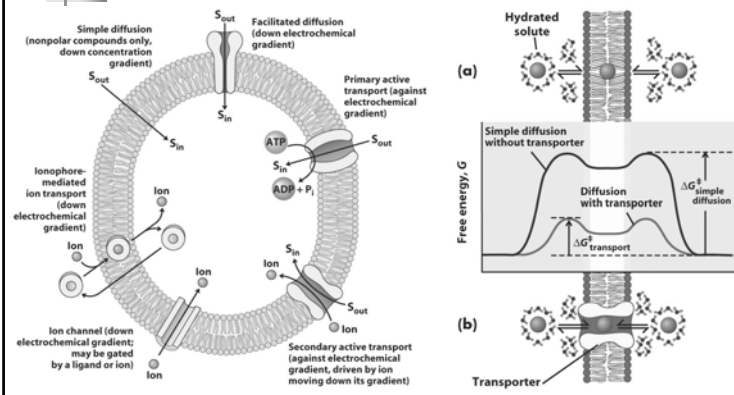


## BCM 094

# Studium membránového potenciálu a aktivního transmembránového transportu

Roman Chaloupka (FÚ UK)

## Membrána a transport přes ni



## Osnova:

1. Membránový potenciál a jeho fyziologický význam
2. Měření membránového potenciálu
3. Příklady metod pro studium membránového transportu:
  - měření aktivity MDR pump (primárně aktivní transport)
  - měření symportu protonů a iontů kovu (sekundárně aktivní transport)

## Membránový potenciál

### Složky:

1. separace náboje (membrána se chová jako deskový kondenzátor)
  2. povrchový potenciál
  3. dipólový potenciál
- ✓ hnací síla pro pohyb iontů přes membránu
  - ✓ velikost m.p. částečně ovlivňuje velikost energie uložené v koncentračních gradientech iontů
  - ✓ reguluje funkci některých proteinů

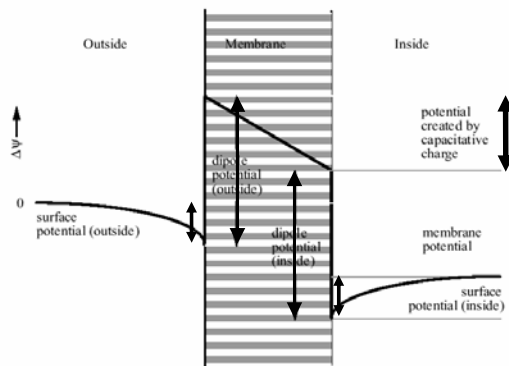
## Povrchový potenciál

- záporně nabitě hlavičky fosfolipidů, k nim kladné náboje z roztoku
- vztah mezi povrchovým nábojem a povrchovým potenciálem je složitý
  - závisí na hustotě pevného náboje a na separaci od pohyblivého náboje
  - teoretická analýza – Gouy a Chapman

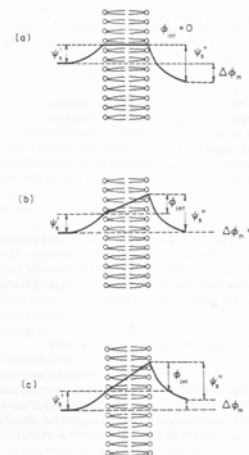
$$\sigma^2 = 2000\epsilon_0\epsilon_r RT \sum_i c_i (e^{-z_i F\psi_0/RT} - 1),$$

## Dipólový potenciál

- fosfolipidy jsou dipóly
  - (esterová vazba mezi karboxylovou skupinou mastné kyseliny a hydroxylem glycerolu)
- hlavičky nepřispívají
- dipólové potenciály protilehlých listů membrány se ruší, ALE
  - mohou hrát důležitou roli v permeabilitě iontů



## Potenciály na membráně II



Profily potenciálu:

- rozdíl v povrchových potenciálech na obou stranách
- totéž pro zkratovanou membránu
- přispívají jak povrchové potenciály, tak vnitřní membránový potenciál

