

# La comunicazione tra le cellule

V. Taglietti, C. Casella. *Fisiologia e Biofisica delle cellule*. EdiSES

J. 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. R. Kandel, J. H. Schwartz, T. M. Jessell. *Principles of neural science*. McGraw-Hill Companies, Inc.

E. D'Angelo, A. Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi*. Edi-Ermes, Milano.

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)

Le cellule comunicano continuamente tra di loro armonizzando la loro attività in modo da garantire le funzioni dell'intero organismo.

Questo si verifica grazie alla elaborazione e trasmissione di **messaggi** che raggiungono cellule **bersaglio** in grado di riconoscerli.

Le caratteristiche di un messaggio sono:

il **contenuto di informazione**

la **destinazione**

la **velocità di trasmissione**

I meccanismi attraverso cui avviene la comunicazione tra le cellule sono riconducibili a due modalità generali:

comunicazione mediante **messaggi elettrici**

comunicazione mediante **messaggi chimici**

## Comunicazione elettrica

- **Informazione stereotipata** (potenziale d'azione tutto o nulla, potenziali elettrotonici)
- **Necessità di linee di trasmissione** (assoni) per raggiungere la destinazione
- **Elevata velocità di trasmissione** (conduzione dell'impulso)

## Comunicazione chimica

- **Possibilità di variare il contenuto di informazione** (variazione della quantità del messaggero)
- **Assenza di linee di trasmissione** (recettori specifici nelle cellule bersaglio riconoscono l'indirizzo con cui le molecole messaggio sono contrassegnate)
- **Velocità di comunicazione lenta** (diffusione e flusso di massa)

# La comunicazione chimica (1)

Il segnale viene trasmesso mediante l'interazione tra due molecole: il **messaggero** e il **recettore**.

La cellula che esprime il recettore è il **bersaglio**.

Le modalità di comunicazione chimica si possono classificare in base alla distanza d'azione:

**modalità autocrina**: il recettore è sulla stessa cellula che produce il messaggero

**modalità paracrina**: il recettore è su cellule adiacenti a quelle che producono il messaggero (**neurocrina** nelle cellule nervose)

**modalità endocrina**: il recettore è lontano dalla cellula sorgente

Una particolare modalità di comunicazione chimica è quella **per contatto** che avviene per l'interazione tra proteine di membrana di cellule adiacenti (es. gap junctions, che permettono il passaggio di piccole molecole) o tra recettori di membrana (recettori integrinici) e proteine della matrice extracellulare (fibronectina e collagene) implicati nei processi di adesione, migrazione e controllo della crescita cellulare.

## La comunicazione chimica (2)

Il legame tra molecola-messaggio e recettore produce una modifica nel recettore che porta, attraverso la regolazione di proteine di membrana e citosoliche, ad un evento cellulare.

Processi implicati nella comunicazione chimica:

- **Sintesi e liberazione** della molecola-messaggio (primo messaggero, ligando, neurotrasmettitore, ormone, fattore di crescita)
- **Diffusione** della molecola-messaggio verso la cellula bersaglio
- **Riconoscimento** da parte del recettore
- **Attivazione** di processi metabolici cellulari da parte del recettore attivato
- **Spegnimento** della catena di trasduzione

## La comunicazione chimica (3)

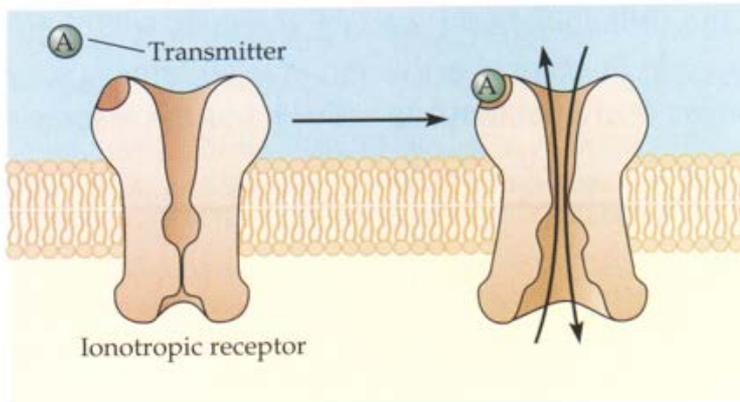
### Compartimentalizzazione dei segnali

Il citosol non sempre costituisce un mezzo omogeneo in cui i messaggeri intracellulari e le proteine solubili diffondono liberamente; spesso presenta **separazioni funzionali tra le diverse regioni della cellula**. La compartimentalizzazione può essere dovuta (1) alla formazione di veri e propri complessi macromolecolari da parte delle proteine implicate nella via di trasduzione, che isolano o comunque delimitano una determinata porzione del citosol, anche grazie alle loro interazioni con il citoscheletro; (2) alla presenza di un'elevata attività enzimatica che limita la diffusione di un particolare messaggero (es. fosfodiesterasi che idrolizzano il cAMP). Nel caso del  $\text{Ca}^{2+}$  la compartimentalizzazione è legata principalmente alla presenza di proteine tampone che legano lo ione limitandone la diffusione.

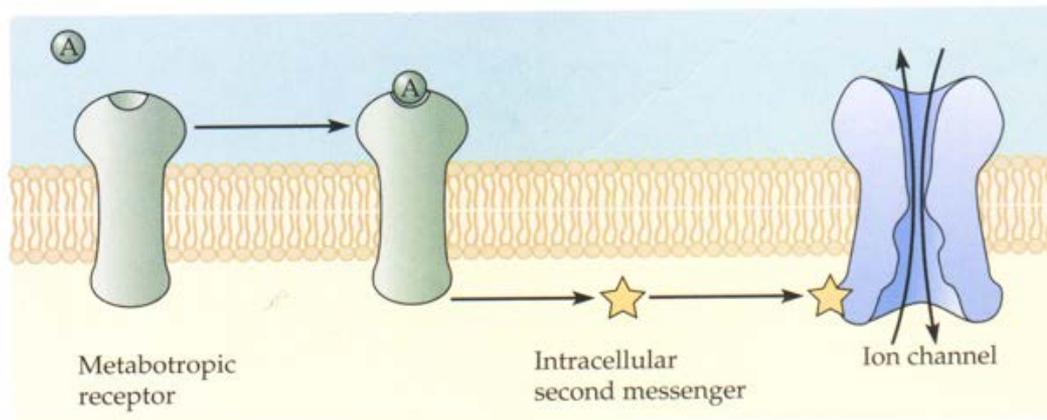
# La trasmissione sinaptica chimica

È la forma di comunicazione osservata più frequentemente tra cellule nervose o tra cellule nervose ed effettori.

(A) Direct transmitter action



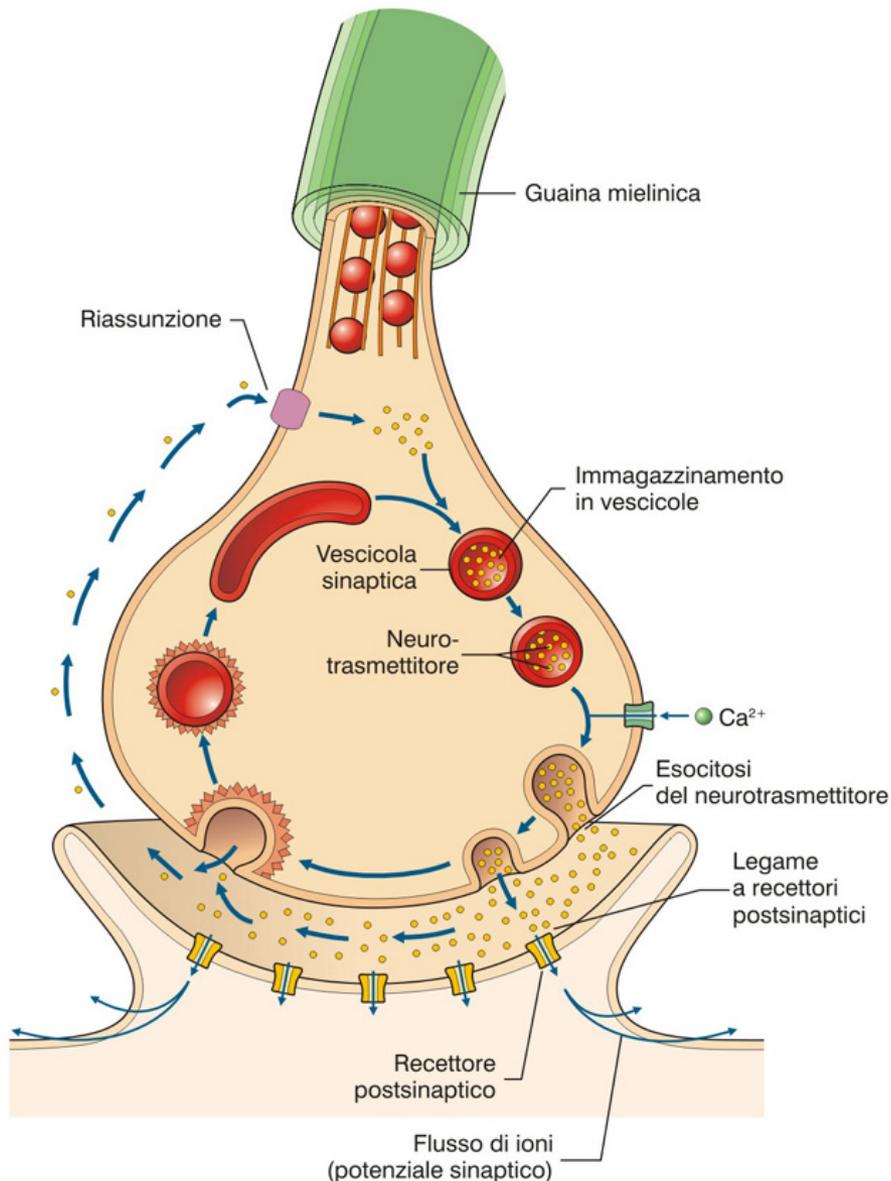
(B) Indirect transmitter action



La trasmissione chimica alle sinapsi avviene secondo due modalità distinte che utilizzano due tipi diversi di recettore: recettori **ionotropici** e **metabotropici**. I primi sono canali ionici ligando dipendenti o receptor operated channels (**ROC, sinapsi dirette o rapide**), i secondi sono proteine di membrana che attivano una cascata metabolica intracellulare (**sinapsi indirette o lente**).

Lo stesso neurotrasmettitore (NT) può interagire con i due tipi di recettore.

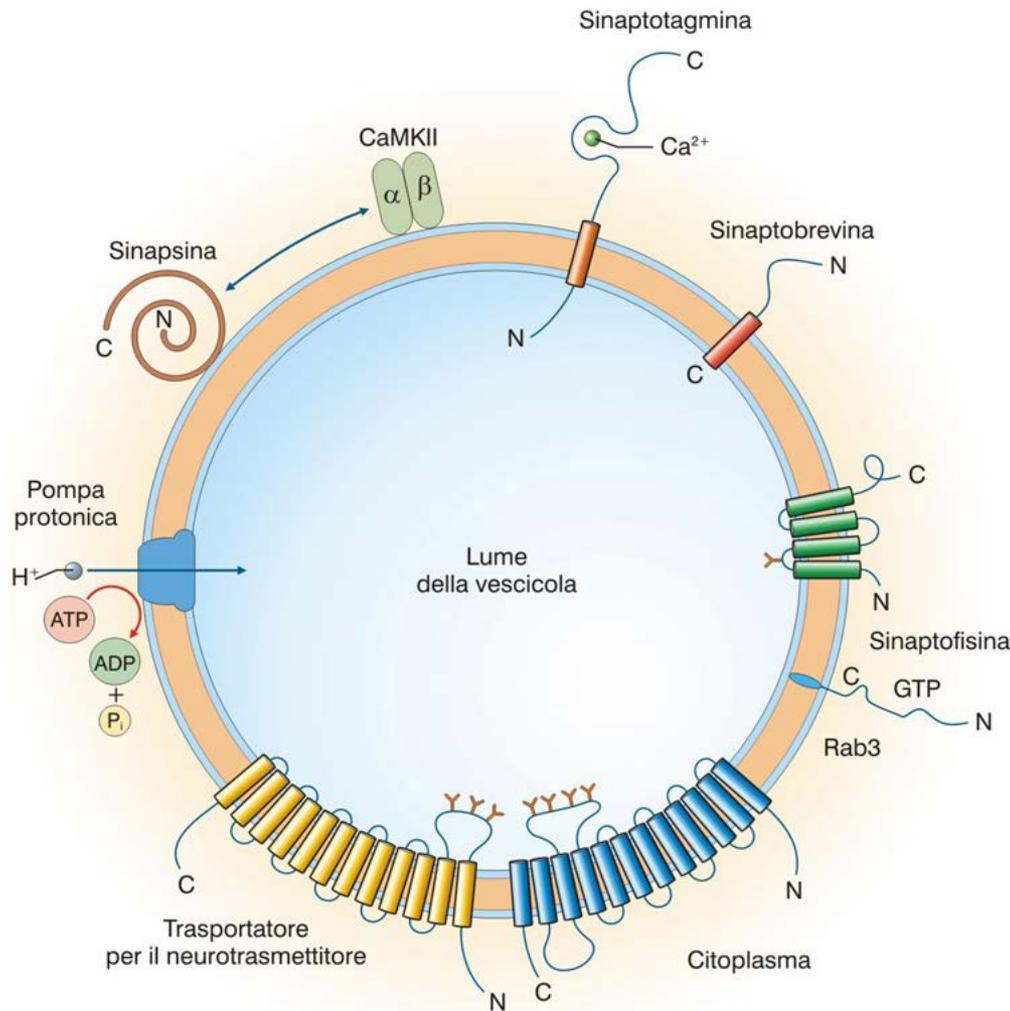
# La trasmissione sinaptica chimica



Schema del ciclo dei principali processi biochimici che coinvolgono una tipica molecola di NT a livello della terminazione sinaptica

