

Neurofyzilogie smyslů

Neurofyzologie

Na NS je postavena naše osobní identita.
Prožívání, vědomí a paměť jsou na NS vázány.
Včetně jejich poruch.

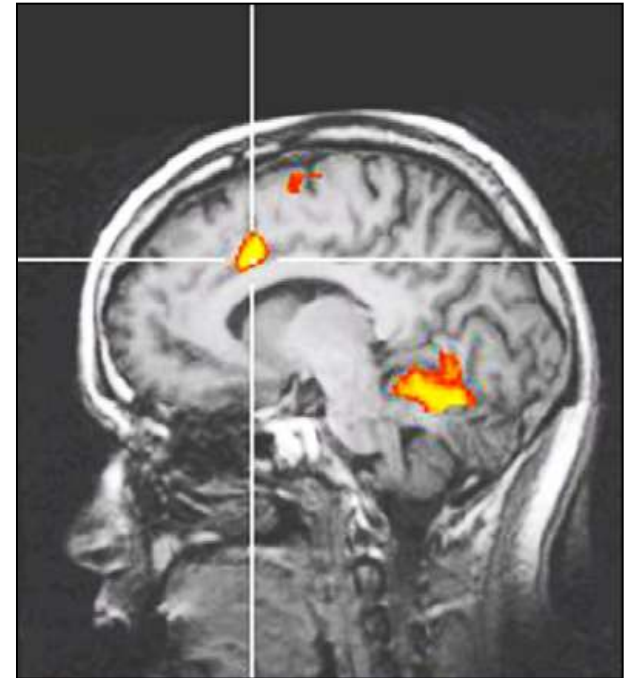
Nejsložitější biologická soustava s
mimořádným postavením mezi ostatními.

Bouřlivý rozvoj:

Molekulární neurovědy

Neurofarmakologie

Zobrazovací metody



Přednostně řešené problémy:

Paměť

Závislosti

Deprese

Neurodegenerativní poruchy

Lokalizace mozkových funkcí

Vědomí, kognice

Pracoviště :

Brno: CEITEC

<https://www.ceitec.cz/vyzkum-mozku-a-lidske-mysli/rp8>

Doktorské studium Neurovědy

<http://www.med.muni.cz/index.php?id=599>

Nobel prices related to neuroscience

1904 Ivan Petrovich Pavlov (Russia) "in recognition of his work on the physiology of digestion, through which knowledge on vital aspects of the subject has been transformed and enlarged"

1906 Camillo Golgi (Italy) and Santiago Ramón y Cajal (Spain) "in recognition of their work on the structure of the nervous system"

1914 Robert Bárány (Vienna) "for his work on the physiology and pathology of the vestibular apparatus"

1932 Sir Charles Scott Sherrington (Great Britain) and Edgar Douglas Adrian (Great Britain) "for their discoveries regarding the functions of neurons"

- 1936 Sir Henry Hallett Dale (Great Britain) and Otto Loewi (Great Britain) "for their discoveries relating to chemical transmission of nerve impulses"
- 1944 Joseph Erlanger (USA) Herbert Spencer Gasser (USA) "for their discoveries relating to the highly differentiated functions of single nerve fibres"
- 1949 Walter Rudolf Hess "for his discovery of the functional organization of the interbrain as a coordinator of the activities of the internal organs"
- 1949 Antonio Caetano de Abreu Freire Egas Moniz "for his discovery of the therapeutic value of leucotomy in certain psychoses"
- 1952 Physics: Felix Bloch (USA) and Edward Mills Purcell (USA) "for their development of new methods for nuclear magnetic precision measurements and discoveries in connection therewith"
- 1961 Georg von Békésy (USA/Hungary)"for his discoveries of the physical mechanism of stimulation within the cochlea"

- 1963 Sir John Carew Eccles (Australia), Alan Lloyd Hodgkin and Andrew Fielding Huxley (Great Britain) "for their discoveries concerning the ionic mechanisms involved in excitation and inhibition in the peripheral and central portions of the nerve cell membrane"
- 1967 Ragnar Granit (Sweden/Finland), Haldan Keffer Hartline (USA) and George Wald (USA) "for their discoveries concerning the primary physiological and chemical visual processes in the eye"
- 1970 Sir Bernard Katz (Great Britain), Ulf von Euler (Sweden) and Julius Axelrod (USA) "for their discoveries concerning the humoral transmitters in the nerve terminals and the mechanism for their storage, release and inactivation"

1973 Karl von Frisch (Germany), Konrad Lorenz (Austria) and Nikolaas Tinbergen (Great Britain) "for their discoveries concerning organization and elicitation of individual and social behaviour patterns"

1977 Roger Guillemin and Andrew Schally for their discoveries concerning "the peptide hormone production of the brain"

1979 Allan M Cormack and Godfrey Newbold Hounsfield for the "development of computer assisted tomography,,

1981 Roger W. Sperry, for his discoveries concerning "the functional specialization of the cerebral hemispheres"

1981 David H. Hubel and Torsten N. Wiesel, for their discoveries concerning "visual system".

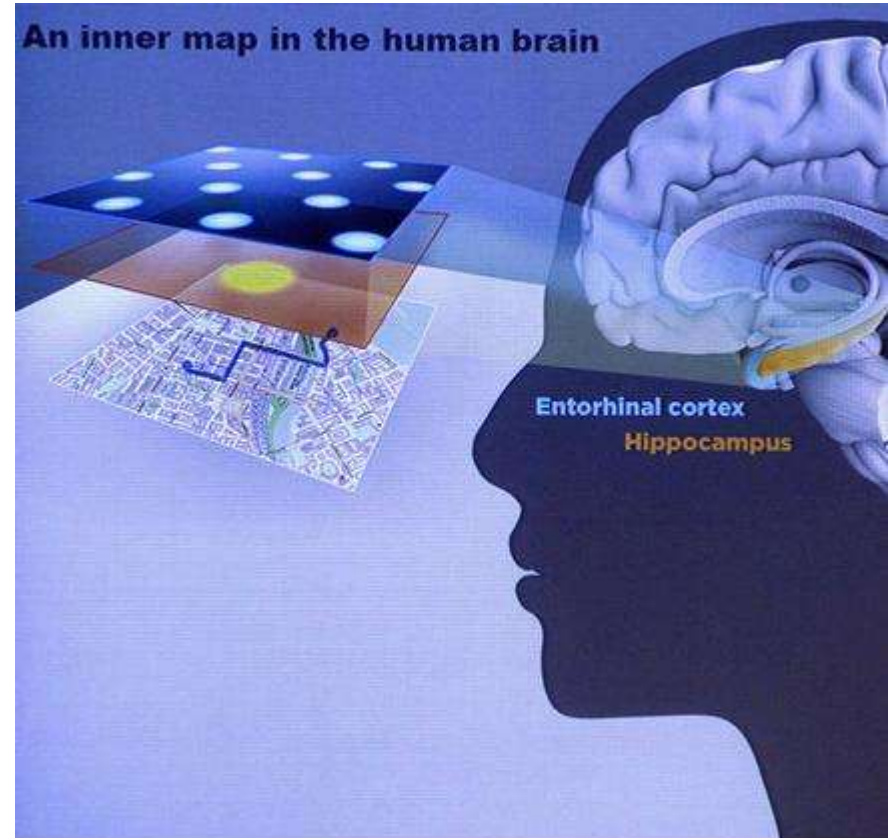
1991 Erwin Neher (Germany) Bert Sakmann (Germany) "for their discoveries concerning the function of single ion channels in cells"

1994 [Alfred G. Gilman \(USA\)](#) [Martin Rodbell \(USA\)](#) "for their discovery of G-proteins and the role of these proteins in signal transduction in cells"

- 1997 Jens C. Skou (Denmark) "for the first discovery of an ion-transporting enzyme, Na⁺, K⁺-ATPase"
- 2000 Arvid Carlsson, Paul Greengard and Eric Kandel for their discoveries concerning "signal transduction in the nervous system"
- 2003 Paul C. Lauterbur Sir Peter Mansfield for their discoveries concerning magnetic resonance imaging
- 2004 Richard Axel, Linda Buck for their discoveries of odorant receptors and the organization of the olfactory system
- 2013 James E. Rothman, Randy W. Schekman and Thomas C. Südhof "for their discoveries of machinery regulating vesicle traffic, a major transport system in our cells".

2014 John O'Keefe, May-Britt Moser, Edvard I. Moser. „For their discoveries of cells that constitute a positioning system in the brain".

2017 Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash and Michael W. Young "for their discoveries of molecular mechanisms controlling the circadian rhythm".



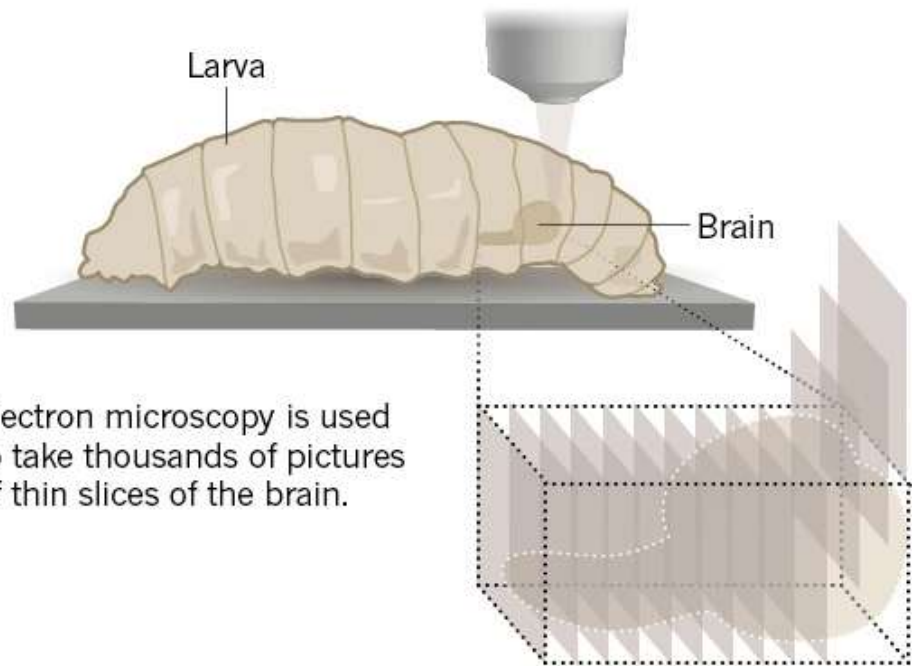
Neurofyzologie

Studium nervových a doprovodných buněk, způsobu jak jsou sestaveny do funkčních celků, které vedou, zpracovávají, ukládají informaci a zprostředkují chování.

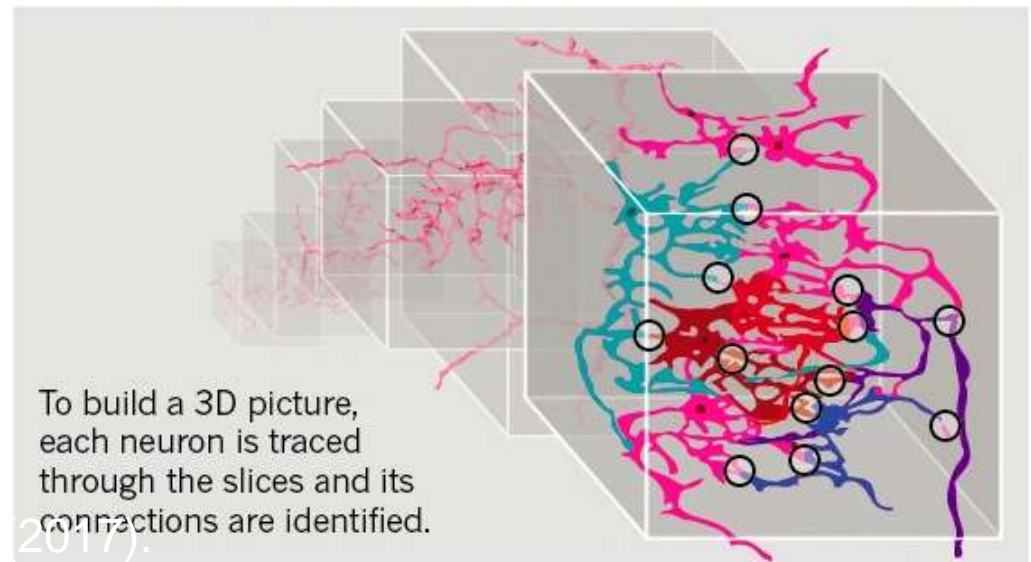
Jak to může
vypadat v praxi:

Kombinace 3D
schématu
neuronové sítě a

To find out how the brain creates behaviour, researchers follow a multistep process, combining a neural wiring diagram with data on behaviour. Working with the simple brains of fruit-fly larvae makes the process manageable.



Electron microscopy is used to take thousands of pictures of thin slices of the brain.



To build a 3D picture, each neuron is traced through the slices and its connections are identified.

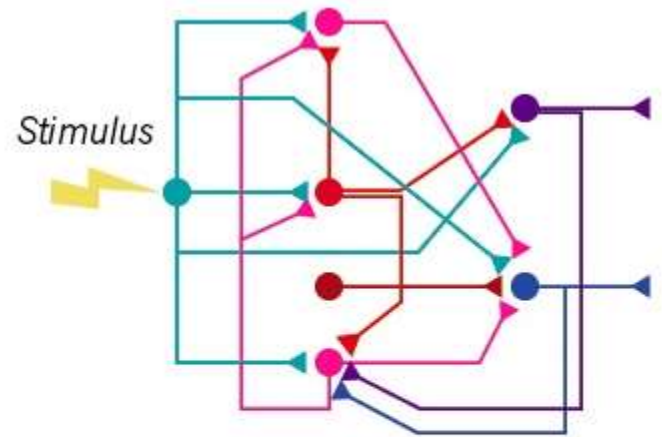
2017).

Jak to může
vypadat v praxi:

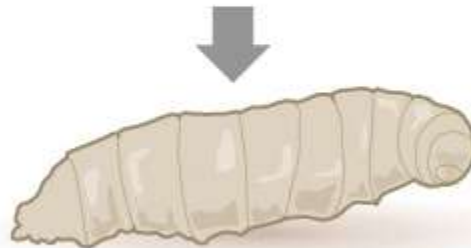
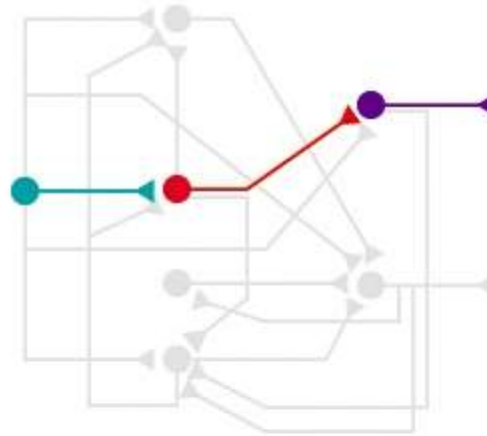
světlem
aktivovaných
neuronů.

Výsledkem je
určitý pohyb a
chování.

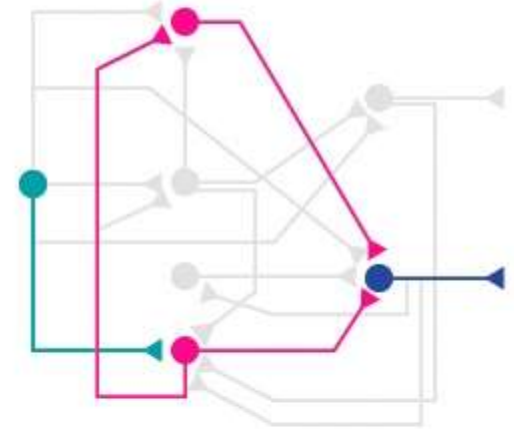
One neuron in a
circuit is activated
with a pulse of light.
A signal passes
through the network
and the resulting
behaviour is studied.



Behaviour 1: Turn head



Behaviour 2: Retract head



©nature

Smyslová neurofyziologie

Proč studovat smysly:

Vrátka do vědomí, kontakt s vnějším světem.

Určují chování.

Používají obecné molekulární principy signalizace.



Upozornění na:

- to, co se děje na membránách smyslových buněk a jak smyslové podněty zasahují do metabolismu buněk.
- Paralely se známými signálními drahami diferenciace, imunity, apoptózy...
- Společně využívané „vyzkoušené“ recepční a signální děje smyslů a buněčné komunikace

Proč smysly:

Schopnost organismů rozpoznávat i nepatrné změny vnějšího prostředí a reagovat na ně v případě ohrožení je jednou z nejdůležitějších podmínek zachování života.

Selekční tlak byl natolik silný, že schopnosti receptorů jsou často na samé hranici fyzikálních možností. Jednotlivé fotony, jednotlivé molekuly, pohyby nanometrových amplitud, nesmírně slabé elektromagnetické pole fascinují fyziology.

Výzkum molekulární podstaty transdukčních mechanismů chemických signálů, mechanických podnětů, ale i např. infračervené detekce, elektrických polí nebo magnetického pole jsou výzvami fyziologii s velkým potenciálem pro aplikace.

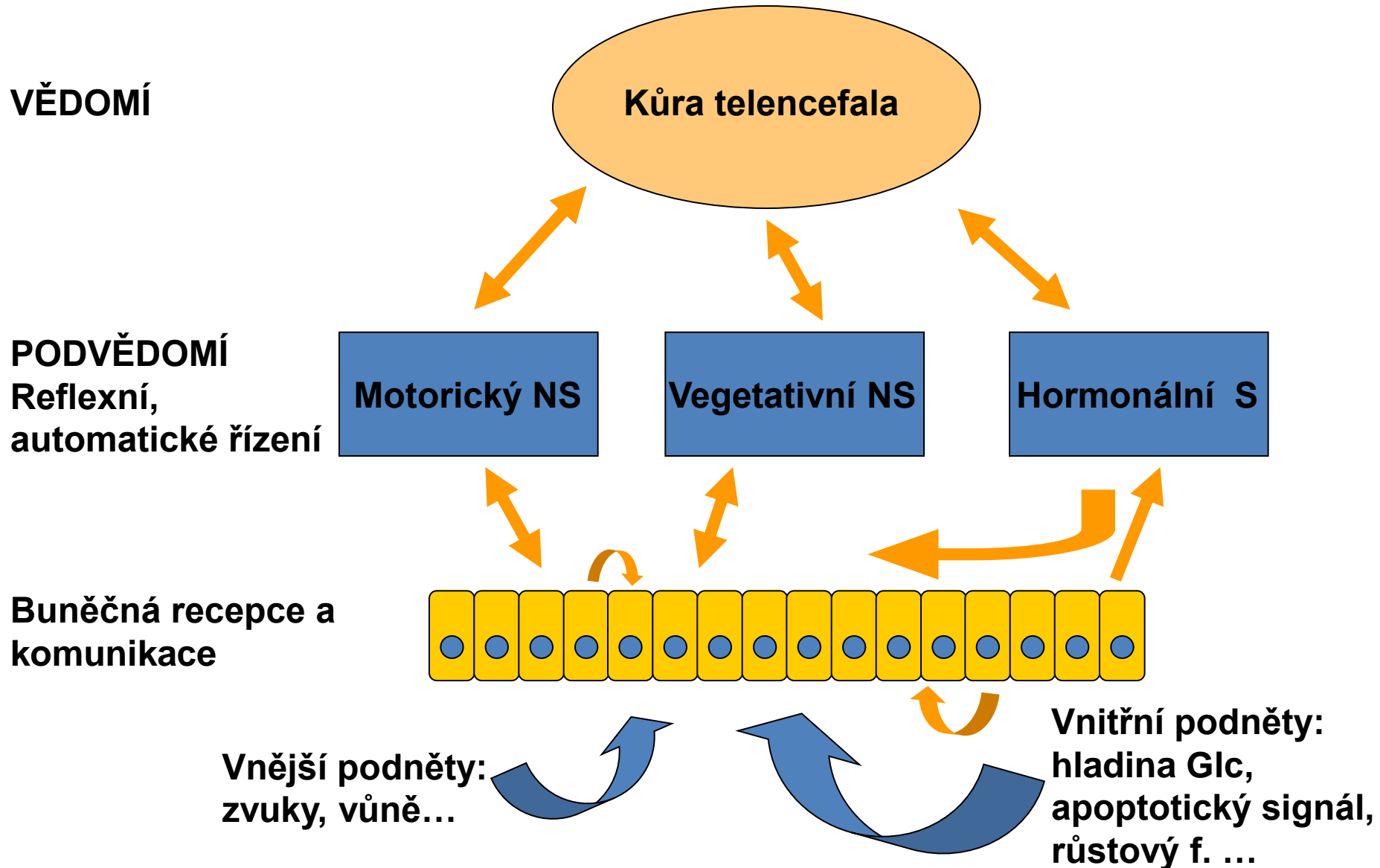
Vstup do NS, potřeba rychlé motorická reakce, kontakt s vědomím.

Kontakt se světem



Předpoklad: některé buňky dokážou reagovat na různé formy energie (chemické, mechanické, elektromagnetické). Metabolická reakce se pak zobrazí jako změna elektrického membránového napětí.

Smyslový a ne-smyslový signál?



Smyslový a ne-smyslový signál?

VĚDOMÍ

Kůra telencefala

PODVĚDOMÍ
Reflexní,
automatické řízení

Motorický NS

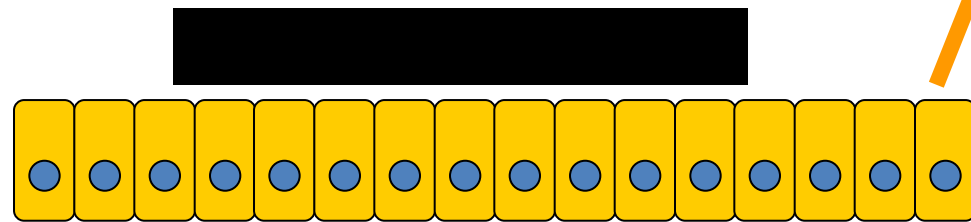
Vegetativní NS

Hormonální S

Buněčná recepce a
komunikace

Vnější podněty:
zvuky, vůně...

Vnitřní podněty:
hladina Glc,
apoptotický signál,
tah v membráně...



Smysly jsou propojené s kůrou, mechanismy ale stejné

VĚDOMÍ

Kůra telencefala

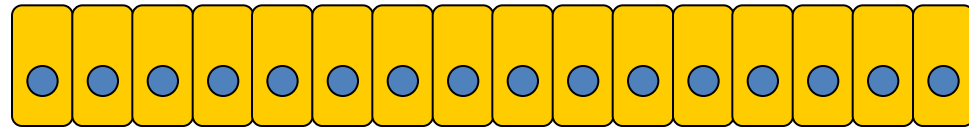
PODVĚDOMÍ
Reflexní,
automatické řízení

Motorický NS

Vegetativní NS

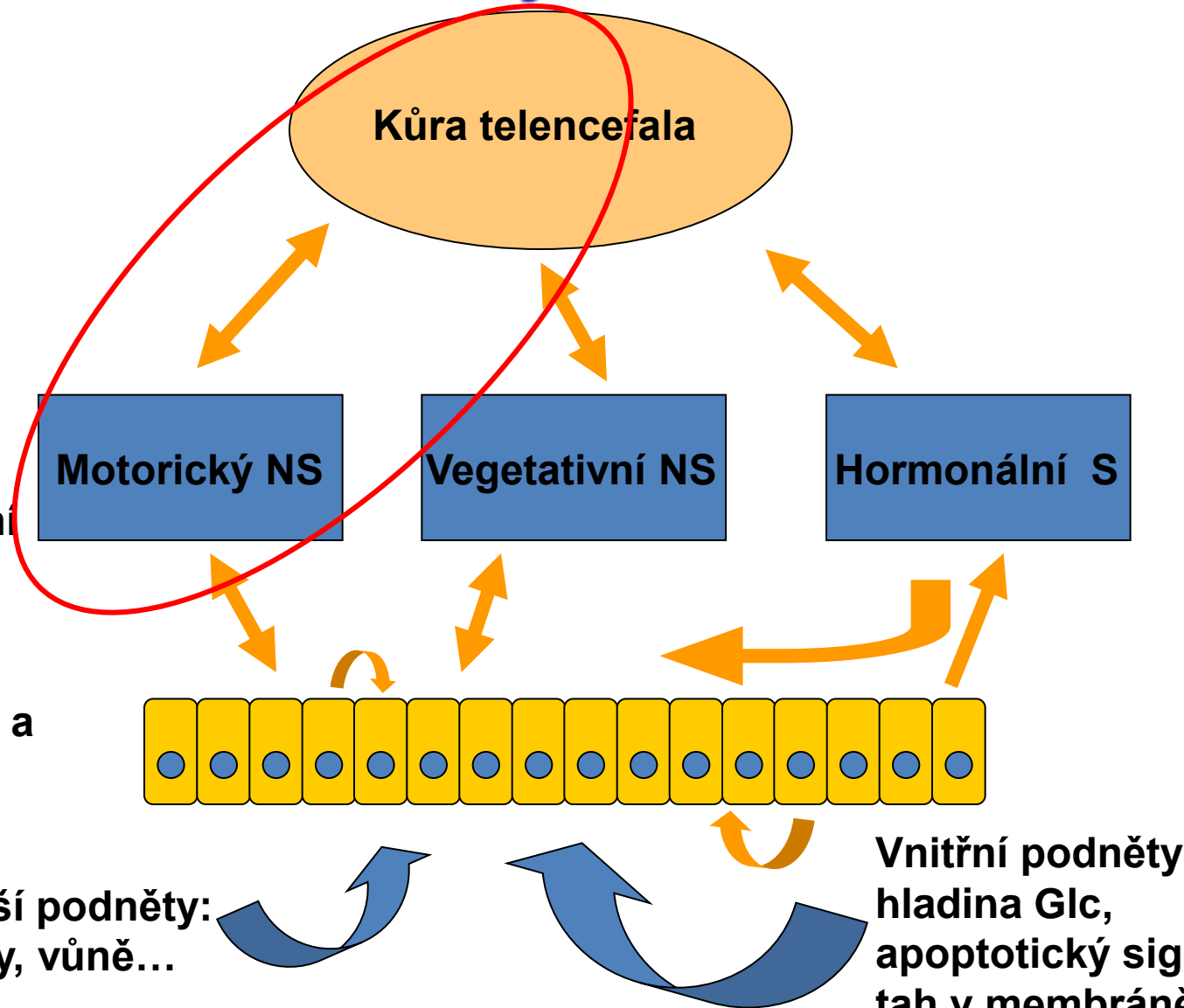
Hormonální S

Buněčná recepce a
komunikace



Vnější podněty:
zvuky, vůně...

Vnitřní podněty:
hladina Glc,
apoptotický signál,
tah v membráně...



Kapitoly z neurofyzologie smyslů – výběr kapitol

Fyziologie membrán:

- klidový potenciál
- akční potenciál
- iontové kanály
- šíření signálů a synapse

Fyziologie smyslů:

- obecné principy
- čich a chuť
- hmat a sluch
- zrak a další smysly

Psychofyzologie:

- zpracování zrakové informace
- učení a paměť

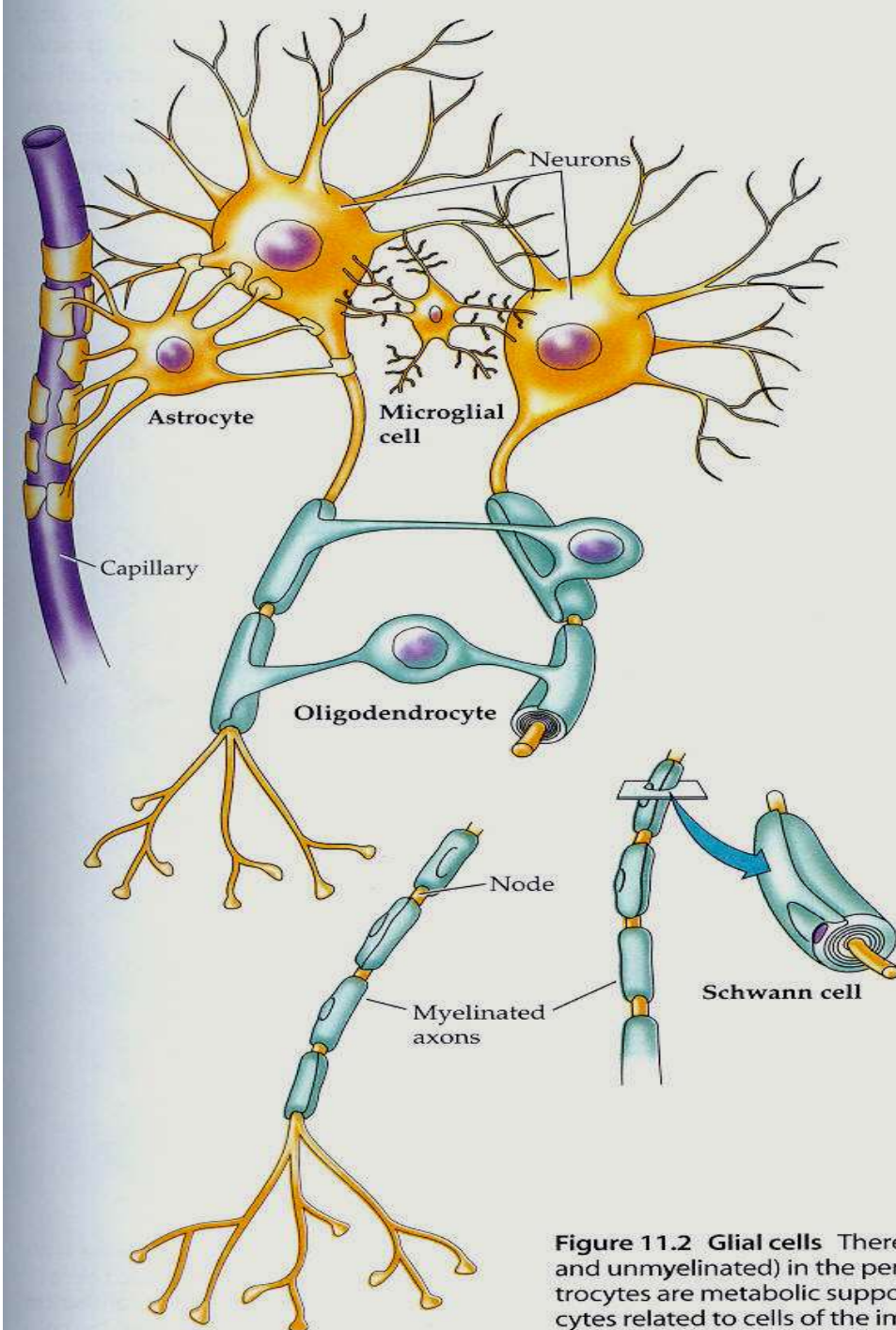


Figure 11.2 Glial cells There are (myelinated and unmyelinated) in the peripheral nervous system. Astrocytes are metabolic support cells related to cells of the immune system.

Internet a něco z jeho neomezené nabídky:

<http://www.physpharm.fmd.uwo.ca/undergrad/medsweb/>

<http://entochem.tamu.edu/index.html>

<http://web.neurobio.arizona.edu/gronenberg/nrsc581/index.html>

<http://www.biol.sc.edu/~vogt/courses/neuro/neurobehavior.html>

<http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/bionb424/links.htm>

<http://nelson.beckman.uiuc.edu/courses/neuroethol/>

<http://www.blackwellpublishing.com/matthews/default.html>

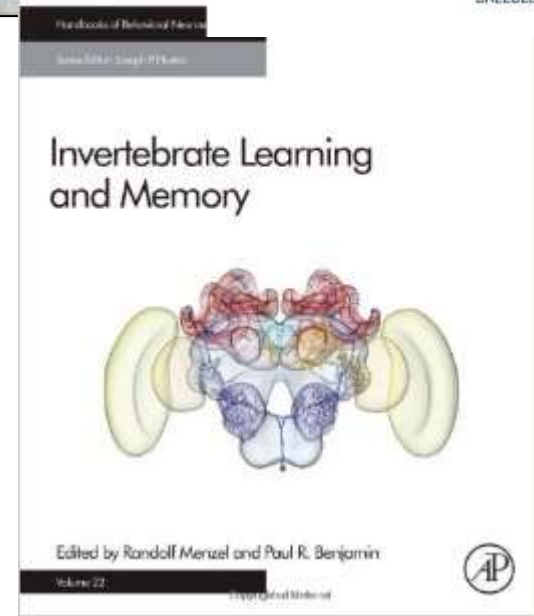
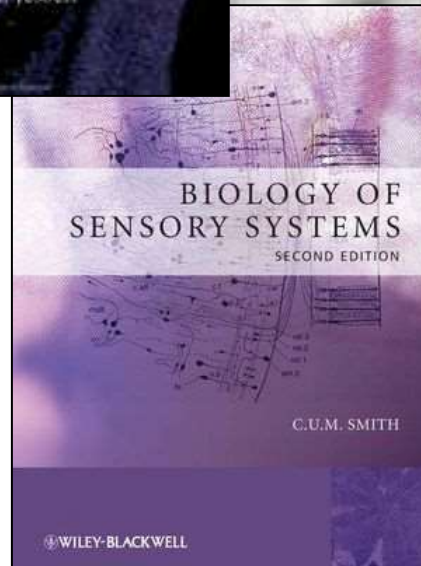
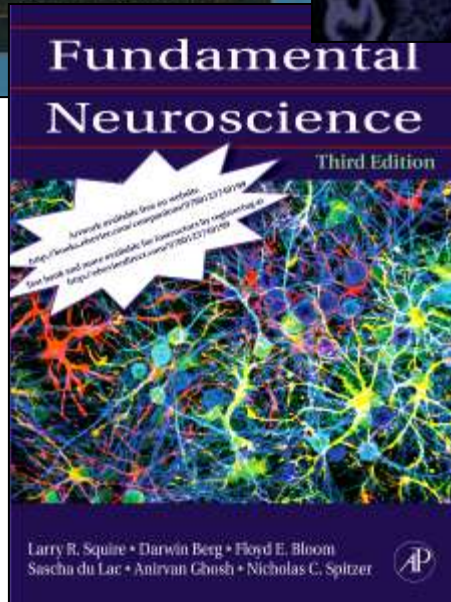
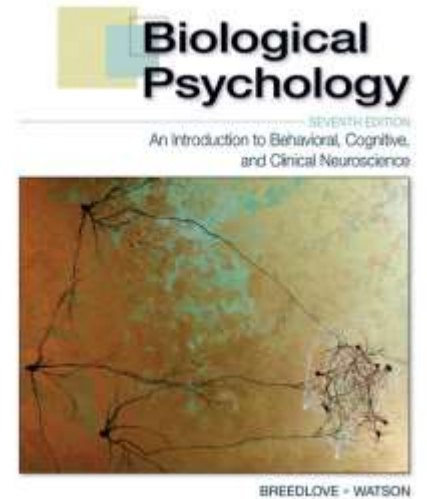
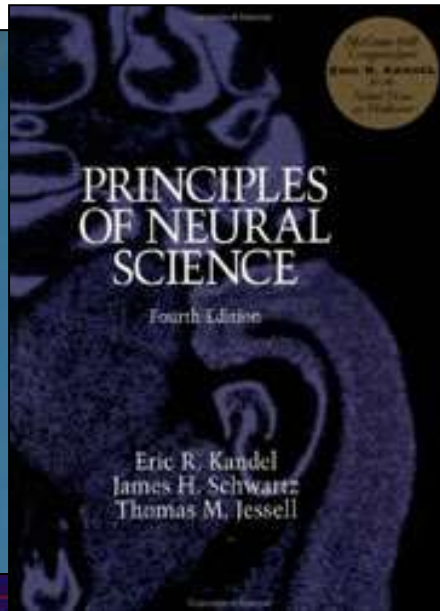
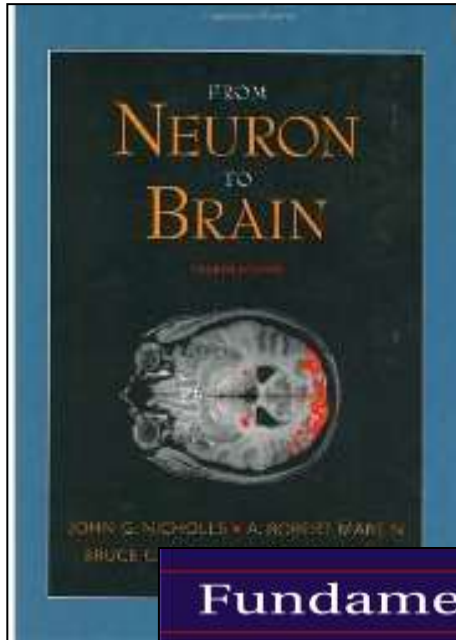
<http://www.hhmi.org/biointeractive/vlabs/neurophysiology/index.html>

<http://www.hhmi.org/biointeractive/click/index.html>

<http://www.sumanasinc.com/webcontent/animations/neurobiology.html>

<http://sites.sinauer.com/neuroscience5e/animations01.02.html>

Materiály, prezentace, metody.



Jak s prezentacemi článků?

Každý týden začneme 10minutovým rozborem zadaného článku

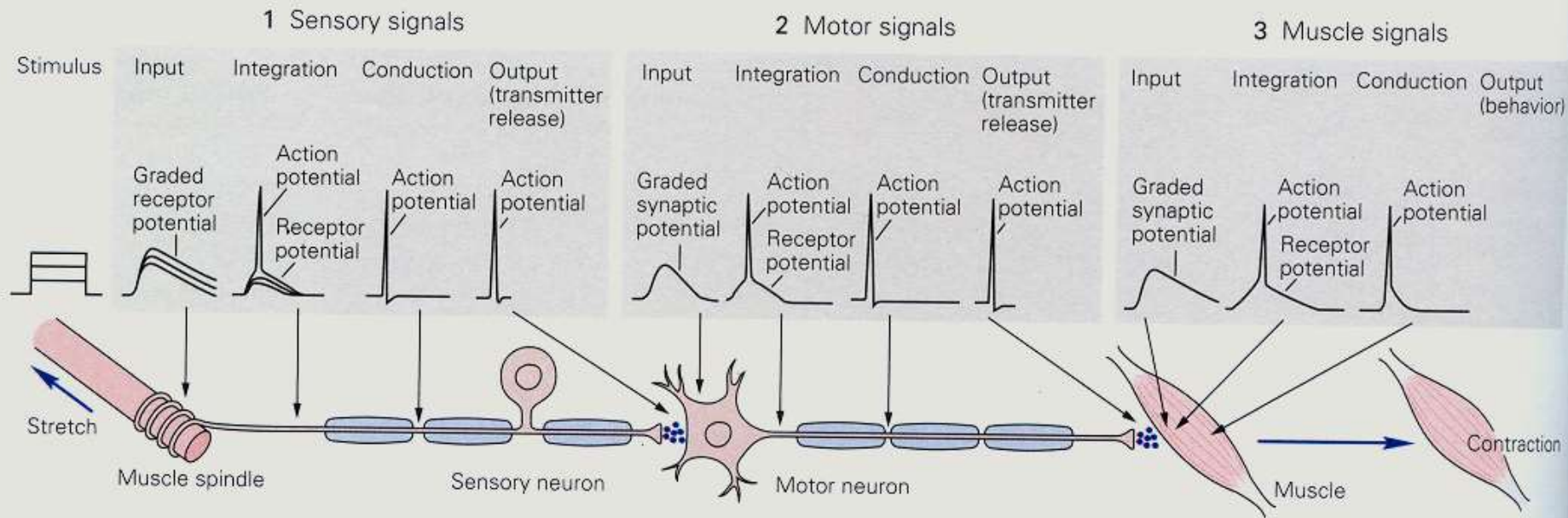
Budete prezentovat ve dvojici.

Hodnotit prezentaci budou Vaši spolužáci (a já).

Čeho si všímat:

- proč byl článek napsán?
- základní myšlenka, hypotéza, jaká je otázka a způsob řešení?
- na co přišli?
- základní pohled na metody a nějaká metodická zajímavost
- shrnutí „Pro media“

Fyziologie nervových membrán: řeč elektrických potenciálů



Předávání a zpracování informací:

elektro - chemická spolupráce



Je elektricky nabitá membrána výlučně nervová vlastnost?

Znakem toho, že je buňka živá, je mimo jiné to, že lze na její membráně - mezi extra a intracelulárním prostředím - změřit rozdílnou koncentraci různých kladných a záporných iontů, projevující se elektrickým napětím, které nazýváme **klidovým potenciálem**. Ten je vlastní všem živým buňkám a pro většinu z nich trvalý a neměnný, ale u některých typů buněk (nervové, svalové), s tzv. vzrušivou membránou, existuje schopnost tento klidový potenciál velmi rychle měnit – generovat **akční potenciály**.

Vztah chemické a elektrické řeči.

Buňky používají k předávání informací chemickou řeč, jsou to chemické povely, které určují vývoj, diferenciaci, metabolismus buněk. Parakrinní. Na větší vzdálenosti u mnohobuněčných živočichů musela existovat dobře fungující cirkulační soustava nesoucí endokrinní signály. I v živočichovi s dokonalou cirkulací je ale důležité některé povely posílat přesně k cíli, ale hlavně rychle ... Jde o motorické reakce.

