

Předmět:
KBB/BB1P; KBB/BUBIO

Vnitrobuněčné oddíly a buněčný transport, cytoskelet

Cíl přednášky: seznámit posluchače s vnitrobuněčnými oddíly, základními principy buněčného transportu a strukturou a funkcí cytoskeletu

Klíčová slova: membránové organely, třídění proteinů, vezikulární transport, exocytóza, endocytóza, cytoskelet

Obrázky v následující prezentaci jsou převzaty z níže uvedené knihy výlučně k výukovým účelům.

The illustrations in following lecture are taken from Alberts et al. *Molecular Biology of the Cell*, 5th Edition (Garland Science 2008) only and exclusively for the educational purposes.

Alberts • Johnson • Lewis • Raff • Roberts •
Walter
Molecular Biology of the Cell
Fifth Edition

Copyright © Garland Science 2008

Vnitrobuněčné oddíly

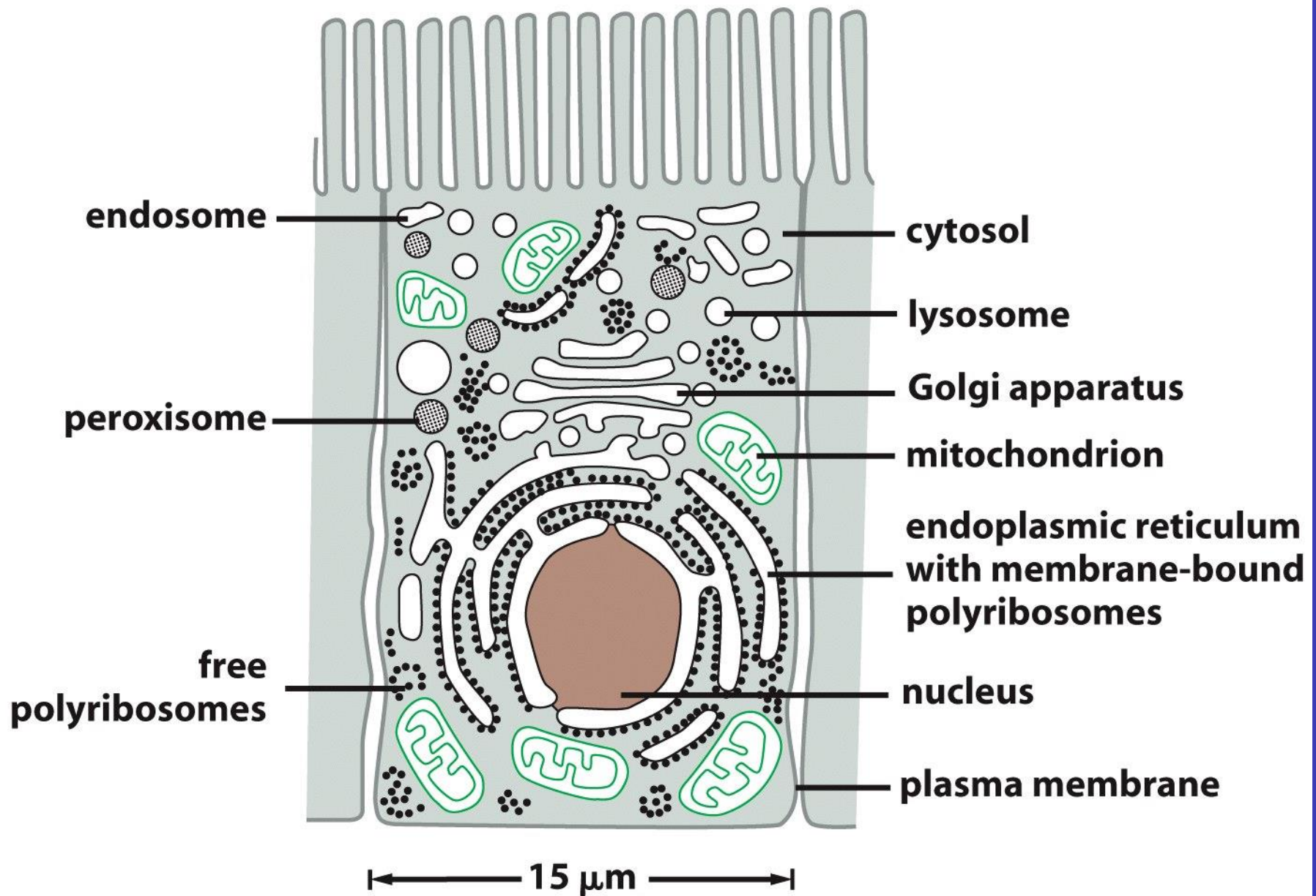
- buňky vyvinuly k oddělení a organizaci svých chemických dějů několik strategií
- jednou z možností je **soustředit** různé **enzymy** potřebné ke katalýze určitého sledu reakcí do jednoho velkého **proteinového komplexu**
- druhá možnost, typická pro eukaryotní buňky, je **umístění** různých **metabolických dějů** a **proteinů** k nim potřebných do různých **oddílů ohraničených membránou**
- takovým membránou ohraničeným oddílům se říká **membránové organely**

Membránové organely

- na rozdíl od prokaryotní buňky, která se skládá z jediného oddílu (cytosolu), eukaryotní buňky jsou **uvnitř rozděleny** pomocí **membrán** a tvoří tak jednotlivé **membránové organely**, mezi něž patří:
 - **jádro**, které je ohraničeno jaderným obalem tvořeným dvěma membránami. Pro komunikaci jádra s cytosolem slouží tzv. **jaderné póry**
 - vnější jaderná membrána přechází plynule v membránu **endoplasmatického retikula**, hlavního místa **syntézy** nových buněčných **membrán**

- k velké části cytosolového povrchu ER jsou přisedlé **ribozomy**, a proto se této části říká **drsné ER** (místo intenzivní **proteosyntézy**)
- **hladká** forma **ER** neobsahuje ribozomy
- v blízkosti jádra se obvykle nachází i **Golgiho aparát**, který přijímá proteiny a lipidy z ER, **upravuje** je a **posílá dál**, případně je sekretuje ven z buňky prostřednictvím procesu známého jako **exocytóza**
- dále jsou v buňkách přítomny **lyzozomy**, malé váčky s **trávicími enzymy** – jejich funkcí je **odbourávat opotřebované organely** a **makromolekuly** a také částice, které buňka pohltila při **endocytóze**

- pohlčené látky nejprve ale musí projít přes **endozomy**, které přijaté látky **třídí** a vybrané molekuly zase vracejí zpět do membrány v procesu označovaném **recyklace**
- dále se v buňce nacházejí **peroxizomy**, které obsahují enzymy pro oxidační reakce – slouží k **odbourávání lipidů** a **detoxifikaci** toxických molekul
- **mitochondrie** a **chloroplasty** (následující přednáška)
- membránové organely v průměru zaujímají asi **polovinu objemu eukaryontní buňky**
- mnohé z buněčných organel jsou spojeny s **cytoskeletem**, který udržuje jejich **pozici v rámci buňky** a rovněž představuje **dráhy pro pohyb** organel v buňce a pro dopravu vezikul mezi nimi



Možnosti transportu

- každý vnitrobuněčný oddíl obsahuje jedinečný **soubor proteinů**, které se musí **selektivně přenášet** z místa syntézy (cytosol), do oddílu, kde jsou využívány
- tento transportní proces (z cytosolu do organely) se nazývá **třídění proteinů** a **závisí na signálech**, které jsou vestavěny do sekvence aminokyselin v daném proteinu
- některé organely spolu navzájem komunikují tak, že vytvářejí malé **membránové váčky (vezikuly)**, které se **odškrcují** od daného oddílu, pohybují se cytosolem a **fúzí** s jinými membránami – **vezikulární transport**
- podobným způsobem jsou buňky schopny přijímat nebo uvolňovat proteiny (tzv. **endo/exocytóza**)

Třídění proteinů

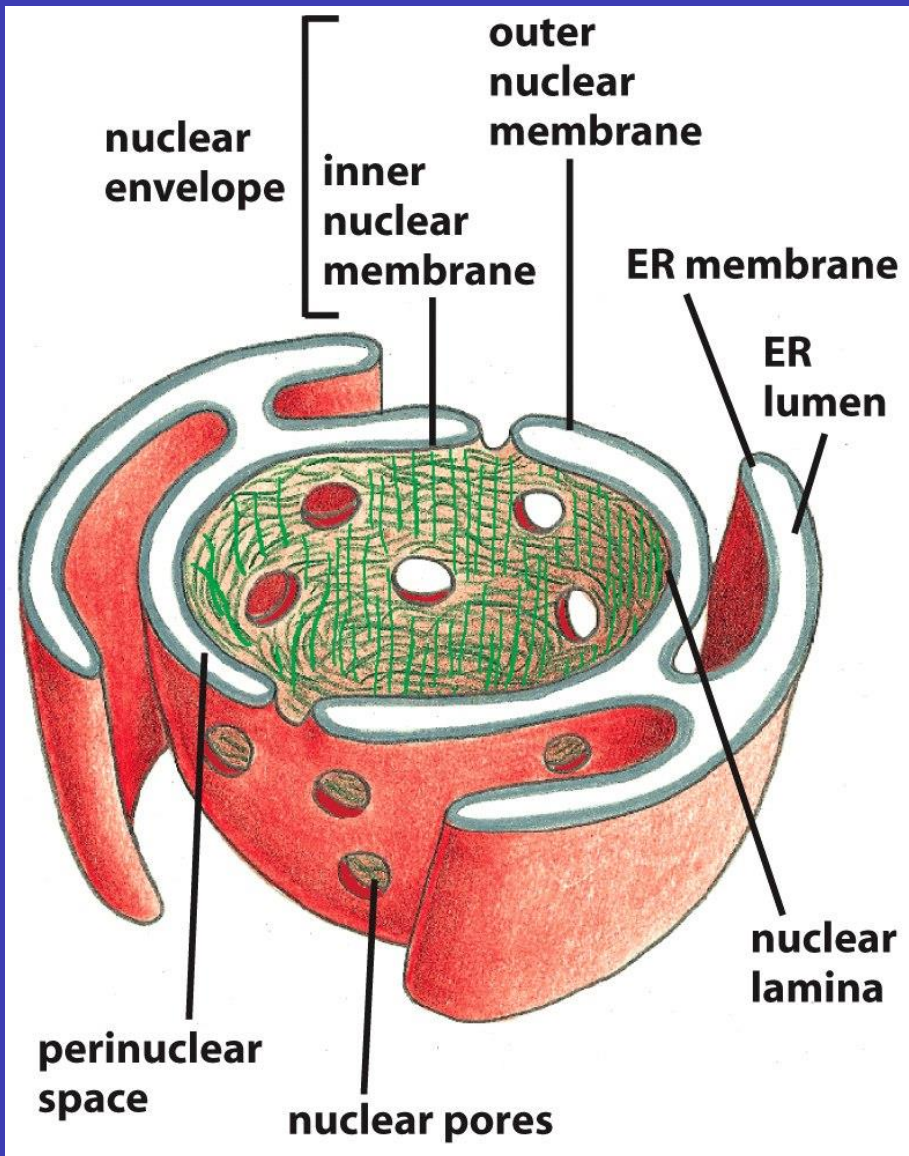
- **syntéza** všech **proteinů** začíná na **ribosomech** v **cytosolu** (výjimkou jsou některé proteiny, které si syntetizují podle vlastní DNA mitochondrie a chloroplasty – většina mitochondriálních a chloroplastových proteinů se ale stejně syntetizuje v cytosole)
- nasyntetizovaný protein obsahuje **adresovou (signální) sekvenci** (určité pořadí aminokyselin), která ho **nasměruje z místa syntézy do místa jeho určení** (do cílové organely). Proteiny bez této adresy zůstávají v cytosole
- proteiny pak mohou být do jednotlivých organel importovány buď **přímo z cytosolu**, nebo prostřednictvím **transportních vezikul** na základě některého ze tří hlavních mechanismů:

1. transport jadernými póry: proteiny směřující z cytosolu do jádra jsou přenášeny jadernými póry, jež prostupují vnitřní a vnější jadernou membránu – póry jsou selektivní, ale umožňují volnou difuzi menších makromolekul

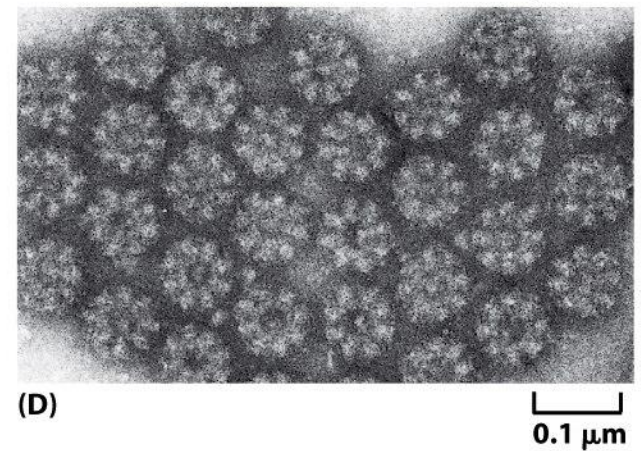
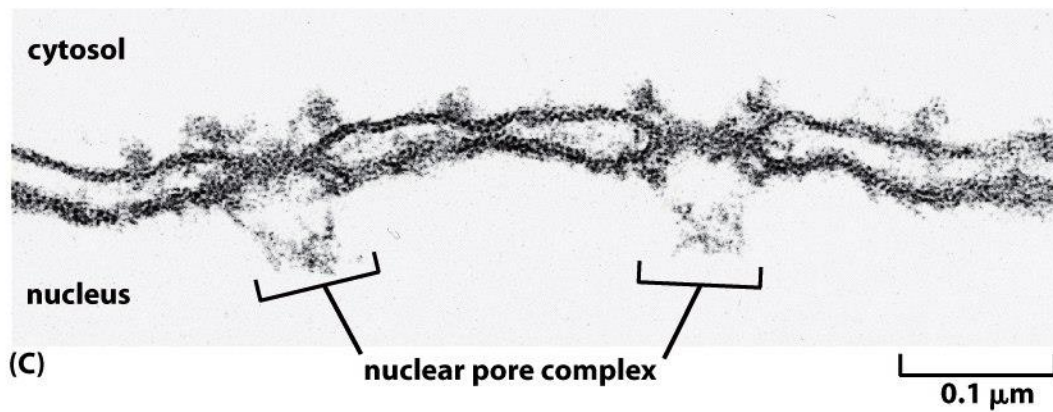
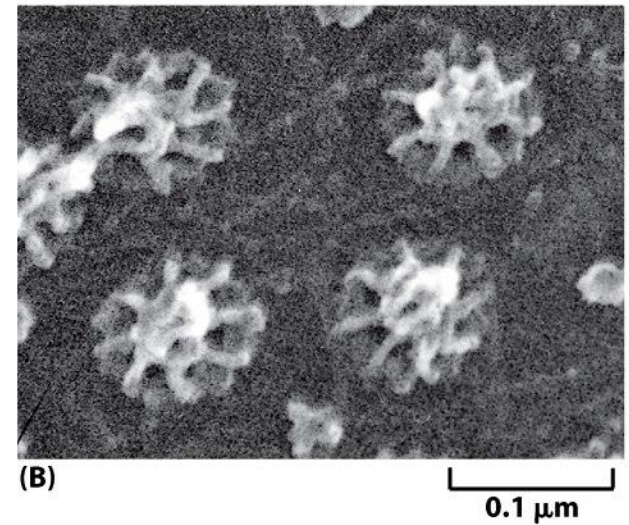
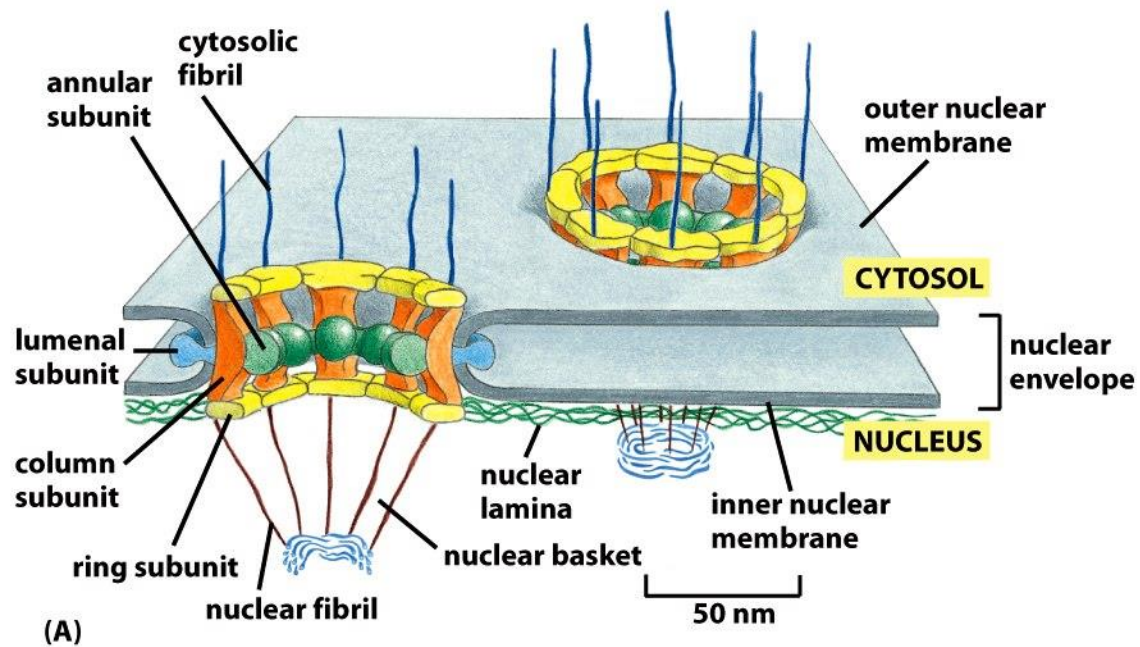
2. transport přes membrány: proteiny směřující do ER, mitochondrií, chloroplastů či peroxizomů se přenášejí přes membránu dané organely **proteinovými translokátory** umístěnými v membráně. Přenášený protein se v tomto případě **musí rozvinout**

