



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**



DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

**MEMBRANA CELLULARE: MODELLO ELETTRICO
E INNOVAZIONI NELLE TECNICHE DI PATCH CLAMP**

Relatore: Prof. Gaudenzio Meneghesso

Laureando: Federico Lovato

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

Data di laurea 25 novembre 2022

INDICE

INTRODUZIONE.....	5
Capitolo 1	
MEMBRANA CELLULARE.....	7
1.1 Struttura della membrana.....	7
1.1.1 Canali ionici.....	8
1.1.2 Proteine carrier e pompe ioniche.....	8
Capitolo 2	
POTENZIALE DI MEMBRANA.....	10
2.1 Trasporto di membrana e membrane eccitabili.....	10
2.2 Potenziale di membrana a riposo.....	10
2.3 Potenziale d'azione	12
2.3.1 Potenziale d'azione nei neuroni.....	12
2.3.2 Periodo refrattario.....	14
2.4 Non tutti gli organismi viventi si comportano allo stesso modo.....	15
Capitolo 3	
MODELLO ELETTRICO DELLA MEMBRANA.....	16
3.1 Modello di Hodgkin e Huxley.....	16
3.2 Convenzioni HH.....	18
3.3 La corrente ionica.....	18
3.4 Caratterizzazione della conduttanza K.....	21
3.5 Modello HH per mammiferi.....	24

Capitolo 4

TECNICA DI PATCH CLAMP.....	25
4.1 Storia del rilevamento di potenziali di membrana e correnti ioniche.....	25
4.2 Introduzione al metodo di patch clamp.....	26
4.3 Tipico modello di registrazione in modalità voltage clamp.....	27
4.4 Patch clamp in vivo.....	28
4.4.1 Registrazioni in vivo da animali anestetizzati.....	29
4.4.2 Registrazioni in vivo da animali svegli.....	29

Capitolo 5

INNOVAZIONI NELLA TECNICA PATCH CLAMP.....	30
5.1 Microchip per patch-clamp.....	30
5.1.1 Morsetto di tensione.....	31
5.1.2 Morsetto di corrente	34
5.1.3 Test in vitro e in vivo.....	34
5.2 Circuito a CMOS.....	35
5.2.1 Current clamp.....	36
5.2.2 Voltage clamp.....	37

Capitolo 6

CONCLUSIONI.....	39
BIBLIOGRAFIA.....	41

INTRODUZIONE

La cellula rappresenta l'unità base degli organismi nonché il livello più basso di organizzazione biologica; è la più piccola unità funzionale in grado di poter vivere e riprodursi in modo totalmente indipendente.

È importante capire come questa interagisca con l'ambiente che la circonda, soprattutto grazie al compartimento che la divide tra il citoplasma interno e la matrice extracellulare: la membrana plasmatica.

La membrana ha una funzione di barriera selettiva; selettività necessaria per la cellula per potersi accrescere, per poter sopravvivere e per la capacità di acquisire sostanze dall'ambiente esterno e poter scaricarne altre.

Inoltre, in questo strato di rivestimento, sono presenti, sulla superficie, dei recettori sensoriali attraverso cui la cellula può captare delle informazioni che derivano dall'ambiente esterno e tramutarle in risposte adeguate da dare all'ambiente.

In questo studio ci concentreremo non solo sulla membrana ma anche sul potenziale che è presente ai suoi capi, cioè la differenza di potenziale elettrico, misurabile in una cellula, tra il citosol e lo spazio extracellulare e vedremo come questo sia strettamente legato con le correnti ioniche.

Senza potenziali di membrana la vita umana non sarebbe possibile.

I cambiamenti nel potenziale di membrana suscitano potenziali d'azione e danno alle cellule la capacità di inviare messaggi in tutto il corpo. Nello specifico, i potenziali d'azione sono segnali elettrici che portano messaggi efferenti al sistema nervoso centrale per l'elaborazione e messaggi afferenti lontano dal cervello per suscitare una reazione o un movimento specifico. Numerosi trasporti attivi incorporati all'interno della membrana cellulare contribuiscono alla creazione di potenziali di membrana, nonché alla struttura cellulare universale del doppio strato lipidico.

Il potenziale di membrana è anche molto importante nella biologia cellulare e mostra come questa sia fondamentalmente connessa con l'elettrochimica e la fisiologia.[1]

A questo scopo in questa tesi si fa riferimento innanzitutto alla funzionalità che la membrana ha nella generazione di potenziali d'azione e come essa possa essere schematizzata con una

rete elettrica grazie al modello di Hodgkin e Huxley per capire la correlazione con la controparte biologica.

Successivamente si parlerà della tecnica di patch clamp, grazie alla quale, si possono misurare il potenziale e la corrente che attraversa la membrana in una data zona e in un singolo istante.

Questo particolare metodo di registrazione, utilizzato sin dalla seconda metà degli anni 70 del secolo scorso e considerato tuttora uno dei metodi più affidabili per la misurazione dei potenziali nelle cellule; presenta però ancora alcuni deficit pratici soprattutto per quanto riguarda la parte di amplificazione e compensazione dei segnali e il ridimensionamento dei componenti. Vengono descritte innovazioni sia per le componenti elettroniche di registrazione sia nuovi strumenti per rendere la misura patch clamp più esaustiva possibile.

CAPITOLO 1

MEMBRANA CELLULARE

1.1 Struttura della membrana

La membrana cellulare è composta da lipidi (fosfolipidi, colesterolo e glicolipidi), da proteine, che possono essere integrali o periferiche e in una piccola parte anche da zuccheri.

La componente lipidica è quella prevalente ed è caratterizzata principalmente da fosfolipidi: questi hanno una testa polare e due code idrofobiche e quando sono immersi in acqua si dispongono a formare liposomi e micelle.

La struttura della membrana cellulare è quella di un grande liposoma cioè formata da un doppio strato di fosfolipidi che lasciano le teste a contatto con l'ambiente intra ed extracellulare e le code a contatto tra di loro. Ogni fosfolipide può spostarsi dalla sua posizione d'origine sia lateralmente che trasversalmente secondo un modello chiamato a 'mosaico fluido'.

Il doppio strato lipidico delle membrane cellulari non è permeabile agli ioni.

Il loro movimento attraverso il doppio strato lipidico è reso possibile da proteine di transmembrana specializzate chiamate canali ionici o proteine trasportatrici che creano dei canali polari o addirittura carichi attraverso la membrana.

Questi pori possono essere più o meno specifici per uno ione in base alla sua dimensione e carica.

Il mantenimento delle corrette concentrazioni ioniche è fondamentale per la sopravvivenza e il mantenimento della cellula.

1.1.1 Canali ionici

I canali ionici sono dei pori macromolecolari costituiti da subunità proteiche, attraverso le quali gli ioni possono attraversare in maniera passiva la membrana che costituisce la cellula.

Questi canali rappresentano il tipo più veloce di proteine di trasporto consentendo il movimento da 10^7 fino a un massimo di 10^8 ioni al secondo.

Grazie al gradiente elettrochimico gli ioni si muovono attraverso un canale ionico aperto, ciò fa sì che non cambino solo le concentrazioni di ioni sui due lati della membrana ma cambi anche il gradiente elettrico.

La maggior parte dei canali ionici sono selettivi solo per una determinata specie ionica, questa selettività è dovuta soprattutto alla dimensione del canale che impedisce a ioni di dimensioni non coerenti con la grandezza del canale stesso di poterlo attraversare, inoltre, la selettività può essere dovuta anche alla presenza di filtri nel canale formati da amminoacidi associati alle subunità proteiche che costituiscono i pori.

La selettività è legata anche a un fattore energetico, infatti gli ioni per entrare nei pori devono perdere il loro guscio di idratazione e formare un legame elettrostatico di tipo transitorio con gli atomi del filtro rendendo il processo altamente specifico solo per particolari ioni.

I canali ionici possono essere 'gated' o 'non gated': i canali 'non gated' consentono il libero movimento di ioni mentre quelli 'gated' si aprono solo in determinate condizioni.

Le condizioni possono essere ad esempio una differenza di potenziale attraverso la membrana cellulare (canali voltaggio-dipendenti) oppure quando specifici ligandi si legano alle proteine di trasporto (canali chemio-dipendenti).

Altri invece possono essere bloccati meccanicamente, in seguito a deformazioni della membrana cellulare o per temperatura.[2]

1.1.2 Proteine carrier e pompe ioniche

Simili ai canali ionici, le proteine carrier sono parte integrante del doppio strato lipidico della membrana cellulare.

La differenza principale delle proteine vettrici o carrier è che non sono simultaneamente aperte ad entrambi gli ambienti intra ed extra cellulari, infatti, il legame di un soluto specifico con il carrier da una parte della membrana crea nella

proteina vettrice un cambiamento di conformazione che permette al soluto di essere rilasciato dall'altra parte.

Diverse classi di trasportatori sono state riconosciute in base a ciò che trasportano (ad esempio ioni, proteine, protoni, carboidrati ecc...).

Il trasporto di ioni contro il loro gradiente di concentrazione è un processo che richiede energia; questo tipo di trasporto viene effettuato dalle pompe ioniche e si definisce attivo perché l'energia richiesta viene ricavata dall'idrolisi dell'ATP.

L'energia derivata dall'idrolisi provoca nella proteina di trasporto un cambiamento di conformazione che spinge lo ione da un lato all'altro della membrana.

Un esempio molto importante di pompa ionica che trasporta ioni è la pompa ATPasi, cioè la pompa sodio-potassio.

Per ogni molecola di ATP che viene idrolizzata, la pompa Na^+/K^+ muove tre ioni sodio fuori dalla cellula e due ioni potassio nella cellula.

