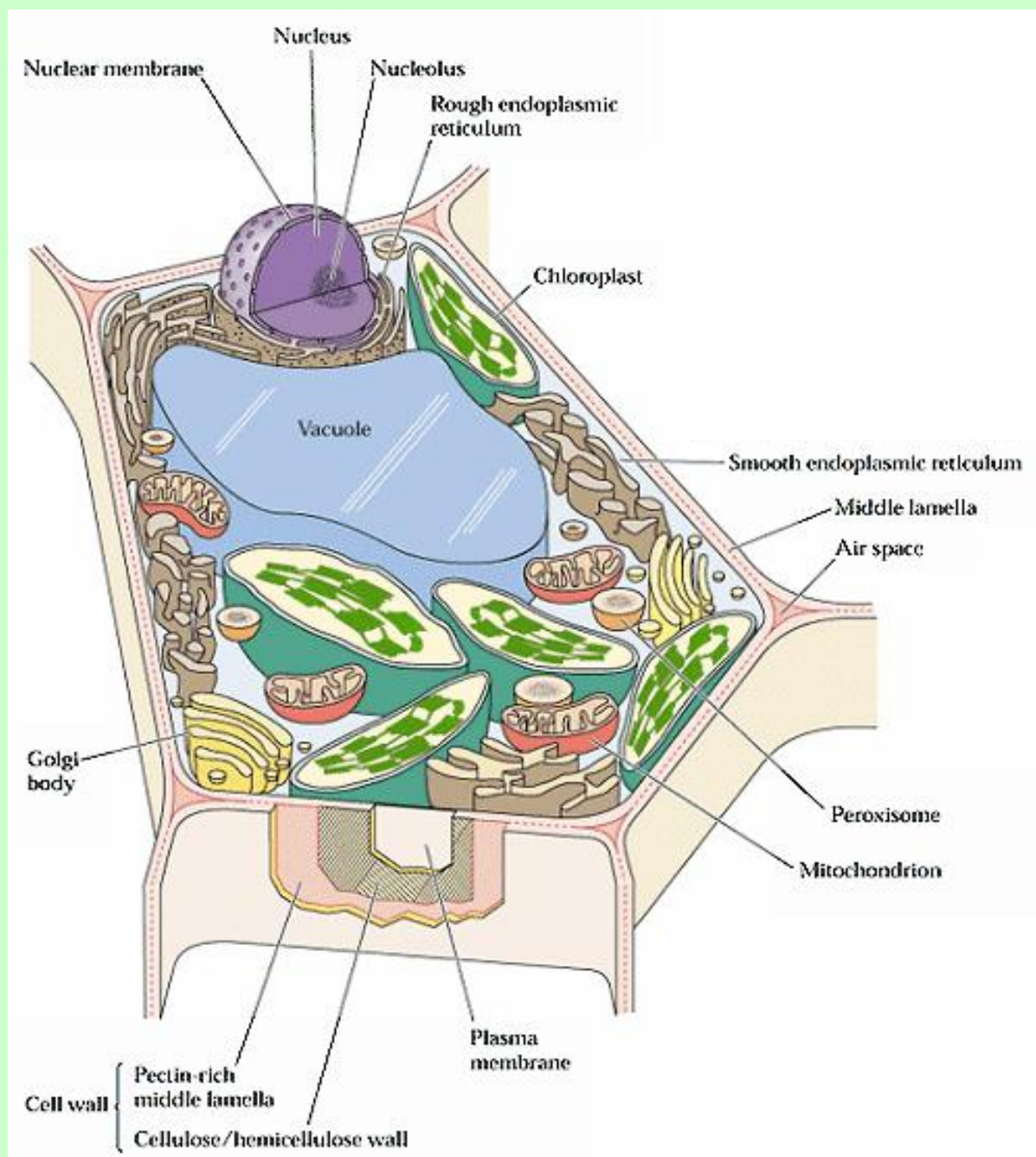


2. Buněčné membrány a vakuoly rostlinných buněk

- **Biologické membrány (blány): model tekuté mosaiky**
- **Povrchová membrána rostlinné buňky, plasmalema**
- **Endomembránový systém rostlinné buňky: definice, složení, funkce**
 - Endoplasmatické retikulum (ER)
 - Jaderný obal
 - Golgiho aparát (GA)
 - Vakuoly (ohraničené tonoplastem)
 - Různé váčky (vesikuly)
 - Peroxisomy
- **Důsledek vakuolisace rostlinné buňky: vznik buněčné stěny**



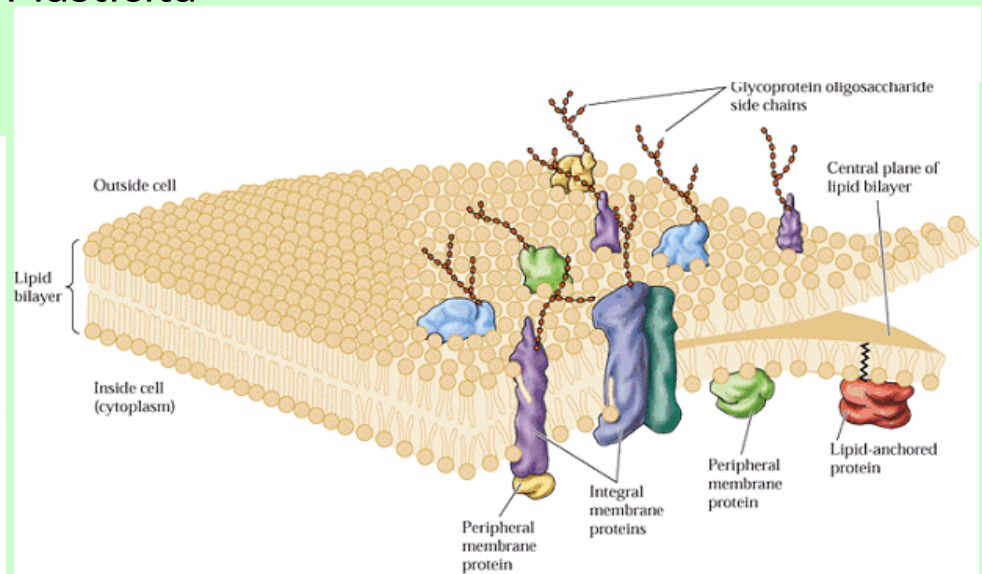
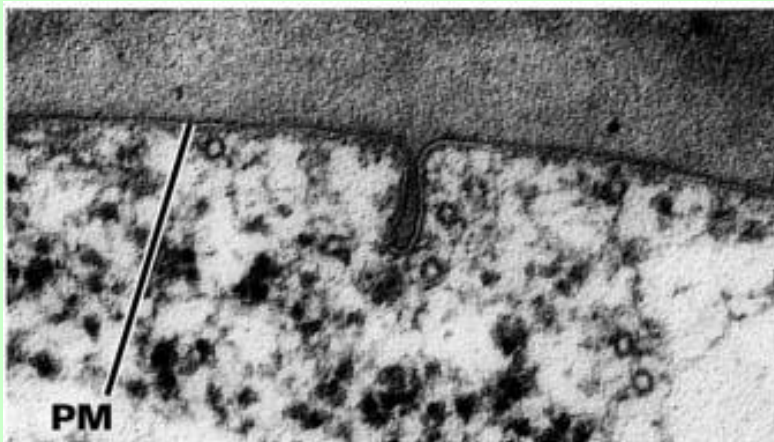
Buněčné membrány

5-10 nm tlustá lipidová dvojvrstva, obsahující proteiny – **model tekuté mosaiky**
(Singer a Nicolson, 70. léta 20. století)

Nevznikají *de novo*, ale dědí se

Semipermeabilita

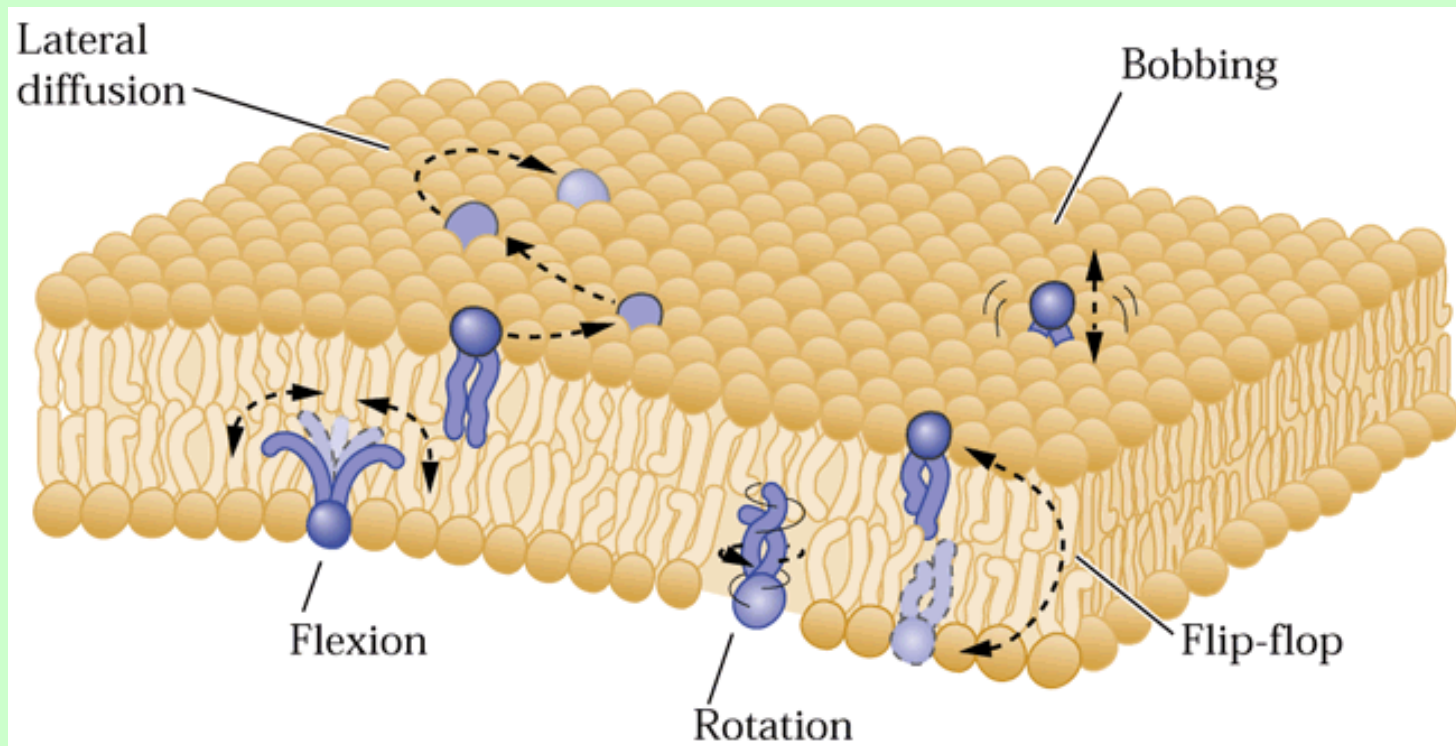
Plasticita



Membrány

- Koncept tekuté mosaiky lipidů a proteinů:

Membrána umožňuje mimo jiné i laterální pohyb lipidových molekul.



Kompartentační pravidla (Schnepf 1965):

Biologické membrány oddělují protoplasmatické a neprotoplasmatické kompartmenty (fáze) v buňce; membrány mají cytosolickou (protoplasmatickou) a extracelulární (neprotoplasmatickou) stranu; membrány jsou strukturně i funkčně asymetrické.

Neprotoplasmatické kompartmenty:

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

Protoplasmatické kompartmenty:

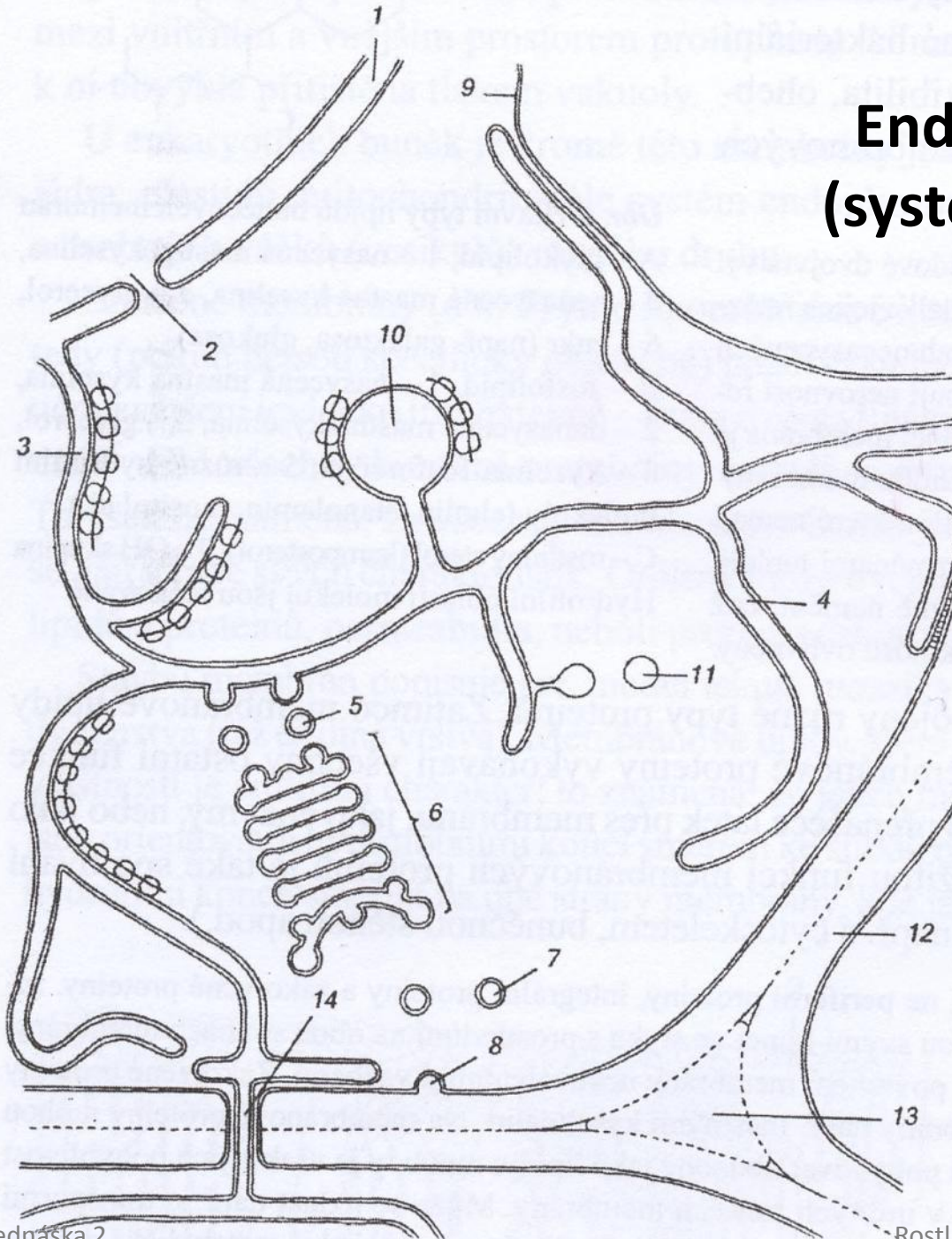
Cytoplasma, karyoplasma, chondrioplasma (mitoplasma) uvnitř mitochondrií, u rostlin navíc plastidoplasma.

