

10) Membránový transport a přeměna energie na membránách

MBIOG 2023

1

Martin Fellner, LRR, PřF UP v Olomouci
Podle Alberts B et al. (2015) Molecular Biology of the Cell, 6th ed., Garland Science

Bruce Alberts

Membránový transport

2

Dvě skupiny membránových proteinů: Transportéry – konformační změny
Kanály – úzké póry, pasivní transport

TABLE 11-1 A Comparison of Inorganic Ion Concentrations Inside and Outside a Typical Mammalian Cell*

Component	Cytoplasmic concentration (mM)	Extracellular concentration (mM)
Cations		
Na ⁺	5-15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0.5	1-2
Ca ²⁺	10 ⁻⁴	1-2
H ⁺	7 × 10 ⁻⁸ (10 ^{-7.2} M or pH 7.2)	4 × 10 ⁻⁵ (10 ^{-7.4} M or pH 7.4)
Anions		
Cl ⁻	5-15	110

Rozdíly v koncentraci iontů přes membránu
↓
Potenciální energie ve formě elektrochemického potenciálu.

*The cell must contain equal quantities of positive and negative charges (that is, it must be electrically neutral). Thus, in addition to Cl⁻, the cell contains many other anions not listed in this table; in fact, most cell constituents are negatively charged (HCO₃⁻, PO₄³⁻, nucleic acids, metabolites carrying phosphate and carboxyl groups, etc.). The concentrations of Ca²⁺ and Mg²⁺ given are for the free ions; although there is a total of about 20 mM Mg²⁺ and 1-2 mM Ca²⁺ in cells, both ions are mostly bound to other substances (such as proteins, free nucleotides, RNA, etc.) and, for Ca²⁺, stored within various organelles.

Principy membránového transportu

3

Nenabitě molekuly mohou difundovat přes lipidovou dvojrstvu – čas, polarita, velikost molekuly.

Lipidová dvojrstva je nepropustná pro nabitě molekuly (ionty).

Category	Molecules	Permeability
HYDROPHOBIC MOLECULES	O ₂ , CO ₂ , N ₂ , steroid hormones	10 ¹ (high)
SMALL UNCHARGED POLAR MOLECULES	H ₂ O, urea, glycerol, NH ₃	10 ⁻¹ to 10 ⁻³
LARGE UNCHARGED POLAR MOLECULES	glucose, sucrose	10 ⁻⁴ to 10 ⁻⁶
IONS	H ⁺ , Na ⁺ , HCO ₃ ⁻ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , Mg ²⁺	10 ⁻¹⁰ to 10 ⁻¹⁴ (low)

Transportéry (přenašeče, permeázy) Kanály

4

Membránové proteiny – transport polárních molekul: ionty, cukry, aminokyseliny, nukleotidy, H₂O, buněčné metabolity; vícepróchodové transmembránové proteiny = polypeptidové řetězce několikrát překlenují lipidovou dvojrstvu => vzniká dráha lemovaná proteinem => hydrofilní molekuly přechází pře membránu bez kontaktu s hydrofobním vnitřkem lipidové membrány.

Transport přes kanály je rychlejší, než pomocí přenašeče; rychlost ~10⁸ iontů/s.

H₂O – schopna pomalu přechází přes PM, ale existují akvaporiny

Cystinurie – dědičné onemocnění, mutace v kanálu transportujícím aminokyselinu cystin z moči nebo ze stěva do krve – akumulace cystinu v moči – cystinové kameny

Pasivní a aktivní transport

5

Nenabitě molekuly – transport ve směru koncentračního gradientu = z vyšší koncentrace do nižší

Nabitě molekuly – navíc transport podle rozdílu v elektrickém potenciálu přes membránu.

Elektrický (membránový) potenciál
out +
in -160 mV

Elekrochemický potenciál

Aktivní transport – aktivita transportérů je řízena zdrojem metabolické energie: iontový gradient nebo hydrolyza ATP

Transportéry a aktivní membránový transport

6

Transportéry mění svoji konformaci a přenášejí transportovanou látku; nemění ji.

Transportéry mají jedno či více specifických míst pro vazbu substrátů.

V_{max} – max. rychlost transportu – transportér je saturovaný

K_m – odráží afinitu transportéru k rozpuštěné látce; K_m reakce je rovna koncentraci látky, při které je rychlost transportu poloviční.

Kompetitivní inhibitory vazebného místa – váží se na stejné vazebné místo, mohou být transportovány

Nekompetitivní inhibitory vazebného místa – váží se kdekoli a mění strukturu transportéru

Aktivní transport – 3 způsoby 7

Molekula transportovaná aktivně proti elektrochem. gradientu

Zdroje energie: LIGHT, ATP

- 1) Spojený transport – využití energie uložené v koncentračním gradientu
- 2) ATP-řízené pumpy – využití energie z hydrolyzy ATP
- 3) Světlem řízené pumpy – využití vstupní energie ze světla; bakterie, mitochondrie, chloroplasty

Struktura pasivních a aktivních transportérů je podobná => **evolučně společný předek**

Aktivní transport je řízen koncentračním gradientem iontů. 8

transported molecule, co-transported ion

UNIPORT, SYMPORT, ANTIPORT

coupled transport

Uniport – rychlost transportu je určena V_{max} a K_m

Spojený transport – přenos rozpustěné látky závisí striktně na transportu druhé látky; volná energie uvolněná během pohybu anorganického iontu po směru elektrochemického gradientu je použita jako **hnací síla (driving force)**.

Iontem řízené spojené transportéry = **sekundární aktivní transport**

ATP-řízené pumpy = **primární aktivní transport**

Stěvní a ledvinové epitelové buňky – transportéry řízeny Na^+ gradientem 9

EXTRACELLULAR SPACE, CYTOSOL, Na+ electrochemical gradient, glucose concentration gradient, plasma membrane

occluded-empty, outward-open, occluded-occupied, inward-open, occluded-empty

Na^+ má tendenci se pohybovat do buňky ve směru elektrochemického gradientu => cukr, aminokyseliny jsou vtaheny do buňky společně s Na^+ .

Neurotransmitery (uvolňovány nervovými buňkami, aby předávaly signál na synapse) jsou po svém uvolnění opět přijímány Na^+ symportéry. Tyto neurotransmiterové transportéry jsou důležitými cíli drog; kokain a antidepressiva je inhibují, a tak prodlužují signalizaci neurotransmiterů, které nejsou účinně odstraňovány.

Společné znaky – svazky 10 či více α šroubovic překlenujících membránu 10

leucine, Na+, N, C, pseudosymmetric conserved core

Krystalografická analýza - transportéry jsou vystavěny z obrácených opakování. Obě poloviny jsou vůči sobě převrácené = pseudosymetrické

Vazebná místa jsou přístupná průchody z jedné strany membrány, ale ne z druhé. Při přepínání mezi dvěma konformacemi transportní proteiny přechodně přijímají okludovanou (uzavřenou) konformaci, při které jsou oba průchody uzavřeny => zabraňuje hnacímu iontu a transportované látce procházet přes membránu bez doprovodu, což by vyčerpalo bezúčelně zásobu energie buňky.

Inward-open: otvor je směřován dovnitř buňky
Outward-open: otvor je směřován vně buňky

Transportéry v plazmatické membráně regulují cytozolické pH 7,2: Na^+H^+ exchanger – spojuje influx Na^+ s effluxem H^+ => pH v vně buňky = 5, pH uvnitř buňky = 7,2 => optimální fungování enzymů v lysozomech a v cytoplazmě

Transcelulární transport monosacharidů přes epitel tenkého střeva. 11

GIFT LUMEN, intestinal lumen, microvillus in apical domain, right junction, intestinal epithelium, extracellular fluid

Na^+ -driven glucose symport, transporter mediating passive transport of glucose, Na^+K^+ pump

low glucose concentration, high glucose concentration, low glucose concentration

Na^+ -spojené symportéry lokalizované v apikální doméně PM aktivně transportují glukózu (živiny) do buňky => vytvoření velkého koncentračního gradientu glukózy (velký „tlak akumulované glukózy“) => uniporty na bazální straně buňky dovolují glukóze opustit buňku pasivně ve směru gradientu.

Glukóza v extracelulární tekutině => transport do krve

Na^+ se dostává ven z buňky pomocí Na^+K^+ antiportu.

