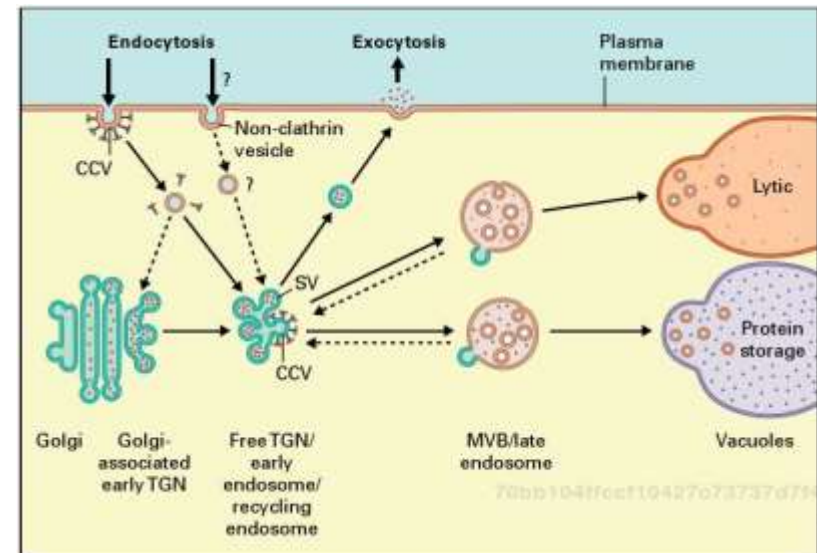
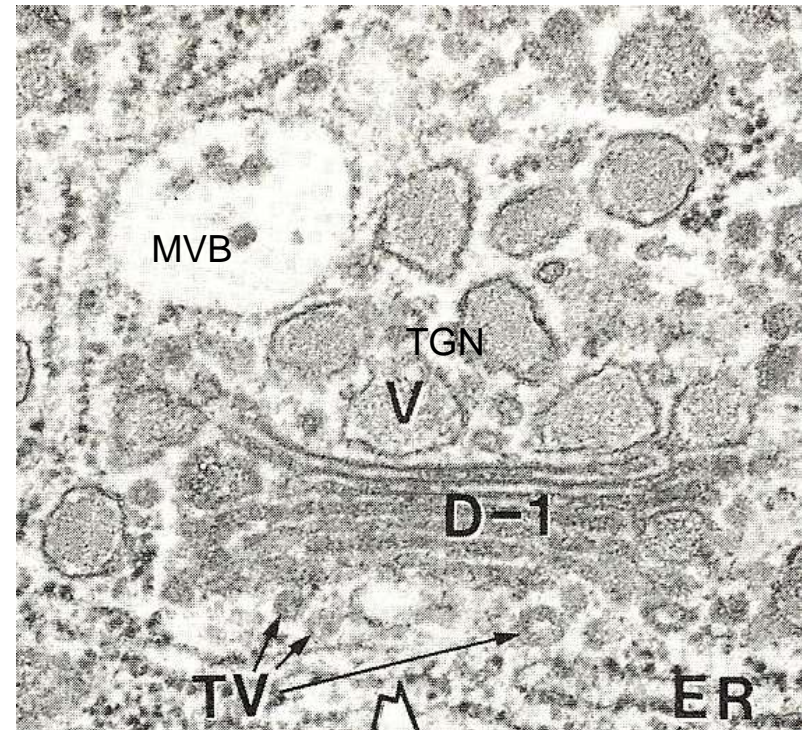


Endozóm rostlinné buňky:

Časný endozóm je **TGN**

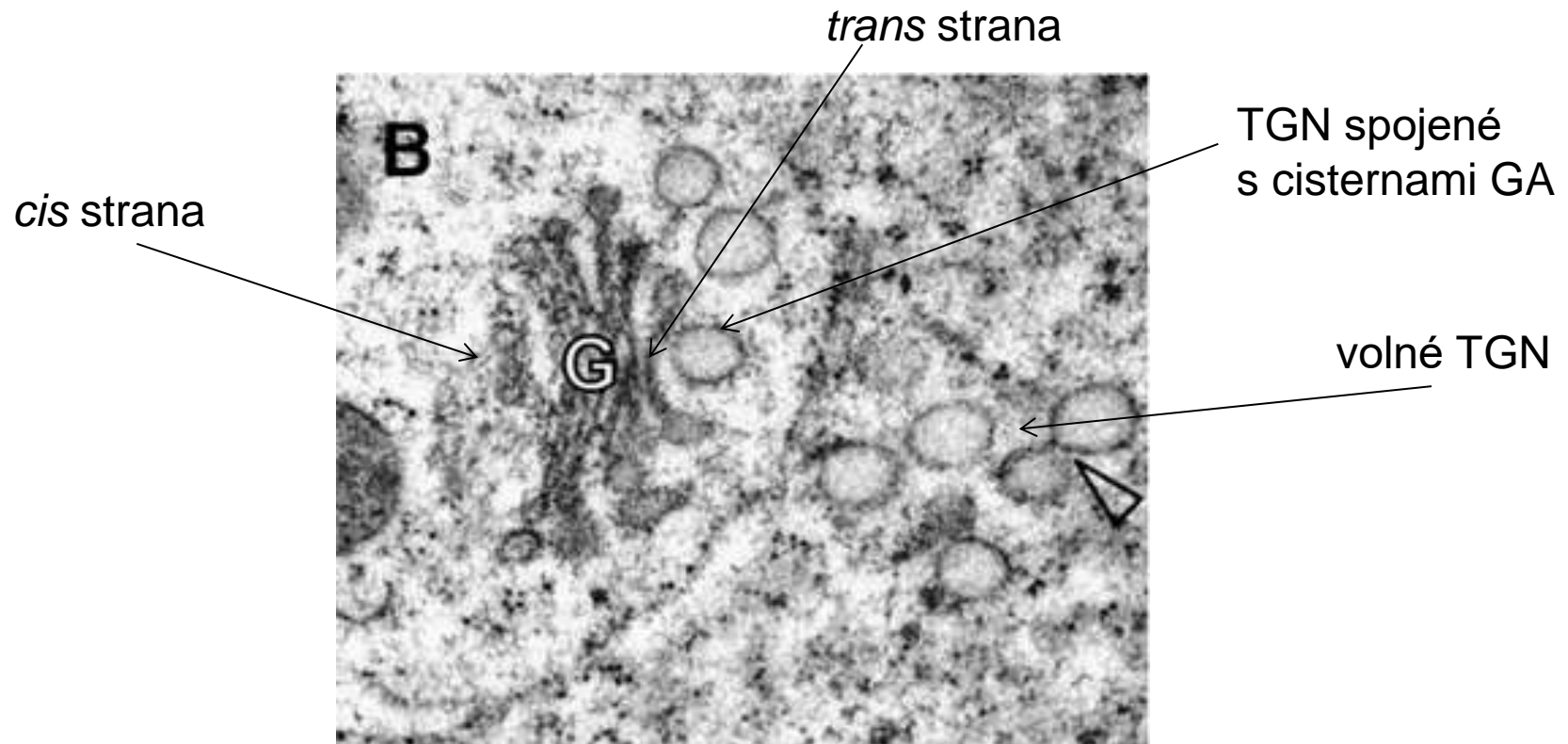
Recyklující endozóm

Střední a pozdní endozóm -
multivesikulární tělíska (**M**ultivesicular
Body, **MVB**), též prevakuolární
kompartiment (**P**revacuolar
compartment, **PVC**).
(MVB=PVC)



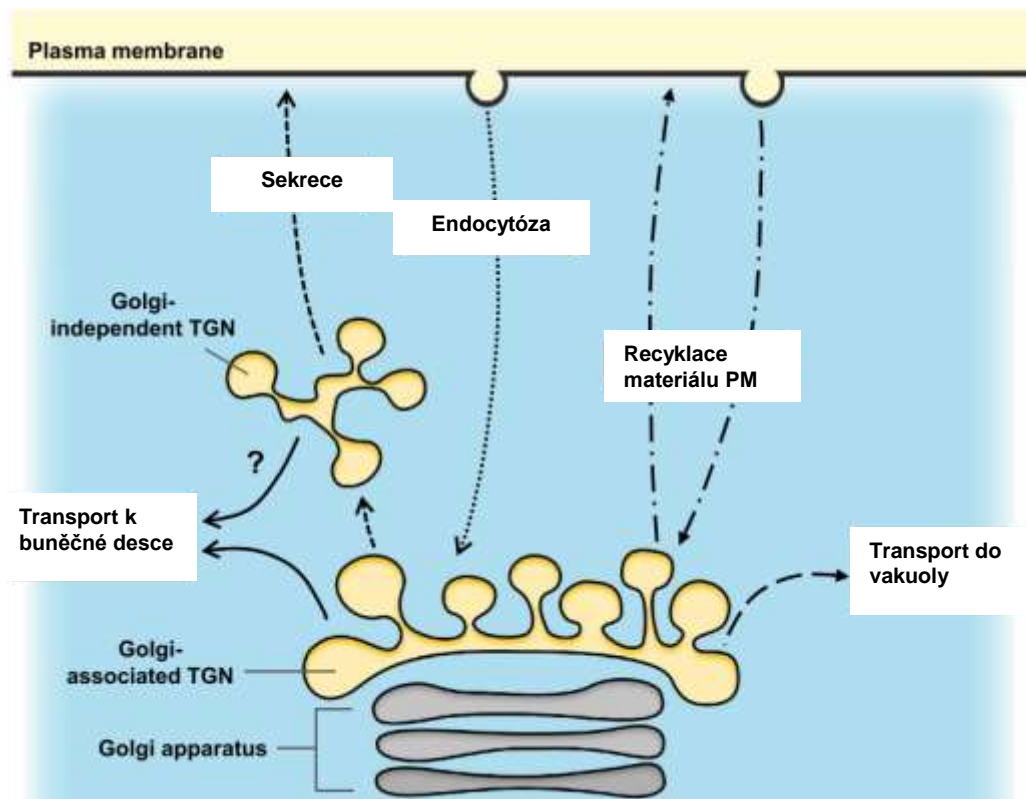
TGN – časný endozóm

- prijímá vâčky od PM (endocytóza) a *trans* GA;
- transportuje materiál k PM (exocytóza) a recykluje materiál z PM (= stýká se zde sekretorická a endocytotická dráha)
- transportuje materiál do MVB vâčkû (vakuolární dráha)
- transportuje materiál k buněčné desce během dělení buňky
- multidoménoový kompartment: TGN asociované s GA i „GA-nezávislé“ TGN

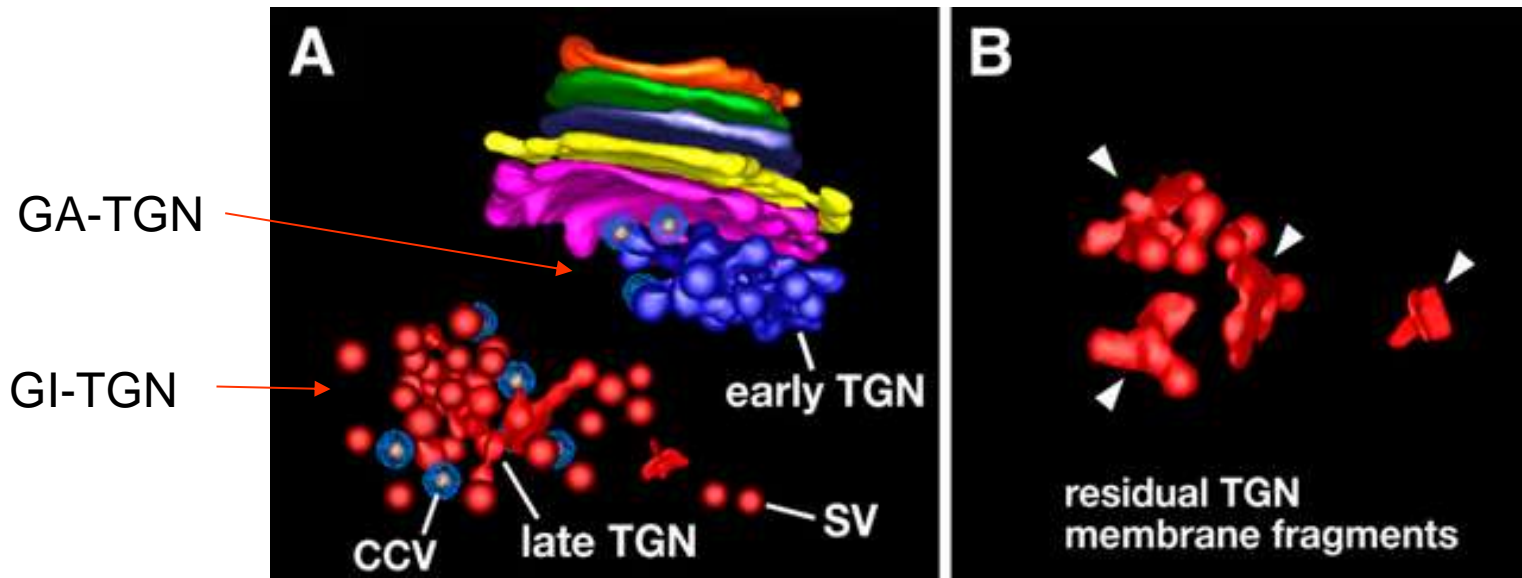


TGN – časný endozóm

- prijímá váčky od PM (endocytóza) a *trans* GA;
- transportuje materiál k PM (exocytóza) a recykluje materiál z PM (= stýká se zde sekretorická a endocytotická dráha)
- transportuje materiál do MVB váčků (vakuolární dráha)
- transportuje materiál k buněčné desce během dělení buňky
- multidoménoový kompartment: TGN asociované s GA i „GA-nezávislé“ TGN



TGN – časný endozóm



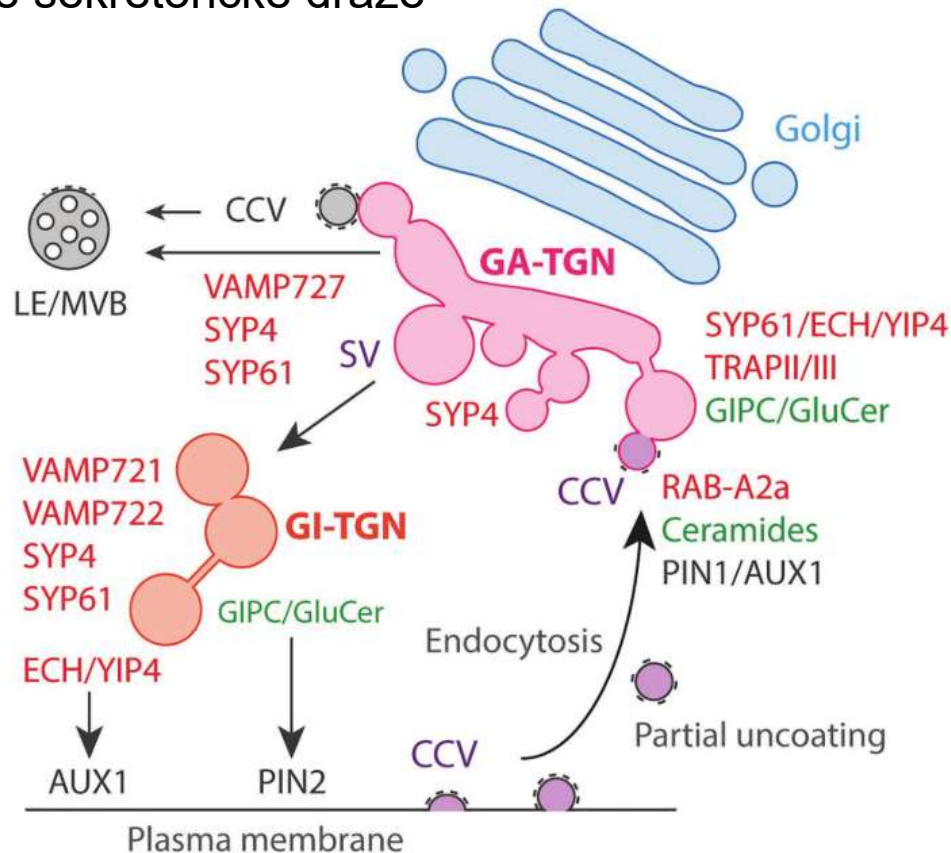
TGN často fragmentuje ve volný/pozdní TGN, který se pohybuje cytoplazmou a je postupně vyčerpán odštěpováním váčků. Proto rozlišujeme **GA-TGN** (Golgi-associated TGN) a **GI-TGN** (Golgi-independent TGN)

