



mezioborová integrace výuky zaměřená na rostlinnou biochemii a fytopatologii

CZ.1.07/2.2.00/28.0171

Obecný metabolismus

Membránové kanály a pumpy (12).

Prof. RNDr. Pavel Peč, CSc.

Katedra biochemie, Přírodovědecká fakulta UP, Olomouc



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

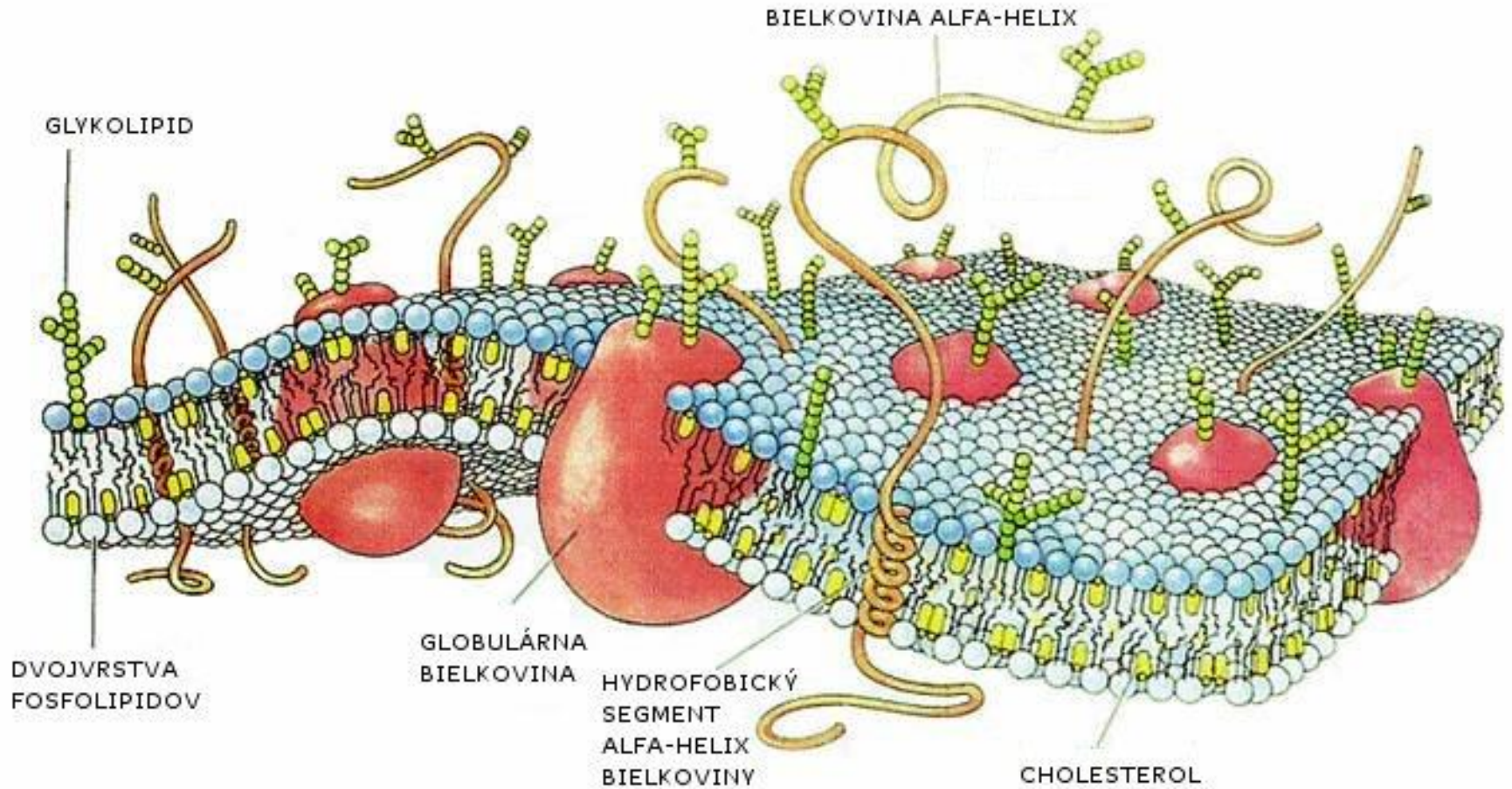
Membránové kanály a pumpy.

- Struktura biologických membrán.
- Membránové proteiny využívající hydrolýzu ATP jako pohon pump přenosu iontů přes membránu.
- Ca^{2+} ATPasa sarkoplasmatického retikula svalových buněk.
- Analogický mechanismus u Na^{+} - K^{+} ATPasy.
- Inhibice Na^{+} - K^{+} ATPasy digitalis.
- Sekundární transportéry.
- Specifické kanály přes membrány (např aquaporiny).

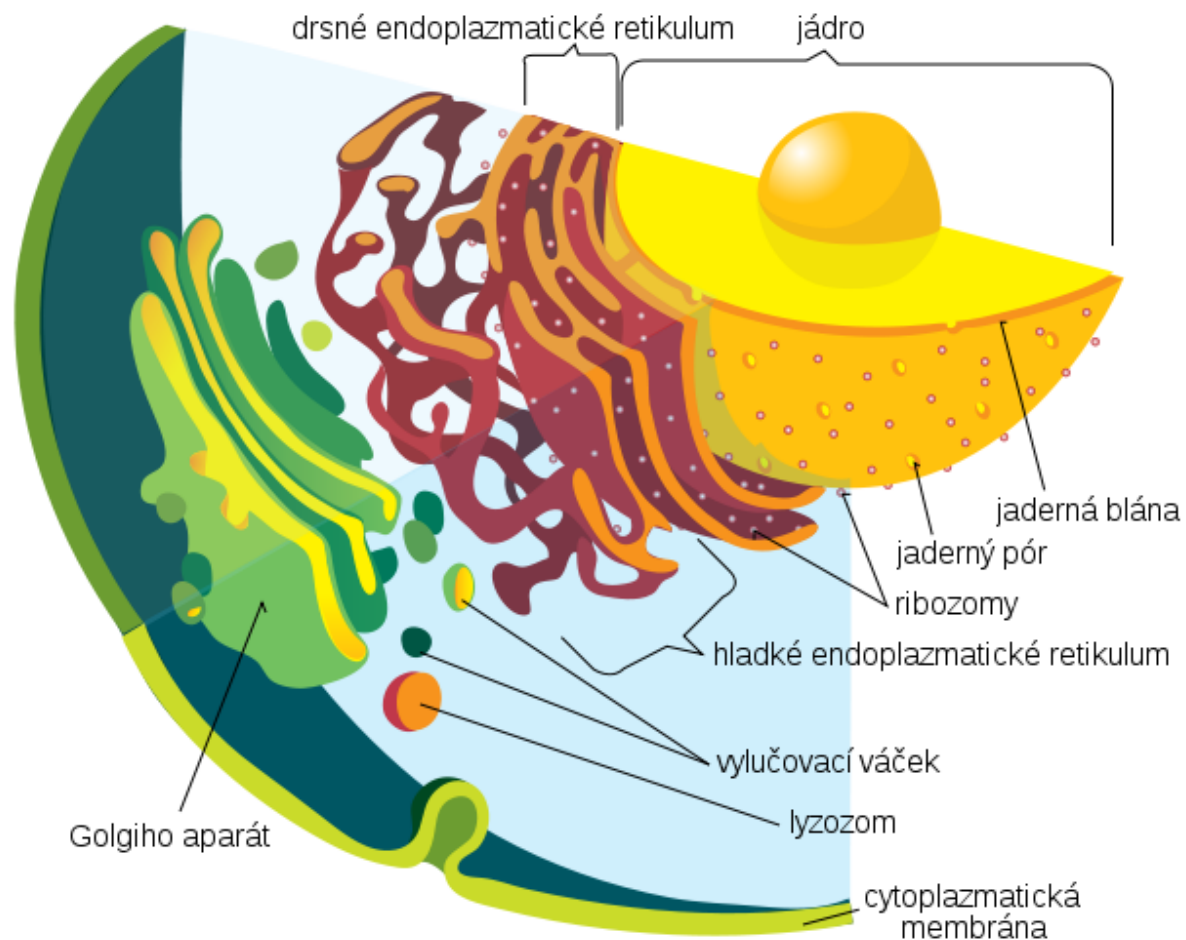
Struktura biologických membrán

- Biologické membrány jsou lipidové dvojvrstvy neprostupné pro ionty a polární molekuly.
- Permeabilita je realizována dvěma typy proteinových molekul: pumpami a kanály.
- Pro činnost pump je nutná energie ATP. Jedná se o aktivní transport.
- Kanály, naopak, umožňují volný tok iontů. Ilustrují pasivní transport nebo tzv. podporovanou (usnadněnou) difúzi.
- Integrální proteiny procházejí membránou a jejich funkcí je mimo jiné, přenos informace z vnější prostředí do buňky.

Buněčná membrána.



Endoplasmatické retikulum a další membránové buněčné struktury.



Endoplazmatické retikulum (ER).

- **Endoplazmatické retikulum (ER)** je soustava vzájemně propojených miniaturních membránových cisteren a kanálků, kterou můžeme najít v cytoplasmě drtivé většiny eukaryotních buněk. Napojuje se na buněčné jádro a obvykle i na Golgiho aparát.
- Endoplazmatické retikulum zvětšuje vnitřní povrch buňky, což má velký význam pro metabolické procesy.
- Rozlišujeme ER, na jehož vnějším povrchu jsou přisedlé ribosomy (**drsné endoplazmatické retikulum**), a ER bez ribosomů (**hladké endoplazmatické retikulum**). Drsná část endoplazmatického retikula se specializuje na syntézu některých proteinů a procesy s tím související, jako je skládání těchto proteinů a jejich oligomerizace či navěšování jistých cukerných zbytků na tyto bílkoviny. V drsném ER také probíhá rozklad špatně sbalených či poškozených bílkovin - mechanismus za to zodpovědný se označuje jako ER-asociovaná degradace. Proteinů. V hladkém endoplazmatickém retikulu se odehrávají zcela odlišné procesy - odstraňování toxických látek, některé části metabolismu lipidů a metabolismu hemu. Dále se mohou z hladkého ER regulovaně uvolňovat vápenaté ionty.

Sarkoplasmatické retikulum

- Velice důležitá organela svalové buňky.
- Velmi bohaté hladké endoplazmatické retikulum, jehož hlavní funkcí je skladovat vápenaté ionty, nezbytné pro činnost svalu.
- Vyznačeny hydratované vápenaté ionty.



Membránové proteiny využívající hydrolýzu ATP jako pohon pump přenosu iontů přes membránu.

Sarkoplasmatická Ca^{2+} ATPasa.