Existují tři skupiny ATP-řízených pump (transportních ATPáz). 12

Energie se uvolňuje hydrolyzou ATP na ADP a fosfát.

ions, small molecule, lipid bilayer, CYTOSOL, ATP, ADP + Pi

P-type pump, ABC transporter, V-type proton pump, F-type ATP synthase

- 1) **Pumpy P-typu:** během pumpovacího cyklu se sami fosforylují (mnoho pump odpovědných za udržování gradientu Na^+ , K^+ , H^+ a Ca^{2+}).
- 2) **ABC transportéry (ATP-Binding Cassette):** primárně pumpují malé molekuly přes PM.
- 3) **Pumpy V-typu:** vytvořeny z mnoha různých jednotek; přenáší H^+ do organel (lysozomy, synaptické vezikuly, vakuoly) a okyselňují je.

ATPázy typu F (ATP syntázy) – strukturně příbuzné V-typu; používají gradientu H^+ k řízení syntézy ATP z ADP a fosfátu; H^+ gradient se vytváří při oxidativní fosforylaci (aerobní bakterie, mitochondrie) nebo při fotosyntéze (chloroplasty) nebo pomocí světlem-řízených H^+ pump u halobakterií.

ATP syntáza – protony řízená turbína 13

Schéma enzymového komplexu - kulovitá **hlavová část (zelená)** je stacionární (stator), zatímco protonový tok napříč membránou pohání rotor (modrý), který se otáčí uvnitř statoru.

ATP syntáza - protonem řízená turbína poháněná tokem H⁺; rychlost otáčení = 8 000 otáček/min; vznik 3 molekul ATP za otáčku; tok H⁺ způsobuje rotaci stonku rotoru uvnitř stacionární hlavy, kde jsou umístěna katalytická místa, která sestávají ATP z ADP a P_i.

Trojozměrná struktura F₁F₀ ATP syntázy, zjištěná rentgenovou krystalografií.

ATPazová pumpa typu P – příklad udržování silného gradientu Ca²⁺ přes PM sarkoplazmatického retikula ve svalové buňce. 14

Volný Ca²⁺ v cytozolu = sekundární přenašeč signálu => zvýšení Ca²⁺ v cytozolu => zesílení extracelulárního signálu => důležité udržovat nízkou hladinu Ca²⁺ v cytozolu, aby i malý influx Ca²⁺ významně zvyšoval koncentraci volného Ca²⁺ v cytozolu.

Ca²⁺ transportér aktivně pumpuje Ca²⁺ ven z buňky a vytváří Ca²⁺ gradient => buňka udržuje strmý gradient Ca²⁺ přes PM.

Sarkoplazmatické retikulum (SR) - specializovaný typ endoplazmatického retikula - slouží jako intracelulární zásobárna Ca²⁺. 15

Akční potenciál => Depolarizace PM svalové buňky => Uvolnění Ca²⁺ ze SR do cytozolu => Stimulace svalové kontrakce

Ca²⁺ pumpa transportuje Ca²⁺ z cytozolu zpět do SR => udržování gradientu Ca²⁺

- 1) Vazba 2Ca²⁺ z cytozolu na vazebná místa
- 2) P z ATP přenesen na aspartát
- 3) ADP se disociuje a je nahrazen čerstvým ATP
- 4) Další konformační změna => otevření průchodu do lumenu => odevzdání 2Ca²⁺ do SR; 2Ca²⁺ nahrazeny 2H⁺ a molekulou H₂O
- 5) Stabilizace prázdného vazebného místa a uzavření průchodu do SR.
- 6) Hydrolyza labilní fosforyl-aspartátové vazby => počáteční konformace

PM pumpa Na⁺-K⁺ zakládá a udržuje gradienty Na⁺ a K⁺ přes PM 16

Koncentrace K⁺ je 10-30x **vyšší** uvnitř buňky než vně.

Koncentrace Na⁺ je 10-30x **nižší** uvnitř buňky než vně.

Na⁺-K⁺ pumpa (Na⁺-K⁺ ATPáza)

Transport živin do buňky

Živočišná buňka věnuje 1/3 své energie na pohánění této pumpy.

Transport 3Na⁺ proti 2K⁺ => elektrogenní pumpa = pohání čistý elektrický proud přes membránu => vznik elektrického potenciálu

ABC transportéry – největší skupina membránových transportních proteinů 17

Obsahují dvě vysoce konzervované **ATP domény** na cytozotické straně membrány: **ATP-Binding Cassettes**

Bakteriální ABC transportér

Vazba ATP na ATP domény => změna konformace => vazba rozpustitelné látky na vazebné místo

Hydrolyza ATP => uvolnění energie => změna konformace => uvolnění molekuly do cytozolu

Eukaryotický ABC transportér

Vazba rozpustitelné látky na vazebné místo

Vazba ATP na ATP domény => změna konformace => uvolnění molekuly do cytozolu

Hydrolyza ATP => uvolnění energie => změna konformace

E. coli – 78 genů (5 % bakteriálních genů) kóduje ABC transportéry; živočišné genomy kódují ještě větší počet ABC transportérů. 18

ABC transportéry – specifické; současně rozmanitost substrátů je vysoká:

- anorganické ionty
- peptidy
- proteiny
- aminokyseliny
- lipidy
- mono- a polysacharidy
- léčiva

První eukaryotický ABC transportér byl objeven kvůli jeho schopnosti transportovat hydrofobní léčiva ven z cytozolu: **MDR = Multidrug Resistance Protein** (P-glykoprotein).

MDR je přítomen ve zvýšené hladině v mnoha nádorových buňkách (až ve 40 % typch nádorů) => buněčná rezistence k lékům používaným při chemoterapii.

Parazitický prvok *Plasmodium falciparum* – způsobuje malárii. Vynul si rezistenci k antimalarióvému léčivu chloroquinu – amplifikace ABC transportéru, který transportuje chloroquin ven z buňky.

19

Kanály a elektrické vlastnosti membrán

Kanály – proteiny, které vytváří póry skrz plazmatickou membránu. Póry jsou úzké a selektivní a mohou se rychle otevírat a zavírat. Specificky transportují anorganické ionty – **iontové kanály**.

Výhoda kanálů – transportují až 100 milionů iontů/sekundu => rychlost 105x vyšší než u transportérů; **transport přes kanály je pasivní** = není spojen se zdrojem energie.

Funkce kanálů – dovolit specifickým anorganickým iontům Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ difundovat rychle ve směru elektrochemického gradientu přes lipidovou dvojvrstvu.

20

Akvaporíny – vodní kanály

Buňka je tvořena H₂O => pohyb H₂O přes buněčné membrány je zásadně důležitý pro život. Pohyb H₂O difúzí je pomalý, buňka však potřebuje regulovat příjem či výdej vody často mnohem rychleji => **existence akvaporinů**.

Rychlý pohyb H₂O – živočišné buňky: epitelové buňky v ledvinách, exokrinní buňky (produkují hormony)

Exokrinní žláza

21

Akvaporíny musí zabránit rozvratu iontového gradientu přes membránu => => selektivně propouští H₂O, ale blokuje pohyb iontů.

Studium 3D struktury odhalilo mechanismus selektivity akvaporinů:

Jedna strana póru je lemována **hydrofilními aminokyselinami (Asn)**, které poskytují přechodné vodíkové vazby molekulám vody; tyto vazby pomáhají seřadit procházející molekuly vody do jedné řady a orientovat je, když procházejí póry.

Hydrofóbní aminokyseliny lemuji druhou stranu póru. Pór je příliš úzký pro vstup jakýchkoli hydratovaných iontů. Tento design snadno vysvětluje, proč akvaporiny nemohou vést ionty K⁺, Na⁺, Ca²⁺, or Cl⁻.

22

Iontové kanály jsou iontově selektivní a kolísají mezi otevřeným a uzavřeným stavem

Rozdíl mezi kanály a akvaporíny – iontové kanály ukazují selektivitu => některé ionty projdou, jiné ne. Důvod? Póry jsou pro některé ionty úzké => neprojdou přes nejužší část kanálu – **selektivní filtr**.

23

Druhý rozdíl mezi kanály a akvaporíny – iontové kanály nejsou neustále otevřeny – otevírají se na základě podnětu – **specifický stimul**:

- **změna napětí** – napětím–řízené kanály
- **mechanický stres** – mechanicky–řízené kanály
- **vazba ligandů** – ligandem–řízené kanály; **neurotransmitery, ionty, nukleotidy**

Kanály jsou rovněž regulovány fosforylací a defosforylací kanálového proteinu.

Dosud identifikováno více než 100 typů iontových kanálů.

Vyskytují se u všech živočichů, rostlin a v mikroorganizmech


Existují K⁺ kanály, které se otevírají i v nestimulované klidové buňce => **únikové K⁺ kanály**. Činí plazmatickou membránu mnohem propustnější pro K⁺ než pro jiné ionty => mají zásadní úlohu při udržování membránového potenciálu napříč všemi plazmatickými membránami.

