

Kompartimentace metabolických dějů v buňce

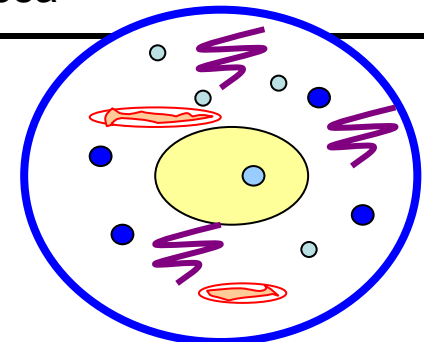
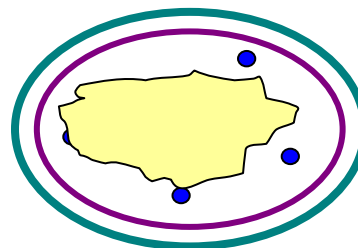
Biochemický ústav LF MU

E.T.

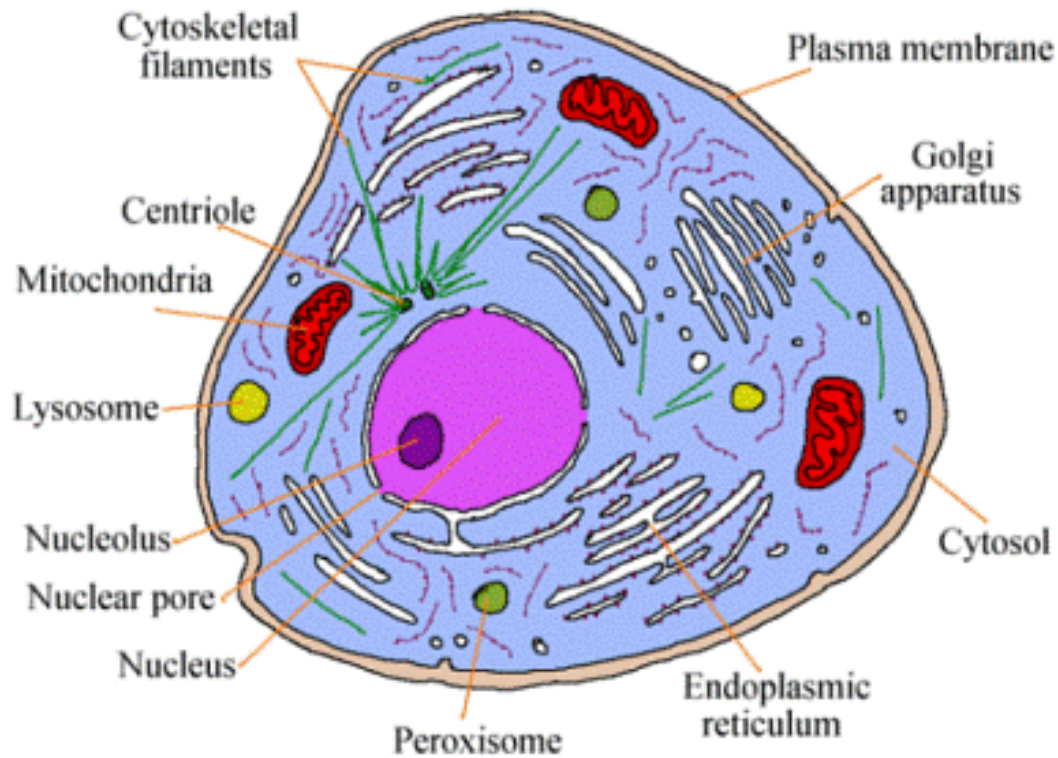
2013

Buňky prokaryontů a eukaryontů

Charakteristika	prokaryont	eukaryont
Velikost buňky (nm)	1-10	>10
Jádro (karyon)	není	je
DNA	obnažená, kruhová	v chromosomech, asociována s proteiny
Organely	nejsou	jsou
Cytoskelet	není	je
Komunikace s prostředím	získávají živiny z prostředí, které je obklopuje	nachází se v konstantním prostředí
Specializace	nízká	diferenciace
Dělení	přehrádečné (binární)	mitosa



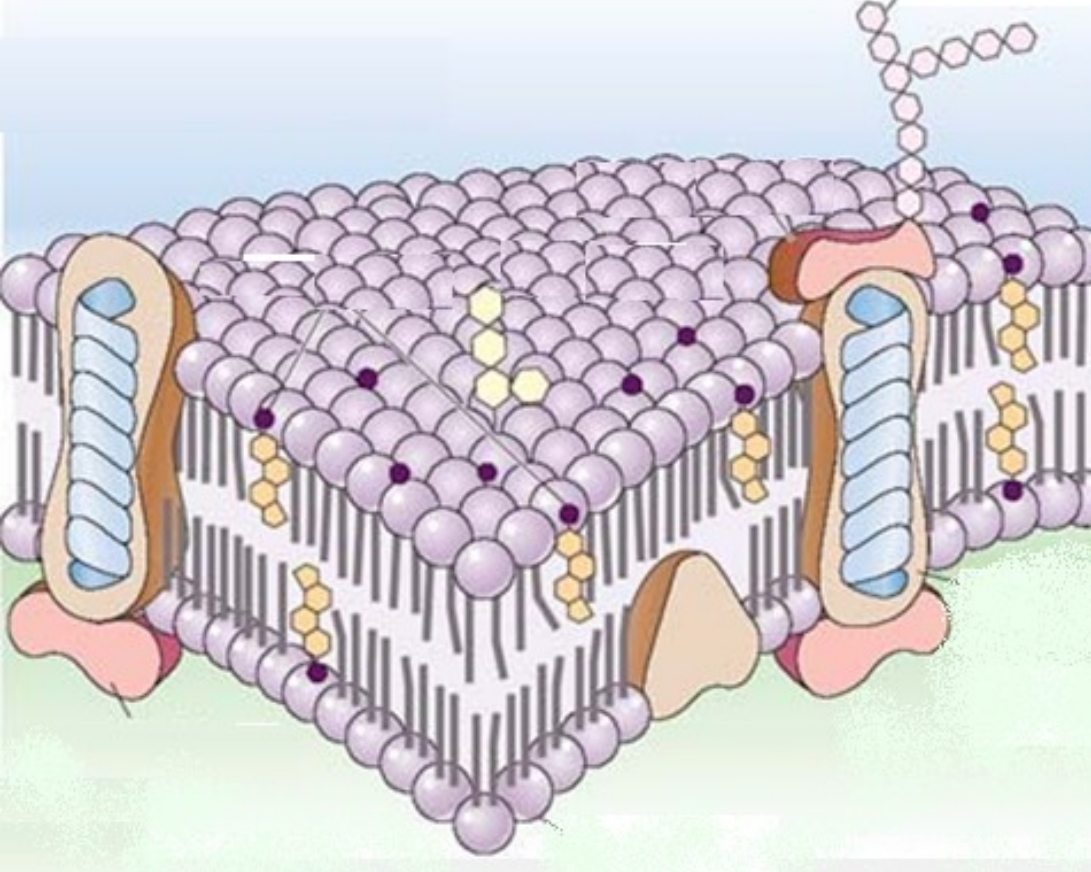
Živočišná eukaryontní buňka a její kompartmenty



Buněčné kompartmenty

- Organely v buňce jsou obklopeny membránami, které oddělují vnitřní prostředí organely od cytosolu
- V membránách se nachází transportní bílkoviny a receptory, které regulují obsah přicházejících a odcházejících látek a udržují tak stálé složení vnitřního prostředí organely
- Každá organela tak má charakteristické vnitřní prostředí a je vybavena pro určité metabolické pochody
- V různých typech buněk může být zastoupení látek v organelách různé

Buněčné membrány



Složení:

Fosfolipidy (fosfatidylcholin, fosfatidylethanolamin, fosfatidylserin, fosfatidylinositol, sfingomyelin)

Glykolipidy

Cholesterol

Proteiny (periferní a integrální)

Fluidně-mozaikový model: dvojvrstva fosfolipidů, v níž jsou zabudovány membránové proteiny.

Polární „hlavy“ fosfolipidů jsou vystaveny na obou površích membrány, nepolární zbytky mastných kyselin jsou orientovány do vnitřní části membrány. 5

Buněčné membrány

- Membrány - brání volnému průchodu látek z prostředí do buňky a naopak, nebo mezi jednotlivými kompartmenty.
- Selektivní permabilita: některé látky nesmějí procházet vůbec, jiné jsou propouštěny snadno a jiné jsou transportovány i proti koncentračnímu spádu

Další funkce membrán:

- metabolické (podmíněné obsahem enzymů),
- regulační (vážou regulující látky prostřednictvím receptorů)
- imunologické (rozpoznávání cizorodých struktur).

