



ΣΧΟΛΗ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΩΝ ΜΑΘΗΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

Βιοφυσική -

*Φυσικές μέθοδοι μελέτης βιολογικών φαινομένων – Βιοπολυμερή
– Κυτταρική μεμβράνη*

Ακαδ. έτος 2008-2009 - Διδάσκουσα: Μυρσίνη Μακροπούλου

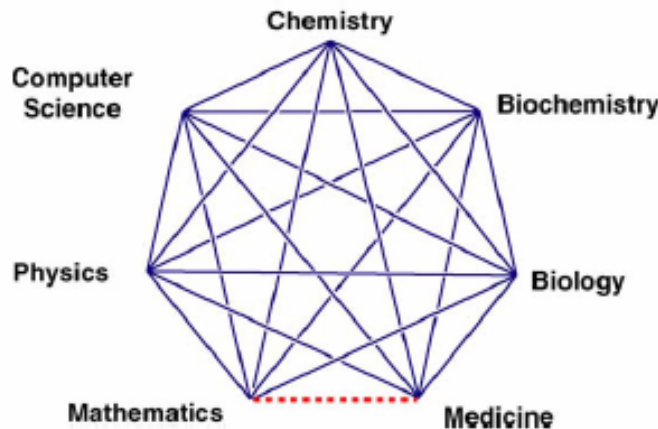
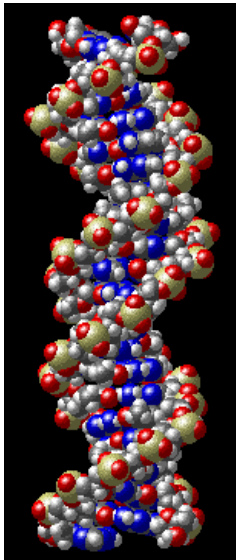
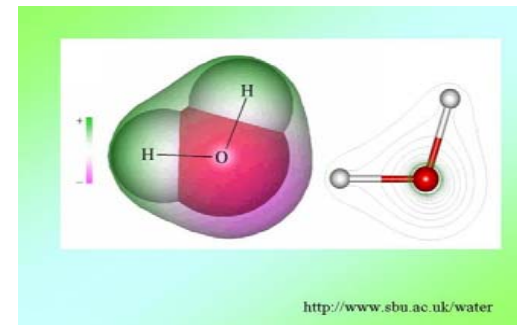


Fig. 15. The seven fields of molecular science.



Από τον ορισμό της Βιοφυσικής:

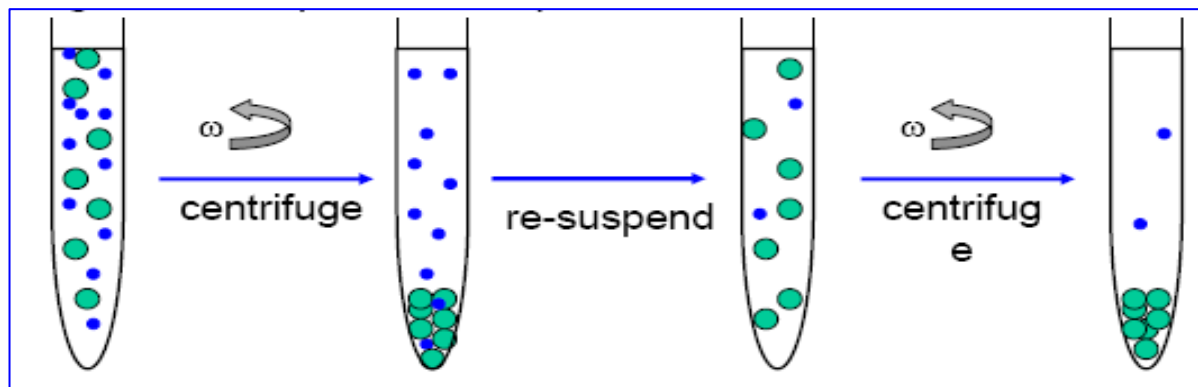
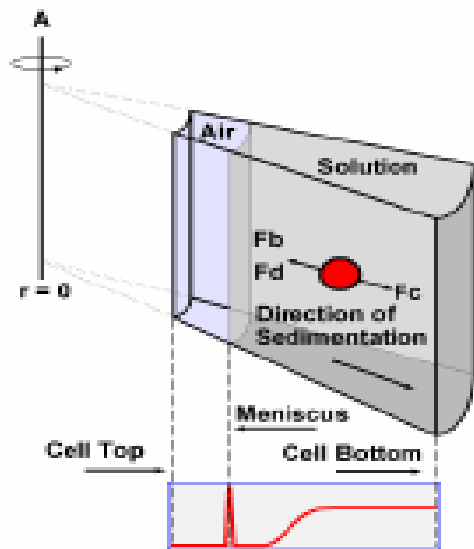
«Η Βιοφυσική είναι ο κλάδος εκείνος των φυσικών επιστημών που ασχολείται με:

- 1) τη μελέτη των φυσικών φαινομένων που υπεισέρχονται στη δομή, οργάνωση και λειτουργία των βιολογικών συστημάτων,
- 2) τη χρησιμοποίηση των αρχών και μεθόδων της Φυσικής στην έρευνα των φαινομένων της ζωής,
- 3) τη μελέτη των βιολογικών αποτελεσμάτων από την επίδραση των φυσικών παραγόντων στην έμβια ύλη».

■ Φυσικές μέθοδοι μελέτης βιολογικών φαινομένων: Φυγοκέντρωση

Η φυγοκέντρωση και η υπερφυγοκέντρωση χρησιμοποιούνται πλατιά για το διαχωρισμό ή την μελέτη μακρομορίων, συμβάλλοντας κύρια στη γνώση της μορφής και του μοριακού βάρους βιοπολυμερών, όπως π.χ. οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊνικά οξέα κ.λ.π.

Στην υπερφυγοκέντρο οι ουσίες κινούνται με τον ίδιο τρόπο που κινούνται σε πεδίο βαρύτητας, με τη διαφορά ότι **η φυγόκεντρος δύναμη υπερτερεί κατά πολύ της βαρύτητας**. Με τη φυγοκέντρωση επιτυγχάνεται η επιλεκτική καθίζηση μακρομορίων σε διάλυμα ή κυτταρικό ελαιώρημα.



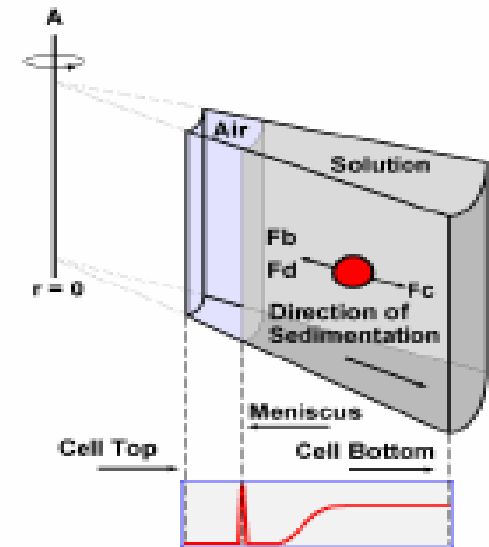
Υπερφυγοκέντρωση (2)

✱ Αν ένα μόριο περιστρέφεται με γωνιακή ταχύτητα ω (rad/s) θεωρούμε ότι υφίσταται μια **φυγόκεντρο δύναμη μέτρου $F_c = m\omega^2 r$** , όπου m η μάζα του μορίου και r η απόσταση του από το κέντρο περιστροφής. Το μόριο εκτοπίζει κάποια μάζα διαλύματος, ασκώντας **μια δύναμη μέτρου $F_a = -m_0\omega^2 r$** , όπου m_0 η μάζα του εκτοπιζόμενου διαλύματος. Επιπλέον υπάρχει η **δύναμη τριβής, με μέτρο $F_f = -fu$** , όπου f ο συντελεστής τριβής και u το μέτρο της ταχύτητας που αποκτά το μόριο.

✱ Αν θεωρήσουμε ένα μόριο σφαιρικής μορφής με ακτίνα r_0 , το οποίο βρίσκεται σε διάλυμα του οποίου ο συντελεστής ιξώδους είναι η , τότε η **δύναμη τριβής (δύναμη Stokes)** γράφεται:

$$F_f = 6\pi\eta r_0 u$$

Στη φυγοκέντρωση μπορεί να ορισθεί ο **παράγοντας επιτάχυνσης, β** , ο οποίος δείχνει πόσες φορές είναι μεγαλύτερη η φυγόκεντρος δύναμη, την οποία υφίσταται το μόριο, από τη δύναμη της γήινης βαρύτητας, ή πόσες φορές είναι μεγαλύτερη η κεντρομόλος επιτάχυνση, g , της επιτάχυνσης της βαρύτητας, g_0 , όπου θεωρούμε ότι $g_0 = 9,81 \text{ m/s}^2$. Έτσι **$\beta = g/g_0$** .

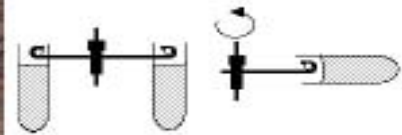


Υπερφυγοκέντρωση (3)

Ανάλογα με την τιμή του παράγοντα β οι συσκευές φυγοκέντρωσης που χρησιμοποιούνται στην βιοφυσική έρευνα αλλά και στην κλινική πράξη διακρίνονται στους παρακάτω τύπους:

- a) **Συνήθεις, επιτραπέζιες, φυγόκεντροι, $1000 < \beta < 6240$**
- b) **Φυγόκεντροι υψηλής ταχύτητας, $10\ 000 < \beta < 20\ 000$**
- c) **Υπερφυγόκεντροι, $20\ 000 < \beta < 400\ 000$,**
- d) **Υπερ-υπερφυγόκεντροι, $\beta > 400\ 000$.**

Οι φυγόκεντροι υψηλής ταχύτητας και οι υπερφυγόκεντροι έχουν ενσωματωμένο σύστημα ψύξης για την **αποφυγή υπερθέρμανσης** των βιολογικών δειγμάτων λόγω τριβών και διατήρηση της θερμοκρασίας σε κανονικά, βιοσυμβατά, επίπεδα. Σε ταχύτητες άνω των 40 000 απαιτείται επίσης λειτουργία σε πολύ υψηλό κενό, γιατί οι θερμοκρασίες που αναπτύσσονται είναι υπερβολικά υψηλές.



Υπερφυγοκέντρωση (4)

- Με τον προσδιορισμό της ταχύτητας καθίζησης και άλλων μετρήσιμων μεγεθών λαμβάνονται πληροφορίες για το μοριακό βάρος και άλλες παραμέτρους των υπό εξέταση μακρομορίων.

- Η οριακή ταχύτητα που αποκτά το μόριο στη φυγόκεντρο υπολογίζεται από τον δεύτερο νόμο του Νεύτωνα με τη συνθήκη η συνισταμένη των δυνάμεων να είναι μηδέν:

$$\vec{F}_\alpha + \vec{F}_f + \vec{F}_C = 0 \quad \longrightarrow \quad -F_\alpha - F_f + F_C = 0$$

και επομένως η οριακή ταχύτητα που αποκτά το μόριο καθορίζεται από τη σχέση:

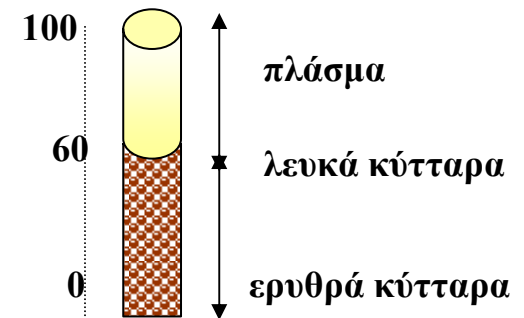
$$u = \frac{\omega^2 r V (\rho - \rho_0)}{f}$$

όπου ρ , ρ_0 οι πυκνότητες του μορίου και του διαλύματος αντίστοιχα και V ο όγκος του σωματιδίου.

- Στη φυγοκέντρωση χρησιμοποιείται ο όρος $S = u/\omega^2 r$, ο οποίος ονομάζεται **συντελεστής καθίζησης** και μετριέται σε μονάδες χρόνου, s . Συνήθως ο συντελεστής καθίζησης εκφράζεται σε μονάδες S (από το όνομα του ερευνητή που μελέτησε το θέμα αυτό, του Svedberg). Η τιμή $10^{-13} s$ ορίζεται ως $1 S$.

Υπερφυγοκέντρωση (5)

- Ο συντελεστής S χαρακτηρίζει τις διάφορες πρωτεΐνες, έτσι για παράδειγμα αν τα μόρια της αιμοσφαιρίνης περιστρέφονται με γωνιακή ταχύτητα 30000 στροφές/λεπτό, σε ακτίνα περιστροφής $r=10$ cm, αποκτούν ταχύτητα $u=1,6$ mm/h και τότε ο συντελεστής καθίζησης έχει την τιμή 4,4 S ή 0.44 ps. Αν μια άγνωστη πρωτεΐνη στις ίδιες συνθήκες παρουσιάζει τον ίδιο συντελεστή S , χαρακτηρίζεται σαν αιμοσφαιρίνη.
- Ο ρυθμός καθίζησης του ολικού αίματος αυξάνεται σε οξείες μολύνσεις και σε μερικές χρόνιες παθήσεις (π.χ. φυματίωση).



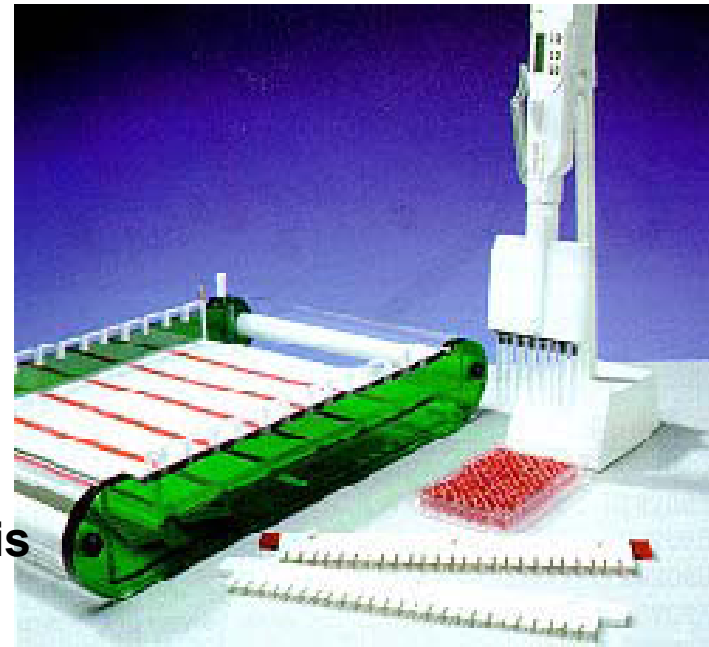
Κατανομή των συστατικών του αίματος σε σωλήνα φυγοκέντρωσης. Το ύψος της στήλης των ερυθρών κυττάρων, ως ποσοστό του όλου ύψους του σωλήνα φυγοκέντρωσης, εκφράζει τον αιματοκρίτη.

■ Φυσικές μέθοδοι μελέτης βιολογικών φαινομένων: Ηλεκτροφόρηση

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος διαχωρισμού φορτισμένων ουσιών, κύρια πρωτεϊνών. Κατά την ηλεκτροφόρηση, ηλεκτρικά φορτισμένα μακρομόρια μεταναστεύουν προς τον ένα ή τον άλλο πόλο ενός ηλεκτρικού πεδίου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται ευρύτατα για το **διαχωρισμό, απομόνωση και ανάλυση των πρωτεϊνικών μιγμάτων** και ιδιαίτερα σε κλινικές αιματολογικές εξετάσεις. Είναι μια κλασική εργαστηριακή μέθοδος ανάλυσης τόσο στη βιοϊατρική έρευνα, αλλά, κυρίως, στην καθημερινή κλινική πράξη.



Electrophoresis



Ηλεκτροφόρηση (2)

Οι πρωτεΐνες σε διάλυμα παρουσιάζονται ιονισμένες χάρη κυρίως στις ομάδες COO^- και $-\text{NH}_3^+$ των αμινοξέων και αυτή η ηλεκτρική συμπεριφορά εξαρτάται βέβαια από τη χημική τους σύσταση, αλλά επίσης και από το pH του διαλύματος.

Οι δυνάμεις που ασκούνται στη φορτισμένη πρωτεΐνη (την οποία υποθέτουμε σφαιρική) είναι:

- Η δύναμη Coulomb, F_e , λόγω ηλεκτρικού πεδίου έντασης E σε φορτίο q , $F_e = qE$.
- Η δύναμη τριβής (νόμος Stokes), F_f , η οποία ασκείται σε μόριο ακτίνας R , που βρίσκεται σε υγρό με συντελεστή ιξώδους η , $F_f = 6\pi\eta Ru$.
- Η δύναμη του πεδίου βαρύτητας, $F_g = mg$.

