

F.G.

SEZIONE 1**Membrane ed Eccitabilità****1****Capitolo 4: Trasmissione sinaptica**

Il trasferimento dei segnali elettrici tra cellule eccitabili ha luogo in regioni specializzate dette sinapsi. La cellula che invia il segnale e la cellula che lo riceve sono definite rispettivamente cellula presinaptica e cellula postsinaptica. Lo spazio che fisicamente separa le due cellule comunicanti è lo spazio intersinaptico o fessura sinaptica. Sulla base della strategia di comunicazione, le sinapsi sono suddivise in due categorie: sinapsi elettriche e sinapsi chimiche. Nelle sinapsi elettriche, il potenziale d'azione (o il potenziale graduato) passa direttamente dalla cellula presinaptica alla cellula postsinaptica. Nelle sinapsi chimiche, il potenziale d'azione generato dalla cellula presinaptica causa l'esocitosi di vescicole sinaptiche e la liberazione di un messaggero chimico nella fessura sinaptica, il mediatore sinaptico o neurotrasmettitore.

> Sinapsi elettriche

Nella sinapsi elettrica, le cellule sono separate da una fessura sinaptica così stretta da poter essere considerata come uno spazio virtuale (circa 2-4 nm). Inoltre, tra le cellule presinaptica e postsinaptica esiste una vera e propria continuità elettrica garantita dalle giunzioni comunicanti (gap junction).

Giunzioni comunicanti: connessioni e connessioni

Le giunzioni comunicanti sono delle regioni di membrana contenenti particolari canali acquosi detti connessioni. Nella giunzione comunicante a ogni connessione della cellula presinaptica corrisponde un connettore giustapposto della cellula postsinaptica. Ogni connettore è costituito da 6 subunità proteiche chiamate connessioni che, disposte in circolo, delimitano un poro acquoso centrale. Si ipotizza che la configurazione preferenziale del connettore sia quella che garantisce lo stato aperto del canale.

Il processo di apertura di un connettore richiede una modificazione conformazionale di tutte le 6 connessioni di cui si compone e si pensa che consista in una rotazione delle subunità rispetto all'asse maggiore del canale stesso (Fig. 4.3). L'apertura delle giunzioni comunicanti può essere modulata dal pH intracellulare, dagli ioni Ca^{2+} , da secondi messaggeri e da neurotrasmettitori. Generalmente esse si chiudono in presenza di stimoli che possono causare un danno cellulare, quali: diminuzione del pH, aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, variazioni anomale del potenziale di membrana.

Propagazione del potenziale d'azione nelle sinapsi elettriche

Il risultato di questa continuità elettrica è che, quando nella cellula presinaptica insorge il potenziale d'azione, si crea una differenza di potenziale tra gli elementi sinaptici e quindi una f.e.m. Essendo assimilabili a delle semplici resistenze tra due elementi conduttori, le sinapsi elettriche possono far passare corrente in entrambe le direzioni. Pertanto, in una sinapsi elettrica la direzione della trasmissione del segnale è di volta in volta imposta dall'elemento sinaptico che per primo genera il potenziale d'azione. Per questo motivo le sinapsi elettriche sono definite sinapsi non rettificanti.

Proprietà delle sinapsi elettriche: rapidità e sincronizzazione dell'attività cellulare in un tessuto

Il ritardo con cui la cellula postsinaptica genera il potenziale d'azione postsinaptico, la cosiddetta latenza, è brevissimo, dell'ordine di alcuni decimi di millisecondo. Per questo motivo, le sinapsi elettriche sono localizzate in aree del sistema nervoso centrale e in tessuti in cui le cellule devono generare potenziali d'azione sincroni per assolvere al loro compito funzionale.

> Sinapsi chimiche

La sinapsi chimica è caratterizzata da una fessura sinaptica relativamente ampia (in media 20 - 40 nm) e da evidenti specializzazioni strutturali e molecolari che consentono di distinguere la cellula presinaptica da quella postsinaptica. In particolare, la cellula presinaptica è caratterizzata da un apparato esocitotico e dalle vescicole sinaptiche.

Le specializzazioni degli elementi presinaptico e postsinaptico finalizzate rispettivamente all'invio di un segnale chimico ed alla sua ricezione rendono la trasmissione mediante sinapsi chimica unidirezionale. Per questo motivo la sinapsi chimica è definita anche sinapsi rettificante.

Eventi della trasmissione sinaptica:

1) Esocitosi del neurotrasmettitore: la liberazione del neurotrasmettitore nella fessura sinaptica è indotta dal potenziale d'azione generato dalla cellula presinaptica e dalla variazione della concentrazione intracellulare di Ca^{2+} . Ciò è reso possibile dalla presenza di canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti sulla membrana del terminale presinaptico. **2) Potenziale postsinaptico:** La formazione del legame neurotrasmettitore-recettore causa una variazione della permeabilità della membrana e, quindi, una variazione del potenziale di membrana della cellula postsinaptica, definita potenziale postsinaptico. In alcune sinapsi chimiche il neurotrasmettitore si lega al sito recettoriale di un canale ionico ligando-dipendente (recettore ionotropo o ionotropico). In tal caso, la molecola recettoriale attivata è la causa diretta della variazione del potenziale di membrana della cellula postsinaptica e la comunicazione è definita trasmissione diretta o sinapsi chimica veloce. In altre sinapsi, il neurotrasmettitore si lega a un recettore accoppiato a una proteina G (recettore metabotropo o metabotropico) che a sua volta modula

F.G.SEZIONE 1Membrane ed Eccitabilità

2

l'attività di un canale ionico o direttamente o attraverso l'attivazione di un secondo messaggero. In entrambi i casi, la variazione della permeabilità della membrana postsinaptica richiede il susseguirsi in cascata di diversi eventi citoplasmatici e si parla di trasmissione indiretta o di sinapsi chimica lenta. Nel caso di un recettore occupato da antagonisti, viene favorito lo stato inattivo del recettore che impedisce l'attivazione delle proteine G. In seguito all'attivazione della proteina G, una molecola di GTP spiazza il GDP dal suo sito di legame; contemporaneamente la subunità α si stacca dal complesso $\beta\gamma$ della proteina G. La subunità α e il complesso $\beta\gamma$ possono interagire con canali ionici (Fig. 4.7A) o enzimi intracellulari (Fig. 4.7B). **3) Rimozione del neurotrasmettitore dalla fessura sinaptica:** la rimozione del mediatore chimico può avvenire attraverso tre meccanismi che, secondo la sinapsi considerata, hanno diversa importanza. Essi sono: la diffusione del neurotrasmettitore fuori dalla fessura sinaptica per gradiente di concentrazione; l'inattivazione enzimatica del neurotrasmettitore ad opera di enzimi idrolitici localizzati nella fessura sinaptica (membrana postsinaptica); il recupero ("re-uptake") del neurotrasmettitore da parte dell'elemento presinaptico grazie alla presenza di meccanismi di trasporto dedicati che permettono sia la rimozione del neurotrasmettitore dalla fessura sinaptica sia il suo riutilizzo da parte dell'elemento presinaptico.

