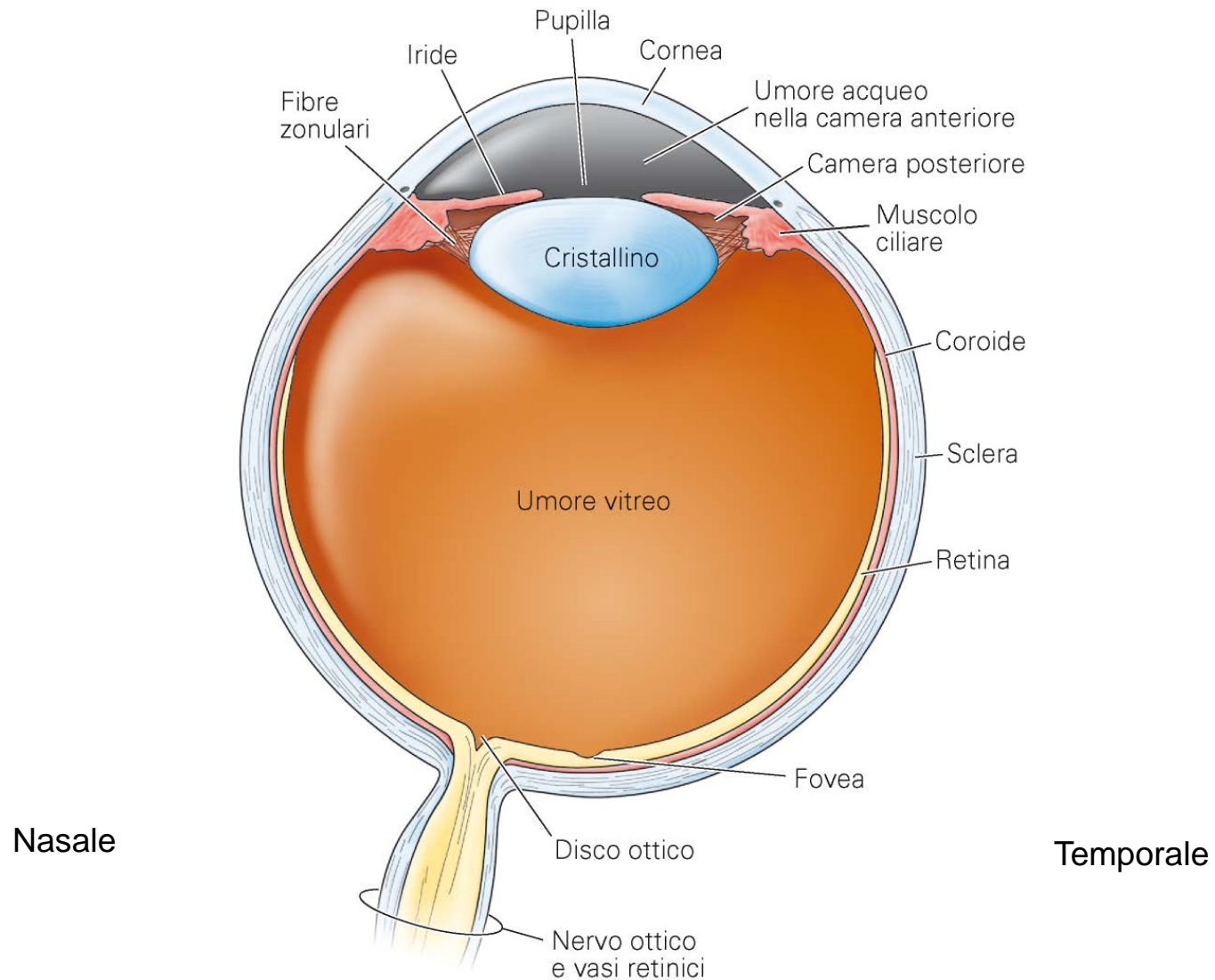


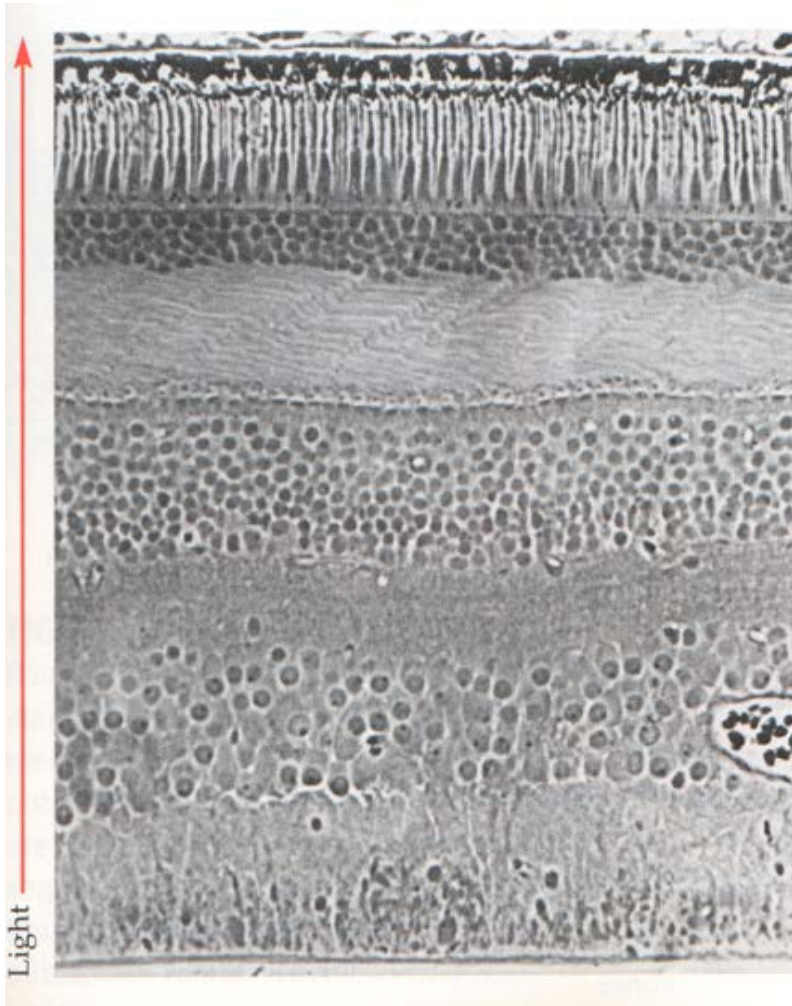
# La fotorecezione

- D. J. Aidley. *The physiology of excitable cells*. Cambridge University Press.
- G. Nicholls, A. R. Martin, P. A. Fuchs, D.A. Brown, M.E. Diamond, D.A. Weisblat. *From neuron to brain*. Fifth Edition, Sinauer Associates, Inc.
- E. D'Angelo, A. Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule e sistemi*. Tomo 2. Edi-Ermes.
- D. Purves, G.J. Augustine, D. Fitzpatrick, W.C. Hall, A.S. LaMantia, L.E. White. *Neuroscienze*. Zanichelli (quarta edizione italiana condotta sulla quinta edizione americana)
- V. Taglietti, C. Casella. *Fisiologia e Biofisica delle cellule*. EdiSES

# L'occhio



# La retina (1)



Pigment epithelium

Strato dei recettori

Strato nucleare esterno:  
Photoreceptor cells:  
rods and cones

Outer plexiform layer

Strato nucleare interno:  
Horizontal, bipolar,  
and amacrine cells

Inner plexiform layer

Ganglion cells

Strato delle cellule  
gangliari

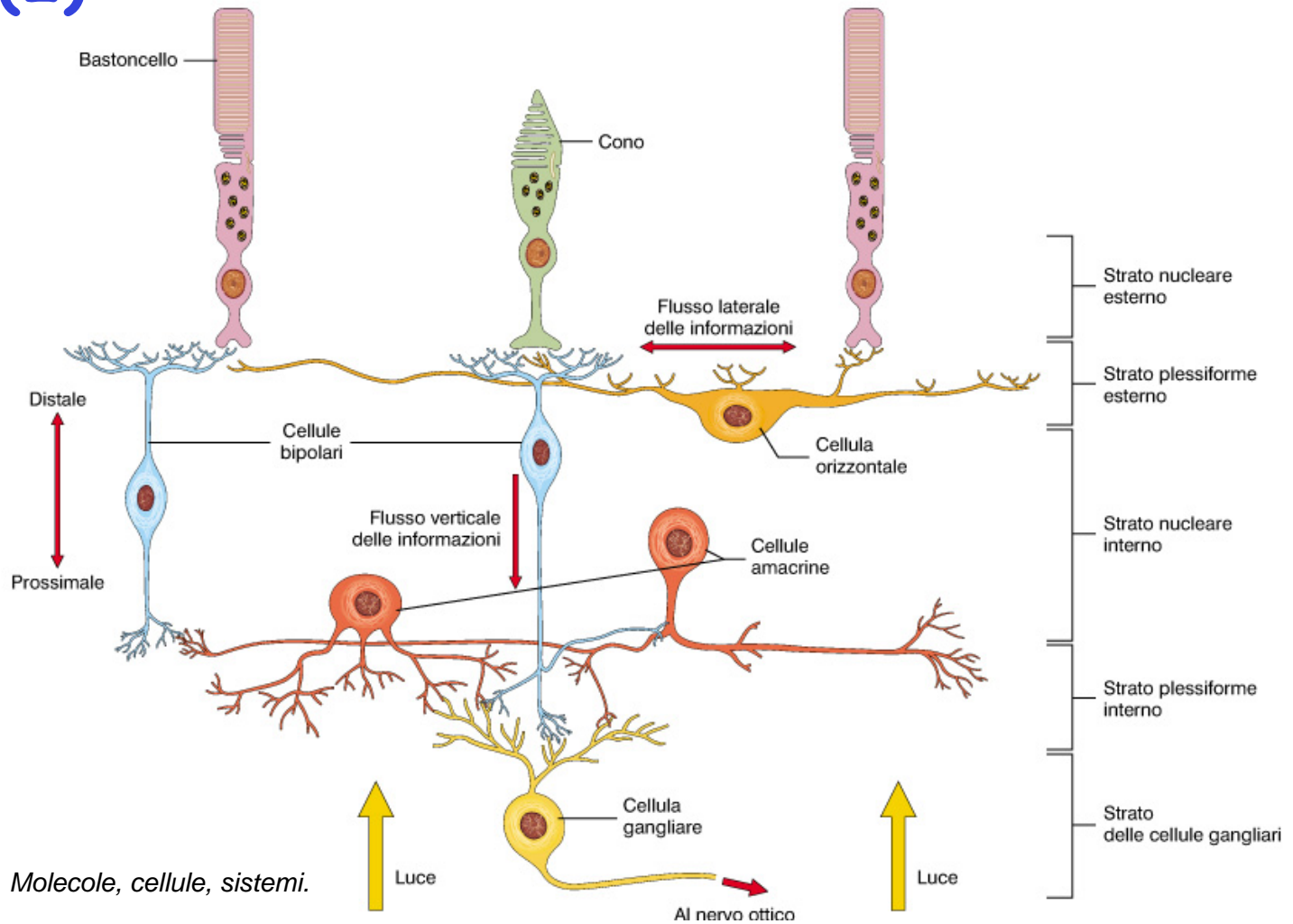
Strato delle fibre nervose  
Optic nerve fibers

Nella retina sono presenti 5 diversi tipi di neuroni: **fotorecettori (coni e bastoncelli)**, **cellule bipolari**, **cellule gangliari**, **cellule orizzontali** e **cellule amacrine** e un tipo di cellule gliali, le **fibre di Müller**. Queste cellule e i loro prolungamenti sono disposti in strati: strato dei recettori, strato nucleare esterno, strato plessiforme esterno, strato nucleare interno, strato plessiforme interno, strato delle cellule gangliari e strato delle fibre nervose.

La luce deve attraversare tutti gli strati prima di raggiungere i fotorecettori.