(CCV: clathrin-coated vesicles; SV: secretory vesicles)

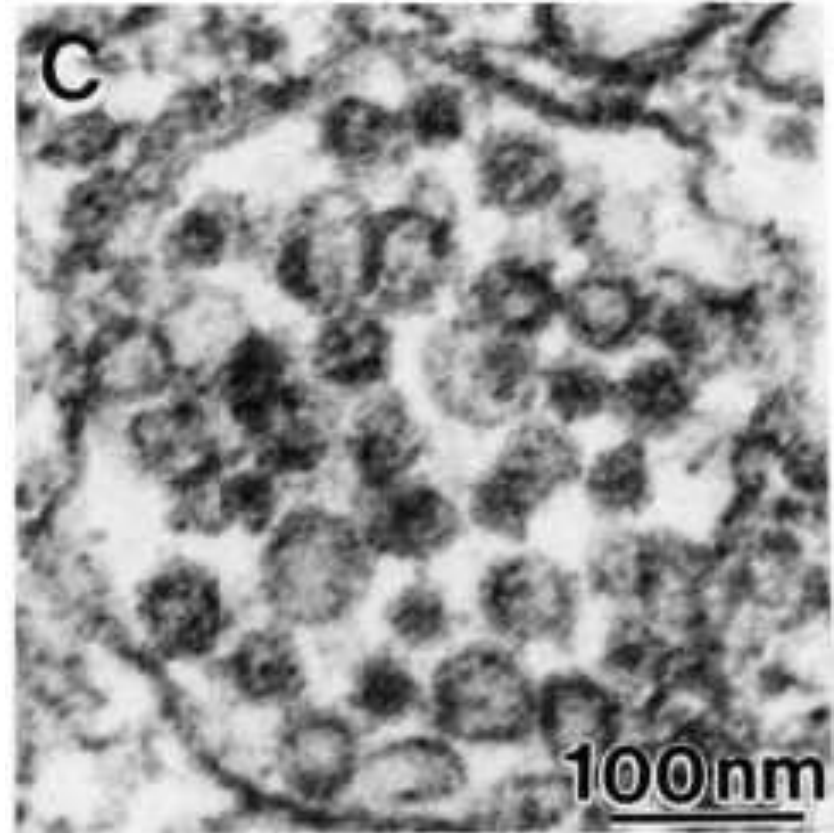
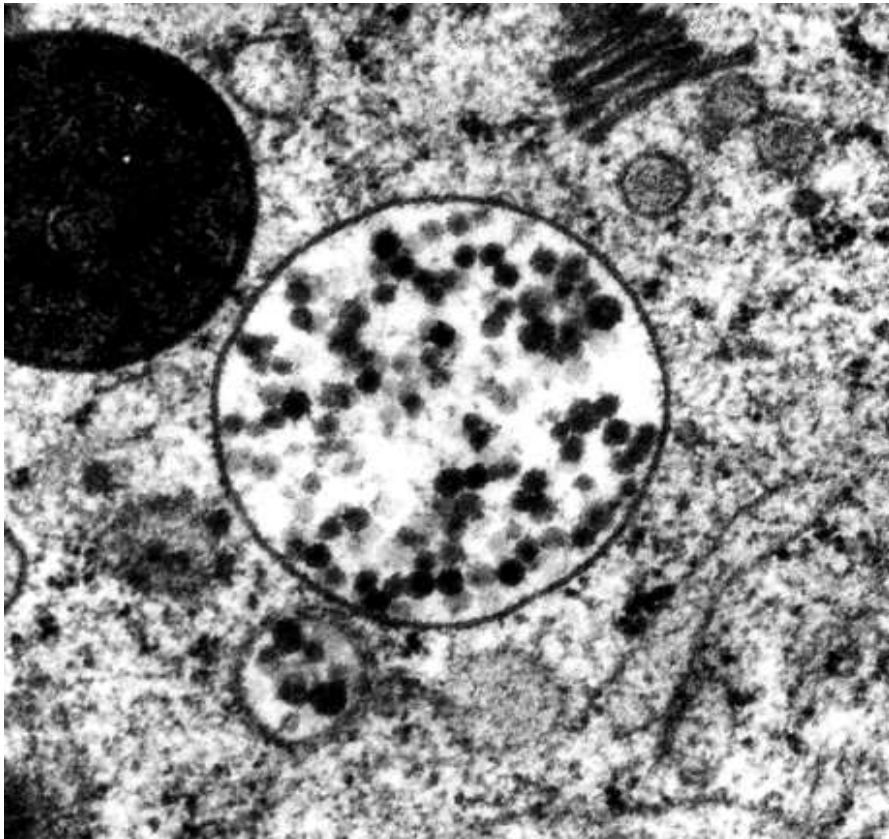
TGN – časný endozóm

TGN je molekulárně i funkčně kompartmentováno:

- alespoň dva typy váčků jsou vytvářeny na membránách TGN: **klathrinové** a **sekretorické (SV; bez proteinového obalu)** – specifické regulace a funkce
- každá subdoména TGN je charakterizována specifickými SNARE, malými GTPázami (Sar, Arf, RAB), lipidovým složením membrán a dalšími regulačními molekulami (např. adaptorové proteiny, doplňkové proteiny) a slouží specifické sekretorické dráze



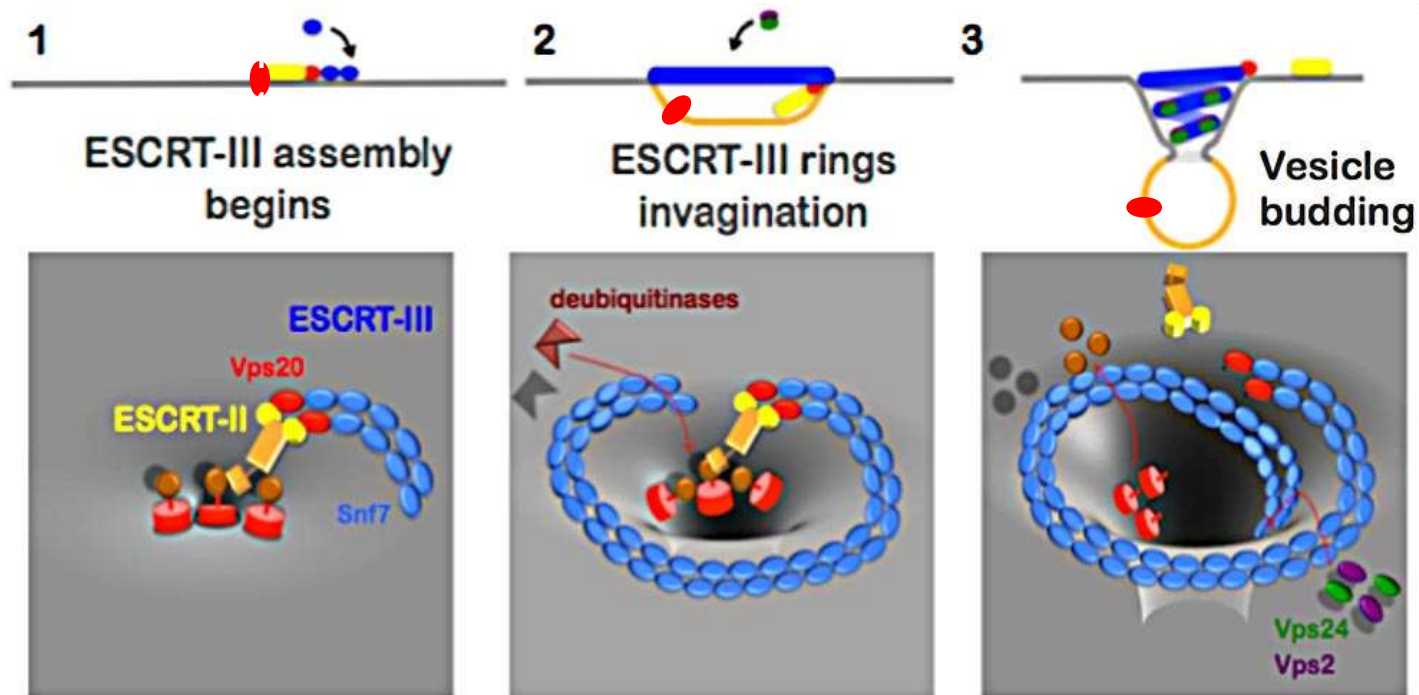
Multivesikulární tělíska – MVB / prevakuolární kompartment – PVC –
pozdní endozóm



The Plant Cell, Vol. 16, 672–693, March 2004,

Hlavní role: doprava membránových proteinů, určených pro degradaci,
do vakuoly.

Pučení intraluminálních váčků do MVB zajišťuje skupina ESCRT proteinů



ESCRT je evolučně konzervovaný vícepodjednotkový komplex, zajišťující remodelaci membrány a tvorbu váčků remodelací membrány směrem z cytosolu do extracelulárního/neprotoplazmatického prostoru.

ESCRT: endosomal sorting complex required for transport

Exocytóza

-fúze post-GA váčků s PM

-doprava lipidů, proteinů (receptorů, enzymů - syntéza celulózy) a složek polysacharidové BS

-polarizovaný proces

Příklady exocytovaných molekul u rostlin:

polysacharidy buněčné stěny;

lipidy

membránové proteiny – receptory, kanály atd.

Proteinové komplexy: celulóza syntázové komplexy.

Endocytóza

- aktivní proces i v rostlinách
- recyklace receptorů, transportérů, membrány atd.
- konstitutivní cyklování molekul mezi PM a endozómem
- cílem je časný endozóm/TGN

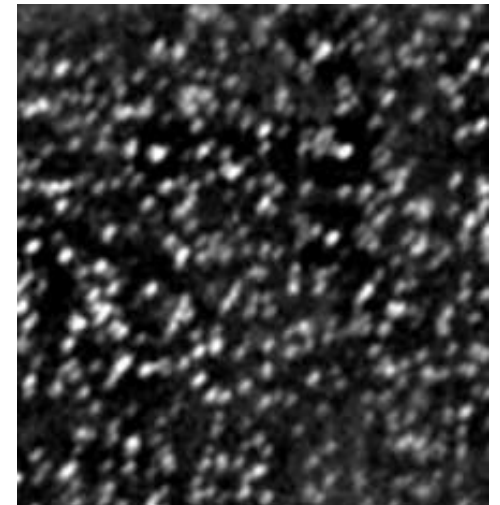
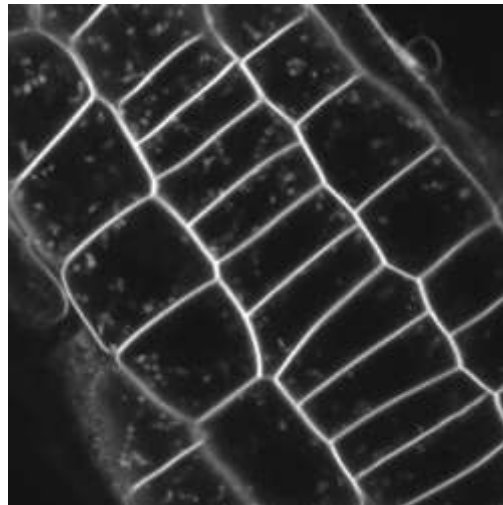
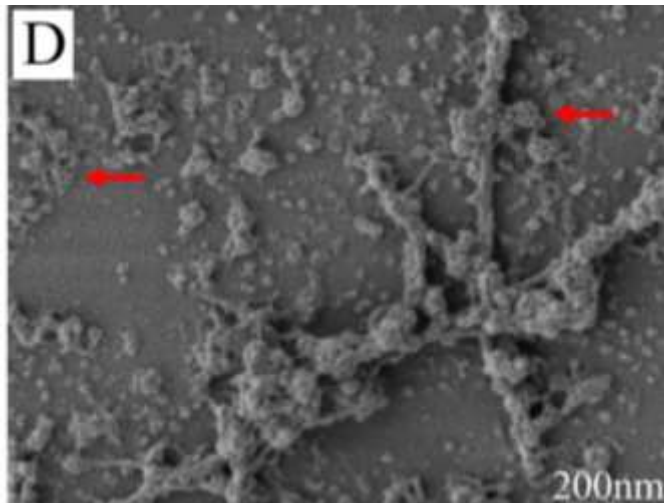
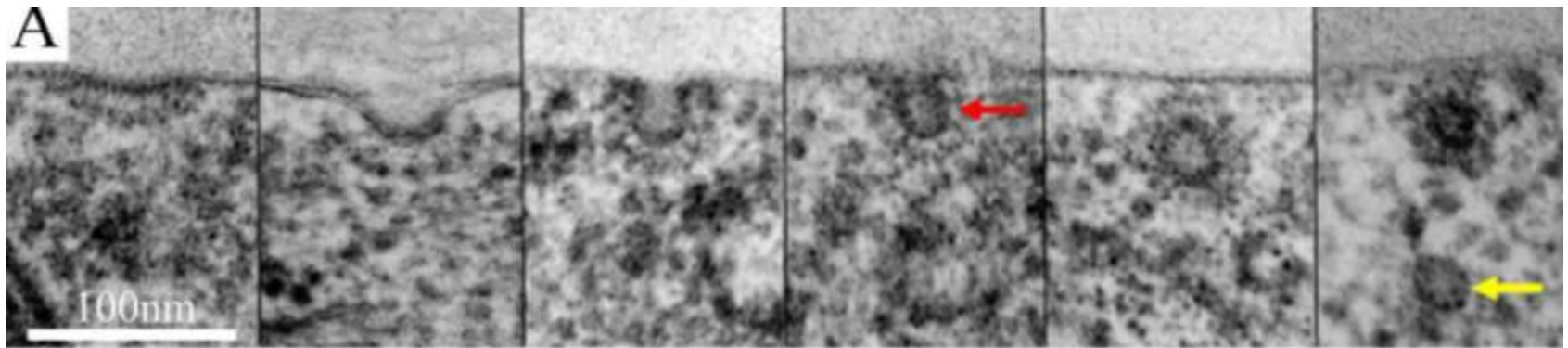
(polarita buňky)

Příklady endocytovaných molekul u rostlin:

Receptorové kinázy: BRI1, FLS2, xylanázový receptor.

Transportéry: BOR1 (B), IRT1 (Fe), AMT1 (NH⁴⁺), PIP2 (voda), KAT1 (K)

Endocytóza



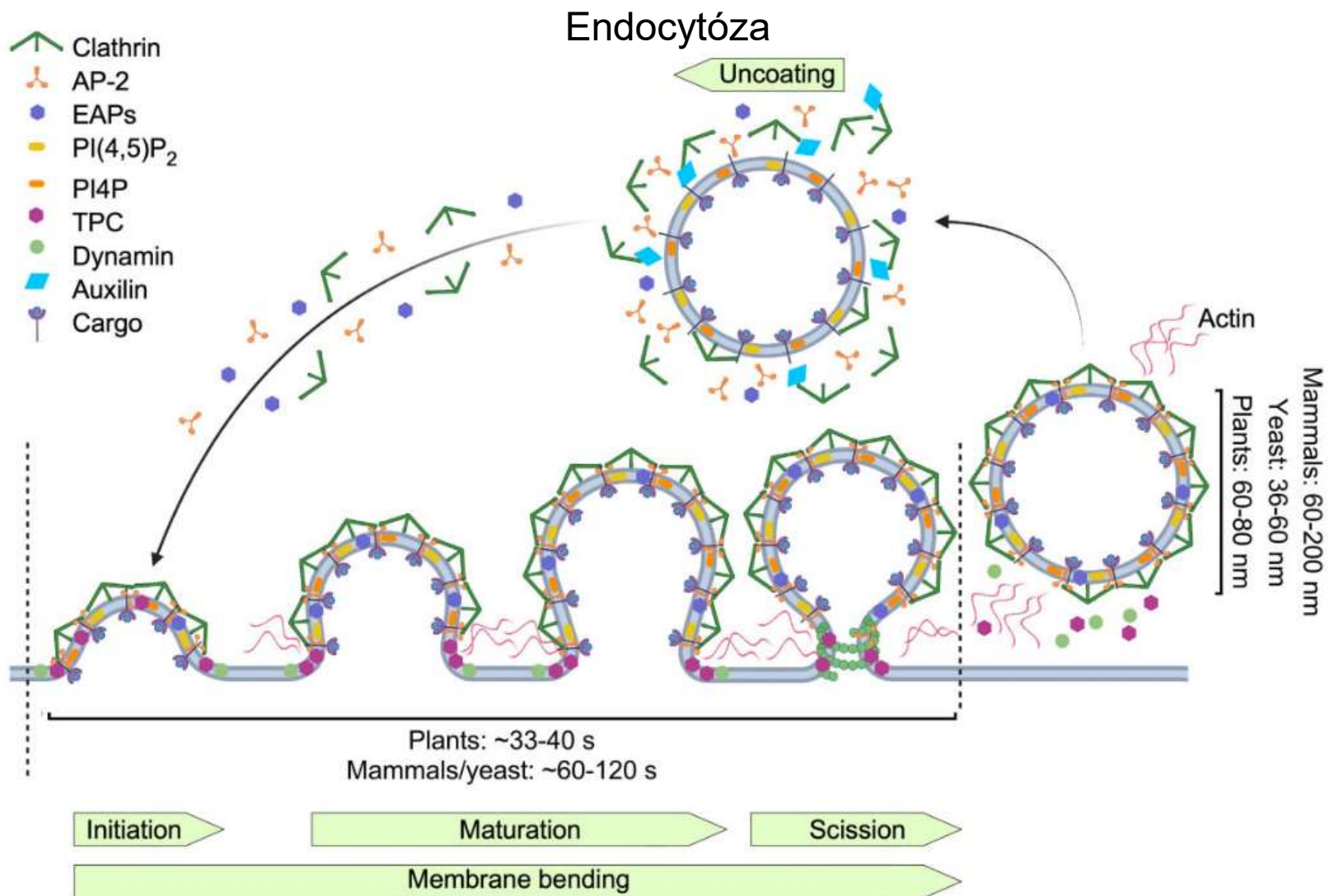


Figure 3 Clathrin-mediated endocytosis (CME) in plants. CME is a multistep process involving initiation and stabilization of clathrin-coated pits (CCPs), maturation and membrane bending, followed by dynamin-catalyzed scission and uncoating. Clathrin-coated vesicles (CCVs) are wider in mammalian cells than in yeast and plants, but plant CCVs form faster than in yeast, where CCVs are pinched off from a narrow tubular invagination. In plants, internalized CCVs display a delayed uncoating, whereas actin is not essential for CME. Adaptor and accessory proteins involved in plant CME are shown. AP-2, AP-2; TPC, TPLATE complex; EAPs, endocytic accessory proteins; PIP, phosphatidylinositol phosphate.