Složení membrán

Zastoupení složek je různé v různých typech membrán:

Typ membrány	Lipidy	Proteiny	Sacharidy
Cytoplazmatická savčí	43	49	8
Cytoplazmatická bakteriální	30	70	-
Myelinová	75	22	-
Vnější mitochondriální	48	52	stopy
Vnitřní mitochondriální	24	76	stopy
Endoplazmatické retikulum	44	54	2

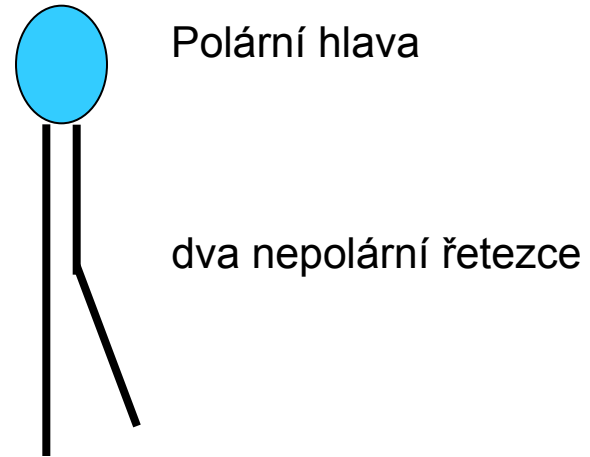
Fosfolipidy mají charakter tenzidu



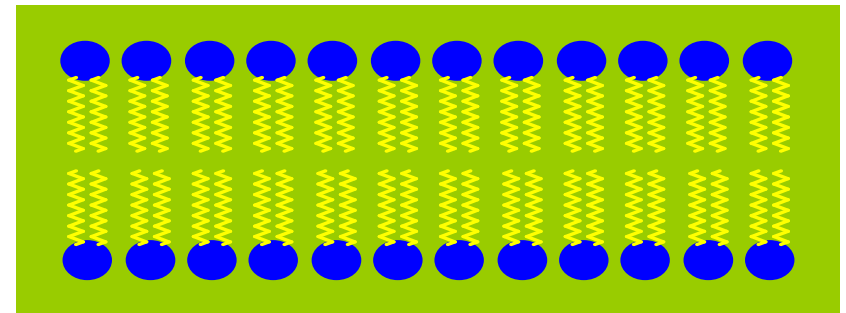
Glycerofosfolipid



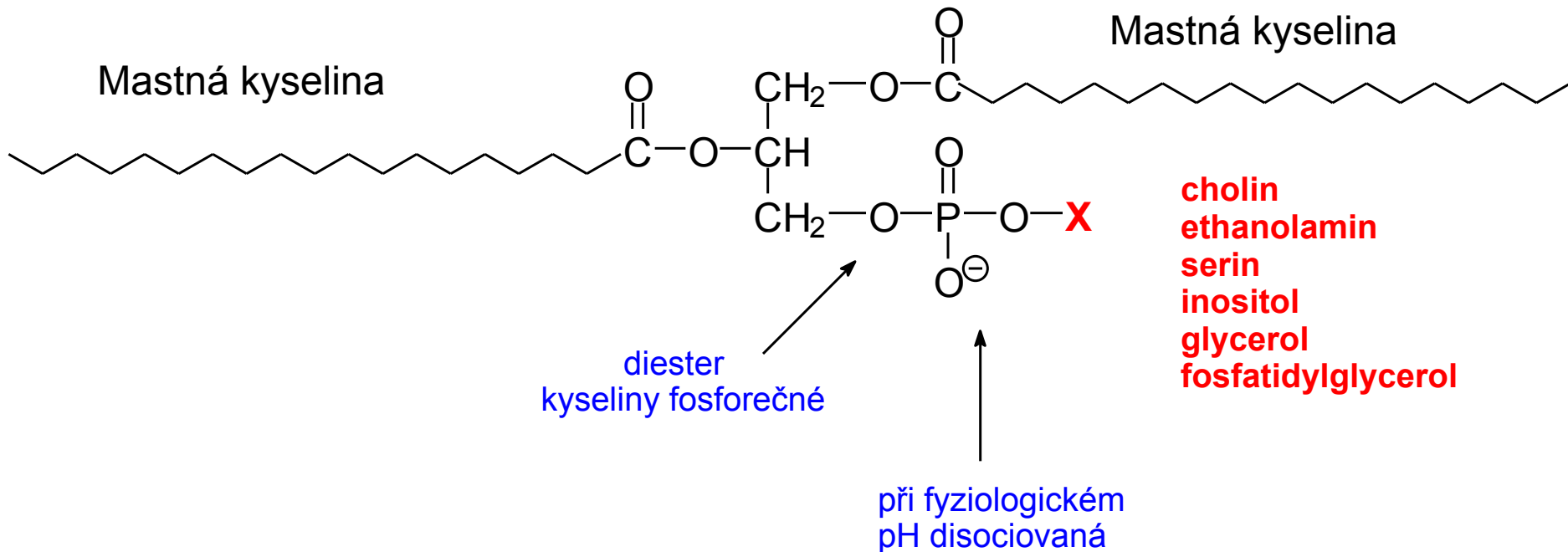
Sfingofosfolipid



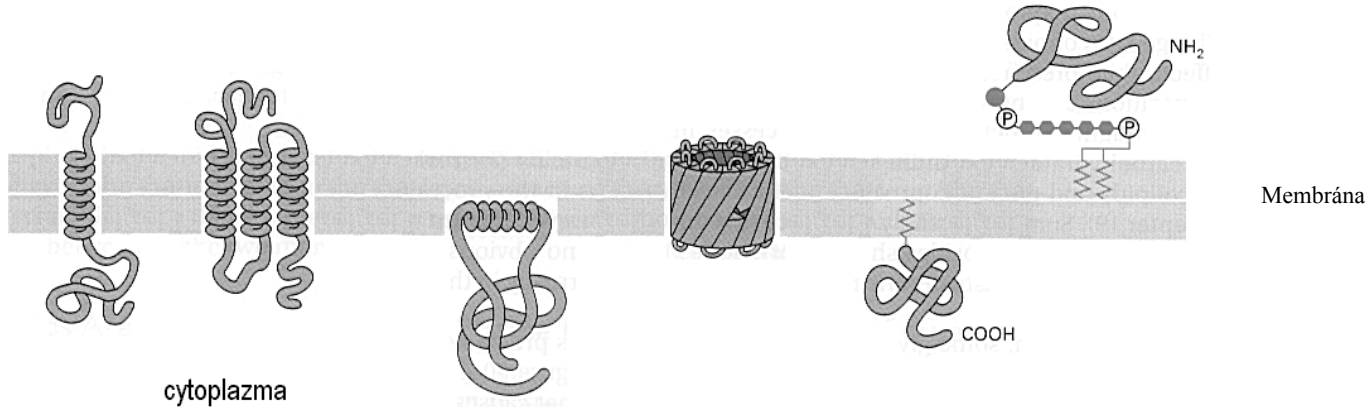
**tvoří dvojvrstvu v
buněčných membránách**



Struktura glycerofosfolipidu



Proteiny v membránách



Integrální a periferní membránové proteiny

Proteiny v membránách: enzymy, transportéry, receptory, kanály.

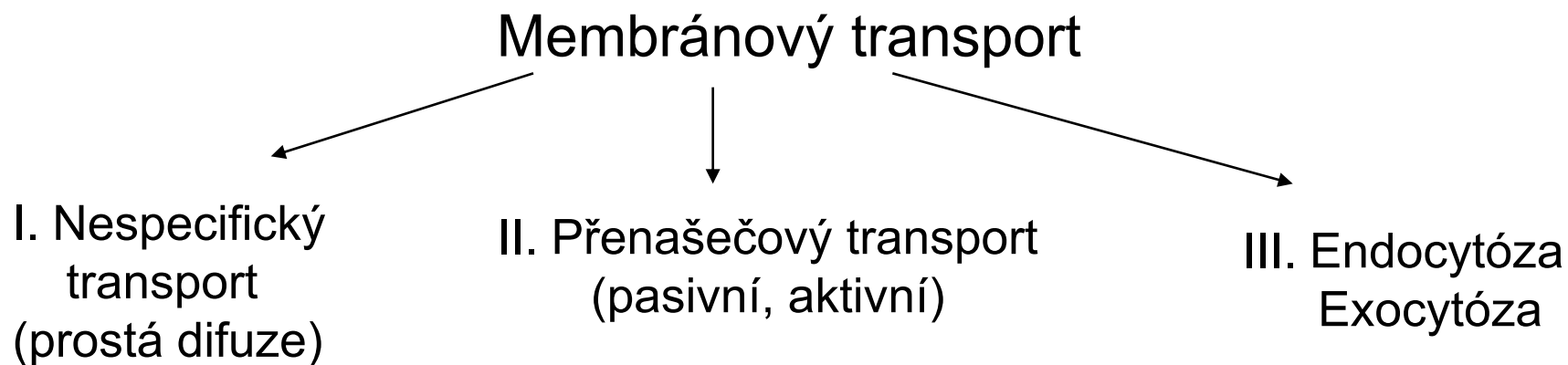
Často glykoproteiny.