Η δύναμη βαρύτητας θεωρείται αμελητέα και επομένως για ομαλή κίνηση του μορίου πρέπει:

$$F_e = F_f \text{ και άρα } qE = 6\pi\eta Ru$$

Από τα παραπάνω συνάγεται η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα μόρια, έχοντας καθαρό φορτίο q , σ' ένα ηλεκτρικό πεδίο έντασης E :

$$u = \frac{qE}{6\pi\eta R}$$

Ηλεκτροφόρηση (3)

❖ Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να γίνει είτε σε αέρια ή σε υγρή φάση, η οποία είναι και η πλέον διαδεδομένη και γίνεται με διάφορους τρόπους: ηλεκτροφόρηση σε στήλη υγρού, σε χαρτί διηθητικό, σε συνήθη τάση, σε υψηλή τάση κ.α. Η ηλεκτροφόρηση ανήκει στα ηλεκτροκινητικά φαινόμενα των βιολογικών υγρών, παραλλαγές των οποίων φαινομένων είναι η ηλεκτρο-ώσμωση, η καθίζηση και η ροή υγρού μέσα από πορώδες διάφραγμα κ.ά..

❖ Ηλεκτροκινητικά φαινόμενα εμφανίζουν τα βιολογικά μακρομόρια, τα κολλοειδή σωματίδια, καθώς και υποκυτταρικά σωματίδια και κύτταρα σε ηλεκτρολυτικό φυσιολογικό διάλυμα. Ως φυσιολογικό διάλυμα θεωρούμε το ισοτονικό προς κάποιο βιολογικό υγρό διάλυμα (π.χ. το πλάσμα του αίματος) όπου σε θερμοκρασία 37° C παρουσιάζει pH=7,2.

❖ Με ορισμένες ηλεκτροφορητικές τεχνικές μπορεί να προσδιορισθεί επίσης το μοριακό βάρος ή ο μοριακός όγκος ενός άγνωστου βιομορίου, γεγονός που έχει ιδιαίτερη ερευνητική αλλά και κλινική σημασία στην ανίχνευση π.χ. γενετικών ανωμαλιών του αίματος και άλλων παθολογικών καταστάσεων.

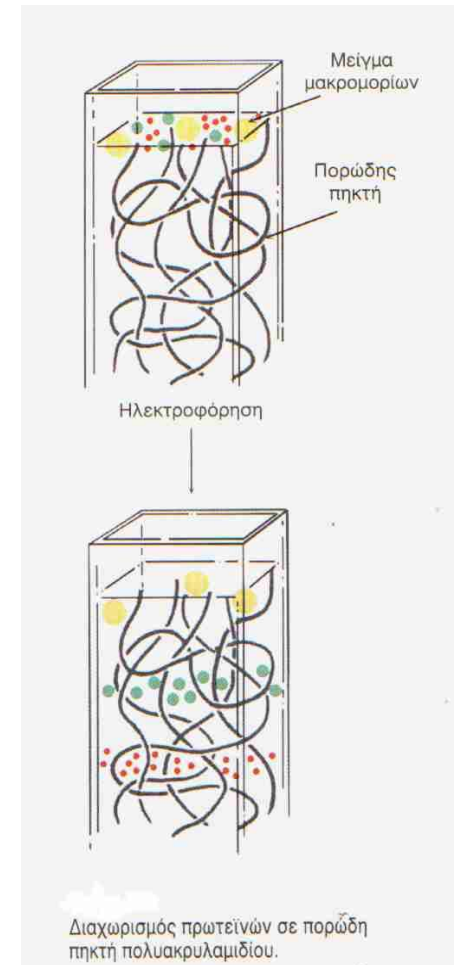
❖ Η ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται και σε μεγάλη κλίμακα για βιομηχανικούς σκοπούς. Έτσι σήμερα, σε μεγάλες βιομηχανικές εγκαταστάσεις χρησιμοποιούνται τα λεγόμενα ηλεκτροστατικά φίλτρα καπνού ή αλλιώς ηλεκτροφορητικοί βιομηχανικοί θύλακες για την κατακράτηση στερεών σωματιδίων (π.χ. άνθρακα) και αποφυγή μόλυνσης του περιβάλλοντος.

Ηλεκτροφόρηση – ένα παράδειγμα

Ο **ηλεκτροστατικός διαχωρισμός** γίνεται πάντα σε πηκτή παρά σε υγρό, κυρίως για δύο λόγους. Κατ' αρχάς η πηκτή καταστέλλει τα ρεύματα που δημιουργούνται από μικρές βαθμιδώσεις θερμοκρασίας - απαραίτητη προϋπόθεση για σωστό διαχωρισμό. Δεύτερον η πηκτή λειτουργεί ως μοριακός ηθμός καθιστώντας έτσι ευκολότερους τους διαχωρισμούς των μορίων .

Τα μόρια που είναι μικρά σε σχέση με τους πόρους της πηκτής μετακινούνται εύκολα δια μέσου της πηκτής, ενώ τα μεγάλα μόρια μένουν σχεδόν αμετακίνητα. Μόρια ενδιάμεσου μεγέθους μετακινούνται μέσα από την πηκτή σε διάφορες ταχύτητες.

Οι **πηκτές πολυακρυλαμιδίου** είναι προτιμητέες για ηλεκτροφόρηση, γιατί αποτελούνται από χημικά ουδέτερες ενώσεις και σχηματίζονται εύκολα .

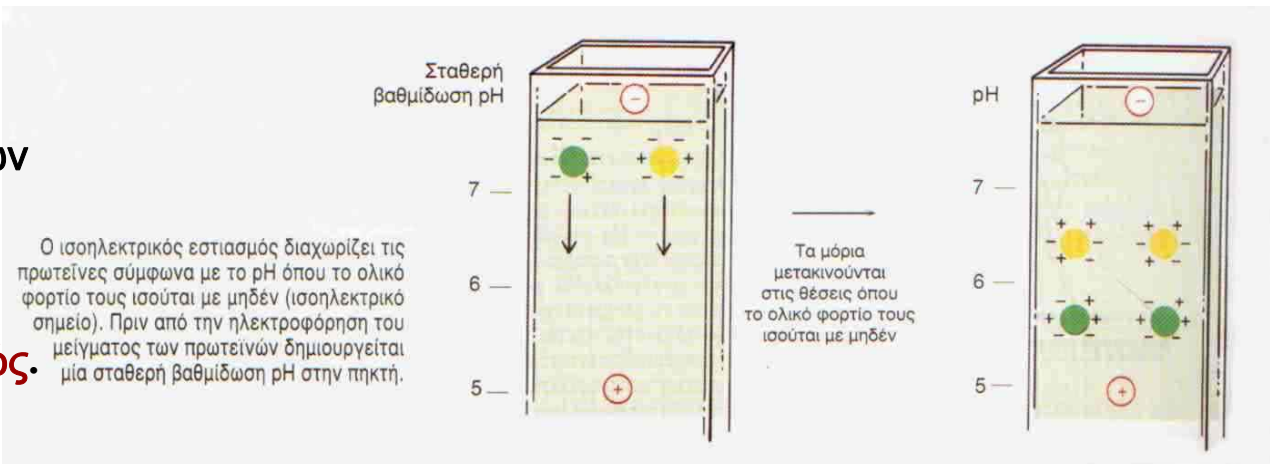


Ισοηλεκτρικό σημείο μιας πρωτεΐνης καλείται εκείνο το pH για το οποίο η ηλεκτροφορητική κινητικότητα της πρωτεΐνης μηδενίζεται.

Ηλεκτροφόρηση - ένα παράδειγμα (συνέχεια)

Οι πρωτεΐνες μπορούν να διαχωριστούν ηλεκτροφορητικά βάσει του σχετικού περιεχομένου τους σε όξινα και βασικά αμινοξέα. Το **ισοηλεκτρικό σημείο (pI)** μιας πρωτεΐνης είναι το pH όπου το ολικό φορτίο της είναι μηδέν. Σ' αυτό το pH , η ηλεκτροκινητικότητα της είναι μηδέν. Για παράδειγμα, το pI του κυτοχρώματος c μιας πολύ βασικής πρωτεΐνης -μεταφορέα ηλεκτρονίων είναι 10,6, ενώ της λευκωματίνης ορού, μιας όξινης πρωτεΐνης στο αίμα, είναι 4,8. Ας υποθέσουμε ότι ένα μείγμα πρωτεϊνών ηλεκτροφορείται σε μια διαβάθμιση pH σε πηκτή απουσία SDS . Κάθε πρωτεΐνη θα μετακινηθεί μέχρι να συναντήσει μια θέση στην πηκτή όπου το pH ισούται με το pI της πρωτεΐνης .

Αυτή η μέθοδος διαχωρισμού πρωτεϊνών ανάλογα με το **ισοηλεκτρικό τους σημείο** λέγεται **ισοηλεκτρικός εστιασμός**.



Η διαβάθμιση pH στην πηκτή σχηματίζεται με ηλεκτροφόρηση πρώτα των **πολυαμφολυτών** (μικρών - πολυφορτισμένων πολυμερών) που έχουν πολλές τιμές pI . Ο **ισοηλεκτρικός εστιασμός** μπορεί εύκολα να διαχωρίσει πρωτεΐνες που διαφέρουν σε pI , ακόμη και κατά 0,01 που σημαίνει ότι μπορούν να διαχωριστούν πρωτεΐνες που διαφέρουν και κατά ένα μόνο αρνητικό φορτίο.

DNA Forensics Problem Set 1

Problem 1: Southern hybridization technique

DNA fingerprint analysis is based on the "Southern" hybridization technique. In this method:

Tutorial

DNA fingerprinting, also termed DNA profile analysis is based on the use of the "Southern" hybridization technique to analyze polymorphic regions of human DNA. Polymorphisms are explained in more detail in problem 5. The experimental steps used in a forensics laboratory for DNA profile analysis are as follows:



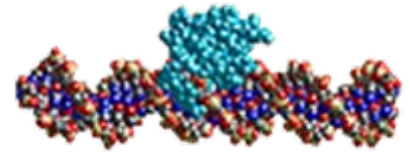


1. DNA extraction

DNA can be extracted from almost any human tissue. Sources of DNA found at a crime scene might include blood, semen, tissue from a deceased victim, cells in a hair follicle, and even saliva. DNA extracted from items of evidence is compared to DNA extracted from reference samples from known individuals, normally from blood.

2. Digestion of DNA with a restriction endonuclease

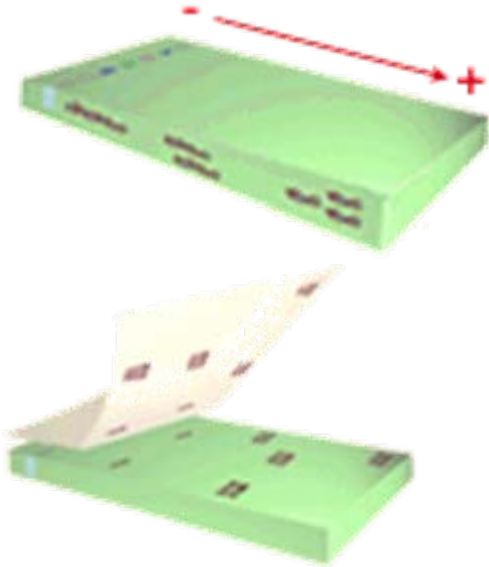
Extracted DNA is treated with a restriction endonuclease, which is an enzyme that will cut double stranded DNA whenever a specific DNA sequence occurs. The enzyme most commonly used for forensic DNA analysis is HaeIII, which cuts DNA at the sequence 5'-GGCC-3'.



3. Agarose gel electrophoresis

Following DNA digestion, the resulting DNA fragments are separated by size via electrophoresis in agarose gels. During electrophoresis, DNAs which are negatively charged migrate toward the positive electrode. As DNA fragments move, their migration rate is slowed by the matrix of the agarose gel. Smaller DNA fragments move more rapidly through the pores of the gel matrix than larger DNA fragments. The result is a continuous separation of the DNA fragments according to size, with the smallest DNA fragments moving the greatest distance away from the origin.



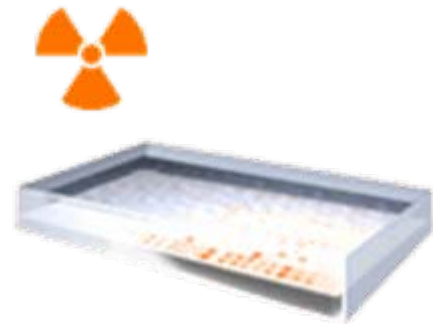


4. Preparation of a "Southern blot"

Following electrophoresis, the separated DNAs are denatured while still in the agarose gel by soaking the gel in a basic solution. Following neutralization of the basic solution, the single strand DNA molecules are transferred to the surface of a nylon membrane by blotting. This denaturation/blotting procedure is known as a "Southern blot" after the inventor, Edwin Southern. Just as the blotting of wet ink on a dry paper transfers a replica of the image to the paper, the blotting of DNA to a nylon membrane preserves the spatial arrangement of the DNA fragments that existed after electrophoresis.

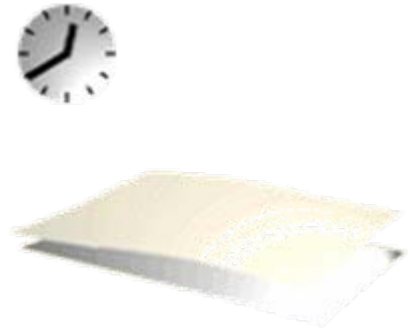
5. Hybridization with radioactive probe

A single locus probe is a DNA or RNA sequence that is able to hybridize (i.e. form a DNA-DNA or DNA-RNA duplex) with DNA from a specific restriction fragment on the Southern blot. Duplex formation depends on complementary base pairing between the DNA on the Southern blot and the probe sequence. Single locus probes are usually tagged with a radioactive label for easy detection, and are chosen to detect one polymorphic genetic locus on a single human chromosome. The Southern blot from step 4 is incubated in a solution containing a radioactive, single locus probe under conditions of temperature and salt concentration that favor hybridization. After hybridization, the unbound probe is washed away, so that the only radioactivity remaining bound to the nylon membrane is associated with the DNA of the targeted locus.



6. Detection of RFLPs via autoradiography

The locations of radioactive probe hybridization on the Southern blot are detected by autoradiography. In this technique, the washed nylon membrane is placed next to a sheet of X-ray film in a light tight container. The X-ray film records the locations of radioactive decay. After exposure and development of the X-ray film, the resulting record of the Southern hybridization is termed an "autoradiograph," or "autorad" for short.



7. Re-probe southern blot with additional probes

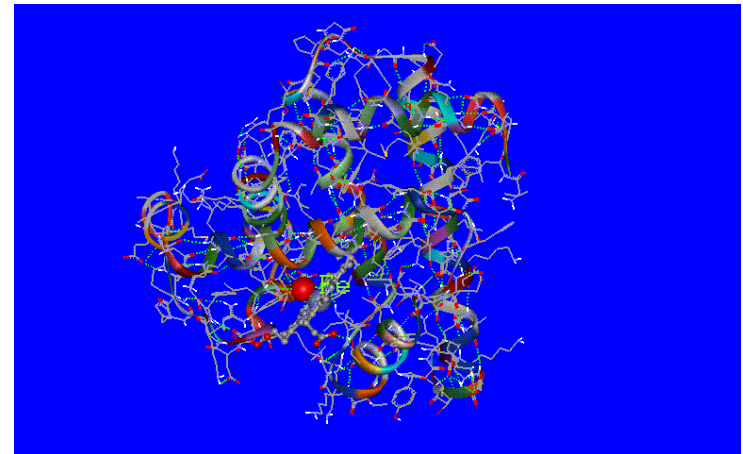
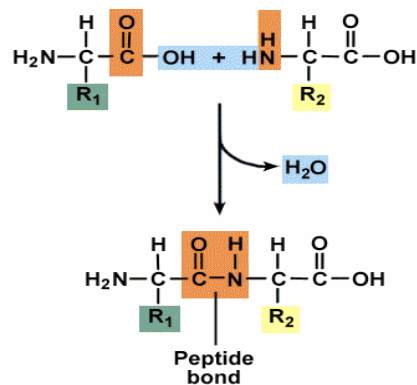
In a typical forensics DNA analysis, DNA polymorphisms on several different chromosomes are characterized. After an autorad has been developed for the first single locus probe, the radioactivity on the Southern blot can be washed away with a high temperature solution, leaving the DNA in place. The Southern blot can be hybridized with a second radioactive single locus probe, and by repetition of steps 5-7, a series of different single locus probes. The set of autorads from a Southern blot is known as a "DNA profile."



