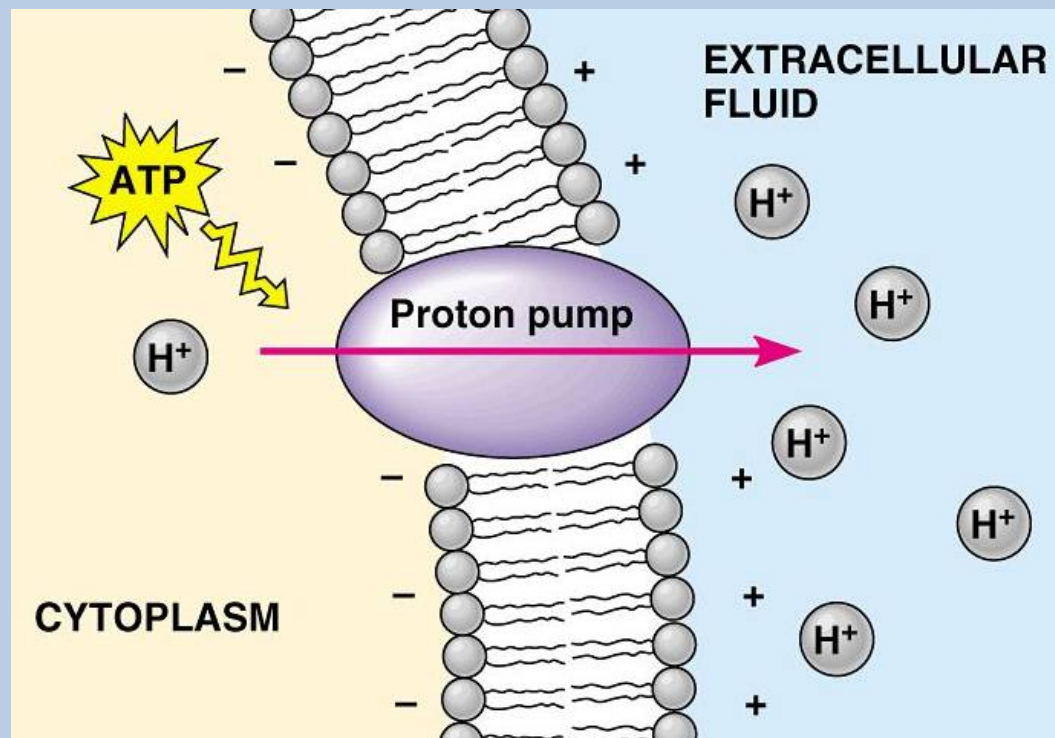


3) Membránový transport

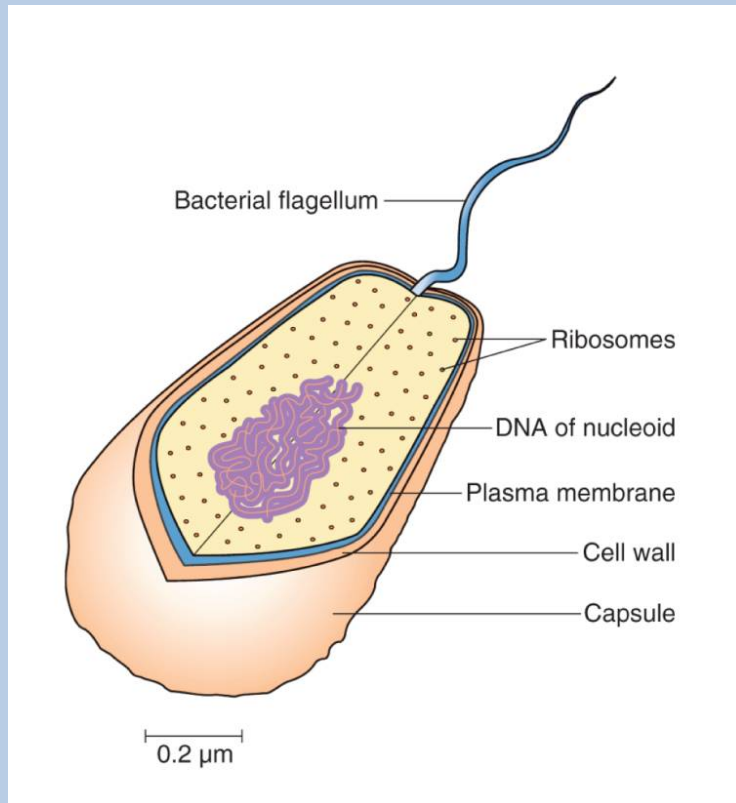
- a) Fyzikální principy
- b) Regulace pohybu roztoků membránami a jejich transportéry
- c) Pumpy

Update 2022

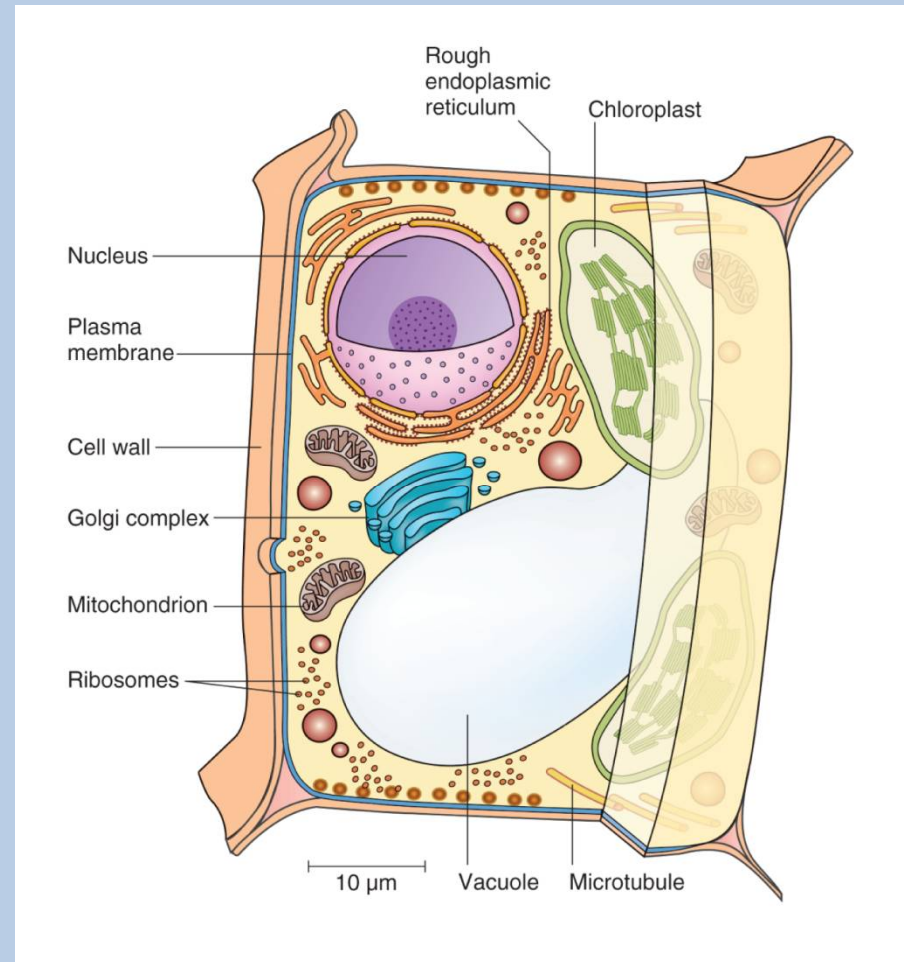
Tsay Y-F et al. (2022)
Plant Physiology 188: 921-923