Le cellule epiteliali contenenti melanina, che formano l'**epitelio retinico pigmentato**, sono a diretto contatto con i fotorecettori

# La retina (2)

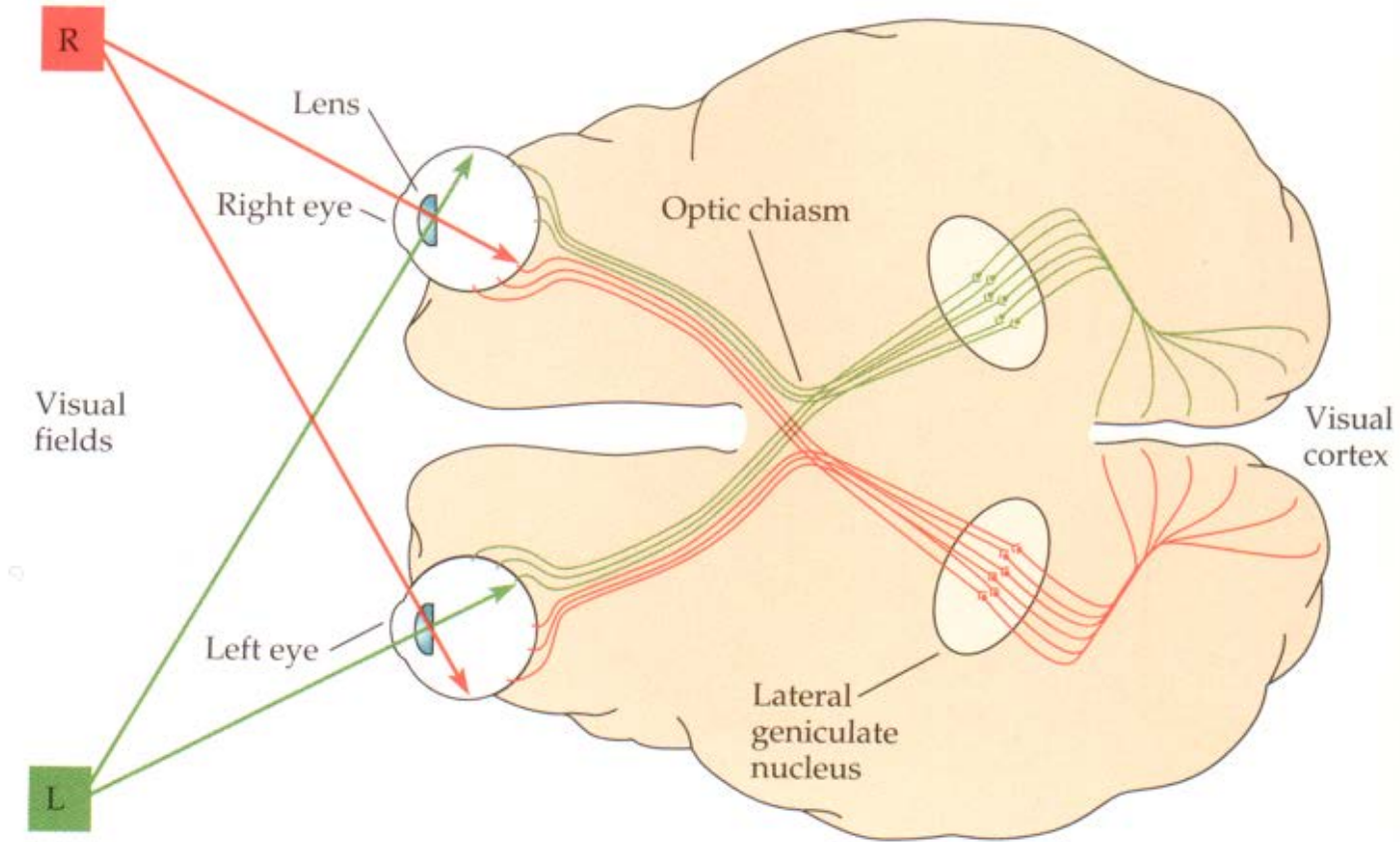


D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

Fotorecettori, cellule bipolari e cellule gangliari costituiscono la via attraverso cui avviene il **flusso verticale** delle informazioni (dai recettori ai neuroni sensoriali). Cellule orizzontali e cellule amacrine sono invece responsabili del **flusso laterale** delle informazioni

Nella retina umana ci sono 100 milioni di bastoncelli e 6 milioni di coni e solo 1 milione di cellule gangliari, quindi ci deve essere una notevole **convergenza** dei fotorecettori sulle cellule gangliari, che costituiscono la via attraverso cui i segnali visivi vengono inviati alla corteccia cerebrale per dare sensazioni coscienti.

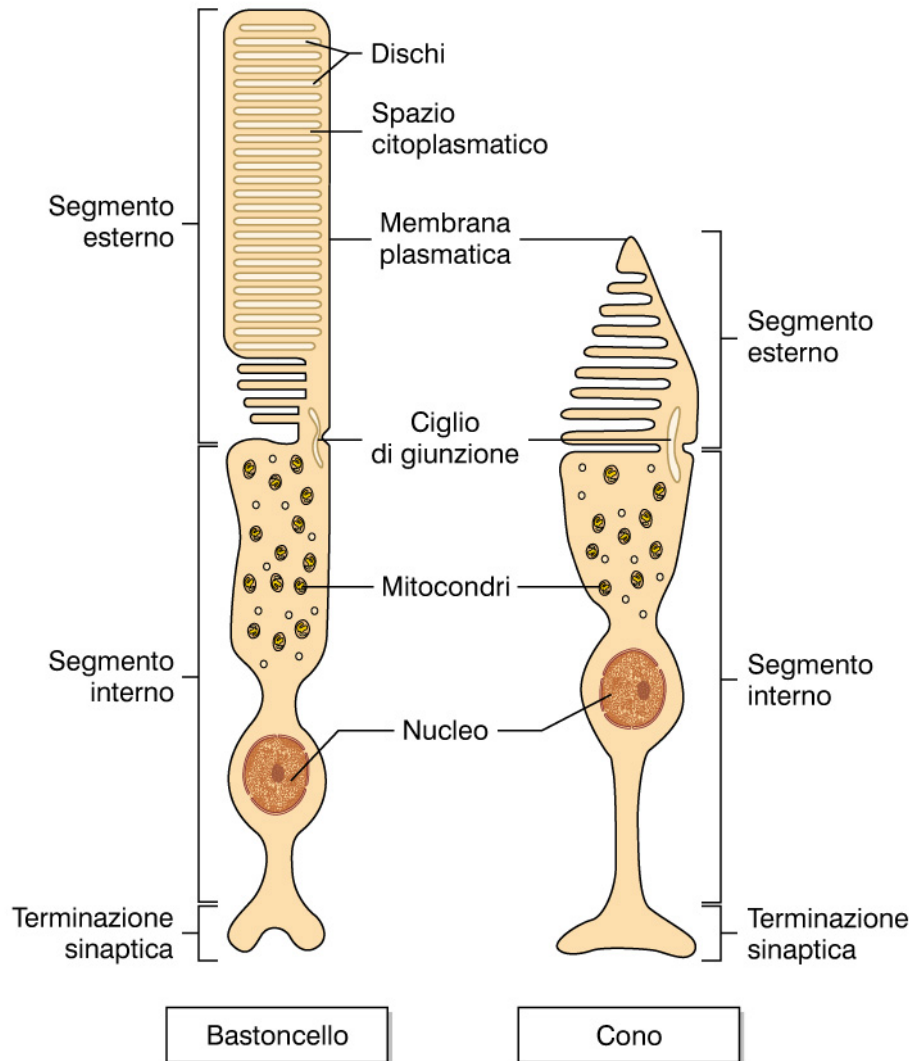
# Vie anatomiche del sistema visivo



Nicholls et al. *From neuron to brain*

Il lato destro di ciascuna retina proietta al nucleo genicolato laterale destro, in modo che la corteccia visiva destra riceva informazioni esclusivamente dalla metà sinistra del campo visivo.

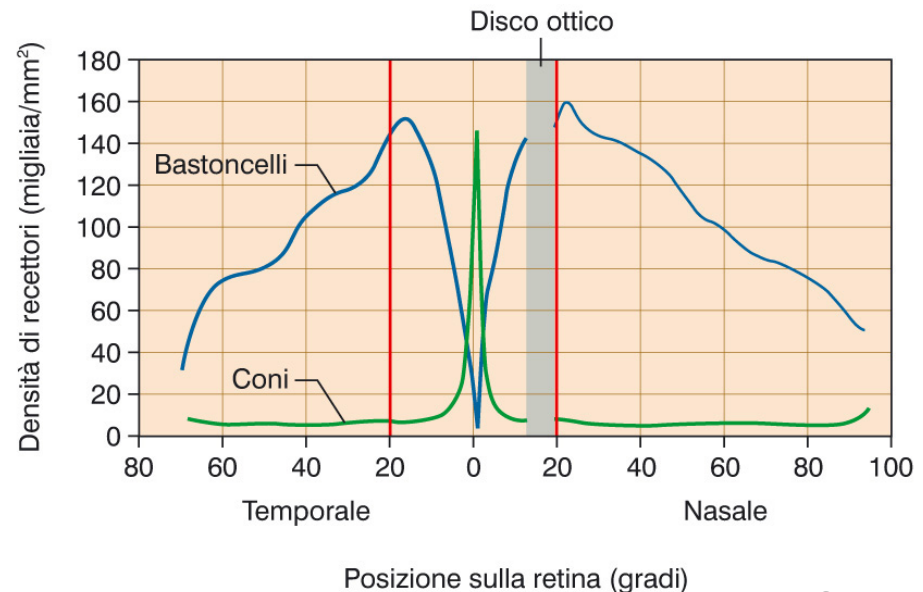
# Struttura dei fotorecettori



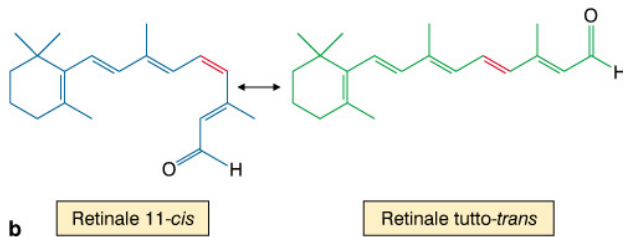
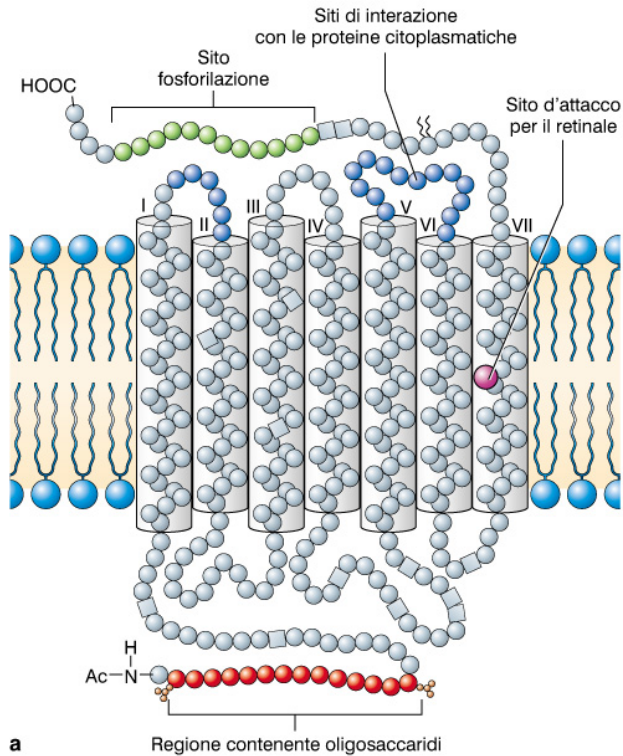
**Bastoncelli:** distribuiti in tutta la retina, tranne che nella fovea, responsabili della visione scotopica (notturna), elevata sensibilità, ma incapacità di distinguere i colori.

**Coni:** concentrati nella fovea, meno presenti nelle altre porzioni della retina, responsabili della visione diurna (fotopica) e della visione dei colori, bassa sensibilità.

