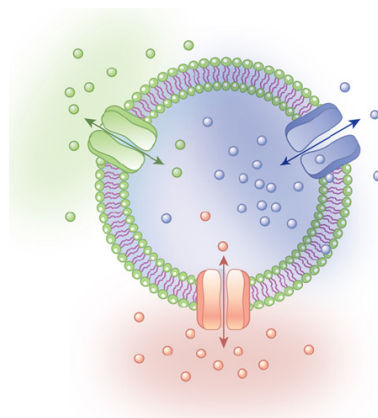




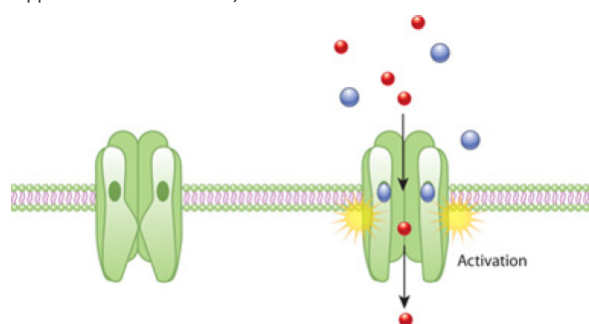
Введение

Клеточные ионные каналы

Живые клетки покрыты мембраной, структурную основу которой составляет двойной слой липидов, слабо проницаемый для воды и практически непроницаемый для ионов. Каждая клетка должна обмениваться с внешней средой различными веществами и, в частности, ионами. Перенос ионов через мембрану играет важную роль в процессах возбуждения клетки и передачи сигналов. Ионы проникают в клетку и выходят из нее через встроенные в мембрану белки — каналы. Каналы — это белки, которые выполняют функцию мембранных пор, так как формируют отверстия, сквозь которые могут проходить ионы. Мембранные каналы селективны—проницаемы только для определенных веществ. Селективность обусловлена радиусом пор и распределением заряженных функциональных групп в них. Существуют каналы, селективно пропускающие ионы натрия (натриевые каналы), а также калиевые, кальциевые и хлорные каналы. (см. рис. 1)

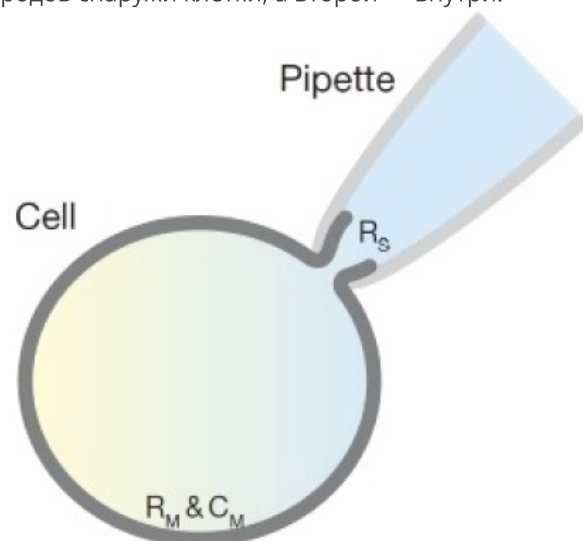


Бывают светочувствительные ионные каналы – каналные родопсины. Эти каналы переходят из закрытого состояния, в котором они непроницаемы для ионов, в открытое, поглощая фотоны определенной длины волны (см. рис 2). Далее белок проходит через несколько промежуточных состояний, чтобы вернуться из открытого состояния в закрытое (в дальнейшем мы будем считать, что в промежуточных состояниях канал также непроницаем для любых ионов).



