

Úvod do biologie buňky - 1. ročník (nejaderné organely)

Úvod

Tento text představuje poznámky a komentáře k přednáškám a seminářům, které se týkají "cytoplasmatických" témat prezentovaných v rámci kurzu Úvod do biologie buňky (1. ročník magisterského studia v oboru Všeobecné lékařství, Universita Karlova v Praze - 1. lékařská fakulta). Je zároveň jakýmsi znalostním minimem těchto témat, což ale v žádném případě neznamená, že je informačně vyčerpávající. Do textu jsme se snažili včlenit následující integrující myšlenku: "Buněčné proteiny musí být správně syntetizovány a sbaleny, aby byly nejen cíleny do správného buněčného kompartmentu, ale aby také správně fungovaly." Organizace a funkce cytoplasmatických organel je demonstrována na komplexitě jejich strukturálního uspořádání a principech jejich dynamické biogenese. Za zásadní považujeme i integraci biochemického a strukturálního pohledu na buňku, které jsou základem komplexního pohledu biologického.

Jsme pevně přesvědčení, že pochopení základních konceptů patologie lidských onemocnění, stejně jako porozumění biologicky kauzální terapii, je z velké míry možné pouze prostřednictvím základní znalosti buněčné biologie. To je také důvod, proč jsme se rozhodli do textu začlenit, z našeho pohledu důležité, poznámky o významu konkrétních buněčně biologických fenoménů pro další studium lékařství. Rádi bychom také studenty vyzvali, aby informace, v tuto chvíli pouze nastíněné, v průběhu dalšího studia a následujících kurzů a předmětů (biochemie, mikrobiologie, imunologie, patologie ale i obory klinické) aktivně vyhledávali a prohlubovali.

Následující text obsahuje aktivní odkazy na obrázky a tabulky obsažené ve volně dostupné on-line verzi učebnice Molecular Biology of the Cell (anglicky) a další výukové texty připravené pro tento kurz. Další obrázky jsou přiloženy na konci dokumentu a jsou aktivně svázány s textem. Dále v textu odkazujeme na vybrané anglicky psané přehledové články publikované v respektovaných vědeckých časopisech, jejichž seznam je v závěru přiložen. Přestože je nám jasné, že jsou tyto publikace určeny jinému čtenáři než studentovi 1. ročníku lékařské fakulty, rádi bychom vyzvali ty ze studentů s hlubším zájmem o věc, aby do těchto souhrnných článků, či jejich novějších verzí, nahlédli, ať už nyní či později v průběhu studia. Plné verze ve formátu .pdf by měly být dostupné z počítačů připojených k síti 1. lékařské fakulty.

Složitost prezentovaných biologických fenoménů je enormní a i přes veškerou naši snahu o zjednodušení, které má vždy své meze, a srozumitelnou formu prezentace, je jasné, že předložený text vzbudí řadu otázek a komentářů. Jsme otevření poznámkám (i negativním) k obsahu i formě, protože pouze skrze kritickou diskuzi je možné zlepšení v příštích letech výuky.

S ohledem na naprostou dominanci angličtiny, jako univerzálně přijímaného jazyka současné biomedicíny, jsme se nemohli vyhnout použití některých anglických odborných výrazů.

Tento dokument je určen pouze pro akademické účely.

podzim 2008 - Milan Elleder a Jakub Sikora

Obsah

1. [KONCEPT BIOGENEZE - OMNI CELLULA E CELLULA - STÁLE PLATNÉ?](#)
2. [CÍLENÍ A TŘÍDĚNÍ PROTEINŮ V BUŇCE - SBALOVÁNÍ PROTEINŮ - ZÁKLADNÍ KONCEPT](#)
 1. [Intracelulární cílení proteinů](#)
 2. [Sbalování proteinů \(Protein folding\) - proteostáza \(proteostasis\)](#)
 3. [Intracelulární transport, cílení a třídění proteinů](#)
 1. [Vezikulární intracelulární transport - základní koncept](#)
 2. [Transmembránový transport a membránové kontakty](#)
3. [ČASNÁ SEKRETORICKÁ DRÁHA - ENDOPLASMATICKÉ RETIKULUM A GOLGIHO APARÁT](#)
 1. [Endoplasmatické retikulum \(ER\)](#)
 1. [Role endoplasmatického retikula v proteostáze](#)
 1. [Proteosyntéza v endoplasmatickém retikulu](#)
 2. [Sbalování proteinů v endoplasmatickém retikulu \(ER associated folding - ERAF\) a jejich export](#)
 3. [Degradace proteinů asociovaná s endoplasmatickým retikulem - ER associated degradation \(ERAD\)](#)
 2. [Golgiho aparát \(Golgiho komplex\)](#)
 1. [Posttranslační modifikace v Golgiho aparátu](#)
 4. [POST-GOLGI SEKRETORICKÁ DRÁHA - EXOCYTOSA](#)
 5. [ENDOSOMÁLNĚ/LYSOSOMÁLNÍ SYSTÉM](#)
 1. [Import substrátů do ELS](#)
 1. [Endocytosa](#)
 1. [Trancytosa](#)
 2. [Autofagie](#)
 3. [Fagocytosa](#)
 2. [Transport lysosomálních proteinů do lysosomů](#)
 3. [Organely se vztahem/podobné lysosomům \(Lysosomal related organelles\)](#)
 6. [MITOCHONDRIE - DYNAMICKÉ MITOCHONDRIÁLNÍ SÍŤ - GENERÁTOR BUNĚČNÉ ENERGIE](#)
 1. [Strukturální a biologické charakteristiky mitochondrií](#)
 2. [Obrat mitochondrií \(mitochondriálních sítí\) - biogeneze vs. degradace](#)
 3. [Mitochondrie jsou strukturálně a organizačně velmi dynamický systém](#)
 7. [PEROXISOMY](#)
 1. [Biogeneze peroxisomů](#)

2. [Peroxisomální metabolismus](#)
8. [CYTOKINEZE - ROZDĚLENÍ CYTOPLASMY A DCEŘINÝCH BUNĚK - KDE A JAK ŘÍZNOUT?](#)
 1. [Kontraktilní prstenec - dělicí rýha - rozdělení cytoplasmy](#)
 2. [Rozdělení a separace cytoplasmy](#)
9. [DOPORUČENÁ LITERATURA:](#)
10. [VÝBĚROVÁ LITERATURA:](#)

Seznam zkratk:

(některé ponechány v angličtině pro jejich obtížnou převevitelnost do češtiny)

3D - trojrozměrný; **ATP** - adenosintrifosfát; **ATPasa** - ATP synthasa; **Cdk** - cyklin-dependentní kinasa; **CMA** - chaperony zprostředkovaná (mediovaná) autofagie; **COP** - coatomerní protein; **DNA** - deoxyribonukleová kyselina; **EDEM** - endoplasmic reticulum degradation-enhancing α -mannosidase like; **ELS** - endosomálně lysosomální systém; **ER** - endoplasmatické retikulum; **ERAD** - endoplasmic reticulum associated degradation (degradace asociovaná s endoplasmatickým retikulem); **ERAF** - endoplasmic reticulum associated folding (sbalování proteinů asociované s endoplasmatickým retikulem); **ESP** - early secretory pathway (časná sekretorická dráha); **gDNA** - genomická (jaderná) DNA; **GPI** - glykosylfosfatidylinositol; **GTP** - guanosintrifosfát; **GTPase** - guanosintrifosfatasa; **LAMP** - lysosomal associated membrane protein (lysosomálně2 asociovaný membránový protein); **LIMP** - lysosomal integral membrane protein (lysosomální integrální membránový protein); **LMP** - lysosomal membrane protein (lysosomální membránový protein); **LRO** - lysosomal related organelles (organely blízké lysosomům); **LSD** - lysosomal storage disorders (lysosomální stádační onemocnění); **M-6-P** - manosa-6-fosfát; **M-6-PR** - manosa-6-fosfát receptor; **MALS** - macroautophagy lysosomal system (sdružený makroautofagicko lysosomální systém); **mRNA** - informační (messenger) RNA; **mtDNA** - mitochondriální DNA; **OXPHOS** - oxidativní fosforylace; **PTS** - peroxisomal targeting sequence (peroxisomální cílicí sekvence); **Rab** - GTPase (rabbit-like); **RER** - rough endoplasmic reticulum (hrubé endoplasmatické retikulum); **RNA** - ribonukleová kyselina; **rRNA** - ribosomální RNA; **SER** - smooth endoplasmic reticulum (hladké endoplasmatické retikulum); **SNARE** - soluble n-ethyl maleimide sensitive attachment proteins receptor; **SRP** - signal recognition particle (signál rozpoznávající částice); **TIM** - translocase of the inner mitochondrial membrane (translokasa vnitřní mitochondriální membrány); **TOM** - translocase of the outer mitochondrial membrane (translokasa vnější mitochondriální membrány); **tRNA** - transferová RNA; **UDP** - uridindifosfát; **UPR** - unfolded protein response (odpověď z přebytku špatně sbalených proteinů); **UPS** - ubiquitin proteasome system (systém ubiquitin proteasomu)

Nejaderné cytoplasmatické kompartmenty

1 Koncept biogeneze - Omni cellula e cellula - stále platné?

Biogeneze je základním principem vzniku živých organizmů včetně individuálních buněk. Definuje jejich původ na podkladě preexistujících živých buněk. Toto základní dogma se zdá být stále univerzálně platné, byť s malými variacemi vyplývajícími z recentních poznatků (*viz. níže*). Cytoplasma (veškeré mimojaderné buněčné komponenty) zahrnuje všechny membránové organely a cytosol (vnitřní vodné

prostředí buňky). Cytosol obsahuje velké množství komplexních nemembránových (proteinových) systémů jako jsou např. cytoskelet, komponenty proteosyntézy či různé cytosolické, lokálně organizované signální a metabolické dráhy (Alb. [12-1](#)). Celková velikost, povrch a objemový jaderně-cytoplasmatický poměr nejsou v průběhu buněčného cyklu konstantní a mohou se měnit i s ohledem na aktuální funkční či diferenciační stav buňky.

Dynamická a permanentní remodelace kompartmentalizovaného vnitřního uspořádání je základním a nevyhnutelným předpokladem viability (životaschopnosti) buněk. Základní roli v těchto procesech sehrávají biologické membrány, které udržují integritu a ohraničují individuální buněčné kompartmenty. Biologické membrány (v obecném smyslu se jedná o hydrofobní prostředí - hydrofobní fáze) (Alb [10-1](#), [10-12](#)) zajišťují komunikaci mezi kompartmenty buď přímými membránovými kontakty nebo prostřednictvím různých specializovaných membránových proteinů či proteinových komplexů. Rozhraní prostředí, která tak díky biologickým membránám vznikají, mohou být spojena s vytvářením gradientů nejrůznějších typů. Není proto překvapující, že udržení takového neustále se obměňujícího živého systému vyžaduje přísun energie.

Dynamická biogeneze membránových organel se děje na základě dříve existujícího strukturálního substrátu, který z ontogenetického pohledu pochází z cytoplasmy oocyta a nikoliv z oplozující spermie. Cytoplasmatické membránové systémy jsou tedy maternálního původu včetně extranukleární tzn. mitochondriální DNA (mt DNA). Přesto však je z důvodu neustálé obnovy a restrukturalizace membránových organel nutné, aby docházelo k přesnému cílení jejich primárních komponent (proteinů, lipidů apod.) jak z míst syntézy tak i cestou regulované recyklace.

[Zpět](#) na obsah

2 Cílení a třídění proteinů v buňce - sbalování proteinů - základní koncept (Alb [12-6](#), viz. též Genová exprese)

Jednotlivé proteiny jsou kódovány geny v jaderné (genomické) DNA (gDNA). Tato informace je procesem transkripce převáděna do formy molekul informační RNA (messenger - mRNA), které dále slouží jako templáty pro syntézu proteinů (translace) na ribosomech. Nově syntetizované proteiny se sbalují a mohou být extensivně posttranslačně modifikovány (např. glykosylovány, proteolyticky štěpeny apod.). Dále jsou tyto molekuly cíleně transportovány do specifických buněčných kompartmentů nebo sub-kompartmentů, které jsou v principu buď membránové (hydrofobní) nebo vodné (hydrofilní). Proteiny s extracelulární funkcí jsou exocytovány (viz. *níže*).

[Zpět](#) na obsah

2.1 Intracelulární cílení proteinů

Intracelulární zpracování a přesné cílení proteinů je regulováno a zajišťováno přítomností signálních (adresových) sekvencí v primární struktuře nově syntetizovaných proteinů nebo trojrozměrnými (3D) signálními značkami v terciární struktuře sbalených proteinů (Alb [12-8](#)). Rozdíly mezi signálními sekvencemi a trojrozměrnými signálními značkami jsou zásadní.

Signální sekvence jsou většinou představovány 20-25 N-terminálně lokalizovanými, převážně hydrofobními aminokyselinami (Alb Table [12-3](#)) v proteinových řetězcích. V případě signálních sekvencí, je to právě primární struktura, která specificky předurčuje cílení do příslušných buněčných kompartmentů (jádro, endoplasmatické retikulum, mitochondrie a jiné). Z toho důvodu mohou být signální sekvence rozpoznávány již v průběhu translace proteinů. Naopak trojrozměrné signální značky se stávají rozpoznatelnými až po sbalení proteinů (*viz. níže*).

Syntéza všech eukaryotických proteinů začíná na volných cytosolických ribosomech nebo polyribosomech (Alb [12-6](#), [12-37](#), *see also Gene Expression*). Jak bylo uvedeno v předcházejících odstavcích, přítomnost N-terminálních signálních sekvencí (Alb Table [12-3](#)), mimo jiné, předurčuje zda bude protein v průběhu translace (kotranslačně) translokován do lumen či membrán cisteren hrubého endoplasmatického retikula (RER) a následně projde sekretorickou dráhou anebo kompletní syntéza proběhne v cytosolu, kde může zůstat a fungovat, nebo bude protein cílen do jádra, mitochondrií či peroxisomů (*viz. níže*).

Proteiny, které nesou signální sekvenci pro import do endoplasmatického retikula jsou v lumen jeho cisteren či v jejich limitujících membránách sbaleny (*viz. níže*), jsou předány do Golgiho aparátu a následně jsou směřovány do endosomálně-lysosomálního buněčného kompartmentu nebo jsou z buňky exocytovány - tzn. dostávají se do cytoplasmatické membrány nebo přímo do extracelulárního prostoru (*viz. níže*).

[Zpět](#) na obsah

2.2 Sbalování proteinů (*protein folding*) - proteostáza (*proteostasis*)

Pojem proteostáza lze definovat jako komplexní soubor intracelulárních regulačních drah, které se podílejí na buněčné a biochemické homeostáze proteinů. Jedná se především o systémy a dráhy podílející se na syntéze, sbalování (*folding*), posttranslačních modifikacích, cílení ale i regulované degradaci proteinů v buňce.

Teoretickým výsledkem translace je lineární polypeptidový řetězec, který však představuje z energetického a biologického hlediska nevýhodnou strukturu. Nově syntetizované proteiny proto musí získat správnou a hlavně energeticky výhodnou sekundární a terciární konformaci - tzv. nativní strukturu. Mezi základní parametry formování nativní struktury patří zanoření hydrofobních aminokyselin a jejich postranních řetězců do vnitřního prostoru molekul proteinů a naopak orientace hydrofilních zbytků směrem k povrchu. Mezi další charakteristiky nativní struktury proteinů patří stabilizace vodíkovými vazbami, van der Waalsovými a elektrostatickými interakcemi, a v omezené míře též kovalentními interakcemi. Na

základě celé řady teoretických, ale i experimentálních prací lze předpokládat, že je to právě nativní struktura proteinů, která při fyziologických podmínkách představuje nejstabilnější konformaci.