Typy endocytozy u roslin

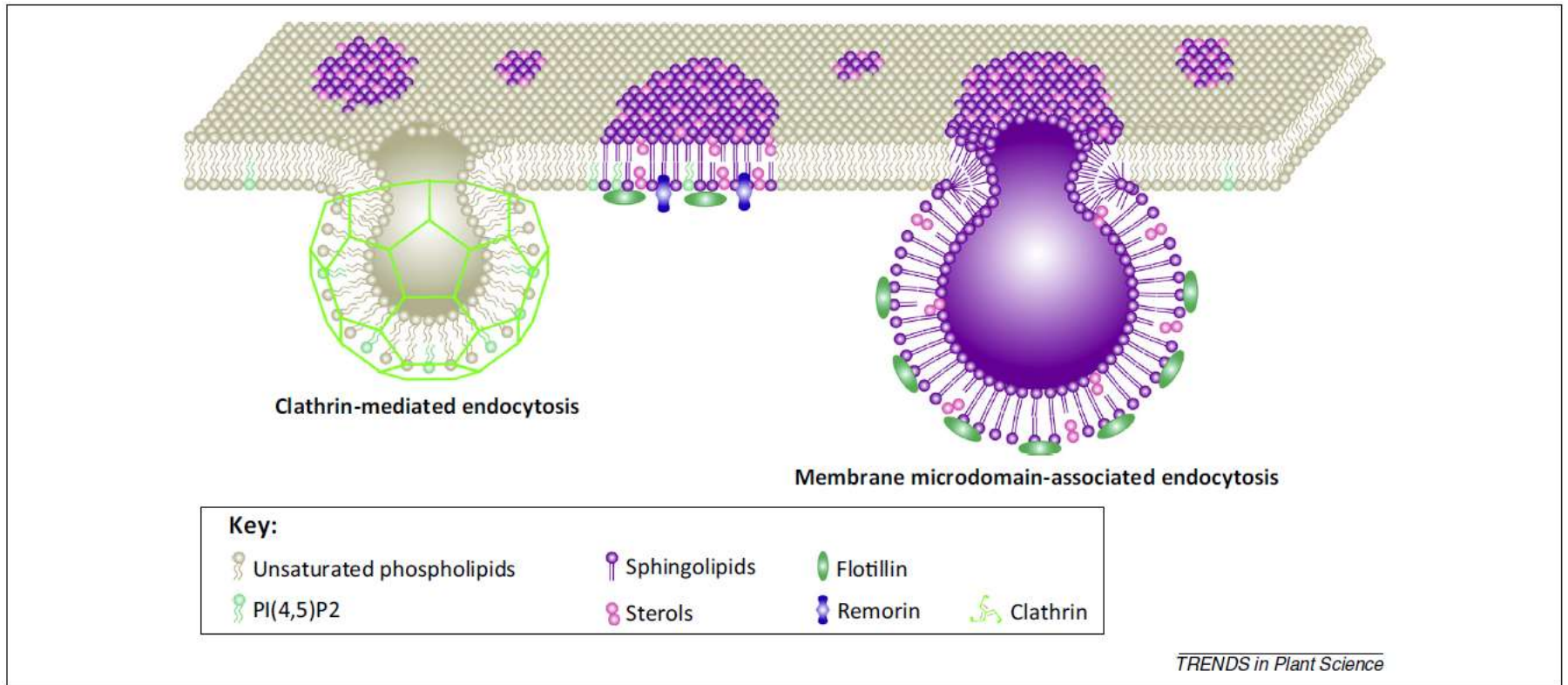


Figure 1. Endocytic pathways identified in plants. In plants, two endocytic pathways have been identified, clathrin-mediated endocytosis (CME) and membrane microdomain-associated endocytosis. Similar to animal cells, CME is the main mechanism for the entry of extracellular material into plant cells. Membrane microdomains are nanodomains at the plasma membrane (PM) that are enriched in sterol and sphingolipids and have been proposed to exist in plant cells. Two membrane microdomain marker proteins, flotillin and remorin, have been identified and flotillin has been shown to participate in a clathrin-independent endocytic pathway in plant cells.

Vakuola

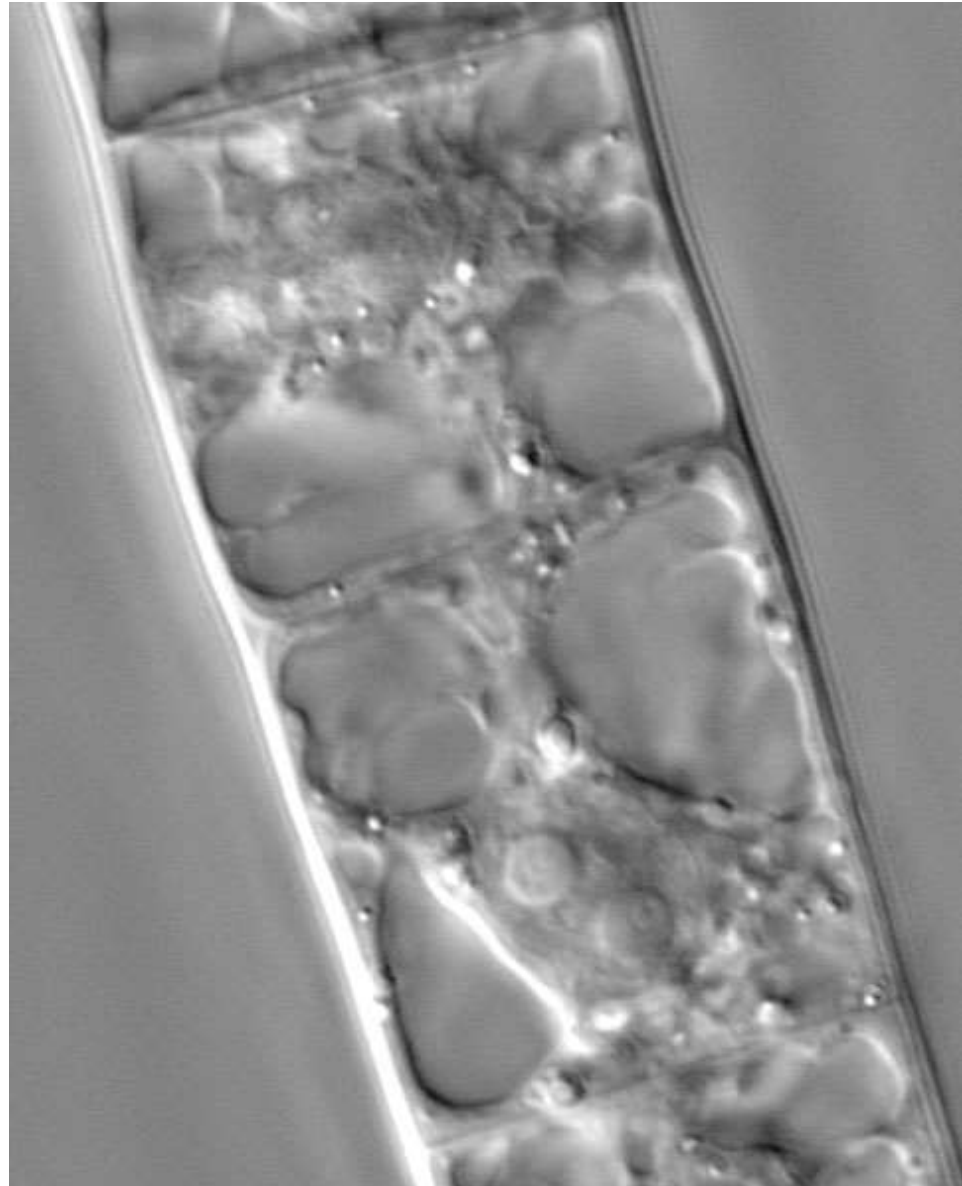
Vakuola: z lat. vacuus – prázdný

Tonoplast: membrána vakuol
(řec. tonos=napětí)

Vakuom: soubor vakuol v buňce

Rostlinné vakuoly: **Lysosomální kompartment** s dalšími rostlinně specifickými funkcemi.

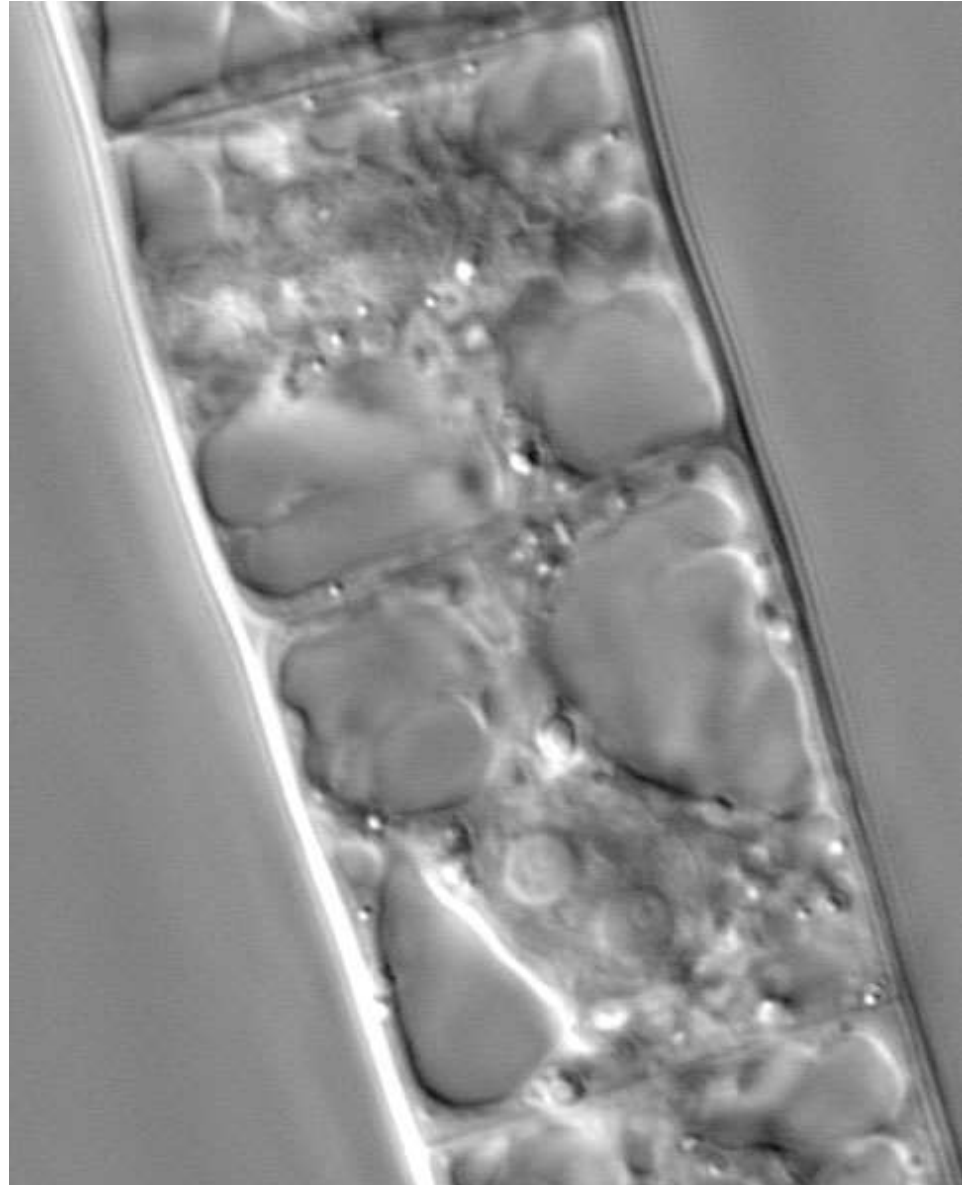
Zaujímá **30-90% objemu** buňky.



Vakuola

Co se dozvíme v této části přednášky:

- Funkce vakuol
- Typy vakuol
- Vznik vakuol
- Regulace transportu do vakuol
- Autofágie a vakuoly



Funkce vakuol

Laciný růst buněk: zvětšováním objemu buněk díky růstu vakuol

Podpůrná funkce: turgorový tlak

Lysosomální kompartment: degradace proteinů, částí cytoplazmy (i celých buněk při PCD)

Udržení homeostáze cytoplazmy: regulace pH, koncentrace iontů a dalších látek

Zásobní funkce: obsahuje vodu, krátkodobé a dlouhodobé rezervy, (dlouhodobé zásobárny např. buňky zásobních orgánů jako oddenky, dělohy, hlízy – proteinové zásobní vakuoly).

Uskladnění toxických látek

Ukládání látek pro interakci rostlin s prostředím: barviva, antibakteriální látky, látky toxické nebo nechutné pro herbivory, látky na ochranu před UV.

Rychlé pohyby rostlin: svěrací buňky průduchů, pohyb listů citlivky (Mimosa).