24

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.  25

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.

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 .

Gradient je směr růstu!

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

D_s pro ionty: $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ (= $50 \text{ } \mu\text{m}^2/2,5 \text{ s}$)
 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) 26
(energetická změna termodynamického systému spojená 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 27

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

Ionty, nabitě 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 ($\Delta\mu_s$). 28

Chemical potential in compartment A	Chemical potential in compartment B	Description
μ_s^A	μ_s^B	Passive transport (diffusion) occurs spontaneously down a chemical potential gradient. $\mu_s^A > \mu_s^B$
μ_s^A	μ_s^B	At equilibrium, $\mu_s^A = \mu_s^B$. Steady state
μ_s^A	μ_s^B	Active transport occurs against a chemical potential gradient. $\mu_s^A < \mu_s^B$. Free energy at least equal to $\mu_s^B - \mu_s^A$ must be supplied for movement to occur

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

Stabilní stav

Aktivní pohyb proti směru gradientu chemického potenciálu = proti směru růstu => potřeba energie

Pro nenabitý roztoky: Rovnice gradientu chemického potenciálu: 29

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

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

i = vnitřek buňky
 o = externí roztok

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: 30

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

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 31

Membrána více permeabilní pro K⁺ než Cl⁻

Initial conditions: $[KCl]_A > [KCl]_B$

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

Diffusion potential exists until chemical equilibrium is reached

Equilibrium conditions: $[KCl]_A = [KCl]_B$

At chemical equilibrium, diffusion potential equals zero

Rovnice gradientu elektrochemického potenciálu pro nabitý roztok: 32

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

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

Rozdíl v elektrickém potenciálu: ΔE

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

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 vnějškem buňky: gradient elektrochem. potenciálu $\Delta\mu_s = 0 =$ Klidový membránový potenciál = neexistuje čistý tok iontů přes membránu.

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

Prostorová struktura bakteriálního K⁺ kanálu ukazuje, jak iontové kanály fungují. 33

Iontové kanály kombinují iontovou selektivitu s vysokou vodivostí. K⁺ se pohybuje kanálem 10 000x rychleji, než Na⁺, i když ionty mají podobné průměry (0,133 nm a 0,095 nm). Jediná změna aminokyseliny v póru K⁺ kanálu v živočišné buňce vede ke ztrátě selektivity a buňka umírá.

Kanály – 4 identické transmembránové podjednotky – vytváří centrální pór přes membránu.

Podjednotka = 2 α -helixy - vychýleny směrem ven => kužel - široký konec směřuje ven z buňky, kde ionty K⁺ vystupují z kanálu.

Polypeptidový řetězec = **pórový helix** – spojuje dva helixy.

Selektivní smyčka – tvoří selektivní filtr – karbonylové atomy kyslíku

K⁺ specifita selektivního filtru v K⁺ kanálu 34

Ve vestibulu dochází k hydrataci iontů. V selektivním filtru ztrácí vodu a karbonylové kyslíky jsou umístěny tak, aby pojal dehydratovaný iont K⁺. Dehydratace iontu K⁺ vyžaduje energii, která je přesně vyvážena energií získanou interakcí iontu se všemi karbonylovými kyslíky, které slouží jako náhradní molekuly vody. Protože iont Na⁺ je příliš malý na to, aby interagoval s kyslíky, může vstoupit do selektivního filtru pouze s velkými energetickými náklady. Filtr tedy vybírá K⁺ ionty s vysokou specifitou.

Obecný princip otevírání a zavírání kanálů (gating) 35

Pohyb šroubovic v membráně – brání, nebo otevírají cestu pro pohyb iontů. Šroubovice se během gatingu naklání, rotují, nebo se ohybají. Nakláněním vnitřních helixů se pór na svém cytosolickém konci stahuje jako bránice. Objemný hydrofobní blok postranních řetězců aminokyselin blokuje malé otevření, které zůstává, a tak brání vstupu iontů do kanálu.

Mechanosenzitivní iontové kanály 36

Mnoho proteinů reaguje na mechanické síly (zvuk, dotek, tlak, smykové síly, gravitace), ale málo kandidátních proteinů je přímo mechanicky aktivovaných iontových kanálů. Tyto kanály jsou většinou vzácné.

Každá z okolo 15 tisíc individuálních vláskových buněk v Cortiho orgánu (uchového aparátu) má celkem pouze 50 až 100 mechanosenzitivních kanálů.

Špatně se identifikují – zabudovány do komplexních architektur.

Bakterie – reagují k osmotickému tlaku v hypotonickém prostředí – do buňky je transportována voda => buňka se zvětšuje => PM se napíná => otevření kanálu => výtok malých molekul (cukry, K⁺, aminokyseliny) => vyrovnávání osmotického prostředí

MscS – 7 stejných podjednotek – vytváří pór o průměru 1,3 nm

MscL – vytváří pór o průměru až 3 nm

37

Depolarizace plazmatické membrány

Na⁺ kanály aktivované změnou napětí – transport Na⁺ do buňky ve směru elektrochemického gradientu.

38

Buňky, které nejdůmyslněji využívají kanály, jsou neurony – nervové buňky.

Funkce – přenáší a předává signál; extrémně dlouhé

Různé signály - přenesené různými skupinami neuronů, ale forma signálu je vždy stejná = **změny elektrického potenciálu přes neuronovou plazma membránu.**

Signál se šíří, protože elektrický vzruch vytvořený v jedné části membrány se šíří do dalších částí.

Dlouhé neurony – signál musí být zesílen => aktivní signální mechanismus: depolarizace PM vlivem Na⁺ kanálů = změna napětí na PM => aktivace sousedních napětově řízených Na⁺ kanálů => opět depolarizace PM, atd. = **akční potenciál (nervový impuls) – vzniká tedy vlivem napětově řízených kationtových kanálů.**

39

Na⁺ kanál – jeden polypeptidový řetězec – obsahuje 4 strukturálně podobné domény

Doména obsahuje:

- 1) Napětový senzor** – S4 šroubovice – obsahuje pozitivně nabitě aminokyseliny – při depolarizaci je S4 přitahován k záporně nabitě straně PM => změna konformace => otevření kanálu
- 2) Centrální kanál se selektivním filtrem**

40

Na⁺ kanály mají mechanismus automatické inaktivace – kanály se znovu rychle zavírou, i když je membrána depolarizovaná. V tomto inaktivovaném stavu kanály nejsou schopny se znovu otevřít, dokud se membránový potenciál nevrátí na svoji počáteční negativní hodnotu.

Doba zotavení z inaktivace – **refrakterní perioda** – omezuje rychlost opakovaného spouštění neuronu

3 odlišné stavy kanálu: zavřený, otevřený, inaktivovaný

41

Depolarizace jedné části membrány axonu vyvolá depolarizaci sousedních oblastí membrány, které prochází stejným cyklem.

↓

Šíření akčního potenciálu ve vláknech z počátečního místa depolarizace přes celou PM.

42

Myelinace zvyšuje rychlost a účinnost šíření akčního potenciálu v nervových buňkách.

Axony neuronů u obratlovců jsou izolované **myelinovým pouzdrem** - zvyšuje rychlost přenosu akčního potenciálu (izolace axonální membrány – zabraňuje unikání proudu).

Roztroušená skleróza – poškození myelinové pochvy v částech CNS => propagace nervového vzruchu zpomalena nebo přerušena

Myelin je tvořen gliovými buňkami:

- Schwannovy buňky – myelinují axony periferních nervů
- Oligodendrocyty - myelinují axony v CNS

Ranvierovy uzly – pravidelné přerušeni myelinové vrstvy – soustředěny Na⁺ kanály – akční potenciál se šíří podél myelinovaného axonu skákáním z uzlu na uzel = **saltační (skokové) vedení**

Saltační (skokové) vedení – 2 výhody: - akční potenciál se šíří rychleji
- šetří se metabolická energie

(C) axon, glial cell, node of Ranvier, myelin sheath

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 cytozolicých regulatorů

Analýza transportní aktivity malých buněk (velké buňky – mikroelektrody)

(A) gentle suction, glass micropipette, tight seal, ion channels, cell membrane, CYTOSOL

(B) pull micropipette away from cell to detach the patch of membrane

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

<https://www.youtube.com/watch?v=a9GLBT3LY1c> (6:36-8:31)

Transmitterem řízené iontové kanály přeměňují chemický signál na elektrický v chemických synapsích.

Neuronové signály jsou přenášeny z buňky do buňky na **synapsích**.

