

1.5 I CANALI IONICI

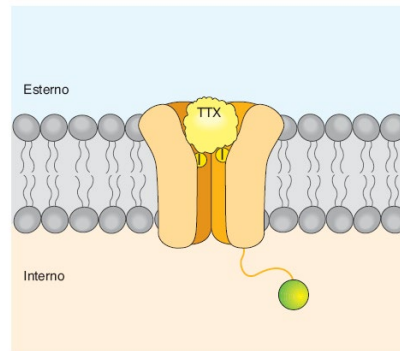
I canali del Na⁺ voltaggio-dipendenti (Nav)

- presenti in quasi tutti i **tessuti eccitabili**
- Nell'uomo: 9 geni che codificano per i canali Nav1.1-Nav1.9
- sono responsabili della fase di **depolarizzazione** del potenziale d'azione
- **Alcune isoforme sono bloccate** reversibilmente e con alta affinità dalla tetrodotossina (**TTX**) (Nav1.1 - Nav1.4; Nav1.6; Nav1.7) (TTX-sensibili)
- esistono anche canali del Na⁺ TTX-insensibili (Nav1.5; Nav1.8; Nav1.9) (iperalgnesia)
- **attivazione ed inattivazione** sono processi molto **veloci** (ms) e voltaggio-dipendenti
- l'**attivazione** è controllata dagli a.a. carichi dei quattro segmenti transmembranali **S4**
- l'**inattivazione** è controllata da a.a. carichi contenuti nelle anse intracellulari (modello "**chain & ball**")
- la **permeabilità** è controllata dall'ansa P (**P-loop**) tra i segmenti **S5** e **S6**

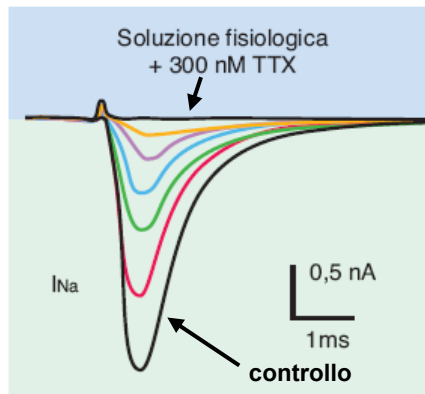
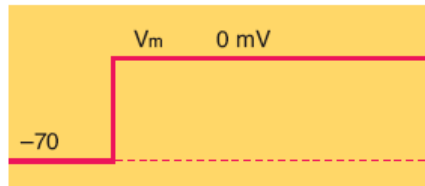
Blocco dei canali del Na^+ con TTX



La tetrodotossina (TTX) è una potente neurotossina che si accumula nei tessuti di alcuni animali, come ad esempio il pesce palla. A bassissime dosi causa paralisi muscolare bloccando l'insorgenza del PA.

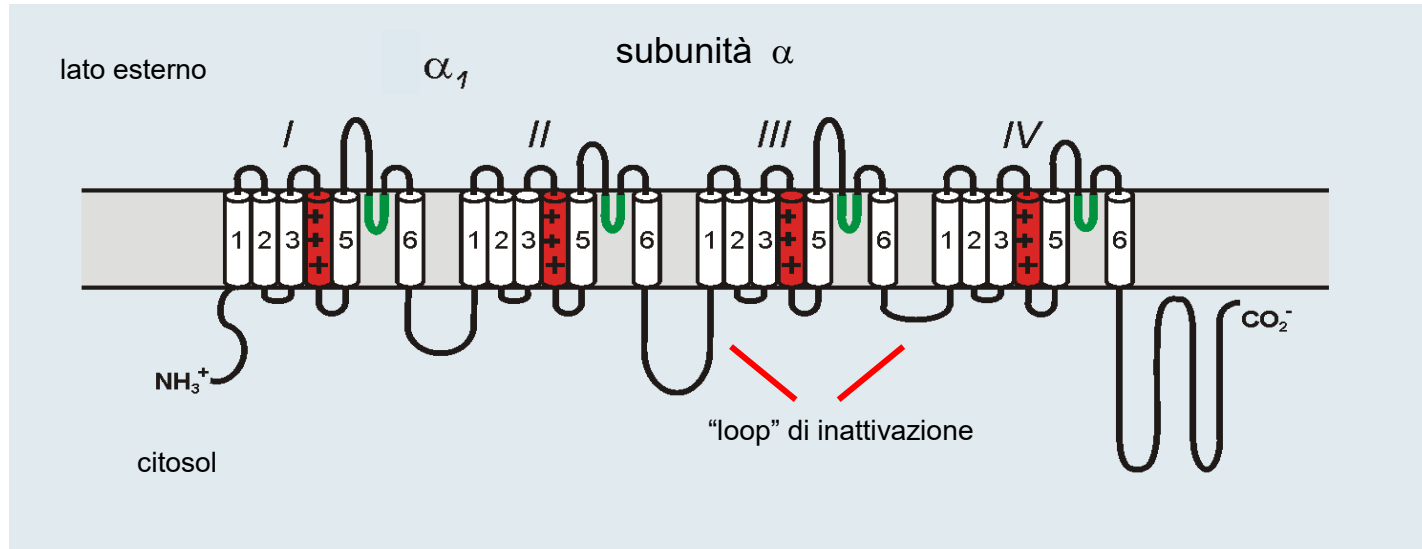


- TTX ha alta affinità ($K_d = 3 \text{ nM}$)
- blocco 1:1 (una molecola di TTX si lega ad un canale Na^+)



- Esempio di come TTX riduce la corrente di Na in modo dose-dipendente

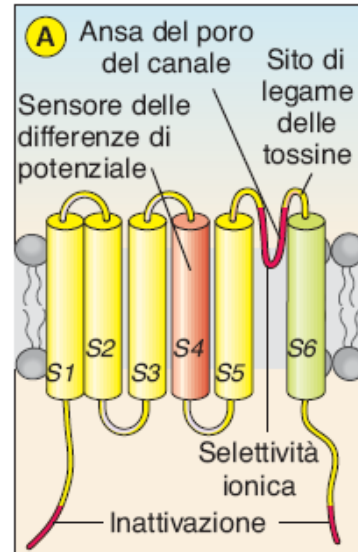
Struttura molecolare dei canali del Na⁺



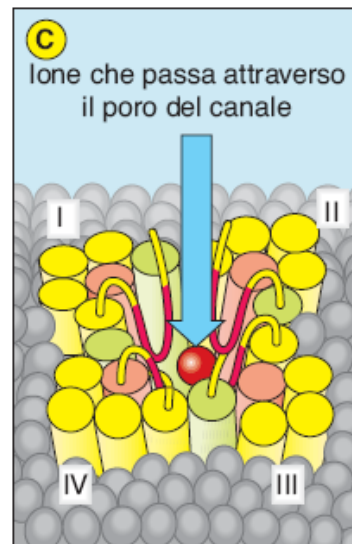
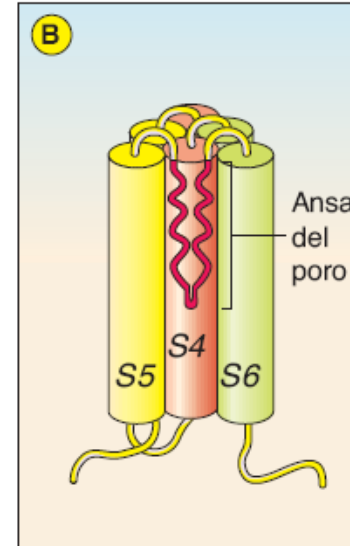
- la subunità α è formata da 4 domini (I, II, III, IV) formati da 6 segmenti transmembranalari (S1, S2, S3, S4, S5, S6)
- i segmenti **S4 contengono** a.a. carichi positivi (soprattutto arginina) e sono i **sensori del potenziale**. Sono responsabili della dipendenza dal voltaggio (attivazione del canale)
- le **"P-loop" S5-S6** controllano la selettività del canale
- l'inattivazione è associata al movimento di un **"loop intracellulare"** che cambia posizione quando il canale è aperto e impedisce il passaggio di ioni

