

Ligandem řízene' kaudy

- ACH (nervosvalová' plotěuka, el. orgán)
- glutamat (páteřní' motoneuron)
- glyceru } inhibiční
- GABA }
- dalsi (ATP, serotonin aj.)

Nejdůležitější' případy

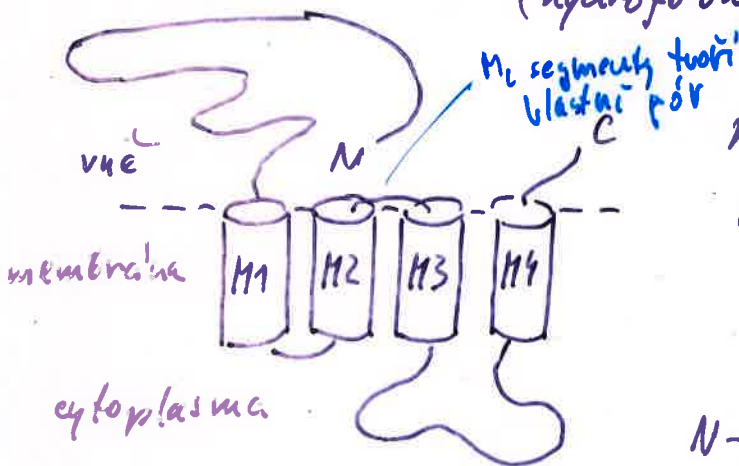
Nikotinový' ACh receptor (nAChR):

- rychlá' synapse v nervosvalové' plotěuce obratlovců' i
- elektrické' orgány (vejček Torpedo, úhoř Electrochorus)
- aktivová'ny nikotínem, bloková'ny jedem kurare

Primární' struktura:

- 4 podjednotky ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ); stechiometrie: ( $2\alpha 2\beta$ )
- vázecné' místo pro ACh na  $\alpha \Rightarrow$  2 vázecná' místa

Podjednotka: 4 transmembránové'  $\alpha$ -spira'ly: M1, M2, M3, M4 (hydrofo'bní)



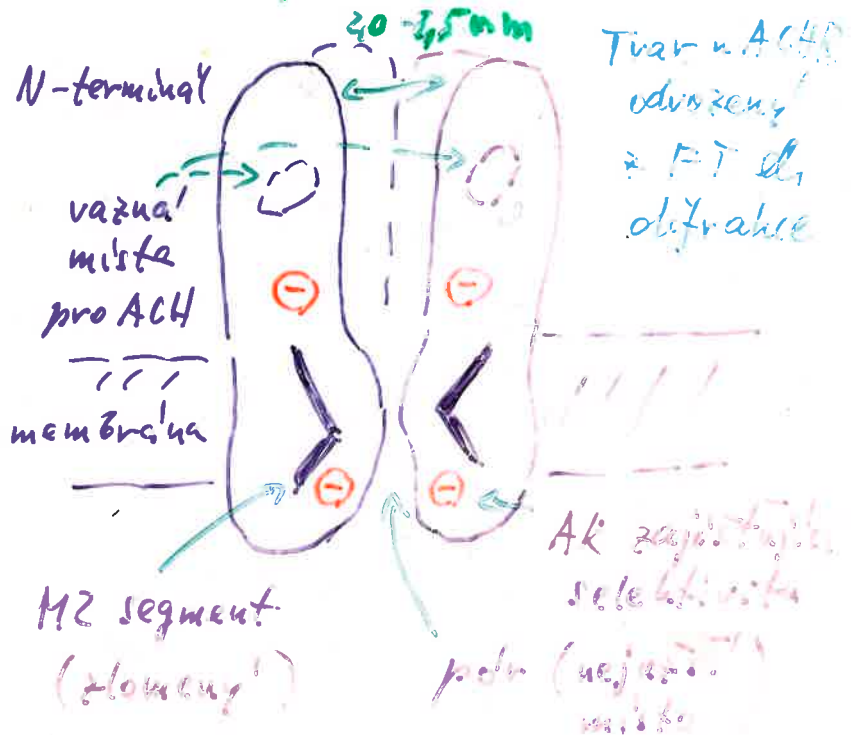
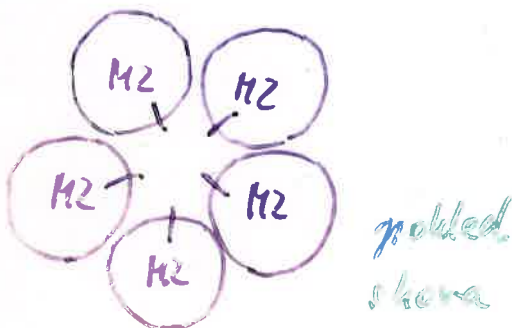
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
počet AK	437	465	489	511
$M_r$ (kDa)	50.1	53.6	57.3	58.1

sekvence AK - podobnost (podobnost...)

