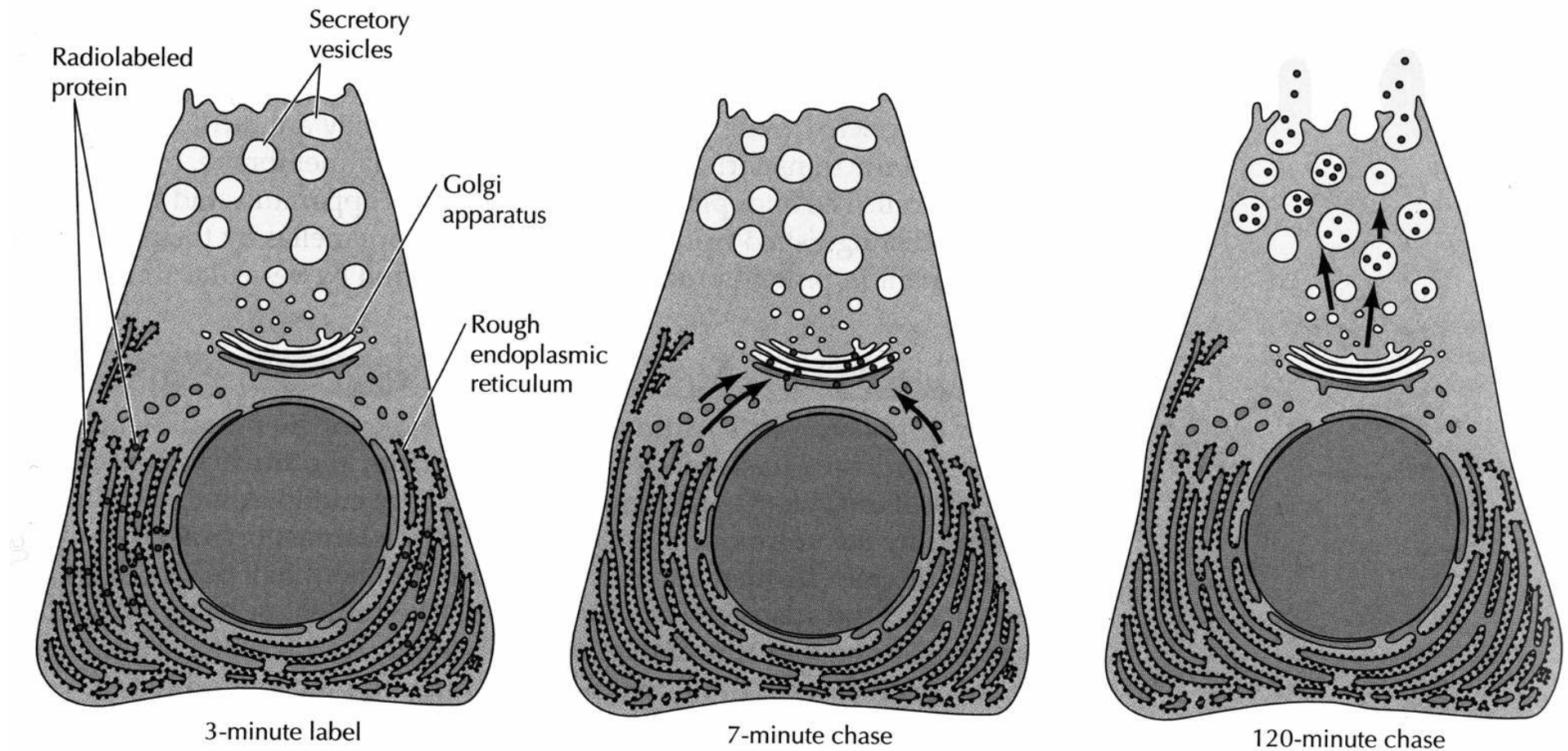


Transportní váčky

- dopravní prostředky při mezimembránovém transportu
- protein se nakládá do váček z vnitřního prostoru organely (sekreční dráha) nebo z mimobuněčného prostoru (endocytóza)
- náklad se později vyloží v jiném buněčném oddílu splynutím membrány transportního váčku s membránou cílové organely nebo plazmatickou membránou
- systém je využíván membránovými lipidy i proteiny

Sekreční dráha

hrubé ER - Golgiho aparát - sekreční váčky - exocytóza

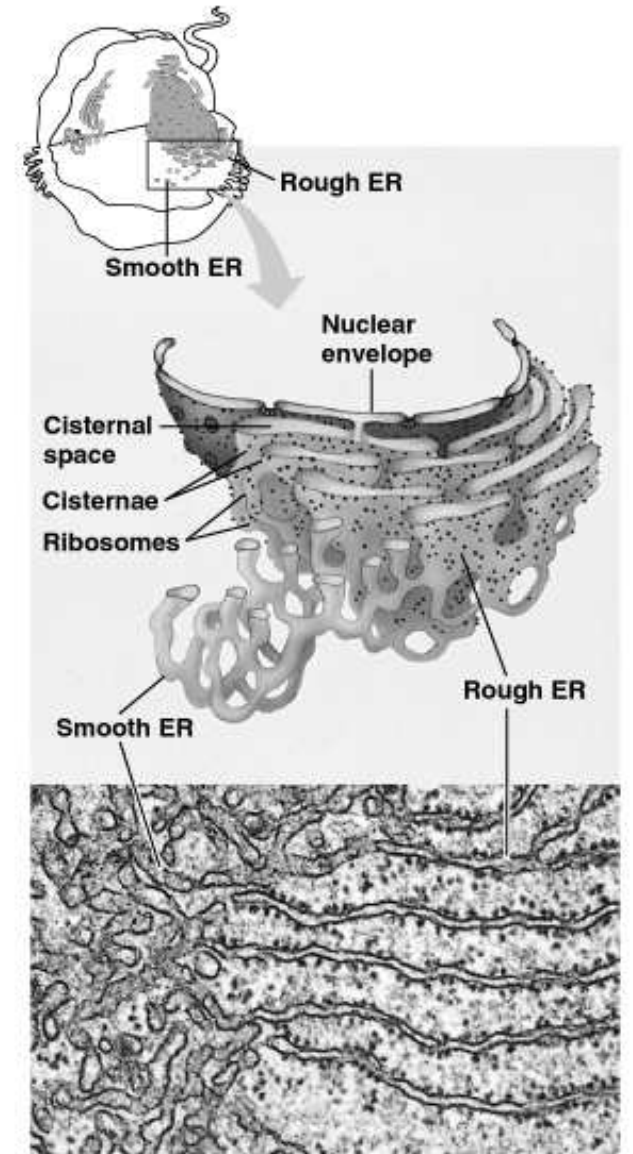


Sekreční dráha

- vyžívána nejen proteiny určenými k sekreci mimo buňku, ale také proteiny plazmatické membrány
- část dráhy využívají proteiny lysozomů, Golgiho aparátu a ER
- vstup proteinů do ER reprezentuje hlavní křižovatku v dopravě proteinů uvnitř eukaryotické buňky

Endoplazmatické retikulum

- cytoplazmatický systém membránově uzavřených tubulů a váčků, který je odvozen od jaderné membrány
- největší organela většiny eukaryotických buněk (10% celkového objemu)
- tvoří přibližně polovinu všech buněčných membrán



Hladké ER

- není spojeno s ribozomy, účast v metabolismu lipidů a uhlovodíkových řetězců
- detoxifikační reakce
- katabolismus glykogenu
- zásobárna Ca

Hrubé ER

- na vnějším povrchu pokryto ribozomy, které syntetizují sekreční proteiny a proteiny pro lysozomy, ER, Golgiho aparát a plazmatickou membránu

ER se podílí na struktuře proteinů a lipidů

- skládání proteinů
- tvorba disulfidických vazeb
- tvorba vícepodjednotkových proteinů
- prvotní místo, ve kterém se k proteinům připojují uhlovodíkové řetězce
- místo syntézy membránových lipidů

ER: vstupní brána pro proteiny Golgiho aparátu, endozomů, lysozomů a buněčného povrchu

2 fáze transportu:

1. z cytosolu do ER
2. transportními váčky od organely k organelle, resp. od organely k plazmatické membráně

Způsob přenosu proteinů z cytosolu do ER

- proteiny rozpustné ve vodě jsou kompletně přenášeny přes membránu ER a uvolněny v lumenu ER (určeny k sekreci nebo pro lumen některé organely)
- budoucí membránové proteiny se přes membránu ER přenášejí jen zčásti a zůstávají v ní zanořeny (určeny k lokalizaci v membráně ER, membráně jiné organely nebo v plazmatické membráně)

Sekvence AA vznikajícího proteinu rozhoduje o vazbě ribozomu na ER

- volné a membránově vázané ribozomy jsou funkčně nerozlišitelné
- syntéza všech proteinů je zahájena na volných ribozomech
- signální sekvence na N-konci vznikajícího polypeptidu přitahuje ribozom na ER
- signální sekvenci reprezentuje krátký úsek hydrofobních AA, který se odštěpuje během přenosu polypeptidu do lumen ER

Signální sekvenci navádějí k membráně ER nejméně dva faktory

1. Signál rozpoznávající částice (SRP)

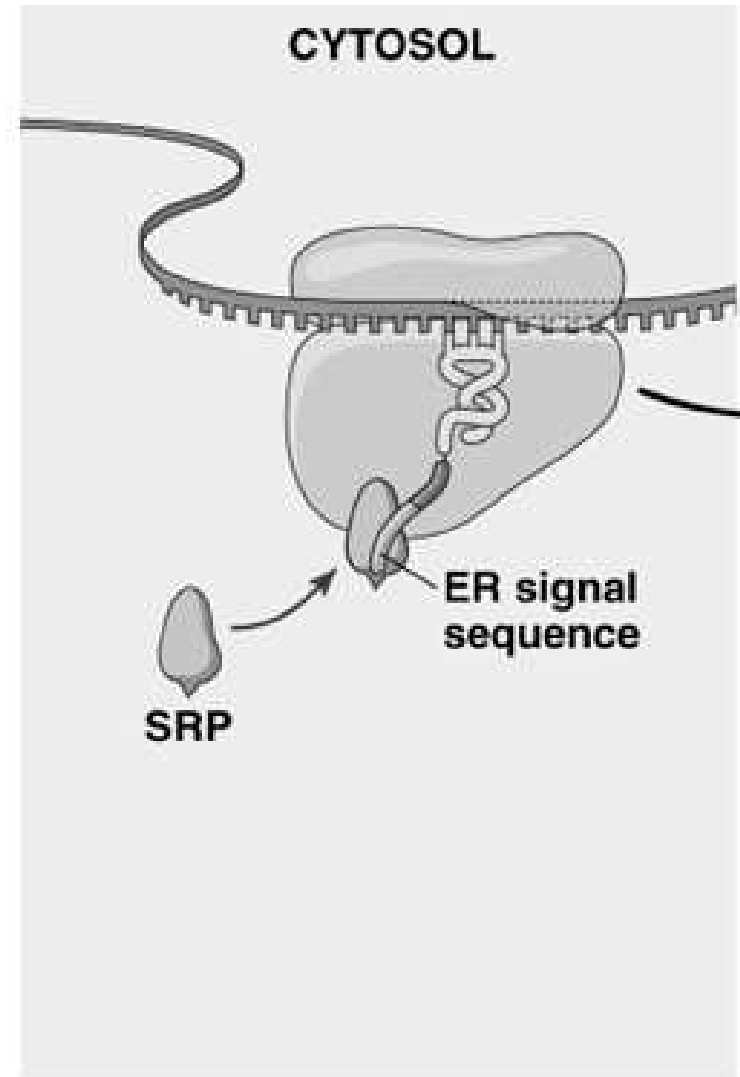
- přítomna v cytozolu
- váže se k signální sekvenci
- složena z 6 polypeptidů a malé cytoplazmatické RNA (7SL RNA)

2. SRP-receptor

- zanořen v membráně ER
- afinita k SRP přitahuje komplex ribozom/peptid/SRP k membráně ER

Mechanismus transportu proteinů do ER

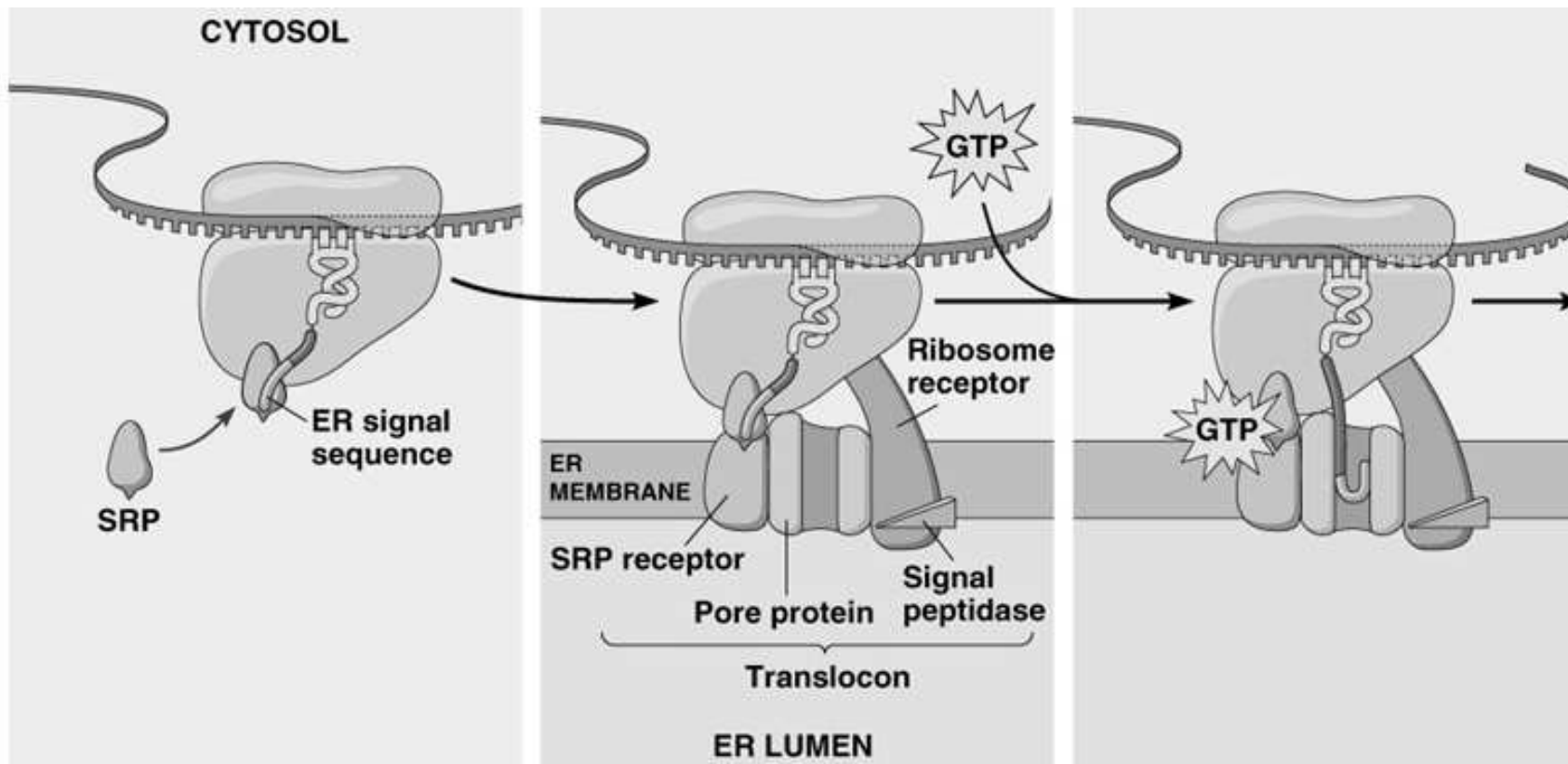
- při translaci na ribozomu vzniká polypeptidový řetězec se **signální sekvencí** na N-konci
- signální sekvence je rozeznána a navázána **SRP**
- vazba SRP dočasně **zastaví** pokračování translace