La subunità α dei canali del Na^+ V-dipendenti

Un dominio con il sensore del
voltage e il filtro di selettività

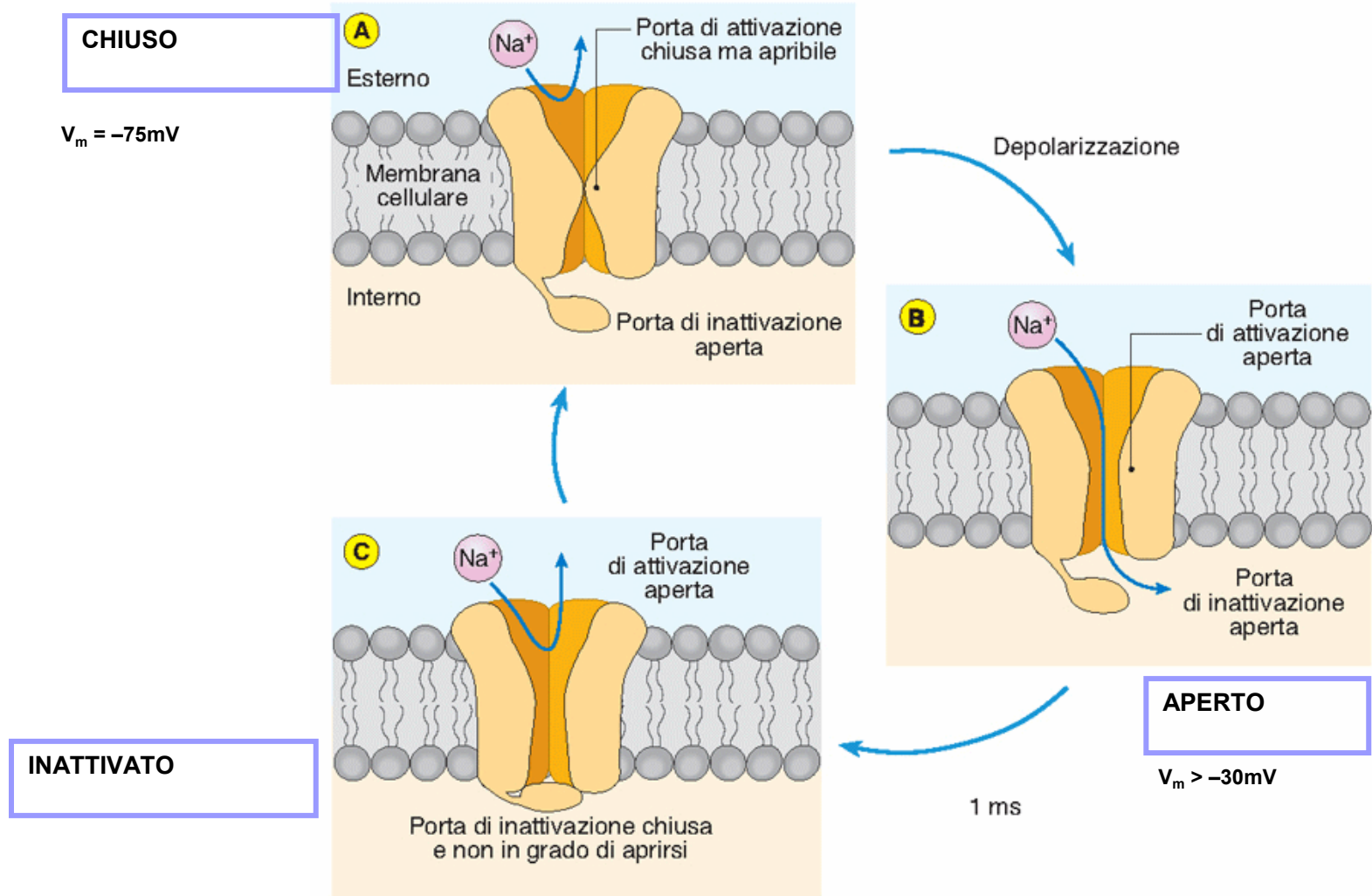


Organizzazione spaziale
di un dominio del canale



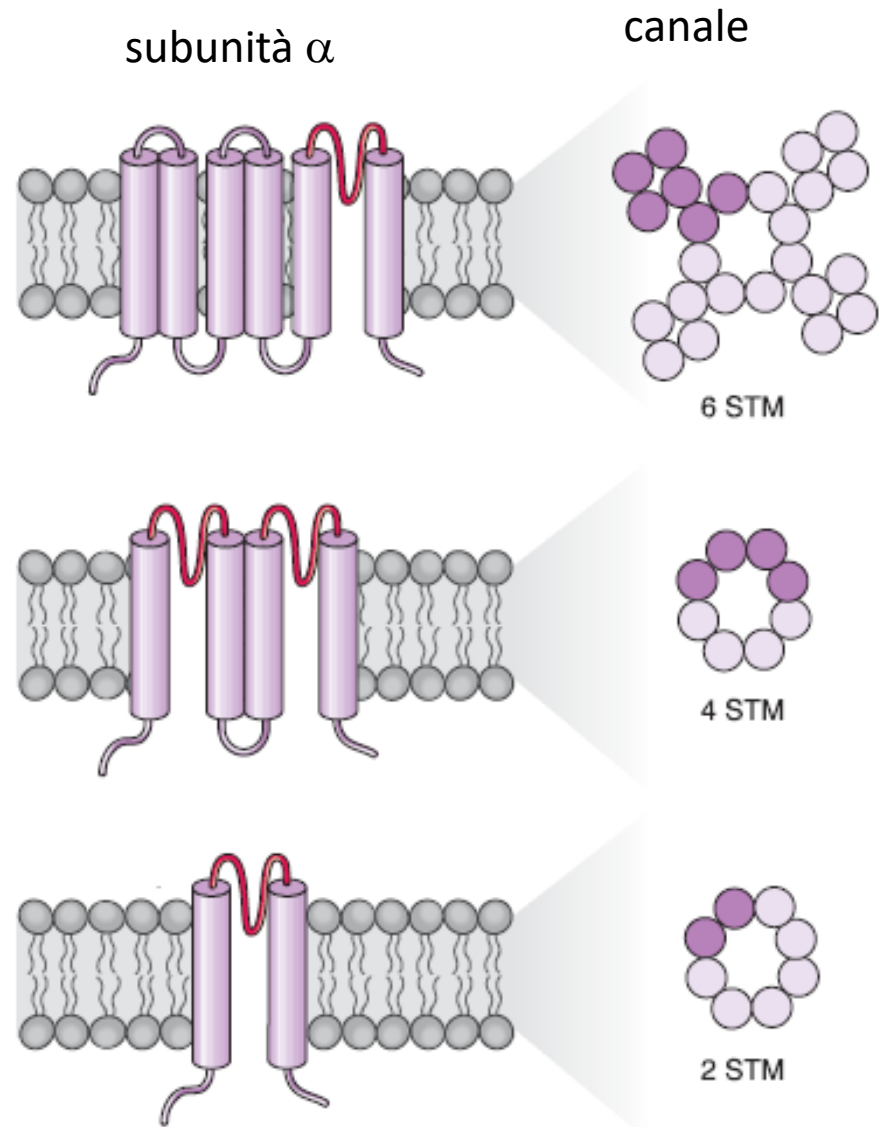
Permeazione
di uno ione

Il modello di inattivazione "chain & ball"



• I canali del K⁺

- Famiglia eterogenea (>80 geni) strutturalmente e funzionalmente
- In generale hanno la funzione di **ripolarizzare** la cellula e mantenere il potenziale di riposo a valori negativi
- La **subunità α** è formata da un dominio con 2,4,o 6 segmenti transmembrana
- Il canale è formato da combinazioni di **subunità α**
- cinetica di **attivazione** lenta o veloce
- l'**inattivazione** può essere veloce oppure inesistente
- bloccanti: Cs⁺, aminopiridine, caribdotossina, apamina, paxillina
- possono essere attivati da variazioni di **potenziale**, dal **Ca²⁺**, dalla riduzione di **ATP** e dall'**ACh**



Canali del K^+ :

- **K_{v1} - K_{v12} : voltaggio-dipendenti.** I più diffusi, sono attivati da depolarizzazione, la fuoriuscita di K^+ causa ritorno al potenziale di riposo.
includono:
 - Delayed rectifier** ($K_{v1,3,7,10}$): attivazione lenta, poca inattivazione
 - Tipo A** ($K_{v1,4}$): attivazione ed inatt veloci
 - K_{v7}** : lentissima cinetica di attivazione, alcune mutazioni sono associate a convulsioni neonatali, syndrome del Q-T lungo.
 - K_{v11}** : ripolarizzazione dopo la sistole. Alcune mutazioni possono creare aritmie.
- **K_{Ca} , calcio-dipendenti** (K_{Ca1-3}), distinti in BK e SK
Si aprono quando il Ca^{2+} intracellulare aumenta ($>mM$).
- **K_{ir} , inward-rectified** , si chiudono con la depolarizzazione, si aprono con l'iperpolarizzazione, includono:
 - K_{ACh} , ACh-dipendenti** (GIRK1, K_{ir3})
 - K_{ATP} , ATP-dipendenti** (K_{ir6})

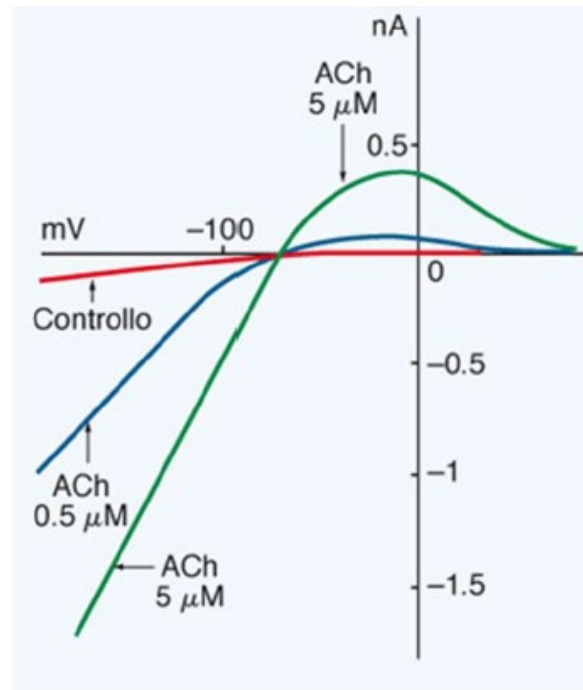


Figura 7-51 ► Relazione I/V stazionaria di canali del tipo GIRK (K_{ir3}) ottenuta in voltage clamp, in assenza di acetilcolina (controllo) ed in presenza di acetilcolina a concentrazioni crescenti (0.5 e $5 \mu\text{M}$).