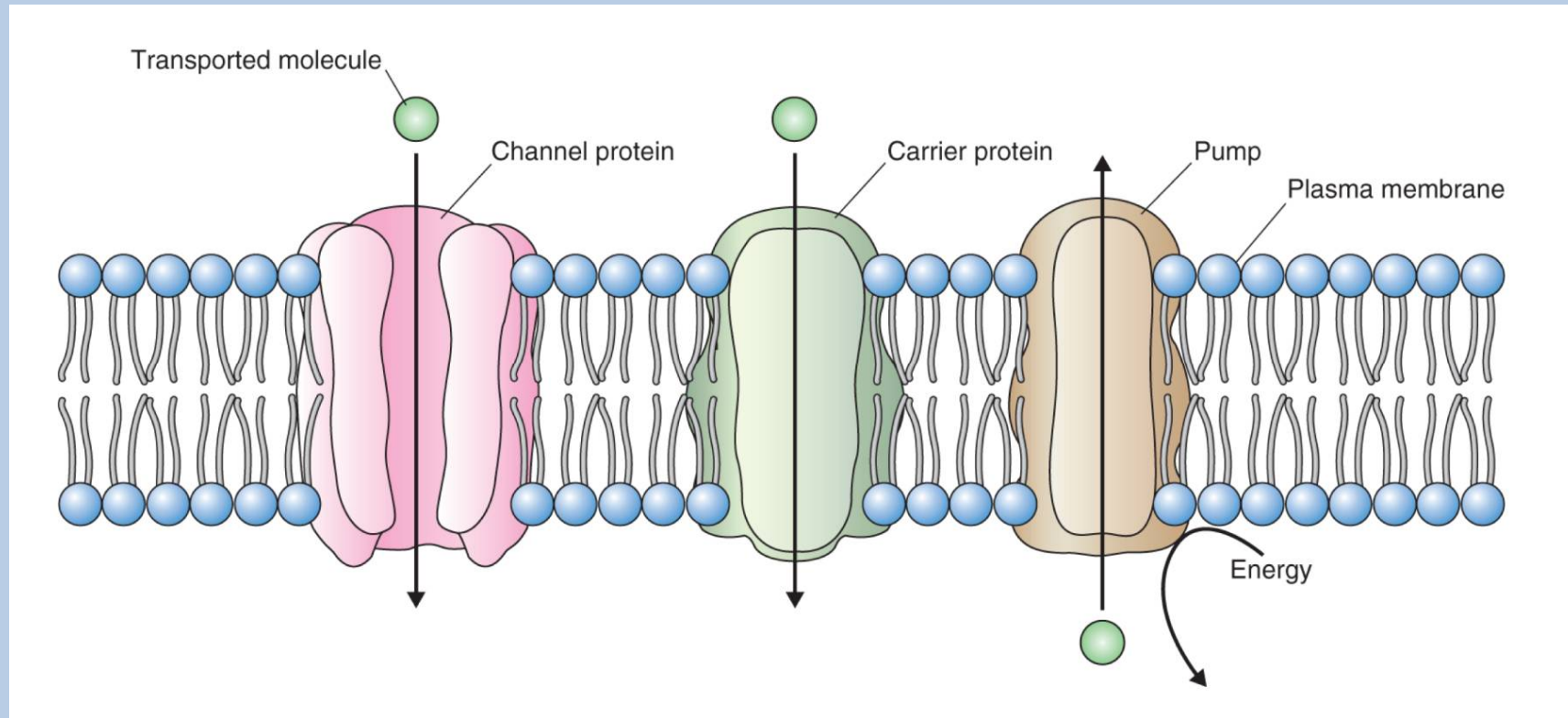
Prokaryotická buňka



Eukaryotická buňka



Pohyb vody – první reakce klidných či dormantních semen

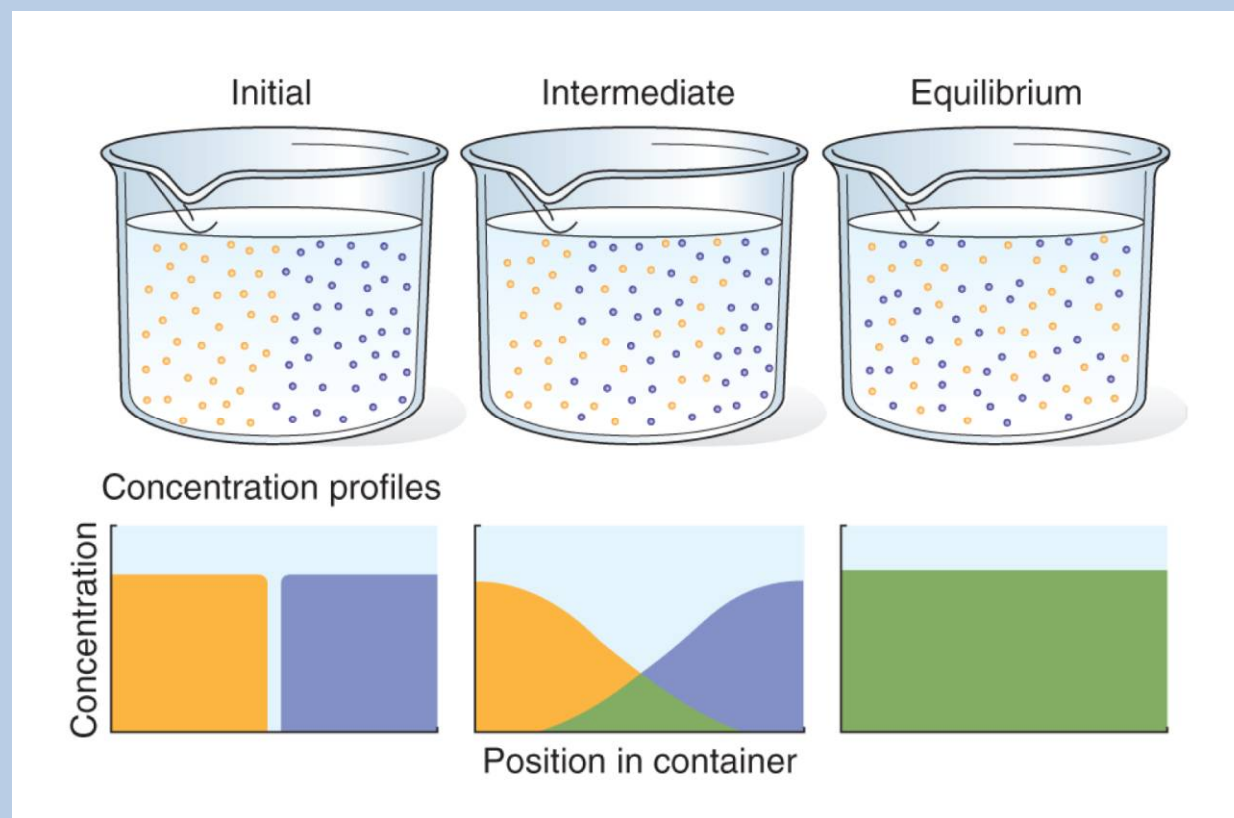


Hydratace buněk a pletiv je jednou z prvních reakcí, které se odehrávají při imbibici semen.

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.

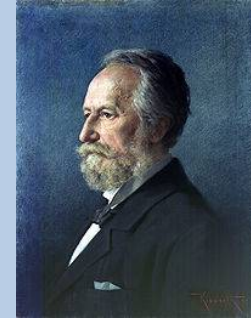


Molekuly jsou v neustálém pohybu - difúze

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

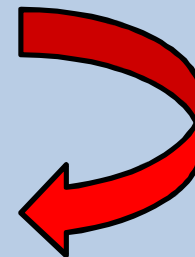
$RT \ln C_s$ = **koncentrační složka**, zahrnující koncentraci **C** roztoku **s** v molech na litr při standardním tlaku **R**, **T** = absolutní teplota

$z_s FE$ = **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

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

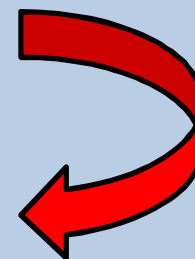


Ionty, nabité
molekuly

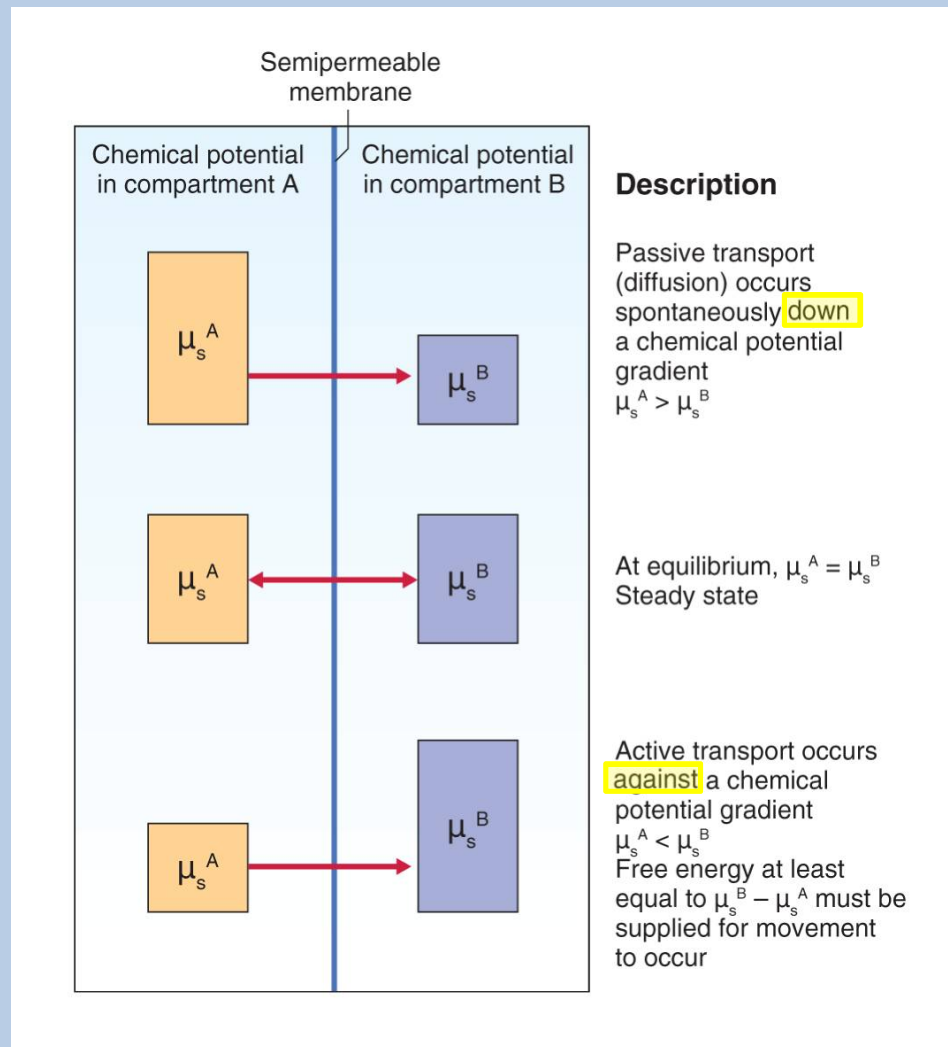
Elektrochemický
potenciál

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:

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



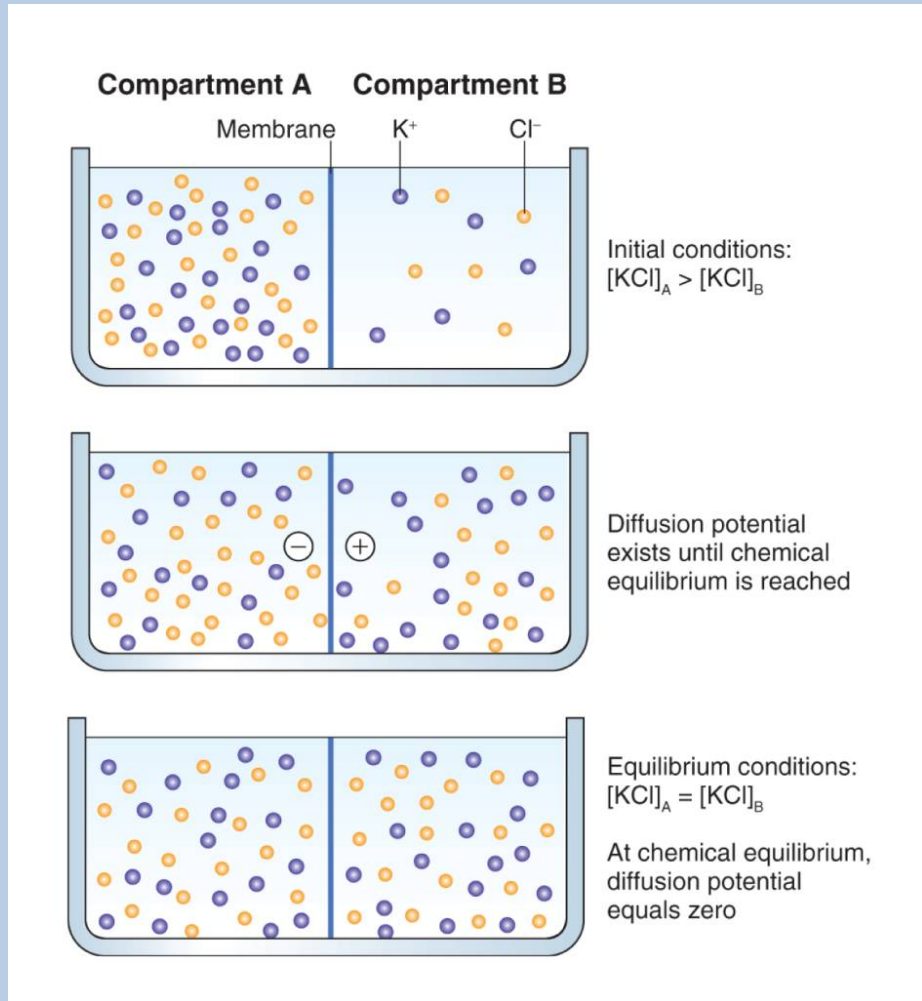
$$\Delta\mu_s = RT \ln(C_s^i/C_s^o) + zF(E^i - E^o)$$