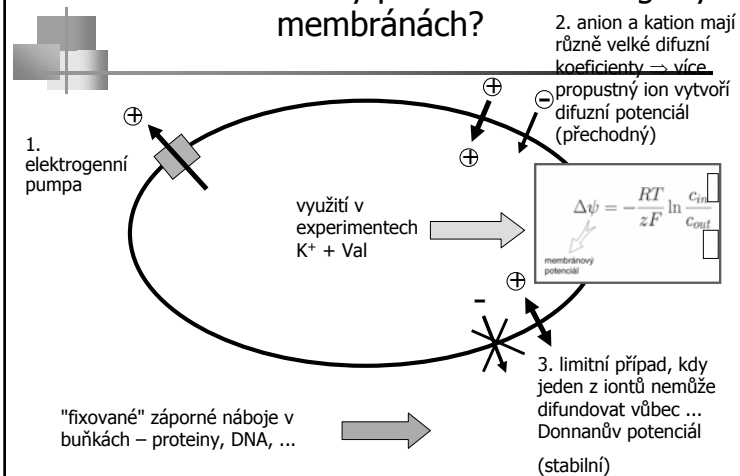
$\Delta\Phi_m$  – membránový potenciál – rozdíl v elektrickém potenciálu vodných prostředí na obou stranách

Přítomnost vnějšího potenciálového rozdílu se projeví vznikem vnitřního membránového potenciálu

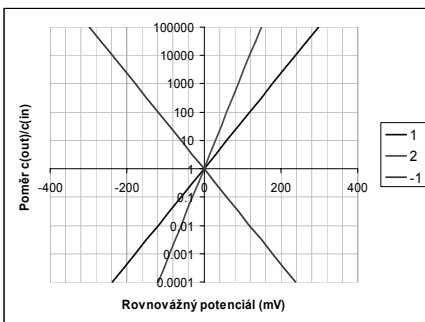
## Membránový potenciál v živých organismech

- Na téměř všech biologických membránách existuje membránový potenciál:
  - bakterie:** používají membránu pro přeměnu energie (energie uložena v  $\Delta\mu_{H^+}$ ) typicky:  $\Delta\Psi \approx -100$  mV
  - mitochondrie, chloroplasty:** podobné bakteriím. Závisí na podmínkách:  $\Delta\Psi \approx 0$  -  $-170$  mV (rozhoduje  $\Delta\mu_{H^+}$  tj. kombinace  $\Delta pH$  a  $\Delta\Psi$ )
  - 30 - -90 mV** v živočišných buňkách
  - 150 - -200 mV** v rostlinách
  - skoky v potenciálu během vedení nervového vzruchu:  $\approx 100$  mV

## Jak vzniká membránový potenciál na biologických membránách?



## Nernstův potenciál



$$\Delta\psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{c_{in}}{c_{out}}$$

membránový potenciál

## Potenciál – více iontů

- v rovnováze ... Nernstova rovnice
- pro stacionární stav
  - toky iontů přes membránu jsou konstantní
  - potenciál je daný stacionárním rozdělením iontů

Goldman-Hodgkin-Katzova rovnice

a

Hodgkin-Horowitzova rovnice

- ✓ popisují stacionární stav  $\Sigma J=0$
- ✓ v ohmické aproximaci

## Systémy permeabilní pro více iontů – stacionární případ

- Goldman-Hodgkin-Katz eq.  
[http://arrhythmia.hofstra.edu/java/rick/goldman/goldman\\_eq.html](http://arrhythmia.hofstra.edu/java/rick/goldman/goldman_eq.html)

$$U = \frac{RT}{F} \ln \frac{\sum_{\text{kationy}} P_i [i]_{out} + \sum_{\text{aniony}} P_i [i]_{in}}{\sum_{\text{kationy}} P_i [i]_{in} + \sum_{\text{aniony}} P_i [i]_{out}}$$

U... rovnovážný potenciál („zero current“),  
 P...permeabilita, [i]... koncentrace

Pokud je pouze jeden ion permeabilní ... dostaneme Nernstovu rovnici

- Hodgkin-Horowicz eq.

$$i U = \frac{\sum G_i U_i}{\sum G_i}$$

U<sub>i</sub> ... Nernstův potenciál pro daný ion, G<sub>i</sub>... vodivost membrány pro daný ion

$$I_i = G_i(U_i - U) = 0$$

$$\sum J_i = 0$$

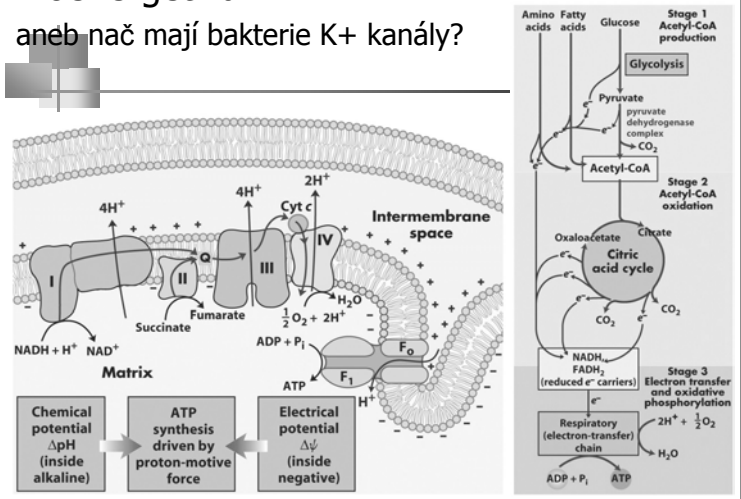
## Dva příklady:

- Nač bakterie potřebují selektivní K<sup>+</sup> kanály?
- Jak zabrání živočišné buňky bobtnání ?  
 Na co potřebují membránový potenciál?

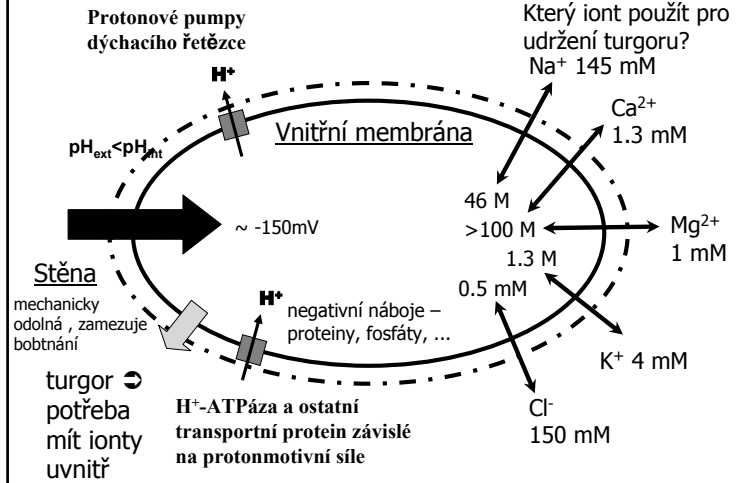
Jaký je význam existence membránového potenciálu na biologických membránách?

## Bioenergetika

aneb nač mají bakterie K<sup>+</sup> kanály?



*Aerobní bakterie: jaké mají kanály, jaké pumpy? Jak je to s transportem iontů přes membránu?*

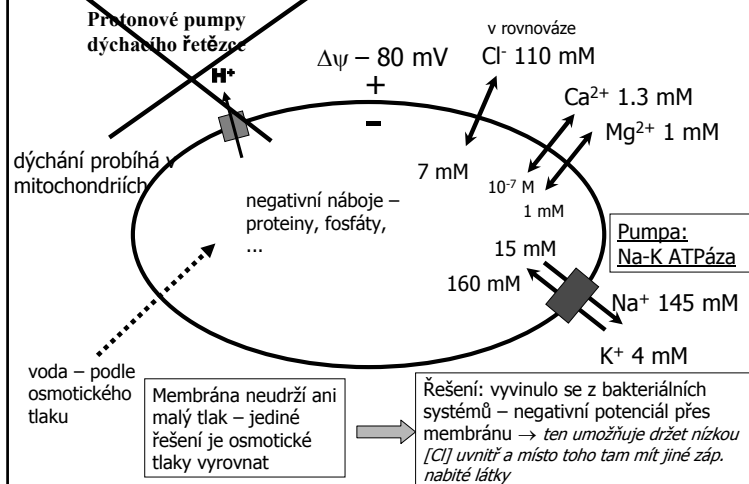


Co z toho plyne:

Aby bakterie mohla udržet vnitřek záporný (cca -150 mV):

- musí být její membrána nepropustná pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  a  $\text{Mg}^{2+}$
- draselné ionty mohou procházet (selektivní kanály), aby udržely osmotický tlak (turgor).

*Osmotické dilema: živočišné buňky nemají na rozdíl od bakterií buněčnou stěnu, jak tedy zabrání bobtnání?*



Co z toho plyne:

- Živočišné buňky udržují podobné koncentrace iontů jako bakterie
- Také mají negativní membránový potenciál, ale nevyužívají ho k přeměně energie ( $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{ATP}$ )
- Ale obojí slouží k dosažení osmotické rovnováhy za současného požadavku udržení důležitých aniontů (proteiny, DNA, fosfáty,...) uvnitř buňky