Биофизические методы изучения каналов: Patch-clamp

Благодаря свободному пропусканию заряженных частиц (ионов) каналы в открытом состоянии эффективно увеличивают электрическую проводимость клеточной мембраны. Для изучения электрических свойств мембраны и изучения свойств ионных каналов существует метод локальной фиксации потенциала (Patch-clamp). Метод заключается в том, что стеклянная пипетка образует с клеточной мембраной контакт с сопротивлением в несколько гигаом – это так называемый гигаомный контакт. В пипетку, заполненную электролитом, помещается электрод, второй электрод помещается внеклеточно, в омывающей жидкости. Для того, чтобы производить измерения тока, протекающего через полную клеточную мембрану, ее кусочек, заключенный внутри пипетки, пробивается избыточным давлением. Такой метод измерения называется Whole-cell patch-clamp (дословно «полноклеточный пэтч-клэмп», см. рис. 3). Эффективная электрическая схема такая: один из электродов снаружи клетки, а второй — внутри.



Часть А. Вольтамперные характеристики каналов

Одной из характеристик, которую можно измерить для каналов, является их ВАХ. ВАХ канального родопсина—это зависимость стационарного тока от приложенного к клеточной мембране напряжения посредством электродов. ВАХ зависит от состава растворов, в которых производятся измерения. В этой части вы будете обрабатывать экспериментальные данные снятые для канального родопсина, который пропускает положительные одновалентные ионы: натрий, калий и водород.

В приложении даны зависимости силы тока, проходящего через мембранные каналные родопсины при включении света, от времени для трех разных растворов, омывающих измеряемую клетку. Концентрации ионов во внеклеточной жидкости в трех случаях:

1. $[H] = 10^{-7.5}$ моль/л (pH=7.5), $[Na] = 140$ ммоль/л, $[K] = 0$ ммоль/л, $[Cl] = 140$ ммоль/л
2. $[H] = 10^{-7.5}$ моль/л (pH=7.5), $[Na] = 0$ ммоль/л, $[K] = 140$ ммоль/л, $[Cl] = 140$ ммоль/л
3. $[H] = 10^{-6.0}$ моль/л (pH=6.0), $[Na] = 0$ ммоль/л, $[K] = 0$ ммоль/л, $[Cl] = 140$ ммоль/л

Внутриклеточный раствор задается раствором, который наливается в пипетку. Он во всех трех экспериментах одинаковый:

$[H] = 10^{-7.5}$ моль/л (pH=7.5), $[Na] = 110$ ммоль/л, $[K] = 0$ ммоль/л, $[Cl] = 110$ ммоль/л

Напряжение, при котором плюс находится внутри клетки, считается положительным. Сила тока, при котором положительно заряженные частицы текут изнутри клетки наружу, считается положительной.

A1 1.50 Постройте ВАХи канального родопсина в трех экспериментах.

Другой характеристикой, описывающей канальные родопсины, которую можно измерить, является проницаемость для разных ионов. Проницаемости для Na, K и протонов будем обозначать P_{Na} ; P_{K} ; P_{H} . Проницаемость является характеристикой мембраны с каналами: она зависит от количества каналов, но не зависит от омывающих мембрану растворов. Отношение же проницаемостей для двух разных ионов не зависит от количества каналов и является наиболее фундаментальной характеристикой канальных родопсинов.

Проницаемость входит в уравнение Гольдмана-Ходжкина-Катца, которое связывает ток через мембрану с напряжением на ней:

$$J(u) = \frac{z^2 e^2 u}{kT} \frac{P_{out} c_{out} - P_{in} c_{in} \exp\left(\frac{zeu}{kT}\right)}{1 - \exp\left(\frac{zeu}{kT}\right)}$$

где J – сила тока, u – приложенное к мембране напряжение, e – элементарный заряд, z – зарядовое число пропускаемого иона, k — постоянная Больцмана, $T = 24\text{ }^\circ\text{C}$ – температура во время проведения эксперимента, P_{out} и c_{out} — проницаемость и концентрация для иона, который находится во внеклеточном растворе, P_{in} и c_{in} — проницаемость и концентрация для иона, который находится внутри клетки.

Считайте, что за время эксперимента, составы растворов снаружи и внутри клетки остаются неизменными.