Kvartérní' struktura

Model:

přibližně  $C_5$  symetrie



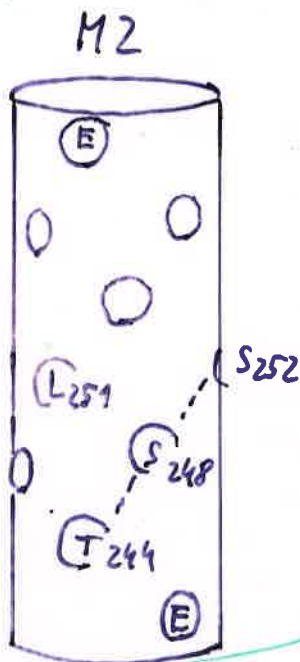
Trvan' AChR odvozený z FT d. difrakce

AK zapo'čítá se selektivita místo

nAChR - otevírací póru a selektivita

- jde o pór naplněný vodou
- selektivní pro kationty ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  a organ. kationty) velmi podobné propustnosti

Hypotéza: nAChR mění tvar (konformaci) při vazbě ACh

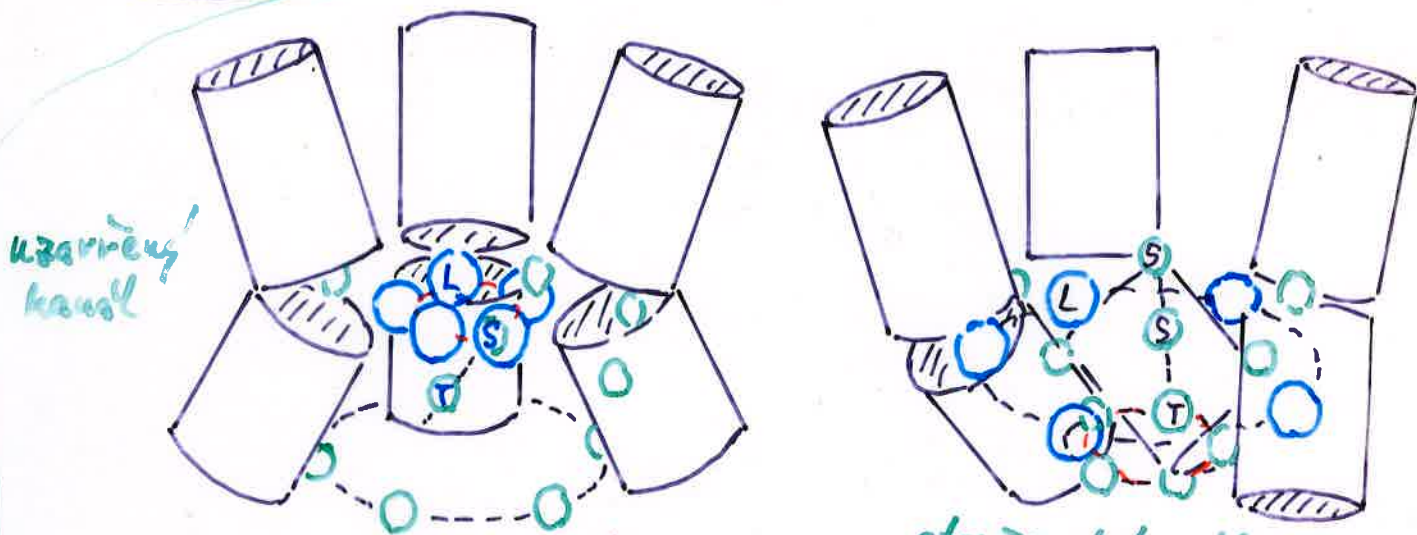


- konzervativní leucín L251 tvoří hydrofobní prstenec v uzavřeném stavu kanálu a brání průchodu iontů

- zlom se při otevření kanálu posune, spodní polovina se vyklácí do směru řečného kose póru; velká rezidua L251 se odtahují z oblasti póru ~~na jejich místo přicházejí menší polární rezidua~~ <sup>nové</sup> - nejužší místo: T244 (S...)

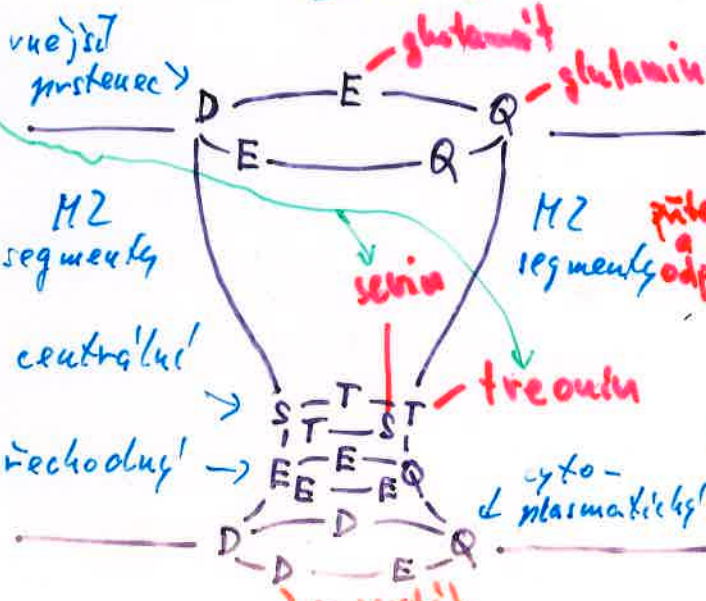
(Unwin 1995, Nature 373)