Sinapsi eccitatorie ed inibitorie

Di conseguenza, se il neurotrasmettitore attiva direttamente o indirettamente un canale ionico con permeabilità prevalente per il Na^+ o per il Ca^{2+} , i canali attivati renderanno più positivo l'interno della cellula postsinaptica (per ingresso di cationi) e la variazione transiente del potenziale della membrana postsinaptica sarà in senso depolarizzante (Fig. 4.8A). Al contrario, se il neurotrasmettitore controlla l'apertura di un canale ionico con permeabilità prevalente per il K^+ o selettivo per il Cl^- , il potenziale di membrana della cellula postsinaptica cambierà in senso iperpolarizzante, rispettivamente a causa dell'uscita di cationi o dell'ingresso di anioni (Fig. 4.8B).

Quando il neurotrasmettitore causa depolarizzazione della cellula postsinaptica, il neurotrasmettitore, il potenziale postsinaptico e la sinapsi chimica sono definiti eccitatori. Se il neurotrasmettitore causa iperpolarizzazione della cellula postsinaptica, il neurotrasmettitore, il potenziale postsinaptico e la sinapsi chimica sono definiti inibitori: il potenziale di membrana della cellula postsinaptica si allontana dal valore di soglia riducendo l'eccitabilità dell'elemento postsinaptico.

È importante sottolineare che il potenziale postsinaptico è un evento elettrico diverso dal potenziale d'azione. La prima differenza consiste nel fatto che il potenziale postsinaptico è evocato chimicamente. La conseguenza è che esso non obbedisce alla legge del "tutto-o-niente" ma è un potenziale graduato, tipicamente transiente (Fig. 4.8). Ovvero, il potenziale postsinaptico raggiunge un massimo o un minimo la cui ampiezza può variare gradualmente in funzione della quantità di neurotrasmettitore rilasciato nella fessura sinaptica o del numero di recettori postsinaptici disponibili. La seconda differenza consiste nell'estensione dell'area di membrana interessata dal potenziale postsinaptico. Il potenziale postsinaptico è un potenziale locale. Esso può essere misurato elettrofisiologicamente solo a livello della regione sinaptica o, attenuato in ampiezza, nelle regioni vicine ad essa. Ciò deriva dal fatto che i canali ionici, attivati direttamente o indirettamente dal neurotrasmettitore, sono localizzati prevalentemente, se non esclusivamente, nella regione sinaptica. La terza differenza rispetto al potenziale d'azione, è che il potenziale postsinaptico ha minore ampiezza (generalmente qualche decina di mV al massimo) ed è caratterizzato da una più lunga durata (decine o centinaia di millisecondi).

Il potenziale postsinaptico può addirittura invertire direzione o diventare nullo quando il potenziale di riposo coincide con il potenziale di equilibrio dello ione o degli ioni che permeano attraverso il recettore-canale attivato durante la trasmissione sinaptica (potenziale di inversione, Erev; dall'inglese "reversal"). Questo fenomeno è ampiamente utilizzato in elettrofisiologia per identificare la natura e il tipo di recettore postsinaptico.

Proprietà delle sinapsi chimiche: amplificazione e integrazione dei segnali presinaptici

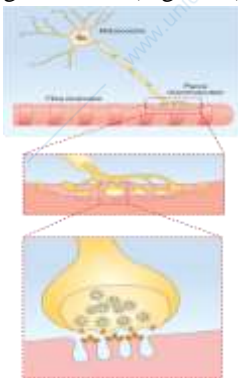
La latenza, pressoché inesistente nella trasmissione elettrica, è di circa 0,3 ms nelle sinapsi chimiche dirette o veloci ma può arrivare a parecchi millisecondi nelle sinapsi chimiche indirette o lente. Inoltre, prevedendo la liberazione di un messaggero chimico, la capacità di trasmissione di una sinapsi chimica dipende dalla capacità di mantenimento e di rinnovo della disponibilità del neurotrasmettitore dell'elemento presinaptico. se nella sinapsi chimica la velocità di rilascio della quantità di neurotrasmettitore di cui la cellula presinaptica dispone eccede il suo ripristino, la trasmissione sinaptica si arresta. Ciò si verifica, ad esempio, quando la cellula presinaptica è stimolata a frequenze così elevate da rendere la quantità di neurotrasmettitore disponibile insufficiente. Questo limite è noto con il termine di affaticabilità della sinapsi chimica. la sinapsi chimica offre importanti vantaggi funzionali rispetto alla sinapsi elettrica. Il primo vantaggio consiste nell'amplificazione del segnale. L'esocitosi anche di un'unica vescicola sinaptica garantisce la liberazione di migliaia di molecole di neurotrasmettitore e, quindi, l'attivazione di migliaia di recettori a livello della cellula postsinaptica. Il secondo vantaggio funzionale della trasmissione chimica sta nella capacità di mantenere o invertire il segno del segnale elettrico presinaptico: il neurotrasmettitore rilasciato da

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità****3**

una depolarizzazione presinaptica può generare nella cellula postsinaptica o una depolarizzazione o una iperpolarizzazione a seconda del tipo di canale postsinaptico che il neurotrasmettitore apre.