L'azione di questa pompa è fondamentale per mantenere i gradienti ionici (o concentrazioni) attraverso le membrane delle cellule ed è alla base della capacità di eccitazione elettrica di muscoli e nervi.[2]

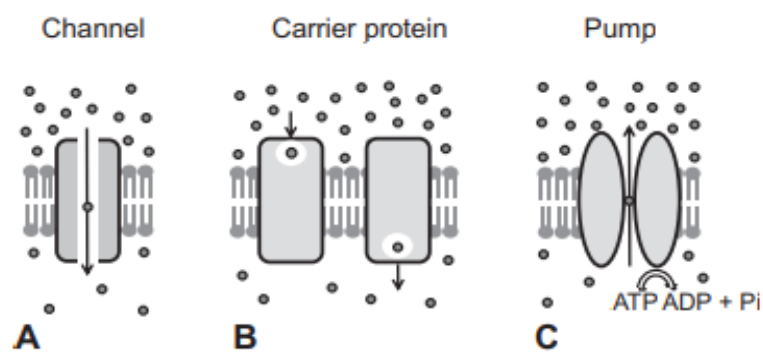


Figura 1: VARI TIPI DI PROTEINE DI MEMBRANA

(A) I canali ionici consentono il passaggio degli ioni con poca o nessuna interazione tra lo ione e il canale. (B) Le proteine carrier subiscono un cambiamento conformazionale legandosi con una molecola di soluto su un lato della membrana, rilasciando la molecola dall'altro lato. (C) Le pompe ioniche possono muovere gli ioni contro il loro gradiente di concentrazione con il dispendio di energia rilasciato dall'idrolisi dell'ATP. [2]

CAPITOLO 2

POTENZIALE DI MEMBRANA

2.1 Trasporto di membrana e membrane eccitabili

Il movimento di ioni, prevalentemente sodio (Na^+), potassio (K^+) e cloro (Cl^-), tra il fluido extracellulare e l'interno della cellula, è alla base delle proprietà elettriche delle membrane cellulari.

Poiché gli ioni trasportano carica elettrica, le forze che guidano il loro movimento dipendono sia dal gradiente di concentrazione da un lato all'altro della membrana sia dal gradiente di potenziale elettrico.

Il gradiente netto prodotto da queste forze è chiamato gradiente elettrochimico; il movimento di ioni può essere passivo o richiedere spesa di energia se lo ione attraversa contro gradiente.[3]

2.2 Potenziale di membrana a riposo

Tutte le cellule eucariote attraverso le loro membrane hanno un gradiente netto di carica dovuto alla distribuzione delle diverse specie ioniche tra ambiente intra ed extra cellulare.

Da questo gradiente deriva un potenziale di membrana a riposo (RMP).

Per comprendere il vero significato dell'RMP bisogna considerare la situazione, più che corretta, che all'interno della cellula esiste un'elevata concentrazione di K^+ .

La membrana cellulare attraverso i canali ionici permette al K^+ il libero movimento, grazie al suo gradiente di concentrazione, dall'interno verso l'esterno della cellula.

Tuttavia, gli ioni K^+ che lasciano la cellula non sono bilanciati da un numero equivalente di ioni caricati negativamente che si muovono simultaneamente a questi.

Il risultato è una separazione tra cariche positive e cariche negative e quindi una differenza di potenziale nella membrana.

Questo gradiente elettrico si oppone ulteriormente al movimento di ioni potassio fuori dalla cellula così, all'equilibrio, il gradiente di concentrazione che porta K^+ fuori dalla cellula è bilanciato dal gradiente elettrico che agisce nel verso opposto.

Il potenziale di equilibrio (V_{eq}) per gli ioni K^+ è proprio la differenza di potenziale ai capi della membrana per la quale i due gradienti sono uguali ed opposti e si bilanciano; esistono potenziali di equilibrio anche per gli ioni Na^+ e Cl^- , presenti maggiormente all'esterno della membrana, sebbene la permeabilità della membrana a questi ioni sia inferiore a quella del K^+ . Il potenziale di equilibrio di ogni singola specie ionica X è descritto dall'equazione di Nernst:

$$V_{eq,X} = \frac{RT}{z_X F} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i} \quad (1)$$

dove $V_{eq,X}$ è il potenziale di equilibrio per lo ione, R è la costante universale dei gas (8.314 [J/mol K]), T è la temperatura in Kelvin, F è la costante di Faraday (96.485 [C/mol]), z_X è la valenza dello ione X (+1 per K^+ e Na^+ ; +2 per Ca^{++} ; -1 per Cl^-), e $[X]_o/[X]_i$ è il rapporto tra le concentrazioni dello ione internamente(i) ed esternamente(o) alla cellula.

L'equazione di Nernst si riferisce ad una sola specie ionica mentre il potenziale di membrana V_m è principalmente correlato alle concentrazioni intra ed extra cellulari dei 3 ioni presenti in maggiori quantità nei pressi delle cellule: Na^+ , Cl^- e K^+ , come espresso dall'equazione di Goldman-Hodgkin-Katz:

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{p_K [K^+]_o + p_{Na} [Na^+]_o + p_{Cl} [Cl^-]_o}{p_K [K^+]_i + p_{Na} [Na^+]_i + p_{Cl} [Cl^-]_i} \right) \quad (2)$$

Dove p_K , p_{Na} e p_{Cl} sono le permeabilità relative della membrana agli ioni K^+ , Na^+ e Cl^- con la permeabilità di K^+ di solito fissata a 1.

Un altro modo per calcolare V_m si esprime nel seguente modo:

$$V_m = \frac{g_K V_{eq,K} + g_{Na} V_{eq,Na} + g_{Cl} V_{eq,Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} \quad (3)$$

Questa equazione fornisce un modo conveniente per calcolare il potenziale netto di membrana dai potenziali di equilibrio dei tre ioni e dalle loro conduttanze di membrana (g_K , g_{Na} e g_{Cl}).

Quando più ioni contribuiscono al potenziale di membrana nessuno di loro è al suo potenziale di equilibrio e la forza che guida il movimento di ioni attraverso la membrana dipende da quanto distante è V_m da V_{eq} , ad esempio per lo ione X questa forza motrice è uguale a $V_m - V_{eq,X}$.

I canali ionici aperti consentono ai tre ioni Na , Cl e K di muoversi liberamente attraverso la membrana della cellula e il movimento libero di questi ioni dissipa il gradiente chimico senza una possibilità di ripristino.

A questo scopo interviene la pompa sodio-potassio che per ogni molecola di ATP idrolizzata, consente a tre ioni Na^+ di essere espulsi dalla cellula e due ioni K^+ di entrare nella cellula.

La pompa bilancia il movimento passivo degli ioni K^+ e Na^+ lungo i loro gradienti di concentrazione, preservando la più alta concentrazione intracellulare di K^+ e la maggiore concentrazione extracellulare di Na^+ . In tutte le cellule eucariote, l'interno della cellula ha un RMP negativo intorno ai $-70/-90$ mV rispetto all'esterno proprio grazie alla pompa ATPasi che fa accumulare maggiormente cariche negative internamente per via della minore quantità di ioni potassio che entrano rispetto a quelli sodio che escono.[2]

2.3 Potenziale d'azione

L'RMP rappresenta la situazione basale di tutte le cellule, alcune di queste però sono in grado di modificare questo potenziale tra cui i neuroni.

Il potenziale d'azione (AP) è un fenomeno elettrico rigenerativo osservato sulle membrane cellulari delle cellule eccitabili che permette la propagazione dei segnali.

Durante un AP il potenziale di membrana della cellula si inverte rapidamente per poi ritornare alla sua conformazione originale, il tutto nel giro di pochi millisecondi.

Questo fenomeno è centrale non solo per l'elaborazione e la trasmissione delle informazioni nel sistema nervoso, ma anche per la contrazione muscolare, il rilascio di ormoni da alcune cellule endocrine e per i segnali elettrici.[2]

2.3.1 Potenziale d'azione nei neuroni

Come visto in precedenza la pompa ATPasi mantiene la giusta concentrazione di ioni ai due lati della membrana e lascia negativo l'interno della cellula rispetto all'esterno.

Nei neuroni l'RMP è di circa -70 mV e l'AP si verifica attraverso l'interazione elettrica con altri neuroni o per stimoli esterni.

Questi stimoli possono essere sia iperpolarizzanti, con conseguente aumento della negatività intracellulare, che depolarizzanti, cioè inducono un aumento del potenziale di membrana a valori più positivi.

In relazione all'intensità dello stimolo a cui sono sottoposti, i neuroni e le altre cellule eccitabili rispondono con una variazione del loro potenziale di membrana.

Gli stimoli depolarizzanti a bassa intensità producono risposte graduate, tuttavia, quando il grado di depolarizzazione supera un valore critico di soglia, viene attivato un AP.

Gli stimoli con intensità non sufficiente a superare la soglia vengono chiamati stimoli sottosoglia mentre quelli che la superano sono chiamati stimoli sopra soglia.

Sopra la soglia, l'ampiezza e le caratteristiche dell'onda AP sono indipendenti dall'intensità dello stimolo, in questa condizione infatti si parla di una risposta che segue la legge del 'tutto o nulla'.

Una volta che la depolarizzazione del potenziale di membrana supera la soglia, segue una rapida ulteriore depolarizzazione (Figura 2, fase 1). Il potenziale di membrana, quindi, aumenta rapidamente fino a un valore positivo vicino a +50 mV (Figura 2, fase 2). La chiave della risposta delle cellule eccitabili di superare la soglia a determinati stimoli è la presenza di canali ionici voltaggio-dipendenti. La rapida depolarizzazione iniziale è interamente guidata dall'apertura del canale Na^+ voltaggio-dipendente che viene attivato quando il potenziale di membrana supera una soglia di circa -40 mV. La grande forza motrice sugli ioni Na^+ è dovuta agli effetti combinati di entrambi i gradienti: ovvero quello di concentrazione e quello elettrico (negatività all'interno della cellula).

Ciò comporta un rapido afflusso di ioni sodio nella cellula aumentando ancora di più il grado di depolarizzazione della membrana fino a far diventare l'interno positivo rispetto all'esterno.

Questa inversione, nota come overshoot, tende a portare il potenziale di membrana al potenziale di equilibrio (V_{eq}) di Na^+ a circa +50 mV, senza raggiungerlo mai del tutto.

I fattori che lo impediscono sono principalmente due: in primis, non appena V_m aumenta, i singoli canali del sodio voltaggio-dipendenti si inattivano spontaneamente bloccando l'ulteriore passaggio di Na nella cellula, in secondo luogo, la depolarizzazione iniziale del potenziale di membrana innesca l'apertura dei canali voltaggio-dipendenti del potassio che però si aprono più lentamente di quelli del sodio e lasciano uscire il potassio secondo il suo gradiente di concentrazione.