- u všech podjednotek velmi podobné pořadí ACh



uzavřený kanál

otevřený kanál



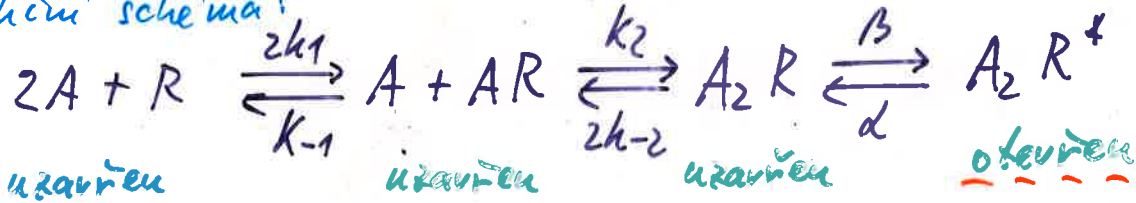
Selektivita náhoda že mění zápornou ACh smítají vodivost

- 3 prstence záporně nabitých ACh:
  - vnější
  - přechodný (intermediát)
  - cytoplasmatický
- centrální prstenec ("hydroxylový") <sup>hvoje volí při otevření kanálu</sup> - jako součást filtra
- neumí být ale polární

Kinetika kanálových změn, fluktuční analýza

Kanál má dva funkční stavy: otevřen a zavřen

Reakční schéma:

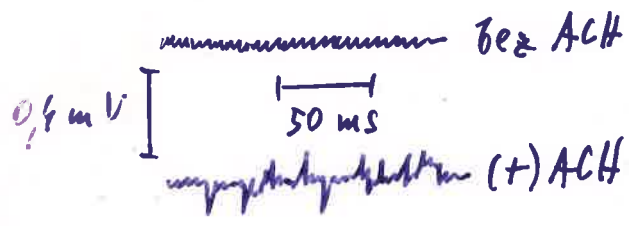


A = ACH  
R = receptor  
→ další stavy

Faktor 2 - jsou dvě možné formy AR (dvě různá vazná místa)

Fluktuční analýza -

- potenciál nervosvalové plotěvky
- šum při změně  $\Psi_M$  obsahuje fluktuace
- použito binomické rozdělení (N - kanálů, r - otevřené, p - pravděp., že daný kanál je otevřený)



střední hodnota  $\langle r \rangle = N \cdot p$

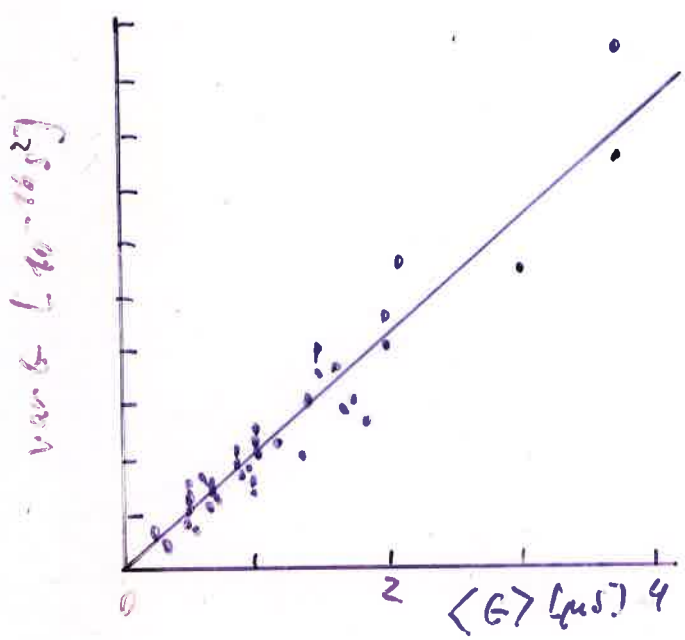
vodivost membrány  $\langle G \rangle = \mu \langle r \rangle = \mu \cdot N \cdot p \Rightarrow \frac{\text{var } G}{\langle G \rangle} = \mu \cdot (1-p)$

variance (rozptyl)  $\text{var}(r) = N \cdot p \cdot (1-p)$

variance vodivosti  $\text{var } G = \mu^2 \cdot N \cdot p \cdot (1-p)$

↑ vlivy z binom. rozdel.

Výsledek (Anderson a Stevens 1973)



- jasná lineární závislost
- použita metoda napětového zámků

Zjednodušení:

pro  $p \rightarrow 0$  (nízká koncentrace ACH) vodivost jednoho kanálu

$$\frac{\text{var } G}{\langle G \rangle} = \mu$$

výsledek  $\mu = 32 \text{ pS}$  (nebo hodnota max. 17-32)

lečtení metodou variace zámků (Anderson a Stevens 1973)

