

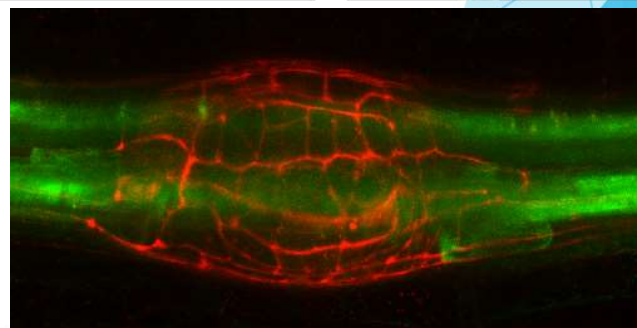
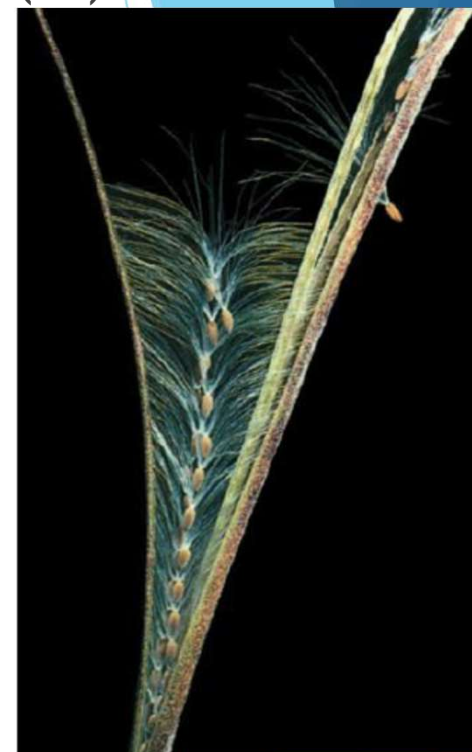
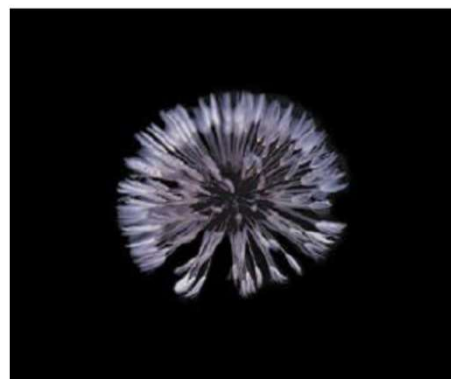
Biologie rostlinné buňky



**Oddělení
experimentální
biologie rostlin**

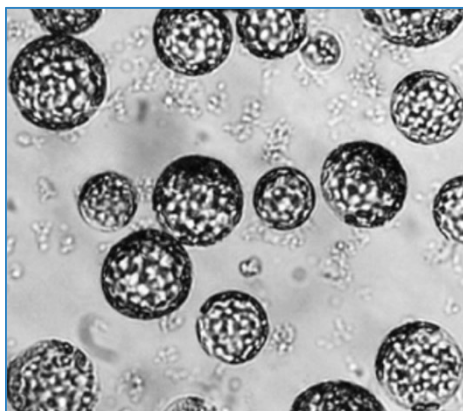
5. Buněčná stěna

- ▶ Rozdíly mezi extracelulární matrix rostlinných a živočišných buněk
- ▶ Přehled struktury primární a sekundární buněčné stěny (BS)
- ▶ Přehled funkcí BS
- ▶ Izolace a analýza BS
- ▶ Model primární BS rostlin
- ▶ Chemické složení rostlinné BS
 - ▶ Celulóza, hemicelulózy a pektiny
 - ▶ Syntéza celulózy CESA komplexem
- ▶ Biogeneze buněčné stěny
- ▶ Mechanika buněčného růstu
 - ▶ Expansiny
- ▶ Sekundární buněčná stěna
 - ▶ Struktura, funkce, lignifikace
- ▶ Permeabilita BS
- ▶ Syntéza kalózy

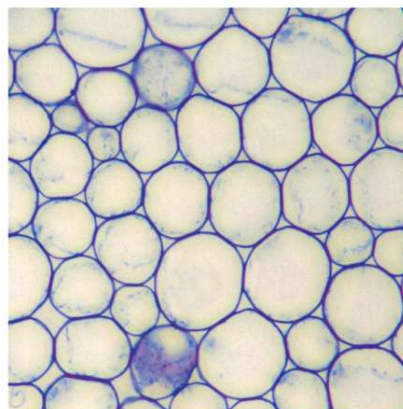


Rozdíl mezi extracelulární matrix (ECM) rostlinných a živočišných buněk

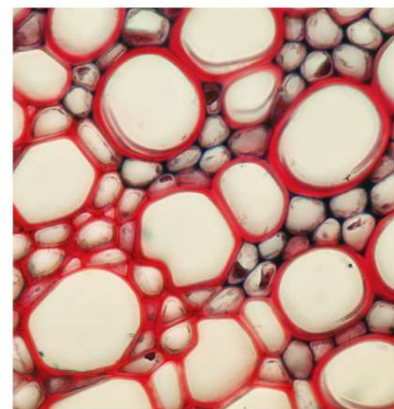
- ▶ V 17. století byly buňky v rostlinách snadno identifikovatelné (Hooke, 1665). Na rozdíl od živočichů, kde je stěna tenká nebo neexistující, což bylo překážkou pro poznání, že *zvířata se také skládají z buněk!*
- ▶ Většina buněk vylučuje do okolního média makromolekuly, které se slučují do organizované struktury, která se nazývá **buněčná stěna (BS)**, **extracelulární matrix (ECM)**, **apoplast**, **glykokalyx**, **sliz** nebo **buněčný obal...**
 - ▶ Mezi rostlinnými biology se termíny buněčná stěna a extracelulární matrix používají zaměnitelně a kontinuum buněčných stěn se obvykle označuje jako apoplast.
- ▶ Buněčná stěna zdůrazňuje podpůrnou roli struktury buňky.
- ▶ ECM zdůrazňuje živé a dynamické aspekty oblasti vně plazmatické membrány a nikdy neznamenala *mrtvá část buněk*, na rozdíl od termínu *apoplast*, což pochází z řečtiny pro „bez formy“.



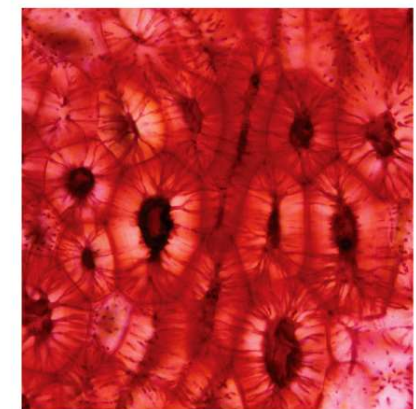
protoplasty



100 µm

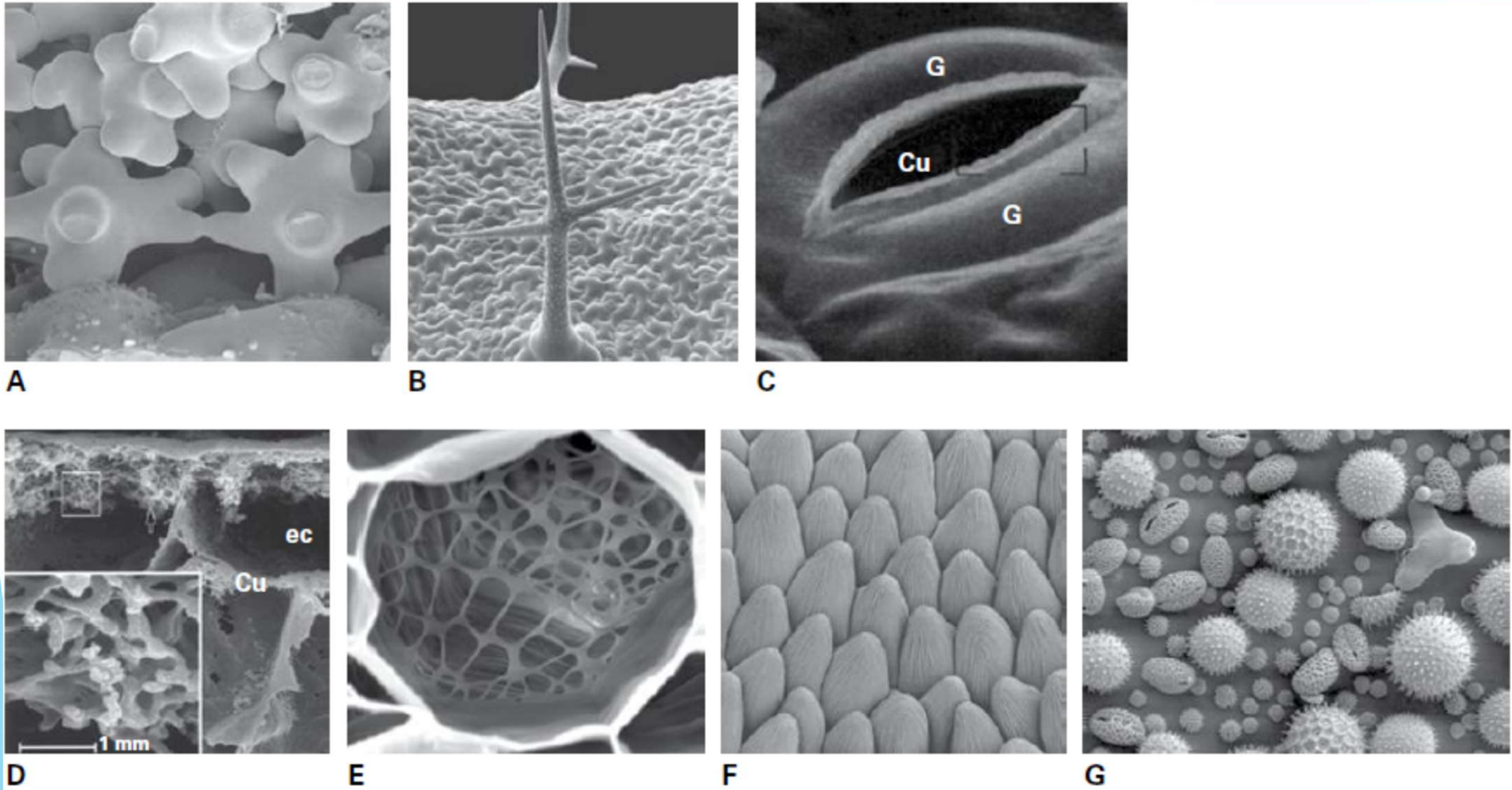


55 µm



75 µm

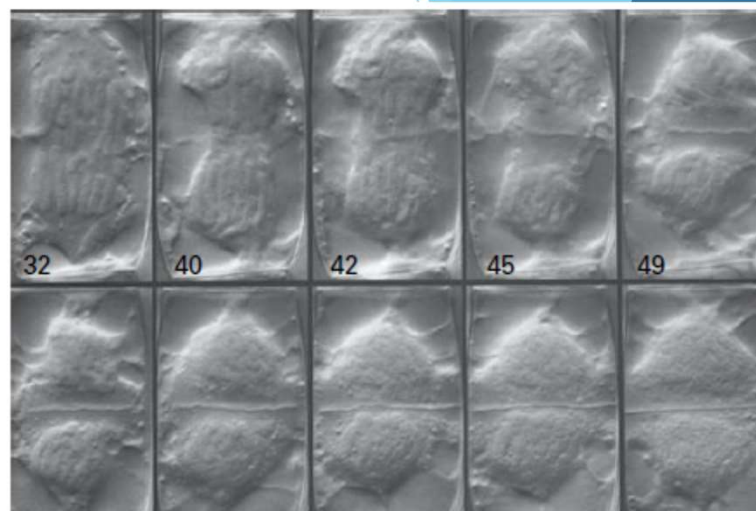
Diverzita buněčné stěny



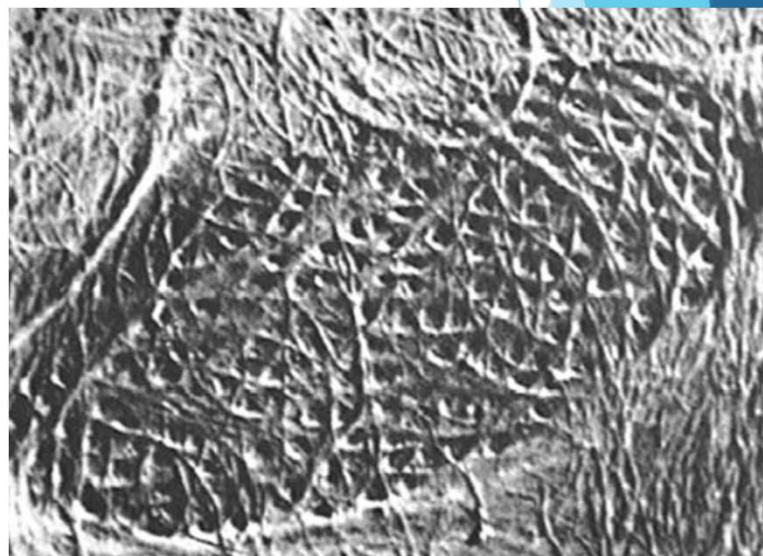
(A) sponge parenchyma (B) *Arabidopsis* trichome (C) a guard-cell pair (D) transfer cells for sugar transport (E) sieve plate (F) epidermal cells of *Antitthium* sp reflect light and enrich colour (G) pollen grains

Přehled struktury primární a sekundární BS

- ▶ V meristémech rostlin se BS začíná tvořit během cytokineze (*cell plate*).
- ▶ Primární buněčná stěna (PBS) má tloušťku ~ 100 nm, je jen mírně tuhá, takže buňka může stále expandovat.
- ▶ PBS obsahuje ztenčeniny (*primary pit fields*), kterými procházejí plasmodesmata.
- ▶ PBS se tvoří, když se buňka stále rozšiřuje, sekundární stěna se vytváří po ukončení expanze.
- ▶ Růst stěny je však kontinuální proces, takže mezi PBS a SBS nedochází k zřetelnému oddělení.
- ▶ *BS má význam v textilním, papírenském, potravinářském, stavebním průmyslu; výroba celulózových biopaliv!*



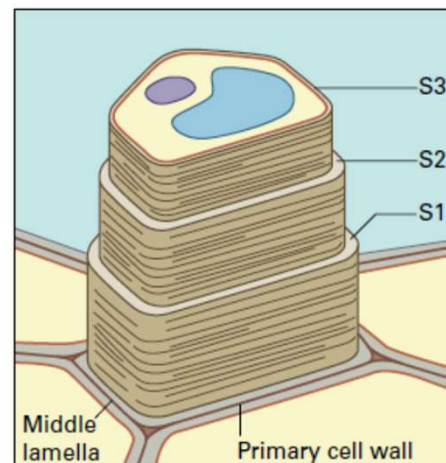
Tradescantia stamenal „hair cells“, time in minutes



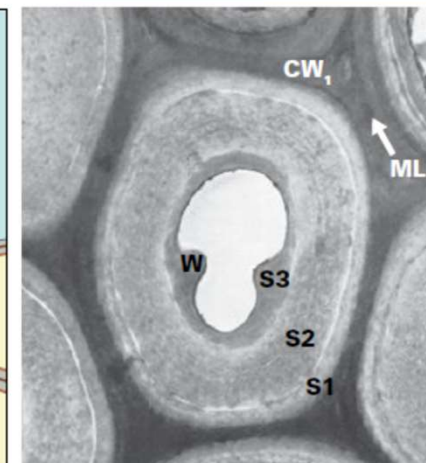
PCW of *Zea mays* showing a pit field through which the plasmodesmata traverse. x 15,000

Přehled struktury primární a sekundární BS

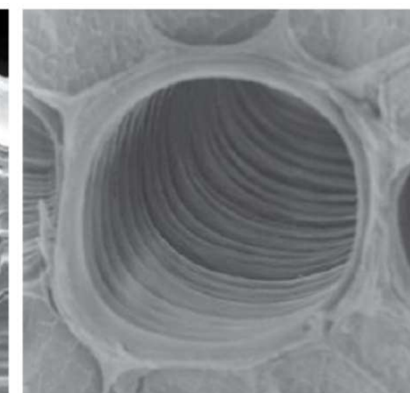
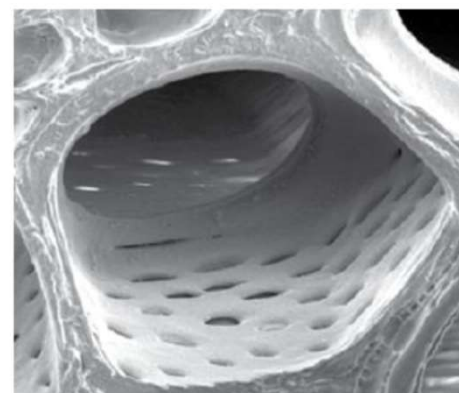
- ▶ Sekundární buněčná stěna (SBS) se začíná ukládat buď ztluštěním PBS (*intususcepce*) a/nebo *apozicí*, což je ukládání nových vrstev materiálu stěny o tloušťce ~ 10 μm mezi plazmatickou membránu a PBS (*směrem dovnitř buňky!*).
- ▶ SBS se specializuje na mechanickou podporu, často jsou buňky ve zralosti mrtvé.
- ▶ SBS tracheid, cévních prvků a vláken obsahuje **lignin**:
 - ▶ zesíťované (*cross-linked*) polymery složené z derivátů polypropanoidní dráhy.
 - ▶ dělá celulózu vodotěsnou (*waterproof*), takže si zachovává tuhost a umožňuje vedení vody.
- ▶ **Suberin**, další voskovitá látka, která se spolu s ligninem vyskytuje v kořeni, tzv. Casparův proužek (*Casparian strip*):
 - ▶ zajišťuje vodotěsnost a také to, že voda a rozpuštěné látky pronikají do stéle (střední válec kořene) přes symplast.