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



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

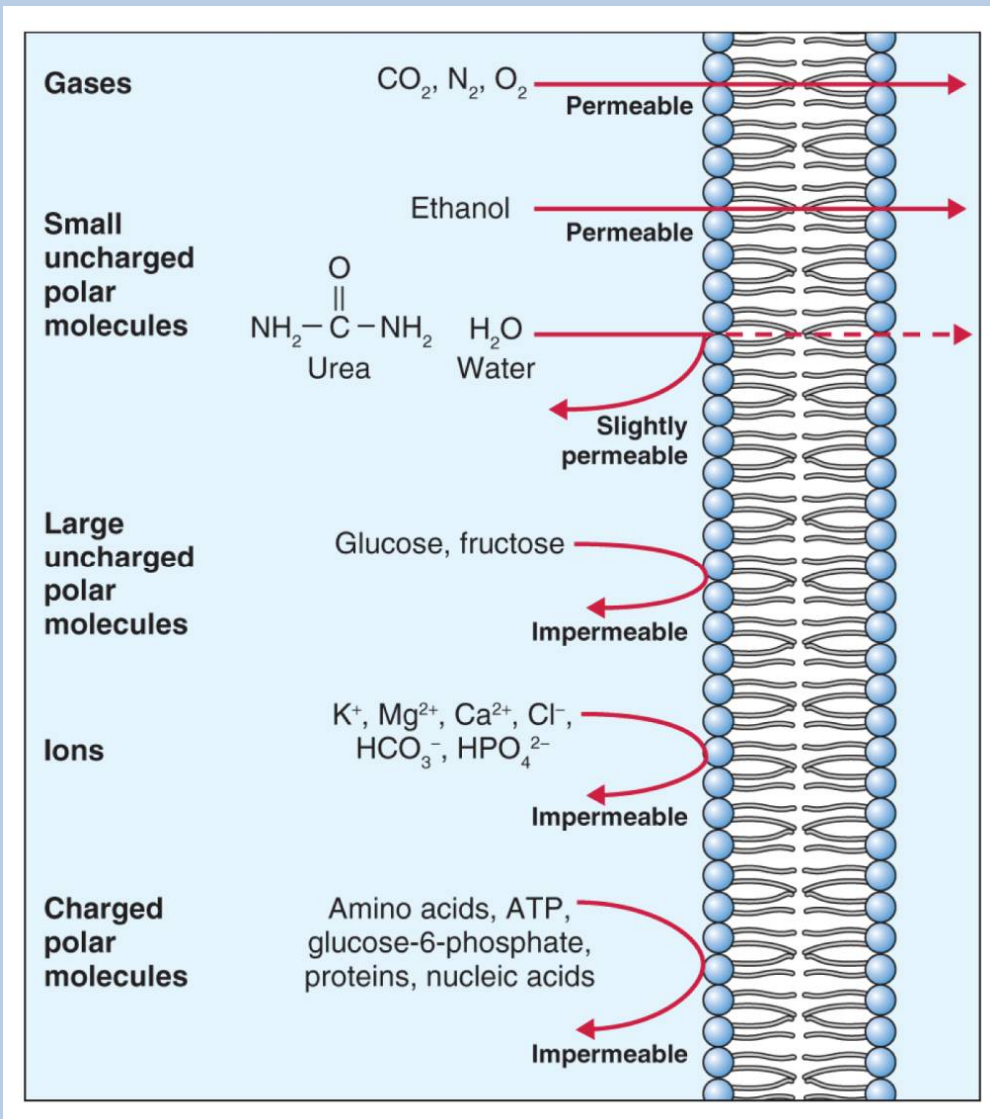
Nernstova rovnice
 ΔE – Nernstův potenciál

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

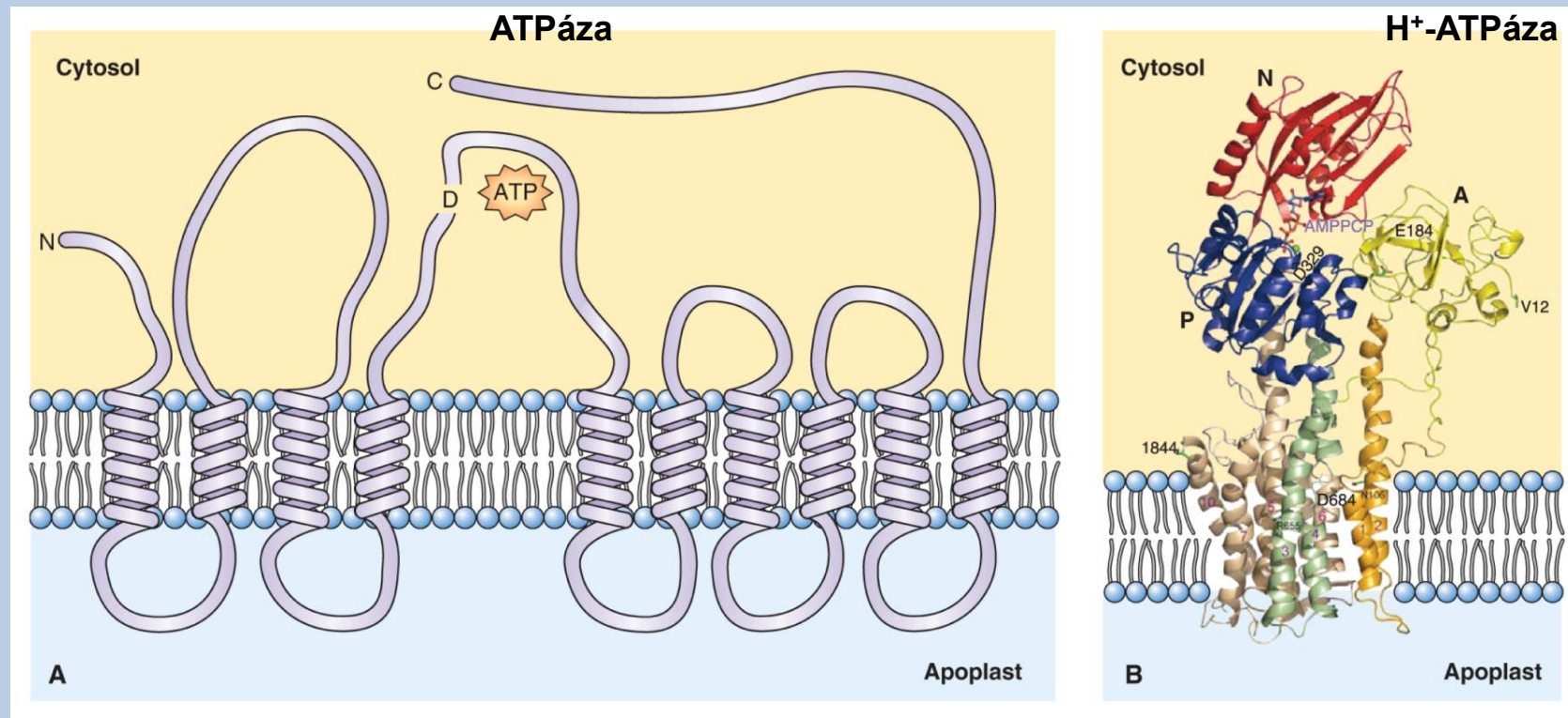
Pohybují se do té doby, dokud existuje gradient chemického potenciálu.

Molekuly neprocházející membránou



Nutnost transportních proteinů

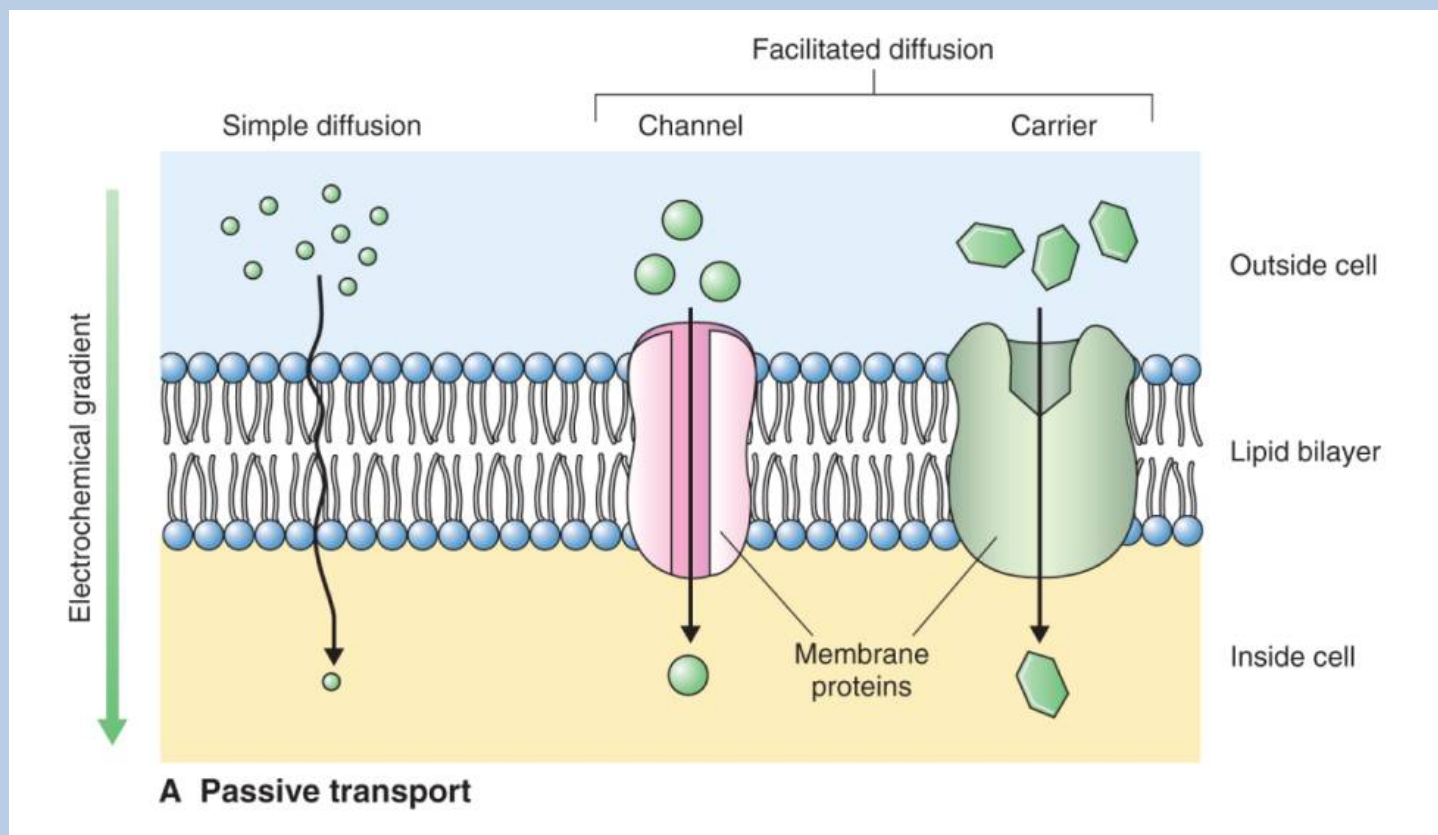
Transportní proteiny - střídavé bloky hydrofobních a hydrofilních aminokyselin.



Hydrofobní aminokyseliny – dovolují překlenout fosfolipidovou dvojvrstvu membrány

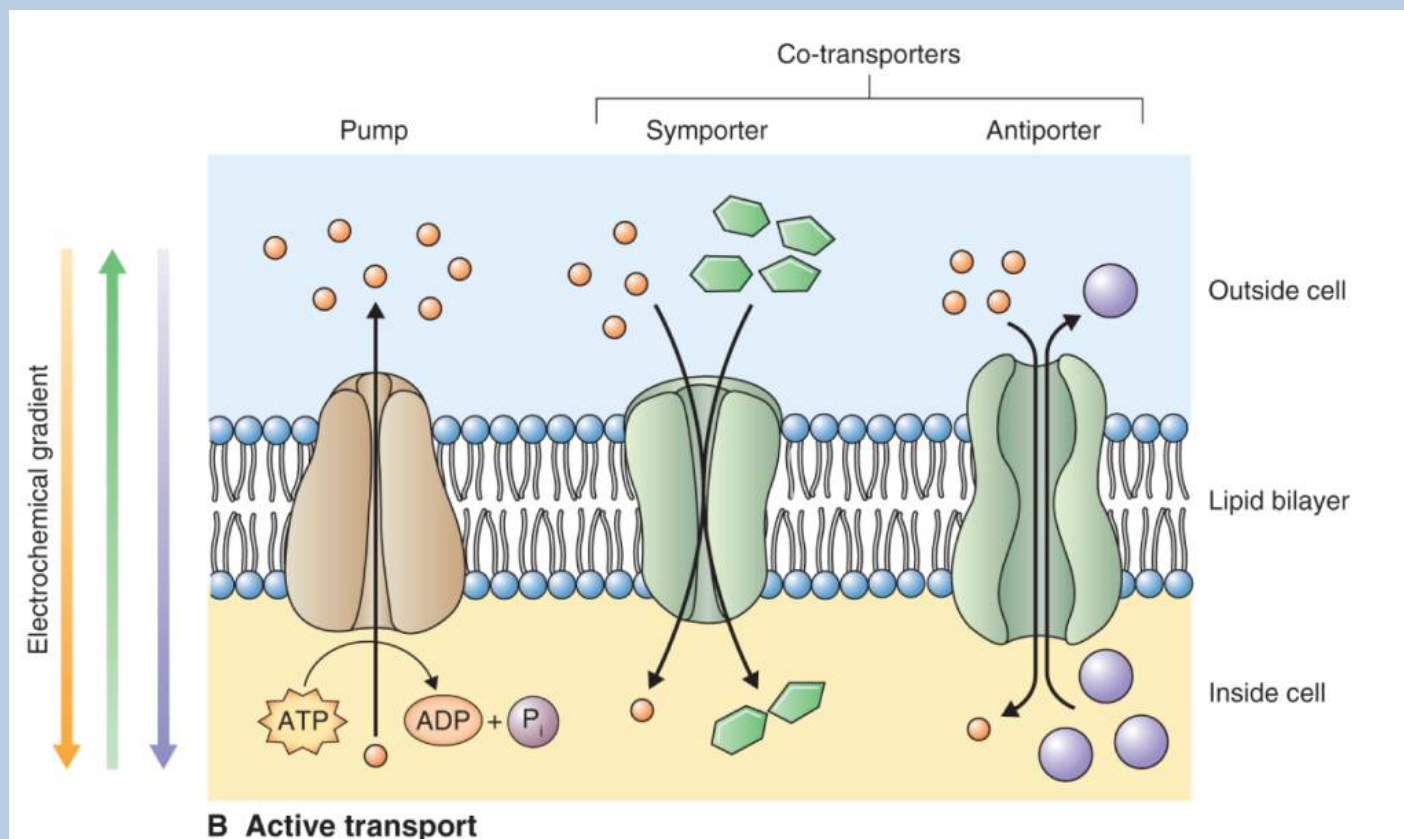
Hydrofilní domény – ponořené do cytozolu, lumenu organel nebo vnějšku buňky