3. vezikulární transport: transport mezi jednotlivými oddíly endomembránového systému zabezpečovaný pomocí **transportních vezikul** do kterých se proteiny „nakládají“ z vnitřního prostoru buněčného oddílu (transportuje se také membránový materiál)

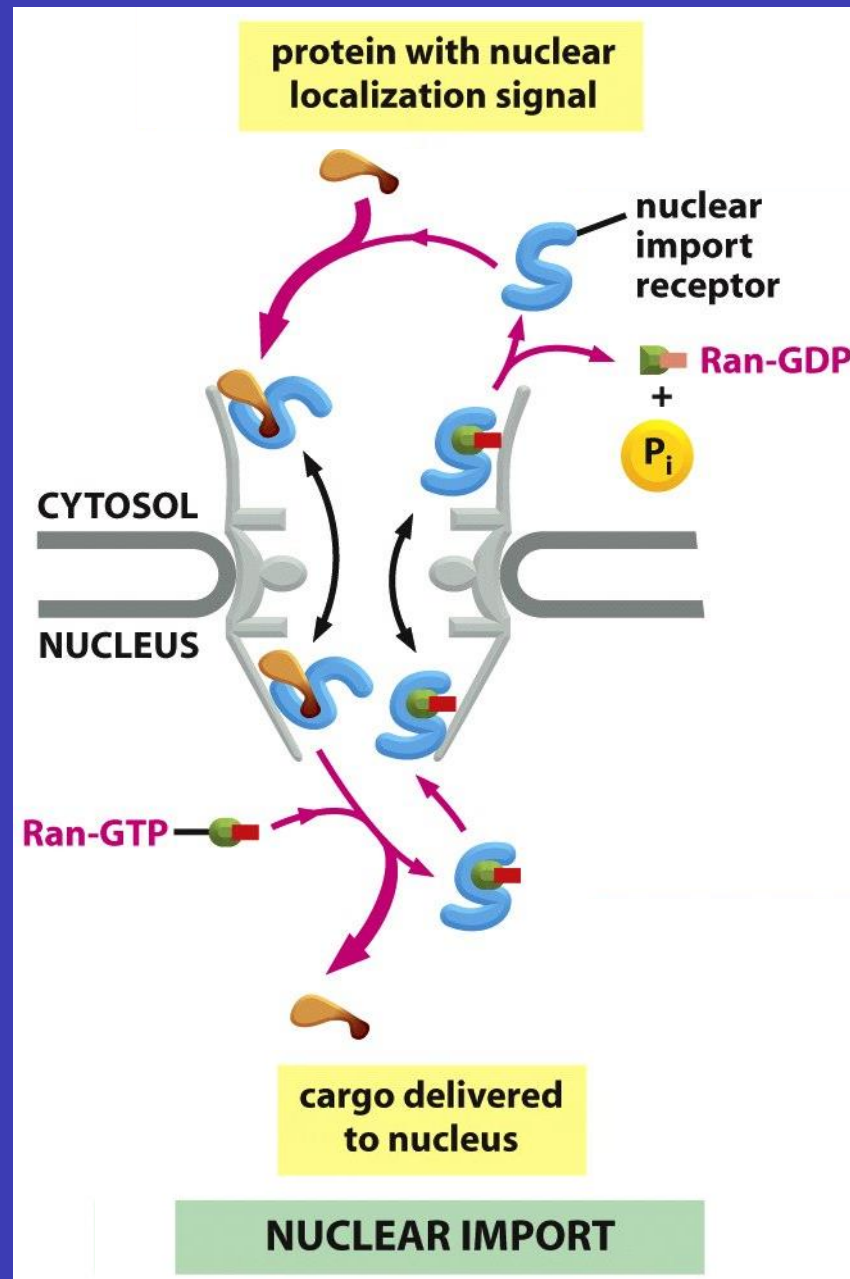
Transport proteinů jadernými póry



- jaderný pór = komplex víc než 100 různých proteinů
- **malé molekuly** rozpustné ve vodě procházejí volně **difuzí**
- **větší molekuly** nemohou projít bez zvláštního **třídícího signálu**
- proteiny jsou přenášeny **aktivním transportem**



- proteiny transportovány z cytosolu do jádra obsahují adresovou sekvenci – **jaderný lokalizační signál**
- na jaderný lokalizační signál se vážou proteiny zvané **jaderné importní receptory** nacházející se volně v cytosole, které navádějí transportovaný protein k jadernému póru
- protein je následně **aktivně přenášen do jádra** za využití energie získané z **hydrolýzy GTP**
- v jádře se jaderný importní receptor **oddělí od proteinu** a je **exportován** jadernými póry zpět **do cytosolu**
- jaderné póry přenášejí proteiny v jejich **kompletně složené konformaci**



Transport proteinů přes membránu ER

- proteiny určené pro Golgiho aparát, endozomy a lyzozomy nebo pro povrch buňky nejprve **vstupují z cytosolu do ER** – jakmile se ocitnou uvnitř ER, **do cytosolu se už nevrátí**, neboť k jiným organelám jsou přenášeny uzavřené v **transportních váčcích (vezikulách)**
- nově syntetizované **membránové proteiny** (určené např. pro plazmatickou membránu) **zůstávají v membráně ER** a v ní cestují dál
- vzhledem k tomu, že ribozomy přiléhají k ER, nově syntetizované proteiny pronikají **z ribozomu do ER už během samotné syntézy** (ještě než jsou dokončeny)

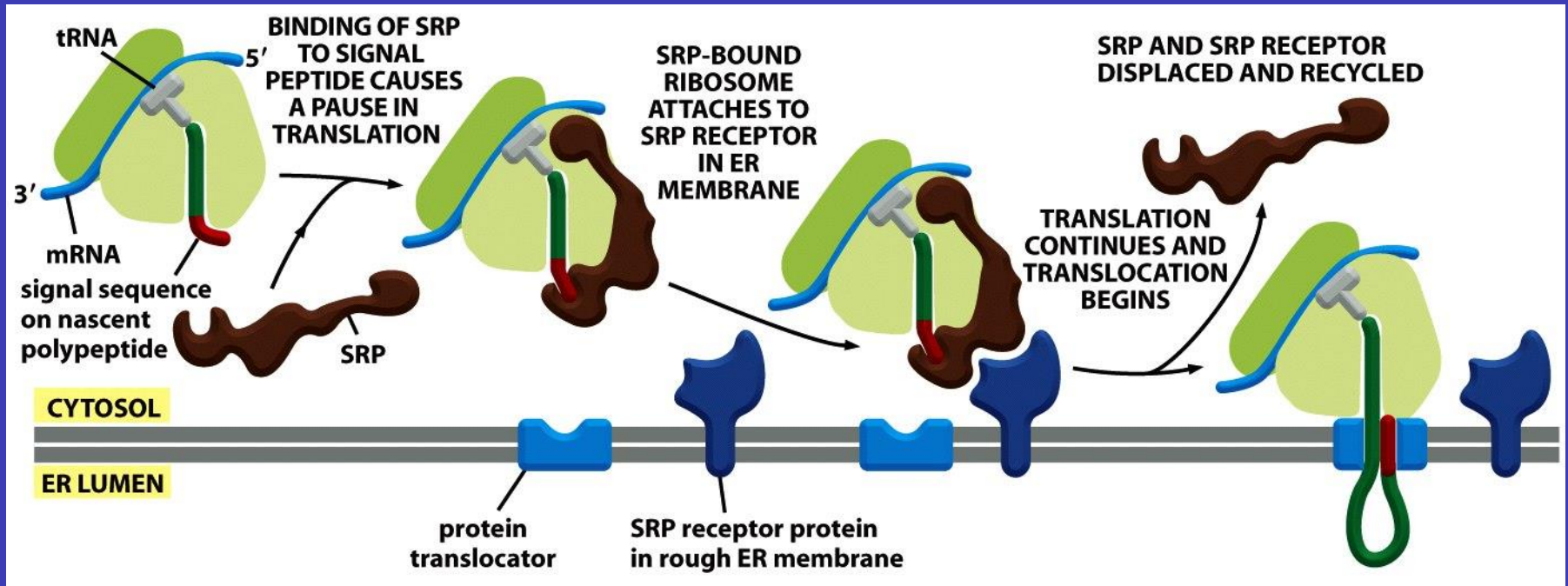
- pro vstup proteinu do ER je zapotřebí nejméně dvou složek:

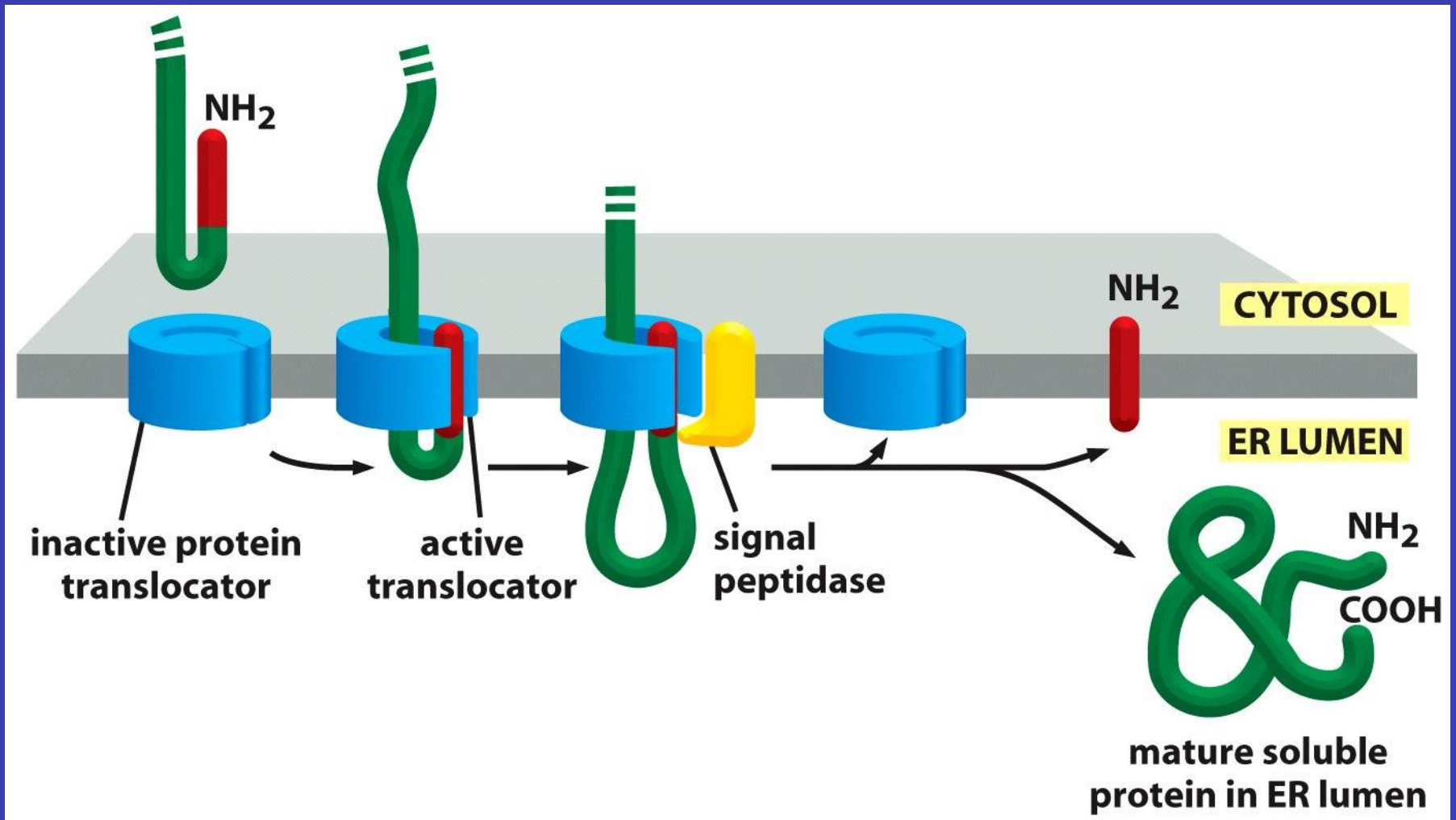
1. tzv. signál rozpoznávající částice („signal recognition particle“ **SRP**) přítomna v cytoplazmě a která **rozpozná signální sekvenci** v molekule proteinu vznikající na ribozomu, naváže se na signální sekvenci a zároveň na ribozom, co vede k zpomalení syntézy proteinu