Nukleové kyseliny se vyskytují vždy jen v protoplasmatických kompartmentech.

Mezi protoplasmatickými a neprotoplasmatickými kompartmenty probíhá transport přes membránu.

Mezi kompartmenty neprotoplasmatickými probíhá transport pomocí váčků.

Endomembránový systém (systém vnitřních membrán) roslinné buňky



Obr. 9 Endomembránový systém roslinné buňky

1 – jaderný obal, 2 – jaderný pór, 3 – drsné ER s ribosomy, 4 – hladké ER, 5 – váček putující od ER k diktyosomu, 6 – diktyosom, blíže ER je cis strana, 7 – váček putující od diktyosomu k plasmalemě, 8 – váček splývající s plasmalemou, 9 – tonoplast, 10 – vznikající proteinové tělísko, 11 – oleosom, 12 – buněčná stěna, 13 – mezibuněčná prostora, 14 – desmotubulus v plasmodesmu

Sekretorická dráha

Minimální sekretorická dráha (anterográdní a retrográdní transport) v rostlinné buňce:

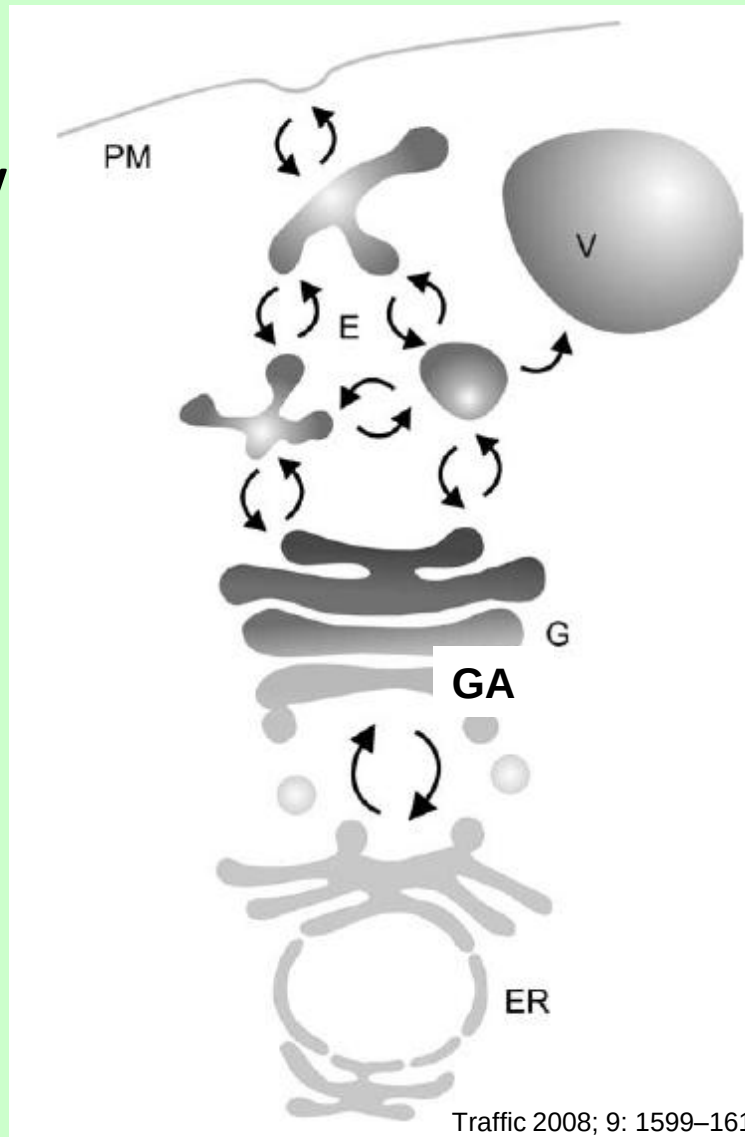
PM – plasmalema

E – endosom

V – vakuola

GA – Golgiho aparát

ER – endoplasmatické retikulum



Transport pomocí transportních váčků (vesikulů):

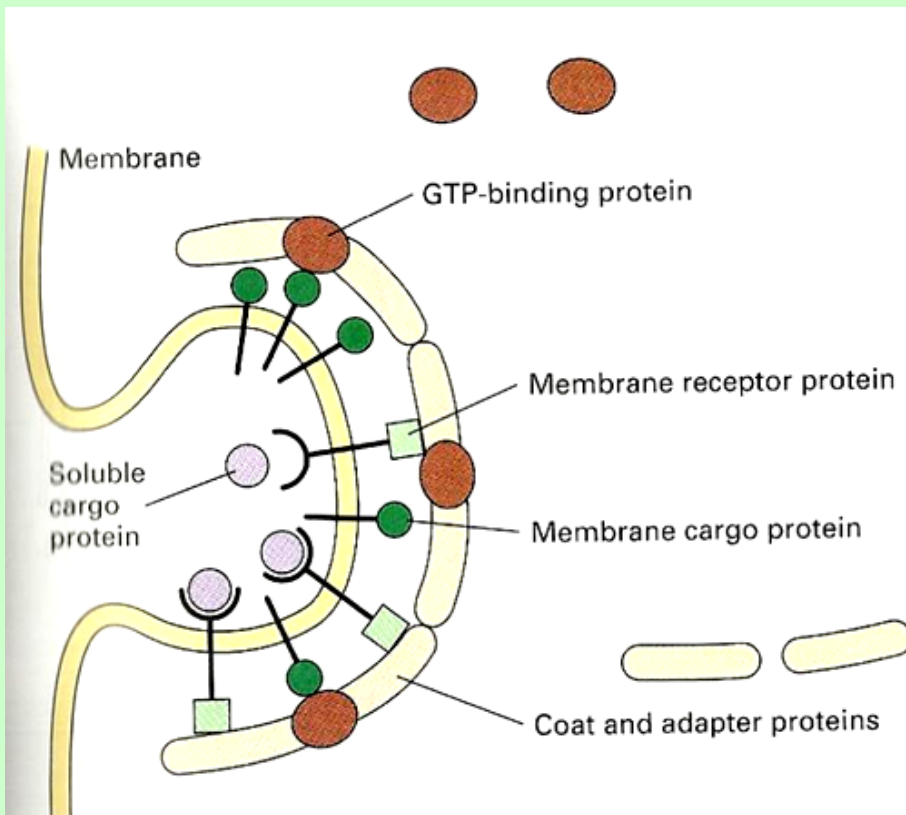
Regulace transportu: odkud a kam?

Tvorba a transport váčku zahrnuje:

1. **aktivace obalových proteinů**, regulovaná specifickými malými GTPasami, vede k tvorbě obaleného váčku na donorové membráně
2. **transport váčku pomocí cytoskeletu k místu určení**
3. **rozpoznání cílové membrány**
4. **oddělení obalových proteinů a jejich recyklace zpět**
5. **párování fusních komplexů SNARE na povrchu váčku a cílové membrány**
6. **splynutí transportního váčku s cílovým kompartmentem**

Transport pomocí transportních váčků

Obalové proteiny



◀ **FIGURE 17-51 Components that participate in budding of coated vesicles.** Budding is initiated by recruitment of a small GTP-binding protein to a patch of membrane. Then complexes of coat and adapter proteins bind to the cytosolic domains of membrane cargo and receptor proteins; the latter bring soluble luminal cargo proteins into the budding vesicle. [Adapted from a sketch by C. Kaiser.]

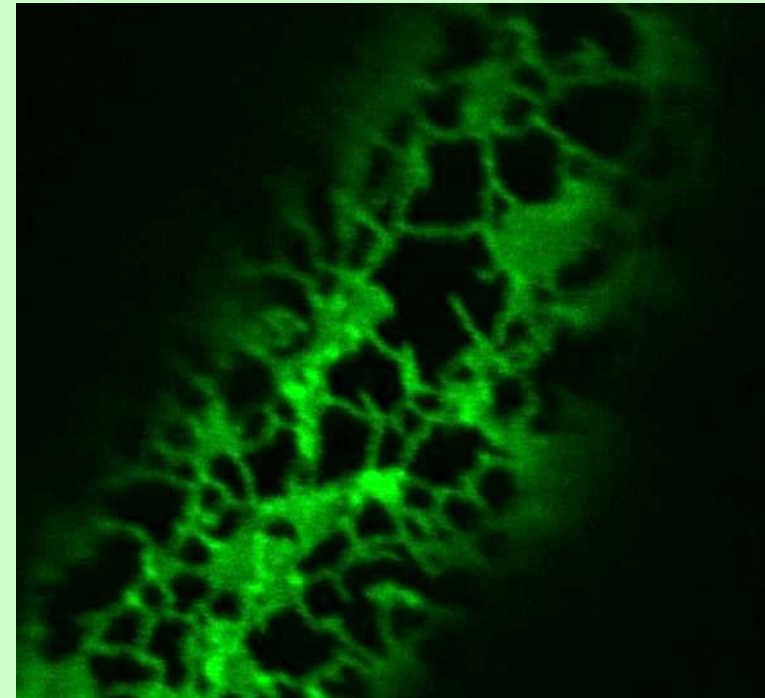
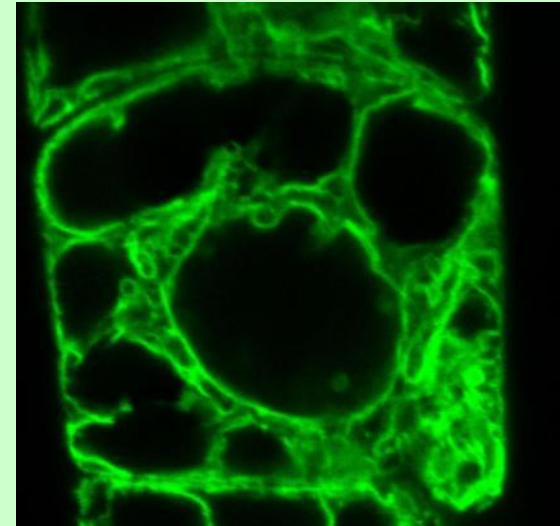
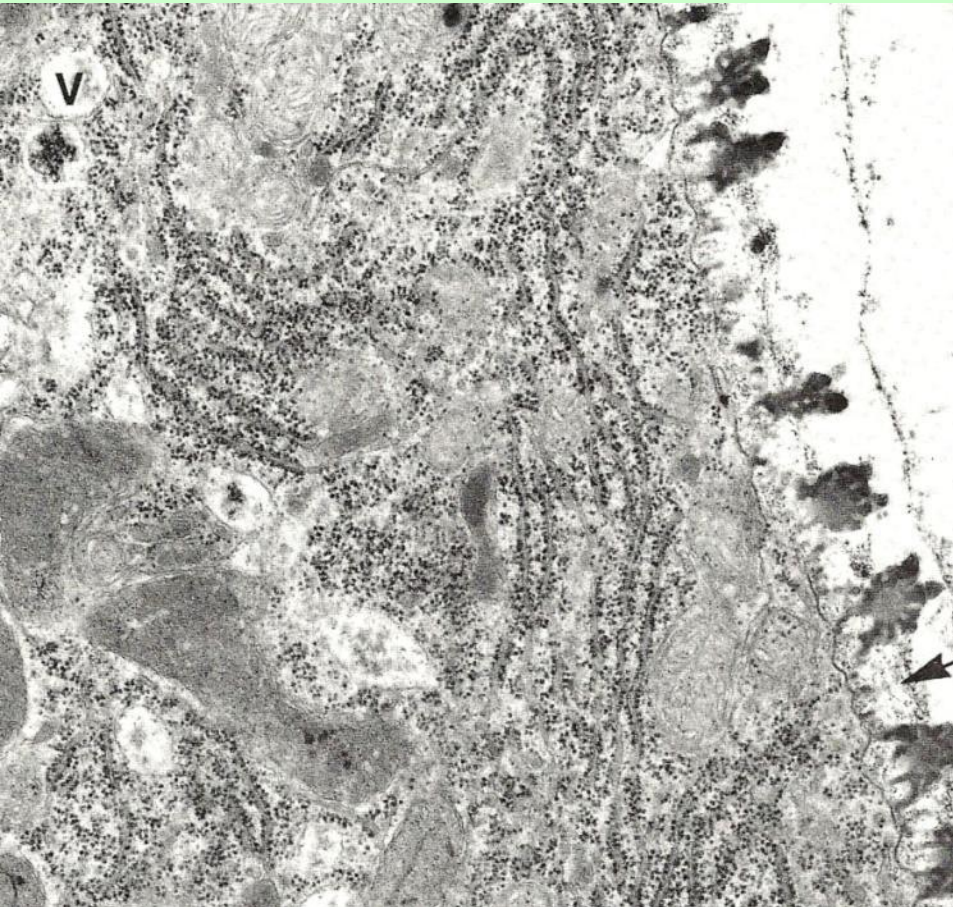
ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM (ER)

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

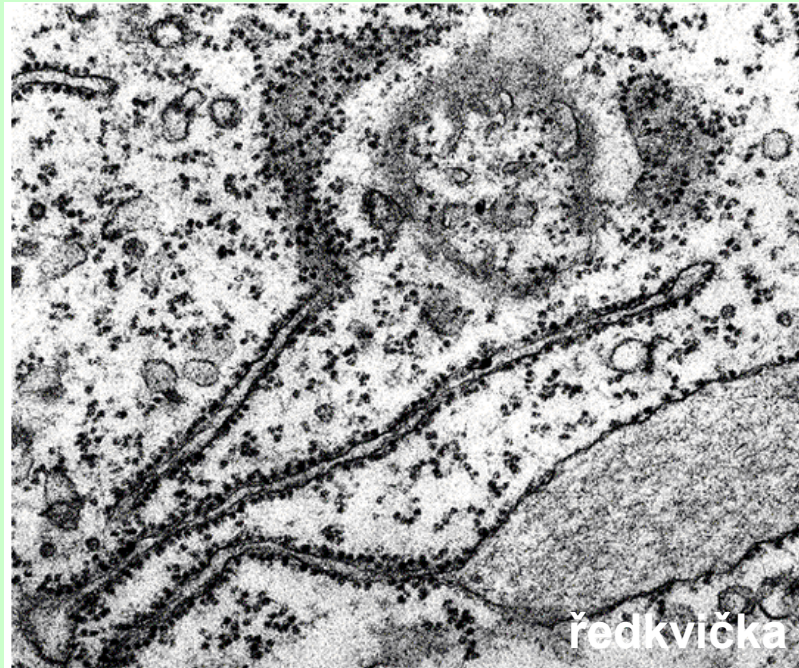
Rozsáhlý, proměnlivý a dynamický systém membránových struktur