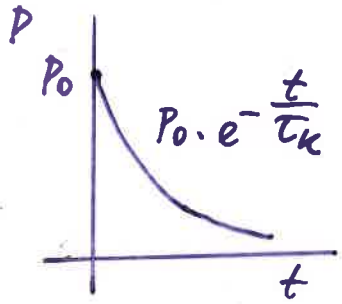
výsledek  $\mu = 30 \text{ pS}$

Flukuační analýza - kinetika - otvření kanálu  $\tau_k$



Předpokládáme, že pravděpodobnost otevření kanálu klesá exponenciálně s časem (tj. kanál se zavírá s touto kinetikou)

$$P(t) = P_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_k}}$$



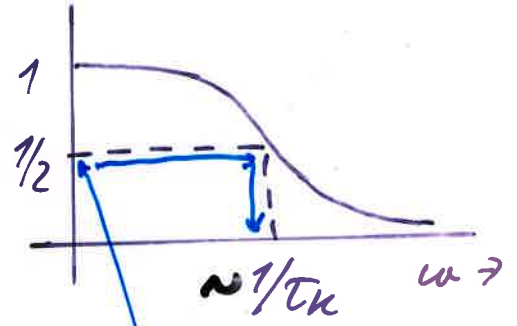
Spektrální průběh odpovídající  $P(t)$  je dán Fourierovou transformací

$$\bar{S}(\omega) = \int_0^{\infty} P_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau_k}} \cdot e^{-i\omega t} dt =$$

$$= P_0 \int_0^{\infty} e^{-(\frac{1}{\tau_k} + i\omega)t} dt = \frac{P_0}{(\frac{1}{\tau_k} + i\omega)} = \frac{P_0 \cdot \tau_k}{(1 + \omega^2 \tau_k^2)} - \frac{i P_0 \omega \tau_k^2}{(1 + \omega^2 \tau_k^2)}$$

Reálná část:

$$S(\omega) = \frac{P_0 \cdot \tau_k}{(1 + \omega^2 \tau_k^2)} \Rightarrow \text{křivka (Lorentzova)}$$

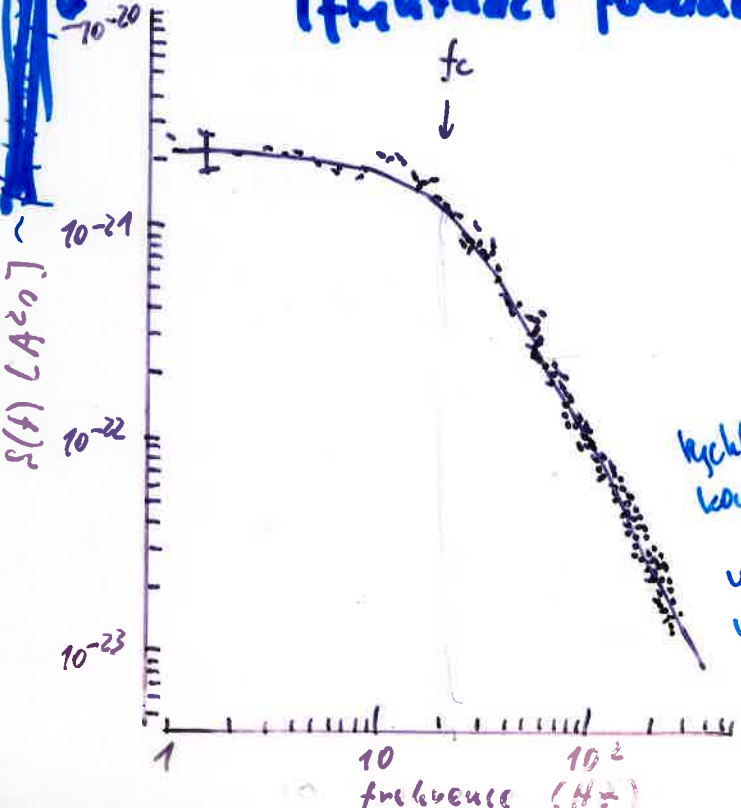


křivka spektrální hustoty (flukuační proud)

z křivky se stanoví bod, kde je hodnota  $S(\omega)$  poloviční

Výsledek

(Anderson a Stevens 1973)



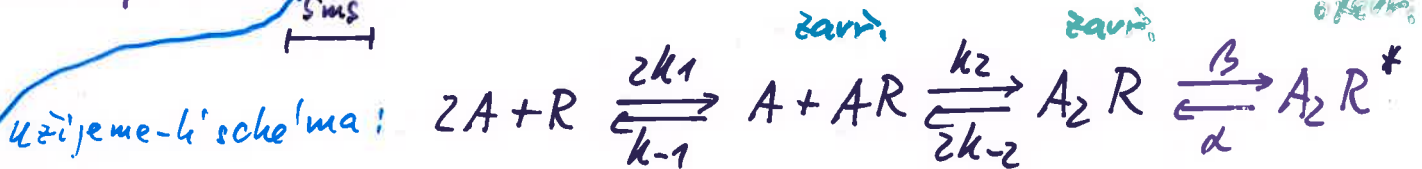
rychlostní konstanta  $\frac{1}{\alpha'} = \tau_k = 7,6 \text{ ms}$   
 viz model volně  $fc = 21 \text{ Hz}$   
 $fc = 2\pi \cdot \alpha' \Rightarrow \alpha' = \frac{fc}{2\pi} = 0,13 \text{ ms}^{-1}$   
 $fc = \omega = 2\pi f = 2\pi \cdot 21$

kinetika - analyza zadržaných z terčíkové elektrody

Pozorování: skupinová otevření (burst) oddělena krátkými závěry (gap)