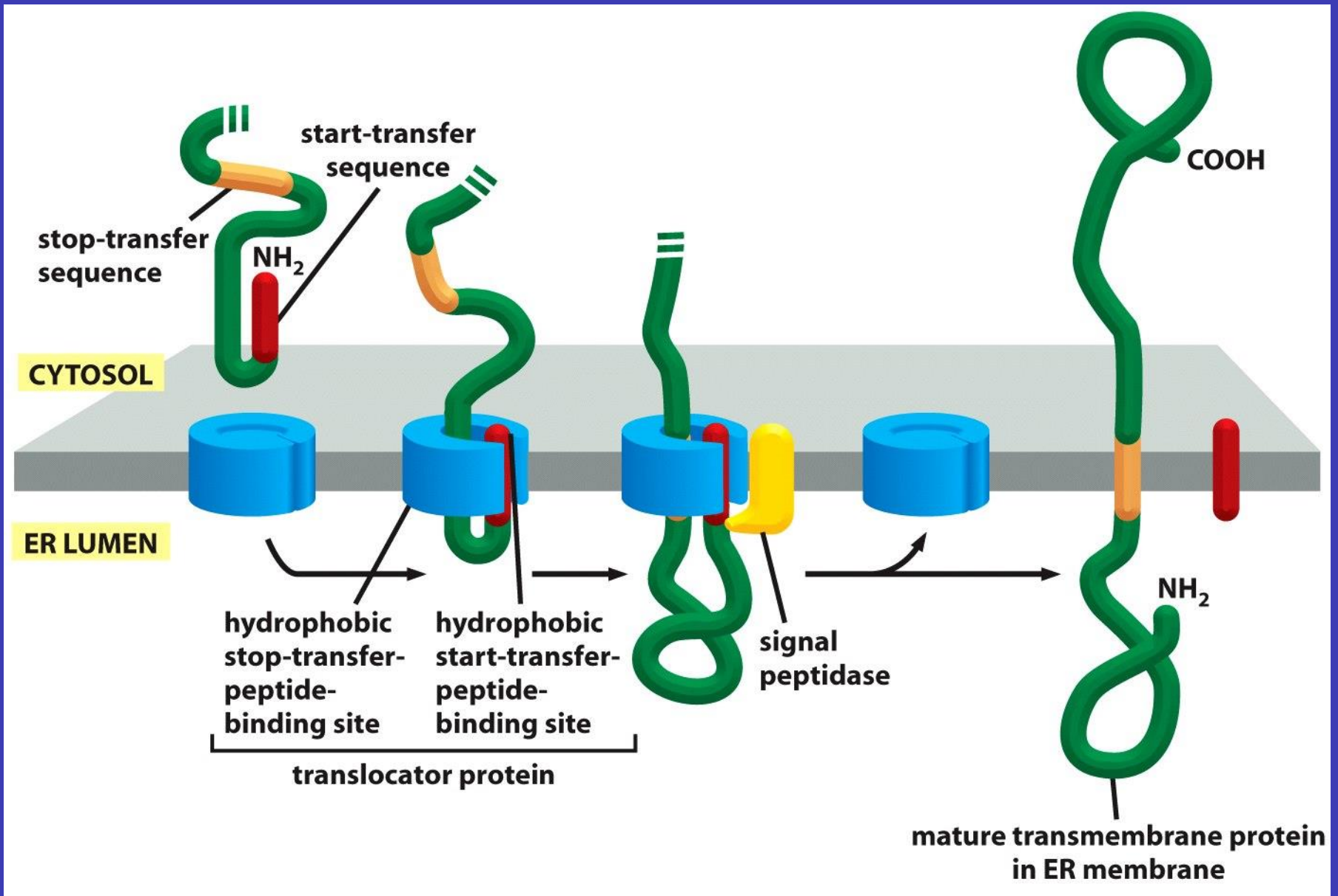
2. SRP-receptor který je zanořen v membráně ER a na který se váže SRP s navázaným ribozomem

- po navázání na svůj receptor se **SRP uvolní** a **začne proteosyntéza** přičemž nově vznikající protein se provléká dovnitř ER **translokačním kanálem**

- pro transmembránové proteiny, které mají zůstat zanořeny v membráně tzv. **iniciační sekvence** začíná vstup proteinu přes membránu a **terminační sekvence** ho ukončí

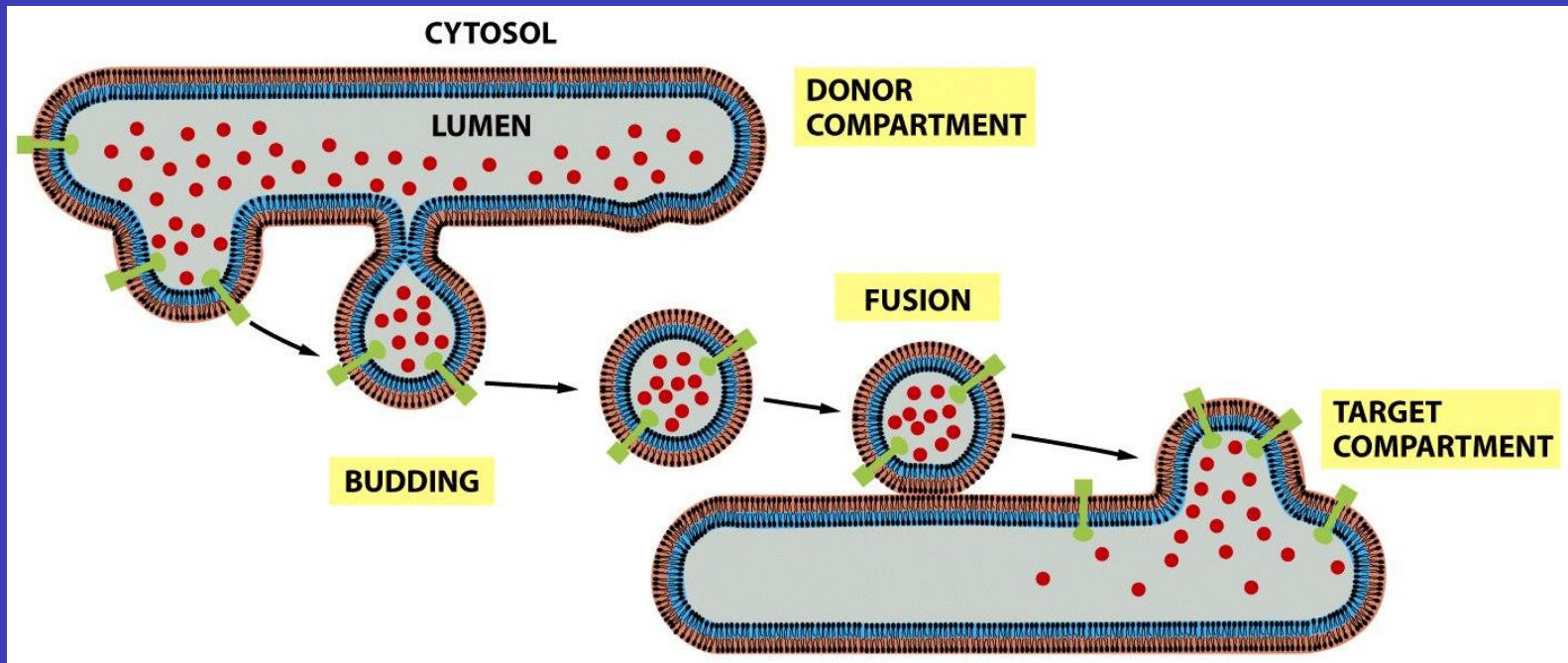


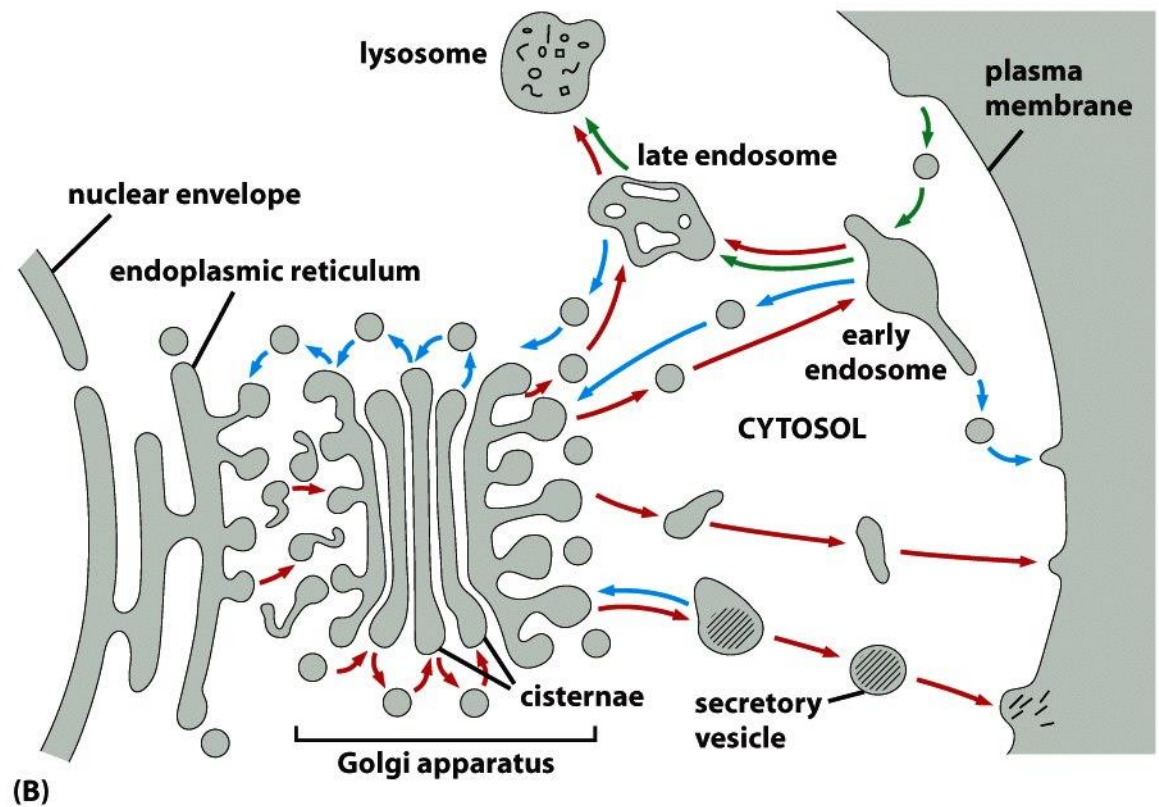
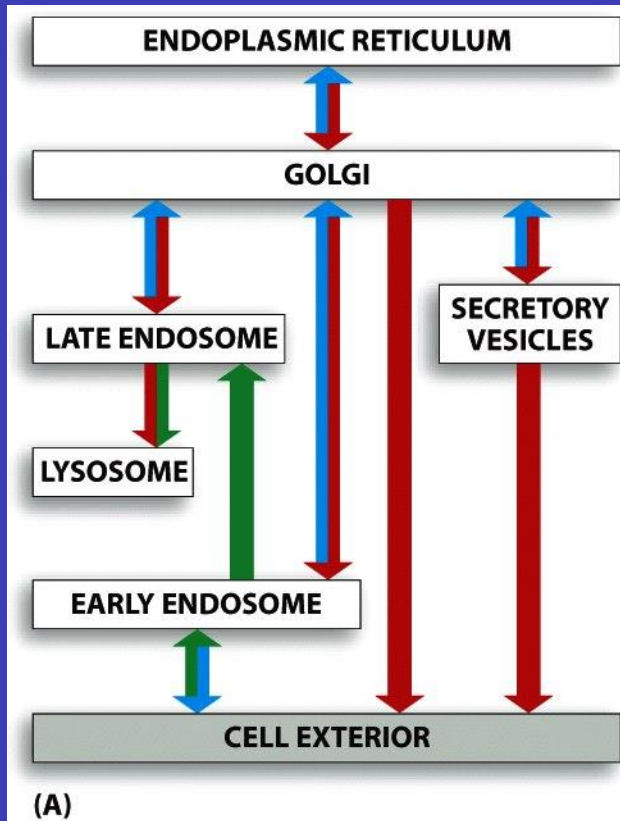




Vezikulární transport

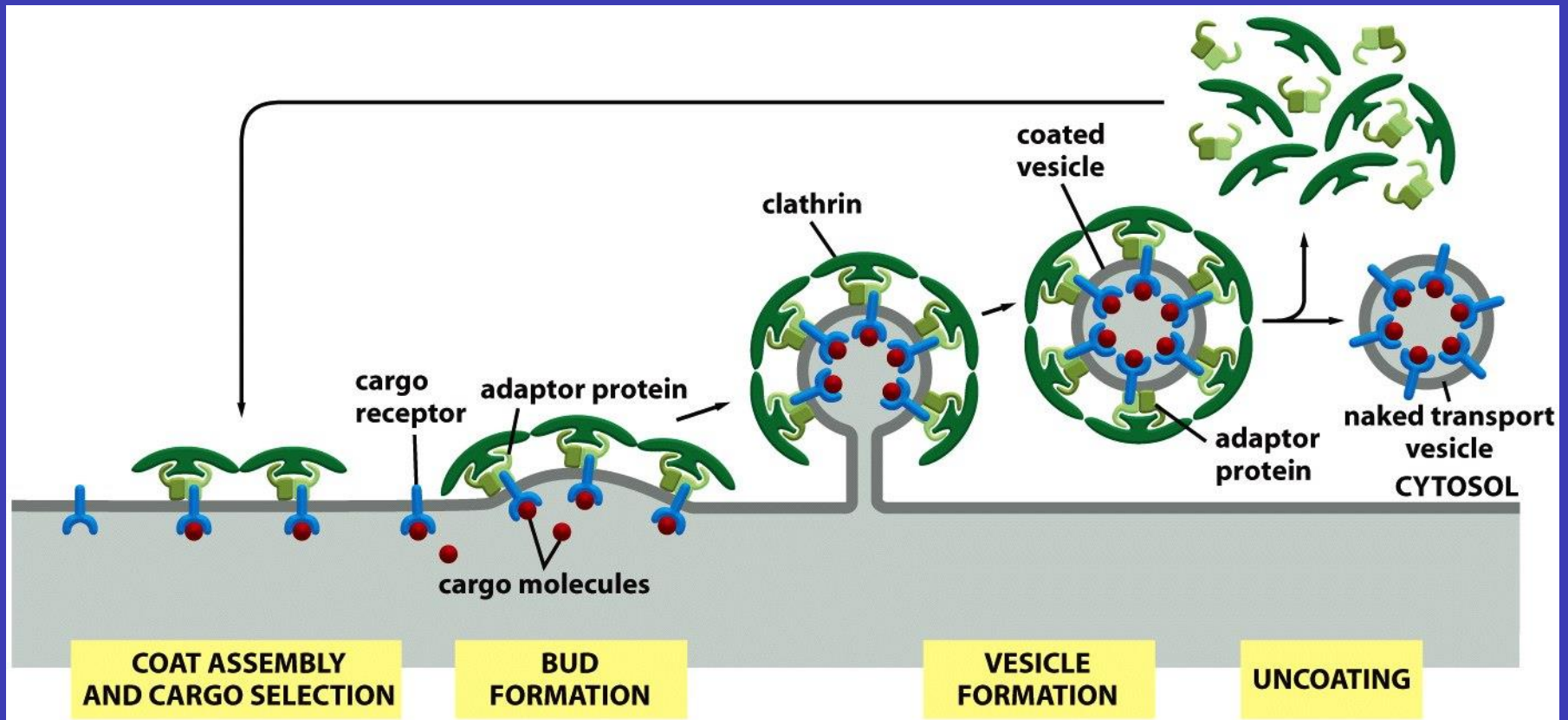
- transportní dráhy zajišťované váčky (vezikulami) se táhnou od ER až k plazmatické membráně a od ní k lyzozomům
- ve vezikulách jsou transportovány proteiny i lipidy, jež nezřídka bývají **během transportu** různě **modifikovány** (např. tvorba disulfidových můstků)

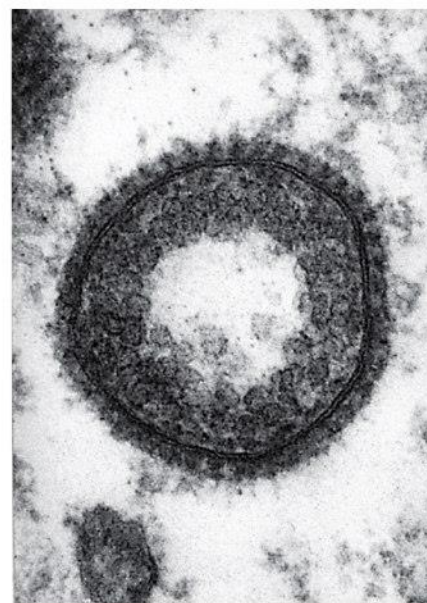
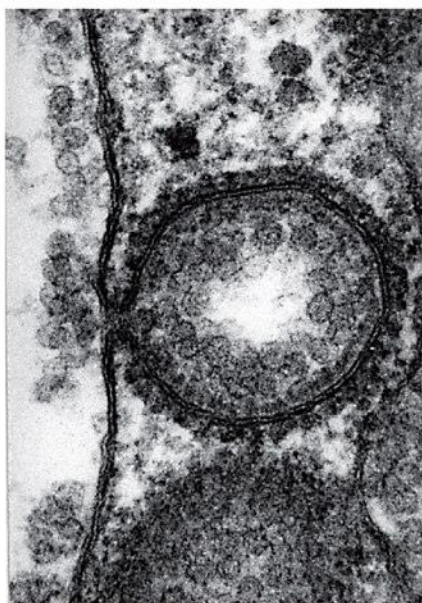
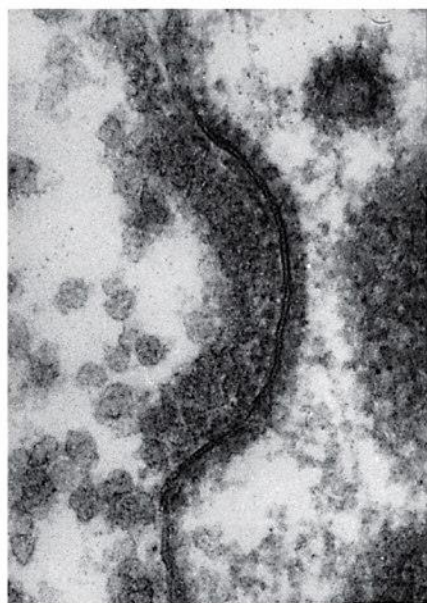