Il picco del potenziale d'azione (Figura 2, fase 3), che rappresenta l'inattivazione di tutti i canali del sodio, impedendo così al sodio di entrare ulteriormente nella cellula, è seguito da una rapida caduta del potenziale di membrana (Figura 2, fase 4). Questa fase è causata dal continuo movimento di K fuori dalla cellula.

A causa del ritardo di risposta dei canali voltaggio-dipendenti del potassio, la conduttanza di membrana degli ioni K^+ aumenta e rimane elevata ben oltre il punto in cui la conduttanza di Na^+ raggiunge il suo valore di riposo, ciò provoca la ripolarizzazione della membrana.

La conduttanza di membrana degli ioni K^+ rimane elevata oltre il punto in cui il potenziale di membrana ritorna al suo valore di riposo di $-70mV$.

Questa fase, che dura solo pochi millisecondi, è chiamata postpotenziale iperpolarizzante (Figura 2, fase 5), a seguito della quale il potenziale di membrana torna alla linea di base.

È interessante notare che, nonostante la grande variazione del potenziale di membrana causata dal movimento ionico attraverso la membrana cellulare, le effettive concentrazioni intra ed extracellulari di ioni Na^+ e K^+ non cambiano in modo significativo, questo perché solo una frazione molto piccola degli ioni attraversa la membrana cellulare durante l'AP.[2]

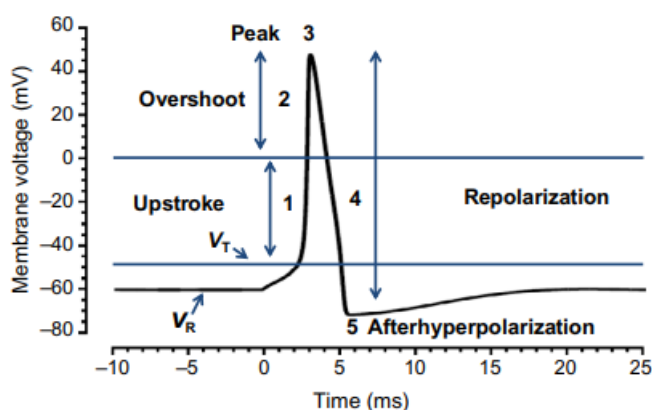


Figura 2: TIPICO ANDAMENTO DI UN AP NEURONALE [2]

2.3.2 Periodo refrattario

Prima del picco del potenziale d'azione e dopo l'apertura dei canali del sodio voltaggio-dipendenti c'è un periodo di alcuni millisecondi nel quale un secondo stimolo equivalente al primo non può innescare l'inizio di un altro AP, questo periodo è indicato come periodo refrattario assoluto.

Tuttavia, appena dopo questo periodo c'è un altro periodo, detto periodo refrattario relativo, dove invece è possibile che un secondo stimolo sufficientemente forte dia il via ad un altro AP. [2]

È bene sottolineare che tale potenziale d'azione non risponderà comunque alla legge del 'tutto o nulla'.

2.4 Non tutti gli organismi viventi si comportano allo stesso modo

Il modello di AP neuronale appena descritto si riferisce agli studi fatti da Hodgkin e Huxley che per la prima volta, nel 1952, hanno svolto esperimenti di questo tipo su un assone di calamaro gigante; con il passare degli anni però è diventato sempre più chiaro che nel complesso neuronale dei mammiferi gli AP mostrano una gamma molto più ampia di comportamenti rispetto a quella del calamaro.

Il modello di Hodgkin-Huxley, infatti, è prevalentemente dominato dalle conduttanze del sodio e del potassio mentre la maggior varietà dei comportamenti degli AP dei mammiferi è dovuta invece a molti più tipi di conduttanze voltaggio-dipendenti sulla membrana cellulare.

Negli ultimi decenni, registrazioni patch-clamp e studi genomici hanno rivelato notevoli variazioni nell'espressione di numerosi sottotipi di canali ionici.[4]

CAPITOLO 3

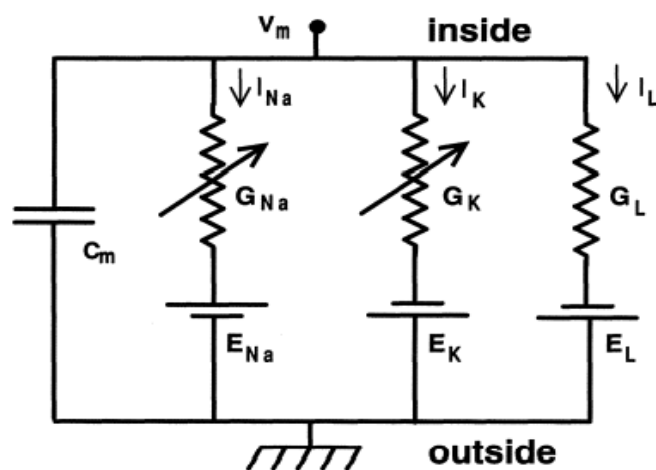
MODELLO ELETTRICO DELLA MEMBRANA

3.1 Modello di Hodgkin e Huxley

Abbiamo visto come la membrana del neurone, grazie a particolari stimoli, riesca a cambiare il suo potenziale di riposo di -70mV in una forma d'onda diversa per aspetti e morfologia a seconda della specie vivente, in particolare abbiamo analizzato un assone di un calamaro gigante.

Nei loro studi, Hodgkin e Huxley sono riusciti a dedurre un modello elettrico della membrana del neurone di calamaro; a seguito di questa svolta il modello Hodgkin e Huxley (HH) è stato ampiamente utilizzato per comprendere la complessità dei neuroni e delle reti neuronali ed è effettivamente considerato il modello più accurato ed efficiente per descrivere il comportamento neuronale.[5]

Il modello di HH si basa sull'idea che le proprietà elettriche della membrana di un segmento di nervo possono essere rappresentate secondo un circuito equivalente come quello mostrato in Figura 3.



*Figura 3: CIRCUITO ELETTRICO EQUIVALENTE PROPOSTO DA HODGKIN E HUXLEY PER UN BREVE SEGMENTO DI ASSONE DI CALAMARO GIGANTE
Le resistenze variabili rappresentano conduttanze dipendenti dalla tensione (Hodgkin e Huxley 1952d). [7]*

In questo circuito, il flusso di corrente che attraversa la membrana ha due componenti principali: uno associato alla carica della membrana e schematizzato con un condensatore C_m e l'altro associato al movimento di specifici ioni attraverso la membrana.

Le membrane biologiche essendo formate da un doppio strato fosfolipidico impermeabile agli ioni, possono essere rappresentate come condensatori a due lastre piane e parallele, riempiti di materiale dielettrico; esse, infatti, accumulano energia elettrica.

La capacità C_m è data da:

$$C_m = \epsilon A/d \quad (4)$$

dove ϵ è la costante dielettrica, A è l'area della piastra e d la distanza tra le due armature.

Essendo immerse in soluzioni, le membrane, accumulano anche ioni di carica diversa che migrano verso la loro superficie in presenza di un campo elettrico, e formano un doppio strato diffusivo, che forma un condensatore con una notevole capacità di accumulo.

L'energia elettrica immagazzinata all'interno della membrana dipende dalla permeabilità della membrana, ma anche dalla densità di carica superficiale, dalla permittività dell'acqua e dalla concentrazione di ioni.

Come è noto una varietà di processi biologici (come la generazione di potenziali graduati e potenziali d'azione) sono influenzati dalla capacità di membrana (C_m).[6]

E_{Na} , E_K ed E_L sono i potenziali a riposo (potenziali di equilibrio) rispettivamente degli ioni sodio, potassio e cloro e sono calcolati tramite l'equazione di Nernst ($E_{Na} \approx 61mV$, $E_K \approx -88mV$ ed $E_L \approx -70mV$).

La corrente ionica viene suddivisa in tre componenti ulteriori: la corrente del sodio I_{Na} , la corrente del potassio I_K e una piccola corrente dovuta agli ioni cloro e ad altri ioni, I_L .

Il comportamento del circuito in figura può essere descritto da una equazione differenziale della forma:

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + I_{ion} = I_{ext} \quad (5)$$

dove C_m è la capacità della membrana, V_m è la differenza di potenziale attraverso la membrana, I_{ion} è la corrente ionica netta che scorre attraverso la membrana e I_{ext} è la corrente di stimolazione esterna applicata.[7]

3.2 Convenzioni HH

Il fatto che I_{ion} e I_{ext} siano da parti opposte nell'equazione sopra significa che hanno convenzioni di segno opposto: per come è scritta l'equazione una corrente ionica positiva tenderà a iperpolarizzare la cellula (cioè renderà V_m più negativo) mentre una I_{ext} positiva tenderà a depolarizzare la cellula, con un incremento di V_m .

Questa convenzione di segno per le correnti dei vari ioni, quindi, significa che un flusso verso l'interno della cellula di ioni caricati positivamente comporta una corrente negativa, ciò probabilmente nasce dal fatto che quando si studia una corrente ionica in esperimenti di voltage-clamp, piuttosto che misurare direttamente la I_{ion} , si misura la corrente di chiusura necessaria a controbilanciarla.

Altra cosa molto importante in termini di convenzioni riguarda la differenza di potenziale di membrana V_m , si può scegliere, come fecero Hodgkin e Huxley, di definire il potenziale intracellulare a riposo pari a zero, oppure porre a zero il potenziale extracellulare in modo che il potenziale intracellulare sia circa $-70mV$. In entrambi i casi la differenza di potenziale attraverso la membrana è la stessa, cambia solo il modo di definire lo 'zero'.

Per il potenziale di membrana va inoltre deciso il segno; infatti, Hodgkin e Huxley nella loro relazione del 1952 usarono la convenzione per la quale una depolarizzazione non aumenta il potenziale rendendolo meno negativo ma quella del segno opposto (depolarizzazione negativa); la convenzione moderna invece prevede che a seguito di uno stimolo l'RMP aumenti diventando via via meno negativo.[7]

3.3 La corrente ionica

La corrente ionica totale I_{ion} nell'equazione (5) è la somma algebrica dei singoli contributi degli ioni più rilevanti nella cellula studiata:

$$I_{ion} = \sum_k I_k = \sum_k G_k (V_m - E_k). \quad (6)$$

Risulta possibile scrivere questa equazione perché ad ogni flusso ionico J è sempre possibile associare una corrente elettrica $I=z*F*J$, dove z è la valenza dello ione e F è la costante di Faraday.