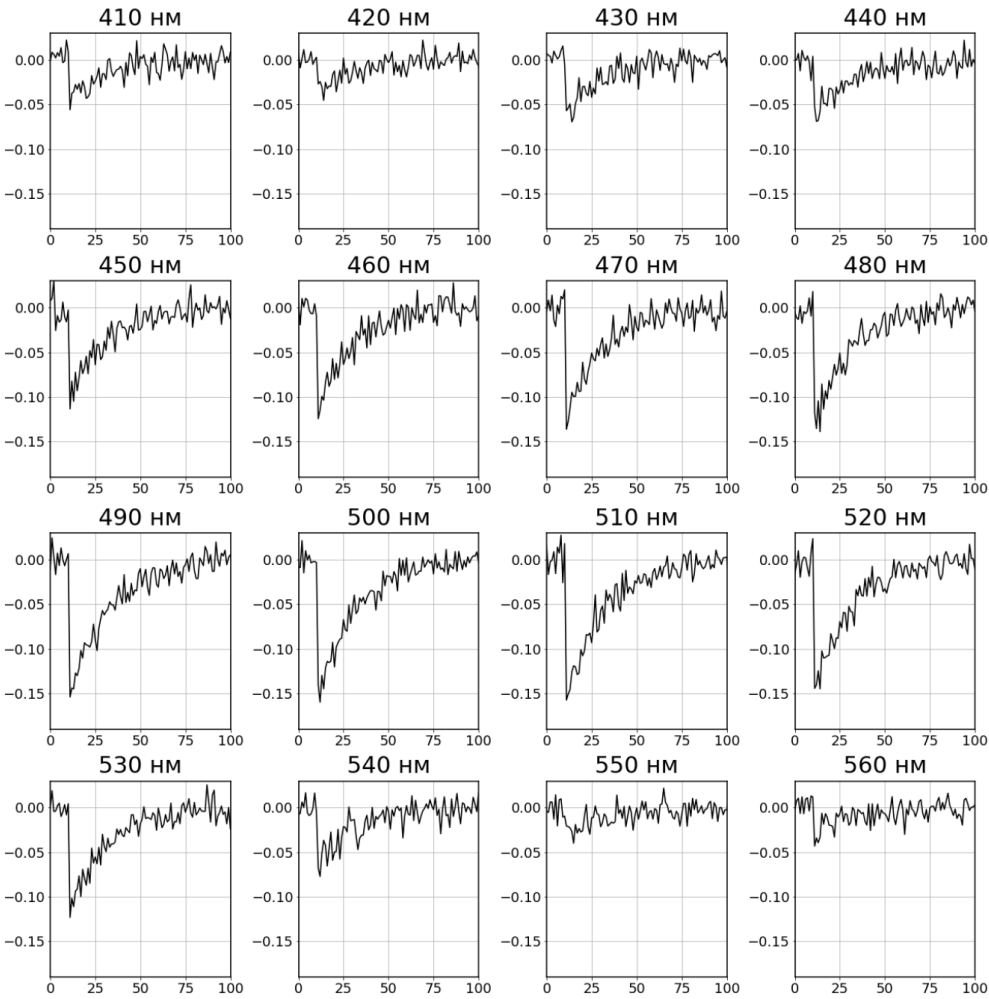
A2 4.00 Постройте графики и с помощью них определите отношения $\frac{P_{\text{K}}}{P_{\text{Na}}}$ и $\frac{P_{\text{H}}}{P_{\text{Na}}}$.

Часть В. Спектр действия канальных родопсинов

Другой фундаментальной характеристикой канальных родопсинов является их спектр действия. Спектр действия — это зависимость заряда проходящего через клеточную мембрану с каналами от длины волны возбуждающего света.

Для измерения спектра действия канального родопсина, исследуемую клетку облучают ультракороткими вспышками лазера (продолжительностью 5 нс; импульсы содержат одинаковое количество фотонов на вспышку для разных длин волн) и измеряют ток (см. рис 4).

Заряд q , проходящий через мембрану, считается за время полужатухания тока. Полученная зависимость $q(\lambda)$ нормируется на максимальное значение заряда $q_{\text{max}} = q(\lambda_{\text{max}})$.