## Měření membránového potenciálu – přímé metody

### Užití mikroelektrody

Tkáňové buňky

Kvasinky

časově náročné = omezený počet buněk

Jsou moc malé

průnik elektrody = narušení integrity membrány

průnik elektrody = rozsáhlé mechanické poškození

Bakterie, orgány ... nelze použít

## Měření membránového potenciálu – nepřímé metody

- redistribuce iontů
- elektrochromní jev

$$\Delta\psi = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{in}}{C_{out}}$$

membránový potenciál

vnitrobuněčná koncentrace sondy

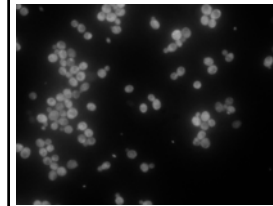
koncentrace sondy vně buňky

- Fluorescenční sondy
  - elektrochromní (styryly, karotenoidy – vnitřní sondy)
  - distribuční (carbocyaniny, rhodaminy, oxonoly, ANS)
- Lipofilní kationty
  - TPP, TPMP permeace
    - centrifugace, filtrace
    - TPP elektroda
- Radioaktivně značené kationty ( $K^+$ ,  $Rb^+$ )

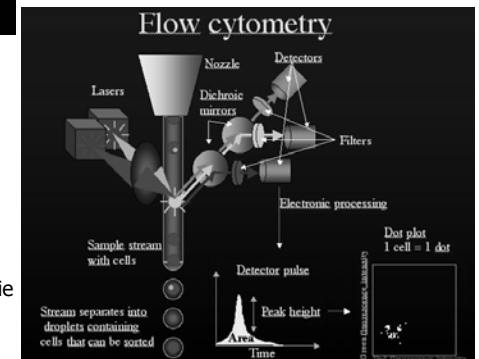
## Detekce pomocí redistribuce iontů

- Je třeba být schopen odlišit ionty uvnitř a vně
- značené ionty (radioaktivně), rychlá centrifugace nebo filtrace
- selektivní elektroda vně, měří pokles koncentrace (např. TPP, tetraphenyl phosphonium)
- fluorescenční sondy, které uvnitř mění své vlastnosti (zhášení, vazba na makromolekuly, tvorba oligomerů díky vyšší koncentraci...)

## Fluorescenční redistribuční sondy



- suspenze buněk jako celku – zprůměrovaný potenciál ← je třeba odlišit signál uvnitř a vně
- jednotlivých buněk
  - fluorescenční mikroskop
  - proudová cytometrie (JC-1)



## Kalibrace

- nejlépe srovnáním s mikroelektrodou, nebo s TPP elektrodou
- generování vhodného difuzního potenciálu (často valinomycin –  $K^+$ , FCCP - pH)
- je třeba dát pozor na artefakty!

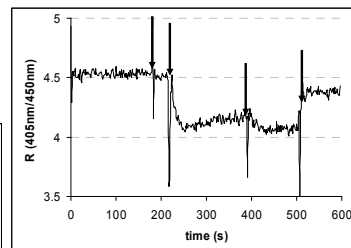
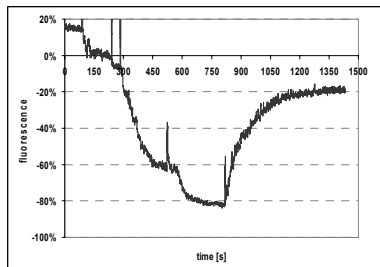


často se používá pouze pro kvantitativní měření,  
nekalibruje se

## Příklad použití fluorescenční redistribuční sondy

Použití fluorescenčních sond diS-C<sub>3</sub>(5) a pyranin pro sledování „energizace“ RSO připravených z *E.coli*

## „Energizace“ RSO RSO – Right-Side Out Vesicles



Delta pH generation in RSO membrane vesicles detected by changes in pyranine fluorescence (increase = acidification). Arrows indicate from the left to the right the addition of: ascorbate, PMS, valinomycin and finally nigericin (pH<sub>out</sub> = 6.5).

## Příklad použití fluorescenční redistribuční sondy

Použití sondy diS-C<sub>3</sub>(3) pro stanovení změn membránového potenciálu u kvasinek (a aktivity MDR pump)

## Problémy při aplikaci redistribučních sond

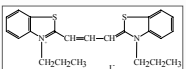
vazba na makromolekuly - změna kvantového výtěžku fluorescence

tvorba nefluoreskujících agregátů molekul sondy

Intenzita fluorescence z buňky neodráží dostatečně přesně vnitrobuněčnou koncentraci sondy.

### DiS-C<sub>3</sub>(3)

3,3'-dipropylthiakarbocyanin jodid

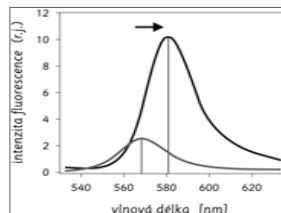


> Velmi rychlé ustavení rovnováhy mezi volnou a vázanou sondou – **sekundy**.