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

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

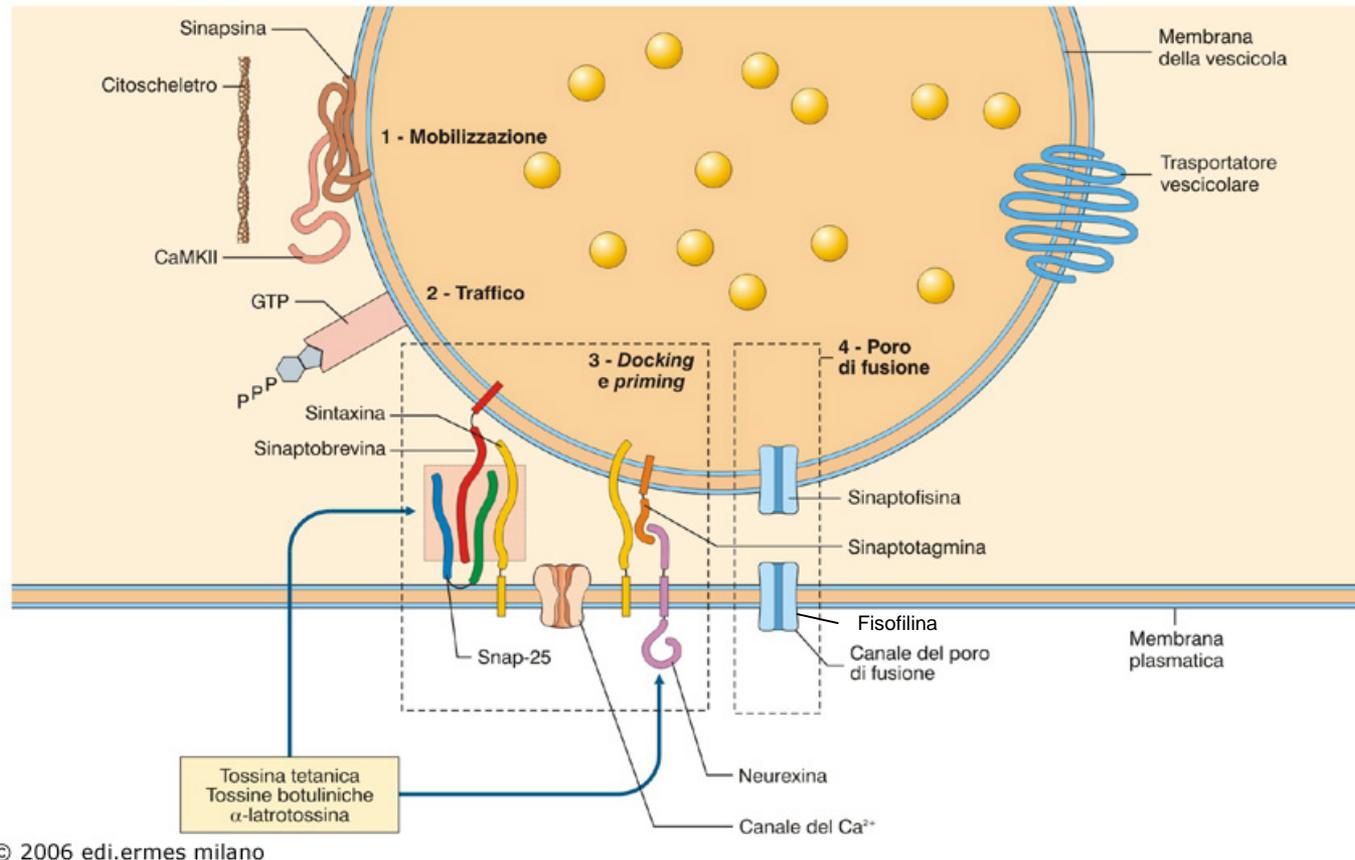


La membrana delle vescicole sinaptiche è dotata di proteine specifiche sia per il trasporto di NT nel lume vescicolare che per la sua esocitosi nello spazio sinaptico.

**Immagazzinamento del NT**  
Una **pompa protonica** (trasporto attivo primario) crea un gradiente elettrochimico attraverso la membrana vescicolare che permette l'accumulo del NT mediante trasporto attivo secondario (antiporto  $H^+/NT$ ).

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

## Fasi della liberazione del neurotrasmettitore



**Mobilizzazione:** liberazione delle vescicole dal legame con il citoscheletro

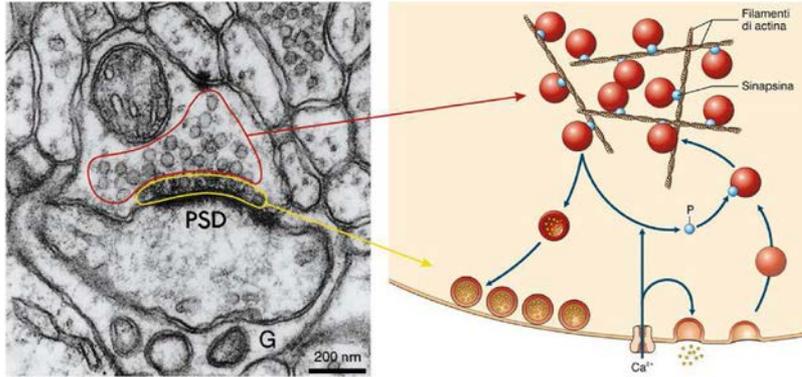
**Traffico:** direzionamento verso le zone attive

**Docking e priming:** ancoraggio alle zone attive e predisposizione alla fusione

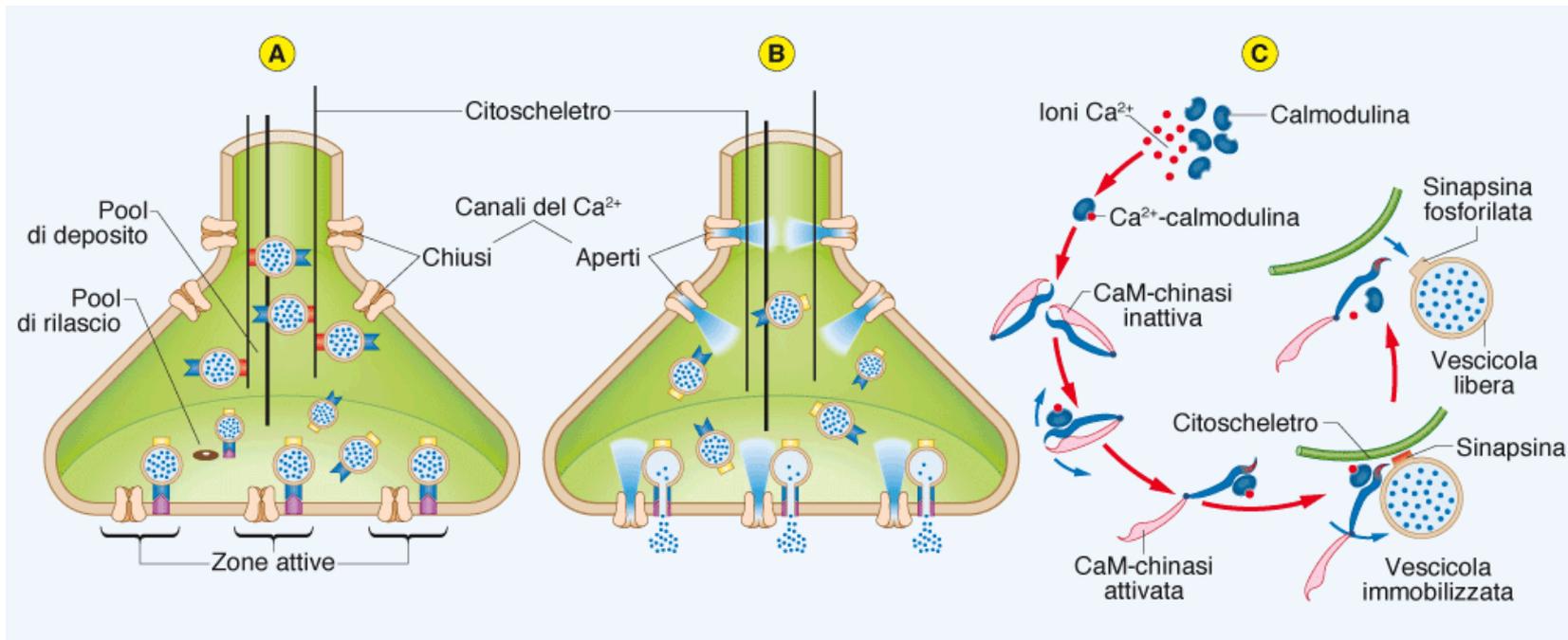
**Fusione:** formazione del poro di fusione

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

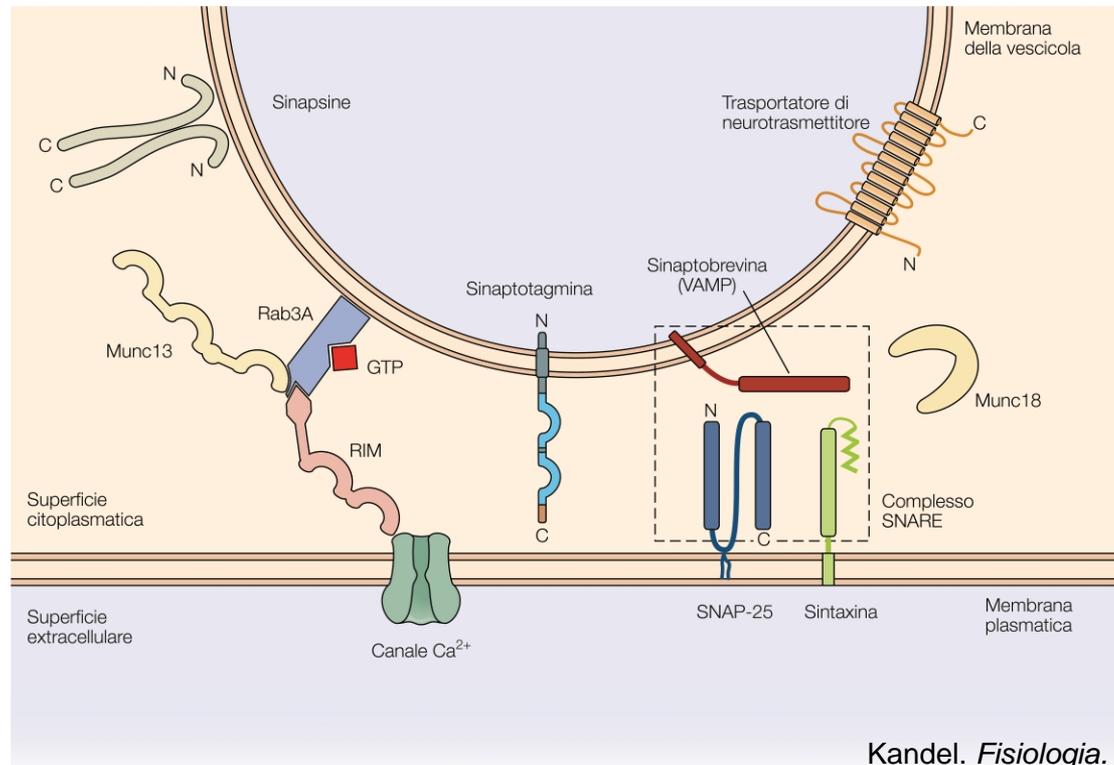
## Mobilizzazione delle vescicole



Le vescicole che fanno parte del **pool di riserva** (**Reserve Pool, RP**) sono legate ai filamenti di actina del citoscheletro tramite la **sinapsina** a sua volta associata alla proteinchinasi calcio/calmodulina dipendente di tipo II (**CaMKII**). L'aumento della  $[Ca^{2+}]_i$  attiva la chinasi che fosforila la sinapsina, permettendo il distacco della vescicola dall'actina.



# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

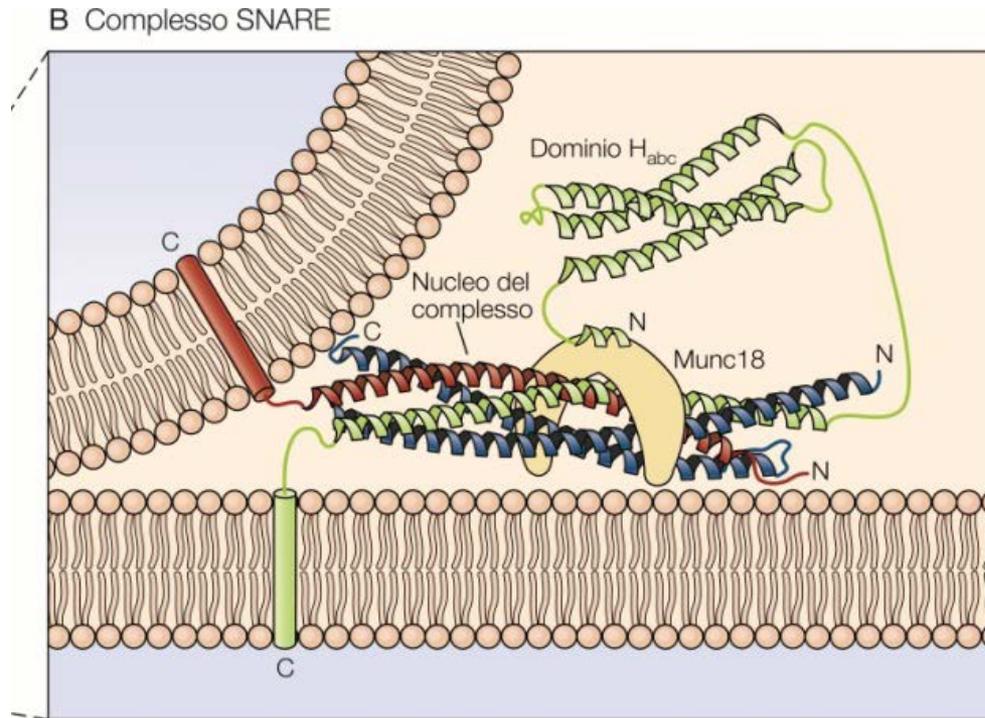


## Indirizzamento e ancoraggio delle vescicole

Una proteina G monomeric, denominata **Rab3**, **indirizza** la vescicola verso la zona attiva della membrana sinaptica e contribuisce all'inizio del processo di ancoraggio tramite il riconoscimento della proteina di membrana **RIM**.

