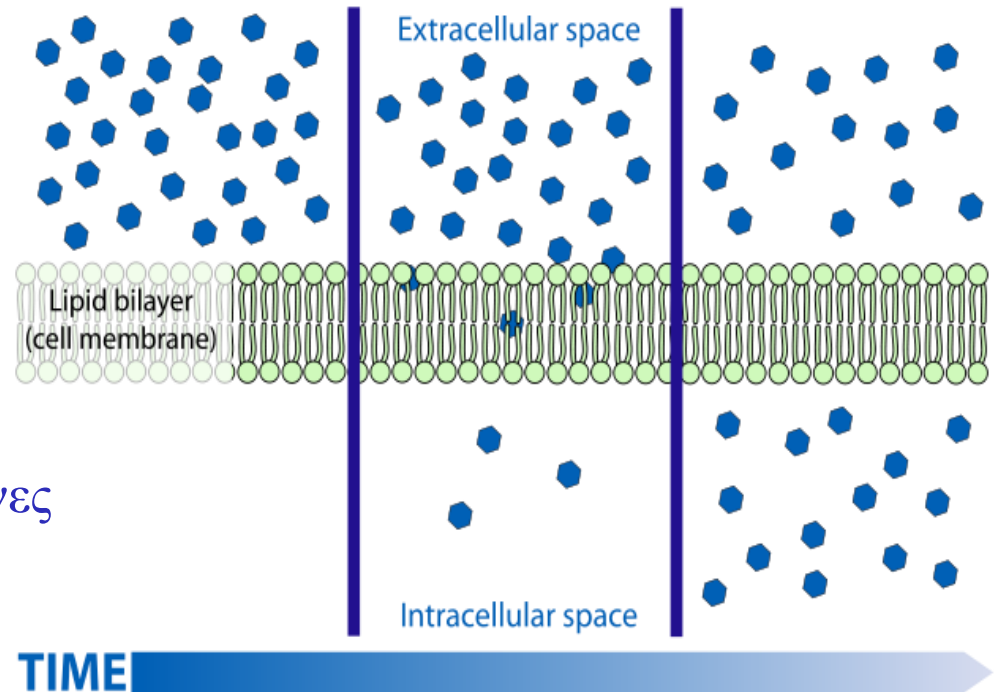


Μεταφορά μορίων δια μέσου μιας μεμβράνης **Ενεργητική** ή **Παθητική** μεταφορά

Η μεμβρανική διαπερατότητα ενός μορίου εξαρτάται από

- Διαπερατότητα (διάχυση- μετακίνηση πάντα από υψηλή συγκέντρωση σε χαμηλή)
- Διαθεσιμότητα πηγής ενέργειας

Μεμβράνες είναι εγγενώς αδιαπέραστες από ιόντα και πολικά μόρια



λιπόφιλο μόρια πχ στεροειδείς ορμόνες
απλή διάχυση

Η ανάγκη μετακίνησης ουσιών διαμέσου των μεμβρανών δημιούργησε την ανάγκη για **αντλίες**, **δίαυλους** και **φορείς**

Αντλίες

χρησιμοποιούν μια **πηγή ενέργειας** (συνήθως ATP ή φωτόνια) με σκοπό την μεταφορά ουσιών (ή ιόντων) από χαμηλή σε υψηλή συγκέντρωση (*ανοδική κατεύθυνση*) Περιγράφεται και σαν **ενεργή μεταφορά**

Δίαυλοι

επιτρέπουν την μεταφορά ουσιών, **χωρίς την ανάγκη ενέργειας**, διαμέσου των μεμβρανών (εκλεκτικά-συγκεκριμένες ουσίες ή ιόντα) από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση (*καθοδική κατεύθυνση*)

Περιγράφεται και σαν **παθητική μεταφορά** ή καλύτερα **διευκολυνόμενη διάχυση**)

Φορείς

Διεκπεραιώνουν την μεταφορά ουσιών (ή ιόντων) χωρίς την κατανάλωση ATP

Εφαρμογές

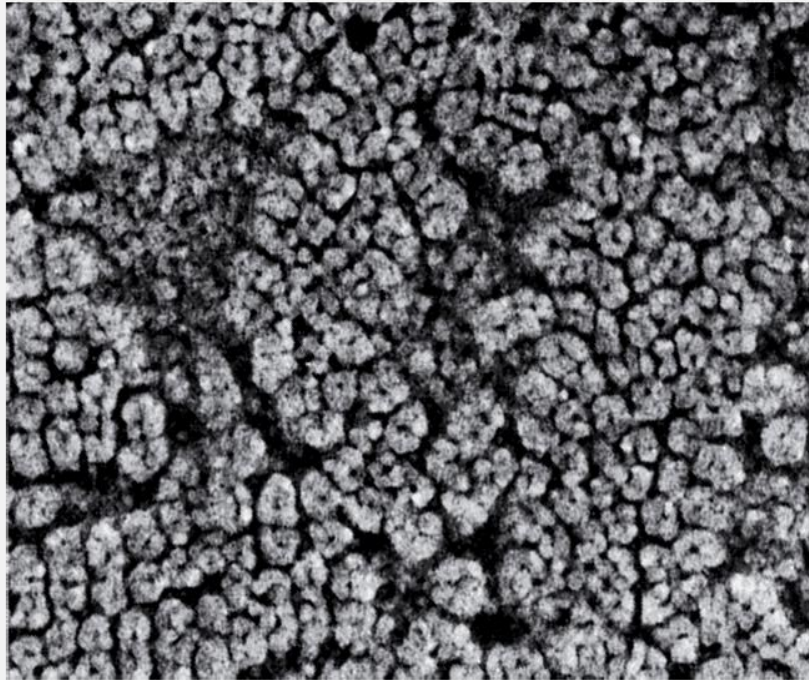
Πρόσληψη θρεπτικών ουσιών (άρα έλεγχο μεταβολισμού)

Παράδειγμα GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5
GLUT3 μόνο εκφράζεται στους νευρώνες και δεσμεύει την Glu ισχυρότερα από τους υπόλοιπους, οπότε είναι τα πρώτα που εξυπηρετούνται

Υπεύθυνες για τις βαθμιδώσεις συγκέντρωσης ιόντων
(άρα πόλωση μεμβρανών)

Επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων
(χασματοσυνδέσεις συγχρονισμό συστολής της καρδίας)

Έλεγχος Διαύλων



100 nm

Οι υποδοχείς της ακετυλοχολίνης. Η ηλεκτρονιομικρογραφία δείχνει την πυκνή διάταξη των υποδοχέων της ακετυλοχολίνης σε μια μετασυναπτική μεμβράνη. [Ευγενική προσφορά Dr. John Heuser και Dr. Shelly Salpeter.]

Παράδειγμα δίαυλου (Na^+) ελεγχόμενου από το πρόσδεμα

Δίαυλος υποδοχέα ακετοχολίνης
Διεκπεραιώνει τη μετάδοση νευρικών σημάτων . Ελέγχεται (ανοίγει) με την δέσμευση της ακετοχολίνης

Σε αντιδιαστολή οι τασοελεγχόμενοι δίαυλοι οι οποίοι ανοίγουν μετά από μεμβρανική εκπόλωση (δεν ελέγχονται από κάποια ουσία αλλά από συγκέντρωση ιόντων)

Ποσοτικοποίηση της ελεύθερης ενέργειας ΔG από την διαφορά συγκέντρωσης (απλή διάχυση)

Η βαθμίδωση συγκέντρωσης (C_1 έξω και μέσα C_2) δημιουργεί διαφορά ενέργειας

$$\Delta G \quad C_1 \leftrightarrow C_2 \quad K = C_2 / C_1$$

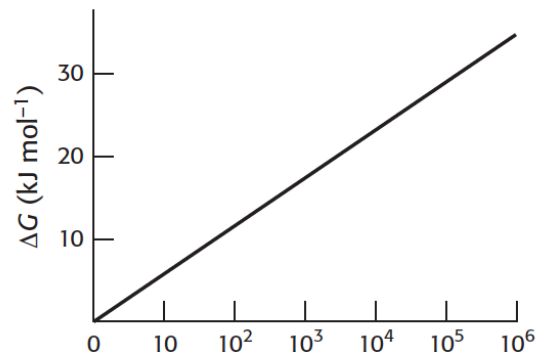
$$\Delta G = RT \ln K = 2,303RT \log K = 2,303RT \log(C_2 / C_1)$$

$$R = 1,99 \times 10^{-3} \text{ kcal mol}^{-1} \text{ deg}^{-1} \quad T = \text{βαθμοί Kelvin } 25^\circ\text{C} (298^\circ\text{K})$$

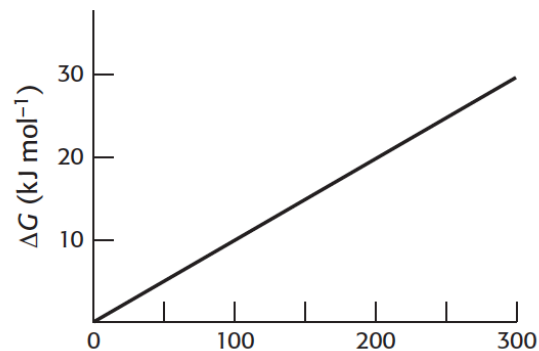
Στην περίπτωση που έχουμε ιόντα λόγο φορτίου έχουμε επιπλέον ενεργεία λόγω διαφοράς δυναμικού ΔV

$$\Delta G = 2,303RT \log(C_2 / C_1) + ZF\Delta V$$

$$Z = \text{ηλεκτρικό φορτίο}, \quad F = \text{σταθερά Faraday} (23,1 \text{ kcal/V} \cdot \text{mol})$$



(A) Λόγος συγκεντρώσεων (c_2/c_1)



(B) Μεμβρανικό δυναμικό (mV)

Εικόνα 13.1 Ελεύθερη ενέργεια και μεταφορά. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας κατά τη μεταφορά (A) μιας μη φορτισμένης διαλυμένης ουσίας από ένα διαμέρισμα συγκέντρωσης c_1 σε ένα διαμέρισμα συγκέντρωσης c_2 και (B) μιας μονοσθενούς φορτισμένης ουσίας διά μέσου μιας μεμβράνης προς την πλευρά που έχει το ίδιο φορτίο με εκείνο του μεταφερόμενου ιόντος. Επισημαίνεται ότι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας που επιβάλλεται από ένα μεμβρανικό δυναμικό 59 mV είναι ισοδύναμη με εκείνη που απαιτείται για λόγο συγκεντρώσεων 10 ενός μονοσθενούς ιόντος σε θερμοκρασία 25°C.

Παράδειγμα ($C_1 = 10^{-3} \text{M}$ έξω και μέσα $C_2 = 10^{-1} \text{M}$)

$$\Delta G = 2,303RT \log(C_2 / C_1) = 2,303 \times 10^{-3} \times 1,99 \times 298 \times \log(100) = 2,7 \text{ Kcal}$$

Σε 25°C (298°C)

Η βακτηριοροδόψινη δημιουργεί βαθμίδωση συγκέντρωσης με δαπάνη ηλιακής ενέργειας

Δύο οικογένειες μεμβρανικών πρωτεϊνών χρησιμοποιούν την υδρόλυση της ATP για την άντληση ιόντων δια μέσου μεμβρανών

Εξωκυττάριο υγρό ζωικών κυττάρων: τα ιόντα παρόμοια με θαλασσινό νερό.

Εσωτερικά (ΕΚ) και εξωτερικά τα ιόντα πρέπει να ελέγχονται, K^+ υψηλό, Na^+ χαμηλό

ρυθμίζονται από ένζυμο **αντλία Na^+-K^+ ή ATPάση Na^+-K^+** (γιατί η υδρόλυση συμβαίνει μόνο εάν δεσμευτούν Na^+-K^+).

Το 1/3 του ATP σε ένα ζωντανό οργανισμό καταναλώνεται για την άντληση αυτών των δυο ιόντων

Με K^+ εσωτερικά 4 mM και εσωτερικά 157 mM
και Na^+ εξωτερικά 143 mM και εσωτερικά 14 mM

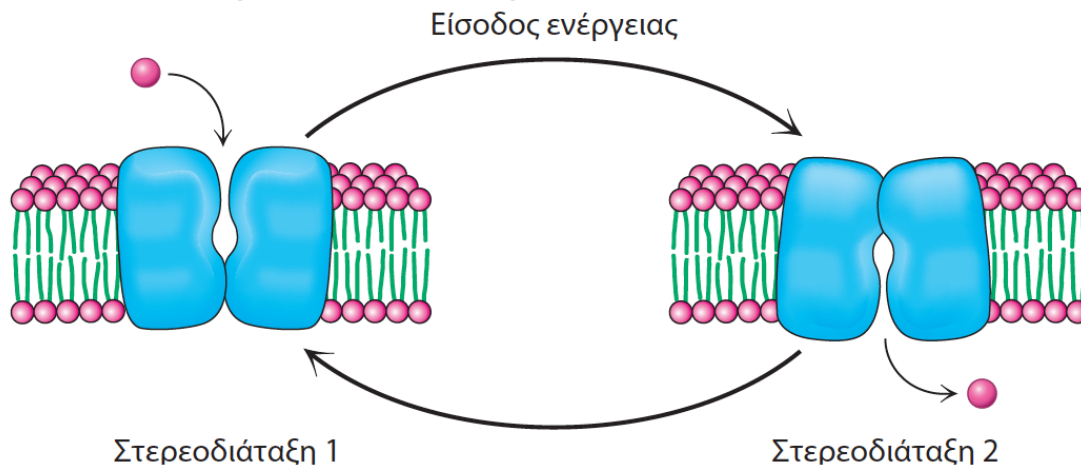
Με την εξίσωση τη προηγούμενης διαφάνειας μπορούμε να υπολογίσουμε την μεταβολή της ελεύθερης $\Delta G = 2,303RT \log(C_2/C_1) + ZF\Delta V$ για τις παραπάνω Συγκεντρώσεις (περίπου 3,66 kcal)

Άλλες ATPάσες: **ATPάση Ca^{+2} , γαστρική ATPάση όλες H^+-K^+ ATPάσες**
τύπου **P** σχηματίζουν ένα ενδιάμεσο φωσφοριλιωμένο προϊόν

Οι ATPάσες τύπου P συζευγνύουν τη φωσφορυλίωση με μεταβολές στερεοδιάταξης για την άντληση ιόντων ασβεστίου δια μέσου των μεμβρανών

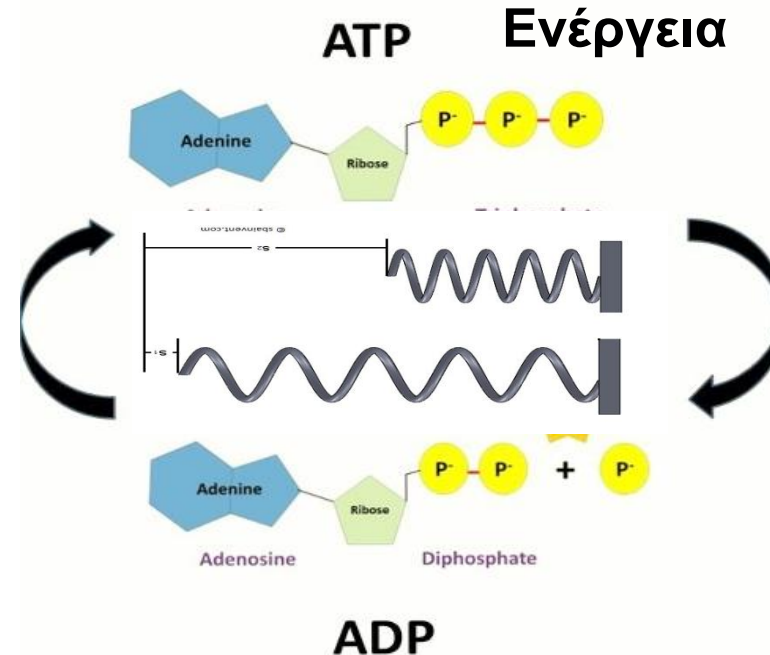
Κάθε αντλία μπορεί να υπάρχει σε δύο κύριες στερεοδιατάξεις:

1. οι θέσεις δέσμευσης των ιόντων ανοίγουν στη μία πλευρά της μεμβράνης
2. οι θέσεις δέσμευσης ιόντων ανοίγουν στην άλλη πλευρά της μεμβράνης



