

TRANSPORT PŘES BUNECNE MEMBRANY

Plasmatická membrána

- selektivně permeabilní bariera: esenciální molekuly (cukry, AA, lipidy.) vstupují do bunky; metabolické intermediáty zůstávají v bunce; odpadní látky se odstraňují

Fosfolipidová dvojvrstva:

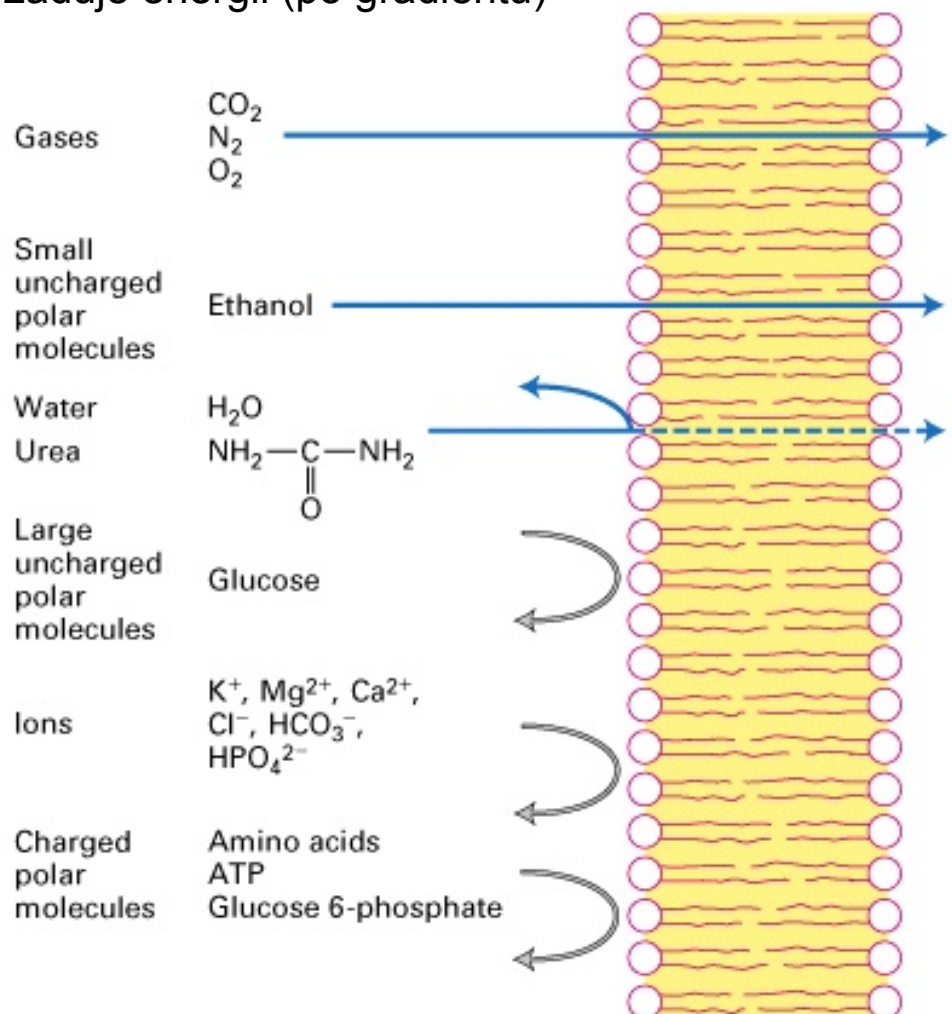
- neprostupná pro většinu **hydrofilních molekul** (glukosa, AA, ionty)
- transport prostřednictvím specifických **transportních proteinů**
- plasmatická membrána i organely
- **hydrofobní molekuly** - mohou projít

Difuze malých molekul přes fosfolipidovou dvojvrstvu

Pasivní difuze - nevyžaduje energii (po gradientu)

1. pohyb molekuly
z vodného roztoku
do hydrofobní
dvojvrstvy

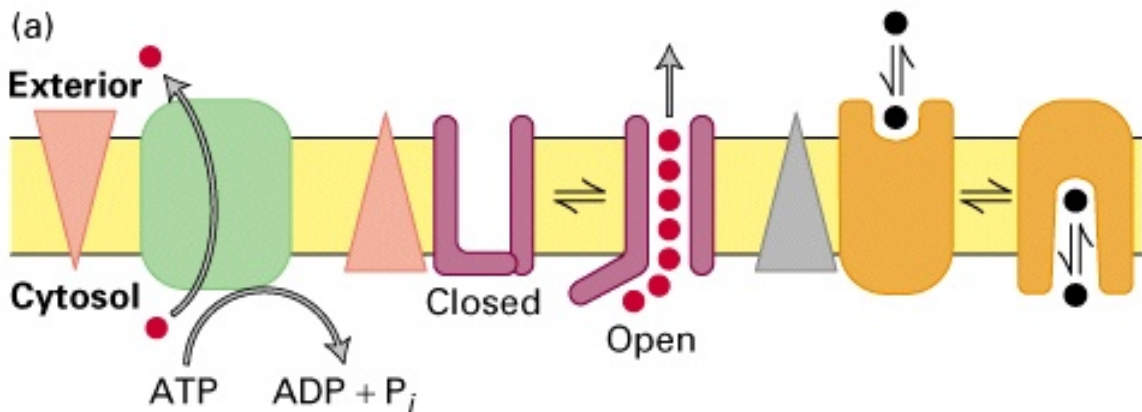
2. Difuze v lipid.
dvojvrstvě
hydrofobní
vrstva 100-1000x
více viskosní
než voda -
limitující krok
rychlosti difuze



Membránové transportní proteiny

- **Integrální transmembránové proteiny** - vysoká specifita pro substráty, studium v liposomech

1. **ATPasové pumpy** - využívají energii z hydrolysy ATP pro pohyb iontu a malých molekul přes membrány proti chemickému koncentracnímu gradientu nebo elektrickému potenciálu - **aktivní transport**
- transport iontu, udržení H^+ gradientu
2. **Kanály** - transportují vodu nebo specifické ionty po směru jejich koncentračního gradientu nebo elektrického potenciálu
3. **Transportery** - specifický transport iontu a jiných molekul, přenesení substrátu vyžaduje konformační změnu transporteru (nižší rychlost přenosu)



ATPasové pumpy

($10^0 - 10^3$ ions/s)