A



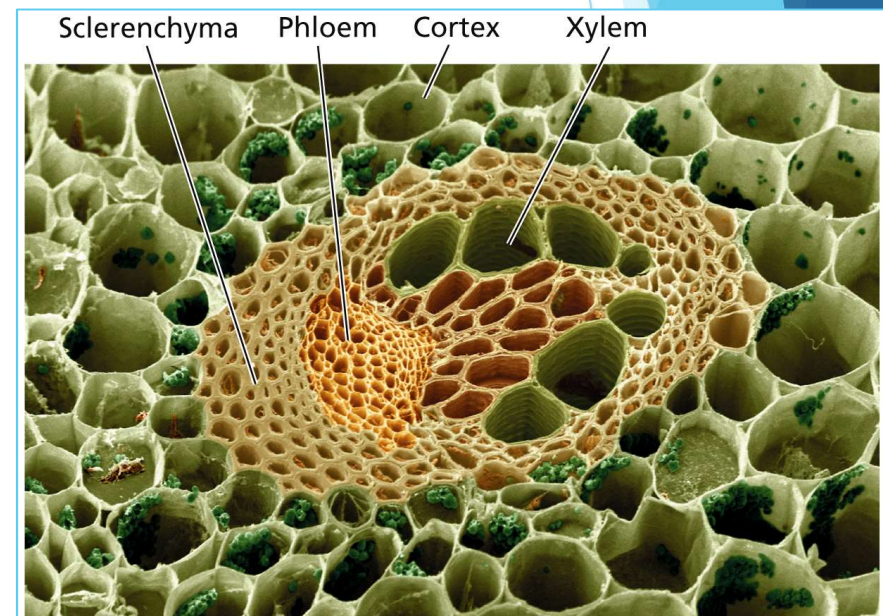
B



tracheidy

Přehled funkcí BS

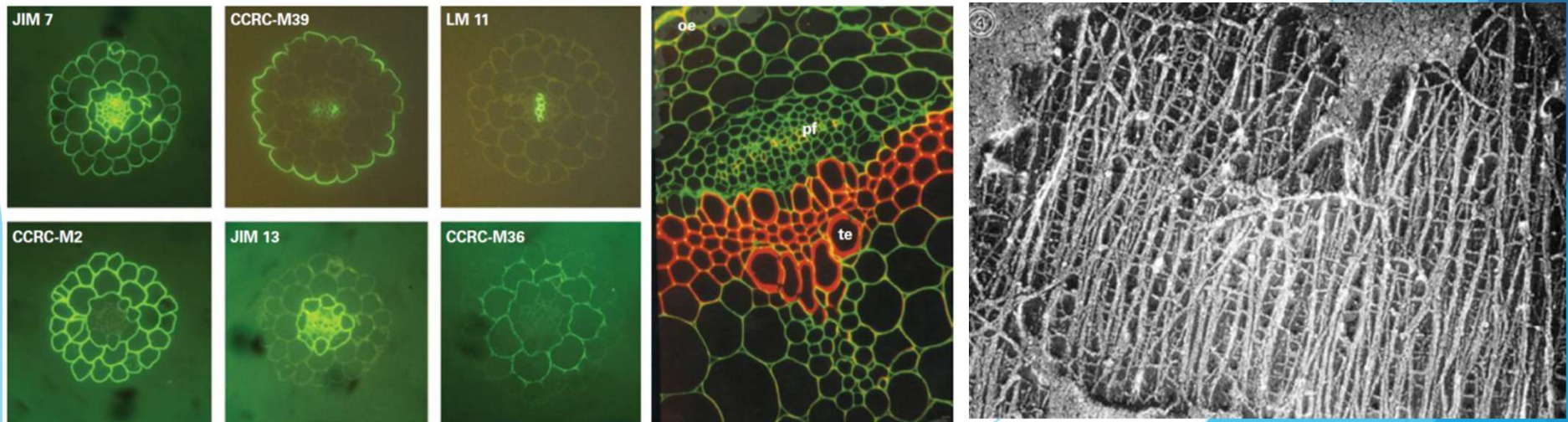
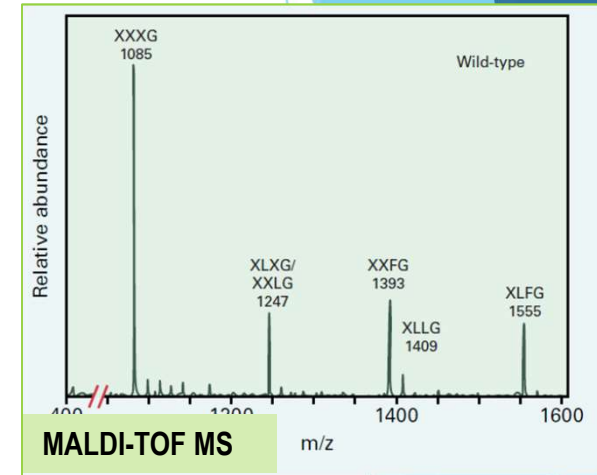
- ▶ Tlustá BS brání rostlinám v pohybu! ***Ale je to velmi dynamická struktura!!!***
- ▶ BS se podílí na mnoha aspektech buněčné morfologie, fyziologie a vývoje.
- ▶ Tloušť BS umožňuje buňce generovat vnitřní hydrostatický tlak (turgor) (0,1-1 MPa)
 - ▶ poskytuje buňce tuhost a mechanickou pevnost („exoskeleton“), rostliny mohou růst do výšky a šířky
 - ▶ transpirační proudění vody v xylému vyžaduje mechanicky pevné stěny, které odolávají zhroucení
- ▶ BS se podílí na organizaci cytoskeletonu (aktinu a mikrotubulů), dělení buněk, tvorbě embryí, vnímání gravitace, vnímání buněčné integrity.
- ▶ Bariéra proti patogenům
 - ▶ Fragmenty CW, fungující jako *elicitory*, signalizují buňce, aby vytvořila antiseptické sloučeniny (*fytoalexiny*).
- ▶ Kutikula, která obsahuje kutin a vosk, brání napadení patogeny, vodotěsnost BS.
- ▶ Mnoho fascinujících strukturálních specializací BS vede k mimořádným barvám rostlin (rýhovaná kutikula v okvětních lístcích, funguje jako difrakční mřížka a vytváří barvy).



Průřez stonkem *buttercup (Ranunculus repens)*, 100 μm
zobrazující buňky s různou morfologií stěny v různých typech kořenových pletiv

Izolace a analýza BS

- ▶ Pletivo se homogenizuje a BS se buď zpeletuje centrifugací (250-1000 g / 5-20 min) nebo se přefiltruje přes síto s póry o průměru 5-10 μm .
- ▶ Složení a struktura BS může být charakterizována:
 - ▶ hmotnostní spektrometrií (MS, MALDI-TOF)
 - ▶ nukleární magnetickou rezonancí (NMR)
 - ▶ high-performance liquid chromatography (HPLC)
 - ▶ elektroforézou, pomocí microarrays
 - ▶ histochemicky a imunologicky.

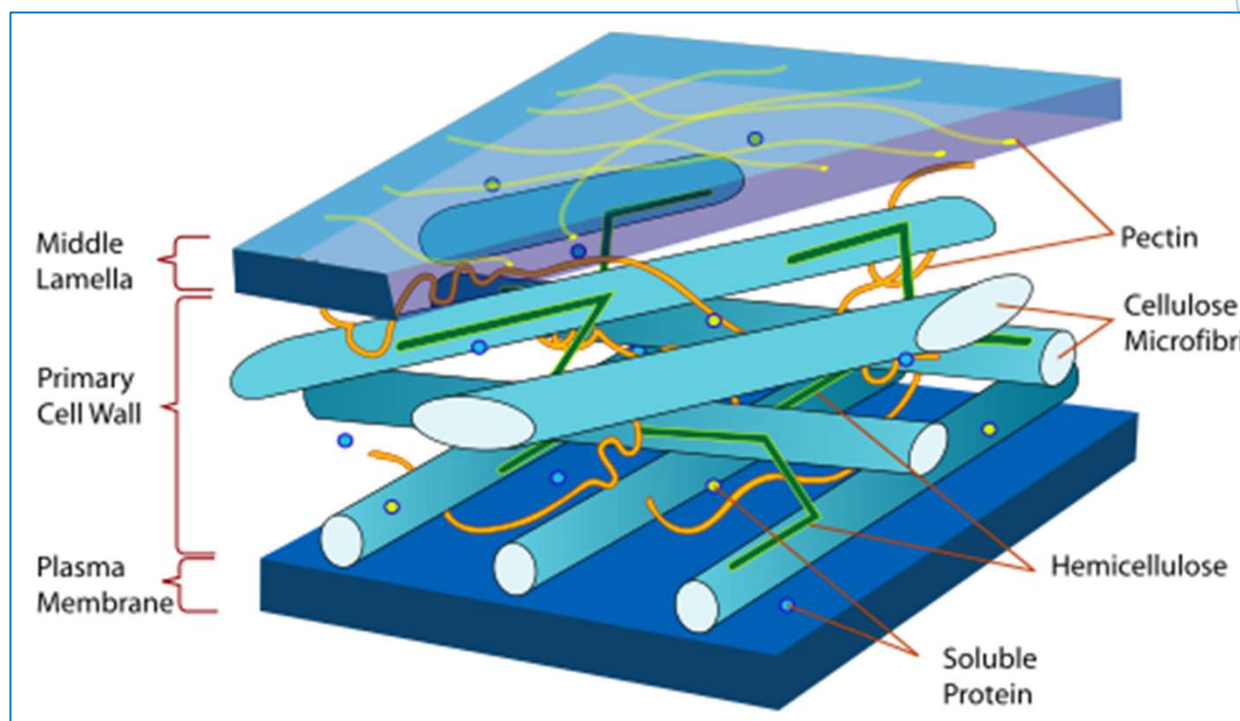


Staining of *Arabidopsis* root with 6 monoclonal antibodies against CW polysaccharides demonstrates specific cell types.

Zea mays root CW revealed by deep etching. The smooth area is PM. x 213,000

Model primární buněčné stěny rostlin

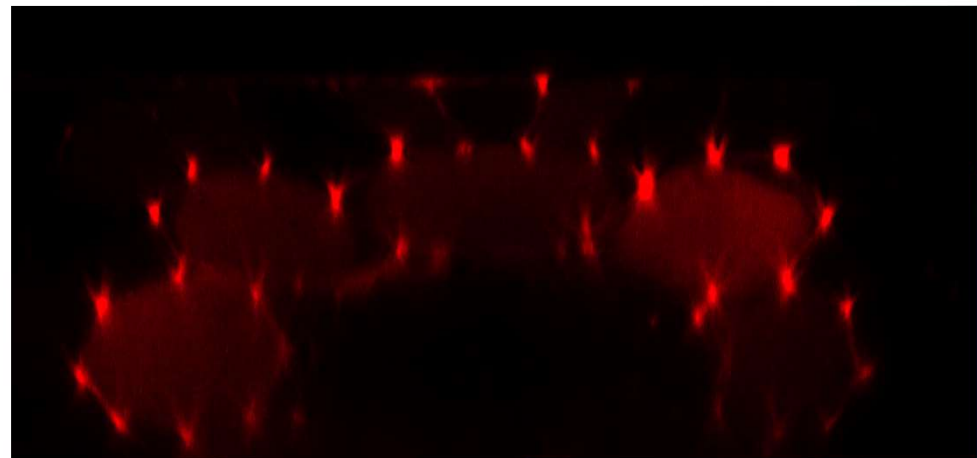
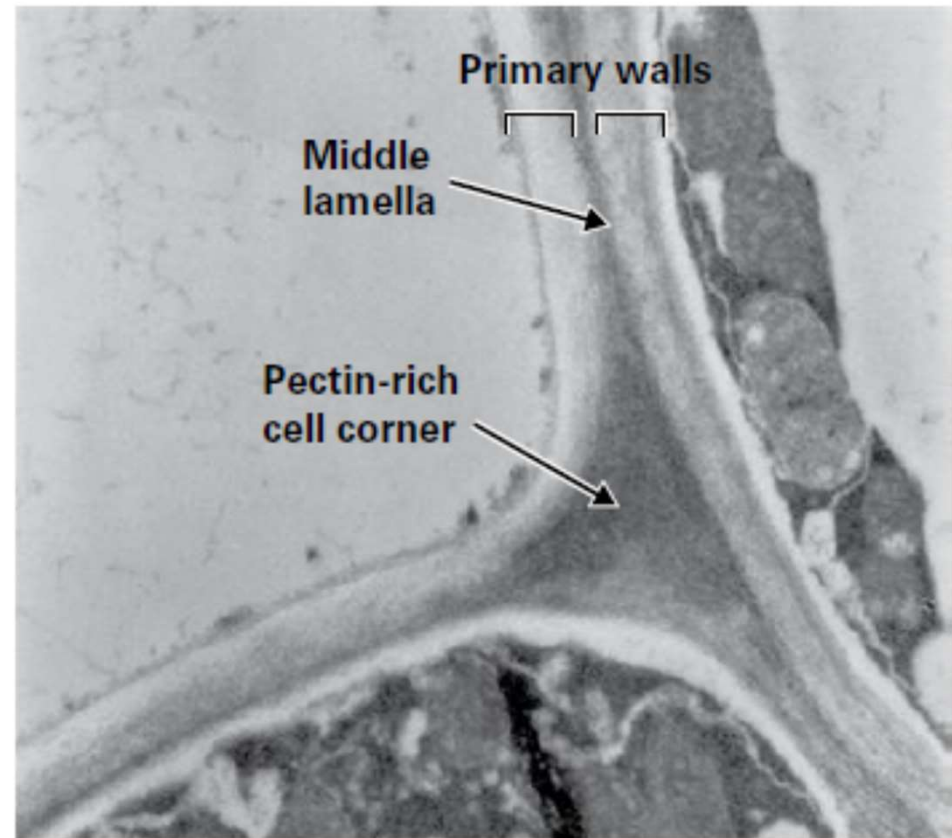
- ▶ Mikrofibrily celulózy (poskytují pevnost BS) uložené v gelovité matrici hemicelulóz a pektinů (viskoelastické vlastnosti BS) a proteiny.



