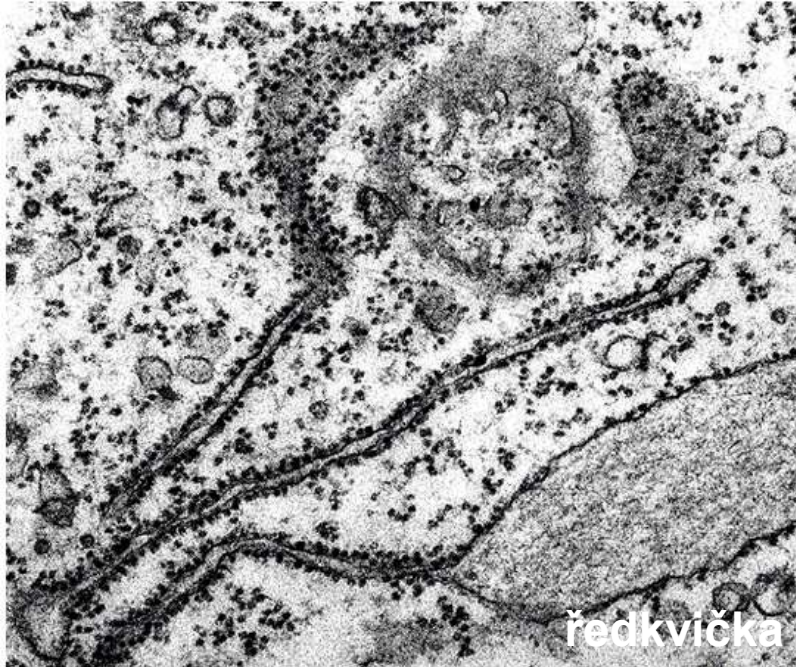
Tvořeno trojrozměrnou strukturou plochých cisteren a tubulů

Propojení mezi sousedními buňkami plasmodesmy

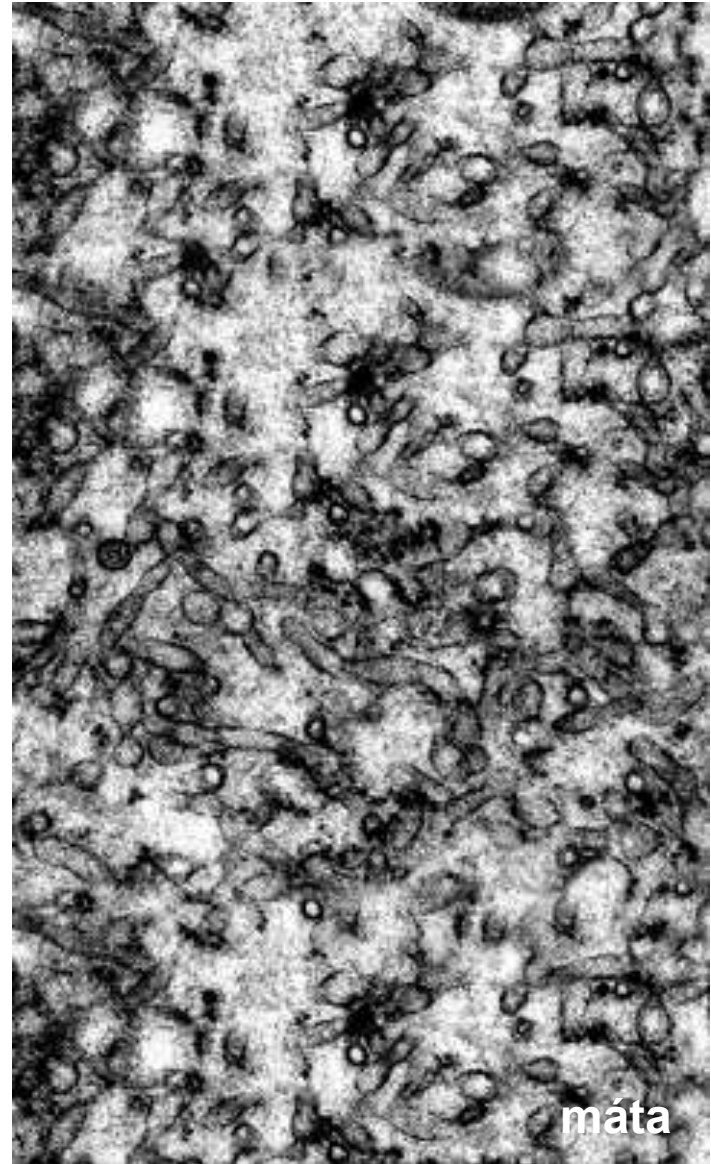


ENDOPLAZMATICKÉ RETIKULUM

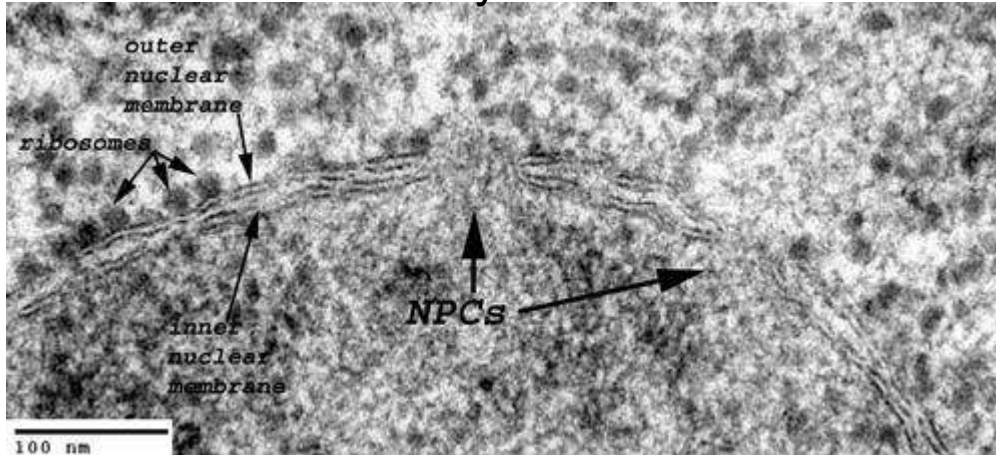
Drsné ER:

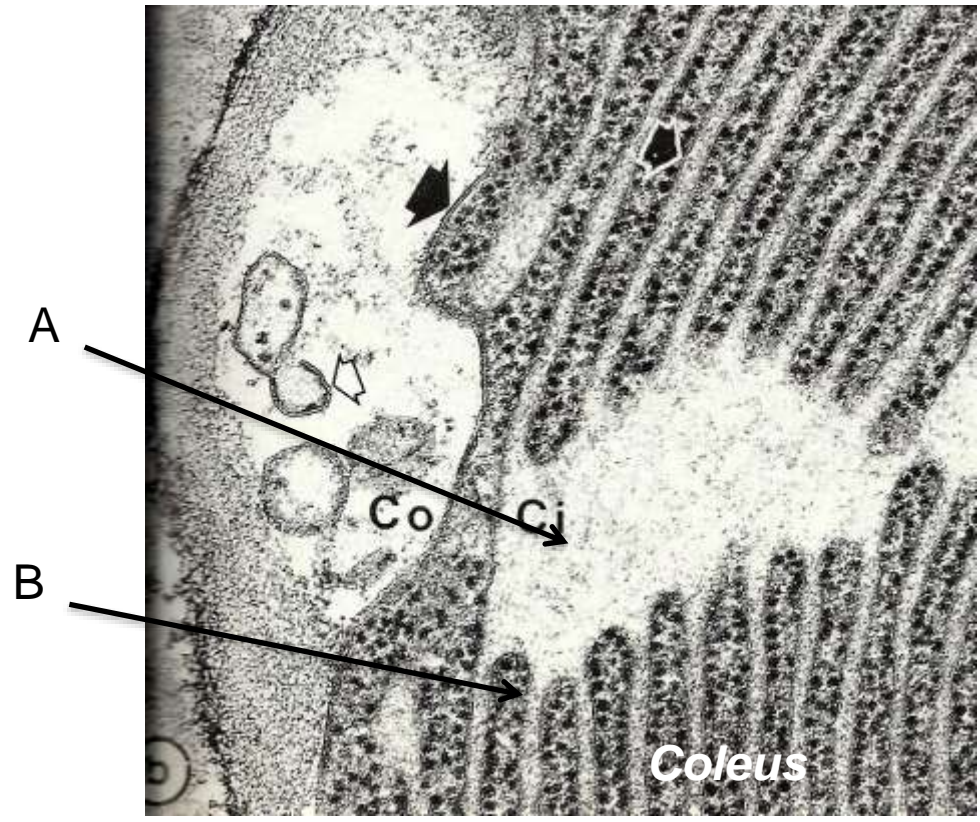


Hladké ER:

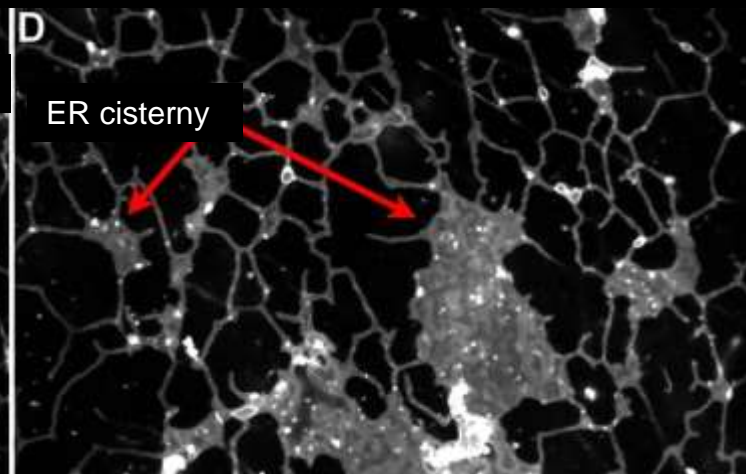
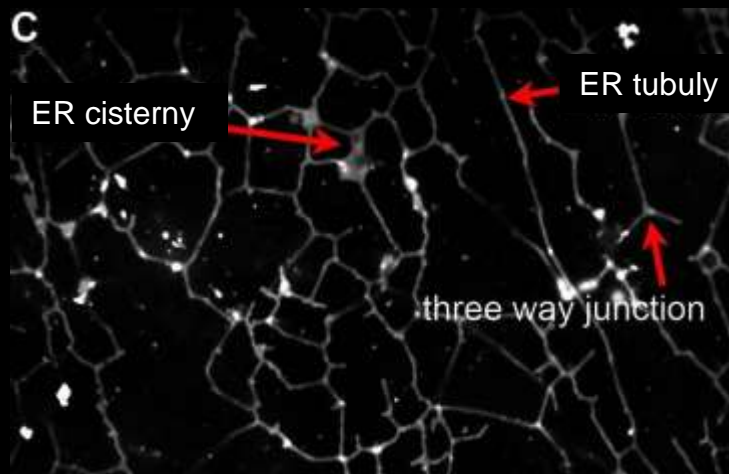
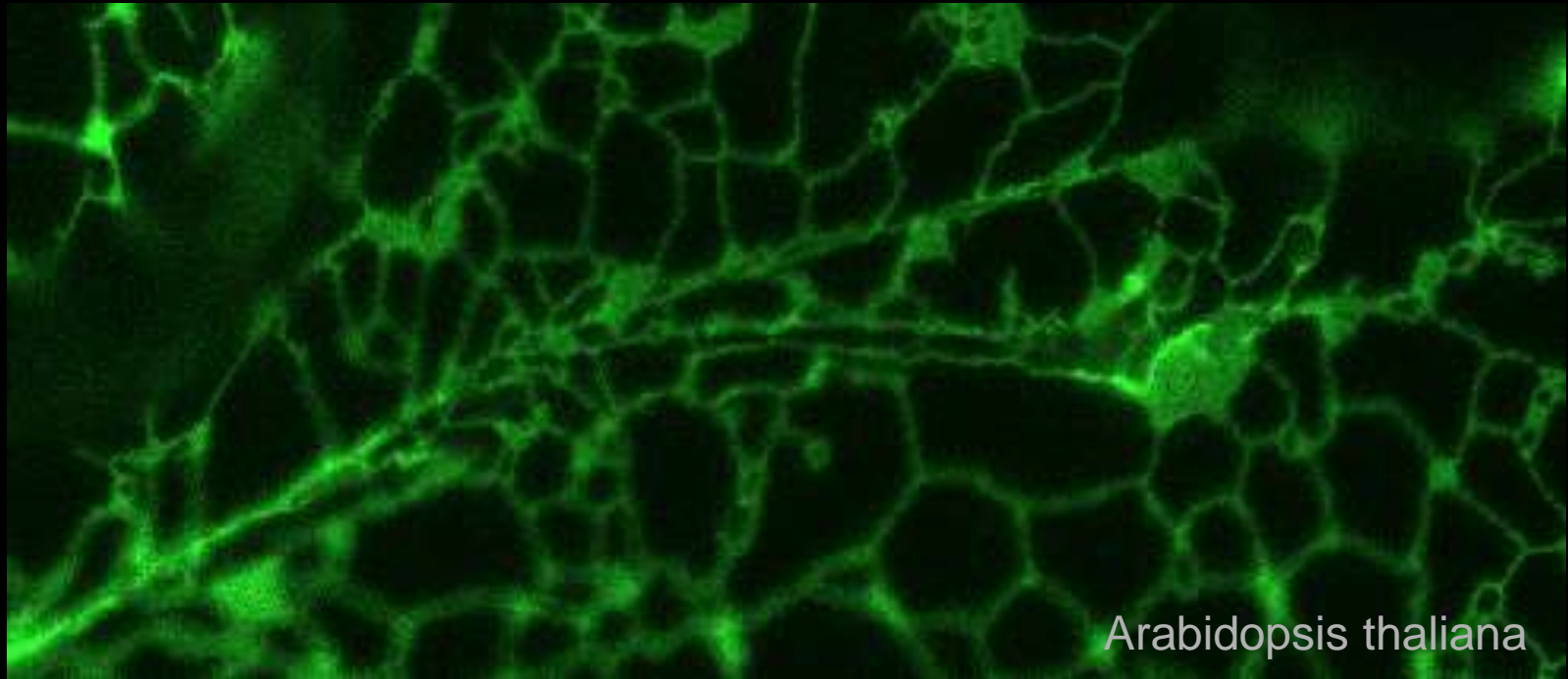