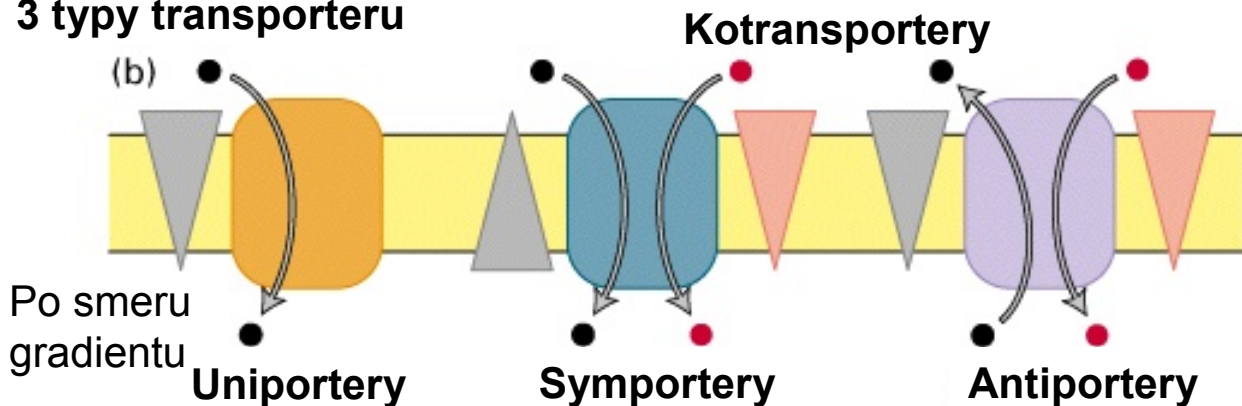
iontové kanály

($10^7 - 10^8$ ions/s)

Transportery

($10^2 - 10^4$ molecules/s)

3 typy transporteru



Kotransportery

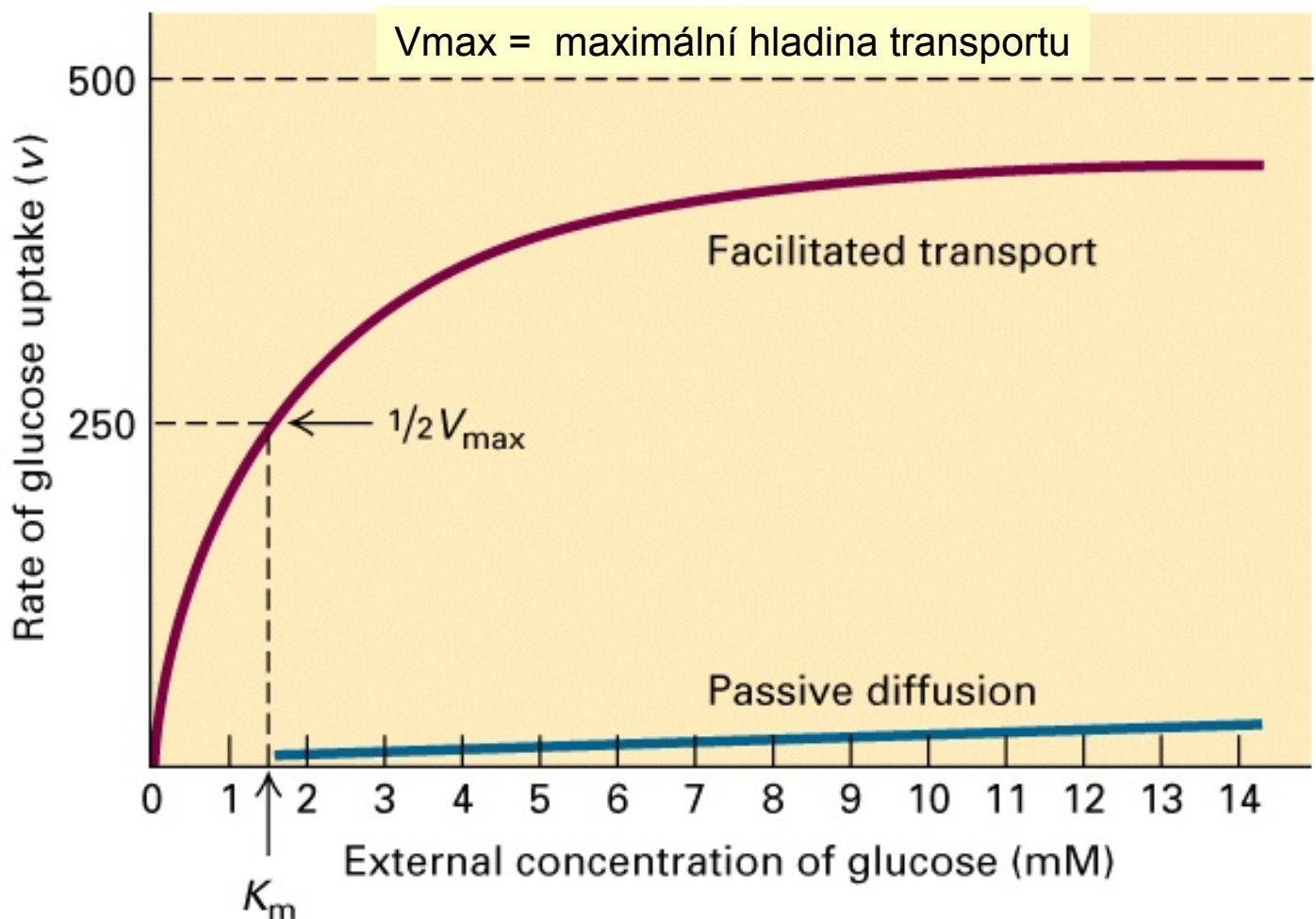
Pohyb jednoho substrátu po směru gradientu spojen s pohybem druhého substrátu proti gradientu

Uniportery

Pohyb substrátu po smeru koncentracního gradientu -

usnadnená difuze

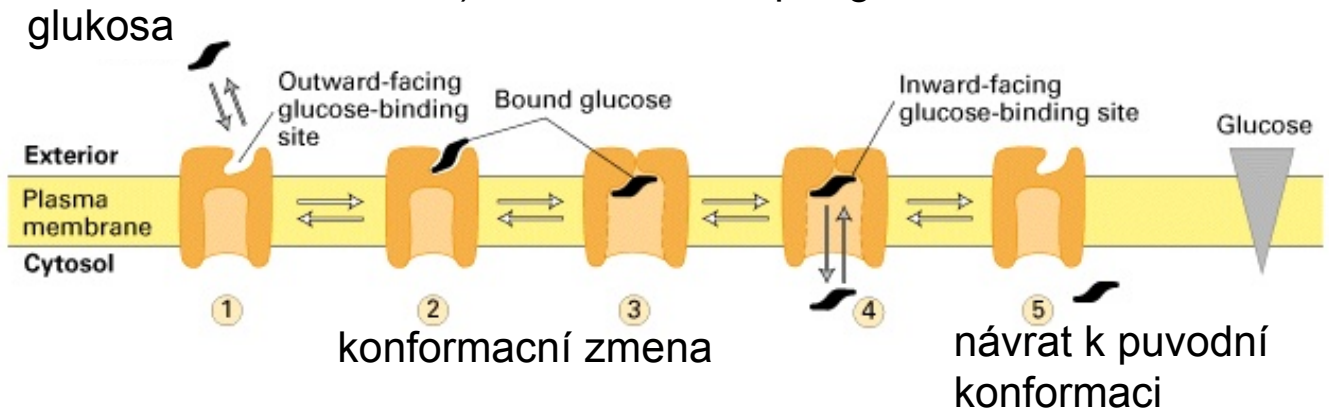
- účinnost je vyšší než u difuze, molekuly nevstupují ("nezdří se") v hydrofobní vrstvě
- transport je specifický (uniporter transportuje buď specifické molekuly nebo skupiny molekul)
- transport se uskutečňuje prostřednictvím omezeného počtu uniporterových molekul (ne přes fosfolipidickou vrstvu)



Při otocení koncentracního gradientu - otocení transportu - tj.
Např. uvolňování glukosy ven z buněk

GLUT1 = transport glukosy do savcích bunek

- 2 konformační stavy - 1) vazebné místo pro glukosu obrácené ven
2) vazebné místo pro glukosu obrácené dovnitř



Vnitrobunecné iontové prostředí a elektrický membránový potenciál

Transport iontu přes plasmatickou membránu - ovlivnen jednak iontovou koncentrací, jednak elektrickým potenciálem na membránu.

