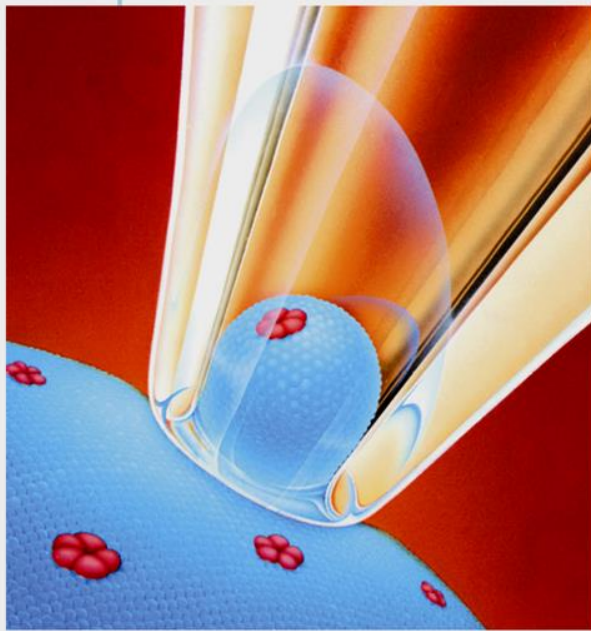


Μεμβρανικοί διάυλοι και αντλίες



Η ροή ιόντων διά μέσου ενός και μόνο μεμβρανικού διαύλου (οι διάυλοι απεικονίζονται με κόκκινο στην αριστερή εικόνα) μπορεί να ανιχνευθεί με την τεχνική της παγίδευσης τάσης μεμβρανικών τμημάτων, η οποία καταγράφει τις μεταβολές του ρεύματος καθώς ο διάυλος μεταπίπτει από την ανοιχτή στην κλειστή κατάστασή του και αντίστροφα. [(Αριστερά) Κατά E. Neher και B. Sakmann. *The patch clamp technique*. © 1992 Scientific American, Inc. All rights reserved* (δεξιά) Ευγενική προσφορά Dr. Mauricio Montal.]

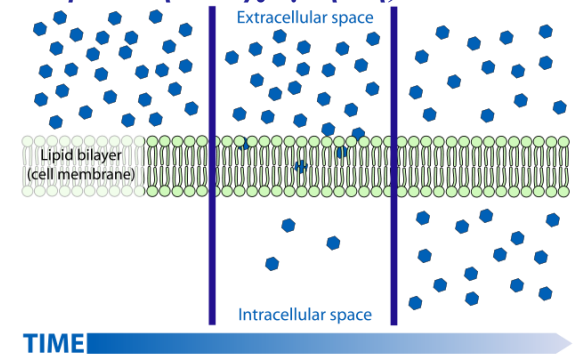
Μεταφορά μορίων δια μέσου μιας μεμβράνης

Ενεργητική ή Παθητική μεταφορά

Η μεμβρανική διαπερατότητα ενός μορίου εξαρτάται από

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

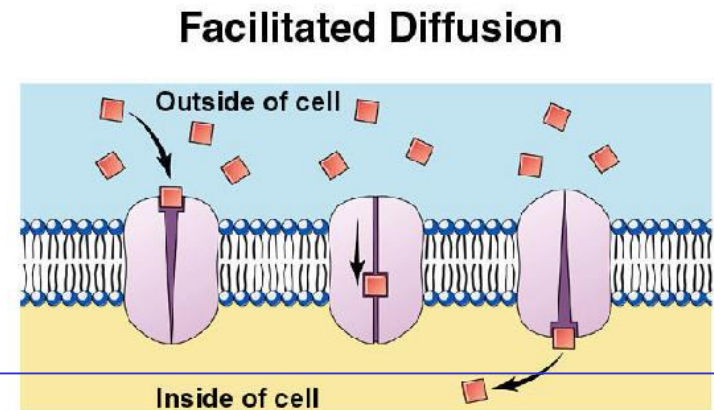
λιπόφιλο μόρια πχ στεροειδείς ορμόνες
απλή διάχυση



images source <http://williamsclass.com>

Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

Διευκολυνόμενη διάχυση: μη λιπόφιλα
μόρια (ιόντα) **παθητική μεταφορά** (διάυλοι)
Ιόντα Na^+ Εξωκυττάρια 143 mM
εσωτερικό 14 mM.
Κατά την νευρική ώση πρέπει να εισέλθουν
ταχύτατα στο κύτταρο



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

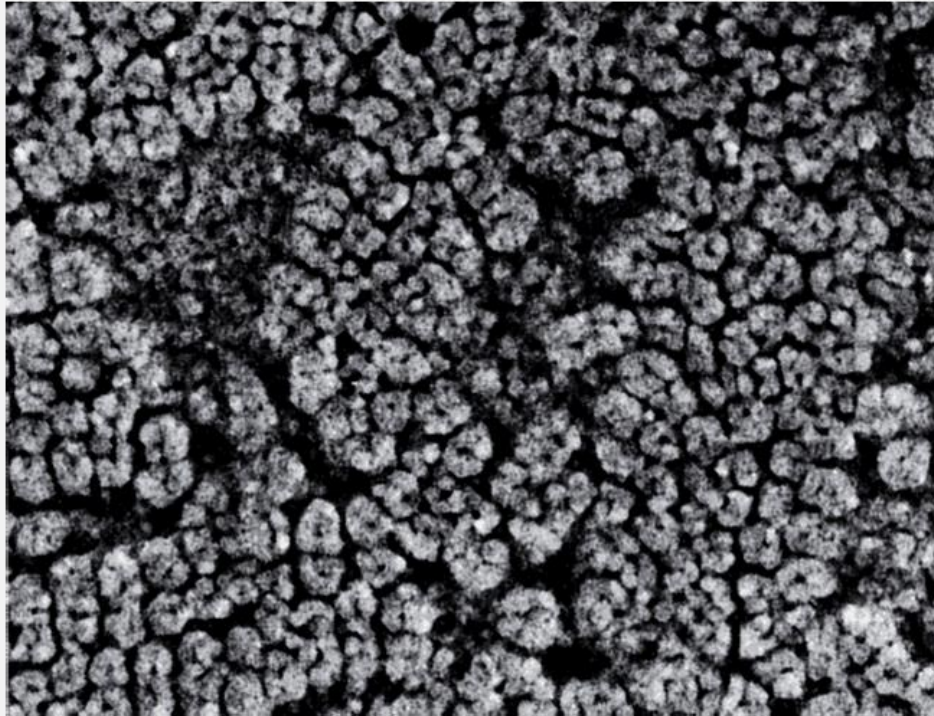
Αντλίες

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 **ενεργεί 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**)

Έλεγχος Διαύλων



100 nm

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)

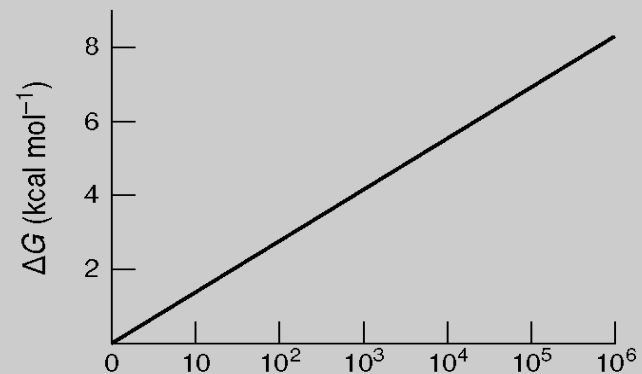
ΕΙΚΟΝΑ 13.1 Οι υποδοχείς της
ακετυλοχολίνης. Η ηλεκτρονιομικρογραφία
δείχνει την πυκνή διάταξη των υποδοχέων
της ακετυλοχολίνης σε μια μετασυναπτική
μεμβράνη. [Ευγενική προσφορά Dr. John Heuser
και Dr. Shelly Salpeter.]

Ποσοτικοποίηση της ελεύθερης ενέργειας ΔG από την διαφορά συγκέντρωσης

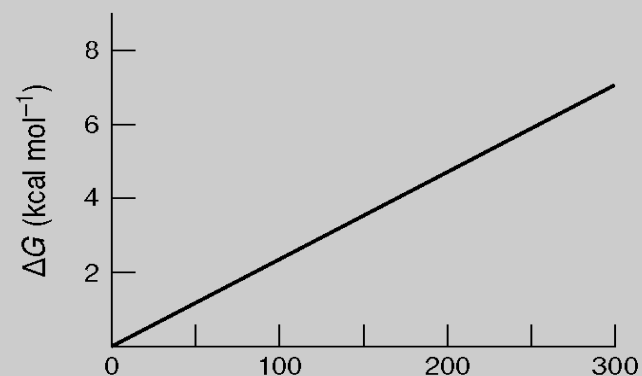
Η βαθμίδωση συγκέντρωσης (C_1 έξω και μέσα C_2) δημιουργεί διαφορά ενέργειας

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

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



(A) Λόγος συγκεντρώσεων (c_2/c_1)



(B) Δυναμικό μεμβράνης (mV)

Εικόνα 13.2 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) ενός φορτισμένου μορίου 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 έναν λόγο συγκεντρώσεων 10 ενός μονοσθενούς ιόντος σε θερμοκρασία 25°C.

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 =ηλεκτρικό φορτίο, F =σταθερά Faraday

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

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

Σε 25°C (298K)

Η βακτηριοροδόφινη δημιουργεί βαθμίδωση συγκέντρωσης με δαπάνη ηλιακής ενέργειας

Οικογένεια πρωτεϊνικών μεμβρανών χρησιμοποιεί την υδρόλυση της ATP για την άντληση ιόντων δια μέσου μεμβρανών

Εξωκυττάρια τα ιόντα παρόμοια με θαλασσινό νερό.

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

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

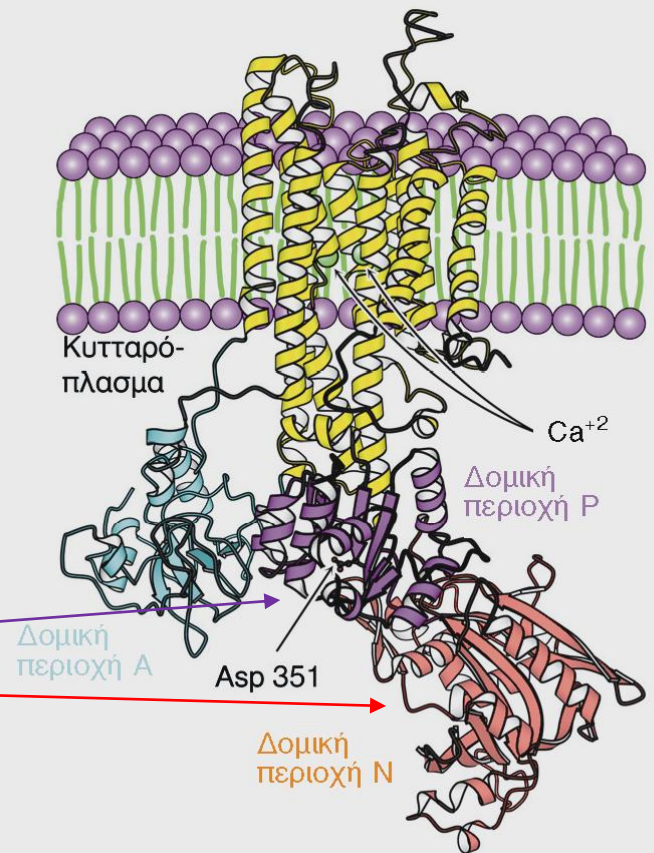
Άλλες ATPάσεις: **ATPάση Ca^{+2} , γαστρική ATPάση H^+-K^+**

