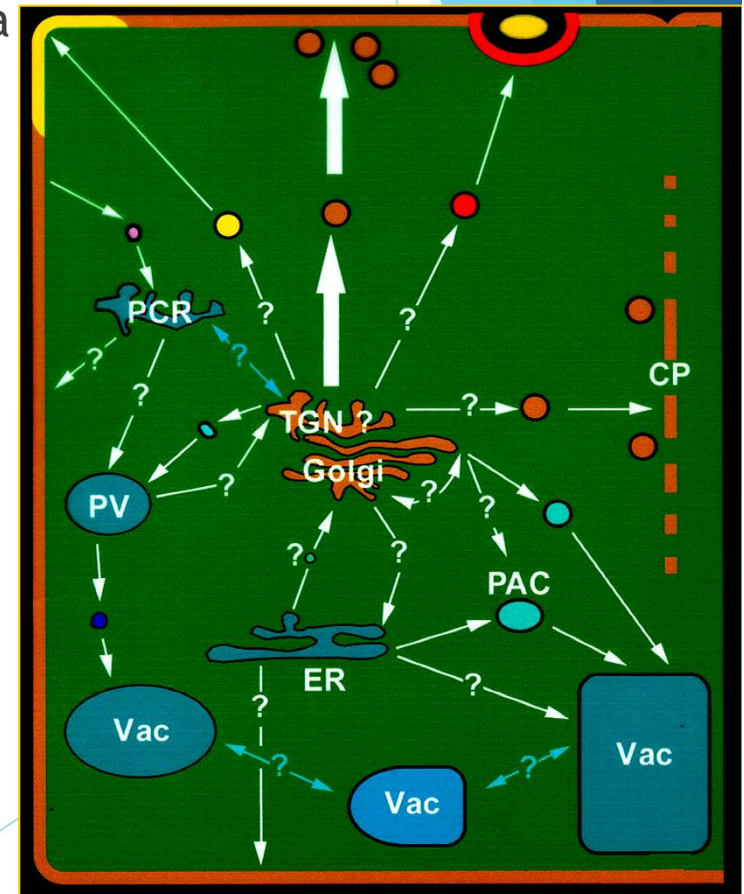


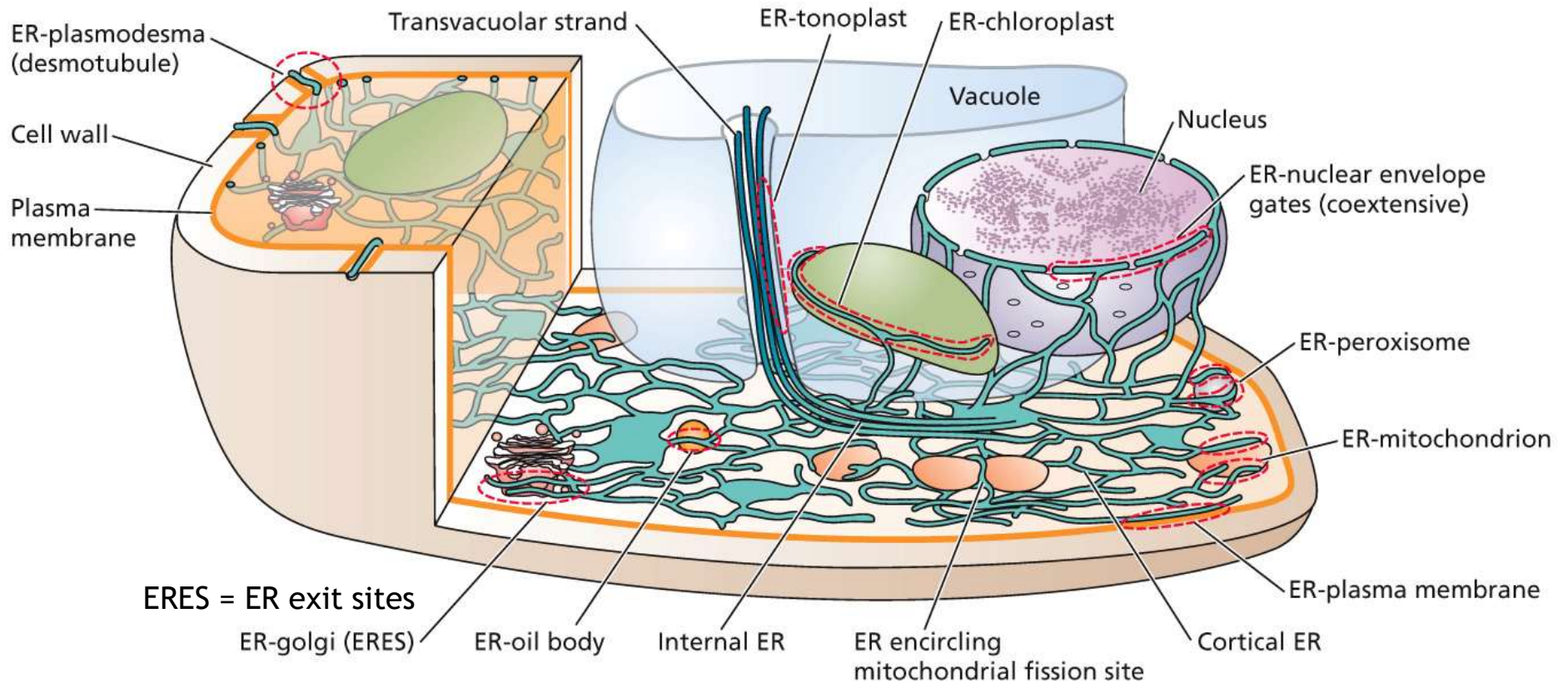
4. Endomembránový systém a transport

- ▶ Definice a hlavní směry transportu
- ▶ **Endoplasmatické retikulum (ER)** - drsné a hladké ER, izolace ER
- ▶ Funkce ER
 - ▶ ER proteiny obsahují signální peptid (sp)
- ▶ **Golgiho aparát (GA)** - objev, struktura, polarita
- ▶ Funkce GA
- ▶ **Vakuola** - objev, struktura, biogeneze, složení
 - ▶ Vacuolar sorting signal
- ▶ Funkce vakuol
- ▶ **Intracelulární membránový transport**
- ▶ Sekreční a endocytická dráha
 - ▶ Vezikulární transport - Rab, SNARE, PIP proteiny
- ▶ Transport z PM a z BS
- ▶ Objev a studium transportu



Endomembránový systém a transport

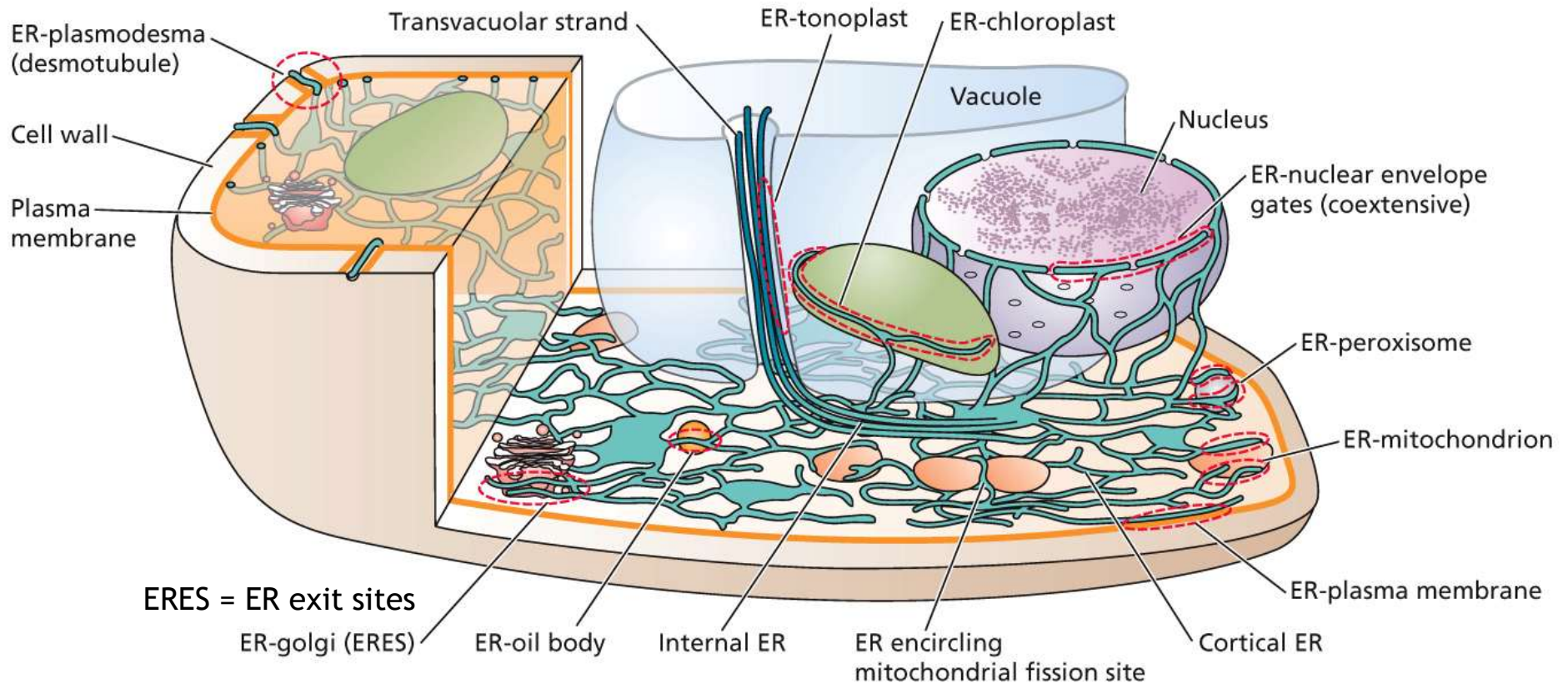
- ▶ Endoplasmatické retikulum (ER) tvoří základ endomembránového systému
- ▶ **Endomembránový systém** = membrány a organely (jaderný obal, PM, GA, vakuoly, endosomy...) které si vyměňují molekuly buď laterální difúzí nebo transportem specializovaných vezikul = **endomembrane trafficking**



- ▶ ER je také vstupní branou do sekreční dráhy (**secretory pathway**)

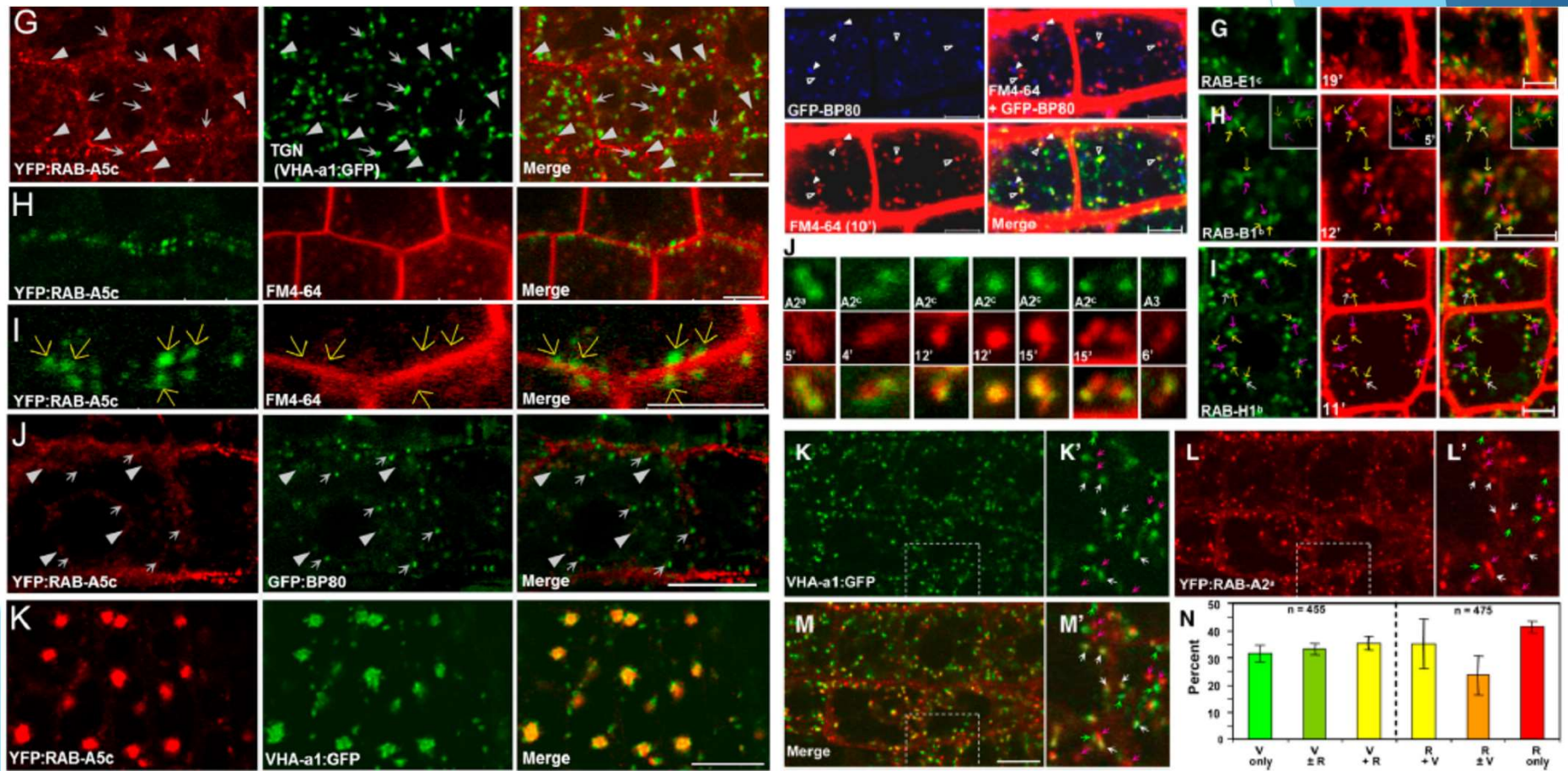
Endomembránový systém a transport

- ▶ Kortikální ER je napojeno na PM, prochází plasmodesmaty (desmotubule)
- ▶ Vnitřní ER se prochází transvakuolárními kanály; ER je kontinuální s jaderným obalem; ER je spojeno s Golgiho aparátem, mitochondriemi, chloroplasty, peroxisomy a olejovými tělisky.



- ▶ ER je také vstupní branou do sekreční dráhy (*secretory pathway*)

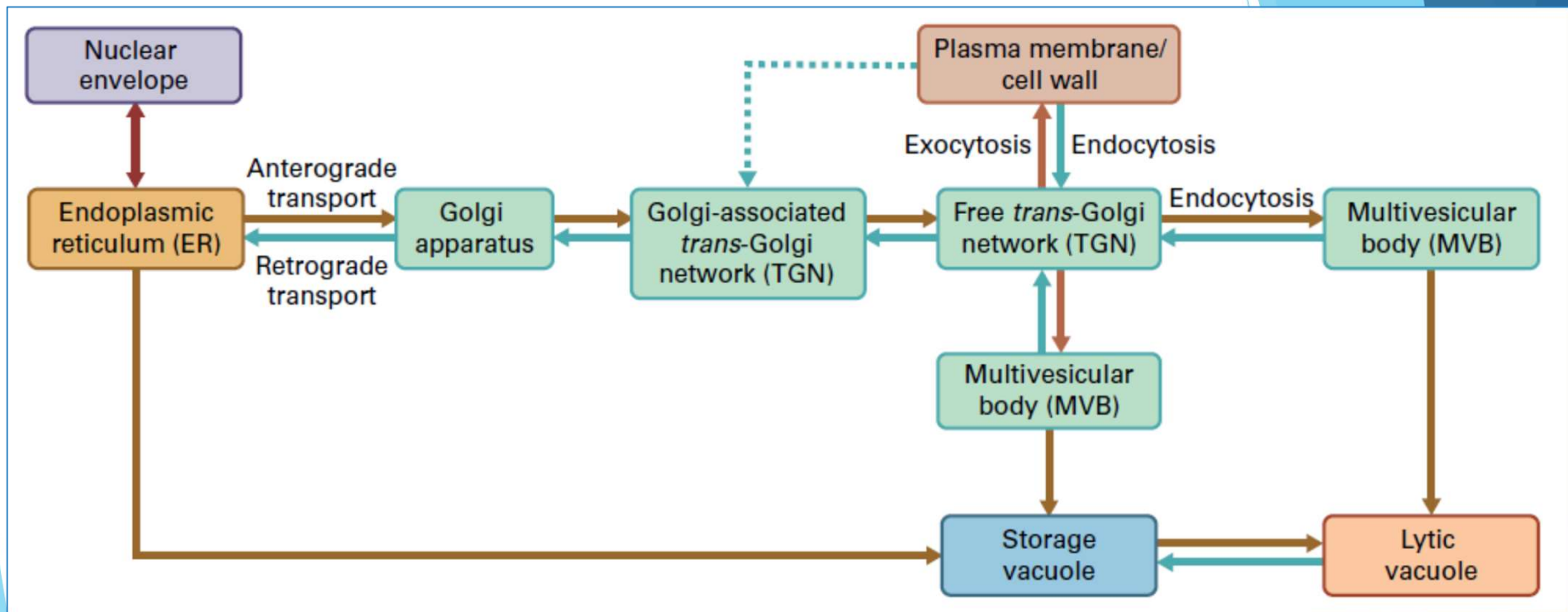
Studium membránového transportu v praxi



Kirchhelle *et al.*, Developmental Cell, 2016

Chow *et al.*, Plant Cell, 2008

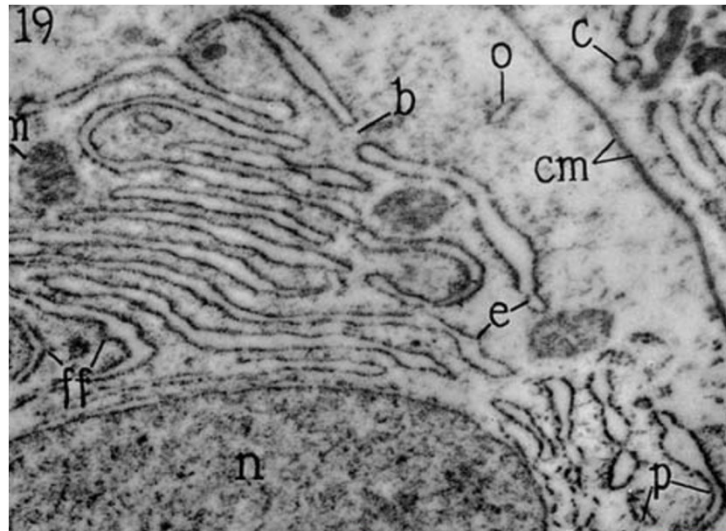
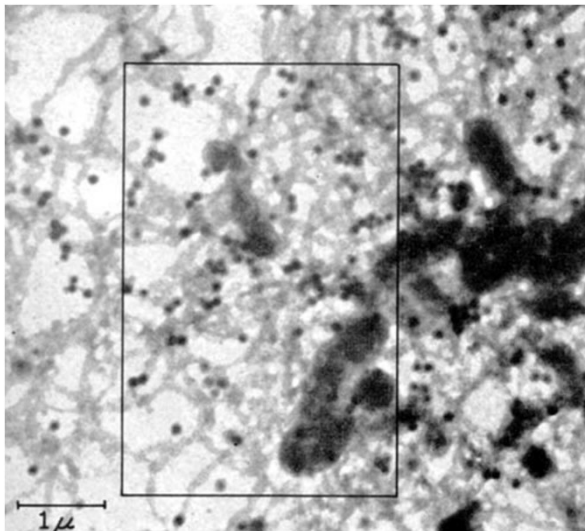
Hlavní směry endomembránového transportu