Přehled obsahu vakuol:

Pevné částice, agregáty a krystaly organického i anorganického původu

-proteinové agregáty, albumin, globulin, prolaminy, gluteliny (proteinové zásobní vakuoly)

-fytin

-polysacharidy (např. inulin, fruktany)

-lipidy a oleje

Koloidní a rozpuštěné látky

-taniny, antokyany: barva listů a květů

-alkaloidy (např. morfin)

-cukry volné i konjugované

-organické kyseliny (např. malát)

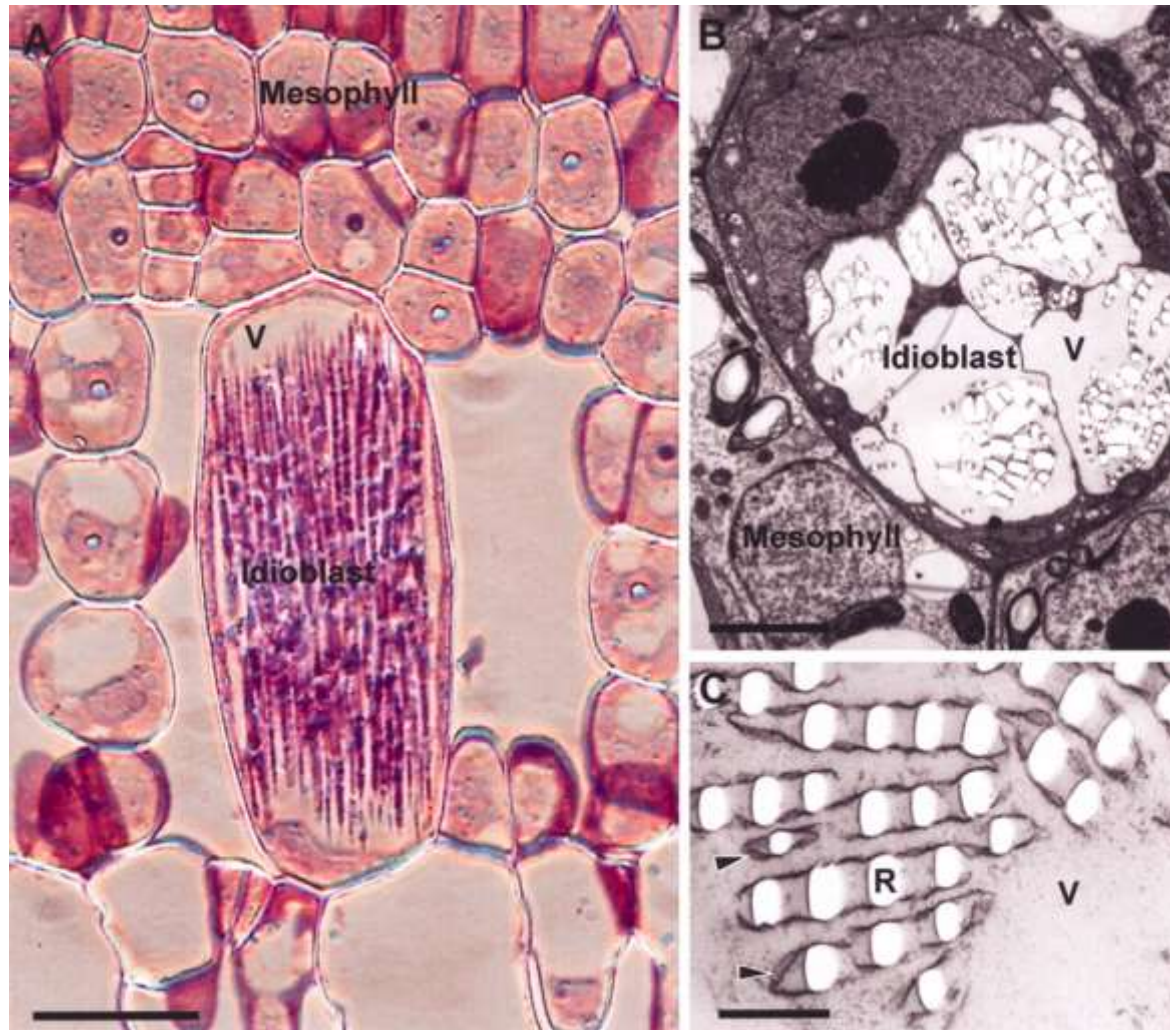
-anorganické ionty

-další látky jako saponiny, štěpné produkty chlorofylu, nukleových kyselin, membrán (senescentní buňky).

Enzymy:

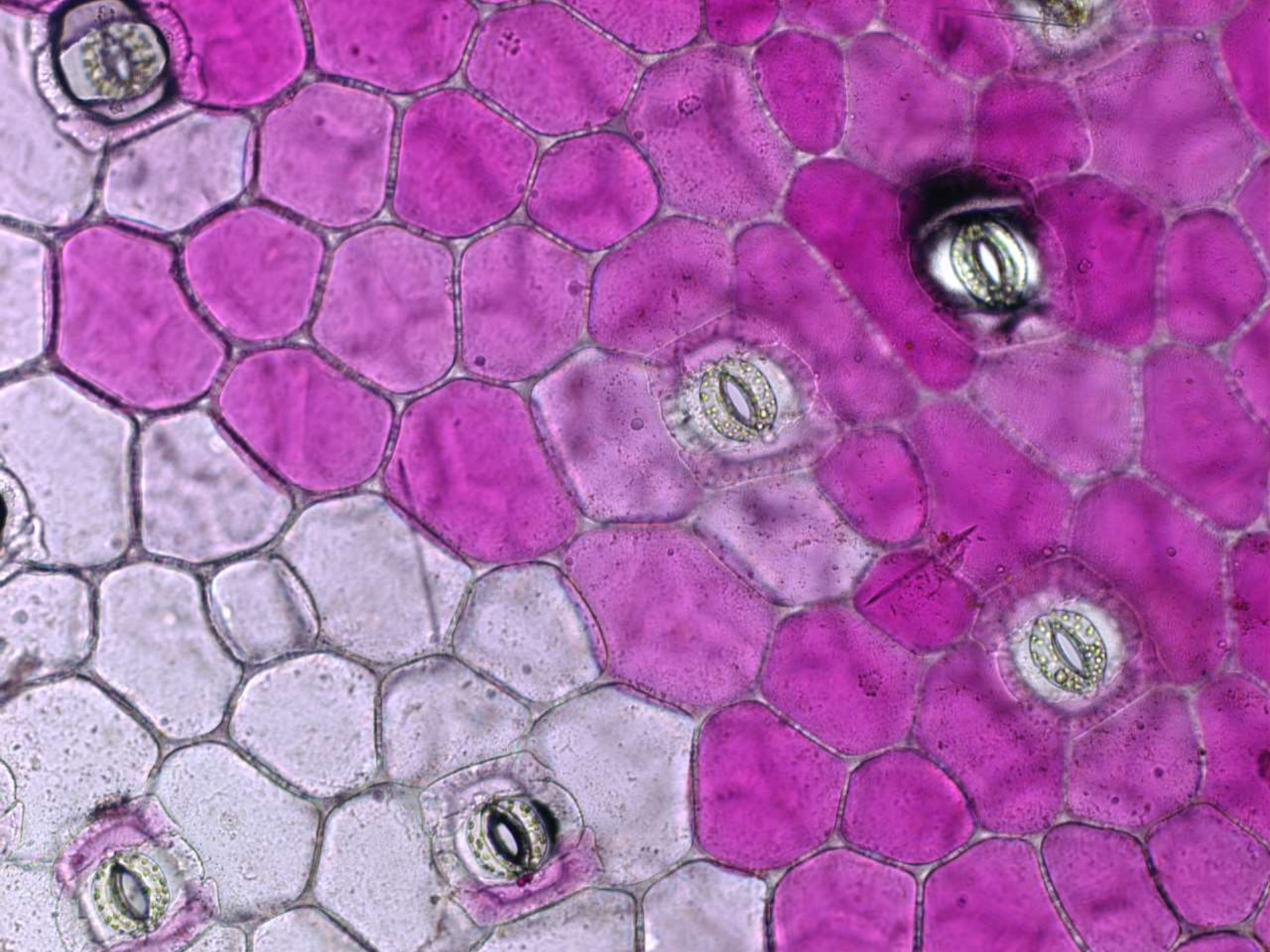
-hydrolázy: peptidázy, esterázy, glukosidázy...

Krystalu šťavelanu vápenatého v idioblastech babelky řezanovité (*Pistia stratiotes*)

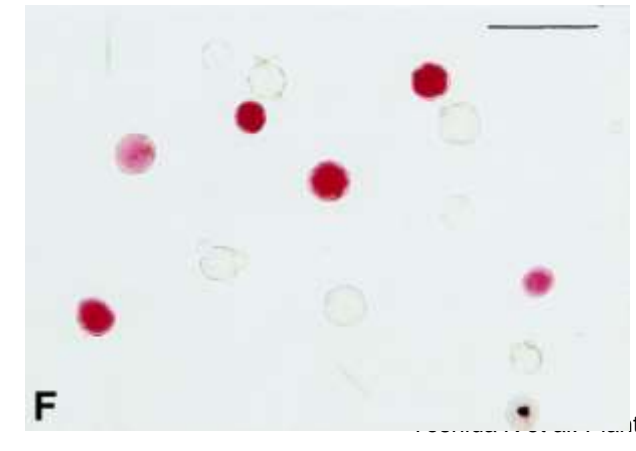
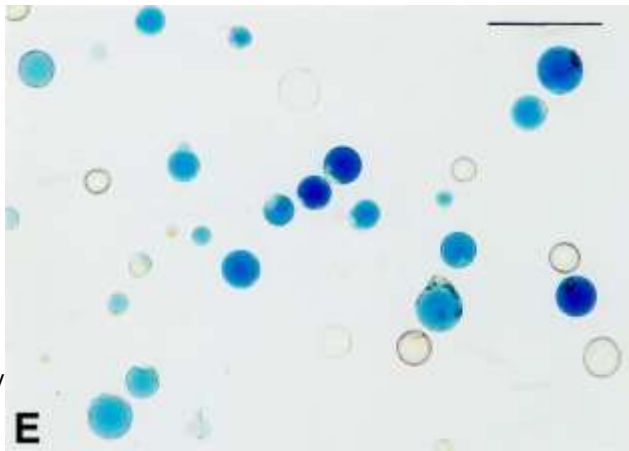
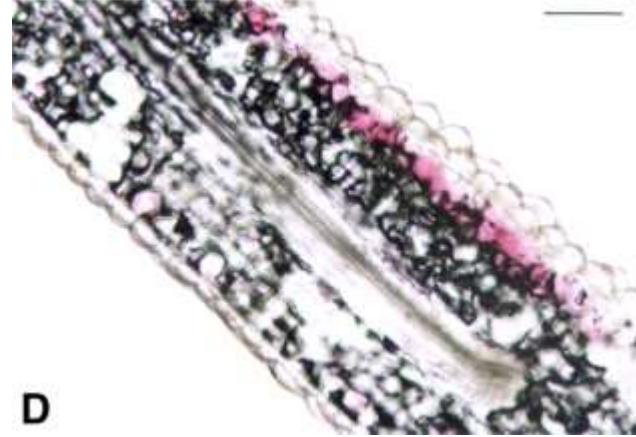
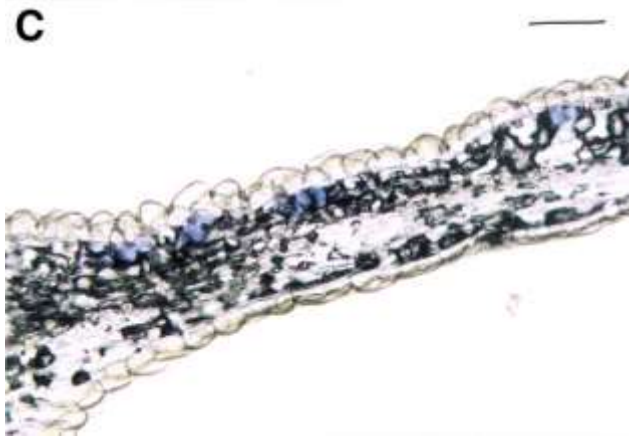


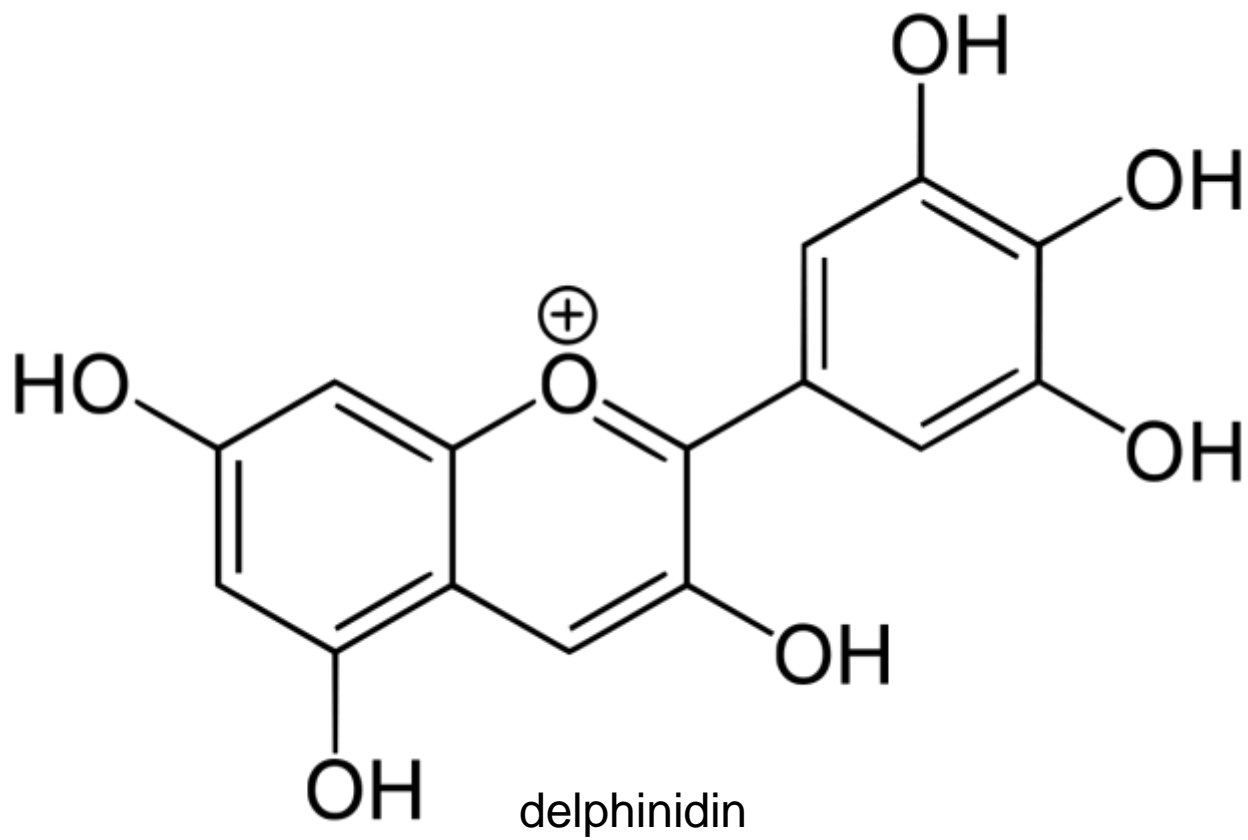
Li X. et.al. Plant Physiol. 2010:133:549-559



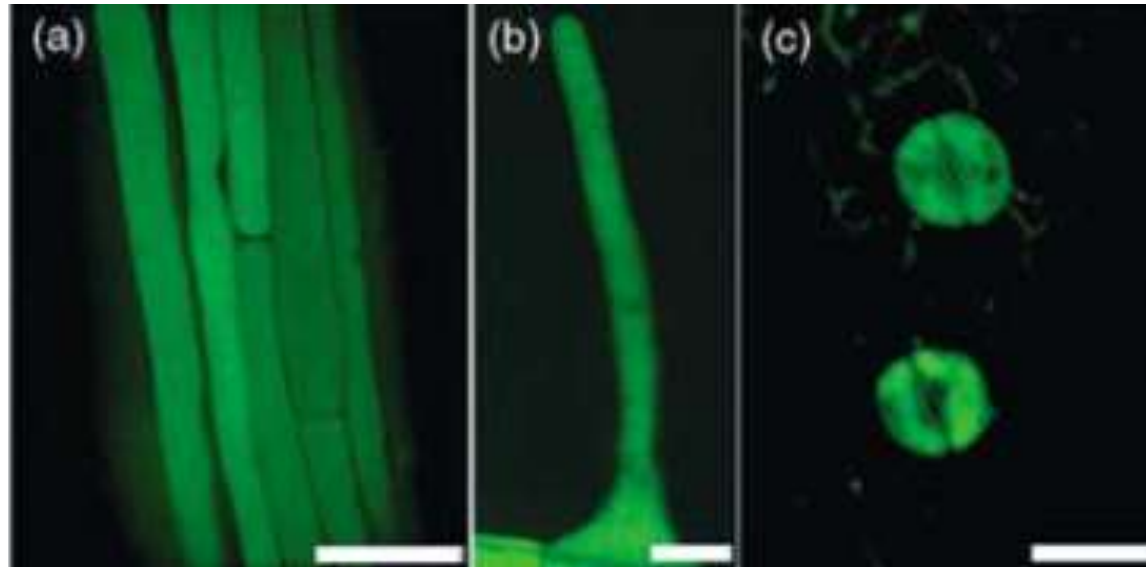


Hydrangea macrophylla



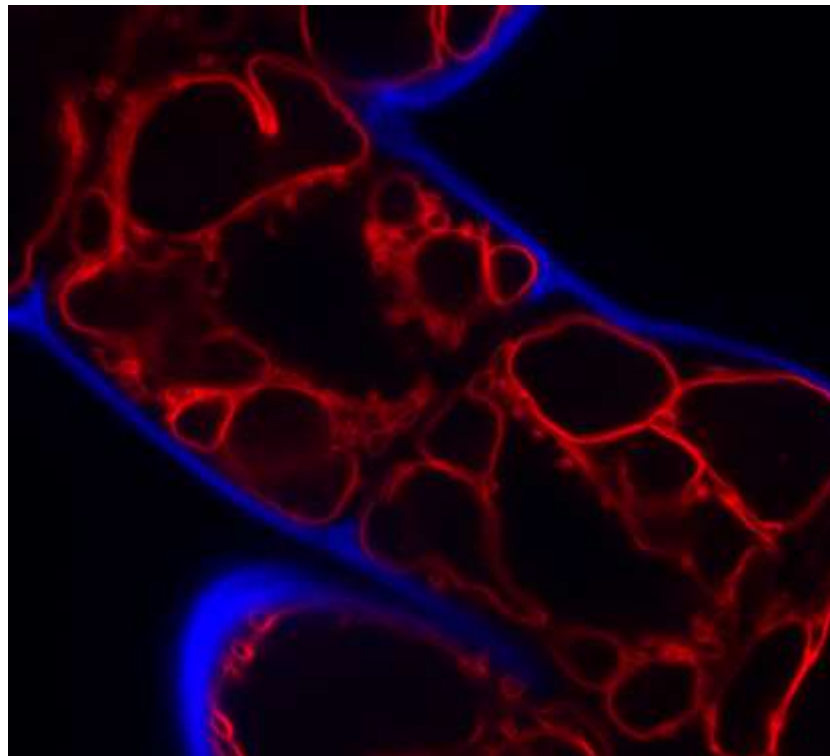


GFP fúzované s
vakuolární signální
sekvencí



FM4-64 (červená,
tonoplast)