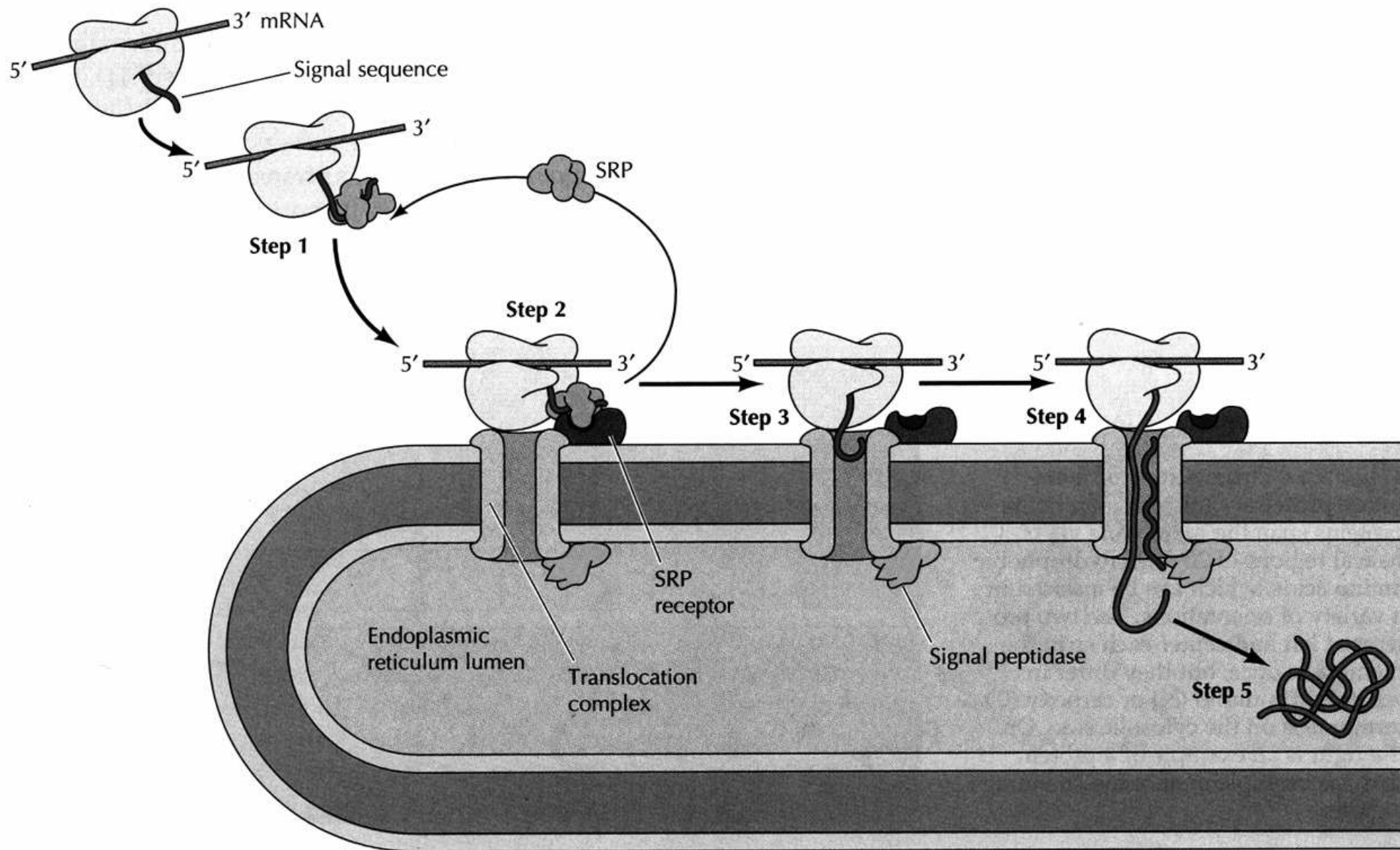
- 1 SRP binds to ER signal sequence and blocks translation

Mechanismus transportu proteinů do ER

- SRP zajistí přenos komplexu SRP/ribozom/polypeptidový řetězec na **SRP-receptor** a tím jej dopraví k **hrubému ER**
- ribozom je vázán k translokačnímu komplexu na membráně ER
- signální sekvence se začlení do membránového kanálku (nutný GTP)



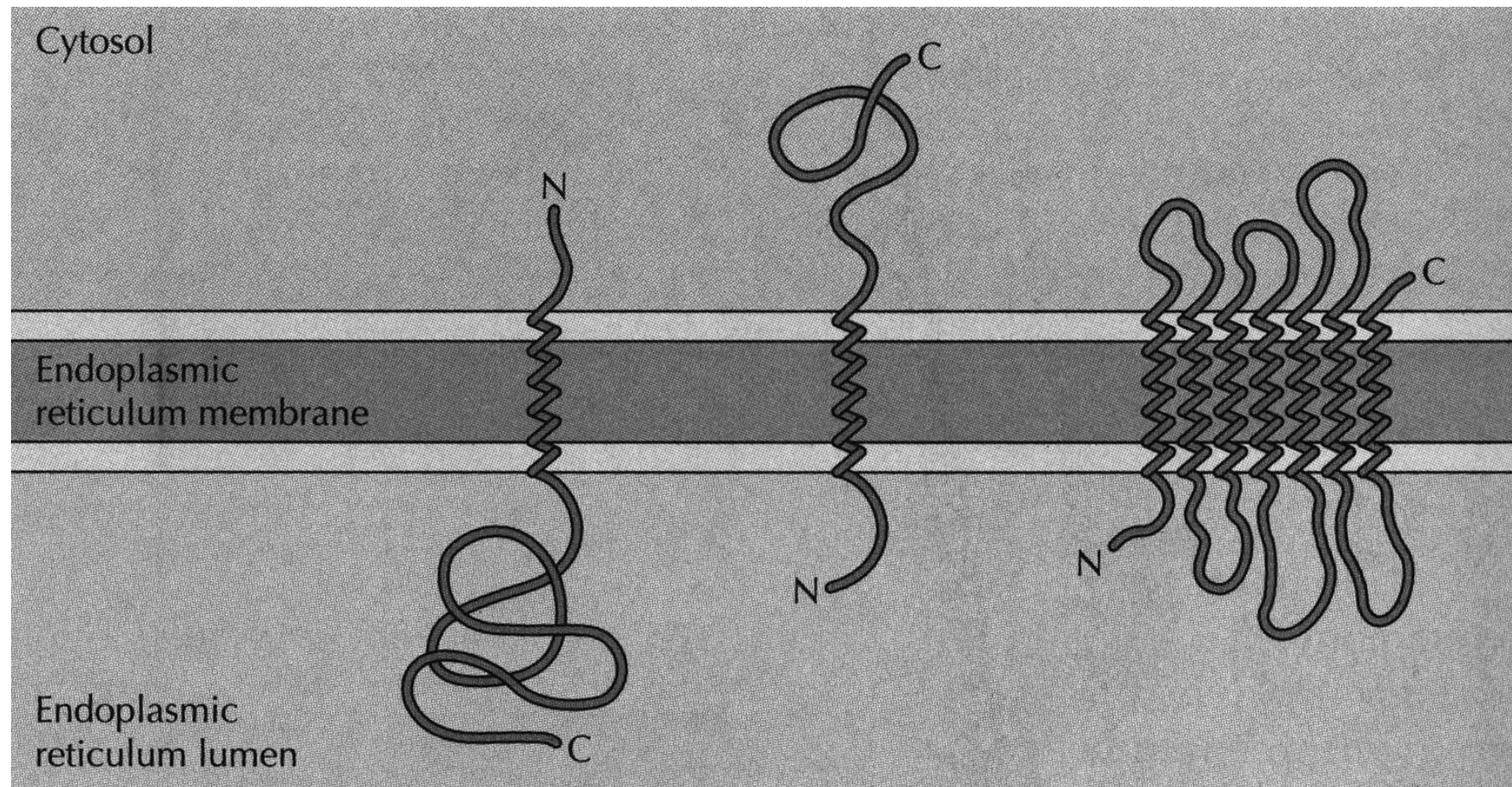
Přenos vznikajících sekretovaných proteinů do ER



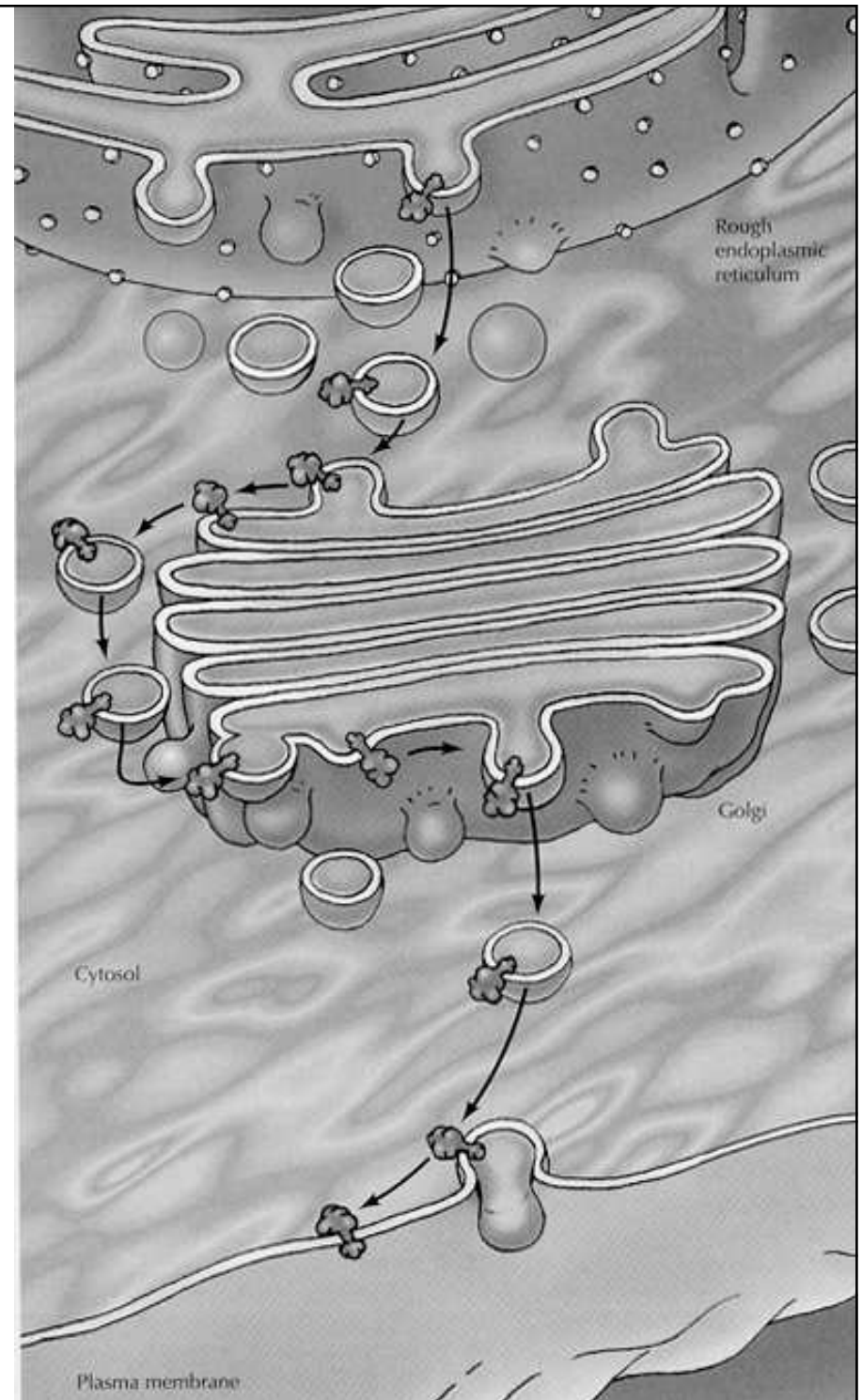
Začlenění proteinů do membrány ER

- probíhá u membránových proteinů ER, Golgiho aparátu, lysozomů a plazmatické membrány
- proteiny jsou v membránách ukotveny hydrofobními oblastmi, které prostupují fosfolipidovou dvouvrstvou v podobě šroubovice o velikosti 20 - 25 AA
- šroubovice je stabilizována vodíkovými můstky mezi peptidovými vazbami a interakcemi hydrofobních AA zbytků s membránovými fosfolipidy
- membránové proteiny mohou procházet membránou v různých orientacích a vícenásobně

Různé možnosti orientace membránových peptidů

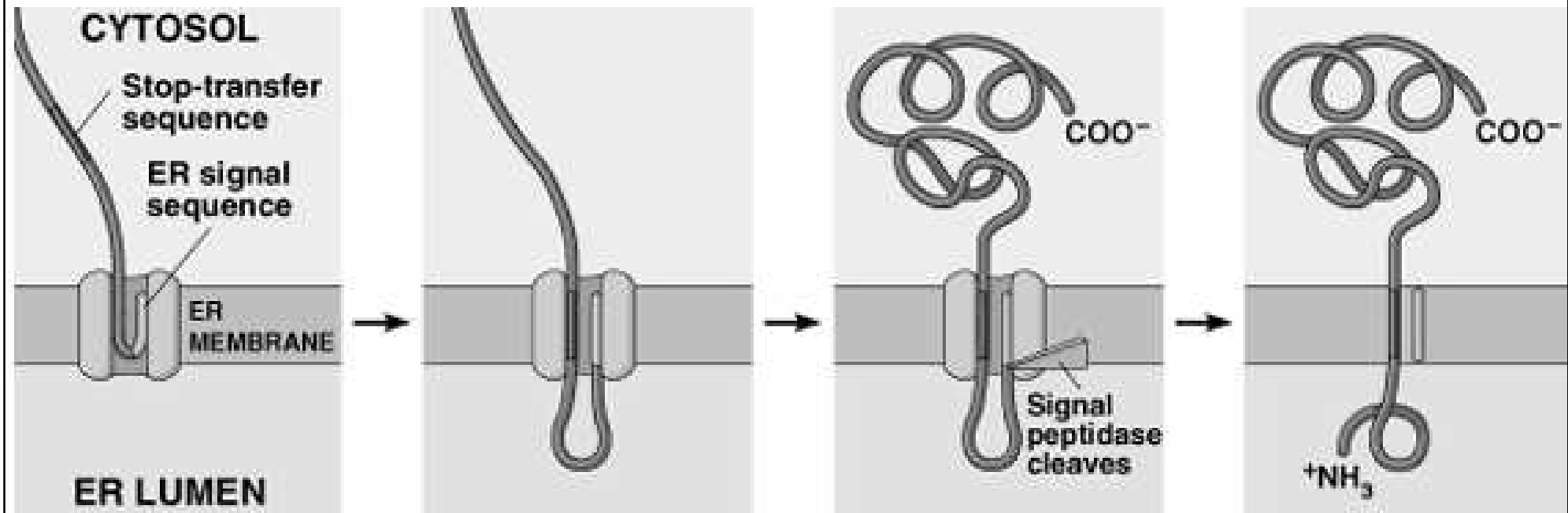


**Orientace proteinů v
membráně ER
vytvořená během
jejich syntézy se
udržuje při jejich
transportu do
membrán Golgiho
aparátu, lysozomů a
plazmatické
membrány**

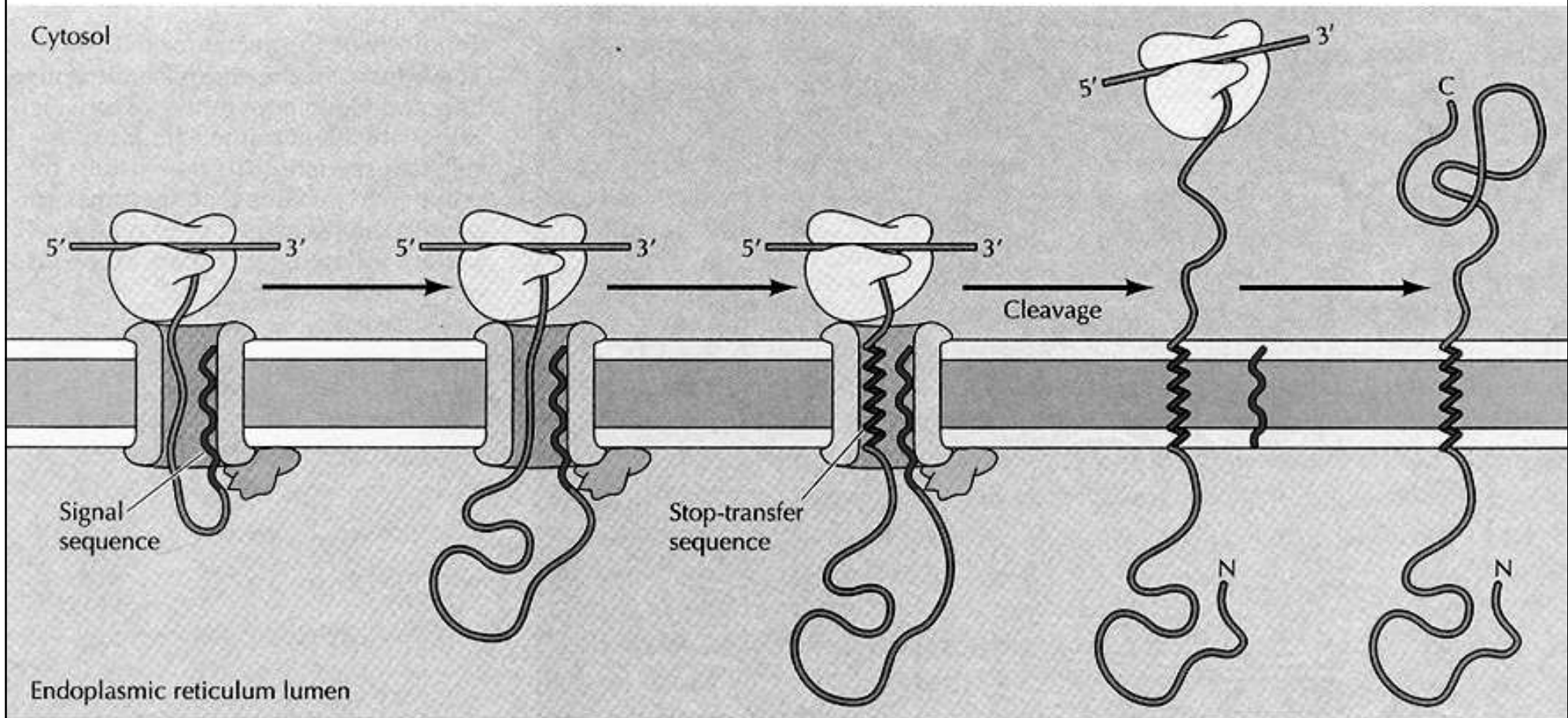


Syntéza transmembránových proteinů s C-konci orientovanými do cytozolu

- N-koncová signální sekvence odštěpena signální peptidázou během translokace do ER
- upevnění v membráně zajistí transmembránová šroubovice ve středové části proteinu (**sekvence zastavující přenos**), která brání pokračování translokace do ER
- uvolnění ribozomu z translokačního aparátu
- dokončení syntézy C-koncové části polypeptidového řetězce v cytozolu

