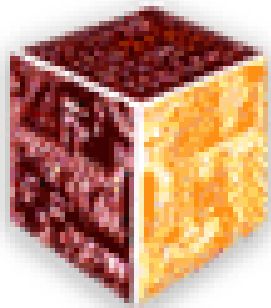


UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI **TERAMO**

Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

Prof.ssa Luisa Gioia



Corso di laurea BIOTECNOLOGIE

Fisiologia cellulare e Laboratorio di Colture cellulari

UNIVERSITA'
DEGLI STUDI
DI TERAMO

**IL MATERIALE CONTENUTO IN QUESTE
DIAPOSITIVE E' AD ESCLUSIVO USO DIDATTICO PER
L'UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI TERAMO.**

ALCUNE IMMAGINI CONTENUTE SONO STATE TRATTE DAI
SEGUENTI LIBRI:

“Biologia molecolare della cellula” – Bruce Alberts *et al.* (Ed. Zanichelli)

“FISIOLOGIA Molecole, cellule e sistemi” – Egidio D'Angelo e Antonio
Peres (Edi-ermes)

“Introduzione alle colture cellulari” - G.L. Mariottini *et al.* (Ed. Tecniche
nuove)

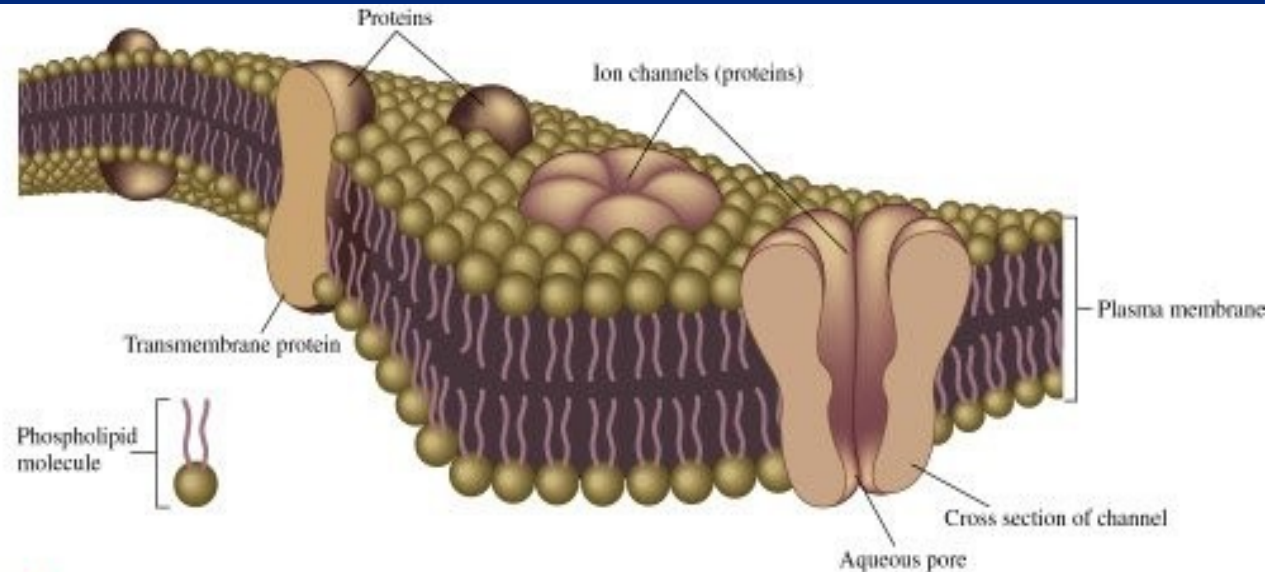
“Cell Biology: a short course” – S.R. Bolsover *et al.*
(Ed. Wiley-Blackwell)

Proprietà elettriche delle membrane biologiche

Costituenti strutturali della membrana danno origine a alle **proprietà elettriche**:

Capacità: determinata dall'impermeabilità agli ioni del doppio strato lipidico, che consente di mantenere separate le cariche elettriche;

Conduttanza: determinata dai canali ionici provvedono ad un passaggio attraverso cui gli ioni inorganici trasportano cariche attraverso la membrana.



b NEUROBIOLOGY
Gary G. Matthews
Blackwell
Science

Capacità della membrana

(circa 1-3 $\mu\text{Farad}/\text{cm}^2$ nelle membrane biologiche)

Le membrane cellulari essendo molto sottili ($d < 100 \text{ \AA}$) possono violare, a livello microscopico, il principio di elettroneutralità delle soluzioni e separare cariche elettriche negative da un lato e positive dall'altro lato della membrana che verranno ad interagire tra loro a causa del ridotto spessore della membrana

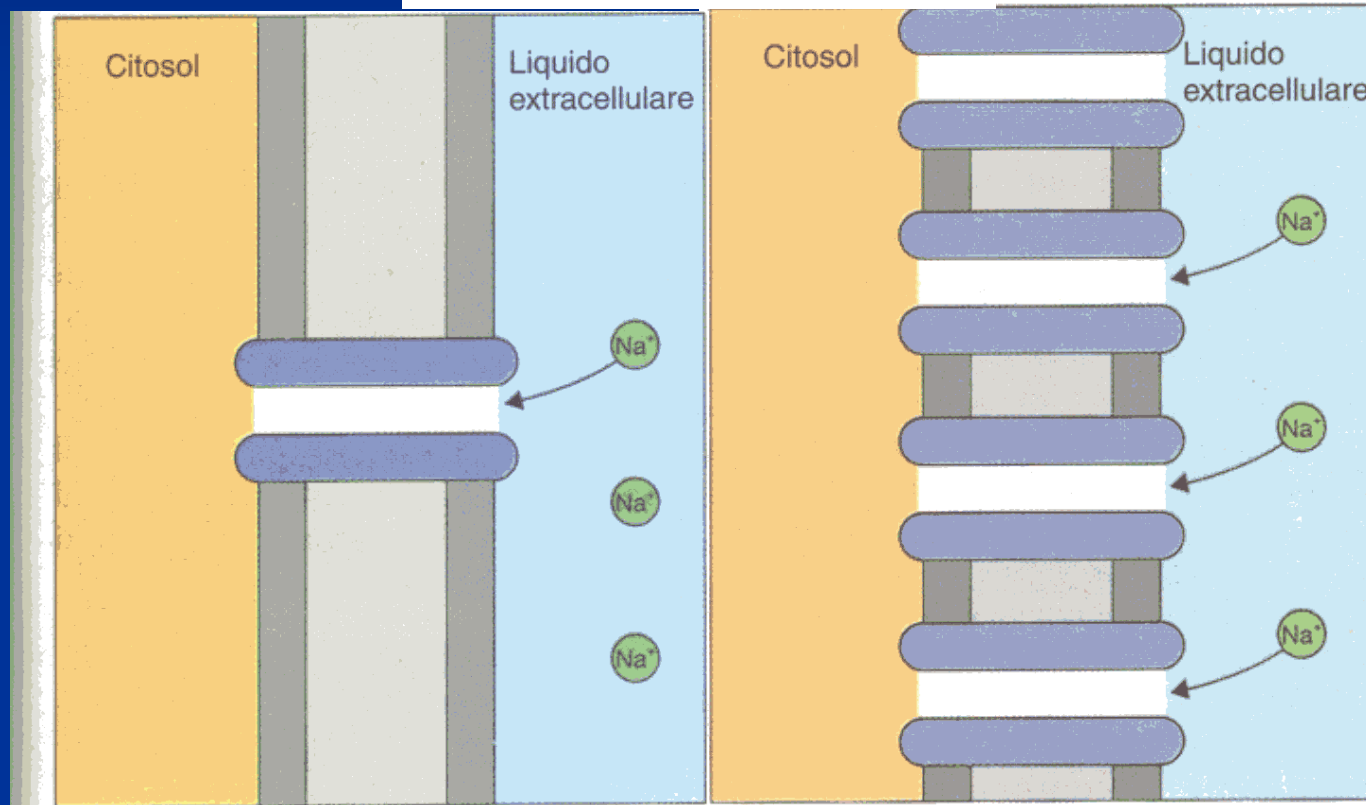
1) **aumenta in proporzione alla costante dielettrica**

-la costante dielettrica è la proprietà di un isolante come il doppio strato lipidico di separare cariche elettriche

2) **diminuisce in relazione allo spessore della membrana**

Conduttanza della membrana

La conduttanza della membrana per ciascuna specie ionica dipende dal numero di canali specifici presenti sulla membrana.



