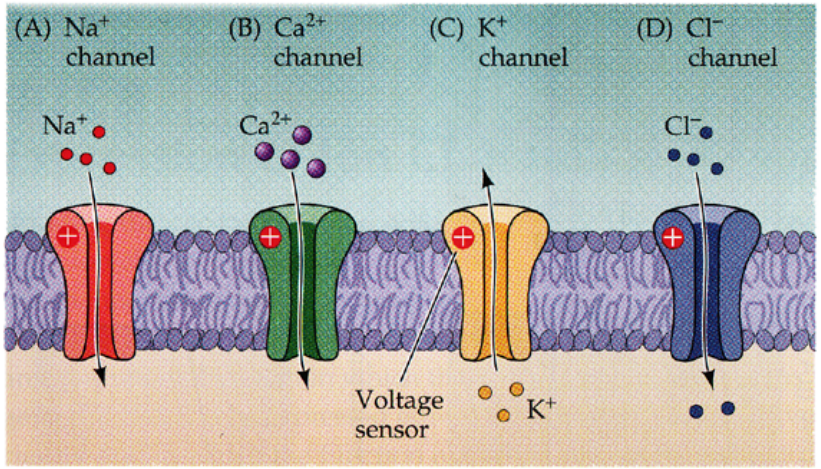
Canali ionici **PASSIVI:** sono sempre aperti e determinano il potenziale di membrana a riposo

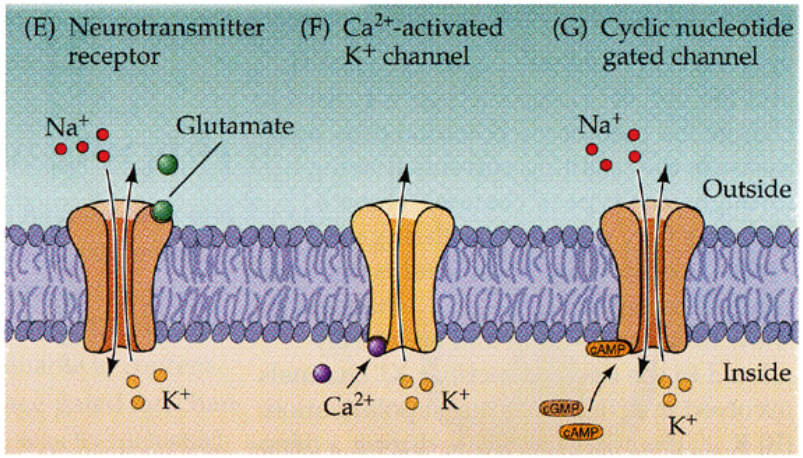
Canali ionici **ATTIVI:** si aprono in risposta a degli stimoli (di natura elettrica, chimica o meccanica)

I CANALI IONICI ATTIVI

CANALI IONICI VOLTAGGIO-DIPENDENTI



CANALI IONICI LIGANDO-DIPENDENTI



I CANALI IONICI ATTIVI

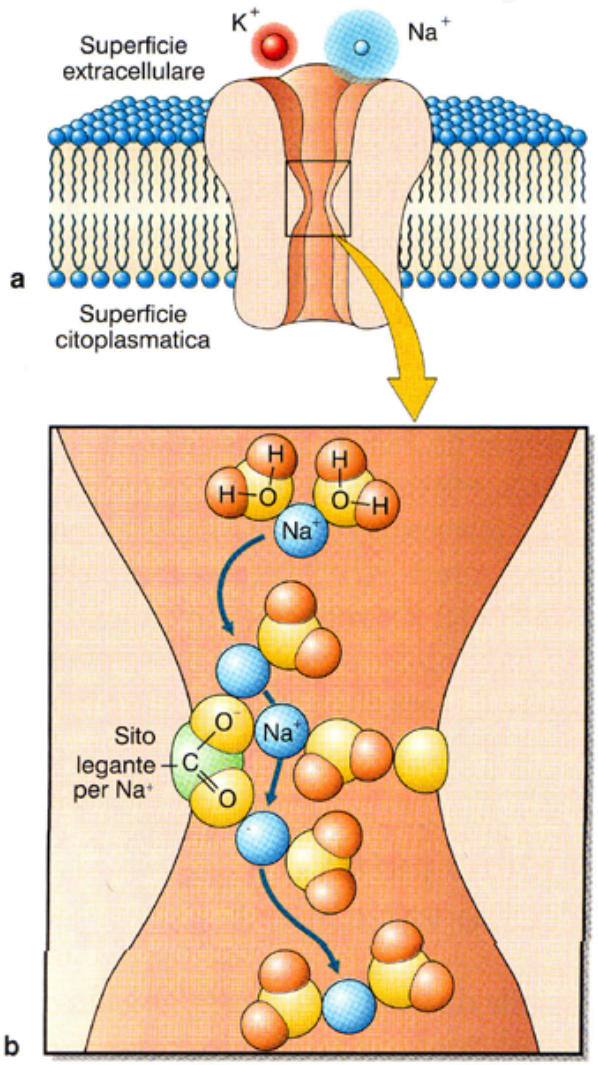
si distinguono per:

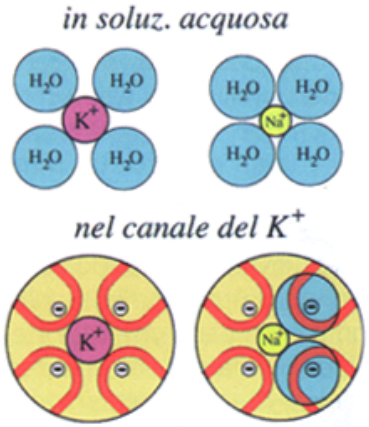
1. IL MECCANISMO DI ATTIVAZIONE

2. LA SELETTIVITÀ IONICA

3. IL MECCANISMO DI INATTIVAZIONE/DESENSIBILIZZAZIONE

• selettività ionica



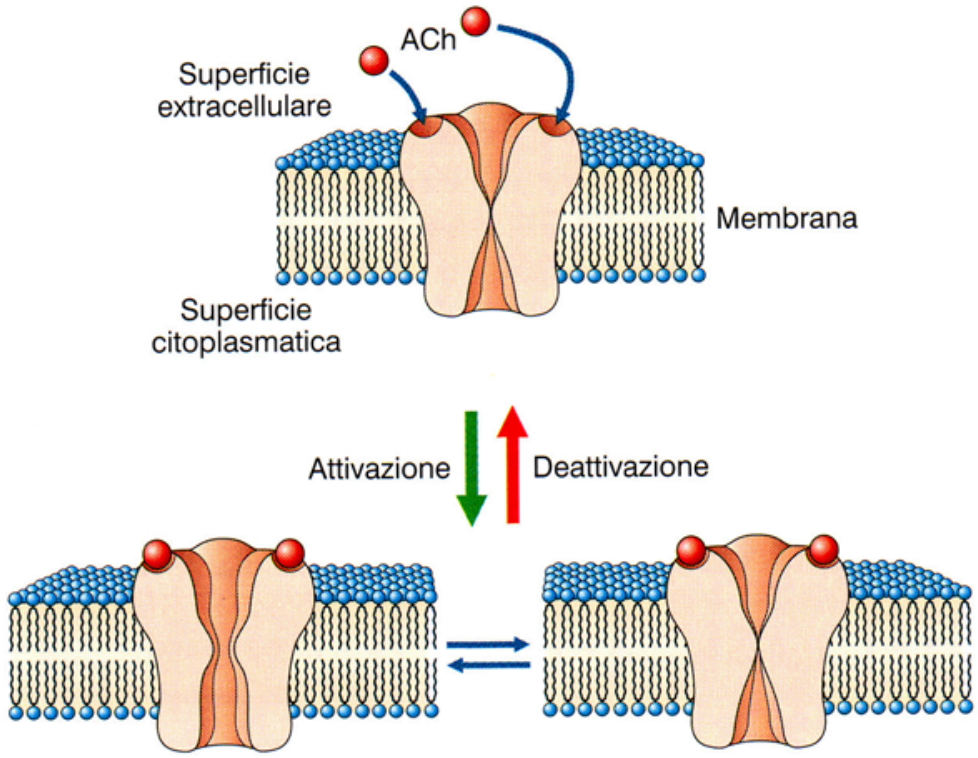


Ione	raggio anidro	raggio idrato	strato idrico
Na^+	0.98	2.91	1.93
K^+	1.33	1.88	0.55
NH_4^+	1.45	1.89	0.44
Cl^-	1.80	1.92	0.12

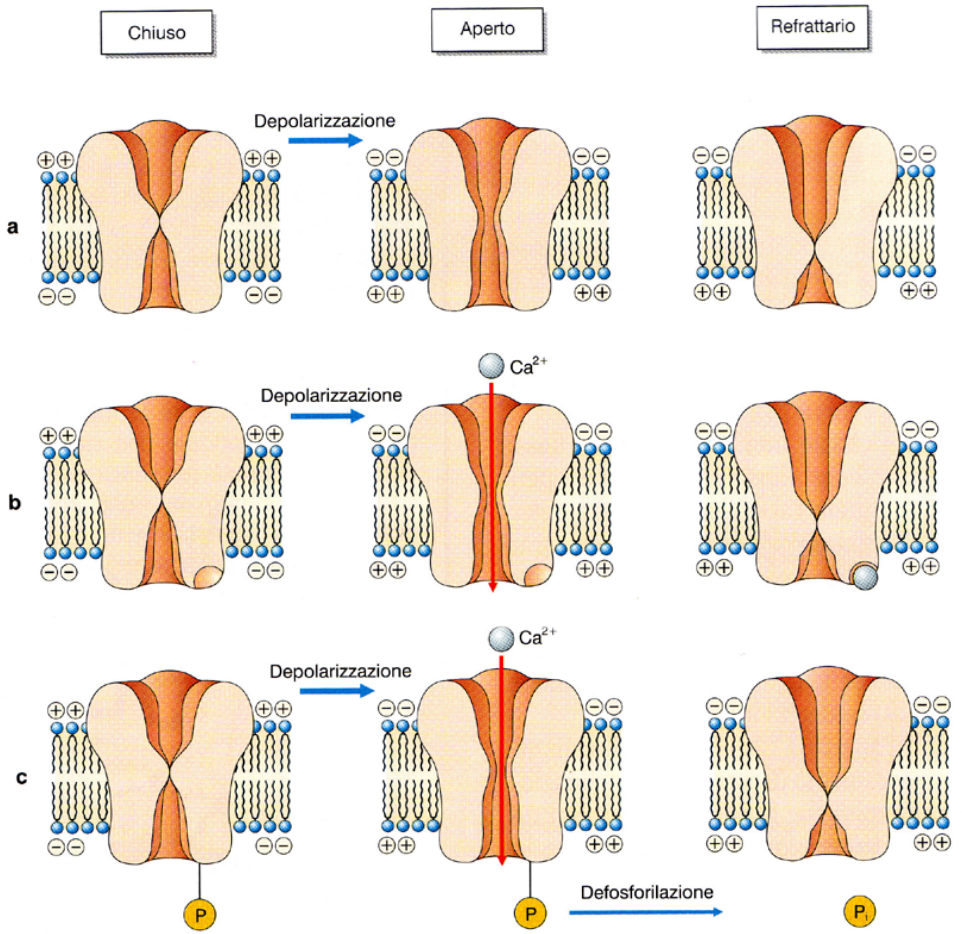
Figura 3.4 Selettività dei canali ionici. **a**, Gli ioni sono circondati da una corona di molecole d'acqua di dimensioni tanto più grandi quanto maggiore è la concentrazione della carica elettrica. Se si confrontano gli ioni Na^+ e K^+, entrambi posseggono la stessa carica elettrica ma, avendo lo ione Na^+ dimensioni minori, la sua carica elettrica risulta più concentrata e, quindi, la "nuvola" di molecole di H_2O che lo circonda risulta più grande di quella attorno allo ione K^+. **b**, Gli ioni interagiscono con residui aminoacidici presenti nel lume del canale (filtro di selettività), che si sostituiscono in parte all'acqua di solvatazione.