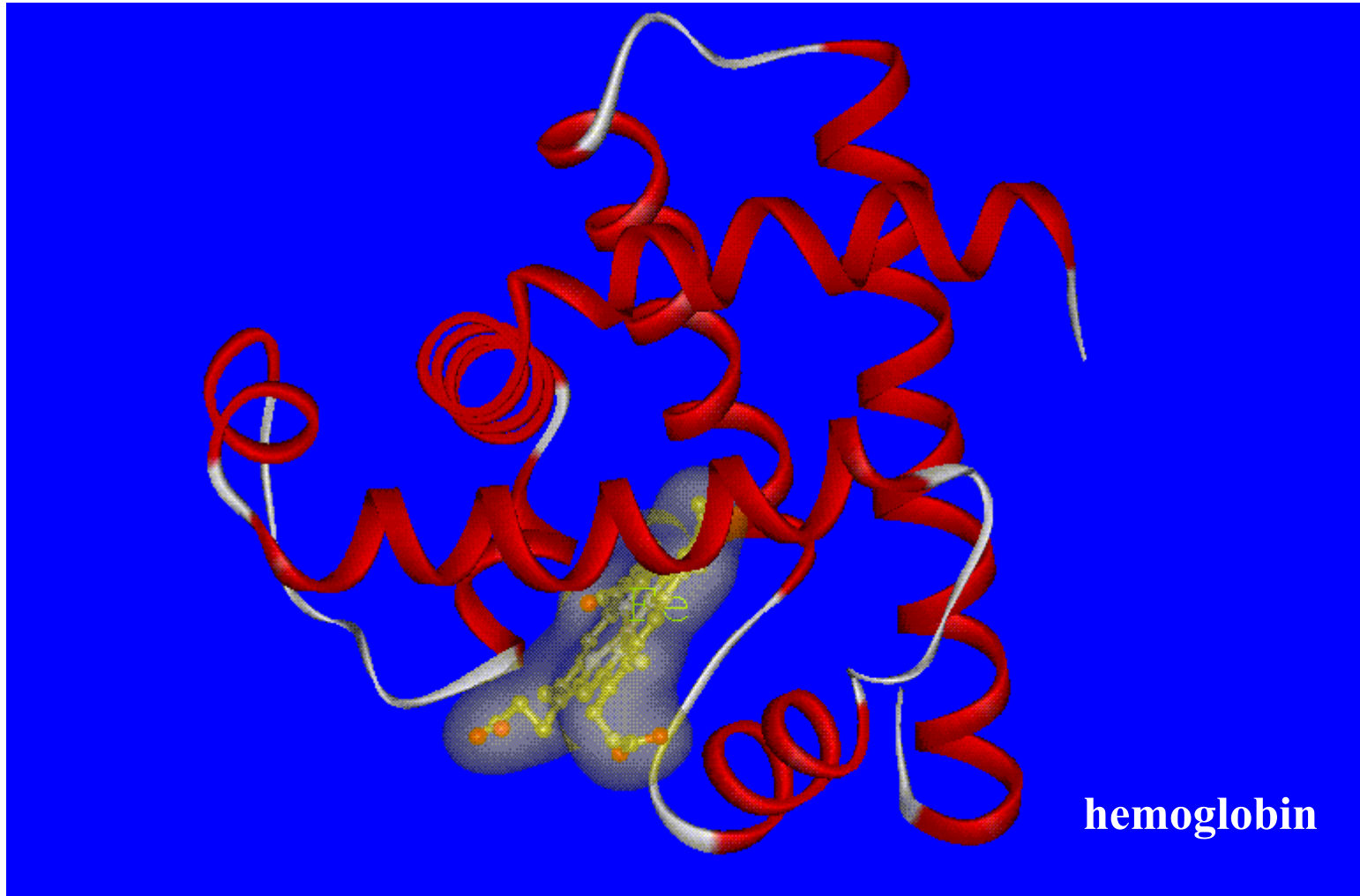
■ Βιοπολυμερή (δομή, λειτουργία και βιοφυσικές ιδιότητες)

❖ Πρωτεΐνες

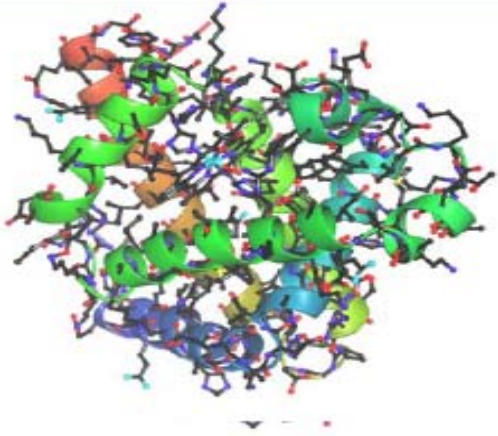
- ⇒ Οι πρωτεΐνες αποτελούν δομικά και λειτουργικά συστατικά των κυττάρων και των ιστών.
- ⇒ Οι πρωτεΐνες είναι μεγαλομοριακές ενώσεις, αποτελούμενες από αλληλουχία διαφόρων αμινοξέων ενωμένων μεταξύ τους με πεπτιδικό δεσμό
- ⇒ Στη πρωτεϊνική δομή συμμετέχουν υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων, μεταξύ των ατόμων υδρογόνου και οξυγόνου του πεπτιδικού δεσμού και μεταξύ ατόμων της πρωτεϊνικής επιφάνειας και του περιβάλλοντος νερού.
- ⇒ Οι μη πολικές πλευρικές αλυσίδες των ουδέτερων αμινοξέων συνδέονται με υδρόφοβες ομάδες.



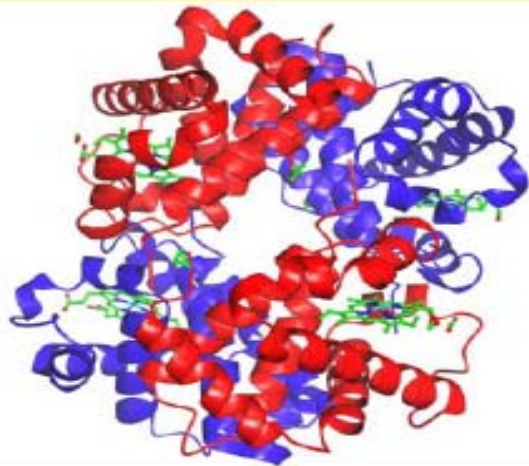
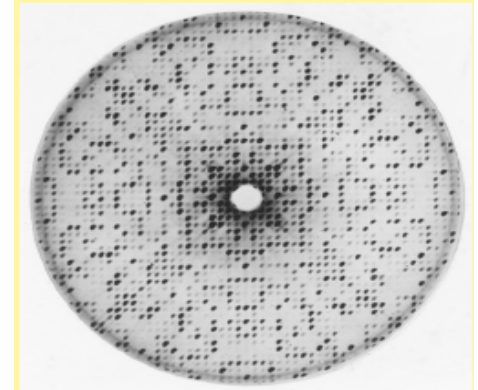
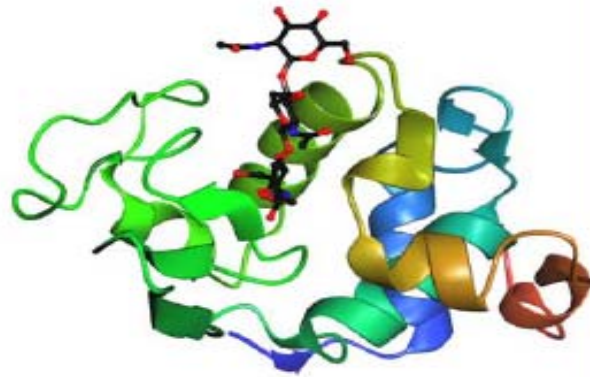
Secondary structure: the α -helix



Lysozyme; the second protein structure and the first enzyme (1965)



myoglobin



Hemoglobin 1968



David Phillips: The Royal Institution, London, 1965

Ο ρόλος των πρωτεϊνών είναι σημαντικός για όλες σχεδόν τις λειτουργίες των έμβιων συστημάτων. Η σημασία τους διαφαίνεται από τις παρακάτω λειτουργίες:

Ενζυμική δράση. Όλα τα γνωστά ένζυμα-καταλύτες των βιοχημικών αντιδράσεων είναι πρωτεϊνικής φύσης. Συνήθως τα ένζυμα αυξάνουν την ταχύτητα κάποιων αντιδράσεων τουλάχιστον 10^6 φορές.

• **Μηχανική στήριξη.** Η μεγάλη αντοχή του δέρματος και των οστών οφείλονται στην παρουσία του κολλαγόνου, μιας πρωτεΐνης που σχηματίζει ίνες.

• **Κίνηση - συστολή.** Οι πρωτεΐνες είναι τα κύρια συστατικά των μυών, των οποίων η συστολή επιτυγχάνεται με την ολισθητική κίνηση δύο ειδών πρωτεϊνικών νηματίων, της ακτίνης και της μυοσΐνης. Επίσης η κίνηση των χρωμοσωμάτων στη μίτωση και η μέσω μαστιγίων προώθηση του σπέρματος επιτυγχάνεται με συσταλτά πρωτεϊνικά συγκροτήματα.

• **Μεταφορά και αποθήκευση.** Οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν στη μεταφορά μικρομορίων και ιόντων. Π.χ. η αιμοσφαιρίνη μεταφέρει οξυγόνο στα ερυθροκύτταρα και η μυοσφαιρίνη στους μυς. Η τρανσφερρίνη μεταφέρει σίδηρο στο πλάσμα του αίματος, ο οποίος αποθηκεύεται στο συκώτι σαν σύμπλοκο με φερριτίνη, μια άλλη πρωτεΐνη.

• Έλεγχος της ανάπτυξης και διαφοροποίησης. Οι πρωτεΐνες χρησιμεύουν στην ελεγχόμενη έκφραση των γενετικών πληροφοριών, ουσιώδη διαδικασία για την κανονική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων.

• Ρύθμιση λειτουργιών. Πολλές λειτουργίες ρυθμίζονται από ειδικές πρωτεΐνες, όπως π.χ. η όραση που ρυθμίζεται από τη ροδοψίνη (πρωτεΐνη-φωτοϋποδοχέας στα ραβδία του αμφιβληστροειδή), η μετάδοση των νευρικών παλμών που ρυθμίζεται από την ακετυλχολίνη κ.ά.

• Ανοσοπροστασία. Τα αντισώματα είναι πολύ ειδικές πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν ξένους εισβολείς, όπως οι ιοί, τα βακτήρια και κύτταρα άλλων οργανισμών και προσδένονται σε αυτούς με σκοπό την εξουδετέρωση του εισβολέα.

■ Ταξινόμηση πρωτεϊνών με βάση τον βιολογικό τους ρόλο

<i>ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</i>	<i>ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΡΟΛΟΣ</i>	<i>ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΤΙΚΑ ΕΙΔΗ</i>
Ένζυμα	Καταλυτική δράση	Οξειδοαναγωγάσες, τρανσφεράσες, υδρολάσες, λυάσες, ισομεράσες, λιγάσες
Στηρικτικές	Μηχανική στήριξη και σύνδεση ιστών	Κολλαγόνο, ελαστίνη, κερατίνη, λιποπρωτεΐνη
Συσταλτές	Μυϊκές κινήσεις	Μυοσΐνη, ακτίνη
Μεταφορικές	Μεταφορά αδιάλυτων ή τοξικών ουσιών	Αιμοσφαιρίνη, αλβουμίνες
Γενετικές	Ρύθμιση γονιδίων	Ιστούνες, νουκλεοπρωτεΐνες
Ρυθμιστικές ή ορμονικές	Ρύθμιση λειτουργίας οργάνων, ιστών και αδένων	Ινσουλίνη, γλυκαγόνη, ACTH
Ανοσοπρωτεΐνες	Ανοσολογική προστασία	Ιντερφερόνη, γ-σφαιρίνες

❖ Βιοπολυμερή (δομή και βιοφυσικές ιδιότητες)

Περίθλαση ακτίνων - X

❖ Η ανακάλυψη της περίθλασης των ακτίνων - X από κρυστάλλους το 1912, από τον Max von Laue αρχικά και τους W.H. Bragg και W.L. Bragg στη συνέχεια, σημείωσε τη γέννηση της *κρυσταλλογραφίας ακτίνων -X*.

❖ Σημαντικοί σταθμοί στην πορεία της βιοφυσικής έρευνας με τη βοήθεια αυτής της μεθόδου είναι οι ανακαλύψεις της δεκαετίας 1950-1960 πάνω στη *δομή σφαιρικών πρωτεϊνών* (Perutz και συν., 1953), στη *δομή του DNA* (εργασίες των Wilkins και Franklin, στις οποίες βασίστηκαν οι Watson και Crick για να διατυπώσουν την περίφημη δομή της διπλής έλικας για το μόριο του DNA, το 1953). Η περίθλαση των ακτίνων - X έδωσε επίσης πολύτιμες πληροφορίες για τη *δομή των ιών*, ενώ σχετικά πρόσφατα η μέθοδος αυτή, σε συνδυασμό με την περίθλαση νετρονίων, έδωσε αποτελέσματα πάνω στη *δομή των μεμβρανών* και υποκυτταρικών σχηματισμών όπως *τα ριβοσώματα και η χρωματίνη*.

❖ Η περίθλαση των ακτίνων - X ως βιοφυσική μεθοδολογία προσδιορισμού της δομής βιομορίων και βιολογικών δομών βασίζεται στις *φυσικές αρχές της περίθλασης ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων*. Επειδή πολλά πρωτεϊνικά μόρια έχουν διαστάσεις μερικών δεκάδων Å και οι χημικές ομάδες τους έχουν διαστάσεις μερικών Å, είναι φανερό ότι για να διακρίνουμε λεπτομέρειες της μοριακής δομής πρέπει να χρησιμοποιήσουμε "φως" με μήκος κύματος της τάξης του 1 Å, άρα ηλεκτρομαγνητικά κύματα ή σωματίδια που ισοδυναμούν με ηλεκτρομαγνητικό κύμα αυτού του μήκους κύματος. Οι ακτίνες -X, τα νετρόνια και τα ηλεκτρόνια, με επιμέρους πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα, χρησιμοποιούνται στη μελέτη και αποτύπωση βιοδομών.

❖ Τα *περιθλασίμετρα ακτίνων -X* είναι συνήθως μεγάλες διατάξεις που περιλαμβάνουν *μηχανικά μέρη* για τον κατάλληλο προσανατολισμό των κρυστάλλων-δειγμάτων ως προς τη δέσμη των ακτίνων-X, *συστήματα καταγραφής* των διαγραμμάτων περίθλασης (φωτογραφικά φιλμ ή απ αριθμητές), καθώς και *κατάλληλα υπολογιστικά συστήματα* για υπολογισμούς και καταγραφή των ποσοτικών δεδομένων (π.χ. εντάσεις των ανακλώμενων δεσμών).

❖ Βιοπολυμερή (δομή και βιοφυσικές ιδιότητες)

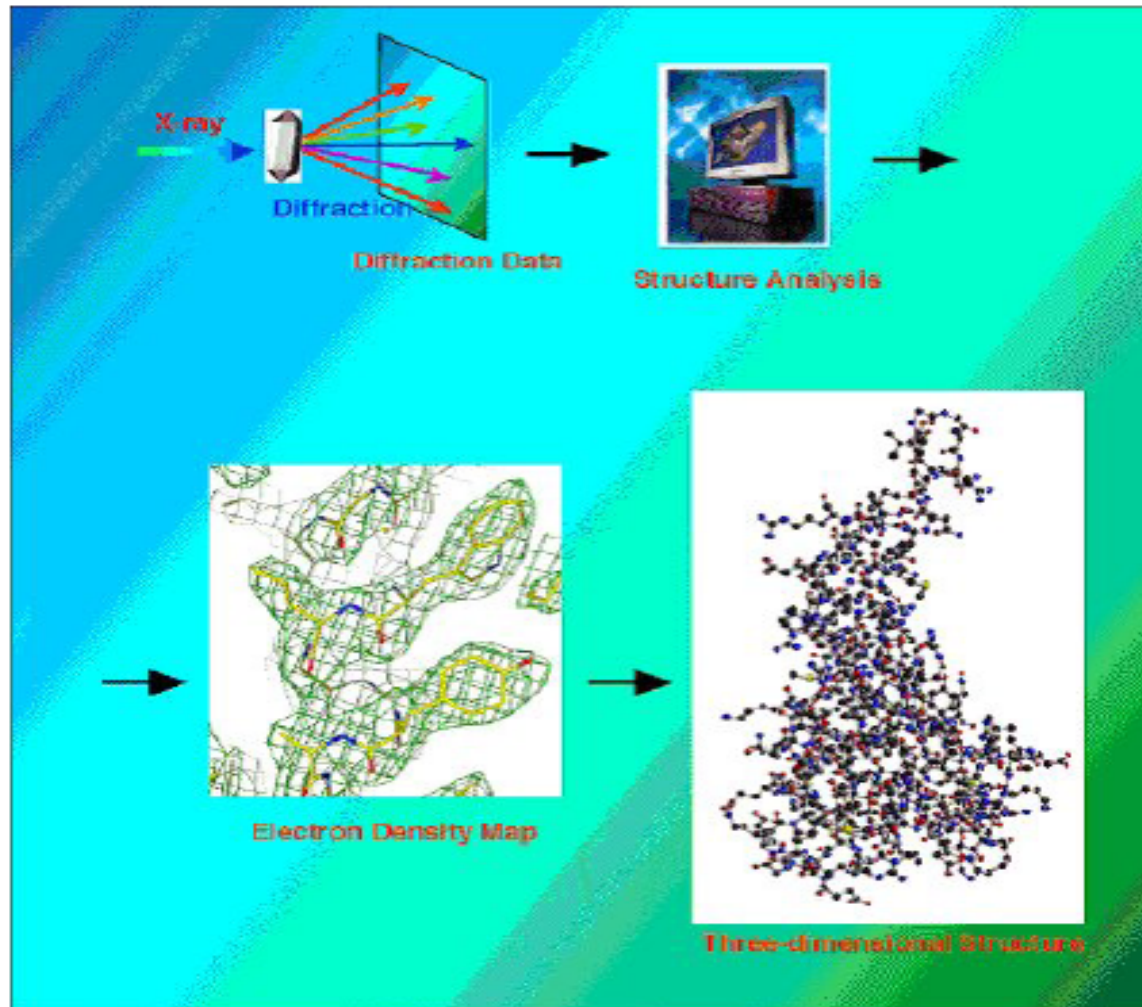
❖ Ο προσδιορισμός της τρισδιάστατης δομής ενός βιολογικού μακρομορίου είναι ένα πολύ δύσκολο πρόβλημα. Ενδεικτικά αναφέρουμε *τα διάφορα στάδια για τη "λύση" της δομής μια πρωτεΐνης:*

• Απομόνωση - καθαρισμός: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η απομόνωση του μακρομορίου και η λήψη μιας καθαρής ποσότητας της τάξης των μg, στην οποία βρίσκονται 10^{15} - 10^{18} ίδια μακρομόρια.