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

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

Οι περιοχές N και P μετακινούνται κατά την
διάρκεια του καταλυτικού κύκλου

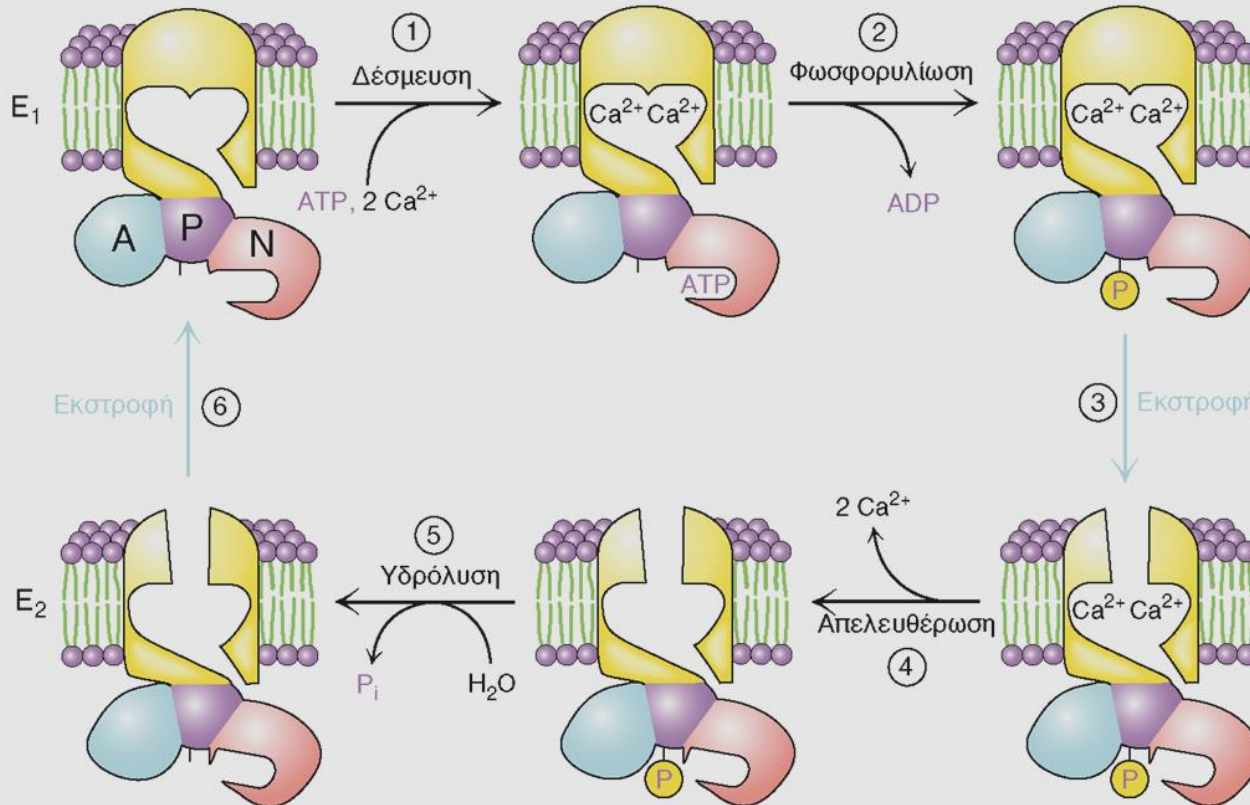
Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων Ca^{+2} το
Asp 351 φωσφορυλιώνεται



**ΕΙΚΟΝΑ 13.4 Η δομή της ΑΤΡάσης Ca^{+2}
του σαρκοπλασματικού δικτύου (ΣΔ)** Το ένζυμο
αυτό, δηλαδή η αντλία ασβεστίου του ΣΔ,
αποτελείται από μια διαμεμβρανική δομική
περιοχή 10 α -ελίκων και μια κυτταροπλασματική
κεφαλή αποτελούμενη από τρεις δομικές περιοχές
(N, P και A). Δύο ιόντα ασβεστίου (πράσινο)
δεσμεύονται στη διαμεμβρανική περιοχή.
Φαίνεται επίσης το αμινοξικό κατάλοιπο
ασπαραγινικού που είναι χαρακτηριστικό αυτής
της οικογένειας πρωτεϊνών.

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- PO_4
- 6) Το ένζυμο χωρίς την PO_4 ομάδα δεν είναι σταθερό στην E2 μορφή και επανέρχεται στην E1



ΕΙΚΟΝΑ 13.5 Ο μηχανισμός δράσης της ΑΤΡάσης τύπου P. Η δέσμευση του Ca^{2+} και η φωσφορυλίωση της ΑΤΡάσης (στάδιο 1 και 2), που απεικονίζονται εδώ για την ΑΤΡάση Ca^{2+} , οδηγούν στην εκτροπή των θέσεων δέσμευσης (στάδιο 3) και την απελευθέρωση του Ca^{2+} στον αυλό του $\Sigma\Delta$ (στάδιο 4). Η υδρόλυση του φωσφοασπαραγινικού (στάδιο 5) και η εκ νέου εκτροπή των θέσεων δέσμευσης (στάδιο 6) επαναφέρουν το ένζυμο στην αρχική κατάστασή του.

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}

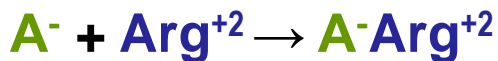
Άρα τελικό ερώτημα είναι:

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



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

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

$\text{A}^- \text{Arg}^{+2} + \text{BATP}^{-3} \rightarrow \text{A}^- + (\text{Arg}^{+2} \text{BATP}^{-3})$ Η Arg^{+2} ενωνεται με BATP^{-3} απελευθερώσει A^-

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

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



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

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 $+10 \text{ Kcal/mol}$

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

Οι ΑΤΡάσες τύπου P είναι εξελικτικά συντηρημένες

Στο γονιδιώμα της ζύμης έχουν βρεθεί 16 πρωτεΐνες

τρεις μεταφέρουν Na^+ ,

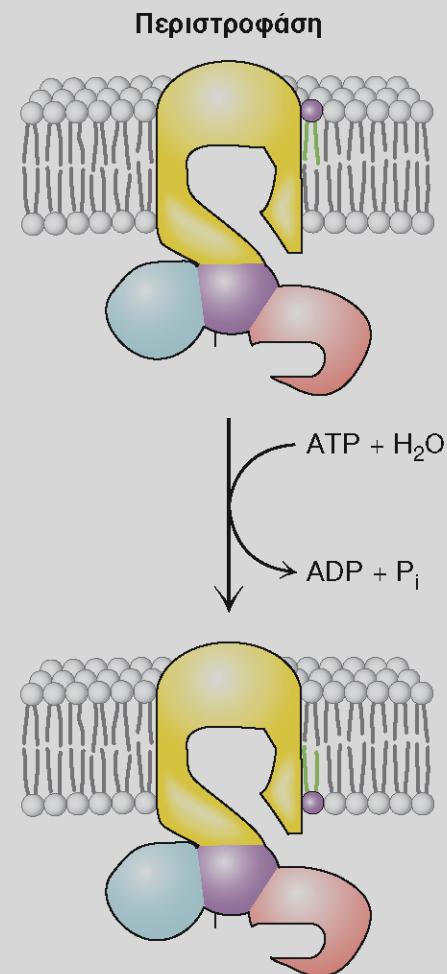
δύο H^+ , δύο Ca^{+2} ,

δύο ιόντα όπως Cu^{+2}

πέντε μεταφέρουν λιπίδια περιστροφάσες

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

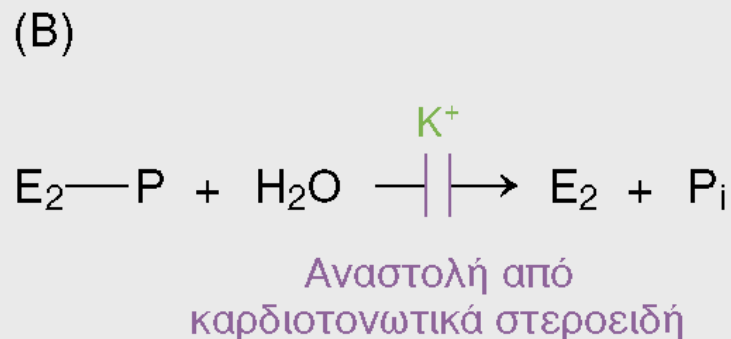
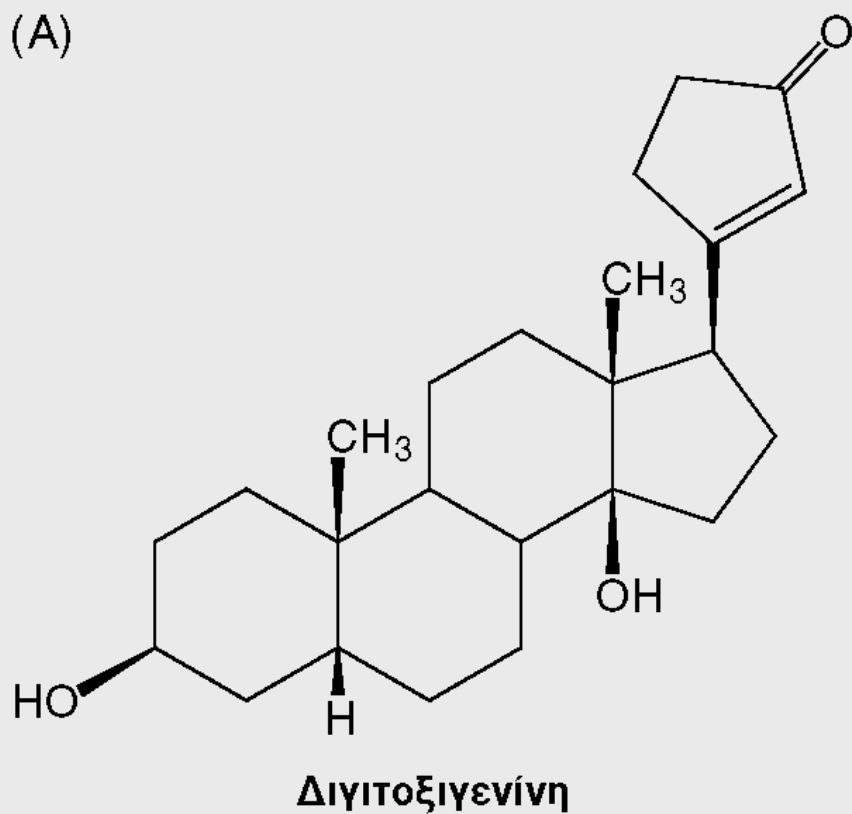
Όταν ένα σύστημα (πρωτεΐνη- αντλία) είναι λειτουργικό χρησιμοποιείται σε πολλούς διαφορετικούς σκοπούς (ρόλους)



ΕΙΚΟΝΑ 13.6 Οι ΑΤΡάσες τύπου P μπορούν να μεταφέρουν λιπίδια. Οι περιστροφάσες είναι ένζυμα που συντηρούν τη μεμβρανική ασυμμετρία «περιστρέφοντας» τα φωσφολιπίδια (παρουσιάζονται με κόκκινη κεφαλή στην εικόνα) από την εξωτερική στην εσωτερική στιβάδα της μεμβράνης.

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

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



ΕΙΚΟΝΑ 13.7 Διγίτοξιγενίνη. Καρδιοτονωτικά στεροειδή, όπως η διγίτοξιγενίνη, αναστέλλουν την αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ παρεμποδίζοντας την αποφωσφορυλίωση της μορφής E₂-P της ΑΤΡάσης.

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

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

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



Η πορφυρά δακτυλίτιδα (*Digitalis purpurea*) είναι η πηγή προέλευσης της δακτυλίτιδας, ενός από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα φάρμακα. [Inga Spence/Visuals Unlimited.]

Δευτερογενείς μεταφορείς

Χρησιμοποιούν μια βαθμίδωση συγκέντρωσης για να ενεργοποιήσουν τον σχηματισμό μιας άλλης

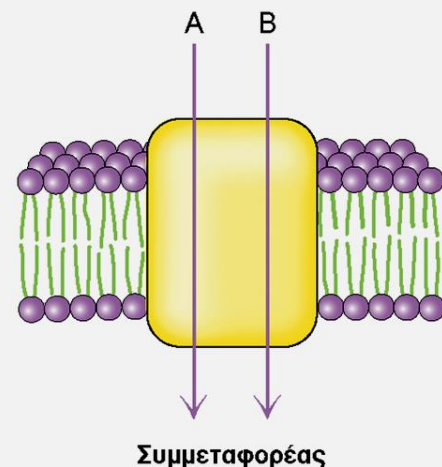
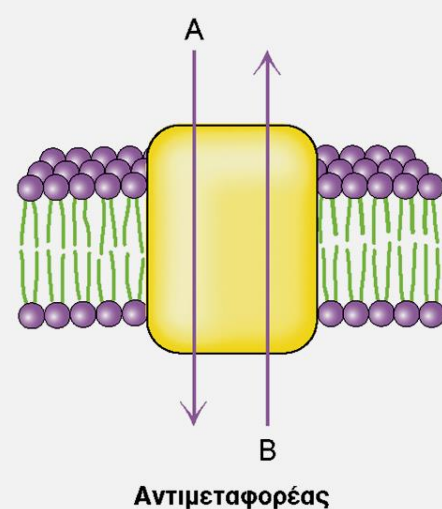
Αφού η διαφορά συγκέντρωσης παρέχει ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί (εάν συζευχθεί) για την μεταφορά για την μεταφορά μιας ουσίας ή ιόντος (δευτερογενείς μεταφορείς)

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 ΑΤΡάση- Ca^{2+} αλλά μπορεί να αντλήσει 2000 ιόντα Ca^{2+} ενώ η αντλία ΑΤΡάση- 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 από το γονιδίωμα του *E. coli* κωδικοποιούν δευτερογενείς μεταφορείς

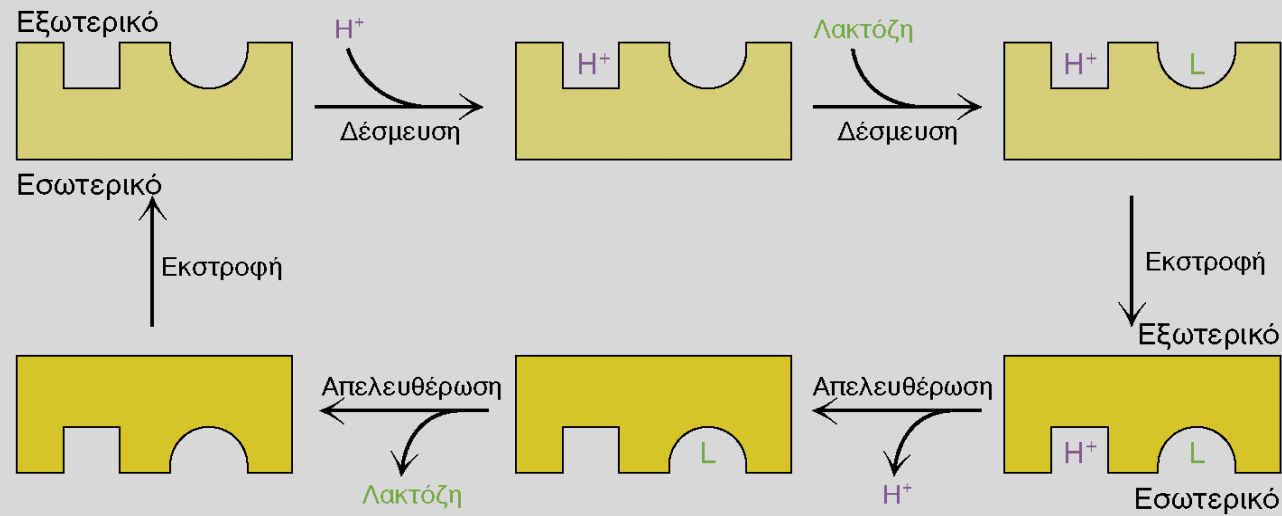


ΕΙΚΟΝΑ 13.10 Δευτερογενείς μεταφορείς.