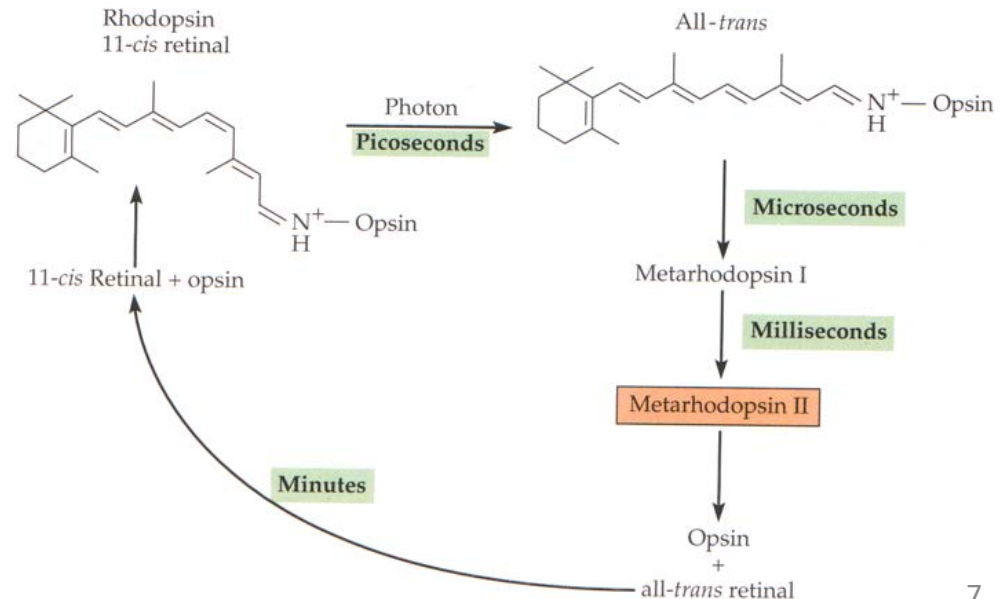
Il pigmento visivo è localizzato nella membrana dei dischi (bastoncelli) e delle invaginazioni (coni), nel segmento esterno.



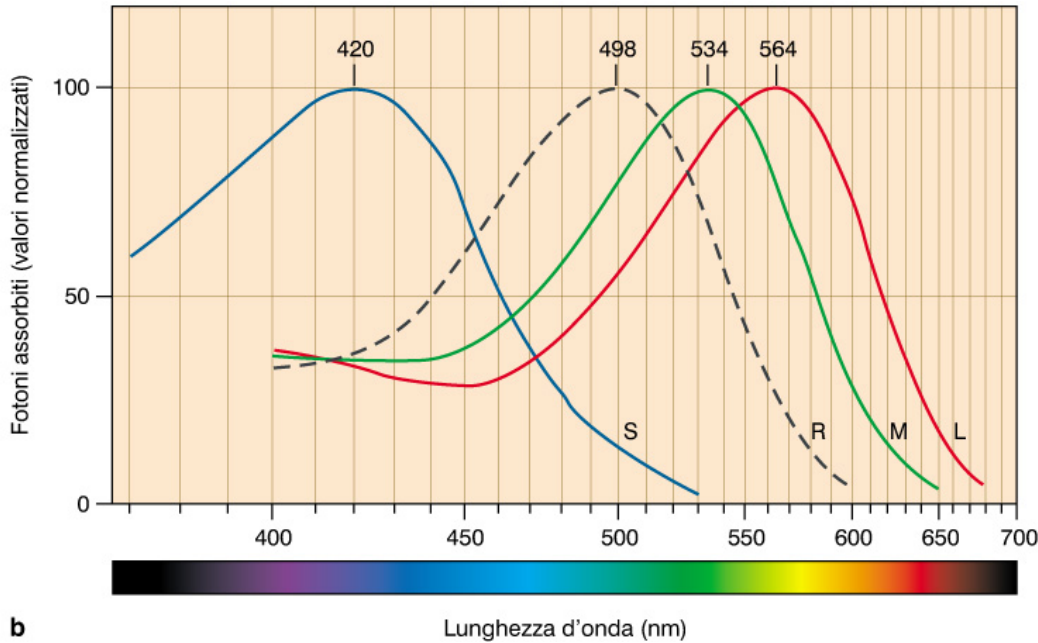
# Struttura della rodopsina



Il pigmento visivo dei bastoncelli, la **rodopsina**, è una proteina integrale di membrana formata da una parte proteica, l'**opsina** (a sette segmenti transmembranari), e un gruppo prostetico cromatico, il **retinale**. Il retinale può esistere in due forme: al buio il retinale è nella forma 11-cis, in seguito all'assorbimento di un fotone isomerizza in tempi inferiori al ps ( $1 \text{ ps} = 10^{-12} \text{ s}$ ) nella forma tutto-trans. Questa isomerizzazione, promuovendo l'attivazione della rodopsina a **metarodopsina II**, è alla base del processo di fototrasduzione.



# Pigmenti visivi dei coni

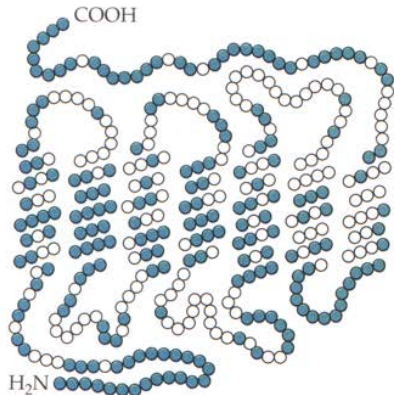


b

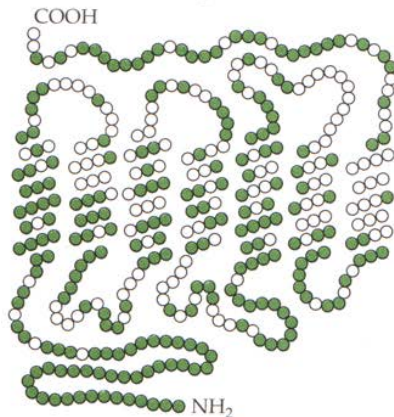
D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

Le **conopsine** hanno struttura simile a quella della rodopsina, ma differente sensibilità alla luce. Il picco di assorbimento infatti è a circa 500 nm per la rodopsina, a 420 nm, 534 nm e 564 nm per i tre tipi di conopsine che assorbono rispettivamente nel blu, nel verde e nel rosso. Nella figura in basso A e B mostrano il confronto tra rodopsina e conopsina blu e verde, C il confronto tra conopsina rossa e verde. Le differenze sono evidenziate dai residui colorati.

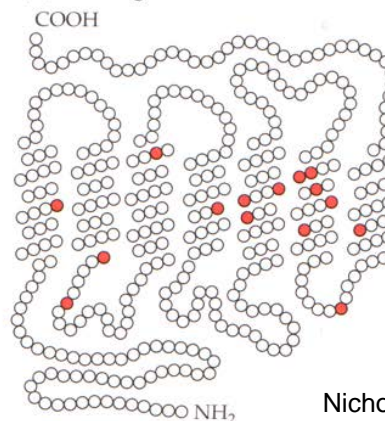
(A) Blue vs. rhodopsin



(B) Green vs. rhodopsin



(C) Red vs. green

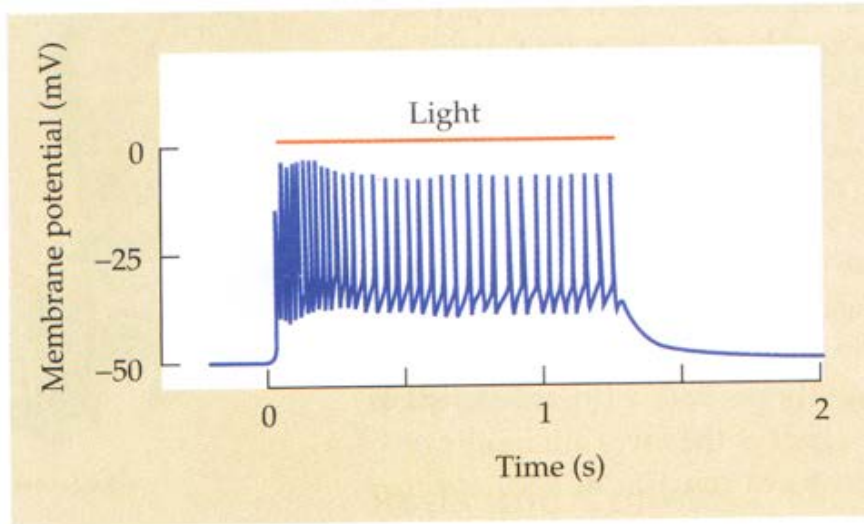


Nicholls et al. *From neuron to brain*

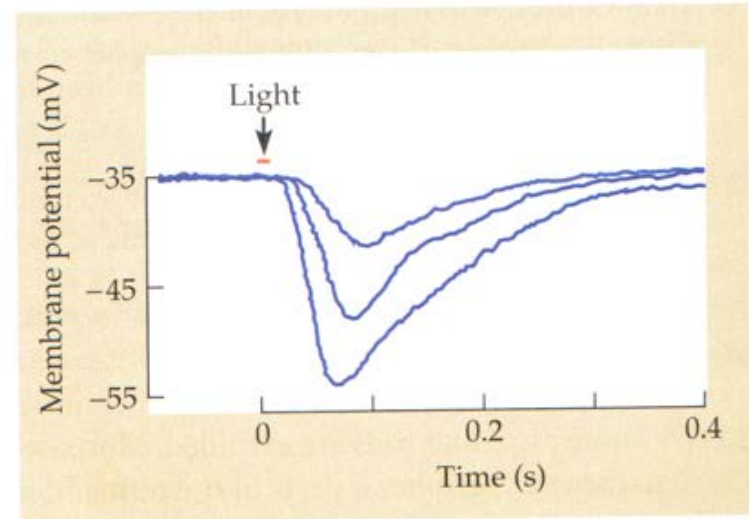


# Risposte dei fotorecettori

(A) Invertebrate photoreceptor

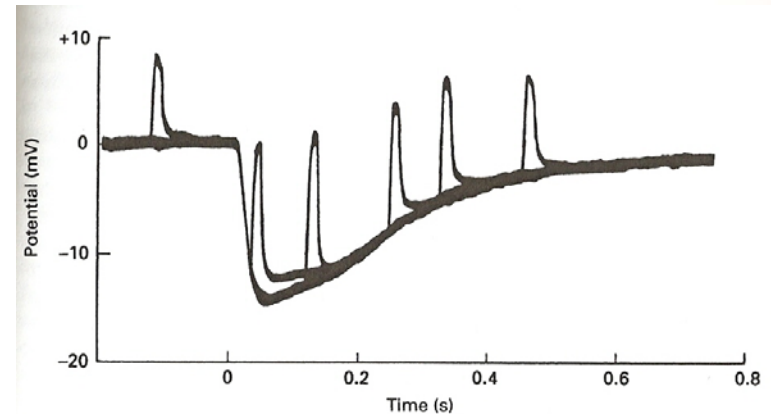


(B) Vertebrate photoreceptor



Nicholls et al. *From neuron to brain*

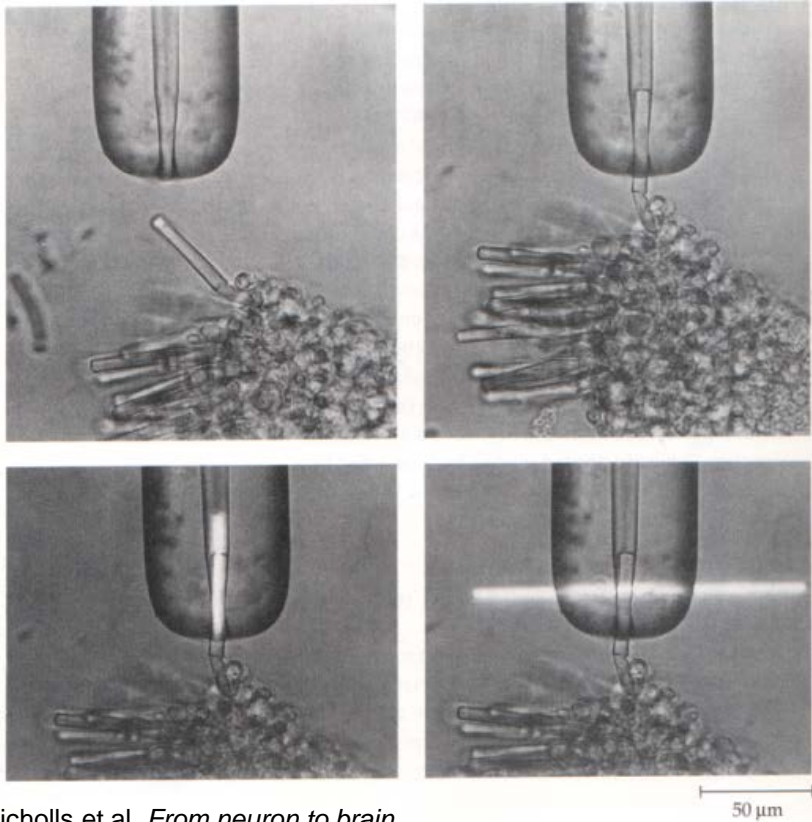
Negli invertebrati i fotorecettori rispondono ad uno stimolo luminoso con la depolarizzazione della membrana, mentre nei vertebrati i fotorecettori rispondono con una **iperpolarizzazione** tanto maggiore quanto più intenso è lo stimolo. Questa risposta è associata alla diminuzione di una **corrente di buio** (**dark current**) responsabile del basso valore di  $V_m$  in assenza di stimolazione.



