

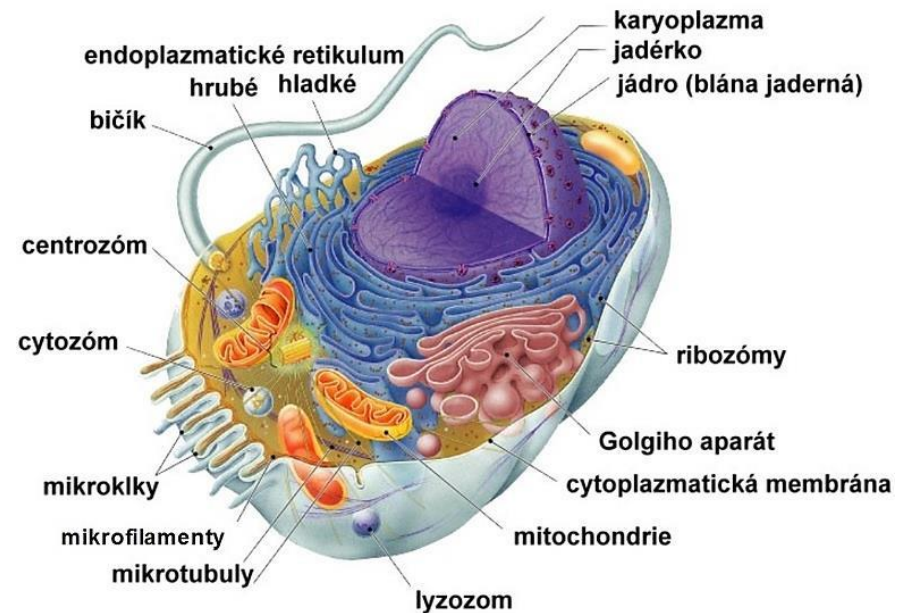
# **Molekulární biologie pro informatiky - 8**

## **Molekulární struktura eukaryotické buňky**

# Eukaryotická buňka

## Struktura buňky

- povrch buňky  
(cytoplazmatická membrána, buněčná stěna)
- základní cytoplazma
- jádro
- semiautonomní organely  
(mitochondrie, chloroplasty)
- endomembránový systém  
(Golgiho aparát, endoplazmatické retikulum,  
vezikulární útvary)
- cytoskelet

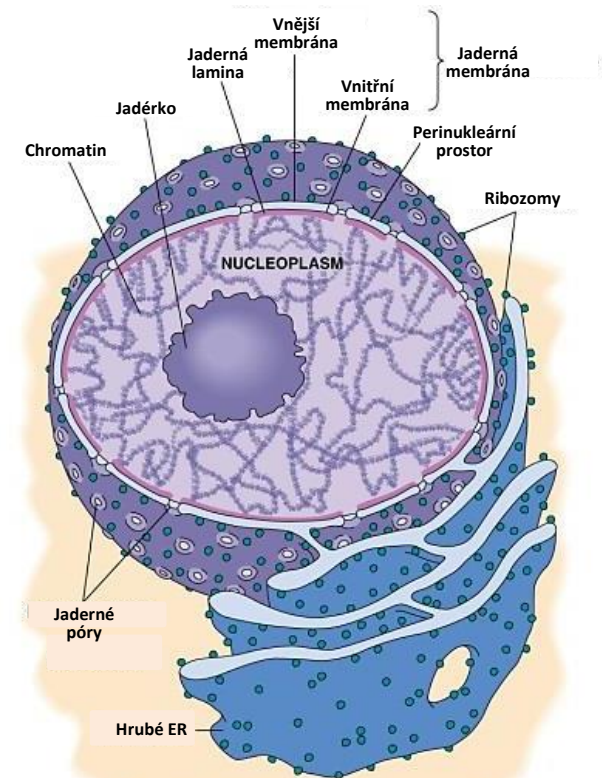
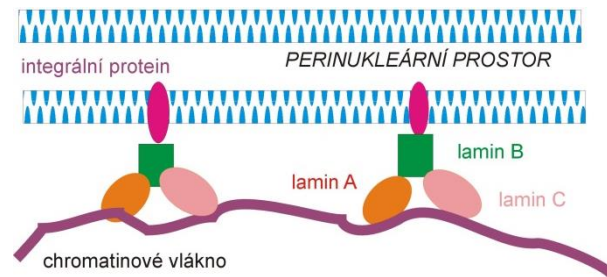
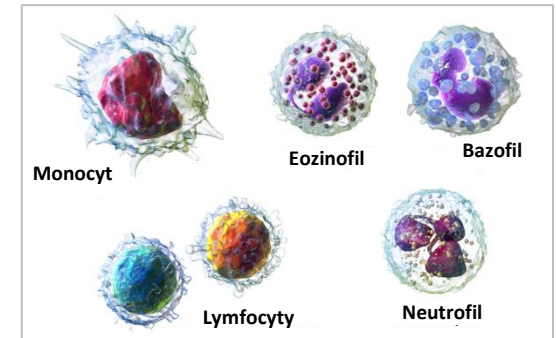


## Buněčné kompartmenty

- zajišťují oddělení a organizaci chemických reakcí v buňce
- enzymy katalyzující sled reakcí soustředěny do jednoho kompartmentu
- metabolických děje probíhají odděleně od zbytku buňky
- výhody - protichůdné chemické procesy v jedné buňce, mikroprostředí vhodné pro chemickou reakci, oddělení nebezpečných rozkladných dějů, dělba práce mezi organelami
- nevýhody - nutná koordinace procesů, biosyntéza organel, třídění proteinů pro různé cíle

# Jádro

- funkce genetická, metabolická, regulační
- různý tvar u různých buněčných typů
- výjimečně u specializovaných buněk chybí (např. erytrocyty)
- hmota uvnitř jádra = chromatin
- jaderná membrána
  - odděluje jádro od cytoplazmy
  - dvě biomembrány (šířka 7-8nm)
  - vnější membrána navazuje na membránu ER
  - perinukleární prostor (šířka 20-40 nm) navazuje na lumen ER
  - jaderné póry skrz obě membrány
- jaderná lamina
  - vyztužení vnitřní membrány, vazba chromatinu
  - lamin A, B, C; proteiny asociované s membránou
- jadérko

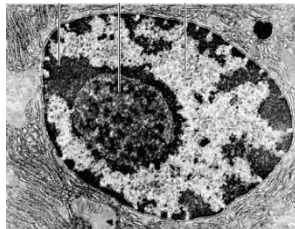
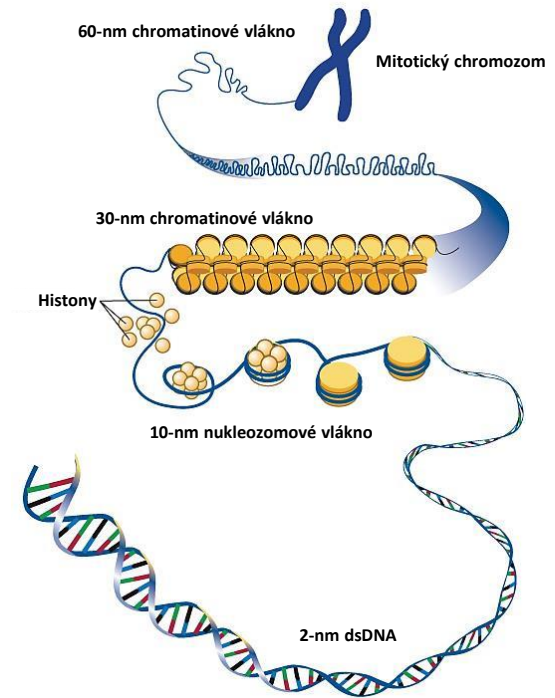


# Chromatin

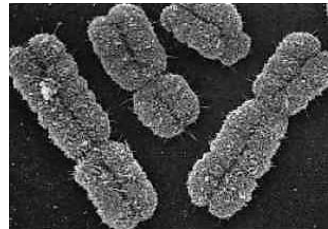
- hmota složená z dsDNA, histonů a proteinů nehistonové povahy
- kvartérní struktura DNA: dvoušroubovice DNA - nukleozomový řetězec - 30-nm chrom. vlákno - 600-nm chrom. vlákno - mitotický chromozom
- odlišné fyzikální stavy: dekonzenzovaný euchromatin  
kondenzovaný heterochromatin

## Chromozom

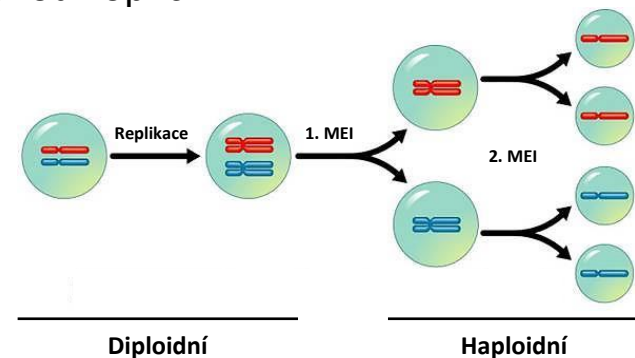
- jedna molekula DNA
- v interfázním jádře rozprostřen v chromozomovém teritoriu
- při mitóze ve formě mitotického chromozomu
- daný počet u každého druhu organismů
- haploidní sada chromozomů v pohlavních buňkách
  - jeden soubor chromozomů s kompletní genetickou informací
  - každý chromozom pouze jednou
- diploidní sada chromozomů v somatických buňkách
  - dvě kompletní sady chromozomů, každý chromozom ve dvou kopiích



Interfáze



Mitotické chromozomy



# Jaderná DNA

## Velikost jaderného genomu

- hodnota C = velikost jaderné složky haploidního genomu daného druhu
- paradox hodnoty C = neexistuje vztah mezi velikostí genomu a biologickou komplexitou organismu
- jednotky Mb - stovky Gb

Druh	Velikost genomu (bp)	Počet chromozomů v haploidním genomu	Počet genů
<i>S. cerevisiae</i>	$1,2 \times 10^7$	16	5.770
<i>C. elegans</i>	$1,0 \times 10^8$	4	21.700
<i>D. melanogaster</i>	$1,2 \times 10^8$	4	17.000
<i>Xenopus laevis</i>	$3,1 \times 10^9$	18	
<i>Mus musculus</i>	$2,8 \times 10^9$	20	23.000
<i>Homo sapiens</i>	$3,3 \times 10^9$	23	21.000
<i>Zea mays</i>	$5,0 \times 10^9$	10	50.000
<i>Allium cepa</i>	$1,5 \times 10^{10}$	8	

## Genové repetice

- jednotkou repetice je gen
- u mnohobuněčných organismů se 50 - 75 % strukturních genů vyskytuje ve dvou nebo více kopiích

### 1. tandemové genové repetice

- geny či skupiny genů které se opakují bezprostředně za sebou
- nukleotidové sekvence které oddělují jednotlivé geny či skupiny se nazývají mezerníky
- např. geny přepisované do 5S rRNA (250x), tRNA (10-100x)  
geny kódující histony (20x skupina genů kódující všech pět histonů)

### 2. rozptýlené genové repetice

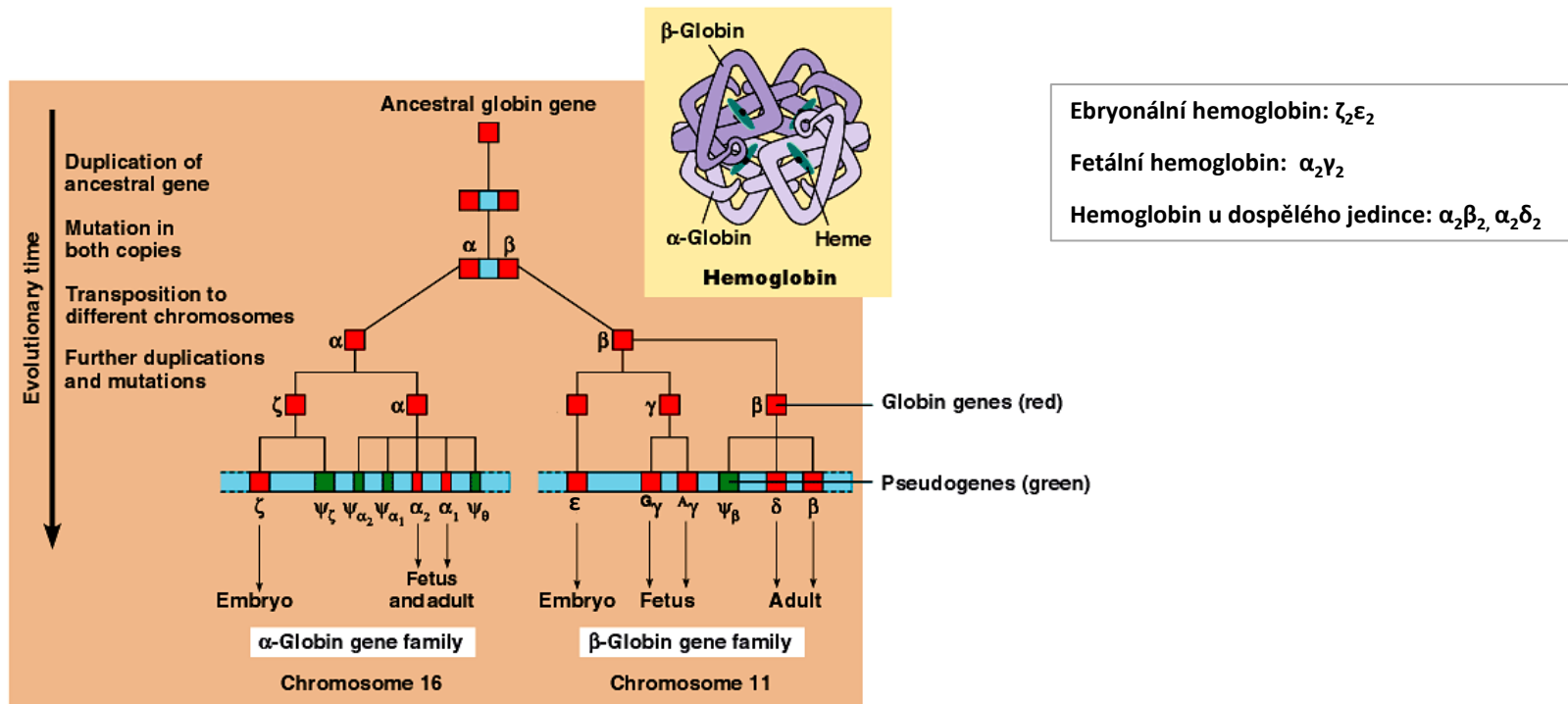
- gen nebo skupina genů s kopiemi na různých místech haploidního genomu
- např. některé geny pro tRNA, snRNA, aj.