Transport přes buněčné membrány

Mechanismy transportů jsou závislé na povaze látek, které mají být přes membrány přenášeny.

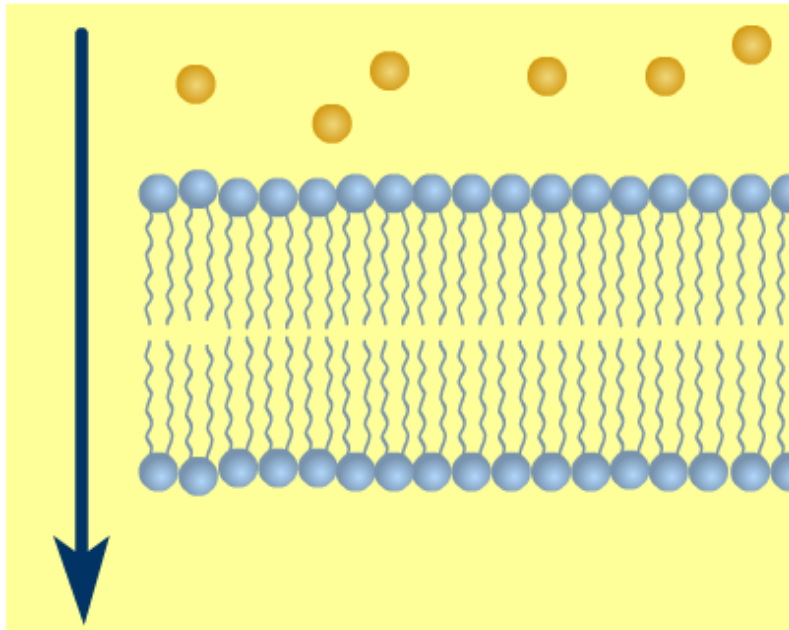
transportní mechanismy: specifické a nespecifické

podle potřeby energie: pasivní a aktivní



Prostá difuze

- Lipidová dvojvrstva - volně dostupná pouze pro vodu a malé nenabitě molekuly jako O_2 , CO_2 , NO, CO, N_2 .
- Přes membránu snadno prochází také menší hydrofobní molekuly, které nereagují s vodou, např. steroidní hormony.
- V některých membránách, např. ve vnější mitochondriální membráně, jsou obsaženy póry tvořené bílkoviny a těmi mohou procházet malé polární molekuly. Pro většinu membrán je však pasivní difuze limitována jen na malé hydrofobní molekuly.

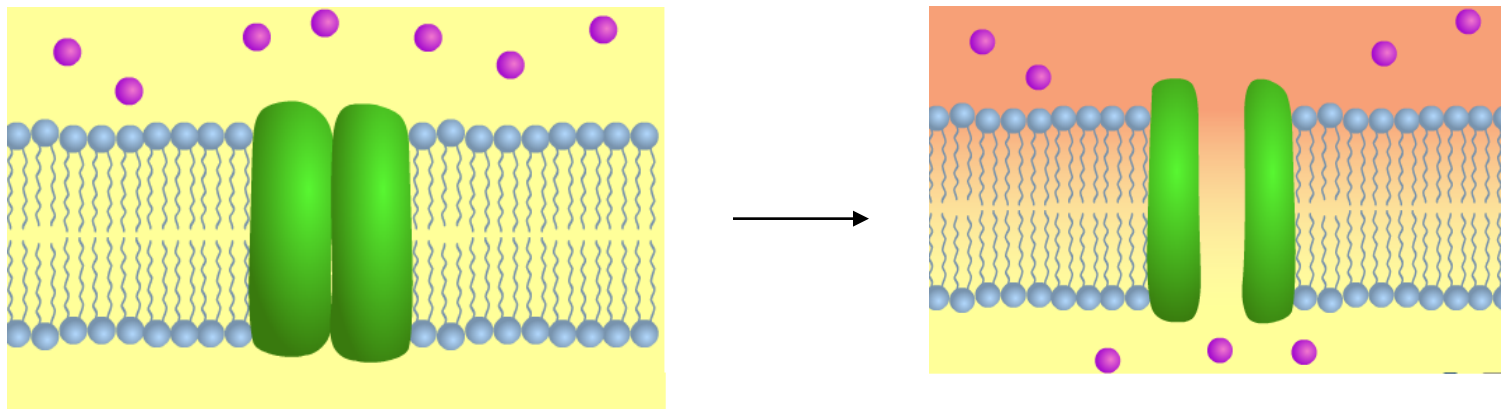


Iontové kanály

- Integrální proteiny v membránách mohou vytvářet kanály a póry usnadňují translokaci molekul nebo iontů přes membránu.
- Látky se pohybují kanálkem ve směru koncentračního spádu.
- Kanálové proteiny nevážou ani nevyčleňují molekuly nebo ionty, které jsou přenášeny.
- Jejich specifita je omezena na velikost a náboj látek. Průtok kanálem může být inhibován a může být regulován řadou mechanismů.

Kanály otvírané změnou napětí

V excitabilních buňkách, jako jsou nervové a svalové buňky, jsou kanály pro ionty, které se otvírají na základě změny membránového potenciálu



Ligandem otvírané kanály

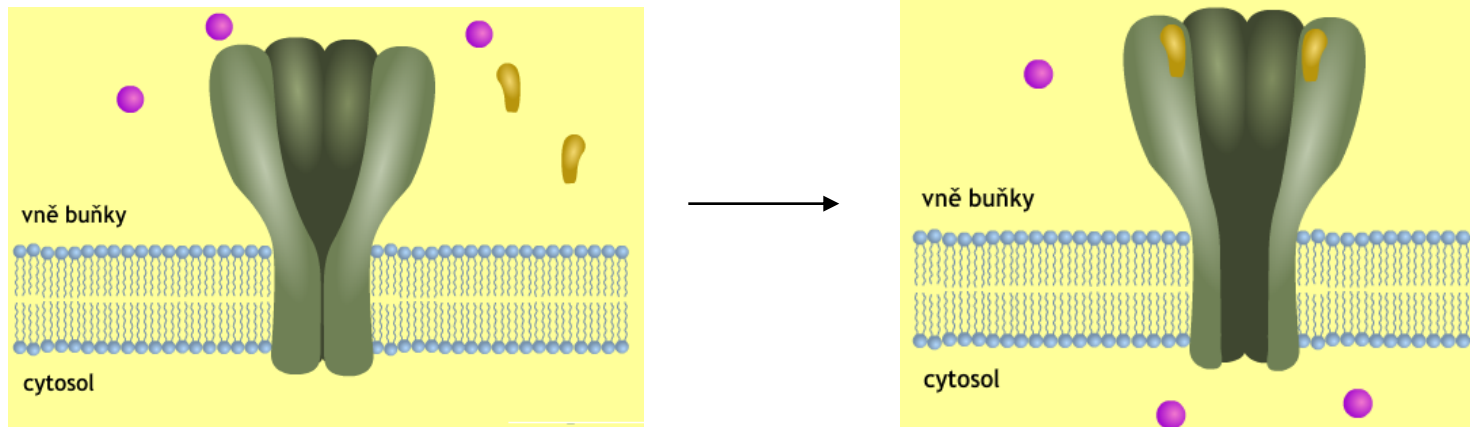
Kanál se otevírá po navázání malé signální molekuly (ligandu).

Některé kanály jsou otvírány extracelulárními ligandy, jiné intracelulárními ligandy.

Ligand není kanálem transportován.