Αυτοί οι μεταφορείς χρησιμοποιούν την καθοδική ροή μιας βαθμίδωσης συγκέντρωσης για να ενεργοποιήσουν τον σχηματισμό μιας άλλης βαθμίδωσης συγκέντρωσης. Στη περίπτωση των αντιμεταφορέων, τα χημικά μόρια κινούνται προς αντίθετες κατευθύνσεις. Στην περίπτωση των συμμεταφορέων, τα δύο μόρια κινούνται προς την ίδια κατεύθυνση.

Διαπεράση της λακτόζης ένας ακόμη συμμεταφορέας

ΕΙΚΟΝΑ 13.11 Η δράση της διαπεράσης της λακτόζης. Η διαπεράση της λακτόζης αντλεί λακτόζη στο εσωτερικό βακτηριακών κυττάρων προσεγγίζοντας την πρωτονιοκίνητη δύναμη. Οι θέσεις δέσμευσης εκστρέφονται όταν ένα μόριο λακτόζης (L) και ένα πρωτόνιο (H^+) είναι δεσμευμένα στην εξωτερική πλευρά. Μετά την απελευθέρωση αυτών των μορίων στο εσωτερικό του κυττάρου, οι θέσεις δέσμευσής τους εκστρέφονται και πάλι προς το εξωτερικό για να συμπληρωθεί ο κύκλος μεταφοράς. Η διαπεράση της λακτόζης είναι ένα παράδειγμα συμμεταφορέα.

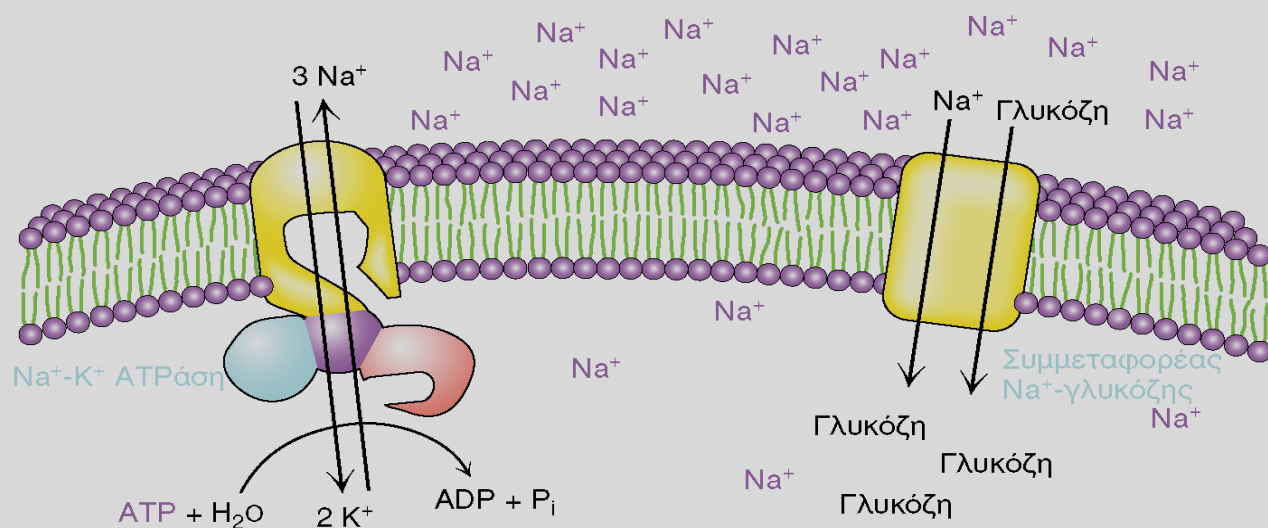


Η οξείδωση καυσίμων (λακτόζη) δημιουργεί διαφορά συγκέντρωσης σε H^+ (pH), αυτή η διαφορά ενέργειας (συγκέντρωση) χρησιμοποιείται για την μεταφορά λακτόζης

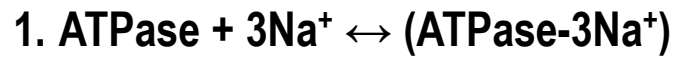
Τα H^+ μετακινούνται από υψηλή σε χαμηλή συγκέντρωση και ταυτόχρονα η λακτόζη μετακινείται από χαμηλή σε υψηλή συγκέντρωση

Γενικότερα μια αντλία όπως ATPάση $\text{Na}^+\text{-K}^+$ μετατρέπει την ενέργεια του ATP σε ενέργεια βαθμίδωσης συγκέντρωσης διατηρεί την στην συνέχεια έχουν αναπτυχτεί αντλίες που χρησιμοποιούν την δεύτερη μορφή ενέργειας για την μεταφορά πολλών διαφορετικών μορίων

ΕΙΚΟΝΑ 13.12 Μεταγωγή ενέργειας από μεμβρανικές πρωτεΐνες. Η αντλία $\text{Na}^+\text{-K}^+$ μετατρέπει την ελεύθερη ενέργεια από τη μεταφορά φωσφορικών ομάδων σε ελεύθερη ενέργεια βαθμίδωσης συγκέντρωσης Na^+ . Η βαθμίδωση συγκέντρωσης ιόντων στη συνέχεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να αντληθούν υλικά στο εσωτερικό του κυττάρου διά μέσου της δράσης ενός δευτερογενούς μεταφορέα όπως ο συμμεταφορέας $\text{Na}^+\text{-γλυκόζης}$.



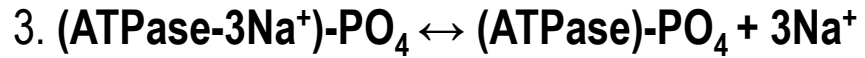
Αντλία $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ με δαπάνη ενέργειας ATP



Τρεις (αρνητικά φορτ.) επιφάνειες προσδένουν Na^+



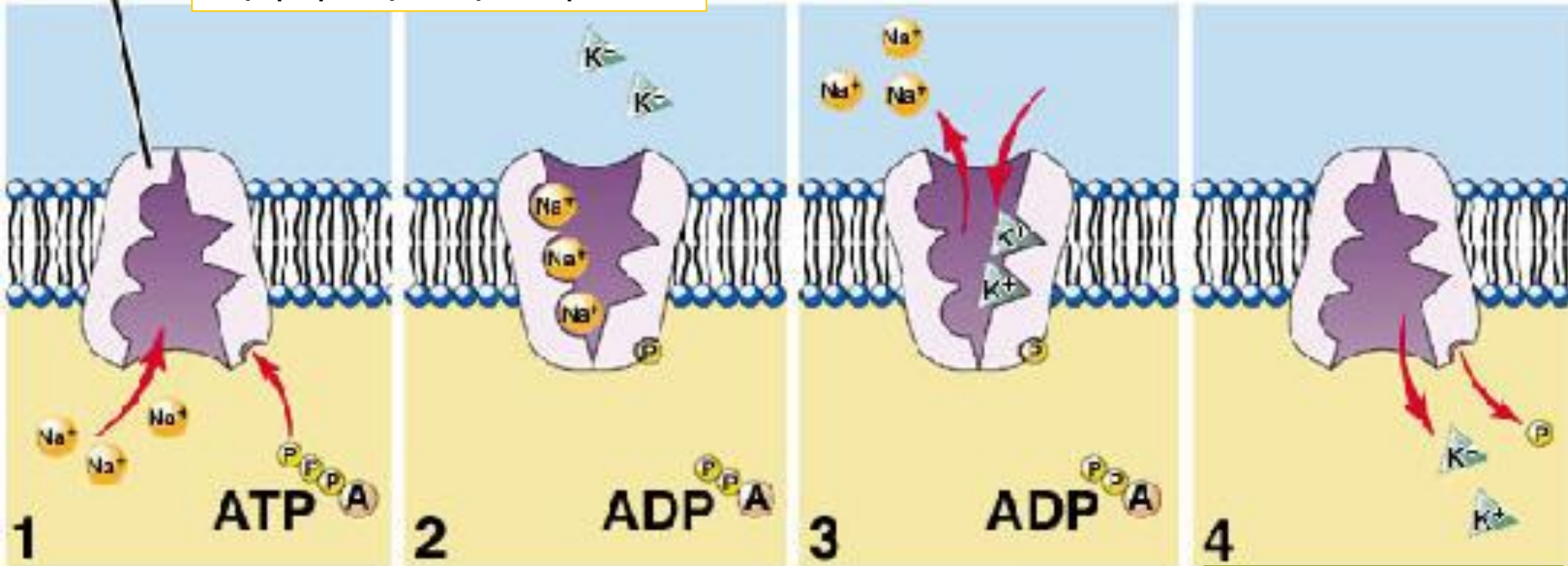
ATP φωσφορυλίωση της ATPase προκαλεί: κλείσιμο εσωτερικής οπής, αλλαγή διαμόρφωσης (αρνητικά φορτ. επιφάνειες) - δεν προσδένεται το Na^+



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

Sodium-potassium pump

Υψηλή συγκέντρωση Na^+



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

Υψηλή συγκέντρωση K^+

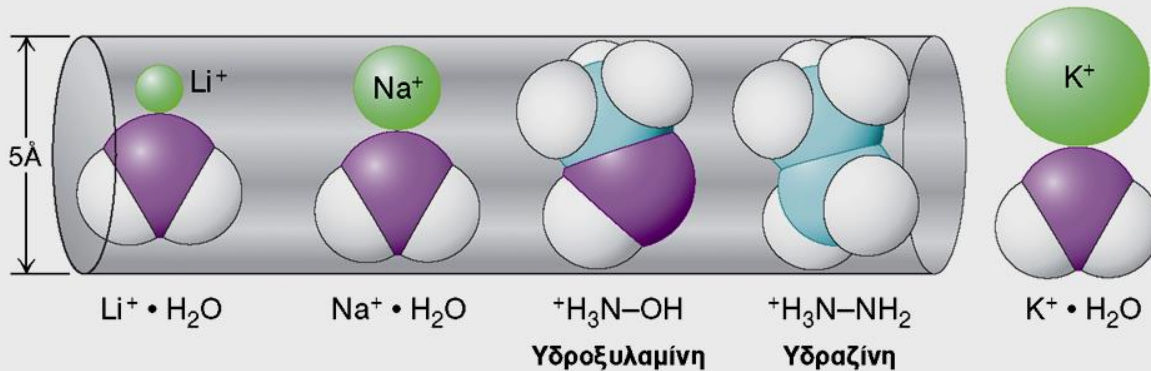
Ιοντικοί διάυλοι δεν είναι απλοί σωλήνες αλλά εξαιρετικά πολύπλοκες μοριακές μηχανές

- 1) Εμφανίσουν υψηλή επιλεκτικότητα για συγκεκριμένα ιόντα (χιλιάδες ιόντα/δευτερόλεπτο)
- 2) Υπάρχουν σε ανοικτή και κλειστή κατάσταση
- 3) Μεταπτώσεις από ανοικτή σε κλειστή κατάσταση ελέγχονται (αναστολείς, ηλεκτρικό δυναμικό)
- 4) Οι ανοικτές μορφές μεταπίπτουν αυθόρμητα σε ανενεργές μορφές

ΠΙΝΑΚΑΣ 13.1 Σχετικές διαπερατότητες για επιλεγμένους ιοντικούς διαύλους.