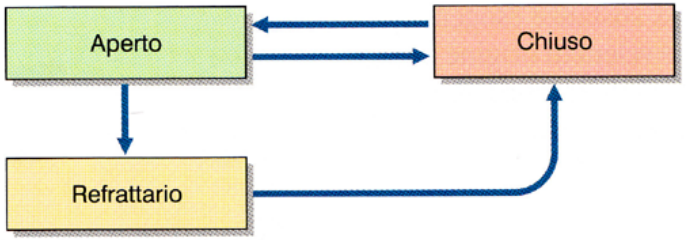
- **inattivazione/desensibilizzazione**

1. Canali ligando-dipendenti



2. Canali voltaggio-dipendenti





CANALI IONICI VOLTAGGIO-DIPENDENTI

1. Si aprono in risposta a variazioni del potenziale di membrana

2. Sono generalmente selettivi ad una sola specie ionica (Na^+, K^+, Cl^- e Ca^{2+})

Struttura dei canali ionici voltaggio-dipendenti:

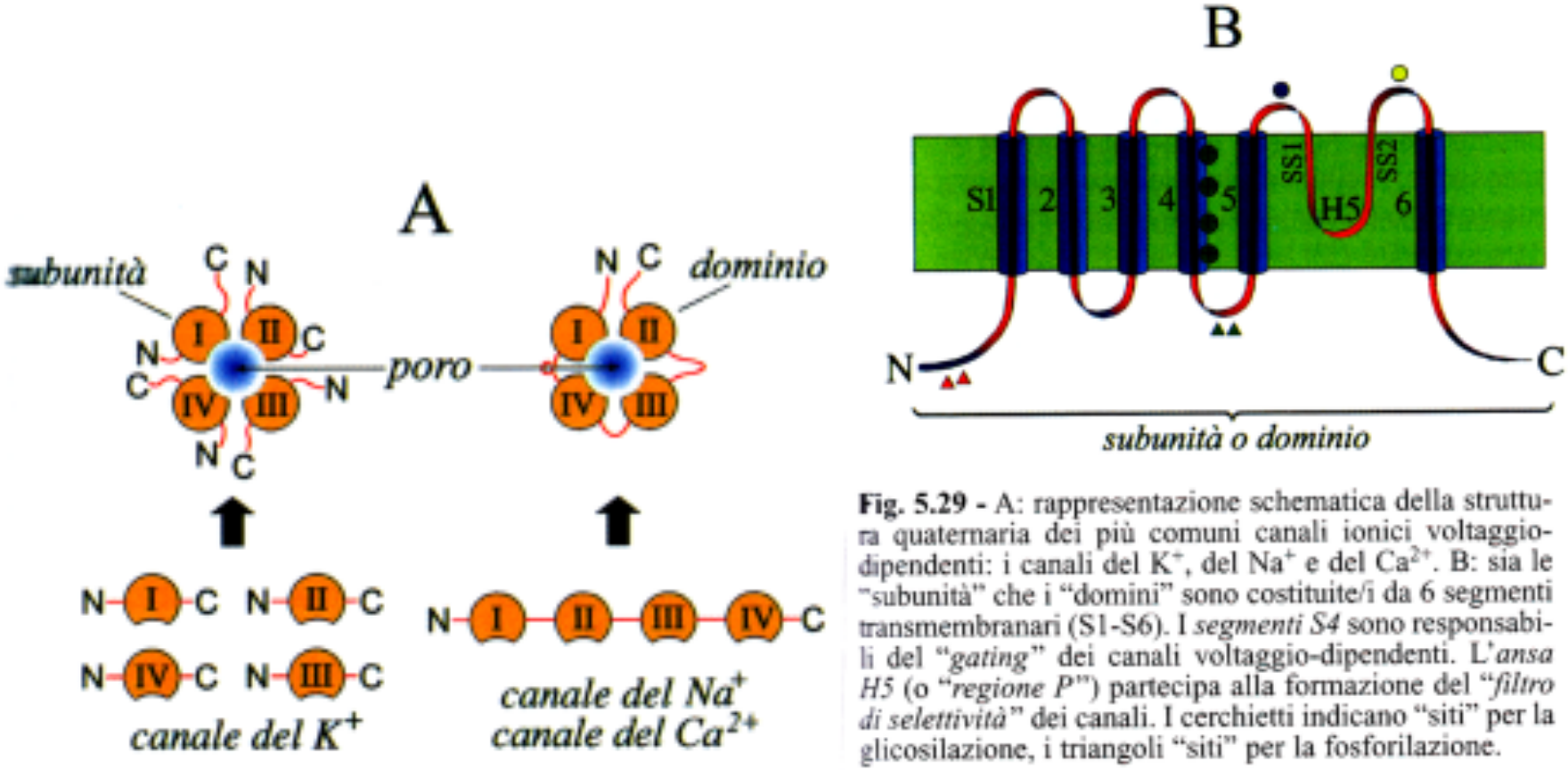
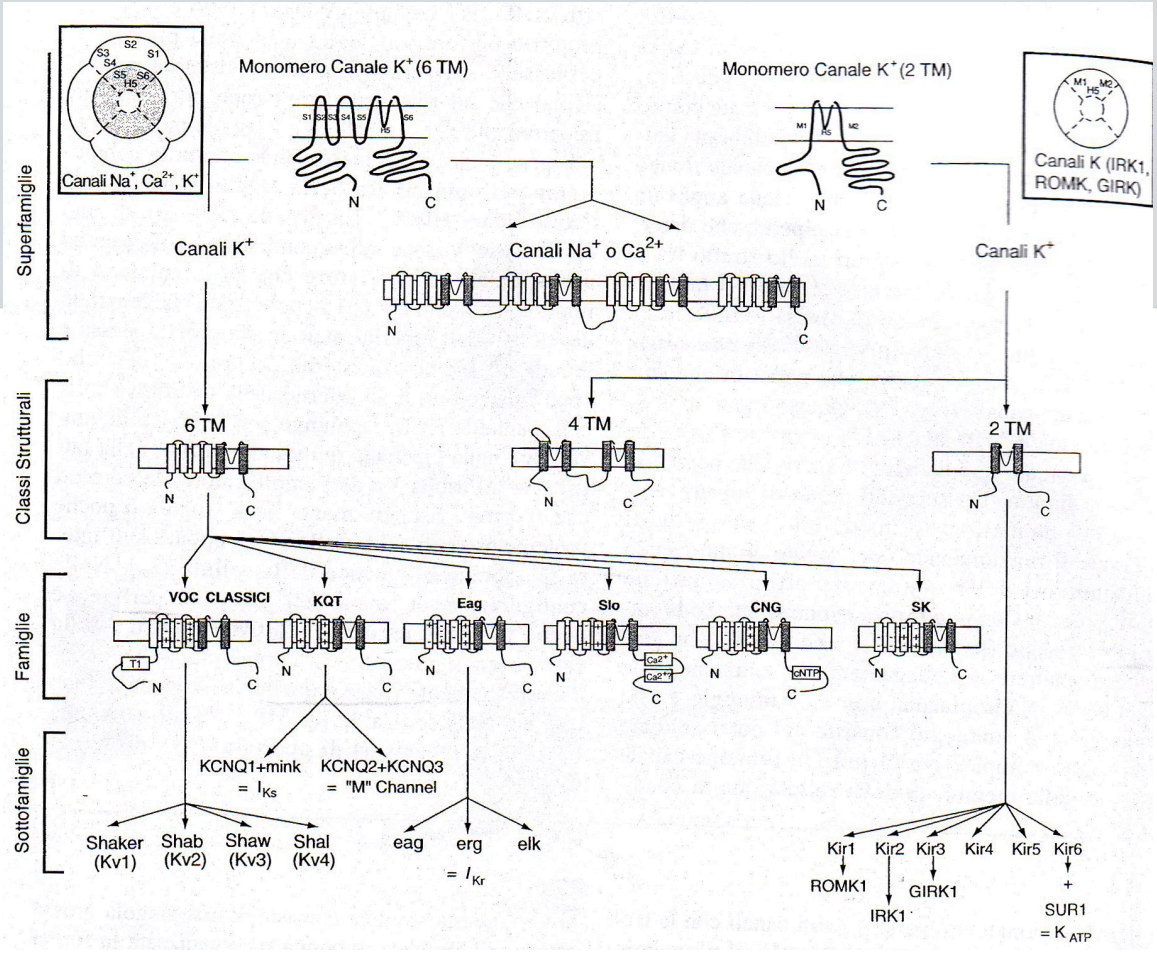
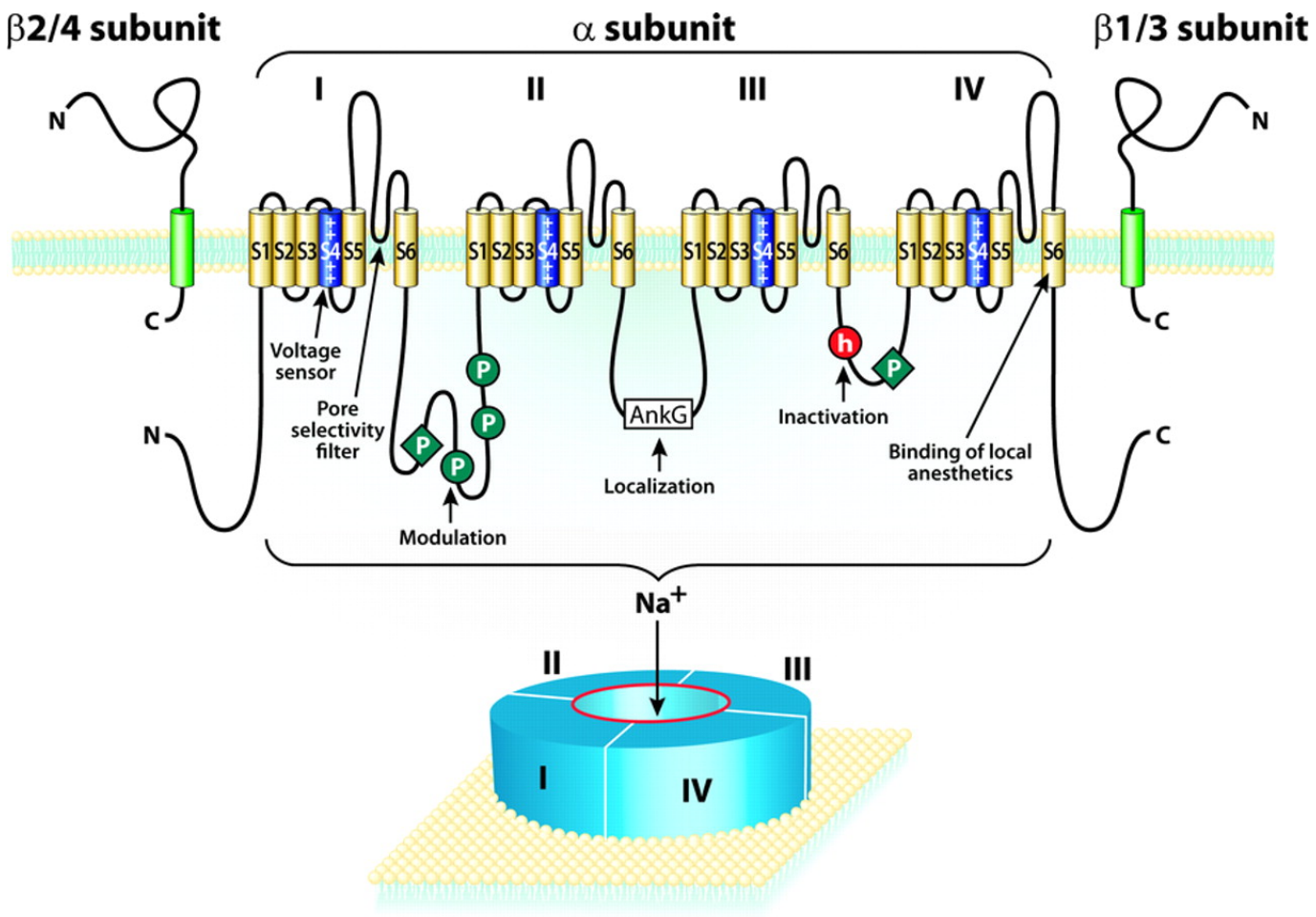


Fig. 5.29 - A: rappresentazione schematica della struttura quaternaria dei più comuni canali ionici voltaggio-dipendenti: i canali del K^+, del Na^+ e del Ca^{2+}. B: sia le "subunità" che i "domini" sono costituite/i da 6 segmenti transmembranari (S1-S6). I *segmenti S4* sono responsabili del "*gating*" dei canali voltaggio-dipendenti. L'*ansa H5* (o "*regione P*") partecipa alla formazione del "*filtro di selettività*" dei canali. I cerchietti indicano "siti" per la glicosilazione, i triangoli "siti" per la fosforilazione.