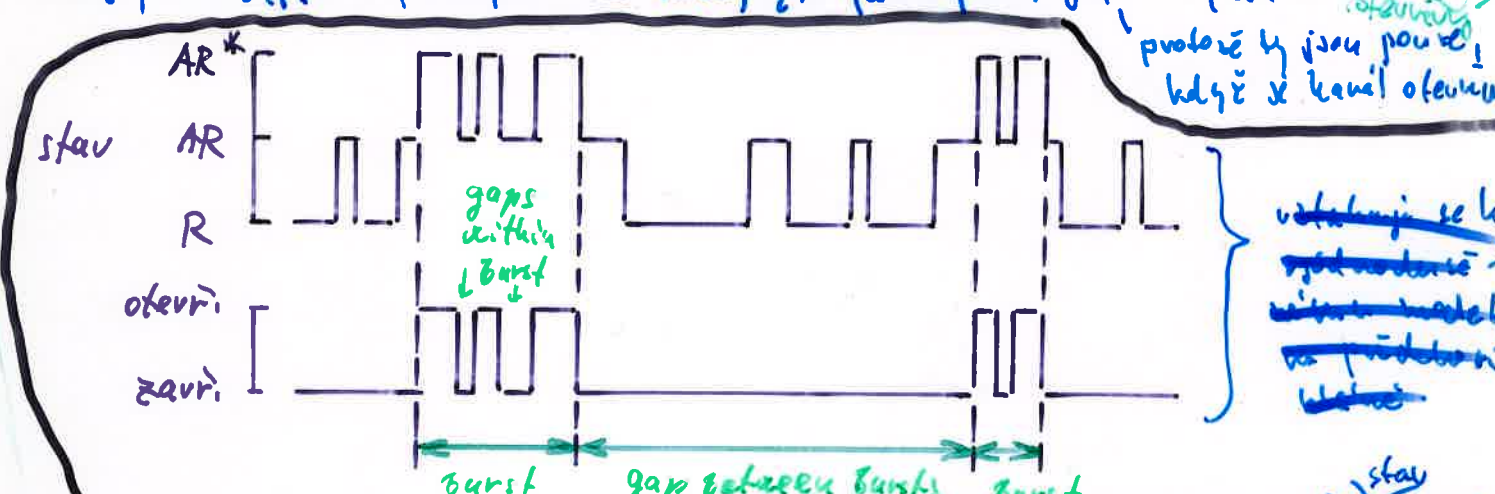
Příklad: proud jedním kanálem (zář, nervosvalová plotěba) - skupinová (burst) otevření oddělena závěry.



Pak: střední doba otevření kanálu  $\sim \frac{1}{\alpha} = \tau_d$  - přechod z  $A_2R^*$  do  $A_2R$  (otevř.)  
 střední doba trvání závěru  $\sim \frac{1}{\beta + 2k-2}$  (ve stavu  $A_2R$ )

relativní úroveň (ve stavu  $A_2R$ )  
 střední počet závěrů (gaps) na skupinu (burst) =  $\frac{\beta}{k-2}$

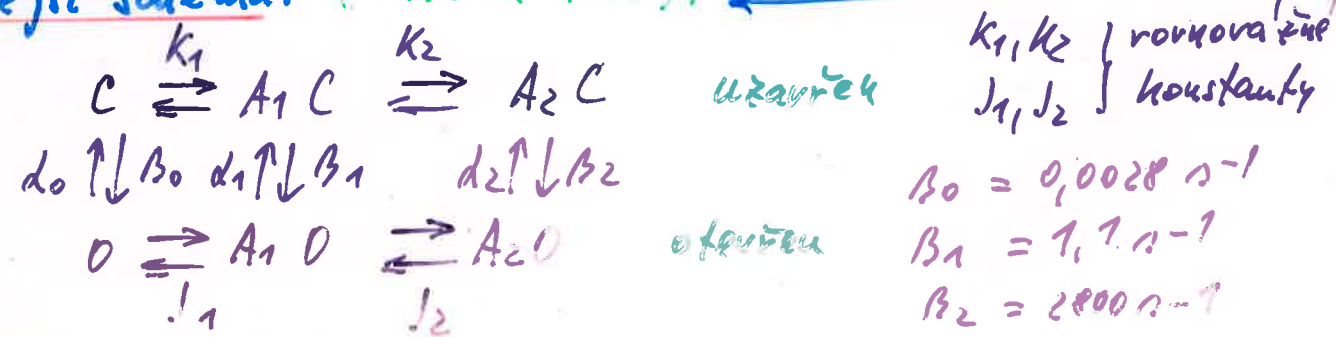
čím je  $\beta > k-2$ , tím ↑ pravděpodobnost tvorby  $A_2R^*$ , ale i počty "gaps" ↓, čili ↑ protože ty jsou pouze když je kanál otevřený



tato "gap" je delší než většina ostatních - odvozi. otevř. na kanálu, když je kanál zobra pouze 1 nebo 0 molekul A<sub>2</sub>R

Výsledky:  $\alpha = 714 s^{-1}$ ;  $\beta = 30600 s^{-1}$ ;  $k-2 = 8150 s^{-1}$   
 $\tau_d = 1,4 ms$ ;  $\frac{1}{\beta + 2k-2} = 20$  (střední doba trvání závěru)