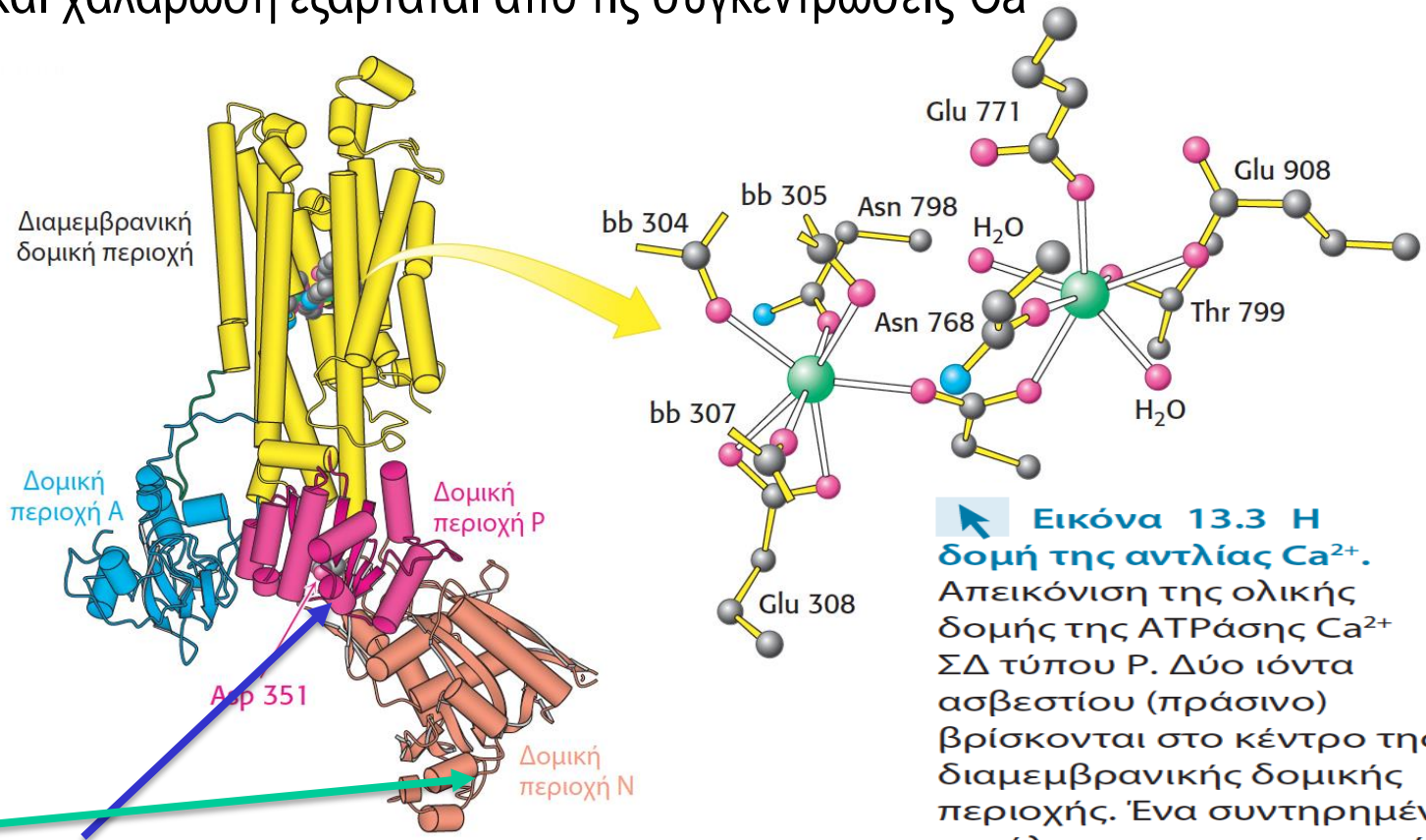
Εικόνα 13.2 Η λειτουργία της αντλίας. Ένα απλό σχήμα για την άντληση ενός μορίου δια μέσου μιας μεμβράνης. Η αντλία μεταπίπτει μεταξύ δύο στερεοδιατάξεων, κάθε μία από τις οποίες έχει μια θέση δέσμευσης προσβάσιμη από διαφορετική πλευρά της μεμβράνης.

Για την άντληση ιόντων κατά μία κατεύθυνση δια μέσου μιας μεμβράνης η ελεύθερη ενέργεια από την υδρόλυση της ATP πρέπει να συζευγνύεται με την αλληλομετατροπή των δύο ανωτέρω στερεοδιατάξεων.



ΑΤΡάση Ca^{2+} : το 80% των μεμβρανών του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ) Ca^{2+} (ΕΚ) 0,1 μM , 1,5mM (ΣΔ) διατηρείται από την ΑΤΡάση Ca^{2+}

Η μυϊκή σύσπαση και χαλάρωση εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις Ca^{2+}



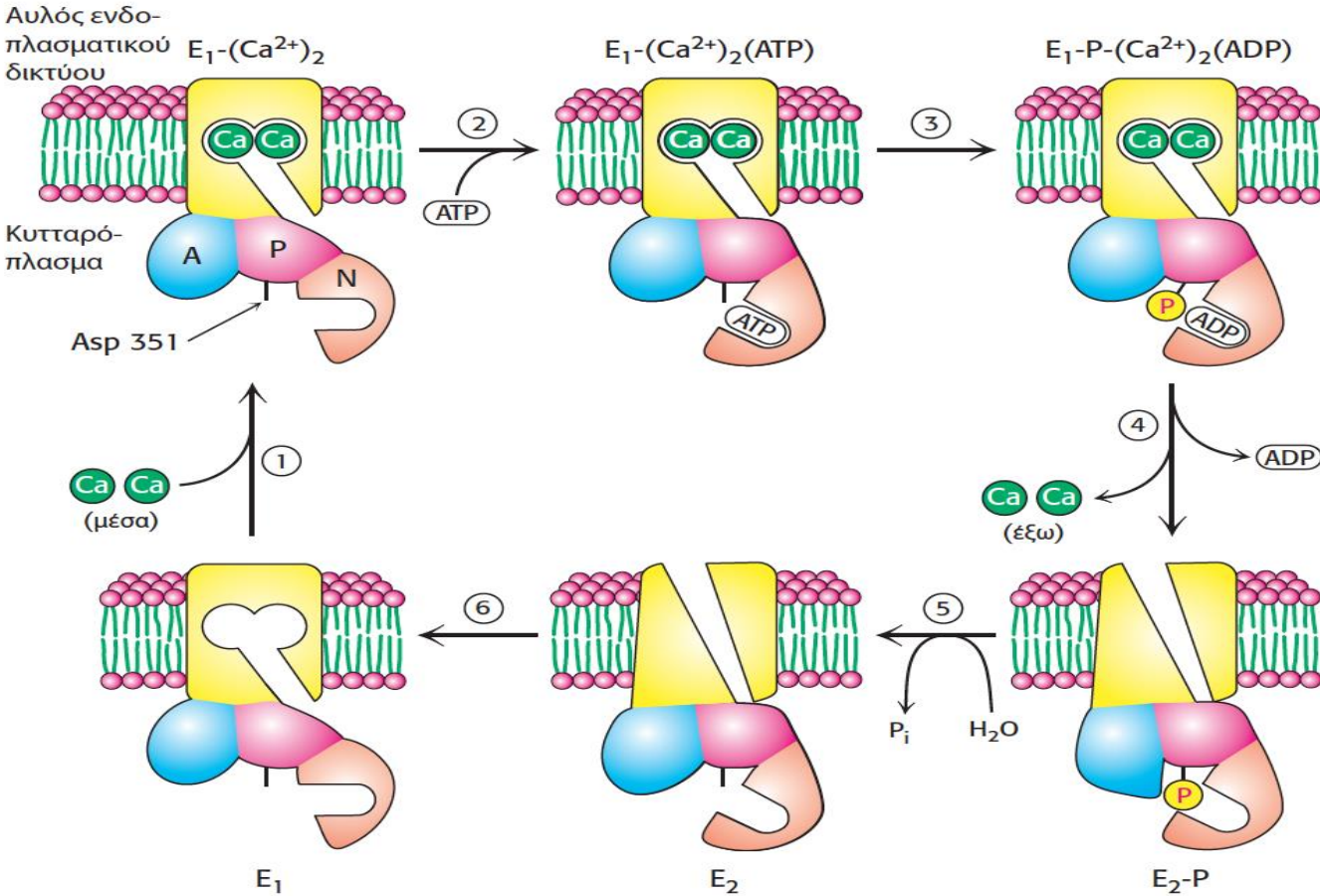
Εικόνα 13.3 Η δομή της αντλίας Ca^{2+} . Απεικόνιση της ολικής δομής της ΑΤΡάσης Ca^{2+} ΣΔ τύπου Ρ. Δύο ιόντα ασβεστίου (πράσινο) βρίσκονται στο κέντρο της διαμεμβρανικής δομικής περιοχής. Ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαραγινικού (Asp 351) που δεσμεύει μια φωσφορική ομάδα βρίσκεται στη δομική περιοχή Ρ. Η σύντμηση bb αναφέρεται στις καρβονυλικές ομάδες του πολυπεπτιδικού κορμού. [Σχεδιασμένο από 1SU4.pdb.]

Οι περιοχές Ν και Ρ μετακινούνται κατά την διάρκεια του καταλυτικού κύκλου

Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{2+} το Asp 351 φωσφορυλιώνεται και ενεργοποιείται

Τέσσερις καταστάσεις στερεοδιάταξης E1 E1-P, E2-P και P

- 1) Η δέσμευση του Ca^{2+} γίνεται αυθόρμητα ($\Delta G < 0$) άρα η απελευθέρωση απαιτεί ενέργεια που προέρχεται από το ATP
- 2) Η γ-φωσφορική ομάδα μεταφέρεται στο Asp (μόνο όταν έχει δεσμευτεί Ca^{2+})
- 3) μετάπτωση από την E1 στην μορφή E2-P το Ca^{2+} εάν ελευθερωθεί μπορεί να πάει μόνο στο $\Sigma\Delta$
- 4) Η μορφή E2-P έχει χαμηλή συγγένεια με το Ca^{2+}
- 5) Με την απελευθέρωση του Ca^{2+} μπορεί να υδρολυθεί το Asp-PO4
- 6) Το ένζυμο χωρίς την PO4 ομάδα δεν είναι σταθερό στην E2 μορφή και επανέρχεται στην E1



Εικόνα 13.5 Αντληση ασβεστίου. Η ATPάση Ca²⁺ μεταφέρει Ca²⁺ διά μέσου της μεμβράνης με έναν μηχανισμό ο οποίος συμπεριλαμβάνει (1) δέσμευση του Ca²⁺ από το κυτταρόπλασμα, (2) δέσμευση της ATP, (3) υδρόλυση της ATP με μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας στο Asp 351 του ενζύμου, (4) απελευθέρωση της ADP και εκτροπή του ενζύμου για να απελευθερώσει Ca²⁺ στην αντίθετη πλευρά της μεμβράνης, (5) υδρόλυση του φωσφοασπαργινικού και (6) εκτροπή του ενζύμου ώστε να προετοιμαστεί για νέα δέσμευση Ca²⁺ από το κυτταρόπλασμα.

Τα Ca^{+2} για να μένουν σταθερά στην πρωτεΐνη πρέπει να είναι δεσμευμένα

Πιθανώς με κάτι αρνητικά φορτισμένο (-) αφού το Ca^{+2} έχει θετικό φορτίο (2+)

Γιατί αφού τα Ca^{+2} είναι συνδεδεμένο, ενδεχομένως σε κάτι A^- να αποδεσμευτεί από αυτό; δεν στέκει ούτε ενεργειακά ούτε από χημικής άποψης

Εκτός εάν αυτό το αρνητικό κέντρο A^- κέντρο ενωθεί με κάτι περισσότερο θετικό Arg^{+2}

Άρα τελικό ερώτημα είναι:

γιατί κάτι που έχει δεσμευτεί (χαμηλή ενέργεια) να αποδεσμευτεί (υψηλή ενέργεια)

Ρόλος του ATP να προσφέρει την απαιτούμενη ενέργεια

Πώς μπορεί να γίνει η απελευθέρωση και δέσμευση Ca^{+2}

$\text{A}^- \text{Ca}^{+2} \rightarrow \text{A}^- + \text{Ca}^{+2}$ για συμβεί πρέπει το A^- να συνδεθεί με κάτι πιο θετικό

$\text{A}^- + \text{Arg}^{+2} \rightarrow \text{A}^- \text{Arg}^{+2}$

Εάν σταματούσε εδώ η αντίδραση (διαδικασία) το $\text{A}^- \text{Arg}^{+2}$ δεν θα δέσμευε άλλο Ca^{+2} πρέπει να ξαναγίνει ελεύθερο A^-

Συνεχίζεται με

$\text{B}^+ + \text{ATP}^{-3} \rightarrow \text{BATP}^{-2}$ σύνδεση ATP^{-3} με αμινοξύ B^+

$\text{A}^- \text{Arg}^{+2} + \text{BATP}^{-2} \rightarrow \text{A}^- + (\text{Arg}^{+2} \text{BATP}^{-2})$ Η Arg^{+2} ενωνεται με BATP^{-2} απελευθερώσει A^-

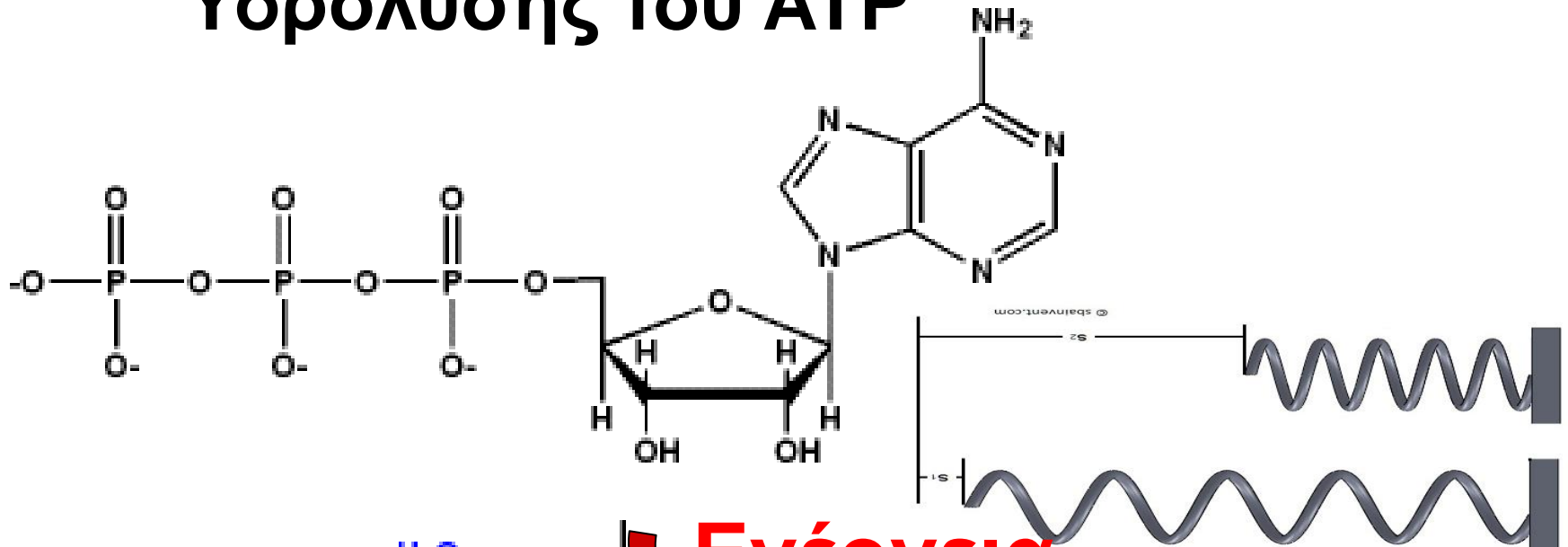
εάν η Arg^{+2} δεν απελευθερωθεί η διαδικασία δεν προχωράει