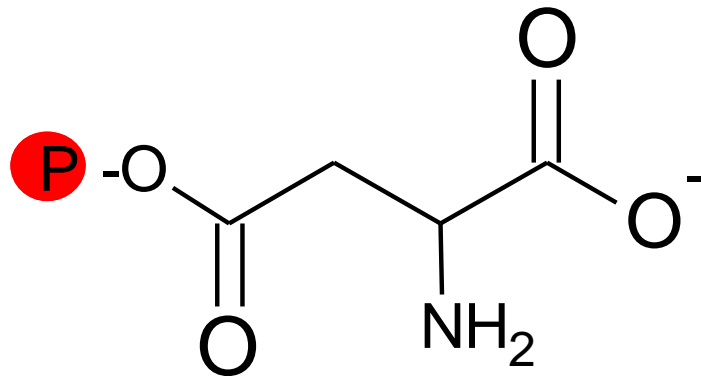
- Sarkoplasmatická Ca^{2+} ATPasa, zkratka SR Ca^{2+} ATPasa .
- Enzym tvoří až 80% membránových proteinů SR a hraje významnou roli při svalovém stahu, který je vyvolán zvýšenou koncentrací Ca^{2+} v cytosolu.
- Uvolnění svalu je způsobeno rychlým přesunem Ca^{2+} z cytosolu do SR.
- Pumpa udržuje koncentrační rozdíl Ca^{2+} mezi cytosolem a SR.
- Normálně je koncentrace Ca^{2+} v cytosolu $0,1 \mu\text{M}$, v SR $1,5 \text{ mM}$.
- SR Ca^{2+} ATPasa je monomerní 110 kD polypeptid s transmembránovou doménou čítající 10α helixů.
- Další část, zhruba polovina molekulové hmotnosti, je v cytosolu a skládá se ze tří domén s různými funkcemi: N doména váže ATP, P doménu lze fosforylovat na místě Asp a třetí doména označovaná A slouží jako ovladač (regulátor) pro doménu N.

Struktura $SRCa^{2+}$ ATPasy.

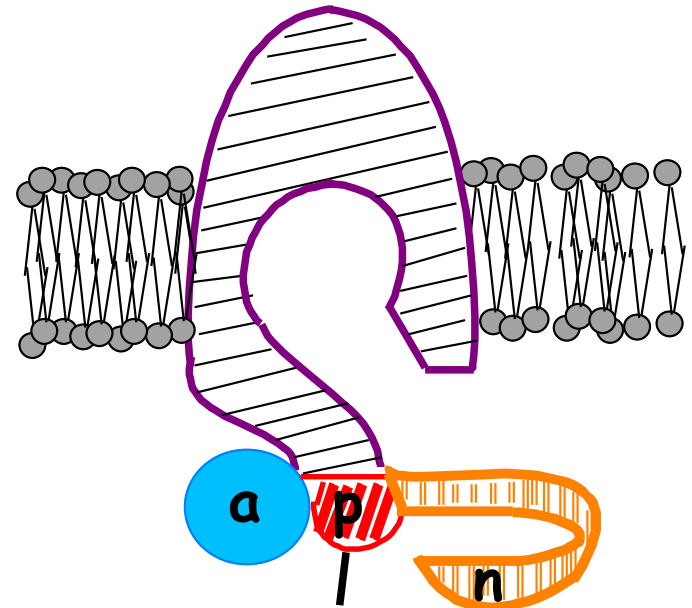
Kalciová pumpa SR je sestavená z 10 membránových α -helixů a cytoplasmovou hlavičkou sestávající ze třech domén (N, P a A). Ca^{2+} ionty se váží na helixy v membráně.

Mechanismus působení ATPasy P-typu

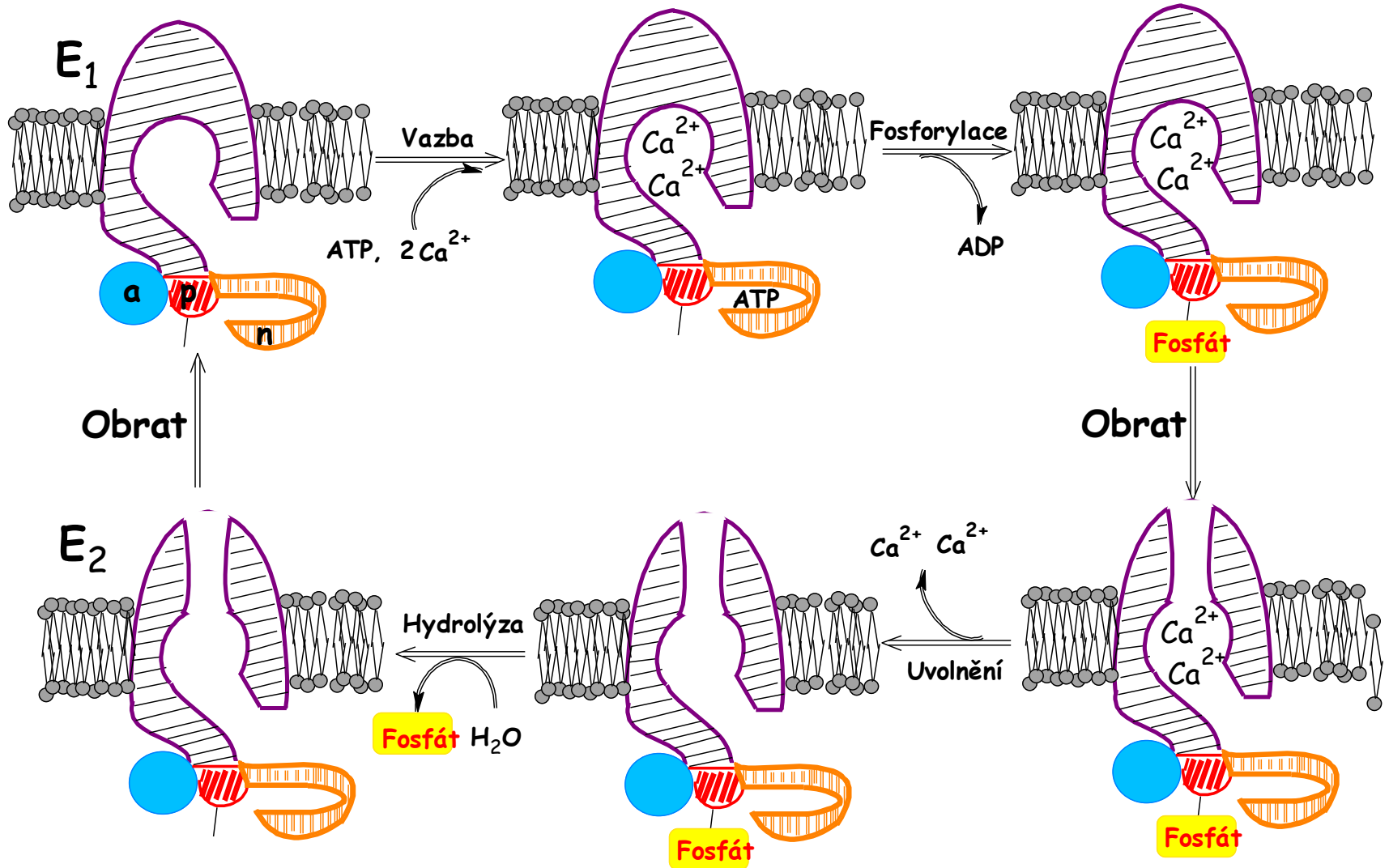
(P, protože tvoří klíčový fosforylovaný meziprodukt).



3 -Fosfoaspartát



Mechanismus působení ATPasy P-typu.



Popis mechanismu působení ATPasy P-typy.

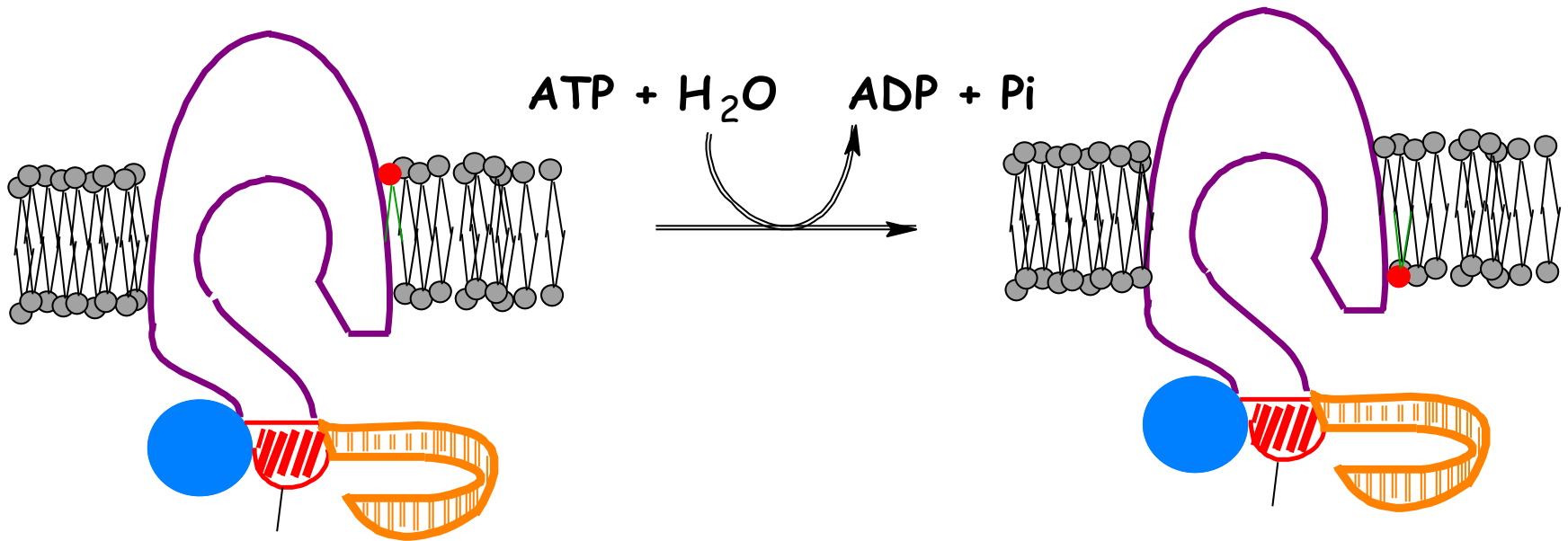
- 1. Vazba ATP a dvou Ca^{2+} iontů = E_1 stav.
- 2. Enzym štěpí ATP a přenáší P na Asp. Ca^{2+} musí být vázány, aby došlo k fosforylaci. Fosforylace posune konformaci enzymu do stavu E_2 .
- 3. Přejít od E_1 k E_2 způsobuje, že dochází k inverzi enzymu, což vede k uvolnění iontů na luminální stranu membrány SR.
- 4. Ve stavu E_2 -P má fosforylovaný enzym nízkou afinitu k Ca^{2+} .
- 5. Po odštěpení Ca^{2+} je fosforylovaný Asp enzymu hydrolyzován a fosfát uvolněn.
- 6. Enzym bez kovalentně vázaného fosfátu je nestabilní a forma E_2 vrací se zpět do formy E_1 a tím se cyklus završí.

