

### 3) Membránový transport

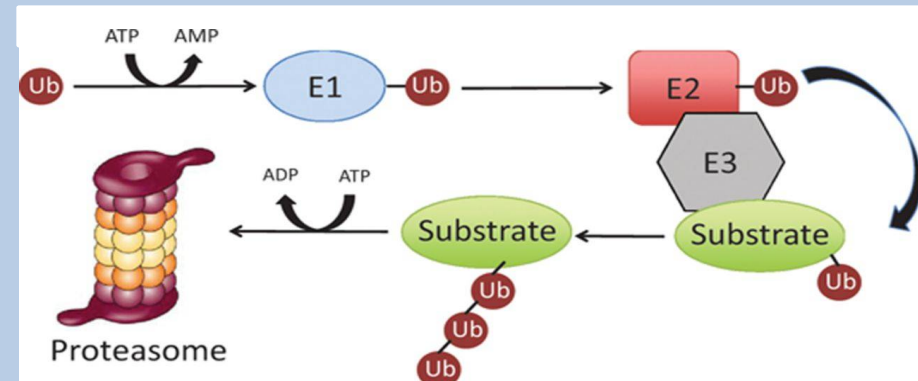
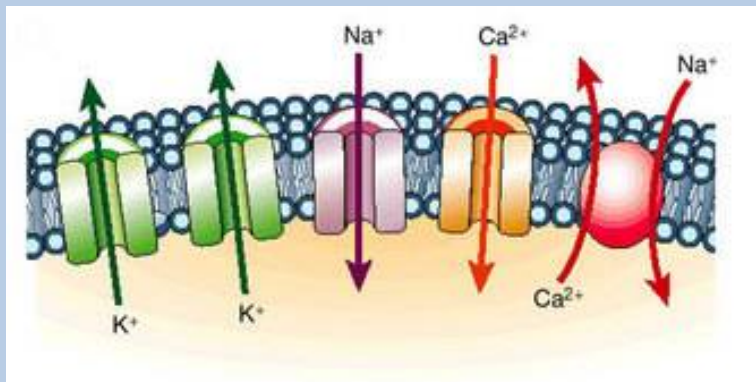
d) Kanály

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

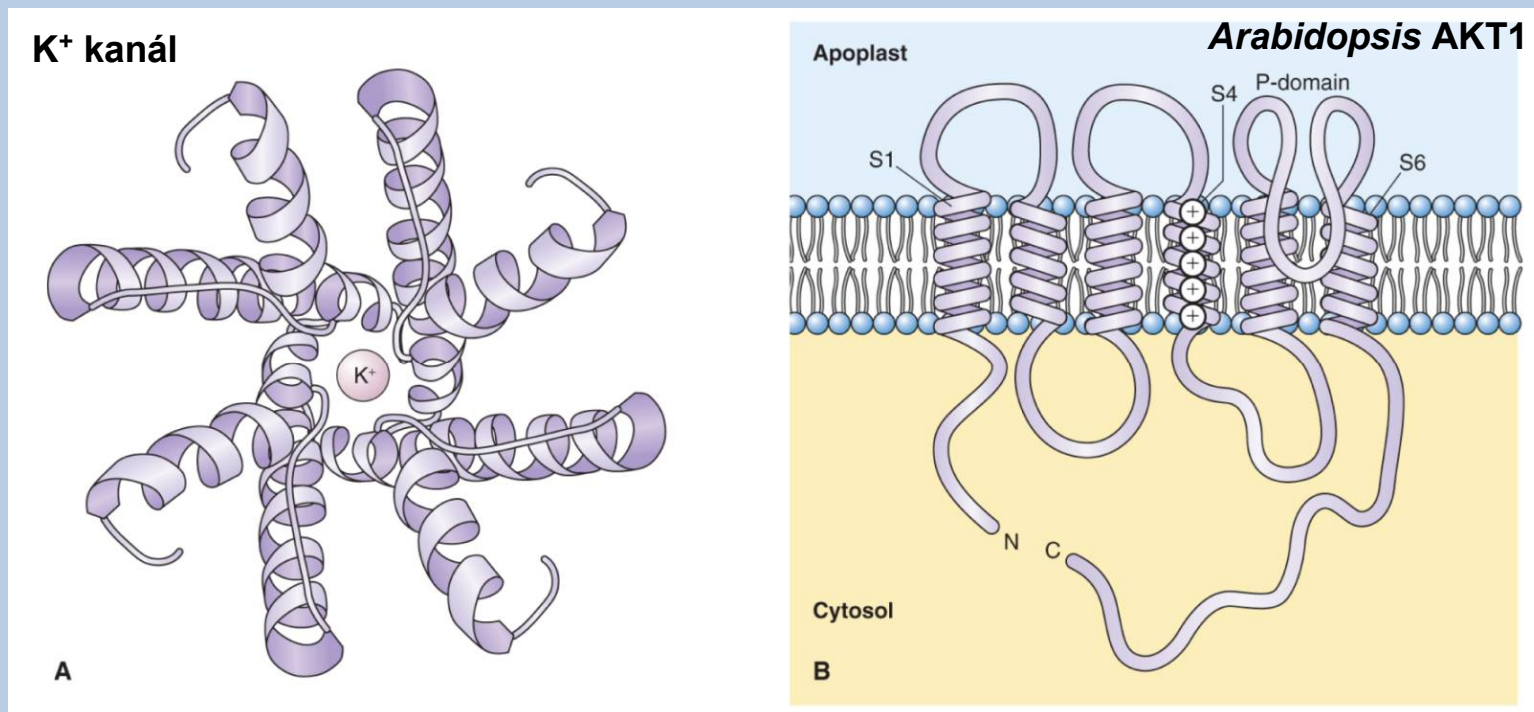


## d) Kanály

### 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<sup>+</sup> do a ven z buněk, a určují koncentraci cytozolického Ca<sup>2+</sup> - buněčná signalizace.

Pasivní transport diktován elektrochemickým potenciálem pro konkrétní iont.

Difúze nabitých částic:

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

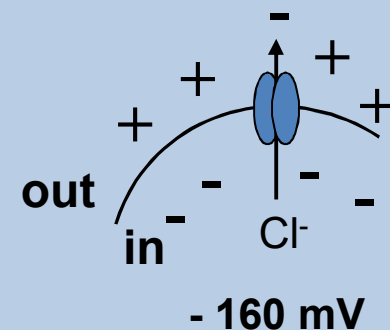
$V_m$

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

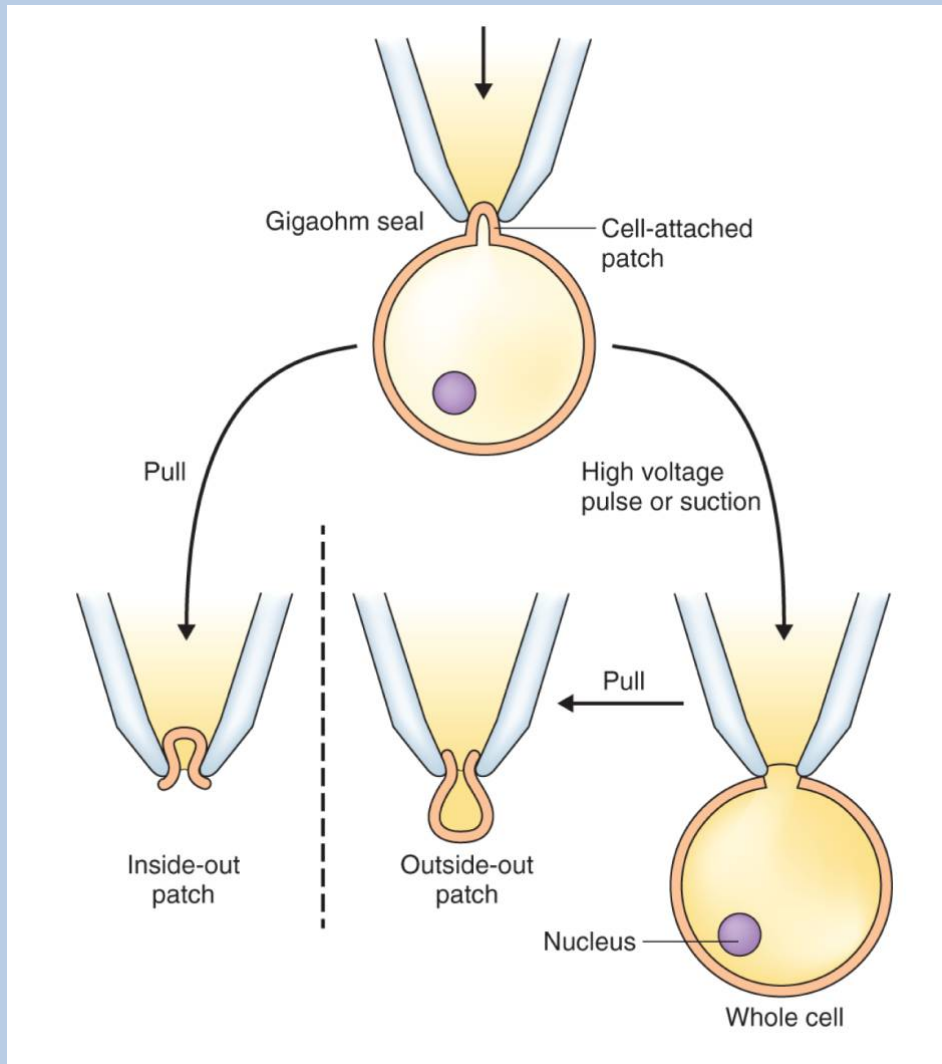
Iontové kanály – vysoce selektivní pro kationty a anionty  
– selektivita na základě velikosti póru

**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=YScg6ioR_8Q)

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

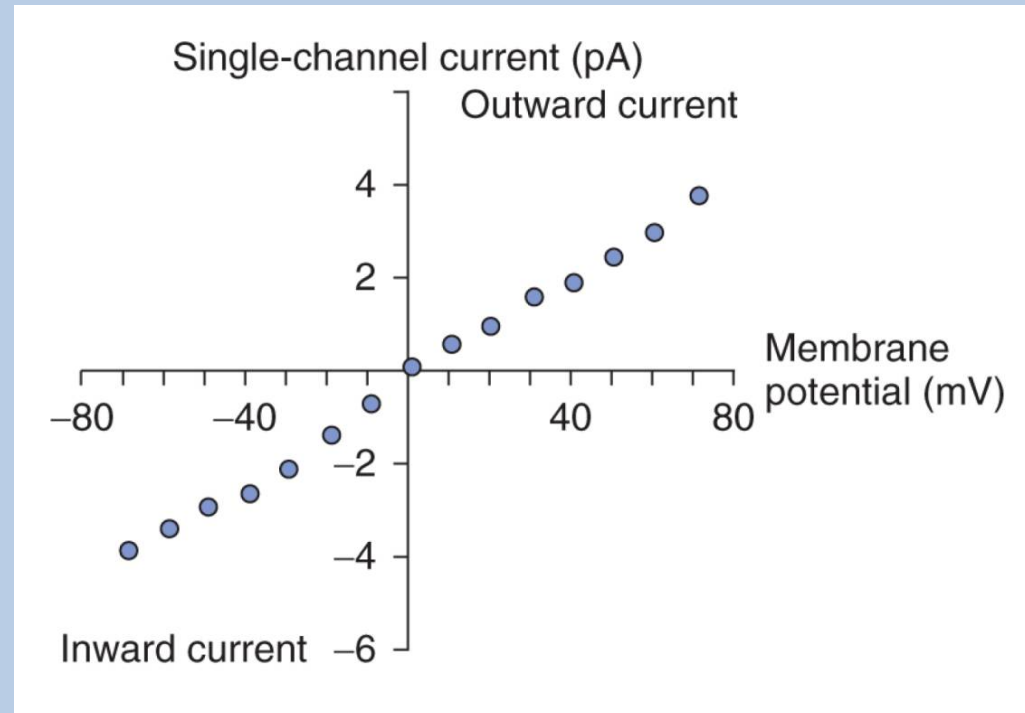
## Pohyb iontů přes plazmatickou membránu vytváří průtok proudu

Ohmův zákon:  $I = V/R$

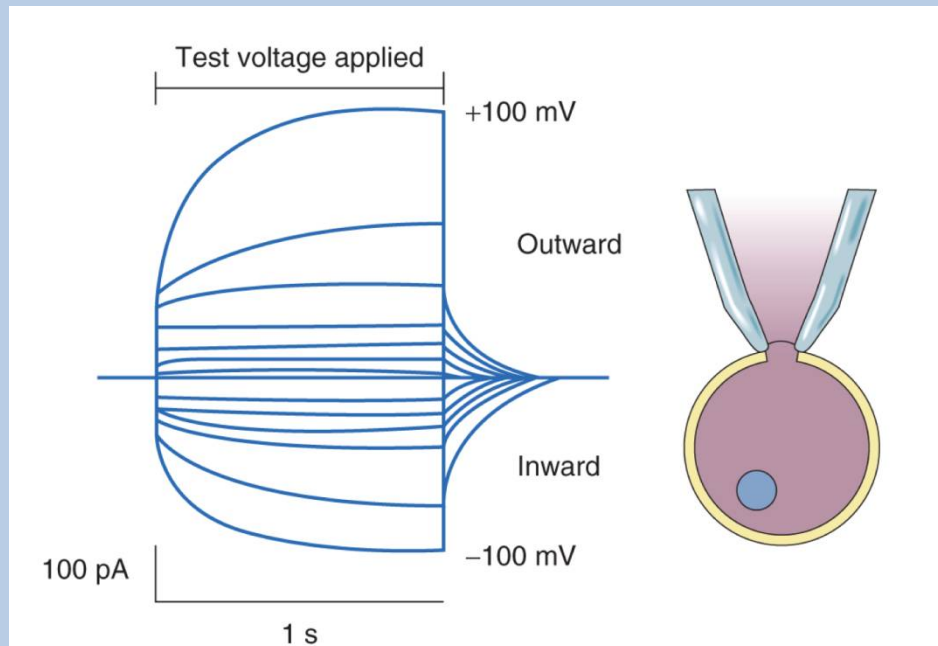
Rezistence membrány k určitému iontu závisí na jeho selektivě a počtu kanálů.