	Δίαυλος Na ⁺	Δίαυλος K ⁺	Υποδοχέας της ακετυλοχολίνης	Δίαυλος Cl ⁻
Li ⁺	0,93	< 0,01	0,87	< 0,01
Na ⁺	1,00	< 0,01	1,00	< 0,01
K ⁺	0,09	1,00	1,11	< 0,01
Rb ⁺	< 0,01	0,91		
Cs ⁺	< 0,01	< 0,08	1,42	
NH ₄ ⁺	0,16	0,13	1,79	
H ₃ NOH ⁺	0,94	< 0,03	1,92	
H ₂ NNH ₃ ⁺	0,59	< 0,03		
H ₃ CNH ₃ ⁺	< 0,01	< 0,02		
Cl ⁻	< 0,01	< 0,01	< 0,01	1,00

Δίαυλος Na⁺



13.27 Η επιλεκτικότητα του διαύλου νατρίου.
Η ιοντική επιλεκτικότητα του διαύλου νατρίου εξαρτάται εν μέρει από στερεοχημικούς παράγοντες. Ιόντα νατρίου και λιθίου μαζί με ένα μόριο ύδατος εφαρμόζουν στον διάυλο όπως και η υδροξυλαμίνη και η υδραζίνη. Αντιθέτως, το K⁺ με ένα μόριο ύδατος είναι πολύ μεγάλο για να προσαρμοστεί στον διάυλο. [Κατά R.D. Keynes. Ion channels in the nerve-cell membrane. Copyright 1979, Scientific American, Inc. All rights reserved.]

Παρόλα αυτά μικρότερα ιόντα όπως το Li⁺ ενωμένα με ένα H₂O μπορούν να διαπεράσουν τον διάυλο Na⁺

Τα ιόντα Li⁺ δεν υπάρχουν σε αφθονία (το σύστημα φτιάχτηκε να λειτουργεί σε συνθήκες περίσσιας K⁺ και Na⁺ στο περιβάλλον ή σε περιβάλλον με περίσσια K⁺ και Na⁺)

Τι θα συμβεί στους διαύλους K⁺ που έχουν μεγαλύτερη διάμετρο;
Θα περνάνε όλα τα μικρότερα ιόντα

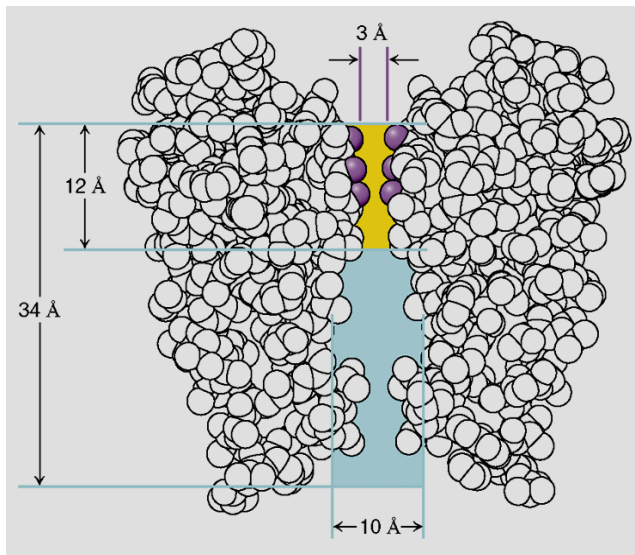
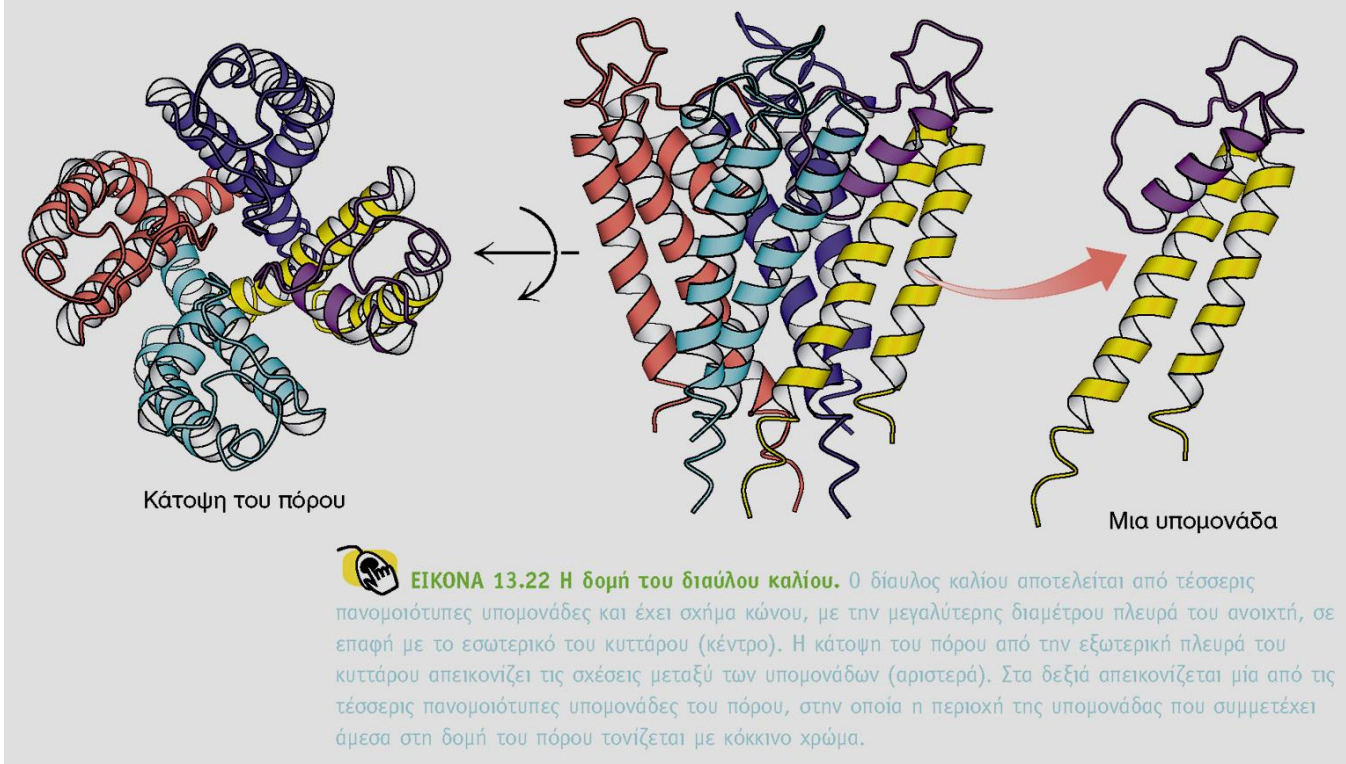
Η επιλεκτικότητα του διαύλου K⁺ εξηγείτε με τις ενέργειες ενυδάτωσης

Η δομή του διαύλου αποκαλύπτει την βάση εξειδικευμένης τάχιστης ιοντικής ισχύος

Η ανακάλυψη του τρόπου λειτουργίας ήταν αργή γιατί προχωρούσε με επαγωγή μεταλλάξεων

Μετά την ανακάλυψη της δομής ανακαλύφθηκαν τέσσερις υπομονάδες συγκροτούν έναν πόρο

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⁺



ΕΙΚΟΝΑ 13.23 Η διαδρομή διά μέσου ενός διαύλου. Ένα κατιόν καλίου που εισέρχεται στον διάυλο καλίου διανύει μια απόσταση 22 Å μέσα στη μεμβράνη, ενώ παραμένει ενυδατωμένο (μπλε). Στο σημείο αυτό, η διάμετρος του πόρου στενεύει στα 3 Å (κίτρινο) και το κάλιο πρέπει να αποβάλει το νερό και να αλληλεπιδράσει με καρβοξυλικές ομάδες (κόκκινο) των καταλοίπων αμινοξέων του πόρου.

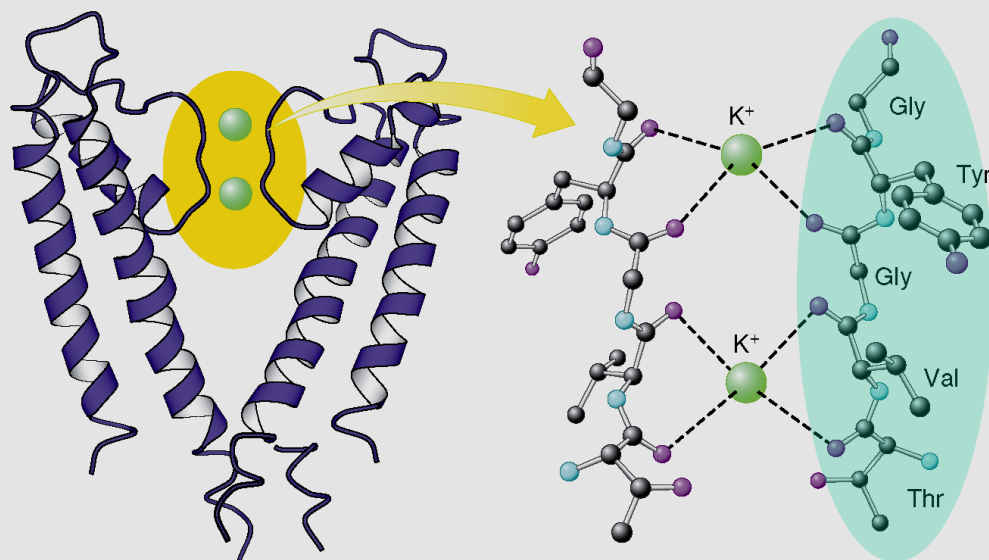
Οι διάλυτοι K^+ είναι 11 (1100%) φορές πιο διαπερατοί από το K^+ από ότι από Na^+

ΠΙΝΑΚΑΣ 13.2 Ιδιότητες αλκαλικών κατιόντων.

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

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

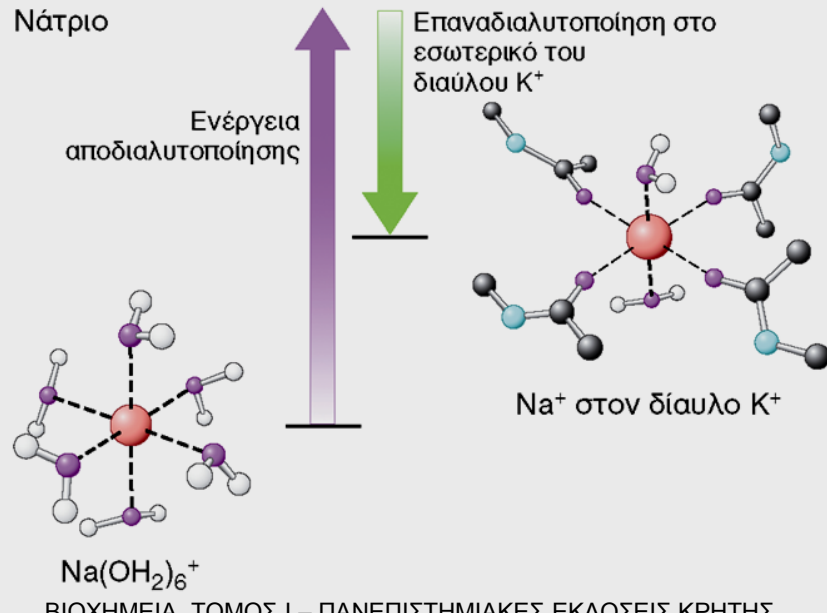
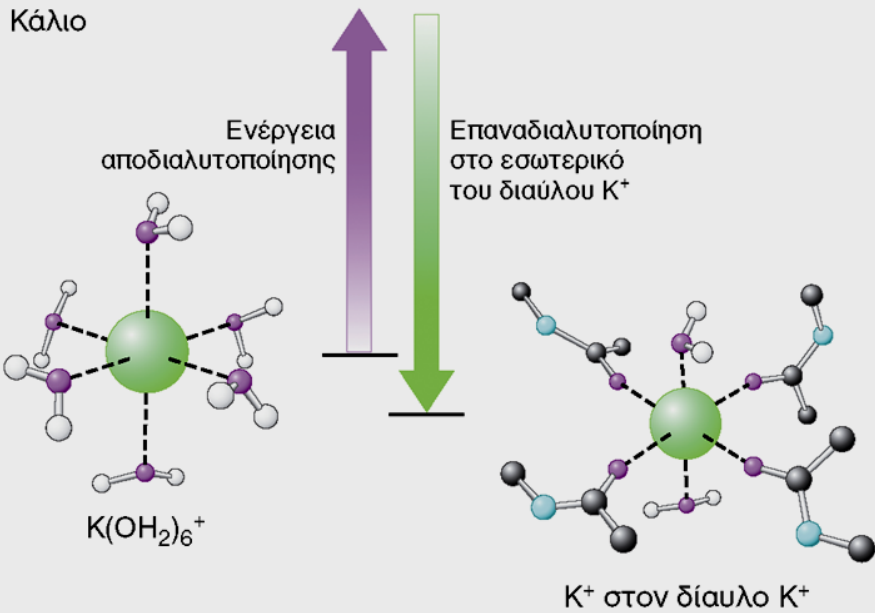


ΕΙΚΟΝΑ 13.24 Το φίλτρο επιλογής του διαύλου καλίου. Τα ιόντα καλίου αλληλεπιδρούν με καρβονυλικές ομάδες της αλληλουχίας αμινοξέων TVGYG του φίλτρου επιλογής, τα οποία είναι τοποθετημένα στην περιοχή διαμέτρου 3 Å του πόρου.