Bassa conduttanza

(a)

Alta conduttanza

(b)

Importante:

- il numero di canali presenti
- il loro stato di conduttività
- selettività del canale

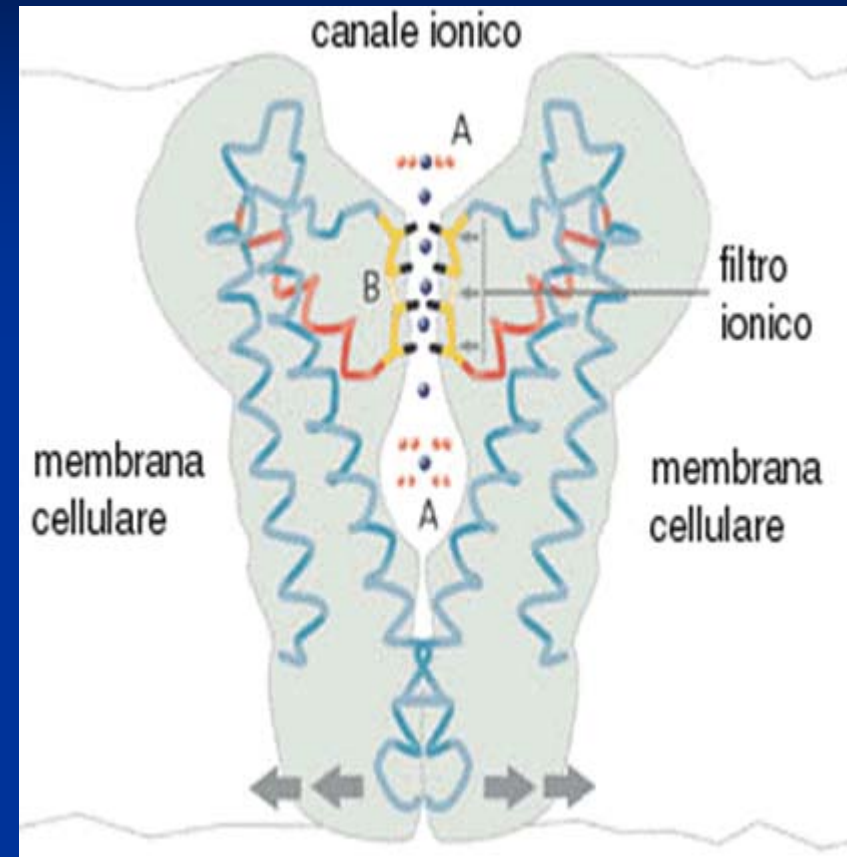
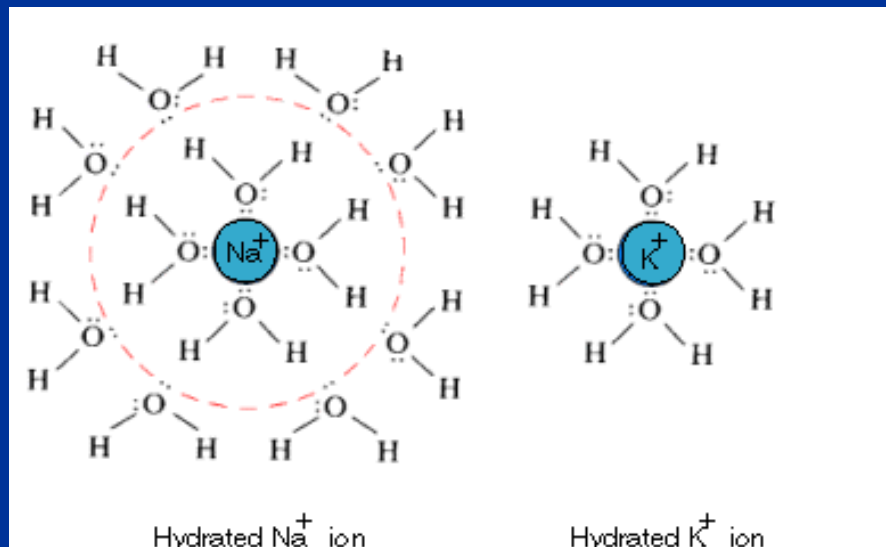
I CANALI IONICI presentano pori stretti e selettivi

Ions must have right **charge**

Ions must have right **size**

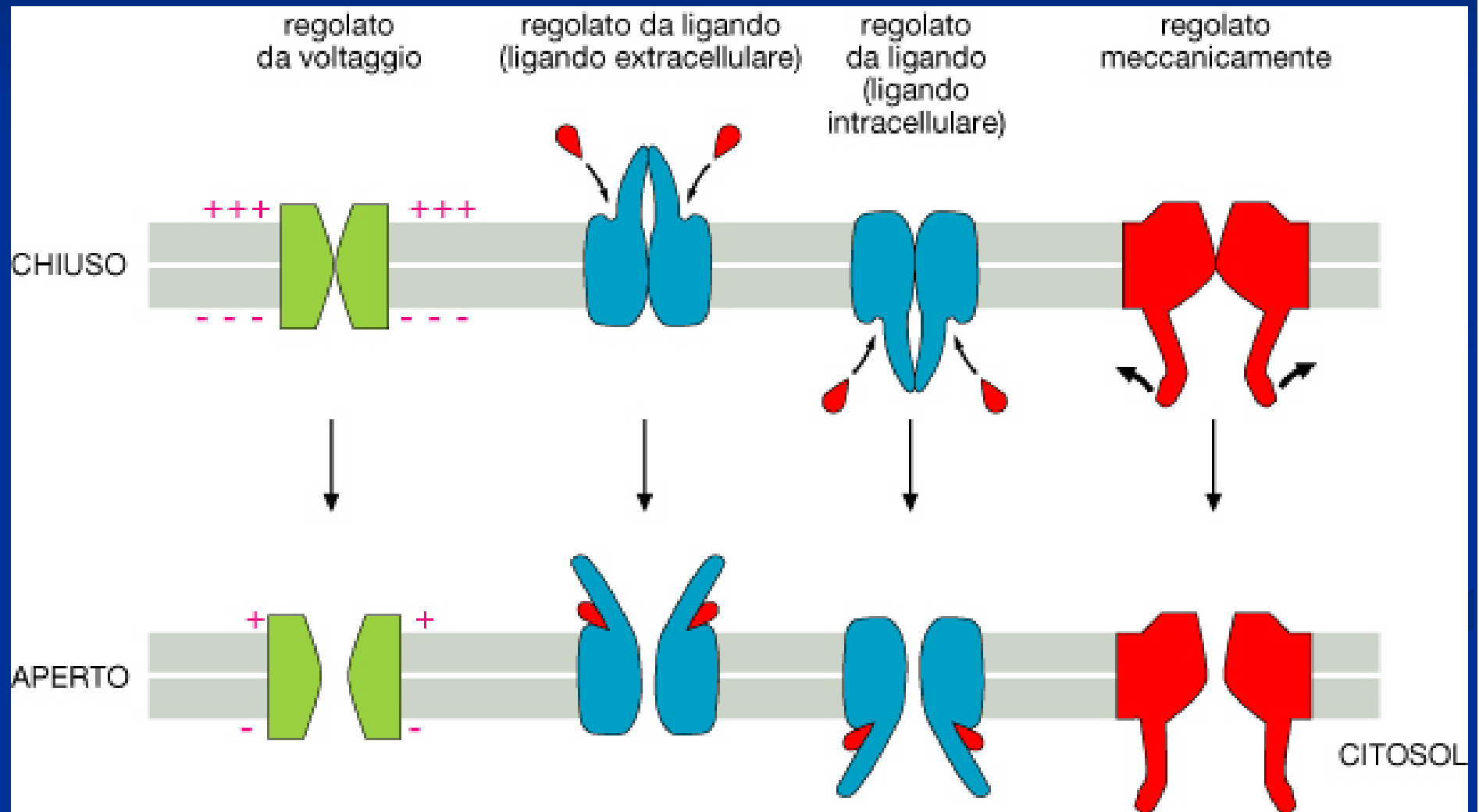
size of central pore

size of the **hydrated ion**



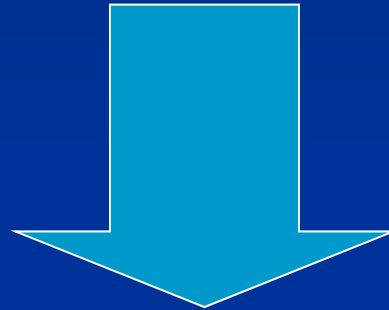
Canali ionici

- **Regolati** (possono «aprirsi e chiudersi»: *gating*)
- **Alcuni “non regolati”**