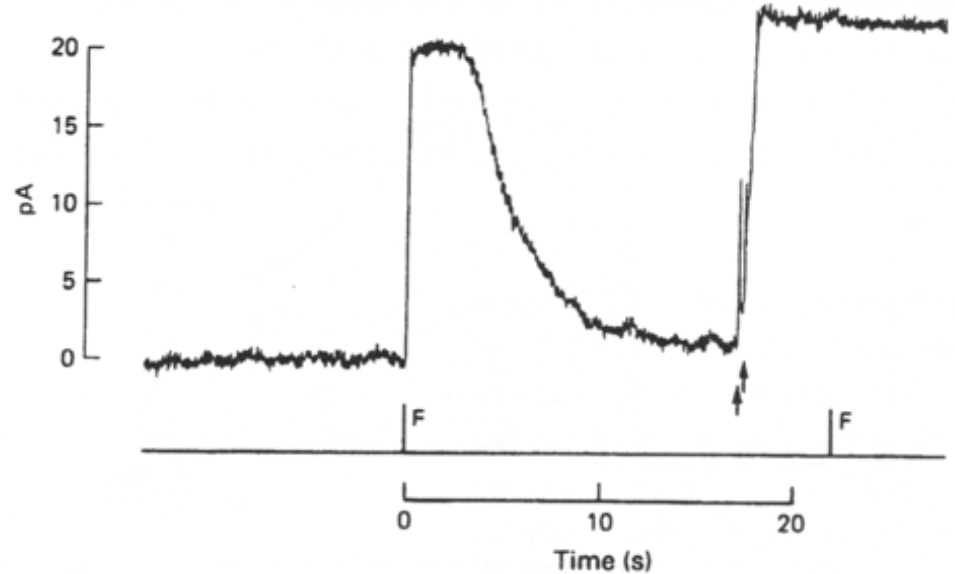
Aidley. *The physiology of excitable cells*

Impulsi di corrente depolarizzante sovrapposti alle risposte a brevi flash di luce mostrano che l'esposizione dei coni alla luce aumenta la resistenza di membrana (e quindi ne diminuisce la conduttanza)

# Registrazione della corrente da un singolo fotorecettore (1)



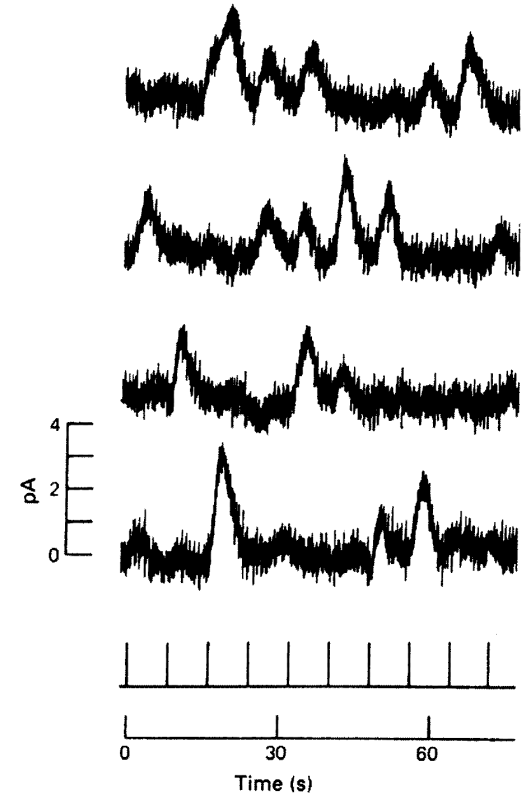
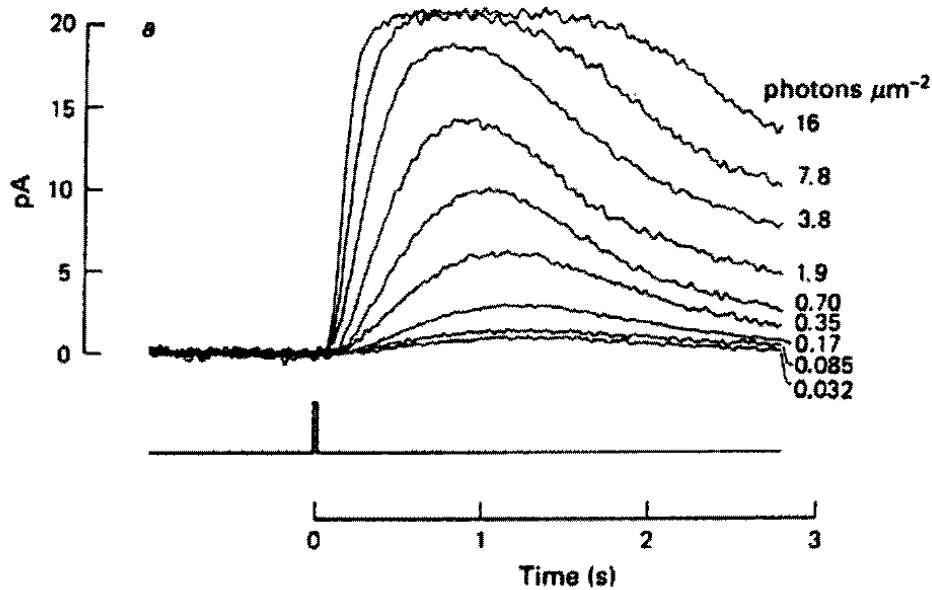
Nicholls et al. *From neuron to brain*



Aidley. *The physiology of excitable cells*

Il segmento esterno di un bastoncello viene succhiato all'interno di una micropipetta in modo da poter registrare tutta la corrente che fluisce attraverso la membrana. Un flash di luce al tempo indicato con F produce una risposta saturante. Dopo il recupero il bastoncello viene rotto a livello del ciglio. In queste condizioni la linea di base della corrente passa da 0 a 22 pA e il flash di luce non evoca alcuna risposta indicando che la corrente evocata dal primo flash è la **riduzione della dark current**.

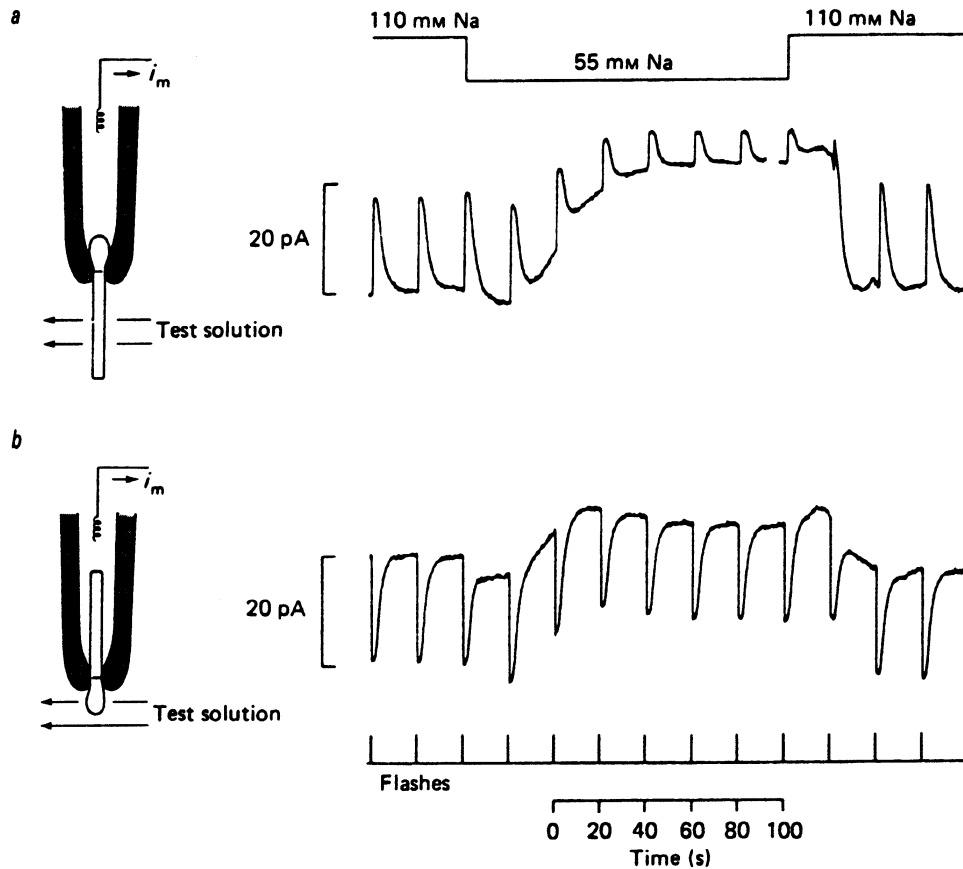
# Registrazione della corrente da un singolo fotorecettore (2)



La risposta dei fotorecettori è funzione dell'intensità della luce.

Il bastoncello è in grado di rispondere ad un singolo fotone.

# Registrazione della corrente da un singolo fotorecettore (3)

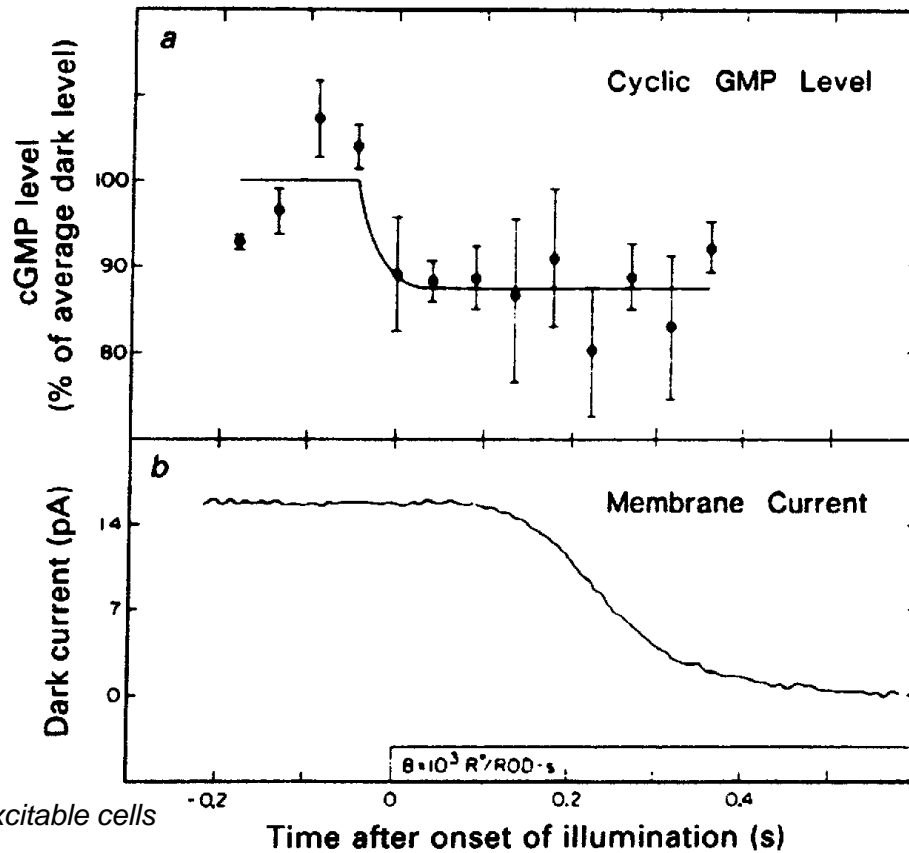


Con la tecnica dell'elettrodo a suzione si è dimostrato che la **corrente di buio è dovuta al flusso di ioni  $\text{Na}^+$  (e  $\text{Ca}^{2+}$ ) attraverso la membrana del segmento esterno.**