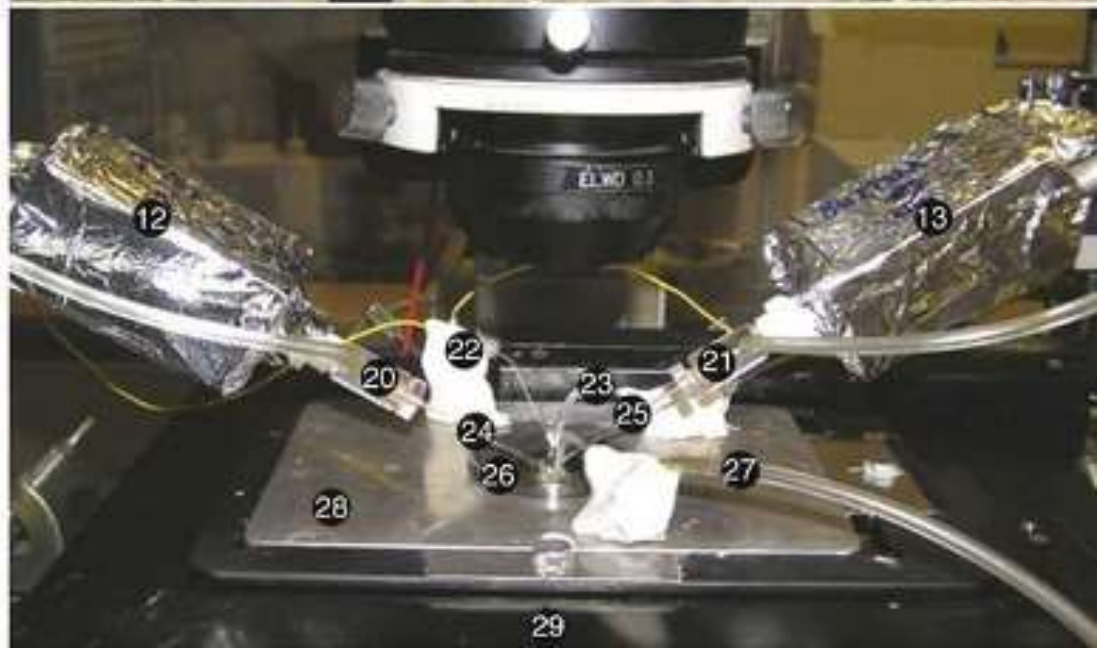
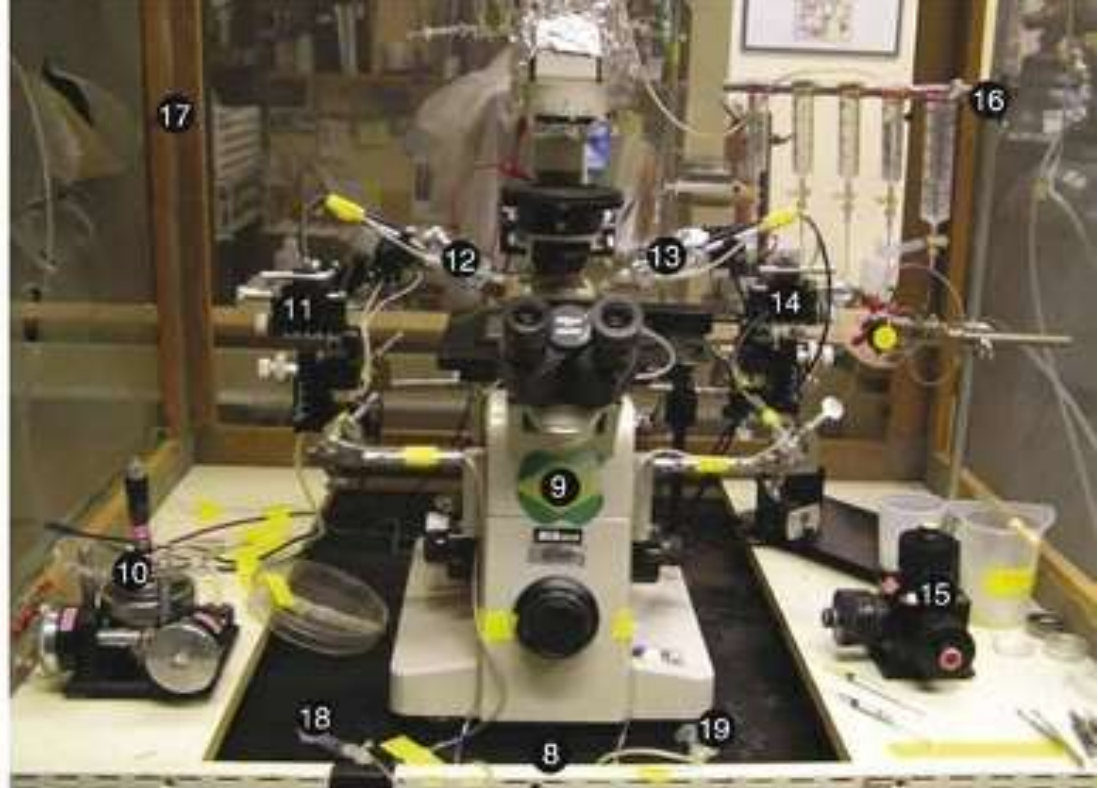
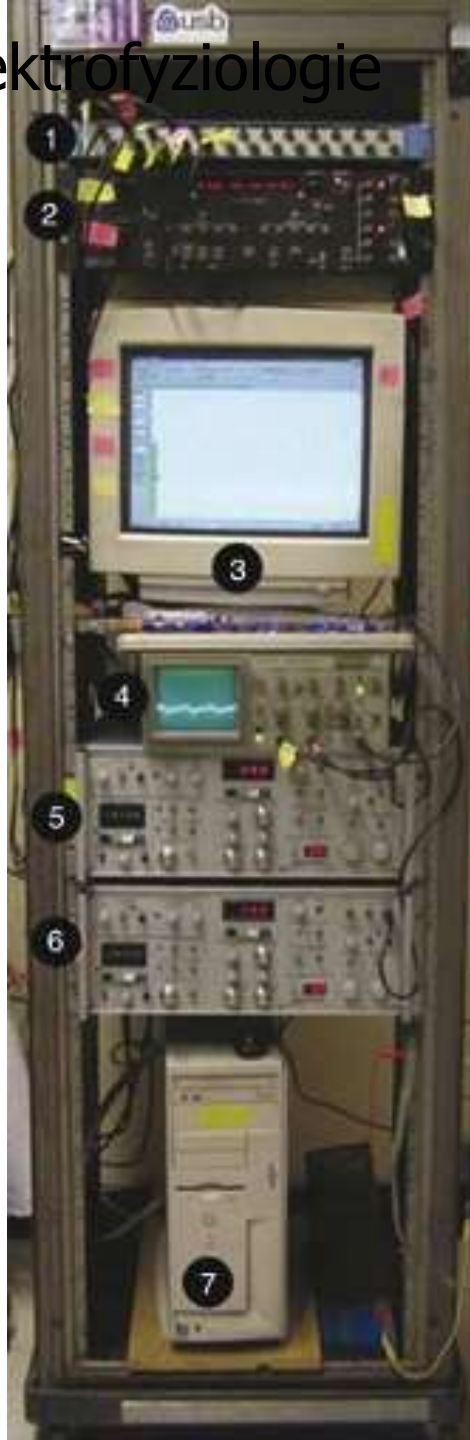
...a to je úkolem nervové soustavy, přesněji řečeno buněk se vzrušivou membránou (nervové a svalové). Jinak se ovšem neurony v zásadě neliší, využívají stejné mechanismy signálních kaskád jako jiné buňky. Chemické látky na synapsí nebo i mimo synapse mají možnost ovlivňovat metabolismus neuronů. Náš mozek není jen soustavou elektrických spojů. Je to houba nasáklá hormonální polévkou. Neurony se tedy chovají jako jiné buňky – závislé metabolismem na chemické polévce kolem. Co umí navíc je, že převádějí ale některé chemické povely na elektrické signály.

Vztah chemické a elektrické řeči.

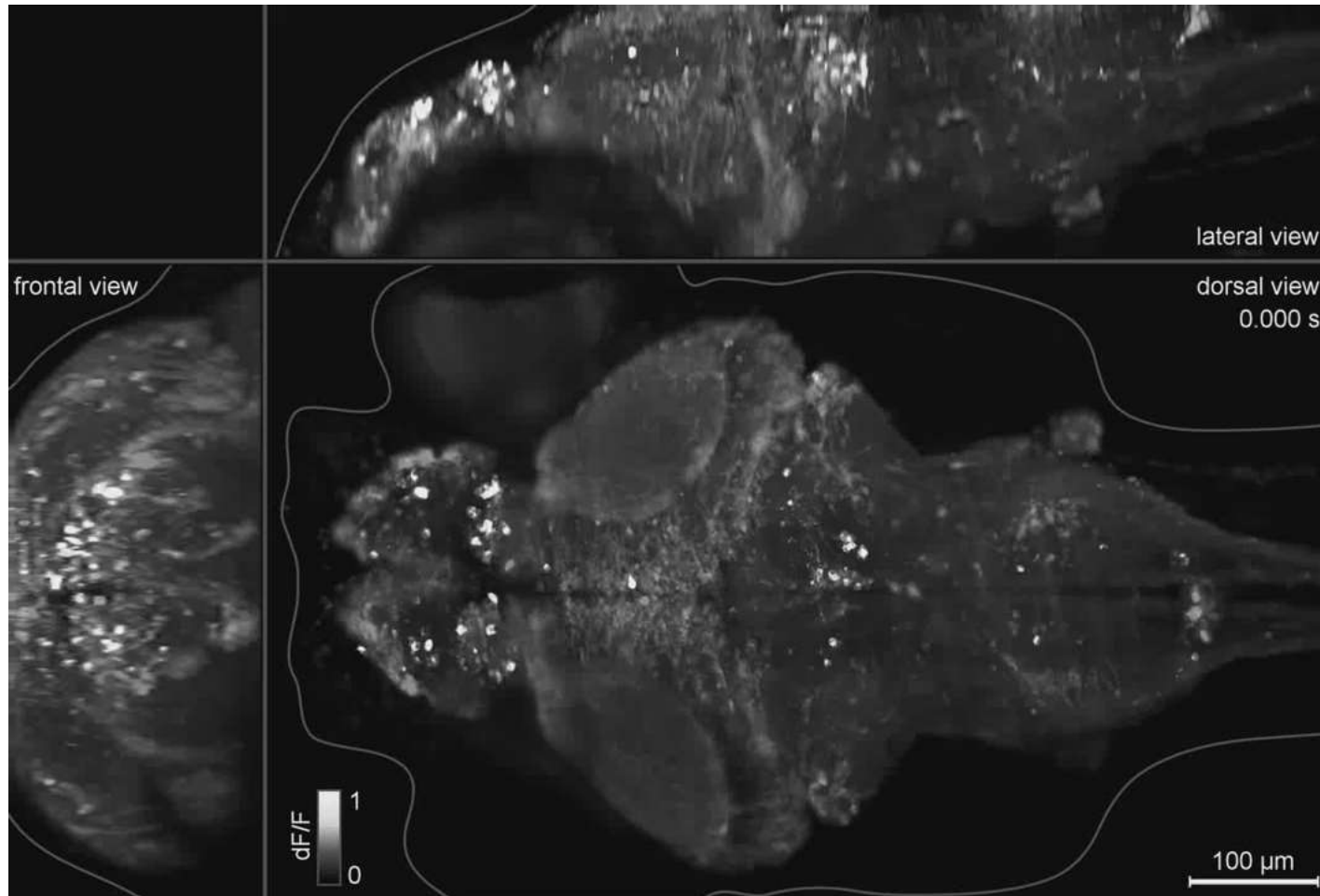
To, co je pro vzrušivé membrány typické, je schopnost generovat akční potenciály, ale k těm se sahá až tehdy, když už není třeba žádnou informaci zpracovávat a je třeba ji poslat velmi rychle na určité místo. Akční potenciál je velmi odolný vůči rušení a tedy nezpracovatelný. To, co se „vymyslí“, je vhozeno do e-pošty a už to nelze vzít zpět – dokud nenarazí na další přepojovací centrum v podobě synaptických propojení.

Pro vzrušivé membrány se schopností rychlého a zacíleného vedení informací (akčních potenciálů, aktivně znovu a znovu generovaných) k tomu přistupuje řeč elektrických potenciálů místních (šířících se s velkým úbytkem jen v místě vzniku).

Klasická elektrofyziologie



Světlo ve službách neurofyzologie - optogenetika



Larva zebrafish (Dáanio). <https://www.youtube.com/watch?v=lppAwkek6DI>

Světlo ve službách neurofyzologie - optogenetika

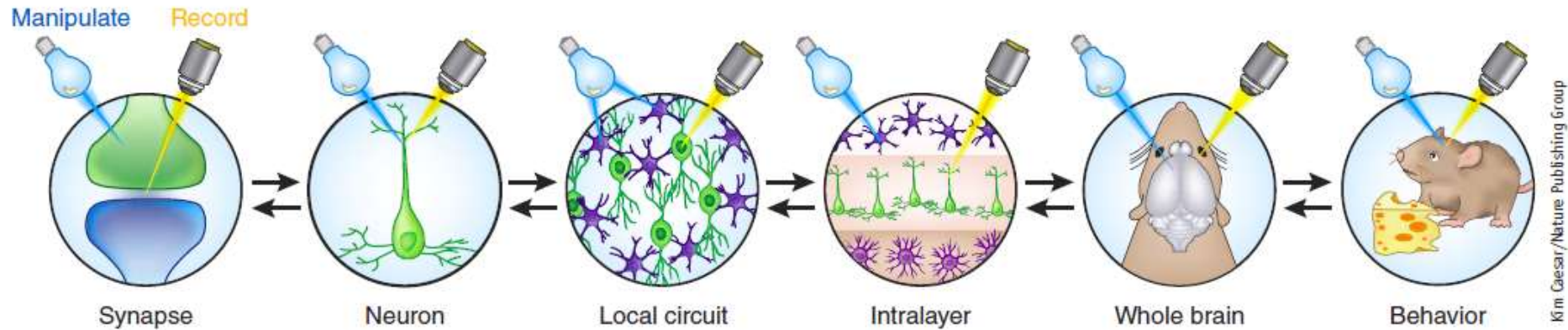
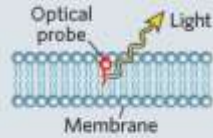
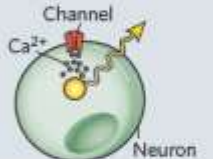


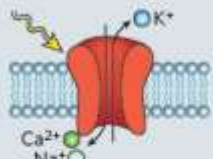
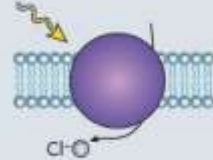


Figure 1 | Optogenetics can be applied at all levels of brain function. A variety of applications use optogenetic probes to both read out and manipulate activity. Specificity can be achieved either by targeting probe expression to relevant cellular compartments or network elements or by targeting light to these elements (see ref. 25 for discussion). The ability to implement optogenetics at different levels of nervous system function provides a powerful way to make causal links between these levels. Figure adapted from Hegemann, P. & Sigrist, S. (eds.), *Optogenetics*. De Gruyter, 2013, p. 109, fig. 10.1.

Světlo ve službách neurofyzologie - optogenetika

Table 1 | Classes of optical probes and reporters

Type of molecule	Illustration	Examples
Measuring		
Voltage sensors		JPW3028* (refs 17, 20) hVOS† (ref. 25) VSFP† (ref. 96)
Calcium sensors		OGB-1* (refs 8, 30) Fluo-4* (ref. 97) D3cpv† (ref. 38) TN-XXL† (ref. 39) GCaMP3† (ref. 98)
Receptor/channel reporters		Fluorescence-labelled Shaker† (ref. 69)
Synaptic release reporters		FM 1-43* (ref. 63) SynaptopHluorin† (ref. 65) FLIPE† (ref. 66) SuperGluSnFR† (ref. 64)
Manipulating		
Optogenetic activators		ChR2† (refs 40, 47, 48, 54) LiGluR† (ref. 49)
Optogenetic inhibitors		Halorhodopsin (NpHR)† (refs 50, 51)

Classes of optical probes used for measuring and manipulating neuronal activity. Representative examples of probes in current use are provided, along with relevant citations. The illustrations show in schematic form the operation of the respective probes. ChR2, channelrhodopsin-2; FLIPE, fluorescent indicator protein for glutamate; hVOS, hybrid voltage sensor; LiGluR, light-gated ionotropic glutamate receptor; NpHR, *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin; VSFP, voltage-sensitive fluorescent protein. *Organic probe. †Genetically encodable probe.

Studium nervového systému člověka in vivo.

NMR (nuclear magnetic resonance)

MRI (magnetic resonance imaging)

<http://sites.sinauer.com/neuroscience5e/animations01.01.html>

BOLD fMRI (blood oxygen level-dependent) - Ale: Demystifying BOLD fMRI Data. The Scientist

PET (positron emission tomography)

<http://sites.sinauer.com/neuroscience5e/animations01.02.html>

http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/47155/title/New-and-Old-Techniques-in-Modern-Neuroscience/&utm_campaign=NEWSLETTER_TS_The-Scientist-Daily_2016&utm_source=hs_email&utm_medium=email&utm_content=36340549&_hsenc=p2ANqtz--lYy4TGk3YTmhWRL2t7ks01lk74vwPMI3zboP5ZMZ-pDpziw43kJkF41CampM1ogkW0iuZHr1LcLPsm9lek0lwMln8EQ&_hsmi=36340549

Membránový (klidový) potenciál

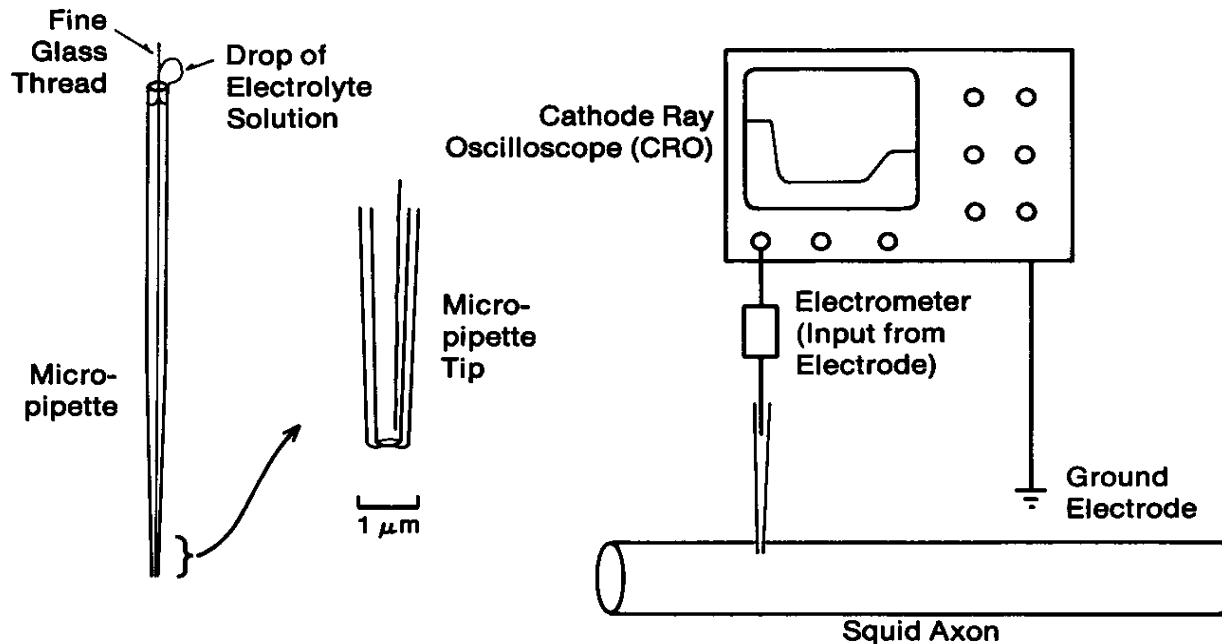


Fig. 4.4 The micropipette is used for electrical recording (extracellular, intracellular, patch), electrical stimulation (current or voltage clamp), or delivery of substances (microionophoresis or pressure ejection). Preparation of an intracellular recording micropipette is shown on the left. The diagram on the right shows the arrangement for recording from a squid axon and observing potentials on a cathode ray oscilloscope (CRO).

Gibbs-Donnanova rovnováha

Důsledkem přítomnosti nabitých částic v roztoku oddělených selektivně propustnou membránou, je přítomnost potenciálového rozdílu (napětí).

Rovnováha, které se ustaví, výsledkem vyvážení osmotických a elektrostatických sil ovlivňujících ionty.

Důsledkem pouhého uvěznění negativně nabitých velkých molekul v buňce, např. proteinů, je malý negativní potenciál.

Pokud se ještě rozjede Na/K pumpa, ustavuje se nová rovnováha, která je opět kompromisem mezi elektrickými a koncentračními silami. Negativní napětí intracelulárně bude mnohem větší.

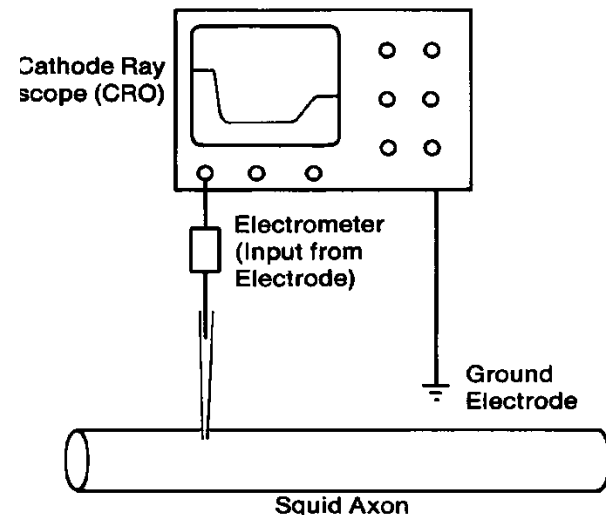
Rovnováha animace

Gibbs Donnanova rovnováha - animace

Finální situace

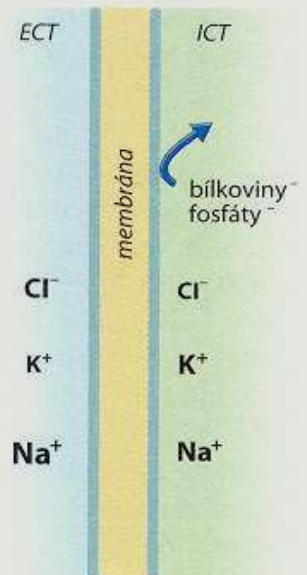
Iont	Koncentrace		Gradient Intra/Extra	Rovnovážný potenciál
	Intracelulární	Extracelulární		
Na ⁺	12 mmol/l	145 mmol/l	1:12	+67 mV
K ⁺	155 mmol/l	4 mmol/l	39:1	-98 mV
Cl ⁻	4 mmol/l	123 mmol/l	1:31	-90 mV
volný Ca ²⁺	10 ⁻⁴ mmol/l	1,5 mmol/l	1:15.000	+129 mV
fixní anionty	155 mmol/l			

Tab. 2.2. Tabulka rozložení iontových koncentrací na buněčné membráně kosterního svalu savce.

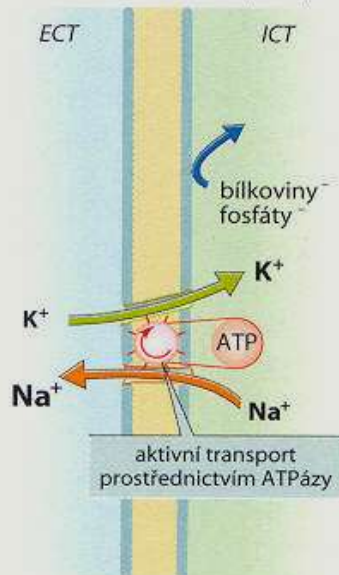


A. Příčiny a důsledky klidového potenciálu membrány

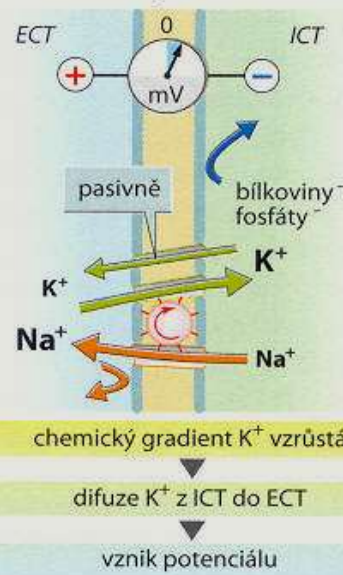
1 pasivní rozložení iontů



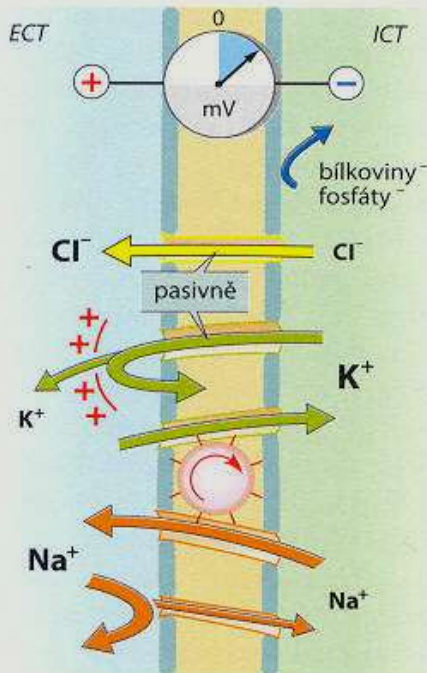
2 aktivní Na⁺-K⁺-pumpa



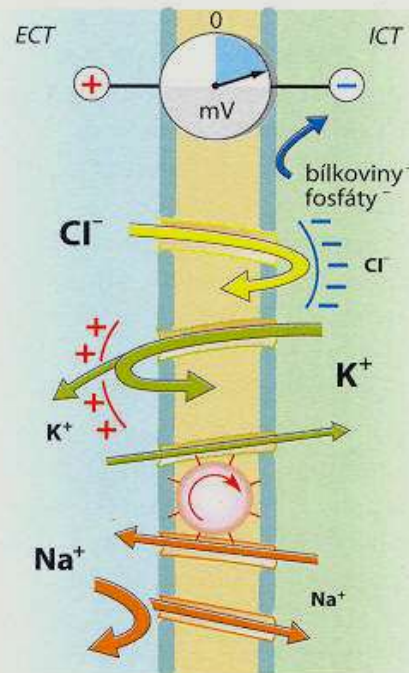
3 difuzní potenciál K⁺



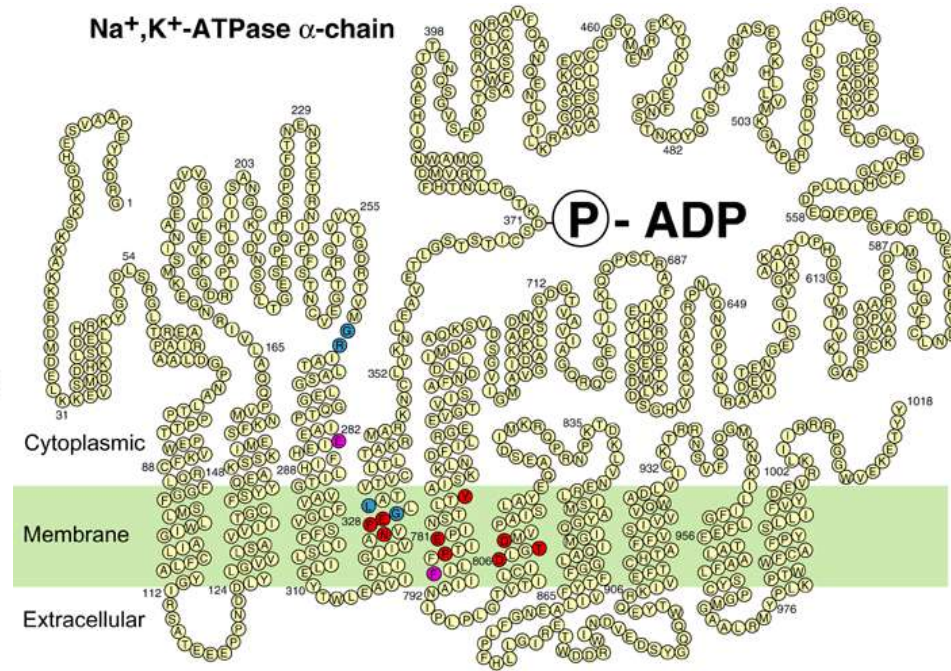
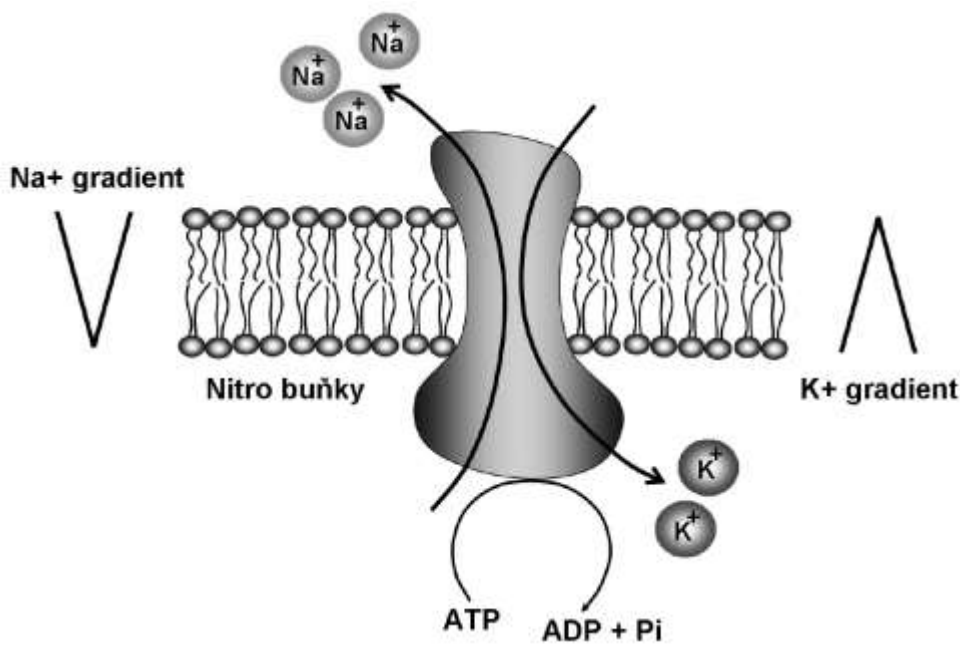
4 potenciál žene Cl⁻ z ICT do ECT



5 konečný stav: klidový membránový potenciál



Na/K ATP-áza nabíjí membránu



- Cation binding residues
- Residues involved in conformational changes
- Residues affecting Na⁺ and K⁺ selectivity

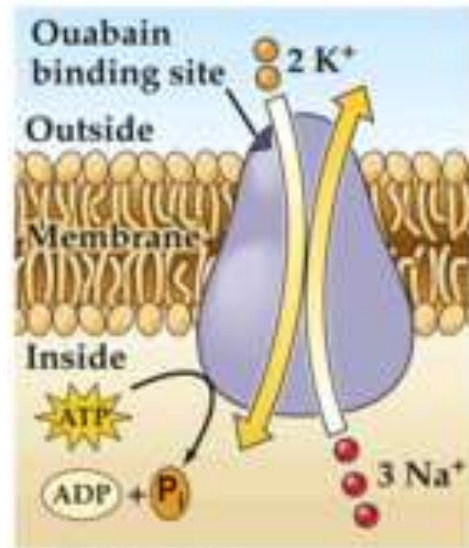
Ouabain

Inhibitor Na/K pumpy

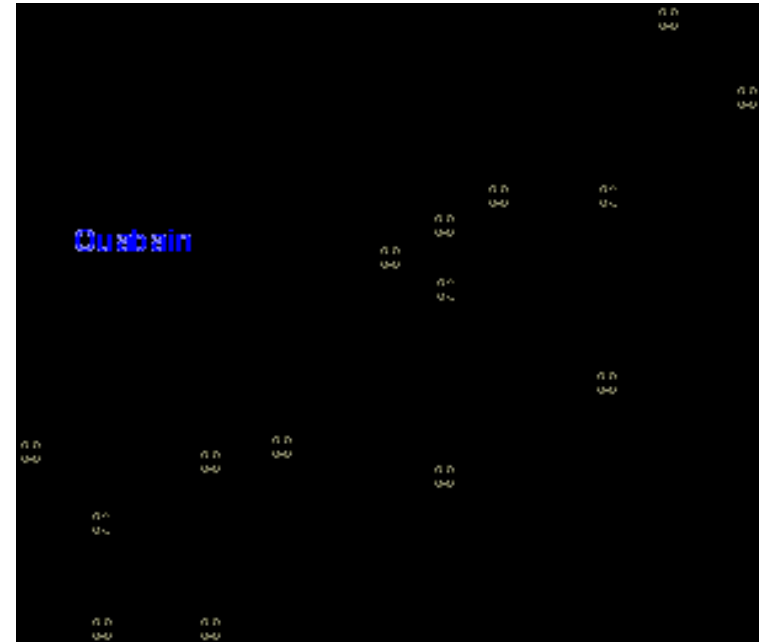
Šípový jed rostlinného původu

Při otravě se koncentrace srovnají a napětí pomalu zmizí

If the Na-K pump is poisoned by ouabain it stops pumping sodium and potassium but the chemical concentration gradients take time to degrade and a large axon can fire thousands of action potentials.



REPRODUCED by Figure 4.11 (Part 1)
© 2012 Sinauer Associates, Inc.



Ouabain (from Somali *waabaayo*, "arrow poison,") also known as **g-strophanthin**, is a plant derived toxic substance that was traditionally used as an arrow poison in eastern Africa for both hunting and warfare. Ouabain is a cardiac glycoside and in lower doses, can be used medically to treat hypotension and some arrhythmias.

Rozdílné postavení iontů

K⁺:



KONCENTRACE

Na⁺:



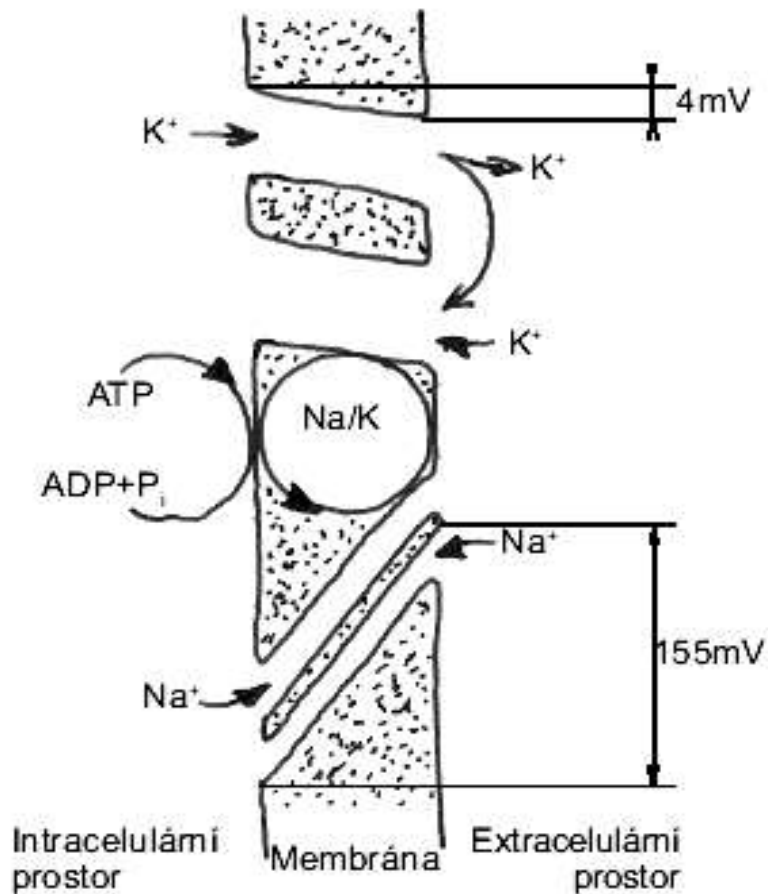
NÁBOJ

INTRA (-)

EXTRA (+)

Rozdílné postavení iontů

<http://sites.sinauer.com/neuroscience5e/animations02.01.html>



Obr. 2.9. Rozdílné membránové podmínky pro Na⁺ a K⁺. Na/K pumpa stále udržuje na membráně gradient Na⁺ i K⁺. Zatímco K⁺ však může membránou volně procházet, pro Na⁺ je téměř nepropustná. Na⁺ je čerpáno „do strmého kopce“ – proti velké elektrochemické síle.

Rovnovážný potenciál – pro daný iont Nernstova rovnice

$$E_{\text{ion}} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[\text{ion}]_e}{[\text{ion}]_i}$$

$$E_{\text{ion}} = 61\text{mV} \log \frac{[\text{ion}]_e}{[\text{ion}]_i}$$

Goldman-Hodgkin-Katz rovnice

$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{PK[K^+]_e + PNa[Na^+]_e + PCl[Cl^-]_i}{PK[K^+]_i + PNa[Na^+]_i + PCl[Cl^-]_e}$$

R – plynová konstanta

T – teplota

F – Faradayova k.

Gradient Intra/Extra	Rovnovážný potenciál
1:12	+67 mV
39:1	-98 mV

Dosadíte-li do N. rovnice gradient, vyjde Vám rov. potenciál

Kdyby v buňce nebyly žádné jiné ionty nebo by je membrána nepropouštěla a naopak kdyby byla ideálně propustná pro uvažovaný iont, byl by celkový klidový potenciál membrány roven právě spočítaným rovnovážným potenciálům pro daný iont.

Zjistíme, že rovnovážný potenciál iontu, který je nejlépe propustný, je určující pro celkový potenciál membrány a že přítomnost špatně propustného iontu vnáší do systému nerovnováhu, která může být využita při vyvolávání velmi rychlých změn při vzniku akčních potenciálů.

V rovnici vystupují koncentrace a propustnosti jednotlivých iontů. Vyplývá z ní, že iont má tím větší vliv na membránové napětí, čím je jeho permeabilita větší. Vysvětluje se tak chování membrány (depolarizace a hyperpolarizace při změně propustnosti pro daný iont).

Klidové membránové napětí E_r tedy leží mezi rovnovážnými napětími všech iontů, přičemž příspěvek každého iontu je vážen jeho koeficientem permeability.

Klidové napětí se pohybuje okolo -90mV , což je hodnota souhlasící s klidovými potenciály pro dobře propustné ionty K^+ a Cl^- . Protože ovšem i Na^+ ionty mohou v malé míře procházet, je skutečné E_r mírně menší. Zatímco u dobře propustných iontů K^+ nebo Cl^- se ustavuje bez problémů dynamická rovnováha s nulovým čistým tokem, přítomnost špatně propustného Na^+ (100x menší propustnost než pro K^+) vše mění, protože pro něj se rovnovážný stav ustavuje mnohem pomaleji a vnáší sem nerovnováhu: chtěl by dovnitř, ale nemůže.

Síla, která žene iont přes membránu se jmenuje **driving force** nebo **hnací síla** (řídící napětí). Tato síla je určena rozdílem mezi stávajícím membránovým napětím E_m a rovnovážným napětím E_{ion} pro daný typ iontu. Například vtok kalciových iontů do buňky by se zastavil, až by uvnitř buňky stoupl kladné napětí na hodnotu rovnovážného napětí pro kalcium, tedy $+130\text{mV}$. Protože je ale uvnitř buňky -90mV , je Ca^{2+} hnáno dovnitř buňky silou $130+90=220\text{mV}$. Ke vtoku ovšem nedojde, protože propustnost membrány pro tyto ionty je nepatrná. Podobně hnací síla pro Na^+ je 157mV , zatímco pro dobře procházející K^+ jen 4mV . Že existuje vůbec nějaká hnací síla pro K^+ je důsledek mírného posunu E_r do kladných hodnot v důsledku existující propustnosti pro Na^+ .

Je jasné, že kdyby neexistoval nějaký mechanismus, který by obnovoval nerovnoměrné rozložení špatně procházejících iontů, po delší době by se ustavila rovnováha i pro ně, ale existují mechanismy, které nerovnováhu udržují, ovšem za spotřeby energie, nejdůležitějším je Na K pumpa.

Existence nerovnováhy pro má zásadní význam pro vznik podráždění a vyvolání nervového signálu. Předávání informací nervovou soustavou může probíhat jen proto, že mezi vnějškem a vnitřkem nervové buňky existuje rozdíl potenciální energie pro Na ionty, na jehož udržování je ovšem potřeba iontovým pumpám neustále dodávat energii ve formě ATP (u některých buněk připadá na NaK pumpu až 70% celkové energetické spotřeby).

Hnací síla = Driving Force

-90mV – (Rovnovážný potenciál)

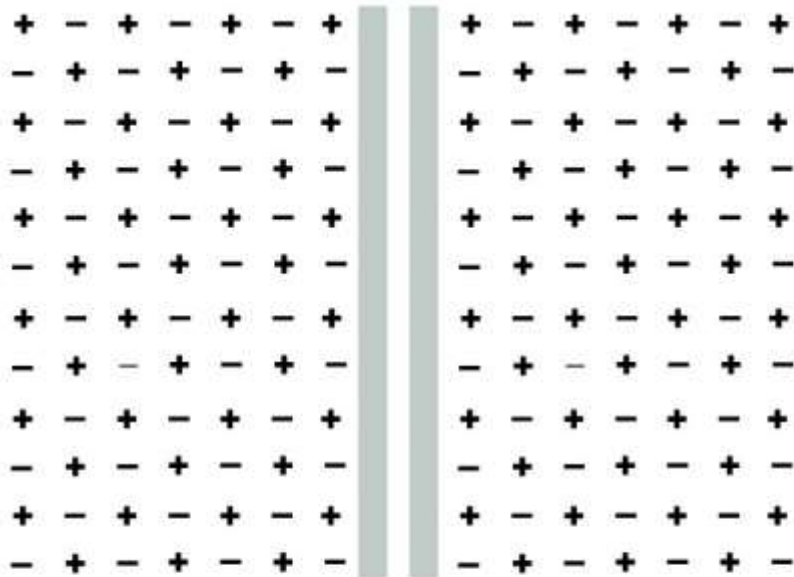
Na: 157 mV

K: 8 mV

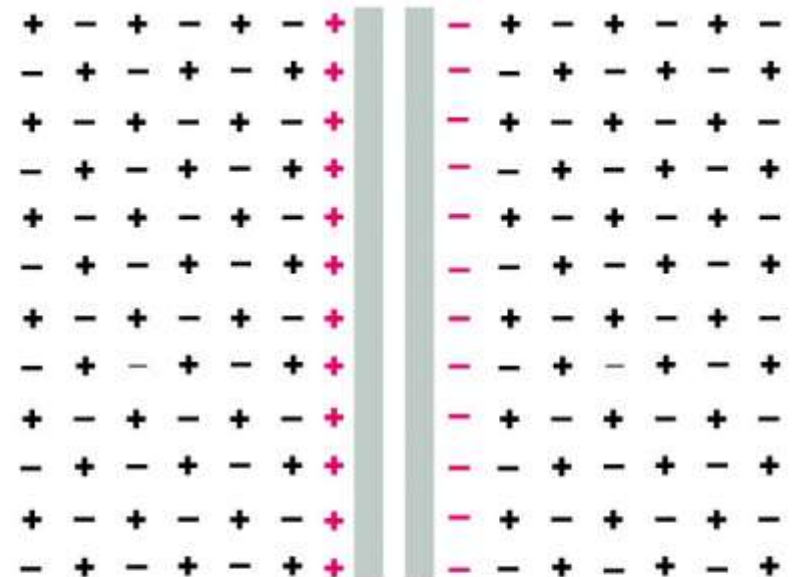
Ca: 219 mV !

Iont	Koncentrace		Gradient Intra/Extra	Rovnovážný potenciál
	Intracelulární	Extracelulární		
Na ⁺	12 mmol/l	145 mmol/l	1:12	+67 mV
K ⁺	155 mmol/l	4 mmol/l	39:1	-98 mV
Cl ⁻	4 mmol/l	123 mmol/l	1:31	-90 mV
volný Ca ²⁺	10 ⁻⁴ mmol/l	1,5 mmol/l	1:15.000	+129 mV
fixní anionty	155 mmol/l			

Tab. 2.2. Tabulka rozložení iontových koncentrací na buněčné membráně kosterního svalu savce.



exact balance of charges on each side of the membrane; membrane potential = 0



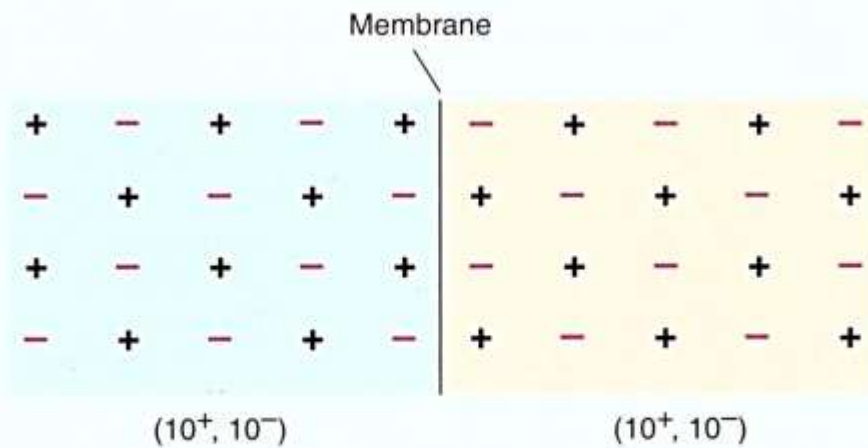
a few of the positive ions (*red*) cross the membrane from right to left, leaving their negative counterions (*red*) behind; this sets up a nonzero membrane potential

Figure 11-22 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Ionty odpovědné za vznik membránového potenciálu leží v tenké vrstvě u membrány. Počet kationtů, který je schopen přechodem membrány změnit napětí o 100mV je pouze 1/100.000 celkového počtu kationtů v cytosolu.

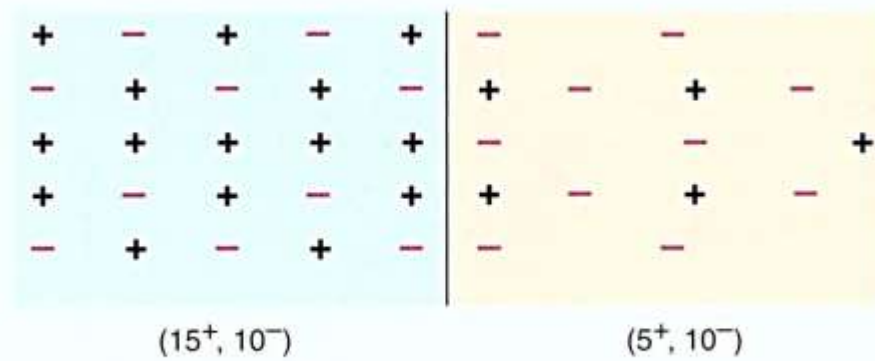
⇒ Stačí tedy malá a rychlá změna k AP.

⇒ Jeden AP koncentrace nezmění.