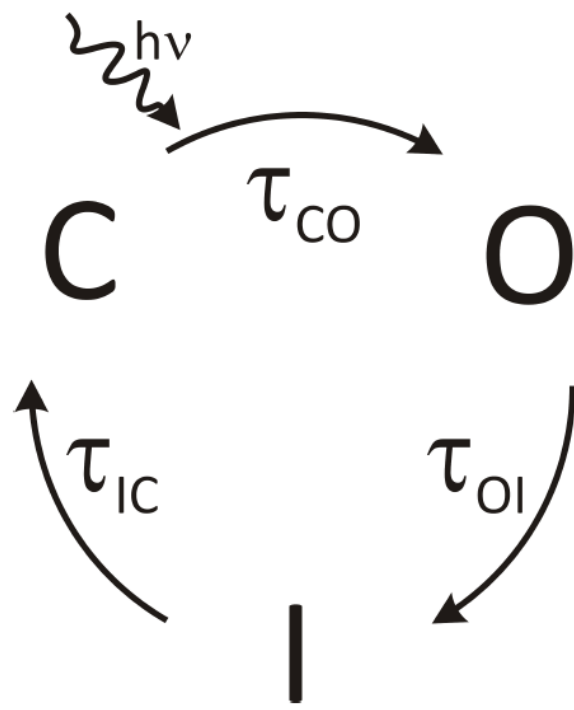


B1 2.50 Постройте спектр действия канального родопсина. Определите положение максимума спектра λ_{max} .

Часть С. Параметры фотоцикла

Во введении говорилось, что канал при поглощении фотонов проходит несколько промежуточных состояний и возвращаются в начальное закрытое состояние. Все эти состояния вместе называются фотоциклом (см. рис 5, на котором показан фотоцикл, в котором одно промежуточное состояние I , C и O – закрытое и открытое состояния соответственно). Переходы между этими состояниями происходят с некоторой вероятностью. Переход из закрытого состояния в открытое невозможен без поглощения света. При наличии света этот переход также происходит с некоторой вероятностью. Вероятность перехода между двумя состояниями A и B описывается величиной τ – характерное время перехода из A в B . Это время определяется, как обратная производная вероятности

перехода по времени: $\tau_{AB} = \left(\frac{dp}{dt}\right)^{-1}$ (то есть вероятность перехода за время dt равна dp).



C1 1.00

Используя все экспериментальные данные, полученные выше, определите параметры фотоцикла канального родопсина τ_{OI} и τ_{IC} .

Часть D. Селективность канального родопсина

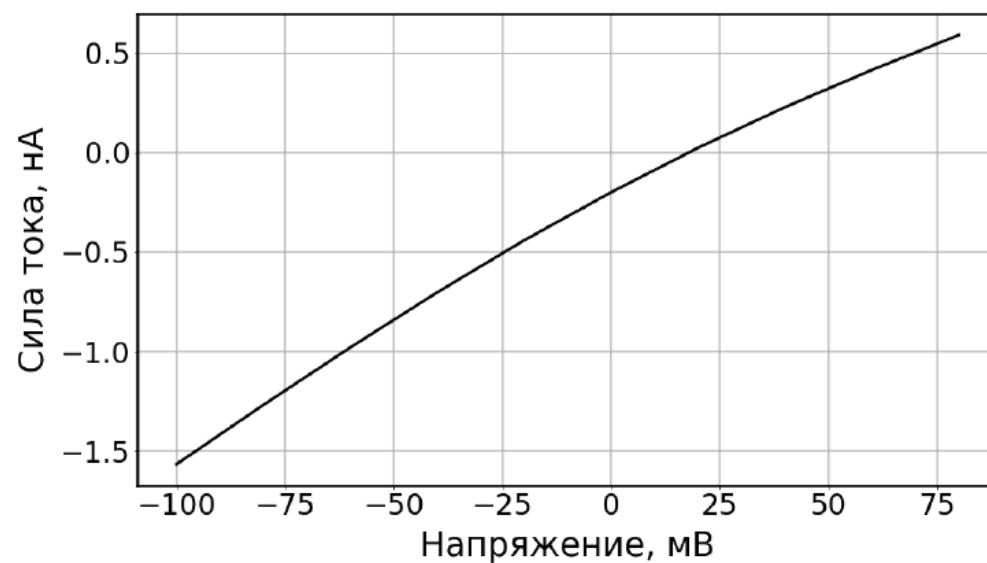
Одной из важнейших характеристик канальных родопсинов является их селективность. Селективность — это способность пропускать ионы только определенного типа. Селективность может быть разной: могут через канал пропускаться только положительные или только отрицательные ионы, или может пропускаться, например, только натрий (или калий, или любой другой ион). Селективность определяется внутренним устройством белка.