In (a) la riduzione della  $[\text{Na}^+]$  nella soluzione che bagna il segmento esterno del bastoncello determina la riduzione della risposta a flash di luce saturanti, indicando una corrispondente riduzione della corrente di buio. Quando la parte del bastoncello esposta alla soluzione test è il segmento interno (b), non si osserva variazione nella risposta

# Trasduzione nei fotorecettori (1)

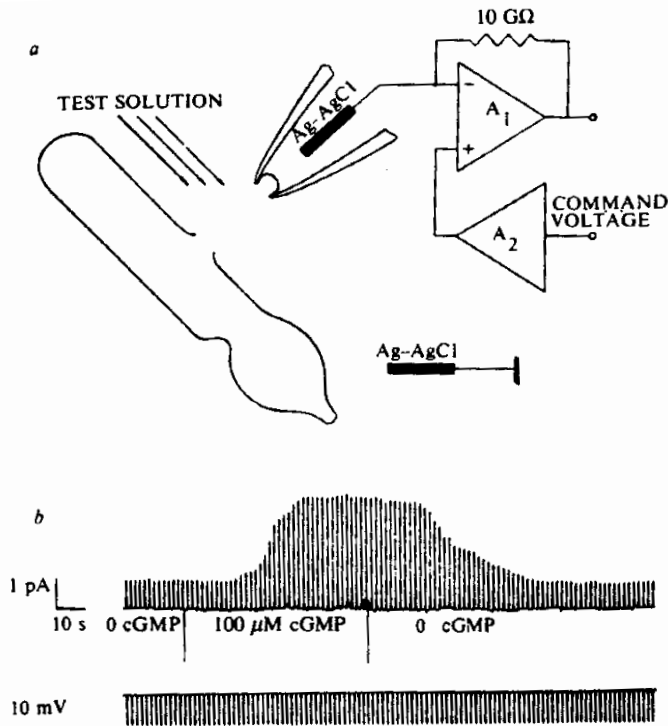
La riduzione di cGMP precede la diminuzione della dark current



Aidley. *The physiology of excitable cells*

**Il cGMP è il messaggero intracellulare** che porta l'informazione dalla membrana dei dischi (attivazione della rodopsina) alla membrana cellulare (chiusura dei canali responsabili della dark current).

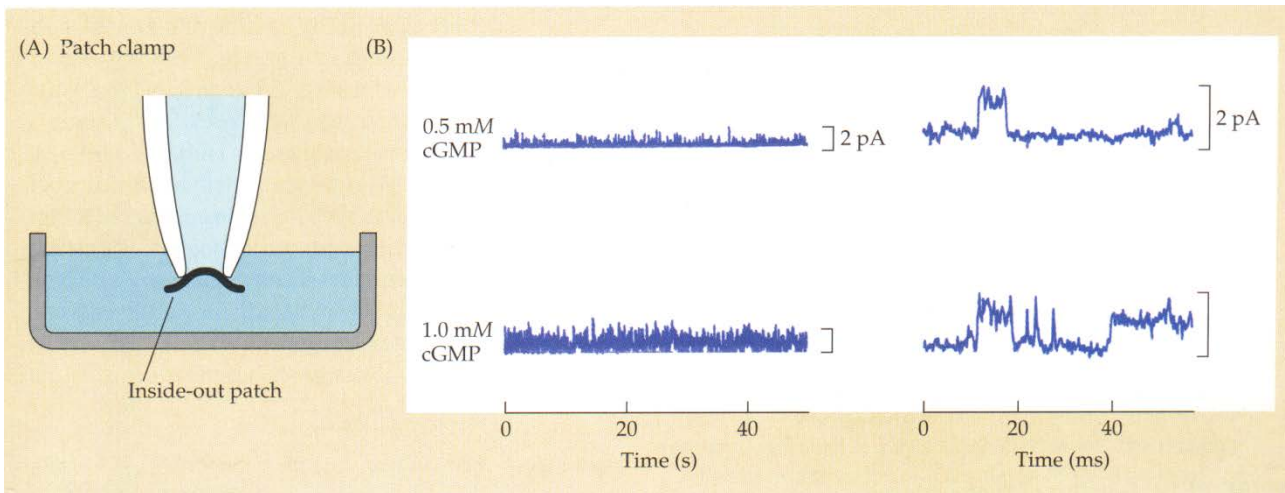
# Trasduzione nei fotorecettori (2)



Il cGMP promuove l'**apertura di canali CNG** presenti sulla membrana dei bastoncelli

1. La **conduttanza della membrana**, misurata dalla corrente evocata con gradini di voltaggio, **aumenta** quando nel mezzo di perfusione viene aggiunto cGMP. L'effetto si osserva in assenza di ATP. **Il cGMP apre i canali direttamente, senza l'intervento di una chinasi.**

Aidley. *The physiology of excitable cells*

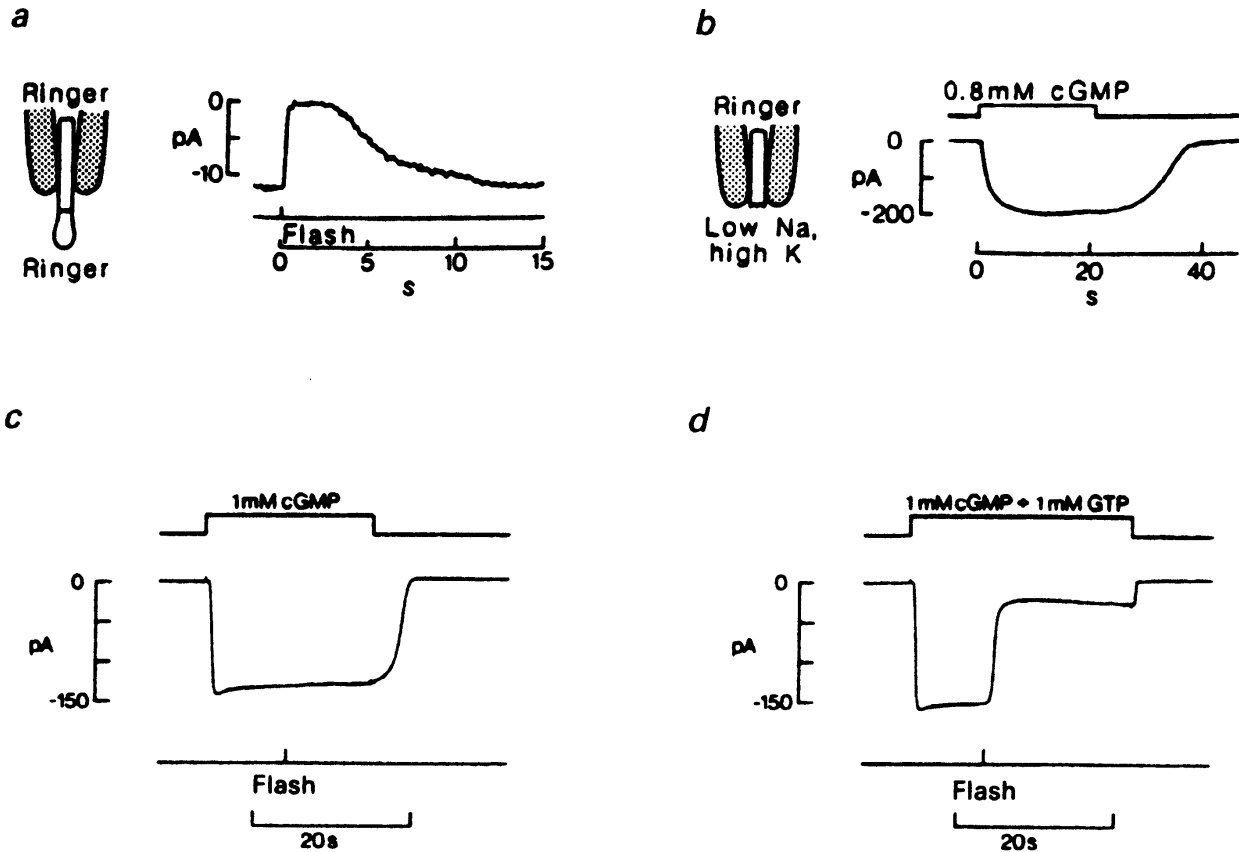


2. La **probabilità di apertura dei canali aumenta** con l'aumentare della concentrazione di cGMP

# Trasduzione nei fotorecettori (3)

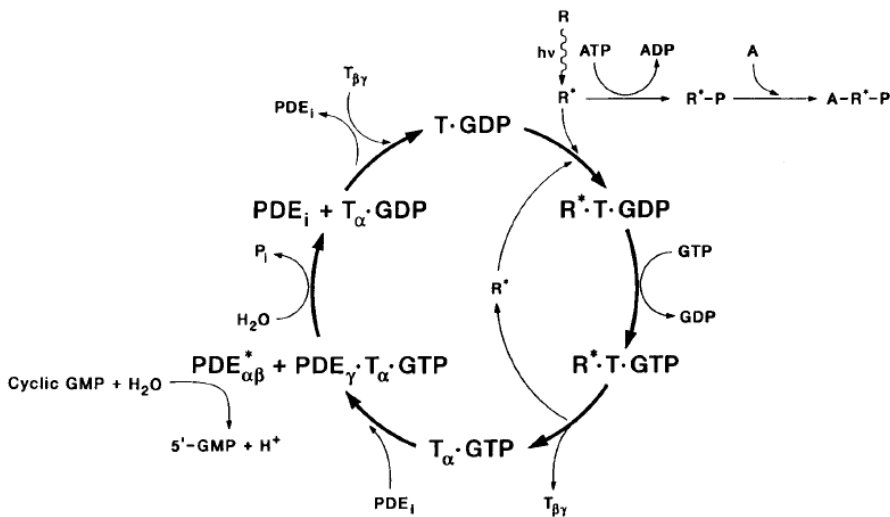
I canali responsabili della dark current sono **canali CNG**, attivati dal **cGMP**. La chiusura di questi canali conseguente all'illuminazione del fotorecettore richiede l'azione di una proteina G, la **trasducina**, attivata dalla metarodopsina II.

Aidley. *The physiology of excitable cells*

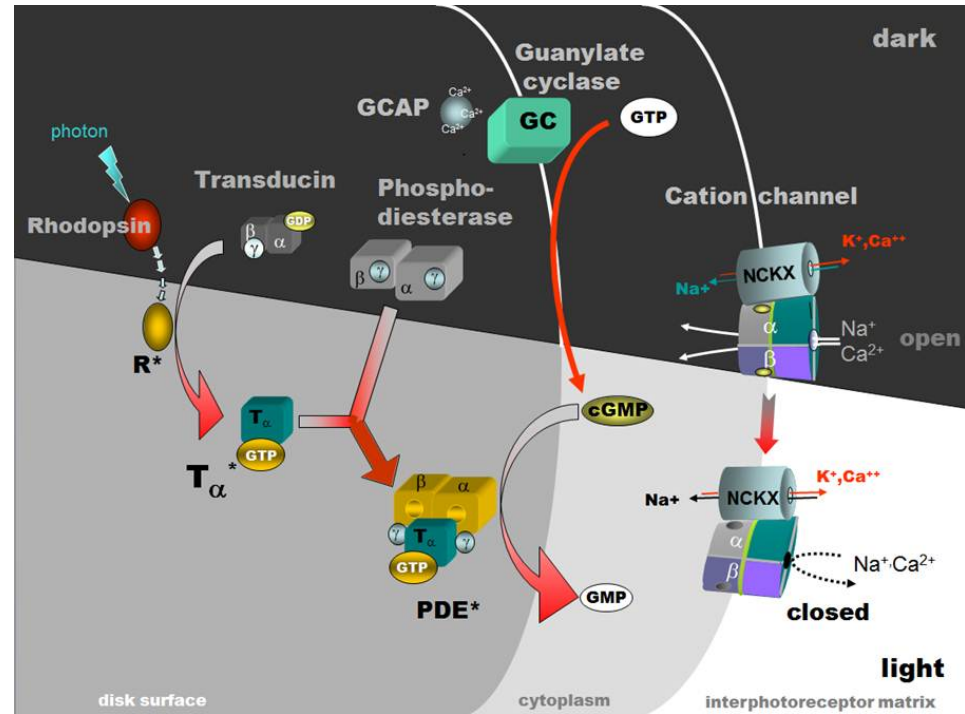


I canali aperti dal cGMP si chiudono in risposta all'illuminazione indicando l'identità dei canali CNG con quelli responsabili della dark current. La necessità della presenza di GTP nel mezzo di perfusione indica che il processo è mediato da una proteina G.