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**

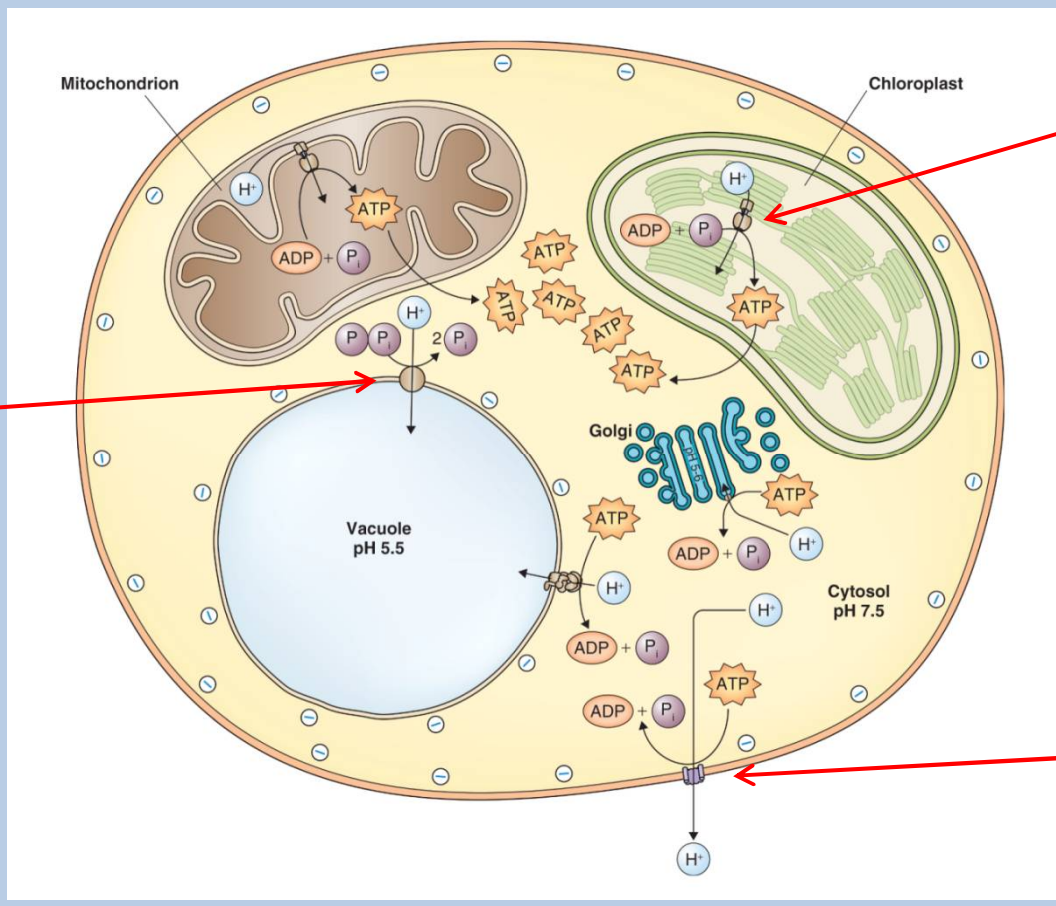
Sekundární aktivní transport – umožněn iontovým gradientem založeným primárním aktivním transportem – **co-transportéry: symportéry, antiportéry**

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

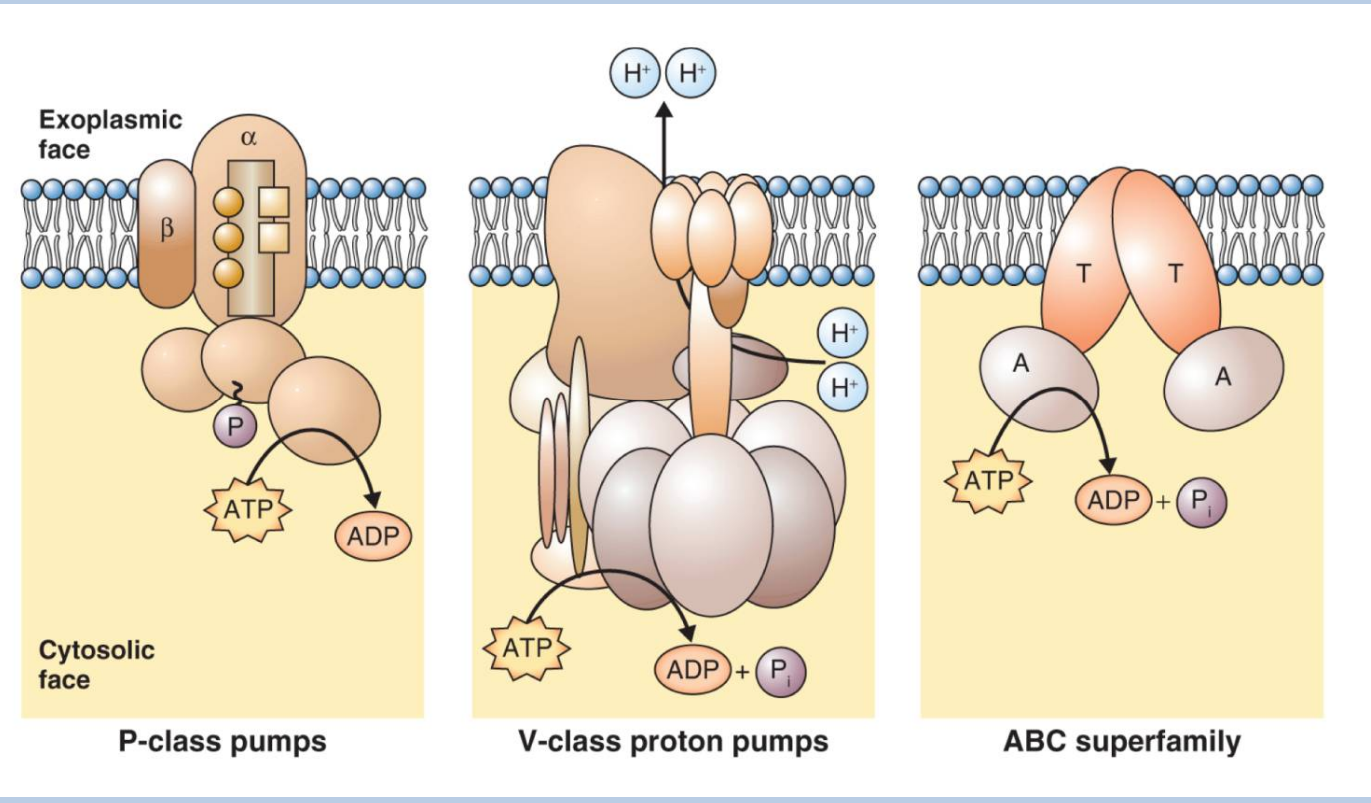
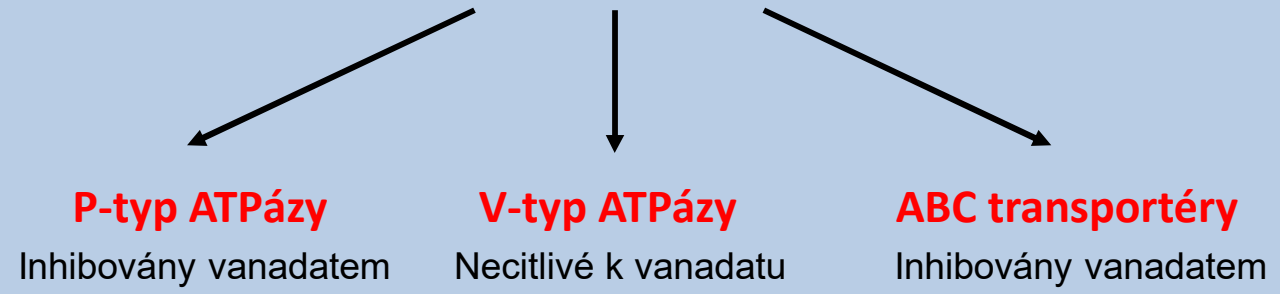


ATP-syntáza (F-typ ATPázy)

Pumpa hydrolyzující ATP

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

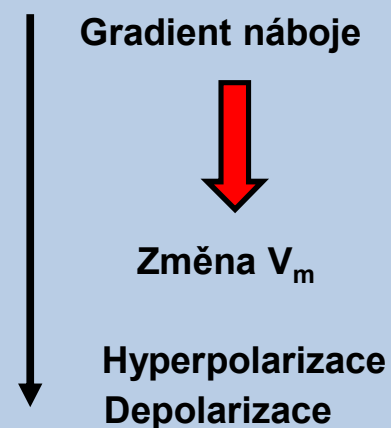
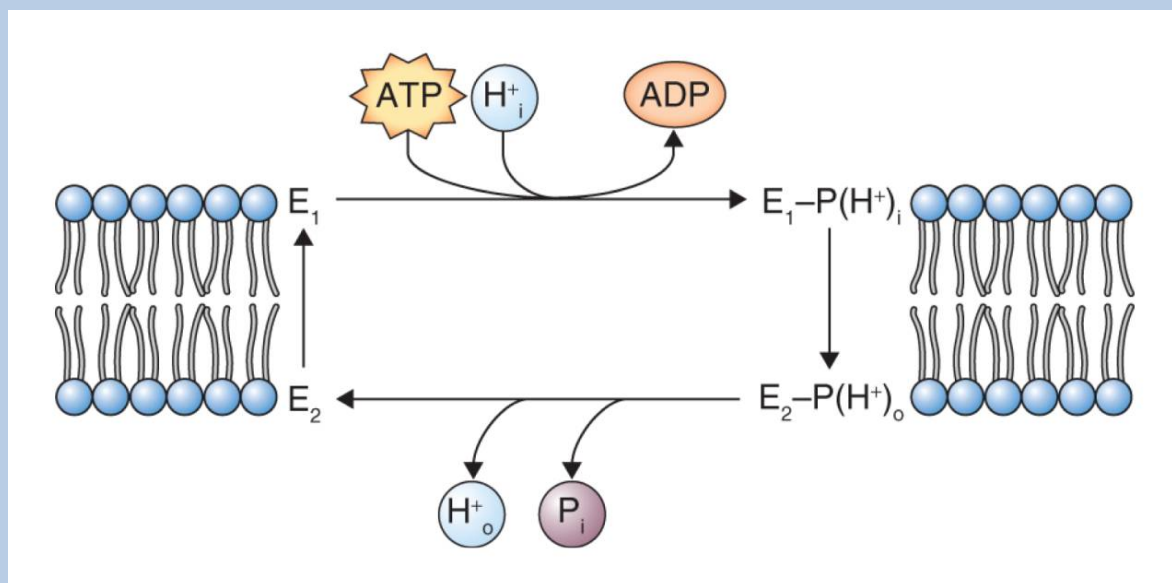
Pumpy hydrolyzující ATP



P-typ ATPázy

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

Po hydrolýze ATP vznikají fosforylované meziprodukty.