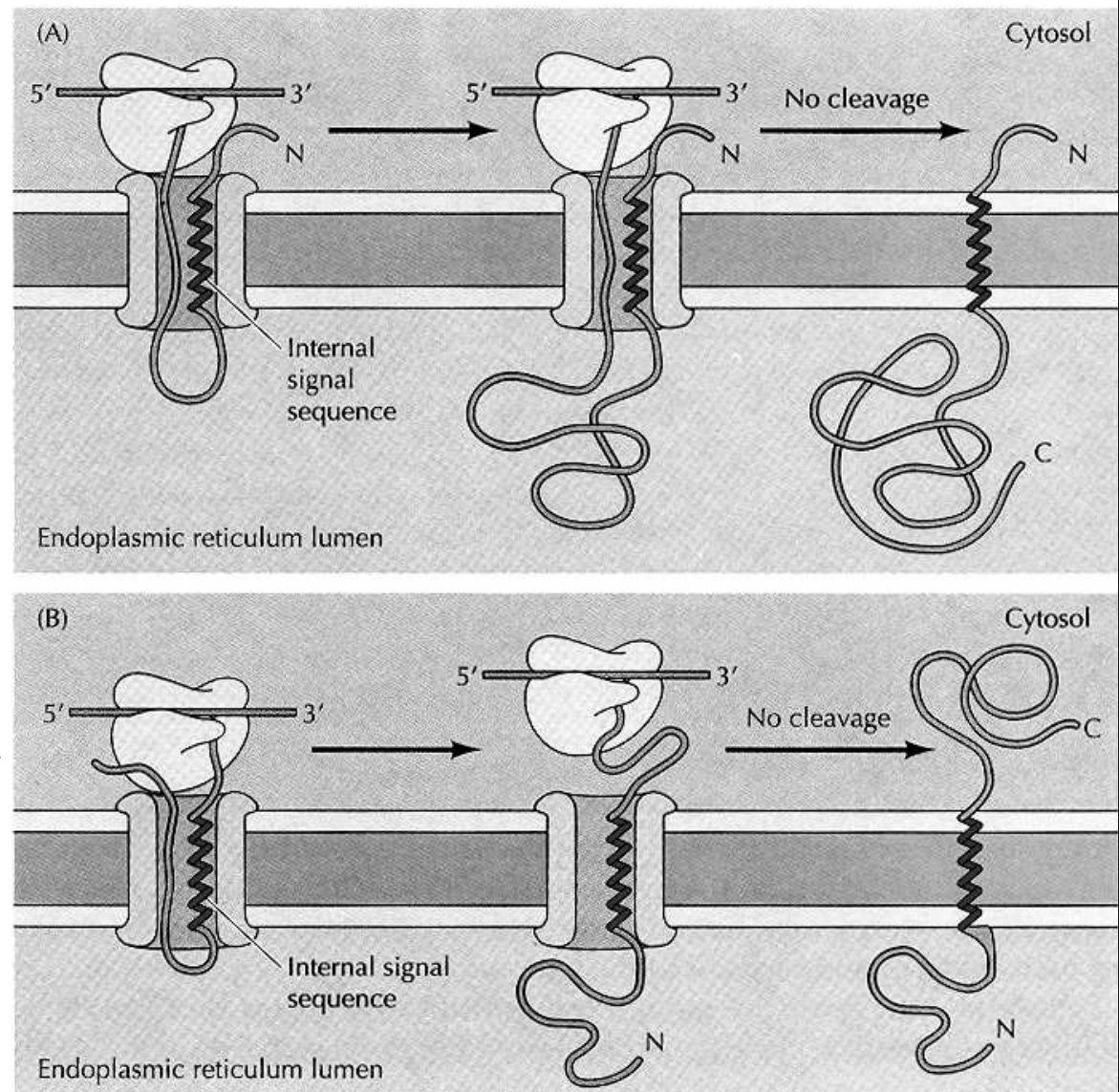


Syntéza transmembránových proteinů s C-konci orientovanými do cytozolu



Vnitřní signální sekvence

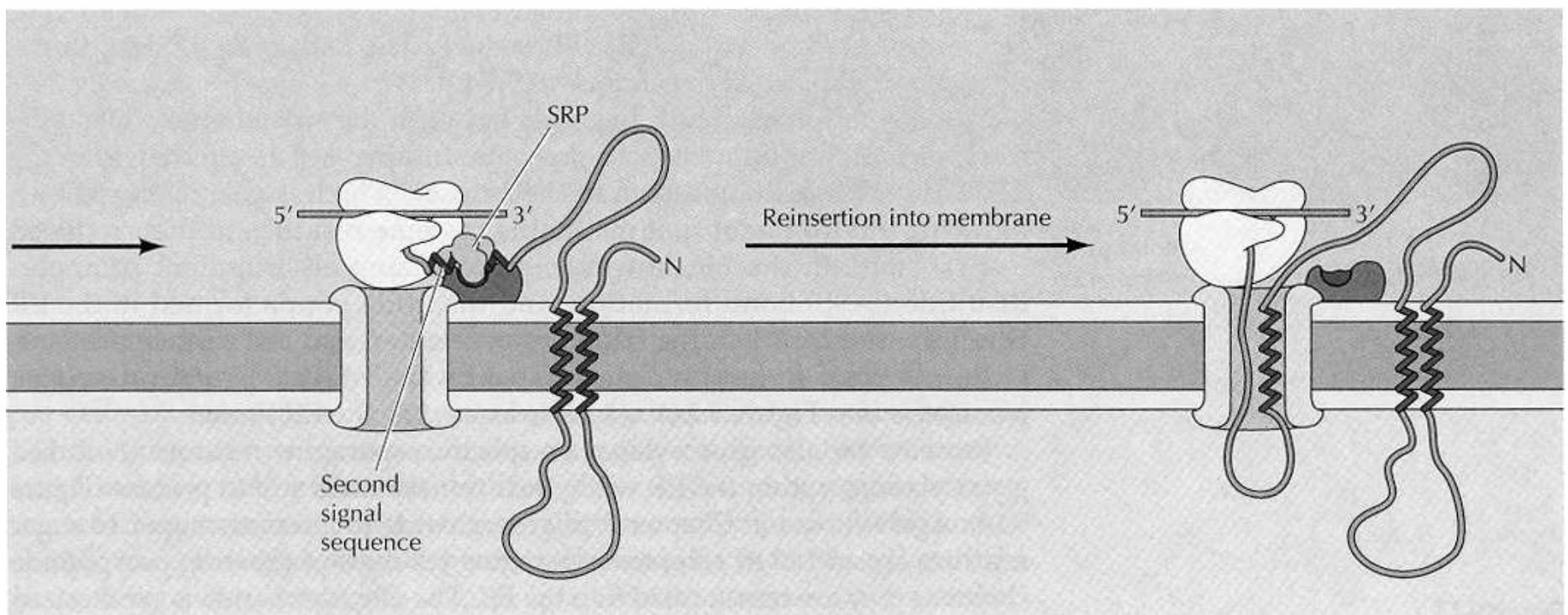
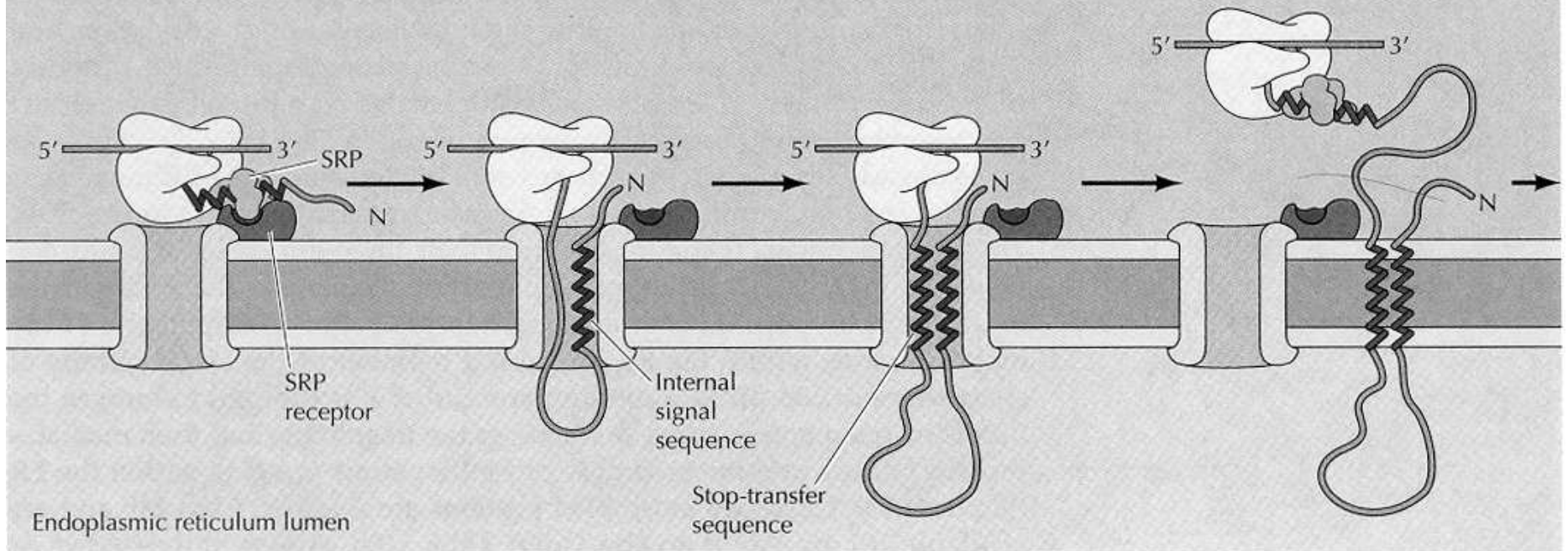
- ukotvují proteiny v membráně ER
- nejsou štěpeny signální peptidázou
- jsou rozeznány SRP, proto mohou zajistit přenos membránou
- jejich orientace určuje, zda membránou bude přecházet N- nebo C-konec proteinu



Vznik proteinů, které procházejí membránou několikrát

důsledek střídání vnitřních signálních
sekvencí a sekvencí zastavujících přenos

Cytosol



Hladké ER a syntéza lipidů

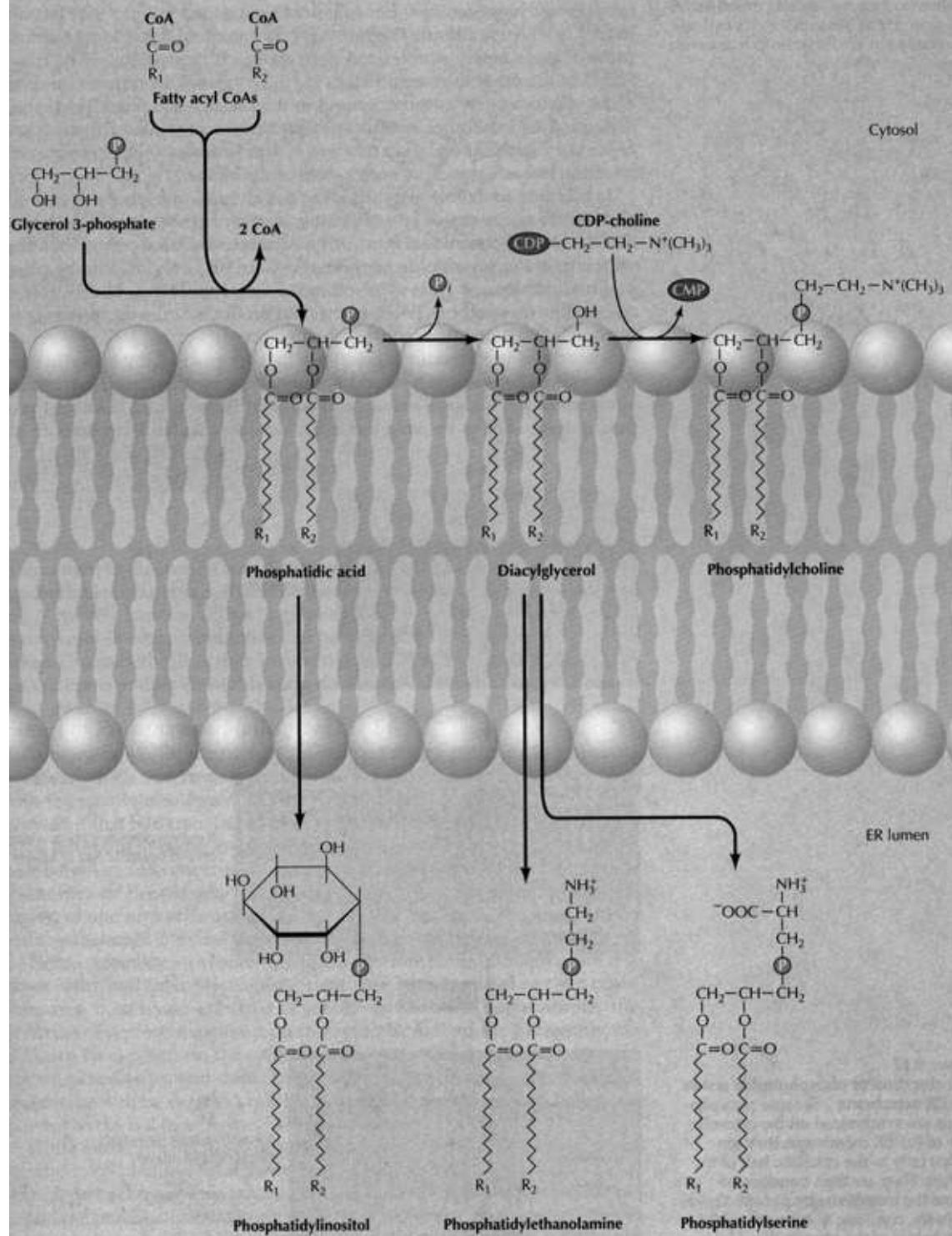
- ER je hlavní místo syntézy membránových lipidů
- chemická povaha lipidů vyžaduje, aby jejich syntéza probíhala ve spojení s již existujícími membránami