# Trasduzione nei fotorecettori (4)



Aidley. *The physiology of excitable cells*



La fotoisomerizzazione della rodopsina a metarodopsina II dà inizio al processo di trasduzione promuovendo una cascata intracellulare di reazioni che inizia con l'attivazione della **proteina G trasducina** (T). La subunità  $\alpha$  della trasducina ( $T_{\alpha} - GTP$ ) **rimuove la subunità inibitrice  $\gamma$  della fosfodiesterasi** ( $PDE_{\gamma}$ ) e permette alle due subunità catalitiche  $PDE_{\alpha}$  e  $PDE_{\beta}$  di esercitare la loro azione di **idrolisi del cGMP** portando alla **chiusura dei canali CNG**. L'azione  $GTP$ asica della  $T_{\alpha}$  determina la fine del ciclo:  $T_{\alpha} - GDP$  si dissocia da  $PDE_{\gamma}$  e si riassocia a  $T_{\beta\gamma}$  ricostituendo la forma inattiva di trasducina,  $PDE_{\gamma}$  riassociandosi a  $PDE_{\alpha}$  e  $PDE_{\beta}$  riforma il tetramero inattivo PDE. La metarodopsina viene inoltre inattivata dall'azione congiunta di **rodopsina-chinasi** e **arrestina**.

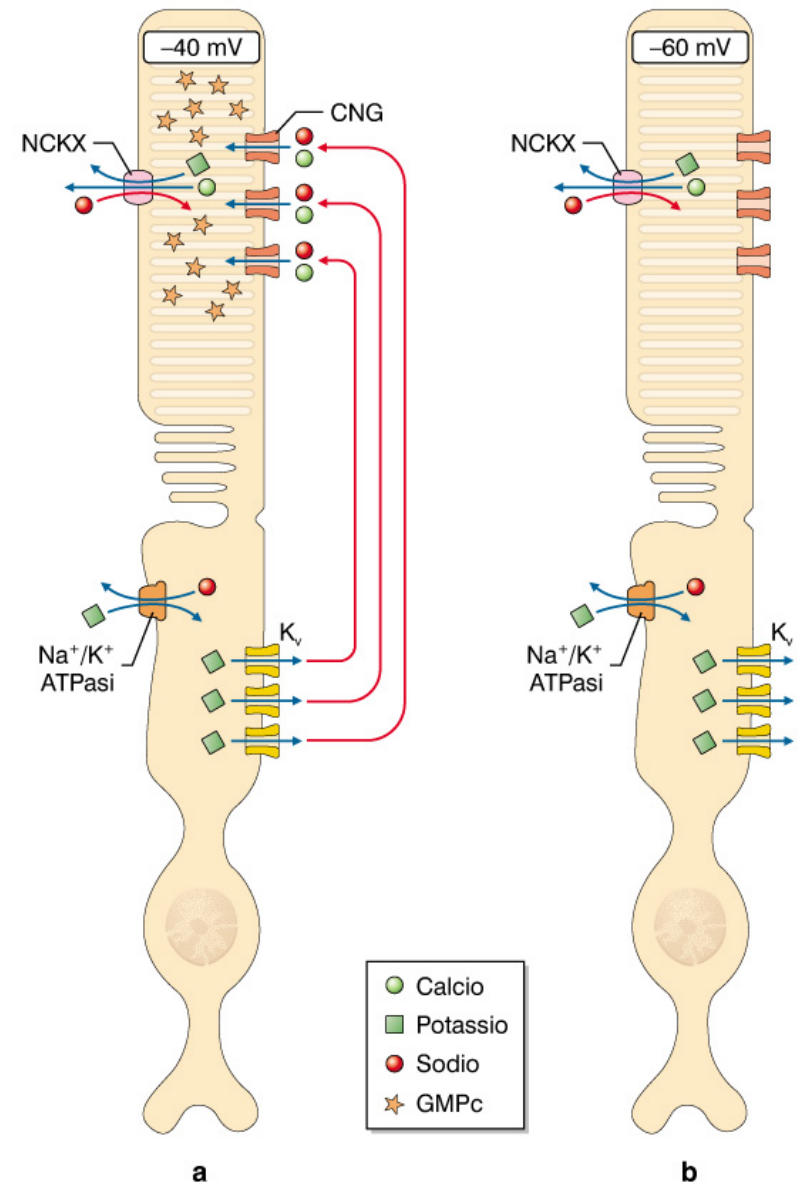
Il processo di fototrasduzione è caratterizzato da una enorme amplificazione del segnale in quanto una molecola di metarodopsina II attiva fino a 500 molecole di trasducina e ciascuna molecola di PDE attivata dalla trasducina è in grado di idrolizzare circa 1000 molecole di cGMP al secondo.



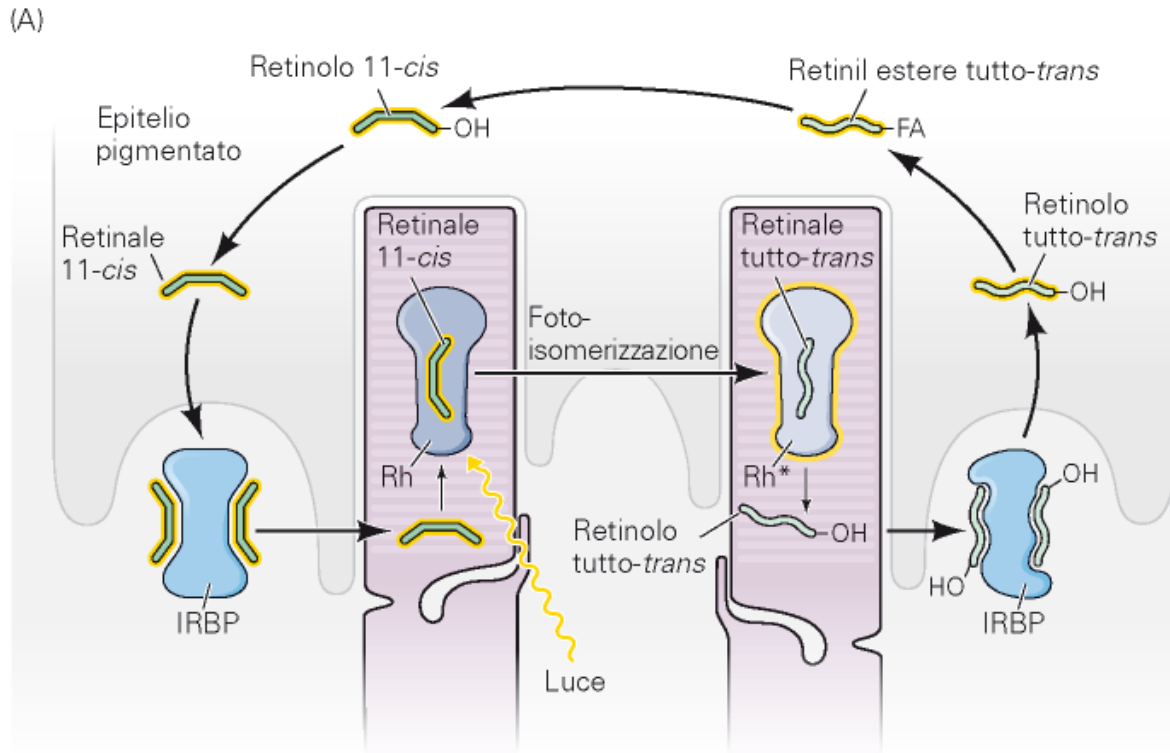
# Trasduzione nei fotorecettori (5)

La **riduzione della [cGMP]** conseguente alla fotoisomerizzazione della rodopsina è il segnale intracellulare che trasferisce l'informazione dalla membrana dei dischi alla membrana esterna, determinando il cambiamento di  $V_m$ .

Al buio l'ingresso di  $\text{Na}^+$  (e  $\text{Ca}^{2+}$ ) attraverso i canali cationici CNG nel segmento esterno causa la depolarizzazione della membrana. Il circuito si chiude attraverso l'uscita di  $\text{K}^+$  dai canali del segmento interno. L'illuminazione del segmento esterno provoca la riduzione di cGMP e quindi la chiusura dei canali CNG e la conseguente iperpolarizzazione della membrana. Meccanismi di trasporto attivo primario e secondario quali la **pompa del  $\text{Na}^+$**  e lo **scambiatore NCKX** mantengono costanti le concentrazioni ioniche intracellulari di  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ .



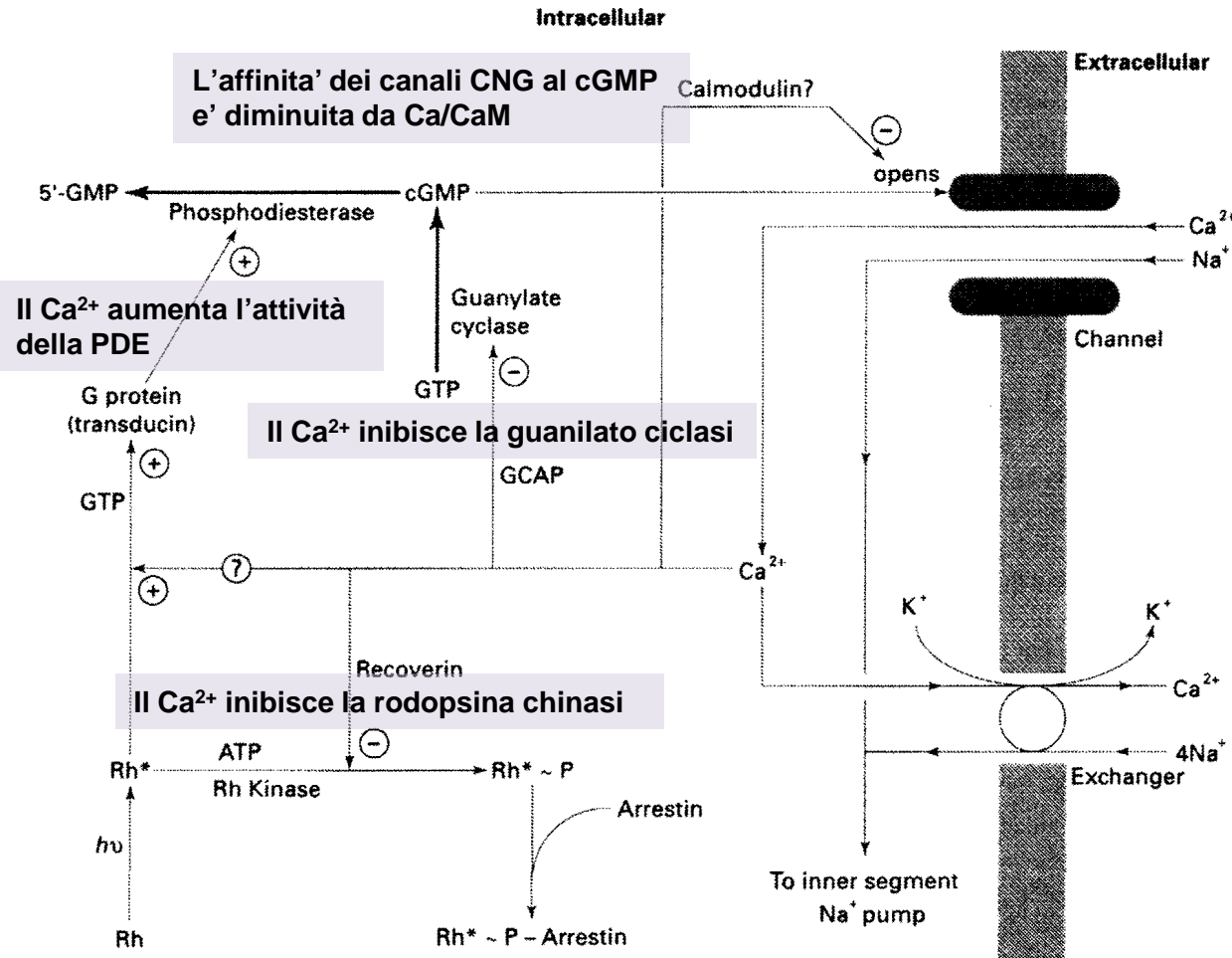
# Il ciclo visivo



Purves et al. *Neuroscienze*

Dopo la fotoisomerizzazione, il retinale tutto-trans si dissocia dall'opsina ed è convertito in retinolo tutto-trans e trasportato dalla proteina chaperon IRBP (interphotoreceptor retinoid binding protein) nell'epitelio pigmentato. Qui, in un processo a più tappe, è riconvertito a retinale 11-cis e trasferito nuovamente al segmento esterno del fotorecettore dove si ricombina con l'opsina.

