

POST-GA KOMPARTMENT - ENDOZÓM

- heterologní – má různé podoby jak u rostlin tak živočichů
- hlavní úloha: reguluje transport látek (proteinů, lipidů, metabolitů) v rámci sekretorické dráhy
- přijímá endocytotické váčky a také váčky s nově syntetizovanými molekulami, přicházející od ER-GA
- zde se rozhoduje, co se bude dít dál

Rozlišujeme tři základní typy endozómu:

1. **časný** – přijímá váčky od plasmatické membrány (PM) – endocytované
2. **recyklující** – u Žb. – spolu s časným recykluje lipidy a proteiny zpět do PM
3. **střední a pozdní** – pro molekuly určené k degradaci; recyklace vakuolárních receptorů = multivesikulární tělíska (malé tělísko s váčky uvnitř): **MVB (multivesikulární tělíska) / PVC (prevakuolární kompartment)**

Endozóm v rostlinných buňkách

1. **TGN (trans-Golgi network; =časný endozom)** – podílí se ale i na recyklaci, takže zastává funkci jak časného tak recyklujícího, zde se setkává sekretorická a endocytotická dráha
2. **multivesikulární tělíska = MVB, neboli PVC = prevakuolární kompartment**

TGN

- odštěpují se od něj klathrinové váčky
- **zde styk sekretorické a endocytotické dráhy**
- **1. místo, kam fúzí endocytotické váčky z PM**
- TGN je často součástí diktyozómů (tedy souboru plochých cisteren GA, kde je připojen na trans-straně), ale může se od GA (diktyosomu) i odpojit a putovat cytoplazmou jako samostatná jednotka – nicméně fce je zřejmě potom jen dočasná, protože bude stráven po odštěpení určitého množství klathrinových váček.

MVB/PVC

- poslední kompartment před vakuolou
- hlavní role: degradace membránových proteinů, degradace rozpustných látek v lumen endomembrán
- Degradace membránových proteinů: váček s membránovým proteinem (např. odštěpený z PM, označený ubiquitinací) fúzuje s membránou MVB. Poté membrána MVB pučí dovnitř → v membráně ve vznikajícím inverzním váčku je určený protein → vznik vnitřního váčku v MVB (odtud název multivesikulární tělísko) → fúze membrány MVB s vakuolou → uvolnění vnitřních váček do prostoru vakuoly → degradace membrány a membránového proteinu váček
- (degradace cytoplazmatických proteinů **pomocí proteasomu vs. Membránových proteinů přes MVB)**

Vznik MVB:

- **Nutnost vytvořit váček směrem do neprotoplazmatického prostoru – zcela unikátní mechanismus** (oproti např. endocytóze či tvorbě váček v ER či GA membránách, kde váčky pučí do protoplazmatického prostoru – cytoplazmy, kde vyklenutí membrány zajišťují obalové proteiny)
- **Mechanismus pučení do lumina MVB zajišťují proteiny ESCRT** (5 proteinových komplexů podílejících se na rozlišení transportovaného materiálu a zajištění vyklenutí membrány dovnitř váčku)

EXOCYTÓZA

- doprava stavebních kamenů pro stavbu BS
- doprava membrány, receptorů, kanálů na PM
- zdrojem materiálu je časný endozóm (EE = early endosome)

- fce = klíčový děj pro EB; hlavní směr jakým jsou dopravovány membrány, proteiny atp na plazmatickou membránu

ENDOCYTÓZA

- nesmírně aktivní proces i u Rb
- dnes studium díky lipofilním barvivům – samy membránou neprojdou – pouze endocytózou

Fce

- **nutná pro recyklaci receptorů** – ty bez funkce na degradaci
- **recyklace signálních molekul** – po endocytóze signál přetrvává – dostanou se do motilního (pohyblivého) endosomu → možnost signalizace do cytoplasmy, stále studováno
- **recyklace a remodelace BS**
- **cílem je časný endozóm = TGN**