Tři hlavní typy membránových lipidů

- fosfolipidy
- glykolipidy
- cholesterol

Fosfolipidy

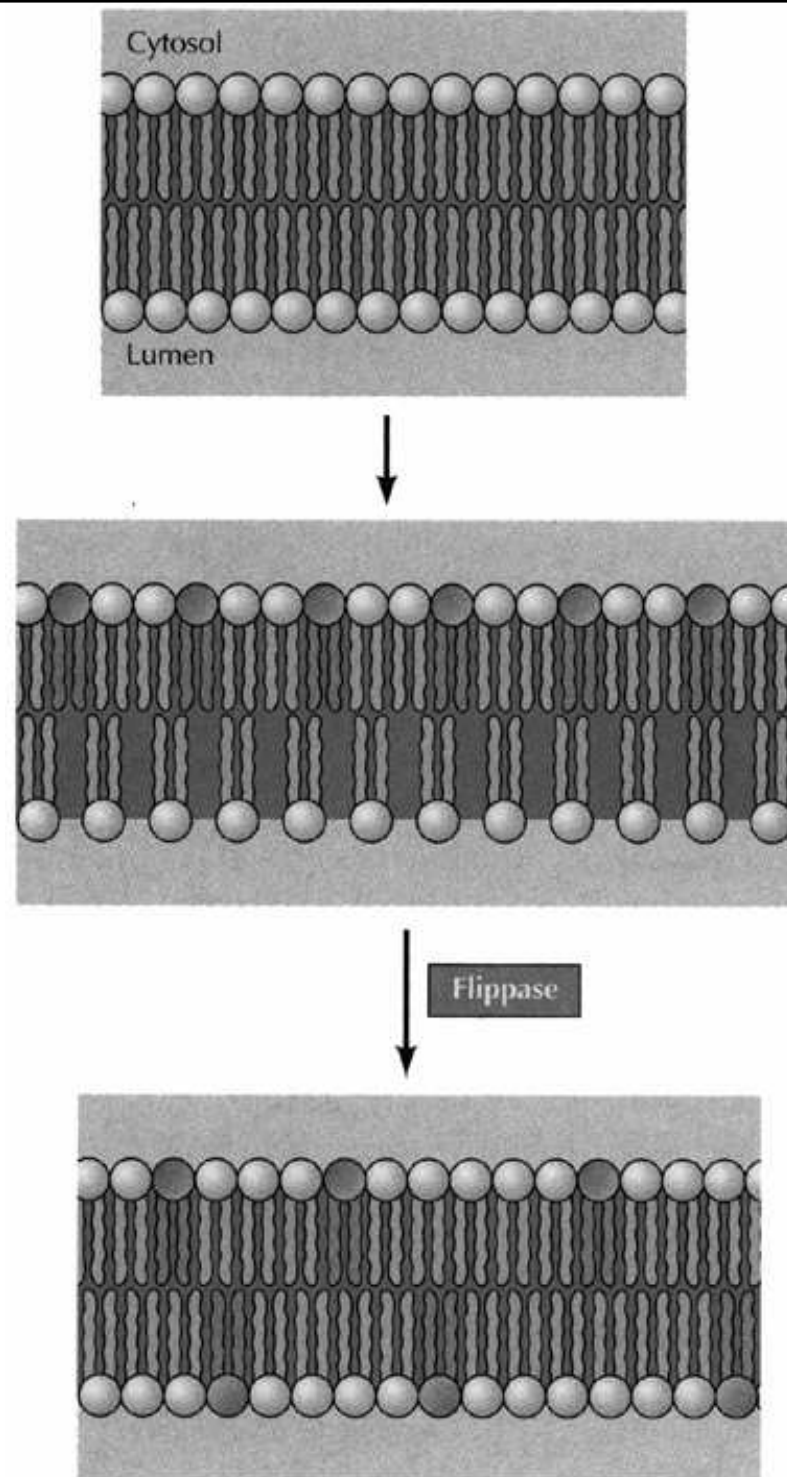
- hlavní strukturní složky membrán
- syntéza probíhá na cytozolické straně membrány ER
- odvozeny z glycerolu a mastných kyselin nesených koenzymem A
- vzniklá kyselina fosfatidová se začleňuje svými řetězci mastných kyselin do membrány
- enzymy na cytozolické straně membrány ER zajistí další konverze fosfatidové kyseliny



Translokace fosfolipidů přes membránu ER

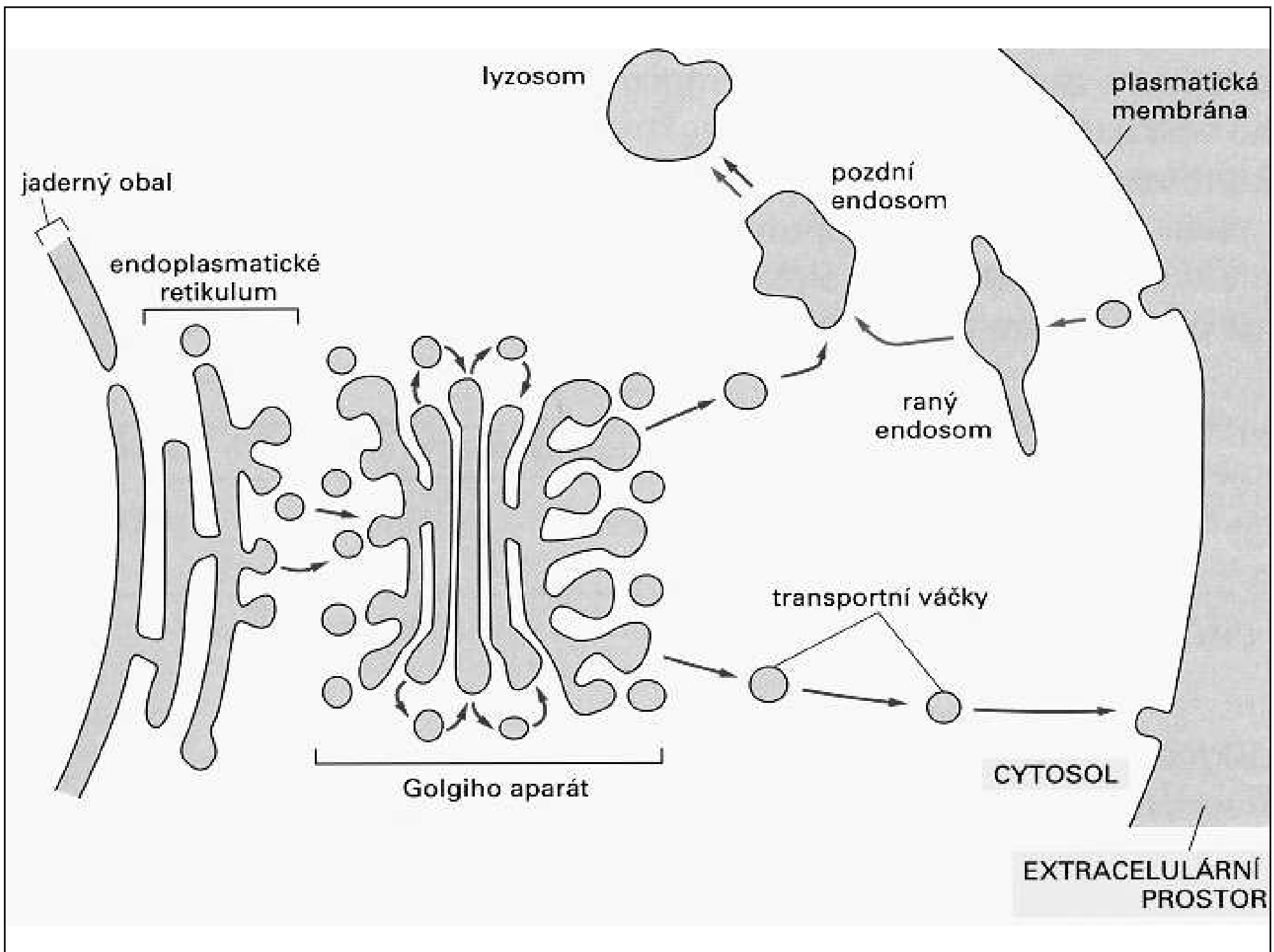
- nové fosfolipidy se začleňují jen do cytozolické poloviny membrány ER
- pro zajištění stability membrány musí dojít k přesunu některých fosfolipidů do druhé poloviny membrány ER směřující k lumen
- transport je energeticky nevýhodný (nutný přechod polárních hlaviček membránou), neprobíhá spontánně
- účast speciálních enzymů (**flipázy**)

Translokace nových fosfolipidů membránou ER

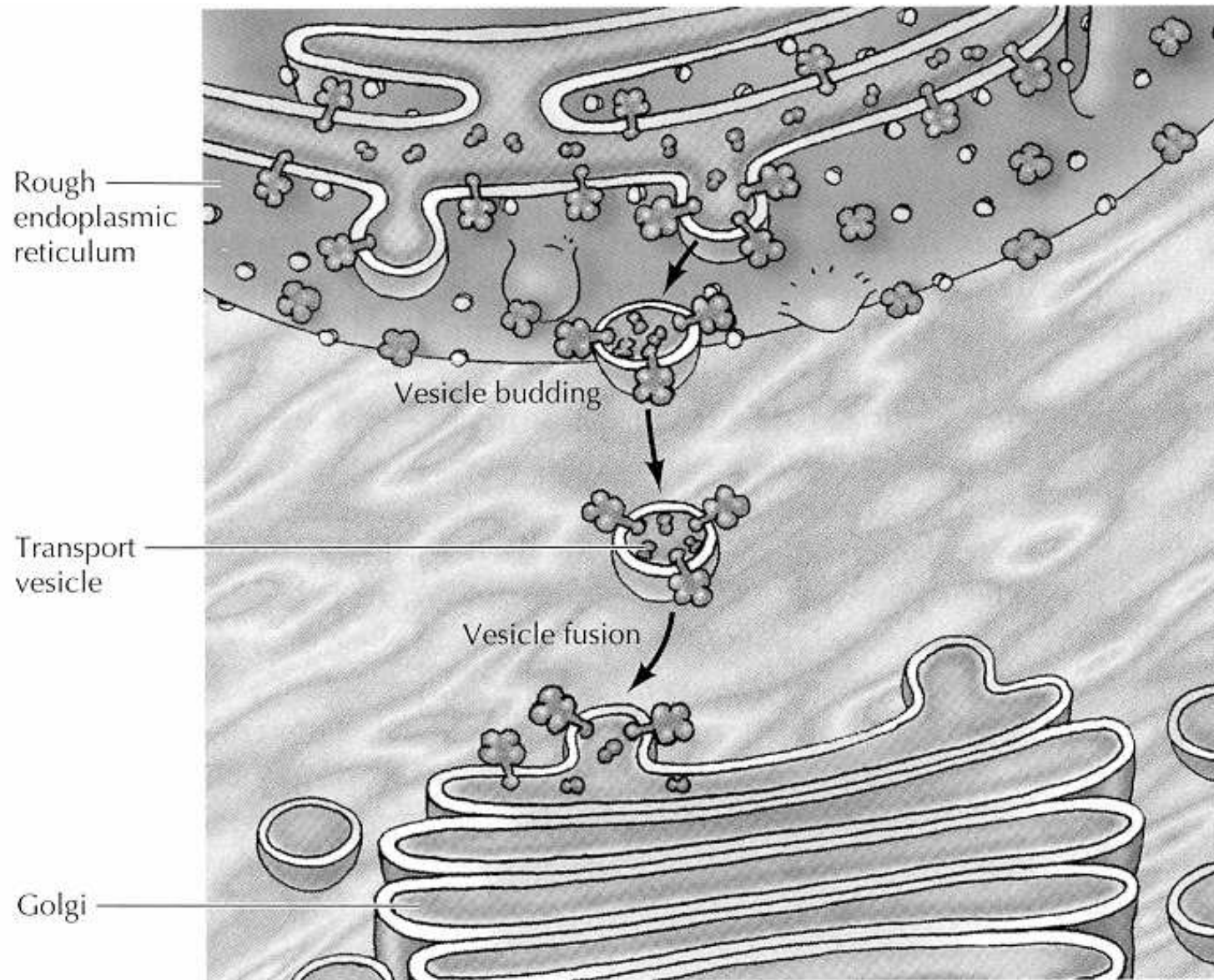


Vezikulární transport z ER

- do Golgiho aparátu, lysozomů, plazmatické membrány, mimo buňku
- probíhá nepřetržitě pučením a fúzí transportních váčků, které nesou přepravované proteiny nebo lipidy
- komunikace s vnějším prostředím
- přepravované proteiny a lipidy jsou chemicky upravovány (glykosylace, vytváření disulfidových můstků)



Transport proteinů z ER do Golgiho aparátu

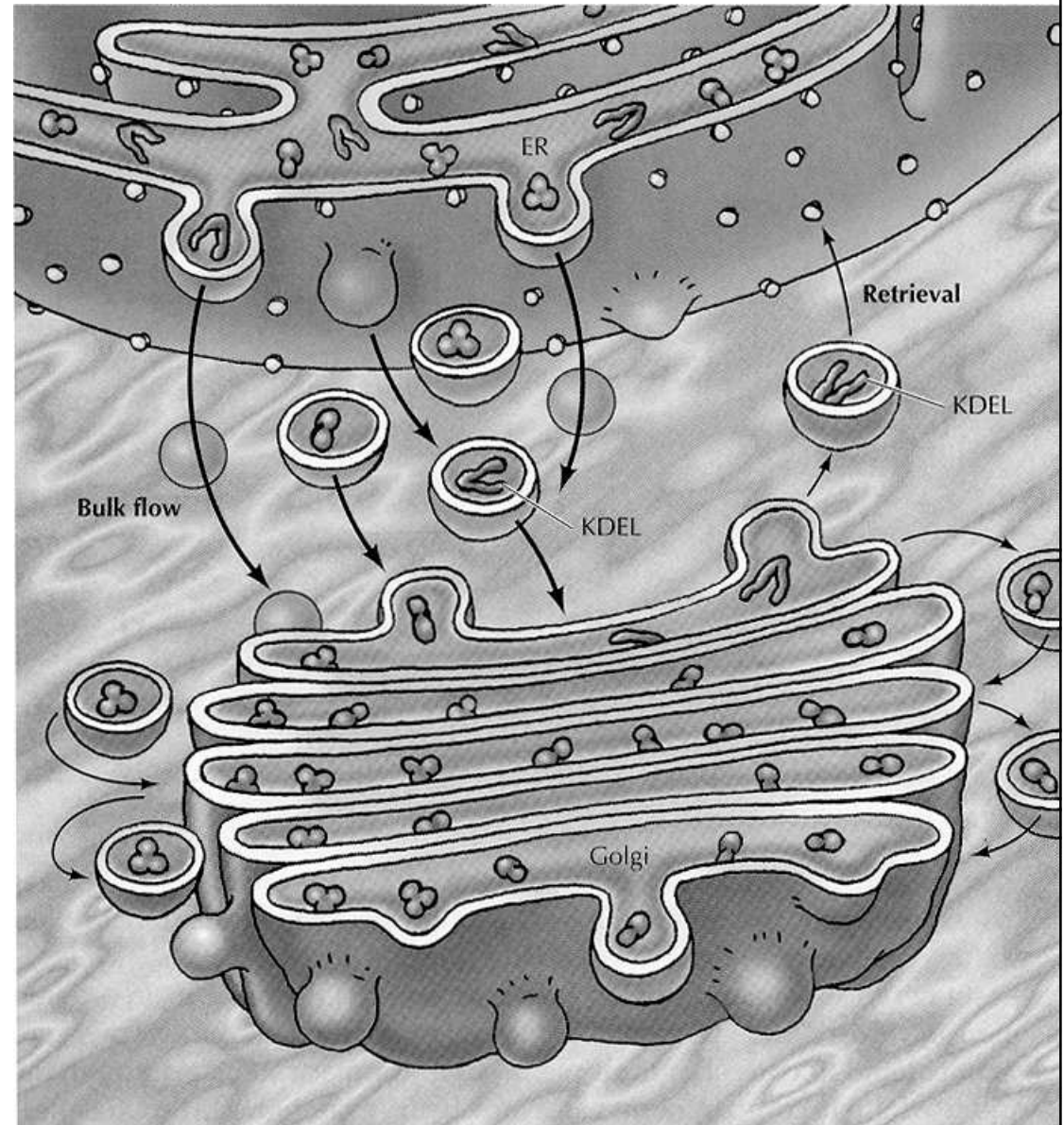


Existují ale také proteiny, které jsou specifické pro ER (chaperony, signální peptidáza, atd.)