Podobný mechanismus je uplatňován u Na^+ - K^+ ATPasy.

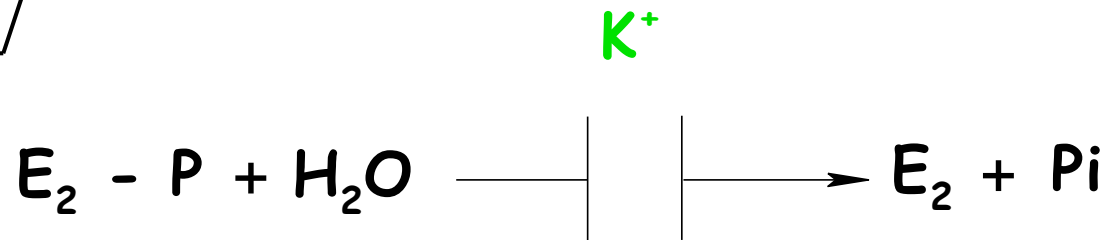
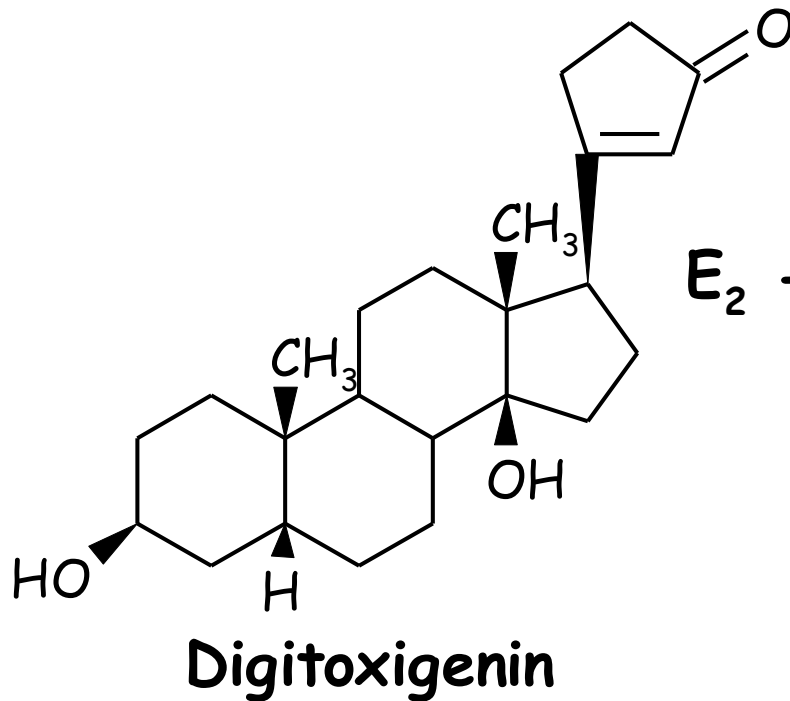
- Ve stavu E_2 jsou vázány tři Na^+ a transportovány přes membránu ven z buňky jako důsledek fosforylace proteinu ve stavu E_2 .
- Na místa uvolněných **tří Na^+** iontů jsou z extracelulárního prostoru přenášeny **dva K^+** .
- Oba K^+ ionty jsou přeneseny přes membránu do buňky. Inverze je způsobena hydrolýzou fosforylovaného Asp. Fosfát je uvolněn do cytosolu.
- Koncentrace Na^+ vně buňky je 143 mM a uvnitř 14 mM.
- U K^+ je koncentrace vně 4 mM a v buňce 157 mM.
- Energie nutná pro udržování těchto koncentračních rozdílů je asi 42 kJ/mol. Získá se hydrolýzou ATP - 50 kJ/mol !!!

Podobné ATPasy mohou transportovat lipidy. **Enzymy se nazývají flipasy.** Flipasy udržují membránovou asymetrii tím, že přenášejí fosfolipidy z cytoplasmové strany membrány na stranu vnitřní.

FLIPASA(obrací)



Glykosidy z náprstníku (*Digitalis purpurea*) inhibují
Na⁺ - K⁺ pumpu



**Inhibice
kardiotonickými steroidy**

Glykosidy z náprstníku (*Digitalis purpurea*) inhibují Na⁺ - K⁺ pumpu

- Rostlinné steroidy jsou silnými inhibitory Na⁺ -K⁺ pumpy. Inhibují v koncentracích 10 nM/L !!
- Digitoxigenin a ouabain = kardiotonické steroidy blokuji defosforylaci formy E₂ - P ATPasy.
- Digitalis je směs kardiotonických steroidů získaných z náprstníku červeného (*Digitalis purpurea*).
- Digitalis zrychluje srdeční stahy - koncentrace Na⁺ se uvnitř buňky zvyšuje. Snížená hladina Na⁺ vně buňky vede ke zvýšení vstupu Ca²⁺ sodno-vápenatým transportérem (výměníkem).
- Zvýšená hladina Ca²⁺ vede ke zvýšené kontrakci srdečních svalů .

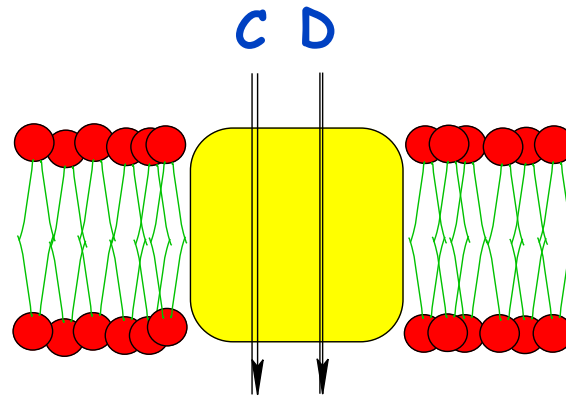
Náprstník červený (*Digitalis purpurea*).



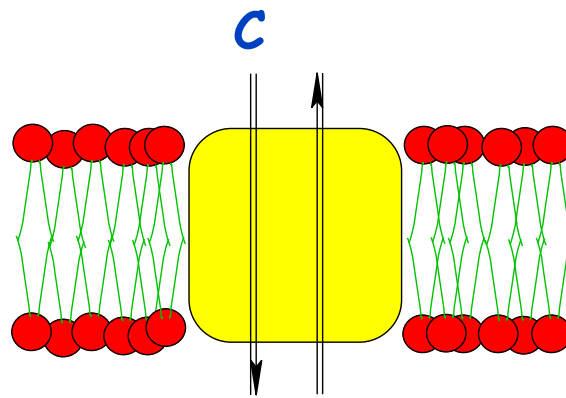
Sekundární transportéry využívající jeden koncentrační gradient ke tvorbě druhého.

- V těchto případech jsou termodynamicky nevýhodné (endergonní) transporty placeny současnými termodynamicky exergonními přenosy.
- Nazývají se sekundární transportéry nebo kotransportéry.
- Jsou klasifikovány ve dvou skupinách:
- A) Antiportéry - transportované látky jdou proti sobě.
- B) Symportéry - transportované látky jdou jedním směrem.
- Sodno-vápenatý transportér plasmové membrány živočišných buněk je antiporter - využívající elektrochemický gradient Na^+ k pumpování Ca^{2+} z buněk.
- Tři ionty sodíku jsou transportovány do buňky na úkor jednoho iontu Ca^{2+} , který je transportován ven. Energie jde na vrub sodno-draselné ATPasy (tvorí Na^+ gradient).
- Transportér má nižší afinitu k Ca^{2+} než Ca^{2+} ATPasová pumpa, ale kapacita transportovat Ca^{2+} ven je větší.
- Transportér může transportovat 2 000 vápenatých iontů přes membránu. Ve srovnání se 30 Ca^{2+} ionty, které transportuje Ca^{2+} ATPasová pumpa (za sekundu).

Symporter a antiporter.



Symporter

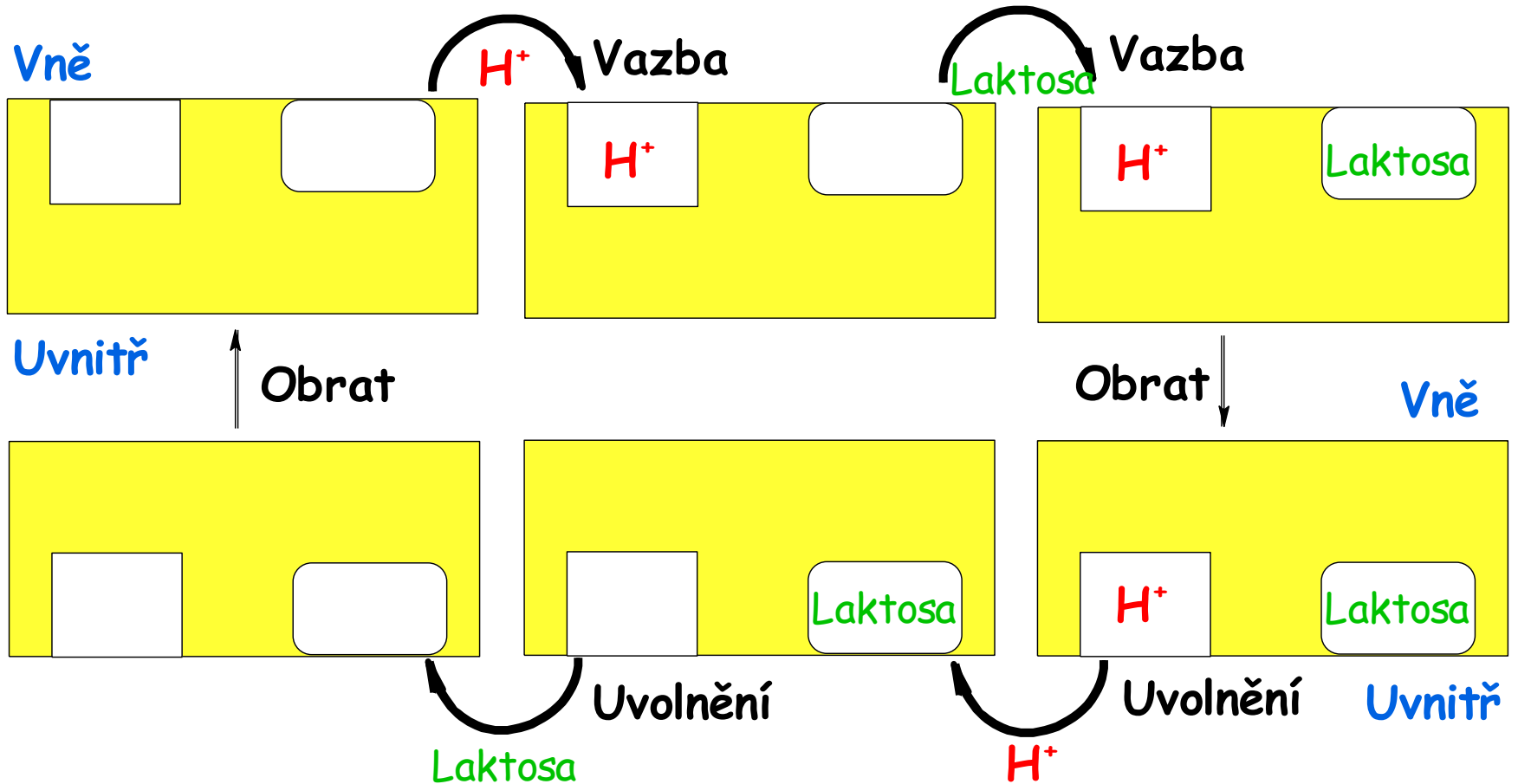


Antiporter

Bakteriální laktosa permeasa.