Рассмотрим эксперимент с другим канальным родопсином (см. рис. 6, графики, данные в пунктах A-C, не имею к нему отношения).

В этом эксперименте составы растворов следующие:

Омывающий: pH=7.5, $[\text{Na}] = 200$ ммоль/л, $[\text{K}] = 0$ ммоль/л, $[\text{Cl}] = 200$ ммоль/л

Внутриклеточный: pH=7.5, $[\text{Na}] = 100$ ммоль/л, $[\text{K}] = 0$ ммоль/л, $[\text{Cl}] = 100$ ммоль/л

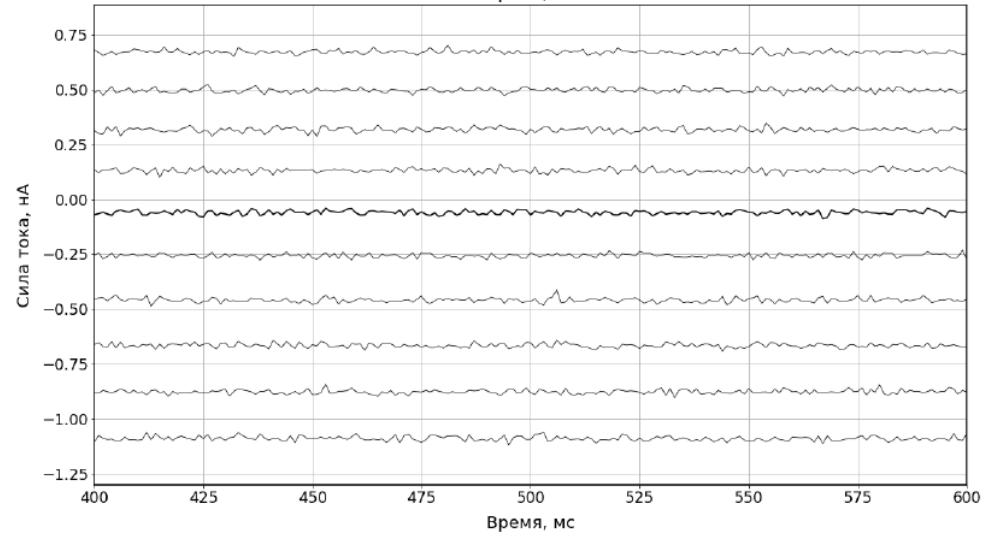
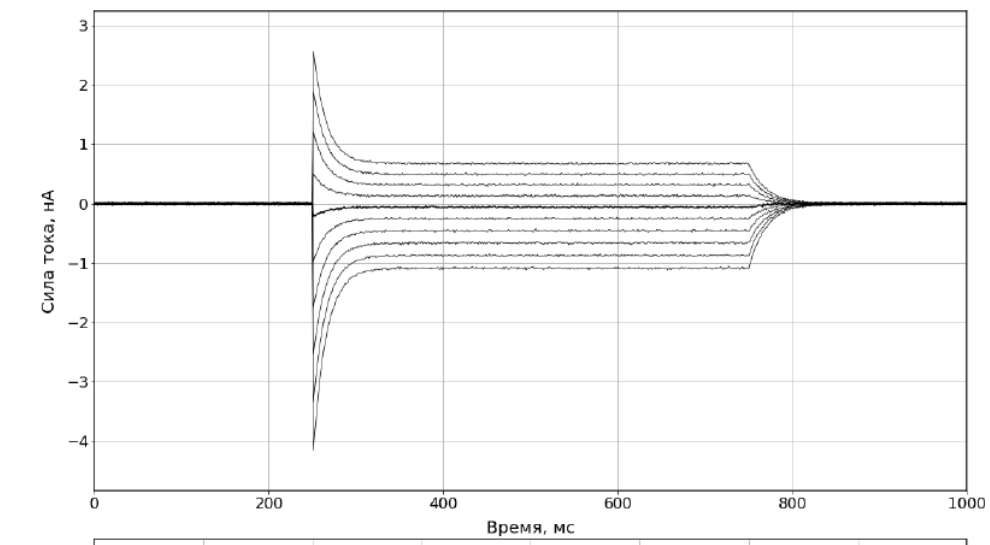