Tvořeno trojrozměrnou sítí plochých cisteren a tubulů

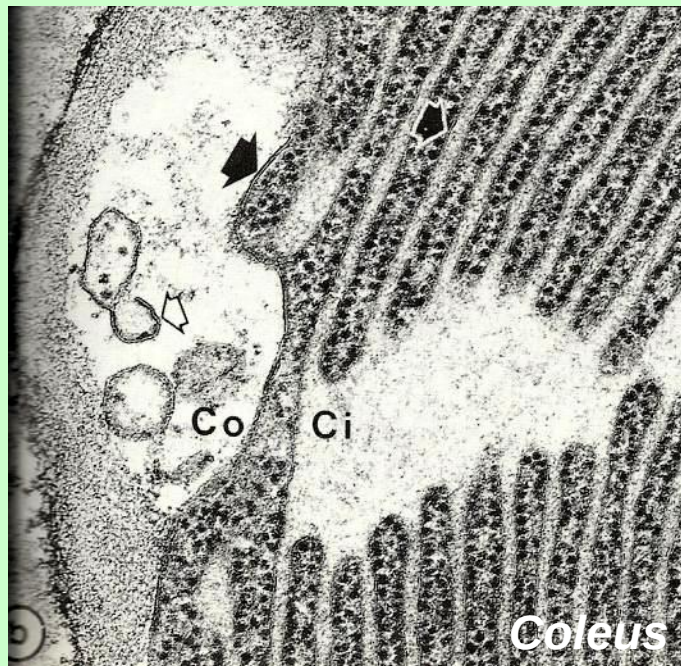
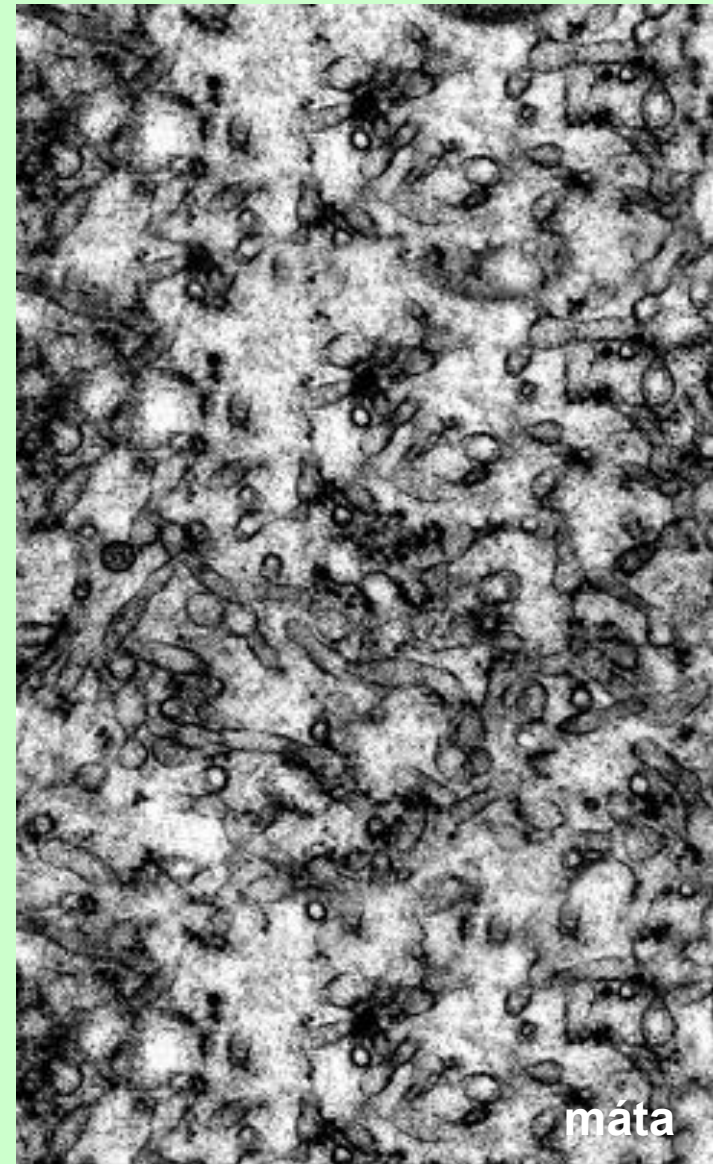
Propojení mezi sousedními buňkami skrze plasmodesmy



Drsné ER:



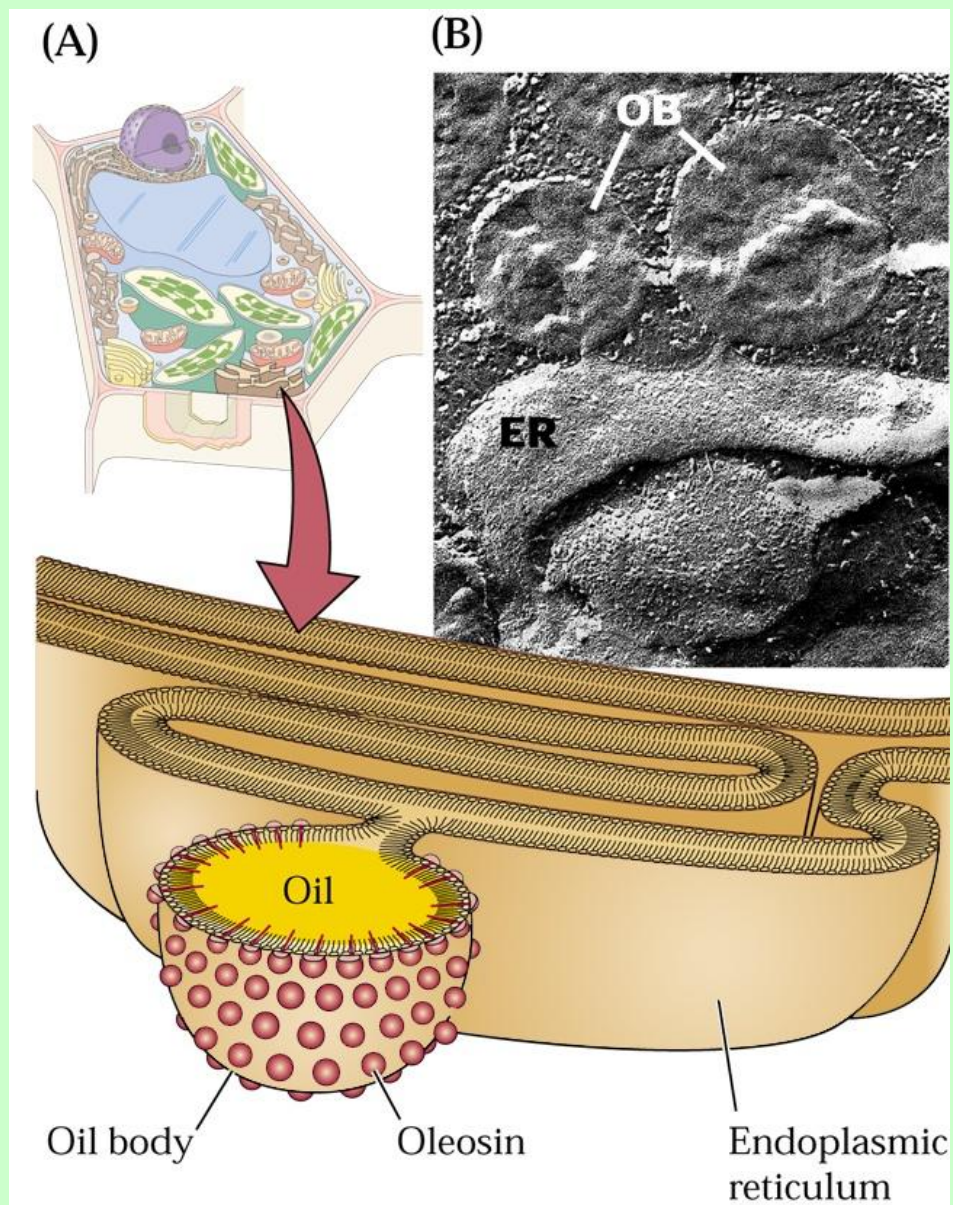
Hladké ER:



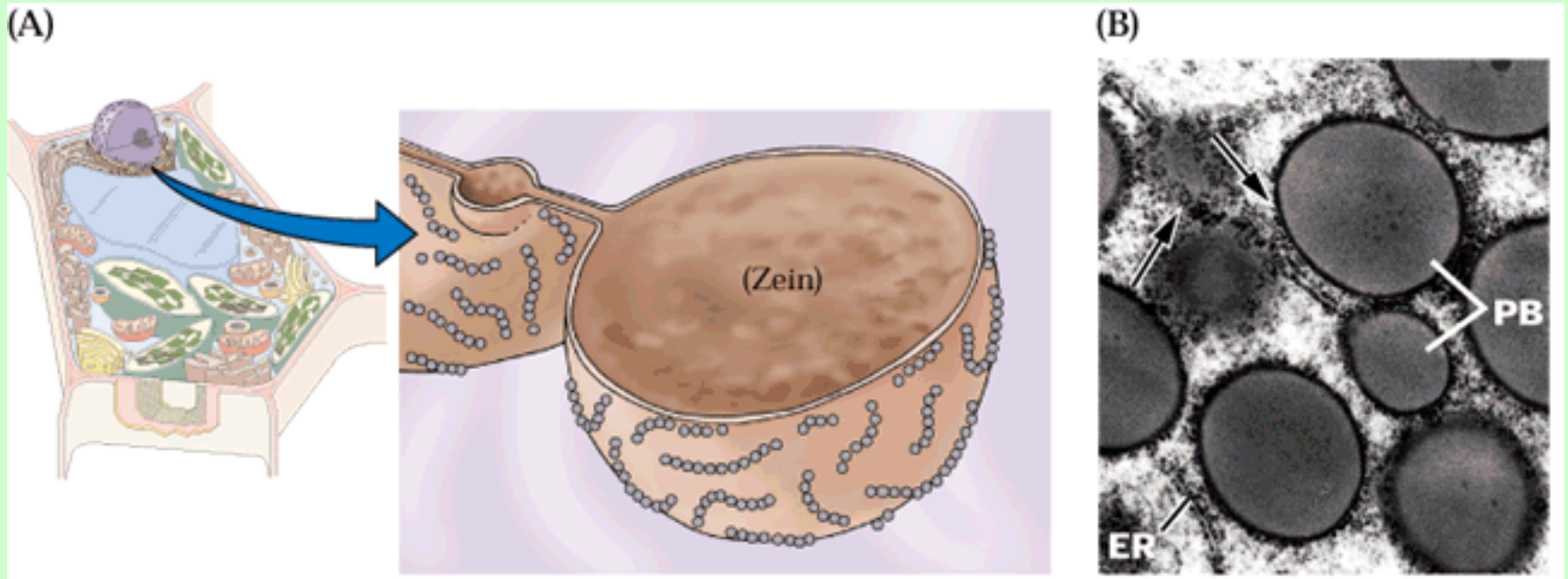
Role endoplasmatického retikula v rostlinné buňce

- je místem vzniku membrán endomembránového systému
- **synthesa lipidů a dalších lipofilních molekul**
- **synthesa a modifikace proteinů a dalších molekul**, jejichž funkce je většinou spjata s membránami, vakuolou, buněčnou stěnou nebo sekretorickou drahou
- **zásobní funkce** (sferosomy neboli oleosomy a proteinová tělíska)
- **zásobárna Ca^{2+} iontů** (úloha při přenosu nejrůznějších signálů)
- **propojuje buňky skrze plasmodesmy**
- **během cytokinese** (dělení buňky) se podílí na tvorbě **buněčné desky**
- specialisované agregáty membrán ER jsou přítomny ve **statocytech** v kolumele kořenové špičky, zřejmě se podílejí na detekci **gravitropického signálu**

Zásobní olejová tělíska - sferosomy



Zásobní proteinová tělíska



Synthesa a úprava proteinů v ER

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

Začátek syntesy proteinu probíhá na ribosomu v cytoplasmě →

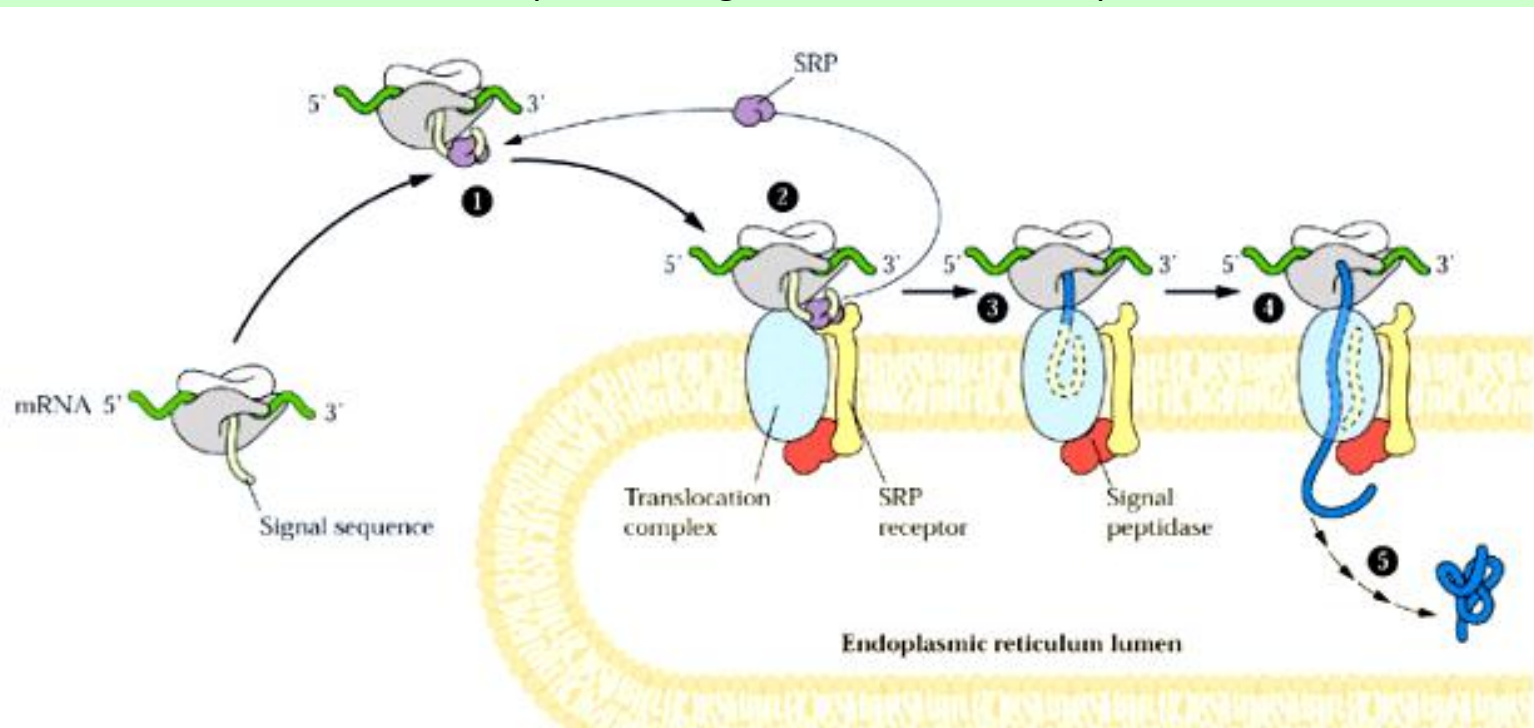
→ po přeložení prvních cca 70 AK signální sekvence rozeznána částicí **SRP** (signal recognition particle)