Nepermeabilní membrána:  $I = 0$

Zcela permeabilní membrána:  $I = V$



## Whole-cell mode patch-clamp

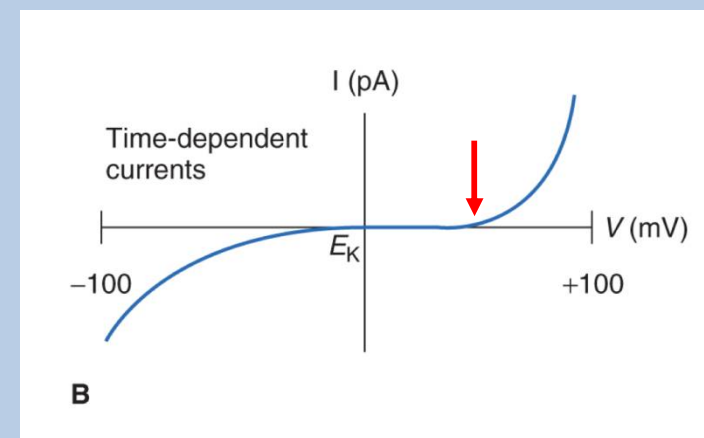


Aktivace kanálů se vyskytuje pouze po dosažení určitého **prahového napětí**.

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  $V_m$ .

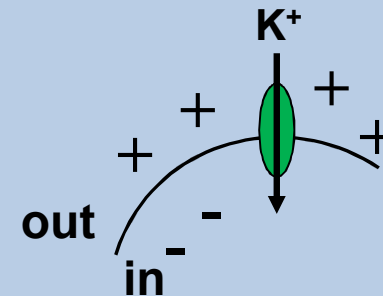


## Otevírání a zavírání kanálů je přesně regulováno - **gating**

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

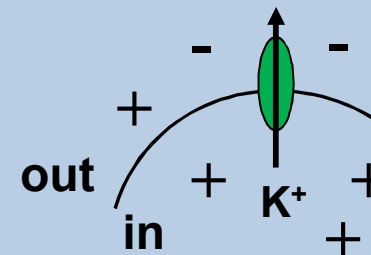
### Inwardly-rectifying channels

– kanály umožňující pohyb  $K^+$  dovnitř buňky



### Outwardly-rectifying channels

– kanály umožňující pohyb  $K^+$  ven z buňky

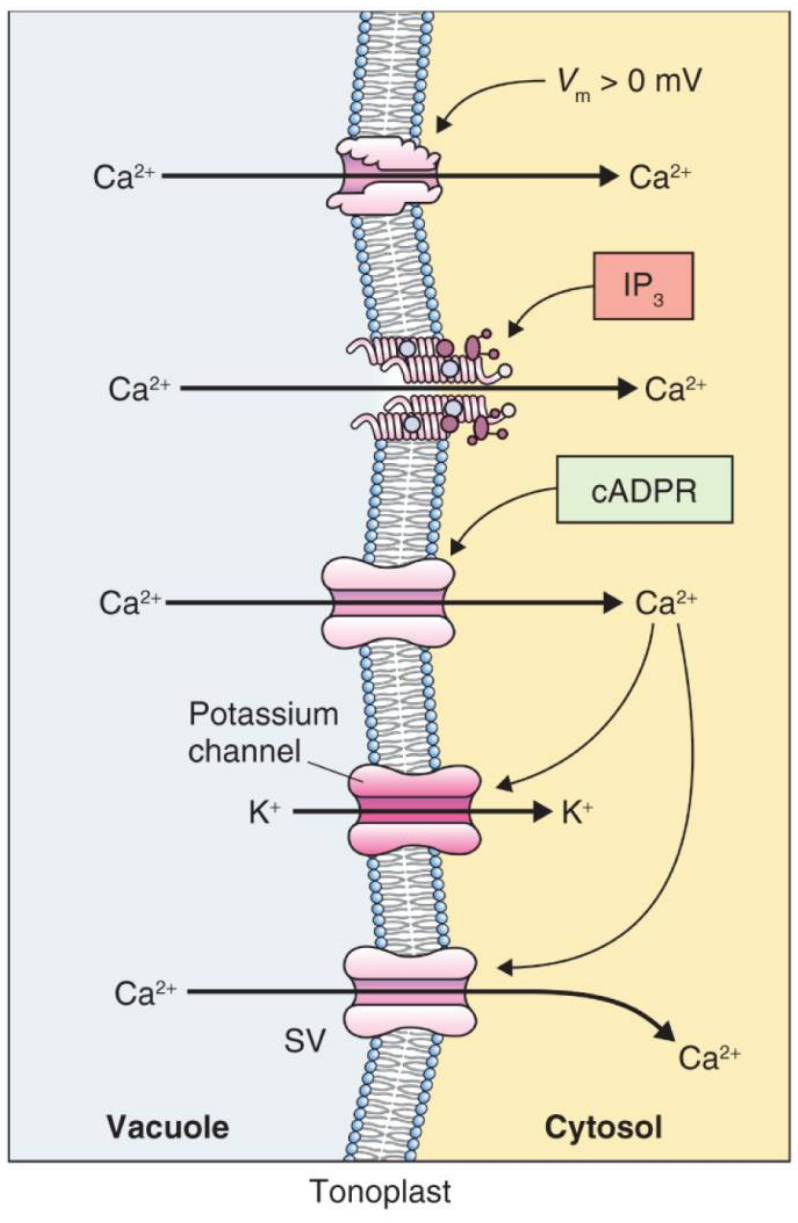


Změny  $V_m$  - využity k regulaci osmotické koncentrace změnou gradientu elektrochemického potenciálu iontů

**Iontové kanály – regulovány:**

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

# Uzavření průduchů indukováno ABA



Ca<sup>2+</sup> regulován napětím

Ca<sup>2+</sup> regulován IP<sub>3</sub> (inositol 3 fosfát)

Ca<sup>2+</sup> regulován cyklickou ADP ribózou

K<sup>+</sup> regulován Ca<sup>2+</sup>

Ca<sup>2+</sup> regulován Ca<sup>2+</sup>

**Dynamické změny v hladině cytozolického Ca<sup>2+</sup> - reakce na různé podněty.**



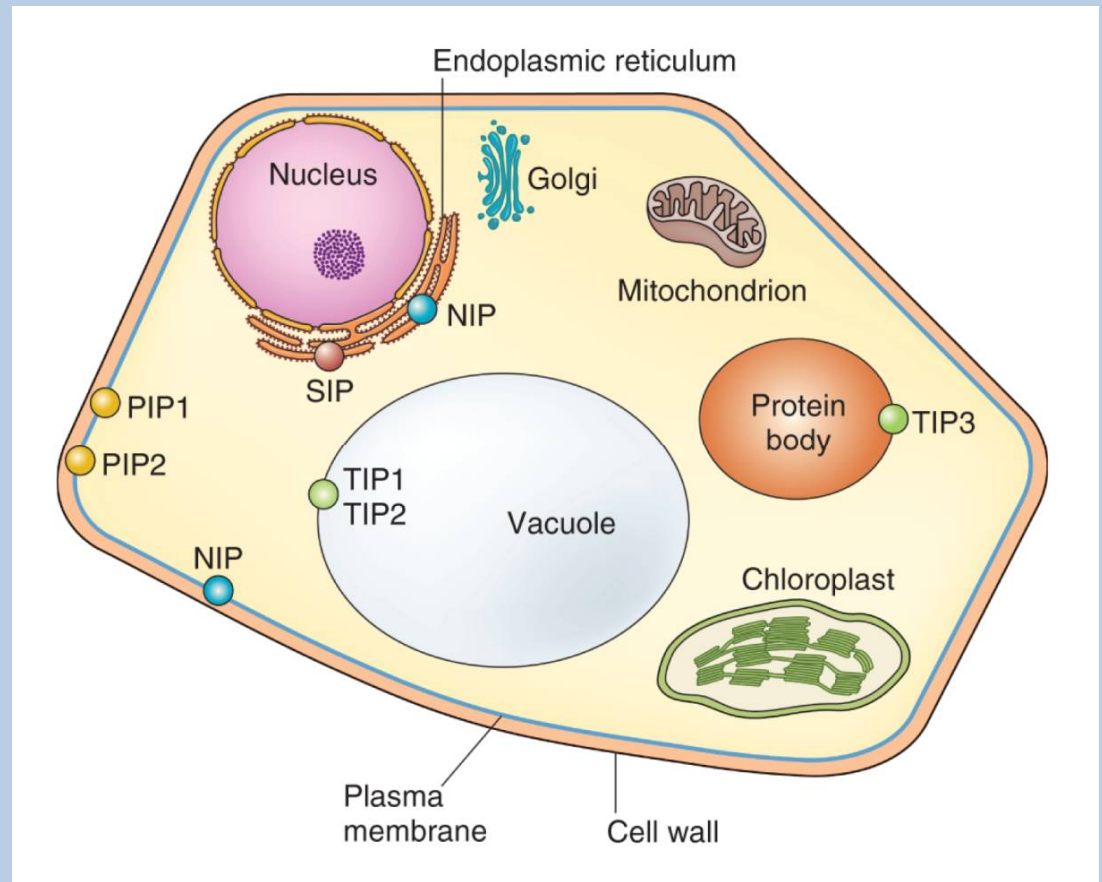
**Akvaporiny**

**Kanály usnadňující pohyb H<sub>2</sub>O**

Objeveny v roce 1993



Christophe Maurel Marteen Chrispeels



U rostlin velká skupina genů:

*Arabidopsis* – 35 genů

kukuřice – 36 genů

rýže – 33 genů

Rovněž transport CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bóru a silikonu, **i ionty!**

**NIP** – **n**odule **i**ntrinsic **p**roteins

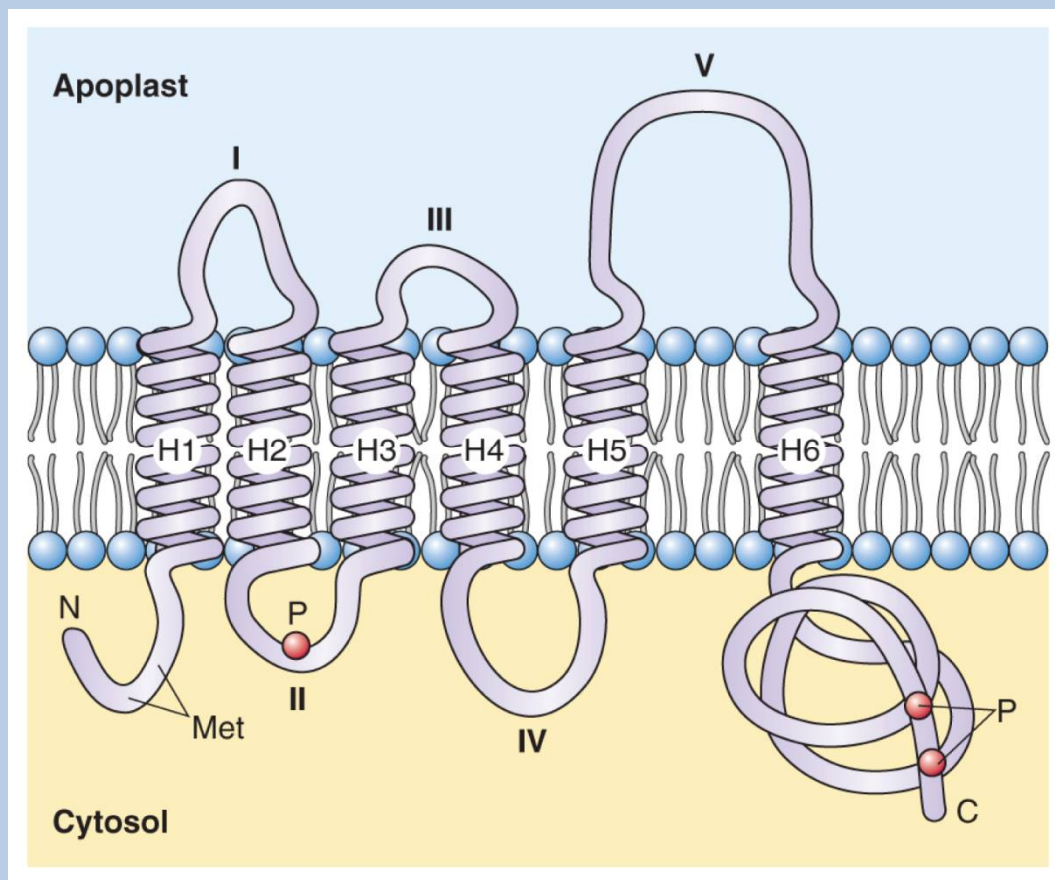
**TIP** – **t**onoplast **i**ntrinsic **p**roteins