Sbalování proteinů (protein folding) je vlastně procesem získávání této energeticky nejvýhodnější (s nejnižší volnou energií) trojrozměrné konformace. V tomto kontextu je dále nutné zmínit, že i vytváření kvarterní struktury proteinů (oligomerizace anebo vytváření heteromerních komplexů či superkomplexů) lze v omezené míře považovat za pokračování procesu sbalování proteinů (Alb [6-79](#)). V některých případech není zcela jednoduché stanovit přesný rozdíl a hranici mezi oligomerizací a tvorbou proteinových komplexů. V nejobecnějším smyslu slova lze říci, že oligomery zůstávají permanentně asociovány a jsou také v této formě buňkou degradovány. Na rozdíl od toho, proteinové komplexy jsou dynamičtější struktury s větší mírou volnosti při vytváření ale i degradaci.

Proces sbalování proteinů, jako jeden ze základních problémů moderní buněčné biologie, je intenzivně studován již od 60. let minulého století a to jak přístupy teoreticko-modelovacími tak experimentálními. Přes obrovský objem dosažených poznatků celá řada základních otázek v této oblasti nezodpovězena. Lze se domnívat, že informace nutná k získání nativní struktury proteinů je vnitřně kódována v primární sekvenci aminokyselin. Dále lze předpokládat, že není možné, aby nově syntetizovaný protein náhodně "testoval" všechny potencionální konformační stavy (konformery) pro nalezení vlastní nativní formy (konformace s nejnižší volnou energií). Současná představa spíše preferuje postupné snižování volné energie sbalovaného proteinu v tzv. free energy landscape (viz. přednášky a semináře) vedoucí k dosažení nativního stavu. Tento model také předpokládá, že individuální proteiny se sbalují modulárním způsobem z různých oblastí a až následně dosahují konečné struktury složením těchto modulů.

Sbalování nově syntetizovaného proteinu může začít v okamžiku výstupu jeho N-konce z ribosomálního kanálu (Alb [6-81](#)). V tomto smyslu není rozdíl mezi proteiny syntetizovanými na volných cytoplasmatických ribosomech/polyribosomech a ribosomech vázaných na cisterny endoplasmatického retikula. Přestože nascentní protein (Alb [6-80](#)) může svou nativní konformaci získat sám o sobě; nejen z důvodů energetických bariér je tento mechanismus krajně nepravděpodobný. Vnitřní prostředí buňky, není vlastně ničím jiným než hustou proteinovou sítí s velkým množstvím hydrofobních (potencionálně agregativních) interakcí. Proto aby nedocházelo k takovému, pro buňku nevýhodnému, protein/proteinovým interakcím vedoucím, v extrémní formě až k tvorbě proteinovým agregátů, existuje v buňkách sofistikovaný kompartmentalizovaný systém proteinových katalyzátorů sbalování - tzv. chaperonů (z francouzského *chaperon* = průvodkyně nebo gardedáma) (Alb [6-83](#)). V proteinové biochemii lze chaperon definovat jako protein napomáhající sbalování a asemblaci (skládání do oligomerů nebo komplexů, viz. výše) jiných proteinů. Chaperony v naprosté většině případů nepředstavují součást finálních proteinových komplexů.

Z výše uvedeného by měl vyplynout následující závěr - proteiny syntetizované na volných cytosolických ribosomech/polyribosomech jsou sbalovány s pomocí cytosolických chaperonových drah. Například ale sbalení a asemblace proteinů cílených do mitochondrií je sice zahájena v cytosolu, dokončena je avšak v mitochondriích s využitím mitochondriálních chaperonů (viz. níže). Proteiny, které

jsou syntetizovány do cisteren endoplasmatického retikula nebo do jeho limitujících membrán jsou sbalovány pomocí ER rezidentních chaperonů (ER associated folding-ERAF) (viz. níže). Zajímavé je, že se v poslední době objevily informace o možnosti transportu peroxisomálních proteinů přes limitující peroxisomální membránu ve sbalené formě, což je z hlediska velikosti peroxisomálního kompartmentu zajímavý biologický fenomén.

Detaily transportu proteinů jadernými póry viz. sekce Genová exprese.

Chaperony asistované sbalování proteinů, oligomerizace, assemblace proteinových komplexů a proteostatická regulace jsou procesy nezbytné pro normální buněčnou funkci. Sekvence kroků na cestě proteinu k místu jeho správné funkce: proteosyntéza/kompartimentově specifické sbalení (folding)/oligomerizace či komplexová assemblace, je využívána prakticky každým buněčným proteinem. Při dalším studiu biologie a patologie proteinů je vhodné tuto funkční sekvenci pochopit a zapamatovat si. Překvapující by tedy nemělo být množství lidských onemocnění asociovaných se špatným sbalováním proteinů (protein misfolding) nebo jejich agregací (viz níže).

[Zpět](#) na obsah

2.3 Intracelulární transport, cílení a třídění proteinů

Intracelulární transport proteinů je možné dále klasifikovat z funkčně-strukturálních hledisek na - (i) **transport proteinů jadernými póry** (viz. sekce Genová exprese, Alb [12-10](#)); (ii) **vezikulární transport** - transport využívající lumen a membrány transportních váček; (iii) **transmembránový transport a přímé membránové kontakty**; a (iv) **nevezikulární transport cytosolem** (např. transport individuálních proteinových molekul v asociaci s cytoskeletem nebo nemembránovými cytosolickými systémy).

Tento text se dále zaměřuje na otázky spojené s vezikulárním a transmembránovým transportem a dále transportem membránovými kontakty.

V nejobecnějším smyslu slova lze buněčné proteiny rozdělit do dvou hlavních skupin na základě jejich potenciálu existovat, popřípadě interagovat s hydrofobním prostředím lipidních biologických membrán: **solubilní** (hydrofilní) **proteiny** a **proteiny membránové** (s různou mírou hydrofobicity) (Alb [10-17](#)). Je to právě schopnost proteinu interagovat s hydrofobními fázemi, která proteiny předurčuje ke způsobu jejich intracelulárního transportu v membránových váčkách. Solubilní proteiny jsou transportovány jako lumenální kargo (náklad), naproti tomu integrační membránové proteiny (jednou či vícekrát transmembránové) nebo s membránami asociované (např. pomocí lipidní kotvy tvořené glykosylfosfatidylinositolem - GPI (Alb [12-57](#)), adaptorovým proteinem nebo estericky vázanou mastnou kyselinou) jsou transportovány v biologických membránách nebo v asociaci s nimi. Membránové proteiny musí setrvávat v asociaci s membránami při intracelulárním třídění a transportu z povahy své struktury (viz. níže).

Na základě těchto uvedených biochemických vlastností proteinů lze tedy dovodit následující: (i) proteiny určené k uvolnění do "volného" hydrofilního prostředí (lumen jiného intracelulárního kompartmentu nebo extracelulárního prostoru) jsou transportovány v lumen transportních váčků a to buď volně nebo v asociaci s jejich membránovým receptorem; (ii) membránové proteiny jsou transportovány v membránách transportních váčků a jsou při fúzi s cílovým kompartmentem předány do cílové biologické membrány.

[Zpět](#) na obsah

2.3.1 Vezikulární intracelulární transport - základní koncept

Intracelulární transport využívající transportní váčky je jedním z hlavních způsobů transportu molekul v buňkách. Vezikulární transport, v obecném pohledu, preferenčně využívá následující buněčné dráhy: sekretorická dráha/exocytoza (časná i pozdní), endocytoza a transcytoza, tzn. procesy, které zajišťují komunikaci intracelulárních kompartmentů s cytoplasmatickou membránou a extracelulárním prostorem (*detaily viz. níže*).

Jak již bylo uvedeno, vezikulární transport je jednou ze základních charakteristik živé eukaryotické buňky. Mezi hlavní principy vezikulárního transportu patří: vektorialita a specifita transportu mezi donorovým (zdrojovým) a akceptorovým (cílovým) kompartmentem, které jsou realizovány následující sekvencí kroků a obecných vlastností (Alb [12-7](#), [13-2](#)): **pučení** (budding) - vytváření transportních váčků, **oddělení od zdrojového (donorového) kompartmentu**, **cílený transport cytosolem v asociaci s cytoskeletem** (prevážně s mikrotubuly), **specifické usazení** (docking)/"svázání" (tethering)/ **iniciální propojení membrán** (porus formation), **finální fúze s cílovým kompartmentem**. Zakončení celého procesu je představováno uvolněním lumenálního obsahu do cílového kompartmentu nebo extracelulárního prostoru nebo inkorporací membránových proteinů do biologické membrány akceptorového kompartmentu.

Pučení/budding - ohyb biologických membrán je možné dosáhnout s využitím extramembránových proteinových "lešení" tvořených multimerizovanými podjednotkami a přídatnými adaptorovými molekulami (Alb [13-7](#)). Mezi proteiny typicky vytvářející taková proteinová lešení (jinak také molekulární pláště/obaly) patří clathrin (Alb [13-41](#)), coatomerní proteiny (COP) nebo caveolin a příbuzné proteiny (Alb [13-42](#)). Tyto a jiné proteiny s podobnou funkcí jsou využívány v různých buněčných kompartmentech (Alb [13-5](#)) nebo vytvářejí lokální membránové asociované akumulace (typicky clathrin v tzv. opláštěných jamkách aktivních v receptorem zprostředkované endocytoze Alb [13-46](#) - *pro detaily viz. níže*). Kontakt tohoto typu proteinů s biologickými membránami je zprostředkován celou řadou adaptorových proteinů nebo cytoplasmatickými konci transmembránových receptorů (Alb [13-8](#)). Další významnou vlastností proteinů tohoto typu je jejich aktivní recyklace zpět do zdrojového kompartmentu.

Druhým významným mechanismem využívaným pro modelování tvaru membrán je aktivní a diferencovaná redistribuce různých typů lipidů a jejich derivátů obsažených

ve vnitřní a zevní vrstvě lipidních biologických membrán. Tento mechanismus je využíván zvláště při formování ostrých okrajových zakřivení limitujících membrán plochých cisteren endoplasmatického retikula nebo Golgiho aparátu, zároveň však třeba při dynamické remodelaci tubulo-vezikulárních výběžků pozdních endosomů.

V případě zájmu o vybraná recentní témata týkající se asemblace a funkce clathrinových plášťů odkazujeme na přehledový článek - [Ungewickell and Hinrichsen, 2007](#).

Oddělení pučícího transportního váčku, tzn. fyzické rozvolnění lipidních dvouvrstev zdrojového kompartmentu a transportního váčku, využívá proteinů jako je dynamin a blízké proteiny (Alb [13-8](#), [13-9](#)). Pro zjednodušení lze funkci těchto proteinů přirovnat k molekulárním škrtidlům. Dynamin a dynaminu podobné proteiny mají podobnou funkci také v remodelování mitochondriálních a peroxisomálních sítí. Jsou aktivními vykonavateli mitochondriálního a peroxisomálního štěpení (fission, viz. níže).

Cytoskelet a vezikulární transport - pohyb transportních váčků je orientovaný (vektoriální) proces. Vedle transportních váčků jsou to i jiné, mnohdy objemnější, membránové buněčné kompartmenty (např. mitochondrie či peroxisomy), které jsou transportovány a přesouvány v buňce obdobným způsobem. Molekulární interakce mezi transportovanou membránovou strukturou (modelově transportním váčkem) je zprostředkována proteiny typu molekulárních motorů (rodina dyneinů a kinesinů) a asociovaných partnerských adaptorových proteinů (Alb [16-63](#)). Rozsah a míra vezikulárního transportu v buňkách je nesmírná. Biologický přesah vezikulárního transportu může být v určitých typech buněk (konkrétně polarizovaných) daleko větší, než omezený na pouhý přesun biologického materiálu a může tak představovat přímou, tkáňově specifickou funkci (např. transcytoza v endoteliích, viz. níže). V jiných buněčných typech je přímým regulátorem celkové buněčné homeostázy a viability.

Axony neuronů, které mohou dosahovat značných délek, jsou struktury s vysokým stupněm strukturální ale i funkční organizace. Jednou z primárních funkcí axonů je kontinuální obousměrný transport membránových a nemembránových (např. proteinové komplexy) "nákladů" podél axonálního cytoskeletálního lešení. Tento transport probíhá buď anterográdně (směrem k axonální periférii) nebo retrográdně (směrem k buněčnému tělu). Axony tak sehrávají naprosto základní roli v organizaci neuronálních endocytických a exocytických drah, synaptické signalizace anebo recyklace autofagosomů.

Molekulární patologie axonálního vezikulárního transportu představuje jednu ze základních příčin celé řady závažných neurodegenerativních onemocnění včetně Alzheimerovy choroby. Pro souhrnný přehled významu axonálního transportu pro lidskou neuropatologii viz. [Roy et al., 2005](#).

Molekulární pláště transportních váčků - transportní váčky nesou v asociaci se svými membránami větší množství proteinů, které jsou důležité, jak pro molekulární identifikaci tak i cílení těchto váčků. Tyto membránové nebo s membránami asociované proteiny charakterizují transportní váčky, tedy jejich zdrojový

kompartment, zároveň však také odráží jejich lumenální obsah. Komplexní soubor proteinů asociovaných s membránami transportních váčků vytváří tzv. plášť - coat (opláštěné váčky - coated vesicles). Pro zjednodušení, existují dvě hlavní skupiny těchto proteinů, jejichž hlavní funkcí je kontinuální regulace vezikulárního transportu a rozpoznávání přesouvaného biologického materiálu: Rab a SNARE proteiny (Alb [13-11](#), [13-12](#), [13-15](#)). Pro přehled současných poznatků v oblasti komplexních vztahů těchto signalizačních sítí viz [Cai et al., 2007](#).

Specifické usazení (docking)/"svázání" (tethering)/ iniciální propojení membrán (porus formation) - selektivní fúze transportních váčků s cílovými (akceptorovými) kompartmenty je zajišťována interakcemi jejich komplementárních membránových SNARE molekul (Alb [13-12](#)). Iniciální interakce a fúze membránových SNARE proteinů a následné fúze membrán jsou regulovány GTPasovou aktivitou Rab proteinů (Alb [13-14](#)).

Regulovaná exocytosa (*viz. níže*) a svázání sekrečních váčků (specifický typ transportních váčků) může být velmi rychlý a transientní proces, který je spouštěn specifickým signálem (typicky v neuronech uvolňování synaptických mediátorů).

[Zpět](#) na obsah

2.3.2 Transmembránový transport a membránové kontakty

Transport mitochondriálních a peroxisomálních strukturálních proteinů, enzymů (včetně enzymových podjednotek a asemblačních faktorů) a membránových proteinů se děje cytosolickým transportem a následně přes limitující membrány těchto organel. Vztah přechodného cytosolického a následného intraorganelového (finálního) sbalování těchto proteinů je popsán *níže* v textu. Z dříve zmíněného je jasné, že proces transmembránového importu proteinů hraje základní roli v biogenezi těchto membránových kompartmentů. Mitochondriální (kodované jadernou gDNA) a většina peroxisomálních proteinů (*viz. níže*) neobsahuje N-terminální signální (adresovou) sekvenci pro import do endoplasmatického retikula, a proto jejich proteosyntéza probíhá na volných cytosolických ribosomech/polyribosomech. Jejich další cílení do příslušných kompartmentů je zajištěno jiným typem specifických signálních sekvencí nebo značek (Alb [12-3](#)). část peroxisomálních proteinů prochází membránou ve sbalené stavu. Na rozdíl od toho, mitochondriální proteiny prochází membránovými translokátory (*viz. níže*) většinou nesbalené.

[Zpět](#) na obsah

3 Časná sekretorická dráha - endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát

Z dynamického buněčně biologického hlediska lze časnou sekretorickou (sekreční) dráhu (early secretory pathway - ESP) charakterizovat jako funkční propojení endoplasmatického retikula (ER) a Golgiho aparátu, mezi kterými stojí membránový systém nazývaný pre-Golgi intermediáty nebo tzv. tubulo-vezikulární membránové

shluky (klastry). Transfer nákladu mezi ER a Golgiho aparátem je obousměrný a využívá obecných konceptů vezikulárního transportu. Probíhá jak směrem z ER do Golgiho aparátu tak i obráceně z Golgiho aparátu do ER. Tento typ transportu zajišťuje retenci a recyklaci residentních proteinů v ER. Směr pohybu transportních váčků mezi ER a Golgiho aparátem je, mimo jiné, asociován s různými typy coatomerních proteinů (viz. výše) vytvářejícími plášť transportních váčků (ER>Golgi - COPII, Golgi>ER - COPI) (Alb [13-20](#), [13-21](#)). Vesikulární transport mezi ER a Golgiho aparátem je orientovaný i díky funkční polarizaci ER, pre-Golgi intermediátů a Golgiho aparátu. Přesun proteinů syntetizovaných a sbalovaných v ER směrem do Golgiho aparátu je integrální součástí proteostatické regulační sítě (viz. *jinde v textu*). Pouze proteiny správně sbalené chaperonovým systémem ERAF (ER associated folding) mohou opustit endoplasmatické retikulum přes výstupní místa (ER exit sites) asociovaná s COPII coatomerními proteiny a vstoupit do cis-Golgi cisterny (viz. *níže*).