Calcofluor (modrá,
buněčná stěna)

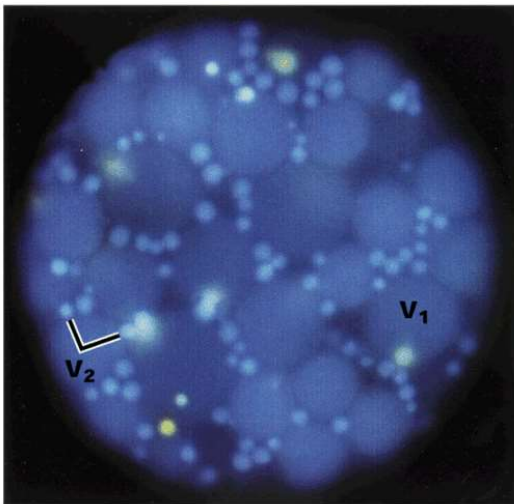


Více typů vakuol v rostlinných buňkách

Lytická vakuola (LV):

- ve všech vegetativních pletivech
- obsahuje hydrolytické enzymy (degradace)
- nízké pH
- γ -TIPs na tonoplastu

Vakuola se zásobními proteiny (PSV):

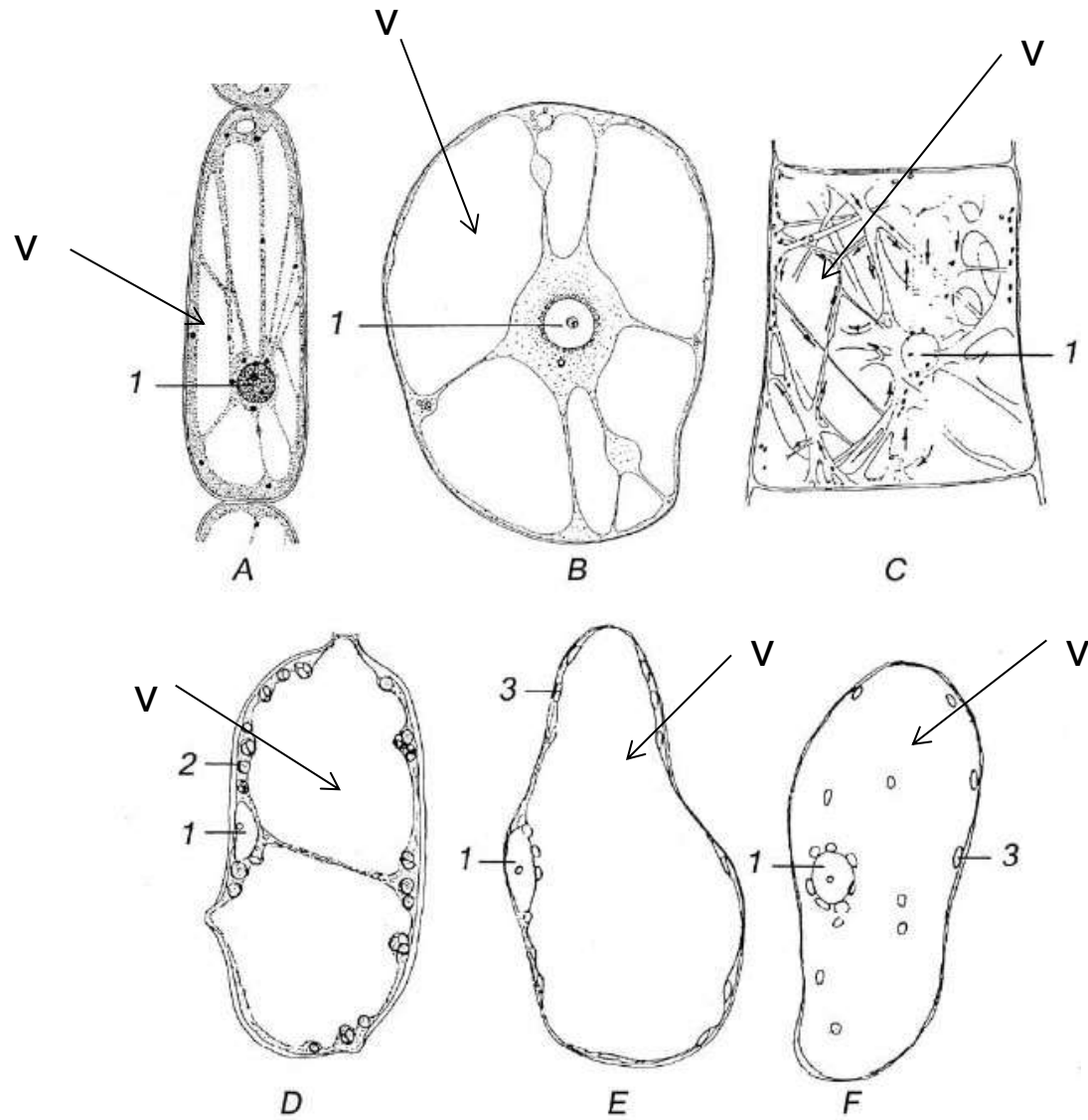


- v buňkách zásobních pletiv (semena)
- obsahuje zásobní proteiny
- často vyšší pH
- α - (δ) -TIPs na tonoplastu

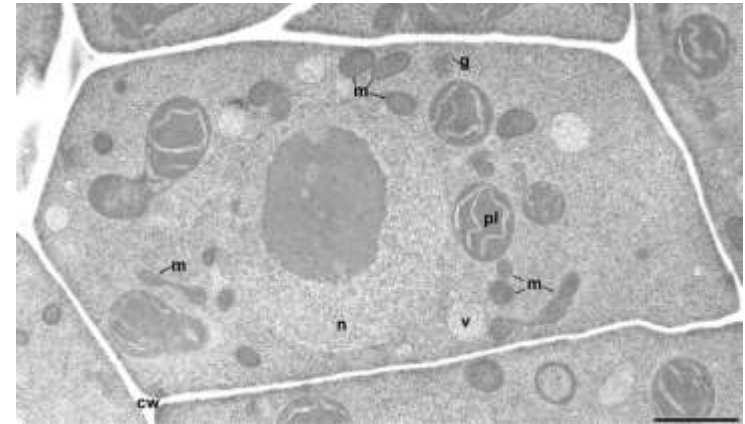
Protoplast aleuronové buňky:

PSV-V1; LV-V2

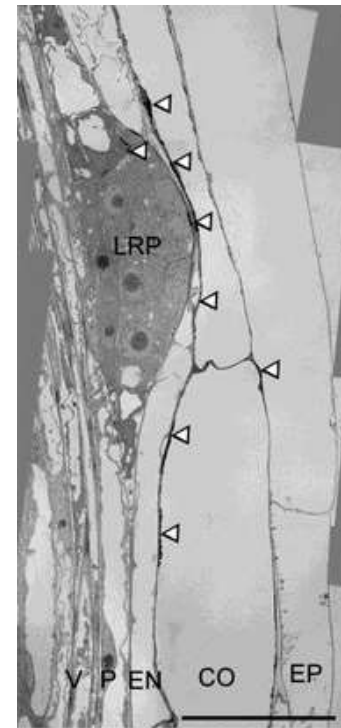
LYTICKÁ VAKUOLA



málo vakuolizovaná buňka apikálního meristému huseníčku



doi.org/10.1104/pp.108.126953



Pletiva kořene:
vakuolizované buňky epidermis (EP), kortexu (CO), endodermis (EN), málo vakuolizované buňky primordia postranního kořene (LRP)

TABLE 6.2**The vacuolar pH of some hyperacidifying plant species**

Tissue	Species	pH ^a
Fruits		
	Lime (<i>Citrus aurantifolia</i>)	1.7
	Lemon (<i>Citrus limonia</i>)	2.5
	Cherry (<i>Prunus cerasus</i>)	2.5
	Grapefruit (<i>Citrus paradisi</i>)	3.0
Leaves		
	Rosette oxalis (<i>Oxalis deppei</i>)	1.3
	Wax begonia (<i>Begonia semperflorens</i>)	1.5
	<i>Begonia</i> 'Lucerna'	0.9 – 1.4
	<i>Oxalis</i> sp.	1.9 – 2.6
	Sorrel (<i>Rumex</i> sp.)	2.6
	Prickly Pear (<i>Opuntia phaeacantha</i>) ^b	1.4 (6:45 A.M.) 5.5 (4:00 P.M.)

Source: Data from Small 1946.

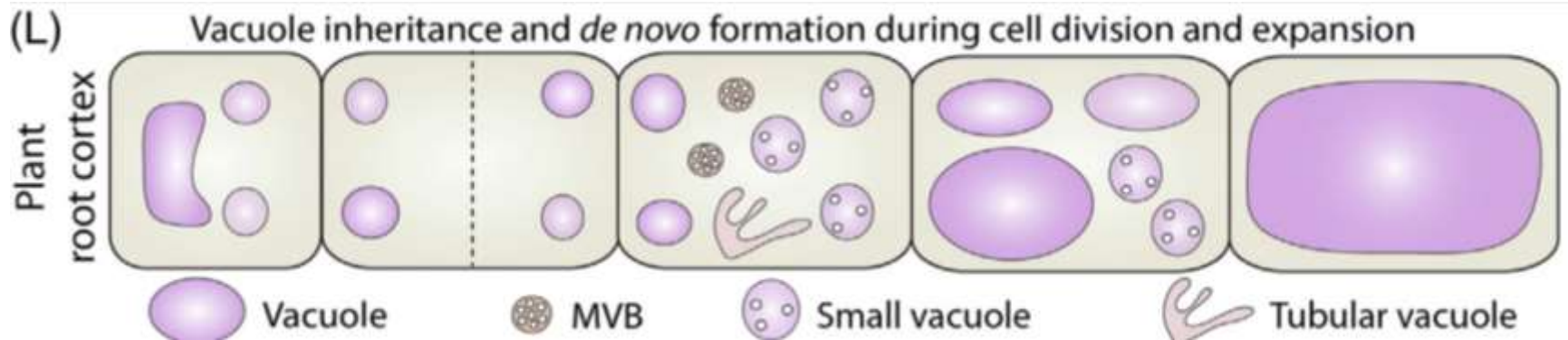
^a The values represent the pH of the juice or expressed sap of each tissue, usually a good indicator of vacuolar pH.

^b The vacuolar pH of the cactus *Opuntia phaeacantha* varies with the time of day. As will be discussed in Chapter 8, many desert succulents have a specialized type of photosynthesis, called crassulacean acid metabolism (CAM), that causes the pH of the vacuoles to decrease during the night.

Vznik lytických vakuol

Vakuoly se dědí během dělení buněk.

Některé typy vakuol mohou vzniknout *de novo* z jiných kompartmentů endomembránového systému (hladké ER, MVB, závislé na typu buňky) – vznik **provakuol/malých vakuol**, které se posléze zvětšují, fúzí spolu a dávají vznik vakuolám.



Vznik lytických vakuol

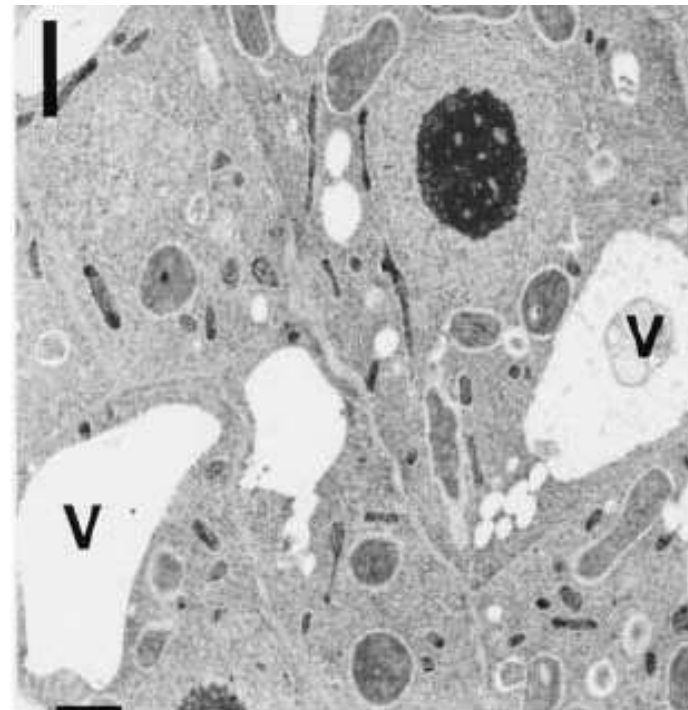
Embryogeneze:

-bazálně orientovaná vakuola v oplozené zygotě → dělení zygoty na buňku suspensoru a embrya → vakuolizované buňky suspensoru; v buňkách embrya se vakuola tvoří později. Role fúze membrán.



4buněčné stádium

Eb – embryo; S – suspensor; En – endosperm; V - vakuoly

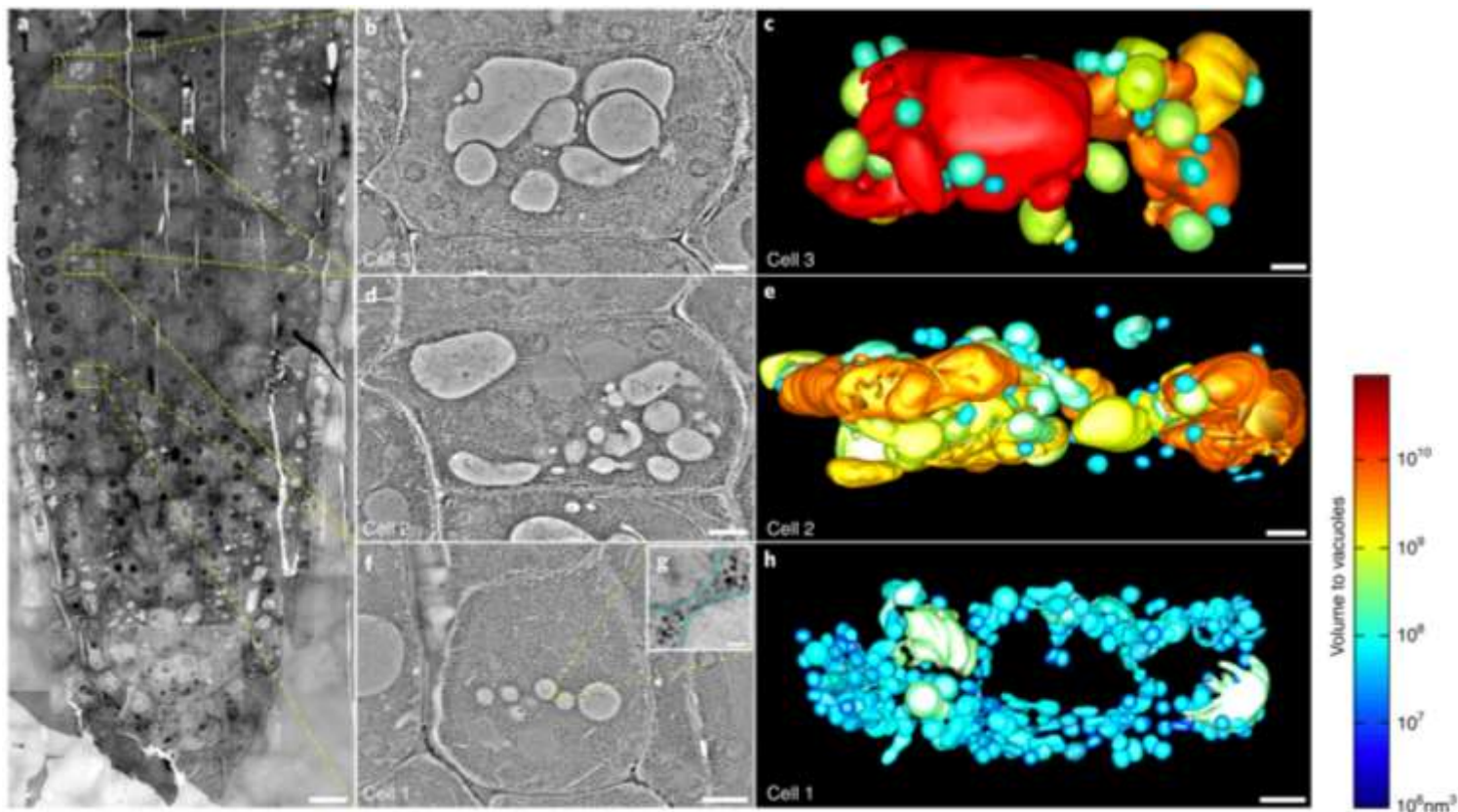


Torpédovité embryo

Od meristému k diferencovaným buňkám

Buňky meristému: málo vakuolizované, obsahují **provakuoly**.

