**Úvodní přednáška – eukaryotická buňka, membrány, membránový transport**

**Charakteristické struktury rostlinné buňky:**

**Buněčná stěna:** vyskytuje se i u bakterií a hub. V rostlinných buňkách má specifickou roli i strukturu.

**Plastidy:** kromě rostlinných buněk se vyskytují i u prvoků – např. krásnooček, hnědých řas. Specifický příklad jsou měkkýši živící se řasami, jejichž plastidy přežívají v buňkách měkkýšů po několik týdnů (měkkýši jsou pak zelení). Jev se nazývá kleptoplastie, tyto plastidy pak **kleptoplastidy** („ukradené plastidy“). Jediným rozdílem mezi rostlinami a dalšími organismy obsahující plastid je ten, že pouze v zelené linii (Glaucophyta, Rhodophyta, zelené řasy a vyšší rostliny) je plastid primární; ostatní organismy mají plastid sekundární/terciární.

**Vakuola:** vyskytuje **se vlastně u všech eukaryot jako lysosomální kompartment**. Také tedy nejde o specifickou rostlinou organelu, v rostlinných buňkách mohou plnit pouze specifickou funkci

* rostlinná buňka je tedy naprosto normální eukaryotická buňka, přičemž žádná z jejich struktur není výhradně specifická pouze pro rostliny

**Vývoj života na Zemi:**

* **fotosyntéza = proces přeměny sluneční energie na energii chemických vazeb** – nejdříve anaerobní = nebyl produkován kyslík
* vývoj oxygenní až později před 2,5 mld let, přičemž vznikající kyslík byl nejprve pro organismy toxický → až po dlouhé době se na něj adaptovaly a vzniklo aerobní dýchání, kde je kyslík využíván pro oxidaci (organických) látek za uvolnění energie.

**Prokaryotická vs. eukaryotická buňka**

* oddělení kompartmentů membránami
* **kompartmentace**
* vlastnost Eb umožněna membránami – obalení jádra membránou a pak vznik dalších kompartmentů
* **oddělení chemických procesů (i protichůdných) aby mohly probíhat v 1 buňce**
* **enzymatické reakce probíhají na menší ploše/ v menším objemu a tím efektivněji**
* **kompartmentací umožněna posloupnost dějů – př. transkripce (jádro) a translace (cytoplasma)**
* **umožnění endosymbiózy - vzniku mitochondrií a plastidů.**
* vchlipování PM již u sinic, rod Sinechococcus – sinice u které je PM vchlípena, a je tak zvětšena plocha pro fotosyntetické proteiny
* vznik organel (= kompartmentu obaleného membránou) popsána i u bakterií - např. magnetotaktických bakterií – ty mají v cytoplasmě magnetosomy = váčky obalené membránou s magnetickým minerálem. Váčky jsou uspořádány do řady podél magnetického pole, slouží pro orientaci bakterie v magnetickém poli.

**Endosymbióza**

* **proces pohlcení prokaryotické b. buňkou eukaryotickou za vzniku mitochondrií a plastidů = semiautonomní organely**

**Důkazy endosymbiotického vzniku plastidů a mitochondrií:**

* **vlastní DNA – u plastidů v cirkulární formě;**
* **geny v operonech (= soubor genů přepisovaný najednou a kódující proteiny jedné biochemické dráhy nejčastěji) organizací podobná PRK DNA**
* **2 – 4 obalové membrány,**
* **vznik vždy dělením, nikoliv *de novo***
* **dělící aparát prokaryotického typu**
* **prokaryotický typ proteosyntézy**
* **dělení nezávisle na jádře Eb**
* recentní symbiózy – Paramecium (trepka) s plastidy – po oddělení ale ještě dokážou přežívat nezávisle
* na konci 19. století formulována teorie endosymbiózy na základě nezávislého dělení plastidů

1. **Vznik mitochondrií - pohlcení prokaryotické buňky schopné aerobní respirace eukaryotickou buňkou. Stalo se 1x před cca 1,5 mld let.**
2. **Vznik plastidů – pohlcení fotosyntetizující prokaryotické buňky (sinice) buňkou eukaryotickou. Stalo se 1x před cca 1 mld let.**

Druhy plastidů: **Primární plastidy** (prošly jedinou endosymbiotickou událostí (viz výše), dvě obalové membrány, výskyt u rostlin a zelených řas pouze). **Sekundární plastidy**: prošly další endosymbiotickou událostí, tedy eukaryotická fotosyntetizující buňka (řasa s primárním plastidem) byla pohlcena jinou eukaryotickou buňkou bez plastidu. U eukaryotického endosymbionta muselo během sekundární endosymbiózy dojít k drastické redukci všech organel s výjimkou plastidu.