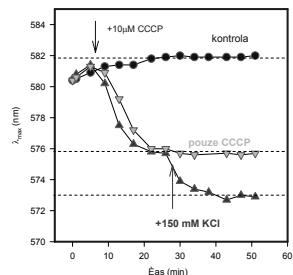
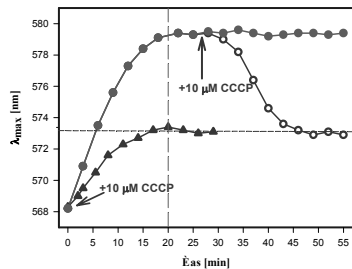
> Množství molekul vázané sondy je **úměrné** počtu molekul volné sondy.

### VAZBA SONDY NA BUNĚČNÉ KOMPONENTY:

- > posun polohy maxima emise o 10 nm do červené oblasti
- > zvýšení kvantového výtěžku fluorescence → nárůst intenzity fluorescence

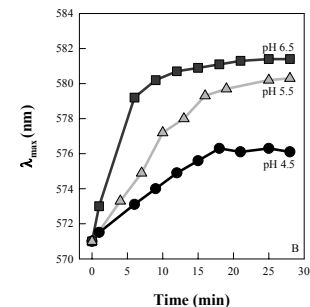
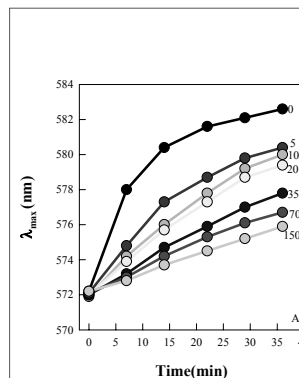


MOŽNOST SLEDOVÁNÍ VSTUPU SONDY DO BUNĚK v procesu ustalování rovnováhy mezi koncentrací sondy ve vnitřním a vnějším prostředí buňky podle  $\Delta\Psi$ .



Nejenom rovnovážná koncentrace sondy diS-C<sub>3</sub>(3) v cytosolu, ale i rychlost vstupu sondy do buněk závisí na  $\Delta\Psi$ .

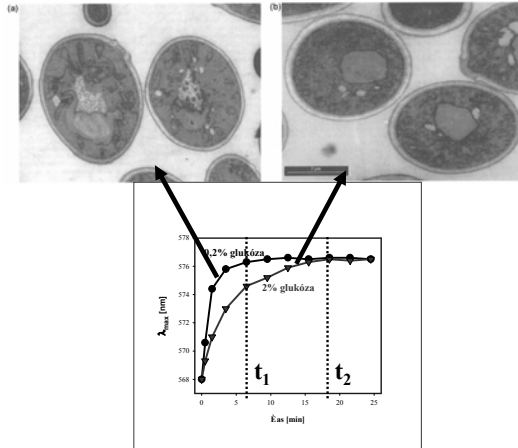
Zvýšení koncentrace K<sup>+</sup> (A) a H<sup>+</sup> (B) ve vnějším prostředí depolarizuje membránu (snížení  $\Delta\Psi$ ).



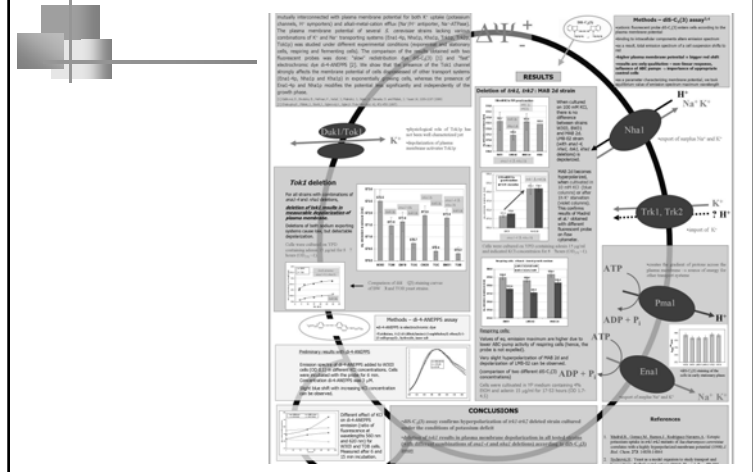


## Vliv přítomnosti buněčné stěny na vstup sondy do buněk

Ovlivnění tloušťky a kvality buněčné stěny kvasinek – změna kultivačních podmínek