Akční potenciál v presynaptické buňce => depolarizace membrány otevře napětově řízené Ca²⁺ kanály na presynaptické membráně.

Uvolnění neurotransmitérů ze synaptických vezikul do **synaptické štěrbiny**.

Vazba neurotransmitéru na transmitterem-řízené kanály (ionotropní receptory) => elektrická změna v postsynaptické buňce.

Neurotransmitery jsou po navázání na receptor rychle odstraněny a rozloženy enzymaticky nebo jsou vychytávány presynaptickým nervovým zakončením.

RESTING CHEMICAL SYNAPSE

ACTIVE CHEMICAL SYNAPSE

Transmitterem-řízené kanály jsou relativně neaktivní k membránovému potenciálu => nejsou schopny produkovat samozesilující buzení.

Transmitterem-řízené kanály produkují lokální zvýšení permeability => změny v membránovém potenciálu – odstupňované podle množství neurotransmitéru uvolněného na synapsi.

Excitační neurotransmitery – otevírají kationtové kanály – vtok Na⁺ nebo Ca²⁺ => depolarizace postsynaptické membrány => vznik akčního potenciálu

Inhibiční neurotransmitery – otevírají Cl⁻ (vtok) nebo K⁺ (výtok) kanály => ztláčení depolarizace postsynaptické membrány => potlačení akčního potenciálu

Stejný transmitter může být excitační nebo inhibiční podle toho, kde je uvolňován, k jakému receptoru se váže a v závislosti na iontových podmínkách.

Acetylcholin – excitační i inhibiční, podle receptoru

Glutamát, serotonin – většinou excitační transmitter

GABA, glycín – většinou inhibiční transmitter

Acetylcholinové receptory v neuromuskulárním spojení jsou transmitterem řízené kationtové kanály.

Acetylcholinový receptor se vyskytuje v buňkách kosterního svalstva.

Kanál je otevřen acetylcholinem uvolněným z nervového zakončení na **neuromuskulárním spojení** = chemická synapse mezi motorickým neuronem a buňkou kosterního svalstva.

Acetylcholinové receptory jsou hustě umístěny na PM svalové buňky na neuromuskulárním spojení (20 tisíc receptorů/cm²)

muscle cell, myelinated axon, nerve, body of Schwann cell, axon terminals

Acetylcholinový receptor kosterního svalstva – pentamer = 5 transmembránových proteinů; 2 jednoho typu, 3 druhého typu 49

5 podjednotek receptoru – uspořádané v prstenci => vytvoření vodou naplněného kanálu

Vazba 2 molekul acetylcholinu => rotace dvoušroubovic lemujících pór (= konformační změny) => narušení kruhu hydrofobních aminokyselin, který blokuje tok iontů v uzavřeném stavu => **otevření kanálu**; negativně nabitě aminokyseliny vylučují z transportu záporné ionty a povzbuzují naopak transport kladných iontů Na⁺, K⁺, Ca²⁺; otevření kanálu vede především k masivnímu proudu Na⁺ do svalové buňky => **depolarizace PM = signál ke kontrakci**.

Uvolnění transmiteru z receptoru => kildový stav kanálu

Terčem léků:

- 1) Transmitterem řízené kanály**
 - operace – uvolnění svalstva
 - léčba nespavosti – prášky na spaní se vážou na GABA receptory
- 2) Na⁺- řízené symportéry**
 - blokáce Na⁺- řízených symportérů => zpomalení vychytávání transmiterů => prodloužení účinků
 - léčba úzkosti, depresí, schizofrenie

Neuromuskulární přenos (nervový impuls stimuluje svalovou buňku) zahrnuje sekvenci aktivaci pěti různých sad iontových kanálů. 50

- 1) Nervový impuls dosáhne nervového zakončení => depolarizace PM nervového zakončení => dočasné otevření napěťově řízených Ca²⁺ kanálů. Protože koncentrace Ca²⁺ vně buněk je více než 1000krát vyšší než koncentrace vnitřní Ca²⁺, Ca²⁺ proudí do nervového zakončení => zvýšení koncentrace Ca²⁺ v cytozolu nervového zakončení => uvolnění acetylcholinu exocytózou do synaptické štěrbině.
- 2) Uvolněný acetylcholin – vazba na acetylcholinový receptor na PM svalových buněk => přechodné otevření Na⁺ kanálů => influx Na⁺ způsobuje depolarizaci PM.
- 3) Lokální depolarizace => otevření napěťově řízených Na⁺ kanálů v PM => více Na⁺ vstupuje do buňky => další depolarizace membrány => otevření sousedních napěťově řízených Na⁺ kanálů => samo-propagující depolarizace (akční potenciál) - zahrnuje celou plazmatickou membránu.
- 4) Generalizovaná depolarizace PM svalových buněk aktivuje napěťově řízené Ca²⁺ kanály v příčných tubulech této membrány (T-tubuly).
- 5) Ca²⁺ kanály v přilehlé oblasti membrány sarkoplazmatického retikula (SR) se přechodně otevřou => uvolnění Ca²⁺ ze SR do cytozolu. Membrány T-tubulu a SR jsou těsně spojeny se dvěma typy kanálů spojených dohromady ve specializované struktuře, ve které aktivace napěťového citlivého kanálu Ca²⁺ v plazmatické membráně T-tubulu způsobuje změnu konformace kanálu Ca²⁺ v plazmatické membráně SR => Ca²⁺ kanál se otevírá a umožňuje proudit Ca²⁺ z lumenu SR do cytoplazmy => náhle zvýšení koncentrace cytoplazmatického Ca²⁺ => kontrakce myofibrilů ve svalové buňce.

Jednotlivý neuron je složité výpočetní zařízení. 51

Neuron přijímá vstupy z tisíce dalších neuronů a tvoří synapse s mnoha tisíci dalšími buňkami. Nervová zakončení vytváří synapse a téměř úplně pokrývají tělo buňky a dendrity. Motorický neuron musí spojit informace přijaté ze všech těchto zdrojů a reagovat buď vytvoření akčního potenciálu podél axonu, nebo zůstat v klidu.

Přeměna energie na membránách 52

Aby si buňky udržely svůj vysoký stupeň organizace ve vesmíru, který neustále směřuje k chaosu, potřebují neustále dostatek **ATP**. V eukaryotických buňkách se většina ATP, která pohání procesy, vyrábí specializovanými a membránou uzavřenými organelami, které **přeměňují energii**.

Mitochondrie - ve všech buňkách zvířat, rostlin a hub - spalují molekuly potravy za vzniku ATP **oxidativní fosforylací**.

Chloroplasty - pouze v rostlinách a zelených řasách - využívají sluneční energii k produkci ATP **fotosyntézou**.

Mitochondrie a chloroplasty obsahují interní membránové systémy – obsahují sady membránových proteinových komplexů, které spolupracují na produkci buněčné ATP. 53

Bakterie – stejné komplexy, ale nacházejí se na buněčné plazmatické membráně

Orgány přeměňující energii v dnešních eukaryotech pocházejí z prokaryotických buněk, které byly endocytovány během evoluce eukaryot. 54

Základní mechanismus přeměny energie v mitochondriích, chloroplastech a prokaryotech

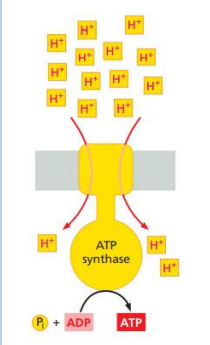
Stejný základní mechanismus využití energie = chemiosmotické spojení = spojení mezi reakcemi, které generují ATP a procesy membránového transportu (chemiosmotické)

2 fáze chemiosmotického procesu:

1. fáze chemiosmotického procesu: vysokoenergetické **elektrony (e⁻)** (pocházející z oxidace molekul potravy nebo z pigmentů excitovaných slunečním zářením) jsou přeneseny proteinovými komplexy k tomu určenými. Přenos e⁻ => uvolnění energie, která je využita k čerpání protonů H⁺ => vznik elektrochemického gradientu přes membránu = H⁺ gradient – **motorická síla**

55

2. fáze: H⁺ proudí zpět ve směru svého elektrochemického gradientu přes membránový protein stroj – ATP syntázu – katalyzuje produkci ATP z ADP a anorganického fosfátu (Pi). ATP syntáza funguje jako turbína v membráně, pohaněná H⁺, aby syntetizovala ATP.