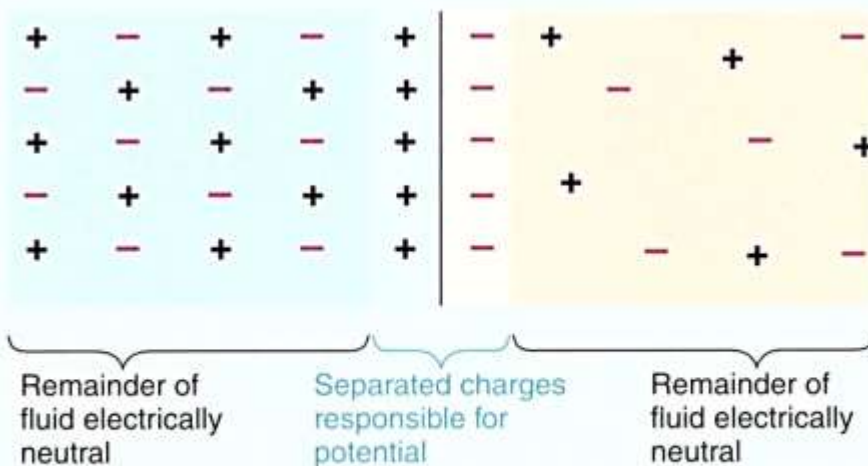
Membrane has no potential

(a)

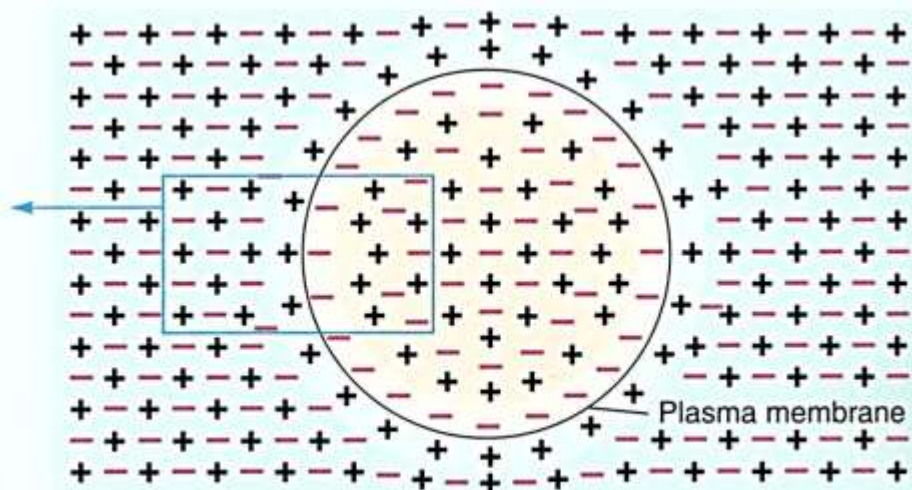


Membrane has potential

(b)



(c)

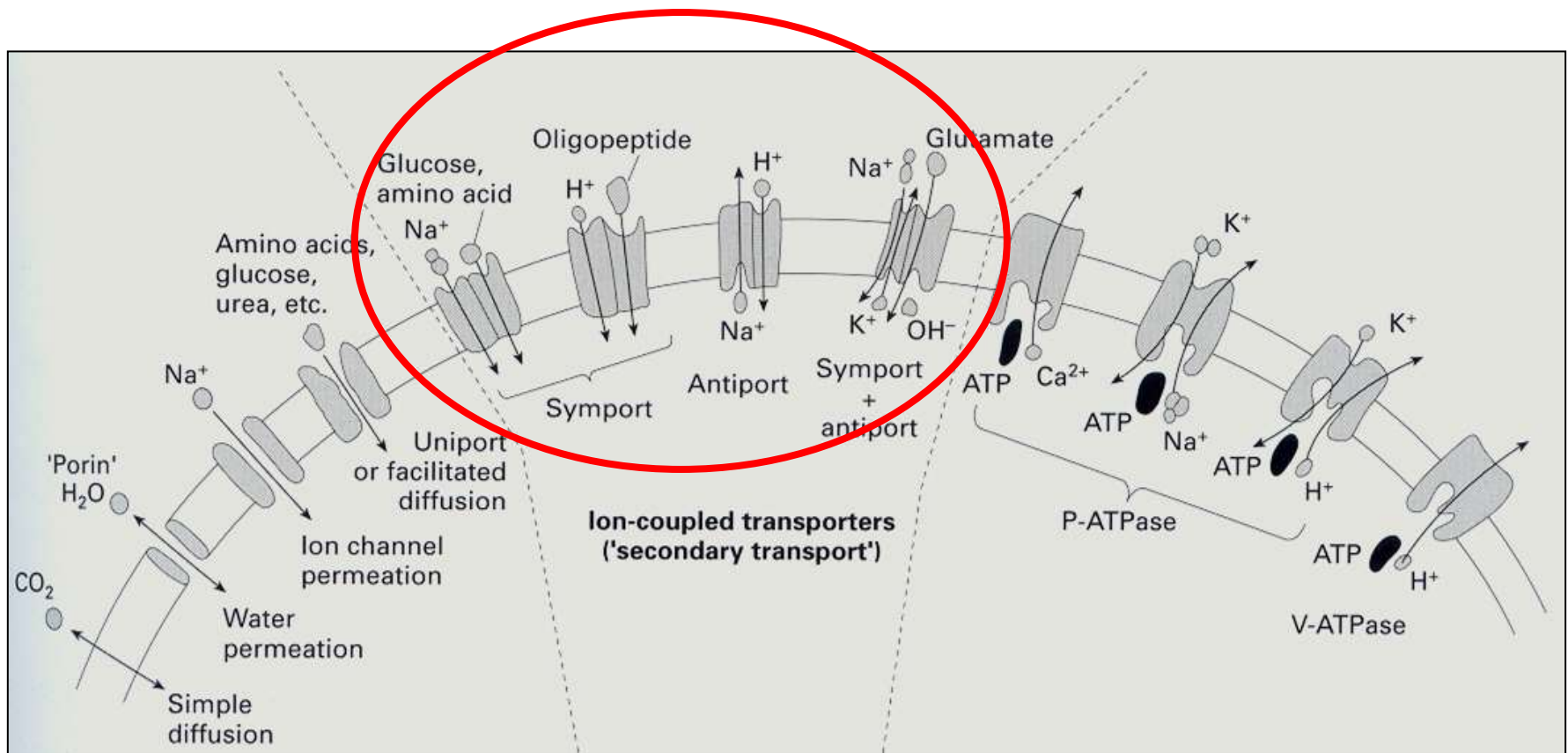


(d)

Jen 6 kationtů vně navíc na pozadí 440.000 iontů ostatních je schopno nabít membránu. Stačí tedy přemístit jen nepatrná množství a potenciál se výrazně změní.

Klidový potenciál

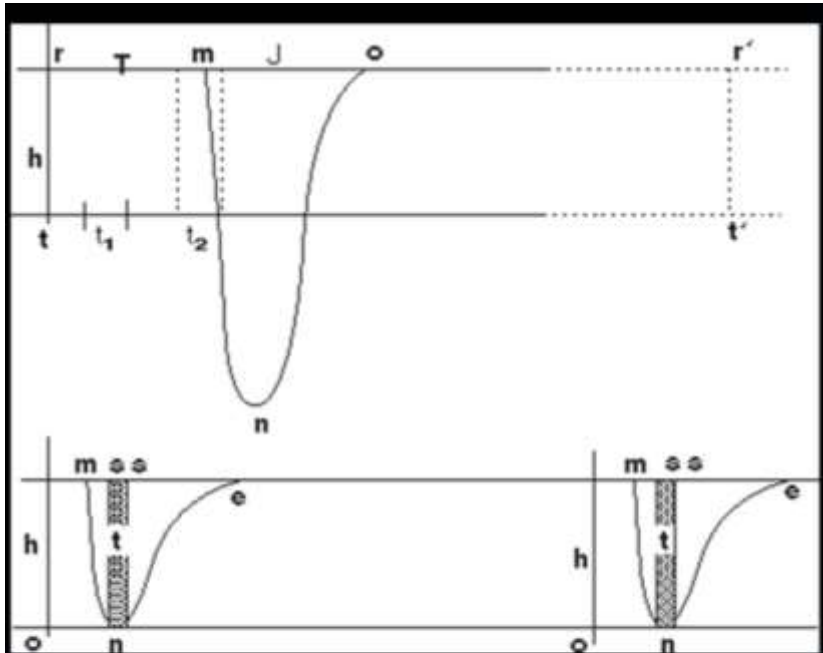
- Uložená energie pro řadu membránových „strojů“ (sekundární aktivní transport) signálů (Ca signály, fertilizace vajíčka).



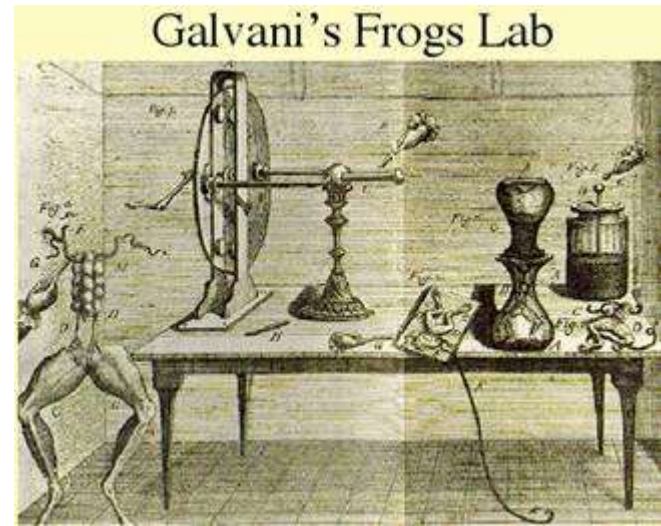
Klidový potenciál

- V neuronech na generování, zpracování a šíření elektrických signálů:
- Akční potenciál – vhodný pro dálkový, nezkreslený a rychlý přenos signálů
- Místní potenciál – vhodný pro zpracování, syntézu, modifikaci informací

Akční potenciál



Horní záznam odpovídá průběhu "nervového akčního proudu", tak jak jej Bernstein naměřil r. 1868 a publikoval r. 1871. Na spodním záznamu, který Bernstein publikoval v Elektrobiologii r. 1913, chybí překmit "akčního proudu" do kladných hodnot (průběhy jsou zaznamenány s opačnou polaritou, než na jakou jsme dnes zvyklí).



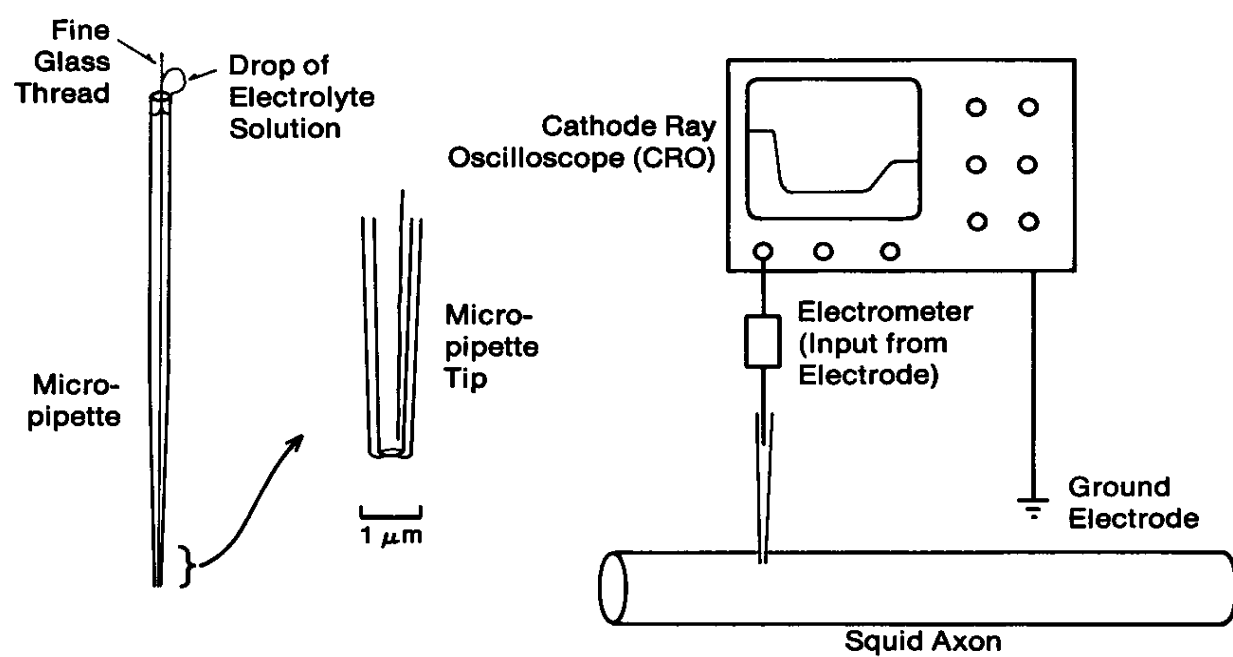
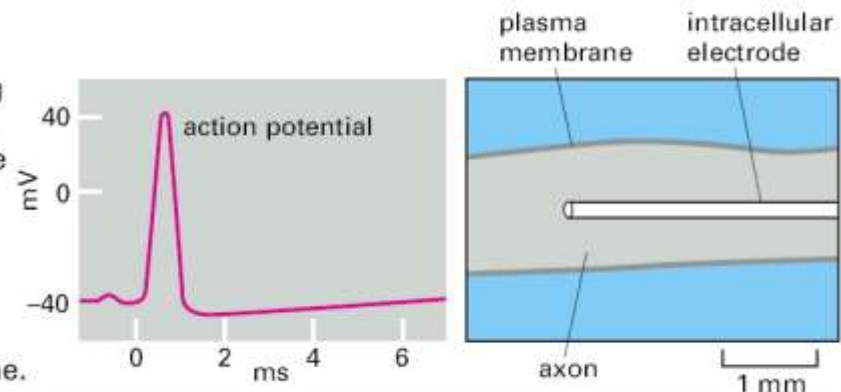


Fig. 4.4 The micropipette is used for electrical recording (extracellular, intracellular, patch), electrical stimulation (current or voltage clamp), or delivery of substances (microiontophoresis or pressure ejection). Preparation of an intracellular recording micropipette is shown on the left. The diagram on the right shows the arrangement for recording from a squid axon and observing potentials on a cathode ray oscilloscope (CRO).

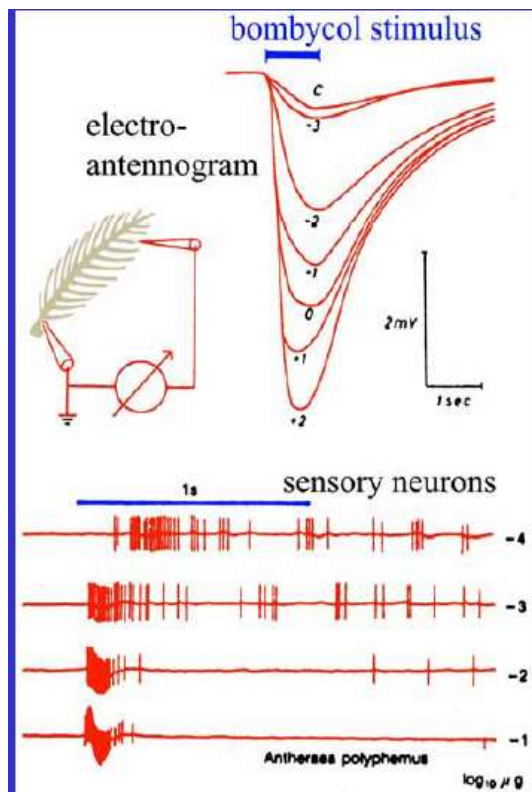
1. Action potentials are recorded with an intracellular electrode

The squid giant axon is about 0.5–1 mm in diameter and several centimeters long. An electrode in the form of a glass capillary tube containing a conducting solution can be thrust down the axis of the axon so that its tip lies deep in the cytoplasm. With its help, one can measure the voltage difference between the inside and the outside of the axon—that is, the membrane potential—as an action potential sweeps past the electrode. The action potential is triggered by a brief electrical stimulus to one end of the axon. It does not matter which end, because the excitation can travel in either direction; and it does not matter how big the stimulus is, as long as it exceeds a certain threshold: the action potential is all or none.

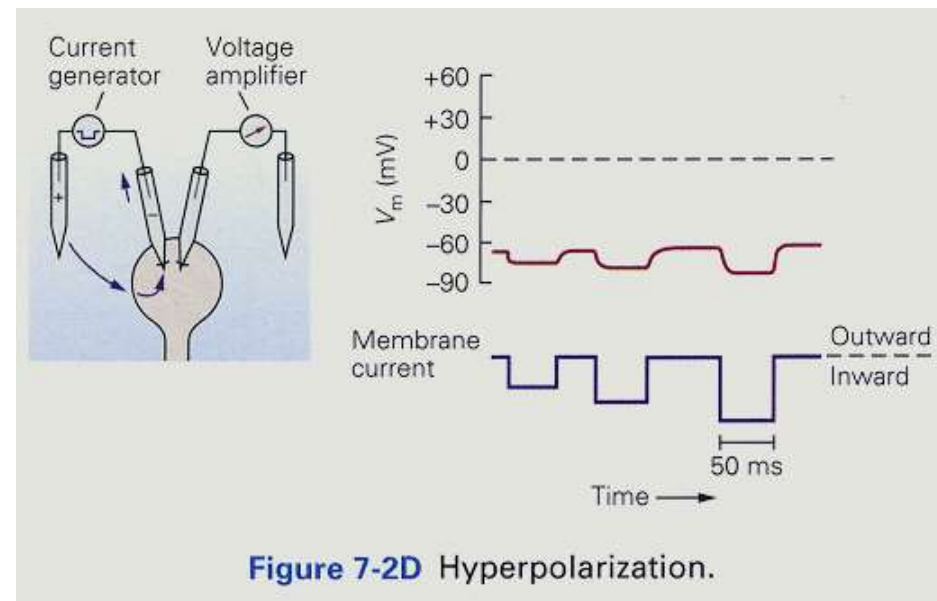
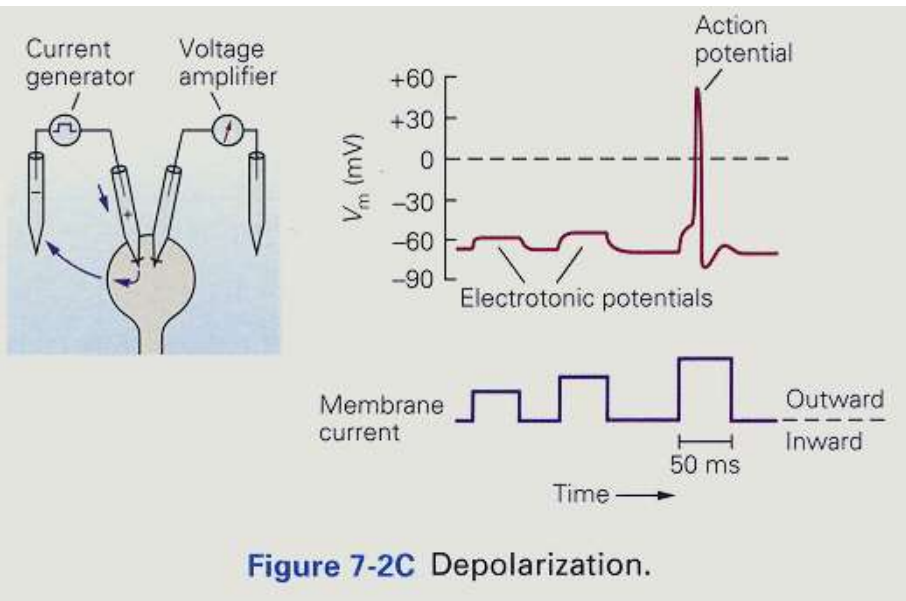
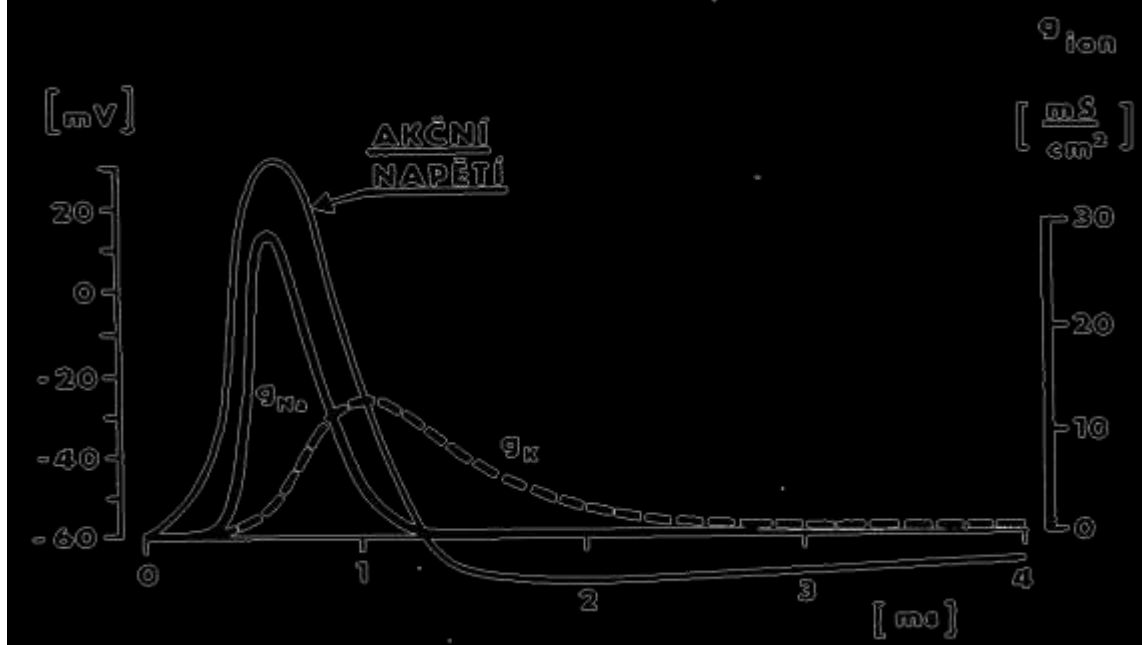


Jak se dnes měří a jak vypadá?

<http://www.hhmi.org/biointeractive/vlabs/neurophysiology/index.html>



Informace, kterou přenáší, je zapsána do frekvence.



- ⇒ Bud' nevznikne vůbec, nebo vzniká stále stejně velký.
- ⇒ Vznikne při určitém stupni depolarizace

The Nobel Prize in Physiology
or Medicine 1963



Iontová hypotéza
Vzniku AP

"for their discoveries concerning the ionic mechanisms involved in excitation and inhibition in the peripheral and central portions of the nerve cell membrane"



**Sir John
Carew
Eccles**

1/3 of the
prize
Australia

Australian
National
University
Canberra,
Australia
b. 1903
d. 1997



**Alan Lloyd
Hodgkin**

1/3 of the
prize
United
Kingdom

University of
Cambridge
Cambridge,
United
Kingdom
b. 1914
d. 1998



**Andrew
Fielding
Huxley**

1/3 of the
prize
United
Kingdom

University
London,
United
Kingdom
b. 1917

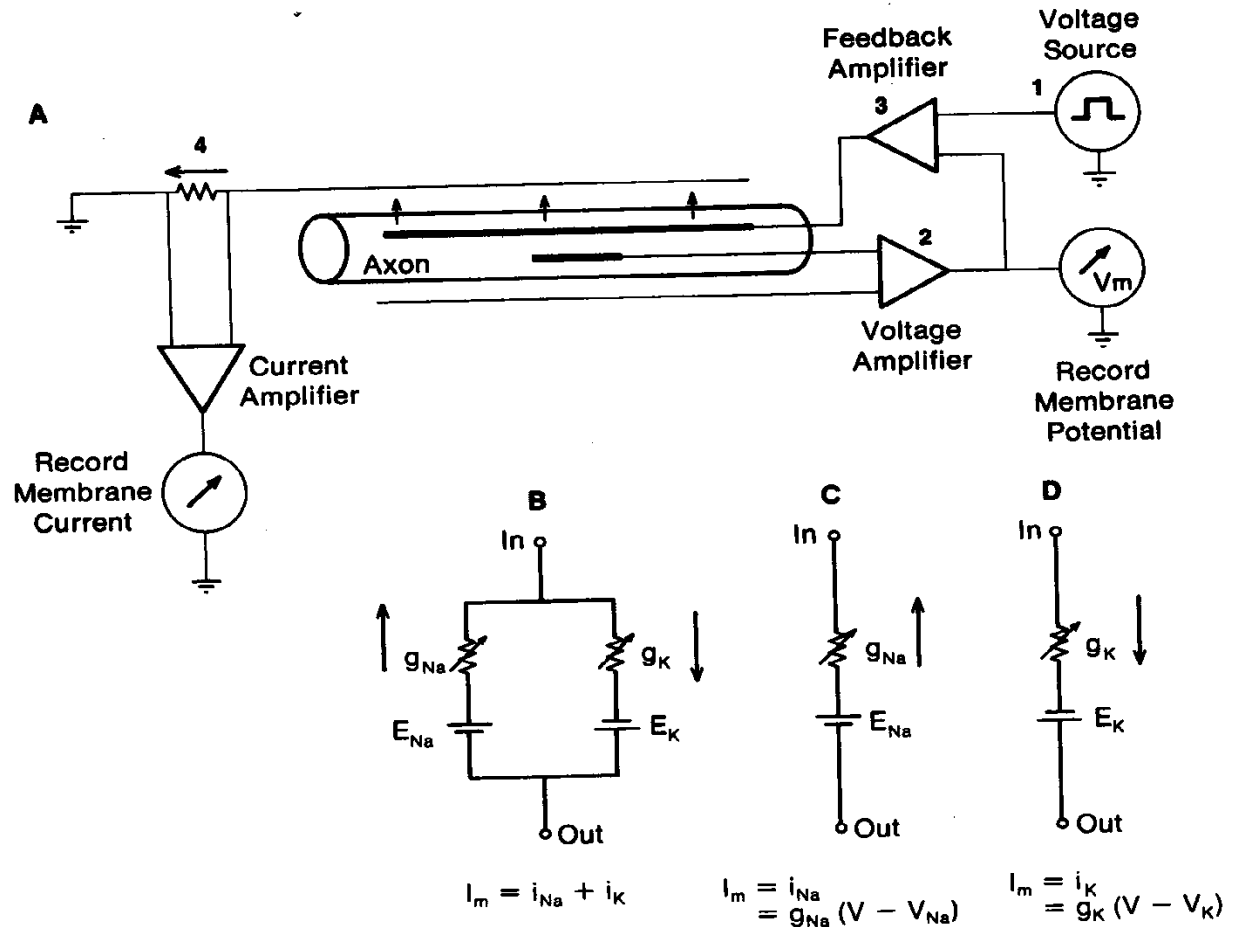
Hypotéza, zvaná iontová, vysvětlující tyto děje na membráně nervových a svalových buněk byla rozpracována a dokázána anglickými vědci pozdějšími nositeli Nobelovy ceny Alanem Hodgkinem a Andrewem Huxleym současně s K. Colem a H. Curtisem v USA v poválečných letech, kdy značně pokročily možnosti elektrotechniky, zejména v konstruování citlivých elektronických obvodů. Jimi vyvinutá technika **napět'ového zámku** (voltage clamp) umožňuje ovládat membránový potenciál a současně registrovat proudy tekoucí přes membránu v důsledku jeho experimentálních změn.

Obě skupiny pracovaly na obřích nervových vláknech sépie a použily dvě podélné kovové elektrody, z nichž jedna po zavedení do axonu umožňuje řízení membránového potenciálu a druhá snímá proudy tekoucí přes membránu. Metoda je postavena tak, že se měří hodnota proudu, který je nutno na membránu dodávat, aby bylo udrženo určité uměle nastavené membránové napětí. Dodávaný proud kompenzuje iontové toky a jeho velikost je tedy s nimi shodná

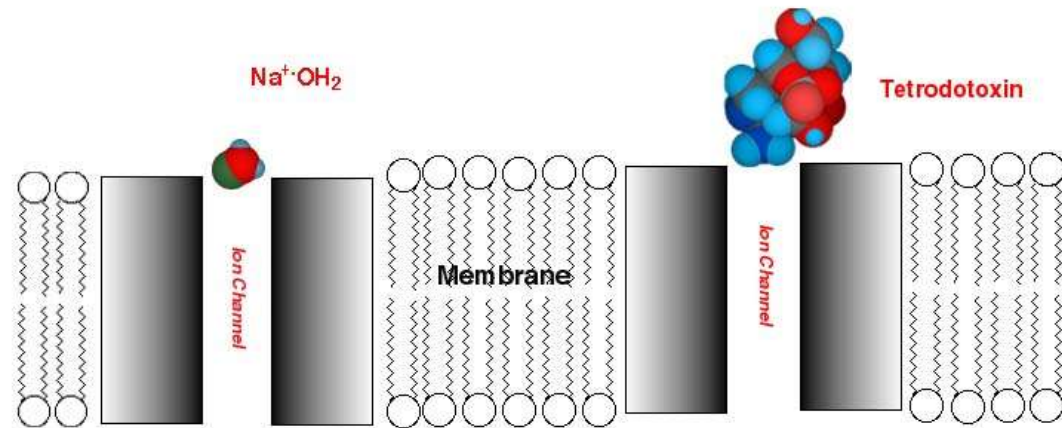
Voltage clamp

Hodgkin & Huxley
napěťový zámek, 1963.

Dodávaný proud kompenzuje
iontové toky tak, aby napětí
zůstalo konstantní. Proud
je registrován.



Jak zajistit, že měříme jen jeden iont a ne směs mnoha?
Blokátory kanálů pomohou zaměřit se jen na určitý iont
Na – TTX (Tetrodotoxin) – „ucpe“ ústí kanálu
K – TEA (Tetraethyl amonium)



Čtverzubec Tetraodon - fugu

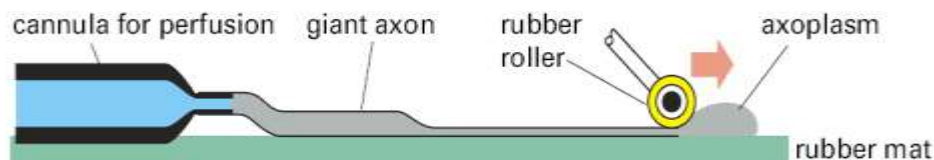


Nebo lze naplnit axon jen roztokem s vybraným iontovým složením. Když se použijí přirozené koncentrace Na a K, tvoří se přirozené AP. a) Záleží tedy hlavně na nich, b) energie je uložena v koncentraci, protože žádné jiné zdroje nejsou, c) membrána a její vlastnosti jsou podstatné pro vznik a šíření AP

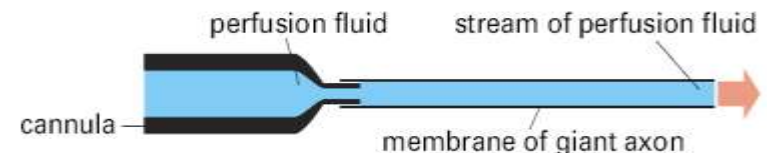
2. Action potentials depend only on the neuronal plasma membrane and on gradients of Na^+ and K^+ across it

The three most plentiful ions, both inside and outside the axon, are Na^+ , K^+ , and Cl^- . As in other cells, the Na^+ - K^+ pump maintains a concentration gradient: the concentration of Na^+ is about 9 times lower inside the axon than outside, while the concentration of K^+ is about 20 times higher inside than outside. Which ions are important for the action potential?

The squid giant axon is so large and robust that it is possible to extrude the gel-like cytoplasm from it, like toothpaste from a tube,



and then to perfuse it internally with pure artificial solutions of Na^+ , K^+ , and Cl^- or SO_4^{2-} . Remarkably, if (and only if) the concentrations of Na^+ and K^+ inside and outside approximate those found naturally, the axon will still propagate action potentials of the normal form. The important part of the cell for electrical signaling, therefore, must be the plasma membrane; the important ions are Na^+ and K^+ ; and a sufficient source of free energy to power the action potential must be provided by the concentration gradients of these ions across the membrane, because all other sources of metabolic energy have presumably been removed by the perfusion.



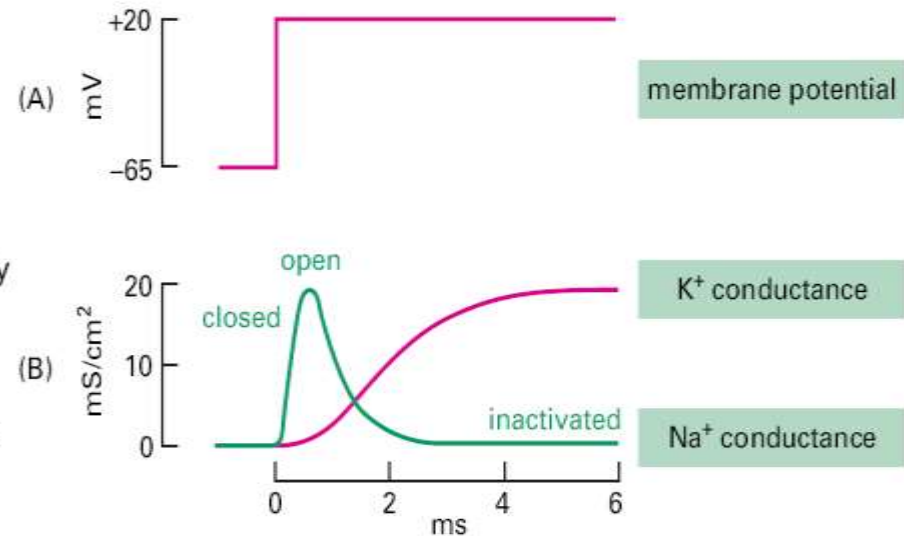
Voltage clamp ještě jednou

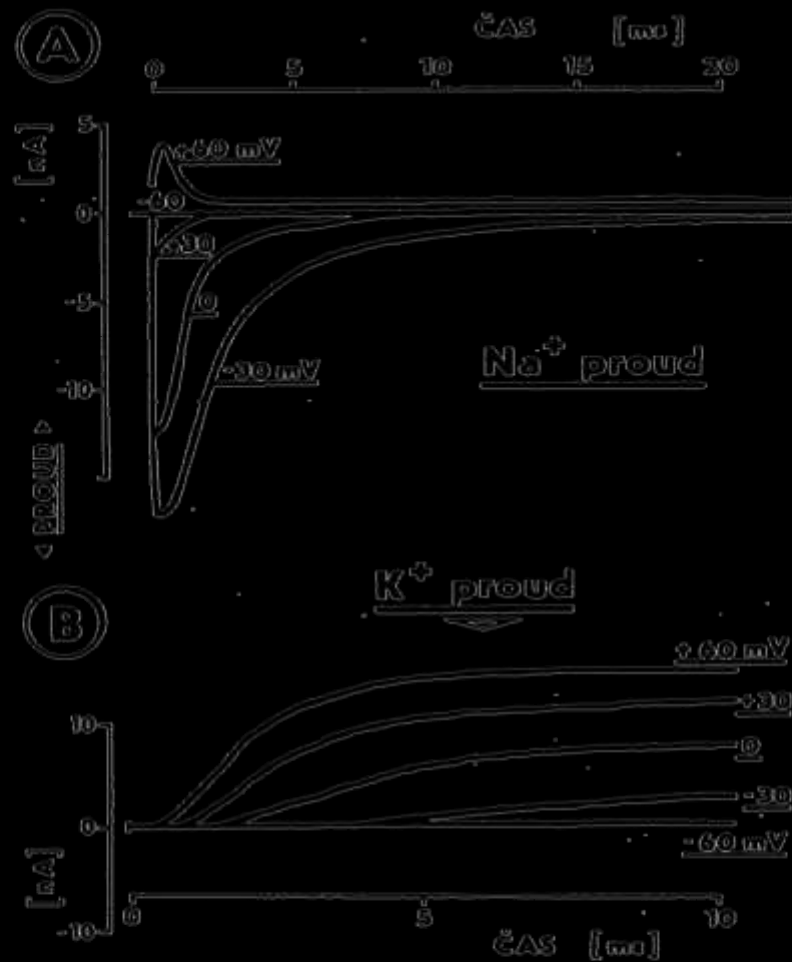
4. Voltage clamping reveals how the membrane potential controls opening and closing of ion channels

The membrane potential can be held constant (“voltage clamped”) throughout the axon by passing a suitable current through a bare metal wire inserted along the axis of the axon while monitoring the membrane potential with another intracellular electrode. When the membrane is abruptly shifted from the resting potential and held in a depolarized state (A), Na^+ channels rapidly open until the Na^+ permeability of the membrane is much greater than the K^+ permeability; they then close again spontaneously, even though the membrane potential is clamped and unchanging. K^+ channels also open but with a delay, so that the K^+ permeability increases as the Na^+ permeability falls (B). If the experiment is now very promptly repeated, by returning the membrane briefly to the resting potential and then quickly depolarizing it again, the response is different: prolonged depolarization has caused the Na^+ channels to enter an inactivated state, so that the second depolarization fails to cause a rise and fall similar to the first. Recovery from this state requires a

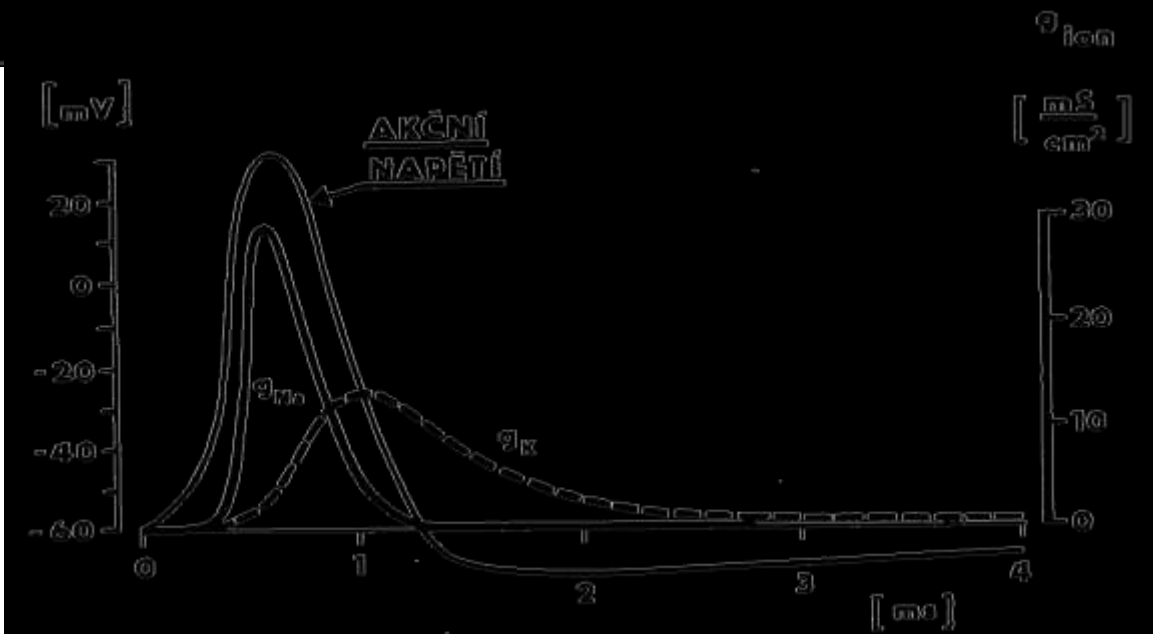
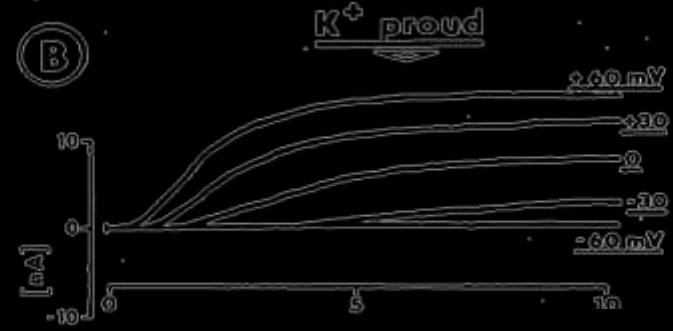
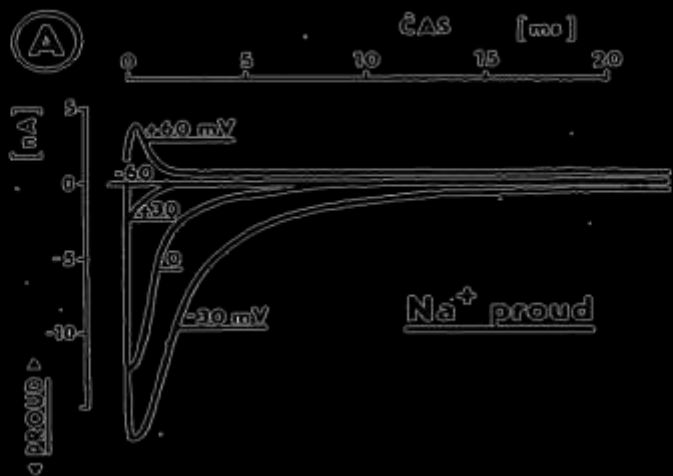
relatively long time—about 10 milliseconds—spent at the repolarized (resting) membrane potential.

In a normal unclamped axon, an inrush of Na^+ through the opened Na^+ channels produces the spike of the action potential; inactivation of Na^+ channels and opening of K^+ channels bring the membrane rapidly back down to the resting potential.





Obr. 14.16 Membránové proudy na narychlňovaných axonech po experimentálně provedené skokové změně membránového napětí. Membránové napětí bylo v čase $t=0$ skokem změněno z -95 mV na hodnoty uvedené u jednotlivých křivek. Křivky vyjadřují naměřené proudy iontů, nejspíše natria, složte kalia. Světlá osa - intenzita proudu, vodorovná osa - čas. Při skoku na -60 mV je skok ještě podprahový a nevyvolává žádný proud. A: Na^+ proud; mezi $+30$ a $+60$ mV mění Na^+ proud polaritu z negativního (směrem do buňky, pod vodorovnou přímkou) na pozitivní (ven z buňky, nad přímkou, pro daný preparát leží do též hodnota rovnovážného napětí pro Na^+ pod $+60$ mV) a s přibývajícím depolarisací teče stále klaději. B: K^+ proud; tento proud síluje po depolarisaci (do pozitivních hodnot, tj. ven z buňky) mnohem pomaleji než proud Na^+ a drží se na stejné výšce během celé depolarisace. (Z DUDRILA 1990b)



Pro Na platí, že napětí -60mV je ještě podprahové a nevyvolá žádný proud iontů. Po překročení prahu, který je asi -50mV , vyvolá nastavení -30mV prudký vtok Na iontů do buňky, který ovšem nemá dlouhého trvání. Tato doba influxu se zkracuje s tím jak snižujeme negativní napětí směrem k 0mV .

Nastavíme-li napětí na membráně dokonce na $+60\text{mV}$ Na tok iontů se obrátí, protože jsme se dostali nad rovnovážné napětí pro Na.

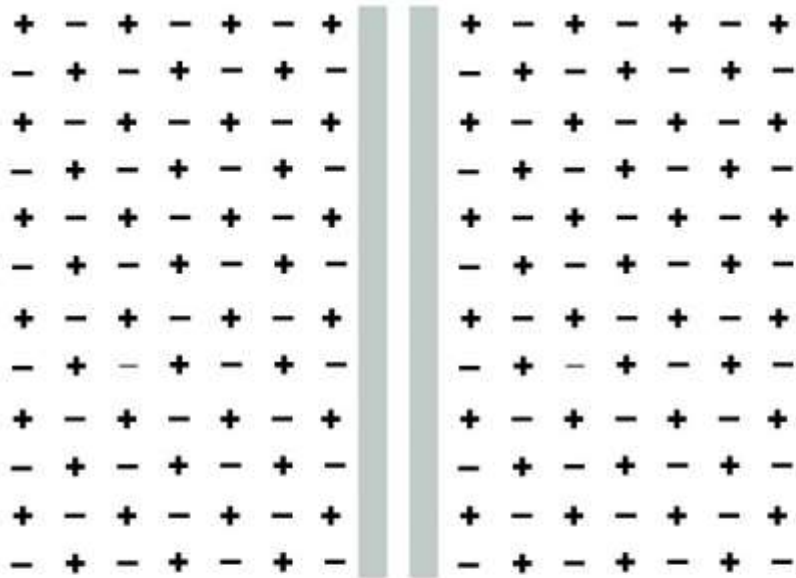
Pro K ionty je charakteristické, že s klesajícím membránovým napětím roste intenzita jejich výtoku z buňky ven mnohem pomaleji než pro Na, ale zato trvá mnohem delší dobu.