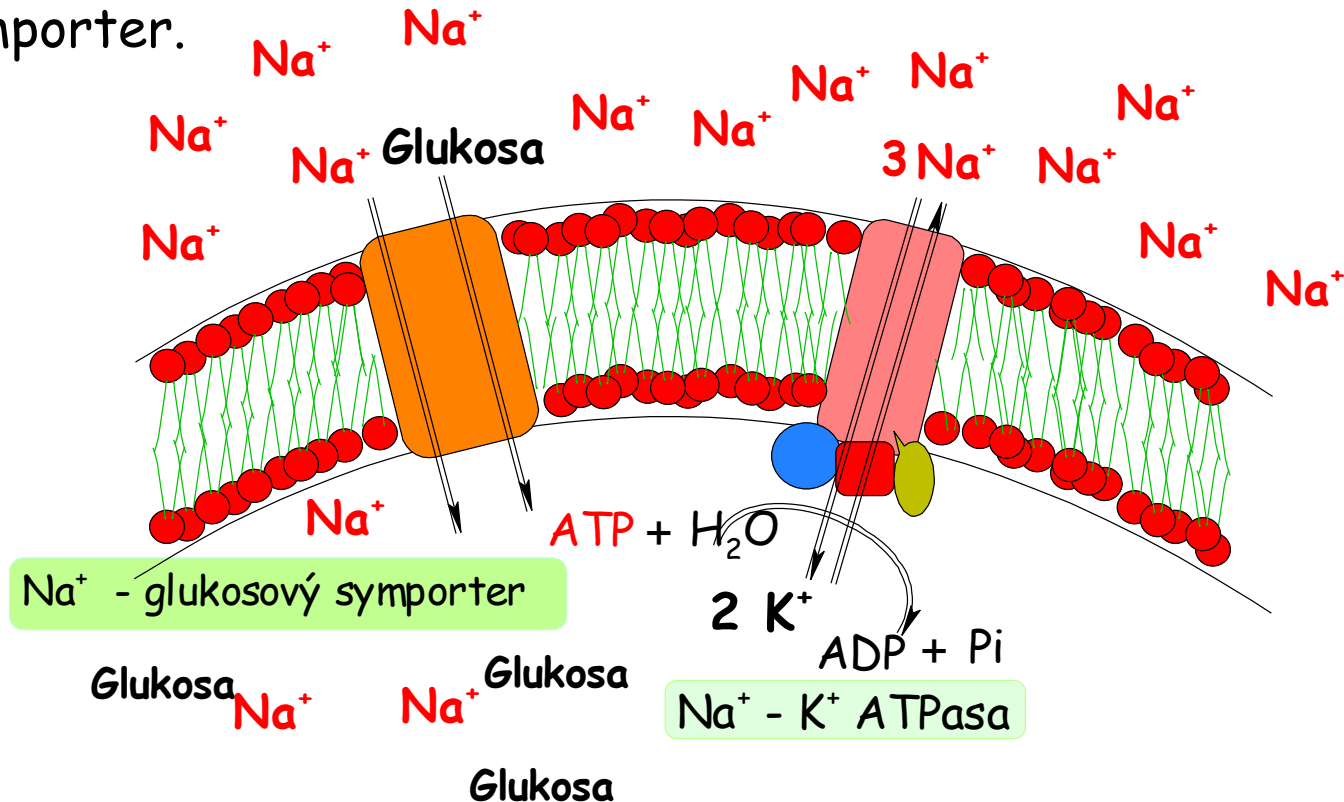
- Zhruba 160 ze 4 000 celkových proteinů kódovaných v *E. coli* genomu jsou sekundární transportéry !!
- Příkladem je **laktosa permeasa**.
- Je to symportér využívající protonový gradient přes membránu *E. coli* vytvořený oxidací energeticky bohatých molekul. Transportuje sacharidy proti koncentračnímu spádu.
- Laktosa permeasa má dvě vazebná místa. Jedno pro protony a druhé pro laktosu.
- Po vazbě obou dochází k převrácení (eversion) a do bakterie se uvolňuje nejdříve proton a posléze laktosa.
- Transport laktosy proti koncentračnímu spádu je vyvážen transportem protonů koncentračním spádem !

Laktosa permeasa. Transportér pumpuje laktosu do bakteriálních buněk poháněný proton-motivní silou. Symport.



Přenos energie membránovými proteiny

- $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPasa převádí volnou energii přenosu fosfátu na volnou energii gradientu sodných iontů, Vzniklý gradient může být využit pro pumpování materiálů do buněk prostřednictvím sekundárních transportérů jako je např. Na^+ -glukosový symporter.



Žaludeční H^+ , K^+ -ATPasa, podobná Na^+ , K^+ -ATPase plasmové membrány a SR Ca^{2+} - ATPase SR.

- Produkce protonů je základní aktivitou buněčného metabolismu.
- V žaludku je pH 0,8 až 1,0. Naproti tomu pH žaludeční sliznice je 7,4. **Přes membránu sliznice je pH gradient 6,6 jednotky pH.** To je nevyšší gradient známý v eukaryotních buňkách.
- Gradient je udržován H^+ , K^+ -ATPasou. Energie hydrolýzy ATP se využívá k pumpování protonů ze sliznice do žaludku. Při tom se vyměňují K^+ ionty.
- Transport je elektricky neutrální. Draselné ionty transportované do buněk sliznice jsou ihned transportovány zpět z buněk spolu s chloridovými anionty.
- Tímto způsobem je do žaludku transportována HCl.
- Je třeba pouze malé množství K^+ - recyklace.

Specifické kanály přes membrány

- Iontové kanály jsou dalšími membránovými proteiny s pasivním transportním systémem schopné transportovat ionty až tisíckrát rychleji.
- Iontové kanály jsou vysoce sofistikované molekulární stroje schopné se chemicky a fyzikálně měnit a vytvářet tak potřebné konformační změny.
- Charakteristické vlastnosti iontových kanálů:
 - A) Jsou vysoce selektivní pro ionty. Příklad: přenáší jen Na^+ a ne K^+ ionty.
 - B) Existují v otevřeném a uzavřeném stavu.
 - C) Změna stavu mezi otevřeno a uzavřeno je přísně regulována.
- Rozdělují se do dvou tříd: 1. Kanály řízené ligandy; 2. Kanály řízené napětím (Volty).
- D) Stav otevřeno pokračuje obvykle spontánně do inaktivovaného stavu.

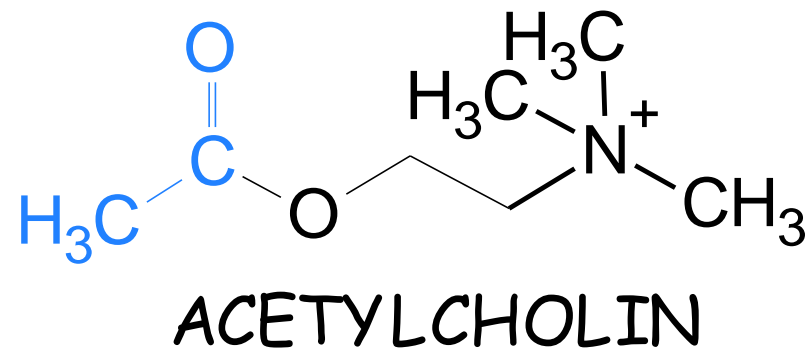
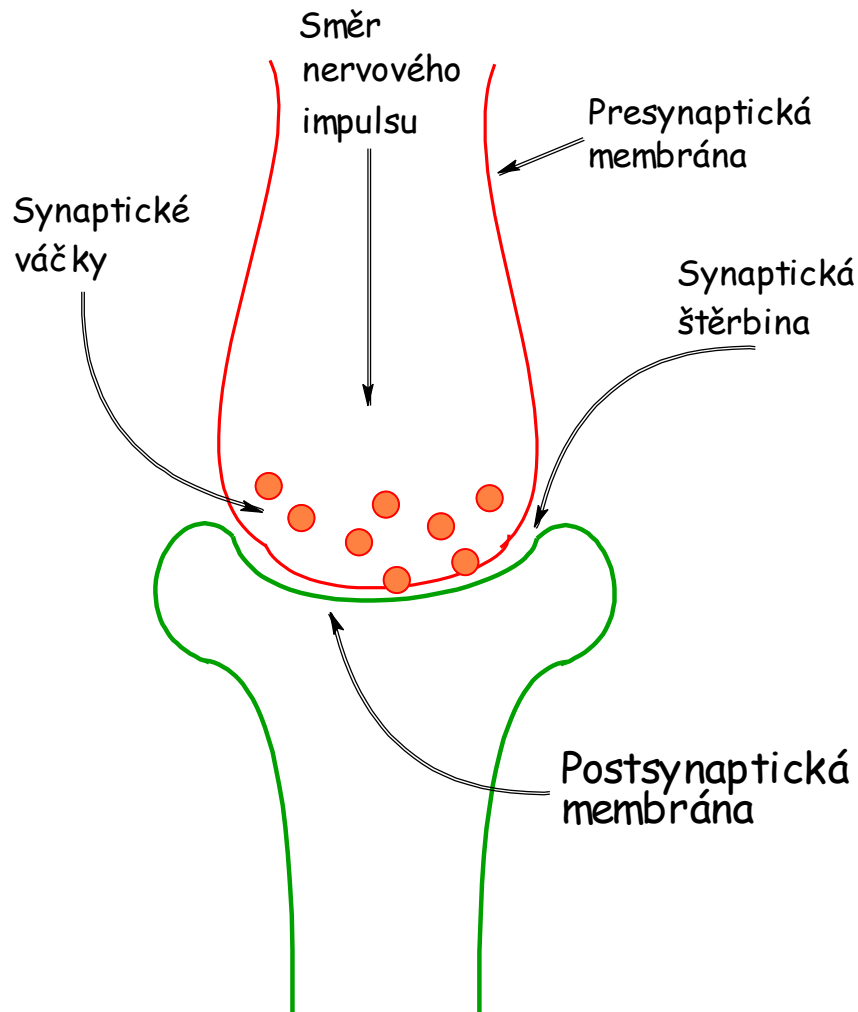
Relativní permeability vybraných iontových kanálků.