• Κρυστάλλωση: Στο στάδιο αυτό επιδιώκεται η κρυστάλλωση του μακρομορίου, π.χ. της πρωτεΐνης, για να ληφθούν διαγράμματα περίθλασης πολύ καλής ποιότητας. Αυτό είναι ένα πολύ δύσκολο στάδιο, γιατί κάθε πρωτεΐνη παρουσιάζει ιδιαιτερότητες και απαιτούνται πολλές προσπάθειες μέχρι να επιτευχθεί η βέλτιστη κρυστάλλωση (μικρή διάσταση κρυστάλλου, απουσία "προσμίξεων" ή άλλων ελαττωμάτων στο πλέγμα). Στο στάδιο αυτό παρασκευάζονται και παράγωγα του μακρομορίου με "βαριά" άτομα, ισόμορφα της φυσικής δομής του κρυστάλλου.

- **Περίθλαση ακτίνων -X (συλλογή - καταγραφή διαγραμμάτων περίθλασης):** Στο στάδιο αυτό καταγράφονται τα διαγράμματα περίθλασης των κρυστάλλων και τουλάχιστον δύο ισόμορφων παραγώγων τους, αρχίζοντας από χαμηλή διακριτική ικανότητα ($\approx 5\text{\AA}$) και φθάνοντας σε καλύτερες τιμές διακριτικής ικανότητας της τάξης του μεγέθους των χημικών δεσμών ($\approx 2\text{\AA}$).
- **Παραγωγή χαρτών ηλεκτρονικής πυκνότητας:** Στο στάδιο αυτό γίνεται πρώτα ο προσδιορισμός των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων με τη βοήθεια της ανάλυσης Fourier και υπολογιστή. Έπειτα γίνεται η αναπαράσταση σε χώρους δύο και τριών διαστάσεων των ηλεκτρονικών πυκνοτήτων που έχουν υπολογισθεί (χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας) που δίνει μια στερεοσκοπική άποψη του μακρομορίου.
- **Ερμηνεία των χαρτών - βελτίωση της δομής:** Στο στάδιο αυτό συνδυάζονται οι πληροφορίες που δίνει ο χάρτης ηλεκτρονικής πυκνότητας με αυτές της δευτεροταγούς και πρωτοταγούς δομής του μακρομορίου για να κατασκευαστεί ένα ατομικό ή μοριακό μοντέλο. Στη συνέχεια ακολουθούν διορθώσεις της δομής, με διαδοχικές συσχετίσεις με διάφορους συντελεστές ακριβείας, που καταλήγουν στη βελτίωση της προτεινόμενης δομής. Η αύξηση της υπολογιστικής ικανότητας των σύγχρονων ηλεκτρονικών υπολογιστών έχει συμβάλει θεαματικά στην επιτάχυνση των διαδικασιών ερμηνείας - βελτίωσης της δομής μακρομορίων και στην ανάπτυξη ευκολότερου στη χρήση λογισμικού για την τεχνική της περίθλασης των ακτίνων -X σε βιοδομές.

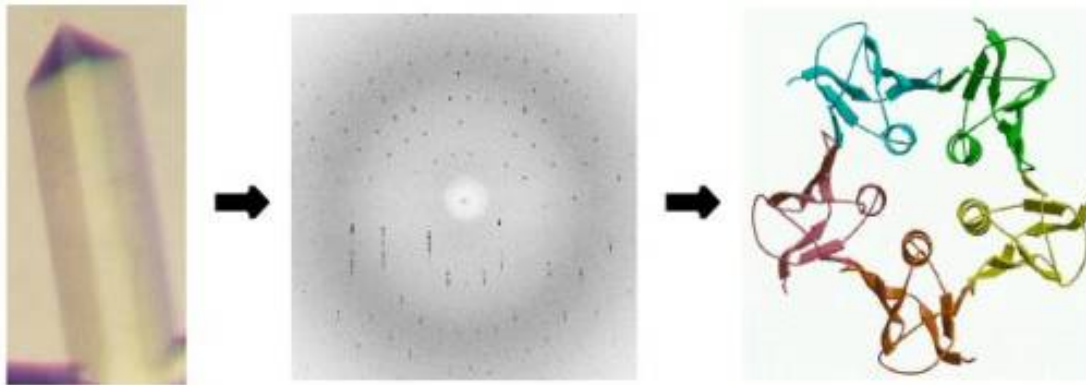
Flow Chart



❖ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

❖ Η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών είναι βιοχημική τεχνική που αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση και τον έλεγχο καθαρότητας των πρωτεϊνών, καθώς η μικροκρυσταλλικότητα των μορίων είναι ένδειξη καθαρότητάς τους. Τα τελευταία χρόνια η χρήση της κρυστάλλωσης για το σκοπό αυτόν έχει εγκαταλειφθεί καθώς οι κρύσταλλοι μπορούν να περιέχουν μέχρι και 10% άλλες προσμίξεις.

❖ Για την δομική μελέτη μορίων με ακτίνες X η κρυστάλλωση του μορίου αποτελεί το πρωταρχικό βήμα. Τα πρώτα περιθλασιγράμματα ακτίνων-X από κρυστάλλους πρωτεϊνών πάρθηκαν από κρυστάλλους πεψίνης από τους Bernal και Crowfoot (D.Hodgkin) το 1934.



(Πηγή: Κυριακή Σ. Παύλου & Σταύρος Ι. Χαμόδρακας, Τομέας Βιολογίας Κυττάρου & Βιοφυσικής Τμήμα Βιολογίας Πανεπιστήμιο Αθηνών)

Βιοπολυμερή (δομή και βιοφυσικές ιδιότητες)

- Τα βιολογικά μακρομόρια ως πολυμερή αμινοξικών καταλοίπων ή νουκλεοτιδίων διπλώνονται σε **τριτοταγή** και **τεταρτοταγή δομή** κυρίως λόγω αλληλεπιδράσεων Van der Waals, διπόλου-διπόλου, δεσμών υδρογόνου (C-O·····H-N), γεφυρών S-S και περιστασιακά λόγω γεφυρών άλατος μεταξύ φορτισμένων αμινοξικών καταλοίπων (-COO⁻...⁺H₃N-).
- Οι υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες διατάσσουν τις υδροφοβικές ομάδες τους προς τον πυρήνα εκθέτοντας τις υδρόφιλες ομάδες στην επιφάνεια, με αποτέλεσμα να θεωρούνται σαν **πολυηλεκτρολύτες**, ικανοί να διαλυτοποιηθούν στο νερό (**πρωτικός πολικός διαλύτης**). Η σταθερότητα των μακρομορίων στο διάλυμα βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ αλληλεπιδράσεων διαλύτη-διαλελυμένης ουσίας και ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων που οδηγούν στην απόκτηση της τεταρτοταγούς δομής.

■ *Η ισορροπία μεταξύ των αλληλεπιδράσεων που ελέγχουν την διαλυτότητα και/ή την διαμόρφωση των πρωτεϊνών στον χώρο τροποποιείται από τους παρακάτω παράγοντες:*

α) θερμοκρασία: αύξηση της θερμοκρασίας ,προκαλεί αύξηση της αταξίας των διαλελυμένων μορίων αλλά επίσης επιτρέπει μακρομοριακές διευθετήσεις υψηλότερης ελεύθερης ενέργειας.

β) pH: Αλλαγές του pH επηρεάζουν τόσο τον διαλύτη όσο και την διαλελυμένη ουσία

γ) Αλάτια: δρουν με διαφόρους τρόπους:

(i) Είναι υπεύθυνα για την ιοντική ισχύ και επηρεάζουν τις μακρομοριακές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Η άπωση μεταξύ ηλεκτρολυτών του ίδιου φορτίου μειώνεται.

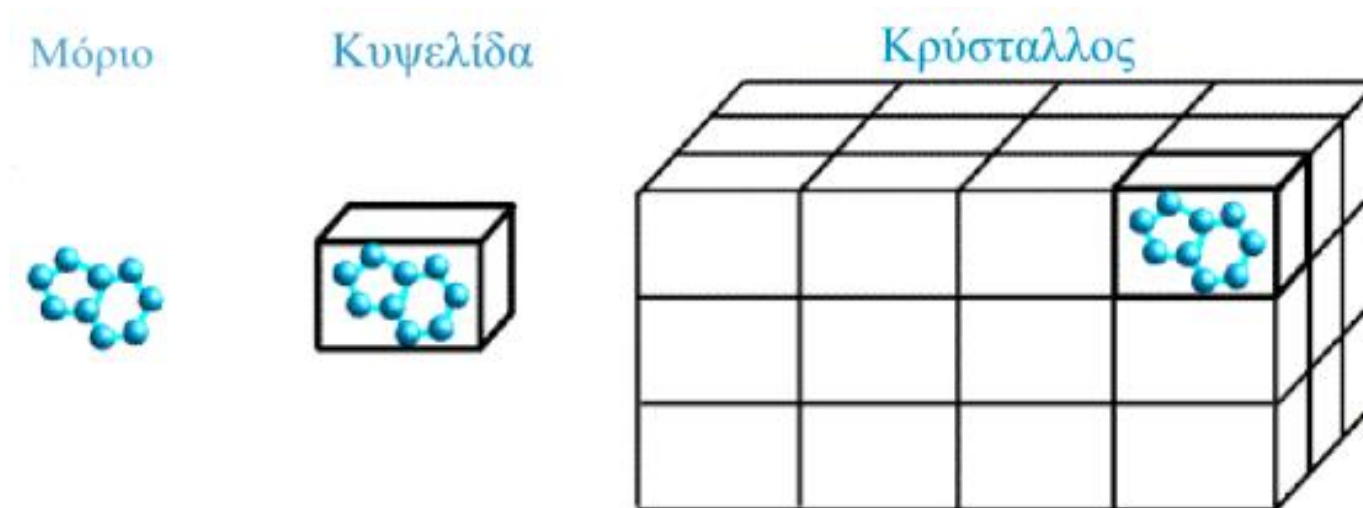
(ii) Μπορούν να σχηματίζουν απ'ευθείας αλληλεπιδράσεις με φορτισμένα αμινοξικά κατάλοιπα (αργινίνη, λυσίνη ασπαρτικό, γλουταμικό) στην επιφάνεια των πρωτεϊνών

(iii) Δρουν με διπολικές-μονοπολικές αλληλεπιδράσεις με τις διπολικές ομάδες των μακρομορίων (πεπτιδικοί δεσμοί, αμινο, υδροξυ, καρβοξυλικές ομάδες και αμίδια) και μπορούν να οδηγήσουν σε μερική αποδιάταξη της πρωτεΐνης).

(iv) Σχηματίζουν μη πολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υδροφοβικών καταλοίπων εκτεθειμένων στο διαλύτη και των υδροφοβικών τμημάτων των οργανικών αλατιών (σουλφονικών, καρβοξυλικών, αμμωνιακών).

δ) Ανταγωνιστές δεσμών υδρογόνου. Μόρια όπως η ουρία, το φορμαμίδιο, τα γουανιδινικά αλάτια σε υψηλές συγκεντρώσεις (≥ 4 M) ανταγωνίζονται τους δεσμούς υδρογόνου των μορίων του νερού και τους ενδομοριακούς δεσμούς υδρογόνου της πρωτεΐνης δρώντας σαν αποδιατακτικοί παράγοντες, ενώ στην αντίθετη περίπτωση σταθεροποιούν τους υδροφοβικούς δεσμούς.

ε) Οργανικοί διαλύτες: Τροποποιούν την διηλεκτρική σταθερά και έτσι προκαλούν αλλαγές σε διάφορες αλληλεπιδράσεις.



Οι αλληλεπιδράσεις που κρατούν τις πρωτεΐνες στο κρυσταλλικό πλέγμα ονομάζονται κρυσταλλικές επαφές και είναι ίδιες σε κάθε οργανωμένη βασική μονάδα μορίων που περιέχεται στην στοιχειώδη κυψελίδα του κρυσταλλικού πλέγματος.

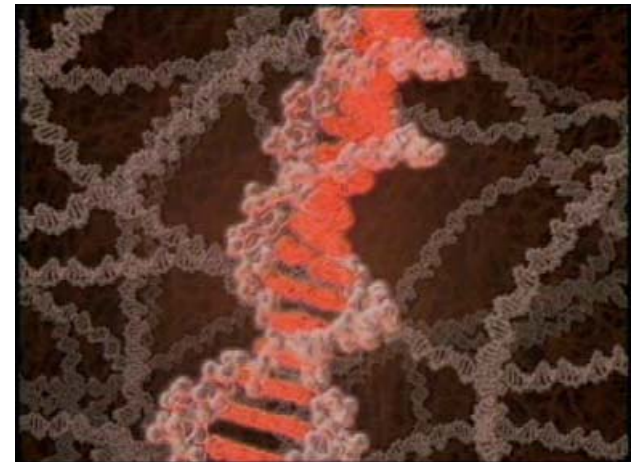
■ Δεσοξυριβοζονουκλεϊνικό οξύ (DNA)

⇒ Το DNA είναι το χημικό μόριο στο οποίο έχει αποτυπωθεί ο γενετικός κώδικας των έμβιων όντων. Το DNA είναι ένα μεγάλο μήκους, υπό μορφή διπλής έλικας, μεγαλομόριο πολυδεσοξυριβοζονουκλεοτιδίων.

⇒ Κάθε μόριο δεσοξυριβοζο-νουκλεοτιδίου αποτελείται από τρία τμήματα: την αζωτούχο βάση (τύπου πουρίνης ή πυριμιδίνης), ένα σάκχαρο (δεσοξυριβόζη) και ένα φωσφορικό οξύ.

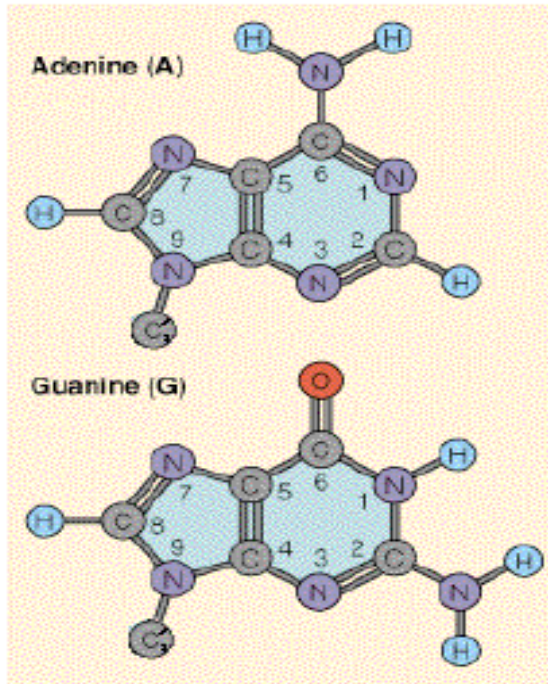
⇒ Το DNA περιέχει 4 είδη αζωτούχων βάσεων: την αδεΐνη (A) και τη γουανΐνη (G) (πουρίνες διπλής αλυσίδας), τη θυμΐνη (T) και την κυτοσΐνη (C) (πυριμιδΐνες απλής αλυσίδας).