- ▶ **Klasická sekreční dráha: ER → GA → BS nebo vakuola**
 - ▶ Anterograde transport
- ▶ **Endocytická dráha**
 - ▶ Retrograde transport

Evoluce a objev endomembránového systému

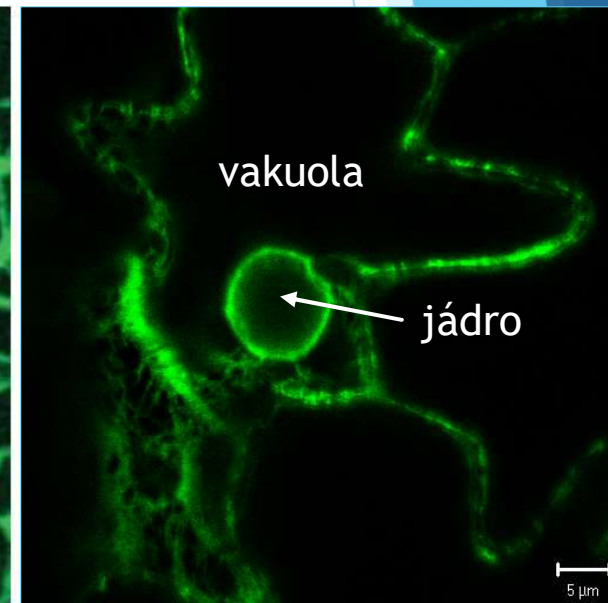
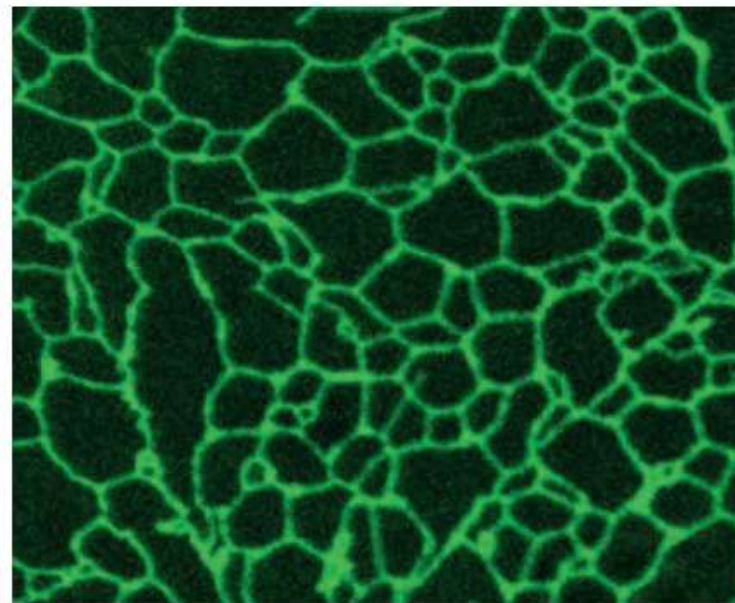
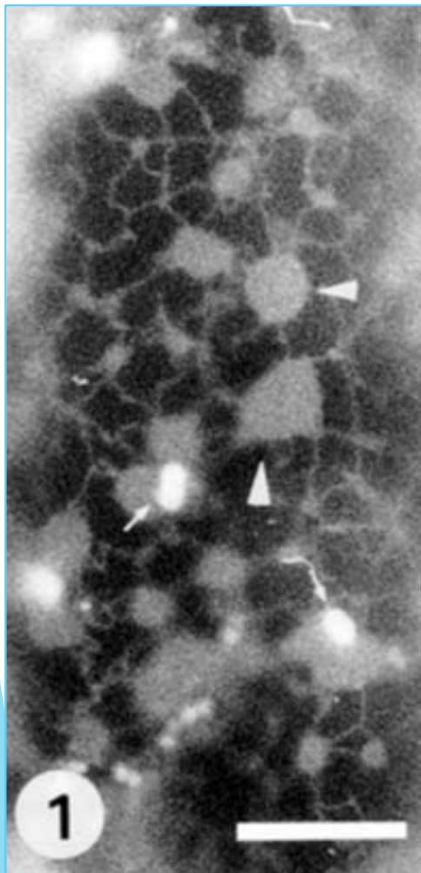
- ▶ Eukaryotická rostlinná buňka je přibližně 1000x větší než původní *prekurzor*.
 - ▶ nemožné provádět všechny požadované procesy pouze na PM.
- ▶ S vývojem větších buněk, docházelo k invaginaci PM, odštěpení a vytvoření měchýřků (vezikul) vázaných na membránu.
- ▶ Všechny vnitřní membrány, souhrnně známé jako **endomembránový systém** (ER, Golgiho aparát, vakuolární kompartmenty, vesikuly).
 - ▶ ER se zahrnuje více než polovinu všech membrán buňky.
- ▶ *Integrovaná studie kombinující elektronovou mikroskopii a biochemii vedla k Nobelově ceně udělené George Paladeovi (1975) za objevy v oblasti strukturální a funkční organizaci buňky.*



ER viděno elektronovou mikroskopii v 1940th (left) & řezy pomocí ultramicrotomu v 1950th (right).

ER tvoří síť vnitřních membrán

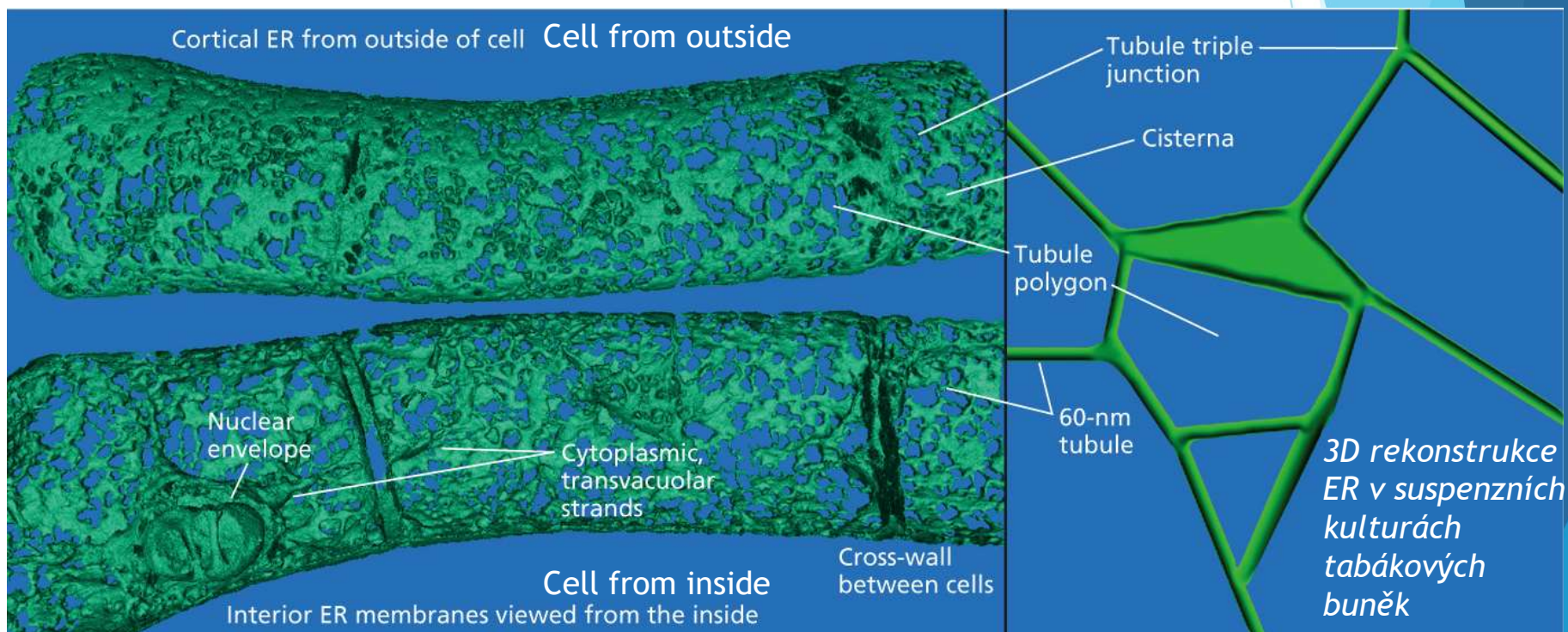
- ▶ ER je komunikační síť mezi organelami v buňce
- ▶ ER je velmi dynamické a mění se během vývoje buňky a v průběhu buněčného cyklu
- ▶ Lze barvit lipofilním, aniontovým, fluorescenčním barvivem, DiOC₆ (č/b obrázek) nebo značit fluorescenčními proteiny



10 μm

ER tvoří síť vnitřních membrán

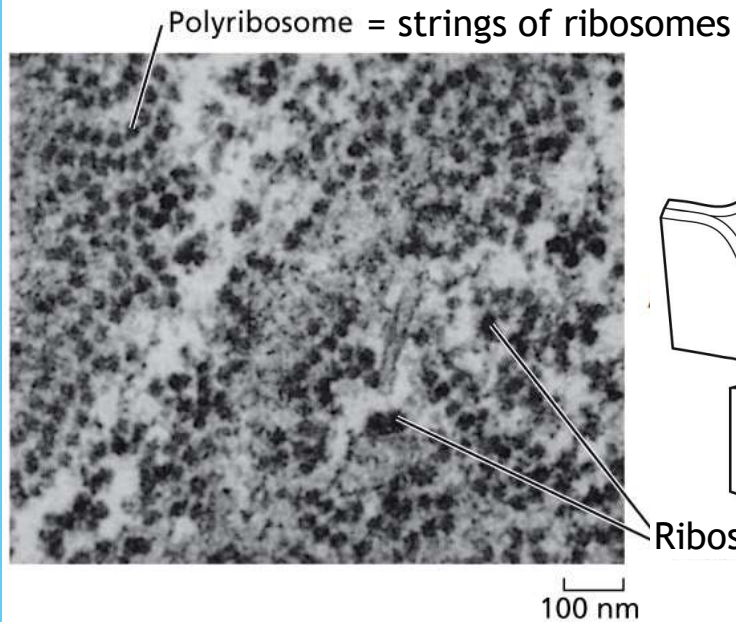
- ▶ ER je hlavním zdrojem membránových fosfolipidů a poskytuje proteiny další náklad (*cargo*) pro komponenty endomembránového systému.
 - ▶ ER je místem syntézy a dodávání lipidů a proteinů.
- ▶ ER se skládá z rozsáhlé sítě tubulů a zploštělých cisteren.



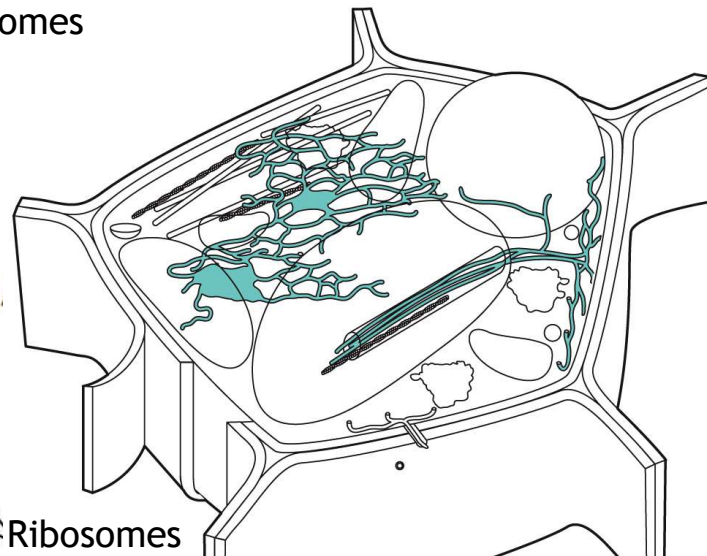
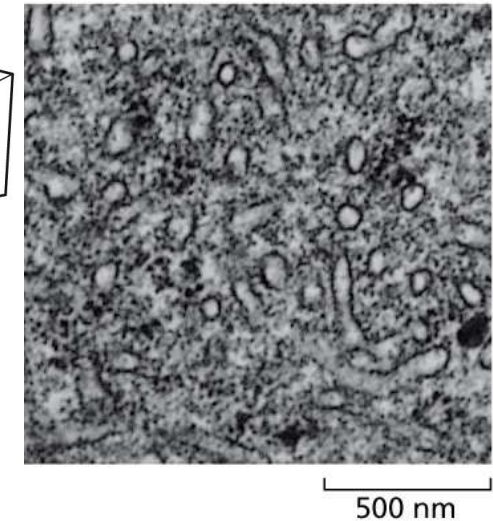
- ▶ *Kortikální ER* těsně pod, možná připojené k, PM; pokud je odděleno, je *vnitřní ER*.
- ▶ *Reticulony* ~ proteiny, které tvoří ER tubuly z membránových listů při expanzi buňky

Drsné a hladké ER (rough and smooth ER)

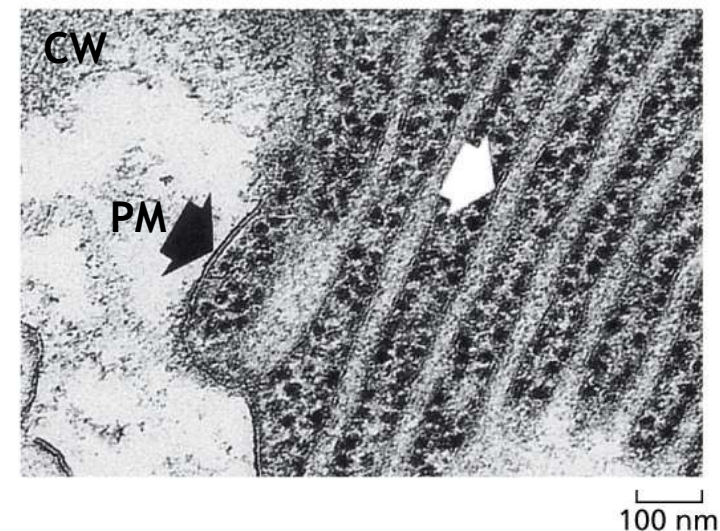
(A) Rough ER (surface view)



(C) Smooth ER (tubules in cross section)