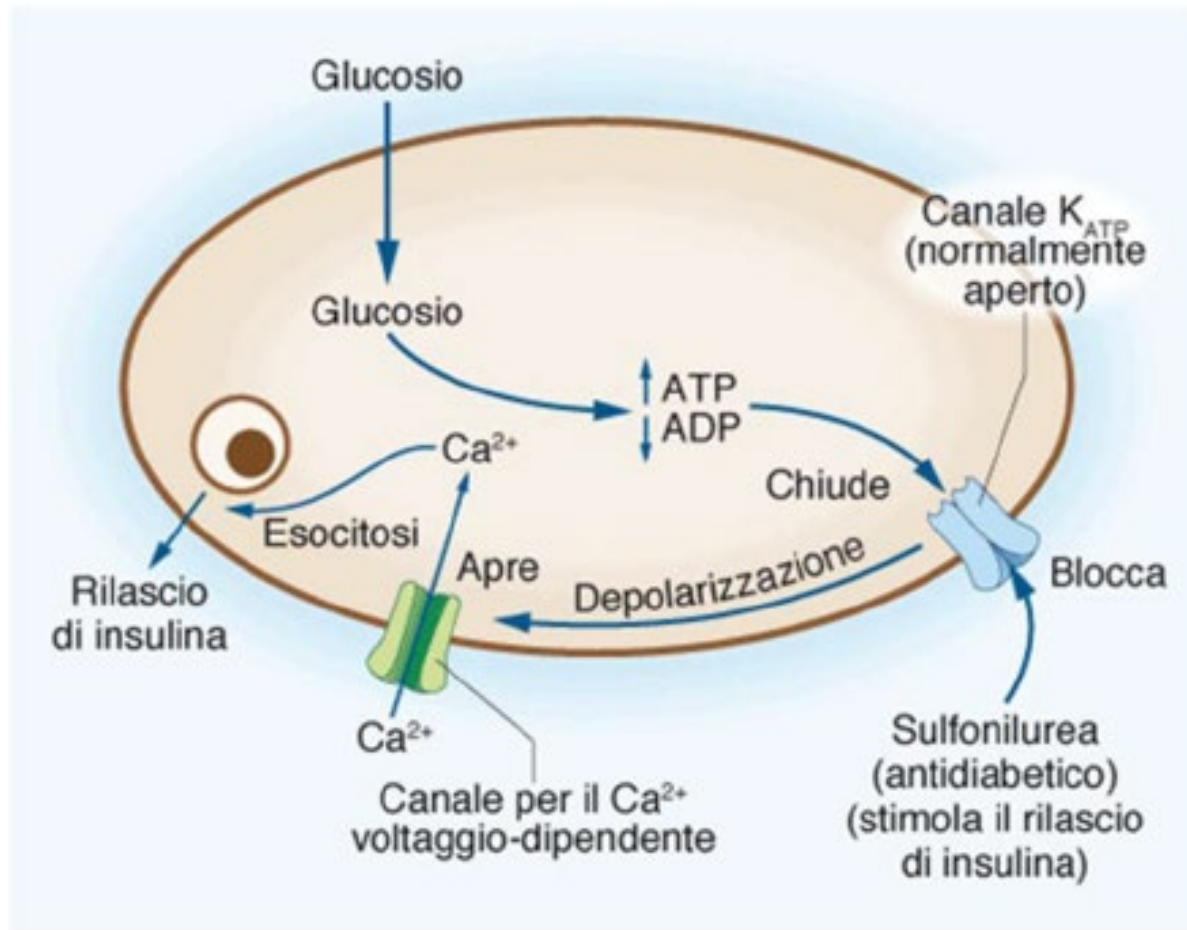


Figura 7-56 ► La regolazione della secrezione di insulina (ormone ipoglicemizzante) da parte delle cellule β del pancreas rappresenta un esempio di “funzione integrata” svolta da canali ionici. Sono implicati due tipi di canali: un canale K_{ATP} e un canale del Ca^{2+} voltaggio-dipendente.

- I canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti (Cav)

- regolano l'ingresso del Ca^{2+} nella cellula
- l'attivazione è V-dipendente (la soglia può essere più alta o più bassa dei canali del Na^+)
- l'inattivazione è V- e Ca^{2+} -dipendente (più lenta dei canali del Na^+)
- causano depolarizzazioni prolungate (i PA durano **10–400 ms**)
- pot. di Nernst molto positivo

$$E_{\text{Ca}} = 58/2 \text{ mV} \log [10^{-3}]/[10^{-8}] = +145 \text{ mV}$$

Controllano:

- 1) la contrazione del m. liscio e cardiaco
- 2) la trasmissione sinaptica (neurosecrezione)
- 3) l'autoritmicità dei potenziali d'azione
- 4) la secrezione ormonale
- 5) il differenziamento, la crescita e l'invecchiamento cellulare
- 6) la trasmissione di segnali chimici intracellulari

Esistono due grandi famiglie di canali Cav:

- a bassa soglia di attivazione (Cav3)
- ad alta soglia di attivazione (Cav1, Cav2)