[Zpět](#) na obsah

3.1 Endoplasmatické retikulum (ER)

ER je prvním kompartmentem časné sekretorické dráhy. ER je představováno rozsáhlým systémem vzájemně propojených membránových prostorů, které mohou ze strukturálního hlediska nabývat komplexní 3D formu od plochých cisteren až po protažené tubuly. ER má v buňkách prostorovou kontinuitu s jaderným obalem a ve většině buněk se rozprostírá v celé cytoplasmě. V polarizovaných buňkách, jako jsou třeba neurony, lze struktury ER nalézt jak v dendritech tak i v axonech.

Endoplasmatické retikulum je funkčně polarizované. Oblasti membrány ER s navázanými ribosomy - hrubé endoplasmatické retikulum (rough endoplasmic reticulum - RER, Alb [12-36](#)) jsou v kontinuitě s hladkým endoplasmatickým retikulem (smooth endoplasmic reticulum - SER), které obvykle slouží jako COPII asociovaná výstupní místa z endoplasmatického retikula (Alb [12-38](#)). Dle současných poznatků existují důkazy pro další vnitřní organizaci a stratifikaci residentní proteinové výbavy ER v jakési intraluminální funkční mikrodomény (viz. *níže*).

Podíl hladkého endoplasmatického retikula v celé síti ER je obvykle větší v buňkách, které mají vyšší vnitřní obrát cholesterolu, jako jsou například ty, které syntetizují steroidní hormony (např. buňky kůry nadledvin) nebo se podílejí na metabolických přeměnách sloučenin toxické nebo xenobiotické povahy (typicky některé léky) spojených s tvorbou hydrofobních intermediátů. Do této druhé skupiny lze typicky řadit hepatocyty.

Endoplasmatické retikulum je klíčovou organelou v procesech spojených s proteosyntézou, sbalováním, iniciální N-glykosylací (Alb [12-51](#)) a asemblací proteinů. Cisterny endoplasmatického retikula představují významné intracelulární depo Ca^{2+} iontů, které sehrávají významné role v celé řadě signálních drah. Endoplasmatické retikulum významně participuje na biosynthese a následné distribuci lipidů v buňce (Alb [12-58](#), [12-60](#)). Není od věci na tomto místě zmínit, že ER residentní signální dráhy spojené s rozpoznáváním stavů s přebytkem špatně sbalených proteinů mohou vyústit až v programovanou buněčnou smrt (viz. *níže*).

[Zpět](#) na obsah

3.1.1 Role endoplasmatického retikula v proteostáze

Pro připomenutí, proteostáza neboli proteostatická síť je komplexní soubor intracelulárních regulačních drah, které se podílí na buněčné a biochemické homeostáze proteinů. Proteostáza zahrnuje mechanismy proteosyntézy, sbalování (foldingu) proteinů, správného cílení, ale také degradace proteinů v buňce. Endoplasmatické retikulum, jako funkčně integrovaná organela, je zavazato prakticky do všech těchto mechanismů. Proteostatické komponenty lokalizované do ER jsou velmi těsně exekutivně propojeny s cytosolickým systémem ubiquitin proteasomu (UPS, viz. níže a v sekci *Genová exprese*) a systémem autofagické degradace proteinů (viz. níže). Tyto dva systémy (UPS a autofagie) představují nejvýznamnější protein degradativní systémy, které udržují dynamické equilibrium buněčného proteomu.

[Zpět](#) na obsah

3.1.1.1 Proteosyntéza v endoplasmatickém retikulu

Jak již bylo zmíněno dříve, syntéza všech buněčných proteinů začíná na volných cytosolických ribosomech a polyribosomech. Import nově syntetizovaného proteinu do lumen cisteren endoplasmatického retikula závisí na přítomnosti ER lokalizační signální sekvence v jeho N-terminální části. Vstup proteinu do lumen nebo cisteren ER je tedy kotranslační proces.

Signální sekvence pro import do endoplasmatického retikula je podobná všem ostatním signálním sekvencím díky vysokému zastoupení hydrofobních aminokyselinových zbytků. Proteiny obsahující tuto signální sekvenci jsou syntetizovány ribosomálními komplexy vázanými na membrány cisteren ER (viz. níže), které tak získávají obraz hrubého retikula (RER). Z tohoto pohledu je možné o hrubém endoplasmatickém retikulu hovořit jako o proteosyntetické - "vstupní" části celé organely.

Kotranslační vstup a fyzická translokace nově syntetizovaného proteinu probíhá pomocí specifické vazby komplexu signální sekvence/ribosom/mRNA na membránový komplex signál rozeznávající částice (signal recognition particle- SRP)/receptoru pro SRP/ transmembránového translokačního kanálu v membráně ER (Alb [12-42](#)). Z důvodu své hydrofobicity přetrvává v průběhu translace signální sekvence v membráně endoplasmatického retikula. Posledním krokem při syntéze lumenálních proteinů je její odštěpení pomocí signální peptidasy, které je provázáno uvolněním nascentního proteinu do lumen cisterny ER (Alb [12-46](#)). Signální sekvence, které zůstávají v membránách ER mají, jak se ukazuje v poslední době, další významné regulační funkce. Popis těchto funkcí však přesahuje rozsah a účel tohoto textu

V současné době je popsáno nejméně třicet vrozených monogenních lidských
--

onemocnění asociovaných s patogenními variacemi (mutacemi) v signálních sekvencích anebo přímo souvisejících s abnormální funkcí signálních sekvencí (pro detaily [Jarjanazi et al., 2008](#)). Lze očekávat, že množství těchto onemocnění se bude v čase zvyšovat spolu s dalším popisem kauzálních vztahů tohoto typu molekulární patologie s patogenezi méně vzácných chorob (např. nádorových onemocnění). I přes letmý nástin základních principů funkce signálních sekvencí, by mělo být už nyní pochopitelné, že experimentální hodnocení kauzality mutací v těchto signálních částech proteinů je problematické, jelikož důsledkem mutací tohoto typu není strukturální alterace proteinu, ale v nejčastějším případě porucha dynamiky jeho syntézy a zpracování sekretorickou drahou.

Vedle solubilních lumenálních proteinů, které obsahují signální sekvenci pro import do ER, jsou na ribosomech vázaných na ER do membrán endoplasmatického retikula syntetizovány integrální membránové proteiny (včetně mnohotně transmembránových) (Alb [10-17](#)). Membránová inserce těchto proteinů je kotranslační proces, který je závislý na střídavé přítomnosti hydrofobních a hydrofilních úseků v sekvenci těchto proteinů. Jednoduché ale i mnohotně transmembránové uspořádání membránových proteinů je dosaženo pomocí kotvení hydrofobních úseků do prostředí membrány a extramembránové (cytosolické vs. ER lumenální) proteosyntézy hydrofilních úseků (Alb [12-47](#), [12-48](#), [12-49](#), [12-50](#)). Pro správnou biochemickou funkci membránových proteinů je potřebné, aby od okamžiku syntézy existovaly v prostředí membrán, jinak by docházelo k hroucení jejich struktur.

Podobně jako transmembránové proteiny, jsou i proteiny kotvené GPI kotvou syntetizovány v ER (Alb [12-57](#)).

[Zpět](#) na obsah

3.1.1.2 Sbalování proteinů v endoplasmatickém retikulu (ER associated folding - ERAF) a jejich export

Proteiny jsou iniciálně v asociaci s ER syntetizovány v nesbalené nascentní podobě (Alb [6-80](#)) a musí zde získat správnou konformaci, ta však nemusí být, podobně jako v případě proteinů sbalovaných v cytosolu, definitivní. Recentní odhad předpokládá, že přibližně třetina syntetizovaných lidských proteinů prochází endoplasmatickým retikulem (sekreční drahou) a je zde také sbalována. To znamená, že tyto proteiny získávají v cisternách endoplasmatického retikula energeticky stabilní konformaci tzn. svou nativní strukturu. Stručně (*viz. výše*), hydrofobní povrchy a residua v proteinech jsou skryta do vnitřních prostor molekul a jsou ustanoveny intramolekulární interakce, které nativní strukturu stabilizují. Je důležité si znovu uvědomit, že sbalování proteinů je dynamický proces, který nemusí být nutně zakončen v endoplasmatickém retikulu, ale v případě sekretorické dráhy může pokračovat v Golgiho aparátu a v následných kompartmentech.

Sbalování proteinů v endoplasmatickém retikulu má celou řadu specifik. Tím základním je skutečnost, že kinetická a postranslační stabilita nově syntetizovaných

proteinů je přímo závislá na podmínkách chemického milieu v cisternách ER, které se od cytosolu odlišuje nejen svým pH ale také koncentrací Ca^{2+} iontů. Je zřejmé, že zatímco nově syntetizované solubilní proteiny jsou sbalovány ve vnitřním prostředí endoplasmatického retikula, tak transmembránové proteiny musí být sbalovány, v závislosti na orientaci svých domén, částečně v lumen ER, v rámci limitující ER membrány, a konečně i v cytosolu, tedy prostředích biochemicky značně rozdílných.

Přestože může sbalení nascentních proteinů proběhnout autokatalyticky (*viz. výše*), je endoplasmatické retikulum organelou s významnou přítomností residentních chaperonových systémů, které zásadně přispívají ke sbalování syntetizovaných proteinů. Podobně jako v případě cytosolických chaperonových systémů, i chaperonové dráhy v endoplasmatickém retikulu začínají s nově syntetizovanými proteiny interagovat již v okamžiku vstupu N- konce syntetizovaného proteinu do cisteren ER. Osud proteinů v endoplasmatickém retikulu je přímo závislý na kvalitě jejich sbalení. Pokud proběhne sbalení v pořádku, proteiny opouští ER přes pre-Golgi strukturální intermediáty do Golgiho aparátu, v opačném případě mohou být po exportu z ER do cytosolu degradovány cytosolickým ubiquitin-proteasomovým systémem (UPS) (*viz. níže*).

Sbalování proteinů je proces, při kterém dochází k postupnému snižování volné energie molekul, a jako takový může zahrnovat přechodné energetické bariery. Jednou z funkcí chaperonů je snižovat tyto bariery a napomáhat tak správnému sbalení proteinů. Ze své povahy je sbalování proteinů proces víceetapový a může v určitých situacích probíhat v opakujících se cyklech pokusů o dosažení výhodné konformace a kontrol kvality této konformace (Alb [6-82](#)). Detailní popis individuálních chaperonových drah v endoplasmatickém retikulu (dodnes je popsáno přes 30 různých ER residentních chaperonů či jiných faktorů sbalování) přesahuje rozsah tohoto textu. Pro pouhou ukázkou by bylo vhodné zmínit cyklický systém ER chaperonové dráhy využívající calnexin/calreticulin, který funguje v přímé součinnosti s iniciální N-glykosylací syntetizovaných proteinů v ER (Alb [12-54](#), Alb [12-51](#)).

Po dosažení vyhovující konformace a kontrole kvality této konformace putují proteiny z ER do Golgiho aparátu, kde může probíhat jejich další posttranslační modifikace. Výstupní místa z endoplasmatického retikula pro správně sbalené proteiny do pre-Golgi membránových intermediátů jsou funkčně spojena s COPII coatomerními proteiny (*viz. výše*).

[Zpět](#) na obsah

3.1.1.3 Degradace proteinů asociovaná s endoplasmatickým retikulem - ER associated degradation (ERAD)

Přestože není známo jaká je celková chybovost a přesná efektivita translace, lze se domnívat, že přibližně 30% proteinů není správně syntetizováno. Podobně i ERAF (*viz. výše*) není bezchybný a významná část nově syntetizovaných proteinů nedosáhne v ER, z různých důvodů, správné konformace. Z důvodu prevence vzniku a eliminace těchto aberantních konformačních forem (konformerů) existuje v endoplasmatickém

retikulu sofistikovaný systém zajišťující, jak kontrolu kvality sbalených proteinů tak i jejich efektivní degradaci (ER associated degradation - ERAD). Rozdělení ERAF a ERAD chaperonových systémů je z pohledu dynamiky sbalování proteinů irelevantní, jelikož tyto systémy představují vzájemně regulovaný a propojený systém.

Energeticky nestabilní konformační proteinové formy (misfolded proteiny) jsou rozpoznány a exportovány do cytosolu s využitím ER membránového translokátoru (Sec61 komplex). V cytosolu jsou tyto aberantní formy monohočetně kovalentně označeny molekulami ubiquitinu (polypeptid konjugovatelný s jinými proteiny a mající signální funkce). Polyubiquitinované proteiny jsou následně degradovány v cytosolickém protein degradačním komplexu - proteasomu (Alb [12-55](#), [6-86](#)).

Pro dokreslení komplexity možností zpracování proteinů v ER, byl vedle transmembránového proteinového translokátoru tvořeného Sec61 komplexem a ER výstupních míst asociovaných s COPII proteiny v nedávné době popsán vezikulární systém transportu špatně sbalených proteinů z ER do proteasomu. Tyto transportní váčky obsahují molekulu zvanou EDEM (endoplasmic reticulum degradation-enhancing α -mannosidase like).

Degradativní část proteostatické sítě udržující rovnováhu správných a nevhodných konformerů zahrnuje vedle UPS (ubiquitin-proteasomový systém) ještě konstitutivně (stále) probíhající makroautofagii (*viz. níže*) aberantně sbalených proteinů. V nedávné době bylo definováno molekulární propojení těchto dvou systémů (UPS a makroautofagie). Detailní popis těchto molekulárních vazeb však přesahuje rozsah tohoto textu.

Přes vysoce efektivní systémy kontroly kvality a degradace proteinů v endoplasmatickém retikulu může, za určitých okolností, celkové množství špatně sbalených proteinů přesáhnout kapacitu ERAD systému. V takové situaci může dojít k indukci evolučně konzervované exekutivní dráhy zvané "unfolded protein response (UPR)" (odpověď z přebytku špatně sbalených proteinů - Alb [12-56](#)), která, ve své extrémní variantě, může vyústit až v programovanou buněčnou smrt (apoptozu).

Proteostatická síť představuje komplexní systém regulačních drah, který lze vnímat z různých úhlů pohledu (biologický, proteinově biochemický nebo fyzikální).

Základní koncept nastíněný již v úvodu k tomuto textu: "proteiny musí být správně sbaleny jinak představují pro buňku nebezpečí", je klíčem k pochopení patogenetických kaskád v celé řadě lidských onemocnění, jejichž společným jmenovatelem je špatné sbalování proteinů (protein folding diseases) (Alb [6-85](#), [6-89](#)).

Příčinou těchto onemocnění mohou být patogenní variace (mutace), které přímo vedou k syntéze nesbalitelných nebo špatně sbalitelných proteinů, které jsou pak preferenčně degradovány ERAD systémem. Jiný typ mutací může vést k agregovaným proteinovým konformačním variantám, které svým množstvím či biofyzikálními parametry přesahují kapacitu ERAD systému. Dále mohou být primárně kompromitovány samotné dráhy proteostatické sítě (ERAD, ERAF, UPS nebo makroautofagie). Nejčastěji se však jedná o relativní insuficienci ERAD systému (např. danou věkem), které vede k nízké intenzivnímu, ale dlouhodobému toxickému efektu aberantně sbalených proteinových konformerů.

Proteinové dráhy proteostatické sítě se v nedávné době staly slibným cílem farmakologického výzkumu a vývoje látek určených k léčbě onemocnění ze špatného sbalování proteinů. Lze očekávat, že se v blízké době objeví celá řada nových preparátů modulujících buněčnou proteostázu skrze řízenou inhibici degradace nebo naopak snížení efektů toxických konformerů.