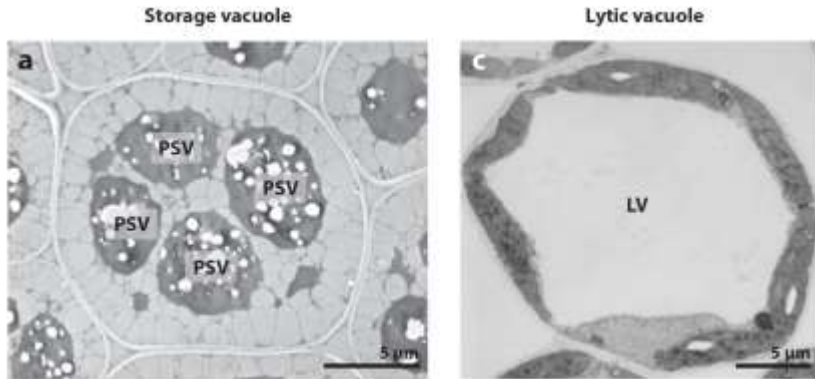
Během diferenciace dochází ke zvětšování a fúzi vakuol – vzniká typická **centrální vakuola** lytického typu.



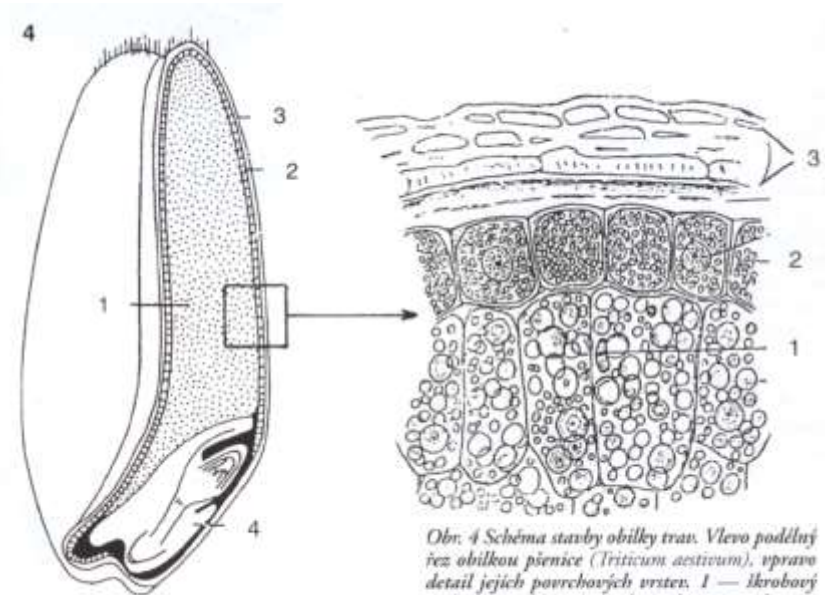
PROTEINOVÉ ZÁSOBNÍ VAKUOLY

Výskyt PSV:

Dělohy, aleuronová vrstva a endosperm semen

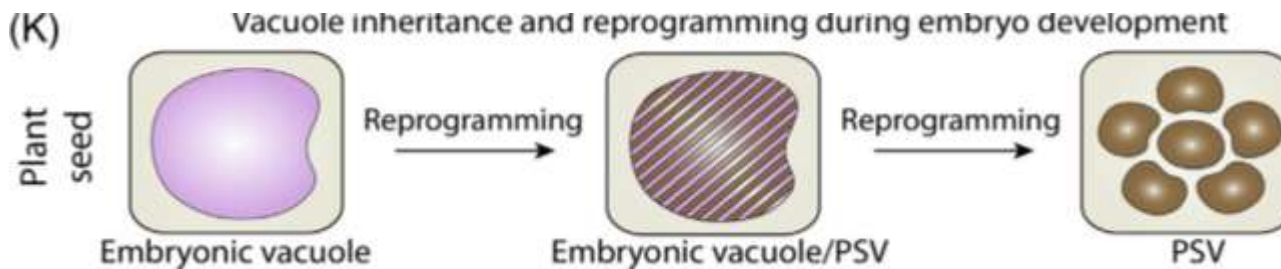


10.1146/annurev-arplant-042817-040508



Obr. 4 Schéma stavby obilky trav. Vlevo podélúž íz obilkou pšenice (*Triticum aestivum*), vpravo detail jejich povrchových vrstev. 1 — íkrobový endosperm, blavní zásobní pletivo, ve kterém probíhá při zrání obilky zvláštní způsob programované buněčné smrti — PCD (blíže viz text), 2 — buňky aleuronové vrstvy, které obsahují zásobní proteiny a během klíčení produkují enzymy rozkládající jak látky v buňkách íkrobového endospermu, tak v aleuronové vrstvě; po odbourání zásob rovněž podlébají PCD, 3 — osemi a oplodí obilky, 4 — embryo. Orig. O.Votrubová, D. Bariáková

Vznik PSV: během vývoje embrya:



PROTEINOVÉ ZÁSOBNÍ VAKUOLY

Obsah PSV (Protein Storage Vacuole):

Zásobní proteiny:

- albuminy, globuliny (semena kvetoucích rostlin)
- gluteliny (hlavně semena rýže)
- prolaminy (lepek; semena trav)

Obranné toxické proteiny, např. ricin ve skočci (*Ricinus communis*)

Polyfosfát fytin

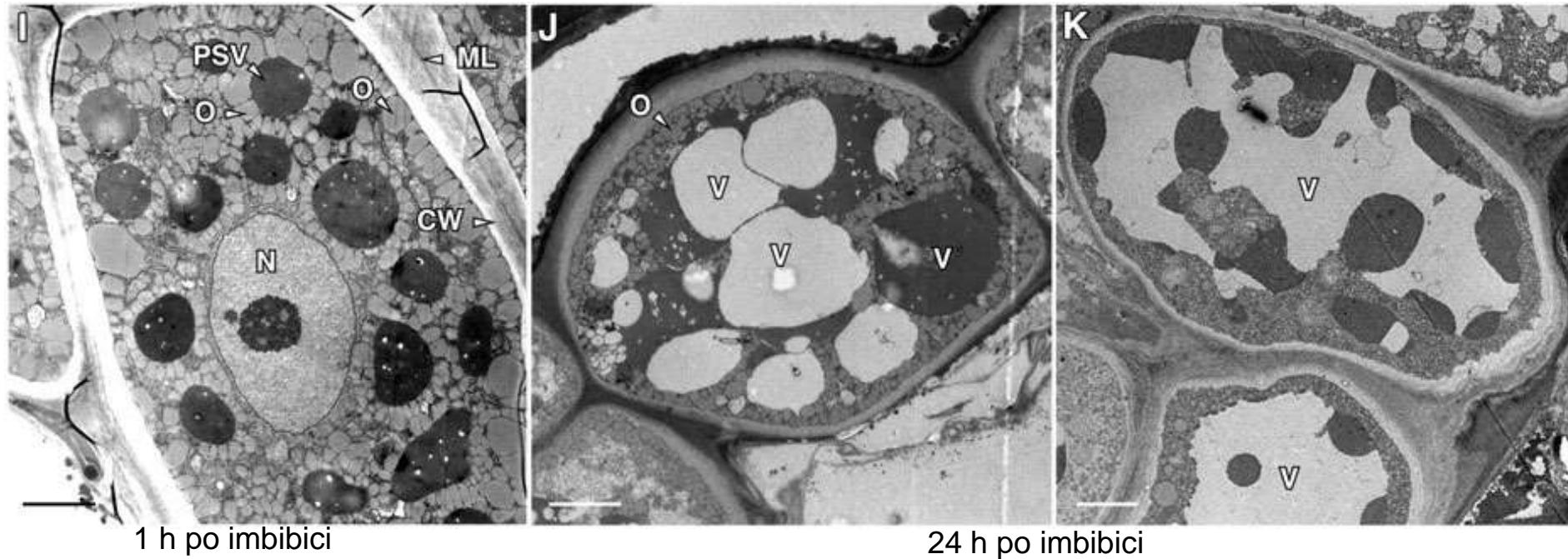
Lytické enzymy (kyselé proteázy, glykosidázy, RNázy...)

Zánik PSV:

Během klíčení semen mění PSV charakter na LV.

Přeměna vakuol během klíčení semen

O-oleosomy; N-nucleus; CW-cell wall



Klíčení:

Buňky aleuronové vrstvy uvolňují enzymy, které škrob ve škrobovém endospermu rozkládají a mobilizují tak pro klíčení. V samotných aleuronových buňkách dochází k přeměně PSV na LV, kde jsou mobilizovány zásobní proteiny.

Po mobilizaci veškerých zásob hynou též buňky aleuronové vrstvy taktéž procesem PCD.

Transport do vakuol

Transport do lytické vakuoly:

Transportní váčky vznikají v GA/TGN a fúzí za vzniku MVB/PVC, nebo GA/TGN maturuje v MVB/PVC

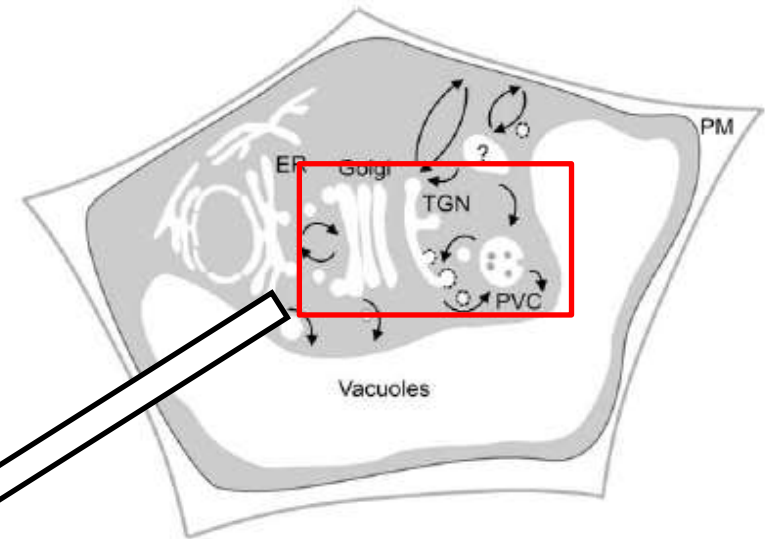
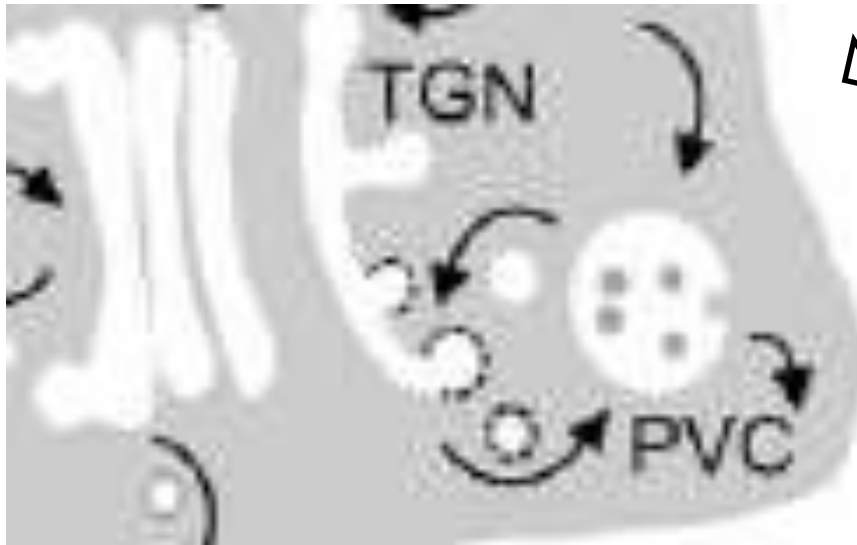


Figure 3: The secretory pathway in plants. Simplified diagram of the well-established compartments in plants and a selection of suggested transport routes. Three pathways have been shown to serve the plant vacuoles, a direct ER-derived route using large PAC/KV vesicles, the Golgi-mediated DV route and a post-Golgi clathrin-mediated route from the TGN and through the PVC. Besides the TGN and the PVC, an unknown compartment labelled very rapidly by FM4-64 exists as well but remains to be characterized (?). Defined vectorial transport in the endocytic route remains to be established. The secretion of soluble proteins is

Transport do vakuol

Transport do lytické vakuoly:

Regulace pomocí **sekvenční aktivace RAB-GTPáz**, specifických receptorů (**vacuolar protein sorting, VPS, vacuolar sorting receptors, VSR**) a **SNARE receptorů**, tvorba intraluminálních váčků (**ESCRT komplex**)

Recyklace receptorů zpět na donorovou membránu (retromer)