# Jaderná DNA

## Genové repetice

### 3. genové rodiny

- skupina sekvenčně příbuzných genů
- společný evoluční původ a biologická funkce genů
- často se geny v rámci rodiny nevyjadřují současně ve stejném vývojovém stádiu organismu
- např. geny kódující polypeptidové řetězce hemoglobinu, ve dvou genových rodinách pseudogeny = nepřesné kopie strukturních genů (inaktivní)



# Lidský genom

Celková velikost ~3.200.000.000 bp

Počet genů ~ 20.500 (odhad před sekvenací 150.000)

Odlišnosti v rámci druhu Homo sapiens ~ 0,1 %

Homologie s ostatními primáty 96 % (celkem), 99 % v genech

26 % z celkové sekvence genomu přepisováno do RNA

1,5 % sekvencí kóduje proteiny nebo funkční RNA

## Lidský karyotyp

- 23 párů chromozomů
- 22 párů autozomů (homologní chromozomy)
- 1 pár gonozomů (pohlavní chromozomy X a Y)
- dělení do 7 skupin podle makrostavby chromozomu

**A** – 1, 2, 3

**B** – 4, 5

**C** – 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, X

**D** – 13, 14, 15

**E** – 16, 17, 18

**F** – 19, 20

**G** – 21, 22, Y

velké metacentrické

velké submetacentrické

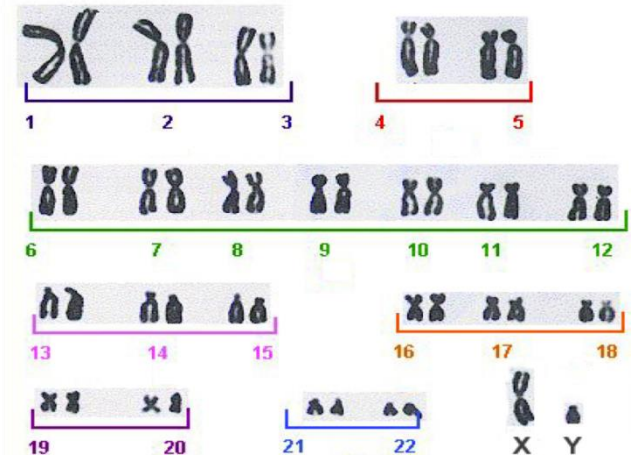
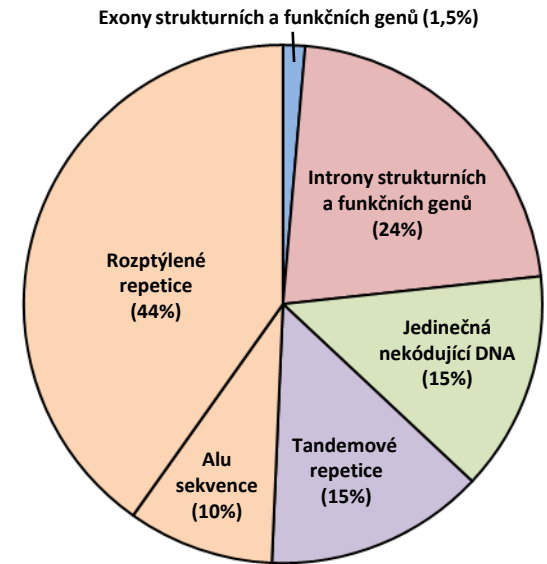
střední submetacentrické

střední akrocentrické

malé submetacentrické

malé metacentrické

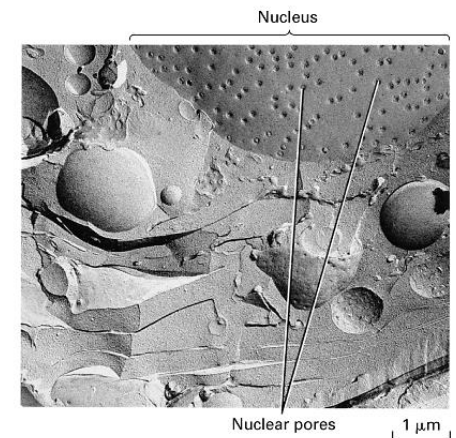
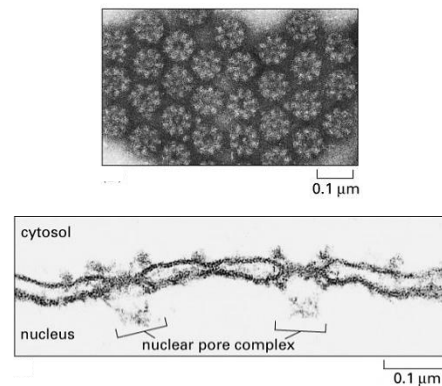
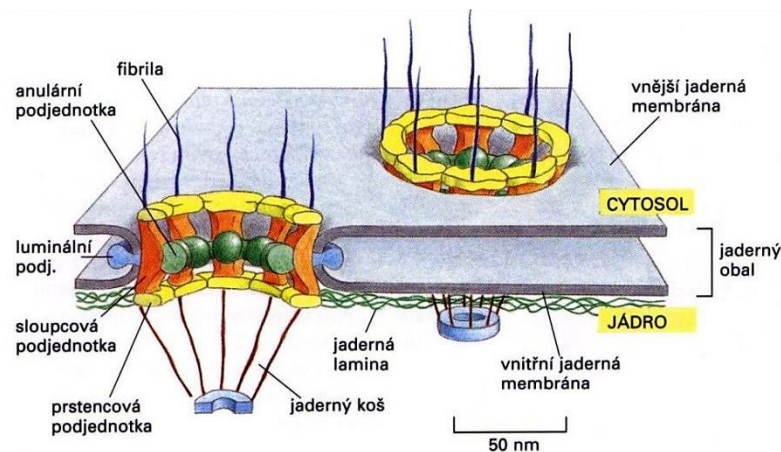
malé akrocentrické



# Transport přes jaderný pór

## Jaderný pór

- kanál skrz obě jaderné membrány obklopený komplexem proteinů
- 3000 - 4000 pórů v jádře savčích buněk, průměr 120 nm, výška 200 nm
- komplex zhruba 100 různých proteinů (nukleoporinů), osmičetná symetrie
- cytoplazmatická strana - kruh s vlákny
- nukleoplazmatická strana - kruh v jaderné lamině, struktura ve tvaru koše
- místo transportu molekul mezi jádrem a cytoplazmou
- pasivní transport - volná difuze menších molekul rozpuštěných ve vodě
- aktivní transport - selektivní transport molekul s třídícími signály; RNA, proteiny, makromolekuly
  - transportní proteiny (importiny, exportiny) se po naložení přenášené molekuly váží k jadernému póru a celý komplex je skrz něj translokován
  - jednostranný transport zajišťuje Ran: Ran-GTP v jádře, Ran-GDP v cytoplazmě

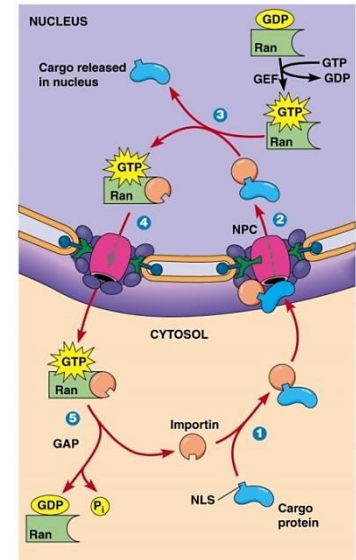
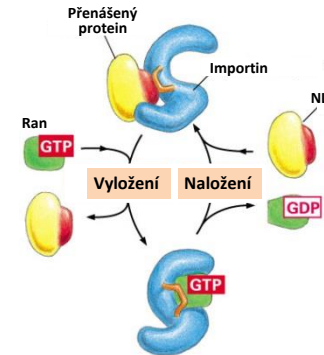




# Transport přes jaderný pór

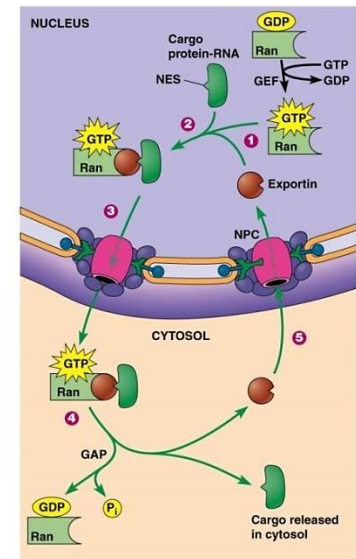
## Transport do jádra, import

- chromatinové proteiny, laminy, ribozomální proteiny, DNA/RNA-polymerázy, TF
- proteiny určené do jádra obsahují jadernou lokalizační sekvenci (NLS)
- NLS rozeznána importinem - vazba k jadernému póru - import do jádra
- vazba Ran-GTP na importin - vytěsnění přenášeného proteinu
- export Ran-GTP/importin z jádra
- RanGAP stimuluje hydrolýzu Ran-GTP na Ran-GDP
- disociace Ran-GTP/importin
- regulace TF blokováním jejich NLS a zadržením v cytoplasmě (např. NFκB / IκB)



## Transport z jádra, export

- molekuly mRNA, tRNA, ribozomové podjednotky
- jaderná exportní sekvence (NEL) bohatá na Leu
- vazba Ran-GTP k exportinu zvyšuje jeho afinitu k NEL - naložení exportovaného proteinu - vazba k jadernému póru export z jádra - hydrolýza Ran-GTP na Ran-GDP - uvolnění přenášené molekuly
- mRNA exportována ve formě hnRNP, kdy alespoň jeden z proteinů obsahuje NES
- rRNA se spojuje s importovanými ribozomálními proteiny, z jádra exportovány podjednotky ribozomů



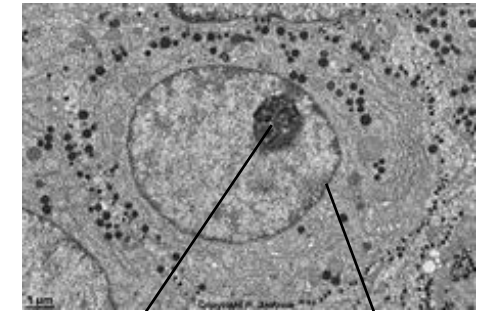
# Jadérko

Struktura v jádře buňky neohraničená membránou

Syntéza molekul rRNA, sestavení ribozomálních podjednotek

**Organizátor jadérka (NOR, Nucleolus Organizer Region)**

- krátká raménka akrocentrických chromozomů 13, 14, 15, 21, 22
- tandemové repetice rDNA (13,7 kb; geny pro rRNA)
- RNA Pol I přepisuje rDNA do 45S pre-rRNA
- štěpení na 18S, 5.8S a 28S rRNA (snoRNP)

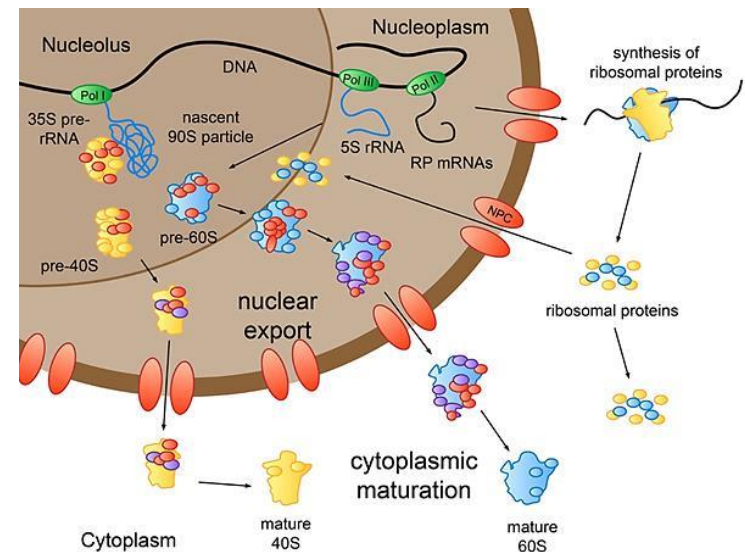
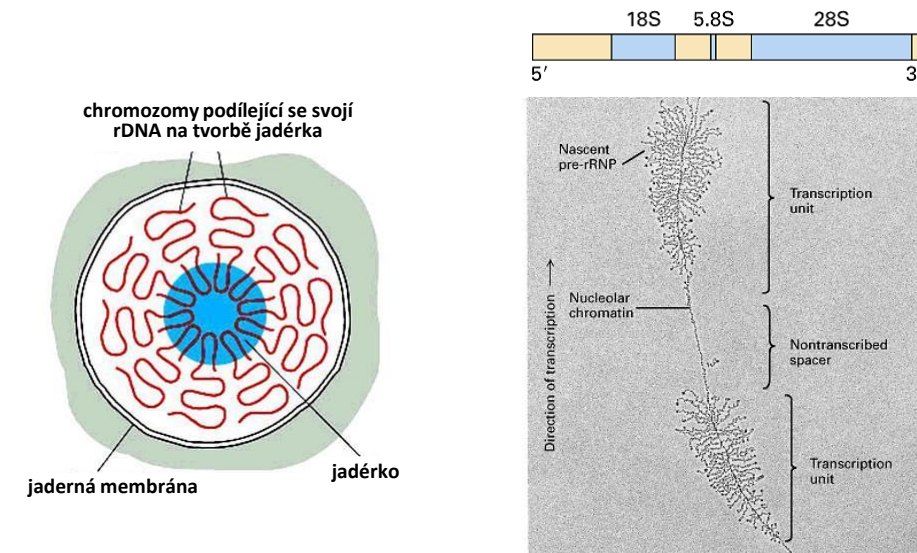


jadérko

jaderná membrána

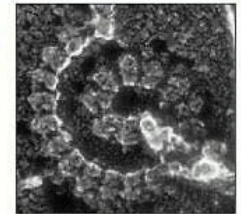
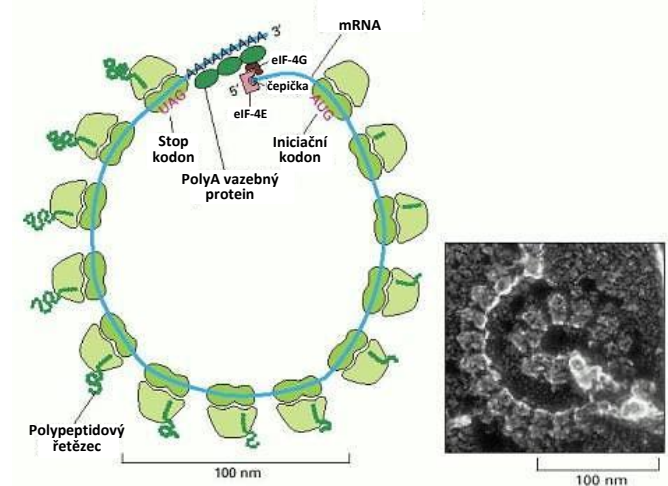
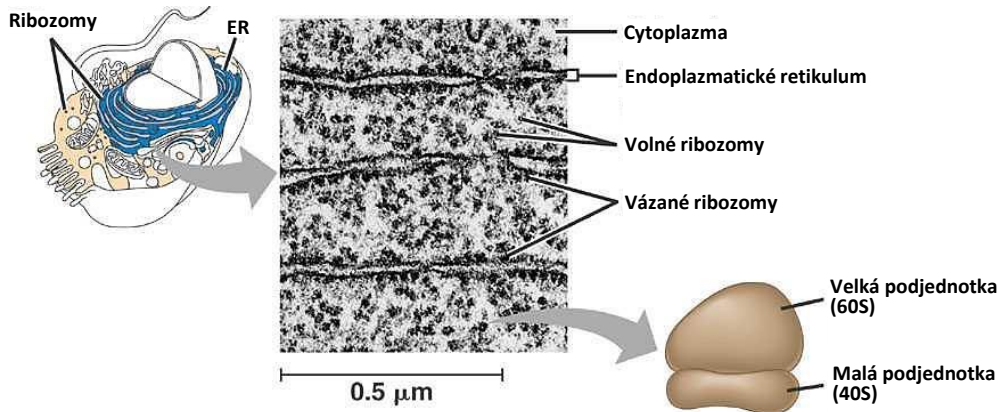
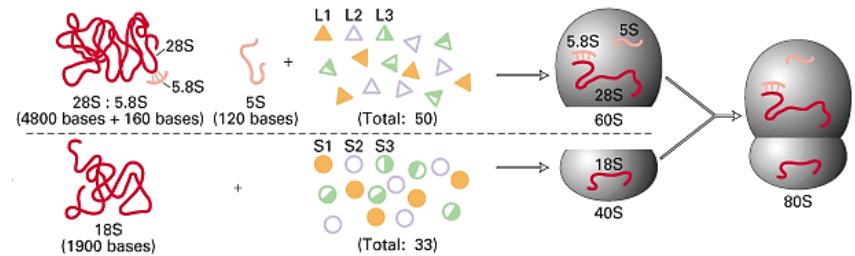
5S rRNA přepisována mimo jadérko (RNA Pol III)