Pro další detaily týkající se tematiky proteostázy, sbalování proteinů, patologie sbalování proteinů a perspektiv léčby těchto stavů doporučujeme následující vynikající souhrné přehledy - [Aridor, 2007](#) a [Roth et al., 2008](#).

[Zpět](#) na obsah

3.2 Golgiho aparát (Golgiho komplex)

Golgiho aparát je dalším (po ER následujícím) kompartmentem časné sekretorické dráhy (ESP) na cestě proteinů určených do extracelulárního prostoru, začlenění do cytoplasmatické membrány nebo k funkci v lysosomálně/endosomálním kompartmentu.

Golgiho aparát může být charakterizován jako systém uzavřených plochých membránových cisteren, které nejsou kontinuálně komunikujícím prostorem, jako je tomu v případě endoplasmatického retikula. Golgiho aparát je strukturálně a funkčně polarizovaný membránový systém, který má svou vstupní cisternu (*cis*-Golgi) a cisternu výstupní (*trans*-Golgi), mezi těmito dvěma ohraničujícími cisternami se nacházejí cisterny mediální. Golgiho aparát není statická struktura. V tomto membránovém systému dochází k relativně rychlým strukturálním změnám v souvislosti s funkční potřebou zpracování proteinů předávaných z endoplasmatického retikula. Golgiho aparát si nelze představovat jako systém symetricky uspořádaných cisteren, bez nějaké větší strukturální komplexity. Naopak, v souvislosti s rozvojem 3D rekonstrukčních algoritmů sériových elektron mikroskopických řezů se v poslední době objevila celá řada prací, demonstrujících přímé mezicisternové komunikace, částečné cisternové fúze, a dokonce i transcisternální tubulární zkratky.

cis-Golgi komunikuje prostřednictvím tubulovesikulárních transportních intermeditů (pre-Golgi intermediáty) s COPII opláštěnými výstupními místy endoplasmatického retikula (viz. výše, Alb [13-21](#)). Pouze proteiny jejichž konformace (správné sbalení) vyhovělo kritériím systémů ERAF a ERAD vstupují do Golgiho aparátu. Transport mezi Golgiho aparátem a endoplasmatickým retikulem je obousměrný - nemalé množství ER residentních (luminálních i membránových) proteinů je recyklováno zpět do ER z Golgiho aparátu v COPII opláštěných váčcích na podkladě přítomnosti ER retenčních signálních sekvencí. Tyto sekvence splňují obecná kritéria jiných signálních sekvencí.

Tok membrán mezi ER a Golgiho aparátem a následnými kompartmenty sekretorické dráhy (viz. níže) je v celkovém buněčném dynamickém equilibriu společně s ději v cytoplasmatické membráně.

Podobně jako v endosomálním systému (*viz. níže*), také Golgiho aparát udržuje mírný sestupný pH gradient směřující od *cis*- do *trans*-Golgi.

[Zpět](#) na obsah

3.2.1 Posttranslační modifikace v Golgiho aparátu

Hlavní funkcí Golgiho aparátu jsou, v rámci ESP, postranslační glykosylační modifikace proteinů. Iniciální N-glykosylace nově syntetizovaných proteinů na asparaginových zbytcích probíhá již v endoplasmatickém retikulu (*viz. výše*, Alb [12-51](#)), kde také slouží potřebám některých ERAF/ERAD chaperonových cest. Oligosacharidové zbytky navázané na molekuly proteinů v endoplasmatickém retikulu jsou v Golgiho aparátu modifikovány buď do formy komplexních nebo na manosu bohatých oligosacharidů (Alb [13-25](#), *viz. níže v části endosomální/lysosomální systém*). Glykosylace proteinů probíhá sekvenčně na podkladě sukcesivní enzymatické aktivity odštěpujících glukosidas nebo navazováním dalších cukerných zbytků prostřednictvím glukosyltransferas. Výsledná frakce oligosacharidů v celkové molekulové hmotnosti takto vzniklých glykoproteinů může být enormní. Vedle N-glykosylace přes asparaginové zbytky v proteinech, dochází v Golgiho aparátu k O-glykosylaci přes -OH skupiny serinů a threoninů (typicky u glykoproteinů proteoglykanového typu).

Sekvenční povahy glykosylačních enzymatických kroků je v rámci Golgiho aparátu dosaženo vnitřní funkční stratifikací cisteren. Postupné enzymatické modifikace substrátových proteinů probíhají v systému izolovaných cisteren se specifickou enzymatickou výbavou směrem od *cis*- do *trans*-Golgi cisteren (Alb [13-26](#), Alb [13-29](#)). Dlouhodobě existují dva dynamické modely fungování systému cisteren Golgiho aparátu (Alb [13-30](#)): **vezikulární transportní model** (cisterny Golgiho aparátu obsahují stabilní enzymovou výbavu a substrátové proteiny jsou mezi nimi přenášeny vezikulárním transportem) a **model zrajících (maturujících) cisteren** (proteinový náklad vstoupí formou substrátové vlny do Golgiho aparátu a ve stále stejné cisterně, která proměňuje (zraje) svou enzymatickou výbavu postupuje od *cis*- k *trans*-Golgi). Výsledky studií prováděných na živých buňkách a technikami vysoce rozlišující mikroskopie (jak světelné tak elektronové) preferují v dnešní době druhý model - model zrajících cisteren.

Pro shrnutí, Golgiho aparát je dynamický membránový systém postupně zrajících cisteren, který zajišťuje glykosylační modifikace proteinů syntetizovaných a sbalovaných v endoplasmatickém retikulu. Postup a zrání cisteren Golgiho aparátu, probíhá souběžně se strukturálními změnami celého systému v odpovědi na vstup proteinů z endoplasmatického retikula.

Rozsah a forma glykosylace může být značná a i přes absenci jednoznačného kódu (jako třeba nukleová kyselina) je opakovaně identicky vystavována z různých monosacharidových zbytků u jednoho typu proteinu. Glykosylace proteinů sehrává významné úlohy ve finálním sbalení proteinů a výrazně přispívá k fyzikálně-chemickým vlastnostem glykoproteinů. Glykosylační modifikace oligosacharidovými zbytky se podílí na protein-proteinových interakcích a antigenních vlastnostech. Pro

další detaily významu glykosylace v těchto procesech viz. kurzy *Biochemie a Imunologie*.

Glykosylace je druhově specifická, což může mít významné konsekvence například v biotechnologické farmakoprodukcí. Rekombinantní proteiny, byť s lidskou primární aminokyselinovou sekvencí, získávají glykosylační charakteristiky živočišných druhů, v nichž nebo v jejichž buněčných kulturách byly produkovány.

[Zpět](#) na obsah

4 Post-Golgi sekretorická dráha - Exocytosa (Alb [12-6](#))

Exocytosa představuje kontinuální a dynamický transport biologického materiálu (nejen proteinů) do extracelulárního prostoru resp. cytoplasmatické membrány. Podobně jako v případě endocytozy (viz. *níže*), je i exocytoza vlastnost každé buňky v lidském těle (v širším smyslu, každé eukaryotické buňky). Míra obou těchto procesů (exocytosy a endocytosy) stejně jako dalších membránových výměn musí setrvat v dynamické rovnováze, tak aby byla zachována konstatní velikost buněčného povrchu a buněčného objemu.

Solubilní proteiny, které prošly časnou sekretorickou drahou a byly posttranslačně modifikovány v Golgiho aparátu, jsou cíleny do nascentních sekretorických granulí v blízkosti výstupních (*trans*-) cisten Golgiho aparátu. Limitující membrána těchto granulí může vedle integrálních membránových proteinů obsahovat také proteiny s membránami asociované (viz. *výše*). Tyto hydrofobní proteinové molekuly jsou určeny buď pro začlenění do cytoplasmatické membrány nebo slouží jako molekulární identifikátory sekrečních granulí (viz. *výše*).

Sekreční granula procházejí složitým procesem zrání, před tím než dojde k uvolnění jejich obsahu do extracelulárního prostoru (Alb [13-56](#)). Zrání granulí může zahrnovat recyklaci některých proteinů na jejich pláštích zpět do donorového kompartmentu (tzn. *trans*-Golgi) nebo další postranslační modifikace lumenálních nákladových molekul (např. proteolytické štěpení nebo kondenzaci obsahu granulí). Topologie míst aktivní exocytosy může korelovat s funkční polarizací buněčných povrchů (jako např. u polarizovaných epitelů nebo neuronů) (Alb [13-61](#)); exocytoza tedy může být polarizovaný proces (Alb [13-62](#), [13-64](#)).

Exocytoza (obecně buněčná sekrece) je funkčně klasifikována na dva základní typy: *konstitutivní* (neregulovaná, permanentní) a *regulovaná* (Alb [13-54](#), [13-55](#)). Uvolnění sekrečních granulí přes cytoplasmatickou membránu probíhá podle obecných konceptů vezikulárního transportu (ukotvení/svázání, membránová fúze a uvolnění obsahu nebo inserce membránových proteinů do cytoplasmatické membrány) (Alb [13-57](#)).

Proces *konstitutivní* (*neregulované*) sekrece je obecná vlastnost všech eukaryotických buněk. Velikost transportních váčků je v případě tohoto typu exocytozy malá a tyto struktury jsou rozlišitelné na úrovni elektronového mikroskopu. Jako příklad tohoto typu exocytozy, lze uvést např. konstitutivní uvolňování plasmatických proteinů

hepatocyty; imunoglobulinů (protilátek) plasmatickými buňkami; proteinů extracelulární matrix fibroblasty, osteoblasty a chondrocyty. Podobně i lysosomální proteiny mohou být uvolňovány osteoklasty nebo dalšími buněčnými typy s příslušností k monocytárně/makrofágové řadě (images [B_cell](#), [mucin_hepatocyte_fibroblast](#)).

Regulovaná sekrece (např. endokrinní či exokrinní) odpovídá procesu, při kterém jsou preformovaná granula udržována v cytoplasmě a jsou uvolněna po specifickém stimulu (nervovém, chemickém nebo endokrinním). Klasická sekretorická granula (např. různá exokrinní a endokrinní granula; cytotoxická granula T lymfocytů; granula heparinocytů, granulocytů nebo destiček) jsou dobře rozpoznatelná světelnou mikroskopií (images [Ag granules](#), [zymogenic granules](#)).

[Zpět](#) na obsah

5 Endosomálně/lysosomální systém

Endosomálně/lysosomální systém (ELS) je úzce asociován s obecnými principy vezikulárního transportu a funkčně pak s časnou sekretorickou drahou (*viz. níže*). ELS je spolu se systémem ubiquitin proteasomovým (UPS) jedním z hlavních degradačních buněčných center. Celý ELS je velmi dynamický a skládá se z membránových kompartmentů a membránových váček, které se účastní vektoriálního a regulovaného transportu molekul. Navíc je celý ELS značně objemově indukovatelný. Funkční a prostorové uspořádání ELS je velmi komplexní. Snahy o statickou popisnou stratifikaci endosomálně/lysosomálního systému, který je ze své biologické podstaty enormně proměnlivý svou mnohosměrností transportu nákladů a vlastních biologických membrán, mohou vést k nechtěným a problematickým zjednodušením a obsahovým zkratkám. Obecný koncept rozděluje ELS na definované vezikulární populace (časné, recyklující a pozdní endosomy a lysosomy, *viz. níže*) by měl vždy být přijímán se znalostí reálné dynamiky a proměnlivosti celého tohoto membránového systému. Těsné funkční a prostorové propojení pozdně endosomálního kompartmentu (manosa-6-fosfát (M-6-P) pozitivní) a lysosomů (M-6-P negativní) vedlo k zavedení, často používaného, pojmu - pozdní endosom(y)/lysosom(y) (late endosomes/lysosomes).

V lysosomech (image [lysosomes_3D](#)) probíhá kontrolovaná intracelulární digesce (degradace) makromolekul různé biologické povahy. Lysosomy obsahují přibližně 60-100 lumenálních hydrolytických enzymů (hydrolas) o různé substrátové specifitě (proteasy, nukleasy, glykosidasy, lipasy, fosfolipasy, fosfatasy a sulfatasy). Kyselé pH optimum většiny těchto hydrolytických enzymů je v lumen lysosomů zajišťováno tzv. vakuolární H⁺-ATPasou a chloridovým proteinovým kanálem v limitující membráně lysosomů (Alb [13-31](#)). Lysosomální membránový proteom vedle těchto dvou proteinů obsahuje ještě dalších 130-150 jiných proteinů. Mezi těmito proteiny převažují vysoce glykosylované lysosomálně asociované membránové proteiny (LAMP) a lysosomální integrální membránové proteiny (LIMP). Vysoký stupeň jejich glykosylace s významným podílem obtížně degradovatelných polyaktosaminů může sloužit, mimo jiné, jako protektivní bariera chránící lysosomální membránu před agresivními lumenálními hydrolasami. Pro shrnutí, celkový lysosomální proteom je tvořen

luminálními hydrolasami (60-100) a lysosomálními membránovými proteiny (130-150).

Jak již bylo uvedeno, ELS je kontinuálně strukturálně remodelující se kompartment s rozsáhlými kontakty v buňce. Koordinace prostorového intracelulárního toku luminálního a membránového materiálu je nesmírná a v řadě aspektů stále nedostatečně prostudovaná. ELS významným způsobem spoluzajišťuje prostřednictvím redistribuce a recyklace biologického materiálu základní buněčnou homeostázu. Velká část interakcí v rámci ELS může zahrnovat kontakty složitějších fázových rozhraní (hydrofilní-hydrofobní nebo hydrofobní-hydrofobní) anebo interakce protein-proteinové a protein-membránové.

Biologie ELS bude v rámci tohoto textu vysvětlena na podkladě jeho biogeneze - tzn. koordinovaného importu substrátů a strukturálních komponent (proteinů) zajišťujících jeho strukturálně funkční integritu.

[Zpět](#) na obsah

5.1 Import substrátů do ELS

Existují tři základní cesty importu substrátů do pozdních endosomů/lysosomů - endocytosa, autofagie a fagocytosa (Alb [13-35](#)). Míra využití těchto tří základních cest může být různá v různých buněčných typech.

[Zpět](#) na obsah

5.1.1 Endocytosa

Endocytosa je obecný termín používaný pro popis procesu internalizace extracelulární tekutiny nebo jiného extracelulárního materiálu invaginací cytoplasmatické membrány. Endocytosa dále zahrnuje následné intracelulární třídění, distribuci a recyklaci tohoto materiálu. Podobně jako v případě exocytosy i *konstitutivní* endocytosa je vlastností každé eukaryotické buňky. Stejně tak *regulovaná* (ve zvláštních případech receptory zprostředkovaná endocytosa) může být vlastností specifických buněčných typů. Molekulární mechanismy endocytosy sledují obecné koncepty vezikulárního transportu (*viz. výše*, Alb [13-41](#)): membránová invaginace plášťovými proteiny nebo reorganizací lipidů v biologických membránách, uvolnění transportních váčků, recyklace molekul plášťových proteinů nebo receptorů, vektoriální transport k akceptorovému kompartmentu a fúze s ním (Alb [13-46](#)). Endocytický proces je charakterizován dvěma základními předpoklady - molekulárním tříděním v definovaných úrovních endosomální dráhy (časné a pozdní endosomy) a progresivním poklesem intraluminálního pH od časných endosomů k lysosomům (Alb [13-49](#), [13-50](#)).

Endocytované molekuly jsou z extracelulárního prostoru invaginací membrány transportovány v drobných opláštěných váčcích do časných endosomů (intraluminální

pH 6.0-6.2). Endocytované komplexy ligand-receptor při tomto pH disociují a receptory jsou recyklovány zpět k inserci do cytoplasmatické membrány v recyklujících endosomech. Z časných endosomů substráty postupují dále do pozdních endosomů, kde se stýkají s lysosomálními proteiny (membránovými i lumenálními), aby vytvořily jeden kompartment - pozdní endosomy/lysosomy. Lysosomy pak vznikají "maturací" (pozor! jde o dynamický přechod bez jednoznačného morfologického rozhraní) provázenou dalším poklesem lumenálního pH. (4.5-5.0). Kyselé pH je kritické pro optimální enzymatickou funkci lysosomálních lumenálních hydrolas (viz. výše).