	Na ⁺ kanálek	K ⁺	Acetylcholinový receptor	Cl ⁻ kanálek
Li ⁺	1,00	< 0,01	0,87	< 0,01
Na ⁺	1,00	< 0,01	1,00	< 0,01
K ⁺	0,09	1,00	1,11	< 0,01
Rb ⁺	< 0,01	0,91		
Cs ⁺	< 0,01	< 0,08	1,42	
NH ₄ ⁺	0,16	0,13	1,79	
Cl ⁻	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1,00

Struktura iontových kanálků

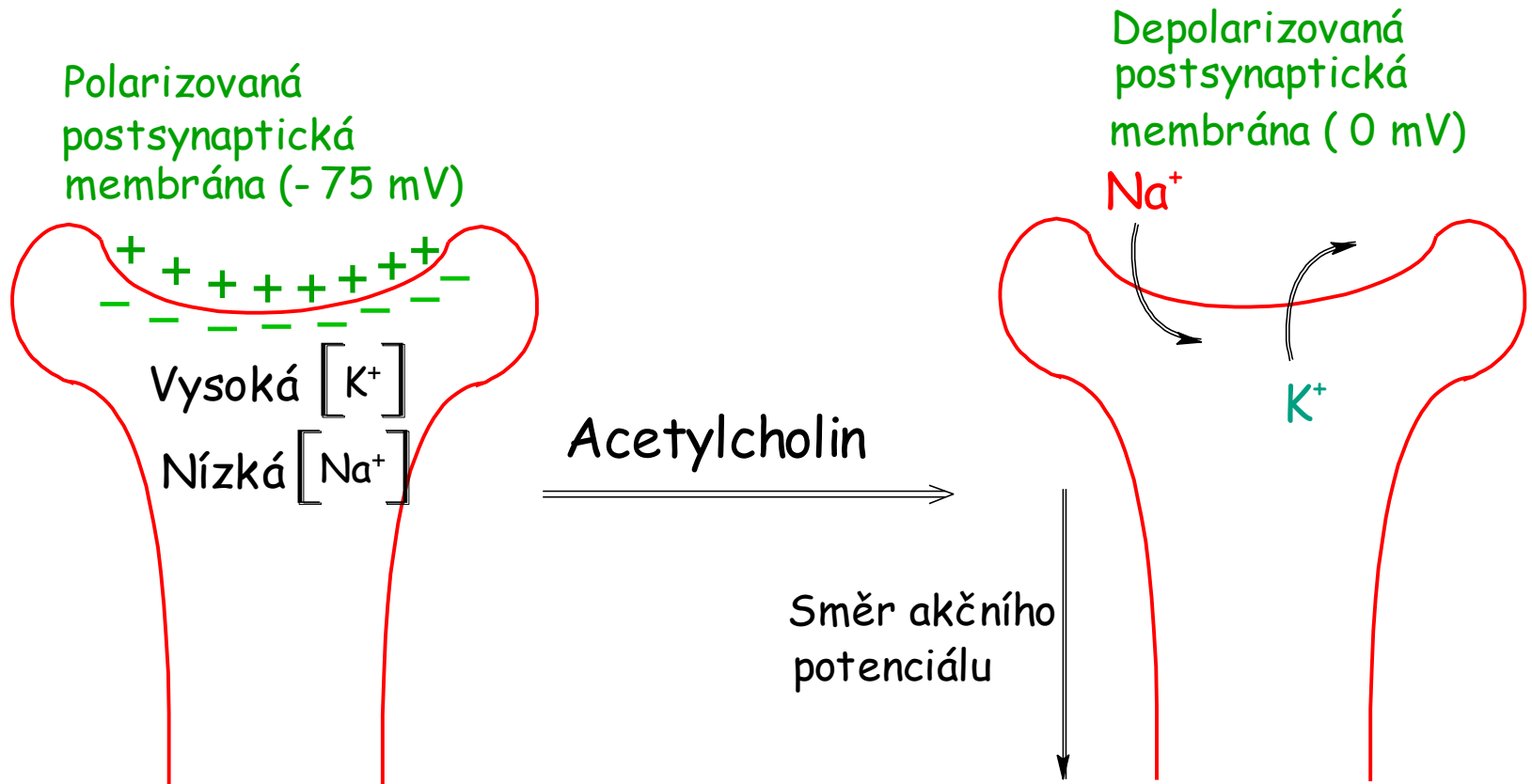
- Jako příklad uvedu tři iontové kanálky podílející se na přenosu nervového vzruchu:
 - A) Ligandem řízený kanálek
 - B) Kanálek acetylcholinového receptoru
 - C) Napětím řízené Na^+ a K^+ kanálky vedoucí nervové impulzy z axonu a neuronu.
- Nervové impulzy jsou vedeny přes synapse malými molekulami schopnými difundovat - neurotransmitery.
- Acetylcholin je cholinergní neurotransmitter (odvozený od cholinu).

Schéma synapse (synaptic cleft - synaptická mezera, 50 nm). Konec presynaptického axonu je vyplněn synaptickými váčky - každý obsahuje 10^4 molekul acetylcholinu



Příchod nervového impulzu zapříčiní, že se z 300 váčků uvolní acetylcholin do mezery.

Koncentrace v mezeře se zvedne z 10 nM na 500 μ M v čase milisekund.



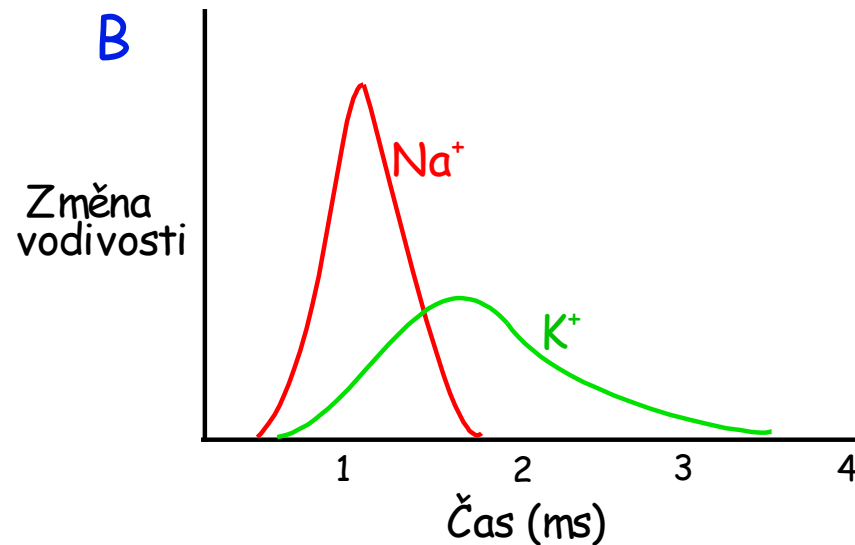
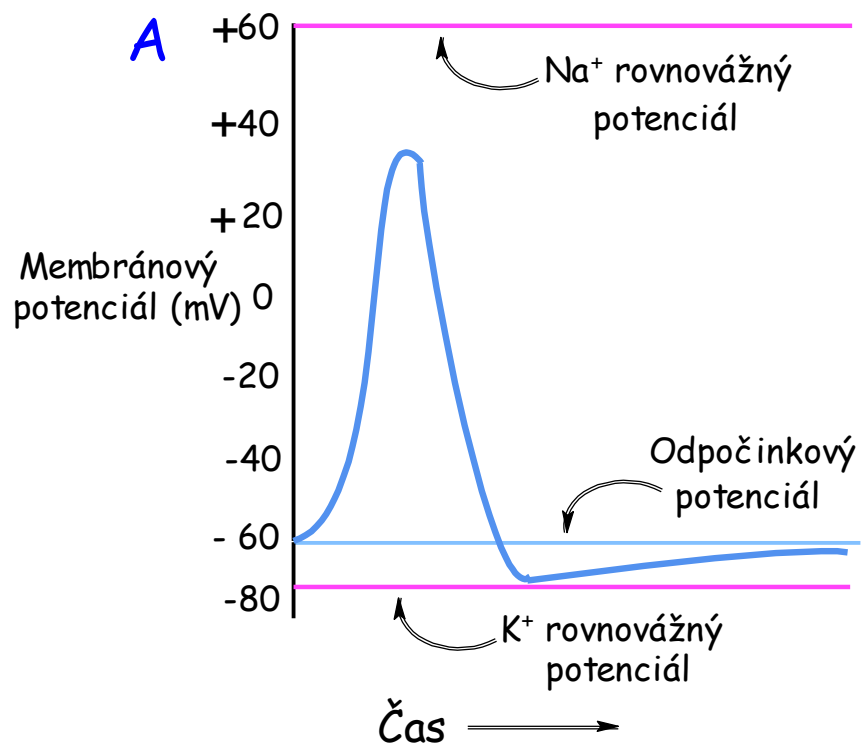
Acetylcholin funguje jako ligand

- Vazba acetylcholinu na postsynaptickou membránu výrazně změní průchodnost pro ionty. Dojde k depolarizaci - během 0,1 ms.
- Převaha sodných iontů depolarizuje postsynaptickou membránu a vytváří akční potenciál.
- Acetylcholin otevírá kationtový kanálek. Změna v propustnosti pro ionty je zprostředkována acetylcholinovým receptorem.
- Acetylcholinový receptor je ligandem řízený kanálek.

Membránové kanálky řízené napětím (Volt).

- Nervový impulz je elektrický signál produkovaný tokem iontů přes plasmovou membránu neuronu.
- Vnitřní část neuronu má vysokou koncentraci K^+ a nízkou Na^+ . Tento iontový gradient je tvořen pumpou poháněnou ATP.
- Při odpočinku je membránový potenciál -60mV . Akční potenciál (nervový impulz) se vytvoří, když je membránový potenciál depolarizován pod kritickou hranici (z -60 na -40 mV). Membránový potenciál získá kladný náboj během milisekundy = $+30\text{ mV}$.

