

3) Membránový transport

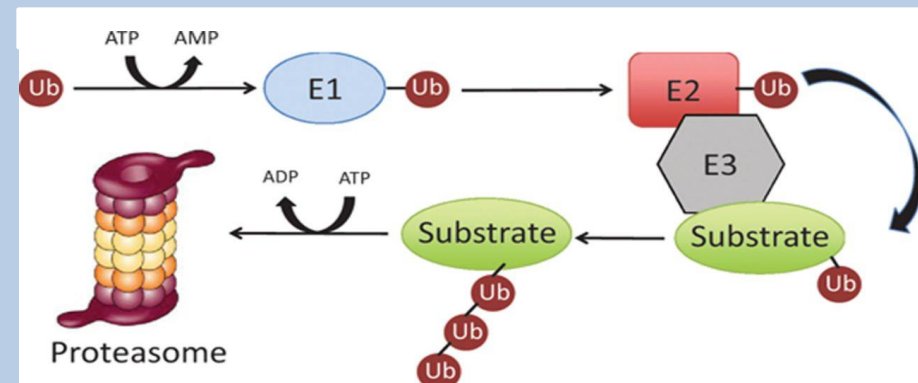
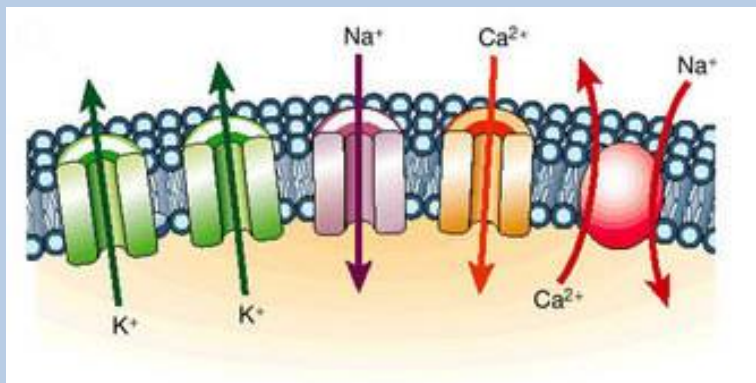
d) Kanály

e) Přenašeče a co-transportéry, mediátory difúze a sekundární aktivní transport

f) Intracelulární transport proteinů

g) Sekreční dráha proteinů

h) Rozpad proteinu a úloha ubiquitin-proteazomového systému

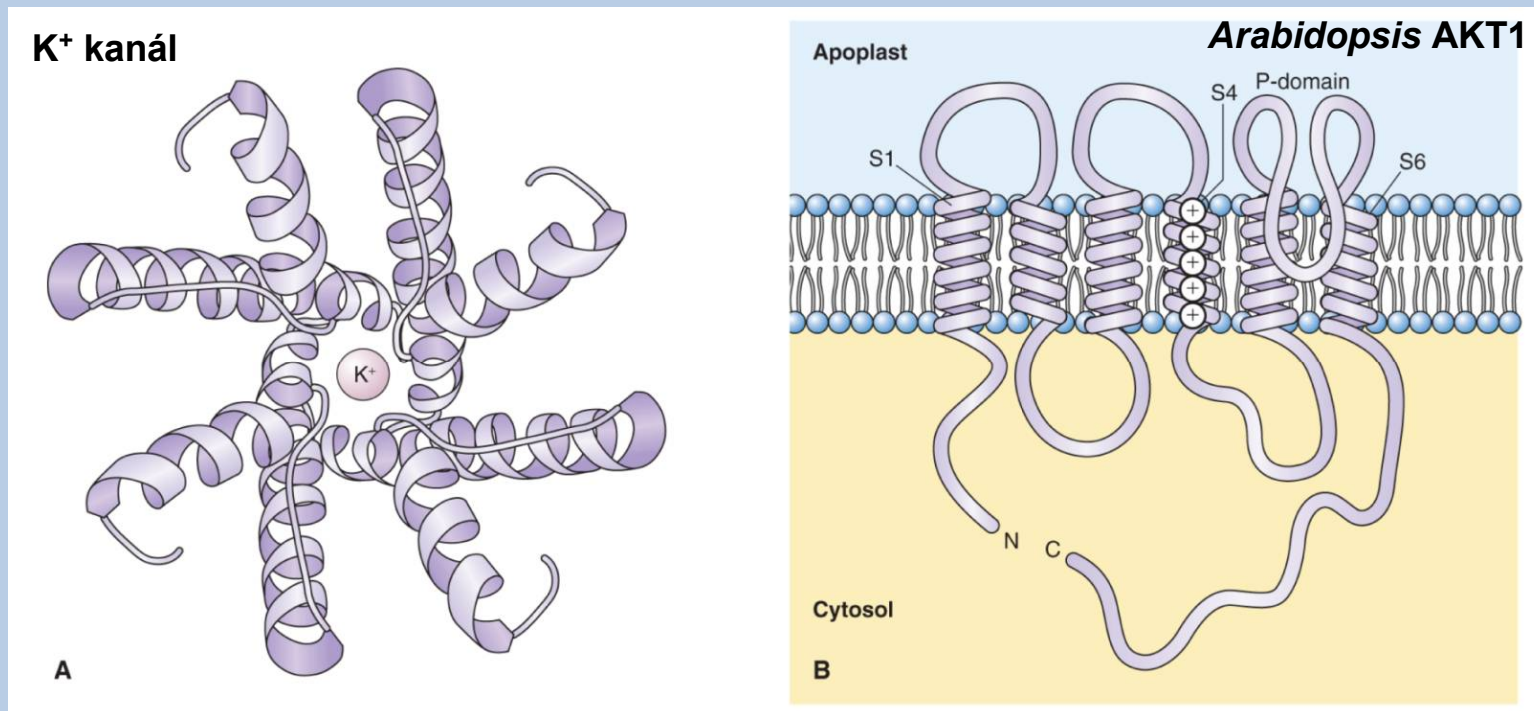


d) Kanály

Rostliny: iontové kanály a akvaporiny

Iontové kanály

Mezi kanálem a iontem dochází pouze k slabé interakci => vysoká rychlost 10^8 iontů/s



Iontové kanály regulují osmotickou koncentraci - umožňují proud K^+ do a ven z buněk, a určují koncentraci cytozolického Ca^{2+} - buněčná signalizace.

Pasivní transport diktován elektrochemickým potenciálem pro konkrétní iont.

Difúze nabitých částic:

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

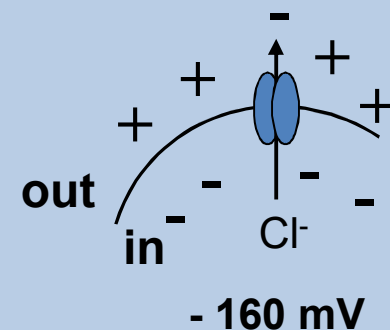
V_m

V_m plazmatické membrány – negativní => kationty mají tendenci proudit do cytozolu a anionty mají tendenci proudit ven z buňky.

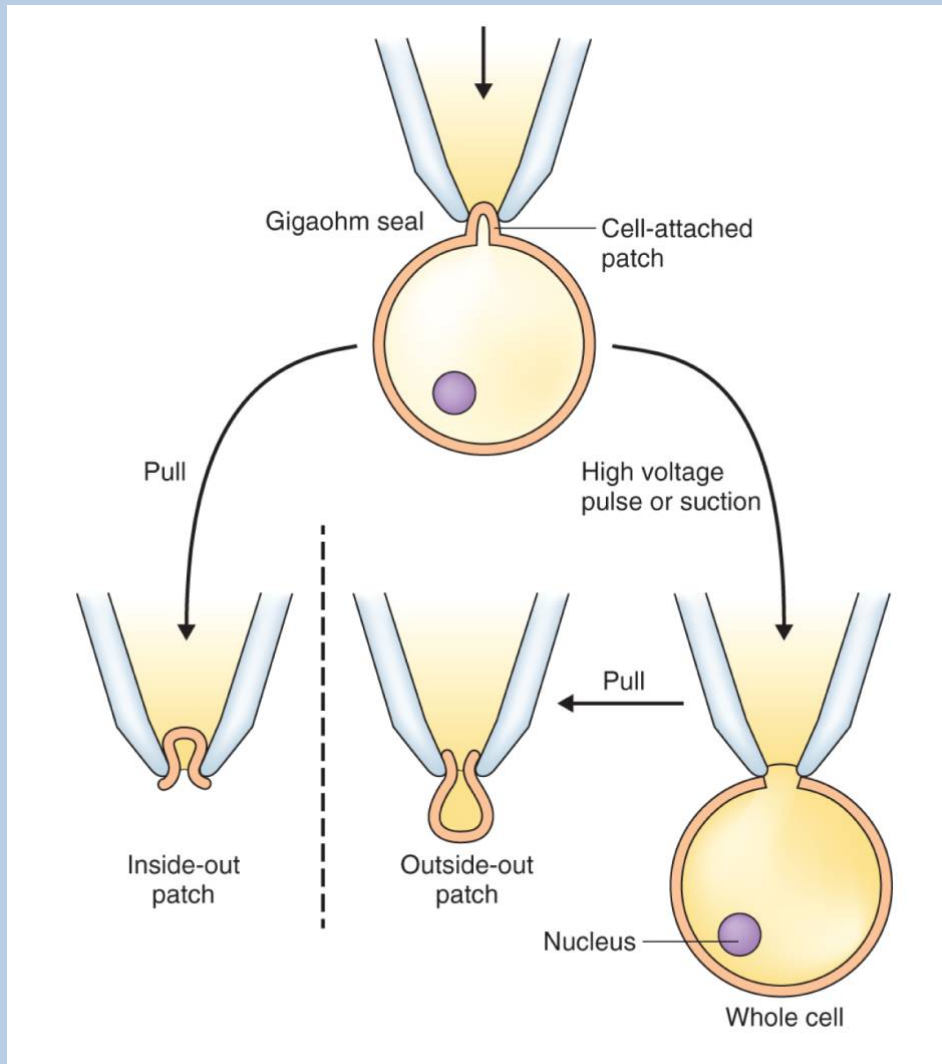
Iontové kanály – vysoce selektivní pro kationty a anionty
– selektivita na základě velikosti póru

Kationtové kanály – selektivní pro K^+ , selektivní pro Ca^{2+}
a neselektivní

Aniontové kanály – většinou širokospektrální (Cl^- , NO_3^- , organické kyseliny)



Aktivita iontových kanálů je studována pomocí metody patch-clamp



Dovoluje detekci malých elektrických proudů vytvářených ionty – schopnost měřit na pikoampéry (10^{-12} A).

Konfigurace:

Cell-attached mode

Inside-out patch

Aktivita jednotlivých kanálů

Whole-cell mode

Outside-out patch

Účinky cytozolických regulátorů

Analýza transportní aktivity malých buněk (velké buňky – mikroelektrody)

https://www.youtube.com/watch?v=YScg6ioR_8Q

<https://www.youtube.com/watch?v=a9GLBT3LY1c> (6.36-8.31)

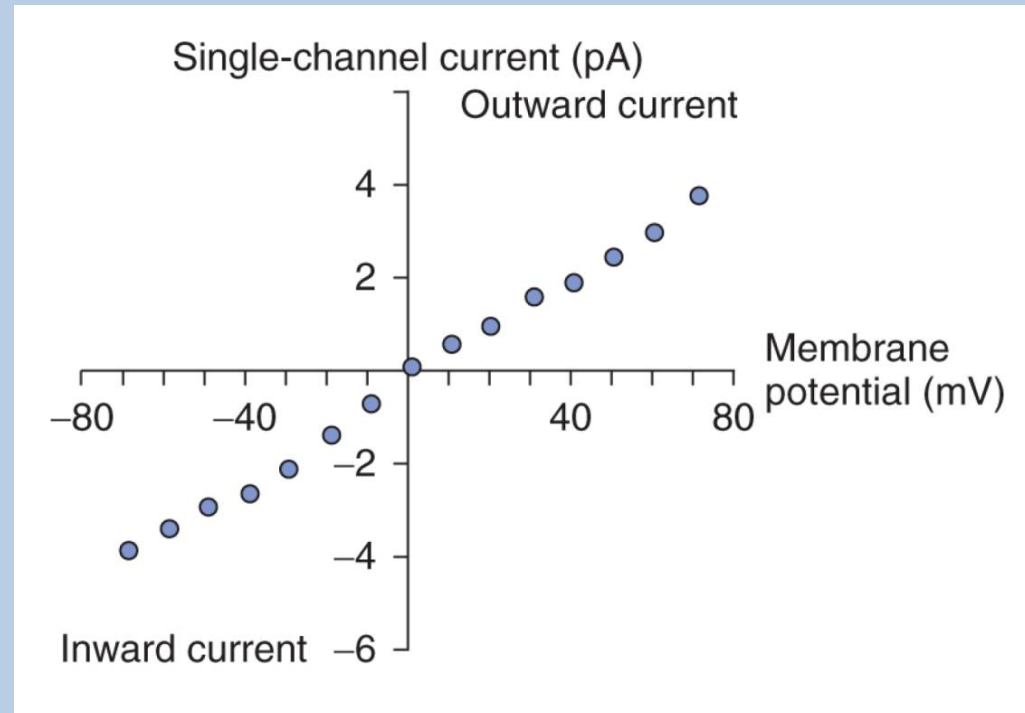
Pohyb iontů přes plazmatickou membránu vytváří průtok proudu

Ohmův zákon: $I = V/R$

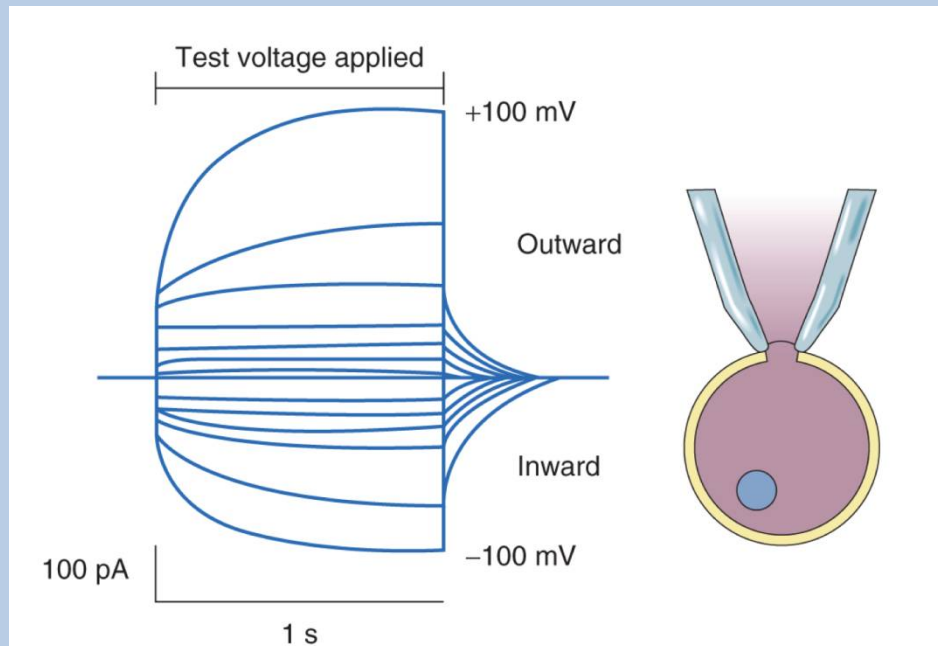
Rezistence membrány k určitému iontu závisí na jeho selektivě a počtu kanálů.