Classificazione dei canali ionici voltaggio-dipendenti:



I canali al sodio voltaggio-dipendenti



Le subunità β <u>modulano</u> la cinetica di attivazione dei canali per il sodio voltaggio-dipendenti

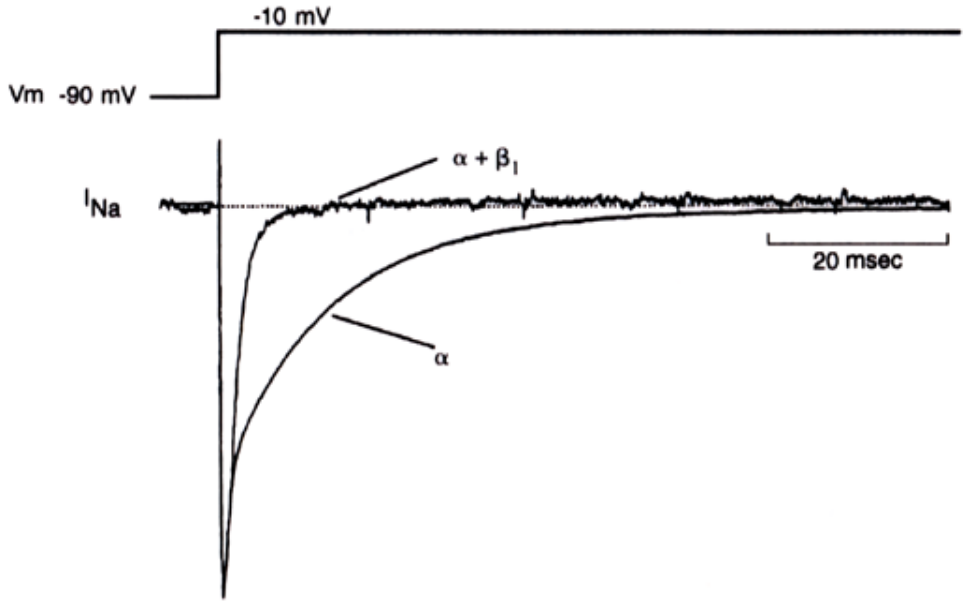


FIGURE 5.1 THE β-SUBUNIT REGULATES Na^+ CHANNEL INACTIVATION

Na^+ currents recorded from two different *Xenopus* oocytes expressing either the α-subunit of the rat Na^+ channel alone, or the α-subunit in combination with the β_1-subunit. The traces have been normalized to the peak current level. From Ji *et al.* (1994).

Tab. 22.2. Classificazione e farmacologia dei canali del Na^+ della superfamiglia Nav1.x. *Abbreviazioni*: ATXII, tossina di anemone di mare; α-tossine, tossine di scorpione di tipo alfa; β-tossine, tossine di scorpioni di tipo beta; DRG, gangli sensitivi spinali; μ-GIIIA, μ-PIIIA, tossine di conchiglie di mare; TTX, tetrodotossina (IC50); $GEFS^+$, generalized epilepsy febbrile sindrome; LQT3, long QT sindrome tipo 3; HPPP, paralisi periodica iperkalemica; PC, paramiotonia congenita; PAM, miotonia da potassio.

Sottofamiglie (simbolo del gene)	Nav1.1, brain type I (SCN1A)	Nav1.2, brain type II (SCN2A)	Nav1.3, brain type III (SCN3A)	Nav1.4, μ1, skMI (SCN4A)	Nav1.5, μ1, skMII (SCN5A)	Nav1.6, NaCh6, PN4 (SCN8A)	Nav1.7, PN1, hNE-Na (SCN9A)	Nav1.8, SNS, PN3 (SCN10A)	Nav1.9, NaN, SNS-2 (SCN11A)
cromosoma	2q23-24	2q23-24	2q23-24	17q23-25	3p21-24	12q13	2q23-24	3p21-24	3p21-24
Tessuto	SNC, SNP	SNC	SNC	Muscolo scheletrico	Cuore, muscolo embrionale, CNS sistema limbico	Cervelletto, nodi di Ranvier, DRG	SNP, DRG, cromaffini, Schwann	Neuroni a piccolo diametro	Neuroni a piccolo diametro
Bloccanti (IC_{50})	TTX (6 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (13 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (4 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (5 nM), lidocaina, μ-GIIIA, μ-PIIIA	TTX (2 μM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (1 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (2 nM), anestetici locali, antiepilettici, antiaritmici	TTX (>100 μM)	TTX (40 μM)
Attivatori	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	Veratridine, β-tossine	–	–
Inibitori inattivazione	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	ATXII, α-tossine	–	–
Fisiologia	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing, topo KO letale in età prenatale	Potenziale d'azione, firing, aumenta nel danno neuronale	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, firing	Potenziale d'azione, nocicezione	Nocicezione
Farmacologia, bersaglio	antiepilettici	antiepilettici	antiepilettici	antiepilettici	antiaritmici	antiepilettici	anestetici locali	–	analgesici
Canalopatie	GEFS+	GEFS+	–	HPPPC, PC, PAM	LQT3	Topo *med*	–	–	–

• *Attivazione*

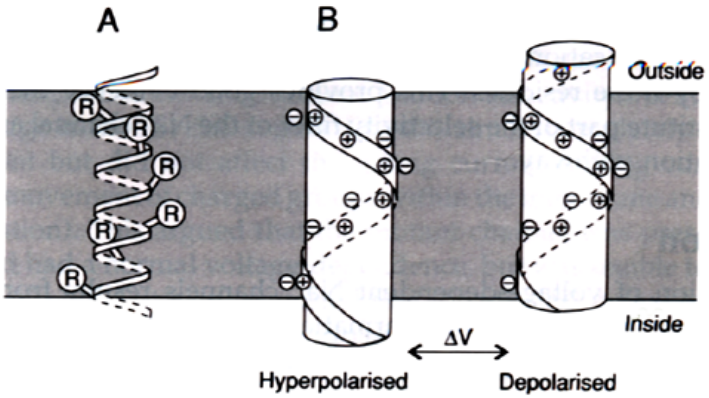


FIGURE 5.5 THE S4 HELIX MOVES DURING VOLTAGE-DEPENDENT ACTIVATION
(A) The S4 segment of repeat I of the rat brain Na^+ channel portrayed with a ball-and-stick model. Positively charged arginine (R) residues are indicated. (B) Sliding helix model illustrating S4 movement in response to depolarization. From Catterall (1986).

• *Inattivazione*

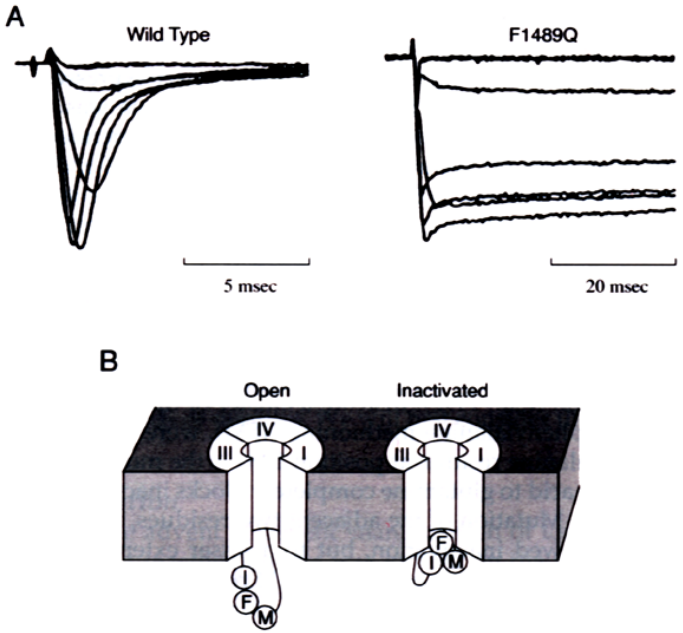
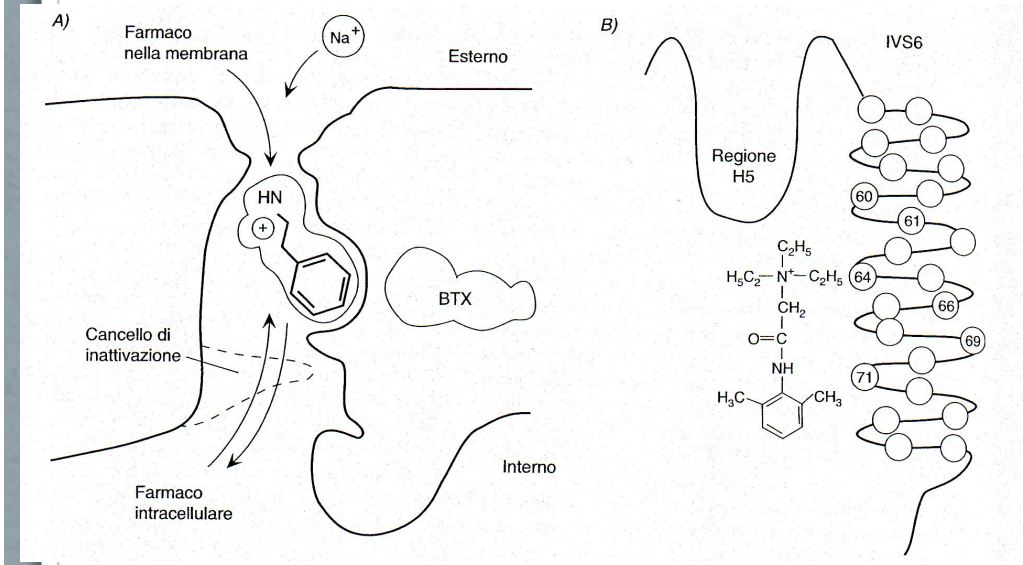


FIGURE 5.7 MECHANISM OF Na^+ CHANNEL INACTIVATION
Phenylalanine 1489 (F) is critical for inactivation of Na^+ channels. (A) Currents recorded from *Xenopus* oocytes in response to depolarizing pulses from −90 to +55 mV from a holding potential of -100 mV. Oocytes were coinjected with mRNAs encoding the β_1-subunit and either the wild-type α-subunit of the rat brain Na^+ channel or a mutant α-subunit in which residue F1488 was replaced with glutamine (Q). Note the different time scales. (B) Model of the hinged-lid mechanism of inactivation. The intracellular loop connecting repeats III and IV is depicted as forming a hinged lid. Critical residues for inactivation, IFM 1488–1490, are indicated. From West *et al.* (1992).