Ad ogni singola componente ionica I_k è associato un valore di conduttanza G_k (dove $G_k = 1/R_k$ e R_k è la resistenza del canale ionico specifico per lo ione k) e un potenziale di equilibrio E_k (il potenziale per quale la corrente ionica netta che scorre attraverso la membrana è zero) secondo la legge di Ohm.

Nel modello presentato da Hodgkin e Huxley sull'assone di calamaro, ci sono 3 diverse correnti ioniche che contribuiscono all'equazione (6): una corrente per l' Na^+ , una per il K^+ e l'altra per il Cl^- e altri ioni.

$$I_{ion} = G_{Na}(V_m - E_{Na}) + G_K(V_m - E_K) + G_L(V_m - E_L). \quad (7)$$

Durante le loro prove sperimentali, Hodgkin e Huxley hanno affermato che G_{Na} e G_K cambiavano dinamicamente in funzione della tensione di membrana (basti pensare a come il potenziale d'azione si genera).

E' bene ricordare che quando i due fisiologi svilupparono il loro modello c'erano pochissime informazioni sulla struttura fisica della membrana e sull'eccitabilità neuronale ma oggi, grazie ad ulteriori studi, sappiamo che la dipendenza dalla tensione delle conduttanze del sodio e del potassio può essere ricondotta ai canali ione-selettivi che controllano il flusso di ioni attraverso la membrana.

Quindi sebbene HH non conoscessero bene i canali di membrana quando hanno sviluppato il loro modello, esso risulta comunque valido, si possono infatti pensare le varie conduttanze G_K del modello elettrico come derivanti dagli effetti combinati di un gran numero di canali ionici presenti attraverso la membrana, ognuno dei quali contenente un piccolo numero di porte fisiche (gates) che regolano il flusso di ioni attraverso il canale.

Un singolo gate può trovarsi in stato permissivo o non permissivo, quando tutti i gates di un canale sono aperti lo ione può passare attraverso il canale, invece quando anche un singolo gate rimane chiuso gli ioni non possono passare e il canale è nello stato non permissivo e resta chiuso.

La dipendenza dalla tensione delle conduttanze ioniche è incorporata nel modello di HH assumendo che la probabilità che una singola porta sia in stato permissivo o non permissivo.

Possiamo definire una probabilità π , compresa tra 0 e 1, che rappresenta la probabilità che un gate si trovi nello stato permissivo, oppure ancora meglio, se consideriamo un insieme di canali invece che uno solo come è giusto aspettarsi in una membrana cellulare, possiamo anche interpretare π come la frazione di gates nello stato permissivo e $1-\pi$ la frazione nello stato non permissivo.

Si può rappresentare la transizione tra permissivo e non permissivo con una cinetica del primo ordine.

$$\frac{dp_i}{dt} = \alpha_i(V) (1 - p_i) - \beta_i(V) p_i, \quad (8)$$

dove (α_i e β_i sono costanti di velocità dipendenti dalla tensione, determinate da Hodgkin e Huxley con degli esperimenti di voltage clamp, che descrivono rispettivamente le velocità di transizione da "non permissiva a permissiva" e "permissiva a non permissiva").

Se la tensione di membrana V_m è ferma a un valore fisso V , la frazione di porte nello stato permissivo raggiungerà un valore stazionario cioè $dp_i/dt = 0$.

Quando un singolo canale è aperto, esso contribuisce con piccolo valore alla conduttanza totale, perciò, possiamo dedurre che per un vasto numero di canali la conduttanza è proporzionale al numero di canali nello stato aperto e a sua volta proporzionale alla probabilità che le porte associate ai canali siano nello stato permissivo.

Quindi la conduttanza macroscopica G_k dovuta a canali di tipo k , con porte costituenti di tipo i , è proporzionale al prodotto della probabilità di singola porta p_i :

$$G_k = \bar{g}_k \prod_i p_i, \quad (9)$$

dove g_k è una costante di normalizzazione che determina la massima conduttanza possibile quando tutti i canali sono aperti.

L'ultima equazione sopra presentata, la (9), in forma generalizzata può essere applicata ad un'ampia varietà di conduttanze oltre a quelle presenti nell'assone di calamaro.

Nello specifico Hodgkin e Huxley hanno modellato la conduttanza del sodio utilizzando tre gates di un tipo etichettato m e un gate di tipo h ; applicando l'equazione qui sopra al canale del sodio si ottiene:

$$G_{Na} = \bar{g}_{Na} p_m^3 p_h \equiv \bar{g}_{Na} m^3 h. \quad (10)$$

E allo stesso modo per il potassio:

$$G_K = \bar{g}_K p_n^4 \equiv \bar{g}_K n^4. \quad (11)$$

Riassumendo tutte le correnti ioniche nel modello HH in notazione standard otteniamo:

$$I_{ion} = \bar{g}_{Na} m^3 h (V_m - E_{Na}) + \bar{g}_K n^4 (V_m - E_K) + \bar{g}_L (V_m - E_L), \quad (12)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V) (1 - m) - \beta_m(V) m, \quad (13)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V) (1 - h) - \beta_h(V) h, \quad (14)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V) (1 - n) - \beta_n(V) n. \quad (15)$$

L'equazione (5) e le equazioni (13), (14) e (15) ci restituiscono il comportamento specifico del potenziale di membrana V_m nel modello.[7]

3.4 Caratterizzazione della conduttanza K

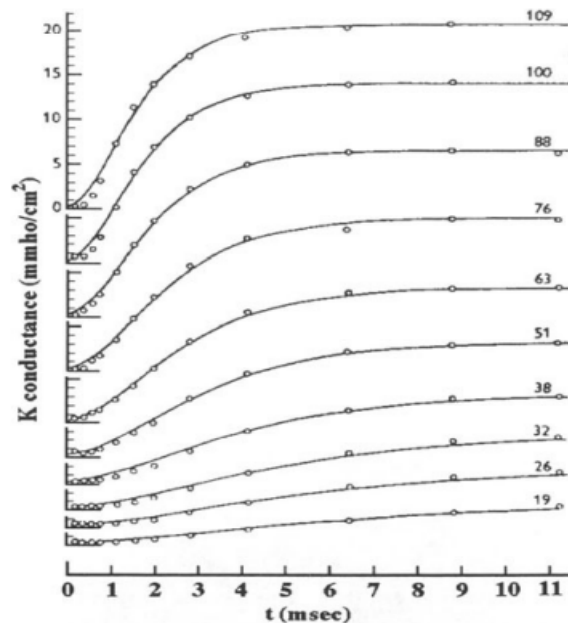


Figura 4: DATI SPERIMENTALI CHE ILLUSTRANO LE PROPRIETA' DIPENDENTI DALLA TENSIONE DELLA CONDUTTANZA DEL POTASSIO NELL'ASSONE DI CALAMARO GIGANTE. Esperimento eseguito con tecnica di voltage clamp. La tensione di comando V_c (mV) è indicata sul lato destro di ciascuna curva. [7]

La Figura 4, mostra alcuni risultati di voltage-clamp eseguiti da Hodgkin e Huxley in cui, a diverse tensioni imposte viene plottato l'andamento temporale della conduttanza del potassio (K) il cui livello aumenta all'aumentare della tensione di comando.

Hodgkin e Huxley hanno incorporato questa dipendenza in un modello matematico scrivendo prima un'equazione, la (15), che descrive l'evoluzione nel tempo.

Negli esperimenti illustrati in Figura 4, il potenziale di membrana inizia nello stato di riposo ($V_m = 0$) e viene quindi istantaneamente portato ad una nuova tensione di clamp V_c .

Con una serie di considerazioni si ottiene:

$$n(t) = n_{\infty}(V_c) - (n_{\infty}(V_c) - n_{\infty}(0))e^{-t/\tau_n} \quad (16)$$

dove

$$\tau_n(V_c) = \frac{1}{\alpha_n(V_c) + \beta_n(V_c)} \quad (17)$$

$$n_{\infty}(0) = \frac{\alpha_n(0)}{\alpha_n(0) + \beta_n(0)} \quad (18)$$

$$n_{\infty}(V_c) = \frac{\alpha_n(V_c)}{\alpha_n(V_c) + \beta_n(V_c)}. \quad (19)$$

Data l'equazione (16), che descrive l'andamento temporale di n in risposta a un cambio di passo della tensione di comando, si potrebbe provare ad adattare curve di questa forma ai dati di conduttanza mostrati in Figura 4 .

La Figura 5 illustra questo processo, utilizzando alcuni dati di conduttanza simulati generati dal modello Hodgkin-Huxley. Ricordiamo che n assume valori compresi tra 0 e 1, quindi per adattare i dati di conduttanza, n deve essere moltiplicato per una costante di normalizzazione g_k .

Per semplicità, viene tracciata la conduttanza normalizzata G_k/g_k .

La curva tratteggiata in Figura 5 mostra i risultati migliori per l'andamento esponenziale dell'eq. (16), anche se non riproduce l'andamento a forma di S (sigmoidale).

Questa discrepanza è più evidente a tempi bassi, vicino all'inizio del cambiamento di conduttanza, mostrato nel riquadro della Fig. 5.

Hodgkin e Huxley si resero conto che se la conduttanza era proporzionale a una potenza di n maggiore (ad es. n^p con $p=4$), avrebbero ottenuto un comportamento migliore come mostrato in Figura 5.