Celková organizace endosomální dráhy je založena na principu transientních membránových interakcí a třídících a recyklačních úrovní. Podobně jako v případě Golgiho aparátu není jednoznačně dořešeno, zda se jedná o postupně zrající membránové kompartmenty či zda dochází pouze k přesunu substrátů.

Současný stav poznání na poli endocytosy akceptuje dynamický a proměnlivý model charakterizovatelný neustálým pohybem substrátů i strukturálních komponent. Statická prezentace endocytosy může být sice didaktickým ulehčením, realita je však pohyblivá. Pro bližší přiblížení složitosti endocytárního systému lze doporučit shrnutí [Johannes and Lamaze, 2002](#) nebo [Ungewickell and Hinrichsen, 2007](#). V tomto textu nezmíněné úlohy signálních modifikací endocytovaných receptorů či proteinů pomocí ubiquitinových polypeptidů (jiné než role v UPS) jsou shrnuty v přehledu [Mukhopadhyay and Riezman, 2007](#).

[Zpět](#) na obsah

5.1.1.1 Transcytosa

Transcytosa je variantou endocytosy, kterou lze definovat jako vezikulární transport endocytovaného materiálu mezi opačnými póly buňky bez výraznějších modifikací transportovaného materiálu (Alb [13-51](#)). Jedná se tedy o přenos biologického nákladu polarizovanými buňkami mezi různými extracelulárními prostory

Endoteliální buňky a buňky syncytiotrofoblastu v placentě jsou buněčné typy s obrovskou mírou transcytosy. Transplacentárně se takto dostávají kromě nutrientů a typicky třeba imunoglobulinů k plodu i některé typy farmak, ale i infekční agens (např. některé viry). Pro detailní přehled viz. [Fuchs and Ellinger, 2004](#).

[Zpět](#) na obsah

5.1.2 Autofagie

Autofagie je proces vlastní všem buněčným typům lidského těla. Jedná se složitý systém signálních a exekutivních drah, který buňce dovoluje efektivní eliminaci jejího vlastního obsahu (proteinů, biologických membrán, organel). Autofagie probíhá jako konstitutivní (kontinuální) proces s malou intenzitou nebo jako indukovatelný mechanismus spouštěný stresovými podmínkami (např. buněčným hladověním). V

současnosti jsou rozlišovány tři základní molekulární varianty autofagie: **makroautofagicko lysosomální systém** (MALS - macroautophagy/lysosomal system), **mikroautofagie** a **chaperony zprostředkovaná autofagie** (CMA - chaperone - mediated autophagy).

Makroautofagie (MALS) označuje proces, při kterém jsou poškozené organely nebo úseky cytoplasmy ohraničeny autofagosomální membránou. Přesný původ této autofagosomální membrány (*de novo* syntéza vs. derivát preexistujících membrán jako třeba cisterna hladkého endoplasmatického retikula) není stále zcela jasný. Nicméně proteom autofagosomální membrány byl v savčích buňkách definován. Autofagosomy se spojují s pozdními endosomy (*viz. výše*) aby vytvořili hybridní organelu autofagolysosom, ve které je zahájena degradace obsahu autofagosomu lysosomálními hydrolasami. Produkty hydrolýzy jsou recyklovány kombinací pasivní difuze a specifického transmembránového transportu a mohou tak být znovu buňkou využity.

Mikroautofagie je na rozdíl od MALS molekulární mechanismus, při kterém lysosomální membrána přímo obklopí část cytoplasmy nebo malé organely jakou jsou například peroxisomy (pexofagie, *viz. níže*)

Chaperony zprostředkovaná autofagie (CMA) je selektivní formou intralysosomální degradace specifické skupiny buněčných proteinů obsahujících KFERQ motivy v primárních amino kyselinových sekvencích. Molekulární cytosolické a lysosomální chaperony (hsc70 and ly-hsc70) váží proteiny určené k degradaci a s využitím molekuly LAMP2a v lysosomální membráně tyto proteiny translokují do lumen lysosomu k degradaci. Podobně jako MALS i CMA je aktivovatelná stresovými podmínkami jako například hladovění, oxidativní stres nebo expozice toxickým látkám.

Autofagie je evolučně konzervovaná signalizační a exekutivní buněčná dráha, která je integrální součástí sítě mechanismů proteostázy společně s UPS (*viz. výše*). Fyziologické role autofagie v degradaci proteinů nebo ontogenezi (detaily viz. [Terman et al., 2007](#)), stejně jako implikace těchto drah pro lidskou patologii včetně variantních programů buněčné smrti (detaily viz. [Bredesen, 2007](#)) jsou v posledních několika letech intenzivně studovány. Autofagie se zdá, například, být jedním z hlavních faktorů mobilizace glykogenu u novorozenců. Je velmi pravděpodobné, že v nejbližší době budou, pokud již nebyly, odhaleny další zásadní role autofagie a přidružených drah v patogenezi lidských onemocnění jako jsou nejruznější neurodegenerativní stavy nebo nádorová onemocnění (pro detaily Cuervo, [2004](#), [2006](#)).

[Zpět](#) na obsah

5.1.3 Fagocytosa

Fagocytosa je poslední z hlavních cest vstupu substrátů do ELS resp. lysosomů. Je využívána pro degradaci většího množství extracelulárního materiálu jako např. mikroorganismů anebo mrtvých buněk po jejich ingesci cytoplasmatickou

membránou (Alb [13-39](#), [13-50](#)). Takto vytvořený fagosom, podobně jako autofagosom, splývá s pozdními endosomy za tvorby fúzní organely - fagolysosomu a tím startuje proces degradace fagocytovaného materiálu. Fagocytoza je molekulární mechanismus, kterým jsou vybaveny pouze určité buněčné typy a specializované buňky; typicky se jedná o buňky imunitního systému jako jsou makrofágy, neutrofilní granulocyty nebo dendritické buňky.

Další molekulární detaily tohoto, z buněčně biologického hlediska enormně důležitého mechanismu, by měly být poskytnuty ve specializovaných kurzech (Mikrobiologie a Imunologie). Při dalším studiu vybraných imunobiologických mechanismů jako je třeba prezentace antigenů by bylo vhodné zpětně propojit tyto znalosti se základní biologii ELS.

[Zpět](#) na obsah

5.2 Transport lysosomálních proteinů do lysosomů

Lysosomální hydrolasy a lysosomální membránové proteiny jsou syntetizovány na ribosomech vázaných na cisterny RER způsobem popsáným výše. Lysosomální proteiny se v ER sbalují a opouštějí ER skrze COPII výstupní místa v opláštěných váčcích. Dále procházejí Golgiho aparátem a po výstupu z *trans*-Golgi cisterny jsou vezikulárním transportem cíleny do pozdních endosomů, kde se setkávají se substráty (viz. výše).

Většina solubilních luminálních lysosomálních hydrolas je postranlačně modifikována N-vázanými oligosacharidovými řetězci s vysokým obsahem manosy. Pro srovnání s komplexními oligosacharidy viz. Alb [13-25](#). Nejvýznamnější posttranslační modifikací solubilních lysosomálních proteinů je syntéza manoso-6-fosfátových (M-6-P) značek, která probíhá ve dvou, po sobě jdoucích enzymatických krocích. V prvním z nich jsou lysosomální enzymy fosforylovány N-acetylglukosamin-1-fosfátem na C6-hydroxylových skupinách některých manosových zbytků. Katalyzátorem této reakce je enzym UDP(uridindifosfát)-N-acetylglukosamin-1-fosfotransferasa (fosfotransferasa). V následujícím kroku je pak N-acetylglukosamin odštěpen enzymem N-acetylglukosamin-1-fosfodiester α -N-acetylglukosaminidasou (fosfoglykosidasa) (Alb [13-38](#)). Tato druhá reakce odhalí M-6-P značku, která tak může být rozpoznána M-6-P receptory v membránách výstupních částí Golgiho aparátu. Multiplikace M-6-P značek na jedné molekule lysosomálního proteinu zvyšuje afinitu pro M-6-P receptory.

M-6-P receptory váží lysosomální hydrolasy svými luminálními doménami orientovanými do *trans*-Golgi cisteren. Transportní váčky nesou tyto proteinové komplexy do pozdních endosomů, kde vlivem nižšího pH disociují a M-6-P receptory jsou recyklovány zpět do *trans*-Golgi nebo na cytoplasmatickou membránu (Alb [13-37](#)). Přítomnost M-6-P receptorů zajišťuje vychytávání "zbloudilých" lysosomálních proteinů na cytoplasmatickou membránu, což je fenomén, který se děje i za fyziologických podmínek.

Některé lysosomální hydrolasy jako cathepsin B, kyselá alfa-glukosidasa nebo lysosomální kyselá fosfatasa jsou transportovány do pozdních endosomů/lysosomů v prekurzorových formách a dochází na nich k autokatalytickým, či jinak zprostředkovaným (např. jinými residentními proteasami) proteolytickým štěpením do aktivních forem.

Vedle M-6-P receptorové cesty cílení lysosomálních proteinů existují ještě alternativní formy selektivního transportu proteinů do tohoto buněčného kompartmentu. Prosaposin, prekurzor čtyř lysosomálních saposinů (A-D), kyselá sfingomyelinasa, GM2 aktivátorový protein a cathepsiny A a H sdílejí společný intracelulární receptor sortilin pro cílení do pozdních endosomů. Beta-glukocerebrosidasa využívá lysosomální integrální membránový protein 2 (LIMP2) jako receptor pro své vlastní cílení. Kyselá fosfatasa se pak váže na receptor pro manosafosfát (M-P) a recykluje do pozdních endosomů s cytoplasmatické membrány.

Jiný mechanismus, než transport s pomocí M-6-P receptorů, využívají lysosomální membránové proteiny. Jejich vstup je zprostředkován tyrosinovými a dileucinovými motivy v jejich cytoplasmatických C-koncích. Zároveň opouštějí *trans*-Golgi v jiném typu opláštěných váčků, než jsou ty, které nesou komplexy s M-6-P receptory.

Lysosomální střádací onemocnění jsou skupinou přibližně 50ti lidských dědičných onemocnění. Jejich celková incidence se pohybuje v rozmezí 1:6-8000 novorozených dětí. Společným jmenovatelem těchto nemocí je expanse lysosomálního kompartmentu v postižených buněčných typech díky akumulaci nedegradovaných či jinak špatně zpracovaných substrátů. Důsledkem této expance je pěníta transformace cytoplasmy.

Většina těchto stavů je způsobena patogenními variacemi (mutacemi) v genech pro lysosomální hydrolasy nebo v jejich aktivátorech, nebo chybným postranlačním zpracováním lysosomálních proteinů. V těchto případech jde tedy o enzymopatie. Velká skupina lysosomálních poruch je však způsobena selektivní malfunkcí různých, pozdně endosomálních/lysosomálních membránových proteinů. Tento typ poruch lze tedy chápat jako poruchu funkce ELS systému samotného.

Pokroky v pochopení molekulární patologie lysosomálních střádacích onemocnění byly dosaženy z velké míry díky pokrokům v poznání normální biologie ELS. Vezmeme-li v úvahu fakt, že lysosomální proteom je tvořen cca. 200-250 ti proteiny, lze důvodně předpokládat že počet onemocnění spojených s lysosomální dysfunkcí (nikoliv nezbytně s lysosomálním střádáním) se ještě zvýší.

[Zpět](#) na obsah

5.3 Organely se vztahem/podobné lysosomům (*Lysosomal related organelles*)

Charakteristiky lysosomů (kyselé intraluminální pH, přítomnost kyselých hydrolas, LAMP proteiny v limitujících membránách a absence M-6-P receptorů) sdílí s klasickými lysosomy i skupina membránových organel nacházejících se jen v určitých buněčných typech. Na základě těchto svých molekulárních charakteristik se tyto organely nazývají "organely se vztahem/podobné lysosomům" (lysosomal related

organelles). LRO zahrnují melanosomy melanocytů, lytická granula T lymfocytů, denzní granula trombocytů, granula heparinocytů, azurofilní granula granulocytů a sekreční granula pneumocytů typu II. Společnou vlastností těchto granul, která je zároveň odlišuje od systému ELS (viz *shora*) je jejich schopnost exocytosy. Dále je to i skutečnost, že obsahují biologicky aktivní látky. Jejich zapojení do degradačních procesů buňky je podle všech pozorování zanedbatelné, i přes přítomnost lysosomálních enzymů.

Společná patologie LRO a lysosomů je buněčným podkladem pro choroby, jako jsou Chediak-Higashi, Heřmanský-Pudlák nebo Griscelli syndromy. Jedná se o onemocnění charakterizovaná imunodeficitem, poruchami pigmentace kůže (albinismus) a hemoragickou diatezou (krvácivostí). Prakticky všechny tyto symptomy jsou důsledkem poruch exocytosy LRO.

[Zpět](#) na obsah

6 Mitochondrie - dynamické mitochondriální síť - generátor buněčné energie (image [mitochondrial network](#))

Mitochondrie jsou membránovým buněčným kompartmentem, jehož enzymová výbava se účastní řady intermediárních metabolických drah - produkce energie (ve formě ATP) je jednou z hlavních. Přibližně 95% buněčného ATP je generováno procesem oxidativní fosforylace (OXPHOS) topicky lokalizovaného do mitochondrií (Alb [14-10](#)). Mezi další residentní mitochondriální metabolické dráhy patří citrátový cyklus, beta oxidace mastných kyselin, části cyklu močoviny a syntéza porfyrinů. Biochemické detaily těchto procesů budou přednášeny v následných kurzech Biochemie.

Mitochondrie, jako kompartment eukaryotických buněk, jsou unikátní svým endosymbiotickým původem (Alb [14-70](#)). Nicméně, i přes svůj evoluční bakteriální původ jsou mitochondrie včetně svého genomu - mitochondriální DNA (mtDNA) - ontogeneticky maternálního původu. Biogeneze mitochondrií probíhá na podkladě preexistujících mitochondrií, tzn. mitochondrie nejsou syntetizovány *de novo* (viz výše).

[Zpět](#) na obsah

6.1 Strukturální a biologické charakteristiky mitochondrií

Mitochondrie se od ostatních membránových kompartmentů zásadně odlišují dvojitým uspořádáním své limitující membrány. Výsledkem tohoto strukturálního uspořádání jsou dva distinktní mitochondriální sub-kompartmenty (*intermembránový prostor a mitochondriální matrix*) ohraničené vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Existence dvojité mitochondriální membrány vede k tvorbě různých, ale přesně definovaných mitochondriálních transmembránových gradientů (Alb [14-8](#)).

Zevní mitochondriální membrána má jednoduché uspořádání bez výraznějšího strukturování či invaginací. Komunikace s vnitřní mitochondriální membránou je zajištěna velkým množstvím kontaktních míst. Některé z proteinů integrálně zabudovaných do zevní mitochondriální membrány slouží jako transmembránové translokátory jaderně kódovaných mitochondriálních proteinů, které jsou syntetizovány na cytoplasmatických ribosomech.

Vnitřní mitochondriální membrána má, na rozdíl od zevní mitochondriální membrány, velmi komplexní uspořádání. Vytváří větší množství invaginací a různě tvarovaných, většinou plochých, otevřených cisteren či krist. Vnitřní mitochondriální membrána ohraničuje mitochondriální matrix, do které je lokalizováno větší množství metabolických cest. Ve vnitřní mitochondriální membráně jsou, vedle jiných proteinů a proteinových komplexů, lokalizovány vícepodjednotkové transmembránové proteinové komplexy systému oxidativní fosforylace (OXPHOS - 4 komplexy dýchacího řetězce a komplex ATP syntasy (ATPasa) (Alb [14-15](#)). Již tak velice složité proteinové komplexy OXPHOS systému se dále organizují do proteinových superkomplexů nazývaných *respirasomy*.