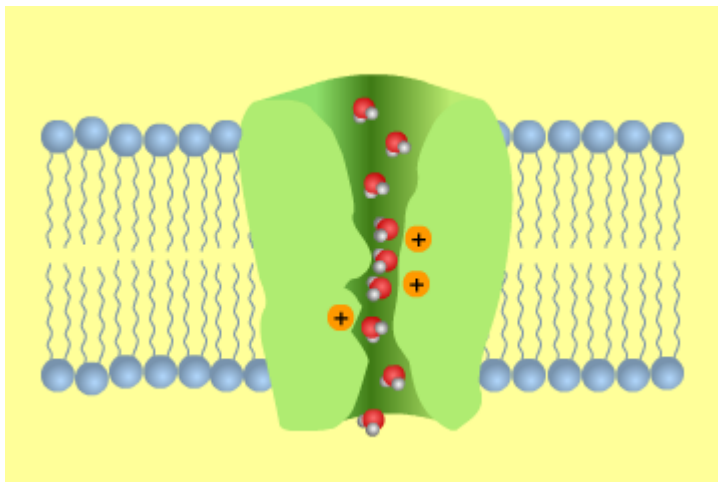
Př.:

acetylcholinový receptor nikotinového typu. Po navázání acetylcholinu se otevírá kanál pro sodné ionty.



Aquaporiny

- Membránové kanály pro vodu
- jsou rozhodující pro obsah vody v buňkách.
- malé hydrofobní integrální membránové proteiny.
- nepropustné pro nabitě molekuly, včetně protonů.
- Specifičnost kanálů k vodě je dále ovlivněna kladně nabitými zbytky argininových molekul v místě zúžení, které vytváří bariéru pro průchod kationtů



Membránové transportní proteiny

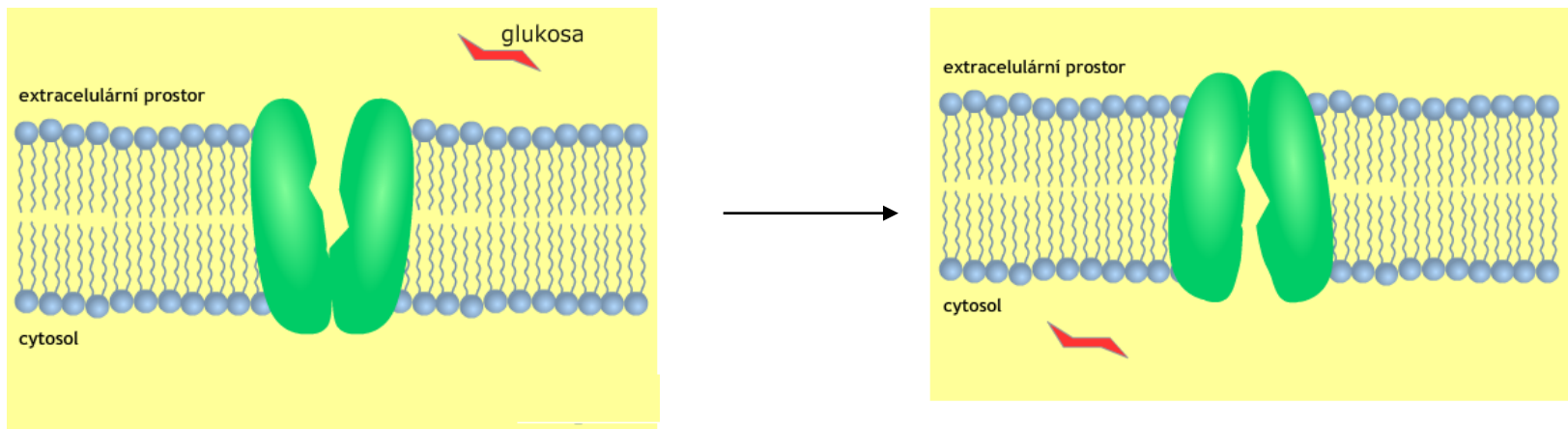
- Umožňují přenos molekul nebo iontů přes membránu navázáním a fyzikálním transportem přes membránu.
- Rychlost transportu je vyšší než při prosté difuzi.
- transport vykazuje saturační kinetiku. Pro transportér může být stanovena V_{\max} i K_m .
- Většina transportérů má vysoký stupeň strukturní specifity k substrátu.

Proces transportu je charakterizován čtyřmi fázemi:

- rozpoznání solutu transportérem
- translokace solutu přes membránu
- uvolnění solutu transportérem
- návrat transportéru do původního stavu

Pasivní transport (usnadněná difuze)

Transport glukosy do buňky pomocí transportéru GLUT



Aktivní transport

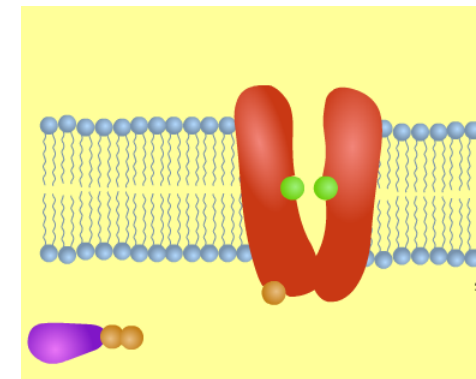
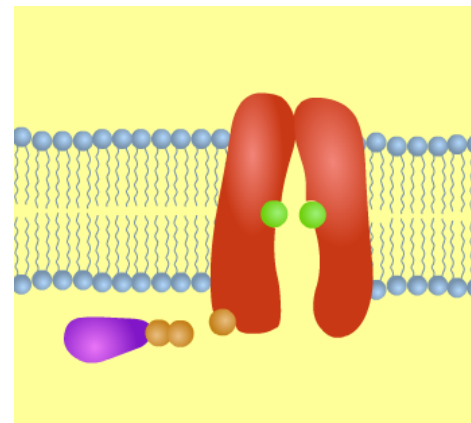
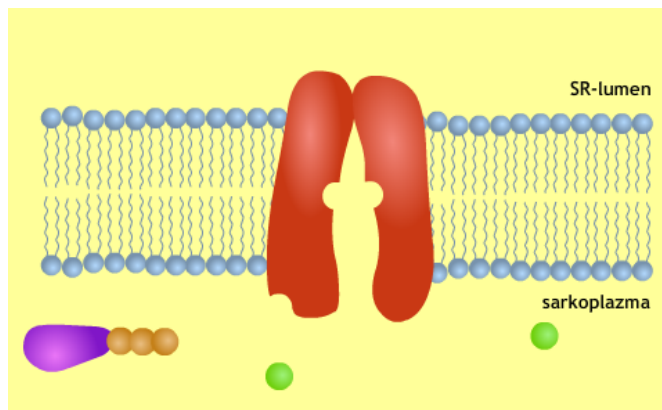
- Transportovaná látka přenášena **proti koncentračnímu gradientu**
- Je potřebný zdroj energie.
- U živočišných buněk je to nejčastěji ATP. Transportéry jsou pak také nazývány ATPasy (ATP je během translokace hydrolyzováno).
- Transportní protein je dočasně fosforylován, tím dochází ke změně jeho konformace, která umožní translokaci látek.
- Při nepřímém (sekundárním) aktivním transportu je vytvořen koncentrační gradient iontu aktivním transportem a jiný transportér využívá energii tohoto gradientu k přenosu další látky.

Ca²⁺-ATPasa sarkoplazmatického retikula

V kosterním svalu je Ca²⁺-ATPasa sarkoplazmatického retikula (SERCA) zapojena do cyklu kontrakce a relaxace a tvoří 1/3 povrchu membrány.

Je tvořena jediným proteinem, který obsahuje 10 transmembránových helixů.