Nepermeabilní membrána: $I = 0$

Zcela permeabilní membrána: $I = V$



Whole-cell mode patch-clamp

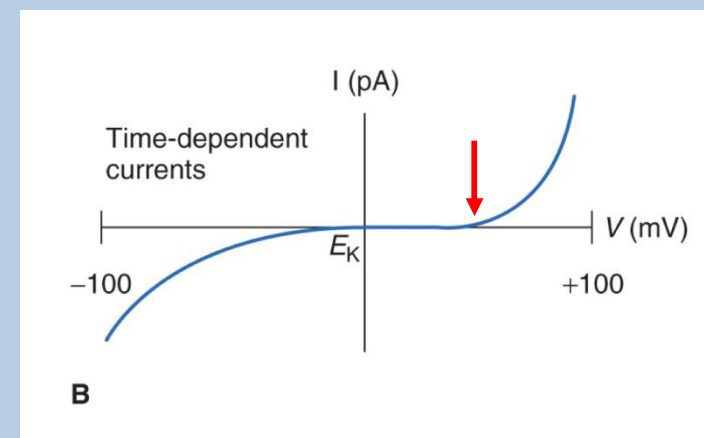


Aktivace kanálů se vyskytuje pouze po dosažení určitého **prahového napětí**.

Napětí mění od -100 do +100 mV

1s napěťové pulzy

Membrána má kanály, které reagují k napětí a otevírají se buď při pozitivním nebo negativním V_m .

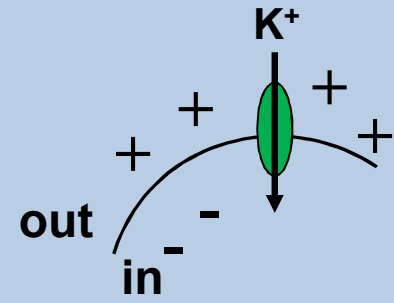


Otevírání a zavírání kanálů je přesně regulováno - **gating**

Napětím-regulované K^+ kanály jsou důležité v udržování membránového potenciálu, protože posun V_m může být kompenzován změnou otevření a zavření kanálů.

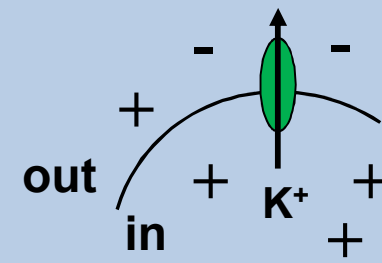
Inwardly-rectifying channels

– kanály umožňující pohyb K^+ dovnitř buňky



Outwardly-rectifying channels

– kanály umožňující pohyb K^+ ven z buňky

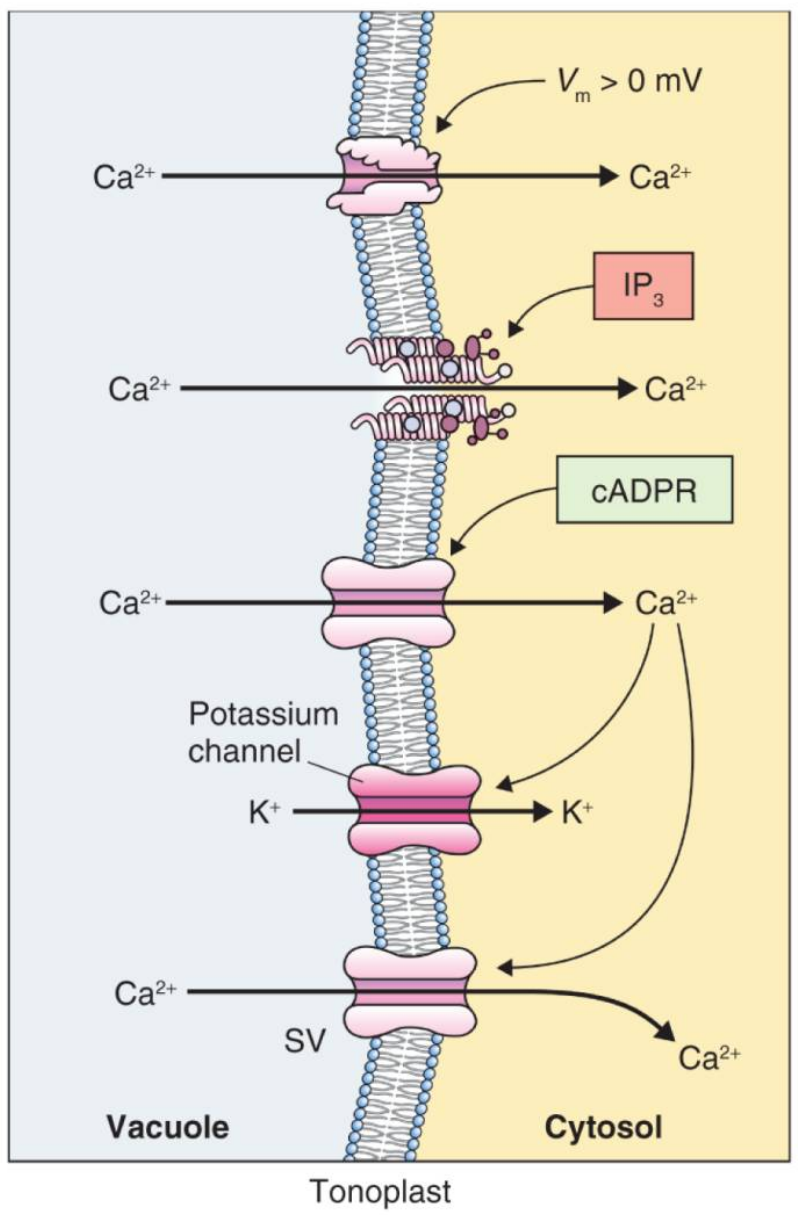


Změny V_m - využity k regulaci osmotické koncentrace změnou gradientu elektrochemického potenciálu iontů

- Iontové kanály – regulovány:
- ligandy: hormony, Ca^{2+} , G-proteiny
 - pH
 - vnější faktory: gravitace, dotek, invaze patogenů, **teplota***
 - změnami v turgoru (např. osmotický tlak – mechano-senzitivní kanály)

*Update 2024
Muraoka Y et al. (2024) Current Biology 33: 5488-5494

Uzavření průduchů indukováno ABA



Ca²⁺ regulován napětím

Ca²⁺ regulován IP₃ (inositol 3 fosfát)

Ca²⁺ regulován cyklickou ADP ribózou

K⁺ regulován Ca²⁺

Ca²⁺ regulován Ca²⁺

Dynamické změny v hladině cytozolického Ca²⁺ - reakce na různé podněty.

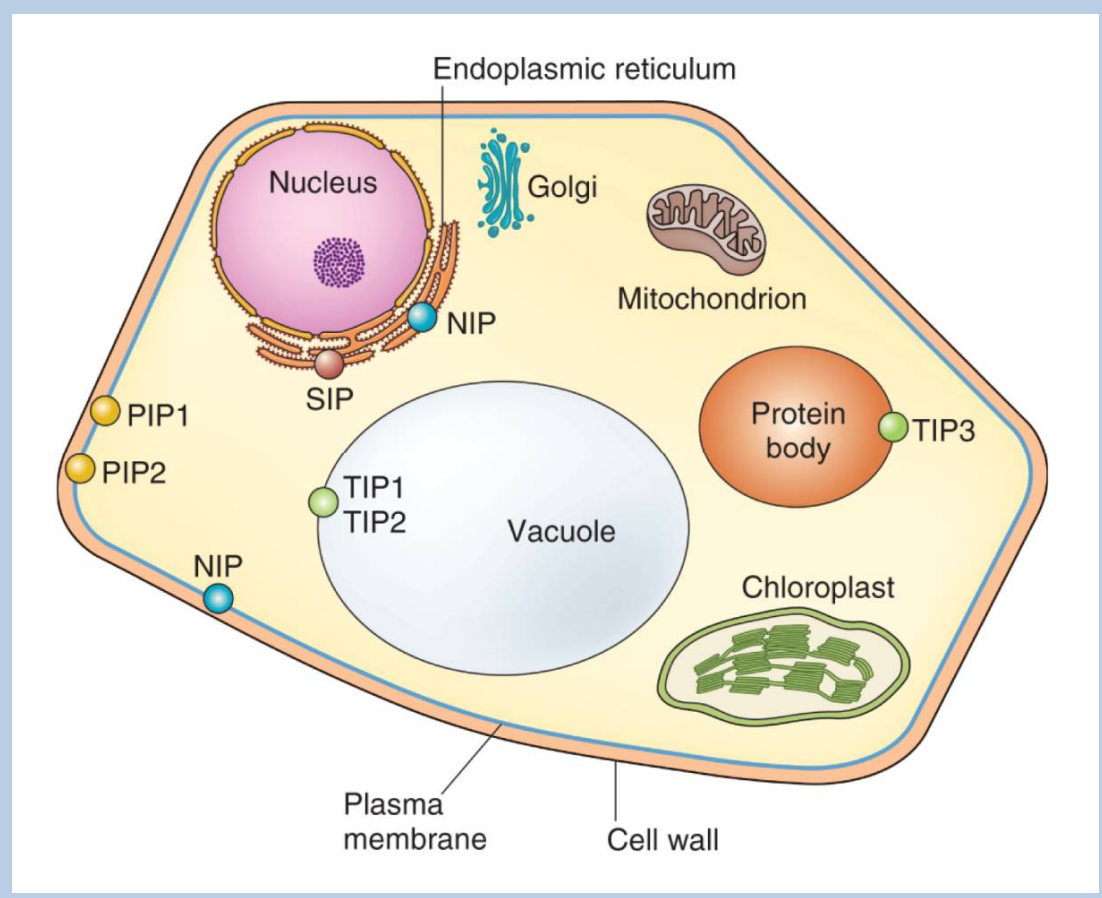
Akvaporiny

Kanály usnadňující pohyb H₂O

Objeveny v roce 1993



Christophe Maurel Marteen Chrispeels



U rostlin velká skupina genů:

Arabidopsis – 35 genů

kukuřice – 36 genů

rýže – 33 genů

Rovněž transport CO₂, NH₃, bóru a silikonu, H₂O₂, NO, H₂S

NIP – nodule intrinsic proteins

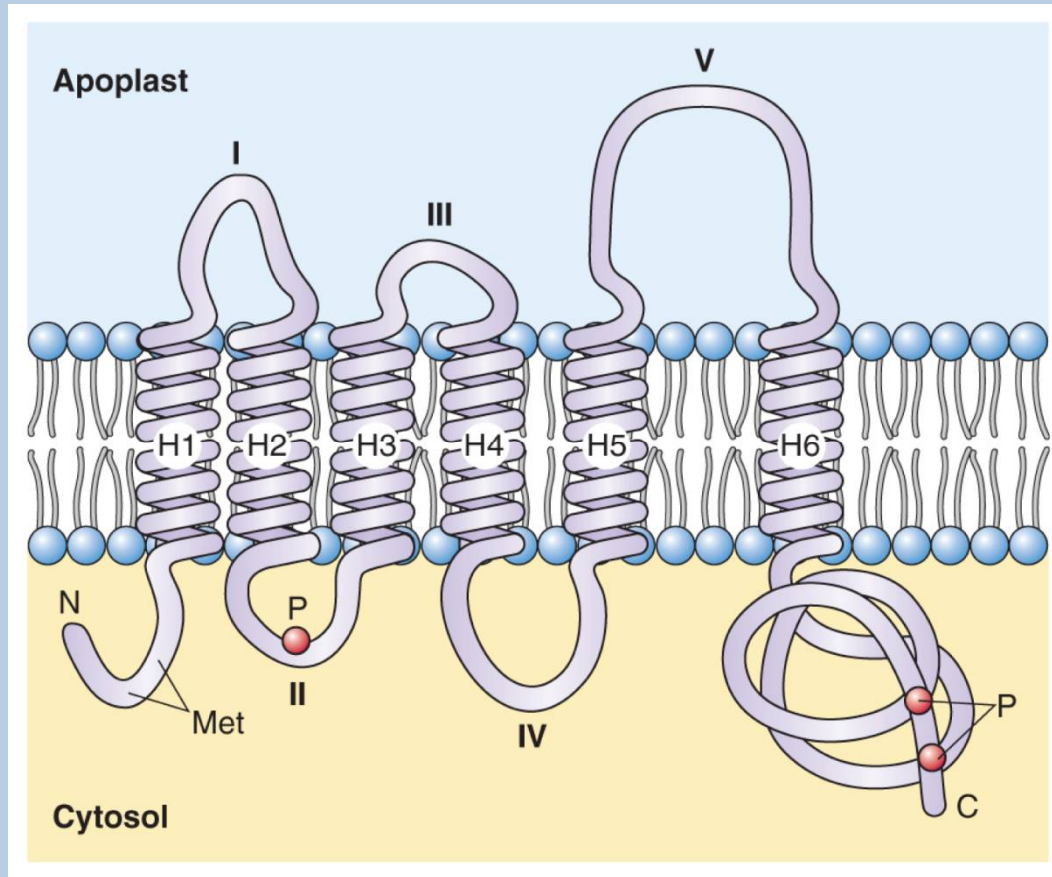
TIP – tonoplast intrinsic proteins

SIP – small basic intrinsic proteins

PIP – plasmamembrane intrinsic proteins

XIP – uncharacterized intrinsic proteins

Relativně malé proteiny, kolem 30 kDa, 6 transmembránových domén



Smyčky I, III a V:

PIP: apoplast

TIP: lumen vakuoly

SIP: lumen ER

Regulace: - mRNA (hormony)

- vodní stres

- nedostatek výživy

Post-translační modifikace:

- fosforylace

- metylace

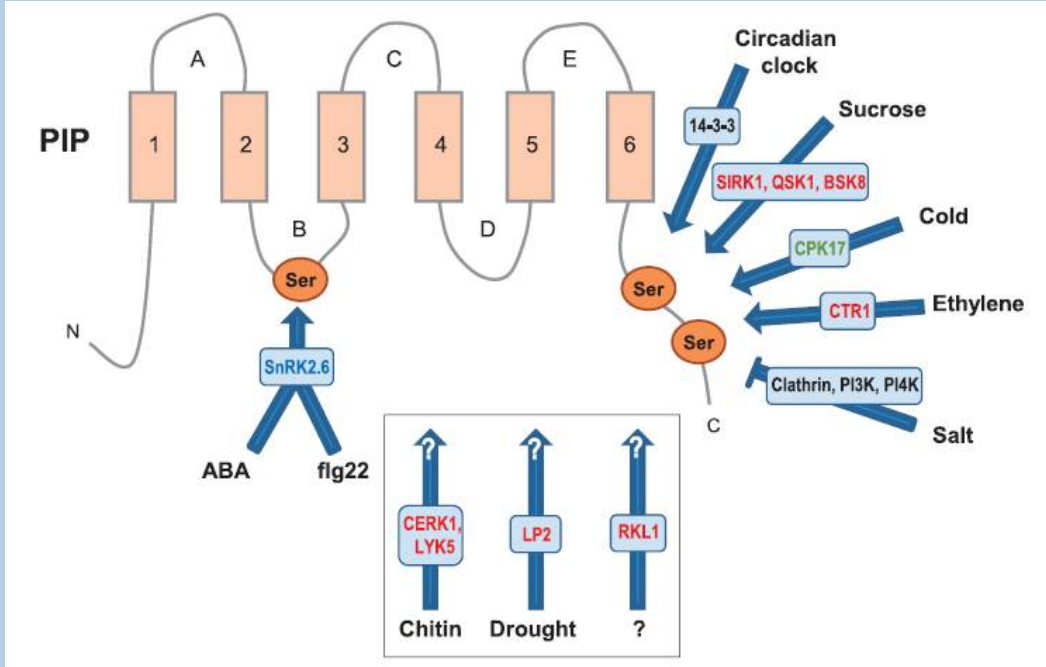
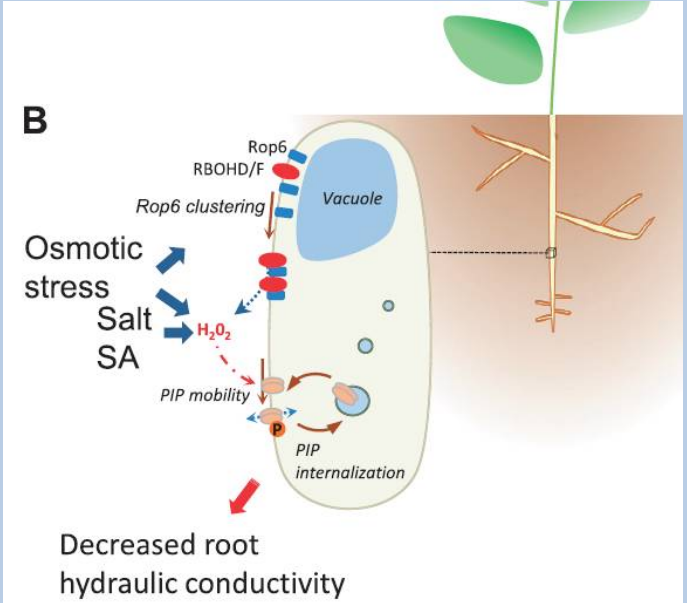
C-konec a smyčka II – fosforylační místa – regulace otevírání aquaporinů (Ca^{2+} -DPK)

N-konec – metylovaná regulační místa

Cytoplazmatické pH mění pohyb vody: anoxie => kyselá cytoplazma => redukce transportu H_2O

Update 2021

Maurel C et al. (2021) Plant Physiology 187: 2056-2070



Hydraulická vodivost kořene je silně snížena (osmotický a solný stres, hormony).

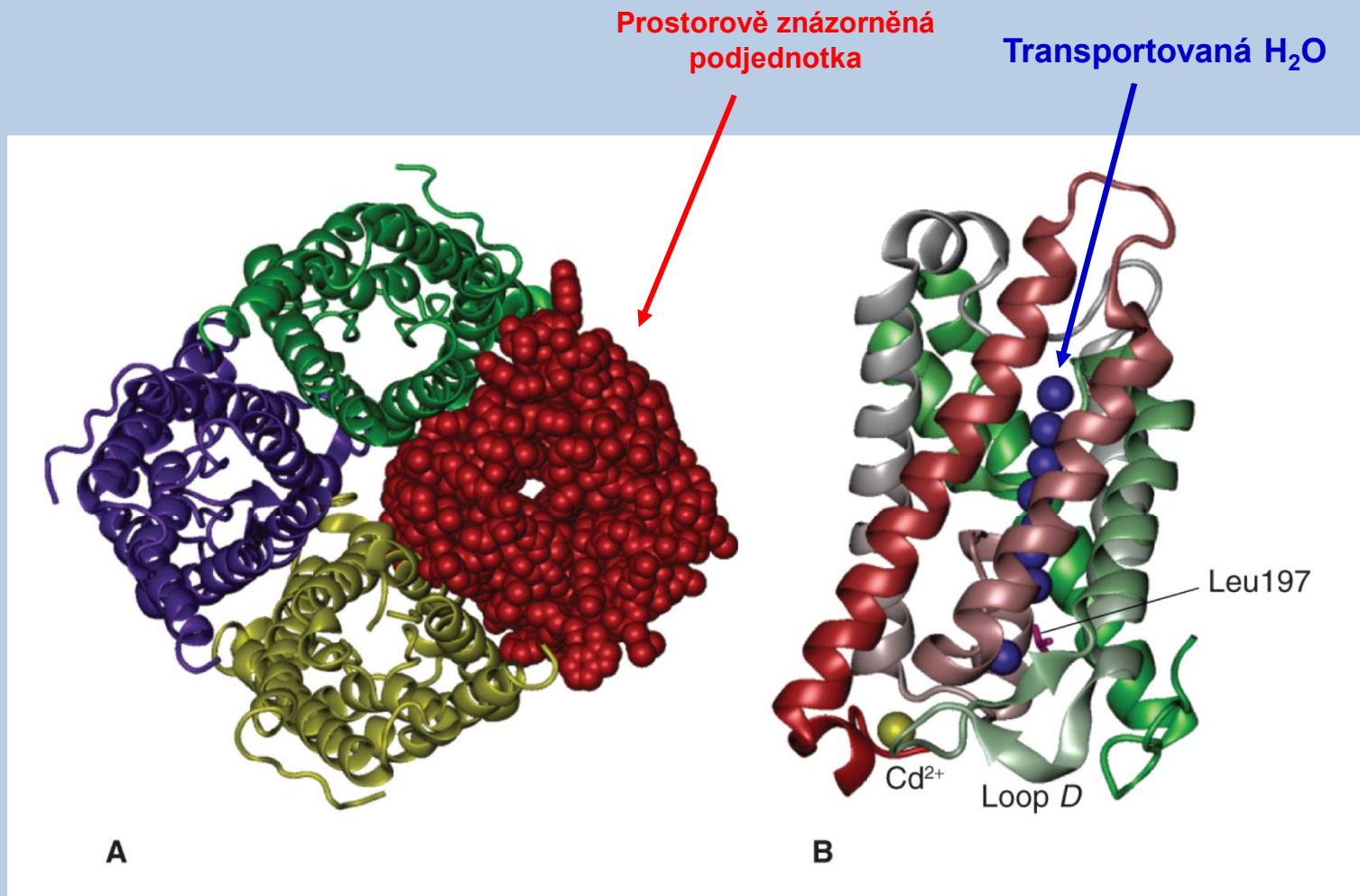
Působení prostřednictvím H₂O₂ – snižuje fosforylaci PIP₂;1 => změna mobility v PM a stimulace internalizace PIP₂;1

Signální dráhy působící společně na fosforylaci PIP

Prototyp PIP: transmembránové domény (1-6), extracelulární smyčky (A, C, E), cytozolické smyčky (B, D).

Stimulace nebo inhibice fosforylace zbytků serinových zbytků různými faktory ve smyčce B nebo na C-konci a prostřednictvím různých meziproduktů.

4 aquaporinové monomery vytváří funkční komplex, ale každá subjednotka tetrameru formuje vodní kanál



Boční pohled na subjednotku

e) Přenašeče a co-transportéry, mediátory difúze a sekundárního aktivního transportu

Přenašeče a co-transportéry hrají úlohu v příjmu anorganických látek, včetně NH_4^+ , NO_3^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- .

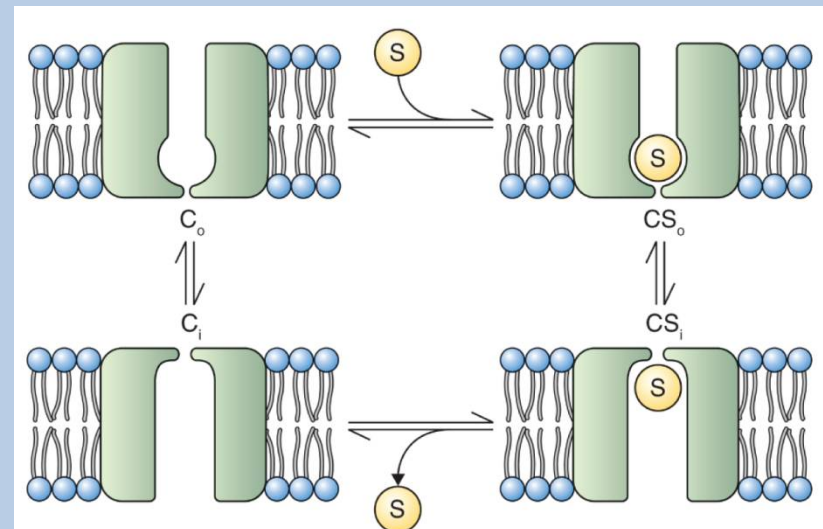
- Důležité:**
- v ukládání cukru do floému pro transport na dlouhé vzdálenosti.
 - ve výměně metabolitů přes mitochondriální a chloroplastové membrány
 - v ukládání iontů a organických roztoků ve vakuole
 - v toleranci rostlin k zasolení
 - v kontrole buněčného pH
 - transport toxických látek z buněk (např. MATE proteiny – Multidrug And Toxic Extrusion)

Transportovaný roztok se váže na transportér a způsobuje konformační změnu.

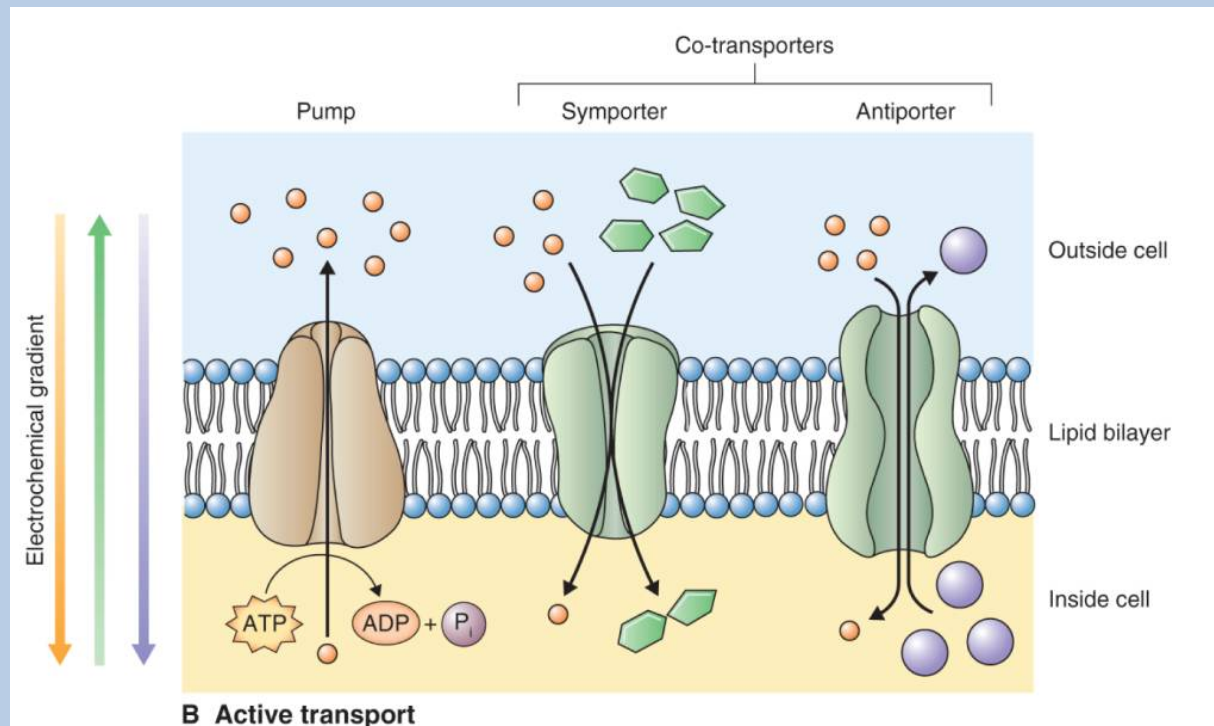


Pohyb roztoku přes membránu

Vysoká selektivita => proteiny jsou schopny rozlišovat stereoizomerii cukrů nebo aminokyselin.



Co-transportéry – spojují pohyb iontů po koncentračním spádu (downhill), např. H^+ , s pohybem anorganických iontů či organických molekul, pohybujících se proti koncentračnímu spádu (uphill).