**SIP** – **s**mall **b**asic **i**ntrinsic **p**roteins

**PIP** – **p**lasmamembrane **i**ntrinsic **p**roteins

**XIP** – **u**ncharacterized **i**ntrinsic **p**roteins

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

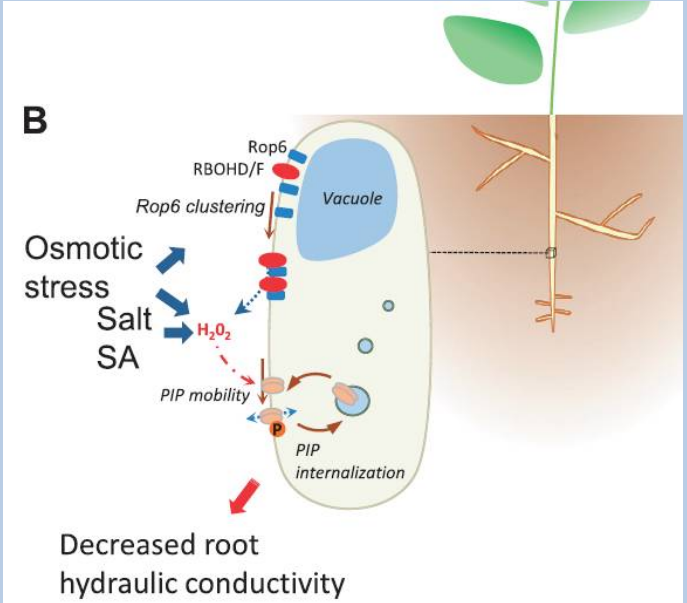
C-konec a smyčka II – fosforylační místa – regulace otevírání aquaporinů ( $\text{Ca}^{2+}$ -DPK)

N-konec – metylovaná regulační místa

Cytoplazmatické pH mění pohyb vody: anoxie => kyselá cytoplazma => redukce transportu  $\text{H}_2\text{O}$

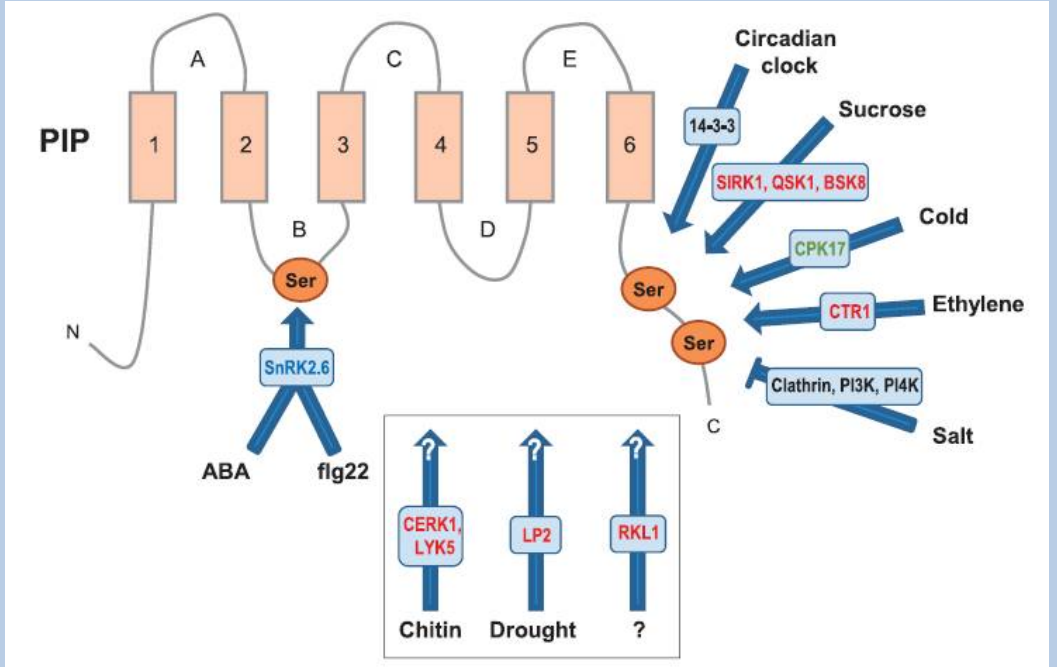
Update 2021

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



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

Působení prostřednictvím H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – snižuje fosforylaci PIP<sub>2</sub>;1 => změna mobility v PM a stimulace internalizace PIP<sub>2</sub>;1

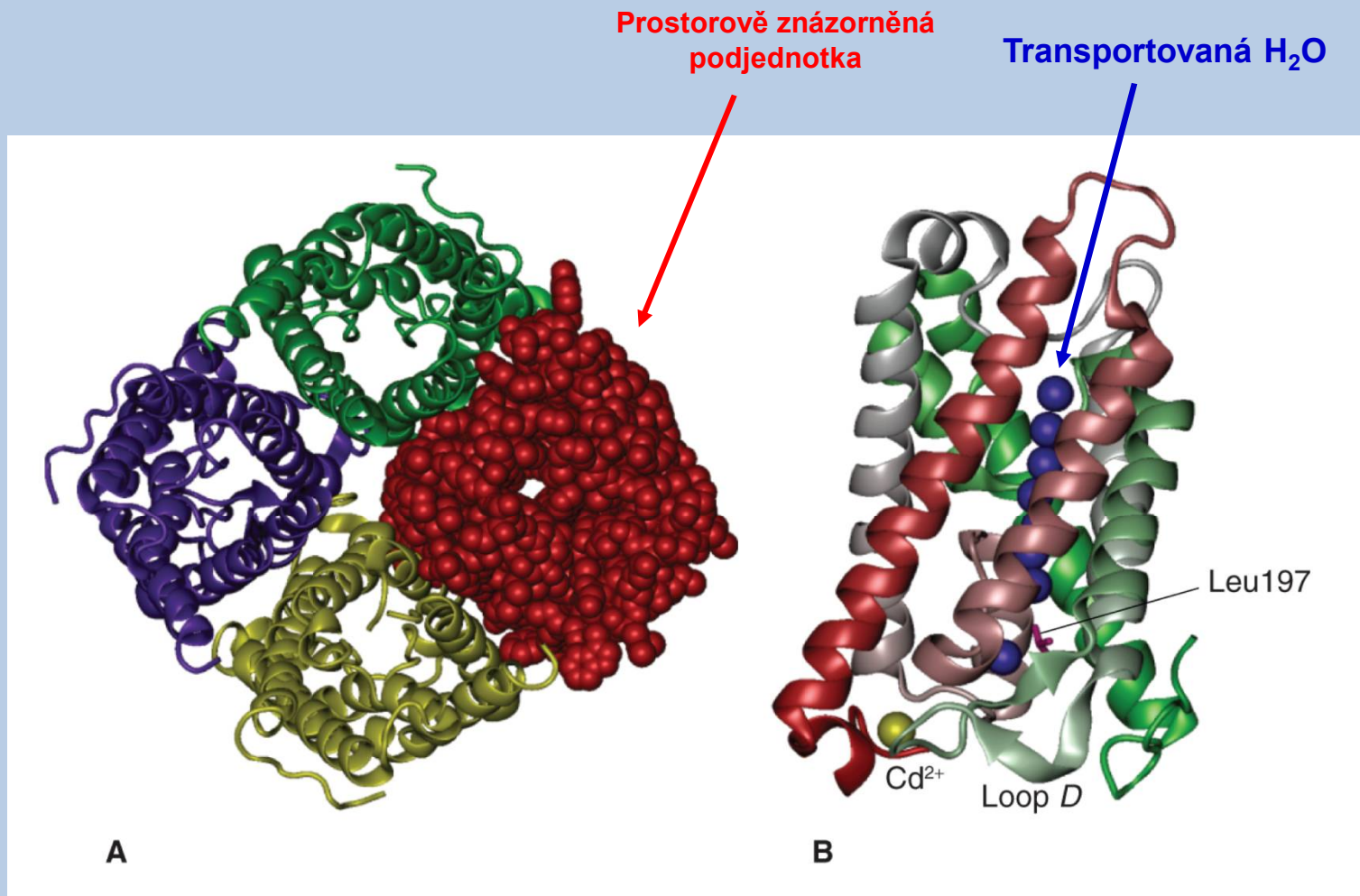


Signální dráhy působící společně na fosforylaci PIP

Prototyp PIP: transmembránové domény (1-6), extracelulární smyčky (A, C, E), cytosolické 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  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ .

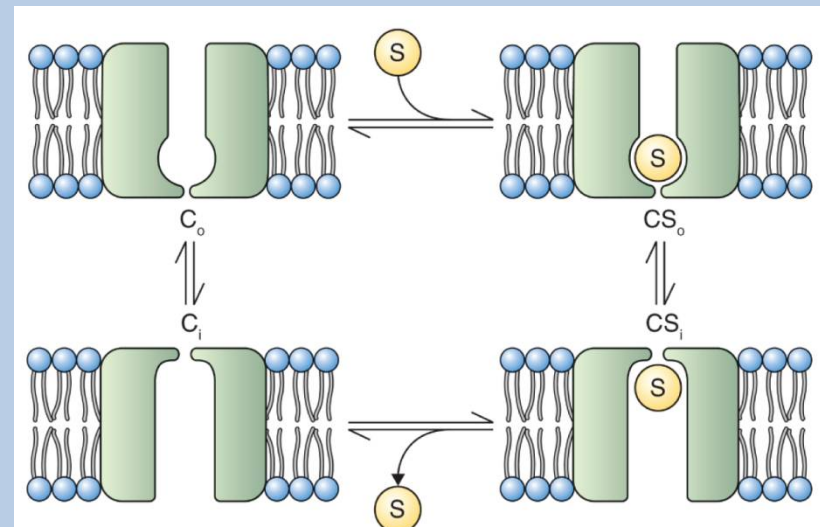
- Důležité:**
- v ukládání cukru do floému pro transport na dlouhé vzdálenosti.
  - ve výměně metabolitů přes mitochondriální a chloroplastové membrány
  - v ukládání iontů a organických roztoků ve vakuole
  - v toleranci rostlin k zasolení
  - v kontrole buněčného pH
  - transport toxických látek z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

Transportovaný roztok se váže na transportér a způsobuje konformační změnu.

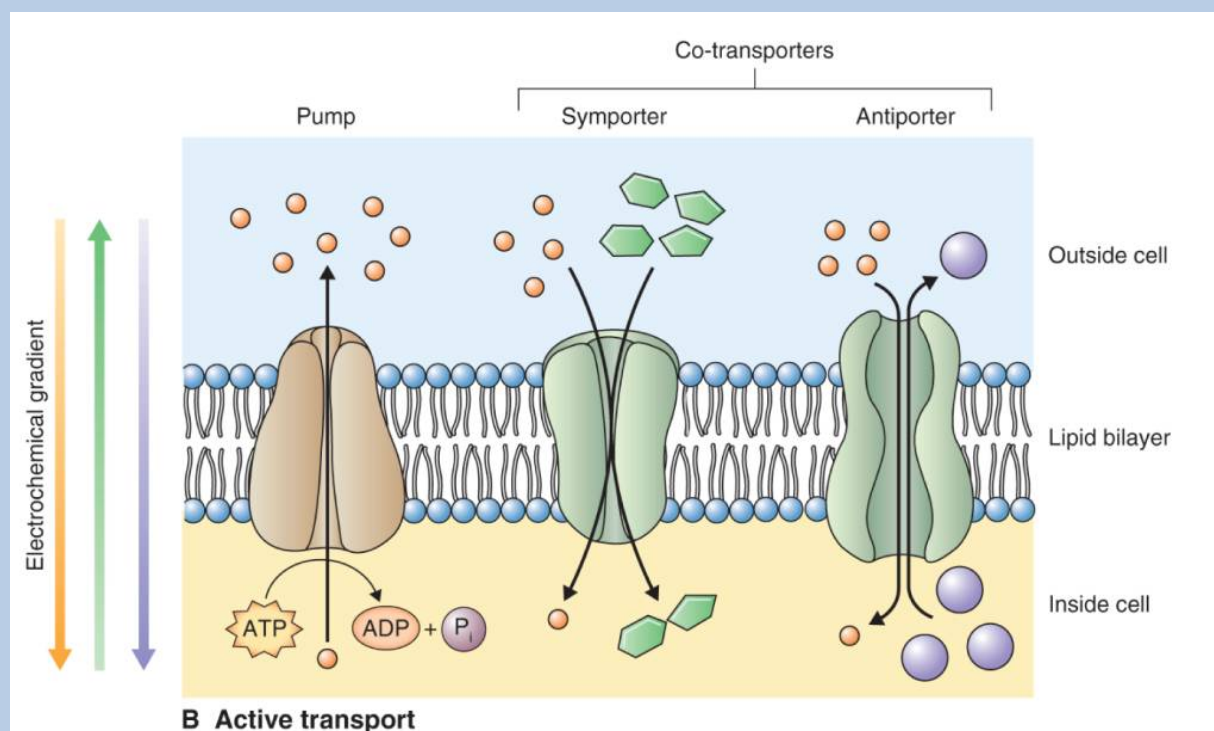


Pohyb roztoku přes membránu

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 ( $H^+/Ca^{2+}$ ,  $H^+/Na^+$ )