Canali ionici “non regolati”

UN TIPO IMPORTANTE DI CANALE IONICO
è CHIAMATO **LEAK CHANNEL**
(o **canale passivo**)

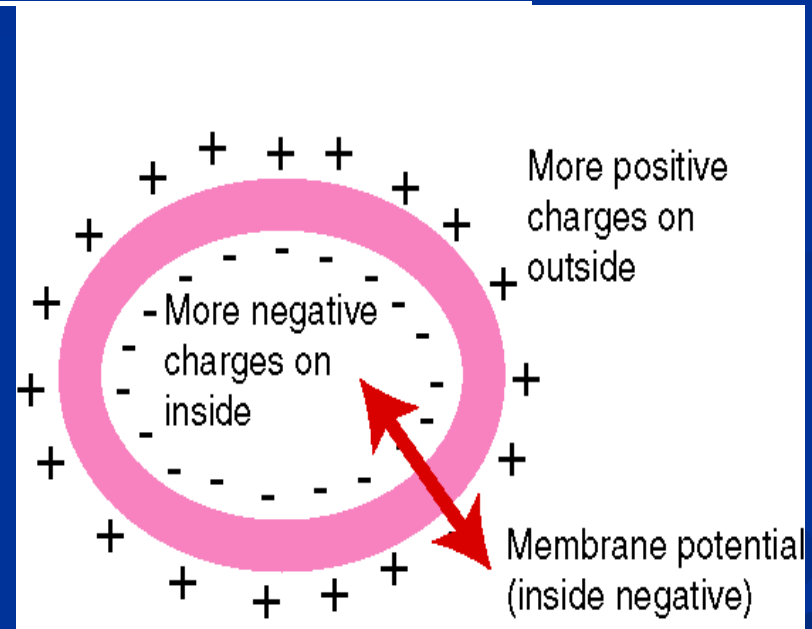


**I K⁺-LEAK CHANNELS HANNO UN
RUOLO CRUCIALE NEL MANTENIMENTO DEL
POTENZIALE DI MEMBRANA**

Un VOLTAGGIO (V_m = differenza di potenziale transmembrana) si forma quando insorge una differenza di cariche elettriche tra il versante citosolico e il versante extracellulare della membrana cellulare

la separazione delle cariche avviene esclusivamente a cavallo della m. mentre le due soluzioni, intra ed extracellulare rimangono elettricamente neutre

distribution of +/- charges not uniform
potential across membrane



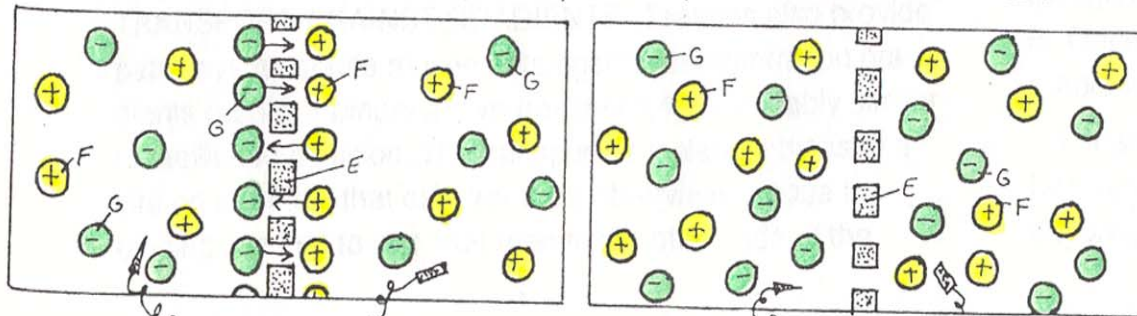
Caratteristiche bioelettriche della membrana cellulare

- quando ioni positivi e negativi sono separati tendono a muoversi gli uni verso gli altri: l'energia associata con questa attrazione (o repulsione) è detta **voltaggio**

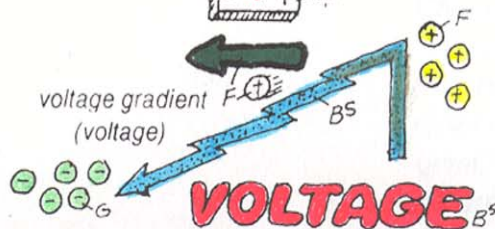
IONIC CURRENT: A VOLTAGE GRADIENT B^S

POSITIVE IONS F
NEGATIVE IONS G

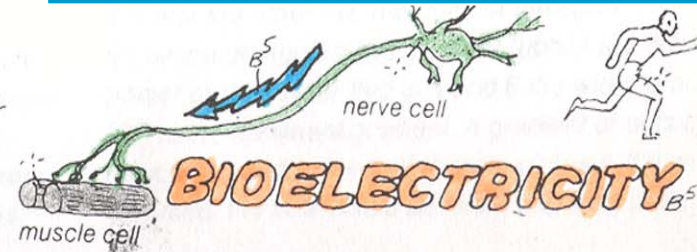
ELECTRIC FORCE B^S



Gli IONI si muovono sotto l'influenza di **forze elettriche** che sorgono perché ioni di segno opposto si attraggono, ioni di segno uguale si respingono



EQUILIBRIUM



Quale valore di potenziale transmembrana ha una cellula "a riposo"?

da cosa dipende il potenziale di riposo di una cellula?

■ **Tutte le cellule presentano una differenza di potenziale transmembrana (V_m) con interno negativo**

■ (prevalentemente valori compresi tra circa -30mV e -90mV)

■ **Le m. cellulari sono polarizzate** (differente distribuzione di cariche ai due lati)

variazioni del potenziale
di membrana

iperpolarizzazioni

depolarizzazioni

Gli elementi fondamentali che determinano il potenziale di membrana sono:

- la differente permeabilità della membrana alle diverse specie ioniche
- le concentrazioni ioniche diverse ai due lati della membrana
- l'attività della pompa sodio-potassio che mantiene costanti queste concentrazioni ed è inoltre elettrogenica

nelle cellule le concentrazioni ioniche e il potenziale transmembrana si mantengono costanti nel tempo al prezzo di un **continuo dispendio energetico**

Ogni ione attraversa la membrana cellulare con 2 modalità:

1. **Trasporto passivo, secondo il proprio gradiente elettrochimico** attraverso vie di permeazione quali canali ionici o sistemi di trasporto facilitati
2. **Trasporto attivo, contro il proprio gradiente elettrochimico** attraverso sistemi di trasporto che consumano energia metabolica (pompe e trasportatori secondariamente attivi)

POTENZIALE DI MEMBRANA

differenza di cariche elettriche sui due lati della membrana, può essere la conseguenza di:

Nel **mitocondrio** la maggior parte del potenziale di membrana è dovuto alle pompe elettrogeniche di H^+ della m. mitocondriale interna

Anche **nei funghi e lieviti** sono pompe elettrogeniche che stabiliscono il potenziale della m. plasmatica.