Nel passo successivo di **ancoraggio** della vescicola alla membrana cellulare sono coinvolte proteine complementari presenti sulla membrana vescicolare e nella zona attiva della membrana presinaptica. Queste proteine vengono identificate col nome di **proteine SNARE** (**sinaptobrevina** (vescicolare), **sintaxina** e **SNAP25** (sulla membrana cellulare)). (SNARE= Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor)

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

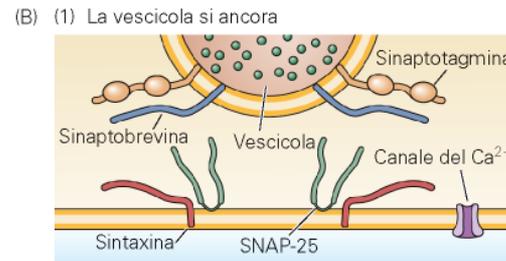
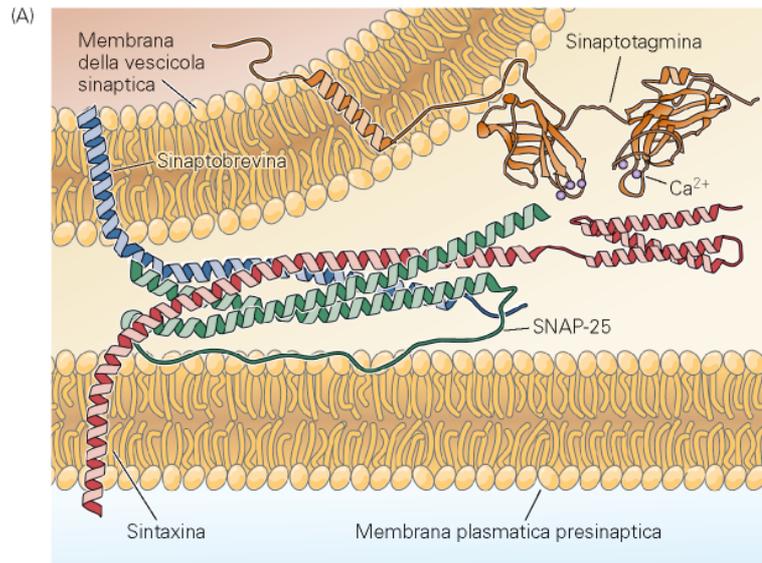


Kandel. *Fisiologia. Principi di neuroscienze*

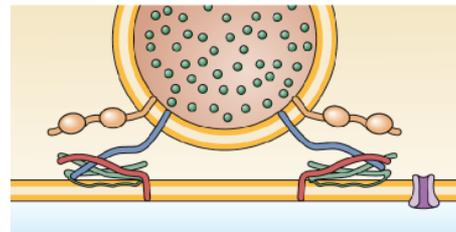
## Priming delle vescicole

**Syntaxina** (verde) e **SNAP25** (blu) della membrana cellulare e **sinaptobrevina** vescicolare (marrone) formano, con le loro componenti ad  $\alpha$ -elica, strutture coiled-coil molto stabili in grado di avvicinare le porzioni idrofobiche delle membrane giustapposte, con eliminazione dell' $H_2O$  di idratazione. La syntaxina prende contatto anche con il canale VOC del  $Ca^{2+}$  assicurando la stretta vicinanza della vescicola alla sede di ingresso del  $Ca^{2+}$ , ione essenziale per le fasi finali dell'esocitosi. Essenziale per il processo di esocitosi è anche la proteina **Munc18** che deve essere legata alla syntaxina perché avvenga la formazione del complesso SNARE. Le vescicole che fanno parte del **pool prontamente liberabile (Readily Releasable Pool, RRP)** sono in questa configurazione.

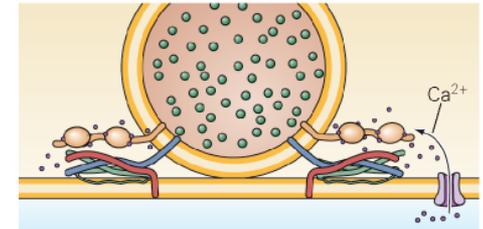
# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore



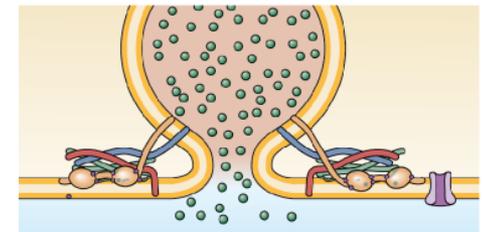
(2) Si formano i complessi SNARE per unire le membrane



(3) Il Ca<sup>2+</sup> che entra si lega alla sinaptotagmina



(4) La sinaptotagmina che ha legato il Ca<sup>2+</sup> catalizza la fusione della membrana legandosi alle SNARE e alla membrana plasmatica



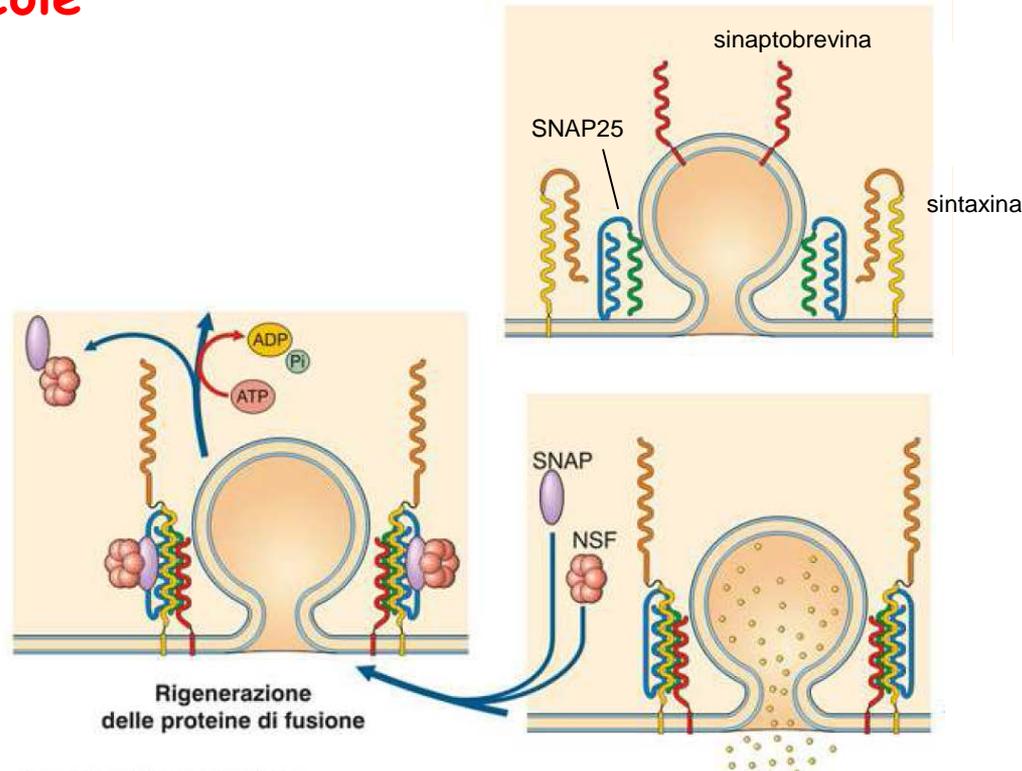
Purves et al. *Neuroscienze*.

## Fusione delle vescicole

L'interruttore molecolare del processo di fusione delle due membrane è la proteina vescicolare **sinaptotagmina** che in seguito al legame con il Ca<sup>2+</sup> acquisterebbe la capacità di inserirsi nel foglietto citoplasmatico della membrana cellulare determinando l'integrazione delle due membrane (**zippering**) e la formazione del **poro di fusione** attraverso cui il contenuto della vescicola viene riversato nello spazio sinaptico. In alcuni casi il poro di fusione è una struttura transitoria e reversibile che richiudendosi consente una rapida riformazione della vescicola (modalità **kiss and run**), in altri si ha la completa fusione delle membrane e il recupero della membrana fusa avviene attraverso il processo più lento dell'**endocitosi**.

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

## Riciclo delle vescicole

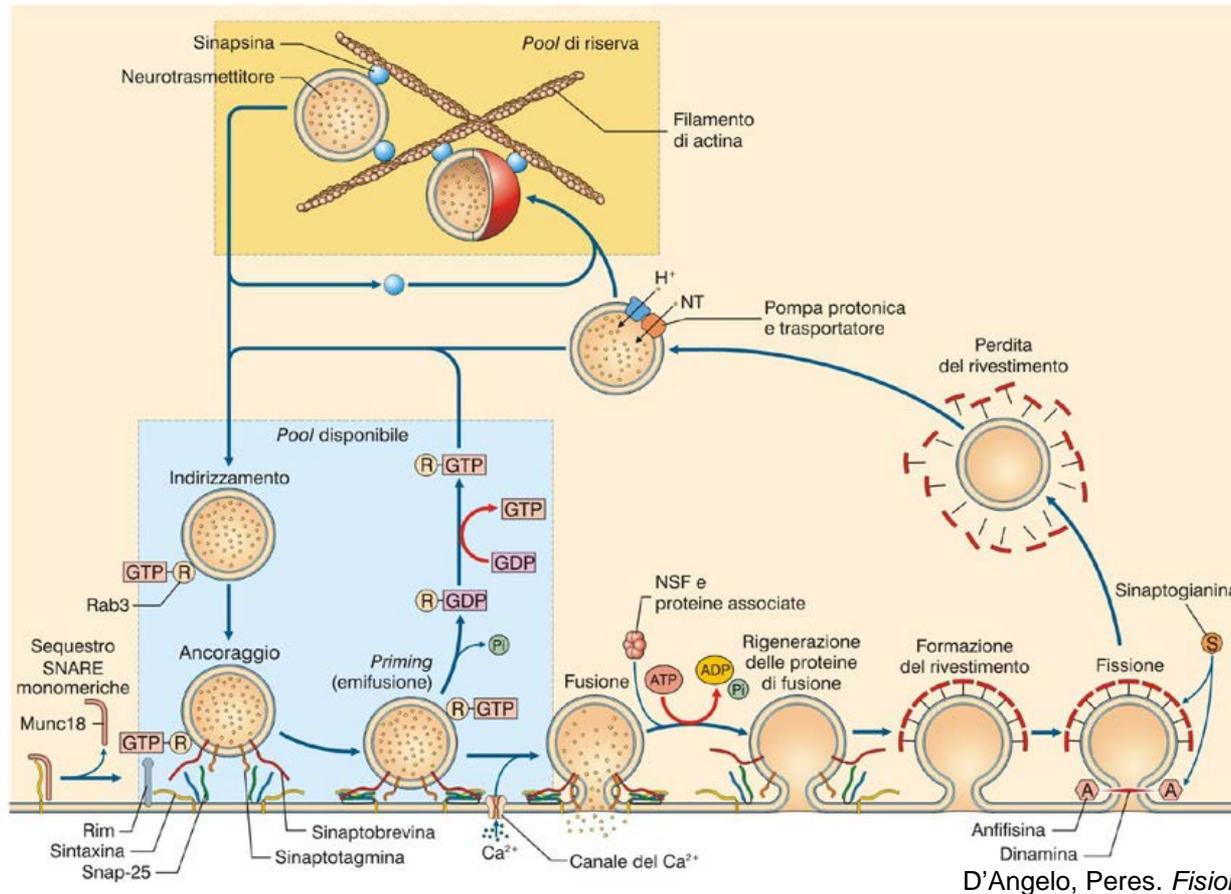


## Rigenerazione delle proteine SNARE

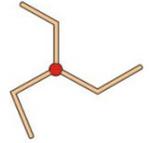
Dopo la fusione e l'esocitosi del NT il complesso proteico di ancoraggio della vescicola alla membrana viene dissolto dall'azione di una proteina (**NSF** = N-ethylmaleimide-sensitive factor) con attività ATPasica che, con altre proteine accessorie, promuove la rottura dei legami delle proteine SNARE che tornano a essere disponibili per un nuovo ciclo.

# Meccanismi molecolari di liberazione del neurotrasmettitore

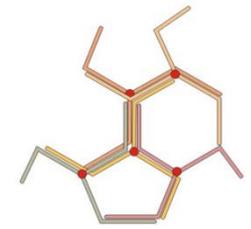
## Riciclo delle vescicole



Trischelo di clatrina



© 2006 edi.ermes milano



Assemblaggio di trischeli

Canestro di clatrina



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

## Recupero della membrana e rigenerazione delle vescicole

Nel caso della modalità kiss and run le vescicole vengono rapidamente recuperate con l'intervento di **dinamina**, che forma un anello intorno al collo della vescicola facilitandone il distacco. Nel caso della completa fusione della vescicola il processo è più lento e richiede l'intervento di **adattine**, che identificano i confini della membrana vescicolare, di **clatrina**, che è indispensabile per realizzare la curvatura della porzione di membrana da endocitare e di proteine per la rimozione del rivestimento vescicolare.