Import ribozomálních proteinů do jádra - sestavení ribozomálních podjednotek - export podjednotek z jádra, všechny kroky regulovány řadou exportních proteinů, které zajišťují správnou tvorbu ribozomů



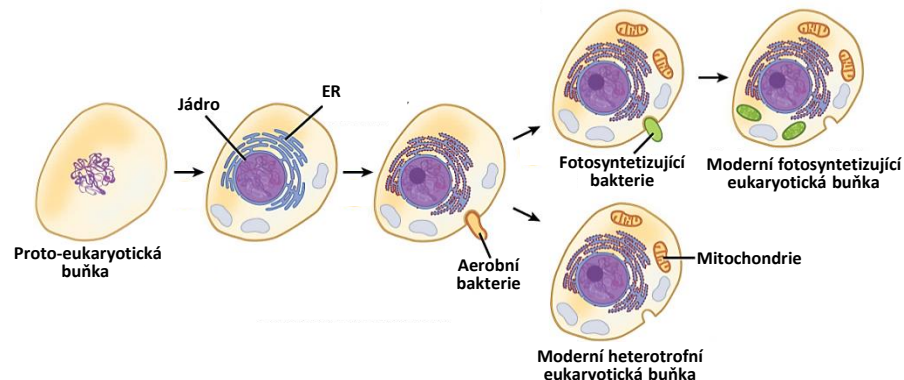
# Ribozomy

- 15 - 25  $\mu\text{m}$ , 80S, neohraničeny membránou
- volně v cytoplazmě nebo vázané na ER
- ribonukleoproteinové částice
- složené ze dvou podjednotek
  - vznik v jadérku, spojení v cytoplazmě
  - 60S: 5S, 5.8S, 28S rRNA; 50 L proteinů
  - 40S: 18S rRNA; 30 S proteinů
- funkce: syntéza proteinů na základě genetické informace uložené v mRNA
- polyribosom: řada ribozomů připojených na jedinou molekulu mRNA, stočen do kruhu



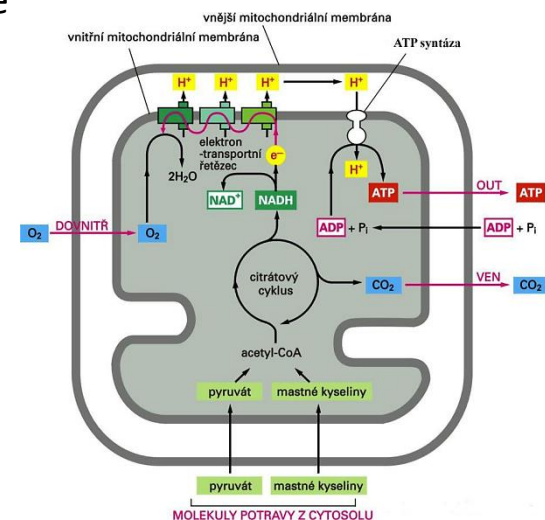
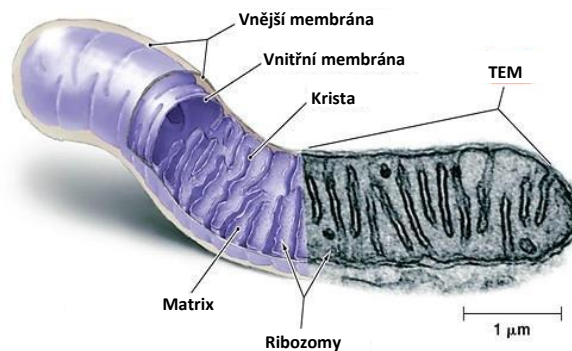
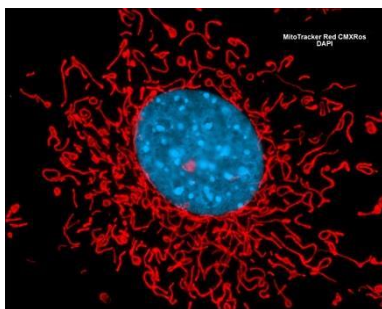
# Semiautonomní organely

- obal ze 2 membrán, energetická centra buňky
- vlastní proteosyntetický aparát a DNA
- syntéza mnoha jejich proteinů probíhá v cytoplasmě a je řízena jadernými geny
- endosymbiotická teorie jejich vzniku při evoluci eukaryotické buňky



## Mitochondrie

- 0,1 - 10  $\mu\text{m}$ , protáhlá tělíska, několik set v jedné buňce
  - dvě biomembrány - vnější hladká, vnitřní je zvrásněna a vytváří přepážky (tzv. křtiny)
    - dva kompartmenty: mezi membránami / matrix mitochondrie mezi křtinami
  - organely buněčného dýchání, získá ATP
  - enzymy oxidativní fosforylace a dýchacího řetězce na vnitřní membráně
  - v matrix umístěny enzymy Krebsova cyklu a katabolismu MK
- mitochondriální DNA a ribozomy



# Mitochondriový genofor

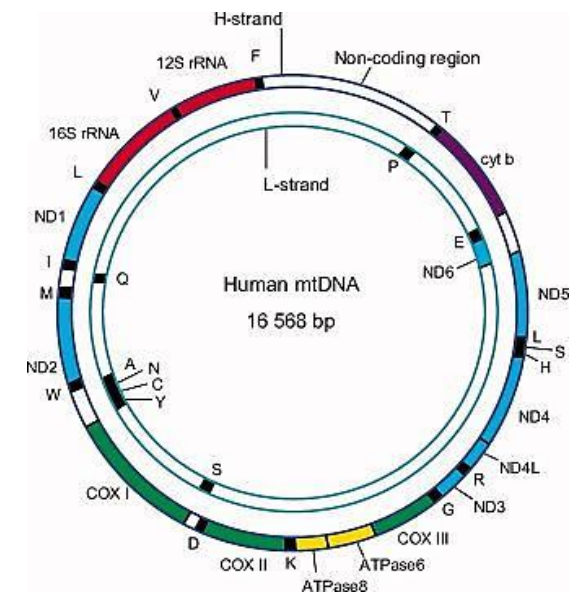
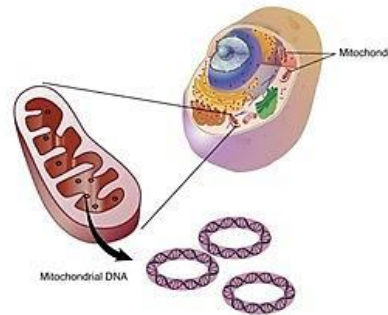
Heterogenita ve velikosti, tvaru a konformaci mtDNA v závislosti na fylogenetickém postavení druhu  
např. mnohobuněční živočichové - kružnicová dsDNA, 16 - 20kb, každý druh má svůj vlastní typ  
vyšší rostliny - kružnicová či lineární dsDNA, 250 - 2000kb, variabilní uspořádání genů

Většinou 5 - 10 molekul dsDNA na mitochondrii

Biochemické děje mitochondrií zajišťují proteiny kódované jak mitochondriálními tak jadernými geny

## Genofor mitochondrií člověka

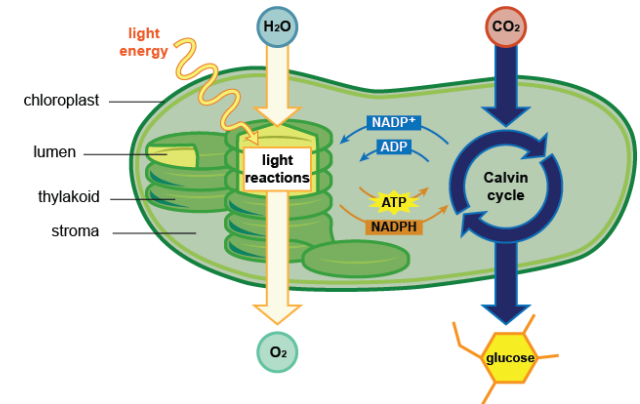
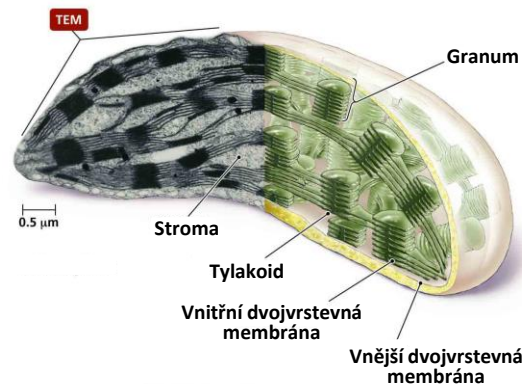
- geny pro funkční RNA
  - 2 molekuly rRNA (12S a 16S)
  - 22 molekul tRNA
- 13 strukturních genů
  - cytochrom c-oxidáza: COI, II, III (10)
  - NADH-dehydrogenáza: ND1-ND6 (41)
  - ATP-syntáz: ATPáza 6 a ATPáza 8 (14)
  - ubichinon-cytochrom b-reduktáza: cyt b (10)
- geny pro ribozomové proteiny a DNA- a RNA-polymerázy nahrazeny jadernými geny
- u živočichů jsou mitochondriální geny jednoduché u hub a rostlin je řada z nich složených



# Semiautorní organelly

## Chloroplasty

- na povrchu dvojitá biomembrána
- thylakoidy - propojený systém plochých vaků, vznik vychlípáním a odškrcením od vnitřní membrány
  - navrstvení do tzv. gran, obsahují fotosyntetické pigmenty (zelený chlorofyl)
- tři kompartmenty - mezi membránami obalu, lumen thylakoidů
  - stroma (matrix): vnitřní základní hmota, která obsahuje DNA, ribozomy a inkluze



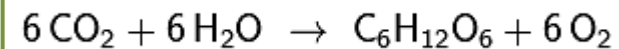
- oxygenní fotosyntéza

### i) světelná fáze fotosyntézy

- závislá na světle, probíhá v thylakoidech
- přeměna světelné energie na chemickou, vznik ATP a NADPH, vedlejším produktem je O<sub>2</sub>

### ii) temnostní fáze fotosyntézy

- nezávislé na světle, ve stromatu
- uložení chemické energie fixací CO<sub>2</sub> do sacharidů, tvorba glukózy a zásobních látek (škrob)



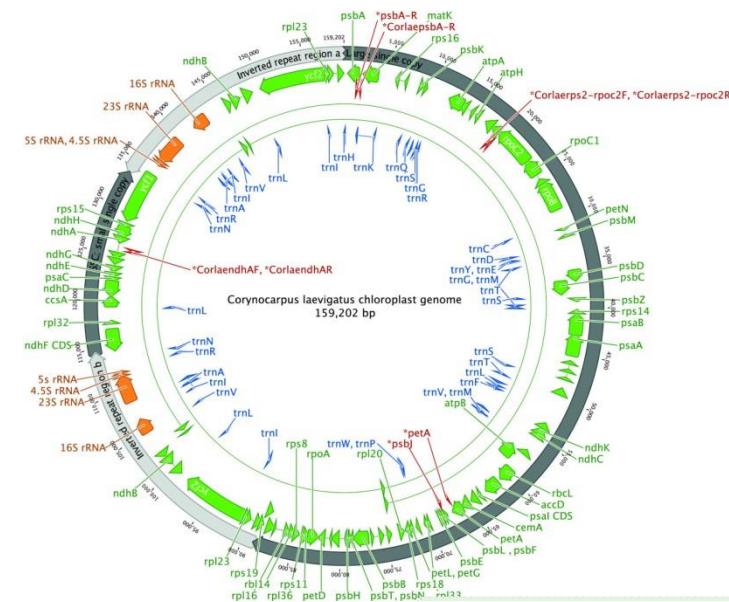
# Chloroplastový genofor

Genom rostlinné buňky rozdělen do jádra, mitochondrií a chloroplastů

Kružnicová dsDNA, 40-220 kb

Jednotná ve struktuře a organizaci genů napříč druhy:

- dvě obrácené repeticce
- krátký a dlouhý jednokopiový úsek (SSC-úsek, LSC-úsek)
- polygenní transkripční jednotky
- geny pro podjednotky RNA-polymerázy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\beta''$ )
- geny pro rRNA (5S, 4,5S, 16S, 23S)
- geny pro tRNA (30 druhů)
- geny pro ribozomové proteiny
- geny pro proteiny fotosyntézy
  - velká podjednotka RuBisCo
  - proteiny fosfosystému I a II
  - podjednotky ATP-syntázy
  - podjednotky NADH-dehydrogenázy



## Zvláštnosti genomu rostlin

- vzájemná závislost a spolupráce jaderná, mitochondriové a chloroplastové složky genomu
- rozdíly ve velikosti jaderného genomu vlivem různého počtu mnohonásobných repetičí
- mnohé geny součástí genových rodin (evoluční přežití rostlinného druhu)

# Cytoplazmatická membrána

## Funkce

- soudržnost buňky a její ochrana před vnějšími vlivy
- dává buňce tvar, ukotvení cytoskeletu
- semipermeabilita (polopropustnost) - regulovaný transport látek mezi buňkou a okolím
- podíl na adhezi buněk a buněčné signalizaci

## Složení

### i) lipidy

- amfifilní dvojvrstva: hydrofilní polární část  
hydrofóbní nepolární část
- tři skupiny: fosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidylinositol, fosfatidylserin), glykolipidy, cholesterol

### ii) proteiny

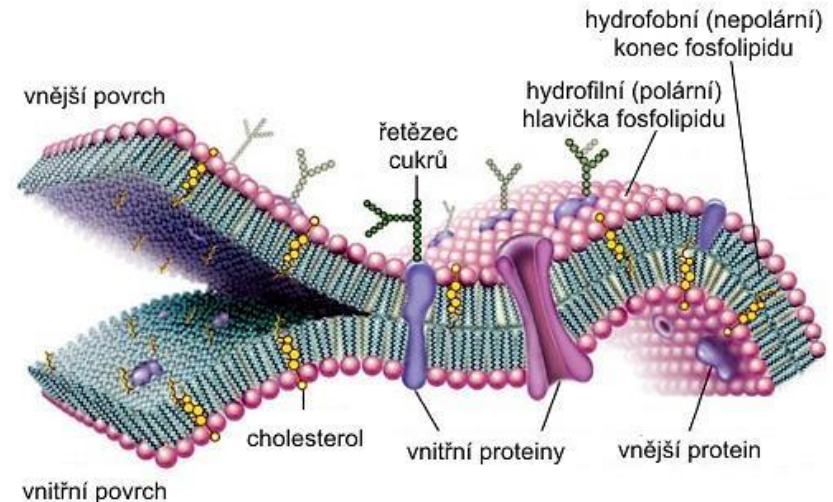
- integrální (zanořeny do lipidové vrstvy), ukotvené s lipidy, periferní (na povrchu lipidové vrstvy)
- funkce: receptory, signalizace, transport látek, mezibuněčný kontakt, kontakt cytoskeletu

### iii) sacharidy

- ve formě glykolipidů a glykoproteinů
- tvoří glykokalyx na vnější straně buňky
- funkce: mechanická, informační, vazebná místa pro patogeny

## Model tekuté mozaiky

- molekuly lipidů i proteinů jsou v neustálém pohybu, pohyb proteinů ve fosfolipidové dvojvrstvě





# Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

## Sekreční a endocytické dráhy

- potřeba spolupráce buněčných organel, které nejsou autonomní, ale slouží celé buňce
- mechanismy pro transport materiálů mezi organelami
- propojení některých organel funkčním sledem pochodů (dráha)

### • sekreční (exocytická) dráha

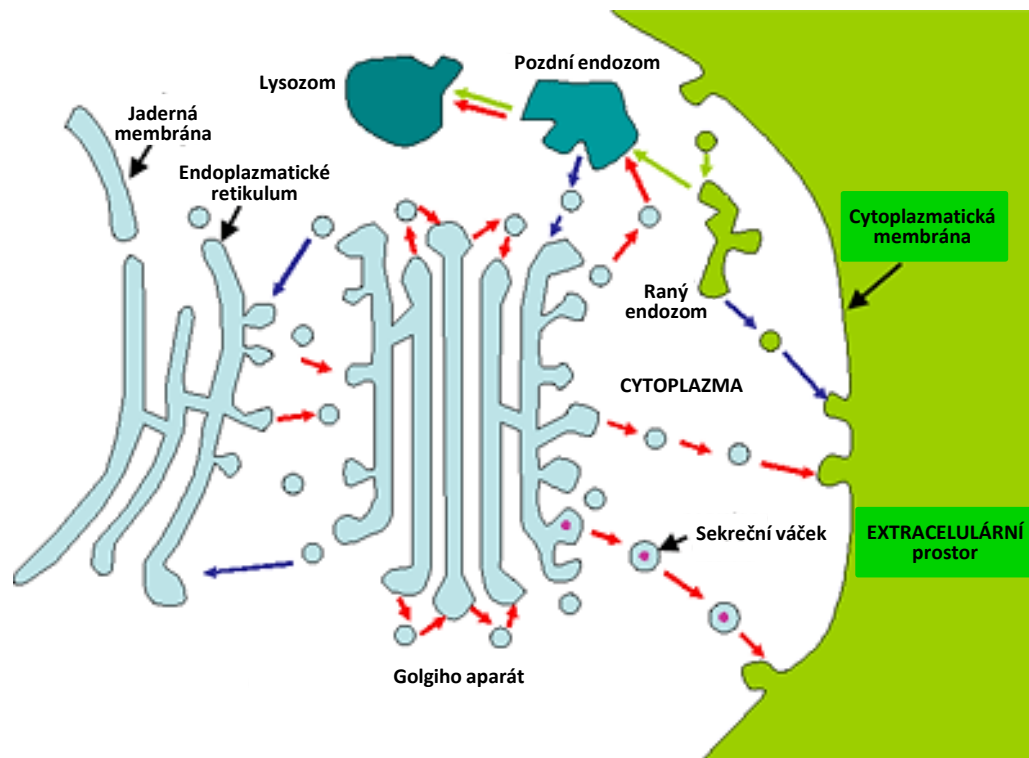
- biosyntéza organel
- vylučování molekul do mezibuněčného prostoru

### • endocytická dráha

- příjem a zpracování signálů a materiálu z vnějšího prostředí

### • vezikulární transport

- transport proteinů a lipidů mezi organelami
- správné umístění molekul uvnitř a vně buňky



# Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

## Chaperony

- podílejí se na translaci, podporují skládání proteinů do správné konformace, brání agregaci proteinů
- vazba na hydrofobní aminokyseliny polypeptidů, konformace vytvořena až po syntéze celé molekuly
- proteinové rodiny - Hsp70, Hsp90, válcovité chaperoniny

## Hsp70 a jejich regulátory

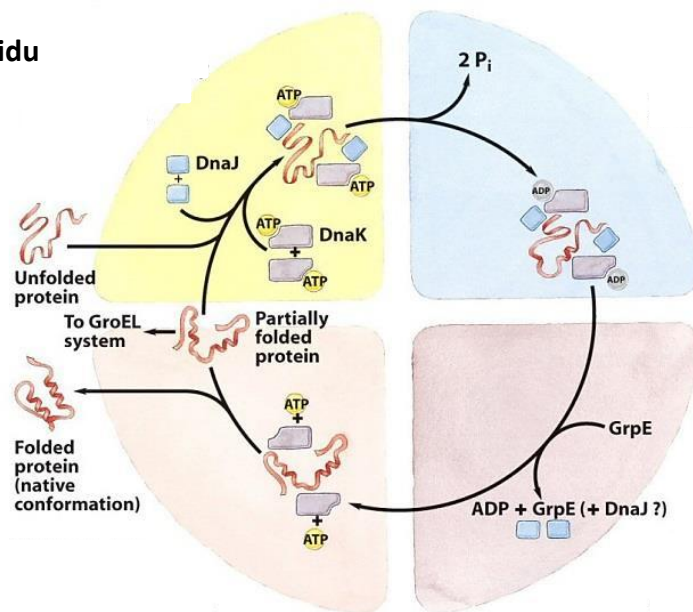
- vazba na nově vznikající proteiny na ribozomu, stabilizace částečně složených polypeptidu
- tvořeny v buňkách vystavených stresu, vazba na chybně poskládané proteiny, sbalení po denaturaci
- působí při transportu proteinů
- DnaK: bakteriální Hsp70, podpůrné proteiny DnaJ a GrpE

Vazba DnaJ k nesloženému peptidu  
Vazba komplexu k DnaK-ATP

DnaJ stimuluje hydrolýzu ATP  
DnaK-ADP pevně váže nesložený protein

DnaK váže ATP  
Uvolnění složeného proteinu

GrpE stimuluje uvolnění ADP



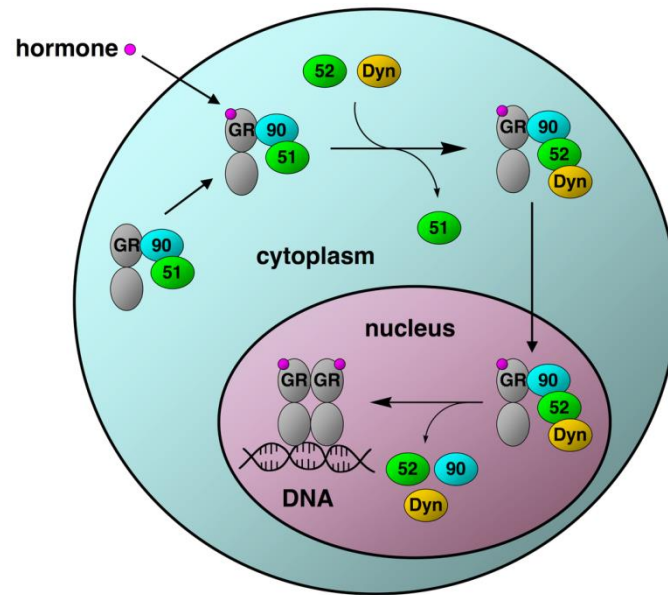
# Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

## Hsp70 u savců

- Hsc73 (cytosol), BiP (ER), mHsp70 (mitochondrie), ctHsp70 (chloroplasty)
- Hsp40 - proteiny podobné DnaJ, vyhledávají specifické substráty
- ekvivalent GroE není třeba, samy si zajišťují výměnu ADP/ATP a uvolnění peptidu

## Hsp90

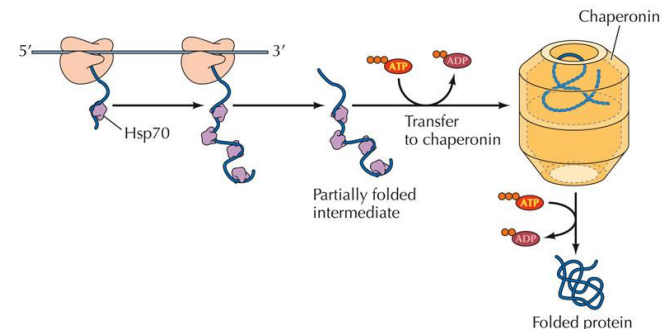
- správné skládání a funkce receptorů pro steroidní hormony (kortizol, estrogen, progesteron, aj.)
- např. glukokortikoidový receptor (GR) - kortizol
- v klidovém stavu vazba s imunofilinem 51 a Hsp90, které udržují GR ve správné konformaci pro vazbu liganu
- vazba kortizolu vyvolá konformační změnu, po které se vymění imunofilin 51 za 52
- imunofilin 52 váže dynein (Dyn), který připojuje komplex k cytoskeletu a zajišťuje jeho traslokaci do jádra
- v jádře se pomocné proteiny uvolní, GR dimerizuje a spouští expresi cílových genů



# Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

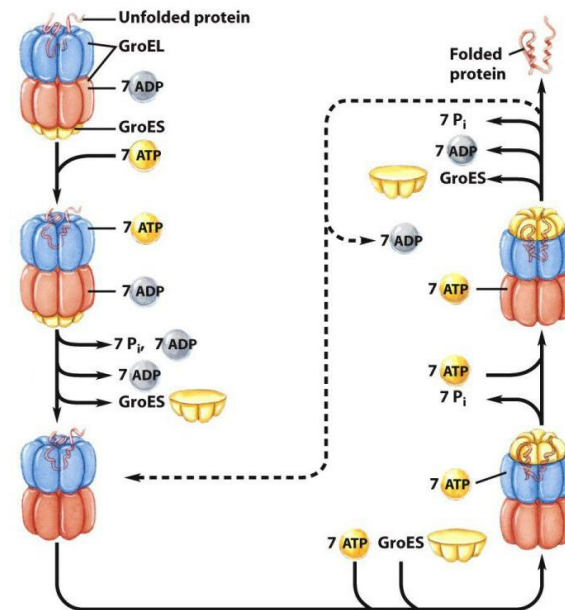
## Hsp60, chaperoniny

- válcovité částice na skládání proteinů, kterým poskytují prostor oddělený od cytoplazmy
- umožňují skládání nových i denaturovaných proteinů
- Hsp70 a Hsp60 se často uplatňují postupně



## Chaperoniny GroEL a GroES u E.coli

- GroEL - 2 kruhy ze sedmi podjednotek tvořící válec
- GroES - poklička válce
- vazba nesloženého proteinu na vnitřní stěnu kruhu GroEL
- vazba ATP ke každé podjednotce obsazeného kruhu
- hydrolýza ATP uvolňuje 14 molekul ADP a GroES
- vazba ATP a GroES k obsazenému kruhu
- skládání proteinu v ohraničeném prostoru
- hydrolýza ATP vede k uvolnění GroES a složeného proteinu



## Obdobné struktury u eukaryot

- mitochondrie Hsp60 a Hsp10
- chloroplasty Cpn60 a Cpn10
- po translokaci proteinu do mitochondrií a chloroplastů s ním nejdříve asociují Hsp40 a Hsp70, které zachovají jeho schopnost skládání a přenesou ho do chaperoninu, kde je skládání dokončeno

# Transport mezi vnitrobuněčnými oddíly

## Třídění proteinů

- biosyntéza organel vyžaduje přísun nových molekul lipidů a proteinů
- proteiny pro jádro, mitochondrie, chloroplasty a peroxizomy transportovány přímo z cytoplazmy pro Golgiho aparát, lysozomy, endozomy, extracelulární prostor přichází z ER

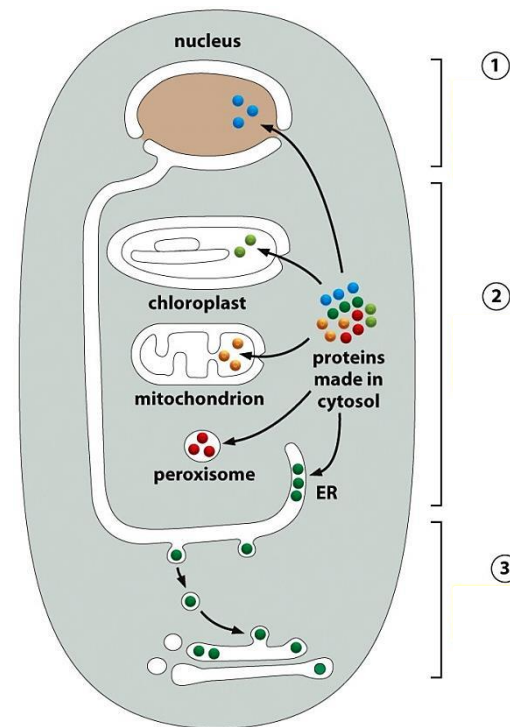
## Adresová sekvence

- sekvence v proteinu určující do jaké organely má jít, protein bez této sekvence zůstává v cytosolu
- pořadí 15 - 60 aminokyselin
- přesné sekvence pro jednotlivé organely se mohou lišit, vliv **hydrofobních**, **kladně nabitých** a **záporně nabitých** aminokyselin

Funkce signálu	Příklad adresové sekvence
Import do ER	*H <sub>3</sub> N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Zadržení v lumen ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO <sup>-</sup>
Import do mitochondrií	*H <sub>3</sub> N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import do jádra	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Import do peroxizomů	-Ser-Lys-Leu-

Tři mechanismy importu proteinů do membránových organel

1. transport jaderným pórem
2. proteinové translokátory (ER, mitochondrie, chloroplasty)
3. transportní váčky (sekreční dráha z ER)

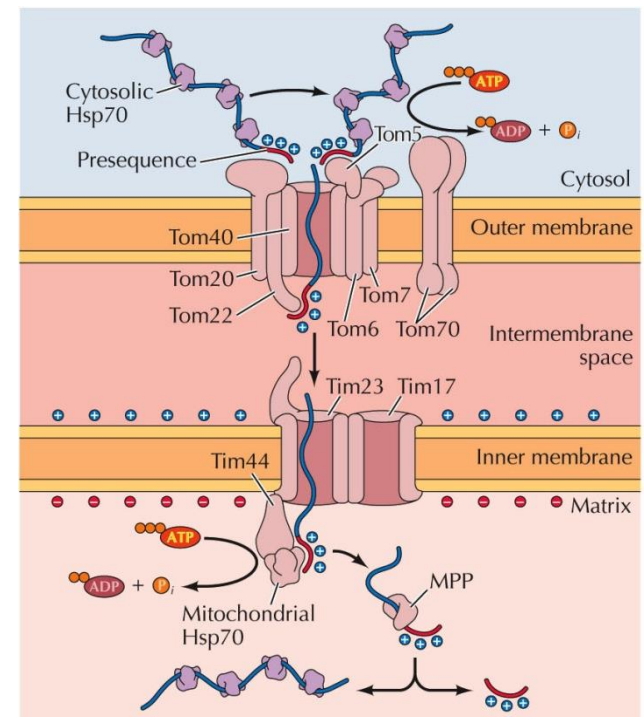


# Import proteinů pomocí proteinových translokátorů

- proteinové translokátory v místech kde jsou v kontraktu obě membrány obalu organel
- vstup do mitochondrií a chloroplastů
  - na N-konci transportovaného proteinu je adresová sekvence
  - během přenosu je protein rozvinut a odstraněna adresová sekvence
  - následuje transport přes membrány a opětovné složení proteinu

## Import do mitochondrií

- přes jednu membránu do mezimembránového prostoru přes obě membrány do matrix
- průběh importu do matrix
  - cytoplazmatické Hsp70 rozvinou transportovaný protein
  - receptor rozezná adresovou sekvenci
  - směřování proteinu do póru translokátoru
  - translokace proteinu vnější membránou (komplex TOM) vnitřní membránou (komplex TIM)
  - odštěpení adresové sekvence matrixovou proteázou
  - vazba mHsp70 na přenášený protein napomáhá dokončení translokace a jeho sbalení uvnitř mitochondrie
  - translokace vnitřní membránou vyžaduje přítomnost elektrochemického gradientu
  - průchod vnější i vnitřní membránou vyžaduje ATP

