

Téma: **Plasmatická membrána**

Úvod:

Cytoplasmatická membrána je lipidová dvouvrstva o tloušťce asi 5 nm oddělující buňku od okolního prostředí. Nejvíce jsou v této dvouvrstvě zastoupeny molekuly fosfolipidů, které obsahují jak hydrofilní tak i hydrofobní část, a označují se tudíž jako amfipatické (tuto vlastnost sdílí i ostatní typy membránových lipidů - steroly, glykolipidy). Amfipatický charakter umožňuje agregaci hydrofobních konců lipidů, zatímco hydrofilní části interagují s okolním polárním prostředím. V důsledku tohoto jevu jsou lipidy schopny se za vhodných podmínek poskládat v různé útvary - micely, liposomy nebo membrány, přičemž jde zároveň o energeticky nejvýhodnější uspořádání. Molekuly fosfolipidů vykonávají několik typů pohybů. Mohou laterálně difundovat jednou vrstvou membrány, ale mohou se také překlápět z jedné vrstvy do druhé za pomoci enzymů (flip-flop). Hydrofobní konce zase mohou rotovat kolem své podélné osy, případně může docházet také k jejich ohybu. S ohledem na pohyb molekul lipidů hovoříme o tekutosti membrány, která závisí jednak na teplotě, ale také na složení lipidů, především pak na stupni nasycení hydrofobní části a její délce. Čím je řetězec delší a více nasycený (obsahuje méně násobných vazeb), tím se tekutost membrány snižuje. Dalším důležitým faktorem snižujícím tekutost membrány živočišných buněk je přítomnost cholesterolu, jehož krátké tuhé molekuly vyplňují mezery mezi sousedními lipidovými molekulami, které vznikají díky nepravidelnosti v jejich nenasyčených řetězcích.

Plasmatická membrána neslouží pouze jako bariéra, ale je také důležitým prostředníkem mezi okolím a buňkou, neboť zajišťuje import a export specifických látek. Membrána je ovšem propustná jen pro určité molekuly (hovoříme o semipermeabilitě), přičemž k volné difúzi může docházet pouze v případě nepolárních malých molekul. Průchod větších či nabitých molekul je zprostředkován kanály nebo přenašeči. Proteiny v membráně mají kromě transportu látek mnoho dalších funkcí (spojníky, receptory, enzymy ...) a mohou se v membráně často volně pohybovat („plují jako lodky v moři lipidů“). Proteiny jakožto i samotné lipidy bývají na necytosolové straně membrány modifikované nejrůznějšími řetězci cukrů, a vytváří tak sacharidový plášť nazývaný glykokalyx, který chrání povrch buňky před mechanickým a chemickým poškozením, zajišťuje absorpci vody a je důležitý i při vzájemném rozpoznávání buněk a adhezi.

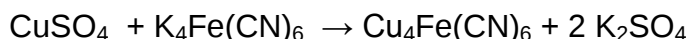
Plasmatická membrána buňky hraje zásadní roli v osmotických jevech v živých organismech. Osmotické děje jsou pro život rostlin i živočichů zcela nezbytné.

Například příjem vody kořeny rostlin probíhá na základě osmózy, stejně tak se vytváří osmotická rovnováha mezi krví a buňkami tkání živočichů, díky osmóze dochází také k zahušťování primární moči v ledvinných kanálcích. Základem osmotických jevů je difúze. K difúzi dochází, smísíme-li různě koncentrované roztoky nebo roztoky různých látek. Po chvíli dojde k rovnoměrnému rozptýlení částic v celém objemu. Nastane vyrovnaní koncentrací difúzí. Jiný případ nastává, oddělíme-li různě koncentrované roztoky polopropustnou membránou, která propouští pouze molekuly rozpouštědla, ne však částice rozpuštěných látek. V tomto případě dochází k přesunu rozpouštědla přes membránu z méně koncentrovaného roztoku do roztoku koncentrovanějšího tak dlouho, dokud se koncentrace na obou stranách membrány nevyrovnají. Současně dochází ke změně objemů na obou stranách membrány. Tento jev se nazývá osmóza. Osmóza je tedy difúze přes polopropustnou membránu.

Roztok, který obklopuje živou buňku může být vůči ní isotonický, hypotonický nebo hypertonický. V isotonickém prostředí, tedy v prostředí fyziologického roztoku, kdy okolí má stejný osmotický tlak jako tekutý obsah buněk, je struktura i funkce cytoplasmatické membrány neporušena. Nachází-li se však buňka v prostředí hypotonickém nebo hypertonickém, dochází vlivem osmotického tlaku k nasávání či ztrátám vody buňkou a plasmatická membrána buď praská nebo ztrácí svůj tvar. Je-li buňka umístěna do prostředí hypotonického, tedy do prostředí, které má nižší obsah solí než buňka samotná, dochází vlivem osmotického tlaku k proudění vody skrze semipermeabilní plasmatickou membránu z okolního prostředí do buňky. Buňka tedy neustálým nasáváním vody zvětšuje svůj objem, až se nakonec vlivem vnitřního tlaku roztrhne. V hypertonickém prostředí, tedy v prostředí s vyšším obsahem solí, prostupuje naopak voda z buňky do prostředí, čímž buňka ztrácí svůj tvar a scvrkává se.