Τελικό στάδιο απελευθέρωση Arg^{+2} με προσθήκη **ενέργειας**

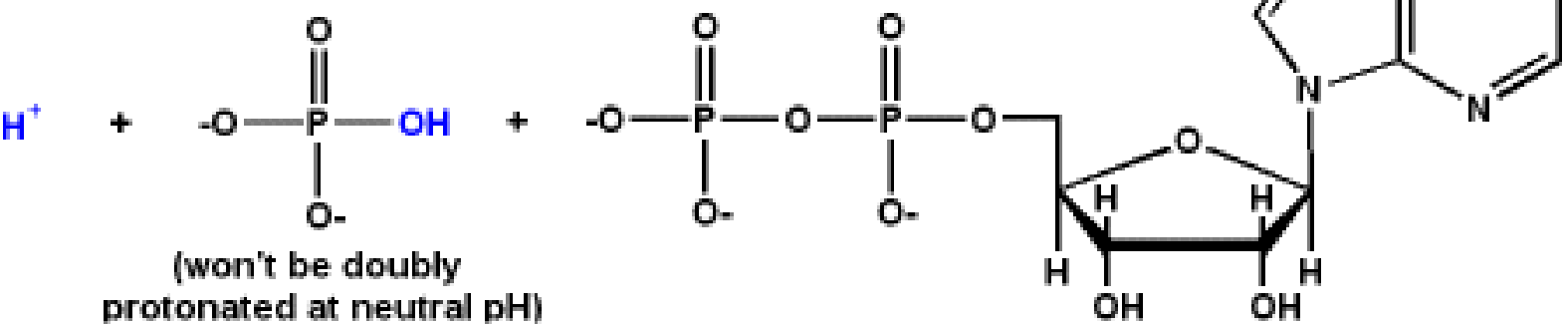
$\text{BATP}^{-2} + \text{Arg}^{+2} + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow + \text{B}^+ + \text{Arg}^{+2} + \text{ADP}^{-2} + \text{P}_i^{-2}$

άρα εάν μπορώ να προσθέτω ή να αφαιρώ φορτίο στο B μπορούν να γίνουν τα παραπάνω αυτό βέβαια απαιτεί ενέργεια ATP

Υδρόλυση του ATP



H_2O **Ενέργεια**



φωσφορικά $P_i = (HPO_4)^{-2}$

Ο ίδιος μηχανισμός χρησιμοποιείται και στην αντλία Na^+-K^+

Η ενέργεια που απαιτείτε για την μεταφορά των ιόντων Na^+-K^+ μπορούν να υπολογιστούν
Η συγκέντρωση Na^+ είναι στο εξωτερικό και το εσωτερικό του κυττάρου είναι 143 και 14 mM

Αντίστοιχα για K^+ στο εξωτερικό και το εσωτερικό του κυττάρου είναι 4 και 157 mM

Με θερμοκρασία 37°C και τιμή δυναμικού -50mV ισχύει $\Delta G = 2,303RT \log(C_2/C_1) + ZF\Delta V$
Για μεταφορά 3mol Na^+ έξω και 2mol K^+ μέσα υπολογίζεται σε $+8,8 \text{ Kcal/mol}$

Η υδρόλυση ATP δίνει -12 Kcal/mol που είναι αρκετή για την ώθηση της ανοδικής μεταφοράς των ιόντων αυτών

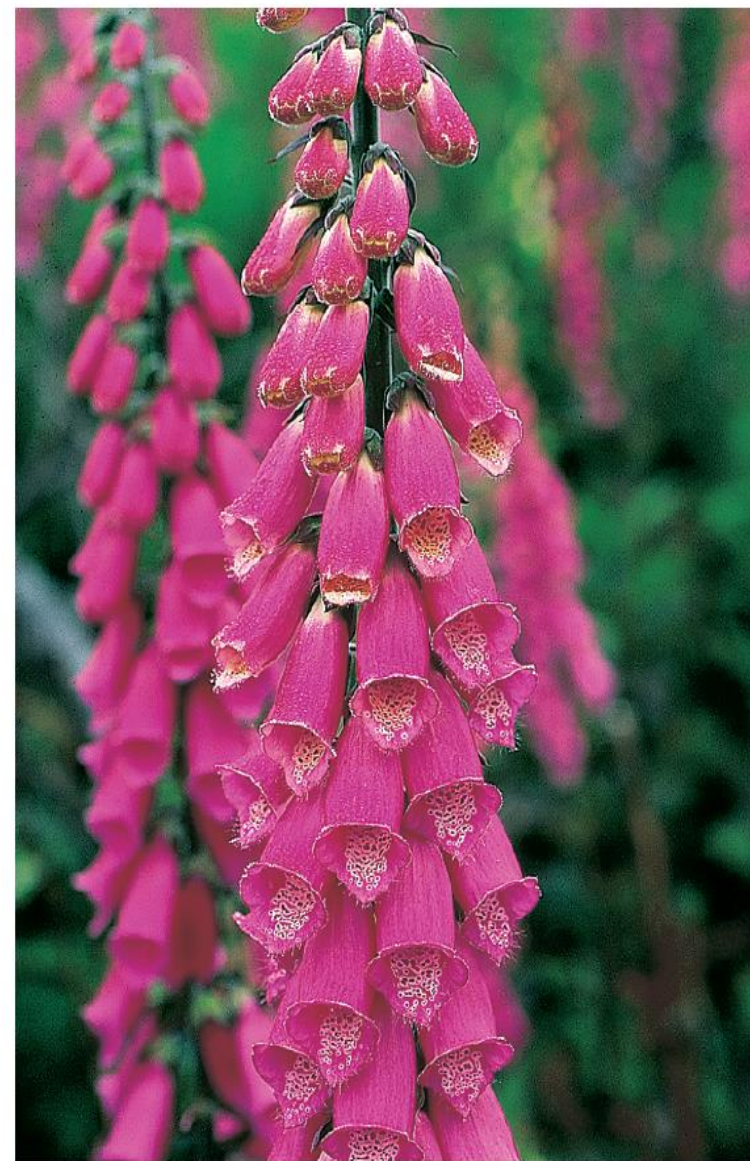
Η δακτυλίτιδα αναστέλλει ειδικά την αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ παρεμποδίζοντας την αποφωσφορυλίωση της (αναστέλλοντας ένα βήμα του κύκλου αναστέλλουμε όλο τον κύκλο)

Αναστολή της αντλίας $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ οδηγεί σε υψηλή συγκέντρωση Na^+ στο εσωτερικό του κυττάρου.

Η μείωση της βαθμιδωτής συγκέντρωσης των $\text{Na}^+ \rightarrow$ επιβραδύνει την εξαγωγή Ca^{+2} (μέσω του ανταλλάκτη νατρίου ασβεστίου- επόμενη διαφάνεια) \rightarrow αύξηση επιπέδων $\text{Ca}^{+2} \rightarrow$ επαύξηση της συσταλτικότητας του καρδιακού μυός

Χρησιμοποιείται από το 1787 πολύ πριν ανακαλυφθεί η ΑΤΡάση $\text{Na}^+ - \text{K}^+$

Στην μορφή E2-P δημιουργείται/υπάρχει μια εγκόλπωση στην οποία ταιριάζει με $\text{K}_i = 10\text{nM}$ ο αναστολέας δακτυλίτιδα. Ο αναστολέας λειτουργεί μόνο εάν βρίσκεται στην εξωτερική μεριά της μεμβράνης



Η πορφυρά δακτυλίτιδα (*Digitalis purpurea*) αποτελεί την πηγή δακτυλίτιδας, ενός από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα. [Inga Spence / Visuals Unlimited].

Οι ΑΤΡάσες τύπου P είναι εξελικτικά συντηρημένες

Στο γονιδιώμα της ζύμης έχουν βρεθεί 16 πρωτεΐνες

τρεις μεταφέρουν Na^+ ,

δύο H^+ , δύο Ca^{+2} ,

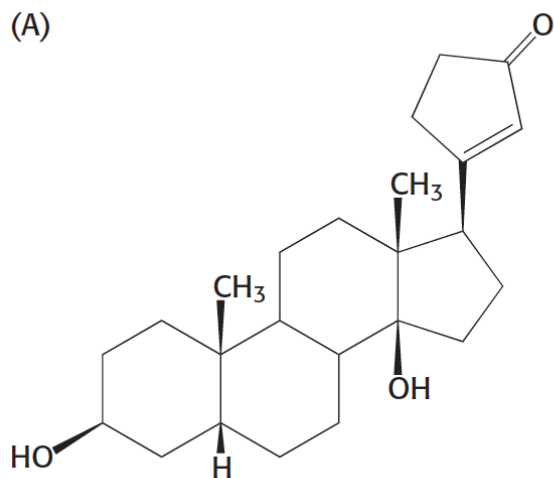
δύο ιόντα όπως Cu^{+2}

πέντε μεταφέρουν λιπίδια περιστροφάσες

Όταν ένα σύστημα (πρωτεΐνη-αντλία) είναι λειτουργικό χρησιμοποιείται σε πολλούς διαφορετικούς σκοπούς (ρόλους)

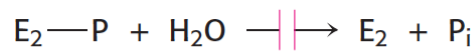
Όλα τα μέλη χρησιμοποιούν τον ίδιο **θεμελιώδη μηχανισμό υδρόλυση του ΑΤΡ**

(A)



Διγίτοξιγενίνη

(B)



Αναστολή από
καρδιοτονωτικά στεροειδή

Εικόνα 13.6 Διγίτοξιγενίνη. Τα καρδιοτονωτικά στεροειδή, όπως η διγίτοξιγενίνη, αναστέλλουν την αντλία $\text{Na}^+\text{-K}^+$ παρεμποδίζοντας την αποφωσφορυλίωση της μορφής $\text{E}_2\text{-P}$ της ΑΤΡάσης.

Δευτερογενείς μεταφορείς

Χρησιμοποιούν μια βαθμίδωση συγκέντρωσης για να ενεργοποιήσουν τον σχηματισμό μιας άλλης

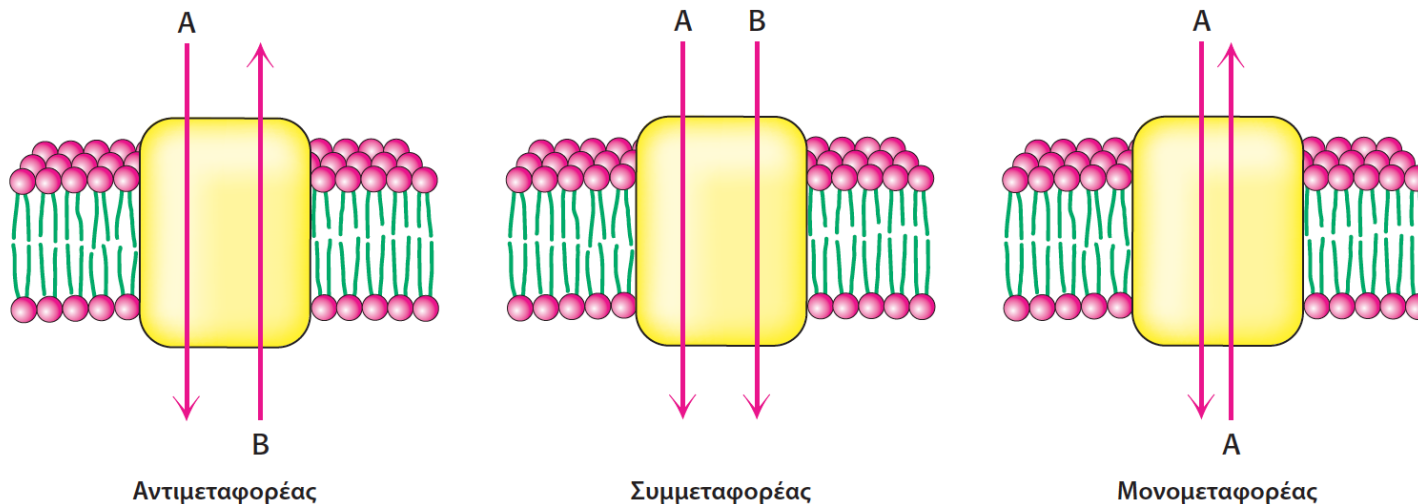
Αφού η διαφορά συγκέντρωσης παρέχει ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί (εάν συζευχθεί) για την μεταφορά για την μεταφορά μιας ουσίας ή ιόντος (δευτερογενείς μεταφορείς)

Αντιμεταφορείς και συμμεταφορείς

Ο ανταλλάκτης νατρίου –ασβεστίου στα ζωικά κύτταρα χρησιμοποιεί την ηλεκτροχημική βαθμίδωση των Na^+ για άντληση Ca^{2+} ($3 \text{Na}^+ \leftrightarrow \text{Ca}^{2+}$). Έχει χαμηλή συγγένεια (Κ αντίδρασης $\text{P} + \text{Ca}^{2+} \leftrightarrow \text{P}(\text{Ca}^{2+})$ σε σχέση με την ATPάση-Ca^{2+} αλλά μπορεί να αντλήσει 2000 ιόντα Ca^{2+} ενώ η αντλία ATPάση-Ca^{2+} μόλις 30 ιόντα ανά δευτερόλεπτο

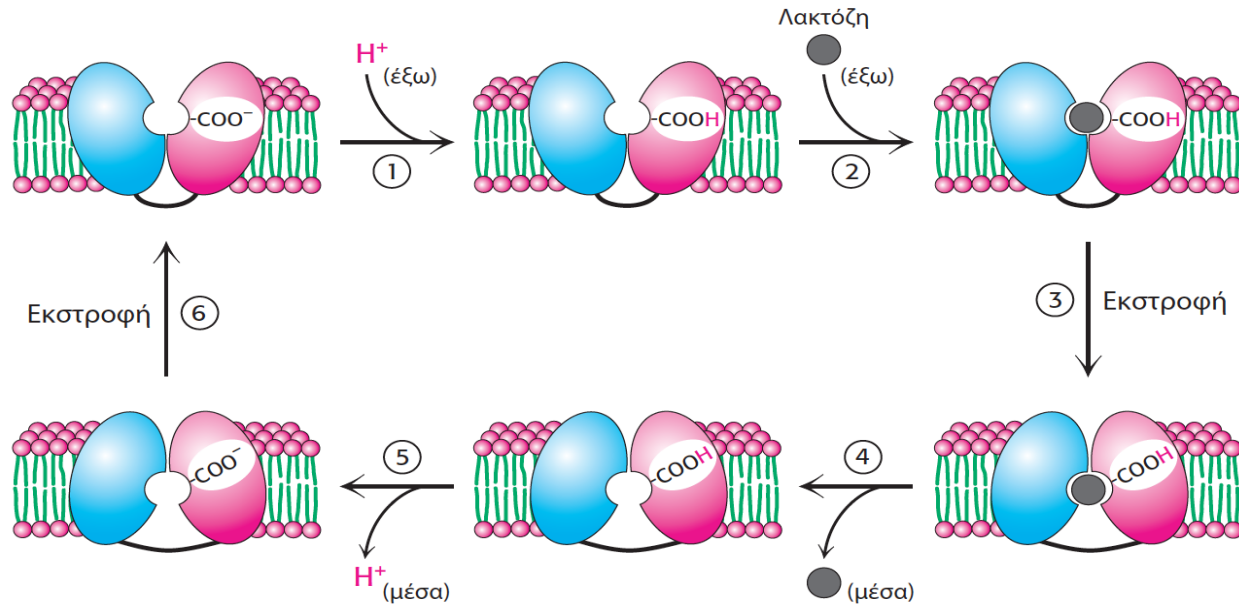
Συμμεταφορέας νατρίου-γλυκόζης (σε μερικά κύτταρα) χρησιμοποιεί την ηλεκτροχημική βαθμίδωση Na^+ 143mM (εξωτ.) - 14mM (εσωτ.) 2,2Kcal για άντληση γλυκόζης με 66 φορές διαφορά συγκέντρωσης μέσα και έξω από το κύτταρο

160 πρωτεΐνες στο γονιδίωμα του *E. coli* (4000 πρωτεΐνες) κωδικοποιούν δευτερογενείς μεταφορείς

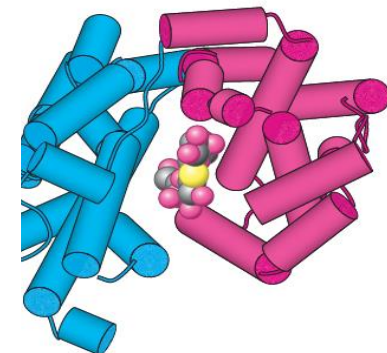
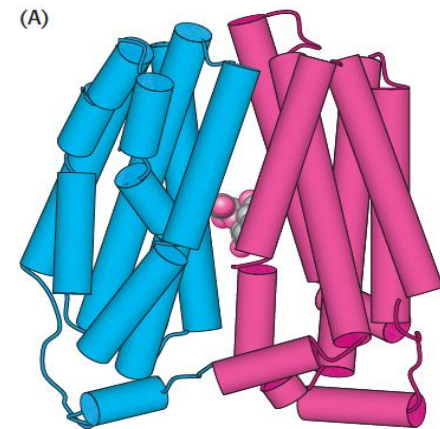


Εικόνα 13.10 Αντιμεταφορείς, συμμεταφορείς και μονομεταφορείς. Οι δευτερογενείς μεταφορείς μπορούν να μεταφέρουν δύο υποστρώματα σε αντίθετες κατευθύνσεις (αντιμεταφορείς), δύο υποστρώματα προς την ίδια κατεύθυνση (συμμεταφορείς) ή ένα υπόστρωμα και προς τις δύο κατευθύνσεις (μονομεταφορέας).