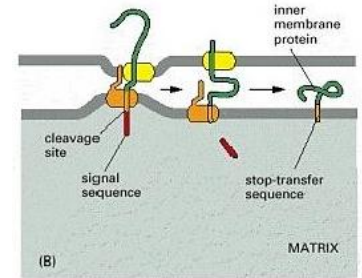
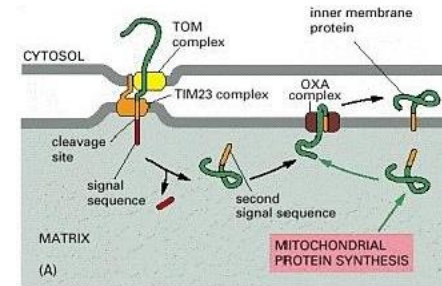


THE CELL, Fourth Edition, Figure 11.4 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

# Import proteinů pomocí proteinových translokátorů

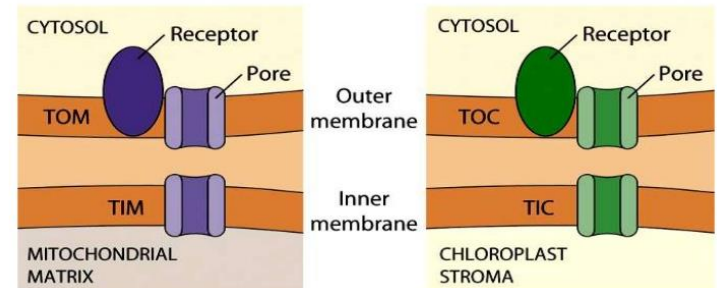
## Import do mitochondrií

- translokace do mezimembránového prostoru
  - i) translokace do matrix, odstranění adresové sekvence, odhalení hydrofobní sekvence, která protein směřuje zpět přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru (komplex OXA)
  - ii) sekvence zastavující přenos přerušuje translokaci vnitřní membránou a protein je odštěpen do mezimembránového prostoru
  - iii) translokace vnější membránou, vazba faktorů, které protein zadrží v mezimembránovém prostoru



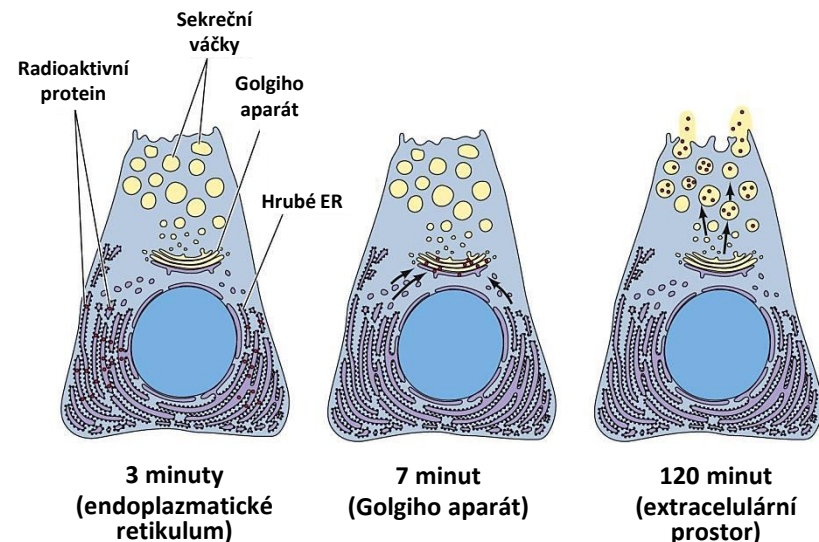
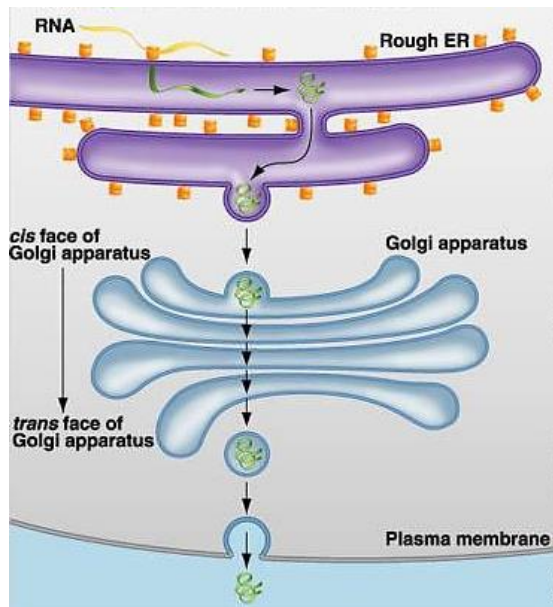
## Import do chloroplastů

- obdoba transportu do mitochondrií
- translokační komplex TOC ve vnější membráně
- translokační komplex TIC ve vnitřní membráně
- adresová sekvence dlouhá 30 - 100 aminokyselin (není kladně nabitá jako u mitochondrií)
- translokace vnitřní membránou nevyžaduje elektrochemický gradient
- proteiny určené do lumen tylakoidu mají dvě adresové sekvence postupně za sebou
- účast ctHsp70 a Cpn60/10 na správném sbalení translokovaného proteinu



# Sekreční dráha

- cesta proteinu přes hrubé endoplazmatické retikulum - endoplazmatické retikulum - Golgiho aparát -  
- sekreční váčky - extracelulární prostor
- používána pro proteiny směřující do endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu, lysozomů,  
plazmatické membrány a vně buňky
- sekreční váčky - dopravní prostředky obsahující proteiny z vnitřních organel  
- proteiny vyloženy po splynutí membrány váčku s membránou cílové organely
- poprvé pozorována u buněk žláзовého epitelu pomocí radioaktivně značených aminokyselin

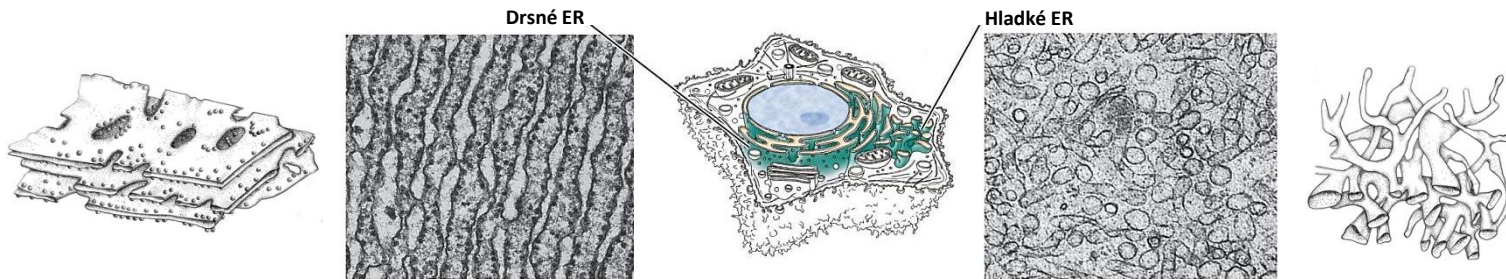




# Sekreční dráha

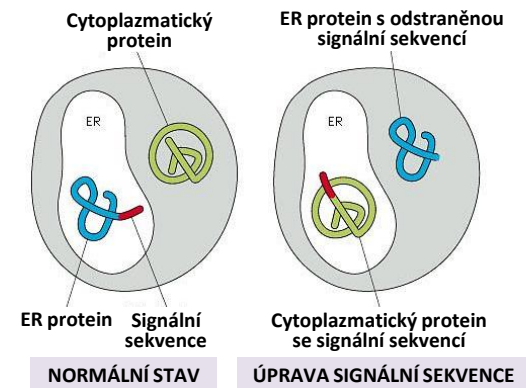
## Endoplazmatické retikulum (ER)

- systém vzájemně propojených plochých váčků a kanálků
- membrány navazují na jaderný obal, lumen navazuje na perinukleární prostor
- dává vzniknout Golgiho aparátu, lysozomům, plazmatické membráně
- funkce: biosyntéza proteinů a lipidů, přeprava látek transportními váčky, skladování buněčných produktů, reakce na podněty z vnějšího prostředí ( $\text{Ca}^{2+}$  signalizace)
- drsné - na cytoplazmatickém povrchu navázány ribozomy, syntéza proteinů
- hladké - bez ribozomů, metabolismus lipidů a polysacharidů, detoxifikační reakce, zásobárna  $\text{Ca}^{2+}$



## Import proteinů do ER

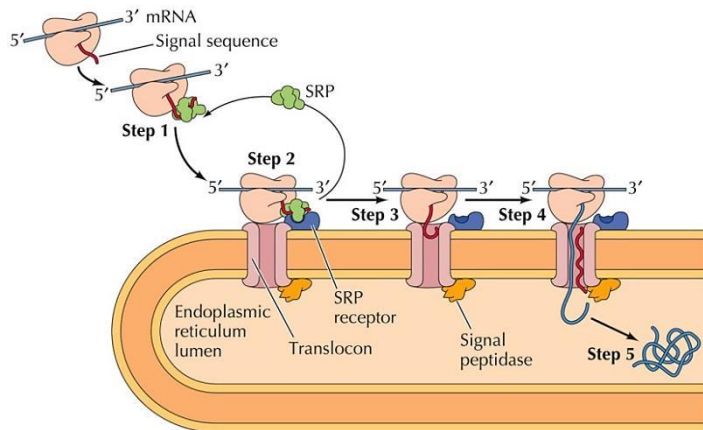
- adresová sekvence pro ER se nazývá signální sekvence
- odstranění signální sekvence z proteinu ER umístí protein do cytosolu
- začlenění signální sekvence do cytoplazmatického proteinu způsobí jeho nasměrování do ER



# Sekreční dráha

## Syntéza proteinů v drsném ER

- kromě vlastní syntézy proteinů se ER podílí i na jejich struktuře - sbalování proteinů, tvorba disulfidických vazeb, sestavování oligomerních proteinů, prvotní místo glykosylace
- ER je hlavní křižovatka v dopravě proteinů po buňce
  - i) volné proteiny jdou skrz membránu do lumen ER, kde jsou uvolněny
    - proteiny vyskytující se v lumen organel, sekretované ven z buňky
  - ii) membránové proteiny zůstávají zanořeny v membráně ER
    - proteiny vyskytující se v membránách organel, plazmatické membráně

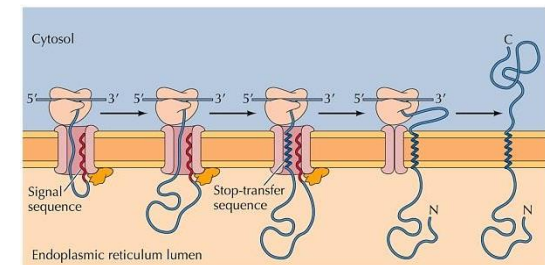
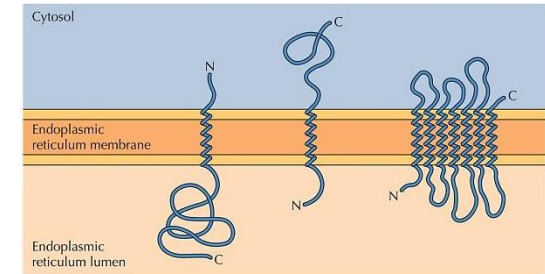
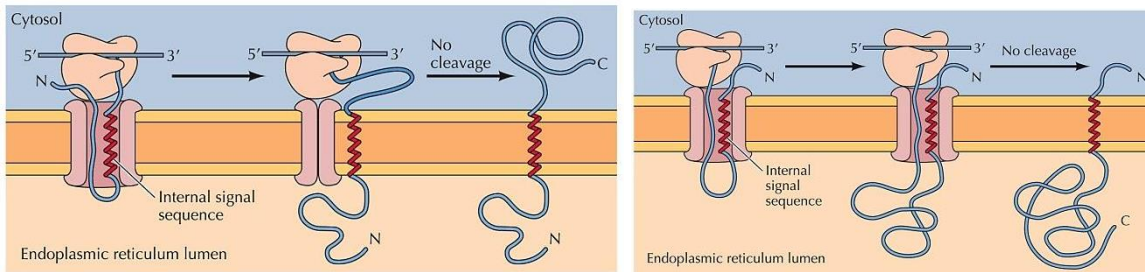


- syntéza všech proteinů začíná na volných ribozomech
- po vytvoření signální sekvence je ribozom přitahován k ER pomocí částice SRP
- vazba SRP na signální sekvenci dočasně zastavuje translaci
- v membráně ER je SRP receptor, který přitahuje komplex ribozom/peptid/SRP
- vazba ribozomu k translokačnímu komplexu v membráně ER
- po vazbě GTP se signální sekvence začlení do membránového kanálku
- hydrolýzou GTP se uvolní SRP, translace pokračuje a rostoucí peptid prochází membránou ER
- odštěpení signální sekvence signální peptidázou
- uvolnění peptidu do lumen ER

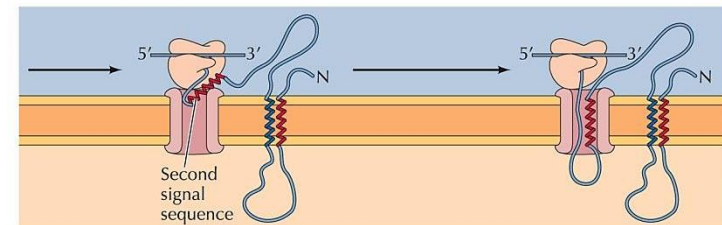
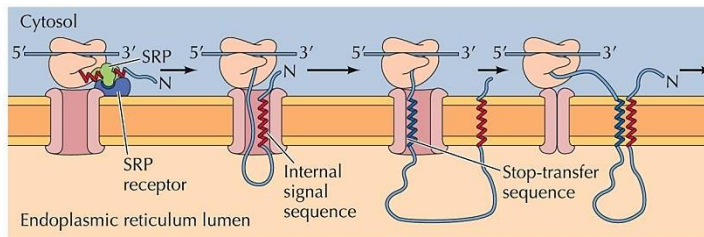
# Sekreční dráha

## Začlenění proteinu do membrány ER

- různé orientace proteinu a počet jeho průchodů přes membránu
- sekvence zastavující přenos, vnitřní signální sekvence
  - hydrofobní oblasti, které ukotvují proteiny v membráně
  - $\alpha$ -šroubovice, 20 - 25 aminokyselin, interakce s fosfolipidy
  - vnitřní s.s. rozeznána pomocí SRP, neštěpena signální peptidázou
  - jejich orientace určují orientaci proteinu v membráně
- různé orientace proteinu