⇒ Το 1953, ο J. Watson και ο F. Crick πρότειναν μια τρισδιάστατη δομή του DNA βασισμένη σε πρότυπα που ανέπτυξαν ως αποτέλεσμα ανάλυσης φασμάτων ακτίνων -X ινών DNA ο M. Wilkins και η R. Franklin.

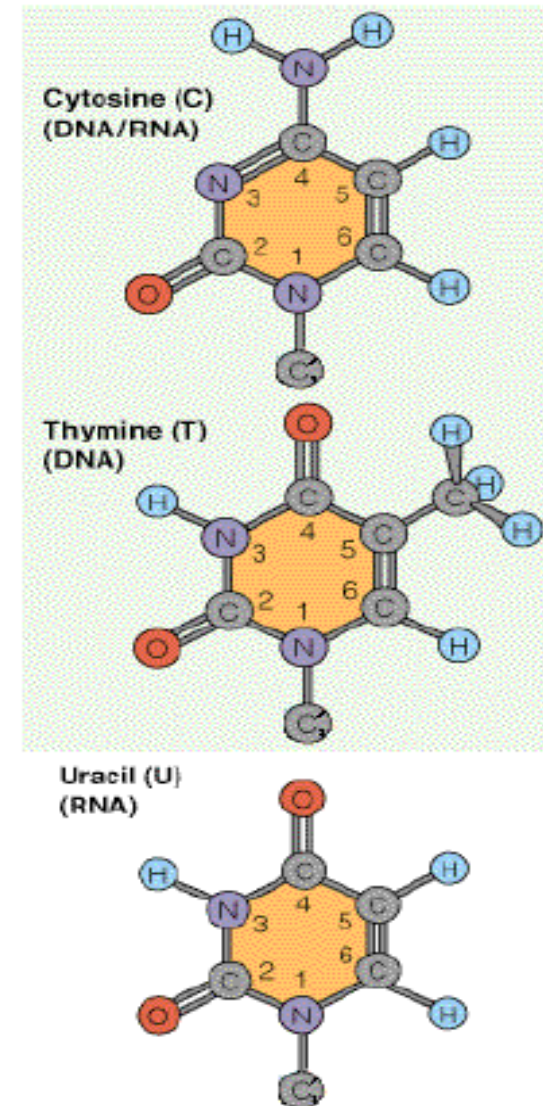


Οι βάσεις

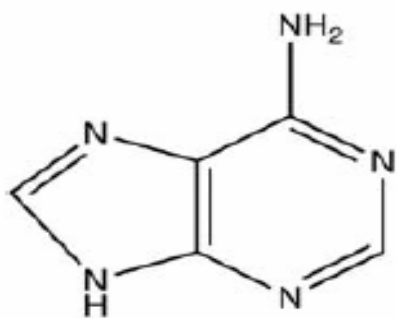
Πουρίνες



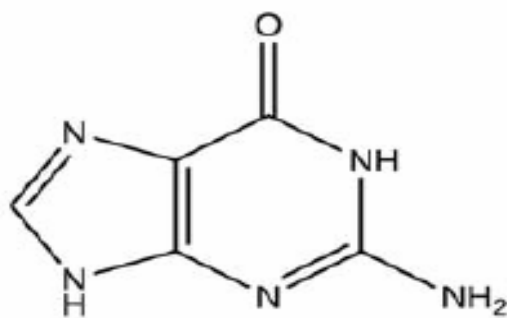
Πυριμιδίνες



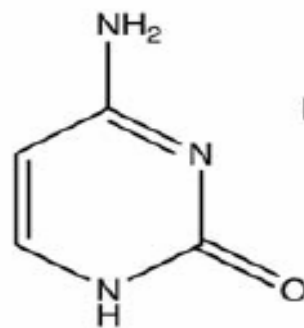
Το DNA περιέχει 4 είδη αζωτούχων βάσεων: την αδενίνη (A) και τη γουανίνη (G) (πουρίνες διπλής αλυσίδας), τη θυμίνη (T) και την κυτοσίνη (C) (πυριμιδίνες απλής αλυσίδας).



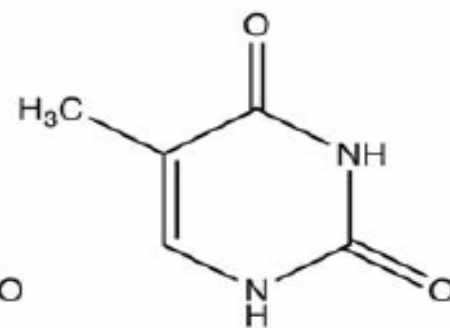
Adenine



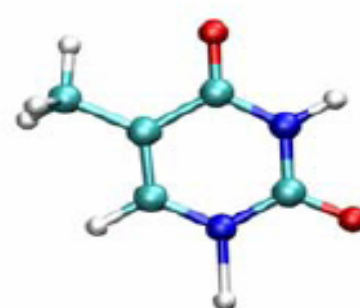
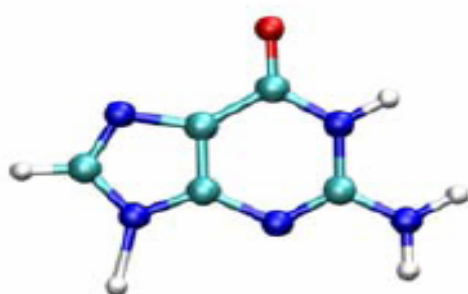
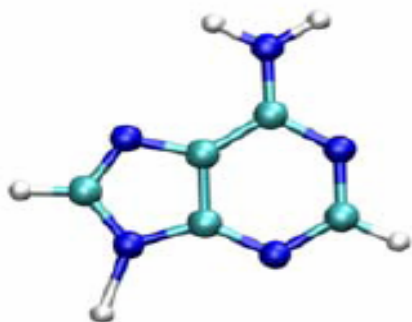
Guanine



Cytosine



Thymine



⇒ Σύμφωνα με το μοντέλο της "διπλής έλικας", το μόριο του DNA αποτελείται από δυο αντιπαράλληλους κλώνους που περιελίσσονται γύρω από έναν κοινό άξονα.

⇒ Το "βήμα" της έλικας είναι 34 Å και έχει 10 νουκλεοτίδες.

⇒ Κάθε κλώνος του DNA αποτελείται από την εναλλαγή των τεσσάρων βάσεων, διαταγμένων με συγκεκριμένη σειρά κατά μήκος του κάθε κλώνου.

⇒ Οι "οδηγίες" για την αναπαραγωγή των κυττάρων βρίσκονται κωδικοποιημένες στη διαδοχή των βάσεων, το αλφάβητο της ζωής! Δηλαδή η γενετική πληροφορία αποτελείται από "μηνύματα" γραμμένα στο αλφάβητο των 4 γραμμάτων: A C G T (σύμβολα των αζωτούχων βάσεων του DNA).

⇒ Μια σειρά μερικών χιλιάδων βάσεων αποτελεί ένα γονίδιο και κάθε μόριο DNA περιλαμβάνει χιλιάδες γονίδια. Ένα συγκεκριμένο γονίδιο καθορίζει την αντίστοιχη δομή μιας ειδικής πρωτεΐνης, ή τμήματος πρωτεΐνης.



Πριν από τη διαίρεση ενός κυττάρου, η οποία θα οδηγήσει σε δυο θυγατρικά κύτταρα, τα μόρια του DNA του κυττάρου - γονέα διπλασιάζονται έτσι, ώστε τα θυγατρικά κύτταρα να έχουν από ένα πλήρες set γονιδίων. Δηλαδή τα μόρια του DNA αυτοαντιγράφονται. Κατά μέσο όρο υπάρχουν 10^{15} κύτταρα στο σώμα ενός ανθρώπου και, με μερικές εξαιρέσεις, το καθένα τους περιέχει ένα τέλει αντίγραφο του DNA αυτού του ανθρώπου, ίδιο με αυτό του αρχικού κυττάρου της γονιμοποίησης.

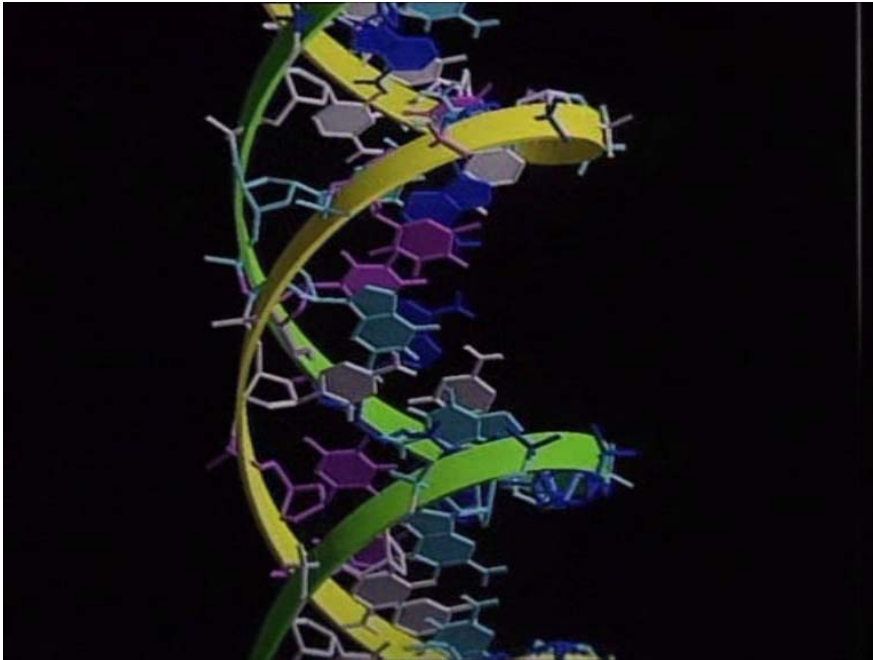
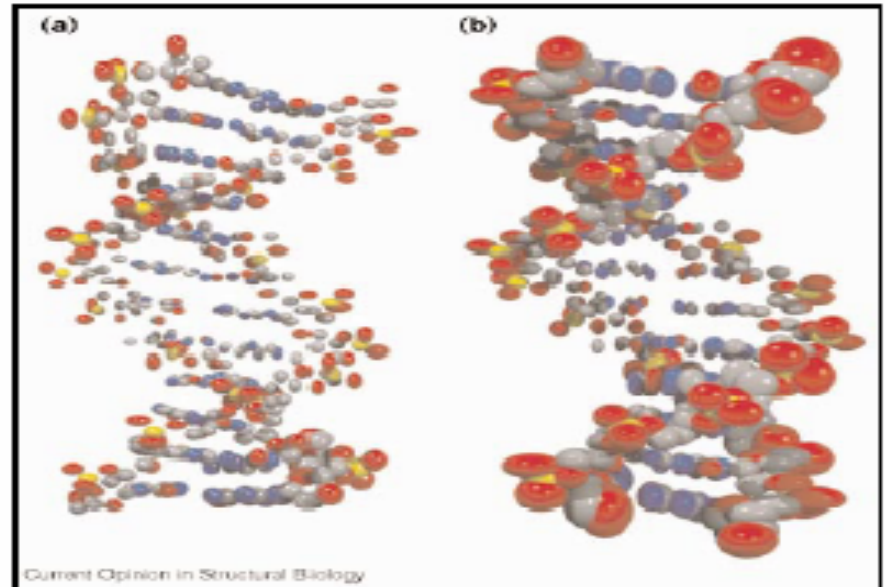
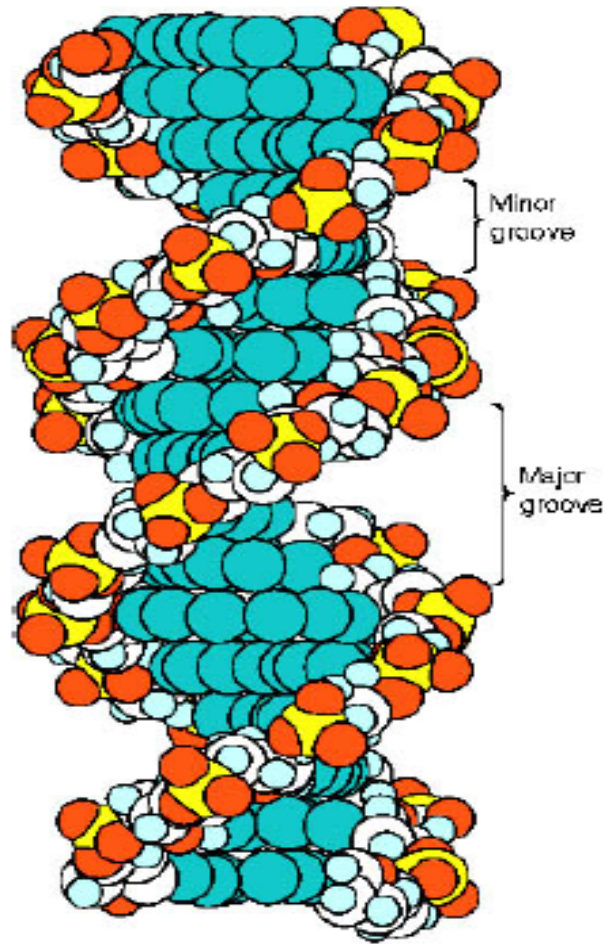


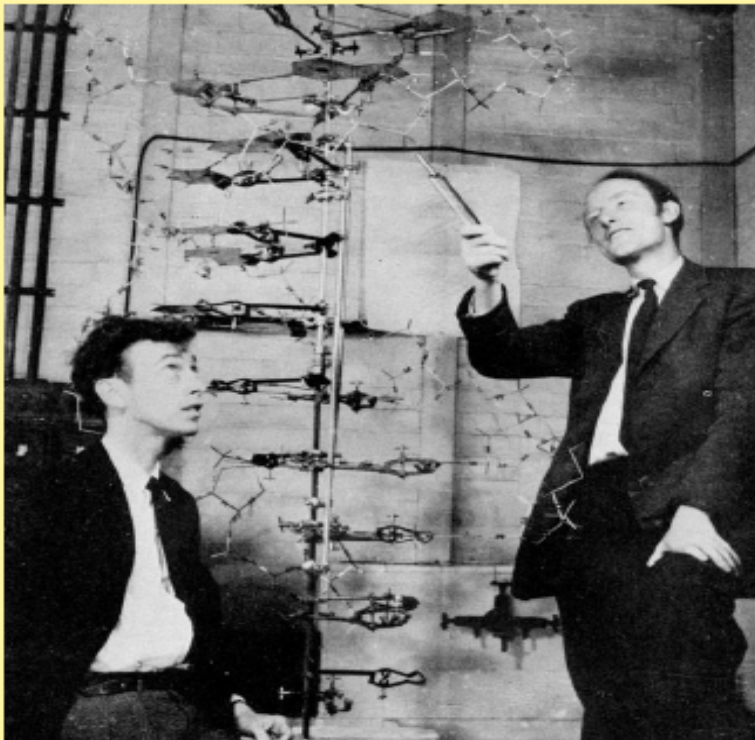
Figure 2



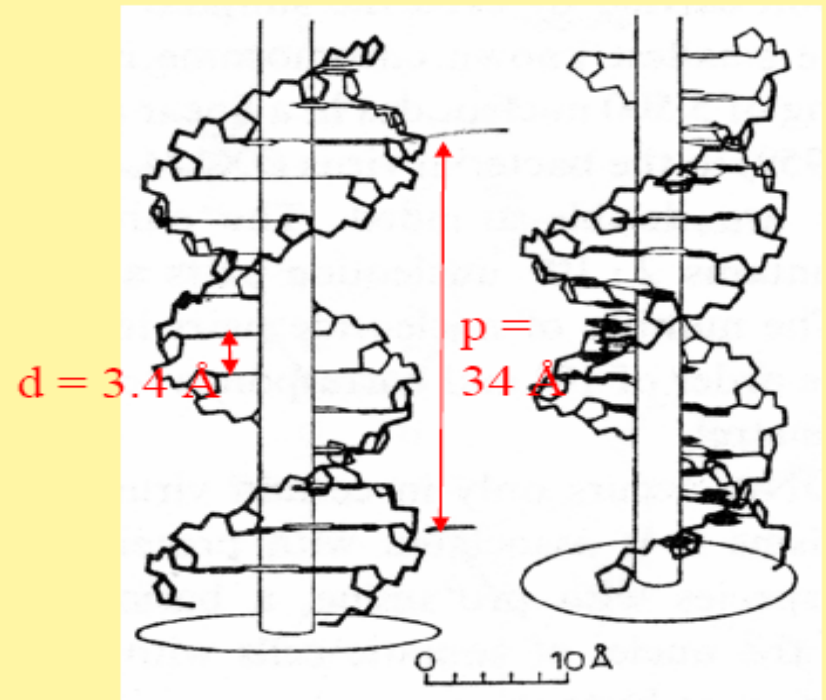
Computational models of the dynamical structure of the EcoRI DNA dodecamer obtained from MD simulations, with atomic motions presented as thermal ellipsoids. (a) Prediction of the crystal structure (KJ McConnell *et al.*, unpublished data). (b) Prediction of the solution structure [45].