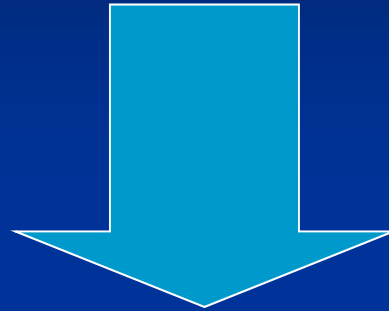
➤ pompaggio elettrogenico attivo

➤ diffusione ionica passiva



K^+

Canali ionici “non regolati”



*I K⁺-LEAK CHANNELS HANNO UN
RUOLO CRUCIALE NEL MANTENIMENTO DEL
POTENZIALE DI MEMBRANA*

Origine del Potenziale di riposo

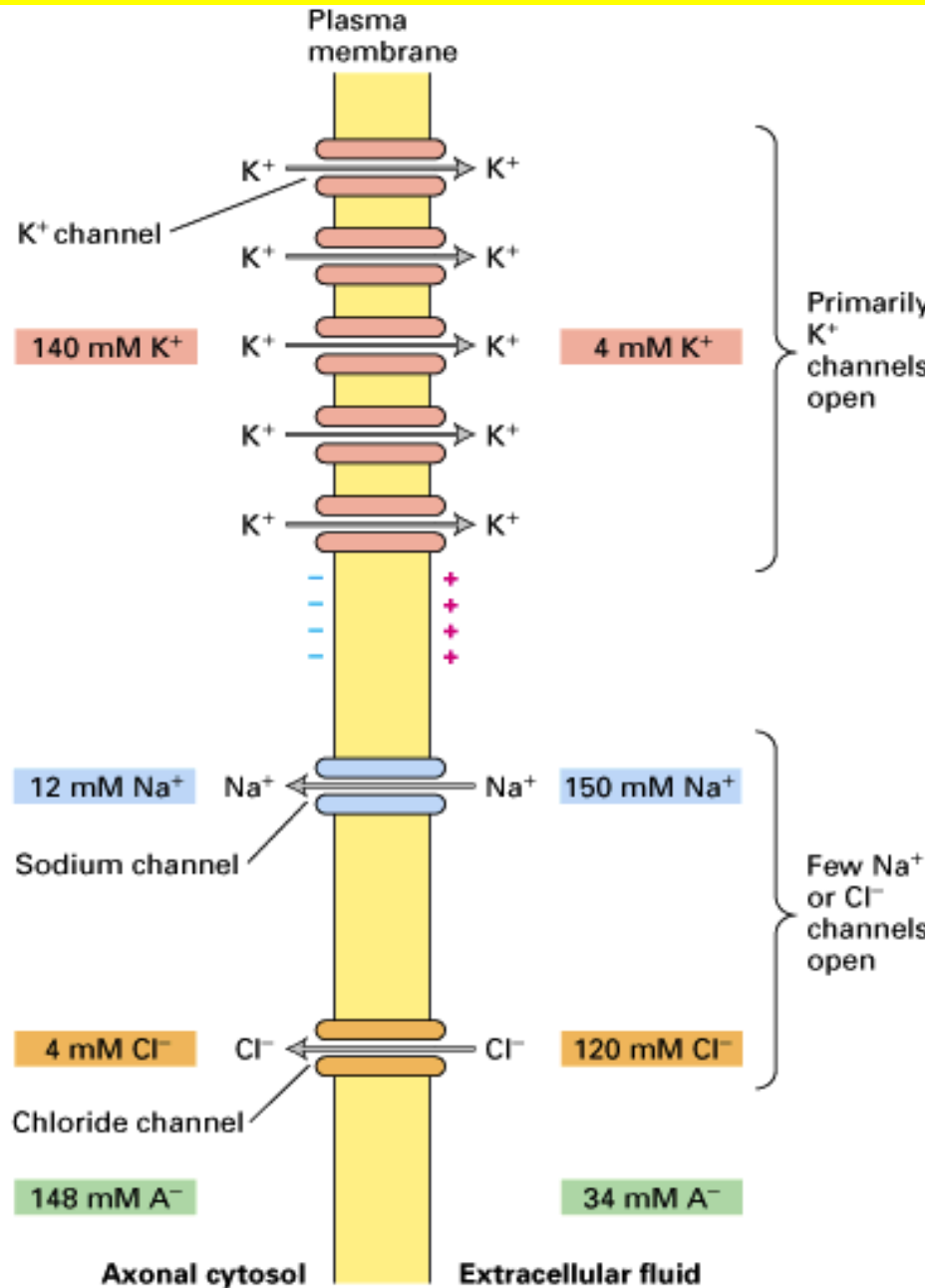
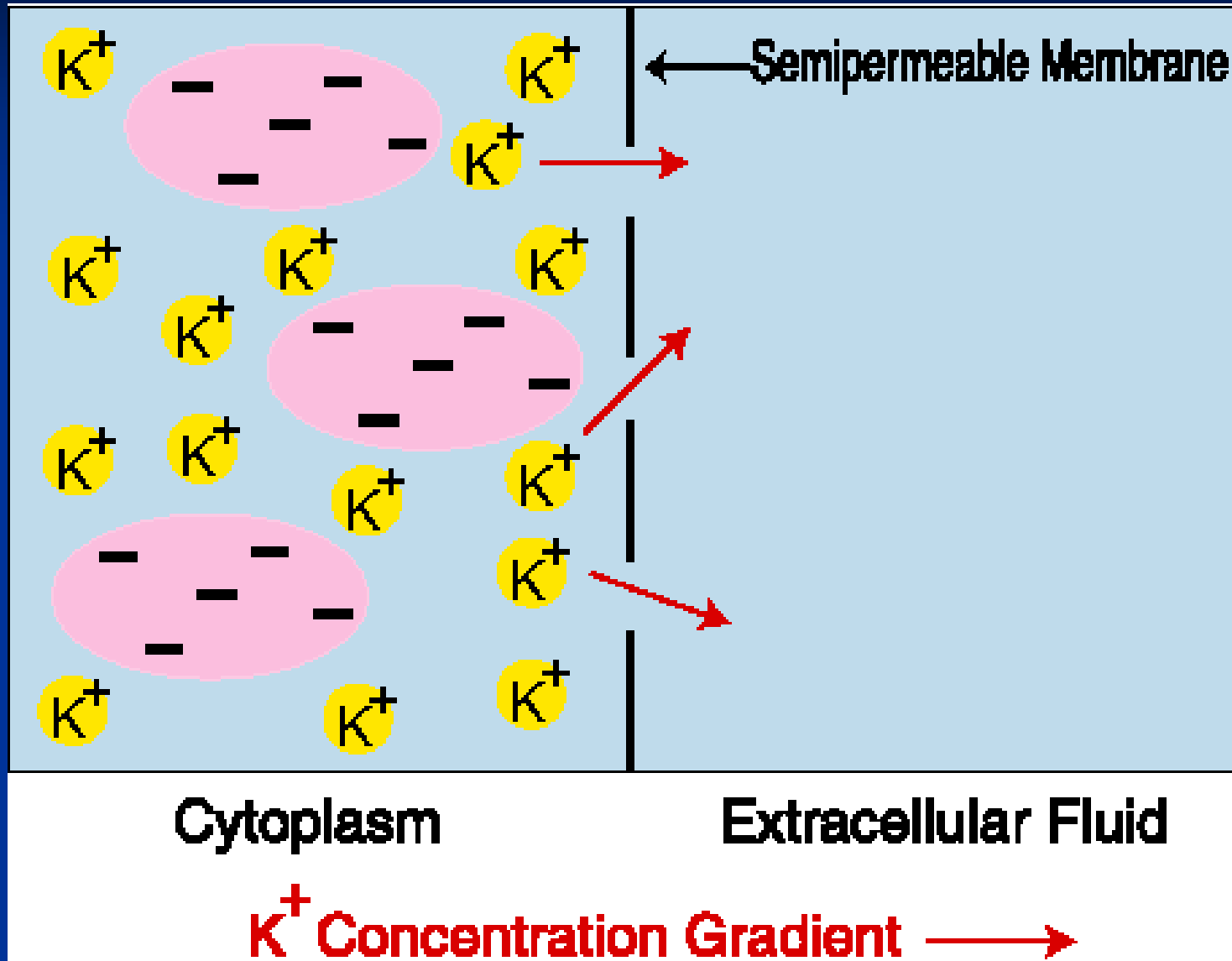


FIGURE 21-9: Origin of the resting potential in a typical vertebrate neuron. The ionic compositions of the cytosol and of the surrounding extracellular fluid are different. A^- represents negatively charged proteins, which neutralize the excess positive charges contributed by Na^+ and K^+ ions. In the resting neuron there are about ten times more open K^+ channels than open Na^+ or Cl^- channels; as a consequence more positively charged K^+ ions exit the cell than Na^+ or Cl^- ions enter, and the outside of the plasma membrane acquires a net positive charge relative to the inside.