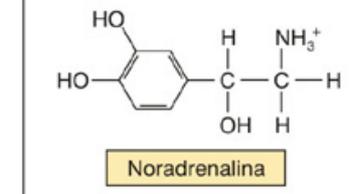
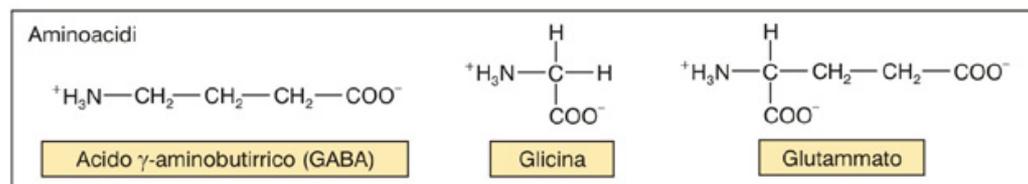
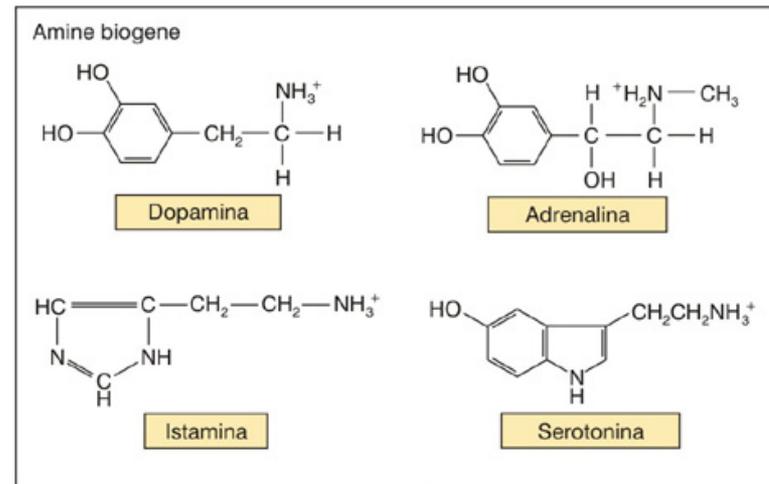
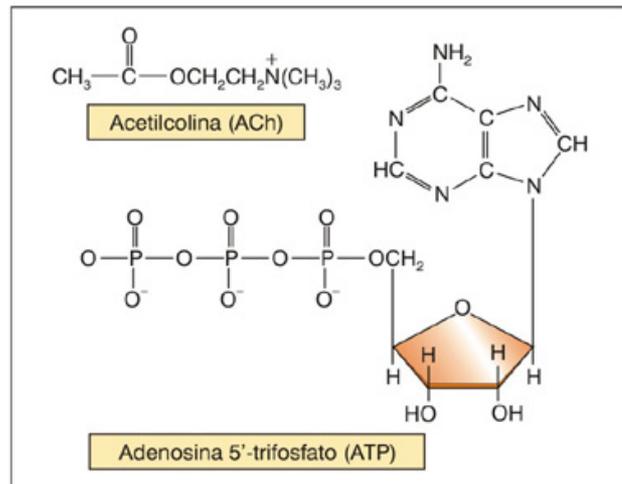
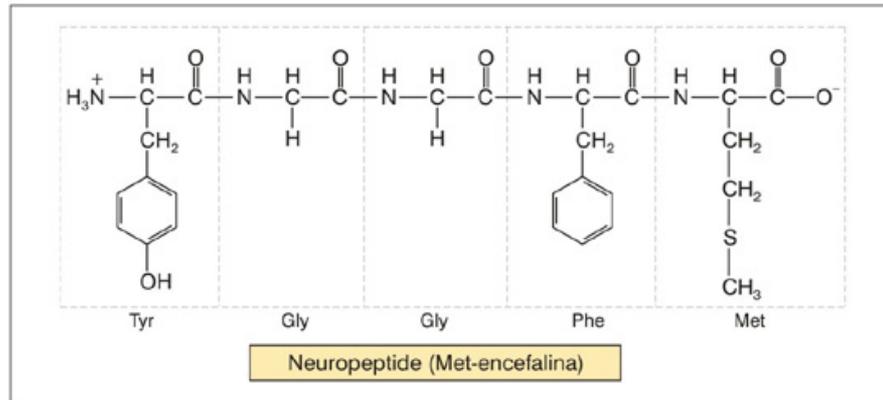
# Neurotrasmettitori

Una sostanza è un neurotrasmettitore se:

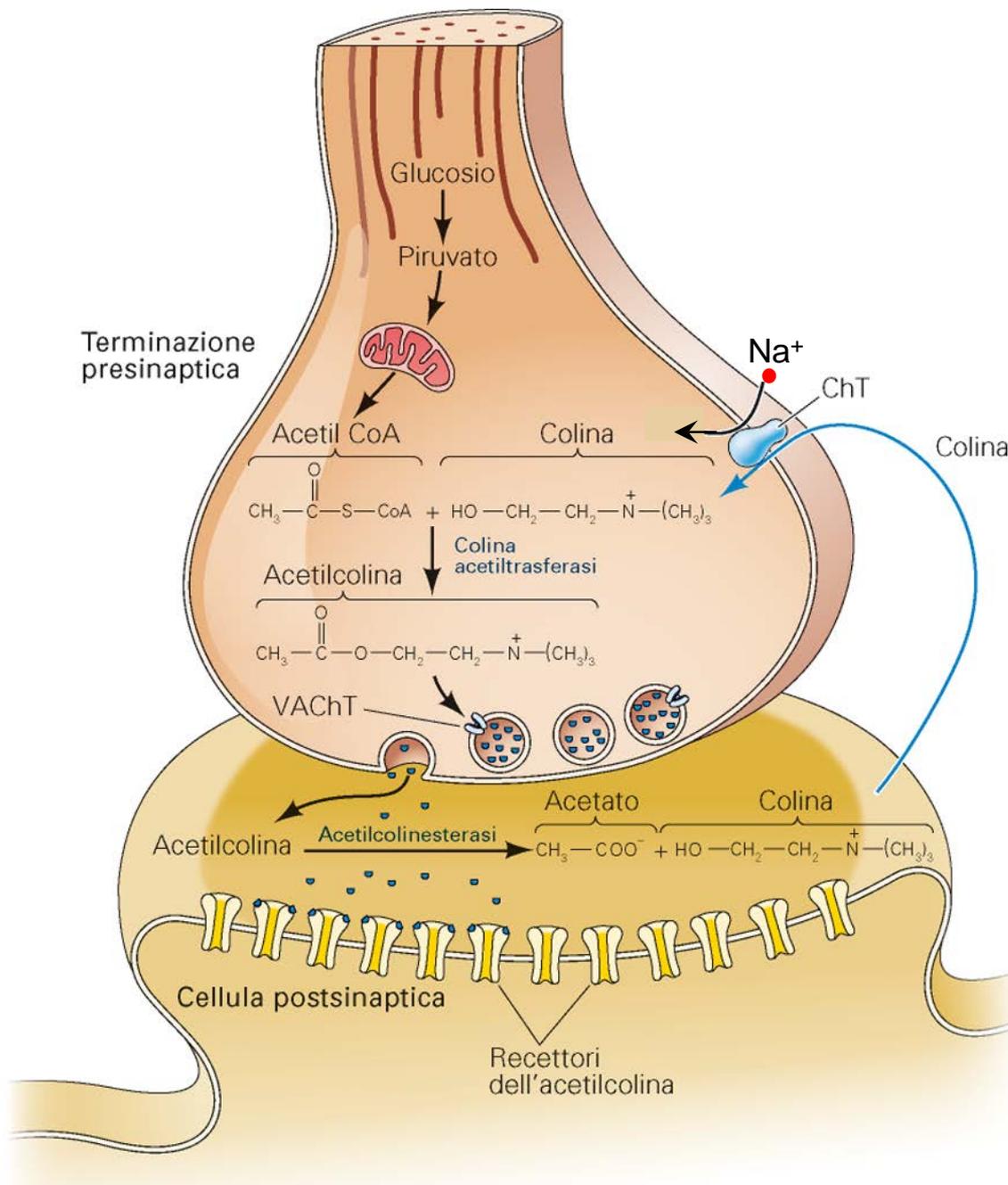
- 1) è **sintetizzata** nell'elemento presinaptico
- 2) è presente nelle **vescicole sinaptiche**
- 3) viene **liberata nello spazio sinaptico** in risposta all'attivazione della cellula presinaptica
- 4) la membrana postsinaptica ha **recettori specifici** per tale sostanza
- 5) l'**applicazione esogena della sostanza riproduce la risposta** indotta dall'attivazione dell'elemento presinaptico
- 6) sono presenti **meccanismi specifici di rimozione** della sostanza dallo spazio sinaptico

# Neurotrasmettitori

Struttura chimica delle principali molecole neurotrasmettitorie

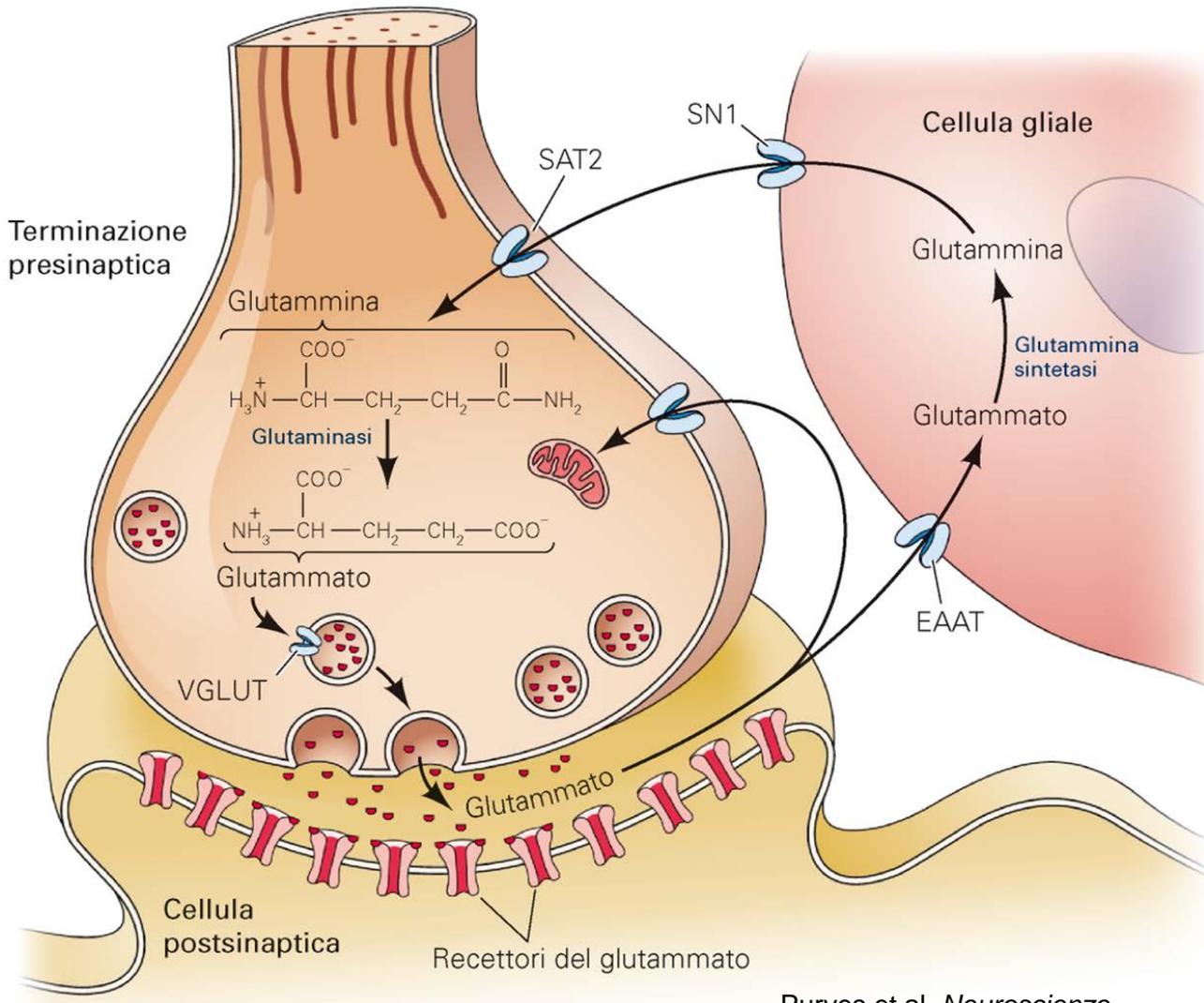


# Acetilcolina (ACh)



L'ACh viene sintetizzata a partire dall'AcetilCoA e dalla colina con una reazione di acetilazione catalizzata dalla **colina-acetiltransferasi**. La colina entra nella terminazione nervosa con un processo di **cotrasporto Na/colina**, l'AcetilCoA deriva dal piruvato metabolico. L'ACh è accumulata nelle vescicole sinaptiche attraverso un trasporto attivo secondario mediato da VACHT. Dopo il suo rilascio l'ACh viene idrolizzata rapidamente dall'ACh-esterasi in acetato e colina, che viene in gran parte recuperata dalle stesse terminazioni che l'hanno liberata. L'ACh è un NT sia periferico (giunzione neuromuscolare, terminazioni del sistema nervoso autonomo) che centrale e a seconda dei recettori con cui interagisce può mediare segnali sia di tipo eccitatorio che inibitorio, rapidi e lenti.

# Glutammato (GLU)

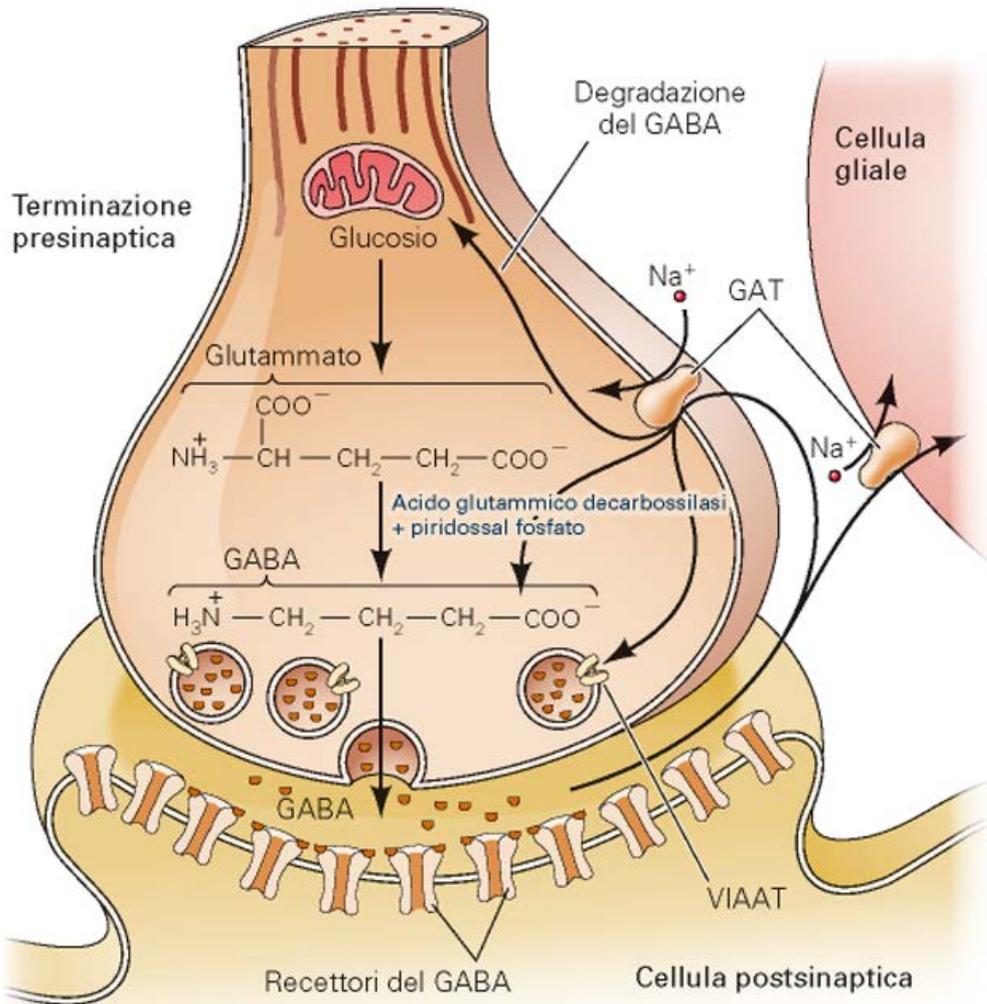


Purves et al. *Neuroscienze*.