Jaderný obal:

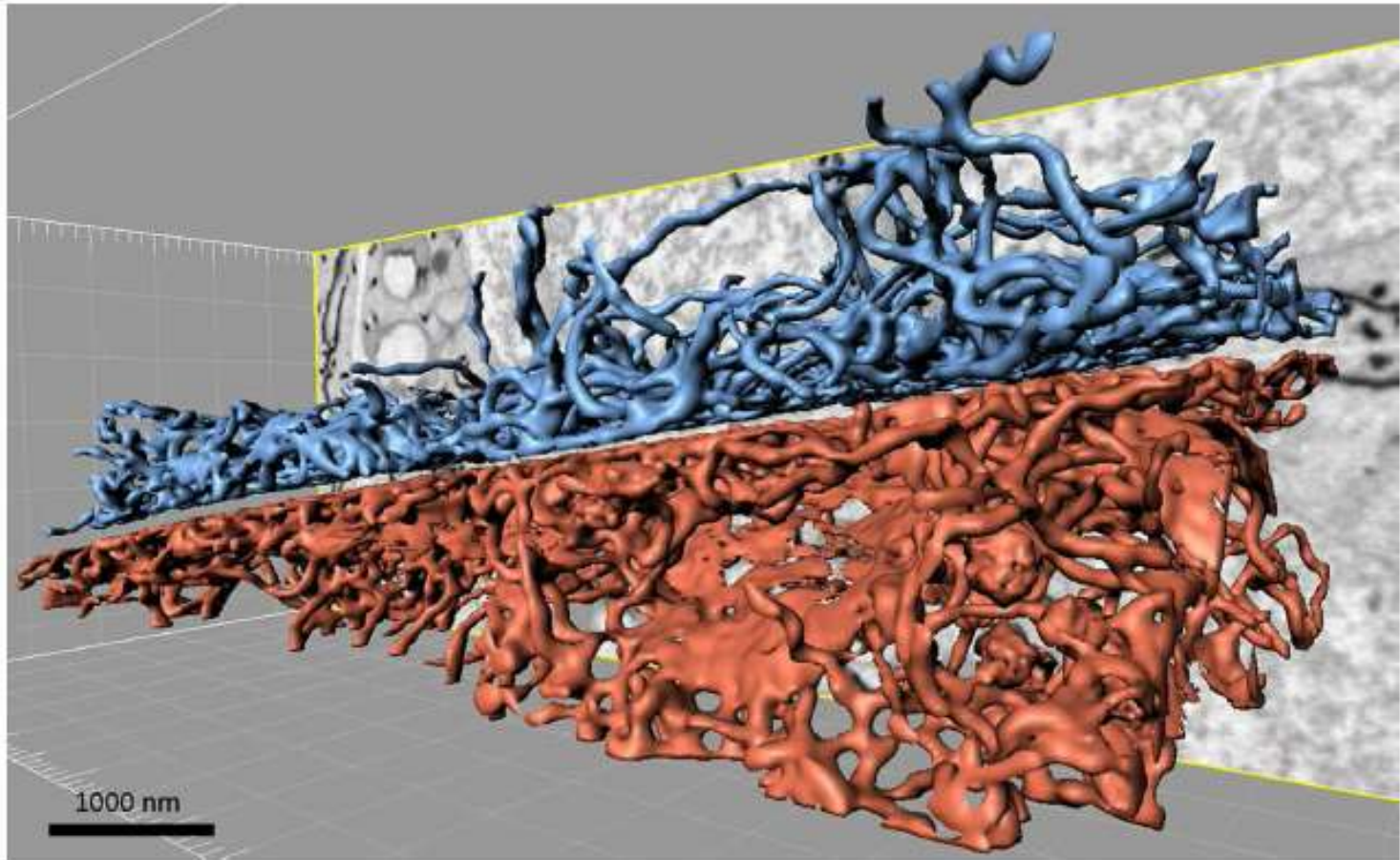




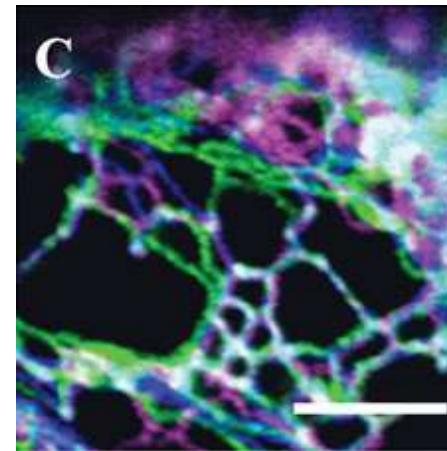
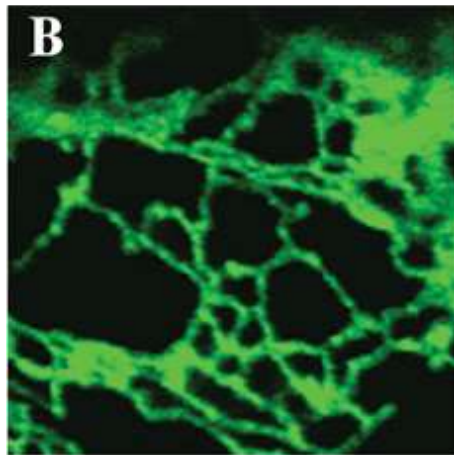
Endomembránový systém:



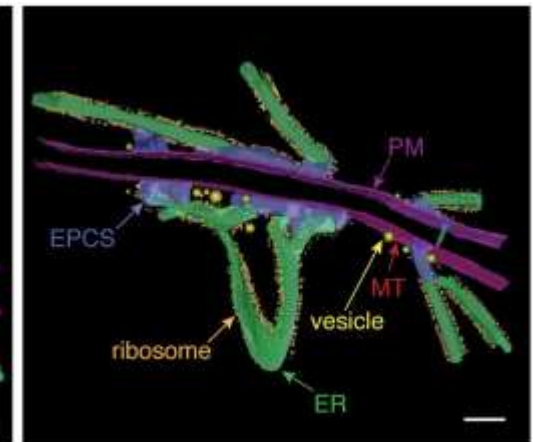
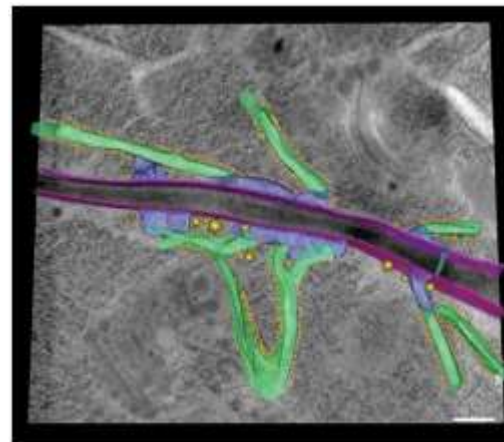
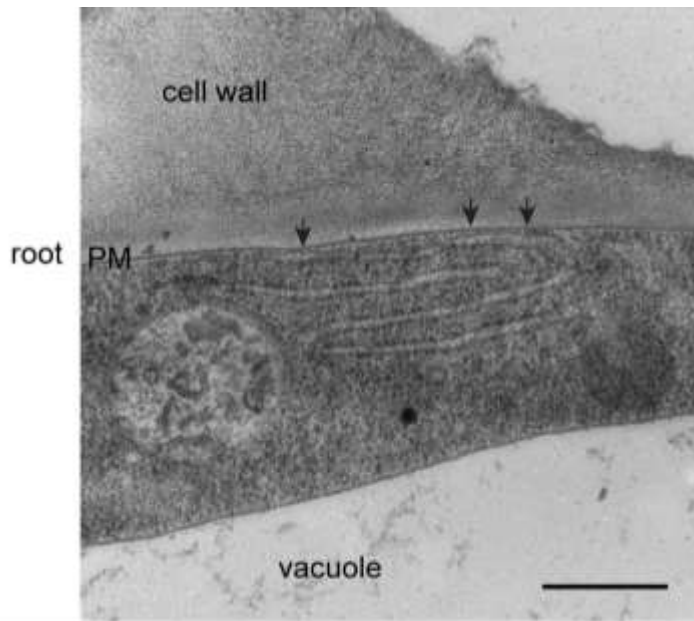
Rekonstrukce kortikálních ER dvou sousedících meristematických buněk hrášku



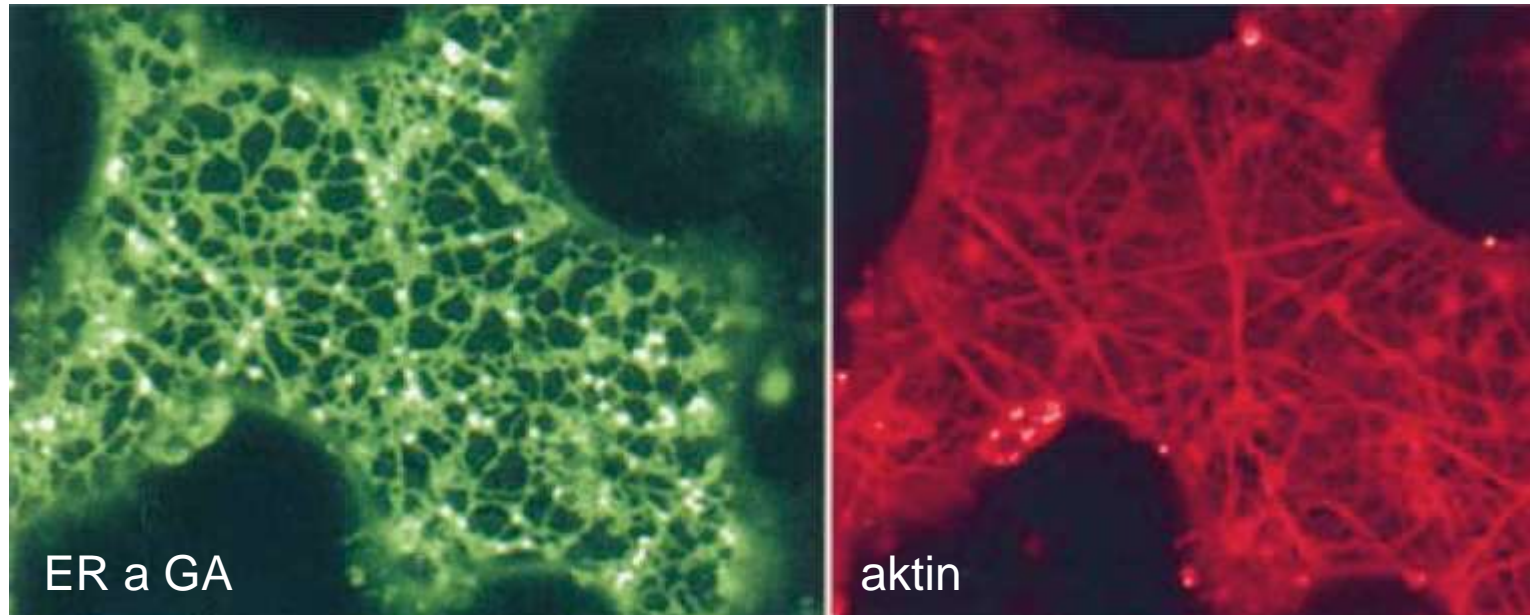
Statické ostrůvky v dynamické polygonální síti – napojení ER na PM
tzv. **ER-PM contact sites (EPCS)** s mnohočetnou funkcí



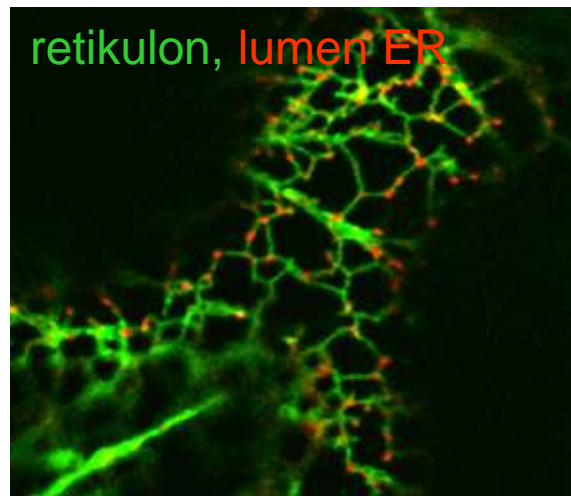
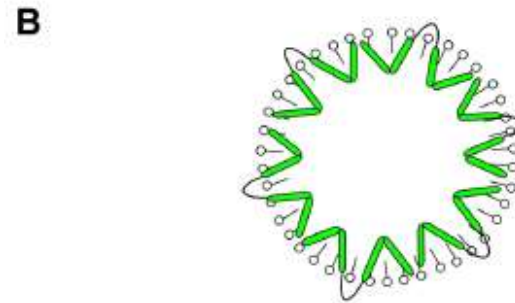
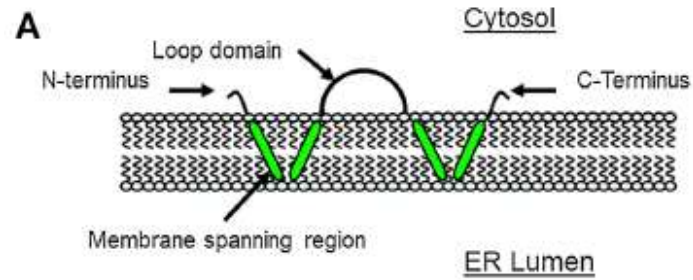
Biochem. J. (2009) 423, 145–155



Pohyb endomembrán je závislý na **aktinovém cytoskeletu**



Proteiny **retikulony** – regulátory tvaru ER membrán



Role endoplazmatického retikula v rostlinné buňce

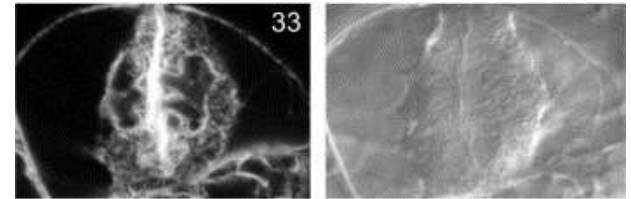
-**syntéza lipidů a lipidických molekul**