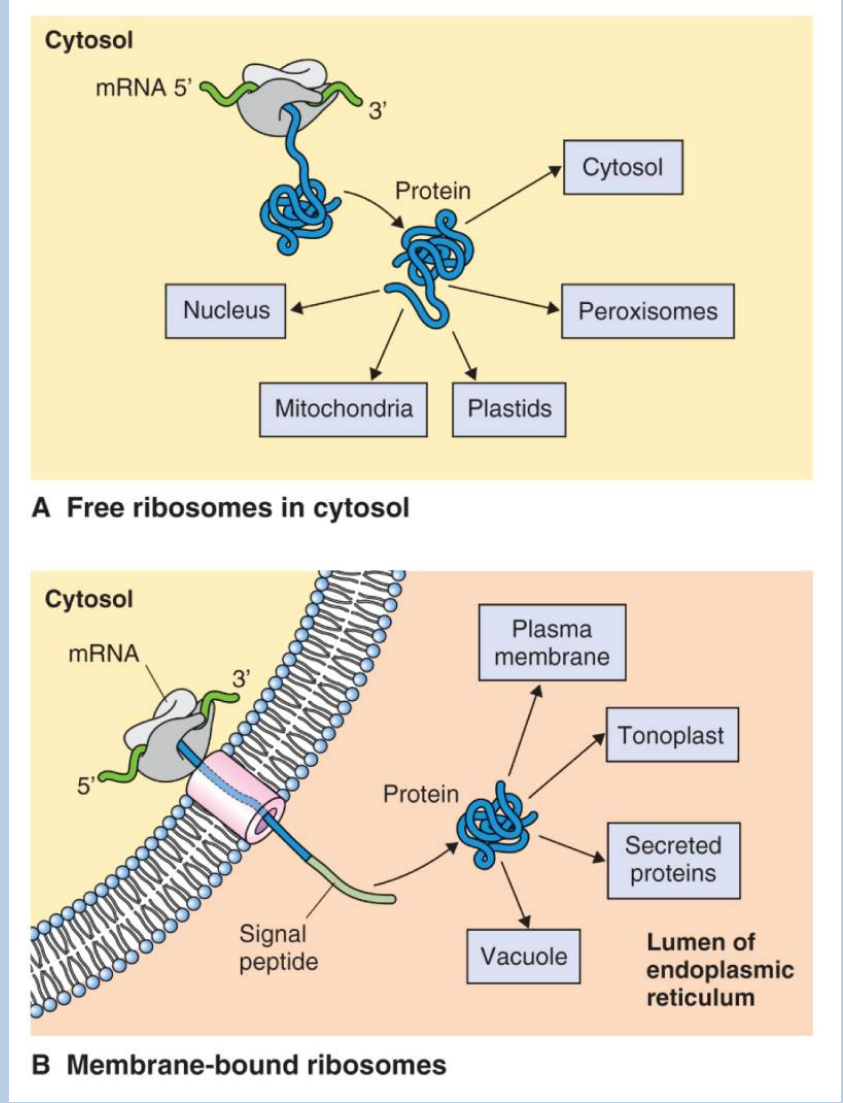
# f) Intracelulární transport proteinů

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.

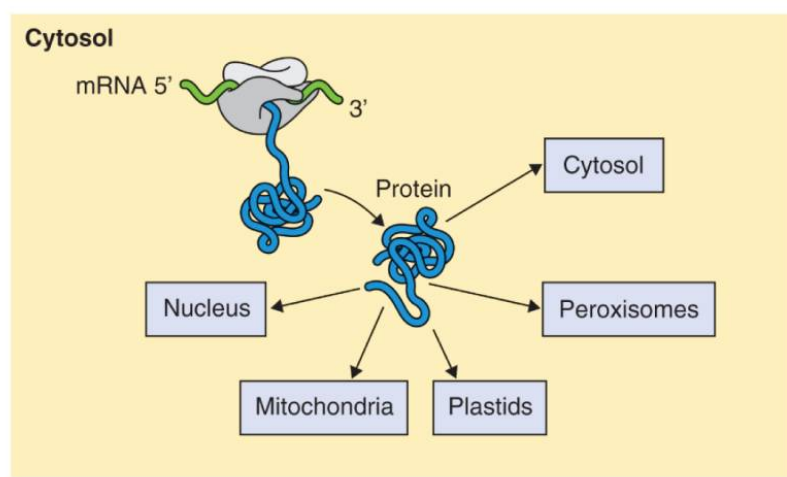
Proteiny cytoplazmy, chloroplastu, mitochondrie, jádra a peroxizómů – syntéza dokončována na volných ribozomech

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

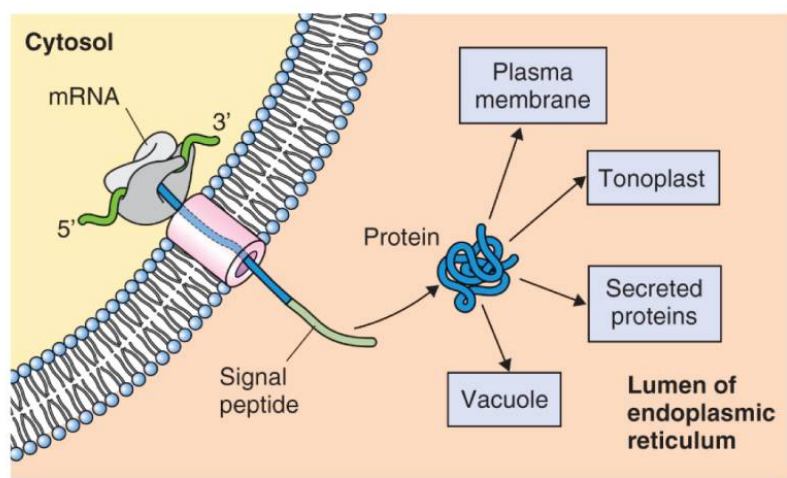
Rostoucí polypeptidový řetězec obsahuje signální peptid



Mechanismus zajišťující syntézu proteinů směřuje k povrchu ER



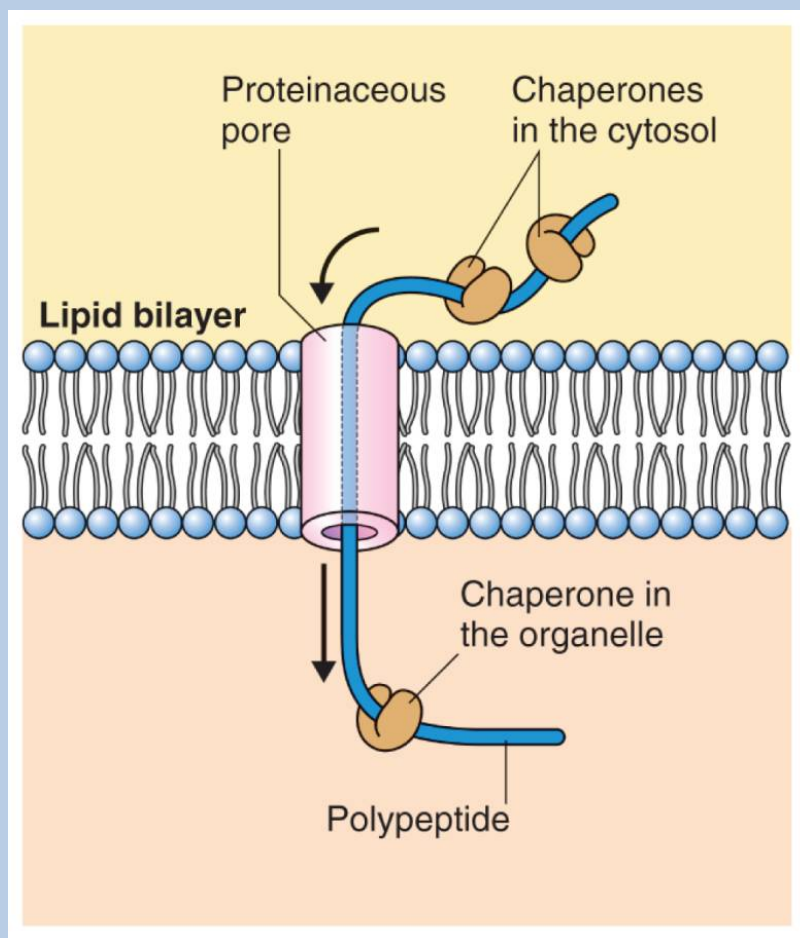
A Free ribosomes in cytosol



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 cytosolu.

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.**

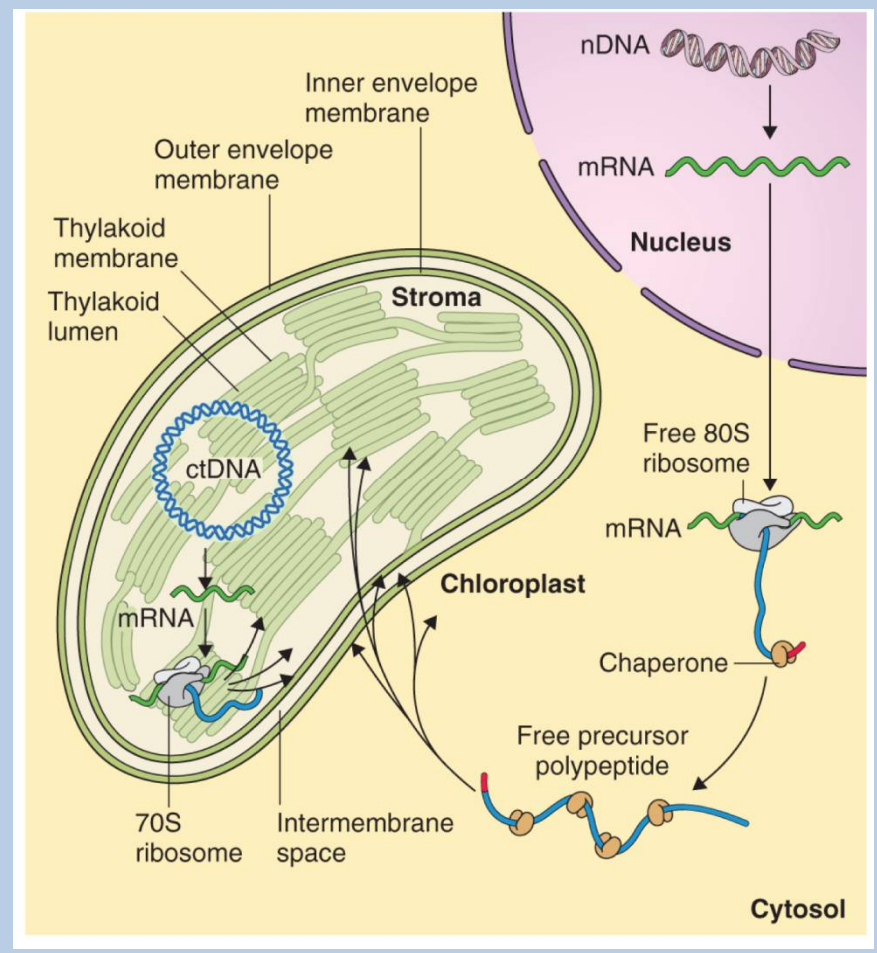
**Většina proteinů má hydrofilní povrch.**



**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

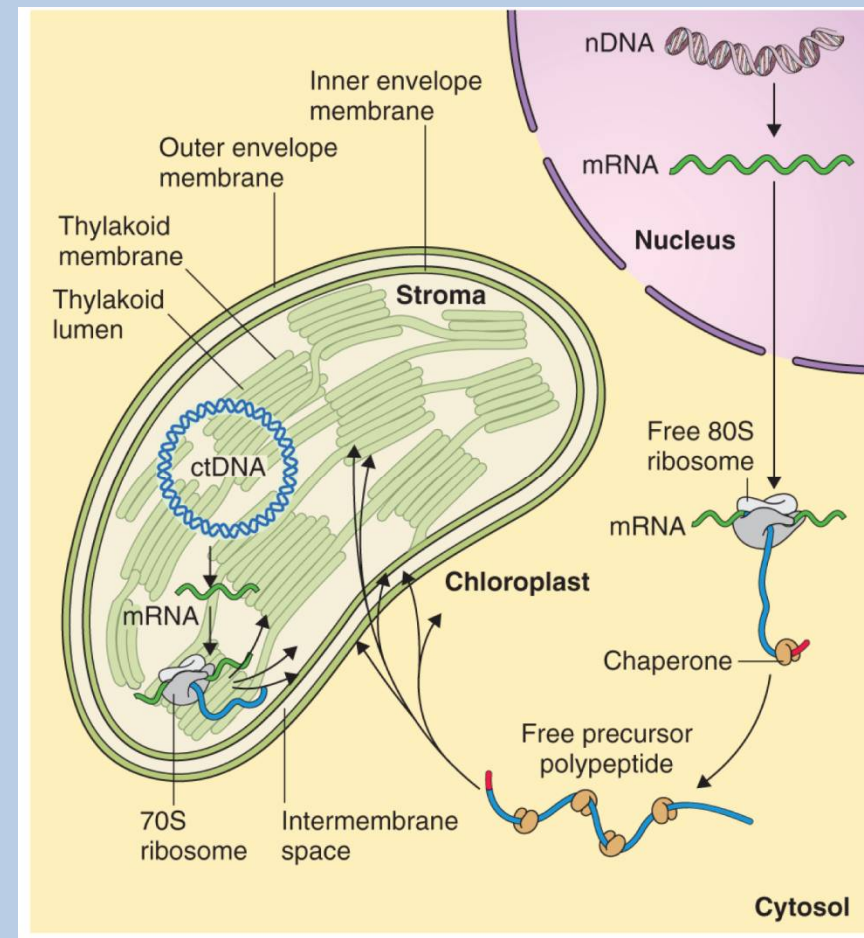
Transport do chloroplastu a mitochondrie zahrnuje translokaci přes několik membránových bariér

