

Potenziale di Membrana

Genesi del Potenziale di Membrana

In tutte le cellule è possibile misurare una **differenza di potenziale a cavallo della membrana plasmatica**, infatti una cellula con un potenziale di membrana pari a 0 è una cellula morta.

Cellula	Pot. di membrana
Assone gigante	- 70 mV
Fibra muscolare	- 90 mV
Globulo rosso	- 10 mV
Neurone di gatto	- 80 mV
Uovo di riccio	- 40 mV

All'inizio gli studi venivano effettuati principalmente sull'**assone gigante del calamaro** e sulle **uova di riccio di mare**, ma le nozioni apprese su questi modelli sperimentali furono fondamentali per comprendere cosa accade nei Mammiferi, in quanto i meccanismi sono i medesimi.

Forze agenti sugli ioni

Sugli ioni a ridosso della membrana possono agire due diverse forze:

- **Gradiente elettrico**
- **Gradiente di concentrazione**

Ipotizziamo di avere una membrana permeabile ad un solo ione, che separi un compartimento privo di ioni da un compartimento dove vi sono uguali concentrazioni di ioni positivi e negativi, come nel caso del cloruro di potassio. In questo caso, quindi, entrambi i compartimenti sono elettricamente neutri.

Il passo successivo è quello di collocare un canale ionico, permeabile per esempio solo ai cationi, a livello della membrana.

Per cui, a questo punto, gli ioni positivi si muoveranno attraverso il canale, spostandosi verso il compartimento dove la loro concentrazione è nulla, quindi si muoveranno spinti dal **gradiente di concentrazione**.

Man mano, nel compartimento di destinazione si accumulano cariche positive, mentre nell'altro compartimento vi sarà un accumulo di cariche negative. Per cui la condizione di elettroneutralità viene persa e si genera quindi un gradiente elettrochimico.

A questo punto si avrà un flusso di cationi in direzione opposta, seguendo il **gradiente elettrico**.

Si arriverà poi ad una condizione in cui il flusso **dovuto al gradiente di concentrazione uguaglia il flusso dovuto al gradiente elettrico**, per cui il flusso degli ioni nelle due direzioni sarà uguale. Si raggiunge così l'**equilibrio**, in cui il **flusso netto degli ioni sarà pari a zero**.

Genesi di un Potenziale d'Equilibrio

Il potenziale di equilibrio di uno ione sarà la differenza di potenziale di membrana alla quale il movimento di ioni lungo il gradiente chimico è esattamente uguale e opposto al movimento di ioni lungo il gradiente elettrico.

Il potenziale di equilibrio può essere calcolato grazie all'**equazione di Nerst**:

$$E = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_{out}}{C_{in}} \longrightarrow E = 58 \text{ mV} \text{ Log}_{10} \frac{C_{out}}{C_{in}}$$

R = costante dei gas

T = temperatura assoluta

z = valenza dello ione

F = costante di Faraday

C_{out} = concentrazioni dello ione all'esterno

C_{in} = concentrazioni dello ione all'interno

Il potenziale di equilibrio del **K⁺** è **-70 mV**, mentre il potenziale di equilibrio del **Na⁺** è **+70 mV**.

Ipotizziamo di settare il potenziale di comando ad un valore di -40mV .

Quindi il potenziale di membrana raggiungerà un valore uguale al potenziale di comando, però a -40mV cominciano ad aprirsi i canali per il Na^+ , che determinerebbero l'innescarsi del potenziale d'azione.

Per far mantenere alla membrana un potenziale di -40mV , devo quindi iniettare una corrente uguale ma opposta, cioè una corrente iperpolarizzante, chiamata **corrente di clamp**.

Questa corrente di clamp permette di mantenere il potenziale di membrana al potenziale di comando ed è uguale, per quanto riguarda la cinetica, alla corrente che sta fluendo attraverso i canali Na^+ .

NB: Le **correnti entranti vengono contrassegnate con il segno $-$** perché negli esperimenti di *voltage clamp* bisogna iniettare una corrente iperpolarizzante per mantenere il blocco del voltaggio.

Utilizzando questa tecnica, **Hodgkin e Huxley** scoprirono, nel 1952, il meccanismo per cui le correnti ioniche danno origine al potenziale d'azione, e per questi studi condivisero il premio **Nobel per la Medicina nel 1963**.