Pučení váčků

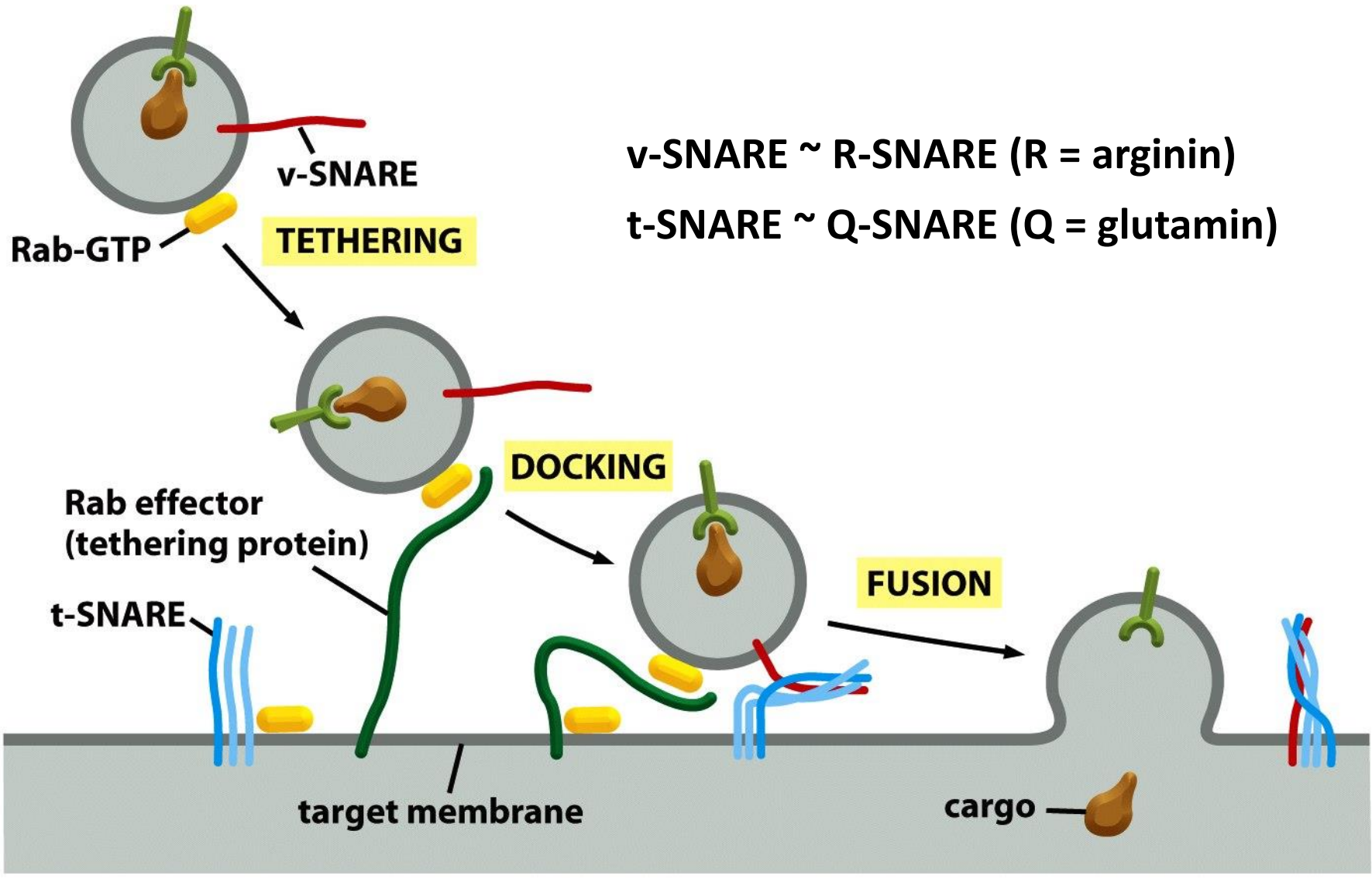
- pučící váčky mívají na své cytosolové (tj. vnější) straně zpravidla **specifický proteinový plášť**, po ukončení pučení váček svůj plášť ztrácí a může se spojit s cílovou membránou
- příkladem proteinu vytvářející takový plášť je **klathrin**
- plášť má dvě funkce: jednak pomáhá **tvarovat membránu do tvaru váčku (klathrin)**, jednak pomáhá **zachytit molekuly pro transport** (za pomoci proteinů **adaptinů**)
- na povrchu vezikul se nachází také tzv. **SNARE-proteiny**, které zajišťují, že váček bude **fúzovat pouze a jen s tou organelou, se kterou má**





0.1 μm

Rozpoznávání a fúze váčků

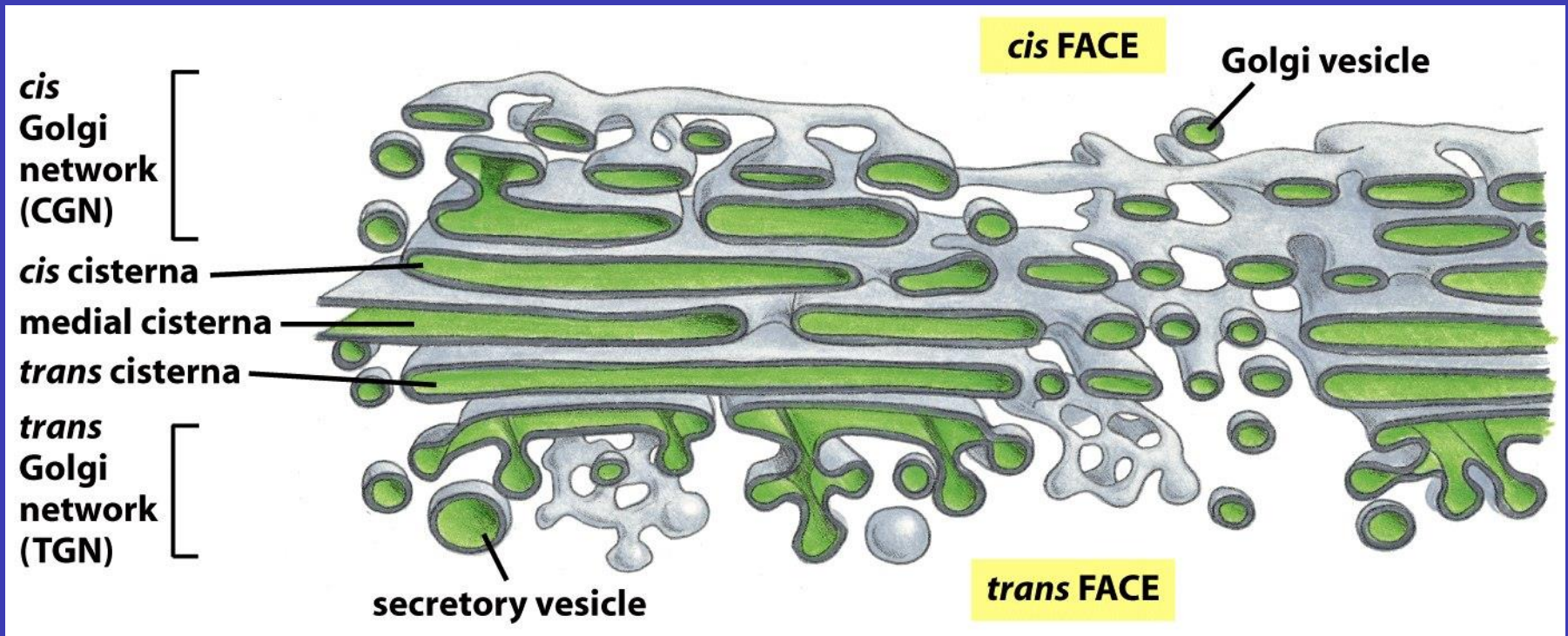


Kontrola a úprava proteinů v ER

- většina proteinů v ER je **kovalentně modifikována** (nejčastěji připojením oligosacharidu, tj. **glykosylací**)
- připojený oligosacharid může hrát mnoho rolí (chránit protein před odbouráním, neumožnit mu opustit ER předtím, než je správně složen, glykokalyx atd.)
- ER slouží jako důležitá kontrola kvality proteinů – **žádný špatně složený protein nemůže opustit ER**, chyby v tomto kontrolním bodě vedou k těžkým onemocněním, jako je např. *cystická fibróza*
- **nesprávně složené proteiny** jsou v ER aktivně zadržovány a **odbourány**

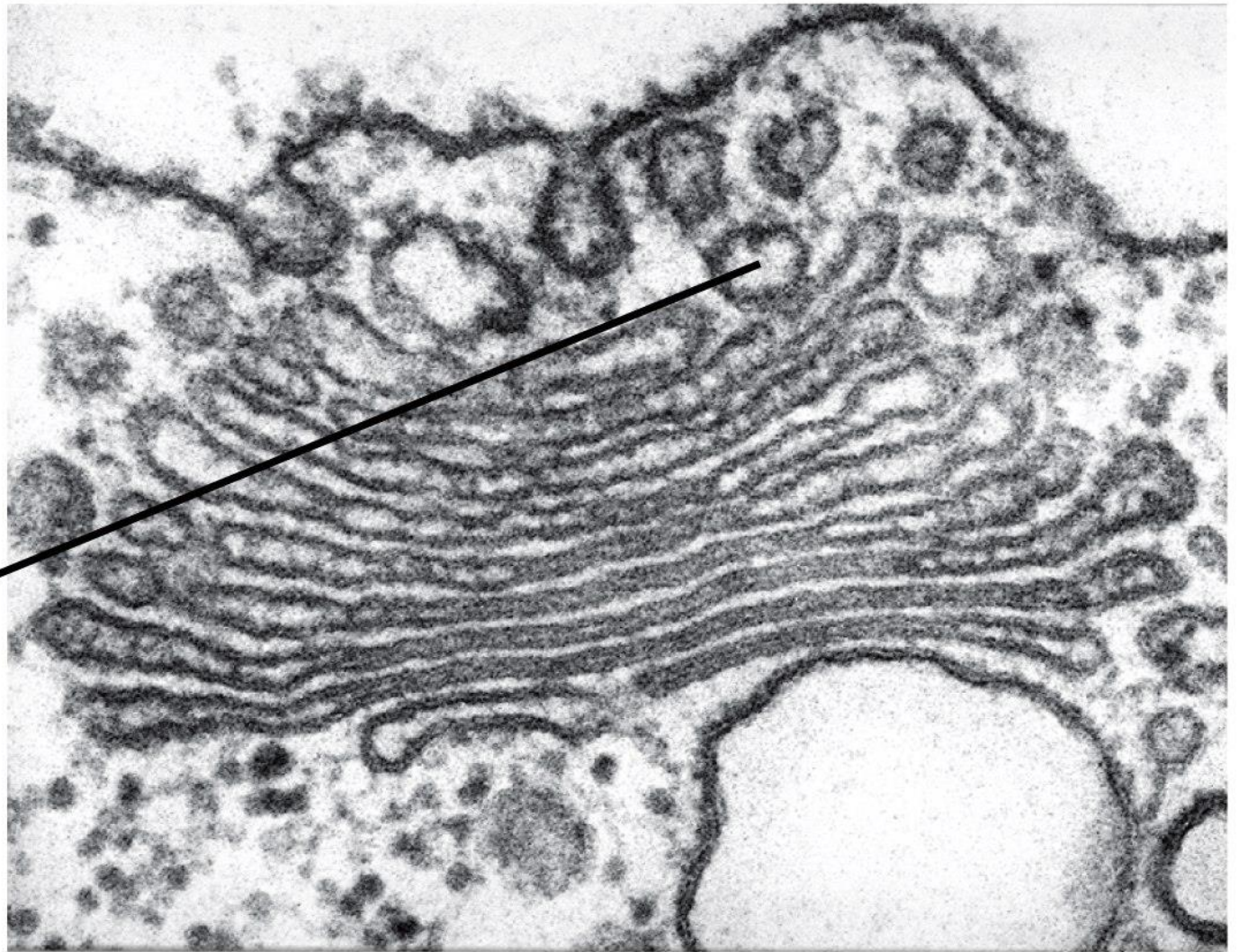
Modifikace a třídění proteinů v GA

- proteiny z ER směřují do Golgiho aparátu, kde do něj vstupují v oblasti cis-pólu
- v GA dochází k dalším významným posttranslačním modifikacím proteinů (glykozylace, sulfatace, speciální proteolýza)
- takto upravené proteiny jsou tříděny a posílány dále na místo jejich určení (např. k plasmatické membráně, aby došlo k jejich sekreci vně buňky pomocí mechanismu zvaného exocytóza)
- proteiny opouštějí GA v jeho výstupní oblasti, která je označována jako trans-pól



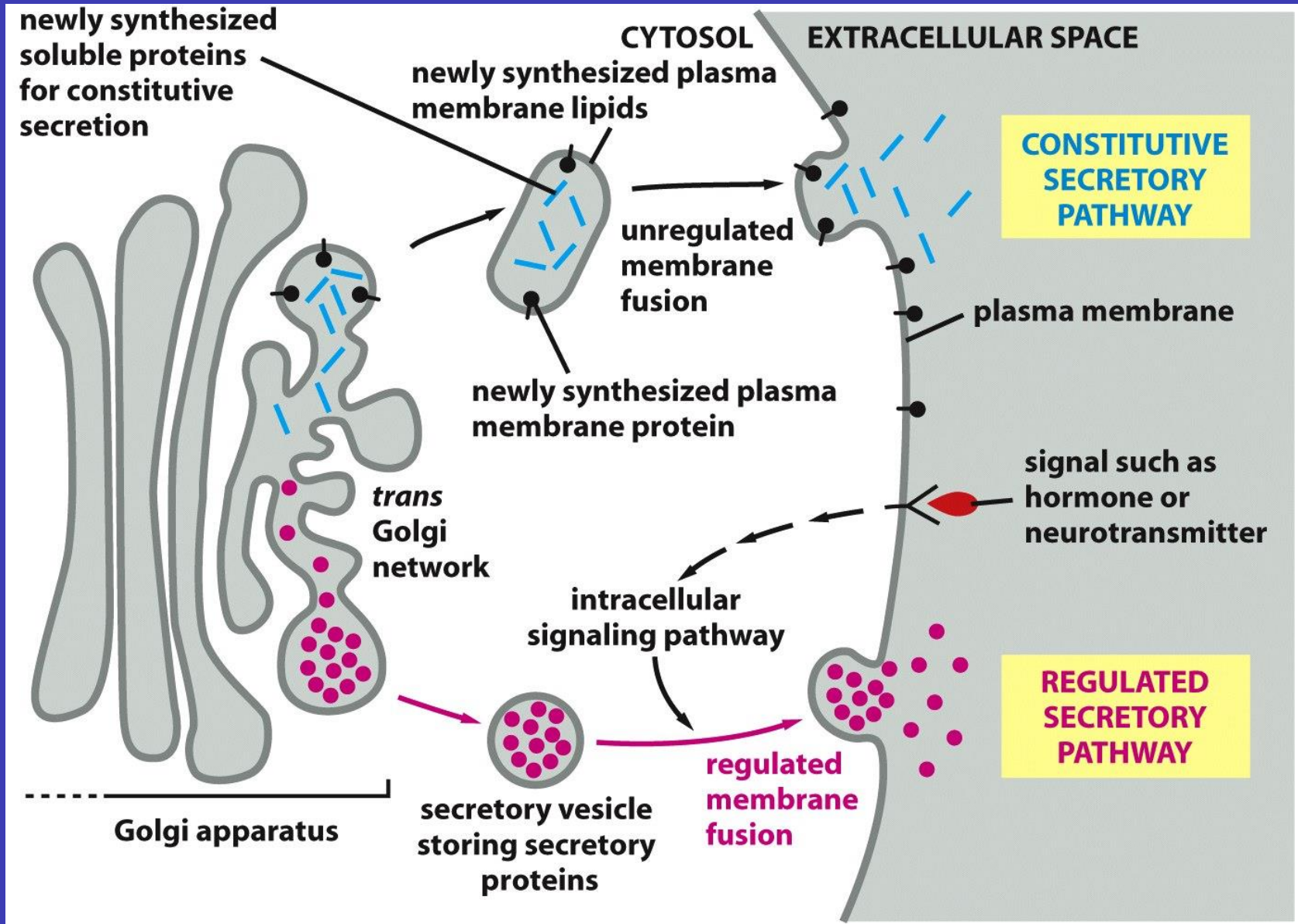
ER → cis Golgi → trans Golgi → konečná destinace