Z takto stanovených iontových proudů přes membránu byl sestaven časový průběh propustnosti membrány pro oba ionty.

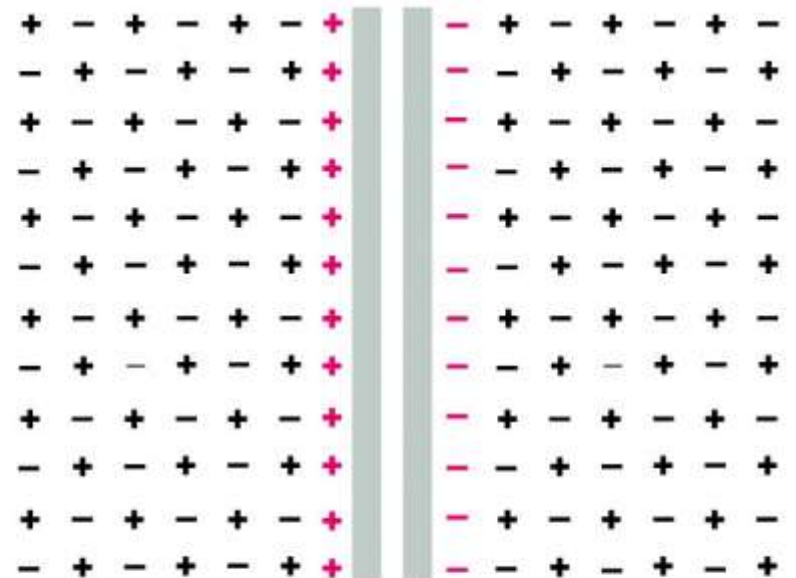
Během vzestupné fáze Na propustnost značně převýší draslíkovou. Propustnost membrány pro Na je závislá na napětí a s klesajícím záporným napětím na membráně roste. Tím ovšem ještě více podpoří vtok Na iontů a další depolarizaci. Díky této pozitivní zpětné vazbě je dosaženo překmitu napětí velmi rychle.

Dříve, než však membránový potenciál může dosáhnout rovnovážného potenciálu sodíku, začne působit samozavírací inaktivační mechanismus a propustnost membrány pro Na začne samovolně opět prudce klesat. Tento mechanismus je rovněž pozitivně závislý na hodnotě depolarizace a má proto charakter negativní zpětné vazby. Navíc se již díky rostoucí depolarizaci zvýšila i propustnost pro K, která je tedy také negativně zpětnovazebná, protože tlumí aktivující stimul.

K uniká z buňky ven a tím vrací potenciál nitra buňky do záporných hodnot směrem k rovnovážnému potenciálu draslíku. Membrána tedy přešla od stavu převažující K propustnosti přes převažující Na propustnost opět k původnímu stavu.



exact balance of charges on each side of the membrane; membrane potential = 0



a few of the positive ions (*red*) cross the membrane from right to left, leaving their negative counterions (*red*) behind; this sets up a nonzero membrane potential

Figure 11-22 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Až 100.000 AP bez Na/K pumpy.

Až 100.000 AP bez Na/K pumpy.
 Koncentrace během jednoho AP
 zůstávají téměř stejné.

Co se mění, jsou hodnoty
 propustnosti P_k , které řídí změny
 potenciálu E_r .

Rovnovážný potenciál – pro daný iont
 Nernstova r.

$$E_{ion} = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[ion]_e}{[ion]_i}$$

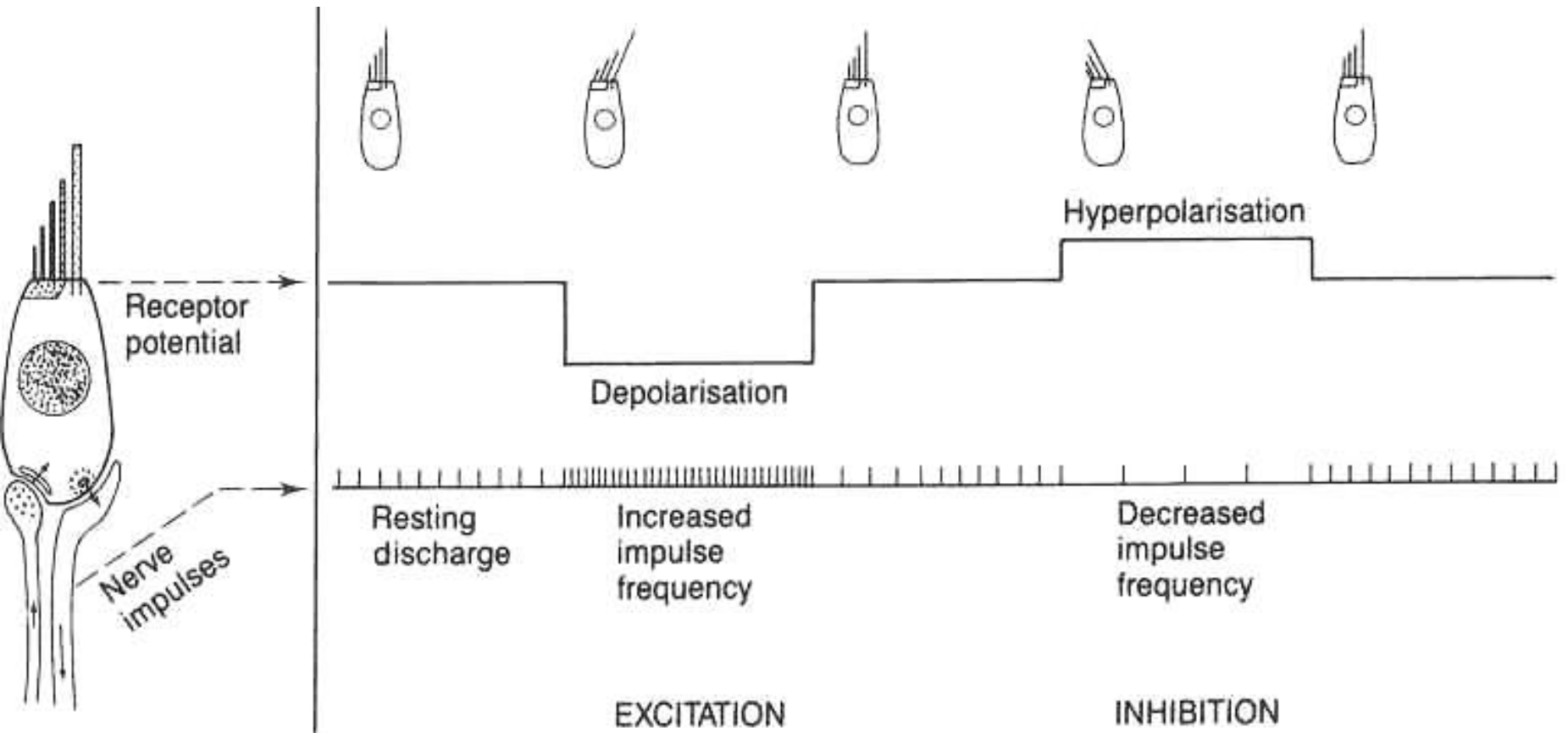
$$E_{ion} = 61mV \log \frac{[ion]_e}{[ion]_i}$$

Goldman-Hodgkin-Katz r.

$$E_r = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_e + P_{Na}[Na^+]_e + P_{Cl}[Cl^-]_i}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_e}$$

Gradient Intra/Extra	Rovnovážný potenciál
1:12	+67 mV
39:1	-98 mV

K čemu ještě voltage clamp?



Když je potřeba zamezit zpětnovazebným dějům závislým na napětí, které by komplikovaly měření – možnost zmrazit napětí membrány.

Lze tak řešit např. problémy:

- Otvírají se Na nebo zavírají K kanály?

- Když nás zajímají změny potenciálu při mechanickém fráždění vláskové buňky.

Zamknutí membrány vyřazuje napětově citlivé kanály a iontové toky jsou důsledkem jen mechanické manipulace.

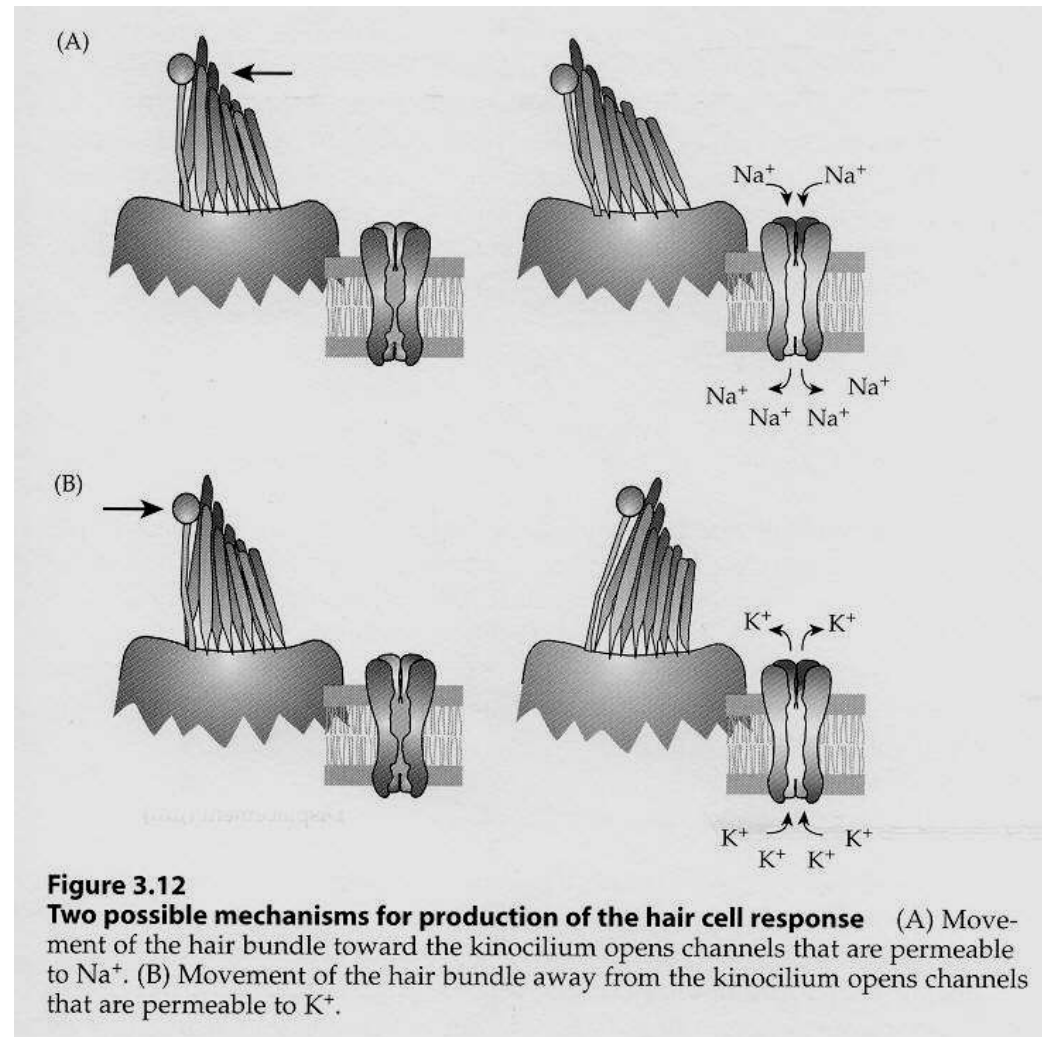


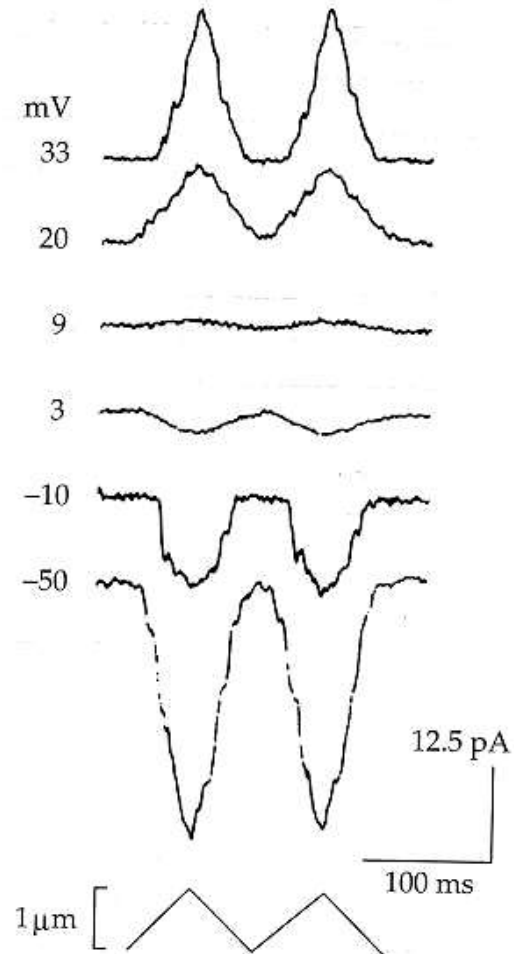
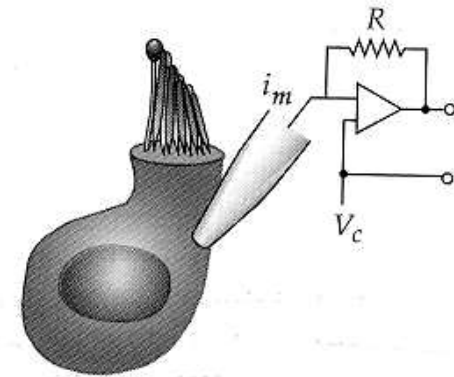
Figure 3.12

Two possible mechanisms for production of the hair cell response (A) Movement of the hair bundle toward the kinocilium opens channels that are permeable to Na⁺. (B) Movement of the hair bundle away from the kinocilium opens channels that are permeable to K⁺.

Výsledek:

Různé proudy přes membránu po pohybech cilií u různých hodnot „zamknutého“ napětí.

Z polarity toků: Není to ani K ani jen Na, jsou to neselektivní toky kationtů.

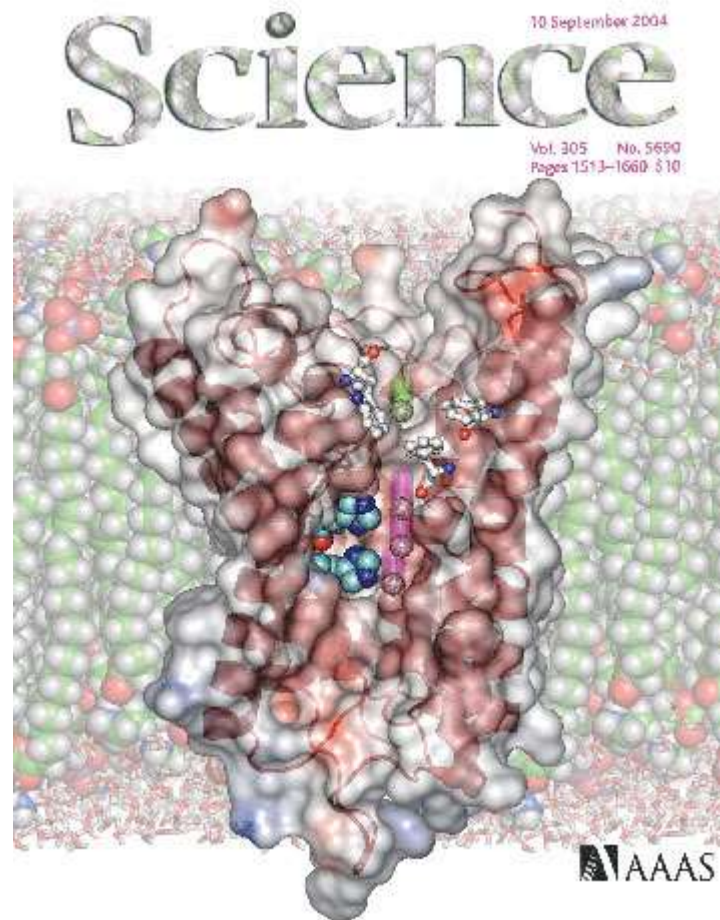


Aby mohla být Na propustnost opět prudce zvýšena, musí být při repolarizaci znovu dosaženo určité minimální záporné hodnoty, což však vyžaduje určitý čas. Během této doby - refrakterní fáze, která následuje těsně po podráždění (asi 1ms), nelze vyvolat další akční potenciál. Frekvence AP je tudíž omezená.

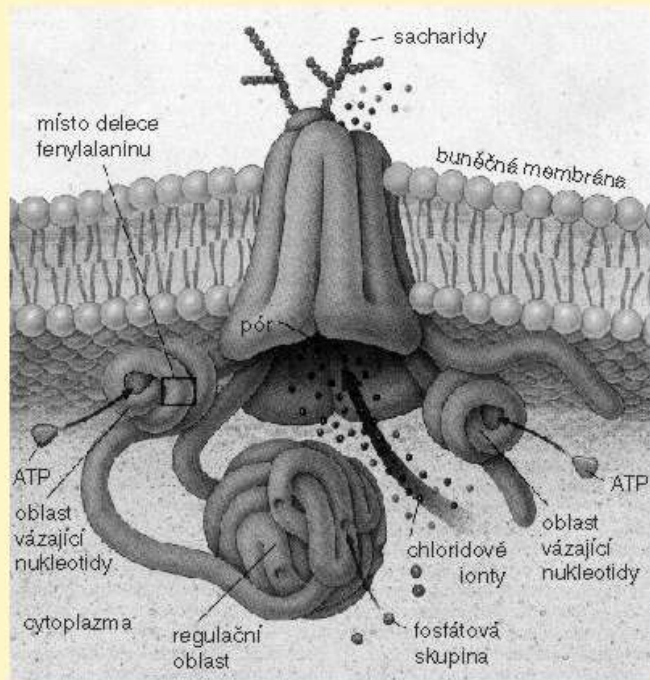
Elektrická vodivost membrány je překvapivě závislá na potenciálu, který je na membránu aplikován. Navíc se ukázalo, že membránové vodivosti pro ionty draselné a sodné jsou různé a na sobě nezávislé. Kinetiku aktivace a dezaktivace popsali H+H systémem nelineárních diferenciálních rovnic, všeobecně známých jako HH rovnice.



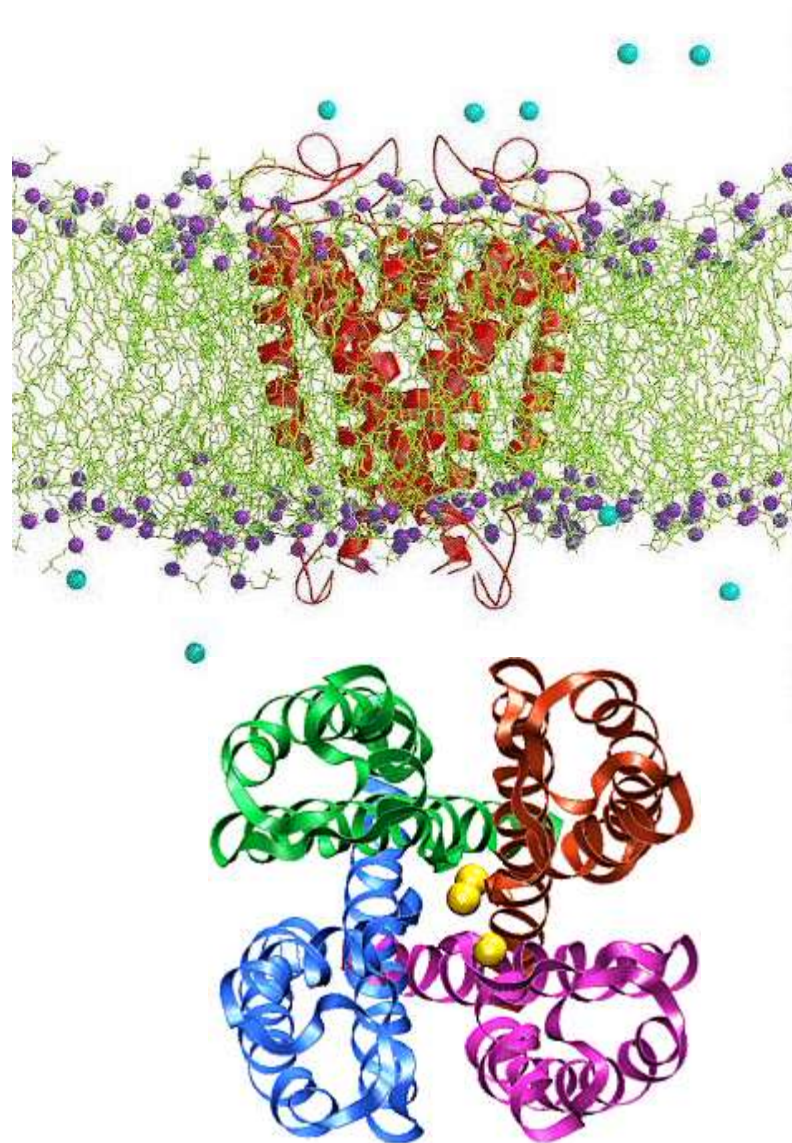
Kanály a patch clamp



Kanály – prostředek udržování integrity buňky a komunikace

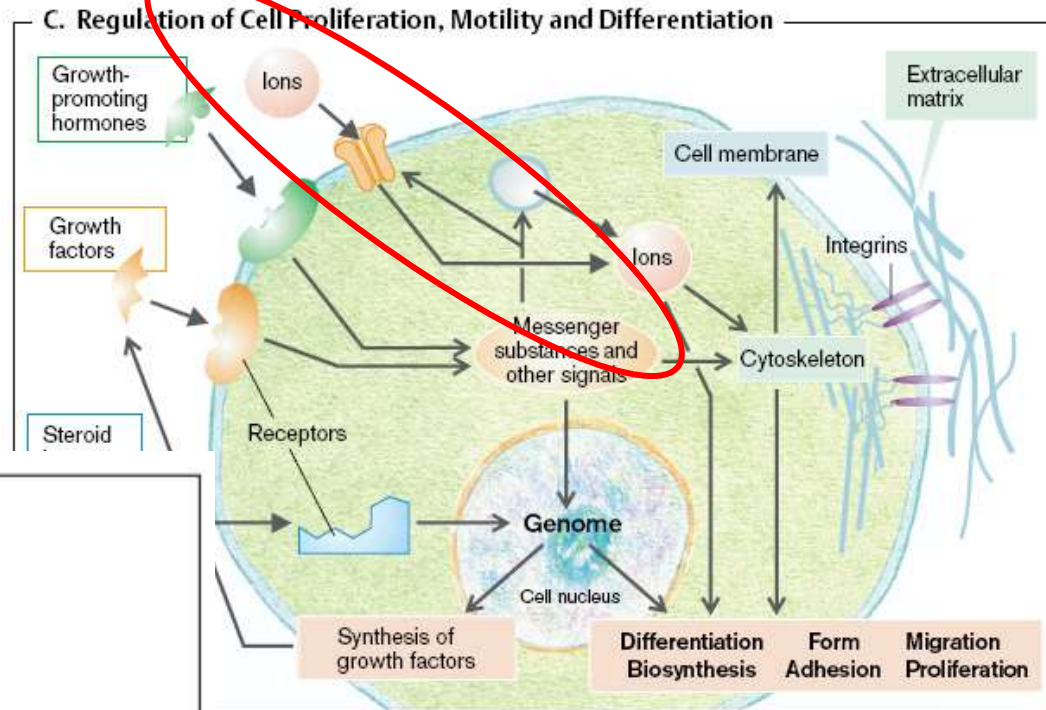


Po ukotvení v membráně se protein CFTR složitě přizpůsobuje – vytváří kanálky, kterými mohou přes membránu proudit chloridové ionty. V cytoplazmatické části proteinu jsou tři regulační oblasti, které se podílejí na uzavírání a otevírání póru. Kanálek se otevře jedině tehdy, když se na CFTR navážou dvě molekuly ATP a zároveň je fosforylována třetí regulační oblast. U mutovaného proteinu je jedna z oblastí vázajících ATP intaktní a membránový kanálek se neotevírá.

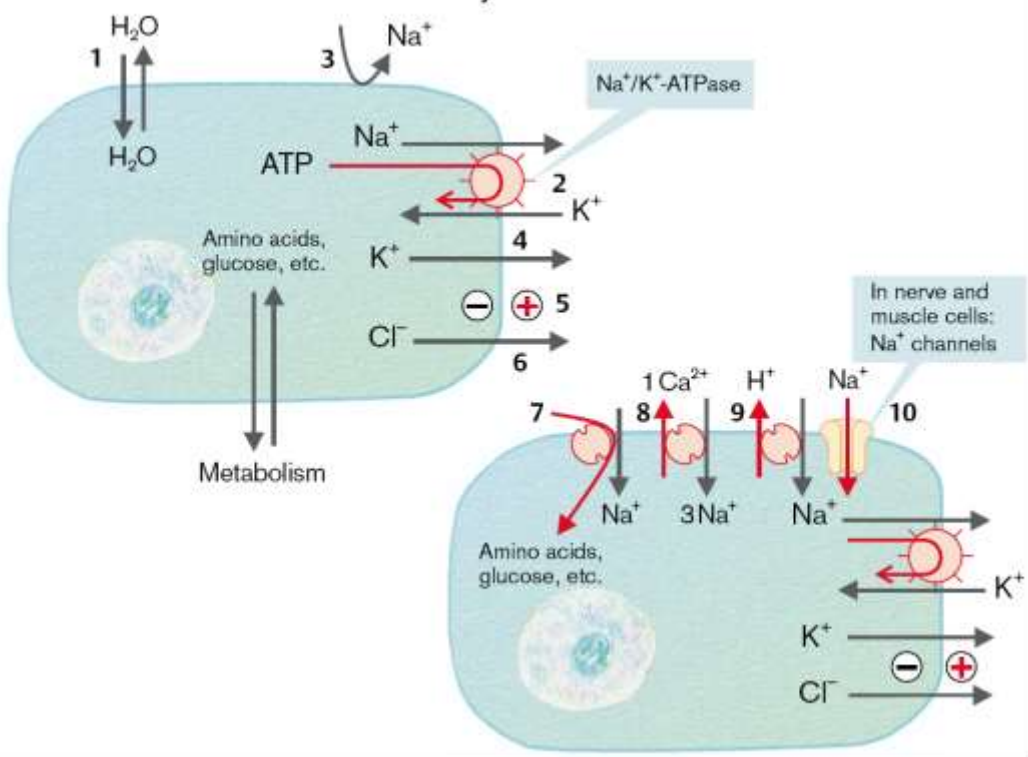


Často i mimo neurony:

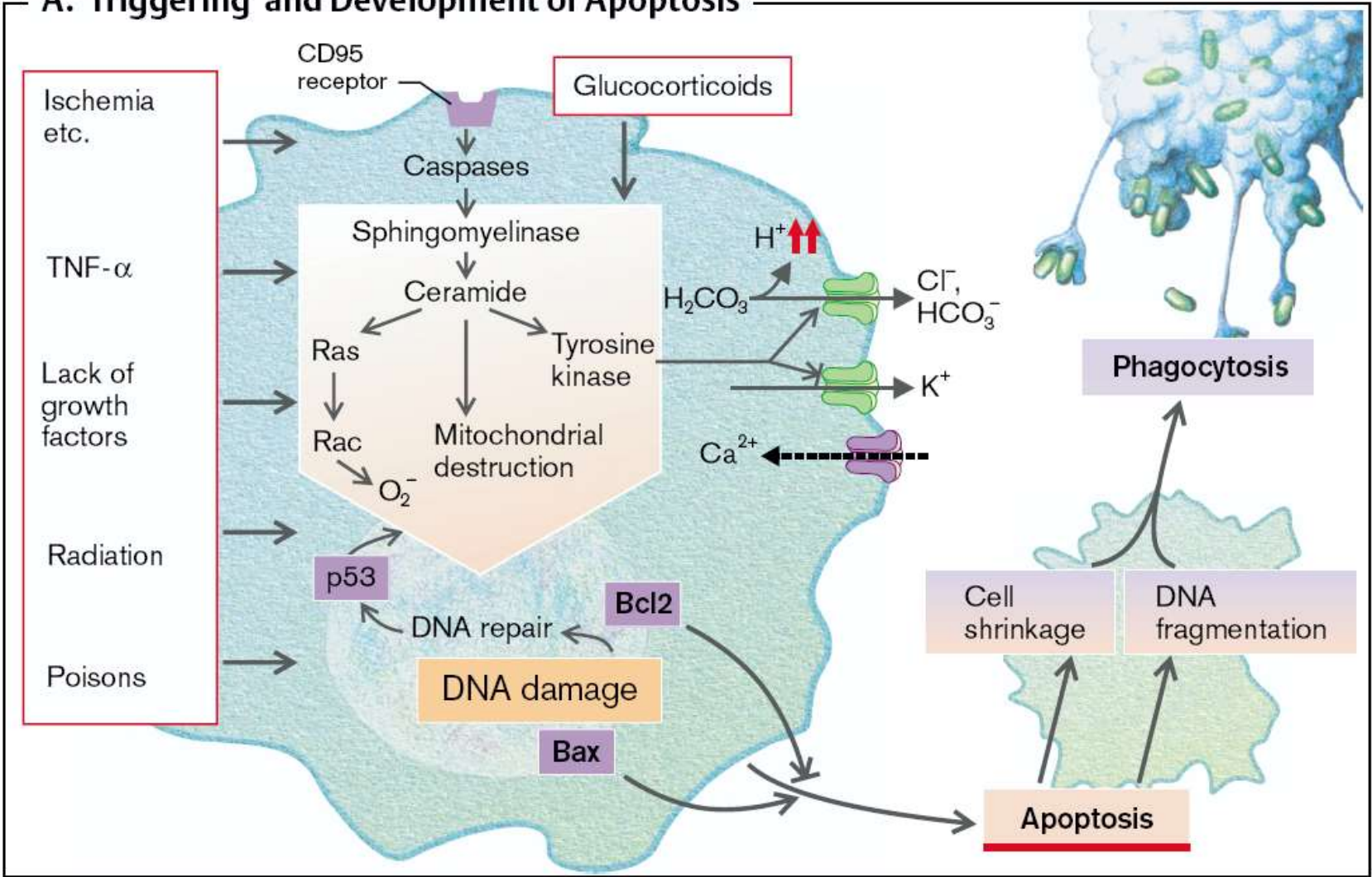
Hlídají objem, osmolalitu, pH, klidové napětí -> transport, signalizaci (Ca)



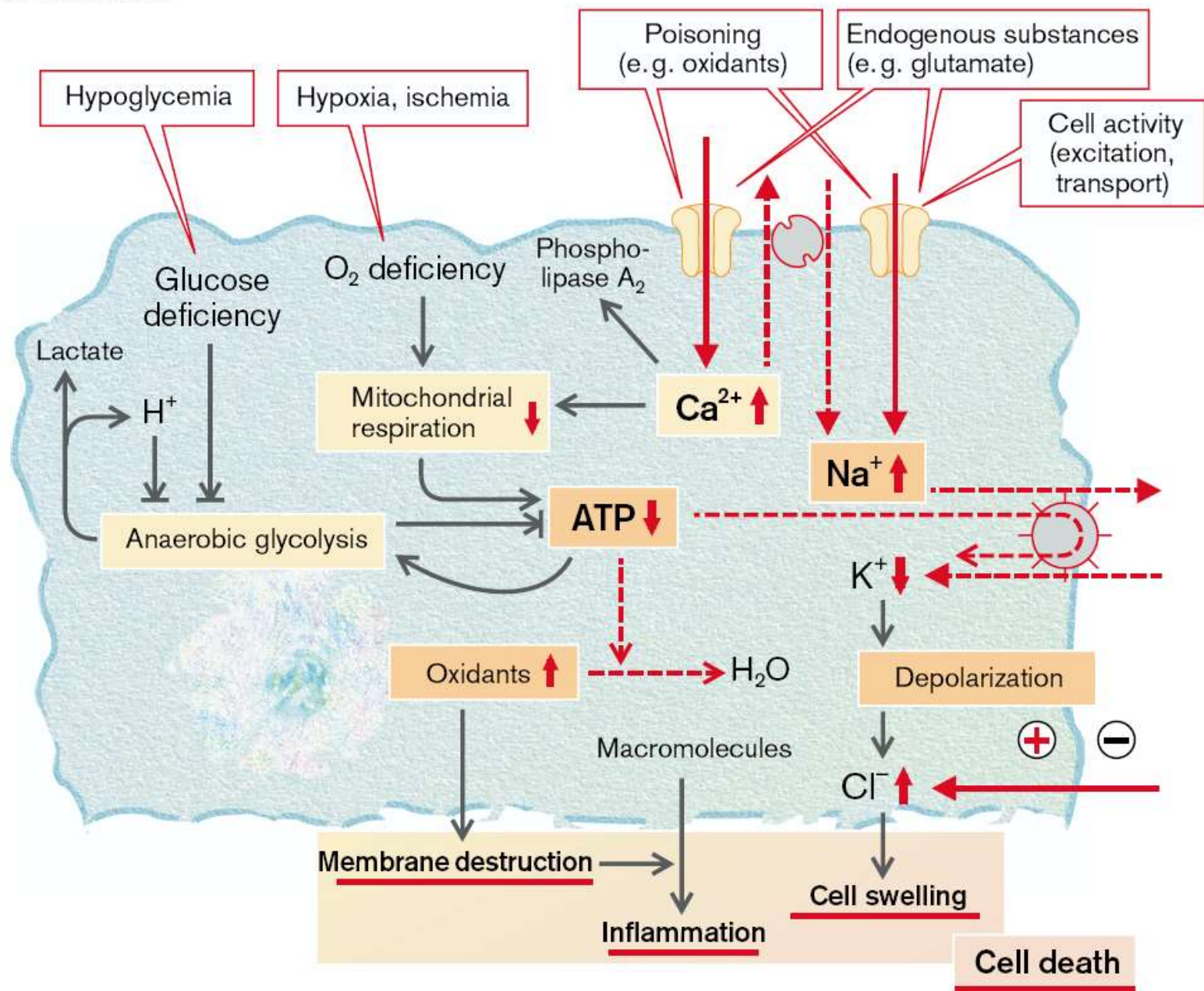
A. Homeostasis of Volume and Electrolytes in the Cell



A. Triggering and Development of Apoptosis



B. Necrosis



Už jste se potkali s kanály?

Buněčná migrace

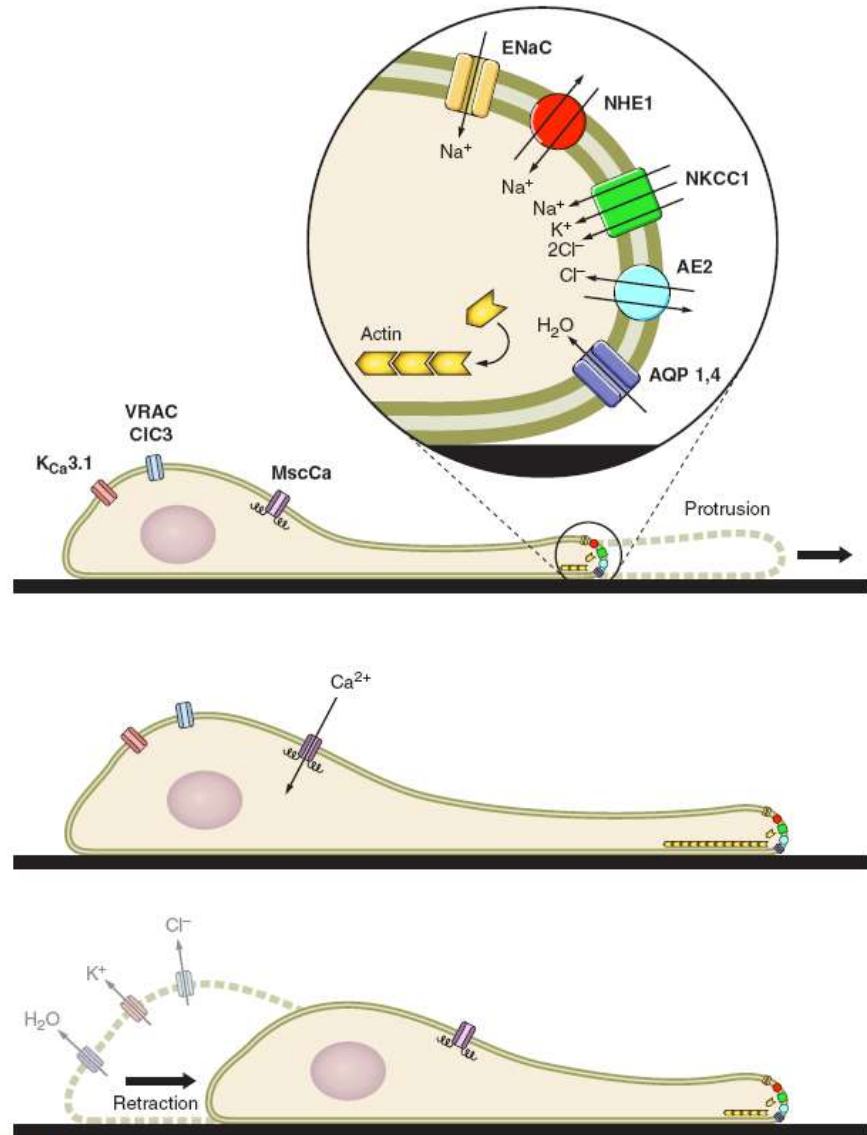


FIGURE 2. Cell volume changes during cell migration. Cell migration is a continuous cycle of protrusion of the cell front and retraction of the trailing end. This can be modeled as a cycle of isosmotic volume increase at the cell front and isosmotic volume decrease at the rear end. This model is based on direct measurements of volume changes in migrating cells [211, 515, 620] and on the subcellular distribution of the relevant ion transport proteins and aquaporins. The molecular nature of the mechanosensitive Ca²⁺ channels implicated in this model is still elusive. The scheme illustrates how members of the "transportome" cooperate during cell migration.

Increasing evidence suggests that ion channels and pumps are involved in the regulation of cell proliferation and migration, and channel proteins have been shown to form macromolecular complexes with cell adhesion molecules and other signaling proteins.

...it is being increasingly suggested that regulation of ion channels and pumps could contribute to cancer progression.

Frontiers in Cellular Neuroscience | www.frontiersin.org 1 March 2015 |
Volume 9 | Article 86

Kanály – prostředek udržování integrity buňky a komunikace

Buněčnými receptory buňky „vidí“ své okolí.
NS „vidí“ jen to, co zasáhne funkci kanálů.

Nevrátkované – určují klidový potenciál
Vrátkované – přijímají signály a řídí místní i akční
potenciály – příjem a zpracování informace NS

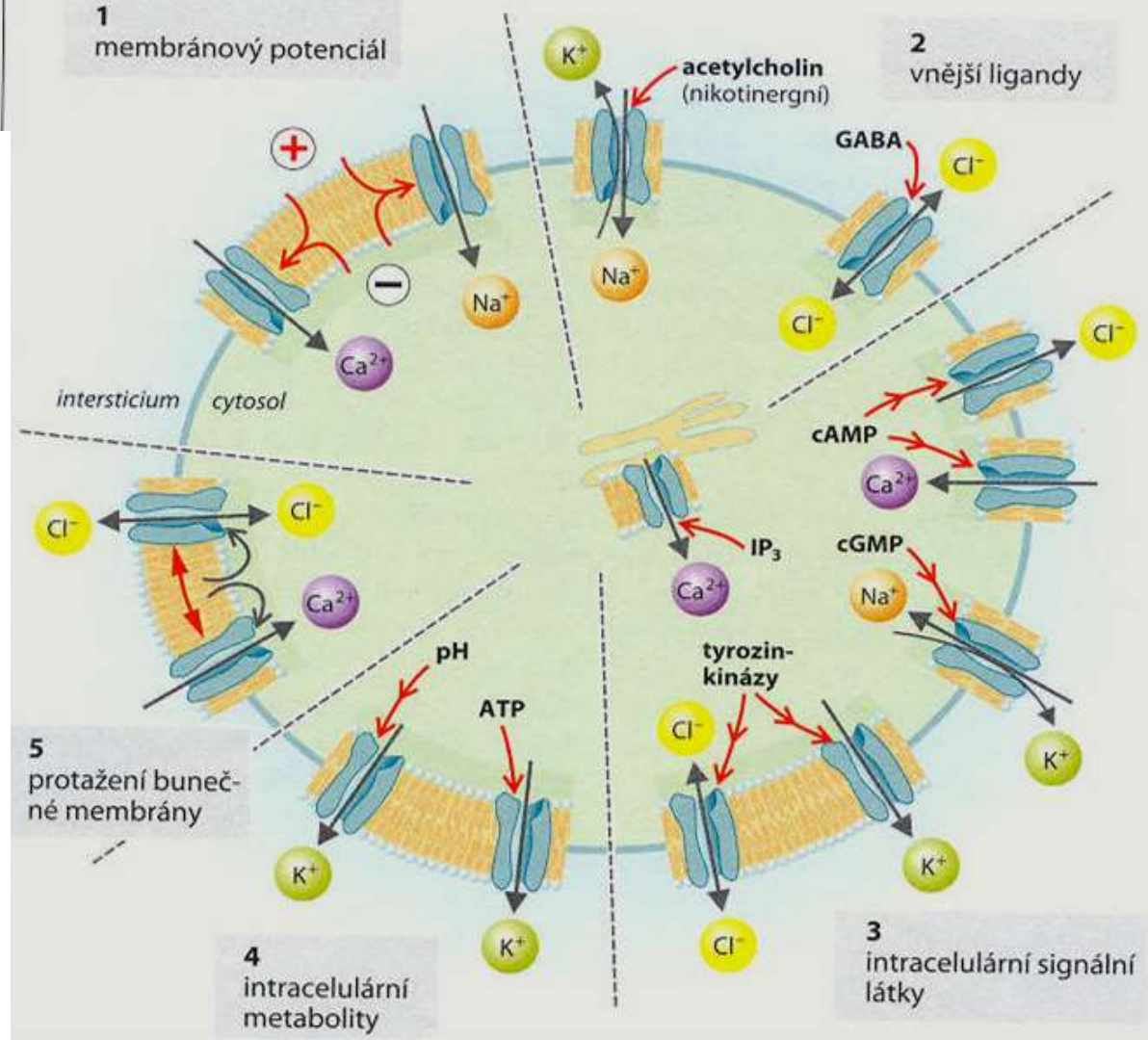
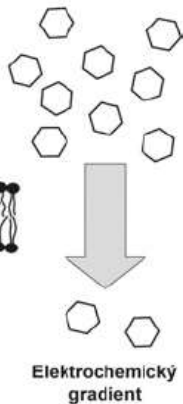
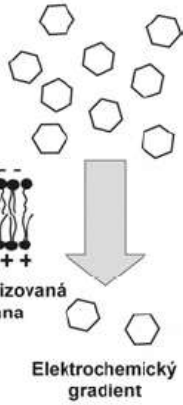
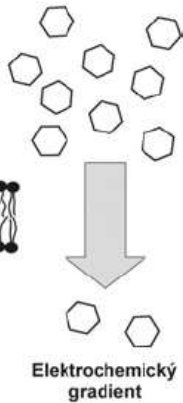
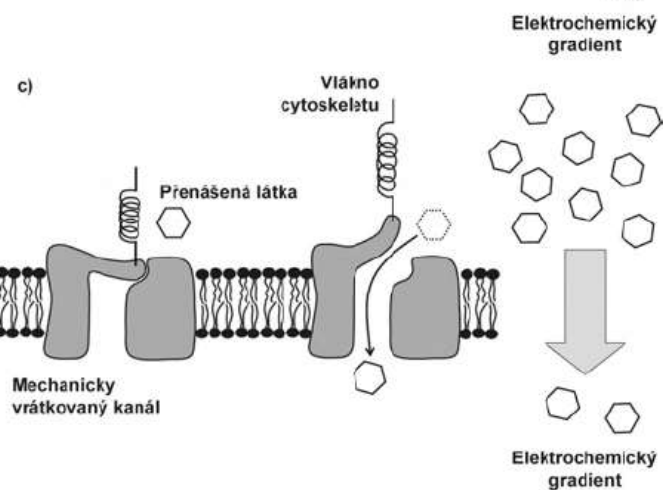
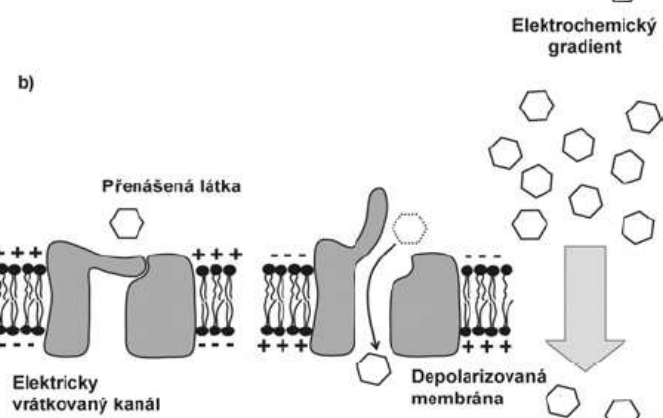
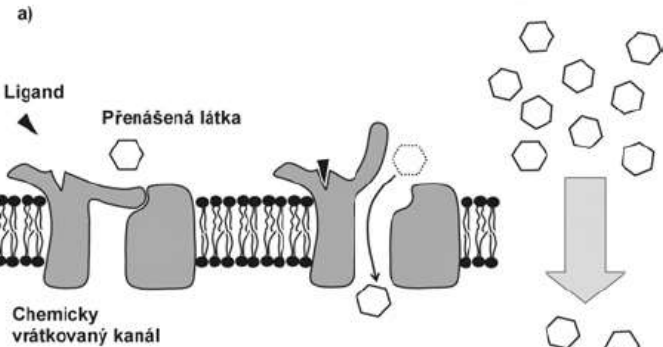


Vrátkované kanály nejsou jen na nervových buňkách !