Sinapsi Neuromuscolare (Esempio di sinapsi chimica)

La sinapsi o giunzione neuromuscolare è una sinapsi chimica diretta eccitatoria il cui neurotrasmettitore è l'acetilcolina (ACh). Nei vertebrati ogni fibra muscolare è caratterizzata da un'unica regione sinaptica che, in genere, occupa una posizione centrale ed è detta placca motrice. In prossimità della placca motrice, il motoneurone perde la sua guaina mielinica e si ramifica. Ciascuna ramificazione forma, alla sua estremità, un grappolo di varicosità, i bottoni sinaptici. L'intero grappolo di bottoni sinaptici è ricoperto da un sottile strato di cellule di Schwann. A livello di ogni bottone sinaptico la fibra muscolare scheletrica presenta una piccola inflessione in corrispondenza della quale la membrana plasmatica postsinaptica forma profonde invaginazioni dette pieghe giunzionali. Uno strato di tessuto connettivo, detto lamina basale, avvolge ciascuna fibra muscolare scheletrica. Seguendo il profilo della fibra muscolare, la lamina basale si estende anche nelle pieghe giunzionali (Fig. 4.10).



(fig. 4.10)

➤ Misura delle potenziale postsinaptico e sue proprietà elettriche

A Paul Fatt e Bernard Katz va il merito di aver caratterizzato le basi ioniche del potenziale postsinaptico della giunzione neuromuscolare, o potenziale di placca. I due ricercatori per primi misurarono il potenziale di placca mediante registrazioni elettrofisiologiche intracellulari dopo aver trattato il muscolo con dosi variabili di curaro. Il curaro è una miscela di tossine d'origine vegetale (estraibile dalla corteccia di liane appartenenti al genere *Strychnos* e da *Chondrodendron tomentosum*).

Esso inibisce la trasmissione del segnale nella giunzione neuromuscolare bloccando i recettori-canali per l'ACh presenti sulla superficie delle fibre muscolari (gli indigeni dell'America Latina lo impiegano per avvelenare le punte delle frecce che usano per cacciare le prede che, paralizzate, muoiono per blocco respiratorio).

Ipotesi del rilascio quantale del neurotrasmettitore

In condizioni di riposo, i due scienziati osservarono che la membrana della cellula muscolare presentava piccole depolarizzazioni spontanee di ampiezza costante (circa 0,5-1 mV; Fig. 4.12). Tali depolarizzazioni scomparivano in presenza di curaro e avevano un andamento temporale simile a quello del potenziale postsinaptico (end-plate potential, epp). Per la ridotta ampiezza e per le proprietà farmacologiche e cinetiche, Fatt e Katz chiamarono gli eventi spontanei potenziali di placca in miniatura (miniature end-plate potentials, mepps). A questa prima osservazione sperimentale se ne aggiunsero altre. Inducendo la liberazione di neurotrasmettitore dalla terminazione nervosa, José del Castillo, Bernard Katz e Ricardo Miledi osservarono una progressiva diminuzione dell'ampiezza del potenziale postsinaptico se la concentrazione del Ca^{2+} extracellulare veniva diminuita (Ca^{2+} -dipendenza della trasmissione sinaptica) e che, in tali condizioni sperimentali, gli eventi postsinaptici apprezzabili più piccoli erano proprio i mepps, i potenziali di placca in miniatura.

Del Castillo, Katz e Miledi formularono quindi l'ipotesi che la liberazione di ACh nella fessura sinaptica corrispondeva alla liberazione contemporanea di pacchetti di definite quantità di neurotrasmettitore, i quanti, e che un "quanto" corrispondeva alla quantità di neurotrasmettitore contenuta in una singola vescicola sinaptica. La teoria del rilascio quantale (o vescicolare) del neurotrasmettitore nella giunzione neuromuscolare è accettata tuttora.

Basi ioniche del Potenziale Postsinaptico: recettore canale nicotinico (nAChR)

L'esatta denominazione del canale acetilcolinico presente nella giunzione neuromuscolare è recettore-canale nicotinico di tipo muscolare, universalmente abbreviato con nAChR (Nicotinic Acetyl-Choline-Receptor) muscolare. Il legame di due molecole di ACh al nAChR muscolare causa l'apertura del recettore-canale. Quando il nAChR muscolare è aperto, il poro ionico è attraversato da una corrente cationica

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità****4**

entrante (Fig. 4.14A). Essa è prevalentemente generata da ioni Na^+ (flusso entrante) e K^+ (flusso uscente). Altri cationi che permeano il canale sono gli ioni Ca^{2+} che entrano all'interno della cellula. Sebbene il Ca^{2+} possa svolgere importanti funzioni di modulazione sul canale stesso (sia in termini di proprietà biofisiche sia in termini di controllo di espressione), la permeabilità al Ca^{2+} è così ridotta che il contributo di questo ione nella generazione del potenziale postsinaptico è trascurabile.

Il legame dell'ACh al recettore-canale determina una corrente aspecifica di ioni Na^+ , Ca^{2+} e K^+ . Poiché il flusso di ioni Na^+ e Ca^{2+} (entrante) è maggiore del flusso di ioni K^+ (uscente), la corrente risultante è cationica entrante e causa la depolarizzazione della membrana postsinaptica.

Interruzione della trasmissione neuromuscolare: ruolo dell'acetilcolina esterasi

La strategia di interruzione della trasmissione sinaptica nella giunzione neuromuscolare è fondamentalmente basata sull'inattivazione enzimatica dell'ACh. Questo compito è svolto dall'enzima acetilcolina esterasi (ACh esterasi) che catalizza la reazione di idrolisi dell'acetilcolina a colina e acetato. Dei due prodotti della reazione, la colina viene recuperata dalla fessura sinaptica ad opera di meccanismi di trasporto localizzati sulla membrana della terminazione sinaptica del motoneurone. Una volta catturata, la colina è riutilizzata dal terminale presinaptico per sintetizzare nuove molecole di ACh e ripristinare la riserva di neurotrasmettitore. Il numero delle molecole di ACh è così elevato da causare la saturazione delle subunità catalitiche dell'enzima (i primi siti di legame che il neurotrasmettitore incontra) e garantire il proseguimento della diffusione di una parte dell'ACh verso la membrana postsinaptica e i siti recettoriali dei nAChR. L'attività enzimatica dell'ACh esterasi domina quando termina il rilascio del neurotrasmettitore dal terminale nervoso. L'elevata efficienza di idrolisi dell'enzima (circa 10 molecole di ACh/ms) assicura la riduzione della concentrazione del neurotrasmettitore nella fessura sinaptica in tempi brevissimi. Quando i nAChR di una membrana muscolare vengono sottoposti a continue e prolungate applicazioni di ACh. In queste particolari condizioni sperimentali si osserva una progressiva riduzione del potenziale postsinaptico dovuta alla cosiddetta desensitizzazione dei nAChR. Oggi si sa che il fenomeno della desensitizzazione non è una prerogativa dei nAChR ma è una caratteristica intrinseca dei recettori postsinaptici in generale. Si ritiene che la desensitizzazione sia il risultato di una modificazione conformazionale indotta dall'esposizione prolungata del recettore-canale al suo ligando.