Symportéry - katalyzují proud roztoků ve stejném směru jako proud H^+ - řídí příjem roztoků do cytozolu (z externího média, nebo z intracelulárních kompartment; H^+ /sacharóza, H^+ /anion, H^+ /aminokyselina)

Antiportéry - katalyzují sekreci roztoků z cytozolu; vyměňují roztoky za protony (H^+/Ca^{2+} , H^+/Na^+)

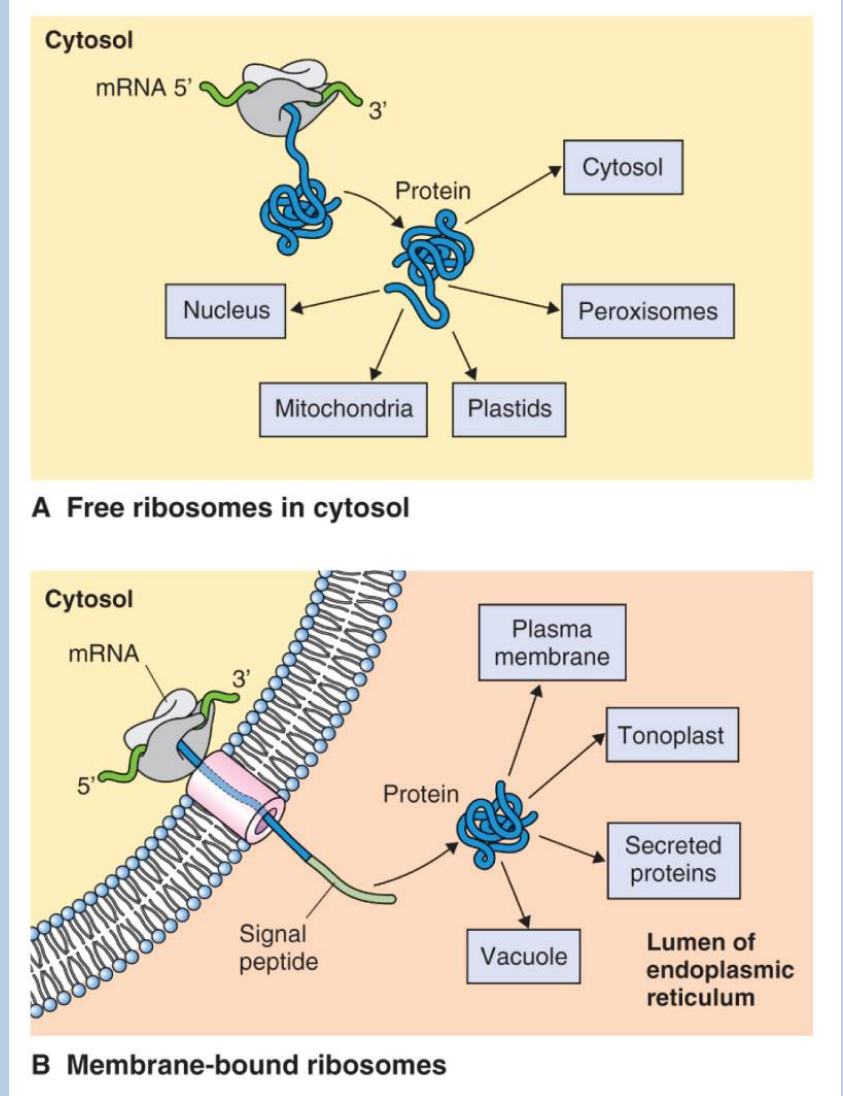
f) Intracelulární transport proteinů

Buněčné proteiny jsou kódovány nukleární DNA a syntetizovány cytozolickými ribozomy (volné či spojené s ER).

Proteiny syntetizované v cytoplazmě nebo ER musí být určeny pro kompartmentaci či membránu.



Proteiny musí být označeny



Proteiny určeny pro transport do dalších kompartment nebo buněčných membrán obsahují **terčové domény** (krátké peptidy, AK motivy), které fungují jako značky a určující cíl transportu

Každý kompartment a proteinový systém vyžaduje odlišnou terčovou doménu a rozdělující mechanismy.

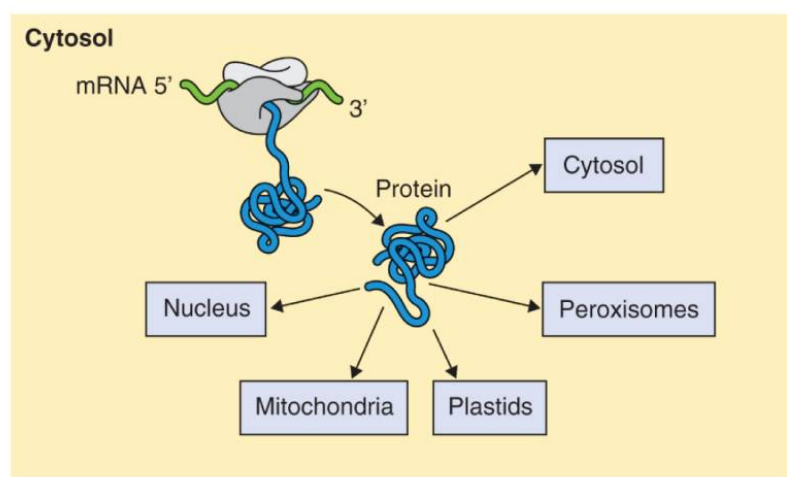
Proteiny cytoplazmy, chloroplastu, mitochondrie, jádra a peroxizómů – syntéza dokončována na volných ribozomech

Proteiny určeny pro sekreční dráhu – syntéza na ribozomech, které jsou připojeny k endoplazmatickému retikulu

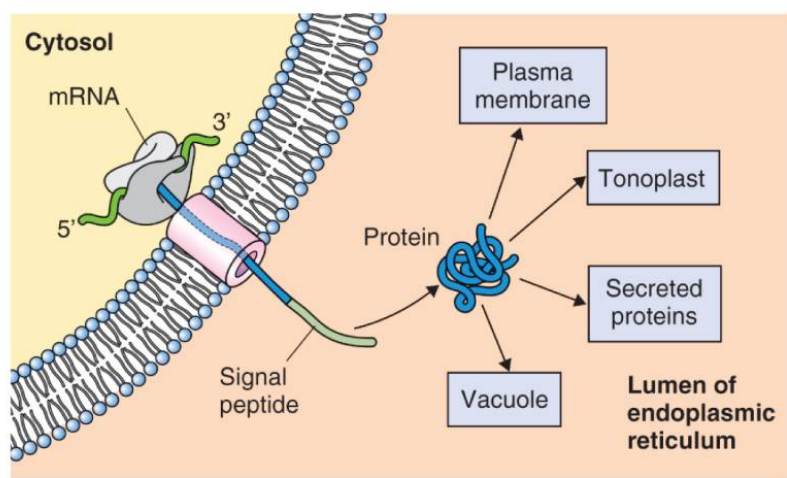
Rostoucí polypeptidový řetězec obsahuje **signální peptid**



Mechanismus, který zajišťuje syntézu proteinů, je lokalizovaný na povrchu ER.

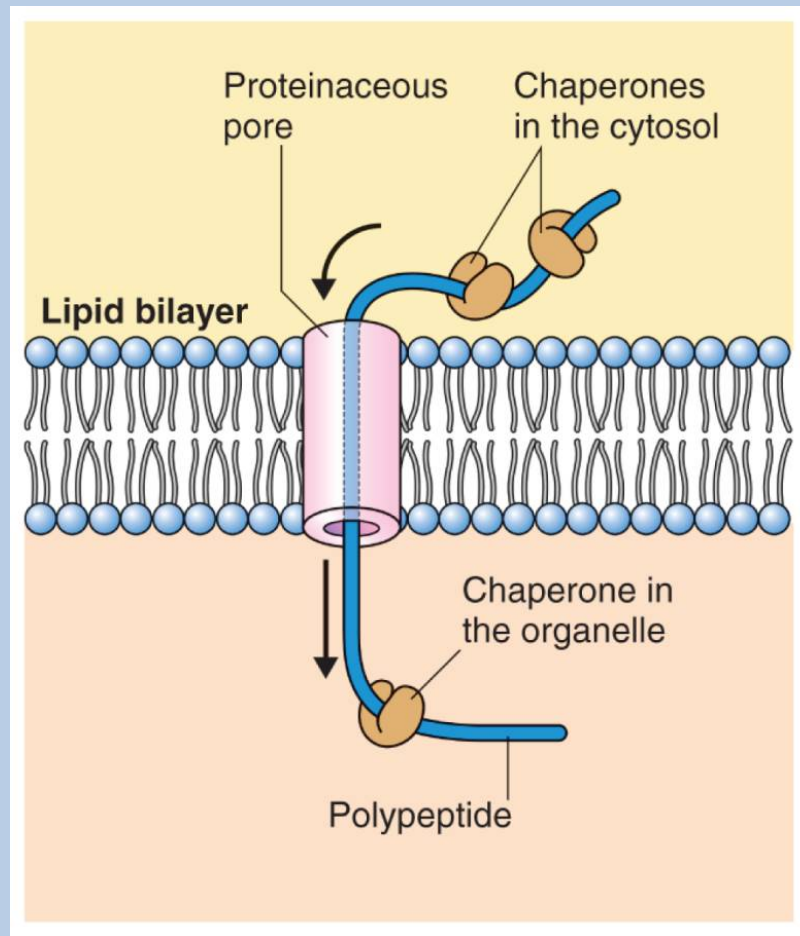


A Free ribosomes in cytosol



B Membrane-bound ribosomes

Terčové domény jsou rozpoznány receptorem na povrchu membrán organel. Specificita terčových domén i receptorů zajišťuje, že proteiny dosáhnou daného cíle.



Cytoplasmatické chaperony udržují řetězec v nestočeném stavu v cytozolu.

Pohyb proteinů přes póry v membránách organel je usnadněn jinými polypeptidy.

Translokovaný protein vstoupí do lumenu organely – interaguje s další sadou chaperonů, které katalyzují stočení proteinu

Protein musí projít nejméně jednou membránou, aby dosáhl daného cíle.

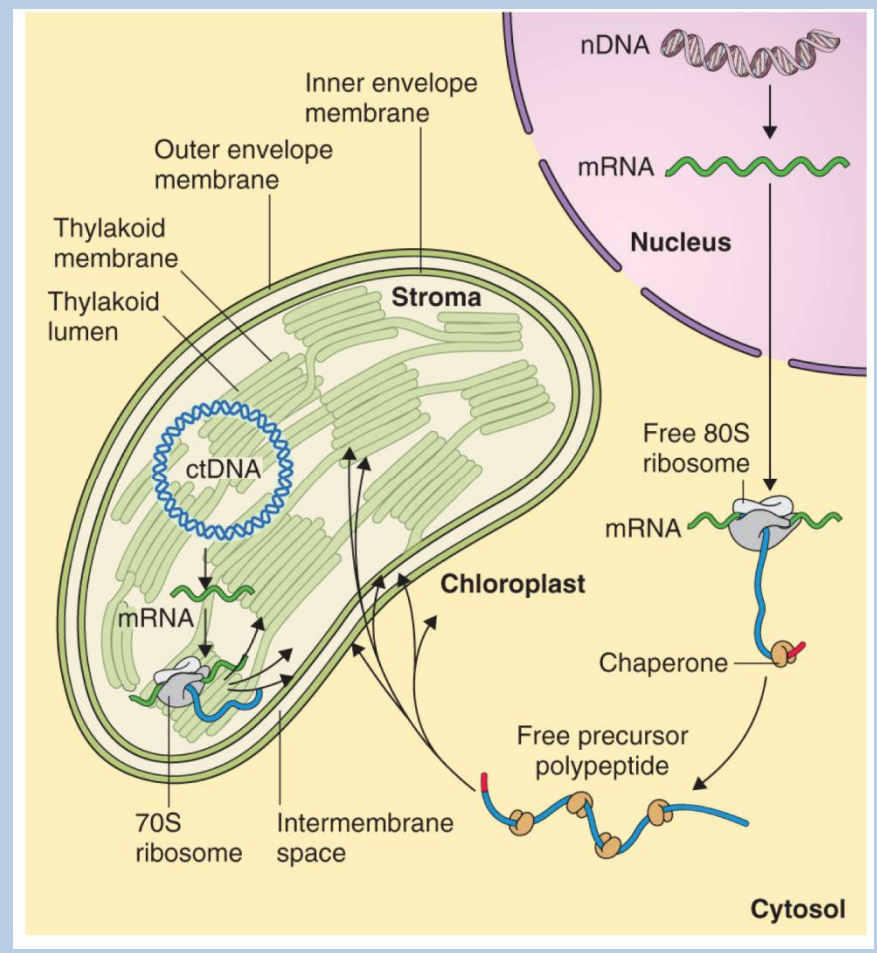
Většina proteinů má hydrofilní povrch.



Nesnadno prostupují hydrofobním vnitřkem membrány.



Bílkovinný pór



Molekulární chaperony: heat shock proteiny Hsp60, Hsp70 a Hsp90

- udržují syntetizované proteiny v nestočené formě
- váží se k AK řetězci, jak se vynoří z membrány a usnadňují stáčení
- opravují špatné stočení proteinů

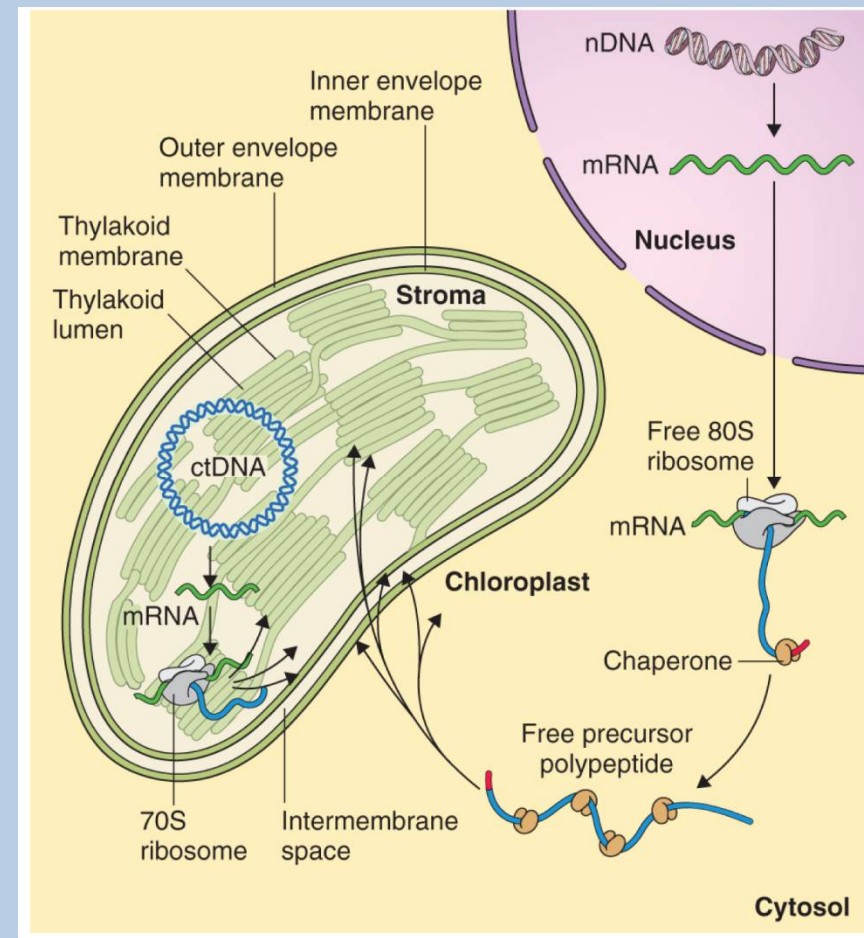
Transport do chloroplastu a mitochondrie zahrnuje translokaci přes několik membránových bariér