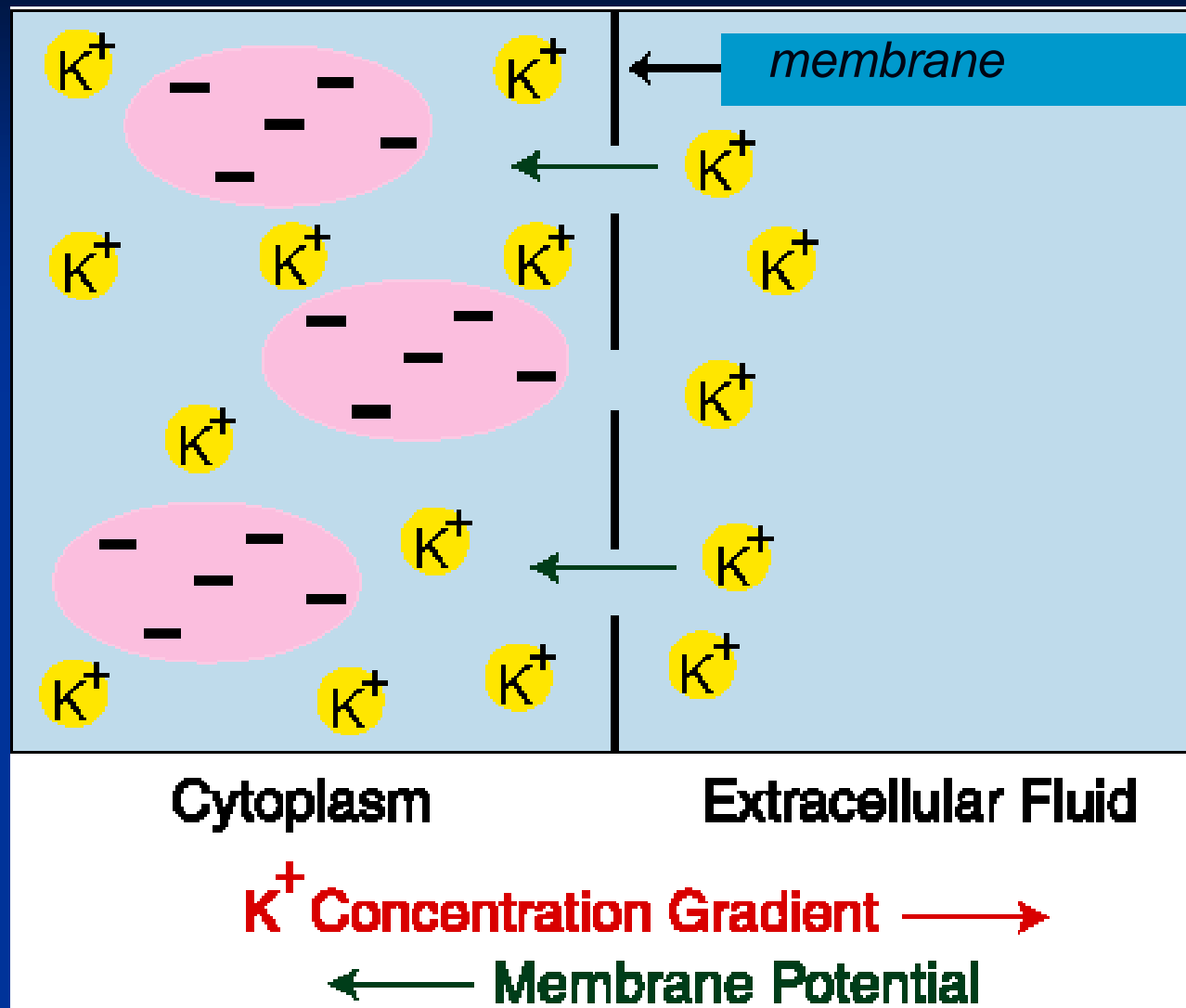
Il potenziale di riposo di una cellula è determinato dall'asimmetrica distribuzione degli IONI nei due ambienti intra ed extracellulare e dalla differente conduttanza alle diverse specie ioniche.

In un neurone vi sono un numero di canali del potassio aperti (*leak channels*) 10 volte maggiore rispetto a quelli del sodio e del cloro

K^+ diffuses out of cell, down concentration gradient



As K^+ leaves, the macromolecules with their many negative charges remain; this leads to development of **membrane potential**

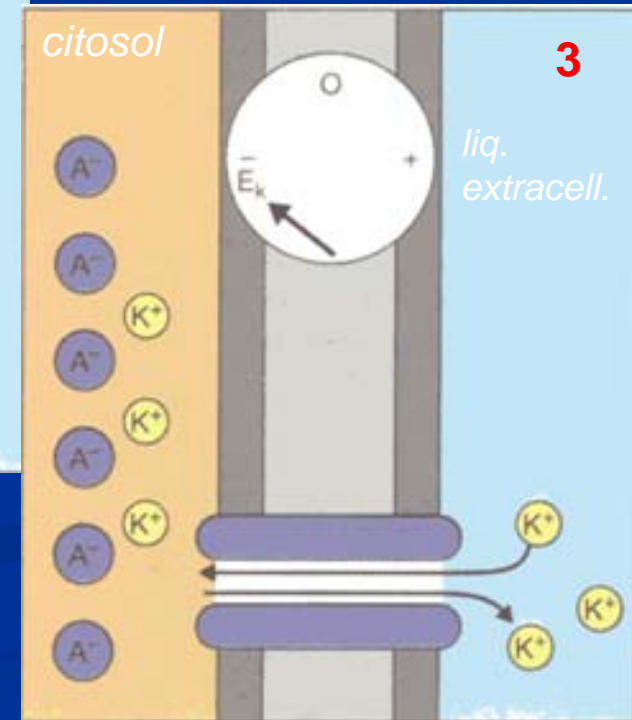
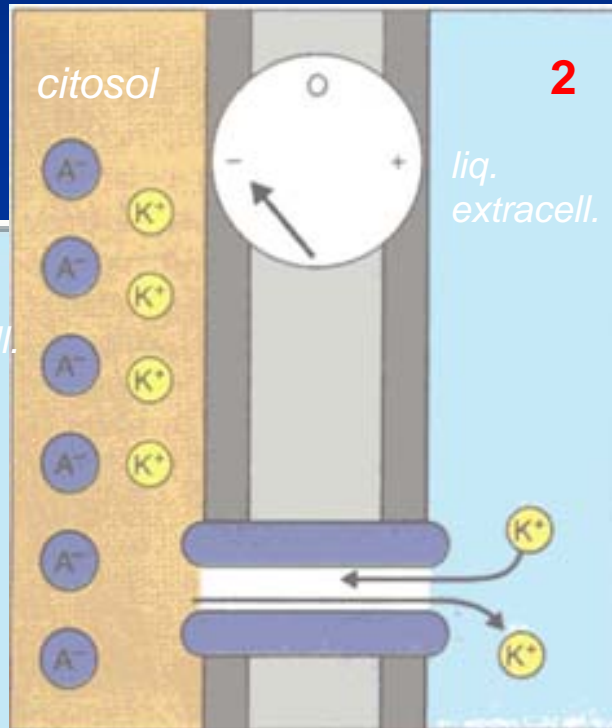
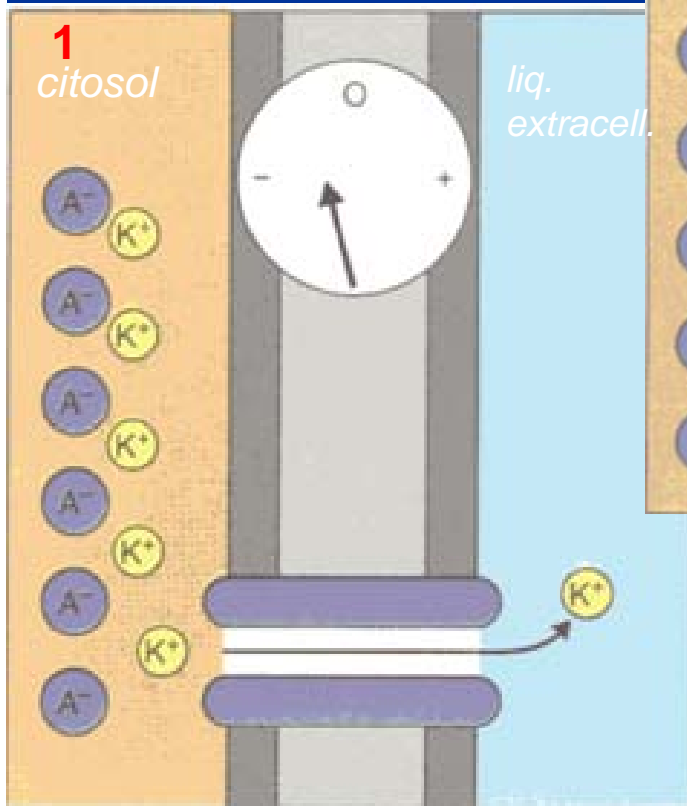
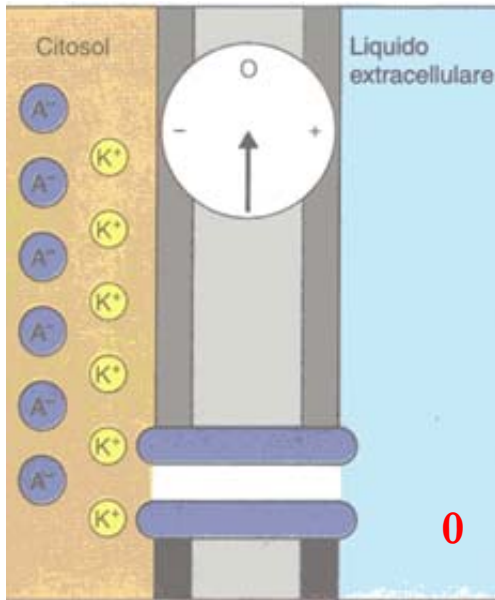