- Iontové složení cytosolu - liší se od vnějšího prostředí
- většina bunek - cytosolické pH ~ 7.2,
 - cytosolická koncentrace $K^+ \gg Na^+$
- obratlovci i bezobratlí - koncentrace K^+ je 20-40 x vyšší v bunkách než v krvi X Na^+ koncentrace 8-12 nižší v bunkách než v krvi
- volný Ca^{2+} - koncentrace v cytosolu $< 0.2 \mu M$ (> 1000 x nižší než v krvi)

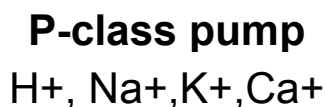
iontové koncentrační gradienty, selektivní pohyb kanály

- **elektrický potenciál** ~ 70 milivoltu (mV) - uvnitř bunek negativní
- tloušťka plasmatické membrány - 3.5 nm, tj. 200.000 V / cm
- důležitý pro řadu procesů (např. elektrické impulsy v neuronech, příjem živin proti koncentračnímu gradientu ...)

savčí bunky - elektrický potenciál je dán především pohybem cytosolického K^+ přes kanály do okolí

rostliny + houby - elektrický potenciál je udržován především ATPasami pumpujícími H^+ ven z bunek

- Transportujú ionty a různé malé molekuly proti koncentračnému gradientu



ABC superfamilie lonty a různé malé molekuly

ABC superfamily (ATP binding cassette): heterogenní, > 100 různých transportních proteinů, 2 transmembránové + 2 cytosolické domény

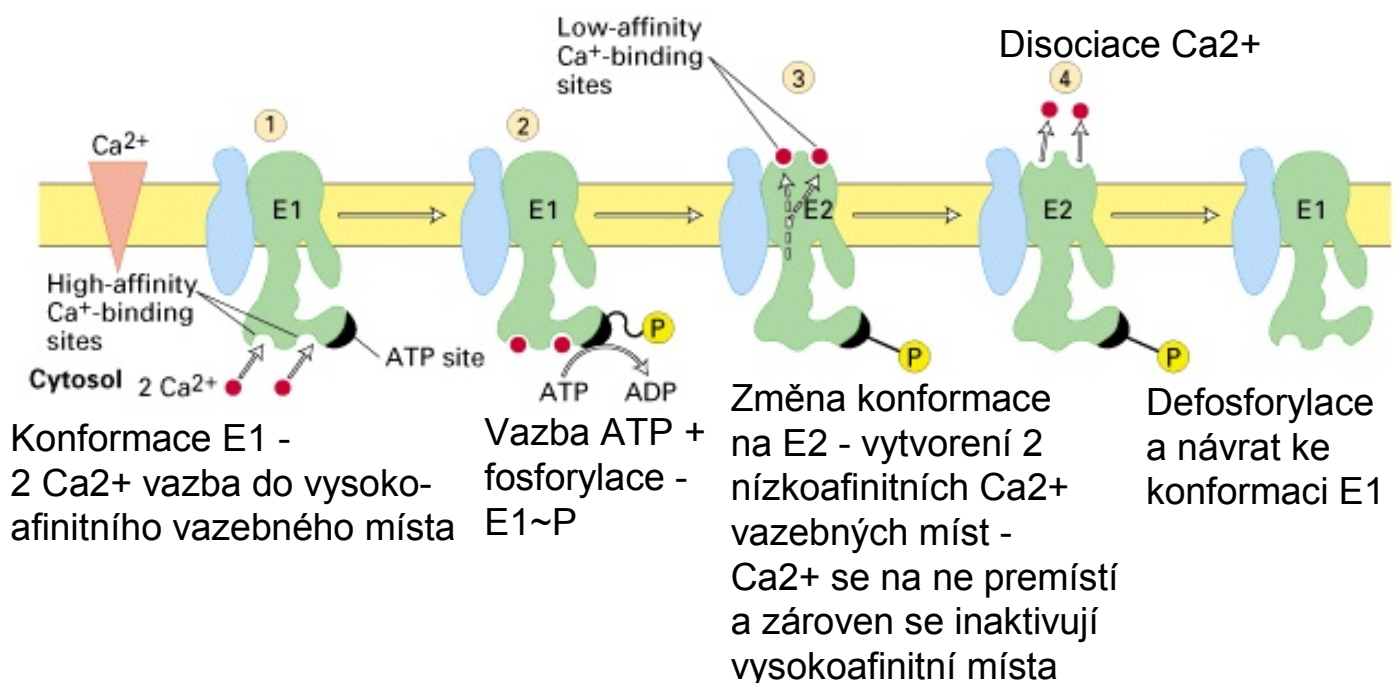
ATPas - 1 - více vazebných míst pro ATP, nehydrolyzují ATP na ADP+Pi pokud to není spojeno s transportem iontu nebo jiných molekul - propojení deju
nervové nebo ledvinné bunky - cca 25 % ATP použito pro iontový transport ; erythrocyty - 50 % ATP

Ca²⁺ ATPasy

Zmeny koncentrace volného Ca²⁺ - signál pro bunecné zmeny, tj. "klidová" cytosolická koncentrace Ca²⁺ nízká - 0.1-0.2 μM

Ca²⁺ ATPAsa plasmatické membrány: transport Ca²⁺ ven z bunky,
- kromě katalytické α -podjednotky, obsahují Ca²⁺-vazebný regulační protein **calmodulin**, zvýšení cytosolického Ca²⁺ - vazba na calmodulin, aktivace Ca²⁺ ATPasy - transport Ca²⁺ "pryc z bunek, rychlé obnovení puvodní cytosolické koncentrace Ca²⁺