πώς πετυχαίνεται η εξειδίκευση; Με μέγιστες αποστάσεις ατόμων 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)

ΕΙΚΟΝΑ 13.25 Η ενεργειακή βάση της ιοντικής επιλεκτικότητας. Το κόστος ενέργειας της αφυδάτωσης του ιόντος καλίου αντισταθμίζεται από ευνοούμενες αλληλεπιδράσεις του με το φίλτρο επιλογής. Επειδή το νάτριο είναι αρκετά μικρότερο ώστε να αλληλεπιδράσει ευνοϊκά με το φίλτρο επιλογής του διαύλου καλίου, η ελεύθερη ενέργεια της αφυδάτωσης του δεν μπορεί να αντισταθμιστεί και έτσι το νάτριο δεν διέρχεται διά μέσου του διαύλου αυτού.

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

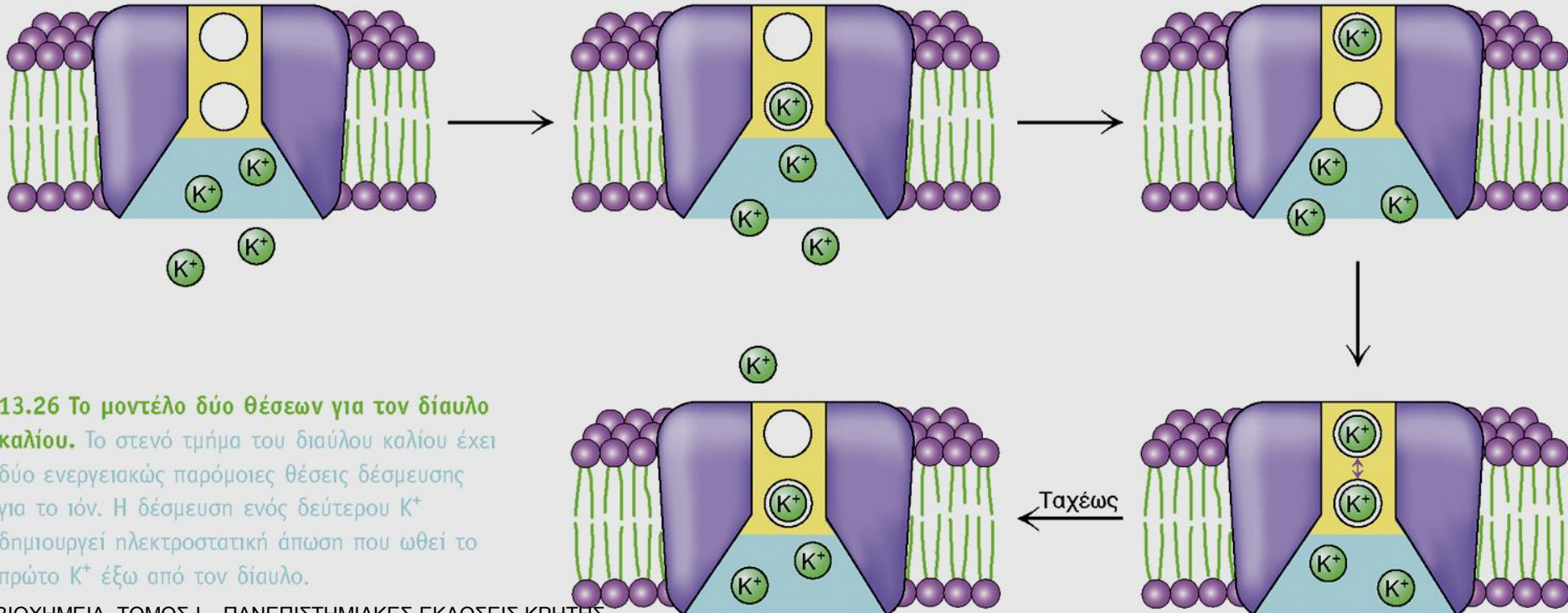


Η δομή του διαύλου εξηγεί τους ταχείς ρυθμούς μεταφοράς

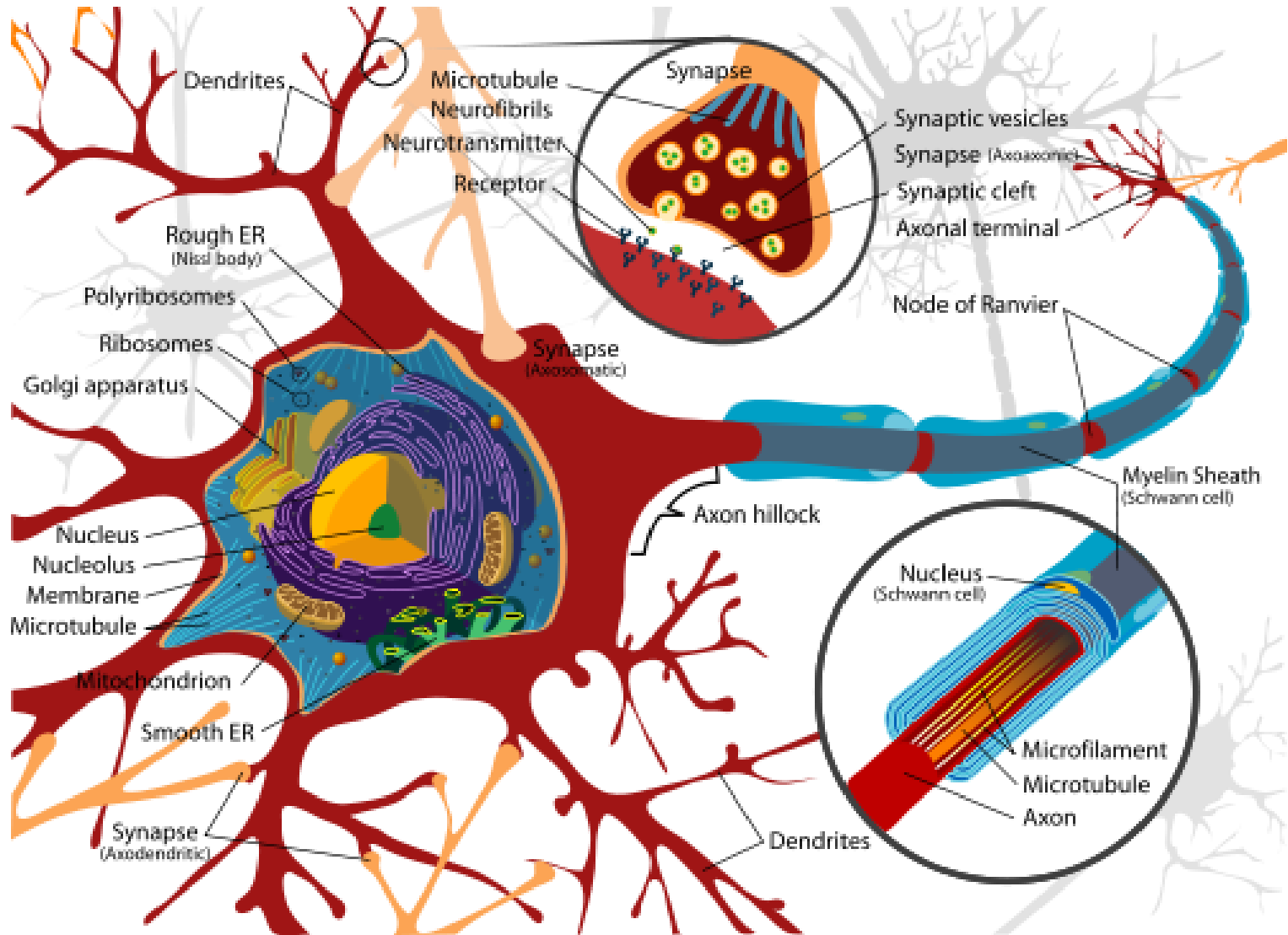
Η διαφορά ενέργειας ενυδάτωσης και δέσμευσης δεν πρέπει να διαφέρουν πολύ, αλλιώς το ιόν θα δεσμευόταν και δεν θα αποδεσμευόταν.

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)



Η νευρική ώση για να μεταφερθεί χρησιμοποιεί διαύλους



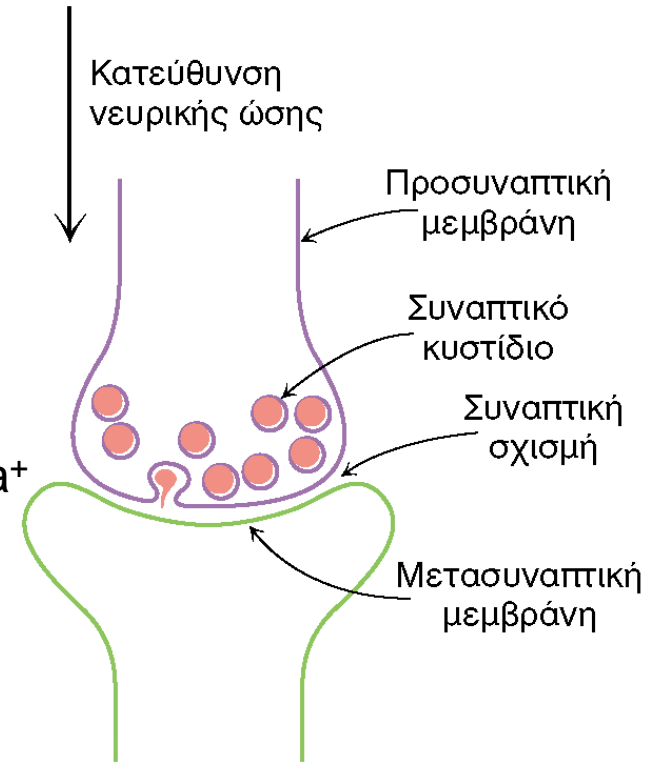
από κύτταρο σε κύτταρο η νευρική ώση γίνεται από ελεγχόμενους από πρόσδεμα διαύλους από την μια άκρη του κυττάρου στην άλλη με ελεγχόμενους από τάση διαύλους (τασοελεγχόμενους)

Το αρχικό σήμα ξεκινάει από ένα διάυλο ακετοχολίνης

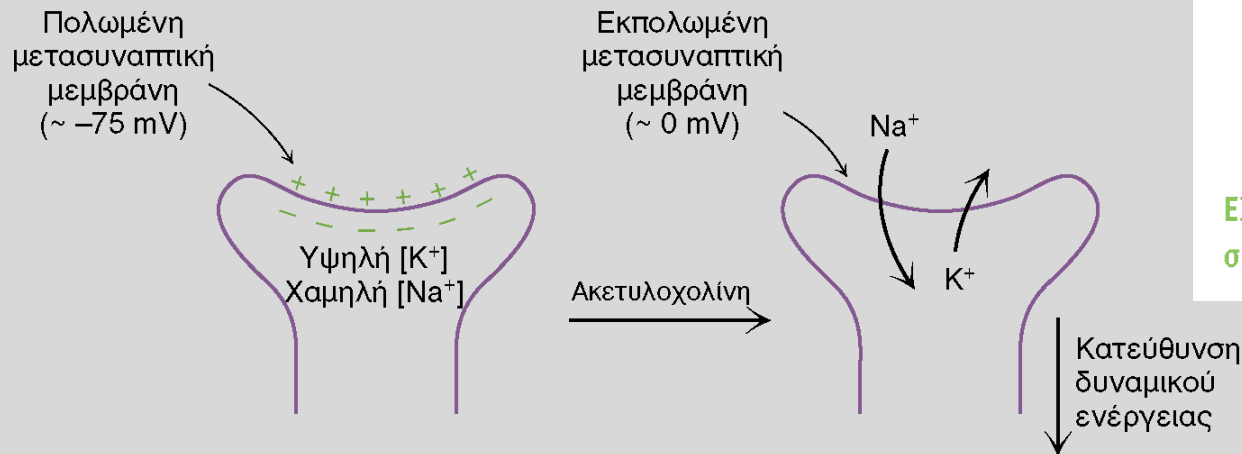
Ο διάυλος της ακετοχολίνης (ελεγχόμενος από πρόσδεμα διάυλος) μεταδίδει την νευρική ώση (νευροδιαβιβαστής)

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

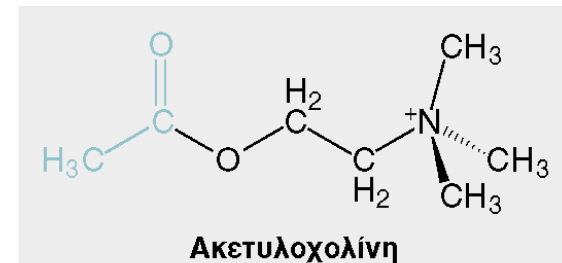
Αποτέλεσμα αλλαγή της διαπερατότητας Na^+ και K^+ (ανοίγουν οι διάυλοι σε 0,1 ms) μεγάλο ρεύμα εισροής Na^+ και μικρό εκκροής K^+



