

CVIČENÍ Z BUNĚČNÉ BIOLOGIE

2. PLASMATICKÁ MEMBRÁNA

TEORETICKÝ 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 nenasycených 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 loďky v moři lipidů“). Proteiny jakožto i samotné lipidy bývají na

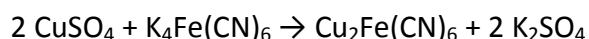
necytosolové straně membrány modifikované nejrůznějšími řetězci cukrů, a vytváří tak sacharidový plášť nazývaný glykokalyx, který chrání povrch buňky před mechanickým a chemickým poškozením, zajišťuje absorpci vody a je důležitý i při vzájemném rozpoznávání buněk a adhezi.

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 vyrovnání 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 ferokyanidu draselného za vzniku semipermeabilní membrány z ferokyanidu 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 hexakynoželezatanu draselného $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, krystalický síran měďnatý $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$

Pomůcky: laboratorní váhy, zkumavka, stojánek, pinzeta, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte 5% vodný roztok $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$.
2. Naplňte zkumavku do poloviny 5% roztokem $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ a k roztoku přidejte pár krystalů $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$.
3. Makroskopicky pozorujte růst Traubeho měchýřků (model semipermeabilní membrány) a schematicky zakreslete uspořádání po 1, 5 a 10 min.

4. Na podložní sklo napipetujte 20 μl roztoku $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ a přidejte krystal $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$. Mikroskopicky pozorujte Traubeho měchýřky. Zakreslete do protokolu.

Úkol č. 2: Působení detergentu na plasmatickou membránu – chemická lyze

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: 2% vodný roztok tritonu X-100

Pomůcky: automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte 2% vodný roztok tritonu X-100 (připraveno vedoucím cvičení).
2. Napipetujte 20 μl buněčné suspenze na podložní sklo, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte buňky za fyziologických podmínek.
3. Na hranu krycího skla opatrně napipetujte 20 μl 2% roztoku tritonu X-100 tak, aby nedošlo k vyplavení buněk. Ihned pozorujte chemickou lyzi buněk na hranici působení detergentu. V místě, kde se buňka nacházela, je možné pozorovat její „stín“, který je tvořen ze zbytků buněčných struktur a zvláště pak z cytoskeletu.
4. Výsledek slovně popište do protokolu a vysvětlete.

Úkol č. 3: Působení hypertonického roztoku na plasmatickou membránu – plasmorhiza

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: 1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy, kádinka, zkumavka, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si 1M vodný roztok NaCl.
2. Napipetujte 20 μl buněčné suspenze na podložní sklo, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte buňky za fyziologických podmínek.

3. Na hranu krycího skla opatrně napipetujte 20 μ l 1M roztoku NaCl a ihned pozorujte působení hypertonického roztoku na buněčnou suspenzi.
4. Pozorujte změnu tvaru buněk, výsledek slovně popište do protokolu a vysvětlete.

Úkol č. 4: Působení hypotonického roztoku na plasmatickou membránu – osmotická lyze

Materiál: kultura hmyzích buněk Sf9 (*Spodoptera frugiperda*)

Chemikálie: 0,1M roztok NaCl

Pomůcky: laboratorní váhy, kádinka, zkumavka, automatická pipeta + špičky, světelný mikroskop + mikroskopické potřeby

Postup:

1. Připravte si 0,1M vodný roztok NaCl.
2. Napipetujte 20 μ l buněčné suspenze na podložní sklo, přikryjte krycím sklíčkem a pozorujte buňky za fyziologických podmínek.
3. Na hranu krycího skla opatrně napipetujte 20 μ l 0,1M roztoku NaCl a ihned pozorujte působení hypotonického roztoku na buněčnou suspenzi.
4. Pozorujte změnu tvaru buněk, výsledek slovně popište do protokolu a vysvětlete.

Otázky:

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

Použitá literatura:

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