- Leukocyty, stejně jako rakovinové buňky mají napětově vrátkované kanály
- Paramecium – trepka
- Rostlinné buňky



Kanály – typy vrátkování



Ligandem řízené:

Ionotropní

transdukce – receptor přímo na kanálu

Ligand se váže extracelulárně (transmitter-gated)

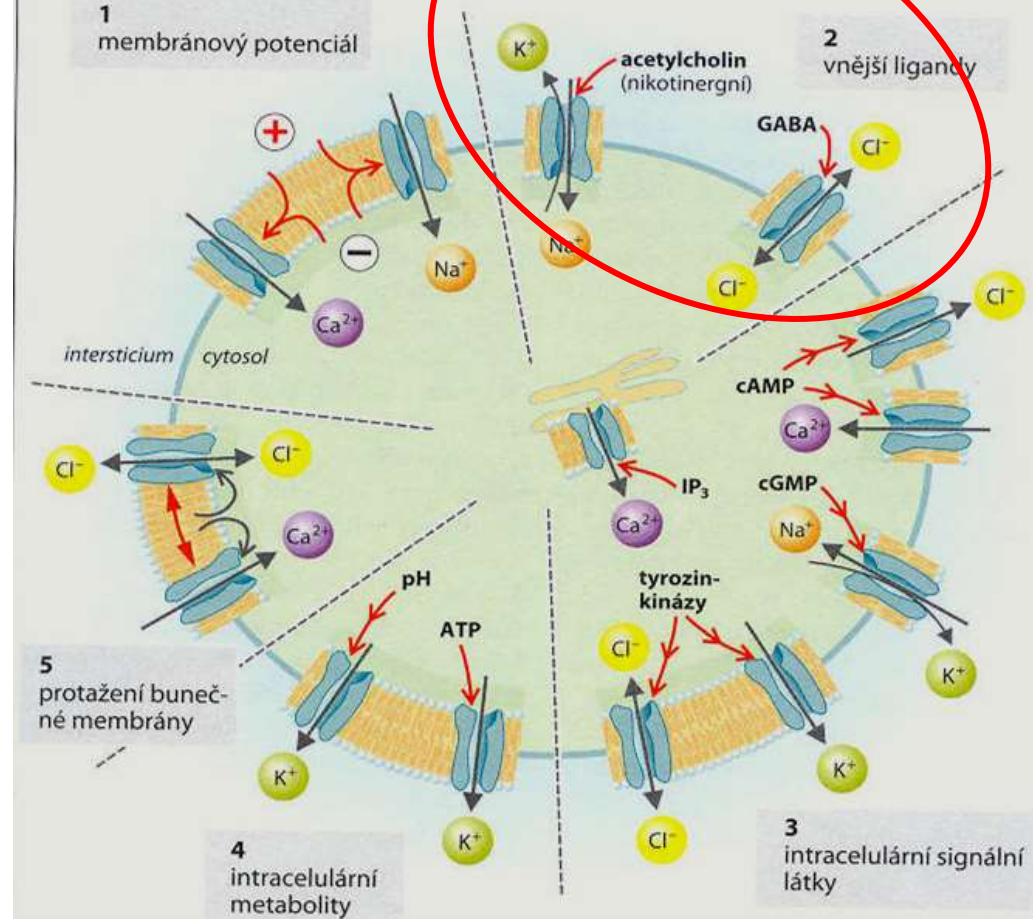
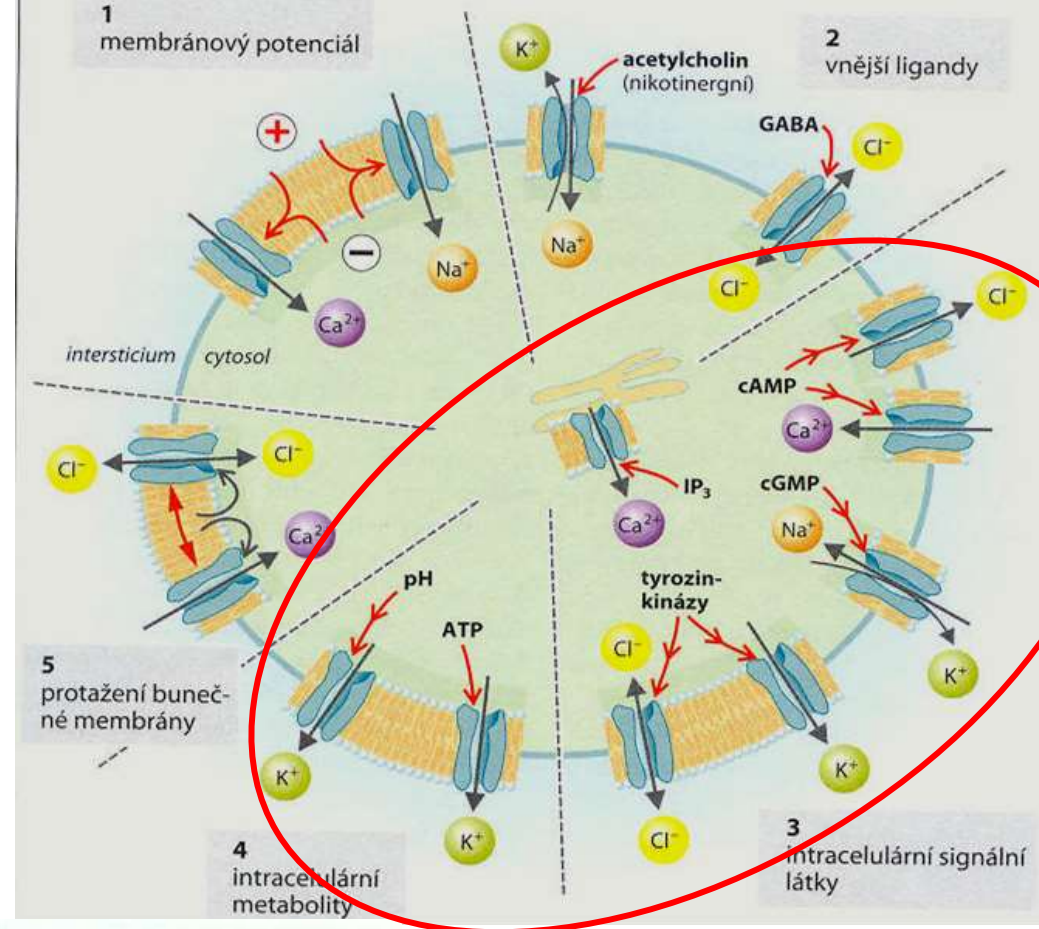


TABLE 12.3 Ionotropic and metabotropic receptors: Structural, functional, and mechanistic differences

Characteristic	Ionotropic receptors	Metabotropic receptors
Receptor molecule	Ligand-gated channel receptor	G protein-coupled receptor
Molecular structure	Five subunits around an ion channel	Protein with seven transmembrane segments; no channel
Molecular action	Open ion channel	Activate G protein; metabolic cascade
Second messenger	No	Yes (usually)
Gating of ion channels	Direct	Indirect (or none)
Type of synaptic effect	Fast EPSP or IPSP	Slow PSPs; modulatory changes (in channel properties, cell metabolism, or gene expression)

- Intracelulárně
 - Ion gated
 - Nucleotide gated
 - Fosforylací řízený



Metabotropní transdukce

TABLE 12.3 Ionotropic and metabotropic receptors: Structural, functional, and mechanistic differences

Characteristic	Ionotropic receptors	Metabotropic receptors
Receptor molecule	Ligand-gated channel receptor	G protein-coupled receptor
Molecular structure	Five subunits around an ion channel	Protein with seven transmembrane segments; no channel
Molecular action	Open ion channel	Activate G protein; metabolic cascade
Second messenger	No	Yes (usually)
Gating of ion channels	Direct	Indirect (or none)
Type of synaptic effect	Fast EPSP or IPSP	Slow PSPs; modulatory changes (in channel properties, cell metabolism, or gene expression)

Struktura – Transmembránové proteiny Rekonstrukce podle vlastností

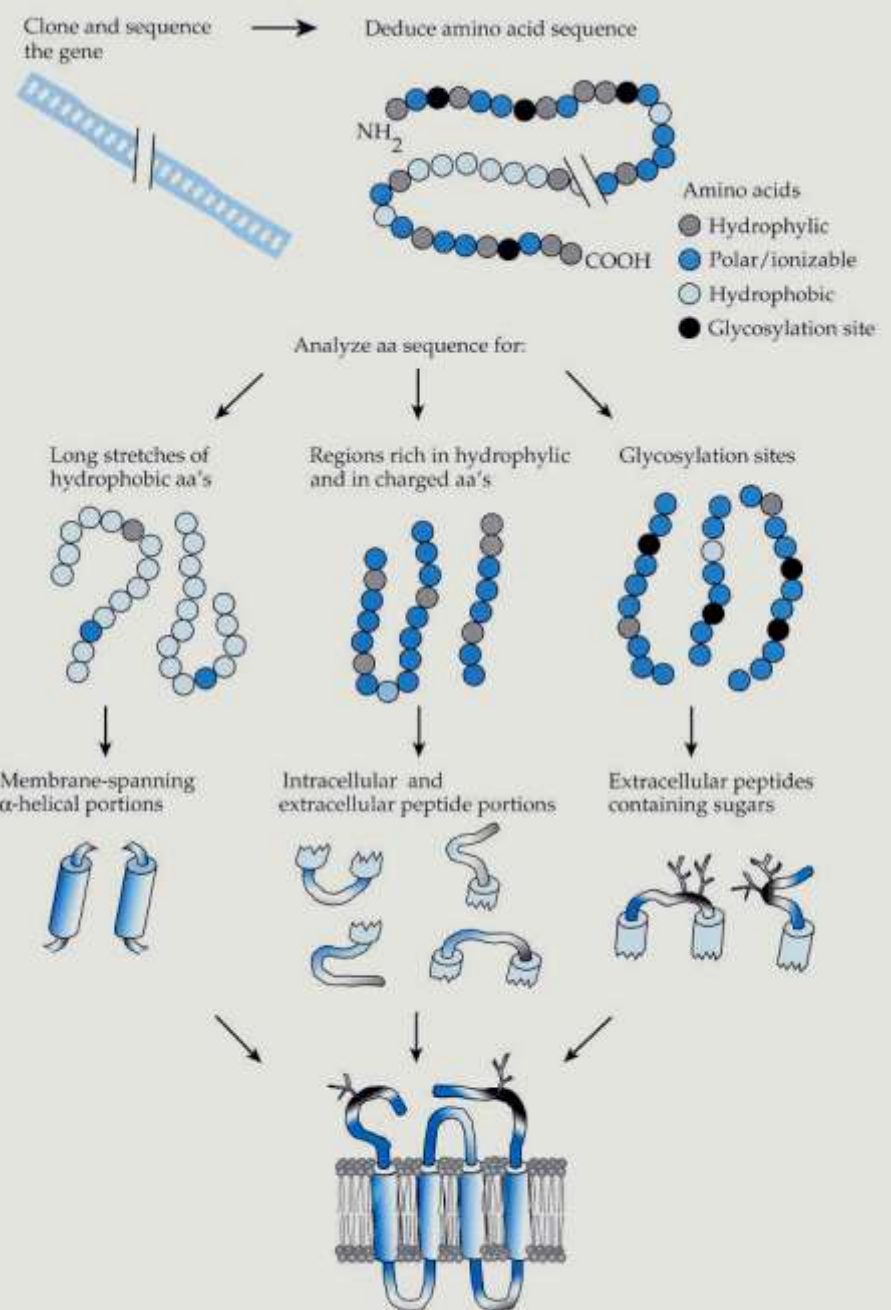
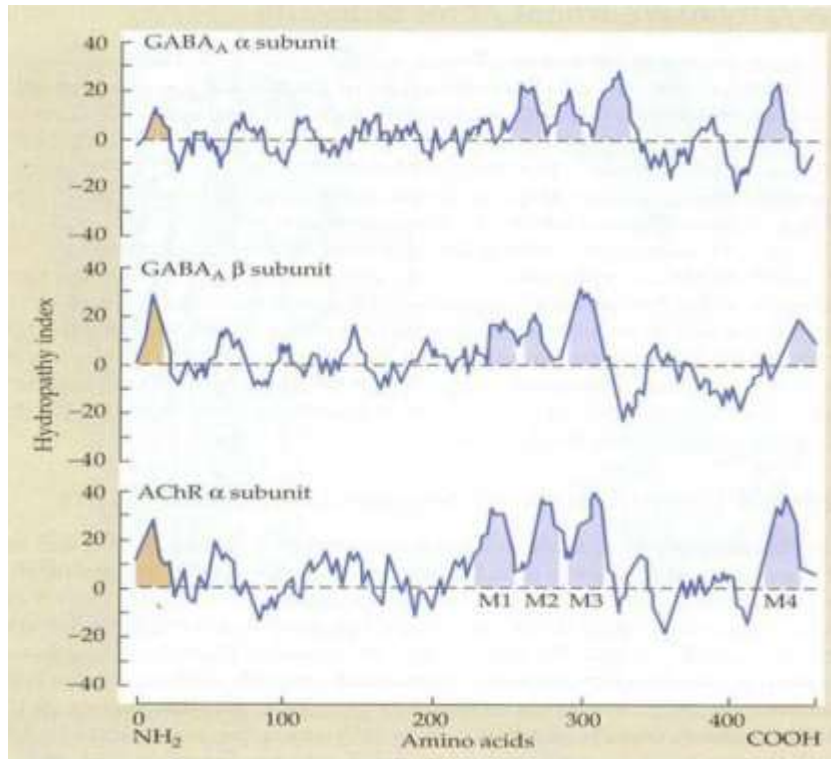


Figure 1.10
Analysis of hydropathy and the folding of membrane proteins The amino acid sequence of a membrane protein can be used to make inferences about protein structure, as described in the text.

X ray krystalografie – prostorový vzhled proteinů tvořících kanály
Proteinový krystal – obsahuje i 10^9 molekul a může přitom zůstat funkční

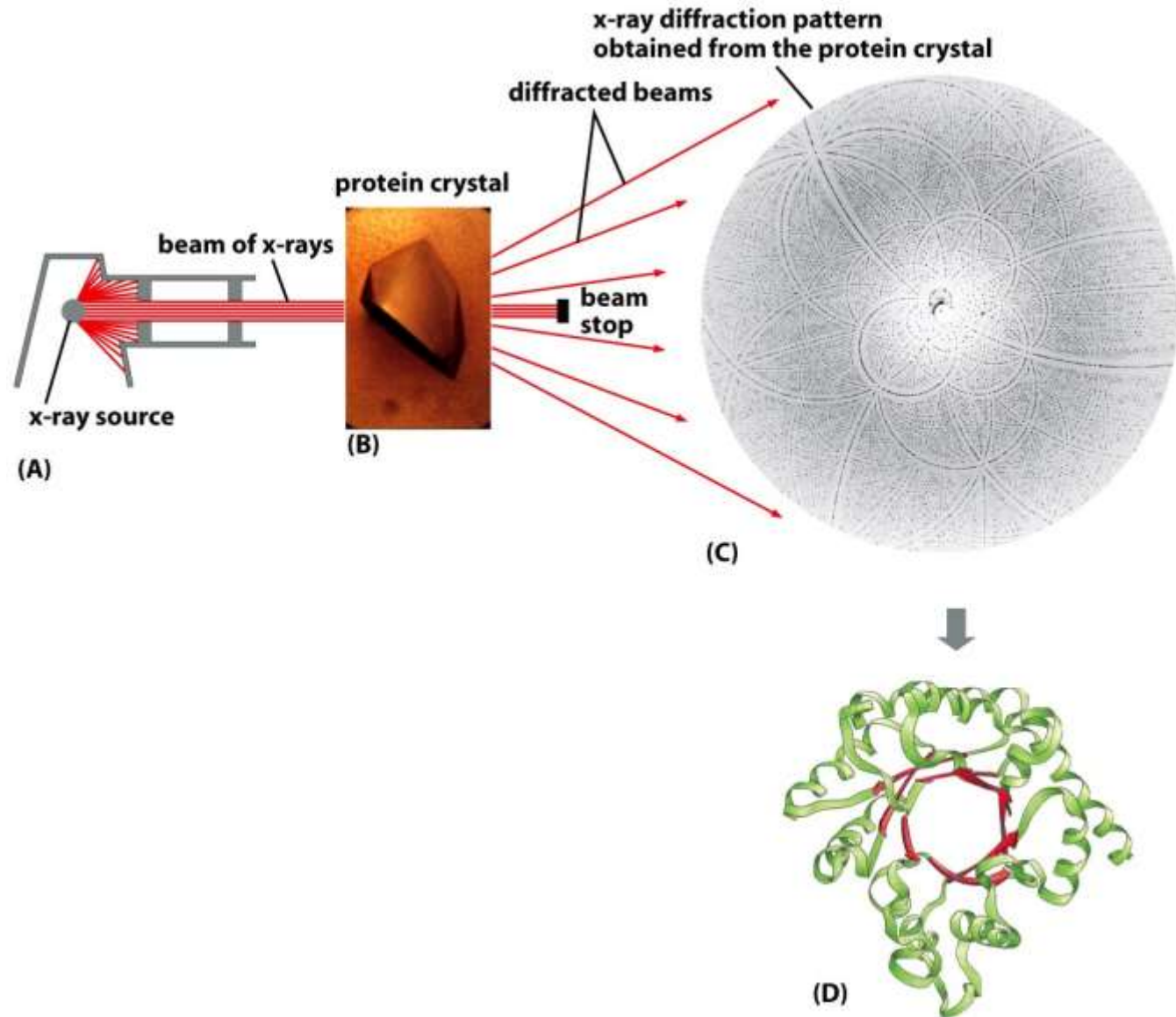
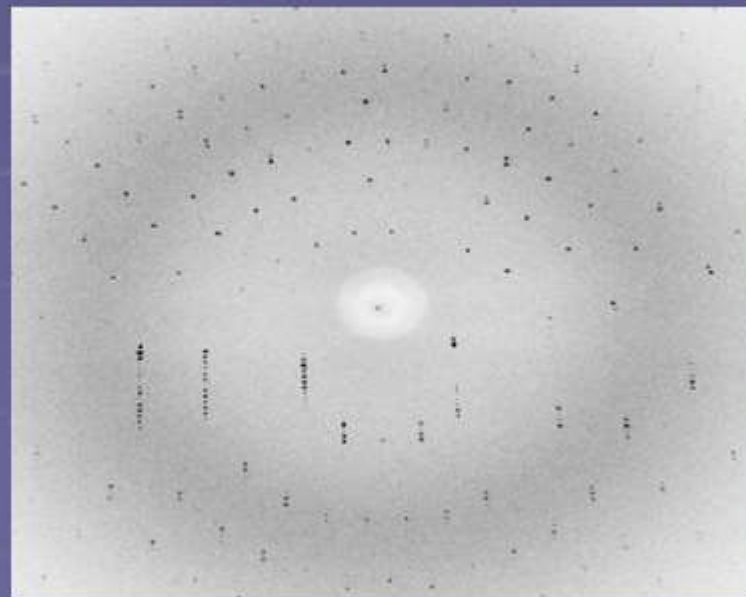
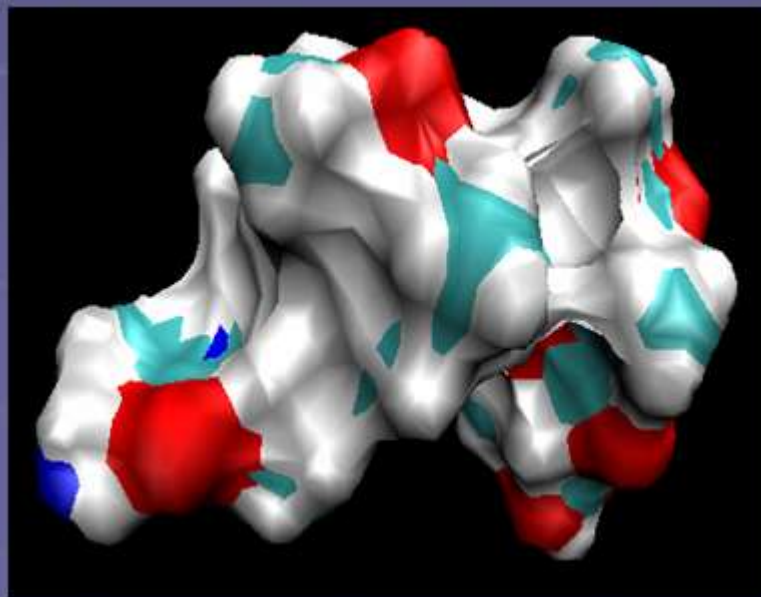
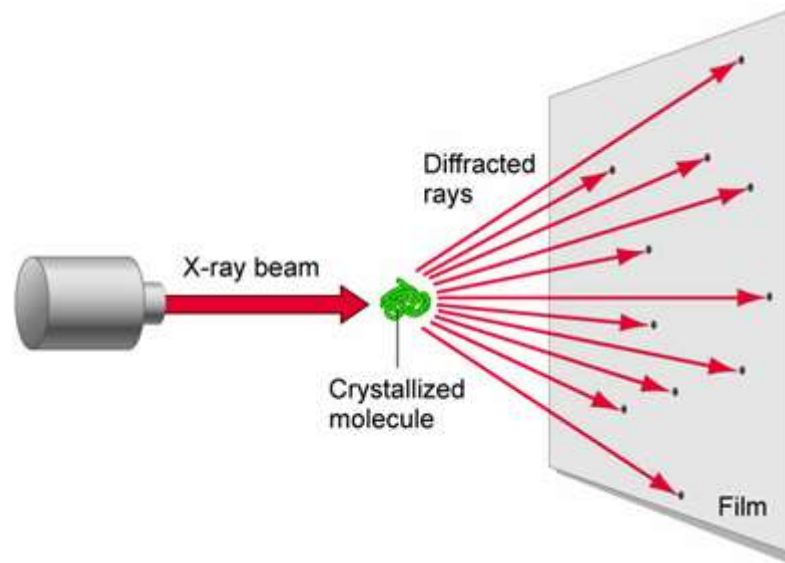
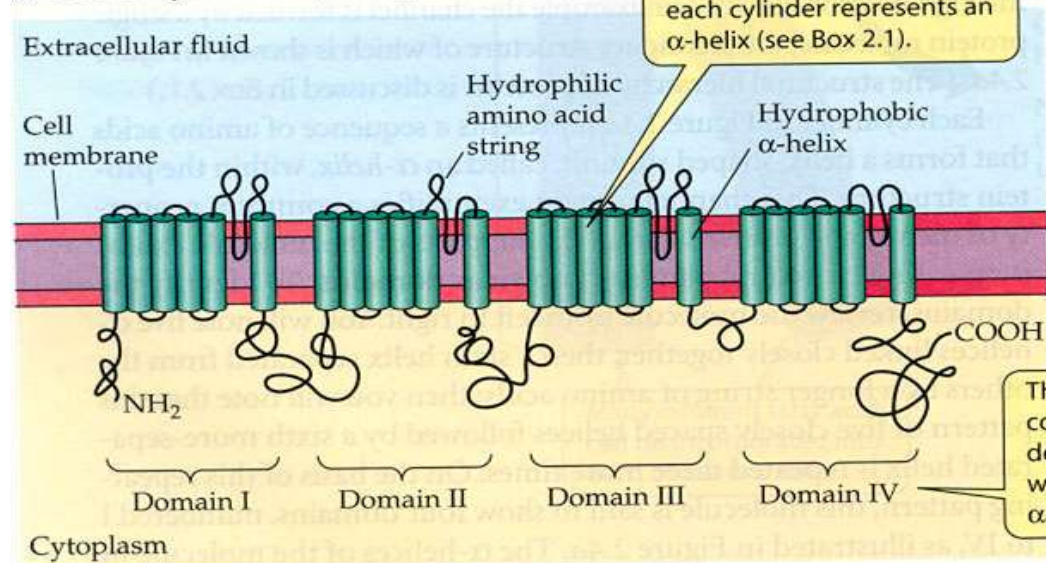


Figure 8-28 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

X ray krystalografie – vzhled proteinu



(a) Secondary structure (linear presentation)



carbohydrate groups always project from the surface, not the inner, cytoplasmic face (see Figure hydrate groups are thought to serve as attachment cellular proteins and as cell recognition sites.

¹ The word fragment *glyco* refers to carbohydrates (after the

Figure 2.4 The structure of a transmembrane propagated Na⁺ channel—illustrating several modes of

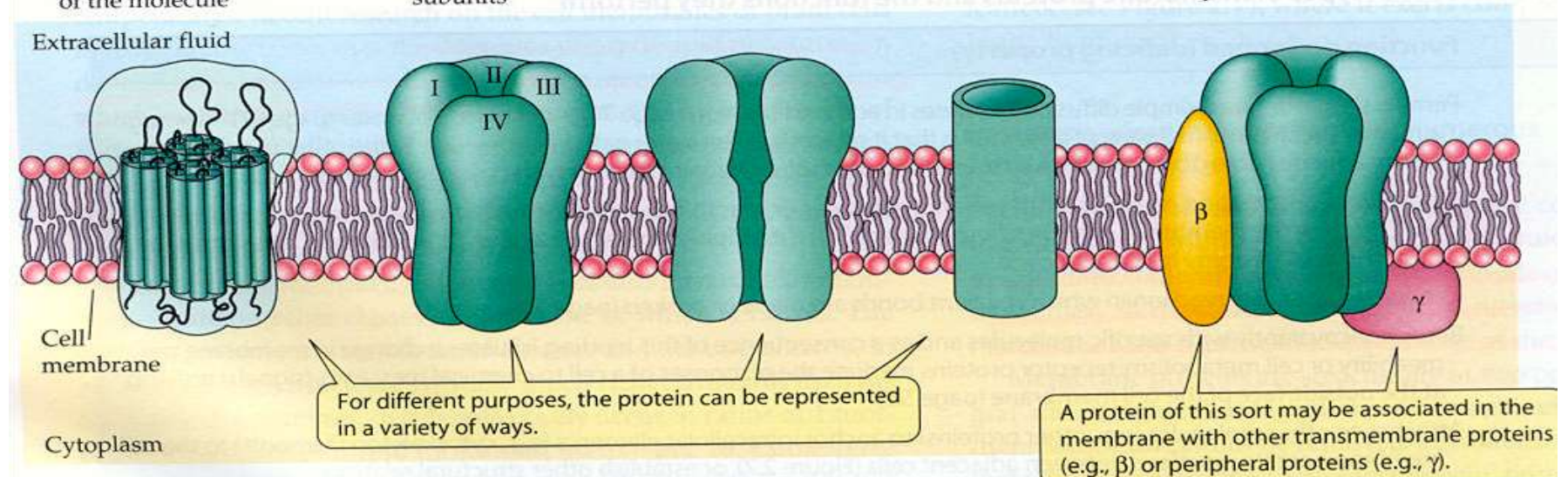
(b) Simplified three-dimensional structure enclosed in a sketch of the envelope of the molecule

(c) Stylized version of chemical structure showing subunits

(d) Semirealistic symbol

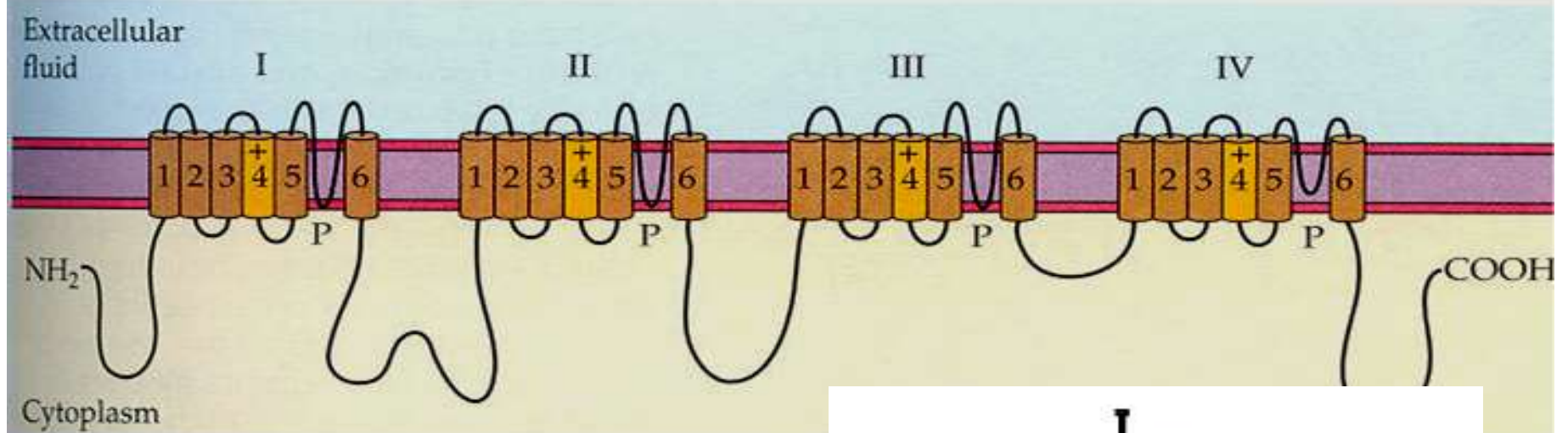
(e) Schematic symbol

(f) Stylized version of chemical structure showing associated protein molecules

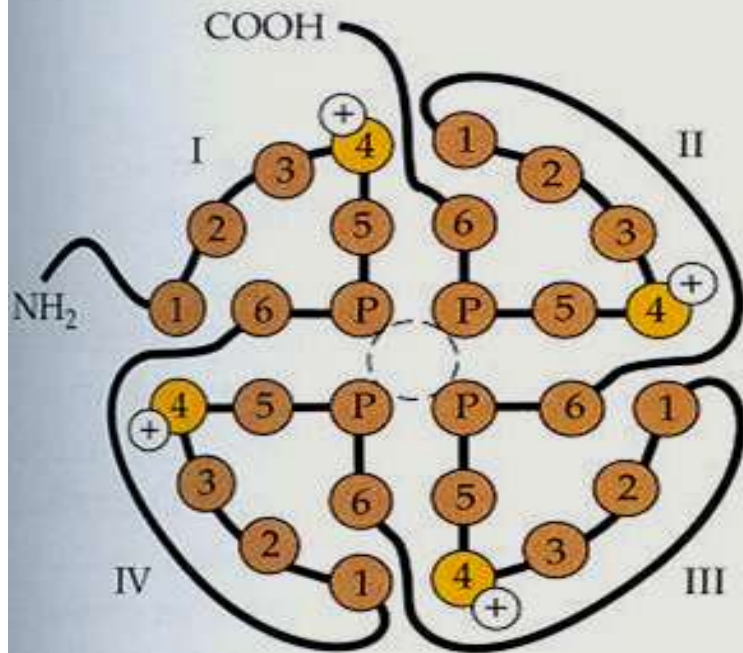


(a) Topology of voltage-gated Na⁺ channels

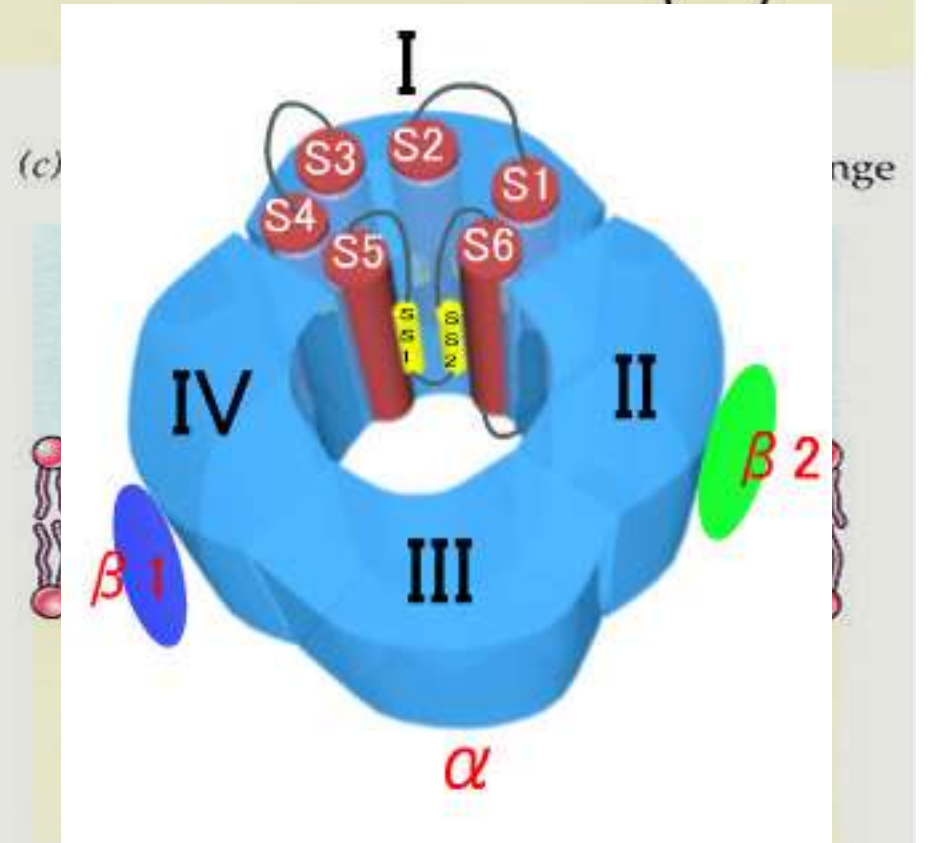
4 domény, 6 segmentů



(b) Surface view of a Na⁺ channel



(c)



Na kanál

- Citlivý na napětí
- Selektivní
- Schopný inaktivace

Citlivý na napětí

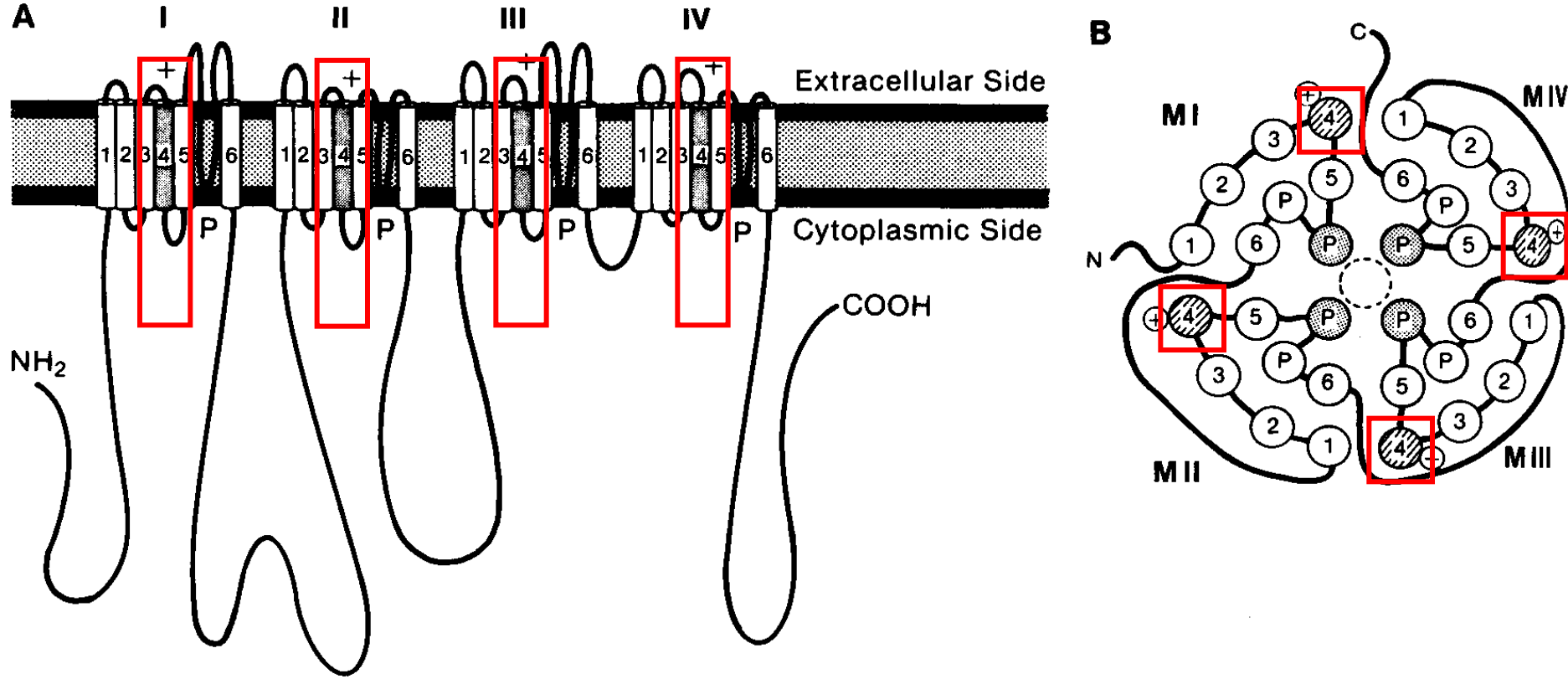
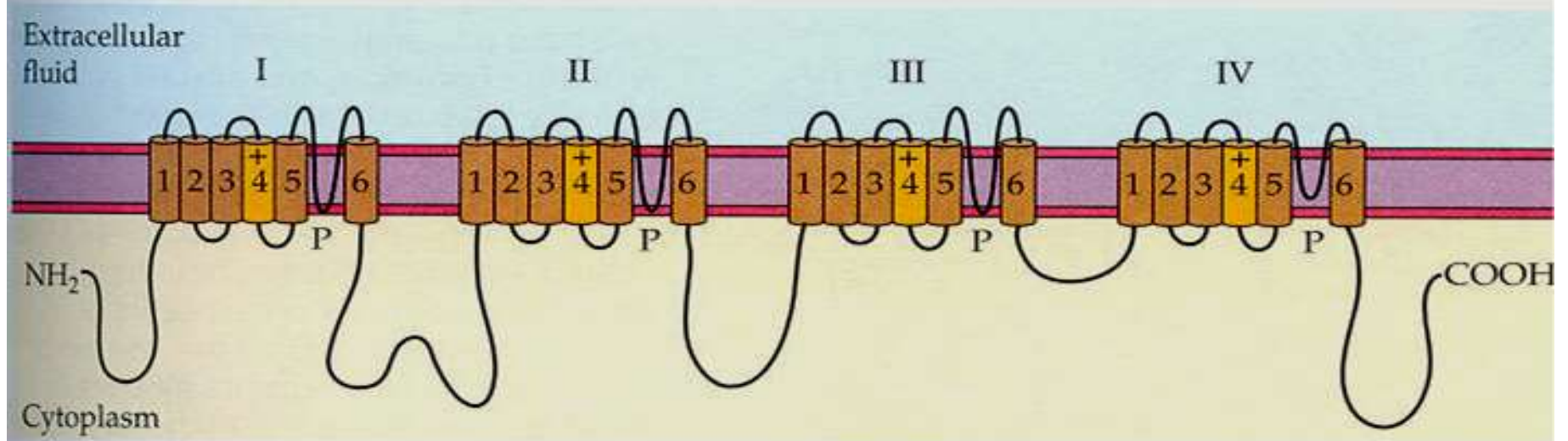
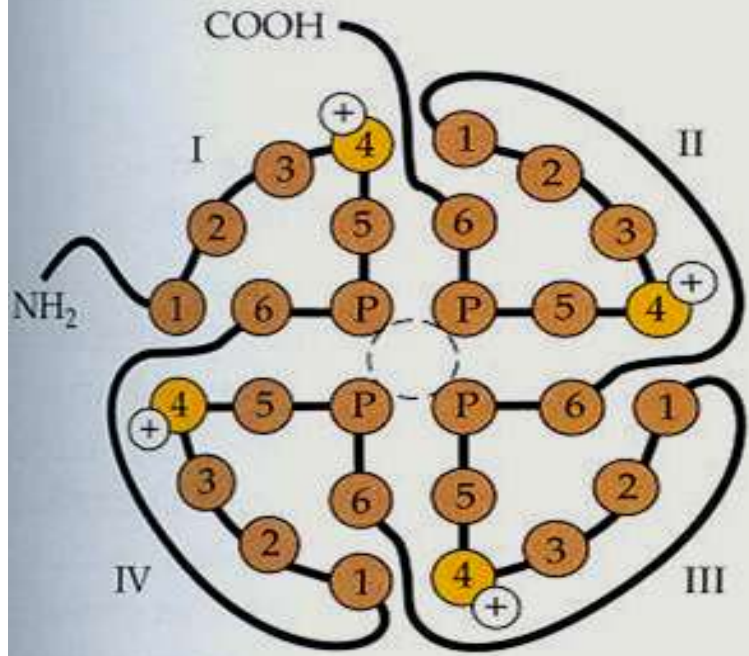


Fig. 5.3 Presumed tertiary structure of the Na⁺ channel protein based on hydropathicity plots of the primary amino acid sequence. **A.** The channel protein consists of four repeating subunits, each containing six presumed transmembrane segments. Segment 4 contains an excess of positively charged residues and is assumed to be the voltage sensor. A long loop between segments 5 and 6 is believed to dip into the membrane and form the face of the pore. A cytoplasmic loop contains the inactivation gate. **B.** View looking down on the membrane to see the arrangement of the four subunits around the central pore. The Ca²⁺ channel protein is similar in its construction. (Modified from Catterall, 1988, and Stevens, 1991, in Kandel et al., 1991)

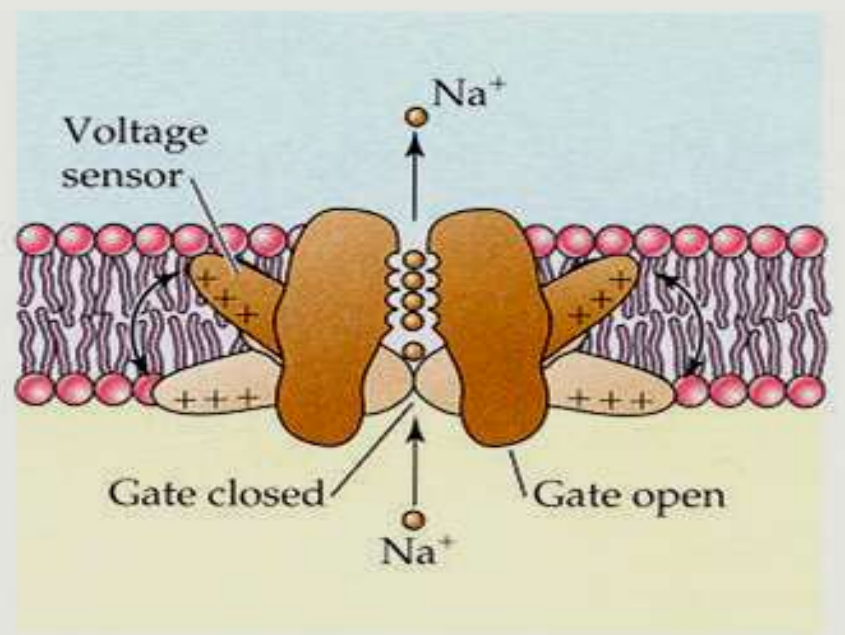
(a) Topology of voltage-gated Na^+ channels



