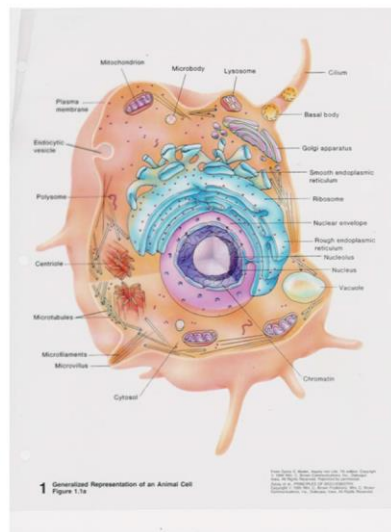


Biochemická organizace eukaryotní buňky

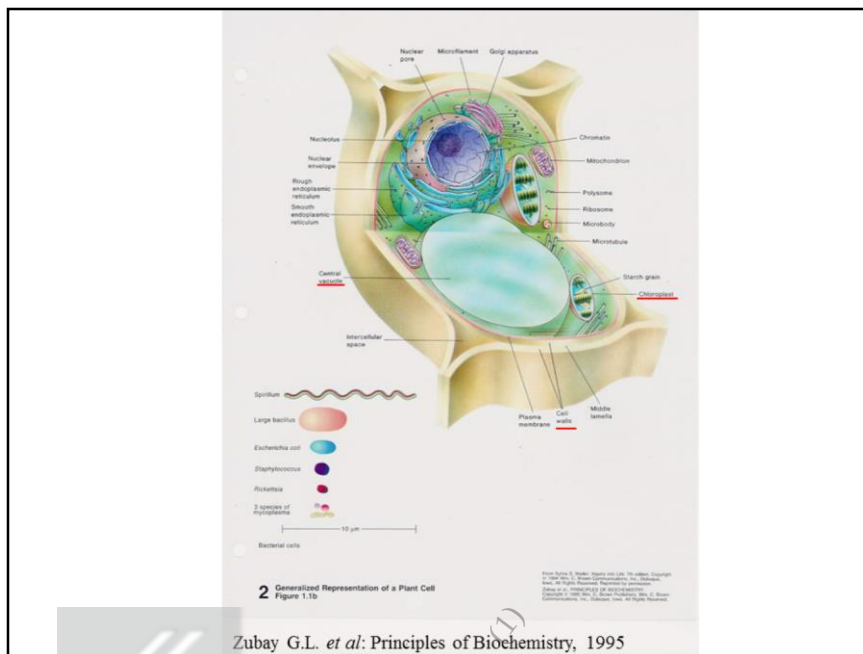
Pozn.: Pod heslem „učebnice“ se v komentářích skrývá kniha M.Kodiček, O.Valentová a R.Hynek: Biochemie – chemický pohled na biologický svět, 2. vydání 2018.



Zubay  et al: Principles of Biochemistry, 1995

Prohlédněte si tab. 1.3 (Učebnice str. 17) a zopakujte si, co již o jednotlivých organelách víte.

Uvědomte si, že náplní eukaryotní buňky (cytosolem) není „zředěný roztok molekul a iontů“, ale 30% „pasta“ bílkovin, obklopující obrovské množství organel a nadmolekulových struktur.



Rostlinná buňka se od živočišné liší především přítomností chloroplastů, obvykle velkou vakuolou a buněčnou stěnou.

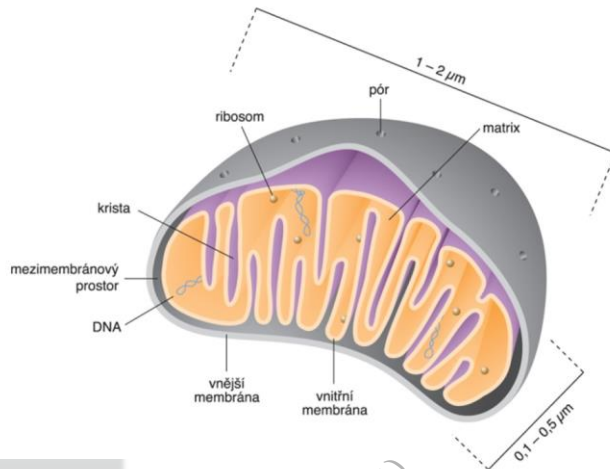
MITOCHONDRIE

(elektronmikroskopický
obrázek tenkého řezu
jaterní mitochondrie,
autor: Daniel S. Friend)



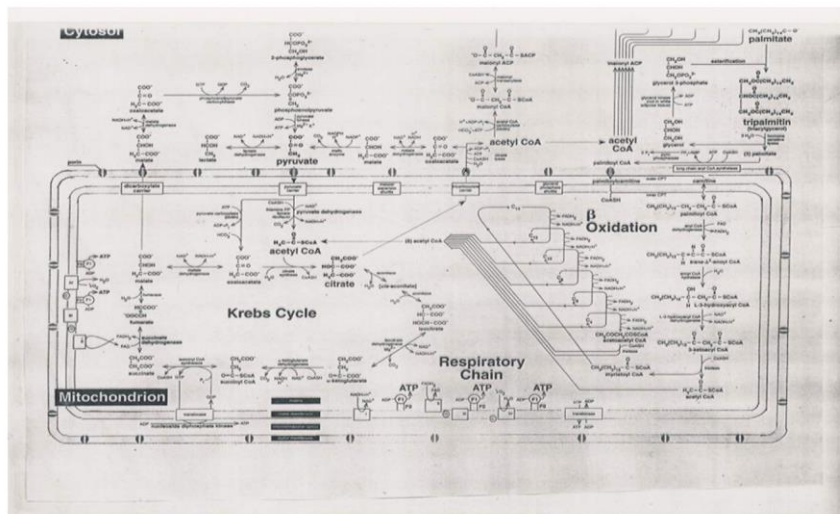
Nádhera elektronmikroskopického zobrazení!

Mitochondrie (schema)



Nejdůležitější funkce mitochondrie: dýchací řetězec a membránová fosforylace.
Zajímavosti: „děravá“ vnější membrána (membránové póry, určuje tvar organely),
kristy (zvětšení plochy vnitřní membrány), kompletní proteosyntetický aparát (DNA,
ribosomy atd., některé kodony zde mají jiný význam než v cytosolu).