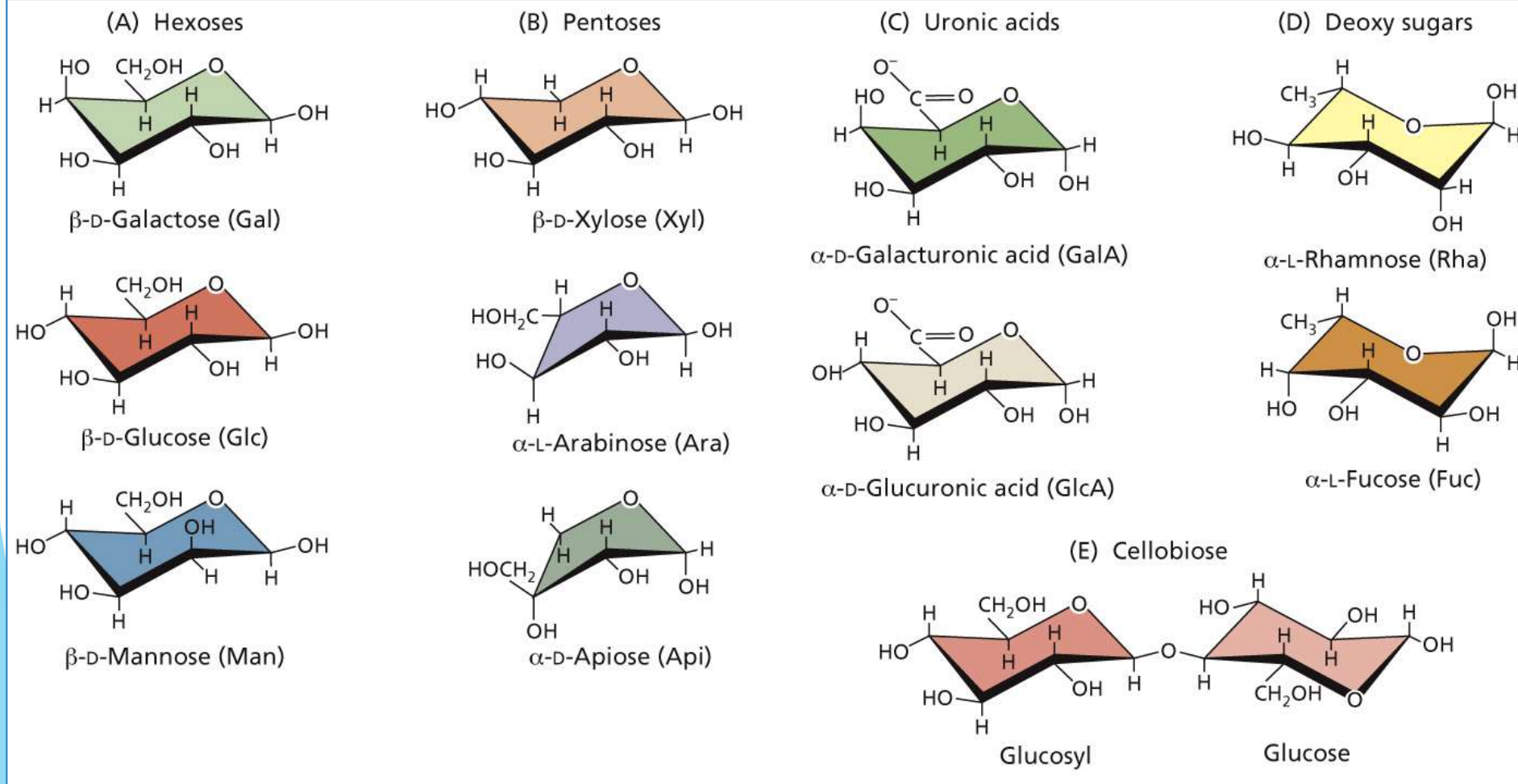
- ▶ Rostlinná BS obsahuje obecně asi 60 % vody a sušinu, která se skládá především z polysacharidů, včetně celulózy, hemicelulóz a pektinů.
- ▶ *Celulóza je nejrozšířenější makromolekula na Zemi!*
- ▶ Složení BS závisí na typu buňky! (její struktuře a funkci...)

Střední lamela

- ▶ Tenká vrstva nacházející se na rozhraní, kde se dotýkají stěny sousedních buněk.
- ▶ Její **původ** lze vysledovat na buněčnou destičku (*cell plate*) vytvořenou během buněčného dělení, další materiál je nabírán do této vrstvy, když buňky expandují.
 - ▶ Obohacená o pektiny, které mohou být v komplexu s glykoproteiny bohatými na hydroxyprolin.
- ▶ Klíčovou **funkcí** je, že slouží jako pružná adhezivní vrstva mezi buňkami.



Konformační struktury cukrů běžně se vyskytujících se v BS rostlin

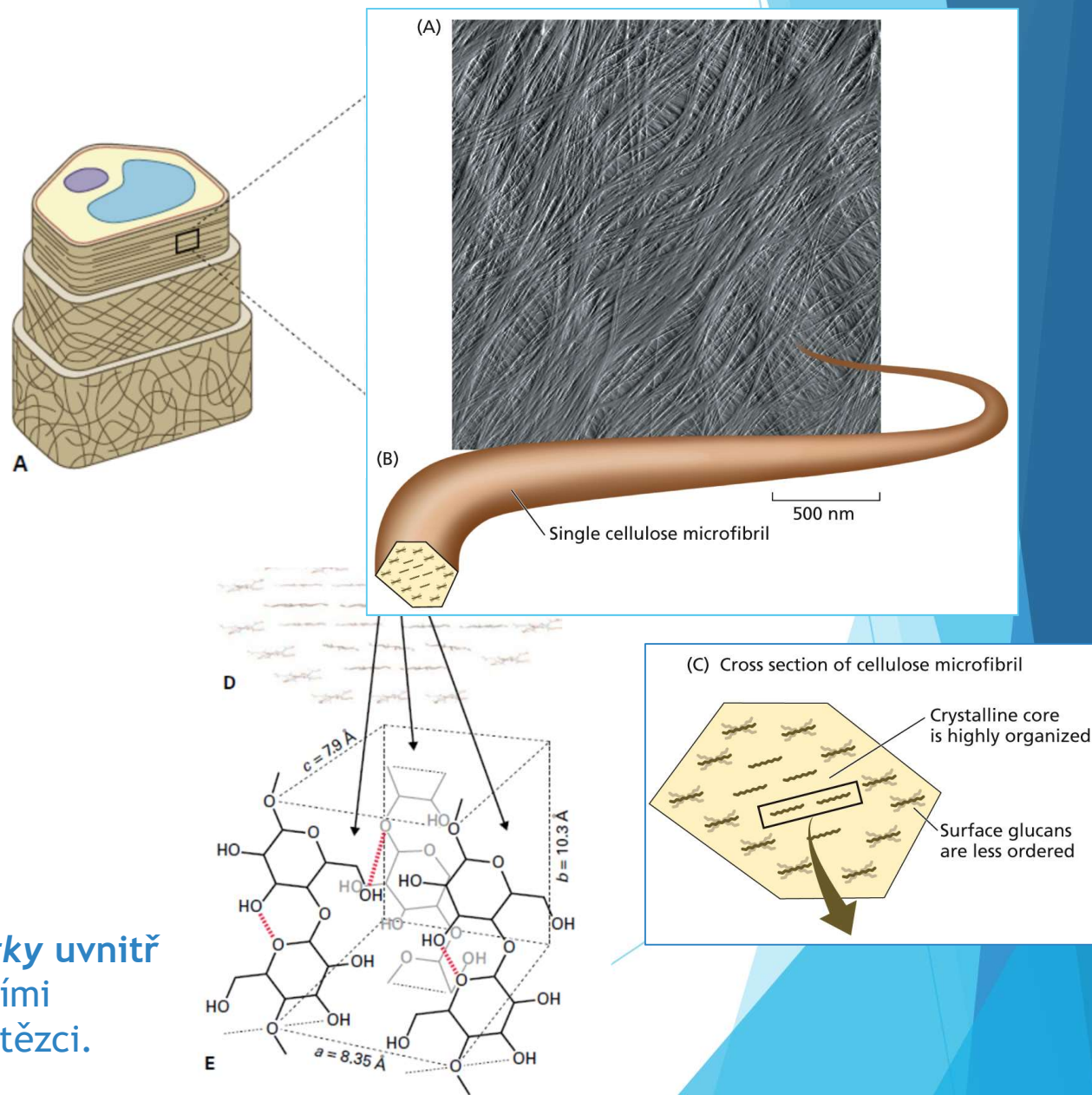


- ▶ **Celobióza:** (1,4)- β -D- vazba mezi dvěmi molekulami glukózy
- ▶ **Celulóza:** microfibrily (mikrovlákna) (1,4)- β -D-glucan

Chemické složení rostlinné BS - celulóza

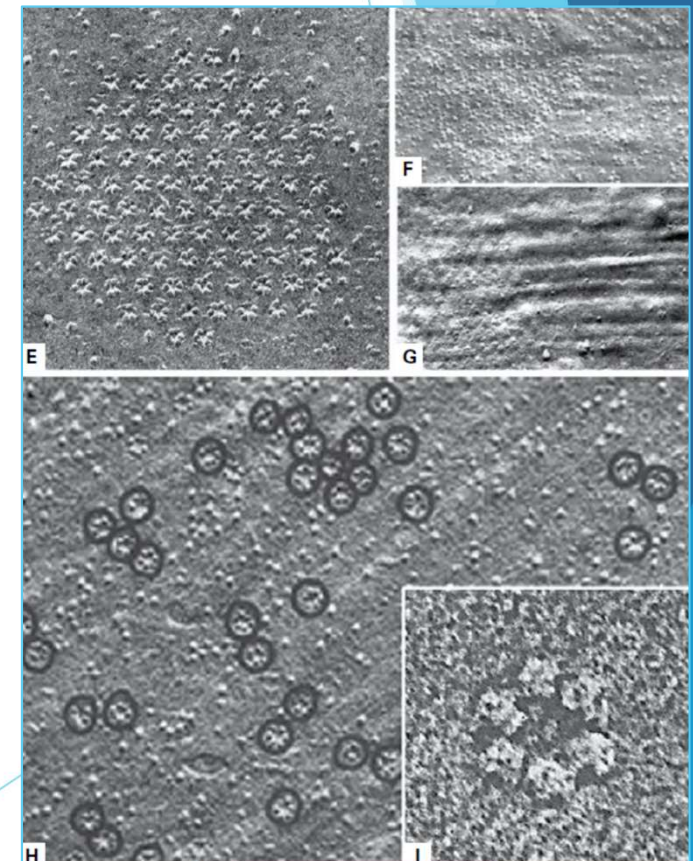
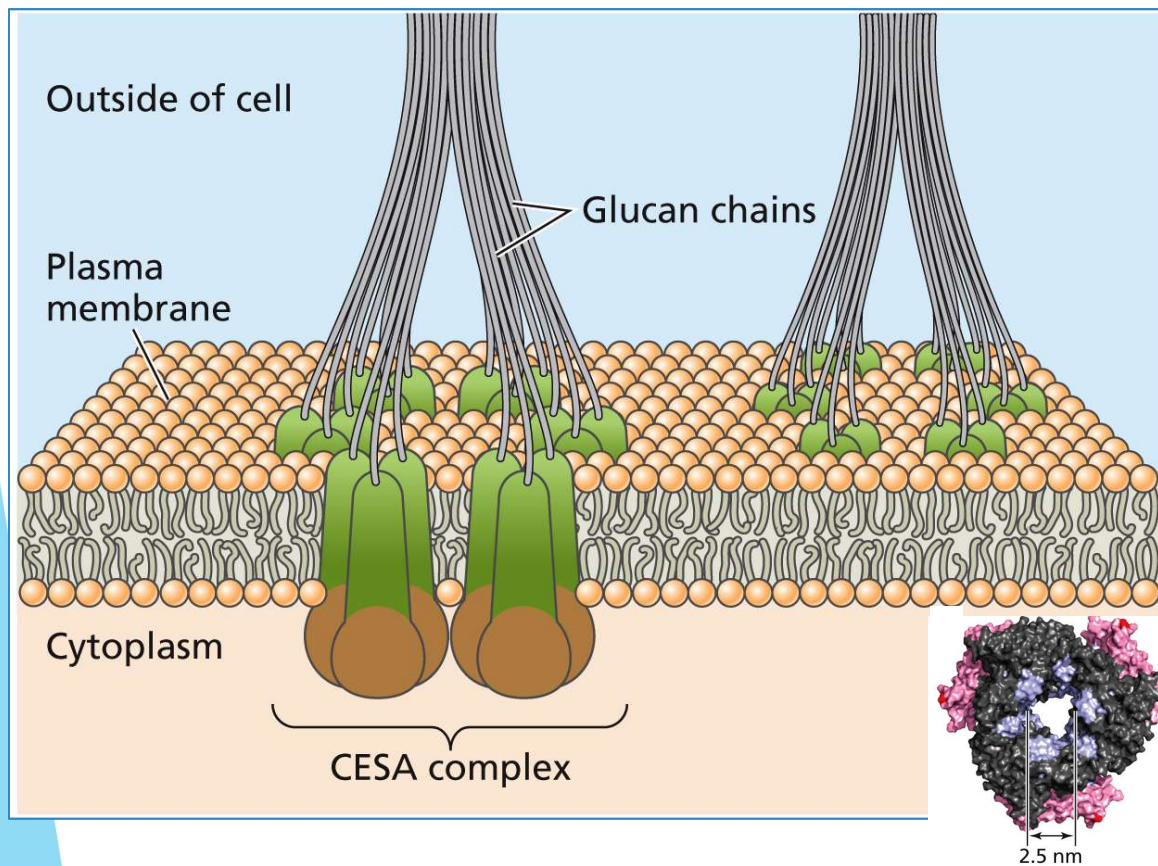
- ▶ Celulóza (cca 20-30 % sušiny, *dry weight* DW) je dlouhý lineární řetězec nejméně 500 molekul glukózy spojených dohromady β -1,4 glykosidickými vazbami.
- ▶ Sousední molekuly celulózy jsou drženy pohromadě vodíkovými vazbami (můstky).
- ▶ Přibližně 18-24 molekul stejné polariry drží pohromadě, aby vytvořily celulózové vlákno (mikrofibril) ~ 3 nm v průměru (obrázek AFM).

Vodíkové můstky uvnitř a mezi sousedními glukánovými řetězci.