La tecnica del *voltage clamp* aveva comunque delle **limitazioni** perché, visti gli elettrodi a disposizione all'epoca, poteva essere applicata solo a **cellule piuttosto grandi** come le uova di Echinoderma o l'assone gigante del calamaro ma non al neurone di un Mammifero o a qualsiasi altro tipo di cellula di Mammifero.

La Tecnica del *Current Clamp*

Negli **anni '30** fu messa a punto la metodica del *current clamp*.

Questa tecnica fu utilizzata sull'**assone gigante del calamaro** e consisteva nel preparare **due elettrodi**, uno collegato ad un **generatore di corrente**, l'altro collegato ad un **millivoltmetro**.

A questo punto veniva iniettato un **gradino di corrente di intensità nota** e si **registrava la variazione di potenziale corrispondente**.

Il *current clamp* può essere utilizzato per studiare il **potenziale d'azione**: si può stimolare la membrana con una corrente depolarizzante, fino a raggiungere la **soglia di attivazione dei canali del Na⁺**, generando il potenziale d'azione.

Questa metodica è la **più semplice** e anche la **più fisiologica**, in quanto le cellule operano secondo questi meccanismi.

Il *current clamp* ha però il **limite** di consentire lo studio delle correnti coinvolte nel potenziale d'azione o in qualsiasi altro fenomeno bioelettrico. Per far ciò è necessaria una metodica che consenta di studiare le correnti elettriche di membrana, bloccando il potenziale di membrana ad un valore predefinito.

La Tecnica del *Voltage Clamp*

Il *voltage clamp* consente di **bloccare il potenziale di membrana al valore desiderato**, misurando le correnti necessarie a mantenere la membrana bloccata a quel potenziale.

Cole, Curtis e Marmont, elettrofisiologi inglesi che effettuavano le registrazioni con la metodica del *current clamp* ai tempi della Seconda Guerra Mondiale, furono chiamati a lavorare ai radar. Proprio in quell'occasione conobbero l'**amplificatore operazionale** che, appena terminò la Guerra, usarono per mettere a punto la nuova metodica del *voltage clamp*.

L'amplificatore operazionale ha un **ingresso invertente (-)** ed un **ingresso non invertente (+)**.

Un elettrodo misura il potenziale di membrana ed è collegato all'ingresso invertente, mentre l'altro elettrodo consente di spostare il potenziale di membrana al potenziale di comando.

In questo sistema quindi il **potenziale di membrana viene comparato con il potenziale di comando** e viene generata ed iniettata nella cellula, una **corrente in grado di spostare il potenziale di membrana al potenziale di comando**.

Anche in questo caso, è possibile distinguere una prima componente capacitiva, molto intensa ma breve, seguita poi dalla corrente resistiva.

Patch Clamp

Il *patch-clamp* consente di **bloccare il potenziale di un pezzo isolato della membrana cellulare o dell'intera cellula** e di **misurare le correnti ioniche che fluiscono attraverso un singolo canale ionico o attraverso l'intera superficie di membrana.**

Questa tecnica fu messa a punto da due tedeschi, **Neher e Sackman.**

Questi due elettrofisiologi resero quindi possibile la caratterizzazione di singoli canali ionici e vinsero il **premio Nobel per la Medicina nel 1991.** Il *patch clamp* utilizza un **unico microelettrodo**, impiegato sia per variare il potenziale sia per misurare direttamente la corrente della membrana, ed è applicabile alle **cellule di Mammifero.**

In particolare, il *patch clamp*, permette di **misurare le correnti che fluiscono attraverso un singolo canale ionico**, e utilizzando la configurazione adatta, consente anche di **studiare tutte le correnti che fluiscono attraverso la membrana.**

Inoltre, consente anche di studiare l'**attività delle cellule nel loro circuito neuronale** o anche, negli ultimi anni, di lavorare con **animali svegli** operando dei fori nella calotta neuronale.

Lo schema del circuito operativo è simile a quello del *voltage clamp*, c'è sempre un amplificatore con un **ingresso invertente (-)**, a cui è collegato il microelettrodo, ed un **ingresso non invertente (+)**.

Il potenziale di membrana viene confrontato con il potenziale di comando e, se non coincidono, l'amplificatore genera una **corrente di feedback**, che fluisce attraverso una resistenza e, tramite lo stesso microelettrodo che ha registrato il potenziale di membrana, viene iniettata nella membrana cellulare.

L'amplificatore ha una sensibilità tale da poter operare in entrambe le direzioni usando lo stesso microelettrodo.