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



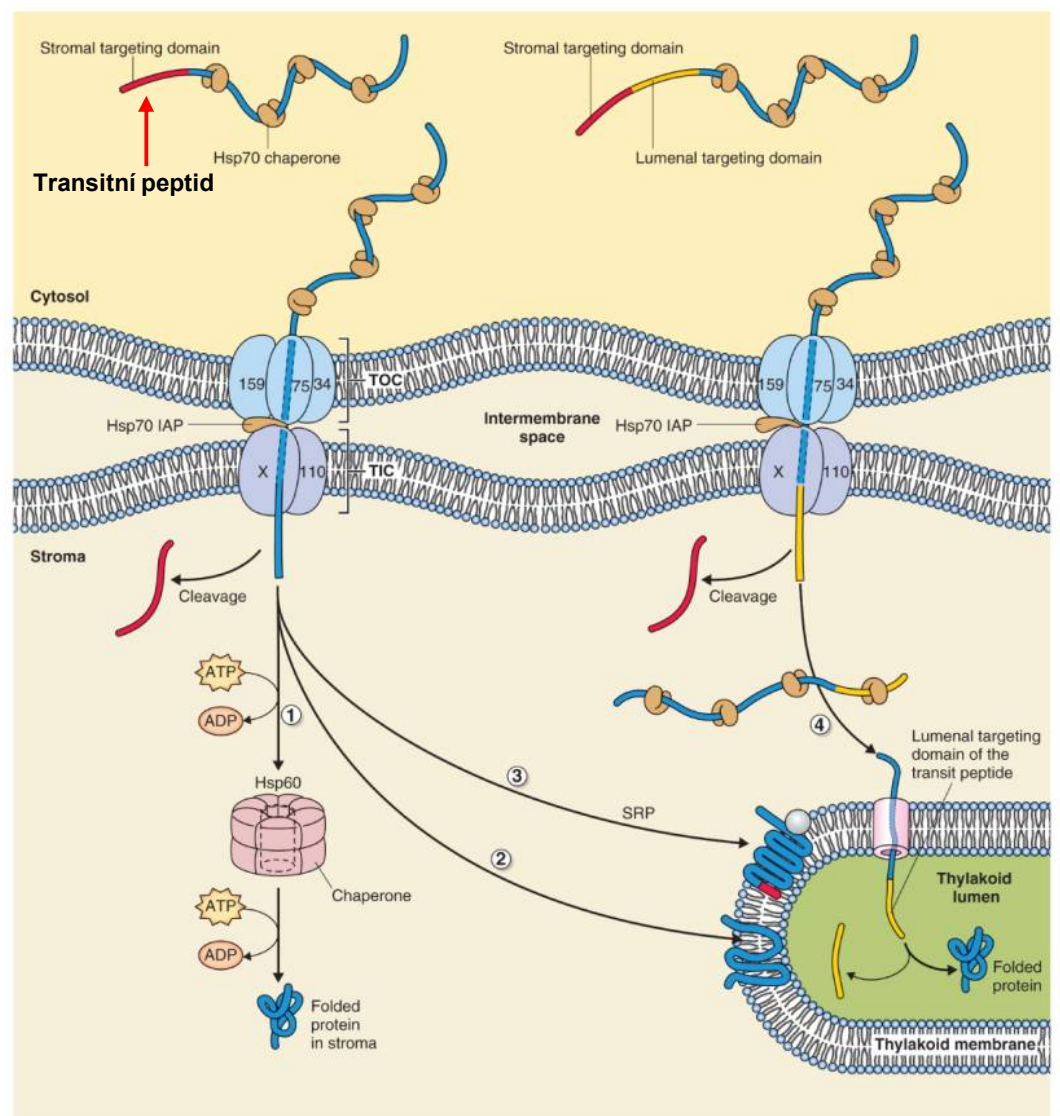
3 vodní kompartmenty

- 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

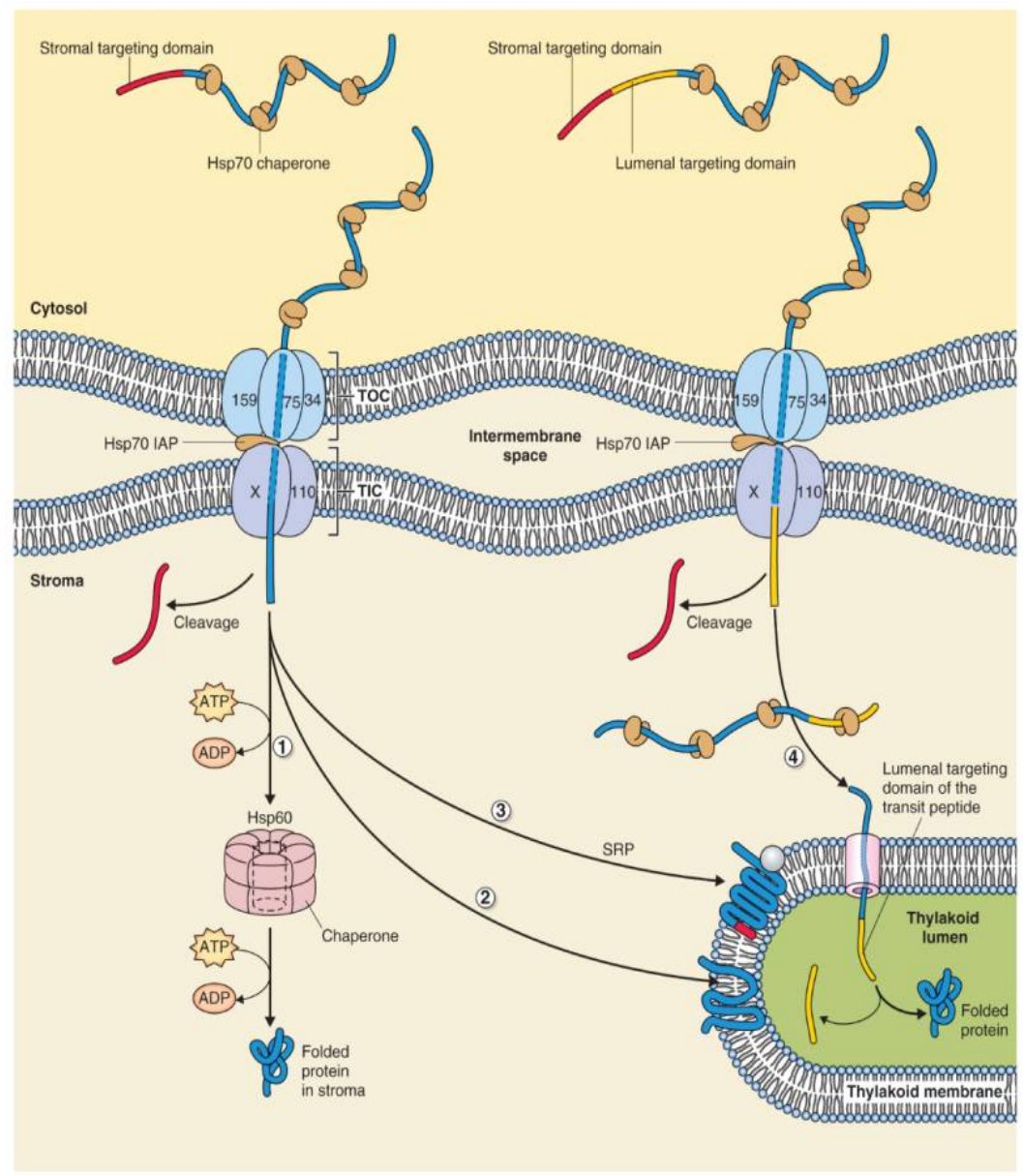
TOC = translocon at the outer chloroplast envelope

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)

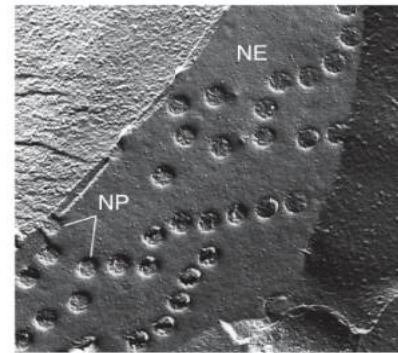
- Štěpení signálního peptidu proteázou a stočení – vyžaduje chaperony

## Transport peptidů do jádra

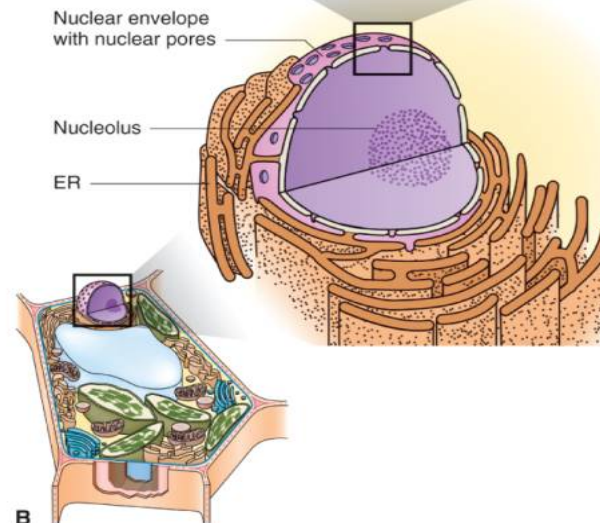
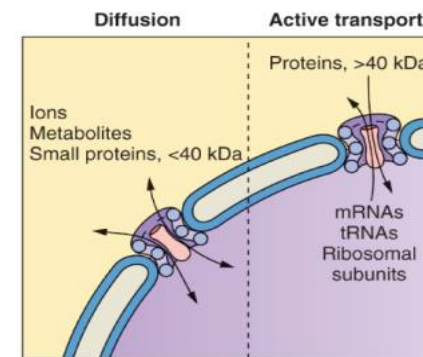
Jaderná obálka - dvojitá membrána;  
odděluje cytoplazmu od matrix jádra  
(nukleoplazma)