Impiego degli anticolinesterasici nella terapia della miastenia grave

La miastenia grave può presentarsi in due forme. La forma oculare pura è la meno grave. Essa si manifesta come circoscritta ai muscoli scheletrici extraoculari, stato che si associa a una visione sdoppiata (diplopia) e/o a un abbassamento anomalo della palpebra superiore (ptosi) e strabismo. La forma generalizzata colpisce l'intera muscolatura scheletrica compresi i muscoli respiratori e rappresenta il quadro clinico più grave. La miastenia grave generalizzata è potenzialmente letale poiché può condurre a blocco respiratorio.

La terapia farmacologica rappresenta un aspetto molto importante del trattamento terapeutico della miastenia. Sebbene non sia sempre risolutiva (soprattutto nella forma generalizzata), con essa si ottiene un buon controllo della sintomatologia. Accanto a farmaci immunosoppressori, vengono impiegati anche inibitori dell'acetilcolinaesterasi (fisostigmina, rivastigmina, edrofonio, galantamina, tacrina, donepezil). Essi compensano la riduzione del numero dei canali acetilcolinici prolungando la permanenza dell'ACh ad alte concentrazioni nella fessura sinaptica.

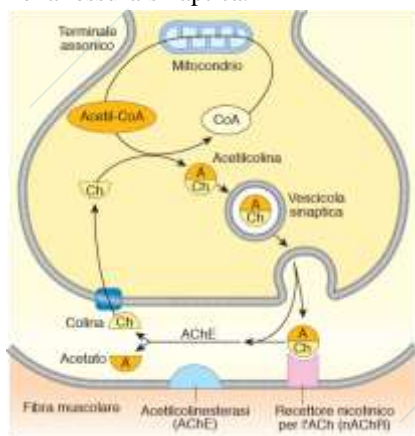


fig. 4.15

F.G.

SEZIONE 1

Membrane ed Eccitabilità

5

Capitolo 4: Meccanismi molecolari alla base di neurotrasmettitore

Il ciclo di eso-endocitosi delle vescicole sinaptiche, come rappresentato nella Fig. 4.16, riassume la sequenza di eventi ai quali vanno incontro le vescicole durante l'attività sinaptica. In breve questi comprendono: il trasporto attivo del trasmettitore nella vescicola sinaptica (1), la formazione del pool di riserva (2), l'ancoraggio della vescicola sinaptica alla membrana citoplasmatica a livello della zona attiva (docking) (3), la conversione della vescicola in uno stato di competenza pronto per la fusione Ca^{2+} -dipendente (priming) (4), l'ingresso di Ca^{2+} che innesca l'apertura del poro di fusione con conseguente rilascio di trasmettitore (5-6), l'endocitosi e il riciclaggio delle vescicole (6-9). Vediamo ora in dettaglio quali sono i principali componenti molecolari che regolano il ciclo di esoendocitosi.

Accumulo del neurotrasmettitore all'interno della vescicola

Il neurotrasmettitore viene accumulato all'interno della vescicola in concentrazioni elevatissime, (fino a 1000 volte superiori a quelle citoplasmatiche), per mezzo di una pompa protonica (H^+ -ATPasi) e di uno scambiatore H^+ -neurotrasmettitore.

Formazione del complesso SNARE

Nel terminale presinaptico la fusione tra la membrana plasmatica e quella vescicolare è preceduta dalla formazione del complesso SNARE, un complesso macro-molecolare risultante dall'interazione tra proteine della membrana vescicolare, come la sinaptobrevina (detta anche VAMP, Vesicle Associated Membrane Protein) e proteine associate alla membrana citoplasmatica presinaptica: syntaxina e SNAP-25 (Synaptosomal Associated Protein, 25 kDa). Il complesso SNARE si forma durante la fase di "priming" della vescicola.

Ruolo della sinaptotagmina

Evidenze sperimentali accumulate in questa ultima decade indicano tuttavia che due proteine sinaptiche vescicolari, la sinaptotagmina 1 e 2, siano i sensori del Ca^{2+} , come dimostra il fatto che la rimozione del gene della sinaptotagmina impedisce il rilascio rapido di neurotrasmettitore e costituiscono il principale candidato per la regolazione del rilascio di neurotrasmettitori.

Endocitosi e riciclaggio della vescicola sinaptica

Risalgono agli anni '70 del secolo scorso (1972) alcuni esperimenti, effettuati su sinaptosomi (un preparato di laboratorio contenente principalmente terminali presinaptici con le vescicole secretorie), che dimostrarono come le vescicole, dopo l'esocitosi, sono reinternalizzate nel terminale tramite endocitosi e nuovamente riempite di neurotrasmettitore, mentre alcune di esse possono essere riciclate localmente nella zona attiva, secondo un meccanismo denominato "kiss and stay" (Fig. 4.17A). Nello stesso periodo Bruno Ceccarelli e collaboratori dimostrarono che, nella giunzione neuromuscolare, l'endocitosi avveniva indipendentemente dal rivestimento di clatrina (meccanismo "kiss and run", Fig. 4.17B).

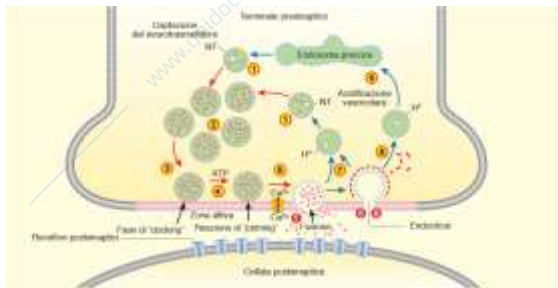


Fig 4.15

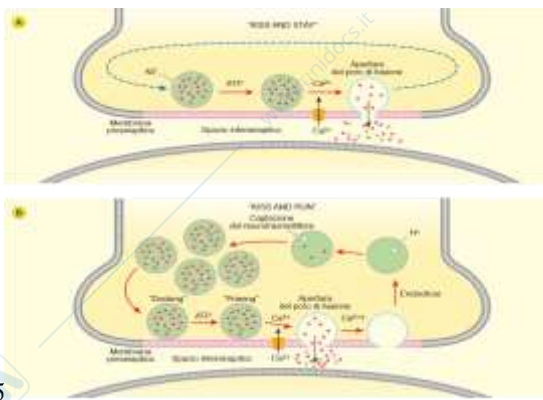


Fig 4.16.

kiss and stay: le vescicole restano nella zona attiva, sono nuovamente ricaricate di neurotrasmettitore dopo la chiusura del poro di fusione rimanendo nello stato di "docking" (6, Fig. 4.16): in questo modo formano il "pool" di vescicole pronto per il rilascio, denominato "ready releasable pool". Nel meccanismo denominato "kiss and run" le vescicole non restano nello stato di "docking" ma sono riciclate localmente per essere nuovamente riempite di neurotrasmettitore (7, Fig. 4.16).