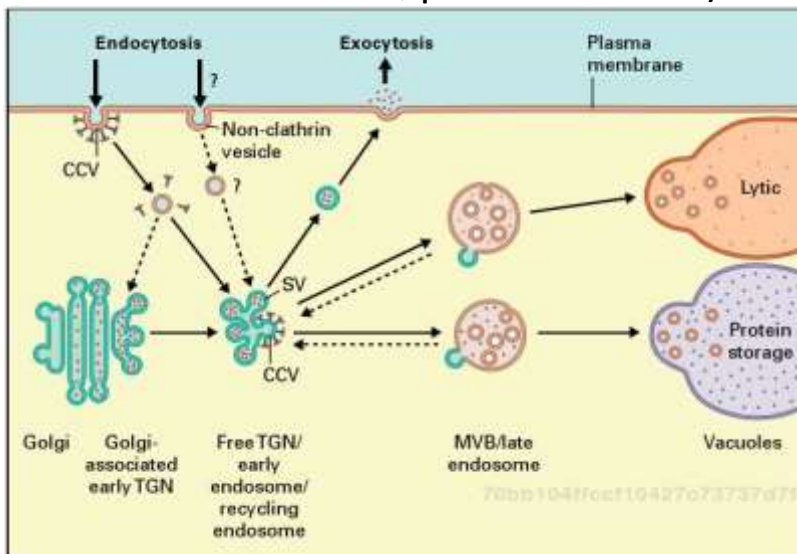
viz. obr. – fluorescence PM + endocytických váčků – přes lipofilní barviva; po delším vystavení by se obarvil i vakuolární systém

Typy

- tvorba klathrinových váčků – dobře prozkoumáno. Klathrinové váčky Rb jsou trochu menší než u Žb
- zajištěna i váčky neklathrinové povahy – o tom se ale nic moc neví (tzv. endocytóza založená na membránových mikrodoménách)

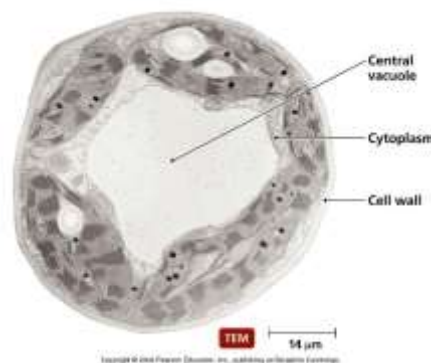
obr. TGN/EE = early endosome → k PM – recyklace; exocytóza

→ pozdní endozóm = MVB/PVC – degradace → vakuola



VAKUOLA

- **lysosomální kompartment**
- **prominentní kompartment** = zaujímá velkou část buňky
- **ale:** spermatické b., sekretoricky specializované b., a meristematické vakuolizovány vakuolizovány minimálně
- **tonoplast = membrána vakuoly**
- **vakuom = soubor vakuol v b.**
- **centrální vakuola:** cytoplasmata potlačena a nachází se spolu s organelami v **kortikální vrstvě = těsně pod PM** + v oblasti jádra
- **transvakuolární provazce** – provazují kortikální cytoplasmu a tu kolem jádra; souvisí s aktinovým cytoskeletem
- u metabolicky neaktivních buněk, se jádro nachází také v kortikální cytoplasmě
- **lumen vakuoly = neprotoplazmatický kompartment**
- **pH mírně kyselé – asi 5,5;** ale i nižší – př. limetka pH = 1,7; či u některých rostlin pH nižší v listech
- **rozdíly pH přes den:** CAM rostliny – v aridních oblastech; kdy se snaží zabránit ztrátám vody přes den: **přes noc tak mají otevřené průduchy a fixují CO₂ enzymem PEPkarboxyláza (fosfoenolpyruvát karboxyláza) za vzniku molekuly malátu (slabá organická kyselina) → ten transportují do vakuoly** – v noci a nad ránem je tedy ve vakuole nízké pH. **Přes den pak malát z vakuoly transportuje do cytoplasmy, kde dochází k jeho dekarboxylaci a uvolňování CO₂ (lze tedy fotosyntetizovat a mít zavřené průduchy), a pH vakuoly stoupá jak je malát odstraňován.**