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

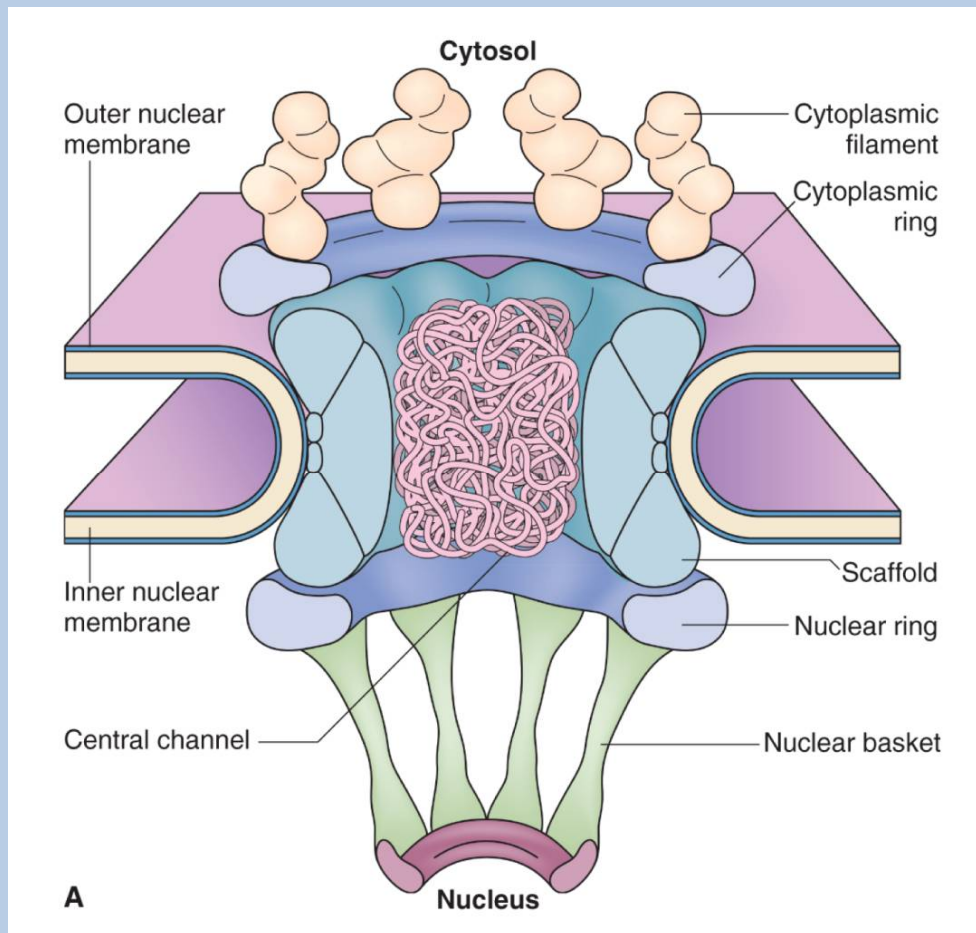


B

## 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

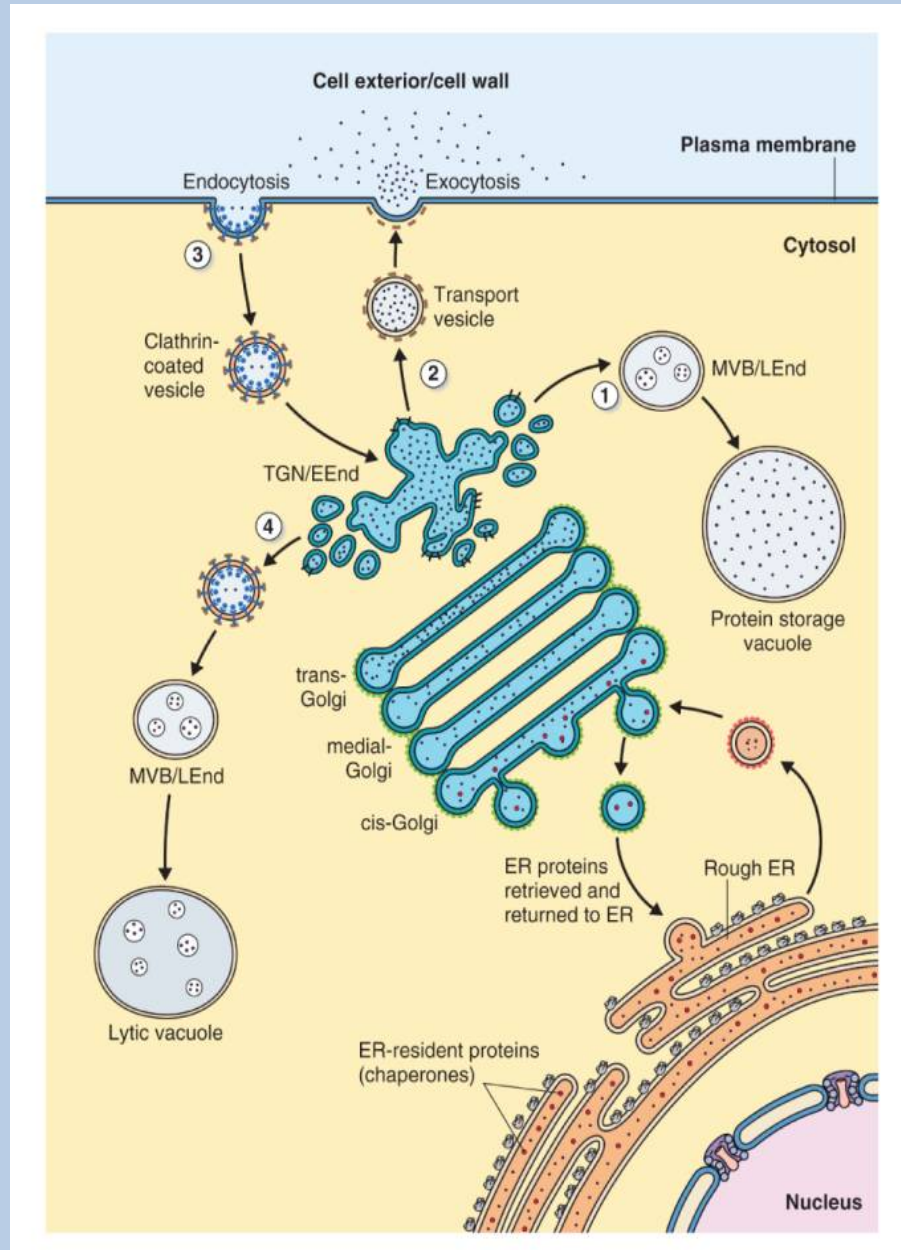
Sekreční dráha vytváří endomembránový systém, který se v buňce rozvětňuje.

- 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.

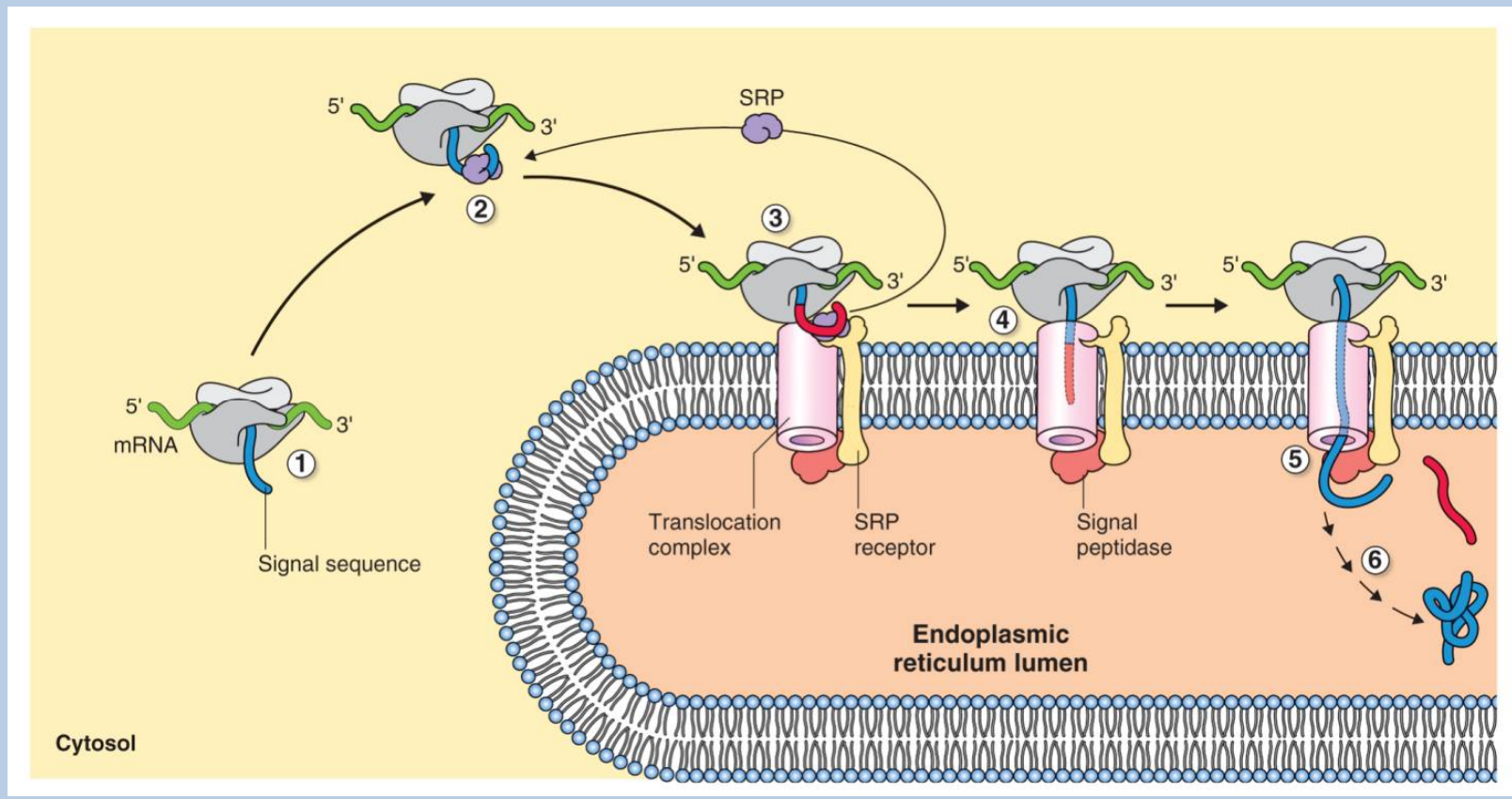
**2)** Proteiny určeny pro exteriér jsou transportovány na PM ve vezikulech k exocytóze.

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





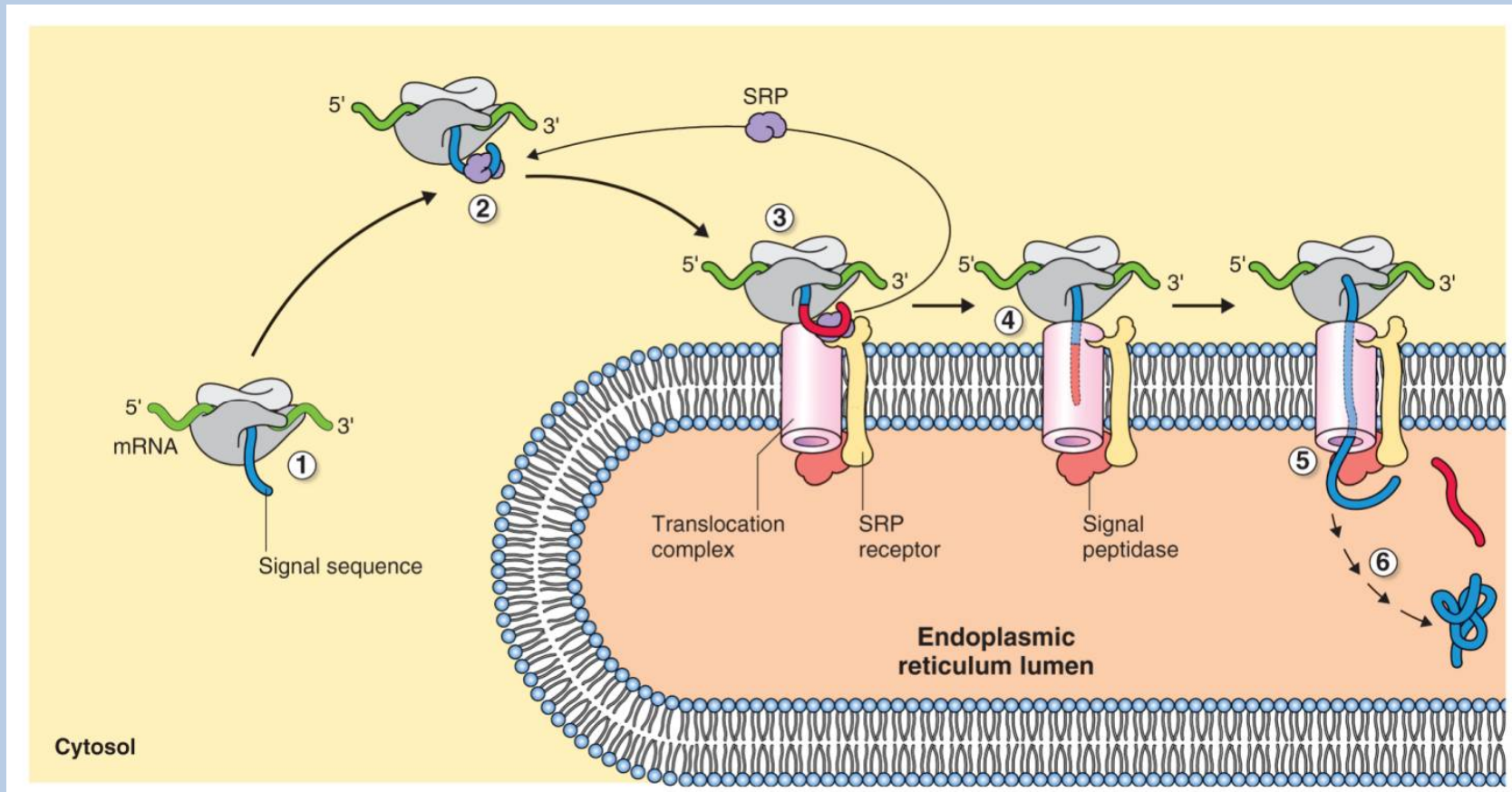
Protein určený pro endomembránový systém nebo pro export na povrch buňky má peptidový signál - směřuje ribozóm s vytvářeným proteinem na povrch ER – dokončena syntéza proteinu.