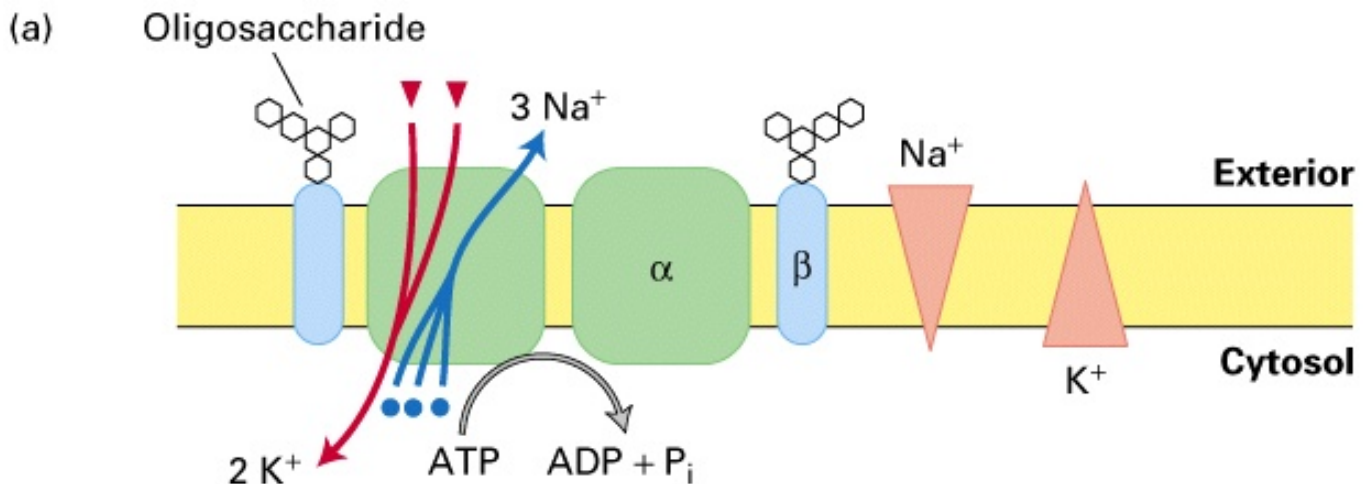
Ca²⁺ ATPAsa svalu - pumpuje Ca²⁺ z cytosolu do **sarcoplasmického retikula** (organela "skladující" Ca²⁺), Ca²⁺ důležitý pro svalovou kontrakci; tvoří > 80 % integrálních membránových proteinu SR



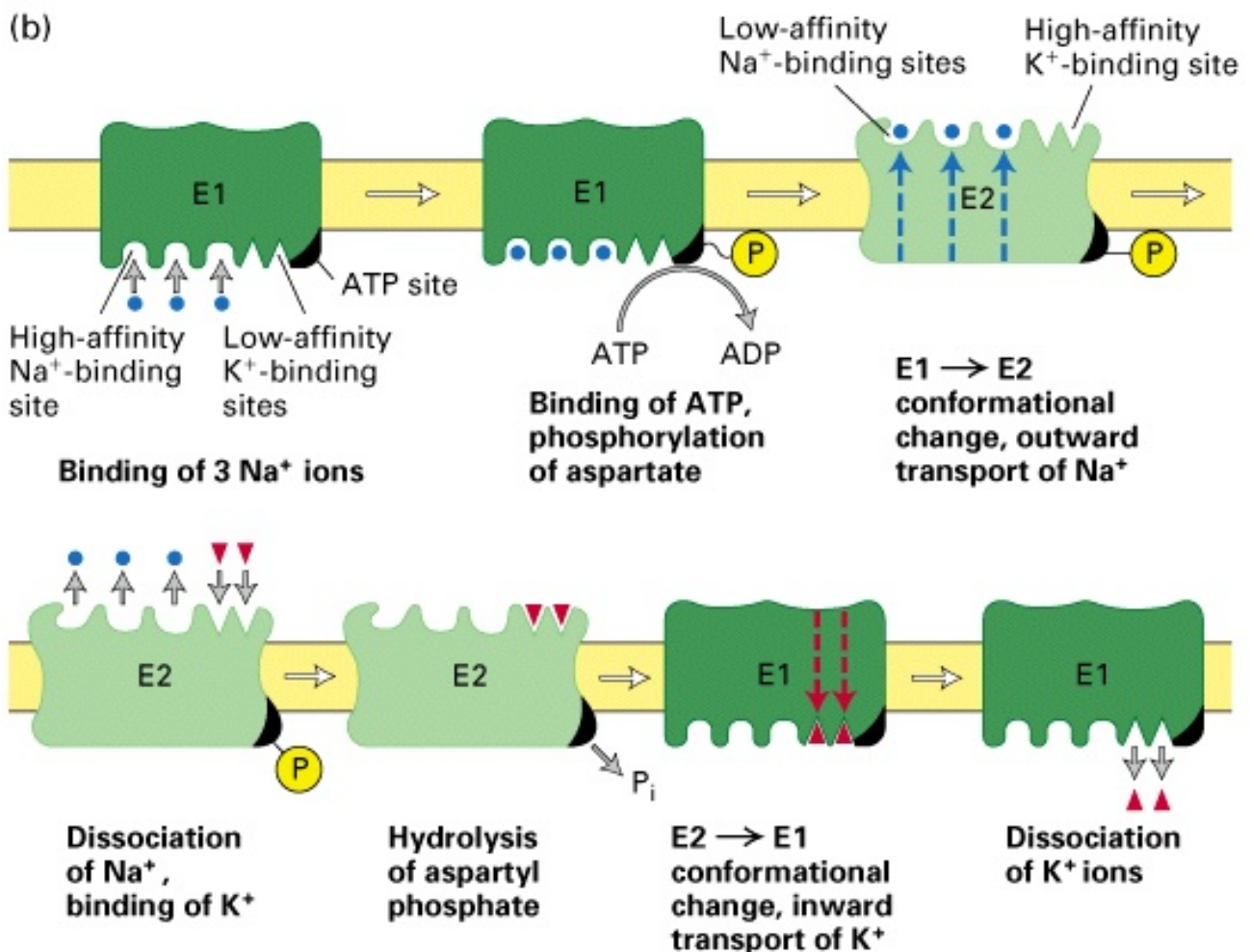
Afinita Ca²⁺ k cytosolickému místu je 1000 x vyšší než k místu nízkoafinitnímu