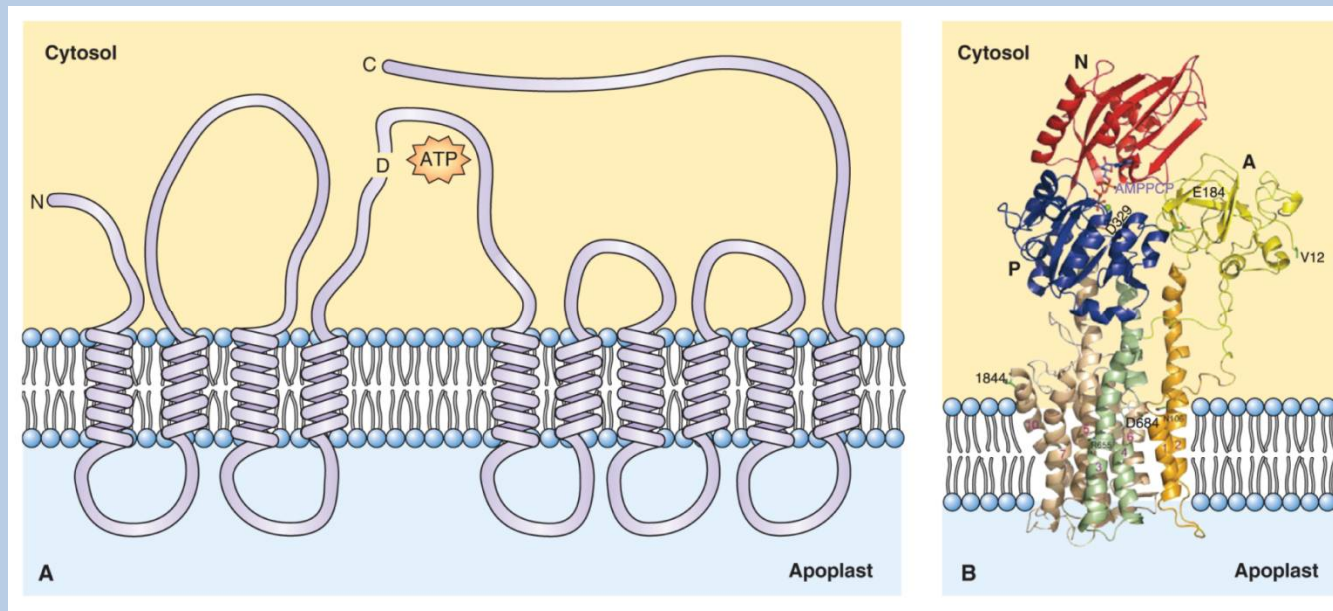


Fosforylace ATPázy ve stavu E1 vede k vazbě H^+ na jedné straně membrány a vede ke vzniku stavu E2. E2 má nižší afinitu k H^+ => uvolnění H^+ i anorganického P na druhé straně membrány.

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



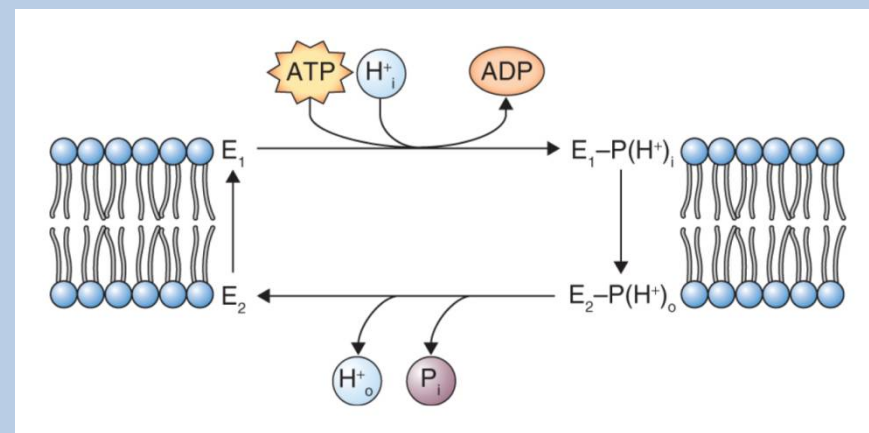
Jeden proton H⁺ je pumpován ven z cytozolu za jednu molekulu ATP

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

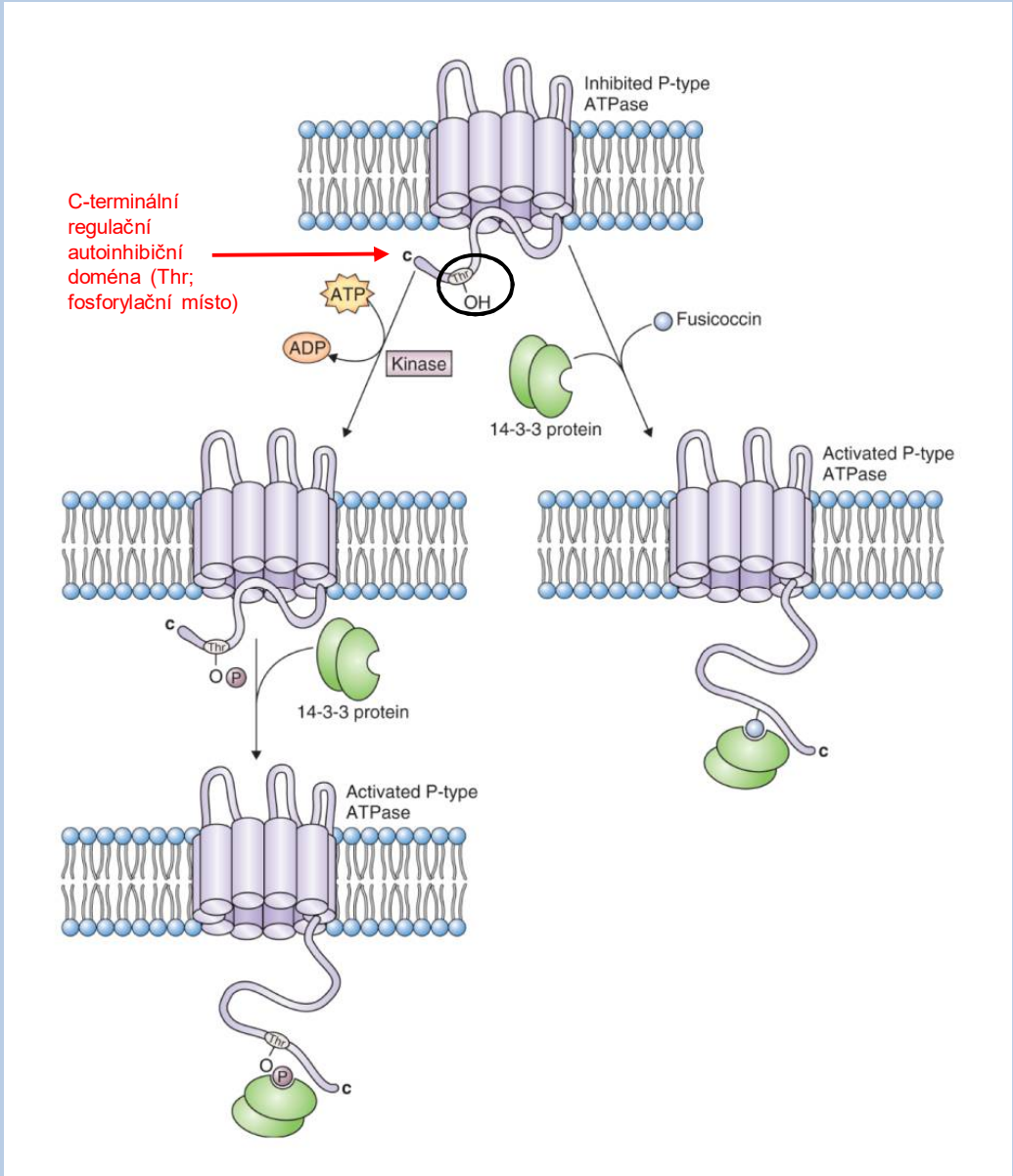
Optimum pro fungování PM H⁺ pumpy je 6,6



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

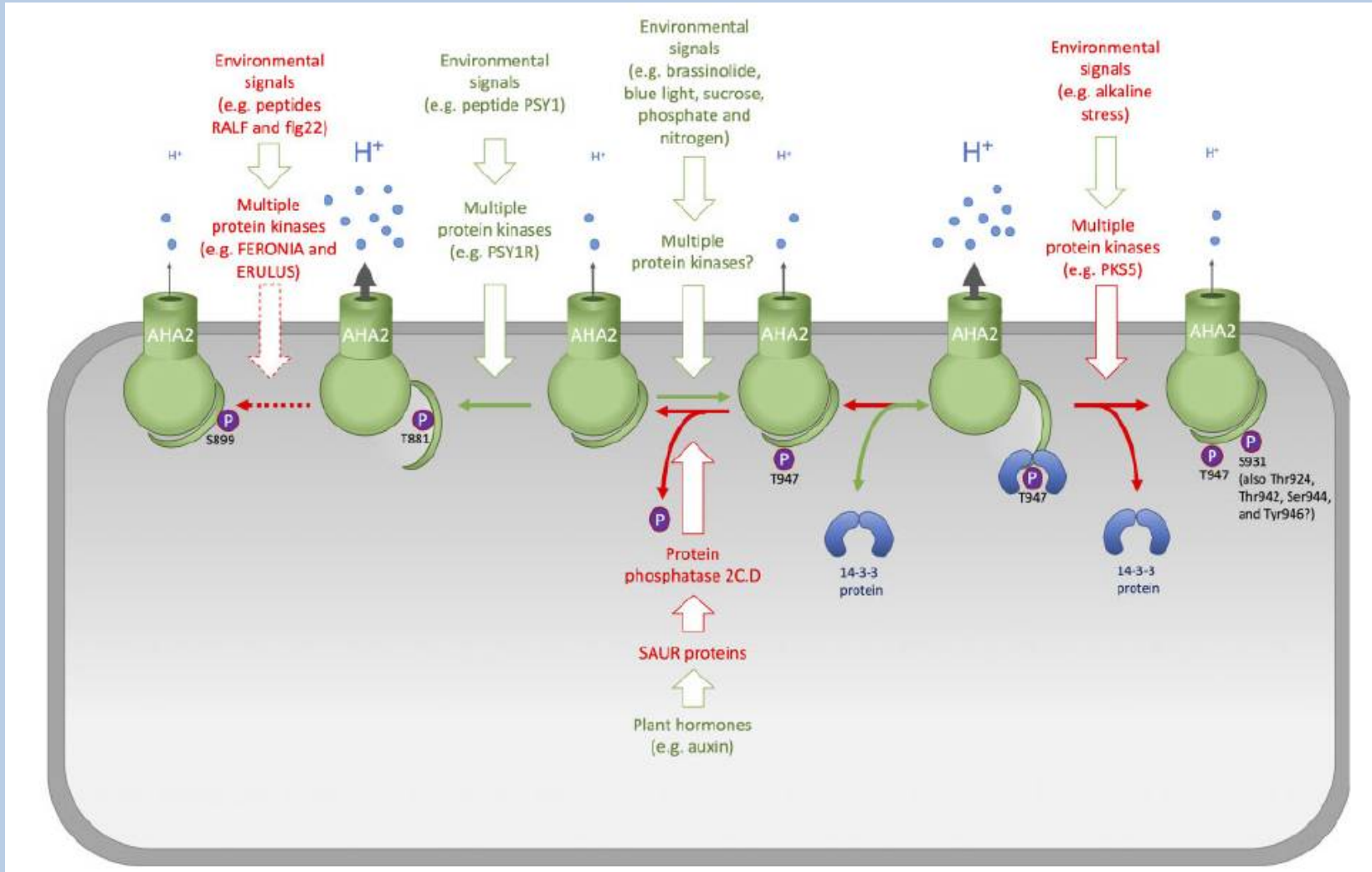
2 geny jsou exprimovány ve všech buňkách.