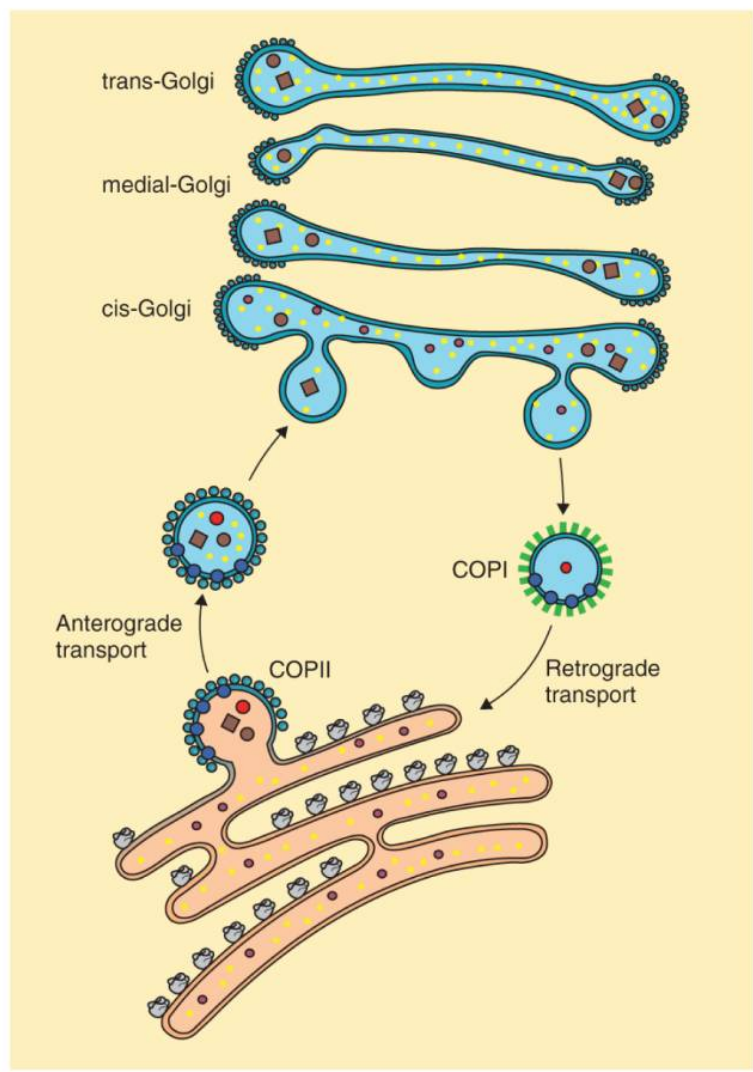


Směrování proteinů do lumenu ER zahrnuje:

- 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

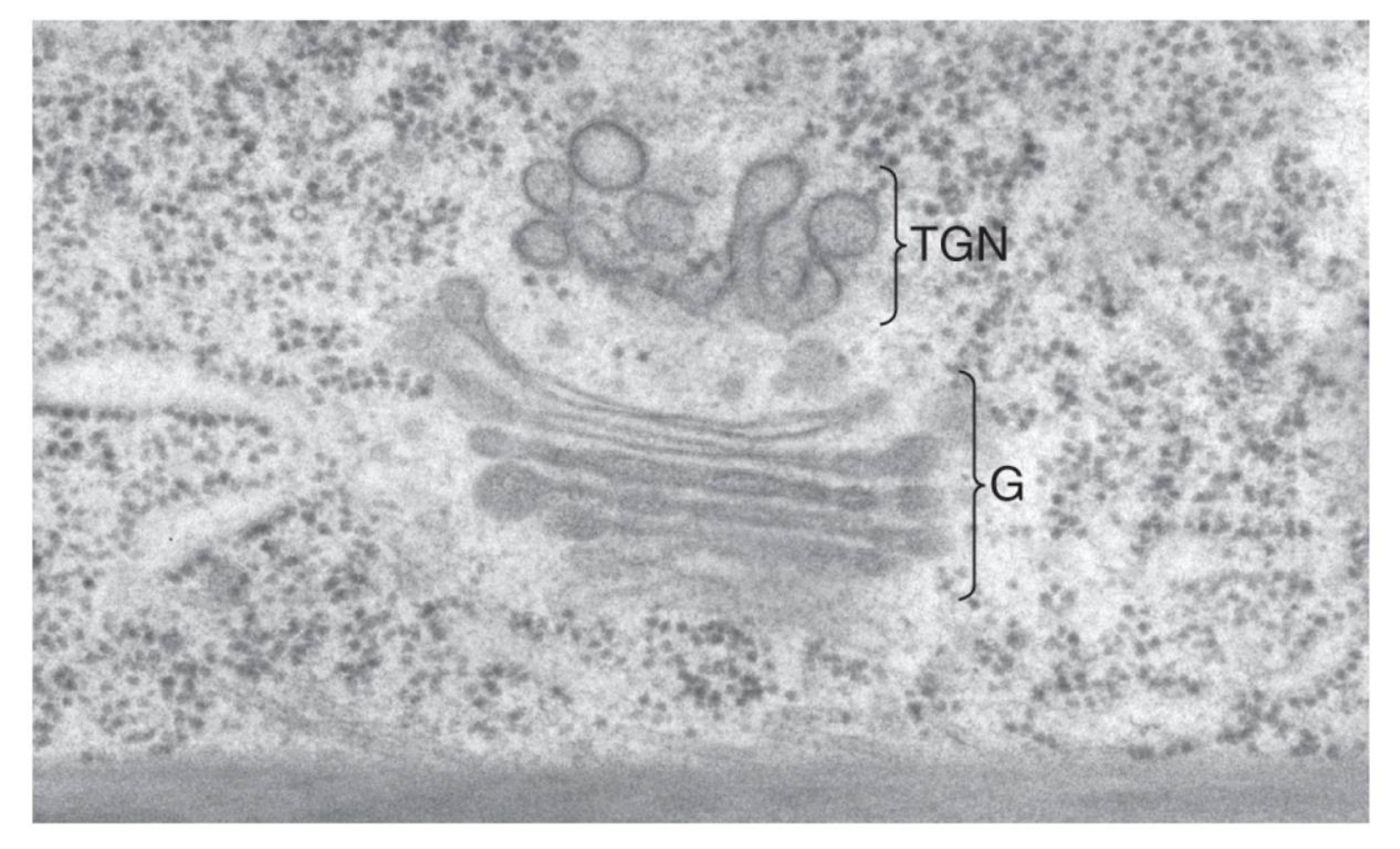
**Retrograde transport** - návrat ER-lokalizovaných proteinů a membránových proteinů z Golgiho aparátu (ERD2 receptor na membráně ER – rozpoznává KDEL motivy) – vezikuly COPI

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

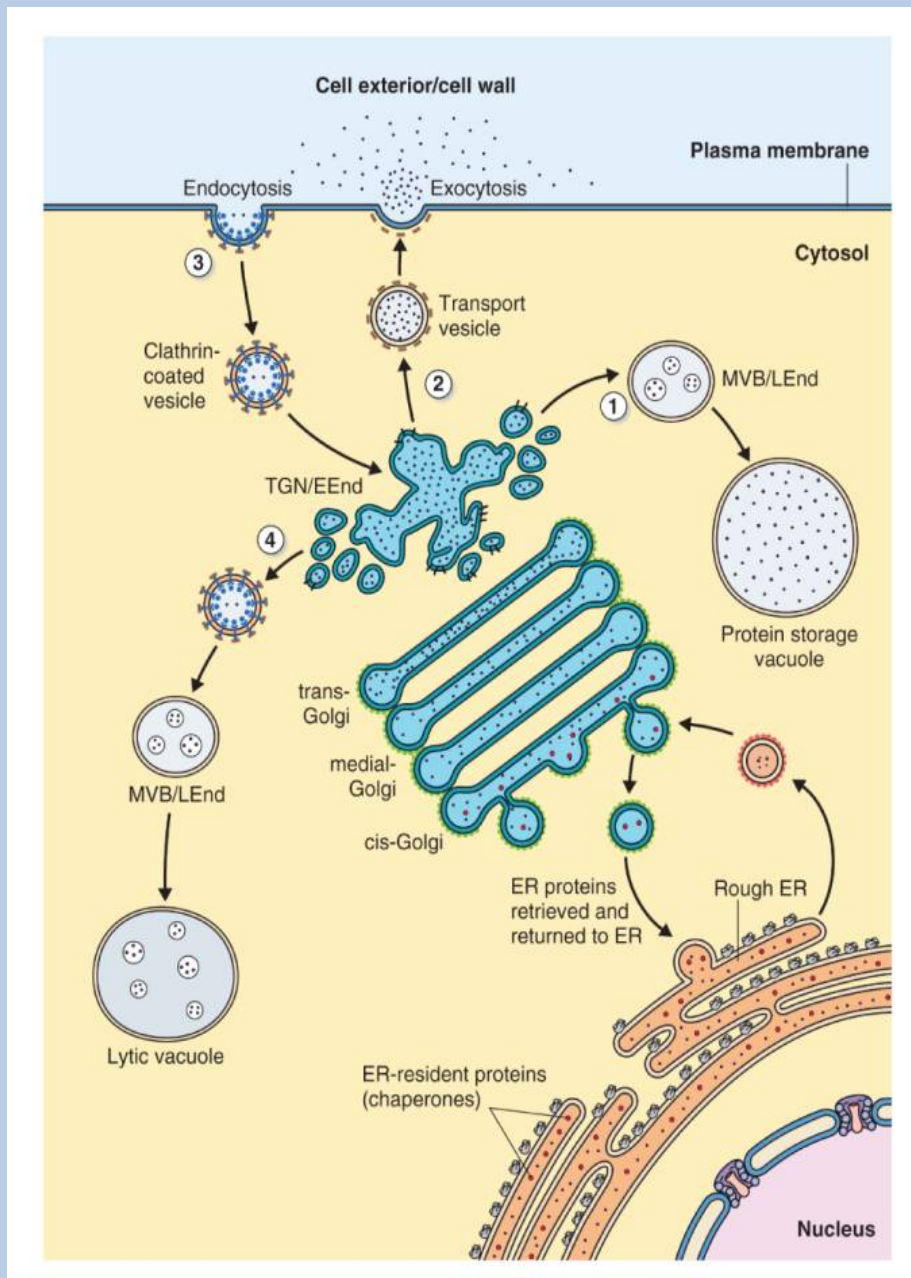
Vezikuly z TGN do vakuol nebo PM – pokryté clathrinem nebo jiným plášťovým proteinem



Vezikuly obsahující proteiny směřují k PM a fúzí 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