Mitochondrie (schema základních katabolických procesů)

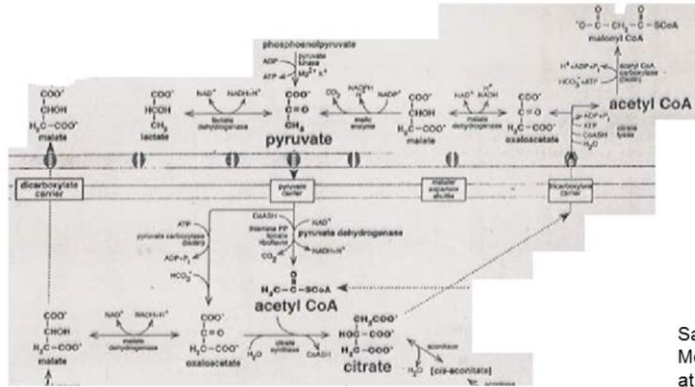


Salway J.G: Metabolism at a Glance, 1994

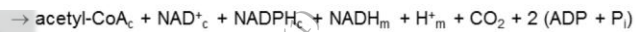
Nejdůležitější mitochondriální metabolické dráhy: citrátový (Krebsův) cyklus a β-oxidace mastných kyselin

Pyruvát-malátový cyklus

(aneb Jak zapojit pyruvát z glykolysy do syntézy mastných kyselin?)



Salway J.G:
Metabolism
at a Glance, 1994



(c = cytosol, m = matrix mitochondrie, též mitosol)

Podrobnosti na dalším slidu

Pyruvát-malátový cyklus

(dojemná souhra metabolických procesů v cytosolu a mitochondrii)

Glykolysa a biosynthesa mastných kyselin probíhají v cytosolu, ale oxidační dekarboxylace pyruvátu v mitochondrii (Učebnice, odd. 9.2)

Jak tedy získat acetyl-CoA z pyruvátu v cytosolu (srov. předchozí slide)?

1: dvě molekuly pyruvátu vstupují z cytosolu do mitochondrie (sekundární aktivní transport spolu s H^+ ; učebnice odd. 5.9.1);

2: jedna molekula pyruvátu oxidačně dekarboxylována za vzniku acetyl-CoA a NADH, druhá karboxylována za vzniku oxalacetátu (známo z glukogeneze, učebnice str. 303 obr. 10.7);

3: připojení acetylu k oxalacetátu za vzniku citrátu (1. reakce citrátového cyklu, učebnice str. 270);

4: citrát transportován zpět do cytosolu;

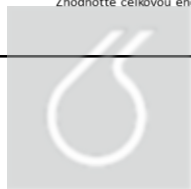
5: citrát v cytosolu rozložen na acetyl-CoA a oxalacetát (enzym ATP-citrát lyasa EC 2.3.3.8):
 $\text{citrát} + \text{ATP} + \text{CoA} \rightarrow \text{oxalacetát} + \text{acetyl-CoA} + \text{ADP} + P_i$;

6: oxalacetát redukován pomocí NADH z glykolysy;

7: malát oxidačně dekarboxylován pomocí NADP^+ na pyruvát (jablečný enzym, učebnice str. 318).

Sumární rovnice na minulém slidu. Výsledek: v cytosolu vznikly z pyruvátu acetyl-CoA a navíc z NADH NADPH, potřebný při synthese MK k redukcím.

Domácí úkol: Napište pomocí strukturního vzorce rovnice reakcí, popsanych v bodech 2, 3, 6 a 7!
Zhodnoťte celkovou energetickou bilanci tohoto cyklu!

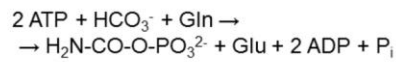


VŠCHT PRAHA

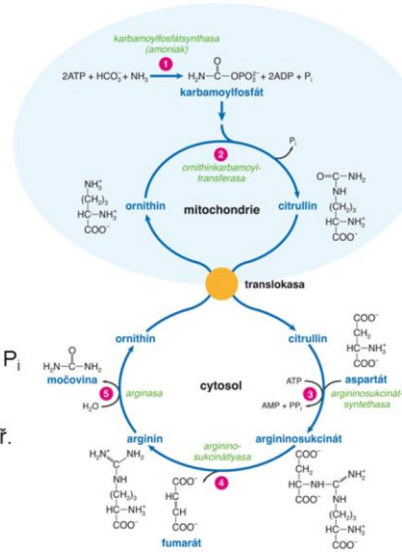
Nepřilášený host (1)

Močovinový cyklus

Poznámka na okraj:
vznik karbamoylfosfátu v cytosolu



Karbamoylfosfát je prekursor mnoha anabolických procesů v cytosolu (např. syntéza pyrimidinových bází).

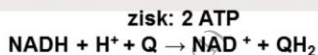
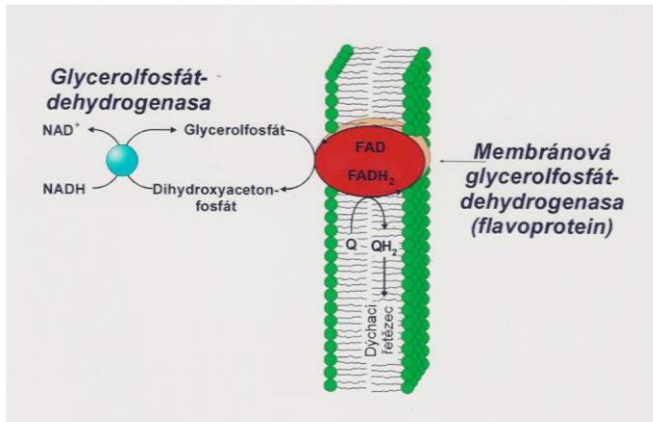


Antiport ornithinu a citrullinu – úžasná vymakanost! Otázka: proč je ten antiport zde tak výhodný?