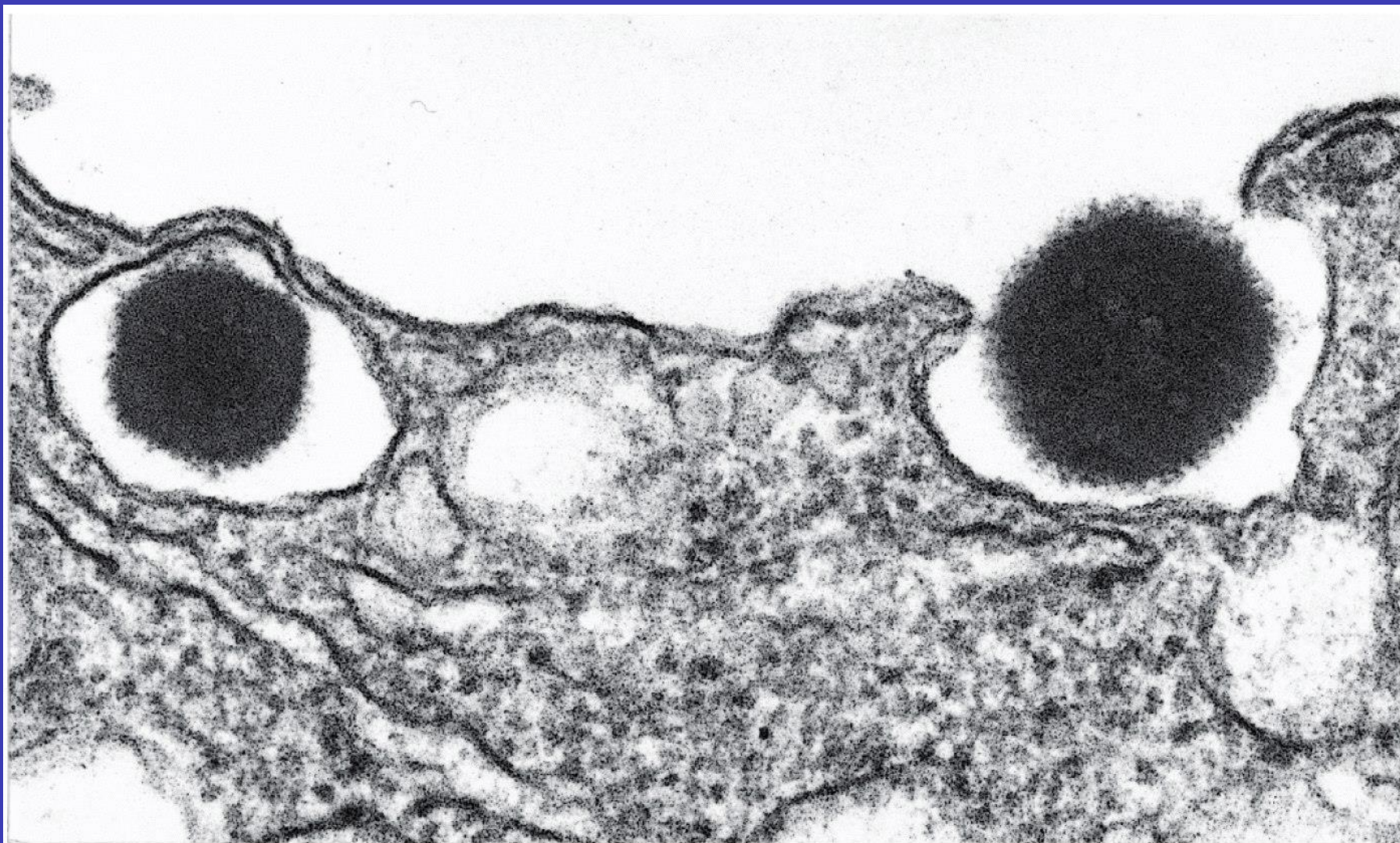
***cis* Golgi
network**



200 nm

Exocytóza



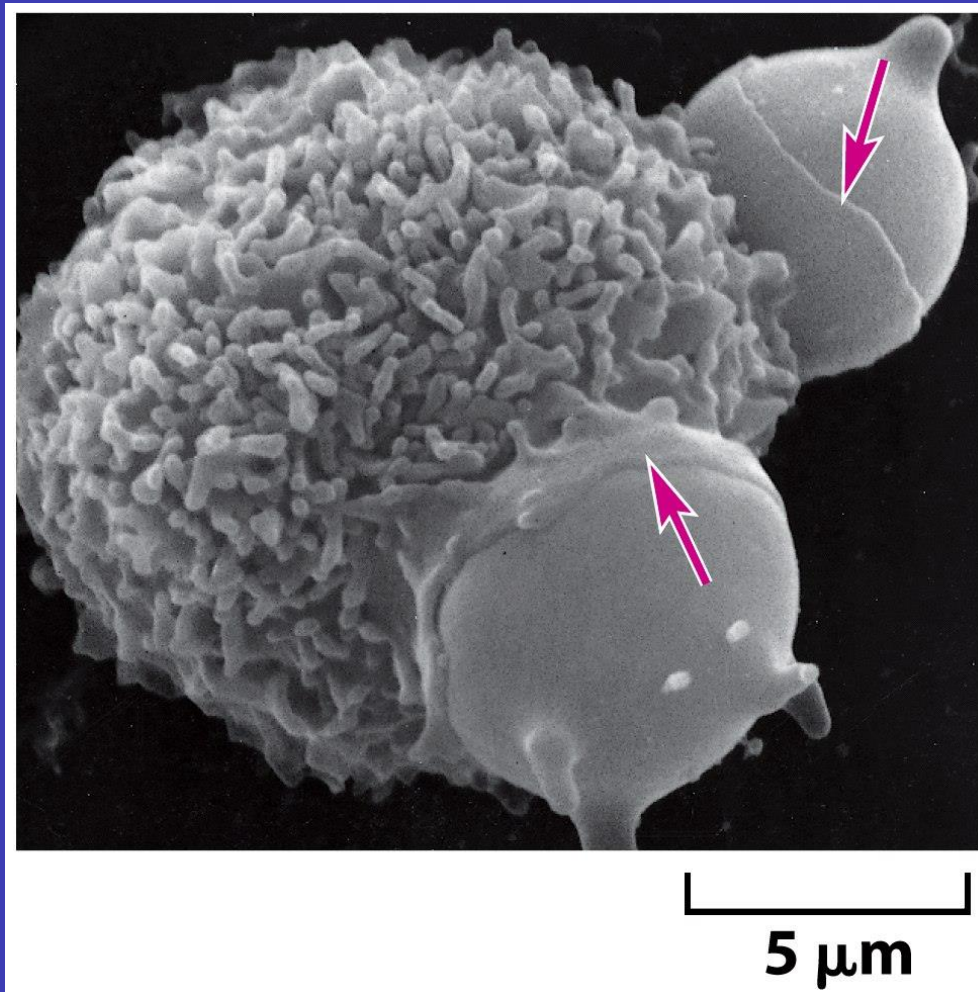


0.2 μm

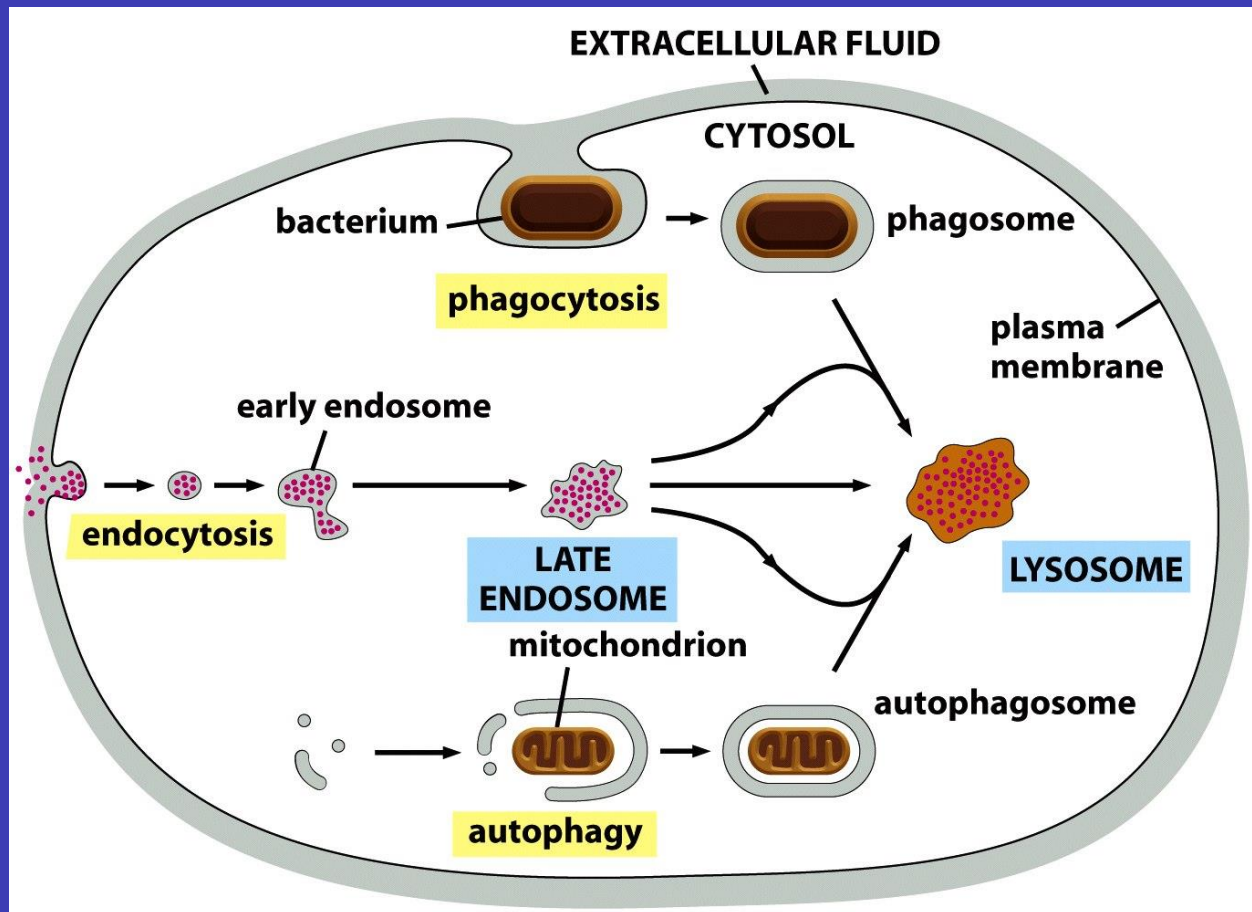
Endocytóza

- dějem opačným k exocytóze je **endocytóza**, kdy buňka ve formě váčků pohlcuje něco ze svého okolí – dělíme ji podle velikosti utvářených váčků a typu přijímaných látek na:
 - **pinocytózu** („buněčné pití“) je pohlcování kapaliny s malými rozpuštěnými molekulami a probíhá hlavně za pomoci **klathrinových** jamek a vezikul
 - **fagocytózu** („buněčné požívání“) je pohlcování velkých částic, např. bakterií, zbytků buněk atd. prostřednictvím **pseudopódií** které bakterii pohltní a na svých koncích fúzí za vzniku tzv. **fagozomů**

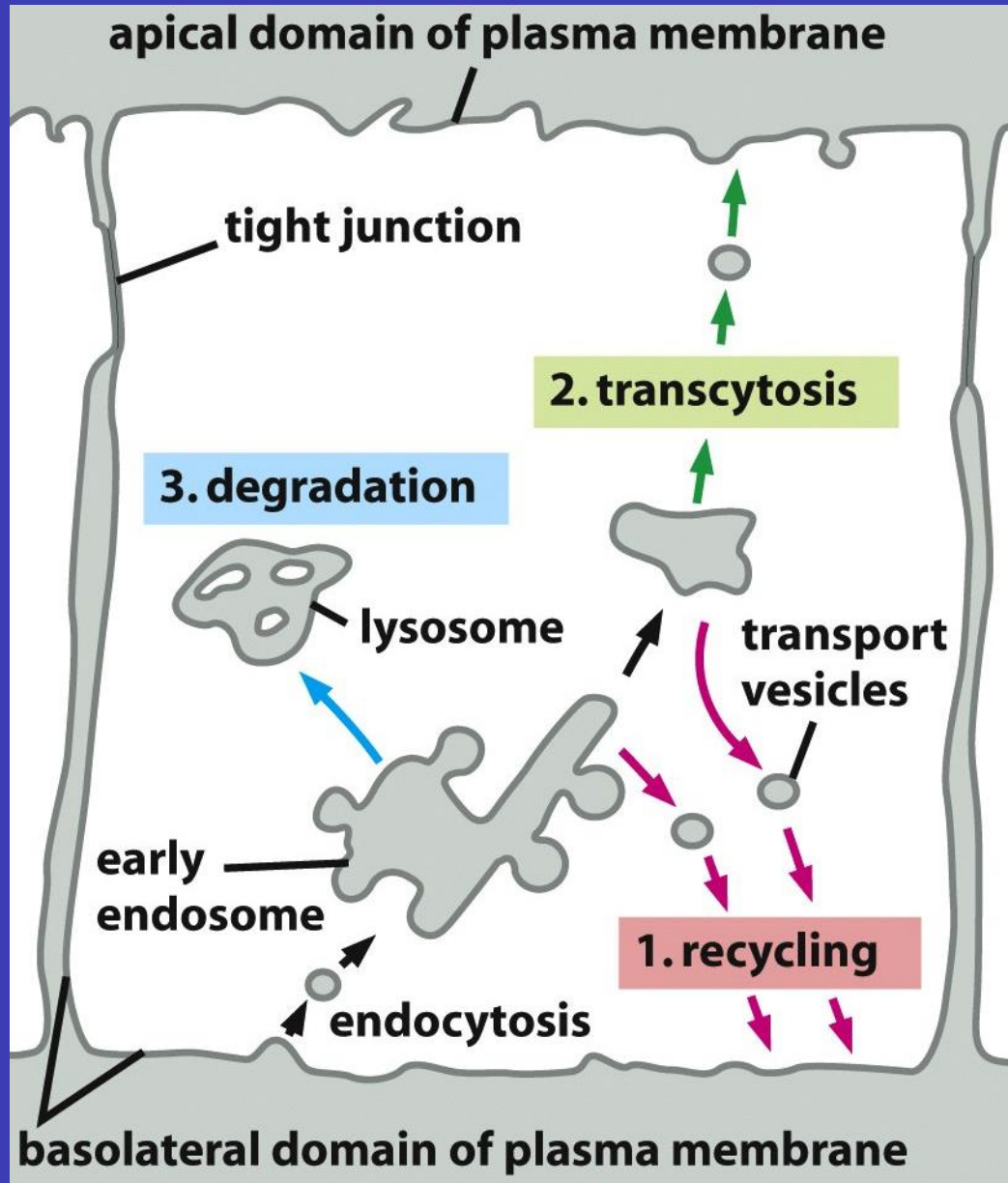
- fagocytické buňky lze najít např. v lidském imunitním systému (*makrofágy*), kde pohlcují mikroorganismy a zbytky jiných buněk