Mitochondrie obsahují vlastní semiautonomní genom (mitochondriální DNA - mtDNA), který je maternálního původu a je tvořený cirkulární molekulou DNA. Jedna mitochondrie v průměru obsahuje 10-20 individuálních molekul mtDNA, které jsou organizovány do nukleoproteinových komplexů (*nukleoidů*). Předpokládá se, že jeden nukleoid mtDNA obsahuje asi 6 molekul mtDNA. Nukleoproteinové komplexy nukleoidů jsou koordinovaně kotveny k vnitřní mitochondriální membráně, ale zřejmě, jak bylo ukázáno ve studiích na kvasinkách, také k vnější mitochondriální membráně. Vedle tohoto ukotvení nukleoidů k mitochondriálním membránám byla navržena i možnost transmembránové interakce nukleoidů s cytosolárními aktinovými filamenti cytoskeletu. Distribuce mtDNA (mtDNA nukleoidů) v rámci mitochondriální sítě (*viz níže*) je nerovnoměrná. Výsledkem této nerovnoměrnosti mohou být okrsky mitochondriální sítě s relativní akumulací a densitou mtDNA, stejně tak lze nalézt úseky chudé na mtDNA. Pro shrnutí, celkový počet molekul mtDNA v jedné buňce (pozor! variabilní s buněčným typem) je ~10-20 000 (~1000 mitochondrií v buňce, ~10-20 molekul mtDNA v mitochondrii).

Mitochondriální DNA kóduje 13 podjednotek různých komplexů OXPHOS systému, dále pak 12S rRNA, 16S rRNA a 22tRNA. Z hlediska prostého charakteru genů v mtDNA lze konstatovat, že mitochondrie jsou schopny vnitřní transkripce a translace. Nicméně je jasné, že naprostá většina mitochondriálních proteinů (recentní odhad je ~1500 predikovaných, z toho ~900-1000 potvrzených) je kódováno jadernou gDNA a musí být po syntéze v cytosolu importováno do cytosolu (*viz. níže*, Alb [14-51,14-64](#)).

Rozdíly v základní genetice jaderné a mitochondriální DNA jsou zásadní. Jaderný genom je diploidní (polovina paternální/polovina maternální), transientně (v S-fázi) se stává tetraploidním, aby se následně po mitóze znovu stal diploidním v dceřiných buňkách. Jakákoliv odchylka v množství DNA či počtu chromosomů (aneuploidie) může mít poměrně zásadní patogenetické konsekvence. Na rozdíl od toho, mitochondriální DNA je maternálního původu (teoretický příspěvek paternální mtDNA je buď efektivně eliminován nebo masivně "naředěn" v maternální cytoplasmě zygoty). Počet molekul mtDNA v jedné buňce je vysoký (*viz. výše*), tzn. eukaryotické buňky jsou polyploidní pro mtDNA. Navíc může být množství mtDNA

v buňce fyziologicky variabilní v průběhu buněčného cyklu anebo v souvislosti s degradací mitochondrií (*viz. níže*). Jaderná gDNA je synchronně replikována v S-fázi buněčného cyklu. Molekuly mtDNA jsou replikovány asynchronně a distribuce do dceřiných buněk v průběhu cytokinese je přímo vázaná na dynamiku dělení mitochondriální sítě a lokální distribuci mtDNA v rámci této sítě (*viz. níže*). Doposud zůstává otevřená otázka synchronizace cyklu gDNA a mtDNA. To, že vzájemná provázanost těchto dvou procesů existuje, lze očekávat hlavně na základě poznatku, že dceřiné buňky získávají přibližně stejné celkové množství mitochondriální masy a mtDNA jako měla buňka rodičovská.

[Zpět](#) na obsah

6.2 Obrat mitochondrií (mitochondriálních sítí) - biogeneze vs. degradace

Jak bylo uvedeno dříve, jaderně kódované mitochondriální proteiny (většina) jsou syntetizovány na volných cytosolických ribosomech nebo polyribosomech. Podobně jako jiné proteiny jsou i mitochondriální proteiny v obecném smyslu slova buď membránové nebo solubilní (hydrofilní) a musí být sbaleny a specificky cíleny do příslušných mitochondriálních subkompartmentů - *intermembránový prostor a mitochondriální matrix* nebo do zevní či vnitřní mitochondriální membrány. Signální sekvence zajišťují specifickou vazbu mitochondriálních proteinů receptory/transmembránové translokátory v zevní a následně též vnitřní mitochondriální membráně. Před importem do mitochondrií jsou proteiny iniciálně sbaleny cytosolickými chaperonovými systémy, průchod membránovým translokátorem pak probíhá v nesbalené formě. Sbalení v místě finální funkce včetně assemblace komplexů, pak probíhá intramitochondriálně. Transmembránová translokace mitochondriálních proteinů se děje pomocí cytosolických a mitochondriálních proteinů typu heat shock (obecné označení pro chaperony indukované původně teplotním stresem) 70 (c/mtHS70), TOM (outer membrane), TIM (inner membrane) a OXA translokátorů (Alb [12-24](#), [12-25](#), [12-26](#)). Tyto a celá řada dalších proteinů zajišťují správné cílení individuálních proteinů v mitochondriích. Je třeba znovu zdůraznit, že většina mitochondriálních proteinů funguje jako vícepodjednotkové superkomplexy, které vyžadují kromě správného cílení také bezchybnou a efektivní lokální assemblaci (*viz. výše v obecných částech o sbalování proteinů*). Podobně jako v případě intramitochondriálních chaperonových systémů, tak i v případě degradace mitochondriálních proteinů je tento kompartment z velké části proteostaticky autonomní.

Mitochondrie nemohou být (v souladu se stavem poznání) syntetizovány *de novo*, ale vznikají na podkladě stávajícího strukturálního substrátu existujících mitochondrií. Mitochondriální dělení probíhá po té, co mateřská mitochondrie získá odpovídající velikost. Zdá se být pravděpodobné, že tento proces "zdvojování" je odlišný od remodelace mitochondriální sítě procesem štěpení (fission, *viz. níže*).

Za určitých nefyziologických situací může docházet k enormnímu zvětšení masy mitochondriální sítě; takto postižené buňky mohou pak mít cytoplasmu doslova přeplněnou mitochondriemi (tzv. onkocytární transformace, image

[oncocytes cirrhosis](#)). Tento typ buněčné patologie je popisován u některých primárních mitochondriálních onemocnění (*viz. níže*) (image [MELAS muscle](#)) a v některých typech nádorů (*onkocytární karcinomy*).

Degradace mitochondrií (jednotlivě nebo v rámci úseků mitochondriální sítě) probíhá procesem makroautofagie v lysosomech (MALS, *viz. výše*).

Bylo by zjednodušením omezovat výklad mitochondriálních funkcí v buňce na metabolické role. Z důvodu nutné redukce na tomto místě pouze zmíníme zásadní exekutivní role mitochondrií v klasické kaspasami zprostředkované apoptoze (mimo jiné uvolněním cytochromu C do cytosolu).

[Zpět](#) na obsah

6.3 Mitochondrie jsou strukturálně a organizačně velmi dynamický systém

Mitochondrie v buňkách fungují jako komplexní a dynamická trojrozměrná síť, které je permanentně remodelovaná procesy štěpení (fission) a fúzí (fusion) (Alb [14-53](#), [14-54](#)). Celkový poměr těchto dvou typů přestavby mitochondriální sítě zůstává v dynamické rovnováze, jinak by vznikala buď fragmentovaná nebo naopak síť tvořená extensivně elongovanými mitochondriemi. Molekulární podstata a počet proteinů participujících na těchto složitých přestavbách a dynamice mitochondriální sítě je velký a přesahuje rozsah a účel tohoto textu. Důležité je, že dynamická a kontinuální remodelace mitochondriální sítě je naprosto zásadní pro celou řadu základních biologických procesů jako je apoptóza, cytokineze, nebo udržování buněčné polarity. V dnešní době již byla celá řada lidských onemocnění molekulárně asociována s poruchami dynamiky mitochondriálních sítí.

Je zajímavé, že nedávno byla popsána strukturální interakce mitochondrií a peroxisomů (*viz. níže*) a dokonce i lidská onemocnění způsobená defekty v této, dříve opomíjené biologické dráze.

Mitochondriální genom je maternálního původu, proto jsou také znaky kódované tímto genomem, a to včetně patologických, děděny maternálně a nikoliv Mendelovsky (pro geny kódované jadernou gDNA). Patogenní variace (mutace) v mitochondriální DNA mohou být jak zděděny (germinální), tak mohou vzniknout v průběhu prenatálního nebo postnatálního života (somatické mutace). I z důvodu relativně "agresivního" intramitochondriálního prostředí (vysoký obsah reaktivních forem kyslíku) je kumulativní množství mutací v mtDNA vyšší než v gDNA. Dalším významným faktorem je i rudimentární mitochondriální DNA opravný aparát, ve srovnání s buněčným jádrem (gDNA).

Integrita mitochondriálního genomu je přímo závislá na mitochondriální proteinové výbavě kódované gDNA (souhrn mtDNA kódovaných proteinů *viz. výše*). Patologické stavy spojené s globální deplecí mtDNA a výsledné deficity odpovídajících mitochondriálních proteinů jsou způsobeny mutacemi v jaderných genech kódujících proteinové regulátory obratu a kontroly kvality mtDNA. Jaderný genom, jak vyplývá

z výše uvedeného, například kóduje převažující většinu proteinů dýchacího řetězce a asemblačních faktorů (Alb [14-64](#)).

Na pozadí prezentovaných konceptů mitochondriální biologie a dědičnosti lze definovat dva typy dědičných mitochondriálních onemocnění.

Jedna skupina těchto stavů je způsobena mutacemi v jaderně kódovaných mitochondriálních proteinech - tato onemocnění jsou děděna Mendelovsky. Druhá skupina onemocnění je způsobena mutacemi v genech kódovaných mtDNA (13 podjednotek různých komplexů OXPHOS systému, dále pak 12S rRNA, 16S rRNA a 22 typů tRNA molekul). Ve srovnání s mutacemi v jaderném genomu, mají mutace v mtDNA genech prahový efekt z podstaty buněčné polyploidity mtDNA (frakce mtDNA molekul mutována/frakce molekul mtDNA nemutována v jedné buňce). Distribuce mutovaných a nemutovaných mtDNA molekul do buněk a následně tkání od prvního dělení oplozeného oocyty (zygoty) do plně vyvinutého organismu je zřejmě přímo závislá na distribuci mitochondriálních sítí, v po sobě jdoucích cytokonezích dceřiných buněk. Regulace a zákonitosti distribuce mtDNA (mutované vs. nemutované) v mitochondriální síti a při buněčném dělení jsou z větší části stále ještě nedefinovány.

Dýchací řetězec ve vnitřní mitochondriální membráně je tvořen vícepodjednotkovým systémem (4-40 podjednotek) proteinových superkomplexů. Správná funkce těchto superkomplexů závisí na správné syntéze, transportu cytosolem, transmembránové translokaci a konečné asemblaci (dokončení sbalování, viz. výše) pomocí asemblačních faktorů. Nesprávná asemblace, i jinak dobře syntetizovaných podjednotek, může ve výsledku vést k poruše enzymatické funkce. Kromě proteinových faktorů může na asemblaci mitochondriálních komplexů participovat lokálně syntetizovaný fosfolipid kardiolipin.

Pro recentní přehled o mitochondriální biologii, mitochondriálních poruchách a jejich terapeutických perspektivách doporučujeme [Yamada and Harashima, 2008](#).

[Zpět](#) na obsah

7 Peroxisomy

Peroxisomy jsou ohraničeny jednoduchou biologickou membránou, která obklopuje jemně granulární matrix. Peroxisomy dosahují velikosti 0.05-2 mikrometry. Ve většině případů peroxisomy nedosahují velikosti mitochondrií. Peroxisomy jsou přítomny ve všech buněčných typech s výjimkou erytrocytů a spermií. Nejhojněji jsou peroxisomy přítomny v cytoplasmě hepatocytů, v epiteliálních buňkách kanálků ledvin či v oligodendroglia (buňky syntetizující myelin).

Lidský peroxisomální proteom zahrnuje produkty přibližně 80ti genů kódovaných jadernou gDNA. Jedná se jak o membránové, tak i o proteiny peroxisomální matrix. Převažující většina (60%) těchto proteinů je asociována s metabolickými drahami lokalizovanými do peroxisomů. Poslední třetina proteinů se nazývá peroxiny a sehrává základní role v biogenezi a udržení peroxisomální organelové populace. Markerovým (výlučně zastoupeným a použitelným pro detekci v tkáních) enzymem

peroxisomů je katalasa, kterou lze detekovat buď histochemicky (pomocí enzymatické aktivity) nebo imunohistochemicky (specifickou protilátkou). Vedle detekce katalasy je dnes možné pomocí protilátek vizualizovat nebo jinak stanovit i celou řadu dalších peroxisomálních proteinů.

[Zpět](#) na obsah

7.1 Biogeneze peroxisomů

Biogeneze peroxisomů (růst a štěpení) je v mnoha svých aspektech stále nedefinovanou oblastí; zvláště pokud jde o recentní hypotézu *de-novo* syntézy peroxisomů v endoplasmatickém retikulu (viz. výše v části *koncept biogeneze*). Další otevřenou otázkou zůstává sdílení některých proteinových komponent biogeneze mezi peroxisomy a mitochondriemi (jde zejména o proteiny spojené se štěpením sítí těchto organel). Formálně je biogeneza peroxisomů srovnatelná v základních rysech s biogenesou lysosomů - syntéza a transport membránových proteinů (integritu zajišťujících) a proteinů matrix (převážně funkčních - enzymových).

V porovnání s mitochondriemi, peroxisomy neobsahují vlastní genetickou informaci v podobě jakékoliv formy nukleové kyseliny. Celý peroxisomální proteom je kódován jadernou gDNA a většina (proteiny matrix a frakce membránových proteinů) peroxisomálních proteinů je syntetizována na volných cytosolických ribosomech nebo polyribosomech. Cílení těchto proteinů do preexistujících peroxisomů je zprostředkováno krátkými specifickými signálními sekvencemi aminokyselin (tzv. peroxisomal targeting signal - PTS). V principu existují dva typy těchto sekvencí v různých peroxisomálních proteinech - (i) C-terminální SKL motiv a (ii) C-terminální PTS1 a (iii) N-terminální PTS2 motivy. Na rozdíl od proteinů endoplasmatického retikula a mitochondrií (viz. výše) jsou peroxisomální proteiny přes limitující organelovou membránu transportovány ve sbaleném stavu, nicméně přesný molekulární mechanismus tohoto přenosu není definitivně stanoven.

Zbytek peroxisomálních membránových proteinů je cílen do peroxisomů z ER, nejspíše pomocí vezikulárního transportu. Nedávno bylo také ukázáno, že část proteinů se do peroxisomů dostává z mitochondrií, zároveň byly popsány transientní membránové interakce s cisternami hladkého endoplasmatického retikula. Co nebylo doposud spolehlivě dokumentováno, je retrográdní transport z peroxisomů do ER nebo mitochondrií.

Import proteinů do peroxisomů vede k objemové expanzi organely, která následně vyústí v peroxisomální štěpení (fission). Některé z proteinů účastnících se peroxisomálních štěpení také participují na štěpení mitochondriálních sítí.

Peroxisomy jsou degradovány mikroautofagií (pexofagie, viz. výše). Jako pravděpodobné se zdá být, že celý proces nemůže probíhat bez vzájemné přímé interakce proteinů peroxisomálních i lysosomálních membrán.

[Zpět](#) na obsah

7.2 Peroxisomální metabolismus

V peroxisomech probíhá celá řada metabolických drah a přeměn. Peroxisomálním proteom tvoří přibližně 50 různých residentních enzymů. Katabolické peroxisomální funkce zahrnují oxidativní reakce širokého spektra substrátů (alkoholů včetně etanolu, xenobiotik nebo amino kyselin), které jsou zprostředkované oxidásami používajícími molekulární kyslík se současnou produkcí peroxidu vodíku. Tato reaktivní sloučenina je dále metabolizována enzymem katalasou (viz. výše). Další významnou peroxisomální metabolickou drahou je beta oxidace mastných kyselin s dlouhým řetězcem (C24, C26), dikarboxylových kyselin, větvených mastných kyselin a prostaglandinů. Peroxisomy jsou dále místem katabolismu purinů, syntézy glycerolu či metabolismu retinoidů. Peroxisomy hlodavců obsahují urát oxidasu (enzym metabolizující kyselinu močovou na solubilní allantoin), která vytváří centrální krystaloid v peroxisomech.