Syntéza pyrimidinových nukleotidů: učebnice str. 360)

Jak zapojit cytosolové NADH do dýchacího řetězce?

glycerolfosfátové kyvadlo (postranní vstup do DŘ)

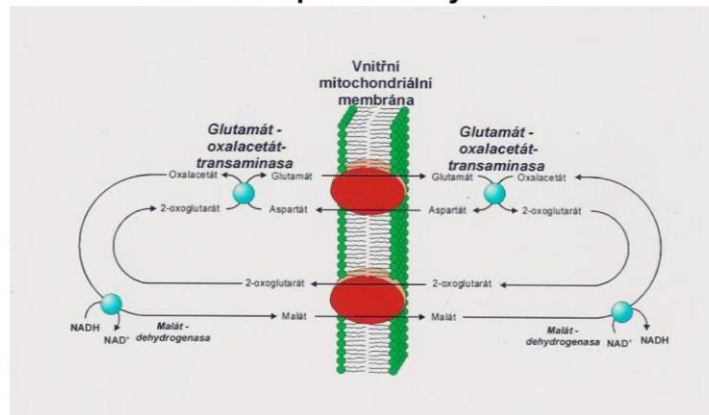


Logika glycerolfosfátového a malátaspartátového kyvadla vysvětlena v učebnici (str. 300).

Otázka: O kolika postranních vstupech do dýchacího řetězce jsme až dosud mluvili?

Jak zapojit cytosolové NADH do dýchacího řetězce?

malát-aspartátové kyvadlo



zisk: 3 ATP (ve srovnání s glycerolfosfátový kyvadlem složitější → pomalejší)
(jediný výsledek: $\text{NADH}_c \rightarrow \text{NADH}_m$)

Příklady transportních systémů ve vnitřní mitochondriální membráně

Poznámky k jednotlivým systémům (začínáme vlevo nahoře, postupujeme po směru hodinových ručiček):

V mitosolu se fosforyluje ADP na ATP: membránová fosforylace, učebnice str. 249); je tam zapotřebí dodávat ADP a P_i a naopak odvádět ATP; ATP/ADP-translokasa využívá membránový potenciál (zde $\Delta\Psi$), fosfátový přenašeč naopak koncentračního spádu protonů.

Transport malát a citrátů je metabolicky důležitý.

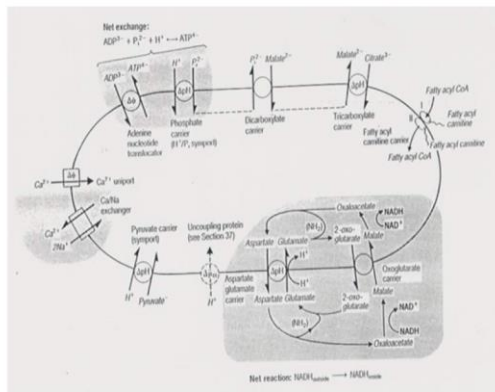
Karnitinový přenašeč – viz učebnice str. 164.

Malát aspartátové kyvadlo popsány na minulém slidesu.

„Uncoupling protein“ reguluje proton-motivní sílu.

Pyruváttranslokasa – viz učebnice str. 267.

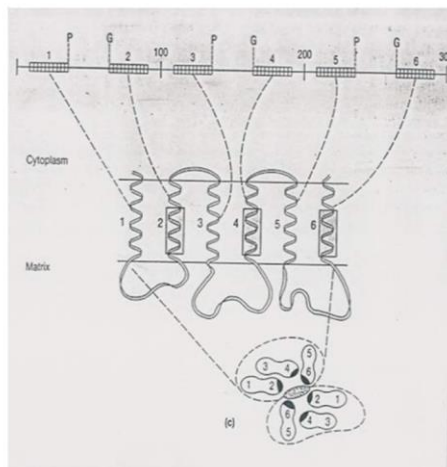
Transport Na^+ a Ca^{2+} je významný pro udržení binéčné iontové homeostasy.



VŠCHT PRAHA
Nepřihlášený host (1)

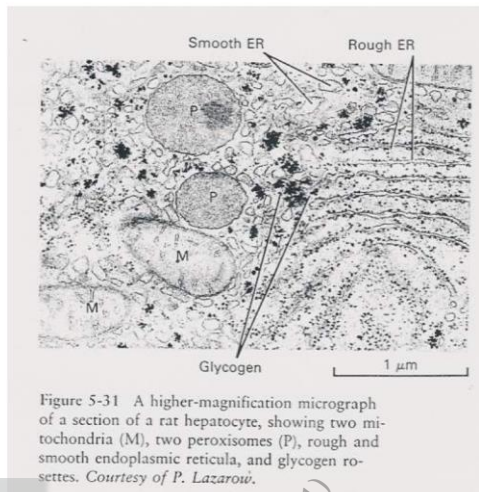
HOMOLOGNÍ STRUKTURA PŘENAŠEČŮ ANIONTŮ V MITOCHONRIÁLNÍ MEMBRÁNĚ

- základní jednotka (100 AK) se 3x opakuje
- krátká smyčka (≈ 45 AK) na straně matrix (na tomto obrázku není zcela zřetelná)
- konzervované zbytky Pro a Gly na koncích transmembránových úseků
- amfipatické transmembránové helixy (helixy 2, 4 a 6)
- funkční jednotka: dimer s hydrofilním kanálkem (adc, pohled „kolmo na membránu“, dobře vyznačeny hydrofilní povrchy helixů 2, 4 a 6)



Toto je ukázka tzv. proteinové rodiny (skupina bílkovin analogické funkce s jistými společnými strukturními znaky).