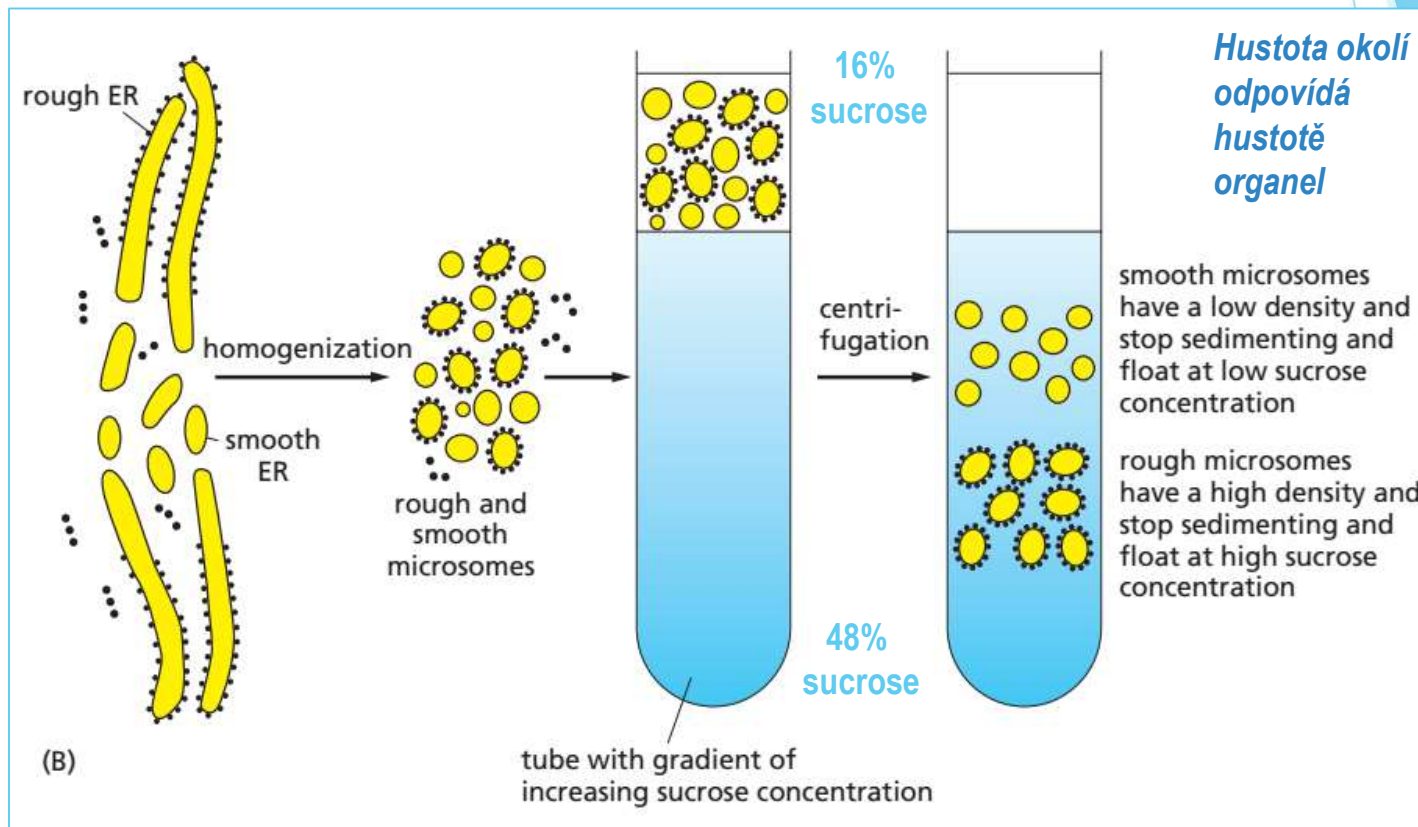
(B) Rough ER (stacked cisternae in cross section)



- ▶ Drsné ER (*rough ER, RER*) má na rozdíl od hladkého ER (*smooth, SER*) mnoho membránově vázaných ribozomů
 - ▶ Drsné ER - cisternové
 - ▶ Hladký ER - trubicovité
- ▶ Většina ER má schopnost vázat ribozomy, protože ER obsahuje *translocony* (slouží k *translokaci peptidů skrz membránu*)

Isolace ER (RER a SER)

- ▶ Homogenizace a poté centrifugace v gradientu hustoty sacharózy.
 - ▶ Zahrnutí EDTA k chelataci iontů Mg^{2+} pomáhá izolovat čisté membrány ER.
 - ▶ Kontrola čistoty pomocí markerové enzymy (často cytochoromy) např. spektrofotometricky, měřením enzymové aktivity.



Funkce ER - syntéza proteinů a lipidů

- ▶ První krok v biosyntéze membrán začíná na ER, kde jsou syntetizovány
 - ▶ proteiny (RER)
 - ▶ lipidy (hlavně SER).

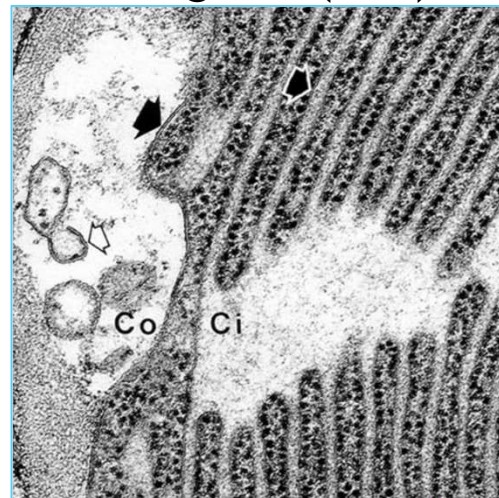
▶ *Strukturální specializace vyplývá z funkce!*

▶ **Syntéza proteinů** - proteiny se sp jsou translatovány na ER ribozomech

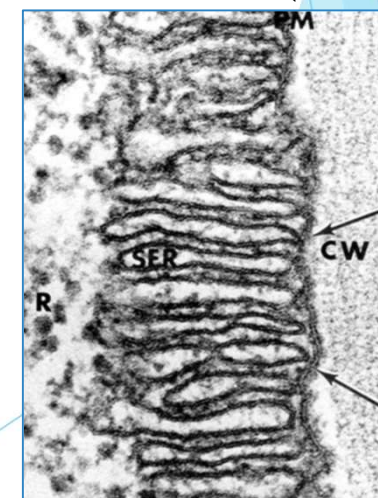
▶ Proteiny syntetizované na ribozomech připojených k ER

- ▶ importovány do ER hned když jsou syntetizovány = *kotranslačně*
- ▶ Proteiny syntetizované cytosolickými ribozomy vstupují do ER *posttranslačně*

Rough ER (RER)

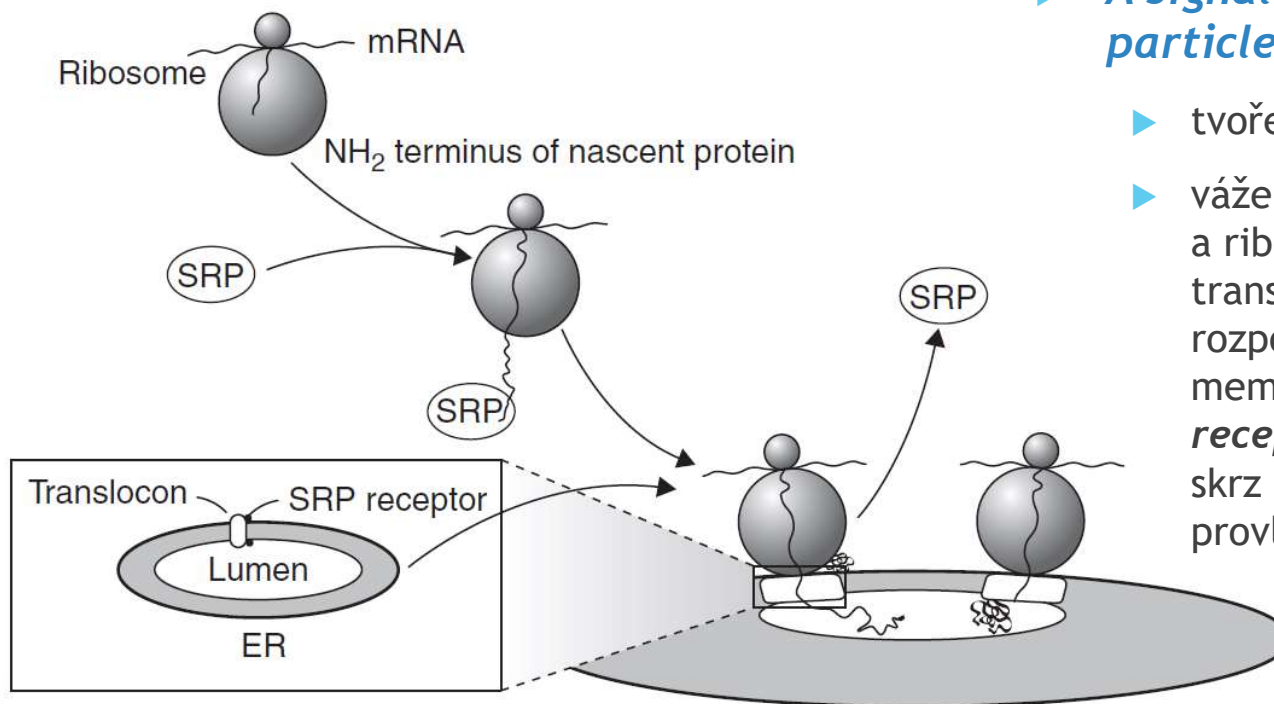


Smooth ER (SER)



ER proteiny obsahují signální peptid (sp)

- ▶ Syntéza proteinů - proteiny se sp jsou translatovány na ER ribozomech
- ▶ *Signální peptid* je hydrofobní sekvence (18-30aa), zodpovědná za translokaci proteinů do ER; obsahuje specifické místo pro štěpení signální peptidázou



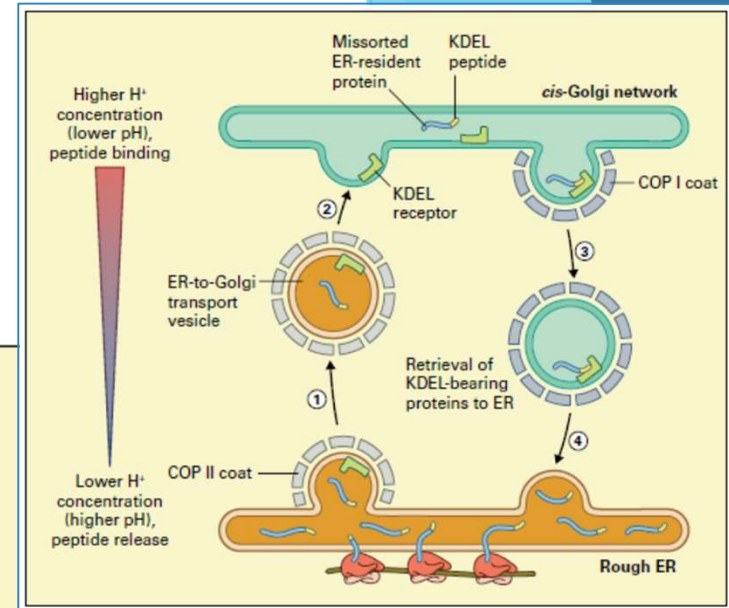
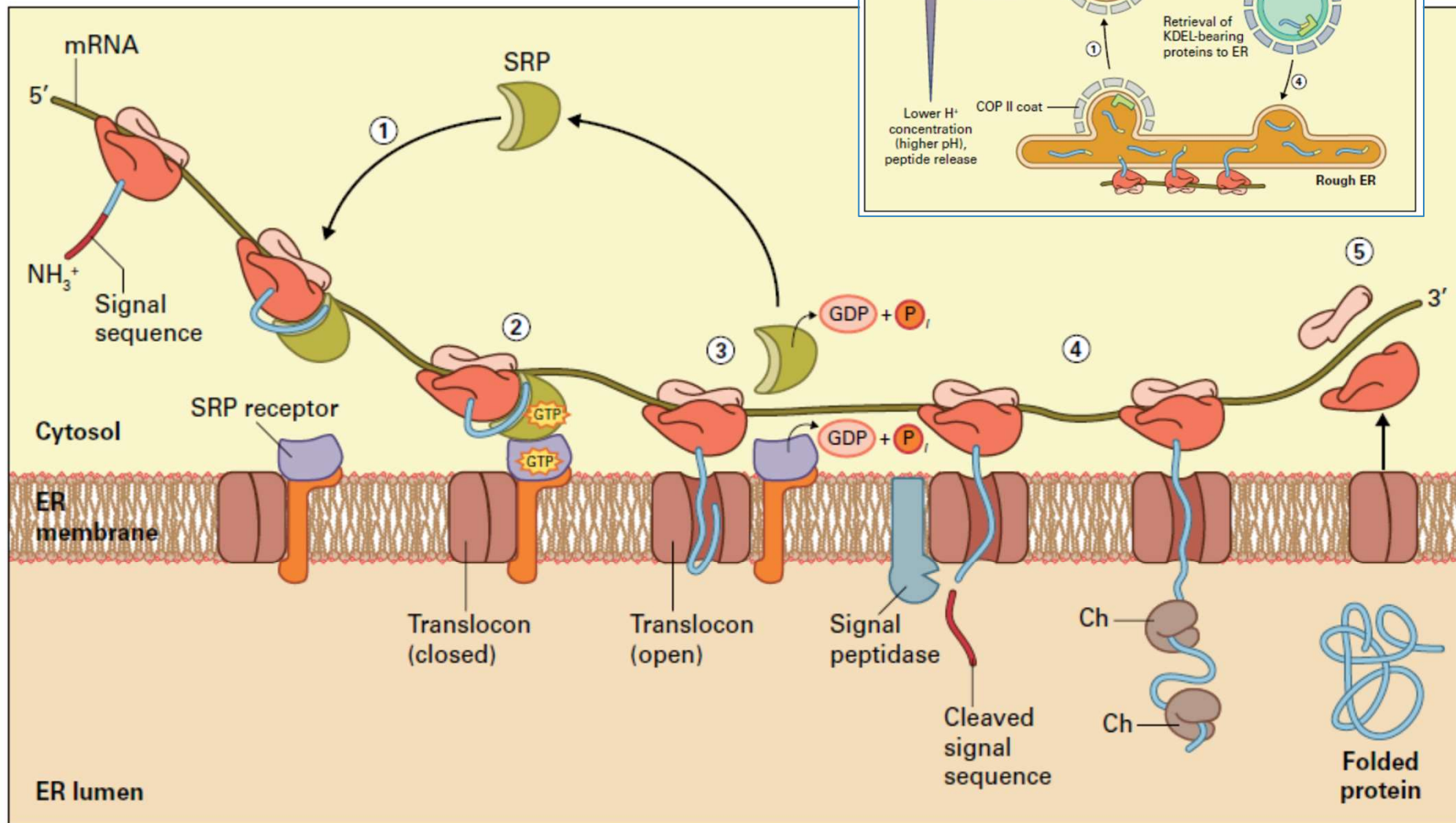
▶ *A signal recognition particle (SRP)*

- ▶ tvořená proteinem a RNA
- ▶ váže se na signální peptid a ribozom, čímž přerušuje translaci, dokud není rozpoznána ER membránovými *SRP receptory a translokony*, skrz které je nový protein provlečen

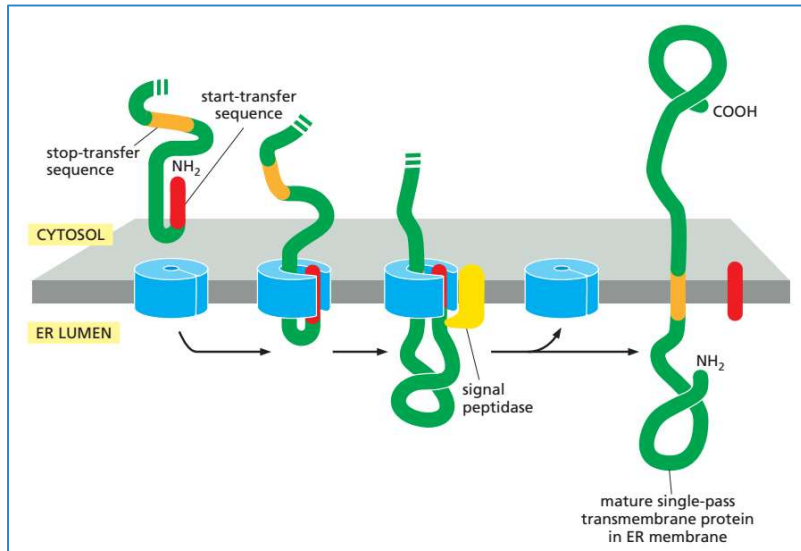
- ▶ *Günter Blobel získal Nobelovu cenu (1999) za fyziologii a medicínu, když ukázal, že nově syntetizované proteiny mají zabudovaný signál*

sp a KDEL proteinové sekvence

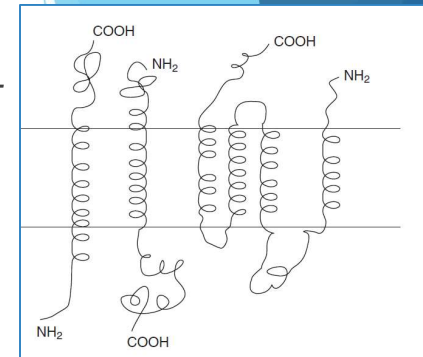
sp **GFP** HDEL



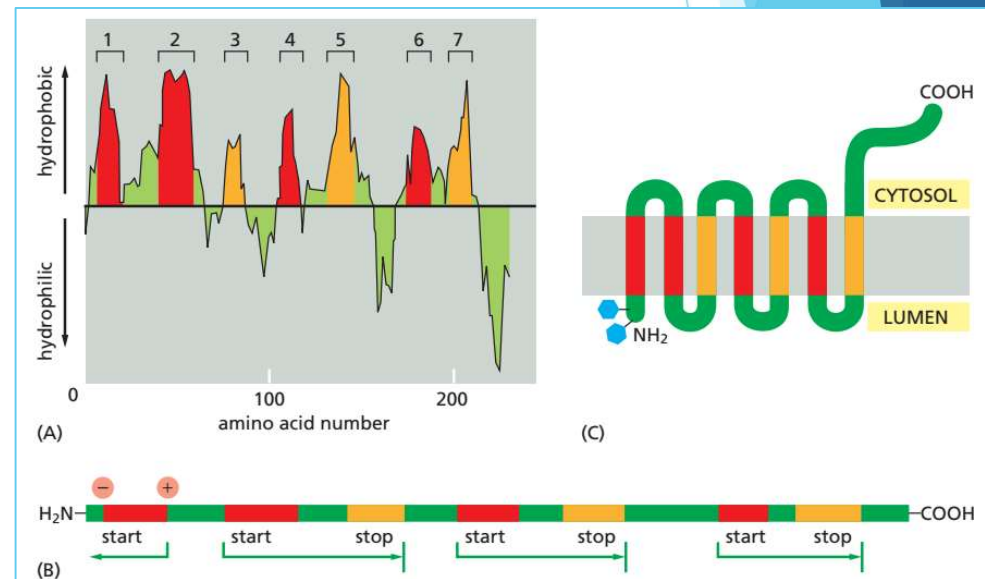
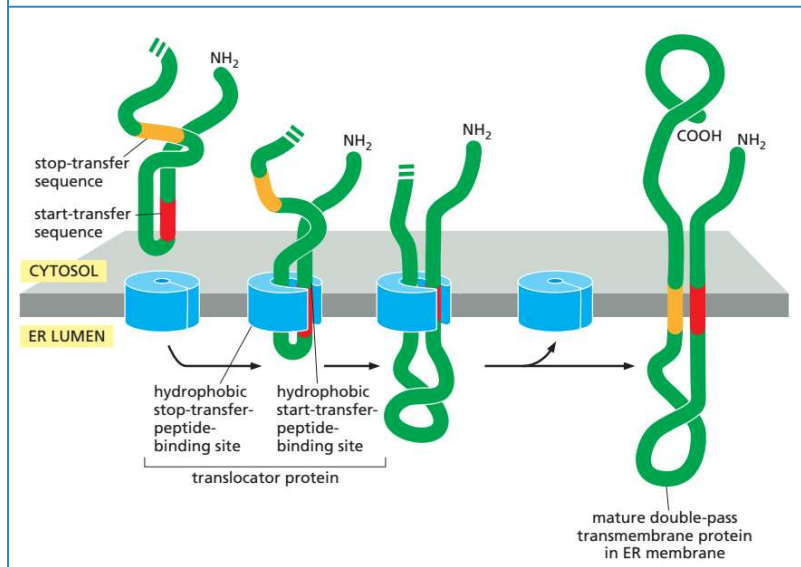
Membránové proteiny mají různou orientaci v ER



- ▶ První sekvence hydrofobních aa působí jako sekvence *start-transfer* a následné sekvence hydrofobních aa působí střídavě jako sekvence *stop*- a *start-transfer* (určeno hydrofobností a nábojem aa).