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).



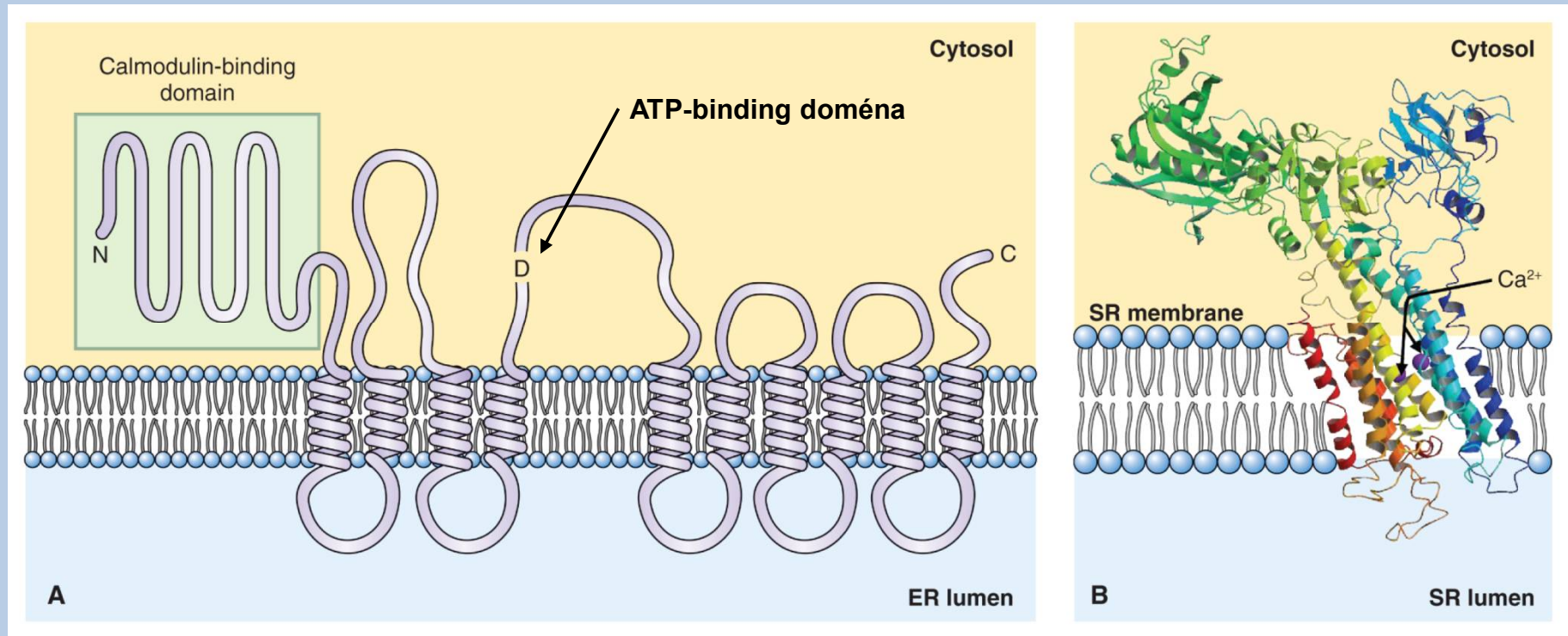
Update 2021 Fuglsang AT and Palmgren M (2021) Plant Physiology 187: 1856-1875

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.



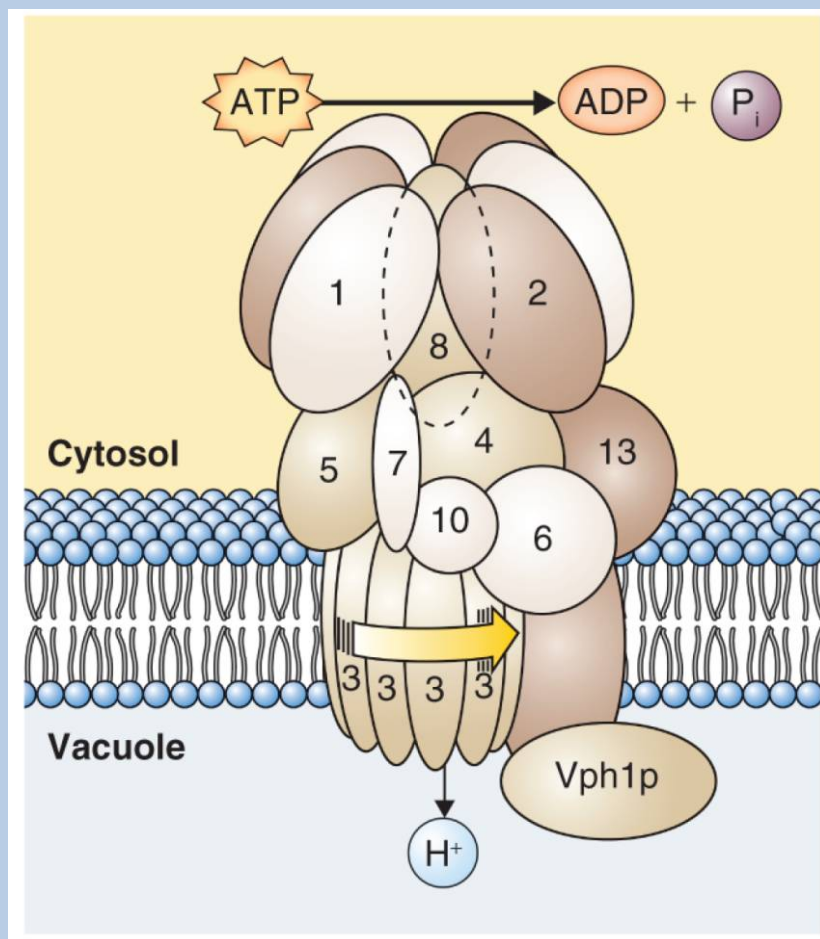
Hydrolýza ATP Ca²⁺-ATPázou je doprovázena transportem dvou iontů Ca²⁺ přes membránu.

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



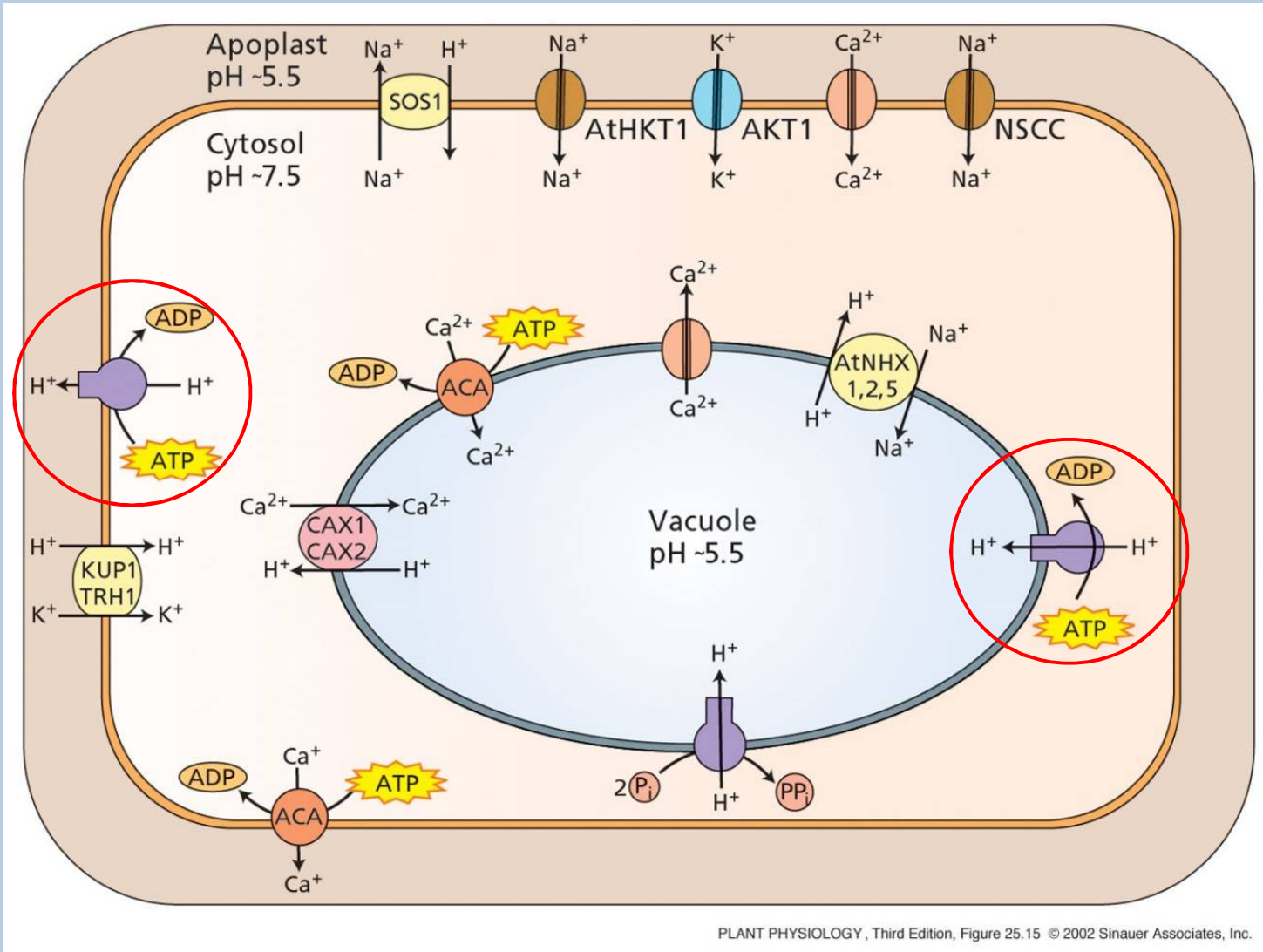
Velké množství kombinací

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⁻).