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

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

→ translace proteinu a jeho translokace do lumina (dutiny) ER

→ po dokončení translace a sbalení proteinu signální sekvence odštěpena

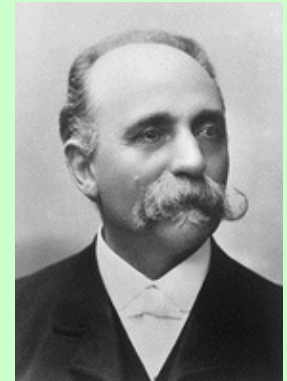


Golgiho aparát

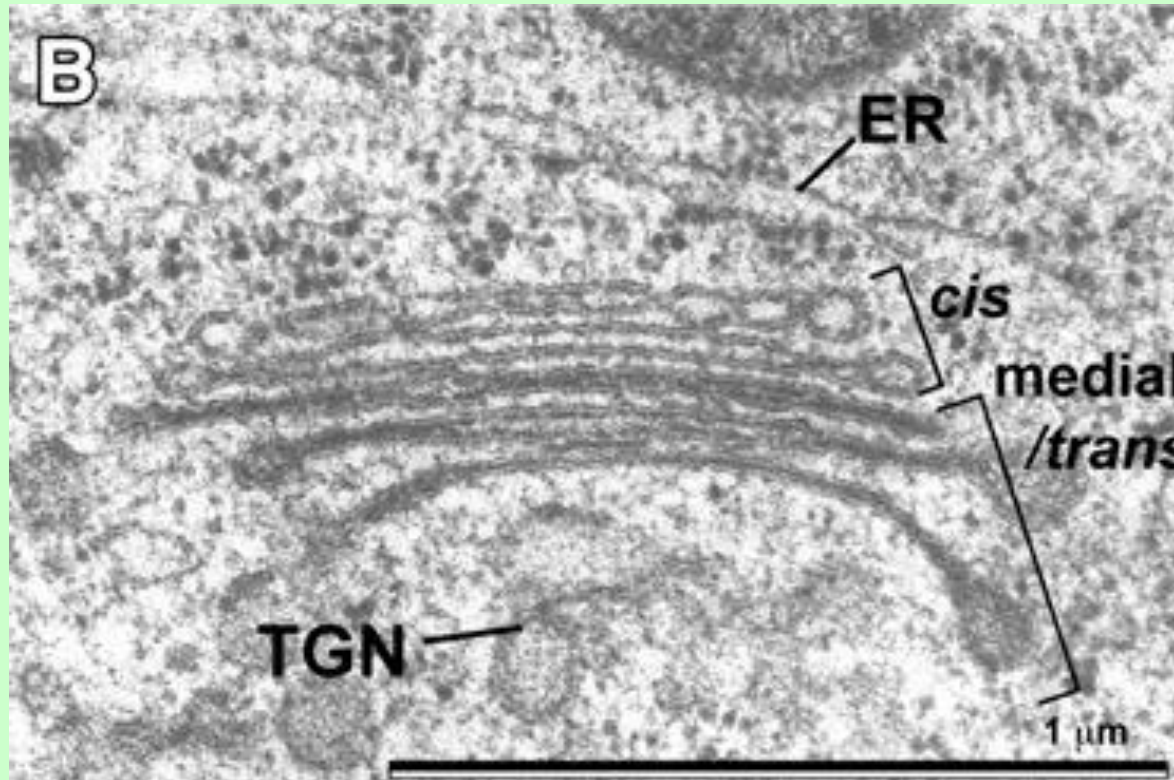
Poprvé popsán italským lékařem Camillo Golgi roku 1897

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

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



Camillo Golgi

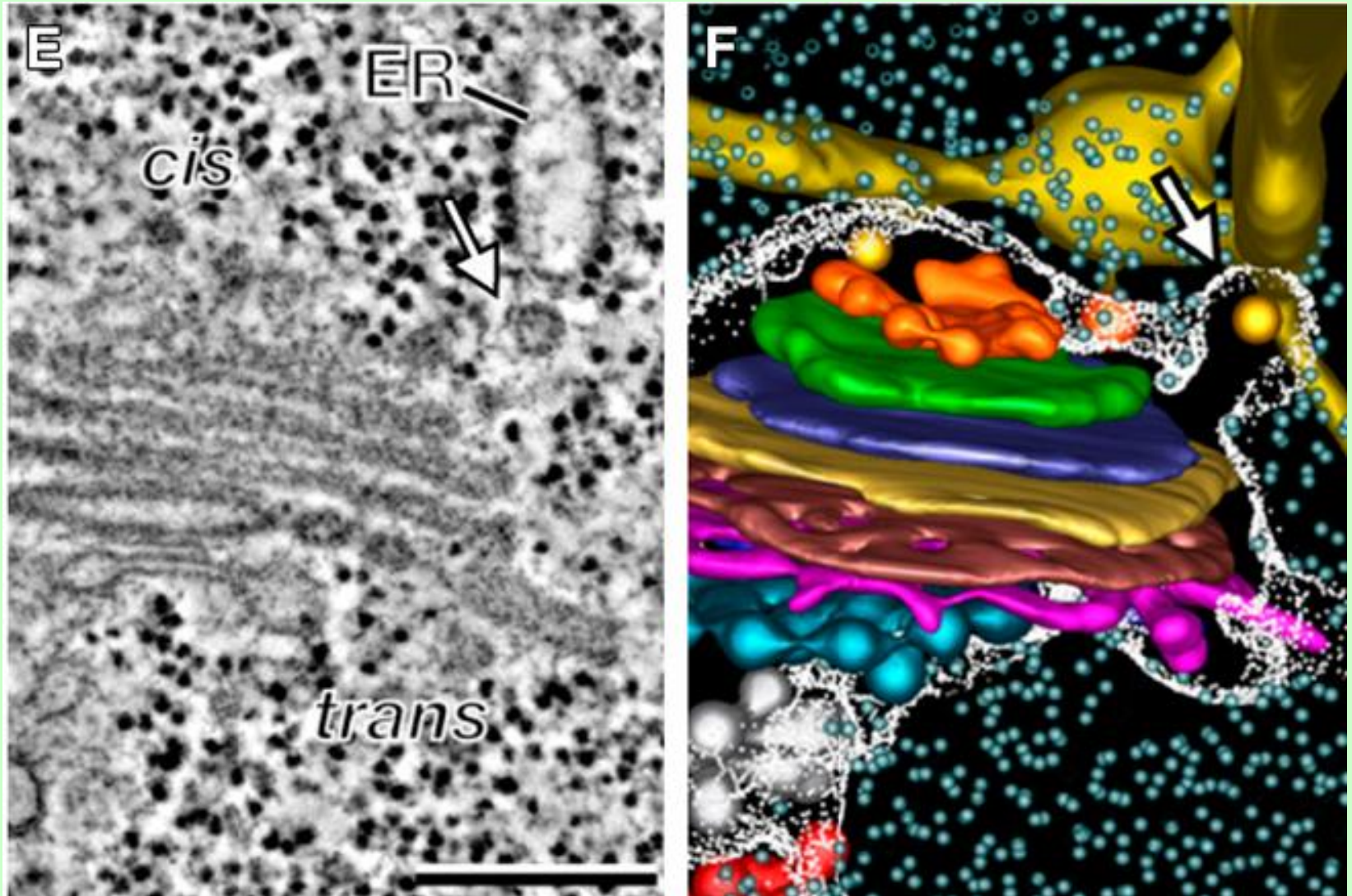


Funkce GA

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

Diktyosom

Trojrozměrná rekonstrukce



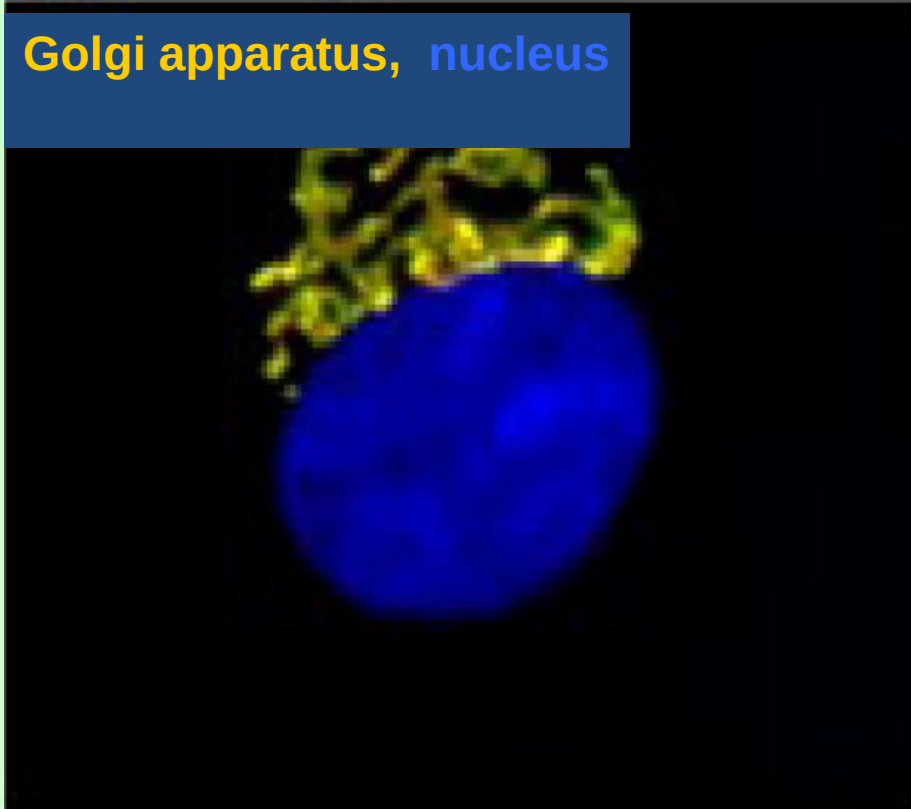
Plant Physiology, August 2008, Vol. 147, pp. 1454–1468