Na⁺/K⁺ ATPase

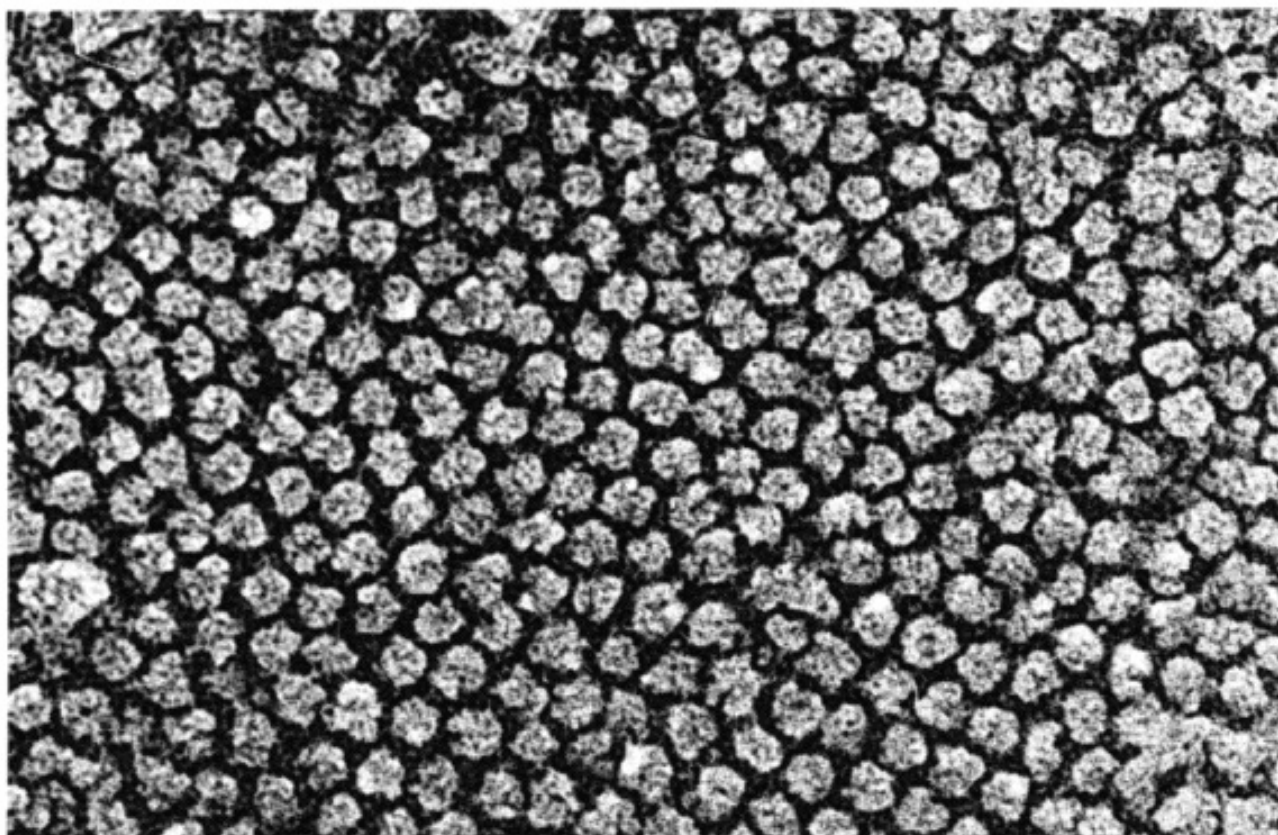
Na⁺/K⁺ ATPase plasmatické membrány savcích buněk - tetramer (α₂, β₂), při transportu se “vymení” 3 Na⁺ ionty (ven) za 2 K⁺ ionty (dovnitř) / 1 ATP



Mechanismus podobný jako u Ca²⁺ ATPase



H⁺ ATPasy V-class (vakuolární a lysosomální membrána)



0.02 μm

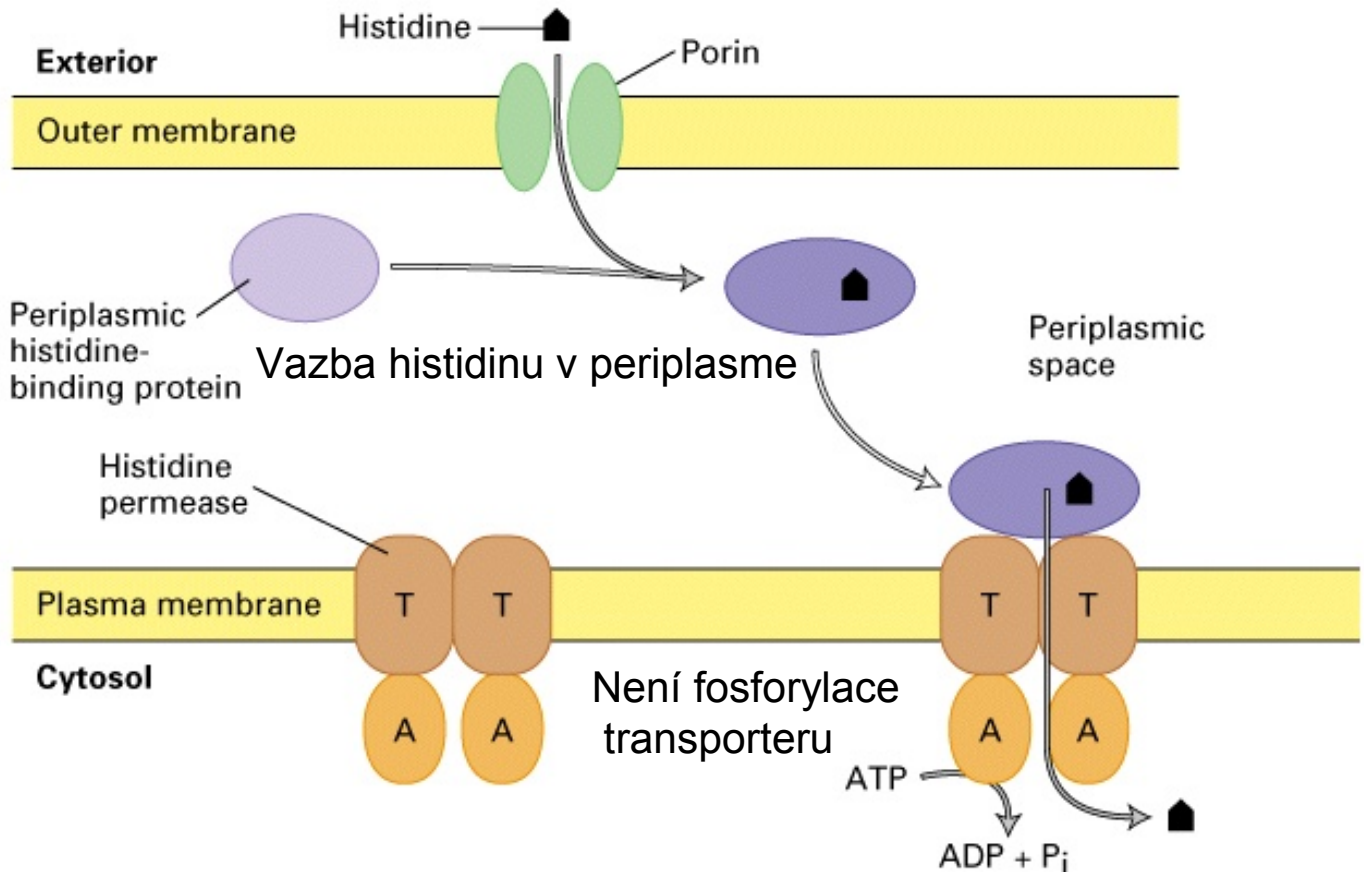
- Transport pouze H⁺
- acidifikace lumen lysosomu - 4.5 - 5.0 pH
- není fosforylace/defosforylace během transportu
- nemohou acidifikovat samy - pumpování H⁺ by vyvolalo pozitivní náboj na vnitřní straně membrány vesiklu (a negativní na straně cytoplasmy) - tj. elektrický gradient, který by bránil transportu dalších H⁺ dříve, než by se ustanovil dostatečný H⁺ gradient;
- transport H⁺ dovnitř organel je doprovázen buď a) pohybem aniontu ve stejném směru (lysosomy a rostlinné vakuoly, iontové kanály) nebo b) pohybem jiných kationtů v opačném směru