Gli anestetici locali



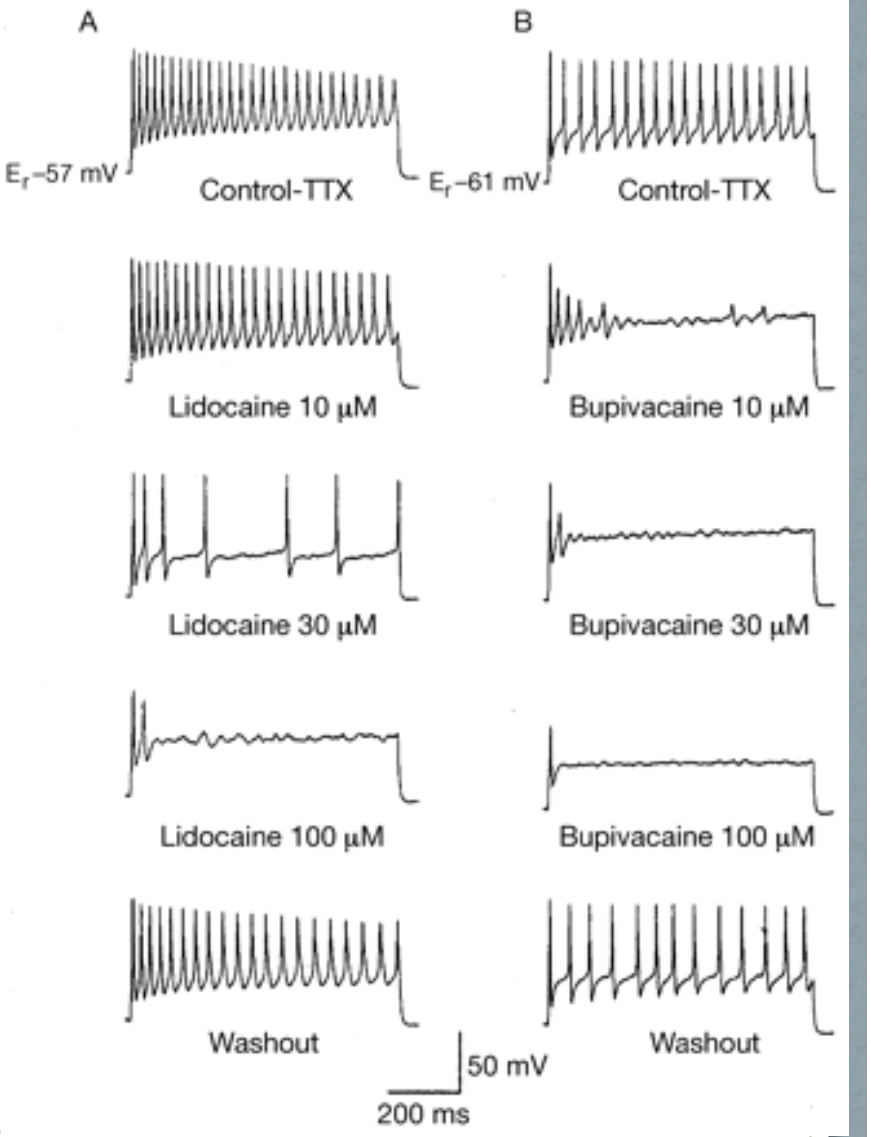


Fig 3 Local anaesthetics reduce firing frequency in small dorsal root ganglia neurones. (A) Trains of tetrodotoxin (TTX)-resistant action potentials elicited by a 750 ms 400 pA current stimulus are reduced in firing frequency by increasing concentrations of lidocaine. (B) Similar effects as in (A) seen with bupivacaine in another neurone. Extracellular solution in bath containing TTX 200 nM; high K_I in pipette; 22–23°C. (Modified with permission from International Association of Pain.[67])

CANALI IONICI LIGANDO-DIPENDENTI:

I NEURORECETTORI

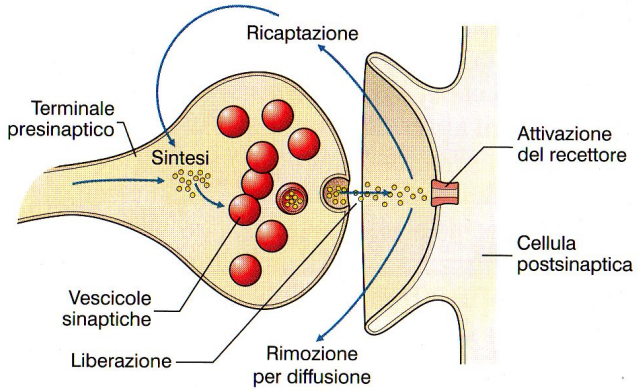


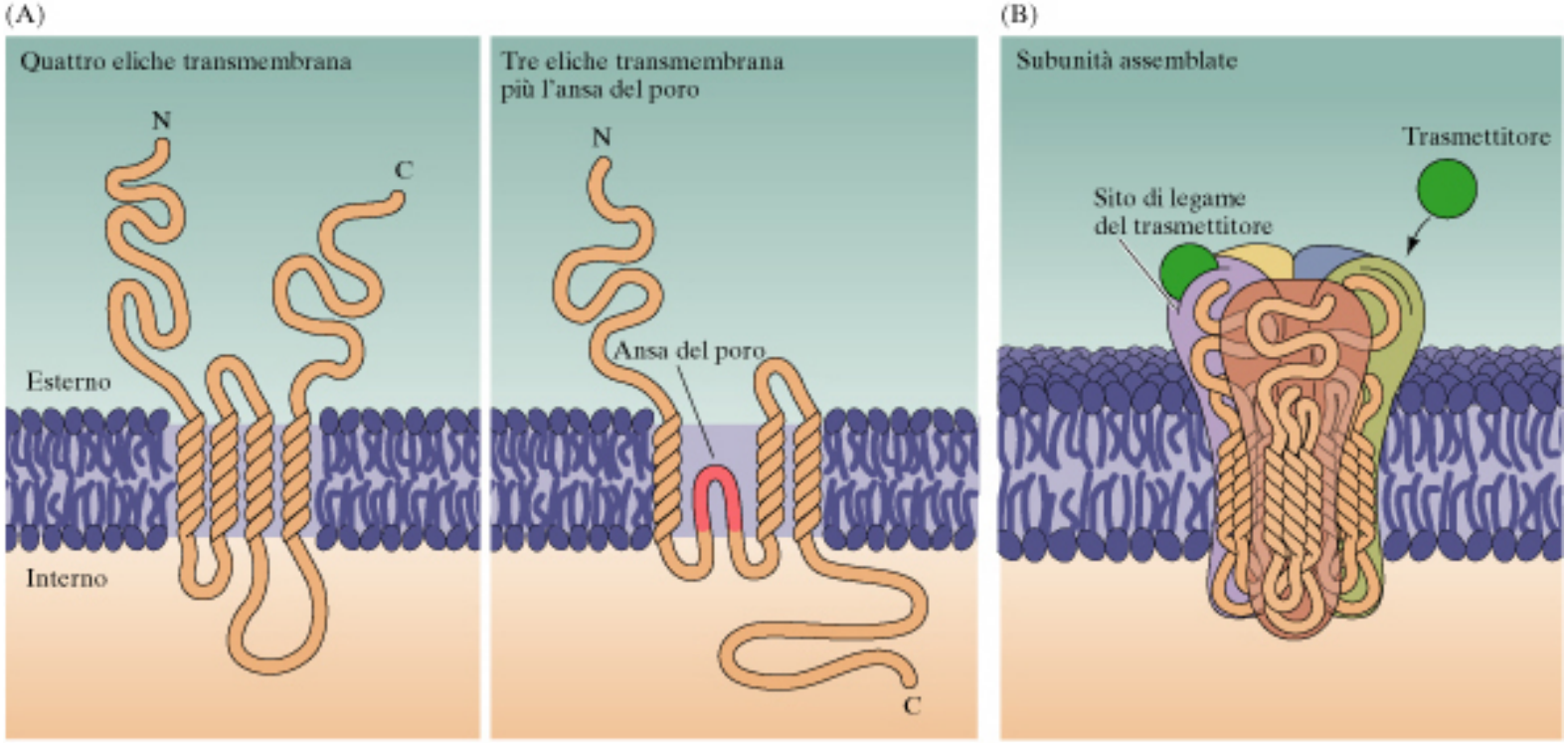
Figura 5.11 Schema di sinapsi chimica. Il neurotrasmettitore liberato dalle vescicole si lega ai recettori presenti sulla membrana postsinaptica e poi viene rimosso per diffusione o per ricaptazione attiva da parte di trasportatori.

Criteri per definire i neurotrasmettitori:

1. **Sintesi nel neurone presinaptico**
2. **Liberazione nella fessura sinaptica**
3. **Legame recettore postsinaptico**
4. **Smaltimento o degradazione rapida**

Tabella 14-1 Neurotrasmettitori a basso peso molecolare ed enzimi chiave delle loro vie di biosintesi.

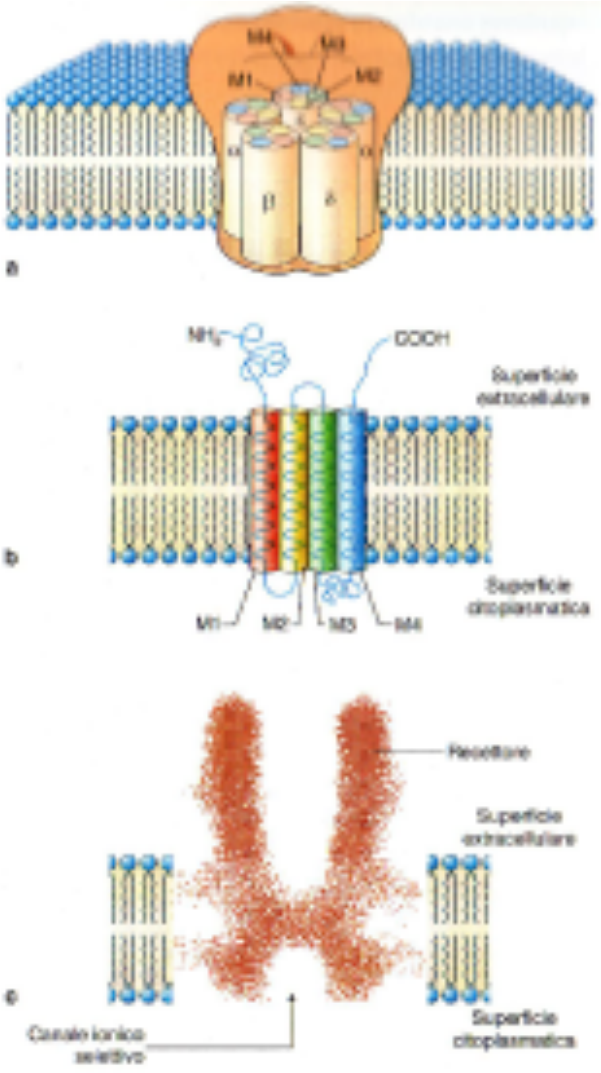
Neurotrasmettitore	Enzimi
Acetilcolina	Colin-acetiltransferasi
Amine biogene	
Dopamina	Tirosin-idrossilasi (specifica)
Norepinefrina	Tirosin-idrossilasi e dopamina-β-idrossilasi (specifiche)
Epinefrina	Tirosin-idrossilasi, dopamina-β-idrossilasi e feniletanolamina-N-metiltransferasi (specifiche)
Serotonina	Triptofano-idrossilasi (specifica)
Istamina	Istidina-decarbossilasi (specificità incerta)
Aminoacidi	
Acido γ-amminobutirrico	Decarbossilasi dell'acido glutammico (probabilmente specifica)
Glicina	Enzimi del metabolismo generale (vie specifiche incerte)
Glutammato	Enzimi del metabolismo generale (vie specifiche incerte)