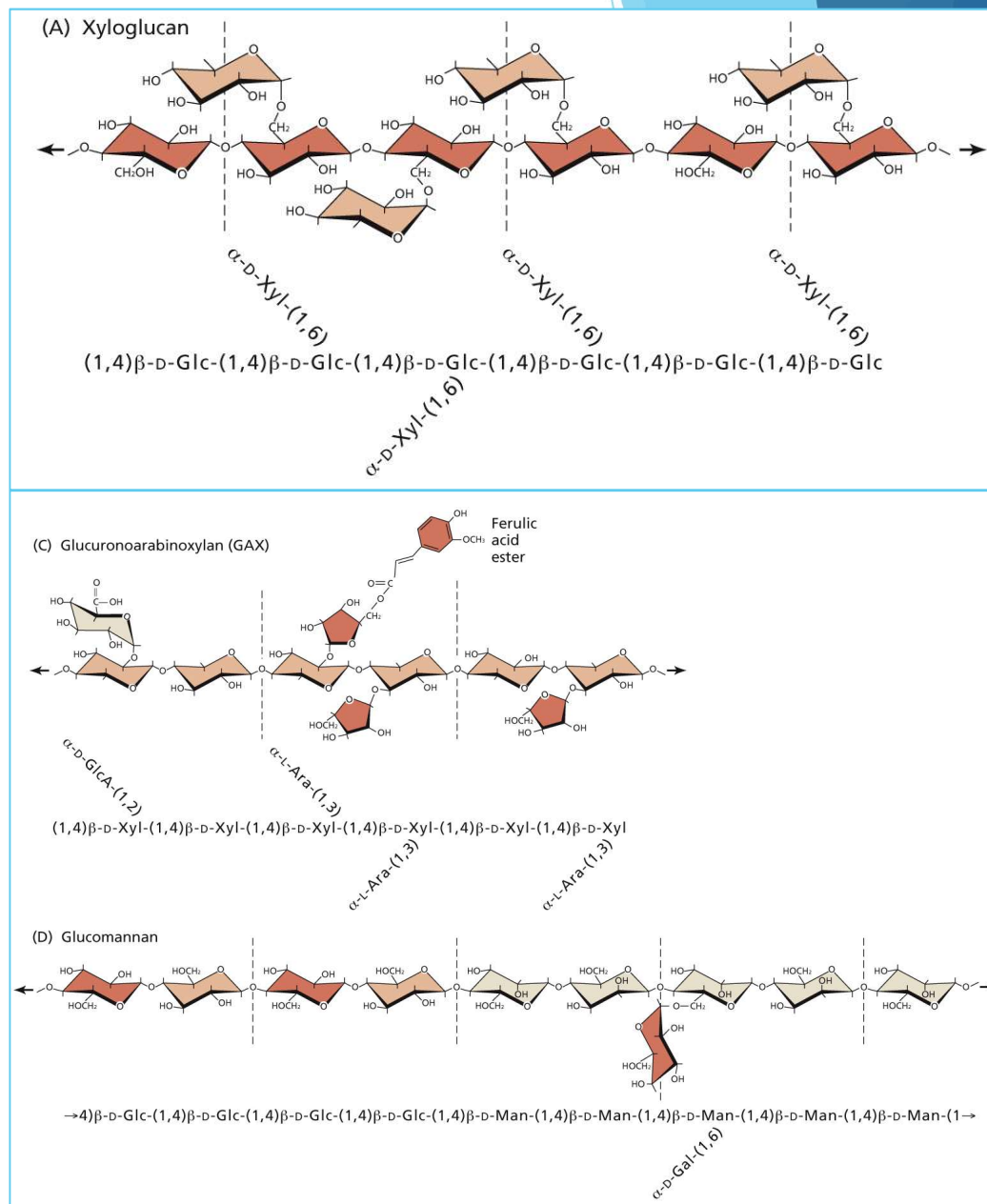
Syntéza celulózy pomocí CESA komplexu

- ▶ Celulózové mikrofibrily jsou syntetizovány z uridindifosfátu (*UDP*)-glukózy na buněčném povrchu membránově vázanými komplexy obsahujícími celulózovou syntázu A (*CESA*).
 - ▶ Komplexní rozetovité struktury tvořené 6 podjednotkami, každá obsahuje 3-6 *CESA*
 - ▶ Superrodina celulózové syntázy *CESA* a *CSL* genů (*cellulose-synthase like CSL genes*).



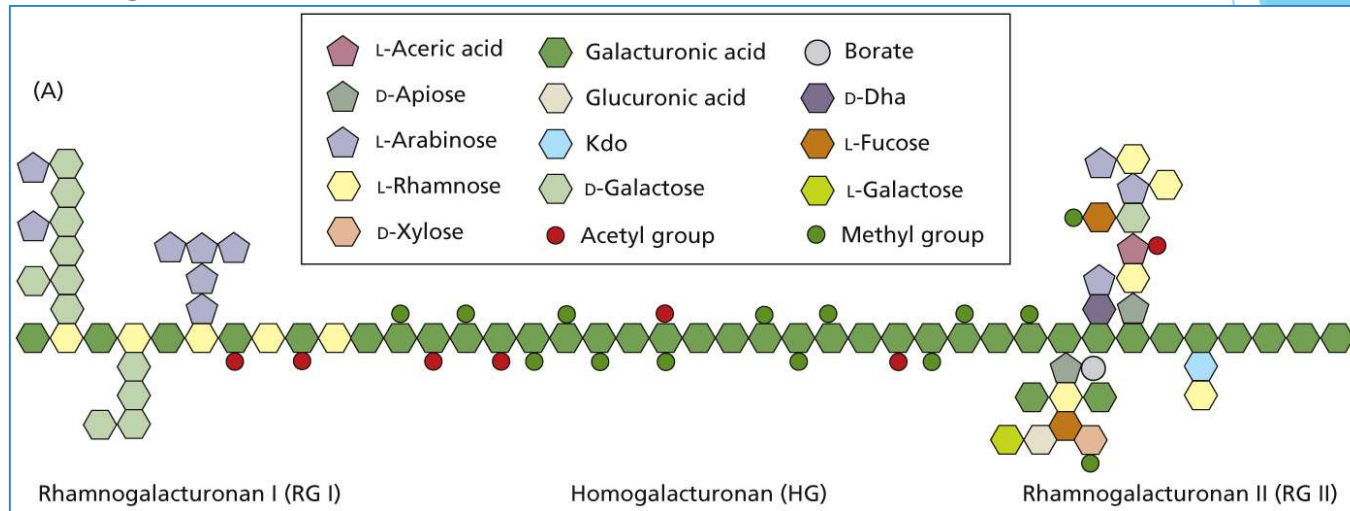
Chemické složení rostlinné BS - hemicelulózy

- ▶ **Hemicelulózy** (cca 15-20 % sušiny) jsou heterogenní skupinou **rozvětvených polysacharidů** složených z lineárního hlavního řetězce β -1,4- vázaného homopolymeru cukru (např. glukózy), na nějž se váží krátké postranní řetězce jiných cukrů (např. xylóza, galaktóza, fukóza).
- ▶ Hemicelulózy zahrnují:
 - ▶ **xyloglukany**
 - ▶ **arabinoxylany**
- ▶ Hlavní řetězec hemicelulóz se pevně, ale **nekovalentně váže** na povrch každého celulóзовého mikrovlákná, čímž je propojuje **vodíkovými vazbami**.
- ▶ *Parciální struktury hlavních hemicelulóz:*



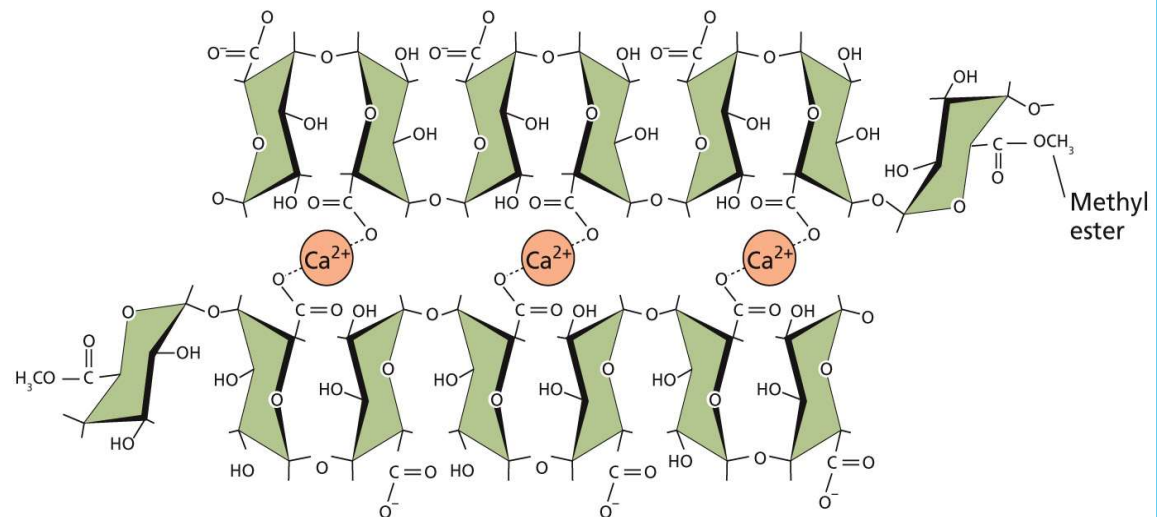
Chemické složení rostlinné BS - pektiny

- ▶ Pektiny (cca 35 % DW) jsou heterogenní skupinou molekul, které obsahují hlavní řetězec z mnoha α -1,4-vázaných zbytků kyseliny galakturonové (GalA), např. Rhamnogalakturonan I a II.



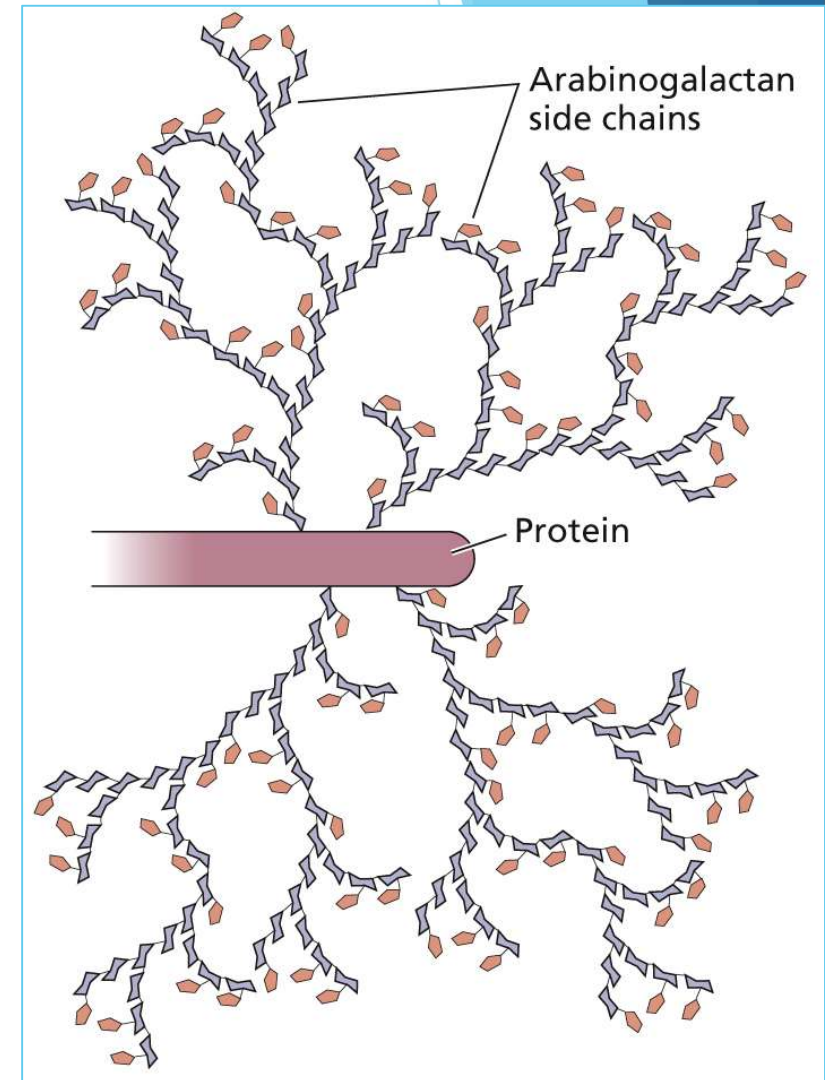
- ▶ Nevětvené homopolymery GalA jsou aniontové (negativně nabité) a snadno **váží Ca^{2+}** za vzniku tuhého gelu s texturou želé (*jelly*).
- ▶ Pektiny se váží na celulóзовé mikrofibrily **esterovými vazbami** a navzájem se váží pomocí **vápníkových můstků** nebo **glykosidických vazeb**.

(B) Ionic bonding of pectin network by calcium



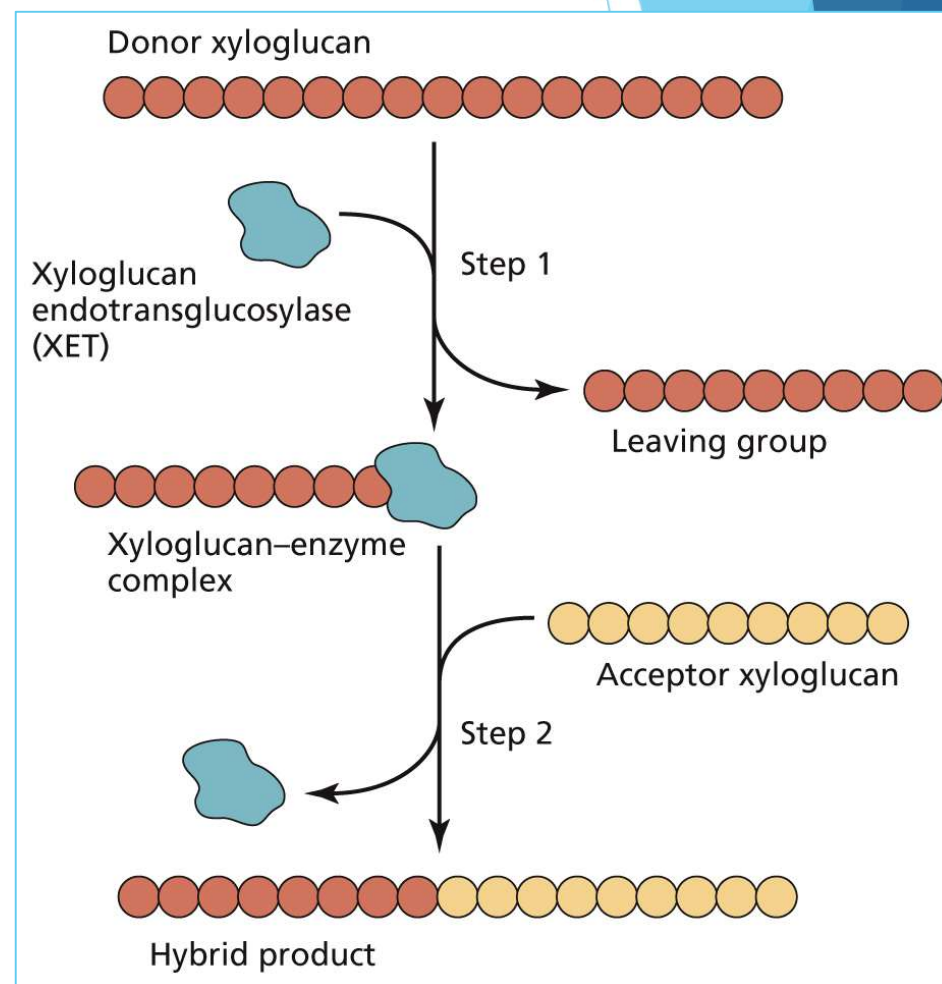
Chemické složení rostlinné BS - proteiny

- ▶ Proteiny (5-10 % DW), z nichž mnohé jsou **glykoproteiny** a mají vysoký podíl navázaných cukrů (např. arabinogalaktan).
- ▶ Nejznámějším proteinem je **extensin** (*žádný vztah k buněčné extenzi!*), který může být vyžadován jako lešení pro pektiny.
 - ▶ Asi 30 % aminokyselin extensinu a příbuzných proteinů je *hydroxyprolin*, jeho hydroxylová skupina, stejně jako ty v *serinu a threoninu*, může být **glykosylována** v Golgiho aparátu za vzniku glykoproteinů.
- ▶ BS také obsahuje mnoho nestructurálních proteinů:
 - ▶ **glykosidázy** (budování a restrukturalizace BS)
 - ▶ **metylesterázy pektinu** (transformace methyl esterifikovaných pektinů na aniontové pektiny)
 - ▶ **expansiny** (*cell wall loosening*)
 - ▶ **yieldiny**
 - ▶ proteiny podílející se na interakci s plazmatickou membránou...