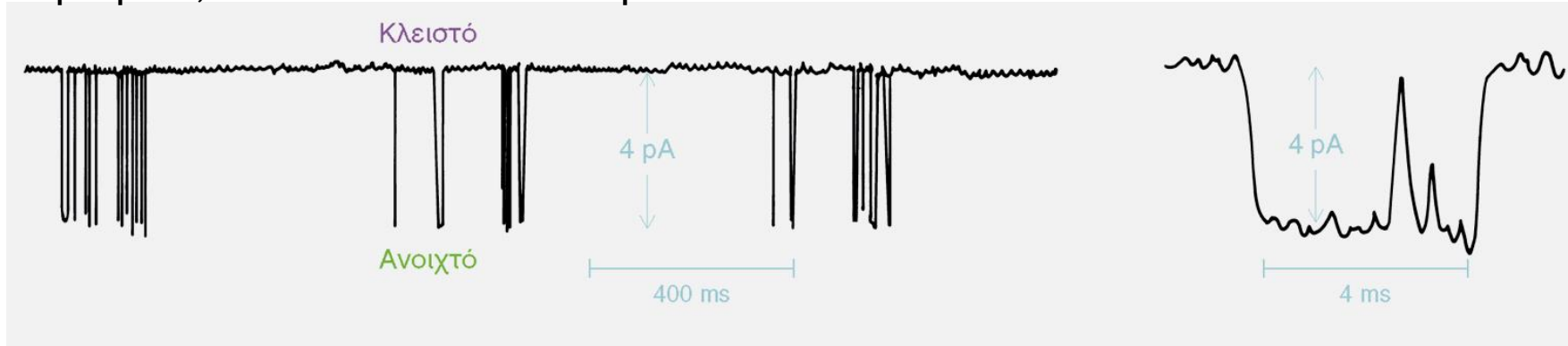
ΕΙΚΟΝΑ 13.14 Σχηματική αναπαράσταση της σύναψης.



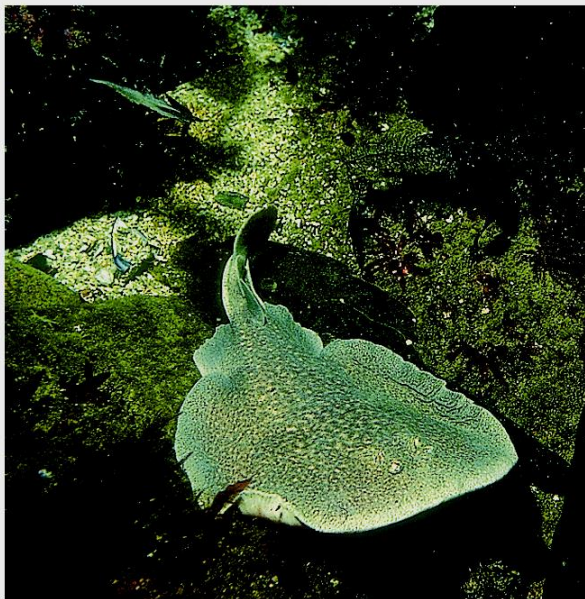
ΕΙΚΟΝΑ 13.15 Εκπόλωση μεμβράνης. Η ακετυλοχολίνη εκπολώνει τη μετασυναπτική μεμβράνη αυξάνοντας την αγωγιμότητα των ιόντων νατρίου και καλίου.



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



ΕΙΚΟΝΑ 13.16 Καταγραφή της αγωγιμότητας του διαύλου του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης με την τεχνική παγίδευσης τάσης μεμβρανικών τμημάτων. Η καταγραφή με την τεχνική της παγίδευσης τάσης μεμβρανικών τμημάτων απεικονίζει τις αλλαγές στην αγωγιμότητα του διαύλου του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης παρουσία της ακετυλοχολίνης. Ο διάυλος υφίσταται συχνές μεταπτώσεις μεταξύ της ανοικτής και της κλειστής κατάστασής του. [Ευγενική προσφορά Dr. D. Colquhoun και Dr. B. Sakmann.]



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

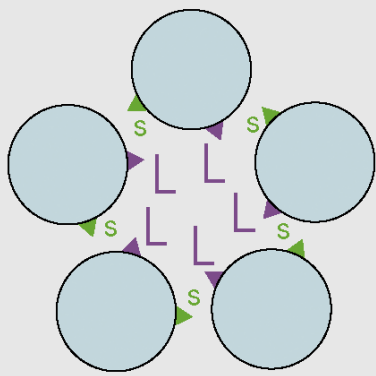
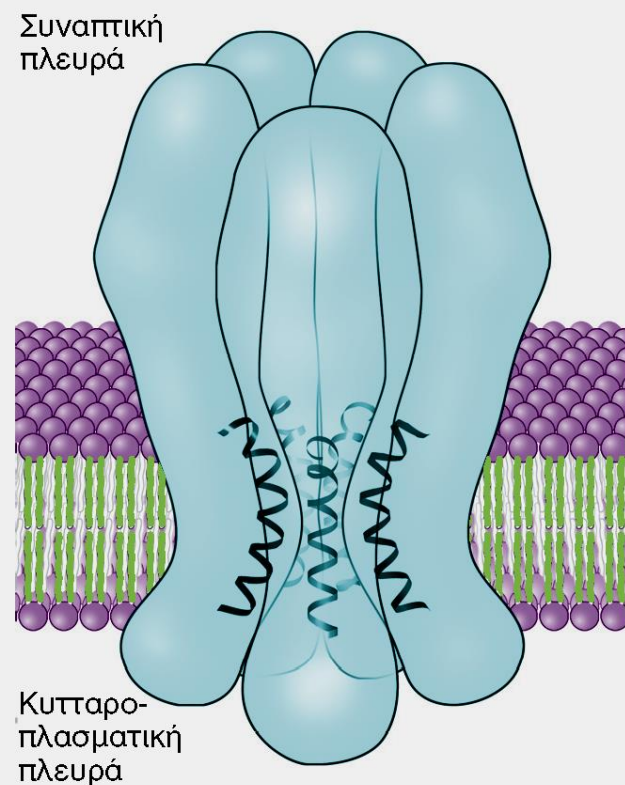
Ένα επίσης εξωτικό βιολογικό υλικό νευροτοξίνη του φιδιού (τοξίνη της κόμπρας) που δεσμεύεται πολύ ισχυρά στον υποδοχέα

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

Το ηλεκτροφόρο σελάχι (*Torpedo marmorata*) έχει ένα ηλεκτρικό όργανο πλούσιο σε υποδοχείς ακετυλοχολίνης, το οποίο μπορεί να προκαλέσει ηλεκτροπληξία μεγέθους 200V σε χρόνο περίπου 1s . [Yves Gladu/Jacana/Photo Researchers.]

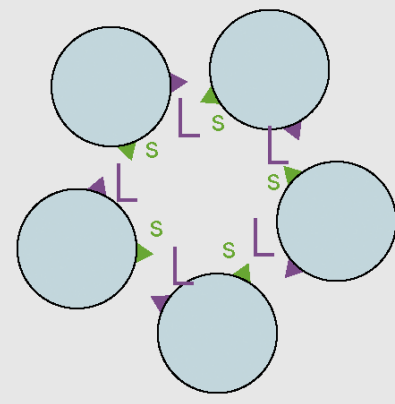
Υποδοχέας ακετοχολίνης (268 kd) πενταμερές τεσσάρων διαμεβρανικών υπομονάδων α_2 , β , γ και δ (κεφάλαιο 12 Λιπίδια-κυτταρικές μεμβράνες) που δημιουργούν έναν πόρο μέσα στην μεμβράνη

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



Κλειστό

Περιστροφή και ολίσθηση των ελίκων



Ανοιχτό

ΕΙΚΟΝΑ 13.17 Σχηματική αναπαράσταση της κλειστής κατάστασης του διαύλου του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Στην κλειστή κατάσταση, το στενό τμήμα του πόρου αποφράσσεται από πλευρικές ομάδες, οι οποίες προέρχονται από πέντε έλικες. [Ευγενική προσφορά Dr. Nigel Unwin.]

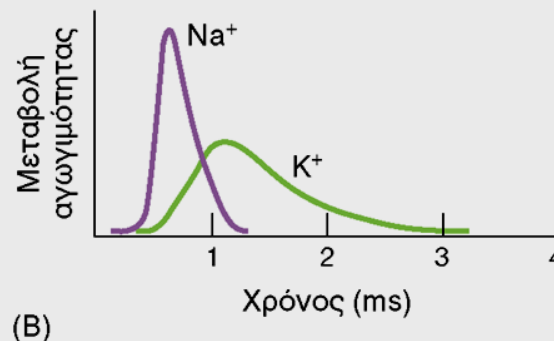
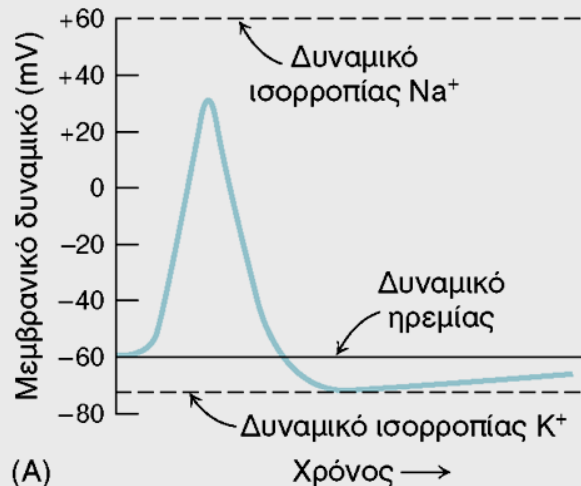
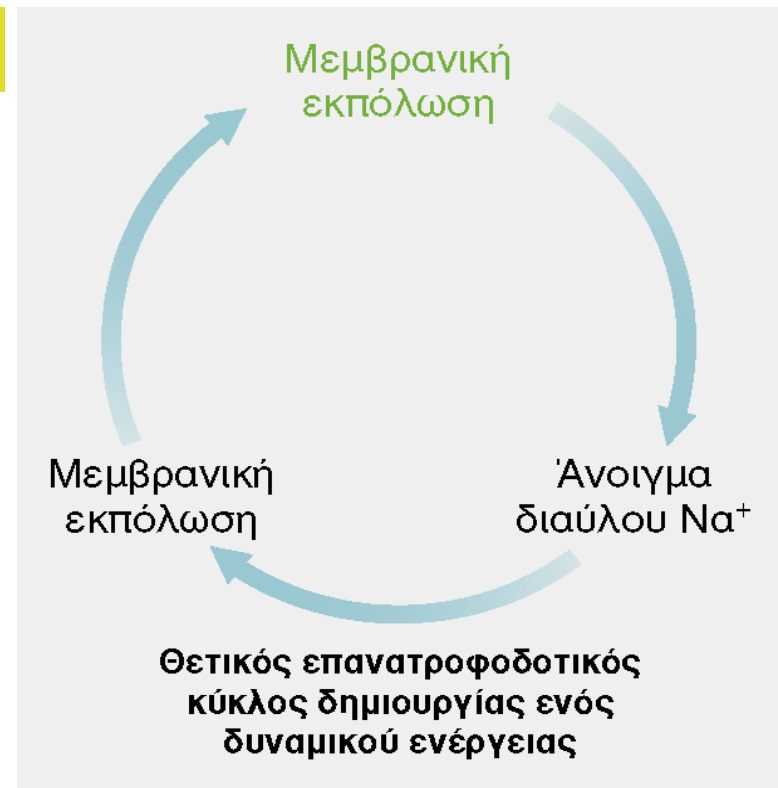
ΕΙΚΟΝΑ 13.18 Το άνοιγμα του πόρου του διαύλου του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Μεγάλες υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες (L) αποφράσσουν τελείως τον πόρο όταν ο διάυλος του υποδοχέα της ακετυλοχολίνης βρίσκεται στην κλειστή του κατάσταση. Το άνοιγμα του διαύλου επιτυγχάνεται από την ολίσθηση των ελίκων που διαγράφουν τον πόρο. Τα μεγάλα κατάλοιπα (L) απομακρύνονται από τον πόρο και αντικαθίστανται από άλλα μικρότερα (S). [Από N. Unwin, *Neuron* 3 (1989):665.]