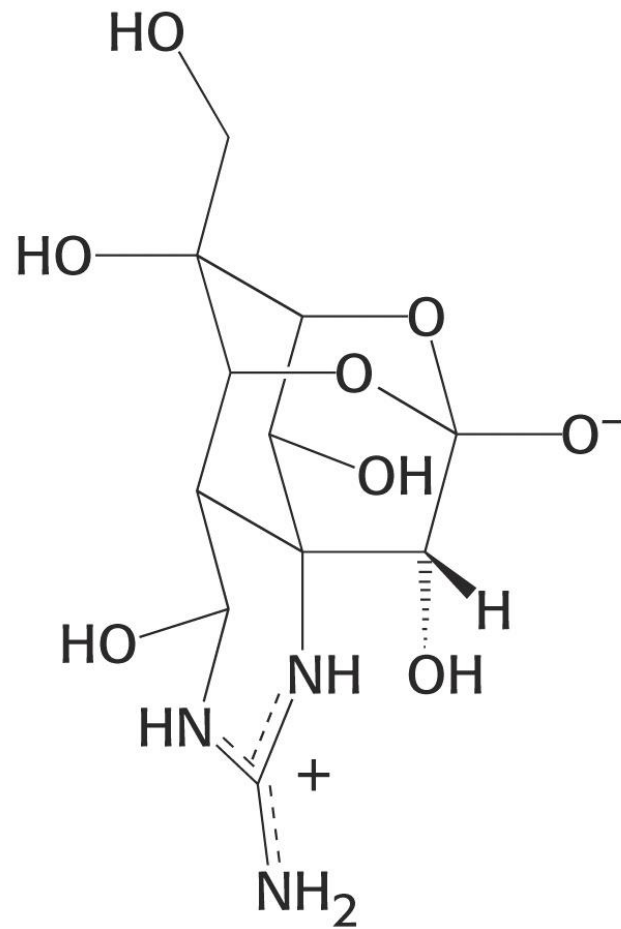
Membránový potenciál. Depolarizací membrány axonu se vytvoří akční potenciál. Časová křivka tvorby membránového potenciálu (A); změna ve vodivosti (propustnosti) Na^+ a K^+ (B).



Návrt do odpočinkové fáze. Tetrodotoxin jako prostředek studia sodíkového kanálku.

- Sodné kanálky se spontánně zavírají a draselné se postupně otvírají.
- Draselné ionty putují ven a tak se membránový potenciál získává zpět negativní hodnotu.
- Sodíkový kanálek byl izolován z elektřinu tvořících částí těla elektrického úhoře a purifikován za pomoci specifického neurotoxinu - tetrodotoxin. Sodíkový kanálek je protein, jeden řetězec 260 kD.
- Tetrodotoxin je organická látka izolovaná z ryby fugu vážící se na sodíkový kanál s afinitou rovnou $K_i \approx 1$ nM.
- Letální dávka pro dospělého je 10 ng.

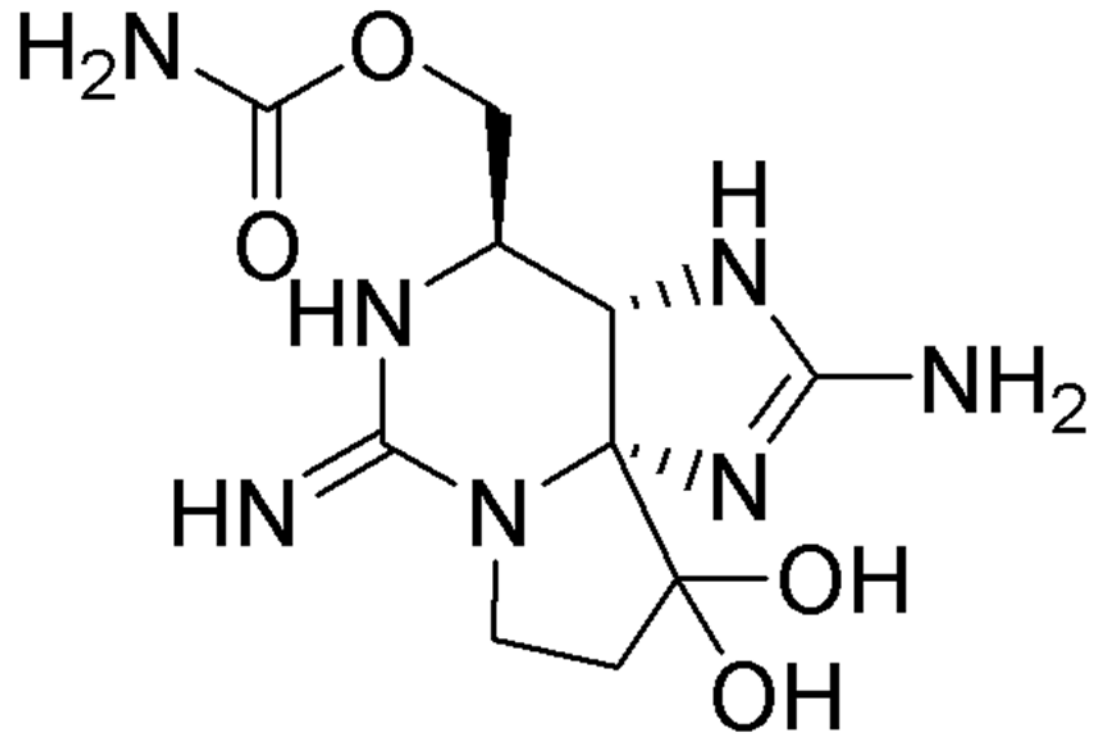
Čtverzubec, fugu (říční prase), lat.



Tetrodotoxin



Další toxin blokující sodíkové kanálky (saxitoxin).



Tetrodotoxin a saxitoxin.

Oba blokují Na⁺ kanálky. Váží se jako ligandy na vstup guanidylovou skupinou.

Regulace funkce kanálku ligandem.

- Tetrodotoxin
- Jed je vytvářen bakteriemi *Pseudomonas* a také bakteriemi *Vibrio fisheri*, které kolonizují trávicí soustavu ryby. Ryba obsahuje smrtelnou dávku pro cca 30 lidí.
- Z neznámé příčiny je genom čtverzubců vysoce kompaktní bez vmezeřených úseků a díky tomu byl u několika druhů již zmapován.
- Saxitoxin
- je hlavní součástí rodiny chemických neurotoxinů. V přírodě jsou převážně produkovány mořskými obrněnkami, ale byly identifikovány i u takových organismů, jako je modrozelená řasa, muňky a modroprstencová chobotnice.
-
- U lidí dochází k intoxikaci převážně požitím ústřic, ve kterých se nahromadily obrněnky během krmení.

Talíř s plátky ryby fugu.



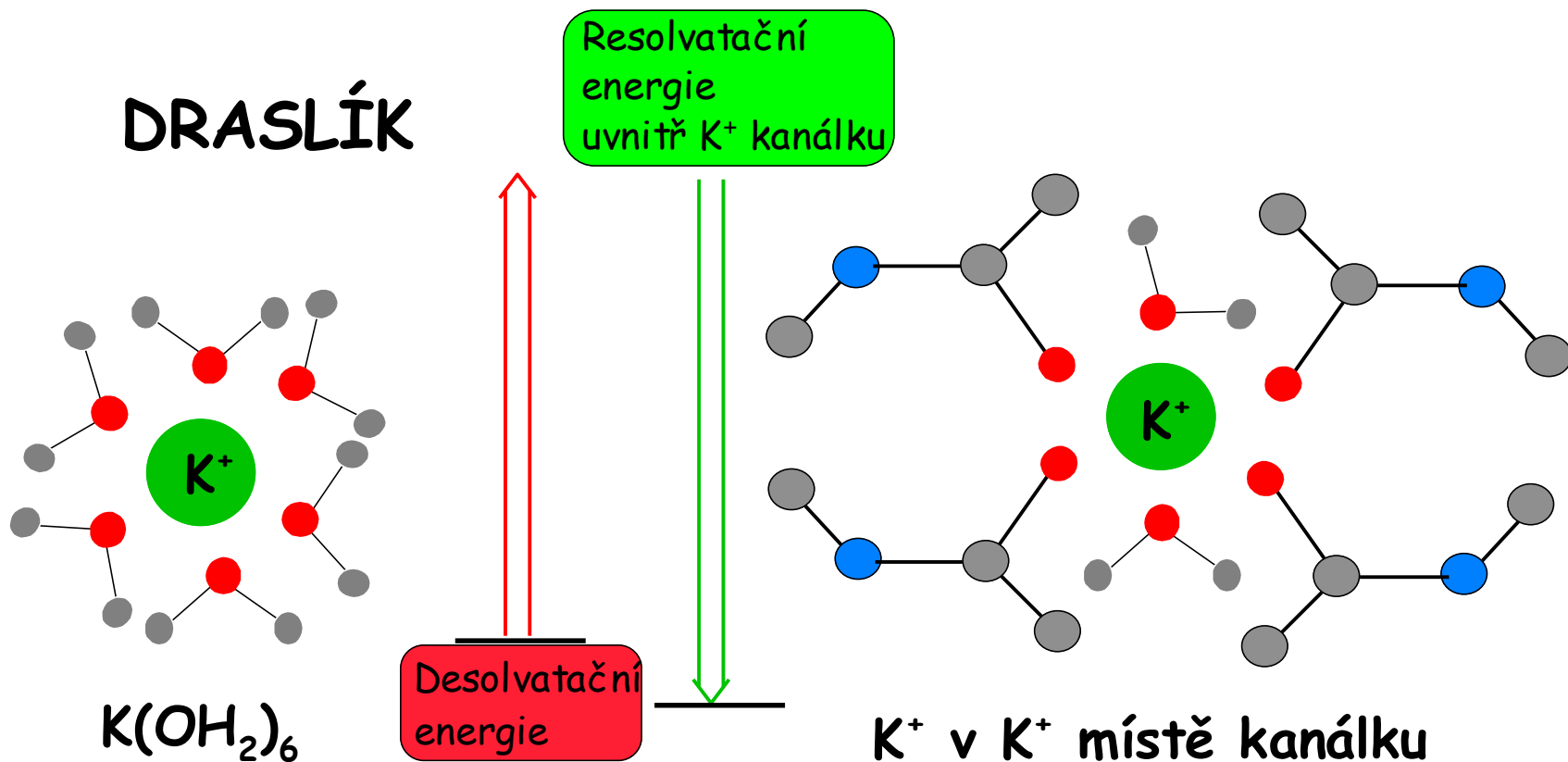
Struktura a funkce draselného kanálku.