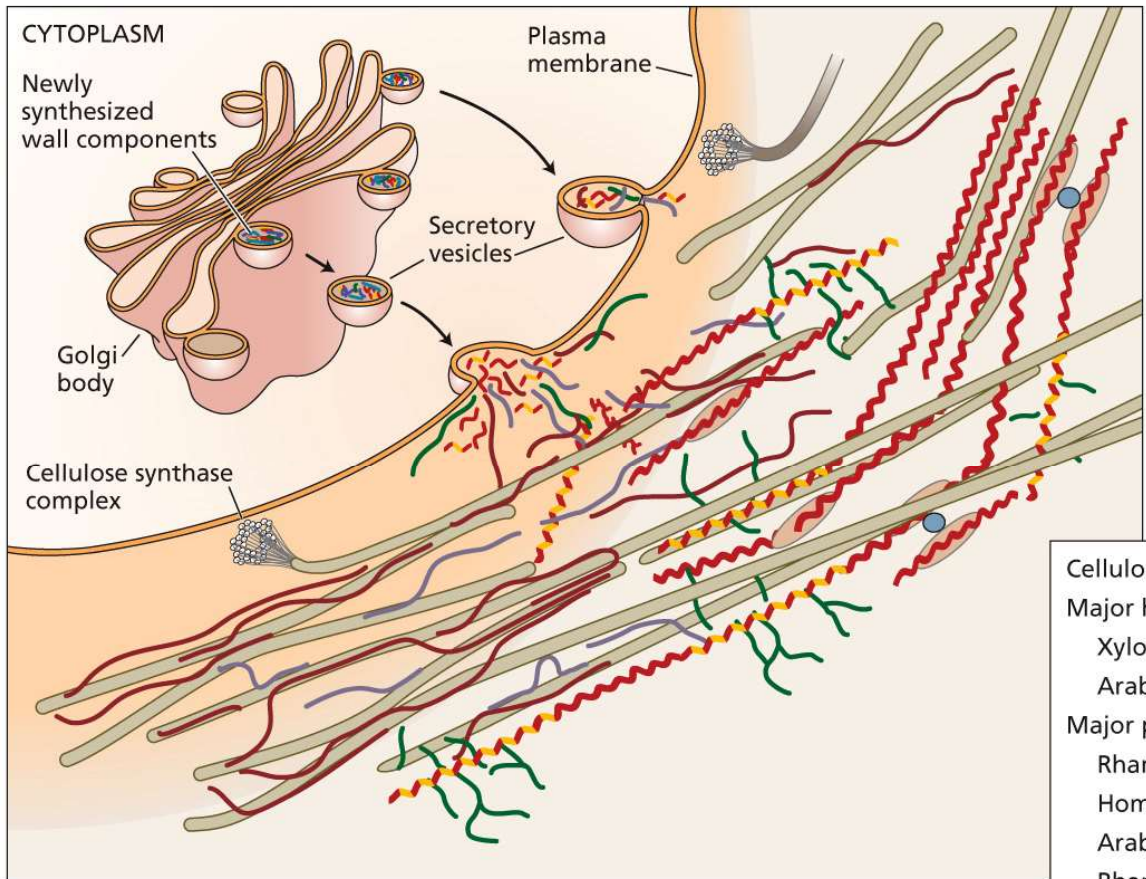
Syntéza - depozice - montáž - modifikace jednotlivých polymerů BS

- ▶ Existují stovky enzymů, které se podílejí na modifikaci polymerů BS
 - ▶ Carbohydrate-Active enZymes Database (www.cazy.org)
 - ▶ Např.: působením xyloglukan endotransglukosylázy (XET) dojde nejdříve k rozštěpení a pak spojení xyloglukanových polymerů do nových konfigurací:
- ▶ BS je extrémně složitá „makromolekula“ zapojená do sběru informací, jejíž aktivita se mění s uspořádáním monomerů....
- ▶ BS liší se od buňky k buňce, z jedné strany buňky na druhou a mění se během vývoje a vlivem prostředí.



Biogeneze buněčné stěny

- ▶ Endomembránový systém je zásadní při syntéze a dodávání komponent BS.
- ▶ Matricové polymery (hemicelulóza a pektiny) jsou syntetizovány v Golgiho aparátu (GA) a vylučovány vezikulami (sekreční dráhou).
 - ▶ Mnoho enzymů (100-1000) potřebných pro syntézu hemicelulózy je v GA.
 - ▶ Proteiny, které tvoří centra syntetizující celulózu, procházejí GA.

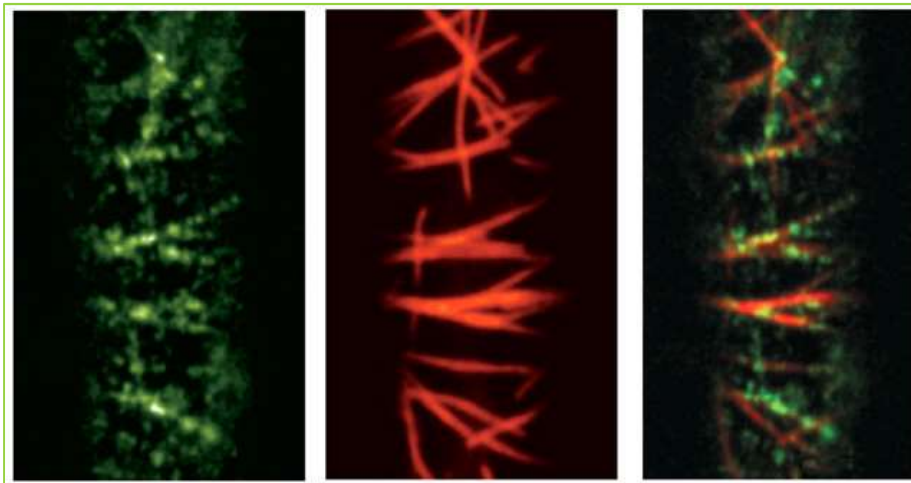


- ▶ Proteiny BS jsou syntetizovány na ribozomech, po navázání SRP (signal recognition particle) vstupují do sekreční dráhy a postupují přes ER, do GA, (proteiny jsou glykosylovány), sekrečních vezikul a do BS.
- ▶ Konečné sestavení BS probíhá v samotné BS, kde jsou přítomny potřebné enzymy.

Cellulose	
Major hemicelluloses	
Xyloglucan	
Arabinoxylan	
Major pectin domains	
Rhamnogalacturonan I	
Homogalacturonan	
Arabinan	
Rhamnogalacturonan II	
Borate ester link	

Mikrotubuly orientují depozici BS

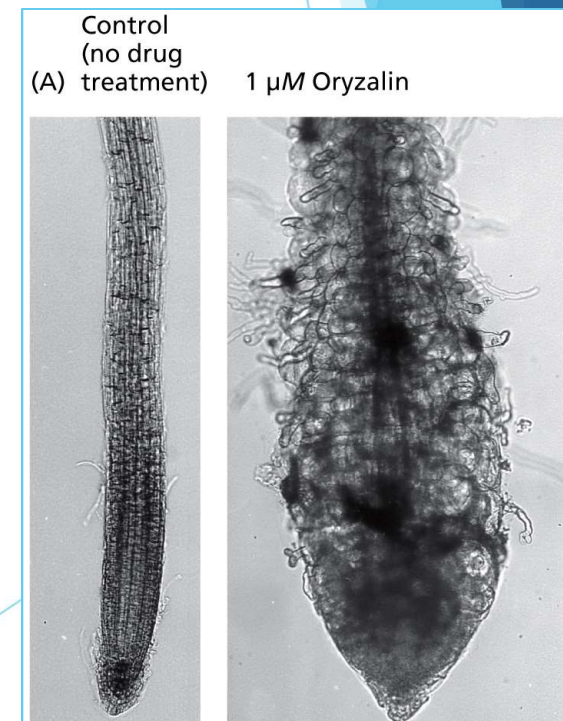
- ▶ Většina dat dává přednost **jedné hypotéze**, že mikrotubuly řídí komplex celulóz-syntézy a orientují mikrofibrily, protože orientace mikrotubulů je paralelní s orientací celulózových mikrofibril.



Obrázky **CESA** a **mikrotubulů** naznačují, že mikrotubuly řídí trajektorii pohybu CESA v plasmatické membráně.

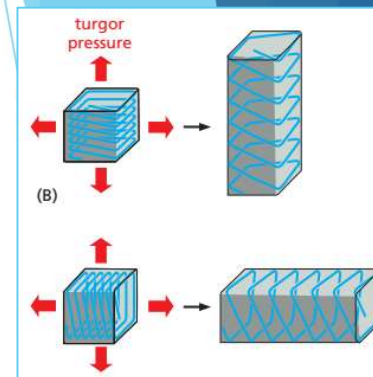
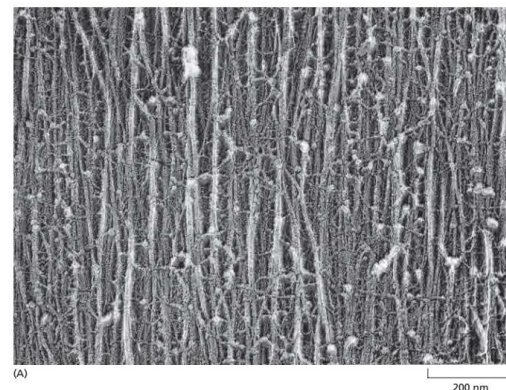
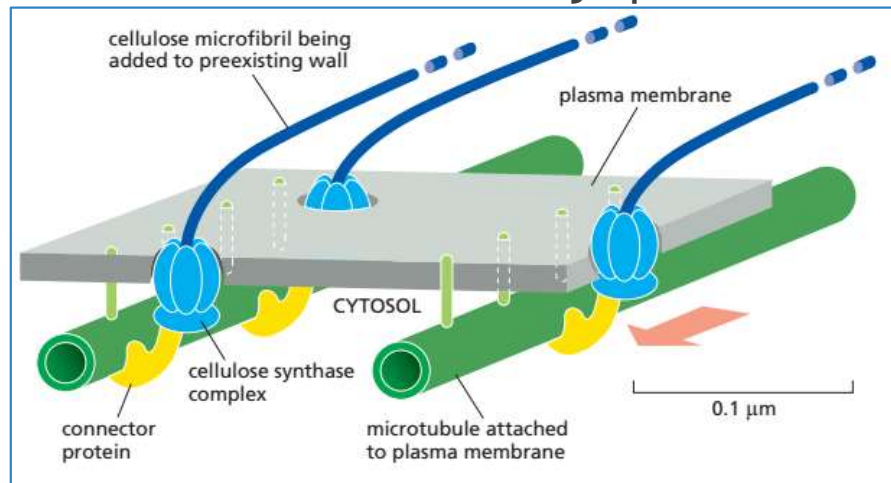
- ▶ Další důkazy:

- ▶ Narušení kortikálních mikrotubulů má za následek dramatický nárůst radiální expanze buněk a současné snížení prodloužení (viz. oryzalin).
- ▶ Činidla, která inhibují polymeraci nebo organizaci mikrotubulů, ovlivňují také orientaci mikrofibrilů.



Orientovaná depozice BS řídí růst rostlinných buněk

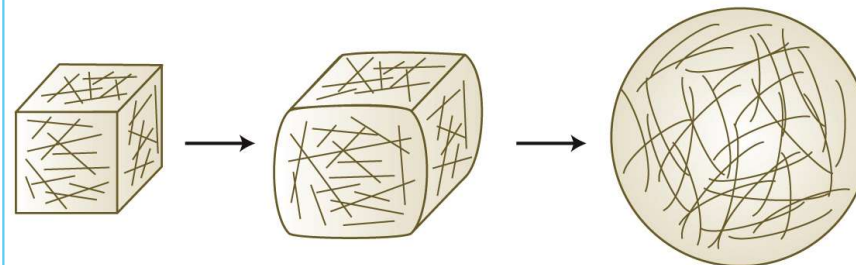
► Orientace mikrotubulů je paralelní s orientací celulózových mikrofibril.



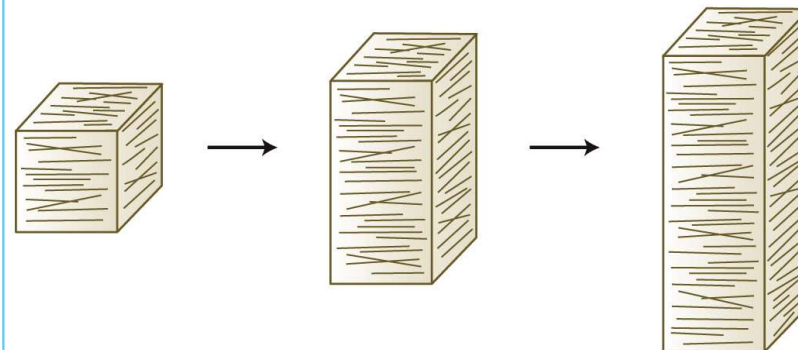
► Orientace nově uložených celulózových mikrofibril ovlivňuje směr buněčné expanze:

- Náhodně orientované (izotropní růst) např. meristémy.
- Příčná orientace má za následek podélnou expanzi buněk (anizotropní růst).