Quindi sono arrivati a una descrizione per la conduttanza K data dall'equazione (11), in questo caso l'equazione che descrive la conduttanza e che soddisfa le condizioni al contorno è:

$$G_K = \{(G_\infty(V_c))^{1/4} - ((G_\infty(V_c))^{1/4} - (G_\infty(0))^{1/4})e^{-t/\tau_n}\}^4 \quad (20)$$

dove $G_\infty(0)$ è la conduttanza iniziale e $G_\infty(V_c)$ è il valore di conduttanza stazionaria raggiunta quando la tensione di comando viene portata a V_c . [7]

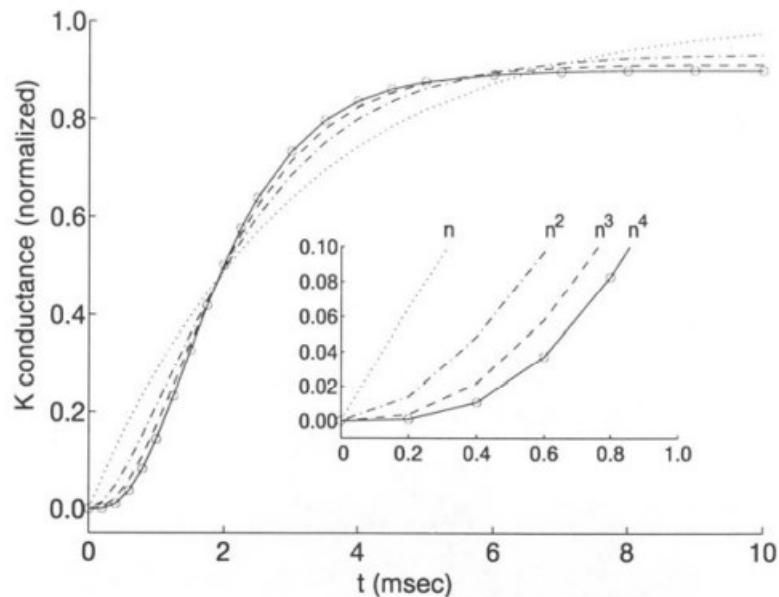


Figura 5: MIGLIORI CURVE DELLA FORMA $G_k = g_k n^p$ ($p = 1 - 4$) PER LA CONDUTTANZA DEL POTASSIO. LA FIGURA INTERNA RAPPRESENTA IL PRIMO MILLISECONDO DI RISPOSTA. L'inflessione con potenza $p=1$ nella curva non può essere ben adattata da un semplice esponenziale (linea tratteggiata) che sale linearmente da zero. Più alte sono le potenze di p ($p = 2$: punto-tratteggiato; $p = 3$: linea tratteggiata) migliore è l'adattamento all'inflessione iniziale. In questo caso, $p = 4$ (linea continua) fornisce l'adattamento migliore. [7]

3.5 Modello HH per mammiferi

Come anticipato nel paragrafo 2.4, anche il modello elettrico di HH descrive la dinamica di un singolo neurone di calamaro gigante, mentre i neuroni dei mammiferi e in particolare del cervello umano sono molto più complessi in termini di caratteristiche strutturali ed elettrofisiologiche.

In realtà secondo dei recenti studi, il modello di HH si può estendere e modificare per essere adattato anche ai mammiferi.

Allo scopo di creare un modello di rete con tutte le caratteristiche di questi ultimi, A.G. Giannari e A. Astolfi, hanno unito le equazioni HH modificate per tre schemi neuronali distinti comunemente osservati nel cervello umano e hanno introdotto una struttura che descrive con precisione reti composte da neuroni con diverse proprietà dinamiche e pattern di attivazione distinti basati su una struttura di feedback.

La dinamica neuronale può essere modellata come nel circuito originale di Figura 3 ma con aggiunta di un ramo per il calcio (conduttanza in serie con potenziale a riposo).

La struttura è ideale sia per modellare l'effetto di sostanze farmacologiche che per modellare neuroni malati.[5]

CAPITOLO 4

TECNICA DI PATCH CLAMP

4.1 Storia del rilevamento di potenziali di membrana e correnti ioniche

Come abbiamo potuto constatare nei capitoli precedenti, il canale ionico svolge un ruolo fondamentale nella segnalazione cellulare.

Vari tipi di stimoli (ad es. legame del ligando, allungamento della membrana, cambiamenti nel potenziale di membrana) aprono il gate del canale, e gli ioni permeano attraverso il poro.

A differenza delle altre molecole di trasduzione del segnale, l'output del canale ionico è una corrente ionica o elettrica attraverso la membrana.

In questo capitolo verranno illustrati i progressi fatti nel corso del tempo, per capire come possono essere rilevati questi segnali elettrici dalle cellule e i metodi che hanno portato a tecniche recenti come quella del patch-clamp.

Il grado e il numero di canali attivi riflettono l'ampiezza della corrente del canale e pertanto, il comportamento delle molecole che fluiscono attraverso di esso, può essere tracciato registrando continuamente la corrente del canale.

Nei canali voltaggio-dipendenti, l'apertura e la chiusura dei gates dipendono da variazioni del potenziale di membrana e viceversa: la corrente attraverso la membrana, caricando e scaricando la capacità della membrana, produce cambiamenti nel potenziale di membrana.

Un'attenta analisi della corrente di membrana transitoria durante la generazione di un potenziale d'azione o di una semplice variazione di V_m è però un processo particolarmente complesso.

Per comprendere l'origine del potenziale di membrana e i suoi cambiamenti sono stati utilizzati metodi elettrofisiologici.

Per misurare il potenziale di membrana, devono essere posizionati due elettrodi sufficientemente fini attraverso la membrana e un voltmetro sensibile per la lettura. Un elettrodo è posizionato all'esterno della cellula e l'altro all'interno. A questo proposito, una questione chiave era come posizionare l'elettrodo all'interno della cellula senza rompere la membrana.

I primi pionieri nel campo trovarono un modo per farlo tagliando gli assoni giganti dei calamari alle estremità e inserendo due elettrodi sopra e sotto, senza danneggiare la membrana.

Nel caso delle fibre nervose mieliniche, a causa della difficoltà di inserire l'elettrodo in un assone di piccolo diametro, sono stati utilizzati metodi di gap (gap di saccarosio, gap di olio) per isolare la parte intatta di nervo e l'estremità tagliata.

Successivamente è stato sviluppato un metodo alternativo in cui viene utilizzato un unico elettrodo di vetro a punta fine invece che due, in modo da ridurre al minimo i danni e le perdite cellulari.

Neher e Sakmann, alcuni anni a seguire, hanno fatto un grande balzo in avanti nello sviluppo di questo tipo di registrazione così complicata. Invece di rendere il puntale della pipetta il più fine possibile, hanno realizzato una pipetta di grosso calibro e un atterraggio morbido per la punta sulla superficie della membrana.[8]

4.2 Introduzione al metodo di patch clamp

Il metodo del patch-clamp è una tecnica elettrofisiologica utilizzata per registrare flussi di corrente ionici attraverso singoli canali di membrana, nonché l'attività elettrica della singola cellula eccitabile.

Con questo metodo è possibile analizzare le modalità attraverso le quali i canali ionici influiscono sia sulla differenza di potenziale a livello di membrana sia su processi cellulari come la secrezione e la contrazione.[9]

Per la registrazione viene utilizzata una pipetta di vetro con un diametro che va dagli 1 ai 2 micron e resistenza attorno ai $4M\Omega$, che viene riempita di elettrolita e poggiata sulla membrana cellulare.

A seguito di una leggera suzione, la membrana presente a livello della punta della pipetta viene sigillata, formando una stretta connessione fisica, tra la punta e la membrana; è proprio per questa procedura che la tecnica viene chiamata di 'patch', ossia di 'rattoppamento'. È il flusso che passa attraverso questo canale sigillato, formato da pipetta e membrana, che viene registrato.

Questi 'patch' possono essere talmente piccoli da contenere anche un singolo canale di membrana, inoltre, il voltaggio nei due lati della membrana e le concentrazioni dei vari ioni esternamente e internamente possono essere manipolati in modo da determinare informazioni utili sia per le caratteristiche di trasporto sia di gating del canale in questione. [10]

L'elettrofisiologia del patch clamp è stata uno strumento centrale della neuroscienza e della ricerca farmaceutica sin dal suo avvento, alla fine degli anni 70 con il prezioso contributo di Neher e Sakmann (1976), ed è tuttora l'unico modo per catturare l'attività intracellulare di singoli neuroni con un elevato rapporto segnale-rumore.[11]

Oltre alla micro-pipetta di vetro viene utilizzata elettronica analogica sensibile per monitorare le correnti sinaptiche e le tensioni intracellulari di singole cellule eccitabili.

Ulteriori studi fatti nei decenni successivi prevedono anche la possibilità di applicare impulsi di aspirazione attraverso la membrana, accedendo al citoplasma cellulare, creando una configurazione a 'cellula intera'.

Gli amplificatori a micro-elettrodi vengono utilizzati per monitorare e manipolare i segnali di corrente e tensione della cellula.

Il circuito di feedback presente all'interno dell'amplificatore può essere usato sia in modalità voltage-clamp, cioè mantenendo costante la tensione della membrana cellulare e monitorando il flusso di corrente ionica generata dagli ioni attraverso di essa, nonché la composizione e la concentrazione attraverso i canali ionici; sia in modalità current-clamp dove viene iniettata una corrente per osservare gli AP e gli eventi sotto la soglia di innesco.

L'utilizzo di un amplificatore in retroazione è molto importante per mantenere, ad esempio nel caso di esperimento di voltage-clamp, la tensione di membrana costante evitando variazioni dovute ad artefatti.

La tecnica di voltage-clamp è stata usata dagli stessi Hodgkin e Huxley nel 1952 per caratterizzare le proprietà fisiche base dei neuroni.[12]

4.3 Tipico modello di registrazione in modalità voltage clamp

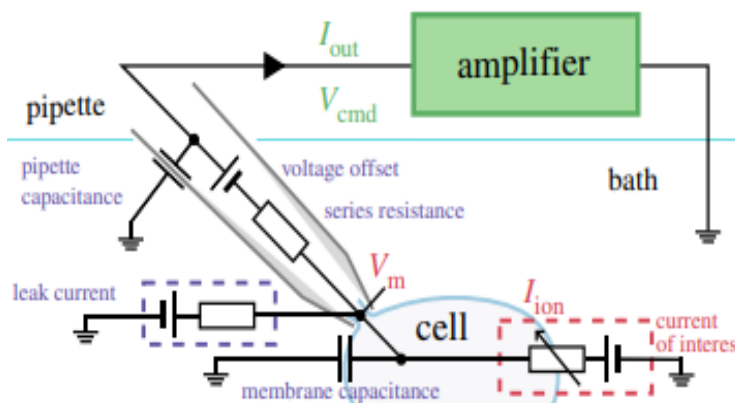


Figura 6: SCHEMA REALISTICO DELL'ESPERIMENTO DI VOLTAGE CLAMP. In rosso la corrente che interessa misurare, in verde la parte di amplificazione e in viola tutti gli artefatti sperimentali.[13]

Per la tecnica di voltage clamp generalmente si impostano queste due condizioni:

- (tensione di comando) V_{cmd} o $V_{clamp} = V_m$ (tensione di membrana)
- (corrente misurata) $I_{out} = I_{ion}$ (corrente di interesse)

Come visto nel paragrafo 3.1, la membrana cellulare si può schematizzare come un condensatore in parallelo alle correnti ioniche.