Nel *voltage clamp* l'elettrodo veniva iniettato nell'assoplasma dell'assone gigante del calamaro.

Nel *patch clamp*, invece, vengono usati dei **microelettrodi** con forma affusolata e con diametro di circa **1 micron**.

Il Seat-up per il Patch Clamp

Il microelettrodo viene appoggiato delicatamente sulla superficie della membrana, grazie all'uso di micromanipolatori molto precisi.

A questo punto si deve sigillare la punta della micropipetta alla superficie della membrana e ciò si fa applicando una **suzione molto delicata**.

Questa suzione **risucchia la porzione di membrana sottesa dalla punta della micropipetta**, formando una sorta di **omega**.

In questo modo si raggiunge una condizione detta di “**Gigaseal**”, in cui la resistenza che c'è tra la punta della micropipetta e la membrana è pari a **1 Giga Ohm** (10^9 Ohm), ovvero una resistenza molto elevata in quanto la membrana aderisce strettamente alla punta della micropipetta.

Se si è fortunati, troveremo un pezzo di membrana con un solo canale ionico e quindi potremo **bloccare il potenziale di membrana soltanto di questo pezzo di membrana** e quindi **studiare l'attività elettrica di questo singolo canale**.

Se non si raggiunge la condizione di Gigaseal, e quindi se la resistenza è bassa, si ha una dispersione della corrente, che quindi non viene interamente registrata perché fluisce.

La prima pubblicazione di Sackman e Neher riguardava i **canali ionici attivati da acetilcolina** nelle **fibre neuromuscolari di rana**. Si trattava delle prime registrazioni effettuate con la tecnica del *patch clamp*, cioè si trattava delle prime tracce elettrofisiologiche appartenenti all'**attività di un singolo canale ionico**.

Le punte dei microelettrodi vengono prodotte da uno strumento apposito. All'inizio la punta è un pò più grossa, quindi prima di essere utilizzata viene fatta passare attraverso una resistenza elettrica, chiamata **forgia**, che genera calore necessario per **smussare la punta dell'elettrodo**. Ovviamente, cellule più grandi hanno bisogno di punte più grandi, mentre cellule più piccole hanno bisogno di punte più piccole.

Quando si effettuano questi tipi di studio occorrono: il **microscopio**, con il quale osservare le cellule; una **camera di registrazione**, cioè una vaschetta nella quale c'è una **soluzione**, generalmente preparata per **mimare la composizione della soluzione dei tessuti biologici**; il **micromanipolatore** per far muovere con precisione il microelettrodo; **pre-amplificatore**, dove viene inserito il **microelettrodo** e che è collegato all'**amplificatore** vero e proprio; l'**oscilloscopio**, che però praticamente non viene più utilizzato, infatti i segnali elettrici ora vengono monitorati utilizzando dei **computer** che però sono meno sensibili degli oscilloscopi; un **tubino** che si diparte dal pre-amplificatore e che è collegato direttamente alla micropipetta e viene utilizzato per applicare la pressione negativa necessaria per raggiungere il Gigaseal; un **sistema utile per cambiare la composizione della soluzione extracellulare** che bagna le cellule, potendo così aggiungere per esempio un inibitore, un secondo messaggero o un ormone che modulano l'attività dei canali ionici. La soluzione viene sempre immessa nella vasca di registrazione e contemporaneamente viene aspirata, c'è quindi un **ricircolo continuo**.

Quando conduco l'esperimento, **come faccio a capire se si è raggiunto il Gigaseal?** Attraverso la micropipetta applico un gradino di potenziale, cioè una corrente. Quando la micropipetta tocca la membrana, la corrente si riduce perché incontra una resistenza. Nel momento in cui si raggiunge il Gigaseal, non passa più corrente tra la pipetta e la soluzione extracellulare, di conseguenza si registra un **segnale piatto**. L'unica corrente che passa è la componente capacitiva, che comunque può essere compensata.

Le configurazioni del *Patch Clamp*

Configurazione in cui la punta della micropipetta prende contatto con la membrana, formando una struttura a forma di omega. In questo caso non passa corrente tra micropipetta e soluzione extracellulare, cioè quel tratto di membrana sotteso alla punta della micropipetta è isolato e, se c'è un singolo canale ionico, sarà possibile monitorare l'**attività di singolo canale**.

Si lavora in *voltage clamp*, in quanto il voltaggio è mantenuto ad un valore costante, e che può essere variato a piacere con il potenziale di comando, ed è possibile misurare l'ampiezza della corrente in funzione del voltaggio applicato e ricavare informazioni sulla conduttanza di singolo canale.

