

ENDOMEMBRÁNOVÝ SYSTÉM ROSTLINNÉ BUŇKY

- systém vnitřních membrán eukaryotické buňky
- to, co umožnilo a udělalo kompartmentaci
- **jaderný obal**
- **ER výchozí struktura** – souvisí s jaderným obalem
- **GA + TGN** (Trans – Golgi network)
- **endosom** = soubor transport. váčků; endo i exocytické váčky
- **vakuola a PM**
- **peroxizomy** = mohou vznikat de novo z ER
- **lumen** endomembrán je neprotoplazmatického původu – jsou zde jiné biochemické podmínky pro reakce; př. kyselější prostředí
- viz. obr. – drsné ER s ribozomy
- **plazmatická membrána**

OBRÁZEK : ER, D=golgiho aparát (cis a trans strana); Va = vakuola; MVB = multivesikulární tělíčko;

Komunikace:

- přes váčky, je to přísně regulováno
- a) **sekretorická dráha**
 - výměna membrán a molekul (proteinů, lipidů) mezi ER, GA, TGN, endosomy, PM a vakuolou
 - pokud protein vzniklý v ER bez specifické lokalizace – dojde až k PM a je sekretován – u živočišné buňky
 - u rostlinné b. je možnost že protein skončí ve vakuole
 - částí dráhy ale projdou veškeré proteiny, syntetizované v ER
 - sekretorická dráha je stará struktura, **minimální: PM, endosom, lysosom(vakuola), GA, ER**
 - primárním konečným cílem transportu je **plazmatická membrána**; při dělení rostlinné buňky (dělení pomocí fragmoplastu, tedy pomocí „fúze váčků“) se hlavním cílem sekretorické dráhy stává právě vznikající BS ve fragmoplastu
- b) **endocytotická dráha**
 - vlastně opačný směr sekretorické dr.
 - **transport v rámci sekretorické dráhy je obousměrný** – od ER k PM zahrnuje pohyb nově syntetizovaných molekul; od PM ke GA zahrnuje recyklaci proteinů z PM či příjem látek; k vakuole znamená degradaci (lytické vakuoly) nebo transport zásobních proteinů (pokud se jedná o proteinové zásobní vakuoly)

Speciality rostlinné buňky:

- **GA – výroba polysacharidů BS** (kromě celulózy a kalózy; celulóza je syntetizována na PM pomocí integrálních membránových proteinů přímo do BS, stejně tak kalóza)
- střední kompartment – u živoč.b. je to místo komunikace mezi ER a GA, u rostlin tento membránový kompartment chybí
- **GA tvoří diktyozomy = mobilní jednotky**; a navíc zůstávají funkční během celé mitózy (u Žb je GA fúzní struktura u jádra; během dělení se GA rozpadá)
- nově syntetizovaná buněčná deska je přechodně primárním cílem transportu (místo PM) během dělení buňky

TRANSPORT

- a) **ANTEROGRÁDNÍ – směr ER → GA**; transport nově syntetizovaných molekul, **přes COP II váčky** (obaleny speciálním proteinovým komplexem COPII)

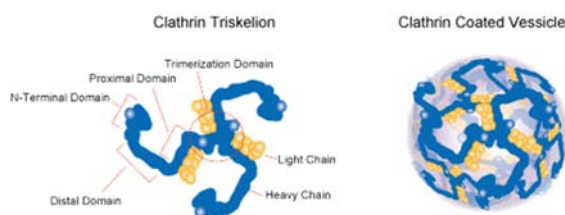
- b) **RETROGRÁDNÍ – směr GA → ER**; recyklace a protein sorting; molekuly s cílovou sekvencí např. do ER mohou občas uniknout a projdou drahou dále – existují proto mechanismy, které protein rozpoznají a vrátí zpět retrográdní cestou.
- **přes COP I váčky** (coat protein) – obaleny specifickými COP I proteiny
 - endocytóza a transport z TGN přes **klathrinové** váčky
 - nicméně i další typy neidentifikovaných váček
 - váčky jsou velmi specifické (COP I, COP II a klathrinové)