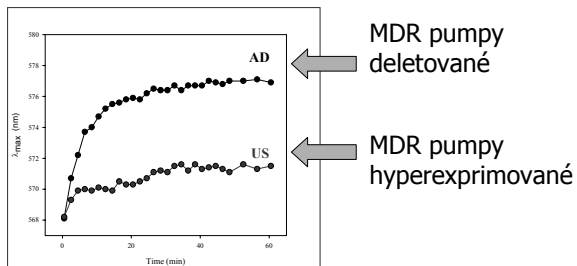


## Membránový potenciál kvasinek s deletovanými transportními systémy pro draslík



## Problémy s metodou:

- Rozdíly v „barvení“ různých kmenů kvasinek ...
- Mají různý potenciál?



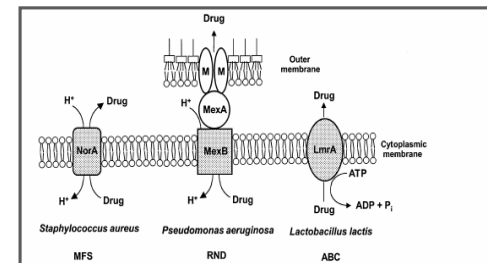
Odpověď: NE, ale koncentraci sondy v buňkách ovlivňují MDR pumpy tím, že sondu aktivně transportují ven!


## MULTIDRUG RESISTENCE - mnohočetná léková rezistence

= aktivní odstraňování cizorodých látek z buněk membránovými proteiny (pumpami).

- ⊖ Rezistence buněk vůči širokému spektru různých strukturálně a funkčně odlišných látek (inhibitorů, léků)
- ⊖ Negativní vliv při odstraňování kvasinkových kontaminací, léčeni infekcí.

⊖ Přítomny v prokaryotech, kvasinkách i v živočišných buňkách včetně lidských.



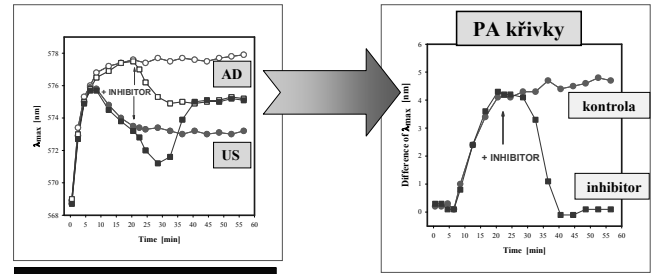


Nevýhoda se může změnit ve výhodu:

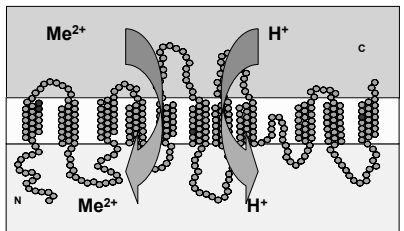
- pomocí DiS-C<sub>3</sub>(3) se dá studovat funkce kvasinkových MDR pump

### Vliv chemického stresu na membránový potenciál a aktivitu MDR pump

Látky, které způsobují současné snížení  $\Delta\Psi$  ( $H^+$ -ATPázu) a inhibici MDR pump



### Sekundárně aktivní transport – studium transportéru MntH

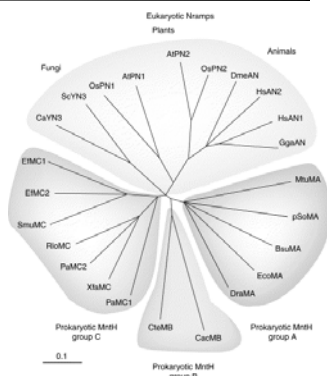


**Rodina proteinů Nramp/MntH**

- **Nramp** = Natural Resistance Associated Macrophage protein
- **MntH** = H<sup>+</sup>-dependent Manganese Transporter

### Nramp alias SLC11 Family (SoLute Carrier 11)

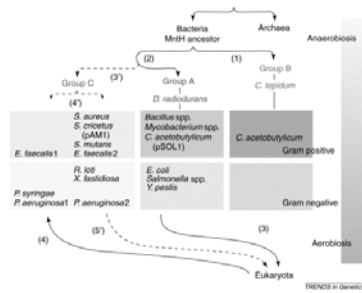
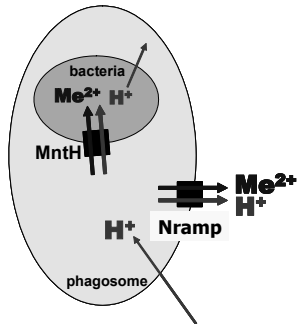
- ☛ Eukaryotní organismy:
  - ☛ Nramp1 alias SLC11A1
  - ☛ Nramp2 alias SLC11A2
- ☛ *S.cerevisiae*:
  - ☛ Smf1p
  - ☛ Smf2p
  - ☛ Smf3p
- ☛ Bakterie:
  - ☛ MntH



Cellier et al. *Trends Genet.* 17 (2001) 365-70.