Chloroplasty – dvojitá membrána; navíc thylakoidní membrány - vytvářejí se z vnitřní chloroplastové membrány



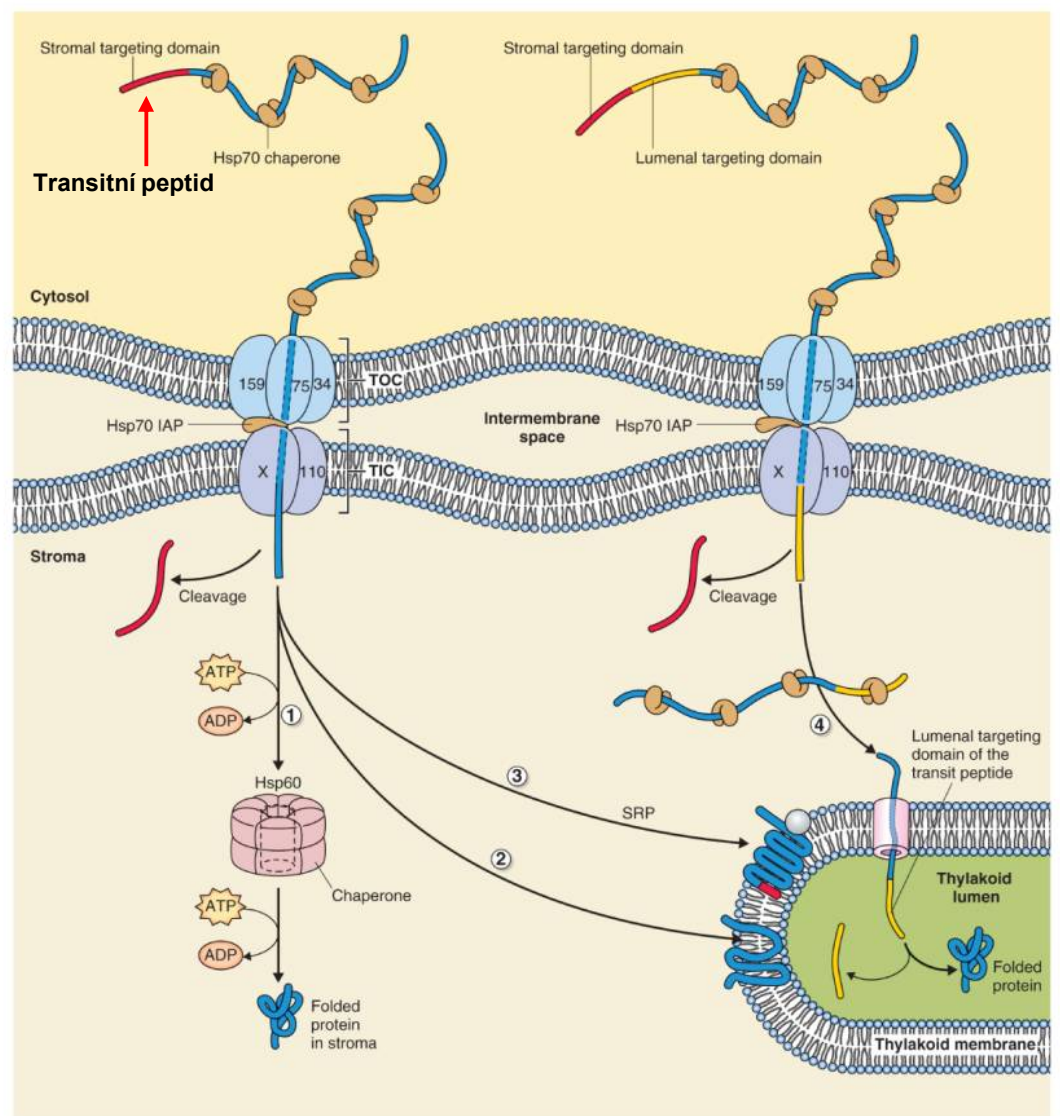
3 vodní kompartmenty

- intermembránový prostor
- stroma
- tylakoidní lumen.



Transport peptidů do chloroplastu

Většina chloroplastových proteinů je syntetizována na volných cytozolických ribozomech.



- Interakce proteinu s Hsp70

- Transportní komplexy TOC a TIC

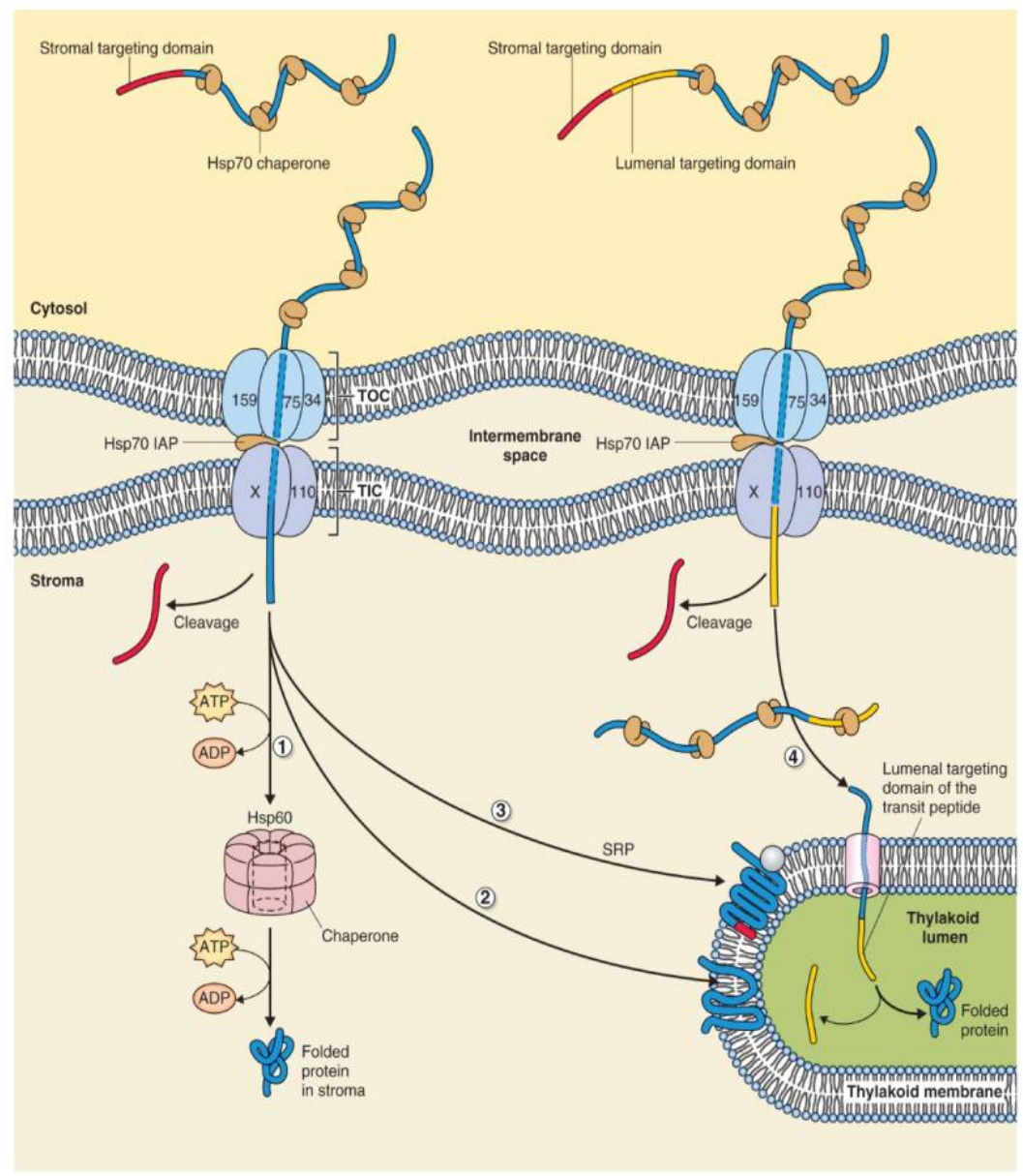
TOC = translocon at the outer chloroplast envelope

TIC = translocon at the inner chloroplast envelope

- Interakce transitního peptidu s TOC a translokace (vyžaduje hydrolýzu ATP, GTP)

- Translokace prostřednictvím TIC (vyžaduje hydrolýzu ATP)

- Transporty prostřednictvím TOC a TIC probíhají téměř současně



- Odštěpení tranzitního peptidu proteázou

1. Protein interaguje s chaperony Hsp60 a Hsp70 => vytvoření finální konformace proteinu (ATP)

2. Transport proteinů určených pro thylakoidní membránu – bez signálního peptidu

3. Transport proteinů určených pro thylakoidní membránu - potřeba signálního peptidu (GTP) (SRP – signální rozpoznávací částice)

4. Transport proteinů určených pro thylakoidní lumen - potřeba signálního peptidu

- Transport nestočených proteinů (ATP)

- Transport nestočených i stočených proteinů (vyžaduje pmf – H⁺membrane force)

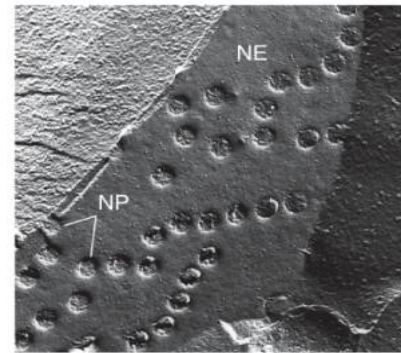
- Štěpení signálního peptidu proteázou a stočení – vyžaduje chaperony

Transport peptidů do jádra

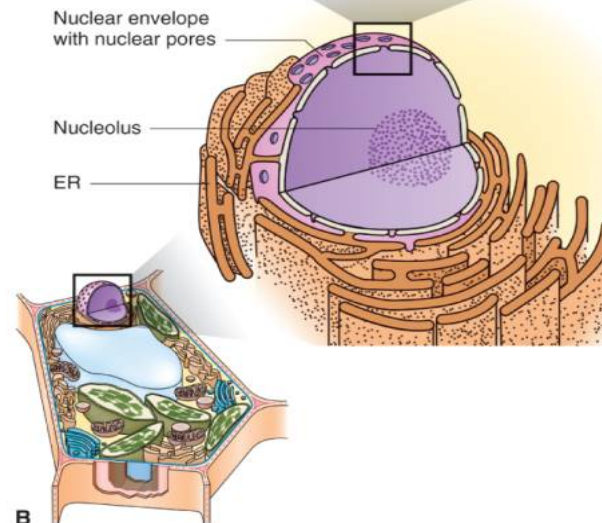
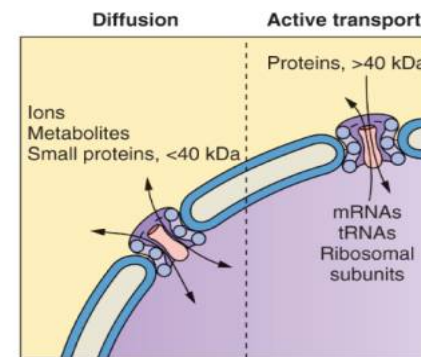
Jaderná obálka - dvojitá membrána;
odděluje cytoplazmu od matrix jádra
(nukleoplazma)

Vnější membrána je spojena s ribozómy
a vytváří spojení s listy drsného ER

Jaderné póry – transport proteinů do
jádra, transport mRNA, tRNA z jádra



A

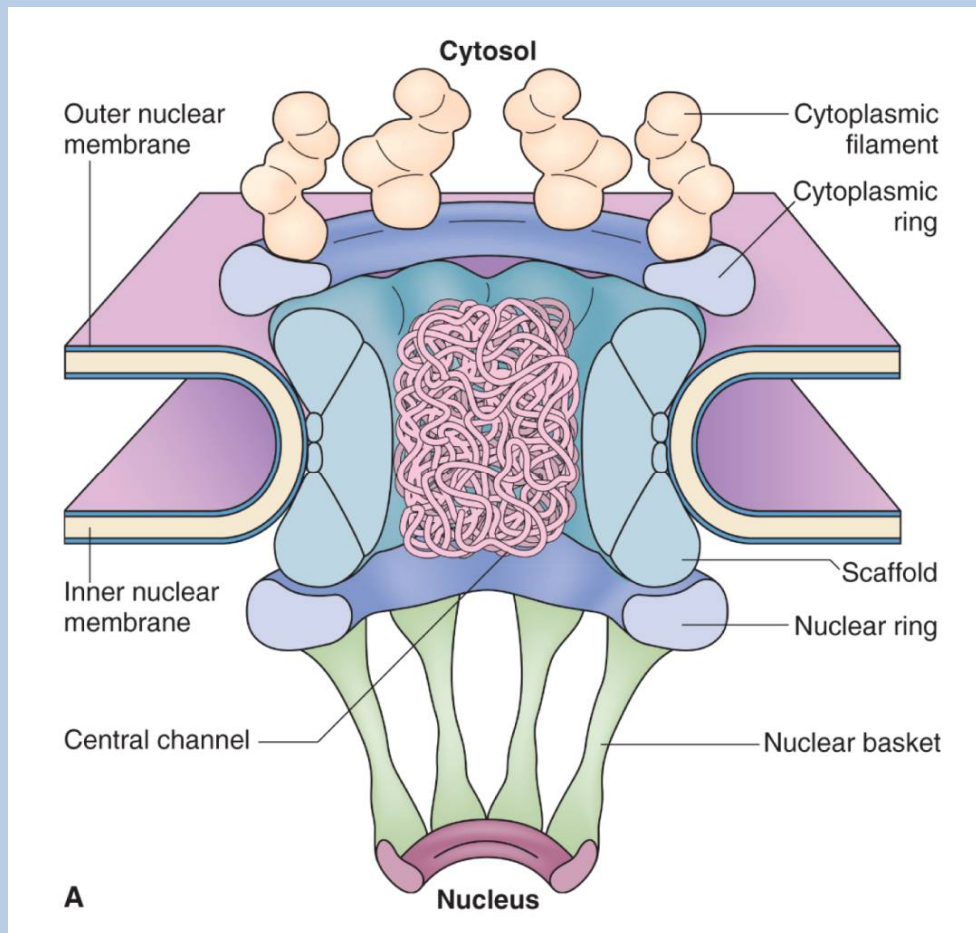


B

Struktura jaderného póru

Komplexní, radiálně symetrická struktura vytvořená z více než 100 individuálních peptidů

Průměr – 9 nm => pasívní difúze molekul < 40 kDa; transport proteinů > 40 kDa



Transportovaný protein obsahuje terčové sekvence nazývané **signál pro lokalizaci v jádře (NLS)**

1. NLS na proteinu se váže k receptorům v jaderném póru (GTP).
2. Transport proteinu skrz pór (GTP)

Transport přes nukleární pór je regulován mnoha faktory:

- Environmentální podněty, např. světlo

Příklad:

Protein COP1 – fotomorfogeneze

Pozor, neplést s plášťovým proteinem COPI

g) Sekreční dráha proteinů

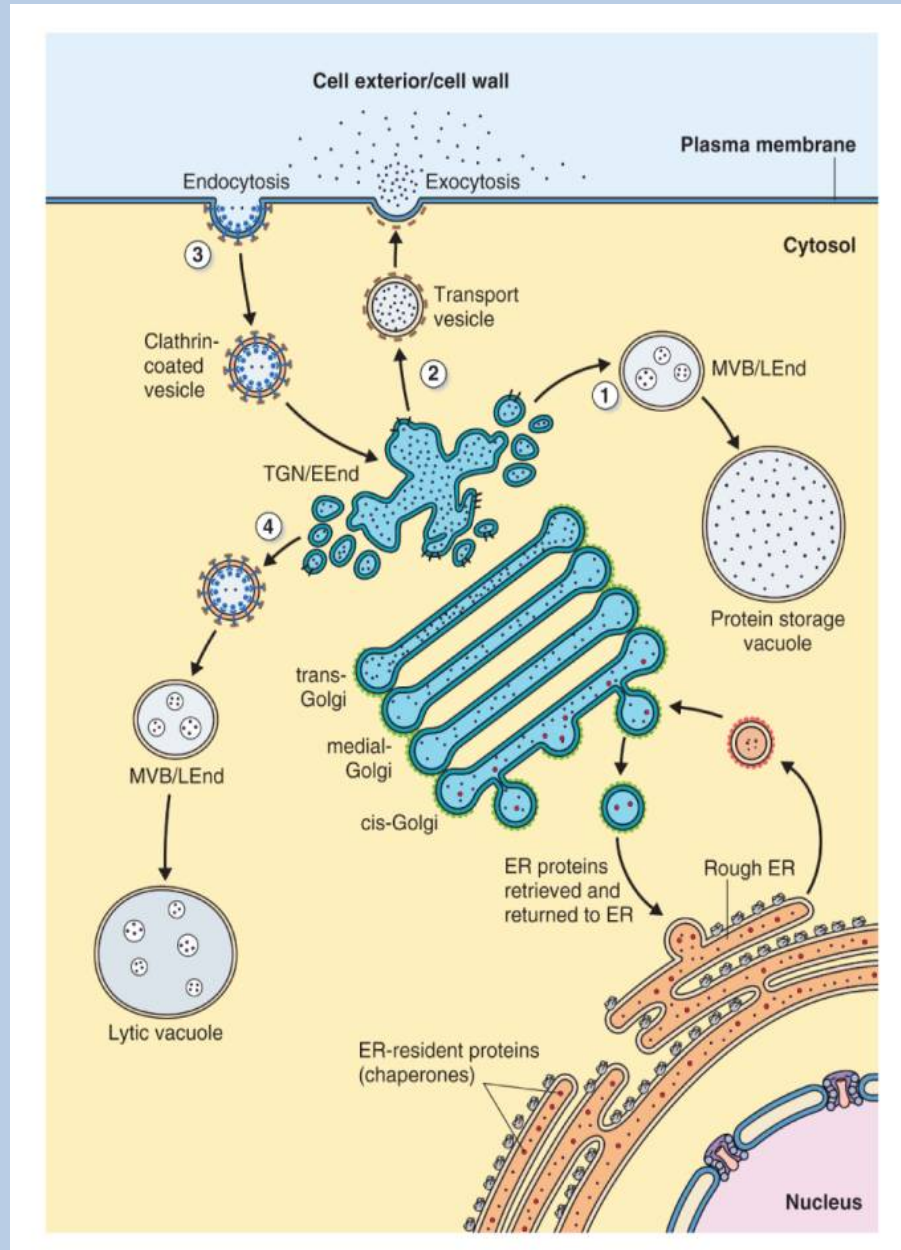
Sekreční dráha vytváří endomembránový systém, který se v buňce rozvětluje.

- ER
- Golgiho aparát
- trans-Golgi síť (TGN)
- multivezikulární tělíska (MVB)
- různé skupiny vezikul a vakuol

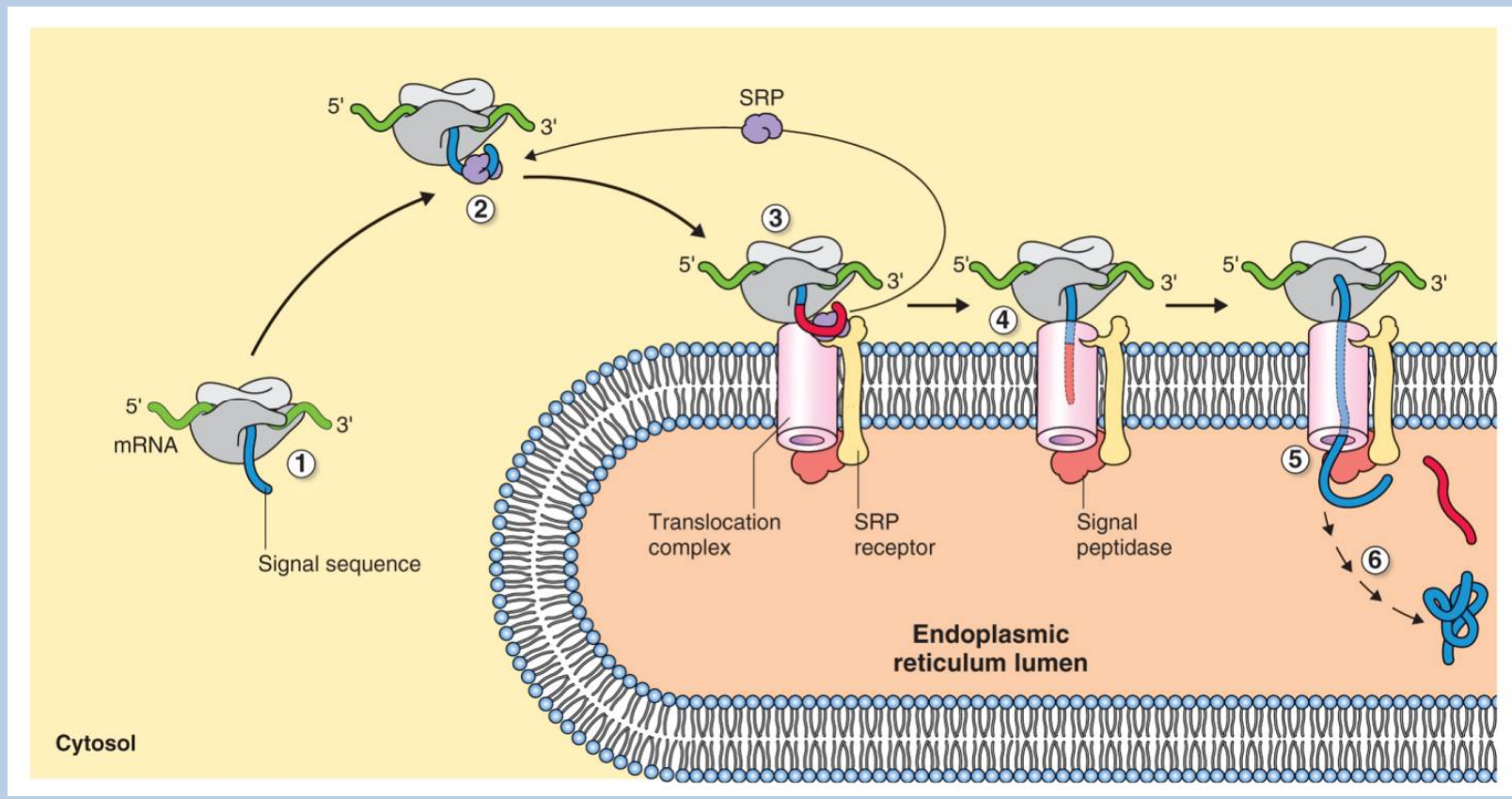
1) Proteiny určeny pro vakuoly jsou transportovány z TGN prostřednictvím (MVB) do vakuoly shromažďující proteiny.

2) Proteiny určeny pro exteriér jsou transportovány na PM ve vezikulech k exocytóze.

3) Proteiny importovány do buňky endocytózou se pohybují v clathrinem obalených vezikulách do TGN – **4)** posílány prostřednictvím MVB do lytických vakuol



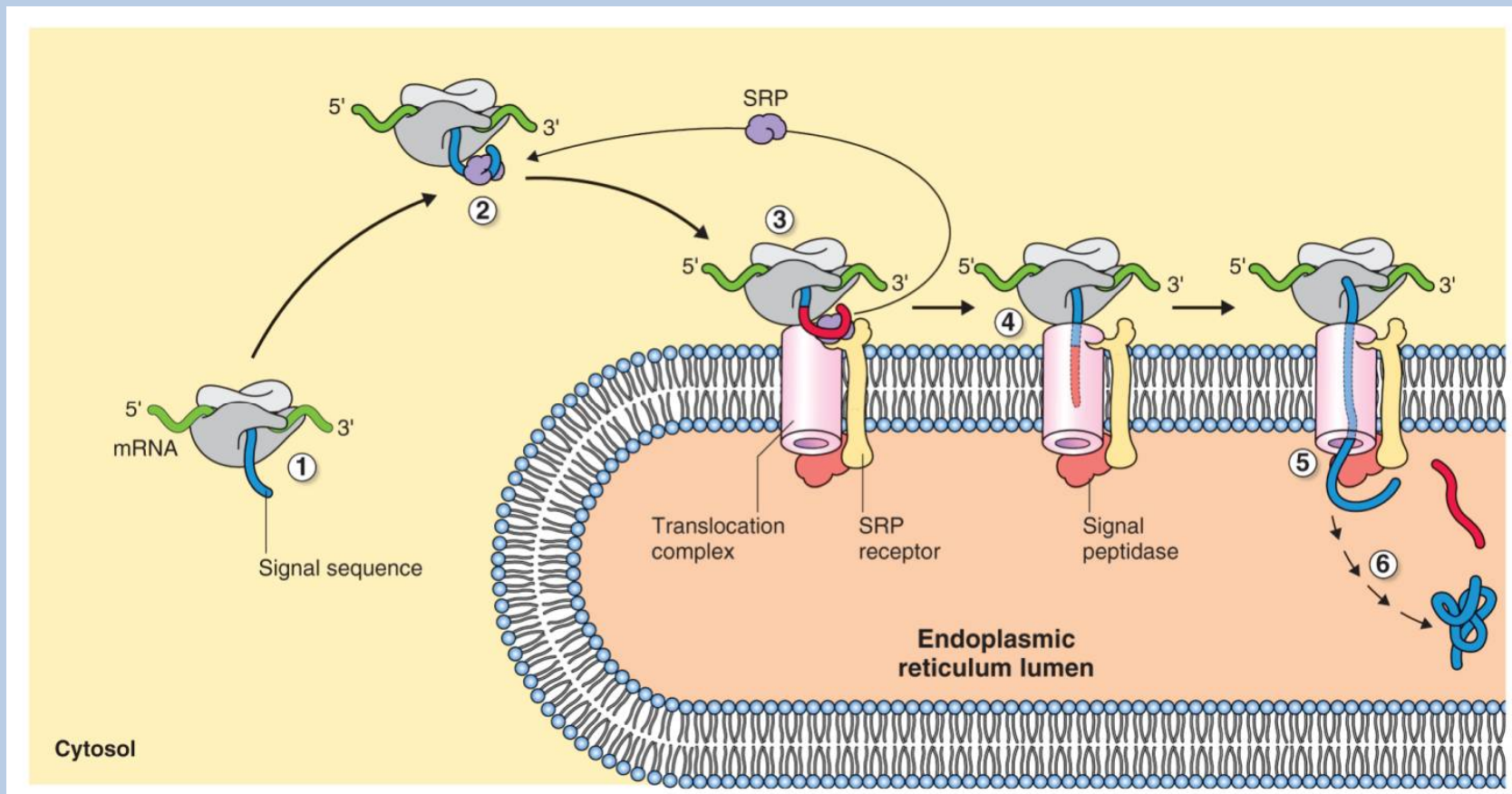
Protein určený pro endomembránový systém nebo pro export na povrch buňky má peptidový signál - směřuje ribozóm s vytvářeným proteinem na povrch ER – dokončena syntéza proteinu.

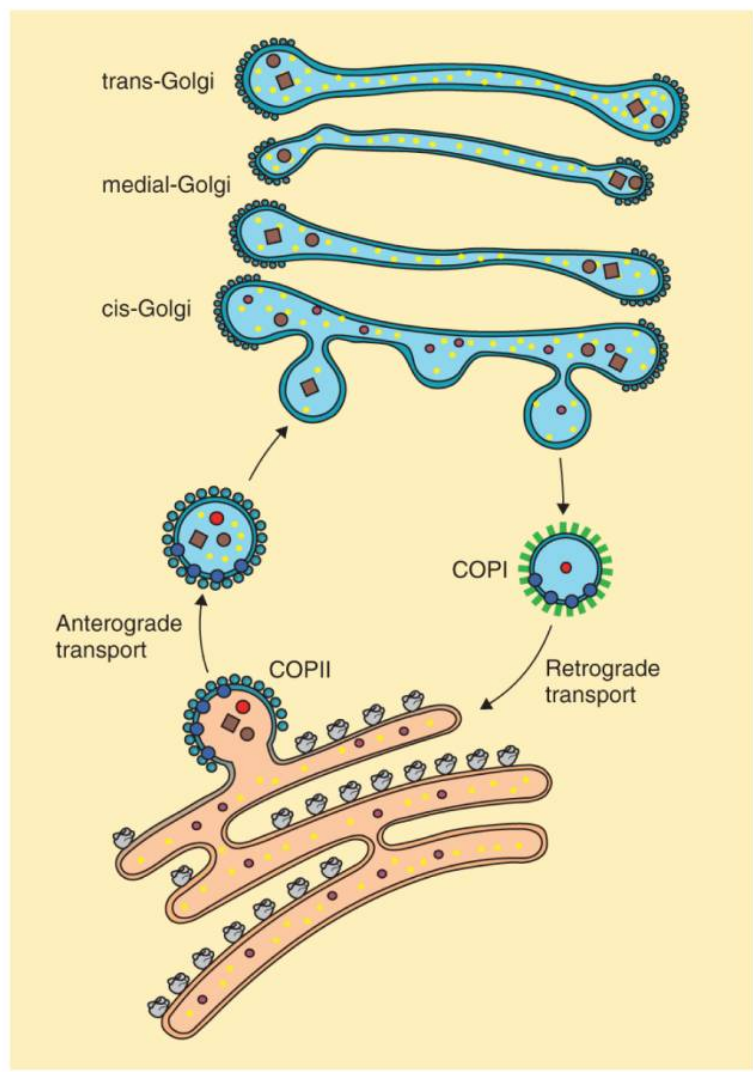


Směrování proteinů do lumenu ER zahrnuje:

- 1) Signální sekvenci (48-90 nukleotidů)
- 2) Signální rozpoznávací částice (SRP) – rozpozná sign. peptid => zastavuje se syntéza proteinu; SRP = RNA-proteinový komplex v cytozolu - zprostředkuje umístění ribozomu na proteinový komplex v ER membráně

- 3) SRP receptor na povrchu ER – rozpoznává SRP – vzniká:
- 4) Translokační systém - hydrolýza GTP => disociace SRP, pokračuje syntéza proteinu; protein se signálním peptidem prochází transmembránovým kanálem
- 5) Signální peptidáza – odstraňuje signální peptid na N-terminálním konci
- 6) Molekulární chaperony (Hsp, BiP, calnexin, calreticulin – retenční signál KDEL, HDEL) – pomáhají stočit protein (GTP); špatně stočené proteiny jsou degradovány v ER nebo v cytoplasmě 26S proteasomem





- ER = resident protein
- Cargo proteins
- Integral membrane protein of the targeting machinery
- Coat proteins of COPII vesicles
- Coat proteins of COPI vesicles

Plášťové (coat) proteiny řídí transport vezikul mezi ER a Golgiho aparátem

Anterograde transport - pohyb vezikul z ER do Golgiho aparátu – COPII vezikuly s plášťovými proteiny – COPII obsahuje informaci o směru transportu

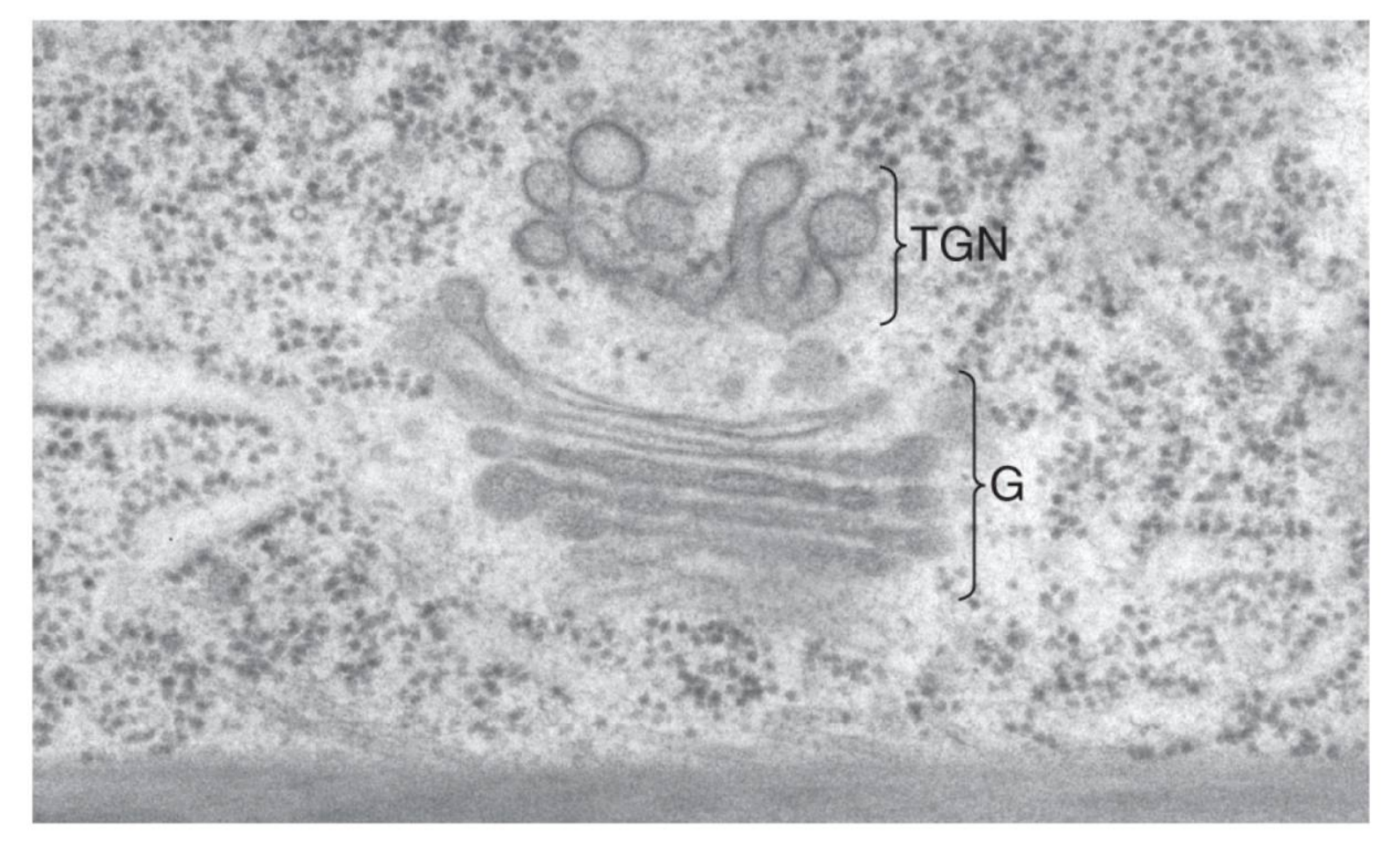
Retrograde transport - návrat ER-lokalizovaných proteinů a membránových proteinů z Golgiho aparátu (ERD2 receptor na membráně ER – rozpoznává KDEL motivy) – vezikuly COPI

Z Golgiho aparátu jsou proteiny transportovány do TGN, MVB, vakuoly, okolí buňky

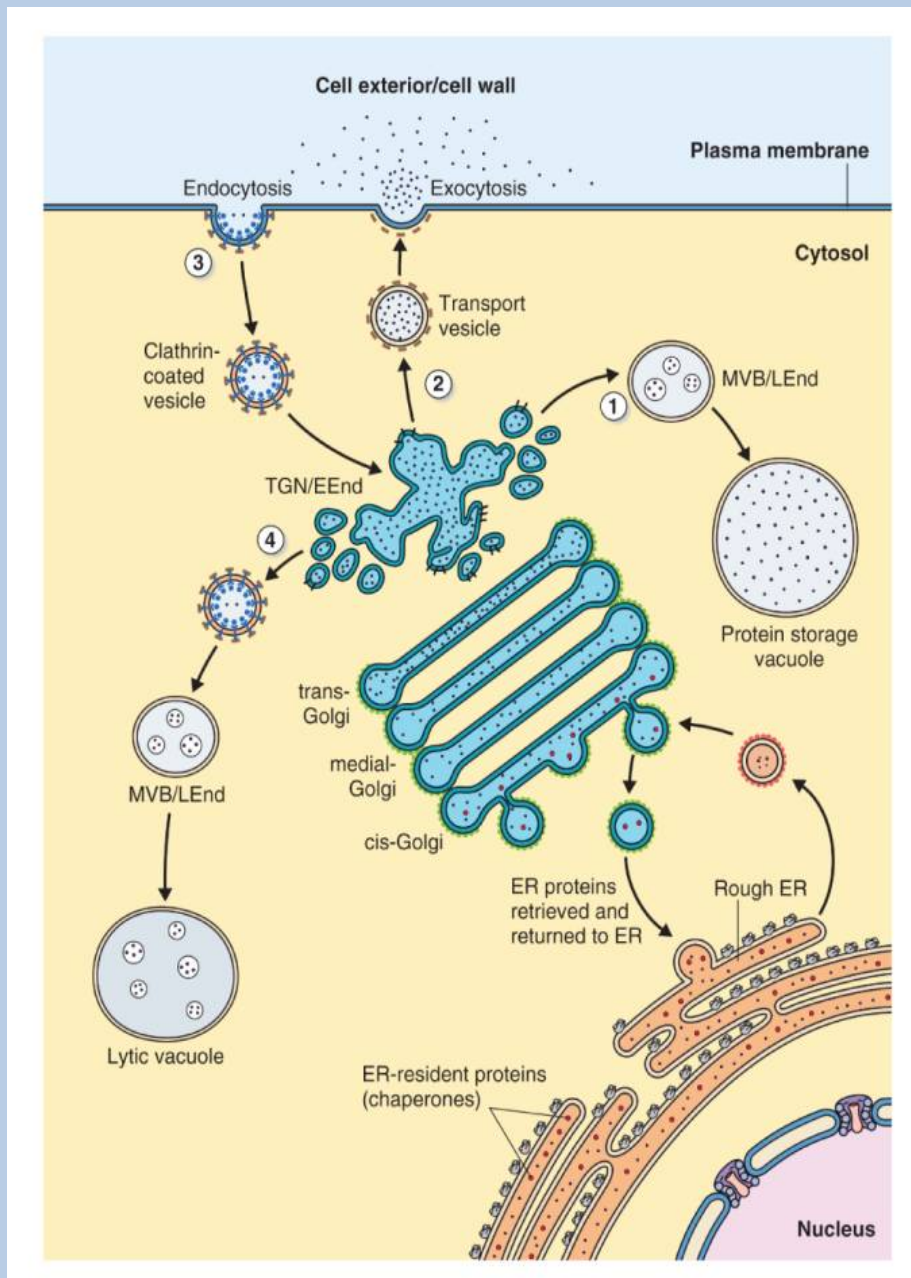
Vezikuly z TGN do vakuol nebo PM – pokryté clathrinem nebo jiným plášťovým proteinem



Vezikuly obsahující proteiny směřují k PM a fúzují s ní. Uvolnění obsahu mimo buňku – **exocytóza** (příklad: α -amyláza obilného aleuronu)



Buňka *Eucalyptus*



Transport proteinů endocytózovou cestou

Invaginace plazmatické membrány



Vezikuly s clathrinovým pláštěm



TGN (Trans Golgi Network)
– oddělení membrány od proteinu



MVB

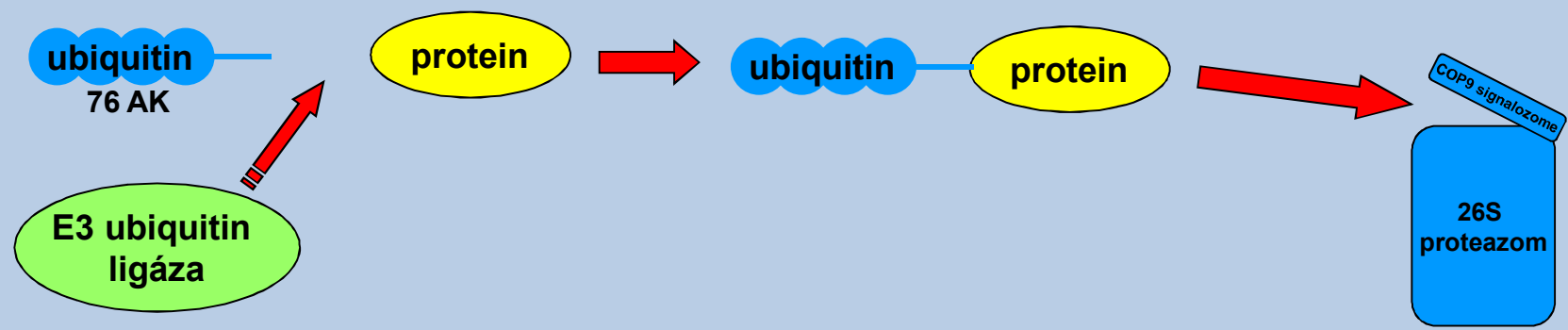


Vakuola

h) Rozpad proteinu a úloha ubiquitin-proteazomového systému

Degradace proteinů musí být vysoce selektivní, aby nedocházelo ke ztrátě dalších potřebných proteinů => označení proteinů

Ubiquitin-proteazomový systém (UbPS) (cytozol a jádro)