VZNIK

- z ER odštěpením váčků → **PROVAKUOLY**, a jejich postupným splnutím vznik větších vakuol
- nicméně vznik i z jiných složek endomembránového syst. – př. EE, GA

EMBRYOGENEZE

- zygota má 1 centrální vakuolu – po jejím dělení
- **apikální b., ze které vzniká embryo – jeho buňky jsou zpočátku bez vakuol** – až v torpédovitém stádiu se začínají buňky vakuolizovat
- **basální b. s vakuolou – dává vznik podpůrné struktuře suspensoru**
- pro vznik vakuoly nutno proteinů účastnících se splývání membrán – **SNARE komplexy**, mutanty defektní v těchto mechanizmech jsou embryoletální.

Dospělá buňka, viz. obr

- meristematické b. jsou bez vakuol, ale mají velká jádra vs. diferenciace buněk a jejich zvětšující se vakuoly

Metody výzkumu

- **molekulární marker GFP;** nicméně vakuolární pH destabilizuje GFP + působením modrého světla (základní složky denního světla) dochází k jeho konformační změně, kdy je pak GFP vystaven proteázám a degradován → pěstování rostlin ve tmě umožňuje pozorovat GFP v lumen vakuoly.

FUNKCE

- **laciný růst** – díky zvětšení objemu vakuoly dojde ke zvětšení objemu samotné buňky; energetická úspora, jelikož není potřeba taková syntéza materiálů cytoplasmy
- **podpůrná – turgor: tlak protoplastu na PM;** udržováno jak transportem solutů, tak samotným tlakem vakuoly
- **homeostáze (= reguluje pH, koncentrace iontů)** – zdroj Ca²⁺ iontů

- **zásobní** – voda; dlouhodobé rezervy u buněk děloh a oddenků
- **uskladnění toxických látek** – aby neškodily cytoplazmě; přes nespecifické ABC transportéry
- **interakce s prostředím** – přes barviva; látky toxické a nechutné herbivorům (sekundární metabolity)

OBSAH

- pevné částice – proteinové agregáty; fytin = zásobárna P; polysacharidy – př. inulin (nikdy škrob – ten je uskladněn ve škrobových zrnech v chloroplastech)
- lipidy a oleje
- koloidní a rozpuštěné
- enzymy – specializované hydrolázy
-
- viz. obr. – **idioblast** = příklad specializované b. mezofylu s odlišnou fci – komulace rafidů (=dlouhých krystalů) šťavelanu vápenatého, toxického metabolitu, uskladněného ve formě krystalů ve vakuole.
- hortensie (Hydrangea macrophylla)
- **modrá barva květů = hodně kyselá půda vs. růžová = neutrální, mírně kyselá půda**
- prvek Al je v půdě velmi častý a na kyselých půdách se stává pro rostliny toxickým, jelikož se v kyselé půdě uvolňuje ze svých solí a vyskytuje se volně jako Al^{3+} iont → u většiny rostlin zastavuje růst, ale existují i takové, které Al dokáží akumulovat, tak že Al^{3+} transportují do vakuol
- vakuoly hortensíí obsahují antokyan **delphinidin** – ten se váže na Al^{3+} → čím tmavší zbarvení květů od růžové do modré, tím více Al vakuoly obsahují
- **tedy čím kyselejší půda, tím více Al ve formě Al^{3+} → o to více hortensie tento iont akumuluje a zbarvení květů v důsledku vazby delphinidinu na Al tmavne**