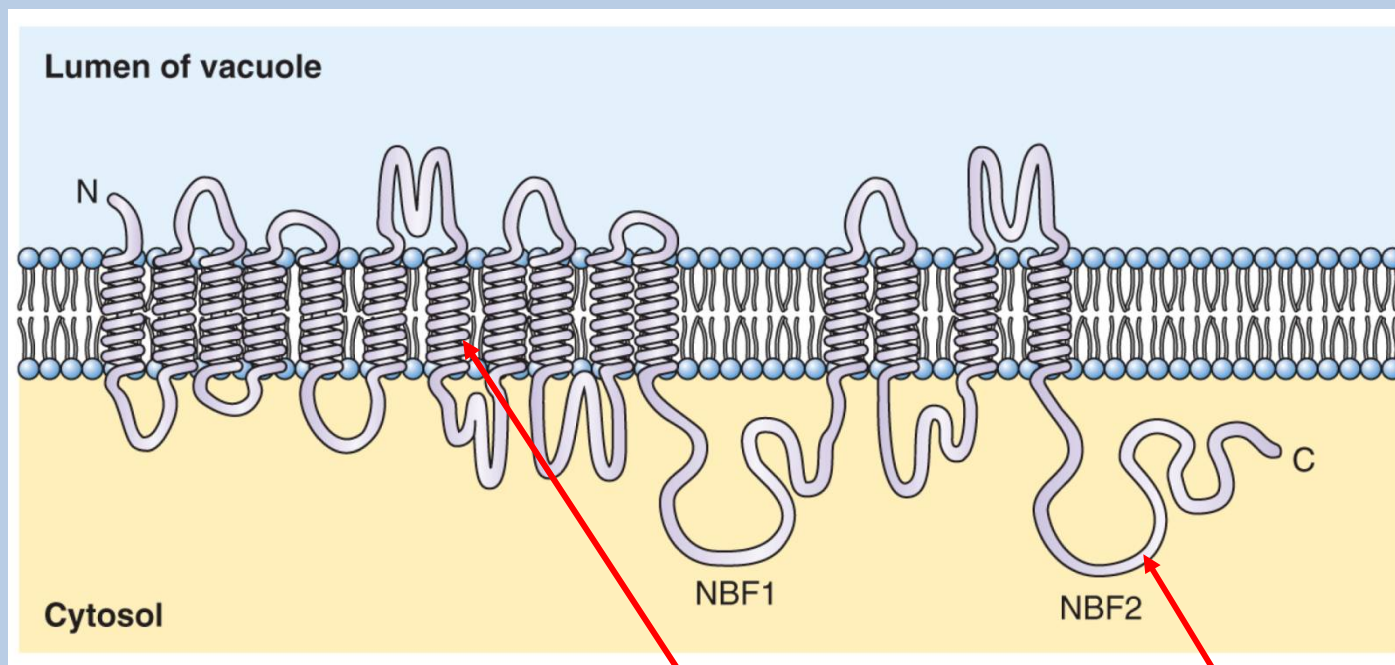
Důležitá úloha protonové pumpy



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

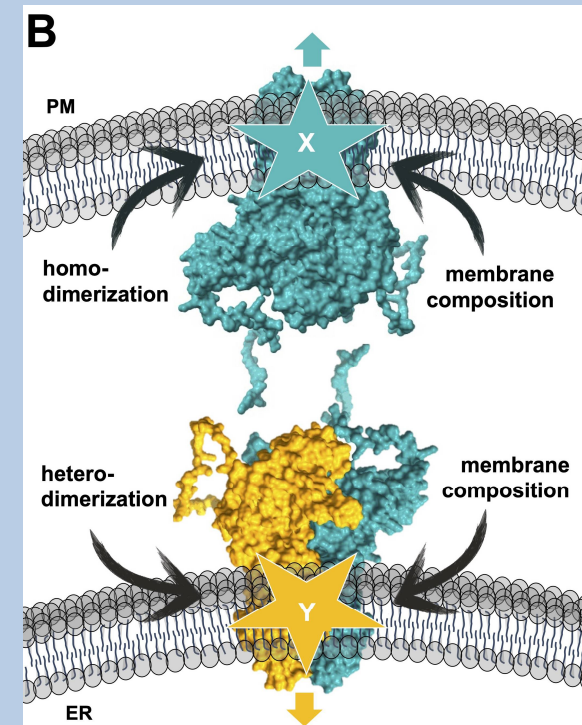
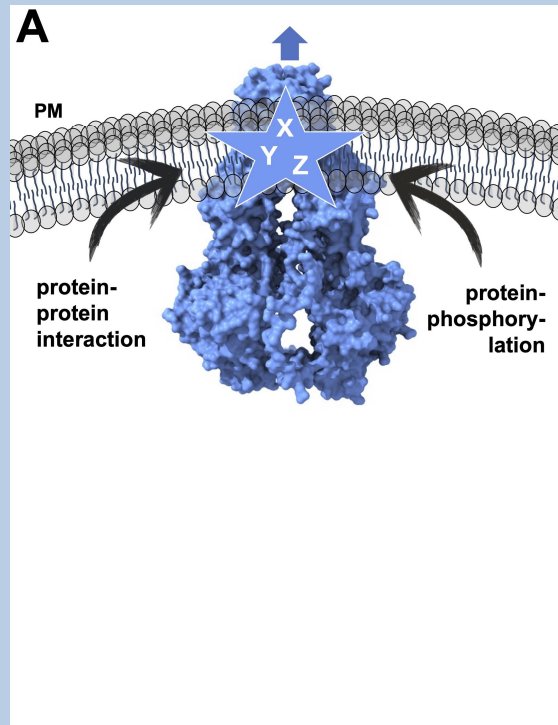
Nukleotid-binding smyčky

(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)

Dva modely regulace substrátové multispecificity ABC transportérů



1) Posun ve specifitě může být způsoben interakcí mezi proteiny nebo fosforylací proteinů.

2) Změna ve specifitě transportéru koreluje se změnou homodimeru na plazmatické membráně na heterodimer na ER.

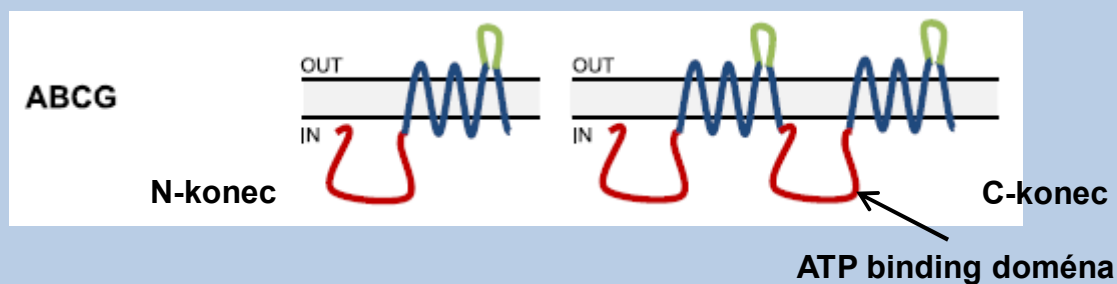
V obou případech není známo jak se tyto změny promítají do vazebné domény substrátu spojené s transmembránovými šroubovicemi.