- Draselným kanálkem prostupuje jen K^+ .
 - Ostatní kationty I. skupiny periodické tabulky na základě rozdílu v desolvatační (hydratační) energii kanálkem neprochází (atom K je dokonce větší než atom Na).
- Draselný kanálek je složen ze čtyř identických alfa-helikálních podjednotek, kónického tvaru s rozšířením dovnitř buňky.

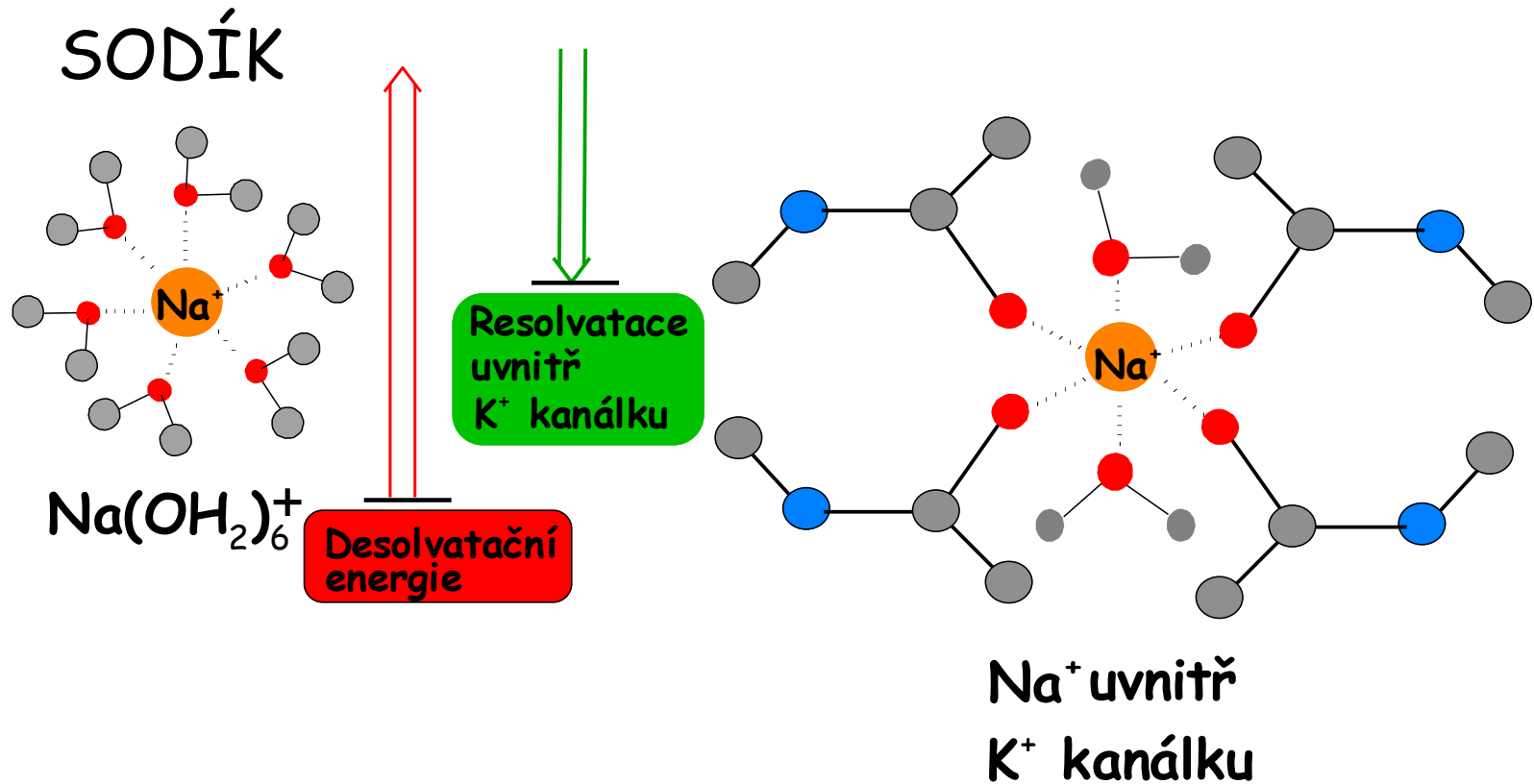
Poloměr a volná energie hydratace iontů alkalických kovů.

• Iont	Radius iontu (Å)	Volná energie hydratace (kJ/mol)
• Li ⁺	0,60	-410
• Na ⁺	0,95	-301
• K ⁺	1,33	-230
• Rb ⁺	1,48	-213
• Cs ⁺	1,69	-197

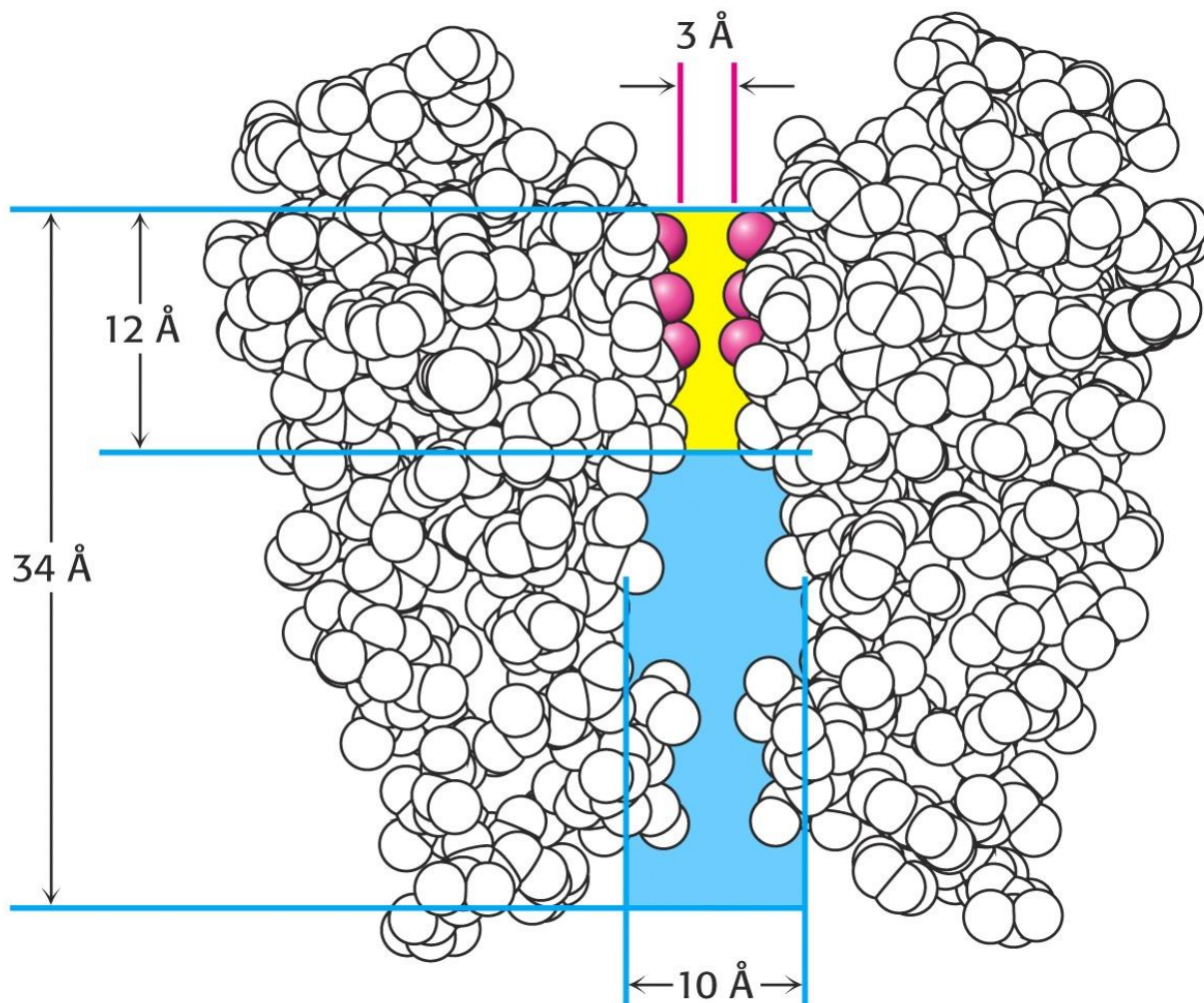
Energetický důvod selektivity iontů.
Energetická cena desolvatace K^+ iontu je kompenzována
přednostní interakcí se selekčním filtrem.



Sodný iont je příliš malý, aby mohl reagovat se selekčním filtrem. Volná energie desolvatace nemůže být kompenzována a Na^+ neprochází kanálkem.