Tvorba váčku:

1. aktivací GTPázy = jsou to signální molekuly tvořící rozsáhlé rodiny, fungují jako „buněčné vypínače a zapínače“ (mají hydrofóbní doménu, která se při aktivaci GTPázy zakotví do zdrojové membrány); v této membráně rekrutuje (váže k sobě) specifické obalové proteiny (COP, klathrin)
2. Obalové proteiny: a) zakřivují membránu pro tvorbu váčku, a b) specificky „nakládají“ váček.
Zakřivení membrány a tvorba váčku: polymerací a změnou konformace membránových proteinů na membráně dochází k zakřivení membrány
Nakládání membránových proteinů do váčku: přímo interakcí s obalovými či adaptorovými proteiny v membráně váčku. **Nakládání rozpustných proteinů**: rozpustné proteiny interagují s transmembránovým receptorem, který interaguje s obalovými či adaptorovými proteiny.
3. Odštěpení váčku od membrány a transport cytoplazmou
4. Oddělení obalových proteinů a jejich následná recyklace na původní (donorovou) membránu
5. Rozeznání cílové membrány a fúze váčku s ní.

Obalové proteiny

- jejich fce je **vytvářet zakřivení membrány** a umožnit tak tvorbu váčku, a **vázat** membránově vázané proteiny pro transport + vazba dalších rozpustných l.
- aktivovány malou GTPázou – po vazbě GTP se aktivuje → zakotví na membráně a aktivuje obalové proteiny (přímo či přes adaptorové proteiny), které následně vážou specifické proteiny pro transport + rozpustné l. – jejich navázání zajištěno receptorovými proteiny (= ty interagují s rozpuštěnými látkami i obalem)
- **COP I** – 7 podjednotek; tvorba regulována **ARF GTPázami**
- **COP II** – 5 podjednotek ; tvorba regulována **SAR GTPázami** (více z obr. netřeba znát)
- každá dráha tvorby váčku je pak regulována jinými faktory
- **klathrin** – molekula obsahuje těžký a lehký řetězec – 3 molekuly tvoří klathrinový **triskelion**, ty se pak následně přikládají k sobě a vytvářejí charakteristickou strukturu klathrinového váčku
- u rostlin účast klathrinu i v TGN a při endocytóze



Malé GTPázy a jejich funkce:

Funkční cyklus malých GTPáz – stav vypnuto (vazba GDP)/zapnuto (vazba GTP) musí být ovlivněn někým jiným, neboť hydrolyzovat GTP na GDP, případně vyměnit GDP za GTP, umí sama malá GTPáza jen velmi pomalu.

Aby k efektivní hydrolyze došlo, je nutná přítomnost faktorů = **GAP** (GTPase activating protein) – **hydrolyzou GTP dojde k vykonání „práce“ a následné deaktivaci GTPázy**, neboli přeměně na GDP formu.

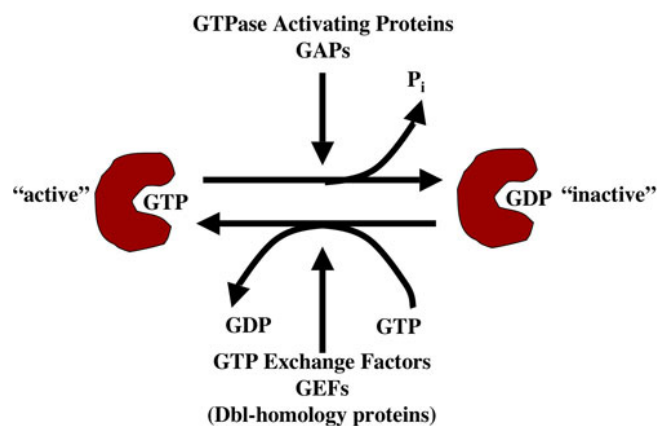
Aby došlo k výměně GDP za GTP (aby se GTPáza mohla znovu aktivovat), je nutná přítomnost dalších faktorů = **GEF (GTPase Exchange Factor)** → umožňují GTPáze vyměnit GDP za GTP a zapnout se tak do aktivního stavu.