Watson Crick model for DNA 1953



James Watson & Francis Crick



10 base pairs per turn of helix
 d is spacing between nucleotides;
 p is pitch of helix

■ Η κυτταρική μεμβράνη

❖ Το κύτταρο και τα οργανίδια του (π.χ. ο πυρήνας, τα μιτοχόνδρια, οι χλωροπλάστες) χωρίζονται από το περιβάλλον τους και επικοινωνούν με αυτό με μεμβράνες (με το γενικό όνομα βιολογικές μεμβράνες) που επιτελούν σπουδαίο ρόλο στην εξέλιξη της ζωής. Το κύτταρο έχει πολλές μεμβράνες, την εξωτερική που ονομάζεται πλασματική μεμβράνη και εσωτερικές: στο ενδοπλασματικό δίκτυο, στα μιτοχόνδρια, τους χλωροπλάστες κ.λ.π.

❖ Οι μεμβράνες εξυπηρετούν και δομικούς αλλά και λειτουργικούς σκοπούς στο κύτταρο (διαχωριστικές επιφάνειες, ρύθμιση διαπερατότητας ιόντων και μορίων, αγωγή νευρικού παλμού και διάδοση πληροφορίας από και προς το κύτταρο, μετατροπή φωτός σε βιοχημική ενέργεια, μορφογένεση, αναγνώριση προτύπων κ.λ.π.). Ταυτόχρονα, οι μεμβράνες αποτελούν συνήθως και τον πρωταρχικό στόχο στην εισβολή βακτηρίων και ιών, στη δράση χημικών και φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και στην έκθεση σε φυσικούς παράγοντες του περιβάλλοντος κόσμου.



□ *Συνοπτικά, ο ρόλος τους είναι ιδιαίτερα σημαντικός στις εξής τέσσερις κύριες διεργασίες:*

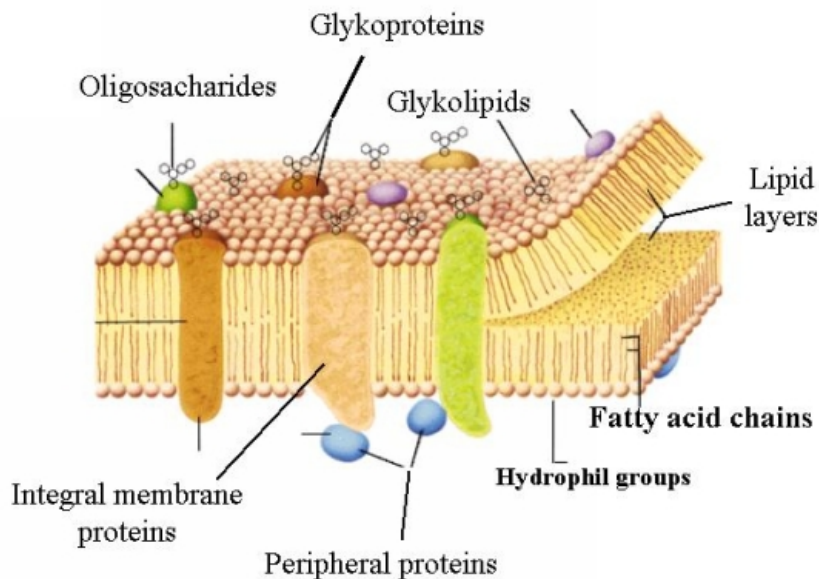
- *Μετατροπή ενέργειας,*
- *Μεταφορά ύλης,*
- *Μετάδοση σήματος,*
- *Επεξεργασία πληροφορίας.*

❖ *Σύνθεση και αρχιτεκτονική δομή των μεμβρανών*

□ *Στη σύνθεση όλων των κυτταρικών μεμβρανών συμμετέχουν, σε διαφορετικό ποσοστό, τα εξής κύρια συστατικά: πρωτεΐνες, λιπίδια, υδρογονάνθρακες, γλυκοπρωτεΐνες, λιποπρωτεΐνες, ιόντα και νερό.*

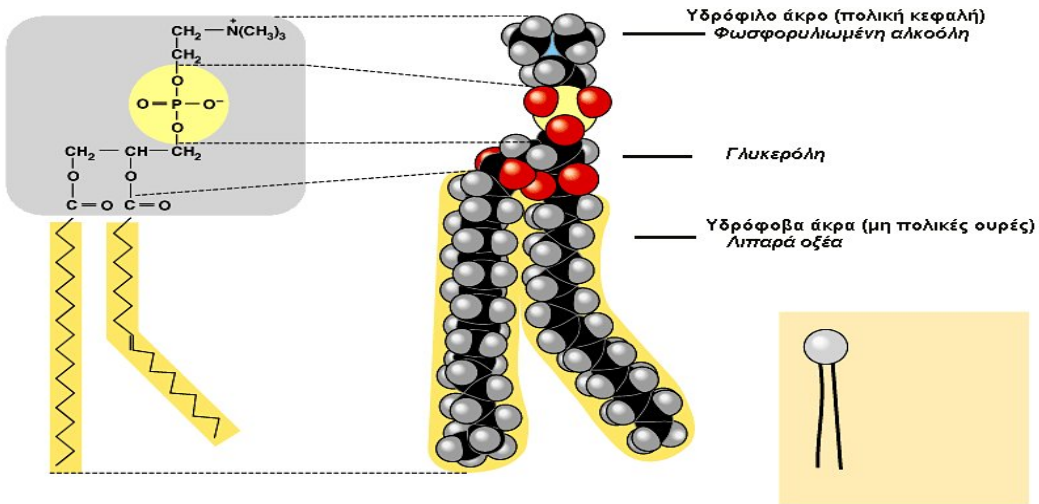
□ *Ο τρόπος με τον οποίο συντάσσονται τα επιμέρους συστατικά των μεμβρανών για να σχηματίσουν τη χωρική δομή της μεμβράνης των έμβιων συστημάτων, προϋποθέτει την ύπαρξη μιας λιπιδικής διπλοστοιβάδας στη δομή όλων των βιολογικών μεμβρανών, που ταιριάζει με τη χαρακτηριστική θερμοδυναμική σταθερότητα τους. Οι λιπιδικές διπλοστοιβάδες είναι αυτο-συναρμολογούμενες δομές, επίπεδες ή σφαιρικές (λιποσώματα) και έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι σήμερα σε ποικίλες βιο-εφαρμογές.*

Η βασική δομή όλων των βιολογικών μεμβρανών είναι ενιαία και αποτελείται σχηματικά από ένα βασικό πλέγμα φωσφολιπιδίων, τα οποία είναι διατεταγμένα σε διπλοστοιβάδα, με τις πολικές κεφαλές προς την εξωτερική υδατική φάση και τις υδρόφοβες λιπαρές αλυσίδες προς το εσωτερικό. Βυθισμένες σε αυτό το λιπιδικό πλέγμα με τυχαία κατανομή βρίσκονται οι πρωτεΐνες. Άλλες είναι βυθισμένες στο εσωτερικό της μεμβράνης, άλλες διαχέονται παράλληλα με την επιφάνεια της μεμβράνης (περιφερειακές) και άλλες διασχίζουν τη φωσφολιπιδική διπλοστοιβάδα (διαμεμβρανικές), σχηματίζοντας με αυτόν τον τρόπο ένα μωσαϊκό, το οποίο όμως δεν είναι άκαμπτο αλλά δυναμικά «ρευστό».

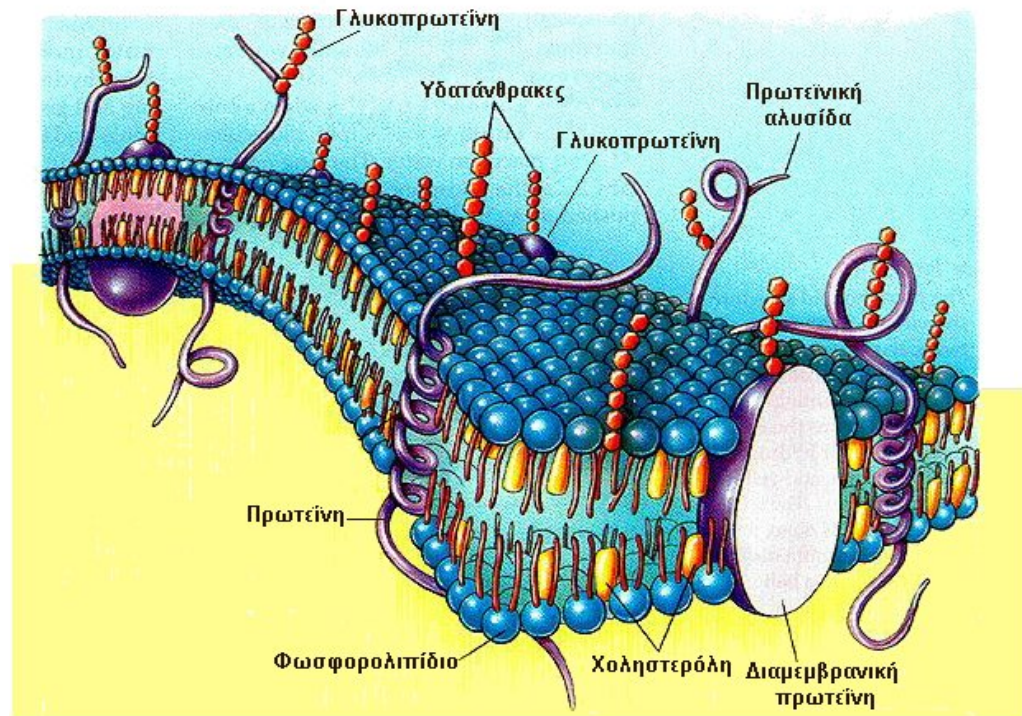


Με τον όρο μεμβράνη δεν εννοούμε μόνο τη δομική οργάνωση στο χώρο αλλά και τη “δυναμική” της, δηλαδή:

- Τις διάφορες γρήγορες δομικές διαταράξεις που μπορούν να συμβούν μέσα στη μεμβράνη (ρευστό μωσαϊκό),
- Την αλλαγή της σύστασης της μεμβράνης υπό την επίδραση εξωτερικών διεγέρσεων,
- Τη συμμετοχή των πρωτεϊνών και των φωσφολιπιδίων της μεμβράνης στην ανακύκλωση των μορίων μέσα στο κύτταρο.

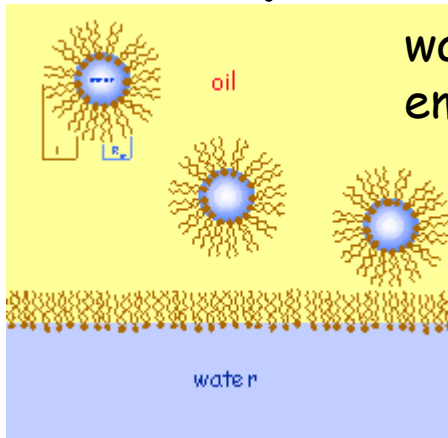


Δομή ενός μορίου φωσφολιπιδίου

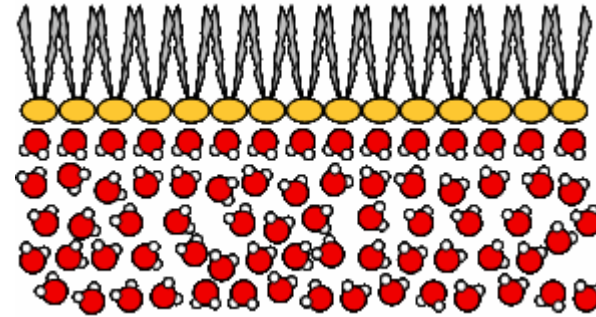


Η δομή της κυτταρικής μεμβράνης

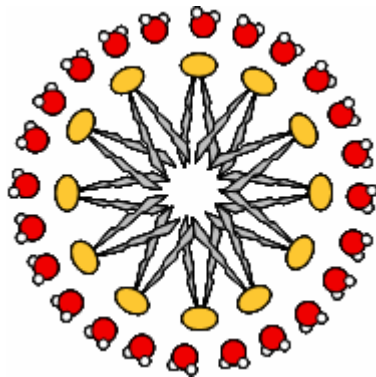
Bi-phasic hydrophilic / hydrophobic arrangements



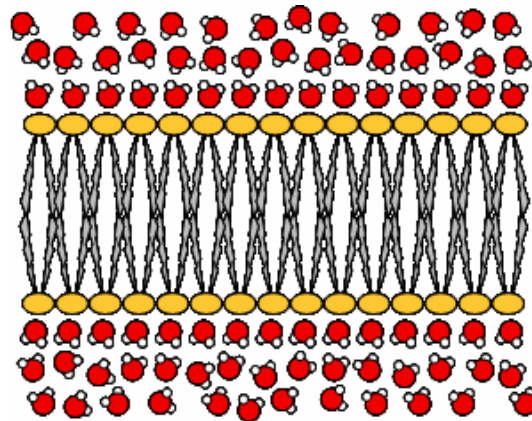
water in liquid oil:
emulsion



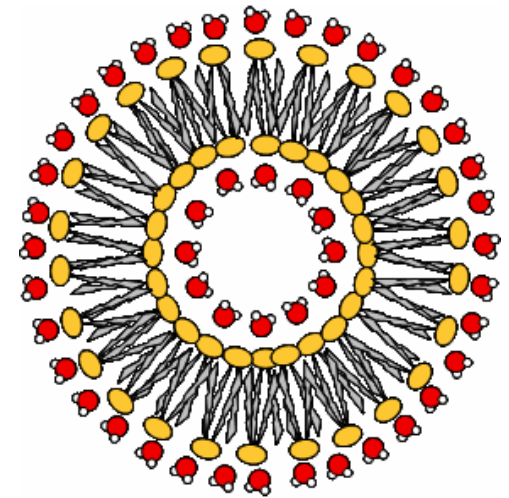
monolayer separating water and oil



micelle



bilayer



Bilayered vesicle (liposom)

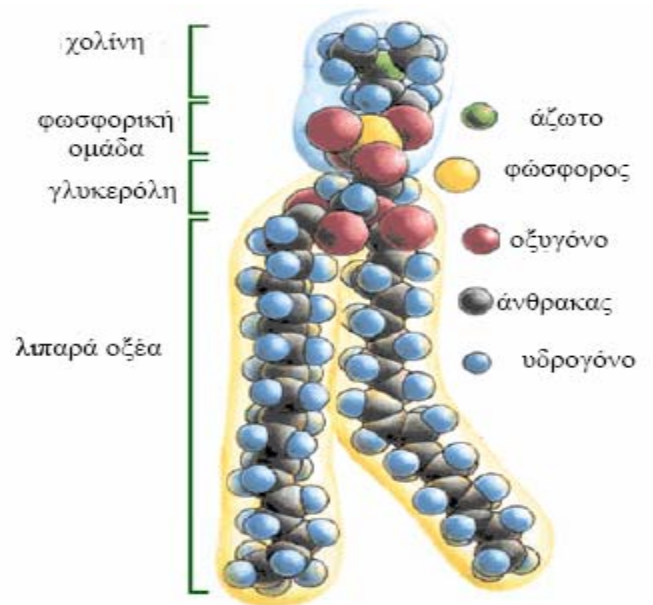
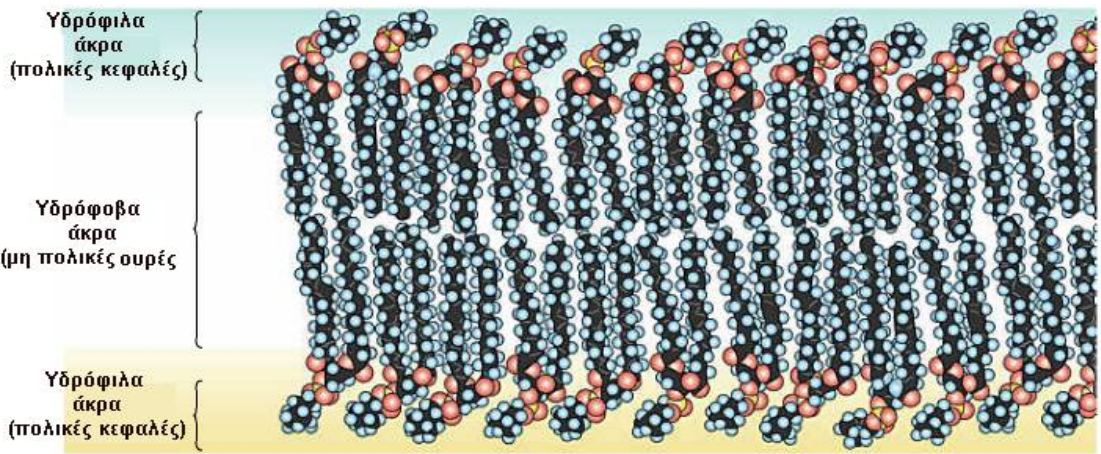
❖ Οι κύριες δυνάμεις που προσδιορίζουν την οργάνωση της μεμβρανικής δομής είναι δυνάμεις ηλεκτροστατικής υφής (ανάμεσα σε ιόντα) και δυνάμεις Van der Waals (υδρόφοβες/υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις και δεσμοί υδρογόνου στο υδάτινο περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης).