Tvorba elektrického gradientu na membránách rostlinných a kvasinkových buněk - plasmatická H⁺ ATPasa

ABC superfamily - transport různých substrátů

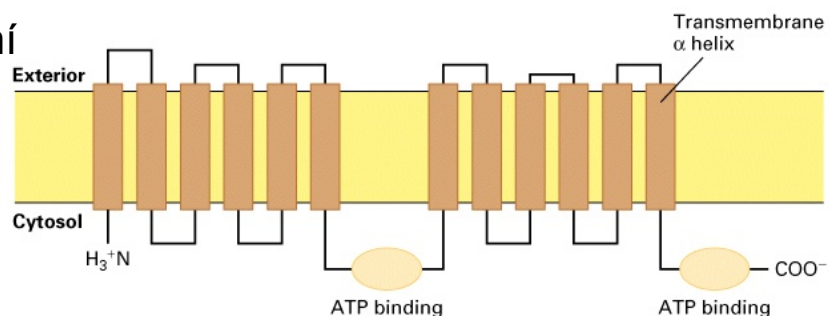
Bakteriální permeasy plasmatické membrány - využívají energii z ATP pro transport AA, cukru, vitamínu, peptidu ..do bakterie proti koncentračnímu gradientu

- často inducibilní - závisí na koncentraci v prostředí a potřebách buněk
- pr. permeasa histidinu



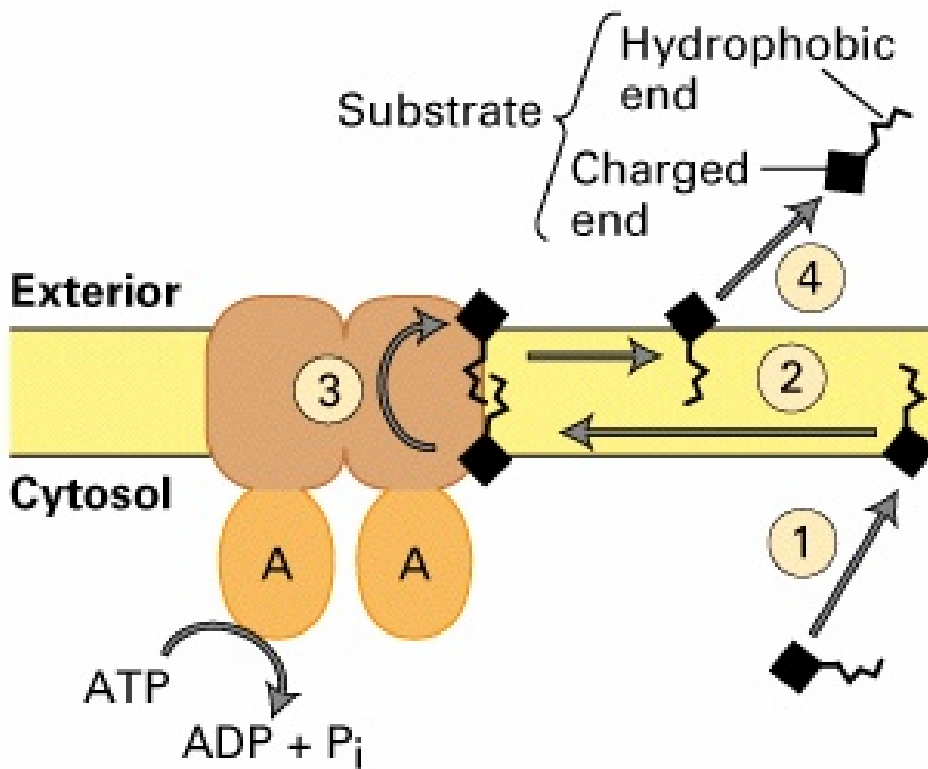
MDR (multidrug resistance) transport proteins

- savcí bunky - zvýšená resistance nádorových buněk k lékům - zvýšení exprese MDR transportních proteinů (amplifikace)
- energie z ATP hydrolysy - pro export různých toxických látek ven z buněk,
- většinou malé hydrofobní molekuly, které mohou difundovat do buněk, velké spektrum molekul
- kvasinky



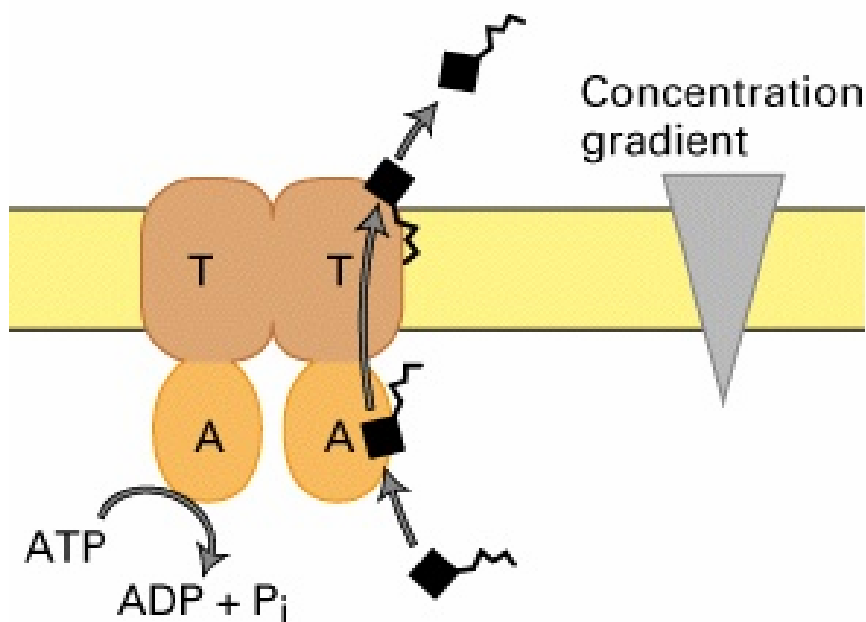
- mechanismus transportu ??

FLIPPASE model



Substrát - molekuly rozpustné v lipidech-
1-více pozitivních náboju - orientace v membráně - vazba na vazebné místo MDR proteinu - uvnitř membrány - "flip" ven - hydrolysa ATP

PUMP model



Vazba substrátu do místa "small-molecule"-vazebné místo na cytosolické strane MDR proteinu hydrolysa ATP- pohyb substrátu proteinem ven z bunky