(C)

Recettore	AMPA	NMDA	Kainato	GABA	Glicina	nACh	Serotonina	Purine
Subunità (combinazione di 4 o 5 subunità richieste per ogni tipo di recettore)	Glu R1	NR1	Glu R5	α_{1-7}	α1	α_{2-9}	5-HT$_3$	P_{2X1}
	Glu R2	NR2A	Glu R6	β_{1-4}	α2	β_{1-4}		P_{2X2}
	Glu R3	NR2B	Glu R7	γ_{1-4}	α3	γ		P_{2X3}
	Glu R4	NR2C	KA1	δ	α4	δ		P_{2X4}
		NR2D	KA2	ε	β			P_{2X5}
				ρ_{1-3}				P_{2X6}
								P_{2X7}

RECETTORI CANALE PER L' ACETILCOLINA o RECETTORI NICOTINICI



Torpedo

Figura 7.2 Struttura del recettore nicotinico periferico dell'acetilcolina (nAChR). **a**, Il nAChR periferico è un pentamero costituito da cinque subunità che circoscrivono un poro centrale acquoso. **b**, Ogni subunità del recettore è composta da quattro segmenti transmembranari idrofobici (M1-M4). La subunità M2 costituisce la parete del poro. **c**, Ricostruzione di immagini ottenute al microscopio elettronico del recettore nicotinico per l'ACh presente sulla giunzione neuroelettrica dell'organo elettrico della razza (Torpedo; risoluzione 1,7 nm). Si vede la superficie esterna e interna del recettore e la regione del poro all'interno della membrana. Il diametro complessivo del recettore è di 8,5 nm (a, b, modificato da ER. Kandel et al., Principles of neural science, McGraw-Hill, 2000; c, modificato da C. Toyoshima, N. Unwin, Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes, Nature 336: 247-50, 1988).

Heteromeric MuscleAChRs

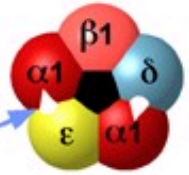
Subunits: α1, β1, γ, δ, ε

$(\alpha1)_2\beta1\gamma\delta$

Fetal Form

$(\alpha1)_2\beta1\varepsilon\delta$

Adult Form



ACh Binding Site
At Subunit Interface

Homomeric Neuronal AChRs

Subunits: α7-α10

$(\alpha7)_5$

Major Subtype With
High Affinity for αBgt
in Both Brain and Ganglia

Heteromeric Neuronal AChRs

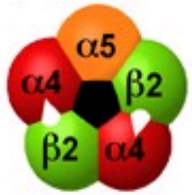
Subunits: α2-α6, β2-β4

$(\alpha4)_2(\beta2)_3$

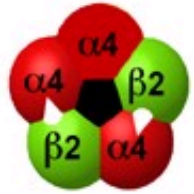
Major Brain
Subtype With High
Affinity for Nicotine

$(\alpha4)_2(\beta2)_2\alpha5$

Likely
Variants

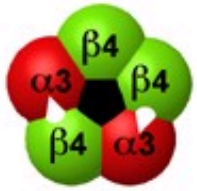


$(\alpha4)_3(\beta2)_2$



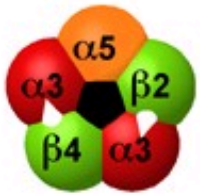
$(\alpha3)_2(\beta4)_3$

Major Ganglion
Subtype



$(\alpha3)_2\beta2\beta4\alpha5$

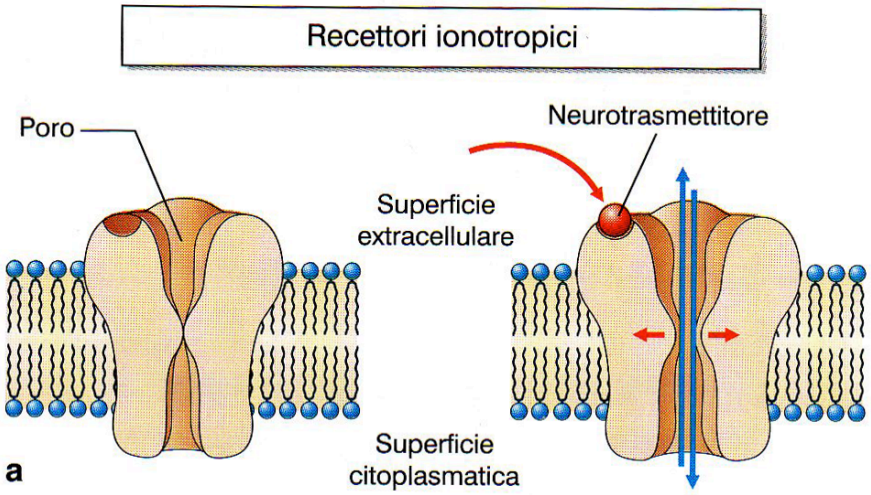
Likely
Variants



$(\alpha3)_2(\beta4)_2\alpha5$

Modalità d'azione dei neurotrasmettitori:

- Canali ionici ligando-dipendenti (Recettori ionotropici)
- Recettori accoppiati a proteine G (Recettori metabotropici)



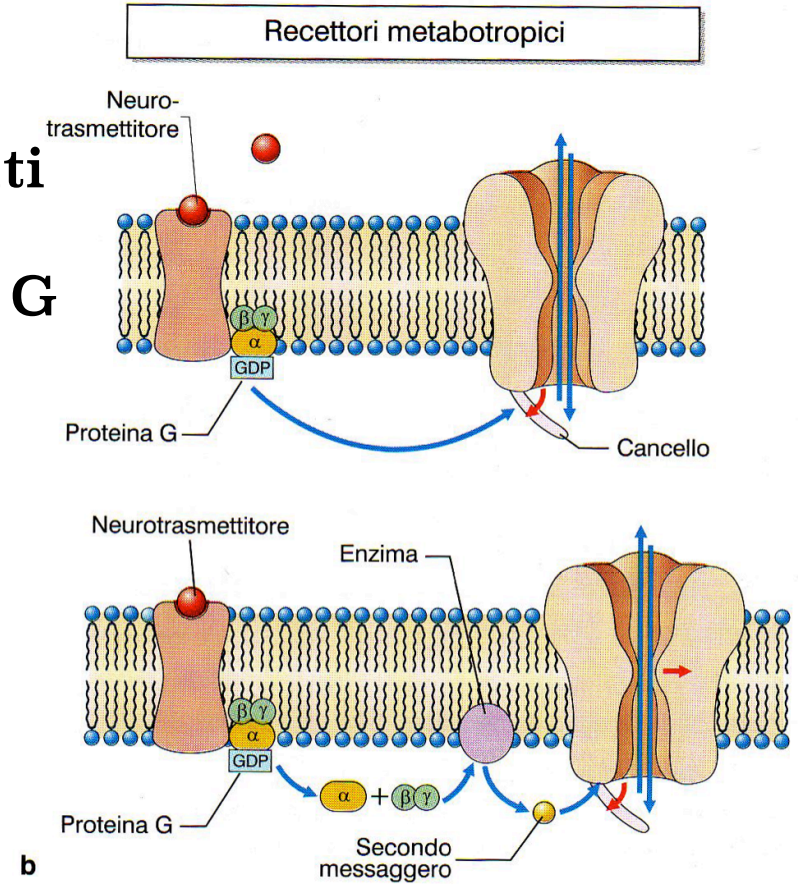


Figura 7.1 Recettori ionotropici e metabotropici. **a**, Recettore ionotropico costituito da singole macromolecole unite insieme a formare un poro (canale ionico). Il legame del neurotrasmettitore al recettore causa l'apertura del canale ionico. **b**, Recettore metabotropico, accoppiato a canali ionici (a destra) mediante proteina G (in alto) o proteina G e secondi messaggeri (in basso) (modificata da G. Nicholls et al., From neuron to brain, Sinauer, 2001).

Recettori per l'acetilcolina

AChRs

1. RECETTORI NICOTINICI

(ionotropici)

Pianta del tabacco

2. RECETTORI MUSCARINICI

(metabotropici)

Amanite muscaria

CORRENTE CATIONICA

SECONDI MESSAGGERI

RECETTORI MUSCARINICI (metabotropici)

Tabella 7.1 Recettori metabotropici dell'acetilcolina (muscarinici)

Recettore	*Localizzazione*	*Risposta funzionale*	*Secondi messaggeri e risposta cellulare*
M_1	SNC: corteccia, ippocampo Ghiandole esocrine: gastriche, salivari eccetera	Eccitazione SNC (memoria?) Secrezione gastrica	↑ IP_3, DAG, depolarizzazione, eccitazione (EPSP lento) ↑ conduttanza per il K^+
M_2	SNC: ubiquitario Cuore: atrio	Inibizione neuronale, tremori, ipotermia Inibizione cardiaca	↓ inibizione cAMP ↓ conduttanza per il Ca^{2+} ↑ conduttanza per il K^+
M_3	Ghiandole esocrine: gastriche salivari eccetera Muscolo liscio: tratto GI occhio Vasi sanguigni: endotelio	 Secrezione gastrica Secrezione salivare Contrazione Accomodazione Vasodilatazione	 ↑ IP_3 ↑ $[Ca^{2+}]_i$
M_4	SNC: corteccia, striato (Polmoni?)	Locomozione accentuata	↓ inibizione cAMP ↓ conduttanza per il Ca^{2+} ↑ conduttanza per il K^+
M_5	SNC: sostanza nera Ghiandole salivari Iride/muscolo ciliare	Ignota	↑ IP_3 ↑ $[Ca^{2+}]_i$

↑, aumento; ↓, diminuzione; IP_3: inositolo 1,4,5-trisfosfato; DAG: diacilglicerolo; GI: gastrointestinale; EPSP, potenziale postsinaptico eccitatorio; cAMP, adenosin-monofosfato ciclico; $[Ca^{2+}]_i$, concentrazione intracellulare di calcio.

Sinapsi: punti di contatto specializzati tra diversi neuroni o tra un neurone e un organo effettore come una fibra muscolare, una ghiandola o un vaso sanguigno.

SINAPSI CHIMICHE

- rapide (recettori ionotropici)
- lente (recettori metabotropici)

SINAPSI ELETTRICHE

Le Sinapsi:

Elettriche

Gap junction (arrows) between astrocyte processes.
Scale = 200 nm.