- opouštějí sekreční dráhu na 1. křižovatce
- na C-konci nesou adresovou sekvenci Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) pro lumen ER
- odstranění sekvence KDEL způsobí, že protein pokračuje sekreční dráhou do Golgiho aparátu a posléze je vyloučen z buňky

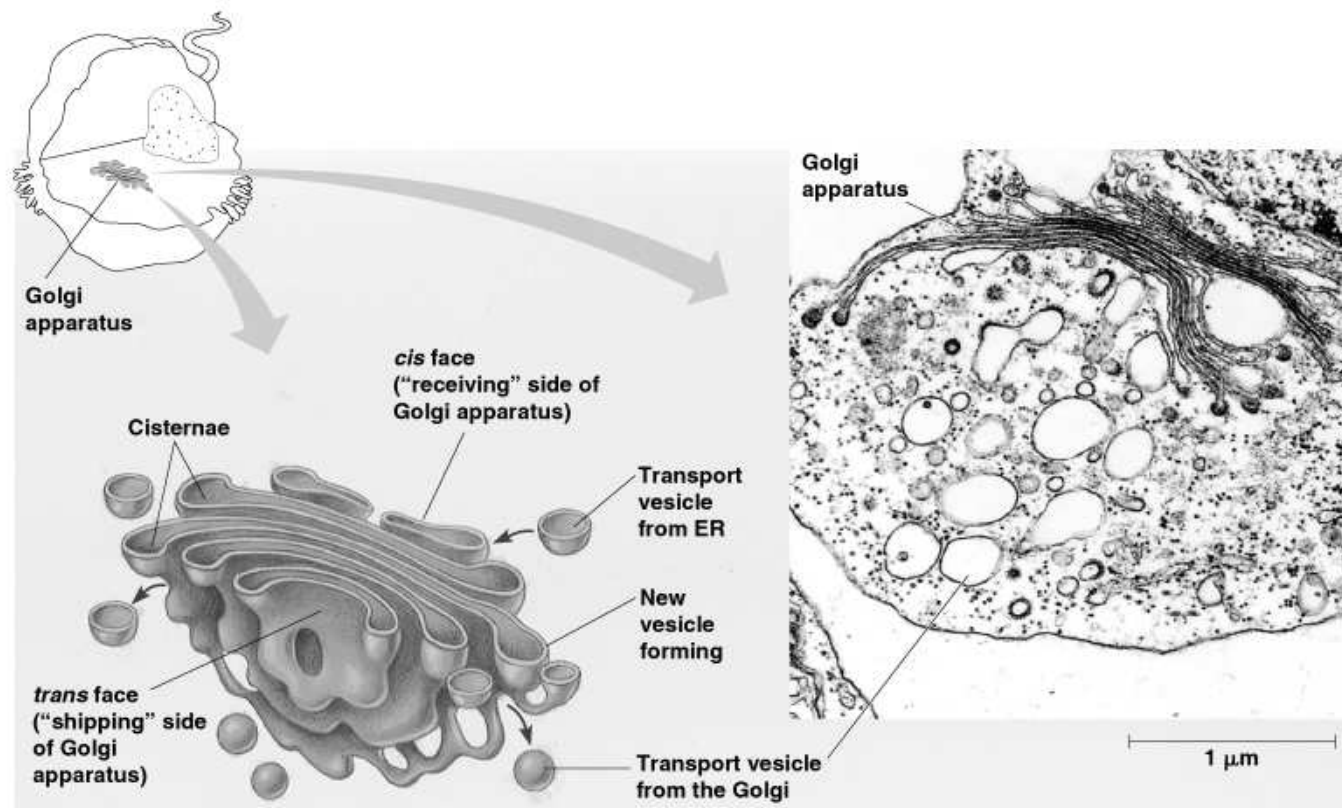
Proteiny ER se dočasně objevují v Golgiho aparátu

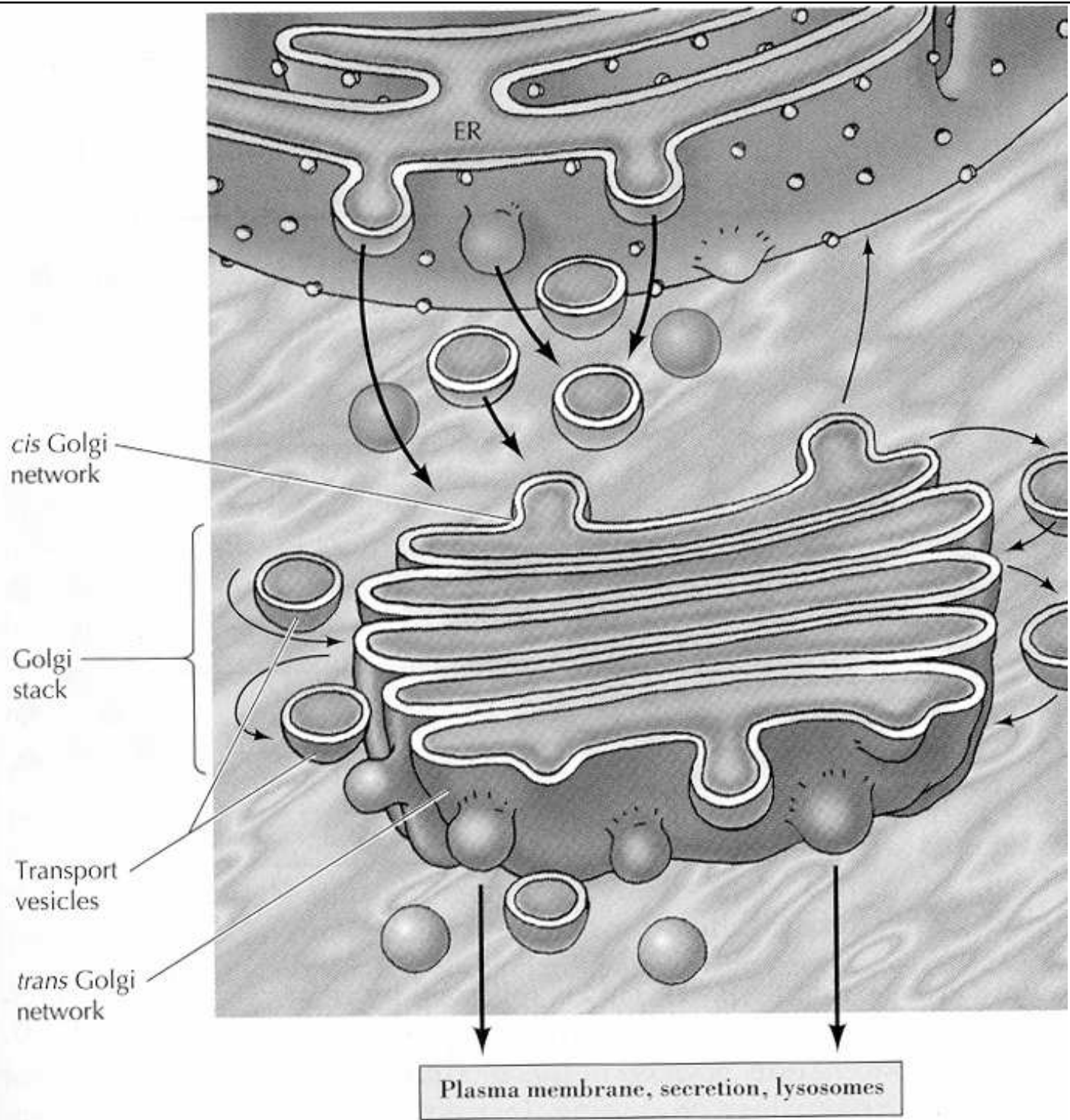
- adresová sekvence KDEL nezabrání transportu proteinů z ER do Golgiho aparátu
- označené proteiny z Golgiho aparátu putují zpět do ER



Golgiho aparát

- organela, ve které se zpracovávají, třídí a modifikují proteiny přijaté z ER
- glykosylace proteinů (tj. přidání uhlovodíkových řetězců)
- syntéza glykolipidů a sfingomyelinu
- u rostlinných buněk místo syntézy polysacharidů buněčné stěny





cis Golgi network

Golgi stack

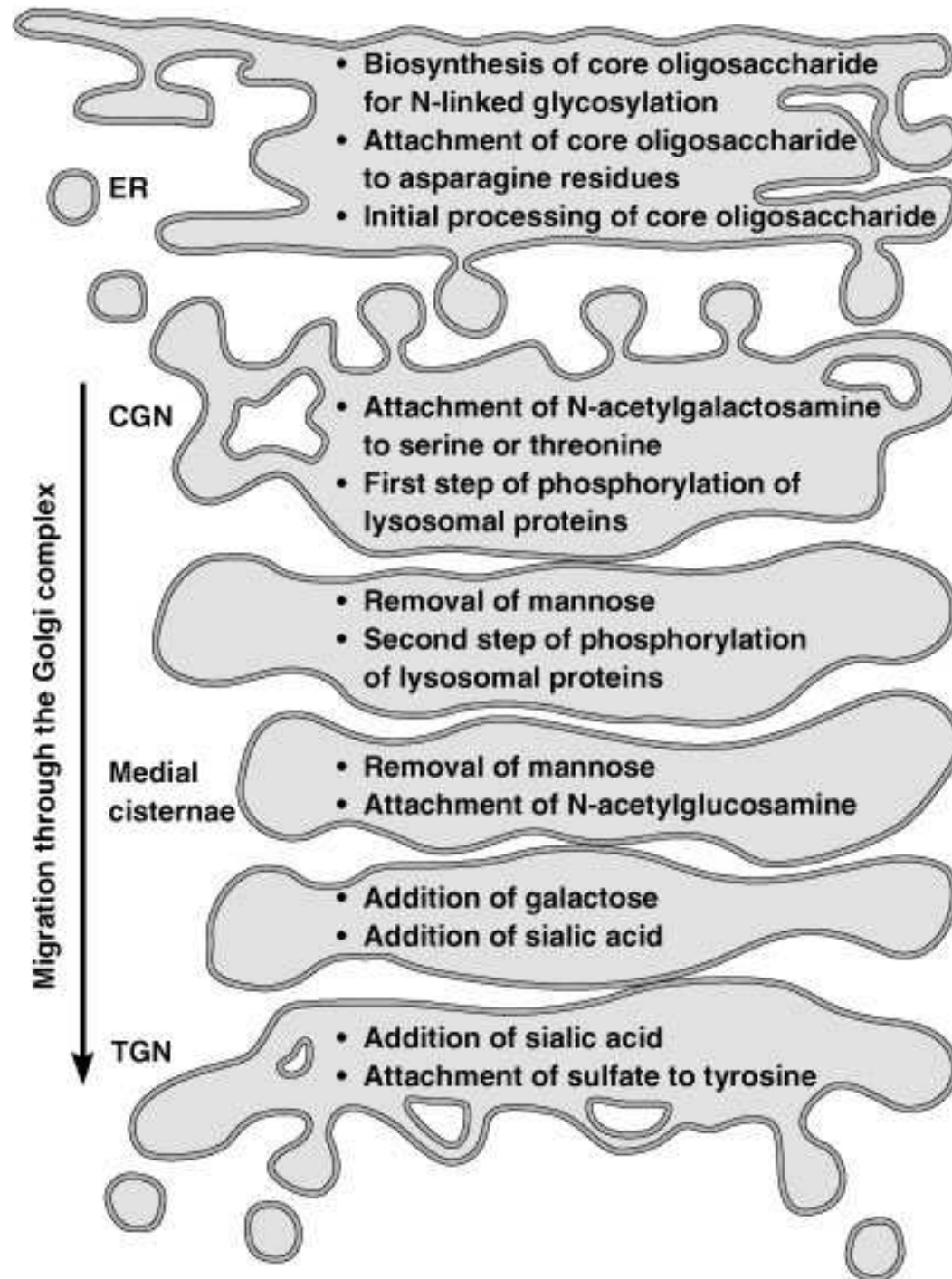
Transport vesicles

trans Golgi network

Plasma membrane, secretion, lysosomes

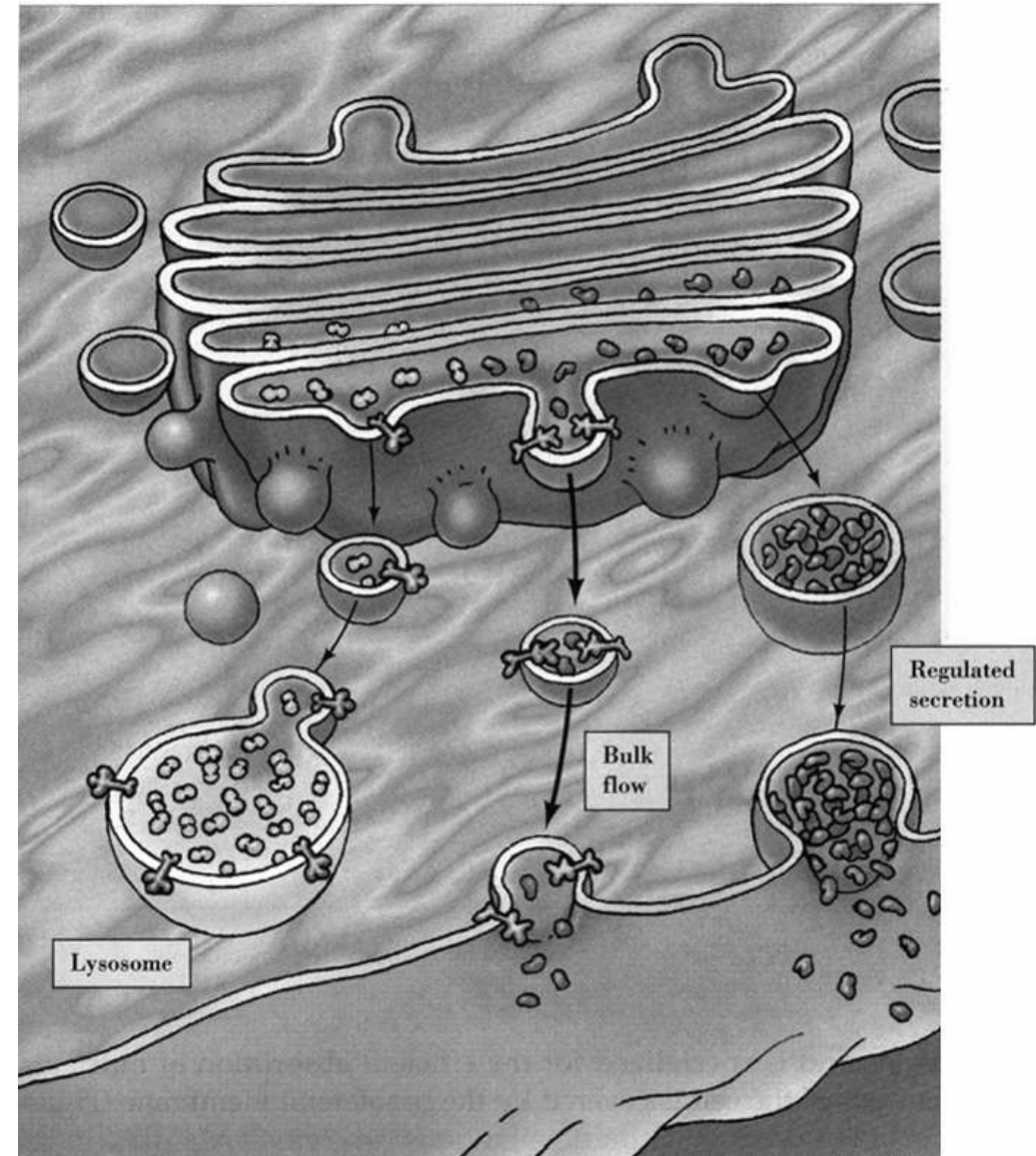
Transport z Golgiho aparátu

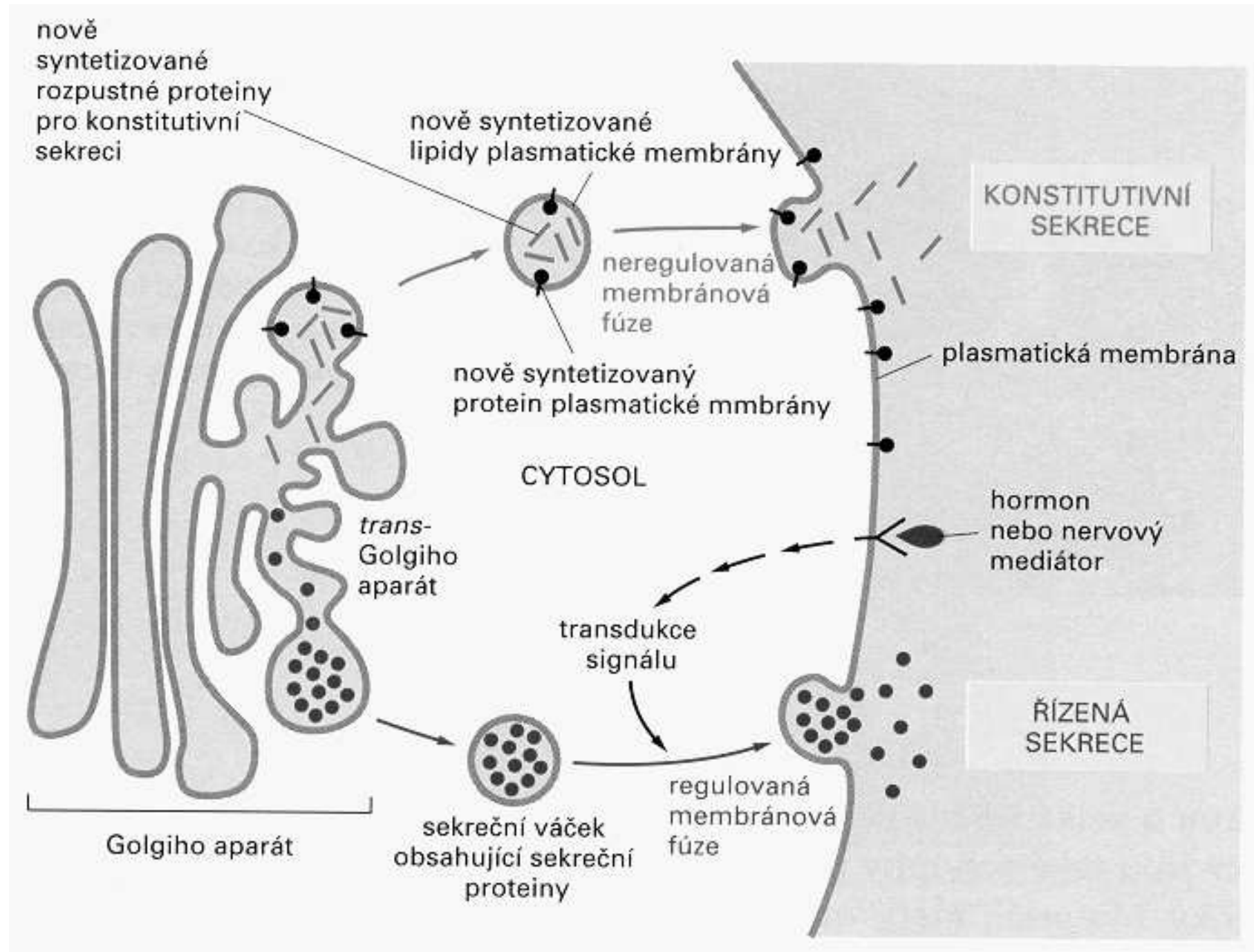
- zajištěn systémem pučení váčků
- označené proteiny směřují přes lysozomy ven z buňky nebo se vracejí do ER
- proteiny Golgiho aparátu jej krátce opouštějí a zpět se do něj vracejí