Rostlinná buňka, Katedra experimentální biologie rostlin PŘF UK

Golgiho aparát

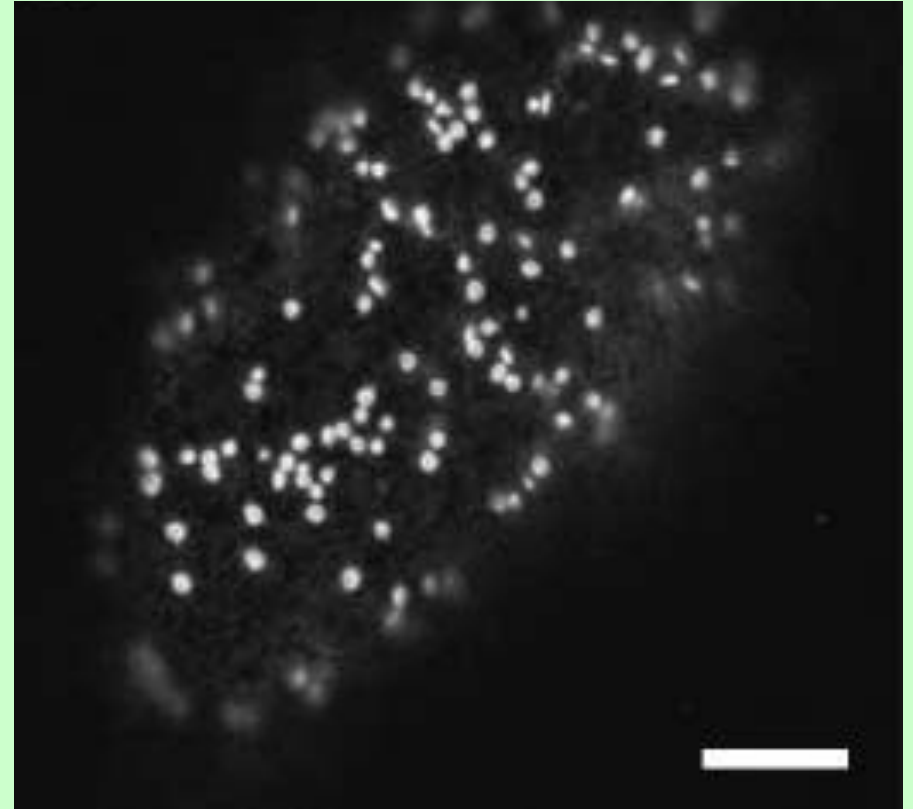
Pohyb a distribuce

Golgi apparatus, nucleus



Krysí buňka

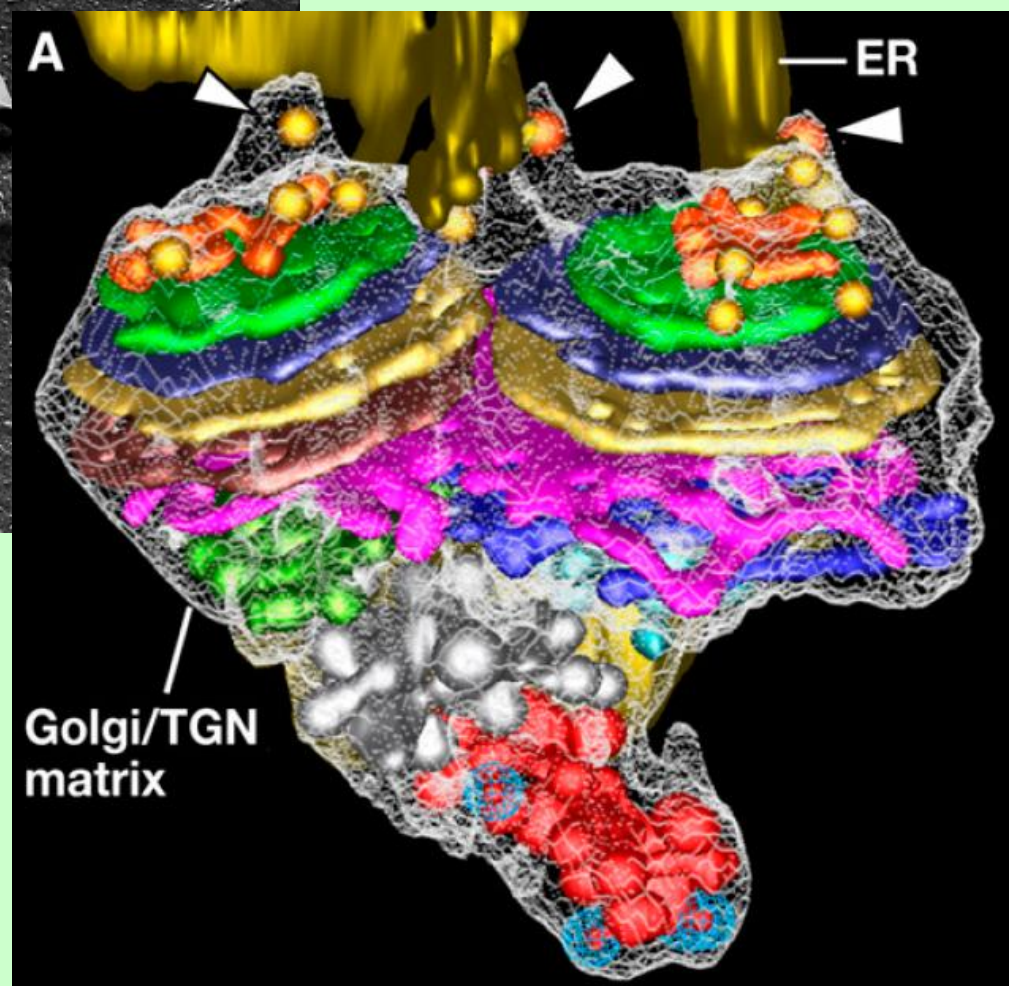
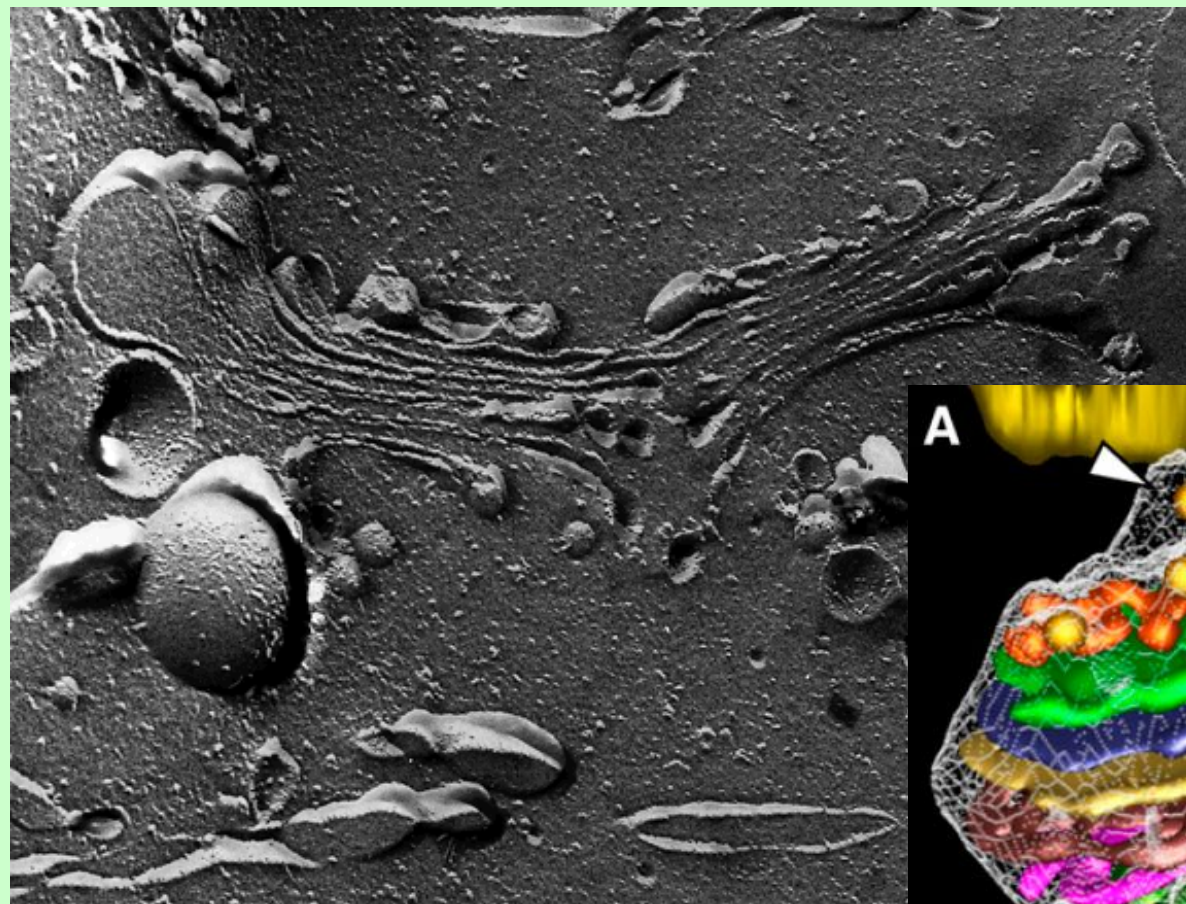
Molecular Biology of the Cell 17, 525–538 2006



Tabáková buňka

New Phytologist 2005 165: 29–44

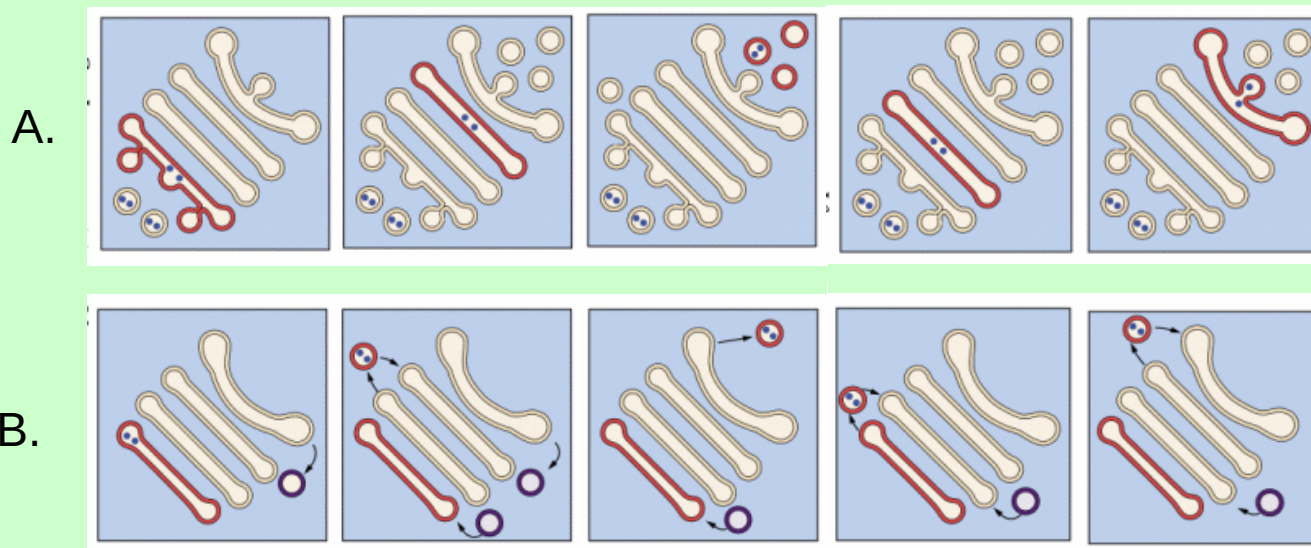
Dělení diktyosomu



Vývoj diktyosomu

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

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



Endosomy

Endosom: soubor organel, regulujících transport v rámci endomembránového systému. Přijímají váčky s nově synthetizovaným materiálem (v ER a GA) i endocytovaný materiál (endocytosa).

Časný endosom – první kompartment, který přijímá endocytované váčky od plasmatické membrány (PM).

Recyklující endosom - spolu s časným endosomem recykluje proteiny zpět do PM.

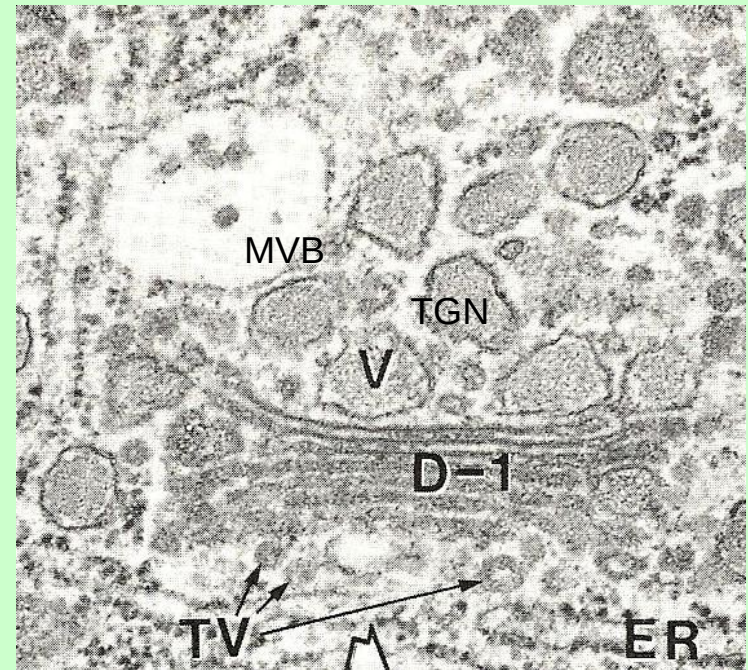
Střední a pozdní endosom – recyklují vakuolární receptory a třídí proteiny určené k degradaci ve vakuolách.

Endosomy rostlinné buňky

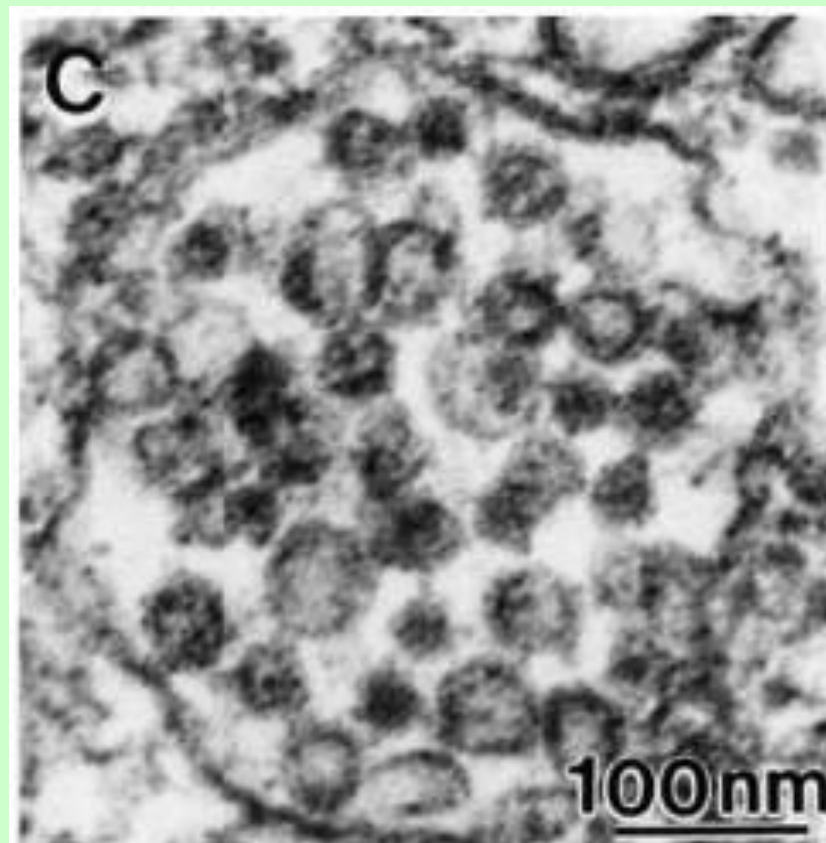
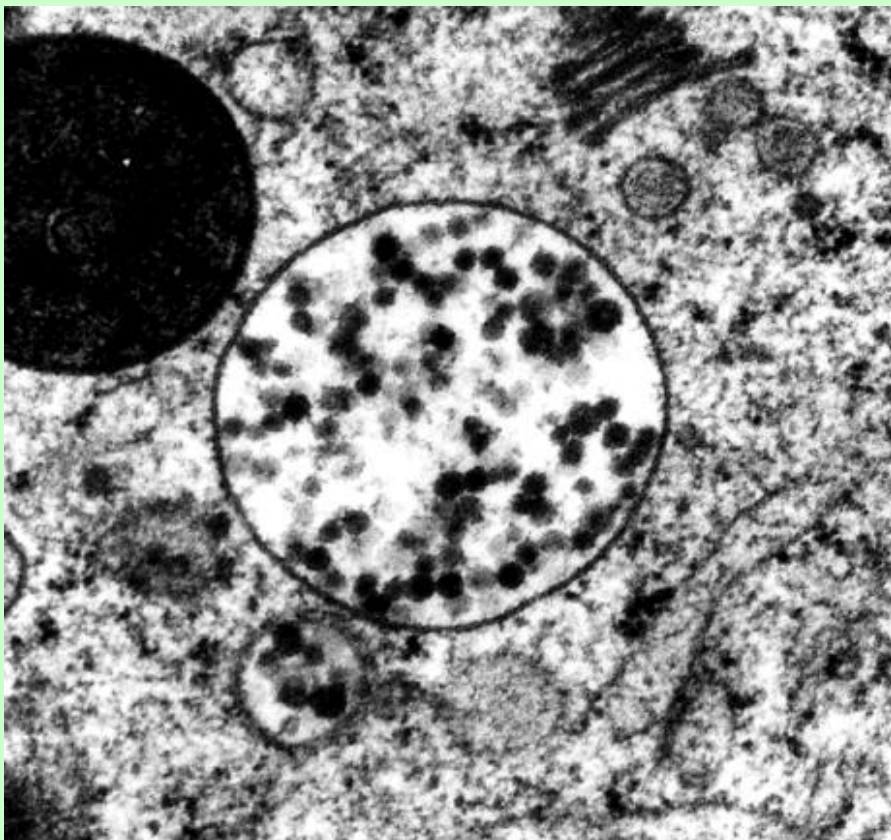
Časný endosom je **TGN**; přijímá váčky od PM, stýká se zde sekretorická a endocytotická dráha.

Recyklující endosom: ?

Střední a pozdní endosom - multivesikulární tělíska (**MVB**), též prevakuolární kompartment (**PVC**).



Multivesikulární tělíska



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

Exocytosa a endocytosa

Exocytosa:

- doprava lipidů, proteinů a jiných látek ven z buňky
- zdroj váčků: TGN, MVB/PVC?

Endocytosa:

- aktivní transport látek do buňky
- recyklace receptorů, transportérů, membrány atd.
- “downregulace” signálních molekul / pokračující signalisace
- recyklace a remodelace buněčné stěny
- cílem je časný endosom/TGN

Při obou procesech komunikuje protoplast rostlinné buňky s buněčnou stěnou.