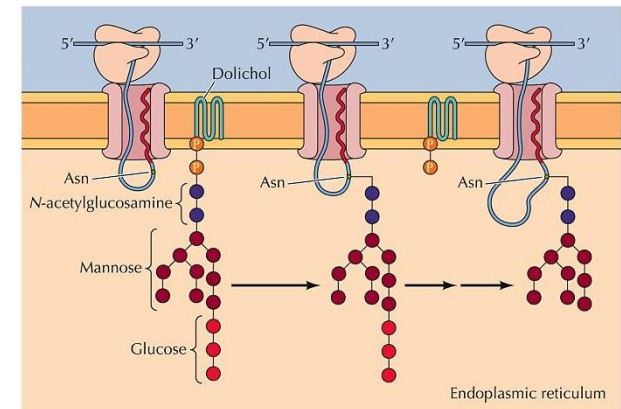
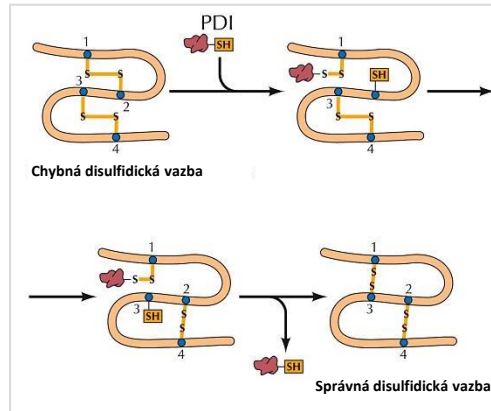
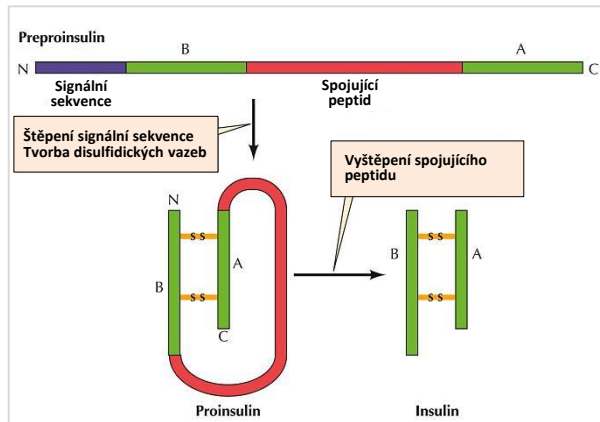
- protein procházející membránou několikrát
  - důsledek střídání vnitřních signálních sekvencí a sekvencí zastavujících přenos



# Sekreční dráha

## Sbalování a úprava proteinů v ER

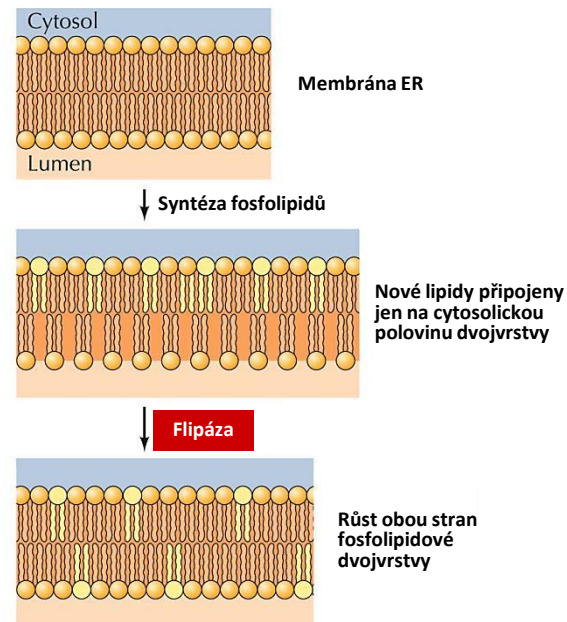
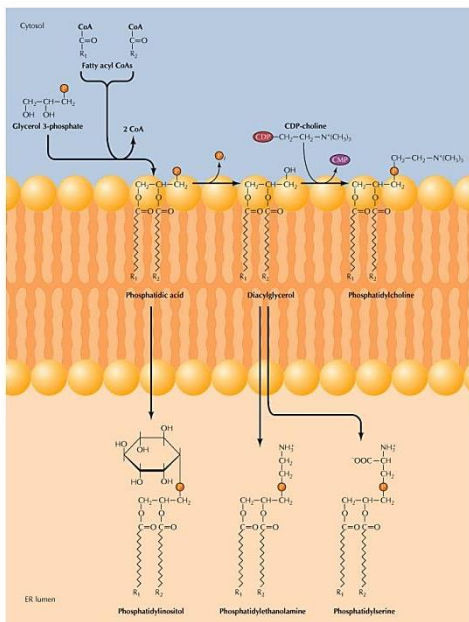
- sbalování - chaperony v ER hojně zastoupeny, rodiny Hsp70 (BiP) a Hsp90 (Grp94)
- štěpení - odstranění některých aminokyselin po translaci
  - vždy odstranění iniciačního Met a signální sekvence, u některých proteinů i jiné sekvence
  - např. inzulín: v buňkách pankreatu syntetizován jako preproinzulín
    - odstraněním signální sekvence se do lumen ER uvolňuje proinzulín
    - vyštěpení a degradace interní sekvence
    - spojení výsledných dvou polypeptidů disulfidickou vazbou → inzulín
- tvorba disulfidických vazeb - disulfid izomeráza, vazby zajišťující nejstabilnější konfiguraci proteinu
- glykosylace - připojení oligosacharidů



# Sekreční dráha

## Hladké endoplazmatické retikulum

- syntéza membránových lipidů (fosfolipidy, glykolipidy, cholesterol)
- chemické vlastnosti lipidů vyžadují, aby se tvořily ve spojení s již existujícími membránami
- syntéza na cytosolické straně membrány ER
- syntéza fosfolipidů
  - vznik kyseliny fosfatidové z glycerol-3-fosfátu a mastných kyselin nesených CoA
  - začlenění kyseliny fosfatidové do membrány a její další konverze
  - translokace fosfolipidů přes membránu, aby se nehromadily na cytosolické polovině ER, flipázy



# Sekreční dráha

## Vezikulární transport z ER

- směřuje do Golgiho aparátu, lysozomů, plazmatické membrány, extracelulárního prostoru
- proteiny a lipidy po cestě upravovány (glykosylace, tvorba disulfidických vazeb)
- náklad váčků je specifický, daný receptory v membráně váčku
- proteiny určené pro lumen ER mají na C-konci adresovou sekvenci Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)

## Golgiho aparát (GA)

- systém plochých nádrží (cisteren) a kanálků
- funkce: zpracování, třízení a modifikace proteinů z ER (glykosylace proteinů), syntéza glykolipidů
- cis strana - vznik nových cisteren fúzí váčku z ER
- přechod váčků přes jednotlivé střední části GA
- trans strana - pučení váčků, které směřují zpět do ER, zpět do GA, ven z buňky
  - vznik lysozómů

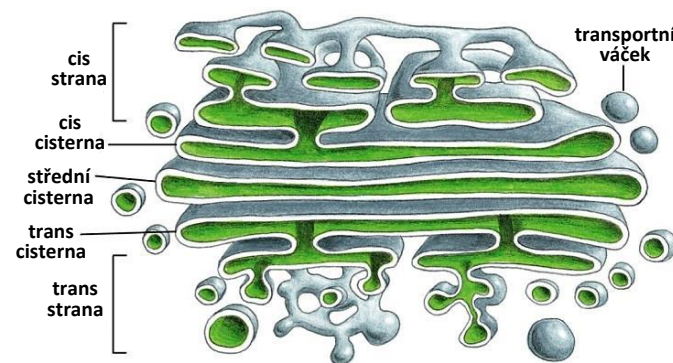
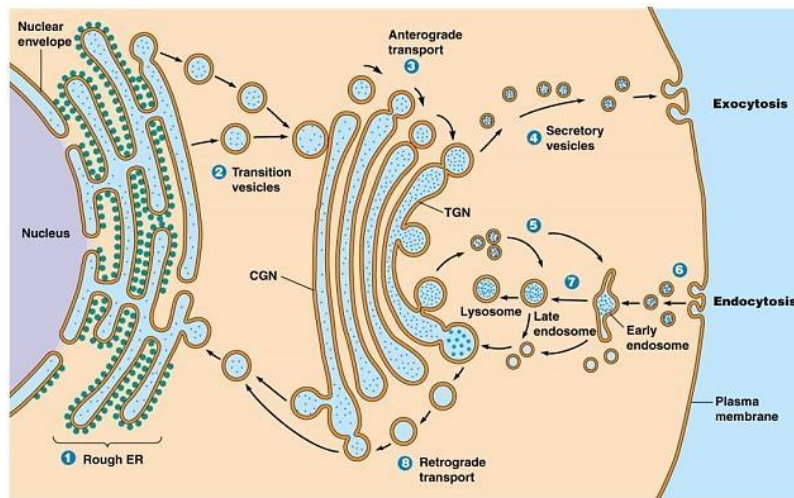


Figure 15-26a Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

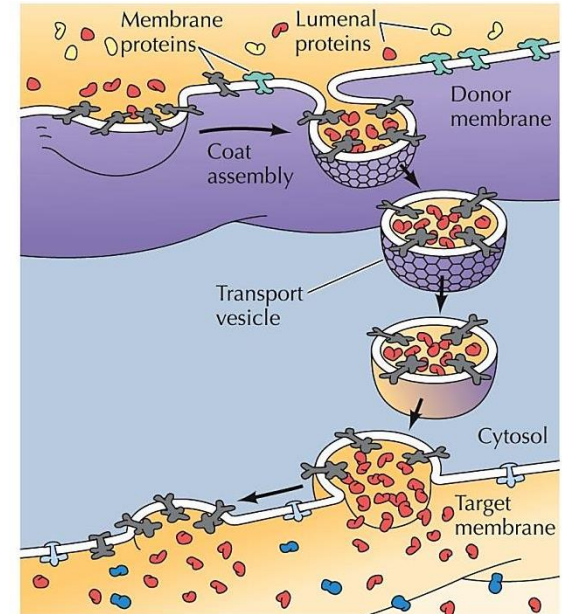


# Sekreční dráha

## Transportní váčky

- různé typy váčků pro transport specifického nákladu
- vykonávají kyvadlovou dopravu mezi organelami
- opláštěné váčky - proteinový obal na cytosolické straně váčků
  - napomáhá tvarovat membránu do podoby váčku
  - účast na zachycení specifických molekul
  - po odškrcení váčku je plášť odstraněn a váček fúzuje s cílovou mem.

Typ váčku	Proteiny pláště	Výchozí organela	Cílová organela
Klathrinový	klathrin + adaptin 1	GA	lyzozom
Klathrinový	klathrin + adaptin 2	plazmalema	endozom
COP	proteiny Coat	ER	GA
		cisterna GA	cisterna GA
		GA	ER



## Klathrinové váčky

- nakládaná molekula - receptor - adaptin - klathrin
- molekuly klathrinu vzájemně interagují a tvoří síť, která narušuje membránu, postupně vzniká jamka a váček s klathrinovým pláštěm
- dynamin se váže kolem ústí váčku a za hydrolýzy GTP se stáhne a odškrtí váček od membrány

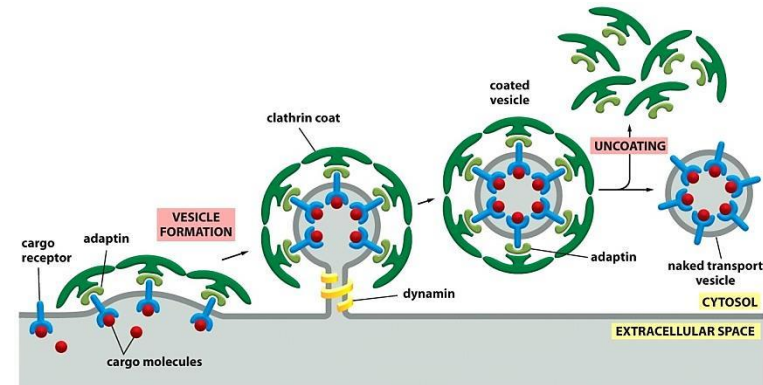
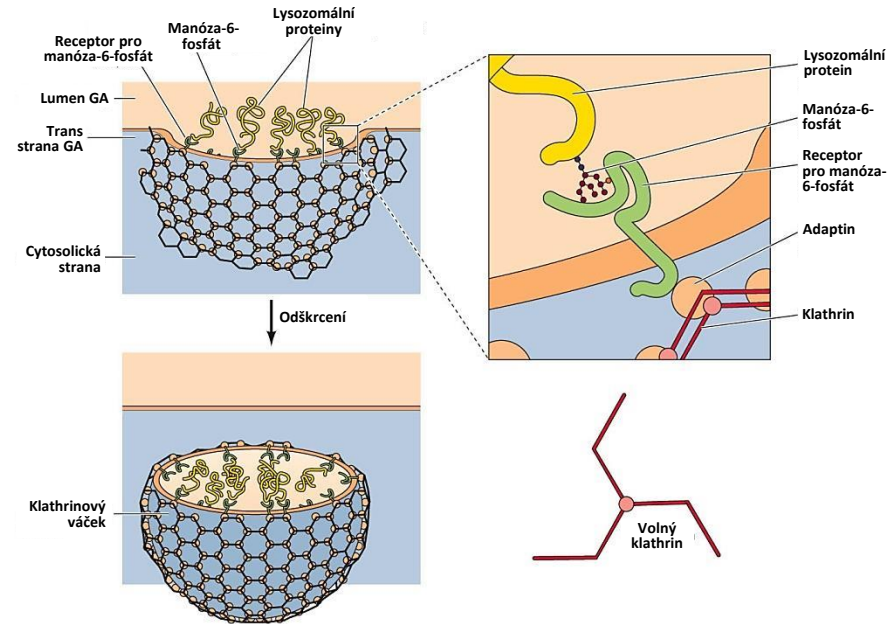


Figure 15-20: Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

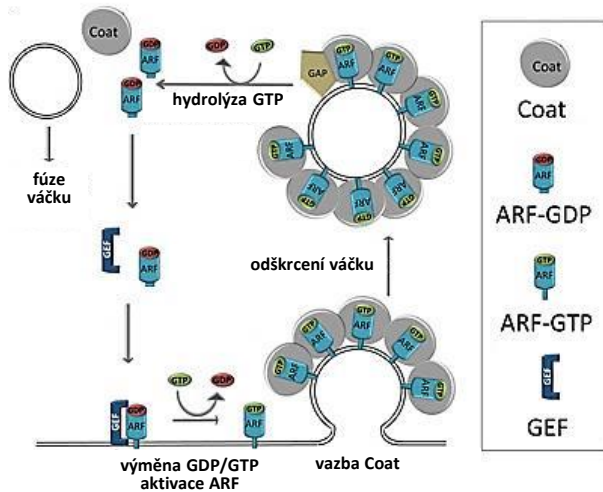
# Sekreční dráha

## Klathrinové váčky

- začlenění specifických proteinů do klatr. váčků
- proteiny určené pro transport z GA do lysozomů označeny přítomností manóza-6-fosfát
- receptor pro manóza-6-fosfát v membráně na trans straně GA
- přes cytosolické adaptiny se k receptoru váží klathriny, které spojí svoje řetězce v síť a zahajují pučení váčku



THE CELL, Fourth Edition, Figure 10.36 © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.