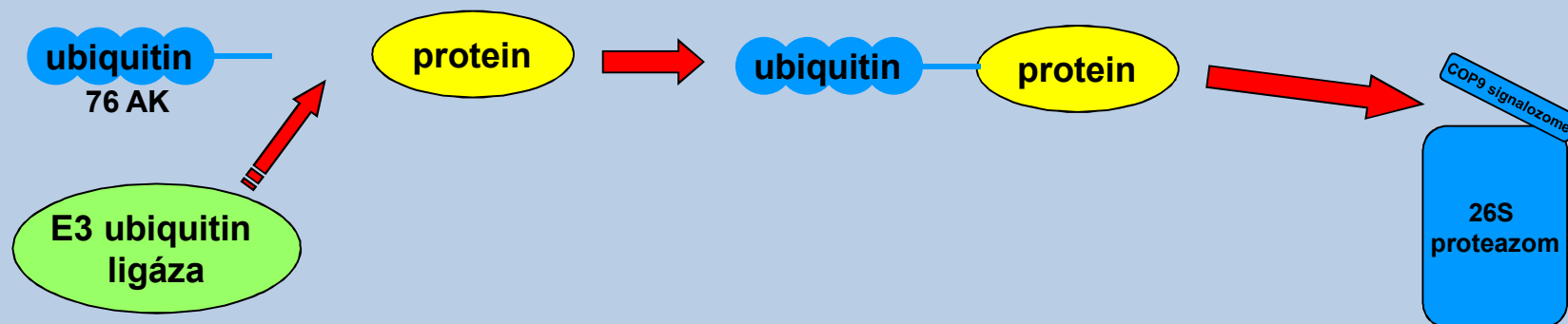


Vakuola

## 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

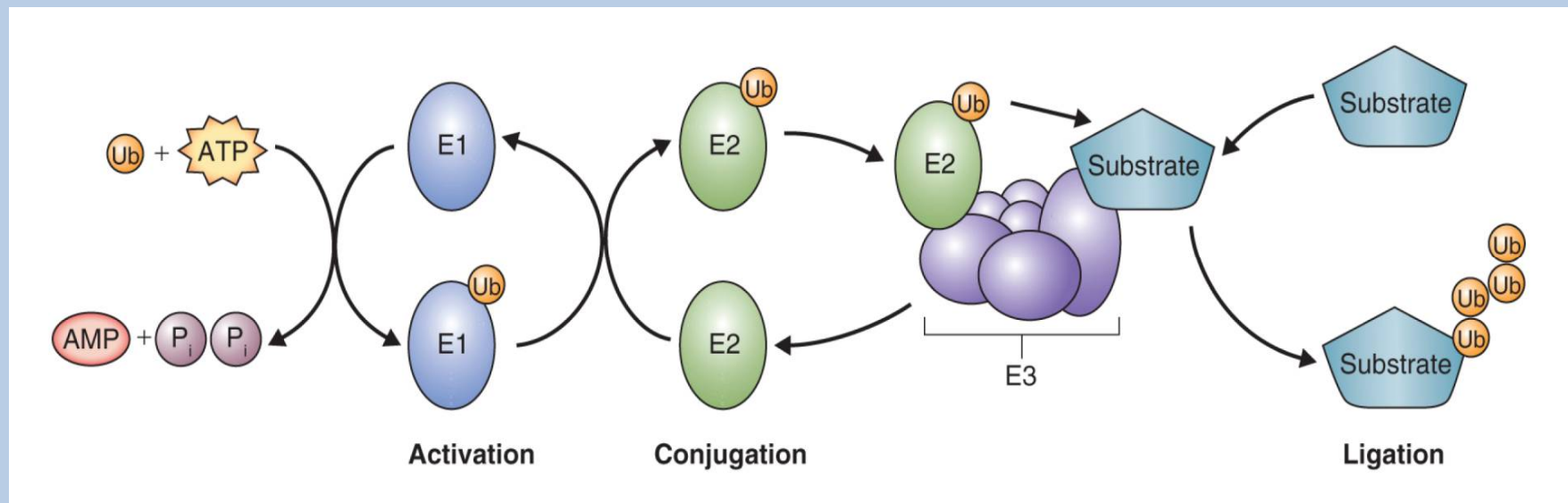
**Update 2018**

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

**E1 - Ub-aktivující enzymy**

**E2 - Ub-konjugační enzymy**

**E3 - Ub-liguující enzymy**

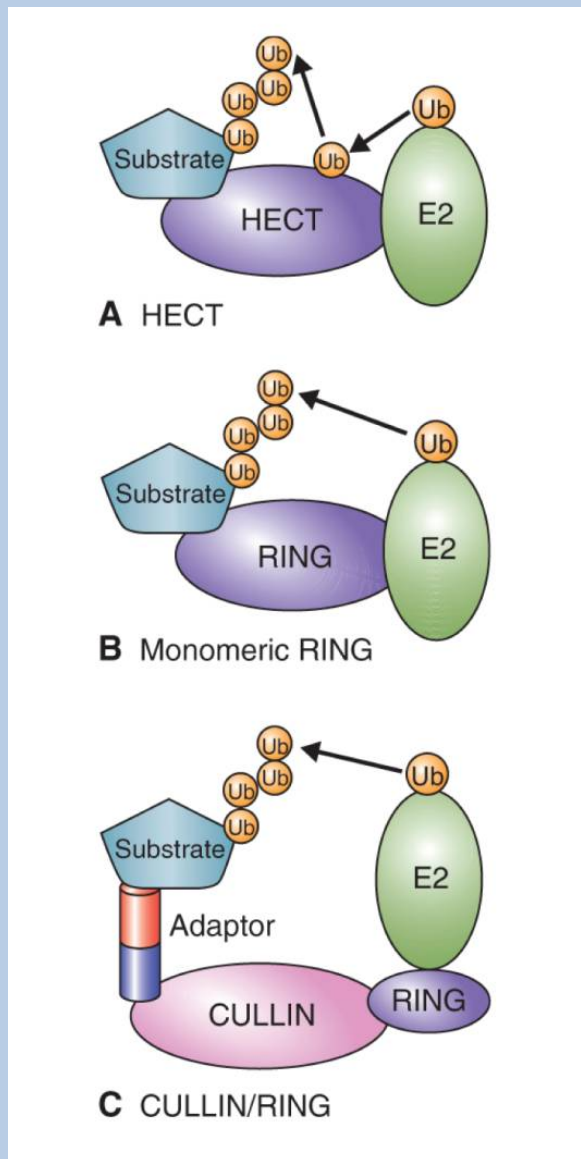


E1 aktivuje Ub použitím ATP: Ub je přenesen na E2. E1 katalyzuje tvorbu E1-Ub přechodné formy

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.**

- monomerické
- 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 ubiquitínované proteiny

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

**Proteazom:**

**20S core proteáza (CP) (barel)**

**+**

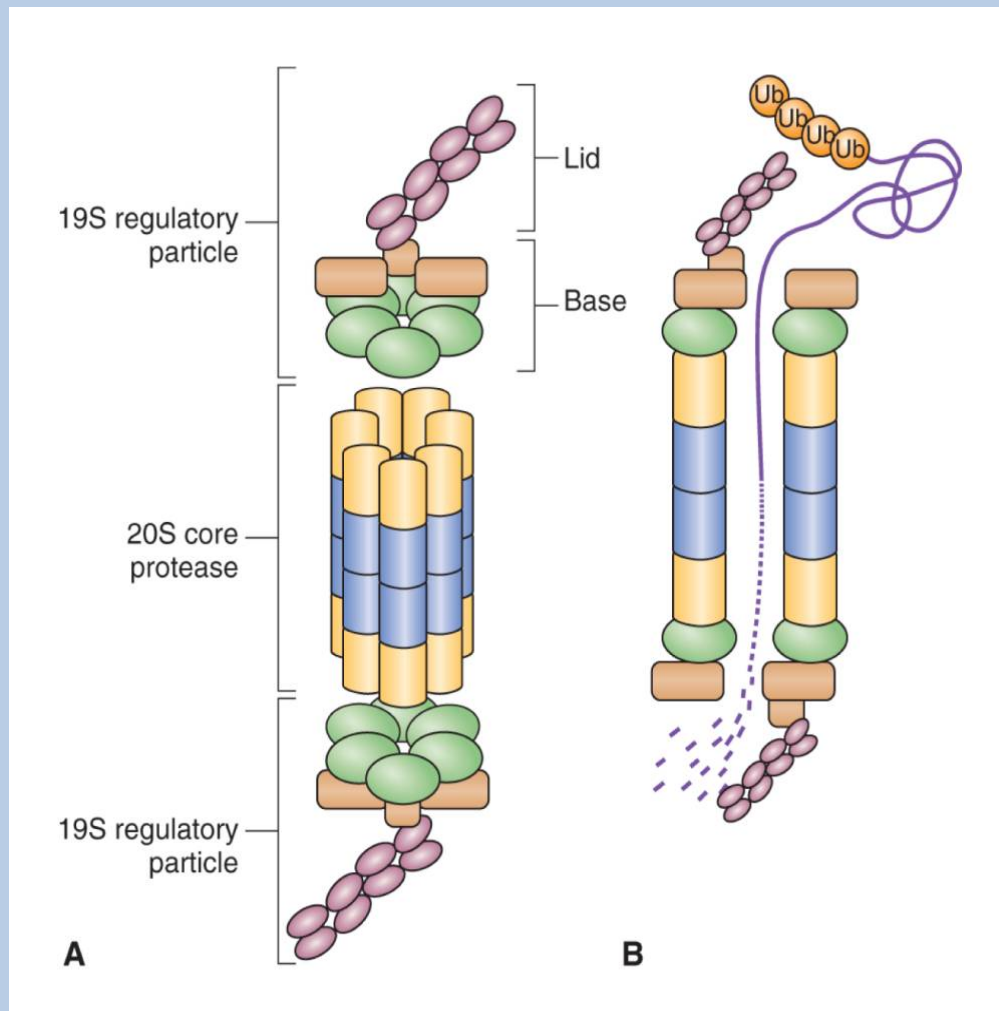
**19S regulační částice (RP)**

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

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

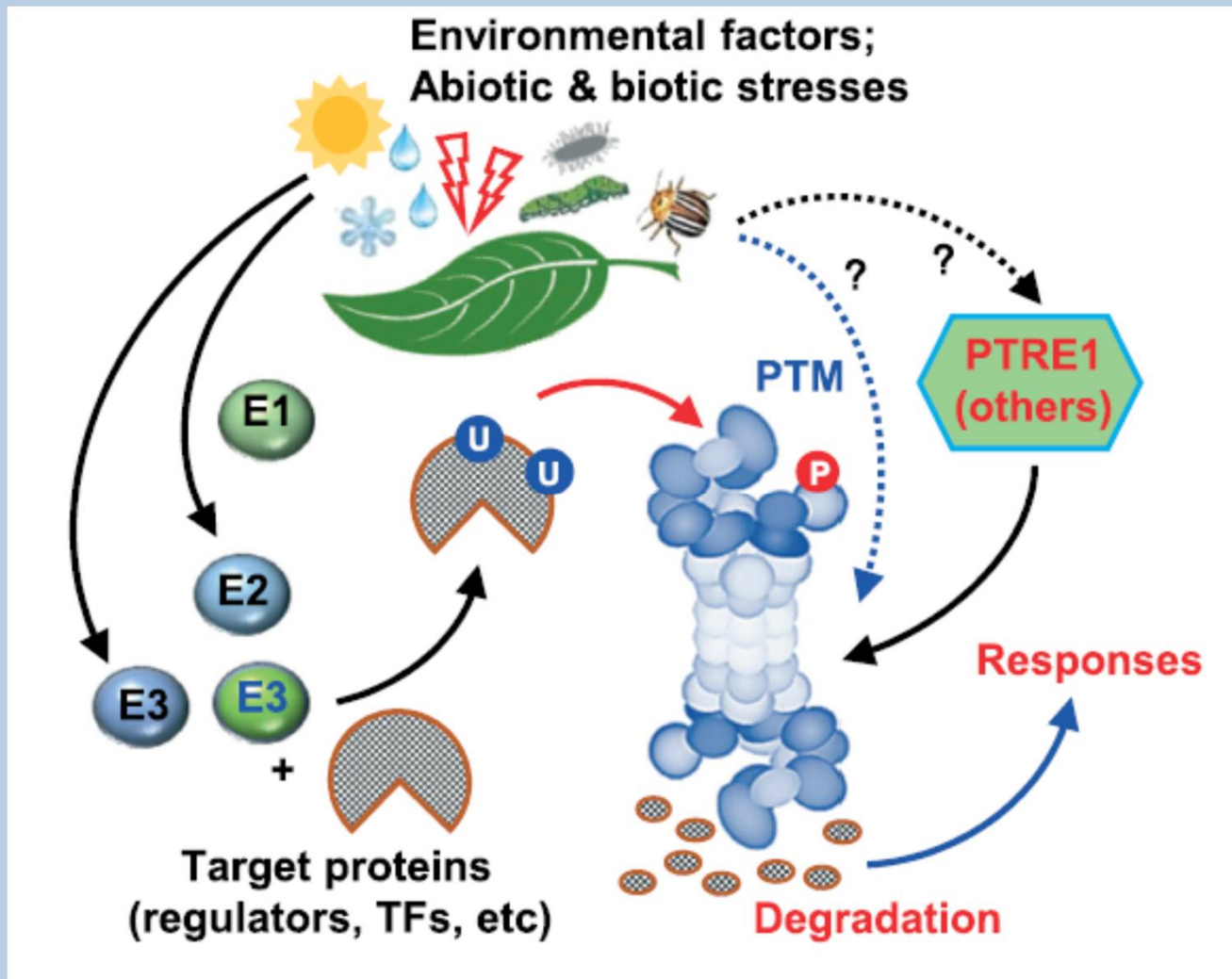
ER proteiny jsou rovněž degradovány cytoplazmatickým UbPS (proces **ERAD**)

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



Update 2019

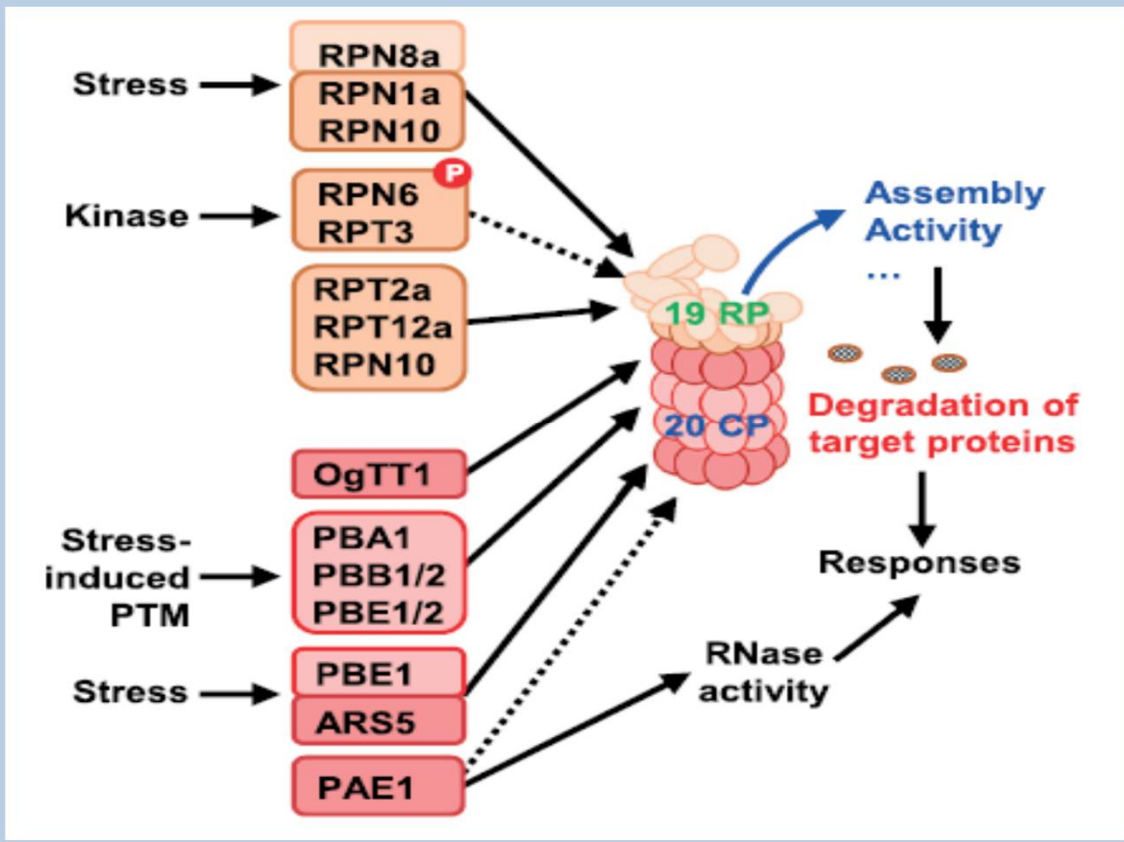
Xu F-Q and Xue H-W (2019) Plant Cell Environment 42: 2931-2944



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