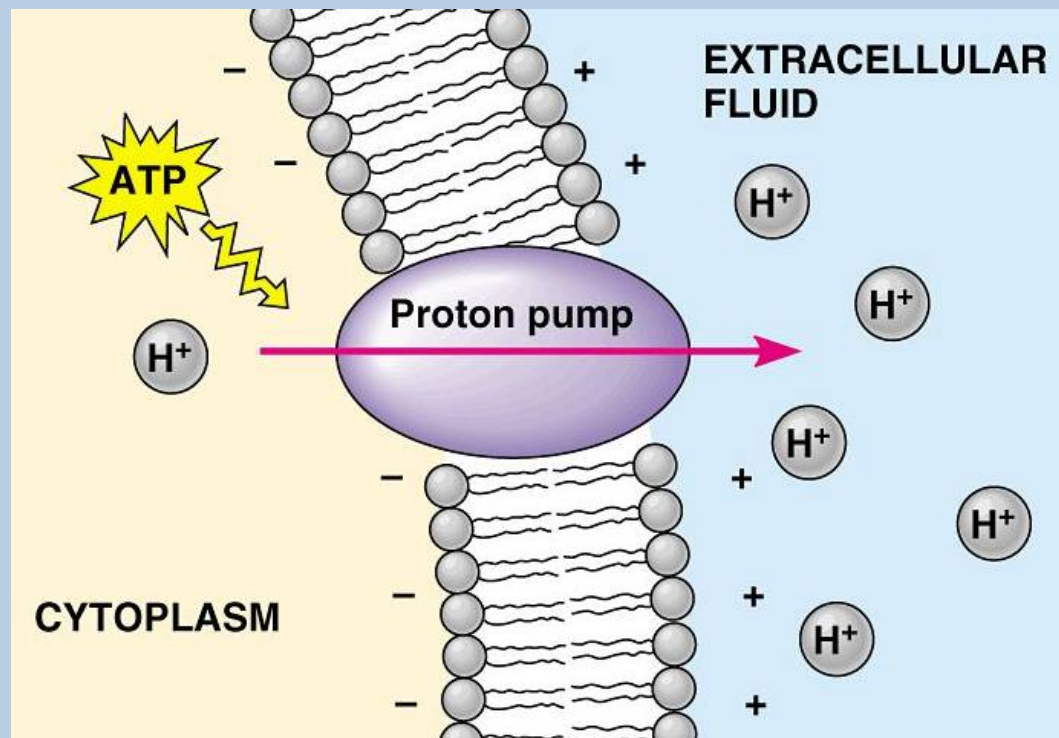


3) Membránový transport

- a) Fyzikální principy
- b) Regulace pohybu roztoků membránami a jejich transportéry
- c) Pumpy

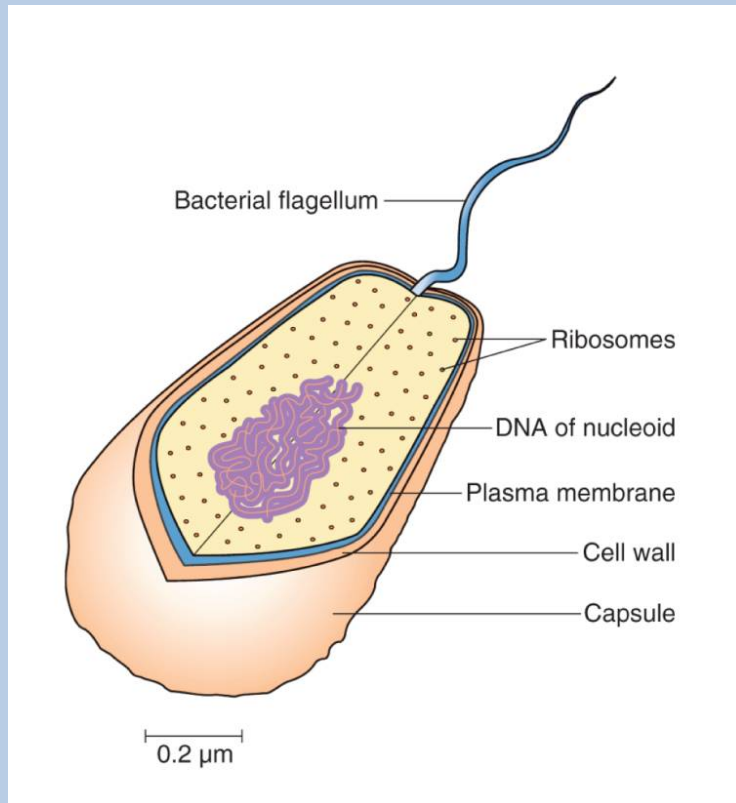


Update 2022

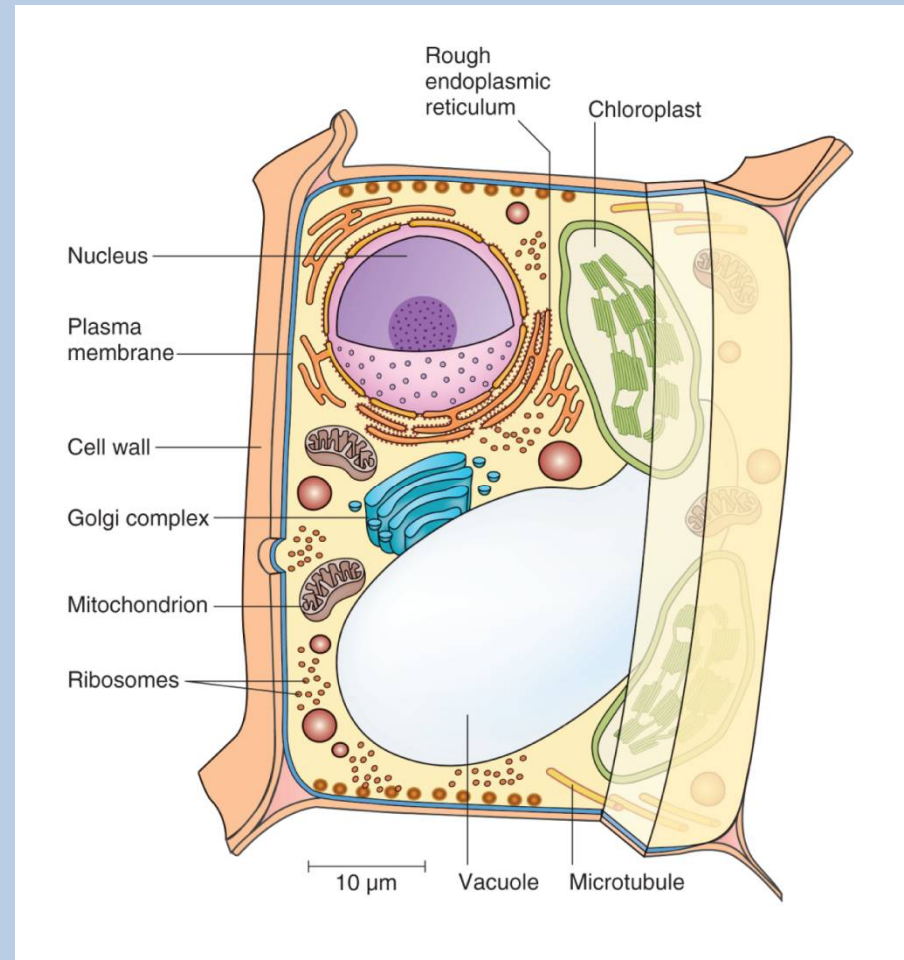
Tsay Y-F et al. (2022)

Plant Physiology 188: 921-923

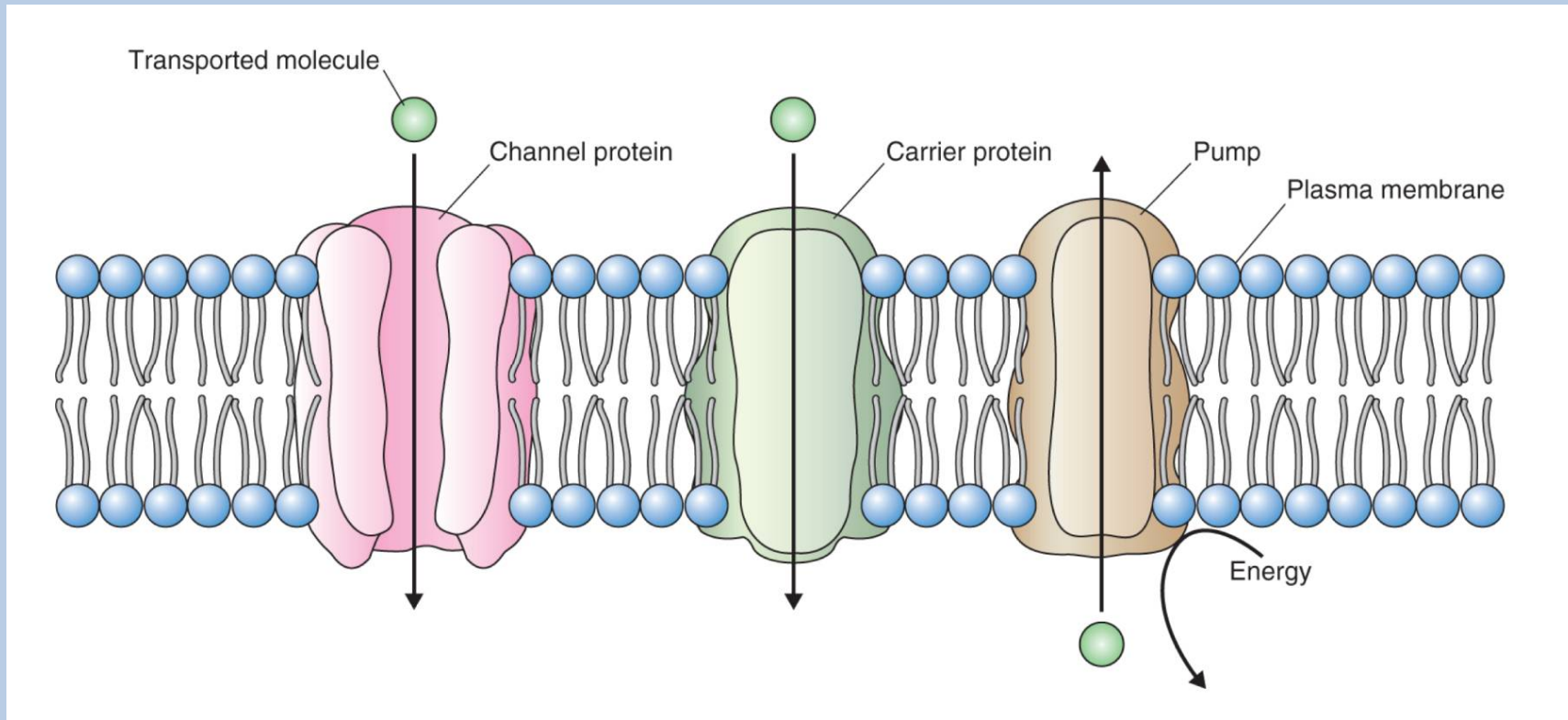
Prokaryotická buňka



Eukaryotická buňka



Pohyb vody – první reakce klidných či dormantních semen

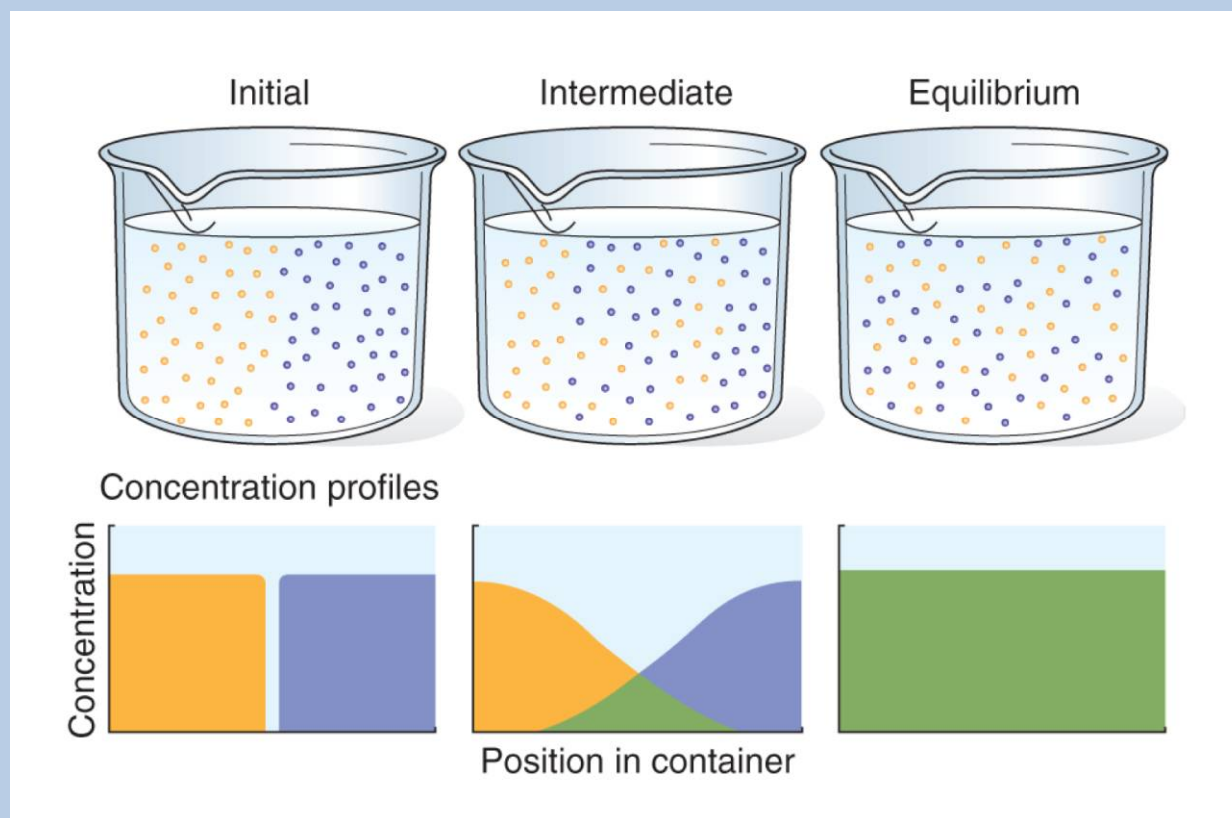


Hydratace buněk a pletiv je jednou z prvních reakcí, které se odehrávají při imbibici semen.