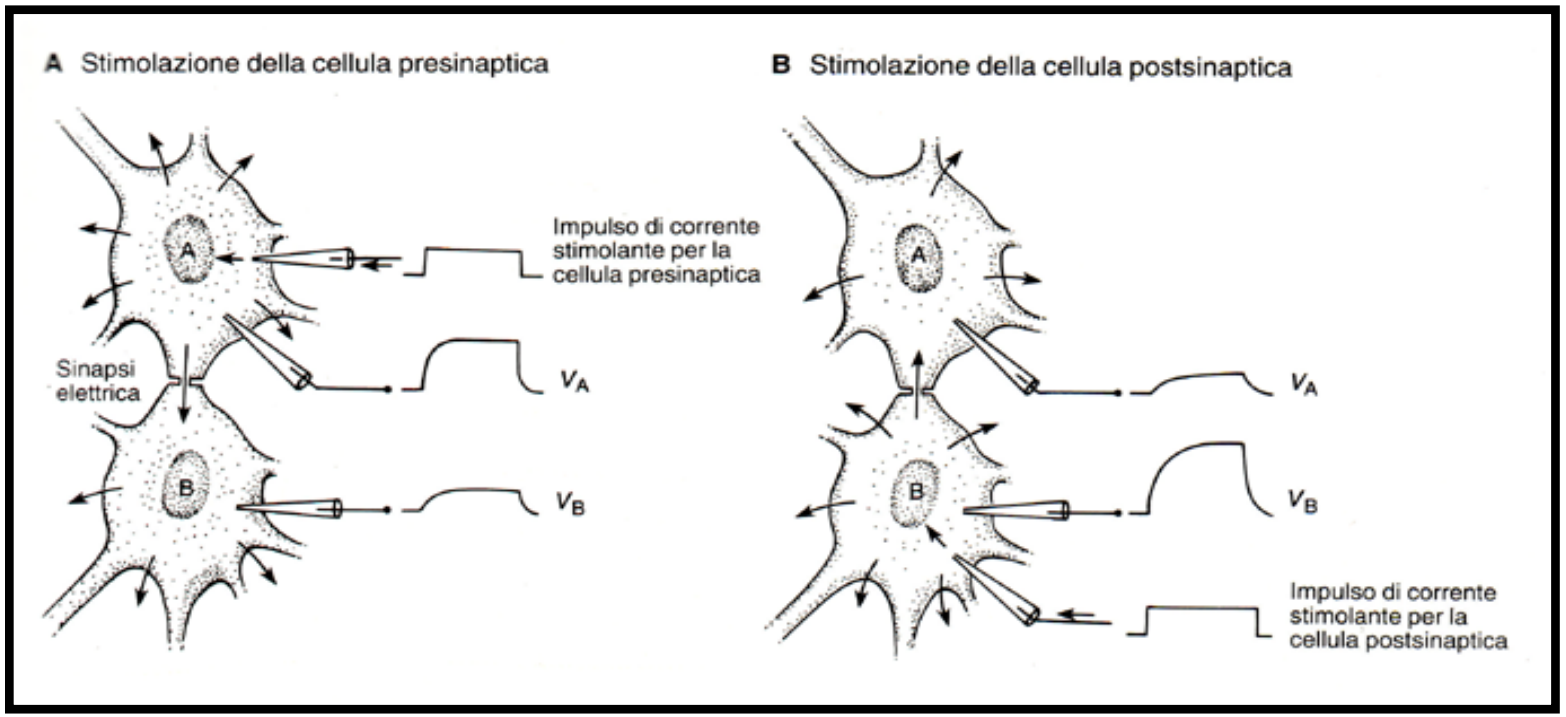
Chimiche

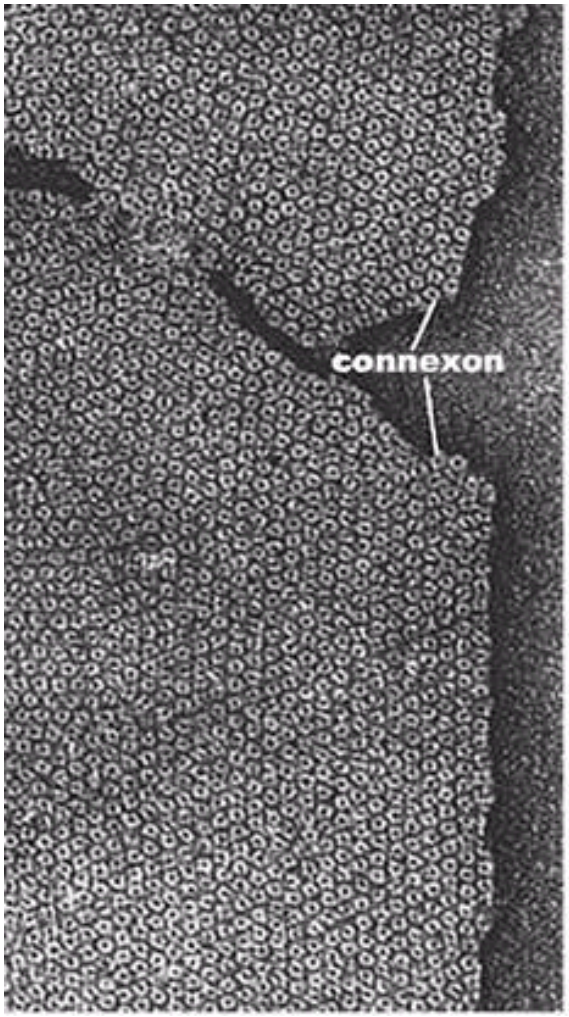
Chemical Synapse (arrows) between neurons.
Scale = 500 nm.

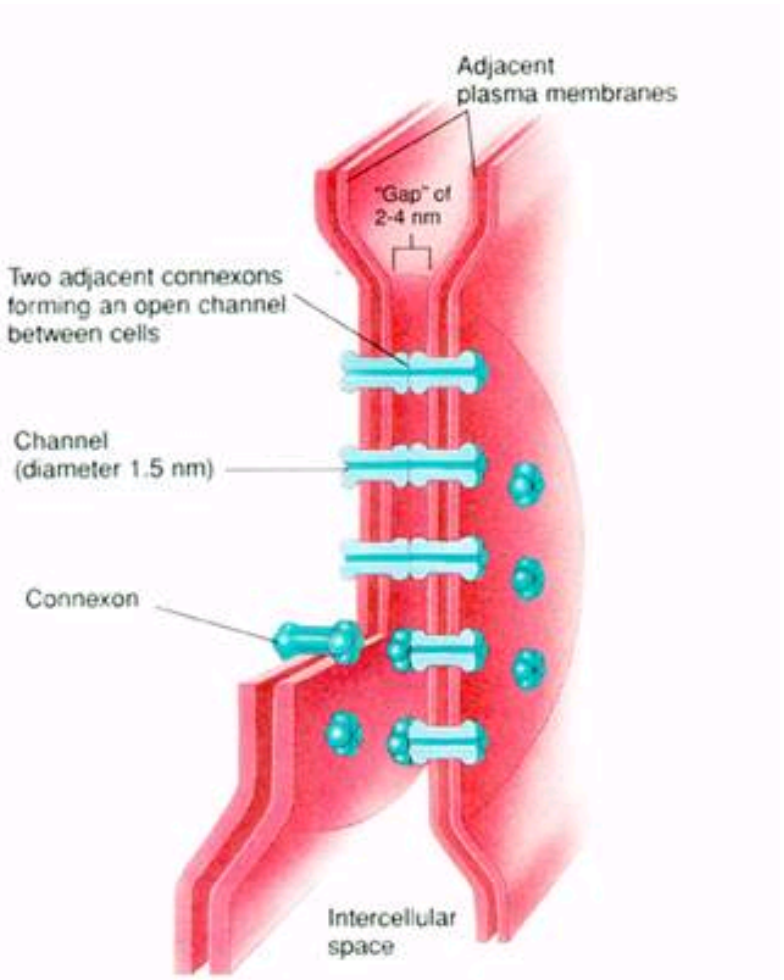
SINAPSI ELETTRICHE

- Sistema nervoso centrale e periferico degli invertebrati

- Sistema nervoso dei vertebrati prevalentemente durante lo sviluppo post natale e miocardio.


A Stimolazione della cellula presinaptica
B Stimolazione della cellula postsinaptica
A
B
Impulso di corrente stimolante per la cellula presinaptica
Sinapsi elettrica
V_A
V_B
V_A
V_B
Impulso di corrente stimolante per la cellula postsinaptica


connexon


Adjacent
plasma membranes
"Gap" of
2-4 nm
Two adjacent connexons
forming an open channel
between cells
Channel
(diameter 1.5 nm)
Connexon
Intercellular
space

GAP-JUNCTION:
6 connessine formano un connessone

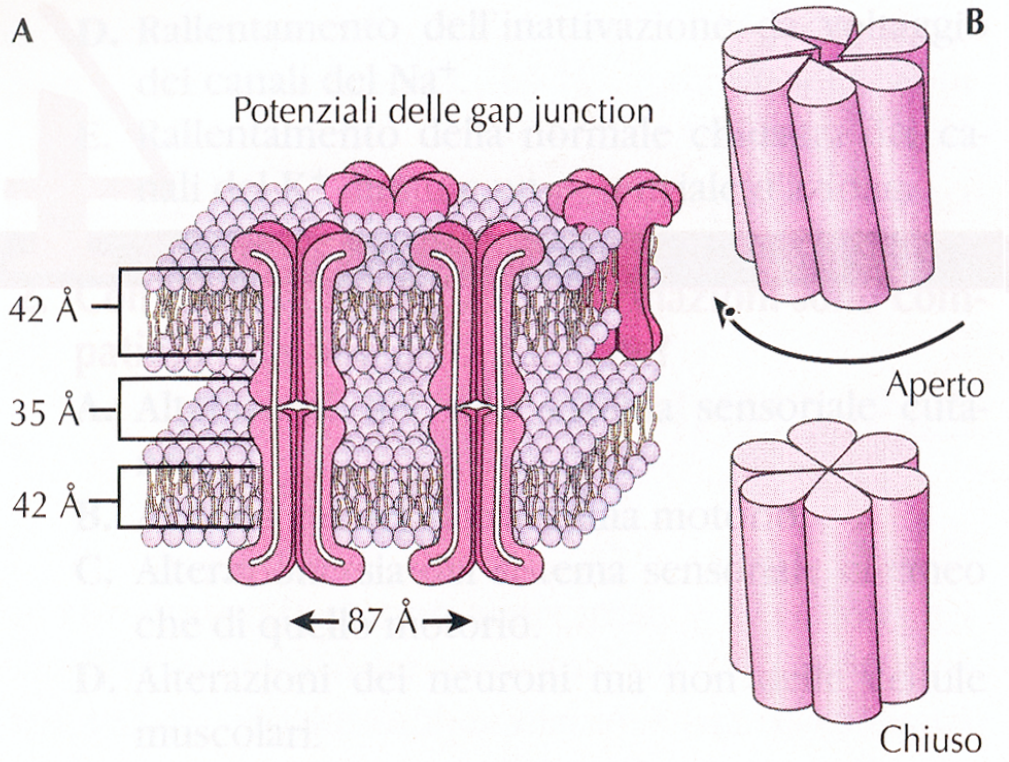


Figura 4-1 **A**, struttura dei canali delle gap junction. **B**, apertura e chiusura del canale di una gap junction. (**A**, rielaborato da Malowski, L. et al, «J Cell Biol», 74:629, 1977; **B**, rielaborato da Unwin, P.N.T. e Zampighi, G., «Nature», 283:45, 1980.)

Il grado di conduttività delle sinapsi elettriche dipende:

1. RESISTENZA

2. GRANDEZZA DELLE SUPERFICI DI CONTATTO

Caratteristiche delle sinapsi elettriche:

- **la loro apertura e chiusura è soggetta a modulazione da parte del pH, ioni calcio, nucleotidi ciclici e da neurotrasmettitori**

- **la propagazione del segnale è RAPIDA ed EFFICIENTE: permette la sincronizzazione di un gran numero di cellule (es. muscolo cardiaco). La velocità di propagazione del segnale permette le reazioni di fuga dell'animale in caso di attacco**

FIGURE 9.1 Electrical and Chemical Synaptic Transmission. (A) At electrical synapses, current flows directly from one cell to another through connexons, intercellular channels that cluster to form gap junctions. (B) At a chemical synapse, depolarization of the presynaptic nerve terminal triggers the release of neurotransmitter molecules, which interact with receptors on the postsynaptic neuron, causing excitation or inhibition.