-**syntéza a modifikace proteinů a dalších molekul**, jejichž funkce je většinou spjata s membránami, vakuolou, buněčnou stěnou nebo sekretorickou drahou (cca 18% proteinů *Arabidopsis thaliana* obsahuje signální peptid pro lokalizaci do ER)

-**zásobní funkce** (sférozómy a proteinová tělíska)

-**zásobárna Ca²⁺ iontů**

-propojuje buňky v **plazmodesmech**



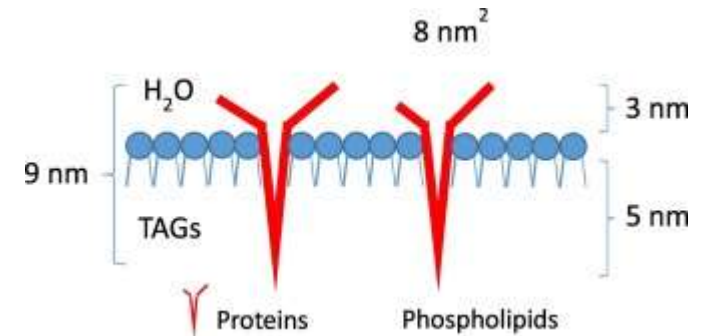
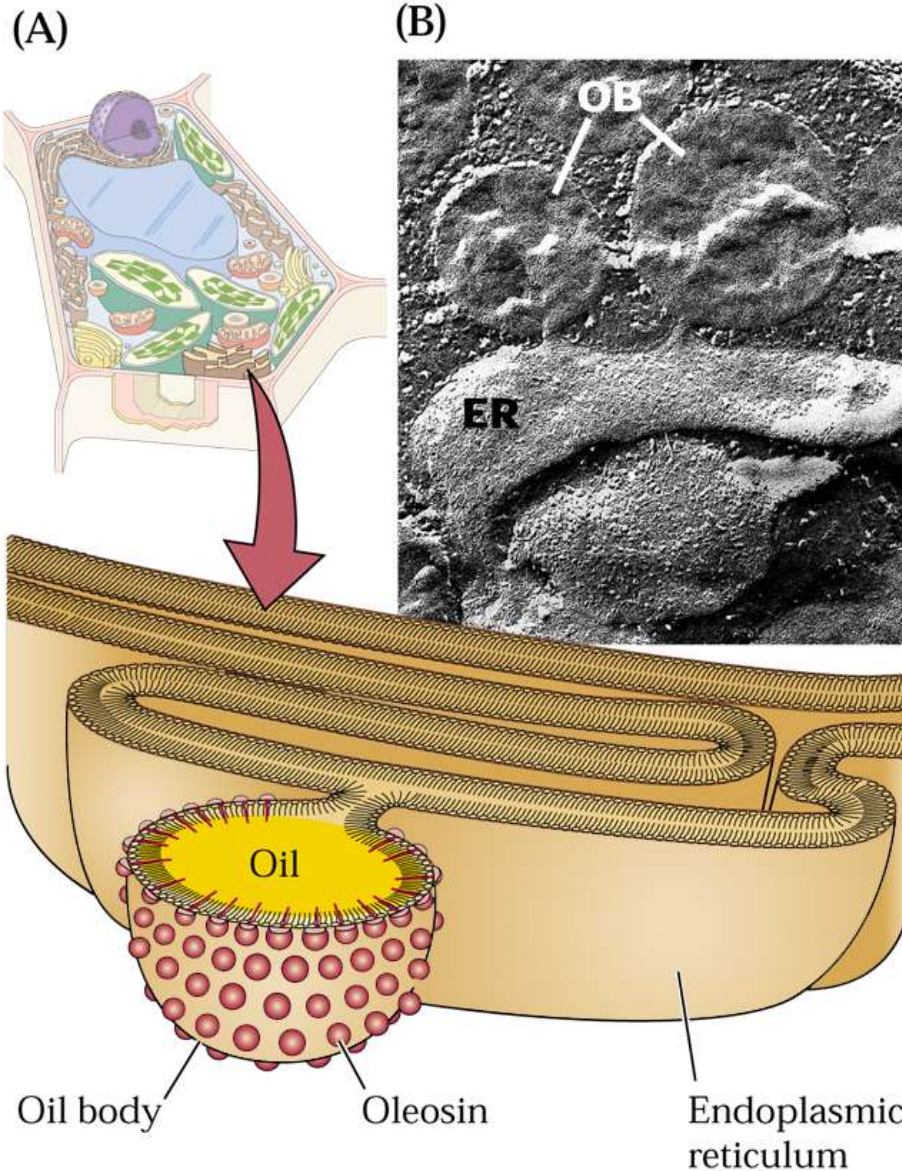
-během **cytokineze** prochází reorganizací a podílí se na tvorbě **buněčné desky**

-specializované agregáty membrán ER jsou přítomny ve **statocytech** v kolumele kořenové špičky, zřejmě se podílejí na detekci **gravitropického signálu**

- **signalizace** (etylén, auxin)

- **metabolomy** (např. biosyntéza kutinu, auxinu)

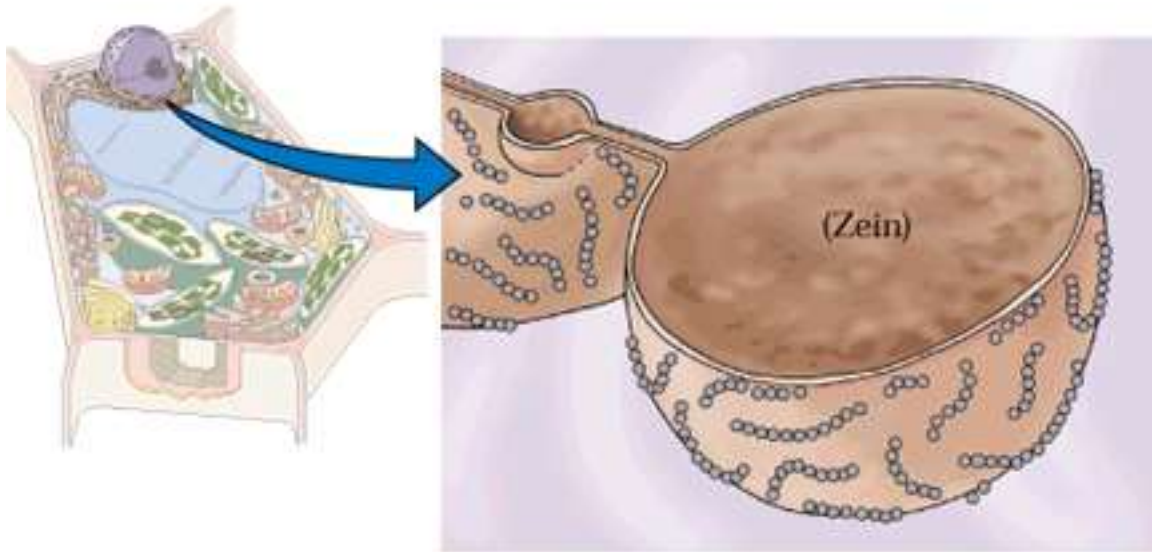
Zásobní olejová tělíska - sférozómy



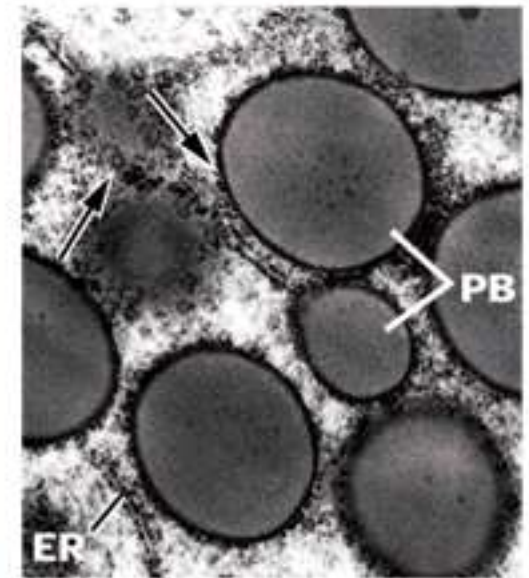
Struktura oleosinů v jednolipidové vrstvě obalující sférozóm/oleozóm/oil body

Zásobní proteinová tělíska (prolaminy, např. zeiny, gluteny (lepek)...)

(A)



(B)



PB – protein bodies

Syntéza a úprava proteinů v ER

Signální sekvence na N-konci budoucího proteinu (16-30 AK).

Začátek syntézy proteinu na ribozómu v cytoplazmě →

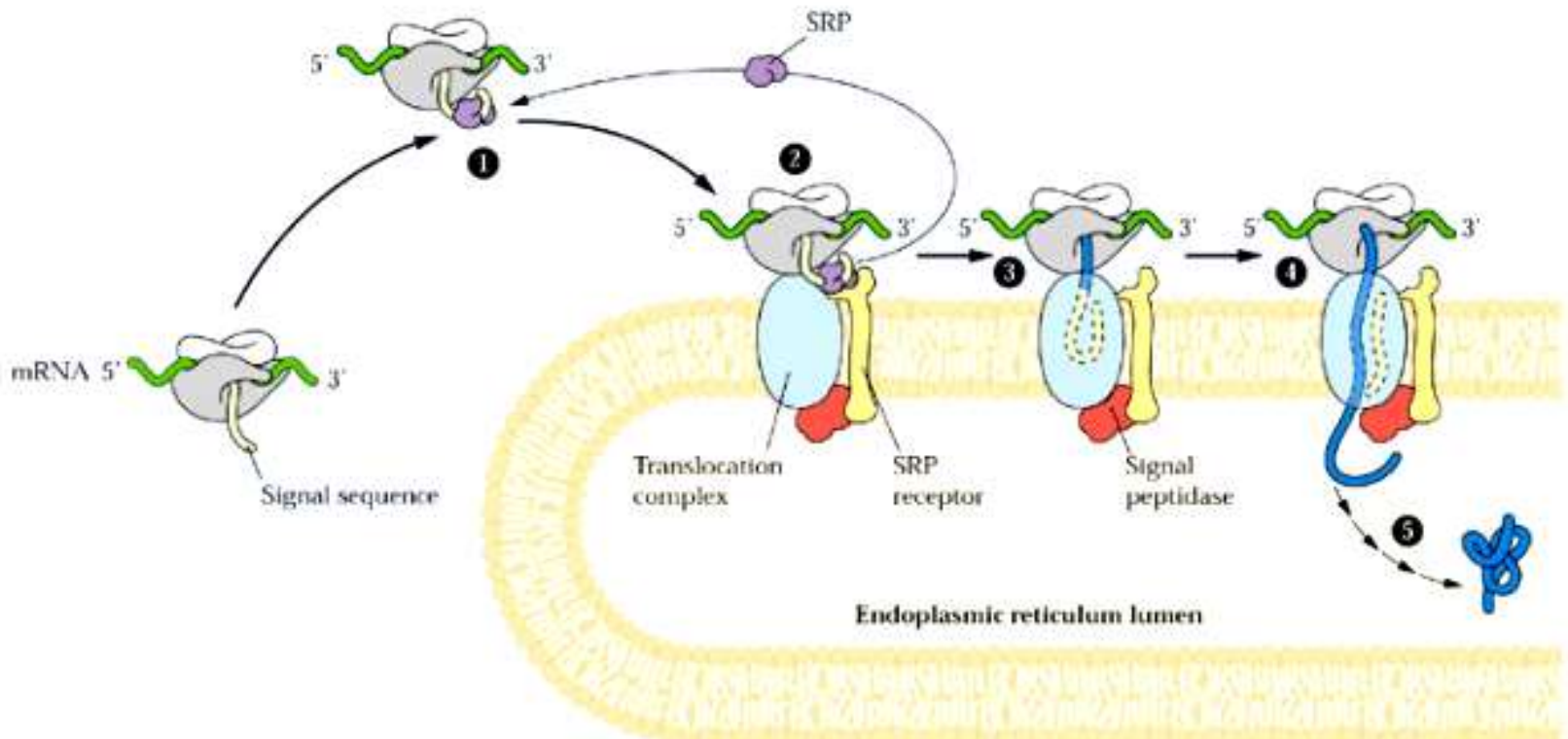
→ po přeložení prvních cca 70 AK signální sekvence rozeznána částicí **SRP** (signal recognition particle)

→ zastavení translace a navázání komplexu SRP-ribozóm na **SRP receptor** v membráně ER