Διαπεράση της λακτόζης ένας ακόμη συμμεταφορέας



Εικόνα 13.12 Ο μηχανισμός δράσης της διαπεράσης της λακτόζης. Ο μηχανισμός αρχίζει με τη διαπεράση ανοιχτή προς την εξωτερική πλευρά του κυττάρου (επάνω αριστερά). Η διαπεράση δεσμεύει ένα πρωτόνιο από την εξωτερική πλευρά του κυττάρου (1) και μετά δεσμεύει το υπόστρωμά της (2). Η διαπεράση εκστρέφεται (3) και ακολούθως απελευθερώνει το υπόστρωμα (4) στο εσωτερικό του κυττάρου. Κατόπιν εκστρέφεται ξανά (6) για να ολοκληρώσει τον κύκλο.

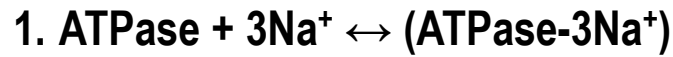


Εικόνα 13.11 Η δομή της διαπεράσης της λακτόζης με δεσμευμένο ένα ανάλογο λακτόζης. Το αμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης απεικονίζεται με μπλε και το καρβοξυ-τελικό άκρο με κόκκινο. (A) Πλάγια όψη. (B) Κάτοψη (από το εσωτερικό του κυττάρου). Παρατηρήστε ότι η δομή αποτελείται από δύο ημίσεια που περιβάλλουν το σάκχαρο και είναι συνδεδεμένα μεταξύ τους μόνο με ένα πολυπεπτιδικό τμήμα. [Σχεδιασμένο από 1PV7.pdb.]

Η οξείδωση καυσίμων (λακτόζη) δημιουργεί διαφορά συγκέντρωσης σε H^+ (pH), αυτή η διαφορά ενέργειας (συγκέντρωση) χρησιμοποιείται για την μεταφορά λακτόζης

Τα H^+ μετακινούνται από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση και ταυτόχρονα η λακτόζη μετακινείται από χαμηλή σε υψηλή συγκέντρωση

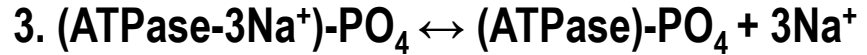
Αντλία Na⁺-K⁺ με δαπάνη ενέργειας ATP



Τρεις (αρνητικά φορτ.) επιφάνειες προσδένουν Na⁺



ATP φωσφορυλίωση της ATPase προκαλεί: κλείσιμο εσωτερικής οπής, αλλαγή διαμόρφωσης (αρνητικά φορτ. επιφάνειες) - δεν προσδένεται το Na⁺

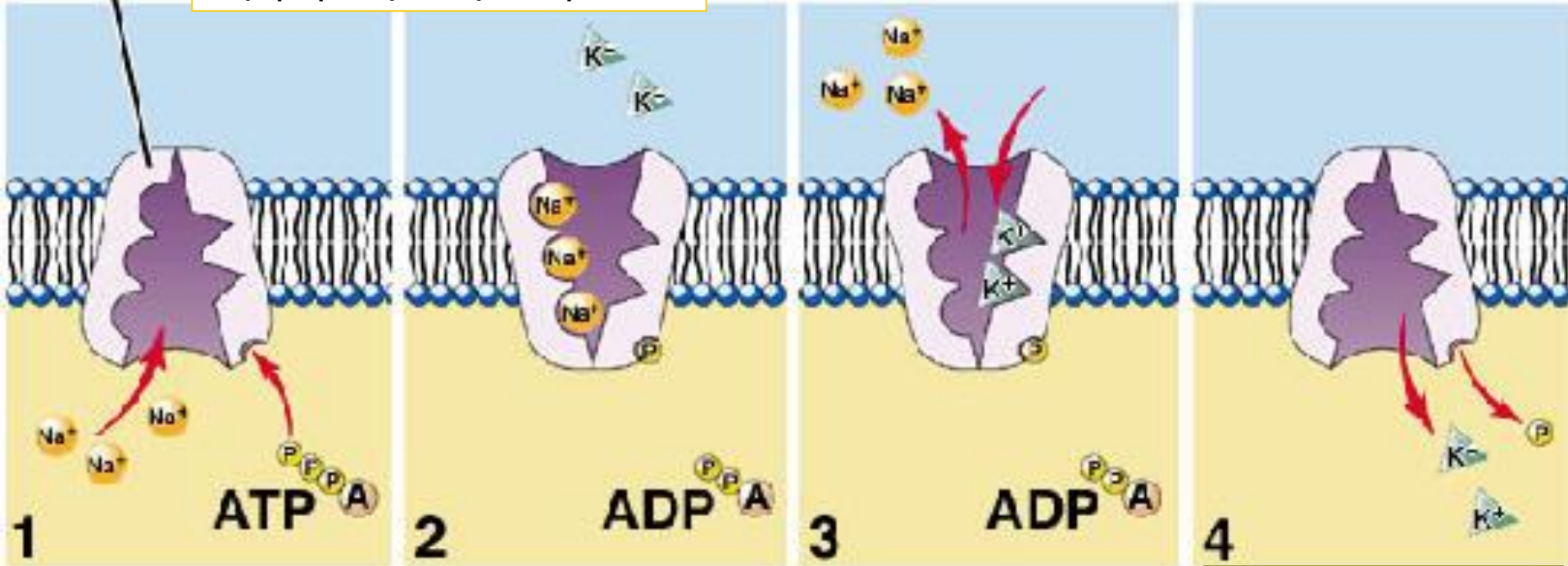


Na⁺ ελευθερώνονται και αυτό δημιουργεί δυο (αρνητικά φορτ.) επιφάνειες που προσδένουν K⁺

Sodium-potassium pump

Υψηλή συγκέντρωση Na⁺

<https://www.youtube.com/watch?v=GTHWig1vOnY>



4. $(\text{ATPase-2K}^+)-\text{PO}_4 \leftrightarrow (\text{ATPase}) + 2\text{K}^+ + \text{PO}_4^{-3}$ πρόσδεση K⁺ κλείνει εξωτερική οπή, ανοίγει εσωτερική η δομική αλλαγή αποφωσφορυλίωση της ATPase και προκαλεί απελευθέρωση του K⁺

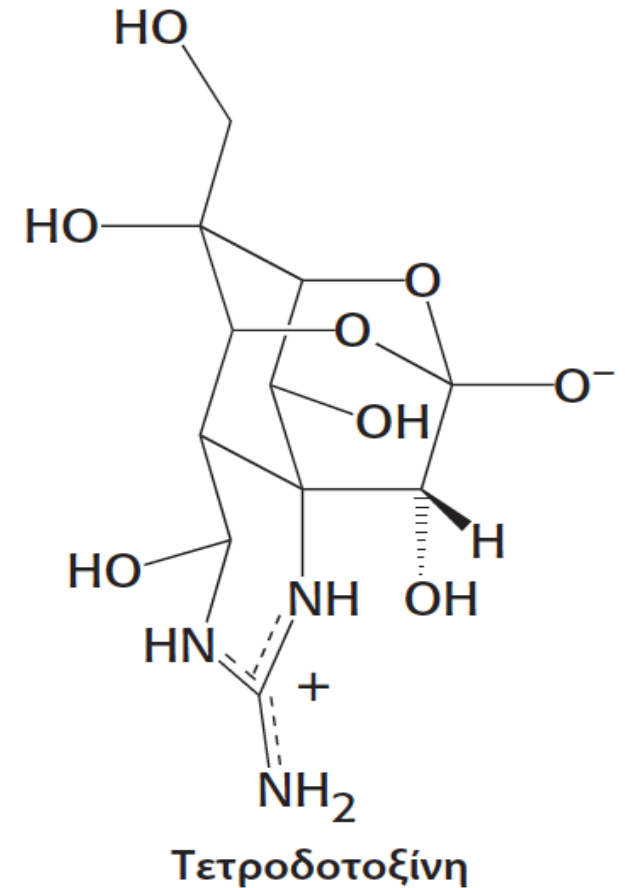
Υψηλή συγκέντρωση K⁺

Η δομή ενός διαύλου ιόντος K είναι ένα αρχέτυπο για πολλές δομές ιοντικών διαύλων

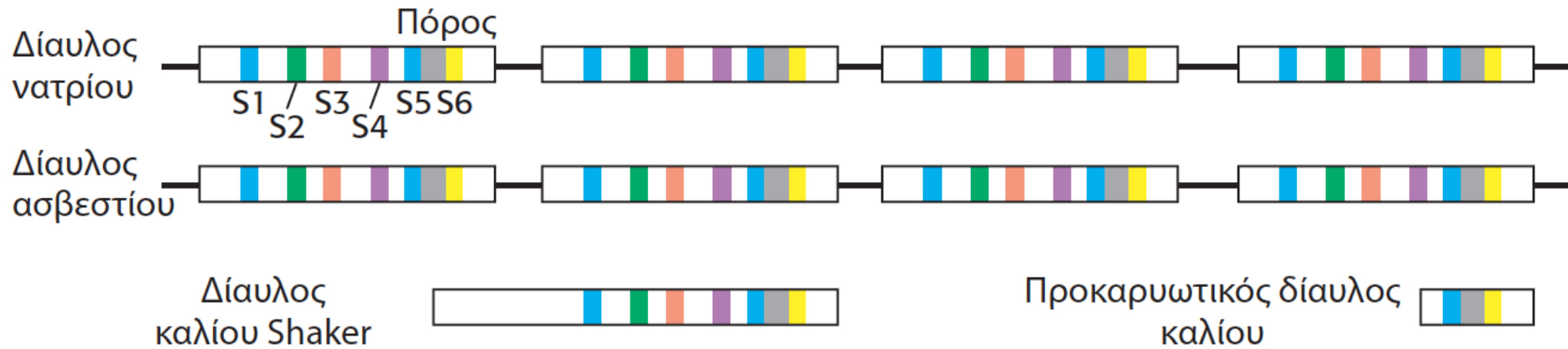
Ο διάυλος νατρίου (πολυπεπτιδική αλυσίδα MB 260 kd) απομονώθηκε (από το ηλεκτρικό χέλι) με τη βοήθεια της τετροδοτοξίνη ψάρι *τετρόδους* ($K_i \sim 1 \text{ nM}$) η οποία είναι θανατηφόρος σε 10 ng σε ενήλικα.

Η απομόνωση της πρωτεΐνης έδωσε την δυνατότητα της ταυτοποίησης και κλωνοποίησης της πρωτεΐνης.
Βρέθηκε ότι οι αλληλουχίες του cDNA στο χέλι και τον επιμύ είναι 61%.

Ανάλυση υδροφοβικότητας δείχνει 5 υδρόφοβα τμήματα (S_1, S_2, S_3, S_4, S_5 και S_6) σε επανάληψη 4 φορές (I-IV). S_4 θετικά φορτισμένα αμινοξέα (K και R) πιθανόν αισθητήρες δυναμικού (αλλοστερικός έλεγχος) λόγω φορτίου (με στοχευμένες μεταλλάξεις βρίσκουμε το ενεργό κέντρο).



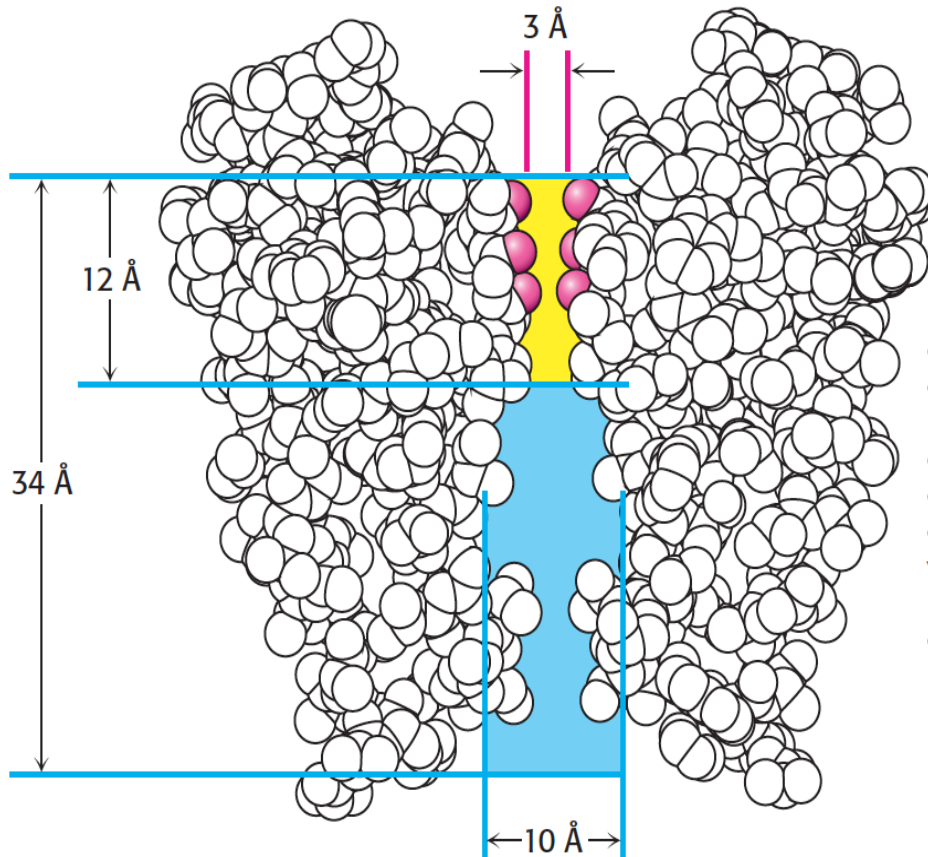
Ο διάυλος K^+ ανάλογος του Na^+ (ήταν δύσκολο να ανακαλυφθεί λόγω έλλειψης γνωστού προσδέματος) άλλα σε μικρή αφθονία. Ανακαλύφθηκε στη μύγα του φρούτου (*shaker*). Το cDNA κωδικεύει μια πρωτεΐνη 70 kd.



Ο πόρος (όπως και στον διάυλο Na^+) βρίσκεται μεταξύ τμημάτων S_5 και S_6 το ίδιο ισχύει και στον διάυλο Ca^{+2}

Εικόνα 13.16 Σχέσεις των αλληλουχιών των ιοντικών διαύλων. Απεικόνιση, όπως δείχνουν τα χρώματα, των δομικά παρόμοιων περιοχών των διαύλων νατρίου, ασβεστίου και καλίου. Κάθε ένας από αυτούς τους διαύλους εμφανίζει σχεδόν συμμετρία τετάρτης τάξεως είτε μέσα στην ίδια πολυπεπτιδική αλυσίδα (διάυλοι νατρίου και ασβεστίου) είτε με σχηματισμό τετραμερούς (διάυλοι καλίου).