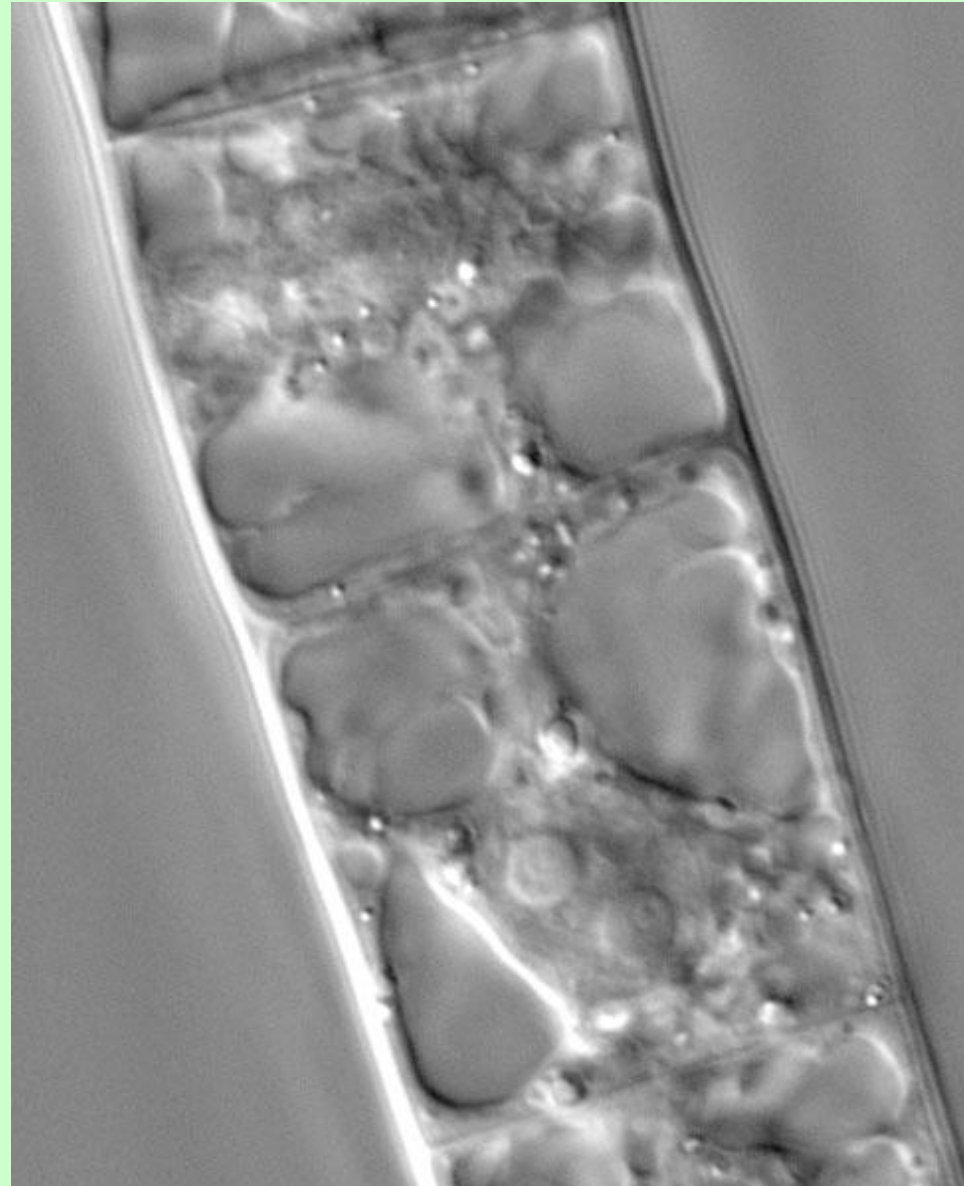
Vakuola

Z lat. vacuus – prázdný

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

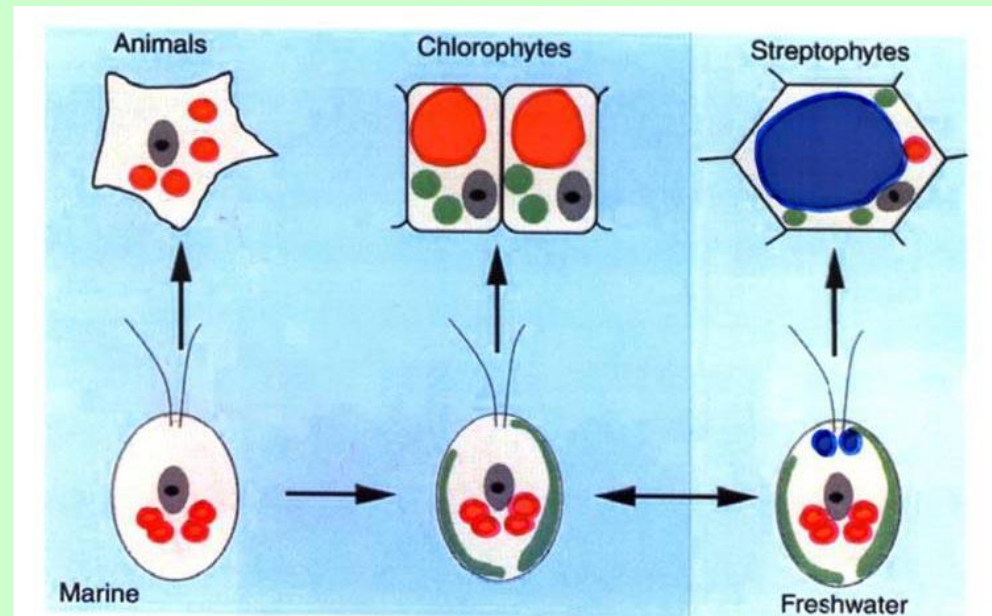
Tonoplast: membrána vakuol

Vakuom: soubor vakuol v buňce



Srovnání lytických vakuol a vakuol spojených s osmoregulací

Lytické vakuoly (lysosomy) mají všichni eukaryoti, u fotosyntetisujících prvků, řas, vznikly po jejich přechodu z moře do sladkovodního prostředí **pulsující vakuoly spojené s osmoregulací.** V důsledku fotosynthesy tam docházelo k hromadění minerálních kationtů z prostředí výměnou za uvolňované protony. V buňkách vyšších rostlin, které opustily vodní prostředí, se z pulsujících vakuol vyvinuly **velké (centrální) vakuoly,** které mohou druhotně převzít i lytickou funkci.

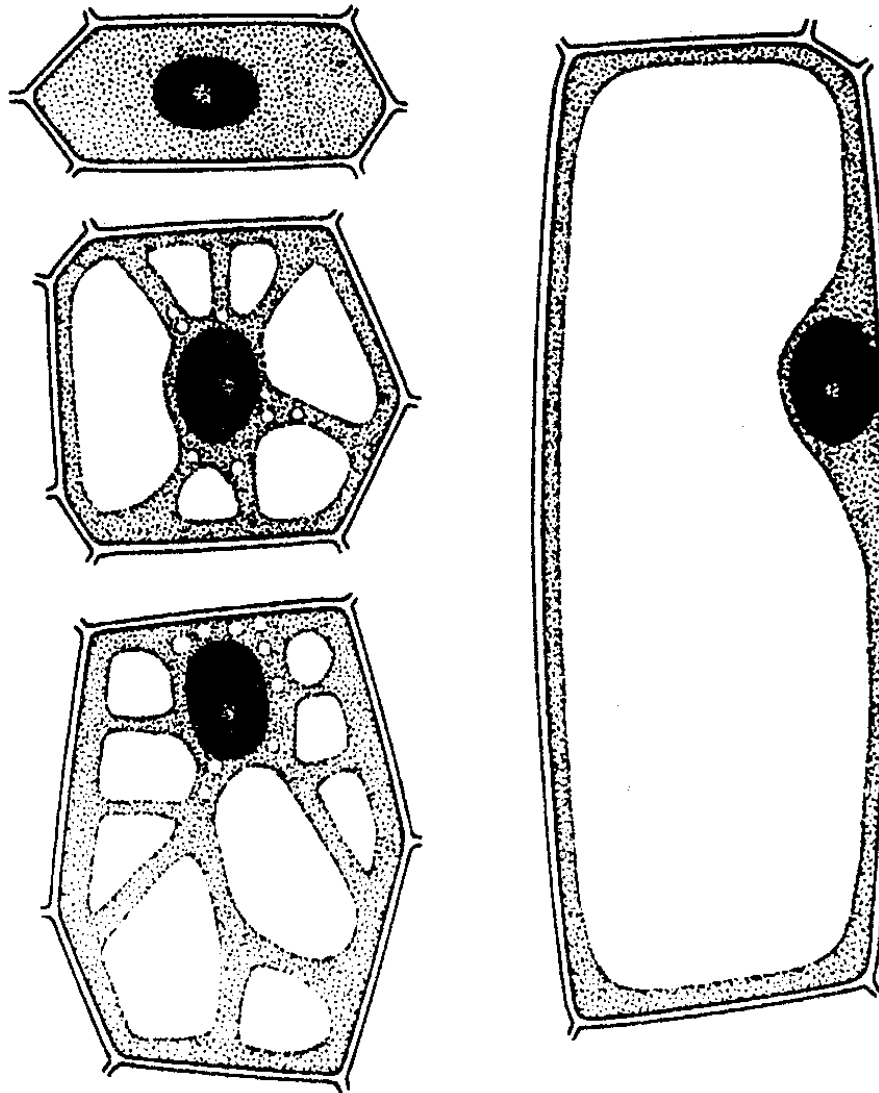


- **oranžově lytické vakuoly**
- **modře vakuoly spjaté s osmoregulací**
zeleně chloroplasty, šedě jádro s jadérkem

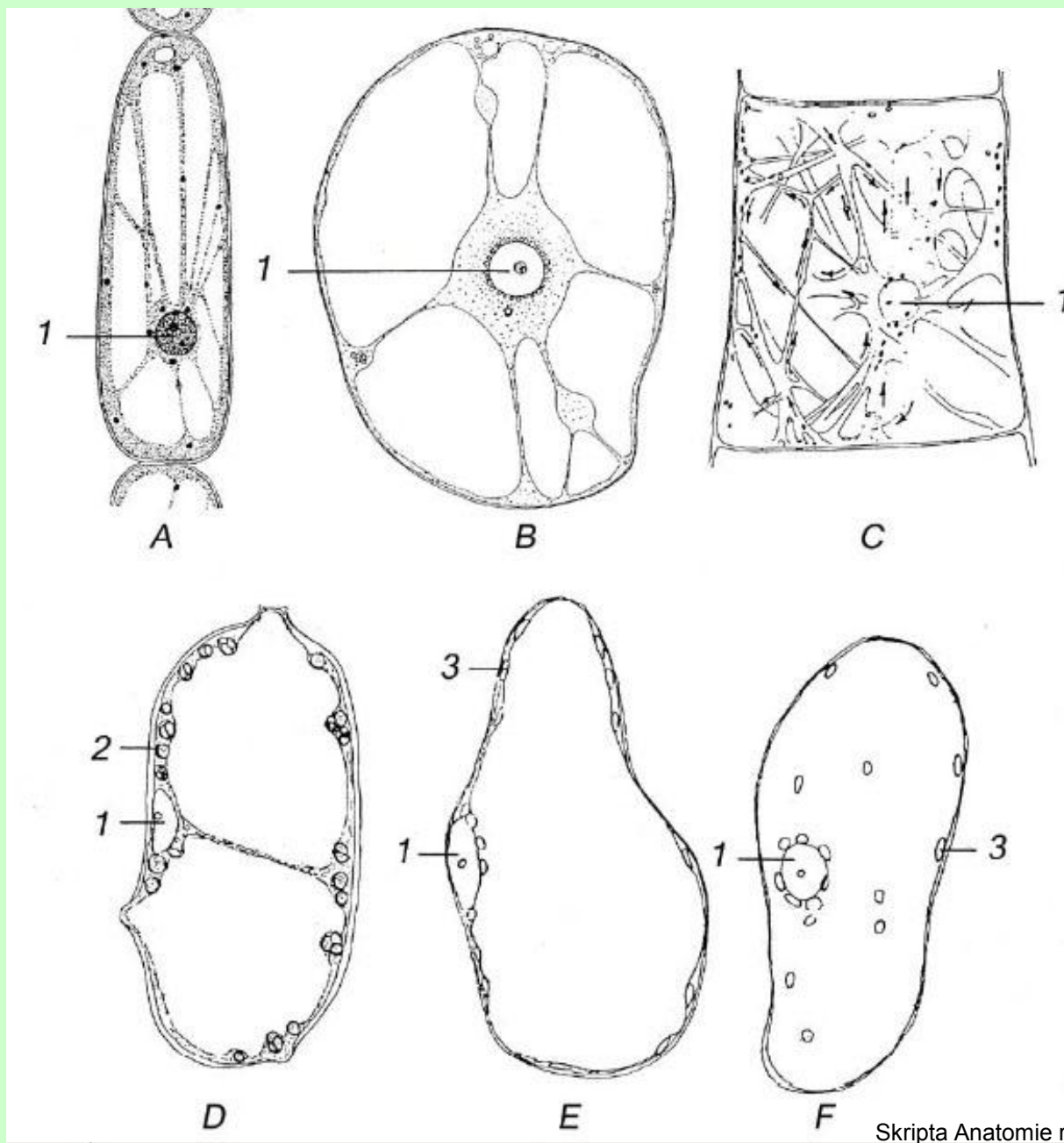
Evolution of the vacuole. Life started in a marine environment. When protists invaded the freshwater habitat contractile vacuoles developed. Streptophytes are the only major evolutionary line that evolved in a freshwater environment. Freshwater protists and seed plants are the only known organisms having different types of vacuoles.

International Review of Cytology
4:1-18, 2007

Vakuolisace rostlinných buněk



Skripta Anatomie rostlin, doc. O. Votrubová



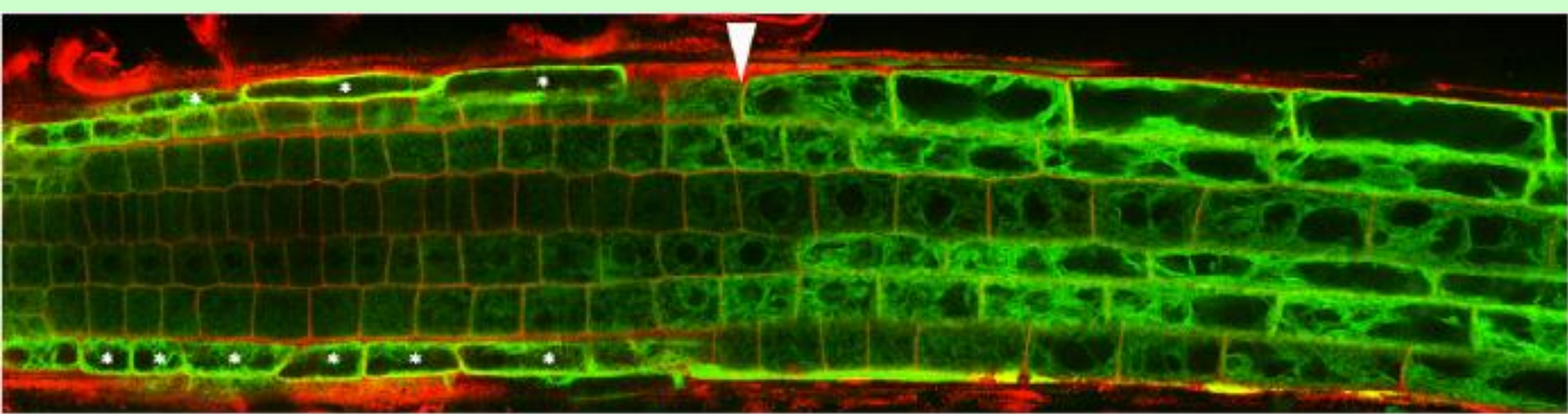
Vznik vakuol

Vakuoly mohou vznikat *de novo* z jiných kompartmentů endomembránového systému (hladké ER, snad i GA/TGN) – vznik provakuol, které se posléze zvětšují, splývají a dávají vznik vakuolám.

