

X20-PE — Patch-clamp

Введение

Клеточные ионные каналы

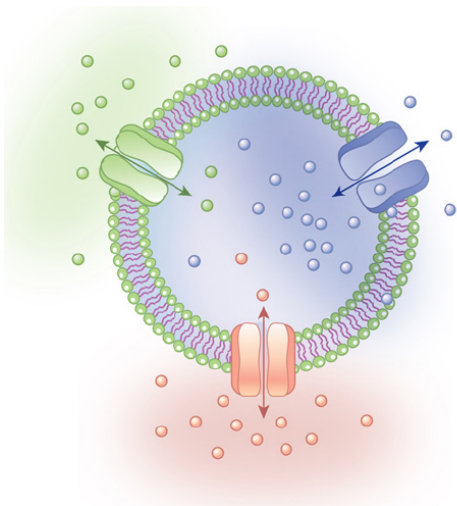


Рис. 1: Рис. 1

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)

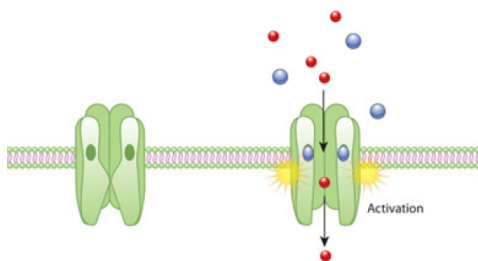


Рис. 2: Рис. 2: Закрытое и открытое состояние канала

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

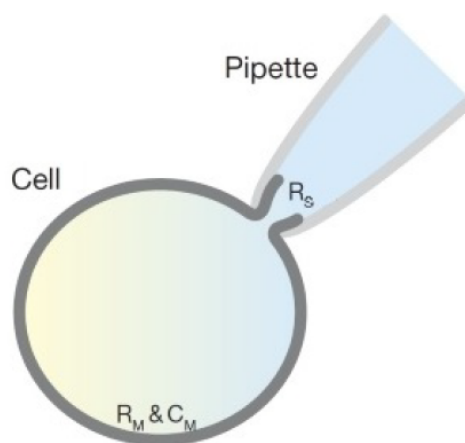


Рис. 3: Whole-cell patch-clamp

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 канальные 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, $T = 24^\circ\text{C}$ - 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 $\frac{P_K}{P_{Na}}$ и $\frac{P_H}{P_{Na}}$.

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 $q_{\max}=q(\lambda_{\max})$.

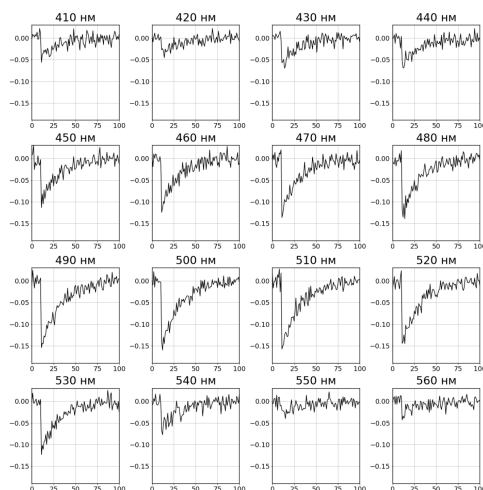


Рис. 4: Рис. 4: Зависимости тока (нА) от времени (мс) при облучении ультракороткими вспышками разной длины волны.

B1^{2.50}

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

Часть С. Параметры фотоцикла

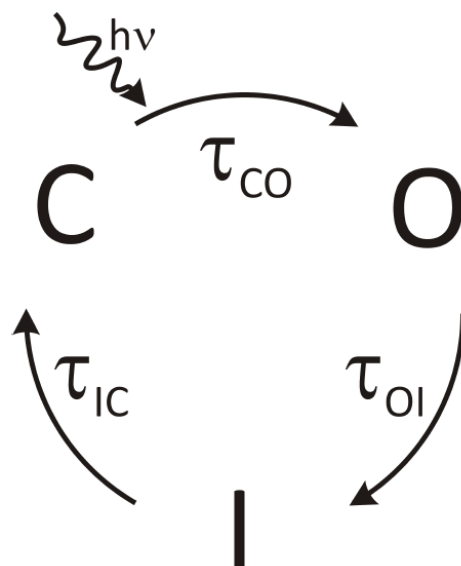


Рис. 5: Фотоцикл канального родопсина

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 А-С, не имеют к нему отношения). В этом эксперименте составы растворов следующие: Омывающий: pH=7.5, [Na] = 200 ммоль/л, [K] = 0 ммоль/л, [Cl] = 200 ммоль/л Внутриклеточный: pH=7.5, [Na] = 100 ммоль/л, [K] = 0 ммоль/л, [Cl] = 100 ммоль/л