* důkazem sekundární endosymbiózy je přítomnost 3-4 membrán u sekundárního plastidu, kdy 1-2 vnější vznikly při sekundární endosym.
* někdy přítomen **nukleomorf (např. u** Cryptophyta (skrytěnky), Chlorarachniophyta **) = zbytek jádra endosymbionta** s DNA, která dodnes obsahuje několik přepisovaných genů. Většina organismů se sekundárním plastidem nukleomorf neobsahuje, protože došlo k rozsáhlé redukci eukaryotického endosymbionta na pouze plastidy.
* Eb tak obsahuje 3 genomy: vlastní jaderný, genom plastidů a genom mitochondrií,
* Eb se sekundárním plastidem s nukleomorfem obsahuje kromě výše zmíněného i genom eukaryotického endosymbionta.

Při sekundární endosymbióze se mitochondrie endosymbionta vždy ztrácejí.

**Kompartmentace a biomembrány**

* kompartmentace = rozdělení prostoru buňky pomocí biomembrán
* sekretorický systém: ER, GA, endozóm (soubor váčků), vakuola, PM
* lytický systém: vakuola
* peroxisomy: u všech Rb
* obecně – organela nadřazena kompartmentu (více kompartmentů v jedné organele)
* možnost kompartmentace i pomocí cytoskeletu a na něm zakotvených enzymů

Kompartmentační pravidla

* perinukleární prostor = mezi dvěma jadernými membránami – komunikace s ER – neprotoplazmatický
* membrány mají vždy dvě strany – protoplazmatická (cytoplazma, karyoplazma, chondrioplazma) X neprotoplazmatická (ER, GA, vakuoly, perinukleární prostor, vnitřek thylakoidů) => membrána je strukturně a funkčně asymetrická
* prostory protoplazmatické a neprotoplazmatické se nikdy nemíchají

**MEMBRÁNY**

* 5-10 nm tlusté – závislé na lipidech, sterolech a proteinech, co je tvoří
* dědí se při dělení a pak se dosyntetizují, nikdy nevznikají *de novo*
* semipermeabilita – volně projde minimum látek – regulace průchodu
* plastické – nemají konec a vždy se uzavírají; mají cytosolickou a extracelulární stranu

**Fce:**

* **regulace transportu – samy fungují jako transportní systém**
* **přenos signálu – změna membránového potenciálu je taky signál – u rostlin řízeno přes H+ ionty; u Ž funguje Na+/K+ pumpa**
* **komunikace mezi buňkami díky plasmodesmům**
* **další fce v semiautonomních organelách (obsahují zde např. proteiny elektrontransportního řetězce)**
* **lipidy v nich amfifilní = mají hydrofóbní (orientovanou dovnitř) část ( „nožička“ řetězec MK) a hydrofilní část (orientovanou směrem do cytosolu)**
* amfifilní lipidy tvoří micely, liposomy či membrány
* **hydrofóbní část se snaží dostat od vody vs. hydrofilní do vody – to je energeticky nejvýhodnější**
* při přerušení se membrány samovolně uzavírají

1. fosfolipidy – deriváty kyseliny fosfatidové + substituent
2. glykolipidy – hojně v membráně plastidů; stabilizace ve vodním prostředí
3. sfingolipidy – sfingosin – alifatický aminoalkohol + substituent cukr u rostlin

**Další složky:**

* steroly – cholesterol málo; hojně **fytosteroly – kamposterol, sitosterol, stigmasterol** – **regulují tuhost membrány v závislosti na jejím složení**
* **kardiolipin** (protonová past) – pomáhá rozdělení H+ iontů na membrány dýchacího řetězce (vnitřní membrána mitochondrií)

**KONCEPT TEKUTÉ MOZAIKY** – lipidy jsou mezi sebou vázány slabými interakcemi; proto je umožněn laterální pohyb molekul v membráně až několik mikrometrů za vteřinu; rotace lipidů i proteinů