Vývoj vakuol - od meristému k diferencovaným buňkám kořene

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

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



Current Opinion in Plant Biology

The meristem, a model for studying vacuole biogenesis. The image illustrates the progressive formation of large vacuoles as cells enter the transition zone of the meristem (arrowhead) where cell differentiation and elongation starts. The tonoplast is labelled with a δ TIP-GFP construct (green signal) while cell walls are labelled with propidium iodide (red signal). Lateral root cap cells (asterisks). The synchronization of vacuole enlargement in differentiating cells of the meristem constitutes a very powerful system to study how vacuole biogenesis occurs and how it is regulated during development. For example, by analyzing the high-resolution map of the transcriptome of Arabidopsis roots [47], we found that the gene ontology terms endomembrane system, intracellular protein transport and vacuolar membrane are significantly enriched in longitudinal pattern gene clusters with maximums of expression in the elongating cells of the transition zone (patterns 14, 15, 18, 22, 28, 29 and 34 in [47]). Functional analysis of the trafficking genes found in these clusters may reveal their function in LV formation.

Funkce vakuol

Laciný růst buněk: zvětšování objemu buněk díky růstu vakuol

Podpůrná funkce: turgorový tlak

Lysosomální kompartment: degradace proteinů, částí cytoplasmy nebo organel, i celých buněk při programované buněčné smrti (PCD)

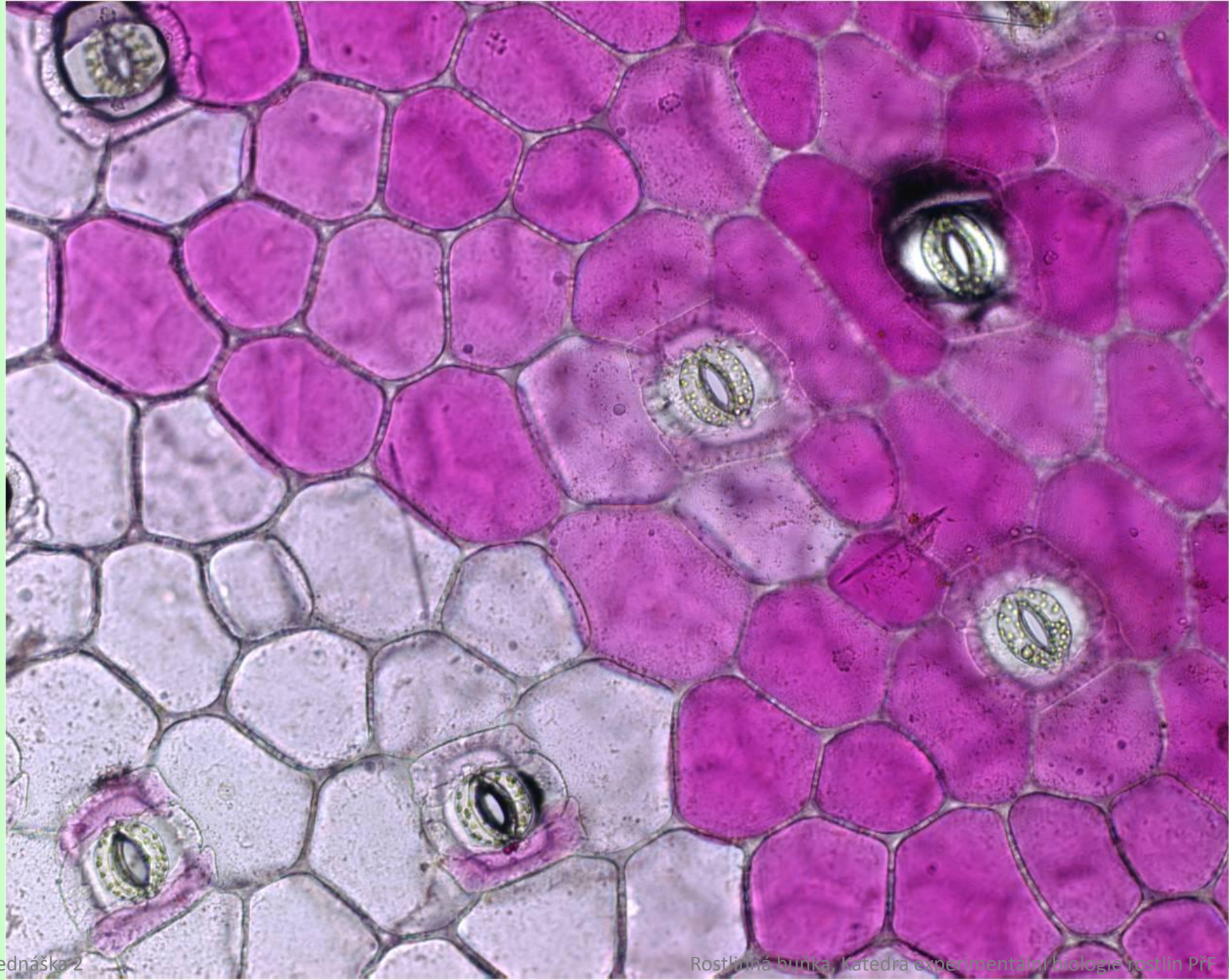
Udržení homeostase cytoplasmy: regulace pH, koncentrace iontů a dalších látek

Zásobní funkce: obsahuje vodu, krátkodobé a dlouhodobé zásoby, např. rozpustné sacharidy (nejčastěji sacharosa)

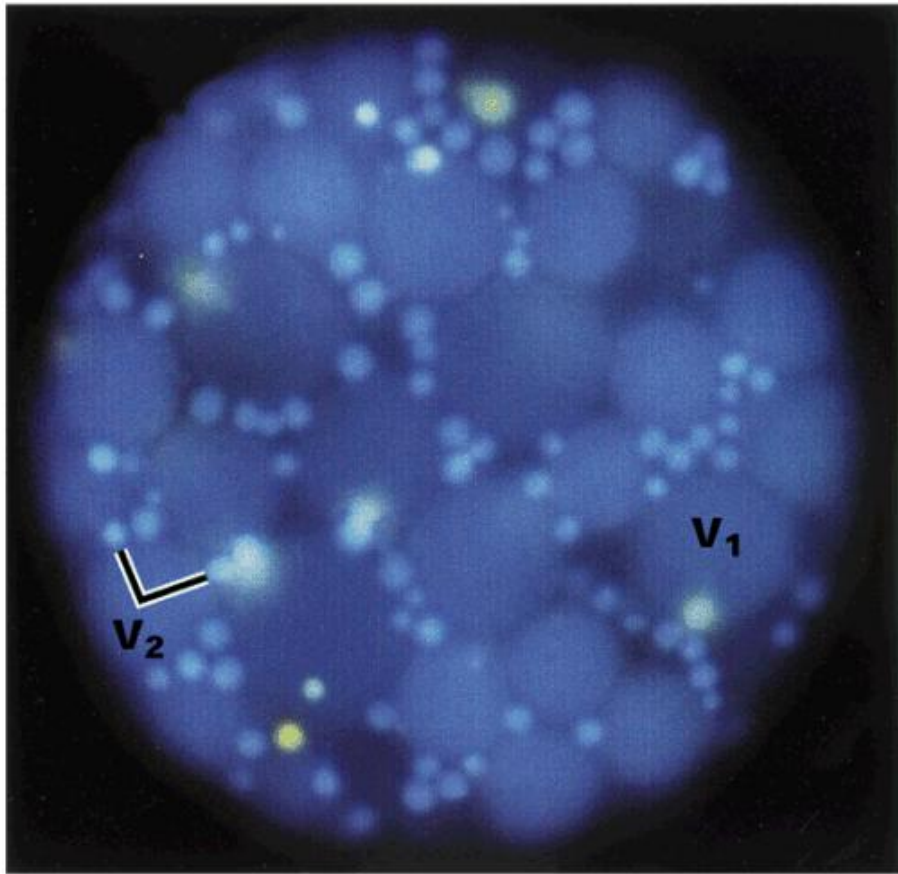
Uskladnění nepotřebných a toxických látek

Ukládání látek pro interakci rostlin s prostředím: ve vodě rozpustná barviva (hydrochromy), antibakteriální látky, látky toxické nebo nechutné pro herbivory, látky na ochranu před ultrafialovým zářením

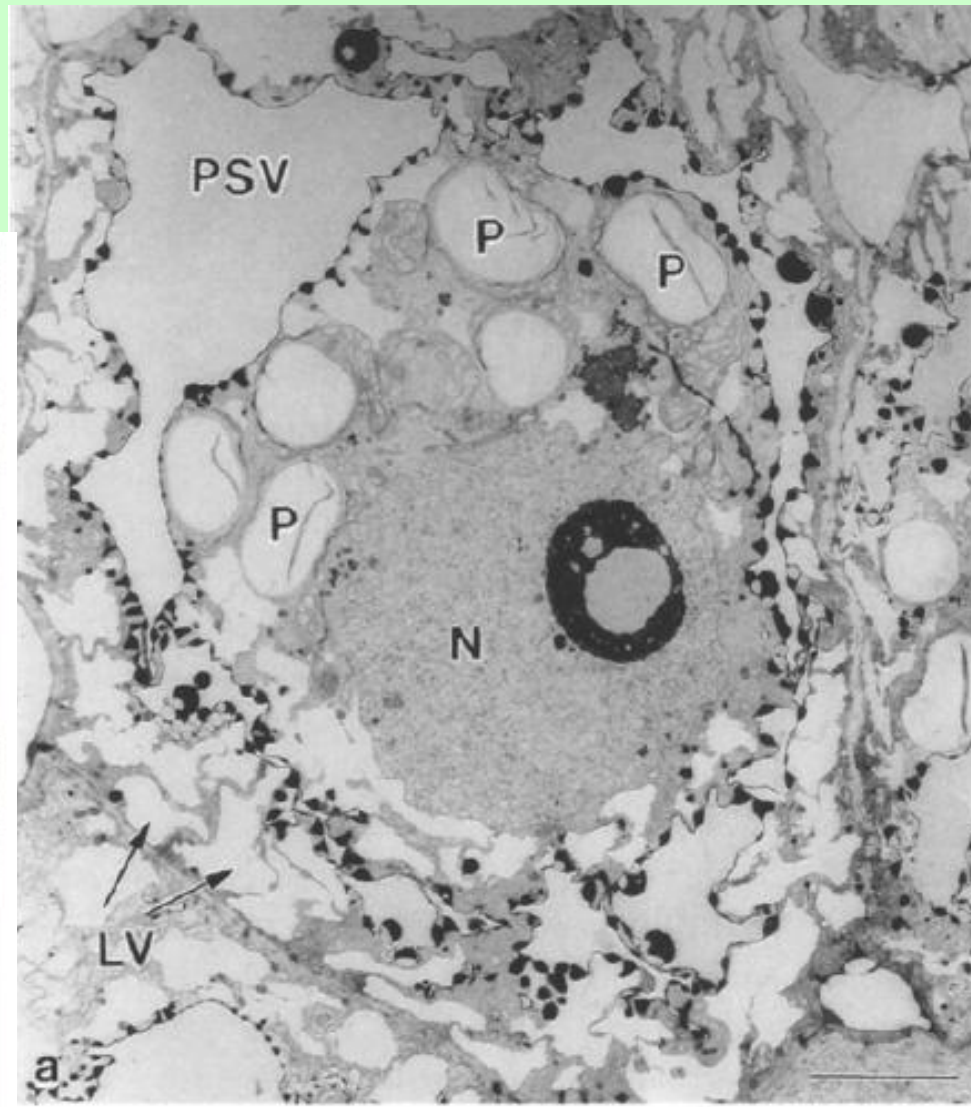
Rychlé pohyby rostlin: svěrací buňky průduchů, pohyb listů citlivky (Mimosa) – na základě změn turgoru



Více typů vakuol (zásobní a lytické) v téže rostlinné buňce



Protoplast aleuronové buňky:
PSV-V1; LV-V2



Parenchymatická buňka ve vyvíjející se děloze hrachu. PSV, LV, P-amyloplast

Protoplasma (1997) 197:1-25

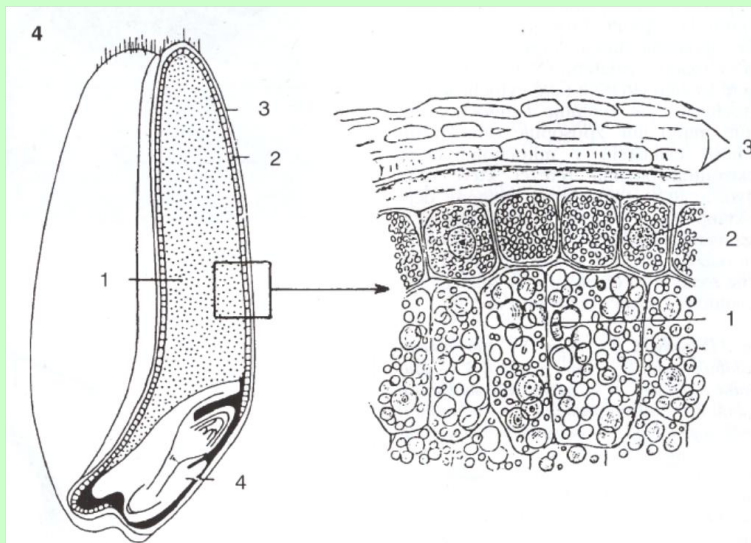
Přeměna vakuol během klíčení semen

Endosperm: vyživovací pletivo v semeni. Odumírá během prvních fází vývoje mladé rostliny poté, co jsou spotřebovány rezervní látky obsažené v jeho buňkách.

Endosperm obiliek trav:

Endosperm obilky je tvořen buňkami škrobového endospermu, který je obklopen buňkami aleuronové vrstvy se zásobními proteiny v přeměněných vakuolách.