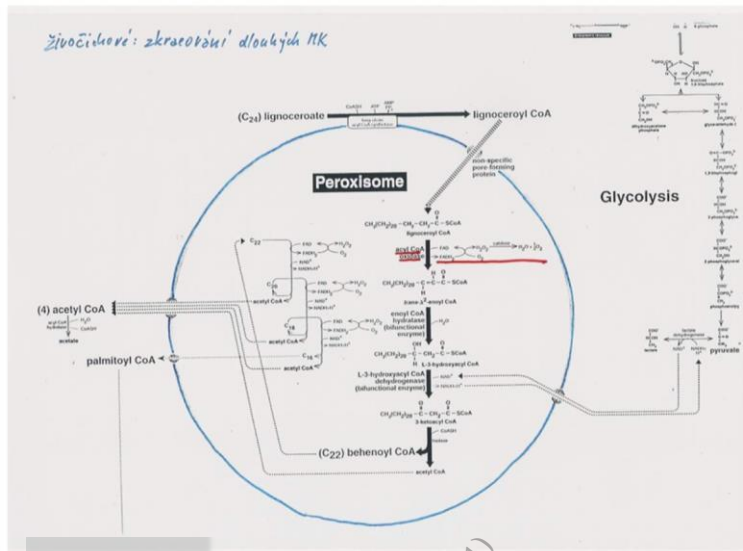
Elektronmikroskopický obrázek krysího hepatocytu (jaterní buňka)



Všimněte si „hustoty“ ortagel (viz 1. slide)!

Zkracování dlouhých mastných kyselin v peroxisomu

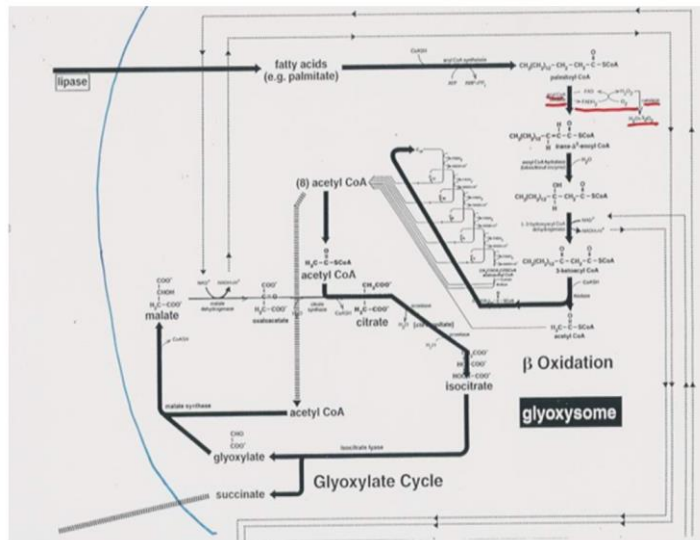
živočišné: zkracování dlouhých MK



Peroxisom je organela, v níž jsou lokalizovány mnohé reakce, při nichž vzniká peroxid vodíku, který je zde rychle rozkládán katalasou. V rostlinných peroxisomech probíhá fotorespirace.

Na obr. je červeně podtržena první reakce zkracování dlouhých mastných kyselin, která však zde nemůže být napojena na dýchací řetězec jako v mitochondrii; použije se místo toho „oxidasový“ trik, kdy vzniká peroxid vodíku (zvýrazněno červeně).

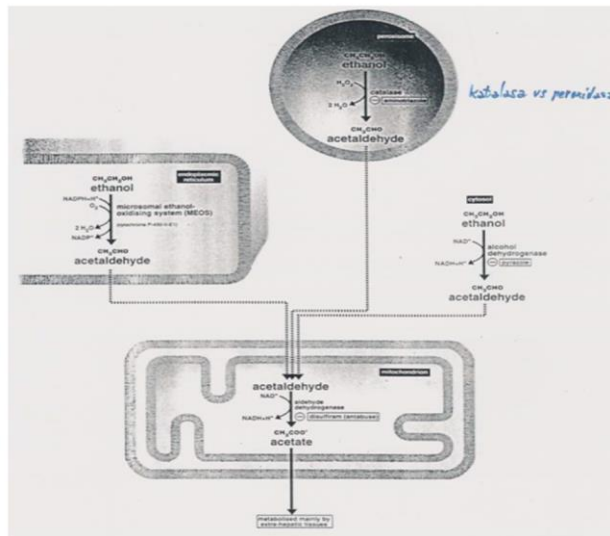
β -Ox. MK a glyoxylátový cyklus v glyoxysomu („rostlinný peroxisom“)



Salway J.G: Metabolism at a Glance, 1994

Vstup mastných kyselin do „mimomitochondriálního“ zkracování. Oceňte prosím šikovnost propojení „oxidasové“ β -oxidace a glyoxylátového cyklu! Zvažte z energetického hlediska, kolik tato lokalizace a provedení β -oxidace buňku „stojí“ ve srovnání s umístěním v mitochondrii.

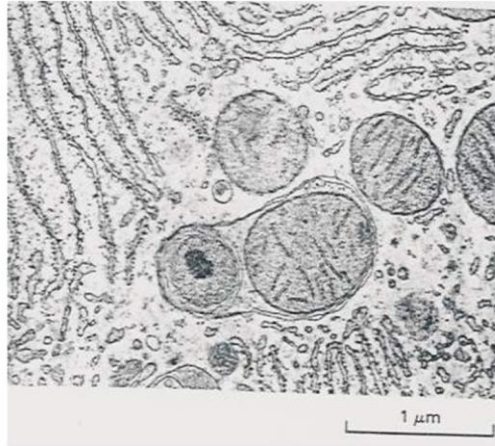
Různé způsoby oxidace ethanolu na acetaldehyd



Salway J.G: Metabolism at a Glance, 1994

Při dehydrogenaci ethanolu za vzniku acetaldehydu mohou být oxidačními činidly NAD^+ (alkoholdehydrogenasa v cytosolu nebo v mitochondrii), kyslík (cytochrom-P450 v endoplasmatickém retikulu, je použit druhý donor elektronů NADPH) a molekulový kyslík (zde si všimněte možnosti katalasy působit jako peroxidasa).

Sekundární lysosom aneb pohřeb mitochondrie



Úkolem lysosomu je zajistit tzv. vnitrobuněčné trávení, tedy hydrolytický rozklad molekul (proteinů apod.) nebo i organel či dokonce buněk. Uvnitř lysosomu je kyselé prostředí ($\text{pH} \sim 5$); přítomné hydrolytické enzymy mají kyselé pH optimum. Lysosomální proteasy patří do skupiny tzv. kathepsinů (učebnice, str. 344 a 345). Zde právě lysosom sežral starou mitochondrii.