Obecnější schéma (Jackson 1988):

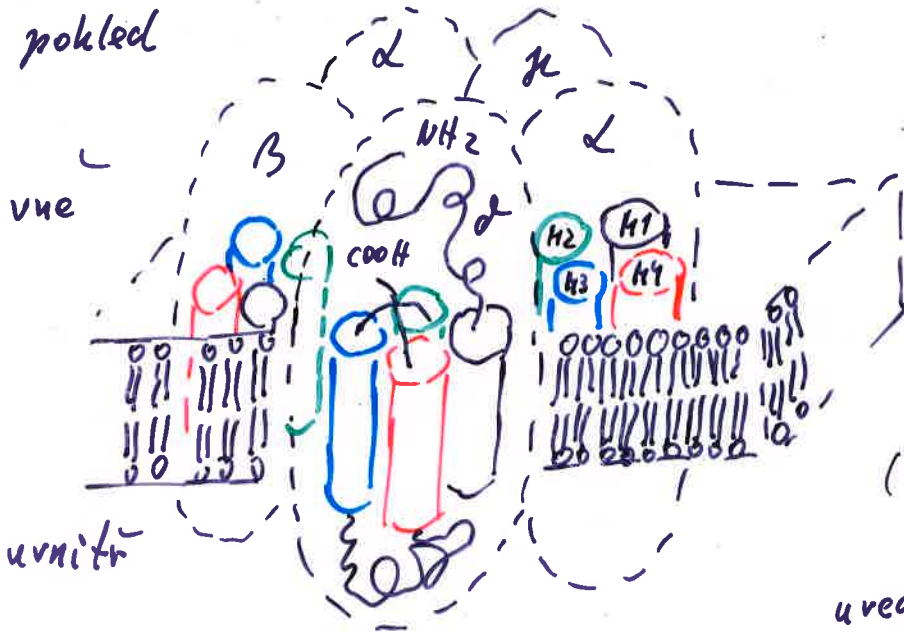


n AChR - shrnutí struktury [Zigmund 199, str. 238-240]

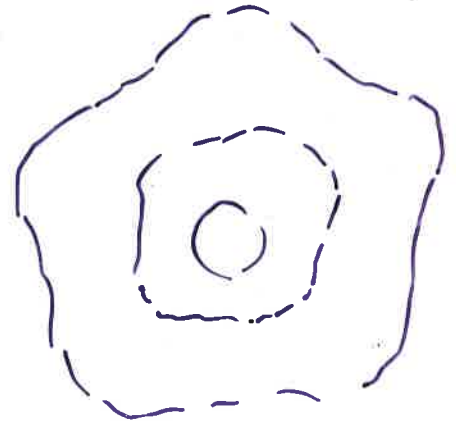
skora "natevka" (funnel)

boční  
pokled

M2 - orientováno k póru



uvnitř

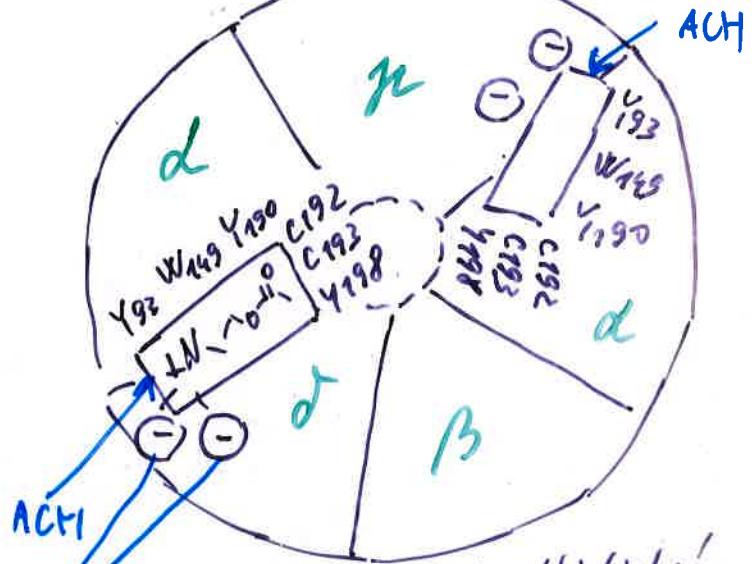
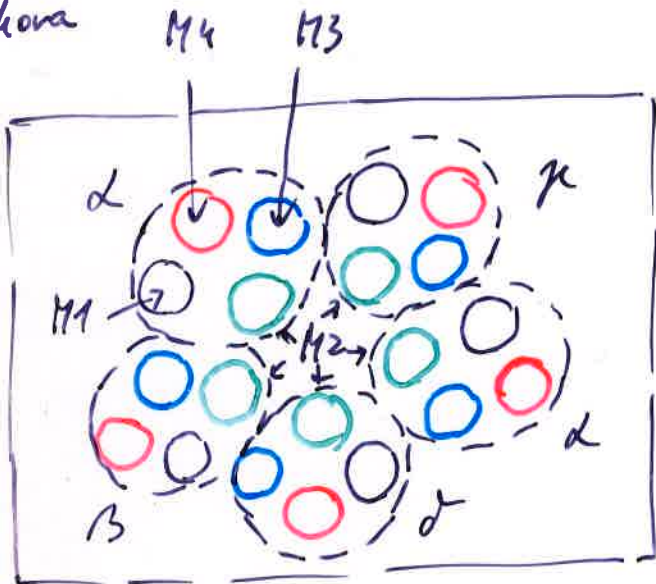