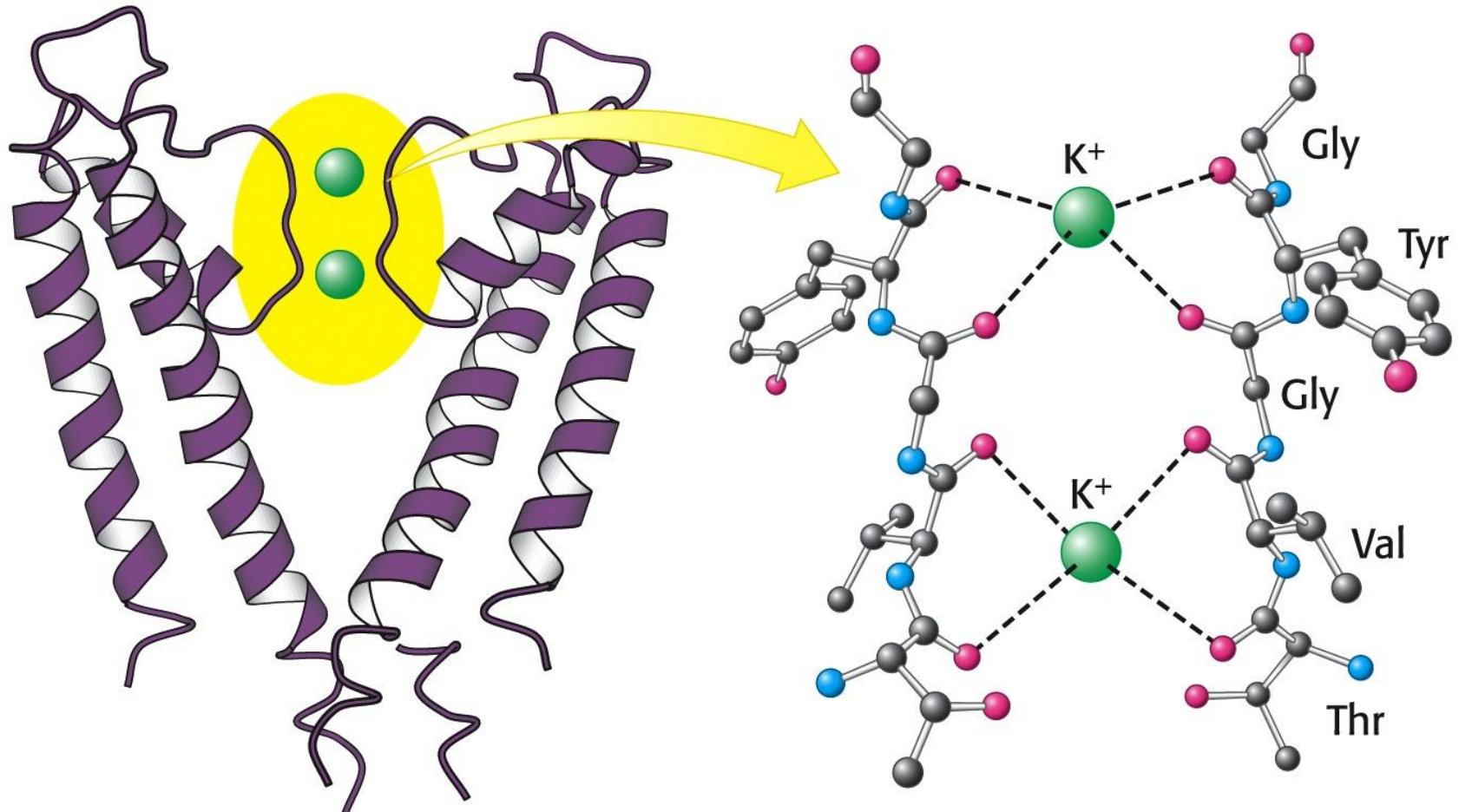


Cesta iontů kanálkem (od spodu).
 K^+ putuje 22 Å solvatován (obalen) vodou (modrá). Poté se musí
vody zbavit (volná energie hydratace !!)
a zbylých 12 Å putuje kanálkem poután karbonyly aminokyselin.



Selektivní filtr draslíkového kanálku.

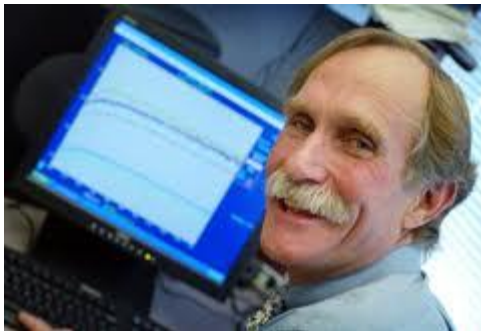
K^+ se váže na karbonyly aminokyselin TVGYC - což je sekvence selektivního filtru tvořená v 3 Å mezeře kanálku.



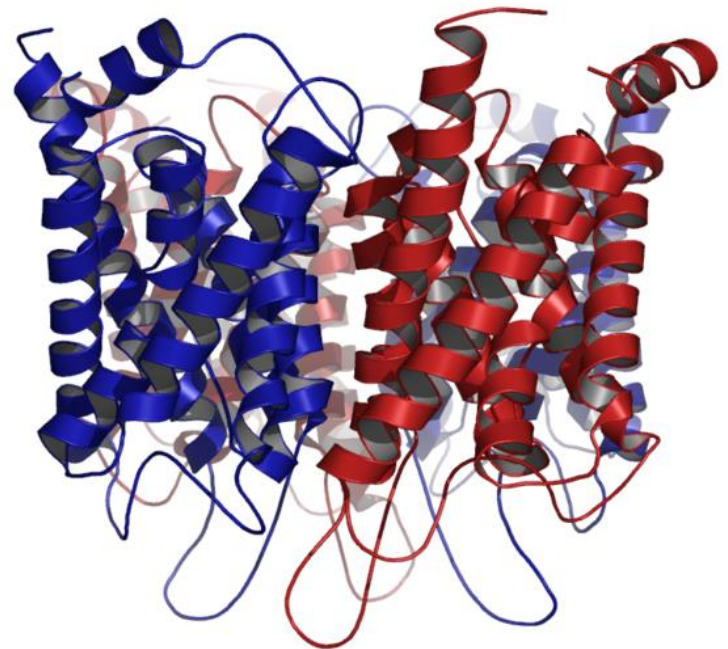
Aquaporiny jsou integrální membránové proteiny vytvářející póry v membráně biologických buněk.

- Za objev aquaporinů, jejich struktury a funkce obdržel v roce 2003 Peter Agre Nobelovu cenu za chemii. Současně s Roderick MacKinnonem, který se zasloužil o objasnění struktury a funkce draslíkového kanálku.

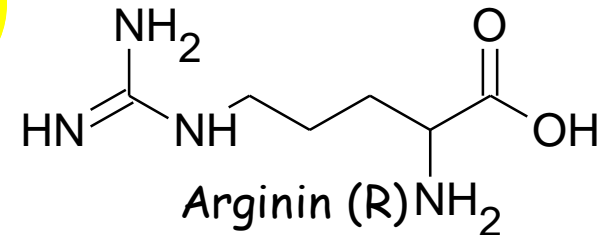
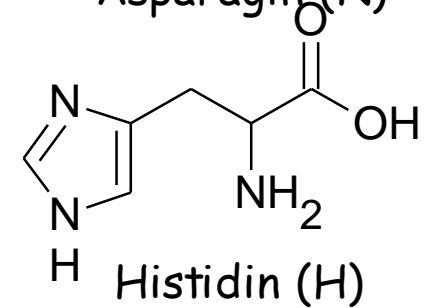
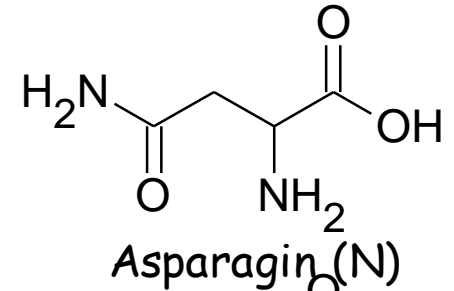
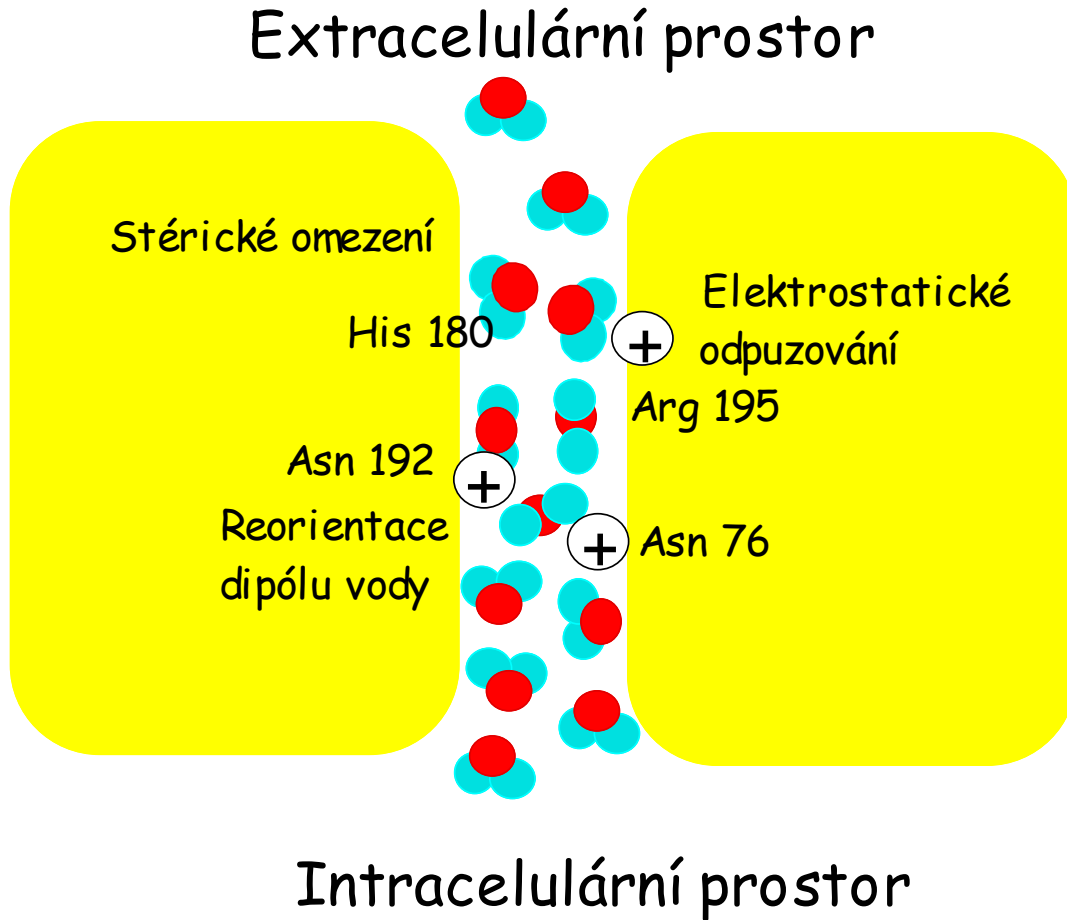
Peter Agre (* 30. leden 1949) je americký biolog a chemik



- **Struktura aquaporinu 1.** Aquaporin je tvořen šesti α -helixy. U savců je známo 13 typů aquaporinů. Šest z nich je v ledvinách.



Schematický náčrt průchodu molekul vody aquaporinem



Popis mechanismu průchodu vody aquaporinem.

- V dutině aquaporinu je ar/R (aromatic/arginine) selektivní filtr, což je seskupení aminokyselin, které zachycují molekuly vody a odpuzují jiné molekuly. Tímto mechanismem aquaporin selektivně váže molekuly vody.
- Filtr ar/R tvoří tetráda aminokyselin. Hlavní roli zde hraje arginin, který zeslabuje vodíkové vazby mezi molekulami vody umožňující vodě reagovat s pozitivně nabitým Arg, který působí také jako protonový filtr.

Laktosapermeasa - sekundární transportér využívající koncentrační gradient k přenosu laktosy.

- Laktosapermeasa je složena ze dvou částí (podjednotek). Každá část obsahuje šest integrální α -helixů. Sacharid se ukládá do kapsy uprostřed proteinu dostupné z intracelulárního prostoru. Mechanismem přenosu je symport (laktosa + protony).
- Mechanismus je v mnohém podobný ATP-asám P-typu.
- Cyklus startuje s oběma polovinami otevřenými ven z buňky. První je vázán proton z vnějšku, uvolní se prostor pro vazbu laktosy.
- Laktosu váže protonizovaná forma laktosypermeasy.
- Struktura se překlápí směrem do buňky.
- Permeasa uvolňuje první laktosu, následně oddisociuje proton a cyklus se uzavírá překlopením směrem do extracelulárního prostředí.

Mechanismus laktosapermeasy (symport - H^+ a laktosa).