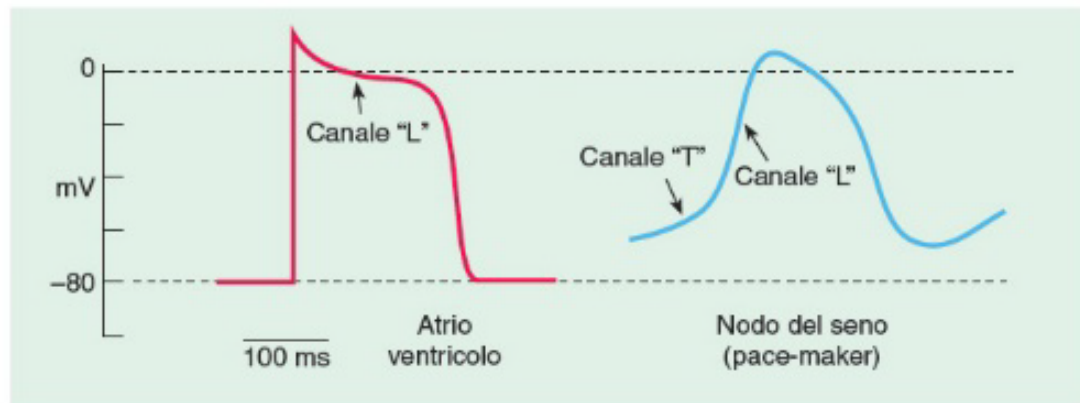
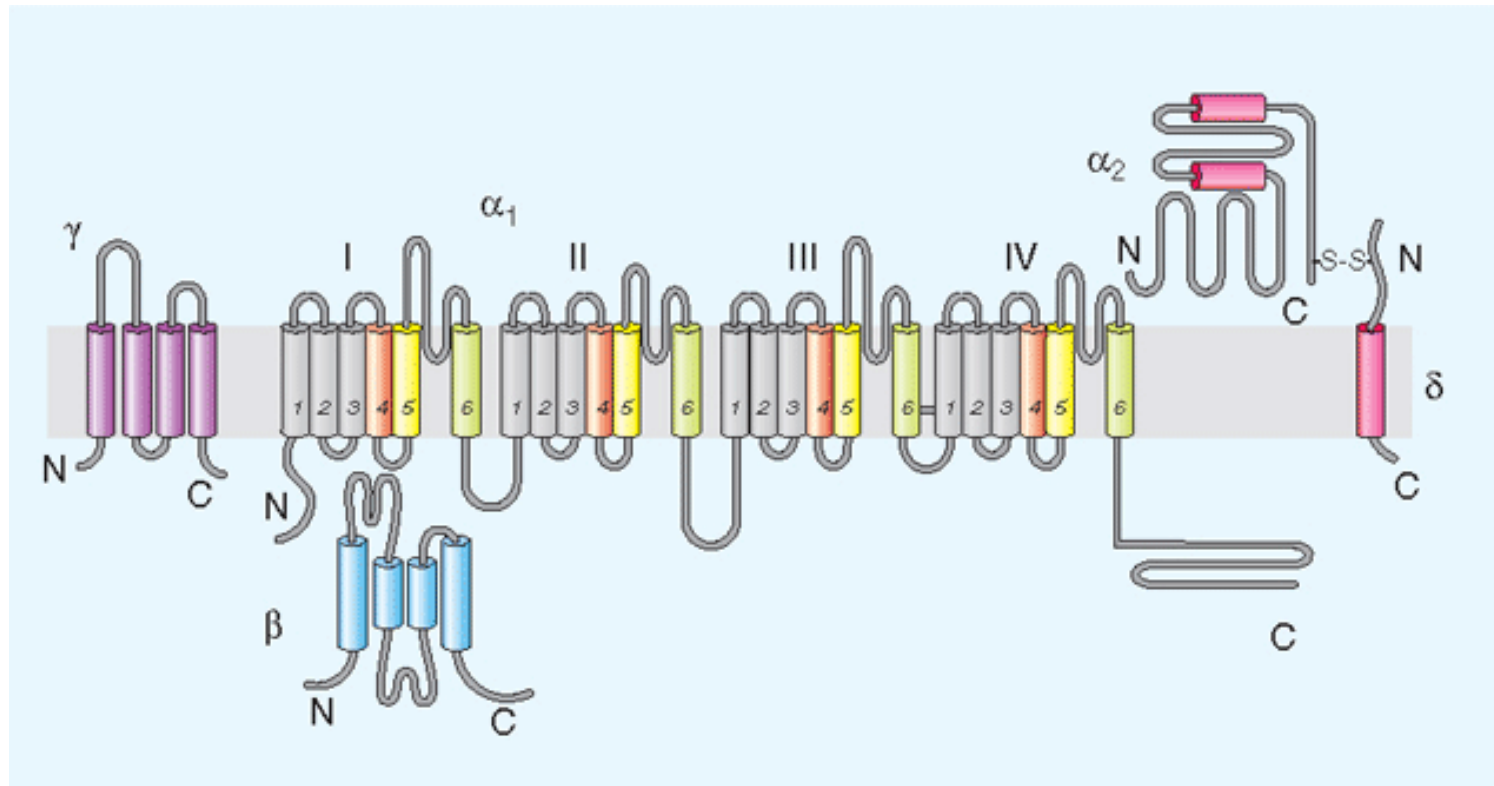
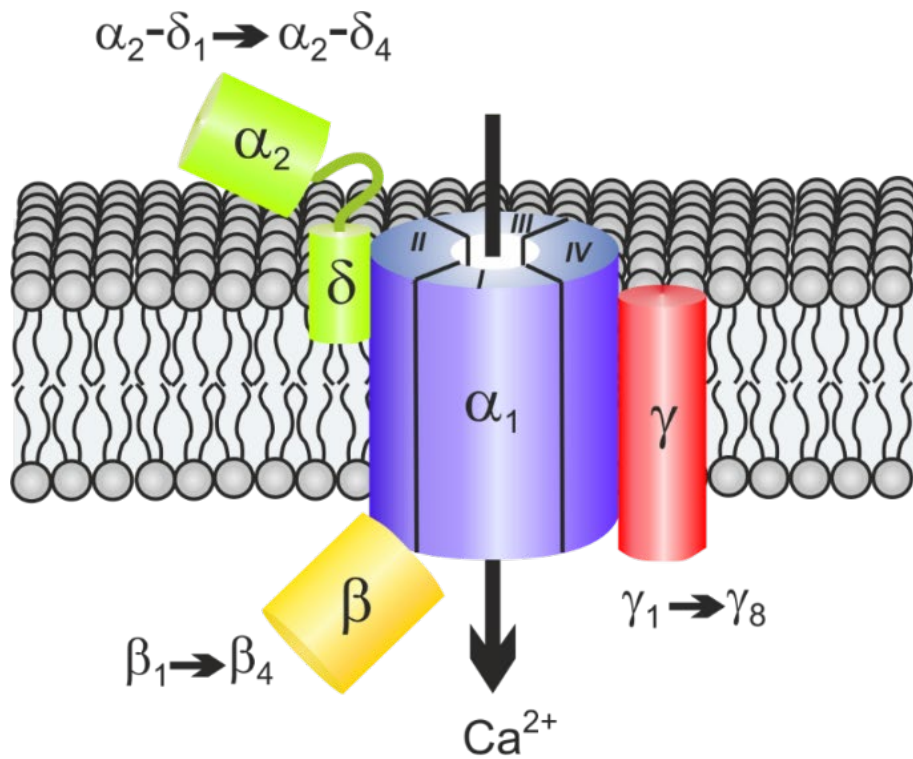


Figura 3.20 Potenziali d'azione cardiaci caratterizzati da lunghe depolarizzazioni dovute all'ingresso di Ca^{2+} attraverso canali L cardiaci (ad alta soglia). I potenziali d'azione delle cellule pace-maker del nodo del seno hanno anche una fase di depolarizzazione lenta dovuta alla presenza di canali a bassa soglia T.

Struttura di un canale del Ca^{2+} : le subunità α_1 , β , α_2 - δ e γ



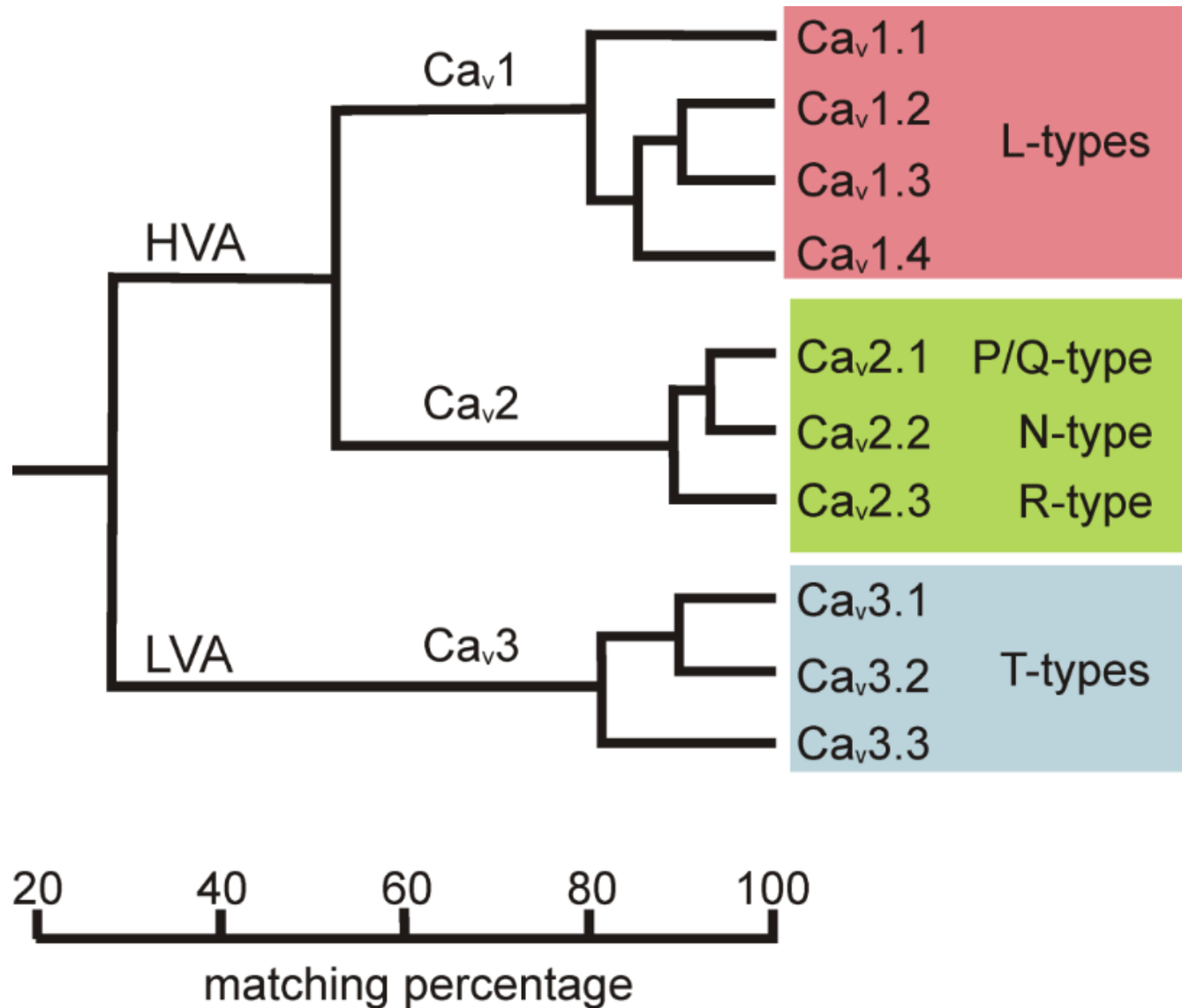


HVA

$\alpha 1$ subunits

$\text{Ca}_v1.1$	} L-type
$\text{Ca}_v1.2$	
$\text{Ca}_v1.3$	
$\text{Ca}_v1.4$	
$\text{Ca}_v2.1$	P/Q-type
$\text{Ca}_v2.2$	N-type
$\text{Ca}_v2.3$	R-type