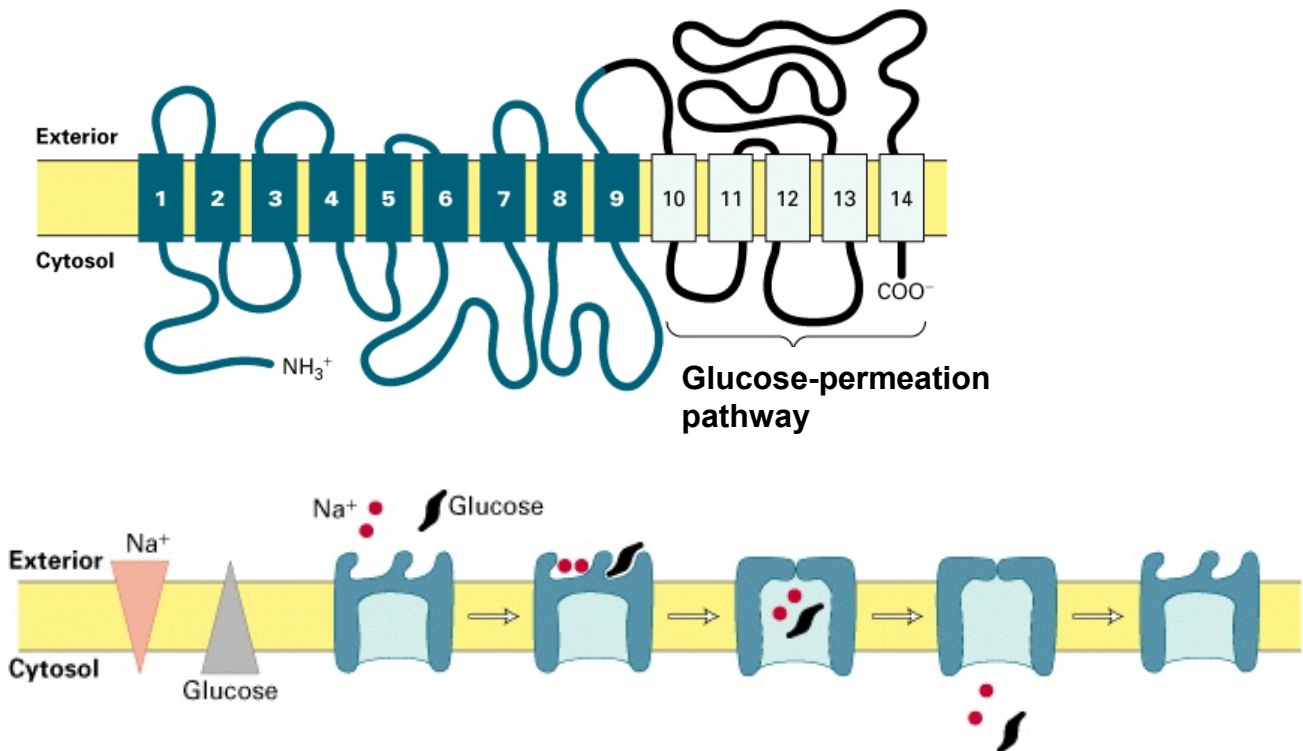
Mdr protein - produkce v játrech, ledvinách a streve - tj. tam, kde je nutné odstranovat toxické látky

Ko-transport - symportery a antiportery

- Transport iontu a malých molekul proti koncentračnímu gradientu
- Energie z elektrochemického gradientu Na^+ nebo H^+ iontu

Na^+ - sprazené symportery pro import AK a glukosy

- Transport Na^+ do bunek - 2 síly - a) Na^+ koncentrační gradient (Na^+ koncentrace uvnitř nízká) b) vnitřní negativní elektrický membránový potenciál
- Na^+ /glucose symporter - 14 transmembránových α -helixu

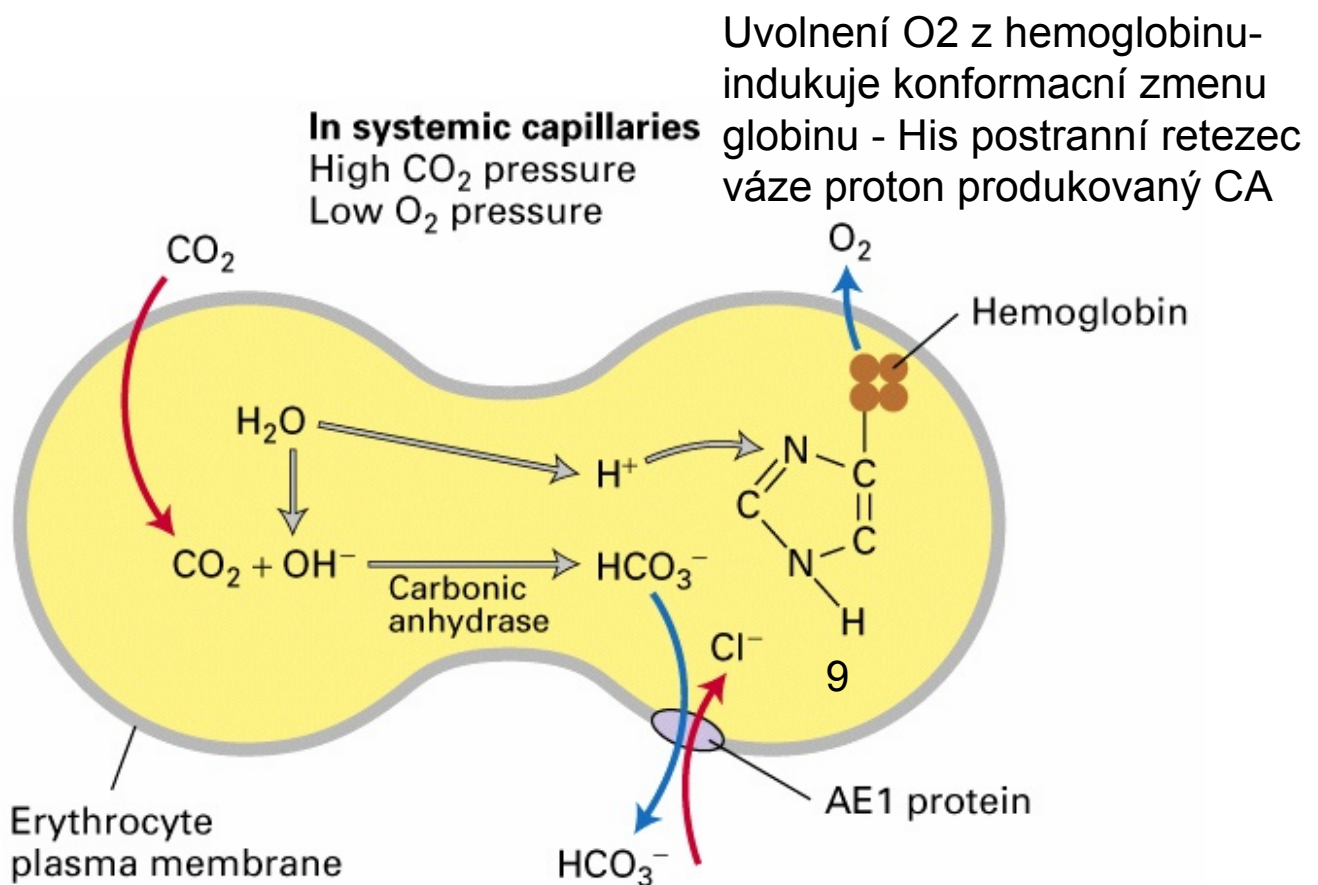


Na^+ - sprazený antiporter pro export Ca^{2+}

- srdeční sval - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter pro udržení nízké koncentrace Ca^{2+} (důležitější než Ca^{2+} ATPasa)
- 3 ionty Na^+ dovnitř x 1 iont Ca^{2+} ven (koncentrační gradient Ca^{2+} > 10000x více Ca^{2+} vne; koncentrace Ca^{2+} uvnitř $2 \times 10^{-7} \text{ M}$, vne $2 \times 10^{-3} \text{ M}$)