Veškeré peroxisomální funkce jsou přímo závislé na kontinuální peroxisomální biogenezi, tzn. na importu komponent peroxisomální matrix a membrán. Tento rys peroxisomální biologie od sebe významně odlišuje, mimo jiné, peroxisomální a mitochondriální poruchy. Do dnešní doby bylo popsáno přibližně 24 různých lidských onemocnění kauzálně souvisejících s peroxisomální dysfunkcí. Tyto poruchy lze klasifikovat na dvě základní skupiny: deficity jednotlivých enzymů (při existujících peroxisomech) a na poruchy biogeneze peroxisomů - Zellwegerův syndrom.

Zellwegerův syndrom (peroxisomální abiogeneze) je možné uvést jako dobrý příklad posledního typu peroxisomálních poruch. Přestože jsou u tohoto postižení všechny enzymy správně syntetizovány, cílový kompartment (peroxisomy jako takové) chybí. Peroxisomální enzymy zůstávají v cytosolu a jsou následně degradovány. Substráty peroxisomálních metabolických drah zůstávají nemetabolizovány a stávají se pro buňku toxickými, např. shora zmíněné velmi dlouhé mastné kyseliny, které se včleňují do membránových lipidů a vedou k nestabilitě membrán, např. myelinu což může vyústit až v obraz demyelinizace (leukodystrofie).

Jak již bylo opakovaně zmíněno, dráhy biogeneze peroxisomů (štěpení - fission) sdílí některé proteinové komponenty s podobnými procesy v mitochondriálních sítích. Nedávno popsán lidský dědičný defekt (mutace v jedné z dynaminu podobných GTPas) je charakterizován sdílenou poruchou štěpení mitochondrií a peroxisomů.

Vedle relativně vzácných dědičných peroxisomálních onemocnění, jsou to ale i častější postižení, jako některé typy nealkoholické steatohepatitidy, které jsou způsobeny abnormální peroxisomální funkcí.

Pro zájemce o detaily v oblasti peroxisomální biologie a patologie lze doporučit přehledový článek [Schrader and Fahimi, 2008](#)

[Zpět](#) na obsah

8 Cytokineze - rozdělení cytoplasmy a dceřiných buněk - Kde a jak říznout?

Centrálním biologickým problémem cytokineze je koordinované rozdělení cytoplasmy s M-fází buněčného cyklu a v širším kontextu, s jaderným cyklem jako takovým. Separace dceřiných buněk musí proběhnout ve správném čase (po separaci chromosomů) a na správném místě (každá dceřiná buňka získá kompletní sadu chromosomů). Základní otázka tedy zní: "Kde a jak říznout?"

Biologický fenomén cytokineze lze vnímat ze dvou úhlů pohledu: (i) separace dceřiných buněk oddělením jejich cytoplasmatických membrán; (ii) mechanismy regulovaného rozdělení cytoplasmatických komponent

[Zpět](#) na obsah

8.1 Kontraktilní prstenec - dělicí rýha - rozdělení cytoplasmy

Cytokineze představuje složitě regulovaný proces, který vede k zásadní architektonické přestavbě cytoplasmy a cytoplasmatické membrány. V průběhu cytokineze je cytoplasma rozdělena pomocí tzv. kontraktilního prstence (Alb [18-34](#)) složeného z aktinových a myozinových filament (typ II). Kontraktilní prstenec se začíná konstituovat v důsledku poklesu aktivity M-Cdk (*více viz. Buněčný cyklus a Buněčná signalizace*). Kontraktilní prstenec modeluje dělicí rýhu (Alb [18-35](#)) mezi nově se konstituujícími se jádry. Po mitoze určuje pozice dělicího vřeténka lokalizaci a orientaci kontraktilního prstence. Kontraktilní prstenec je formován v rovině metafazické orientace chromosomů a kolmo na dlouhou osu dělicího vřeténka. Před fyzickým rozdělením propojuje budoucí dceřiné buňky úzký cytoplasmatický můstek. Tento můstek obsahuje vzájemně propletený systém protisměrně orientovaných svazků mikrotubulů s centrální densitou zvanou "midbody" (Alb [18-35](#)). Zahájení cytokineze je regulováno kinasami z rodiny polo-kinas, jakým mechanismem přesně, není známo.

[Zpět](#) na obsah

8.2 Rozdělení a separace cytoplasmy

Většina buněčných dělení je symetrická; každá dceřiná buňka tedy získává stejné množství cytoplasmy včetně organel. Stále ještě existuje velké množství nezodpovězených otázek týkajících se základních principů regulace strukturální cytoplasmatické segregace. Jakým způsobem se chovají membránové cytoplasmatické kompartmenty? Zdvojuje se masa organel před mitozou, či jsou naopak organely v dceřiných buňkách resyntetizovány? Jakým způsobem je regulována míra exocytózy a endocytózy a remodelace cytoplasmatické membrány v průběhu cytokineze?

Pouze pro přiblížení a ukázkou chování membránových organel v průběhu cytokineze jsme se rozhodli zařadit modelový příklad dvou kompartmentů - Golgiho aparátu a endocytických kompartmentů (endosomů). V interfázi se Golgiho aparát akumuluje v okolí centrosomu s přispěním cytoskeletu (preferenčně mikrotubulů). Experimentální data ukázala, že cisterny Golgiho aparátu a endosomální membrány se v průběhu

profáze rozdělí na dva shluky (v asociaci se zdvojenými centrosomy) a následně disintegrují v průběhu metafáze. V závěru mitózy (anafáze a telofáze) dochází k rekonstrukci Golgiho aparátu v dceřiných buňkách ze dvou, nově se vytvářejících shluků membrán (větší a menší), které jsou v blízké asociaci s obnovujícím se jaderným obalem a sledují formování dělicí rýhy. Koordinovanou fúzí těchto membránových shluků s molekulárními parametry Golgiho aparátu se znovu vytvoří koncová organela.

Vytváření dělicí rýhy, tzn. extenzivní remodelace cytoplasmatické membrány, probíhá, mimo jiné proto, že dochází k regulované fúzi membrán endosomálního kompartmentu a membránových struktur charakteru Golgiho aparátu v oblasti kontraktilního prstence s cytoplasmatickou membránou. V tomto případě tedy tyto dva kompartmenty slouží jako depo biologických membrán pro rozdělení cytoplasmatické membrány. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda jsou tyto procesy univerzálně platné ve všech buněčných typech či v případě asymetrické mitózy.

Podobně i mitochondriální síť musí být v průběhu cytokineze koordinovaně rozdělena, včetně obsažené mitochondriální DNA (pozor frakce mtDNA může být mutována, viz. výše). Existují práce, které poukazují na propojenost zdvojování mitochondriální masy před mitózou, popřípadě na strukturální remodelaci sítě do těsného okolí jádra před mitózou. Podle dostupných informací, však zůstává nejasné, zda mitochondriální síť prodělává v cytokinezi podobně komplexní a koordinovanou přestavbu jako třeba Golgiho aparát.

Na závěr tohoto velmi stručného úvodu do problematiky cytokineze, nelze než podotknout, že cytokineze by neměla být vnímána jako pouhý přívěšek dělení jádra (*pro detaily viz. [Barr and Gruneberg, 2007](#) nebo [Montagnac et al., 2008](#).*)

[Zpět](#) na obsah

9 Doporučená literatura:

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. (2002/2007). [Molecular Biology of the Cell, 4/5th edn \(London, Garland Science\)](#).

[Zpět](#) na obsah

10 Výběrová literatura:

Aridor, M. (2007). [Visiting the ER: the endoplasmic reticulum as a target for therapeutics in traffic related diseases](#). Advanced drug delivery reviews 59, 759-781.

Barr, F.A., and Gruneberg, U. (2007). [Cytokinesis: placing and making the final cut](#). Cell 131, 847-860.

Bredesen, D.E. (2007). [Key note lecture: toward a mechanistic taxonomy for cell death programs](#). Stroke; a journal of cerebral circulation 38, 652-660.

Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). [Coats, tethers, Rabs, and SNAREs](#)

[work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle.](#) Developmental cell 12, 671-682.

Cuervo, A.M. (2004). [Autophagy: in sickness and in health.](#) Trends Cell Biol 14, 70-77.

Cuervo, A.M. (2006). [Autophagy in neurons: it is not all about food.](#) Trends Mol Med 12, 461-464.

Fuchs, R., and Ellinger, I. (2004). [Endocytic and transcytotic processes in villous syncytiotrophoblast: role in nutrient transport to the human fetus.](#) Traffic (Copenhagen, Denmark) 5, 725-738.

Jarjanazi, H., Savas, S., Pabalan, N., Dennis, J.W., and Ozcelik, H. (2008). [Biological implications of SNPs in signal peptide domains of human proteins.](#) Proteins 70, 394-403.

Johannes, L., and Lamaze, C. (2002). [Clathrin-dependent or not: is it still the question?](#) Traffic (Copenhagen, Denmark) 3, 443-451.

Montagnac, G., Echard, A., and Chavrier, P. (2008). [Endocytic traffic in animal cell cytokinesis.](#) Current opinion in cell biology 20, 454-461.

Mukhopadhyay, D., and Riezman, H. (2007). [Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling.](#) Science (New York, NY 315, 201-205.

Roth, J., Yam, G.H., Fan, J., Hirano, K., Gaplovska-Kysela, K., Le Fourn, V., Guhl, B., Santimaria, R., Torossi, T., Ziak, M., et al. (2008). [Protein quality control: the who's who, the where's and therapeutic escapes.](#) Histochemistry and cell biology 129, 163-177.

Roy, S., Zhang, B., Lee, V.M., and Trojanowski, J.Q. (2005). [Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases.](#) Acta Neuropathol (Berl) 109, 5-13.

Schrader, M., and Fahimi, H.D. (2008). [The peroxisome: still a mysterious organelle.](#) Histochemistry and cell biology 129, 421-440.

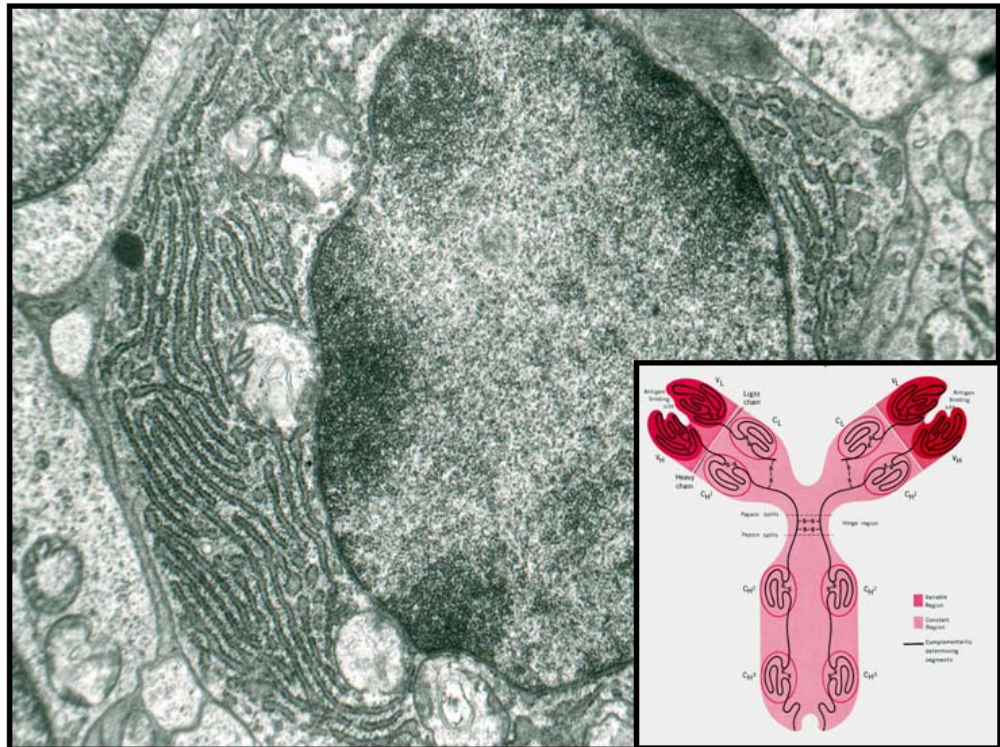
Terman, A., Gustafsson, B., and Brunk, U.T. (2007). [Autophagy, organelles and ageing.](#) The Journal of pathology 211, 134-143.

Ungewickell, E.J., and Hinrichsen, L. (2007). [Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding.](#) Current opinion in cell biology 19, 417-425.

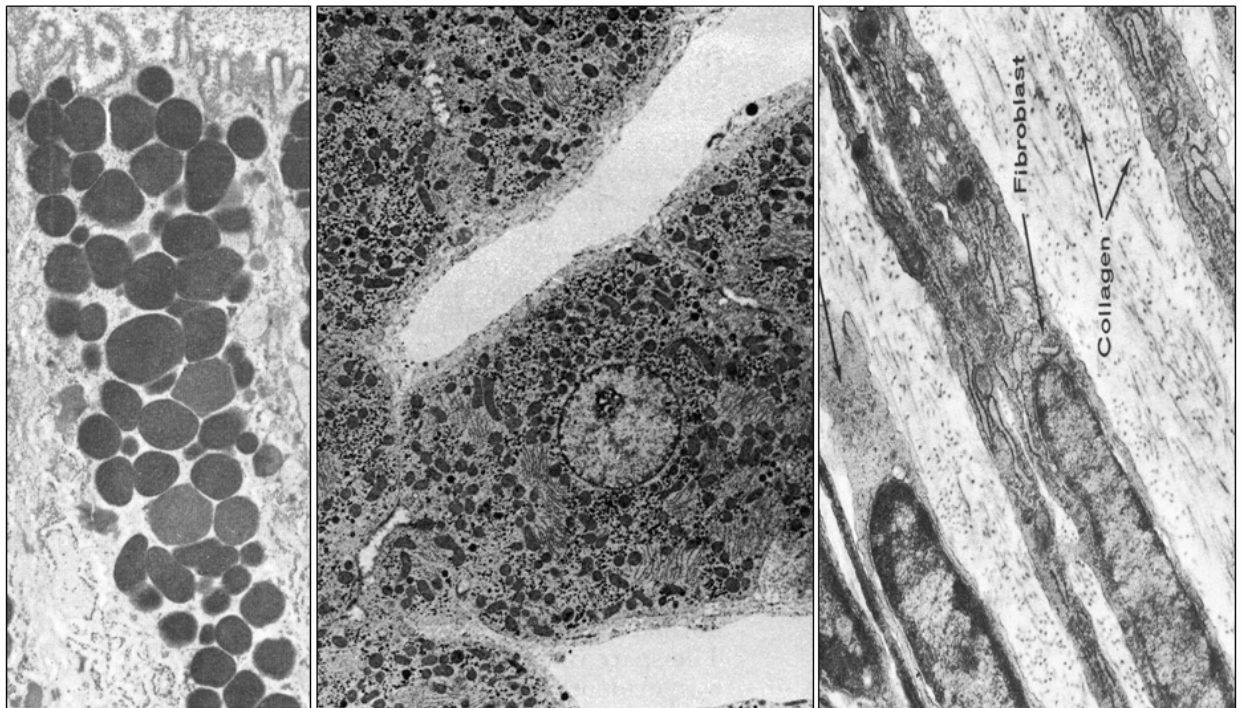
Yamada, Y., and Harashima, H. (2008). [Mitochondrial drug delivery systems for macromolecule and their therapeutic application to mitochondrial diseases.](#) Advanced drug delivery reviews 60, 1439-1462.