## COP váčky

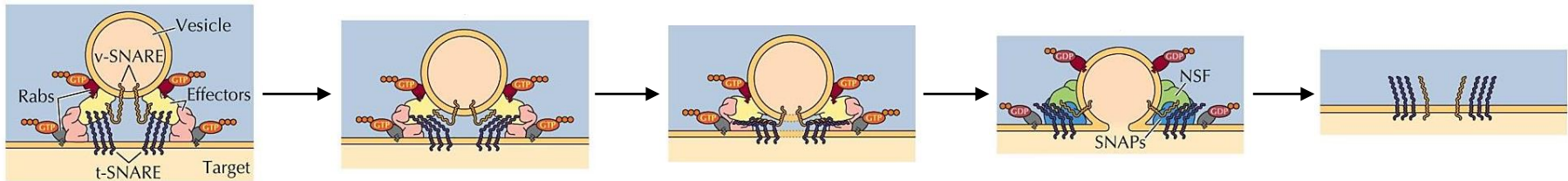
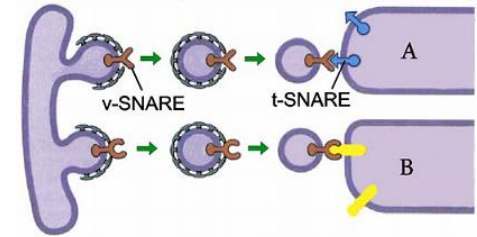
- přeprava molekul mezi ER a GA, v rámci GA
- plášť tvořen proteiny Coat
- pro odškrcení váčku nutná účast proteinu ARF (GTPáza)
- ARF-GTP se spojuje s membránou GA, je nutný pro vazbu Coat proteinů a podílí se na tvorbě váčků
- po vytvoření a odškrcení váčku hydrolýza ARF-GTP na ARF-GDP
- rozložení COP, fúze váčku s cílovou membránou



# Sekreční dráha

## Doručení váčků

- navádění váčků k cíli závisí na proteinech SNARE
- v-SNARE na povrchu váčků specificky rozeznány t-SNARE na povrchu cílových membrán
- unikátní SNARE pro každou organelu a typ transportních váčků
- interakce proteinů NSF a SNAP zodpovídá za fúzi váčku s cílovou membránou



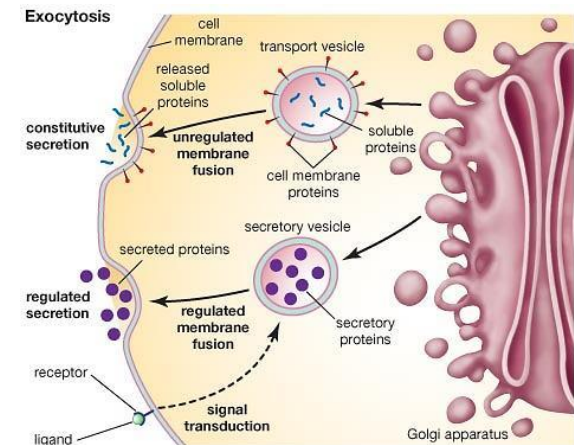
## Sekrece molekul z buňky

### i) řízená

- sekrece molekul po přijetí signálu
- transportní váčky splývají a tvoří větší váček
- po přijetí signálu jeho exocytóza
- do váčků jdou specifické molekuly, běžné u žlaznatých buněk

### ii) konstitutivní

- sekrece průběžná, bez signálu

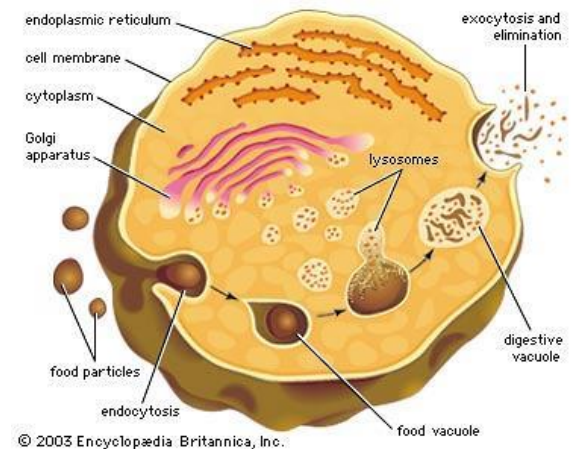
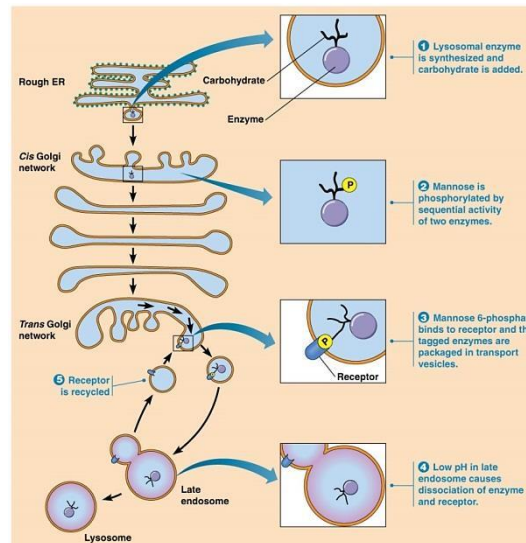
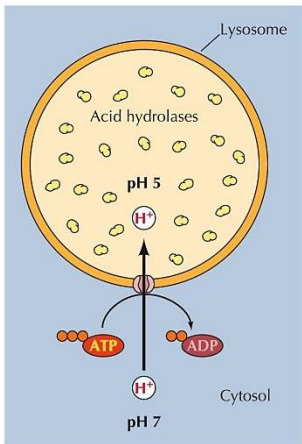


© 2008 Encyclopædia Britannica, Inc.

# Sekreční dráha

## Lysozomy

- funkce: nitrobuňkové trávení, rozklad materiálu z nitra i vnějšku buňky
- váčky uzavřené membránou (0,05 - 0,5  $\mu\text{m}$ )
- obsahují zhruba 50 typů kyselých hydroláz na rozklad všech organických složek buňky
- hydrolázy fungují při  $\text{pH} \sim 5$ , kyselé  $\text{pH}$  udržují  $\text{ATP}$  dependentní  $\text{H}^+$  pumpy
- proteiny v membráně lysozomu chráněny glykosylací
- primární lysozom vniká odškrcením od GA - po splnutí s endozomem vzniká sekundární (aktivní) lysozom - terciální lysozom s nestravitelnými zbytky odstraňovanými exocytózou
- přes 30 genetických chorob člověka s mutantními geny pro lysozomální enzymy
  - např. Gaucherova nemoc: glukocerebrosidáza na rozklad glykolipidů, léčba aplikací enzymu



© 2003 Encyclopædia Britannica, Inc.

# Endocytická dráha

## Endocytóza

- příjem částic, molekul a kapaliny z vnějšího prostředí
- malé molekuly přijímány u všech buněk
- velké částice a celé buňky přijímány fagocytyujícími buňkami
- pohlcovaný materiál obklopen plazmalemou - pučení dovnitř buňky - odškrcení endocytického váčku - fúze s lysozomem

### i) pinocytóza

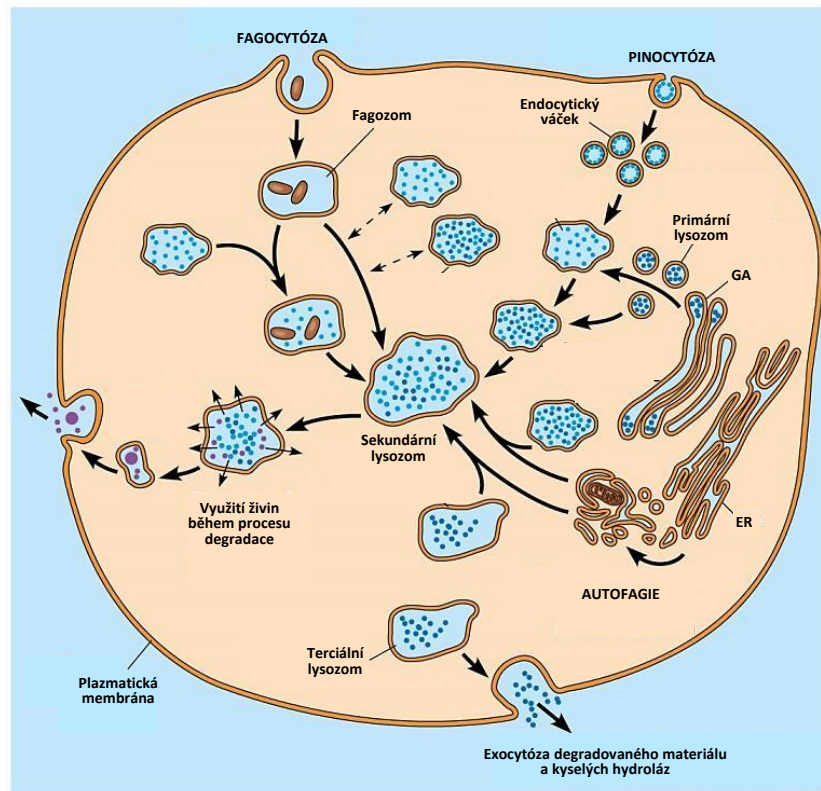
- pohlcení kapaliny a malých molekul
- využití klathrinových jamek a váčků
- neutrální, nerozlišuje přijímaný materiál
- průběžné pohlcování částí plazmalemy

### ii) fagocytóza

- pohlcení velkých částic pomocí fagozomů
- vazba částice k povrchovým receptorům - tvorba pseudopodií obklopujících částici - tvorba fagozomu - fúze s lysozomem - fagolysozom

### iii) autofagie

- rozklad vlastních struktur
- staré organely, hladovějící buňky
- uzavření organely v membráně z ER - tvorba autofagozomu - fúze s lysozomem



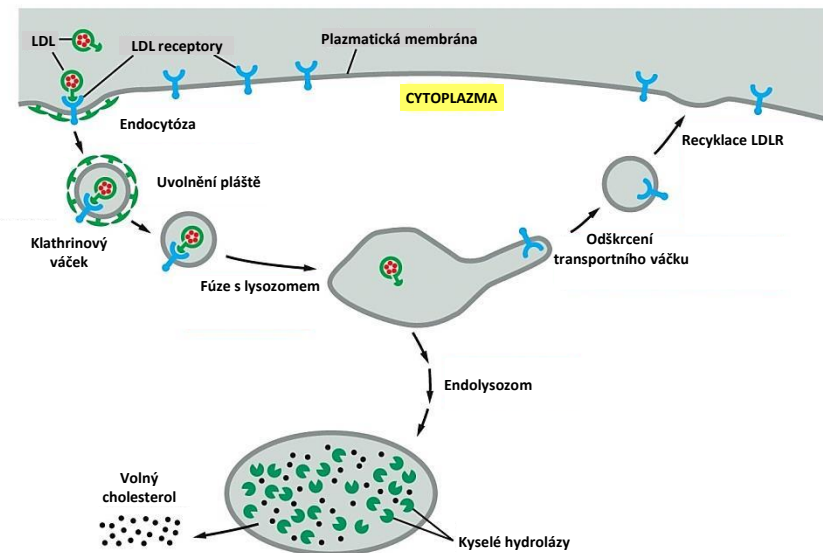
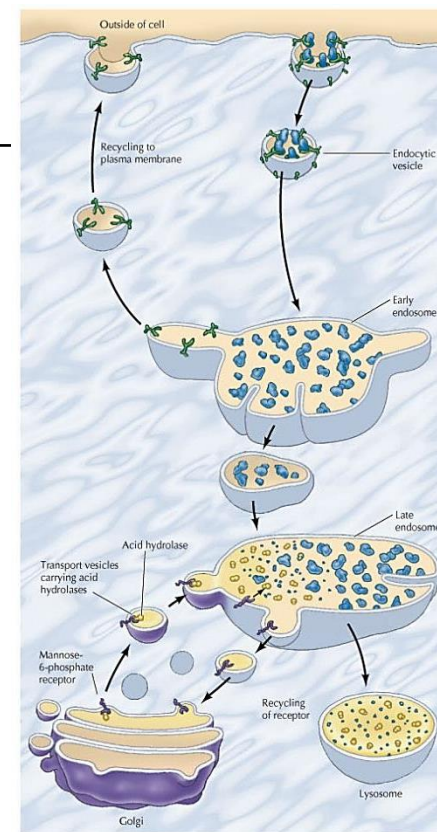
# Endocytická dráha

## Endocytóza přes povrchové receptory

- selektivní zvýšení koncentrace látek v buňce
- vazba molekul k příslušným receptorům - uzavření komplexu receptor/ligand do klathrinových váčků - odstranění obalu váčku - fúze s lysozomem - zpracování pohlceného materiálu, recyklace receptorů
- např. cholesterol

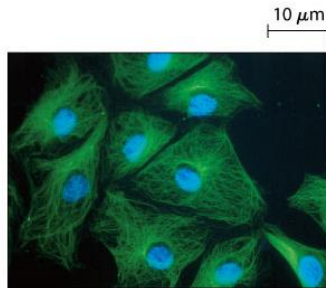
## Cholesterol

- nezbytný pro tvorbu membrán
- v krvi vázán na proteinovém nosiči a společně tvoří lipoproteiny
- nízkodenzitní lipoprotein LDL vzniká v játrech a dopravuje cholesterol k buňkám
- vazba LDL s cholesterolem na LDLR - klathrinová endocytóza - fúze s lysozomem - uvolnění LDL od LDLR v kyselém prostředí lysozomu - recyklace receptorů - rozložení LDL - uvolnění cholesterolu do cytoplazmy
- porucha LDLR receptoru: hromadění cholesterolu v krvi, vývoj aterosklerózy, srdeční infarkty v raném věku

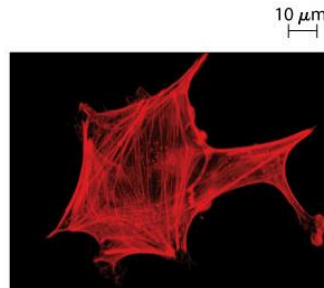


# Cytoskelet

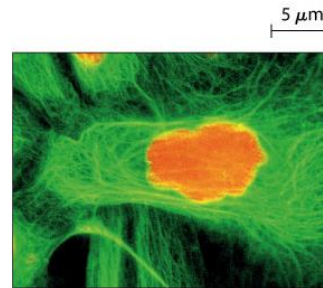
**Mikrotubuly**



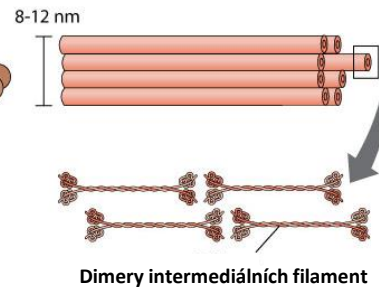
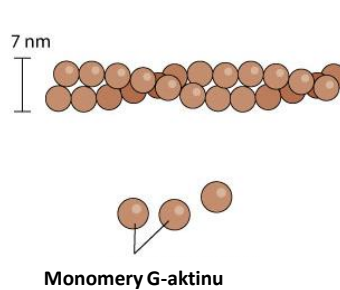
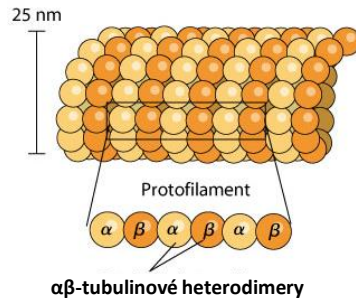
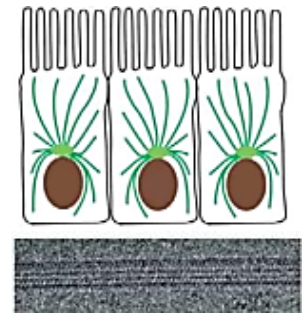
**Mikrofilamenta**



**Intermediální filamenta**



**Mikrotubuly**

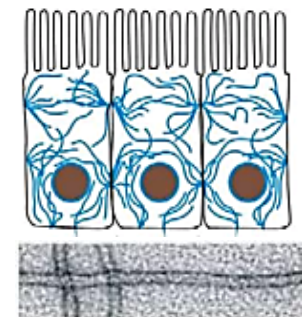


<b>Struktura</b>	Dutý váleček, stěna z 13 protofilament	Dva propletené řetězce F-aktinu	8 protofilament
<b>Monomery</b>	$\alpha$ -tubulin $\beta$ -tubulin	G-aktin	Cytokeratin, vimentin, desmin, neurofilamenta, nestin, laminy
<b>Polarita</b>	(+) a (-) konce	(+) a (-) konce	---
<b>Funkce</b>	Organizace a udržení tvaru a polarity buňky Pohyb chromozomů Intracelulární transport Pohyb organel Pohyblivost buněk (axonema)	Kontrakce svalů Pohyb buněk, cytokineze Proudění cytoplazmy Udržení tvaru buňky Intracelulární transport	Podpora buněčných struktur Udržení tvaru buňky Tvorba jaderné laminy a lešení Zesílení axonů nervových buněk Organizace svalových vláken