Gradi di omologia tra i diversi tipi di canali del Ca^{2+}





Calcio-antagonisti per la cura di cardiopatie e ipertensione

I canali del Ca^{2+} di tipo L svolgono un ruolo fondamentale nel regolare i flussi di Ca^{2+} che controllano l'eccitabilità e la forza di contrazione del muscolo cardiaco e dei muscoli lisci che determinano lo stato di dilatazione dei vasi sanguigni. Per questo motivo, molecole che bloccano o riducono l'attività dei canali L e quindi i flussi di Ca^{2+} che entrano nelle cellule muscolari rappresentano una categoria di farmaci estremamente interessanti per il loro uso come anti-ipertensivi, antiaritmici e antianginosi. Questi farmaci sono denominati **calcio-antagonisti** o anche bloccanti dei canali del Ca^{2+} . Attualmente esistono tre classi di farmaci calcio-antagonisti con differenti proprietà farmacologiche e funzionali: le fenilalchilamine (derivati del **verapamil**), le benzodiazepine (derivati del **diltiazem**) e le 1,4-diidropiridine (derivati della **nifedipina**). Le tre classi di molecole hanno siti distinti di legame sulla subunità α_1 del canale e modi d'azione diversi che ne caratterizzano e ne condizionano l'impiego nella cura di alcune patologie cardiovascolari. Occorre però chiarire che per tutte e tre le classi di molecole vale il principio che il canale legato al farmaco è bloccato e non conduce Ca^{2+} .

La caratteristica principale che determina l'impiego del farmaco in un particolare tessuto e in una particolare patologia è strettamente legata allo stato del canale in cui il sito di legame è più facilmente raggiungibile dal farmaco. Così nel caso del verapamil e del diltiazem il loro sito di legame è all'interno del canale ed è più facilmente raggiungibile quando

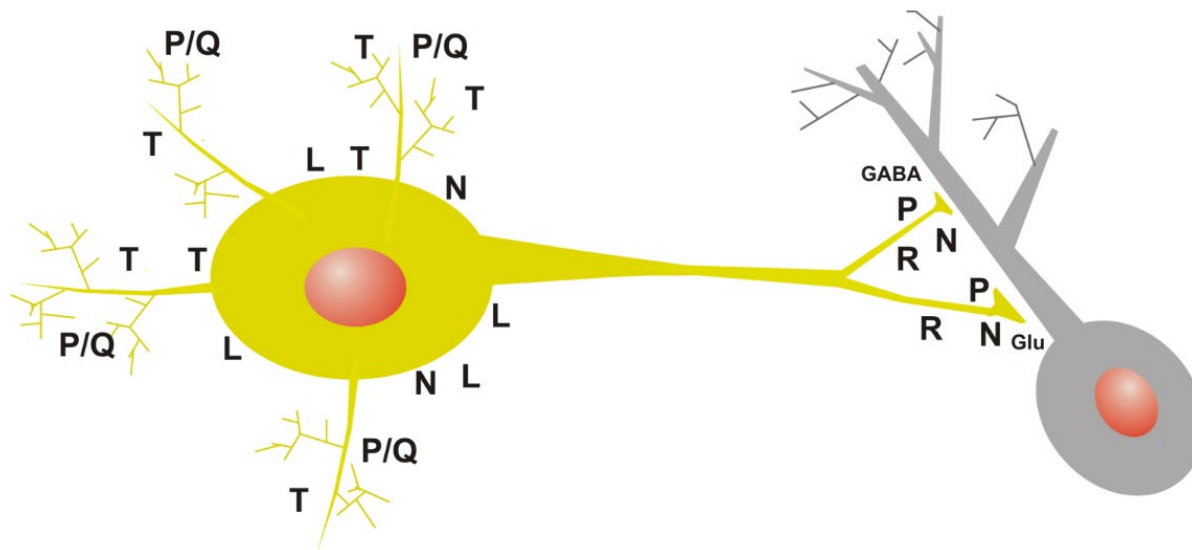
il canale è aperto. Di conseguenza questi due farmaci sono più attivi e quindi largamente impiegati nella cura delle patologie miocardiche (aritmie e scompensi cardiaci) dove il canale L rimane aperto molto a lungo durante i prolungati potenziali d'azione (Fig. 3.4C) e ha quindi la possibilità di interagire con i due calcio-antagonisti. Al contrario, il legame delle 1,4-diidropiridine (1,4-DHP) è fortemente condizionato dallo stato inattivato del canale che persiste durante le sostenute depolarizzazioni della cellula muscolare, come avviene per esempio nelle lunghe fasi di attività del muscolo liscio vasale. Quindi, le 1,4-DHP sono calcio-antagonisti particolarmente efficaci come miorelassanti della muscolatura liscia radiale del vaso e sono comunemente impiegate come anti-ipertensivi, in quanto la pressione arteriosa è strettamente correlata allo stato di costrizione del vaso. Più il diametro del vaso è ridotto (vasocostretto) e maggiore è la pressione arteriosa. Bloccando il Ca^{2+} che passa attraverso i canali del Ca^{2+} di tipo L, le 1,4-DHP riducono la contrazione delle cellule muscolari radiali con conseguente aumento della loro lunghezza e quindi della circonferenza (diametro) del vaso.

BIBLIOGRAFIA

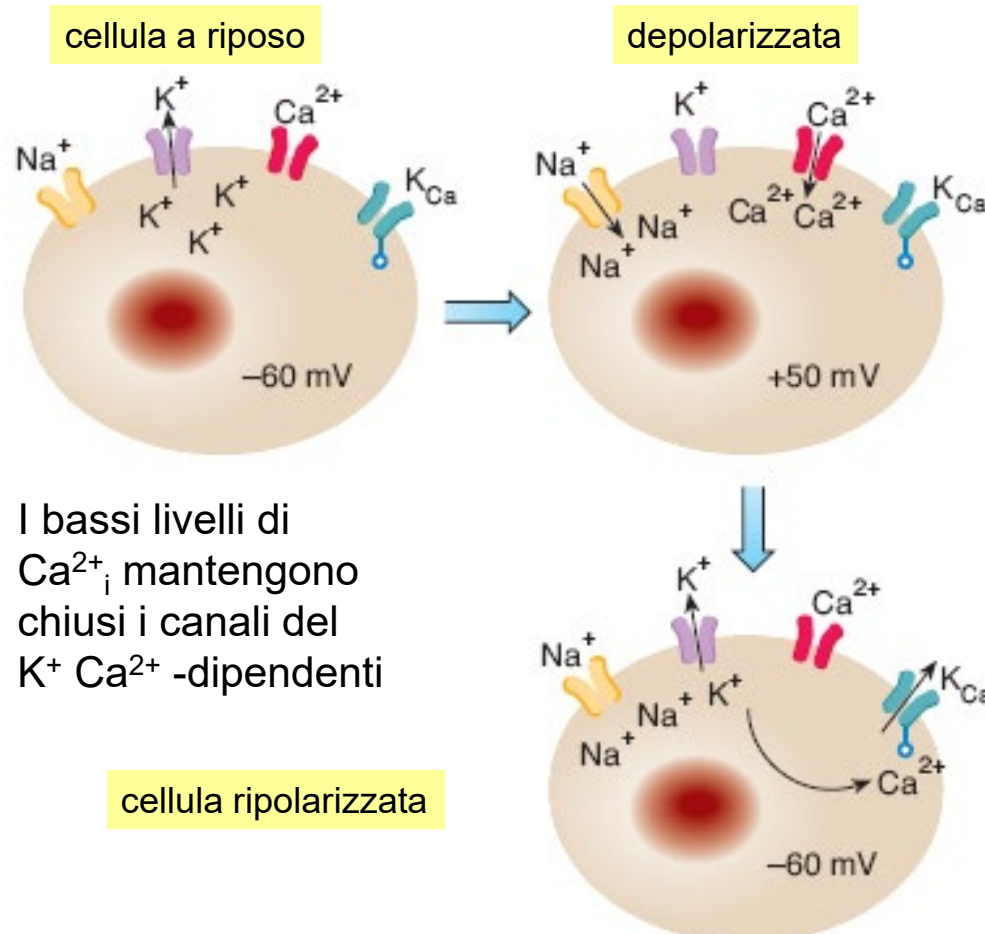
Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M.J., Glossmann, H. (1998) Structural basis of drug binding to L Ca^{2+} channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 19: 108.