Tra l'elettrodo della pipetta e la cellula, c'è una resistenza in serie, che induce un mismatch tra la tensione di membrana V_m e la tensione di comando V_{cmd} , provocando uno spostamento nelle relazioni misurate corrente-tensione e anche un condensatore che rispecchia l'effetto capacitivo indotto dalla parete della pipetta.

Nella pipetta è presente anche un offset di tensione (dovuto all'amplificatore, agli elettrodi e ai potenziali di giunzione ecc...).

Infine, una resistenza di tenuta finita può causare una notevole corrente di dispersione attraverso il sigillo della pipetta ed eventuali perdite attraverso la membrana contaminando la registrazione della corrente. Tutti questi artefatti possono essere parzialmente compensati dall'amplificatore patch-clamp utilizzando regolazioni hardware in tempo reale.[13]

4.4 Patch clamp in vivo

Come già detto le tecniche di patch clamp ci consentono di registrare potenziali di membrana (compresi gli AP) dei singoli neuroni e di rilevare quindi come le attività neuronali supportino la funzione cerebrale a livello della singola cellula.

In questo paragrafo si andranno ad analizzare, anche grazie al lavoro di Asako Noguchi, Yuji Ikegaya e Nobuyoshi Matsumoto, come la tecnica di patch clamp sia attuata su organismi in vivo concentrandosi in particolar modo sulle attività neuronali nell'ippocampo, nel quale alcuni malfunzionamenti sono responsabili di malattie come l'Alzheimer e l'epilessia.

I ricercatori hanno sviluppato in particolar modo due tecniche per questo tipo di registrazione elettrofisiologica: una che prevede di ottenere dati su un insieme di più cellule che circondano gli elettrodi usati per la registrazione (metodo extracellulare), l'altra usata per misurare la dinamica del potenziale di membrana sopra e sottosoglia (metodo intracellulare).

Le registrazioni intracellulari hanno la peculiarità di usare tecniche con elettrodi con spessore della punta molto fino, in modo da avere una maggiore impedenza d'elettrodo.[11]

4.4.1 Registrazioni in vivo da animali anestetizzati

Le registrazioni in vivo di intere cellule sono state ottenute per la prima volta da animali anestetizzati perché riuscire a creare un sigillo tra pipetta e membrana è un processo critico che richiede che il cervello sia il più fermo possibile.

Mentre negli anni passati molti ricercatori si sono concentrati sulla neocorteccia del cervello, per la prima volta Hahn et al. hanno ottenuto registrazioni di cellule intere in vivo da cellule piramidali ippocampali.

Kitamura et al. hanno stabilito un metodo, usando del colorante fluorescente, che consente la visualizzazione del neurone come un'immagine negativa con la successiva identificazione delle sue strutture somatiche e dendritiche.

Queste tecniche hanno accelerato non solo la registrazione elettrofisiologica di patch clamp ma anche il riconoscimento e la manipolazione genetica di singoli neuroni di animali vivi.

Nella maggior parte degli studi di cui sopra, i ricercatori hanno catturato la dinamica del potenziale di membrana da un singolo neurone in una prova.[11]

4.4.2 Registrazioni in vivo da animali svegli

Margri et al., addestrando dei topi a rimanere quasi immobili, sono riusciti ad osservare le depolarizzazioni del potenziale di membrana a livello della corteccia cerebrale in risposta alla stimolazione dei baffi dei roditori.

Ovviamente il sistema cerebrale vero e proprio si trova più in profondità della neocorteccia e quando i ricercatori tentano di registrare potenziali di membrana da regioni profonde in vivo, alcuni 'ostacoli' come la matrice extracellulare o i vasi sanguigni rischiano di interagire con il puntale della pipetta di vetro.

Quindi, la registrazione patch-clamp a 'cella intera' dalle regioni più profonde degli animali risulta tecnicamente molto difficile ma con tecniche di aspirazione che prevedono la rimozione della neocorteccia anche questo sta diventando possibile.[11]

CAPITOLO 5

INNOVAZIONI NELLA TECNICA PATCH CLAMP

5.1 Microchip per patch-clamp

Nonostante l'utilità e decenni di sviluppo, gli amplificatori usati nella tecnica di patch clamp sono costosi e ingombranti con una bassa portata e scalabilità per il singolo canale ionico e per analisi che riguardano singole cellule.

A questo scopo, nel lavoro di Reid R. Harrison et al., viene presentato un microchip personalizzato o 'Patch chip' che svolge tutte le funzioni di un tradizionale impianto patch-clamp ma con meno potenza e con tutte le funzioni di amplificazione per produrre un segnale robusto.

Il microchip in questione, ideato da Reid R. Harrison et al., prevede un amplificatore patch-clamp personalizzato in grado di eseguire sia misurazioni voltage clamp che current clamp.

La dimensione microcircuitale caratteristica di $0,35 \mu\text{m}$, inferiore ai precedenti $0,5 \mu\text{m}$ dei microcircuiti pubblicati (Sigworth, 1995; Laiwalla et al., 2006; Weerakoon et al., 2010; Goldstein et al., 2011) offre prestazioni più elevate grazie a tensioni di soglia più basse.

Un'innovazione chiave, che ha permesso di fare dei passi avanti rispetto ai precedenti tentativi, è stato l'uso di elementi di feedback non lineari nel morsetto dell'amplificatore di voltage clamp per convertire le correnti misurate in tensioni eliminando così la necessità di utilizzare resistenze di valore elevato.

Il chip mostra bassi livelli di rumore di corrente ($1,1 \text{ pA rms}$ su 5 kHz) durante il voltage-clamp e bassi livelli di rumore di tensione ($8,2 \mu\text{V rms}$ su 10 kHz) durante le misurazioni di corrente.

Inoltre, con il chip in questione sono state eseguite misurazioni di corrente e tensione in vitro in Cellule HEK293FT, neuroni in coltura e anche registrazioni in vivo come parte di un sistema robotico.[12]

5.1.1 Morsetto di tensione

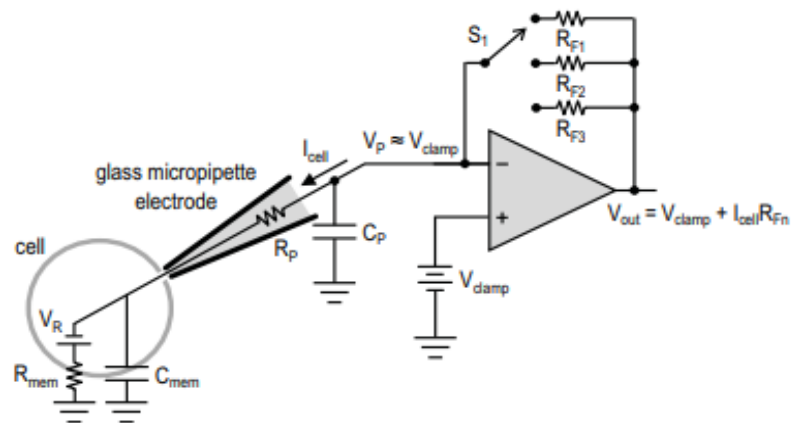


Figura 7: MODELLO ELETTRICO SEMPLIFICATO DELLA CELLULA VISTO AL CAPITOLO 3 E TUTTA L'APPARECCHIATURA NECESSARIA ALLA RILEVAZIONE PATCH CLAMP DI TENSIONE. Viene utilizzato un amplificatore operazionale con ingresso FET per mantenere la tensione della pipetta V_p al potenziale specificato dall'utente V_{clamp} . La corrente a cellula intera I_{cell} passa attraverso il resistore di feedback R_{Fn} selezionato dall'interruttore $S1$. La tensione di uscita risultante è linearmente proporzionale alla corrente misurata. Sono necessari diversi resistori di feedback per misurare accuratamente diversi intervalli di corrente da picoamp a nanoampere. Questi resistori devono essere nell'intervallo $M\Omega$ e $G\Omega$, il che li rende relativamente grandi e poco pratici da integrare su un chip.[12]

La figura sopra illustra uno schema circuitale semplificato per esperimenti patch-clamp di tensione, viene utilizzato un amplificatore operazionale in un circuito di feedback per fissare il potenziale di membrana a un valore specifico ad esempio V_{clamp} .

Se, una volta fissato V_{clamp} , il potenziale di membrana non coincide con esso, l'amplificatore genera una corrente di feedback che viene iniettata nella membrana cellulare e passa attraverso lo stesso microelettrodo che ha registrato il potenziale nel doppio strato fosfolipidico.

E' sin da subito bene notare che qui, il modello elettrico che schematizza la membrana cellulare, è differente da quello presentato da Hodgkin e Huxley: infatti, in Figura 7 è presente il solo condensatore per simulare la capacità di membrana in parallelo a un resistore che rappresenta la resistenza della membrana.

Questa semplificazione può andare bene per rappresentare la membrana ma manca di qualsiasi dinamica di corrente dovuta ai canali ionici.

L'amplificatore operazionale usato ha ingressi FET (field effect transistor) per assicurare che la corrente che fluisce nei terminali di ingresso sia inferiore a un picoamp in grandezza (Sigworth, 1995; Sakmann e Neher, 2009).

L'intera corrente, che rispecchia l'attività del canale ionico analizzato, chiamata I_{cell} , viene forzata attraverso una delle resistenze di retroazione R_{Fn} e viene così convertita in una tensione proporzionale.

Le proprietà dei vari tipi di canali sono state studiate facendo variare V_{clamp} su un intervallo di circa 100mV, monitorando ampiezza e andamento nel tempo delle correnti interne.

Poiché V_{out} , la tensione di uscita, è uguale a $V_{clamp} + I_{cell} * R_{Fn}$, bisogna scegliere una resistenza R_{Fn} che mi possa convertire tensioni di pochi picoamp a tensioni dell'ordine di mV o Volt, per fare ciò serve una R_{Fn} di valore molto elevato, dai $M\Omega$ ai $G\Omega$.

Inoltre, le correnti registrate possono variare ampiamente a seconda delle sinapsi attive, perciò, sono richiesti un'ampia gamma di valori di R_{Fn} .