**Mikrofilamenta**



**Intermediální filamenta**



# Spoje buněk

- struktury zajišťující trvalé spojení sousedních buněk a spojení buněk s extracelulární matrix (ECM)
- důležité pro morfologii a funkci epitelů s těsným uspořádáním buněk
- vyžadují napojení na cytoskelet

## Těsné vazby

- brání průniku molekul a tekutiny

## Adherentní vazby

- propojují mikrofilamenta sousedních buněk

## Desmozomy

- propojují intermediální filamenta sousedních buněk

## Mezerové spoje

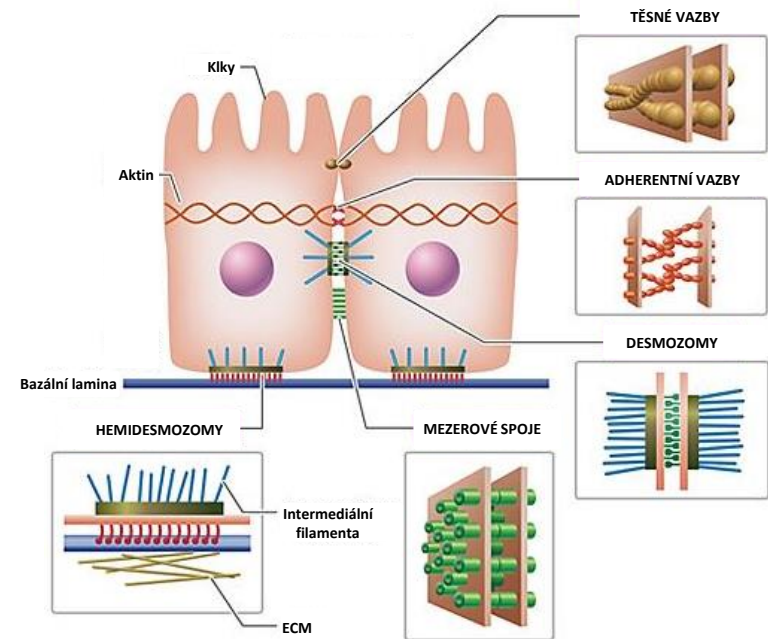
- spojují cytoplazmy sousedních buněk

## Hemidesmozomy

- připojují intermediální filamenta k bazální lamině

## Polarita epiteliálních buněk

- apikální povrch - přítomnost mikrokloků a řasinek
  - pohyb hlenů v dýchací trubici, vajíčka ve vejcovodu, umístění speciálních receptorů
- laterální povrch - přítomnost adherentních, mezerových a těsných vazeb a desmozomů
  - spojení buněk přes speciální ligandy a cytoskelet
- bazální povrch - přítomnost hemidesmozomů a adhezivních plaků
  - ukotvení buněk v bazální lamině



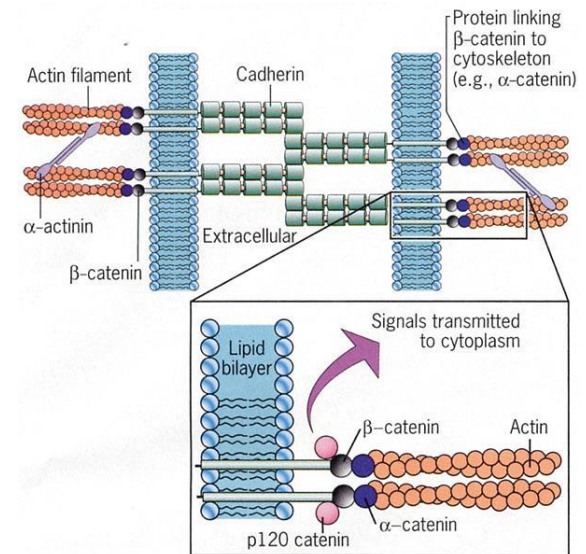
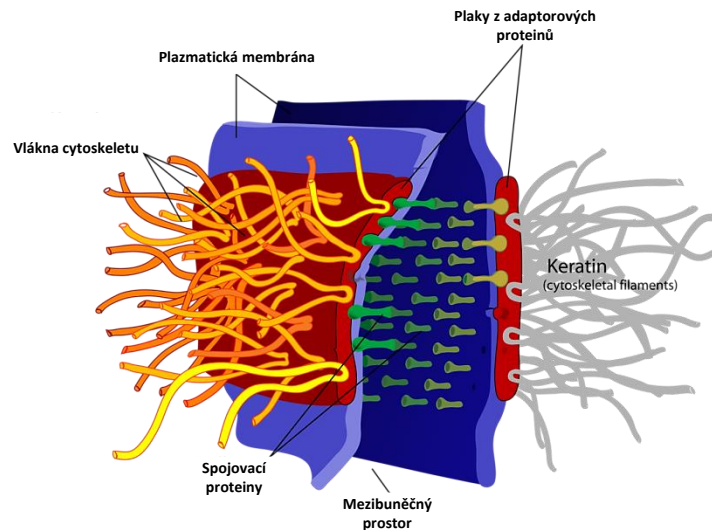
# Spoje buněk

## Adherentní spoje, desmozomy a hemidesmozomy obsahují plaky

- destičky či pásy lokálně nahromaděného materiálu na cytosolické straně plazmatické membrány
- vytvořeny z adaptorových proteinů
- ukotvení transmembránových spojovacích proteinů, které váží ECM či protein sousední buňky
- vazba cytoskeletu

## Adherentní vazby

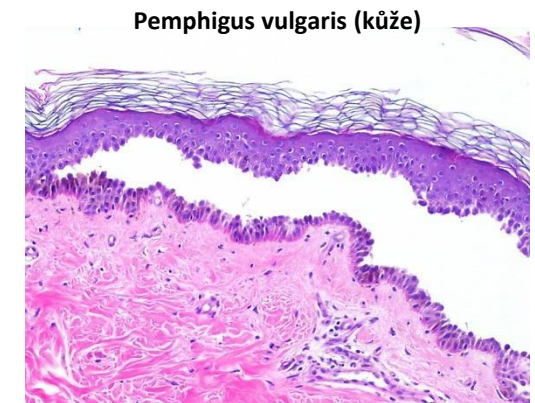
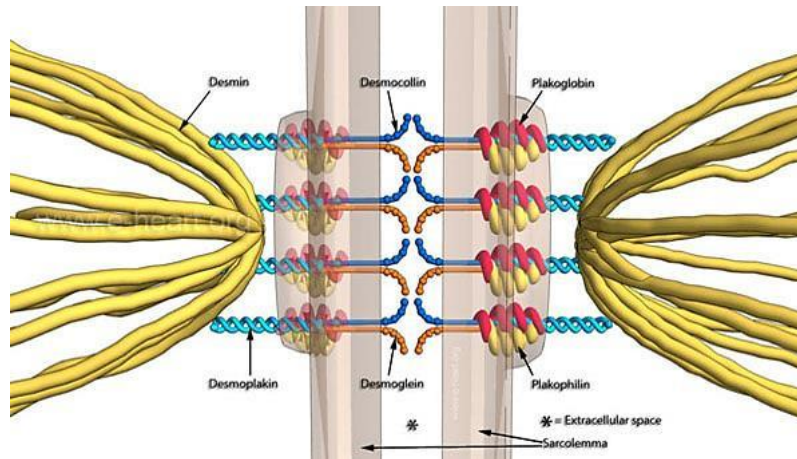
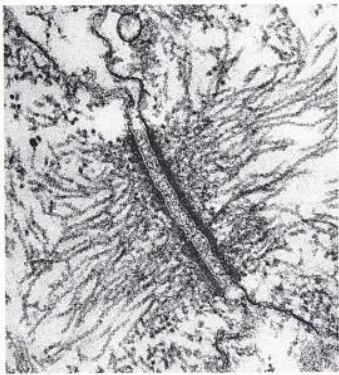
- kadheriny - spojovací proteiny, homofilní vazby v přítomnosti  $\text{Ca}^{2+}$ 
  - přemostují mezibuněčný prostor svými extracelulárními doménami
- adaptorové proteiny - kateniny ( $\alpha$ ,  $\beta$ , p120), vinkulin
- interakce s mikrofilamenty (F-aktin)



# Spoje buněk

## Desmozomy

- mechanické svorky zajišťující soudržnost tkáně a silnou adhezi buněk (střevní epitel, kůže, srdce)
- spojovací proteiny - speciální kadheriny desmocollin a desmoglein
- adaptorové proteiny tvořící silné plaky - plakofilin, plakoglobin, desmoplakin
- interakce s intermediálními filamenti, které vyčnívají z plaků do nitra buňky - tonofibrily
- Pemphigus vulgaris - autoimunitní onemocnění kůže, tvorba protilátek proti desmogleinu
  - narušena adheze epitelu, mezi buňky proniká tělní tekutina, tvorba puchýřů



## Hemidesmozomy

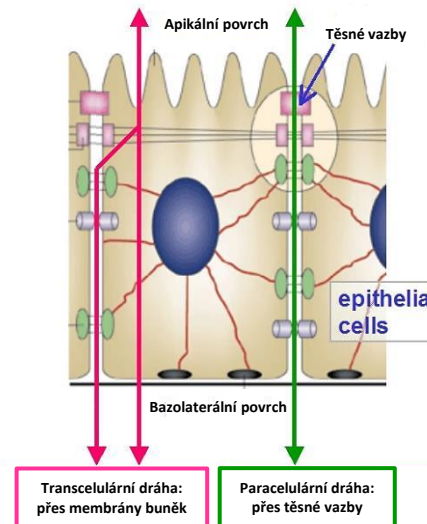
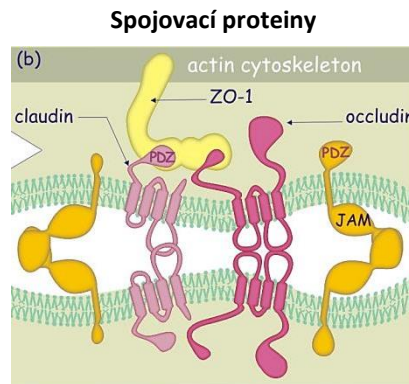
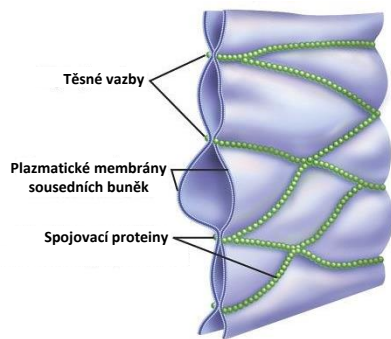
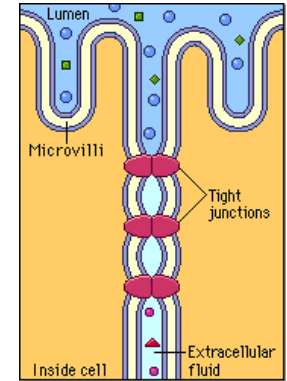
- propojení buněk s bazální laminou a tím ECM
- podobnost s desmozomy, avšak místo kadherinů používají jako spojovací proteiny integriny, které se váží k laminám bazální membrány



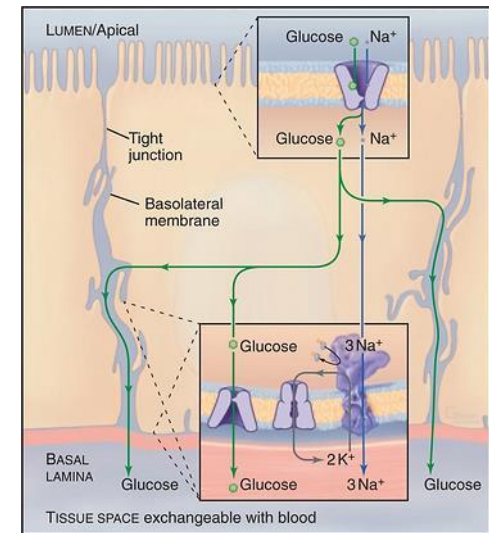
# Spoje buněk

## Těsné vazby

- většinou těsně pod apikálním povrchem, bez prostoru mezi buňkami
- spojovací proteiny - claudin, occludin, JAM (junction adhesion molecules)
  - těsné uspořádání, homofilní interakce s proteiny sousední buňky
- podíl na polarizaci buněk, brání laterálnímu pohybu membránových lipidů a proteinů
- překážka pro průchod tekutin a molekul přes vrstvu buněk, oddělení tělních dutin
- míra jejich propustnosti rozhoduje o průchodu molekul transbuněčnou či parabuněčnou drahou
- transport glukózy přes střevní epitel
  - vstup do buňky na apikální straně přes Na<sup>+</sup>/glukóza synportní protein
  - export glukózovým transportérem na bazolaterálním povrchu



## Transport glukózy ve střevě



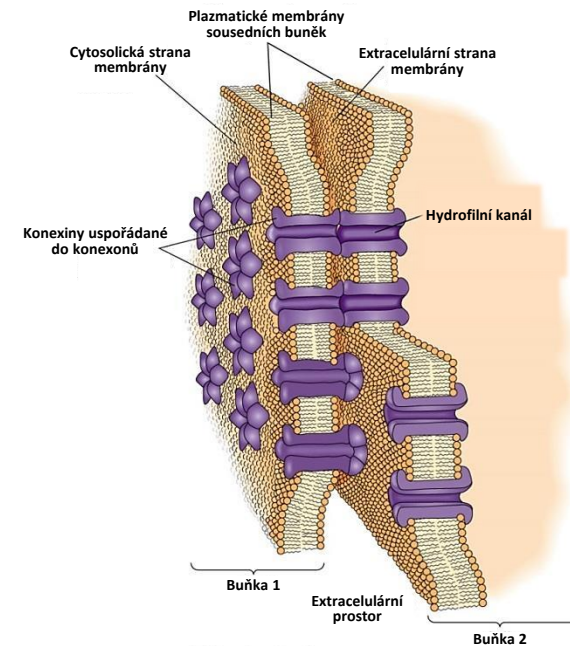
# Spoje buněk

## Mezerové spoje

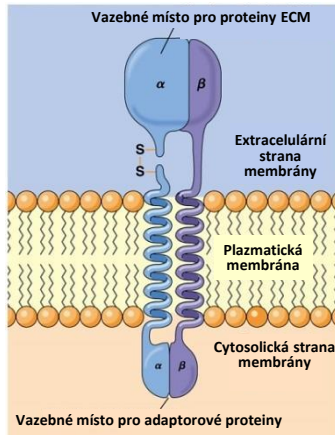
- umožňují přímou chemickou a elektrochemickou komunikaci buněk
- membránový protein konexin
- 6 molekul konexinu uspořádaných do kruhů tvoří dutý válec konexon
- konexony dvou sousedních buněk tvoří hydrofilní kanál, který propojuje cytoplazmy buněk
- umožňují tok malých molekul mezi buňkami (ionty, cukry, cAMP)

## Spojení buněk s ECM

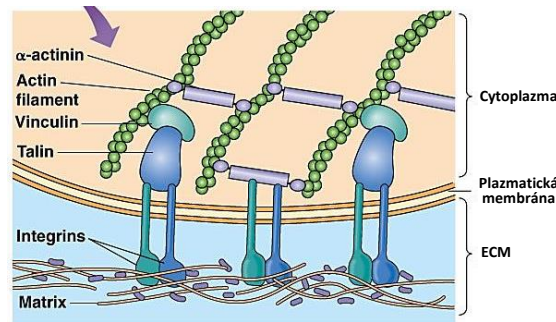
- fokální adheze a hemidesmozomy
- oba typy vazeb zprostředkovány integriny
- rozdíl v napojení na cytoskelet - fokální adheze váží mikrofilamenta
- hemidesmozomy váží intermediální filamenta



## Integrin



## Fokální adheze



## Hemidesmozom