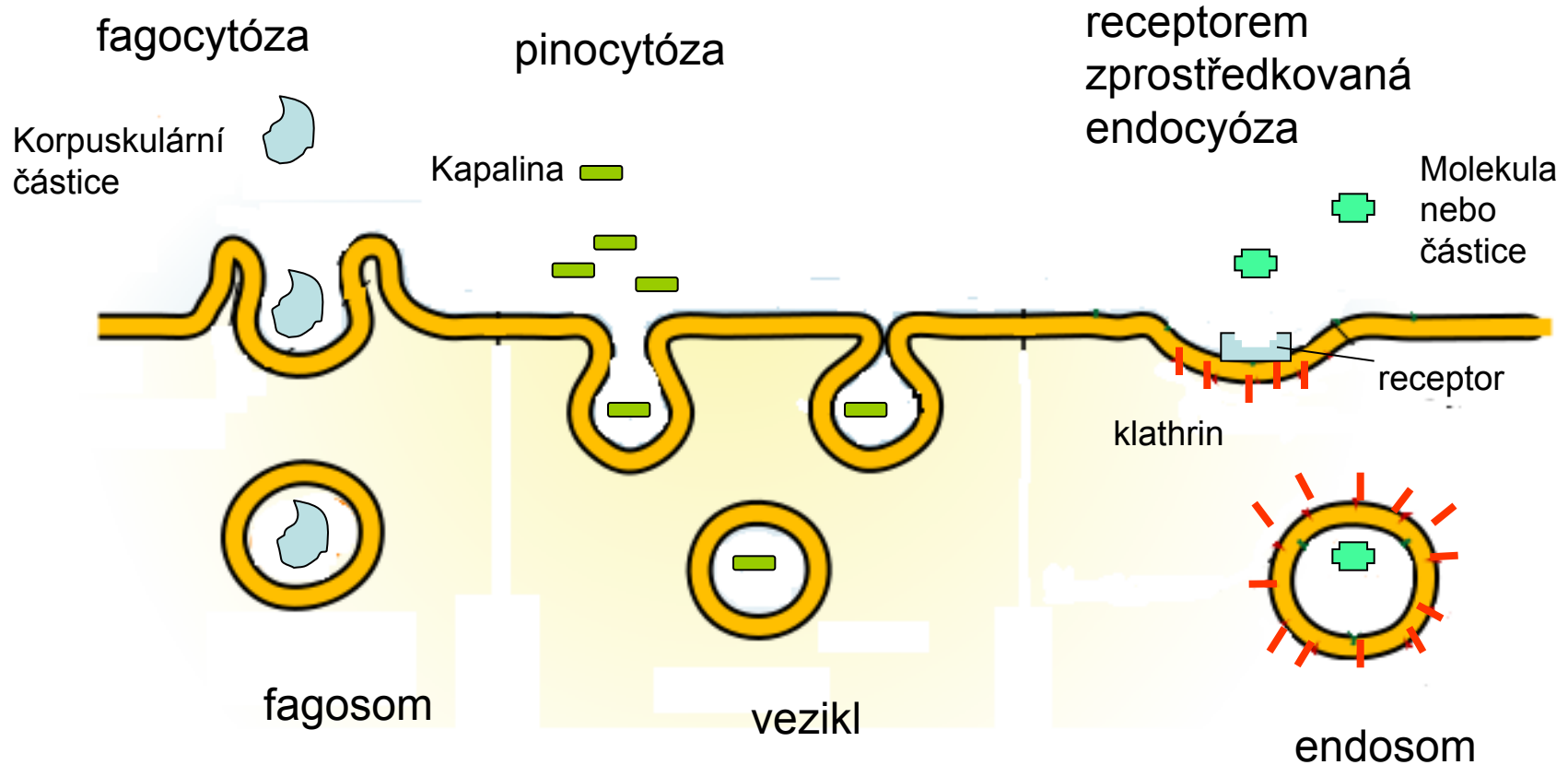
Po navázání vápníku se na transportér váže ATP, bílkovina je fosforylována a mění konformaci. Vazebné místo má malou afinitu k Ca²⁺ a je otevřeno opačným směrem (do lumen ER nebo extracelulárně).



Příklady ATPas

Typ ATPasy	Příklad	Lokalizace	Funkce
F (faktor spřažení)	H ⁺ -ATPasa	mitochondriální membrána	syntéza ATP
V (vakuolární)	H ⁺ -ATPasa	lyzomální membrána	transport H ⁺ , acidifikace prostředí
P (aktivované fosforylací)	Ca ²⁺ -ATPasa	plazmatická membrána	transport Ca ²⁺
	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa	plazmatická membrána	tvorba elektrochemického gradientu Na ⁺ a K ⁺
	H ⁺ /K ⁺ -ATPasa	plazmatická membrána	acidifikace lumen žaludku
ABC (ATP-binding cassette)	P-glykoprotein	plazmatická membrána	export hydrofóbních xenobiotik/léků z buňky ven
	ABCA1	plazmatická membrána	transport cholesterolu z buněk do HDL
	CFTR	plazmatická membrána	transport Cl ⁻
	TAP	endoplazmatické retikulum	transport antigenu z cytoplazmy do ER

Endocytóza

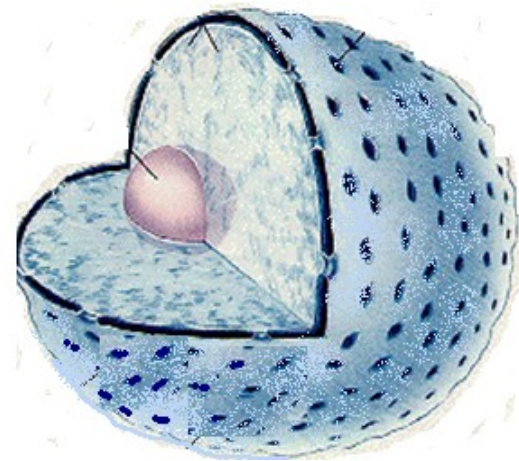


Probíhá jen ve specializovaných buňkách (makrofágy, dendritické buňky a neutrofilů)

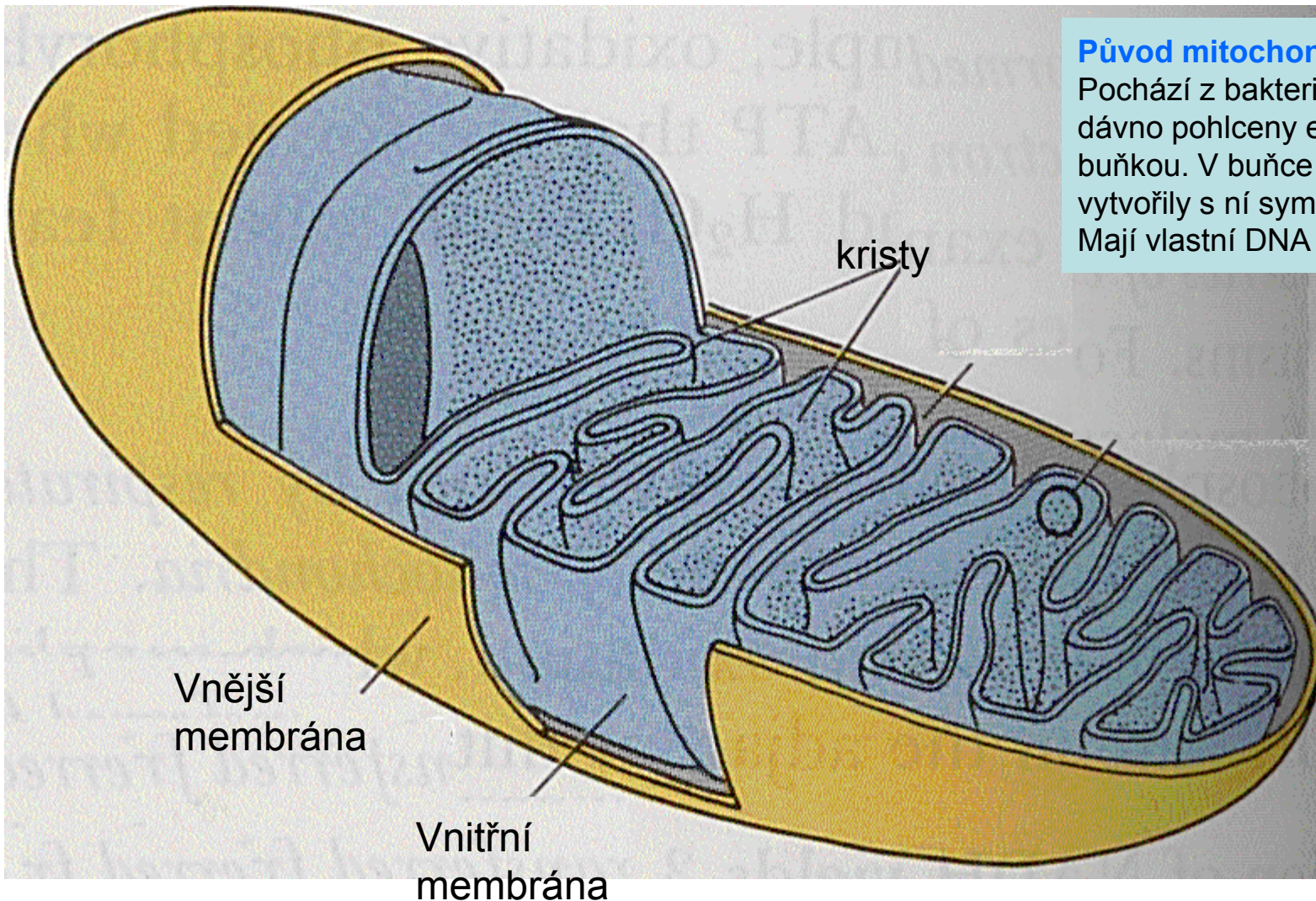
všechny buňky

Jádro

- Největší subcelulární organela
- Obsahuje jadérko
- Jaderný obal se skládá ze dvou membrán, v nichž jsou jaderné póry
- Pomocí pórů se do jádra dostávají proteiny syntetizované v cytoplazmě a opačným směrem RNA a ribosomy
- Vnější membrána navazuje na ER
- Jádro obsahuje hlavně chromatin (DNA + bílkoviny histony)
- Jádro: replikace DNA, transkripce a posttranskripční úpravy mRNA a tRNA
- Jadérko: syntéza rRNA a ribosomů