❖ Οι κυτταρικές μεμβράνες έχουν πάχη που ποικίλλουν από 50 έως 90 Å. Πρώτοι οι Fricke και Hober στις αρχές του 20^{ου} αιώνα υπολόγισαν το πάχος της κυτταρικής μεμβράνης, αφού μέτρησαν πειραματικά την ηλεκτρική αγωγιμότητα και τη χωρητικότητα αιωρήματος ερυθροκυττάρων σε ισοτονικό διάλυμα.

❖ Ο Fricke προσδιόρισε τη χωρητικότητα (C_m) των ερυθρών σε 0.81 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ και, υποθέτοντας τιμές της διηλεκτρικής σταθεράς (ϵ) των βιομεμβρανών ίσες με 3 και 10, υπολόγισε το πάχος τους σε 3,3 nm και 11,0 nm αντίστοιχα, εφαρμόζοντας τη σχέση της χωρητικότητας επίπεδου πυκνωτή:

$$C_m = \epsilon/4\pi d,$$

όπου d το πάχος της μεμβράνης.

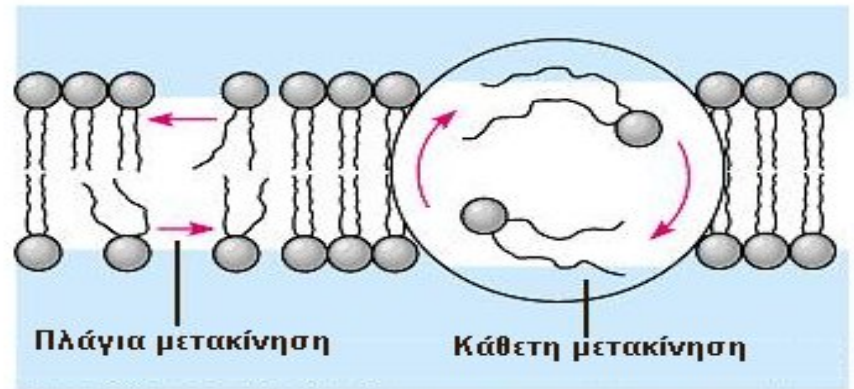


Η διπλοστιβάδα των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης
 Τα φωσφολιπίδια διατάσσονται με τρόπο ώστε να έχουν τα υδρόφιλα άκρα τους προς το εξωτερικό και το εσωτερικό του κυττάρου και τα υδρόφοβα άκρα προς το εσωτερικό της διπλοστιβάδας τους.

Εικόνα 1 : Φωσφολιπίδιο.

Τα μόρια των φωσφολιπιδίων μπορούν να μετακινούνται, οριζόντια, αλλάζοντας θέση, και κάθετα, μεταπηδώντας από τη μια στιβάδα στην άλλη.

Διαρκή κίνηση παρουσιάζουν και τα υπόλοιπα συστατικά μόρια, της μεμβράνης. Έτσι η κυτταρική μεμβράνη χαρακτηρίζεται ότι βρίσκεται σε ρευστή (υγρή) και όχι στατική (στερεή) κατάσταση.



Οι μετακινήσεις των φωσφολιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης συντελούν στη ρευστότητά της. Οι οριζόντιες μετακινήσεις είναι συχνές ενώ οι κάθετες σπάνιες.

➔ Φαινόμενα μεταφοράς μέσω των κυτταρικών μεμβρανών

❖ Η **διαβατότητα** ή **εκλεκτική διαπερατότητα** της βιολογικής μεμβράνης είναι μια από τις σπουδαιότερες ιδιότητες αυτής της βιολογικής δομής.

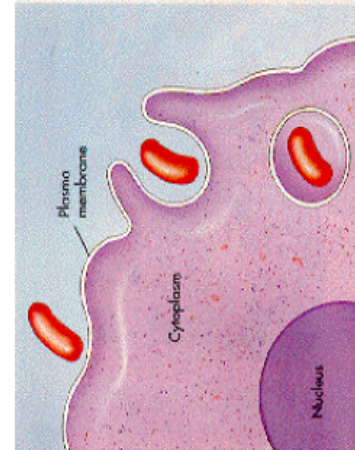
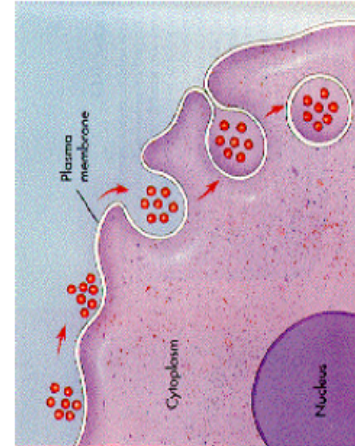
❖ Ανάλογα με το μέγεθος των μεταφερομένων ουσιών, διακρίνουμε δυο κύριους τρόπους μεταφοράς ουσιών μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, τη μικρομεταφορά και τη μακρομεταφορά.

❖ Η **μικρομεταφορά** αναφέρεται στη μεταφορά μικροσωματιδίων μέσω της μεμβράνης, όπως τα ιόντα, τα μικρομόρια, το νερό.

❖ Η **μακρομεταφορά** αναφέρεται στη μεταφορά κάποιων μοριακών συμπλεγμάτων, στερεών ή υγρών, όπως στην περίπτωση της φαγοκύττωσης ή της πινοκύττωσης.

@ Η **κυτταροφαγία** ή **φαγοκύττωση** οδηγεί στον εγκλωβισμό, μεγάλων σχετικά, στερεών σωματιδίων που επιτυγχάνεται με προεκτάσεις του πρωτοπλάσματος (ψευδοπόδια) που αγκαλιάζουν το σωματίδιο και ενώνονται πίσω του, φέρνοντάς το έτσι στο εσωτερικό του κυττάρου.

@ Η **κυτταροποσία** ή **πινοκύττωση** οδηγεί στον εγκλωβισμό μικροσκοπικών σταγόνων υγρού, στο οποίο αιωρούνται σωματίδια και μακρομόρια. Αυτά τα σωματίδια προσκολλώνται στην επιφάνεια του κυττάρου, η οποία εγκολπώνεται και τα "καταπίνει".

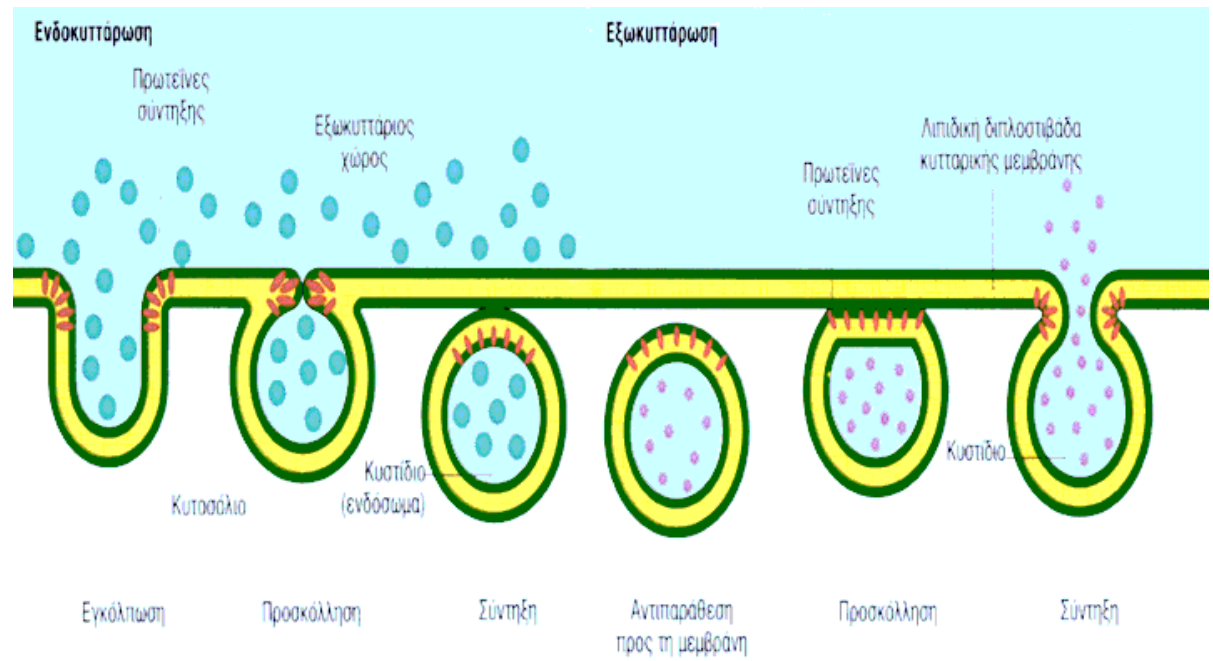


Endo/exocytosis

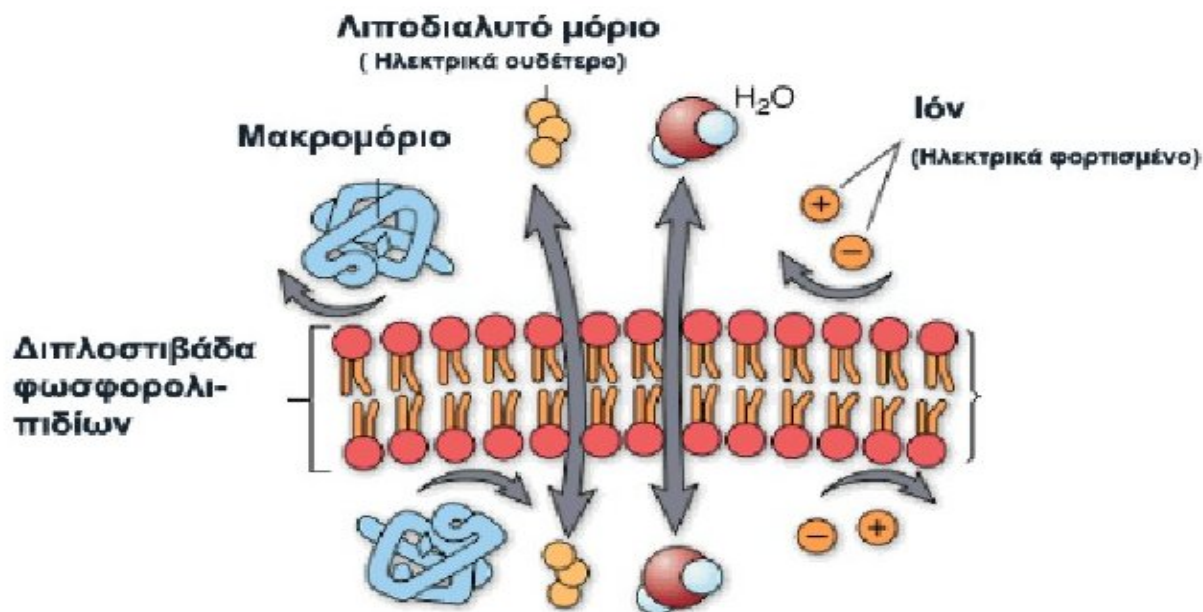
Μεταφορά με ενδοκυττάρωση/εξωκυττάρωση

Υλικά από τον εξωκυττάριο χώρο καθώς επίσης και από την έξω επιφάνεια της μεμβράνης, μπορούν να ενσωματωθούν μέσα στο κύτταρο με μια εγκόλπωση που συμβαίνει στην επιφάνεια του κυττάρου, με ένα μηχανισμό ο οποίος ονομάζεται ενδοκυττάρωση. Το τμήμα της κυτταρικής μεμβράνης εγκολπούμενο, συνενώνεται στα δύο άκρα του και δημιουργεί ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο ή όπως αλλιώς λέγεται, ένα ενδόσωμα, που είναι ένα μικρό, σφαιρικό σωματίδιο το οποίο περιβάλλεται από μεμβράνη. Το υλικό που έχει εγκλειστεί μέσα σε ένα τέτοιο κυστίδιο, στη συνέχεια μπορεί να υποστεί επεξεργασία μέσα στο κύτταρο.

Η εξωκυττάρωση είναι μηχανισμός αντίστροφος της ενδοκυττάρωσης και περιγράφει τη συνένωση ενός κυστιδίου που περιβάλλεται από μεμβράνη, με την επιφανειακή κυτταρική μεμβράνη με σκοπό την απέκκριση του περιεχομένου του στο γύρω εξωκυττάριο χώρο. Αυτή η συνένωση των δύο μεμβρανών έχει επίσης σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση ενός νέου μεμβρανικού τμήματος στην επιφάνεια του κυττάρου.



❖ Η απλούστερη διαδικασία μικρομεταφοράς, με την οποία μόρια ύλης διαπερνούν τη μεμβράνη, είναι η **ελεύθερη διάχυση**. Ο ρυθμός διάχυσης είναι συνάρτηση της διαλυτότητας των μορίων στα λιπίδια, που εκφράζεται με το λόγο της συγκέντρωσης της ουσίας στα λίπη ως προς την αντίστοιχη συγκέντρωση στο νερό ($C_{\text{λίπη}} / C_{\text{νερό}}$). Για ουσίες που δεν διαλύονται στα λιπίδια (π.χ. Na^+ , K^+ , Cl^- , γλυκόζη, αμινοξέα κ.ά), ο ρυθμός διάχυσης είναι συνάρτηση του μεγέθους των μορίων συγκρινόμενου με αυτό των "πόρων" της μεμβράνης. Όλα τα παραπάνω (ελεύθερη διάχυση, διάλυση μορίων στα λιπίδια, διέλευση μικρών ουσιών από πόρους) συνιστούν διαδικασίες **παθητικής μεταφοράς μορίων** μέσα από τη μεμβράνη, **χωρίς κατανάλωση ενέργειας**.

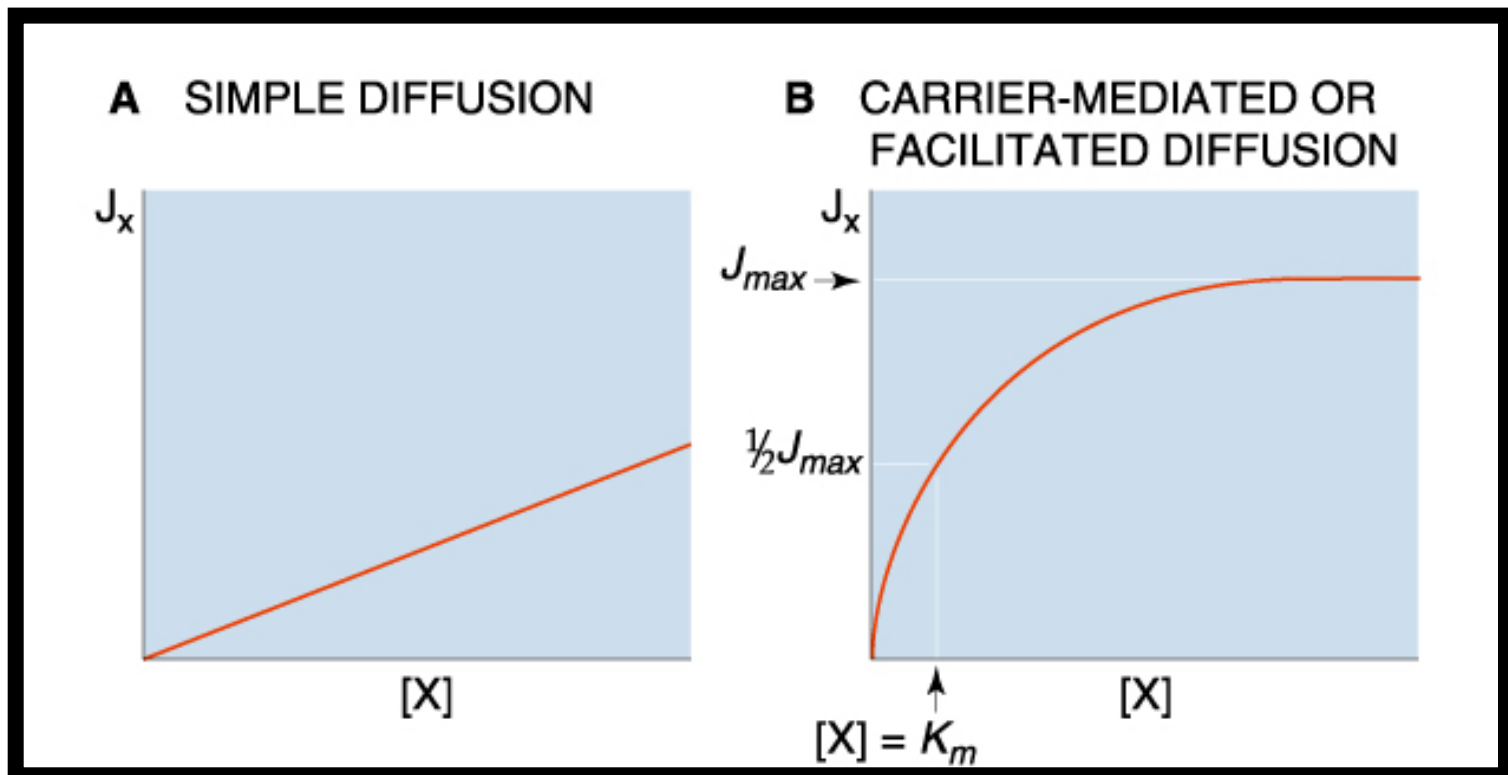


Απλή διάχυση μέσω της διπλοστιβάδας των φωσφορολιπιδίων

Το νερό και άλλα μικρά μη πολικά μόρια (λιποδιαλυτά) μπορούν να διαπεράσουν τη διπλοστιβάδα των φωσφορολιπιδίων ενώ αντίθετα τα ιόντα και τα μακρομόρια δεν μπορούν να τη διαπεράσουν.