Il GLU che fa parte del pool neurotrasmettitoriale viene sintetizzato nei neuroni per azione della **glutaminasi**, che converte la glutamina in GLU. Il GLU è accumulato nelle vescicole con trasporto attivo secondario mediato da VGLUT. Il GLU rilasciato nello spazio sinaptico viene ricaptato sia dalla terminazione nervosa che dalle cellule gliali mediante **cotrasporto Na<sup>+</sup>/GLU (EAAT)**. Nelle cellule gliali l'enzima **glutamina sintetasi** catalizza la conversione di GLU in glutamina, che viene rilasciata nell'interstizio da un carrier specifico (SN1). La glutamina rientra nel terminale sinaptico mediante un altro carrier (SAT2), completando così il **ciclo glutammato-glutamina** che garantisce una cooperazione tra cellule

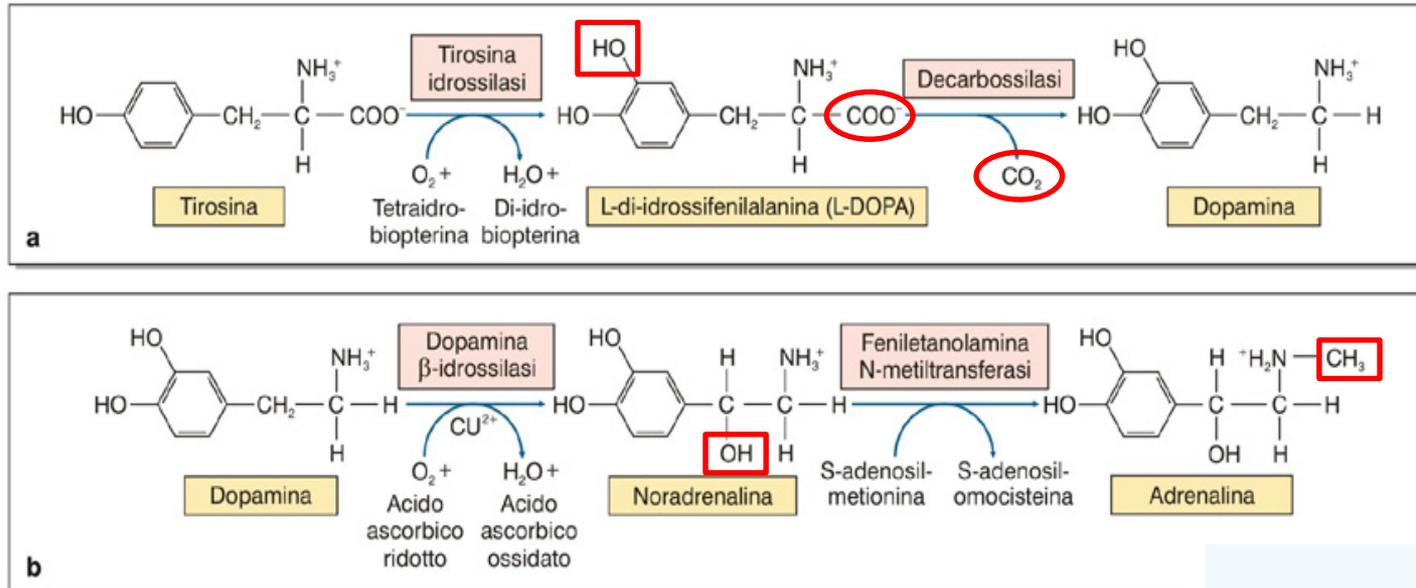
gliali e cellule nervose, necessaria per mantenere il controllo sulla quantità di GLU presente nella terminazione e nello spazio sinaptico. Il GLU è il NT liberato da quasi tutti i neuroni eccitatori del sistema nervoso centrale (si pensa che più della metà delle sinapsi centrali lo liberino). I recettori del GLU sono sia ionotropici che metabotropici.

# Acido gamma-aminobutirrico (GABA)



Il GABA è il principale NT delle sinapsi inibitorie centrali. Viene sintetizzato a partire dal Glu di origine metabolica per decarbossilazione catalizzata dall'enzima **glutammato decarbossilasi** in presenza del cofattore piridossal fosfato (vitamina B6). Il GABA è accumulato nelle vescicole per trasporto attivo secondario mediato da VIAAT. Una volta liberato nello spazio sinaptico, ne viene rapidamente rimosso per reuptake dalla terminazione sinaptica e dalle cellule gliali attraverso cotrasportatori Na<sup>+</sup>/GABA (GAT). I recettori del GABA sono sia ionotropici che metabotropici.

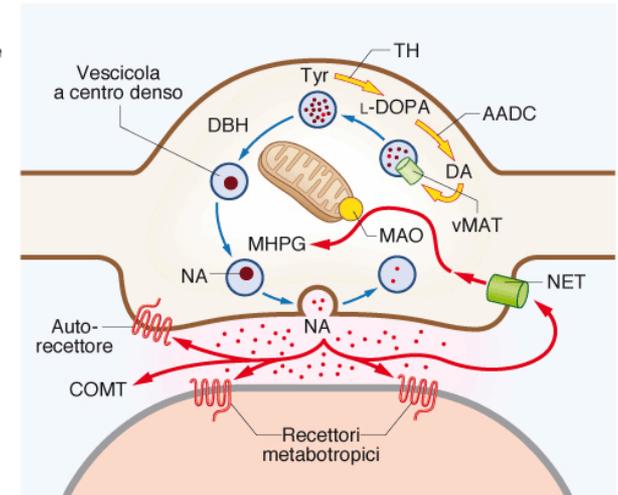
# Catecolamine



© 2006 edi.ermes milano

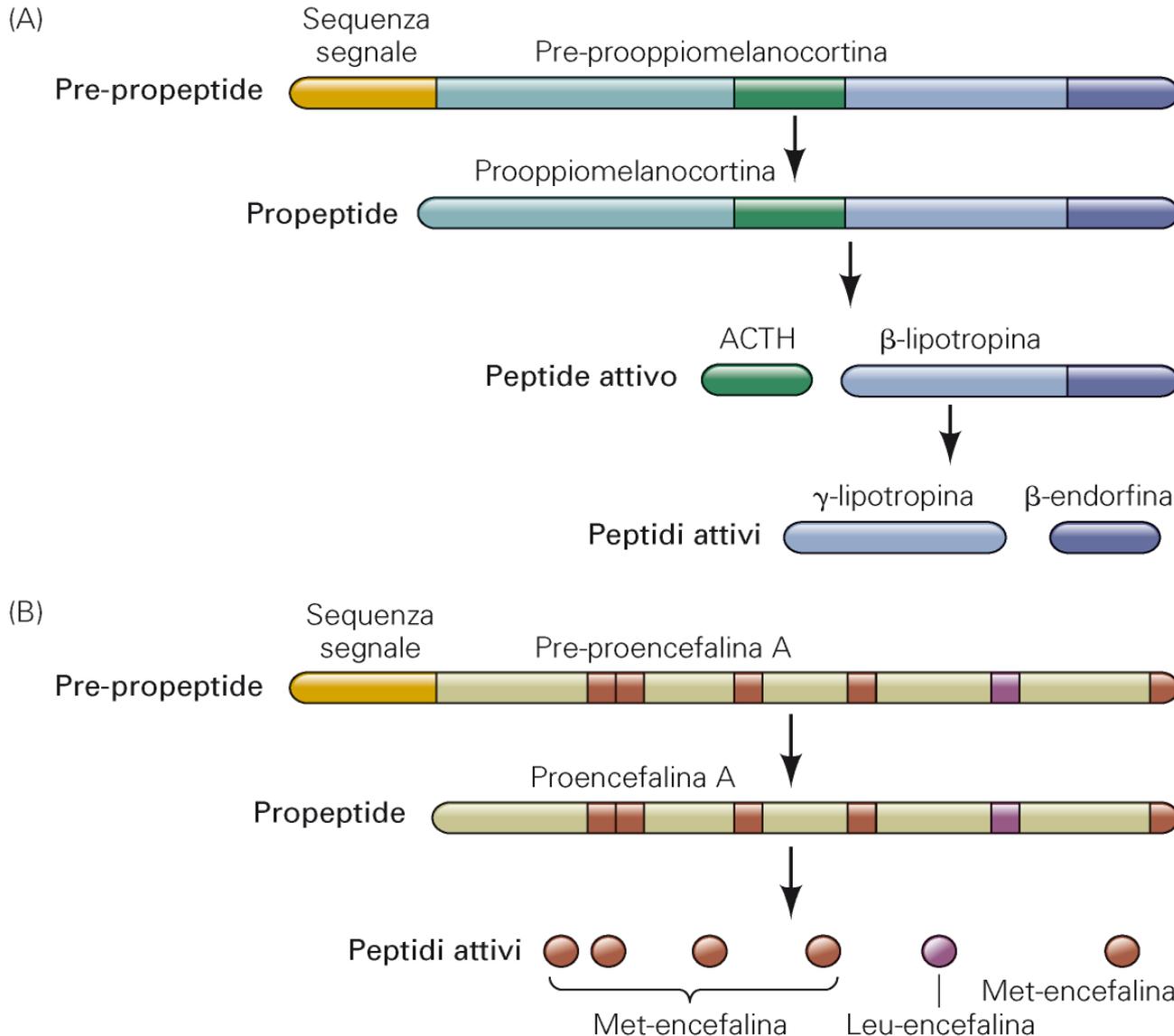
D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

Le **catecolamine** (dopamina, nor-adrenalina e adrenalina) derivano dall'aa **tirosina** attraverso i passaggi enzimatici rappresentati sopra. Sono immagazzinate nelle vescicole sinaptiche attraverso il carrier VMAT e vengono ricaptate attraverso carrier specifici (DAT per la dopamina, NET per la nor-adrenalina) la cui azione viene bloccata da droghe quali la cocaina (DAT) e le amfetamine (DAT e NET). Le catecolamine sono degradate da enzimi mitocondriali (monoaminoossidasi, MAO) e citosolici (catecol-orto-metiltransferasi, COMT). I recettori delle catecolamine sono esclusivamente metabotropici.



**Figura 10-31** ▶ Schema di un neurone noradrenergico, quale tipico esempio di neurone catecolaminergico. Il contatto sinaptico qui rappresentato è una varicosità *en passant*. DBH: dopamina β-idrossilasi (enzima contenuto nelle vescicole); NA: noradrenalina; NET: *norepinephrine transporter*; Tyr: tirosina; DA: dopamina; vMAT: *vesicular monoamine transporter*; MAO: monoammino-ossidasi; MHPG: metossi-idrossi-fenilglicole, esempio di prodotto di demolizione delle catecolamine; COMT: catecol-orto-metiltransferasi.

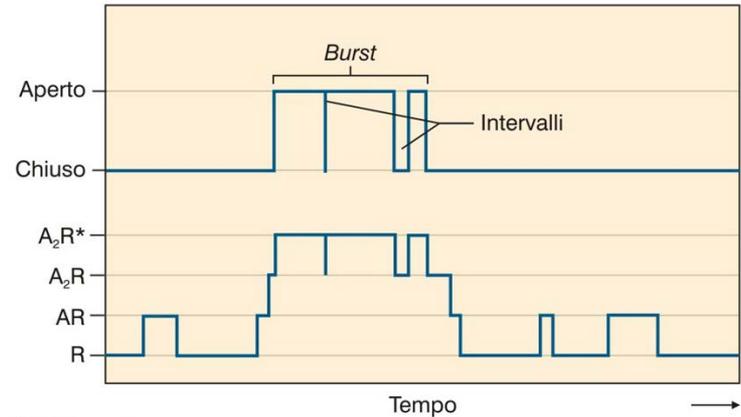
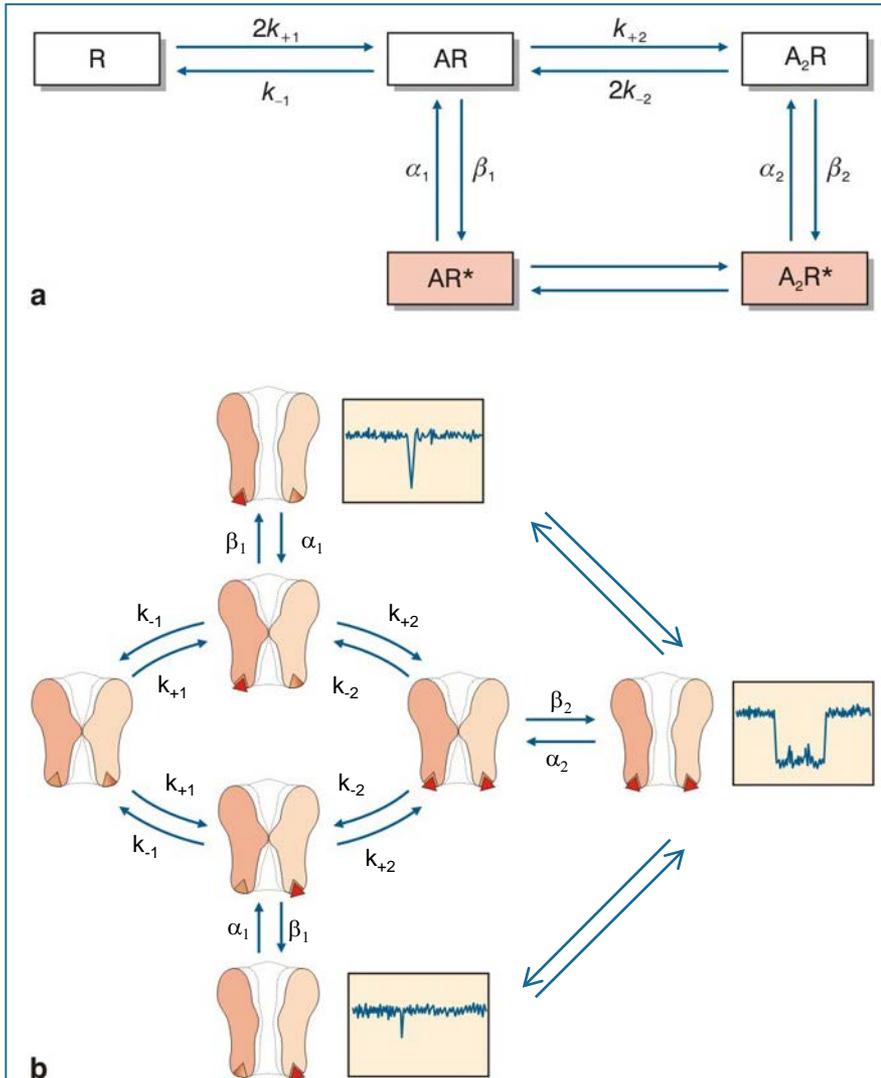
# Neuropeptidi



Molecole di natura proteica composti da un minimo di due a un massimo di qualche decina di aa. Vengono sintetizzati nel soma del neurone come pre-pro-peptidi, immagazzinati in vescicole in cui vengono trasformati nei peptidi finali. Le vescicole vengono trasportate alla terminazione sinaptica attraverso il sistema microtubuli-motori molecolari alla velocità di 5-15 mm/h. Da un propeptide è possibile avere neuropeptidi diversi o più copie dello stesso neuropeptide. I neuropeptidi secreti nello spazio sinaptico sono di solito degradati da peptidasi. I recettori sono tutti metabotropici.