Příloha 1. Plasmocyte - B lymphocyte secreting immunoglobulins

plasmocyte – B lymphocyte secreting immunoglobulins
mechanism – constitutional secretion



Příloha 2. Mucin hepatocyte fibroblast secretion.png



**gastric mucosa
mucinous cell**

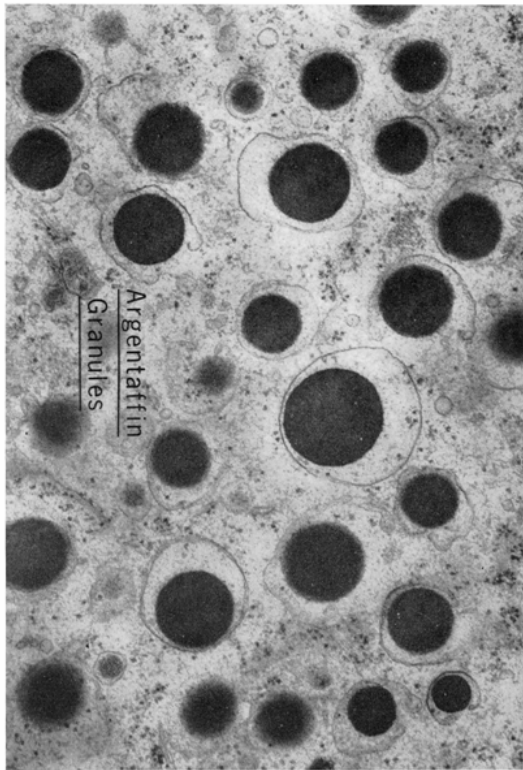
hepatocyte

fibroblast

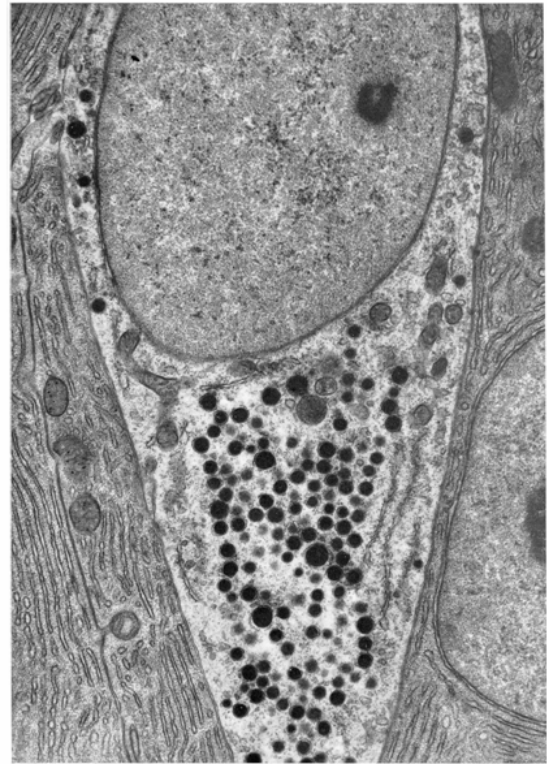
constitutional + **regulated**
secretion

constitutional secretion

Příloha 3. Argentaffini granula



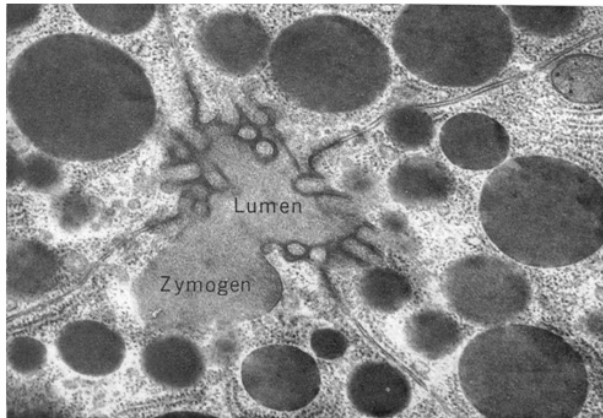
Argentaffin cell from the gastric mucosa of a bat.
Collidine buffered osmium fixation.
Lead hydroxide staining. 41 000x



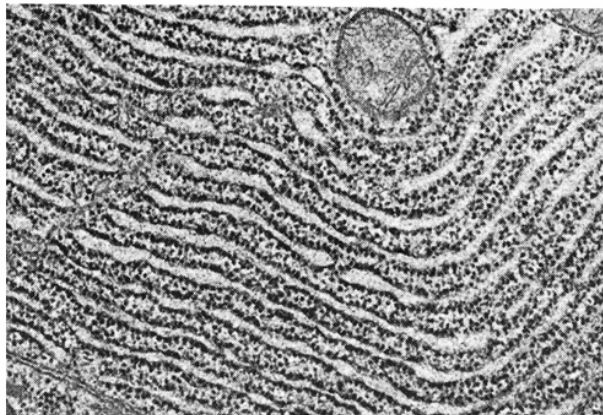
Alpha cell from an islet in bat pancreas.
Collidine buffered osmium fixation.
Lead hydroxide staining. 17 500x

The Cell. An Atlas of Fine Structure. Fawcett DW, 1966

Příloha 4. Zymogeni granula

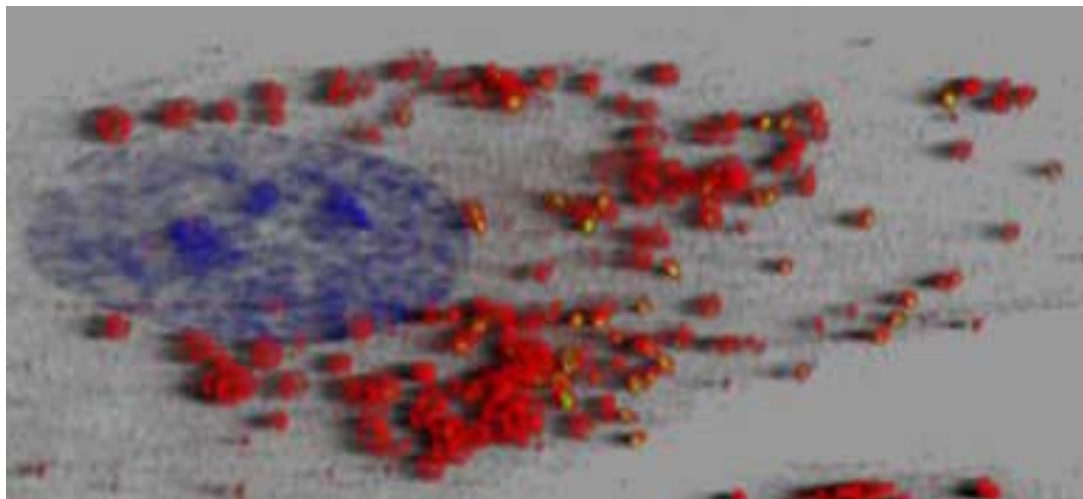


Zymogen granules of exocrine pancreas



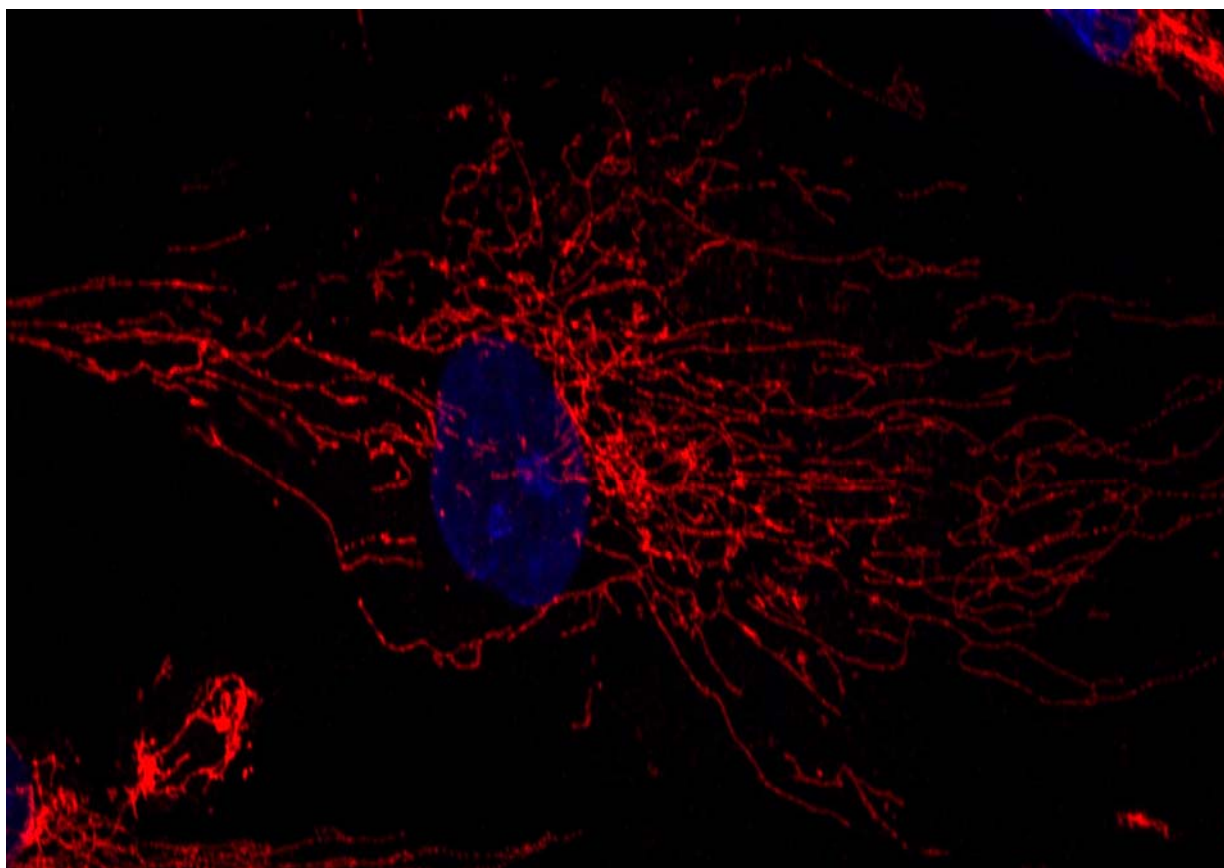
Endoplasmic reticulum of the corresponding pancreatic cell

Příloha 5. Lysosomes 3D



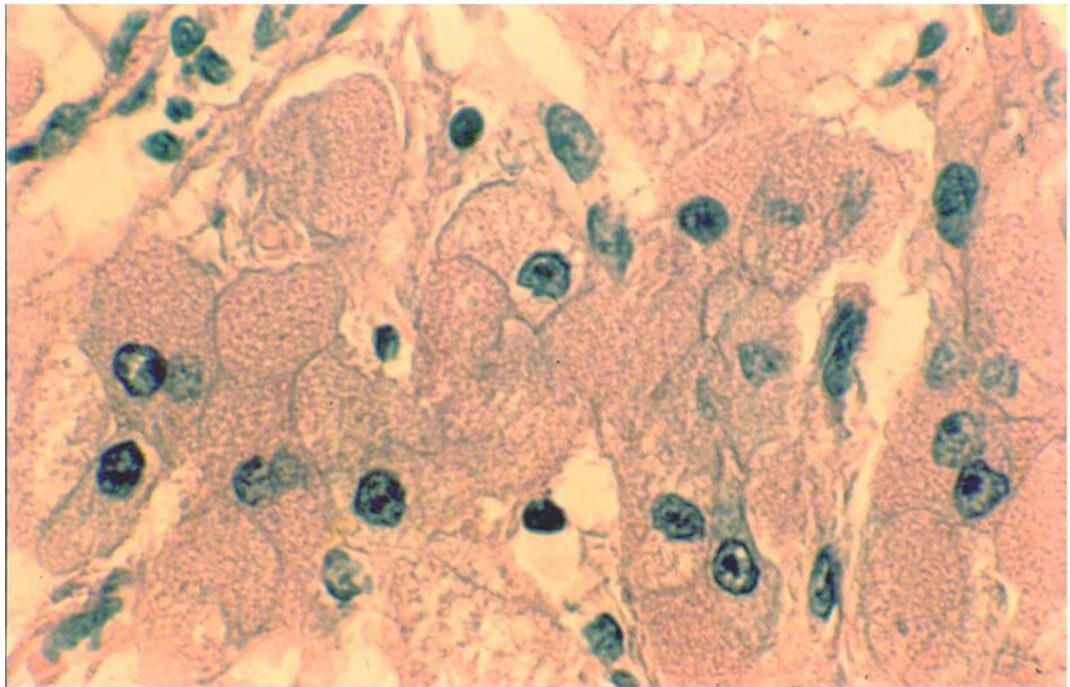
Lysosomal membranes (red), undefined lysosomal membrane transporter (green), nucleus (blue)

Příloha 6. Mitochondrial network



mitochondrial network (red), nucleus (blue)

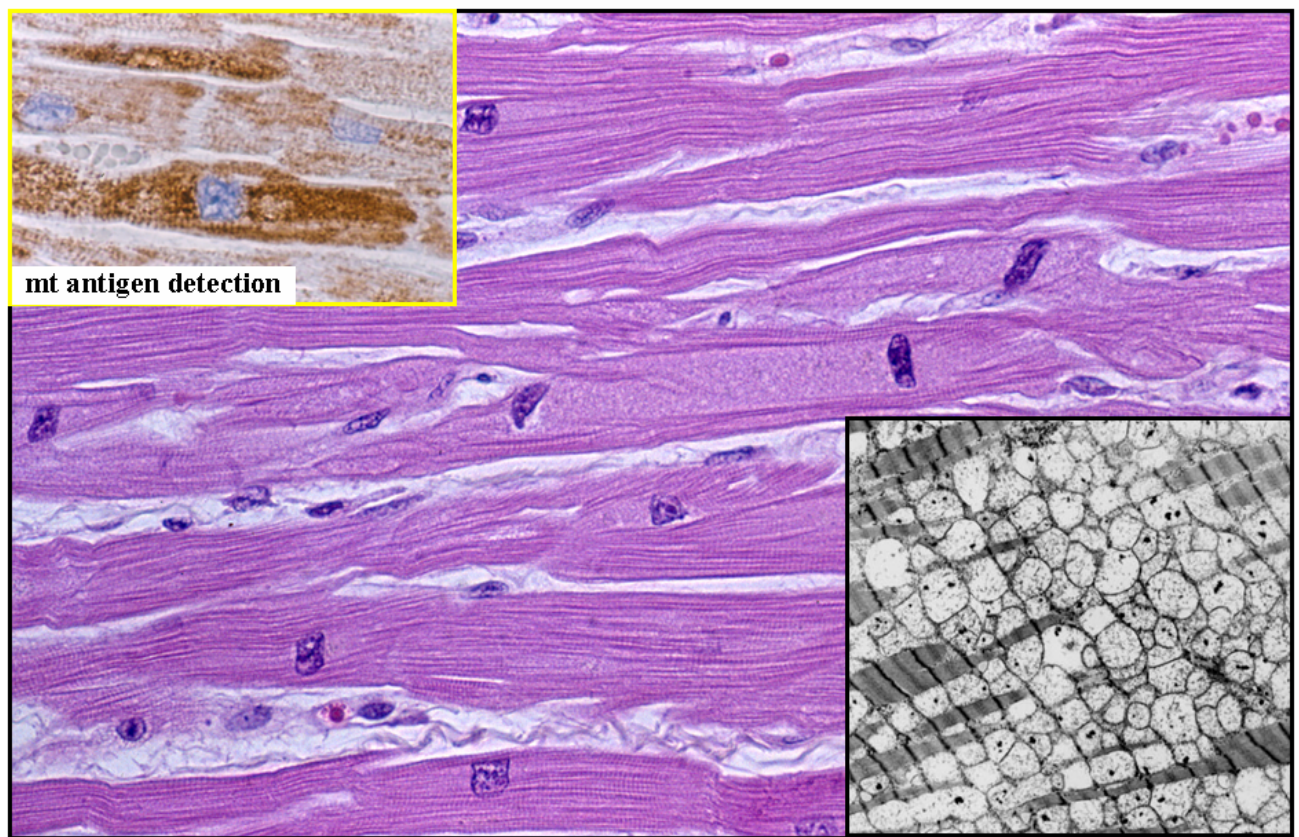
Příloha 7. Oncocytes cirrhosis



progressed to cirrhosis and partial liver failure

oncocytic transformation of hepatocytes in mtDNA depletion
HE

Příloha 8. MELAS muscle



MELAS myokard (HE; mt antigen; EM)