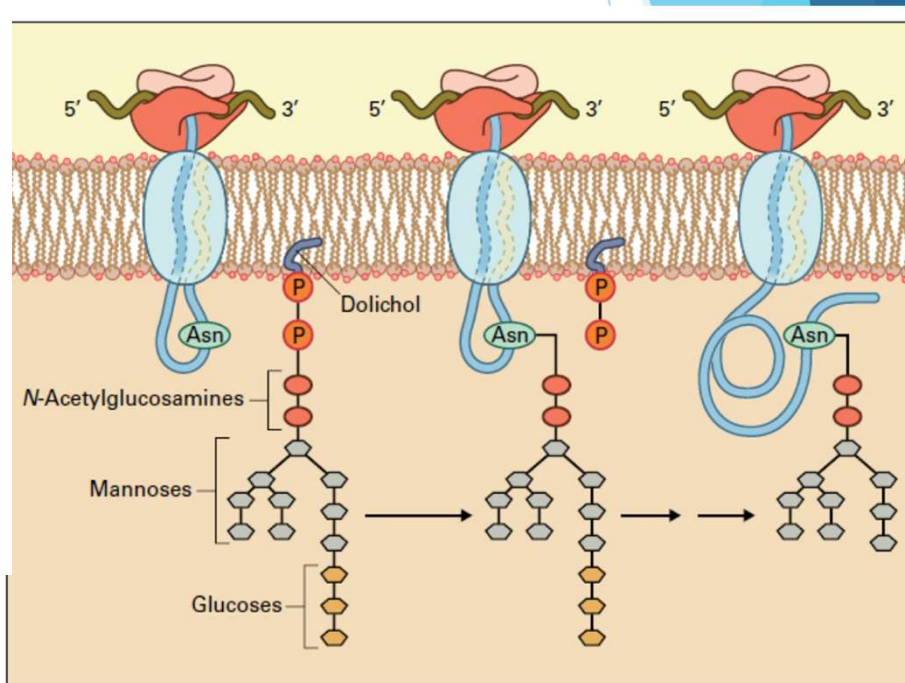
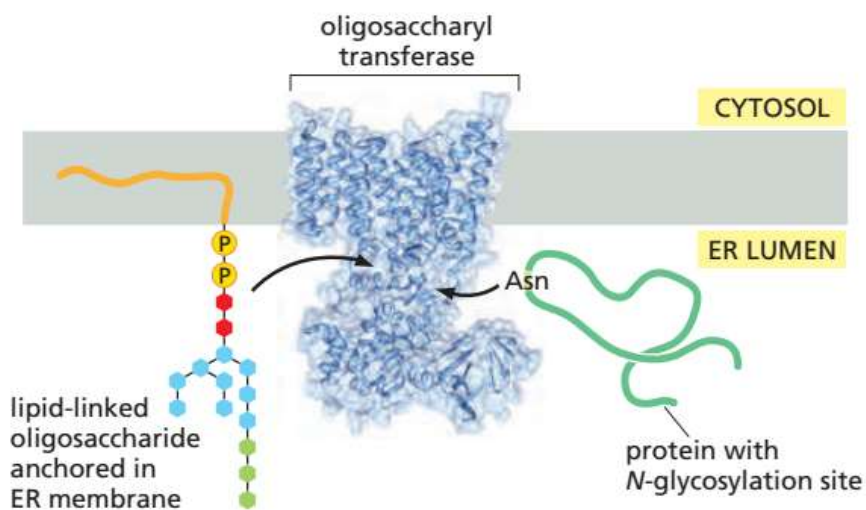
Kyte-Doolittle plot
 charakterizuje hydrofobnost proteinových oblastí



- ▶ Proteiny jsou syntetizovány od amino-konce ke karboxy-konci
- ▶ U *integrálních proteinů* může 7-21 nepolárních aa překlenout membránu

Funkce ER - glykosylace proteinů

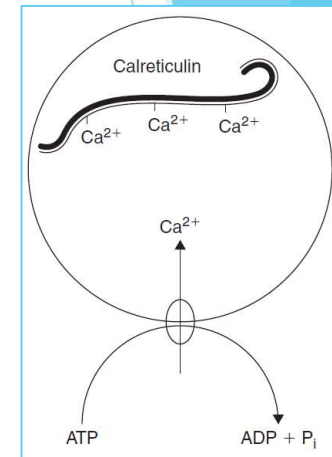
- ▶ Mnoho sekretovaných proteinů je N-glykosylovaných během translokace v ER.
- ▶ Glykosylace probíhá v ER, kde je jeden typ oligosacharidu [(N-acetylglukosamin)₂(manóza)₉(glukóza)₃] přidán k aminoskupině *asparaginu* (N): sekvence aminokyselin N-X-Ser/Thr
- ▶ Tak vznikají **N-vázané glykoproteiny** - proteiny s kovalentně vázanými cukernými řetězci pomocí enzymu *oligosacharyltransferázi*



- ▶ Než nově vytvořený glykoprotein opustí ER, odštěpí se 3x glukózový (a 1 mannózový) zbytek, čímž vzniká glykoprotein s vysokým obsahem manózy.

Funkce ER

- ▶ **Syntéza lipidů** - ER produkuje většinu lipidů potřebných pro syntézu membrán
 - ▶ tvorba fosfatidylcholinu z molekuly glycerol-3-fosfátu (z cytosolu), molekuly CDP-cholinu a dvou mastných kyselin-koenzymu A (z plastidů)
 - ▶ K syntéze dochází na cytoplazmatické straně membrány ER (hladké, *flippasy* (fosfolipidové translokátory specifické pro skupinu „hlavy“) je mohou „překlopit“ přes membránu (1/100 s)
- ▶ **Regulace obsahu Ca^{2+} v cytosolu**
 - ▶ ER, stejně jako PM, pomáhá řídit iontové složení cytosolu.
 - ▶ ER má Ca^{2+} ATPázu pumpující Ca^{2+} z cytosolu do lumenu ER
 - ▶ *Calreticulin* je protein vázající Ca^{2+} s nízkou afinitou a vysokou kapacitou (až 25 molekul vápníku!)
- ▶ **Syntéza fenypropanoidů a flavonoidů**
 - ▶ Fenypropanoidová dráha zapojená do syntézy flavonoidů je součástí rostlinné aromatické dráhy s hlavními enzymy zabudovanými v ER.
 - ▶ Enzymy spojené s cytosolickou stranou membrány ER.
 - ▶ Syntetizované flavonoidy jsou uloženy ve vakuole.
 - ▶ Začíná aa fenylalanin, který je prekurzorem fytoalexinů (obranných mechanismů); flavonoidy (barvy rostlin); lignin; kumarin (vůně čerstvě posekané trávy).

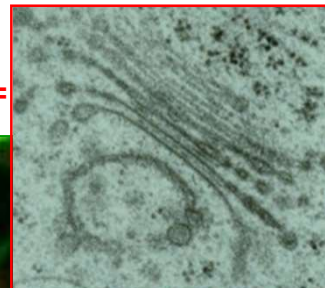


Objev Golgiho aparátu (GA)

- ▶ Camillo Golgi (1898) vizualizoval síťovité retikulum vláken v Purkyňových buňkách sovy, nazval to „*internal reticular apparatus*“
- ▶ GA má polymorfní vzhled, i mnoho názvů, např. v rostlinách diktyozóm (*dictyosome*)
 - ▶ U obratlovců se GA obvykle jeví morfologicky jako vláknitá síť, zatímco u bezobratlých a rostlin se jeví jako samostatné prvky.
- ▶ Až v 1957 bylo dokázáno, pomocí elektronového mikroskopu, že rostliny mají GA!

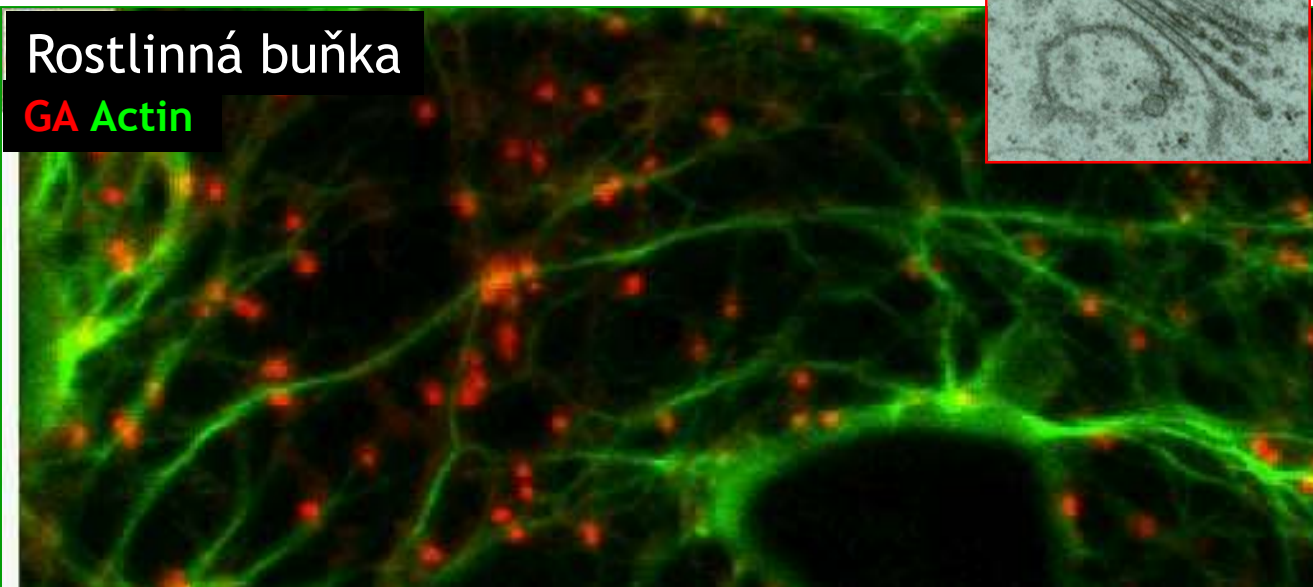
ST N RFP

Každá tečka =



Rostlinná buňka

GA Actin



Golgi, C. (1898)

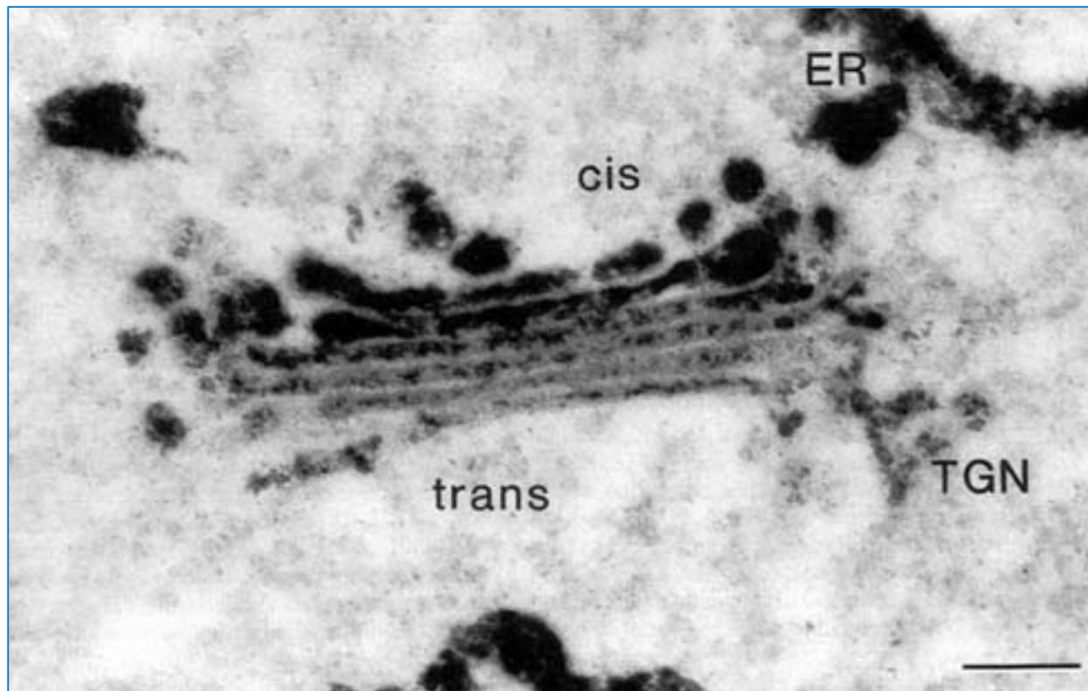


HeLa buňka

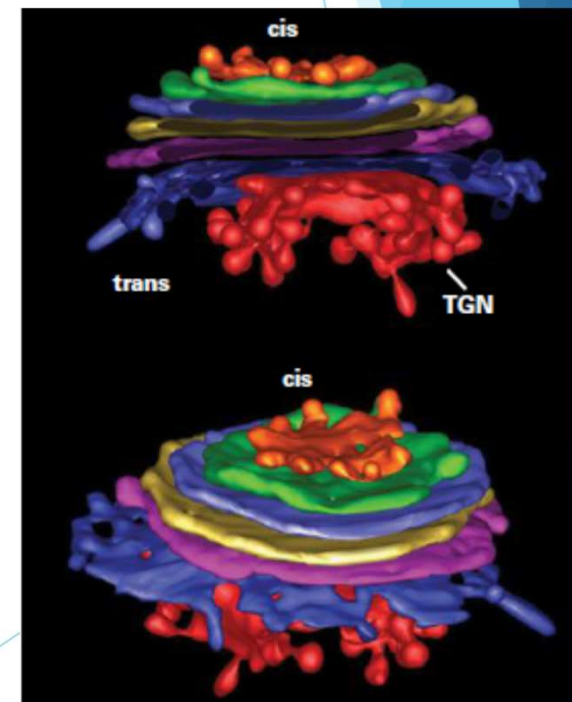


Struktura GA

- ▶ Golgiho aparát se skládá ze všech Golgi tělísek (*Golgi stacks*) v buňce!
- ▶ Architektura GA se liší od buňky k buňce a v průběhu života buňky:
 - ▶ až 100 Golgiho tělísek v Golgiho aparátu (meristémové buňky).
- ▶ Typicky 4-7 zploštělých cisteren (< 20 pozorovaných) nebo 1-2 u řas a hub
- ▶ Golgiho tělísko je **polární** seskupení cisteren:
 - ▶ *cis* strana (plošší cisterny) a *trans* strana (zahrnuje *trans Golgi network*, TGN).