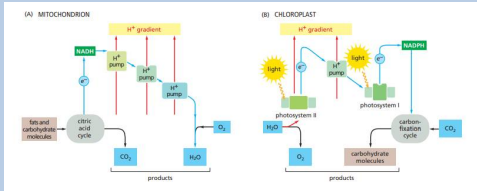


Energie z potraviny nebo fotosyntézy
 ↓
 Vysokoenergetické e⁻
 ↓
 Přenos e⁻
 ↓
 Uvolnění energie
 ↓
 Čerpání H⁺
 ↓
 Elektrochemický gradient H⁺
 ↓
 ATP

56

Elektrony se pohybují proteinovými komplexy v biologických systémech prostřednictvím pevně vázaných kovových iontů nebo jiných nosičů, které je snadno přijímají a uvolňují, nebo pomocí speciálních malých molekul, které je vychytávají na jednom místě a přenášejí je na jiné.

Mitochondrie – první nosič **NAD⁺** (Nikotinamid adenin dinukleotid) - ve vodě rozpustná malá molekula – přijímá 2 e⁻ a 1 H⁺ => NADH. NADH – přenos e⁻ do vnitřní mitochondriální membrány – e⁻ z energeticky bohatého NADH jsou předávány z jednoho komplexu membránových proteinů do dalšího. V každém kroku přecházejí na sloučeninu s nižší energií, dokud nedosáhnou konečného komplexu – spojení s molekulárním kyslíkem (O₂) => H₂O. **Energie uvolněná v každém kroku pohání H⁺ pumpy** ve vnitřní mitochondriální membráně, využívající 3 různé membránové proteinové komplexy => **protonová motorická síla**, kterou využívá ATP syntáza k produkci **ATP = univerzální zdroj energie ve celé buňce**.

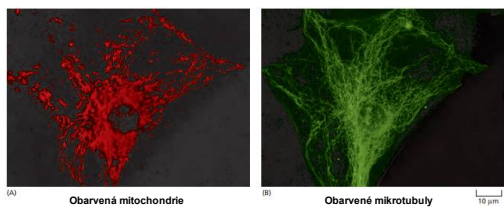


(A) MITOCHONDRION (B) CHLOROPLAST

Mitochondrie i chloroplasty využívají řetězec přenosu e⁻ k produkci H⁺ gradientu, který pohání reakce, které jsou pro buňku kritické. Chloroplasty však vytvářejí O₂ a přijímají CO₂, zatímco mitochondrie spotřebovávají O₂ a uvolňují CO₂.

Mitochondrie

57



(A) Obarvená mitochondrie (B) Obarvené mikrotubuly

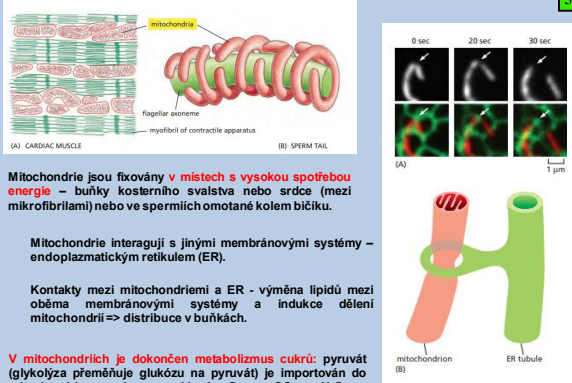
Mitochondrie zaujímají až 20% cytoplazmatického objemu eukaryotické buňky.

Velikost v průměru 0,5 až 1 μm – dynamické a plastické struktury

Neustále mění tvar, dělí se a spojují se.

Jsou často spojeny s mikrotubulárním cytoskeletem, který určuje jejich orientaci a distribuci v různých typech buněk.

58



(A) CARDIAC MUSCLE (B) SPERM TAIL

Mitochondrie jsou fixovány v místech s vysokou spotřebou energie – buňky kosterního svalstva nebo srdce (mezi mikrofibrilami) nebo ve spermích omotané kolem bíčků.

Mitochondrie interagují s jinými membránovými systémy – endoplazmatickým retikulem (ER).

Kontakty mezi mitochondriemi a ER - výměna lipidů mezi oběma membránovými systémy a indukce dělení mitochondrií => distribuce v buňkách.

V mitochondriích je dokončen metabolismus cukrů: pyruvát (glykolýza přeměňuje glukózu na pyruvát) je importován do mitochondrie a nakonec oxidován O₂ na CO₂ a H₂O => vyrobeno 15krát více ATP z cukru než samotnou glykolýzou.

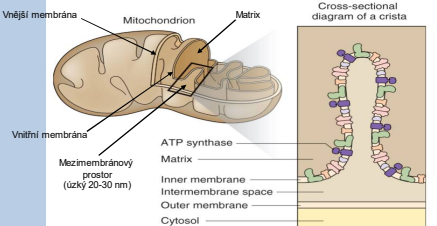
Mitochondrie mají vnější a vnitřní membránu.

59

Vnější membrána – obsahuje enzymy; vysoce permeabilní (až 5000 daltonů); poriny – proteinové komplexy vytvářející vodní kanály – transport iontů a malých molekul

Vnitřní membrána – obklopuje mitochondriální matrix; vysoce zvrásněná, vytváří tubulární křivky; obsahuje ATP syntázu a je místem elektronového transportního řetězce; velmi nízká permeabilita => specifické transportéry

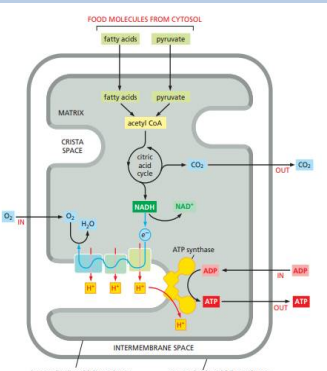
Matrix – obsahuje rozpustné enzymy, mitochondriální DNA a ribozomy



Vnější membrána
 Vnitřní membrána
 Matrix
 Mezimembránový prostor (úzký 20-30 nm)
 ATP synthase
 Inner membrane
 Intermembrane space
 Outer membrane
 Cytosol

Citrátový (Krebsův) cyklus v matrix produkuje NADH.

60



FOOD MOLECULES FROM CYTOSOL
 fatty acids, pyruvate
 fatty acids, pyruvate
 acetyl CoA
 citric acid cycle
 NADH, NAD⁺
 ATP synthase
 ADP, ATP
 H₂O, O₂
 CO₂
 INTERMEMBRANE SPACE
 inner mitochondrial membrane
 outer mitochondrial membrane

Matrix – hlavní pracovní část mitochondrie

Mitochondrie používají jako palivo mastné kyseliny (z tuků) a pyruvát (z glukózy).

Acetyl CoA – metabolický meziprodukt

Acetylátové skupiny (CH₂CO-) v acetyl CoA jsou oxidovány v citrátovém cyklu => CO₂

Energie vazby uvolněné oxidací je ve formě e⁻ nesených NADH => přenos e⁻ z matrix do elektronového transportního řetězce na vnitřní membráně.

Energie nesená NADH elektrony je zde přeměněna na energii fosfátové vazby v ATP.

61

Chemiosmotický proces spojuje oxidační energii s produkcí ATP.

Cyklus kyseliny citronové sám o sobě kyslík nevyužívá. Pouze poslední krok oxidativního metabolismu spotřebovává přímo molekulární kyslík (O₂).

Veškerá energie z metabolisme sacharidů, tuků a dalších potravin je uložena ve formě energeticky bohatých sloučenin (NADH), které přivádí e⁻ do dýchacího řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně.

Elektrony, nesené NADH, se spojují s O₂ na konci dýchacího řetězce a vytvoří vodu.

Energie uvolněná během série přenosu e⁻ z NADH na O₂ je využita na vnitřní membráně k vytvoření elektrochemického gradientu, který řídí konverzi ADP + Pi na ATP.

Oxidativní fosforylace

62

Spalování vodíku = H₂ + 1/2 O₂ => H₂O – exergonická reakce = uvolňuje se teplo => rozdělena do malých kroků => uloženi poloviny celkové energie.

Matrix:

$$2 \text{H}^+ + 2 \text{e}^- = \text{H}_2$$

$$+ \text{O}_2$$

$$\downarrow$$

$$\text{H}_2\text{O}$$

H₂O - molekula s velmi nízkou energií => velmi stabilní => H₂O může sloužit jako donor e⁻ pouze tehdy, když je vynaloženo velké množství energie z vnějšího zdroje na jeho štěpení na H⁺, e⁻ a O₂ = fotosyntéza, zdrojem energie je slunce.

63

Redoxní potenciál je měřítkem afinity elektronů.

Při chemických reakcích jsou všechny e⁻ odstraněné z jedné molekuly vždy předány jiné, takže kdykoliv je **jedna molekula oxidována (ztratil e⁻)**, další je **redukována (získala e⁻)**. Stejně jako u jakékoliv jiné chemické reakce, tendence těchto redoxních reakcí probíhat spontánně závisí na změně volné energie (ΔG) pro přenos e⁻, která zase závisí na relativní afinitě dvou molekul k elektronům.