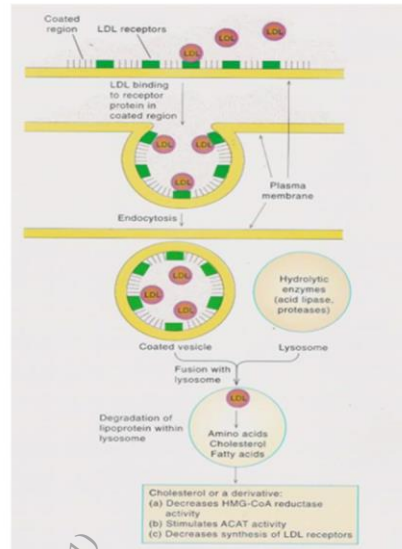
Endocytosa LDL (zjednodušené schema)

Vazba LDL na specifický receptor prostřednictvím jeho proteinů

Endocytosa: Vchlípení buněčné membrány a vznik endosomu

Spojení endosomu s tzv. primárním lysosome, který vznikl odštěpením z endoplasmatického retikula a obsahuje hydrolytické enzymy

Hydrolyza proteinů a lipidů



LDL = low density lipoprotein, učebnice str. 322.

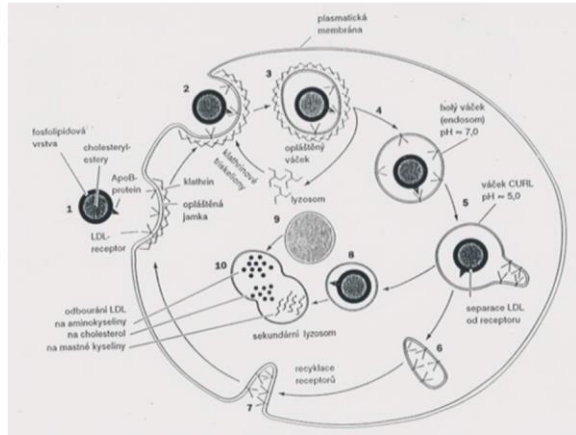
Endocytosa LDL (podrobné schema)

Vysvětlivky (srovnej s předchozím slidem!):

2: klatrin: viz učebnice str. 160 a 169

5: snížení intralysosomálního pH (primární aktivní transport protonů), proto se uvolní LDL z vazby na receptor; receptorové molekuly se shromáždí v jedné části membrány, která je pak uvolněna a začleněna zpět do buněčné membrány (kroky 6 a 7)

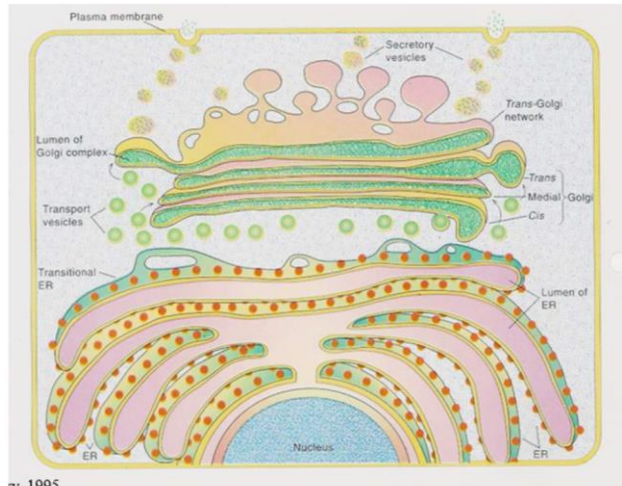
10: spojení váčku s LDL s primárním lysozomem, vznik sekundárního lysosomu; hydrolytický rozklad látek



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

Hrubé endoplasmatické retikulum a Golgiho aparát



Zubay G.L. *et al*: Principles of Biochemistry, 1995

Hlavní funkce: translace a posttranslační modifikace

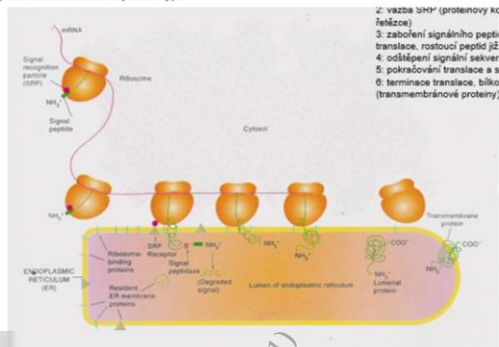
Několik uzavřených prostor: lumen ER, cis, střední a trans část Golgiho aparátu

Komunikace mezi nimi: pomocí transportních váčků

Translace na hrubém endoplasmatickém retikulu

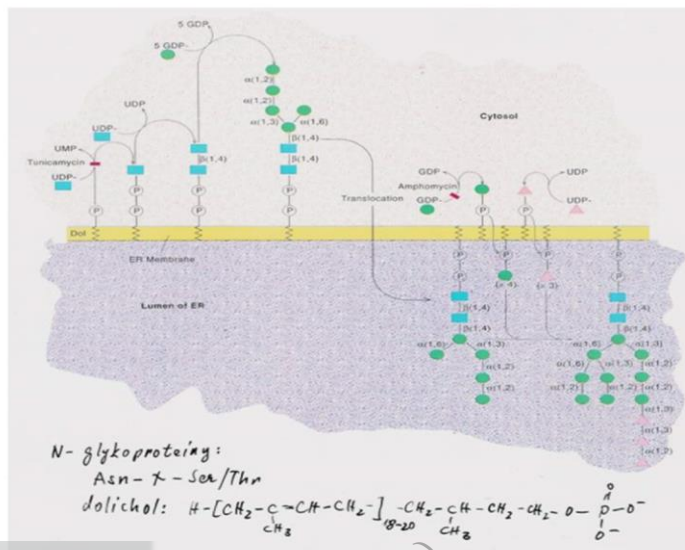
Průběh translace:

- 1: syntéza signálního peptidu (presekvence): — ≈ 20 hydrofobních aminokyselin (slouží k průchodu peptidového řetězce do lumen ER)
- 2: vazba SRP (proteinový komplex, signal recognition particle, brání prodloužení peptidového řetězce)
- 3: zaboření signálního peptidu do membrány ER a vazba SRP na SPR-receptor (odblokování další translace, rostoucí peptid již proniká do lumen ER)
- 4: odštěpení signální sekvence peptidasou v lumen ER
- 5: pokračování translace a svinování vynikajícího řetězce
- 6: terminace translace, bílkovina buď pronikla celá do lumen ER nebo zůstala částečně v membráně (transmembránové proteiny)