Τασοελεγχόμενοι διάυλοι 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 διάυλοι (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 διάυλους) στα $+30\text{mV}$ κλείνουν οι διάυλοι Na^+ και ανοίγουν οι διάυλοι 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

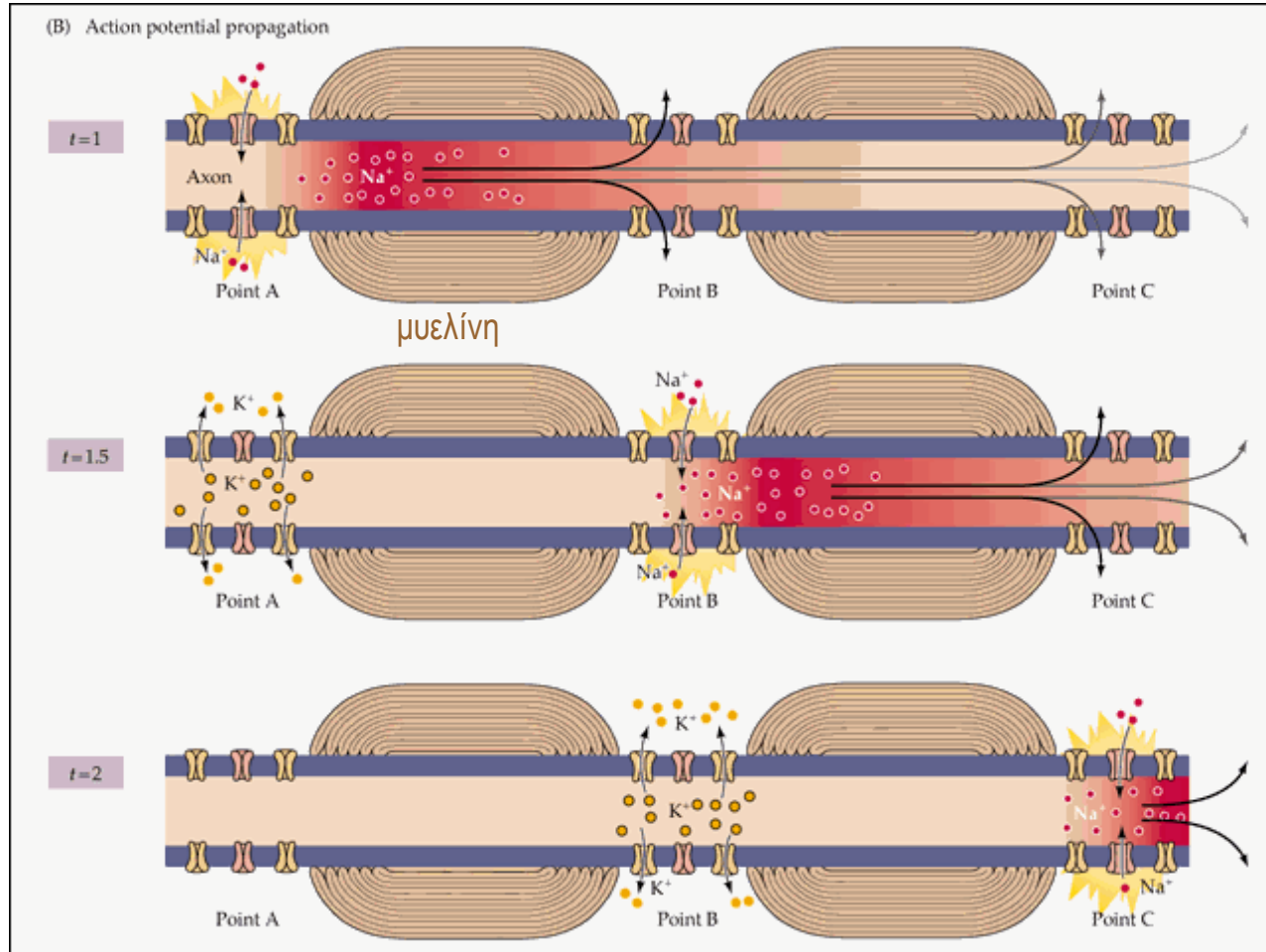


ΕΙΚΟΝΑ 13.19 Μεμβρανικό δυναμικό. Η εκπόλωση μιας νευραξονικής μεμβράνης οδηγεί στη δημιουργία ενός δυναμικού ενέργειας. Χρονική εξάρτηση (A) της μεταβολής του μεμβρανικού δυναμικού και (B) της μεταβολής της αγωγιμότητας των Na^+ και K^+ .

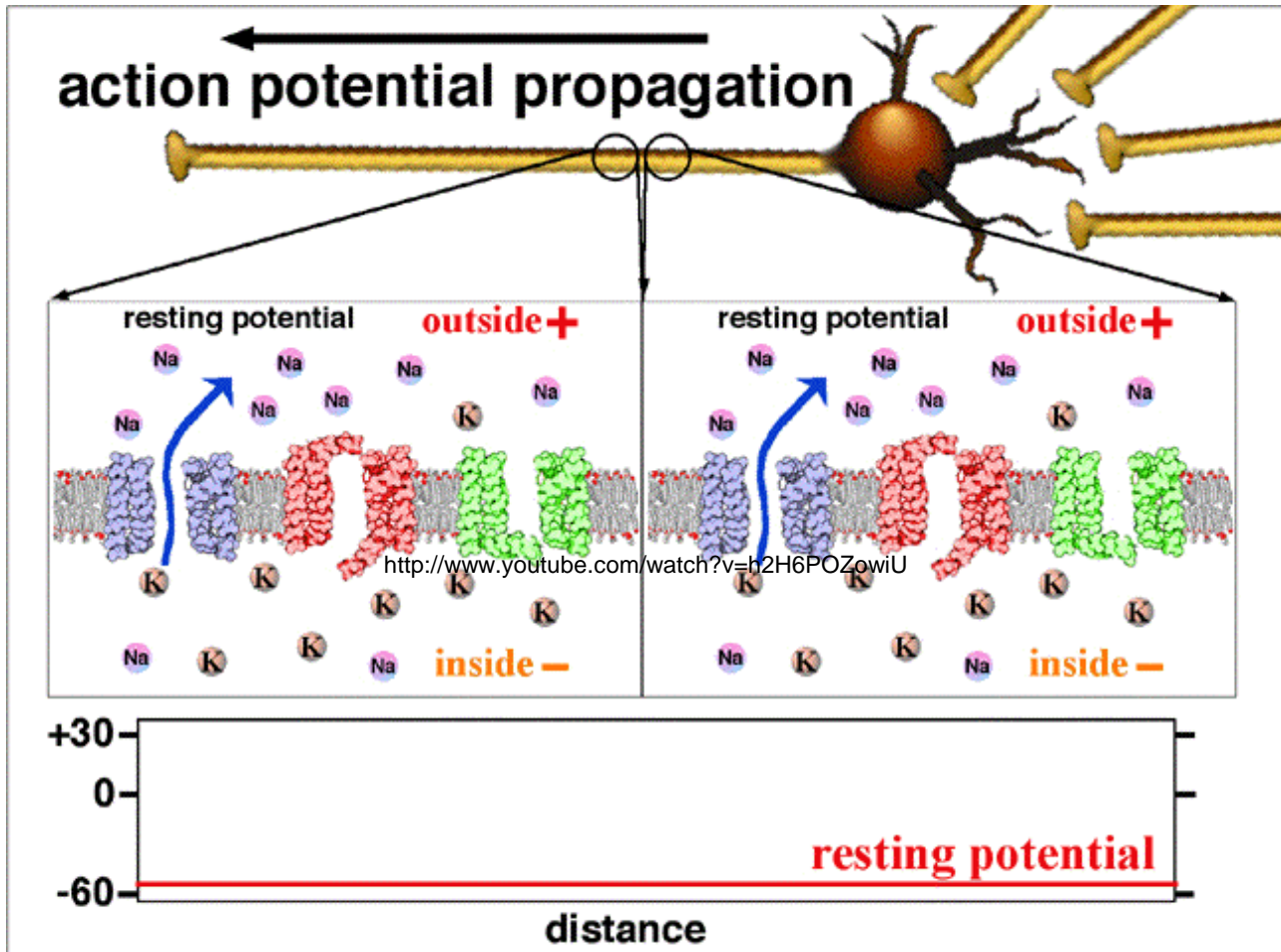
Μετάδοση της νευρικής ώσης

Ξεκινάει λόγω νευροδιαβιβαστή (μεμβρανική εκπόλωση). Οι Τασσελεγχόμενοι διάλυοι ανοίγουν 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

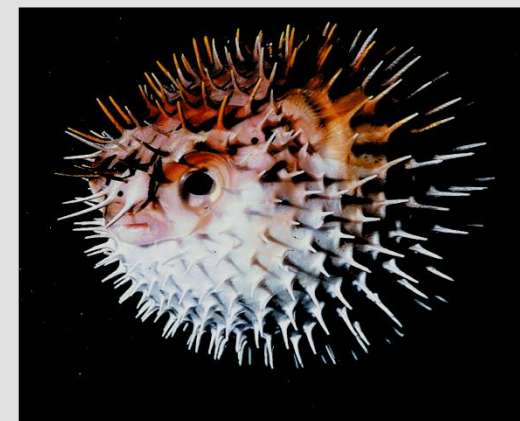
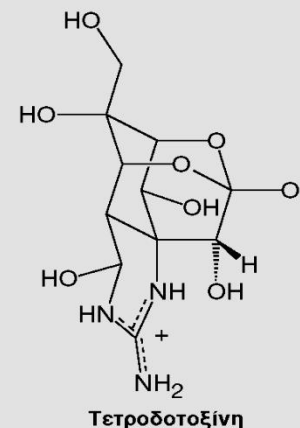
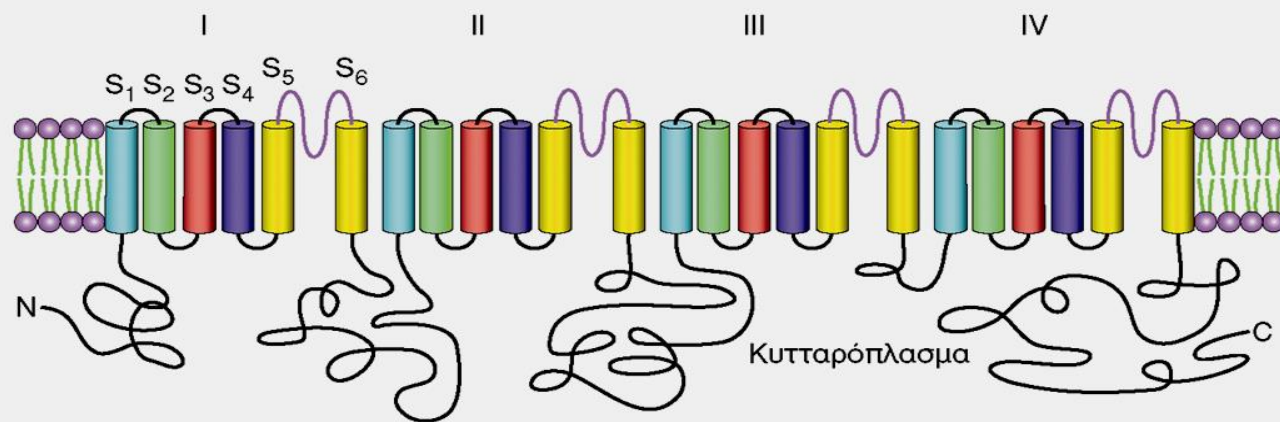
<http://www.youtube.com/watch?v=h2H6POZowiU>

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).



Το ψάρι τετρόδους θεωρείται μαγειρικό έδεσμα στην Ιαπωνία. [Fred Bavendam/ Peter Arnold.]

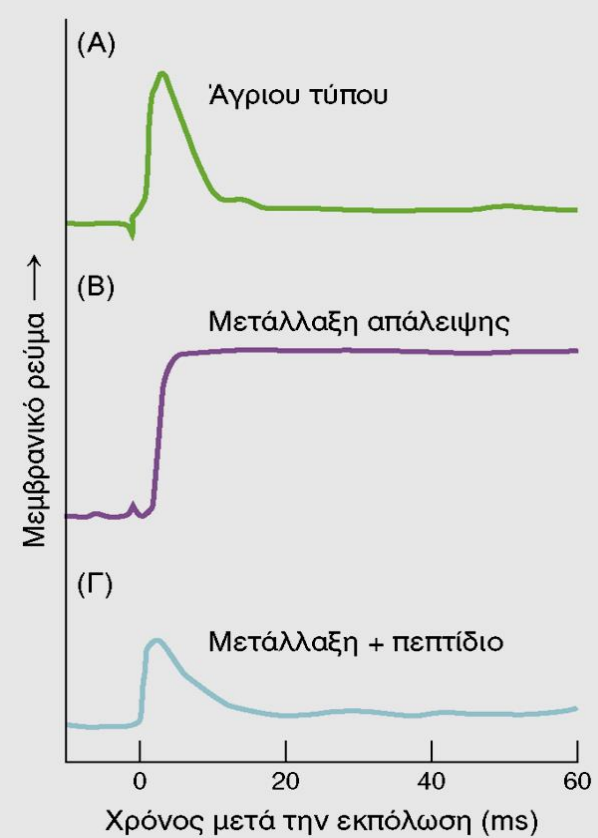
ΕΙΚΟΝΑ 13.20 Ο διάυλος νατρίου. Ο διάυλος Na^+ αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με τέσσερις επαναλαμβανόμενες μονάδες (I έως IV). Κάθε επανάληψη σχηματίζει πιθανώς έξι διαμεμβρανικές έλικες. Οι θηλιές (απεικονίζονται με κόκκινο) μεταξύ των ελίκων 5 και 6 κάθε επανάληψης δομούν τον πόρο του διαύλου.