Rozvoj oboru membránového transportu – klonování, techniky patch-clamp

a) Fyzikální principy

Hnací silou pohybu molekul v roztoku nebo plynné fázi je gradient a jeho potenciální energie.

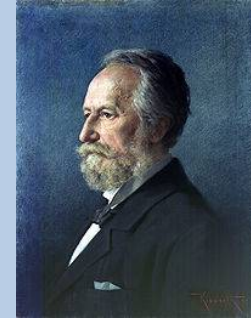


Molekuly jsou v neustálém pohybu - difúze

Difúze je spontánní proces a splňuje **Fickův zákon**.

Probíhá buď z jednoho místa na druhé, nebo přes membránu.

Rychlost, kterou se molekuly pohybují, závisí na jejich velikosti, na velikosti koncentračního gradientu, viskozitě média a teplotě.



Adolf Fick (1829-1901)

Tento vztah je vyjádřen rovnicí:

$$J_s = - D_s (\Delta C_s / \Delta x)$$

J_s – rychlost difúze molekuly roztoku s

D_s – difúzní koeficient

$\Delta C_s / \Delta x$ – koncentrační gradient = rozdíl v koncentracích ΔC_s mezi dvěma body Δx .

Molekuly se pohybují ve směru koncentračního gradientu (z místa o vyšší koncentraci těchto molekul do míst o nižší koncentraci = ve směru růstu).

Gradient je směr růstu !

D_s pro ionty: $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (= $50 \text{ } \mu\text{m} / 2,5 \text{ s}$)

D_s pro větší molekuly: $10^{-11} - 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$

Chemický potenciál (μ_s) (volná energie na jeden mol: J/mol)

(energetické změny termodynamického systému spojené se změnou počtu částic jednotlivých složek)

$$\mu_s = \mu_s^* + RT \ln C_s + z_s FE + V_s P$$

μ_s^* = chemický potenciál roztoku **s** za standardních podmínek

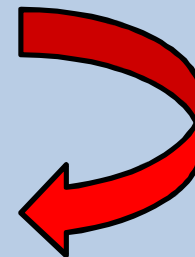
$RT \ln C_s$ = **koncentrační složka**, zahrnující koncentraci **C** roztoku **s** v molech na litr při standardním tlaku **R**, **T** = absolutní teplota

$z_s FE$ = **elektrická složka**, **z** = náboj roztoku **s** (0 pro nenabitý roztok, +1, +2 nebo -1, -2 v závislosti na valenci kationtů či aniontů), **F** = Faradayova konstanta = množství náboje v jednom molu elektronů, **E** = elektrický potenciál roztoku vztažený k uzemnění

$V_s P$ = **složka hydrostatického tlaku**, zahrnuje parciální molární objem **V** a tlak **P**.

Biologické molekuly: příspěvky V a P jsou malé

$$\mu_s = \mu_s^* + RT \ln C_s + z_s FE$$

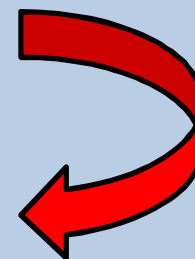


Ionty, nabité
molekuly

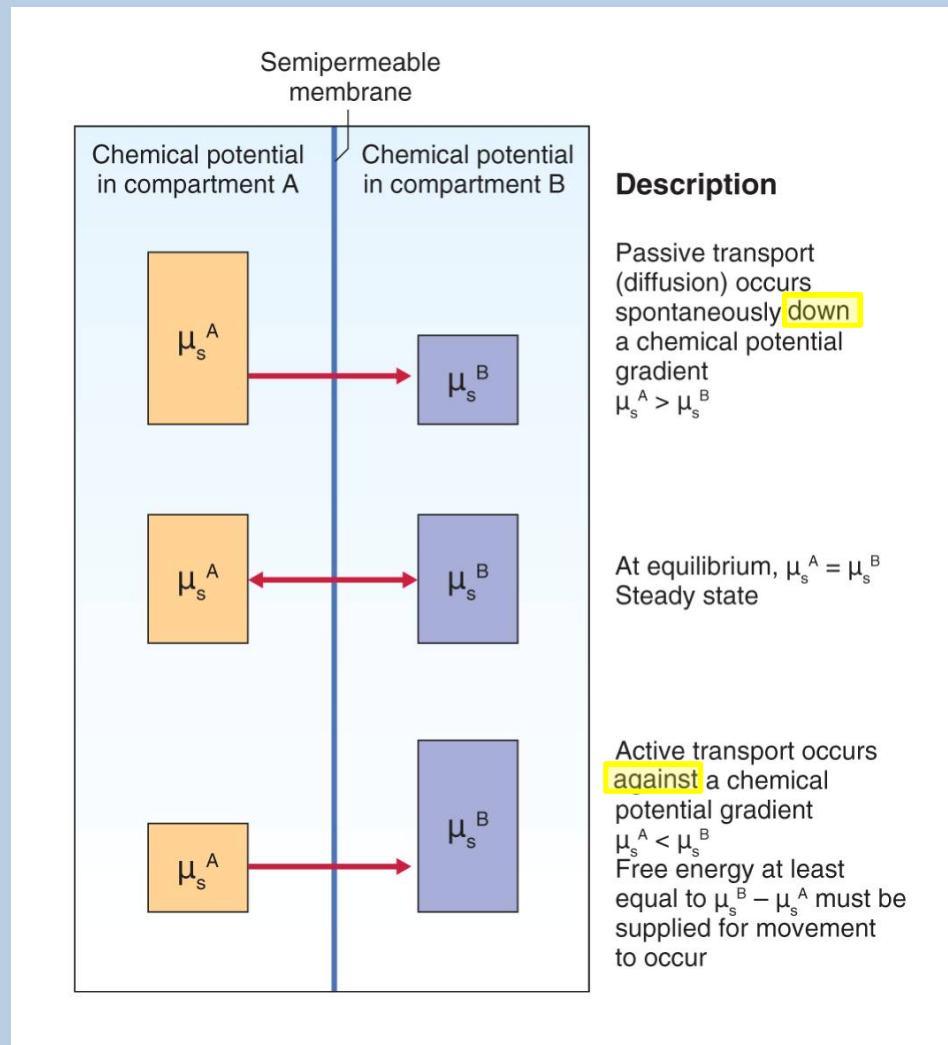
Elektrochemický
potenciál

Pro **nenabitý** roztok je elektrická složka $z_s FE = 0$

$$\mu_s = \mu_s^* + RT \ln C_s$$



Hnací silou difúze roztoku do a ven z buňky je **rozdíl** mezi chemickým potenciálem uvnitř buňky a chemickým potenciálem externího roztoku ($\Delta\mu_s$).



Pasivní pohyb se děje ve směru gradientu chemického potenciálu = ve směru růstu .

Stabilní stav

Aktivní pohyb proti směru gradientu chemického potenciálu = proti směru růstu.

Pro **nenabité** roztoky: Rovnice **gradientu** chemického potenciálu:

$$\Delta\mu_s = (\mu_s^* + RT\ln C_s^i) - (\mu_s^* + RT\ln C_s^o)$$



i = vnitřek buňky
o = externí roztok

$$\Delta\mu_s = RT\ln(C_s^i/C_s^o)$$

Hnací síla difúze nenabitého roztoku s je velikost rozdílu jeho koncentrace přes membránu.

Znaménko produktu rovnice označuje směr pohybu roztoku **s**: **záporné znaménko ukazuje, že roztok má tendenci difundovat do buňky ve směru (down) chemického gradientu.**

Pro **nabitý** roztok je chemický (elektrochemický) potenciál:

$$\mu_s = \mu_s^* + RT \ln C_s + z_s FE + V_s P$$

Rovnice gradientu elektrochemického potenciálu pro nabitý roztok:

$$\Delta\mu_s = (\mu_s^* + RT \ln C_s^i + z_s FE^i) - (\mu_s^* + RT \ln C_s^o + z_s FE^o)$$



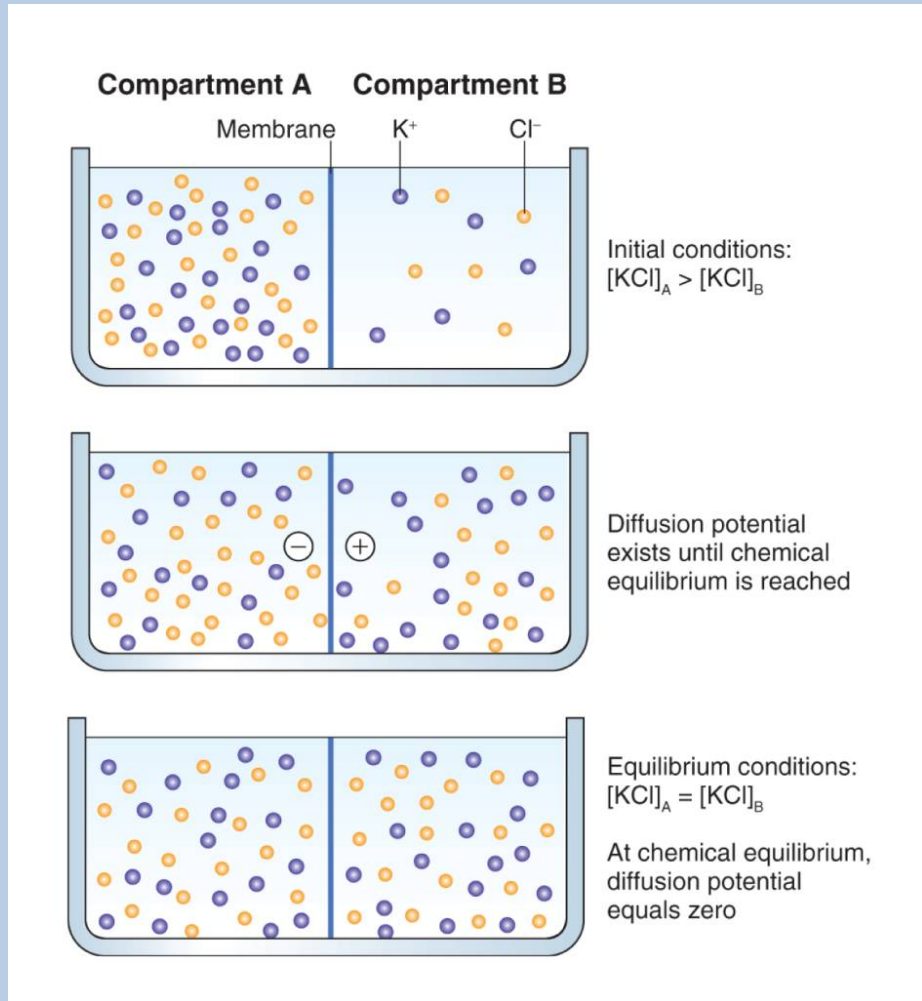
$$\Delta\mu_s = RT \ln(C_s^i/C_s^o) + zF(E^i - E^o)$$

V_m - membránový potenciál
(membránové elektrické napětí)

Pohyb nabitého roztoku reaguje na dvě nezávislé síly: rozdíl v koncentraci přes membránu a membránový potenciál.

Vývoj membránového potenciálu

Membrána více permeabilní pro K^+ než Cl^-



K^+ i Cl^- difundují ve směru koncentračního gradientu (tedy z vyšší koncentrace do nižší) z části A do části B, ale K^+ difunduje přes membránu rychleji než Cl^- .