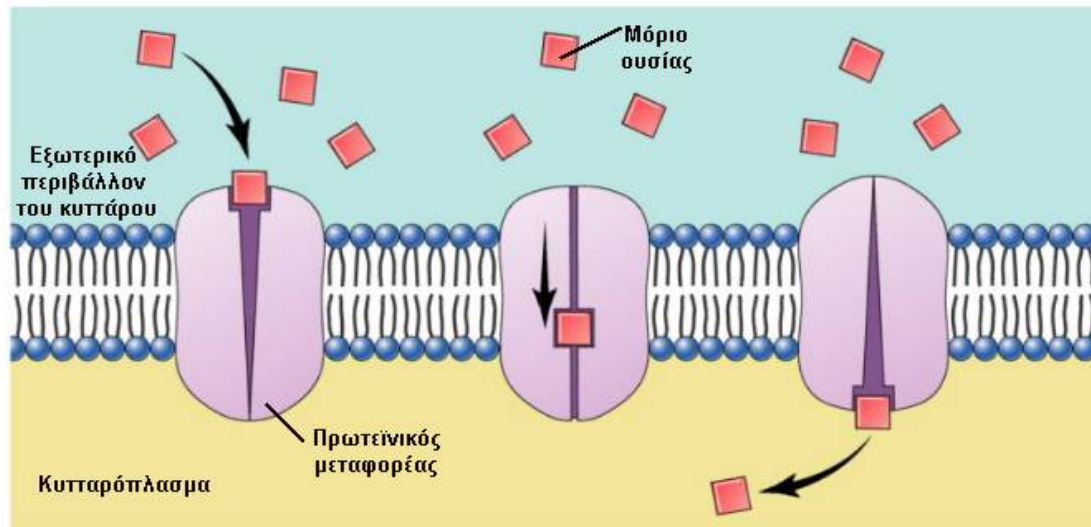
❖ Σε πολλές περιπτώσεις η ανταλλαγή ύλης με το περιβάλλον της κυτταρικής μεμβράνης γίνεται με *ενεργό μεταφορά ουσιών* ή και με *διευκολυνόμενη διάχυση*. Με διευκολυνόμενη διάχυση μεταφέρονται μόρια που δεν μπορούν να περάσουν μέσα από ιοντικά κανάλια, ούτε και από το στρώμα των λιπιδίων (μη λιποδιαλυτά μόρια), όπως είναι π.χ. ορισμένα σάκχαρα απαραίτητα στο μεταβολισμό του κυττάρου.

❖ Τα μόρια που αναλαμβάνουν ρόλο "μεσάζοντα" στη διευκολυνόμενη διάχυση λέγονται *ιανοφόρα* και παίζουν το ρόλο τους είτε σαν μεταφορείς αυτοί καθαυτοί, είτε σχηματίζοντας προσωρινούς πόρους για να περάσουν ουσίες.



❖ Τα ιονοφόρα δρουν με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

- α) παραλαμβάνουν κατιόντα από το εξωτερικό περιβάλλον της μεμβράνης και, παρέχοντας τους ένα υδροφοβικό κάλυμμα, τα μεταφέρουν και τα αποθέτουν στο εσωτερικό,
- β) δημιουργούν "κανάλια" στη μεμβράνη μέσα από τα οποία περνούν εκλεκτικά τα κατάλληλα ιόντα. Ένα παράδειγμα ιονοφόρου μεταφορέα είναι η βαλινομυκίνη (valinomycin), η οποία "ενσωματώνεται" στην κυτταρική μεμβράνη, λόγω των υδρόφοβων απολήξεων του μορίου της, αυξάνοντας σημαντικά την ταχύτητα μεταφοράς των ιόντων K^+ . Ένα μόνο μόριο βαλινομυκίνης διευκολύνει την (παθητική) διάχυση των ιόντων K^+ έτσι, ώστε η ταχύτητα διάχυσης να φθάνει τα $10^4 K^+/s$. Ένα άλλο παράδειγμα ιονοφόρου μορίου είναι ένα αντιβιοτικό, η γραμισιδίνη A (gramicidin A), το οποίο "ενσωματώνεται" στη λιπιδική διπλοστοιβάδα αυξάνοντας σημαντικά την ηλεκτρική αγωγιμότητα της μεμβράνης, μέσω της δημιουργίας πόρων, πολύ επιλεκτικών στη διαπερατότητα ιόντων Na^+ . Η ροή ιόντων Na^+ ανά πόρο γραμισιδίνης φθάνει τα $10^7 Na^+/s$. Τα ιονοφόρα-μεταφορείς ιόντων είναι κυρίως αντιβιοτικά ή ουσίες βακτηριακής προέλευσης (π.χ. τοξίνες βακτηρίων), που ανταγωνίζονται τη δράση άλλων, βλαβερών, μικροοργανισμών (βακτήρια, βάκιλοι) διαταράσσοντας τις μεμβρανικές λειτουργίες τους.



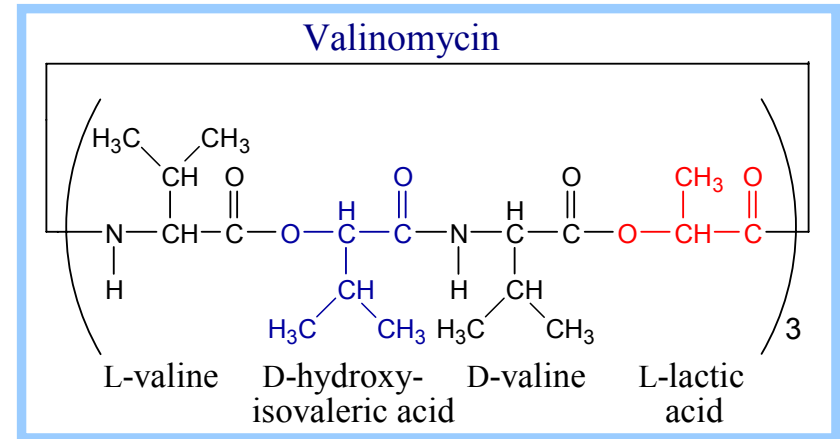
Υποβοηθούμενη διάχυση

Το μόριο προσδένεται στον πρωτεϊνικό μεταφορέα και εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα χωρίς την κατανάλωση ενέργειας, αφού ο πρωτεϊνικός υποδοχέας αλλάζει στερεοχημική δομή προσωρινά για το σκοπό αυτό.

✚ Ιονοφόρα

Η Βαλινομυκίνη είναι ιονοφόρο για το K^+ (Valinomycin is a carrier for K^+).

- Puckering of the ring, stabilized by **H-bonds**, allows valinomycin to closely surround a single unhydrated K^+ ion.
- Six oxygen atoms of the ionophore interact with the bound K^+ , replacing O atoms of waters of hydration.
- Valinomycin is highly **selective for K^+** relative to Na^+ .

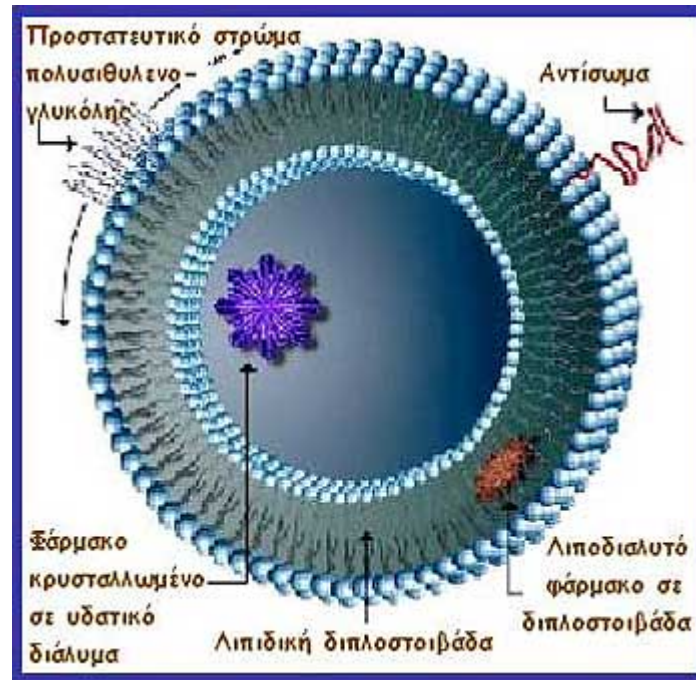


- The smaller Na^+ ion cannot simultaneously interact with all 6 oxygen atoms within valinomycin. Thus it is energetically less favorable for Na^+ to shed its waters of hydration to form a complex with valinomycin.
- Whereas the interior of the valinomycin- K^+ complex is polar, the **surface** of the complex is **hydrophobic**.

This allows valinomycin to enter the lipid core of the bilayer, to solubilize K^+ within this hydrophobic milieu.

❖ Η ενεργός μεταφορά πραγματοποιείται με ταυτόχρονη κατανάλωση ενέργειας, η οποία προέρχεται από τον μεταβολισμό των τροφών και βρίσκεται αποθηκευμένη στο μόριο της **τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP)**.

❖ Η διευκολυνόμενη διάχυση γίνεται με τη βοήθεια φορέων, δηλαδή πολύ ειδικών πρωτεϊνών. Κάθε μια από τις πρωτεΐνες-φορείς μπορεί να αντιδράσει μόνο με μια ειδική χημική ομάδα της ουσίας που διαχέεται και, τελικά, μετά την πρόσκαιρη αυτή σύνδεση, η ουσία αποδίδεται στην άλλη πλευρά της μεμβράνης και ο φορέας παραμένει ανέπαφος.



Τομή λιποσώματος όπου διακρίνονται τα σημεία εγκλωβισμού, λιπόφιλων και υδρόφιλων μορίων, και οι τροποποιήσεις που μπορούν να γίνουν στην επιφάνειά του.

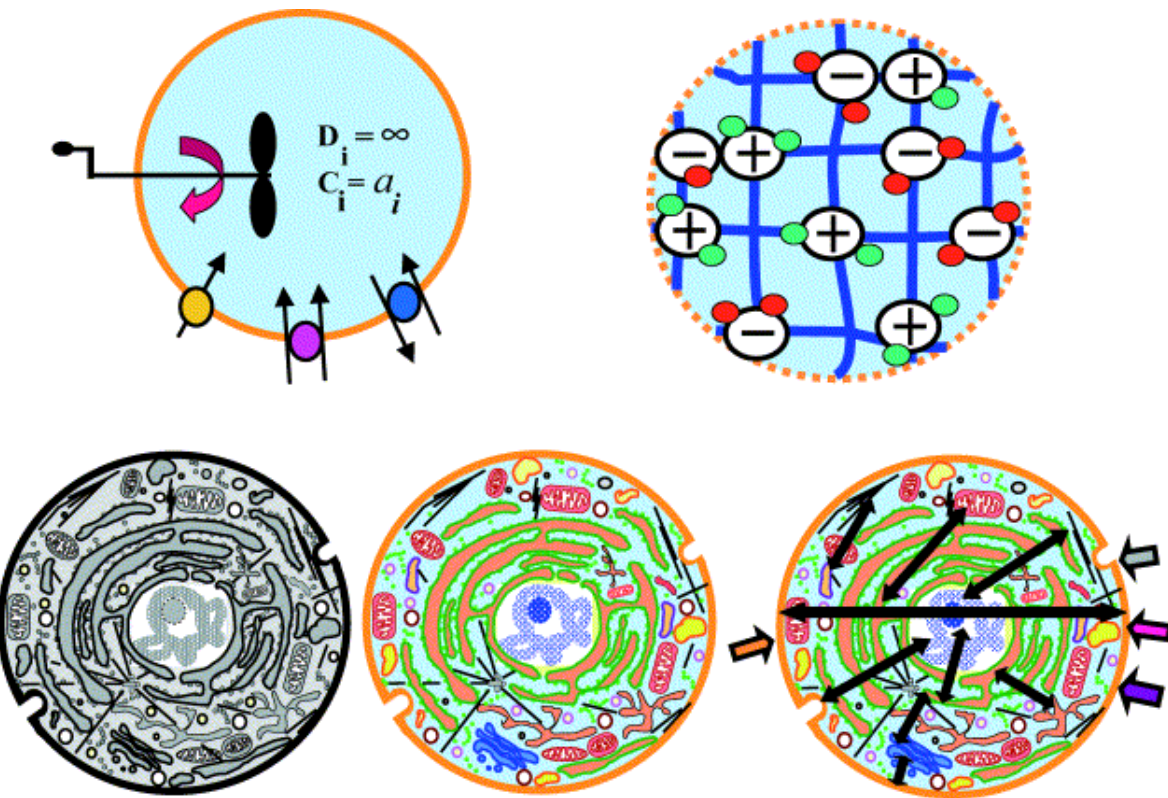


Figure 1. Working models of the cell after the Second World War. **Upper left:** for biophysicists it was enough to assume that the only relevant feature of the cell is its plasma membrane containing specific translocating mechanisms. The cytoplasm was supposed to be a well-stirred solution where diffusion coefficients have an infinite value, activities were identical to concentrations, and the nucleus as well as other organelles were not taken into consideration. **Upper right:** Gilbert N. Ling disregarded the membrane as the seat of translocating mechanisms. He considered that the cytoplasm is an entangled mesh of macromolecules with enough fixed electric charges and hydrogen binding sites to insure that water and ions would not be entirely free.

Bottom left: cell biologists observed that the cell contains densely packed organelles, such as the nucleus, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus, lysosomes, endosomes, peroxisomes, mitochondria, microfilaments, microtubes and shuttling vesicles. **Bottom center:** biochemists demonstrated that different organelles have different molecular species, membranes have domains, and proteins have different life spans. **Bottom right:** physiologists study the mechanisms and signals that enable a given protein species to move through a labyrinth of organelles, and travel from the point of synthesis to very specific targets.

Από το άρθρο: «Membrane targeting», M. Cereijido, R. G. Contreras, L. Shoshani and M. R. García-Villegas, [Progress in Biophysics and Molecular Biology, Vol. 81, Issue 2, February 2003, Pages 81-115](#)

■ Βιβλιογραφία

- "Θέματα Μοριακής Βιοφυσικής", Στ. Χαμόδρακα, Εκδόσεις Συμμετρία, 1993.
- "Biophysique", M. Volkenstein, (στα γαλλικά) (Editions Mir, Moscou), 1985.
- "Medical Instrumentation – Application and Design", J.G. Webster, (John Wiley and Sons, Inc.), 1998.
- "Biophysics and biochemistry at low temperatures", F. Franks, (Cambridge University Press), 1985.
- 2. "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A Practical Approach" (1992) A.Ducruix and R.Giege, Oxford University Press, Oxford-New York-Tokyo.
- 3. "Protein Crystallography" (1976) Blundell, T.L. & Johnson, L.N., Academic Press, London-New York-San Francisco.
- "Ο ρόλος των μειωτών ισχύος στη διαλυτότητα των βιομορίων στα μικτά υδατικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα και εφαρμογές στη χρωματογραφία και στην κρυστάλλωση" (1995) Διδακτορική Διατριβή Ι.Παπανικολάου, Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
- Πολλές εικόνες – σχήματα είναι από εκπαιδευτικό υλικό ή δημοσιεύσεις που διατίθενται ελεύθερα στο διαδίκτυο.
- Η ιστοσελίδα μου είναι στη διεύθυνση: <http://users.ntua.gr/mmakro>