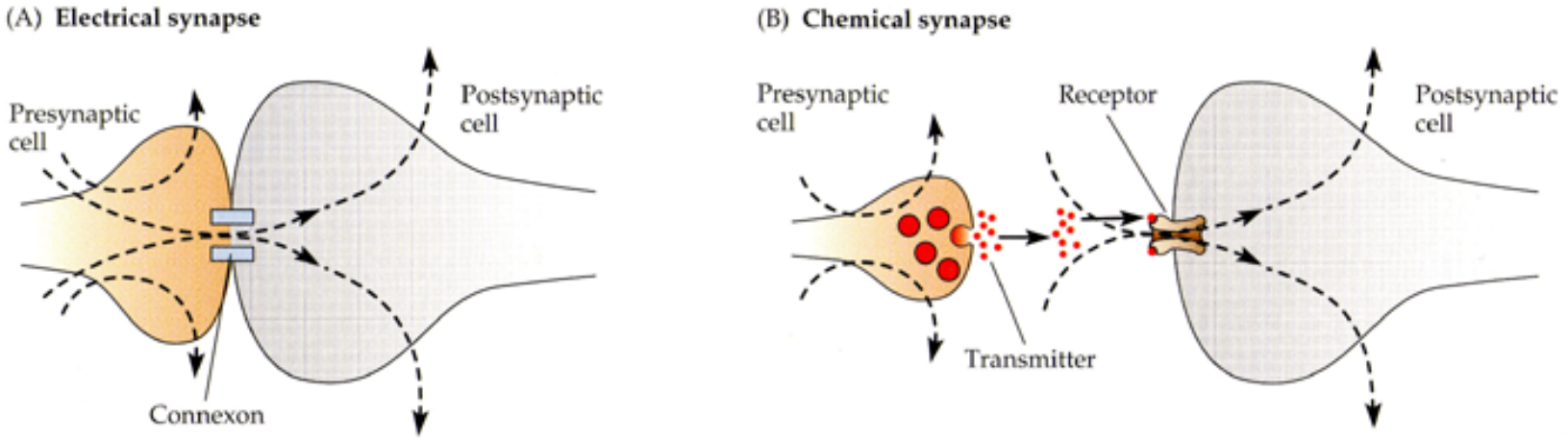


Tabella 9-1 Proprietà distintive delle sinapsi elettriche e chimiche.

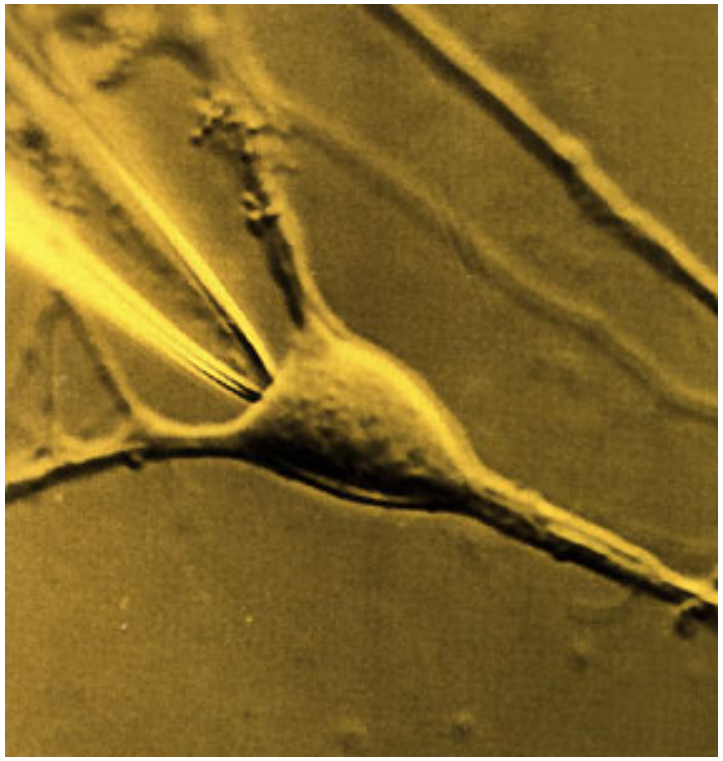
Proprietà	Sinapsi elettriche	Sinapsi chimiche
1. Distanza fra le membrane pre- e postsinaptiche	3,5 nm	30-50 nm
2. Continuità citoplasmatica fra cellula pre- e postsinaptica	Sì	No
3. Componenti ultrastrutturali	Canali delle giunzioni comunicanti	Zone attive e vescicole presinaptiche; recettori postsinaptici
4. Agenti della trasmissione	Correnti ioniche	Neurotrasmettitori
5. Ritardo sinaptico	Virtualmente assente	Apprezzabile: al minimo 0,3 ms, in generale 1-5 ms o più
6. Direzione della trasmissione	Generalmente bidirezionale	Unidirezionale