Capitolo 4: Neurotrasmettitori

I neurotrasmettitori sono una famiglia di molecole molto eterogenee, suddivise in due classi in funzione della loro struttura e processo di sintesi ed immagazzinamento all'interno delle vescicole: i neurotrasmettitori a basso peso molecolare (ACh, amine biogene, aminoacidi e purine) (Fig. 4.18); i neuropeptidi, che sono molecole relativamente grandi, costituite da catene aminoacidiche di lunghezza variabile (3-36 aminoacidi), come indicato in Fig. 4.19.

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità**

NEUROTRASMETTORI A BASSO PESO MOLECOLARE		AMINE BIOGENE		PRINCIPALI NEUROTRASMETTORI PEPTIDICI	
Avissione	$EP_3N-CH_2-CH_2-CH_2-C(=O)-CH_3$	GATECOLAMINE		NEUROPEPTIDI	Aminoacidi
AMINOACIDI (Dati sintetici)	$H_2N-CH(CH_3)-COOH$	Dopamina		Leu-enkefalina	5
Asparagine	$H_2N-CH(CH_2COOH)-COOH$	Noradrenalina		Met-enkefalina	5
GABA	$H_2N-CH(CH_2COOH)-COOH$	Adrenalina		α -Endorfina	16
Glicina	$H_2N-CH2-COOH$	INDOLAMINE		β -Endorfina	30
FERRE		Serotonina (5-HT)		Sostanza P	11
Aspartato	$O=C(O^-)-CH_2-CH(NH_2)-COO^-$	INDOLAMINE		Somatostatina T4	14
Glutammato	$O=C(O^-)-CH_2-CH(NH_2)-COO^-$	5-Metossitriptamina		Ormone rilasciante la tireotropina (TRH)	3
		Adrenalina		Ormone rilasciante l'ormone lutealizzante (LHRH)	10
				Angiotensina II	8
				Vasopressina	9
				Ossibocina	9
				Colestocholina octapeptide (CCK-8)	8
				Peptide intestinale vasoattivo (VIP)	27
				Neuropeptide Y	36
				Neurotensina	12
				Bombesina (BBS-14)	14

I neuropeptidi sono contenuti in vescicole di dimensioni maggiori (60-120 nm di diametro), denominate large-dense core (a nucleo denso). I trasmettitori di natura peptidica sono sintetizzati come pre-propeptidi nel reticolo endoplasmatico ruvido, dove la sequenza segnale che indica il peptide da secernere viene rimossa. Il propeptide risultante viene impacchettato in vescicole a livello dell'apparato di Golgi.

Alcune molecole, come ossido nitrico (NO; monossido d'azoto) e monossido di carbonio (CO), pur non essendo rilasciate per esocitosi e non legandosi a specifici recettori di membrana, modificano l'attività cellulare e per questo vengono ugualmente classificate come neurotrasmettitori. Il monossido d'azoto viene sintetizzato dalla ossido nitrico sintetasi (NOS) a partire dall'aminoacido arginina. Diffonde attraverso la membrana cellulare e può modificare l'attività della cellula stessa ove viene prodotto e quella delle cellule bersaglio. NO esercita la sua azione attivando la guanilato ciclasi (GC) e quindi la via del cGMP/PKG.

ACh e i suoi recettori

L'ACh viene sintetizzata nella terminazione nervosa a partire da due composti, acetilcoenzima A e colina, in una reazione catalizzata dall'enzima colina acetiltransferasi (CAT): un neurone viene definito colinergico in base alla presenza di questo enzima. La colina non può essere sintetizzata dal sistema nervoso e deve quindi essere introdotta per mezzo della dieta o recuperata da uno specifico trasportatore Na^+ -dipendente. L'ACh viene impacchettata in vescicole sinaptiche per mezzo di uno specifico trasportatore H^+ -dipendente, accumulata ad altissima concentrazione (decine di migliaia di molecole per vescicola) e liberata per esocitosi nello spazio intersinaptico, in seguito all'arrivo di un potenziale d'azione nel terminale. Una volta rilasciata nello spazio intersinaptico, l'ACh può produrre sulla cellula bersaglio azioni molto diverse, a seconda del recettore a cui si lega: nicotinico (nAChR) o muscarinico (mAChR).

- **Recettore nicotinico**

Il recettore nicotinico (nAChR) deve il suo nome alla nicotina, un alcaloide di origine vegetale che è l'agonista di riferimento di questo recettore. Il nAChR muscolare è una glicoproteina di membrana con peso molecolare di circa 275 kDa. Il nAChR espresso nella fibra muscolare scheletrica adulta e innervata è costituito da 5 subunità assemblate secondo la stechiometria $\alpha_2, \beta, \gamma, \delta$ negli invertebrati e $\alpha_2, \beta, \epsilon, \delta$ nei vertebrati (Fig. 4.22). Ciascuna subunità possiede quattro porzioni idrofobiche costituite da regioni transmembrana ad α -elica definite M1, M2, M3 ed M4. Le pareti interne del canale ionico sono composte dai 5 segmenti M2 che formano diversi anelli di aminoacidi che determinano la selettività del poro ionico del canale. La proteina recettore-canale passa dallo stato chiuso allo stato aperto quando a ciascuna subunità α si lega una molecola di acetilcolina. Per causare l'apertura del recettore-canale, il legame dell'ACh alle due subunità α deve determinare una modificazione conformazionale di tutte e cinque le subunità del poro. Sono antagonisti del recettore nicotinico il curaro e la α -bungarotossina, che è stata utilizzata per l'isolamento e la purificazione del recettore grazie al suo legame irreversibile con la proteina.