Tyto regulační proteiny jsou nutné k vypínání a zapínání malé GTPázy. Pokud v buňce je lokálně vyšší koncentrace GAP – GTPázy především v neaktivní formě (GDP); pokud vyšší koncentrace GEF – GTPázy především v aktivní formě (GTP). Dle výskytu a aktivity pomocných proteinů a tedy koncentrace aktivní či neaktivní GTPázy se tak může ustanovit polarita b.

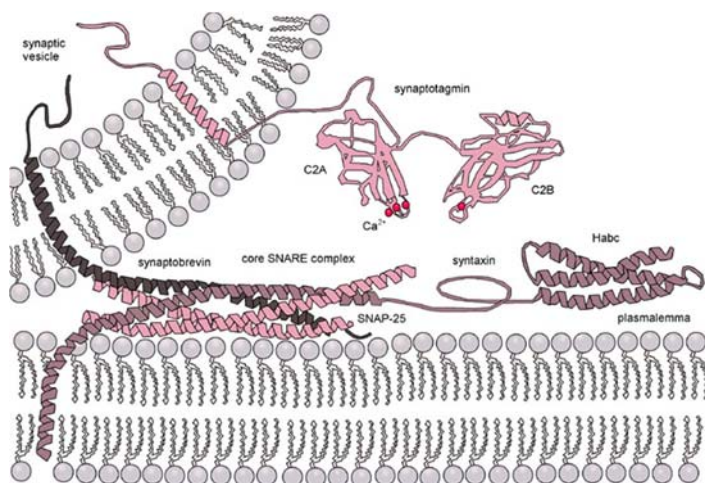
Další regulující faktory: cyklus malých GTPáz je regulován spoustou dalších faktorů, což napomáhá přesnější regulaci GTPáz, např.

GDI – když navázáno GDP na GTPázu, blokuje jeho výměnu za GTP, i když by byl přítomen GEF

GDF - GDI displacement factor: reguluje interaci GDI a GTPázy.



Fúze váčků:



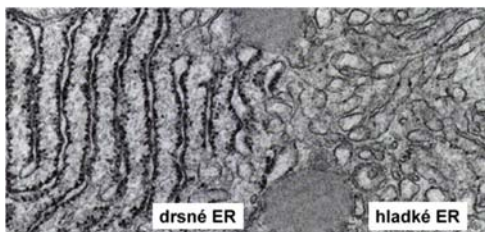
- SNARE komplexy – v membráně zakotvené proteiny
- 1. **V- SNARE** v membráně váčků (synaptobrevin)
- 2. **T- SNARE** v cílové (targetové) membráně (syntaxin 1 a SNAP-25)
- jen některé spolu mohou interagovat = musí být kompatibilní, to zajišťuje specifitu
- tvorba komplexu V/T SNARE – změna konformace, následné přiblížení membrány váčků a té cílové → fúze membrán
- po fúzi se membránové komplexy vrací i s váčkem zpět (V SNARE = recyklovány zpět na původní membránu); T SNARE zůstávají
- obalové proteiny se samozřejmě rozpadají před samotnou fúzí

ENDOPLAZMATICKÉ RETIKULUM ER

-poprvé popotáno až v 60. letech 20. st (elektronová mikroskopie)

- 3D struktura procházející celou cytoplazmou; tubuly dynamicky vznikají a zanikají; rozsáhlé, proměnlivé a dynamické; děleno na : ploché cisterny a tubuly

- **hladké vs. drsné – obaleno ribozomy**



- jejich poměr se liší dle typu buňky; ty pro sekreci – více hladkého; buňky pro ukládání spíše více drsného