- nežádoucí pohlcené částice jsou pak **hydrolyzovány v lyzozomu**. Kromě fagocytózy může buňka obalit váčkem i svou vlastní organelu a prostřednictvím tzv. **autofagzomu** ji poslat na degradaci do lyzozomu = **autofágie**)



Třídění endocytovaných látek v endozomech



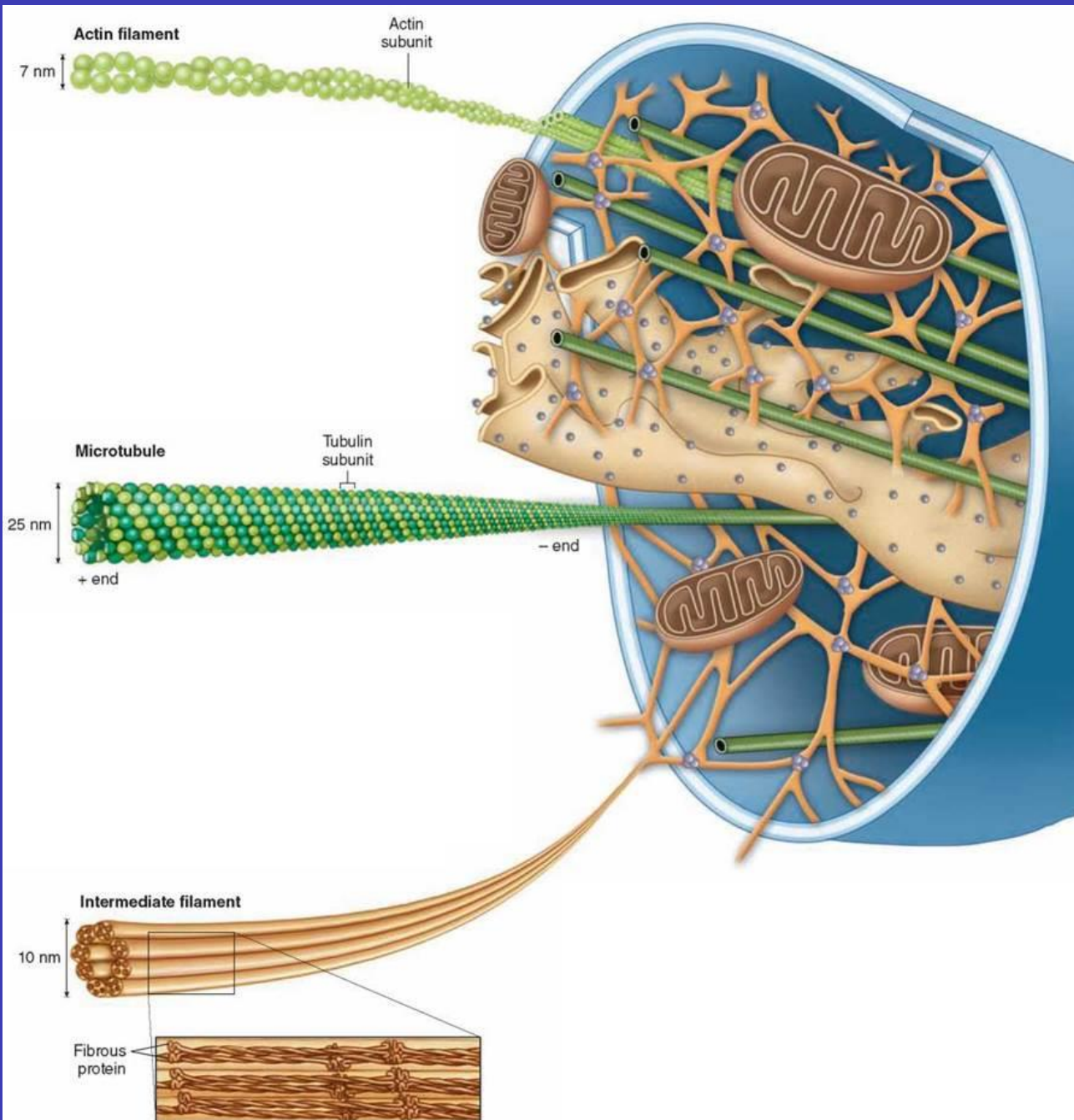
Cytoskelet

- eukaryontní buňky obsahují v cytoplazmě složitou **síť proteinových vláken – cytoskelet**, který jim umožňuje měnit tvar, vykonávat pohyby, zabezpečovat vezikulární transport atd. a můžeme ho považovat za „**oporně-pohybovou**“ soustavou buňky. Cytoskelet se skládá ze tří typů vláken:

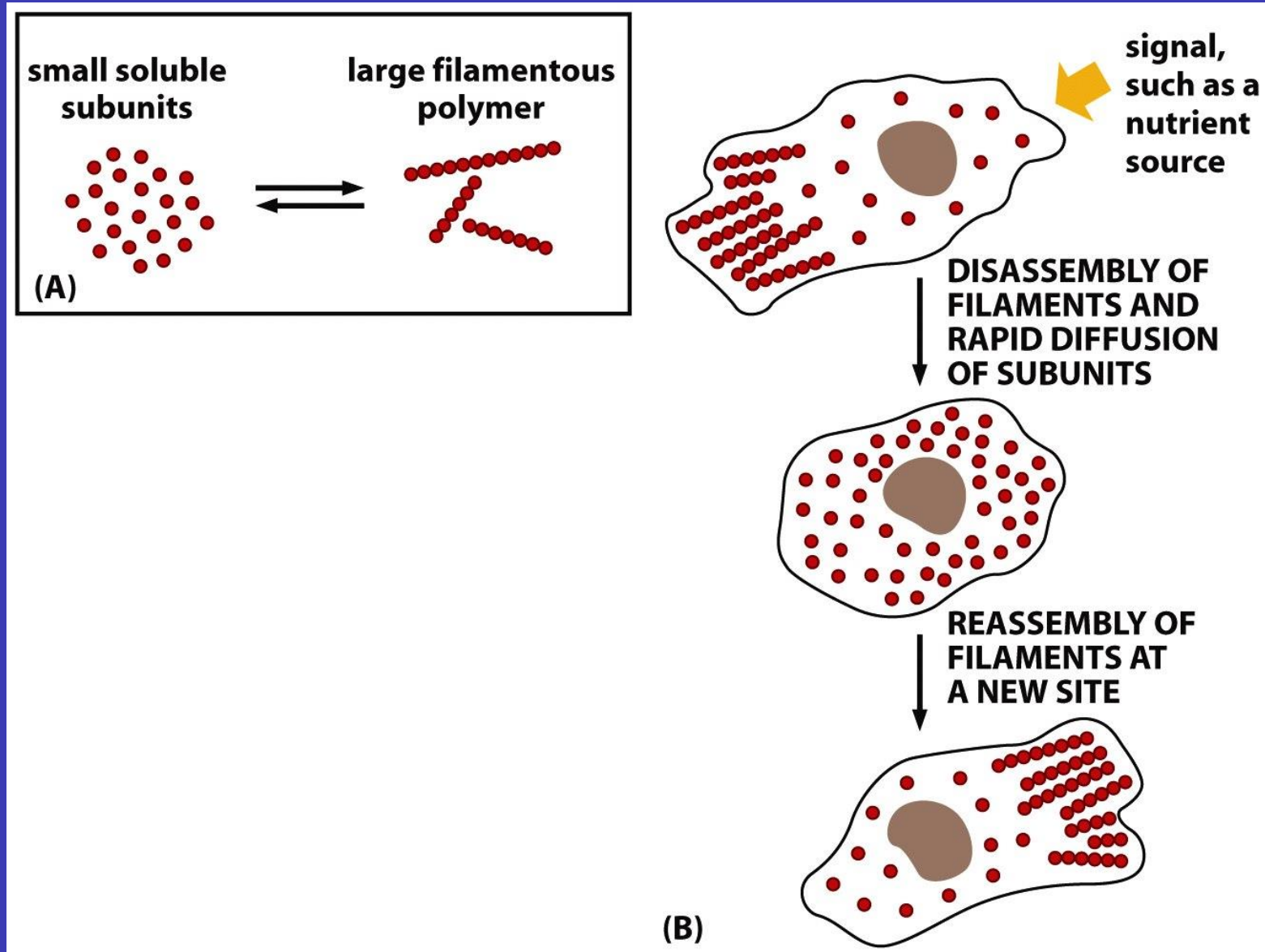
- **střední (intermediární) filamenta** – mají velkou pevnost v tahu a umožňují buňce zvládat mechanický stres, nacházejí se i v jádře (jaderná lamina)

- **mikrotubuly** – jejich síť určuje pozici organel a řídí transport uvnitř buňky, důležitá role při dělení buněk

- **aktinová vlákna** – jsou důležitá pro buněčný pohyb, zejména pohybuje-li se buňka po nějakém povrchu



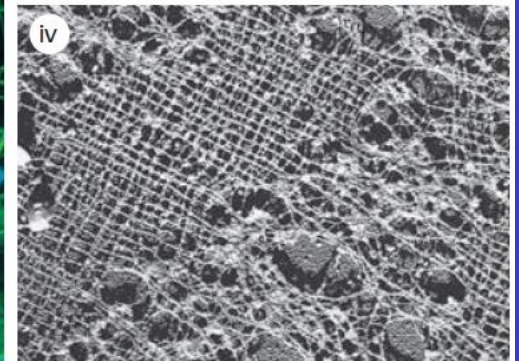
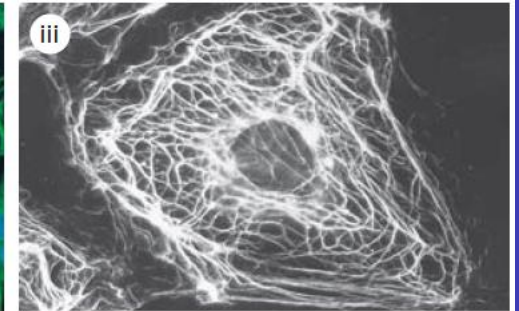
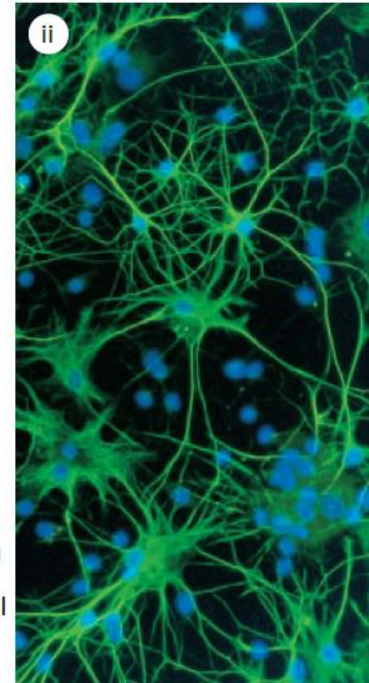
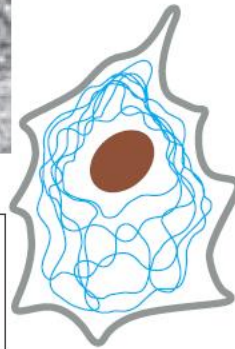
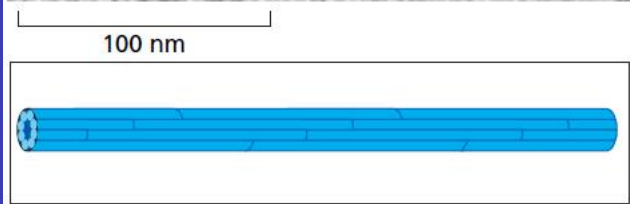
Cytoskelet je vysoce dynamická struktura



Střední filamenta

- mají velkou **pevnost v tahu** a jejich hlavní funkcí je umožnit buňkám odolat mechanickému stresu
- jsou tvořena dlouhými stočnými vlákny, které se skládají z fibrilárních proteinů (**keratiny, laminy, vimentin, desmin**)
- nacházejí se u většiny buněk kde tvoří **cytoplazmatickou síť**, která **odklopuje jádro** a dosahuje **až k periferii** buněk
- na periferii buněk je často **ukotvena do plazmatické** membrány v místech mezibuněčných spojů – **desmozomů**
- střední filamenta se nacházejí také v **buněčném jádře**, kde pod jadernou membránou vytváří síťovitou strukturu – **jadernou laminu**, která zesiluje jadernou membránu všech eukaryontních buněk

INTERMEDIATE FILAMENTS

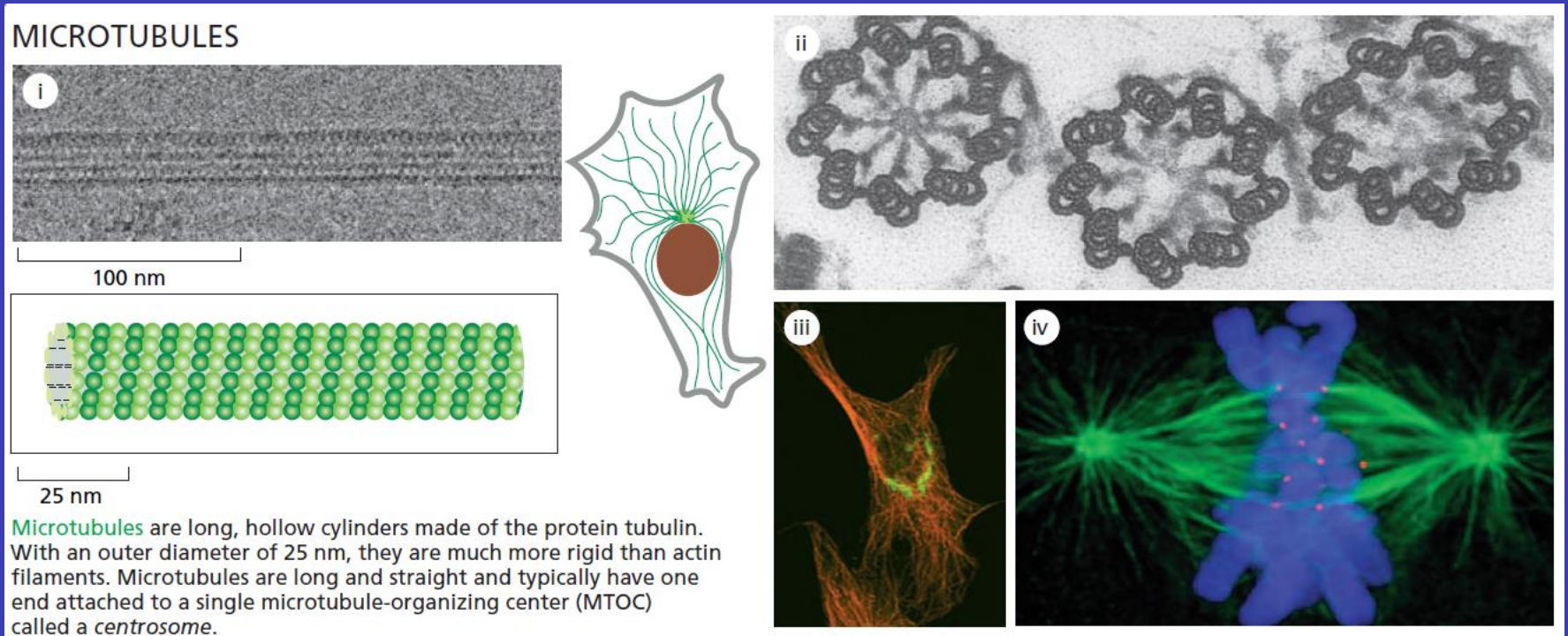


Intermediate filaments are ropelike fibers with a diameter of around 10 nm; they are made of intermediate filament proteins, which constitute a large and heterogeneous family. One type of intermediate filament forms a meshwork called the nuclear lamina just beneath the inner nuclear membrane. Other types extend across the cytoplasm, giving cells mechanical strength. In an epithelial tissue, they span the cytoplasm from one cell-cell junction to another, thereby strengthening the entire epithelium.