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

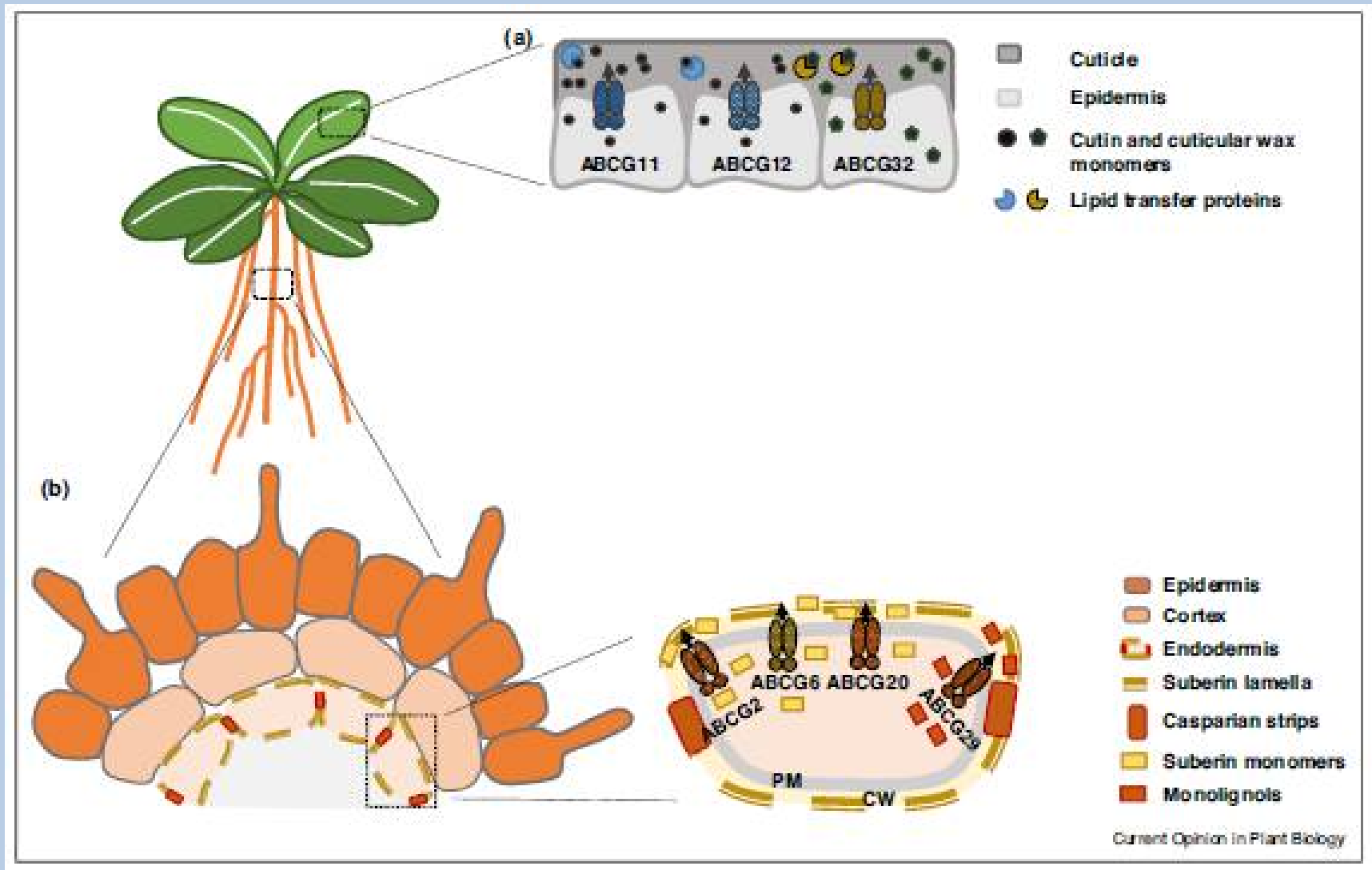
AtABCG2

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

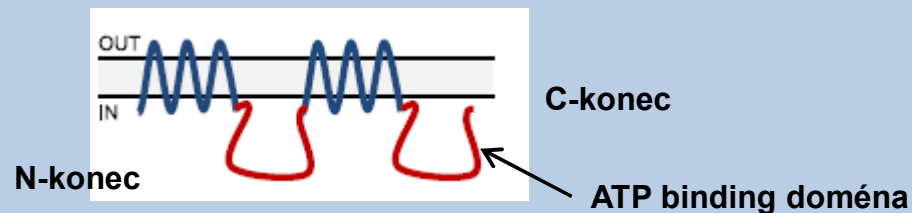
AtABCG31

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



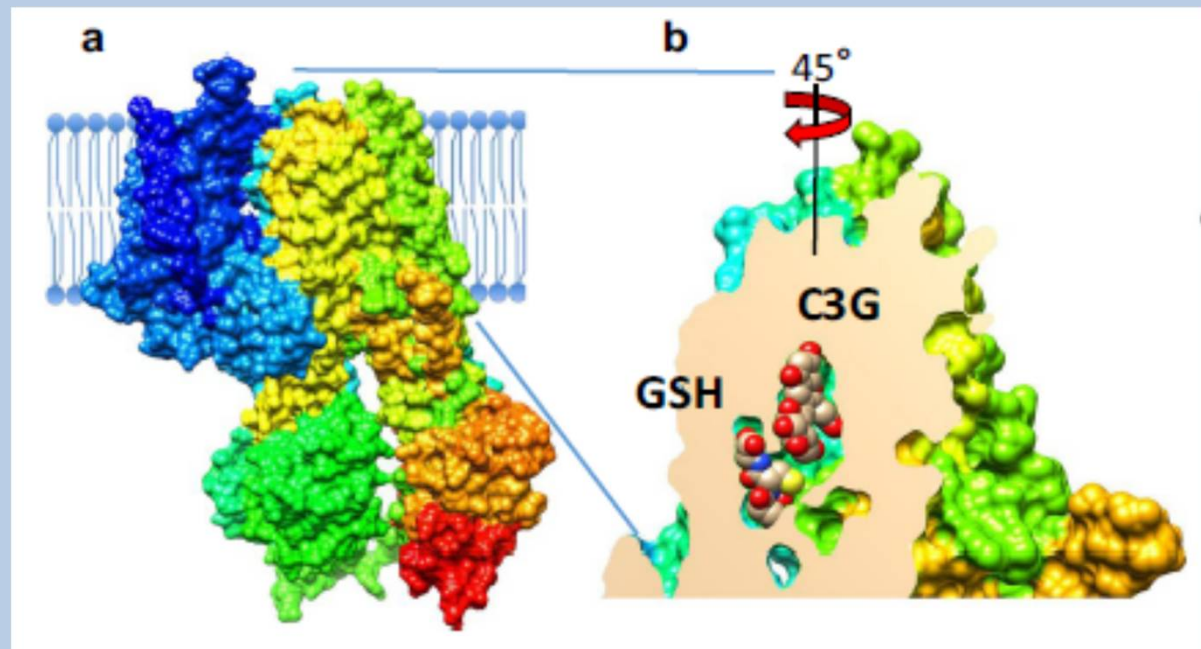
transport auxinů; defekt vede k dwarfismu, redukované apikální dominanci, krátkému hypokotylu ve tmě i na světle, snížené fertilitě, redukovanému prodlužování nitek tyčinek

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)



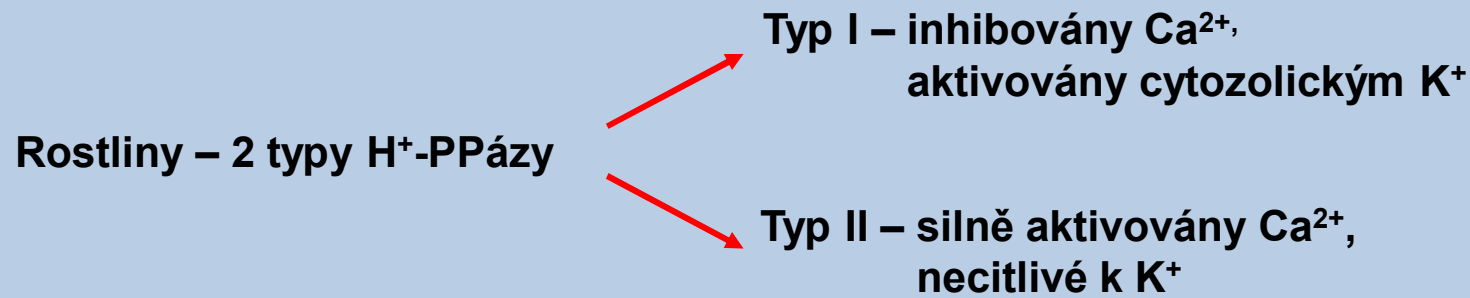
Update 2022

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

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

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

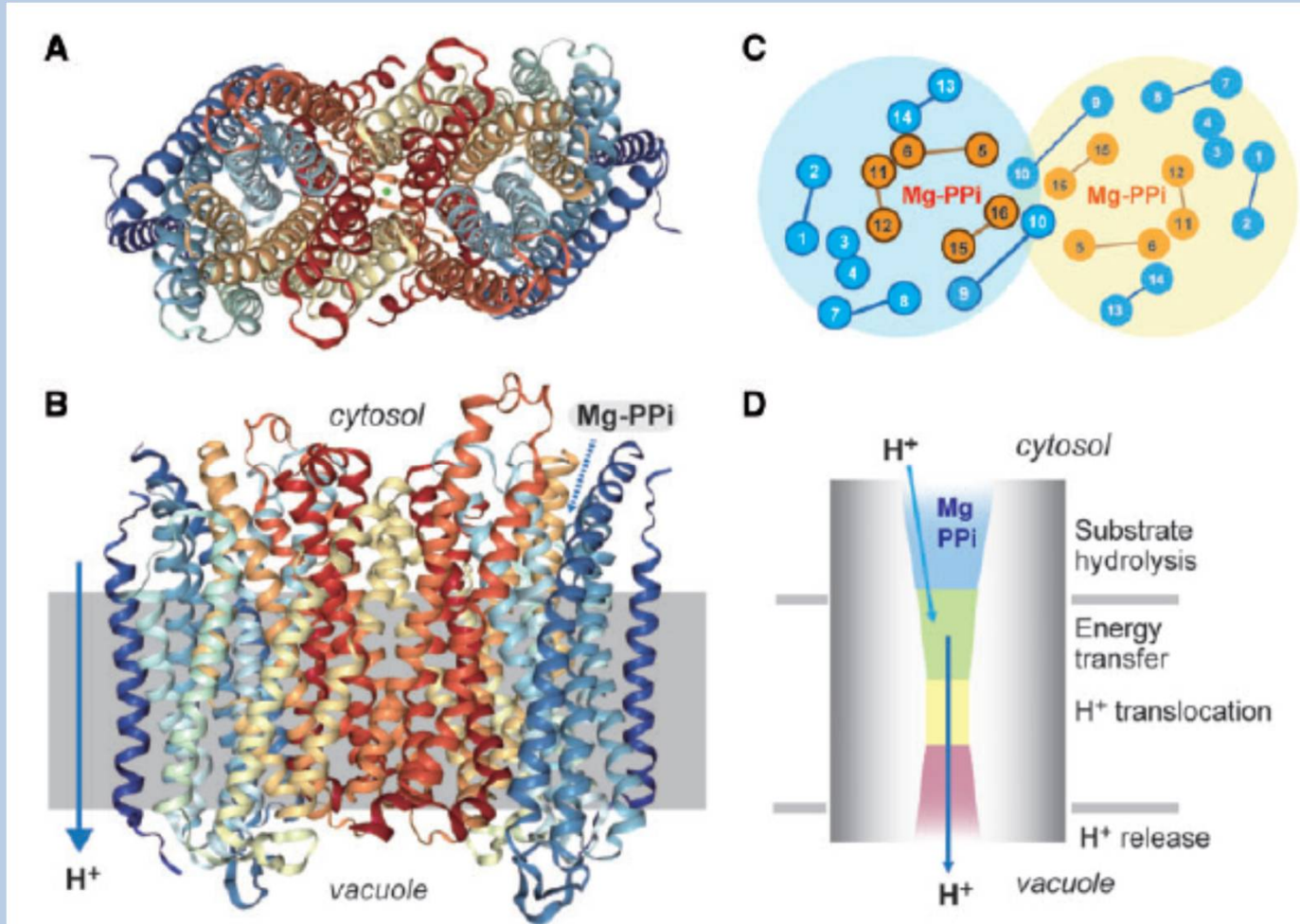
Funkční H^+ -PP - homodimer, 80 kDa; funguje i jako dimer; vakuola, Golgiho aparát, multivezikulární tělíska, plazmatická membrána



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:

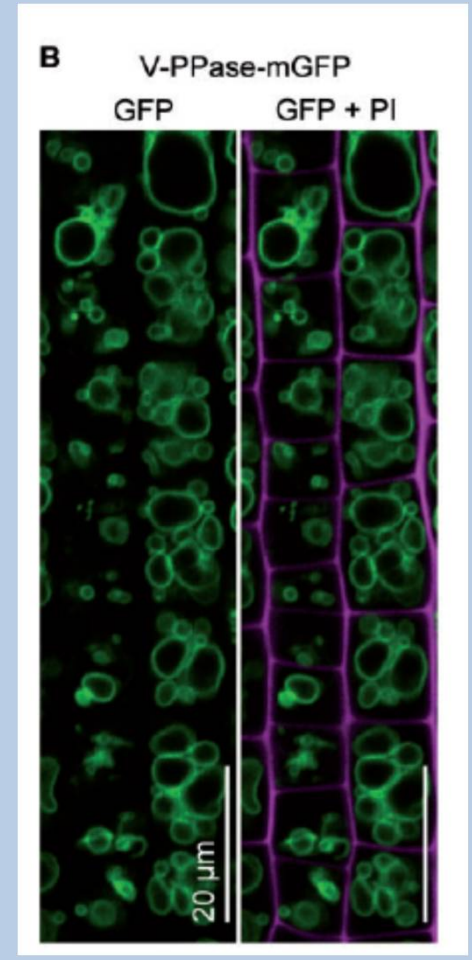
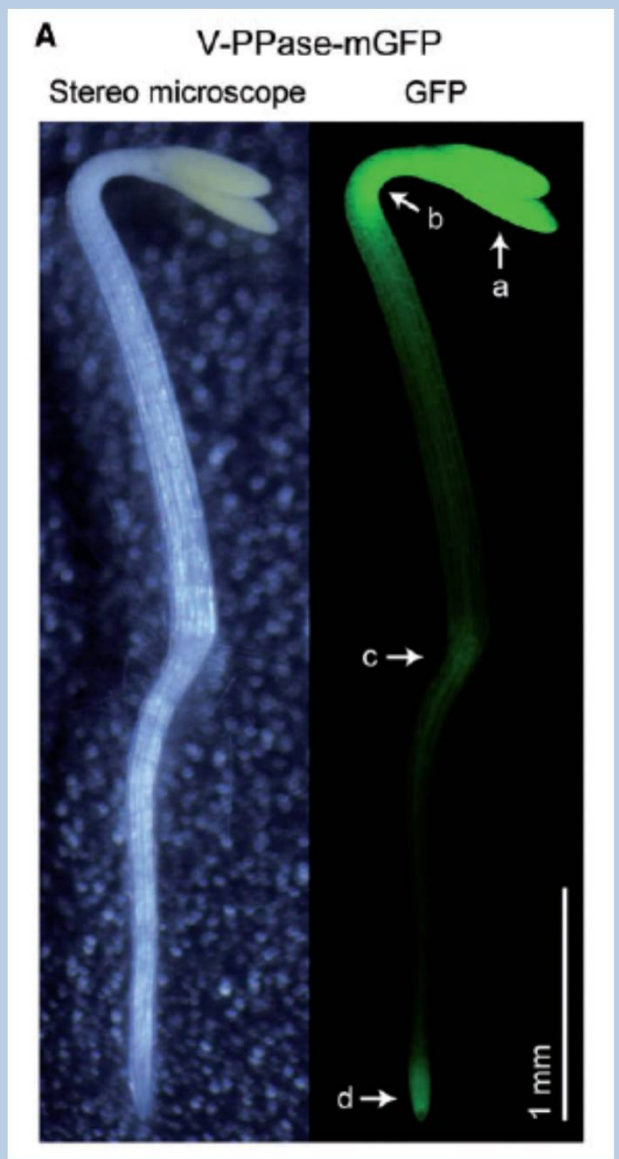
- 1) Hydrolýza PPI = udržování hladiny PPI v cytozolu
- 2) Udržení kyselosti vakuolárního lumenu – důležité nízké pH ve vakuole

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)