(A) Randomly oriented cellulose microfibrils

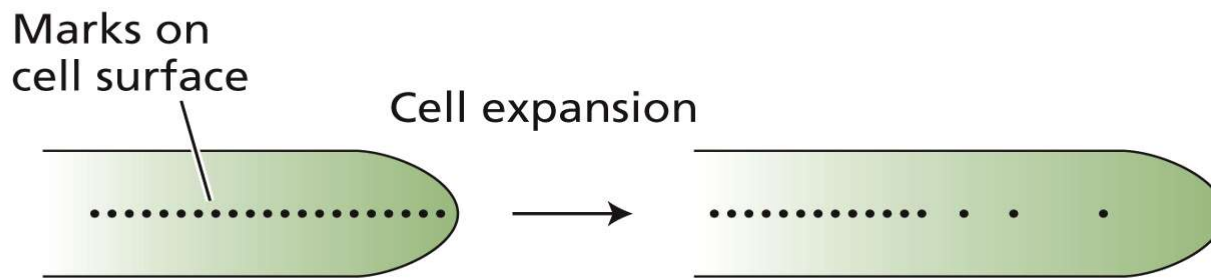


(B) Transverse cellulose microfibrils

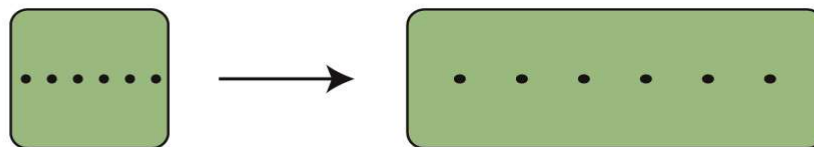


Buněčný povrch se rozpíná různě

(A) Tip growth ~ typické pro pylové láčky, kořenové vlásky

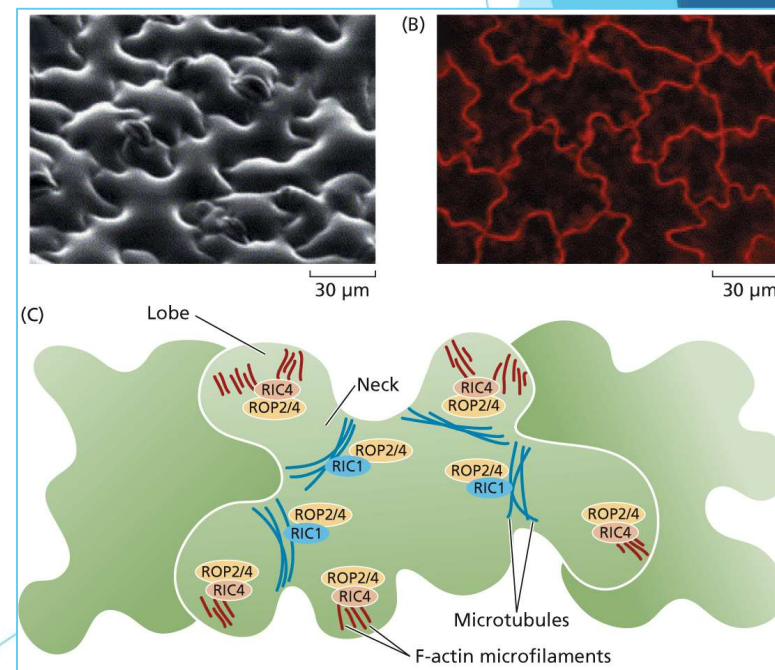


(B) Diffuse growth ~ většina buněk v mnohobuněčných rostlinách



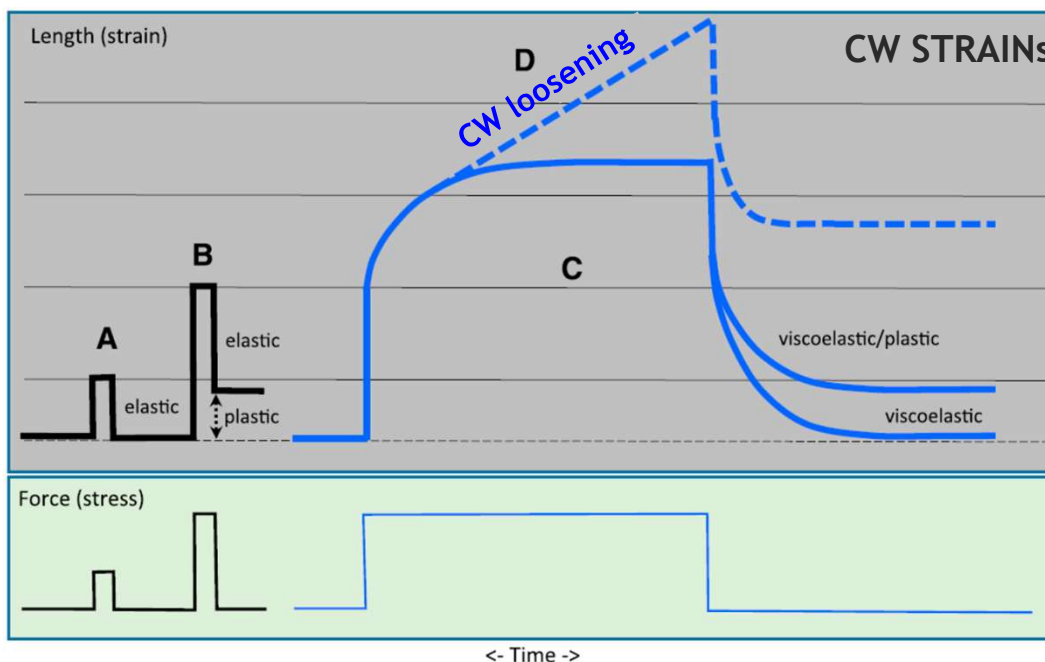
▶ "mezi (In between)" ~ např. interdigitální buněčný růst *pavement cells* (*Arabidopsis* leaf epidermis)

▶ laloky a zářezy jsou regulovány ROP (*Rho*-like from plants) GTPázami a jejich aktivačními proteiny (RIC), které organizují cytoskeleton.



Biomechanické vlastnosti BS

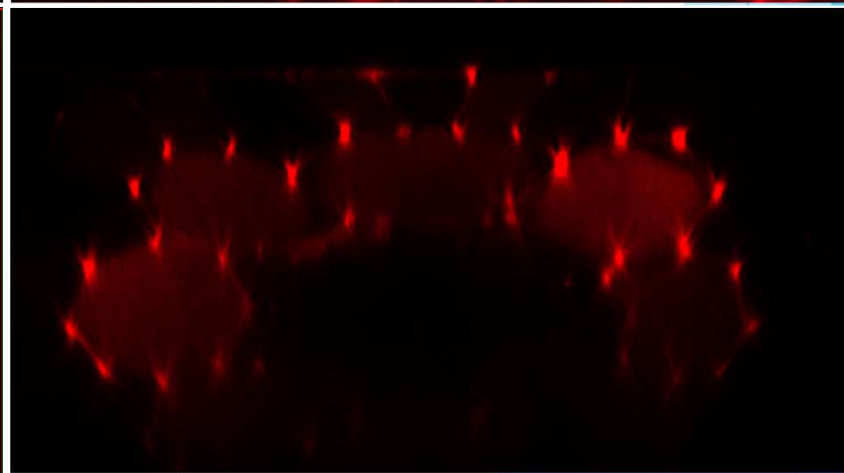
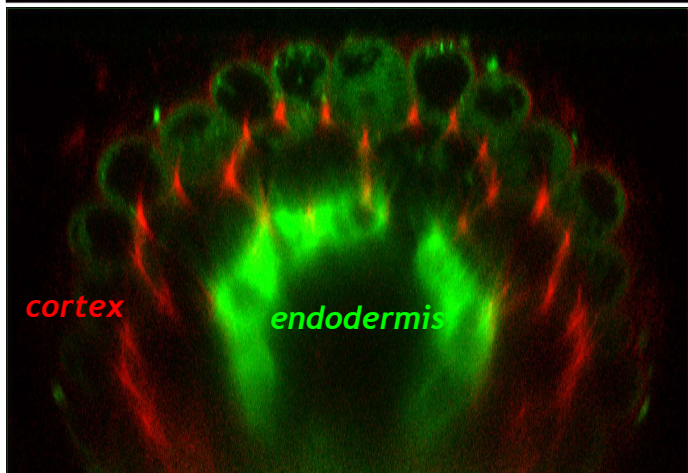
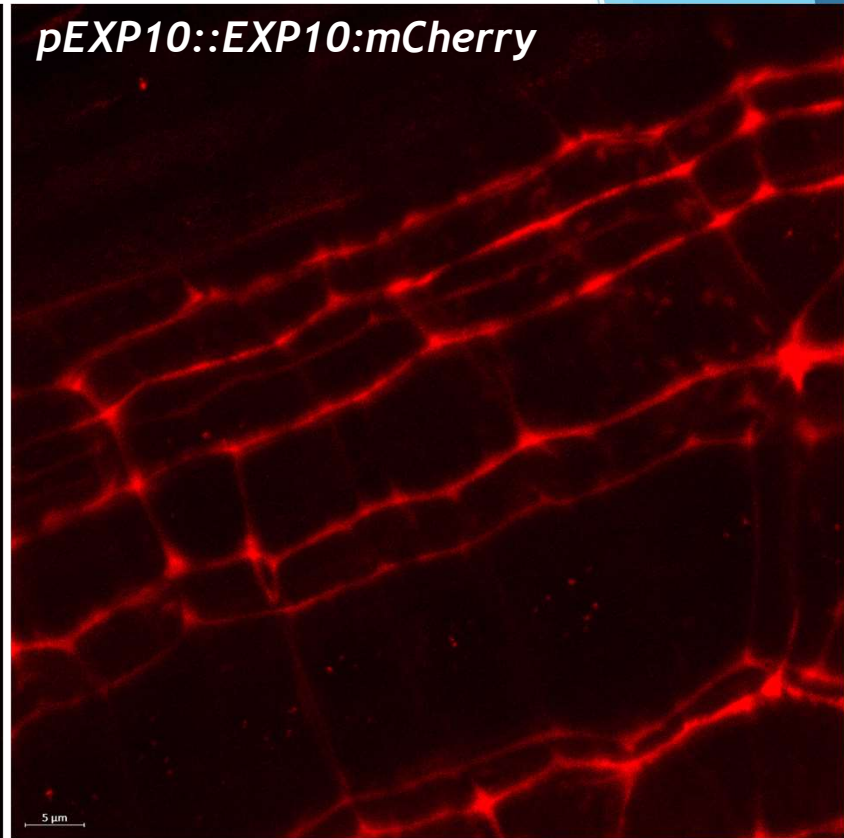
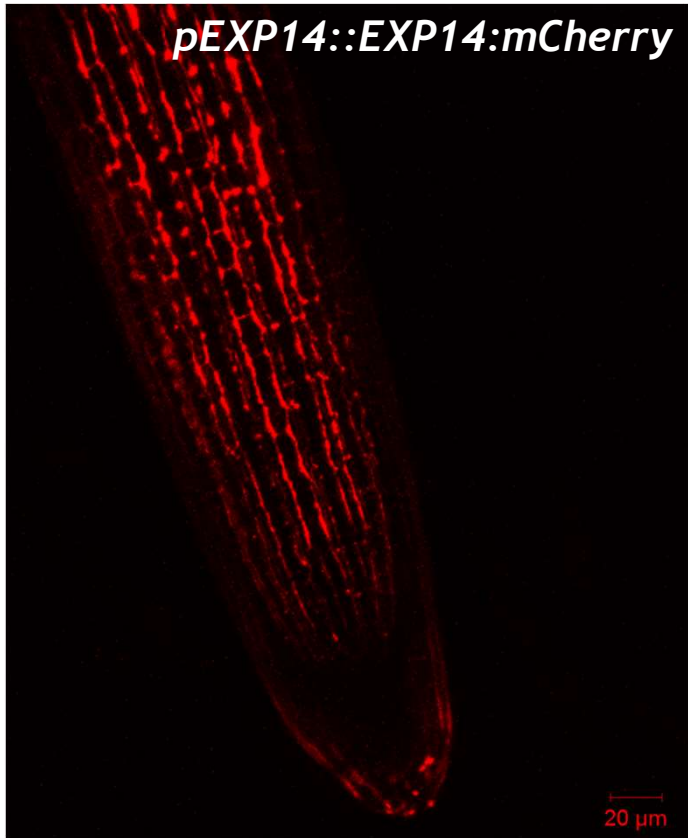
- ▶ BS jako hydratovaný polymerní materiál má **viskoelastické vlastnosti** (mezi pevnou látkou a kapalinou).
- ▶ Jeho pevnost může být kvantifikována modulem pružnosti a pevností v tahu.
 - ▶ Pevnost v tahu je množství napětí potřebného k přetržení materiálu.
 - ▶ Pevnost v tahu umožňuje rostlinným buňkám vyvinout turgorový tlak.
- ▶ Stresová relaxace BS umožňuje snížit turgor a vodní potenciál a absorbovat více vody pro expanzi buněk...



Rozvolnění BS (CW loosening) má za následek relaxaci tahového napětí, což vede k expanzi buněk.

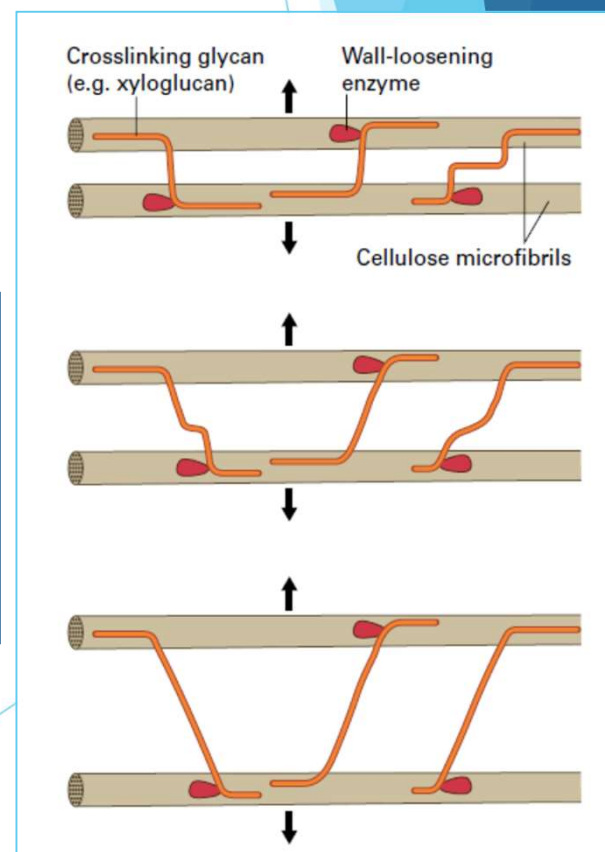
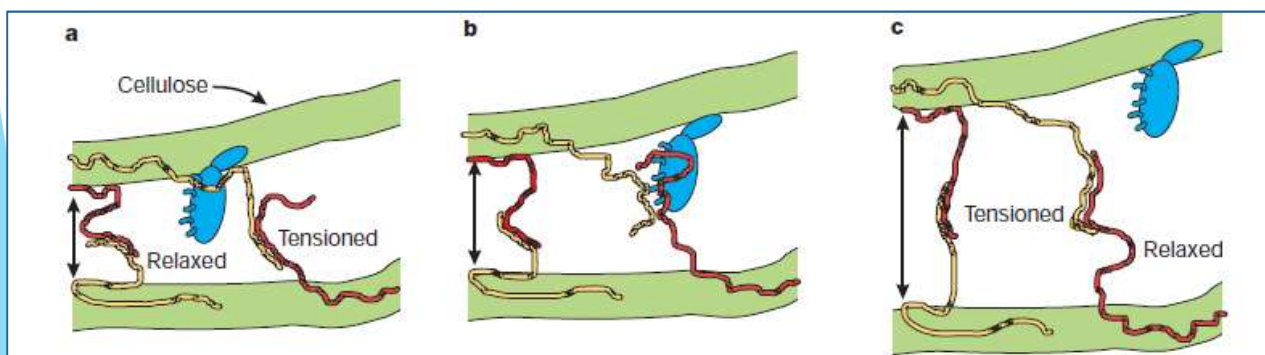
- ▶ Elastická deformace (vratná)
- ▶ Plastická deformace (nevratné prodloužení)

Lokalizace expansinů do BS



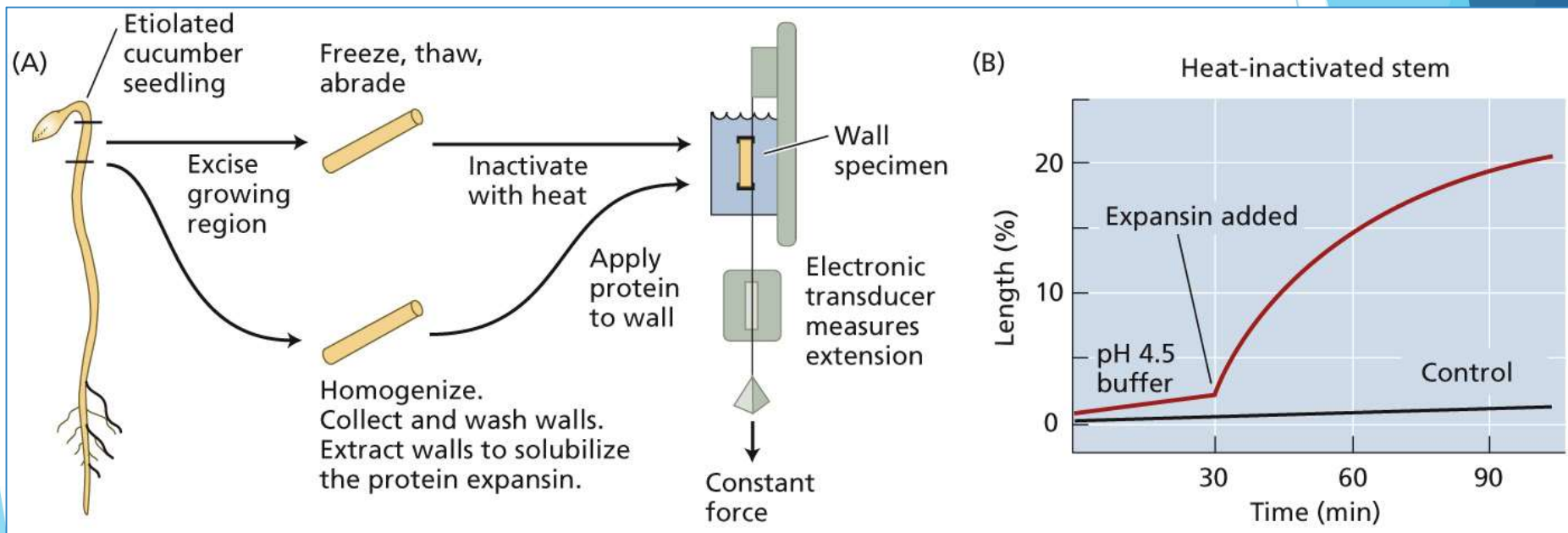
Expansiny a „teorie kyselého růstu“

- ▶ “*Acid growth theory*” říká, že prodlužování rostlinných buněk je podporováno auxinem stimulovanou acidifikací BS (Cleland, 1971; Hager *et al.*, 1971).
 - ▶ Cílem jsou H⁺-ATPázy v plazmatické membráně, které vylučují protony H⁺ do BS.
- ▶ **EXPANSINY** jsou aktivovány sníženým pH apoplastu (McQueen-Mason *et al.*, 1992).
- ▶ V *Arabidopsis* je 36 expansinů, dělí se na dvě hlavní rodiny α - (EXPA) a β - (EXPAB).
- ▶ **EXPANSINY** nemají hydrolytickou ani jinou enzymatickou aktivitu:
- ▶ *narušují nekovalentní vazby mezi polysacharidy BS, čímž rozvolňují BS a umožňují prokluz celulózových mikrofibril a asociovaných polysacharidů (xyloglukanů).*