- **Distribuzione eterogenea dei canali del Ca^{2+} nei neuroni**

- i canali N e P/Q sono addensati nei *terminali presinaptici*. Sono determinanti nel *controllo* della trasmissione sinaptica
- i canali L e T sono preferenzialmente somatici e perisomatici (*postsinaptici*). Implicati nell'invecchiamento neuronale
- i canali T sono distribuiti lungo i dendriti assieme ai canali P/Q



Ruolo dei canali del K^+ voltaggio- e Ca^{2+} -dipendenti

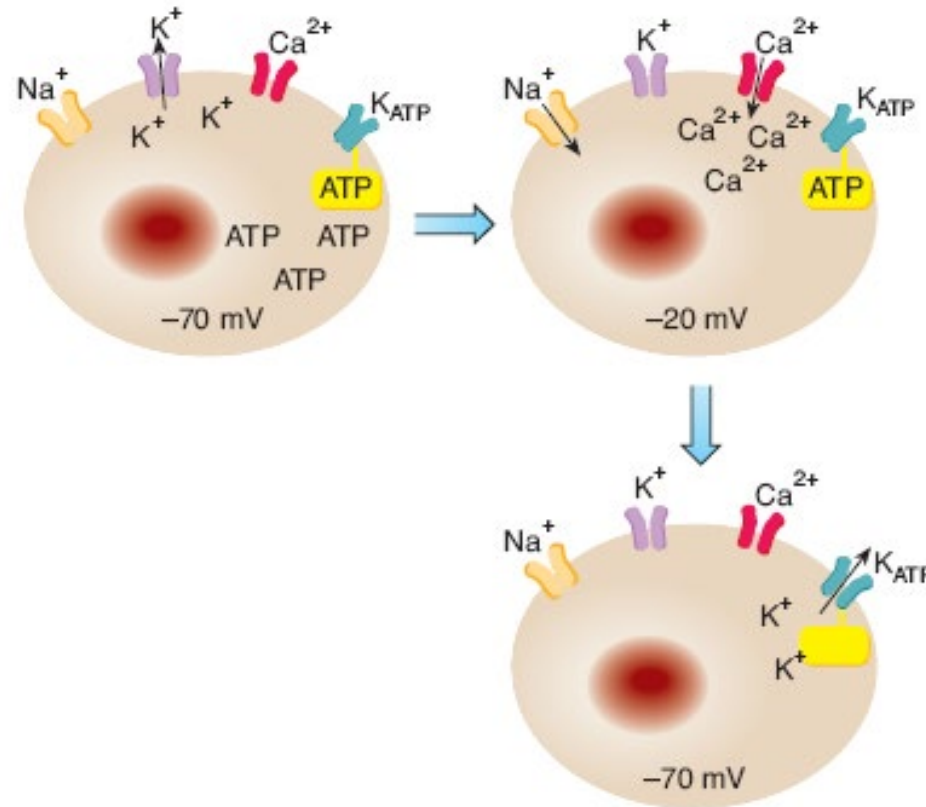


I bassi livelli di Ca^{2+}_i mantengono chiusi i canali del $K^+ Ca^{2+}$ -dipendenti

L'aumento di Ca^{2+} intracellulare apre i canali del $K^+ Ca^{2+}$ -dipendenti e la cellula si ripolarizza più velocemente, grazie anche all'apertura dei canali del K^+ V-dipendenti

Ruolo dei canali del K^+ ATP-dipendenti

cellula a
riposo



Intensa attività muscolare causa riduzione di ATP e blocco delle pompe ioniche, causando depolarizzazione.

Gli alti livelli di ATP intracellulare mantengono chiusi i canali del K^+ ATP-dipendenti.

La riduzione di ATP intracellulare durante l'ipossia induce l'apertura dei canali del K^+ ATP-dipendenti, la cellula si ripolarizza, il Ca^{2+} intracellulare cessa di aumentare. La cellula rimane ripolarizzata fino a che non si ripristinano i livelli di ATP intracellulare.

I canali del Cl⁻

- Canali anionici ubiquitari, permeabili anche ad altri anioni (HCO_3^-)
- La concentrazione intracellulare può variare in funzione dell'espressione di $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ e $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$. Questo trasporto può accumulare Cl^- fino ad un valore di 50 mM.
- Si distinguono in:
 - canali attivati da ligando (recettori GABA e glicina)
 - Voltaggio –dipendenti (CLC)
 - CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
 - Attivati dal Ca^{2+} (CLCa)
 - Canali intracellulari(CLIC)

Funzione:

- trasmissione GABAergica
- regolano eccitabilità, stabilizzano il potenziale a riposo
- secrezione di Cl e bicarbonate, produzione di muco

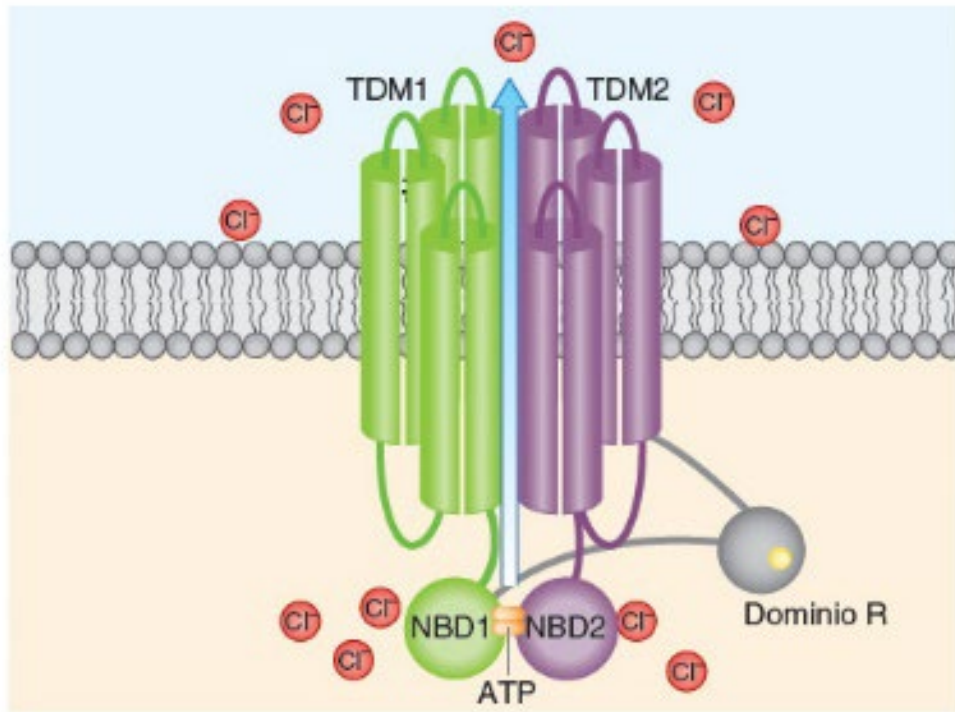


Figura 3.26 Rappresentazione schematica della struttura del canale CFTR. Sono evidenti i due domini transmembrana (TMD1 e TMD2) composti da sei segmenti paralleli, i due domini citoplasmatici (NBD1 e NBD2) che legano ciascuno una molecola di ATP e il dominio R regolatorio che possiede siti di fosforilazione PKA-dipendenti.

Il canale CFTR è aperto quando il dominio R è fosforilato, 2 ATP sono legati nei rispettivi domini. (regolato da cAMP).

Espresso nell'epitelio respiratorio, gastro-intestinale, pancreas e ghiandole sudoripare.

I canali TRP (TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL)

- Superfamiglia di canali cationici ubiquitari negli eucarioti, espressi sulla membrana plasmatica o sulle membrane intracellulari
- Attivazione polimodale (ad es. TRPV1 dipende da capsaicina e calore, TRPM8 risponde al mentolo ed al freddo)
- STRUTTURA: proteine tetrameriche, ciascuno con 6 STM
- Differiscono nella sequenza e lunghezza delle porzioni N e C terminale
- Permeabili ad una o più Correnti cationiche (Na, Ca, K)

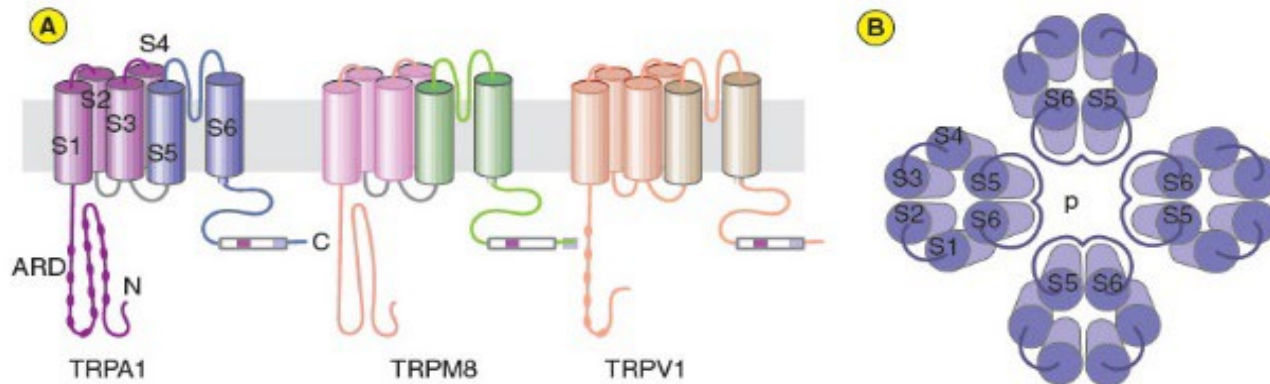


Figura 3.27 (A) Rappresentazione schematica delle subunità proteiche dei canali TRPA1, TRPM8 e TRPV1. Ciascuna subunità è formata da sei segmenti transmembrana (S1-S6), un'ansa che unisce i segmenti S5 ed S6 all'interno del poro e due lunghi terminali citoplasmatici N e C di diversa lunghezza. TRPA1 e TRPV1 possiedono un numero variabile di ripetizioni di anchirina che formano il dominio ARD. (B) Quattro subunità TRP si aggregano in membrana per formare un canale tetramerico. Si noti la disposizione dei 4 segmenti S5 e S6 all'interno del poro (p).