Η δομή του διαύλου αποκαλύπτει την βάση εξειδικευμένης τάχιστης ιοντικής ισχύος



Πόρος με διάμετρο 10 Å καταλήγει σε 3 Å όπου το ιόν καλίου αλληλεπιδρά με πλευρικές ομάδες
Φίλτρο επιλογής TVGYG αλληλουχία πλήρως συντηρημένη και χρήσιμη για ταυτοποίηση διαύλων K⁺

Εικόνα 13.18 Η διαδρομή διά μέσου ενός διαύλου. Όταν ένα ιόν καλίου εισέρχεται στον διαυλό του μπορεί να διανύσει απόσταση μήκους 22 Å μέσα στη μεμβράνη ενώ είναι ακόμη ενυδατωμένο (μπλε). Σε αυτό το σημείο, η διάμετρος του πόρου μικραίνει στα 3 Å (κίτρινο) και τα ιόντα καλίου πρέπει να αποβάλουν τα μόρια ύδατος που φέρουν και να αλληλεπιδράσουν με τις καρβονυλικές ομάδες (κόκκινο) των αμινοξέων του πόρου.

Οι διάυλοι K^+ είναι 11 (1100%) φορές πιο διαπερατοί από το K^+ από ότι από Na^+

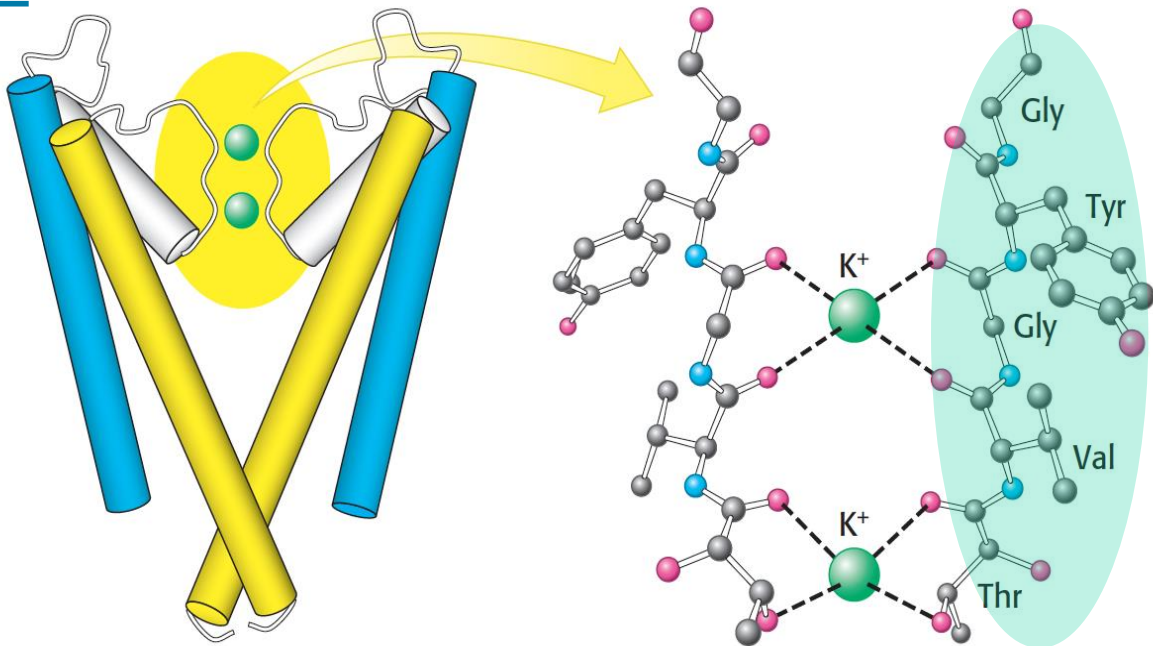
Πίνακας 13.1 Ιδιότητες των αλκαλικών κατιόντων

Ιόν	Ιοντική ακτίνα (Å)	Ελεύθερη ενέργεια ενυδάτωσης σε kJ mol^{-1} (kcal mol^{-1})
Li^+	0,60	-410 (-98)
Na^+	0,95	-301 (-72)
K^+	1,33	-230 (-55)
Rb^+	1,48	-213 (-51)
Cs^+	1,69	-197 (-47)

Η στενή διάμετρος (3 Å) απορρίπτει ιόντα με ακτίνα μεγαλύτερη από 1,5 Å. Ένα απογυμνωμένο ιόν (χωρίς δεσμευμένα H_2O) Na^+ χωράει μέσα από τον πόρο. Άρα πώς πετυχαίνεται η εξειδίκευση;

Φίλτρο επιλογής TVGYG

Εικόνα 13.19 Το φίλτρο επιλογής του ιοντικού διαύλου καλίου. Τα ιόντα καλίου αλληλεπιδρούν με τις καρβονυλικές ομάδες της αλληλουχίας Thr-Val-Gly-Tyr-Gly (TVGYC) του φίλτρου επιλογής που κατανέμονται στον πόρο του διαύλου K^+ διαμέτρου 3 Å. Στην εικόνα φαίνονται μόνον δύο από τις τέσσερις υπομονάδες του διαύλου.



Με μέγιστες αποστάσεις ατόμων

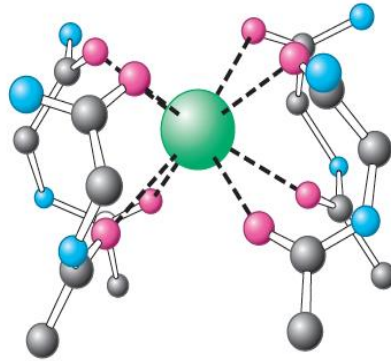
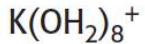
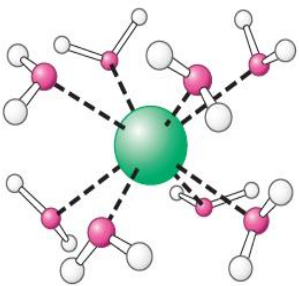
πώς πετυχαίνεται η εξειδίκευση;

ακτίνα O^- , K^+ και Na^+ είναι 1,4, 1,33, 0.95 Å αντίστοιχα, οι δεσμοί μεταξύ των ατόμων έχουν συγκεκριμένη απόσταση (ακτίνα άτομου 1 + ακτίνα άτομου 2). Οι αποστάσεις μεταξύ των οξυγόνων και του νατρίου δεν είναι ιδανικές (σε σχέση με αυτές που είχε με το νερό)

Κάλιο

Ενέργεια αφυδάτωσης

Επαναδιάλυση στη θέση του διαλύου K^+

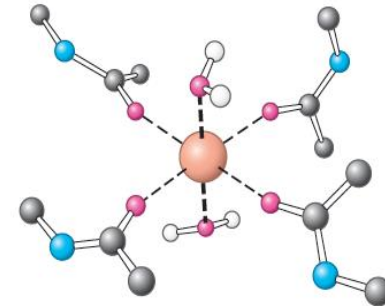
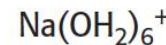
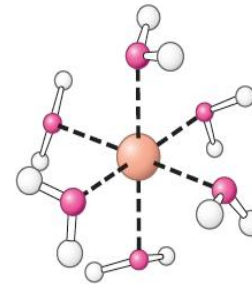


K^+ στη θέση του διαλύου K^+

Νάτριο

Ενέργεια αφυδάτωσης

Επαναδιάλυση στη θέση του διαλύου K^+



Na^+ στη θέση του διαλύου K^+

Εικόνα 13.20 Η ενεργειακή βάση της ιοντικής επιλεκτικότητας. Το ενεργειακό κόστος της αφυδάτωσης ενός ιόντος K^+ αντισταθμίζεται από ευνοϊκές αλληλεπιδράσεις του ιόντος με το φίλτρο επιλογής. Επειδή το ιόν νατρίου είναι πολύ μικρό για να αλληλεπιδράσει ευνοϊκά με το φίλτρο επιλογής, η ελεύθερη ενέργεια που απαιτείται για την αφυδάτωσή του δεν μπορεί να αντισταθμιστεί και έτσι τα ιόντα νατρίου δεν μπορούν να διέλθουν διά μέσου αυτού του ιοντικού διαύλου.

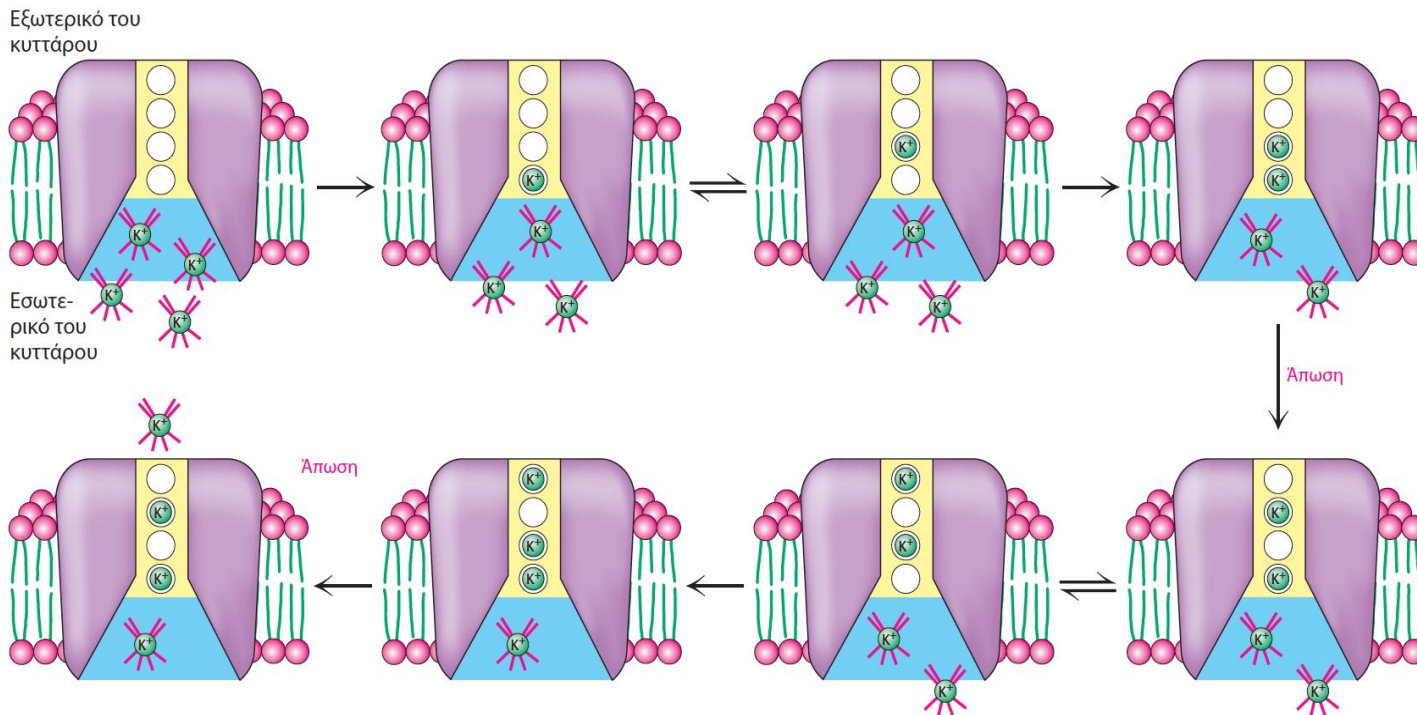
πώς συνδέονται αυτά με όλα όσα έχουμε μάθει;
 $\text{K}(\text{H}_2\text{O})_8^+ + \text{P} \leftrightarrow (\text{K P}) + 8\text{H}_2\text{O} \Delta\text{G} < 0$ ενώ
 $\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_6^+ + \text{P} \leftrightarrow (\text{Na}(\text{H}_2\text{O})_2^+ \text{P}) + 4\text{H}_2\text{O} \Delta\text{G} > 0$

Η δομή του διαύλου εξηγεί τους ταχείς ρυθμούς μεταφοράς

Η διαφορά ενέργειας ενυδάτωσης και δέσμευσης δεν πρέπει να διαφέρουν πολύ, αλλιώς το ιόν θα δεσμευόταν και δεν θα αποδεσμευόταν.

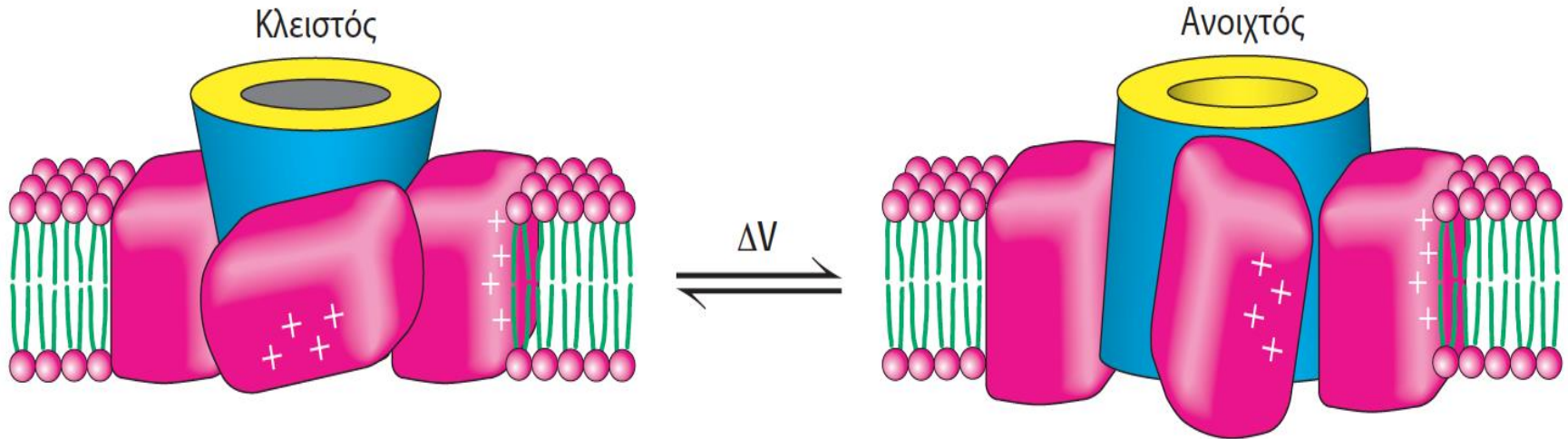
Πρέπει βέβαια να μετατοπιστεί σε μια δεύτερη θέση με αντίστοιχη ενέργεια δέσμευσης αλλά δεν θα υπήρχε λόγος (ενεργειακή διαφορά) εάν όμως ένα δεύτερο ιόν προσκολληθεί στη δεύτερη θέση λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης προωθεί το πρώτο ιόν στο εσωτερικό του κυττάρου.

Η όλη διαδικασία προωθείται από την διάφορα συγκέντρωσης (διάχυση- ώσμωση) μέσω ενός βιοχημικού μηχανισμού (τρόπος)



Εικόνα 13.21 Μοντέλο της ιοντικής μεταφοράς από τον διάυλο K^+ . Το φίλτρο επιλογής έχει τέσσερις θέσεις δέσμευσης. Τα ενυδατωμένα ιόντα καλίου μπορούν να εισέρχονται σε αυτές τις θέσεις, ένα τη φορά, χάνοντας τα υδατικά περιβλήματά τους. Όταν δύο ιόντα καταλαμβάνουν παρακείμενες θέσεις, απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις τα αναγκάζουν να απομακρυνθούν το ένα από το άλλο. Συνεπώς, καθώς στον διάυλο εισέρχονται ιόντα από τη μία πλευρά, ιόντα εξωθούνται από την άλλη πλευρά του διαύλου λόγω απωστικών δυνάμεων.

Έλεγχος λειτουργίας διαύλου



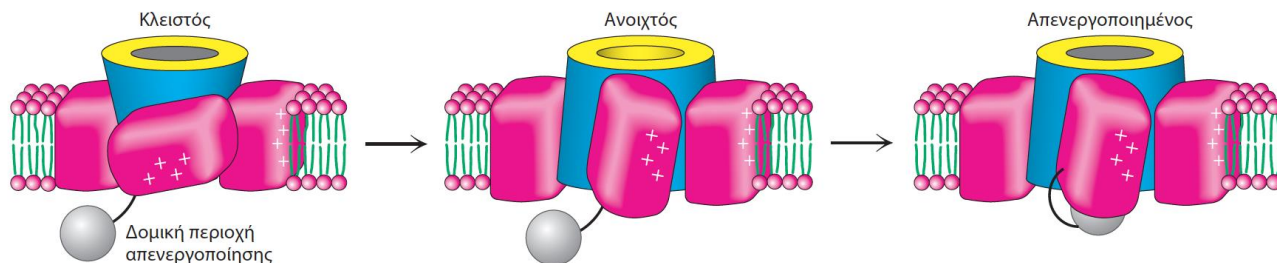
Εικόνα 13.23 Ένα μοντέλο ελέγχου της τάσης σε ιοντικούς διαύλους. Οι κώπες με δράση αισθητήρα δυναμικού βρίσκονται στην «κάτω» θέση τους, κάτω από τον κλειστό διάυλο (αριστερά). Η εκπόλωση της μεμβράνης έλκει τις κώπες σε θέση κάθετη προς τη μεμβράνη. Η μετακίνηση αυτή μεγεθύνει τη βάση του διαύλου, ανοίγοντάς τον (δεξιά).