## Fyziologická role MntH/Nramp transportérů a $Me^{2+}$

- ✦ MntH – Nramp prototyp
- ✦ diverzita bakteriálních MntH



Cellier et al. *Trends Genet.* 17 (2001) 365-70.

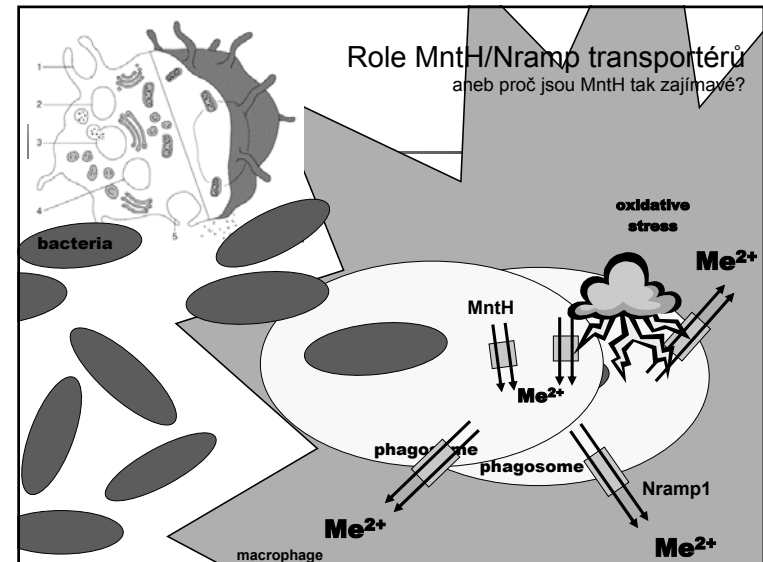
## Choroby spojené s polymorfismem Nramp genů

- ✦ **Nramp1 alias SLC11A1 (Bcg/Lsh/Ity)**
  - ✦  $Me^{2+}$  transport – fagosomální lumen → cytoplasma
  - ✦ antimikrobiální ochrana (komplementární k aktivitě NADPH oxidasy a NO synthasy)
  - ✦ 12 známých polymorfismů:
    - ✦ 2 – náchylnost k mycobakteriálním infekcím (tuberkulóza, lepra, Buruliho vředy)
    - ✦ 1 – náchylnost k infekcím spojená se zvýšenou rezistencí vůči patologickým projevům imunitního systému
    - ✦ ...

## Choroby spojené s polymorfismem Nramp genů

- ✦ **Nramp2 alias SLC11A2 (DMT1/DCT1)**
  - ✦ 2 isoformy – alternativní splicing
    - ✦ Nramp2-I – epitelální buňky
    - ✦ Nramp2-II – recyklační endosomy
  - ✦ Životně nezbytný
  - ✦ poruchy vstřebávání železa (serum & hepatic overload, microcytic anemia)
  - ✦ mikrocytická anemie: (1285G>C / E399D; 1246C>T / R416C; delece V114 & G212V)

## Role MntH/Nramp transportérů aneb proč jsou MntH tak zajímavé?



## Jak studovat transport ( $Me^{2+}$ ) *in vivo*?

### Eukaryotické Nramp:

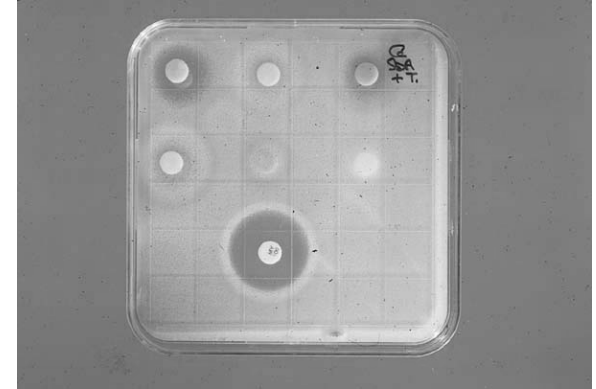
- Akumulace radioaktivních kovů
- Patch-clamp vajíček drápatky (*Xenopus*)
- Fluorescenční sondy citlivé na  $Me^{2+}$  (AM formy)
- Komplementace funkce u kvasinek s deletovanými SMF proteiny