Funkčnost membrány může být narušena řadou vlivů, jedním z nich je například působení detergentu. Detergent se zabudovává do plasmatické membrány buněk, čímž rozruší její strukturu, membrána se následně rozpadá a obsah buňky je uvolněn do prostředí.

Jako chemický model tvorby semipermeabilní membrány a osmotických jevů slouží Traubeho měchýřek. Principem utváření Traubeho měchýřků je reakce krystalů CuSO_4 s roztokem feročyanidu draselného za vzniku semipermeabilní membrány z feročyanidu měďnatého, která má tvar měchýřku:



Roztok síranu uvnitř měchýřku je hypertonický vůči okolnímu roztoku $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, čímž vlivem osmotického tlaku dochází k nasávání vody měchýřkem, který se zvětšuje až praskne, vylije se z něj roztok CuSO_4 . Síran měďnatý opět okamžitě reaguje s $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ za vzniku nové membrány. Takto interakcí dvou jednoduše organizovaných soustav (roztoků anorganických látek) vzniká soustava

více komplexní (osmotická soustava) s novými strukturami a vlastnostmi: membrány, semipermeabilita, osmóza, měchýřky, růst, pohyb a změny tvaru měchýřků.

Úkol č. 1: Traubeho model osmotické soustavy

Chemikálie: 5% vodný roztok ferokyanidu draselného $K_4Fe(CN)_6$; krystalický síran měďnatý ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)

Pomůcky: laboratorní váhy; zkumavka; stojánek; pinzeta; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte 5% vodný roztok ferokyanidu draselného.
2. Zkumavku naplňte do poloviny 5% vodným roztokem ferokyanidu draselného.
3. K roztoku $K_4Fe(CN)_6$ přidejte několik krystalů síranu měďnatého.
4. Makroskopicky pozorujte růst měchýřků, schématicky zakreslete uspořádání měchýřků ve zkumavce po 1, 5 a 10 minutách.
5. Na podložní sklo napipetujte 20 μ l destilované vody a umístěte do ní krystal $CuSO_4$, překryjte krycím sklem. Na okraj sklíčka připipetujte 20 μ l roztoku $K_4Fe(CN)_6$.

Pod mikroskopem pozorujte (při malém zvětšení) vznik ferokyanidu měďnatého, tedy vznik semipermeabilní membrány. Membránu schématicky zakreslete do protokolu.

Úkol č. 2: Chemická lýza

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9

Chemikálie: 2% vodný roztok tritonu X-100

Pomůcky: automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; mikrozskumavka eppendorf; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 2% vodného roztoku tritonu X-100.
2. Na podložní sklo napipetujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk Sf9 a překryjte ji krycím sklem. Pod mikroskopem pozorujte při různých zvětšeních typický tvar buněk Sf9 za fyziologických podmínek.
3. Na hranu krycího skla napipetujte 20 μ l 2% roztok tritonu X-100.
4. V preparátu vyhledejte hranici působení tritonu, tedy místo kde lze pozorovat postupný rozpad buněk. Zvolte si konkrétní buňku, kterou pozorujete až do jejího úplného rozpadu. Vhodným zcloněním lze docílit i toho, že v místě, kde se buňka nacházela, je možné pozorovat ještě její

„stín“. Ten je tvořen ze zbytků buněčných struktur zvláště pak z cytoskeletu.

Úkol č. 3: Osmotická lýza

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9

Chemikálie: 0,1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy; kádinka; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 0,1M vodného roztoku NaCl.
2. Na podložní sklo napípujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk Sf9 a přidejte k ní 20 μ l 0,1M roztoku NaCl, promíchejte a překryjte krycím sklem.
3. Mikroskopem pozorujte lýzi buněk.

Úkol č. 4: Plasmorhiza buněk

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9

Chemikálie: 1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy; kádinka; automatická pipeta s variabilním objemem + špičky; světelný mikroskop a mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si dostatečné množství (pro celou skupinu) 1M vodného roztoku NaCl.
2. Na podložní sklo napípujte 5 μ l suspenze hmyzích buněk Sf9 a přidejte k ní 20 μ l 1M roztoku NaCl, promíchejte a překryjte krycím sklem. Mikroskopem pozorujte plasmorhizu, tedy svrašťování buněk.
3. Změnu tvaru buněk zakreslete do protokolu.

Otázky:

1. Pokuste se objasnit rozdíly mezi jednotlivými útvary: micely, liposomy a membránami. Popište a zakreslete jednotlivé struktury.
2. Uveďte příklady detergentů.
3. Jaké vlivy mohou porušit strukturu a funkčnost cytoplasmatické membrány?

Použitá literatura:

- Hejtmánek M. *et al.*, (1999): Praktická cvičení z biologie, Olomouc