- **Recettore muscarinico**

Il recettore muscarinico mAChR prende il nome dal suo agonista, la muscarina, un alcaloide naturale di origine vegetale. È espresso nelle cellule effettrici del sistema nervoso autonomo innervate da neuroni postgangliari parasimpatici, nel cervello e nei gangli periferici. Esistono cinque sottotipi di recettori muscarinici (M1-M5), codificati da 5 diversi geni, che hanno pesi molecolari compresi tra 55 e 70 kDa e la caratteristica struttura a 7 α -eliche transmembranal, comune a tutti i recettori di tipo metabotropo. I sottotipi M1, M3, M5 interagiscono con proteine Gq che attivano l'enzima fosfolipasi C (PLC); i sottotipi M2 e M4 provocano inibizione dell'adenilato ciclasi (tramite attivazione delle Gi/o) e regolazione diretta di alcuni canali (ad esempio aumento della corrente K^+ nel tessuto cardiaco atriale). Nel cervello sono diffusi i sottotipi M1, M3 e M4, mentre a livello cardiaco è espresso il tipo M2.

Neurotrasmettitori di natura aminoacidica

Tratto Da: "Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati (E. Carbone, G. Aicardi, R. Maggi)"

A cura di O.K.

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità**

7

❖ GABA

Il GABA è sintetizzato dal glutammato in una reazione catalizzata dall'enzima acido-glutammico-decarbossilasi (GAD), e da un cofattore, il piridossal fosfato, che deriva dalla vitamina B6, pertanto una carenza di vitamina B6 può portare alla riduzione della sintesi di GABA. Il meccanismo principale di inattivazione del GABA è dovuto alla sua ricaptazione ad opera di trasportatori ad alta affinità presenti sia sui neuroni che nelle cellule gliali. Alcuni farmaci che agiscono come agonisti dei recettori per il GABA, come le benzodiazepine e i barbiturici, vengono utilizzati nel trattamento dell'epilessia, come anestetici e sedativi.

Recettore GABAA – Il recettore GABAA, così come quello per la glicina, sono strutturalmente simili al nAChR, costituiti da più subunità disposte intorno ad un poro ionico centrale con un sito di legame per il neurotrasmettitore sul lato extracellulare. Nel caso del recettore GABAA, il complesso proteico ha un peso molecolare di 275 kDa e il canale ionico associato è selettivamente permeabile al Cl⁻ (la selettività è determinata da aminoacidi carichi positivamente allineati nel poro di permeazione).

Il recettore GABAA è inibito dalla bicucullina (azione convulsivante) o dalla picrotossina che interferisce con la corrente ionica.

Recettore GABAB – I recettori GABAB sono ubiquitari nel sistema nervoso centrale. A livello presinaptico, la loro attivazione causa inibizione del rilascio di trasmettitore, tramite l'apertura di canali permeabili al K⁺ e il blocco di canali del Ca²⁺.

Recettore GABAC – È un recettore ionotropo accoppiato ad un canale del Cl⁻ e risulta prevalentemente espresso a livello della retina (cellule bipolari)

❖ Glicina

La glicina è un aminoacido sintetizzato a partire dalla serina e rappresenta il principale neurotrasmettitore inibitorio del midollo spinale (tronco dell'encefalo). Dopo essere stata rilasciata nella fessura sinaptica, la glicina viene rimossa per mezzo di trasportatori specifici. Forma un canale ionico permeabile al Cl⁻. Ha struttura pentamerica (260 kDa) composta da due tipi di subunità (3α, 2β) ed è bloccato dalla stricnina.

❖ Glutammato

Il glutammato è il neurotrasmettitore eccitatorio più diffuso nel cervello ed è implicato nella regolazione di molte funzioni, tra le quali percezione delle sensazioni e del dolore, apprendimento, memoria, controllo della funzione motoria. Il glutammato causa depolarizzazione postsinaptica e in determinate condizioni anche aumento di Ca²⁺ intracellulare. La barriera ematoencefalica è praticamente impermeabile a questo neurotrasmettitore, per cui deve essere sintetizzato nel tessuto nervoso da precursori locali, quali ad esempio il glucosio, anche se il principale precursore è la glutamina. La glutamina, rilasciata dalle cellule gliali, una volta all'interno della terminazione sinaptica, viene metabolizzata in glutammato in una reazione catalizzata dall'enzima glutaminasi.

Recettori ionotropi e metabotropi per il glutammato

Per quanto riguarda i recettori ionotropi del glutammato sono stati identificati tre agonisti da cui prendono il nome tre sottotipi diversi di recettori. Si distingue pertanto tra recettori: NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (acido α-amino-3-idrossi-5-isoxazol-propionico), kainato (KA). I recettori per AMPA e kainato sono strutturalmente simili: attivano canali cationici permeabili a una corrente mista di Na⁺ e K⁺.

La particolarità di questo recettore consiste nel fatto che oltre ad essere un canale attivato da ligando, la sua attivazione è legata alla rimozione voltaggio-dipendente del blocco del Mg²⁺. Sono stati identificati otto recettori metabotropi per il glutammato, le cui risposte possono essere di natura eccitatoria o inibitoria, a seconda della proteina G a cui sono accoppiati. I recettori metabotropi del tipo mGluR1 e mGluR5 sono accoppiati a proteine Gq ed attivano l'enzima PLC, mentre i recettori mGluR2, mGluR3, mGluR4, mGluR6 e mGluR8 attivano proteine Gi/o, causando generalmente attivazione di correnti del K⁺ e inibizione di correnti del Ca²⁺ (azione inibitoria).

Ammine biogene e loro recettori

Le amine biogene che agiscono come neurotrasmettitori sono le catecolamine (adrenalina o epinefrina, noradrenalina o norepinefrina, dopamina), la serotonina e l'istamina.

Catecolamine

Le catecolamine sono composti organici contenenti un nucleo catecolico e un gruppo aminico e sono utilizzate come neurotrasmettitori sia nel sistema nervoso centrale che in quello periferico. Derivano da un precursore comune, la tirosina, e vengono sintetizzate attraverso una successione di reazioni enzimatiche che coinvolgono vari enzimi: la tirosina idrossilasi e la DOPA decarbossilasi che sono espresse in tutti i neuroni catecolaminergici, la dopamina-β-idrossilasi (DBH) che trasforma la dopamina in noradrenalina (NA) nei neuroni noradrenergici e adrenergici e la feniletanolamina-N-metiltransferasi (PNMT), con cui la NA viene trasformata in adrenalina (A) nei neuroni adrenergici.