# Adattamento nei fotorecettori



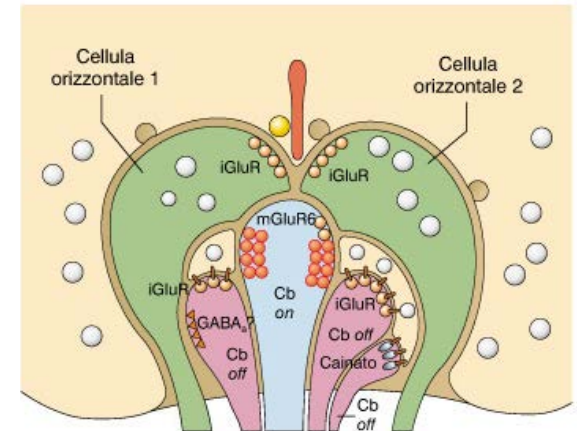
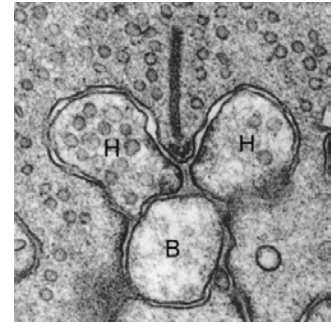
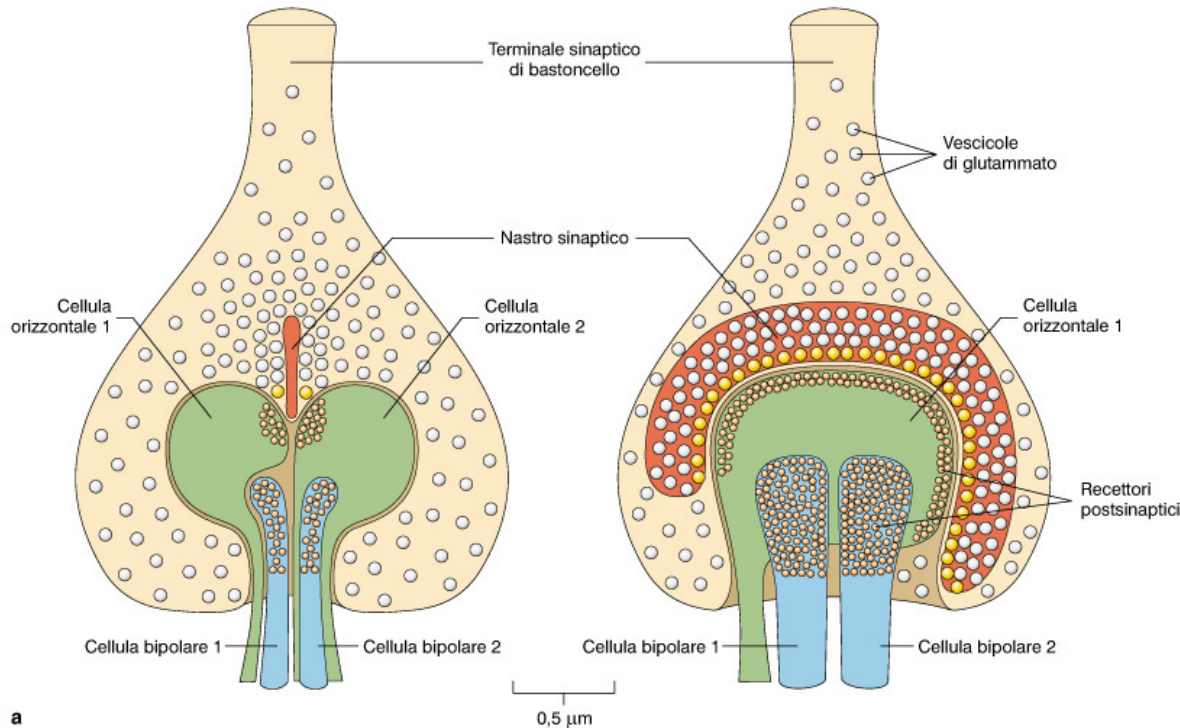
Aidley. *The physiology of excitable cells*

I fotorecettori sono in grado di rispondere a intensità di luce molto diverse non solo perché esistono differenti tipi di recettore specializzati per la visione notturna e diurna, ma anche per il fenomeno dell'**adattamento**, dovuto all'attività regolatrice del  $Ca^{2+}$ . Questo ione infatti inibisce la GC (che catalizza la sintesi di cGMP) e la rodopsina chinasi (che inattiva la metarodopsina II), riduce l'affinità del cGMP per i canali CNG e aumenta l'attività della PDE. **In condizioni di forte illuminazione l'ingresso di  $Ca^{2+}$  attraverso i canali CNG diminuisce.** Il minor ingresso dello ione insieme all'attività dello scambiatore NCKX provoca la **riduzione della  $[Ca^{2+}]$** .

Conseguentemente si ha **aumento dell'attività della GC** e **riduzione dell'attività della PDE** e quindi aumento del cGMP, **aumento dell'attività della rodopsina chinasi** e quindi accelerazione della desensibilizzazione della metarodopsina e **aumento della probabilità di apertura dei canali CNG**.

# Struttura delle sinapsi dei fotorecettori

D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

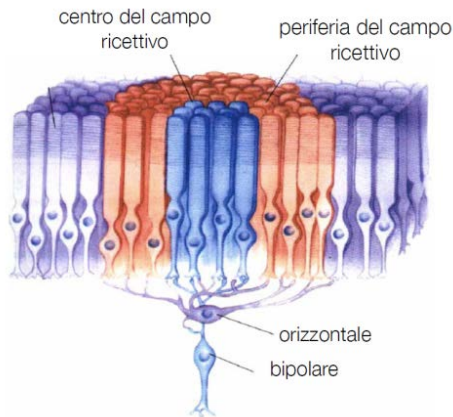


I fotorecettori stabiliscono contatti sinaptici sia con le cellule bipolari che con le cellule orizzontali mediante terminazioni specializzate che prendono il nome di **sinapsi a nastro**. Le vescicole sinaptiche, contenenti glutammato (Glu), sono disposte intorno ad un organello, il **nastro**, e al buio rilasciano continuamente il neurotrasmettitore nello spazio sinaptico. Le cellule orizzontali e le cellule bipolari sono contenute in una invaginazione del terminale del fotorecettore. L'azione del Glu sulle cellule orizzontali è eccitatoria, per cui al buio queste cellule sono depolarizzate. L'azione sulle cellule bipolari dipende dal tipo di recettore per il Glu presente sulla membrana postsinaptica: nelle cellule bipolari in cui il recettore è metabotropico, l'azione del Glu è inibitoria e la cellula è iperpolarizzata, nelle cellule bipolari in cui il recettore è ionotropico, il Glu depolarizza la membrana.

# Risposte delle cellule bipolari

**Cellule bipolari H:** al buio il costante rilascio di Glu da parte dei fotorecettori depolarizza la membrana su cui sono presenti recettori AMPA; quando la luce colpisce il fotorecettore, questo si iperpolarizza e il rilascio di Glu diminuisce. Conseguentemente diminuisce la stimolazione eccitatoria sulla cellula bipolare H che si iperpolarizza.

**Cellule bipolari D:** al buio sono iperpolarizzate per l'azione inibitoria del Glu mediata da recettori metabotropici mGluR accoppiati ad una proteina  $G_o$  che, se attivata, promuove la chiusura di canali cationici del tipo TRP. L'illuminazione dei fotorecettori, con la conseguente diminuzione del rilascio di Glu, promuove la rimozione dell'inibizione dei canali TRP e quindi la depolarizzazione della membrana.



**Campo recettivo** di una cellula bipolare (o di un neurone retinico): area della retina dalla quale l'attività della cellula bipolare (o del neurone) risulta influenzata.

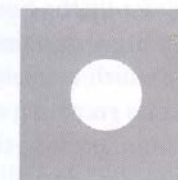
Il campo recettivo di una cellula bipolare (o di un neurone retinico) ha un centro in cui la risposta è opposta a quella della periferia che lo circonda.

Nelle cellule bipolari H l'illuminazione centrale provoca iperpolarizzazione, mentre l'illuminazione anulare induce depolarizzazione: campo recettivo con **centro OFF**

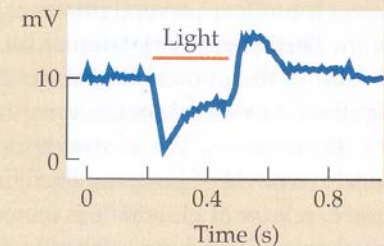
Nelle cellule bipolari D l'illuminazione centrale promuove la depolarizzazione, mentre quella periferica l'iperpolarizzazione: campo recettivo con **centro ON**