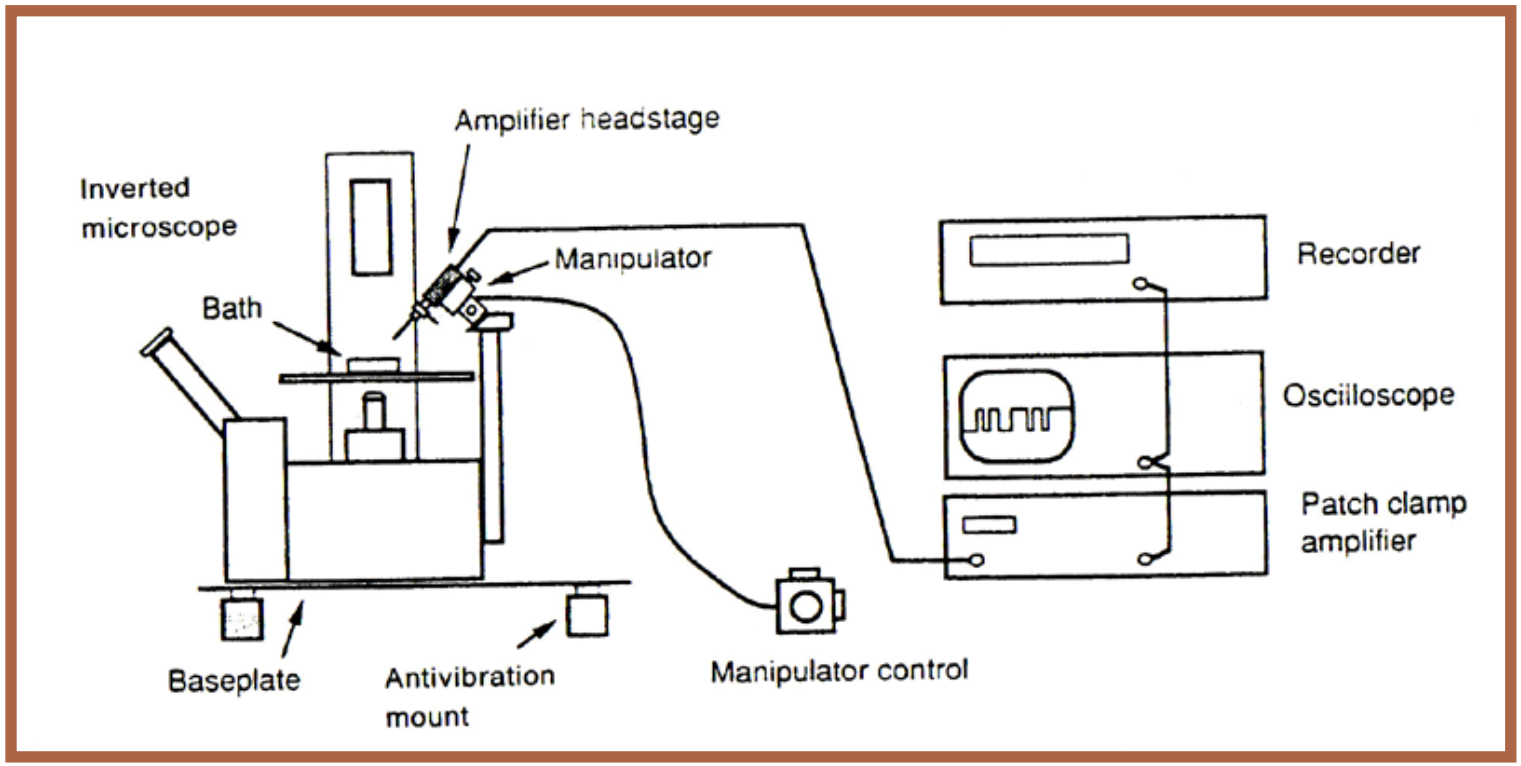
La Tecnica del *Patch Clamp*

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991

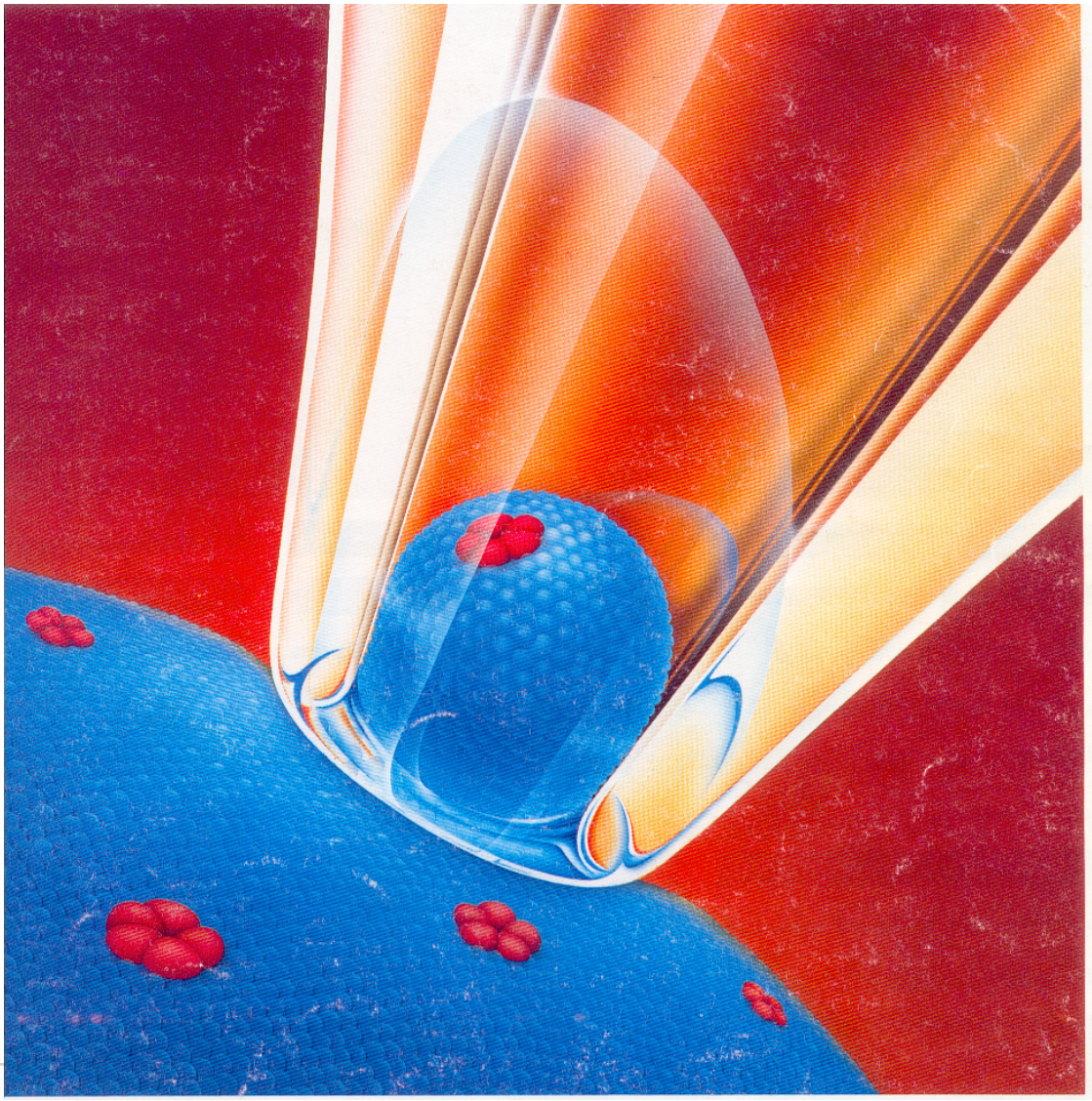
Bert **Sakmann**

Erwin **Neher**

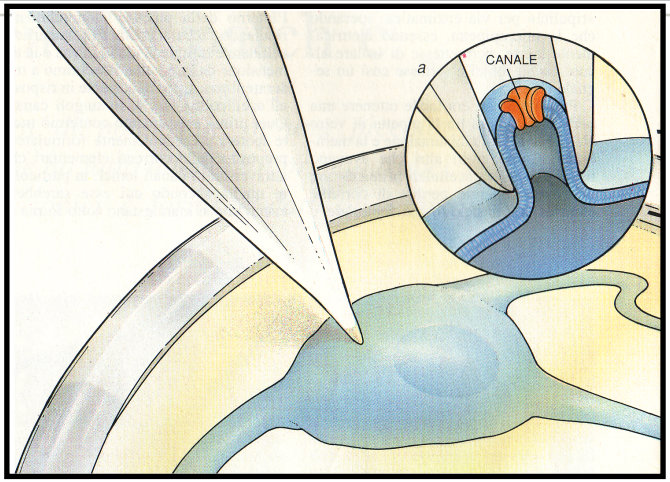


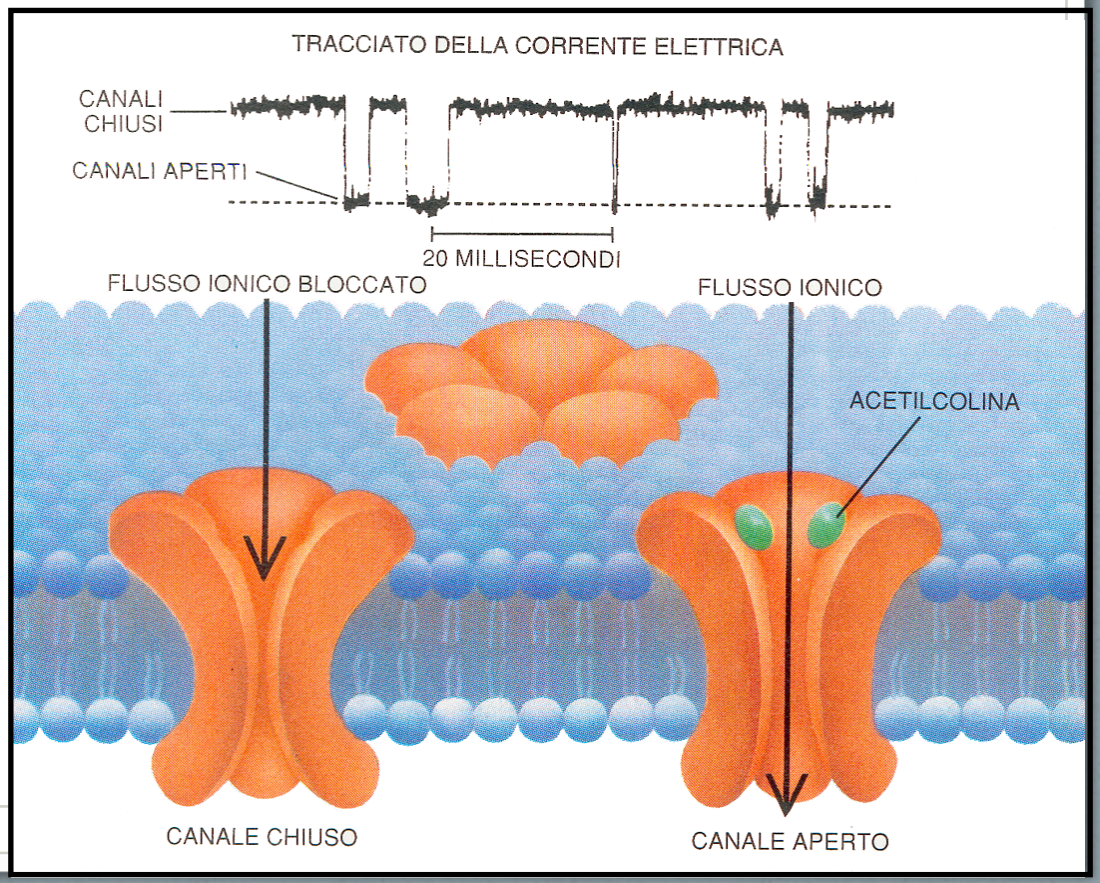

Amplifier headstage
Inverted microscope
Manipulator
Bath
Recorder
Oscilloscope
Patch clamp amplifier
Baseplate
Antivibration mount
Manipulator control

Come si studiano i canali ionici: il *patch clamp*



Le singole aperture del canale ionico



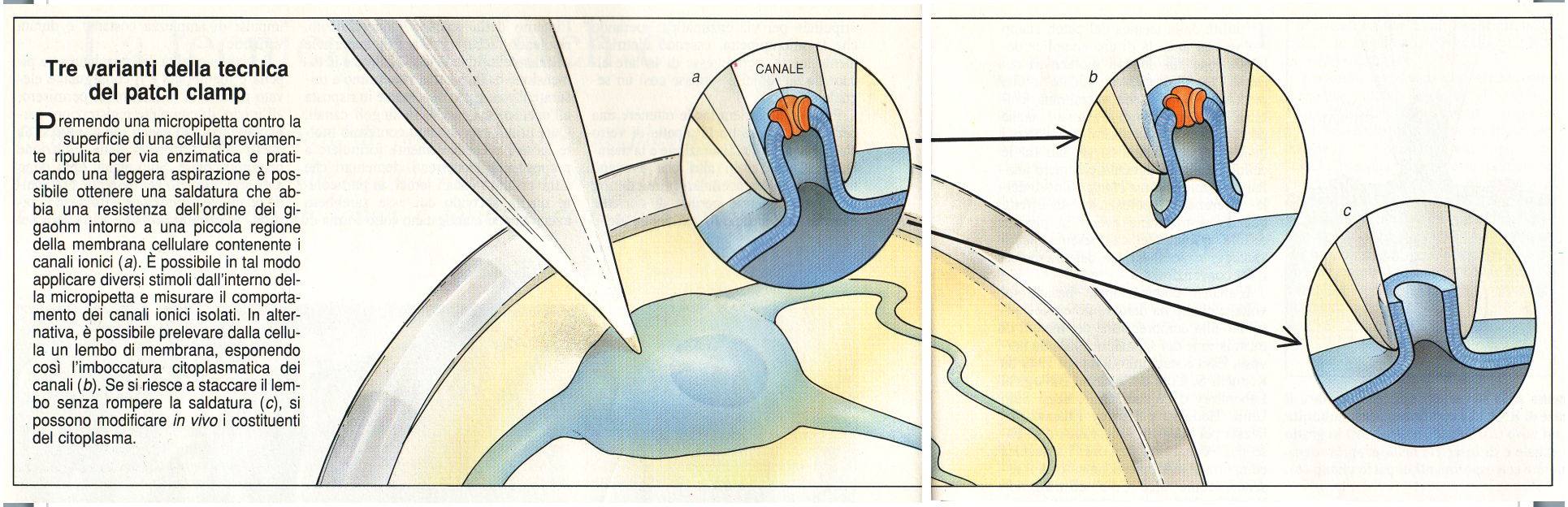


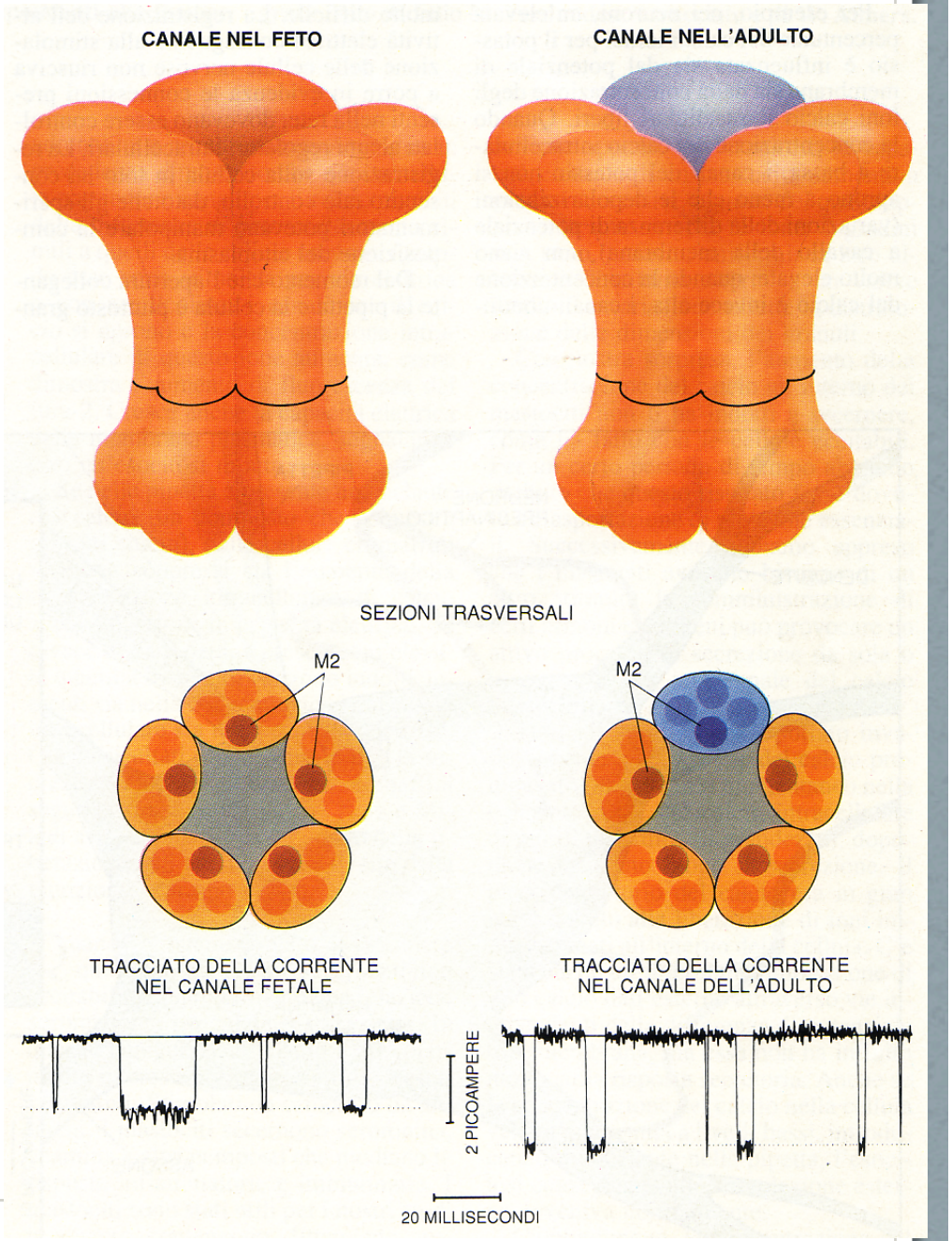
Le tre configurazioni del *patch clamp*

a) cell-attached

b) excised-patch (outside out; inside out)

c) whole-cell



Conduttanza e cinetica:

- tempo medio di apertura
- ampiezza della corrente