Gradiente elettrochimico = 0 → **POTENZIALE DI EQUILIBRIO** per il K^+

Potenziale di equilibrio per il potassio (E_{K^+})

Quando i due gradienti si equivalgono un numero uguale di ioni K^+ attraversa la m. nelle due direzioni e siamo al E_{K^+}

$$E_{K^+} \sim -90mV$$



➤ Il flusso di uno ione attraverso un canale è spinto dal suo **GRADIENTE ELETTROCHIMICO**

➤ Quando il gradiente elettrochimico è zero non c'è flusso netto per quello ione attraverso il canale

➤ Il potenziale di membrana a cui si raggiunge questo equilibrio si chiama **potenziale di equilibrio per lo ione**

➤ Il potenziale di equilibrio per uno ione si calcola mediante **l'equazione di Nerst**

II POTENZIALE DI EQUILIBRIO di uno ione può essere espresso quantitativamente

Nernst Equation

[X]outside = molar concentration of "X" outside membrane

[X]inside = molar concentration of "X" inside membrane

$$E_x = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X] \text{ outside}}{[X] \text{ inside}}$$

Ex = equilibrium membrane potential (mV)

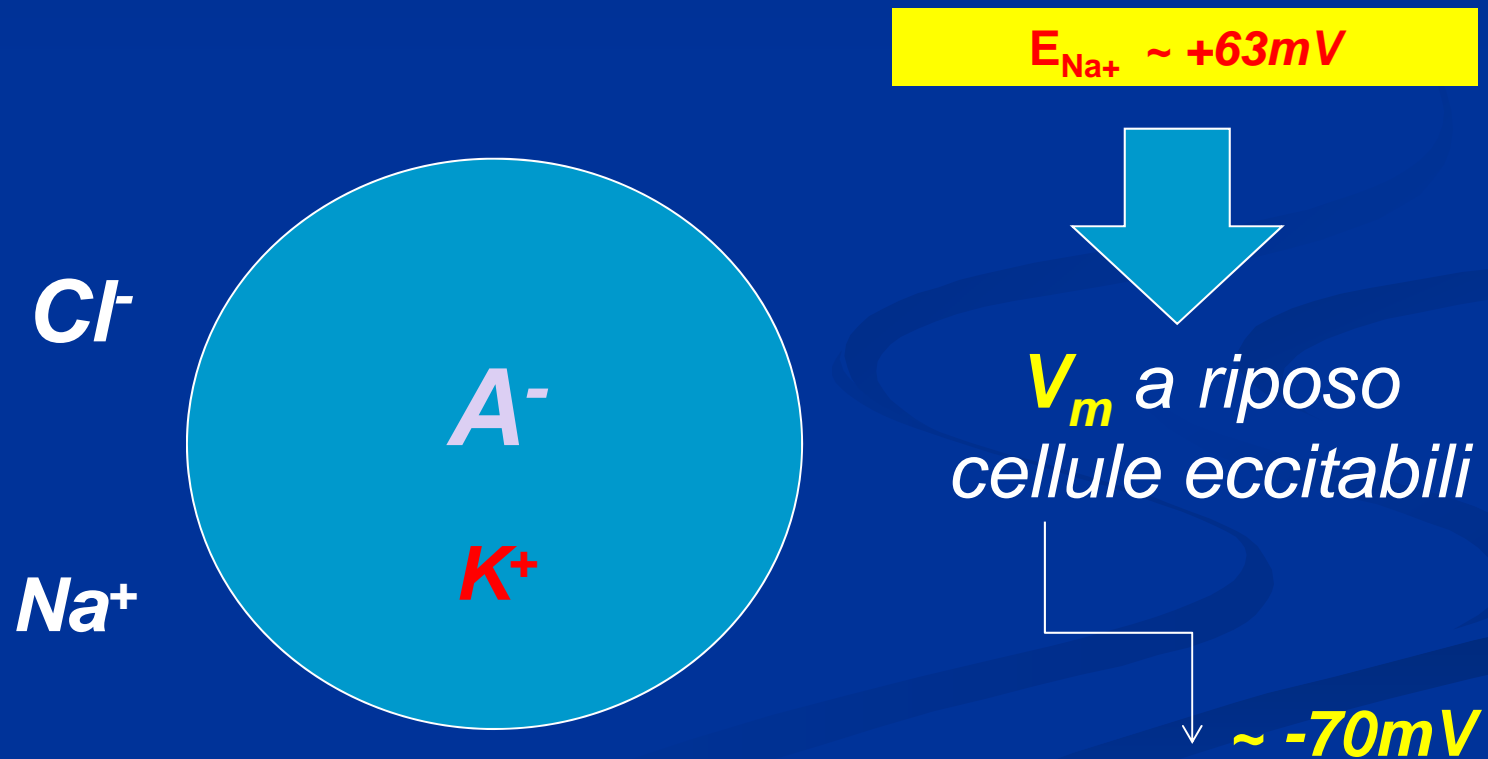
R = gas constant = 1.987 cal/mol K

T = temp in Kelvin degrees

z = charge of the ion

F = Faradays constant = 23,062 cal/mol V

- Nelle cellule il Cl^- si trova molto vicino al suo potenziale di equilibrio. La negatività intracellulare mantiene fuori tale ione
- Lo ione K^+ ha un $E_{\text{K}^+} \sim -90\text{mV}$, poco più negativo del V_m ; nonostante il gradiente sia piccolo il flusso del K^+ non è trascurabile perché la m . è molto permeabile al K^+
- Il Na^+ è molto lontano dall'equilibrio perché il suo E_{Na^+} è $\sim +63\text{mV}$; nonostante l'elevato gradiente il flusso di Na^+ è molto piccolo a causa della bassa permeabilità della m . a questo ione.