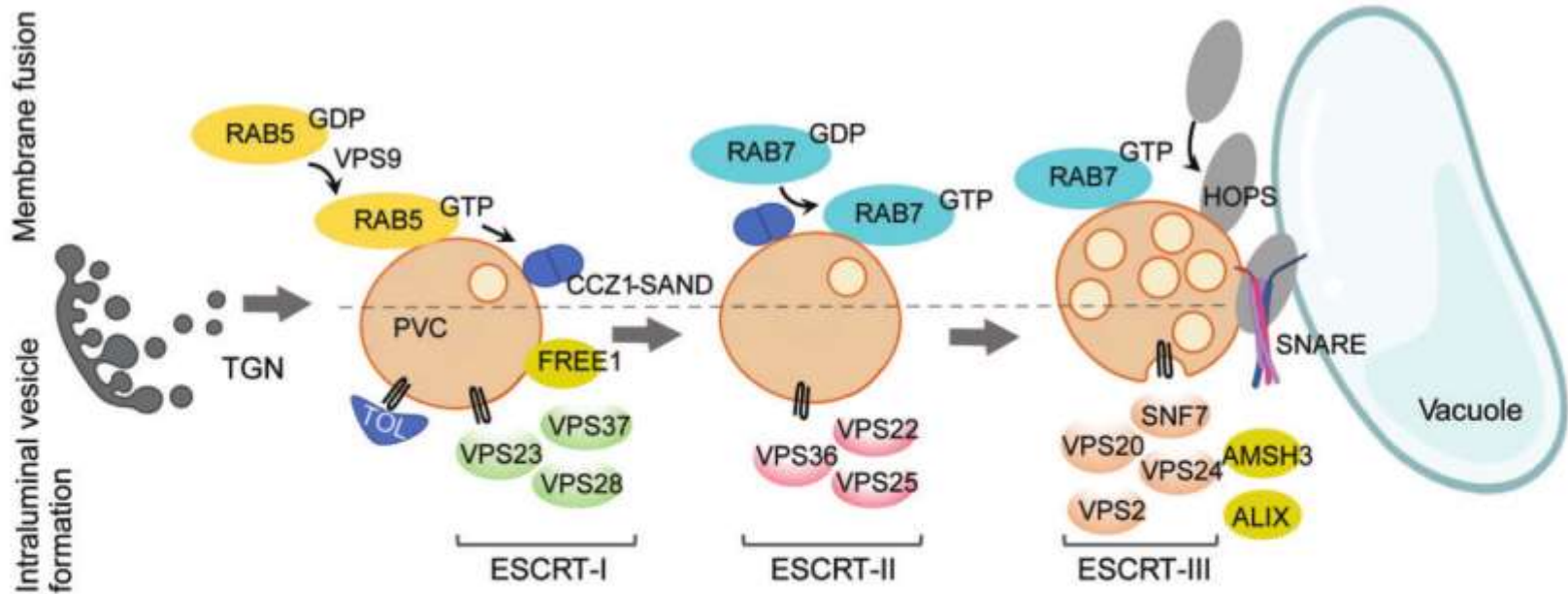


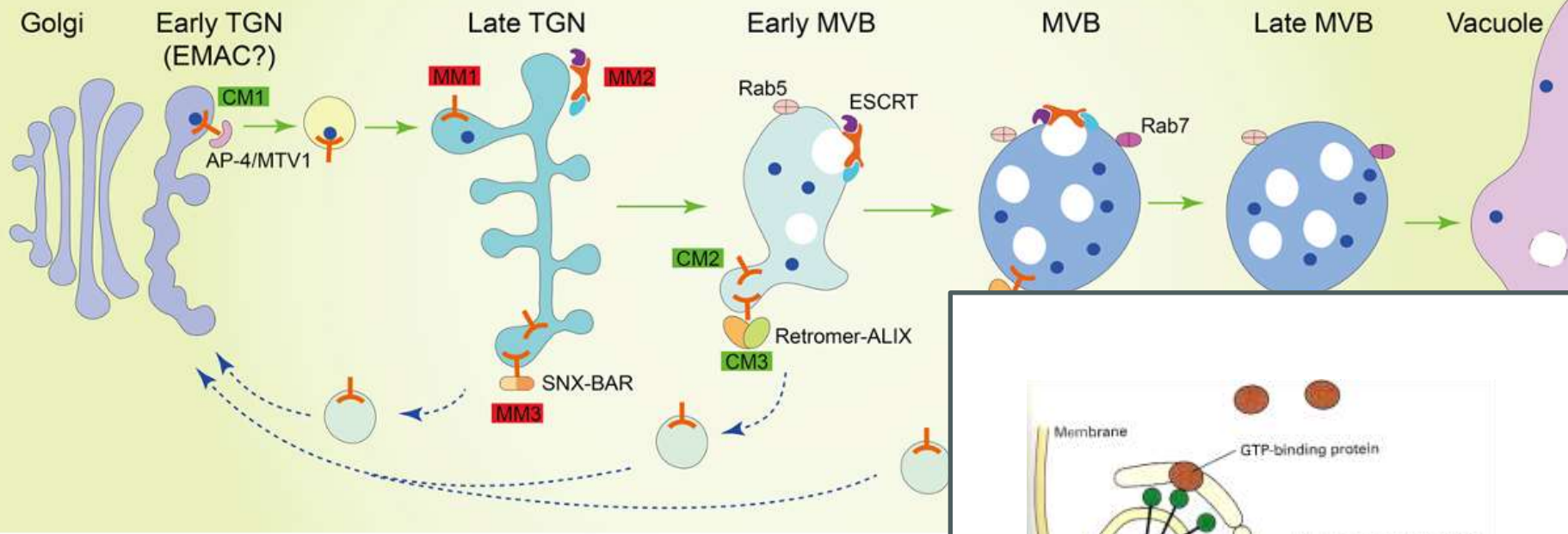
Figure 4 Post-Golgi trafficking to the vacuole. Trafficking to the vacuole involves the maturation of prevacuolar compartments (PVCs) in preparation for fusion. The recruitment of fusiogenic proteins starts with the activation of the GTPase RAB5 and is followed by RAB7 activation and HOPS recruitment. The SNARE complex mediates the final membrane fusion step. PVC maturation also involves the formation of intraluminal vesicles carrying ubiquitinated cargo proteins for vacuolar degradation. This process initiates with the recruitment of ubiquitinated cargo by TOL proteins and the activity of the plant-specific component FREE1, followed by the sequential action of the ESCRT-I to III complexes, resulting in the inward bending of the membrane to form internal vesicles.

Transport do vakuol

Transport do lytické vakuoly:

Regulace pomocí **sekvenční aktivace RAB-GTPáz**, specifických receptorů (**vacuolar protein sorting, VPS, vacuolar sorting receptors, VSR**) a **SNARE** receptorů, tvorba intraluminálních váčků (**ESCRT komplex**)

Recyklace receptorů zpět na donorovou membránu (retromer)



 Vacuolar Sorting Receptor

 Vacuolar Protein

 AP-4/MTV1

 SNX-BAR

 Rab5

 Rab7

Evidence for Classical Model

CM1 VSRs interact with AP-4 at TGN

CM2 VSRs localize to the limiting membrane of MVBs

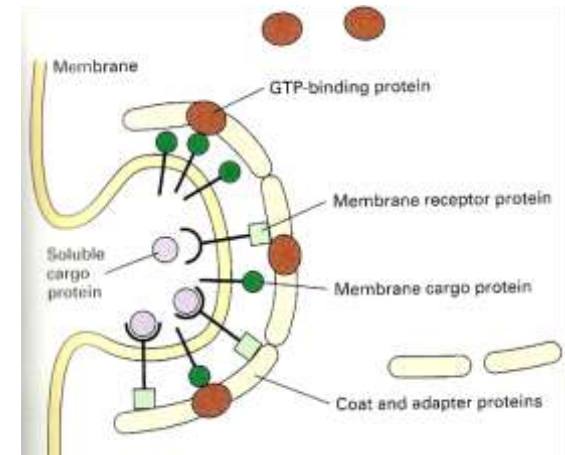
CM3 VSRs interact with MVB-localized Retromer

Evidence

MM1 VSR

MM2 ESC

MM3 SNX-BAR proteins localize to the TGN



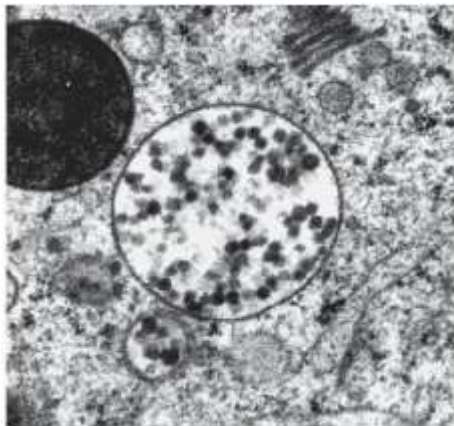
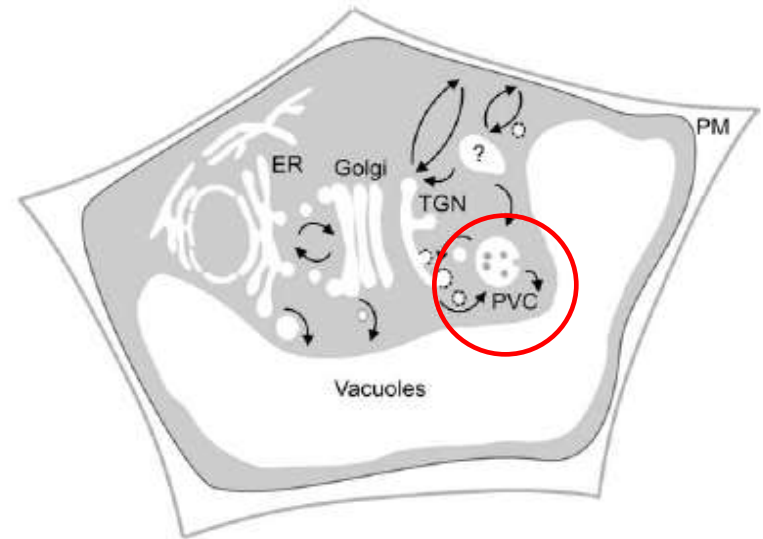
ex

Transport do vakuol

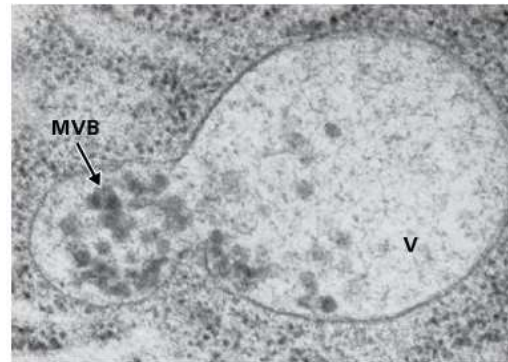
Transport do lytické vakuoly:

-Transport mezi MVB/PVC a vakuolou zahrnuje fúzi MVB s tonoplastem

-Retrográdní směr transportu z tonoplastu **nebyl detekován**



MVB



Vnitřní váčky MVB jsou uvolněny do vakuoly fúzí s tonoplastem

Figure 3: The secretory pathway in plants. Simplified diagram of the well-established compartments in plants and a selection of suggested transport routes. Three pathways have been shown to serve the plant vacuoles, a direct ER-derived route using large PAC/KV vesicles, the Golgi-mediated DV route and a post-Golgi clathrin-mediated route from the TGN and through the PVC. Besides the TGN and the PVC, an unknown compartment labelled very rapidly by FM4-64 exists as well but remains to be characterized (?). Defined vectorial transport in the endocytic route remains to be established. The secretion of soluble proteins is

Transport do vakuol

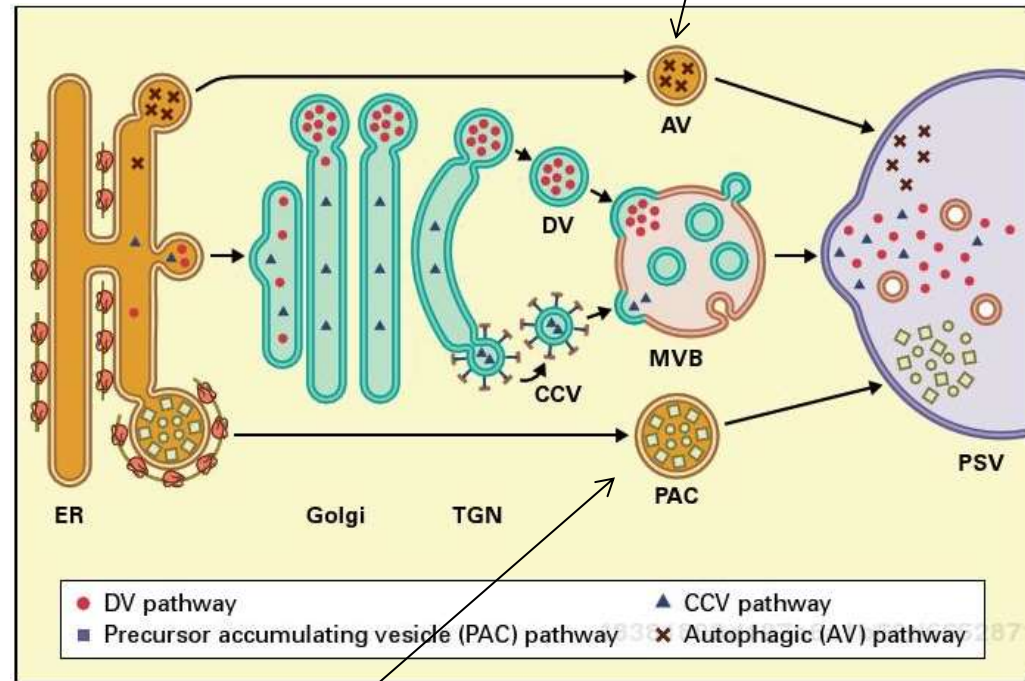
Transport do PSV:

-PSV obsahují především zásobní proteiny, agregace během jejich syntézy v ER a GA

-Možnosti transportu závisejí na typu transportované látky:

1. Transport standardní sekretorickou drahou (ER→GA →TGN →MVB→vakuola) (například globuliny leguminóz)
2. Tvorba proteinů v ER a ukládání zde jako PB (zeiny kukuřice) nebo autofagocytóza PB do vakuoly (např. gliadiny pšenice)
3. Transport obcházející GA: proteiny z ER transportovány přímo do vakuoly pomocí **precursor-accumulating vesicles (PAC, např. semena dýně; výjimečné)**

Agregované zásobní proteiny z ER fagocytovány do vakuoly



GA-nezávislá dráha transportu proteinů z ER - PAC

-Kompozitní charakter PSV

Autofágie

AUTOFÁGIE: způsob degradace rozsáhlých částí cytoplazmy v lysosomálním kompartmentu (vakuole) eukaryotické buňky.

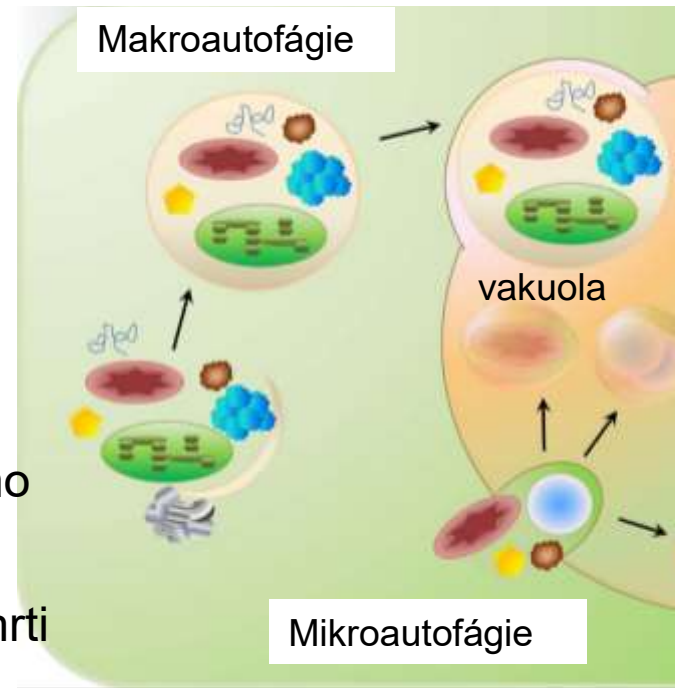
Makroautofágie: degradace částí cytoplazmy nebo organel uložením do cytosolického váčku obaleného membránou zvaném autofagozóm, který posléze splyne s vakuolou.

Mikroautofágie: organela nebo část cytoplazmy je přímo obklopena vakuolární membránou a rozložena.

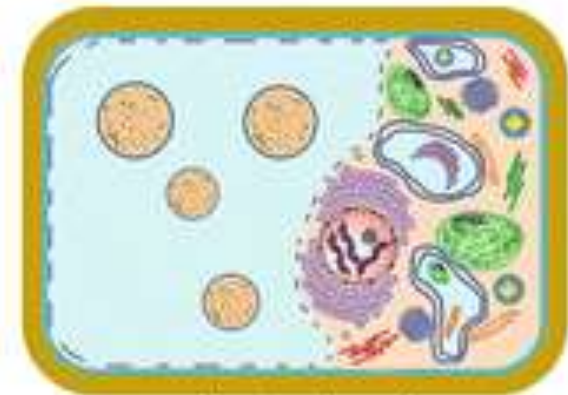
Mega-autofágie: děje se při programované buněčné smrti prasknutím vakuoly a degradací veškerého buněčného obsahu.

Autofágie je součástí vývoje rostlinné buňky. Zajišťuje recyklaci proteinů a lipidů, je ve zvýšené míře indukována hladověním. Běžný je vznik vakuol autofágií.

Mutanty s defektními autofagickými mechanismy jsou více citlivé na stres.