Agenti esterni possono rendere la misura delle correnti pico ampere molto difficoltose e creare resistenze parassite che provocano cortocircuiti, è bene quindi proteggere i resistori di feedback da questi fattori.

Un'area chip molto limitata e capacità parassite dovute a resistori di valore molto grande rendono difficile costruire resistori di qualche $M\Omega$ su questi dispositivi molto piccoli.

Per ottenere un maggiore sensibilità con un amplificatore patch-clamp completamente integrato, Reid R. Harrison et al., hanno progettato un circuito voltage-clamp che elimina la necessità di utilizzare resistori di feedback molto grandi; per fare ciò sono stati utilizzati dei diodi al posto delle resistenze.

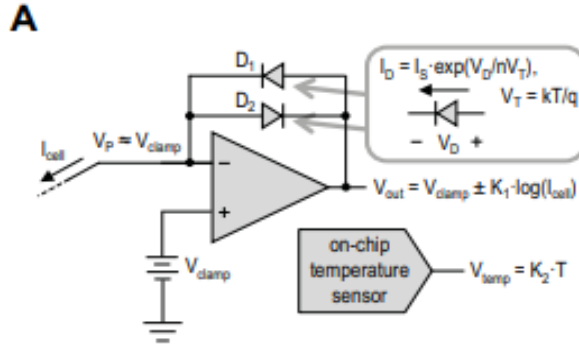


Figura 8: SCHEMA SEMPLIFICATO DEL CIRCUITO DI VOLTAGE CLAMP IN PATCHCHIP. I diodi su chip vengono utilizzati al posto di grandi resistori di feedback. [12]

La corrente diretta attraverso il diodo (iD) è una funzione esponenziale della tensione ai capi del diodo (vD):

$$iD = I_S(e^{vD/(nV_T)} - 1) \approx I_S e^{vD/(nV_T)} \quad (21)$$

Per valori di $vD > 0$, I_S è la corrente di saturazione del diodo, n è una costante approssimativamente uguale a 1,5 e V_T è la tensione termica kT/q , che è di circa 26 mV a temperatura ambiente. Quando $vD < 0$, la corrente nel diodo si avvicina a I_S che è di pochi picoAmp; quindi, si può considerare la corrente inversa praticamente zero. Il posizionamento dei diodi $D1$ e $D2$ in antiparallelo nel circuito di feedback come mostrato in Figura 8, ci assicura che uno dei dispositivi sia sempre acceso e l'altro spento, a seconda della direzione di I_{cell} . Posizionando i diodi in un circuito di feedback, si inverte la relazione esponenziale corrente-tensione e si produce una tensione di uscita che è una funzione logaritmica della corrente misurata I_{cell} :

$$V_{out} = V_{clamp} \pm nV_T \ln \frac{|I_{cell}|}{I_S} \quad (22)$$

dove il segno dipende dalla direzione della corrente.

E' inoltre importante notare come il rapporto corrente-tensione degli elementi a diodo è influenzato dalla temperatura, infatti, sia V_T che I_S variano con essa; per integrare questo problema è stato integrato un sensore di temperatura sul chip (Tuthill, 1998) vicino ai diodi, in modo da eseguire una calibrazione su di essi (Figura 8).

La rappresentazione con i diodi al posto delle resistenze presenta vantaggi significativi per la tecnica di voltage-clamp perché consente di misurare un'ampia gamma di

correnti da pico a micro, di qualsiasi segno, e rappresentarle in un range di tensione limitato compatibile con un ADC.[12]

5.1.2 Morsetto di corrente

La maggior parte degli esperimenti di patch clamp prevede la tecnica di voltage clamp per mantenere un potenziale di membrana e misurare le correnti risultanti. Tuttavia, anche la tecnica di current clamp viene molto utilizzata per misurare il potenziale intracellulare consentendo così ai neuroni di attivare potenziali d'azione di decine di mV in modo naturale.

I componenti principali del circuito a clamp di corrente sono un buffer di tensione o un amplificatore e una sorgente di corrente programmabile; il buffer generalmente ha un guadagno unitario per il monitoraggio delle tensioni intracellulari.

Nel loro lavoro, Reid R. Harrison et al., hanno previsto sia un basso rumore di fondo, sia una corrente programmabile basata su transistor per iniettare correnti positive e negative in un ampio range.[12]

5.1.3 Test in vitro e in vivo

Per il test in vitro sono stati eseguiti, con il microchip in questione, sia esperimenti di voltage clamp che di current clamp su cellule HEK293FT in coltura e su neuroni coltivati.

Nelle prove di voltage clamp, dopo aver ottenuto il sigillo con la pipetta, è stato eseguito un breve impulso di tensione di 1V per circa 1 ms dal PatchChip per rompere la membrana cellulare nel punto di contatto dell'elettrodo ottenendo così una configurazione a 'cella intera'; le correnti misurate si sono rivelate paragonabili a quelle registrate con amplificatori patch-clamp standard.

In modalità current clamp invece sono state iniettate correnti che vanno dai -100 pA a +150 pA e si sono misurati valori rappresentativi del potenziale di membrana come la resistenza di membrana $R_m=274M\Omega$ e la capacità di membrana $C_m=46,7pF$.

L'iniezione di corrente superiore a 75pA ha comportato una depolarizzazione nella cellula studiata e una conseguente attivazione del potenziale d'azione.

Similmente al test in vitro anche su cellule di topo in vivo sono state eseguite prove di voltage e current clamp grazie all'utilizzo di un sistema robotico, i potenziali d'azione però in questo caso sono stati registrati quando la corrente iniettata superava i 200pA.

Una limitazione nell'attuale implementazione del PatchChip è quando la corrente cambia direzione, infatti in questo caso, l'uscita dell'amplificatore operazionale non può passare istantaneamente tra i due diodi di feedback, facendo deviare la risposta dall'esponenziale previsto del primo ordine.[12]

5.2 Circuito a CMOS

Nel lavoro svolto da Siddharth Shekar, Krishna Jayant et al., viene presentato un amplificatore a CMOS multi-clamp in grado di registrare sia tensioni che correnti con prestazioni superiori a quelle dei precedenti apparecchi patch clamp.

La miniaturizzazione del dispositivo consente un mirroring della corrente ad alta larghezza di banda, facilitando l'uso di resistori attivi di valore elevato con un rumore più basso rispetto ai loro equivalenti passivi consentendo così una gamma più ampia di impedenze ad elettrodi.

Per testare la funzionalità dell'amplificatore sono state fatte misurazioni su colture neuronali con un elettrodo, sia internamente che esternamente alla cellula, sia usando elettrodi con punta molto sottile sia patch con impedenza elevata.

Gli elettrodi più affilati hanno dei diametri dell'ordine dei nanometri e impedenze dell'ordine delle centinaia di megaohm, consentendo l'accesso intracellulare per misurazioni di tensione più accurate.

Registrazioni di tensioni dell'ordine dei μV o mV e correnti che vanno da pA a nA richiedono l'uso di amplificatori per strumentazione a basso rumore; inoltre, il tutto risulta più complicato per via della resistenza in serie (R_s) e della capacità (C_p) della pipetta, che tendono a distorcere le registrazioni.

È quindi necessario che anche l'amplificatore abbia circuiti di compensazione associati per tenere conto dei legami non ideali della pipetta.

L'uso di circuiti integrati possono risolvere alcuni problemi come la larghezza di banda, le prestazioni, il costo e l'efficienza energetica ma richiedono elevati valori di resistenza.

Elementi non lineari di feedback, come visto nel capitolo 5.1, possono essere usati per superare questi inconvenienti, tuttavia, restano un problema l'elevata sensibilità alla temperatura e la distorsione.

Il chip ideato da Siddharth Shekar, Krishna Jayant et al., include circuiti di compensazione che utilizzano un riscontro negativo e transistori che operano sottosoglia per poter realizzare grandi resistenze; consente inoltre di ridurre l'area dell'amplificatore consumando pochi mW di potenza.

Un'altra peculiarità dell'amplificatore a CMOS citato è che può essere utilizzato anche con micro-elettrodi affilati ad alta impedenza per via della sua resistenza elevata, gamme di compensazione della capacità e dispone di un ingresso condiviso che consente il passaggio tra CC e VC; infine, in vitro, l'amplificatore è stato in grado di registrare segnali ad alta fedeltà in entrambe le modalità.[14]

5.2.1 Current clamp

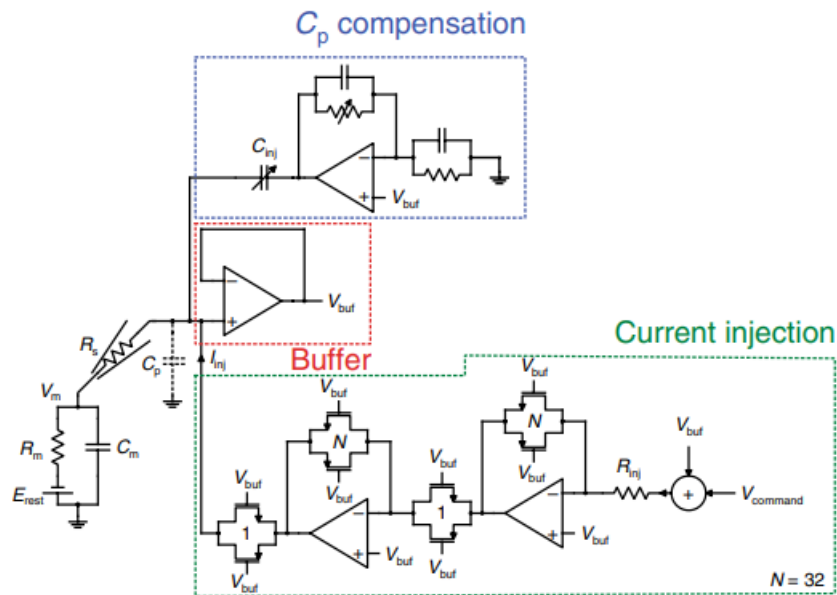


Figura 9: SCHEMA CIRCUITALE DI CURRENT CLAMP CHE MOSTRA L'IMPLEMENTAZIONE DEL BUFFER DI TENSIONE, IL CIRCUITO DI COMPENSAZIONE DI C_p E IL CIRCUITO DI INIEZIONE DI CORRENTE. [14]

Il circuito di current clamp (CC) consiste in un buffer di tensione a guadagno unitario con un ingresso ad alta impedenza e feedback negativo, circuito di compensazione per C_p e circuito di iniezione di corrente con MOSFET.