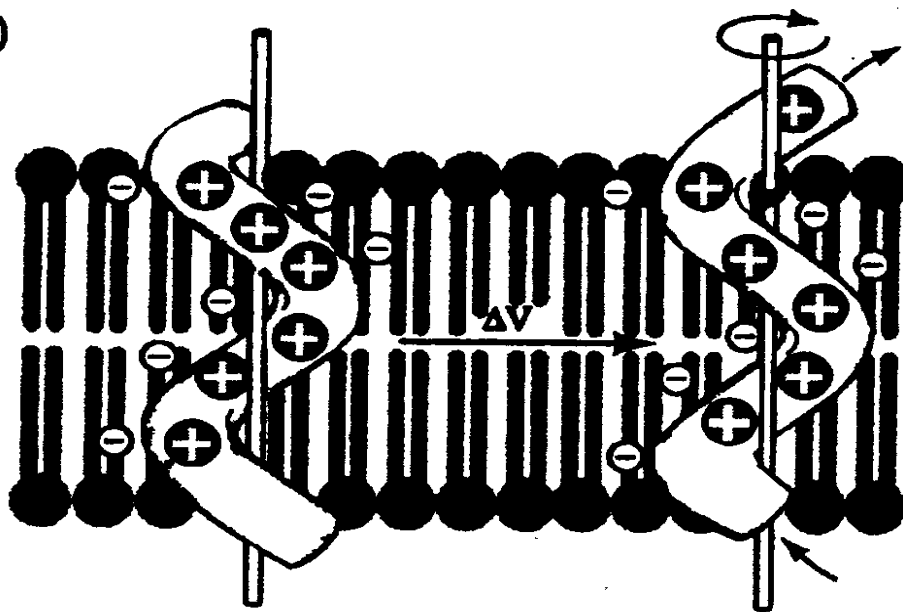
(b) Surface view of a Na^+ channel



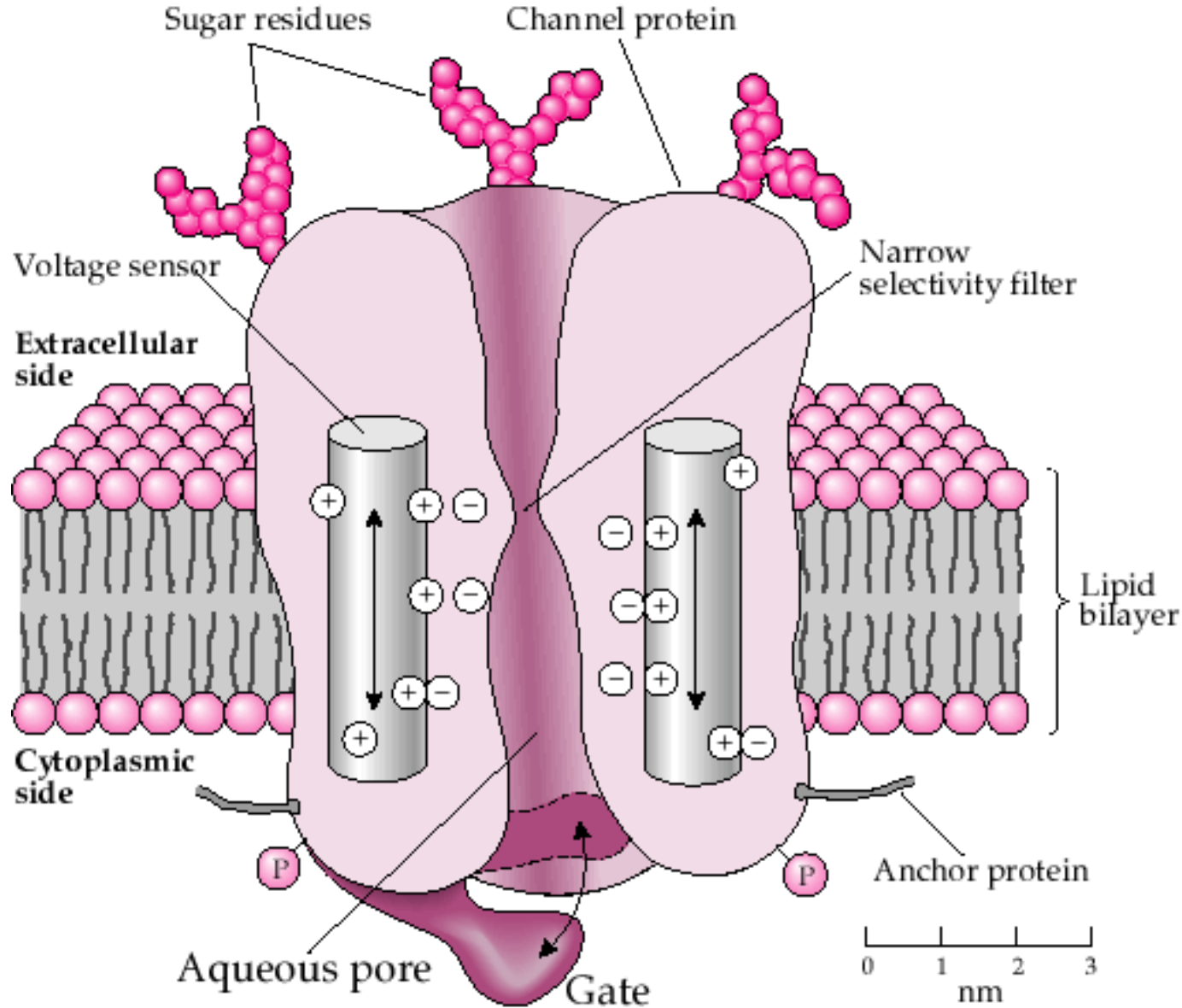
(c) Voltage-dependent conformational change



(B)



Obr. 13 Kluzně šroubový model napětově závislého vrátkování podle Catteralla. Segment S_4 je zřejmě senzor napětí. Segment S_4 domény III sodíkového kanálu elektrického orgánu parejnoka Torpedo je znázorněn jako transmembránová α šroubovice s řadou pozitivních nábojů, tvořených opakujícími se zbytky "zásadité" aminokyseliny argininu. Každý pozitivní náboj je neutralizován negativním nábojem sousedních transmembránových šroubovic (každá třetí v pořadí sekvence). Vytváří se spirála iontových párů prostupujících membránou. Síla membránového elektrického pole stabilizuje tvorbu iontových párů tím, že táhne pozitivní náboje dovnitř a vytlačuje negativní náboje ven podobně jako jádro v elektromagnetu. Při depolarizaci (ΔV) se tato síla uvolní a šroubovice tvořící segmenty S_4 ve všech 4 homologních doménách se vysunou ven jako uvolněné pružiny ve směru spirály přibližně o 5 Å, přičemž se otočí o 60° tak, že se kladné náboje posunou vzhledem k sousední šroubovici o jedno místo ven z buňky. Dojde tím ke snížení kladného náboje na vnitřní straně membrány. Je zajímavé (A), že velmi podobné uspořádání bazických argininových nebo lysinových kladně nabitých zbytků nacházíme v tomto předpokládaném napětovém senzoru S_4 jak u sodíkového kanálu z parejnoka či mozku potkana, tak ve vápníkovém kanálu králíčího kosterního svalu a v draslíkovém kanálu mutanta Shaker octomilky Drosophila melanogaster (viz obr. 14). (Podle Catterall 1988)



Sinauer Associates, Inc.
 Feldman
*Fundamentals of
 Neuropsychopharmacology*
 Fig. 5-8

Fig 5.8 Basic Model of a Voltage Gated Ion Channel

Selektivní

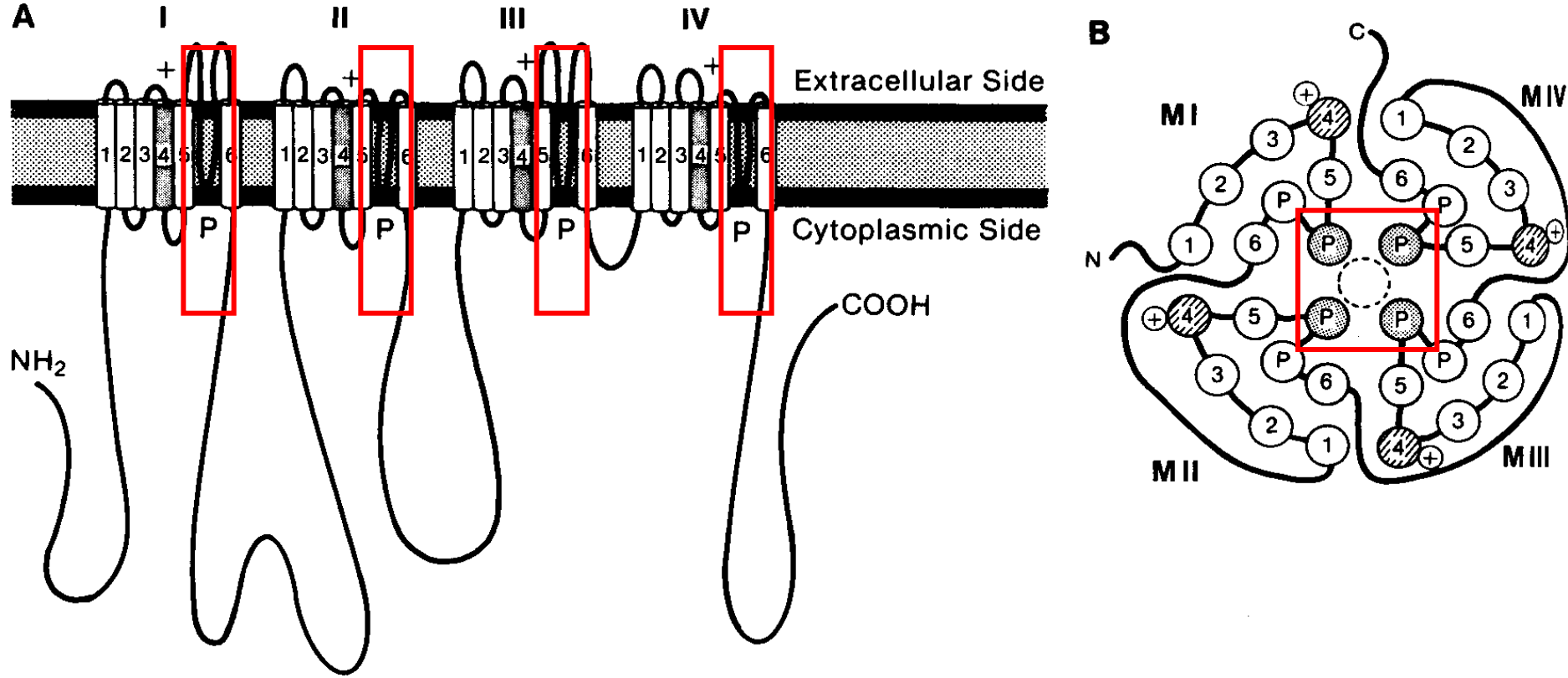
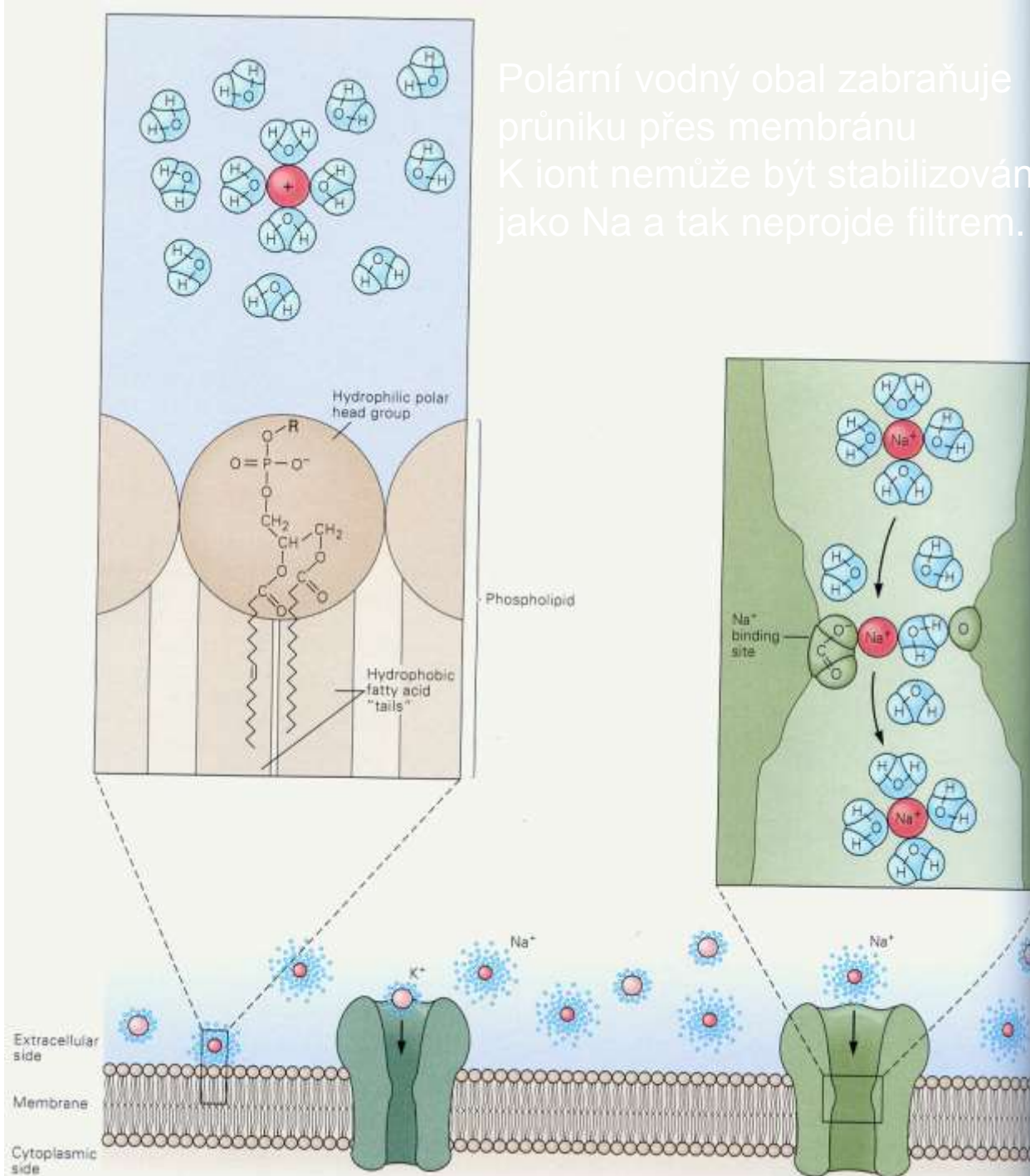


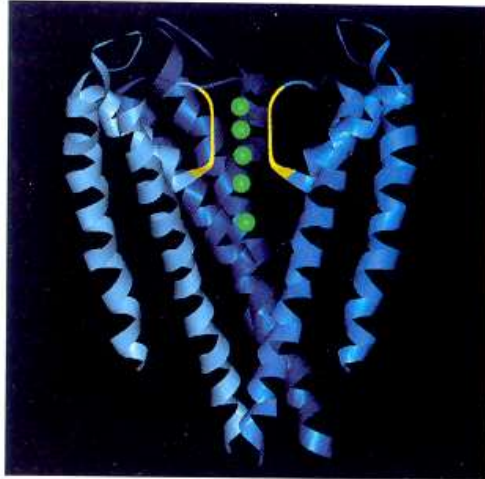
Fig. 5.3 Presumed tertiary structure of the Na⁺ channel protein based on hydropathicity plots of the primary amino acid sequence. **A.** The channel protein consists of four repeating subunits, each containing six presumed transmembrane segments. Segment 4 contains an excess of positively charged residues and is assumed to be the voltage sensor. A long loop between segments 5 and 6 is believed to dip into the membrane and form the face of the pore. A cytoplasmic loop contains the inactivation gate. **B.** View looking down on the membrane to see the arrangement of the four subunits around the central pore. The Ca²⁺ channel protein is similar in its construction. (Modified from Catterall, 1988, and Stevens, 1991, in Kandel et al., 1991)

Polární vodný obal zabraňuje průniku přes membránu
K iont nemůže být stabilizován jako Na a tak neprojde filtrem.

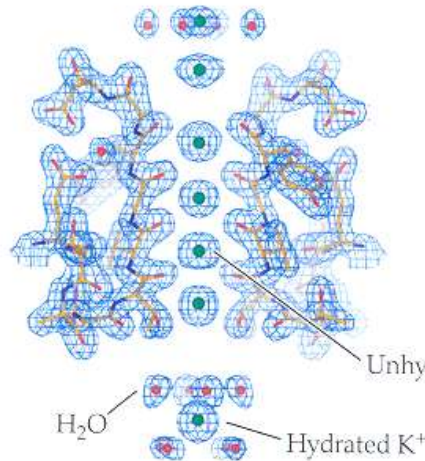


Selektivita K⁺ kanálu *Streptomyces*

(a) K⁺ channel structure



(b) Ion selectivity filter



(c) Model of ion permeation

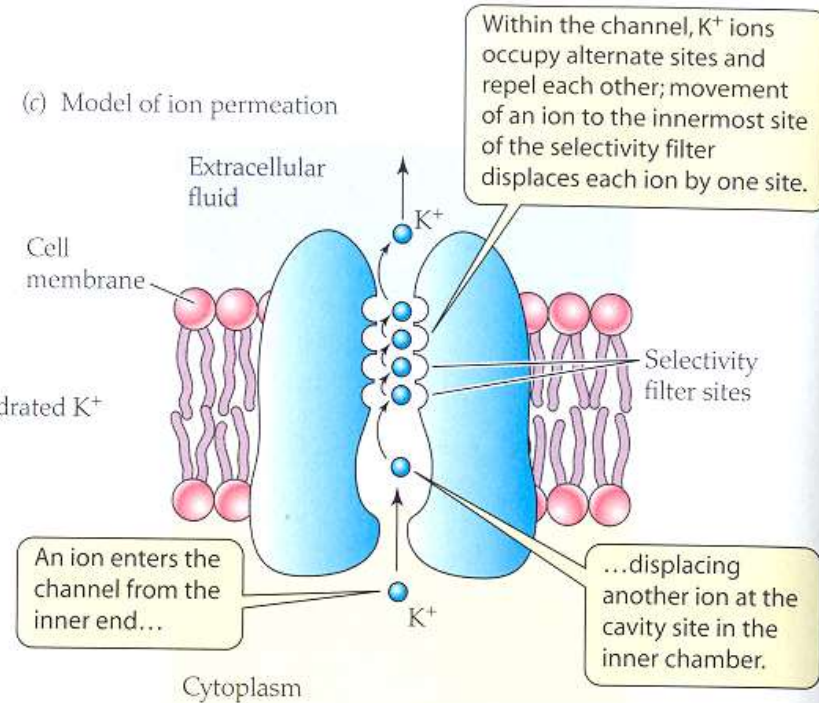
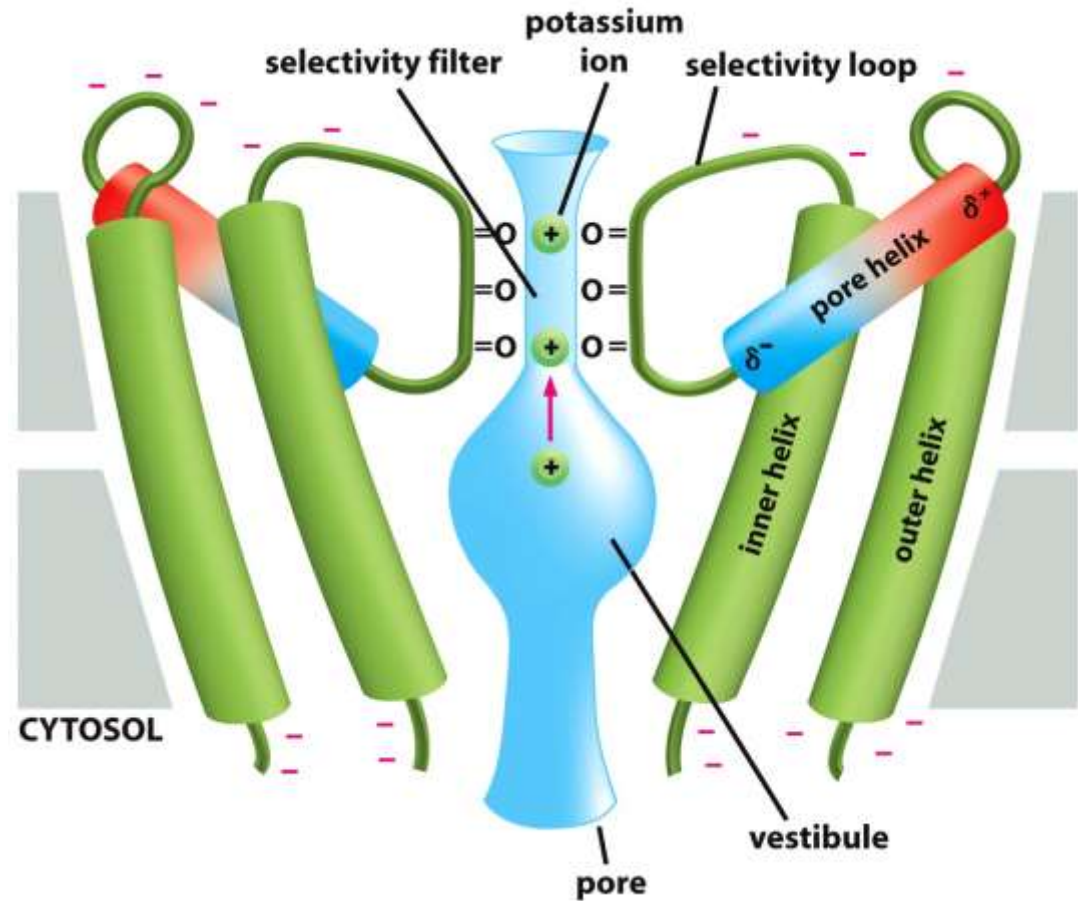


Figure 11.22 Ion permeation through K⁺ channels (a) The structure of a bacterial K⁺ channel as determined by X-ray diffraction. The subunits correspond to membrane-spanning segments 5 and 6 and the P loop of voltage-gated channels (see the figure in Box 11.1). The narrow ion-selective pore is lined by the P loop of each of the four subunits (yellow; only two of the four are visible here), and it has four sites that can be occupied by K⁺ ions (green spheres). An additional K⁺ ion can occupy an inner cavity below the selectivity filter. (b) Sites occupied by K⁺ ions in and near the selectivity filter. K⁺ ions are normally surrounded by polar water molecules, but in the pore of a potassium channel, oxygen atoms lining the pore compete with water molecules to attract the cation. The image shows a K⁺ ion in the inner chamber with eight water molecules around it (bottom), four unhydrated K⁺ ions at the selectivity filter sites, a K⁺ ion at the outer face of the pore, and a K⁺ ion with a partial shell of four water molecules (top). (c) A model of K⁺ ion permeation. This chain reaction allows the channel to be both highly selective and highly permeable to K⁺. (a from Morais-Cabral et al. 2001; b from Zhou et al. 2001; c after Miller 2001.)

with short axons or no axons, so a graded potential change at one of the cell can spread passively (electrotonically) to the terminal without major decrement.

The inputs and outputs of spiking and nonspiking neurons are same, but the short-axon nonspiking neuron does not require spiking encoding to carry the signal over large distances. Examples of nonspiking neurons include the photoreceptors, bipolar cells, and horizontal cells of the vertebrate retina (see Chapter 13), granule cells of the olfactory bulb, and many arthropod interneurons.

Selektivita K⁺ kanálu *Streptomyces*



Negativně nabité AK lákají kationty. Z cytosolu se pór otevírá do vestibulu. To umožňuje K iontům zůstat hydratované i v polovině membrány. V úzkém selektivním filtru řada O tvoří řadu dočasných vazebných míst pro dehydratovaný K. O atomy soutěží s vodními molekulami o vazbu na K. K musí ztratit svůj vodní obal a místo s vodou interaguje s O.

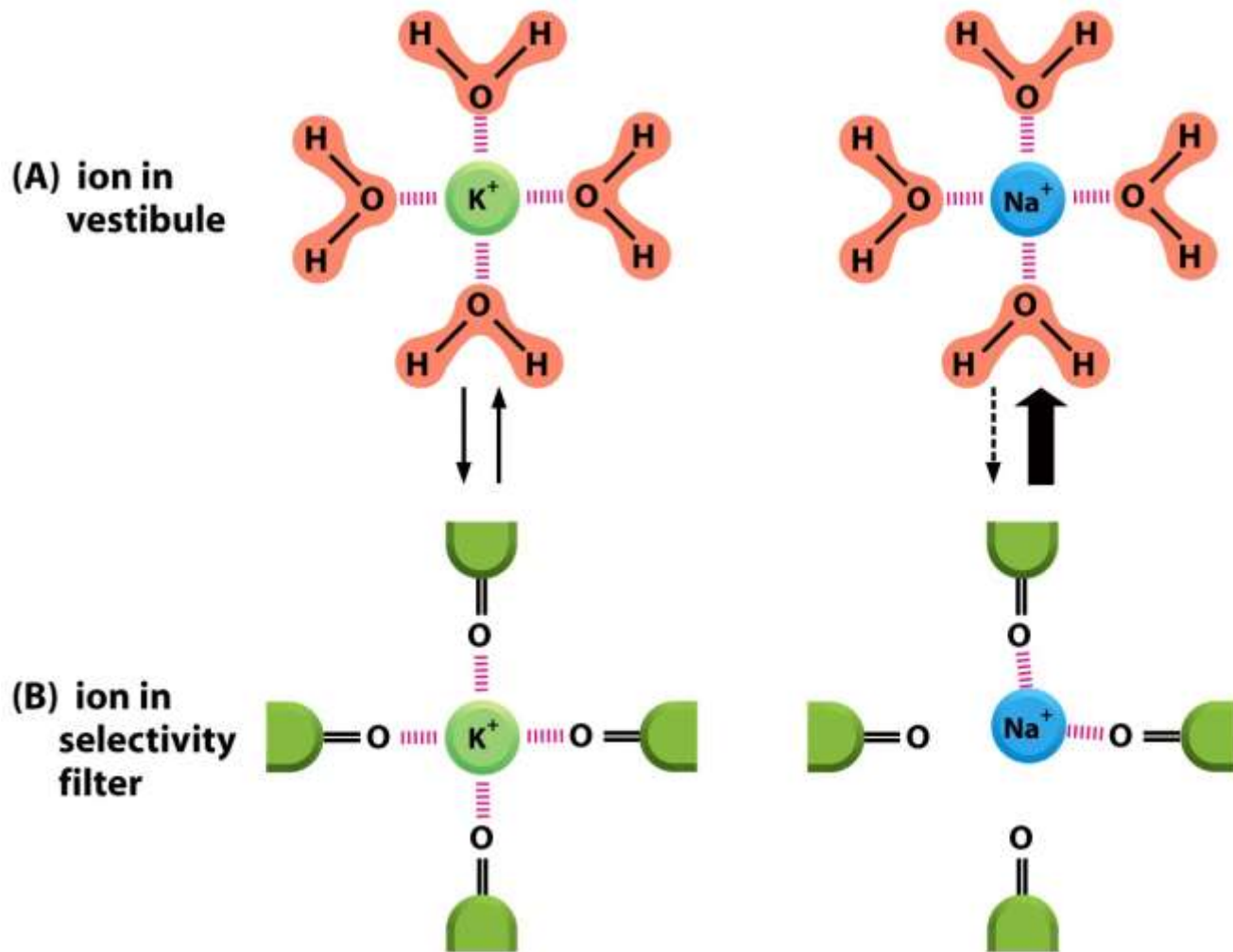


Figure 11-24 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Menší sodík nevstupuje, protože karbonylové kyslíky jsou příliš daleko na to, aby se kompenzovala energetická ztráta odhození vodního obalu.

Schopný inaktivace

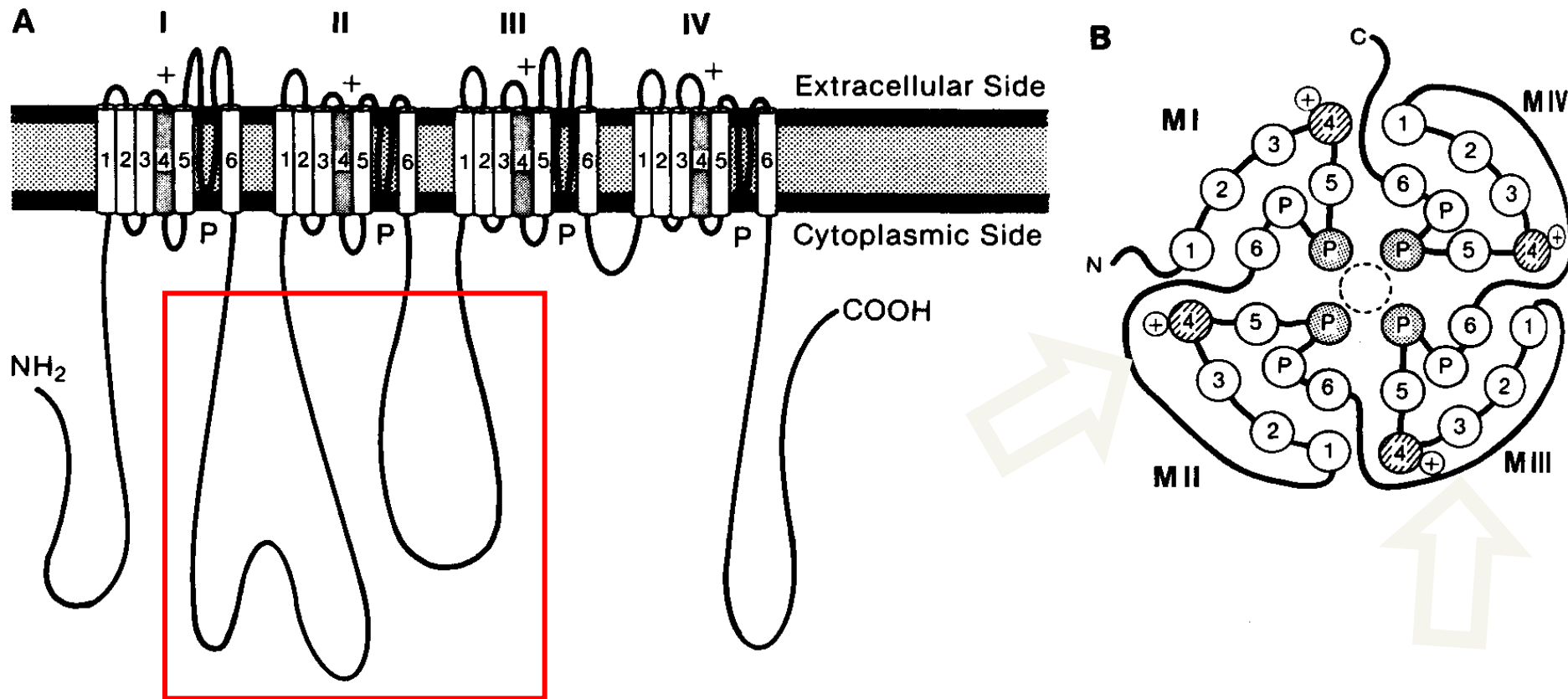
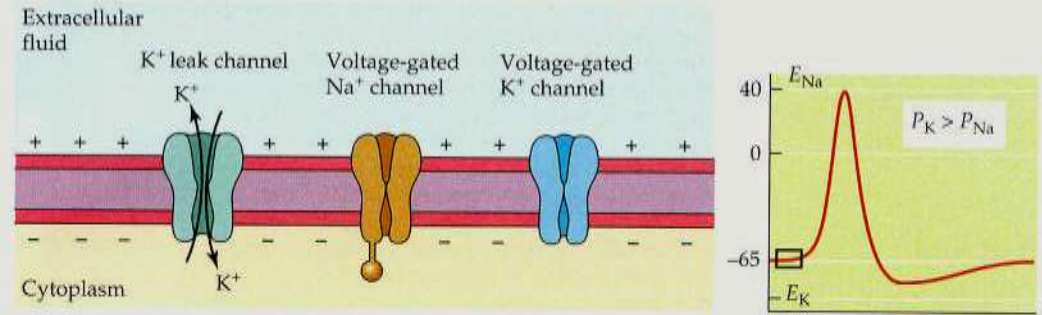


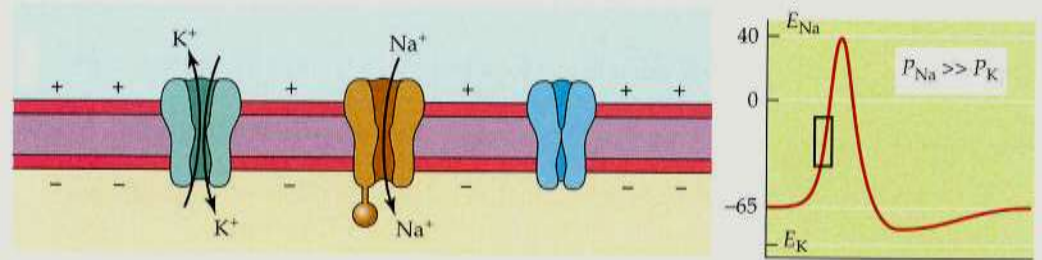
Fig. 5.3 Presumed tertiary structure of the Na^+ channel protein based on hydropathicity plots of the primary amino acid sequence. **A.** The channel protein consists of four repeating subunits, each containing six presumed transmembrane segments. Segment 4 contains an excess of positively charged residues and is assumed to be the voltage sensor. A long loop between segments 5 and 6 is believed to dip into the membrane and form the face of the pore. A cytoplasmic loop contains the inactivation gate. **B.** View looking down on the membrane to see the arrangement of the four subunits around the central pore. The Ca^{2+} channel protein is similar in its construction. (Modified from Catterall, 1988, and Stevens, 1991, in Kandel et al., 1991)

Schopný inaktivace

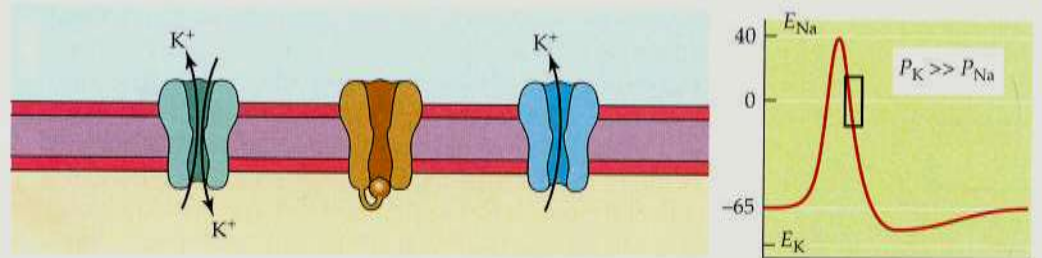
(a) Resting membrane potential



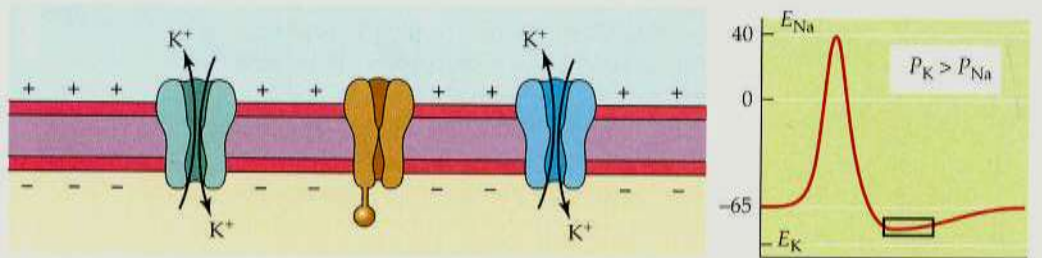
(b) Rising phase



(c) Falling phase



(d) Recovery



Proteáza aplikovaná intracelulárně zrušila inaktivaci – musí být intracelulárně
Také K kanál je schopen inaktivace, ale později než Na.

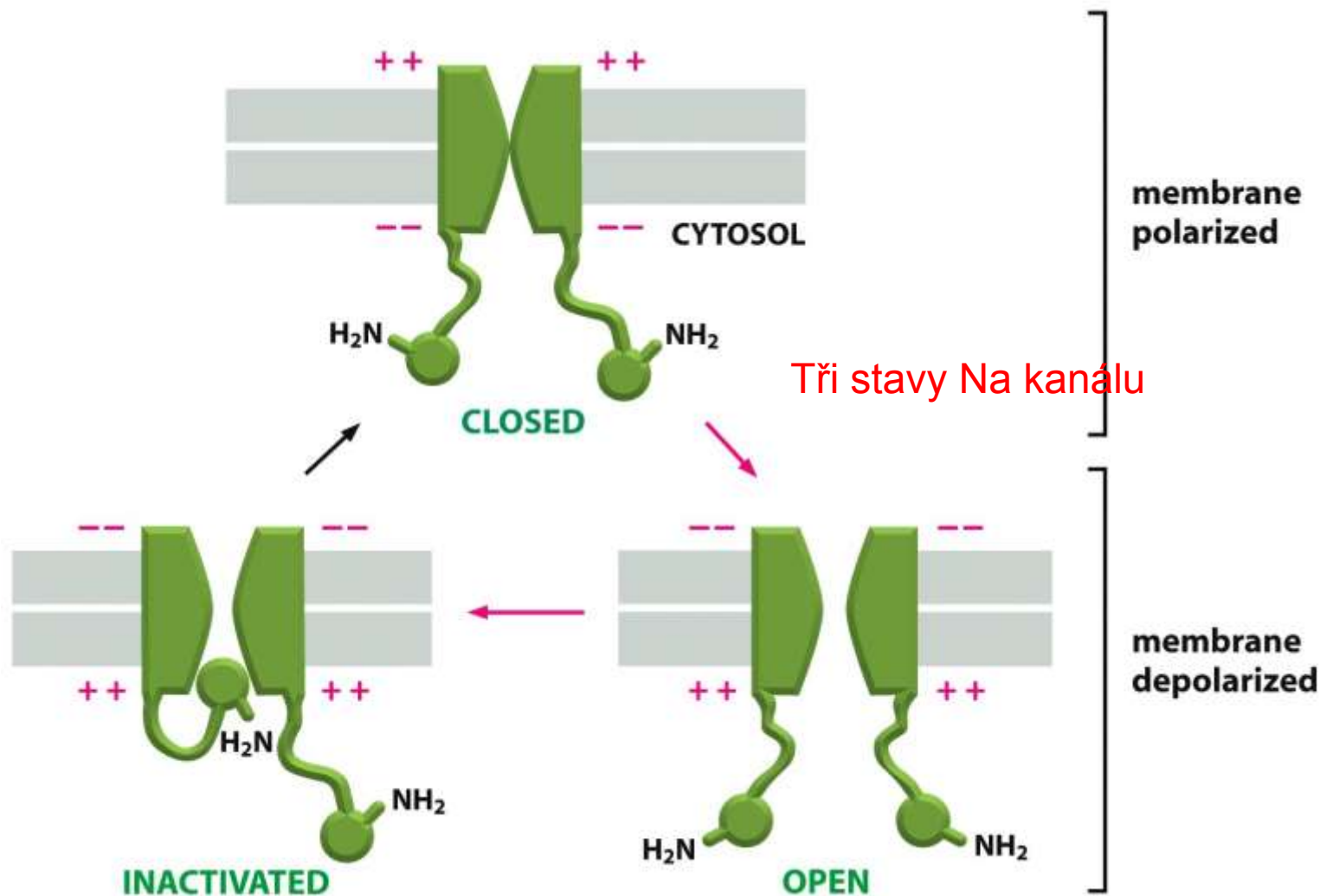
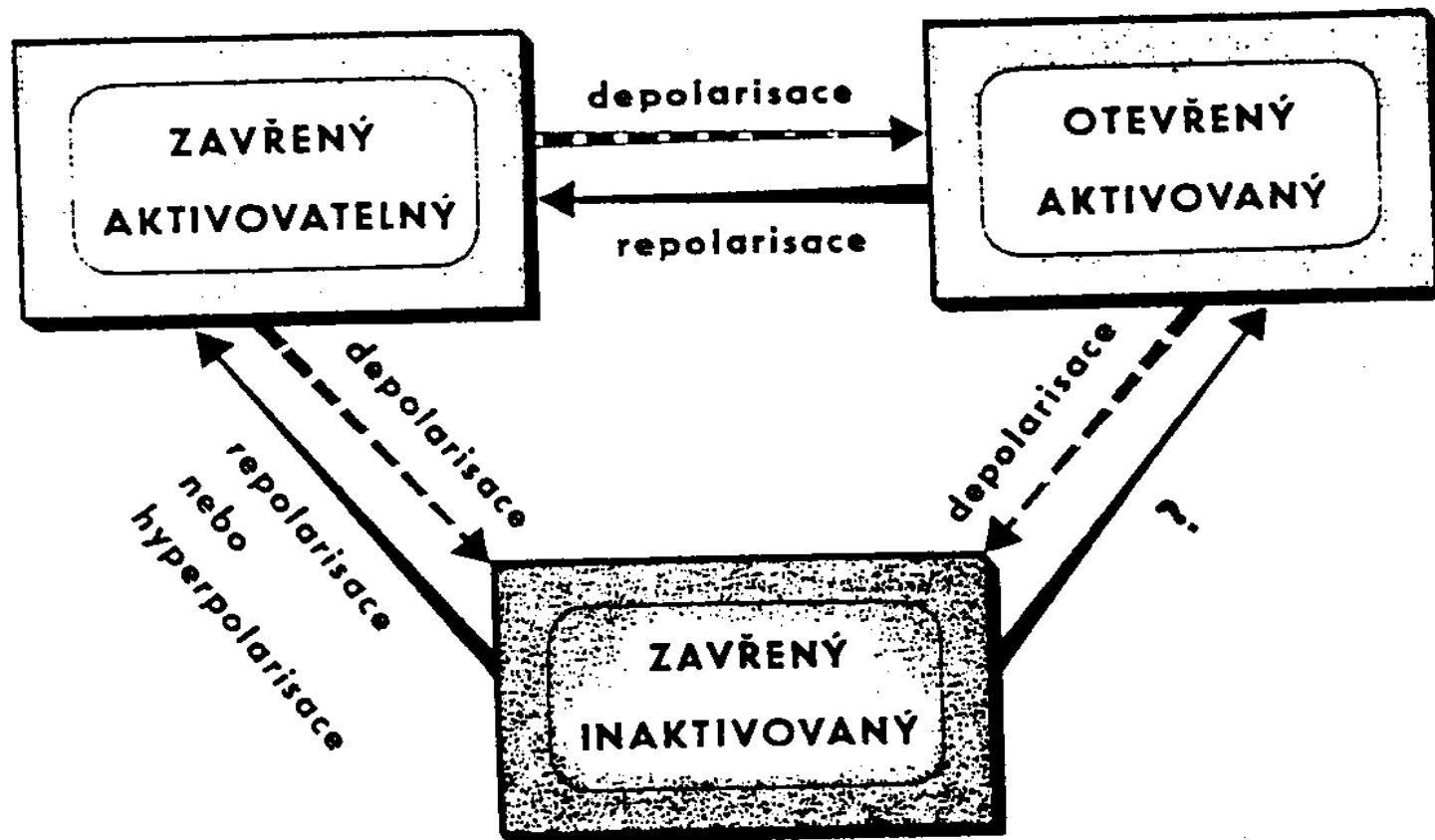


Figure 11-31 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

STAVY KANÁLŮ

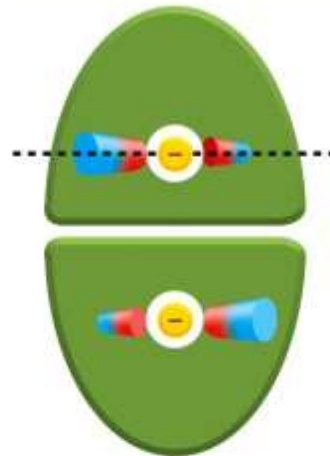


Refrakterní fáze kanálu – omezení frekvence AP

Kanál musí projít fází repolarizované membrány aby byl znovu aktivovatelný

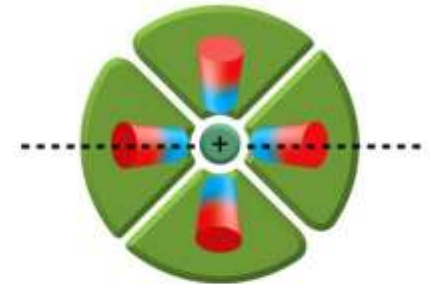
Ne vždy je kanál pórem mezi 4mi doménami.
Cl kanál je dimer, kde každá podjednotka má svůj pór. Jsou asymetrické a dohromady tvoří selektivní filtr.