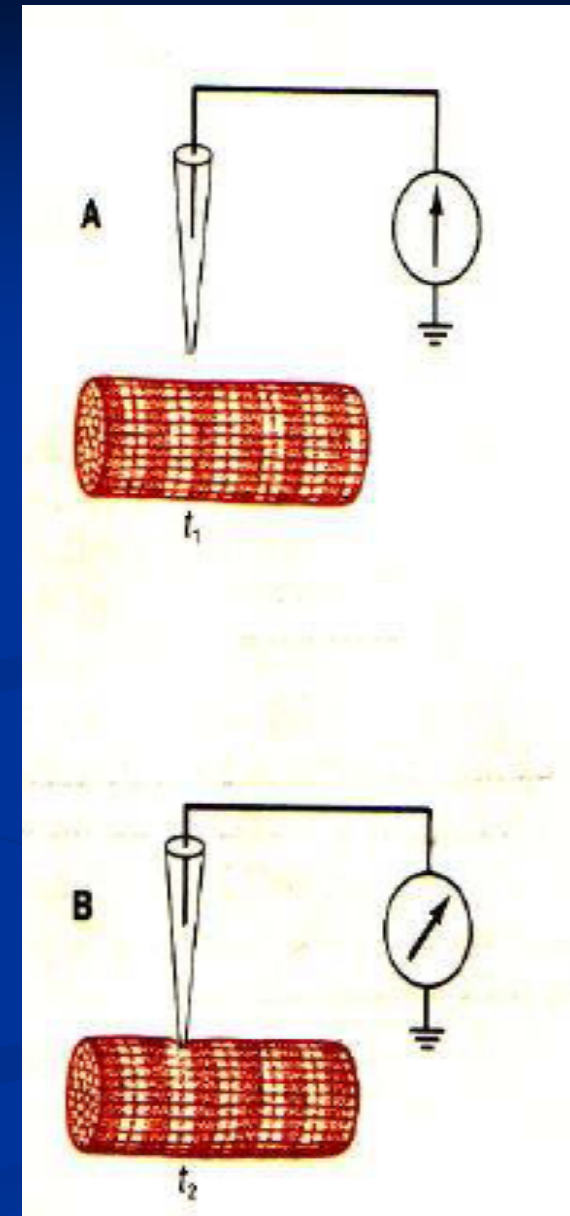


gli ioni che non possono permeare la m . non hanno alcuna influenza sul V_m

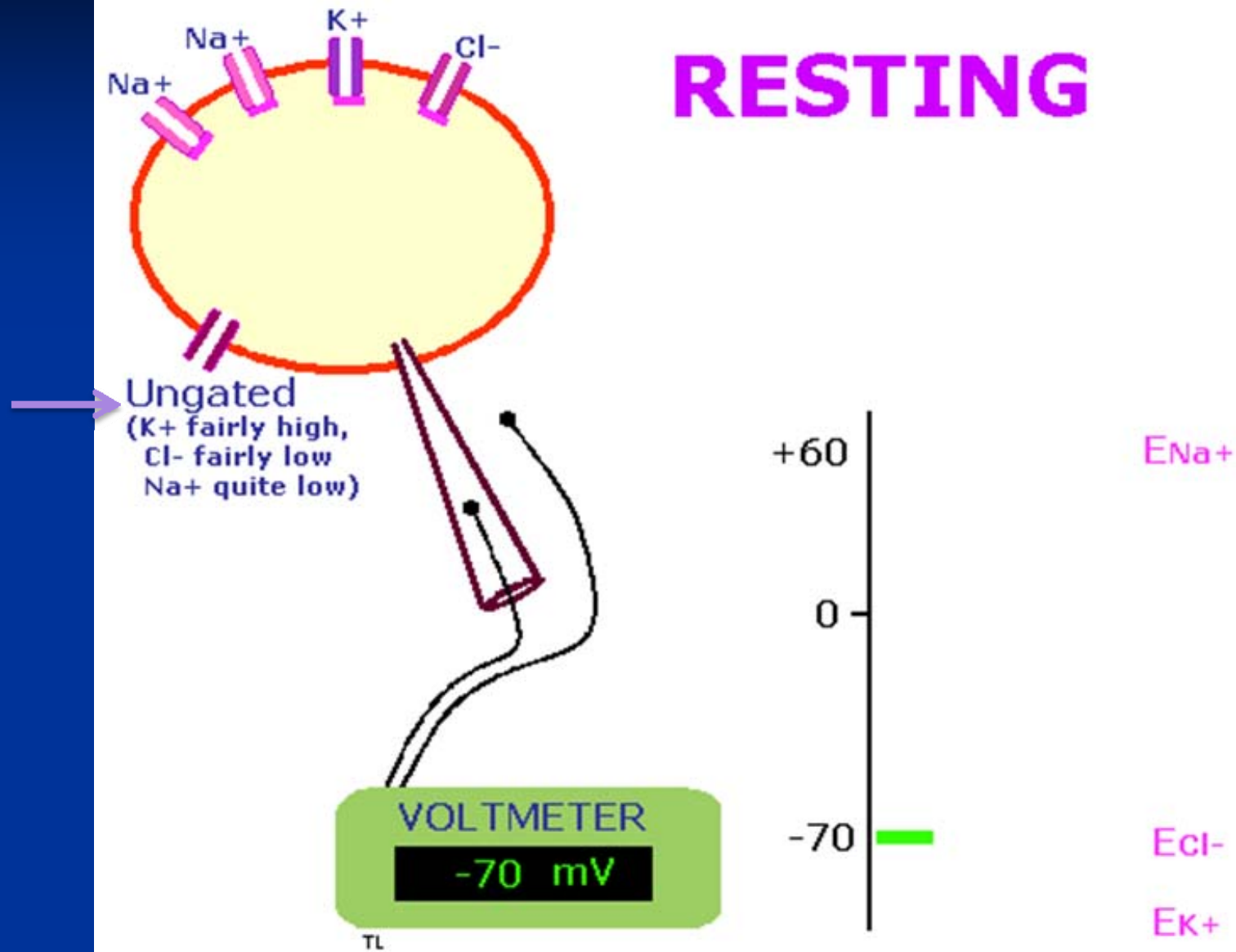
Misurazione del potenziale di riposo

metodi elettrofisiologici

Il potenziale è una caratteristica della membrana e il suo valore non varia se si spinge l'elettrodo in profondità nel liquido intracellulare



Potenziale di membrana «a riposo»



Metodi elettrofisiologici per lo studio delle caratteristiche bioelettriche della membrana

■ Misurazione del potenziale di membrana

Registra la **differenza di potenziale** tra interno ed esterno della membrana cellulare.

Può essere misurato inserendo nel citoplasma della cellula un **microelettrodo** con punta sottile (diametro circa $0,5\mu\text{m}$ pieno di una soluzione ad elevata conduttanza ionica: KCl 3M). Esso leggerà il valore all'interno della cellula; tale microelettrodo è collegato ad un **elettrodo di riferimento** (connessione elettrica ottenuta mediante spirali di AgCl) immerso nella soluzione di registrazione. Esso legge il valore della soluzione extracellulare.

Il valore di potenziale registrato viene amplificato e tradotto da un registratore

Metodi elettrofisiologici per lo studio delle caratteristiche bioelettriche della membrana

- Misurazione del potenziale di membrana
- Voltage-clamp
- Patch-clamp

Metodi elettrofisiologici per lo studio delle caratteristiche bioelettriche della membrana

Voltage-clamp

*Registra la **somma di tutte le correnti** prodotte dai flussi ionici attraverso tutti i canali presenti nella membrana*

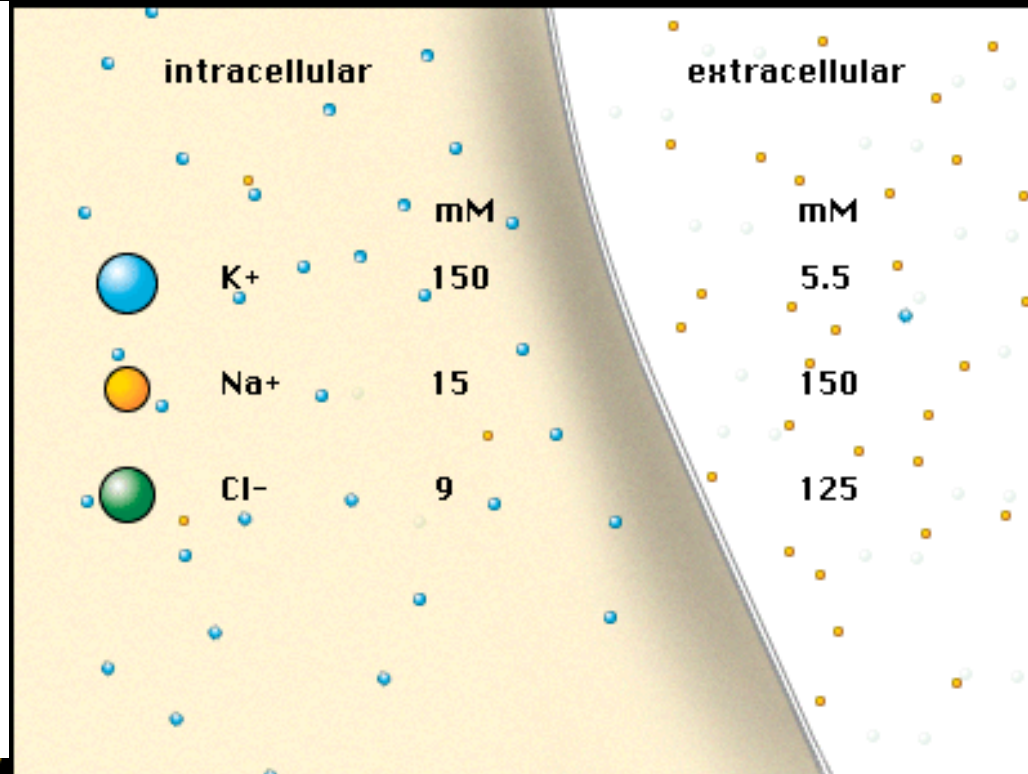
Patch-clamp

*Registra le **correnti attraverso i singoli canali** presenti in una piccola area della membrana*

2.1 IONIC COMPOSITION

Different ionic concentration between the inside and the outside of the cell.