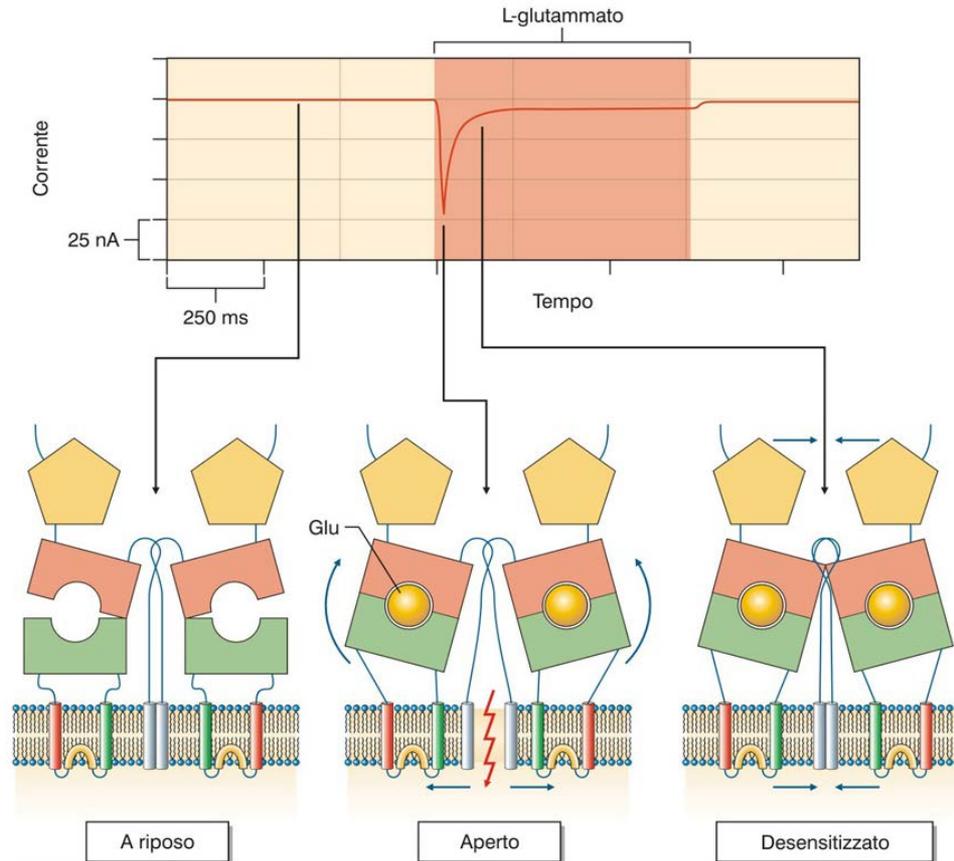
# Recettori ionotropici (1)

Sono canali ligando dipendenti (o **Receptor Operated Channels, ROC**) la cui apertura dipende dal legame con il NT. Un ROC in genere possiede due siti di legame per il NT e tende ad aprirsi e richiudersi più volte prima che l'agonista si stacchi dando origine a scariche di corrente ad alta frequenza (burst).



# Recettori ionotropici (2)

## Modello di attivazione e desensibilizzazione



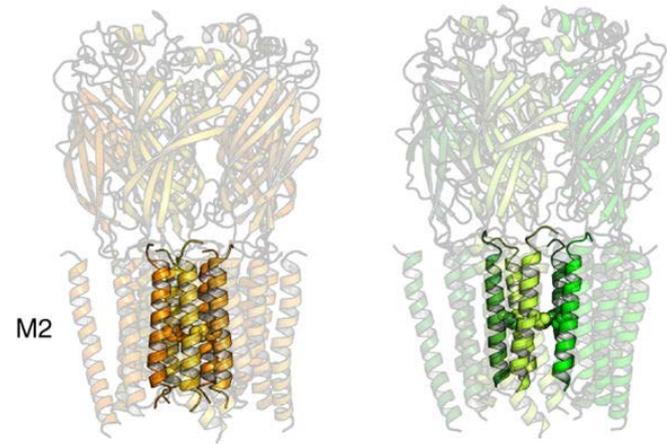
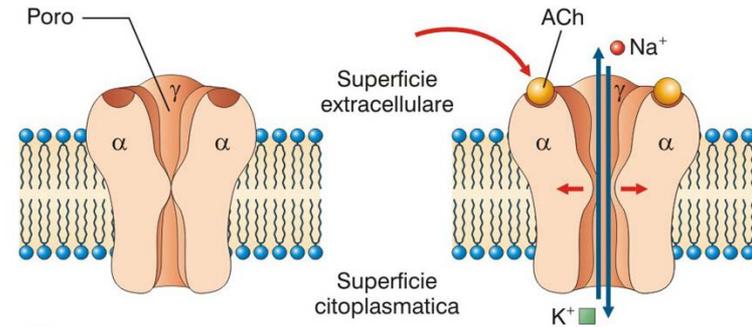
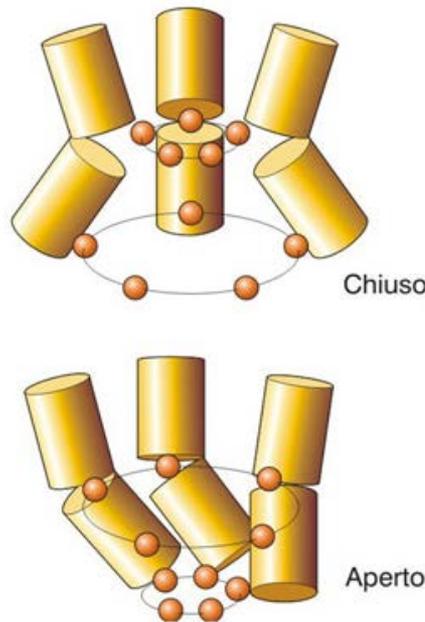
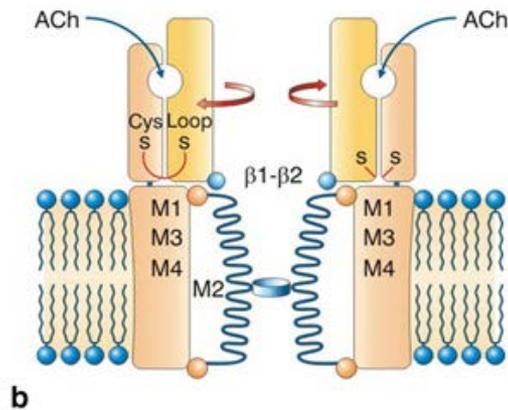
D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

La presenza prolungata di agonista sul recettore provoca il fenomeno della desensibilizzazione, che consiste nella chiusura del canale, pur essendo legato al NT. Il legame di Glu ai siti di legame provoca l'apertura del canale e il passaggio della corrente sinaptica. Il permanere del glutammato nei siti di legame porta al passaggio allo stato desensibilizzato e al declino della corrente per la chiusura del canale.

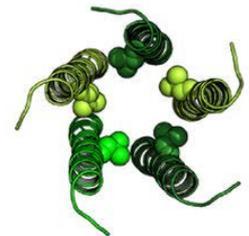
# Recettori ionotropici (3)

## Modello di gating

Il meccanismo molecolare di apertura del canale è stato determinato con maggior dettaglio per nAChR: la transizione tra stato chiuso e aperto è associata alla rotazione dei segmenti M2 del canale. Un modello recente propone che il segmento M2 di ciascuna subunità sia formato da due cilindri che puntano verso il centro del poro occludendolo. Il legame con il NT, promuovendo la rotazione dei cilindri, fa sì che questi puntino verso l'esterno rendendo il poro accessibile agli ioni.



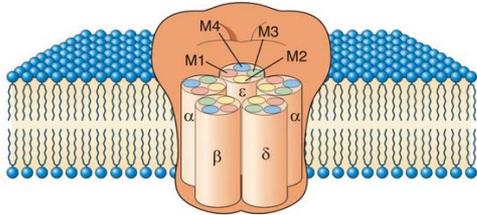
Resting



Active

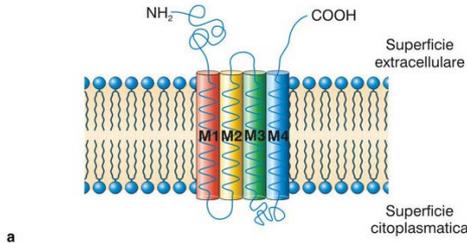
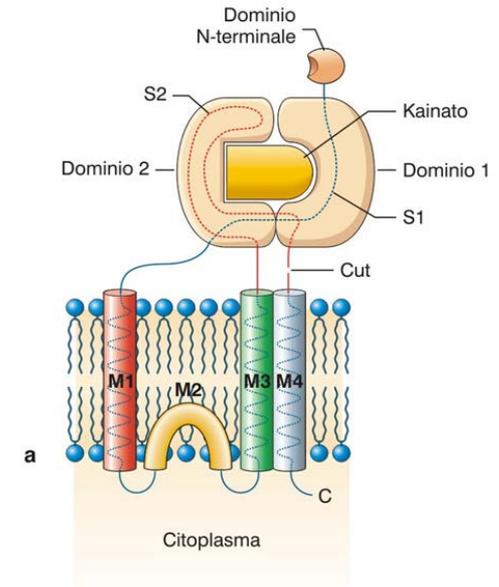
# Recettori ionotropici (4)

Si distinguono tre gruppi di ROC sulla base della loro struttura molecolare:

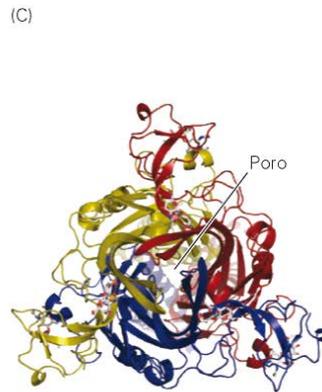
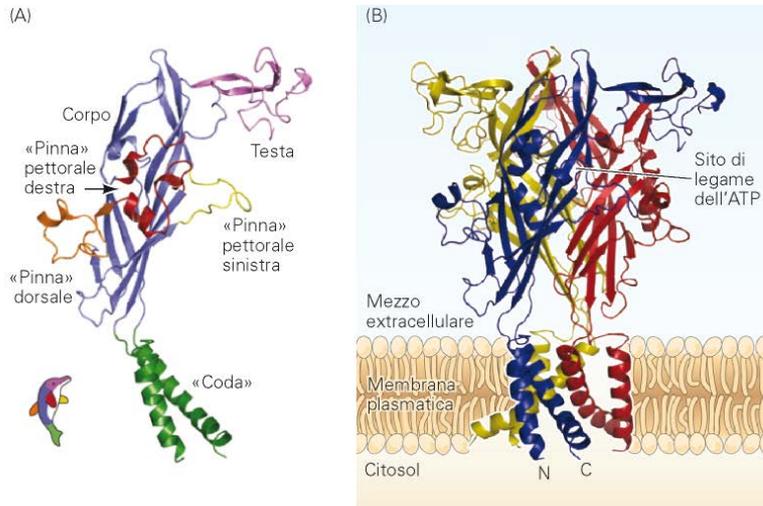


**ROC nicotino-simili** (a sinistra): **nAChR**, **GABAR**, **GlyR** e **5HTR**. Pentameri in cui ogni subunità è formata da quattro segmenti transmembrana (M1-M4) con i domini C- e N-terminali extracellulari

**ROC per il glutammato** (a destra): **AMPA** (acido α-amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo propionico), **NMDAR** (N-metil-D-aspartato) e recettori del **kainato**. Tetrameri in cui il dominio transmembrana di ogni subunità è formato da quattro segmenti M1-M4. Il dominio N-terminale è extracellulare e il dominio C-terminale intracellulare



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



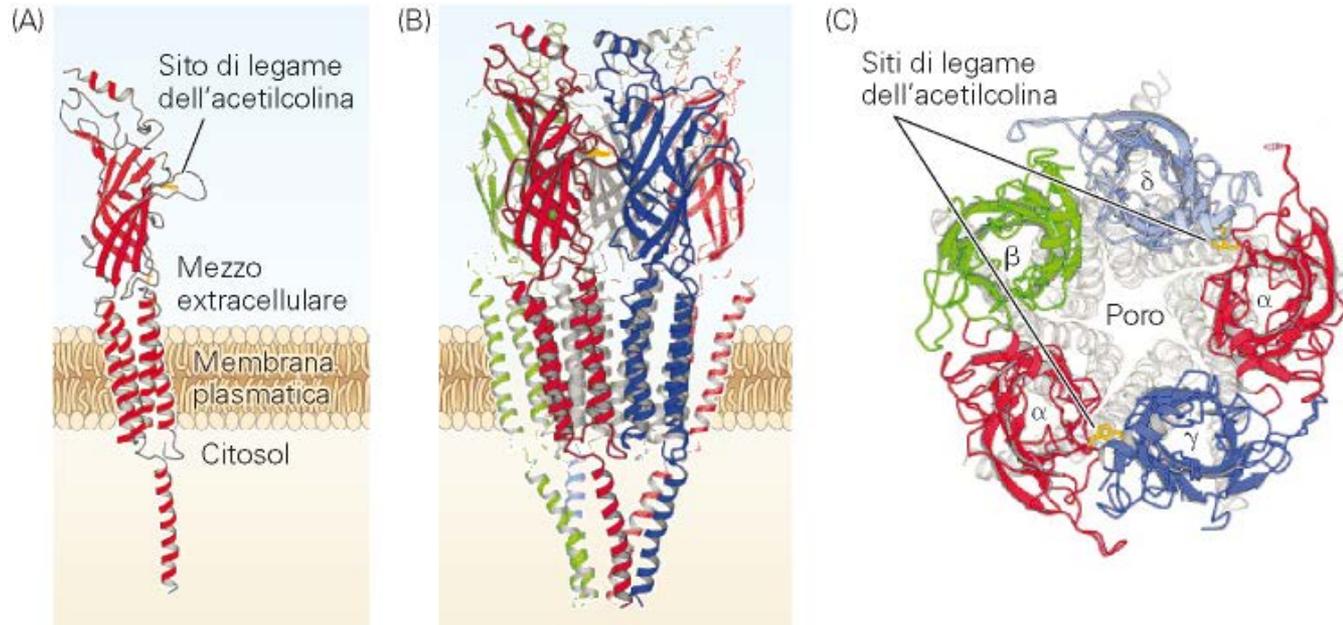
**ROC attivati da ATP** (purinergici): **P2XR**. Trimeri le cui subunità hanno il dominio transmembrana costituito da due soli segmenti.