Řízená sekrece z buňky

- zajišťuje uvolnění přenášené molekuly z buňky jen pro přijetí určitého signálu
- transportní váčky se mění na větší sekreční váčky, obsahující přenášenou molekulu
- přijetí signálu vyvolá exocytózu
- běžné u žlaznatých buněk
- konstitutivní sekrece probíhá průběžně (bez závislosti na signálu)





Principy specifického vezikulárního transportu

- váček musí nakládat jen proteiny určené pro příslušnou cílovou stanici
- váček musí fúzovat jen s vhodnou cílovou membránou
- existence různých typů transportních váčků pro transport specifického nákladu, které vykonávají kyvadlovou dopravu mezi organelami

Proteinový obal váčků napomáhá pučení

- váčky, které pučí z membrány, mají na své cytozolové straně často specifický proteinový plášť (opláštěné váčky)
- po ukončení pučení je plášť odstraněn (membrána váčku může fúzovat s cílovou membránou)
- existuje několik druhů opláštěných váčků s typickými proteinovými obaly

Funkce proteinového obalu váčků

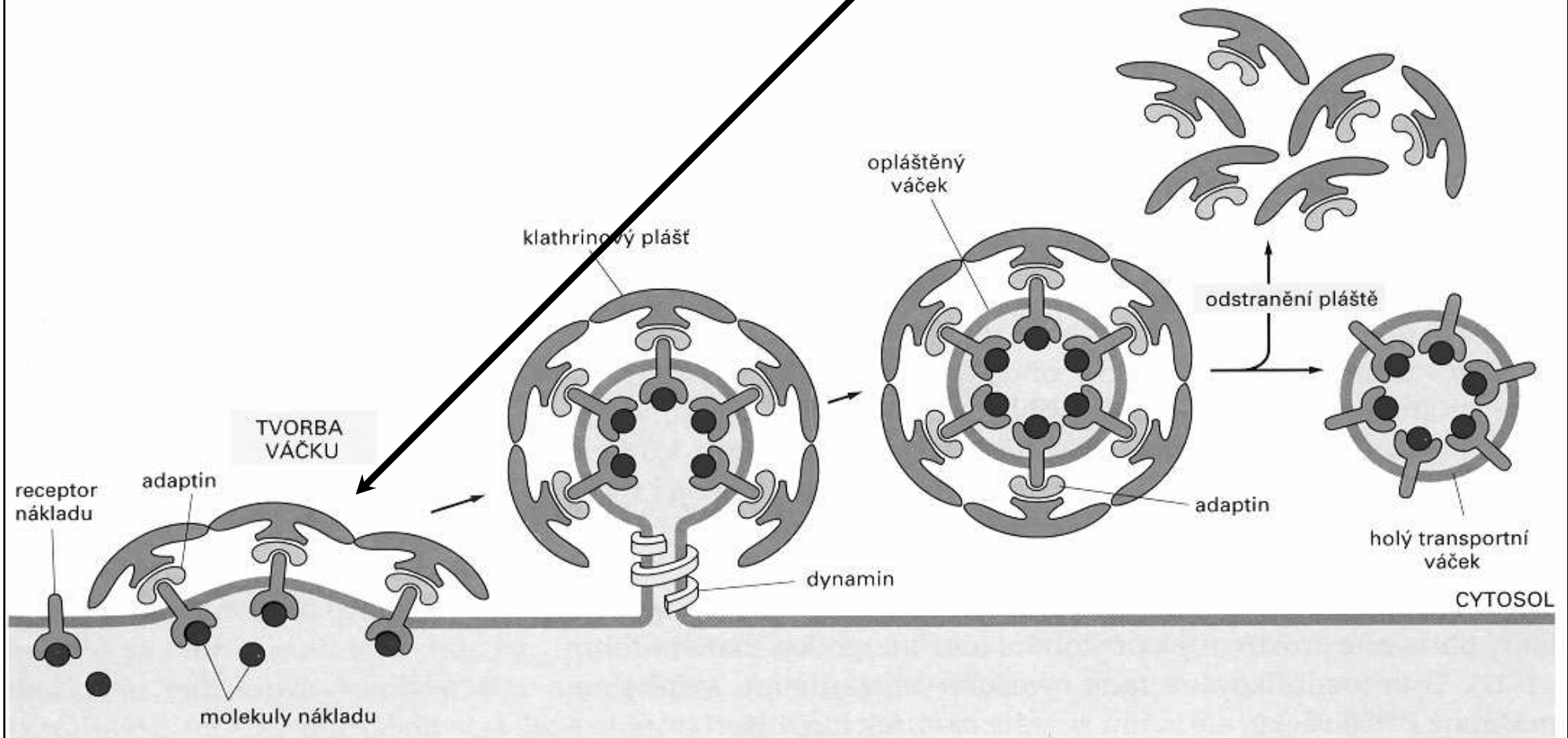
- účast na tvarování membrány do podoby váčku (pučení)
- účast na zachycení specifických molekul

Tabulka 14-4 Některé typy opláštěných váčků

Typ váčku	Proteiny pláště	Původ	Cílová stanice
Klathrinový	klathrin + adaptin 1	Golgiho aparát	lyzozom (přes endosomy)
Klathrinový	klathrin + adaptin 2	plasmatická membrána	endosomy
COP	proteiny COP	ER cisterna Golgiho aparátu Golgiho aparát	Golgiho aparát cisterna Golgiho aparátu ER

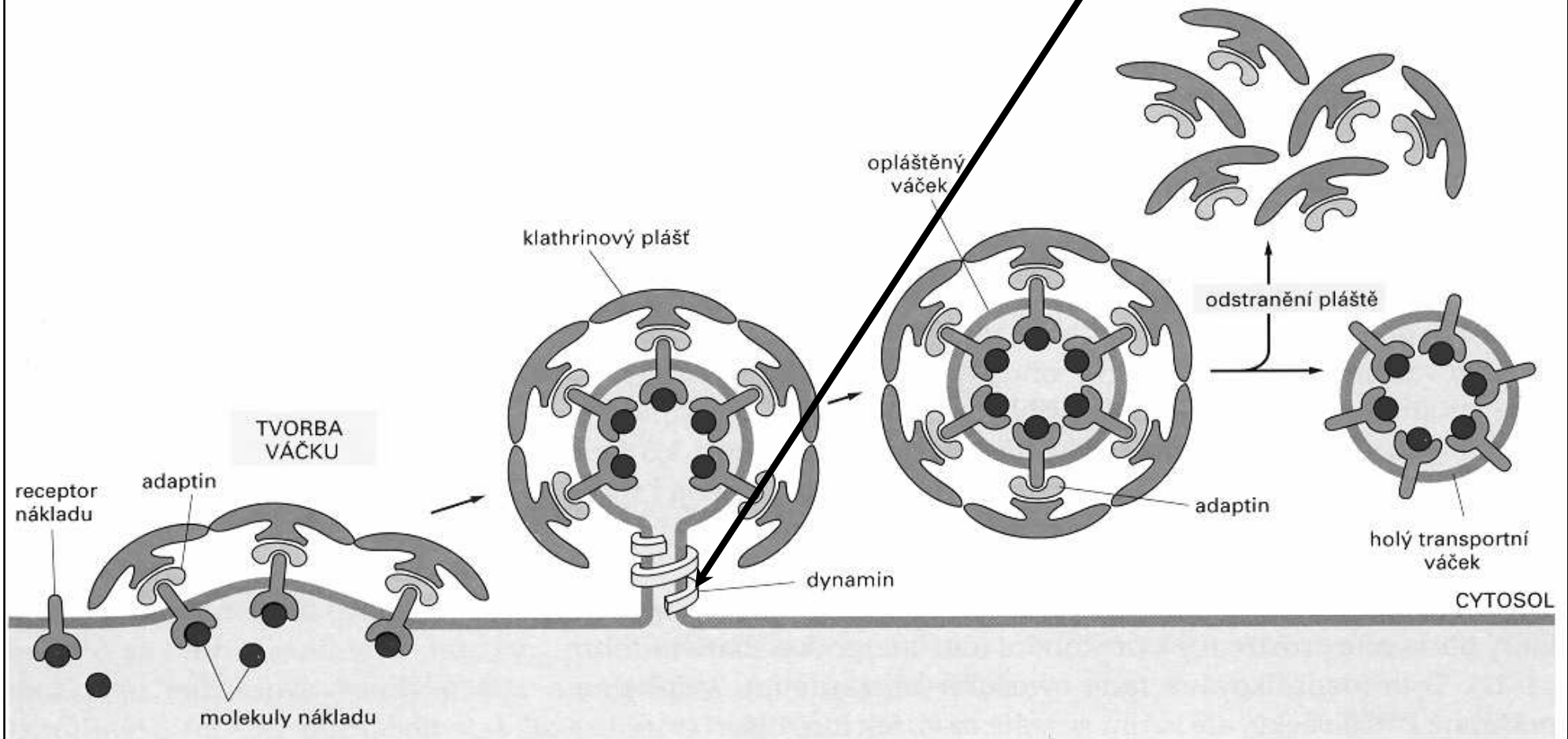
Selektivní transport klathrinovými váčky

- z membrány se váček začíná oddělovat jako jamka s klathrinovým pláštěm
- vazbu klathrinu k membráně zajišťují **adaptiny**
- adaptiny spolu s receptory zodpovídají za typ molekul, které mají být do váčků začleněny



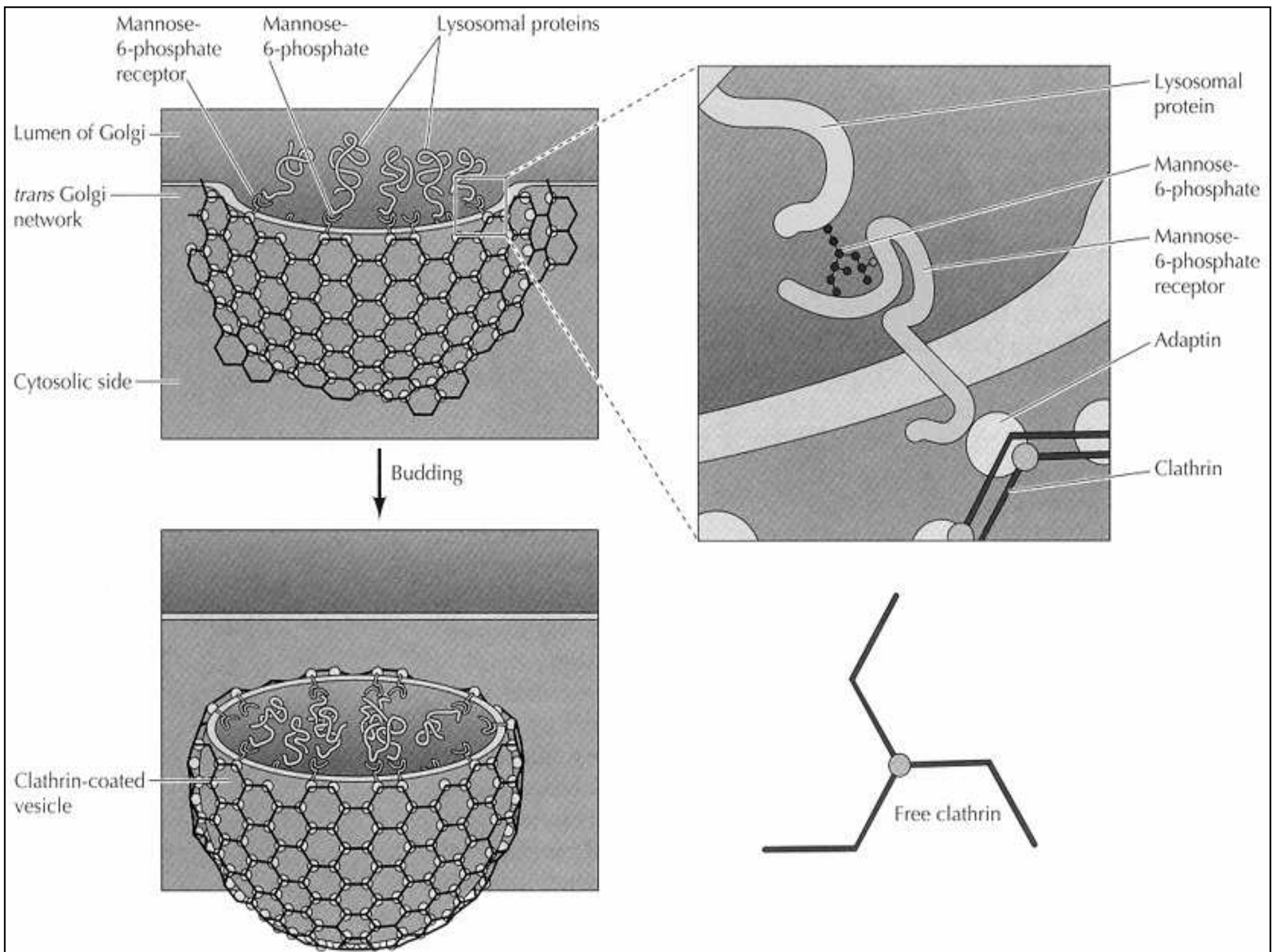
Selektivní transport klathrinovými váčky

- molekuly klathrinu se na cytozolové straně membrány skládají do sítě podobné koši - začátek tvorby váčku
- kolem ústí váčku se objevuje malý GTP-vázající protein dynamin
- dynamin hydrolyzuje GTP, čímž se stáhne a odškrtí váček od membrány



Začlenění specifických proteinů do klathrinových váčků

- proteiny určené pro transport z Golgiho aparátu do lysozomů jsou označeny přítomností **manoso-6P**
- prostřednictvím manoso-6P se tyto proteiny vážou k **receptorům pro manoso-6P**, které procházejí membránou v oblasti *trans* Golgiho aparátu
- k receptorům pro manoso-6P se vážou cytozolické **adaptiny**, ke kterým se váže **klathrin**
- klathriny se skládají ze 3 polypeptidových řetězců
- spojením těchto řetězců vzniká síť, která narušuje membránu a zahajuje pučení

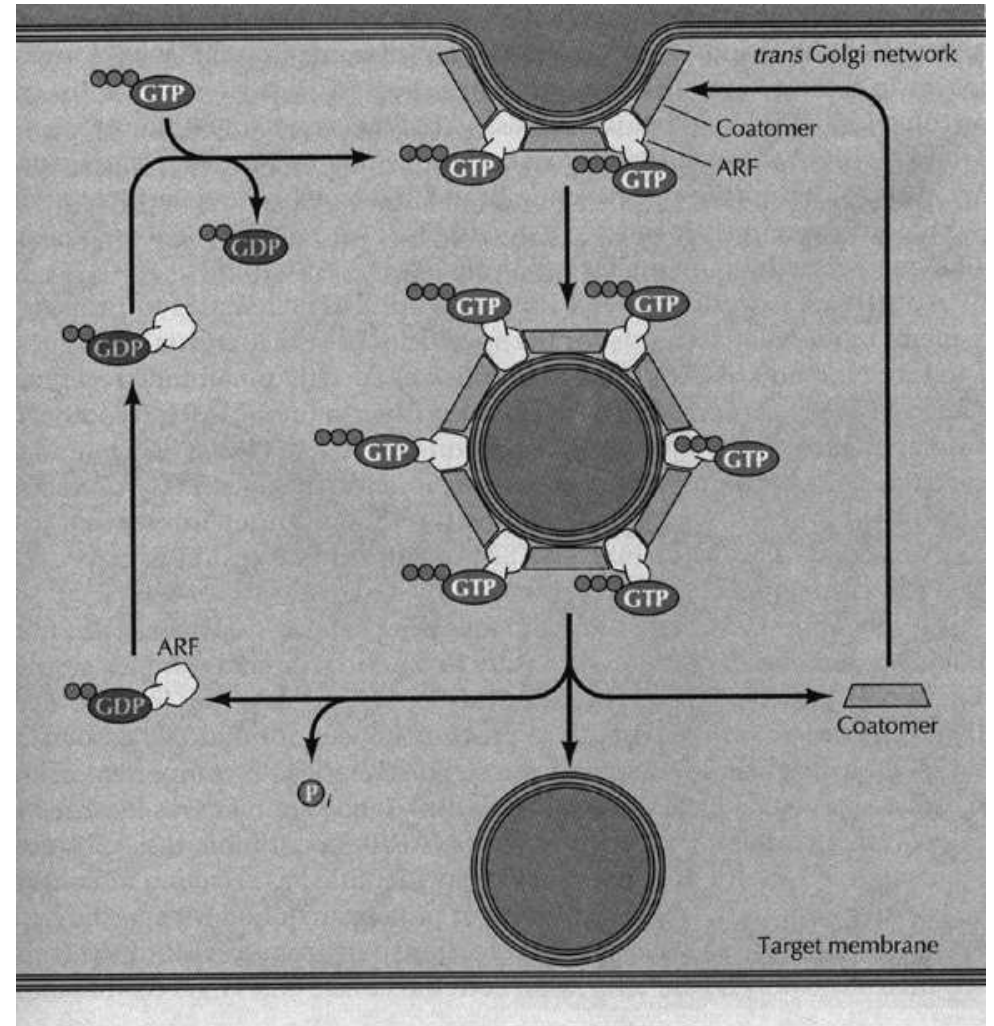


Váčky COP

- COP = „coat protein“
- zapojeny do přepravy molekul mezi ER a Golgiho aparátem a mezi jednotlivými částmi Golgiho aparátu
- pro pučení nutná účast proteinu ARF