Il *cell attached* consente anche di studiare la **modulazione dei canali ionici**, da parte per esempio di agonisti extracellulari.

Il problema di questa configurazione è che la **soluzione presente nella micropipetta non può essere cambiata**, inoltre **non posso applicare secondi messaggeri intracellulari** perché non si ha accesso al citosol. Dalla configurazione *cell attached* è possibile ottenere altre due diverse configurazioni (*whole cell* e *inside out*).

La configurazioni di Whole-Cell

Configurazione più usata e consente di **registrare l'attività di tutti i canali ionici espressi sulla membrana plasmatica**, effettuando un *voltage clamp* con un solo elettrodo.

Si ottiene dalla configurazione di *cell attached*, applicando una **seconda suzione gentile**, ciò farà sì che il **pezzo di membrana** sotteso alla punta dell'elettrodo nella configurazione di *cell attached* **si rompa**.

In questo caso la soluzione della micropipetta viene in contatto con la soluzione del citoplasma.

La configurazioni di *Inside-Out*

Si ottiene dalla configurazione di *cell attached* **ritraendo rapidamente e di pochi micron la punta della micropipetta che viene esposta alla soluzione extracellulare ed i lembi della membrana si ripiegano, formando una vera e propria bolla.**

A questo punto **si solleva ancora di più la punta della micropipetta** e la si fa uscire **al di fuori della soluzione extracellulare**, esponendo così rapidamente questo pezzo di membrana all'aria. Ciò comporta la **rottura della bolla** e resta solamente il pezzo di membrana che aveva aderito alla punta della micropipetta.

Ora, molto rapidamente, si riporta la punta del **microelettrodo nella soluzione extracellulare.**

In questo modo, il **versante citosolico della membrana è ora rivolto verso la soluzione extracellulare**, la cui composizione può essere modificata, aggiungendo per esempio AMPc, GMPc o DAG, per studiare quindi la **risposta del canale a sostanze intracellulari.**

La configurazioni di *Outside-Out*

La configurazione *inside out* non risolve però tutti i problemi. Infatti, per esempio, se so che un certo agonista extracellulare attiva un singolo canale, come faccio a costruire la **curva dose-risposta**? Potrei provare tutte le diverse concentrazioni utilizzando tanti *patch* di membrana diversi, ma sarebbe un esperimento lunghissimo. Sarebbe più comodo costruire la curva dose-risposta misurando l'attività di un singolo canale ionico, dovrei quindi rivolgere il versante citosolico della membrana verso la soluzione di registrazione?

Dalla configurazione di *whole cell* ritraggo rapidamente la punta della micropipetta, portando così via un pezzo di membrana.

I lembi di membrana adiacenti alla punta della micropipetta si ricongiungono e allora il **versante extracellulare sarà ora rivolto verso la soluzione extracellulare**. Posso così studiare il singolo canale ionico presente in questo pezzo di membrana, potendo inoltre **modificare la composizione della soluzione extracellulare** per studiare la **risposta del canale a sostanze extracellulari**.

Il *cell attached* è usato per misurare le correnti che fluiscono attraverso un singolo canale ionico.

Il *whole cell* è usato per misurare le correnti che fluiscono attraverso l'intera membrana.

L'*inside out* è usato per valutare la risposta di singoli canali al voltaggio e a sostanze intracellulari.

L'*outside out* è usato per valutare la risposta di singoli canali al voltaggio e a sostanze extracellulari.

Differenza tra *Cell-Attached* e *Whole-Cell*

Quando misuriamo l'attività di un singolo canale ionico tramite *cell attached*, *inside out* o *outside out*, vengono misurati eventi di apertura discreti.

Questo accade per esempio quando registriamo l'attività dei canali voltaggio-dipendenti al Na^+ , i quali si aprono in risposta ad una depolarizzazione. All'attivazione segue però l'inattivazione, nonostante il permanere dello stimolo depolarizzante. Infatti, quando si va a misurare l'attività di singolo canale, facendo tante registrazioni da uno stesso *patch* di membrana, si vede che gli eventi di apertura sono localizzati soprattutto all'inizio perché dopo il canale inattiva.

Quando accedo all'attività elettrica di tutta la cellula mediante *whole cell*, si può misurare la media di tutte le correnti che fluiscono attraverso quel singolo canale della membrana plasmatica.