Έλεγχος λειτουργίας διαύλου

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

Ένας μεταταγμένος διάυλος 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 πεπτιδίο ανάλογο των 20 πρώτων αμινοξέων στο N-τελικού άκρου



ΕΙΚΟΝΑ 13.28 Απενεργοποίηση του διαύλου καλίου. Η αμινο-τελική περιοχή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του διαύλου καλίου είναι κρίσιμη για την απενεργοποίησή του. (A) Ο άγριος διάυλος καλίου τύπου shaker υφίσταται τάχιστα απενεργοποίηση μετά το άνοιγμά του. (B) Ένας μεταλλαγμένος διάυλος που εμφανίζει έλλειψη των 6 από τα 46 κατάλοιπα αμινοξέων της αμινο-τελικής περιοχής 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 μM . [Κατά W.N. Zagotta, T. Hoshi και R.W. Aldrich. *Science* 250 (1990):568.]

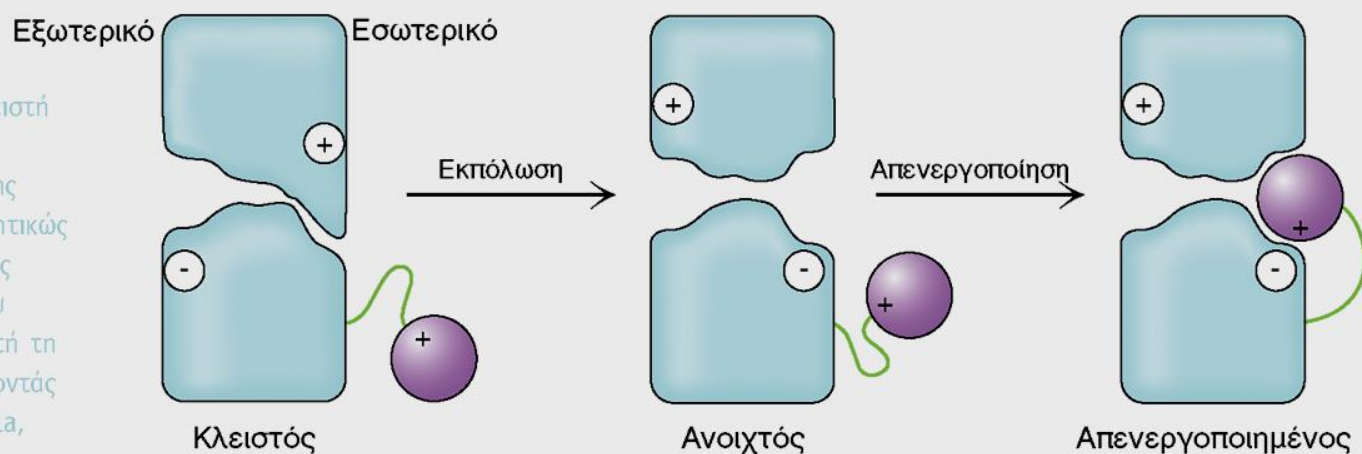
Τα πειράματα υποστηρίζουν σθεναρά το μοντέλο της σφαίρας και της αλυσίδας
 Τα πρώτα 20 αμινοξέα σχηματίζουν μια κυτταροπλασματική μονάδα (σφαίρα) ακολουθούμενου από ένα εύκαμπτο τμήμα (αλυσίδα).

Η σφαίρα περιστρέφεται ελεύθερα αλλά όταν ο διάυλος εκπολώνεται δημιουργείται μια εγκόλπωση στην επιφάνεια, η οποία είναι συμπληρωματική (πρόσδεση) της σφαίρας

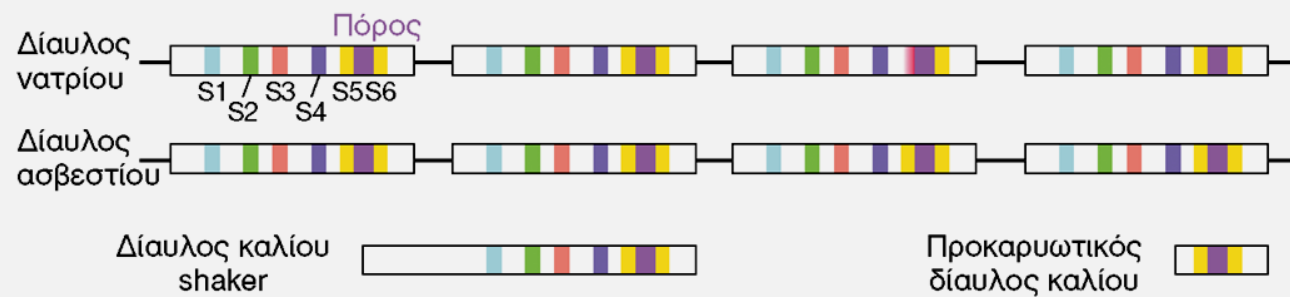
Βράχυνση της αλυσίδας επιταχύνει την απενεργοποίηση γιατί η σφαίρα βρίσκει τον στόχο της γρηγορότερα αντίστροφα επιμήκυνση της αλυσίδας οδηγεί σε επιβράδυνση της απενεργοποίησης

ΕΙΚΟΝΑ 13.29 Το μοντέλο της σφαίρας και της αλυσίδας. Η δομική περιοχή απενεργοποίησης ή η «σφαίρα» (κόκκινο)

είναι προσδεμένη στον διάυλο μέσω μιας εύκαμπτης «αλυσίδας» (πράσινο). Στην κλειστή κατάσταση, η σφαίρα βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα. Η εκπόλωση της μεμβράνης ανοίγει τον διάυλο και δημιουργεί μια αρνητικώς φορτισμένη θέση δέσμευσης για τη θετικώς φορτισμένη σφαίρα, κοντά στο άνοιγμα του διαύλου. Η μετακίνηση της σφαίρας σε αυτή τη θέση απενεργοποιεί τον διάυλο αποφράσσοντάς τον. [Κατά C.M. Armstrong και F. Bezanilla, *J. Gen. Physiol.* 70(1977):567.]



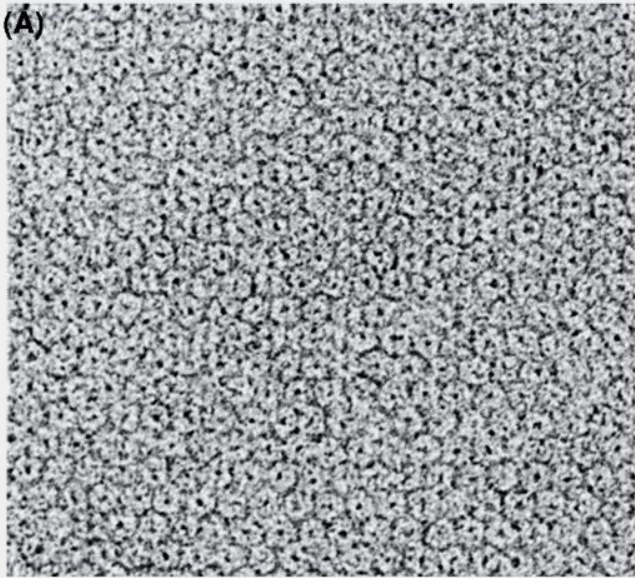
Ο δίαυλος K^+ ανάλογος του Na^+ (ήταν δύσκολο να ανακαλυφθεί λόγω έλλειψης γνωστού προσδέματος) άλλα σε μικρή αφθονία. Ανακαλύφθηκε στη μύγα του φρούτου (*shaker*). Το cDNA κωδικεύει μια πρωτεΐνη 70 kd.



ΕΙΚΟΝΑ 13.21 Σύγκριση της αλληλουχίας ιοντικών διαύλων. Τα όμοια χρώματα δείχνουν δομικές όμοιες περιοχές στους διαύλους νατρίου, ασβεστίου και καλίου. Οι δίαυλοι αυτοί εμφανίζουν σχεδόν τετραμερή συμμετρία.

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

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



Λειτουργούν σαν διακυτταρικοί δίαυλοι (διακυτταρική απόσταση 35\AA έχουν πυκνή διάταξη και εξαγωγικό 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)

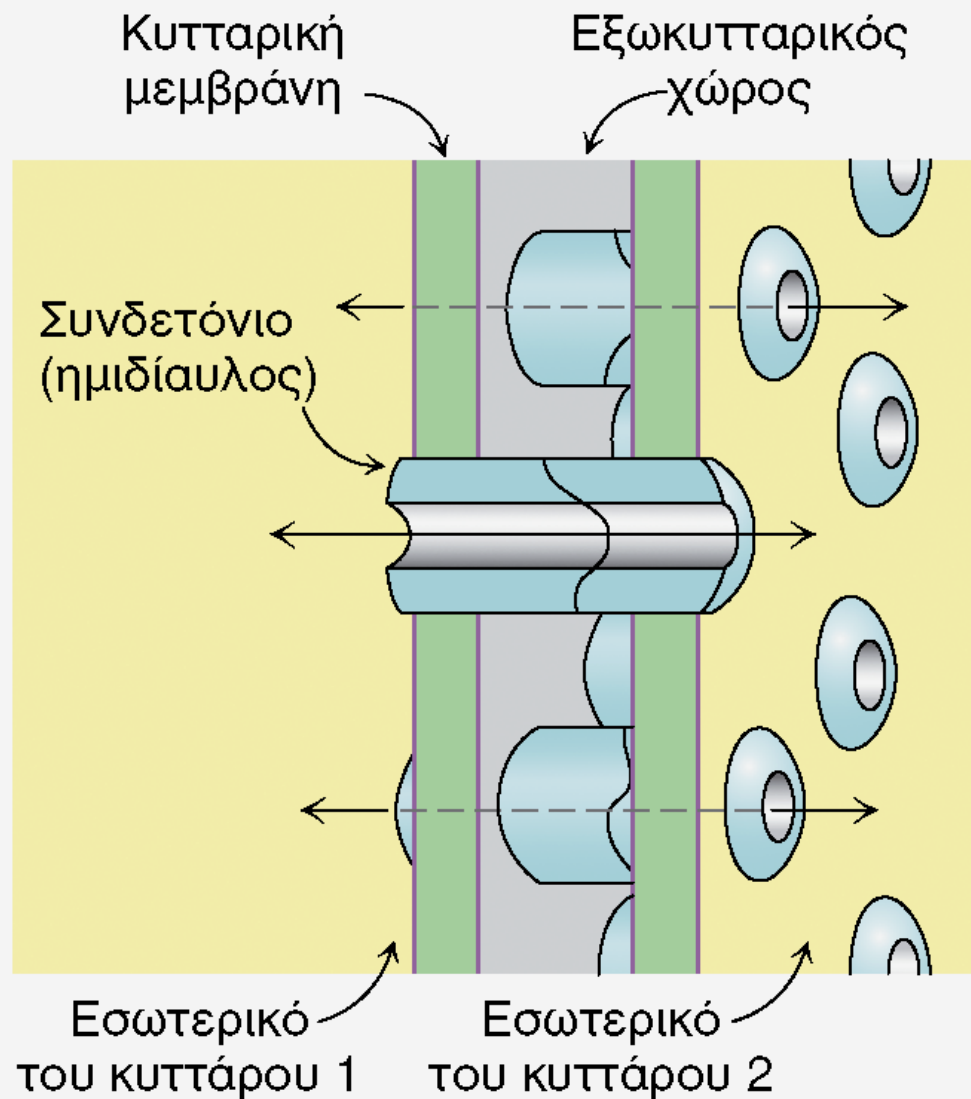
ΦΕΙΚΟΝΑ 13.30 Χασματοσυνδέσεις. (Α)

Ηλεκτρονιομικρογραφία απομονωμένων χασματοσυνδέσεων. Τα κυλινδρικά συνδετόνια είναι οργανωμένα σε εξαγωγικό δίκτυο με μια κυτταρική μονάδα μήκους 85\AA . Η πυκνοχρωματισμένη κεντρική οπή έχει διάμετρο περίπου 20\AA . (Β) Ηλεκτρονιομικρογραφία εγκάρσιας τομής δύο κυτταρικών μεμβρανών που ενώνονται με χασματοσυνδέσεις. [(Α) Ευγενική προσφορά Dr. Nigel Unwin και Dr. Guido Zampighi, (Β) Από E. L. Hertzberg και N. B. Gilula. *J. Biol. Chem.* 254 (1979):2143.]

Χασματοσυνδέσεις αποτελούνται από 12 μόρια *συνδεΐνης* έξι μόρια (*συνδετόνιο* ή *ημιδίαυλος*) 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 κυττάρων από γειτονικά που είναι τραυματισμένα ή πεθαίνουν)



ΕΙΚΟΝΑ 13.31 Σχηματική αναπαράσταση μιας χασματοσύνδεσης. [Ευγενική προσφορά Dr. Werner Loewenstein.]