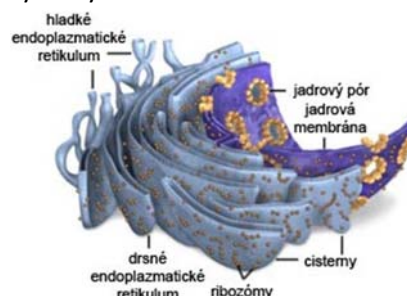
- obr. vlevo dole – A = lumen ER (neprotoplazmat. prostor) – dle lokalizace ribozomů, protože ty jsou vždy na cytosolické straně membrány

- bílá barva

na obr. vpravo – místo, kde struktura zůstala statická po celou dobu monitorování; zde pravděpodobně interaguje s kortikální vrstvou PM

- **pohyb je závislý na aktinovém cytoskeletu**; depolymerací aktinu dojde k zastavení pohybu, nicméně tvar zůstává =, za tvar zodpovědné proteiny **retikulony** (vytváří tubulární útvary ER, a tvoří trubičky i in vitro)

- ER a GA ko-lokalizují s aktinovým cytoskeletem



Obr. Štuktúra endoplazmatického retikula

FUNKCE ER

- syntéza lipidů a lipidických molekul
- modifikace hydrofóbního charakteru – pro fungování v membránách
- zásobní fce: lipidy do sférozomů; hydrofóbní proteiny do proteinových tělísek
- zásoba Ca^{2+} iontů – pro signalizaci
- propojení buněk v plasmodesmech – podíl na protoplazmatickém propojení buněk
- podíl na tvorbě buněčné desky
- molekulární mechanismus percepce gravitace neznáme, ale část ER se podílí

Zásobárna:

1. **zásobní oleje triacylglyceridy) v semenech**
 - ukládání mezi lipidickou 2vrstvou (hydrofóbní) = **sférozomy**
2. **zásobní proteiny – semena trav a obilovin (např. lepek)**
 - ukládání do váčků obalených jednotkovou membránou; tělísko obaleno membránou s ribozomy

Syntéza a úprava proteinů:

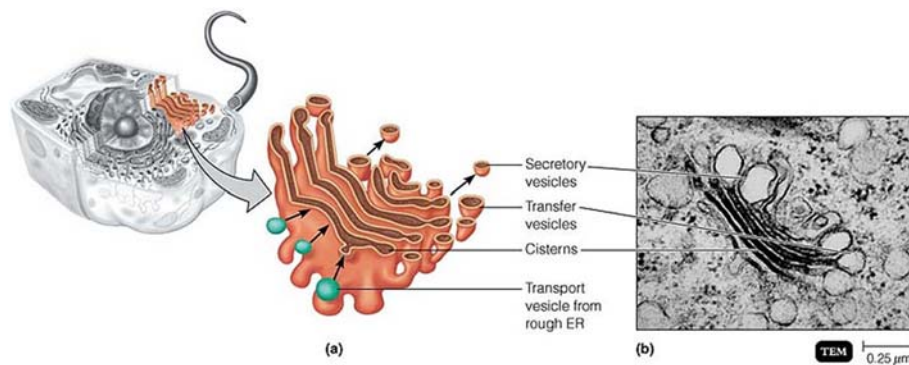
- po rozpoznání signální sekvence na N-konci proteinu syntetizovaného na ribozómu - nasednutím **SRP**, které sekvenci pozná a naváže se, a pozastavení translace
- vazba a zakotvení ribozomu na **SRP-receptor v membráně ER**
- **připojení ribozómu na translokační komplex** – kanál, kterým probíhá translace do lumina ER (kotranslační přenos; umožňuje okamžité sbalování syntetizovaného proteinu v cílovém kompartmentu (ER), kde jsou jiné biochemické podmínky než v cytosolu, např. v cytosolu je redukující prostředí, v endomembr. organelách spíše oxidující)
- **probíhají glykosylace proteinů – na N skupině → N-glykosylace**
- **degradace nesprávně sbalených proteinů**
- **proteiny podílející se na sbalování a úpravě proteinů ER:**
 - **BiP** (Binding Protein; váže nově syntetizované peptidy a brání v jejich nesprávném samovolném sbalení); **signální peptidáza** (odštěpuje od proteinů signální peptid); **PDI** (Protein Disulfid Izomerase, katalyzuje formaci S-S můstků); **PPI** (Peptidyl-Propyl Izomerase, katalyzují izomerizaci peptidové vazby před prolinem); **Calnexin a calreticulin** (Ca^{2+} vázající chaperony