(A) CHLORIDE CHANNEL

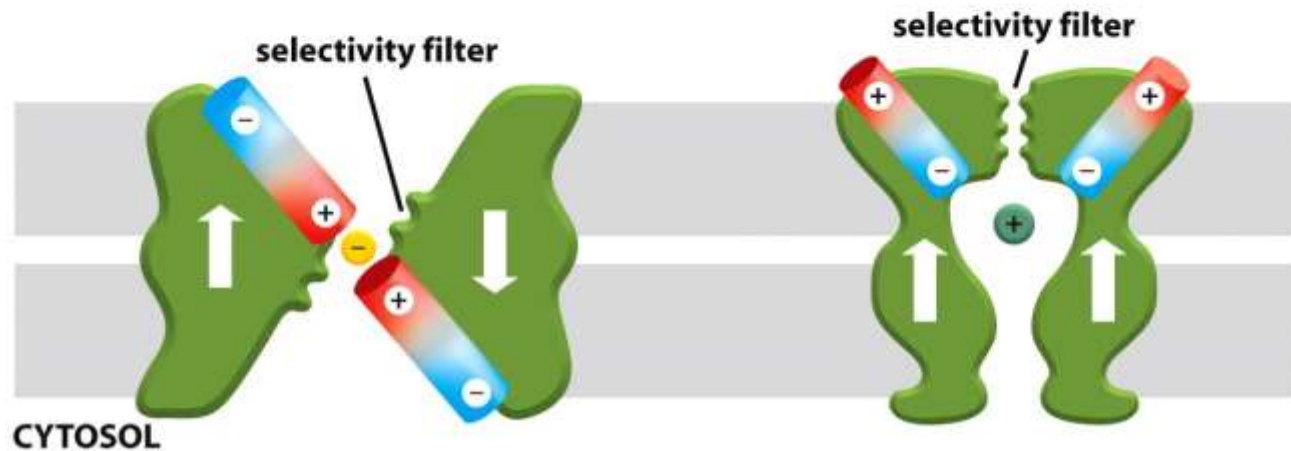


two subunits

(B) POTASSIUM CHANNEL



four subunits





**The Nobel Prize in Physiology or
Medicine 1991**

Patch Clamp – Technika, která „vidí“ kanály při práci

"for their discoveries concerning the function of single ion
channels in cells"



Erwin Neher

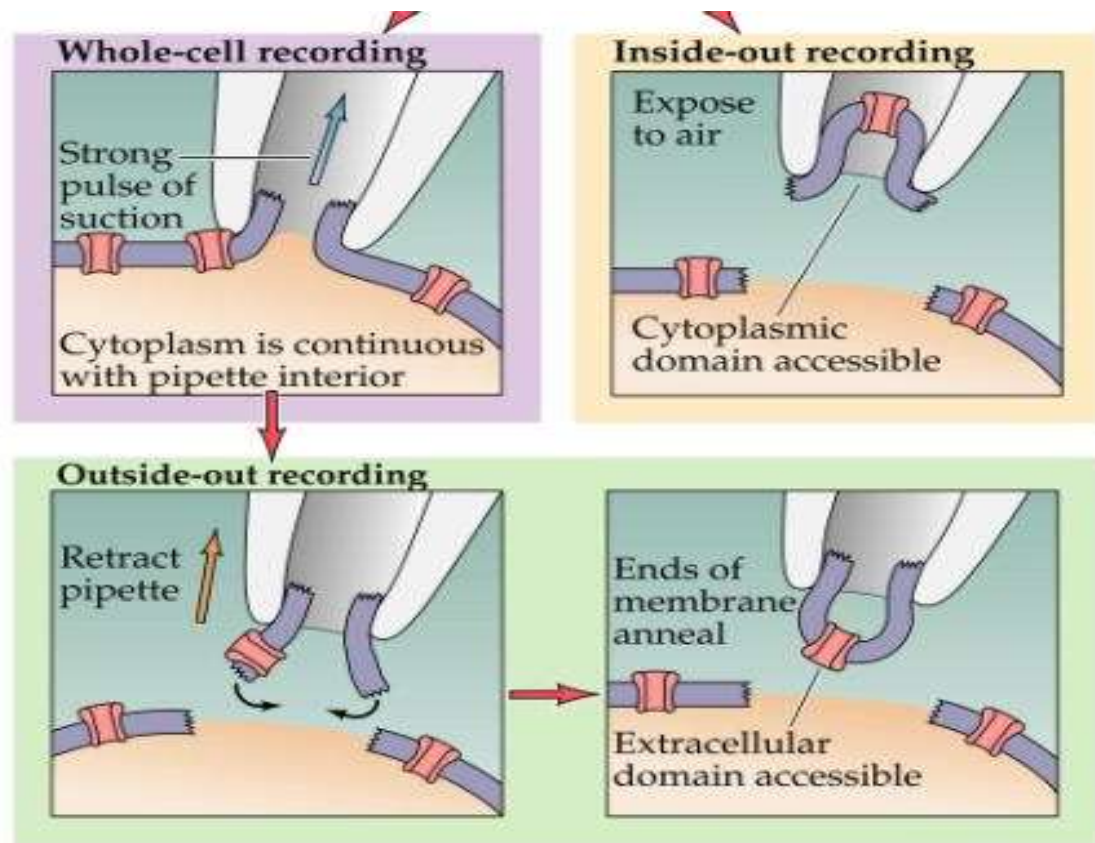
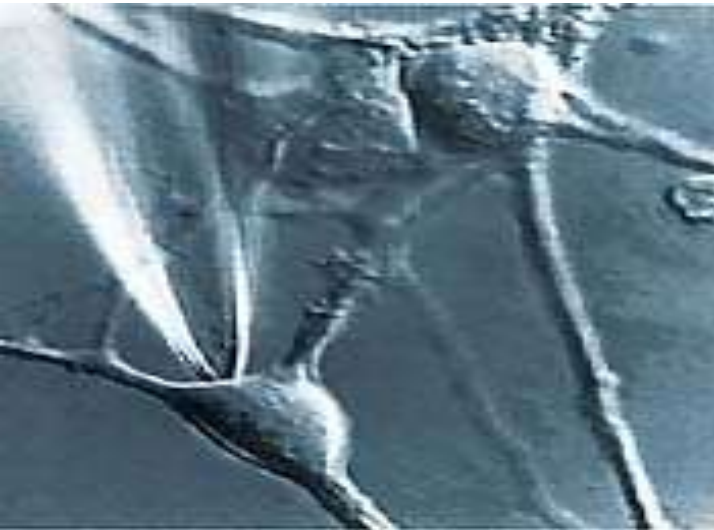
1/2 of the prize
Federal Republic of
Germany
Max-Planck-Institut für
Biophysikalische
Chemie
Goettingen, Federal
Republic of Germany
b. 1944

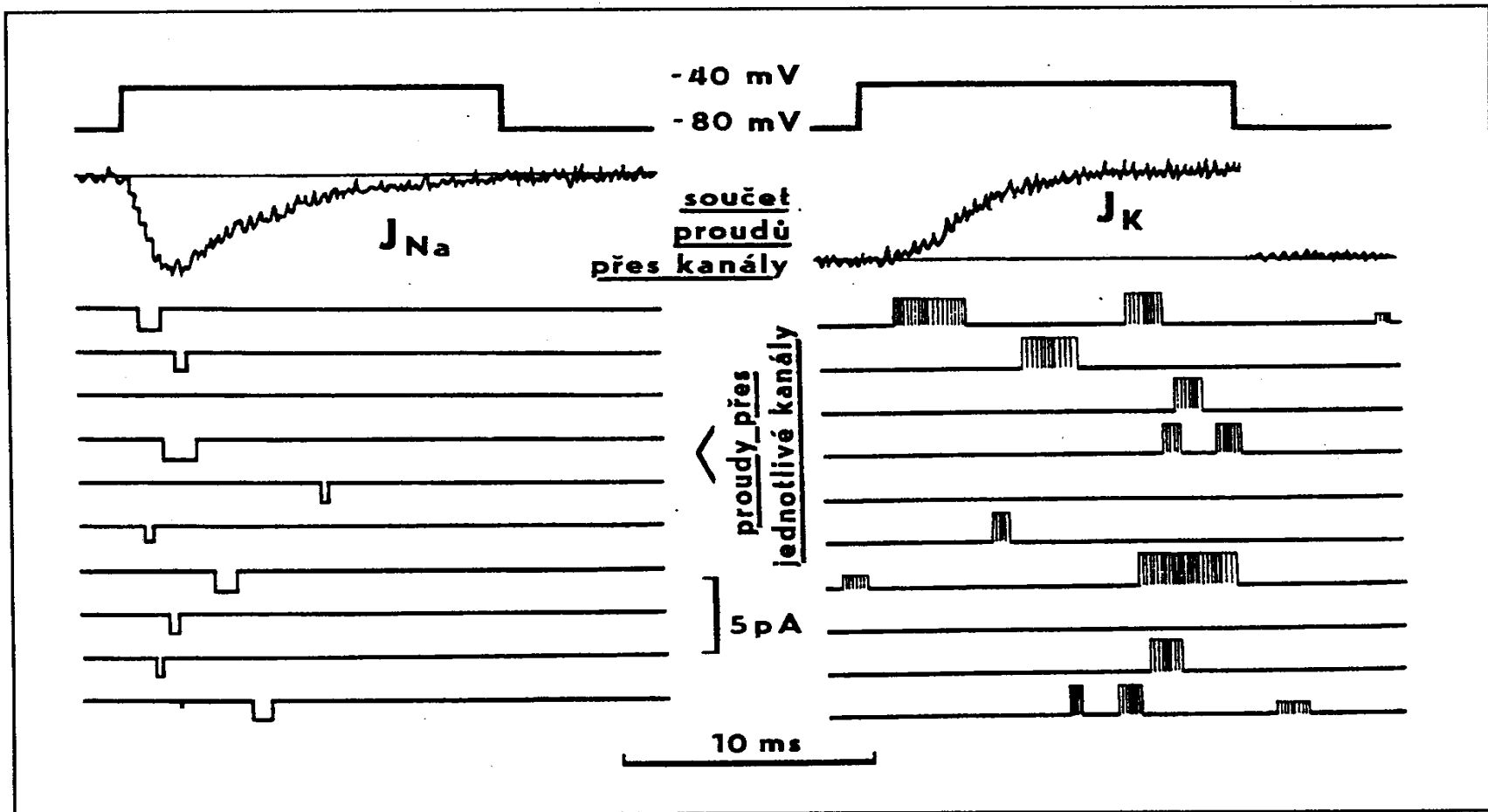


Bert Sakmann

1/2 of the prize
Federal Republic of
Germany
Max-Planck-Institut für
medizinische Forschung
Heidelberg, Federal
Republic of Germany
b. 1942

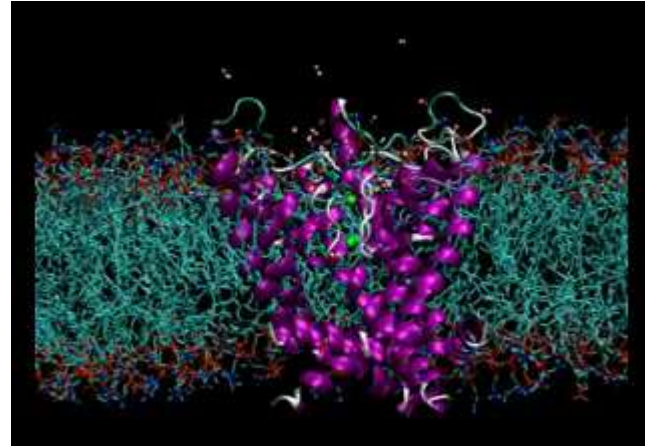
Neher & Sackman
Terčíkový zámek, 1991



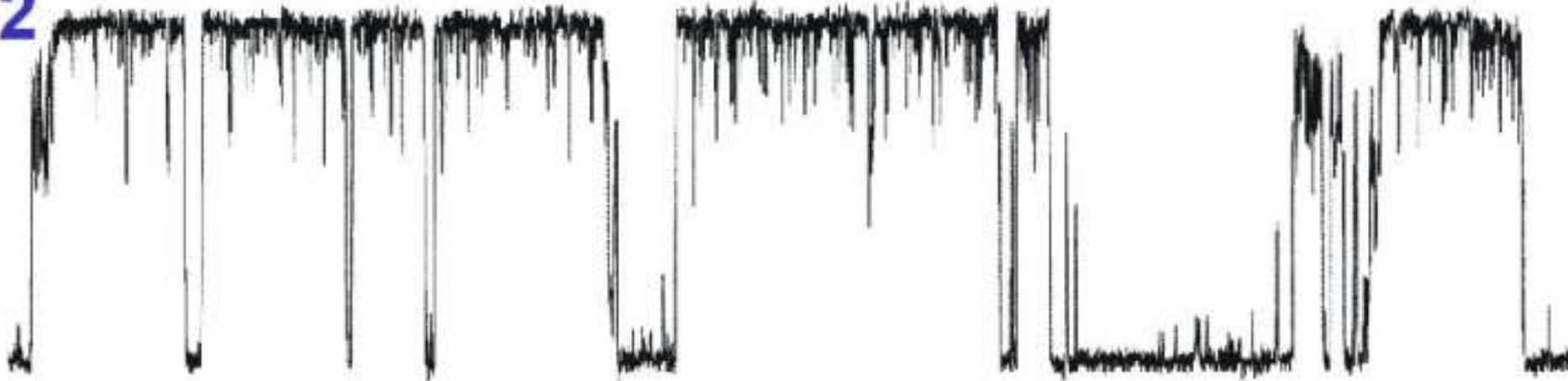


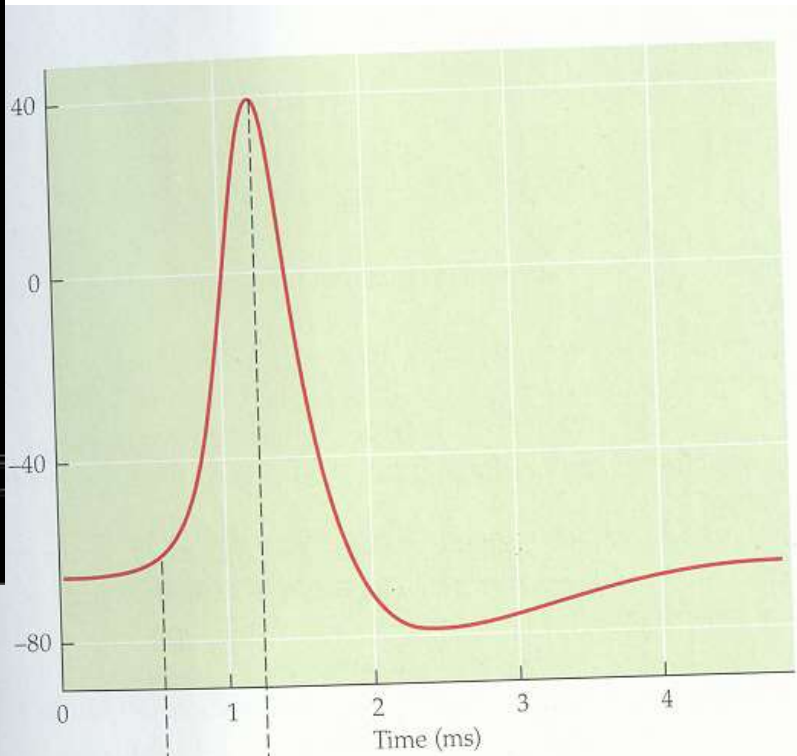
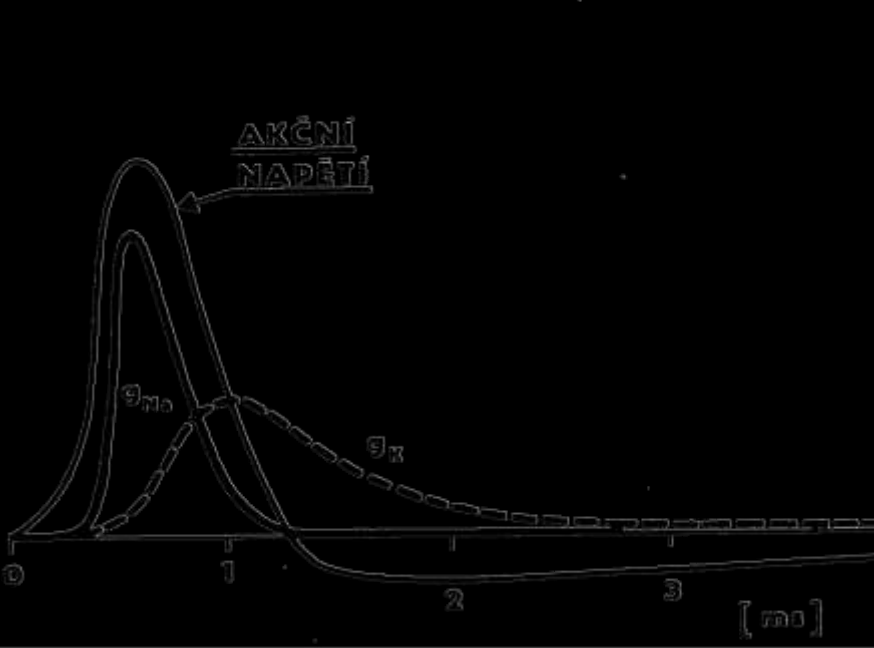
Obr. 14.18 Proudý tekoucí Na^+ -kanály (vlevo) a K^+ -kanály (vpravo). Membránové napětí bylo po dobu 14 ms experimentálně skokem přestaveno z -80 mV na -40 mV (horní křivka), a to bylo desetkrát opakováno. Přitom byly měřeny membránové proudy (10 křivek v dolejší části obr.). Proudý proteklé jednotlivými kanály se objevují porůznu během depolarisace a trvají různě dlouho. Sumací takovýchto záznamů vzniká záznam sumačního proudů, J_{Na} popř. J_K (zubatá křivka). Je vidět, že u Na^+ -kanálů je otevření nejpravděpodobněji krátce po změně napětí na membráně a že pak dochází k pozvolné inaktivaci. K^+ -kanály se naproti tomu otevírají v průměru s jistým zpožděním, pak se však ustavuje určitá střední častota otevření, která zůstává konstantní po celou dobu depolarisace. (Z DUDELA 1990b)

Tepelné vibrace membrány a vibrace kanálu.



2



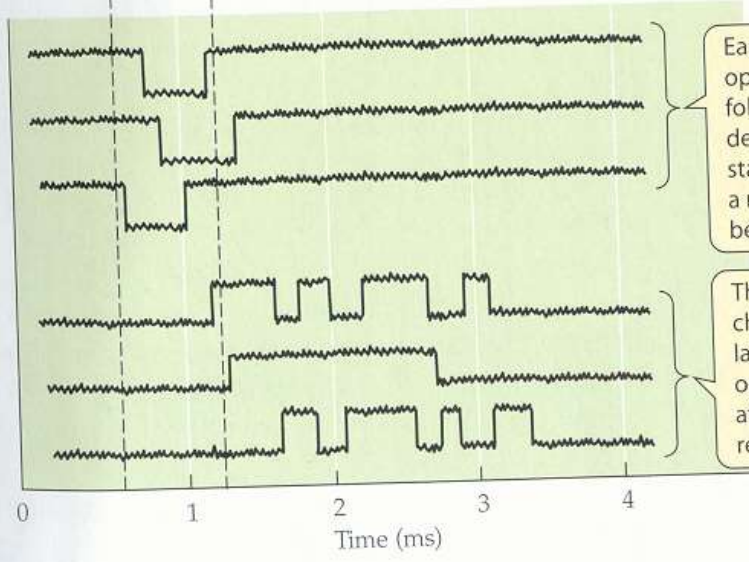


ing current, the e
time course of the
site to each other.
the Hodgkin cy
sulting from pe
membrane pot
In 1952, Ala
landmark pap
demonstrate an
underlying the
mental result o
potential is cla
current-measu
required to set
charge stored b
not ionic curre
a shift in accur

Záznam koresponduje s fázemi AP

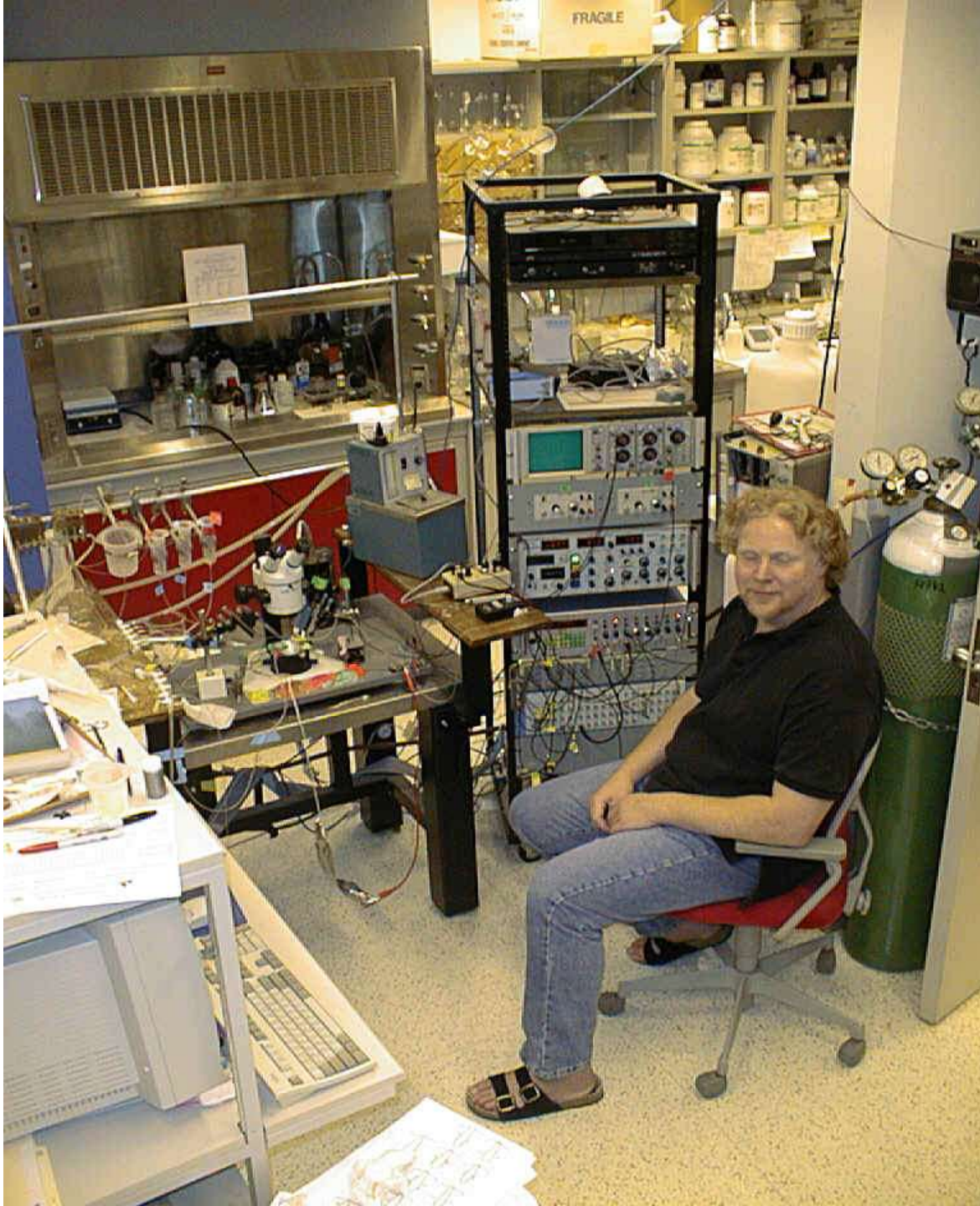
(a)
Inward
currents
through Na^+
channels

(b)
Outward
currents
through K^+
channels



Each Na^+ channel opens with little delay following initial depolarization, and stays open for less than a millisecond before becoming inactivated.

The voltage-gated K^+ channels open slightly later and can stay open until shortly after membrane repolarization.

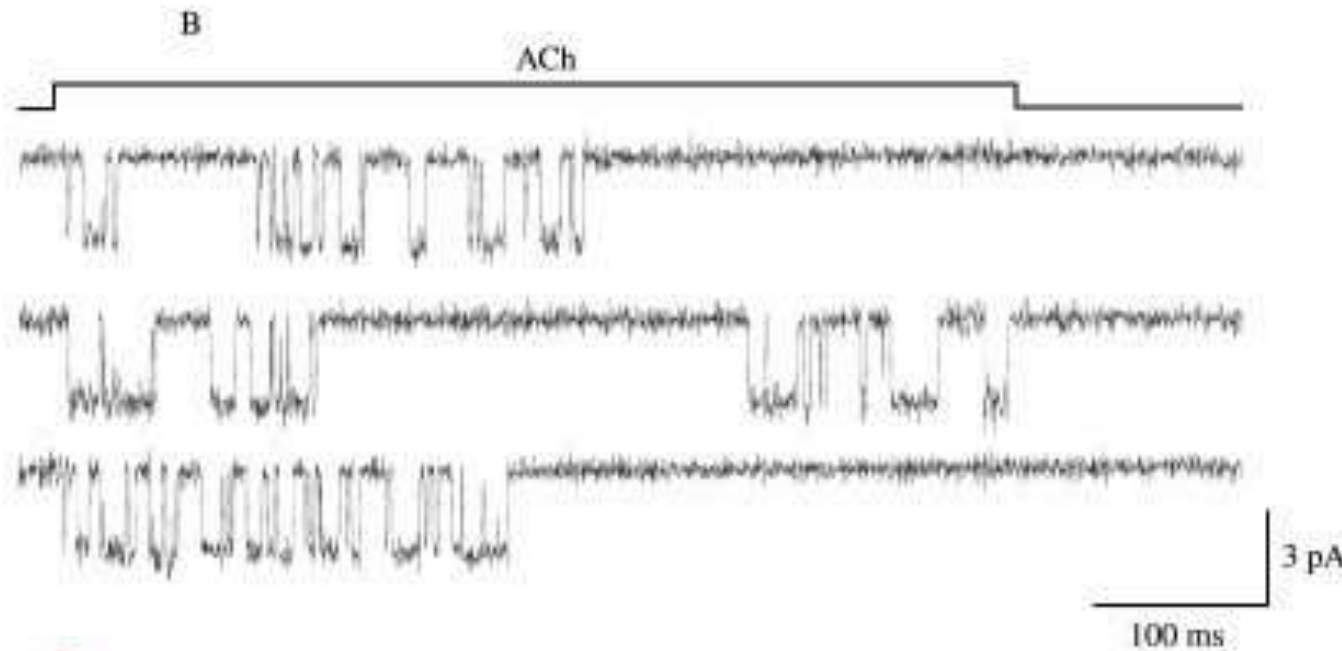
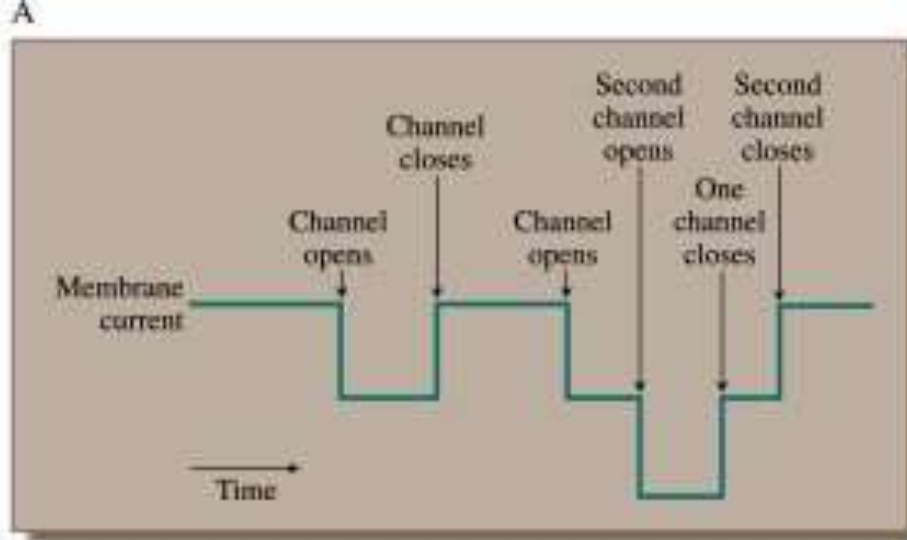


[Animace patch clamp](#)

https://www.jove.com/video/55627/electrophysiological-method-for-whole-cell-voltage-clamp-recordings?utm_source=joveglobal&utm_medium=email&utm_campaign=2017newsletters062117

http://www.the-scientist.com/?articles.view/articleNo/50227/title/Robotic-Patch-Clamping-Gains-Eyes/&utm_campaign=NEWSLETTER_TS_The-Scientist-Daily_2016&utm_source=hs_email&utm_medium=email&utm_content=55843454&hsenc=p2ANqtz-vNp_o-2-DPakc5dEQGZxQcKcyvfhvY827y8AWZ8NTN26AQ5MoFnRIA3X1Iz5upS0IbVAMccbiDxONemRx0MyGAI66Q&hsmi=55843454/

Pravděpodobnostní děj



Roderick MacKinnon and Ion Channels

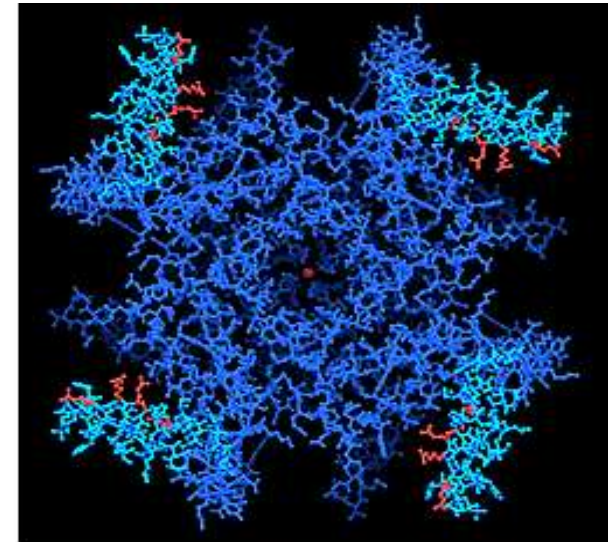


Roderick MacKinnon, M.D., a visiting researcher at the U.S. Department of Energy's Brookhaven National Laboratory, is a recipient of the 2003 Nobel Prize in Chemistry 'for structural and mechanistic studies of ion channels.,

His research explains "how a class of proteins helps to generate nerve impulses – the electrical activity that underlies all movement, sensation, and perhaps even thought. The work leading to the prize was done primarily at the Cornell High Energy Synchrotron Source [CHESS] and the National Synchrotron Light Source [NSLS] at Brookhaven.

The proteins, called ion channels, are tiny pores that stud the surface of all of our cells. These channels allow the passage of potassium, calcium, sodium, and chloride molecules called ions. Rapid-fire opening and closing of these channels releases ions, moving electrical impulses from the brain in a wave to their destination in the body."¹

"Potassium channels act as both gateways and gatekeepers on cell membranes, controlling the flow of ions and enabling brains to think, muscles to move, and hearts to beat. Malfunctioning ion channels contribute to epilepsy, arrhythmia, and other diseases."²



An overhead view of a voltage-dependent potassium ion channel shows four red-tipped "paddles" that open and close in response to positive and negative charges. This structure, discovered by Rockefeller scientists, shows for the first time the molecular mechanism by which potassium ions are allowed in and out of living cells during a nerve or muscle impulse.

The Nobel Prize in Chemistry 2003



"for discoveries concerning channels in cell membranes"

"for the discovery of water channels"



Peter Agre

1/2 of the prize

USA

Johns Hopkins University
School of Medicine
Baltimore, MD, USA

b. 1949

"for structural and mechanistic studies of ion channels"



Roderick MacKinnon

1/2 of the prize

USA

Rockefeller University
New York, NY, USA; Howard
Hughes Medical Institute

b. 1956

Kanály a metody mol. genetiky

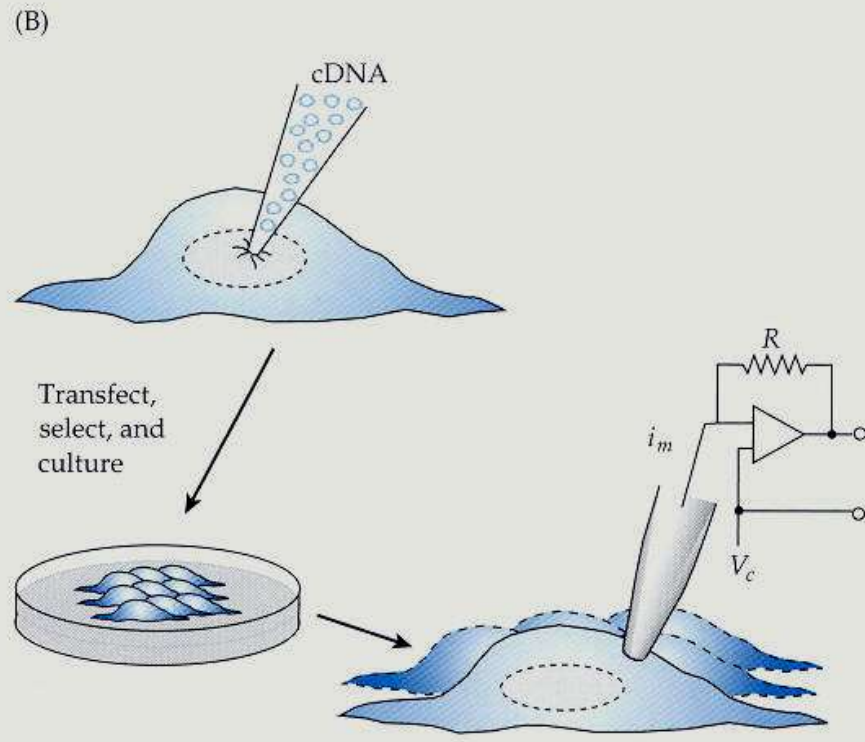
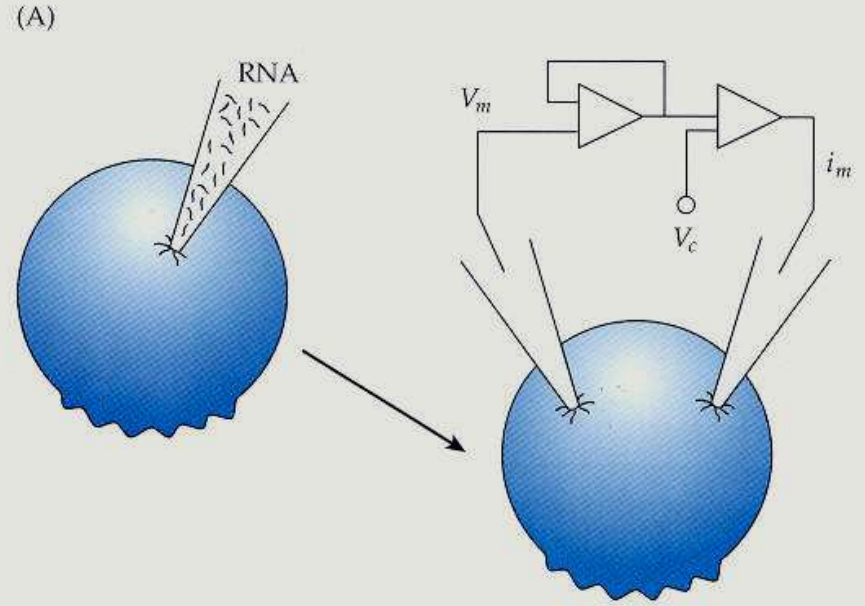
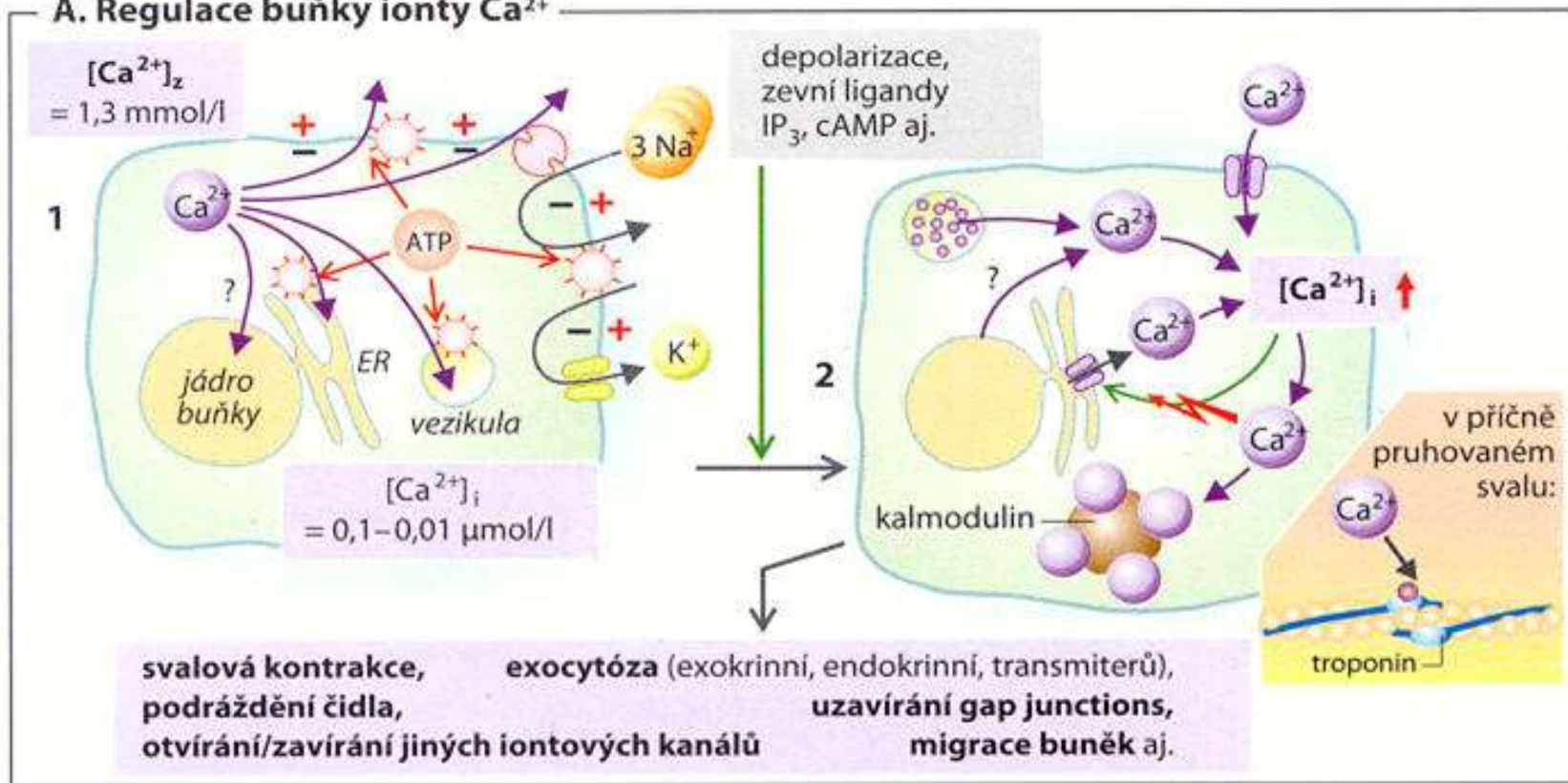


Figure 1.9
Common methods of gene expression for recording the electrical activity of ion channels and other membrane proteins (A) Injection into a *Xenopus* oocyte, which can then be studied by voltage clamping. (B) Transfection. DNA incorporated into plasmid or viral vector is introduced into the cell by electroporation, Ca^{2+} shock, or direct injection into the nucleus (as shown). Cell line may then be used for patch-clamp recording. V_m , membrane potential; V_c , command potential; R , feedback resistance of patch amplifier; i_m , membrane current. After Fain (1999).

Vápníková komunikace a Ca kanály

A. Regulace buňky ionty Ca^{2+}



Vápníková komunikace a Ca kanály

Calcium ions generate versatile **intracellular signals that determine a large variety of functions** in virtually every cell type in biological organisms, including the control of **heart muscle cell contraction** as well as the **regulation** of vital aspects of the entire **cell cycle**, from cell proliferation to cell death.

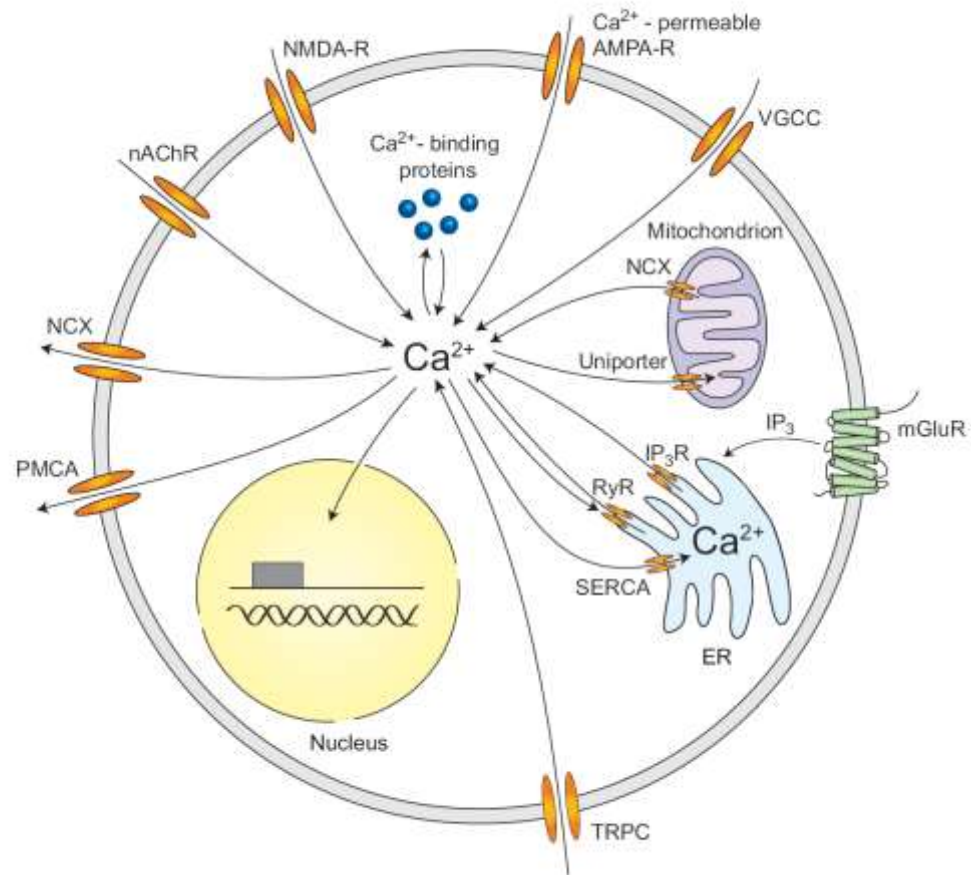
In the nervous system, calcium ions preserve and, perhaps, even extend their high degree of versatility because of the complex **morphology of neurons**.

In presynaptic terminals, calcium influx **triggers exocytosis** of neurotransmitter-containing synaptic vesicles. **Postsynaptically**, a transient rise of the calcium level in dendritic spines is essential for the induction of activity-dependent **synaptic plasticity**.