Mitochondrie – energetické centrum buňky



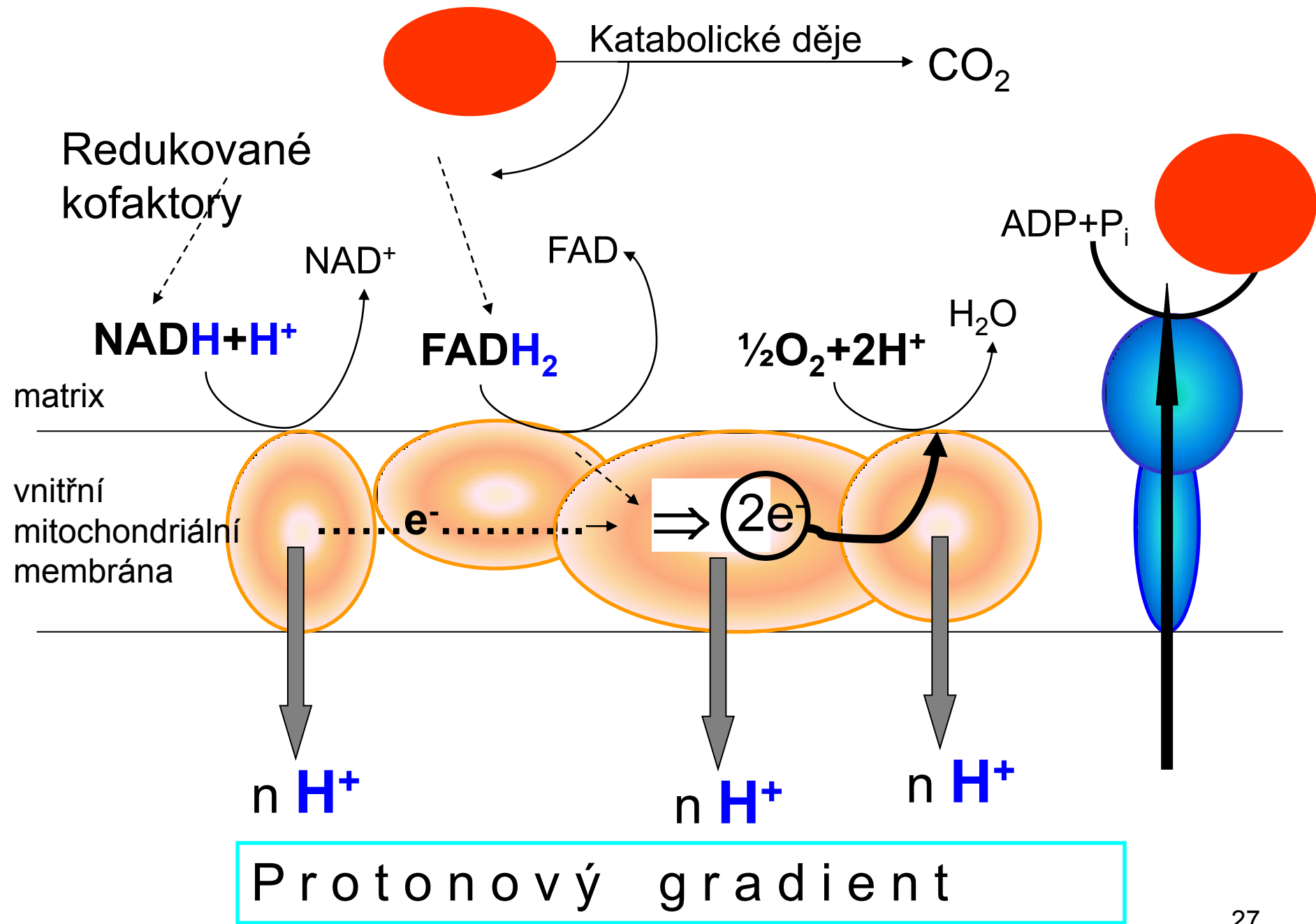
Původ mitochondrií v buňce
Pochází z bakterií, které byly dávno pohlceny eukaryontní buňkou. V buňce přežily a vytvořily s ní symbiotický vztah. Mají vlastní DNA

Procesy v mitochondriích

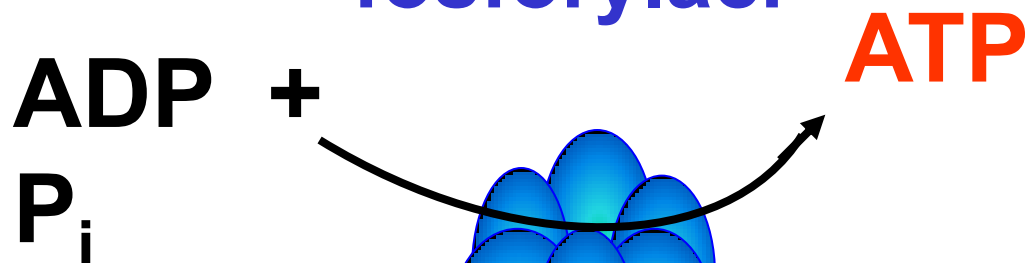
- Zajišťují převážnou část produkce energie, využívají kyslík, redukují jej na vodu
- Vnější membrána – dobře propustná pro většinu molekul, obsahuje bílkovinu porin, která tvoří propustné póry
- Vnitřní membrána – velmi nepropustná, obsahuje řadu bílkovinných transportérů a enzymy a kofaktory dýchacího řetězce, ATP-asa syntetizující ATP
- Matrix – citrátový cyklus, β -oxidace, replikace DNA, proteosyntéza (13 proteinů dýchacího řetězce a oxidační fosforylace), v játrech část močovinového cyklu, některé transaminace, oxidační dekarboxylace pyruvátu ad.
- Mitochondrie se mohou dělit
- Mitochondriální DNA – cirkulární, méně než 1% buněčné DNA, celkem 37 genů, pouze 13 kóduje bílkoviny

Vnitřní mitochondriální membrána

- kristy
- semipermeabilní
- není propustná pro ionty
- není propustná pro protony !
- obsahuje enzymové komplexy dýchacího řetězce, kofaktory
- obsahuje transportní proteiny