Έλεγχος λειτουργίας δίαυλου

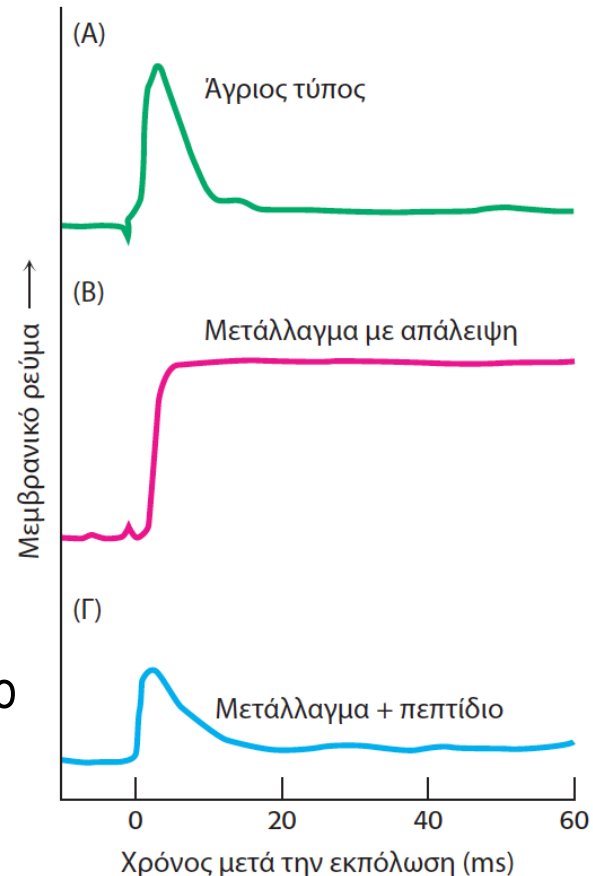
Πώς μπορεί ένας δίαυλος να ανοίγει και να κλείνει σε ms;
Έκθεση σε θρυψίνη (στην εξωτερική πλευρά) δημιουργεί έναν δίαυλο που παραμένει μόνιμα ανοικτός.

Ένας μεταταγμένος δίαυλος τύπου shaker (έλειπαν 42 αμινοξέα στο N-τελικό άκρο) ανοίγει με απόκριση στην εκπόλωση αλλά δεν απενεργοποιείται

Μπορεί να απενεργοποιηθεί εάν προσθέσουμε στο διάλυμα ένα συνθετικό πεπτίδιο ανάλογο των 20 πρώτων αμινοξέων στο N-τελικού άκρου

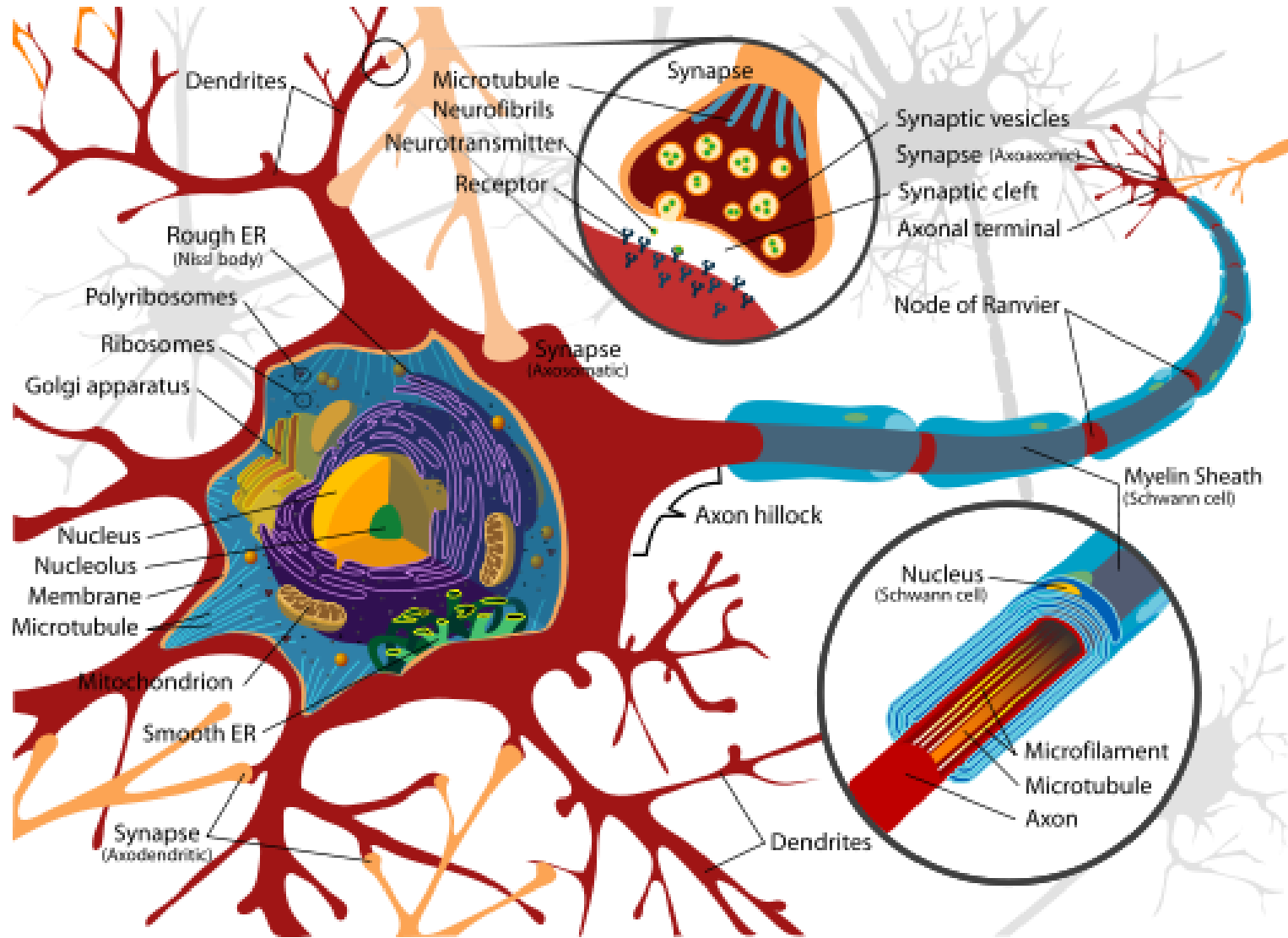


Εικόνα 13.25 Το μοντέλο της σφαίρας και της αλυσίδας. Η δομική περιοχή απενεργοποίησης ή η «σφαίρα» (γκρι) είναι προσδεμένη στον δίαυλο μέσω μιας εύκαμπτης «αλυσίδας». Στην κλειστή κατάσταση, η σφαίρα βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η εκπόλωση της μεμβράνης ανοίγει τον δίαυλο και δημιουργεί μια αρνητικά φορτισμένη θέση δέσμευσης για τη θετικά φορτισμένη σφαίρα, κοντά στο άνοιγμα του διαύλου. Η μετακίνηση της σφαίρας σε αυτή τη θέση απενεργοποιεί τον δίαυλο, αποφράσσοντάς τον.



Εικόνα 13.24 Απενεργοποίηση του διαύλου καλίου. Η αμινο-τελική περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του διαύλου καλίου είναι κρίσιμη για την απενεργοποίησή του. (Α) Ο άγριος τύπος του διαύλου K⁺ τύπου Shaker υφίσταται τάχιστα απενεργοποίηση μετά το άνοιγμά του. (Β) Ο μεταλλαγμένος δίαυλος με έλλειψη των καταλοίπων 6 έως 46 δεν απενεργοποιείται. (Γ) Η απενεργοποίηση του μεταλλαγμένου διαύλου αποκαθίσταται με την προσθήκη ενός πεπτιδίου που αποτελείται από τα κατάλοιπα αμινοξέων 1 έως 20 της αμινο-τελικής περιοχής του διαύλου, σε συγκέντρωση 100 μΜ. [Κατά W.N. Zagotta, T. Hoshi and R.W. Aldrich. *Science* 250 (1990):568-571.]

Η νευρική ώση για να μεταφερθεί χρησιμοποιεί διαύλους



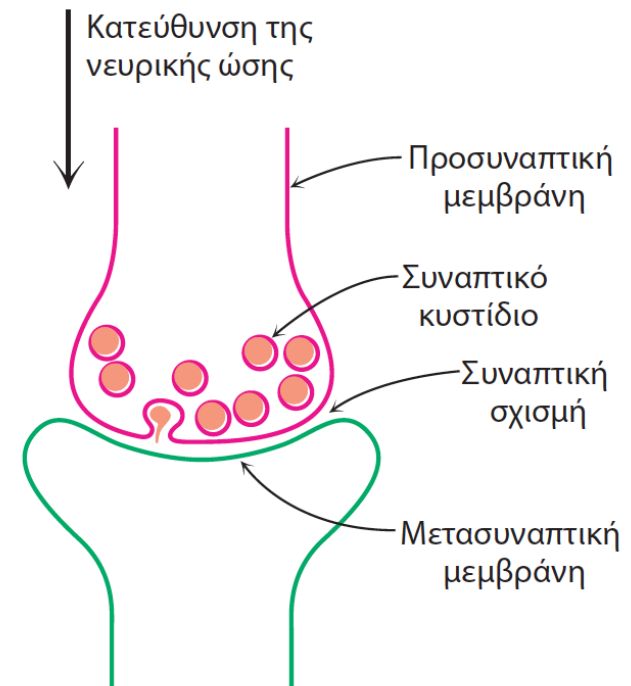
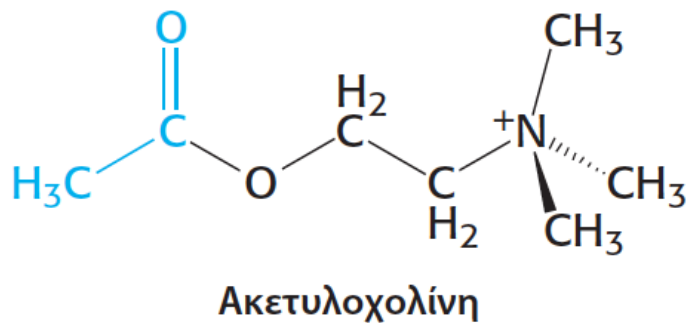
από κύτταρο σε κύτταρο η νευρική ώση γίνεται από ελεγχόμενους από πρόσδεμα διαύλους
από την μια άκρη του κυττάρου στην άλλη με ελεγχόμενους από τάση διαύλους (τασοελεγχόμενους)

Το αρχικό σήμα ξεκινάει από ένα διάυλο ακετοχολίνης

Ο διάυλος της ακετοχολίνης (ελεγχόμενος από πρόσδεμα διάυλος) μεταδίδει την νευρική ώση (νευροδιαβιβαστής)

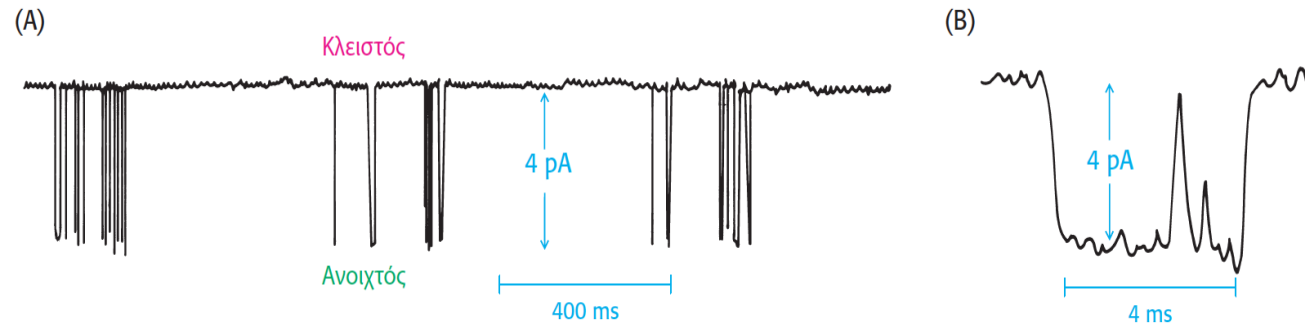
Ταυτόχρονη απελευθέρωση 300 συναπτικών κυστιδίων (10^4 μόρια το καθένα) τα οποία αυξάνουν την συγκέντρωση στην συναπτική σχισμή από 10nM σε 500nM σε $<1\text{ms}$

Αποτέλεσμα αλλαγή της διαπερατότητας Na^+ και K^+ (ανοίγουν οι διάυλοι σε 0,1 ms) μεγάλο ρεύμα εισροής Na^+ και μικρό εκκροής K^+

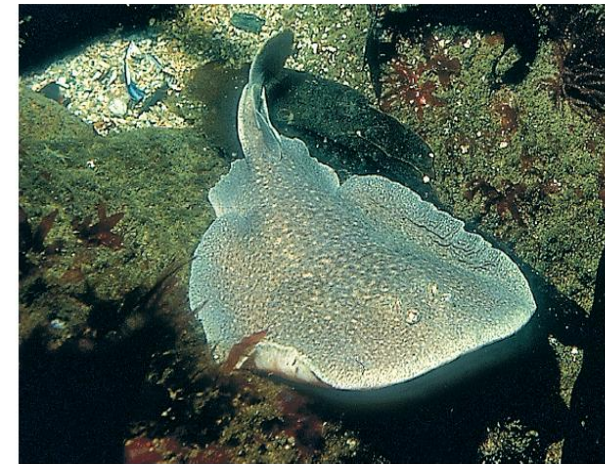


Εικόνα 13.26 Σχηματική αναπαράσταση της σύναψης.

Το ρεύμα i που εισέρχεται (ιόντα Na^+) είναι 4pA όταν έχουμε δυναμικό -100mV που είναι ισοδύναμο με $2,5 \times 10^7$ ιόντα ανά δευτερόλεπτο



Εικόνα 13.15 Παρατηρώντας μεμονωμένους διαύλους. (A) Η καταγραφή με την τεχνική της καθήλωσης μεμβρανικού τμήματος απεικονίζει έναν διαύλο που υφίσταται μεταπτώσεις μεταξύ της κλειστής και της ανοιχτής κατάστασης. (B) Λεπτομερής επιθεώρηση της καταγραφής (A) αποκαλύπτει τη χρονική διάρκεια για την οποία ο διαύλος παραμένει ανοιχτός.