Zubay G.L. *et al*: Principles of Biochemistry, 1995

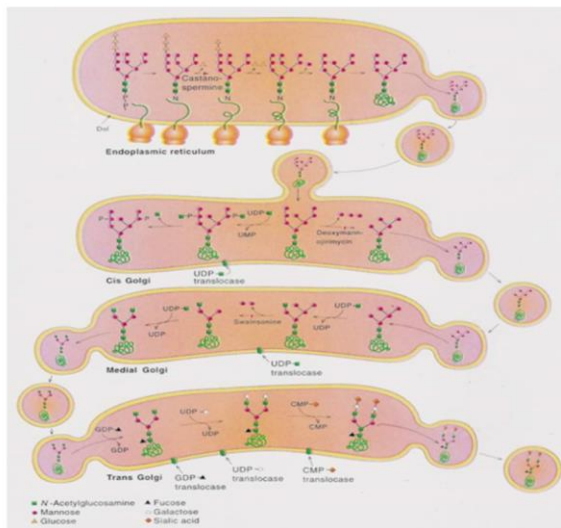
Syntéza oligosacharidové části N-glykoproteinů (1. část)



N-glykoproteiny: oligosacharidový řetězec je navázán na amidový dusík Asn v sekvenci –Asn-jakákoliv AK – Ser nebo Thr (viz učebnice str. 49)

Nejdříve se syntetizuje oligosacharidový řetězec na specifickém nosiči dolicholfosfátu, rozpuštěném v membráně ER, a to nejdříve na cytosolové straně a poté na vnitřní straně membrány (viz obr.)

Syntéza sacharidové části N-glykoproteinů (2. část)



Zubay G.L. et al: Principles of Biochemistry, 1995

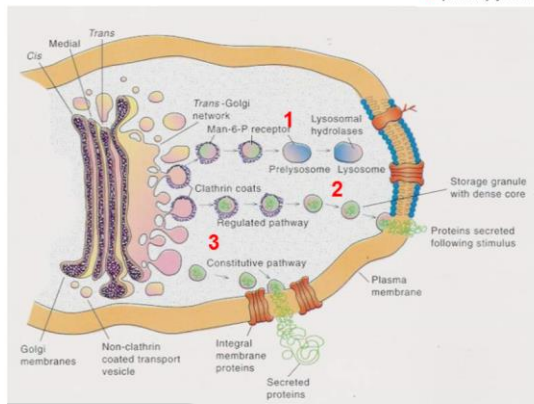
Tento základní řetězec se v průběhu translace (kotranslační modifikace) přenesl na signální sekvenci –Asn-X-Sr/Thr- (viz předchozí slide). Sacharidový řetězec se pak upravuje dalšími modifikacemi v ER a Golgiho aparátu.

O-Glykoproteiny se syntetizují postupnými enzymovými úpravami již sbalených polypeptidových řetězců (posttranslační úpravy) v ER a Golgiho aparátu.

Směrování („targeting“) proteinů z endoplasmatického retikula

Základní možnosti směrování proteinů

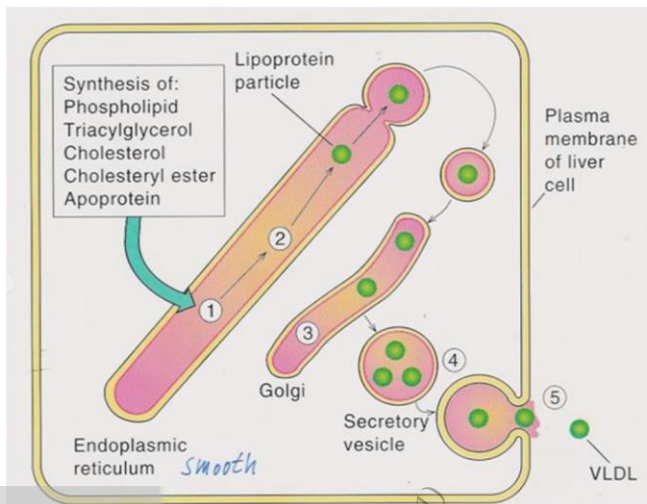
- 1: proteiny zůstávají v lysozomech
- 2: proteiny jsou na základě vnějšího impulsu sekretovány z buňky
- 3: proteiny jsou konstitutivně (vždy) sekretovány z buňky



Zubay G.L. *et al*: Principles of Biochemistry, 1995

Funkce hladkého endoplasmatického retikula

Zubay G.L. *et al*: Principles of Biochemistry, 1995



Hlavní funkce hladkého endoplasmatického retikula: syntéza lipidů a lipoproteinů (zejména v jaterních buňkách)



CYTOSKELET

Soustava vláknitých bílkovinných struktur v cytosolu eukaryotních buněk

FUNKCE

- Mechanická odolnost a udržení charakteristického tvaru buněk
- Transport uvnitř buňky (neurony až 1 m)
příklady: adenovirus ($r = 45 \text{ nm}$)
ve vodě potřebuje k pohybu na vzdálenost $10 \mu\text{m}$ asi 10 s
v cytosolu na tutéž vzdálenost asi 1,5 h
pohyb chromosomů při dělení buňky
- Možná i další



VŠCHT PRAHA

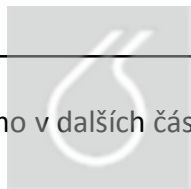
Nepřihlášený host (1)



Složky cytoskletu

Struktura	Tloušťka	Strukturní proteiny	Vazba NTP	Asociované proteiny
mikrotubuly	25 nm	α -tubulin β -tubulin	GTP	MAPs MIP
intermediární filamenta	10 nm	kyselé a bazické keratiny vimentin desmin lamin A, B, C	-	?
mikrofilamenta	7 nm	aktin	ATP	myosiny

Bude probráno v dalších částech.