AE1 protein: $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ antiporter

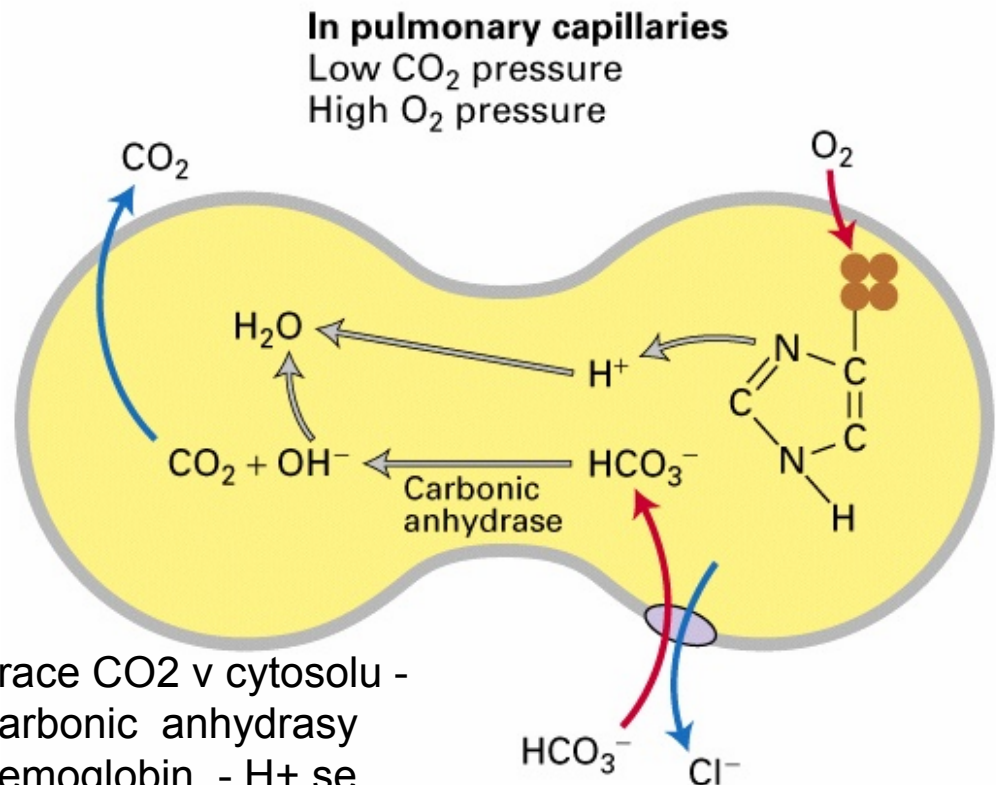
- Nezbytný pro transport CO_2 v erythrocytech
- aniontový transporter
- výměna 1 Cl^- za 1 HCO_3^- , tj. není ovlivnen náboj a membránový potenciál; reakce závislá na koncentračních gradientech transportovaných iontu
- nezbytný pro důležitou funkci erythrocytu = transport odpadního CO_2 do plic
- CO_2 uvolněný z buněk do kapilár difunduje přes membránu erythrocytu
Plynný CO_2 je špatně rozpustný ve vodném prostředí; carbonic anhydrasa (CA) ho konvertuje na dobře rozpustný bikarbonát (HCO_3^-)



Výměna aniontu - cca 50 milisekund - 5×10^9 HCO_3^- iontu exportováno z buněk

Plíce

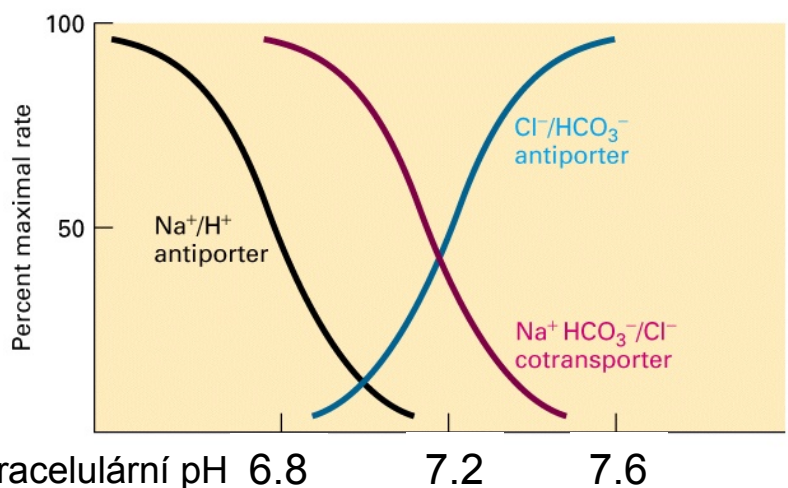
- CO₂ difunduje z erythrocytu - vydechován



- snížená koncentrace CO₂ v cytosolu - zpětná reakce carbonic anhydrasy
- O₂ se váže na hemoglobin - H⁺ se uvolní z hemoglobinu
- snížená koncentrace HCO₃⁻ uvnitř erythrocytu vyvolá vstup HCO₃⁻ výměnou za Cl⁻

Regulace cytosolického pH ko-transportery

- udržování cytoplasmatického pH, odstranování H⁺ vznikajícího během metabolismu
- Na⁺HCO₃⁻ / Cl⁻ cotransporter = import 1 Na⁺ po směru koncentračního gradientu spolu s 1 HCO₃⁻; výměnou za 1 Cl⁻
importovaný HCO₃⁻ + H⁺ = vzniká CO₂, který difunduje z buněk
- Na⁺/H⁺ antiporter = 1 Na⁺ dovnitř / 1 H⁺ ven
- Na⁺ nezávislý Cl⁻/HCO₃⁻ antiporter (podobný AE1) = export HCO₃⁻ = snížení cytosolického pH (HCO₃⁻ = OH⁻ + CO₂)
- aktivita těchto antiporterů závislá na pH = kontrola cytosolického pH



Osmosa, vodní kanály a regulace objemu bunky

- Osmosa = pohyb vody z oblasti nižší koncentrace rozpustených látek do oblasti s vyšší koncentrací
- fosfolipidová dvojvrstva - částečně permeabilní pro vodu - vodní kanály
- kontrola bunecného objemu: některé bunky (napr erythrocyty) dostanou-li se do hypotonického prostředí - osmotická lyse x hypertonické prostředí
- isotonické prostředí - nutné pro udržení savcích bunek
- bunky mající bunecnou stenu - umístění do hypotonického prostředí - nezvysí se objem, ale vnitrobunecný tlak (turgor)

Vodní kanály

- urychlují průchod vody
- ne ve všech bunkách (napr zářivky jsou odolné proti osmotické lysi)
- AQUAPORIN = tetramer identických 28 kDal podjednotek