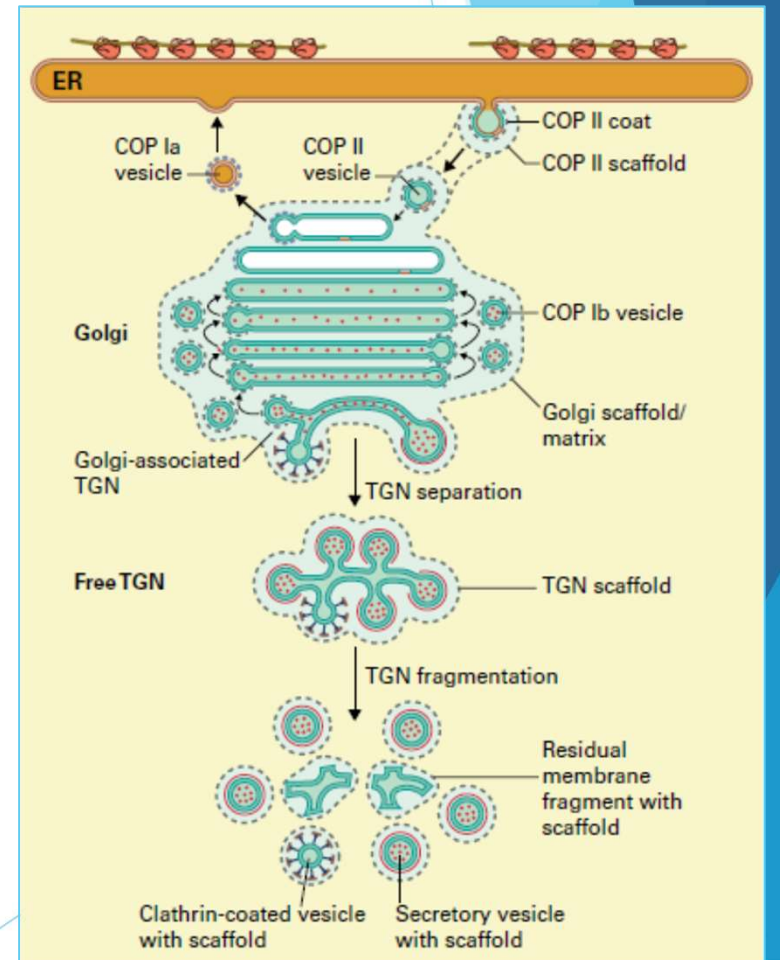
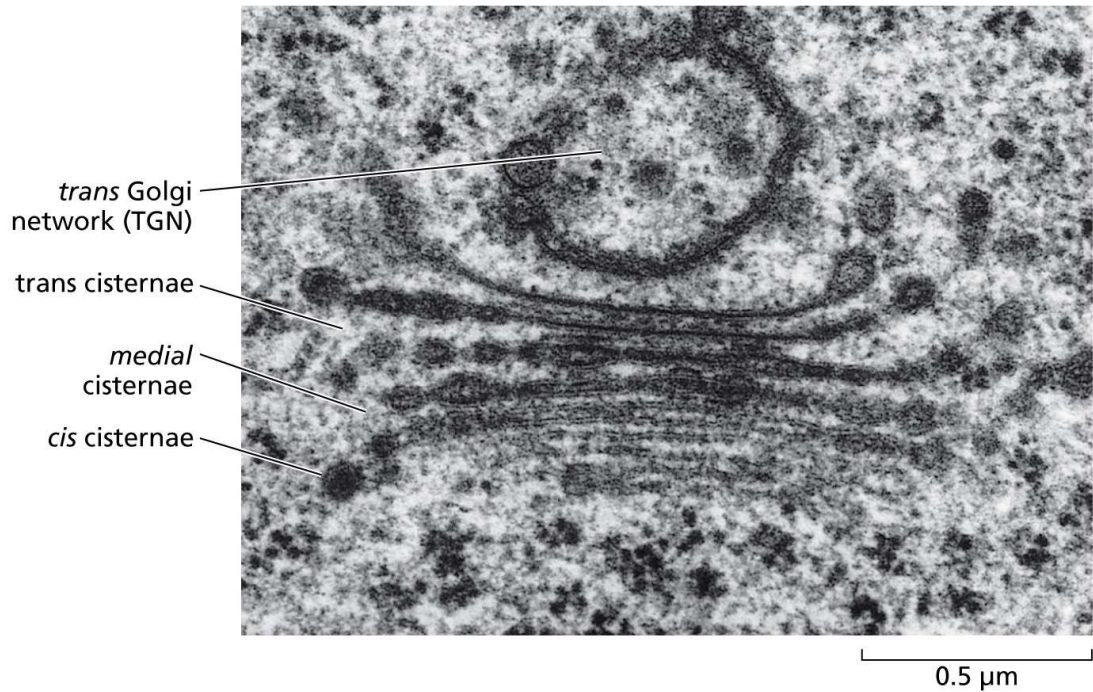
Elektronová mikroskopie, barvení zinc iodide-osmium



3D tomografický model

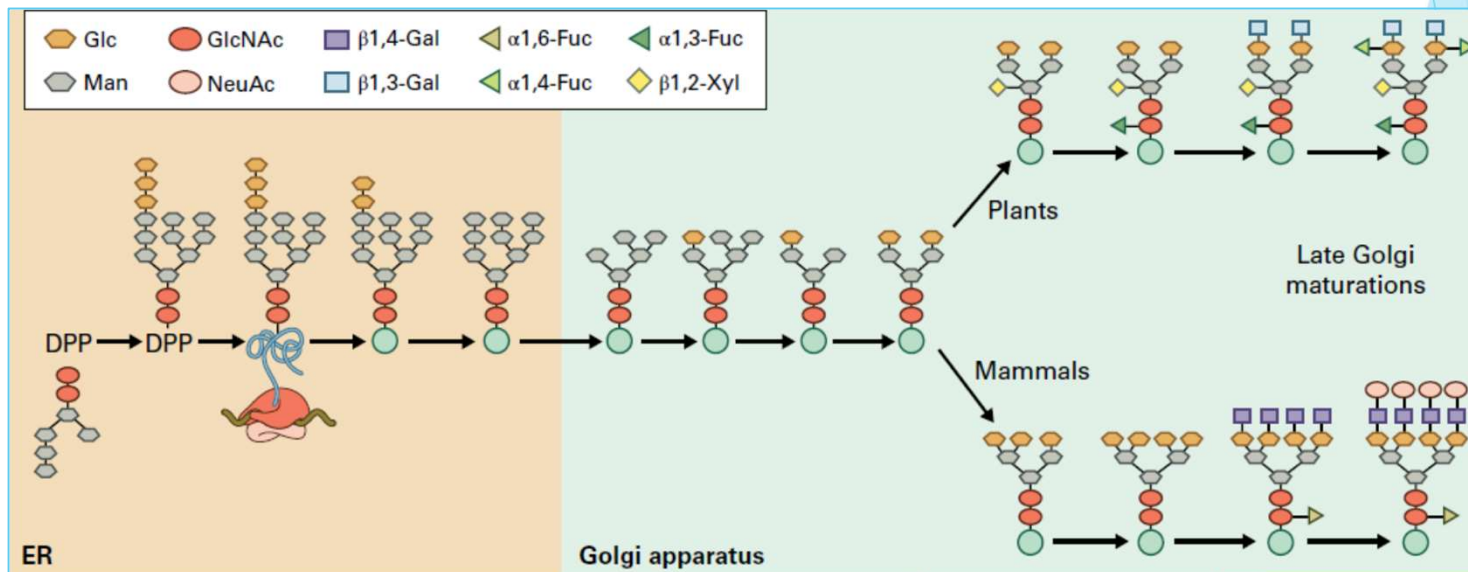
GA je organela, která vykazuje polaritu

- ▶ *cis* strana ~ dynamické asociace s ER prostřednictvím vezikul a tubulárních spojení
- ▶ *trans* strana ~ TGN z/do různých destinací, včetně PM, vakuol
 - ▶ typicky *anterográdní (anterograde)* pohyb *cis-to-trans*
 - ▶ také *retrográdní (retrograde)* pohyb z *trans-to-cis*!
- ▶ Polarita GA je zachována,
 - ▶ přestože membrány neustále protékají!



Funkce GA = továrna na sacharidy

- ▶ GA jsou pohyblivé organely, které využívají aktomyosinový systém.
 - ▶ Mnoho buněk rostlin a hub má specializovaný typ polarizovaného růstu (*tip growth*), kde jsou vezikuly odvozené od GA směřovány do jediného místa.
- ▶ Golgiho tělíska se mohou dělit štěpením nebo se mohou vytvářet z ER.
 - ▶ Jejich počet reguluje sekreci během růstu a diferenciaci.
- ▶ **Různé cisterny v jednom Golgiho těle mají různé enzymy.**
- ▶ Zpracovávají polysacharidy pro BS nebo glykoproteiny pro BS a vakuoly.
 - ▶ např. modifikace N-vázaných glykoproteinů, glykosylace -OH skupin hydroxyprolinu, serinu, threoninu a tyrosinu (O-vázané oligosacharidy)



Glykoproteiny a polysacharidy určené k sekreci jsou zpracovávány v GA

▶ Zpracování sekretovaných i jiných glykoproteinů

- ▶ Vysokomannosové glykoproteiny z ER a jejich oligosacharidy jsou dále zpracovávány různými **glykosylázami** za vzniku komplexních glykoproteinů.
- ▶ O-vázané glykosylační reakce připojují cukry k hydroxylové (OH) skupině Ser nebo Thr, např. proteiny bohaté na arabinogalaktan v BS
 - ▶ Např. enzymy degradující BS při abscisi, hydrolázy potřebné při klíčení a trávící enzymy u hmyzožravých rostlin

▶ Syntéza sacharidů a jejich sekrece do BS

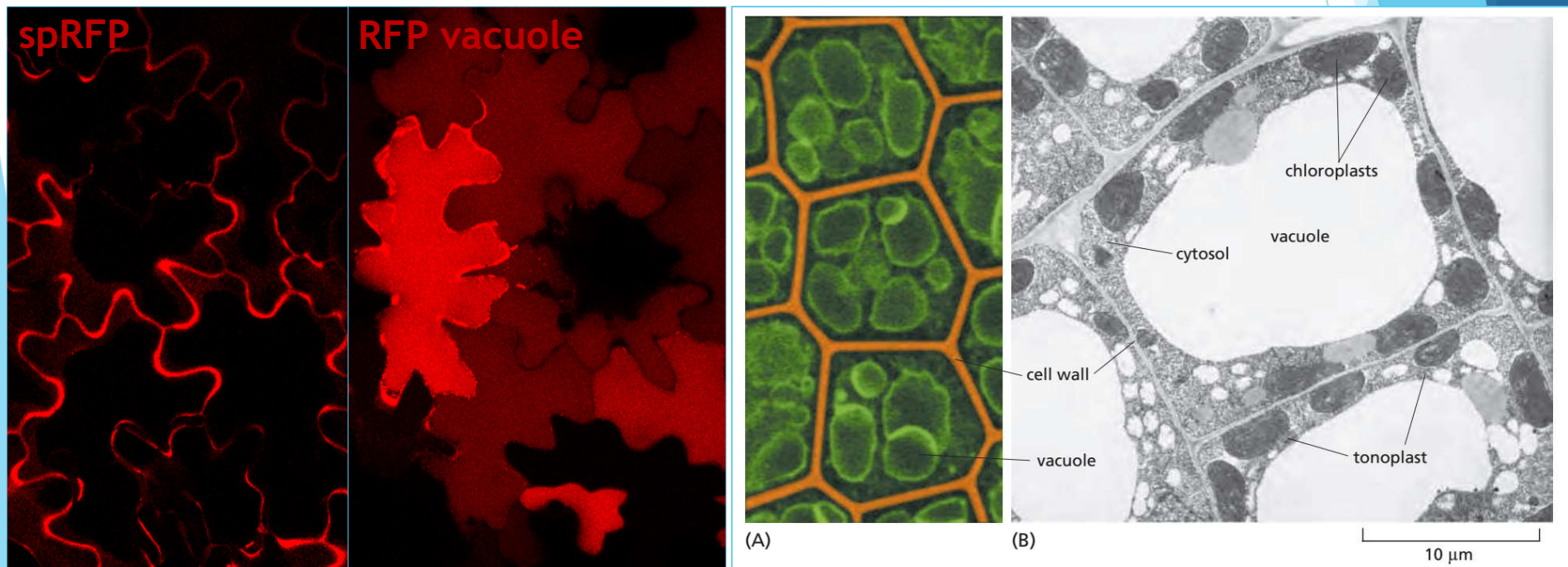
- ▶ V rostlinách jsou hlavními sekrece produkty téměř všech buněk **komplexní polysacharidy**, včetně **pektinů a hemicelulóz**, které jsou vylučovány do BS.
- ▶ komplexní polysacharidy: rozvětvené, složené z > 12 různých monosacharidů, což naznačuje, že mohou být potřeba stovky specifických **glykosyltransferáz**
- ▶ enzymy jsou lokalizovány odděleně v různých cisternách a vezikulách GA
 - ▶ Např. pektiny jsou iniciovány a prodlužovány v *cis*-Golgiho cisternách, methyl esterifikovány v mediálních Golgiho cisternách a postranní řetězce jsou přidány v *trans*-Golgiho cisternách

▶ Transport cukrů z cytosolu

- ▶ GA obsahují **transportéry** (dolicholy nebo proteiny), které přenášejí nukleotidy aktivované cukry (schopné účastnit se glykosylačních reakcí) do lumenu GA

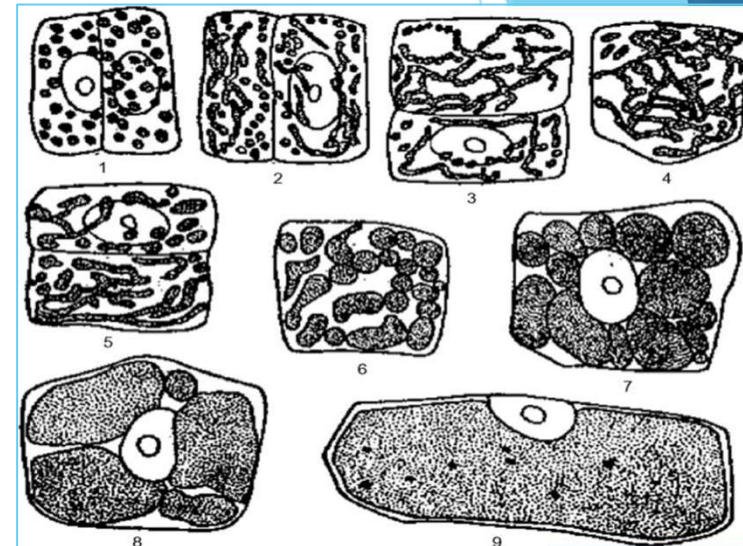
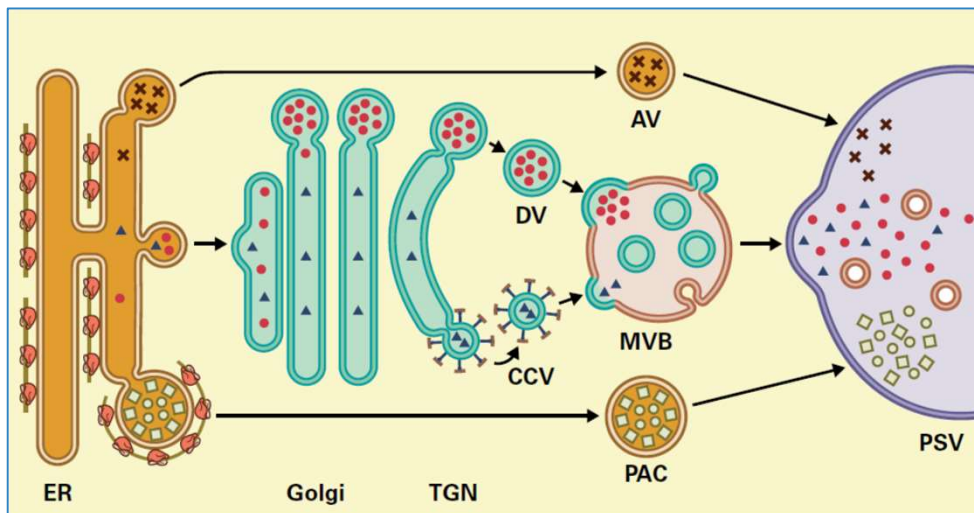
Objev vakuol

- ▶ Kontraktilní vakuoly („stars“) byly poprvé pozorovány u prvoků v 18. století.
- ▶ Matthias Schleiden (1842) pozoroval, že většina rostlinných buněk obsahuje nápadnou centrální oblast, která se ve světelném mikroskopu jeví jako prázdná, z latiny *vacuole* = „prázdná“
 - ▶ Vakuolární šťáva (*vacuolar sap*) (voda a rozpuštěné látky) uzavřená propustnou vakuolární membránou (*tonoplast*).
- ▶ Hugo de Vries (1880) pozoroval epidermální buňky *Tradescantia* a všiml si, že buněčné stěny se vybouřily, když byly buňky umístěny do čisté vody.



Struktura, biogeneze a dynamika vakuol

- ▶ **Vakuolární systém** = všechny vakuoly obsažené v buňce během vývoje.
- ▶ Vakuoly se liší velikostí a vzhledem, např. jedna centrální vakuola vs. mnoho malých vakuol v meristematických buňkách

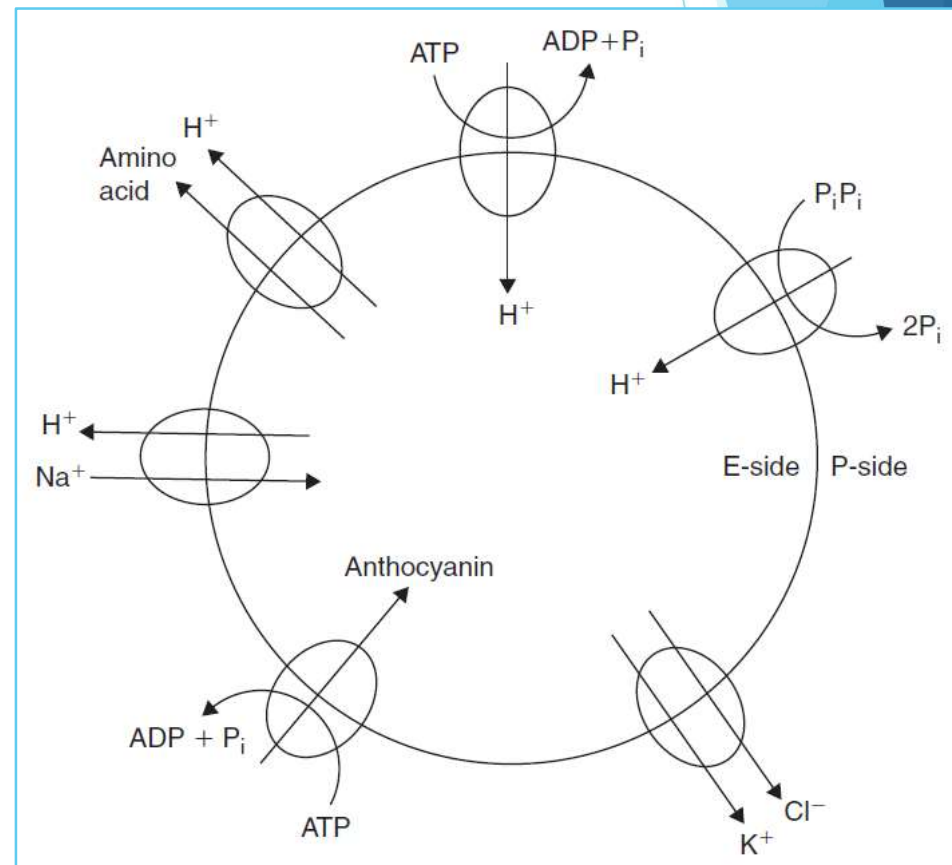


Vakuolární systém kořenových buněk ječmene zbarvených *neutralní červení* (*neutral red*).