* flip-flop pohyb nejméně častý – energeticky nevýhodné, kdy hydrofilní část musí překonat hydrofóbní (avšak v ER při syntéze membránových lipidů musí dojít k jejich překlopení do cytosolické části membrány; zajišťují enzymy flipázy neboli flip-flopázy)
* **součástí membrán jsou i integrální membránové proteiny** – pro jejich funkci je důležitá správná viskozita, též laterální pohyb

**Viskozitu membrány určuje teplota a složení membrány**

* **délka řetězců mastných kyselin** (čím delší tím vyšší teplota tání)
* **nasycenost řetězců MK i jejich délka** – přičemž: čím delší řetězec MK → tím tužší membrána; dvojná vazba ohne řetězec – ohyb řetězce naruší semikrystalické uspořádání → membrána je tak tekutější
* **přítomnost sterolů** – stabilizace tekutých membrán („vyplnění místa“, viz. obr) a naopak i zvýšení tekutosti u membrán stabilních (narušení semikrystalického uspořádání).

**Tm = teplota tání**, teplota, při které dochází ke změně viskózního stavu ve fluidní u části membrány; nicméně u přírodních membrán není klasický fázový přechod, protože membrána obsahuje mnoho druhů lipidů o různé Tm→ jsou tak odolnější proti teplotním změnám

* **př. chladová aklimace** – u R komplexní proces, který zahrnuje i změnu složení membrán, aby zůstaly fluidní i při nízkých teplotách
* **Obsah olejů jako zásobních látek rostlin, hlavně v semenech – oleje zůstávají při normální teplotě tekuté díky složení MK (**př. olivový olej – obsah hlavně nenasycených MK (k. olejová))

K**ONCEPT MEMBRÁNOVÝCH MIKRODOMÉN** – existence viskóznějších oblastí = mikrodomény – fce: sdružování fčně podobných proteinů nebo proteinů účastnících se jedné signální dráhy do domén, čímž se zvyšuje efektivita jejich funkce - výhoda při signalizaci, endocytóze

* předpoklad jejich rychlého vzniku a rozpadu, ale u rostlin překvapivě stabilní
* Mikrodomény mají jiné složení než okolní membrána
* Předpokládáme velikost desítek nm

**TRANSPORTNÍ MEMBRÁNOVÉ SYSTÉMY**

* membránové proteiny

1. **periferní** – přes slabé interakce (elektrostatické síly, solné můstky, vodíkové vazby), snadno oddělitelné od membrány třeba zvýšením koncentrace solí
2. **integrální** – **transmembr. domény = 20 amk tvořících alfahelix**; fce: receptorů, transportérů, enzymů (elektron transportních řetězců dýchacích a fotosyntetických)
3. **kotvení v lipidové dvojvrstvě** – kotva vzniká během post- transkripčních úprav

* lipidová kotva (myristyl, palmityl), prenylová kotva – hydrofóbní
* **GPI – glykofosfatidylinositolová kotva – na extracelulární straně**

**Membránový transport**

1. **pasivní** – nespotřebovává energii, ve směru gradientu elektrochem. potenciálu

volná difuze (průchod látek volně membránou),

otevřeným kanálem

přenašečem (usnadněná difúze)

1. **aktivní** – spotřeba energie, transport proti směru elektrochem. potenciálu

pumpy = aktivní, spotřeba ATP

případně přenašečový protein (symport či antiport) = taktéž aktivní

* fce: mimo jiné pro udržení turgoru (=tlak PM na BS) – důležitý pro růst a dělení buňky; ustanovuje se přes akumulaci solí v cytosolu, příjem látek.

**Transportéry**

1. **Pumpy** – až 102 molekul/s; **primární aktivní transport =** generují transmembránový potenciál
2. **Kanály** – až 108 molekul/s; **pasivní transport**
3. **Přenašeče** – **a) uniport** (enzymová kinetika, kdy rychlost transportu je dána počtem přenašečů a ne koncentrací přenášené látky); jde o pasivní transport vždy ve směru koncentračního spádu
4. **Přenašeče** – **spojeno s transportem protonů (=H+) = sekundární aktivní transport** – **kdy ATP je ve formě gradientu H+; b)symport, c) antiport**
5. **Aquaporiny**

**ad1) Pumpy**

1. **ATPázy P-typu:**

* **H+- ATPáza u rostlin**
* Na+/K+ pumpa uŽ
* **obě dvě generují membránový potenciál**
* během přenosu dochází k dočasné fosforylaci
* transmembránový potenciál – význam pro transport i signalizaci
* **kontrola pH; pro ně optimum pH=6,6 – při poklesu pH v cytoplazmě z obvyklých 7 jsou tedy aktivovány a pak pumpují H+ ven a vyrovnávají pH**
* **uplatnění při růstu buněčné stěny, kterou okyselují**