Extenze izolovaných BS indukovaná nízkým pH

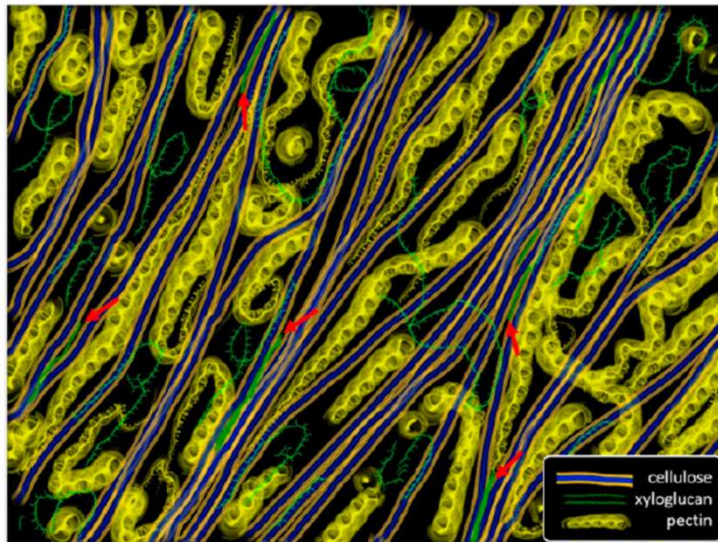
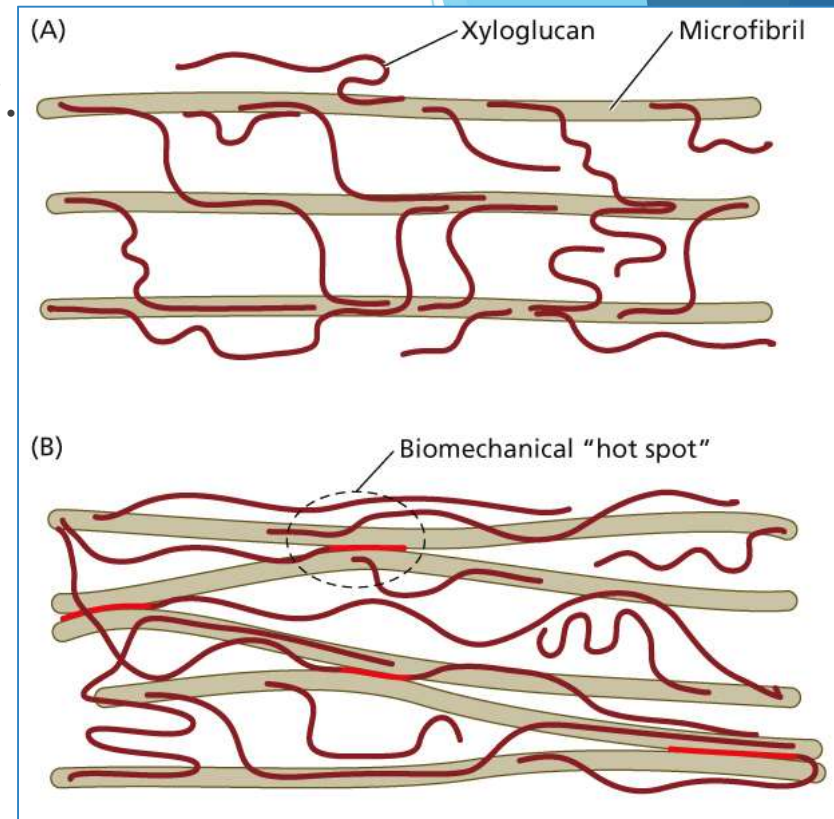
- ▶ Měřeno v extenziometru (prof. Daniel Cosgrove)
 - ▶ Vzorek BS z teplem usmrcených buněk se upne v přístroji a napne.
 - ▶ Extenziometr měří délku pomocí elektronického převodníku.



- ▶ Při nízkém pH se BS nevratně prodluží (*it creeps*).
 - ▶ “*Creep*” označuje časově závislé nevratné prodloužení..

Jak rostou rostlinné buňky? Zásadní role polymerů BS

- ▶ BS je pevná, aby odolala turgoru, a přesto flexibilní, aby umožnila nevratnou expanzi.
- ▶ (A) *Model tethered-network* navrhuje, že xyloglukany se ve velké míře váží na celulózové povrchy a tvoří příčné můstky, které paralelní mikrofibrily spojují dohromady.
- ▶ (B) Nový *alternativní model* naznačuje, že xyloglukan není nosným a extenze BS a mechanika jsou řízeny na omezených biomechanických “hot spots”



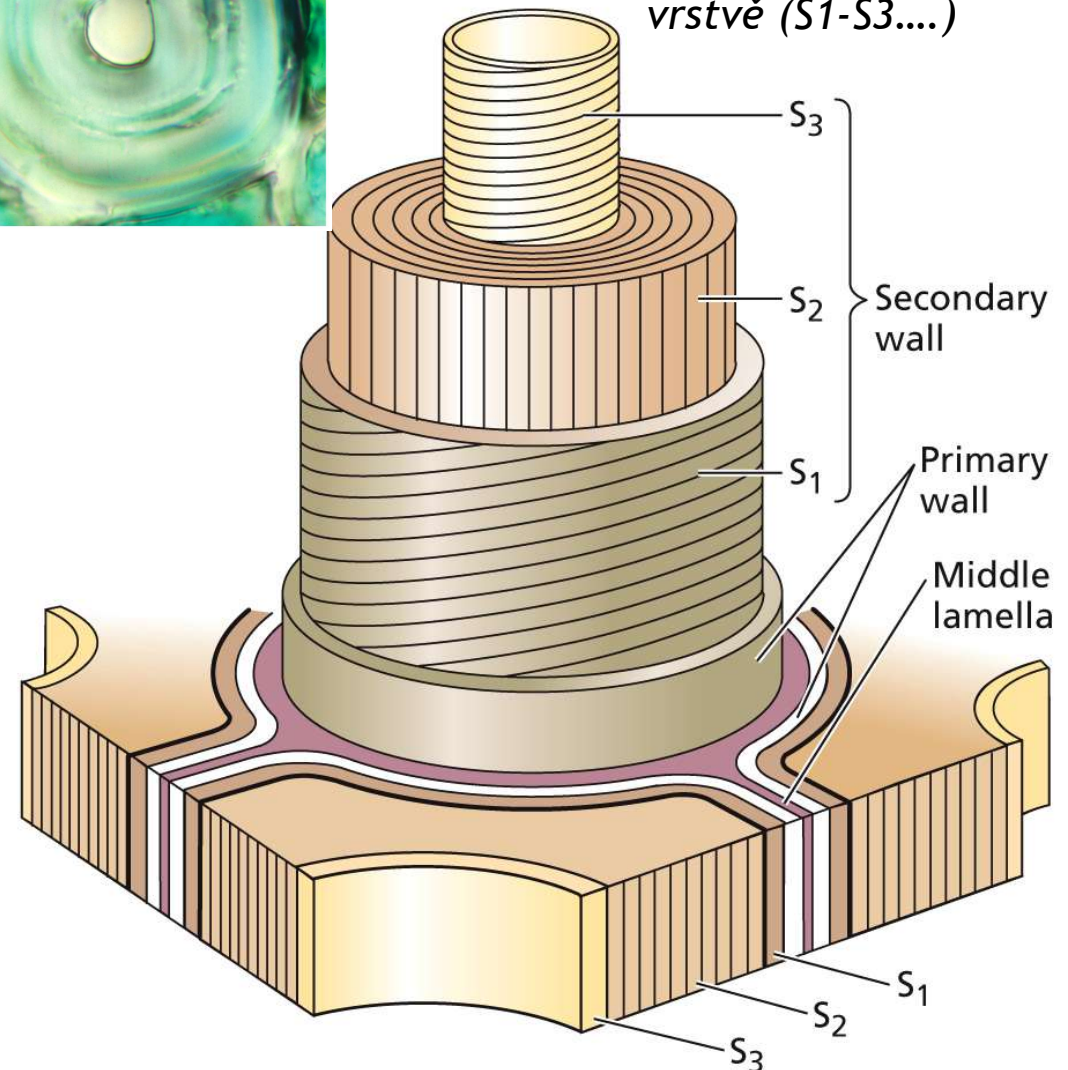
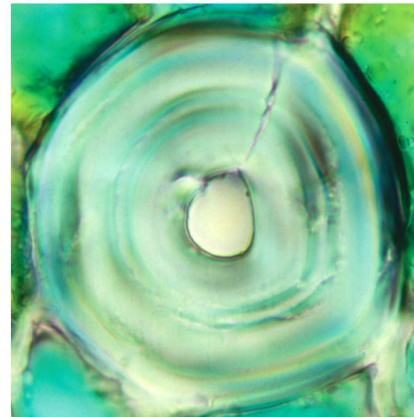
- ▶ Biomechanický “hot spot” je oblast, kde se celulózové mikrofibrily dostávají do těsného kontaktu s pomocí zachyceného xyloglukanu (červené šipky).

Break



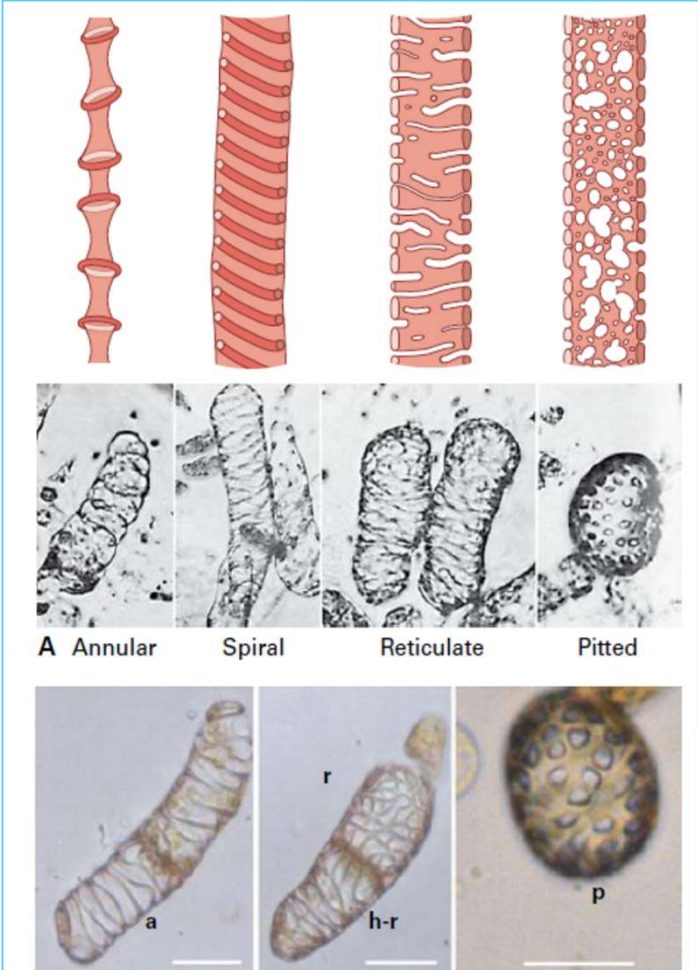
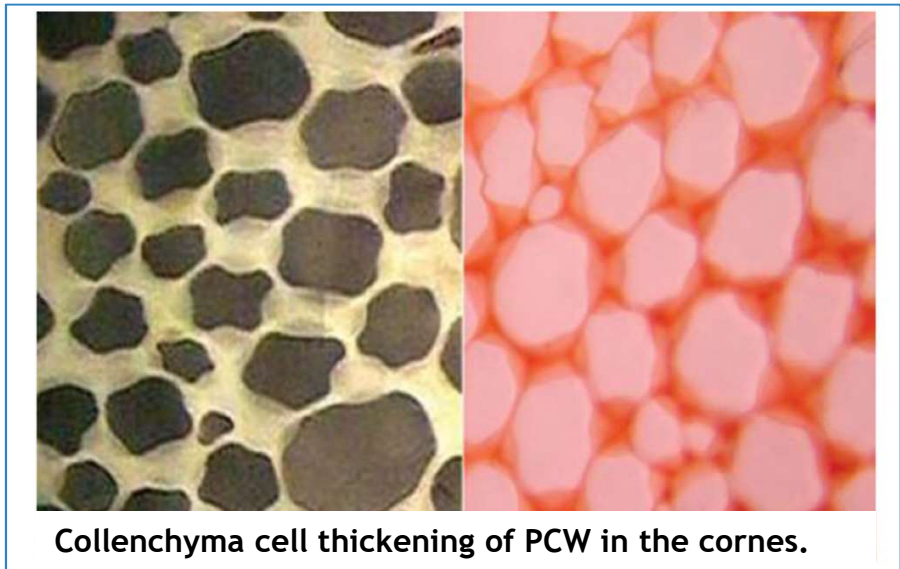
Struktura sekundární BS

- ▶ Hierarchická struktura sestavená zevnitř PBS
- ▶ Strukturální zesilující role
- ▶ Často vysoce lignifikovaná
- ▶ Celulózu sekundární BS syntetizují 3 CESA komplexy, ale liší se od PBS!
- ▶ Hemicelulózy sekundární BS mají xylanové a (gluko-)mannanové hlavní řetězce s několika substitucemi (postranní řetězce)
 - ▶ různé vlastnosti BS (rozpuštěnost, vazba celulózy)



Funkce sekundární BS

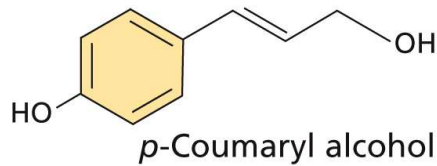
- ▶ Buňky sekundární BS jsou ve zralosti často mrtvé,
 - ▶ např. tracheidy, xylémové cévy, vlákna v dřevnatých pletivech,
- ▶ interfascikulární vlákna floemu, kamenné a epidermální buňky (vlákna bavlny)



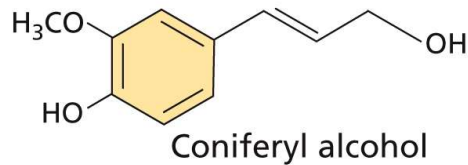
Tracheary elements of *Zinnia elegans*.