Rozdíl v náboji přes membránu



Rozdíl v elektrickém napětí

Rovnice gradientu elektrochemického potenciálu pro nabitý roztok:

$$\Delta\mu_s = RT\ln(C_s^i/C_s^o) + zF(E^i - E^o)$$



$$RT\ln(C_s^i/C_s^o) = -zF(E^i - E^o)$$

Rozdíl v elektrickém potenciálu: ΔE

$$\Delta E = (RT\ln(C_s^o/C_s^i))/z_sF$$

Pro monovalentní kationty a 25°C : z = +1



$$\Delta E = 59 \text{ mV } \log (C_s^o/C_s^i)$$

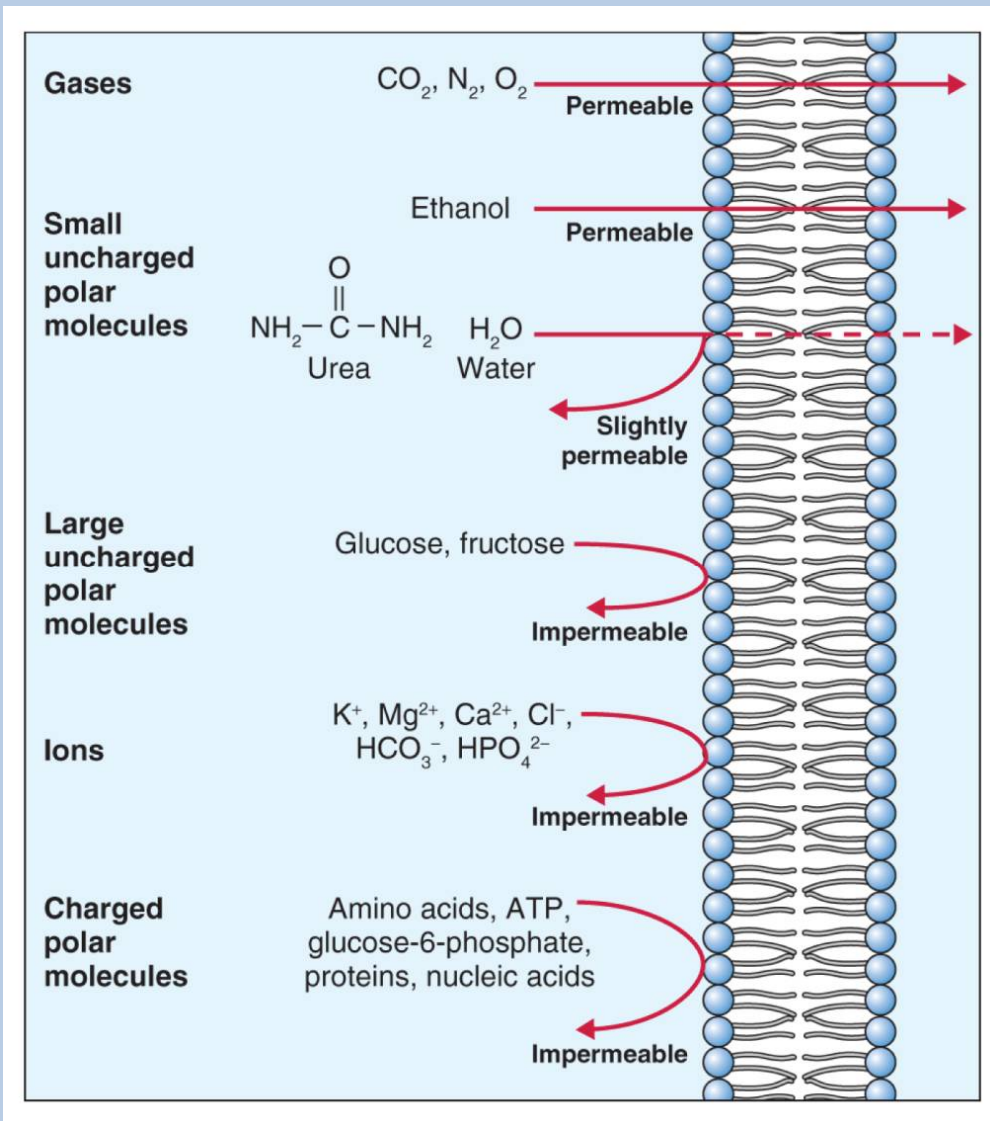
Nernstova rovnice
 ΔE – Nernstův potenciál

Rovnováha mezi vnitřkem a vnějším buňky: gradient elektrochem. potenciálu $\Delta\mu_s = 0$.

Table 5.1 Comparison of predicted and observed ion concentrations in pea root tissue, where the membrane potential was measured as -110 mV.

Ion	External concentration (mmol L ⁻¹)	Internal concentration (mmol L ⁻¹)	
		Predicted	Observed
K ⁺	1	74	75
Na ⁺	1	74	8
Mg ²⁺	0.25	1340	3
Ca ²⁺	1	5360	2
NO ₃ ⁻	2	0.0272	28
Cl ⁻	1	0.0136	7
H ₂ PO ₄ ⁻	1	0.0136	21
SO ₄ ²⁻	0.25	0.00005	19

b) Regulace pohybu roztoků membránami a jejich transportéry



Lipofilní (hydrofobní) molekuly

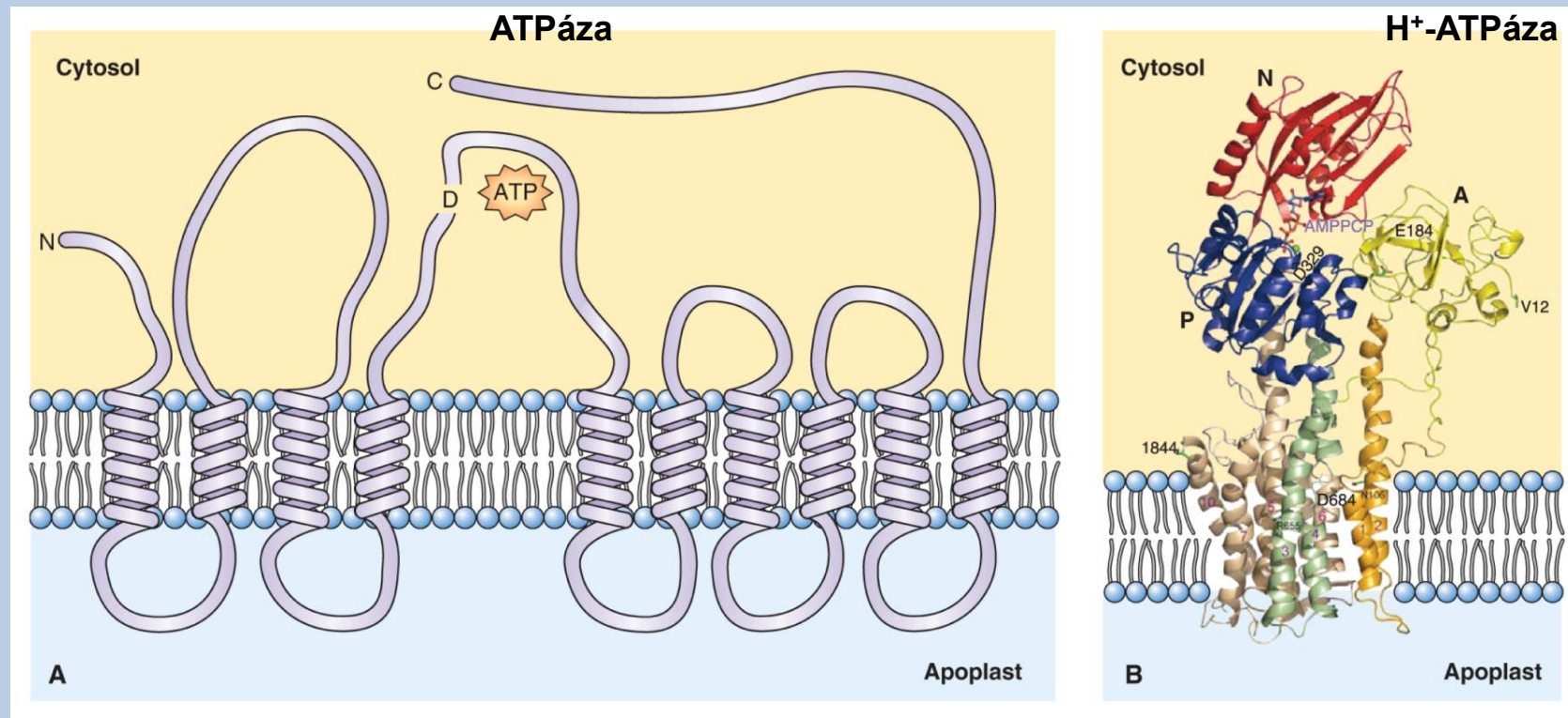
Pohybují se do té doby, dokud existuje gradient chemického potenciálu.

Molekuly neprocházející membránou



Nutnost transportních proteinů

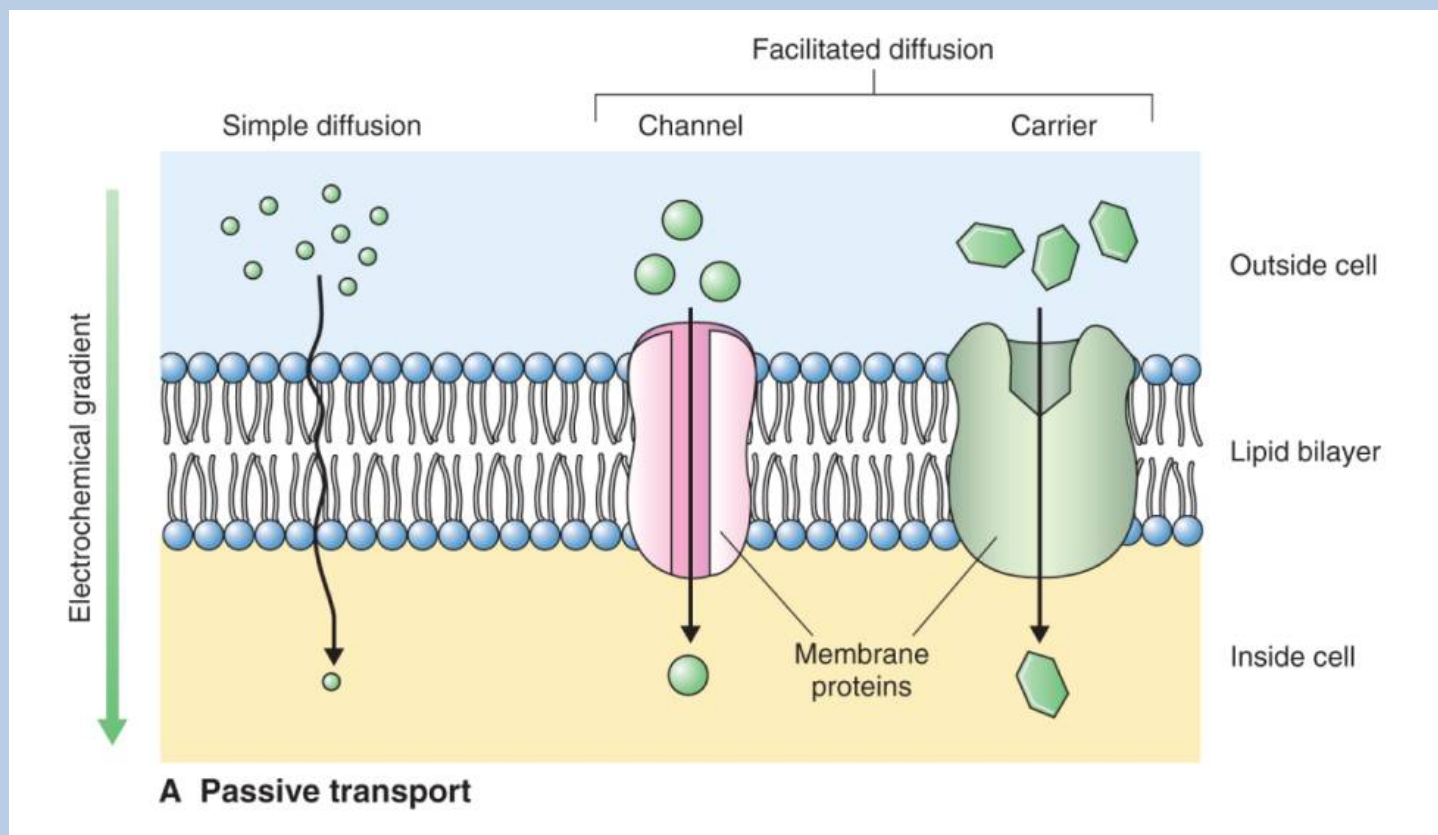
Transportní proteiny - střídavé bloky hydrofobních a hydrofilních aminokyselin.