Syntéza ATP aerobní fosforylací

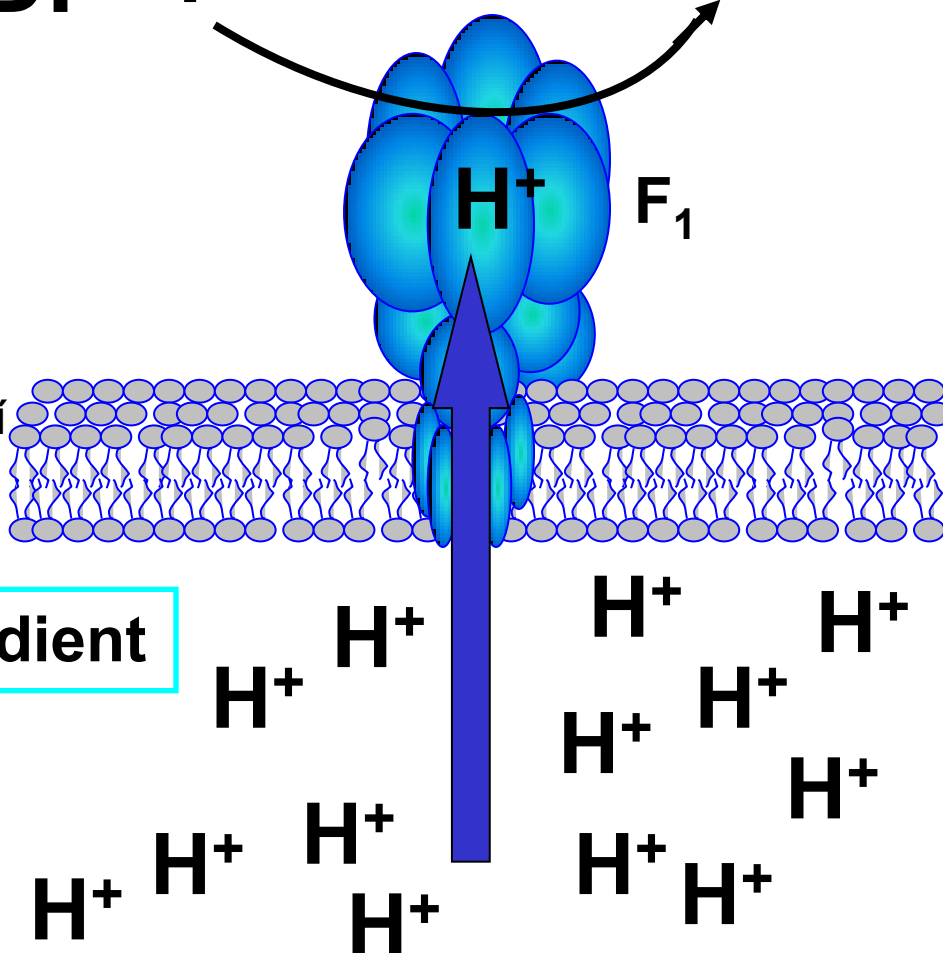


matrix

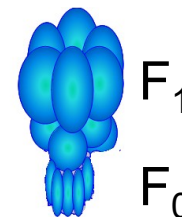
Vnitřní mitochondriální membrána

Protonový gradient

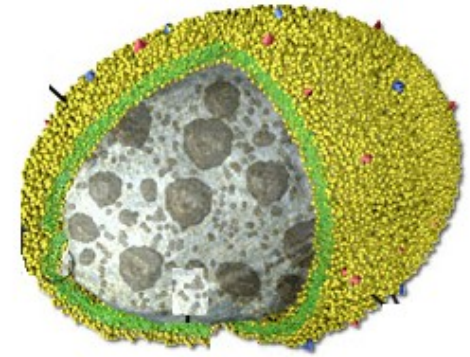
Protonmotivní síla



ATP-synthas



Lyzosomy



- Intracelulární organely zodpovědné za buněčné trávení.
- Mají jednoduchou membránu, která zabraňuje tomu, aby lyzomální enzymy unikaly do cytoplazmy.
- Role lyzosomů: rozklad látek přijatých endocytosou, pinocytosou, fagocytosou nebo autofagií.
- Obsahují hydrolytické enzymy (nukleasy, fosfatasy, glykosidasy, esterasy, proteasy)
- Štěpí složité molekuly na jednoduché produkty, které se vrací do cytoplazmy
- pH v lyzosomech je kolem 5,5
- Lyzomální choroby – deficit některého enzymu, dochází k akumulaci nerozložených substrátů v lyzosomech (např. Gaucherova choroba – ukládání glukocerebrosidů v mozku, játrech, kostní dřeni a slezině)

Peroxisomy

- Velikostí se podobají lyzozomům, mají jednoduchou membránu
- Využívají molekulární kyslík k oxidačním reakcím
- Odbourávají delší mastné kyseliny (>20 C) na kratší, metabolizují cholesterol na žlučové kyseliny, syntetizují plazmalogeny
- Při jejich metabolismu vzniká H_2O_2 , který je štěpen pomocí enzymů katalasy a peroxidasy
- Mohou se dělit

Peroxisomální disfunkce

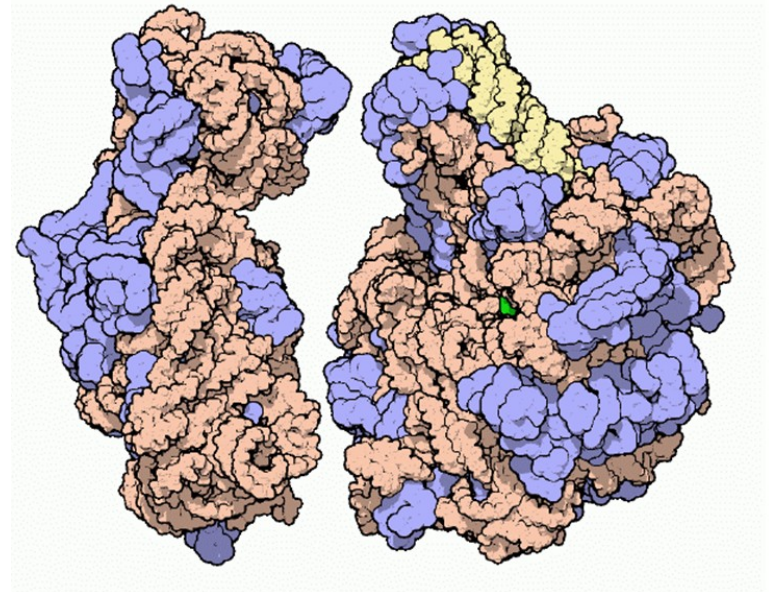
nejméně 16 klinicky a biochemicky odlišných heterogenních poruch
(poruchy peroxizomální biogeneze nebo syntézy jednotlivých proteinů
spojených s peroxisomální dysfunkcí

Těžké symptomy již v dětství

Ribosomy

Komplexy proteinů a rRNA nejsou - ohraničené membránou

- až 80 % celkové RNA v buňce
- typy ribosomů u eukaryontů a prokaryontů jsou rozdílné
- Větší a menší podjednotka (u eukaryontů 60S a 40S)



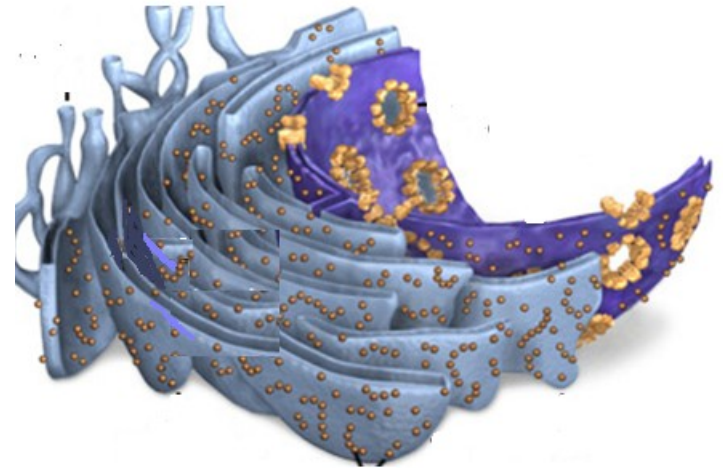
http://www.pdb.org/pdb/static.do?p=education_discussion/molecule_of_the_month/pdb10_1.html

Probíhá zde syntéza proteinů

Jsou buď volně v cytoplazmě nebo vázané na ER

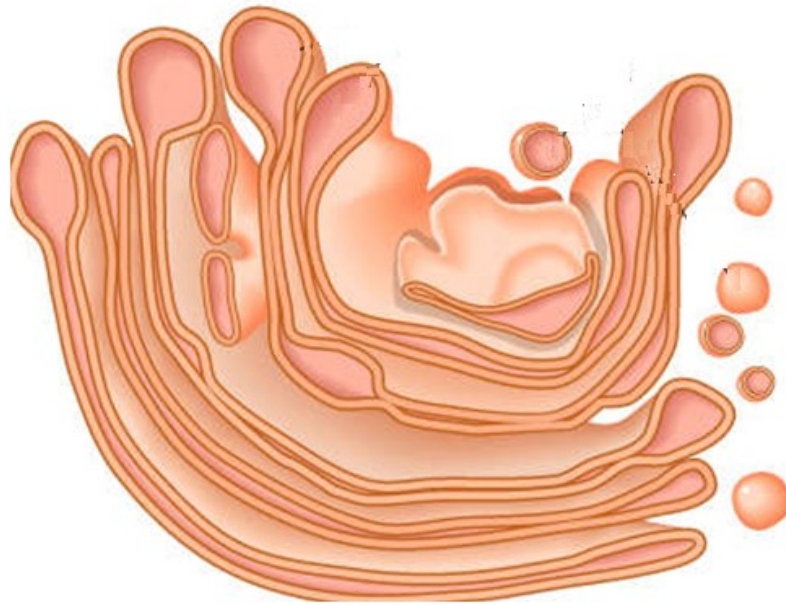
Endoplazmatické retikulum

- Síť membránových tubulů
- Hladké a hrubé ER
- Hladké ER: syntéza triacylglycerolů, desaturace a elongace mastných kyselin, metabolismus cizorodých látek pomocí P450, metabolismus steroidních hormonů
- Hrubé ER – spojené s ribosomy
- Probíhá zde posttranslační úprava bílkovin a jejich transport do dalších částí buňky