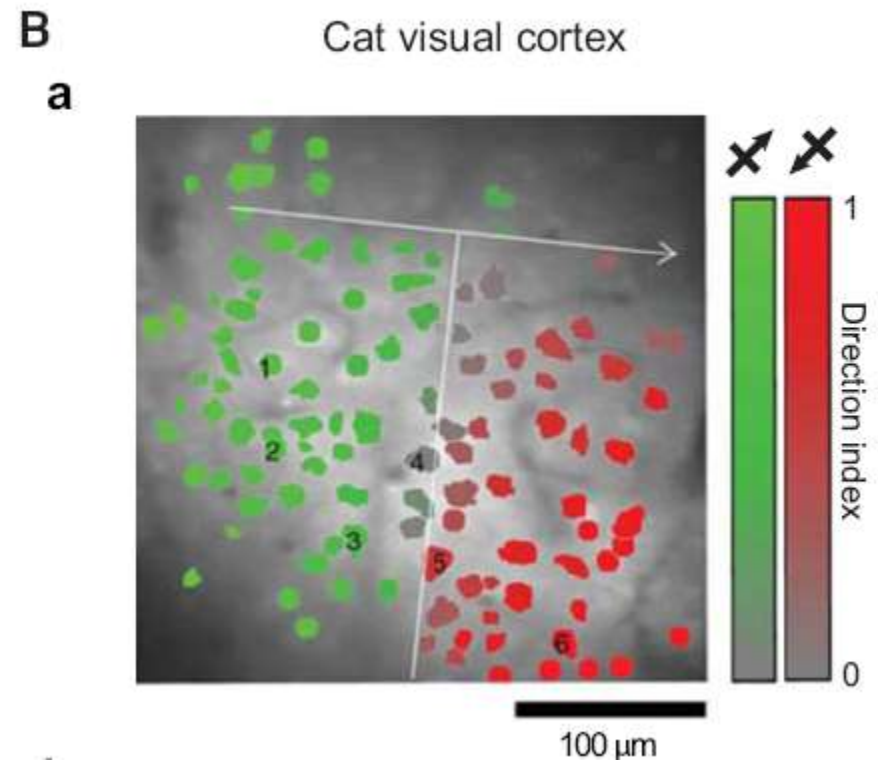
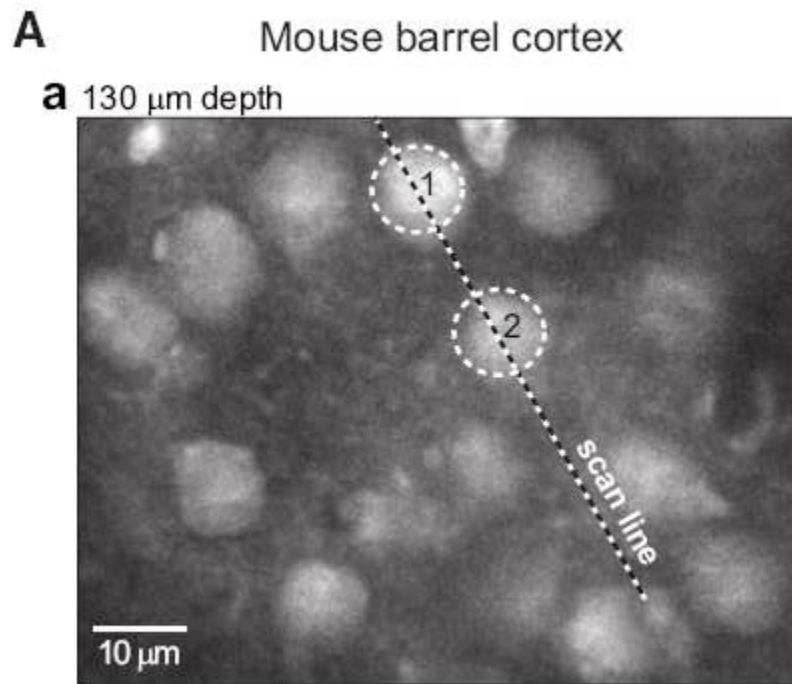
In another cellular subcompartment, the **nucleus**, calcium signals can **regulate gene transcription**. Importantly, intracellular calcium signals regulate processes that operate over a wide time range, from neurotransmitter release at the microsecond scale to gene transcription, which lasts for minutes and hours.

Thus, the **time course**, the **amplitude**, and, most notably, the **local action site in well-defined cellular subcompartments are essential determinants for the function of intracellular calcium signals**.

Ca metabolismus a vápníková komunikace, kanály

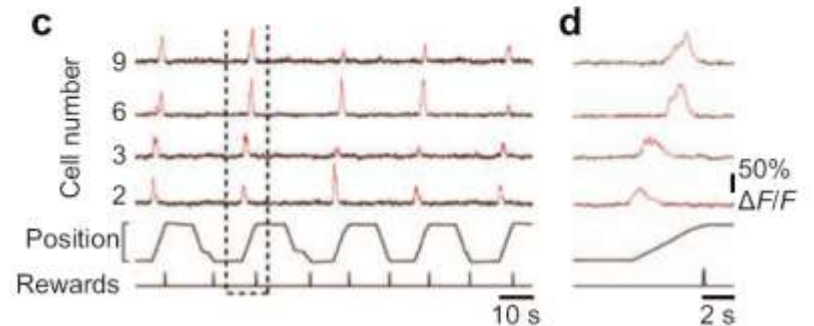
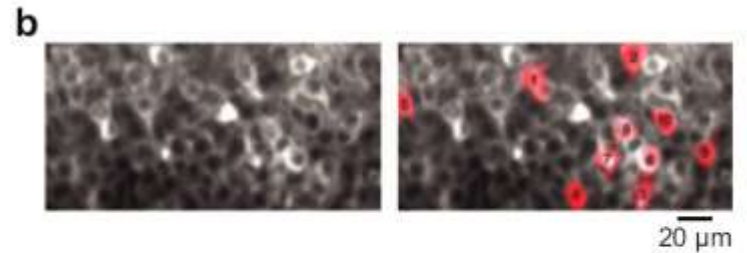
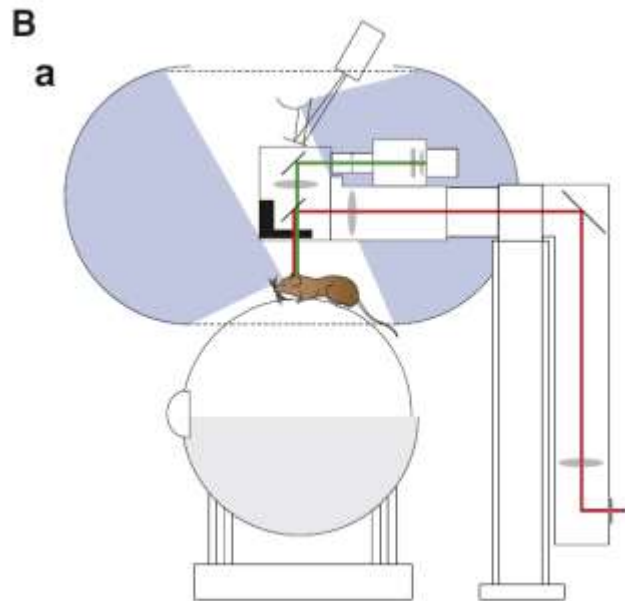
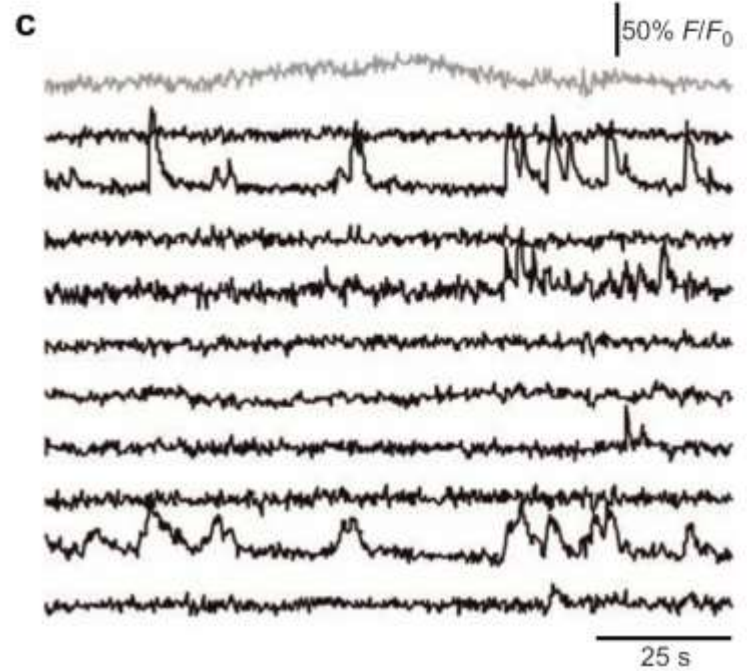
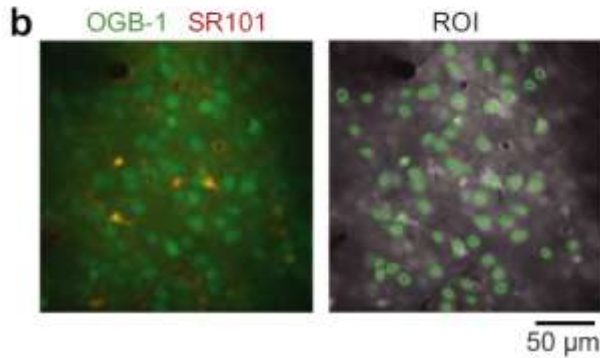
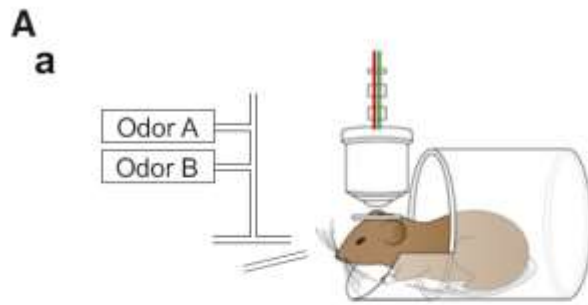


Vizualizací Ca iontů lze měřit a lokalizovat aktivitu neuronů
Vápníková signalizace in vivo
Časné geny spuštěné aktivitou neuronů

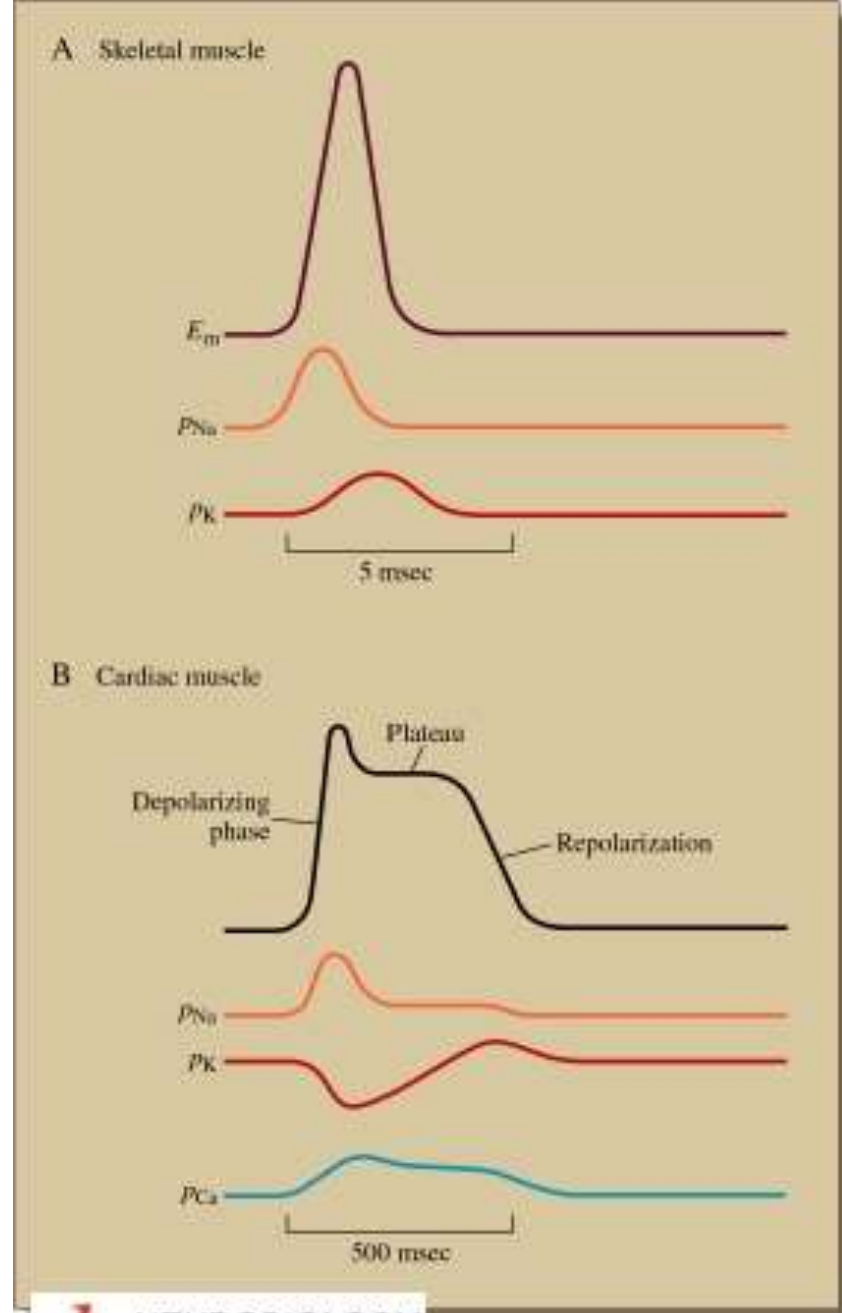


Ca aktivita Neuronů

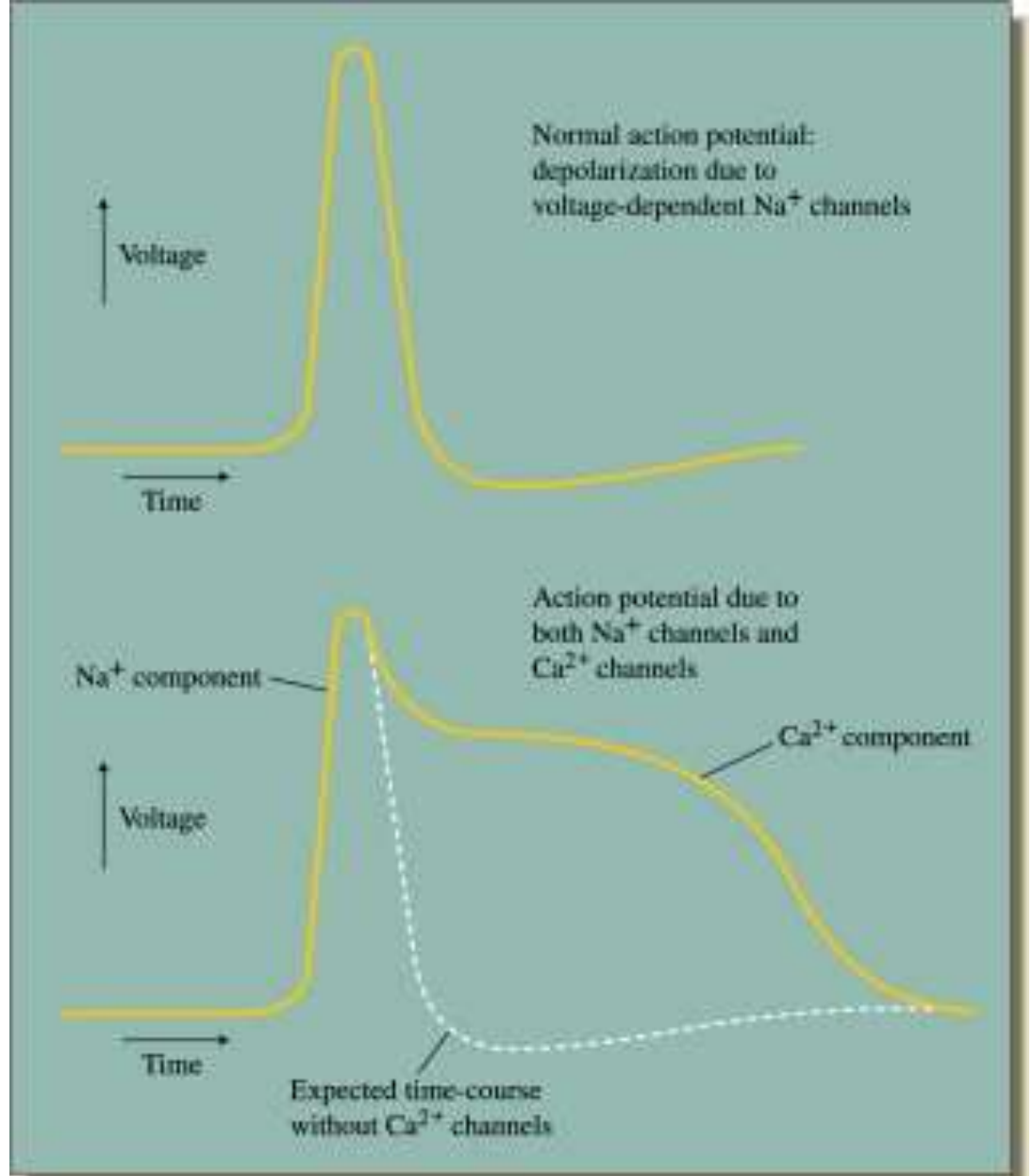
Fluorescenční stanovení Ca

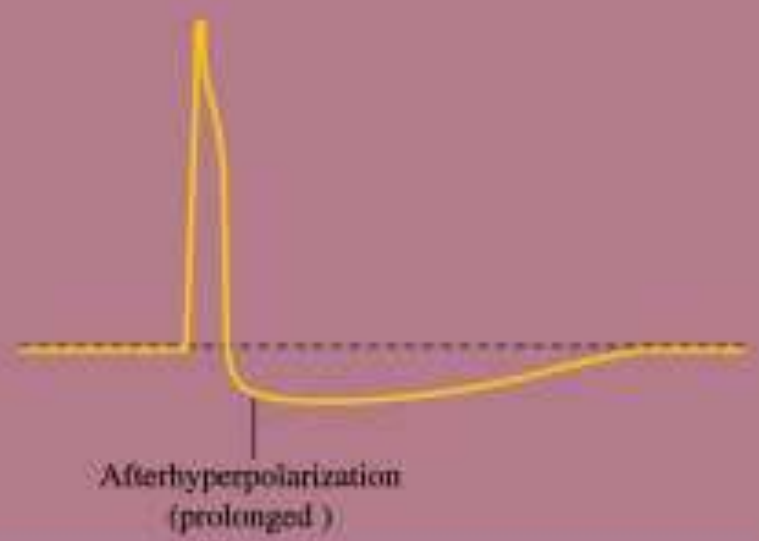
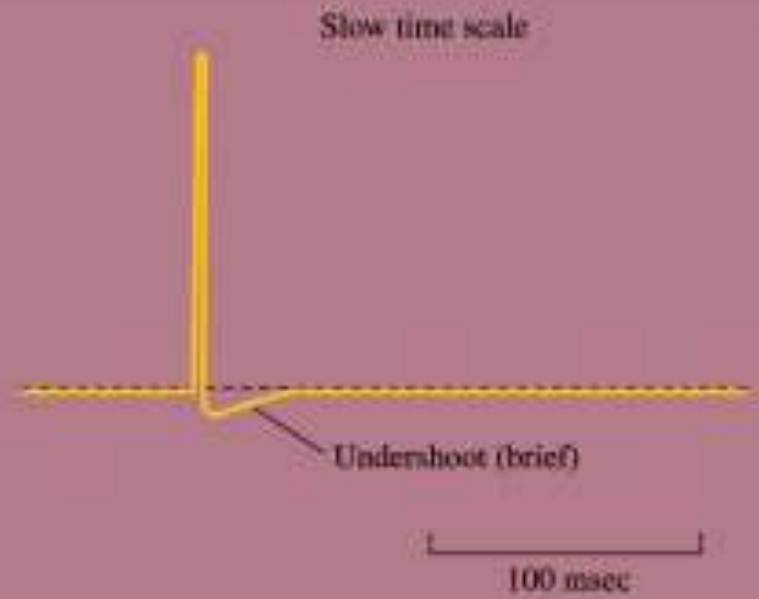
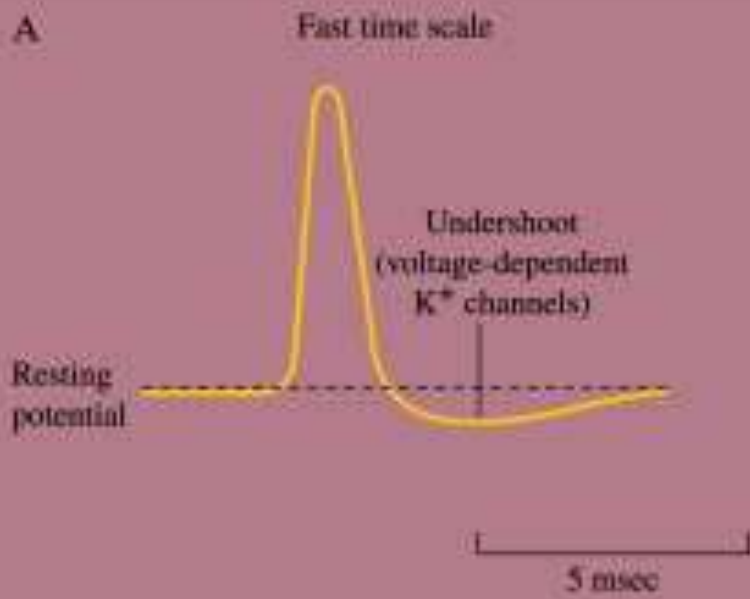


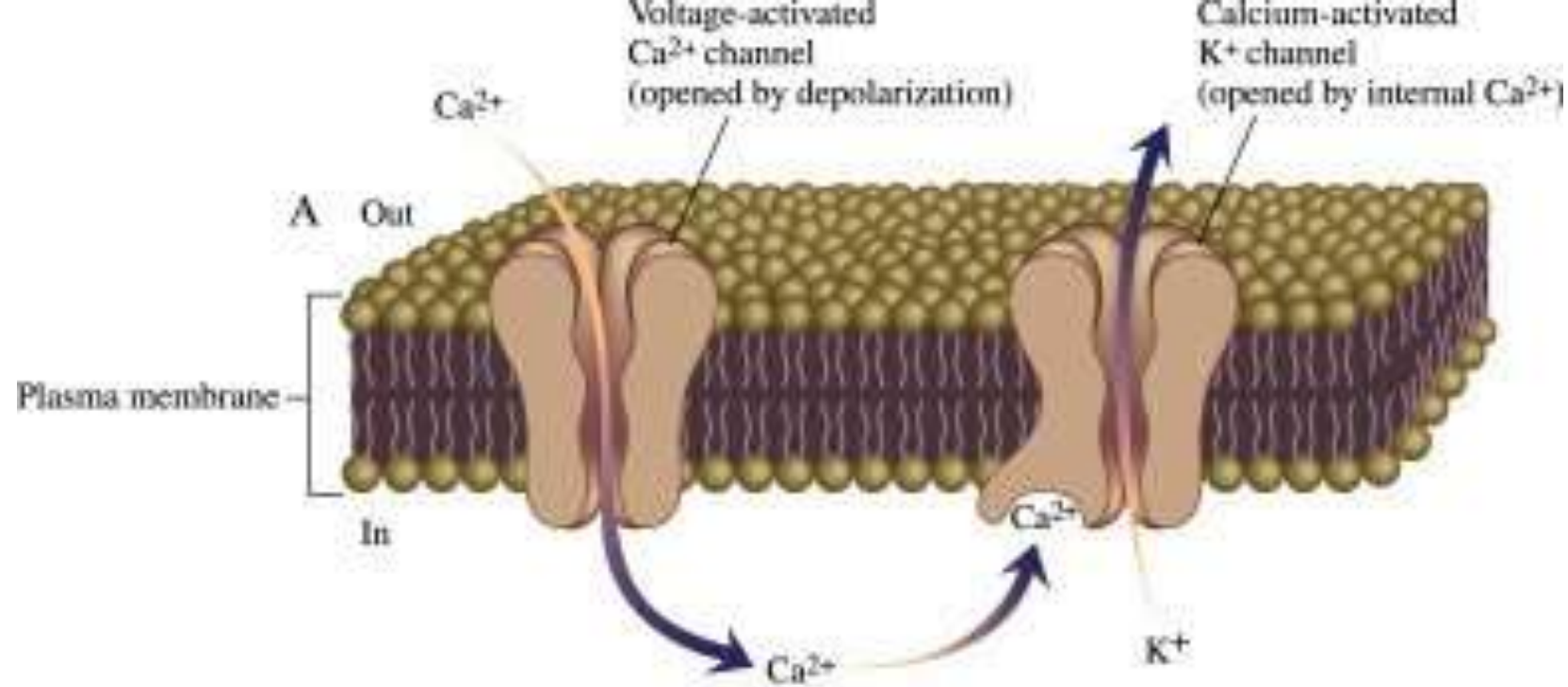
Ca v myokardu a jeho podíl na tvaru AP



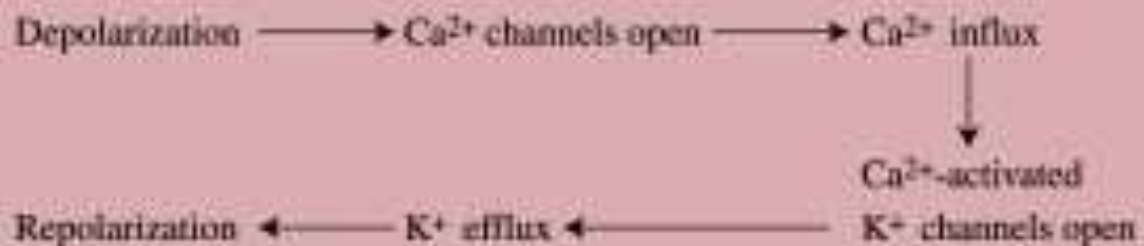
Ca v myokardu a jeho podíl na tvaru AP







B

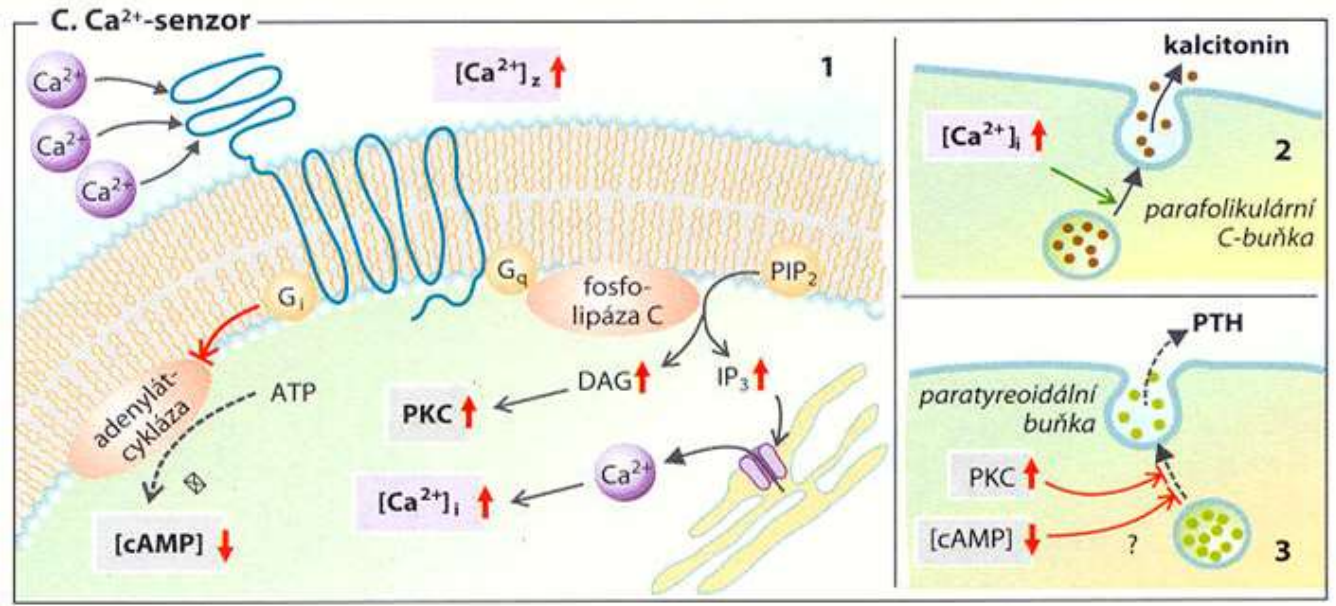
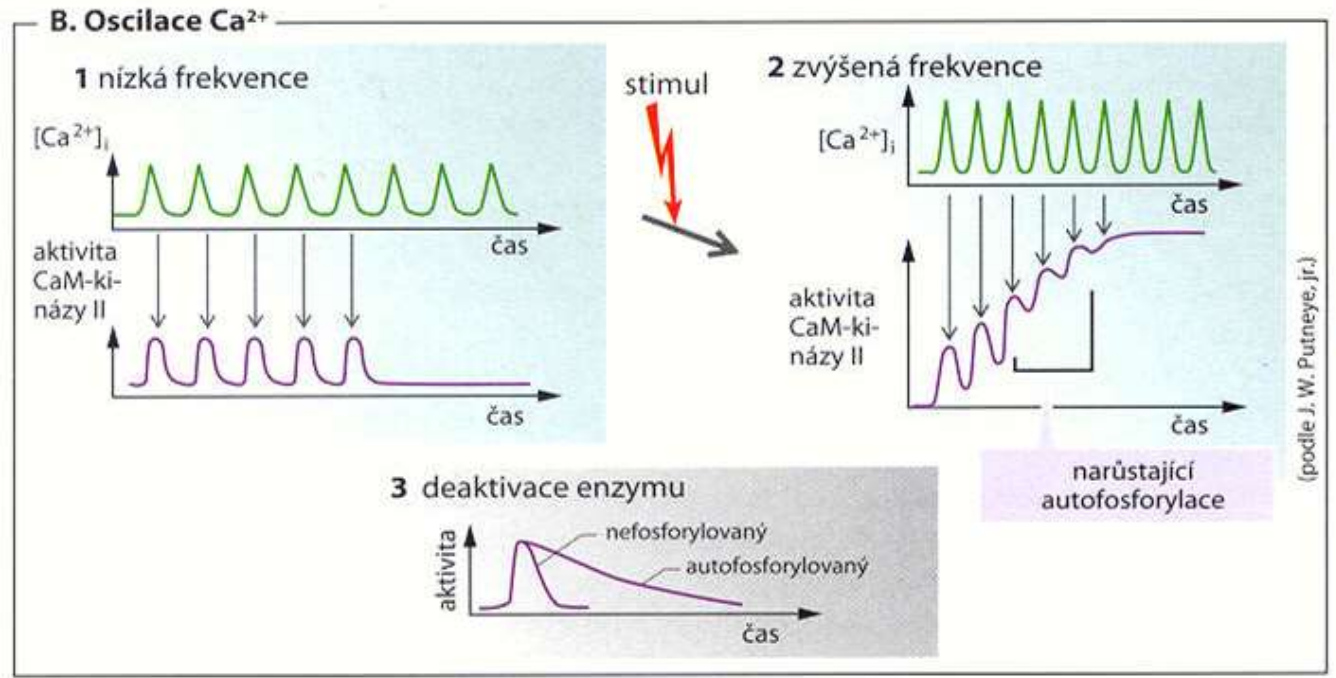


b

NEUROBIOLOGY
Gary G. Matthews

Blackwell
Science

Ca oscilace



Jak měřit změny intracelulárního vápníku

Intracelulární vápník je centrální veličinou, na které závisí téměř všechny buněčné regulační mechanismy. Volného intracelulárního vápníku je v buňkách nepatrně, a proto stačí přidat (nebo ubrat) jen mizivé množství, aby to vyvolalo okamžité a hluboké změny v jeho koncentraci. O tom se vědělo již dávno. Problém byl však v tom, že experimentální sledování změn tak nízkých vápníkových koncentrací není zrovna jednoduché. V 80. letech vyvinul Robert Tsien fluorescentní látky, zejména fura-2 a fluo-3, které mění své optické vlastnosti v závislosti na přítomnosti i nepatrných množství vápníku. Nové látky přinesly pokrok. Není třeba je do buněk složitě vpravovat. Před použitím se esterifikují, což jim dodá schopnost snadno prostupovat lipoidními membránami. Jakmile se takto dostanou do buňky, vrhnou se na ně intracelulární esterázy, látka je hydrolyzována a tím ztratí svoji lipofilní vlastnost. Zůstane tedy uvězněna v buňce jako v kleci.

Prakticky probíhá sledování hladiny intracelulárního vápníku tak, že po inkubaci s některým z výše uvedených optických indikátorů jsou buňky umístěny pod speciálně upravený mikroskop, kde jsou střídavě osvětlovány dvěma vlnovými délkami. Na obě vlnové délky odpovídá indikátor fluorescencí (s maximem obvykle kolem 540 nm). Vtip je v tom, že na jednu vlnovou délku (většinou kolem 340 nm, záleží na typu fluorescenční látky) odpovídá hlavně ta část látky, která vytvořila s intracelulárním vápníkem komplex, při druhé (obvykle 380 nm) odpoví zbytek, tedy ta část, která zůstala volná. Změny hladiny vápníku poruší rovnovážný stav mezi látkou, která vytvořila s vápníkem komplex, a tou, která zůstala volná, a tím se také mění měřená fluorescence. Tato metoda dnes umožňuje sledování změn vápníku během různých experimentálních postupů.

Kanály citlivé na jedy a anestetika

- Eter používán jako celkové anestetikum (1846), nahrazen chloroformem, (toxicita), N₂O,
- Lidokain, Xylokain – lokální anestetikum, blokuje Na kanály a brání vzniku AP

Local Anesthetic	Novocaine, Xylocaine	Blocks voltage gated Na ⁺ channels
General Anesthetics	Ether, Chloroform, Isoflurane	Blocks voltage gated K ⁺ channels
	Diazepam (Valium)	Opens Cl ⁻ channels

The following are poisons that exert their effects through interference with nerve conduction.

Agitoxin, Charybdotoxin	Scorpion	Blocks potassium “leaky” channels
Dendrotoxin	Green Mamba	Blocks voltage-gated potassium channels
Phoneutriatoxin	Banana spider	Slows inactivation of voltage-gated sodium channels
Batrachotoxin	Poison Arrow Frog	Prevents sodium channels from closing
Brevetoxin	Red Tide Dinoflagellate	Activates sodium channels
Maculotoxin	Blue-Ringed Octopus	Blocks sodium channels

Na kanál a bolest

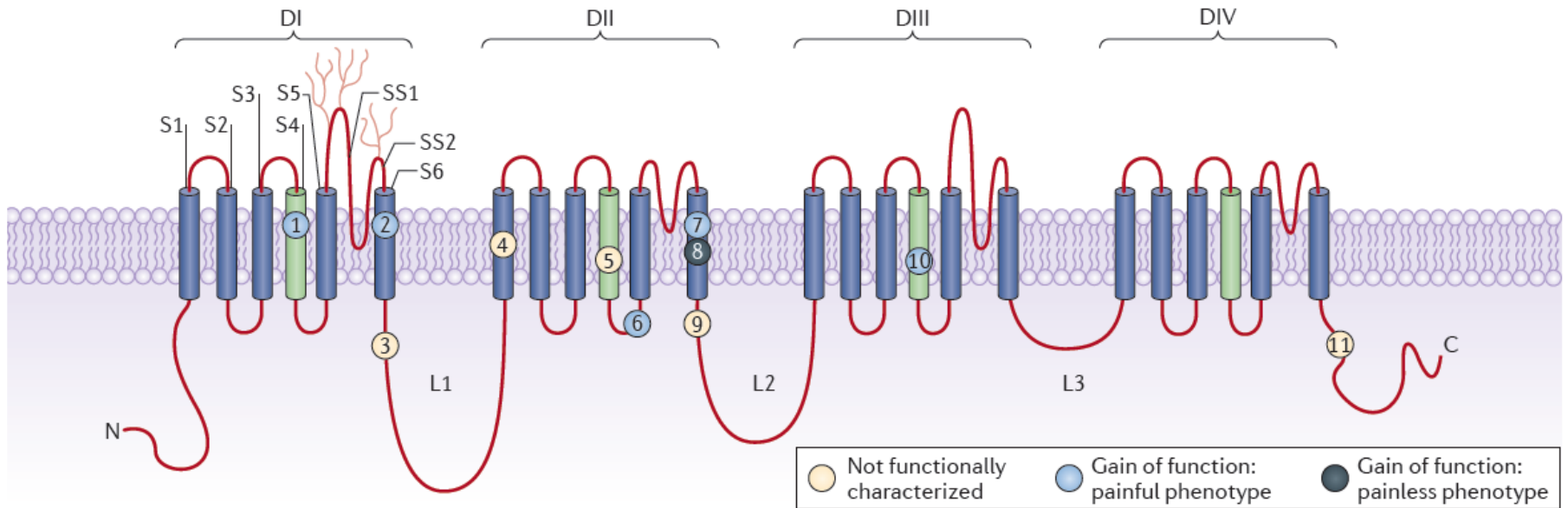


Figure 3 | Schematic diagram of the Na_v1.9 channel and locations of substitutions identified in individuals with pain disorders. The voltage-gated sodium channel Na_v1.9, like other Na_v channels, is composed of 24 transmembrane segments that are organized into four homologous domains (DI–DIV) and cytoplasmic amino and carboxyl termini. The fourth transmembrane segment of each domain (S4; green segments) is an amphipathic α -helix voltage sensor of the channel and has positively charged lysine or arginine residues that line one face of the helix. This configuration enables the exchange of ion pair partners following membrane depolarization, which facilitates the movement of these residues ‘outwards’ in the plane of the membrane. The pale red lines represent N-linked sugar moieties. Filled circles (numbered 1–11) represent amino acid substitutions in Na_v1.9 from individuals with pain disorders; pale

yellow circles denote mutations that have not been tested in functional assays. Mutations 1 (R225C) and 7 (A808G) were each identified in Chinese families with familial episodic pain⁸. Mutations 2 (I381T), 3 (K419N), 4 (A582T), 5 (A681D), 6 (G699R), 9 (A842P), 10 (L1158P) and 11 (F1689L) were identified in individuals with painful peripheral neuropathy (predominantly with small-fibre neuropathy) who had no mutations in the genes encoding the two other peripheral sodium channels Na_v1.7 and Na_v1.8 (REFS 6,9). The mutation L811P (mutation 8; black) was identified in two individuals with a complex syndrome involving an inability to experience pain and self-mutilation⁷. Thus, unlike mutations 1, 2, 6, 7 and 10 (all blue), which were associated with a gain of function and a painful phenotype, mutation 8 was associated with a painless phenotype despite the gain of channel function.

V lidském genomu je několik tisíc genů kódujících iontové kanály. Přes 150 jich kóduje napětově citlivé kanály.

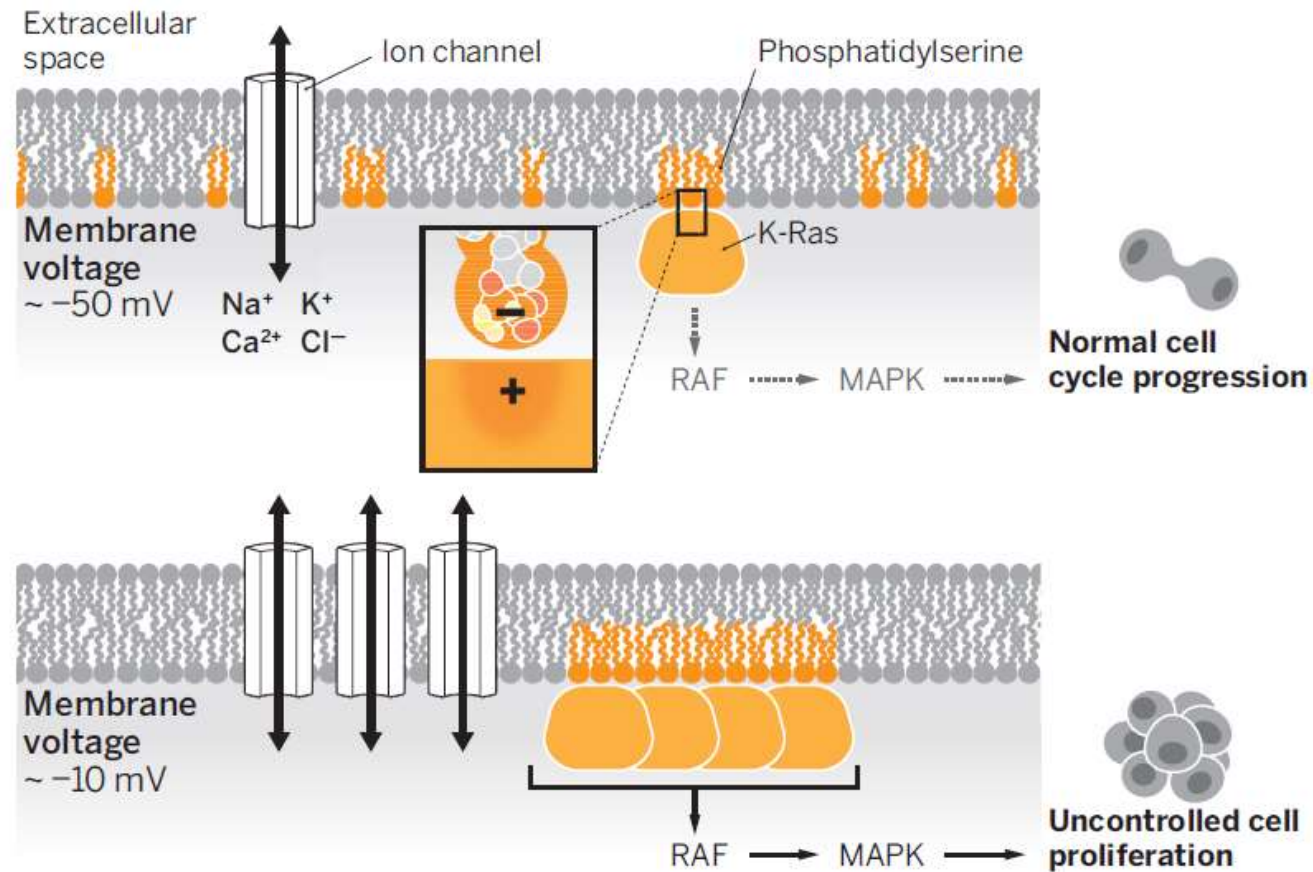
Iontové kanály a rakovinné metastázy

Rakovinné buňky projevující velkou schopnost metastázovat obsahují v membránách značný počet sodíkových kanálů (Na^+) řízených napětím. Jestliže jsou sodíkové kanály zapojeny přímo do metastázové kaskády, pak by po jejich blokadě měla schopnost vytvářet metastázy klesnout. Když se metastázujícím nádorovým buňkám prostaty zablokují sodíkové kanály tetrodotoxinem, pohyblivost buněk klesne a také přestanou vysílat výběžky.

Druhou vlastností metastázujících buněk je, že se na své cestě k novým místům osídlení „probourávají“ tkáněmi pomocí proteolytických enzymů. Vylučování enzymů i jiných látek je v buňce často spojeno s depolarizací, vyvolanou otevřením napěťově citlivých sodíkových a vápníkových kanálů. Tak se vylučují například neurotransmitery v mozku i na periférii a zřejmě i některé enzymy, které rakovinným buňkám otvírají cestu k tvorbě metastáz. A právě tetrodotoxin pomohl prokázat, že u jednoho typu prostatických nádorových buněk klesá vylučování exocytů po zablokování sodíkových kanálů.

Zpomalí anestetika zhoubné bujení? [František Vyskočil](#) Publikováno: Vesmír 79, 312, [2000/6](#)

Membránové napětí v řízení citlivosti na mitogenní signály.



Potential and proliferation. In a normal, nonproliferating cell, the resting membrane potential ($V_m \approx -50$ mV) is set by ion channel activity. Phosphatidylserine lipids are in small clusters that localize with K-Ras, which leads to low activation of the RAF-MAPK pathway. Channel overexpression depolarizes the cell ($V_m \approx -10$ mV), increasing the potential of phosphatidylserine lipids to spread across the membrane, leading to high activation of K-Ras and uncontrolled cell proliferation.

Potenciál buněk a K-Ras signálování o tom.pdf

Plasma membrane depolarization can trigger cell proliferation. By responding to voltage-induced changes in phosphatidylserine spatiotemporal dynamics, K-Ras nanoclusters set up the plasma membrane as a biological field-effect transistor, allowing membrane potential to control the gain in mitogenic signaling circuits.

SCIENCE sciencemag.org 21 AUGUST 2015 • VOL 349 ISSUE 6250