Hydrofobní aminokyseliny – dovolují překlenout fosfolipidovou dvojvrstvu membrány

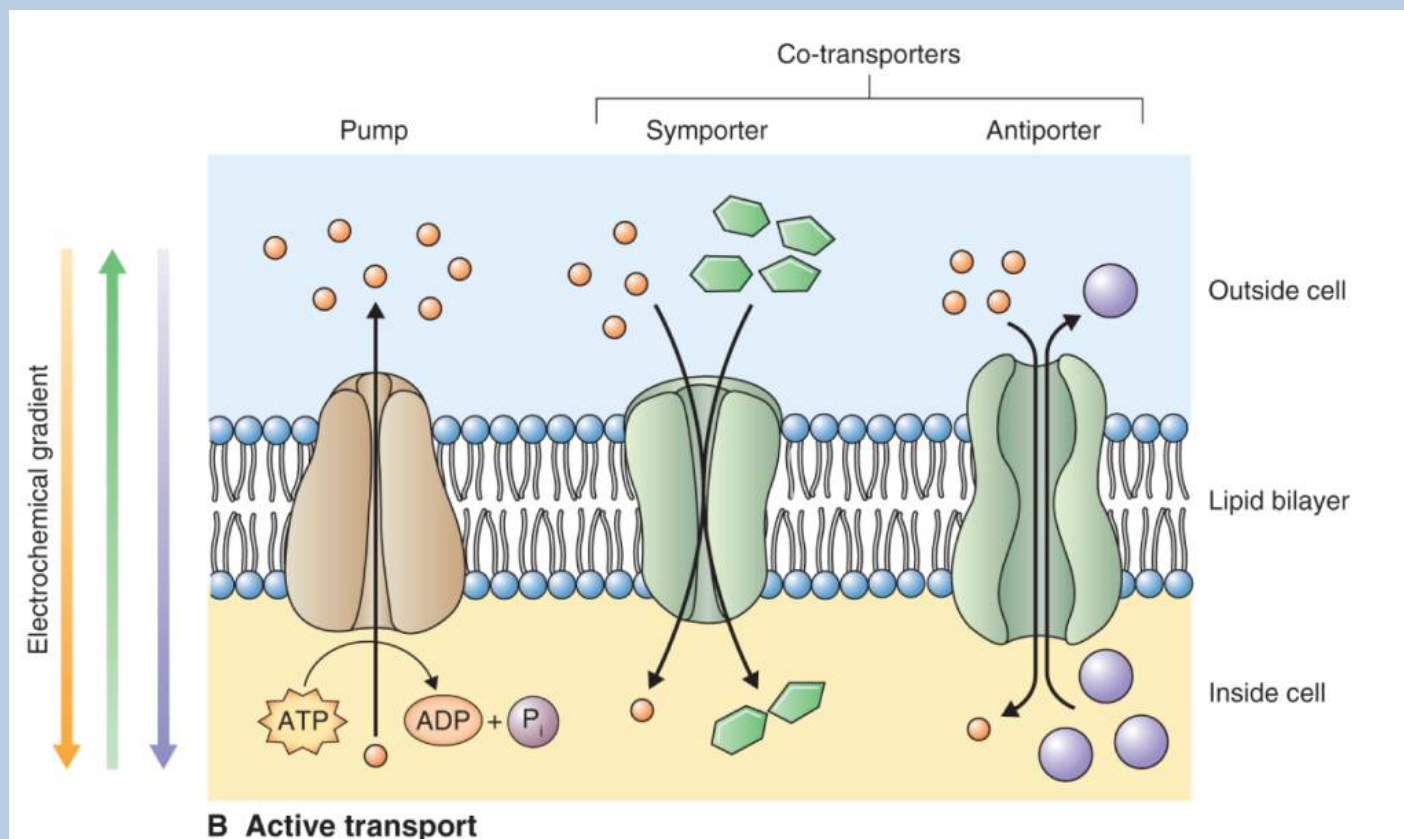
Hydrofilní domény – ponořené do cytozolu, lumenu organel nebo vnějšku buňky

Prostá difúze – roztoky se pohybují volně přes PM ve směru gradientu elektrochemického potenciálu (ve směru koncentračním spádu)



Usnadněná difúze – roztoky pohybují se ve směru gradientu elektrochemického potenciálu, ale vyžadují pro svůj transport přítomnost membránových transportérů: **kanály** a **přenašeče**

Pohyb roztoků **proti gradientu** jejich elektrochemického potenciálu = **aktivní transport** vyžadující buněčnou energii



Primární aktivní transport – hydrolyzován ATP nebo pyrofosfát k uvolnění energie požadované pro vytvoření gradientu – **pumpy**

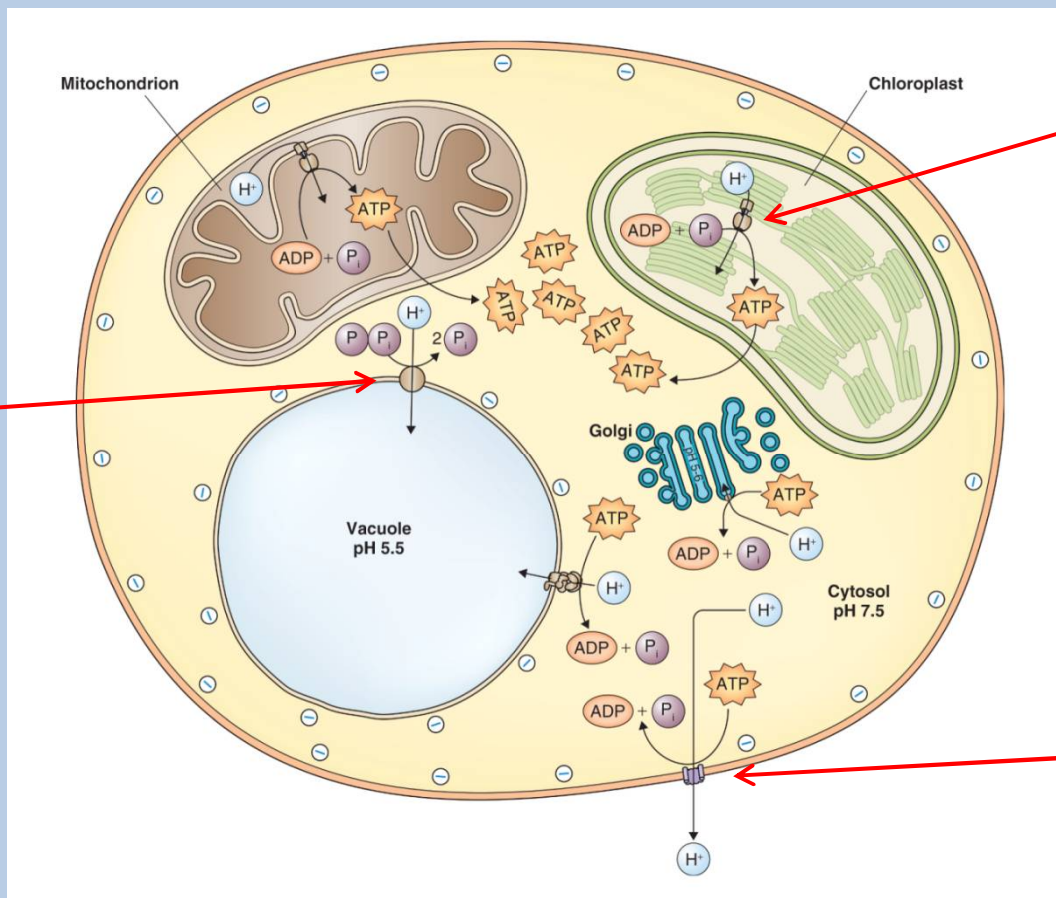
Sekundární aktivní transport – umožněn iontovým gradientem založeným primárním aktivním transportem – **co-transportéry: symportéry, antiportéry**

c) Pumpy

Transportují roztoky proti elektrochemickému gradientu.

Vážou se k roztokům, které mají transportovat a hydrolyzují ATP nebo pyrofosfát jako zdroj energie.

Pumpa hydrolyzující pyrofosfát

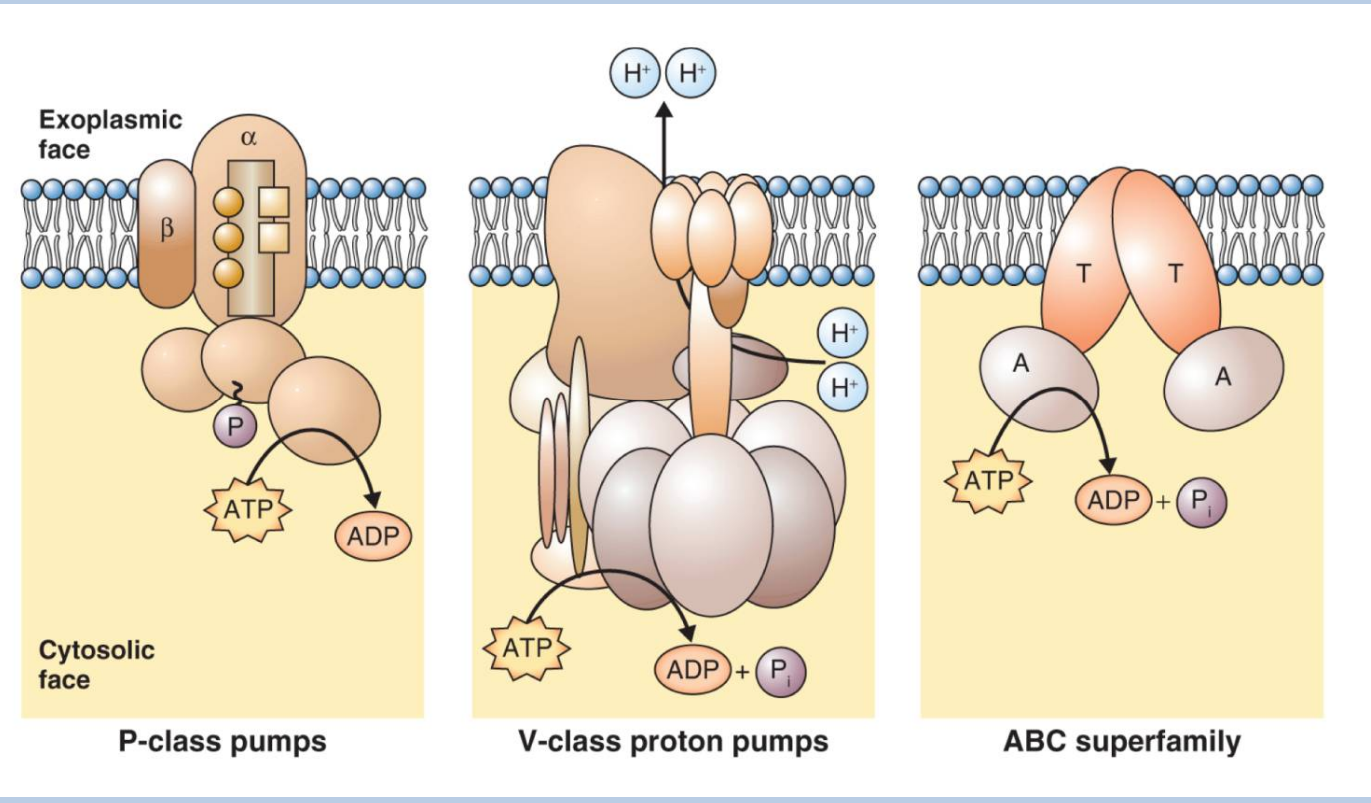
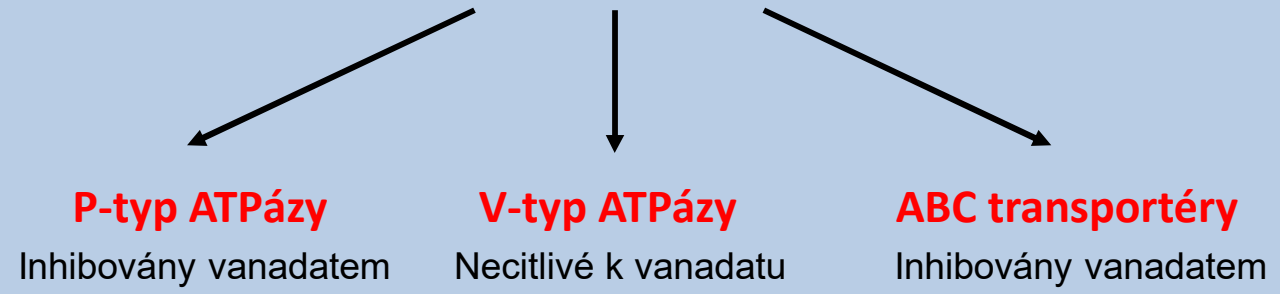


ATP-syntáza (F-typ ATPázy)

Pumpa hydrolyzující ATP

Transportují roztoky rychlostí 10 nebo 100 molekul nebo iontů/sek.