TRPV: vanilloidi

TRPC: canonici

TRPM: melastatina

Regolazione:

- Voleggio (debole regolazione in quanto S4 contiene pochi aa carichi)
- temperatura
- stimoli meccanici
- stimoli chimici
- calcio e calmodulina
- pH

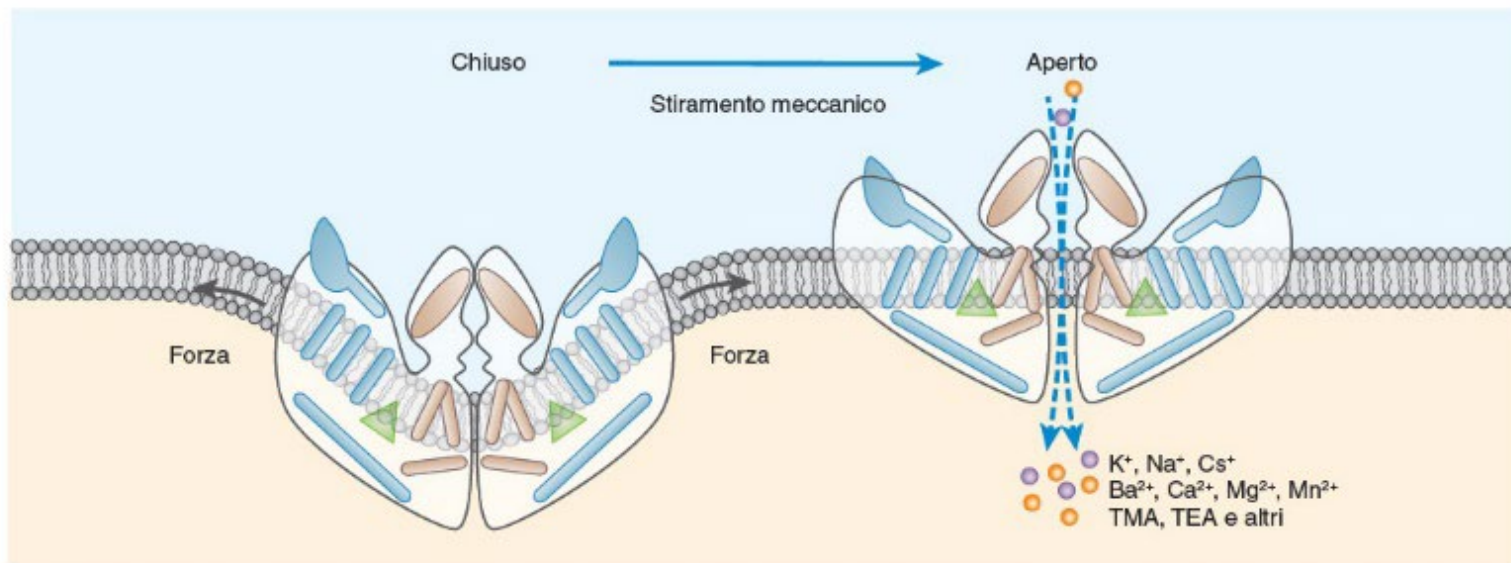


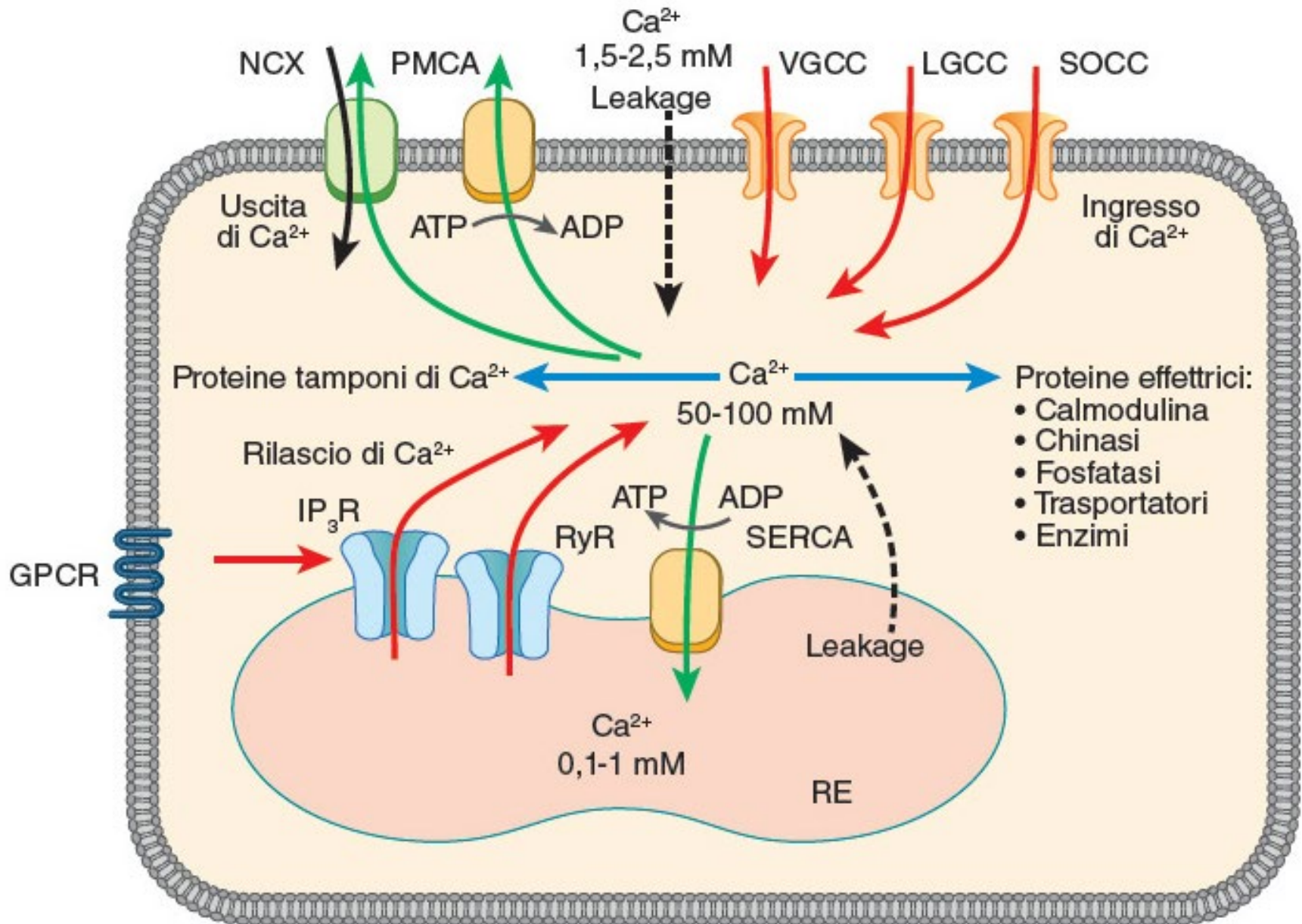
Figura 3.28 Modello di attivazione dei canali Piezo. Lo stiramento della membrana attiva direttamente il canale producendo l'appiattimento delle strutture a pala. I Piezo sono canali cationici non selettivi, permeabili agli ioni monovalenti (K^+ , Na^+ e Cs^+) e divalenti (Ba^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+}) e a diversi cationi organici come il tetrametilammonio (TMA^+) e il tetraetilammonio (TEA^+).