In a typical mammalian cell there is a large difference in the concentration of ions (such as Na^+ and K^+) between the cytoplasm and the extracellular environment



Potenziale di membrana

You changed the voltage across the membrane and held it there.

*This is called a "**Voltage Clamp**"*

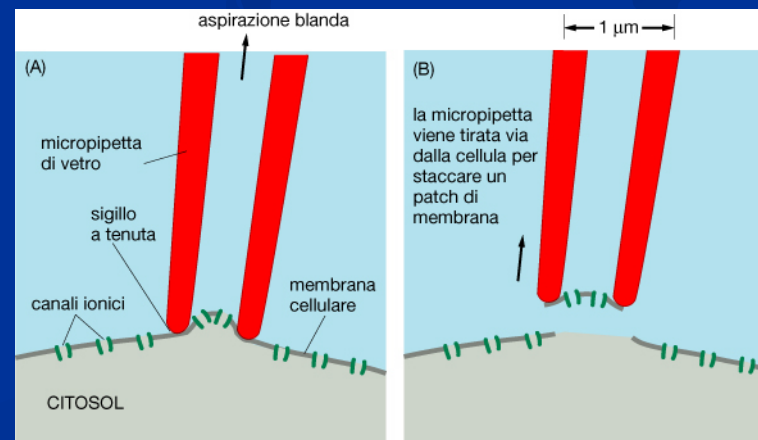
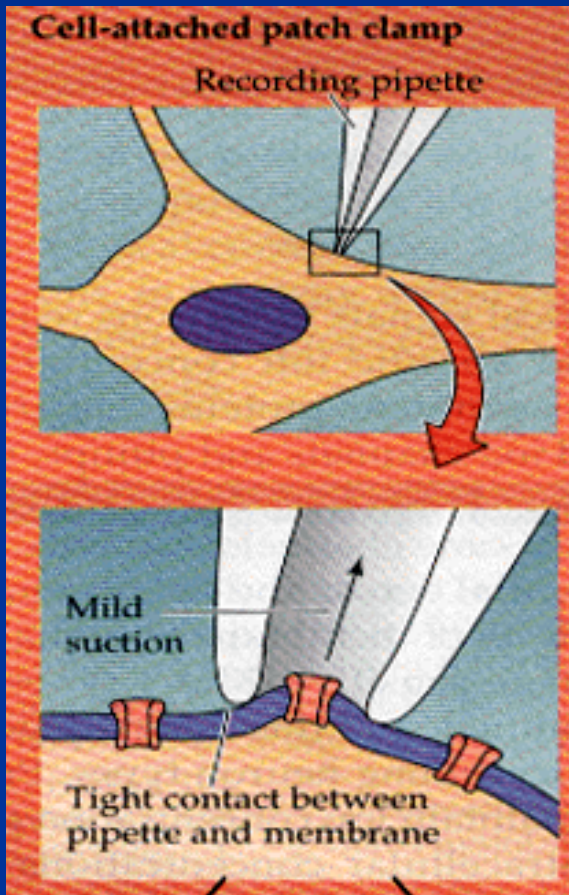
When channels open due to a change in voltage, ions will move across the membrane.

It takes an equal amount of current in the opposite direction to hold the voltage at the new potential.

By injecting this current with a current electrode and measuring the current injected you can estimate how many channels are opened.

Metodi elettrofisiologici per lo studio delle caratteristiche bioelettriche della membrana

Patch-clamp



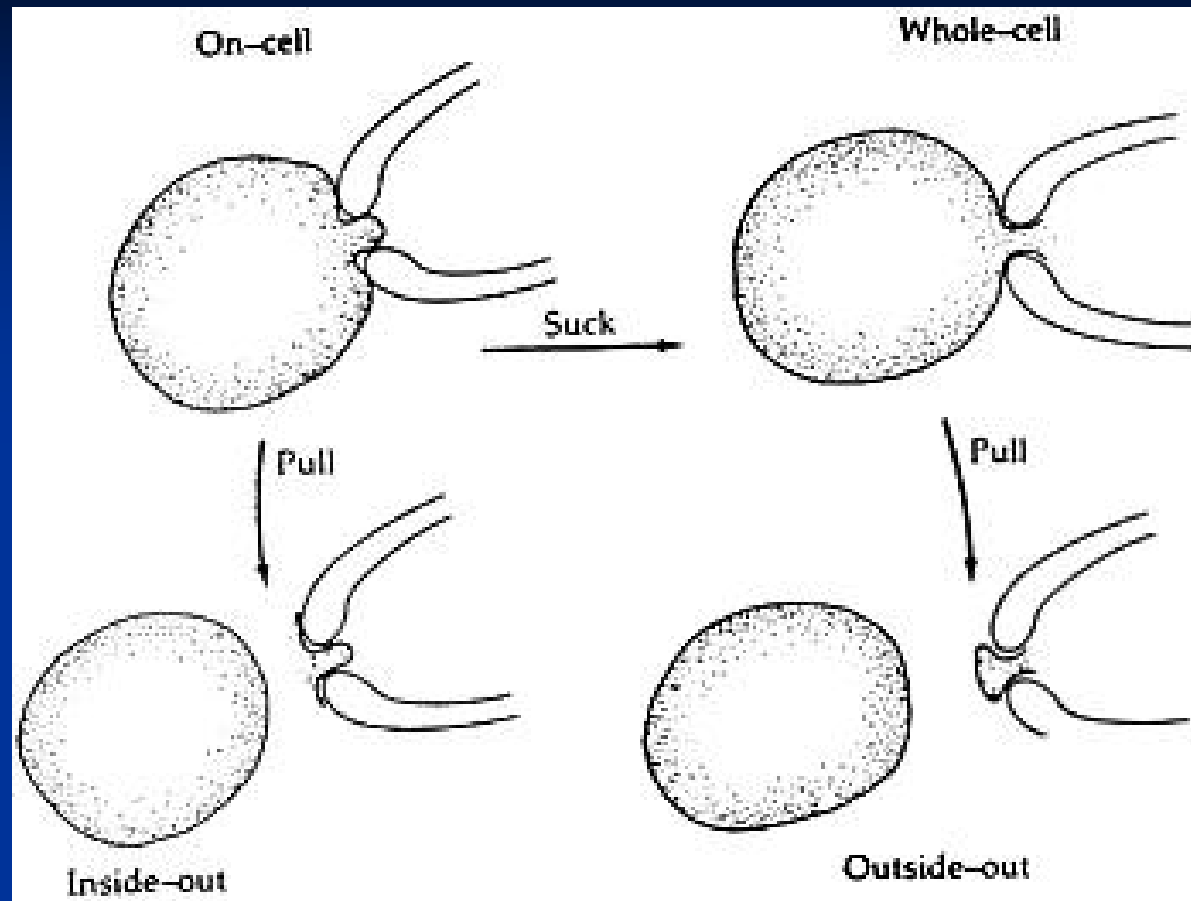
Patch clamp

*The pipette in contact with the cell membrane forming a **giga-seal***

A



The four recording methods for Patch Clamp



The **on-cell configuration** is obtained by forming a giga-seal between the patch pipette and the cell membrane. Withdrawal of the pipette from the cell produces an **inside-out patch**. If the patch is destroyed in the on-cell configuration, the standard **whole-cell configuration** is obtained. If the patch is permeabilised instead of destroyed, **perforated patch whole-cell configuration** is produced. Withdrawal of the pipette from the standard whole-cell configuration produces an **outside-out patch**.