Přenosy elektronů poskytují většinu energie pro život – je dobré je pochopit.

Redoxní pár: NADH a NAD⁺; NADH se převádí na NAD⁺ ztrátou elektronů v reakci:

$$\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$$

NADH – silný donor e⁻
 NAD⁺ – slabý příjemce e⁻

Sklon k přenosu e⁻ z redoxního páru lze měřit experimentálně – vytvoření elektrického obvodu s druhým redoxním párem (referenčním standardem) – měříme rozdíl napětí mezi nimi = **redox potenciál**.

Elektrony se spontánně pohybují z redoxního páru NADH/NAD⁺ s nižším redox potenciálem (nižší afinitou k e⁻) k redoxnímu páru O₂/H₂O s vyšším redox potenciálem (vyšší afinitou k e⁻).

NADH – vhodný donor e⁻
 O₂ – vhodný příjemce e⁻

64

Ionty přechodných kovů a chinony snadno přijímají a uvolňují elektrony.

Vlastnosti membránových proteinových komplexů transportujících e⁻ závisí na kofaktorech přeneslých e⁻ – **přechodné kovy Fe, Cu, Ni, Mn** – vázané na proteinech. Ionty těchto kovů existují v několika různých oxidačních stavech => snadno přijímají či odevzdávají e⁻. Ionty jsou často zbarvené.

Cytochromy – rodina proteinů obsahující hemovou skupinu – atom Fe je držen 4 atomy N v rozích čtverce z porfyrinového kruhu – nesou 1 e⁻.

Železo-sírné proteiny – 2 nebo 4 atomy Fe jsou navázány na stejný počet atomů S a cysteinové postranní řetězce => vytvoří se **železo-sírnaté shluky** – nesou 1 e⁻.

65

Ubichinon (chinon, koenzym Q) – nejjednodušší kofaktor, není vázán vždy na protein; malá hydrofobní molekula => volně se pohybuje v lipidové dvojvrstvě; přijímá nebo daruje jeden nebo dva e⁻; po redukci vychytává H⁺ z vody spolu s každým e⁻.

Mitochondriální transportní řetězec – 6 cytochromových hemů, 8 klastřů Fe + S, 3 atomy Cu, flavinový mononukleotid a ubichinon – přenáší e⁻ z NADH na O₂. Celkem 60 různých polypeptidů – 3 velké komplexy membránových proteinů.

66

NADH přenáší své elektrony na O₂ prostřednictvím tří velkých enzymových komplexů umístěných ve vnitřní membráně mitochondrie.

NADH dehydrogenáza – největší z komplexů; přijímá e⁻ z NADH a předává je přes flavinový mononukleotid a 8 Fe-S klastřů k ubichinonu Q; redukován ubichinol přenáší e⁻ na cytochrom c reduktázu.

Cytochrom c reduktáza – funguje jako dimer; každý monomer obsahuje 3 cytochromové hemy a shluk Fe+S; přijímá e⁻ z ubichinolu a přenáší je na cytochrom c (malý protein v prostoru křisty); cytochrom c přenáší e⁻ jeden po druhém na cytochrom c oxidázu.

Cytochrom c oxidáza – obsahuje 2 cytochromové hemy a 3 atomy Cu; přijímá e⁻ z cytochromu c a předává je molekulárnímu O₂; k přeměně 1 molekuly O₂ na H₂O je potřeba 4 e⁻ a 4 H⁺.

NADH dehydrogenázový komplex obsahuje samostatné moduly pro přenos elektronů a pumpování protonů. 67

NADH dehydrogenáza – největší z komplexů; přijímá e⁻ z NADH a předává je přes flavinový mononukleotid a 8 Fe-S klastřů k ubiquinonu; redukovány ubiquinol přenáší e⁻ na cytochrom c reduktázu.

NADH dehydrogenázový komplex – 40 různých proteinových podjednotek; tvar L s hydrofobním membránovým ramenem a hydrofilním ramenem v matrixi

Přenos e⁻ a čerpání H⁺ jsou fyzicky odděleny v komplexu NADH dehydrogenázy. Přenos e⁻ probíhá v rameni matrixi a čerpání H⁺ v rameni membrány. NADH se uvolní v blízkosti špičky ramene matrixi, kde přenáší své e⁻ prostřednictvím navázaného flavinového mononukleotidu do železno-sírových klastřů, který se táhne po rameni a funguje jako dráha, který přenáší e⁻ do molekuly ubiquinonu vázané na protein. Přenos e⁻ na chinon spouští protonovou translokaci v sadě protonových pump v membránovém rameni. Aby k tomu došlo, musí být oba procesy energeticky a mechanicky propojeny. Mechanické spojení zajišťuje 6 nm dlouhá, **amfipatická α šroubovice**, která probíhá paralelně s povrchem membrány na straně matrixi ramene membrány. Redukce každého chinonu přenosem 2 e⁻ vede k odčerpání čtyř H⁺ z matrixi do prostoru křisty => protonová síla.

Cytochrom c reduktáza vycytává a uvolňuje protony na opačné straně membrány křisty, takže pumpuje protony. 68

Když molekula ubiquinonu přijme 2 e⁻, tak přijme i 2 H⁺ => **ubichinol(QH₂)**

Q cyklus

V dýchacím řetězci ubiquinol přenáší e⁻ z NADH dehydrogenázy na **cytochrom c reduktázu**. Protože jsou H⁺ v této molekule QH₂ vycytávány z matrixi a uvolňovány na opačné straně membrány křisty, jsou na 2 přenesené e⁻ přeneseny dva H⁺ z matrixi do prostoru křisty => **příspěvek k protonové síle**.

Cytochrom c reduktáza – velký soubor podjednotek membránových proteinů. Tři podjednotky tvoří katalytické jádro – přenáší e⁻ z ubichinolu na cytochrom c 69

Cytochrom c reduktáza – velký soubor podjednotek membránových proteinů. Tři podjednotky tvoří katalytické jádro – přenáší e⁻ z ubichinolu na cytochrom c

Q cyklus - propracovaný mechanismus redoxní smyčky 70

Zatímco jeden z e⁻ přijatých z každé molekuly QH₂ je přenesen z ubichinonu přes komplex do nosného proteinu cytochromu c, druhý e⁻ je recyklován zpět do zásoby chinonu.

Cyklus Q zvyšuje celkové množství redoxní energie, která může být uložena v elektrochemickém H⁺ gradientu. Výsledek: na každý e⁻, který je přenesen z NADH dehydrogenázy do cytochromu c, jsou přes membránu křisty pumpovány 2 H⁺.

Komplex cytochrom c oxidázy pumpuje protony a redukuje O₂ pomocí centra katalytického železa a mědi. 71

Konečným článkem mitochondriálního e⁻ transportního řetězce je **cytochrom c oxidáza**. Komplex cytochrom c oxidázy přijímá e⁻ z rozpustného elektronového nosiče cytochromu c.

O₂ má vysokou afinitu k e⁻ => O₂ může při jeho redukcí za vzniku H₂O uvolnit velké množství volné energie. **Vývoj buněčného dýchání, při kterém se O₂ přeměňuje na vodu, tedy umožnil organismům využít mnohem více energie, než lze získat z anaerobního metabolismu.**

Reakce cytochrom c oxidázy představuje asi 90 % celkového příjmu kyslíku ve většině buněk. Tento proteinový komplex je proto klíčový pro veškerý aerobní život.

Pumpování H⁺ vyžaduje nejméně tři odlišné konformace proteinu pumpy. 72

Alosterické změny konformace proteinu řídí transport e⁻. Konformační změny proteinu jsou spojeny s tzv. proteinovými dráty, které umožňují proteinu pumpovat H⁺ přes membránu křisty.

Tento mechanismus čerpání H⁺ transmembránovým proteinem využívá NADH dehydrogenáza, cytochrom c oxidáza a mnoho dalších protonových pump.

3 konformace proteinu:

- 1) Protein s vysokou afinitou k H⁺ => nabírání H⁺ na vnitřní straně membrány.
- 2) Uzavřená konformace proteinu.
- 3) Protein s nízkou afinitou k H⁺ => uvolnění H⁺ na vnější straně membrány.