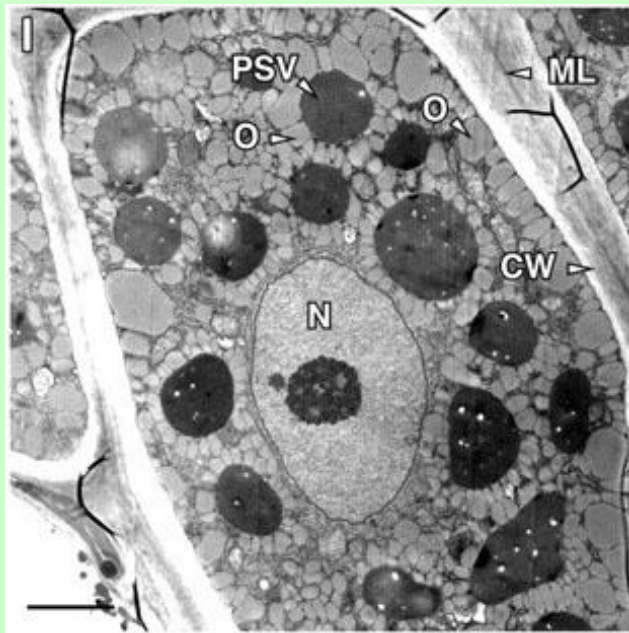
Buňky aleuronové vrstvy zůstávají živé i při dozrávání obilky. Buňky škrobového endospermu podléhají zvláštnímu typu PCD – po uložení škrobu odumírají, ale nedochází k rozložení jádra ani organel („mumifikovaný“ stav).



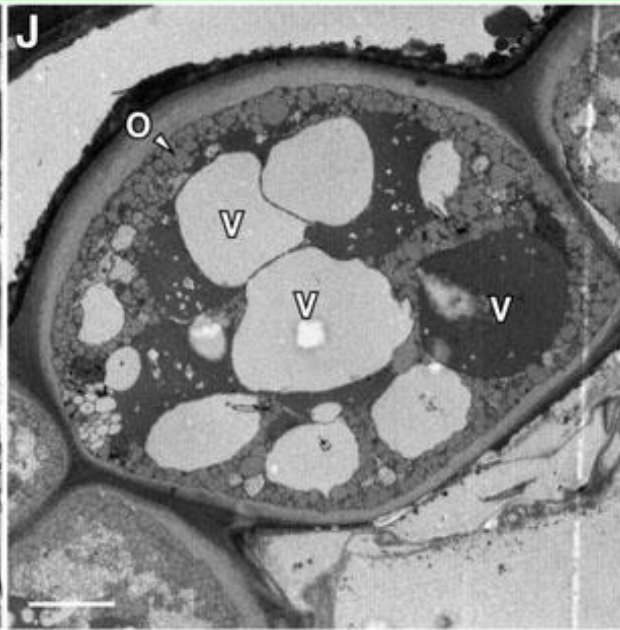
Obr. 4 Schéma stavby obilky trav. Vlevo podélný řez obilkou pšenice (*Triticum aestivum*), vpravo detail jejích povrchových vrstev. 1 — škrobový endosperm, hlavní zásobní pletivo, ve kterém probíhá při zrání obilky zvláštní způsob programované buněčné smrti — PCD (bližší viz text), 2 — buňky aleuronové vrstvy, které obsahují zásobní proteiny a během klíčení produkují enzymy rozkládající jak látky v buňkách škrobového endospermu, tak v aleuronové vrstvě; po odbourání zásob rovněž podléhají PCD, 3 — osemení a oplodí obilky, 4 — embryo. Orig. O. Votrubová, D. Bartáková

Lenochová, Kuthanová a Votrubová
2004, Živa 5:194-197

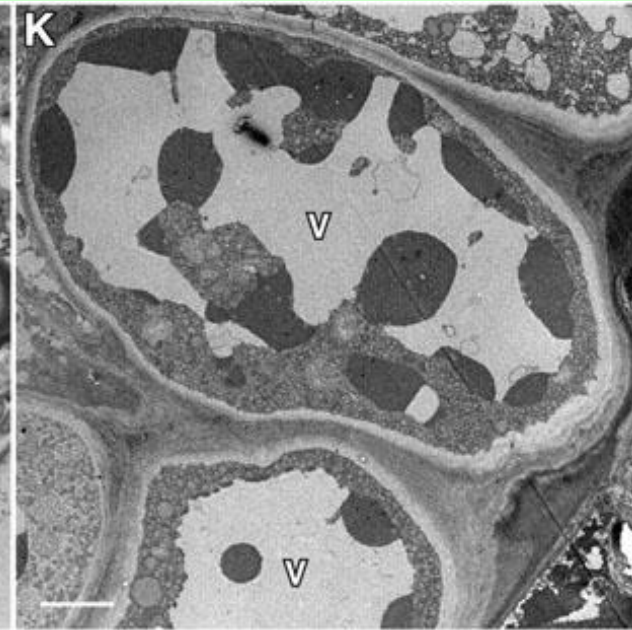
Přeměna vakuol během klíčení semen



1 h after imbibition



24 h after imbibition



Plant Physiology 143:1173-1188 (2007)

Klíčení:

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

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

Autofagie

Autofagie je degradace rozsáhlých částí cytoplasmy v lysosomálním kompartmentu (vakuole) eukaryotické buňky.

Makroautofagie: degradace částí cytoplasmy nebo organel uložením do cytosolického váčku obaleného membránou zvaného **autofagosom**, který posléze splyne s vakuolou.

Mikroautofagie: organela nebo část cytoplasmy je přímo obklopena vakuolární membránou a rozložena.

Mega-autofagie: děje se při programované buněčné smrti (PCD) prasknutím membrány vakuoly a degradací veškerého buněčného obsahu (protoplastu), nebo i buněčné stěny.

Autofagie je součástí vývoje rostlinné buňky. Zajišťuje obrat proteinů a lipidů, je ve zvýšené míře indukována hladověním.

Přehled autofagie

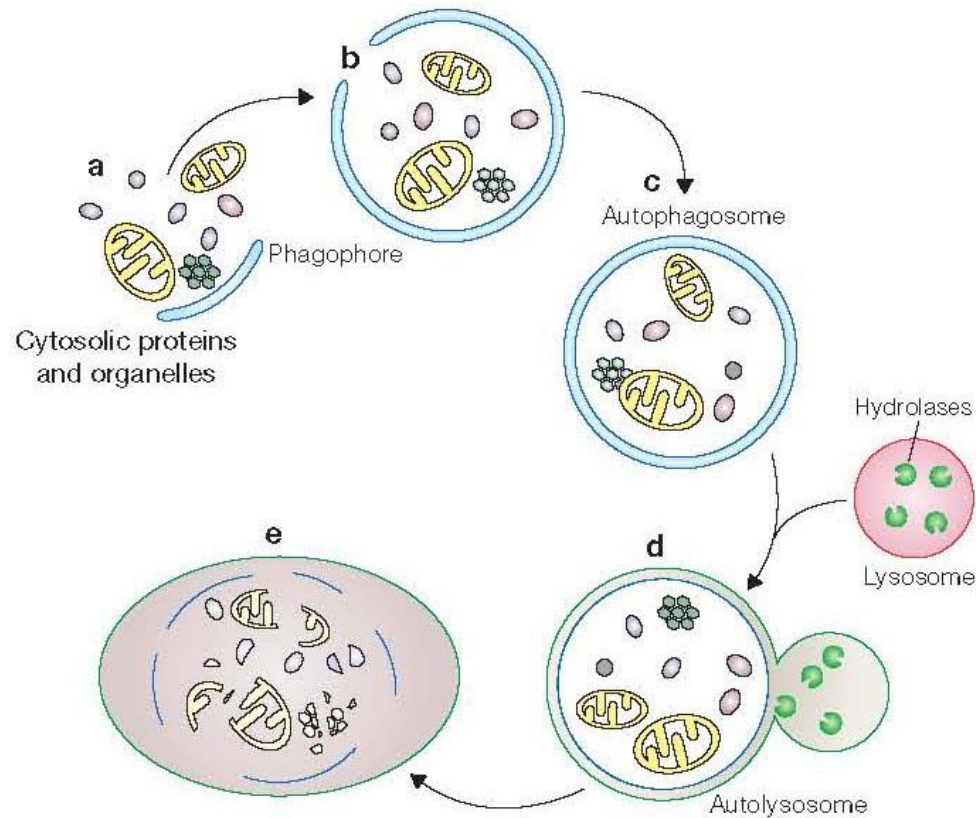
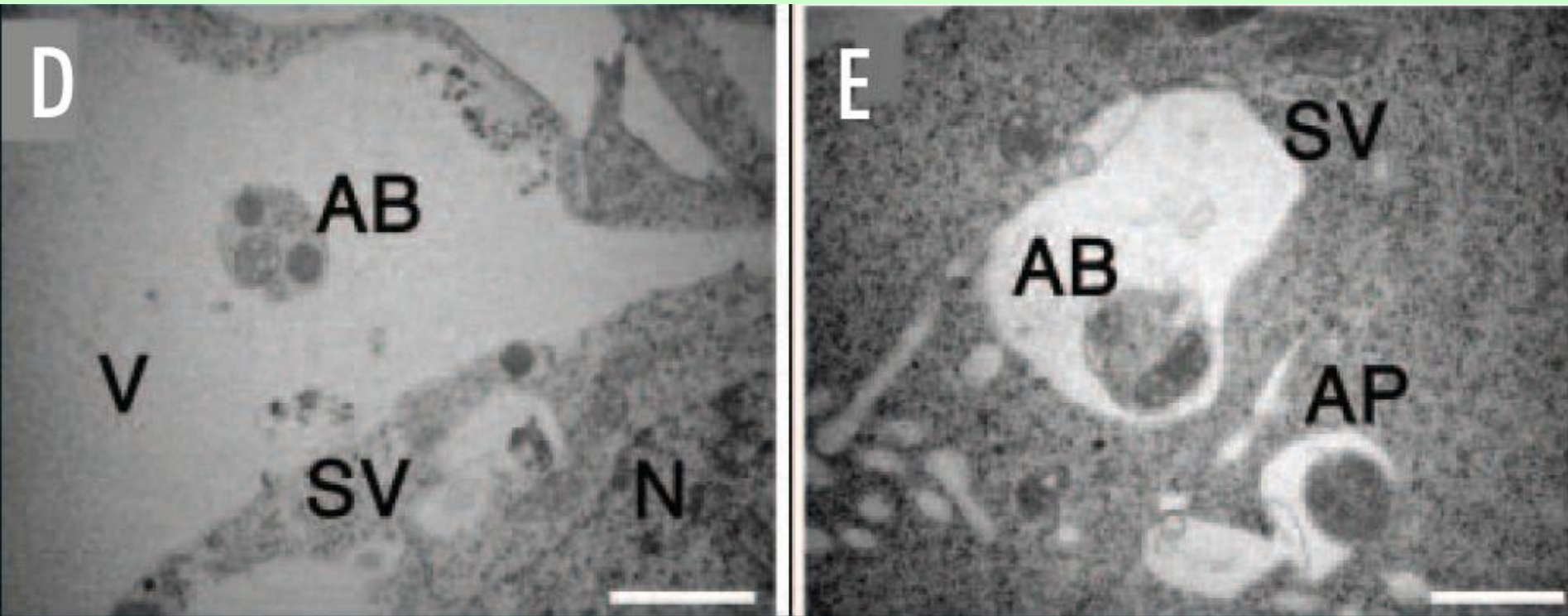


Figure 1 Schematic depiction of autophagy. (a, b) Cytosolic material is sequestered by an expanding membrane sac, the phagophore, (c) resulting in the formation of a double-membrane vesicle, an autophagosome; (d) the outer membrane of the autophagosome subsequently fuses with a lysosome, exposing the inner single membrane of the autophagosome to lysosomal hydrolases; (e) the cargo-containing membrane compartment is then lysed, and the contents are degraded.

Autofagie

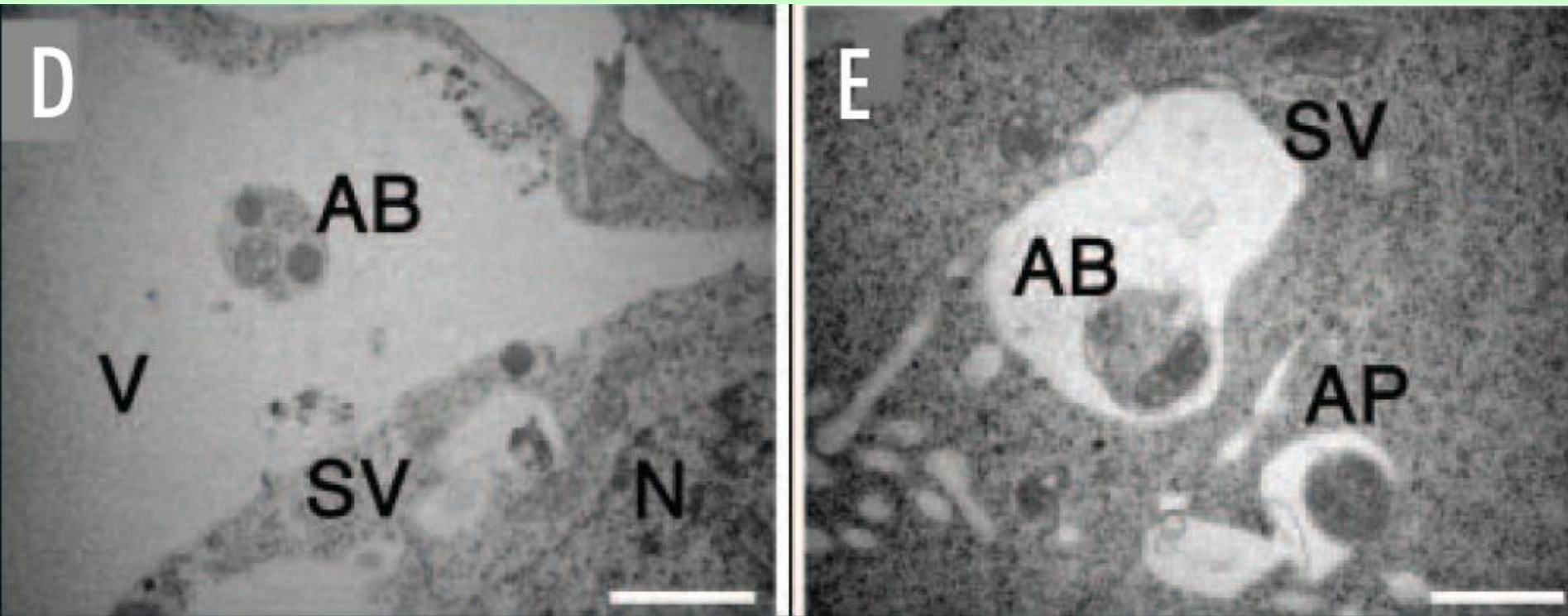


Autophagy 2:2, 96-106, April/May/June 2006

Autofagie v buňkách tabáku kultivovaných v médiu bez dusíku.

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

Autofagie



Autophagy 2:2, 96-106, April/May/June 2006

Autofagie v buňkách tabáku kultivovaných v médiu bez dusíku.

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

Role vakuol v senescenci a PCD

Senescence:

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

Programovaná buněčná smrt (PCD):

- regulovaný proces zániku buněk zahrnující aktivaci specifických enzymů, specifických signálních drah, proteosyntesu
- PCD procesy začínají v cytoplasmě, pro její dokončení je nutná vakuola
- Ke konci PCD se akumulují ve vakuole vysoké koncentrace hydrolytických enzymů. Konečnou fází je **mega-autofagie**, kdy je prasknutím vakuoly degradován celý protoplast buňky.