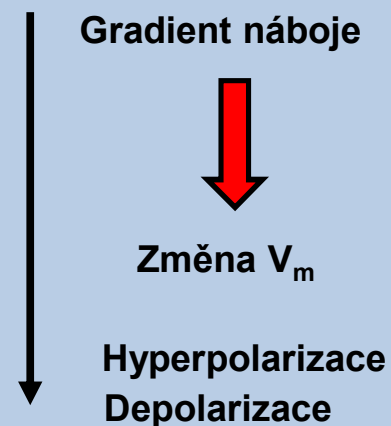
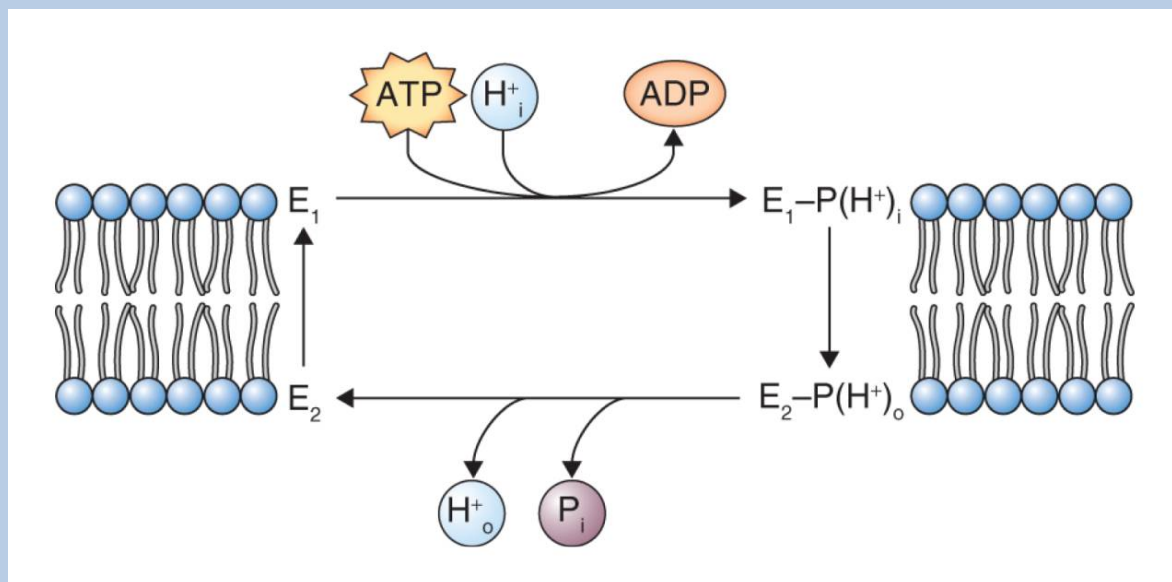
Pumpy hydrolyzující ATP



P-typ ATPázy

Cytozolické domény váží a hydrolyzují ATP a uvolněná energie řídí pohyb roztoků přes membránu.

Po hydrolýze ATP vznikají fosforylované meziprodukty.

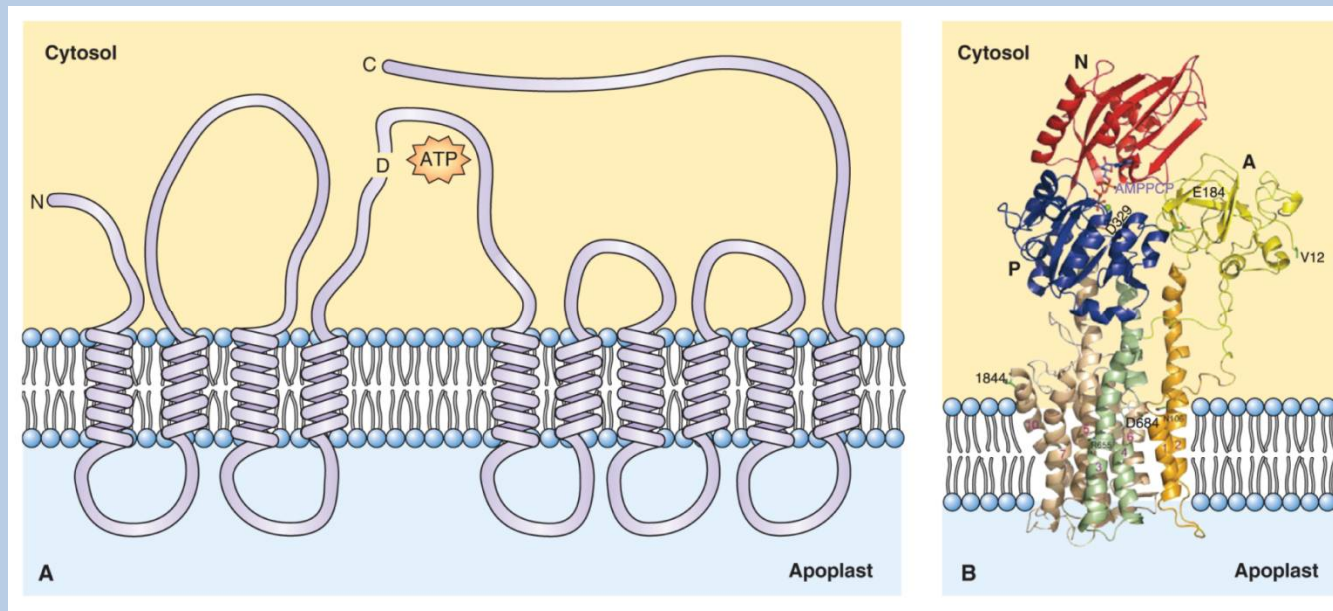


Fosforylace ATPázy ve stavu E1 vede k vazbě H^+ na jedné straně membrány a vede ke vzniku stavu E2. E2 má nižší afinitu k H^+ => uvolnění H^+ i anorganického P na druhé straně membrány.

Hydrolýza P z E2 => vznik E1 stavu.

Elektrochemický gradient protonů se nazývá **protonová hnací síla (proton motive force - pmf)**

Plazmamembránová (PM) H⁺-ATPáza - na Mg závislá P-tyt ATPáza



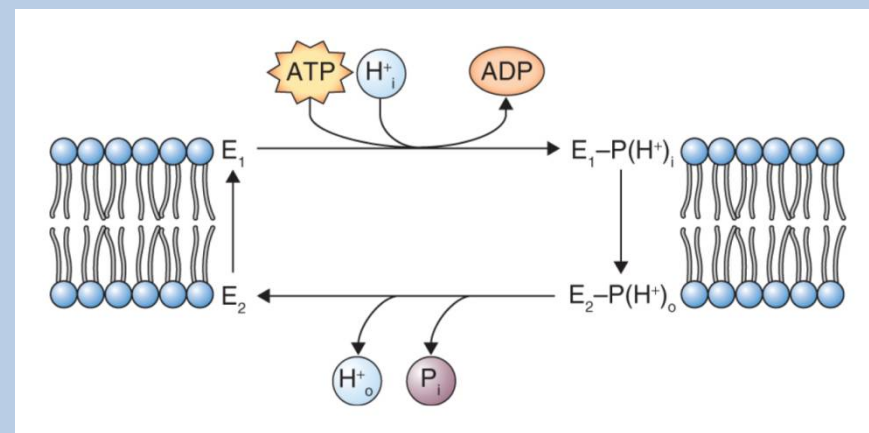
Jeden proton H⁺ je pumpován ven z cytozolu za jednu molekulu ATP

Funkcí PM H⁺ pumpy je udržování cytozolického pH na 7,3 – 7,5.

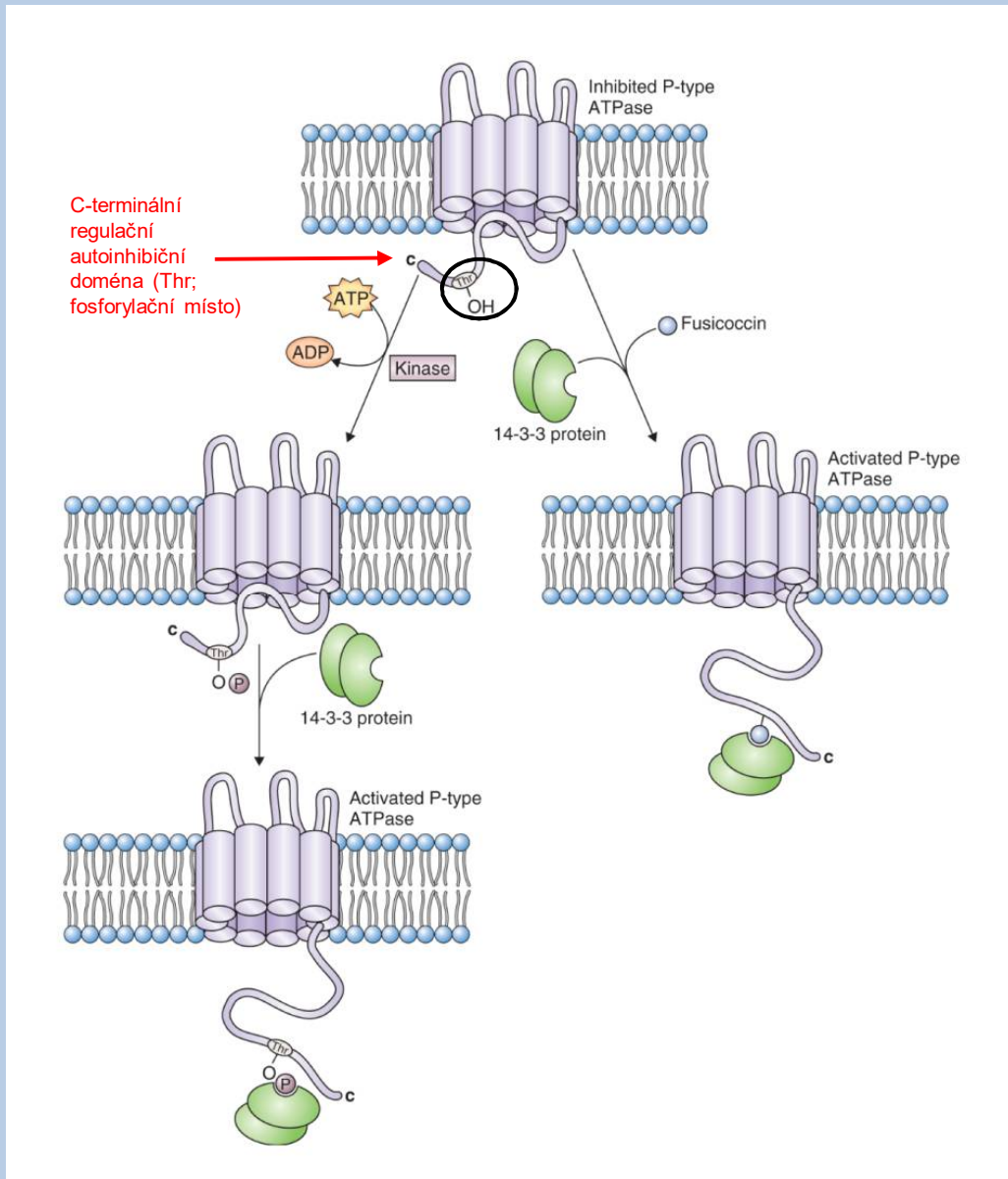
Optimum pro fungování PM H⁺ pumpy je 6,6



Akumulace H⁺ v cytozolu vede k aktivaci pumpy



PM H⁺-ATPáza je regulována prostřednictvím enzymové aktivity spíše než genovou expresí