Lignifikace sekundární BS

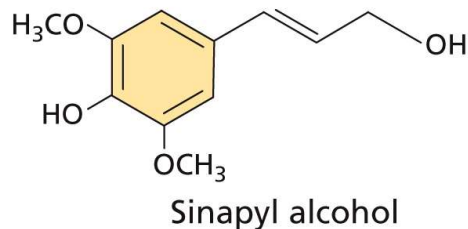
- ▶ Transformuje sekundární BS na hydrofobní strukturu odolnou proti dekonstrukci (tlaku).
- ▶ Lignifikace začíná během tvorby sekundární BS a může pokračovat i po buněčné smrti metabolickými příspěvky sousedních živých buněk.
- ▶ **Monolignoly** jsou hlavními stavebními kameny ligninu
 - ▶ H, G, S jednotky ligninového polymeru se liší počtem methoxy-substituentů ve fenolovém kruhu.



→ *p*-Hydroxyphenyl (H) units (minor amounts)

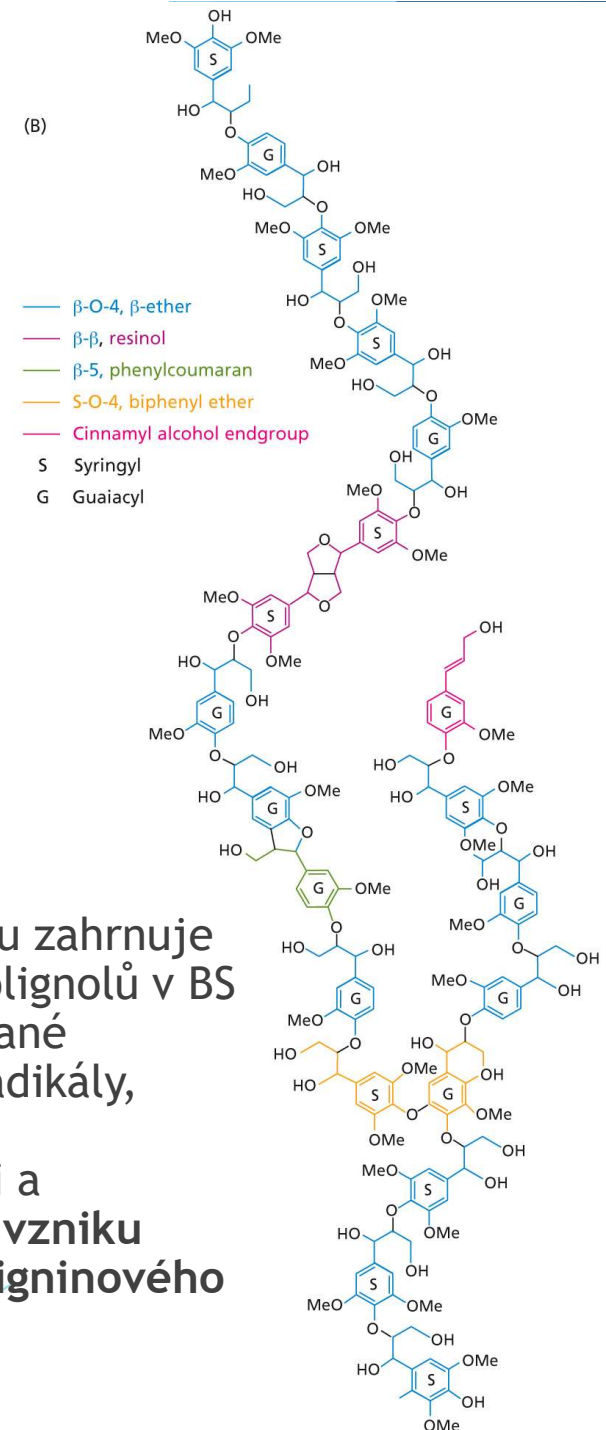


→ Guaiacyl (G) units



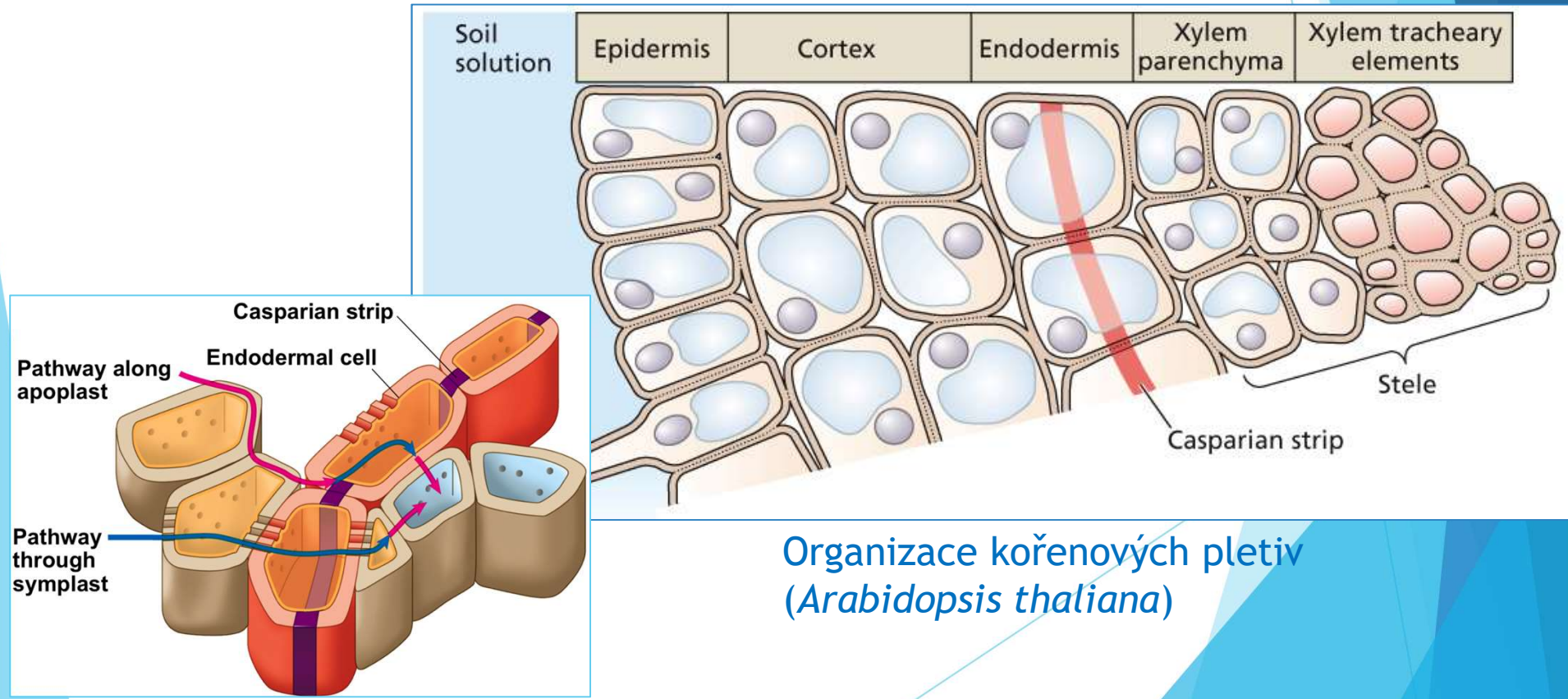
→ Syringyl (S) units

▶ Tvorba ligninu zahrnuje spojení monolignolů v BS zprostředkované oxidačními radikály, katalyzované peroxidázami a lakázami, za vzniku náhodného ligninového polymeru.



Permeabilita BS

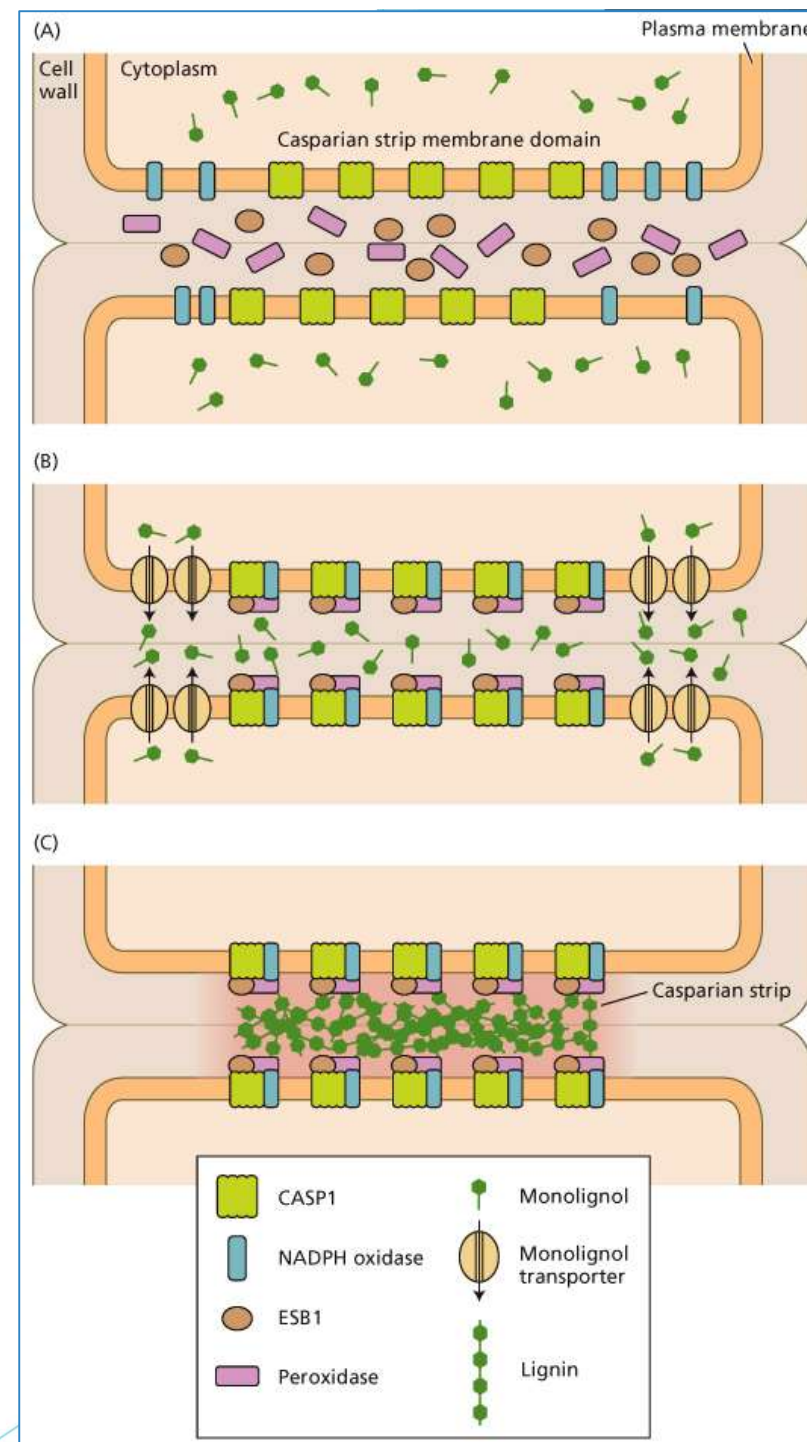
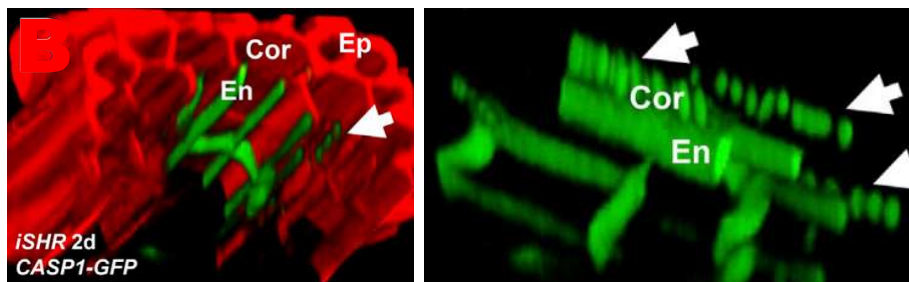
- ▶ BS není pouze pevná a amorfní, ale **obsahuje četné vodné póry**:
 - ▶ funguje jako síto, přes které mohou voda a polární molekuly snadno difundovat, když je BS hydratovaná (její propustnost je typicky větší než u PM).
 - ▶ Průměrná velikost pórů cca 5-10 nm, liší se od buňky k buňce a během vývoje.
- ▶ Dehydratovaná BS omezuje pohyb vody; odpařování je hnací silou pohybu.



Organizace kořenových pletiv
(*Arabidopsis thaliana*)

Zvláštní lignifikace probíhá v Caspariho proužku

- ▶ Caspariho proužek (*Casparian strip*) je prstenovitá modifikace BS cévních rostlin.
- ▶ V kořenové endodermis tvoří *hydrofobní bariéru* mezi stéle a kůrou.
 - ▶ Selekcce živin, ochrana před patogeny...
- ▶ Obsahuje **suberin**, ale také **lignin**!
- ▶ **CASP1** klíčový protein, řídící syntézu
 - ▶ NADPH oxidáza vytváří H_2O_2 , peroxidázi
- ▶ **ESB1** (Enhanced Suberin 1) je nezbytný pro správnou lignifikaci v úzké oblasti.
 - ▶ Člen rodiny DIRIGENT proteinů s dirigentní doménou, která může řídit stereochemii.



Syntéza kalózy (*callose*) a Ca^{2+} signalizace

▶ Integrita PM je důležitá pro syntézu celulózy:

- ▶ udržuje nízkou koncentraci Ca^{2+} v cytosolu, která je nezbytná pro syntézu celulózy.

▶ Zvýšení koncentrace Ca^{2+} inhibuje syntézu celulózy a stimuluje syntézu kalózy (β -1,3 glukan).

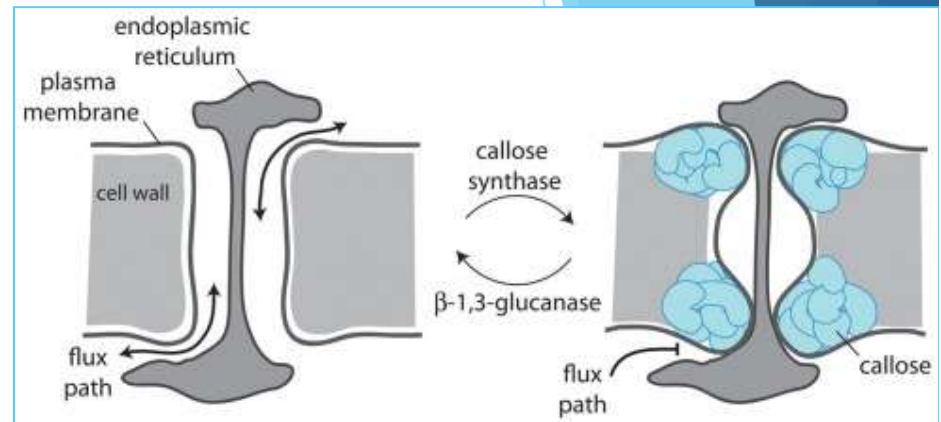
- ▶ Koncentrace Ca^{2+} funguje jako součást signálního řetězce, signalizující útok, buňka se může odizolovat od zbytku rostliny kalózou

▶ Tvorba kalózy při poranění rostliny (Ca^{2+} funguje jako *secondary messenger*).

▶ Ukládání kalózy kolem plasmodesmat může být také důležité pro oddělení jedné buňky od druhé.

▶ Genetické důkazy naznačují, že kalózová syntáza (*Glucan Synthase-Like gene, GLS*) a celulózová syntáza pocházejí z nezávislých genů:

- ▶ horizontální přenos genů syntetizujících celulózu z eubakterií do jádra eukaryotických rostlinných buněk v evoluci suchozemských rostlin.



Při inkompatibilní reakci je růst pylových láček zastaven a současně dochází k bobtnání špiček pylových láček a tvorbě kalózových zátek (barvení anilinovou modří, aniline blue)