(rekonstrukce - e<sup>-</sup> difrakce)

vazna' místa pro ACh

uvadeny vazne' aminokyseliny

pokled  
skora



cysteiny C192-C193 - disulfidický  
západně nabité At, které jsou v kontaktu s v+4 od ACh  
místech

Velký v membráně vázaný komplex - 5 podjednotek  
každá podjednotka má 4 transmembránové segmenty (M1-M4).  
Segment M2 - vytváří (vystřela - lining) pór  
Vazba ACh → konformační změna → zvětšení  $\phi$  póru.  
Selektivita pro kationty - vhodné pozice negat. nabitéch At  
Jsou dvě vazna' místa pro ACh - na  $\alpha$  podjednotkače,  
vazna' rezidua aminokyselin jsou známa.

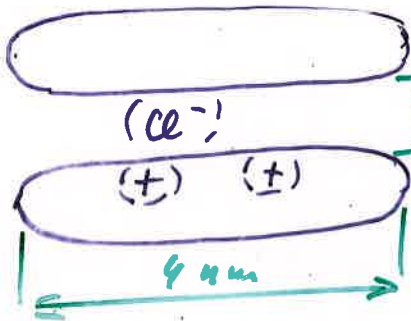
5-hydroxytryptamin = serotonin

### 2) Serotoninový kanál (5HT)

čev. 5HT<sub>3</sub>-receptor = ligandem řízený iont. kanál (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>)  
α-podjednotka - podobná u AChR - asi stechiom. : 2,5

### 3) GABA<sub>A</sub> a glycinové - v CNS - inhibiče (pouští Cl<sup>-</sup>)

- dvě vazná místa pro Cl<sup>-</sup>



5,6-6 Å (φ menší než u AChR)

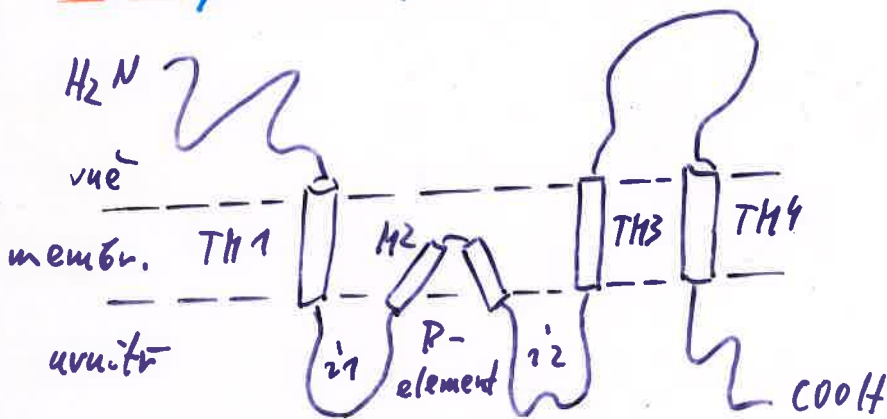
většinou postsynaptická inhibiče / mozek (GABA) / mícha (glycin)

### 4) Glutamatový receptor - excitace v CNS (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>)

rozdělení dle agonistů / AMPA (take quisqualát) / kainát / NMDA (K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>)

jsou dost odlišné od u AChR (jiný genový původ)

### Soudobý model podjednotky glutamátového receptoru (Hayes 1990)



- M2 tvoří zámek a je podobný H5 (P) smyčce v napětově řízených K<sup>+</sup> kanálcích

Mg<sup>2+</sup> - blokuje kanál / uzavírá / (viz další káňal)

4 nebo 5 podjednotek tvoří kanál;