D1 1.00

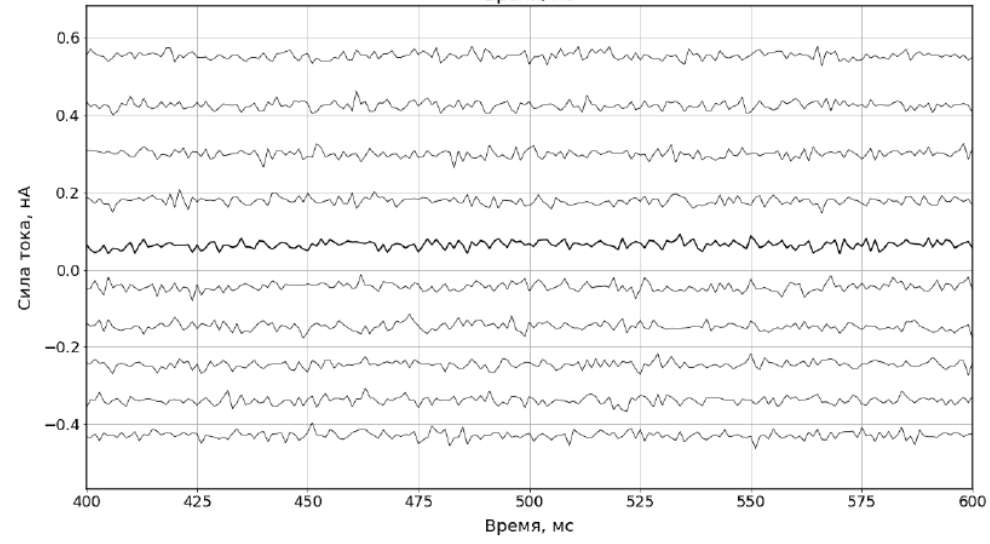
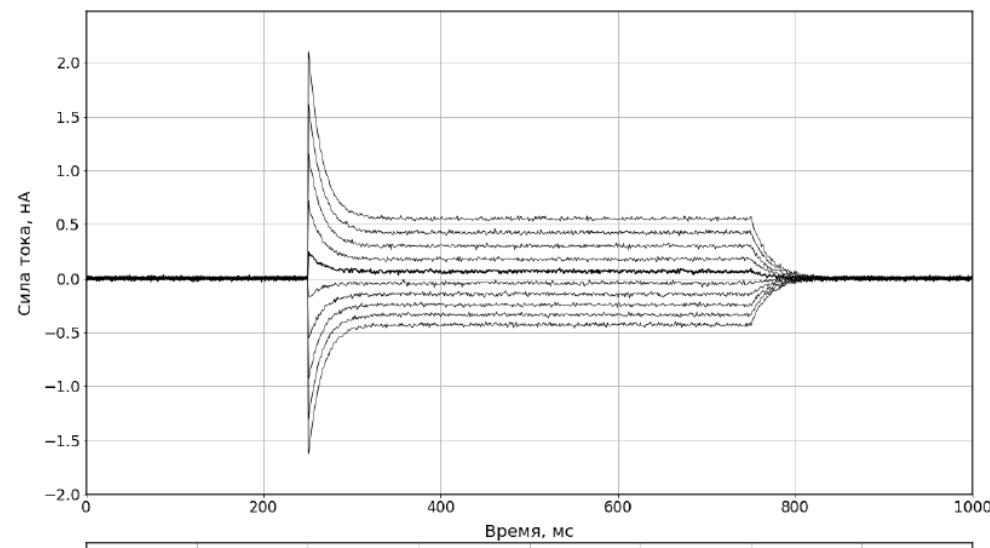
По ВАХ определите положительные или отрицательные ионы пропускает этот канальный родопсин. При помощи схем и рисунков объясните, как вы определили селективность.