1. **ATPázy V-typu**

* proteinové komplexy; nejméně 3 membránové a 5 cytosolických domén
* štěpí ATP kvůli transportu H+ proti koncentračnímu spádu
* pH vakuoly = průměrně 5,5 (ale může být i mnohem méně) – je zajištěno V-typem pumpy, aby ve vakuole mohly probíhat specifické lytické procesy. ATPázy V typu jsou i na endomembránách, kde okyselují lumen endomembr. organel.

3. **ATPázy F- typu**: v membránách mitochondrií a plastidů; syntéza ATP.

1. **H+ - PPáza = pyrofosfatáza**

* vývin v důsledku přebytku PPi při syntéze makromolekul (př. celulóza)
* na membráně vakuol, unikátní pro rostliny, transportem H+ do vakuol přispívá okyselení vakuol

1. **ABC transportéry = ATP binding cassette**

* **přenos organických látek za štěpení ATP**
* **velká rodina strukturně příbuzných proteinů**
* mohou být i nespecifické, tedy rozeznávají třeba celou skupinu strukturně podobných substrátů
* ABC transportéry jsou např. využívány pro transport toxických látek do vakuoly, kde jsou zneškodněny (např. fytochelatiny – konjugáty glutathionu chelatující např. těžké kovy; xenobiotika, často zneškodňována glykosylací, též transportována pomocí ABC transportérů do vakuoly), dále se podílejí na transportu sekundárních metabolitů. Na PM jsou lokalizovány ABC transportéry pro dopravu monolignolů do BS (syntéza ligninu)

**ad2) Kanály**

* regulace otevřenosti: napětím, ligandem, mechanicky, pasivní transport (nevytváří se zde energie), selektivní/méně selektivní

1. **K+ kanály**

* **K+ iont je nejdůležitější při regulaci turgoru**
* pletivově specifické kanály s odlišnou regulací

1. **Ca2+ kanály**

* **otevření směrem do cytosolu**, kde je normální koncentrace Ca2+ extrémně nízká
* slouží pro přenos signálu
* V PM je mechanosenzitivní Ca2+ kanál –možná role v dráze vnímající snížení teploty (snížení teploty – zvýšení tuhosti membrány – vnímání mechanosenzitivním kanálem)

1. **Aniontové kanály (pro chloridové anionty, soli); též aniontové kanály pro organické kyseliny**– př. malátový kanál v tonoplastu (membráně vakuoly), kanály v PM pro transport organických kyselin de rhizosféry pro detoxifikaci těžkých kovů (chelatace)

**ad3) Přenašeče**

* mají specifické místo pro přenášené molekuly
* při zvyšující se koncentraci solutů dochází k nasycení přenašečů a zpomalení transportu – enzymová kinetika

**Přenašeče účastnící se pasivního transportu**

* přenášejí po koncentračním spádu
* pasivní transport (též nazývaný usnadněná difúze)

**Přenašeče spojené s transportem protonů (aktivní transport)**

* Přenášejí proti koncentračnímu spádu
* sekundární aktivní transport – využívají transmembránového potenciálu (větší koncentrace H+ vně/ nižší v cytosolu) (vs. Žb, kde je místo H+ iont Na+)
* **symport; antiport** (viz. obr prezentace)

**ad5) Aquaporiny**

* tetramery – každá doména představuje kanál
* umožnění zvýšeného transportu vody pletivy

**Membránový potenciál (MP)**

-Rozdíl elektrických potenciálů mezi dvěma vodními prostředími oddělenými membránou

-Generován na všech membránách

-Největší rozdíl elektrických potenciálů je na PM (kolem -140 mV; uvádíme pro záporný náboj v cytosolu)

-Na vakuolární membráně -20 mV

-V rostlinách je MP generován především H+ ATPázou P-typu (transport vodíkových iontů ven z buňky, zanechává nekompenzovaný záporný náboj v cytosolu), a dále transportem K+ iontů oběma směry; stálý pomalý výtok K+ z buňky kanály (udržování záporného náboje uvnitř buňky; regulace uzavřením při hyperpolarizaci). Dále každá transportovaná molekula přispívá k přesunu nábojů – nutnost kompenzace).