Typy vakuol

1. **lytická vakuola LV**
 - nízké pH; obsahuje hydrolytické enzymy → klasický lysosomální kompartment
 - γ -TIPs na tonoplastu – typ aquaporin; pro nás význam markeru
2. **PSV = protein storage vacuole (zásobní proteinové)**
 - vyšší pH; obsah zásobních proteinů (jejich častá agregace) → fce: zásobní
 - α -TIPs na tonoplastu
 - vyskytují se v zásobních orgánech (dělohy, aleuronová vrstva, endosperm semen)
 - př. aleuronová vrstva = vrstva buněk v semenech s vyšším obsahem látek pro klíčení; (viz. obr. – velké vakuoly = zásobní vs. malé vakuoly – lytické)
 - proteiny zde uskladněné buď rozpustné, či agregované
 - předpoklad vzájemné existence obou typů vakuol, protože jinak by lytické enzymy zničily většinu PSV: při klíčení se postupně charakter PSV mění na LV, protože je třeba lyze zásobních proteinů
 - nicméně výskyt PSV i v oblastech bez zásobní fce
 -
 - viz. obr. imbibice (prvotní fáze klíčení); O=oleosomy; pozorování postupné změny PSV na LV a současnou degradaci proteinových zásob
 - viz. obr. zb = zein bodies – struktury odvozeny od ER = **ZÁSOBÁRNA PROTEINŮ MIMO VAKUOLU (VAKUOLA, RETIKULUM, PLASTIDY → ZDE SE UKLÁDAJÍ PROTEINY**

Transport do vakuol (v rámci sekretorické váčkové dráhy)

- a) **do LV (lytické vakuoly): EE (TGN) → LE (MVB) → vakuola**

1. **EE (TGN) → LE (MVB)**

klathrinové v. (v TGN vznik) – z časného endosomu(EE) do pozdního endosomu(LE) = PVC (prevakuolární kompartment)

anterográdní transport (TGN → PVC) – regulován **VSRs = vacuolar sorting receptors** → rekrutují klathrin a nakládání specifických látek; od EE do LE; recyklace → retrográdní směr (transport zpět) retrográdní směr – přes **retromerový proteinový komplex**; obal proteinu, který zajišťuje transport do TGN; od LE do EE čili TGN. Zajišťuje především recyklaci VSR zpět na TGN(EE).

2. LE (MVB) → vakuola

Zajišťován fúzí MVB s vakuolární membránou. Retrográdní směr z vakuoly do MVB nebyl nikdy detekován.

b) do PSV (proteinové zásobní vakuoly)

- není znám univerzální receptor; proteiny syntetizovány v ER nebo GA
- hodně závisí na tom, co se transportuje
- až na prolaminy, transportované proteiny jsou rozpustné - nicméně agregují do nerozpustných agregátů
- globuliny: od transGA přes „dense vesicles“ (DV) do PSV
- má kompozitní charakter = obsah více membrán – výsledek transportu proteinových tělísek pomocí **autofágie** - nedokonale rozložené membrány příchozích váčků.

Autofágie = klíčový proces vedoucí ke *vakuol

1. **makroautofágie** – části k degradaci obaleny membránou = vznik váčku **autofagosomu** → splynutí s vakuolou (zde je stráven/rozložen hydrolytickými enzymy)
2. **mikroautofágie** = organela nebo část cytoplasmy je přímo obklopena vakuolární membránou a rozložena
3. **mega-autofágie** – během PCD (=programmed cell death); **prasknutí vakuoly a vylití lytických enzymů** → **následná degradace protoplastu**; př. vodivá pletiva – zůstává tak pouze BS

Autofágie je běžnou součástí života buňky, zajišťuje obrat proteinů i lipidů. Autofágie pomáhá např. při hladovění – recyklace části cytoplasmy pro přežití b. → z jednotlivých složek se syntetizují nezbytné molekuly pro přežití (rostliny s poškozenými autofagickými mechanismy jsou citlivější na stres).

Role v senescenci a PCD

- **senescence** = regulovaný proces, jehož cílem je recyklovat co nejvíce látek na konci života orgánu; př. v listech *Arabidopsis* tvorba specifických vakuol
→ rozděluje se na fáze; vakuola zde hraje velkou roli (možná existuje i třetí druh vakuoly = senesting vacuola); začátek v cytoplazmě X pro dokončení je nutná vakuola → mega-autofágie = PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT PCD!
- **PCD** = regulovaný proces vs. nekróza = neregulované odumírání