v lumen ER; zajišťují správné sbalení proteinů, váží proteiny na jejich cukerných zbytcích a zabraňují tak jejich agregaci během dalších úprav proteinů)

od ER k vakuole se postupně snižuje pH v lumen endomembránových kompartmentů = zvyšuje se kyselost

- ER exit site = ERES – dobře odlišené domény v živočišné buňce, kde dochází k interakci ER a GA. U rostlin nejsou ERES tak zřejmé, ale hlavní proteiny podílející se na tvorbě ERES u živočichů jsou kódovány též u rostlin.
- střední kompartment: tubulo-vesikulární kompartment na rozhraní ER/GA – v savčích b.
 - u rostlin nikdy nebyl pozorován
 - nicméně ER a GA jsou v rostlinných b. vždy v těsné blízkosti; **cis-Golgi vždy natočeno k ER**
 - u Rb je tedy úspěšný transport mezi ER/GA zajištěn především blízkostí struktur

GOLGIHO APARÁT GA



= soubor plochých cisteren, TGN (tubulo-vesikulární struktura) vždy na trans straně

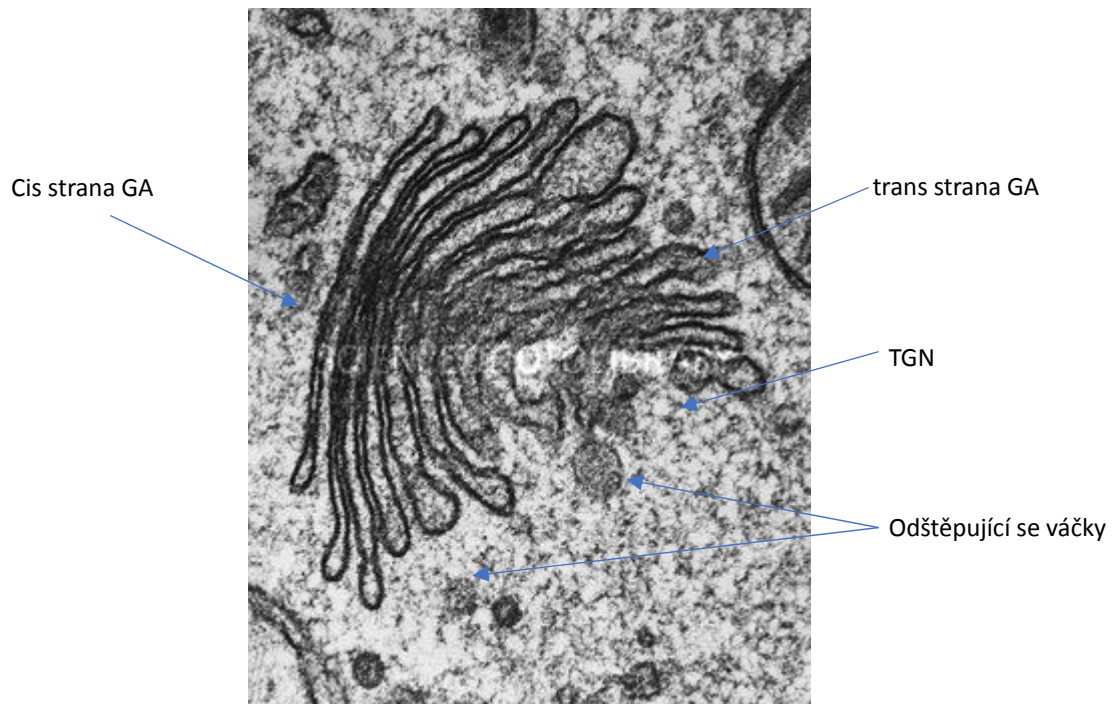
- každá část GA je polarizována na cis- a trans-stranu