- ▶ Většina vakuol se tvoří z **membrán TGN**.
- ▶ Nově vytvořené vakuoly se spojí (*MVB, multi-vesicular bodies*) a vytvoří větší vakuoly.
- ▶ Provakuola (nebo fagofor) se může tvořit *de novo* z **PM** např. během fagocytózy.
 - ▶ Minimálním požadavkem je syntéza tonoplastu (vakuolární membrány), který obsahuje transportéry nezbytné ke zvýšení osmotického tlaku v lumenu.
- ▶ Vakuoly se mohou tvořit také přímo z **ER**, tzv. protein-body ER, dává vzniknout přímo vakuolám pro ukládání proteinů.

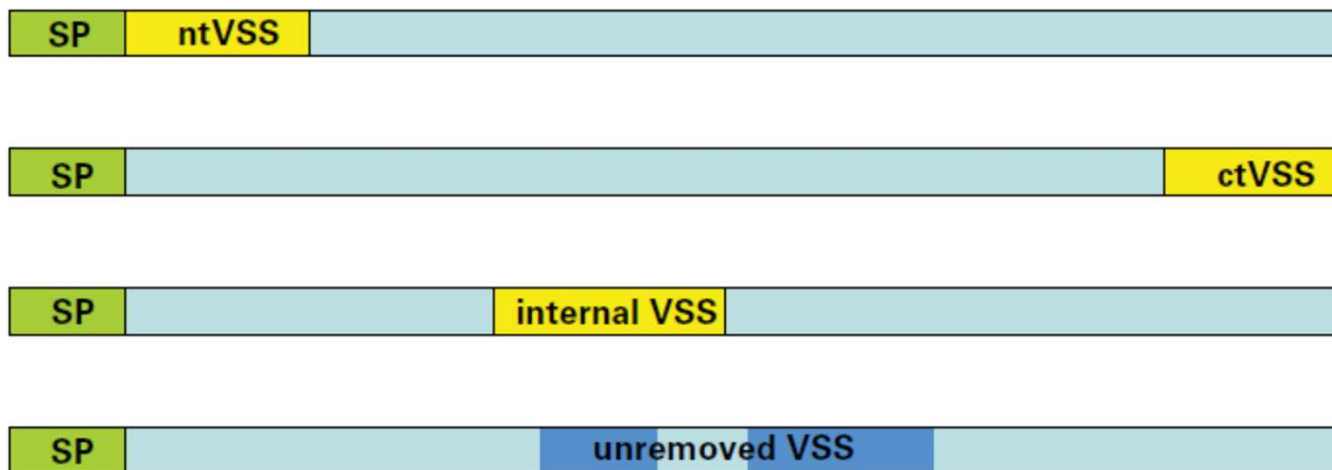
Složení vakuol

- ▶ Nespecifické **hydrolytické enzymy**, které mají typicky **kyselé pH optimum**,
 - ▶ např. proteázy, esterázy (např. fosfatáza), fosfodiesterázy (např. RNáza a DNáza) a acylesterázy (např. lipáza).
 - ▶ α -mannosidáza se používá jako marker
- ▶ **Lipidy** vakuolární membrány jsou podobné, ale ne totožné, s ostatními membránami.
 - ▶ podobná funkce bariér
- ▶ *Transport přes vakuolární membránu*
 - ▶ Proton-translokační pumpy (V-ATÁáza, H^+ -PPáza)
 - ▶ ABC transportéry (neboli transportní ATPázy)
 - ▶ Vakuolární kanály
 - ▶ Vakuolární přenašeči



Vacuolar sorting signals (VSS)

- ▶ VSS (žlutý box) - odstraněn z pro-peptidů **post-translačně**, když je dopraven do vakuoly.
- ▶ Může být N-terminální (*ntVSS*), C-terminální (*ctVSS*) nebo interní VSS.
- ▶ Někdy VSS není odstraněn (*unremoved VSS*), potom je exponován na povrchu složeného proteinu a může být tvořen různými částmi polypeptidu.



- ▶ **Signal peptide (sp)** - u všech sekrečních proteinů nezávisle na finální lokaci
 - ▶ odstraněn *co-translačně*!!
 - ▶ nemá vliv na vacuolar sorting

Vakuoly mají v rostlinných buňkách různé funkce

▶ Role v expanzi buněk ~ až 95 % celkového objemu buněk, typicky >60 %

- ▶ umožňuje rostlině dosáhnout velké rozměrů s minimální investicí do energeticky náročných sloučenin (celulóza, nebo proteiny), místo toho je vakuola naplněna vodou
- ▶ velká centrální vakuola vytlačuje cytoplazmu do stran, kde je vzdálenost od atmosféry (O_2 , CO_2) k chloroplastu nebo mitochondriím minimální

▶ Role v generaci turgoru

- ▶ V důsledku přítomnosti rozpuštěných látek v buňce, rozdílné permeability PM a tuhosti BS, voda vstupuje do buněk a vytváří **turgorový tlak**:
 - ▶ je hnací silou pro další expanzi a formování buněk.
- ▶ Rostliny rostoucí v prostředí s vysokým osmotickým tlakem (daný přítomností solí) musí produkovat dostatečný **osmotický tlak** ve svých buňkách, aby umožnily příjem vody nezbytné pro život a růst.
 - ▶ V závislosti na buňce glycerol, trehalóza, betainy a prolin mohou zvyšovat osmotický tlak cytosolu nebo organely. Osmotický tlak vakuoly a cytoplazmy musí být stejný.
- ▶ Složky, které obvykle nejvíce přispívají k osmotickému tlaku vakuoly, jsou Na^+ , K^+ a Cl^-



Vakuoly mají v rostlinných buňkách různé funkce

▶ Proteolýza a recyklace

- ▶ *Lytické vakuoly* ~ role v přeměně proteinů na aa, které jsou recyklovány.
- ▶ *Autofagozomy* ~ specializované lytické vakuoly spojené s programovanou buněčnou smrtí (*autofagie* při hladovění, buňky recyklují vlastní protoplazmu).
 - ▶ *Selektivní autofagie* umožňuje recyklaci dysfunkčních proteinů a organel (jako jsou chloroplasty poškozené UV světlem nebo peroxisomy H_2O_2).

▶ Skladovací prostor a homeostáze

- ▶ udržování buněčné homeostázy (ionty, voda a aminokyseliny)
- ▶ udržují hladiny organických a anorganických molekul (mohou být toxické)
- ▶ udržují rovnováhu vody s cytosolem, aby mohly probíhat enzymatické reakce

▶ Vakuoly jsou **typicky kyselé** (pH 5), zásobárna H^+

- ▶ pro regulaci pH mohou být zásadité (výměna Na^+/H^+)

▶ Skladování živin (PO_4 , ionty, aa, cukry, malát)

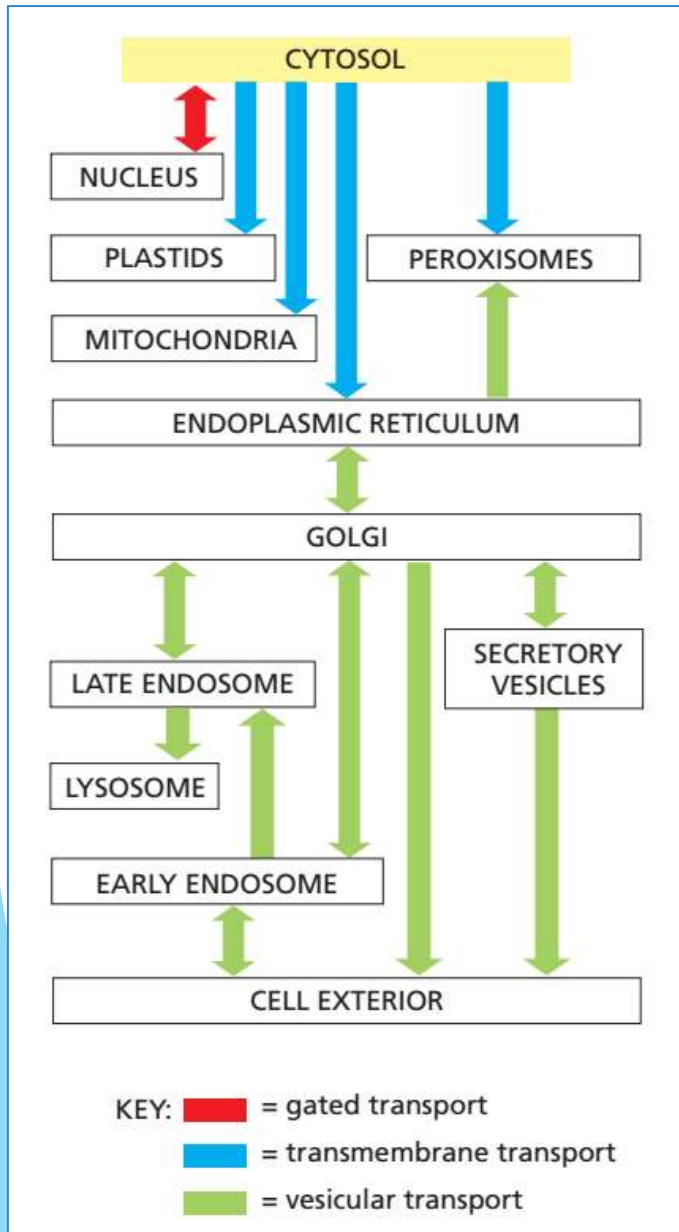
- ▶ sekundárních metabolitů (alkaloidy)
- ▶ pigmentů (anthokyaniny)
- ▶ bílkovin = *protein bodies* v semenech



Break

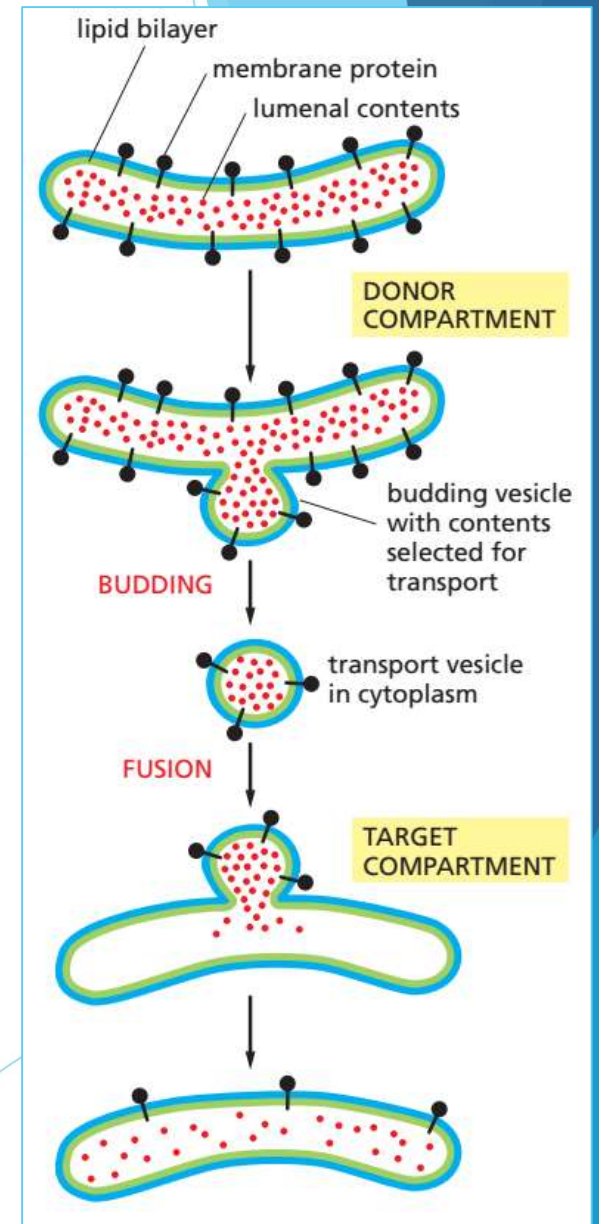


Intracelulární membránový provoz

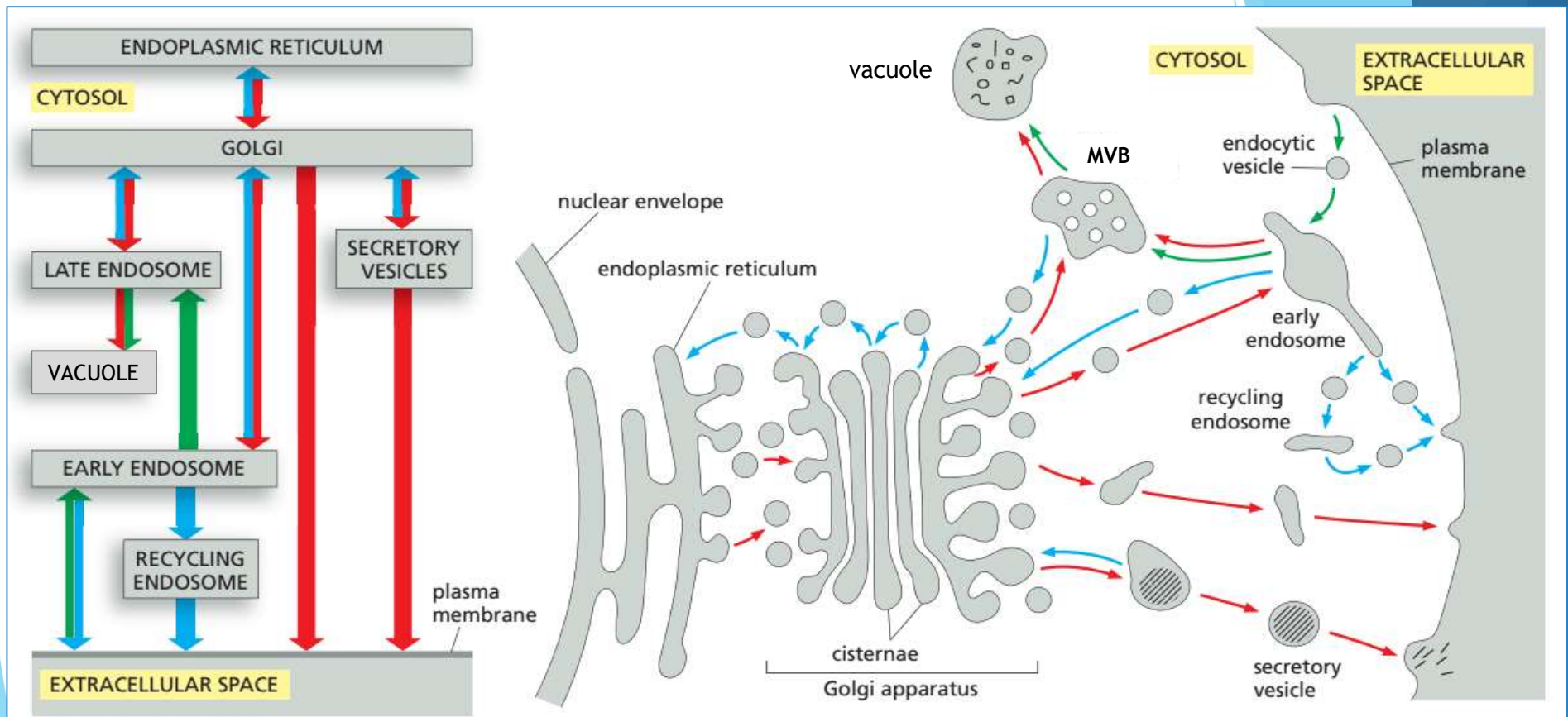


Vesicular trafficking

- ▶ Transportní vezikuly vyrazí z jednoho oddělení (*donor*) a spojí se s druhým (*target*).
- ▶ Vezikuly přenášejí materiál (*cargo*) z lumenu, stejně tak jako membránu z dárcovského do cílového oddělení (*compartment*).
- ▶ Procesy pučení (*budding*) a fúze.
- ▶ Proteiny i lipidy si zachovávají svou orientaci!!!