Το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν (ηλεκτρικό όργανο) στο ψαρί *Torpedo marmorata* για την παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος 200V

Η πυκνή διάταξη των υποδοχέων ακετυλοχολίνης στο συγκριμένο ψάρι το έκανε ιδανικό βιολογικό υλικό για την απομόνωση και μελέτη του υποδοχέα

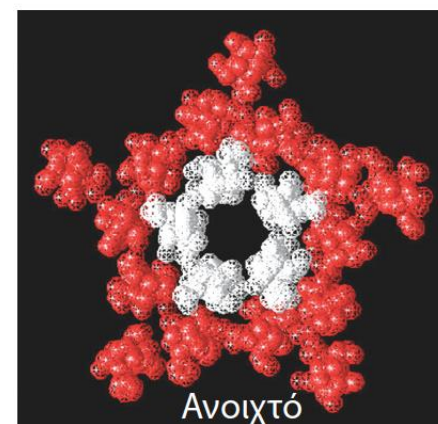
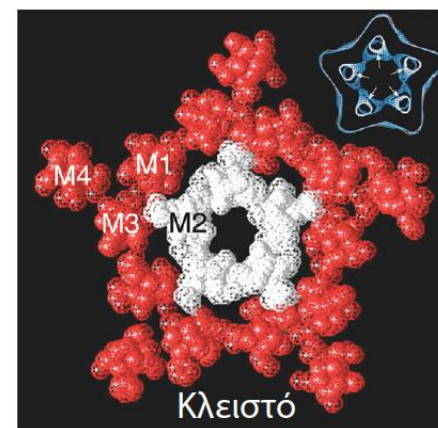
Ένα επίσης εξωτικό βιολογικό υλικό νευροτοξίνη του φιδιού (τοξίνη της κόμπρας) που δεσμεύεται πολύ ισχυρά στον υποδοχέα

Για μελέτη βιολογικών μηχανισμών χρησιμοποιούμε τα κατάλληλα (ακραία) βιολογικά εργαλεία

Η μουδιάστρα νάρκη η μαρμαίρουσα (*Torpedo marmorata*, επίσης γνωστή ως ηλεκτροφόρο σελάχι) έχει ένα ηλεκτρικό όργανο, πλούσιο σε υποδοχείς ακετυλοχολίνης, το οποίο μπορεί να μεταδώσει ένα ηλεκτρικό σοκ 200V σε χρόνο περίπου ενός δευτερολέπτου. [Yves Gladu / Jacana / Photo Researchers.]

Υποδοχέας ακετοχολίνης (268 kd) πενταμερές τεσσάρων διαμεμβρανικών υπομονάδων α_2 , β , γ και δ (κεφάλαιο 12 Λιπίδια-κυτταρικές μεμβράνες) που δημιουργούν έναν πόρο μέσα στην μεμβράνη εξ ίσου **διαπερατός από Na^+ και K^+**

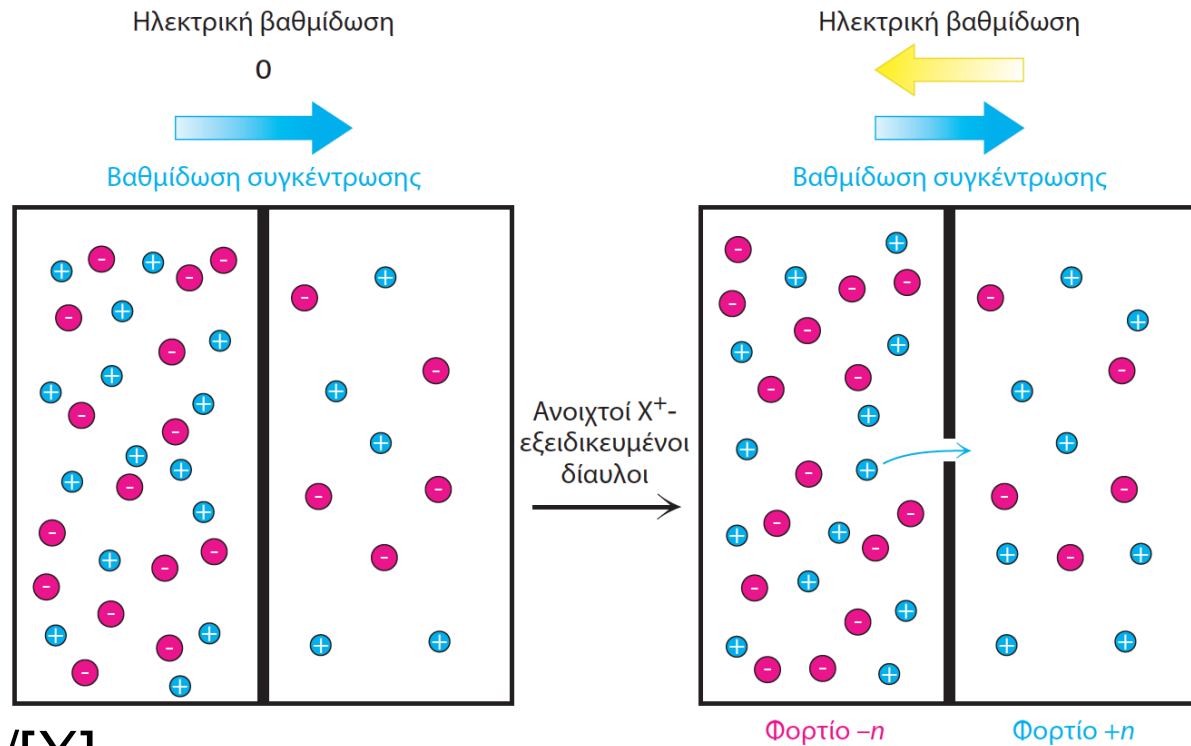
Δέσμευση της ακετοχολίνης \leftrightarrow αλλαγή στερεοδιάταξης (περιστροφή α -έλικας) και άνοιγμα του εσωτερικού (τα κατάλοιπα Leu αντικαθίσταται από Ser) υδρόφοβου δακτυλίου



Εικόνα 13.28 Το άνοιγμα του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Εγκάρσια τομή από ανακατασκευή του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στην κλειστή (επάνω) και στην ανοιχτή του (κάτω) μορφή. (Η ανοιχτή μορφή αντιστοιχεί στη δομή που απεικονίζεται στην εικόνα 13.27) Οι περιοχές που σημειώνονται ως M1, M2, M3 και M4 αντιστοιχούν στις τέσσερις διαμεμβρανικές α -έλικες κάθε υπομονάδας. Η εγκάρσια τομή της ανοιχτής μορφής του υποδοχέα δημιουργήθηκε με επεξεργασία του υποδοχέα με ακετυλοχολίνη και ψύξη του δείγματος μέσα σε 50 ms. Παρατηρήστε ότι η οπή στο κέντρο του διαύλου είναι σημαντικά μεγαλύτερη όταν ο διάυλος βρίσκεται στην ανοιχτή του μορφή. Η μεγέθυνση αυτή οφείλεται στη στροφή των ελίκων M2 κατά περίπου 15° κατά μήκος του άξονά τους. [Ευγενική προσφορά Nigel Unwin.]

Τασοελεγχόμενοι διάλυλοι προωθούν την νευρική ώση

Εικόνα 13.29 Δυναμικό ισορροπίας. Το μεμβρανικό δυναμικό φθάνει σε μια τιμή ισορροπίας όταν η κινητήριος δύναμη, προερχόμενη από τη βαθμίδωση της συγκέντρωσης, εξισορροπείται από την αντίθετη δύναμη προερχόμενη από την άπωση των ομώνυμων φορτίων.



$$V_{ισορ} = -(RT/zF) \ln([X]_{εσωτ}/[X]_{εξωτ})$$

Κατάσταση ηρεμίας μεμβρανικό δυναμικό **-60mV**

Για Na^+ εξωτερικά 143 mM και εσωτερικά 14 mM το δυναμικό ισορροπίας είναι **+62 mV**

για K^+ εσωτερικά 4 mM και εσωτερικά 157 mM το δυναμικό ισορροπίας είναι **-60 mV**

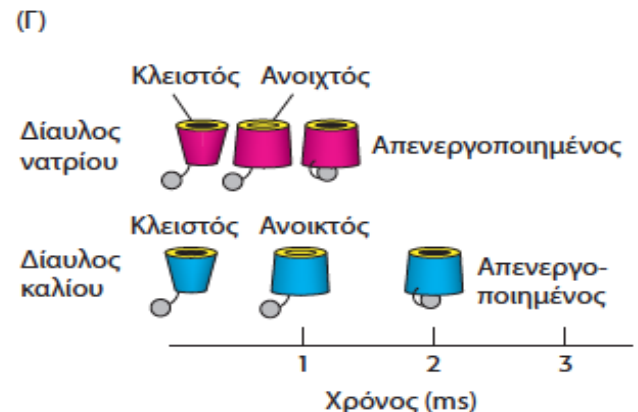
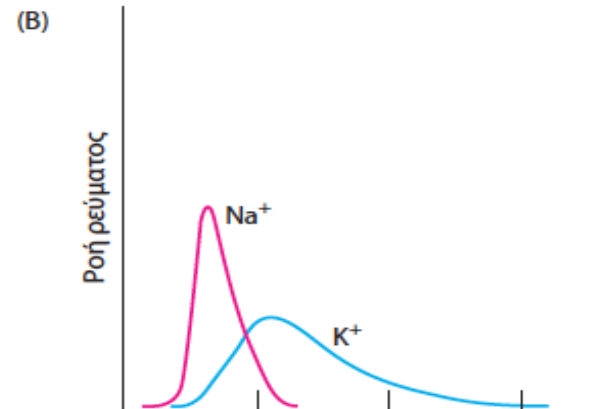
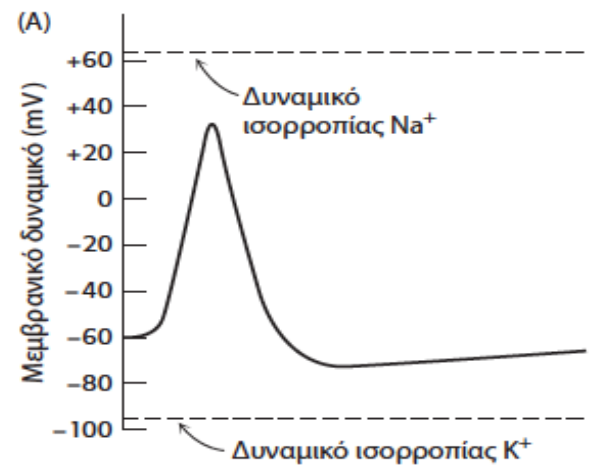
Τασοελεγχόμενοι δίαυλοι προωθούν την νευρική ώση

Κατάσταση ηρεμίας μεμβρανικό δυναμικό -60mV .

Νευρική ώση ή *δυναμικό ενεργείας*: δημιουργείται όταν το δυναμικό πέσει κάτω από μια τιμή (π.χ. -60 σε -40 mV) ανοίγουν οι δίαυλοι (τασοελεγχόμενοι) Na^+ και παραμένουν ανοικτοί μέχρι (μέσα σε 1ms) $+30\text{mV}$

Αρχικά εισέρχονται ιόντα Na^+ τα όποια ρίχνουν το δυναμικό και πολώνουν περισσότερους (γειτονικούς δίαυλους) στα $+30\text{mV}$ κλείνουν οι δίαυλοι Na^+ και ανοίγουν οι δίαυλοι ιόντων K^+ τα όποια εξέρχονται στο κύτταρο και το δυναμικό στην κατάσταση ηρεμίας των -60mV . Μόνο ένα μικρό ποσοστό ιόντων ($1/10^6$) διαπερνά την μεμβράνη κατά την διάρκεια του δυναμικού ενεργείας

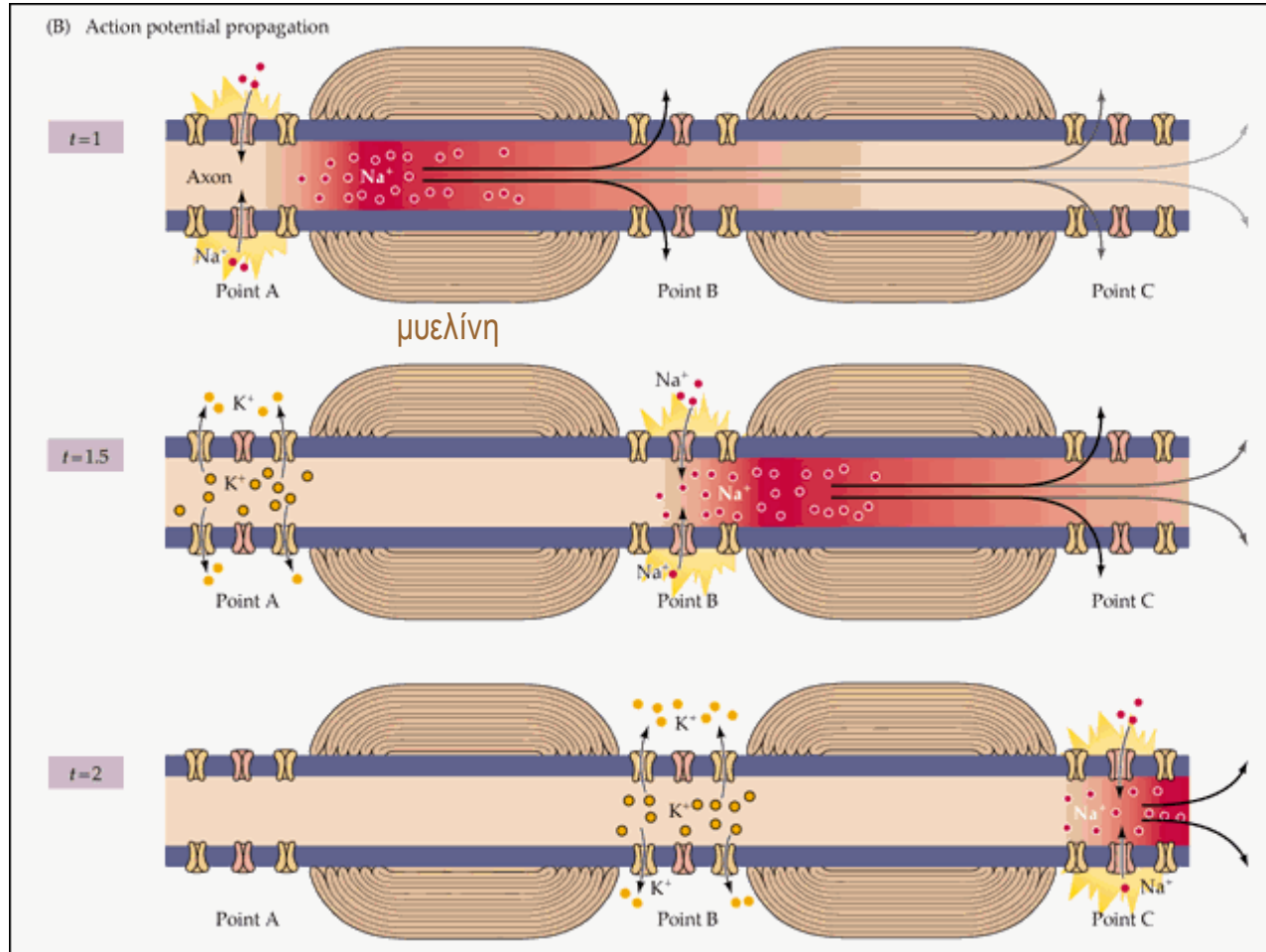
Εικόνα 13.30 Ο μηχανισμός του δυναμικού ενέργειας. (Α) Με την έναρξη του δυναμικού ενέργειας, το μεμβρανικό δυναμικό μεταβάλλεται ανοδικά προς το δυναμικό ισορροπίας του Na^+ και ακολούθως καθοδικά προς το δυναμικό ισορροπίας του K^+ . (Β) Τα ρεύματα διά μέσου των διαύλων Na^+ και K^+ δημιουργούν το δυναμικό ενέργειας. (Γ) Οι καταστάσεις των διαύλων Na^+ και K^+ κατά τη διάρκεια του δυναμικού ενέργειας.