- trans-strana často vyklenuta k TGN; membrány jsou silnější, obsah trans-str. tmavší na EM snímcích
- cis strana = komunikuje s ER pomocí COP II váčků; je tenčí než trans; barvení je zde slabší
- trans strana komunikuje s TGN systémem (zde se vytvářejí klathrinové váčky)
- cisteren bývá 5-8ks; TGN = *rozpadem poslední stěny GA → Golgiho matrix!
- **diktyozóm** = jednotka GA, která je mobilní a samostatně funkční

FUNKCE

- křižovatka sekretorické dráhy, sekretovaných molekul – místo třídění
- továrna na polysacharidy BS (hemicelulózy a pektiny)
- úprava cukerných řetězců – O-glykosylace a vznik O-glykoproteinů
- produkce glykolipidů
- třídění směrů transportu látek a membrán
- **cisterny jsou na okrajích vyboulené – z krajů pučení váčků – hlavně COP I pro retrográdní transport k ER = na cis-straně a pro transport mezi cisternami**
- **na tran-straně pučení klathrinových váčků**
- viz. obr. – **matrix GA – fce: udržení cisteren GA pohromadě**; váčky retrográdního směru jsou zde „uzavřeny“, aby se „neztratily“ a došly tam kam mají.
 - těsně kolem GA; nejsou tam ribozomy; jemná síťovitá struktura – tvořena proteiny **Golginy** (mají domény pro protein-protein interakce)
- obr. Žb. vs. rostlinná b. – jednotlivé kuličky jsou diktyozomy

- obr. zeleně je ER, červeně **diktyozomy** – **pohyb závislý na aktinu**, typu „**stop and go**“ = rychle přebíhají a mezitím mají pozorovatelné zastávky (teorie: ve chvíli, kdy stojí, dochází k intenzivní výměně váčků mezi ER a GA)
- v místě asociace ER a GA – se následně formují COP II váčky
- u buněk řas, prvoků a rostlin pozorováno dělení GA (diktyozomů) – začíná na cis-straně
- při stresu rozpad GA v buňkách – následné obnovení z ER



Strukturní a funkční odlišení:

- Rb obsahuje velkou vakuolu dělící cytoplazmu na více částí – mobilní diktyozomy tak zajistí rovnoměrnou distribuci látek v buňce
- každá cisterna má jiný obsah enzymů (záleží na typu buňky) – možno pozorovat na syntéze složitých molekul (xyloglukan a pektiny = složité polysacharidy BS)

TEORIE FUNGOVÁNÍ

<https://www.youtube.com/watch?v=WcC57iFPwjk>

A. Hypotéza maturace cisteren

- každá cisterna prochází maturací, tedy má své specifické složení, které je stále obnovováno váčkovým transportem v retrográdním směru
- syntetizovaný produkt tak zůstává v cisterně, ve které se postupně mění složení enzymů a která se v Golgi souboru cisteren stále posunuje směrem k trans straně
- retrográdní transport – vrací specifické enzymy do jednotlivých cisteren
- tato teorie upřednostňována

B. hypotéza kyvadlového pohybu váčků

- Cisterny jsou stabilní se stabilním enzymatickým složením
- Produkt je po syntéze/úpravě posunut do další cisterny váčkovým transportem

C. Hypotéza přechodných tubulárních propojení mezi cisternami