→ oddělení SRP od ribozómu a připojení ribozómu na **translokační komplex**

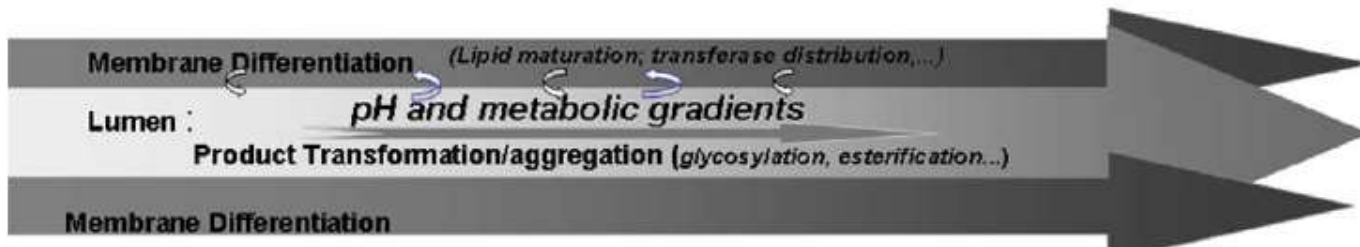
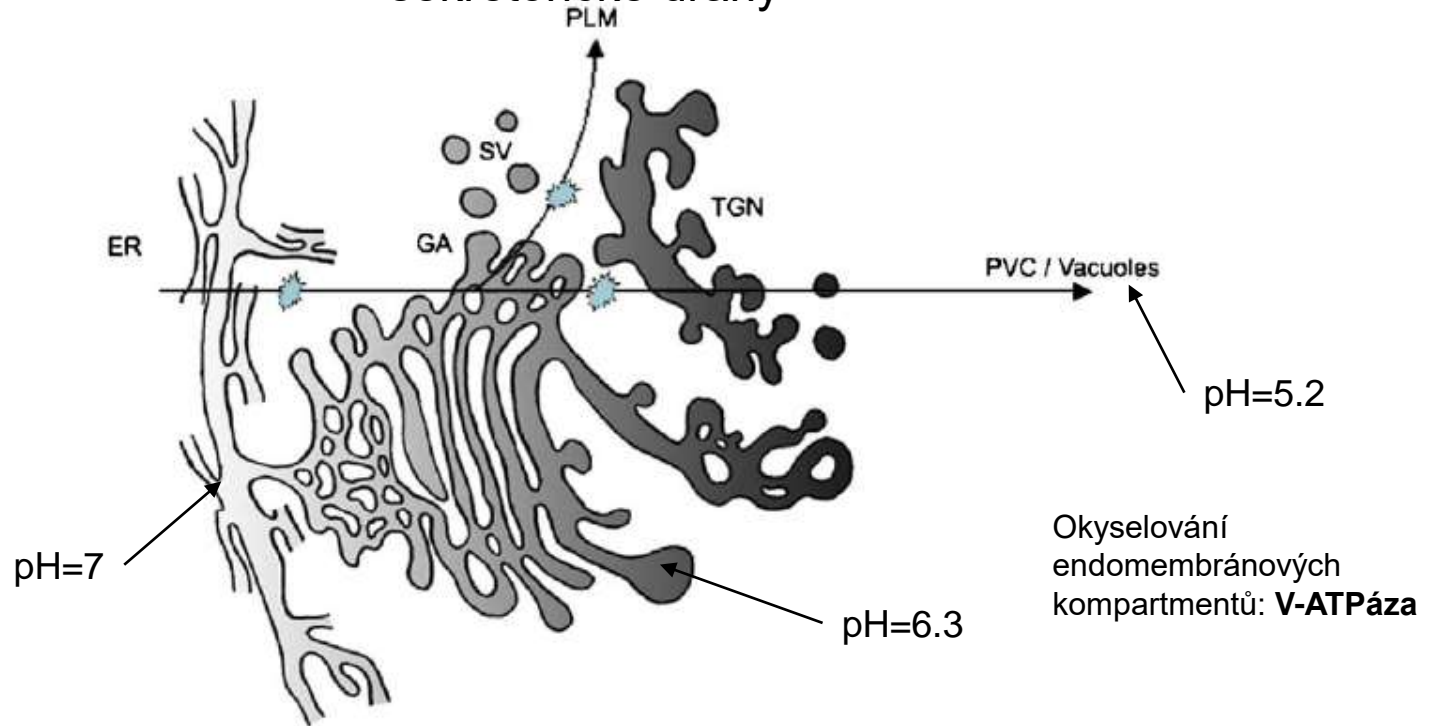
→ translace proteinu a translokace do lumina ER

→ po dokončení translace a sbalení proteinu signální sekvence odštěpena



Syntéza a úprava proteinů v ER

rezidentní enzymy a specifické prostředí kompartmentů sekretorické dráhy



Syntéza a úprava proteinů v ER

- **modifikace** některých aminokyselin (např. prolinu na hydroxyprolin)
- **formování disulfidických můstků**
- **přidávání sacharidových zbytků** na N-skupiny proteinů (N-glykoproteiny)
- **ER protein quality control** (kontrola kvality proteinů syntetizovaných v ER) zahrnuje:
 - Sbalování proteinů
 - Zadržení nesprávně sbalených proteinů v prostoru ER
 - Degradace nesprávně sbalených proteinů

Syntéza a úprava proteinů v ER: příklady rezidentních proteinů

Signální peptidáza: odstraňuje signální sekvenci

N-glykosylace

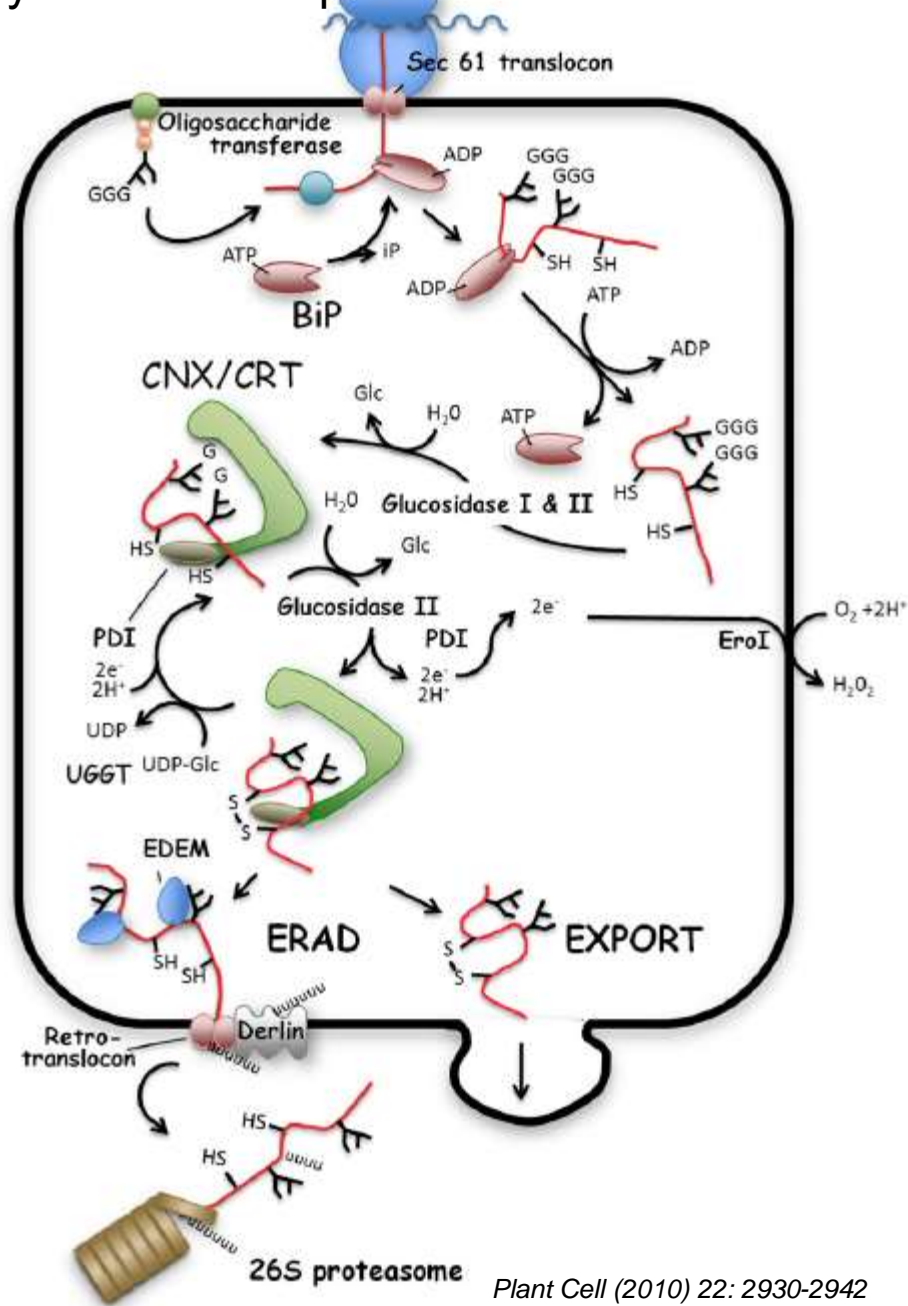
BiP (Binding Protein; HSP70 chaperone): váže nově syntetizované peptidy, ATPáza

Calnexin a calreticulin (CNX/CRT): Ca^{2+} vázající chaperony v lumen ER. Zajišťují správné sbalení proteinů

Foldázy PDI a PPI:

PDI (Protein Disulfide Izomerase): katalyzuje formaci S-S můstku

PPI (Peptidyl-Prolyl Izomerase; immunophilins) katalyzují izomerizaci peptidové vazby před prolinem.



ER exit sites (ERES)

ERES: specializované domény v membráně ER v savčích a kvasinkových buňkách, kde dochází k vytváření COPII váčků (ER výstupní místa).

Střední kompartment (intermediate compartment): často tvořen na rozhraní ER a GA.

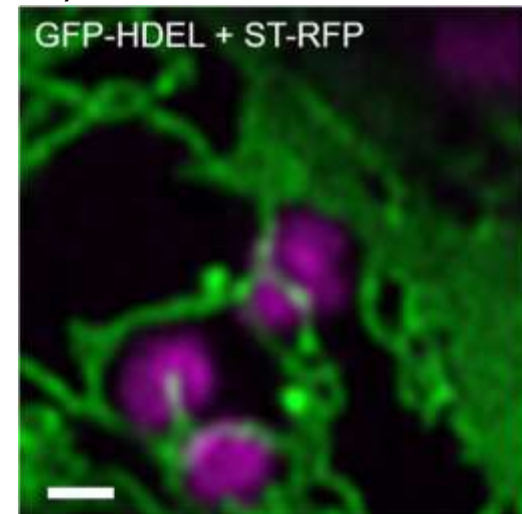
A jak je to v rostlinách?

Rostlinné buňky využívají v transportu COPII váčky a kódují většinu proteinů, podílejících se na tvorbě savčích ERES

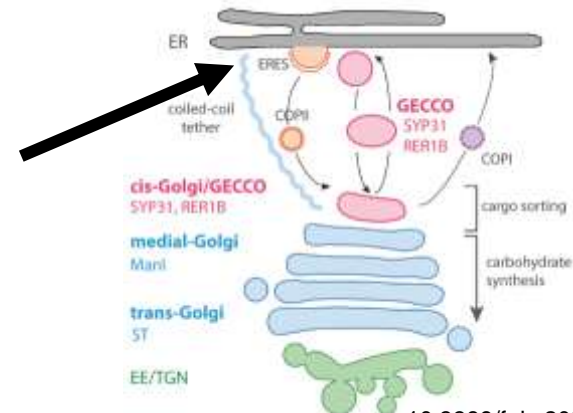
Střední kompartment se nevytváří (COPII váčky vznikající na ER jsou vzdálené od cis-GA max 300 nm)

GA tvoří mobilní jednotky (diktyosomy) pohybující se v blízkosti ER podél aktinu

Pro výměnu váčků dochází k dočasným zakotvením GA u membrán ER (coiled-coil proteiny pro dočasné zakotvení a výměnu váčků).

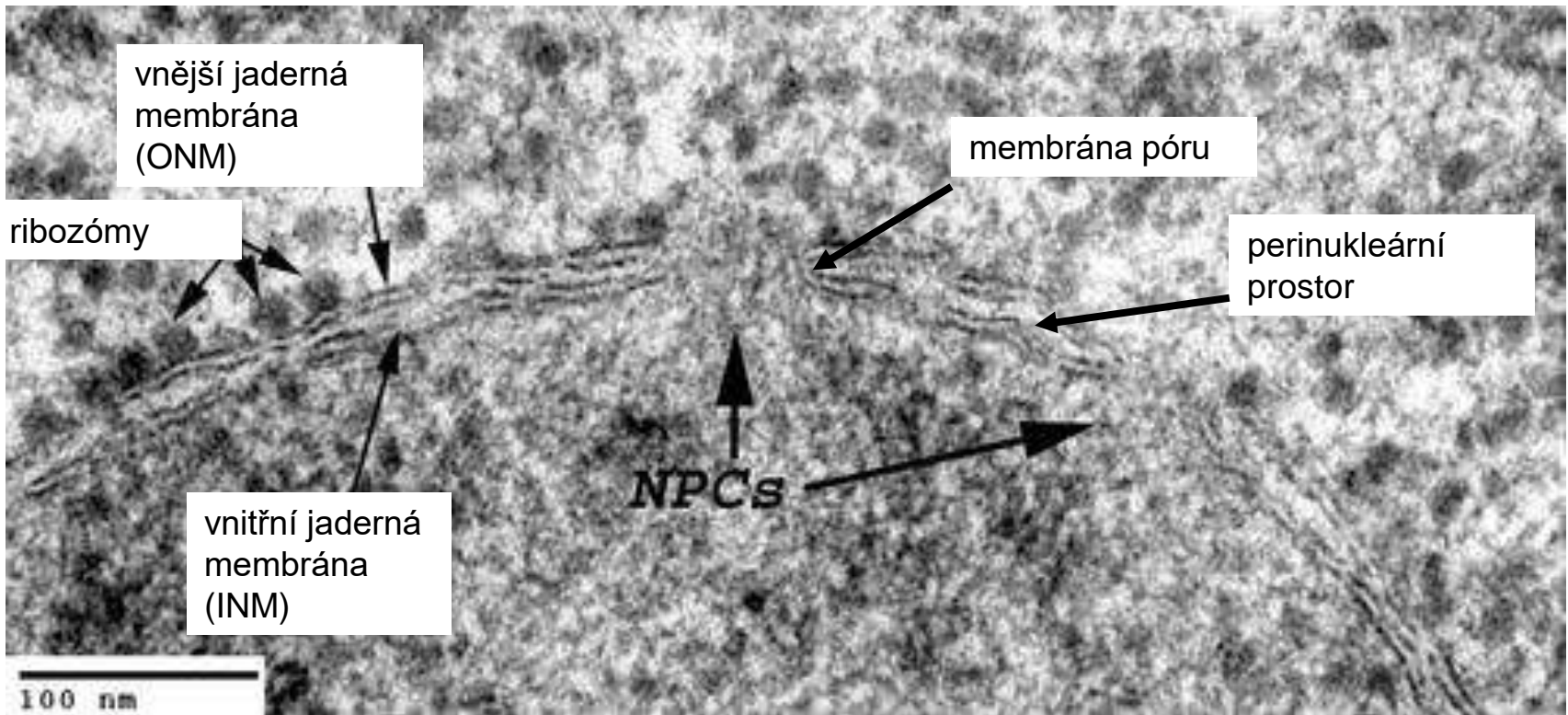


10.1111/jmi.12909



10.3389/fpls.2020.609516

Jaderný obal



ONM: signalizace Ca^{2+} ; ribozómy; RanGAP; nukleace mikrotubulů

Membrána póru: kotvení komplexu jaderného póru (NPC); jediné místo spojení ONM a INM

INM: kotvení chromatinu, komunikace jádro-cytosol.)