(A) Subunità di un recettore P2X<sub>4</sub>. (B) Vista laterale e (C) vista dall'alto del recettore formato da tre subunità.

# Recettori ionotropici per l'acetilcolina (nAChR)

Sono espressi sia sulla membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare che nel sistema nervoso centrale e periferico.

I **nAChR muscolari** sono composti dalle subunità  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (o  $\epsilon$ ) e  $\delta$  nella proporzione 2:1:1:1



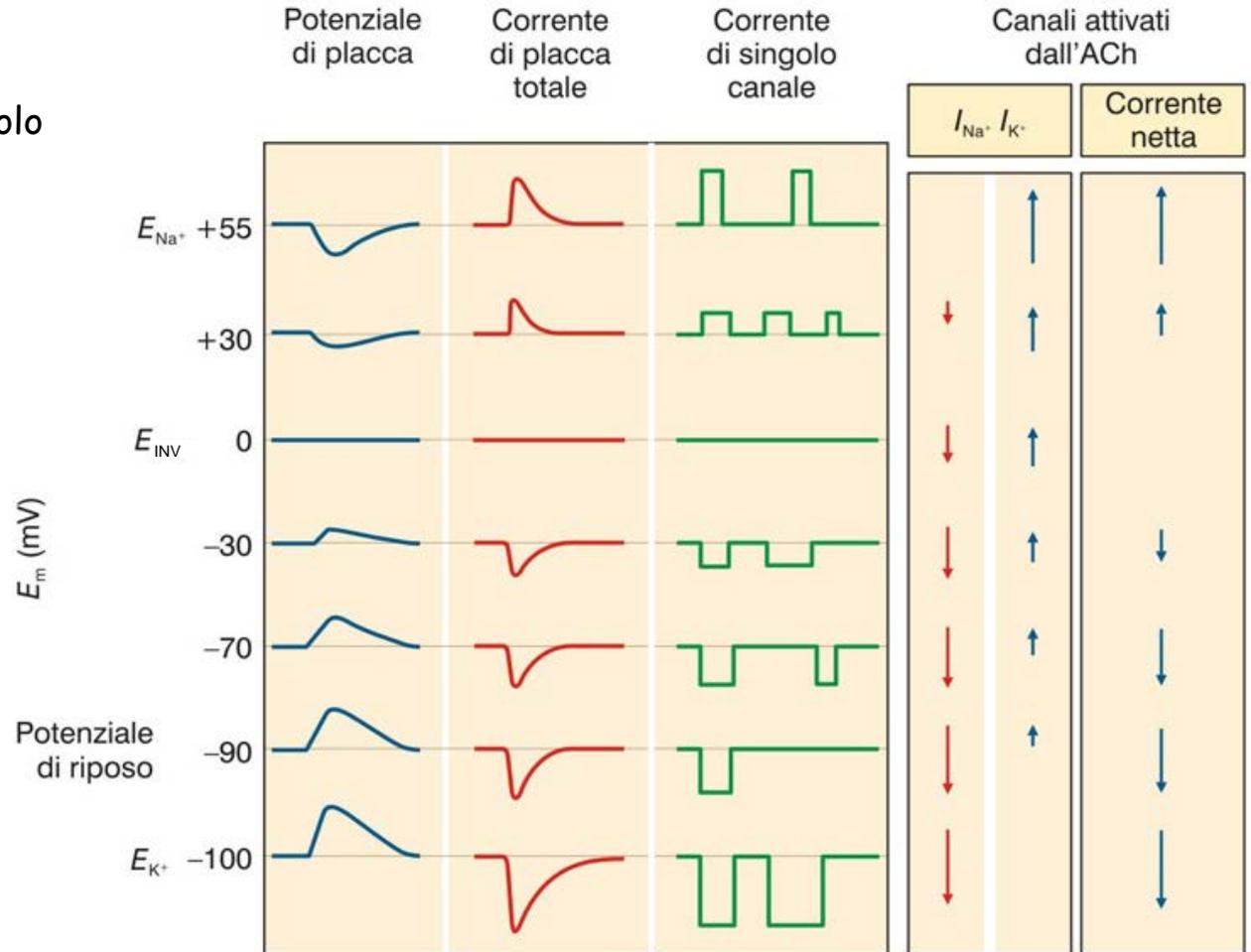
Purves et al. *Neuroscienze*.

Struttura della subunità  $\alpha$  del recettore nACh (A). Cinque subunità (2 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 1 $\gamma$  e 1 $\delta$ ) si assemblano per formare il recettore (B). In C il recettore nACh è visto dalla prospettiva della fessura sinaptica.

# Recettori ionotropici per l'acetilcolina (nAChR)

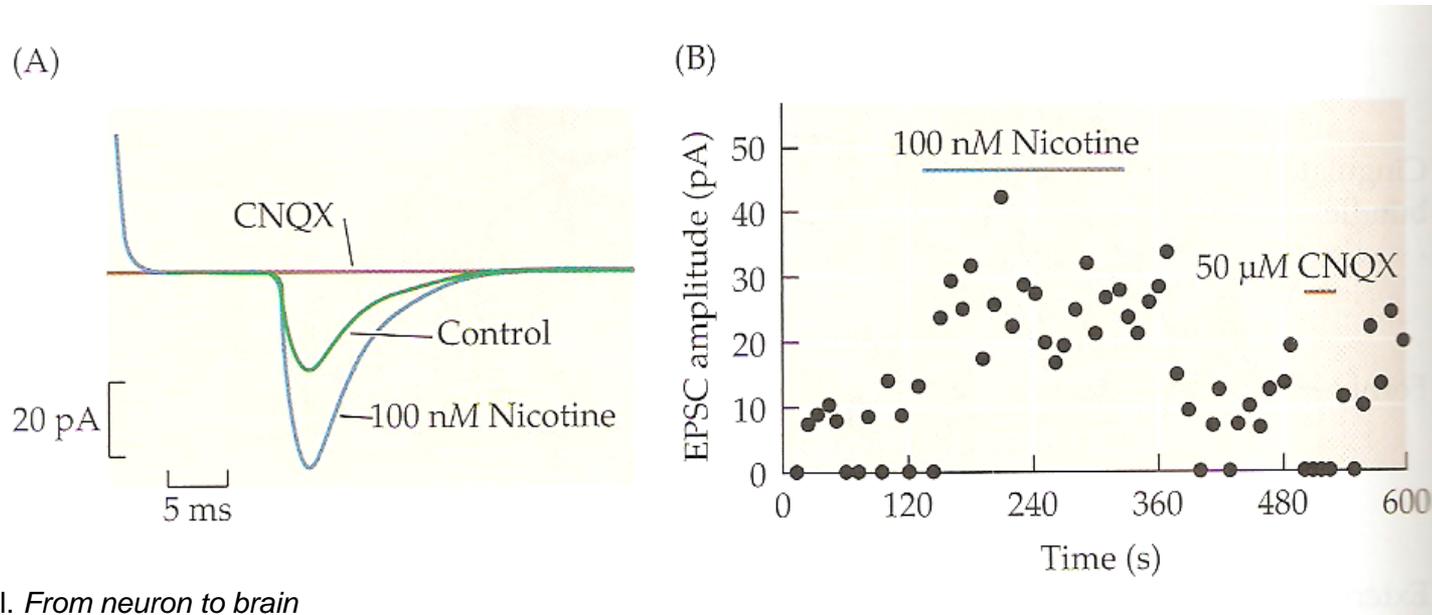
Il canale si apre quando due molecole di ACh si legano alle subunità  $\alpha$  permettendo il flusso della corrente sinaptica trasportata dagli ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  che si muovono seguendo ciascuno il proprio gradiente elettrochimico

EPSP, EPSC e correnti di singolo canale mediate dai nAChR muscolari registrati a diversi potenziali di membrana



# Recettori ionotropici per l'acetilcolina (nAChR)

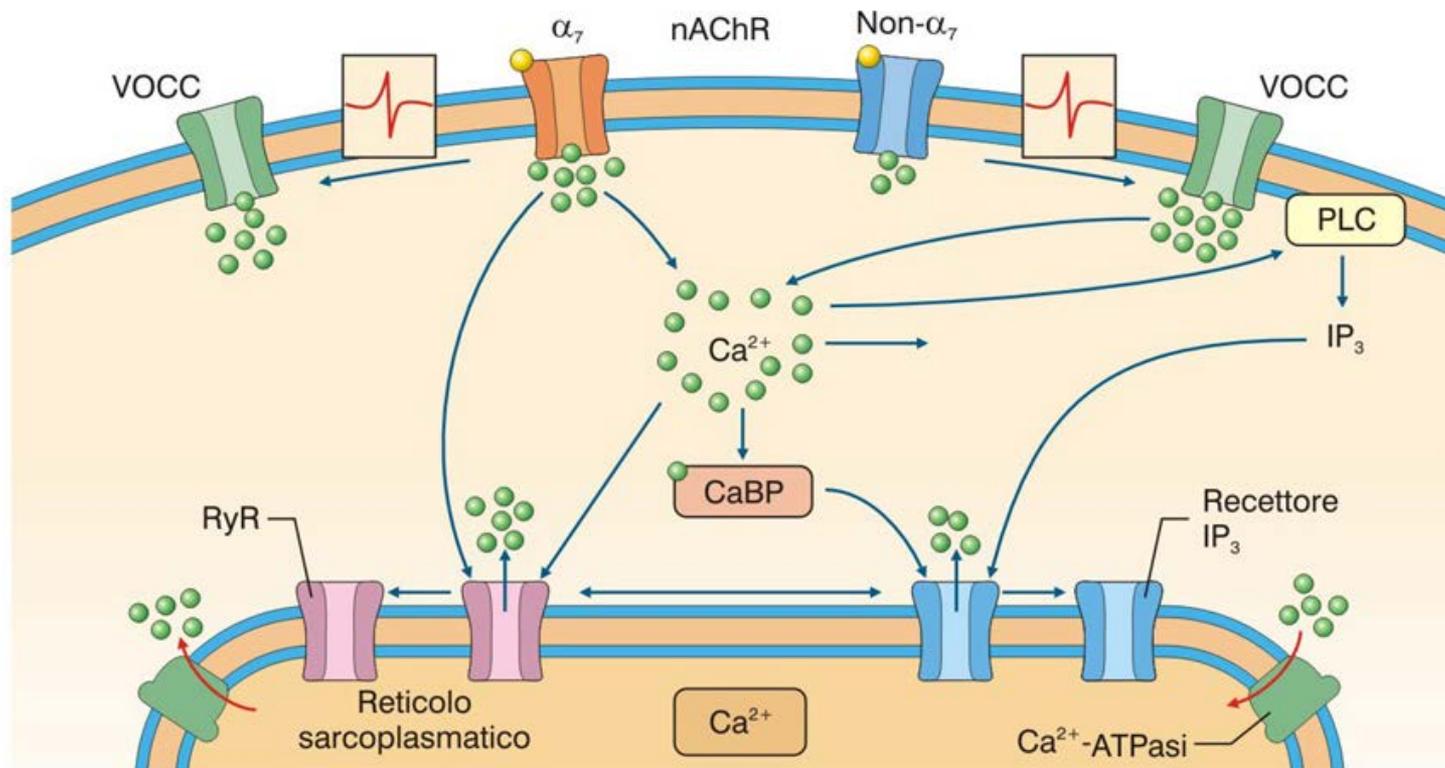
Nel **sistema nervoso centrale** (SNC) i nAChR sono costituiti dalle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  (9 isoforme  $\alpha$  e 3 isoforme  $\beta$ ). I nAChR del SNC sono localizzati prevalentemente a livello presinaptico dove svolgono un'azione modulatrice del rilascio di vari NT (glutammato, dopamina, NA).



Nicholls et al. *From neuron to brain*

La stimolazione dei recettori nicotinici presinaptici promuove la liberazione di glutammato. La EPSC di controllo, evocata dalla stimolazione della via afferente, è dovuta alla liberazione di glutammato dalle terminazioni presinaptiche, viene infatti annullata dal CNQX, bloccante selettivo dei recettori del glutammato. La somministrazione di nicotina (agonista dei nAChR) aumenta l'ampiezza della EPSC. Questo effetto è dovuto all'aumentato rilascio di glutammato conseguente all'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i recettori nicotinici  $\alpha_7$  come dimostrato da esperimenti in cui l'aumento di EPSC indotto dalla nicotina risulta annullato dalla perfusione con  $\alpha$ -bungarotossina, bloccante specifico dei nAChR  $\alpha_7$ .