ARF

- ADP-ribosylation factor
- váže GTP nebo GDP
- komplex ARF-GTP se spojuje s membránou Golgiho aparátu, je nutný pro vazbu COP a podílí se na tvorbě váčků
- komplex ARF-GDP způsobuje rozložení COP po dokončení pučení a před fúzí s cílovou membránou

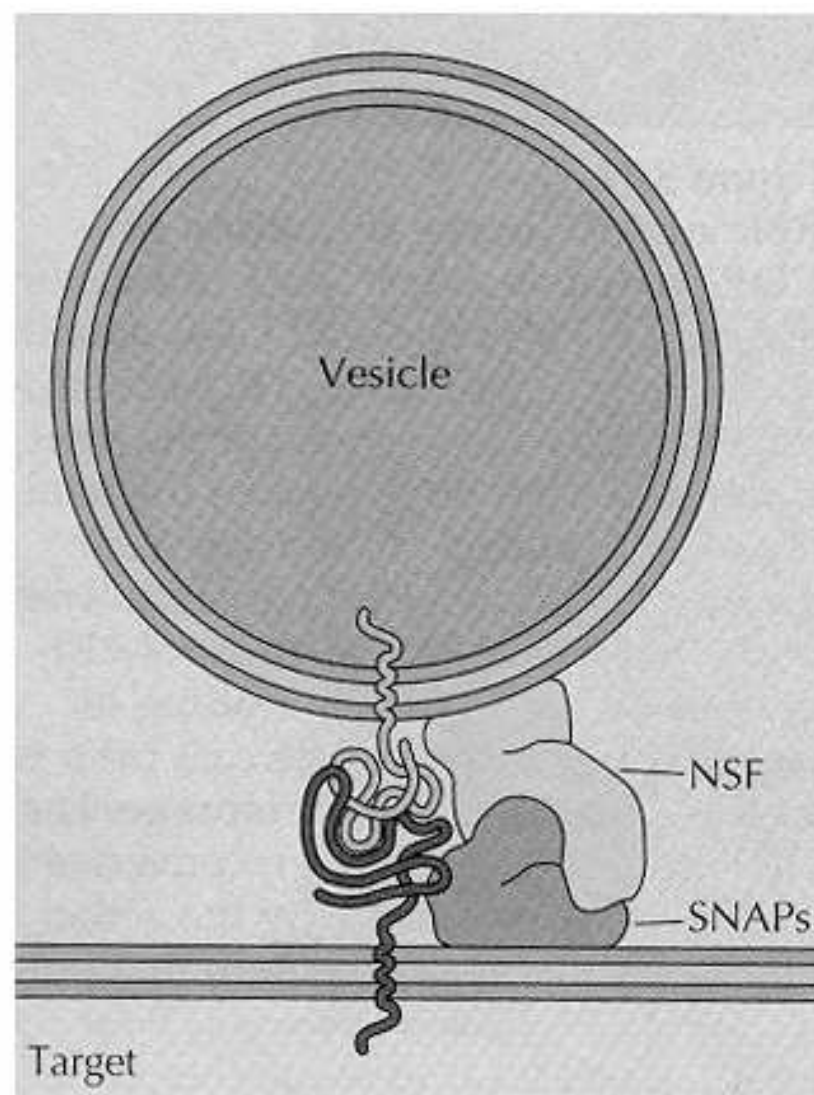
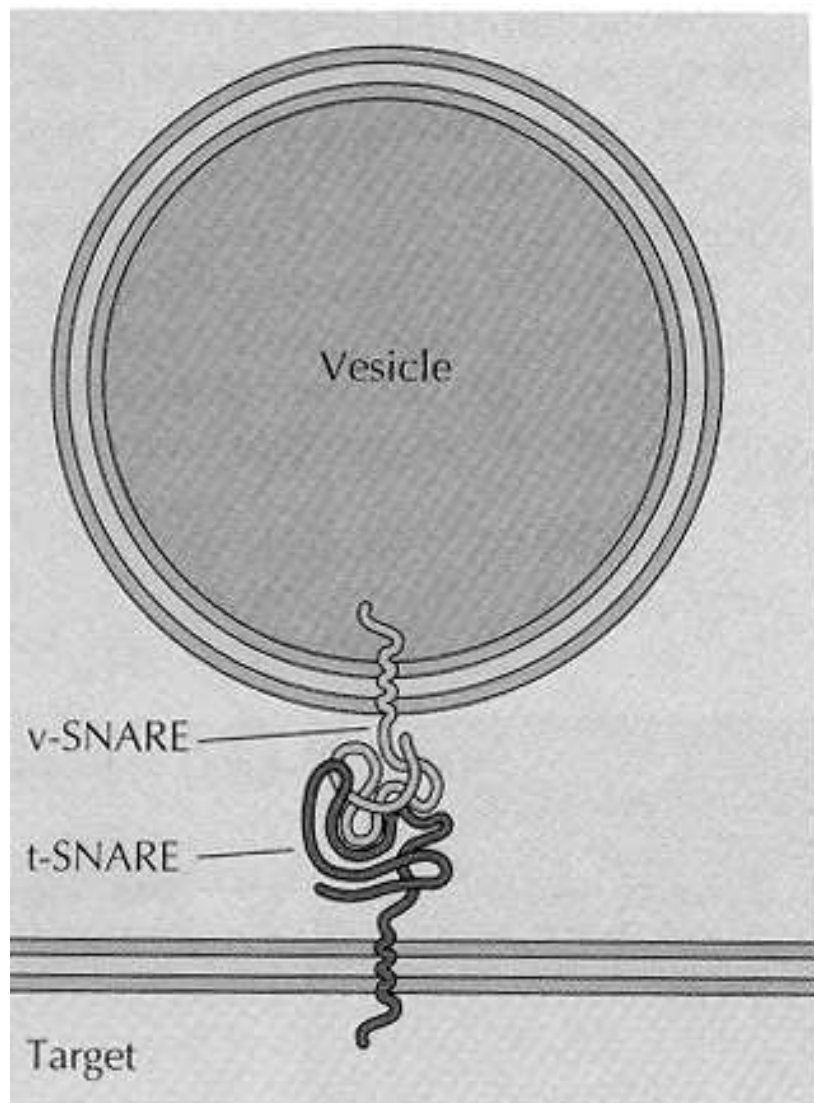


Fúze váčků

- transportní váčky mají na svém povrchu molekulární značky, které svědčí o původu váčku a jeho nákladu
- tyto značky musí být rozeznány receptory na cílových membránách
- specifita navádění váčků k cílům závisí na proteinech SNARE

Proteiny SNARE

- Soluble N-ethylmaleimid-sensitive fusion-protein attachment-protein receptor
- SNARE proteiny na povrchu váčků (**v-SNARE**) jsou specificky rozeznány proteiny SNARE na povrchu cílových membrán (**t-SNARE**)
- každá organela a každý typ transportních váčků nese unikátní proteiny SNARE
- interakce mezi komplementárními proteiny SNARE zajišťují specifickou vazbu váčků s cílovými membránami
- za vlastní fúzi zodpovídá interakce proteinů **NSF** a **SNAP**



Lysozomy

- organely, které obsahují enzymy schopné rozložit všechny typy biologických makromolekul (proteiny, nukleové kyseliny, uhlovodíky, lipidy)
- fungují jako buněčný trávicí systém
- rozkládají materiál přijatý z **vnějšího prostředí** i vlastní **nitrobuněčné struktury** určené k rozkladu
- velká variabilita ve velikosti (důsledek přítomnosti různorodého tráveného materiálu)

Lysozomální enzymy

- asi 50 různých enzymů, které fungují jako kyselé hydrolázy s optimem pH cca 5
- kyselé pH uvnitř lysozomu zajišťují ATP-dependentní H^+ pumpy
- produkty rozkladu jsou přenášeny do cytozolu
- je známo více než 30 různých genetických chorob člověka, které jsou důsledkem mutací v genech lysozomálních enzymů: nerozložený materiál se v lysozomech hromadí



Gaucherova nemoc

- důsledek mutace v genu kódujícím lysozomální enzym, který je nutný pro rozklad glykolipidů (glukocerebrosidáza)
- zvětšení velikosti a počtu lysozomů s nedegradovaným materiálem
- terapie je založena na podávání chybějícího enzymu
- kandidát pro genovou terapii (začlenění cDNA kódující daný enzym do kostní dřeně)

Gaucherova nemoc - projevy

Typ I:

- není zasažen nervový systém
- zvětšení sleziny, jater, poruchy struktury kostí
- neohrožuje život člověka

Typ II:

- nervový systém je zasažen, poruchy jsou zřejmé od raného dětství, pacienti umírají velmi brzy

Typ III:

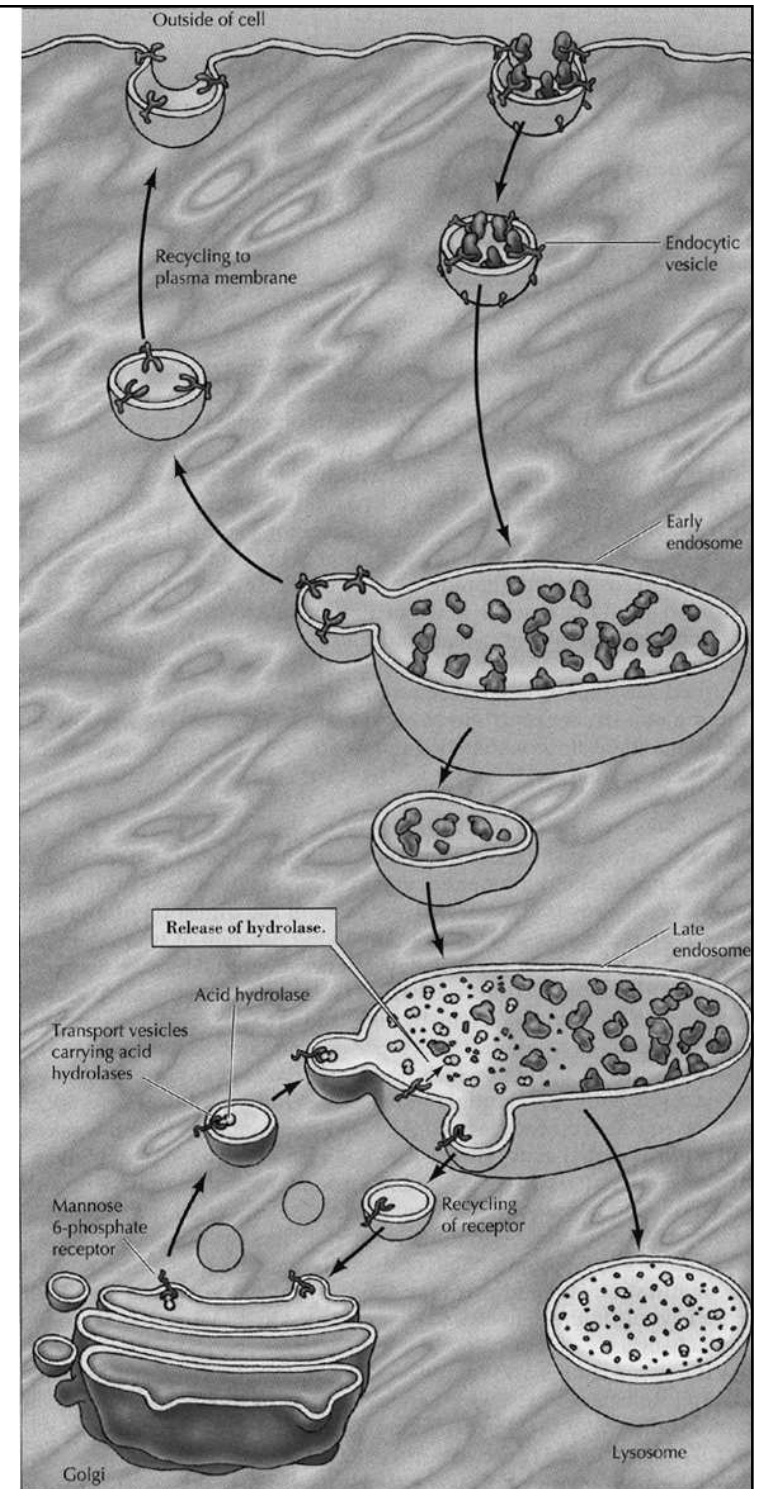
- nervový systém je zasažen (demence), poruchy se začnou projevovat přibližně od 10. roku věku

Tvorba lysozomů

- fúzí transportních váčků vzniklých pučením z Golgiho aparátu s pozdními endozomy, tj. váčky vzniklé endocytózou plazmatické membrány
- enzymy jsou syntetizovány ribozomy hrubého ER a do lysozomů se přenášejí přes Golgiho aparát
- lysozomy představují křižovatku mezi sekreční drahou a endocytickou drahou

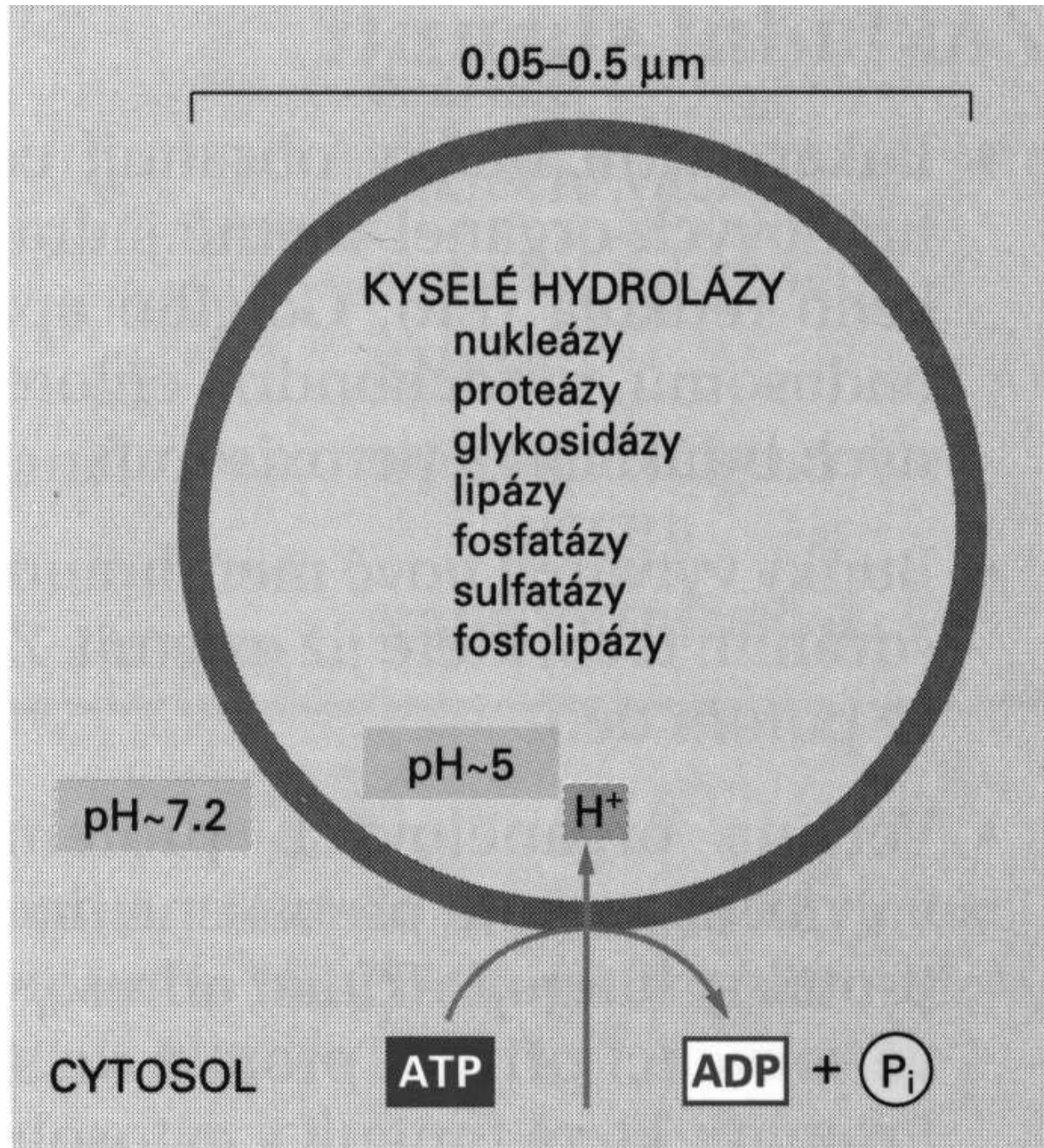
Zrání lysozomů

- endocytózou vzniká váček, který fúzuje s raným endozomem
- recyklace složek plazmatické membrány
- raný endozom zraje do podoby pozdního endozomu
- fúzí pozdního endozomu s transportními váčky z Golgiho aparátu (nesou kyselé hydrolázy) vzniká aktivní lysozom
- při zrání lysozomu dochází k snižování pH až na úroveň 5,5