Výroba ATP v mitochondriích

73

Každá ze tří protonových pump dýchacího řetězce přispívá k vytvoření elektrochemického protonového gradientu přes vnitřní mitochondriální membránu. **Gradient H⁺ pohání syntézu ATP pomocí ATP syntázy**, která má mimořádný výkon při přeměně energie obsažené v tomto elektrochemickém gradientu na biologicky užitečnou energii chemické vazby ve formě ATP. H⁺ proudí ve směru elektrochemického gradientu membránovou částí této protonové turbíny, čímž řídí syntézu ATP z ADP a Pi v extramembránové části komplexu.

Průměrný člověk – obrát 50 kg ATP/den. Sportovec běžící maraton – obrát několika stovek kilogramů ATP/den. ATP produkovány v mitochondriích je odvozen z energie dostupné v meziproductech NADH, FADH₂ a GTP. Tyto tři energeticky bohaté sloučeniny vznikají jak oxidací glukózy, tak oxidací tuků.

Glykolyza – produkce 2 molekul ATP/molekulu glukózy = celkový energetický výtěžek pro fermentační procesy, ke kterým dochází v nepřítomnosti O₂

Oxidativní fosforylace – 2,5 molekuly ATP/2e⁻ z NADH; 1,5 molekuly ATP/2e⁻ z FADH₂ produkovaného sukcinát dehydrogenázou v mitochondriální matrix.

ATP syntáza je nanostroj, který vyrábí ATP rotační katalýzou.

74

ATP syntáza – 23 proteinových podjednotek (celkem 600 tisíc daltonů)

Produkce ATP z ADP + Pi - reakce na elektrochemický gradient

nebo funguje opačným směrem

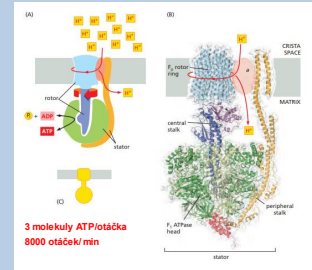
Hydrolyza ATP – vznik elektrochemického gradientu

ATP syntáza – turbína: rotor a stator

Rotorový prstenec v membráně – otáčí se v reakci na proud H⁺ do matrix poháněný elektrochemickým gradientem přes membránu.

Katalytická místa sestávají ATP z ADP + Pi

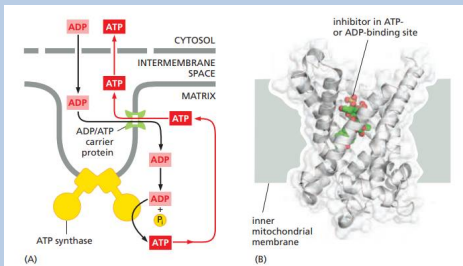
Hlavu tvoří 3α a 3β podjednotky; každá β podjednotka má katalytická místa, která se nachází v různých konformacích. Při otáčení rotoru mění konformace β podjednotek (jedna z konformací má vysokou afinitu k ADP i Pi) a tlačí vazebné místo do jiné konformace a ADP a Pi jsou poháněny k tvorbě ATP. Mechanická síla centrálního rotoru je tak přeměněna na chemickou energii fosfátové vazby ATP.



Speciální transportní proteiny vyměňují ATP a ADP přes vnitřní membránu.

75

Přenašečový protein ADP/ATP - přenáší ATP produkovány v matrix přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru, odkud difunduje přes vnější mitochondriální membránu do cytozolu. Výměnou přechází ADP z cytozolu do matrix pro recyklaci ATP.



Chloroplasty a fotosyntéza

76

Mechanismus řídicí fotosyntézu se vyvinul před 3 miliardami let u předků dnešních bakterií. **Dnes je to jediný hlavní mechanismus ukládání sluneční energie na Zemi.**

Sinice – nejpokročilejší fotosyntetické bakterie – minimální nároky na energii. Využívají e⁻ z H₂O a energii ze slunečního záření => CO₂ se mění na organické sloučeniny = fixace uhlíku.



Uvolněný O₂ pohání oxidativní fosforylaci => **Evoluce sinic umožnila vývoj mnoha různých aerobních forem života na Zemi.**

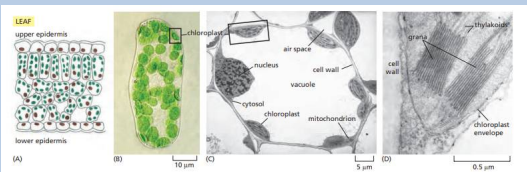
Chloroplasty připomínají mitochondrie, ale mají oddělený tylakoidní oddíl.

77

Fotosyntéza u rostlin – **chloroplast**; chemiosmotické mechanismy přeměny energie stejné jako u mitochondrií

Chloroplasty – větší než mitochondrie; stejné organizační principy:

- 1) **Vysoce propustná vnější membrána**
 - 2) **Méně propustná vnitřní membrána s transportními proteiny**
 - 3) **Úzký mezimembránový prostor**
- } Chloroplastový obal



Vnitřní membrána obklopuje velký prostor – **stroma** (analogický s matrix u mitochondrií)

78

Chloroplast má vlastní genom a genetický systém => stroma obsahuje speciální ribozomy, RNA a chloroplastovou DNA

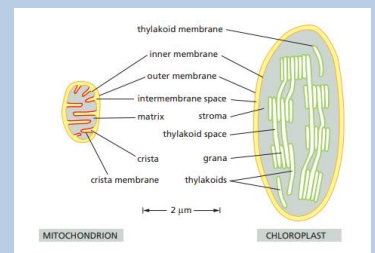
Rozdíly v organizaci:

Vnitřní membrána není složena z křst a neobsahuje elektronové transportní řetězce.

Elektronové transportní řetězce, fotosyntetické systémy, ATP-syntáza – **tylakoidní membrána**

Tylakoidní membrána tvoří **tylakoidy**; je složena do zploštělých vezikul - **grana**

Lumen tylakoidů jsou propojeny navzájem - **tylakoidní prostor** = samostatný oddíl bez spojení s transmembránovým prostorem či s stroma



79

Chloroplasty zachycují energii ze slunečního světla a používají ji k fixaci uhlíku.

Reakce během fotosyntézy – 2 části (kategorie; 2 samostatné procesy):

1) Vyžadující světlo: reakční centra v tylakoidní membráně; foton → chlorofyl ⇒ e⁻ (vytvoří se chlorofyl⁺; chlorofyl⁺ získává e⁻ z H₂O ⇒ O₂); pohyb e⁻ podél transportního řetězce přes 2. reakční centrum (NADP⁺/NADPH) ⇒ H⁺ jsou pumpovány přes tylak. membránu ⇒ H⁺ gradient ⇒ syntéza ATP ve stroma; e⁻ (spolu s H⁺) jsou naloženy na NADP⁺ ⇒ NADPH.

2) Nevýžadující světlo: ATP a NADPH – zdroj energie k přeměně CO₂ na sacharidy; fixace C ve stroma ⇒ 3C cukr glyceraldehyd-3-fosfát a další – transport do cytozolu ⇒ vznik sacharózy – metabolické potřeby nefotosyntetických pletiv.

NADP⁺ = nikotinamid adenin dinukleotid fosfát

80

Fixace uhlíku využívá ATP a NADPH k přeměně CO₂ na cukry.

Živočišné buňky – oxidace sacharidů ⇒ CO₂ a H₂O + produkce ATP

Reverzní reakce – rostliny spotřebovávají CO₂ a H₂O ⇒ sacharidy – energeticky náročný proces

Centrální reakce fixace uhlíku:

CO₂ + 5C ribulóza 1,5 bifosfát + H₂O ⇒ 2 molekuly 3C 3-fosfoglycerátu; reakce je katalyzována ve stroma enzymem **ribulóza bifosfát karboxyláza (Rubisco)** – pomalá reakce ⇒ velká spotřeba enzymu ⇒ Rubisco – 50 % všech proteinů v chloroplastu – **nejhojnější protein na Zemi** – udržuje množství CO₂ v atmosféře na nízké úrovni.

81

Calvinův cyklus (cyklus fixace uhlíku)

Série reakcí – spojení CO₂ s ribulóza 1,5-bifosfátem ⇒ jednoduchý cukr

Jeden cyklus: 6 molekul 3-fosfoglycerátu ⇒ 3 molekuly ribulóza 1,5-bifosfátu + 1 molekula glyceraldehyd-3-fosfátu (3C cukr) ⇒ cukry, škrob, bílkoviny

Melvin Calvin (Nobelova cena 1961)

Andrew Benson **James Bassham**

82

Cukry vytvořené fixací uhlíku mohou být skladovány jako škrob nebo spotřebovány k produkci ATP.

Glyceraldehyd-3-fosfátu (3C cukr) – lze použít mnoha způsoby v závislosti na potřebách rostliny.