## Organizzazione del campo recettivo di una cellula H

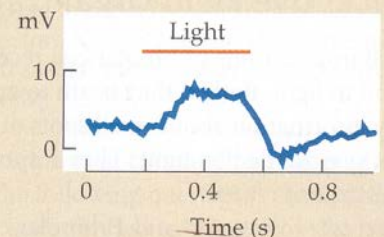
(A) Central illumination



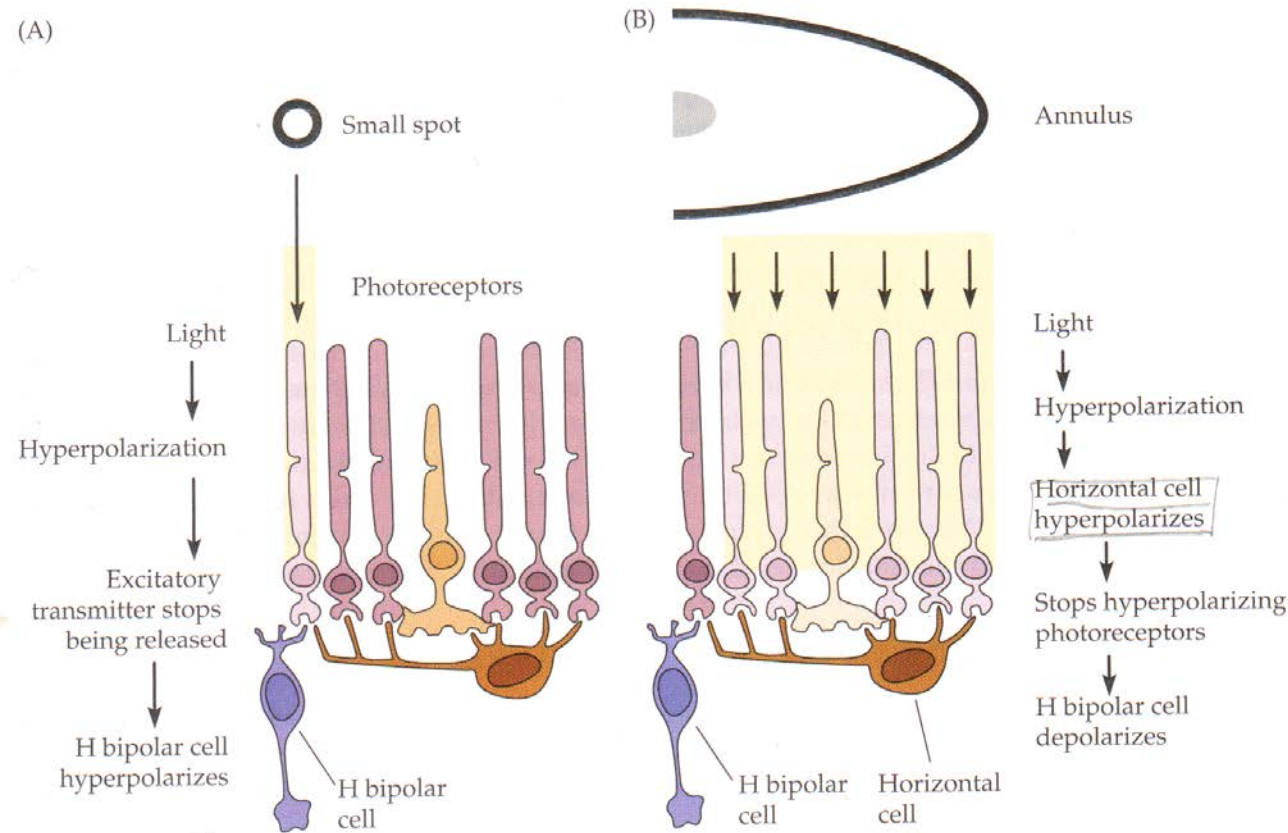
1 mm



(B) Annular illumination



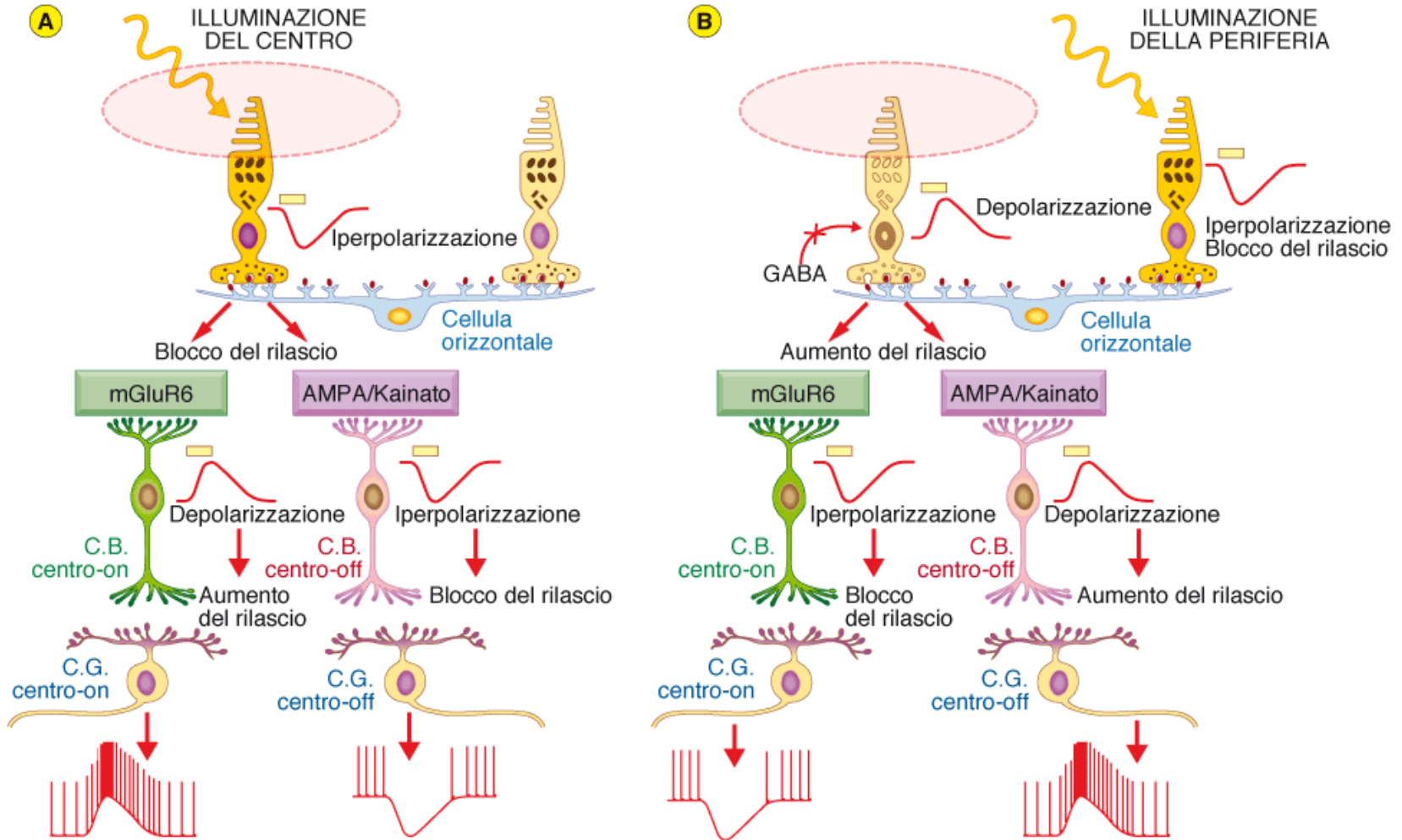
# Funzione delle cellule orizzontali

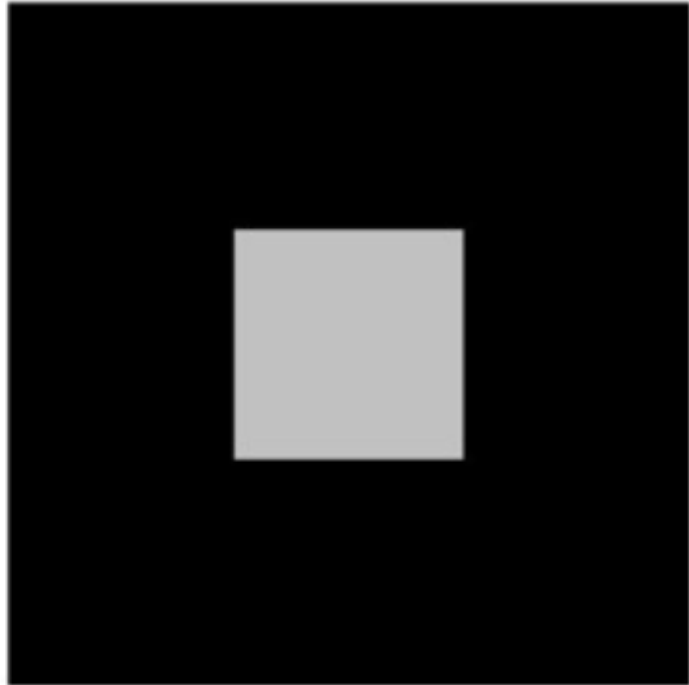


Nella figura sono mostrate schematicamente le connessioni coinvolte nelle risposte centro OFF periferia ON di una cellula bipolare H. L'illuminazione del fotorecettore centrale determina riduzione del rilascio di Glu e conseguente iperpolarizzazione della cellula bipolare e della cellula orizzontale. Il feedback negativo dalla cellula orizzontale è trascurabile. L'illuminazione della periferia attiva molti fotorecettori per cui il segnale iperpolarizzante sulle cellule orizzontali è intenso. La ridotta liberazione di GABA determina depolarizzazione del fotorecettore centrale e della cellula bipolare associata (l'azione del Glu non è più antagonizzata dal GABA), ma non ha effetto sui fotorecettori illuminati che sono fortemente iperpolarizzati dalla luce.

La risposta delle cellule bipolari D e H all'illuminazione della periferia è mediata dalle cellule orizzontali. Le cellule orizzontali ricevono inputs da numerosi fotorecettori, rispondendo al costante rilascio di Glu con la depolarizzazione, sono elettricamente connesse tra loro mediante gap junctions e formano contatti sinaptici inibitori (GABA) con i fotorecettori e le cellule bipolari. **Al buio** la depolarizzazione dei fotorecettori è antagonizzata dall'input inibitorio delle cellule orizzontali. In condizioni di **illuminazione** l'iperpolarizzazione delle cellule orizzontali si manifesta con un ridotto output inibitorio. **L'inibizione laterale** operata dalle cellule orizzontali contribuisce all'aumento del contrasto centro-periferia

# Confronto delle risposte dei due tipi di cellule bipolari

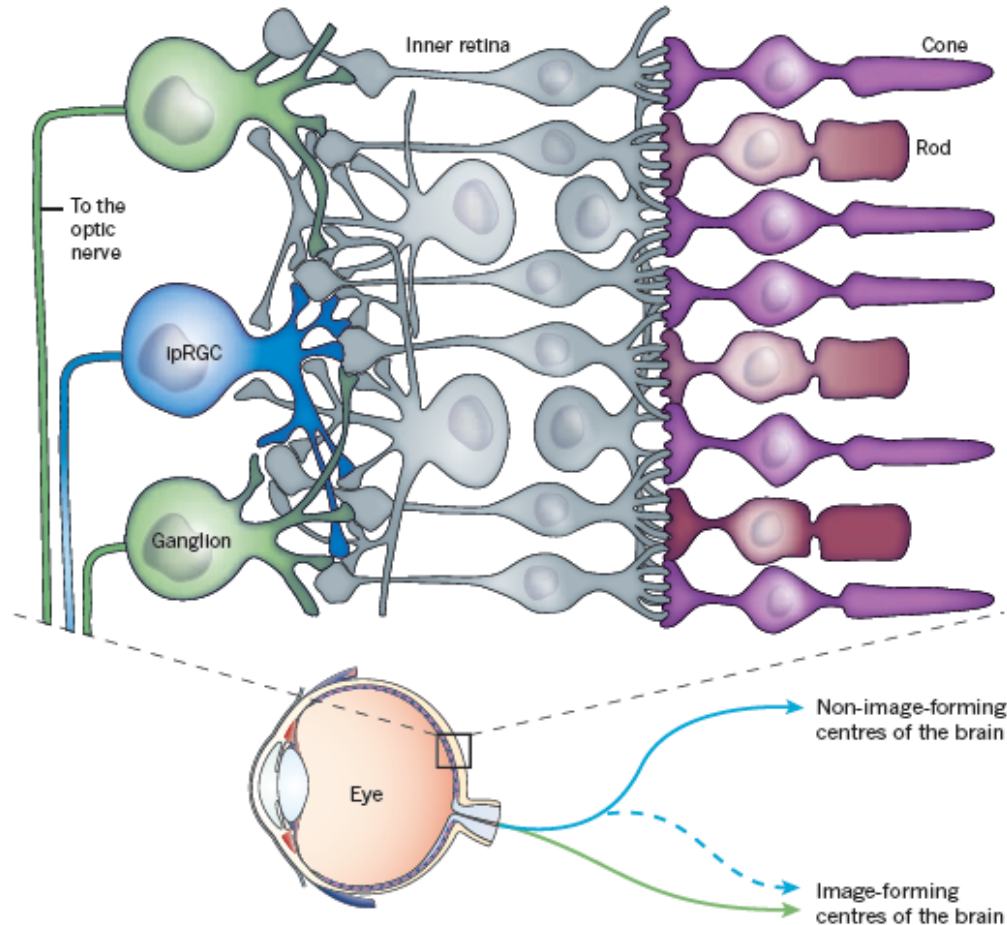








# Fotorecettori che non formano immagini



Nella retina sono presenti **cellule gangliari retiniche intrinsecamente fotosensibili (ipRGC)** che possiedono il pigmento visivo **melanopsina**, strutturalmente correlato alla rodopsina. Le ipRGC sono ritenute implicate nella regolazione dei ritmi circadiani e nella sensibilità alla luminosità dell'ambiente. Il meccanismo di trasduzione del segnale luminoso pare avvenga attraverso l'accoppiamento ad una proteina *G* che attiva la via dei fosfoinositidi portando all'apertura di canali TRP cationici e quindi alla depolarizzazione della cellula.