Sekreční a endocytická dráha “cestovní mapa”



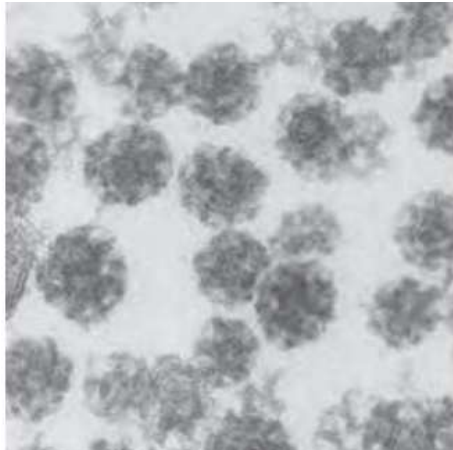
- ▶ Sekreční dráha (*secretory pathway*) červené šipky
- ▶ Endocytická dráha (*endocytic pathway*) zelené šipky
- ▶ Zpětný tok komponentů (*retrieval*) modré šipky

Fusion vs Fission ~ nová membrána se může oddělit od stávající membrány!!!

Vesikulární přenos je zprostředkovaný 3 typy obalových proteinů (*coat*)

- ▶ Anterogate transport (COPII)
- ▶ Retrograde transport (COPI)
- ▶ Membrane recycling (clathrin)

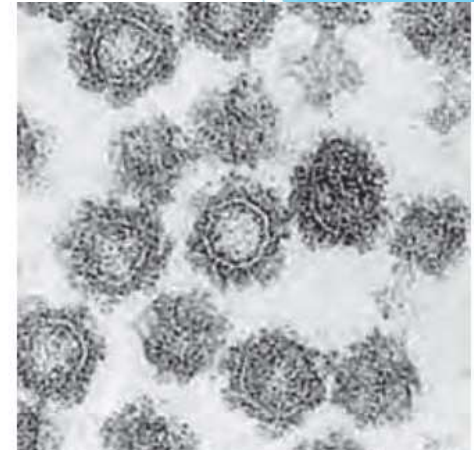
▶ clathrin-coated vesicles



COPI-coated vesicles

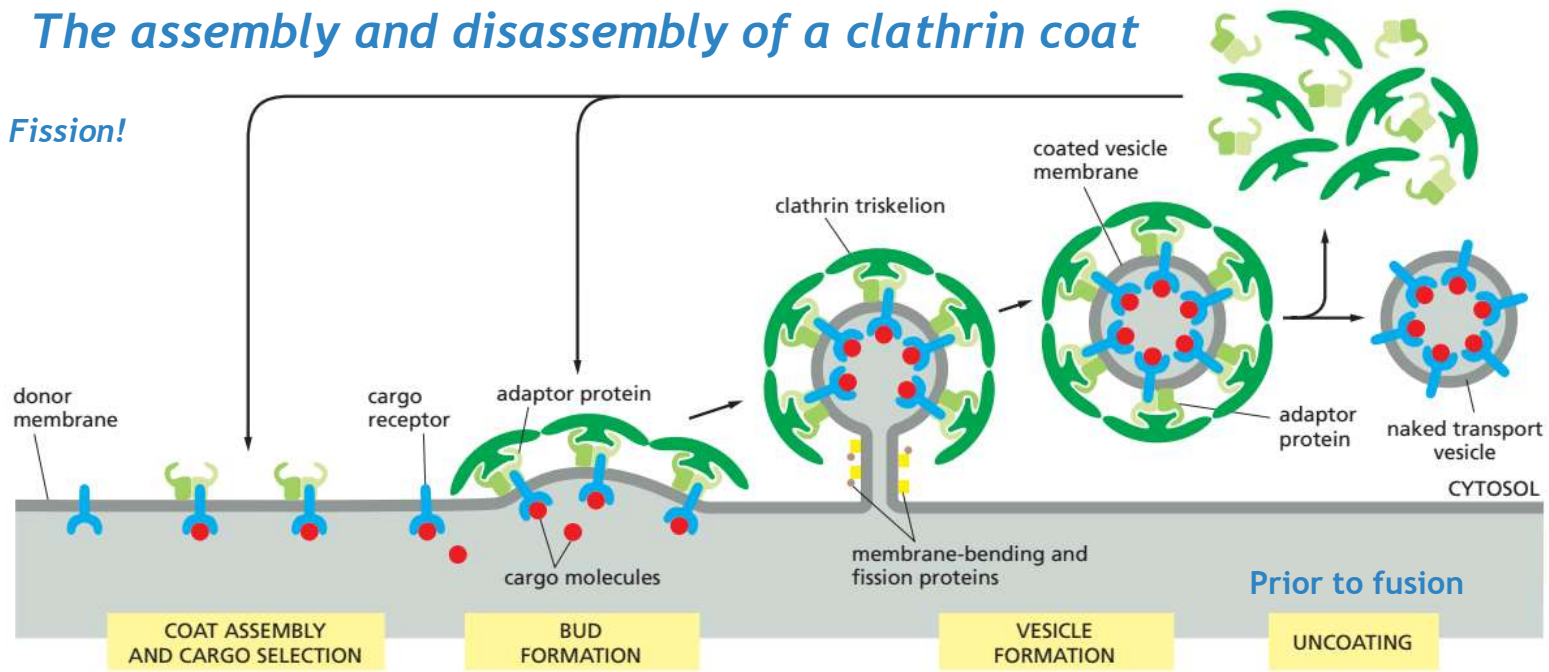


COPII-coated vesicles



The assembly and disassembly of a clathrin coat

▶ *Fission!*



1. COPII-coated vesicles bud from the ER and are transported to the *cis* face of the Golgi apparatus.

2. Cisternae progress through the Golgi stack in the anterograde direction, carrying their cargo with them.

3. Retrograde movement of COPI-coated vesicles maintains the correct distribution of enzymes in the *cis*, *medial*, and *trans* cisternae of the stack.

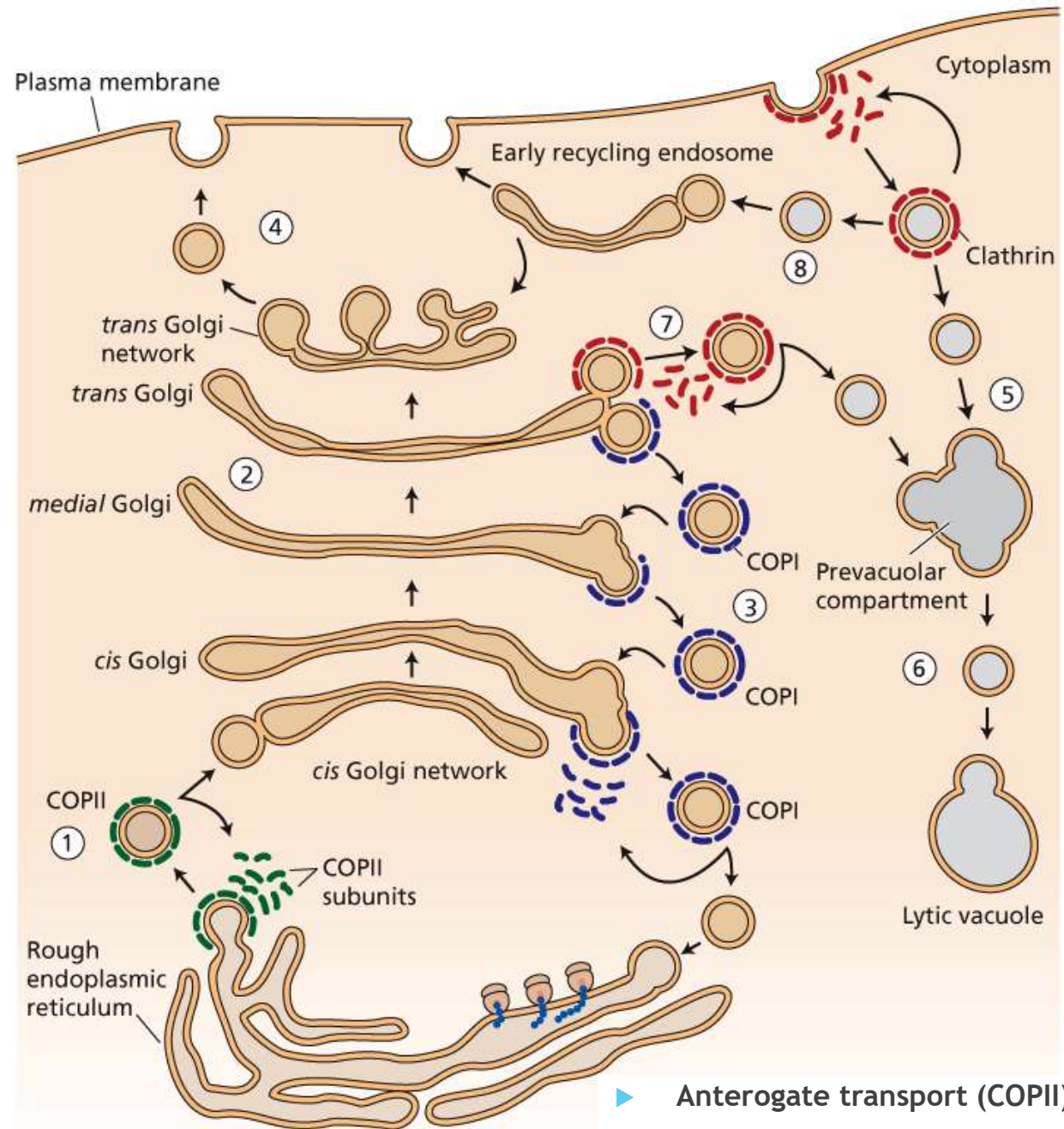
4. Uncoated vesicles bud from the *trans* Golgi membrane and fuse with the plasma membrane.

5. Endocytotic clathrin-coated vesicles fuse with the prevacuolar compartment.

6. Uncoated vesicles bud off from the prevacuolar compartment and carry their cargo to a lytic vacuole.

7. Proteins destined for lytic vacuoles are secreted from the *trans* Golgi to the prevacuolar compartment via clathrin-coated vesicles, and then repackaged for delivery to the lytic vacuole.

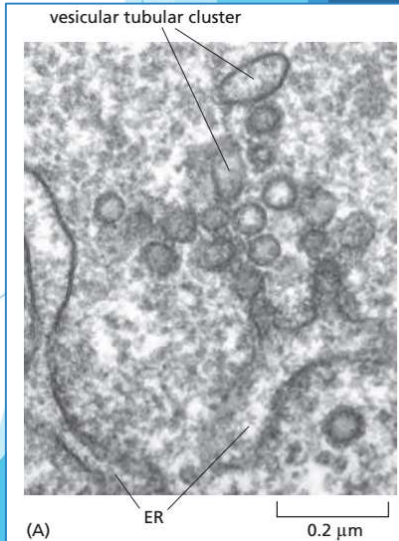
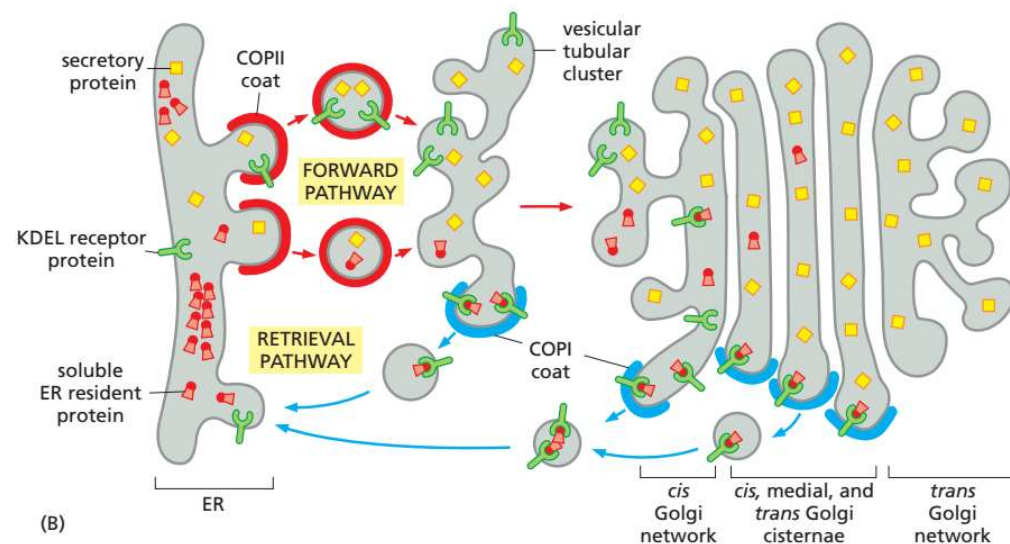
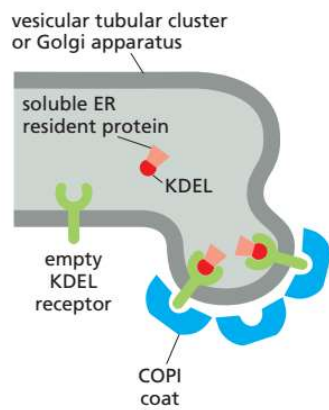
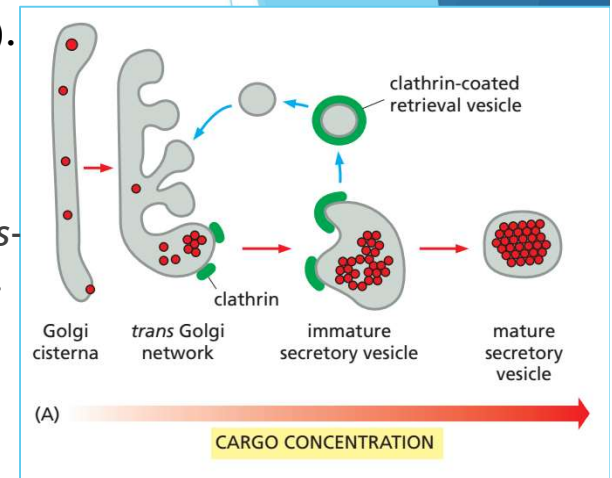
8. Endocytic clathrin-coated vesicles can also uncoat and recycle via the early recycling endosome. Vesicles produced



- ▶ Anterogate transport (COPII)
- ▶ Retrograde transport (COPI)
- ▶ Membrane recycling (clathrin)

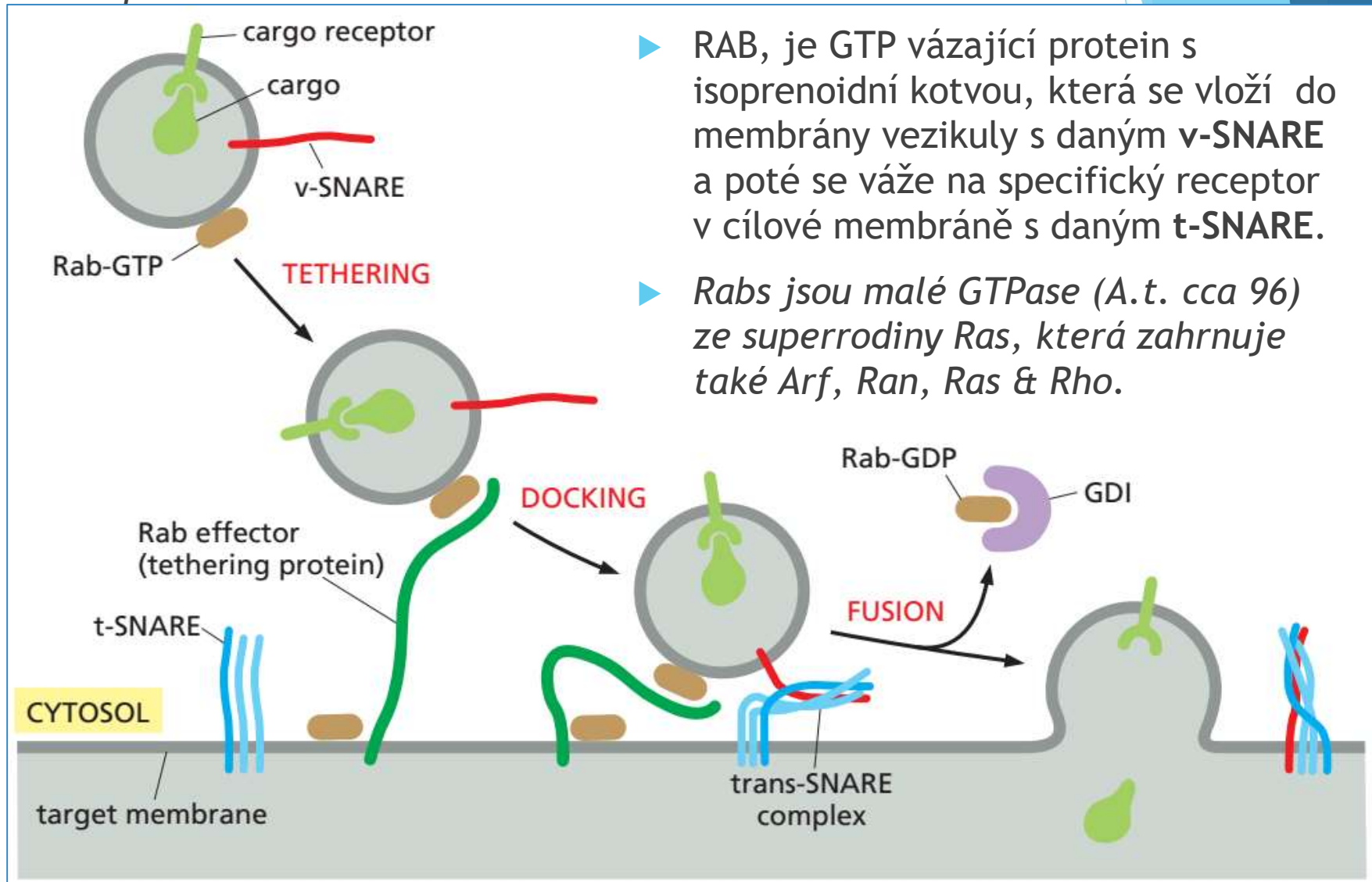
Transport uvnitř endomembránového systému

- ▶ Sekrece proteinů z buněk začíná v hrubém ER, v **ERES (ER exit sites)**.
- ▶ **Pohyb vpřed (anterograde)** z ER, do Golgiho, od *cis* k *trans* přes cisternám, zráním (*cisternal maturation*), k PM nebo prevakuolárním strukturám.
 - ▶ Existuje klesající pH gradient organel ER (pH7,5) vakuoly (pH 6).
- ▶ Některé rezidentní proteiny v lumenu ER mají K/HDEL sekvenci, proteiny vázané na membránu mají KK nebo KXK.
 - ▶ Tyto 3 sekvence jsou rozpoznávány receptorovými proteiny v *cis*-Golgi, vazba na něj umožňuje retrográdní transport zpět do ER.
- ▶ Některé proteiny nikdy neopouští GA (neví se jak).
- ▶ **Zpětný pohyb (retrograde)** recyklace membránových vezikul z PM, z *trans* do *cis* membrány GA, nebo z GA do ER.