*in vivo*  
RSO/ISO  
isolace & rekonstrukce

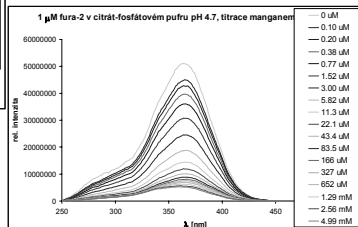
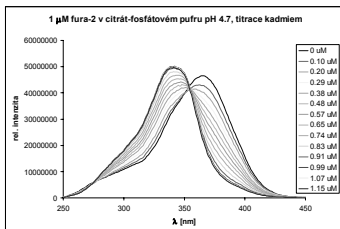
### Bakteriální MntH proteiny

- Akumulace radioaktivních kovů, ICP-MS
- metoda využívající pH-citlivý GFP (pHluorine)
- Inhibiční zóny (Disk Diffusion Assay)

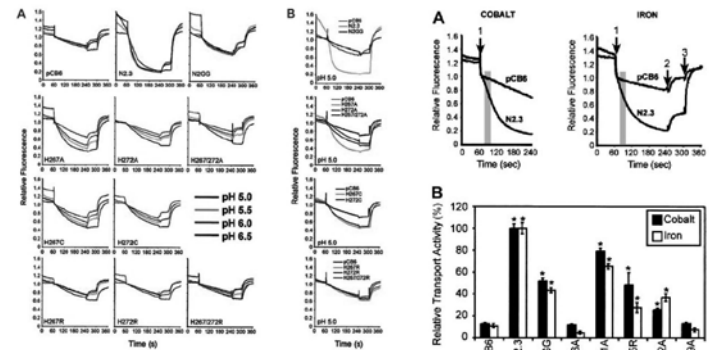
## Inhibiční zóny (Disk Diffusion Assay)



## Fluorescenční sondy citlivé na $Me^{2+}$

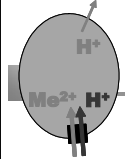


## Fluorescenční sondy citlivé na $Me^{2+}$

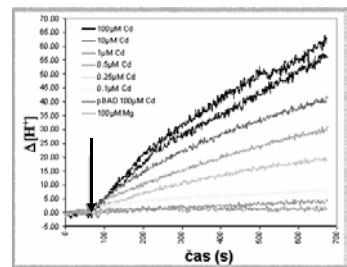
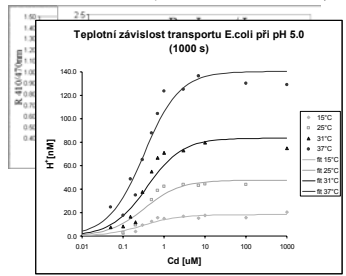


# Sledování funkce MntH *in vivo*

## GFP (pHluorine)



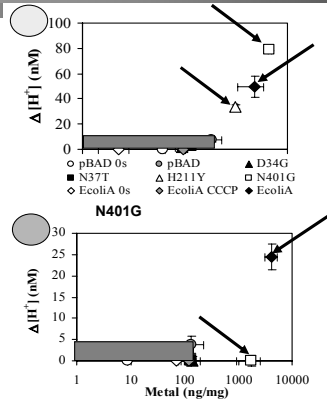
- ☛ sledování změn vnitrobuněčného pH způsobené funkcí MntH
- ☛ pHluorine - GFP (Green Fluorescent Protein) citlivý na změny pH (Miesenbock et al. *Nature* 394 (1998) 192-5 & Oisen et al. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 4145-7.)



☛ modelový systém: *E. coli* DH11S *mntH* (GFP - pGBM6-pHL; MntH - pBAD)

# Sledování funkce MntH *in vivo*

ICP-MS + pHluorine



# ICP-MS

## Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry

☛ dělení podle m/z

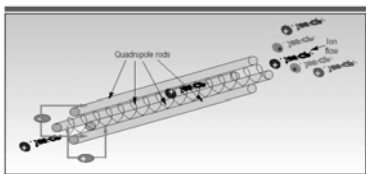
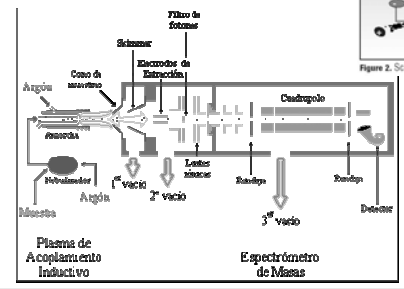


Figure 2. Schematic showing principles of a quadrupole mass filter.