Nadměrná fotosyntetická aktivita: přeměna na škrob (granule, stroma) – polymer glukózy – zásoba sacharidů

Část glyceraldehyd-3-fosfátu ⇒ tuk (tukové kapičky) ⇒ cukry, mastné kyseliny ⇒ cytosol; cukr vstupuje i do glykolytické dráhy ⇒ pyruvát, pyruvát + mastné kyseliny ⇒ mitochondrie – cyklus kyseliny citrónové ⇒ produkce ATP procesem oxidativní fosforylaci

Část glyceraldehyd-3-fosfátu v cytozolu ⇒ **sacharóza** – hlavní forma cukru transportovaná mezi buňkami rostliny z listů do ostatních částí rostliny

83

Komplexy chlorofyl-protein mohou přenášet buď excitační energii, nebo elektrony.

Chlorofyl: – dlouhý hydrofobní ocásek ⇒ chová se jako lipidy
– porfyrinový kruh – centrální atom Mg
– systém delokalizovaných e⁻ v konjugovaných dvojitých vazbách

Absorpce světla chlorofylem ⇒ energie fotonu ⇒ jeden z e⁻ se přesune ze stavu nižší energie do orbitálu s vyšší energií. **Excitovaný e⁻ se vrací do základního stavu – 3 způsoby:**

- 1) Přeměna energie na teplo, nebo teplo + světlo (fluorescence)
- 2) Přenos energie do sousední molekuly chlorofylu – rezonanční energie
- 3) Přenos excitovaného e⁻ na blízkou molekulu (akceptor) ⇒ chlorofyl⁺ přijme e⁻ z jiné molekuly ⇒ návrat k původnímu stavu

Způsoby 2) a 3) jsou možné v případě, že chlorofyl tvoří komplex s proteinem = **komplex chlorofyl-protein**

84

Většina fotonem excitovaných chlorofylů vázaných na proteiny jednoduše přenáší absorbovanou energii do jiného blízkého chlorofylu procesem přenosu rezonanční energie.

Avšak chlorofyl umístěný ve **speciálním páru** = těsná interakce s druhou molekulou chlorofylu ve stejném komplexu chlorofyl-protein ⇒ spuštění chemické reakce vyvolané světlem

Foton ionizuje molekulu chlorofylu ve speciálním páru ⇒ disociace na e⁻ a chlorofyl⁺. **Elektron přechází na ubiquinon (mobilní e⁻ nosič)** ve stejném proteinovém komplexu = **centrální krok oddělování náboje ve fotosyntéze.**

Chlorofyl⁺ = silný oxidant = snadno stahuje e⁻ z nízkenergetického substrátu, což je H₂O

Fotosystém se skládá z anténního komplexu a reakčního centra. 85

Dva odlišné typy komplexů chlorofyl-protein:

- 1) **Fotochemické reakční centrum** – obsahuje právě popsaný speciální pár chlorofylů
- 2) **Anténní komplex (komplex pro sběr světla, LHC)** – absorpce světla a přenos rezonanční energie; úlohou je shromáždit energii dostatečného počtu fotonů pro fotosyntézu – energie přechází z jednoho chlorofylu na druhý, dokud nedosáhne speciální páru

Tylakoidní membrána obsahuje dva různé fotosystémy pracující v sérii. 86

Chloroplasty obsahují **dva funkčně odlišné fotosystémy** – každý dodává elektrony do transportního řetězce.

- 1) Fotosystém I – tylakoidy netvořících grana (nenavrstvené tylakoidy)
- 2) Fotosystém II – grana (navrstvené tylakoidy)

Cesta e⁻ přes dva fotosystémy – schéma Z

Schéma Z 87

Reakční centrum **fotosystému II** odebírá nejprve e⁻ z H₂O. Elektron prochází **elektronovým transportním řetězcem** (plastoquinon, komplex cytochromu b₆-f a protein plastocyanin) do **fotosystému I** – pohání e⁻ přes membránu v druhé světlem řízené reakci (energizace přijmutých e⁻), kde dochází k oddělení náboje, a která vede k produkci NADPH.

Schéma Z je nezbytné k překlenutí velmi velké energetické mezery mezi vodou a NADPH. Jediné kvantum viditelného světla neobsahuje dostatek energie jak k vytažení elektronů z H₂O, která svoje elektrony drží velmi pevně (špatný donor e⁻), tak k jejich přitahování k NADP⁺ (špatný akceptor e⁻).

Fotosystém II používá manganový shluk k vyťahování elektronů z vody. 88

Pouze fotosystém II je schopen odebírat e⁻ z H₂O a vytvářet O₂ jako odpadní produkt – obsahuje **manganový shluk** spojený s proteinem.

H₂O – velice stabilní => potřeba velké energie k oddělení e⁻. Speciální pár chlorofylů – P680; reakce 2H₂O + 4 fotony → 4H⁺ + 4e⁻ + O₂ je katalyzována klastrem Mn. Meziproducty zůstávají pevně připojeny k Mn klastru, dokud nejsou dvě molekuly H₂O plně oxidovány na O₂.

Uvolněné H⁺ – vypuštěny do tylakoidního prostoru => H⁺ gradient

Veškerý O₂ v zemské atmosféře byl vytvořen tímto způsobem. Přestože přesné detaily reakce oxidace H₂O ve fotosystému II stále nejsou plně pochopeny, vědci se snaží zkonstruovat umělý systém, který napodobuje tento proces. Pokud by jejich snaha byla úspěšná, mohlo by to poskytnout prakticky nekonečnou dodávku čisté energie, která by pomohla vyřešit světovou energetickou krizi.

Cytochrom b₆-f komplex propojuje fotosystém II s fotosystémem I. 89

Elektrony extrahované z H₂O fotosystémem II – přeneseny na plastoquinol (QH₂, silný donor e⁻). Plastoquinol přenáší své e⁻ do **komplexu b₆-f**, jehož struktura je homologní s cytochromem c redukázou v mitochondriích. Komplex cytochromu b₆-f pumpuje H⁺ do tylakoidního prostoru Q cyklu (slide 68) => přídavek k H⁺ gradientu přes tylakoidní membránu.

Komplex b₆-f – spojovací článek mezi fotosystémy II a I – předává e⁻ plastocyaninu (pC, mobilní e⁻ přenašeč, malý protein obsahující Cu); plastocyanin přenáší e⁻ fotosystému I. Fotosystém I využívá druhý foton – energizace přijmutých e⁻.

Fotosystém I provádí druhý krok oddělení náboje ve schématu Z. 90

Fotosystém I přijímá e⁻ z plastocyaninu – přenos prostřednictvím druhé separace náboje do malého proteinu **ferredoxinu (Fd)** na protější povrchu membrány

Ferredoxin přenáší e⁻ do enzymového komplexu: **ferredoxin-NADP⁺ reduktáza (FNR)**

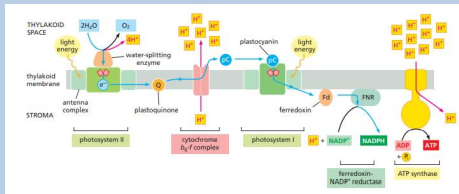
Produkce NADPH z NADP⁺

Redukce NADP⁺ vyžaduje molekulu chlorofylu fotosystému I. Redukovaný NADPH – využit ve stroma k biosyntéze glyceraldehdu-3-fosfátu.

Chloroplastová ATP syntáza využívá k produkci ATP H^+ gradient generovaný fotosyntetickými světelnými reakcemi. 91

Shrnutí:

Počínaje odebráním e^- z H_2O umožňují světlem řízené kroky oddělování náboje ve fotosystémech II a I energeticky překonat nepříznivý (vzestupný) tok e^- získané z vody do NADPH. Elektrony řízená H^+ pumpa a komplex cytochromu b6-f generují ve fotosystémech velký H^+ gradient přes tylakoidní membránu. Molekuly ATP syntázy v tylakoidní membráně pak využívají tento H^+ gradient k produkci velkého množství ATP ve stroma chloroplastu, čímž napodobují syntézu ATP v mitochondriální matrix.



Přepnutí tvorby NADPH (lineární režim) na tvorbu ATP (cirkulární režim)

Redukovaný ferredoxin nepředává e^- na ferredoxin-NADP⁺ reductázu => utlumí se režim vzniku NADPH; místo toho difunduje zpět do komplexu b6-f, kde redukuje plastochinon => zvýší se H^+ gradient přes membránu a tím i množství ATP vytvořené ATP syntázou. To umožňuje chloroplastům generovat buď více NADPH (lineární režim) nebo více ATP (cirkulární režim), **v závislosti na metabolických potřebách buňky.**