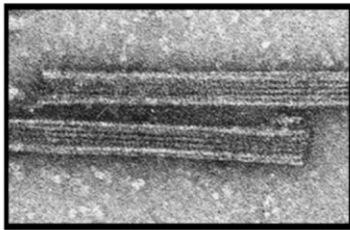
VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

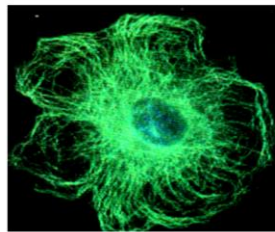


Mikrotubuly pod mikroskopem

Elektronová mikroskopie



Fluorescenční mikroskopie



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

Struktura a vznik mikrotubulů

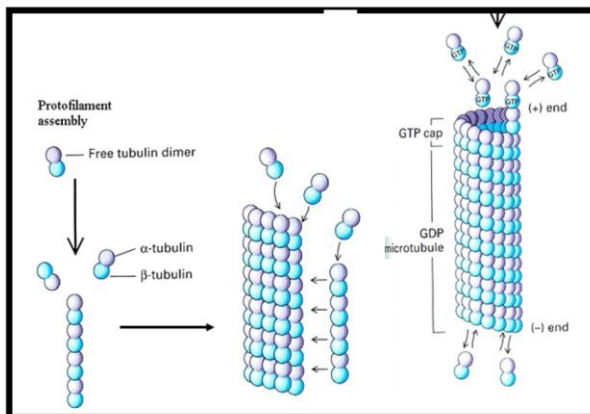
Základní jednotka:
nekovalentní heterodimer
 α - a β -tubulinu

Protofilamenta: nekovalentní
lineární polymery těchto dimerů

Vlastní mikrotubulus:
13 – 16 protofilament
lze rozlišit + a – konec
polarizace buňky (železnice)

Velmi dynamický systém:
růst směrem k + konci,
odbourávání od - konce

Pro připojení jednoho dimeru
na + konci je zapotřebí energie,
získaná hydrolyzou jedné
molekuly GTP
(v přítomnosti Mg^{2+})



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

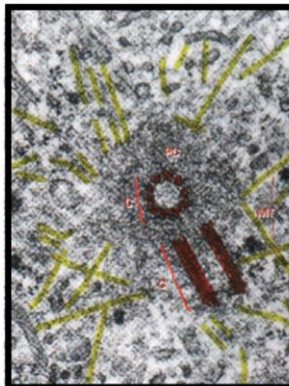
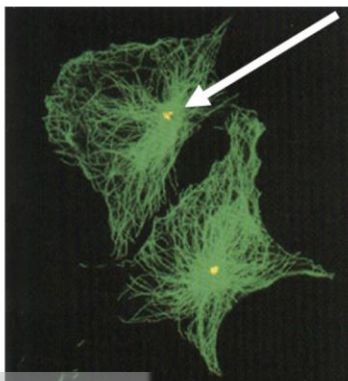


MTOC – microtubule organisation centre, též centrosom

„Hlavní nádraží“ - mikrotubuly jsou v něm zakotveny - koncem

Nalézá se poblíž jádra

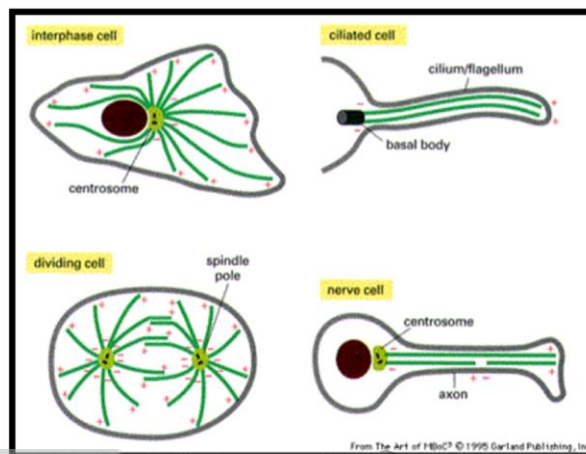
Centrum mnoha důležitých buněčných funkcí, důležité pro dělení buňky



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host

MTOC – schema v různých buňkách



MAPs (microtubule associated proteins) - mikrotubulární motory

Proteiny zajišťující transport částic (molekul, chromosomů organel) po vláknech mikrotubulů

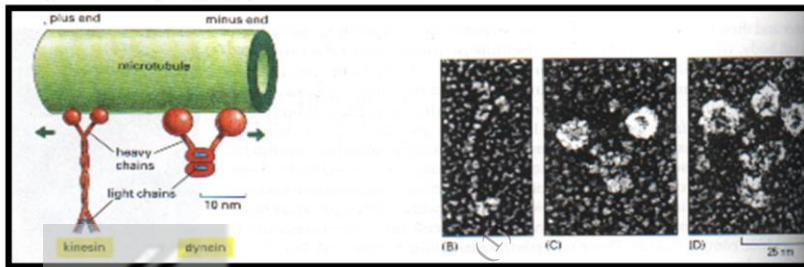
Mají specifická vazebná místa pro jednotlivé „pasažéry“.

Kinesiny: jezdí od – k +, jednoduchá molekula,

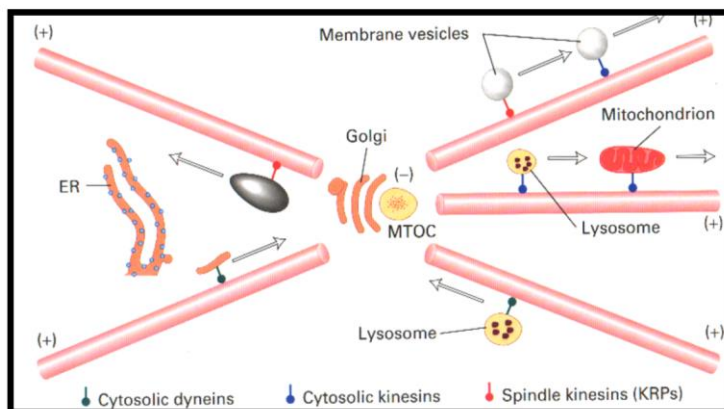
zvláštní skupina: „spindle kinesins“, podílejí se na dělení buněk pohybem po dělicím vřetánku

Dyneiny: Jezdí od + k –, komplex více bílkovin

Na jeden krok hydrolyzují jednu molekulu ATP.