Il buffer deve avere una bassa perdita di corrente in ingresso in modo da consentire registrazioni di tensione con $I_{inj}=0$.

Nello caso in cui la corrente iniettata (I_{inj}) fosse zero, l'unica circuiteria extra richiesta sarebbe quella necessaria per compensare C_p , generalmente di pochi pF, che agisce in combinazione con R_s per filtrare il segnale misurato, tuttavia, I_{inj} nella maggior parte dei casi non è zero.

Quando viene iniettata una corrente, R_s introduce una tensione di offset proporzionale nella misurazione che però può essere sottratta se R_s è determinata accuratamente.

La compensazione di C_p è importante per misurare segnali in tensione alla massima larghezza di banda possibile, per fare ciò, si moltiplica la tensione registrata V_{buf} per un fattore di guadagno A che va da 1 a 2 implementato con l'uso di un amplificatore non invertente e ricollegandola all'ingresso tramite un condensatore programmabile C_{inj} .

La corrente iniettata risulta quindi uguale a $(A-1) * C_{inj} * dV_{buf}/dt$.

Considerando che la resistenza di membrana della cellula R_m è di diverse decine di $M\Omega$ o maggiore, l'impedenza di uscita del blocco di iniezione di corrente deve essere almeno un ordine di grandezza maggiore in modo da non aggiungere una sostanziale quantità di corrente di dispersione. La tensione di comando viene prima convertita in corrente proporzionale attraverso un resistore fisso su chip R_{inj} .

R_{inj} va presa di qualche centinaio di $k\Omega$, infatti, sarebbe ottimale una resistenza elevata per ridurre il rumore ma si porrebbero così dei limiti alla massima corrente che può essere iniettata.

A seguito di questi accorgimenti, i ricercatori Siddharth Shekar, Krishna Jayant et al. hanno osservato un potenziale di membrana a riposo di $-58mV$ e potenziali d'azione neuronali con altro SNR.[14]

5.2.2 Voltage clamp

Il VC si ottiene utilizzando un convertitore I/V (TIA), che assicura che la tensione della pipetta (V_p) sia uguale a una $V_{comando}$ precedentemente stabilita, un circuito di compensazione per C_p e uno per R_s .

Per grandi correnti transitorie in ingresso, la tensione di uscita del convertitore I/V con un valore di resistenza di feedback fisso si satura e potrebbe portare alla perdita temporanea del feedback; a questo scopo vengono usati diodi in antiparallelo come in 5.1.1.

Come notato in precedenza, R_s è in genere diverse centinaia di $M\Omega$ per microelettrodi affilati e di conseguenza le correnti, che sono tipicamente nel range $pA-nA$, scorrono attraverso R_s causando errori della scala dei mV nella tensione. Inoltre, R_s , in combinazione con la capacità della membrana C_m , filtra il segnale di interesse. I circuiti dedicati devono quindi compensare sia R_s che C_p ; un'altra componente fondamentale per determinare con precisione la corrente del segnale e conseguentemente per la compensazione di R_s .

La mancanza di compensazione R_s porterebbe innanzitutto, un cambio di passo in $V_{comando}$ determinando una variazione del potenziale di membrana (V_m) con una costante di tempo esponenziale determinata da $R_s C_m$. In secondo luogo, una corrente I_p che scorre attraverso R_s farà deviare V_m da $V_{comando}$ di un fattore $I_p R_s$. Infine, qualsiasi corrente di segnale sarà filtrata passa-basso con una costante di tempo data da $R_s C_m$.

Come detto precedentemente, in un tipico esperimento VC, V_p viene portato dal suo valore iniziale, quello del potenziale di membrana a riposo, a un valore differente. Dato che il TIA assicura che questo passaggio sia applicato anche all'elettrodo collegato alla pipetta, la corrente risultante misurata dal TIA sarà una combinazione della corrente desiderata attraverso la pipetta e la corrente di carica richiesta per modificare il potenziale attraverso C_p . [14]

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Questa tesi si è posta l'obiettivo di capire nel dettaglio il funzionamento della membrana cellulare, in particolare: della selettività dei canali ionici nel passaggio di sostanze, assicurando così l'integrità biochimica della cellula; della capacità che hanno queste particolari proteine di membrana nel far passare gli impulsi elettrici da una cellula all'altra come nel caso dei neuroni e di come sia possibile legare il comportamento dei canali a variazioni del potenziale di membrana.

Il modello di membrana descritto da Hodgkin e Huxley ci ha permesso, grazie alla rete elettrica circuitale da loro schematizzata, di capire meglio come il doppio strato fosfolipidico si comporti.

Questo passaggio ci è stato molto utile non solo per chiarire alcuni aspetti sul comportamento dei canali ionici e sulla loro dipendenza dal potenziale di membrana ma anche per capire elettricamente come, in ambito di registrazione dei potenziali, la membrana e i canali che la attraversano influiscano sulla misura.

Abbiamo anche visto come la misura del potenziale, grazie al lavoro di numerosi fisiologi e biofisici come Neher e Sakmann, sia tutt'ora possibile e come con l'avvento dell'elettronica e processi di automazione si sia potuto rendere conto di misure sempre più precise e mirate.

A questo scopo sono stati presentati due lavori che, grazie a uso di diodi, CMOS, circuiti di compensazione ed elementi di feedback, hanno portato una ventata di aria fresca a una tecnica sempre più affidabile in un ambito, quello dei potenziali cellulari, che può darci ancora molte risposte sul comportamento delle cellule e del nostro organismo.

La possibilità di poter registrare correnti e tensioni in una cellula è un elemento di importanza assai rilevante poiché permette, indifferentemente dal tipo di cellula, di riscontrare eventuali anomalie della singola unità biologica o del complesso di unità preso in esame.

Dobbiamo infatti ricordare che i canali ionici sono fondamentali per una corretta trasmissione del segnale e il potenziale di membrana contiene molte specifiche sul comportamento del tipo di cellula in esame.

In questo elaborato mi sono concentrato in particolare sul neurone, ma registrazioni di correnti e potenziali transmembrana possono darci molto anche su altri tipi di cellule, indipendentemente dalla loro capacità o meno di sviluppare degli AP.

Ad esempio, nel miocardio una rilevazione anomala o un'interruzione del movimento di ioni (corrente) può causare un battito cardiaco anomalo o nel caso dei neuroni se i canali non rispondono bene agli stimoli può essere presente una patologia neuronale.

Inoltre, la registrazione in vivo di cellule intere in combinazione con altre tecniche ibride quali ottica, manipolazione genica e farmacologia intracellulare non solo svela la dinamica del potenziale di membrana individuale, ma scopre anche caratteristiche aggiuntive di attività cellulare.

Ad esempio, per svelare il contributo di specifici canali ionici all'attività sinaptica in singoli neuroni, i ricercatori hanno manipolato farmacologicamente la conduttanza ionica e hanno tentato di rivelare il contributo della conduttanza eccitatoria e inibitoria a livello unicellulare.[10]

Recentemente, le registrazioni in vivo di cellule intere sono state applicate non solo nei roditori ma anche altre varie specie di animali viventi, compreso il pesce zebra, furetti, gatti, pipistrelli e anche l'uomo.

In conclusione, ritornando alle cellule nervose, uno degli obiettivi principali per gli anni a venire, sarà quello di poter registrare segnali intracellulari provenienti da sempre più neuroni affinando quindi la tecnica patch clamp in applicazioni dove sono necessarie un gran numero di registrazioni intracellulari simultanee facendo così finalmente luce su nuove basi fisiologiche che legano le varie funzioni cerebrali alle caratteristiche anatomiche, molecolari e genetiche.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Dan Chong, Matt Klingler (UCD), <https://chem.libretexts.org/@go/page/257>
- [2] Raghavan M, Fee D, Barkhaus PE. Generation and propagation of the action potential. *Handb Clin Neurol*. 2019; 160:3-22.
- [3] Dubyak GR (2004). Ion homeostasis, channels, and transporters: an update on cellular mechanisms. *Adv Physiol Educ* 28: 143–154.
- [4] Bean BP (2007). The action potential in mammalian central neurons *Nat Rev Neurosci* 8: 451–465.
- [5] A.G. Giannari, A. Astolfi, Model design for networks of heterogeneous Hodgkin–Huxley neurons, *Neurocomputing*, Volume 496,2022, Pages 147-157.
- [6] Mohammad Tajparast, Mladen I. Glavinović , Effect of ion concentration, solution and membrane permittivity on electric energy storage and capacitance. *Bbamem* (2018)
- [7] Nelson, M., Rinzel, J. (1998). The Hodgkin—Huxley Model. In: *The Book of GENESIS*. Springer, New York, NY.
- [8] Kukita, F., Oiki, S. (2012). Prologue: The Ion Channel. In: Okada, Y. (eds) *Patch Clamp Techniques*. Springer Protocols Handbooks. Springer, Tokyo.
- [9] https://it.wikipedia.org/wiki/Patch_clamp
- [10] <http://www.biopills.net/potenziale-di-membrana-potenziale-azione>
- [11] Noguchi A, Ikegaya Y, Matsumoto N. In Vivo Whole-Cell Patch-Clamp Methods: Recent Technical Progress and Future Perspectives. *Sensors (Basel)*. 2021 Feb 19;21(4):1448.
- [12] Harrison RR, Kolb I, Kodandaramaiah SB, Chubykin AA, Yang A, Bear MF, Boyden ES, Forest CR. Microchip amplifier for in vitro, in vivo, and automated whole cell patch-clamp recording. *J Neurophysiol*. 2015 Feb 15;113(4):1275-82.

- [13] Lei CL, Clerx M, Whittaker DG, Gavaghan DJ, de Boer TP, Mirams GR. Accounting for variability in ion current recordings using a mathematical model of artefacts in voltage-clamp experiments. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 2020 Jun 12;378(2173):20190348.
- [14] Shekar, S., Jayant, K., Rabadan, M.A. et al. A miniaturized multi-clamp CMOS amplifier for intracellular neural recording. *Nat Electron* 2, 343–350 (2019).