I due principali enzimi che catabolizzano le catecolamine sono le monoaminoossidasi (MAO) e le catecolometiltransferasi (COMT). Inibitori dei MAO sono stati largamente utilizzati nel trattamento della depressione e del morbo di Parkinson.

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità****8****Adrenalina e noradrenalina**

Nel sistema nervoso centrale, a livello delle sinapsi adrenergiche, il neurotrasmettitore più comunemente utilizzato è la noradrenalina (NA). Questo neurotrasmettitore è importante per la regolazione del sonno, della veglia e del comportamento alimentare. A livello periferico, la NA è rilasciata dalle terminazioni simpatiche postgangliari. L'adrenalina è presente nel cervello in quantità minore rispetto alle altre catecolamine mentre viene sintetizzata soprattutto a livello delle cellule cromaffini della midollare surrenale e rilasciata nel torrente circolatorio in seguito a stimolazione da parte del nervo splanchnico.

Dopamina

Prodotta a partire dalla DOPA ad opera dell'enzima DOPA decarbossilasi, la dopamina esercita la sua azione soprattutto a livello del sistema nervoso centrale, dove il sistema dopaminergico ha un ruolo importante nel controllo extrapiramidale del movimento, in alcune funzioni comportamentali e percettive. Non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, a differenza del suo precursore (levodopa), che pertanto può essere assunto nel trattamento della patologia al fine di ottenere una temporanea alleviazione dei sintomi (Tab. 4.2). I recettori per la dopamina sono metabotropi e si distinguono due classi principali: D1-simili (D1 e D5) e D2-simili (D2, D3, D4).

Serotonina

La serotonina (5-HT) è sintetizzata a partire dall'aminoacido triptofano. La funzione della serotonina a livello cerebrale è prevalentemente associata alla regolazione dei cicli circadiani, dell'alimentazione, del sonno e della reazione di allerta. Il dietilamide dell'acido lisergico (LSD), uno stupefacente ad azione allucinogena, può interagire con le sinapsi serotoninergiche. La serotonina può anche agire come ormone sulla muscolatura liscia, regolandone l'attività contrattile. Sono stati identificati diversi recettori per la serotonina (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄), tutti metabotropi ad eccezione del tipo 5-HT₃ che è ionotropo. Questo recettore-canale è permeabile a una corrente cationica mista ed è strutturalmente simile al nAChR.

Istamina

È infatti localizzata nella maggior parte dei tessuti del corpo, in particolar modo nei polmoni, nella pelle e nel tratto gastrointestinale. I recettori per l'istamina, suddivisi farmacologicamente in tre classi, H₁, H₂ e H₃, sono di tipo metabotropo, accoppiati a proteine G.

Neurotrasmettitore peptidici

Attualmente i peptidi oppioidi sono classificati, in base alle caratteristiche strutturali e funzionali, come encefaline, endorfine, dinorfine e endomorfine. Sono stati identificati tre tipi di recettori per i peptidi oppioidi, denominati μ , δ , κ . Analizzando la distribuzione di questi recettori nel cervello è emerso che quelli di tipo μ sono i più diffusi e responsabili della maggior parte degli effetti farmacologici degli analgesici oppiacei

Capitolo 4: Trasmissione sinaptica-Integrazione sinaptica

Di seguito si riportano le differenze tra la giunzione neuromuscolare e le sinapsi tra due cellule nervose

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità****9**

1) Il terminale presinaptico del motoneurone che forma la giunzione neuromuscolare è molto ampio (placca motrice) e contatta singolarmente la fibra scheletrica muscolare (Fig. 4.10), mentre i terminali dei neuroni presinaptici, tranne poche eccezioni, sono generalmente piccoli e numerosi (bottoni sinaptici).

2) Nella giunzione neuromuscolare, con un solo potenziale d'azione presinaptico viene rilasciato il contenuto di 100-200 vescicole. Nelle sinapsi neuronali invece i neurotrasmettitori possono essere sia di natura eccitatoria (ACh, glutammato) che inibitoria (GABA e glicina) e ciascun bottone sinaptico rilascia in media una sola vescicola in seguito all'arrivo di un potenziale d'azione. Dato che un insieme di bottoni sinaptici che rilasciano il contenuto di alcune vescicole simultaneamente produce una depolarizzazione (EPSP, Excitatory Post-Synaptic Potential) o una inibizione (IPSP, Inhibitory Post-Synaptic Potential) di qualche mV, è chiaro che l'eccitamento del neurone postsinaptico può nascere solo quando la somma spaziale e temporale di tutti gli EPSP e IPSP che arrivano sul soma del neurone postsinaptico raggiunge la soglia di eccitazione intorno a -50 mV partendo da un potenziale di riposo di -70 mV. Questo fenomeno di sommazione degli EPSP e IPSP è comunemente indicato come "integrazione sinaptica", in quanto il soma del neurone postsinaptico svolge un ruolo di vero e proprio integratore della complessa attività presinaptica che ne controlla le funzioni.

3) A livello postsinaptico, nella fibra muscolare scheletrica la generazione del potenziale d'azione è garantita da un'alta densità di canali del Na^+ e del K^+ voltaggio-dipendenti che sono più o meno uniformemente distribuiti lungo tutta la fibra così da permettere la propagazione dell'eccitamento e la contrazione a lunga distanza. Nei neuroni invece la generazione del potenziale d'azione postsinaptico avviene solo a livello del monticolo assonico dove la densità dei canali del Na^+ è particolarmente elevata.

4) Infine, mentre nella sinapsi neuromuscolare la comunicazione nervosa è intesa come un trasferimento di informazione "a senso unico" dal motoneurone alla fibra muscolare scheletrica, nelle sinapsi neuronali può accadere che i neuroni postsinaptici rispondano al segnale chimico inviato dalla cellula presinaptica rilasciando a loro volta neurotrasmettitori, i quali agiscono con un meccanismo di feedback sul neurone presinaptico.