Perinukleární prostor: kontinuální s lumenem ER

NPC: komplex jaderného póru

Golgiho aparát

Poprvé popsán italským lékařem Camillo Golgi v roce 1897

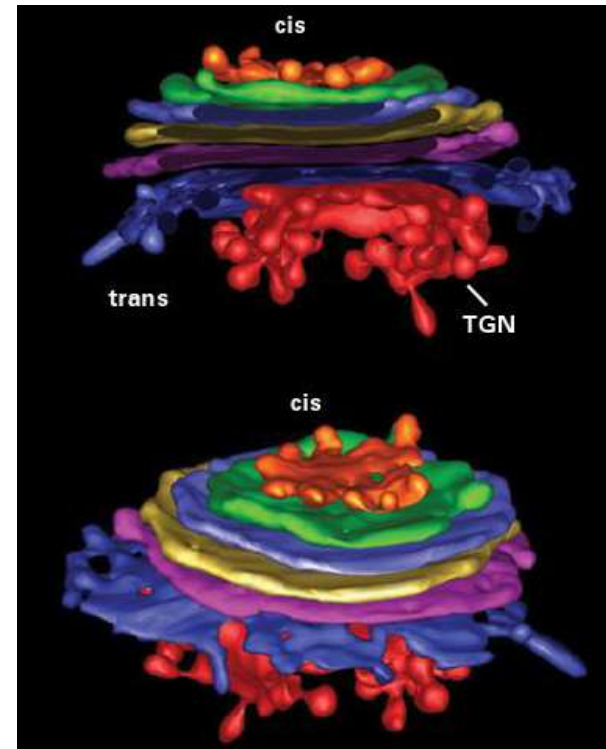
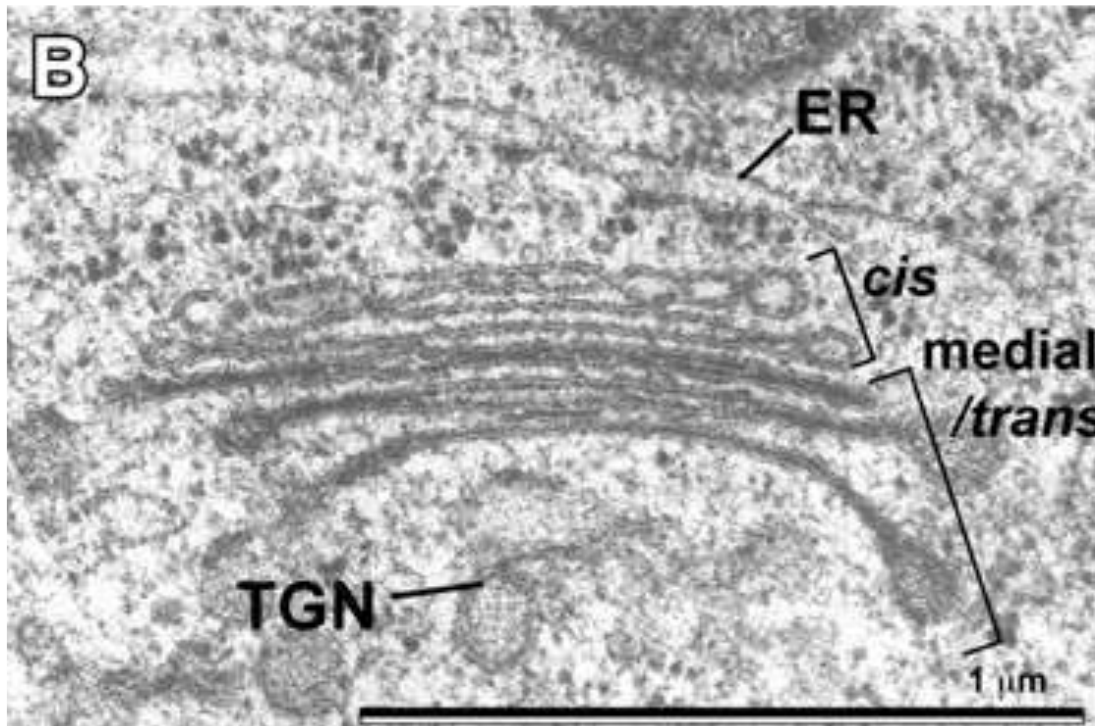
Soubor plochých cisteren, **TGN** (trans-Golgi network) a **Golgiho matrix**

Diktyozóm

Polarizace GA: **cis-GA** a **trans-GA**



Camillo Golgi

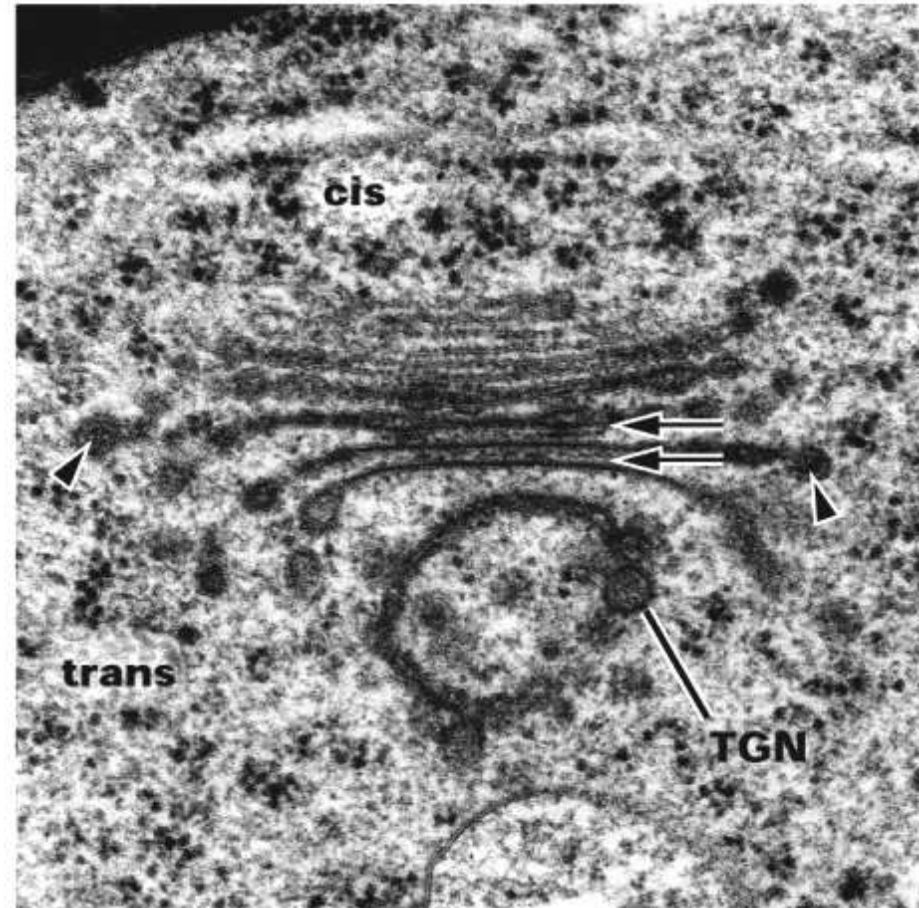
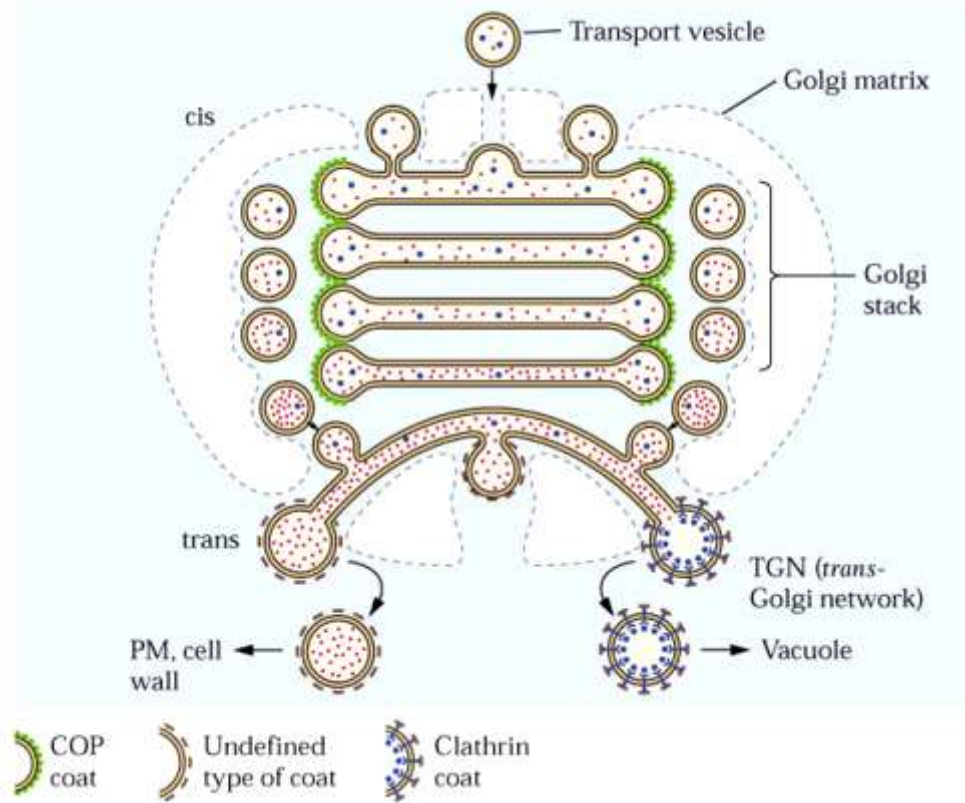


Funkce GA

- centrální pozice v sekretorické dráze, křižovatka transportovaných molekul
- syntéza **všech necelulózních polysacharidů** pro stavbu buněčné stěny
- syntéza a úprava cukerných řetězců** u glykoproteinů (O-glykoproteiny)
- produkce **glykolipidů**

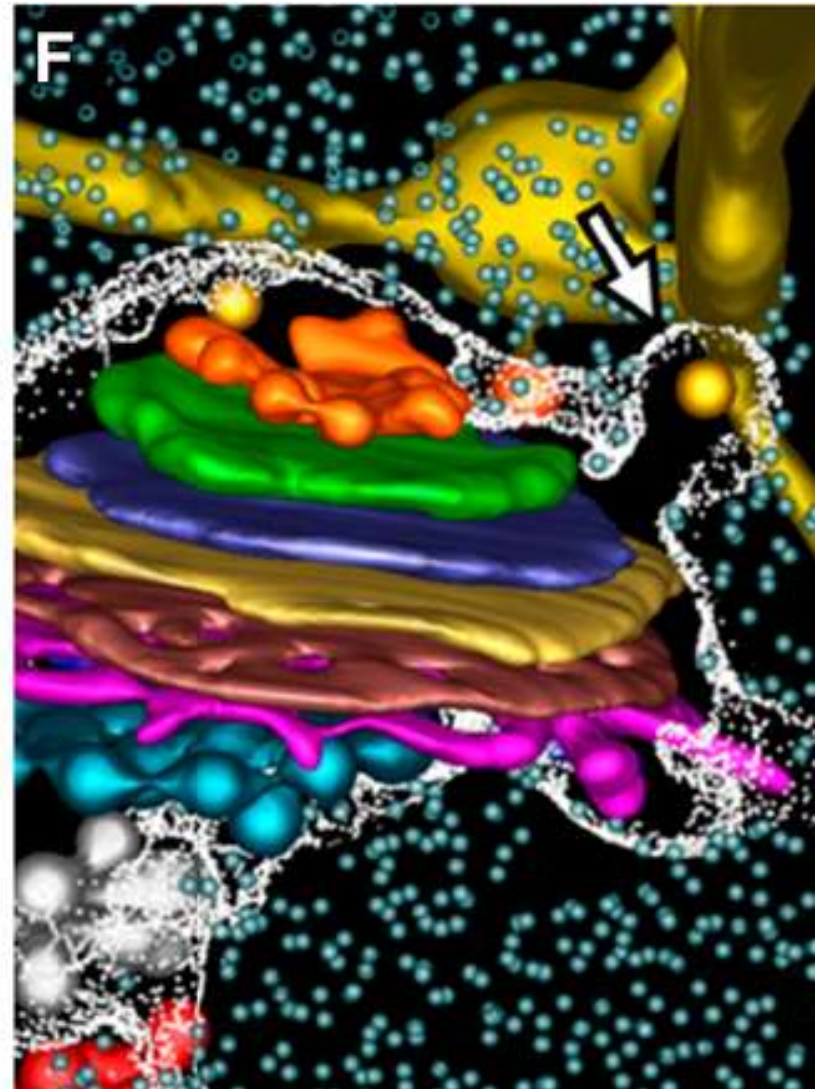
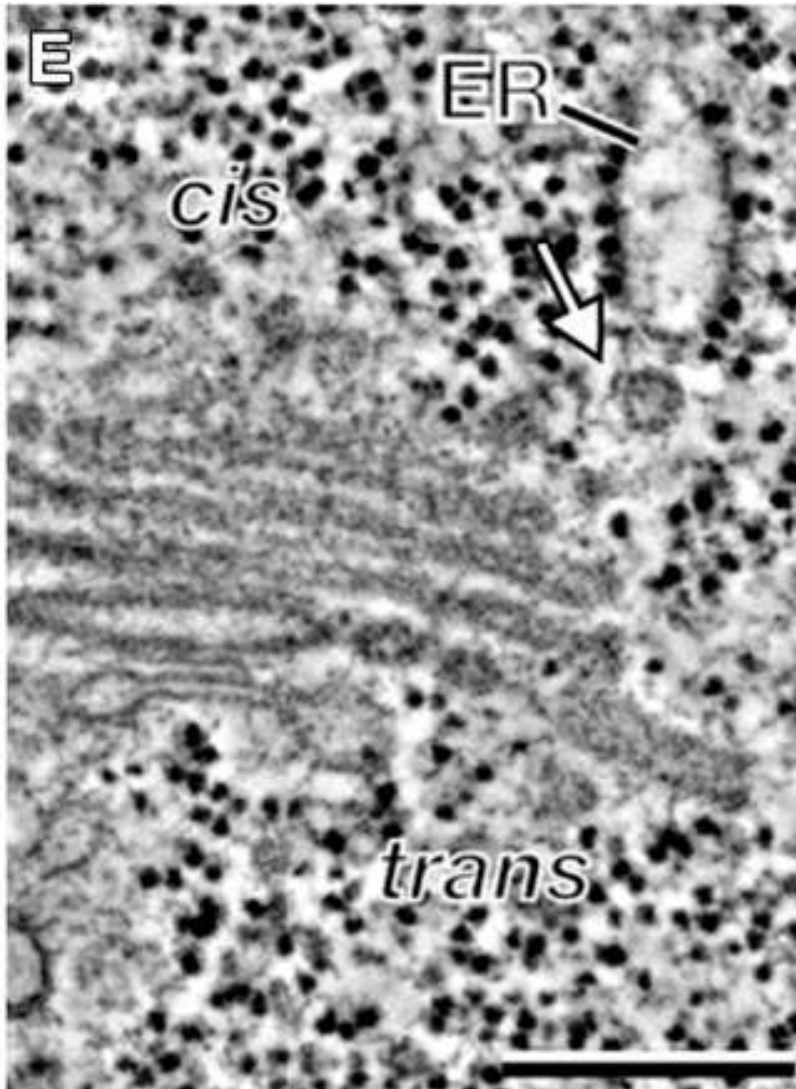
Golgiho aparát