G. Aicardi, V. Carabelli, E. Carbone, R. Maggi
Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati, III Ed.
Edises Edizioni

2021: Premio Nobel per la Fisiologia assegnato congiuntamente a:
Ardem Patapoutian/David Julius

OMEOSTASI DEL Ca^{2+} INTRACELLULARE



GLI HOT-SPOT DI Ca^{2+} INTRACELLULARE

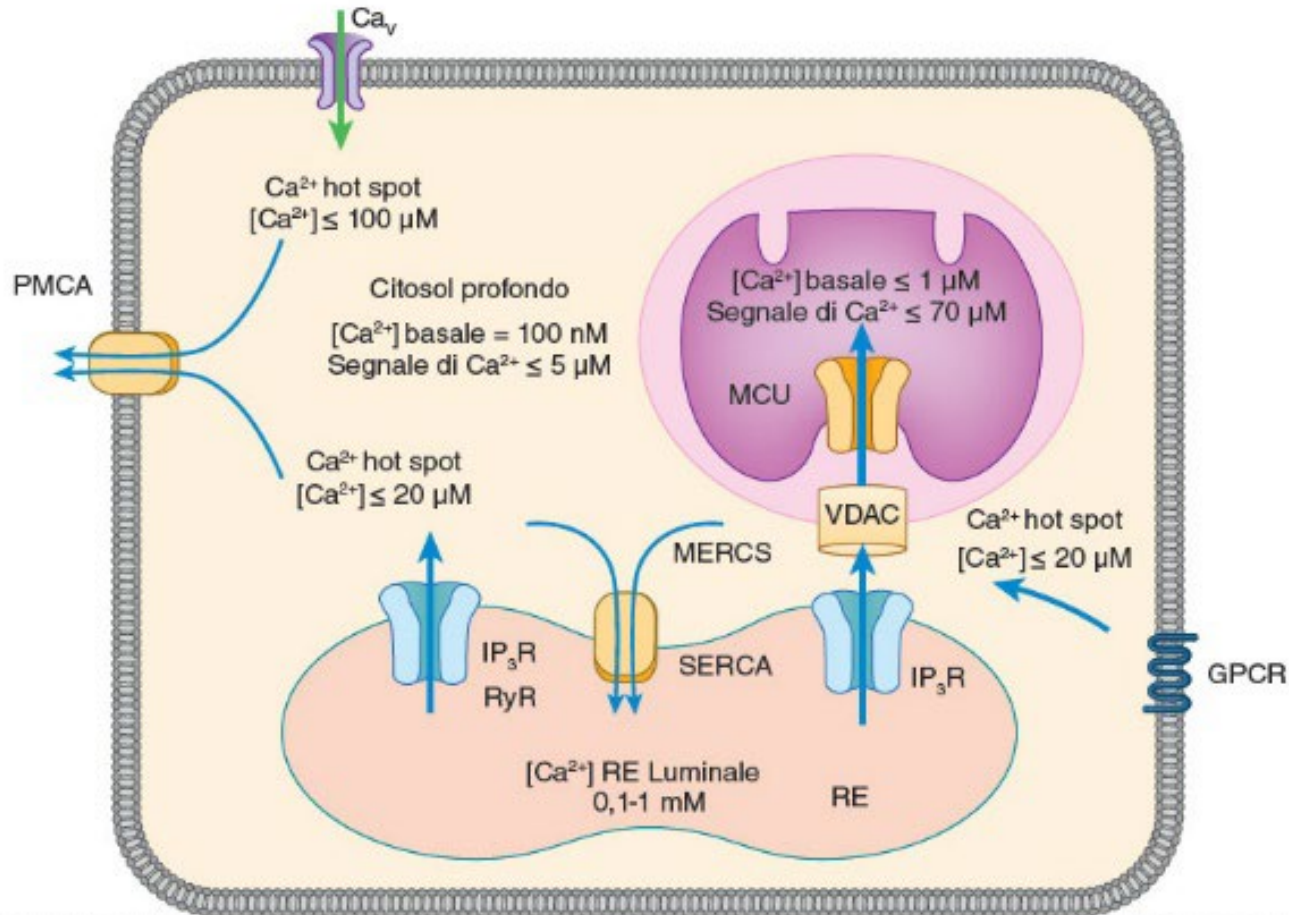


Figura 1.24 Illustrazione schematica dei Ca^{2+} hot spot, siti ad alta $[\text{Ca}^{2+}]$ generati nelle vicinanze dei canali del Ca^{2+} (Ca_v) sulla membrana plasmatica, degli IP₃R e RyR sul reticolo endoplasmatico, e dei punti di contatto tra reticolo endoplasmatico e mitocondri (MERCS). Quest'ultimo Ca^{2+} hot spot garantisce l'attivazione del trasporto del Ca^{2+} nella matrice mitocondriale, mediato dal canale VDAC e dal trasportatore MCU.

TRASDUZIONE DEI SEGNALE Ca^{2+} -DIPENDENTI

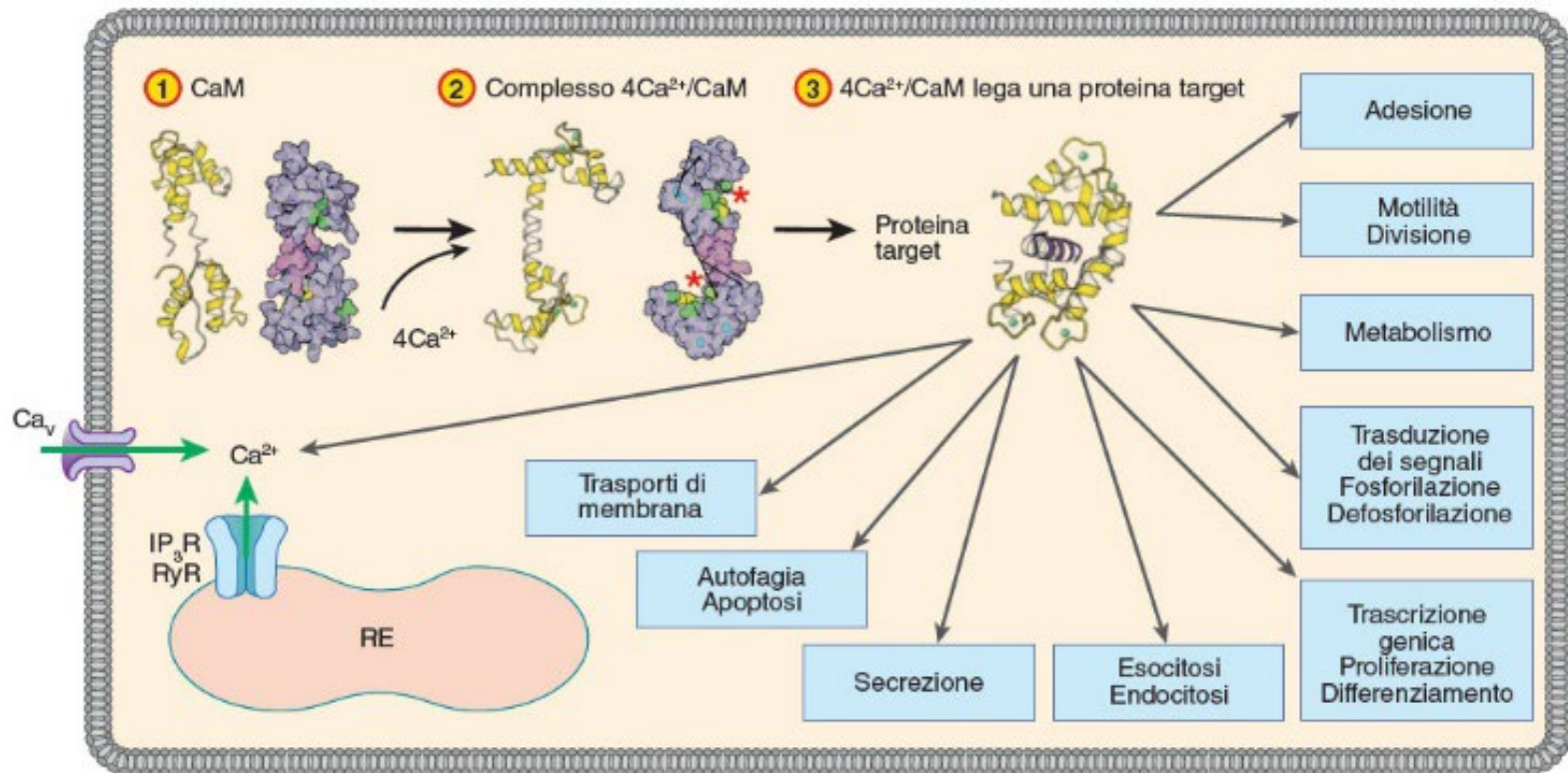


Figura 1.26 Meccanismo di attivazione e funzioni cellulari regolate dalla calmodulina. CaM è una piccola proteina (~17 kDa) composta da due teste contenenti due siti di legame per il Ca^{2+} , ciascuna separata da un dominio flessibile (1). Il legame con quattro ioni di Ca^{2+} provoca un cambio conformazionale della 4Ca^{2+} -CaM in due fasi: nella prima fase le teste della 4Ca^{2+} -CaM ruotano lungo il dominio flessibile, esponendo gli aminoacidi idrofobici, evidenziati con asterischi rossi (2). Successivamente il legame con una proteina target provoca un ripiegamento della 4Ca^{2+} -CaM, che trasmette il cambio conformazionale alla proteina target (3). Le proteine regolate e/o attivate dalla 4Ca^{2+} -CaM sono coinvolte in molte attività cellulari (freccie grigie).