Mikrotubuly

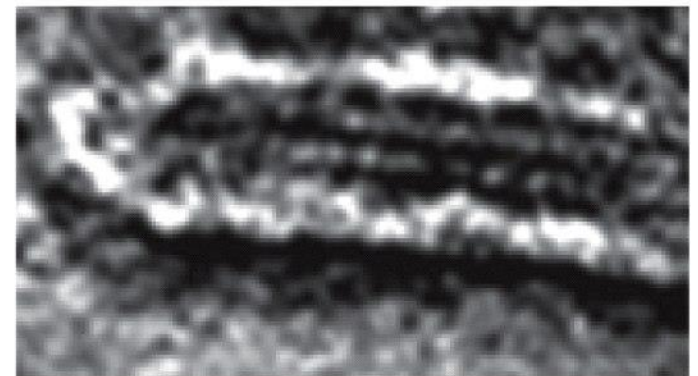
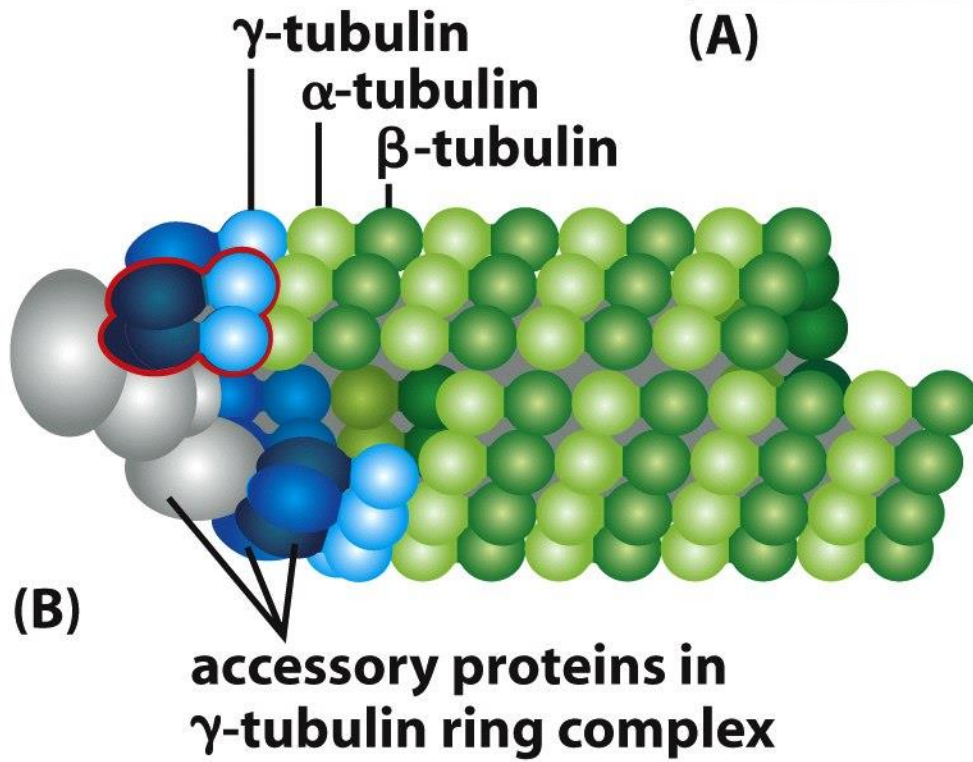
- v typické živočišné buňce mikrotubuly vyrůstají z malé struktury ve středu buňky, tzv. **centrozomu** – odtud sahají k periferii buňky, čili vytvářejí **systém drah**, podél nichž se **transportují vezikuly, organely** atd.
- mikrotubuly tvoří duté vlákna skládající se z **tubulinových podjednotek** (heterodimery **α -tubulinu** a **β -tubulinu**). Tubulinové podjednotky se navzájem spojují tak, že se postupně střídají α -tubulin a β -tubulin
- mikrotubuly se vytvářejí z tzv. **nukleárního místa** – prstencovité útvary v centrozomu obsahující **γ -tubulin**

- mikrotubuly jsou neustále rozkládány na podjednotky a zase skládány zpátky (**depolymerizace** a **polymerizace**), což jim umožňuje **měnit prostorovou orientaci**
- mikrotubul nejprve **roste z centrozomu** k plazmatické membráně, a pak začne „couvat“ (tj. je zpět odbouráván na tubuliny) buď úplně až k centrozomu nebo jen částečně





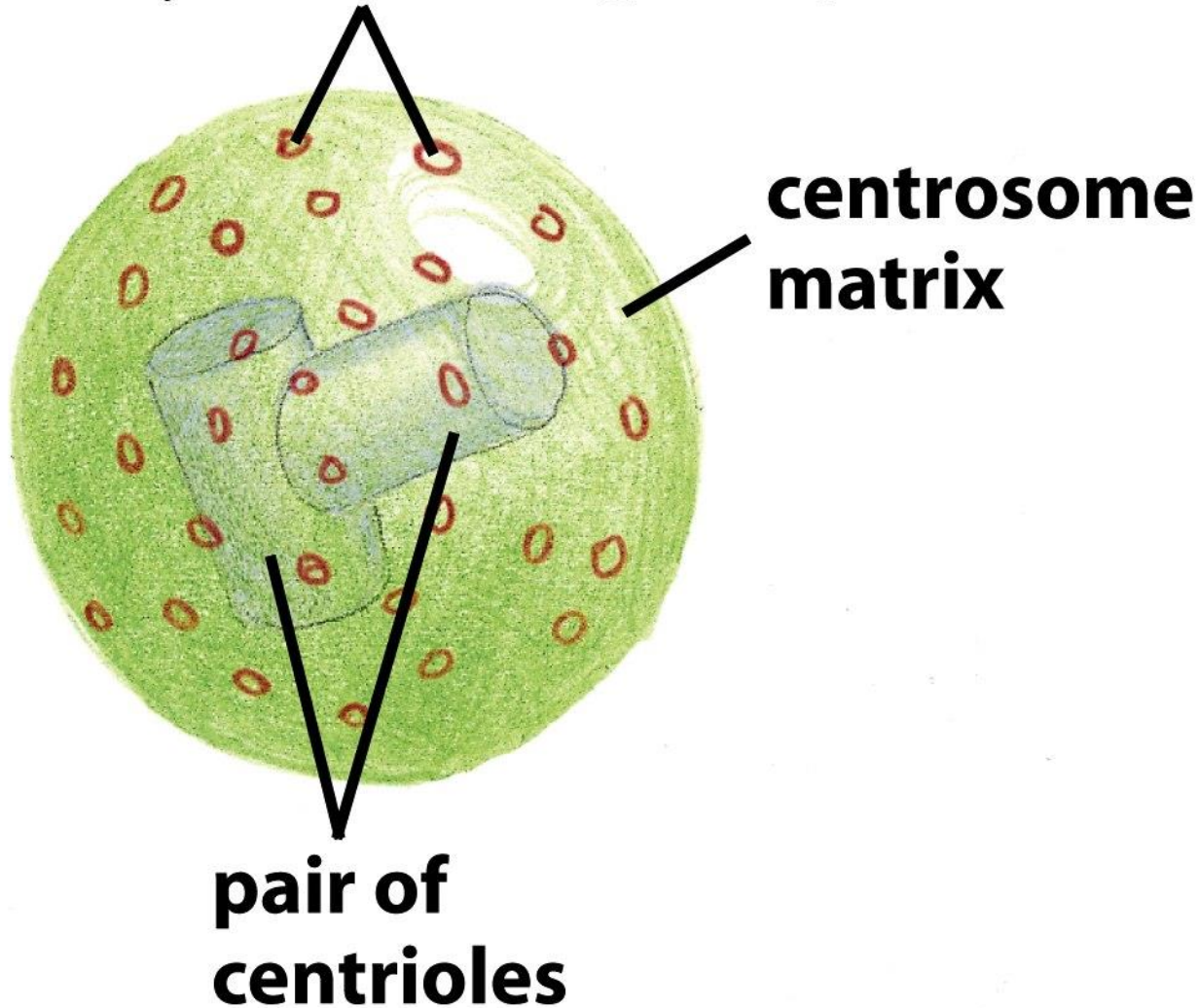
(A)

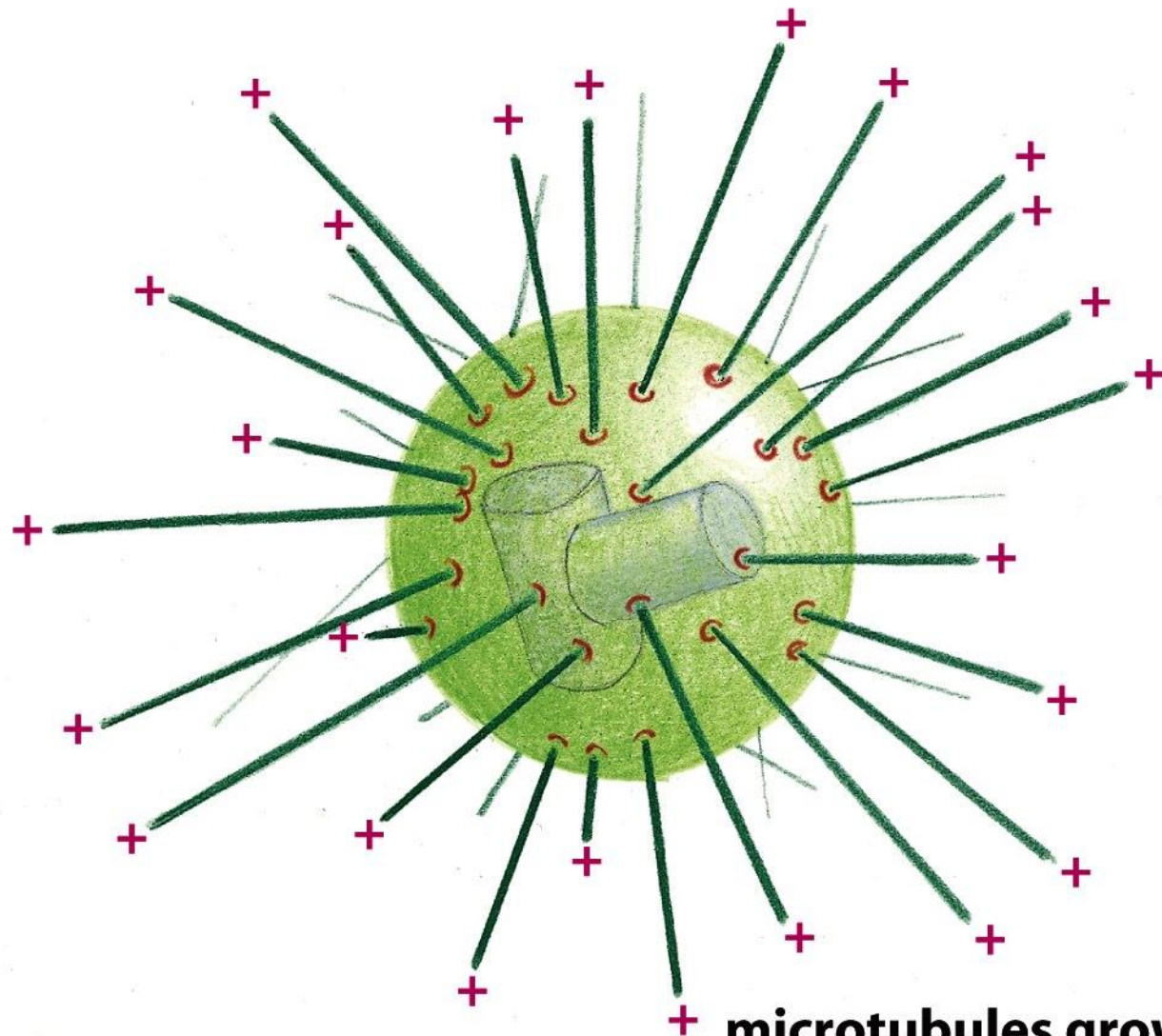


(C)

100 nm

**nucleating sites
(γ -tubulin ring complexes)**

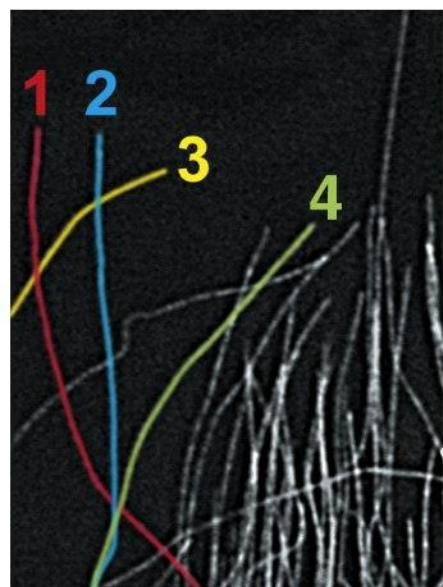




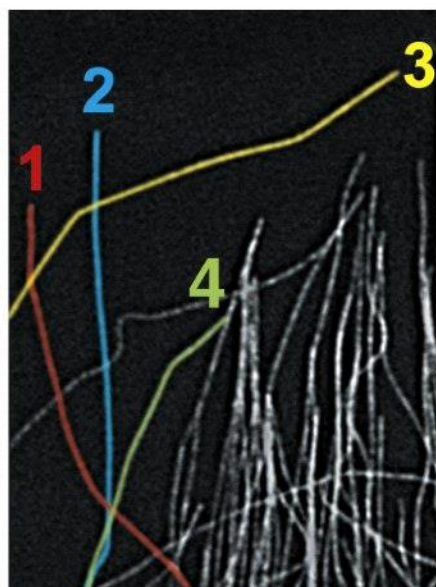
**microtubules growing from
 γ -tubulin ring complexes
of the centrosome**

Mikrotubuly mohou být stabilizovány

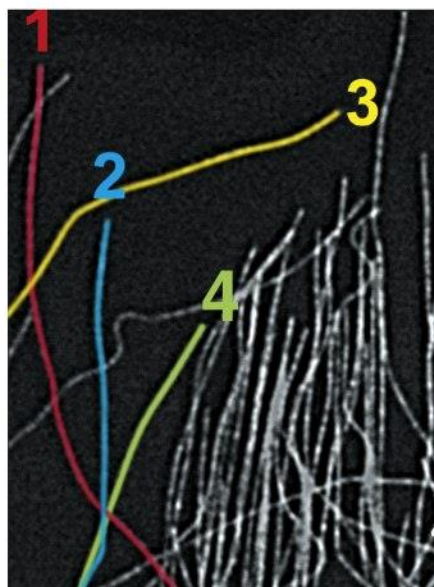
- jestliže neustále rostoucí a couvající mikrotubuly narazí tam, kde dorostou, na nějakou situaci, která vyžaduje jejich přítomnost, dojde k jejich **stabilizaci pomocí tzv. čepičky**
- takové mikrotubuly jsou pak využívány po žádoucí dobu a potom je z nich čepička opět odňata
- z centrozomu rostoucí mikrotubuly tedy **náhodně rostou do různých směrů** a jaksí naslepo zkoušejí najít místo, kde je jich zapotřebí (buňka nemůže „vědět“, kde právě potřebuje jejich přítomnost, proto se v evoluci prosadilo toto „slepé“ řešení)