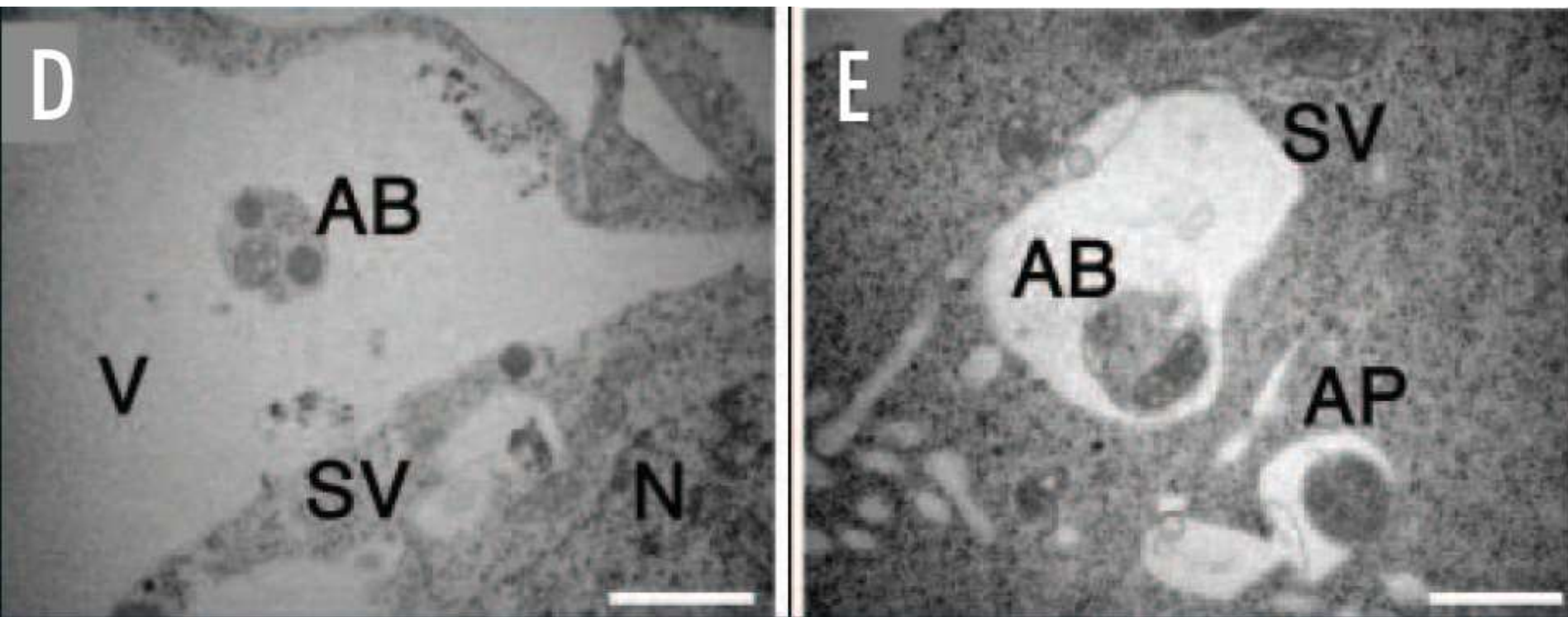
10.1111/febs.13712



Mega-autofágie

DOI 10.1007/978-3-319-21033-9_11

Autofágie

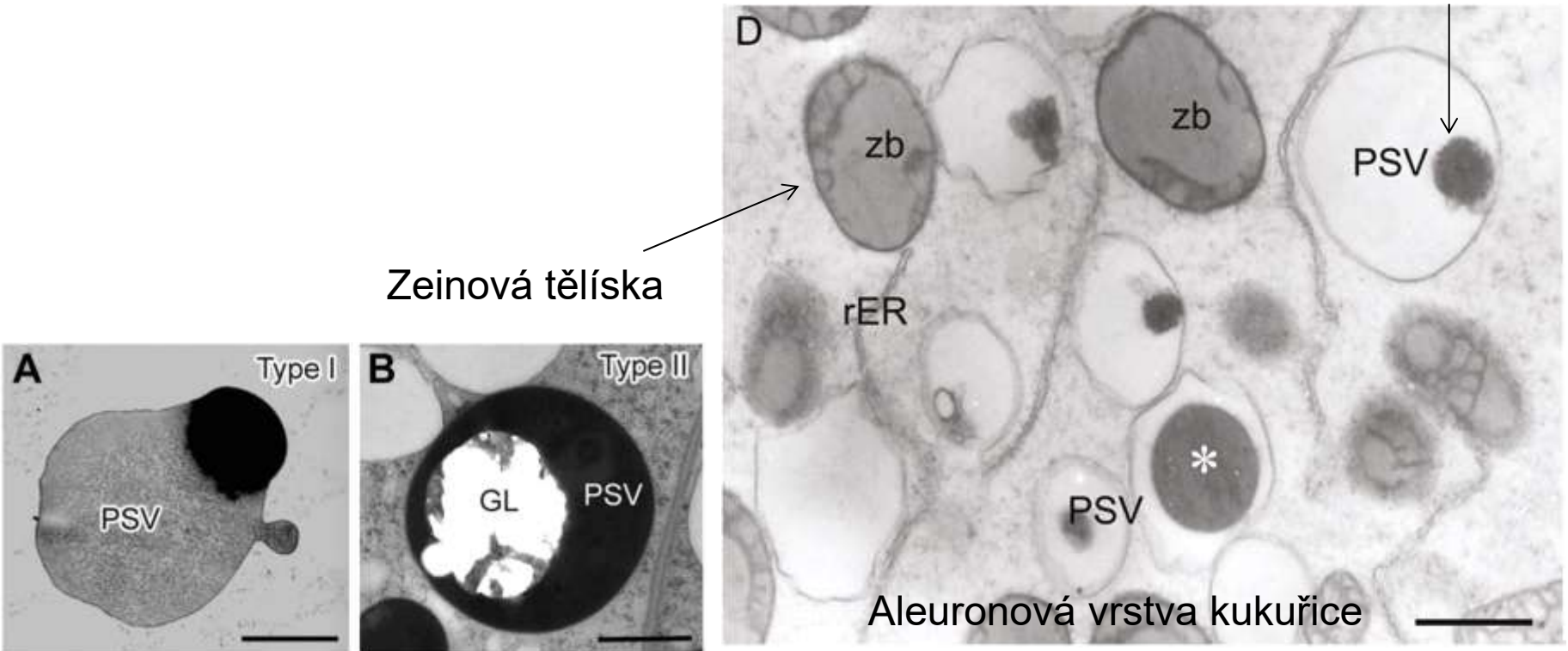


Autofágie v buňkách tabáku kultivovaných v médiu bez dusíku.

V – vakuola, SV – malá vakuola, N – jádro, AB – autofagické tělísko, AP - autofagozóm

Doprava proteinových tělísek do PSV autofágií

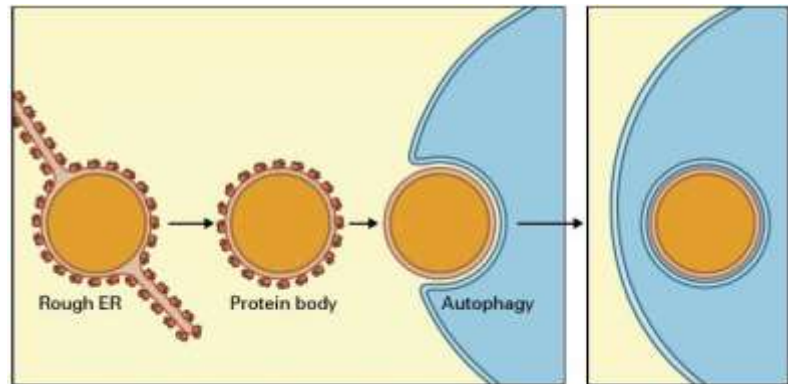
Globulinové inkluze v PSV



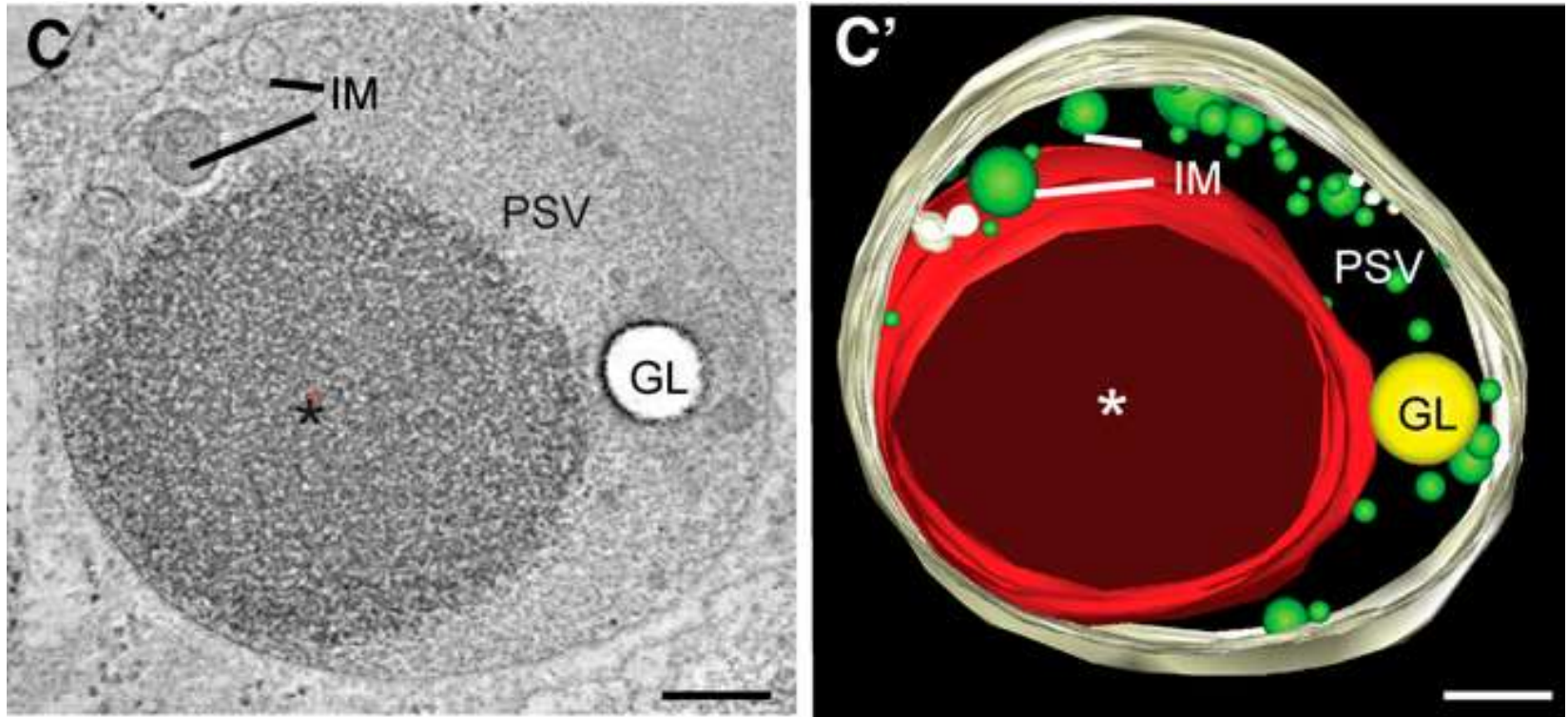
Zeinová tělíska

Aleuronová vrstva kukuřice

Meristemické buňky tabáku



Kompozitní charakter PSV



PSV buňky endospermu kukuřice.

PSV: proteinová zásobní vakuola; IM: intravakuolární membrány;
GL: globulární agregát fytinu; * proteinová inkluze zeinu.

Role vakuol v senescenci a PCD

Senescence:

-regulovaný proces, jehož cílem je recyklovat co nejvíce látek na konci života orgánu

-v raných fázích je senescence proces, který lze zvrátit; později získává formu **PCD** a stává se nezvratitelným.

PCD (programovaná buněčná smrt):

- regulovaný proces zahrnující aktivaci specifických enzymů, specifických signálních drah, proteosyntézu.

- PCD procesy začínají v cytoplazmě, pro její dokončení je nutná vakuola

- Ke konci PCD akumulují ve vakuole vysoké koncentrace hydrolytických enzymů. Konečnou fází je **mega-autofágie**, kdy je prasknutím vak degradován celý cytoplazmatický obsah.

Shrnutí:

Sekretorická dráha: význam, komponenty.

Regulace váčkové transportu v rámci endomembránového systému: tvorba váčku, fúze váčku, regulační mechanismy. Malé GTPázy.

Endoplazmatické retikulum: struktura, funkce.

Golgiho aparát: struktura, funkce. Strukturní a funkční aspekty specifické pro rostliny.

Endozóm: struktura, funkce.

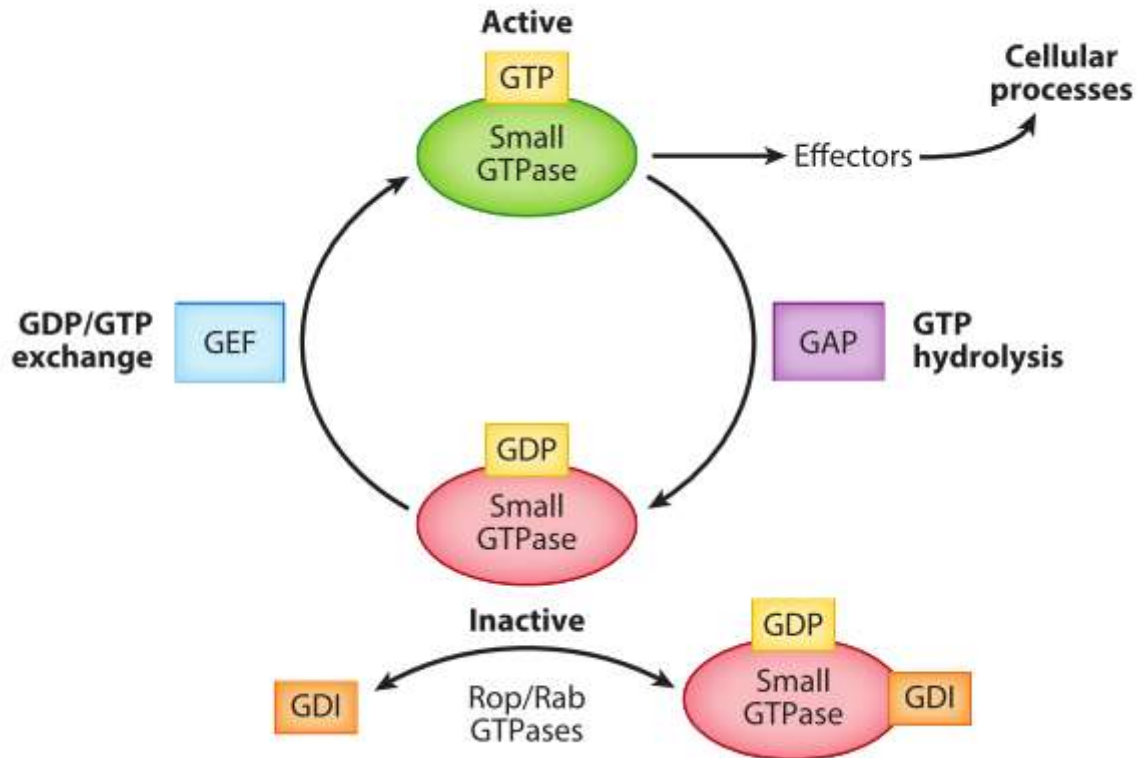
Vakuola: struktura, funkce. Strukturní a funkční aspekty specifické pro rostliny.

Autofágie.

O malých GTPázách

obecný funkční cyklus malých GTPáz

a Small GTPase cycle



Malé monomerní GTPázy v buňce cyklují mezi **neaktivním stavem, kdy váží GDP**, a **aktivním stavem, kdy váží GTP** (obrázek 1). V aktivním stavu s navázaným GTP se GTPáza může vázat na efektorové proteiny a regulovat buněčné procesy. *(Interakce mezi GTPázou a jejími specifickými efektorovými proteiny (tedy proteiny, které jsou GTPázou regulovány) může ovlivňovat aktivitu těchto proteinů různými způsoby, jako je třeba změna jejich konformace umožňující vazbu substrátů, uvolnění nebo indukce autoinhibičních stavů nebo umístění těchto proteinů do specifického místa v buňce (např. specifické membrány nebo kompartmentu)).* Tento cyklus GTPáz je přísně regulován **guaninovými výměnnými faktory (GEF)**, které po navázání umožňují výměnu GDP za GTP a způsobí tak na zapnutí malé GTPázy do aktivního stavu, a **proteiny aktivujícími GTPázy (GAP)**, které protein vypínají tím, že dramaticky zvyšují rychlost, s jakou je navázaný GTP hydrolyzován na GDP+Pi. Mutace ve vysoce konzervovaných doménách malých GTPáz, které narušují tento cyklus výměny nukleotidů a hydrolýzy, mohou stabilizovat mutovanou GTPázu buď v konformaci GTP, nebo GDP. Takto vznikají proteiny, které jsou konstitutivně aktivní (CA, trvalé vázané GTP v molekule), konstitutivně neaktivní nebo dominantně negativní (DN - trvale vázané GDP v molekule). Kromě toho u podrodin Rab a Rho GTPáz inhibitory disociace guaninových nukleotidů vykonávají činnost podobnou chaperonu tím, že odstraňují neaktivní formy těchto proteinů vázané na GDP z buněčných membrán a sekvestrují a stabilizují tyto proteiny v cytosolu maskováním jejich posttranslačních lipidových modifikací.

<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-112619025827>

G-proteins

monomeric
small

heterotrimeric

RAS

Non-plant
Plant

RAN

RAB

RHO

RAS

ARF

RHO

CDC42

RAC

ROP