Takže nic volně neplave



Nepřihlášený host (1)

VŠCHT PRAHA

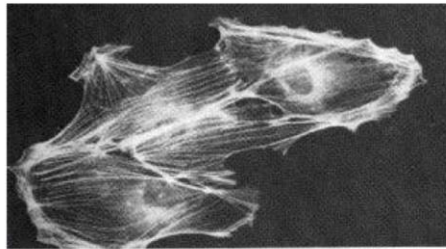


Mikrofilamenta

Elektronová mikroskopie



Fluorescenční mikroskopie



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)



Mikrofilamenta

Základní složka: šroubovicové vlákno tvořené monomery G-aktinu (globulárního)

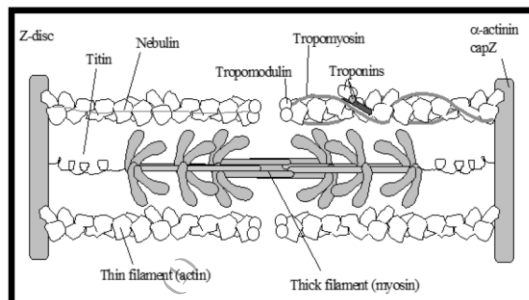
Hlavní složky: F-aktin (polymer G-aktinu) a myosin (učebnice str. 75),

vzájemný pohyb je spojen s hydrolyzou ATP

Jsou orientovány: + a – konec. Stablnější než mikrotubulární síť.

Mikrofilamenta jsou zodpovědná za pohyb buněk jako celku

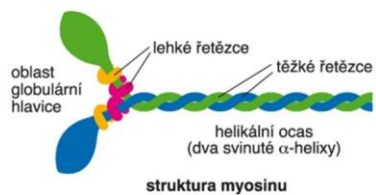
**Bílkovinná struktura
příčně-pruhovaného svalu**



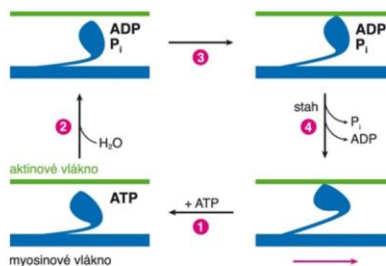
VŠCHT PRAHA

Nepřilášený host

Myosiny – aktinové motory



Vzájemný pohyb aktinového a myozinového vlákna, spojený s hydrolyzou ATP (učebnice str. 75)





Inetermediární filamenta

Elektronová mikroskopie



Fluorescenční mikroskopie



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)



Inetermediární filamenta

Velmi heterogenní složení, závisí na druhu tkáně

Nejstabilnější struktura cytoskeletu, vlákna nejsou orientována

Zodpovědná za mechanickou stabilitu buněk a tkání; nezajišťují pohyb, a proto nepotřebují NTP.

Kyselé a basické keratiny (chlupy, vlasy, nehty...)

Neurofilmenta (axony nervových buněk)

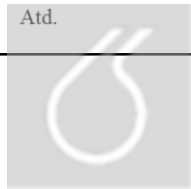
Vimentin (zejména důležitý při vývoji zárodku)

Desmin (ve svalové tkáni)

Lamininy (báze epithelových tkání)

Laminy (připojení jaderního obsahu na jadernou membránu)

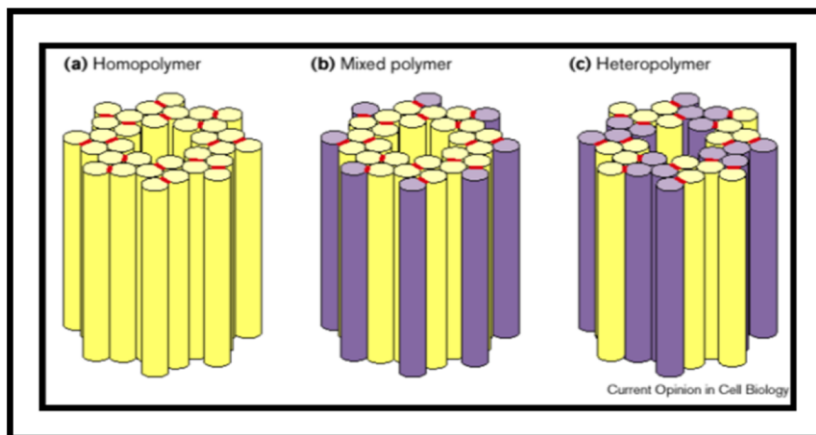
Atd.



VŠCHT PRAHA

Nepřihlášený host (1)

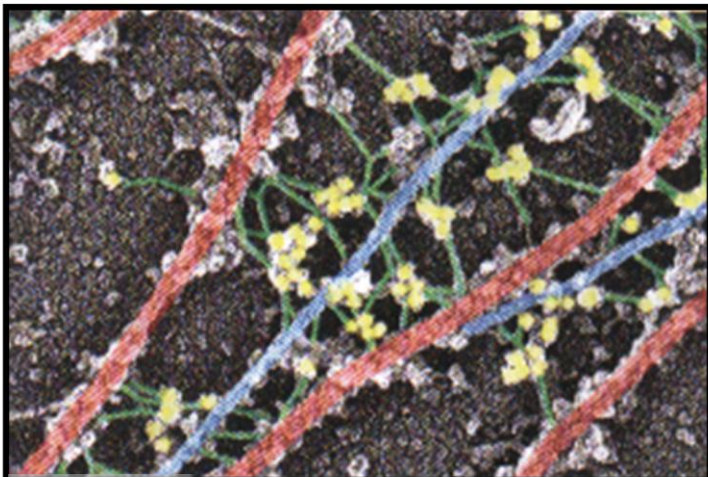
**Jednotlivé složky intermediárních filament
mohou kopolymerovat**



Nepřihlášený host (1)

VŠCHT PRAHA

Propojení jednotlivých složek cytoskeltu



Takovouto síť vláken v buňce jednotlivá vlákna cytoskeletu vytvářejí!!!