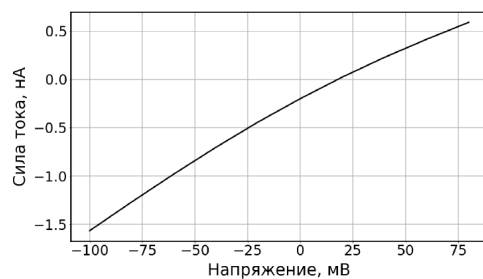


Рис. 6: Рис. 6: ВАХ канального родопсина

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

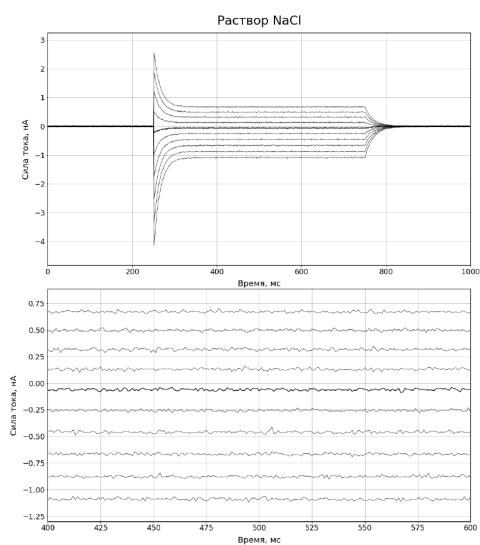


Рис. 7: Условие 1. Снизу вверх напряжение меняется от -100 мВ до 80 мВ с шагом 20 мВ. Линия 0 мВ выделена жирным. Свет включен между 250 мс и 750 мс.

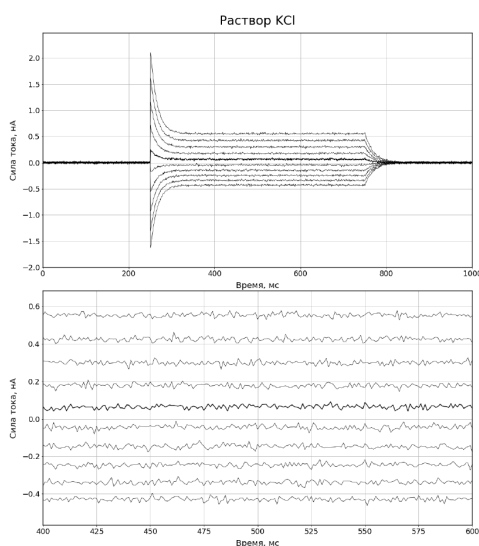


Рис. 8: Условие 2. Снизу вверх напряжение меняется от -100 мВ до 80 мВ с шагом 20 мВ. Линия 0 мВ выделена жирным. Свет включен между 250 мс и 750 мс.

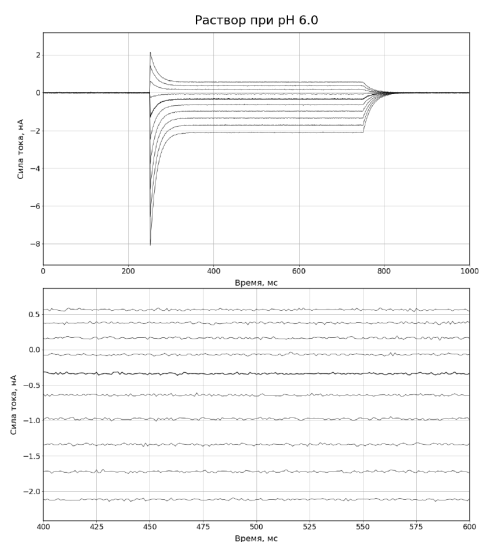


Рис. 9: Условие 3. Снизу вверх напряжение меняется от -100 мВ до 80 мВ с шагом 20 мВ. Линия 0 мВ выделена жирным. Свет включен между 250 мс и 750 мс.