Arabidopsis PM H⁺-ATPáza: 11 genů

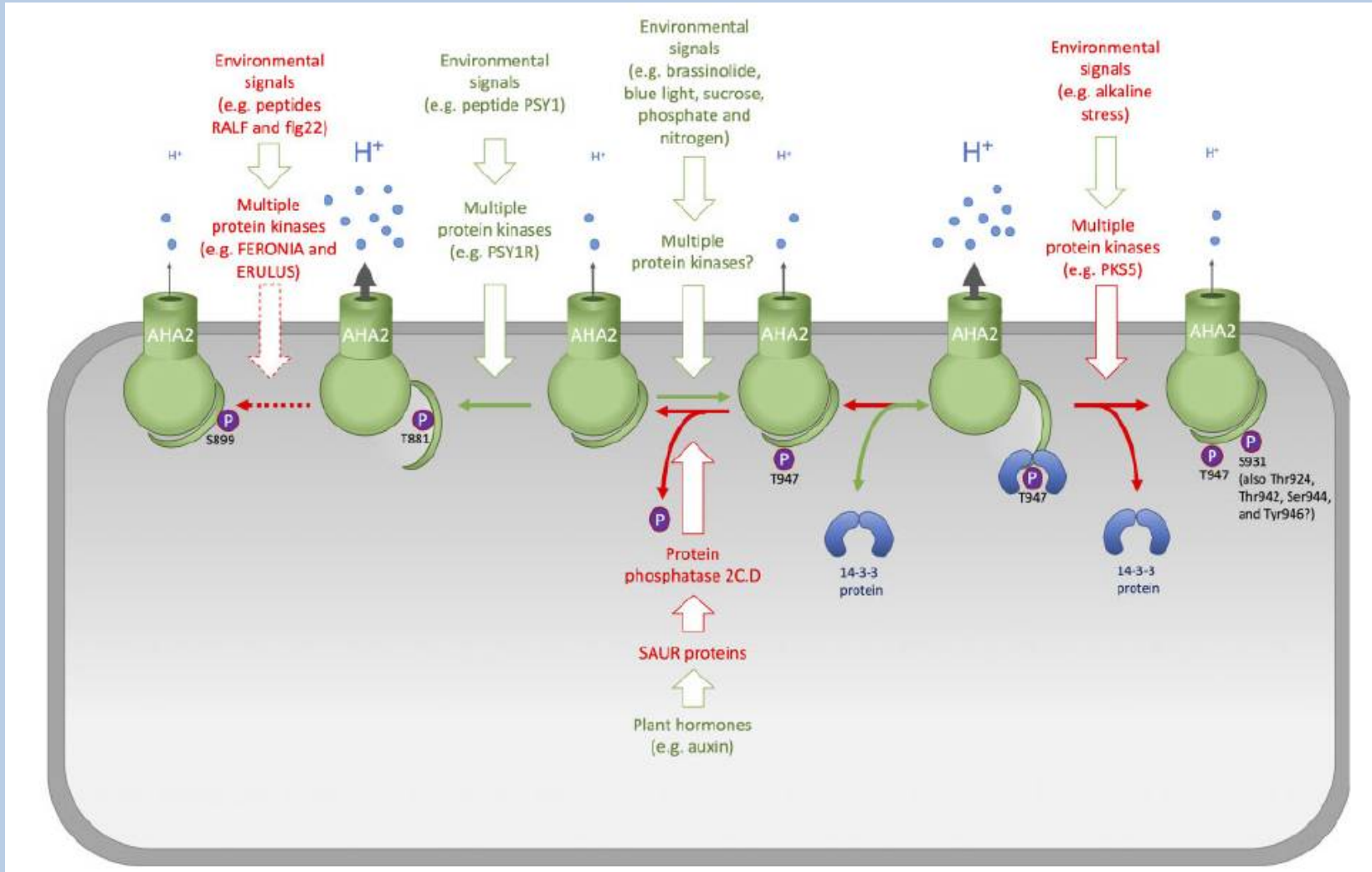
2 geny jsou exprimovány ve všech buňkách.

Individuální buňky exprimují mnohonásobné izofomy těchto genů.

Aktivita H⁺ pumpy je regulována prostřednictvím aktivity **proteinu 14-3-3**.

Aktivitu H⁺ pumpy stimuluje houbový toxin **fusicoccin**.

Model regulace protonové pumpy AHA2 u *Arabidopsis* – environmentální (světlo, alkalický stress) a vývojové faktory (FERONIA, protein kinázy, hormony, sacharidy, peptidy).



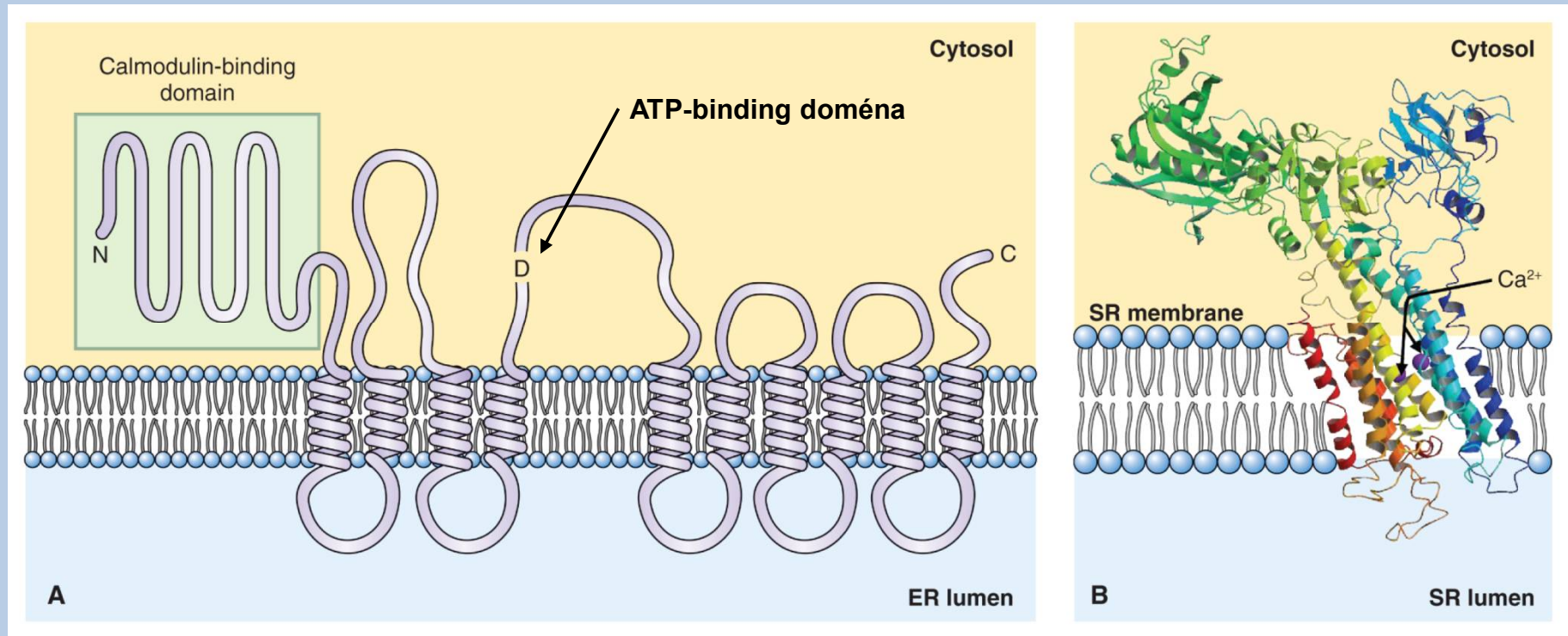
Update 2021 Fuglsang AT and Palmgren M (2021) Plant Physiology 187: 1856-1875

Update 2022 Miao R et al. (2022) TIPS 27: 588-600

Ca²⁺-ATPáza reguluje hladinu cytozolického vápníku (50 – 200 nM)

Pumpuje Ca²⁺ z cytozolu do vakuoly, ER nebo dalších organel

P-ATPáza; vyskytuje se ve všech membránách, včetně chloroplastů a mitochondrií.



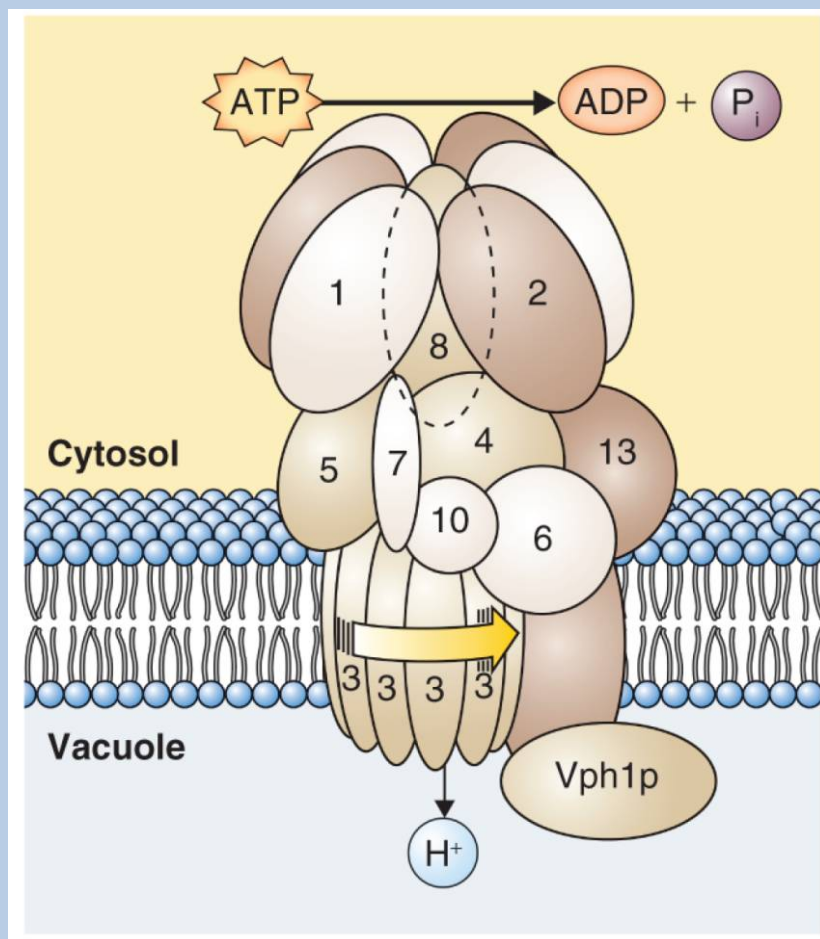
Hydrolýza ATP Ca²⁺-ATPázou je doprovázena transportem dvou iontů Ca²⁺ přes membránu.

N-terminální doména pumpy – váže **calmodulin** (Ca²⁺ senzor)

[Ca²⁺] v cytoplasmě nízká => vazba calmodulinu => inhibice pumpy => zvyšování [Ca²⁺] v cytoplasmě

V-tyt ATPÁzy

Složitá multisubjednotková struktura



Arabidopsis V-ATPÁzy: 13 subjednotek kódovaných 27 geny; tonoplast a endomembrány



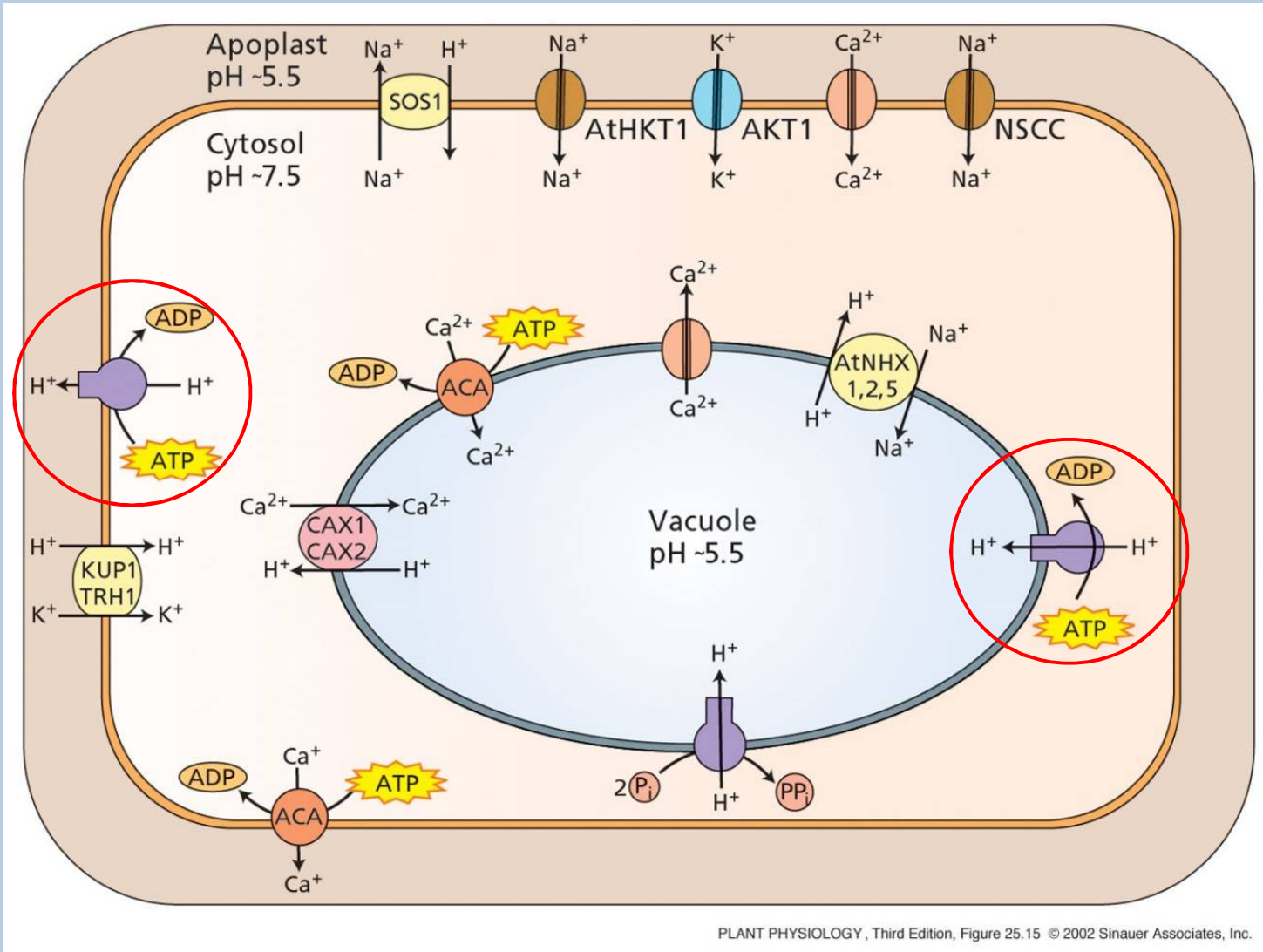
Velké množství kombinací

Pumpují 3 H⁺/ 1 hydrolyzovaný ATP

Chybí v chloroplastech a mitochondriích.