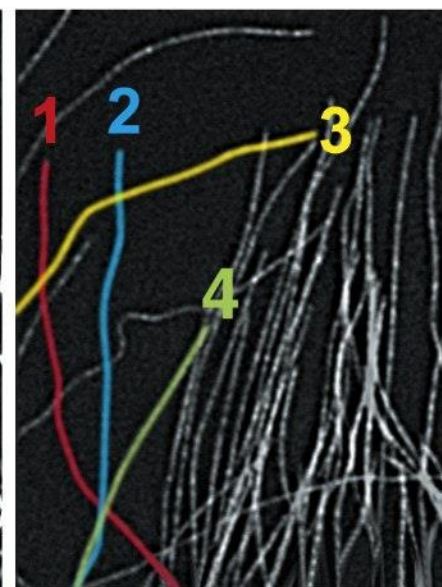
time 0 sec



125 sec

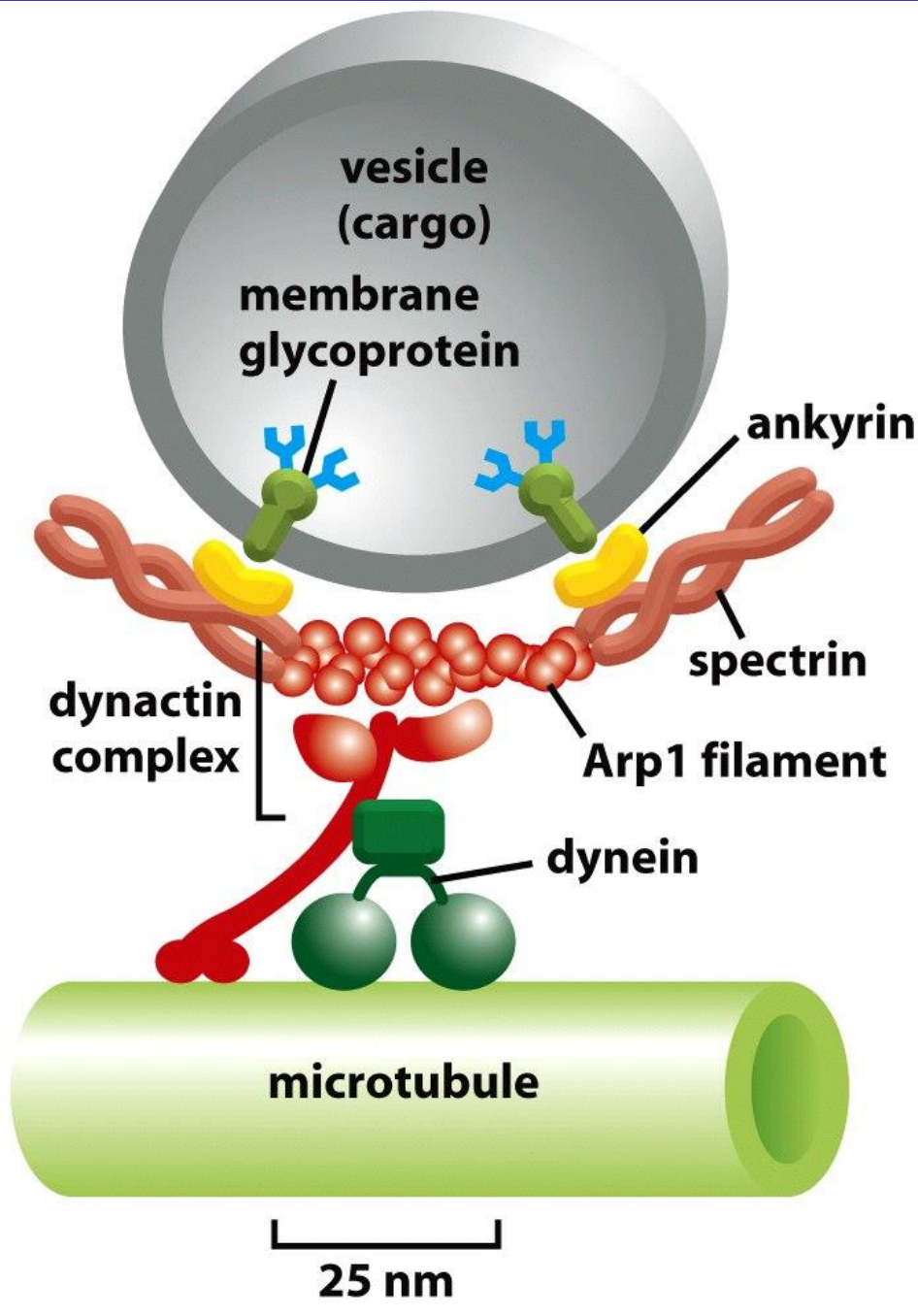


307 sec



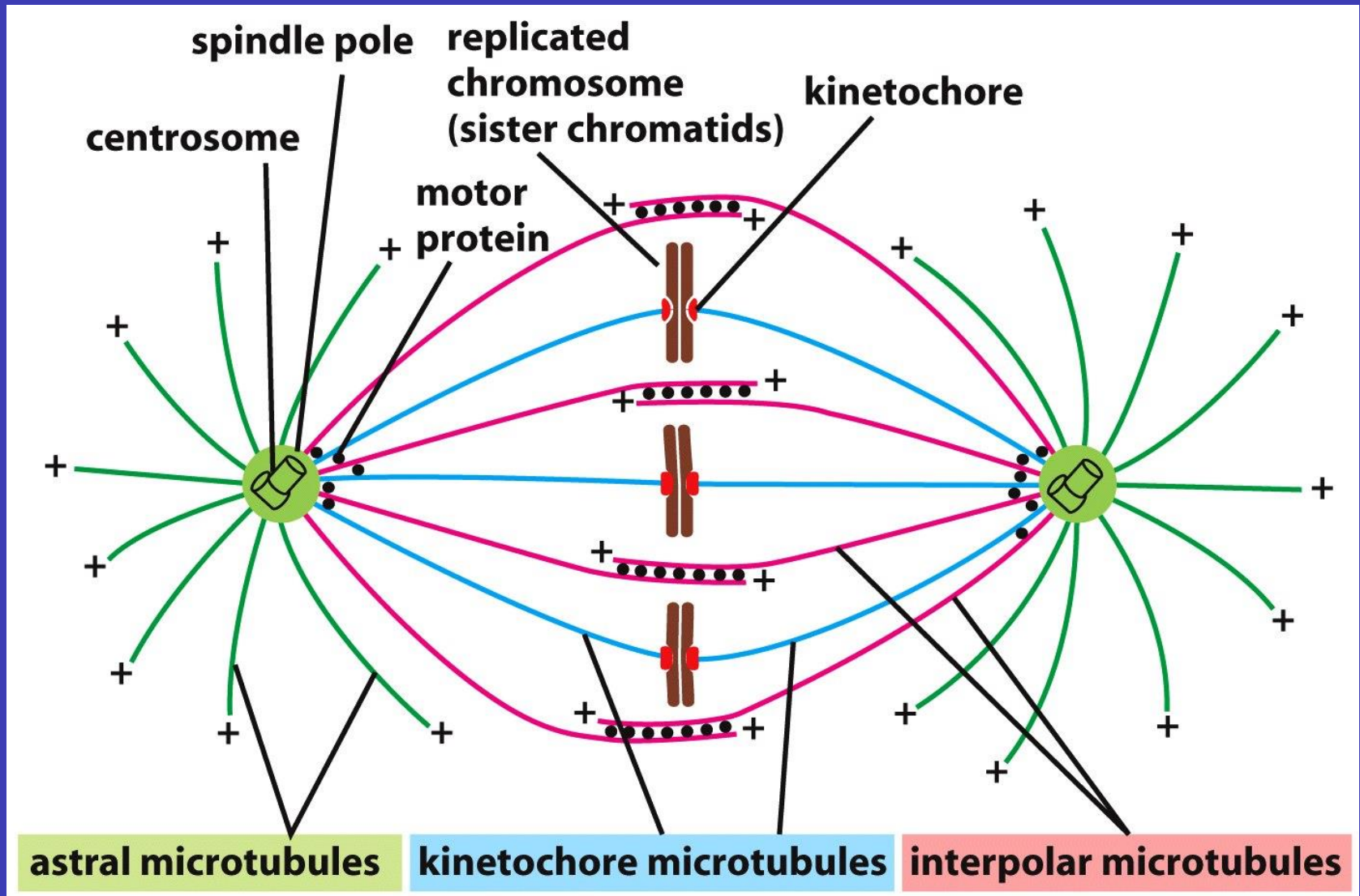
669 sec

10 μm



dopravu „nákladu“ (např. organel, vezikul) podél mikrotubulů zajišťují tzv. **molekulové motory**

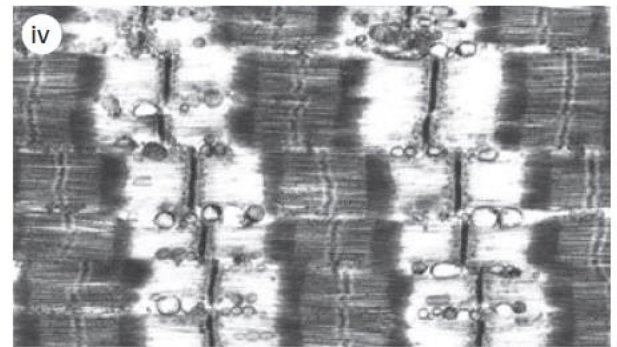
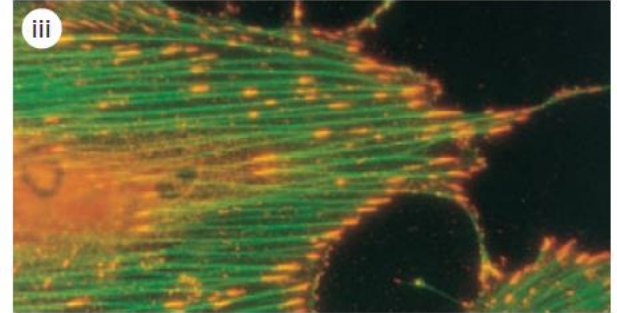
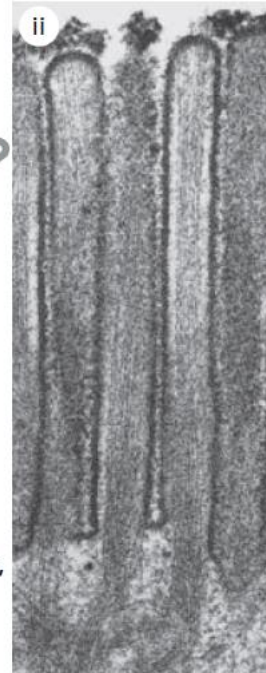
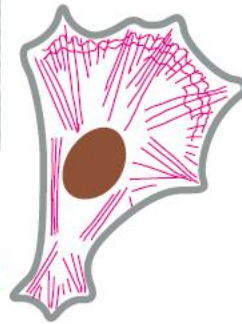
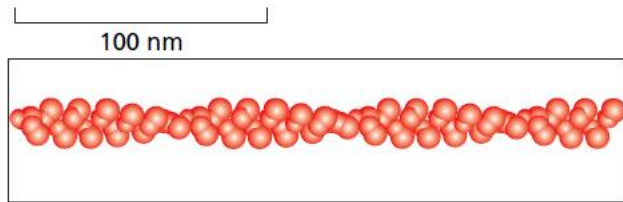
Úloha mikrotubulů v buněčném dělení



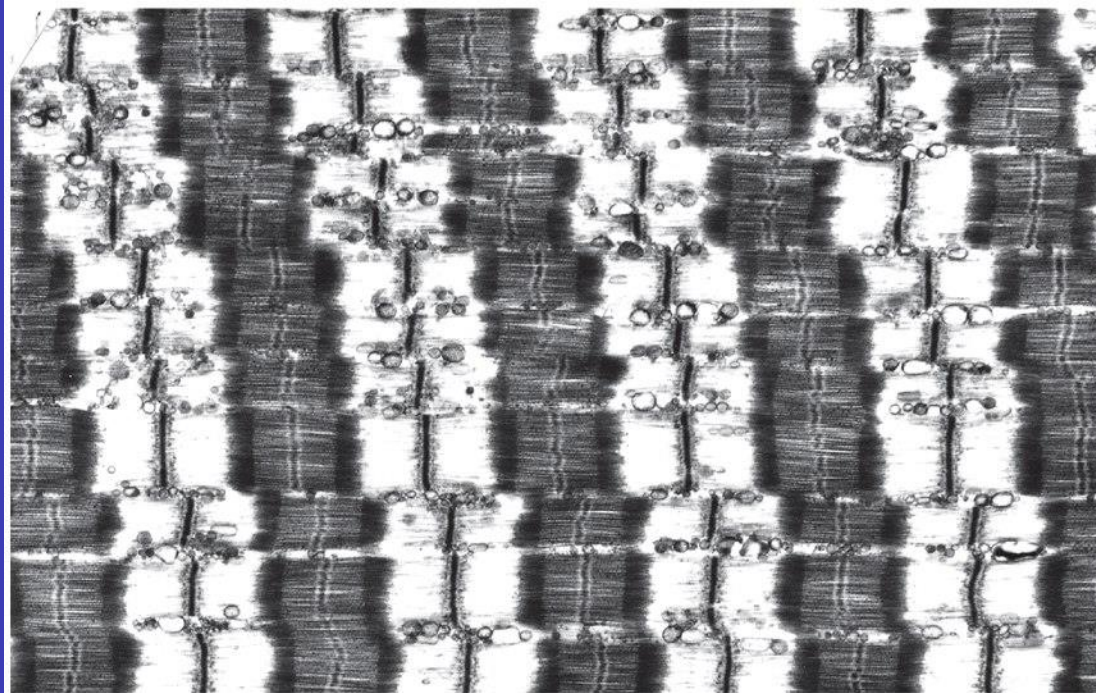
Aktinová vlákna

- aktinová vlákna jsou tenká a pružná, vznikají **polymerizací** základní jednotky **aktinu** a jsou důležitá pro **buněčný pohyb**, zejména když je uskutečňován prostřednictvím buněčného povrchu
- podobně jako mikrotubuly, většina aktinových vláken je **nestabilní**
- aktinová vlákna se spojují s velkým počtem **aktin-vázajících proteinů**, co vede k možnosti vykonávat **různé buněčné funkce** a také k **stabilizaci aktinových vláken**
- ve většině buněk je aktin uložen těsně **pod plasmatickou membránou** v buněčném kortexu
- spojení aktinu s **myosinem** tvoří podstatu svalové práce

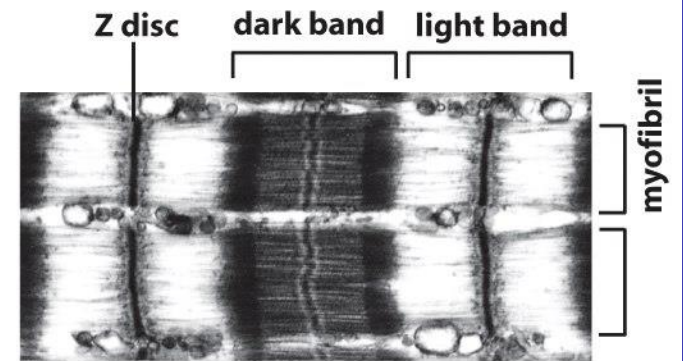
ACTIN FILAMENTS



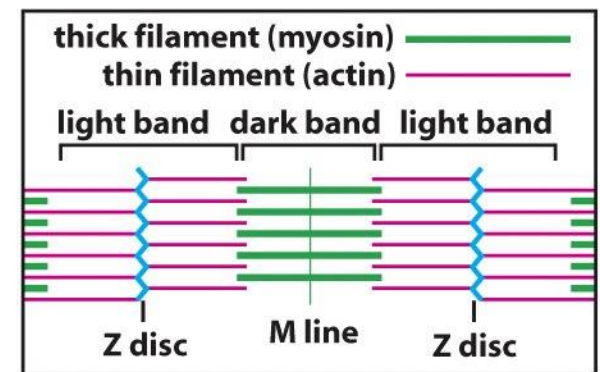
Actin filaments (also known as *microfilaments*) are two-stranded helical polymers of the protein actin. They appear as flexible structures, with a diameter of 5–9 nm, and they are organized into a variety of linear bundles, two-dimensional networks, and three-dimensional gels. Although actin filaments are dispersed throughout the cell, they are most highly concentrated in the *cortex*, just beneath the plasma membrane.



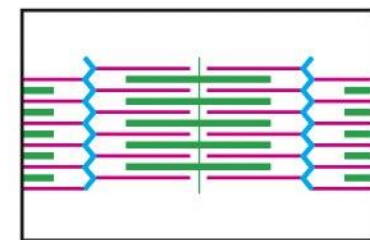
(A) 2 μ m



(B) one sarcomere



(C)



(D)