Všechny lysozomální enzymy jsou kyselé hydrolázy

- jsou aktivní jen při kyselém pH (v lysozomech) a ne při neutrálních podmínkách (zbytek cytoplazmy) - ochrana před nežádoucím rozkladem vlastních struktur
- kyselé pH v lysozomech udržují membránové protonové ATPázy, které do lysozomu přenášejí protony z cytozolu za spotřeby energie ATP
- většina proteinů lysozomální membrány je značně glykosylována: ochrana před natrávením lysozomálními proteázami



Endocytické dráhy

- způsob příjmu kapaliny spolu s molekulami z vnějšího prostředí
- pro malé molekuly využívají všechny eukaryotické buňky
- příjem velkých částic nebo celých buněk zajišťují specializované fagocytické buňky

Průběh endocytózy

- obklopení pohlcovaného materiálu plazmatickou membránou
- pučení membrány dovnitř buňky spolu s pohlcovaným materiálem
- odškrcení membrány a vznik vnitrobuněčného endocytického vakuolu
- předání pohlceného materiálu lysozomům, kde je stráven

Dvy typy endocytózy

- Pinocytóza (buněčné pití): pohlcování kapaliny a molekul prostřednictvím malých váčků (max. průměr 150 nm)
- Fagocytóza (buněčné požívání): trávení velkých částic, např. mikroorganismů a zbytků buněk prostřednictvím velkých váčků zvaných fagozomy (průměr obvykle větší než 250 nm)

Průběh fagocytózy

- vazba cizorodé částice k povrchu fagocytické buňky
- aktivace povrchového receptoru
- vytváření listovitých výběžků plazmatické membrány - pseudopodia (účast aktinových složek cytoskeletu)
- výběžky částici obklopí a fúzí koncových částí membrán vzniká **fagozom**
- uvnitř buňky fagozom fúzuje s lysozomem za vzniku **fagolysozomu**, ve kterých je pohlcený materiál rozložen kyselými lysozomálními hydrolázami

AUTOPHAGY

PHAGOCYTOSIS

Endoplasmic reticulum

Mitochondrion

Autophagosome

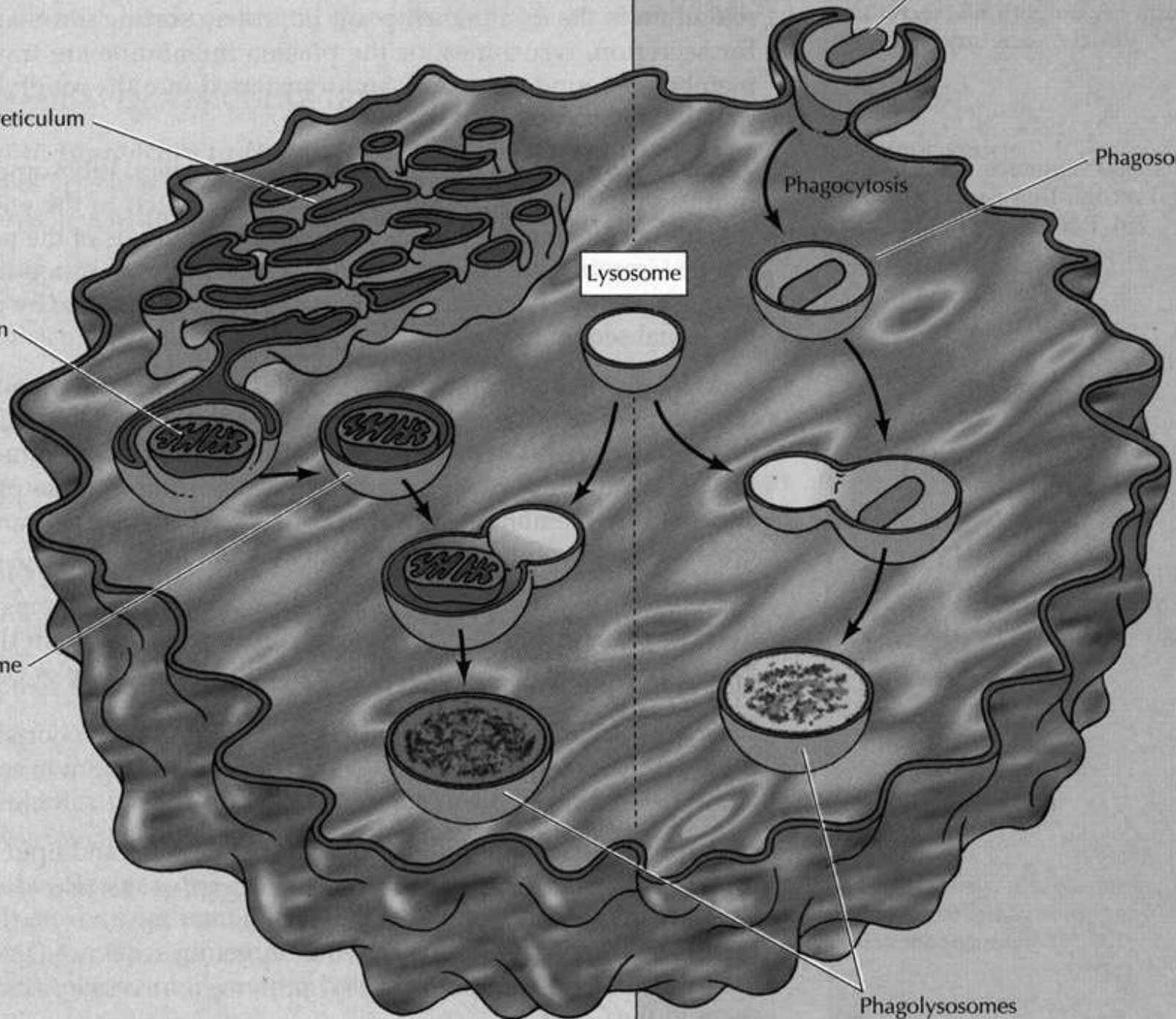
Lysosome

Bacterium

Phagocytosis

Phagosome

Phagolysosomes



Autofagie

- postupný rozklad vlastních složek buňky
- patrná v hladovějících buňkách (zoufalý pokus získat energii potřebnou pro zbytek buňky)
- částice určená k rozkladu je nejdříve uzavřena v membráně vychlípené z ER - vzniká **autofagozom**
- autofagozom fúzuje s lysozomem a částice je rozložena

AUTOPHAGY

PHAGOCYTOSIS

Endoplasmic reticulum

Mitochondrion

Autophagosome

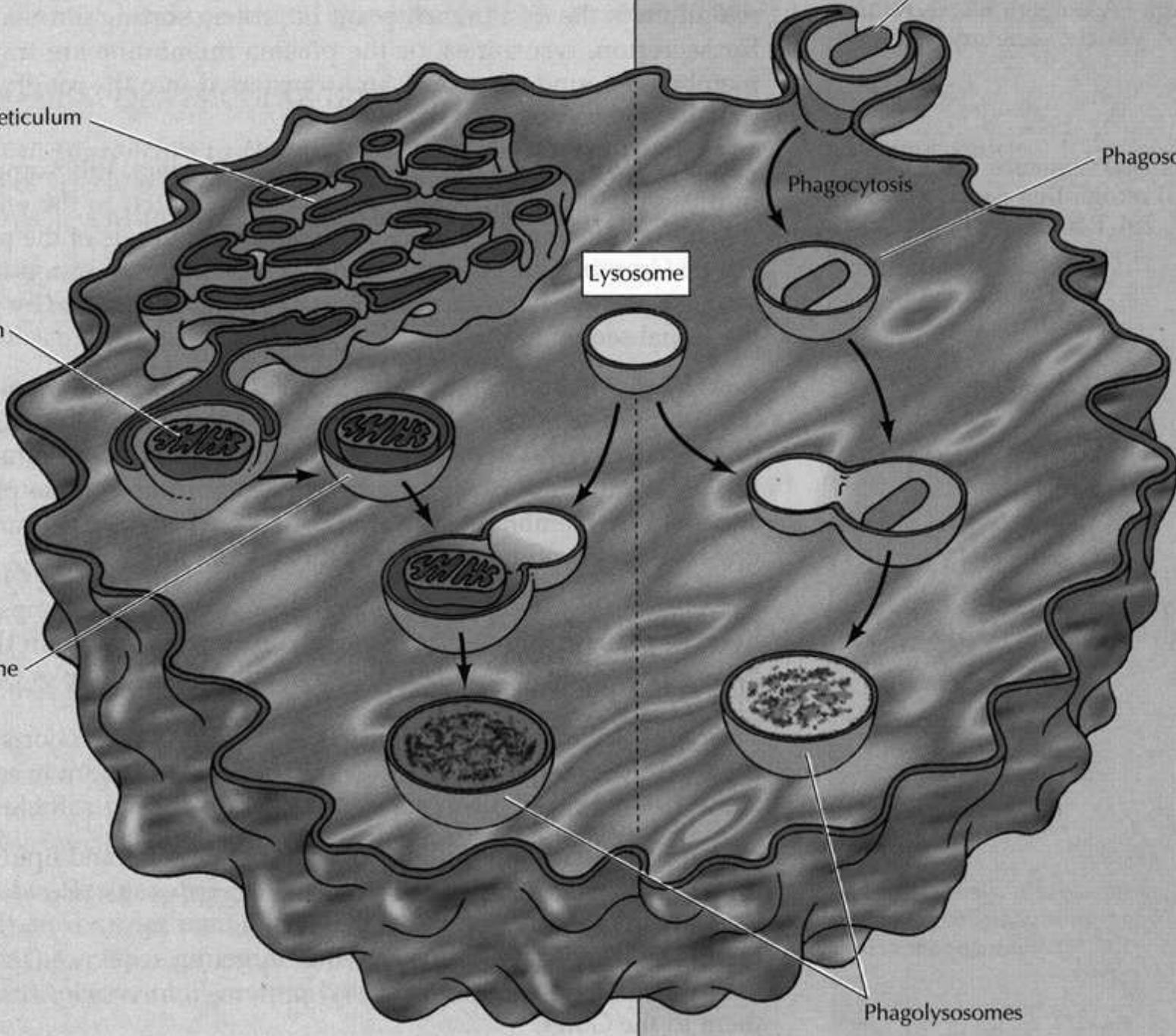
Bacterium

Phagocytosis

Phagosome

Lysosome

Phagolysosomes



Pinocytóza

- průběžné pohlcování části plazmatické membrány
- tvorba pinocytotických váčků, které jsou později vráceny k buněčnému povrchu
- makrofág pohlcuje 3% své plazmatické membrány každou minutu (celou během půl hodiny)
- využívá klathrinových jamek a váčků, které fúzí s endozomy
- je neutrální, nerozlišuje přijímané materiály

Endocytóza zprostředkovaná receptory

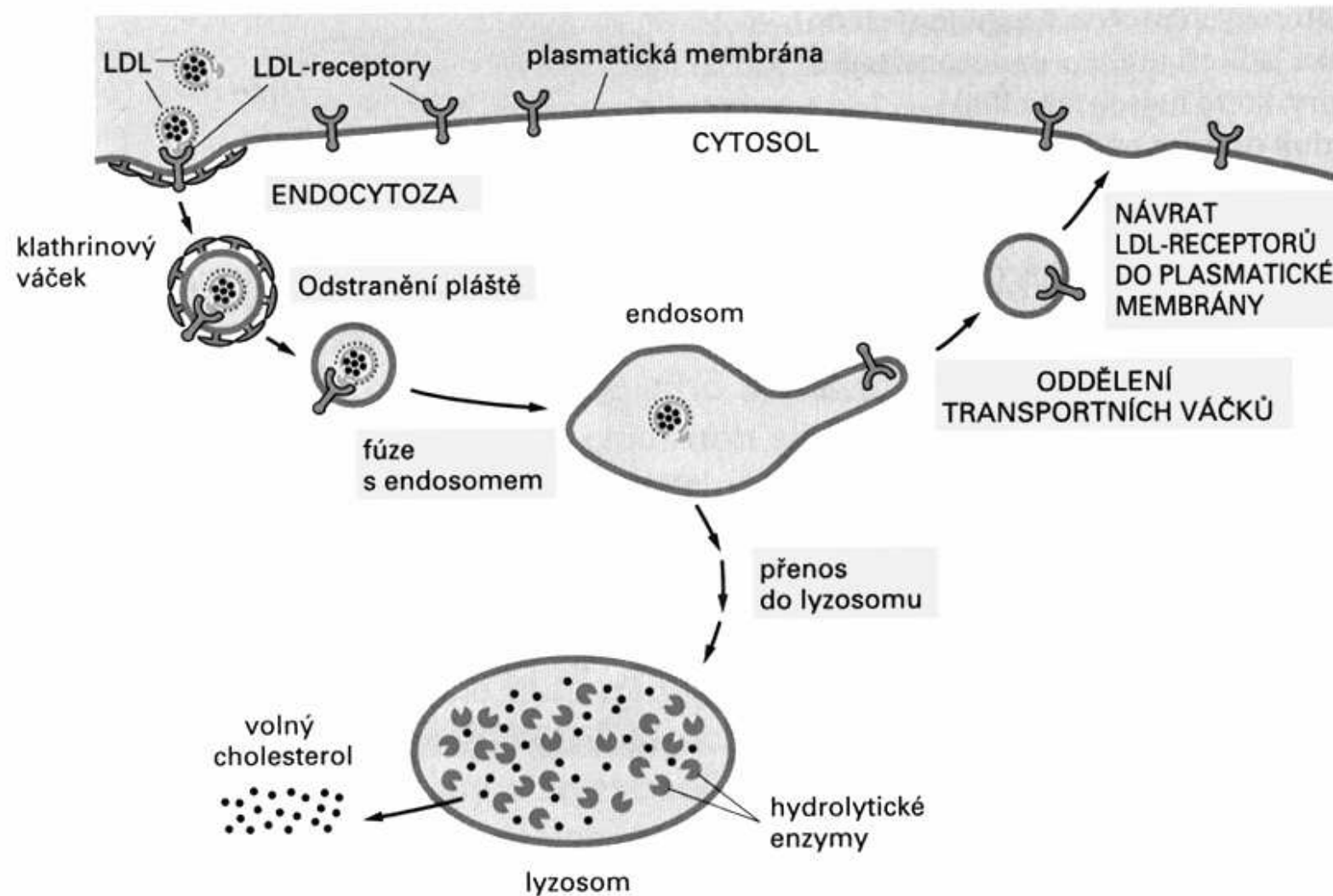
- mechanismus pro selektivní zvyšování koncentrace určitých látek v buňce
- přijímané molekuly se vážou k příslušným receptorům na buněčném povrchu
- komplexy molekula/receptor vstupují do buňky v klathrinových váčcích
- příkladem je příjem cholesterolu

Endocytóza cholesterolu

Cholesterol

- nutný pro tvorbu membrán
- nerozpustný ve vodě, v krevním řečišti je přenášen proteinovými nosiči (**lipoproteiny s nízkou hustotou, LDL**)
- LDL se vážou na **receptory** umístěné na povrchu buněk
- komplexy LDL s receptory jsou pohlceny **klathrinovou endocytózou** a dodány **endozomům**
- v kyselém prostředí se LDL uvolní z receptoru
- receptory jsou transportními vácčky dodány zpět do plazmatické membrány

- LDL jsou rozloženy v lysozomech
- uvolněný cholesterol přechází do cytozolu, kde se využije pro syntézu nových membrán





Poruchy příjmu cholesterolu

- důsledek poruchy struktury LDL-receptoru
- buňky nepřijímají cholesterol
- cholesterol se hromadí v krvi a předurčuje postižené jedince k vývinu atherosklerózy
- většina pacientů umírá v raném věku na srdeční záchvat (důsledek ucpání tepen zásobujících srdce)