(A)



Golgiho aparát

Matrix – proteiny golginy

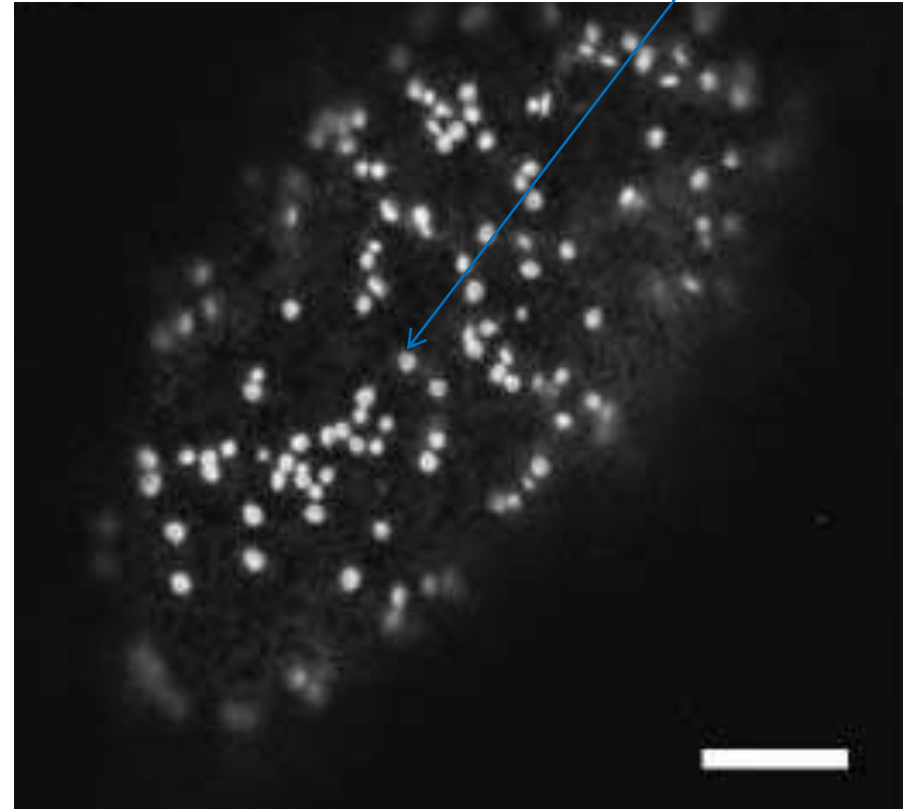
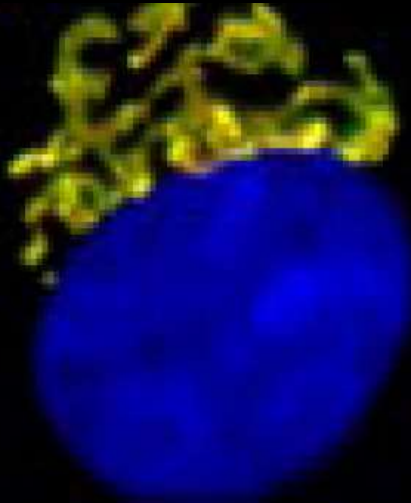


Golgiho aparát

Pohyb a distribuce

Diktyozóm

Golgi apparatus, nucleus



Krysí buňka

Molecular Biology of the Cell 17, 525–538 2006

GA v blízkosti jádra
GA se rozpadá během mitózy a je
rekonstruováno po mitóze

Tabáková buňka

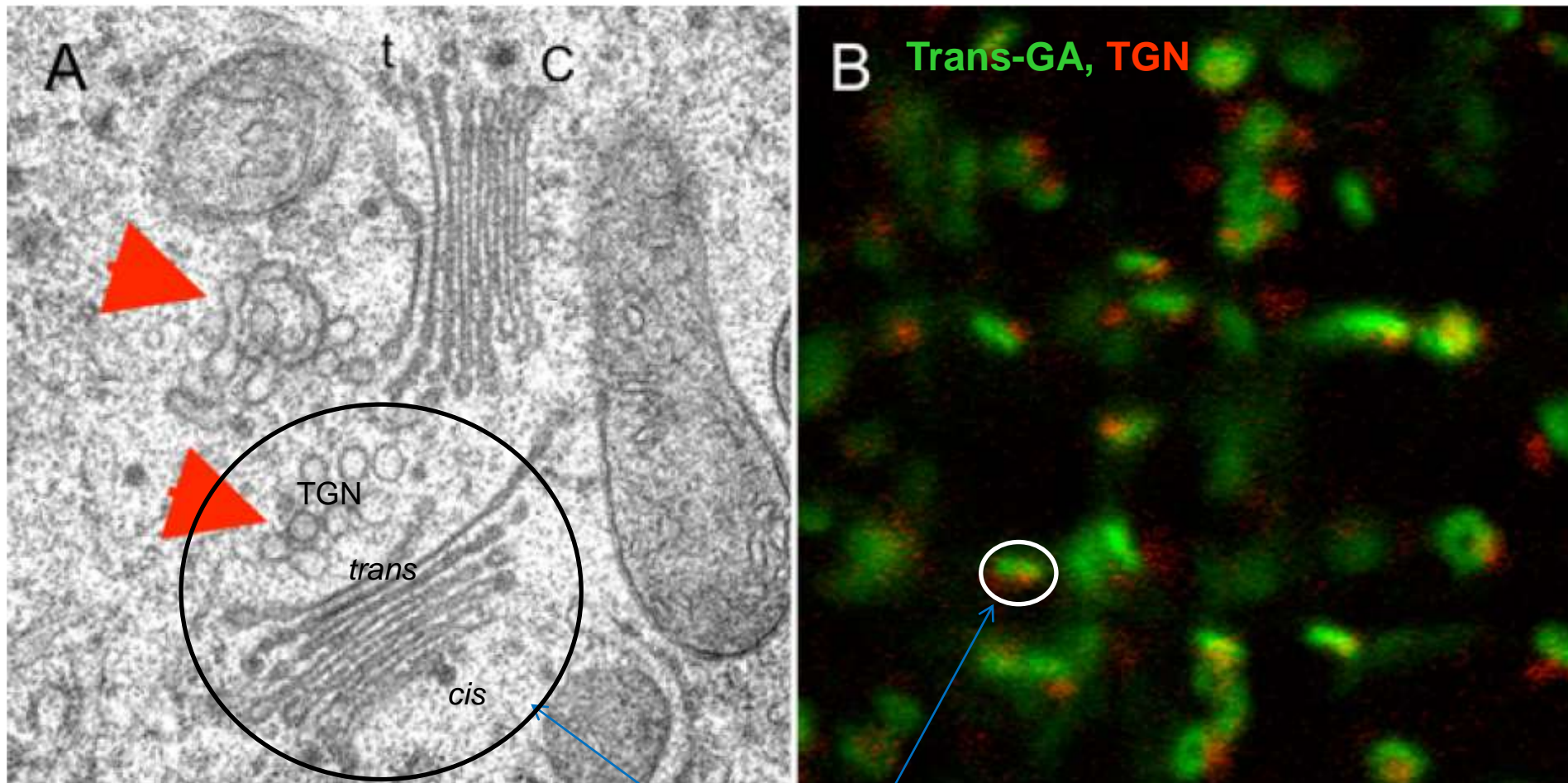
New Phytologist 2005 165: 29–44

X

Funkční jednotkou GA je diktyozóm
Diktyozómy se pohybují v cytoplazmě
Během mitózy zůstává GA plně
funkční a nedochází k rozpadu

Golgiho aparát

Pohyb a distribuce, diktyozóm

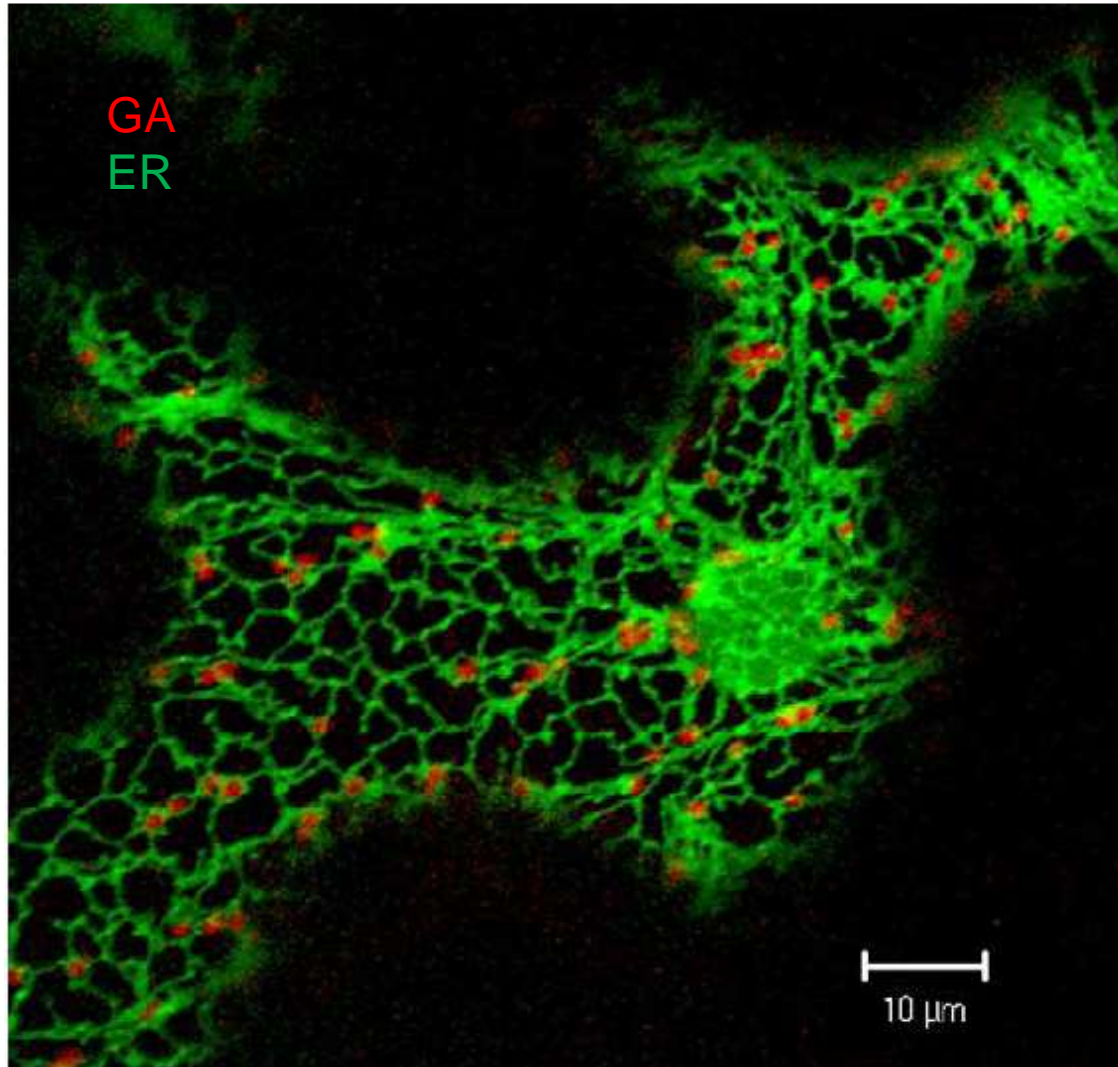


Diktyozóm

Golgiho aparát

Počet diktyosomů závisí na buněčném typu a funkci:

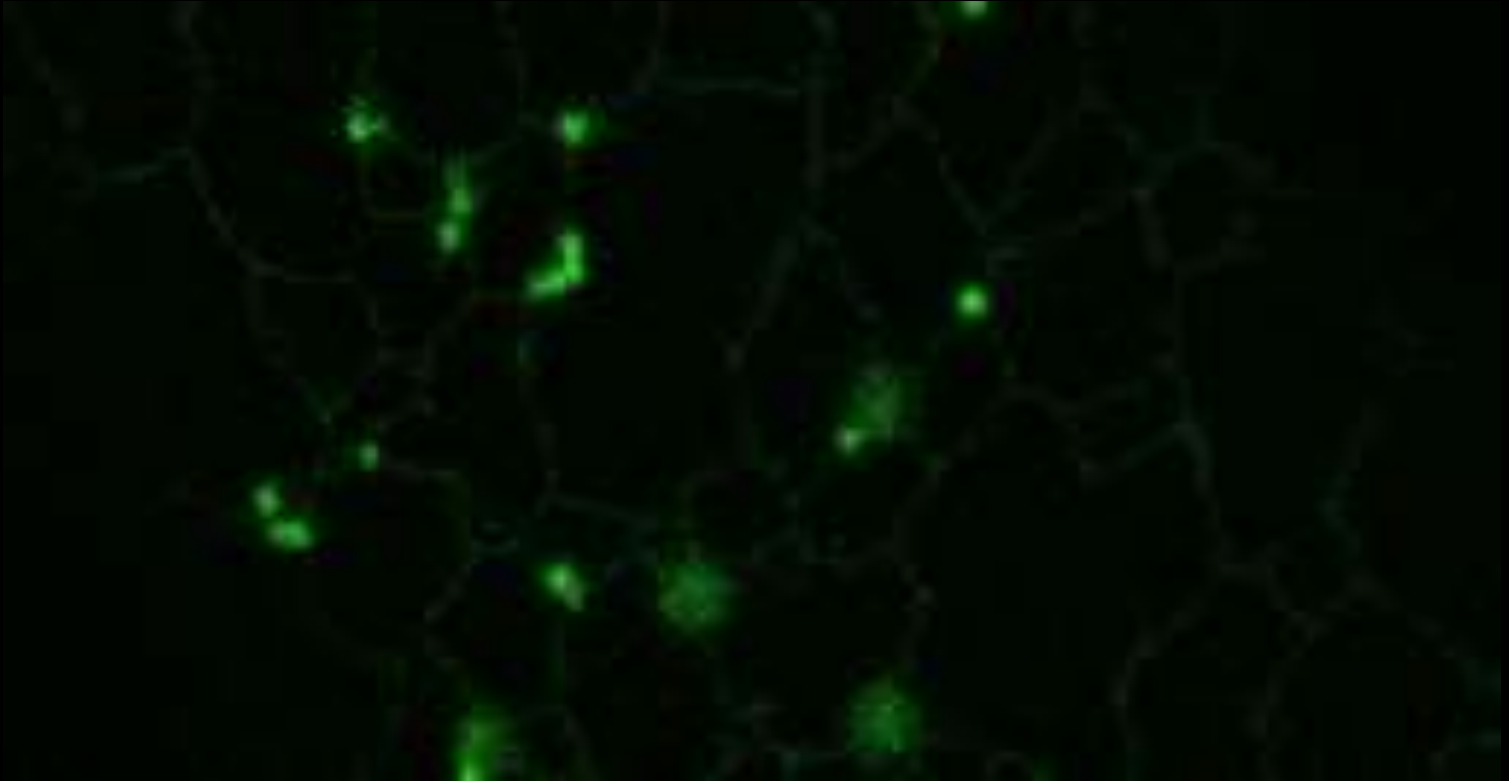
Kořenová špička cibule: 400, apik. meristém vrbovky: 20



Golgiho aparát

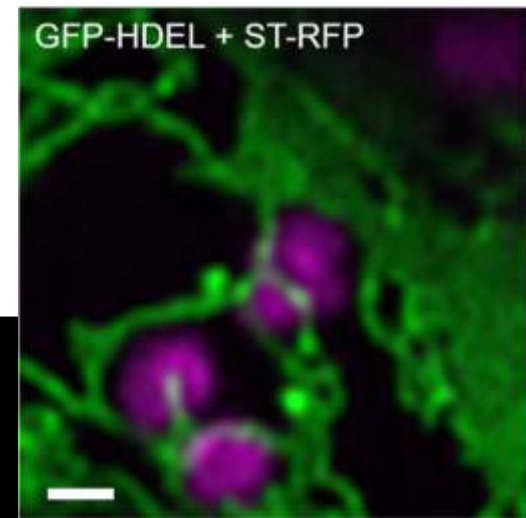
Pohyb a distribuce

Pohyb stop-and-go

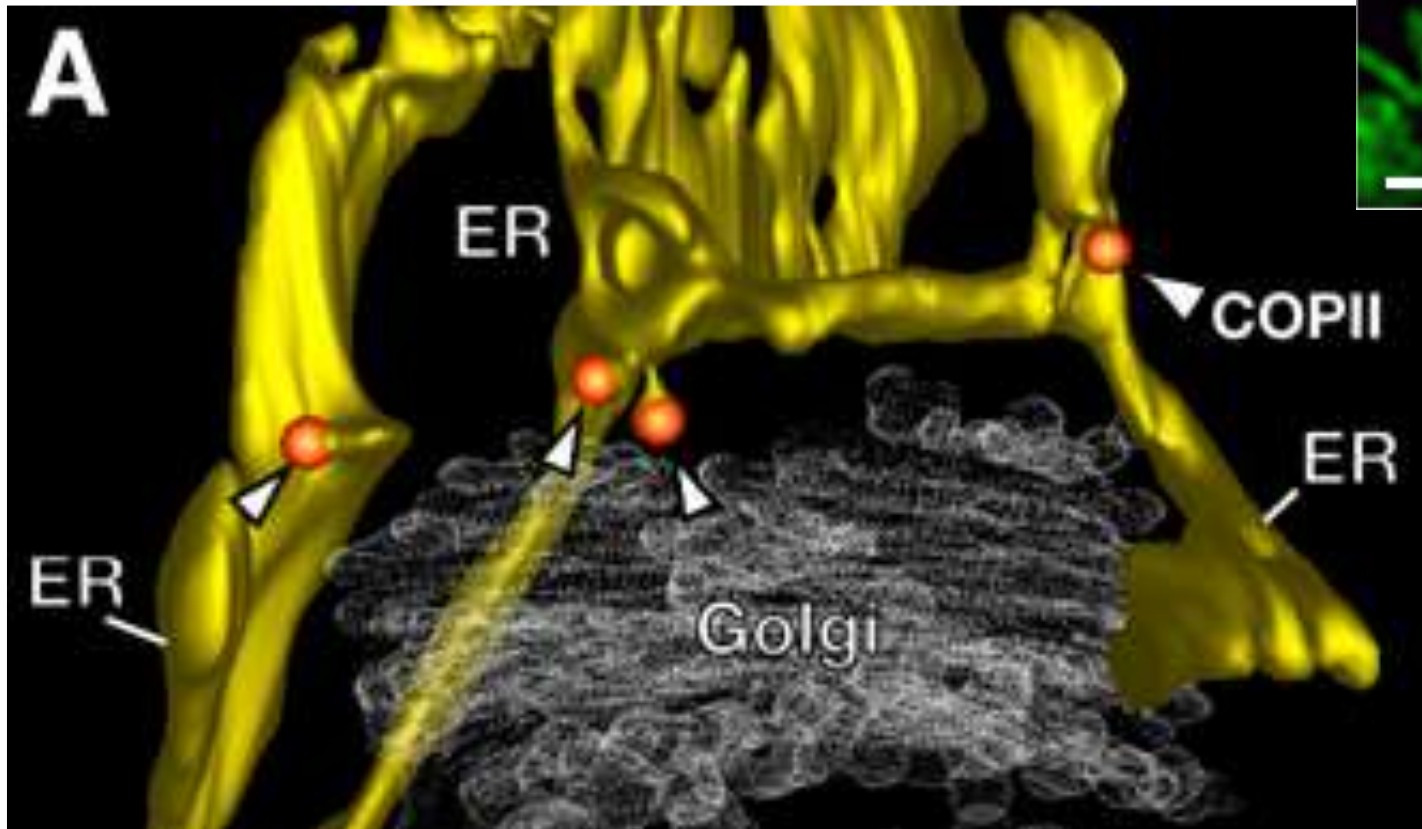


Golgiho aparát

Pohyb a distribuce



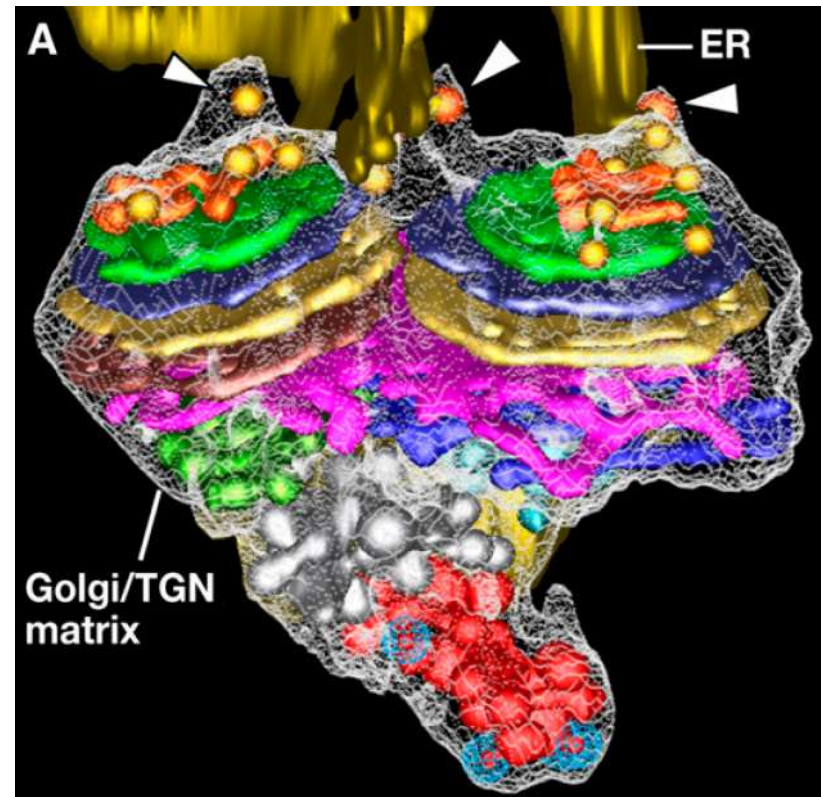
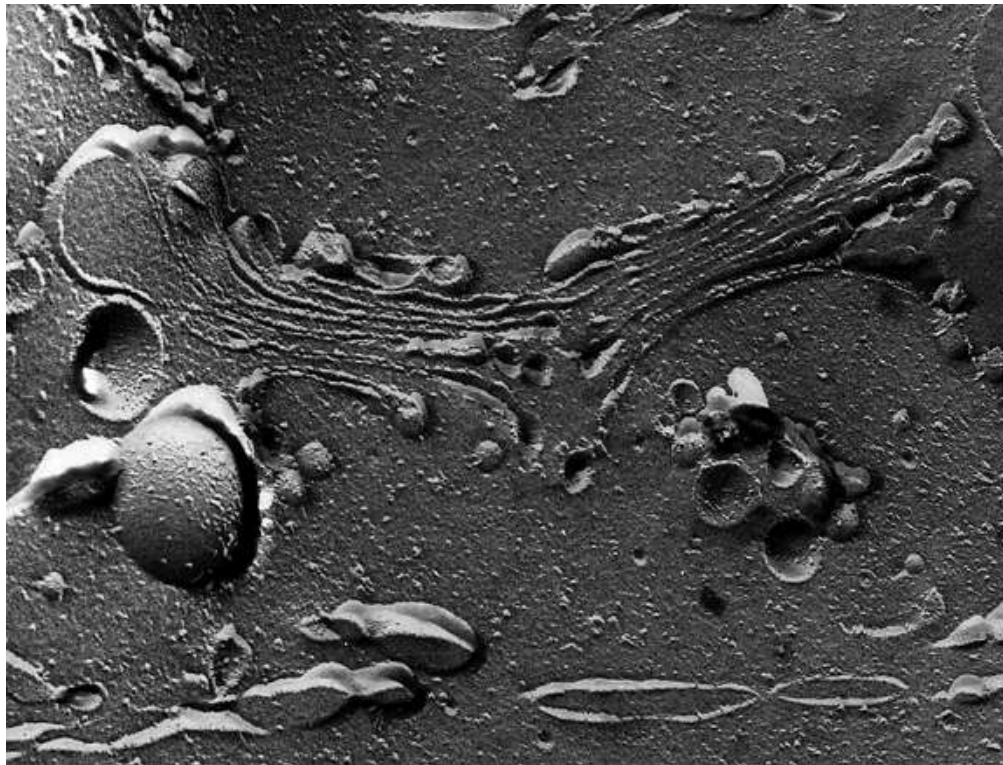
10.1111/jmi.12909



Většina COPII váčků vznikajících na membránách ER jsou vzdálené od cis-GA max 300 nm

Vznik GA:

- Biogeneze z ER membrán
- Dělení GA (pozorováno u rostlin, řas a prvoků)



Strukturní a funkční odlišení cisteren GA

Jednotlivé cisterny GA jsou strukturně a funkčně odlišeny; každá obsahuje jiný soubor enzymů, které zajišťují specifické procesy probíhající v cisterně (**rezidentní enzymy**).

cis-GA:

-Zřejmě tvoří specializovaný kompartment pro interakci s ER (GECCO: Golgi entry core compartment), podílející se i na formaci GA z ER membrán

-Příjem váčků z ER (COPII)

-Recyklace molekul z ER retrográdním transportem (COPI)

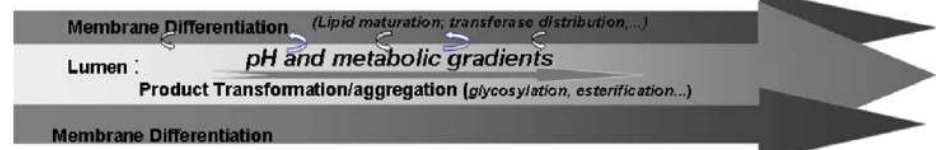
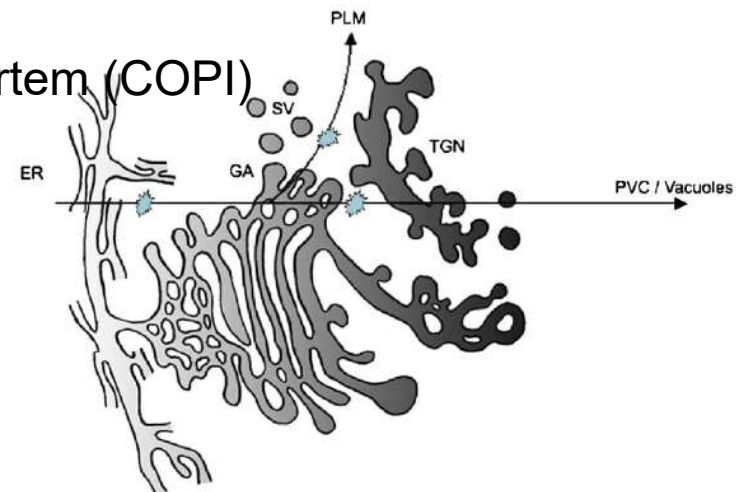
trans-GA:

-Kyselý charakter

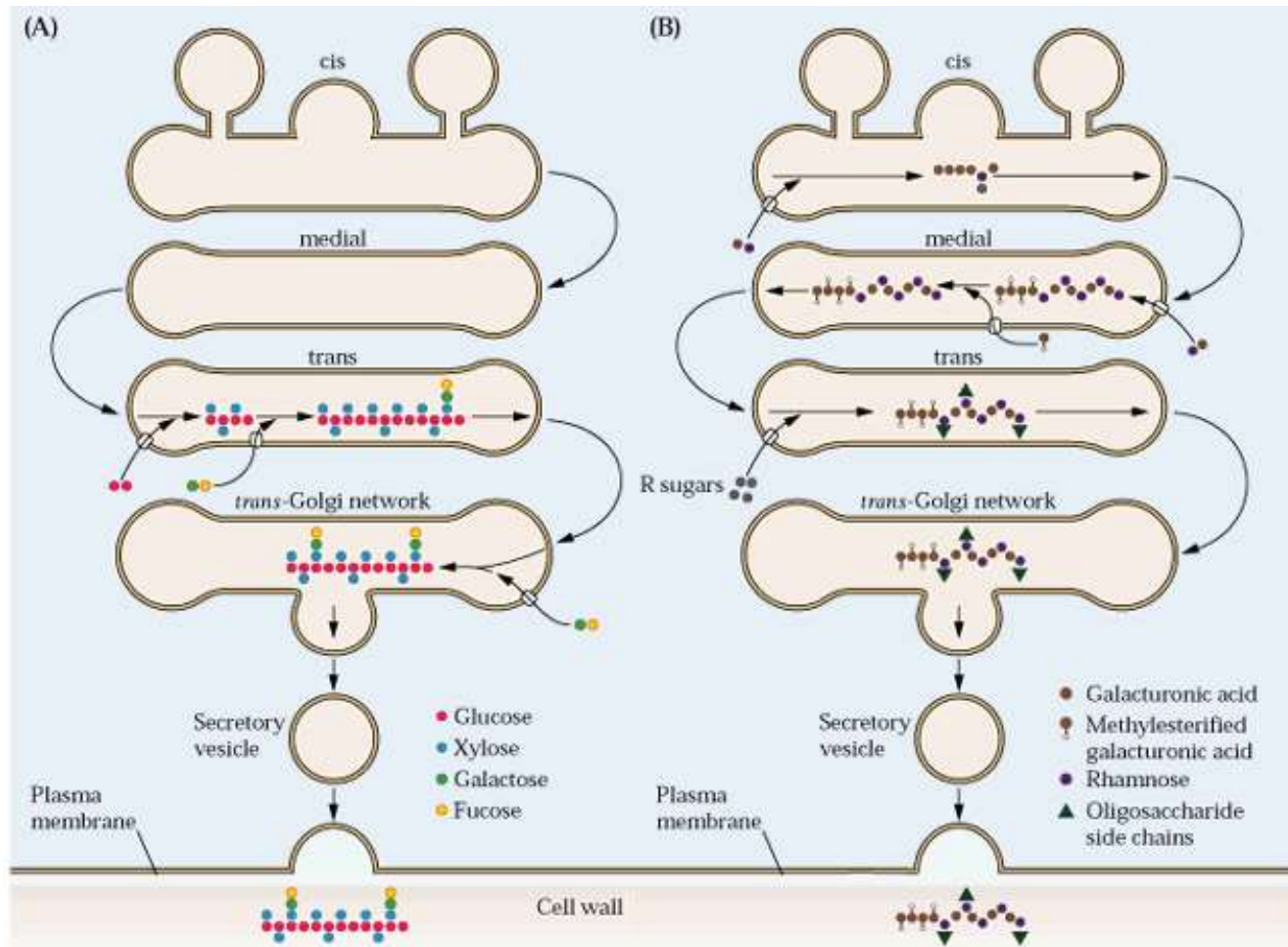
-Tlustší membrána (obsah sterolů)

TGN:

- Balení syntetizovaných proteinů a polysacharidů do transportních váčků a jejich další transport k cílovým místům



Strukturní a funkční odlišení cisteren GA

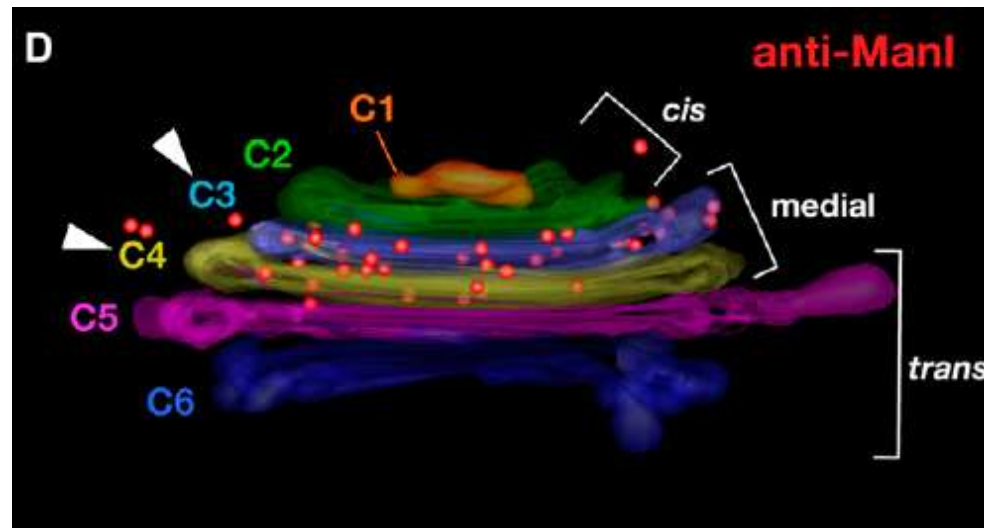


syntéza xyloglukanu

syntéza pektinu

Strukturní a funkční odlišení cisteren GA

Detekce manosidázy I (zprostředkovává první reakce glykosylace proteinů) pomocí imunolokalizace:

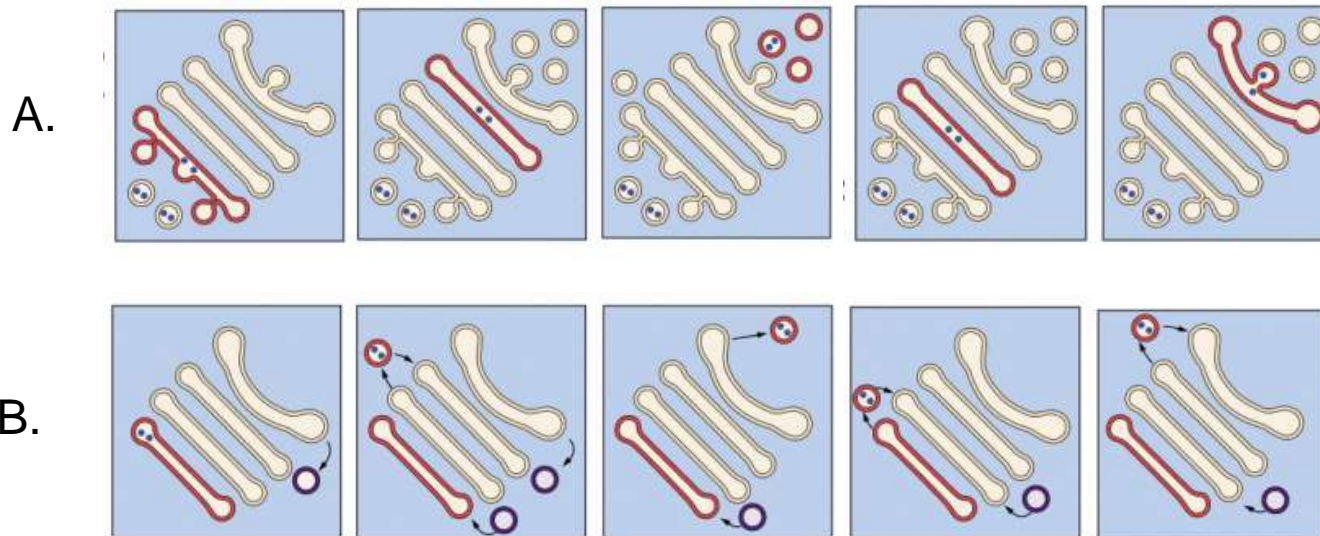


Strukturní a funkční odlišení cisteren GA

A. Hypotéza maturace cisteren: cisterny GA maturují a postupují od cis k trans straně, nové cisterny jsou tvořeny na cis-straně fúzí váčků z ER. Charakteristické enzymatické složení cisteren je zajištěno retrográdním transportem váčků mezi cisternami.

B. Hypotéza kyvadlového pohybu váčků: cisterny GA jsou statické a proteiny a syntetizované látky se pohybují mezi cisternami pomocí odštěpování a fúze váčků. Váčkový transport retrográdním směrem kompenzuje ztrátu membrány.

C. Hypotéza přechodných tubulárních propojení mezi cisternami: transport skrze přechodné membránové kanály tvořené mezi cisternami.



Syntéza polysacharidových šupin v GA zelené řasy *Scherffelia dubia*

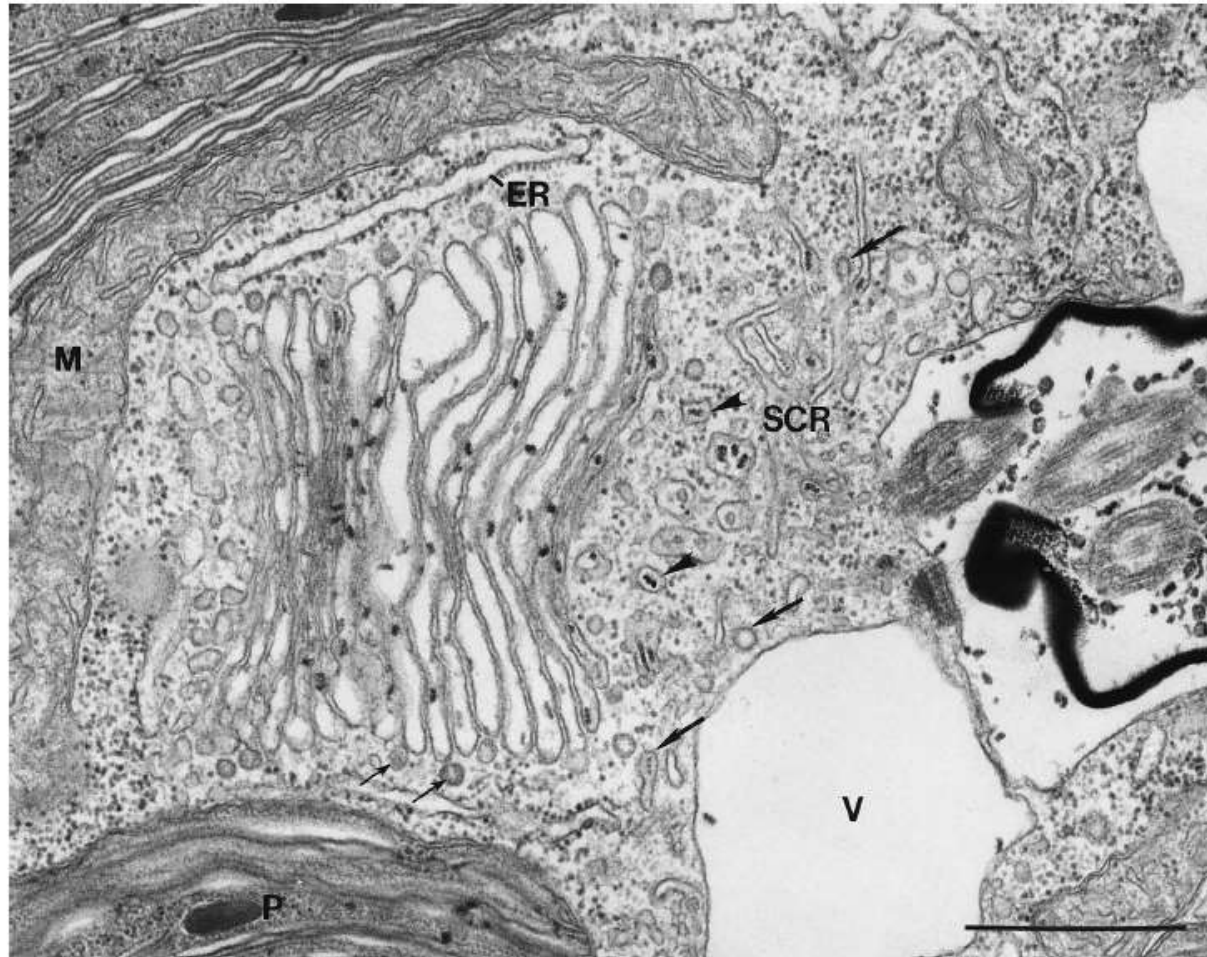


Fig. 3. Golgi stack in the alga *Scherffelia dubia*. A membranous scale reticulum (SCR), and secretory vesicles containing scales (arrowheads) are seen near the *trans* side of the Golgi body. Vesicles not containing scales (small arrows) are closely associated with the Golgi stack. Large arrows indicate clathrin-coated membrane profiles. ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondrion; P, plastid; V, contractile vacuole. Bar equals 0.5 μm . Micrograph courtesy of Prof. B. Becker. Modified with permission from [84].