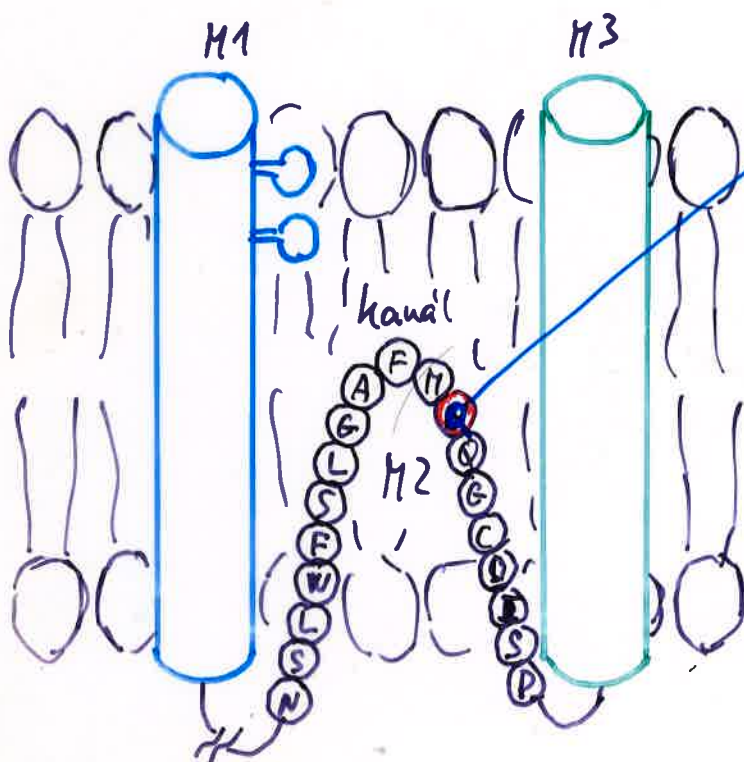
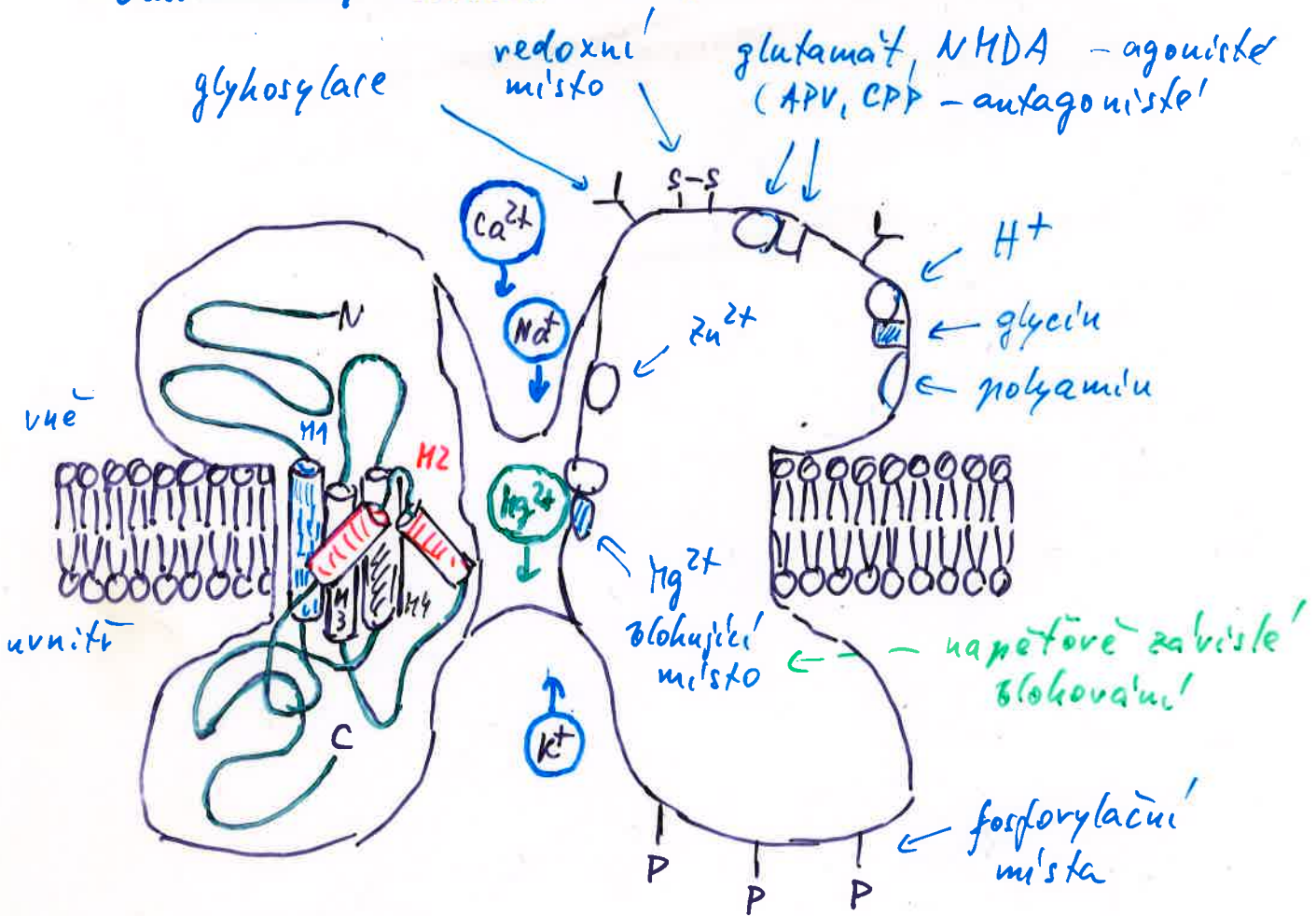
### 5) P<sub>2x</sub> ATP receptorní kanál - hlavně hladké svaly (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>)

(parinergní transmisí: ATP = NT) P<sub>2</sub>-purinoreceptorů, obecně P<sub>2x</sub>-kanály

podjednotka: 399 AA; 2 transmembránové segmenty a velká vnější smyčka / pozn: molekula purinu je speciální molekula ATP

pozn: ustolík podjednotek tvoří por

# Glutamatový NMDA-receptor (iono krompi)



toto Q (glutaminu) u non-NMDA zamenene u NMDA za asparagin (N) interaguje s  $Mg^{2+}$  a spôsobuje napetove zaviste blokovani kanaly