V-ATPÁzy okyselují vakuolu => + náboj balancován akumulací organických aniontů (malát, oxalát) a anorganických aniontů (Cl⁻).

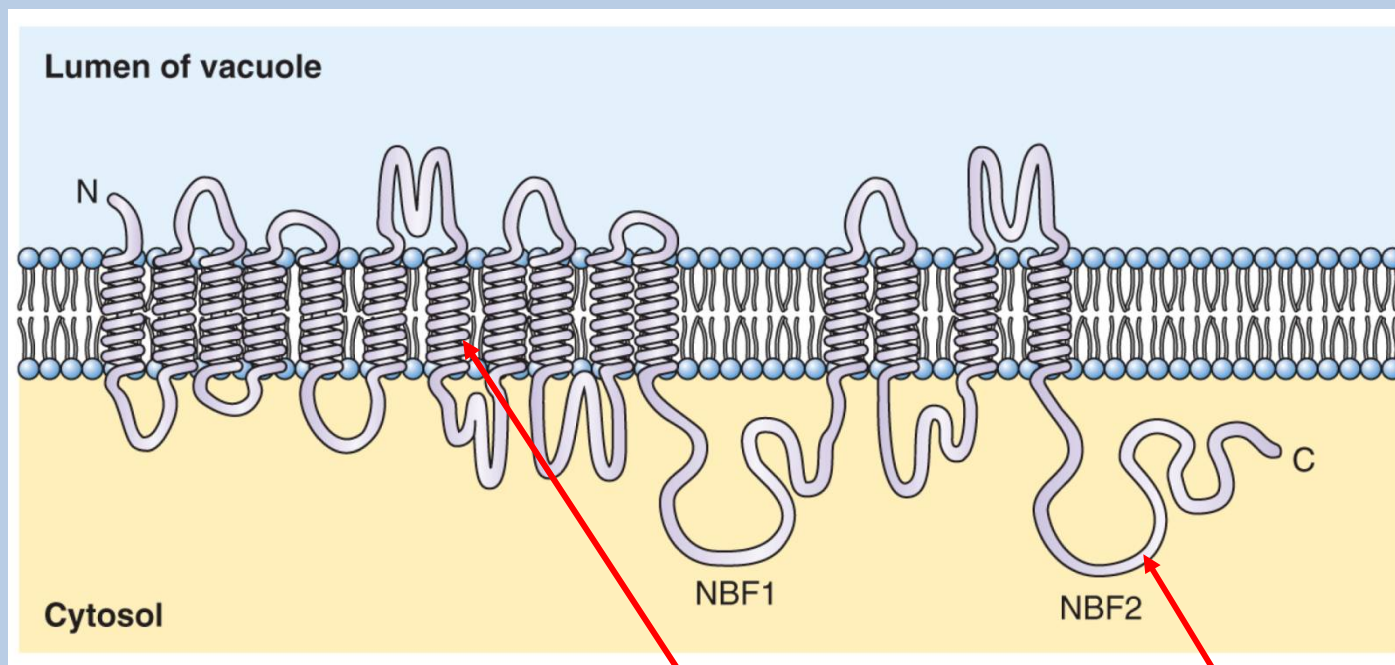
Důležitá úloha protonové pumpy



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 25.15 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

ABC transportéry

ATP-Binding Casette transportéry - ATPázy P-typu: hydrolyzují ATP a transportují různé organické molekuly; vakuola, plazmatická membrána



2 základní strukturní elementy:

Integrální domény

Nukleotid-binding smyčky

(zapojeny v hydrolýze ATP)

Transport antokyanů, katabolitů chlorofylu, protihoubových látek, auxinů, vosků

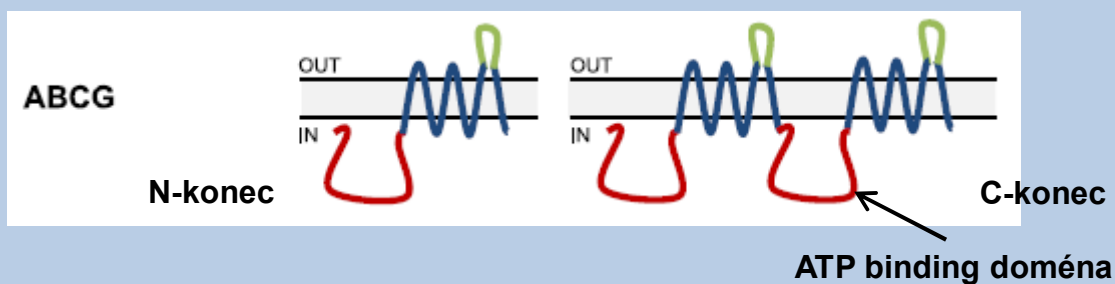
Akumulace metabolitů a xenobiotických molekul ve vakuole (syntetické herbicidy) (glutation; GST – glutation transferáza)

Update 2020

Gräfe K and Schmitt L (2021) J Exp Botany 72: 92-106

ABC transportéry jsou nezbytné pro vývoj rostlin – hrají úlohu např. v gametogenezi, vývoji a klíčení semen, tvorbě orgánů a sekundárním růstu.

Transportéry ABCG



AtABCG11

AtABCG12

AtABCG13

AtABCG32

transport kutinu a monomerů kutikulárního vosku; defekt vede k dwarfismu, pylové sterilitě a fúzi orgánů

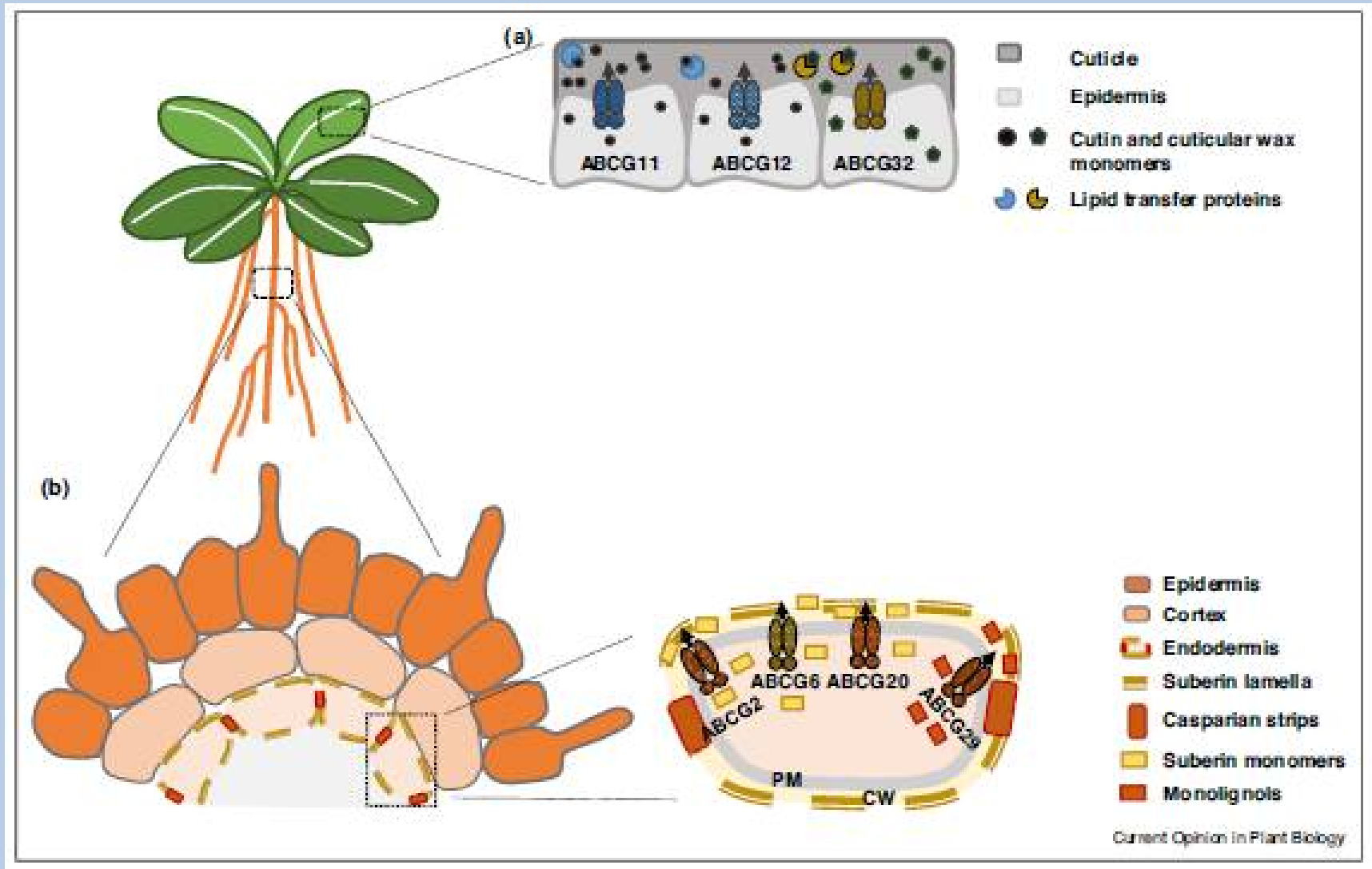
AtABCG2

AtABCG6

AtABCG20

AtABCG29

transport suberinů, vytváření suberinových lamel v kořenových endodermis; tvoří rovněž osemení; defekt vede k větší permeabilitě osemení a hypersensitivitě semen k ABA



Do THT et al. (2018) Current Opinion in Plant Biology 41: 32-38

AtABCG1

AtABCG9

AtABCG16

AtABCG26

AtABCG31

transport sporopoleninu a monomerů pylových lipidů;
defekt vede k narušení vývoje pylu a nízká životnost pylu
(rychlejší vysychání); **exprimovány v samčím i samičím gametofytu**

AtABCG16

transport kyseliny jasmonové; vyskytují se na cytoplazmatické membráně a jaderné membráně

AtABCG14

transport cytokininů; defekt vede k akumulaci cytokininů a k redukovanému růstu stonku

AtABCG25

AtABCG30

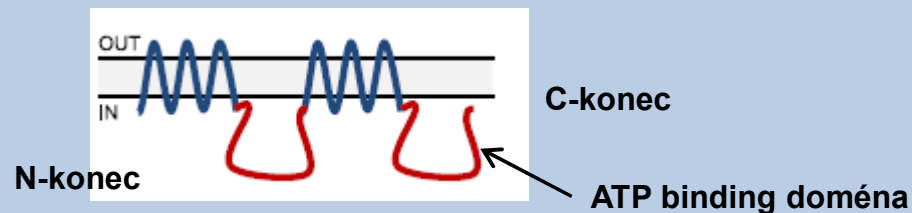
AtABCG31

AtABCG40

transport ABA z endospermu do embrya; defekt vede k nižší akumulaci ABA v embryu => slabší redukce klíčení semen