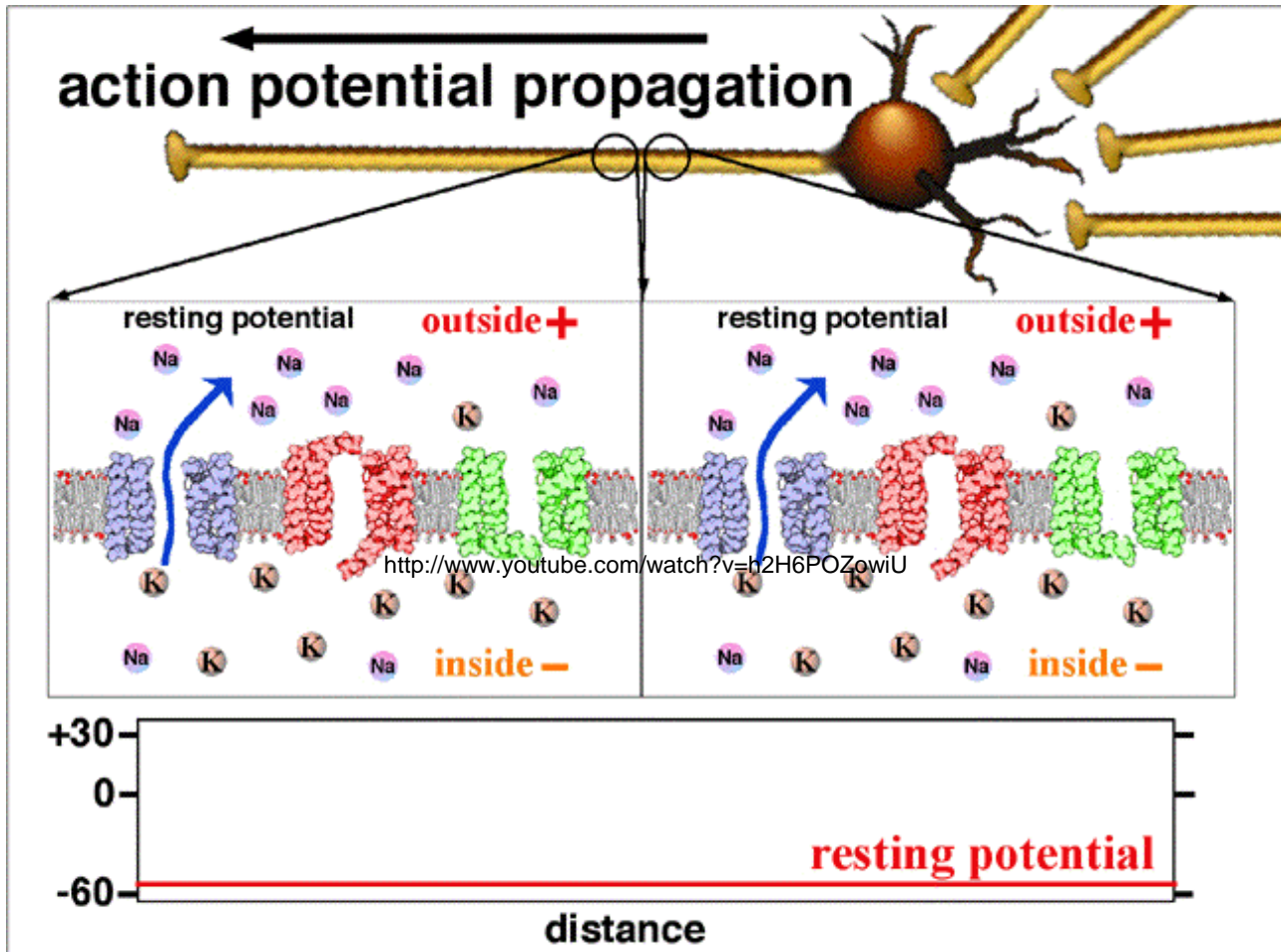
Μετάδοση της νευρικής ώσης

Ξεκινάει λόγω νευροδιαβιβαστή (μεμβρανική εκπόλωση). Οι Τασσελεγχόμενοι διάλυοι ανοίγουν ιόντα Na^+ εισρέουν στο εσωτερικό

Η διάφορα δυναμικού ανοίγει τους γειτονικούς τασσελεγχόμενους διάλυους. (Οι προηγούμενοι κλείνουν και η ATPάση αρχίζει να αποκαθιστά την ισορροπία)



Η διαδικασία συνεχίζεται μέχρι την άλλη άκρη του νευρικού κυττάρου, όπου θα ενεργοποιηθεί ο νευροδιαβιβαστής του γειτονικού νευρικού κυττάρου



Η ταχύτητα μεταφοράς του σήματος μπορεί να είναι από 1-100 m/sec (3,6-360 Km/h)

Video και περιγραφή πως ξεκινάει το σήμα και σε πια κατεύθυνση προχωράει

<http://www.youtube.com/watch?v=h2H6POZowiU>

<https://www.youtube.com/watch?v=liiz5CpFCQo>

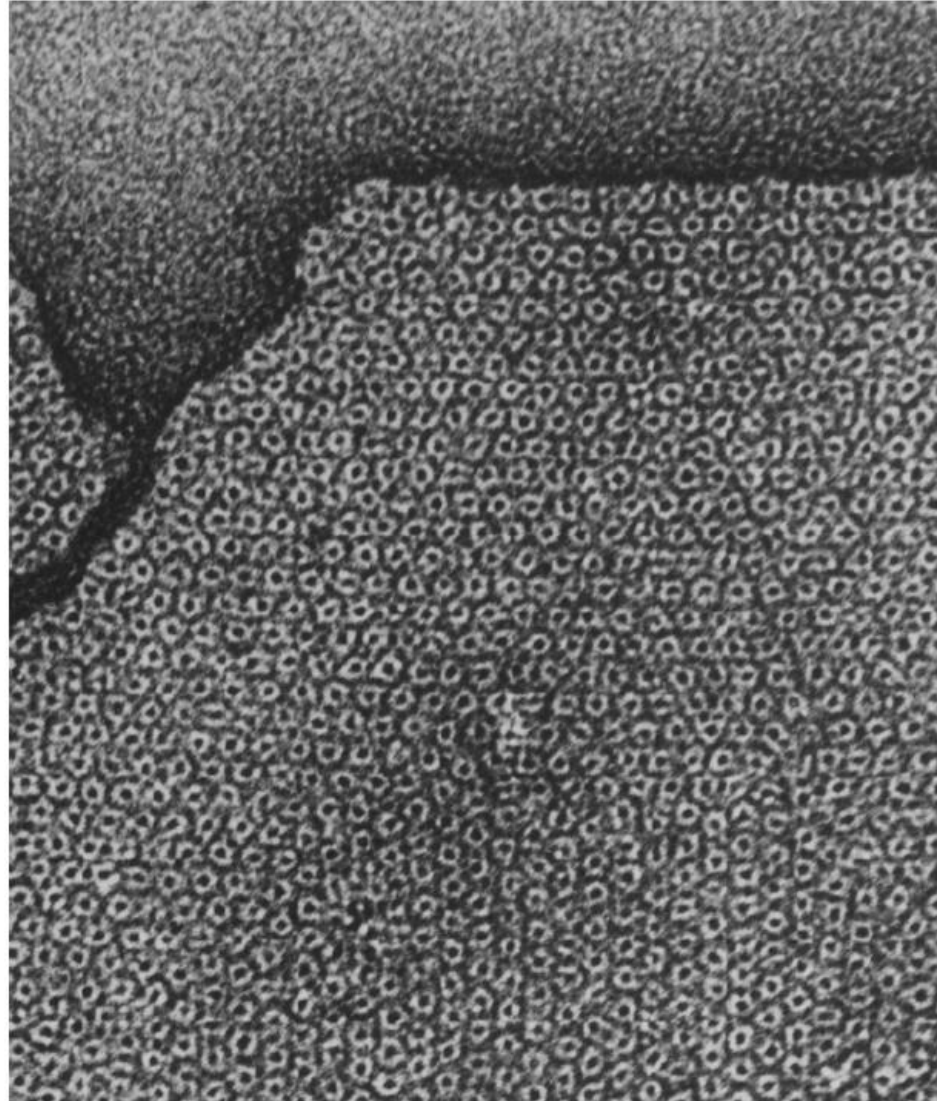
Χασματοσυνδέσεις επιτρέπουν σε ιόντα και μικρά μόρια να κινούνται μεταξύ επικοινωνούντων κυττάρων

Λειτουργούν σαν διακυτταρικοί δίαυλοι (διακυτταρική απόσταση 35\AA έχουν πυκνή διάταξη και εξαγωνικό σχηματισμό με οπή 20\AA , μπορούν να περάσουν μόρια μικρότερα από 1kd (σάκχαρα, αμινοξέα νουκλεοτιδία)

Απαραίτητα για θρέψη κυττάρων που δεν έχουν αιμοφόρα αγγεία (φακός οφθαλμού, οστά)

Εικόνα 13.31 Χασματοσυνδέσεις. (A)

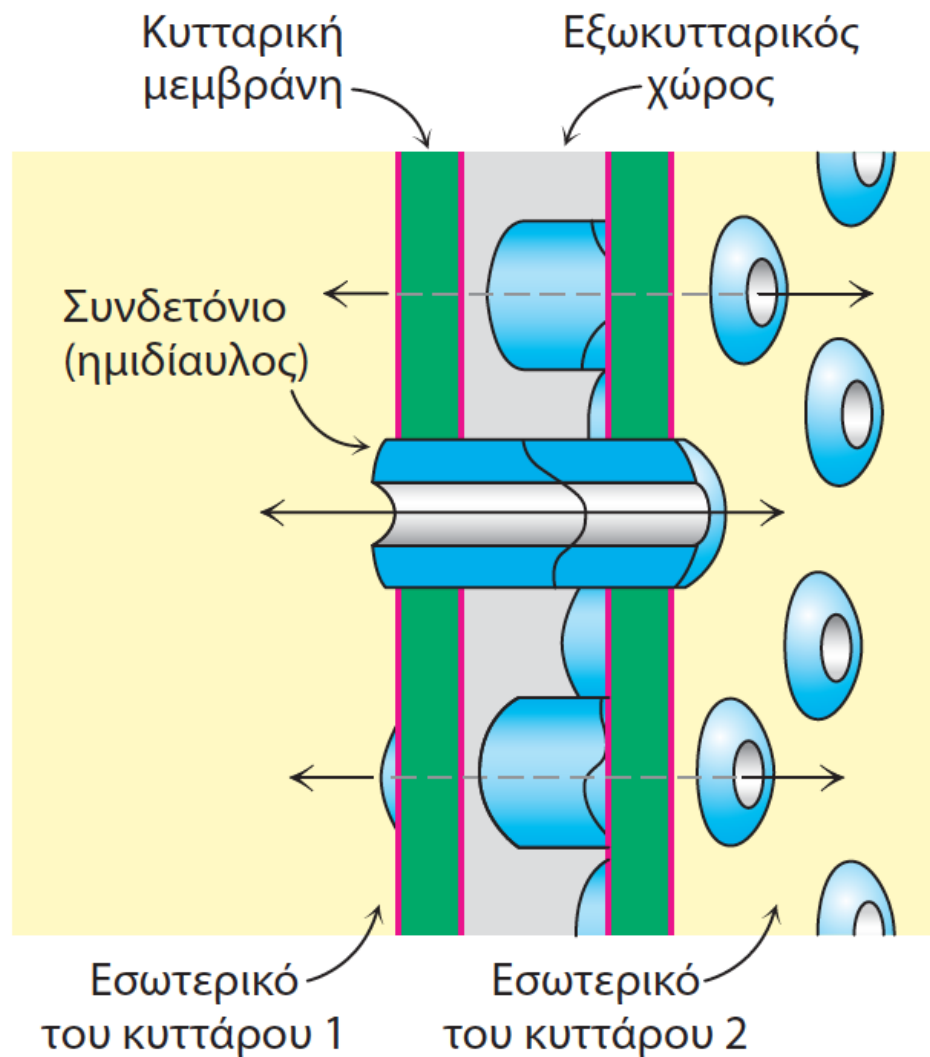
Ηλεκτρονιομικρογραφία απομονωμένων χασματοσυνδέσεων. Τα κυλινδρικά συνδετόνια είναι οργανωμένα σε εξαγωνικό δίκτυο με μια κυτταρική μονάδα μήκους 85\AA . Η πυκνοχρωματισμένη κεντρική οπή έχει διάμετρο περίπου 20\AA . [Don W. Fawcett / Photo Researchers]



Χασματοσυνδέσεις αποτελούνται από 12 μόρια συνδεΐνης έξι μόρια (συνδετόνιο ή ημιδιάυλος) από κάθε κύτταρο

1. Διαπερνούν δυο μεμβράνες
2. Συνδέουν κυτταρόπλασμα με κυτταρόπλασμα
3. Συντίθενται από διαφορετικά κύτταρα

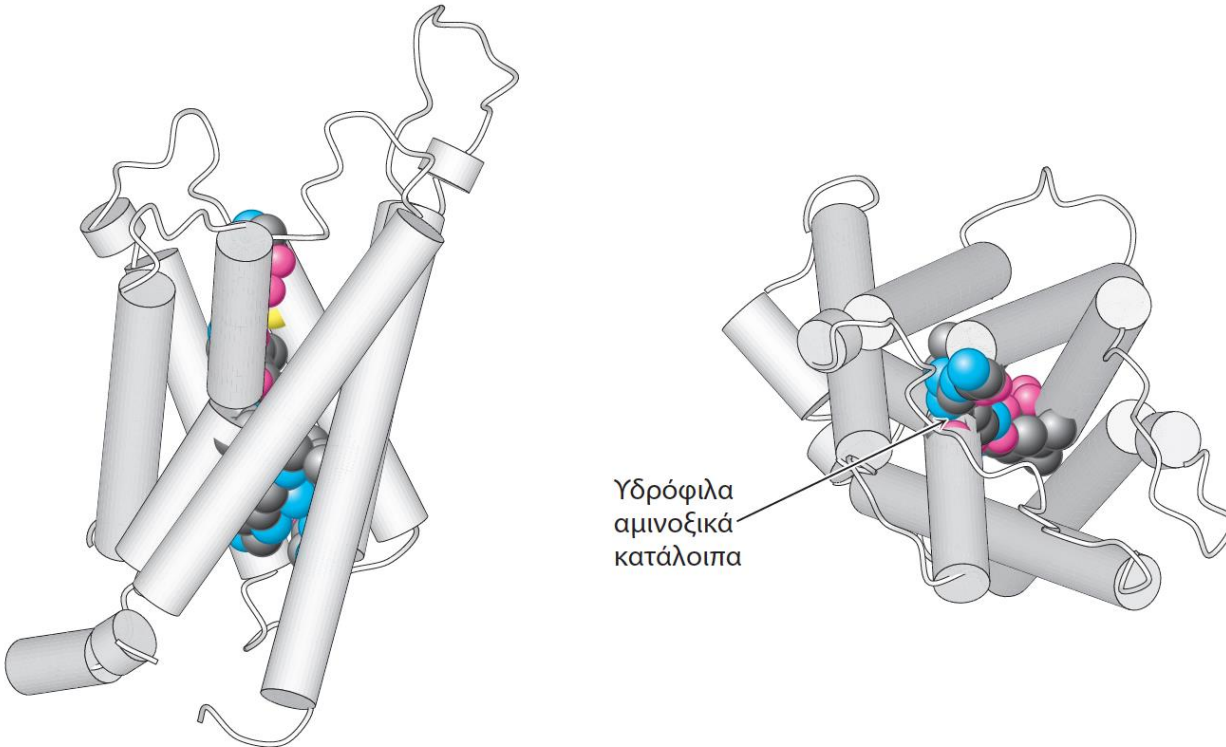
Ελέγχονται (κλείνουν) από υψηλές συγκεντρώσεις Ca^{2+} ή H^{+} (εξυπηρετεί την απομόνωση των κανονικών κύτταρων από γειτονικά που είναι τραυματισμένα ή πεθαίνουν)




Εικόνα 13.32 Σχηματική απεικόνιση μιας χασματοσύνδεσης. [Ευγενική προσφορά Dr. Werner Loewenstein.]

Ειδικοί διάυλοι αυξάνουν τη διαπερατότητα ορισμένων μεμβρανών στο νερό

- Σημαντική κατηγορία διαύλων που δεν λαμβάνει καθόλου μέρος στην ιοντική μεταφορά αλλά οι διάυλοι αυτοί αυξάνουν τον ρυθμό ροής του νερού δια μέσου των μεμβρανών.
- Σε ορισμένους ιστούς (π.χ. νεφρούς, έκκριση σάλιου και δακρύων) είναι αναγκαία η τάχιστη μεταφορά νερού δια μέσου της μεμβράνης.
- Οι διάυλοι αυτοί ονομάζονται **υδατοπορίνες**.
- Δομή υδατοπορίνης: 6 διαμεμβρανικές α-έλικες και δύο θηλιές με υδρόφιλα αμινοξέα στο εσωτερικό του διαύλου.
- Μόρια ύδατος διαπερνούν τον διάυλο σε σειρά με ρυθμό 10^6 μόρια/δευτερόλεπτο



 **Εικόνα 13.33 Η δομή της υδατοπορίνης.** Πλευρική όψη (αριστερά) και κάτοψη (δεξιά) της δομής της υδατοπορίνης. Παρατηρήστε τα υδρόφιλα κατάλοιπα του διαύλου νερού (απεικονίζονται ως χωροπληρωτικά μοντέλα) [Σχεδιασμένο από 1J4N.pdb.]