Rabs navádějí transportní vezikuly k jejich cílové membráně

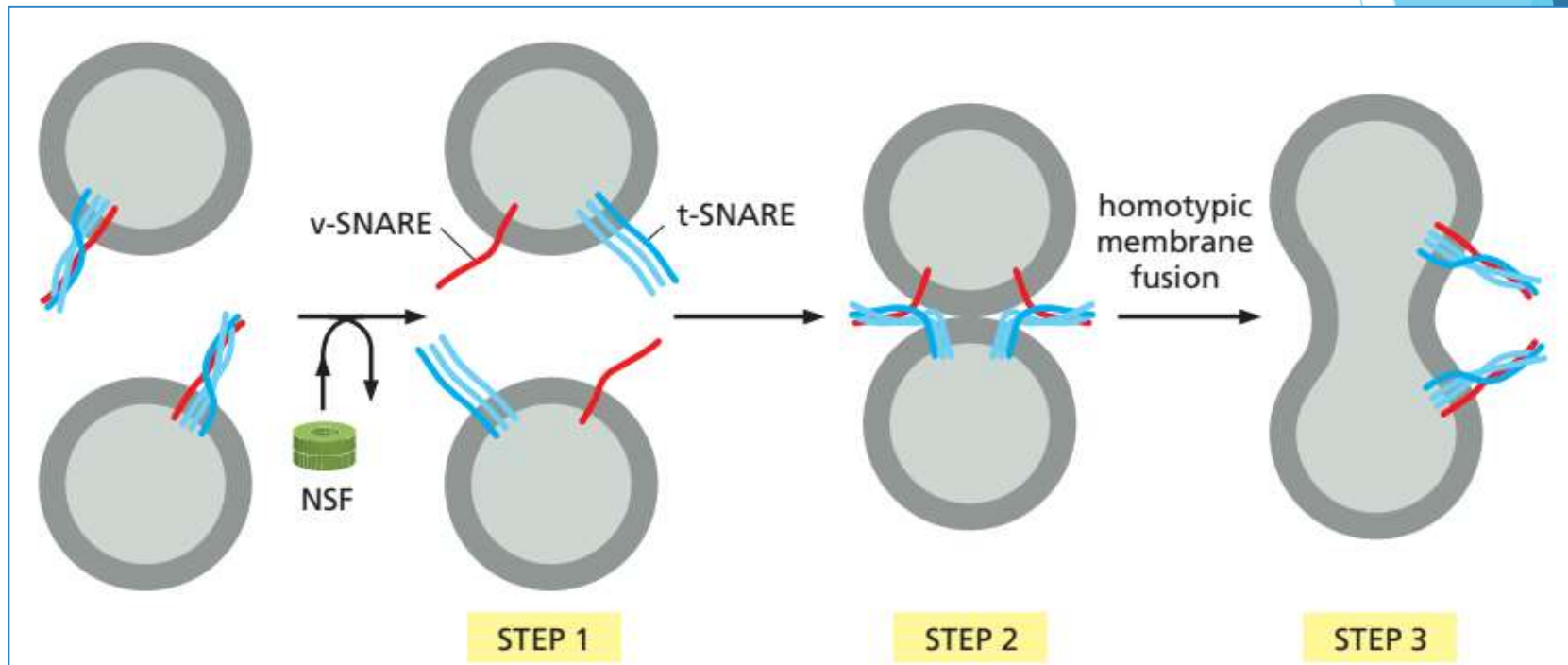
- ▶ Rab proteiny a Rab efekty nasměřují vezikuly do specifických míst na správné cílové membráně.



- ▶ RAB, je GTP vázající protein s isoprenoidní kotvou, která se vloží do membrány vezikuly s daným v-SNARE a poté se váže na specifický receptor v cílové membráně s daným t-SNARE.
- ▶ Rabs jsou malé GTPase (A.t. cca 96) ze superrodiny Ras, která zahrnuje také Arf, Ran, Ras & Rho.

Rabs navádějí transportní vezikuly k jejich cílové membráně

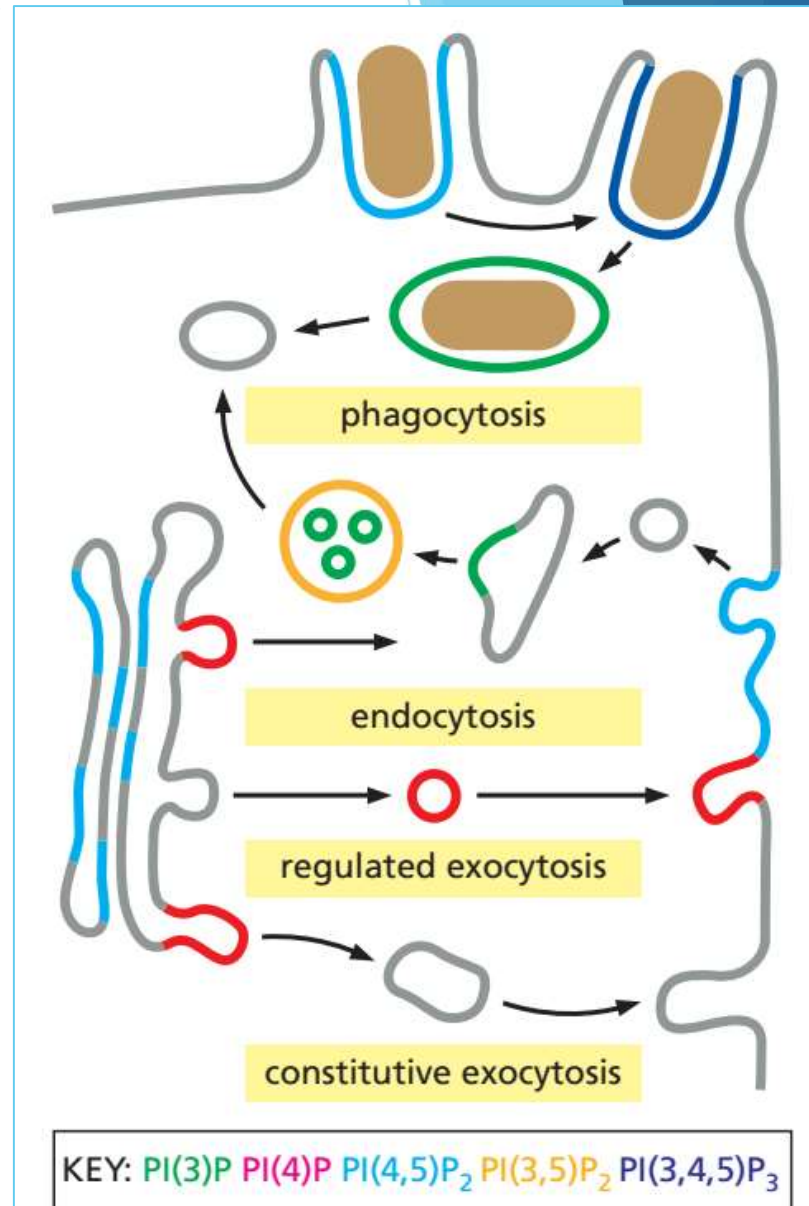
- ▶ SNARE proteiny a jejich regulátory zprostředkovávají fúzi lipidových dvojvrstev.
- ▶ Ke specifickému cílení dochází, protože každá vezikula má specifický v-SNARE a každá cílová membrána (*target*) má 3 specifické t-SNARE, které umožňují dodání na správné místo a ve správný čas.



- ▶ Po spojení v-SNARE a t-SNARE se vezikula spojí s cílovou membránou,
 - ▶ GTP je hydrolyzován Rab-GTPázou na GDP
 - ▶ dojde k uvolnění Rabu...

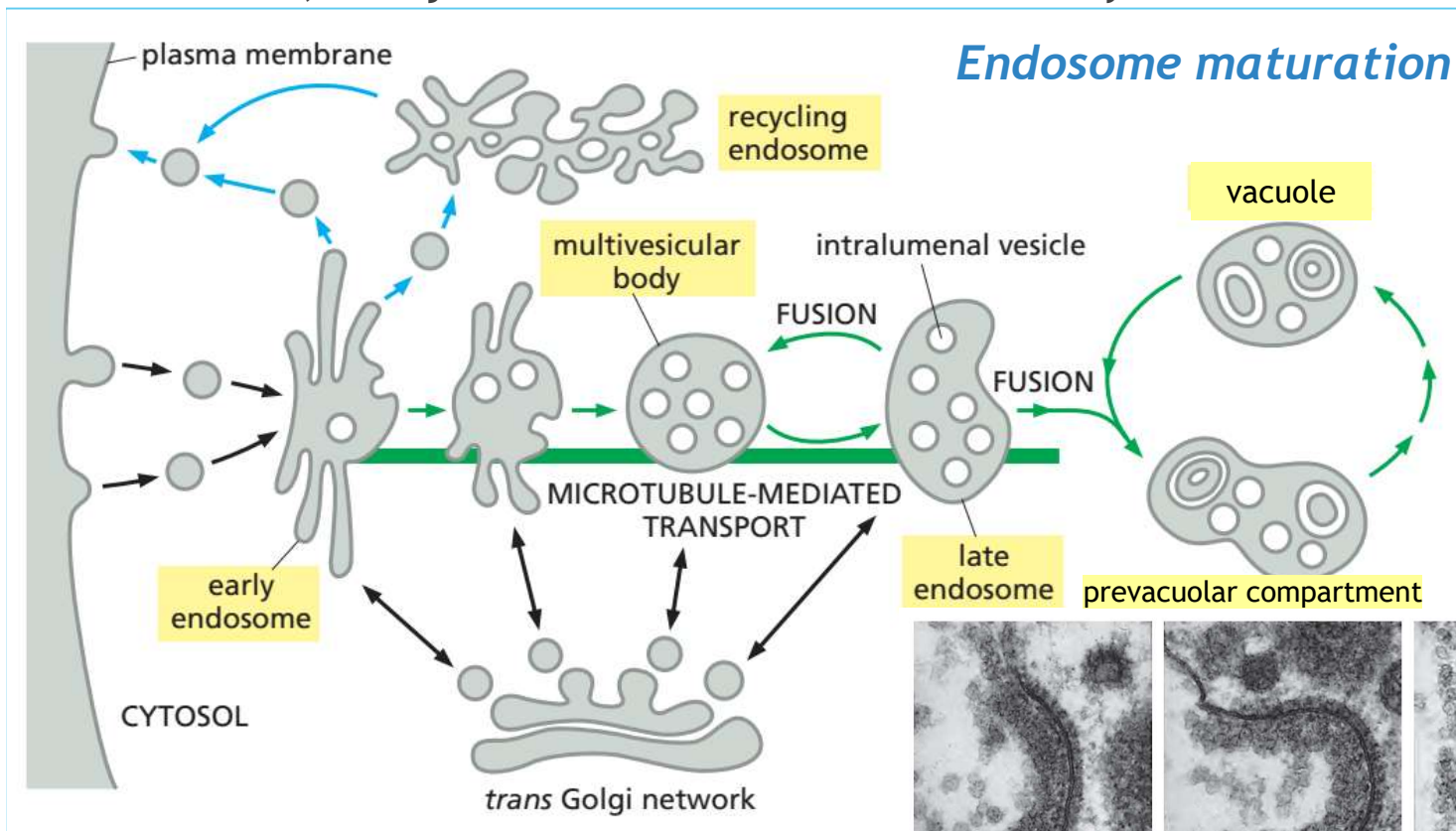
Fosfoinositidy (*phosphoinositides*) označují organely a membránové domény

- ▶ Ačkoli inositol-fosfolipidy tvoří méně než 10 % celkových fosfolipidů v membráně, mají důležitou regulační funkci.
- ▶ Mohou podstoupit rychlé cykly fosforylace a defosforylace v polohách 3', 4' a 5' jejich hlavových skupin inositol-cukrů za vzniku různých typů fosfoinositidů (fosfatidylinositol-fosfátů nebo PIP).
- ▶ Vzájemná konverze fosfatidylinositolu (PI) a PIP je vysoce kompartmentalizovaná:
 - ▶ různé organely v endocytické a sekreční dráze mají odlišné sady PI a PIP kináz a PIP fosfatáz.



Transport z PM do endomembrány

- ▶ **Endocytóza** ~ buňky pohltí malé objemy vnějšího média a internalizují PM (např. fagocytóza, pinocytóza atd.),
 - ▶ přebytečná nebo PM stará membrána je buď recyklována odesláním zpět do PM, GA, nebo je znehodnocena odesláním do vakuoly.



0.1 μm

Transport makromolekul do rostlinných buněk různými mechanismy

▶ *Fluid-Phase Endocytosis*

- ▶ *Klasická cesta:* PM - klatrinové vezikuly - rané endozomy - multivezikulární tělíska (MVB) - vakuola
- ▶ Když je rostlinná buňka napadena patogenem, MVB se sloučí zpět s PM a uvolní vezikuly, známé jako **exozómy**, do BS (biotické a abiotické proteiny, odezvy na stres, **nemají signální peptid!**)
- ▶ Mnoho symbiontů a patogenů vstupuje do buňky endocytózou.

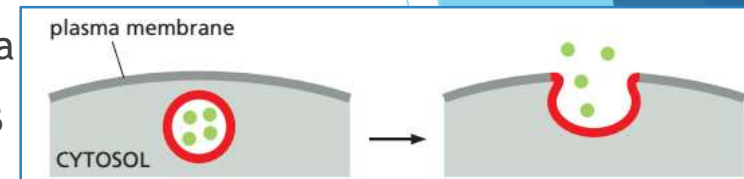
▶ *Receptor-Mediated Endocytosis*

- ▶ vazba extracelulárních ligandů (např. hormonů, lektinů, protilátek) na receptory v mikrodoménách PM, poté je ligand a jeho receptor endocytován do buňky.

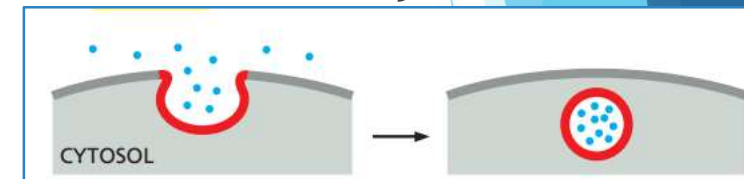
▶ *Piggyback Endocytosis*

- ▶ vitamíny rozpustné ve vodě, jako je biotin, mají receptory v PM a makromolekuly připojené k biotinu (biotinylace) mohou pronikat PM.

▶ Exocytóza

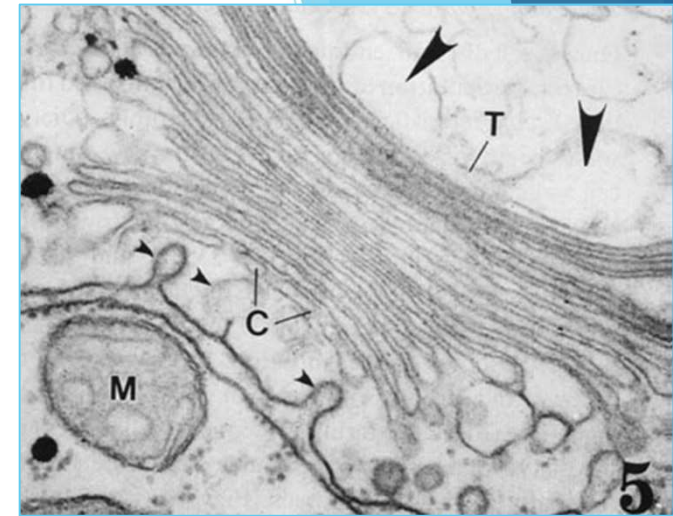


▶ Endocytóza



Objev a studium transportu

- ▶ V roce 1870 Rudolf Heidenhain studoval sekreční proces v exokrinních buňkách slinivky břišní savců.
- ▶ Pokroku bylo dosaženo v 50. letech díky technikám elektronové mikroskopie a buněčné frakcionace.
- ▶ V letech 1980-90 Schekman použil kvasinkové buňky, které vylučují řadu enzymů, např. ošetřili je chromanem a našli mnoho sekrečních mutantů.
- ▶ Rostliny mají vysoce vyvinuté sekreční systémy, někdy ve velice specializovaných buňkách např. nektar, žahavé buňky kopřiv, masožravky...
- ▶ U rostlin biochemické, morfologické a farmakologické studie identifikovaly homology genů zapojených do membránového transportu nalezených u kvasinek a savců.
- ▶ **Rostliny mají mnohem více izoforem některých sekrečních genů než kvasinky!**
- ▶ Rostlinné geny zapojené do sekreční dráhy byly zmutovány, navázány na FP...
- ▶ Najít specifický inhibitor zapojený do specifické dráhy je obtížné...



- ▶ např. *Brefeldin A*