PhPDR1 - transport strigolaktonů z kořenů do stonků

Transportéry ABCB



AtABCB1/AtPGP1

AtABCB19/AtPGP19/AtMDR1



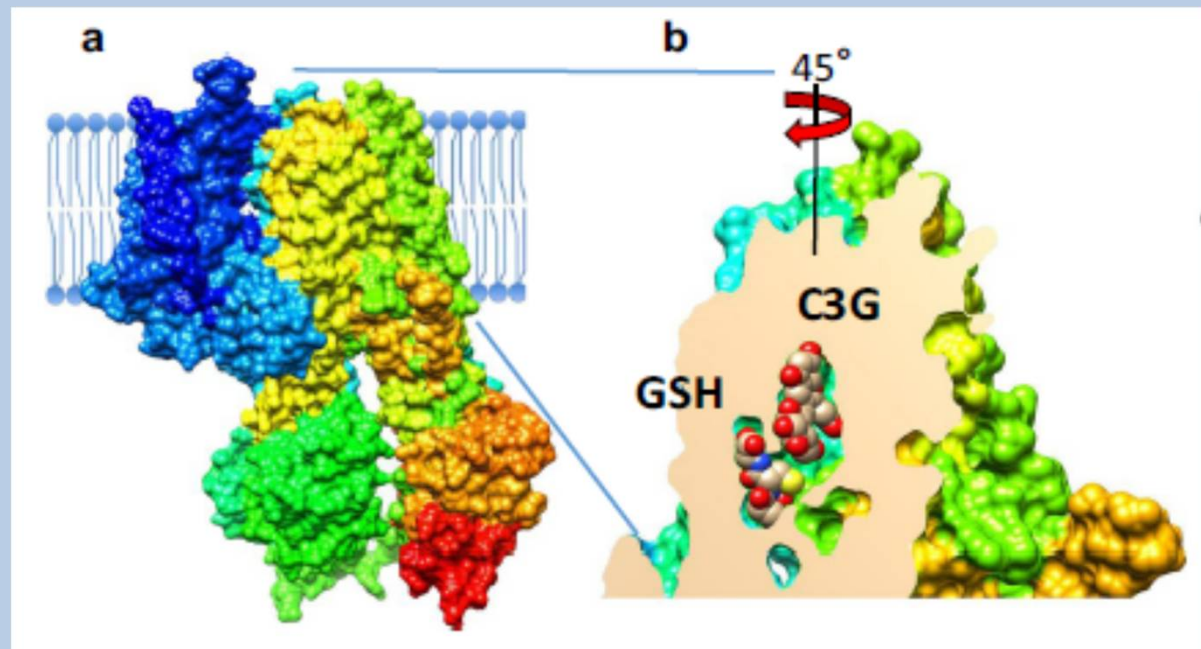
transport auxinů; defekt vede k dwarfismu, redukované apikální dominanci, krátkému hypokotylu ve tmě i na světle, snížené fertilitě, redukovanému prodlužování nitek tyčinek

Update 2019

Behrens CE et al. (2019) Scientific Reports 9: 437-451

Transportéry ABCC

- AtABCC2** – transport antokyaninů a dalších flavonoidů; vyskytují se na tonoplastu; transport cyanidin 3-O-glukosidu (C3G) je závislý na ko-transportu glutationu (GSH)



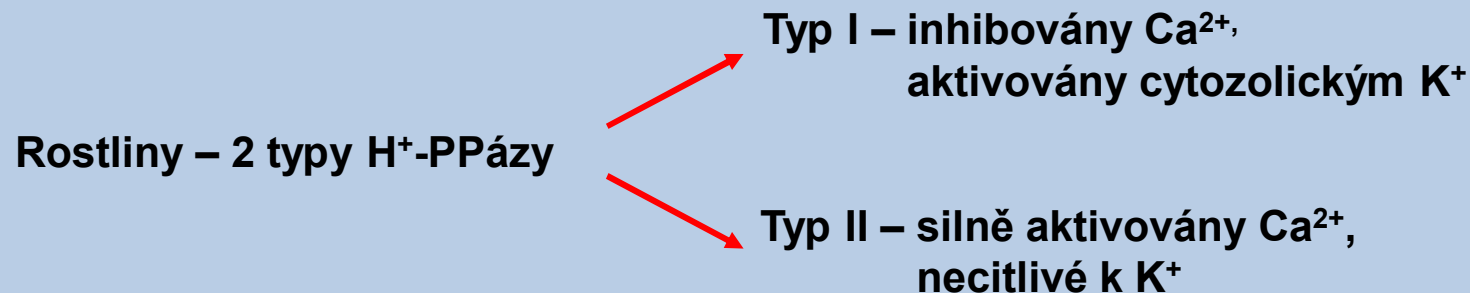
Update 2022

Dean JV et al. (2022) Physiologia Plantarum 174: e13780

- AtABCC1, AtABCC14** – transport acylovaných antokyaninů do vakuoly

Pumpy hydrolyzující pyrofosfát (PPI) – pyrofosfatázy (H⁺-PP)

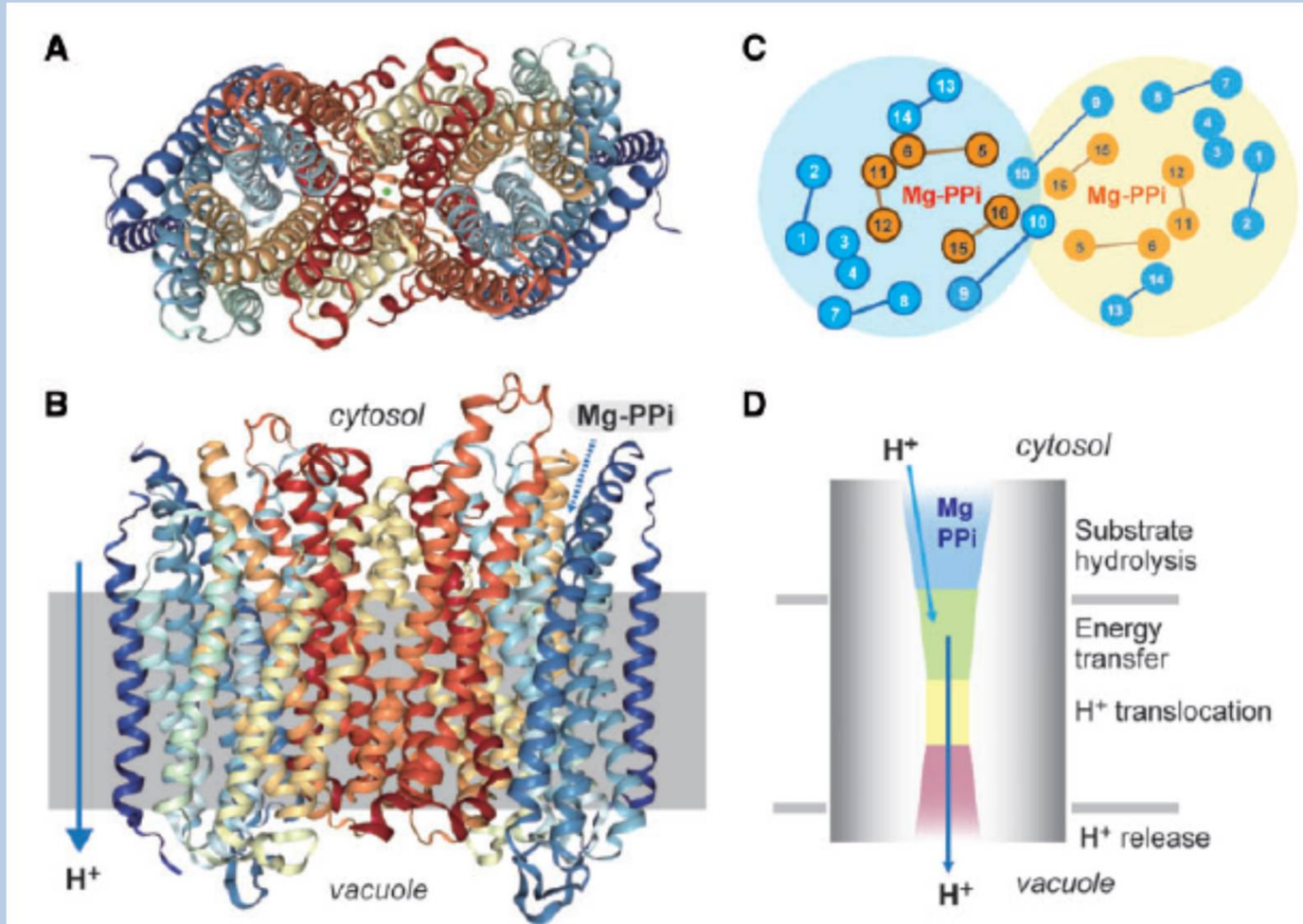
Funkční H⁺-PP - homodimer, 80 kDa; funguje i jako dimer; vakuola, Golgiho aparát, multivezikulární tělíška, plazmatická membrána



Proč existují dva typy H⁺ pump na tonoplastu rostlinných buněk: H⁺-ATPázy + H⁺-PP ?

Využití velkého množství pyrofosfátu v rostlinných buňkách (mM) – produkován během syntézy ADP-glukózy a uridin-difosfátu (UDP)-glukózy

V-ATPázy a H⁺-PPázy - okyselování vakuoly => udržování tonoplastového V_m okolo 20-30 mV



Duální funkce H⁺-PPáz:

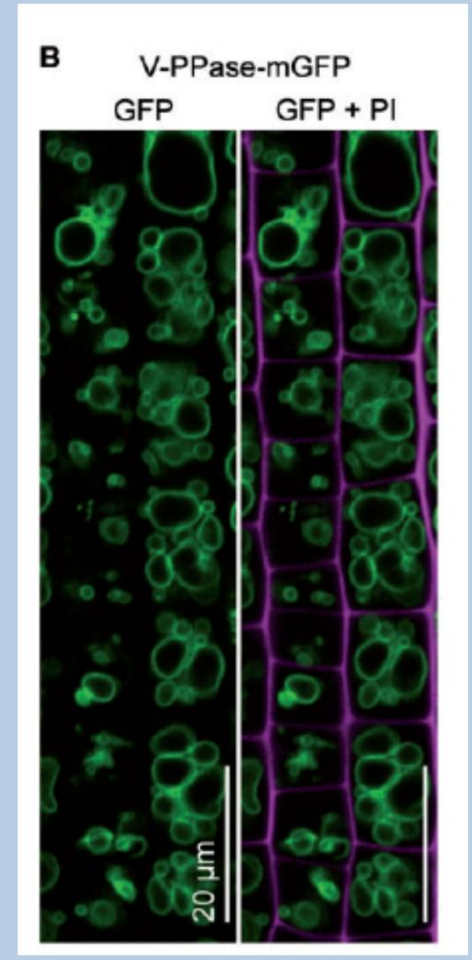
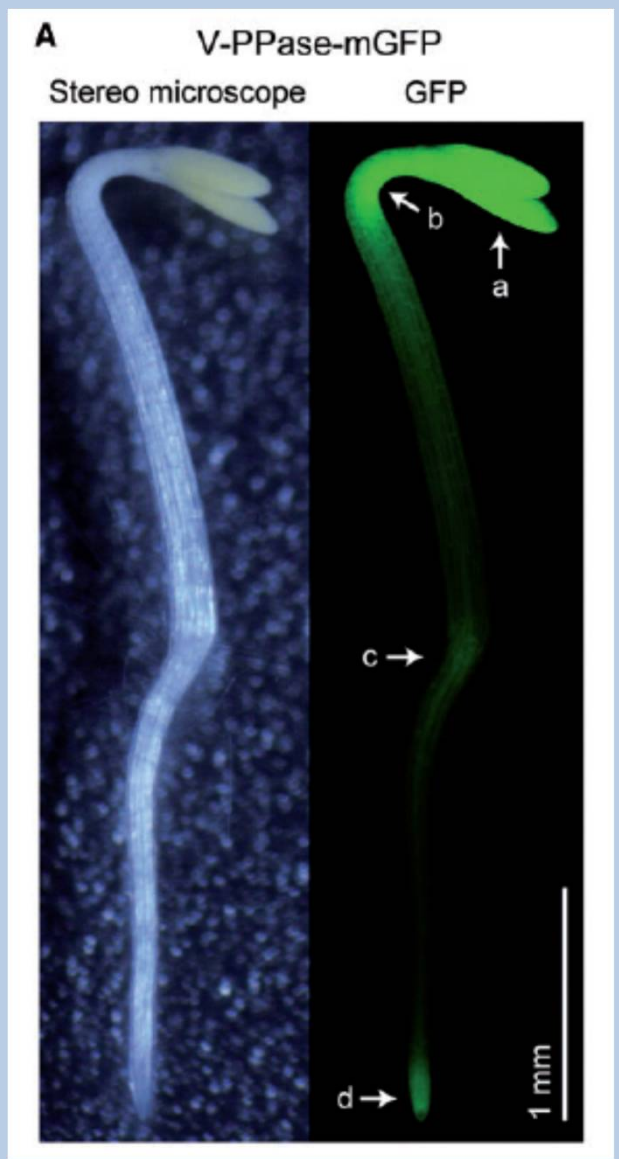
- 1) Hydrolýza PPI = udržování hladiny PPI v cytozolu
- 2) Udržení kyselosti vakuolárního lumenu – důležité nízké pH ve vakuole

A, B: Prostorové uspořádání V-PPázy z pohledu od cytoplazmy (**A**) a z bočního pohledu (**B**)

C: Schéma vrchního pohledu na dimer V-PPázy - uspořádání transmembránových helixů (TM1–TM16)

D: Schéma funkčních domén - hydrolýza substrátu, přenos energie, translokaci H⁺ a uvolnění H⁺.

Lokalizace vakuolárních H⁺-PPáz v rostlině



GFP – Green fluorescent protein

PI – propidium iodide (barvení buněčné stěny)

Segami S et al. (2018)