Sommazione temporale e spaziale degli EPSP e degli IPSP

In Fig. 4.31 sono riportati due casi di sommazione spaziale. Nel primo caso (A), tre sinapsi eccitatorie (A, B e C) generano tre EPSP di 8-10 mV d'ampiezza ciascuno. Se considerati singolarmente sono sottosoglia e, quindi, non sono in grado di generare potenziali d'azione. Tuttavia, quando tutte e tre le sinapsi sono simultaneamente attive (A+B+C), l'EPSP risultante è sopra soglia (supera -50 mV) e genera un potenziale d'azione. Nel secondo caso (B), la presenza della sinapsi inibitoria C (blu) produce per sommazione un vero e proprio blocco dell'eccitazione indotto dalle altre due sinapsi (A e B). Infatti, quando tutte e tre le sinapsi sono contemporaneamente attive (A+B+C), l'EPSP risultante è un segnale sottosoglia che non è in grado di generare alcun potenziale d'azione (riquadro in Fig. 4.31B).

Modulazione dell'attività sinaptica: facilitazione e inibizione presinaptica

Un neurone presinaptico può tuttavia formare contatti sinaptici anche a livello del terminale assonico presinaptico, e quindi ridurre (inibizione presinaptica) o aumentare il rilascio di neurotrasmettitore (facilitazione presinaptica). Il meccanismo è significativamente diverso dalla modulazione postsinaptica in quanto non vi è sommazione, ma semplicemente un innalzamento o abbassamento del Ca^{2+} intracellulare che controlla il rilascio del neurotrasmettitore presinaptico. Nel caso di Fig. 4.33, due sinapsi eccitatorie A e B controllano efficacemente l'attività del neurone postsinaptico. Il neurone presinaptico A riceve tuttavia un contatto asso-asonico da un neurone inibitorio (C) il cui neurotrasmettitore è in grado di indurre l'inibizione dei canali del Ca^{2+} abbassando quindi i livelli di Ca^{2+} intracellulare che controllano il rilascio di A (inibizione presinaptica). In questo caso, quando C è inattivo (Fig. 4.33A), la somma degli EPSP delle sinapsi A e B è in grado di eccitare il neurone postsinaptico ma quando anche C è attivo (Fig. 4.33B) l'attività del neurone A è fortemente compromessa e la sommazione degli EPSP di A e B non è più in grado di generare l'impulso. Un fenomeno opposto avviene per la facilitazione presinaptica dove il contatto presinaptico asso-asonico tra C e A agisce tipicamente aumentando i livelli di Ca^{2+} intracellulare che controllano il rilascio di A, aumentandone l'EPSP. In questo caso, la sola stimolazione di A è in grado di indurre un potenziale d'azione. Infine, esiste ancora un'ulteriore importantissima forma di modulazione dell'attività sinaptica, nota come potenziamento o depressione a lungo termine, (LTP, LTD) che produce cambiamenti duraturi dell'efficacia della trasmissione sinaptica.

Patologie della sinapsi chimica e loro trattamenti farmacologici

Tratto Da: "Fisiologia: dalle molecole ai sistemi integrati (E. Carbone, G. Aicardi, R. Maggi)"

A cura di O.K.

F.G.**SEZIONE 1****Membrane ed Eccitabilità****10**

Alterato rilascio di neurotrasmettitore – Durante l'infezione tetanica o da botulino, vengono attivate la tossina tetanica (TeNT) o le tossine botuliniche (BoNT), che grazie alla loro azione proteasica impediscono la fusione vescicolare, bloccando il rilascio di neurotrasmettitore e l'attività sinaptica (Fig. 4.34A) (Par. 4.2). La TeNT blocca il rilascio vescicolare di glicina dalle sinapsi dei neuroni inibitori che controllano l'attività dei motoneuroni spinali. In tal caso, i motoneuroni vengono permanentemente stimolati e producono le tipiche contrazioni tetaniche dei muscoli scheletrici.

Alterata interazione neurotrasmettitore-recettore – Alcune malattie come la schizofrenia, l'ansia e l'epilessia sono curate agendo sui recettori postsinaptici (Fig. 4.34B). Nella schizofrenia per esempio le sinapsi di alcune aree del sistema nervoso centrale rilasciano quantità eccessive di dopamina. Questa patologia si cura con farmaci antipsicotici (clorpromazina e aloperidolo) che riducono i sintomi bloccando i recettori per la dopamina. Per la cura dell'ansia si usano comunemente le benzodiazepine (Diazepam) che agiscono sui recettori GABAA (Par. 4.3) producendo un potenziamento dell'azione inibitoria GABAergica (ansiolitici). Anche per la cura dell'epilessia si usano molecole che agiscono sui recettori GABAA, potenziandone l'azione.

Alterata rimozione del neurotrasmettitore dallo spazio intersinaptico – La depressione è una malattia neurologica associata a una deficienza di serotonina e noradrenalina a livello del SNC. Si cura con la fluoxetina (Prozac) che inibisce il trasportatore del re-uptake presinaptico della serotonina (Fig. 4.34C). In questo modo la concentrazione di serotonina nello spazio intersinaptico e l'attività delle sinapsi serotoninergiche aumentano. Nella malattia di Alzheimer invece la perdita di memoria e l'insorgere della demenza è associata a una forte perdita di neuroni colinergici e a una riduzione del numero di recettori nicotinici dell'area cognitiva pre-frontale. Le terapie più efficaci sono basate sull'uso di anti-ACh-esterasici (rivastigmina, galantamina) che aumentano i livelli di ACh nello spazio intersinaptico riducendo la quantità di neurotrasmettitore idrolizzato dall'enzima ACh esterasi.

Aumentati livelli di neurotrasmettitore – Il morbo di Parkinson è una patologia associata a una progressiva distruzione dei neuroni dopaminergici della sostanza nigra che innervano neuroni del caudato e del putamen con conseguente riduzione o mancanza di dopamina in quelle aree cerebrali. La dopamina ha un'azione inibitoria sul controllo della contrazione muscolare scheletrica, permettendo una regolazione continua e precisa dei movimenti muscolari. Nel parkinsonismo la perdita di inibizione produce tremore a riposo, rigidità muscolare e in alcuni casi demenza. Si cura farmacologicamente con la levodopa (L-DOPA) un precursore della dopamina, che è trasportato nell'assone terminale presinaptico dei neuroni dopaminergici ed è usato come substrato per la sintesi di nuova dopamina.