Arabidopsis - více než 1300 genů zapojených v ubiquitinačním systému

Odstraňování proteinů je důležitý proces

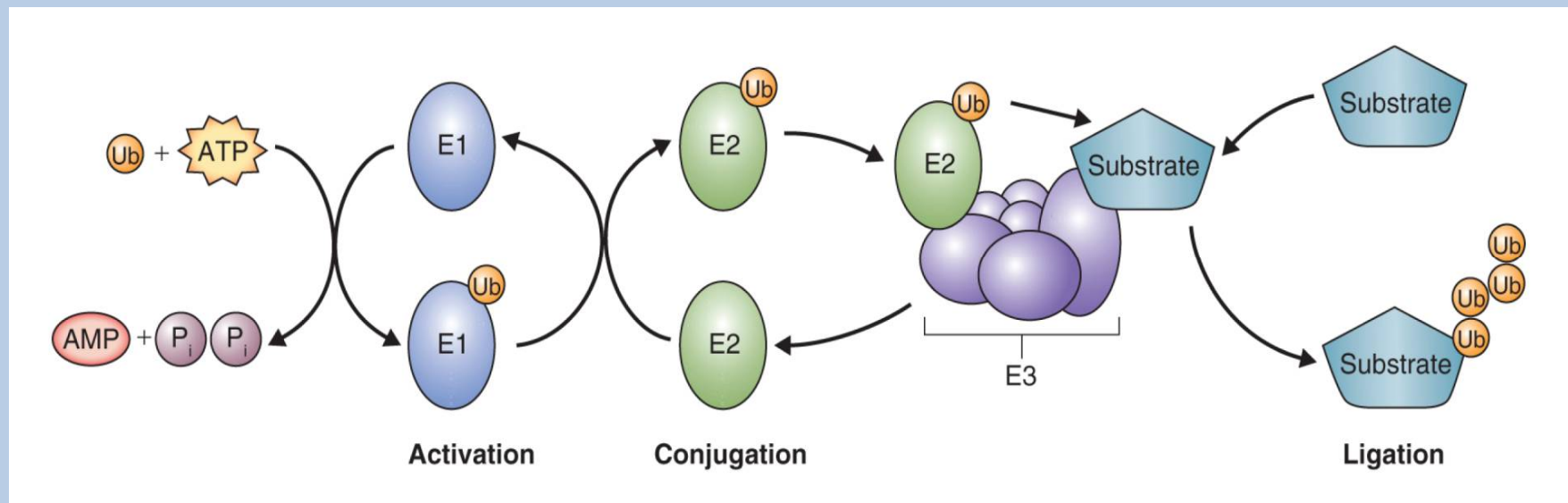
Update 2018

Miricescu A et al. (2018) J Exp Botany 69: 4511-4527

E1 - Ub-aktivující enzymy

E2 - Ub-konjugační enzymy

E3 - Ub-liguující enzymy

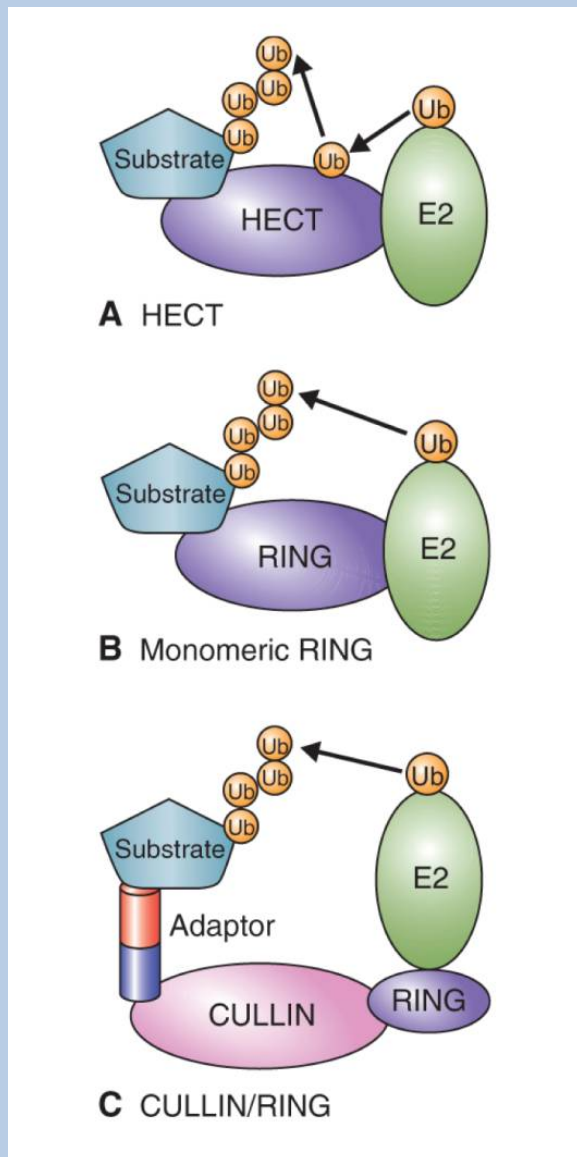


E1 aktivuje Ub použitím ATP: Ub je přenesen na E2. E1 katalyzuje tvorbu E1-Ub přechodné formy

Ub-ligáza (E3) se váže k E2-Ub a terčovému proteinu a katalyzuje přenos ubiquitinu k terčovému proteinu.

Ubiquitinace - vysoce specifický proces; specificita je určována E3 ligačním procesem. Arabidopsis - více než 1200 E3 genů; E2 - 37 genů, E1 – 2 geny

2 typy E3 ligázového komplexu



HECT E3 ligázy - akceptují Ub z E2 a přenesou ho na terčový protein

RING E3 ligázy - váží komplex E2-Ub a terčový protein a usnadňují **přímý přenos** Ub z E2 na terčový protein.

- monomerní
- multimerické

CULLIN/RING ligázy jsou složité shromáždění proteinů:

- RING finger doména
- variabilní komponenta, adaptor - rozpoznává a váže terčový protein
- CULLIN - vytváří lešení pro zbytek komplexu

26S proteazom - molekulární mašinerie štěpící ubiquitinované proteiny

Ubiquitinované proteiny jsou rozpoznány 26S proteazomem a podstupují ATP-závislou proteolýzu.

Proteazom:

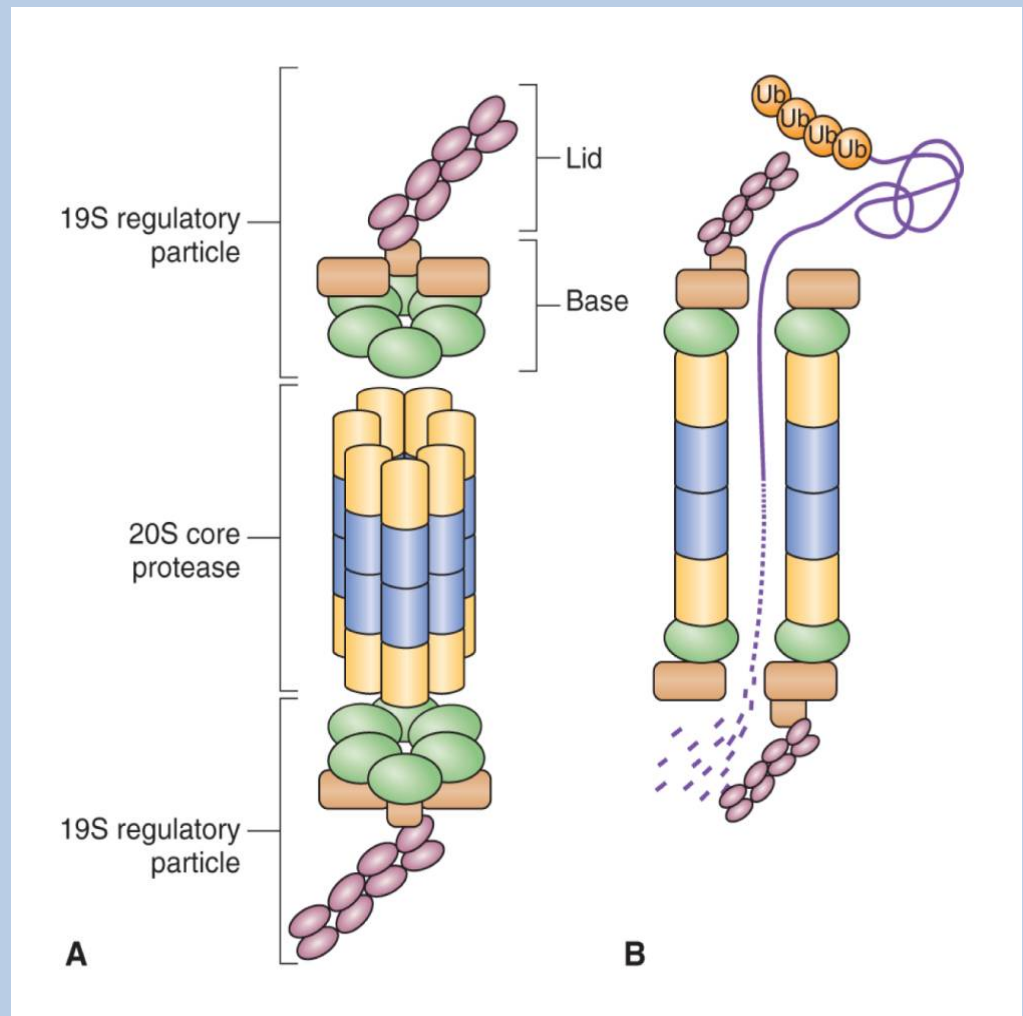
20S core proteáza (CP) (barel)
+
19S regulační částice (RP)

RP - specifita k proteolýze - rozpoznání ubiquitinovaných proteinů => vstup do CP – proteolýza

RP - katalyzuje odstranění ubiquitinové značky a rozbalení terčových proteinů => proteolýza pomocí CP

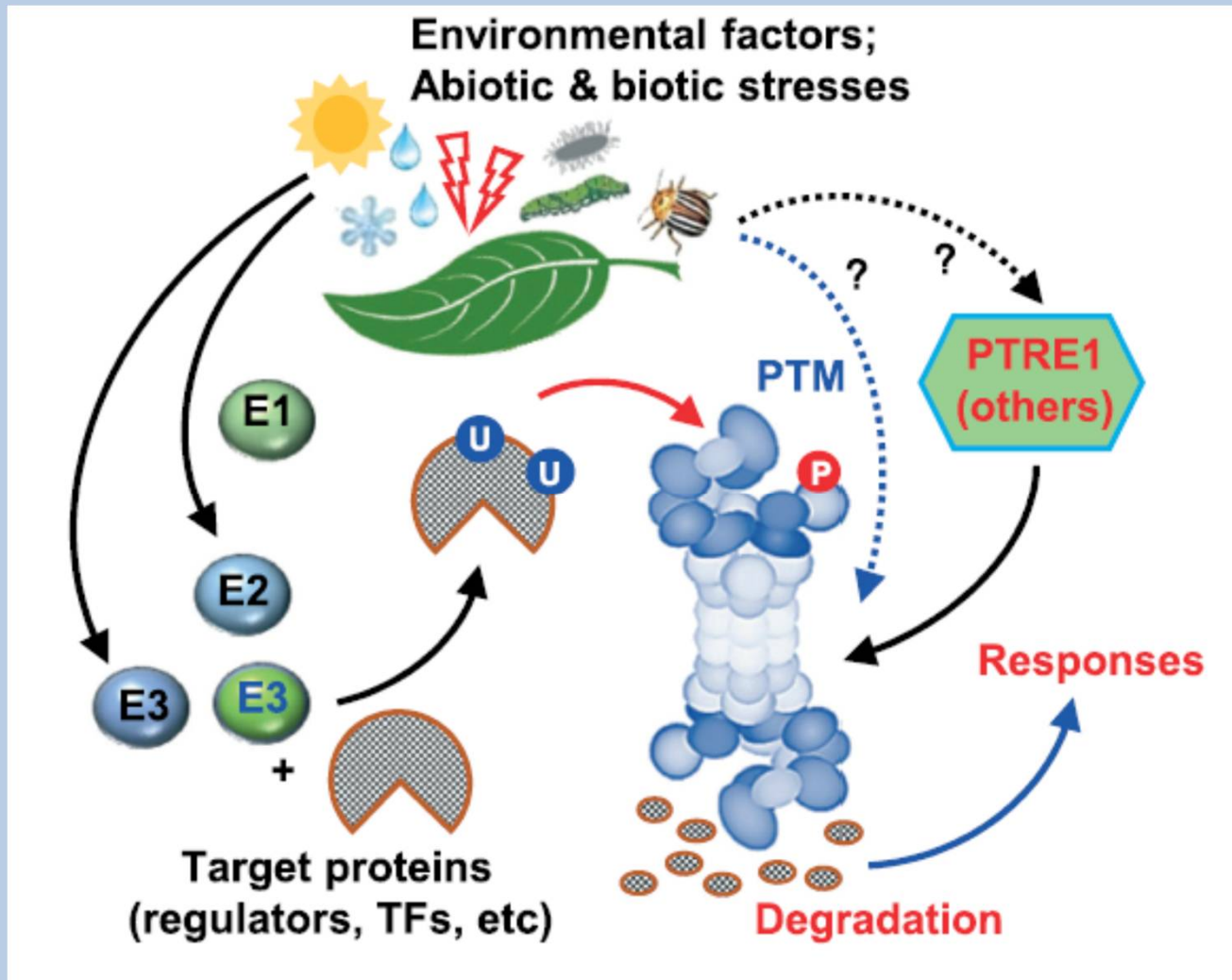
ER proteiny jsou rovněž degradovány cytoplazmatickým UbPS (proces **ERAD**)

ERAD – ER-lokalizované chaperony rozpoznávají defektní proteiny v lumenu ER, rozplétají je a dovolují jejich transport do cytosolu k degradaci pomocí UbPS.



Update 2019

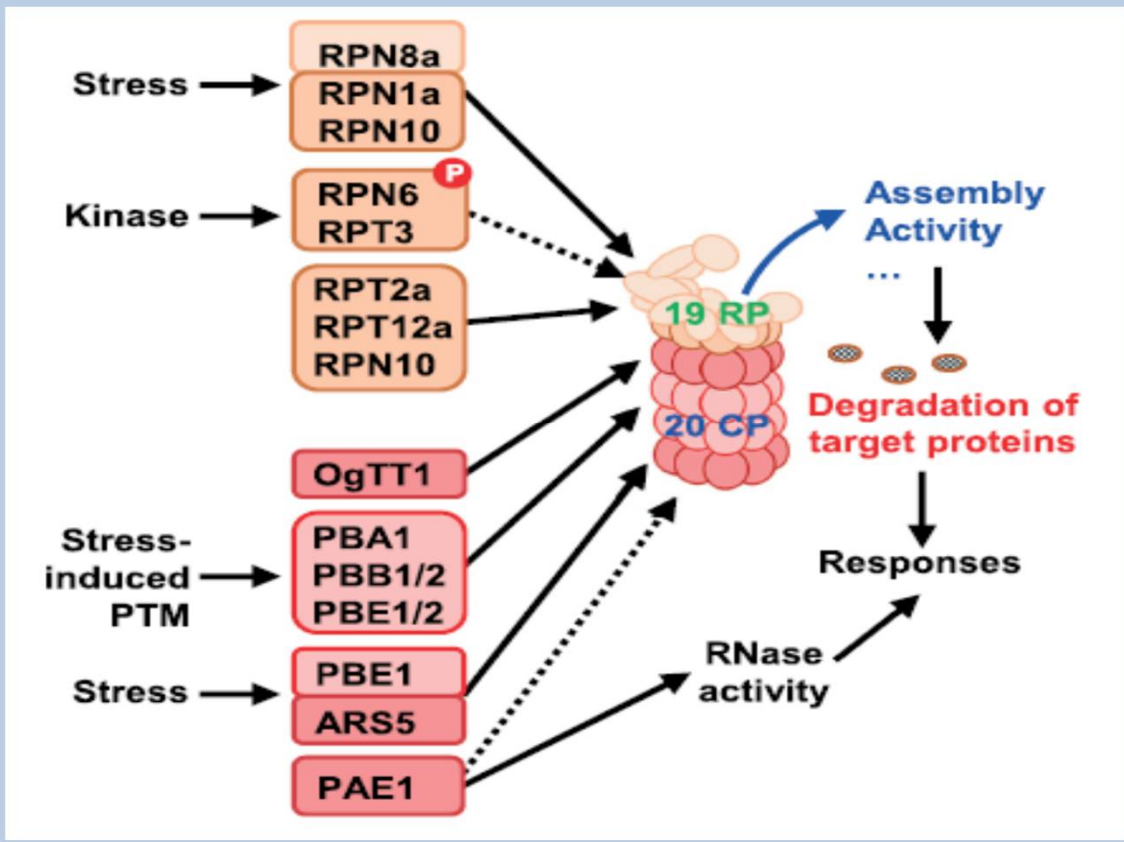
Xu F-Q and Xue H-W (2019) Plant Cell Environment 42: 2931-2944



PTM = post-translační modifikace

PTRE1 = proteazomový regulátor

Podjednotky 19RP a 20CP regulují proteazomovou aktivitu a odpovědi rostlin ke stresům.



Některé podjednotky 19S jsou transkripčně regulovány nebo fosforylovány stresovými podmínkami. Několik podjednotek 20CP může být modifikováno stresem i post-translačně (PTM).

↓
Změna stavby proteazomu → Degradace odlišných proteinů během odpovědi ke stresům