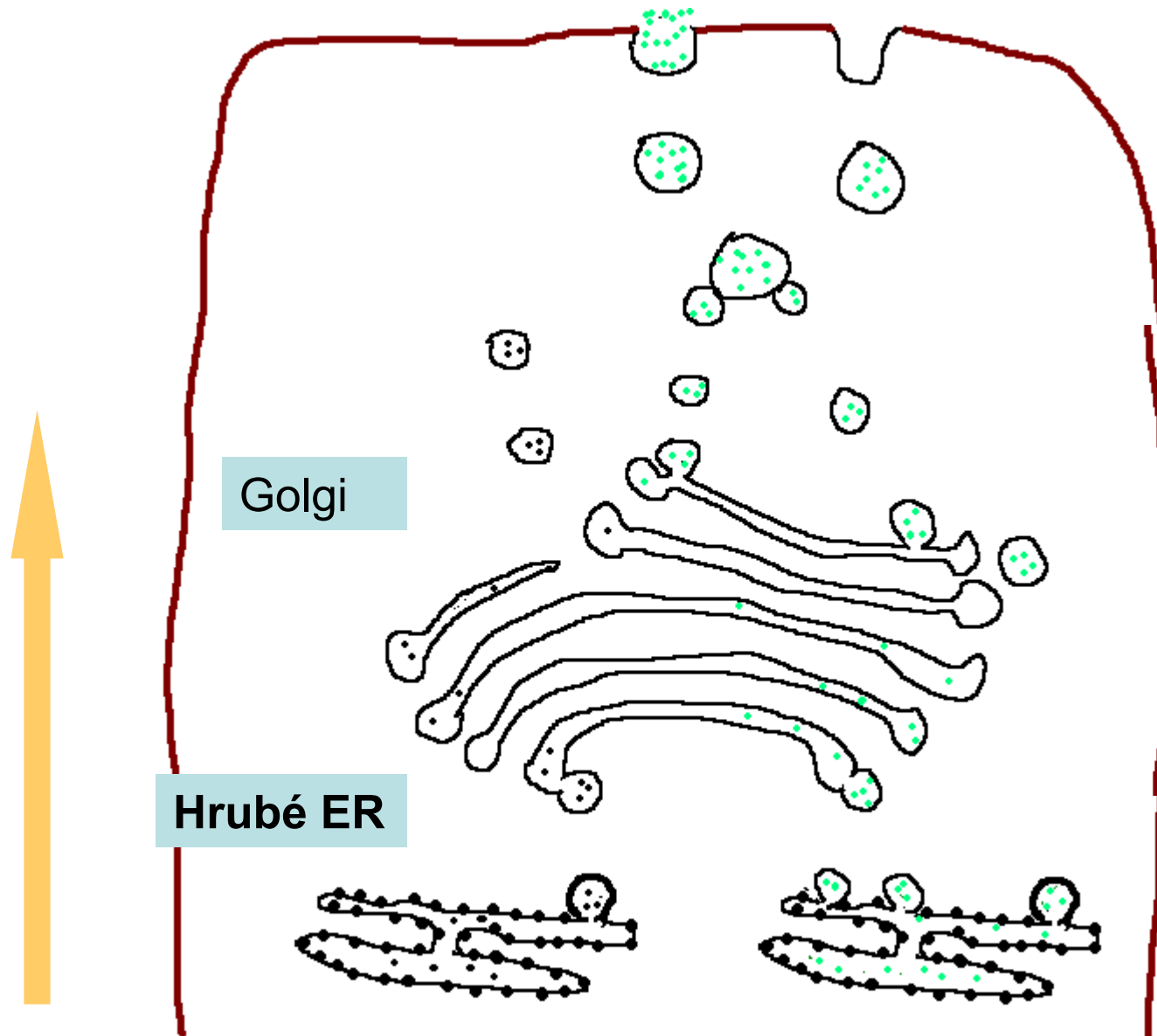


Golgiho komplex

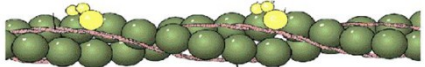
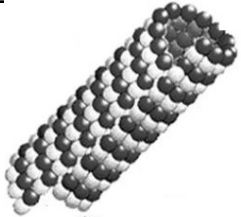
- Membránové váčky navazující na ER
- Cis-Golgi – přivrácené k jádru
- Trans-Golgi – přivrácené směrem k plazmatické membráně
- Modifikace proteinů transportovaných z hrubého ER a sorting



Transport proteinů syntetizovaných na RER



Cytoskelet

Vlákno	Hlavní protein	Hlavní funkce
Aktinová filamenta (mikrofilamenta)	aktin 	Udržování tvaru buňky, pohyb chromozomů a dalších subcelulárních komponent, migrace buněk...
Mikrotubuly	tubulin 	Buněčné dělení, endocytosa, exocytosa, udržování tvaru buňky, umístění organel, transport vesikulů ...
Intermediární filamenta	Desmin (svalové buňky) Vismetin (fibroblasty) Keratin (epitelové buňky) Neurofilamenta (neurony)	Tvoří podpůrnou strukturu v buňce.

Cytosol

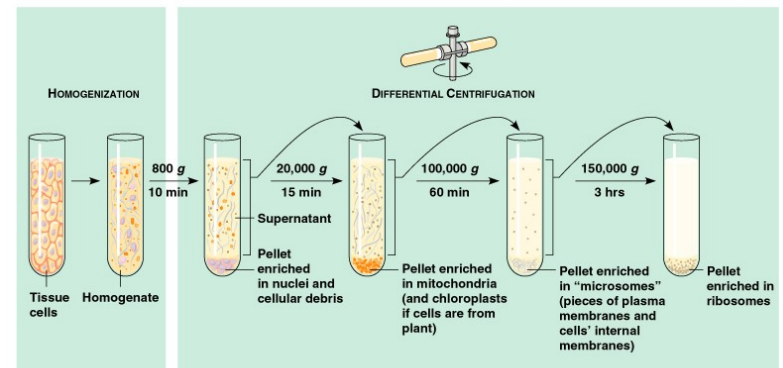
- Největší oddíl v buňce
- Charakter vodného gelu s mnoha rozpuštěnými látkami
- Řada enzymů a dalších proteinů
- V cytosolu probíhá řada chemických pochodů – první kroky metabolismu molekul vstupujících do buňky, metabolismus glukosy, syntéza proteinů ad.

Enzymové markery subcelulárních frakcí

Frakce	Enzym
Plasmatická membrána	Na ⁺ /K ⁺ -ATPasa
Jádro	DNA-polymerasa
	RNA-polymerasa
Endoplasmatické retikulum	Glukosa-6-fosfatasa
	Cytochrom-b ₅ -reduktasa
Golgiho aparát	Galaktosyltransferasa
Lyzosomy	Kyselá fosfatasa
	β-Glukuronidasa
Mitochondrie	Sukcinátdehydrogenasa
	Cytochrom-c-oxidasa
Peroxisomy	Katalasa
Cytosol	Laktátdehydrogenasa
	Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

Frakcionace buněk

- Homogenizované bunky jsou centrifugovány při různých otáčkách a délce centrifugace
- Homogenát obsahuje směs organel, úlomků membrán, molekul
Pomalá centrifugace způsobí, že sedimentují pouze velké složky v homogenátu
Supernatant je dekantován a opět zcentrifugován při vyšších otáčkách
- Čistota frakcí je testována pomocí „markerů“
- Nověji též pomocí průtokové cytometrie, imunoizolace ad.



Hlavní buněčné kompartmenty a jejich funkce

Kompartment	Metabolický proces
Lyzosom	Intracelulární trávení
Mitochondrie	Dýchací řetězec, citrátový cyklus, β -oxidace, syntéza ketolátek (játra), částečná syntéza DNA, částečná transkripce a replikace
Peroxisomy	Odbourání delších mastných kyselin na kratší, přeměna cholesterolu na žlučové kyseliny, syntéza plazmalogenů, metabolismus peroxidu vodíku
Jádro	Největší organela. Syntéza DNA a RNA.
Jadérko	Syntéza a úprava rRNA,
Endoplazmatické retikulum	Hladké: syntéza triacylglycerolů, fosfolipidů, metabolismus cizorodých látek, steroidních hormonů Hrubé: posttranslační modifikace proteinů
Golgiho aparát	Modifikace proteinů (sulfatace, fosforylace, glykosylace) ⁴⁰