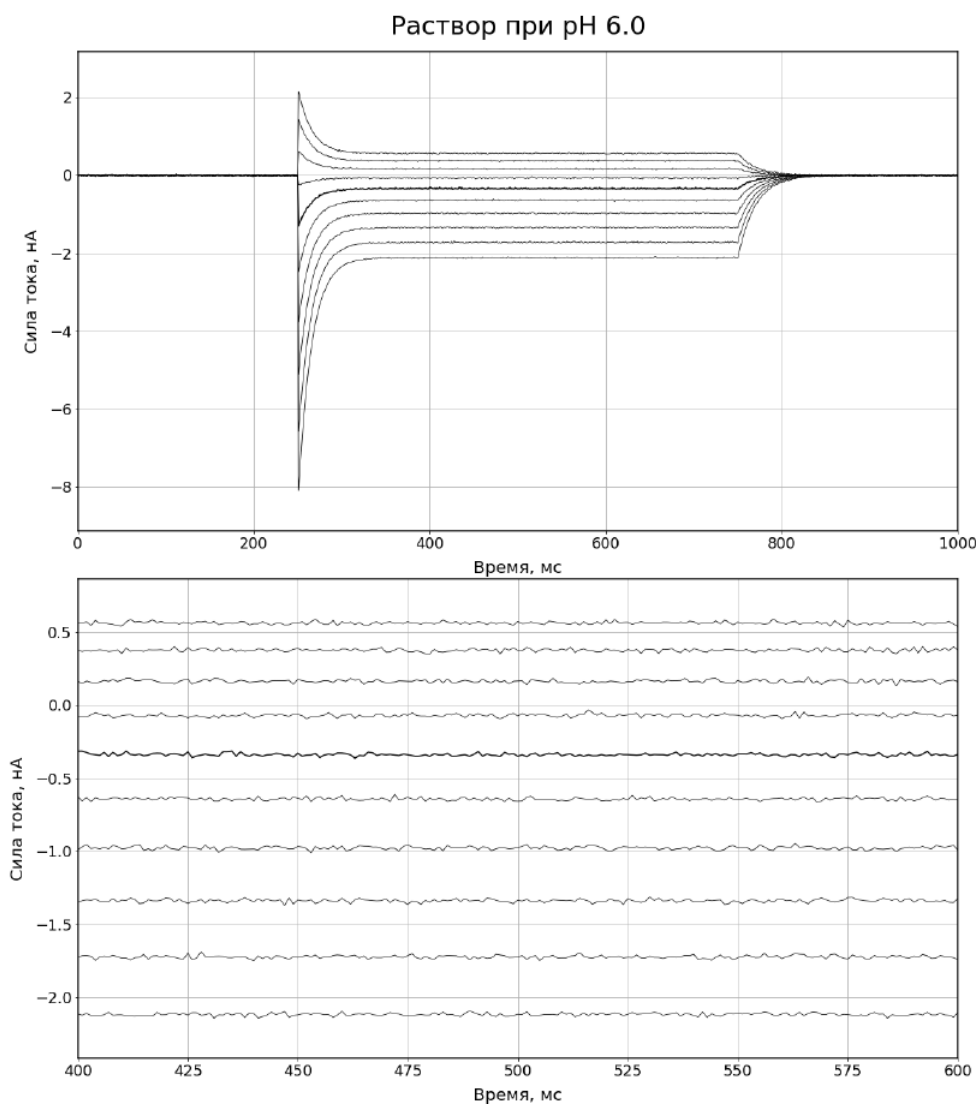
Приложение

Раствор NaCl



Раствор KCl





РЕ ★ Цепи Расчет цепей 2020 Сборы ХУ X XXI век Биофизика

 Website in English

2020 — Мы те, кого должны превзойти.