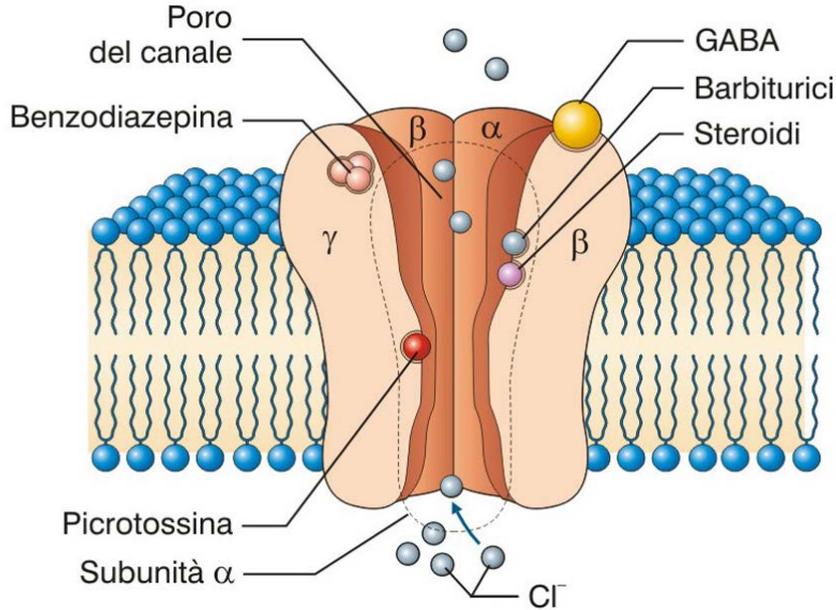
# Recettori ionotropici per l'acetilcolina (nAChR)



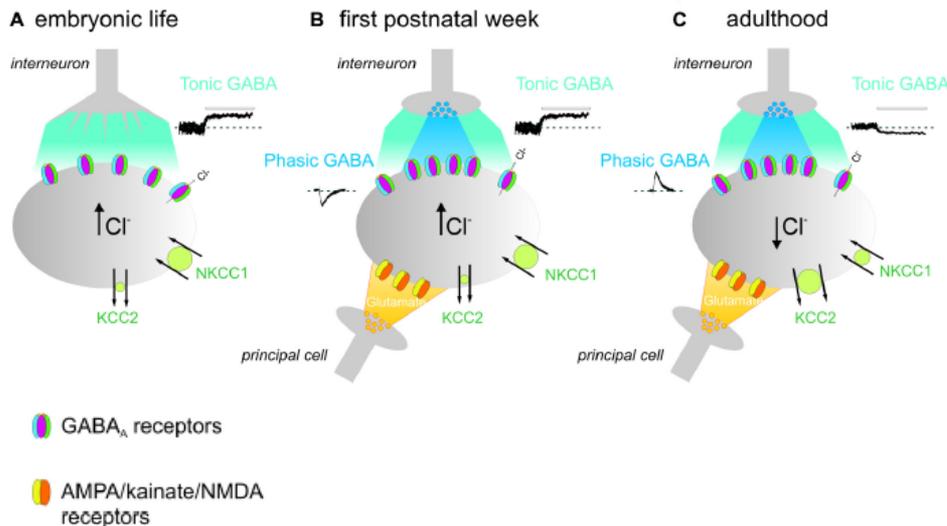
D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi.*

Nel SNC i nAChR promuovono l'esocitosi delle vescicole direttamente, a causa della loro intrinseca permeabilità allo ione  $\text{Ca}^{2+}$  (recettori  $\alpha_7$ ), ma anche indirettamente, attraverso la depolarizzazione del terminale e conseguente apertura dei canali VOC del  $\text{Ca}^{2+}$ .

# Recettori ionotropici per l'acido $\gamma$ -amino butirrico (GABAR)



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

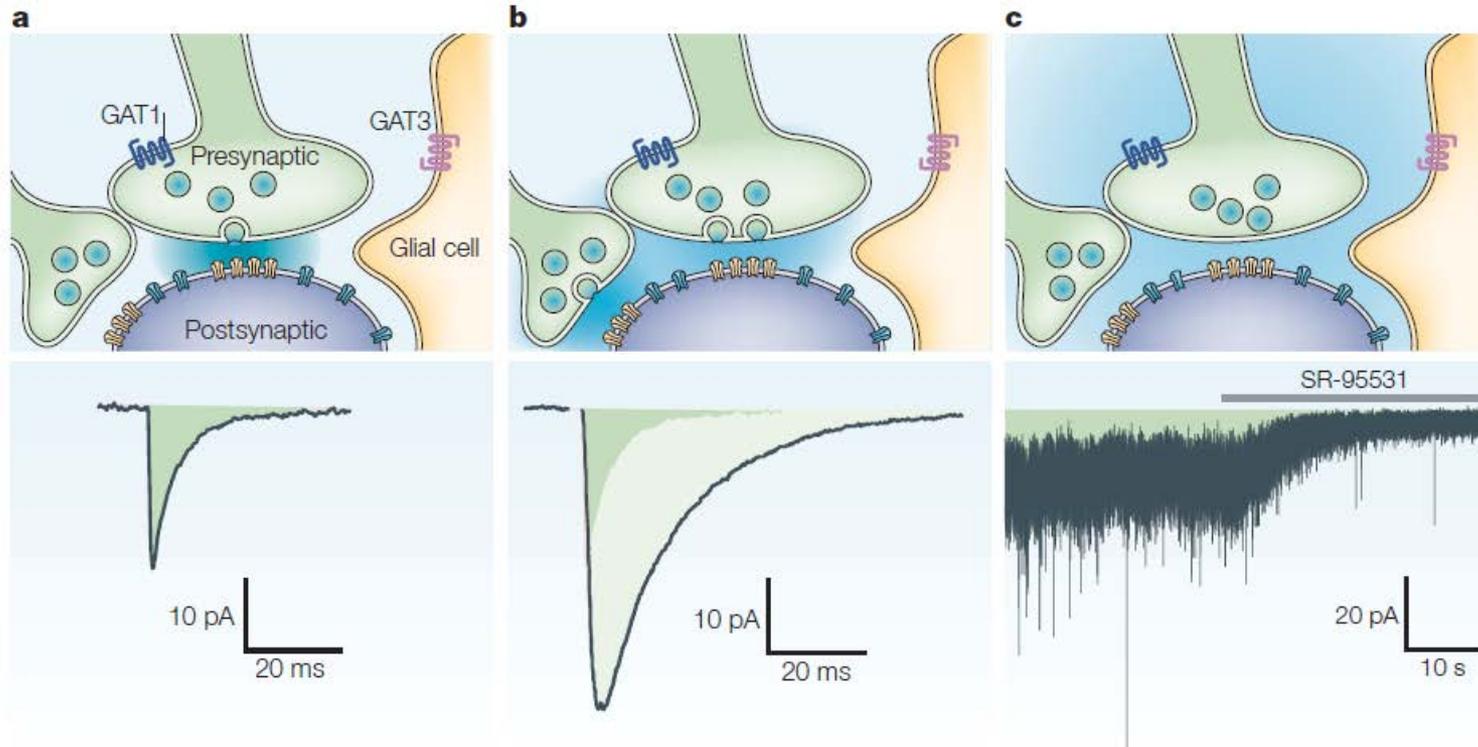


Sono canali ligando dipendenti permeabili al  $\text{Cl}^-$  (e  $\text{HCO}_3^-$ ), strutturalmente simili al recettore nACh. A seconda del tipo di subunità che li compongono si suddividono in due classi, **GABA<sub>A</sub>** e **GABA<sub>C</sub>**, che hanno proprietà funzionali e farmacologiche diverse. Sono distribuiti in maniera ubiquitaria nel SNC, sia sui neuroni che sulle cellule gliali.

## Recettori GABA<sub>A</sub>

Agonisti: **benzodiazepine, barbiturici e neurosteroidi**; antagonisti: **bicucullina e picrotossina**. Hanno due modalità di apertura: **aperture brevi** (durata media 2.5 ms) e **fluttuazioni tra stato aperto e chiuso (burst** della durata di 20-50 ms) che danno origine a sequenze di aperture separate da brevi chiusure. L'aumento di  $g_{\text{Cl}}$  che si osserva in seguito all'apertura del canale genera una  $i_{\text{Cl}}$  che nella maggior parte dei casi è **inibitoria** ( $E_{\text{Cl}} \leq V_m$  di riposo o comunque  $< V_m$  soglia). Nei neuroni immaturi, invece, l'azione del GABA è eccitatoria perché in queste cellule  $E_{\text{Cl}}$  è meno negativo di  $V_m$  e la depolarizzazione indotta dal GABA può attivare l'apertura di VOC del  $\text{Ca}^{2+}$ . L'attivazione dei GABA<sub>A</sub>R può avvenire secondo due modalità: **attivazione fasica e attivazione tonica**.

# Attivazione dei recettori $GABA_A$



Farrant, Nusser. *Nature Reviews Neuroscience*, 2005, **6**:215.

L'attivazione sinaptica **fasica** è legata alla presenza di  $GABA_A$  immediatamente di fronte ai siti di rilascio. La IPSC è rapida e dipende dal numero di vescicole (maggiore in **b** che in **a**) che riversano il loro contenuto nello spazio sinaptico. La maggior durata della corrente in **b** è legata anche all'attivazione di recettori extrasinaptici conseguente alla diffusione del NT nello spazio extrasinaptico (spill-over).

L'attivazione **tonica** dipende dalla permanenza di basse concentrazioni di  $GABA$  che attiva i recettori extrasinaptici ad alta affinità. La traccia in **c** mostra la IPSC tonica, che risulta dall'apertura stocastica dei recettori ad alta affinità, sovrapposta a correnti fasiche. L'applicazione di un antagonista dei  $GABA_A$  riduce sia la risposta tonica che quella fasica.

(Nelle registrazioni la IPSC è una corrente in ingresso perché questi esperimenti (patch clamp, configurazione whole cell) sono fatti con  $[Cl^-]_i = [Cl^-]_o$  al V di blocco = -70 mV)

## Ruoli funzionali dell'inibizione fasica e tonica

### Inibizione fasica:

- generazione dell'attività ritmica in reti neurali attraverso la sincronizzazione dell'attività di gruppi di neuroni
- controllo dell'efficacia degli input eccitatori (localizzazione dei GABAR a livello dendritico) e dell'output cellulare (localizzazione nelle zone perisomatiche)

### Inibizione tonica:

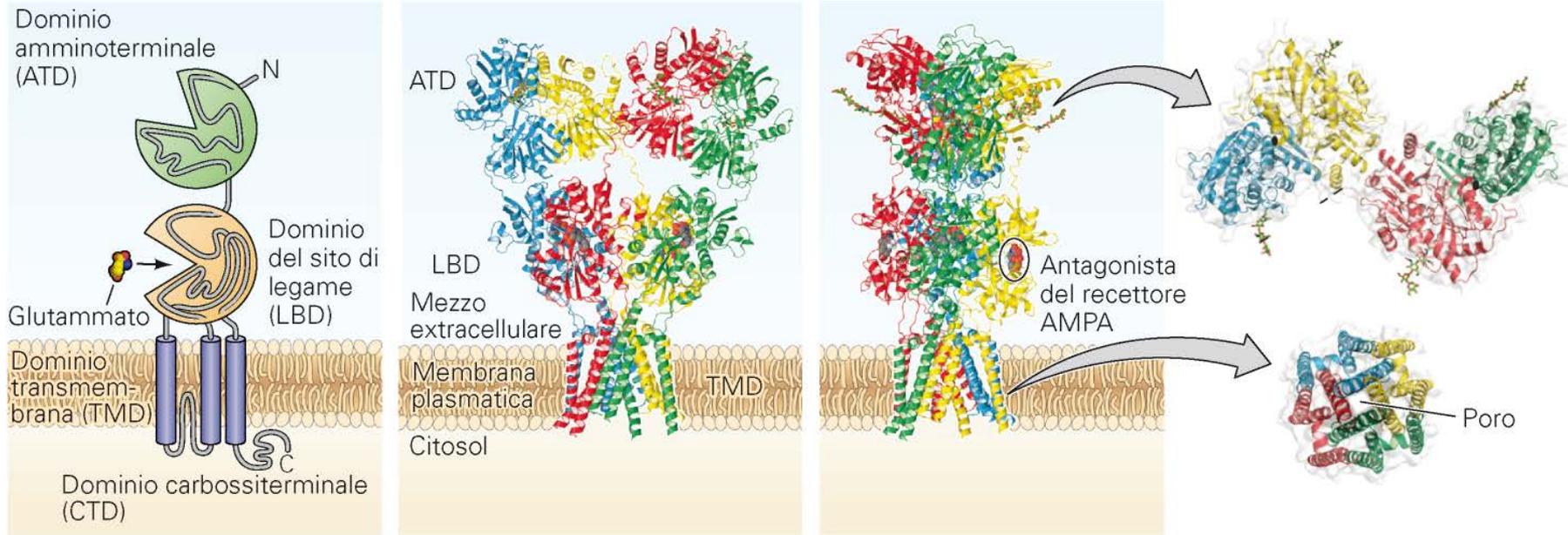
- alterazione persistente della conduttanza della membrana che riduce l'eccitabilità neuronale rendendo più difficile il raggiungimento della soglia di scarica di un potenziale d'azione

# Recettori ionotropici per il glutammato

Sono responsabili della gran parte della trasmissione eccitatoria rapida del SNC. A seconda della loro sensibilità agli agonisti esogeni vengono classificati in **recettori di tipo AMPA** (da acido  $\alpha$ -amino-3-idrossi-5-metil-4-isossazolo propionico), **NMDA** (da N-metil-D-aspartato) e **per il kainato**.

# Recettori ionotropici per il glutammato

## AMPA



## Recettori AMPA

Elevata affinità per AMPA e bassa per glutammato e kainato, rapida desensibilizzazione. Sono costituiti dalla combinazione eteromera di quattro subunità (*GluA1*, *GluA2*, *GluA3* e *GluA4*), hanno potenziale di inversione 0 mV in quanto permeabili sia al  $\text{Na}^+$  che al  $\text{K}^+$ . La permeabilità al  $\text{Ca}^{2+}$  è bassa. Le correnti sinaptiche conseguenti all'attivazione dei recettori AMPA hanno cinetica rapida e durano pochi ms. Alcuni AMPAR non esprimono la subunità *GluA2* e sono permeabili al  $\text{Ca}^{2+}$ .

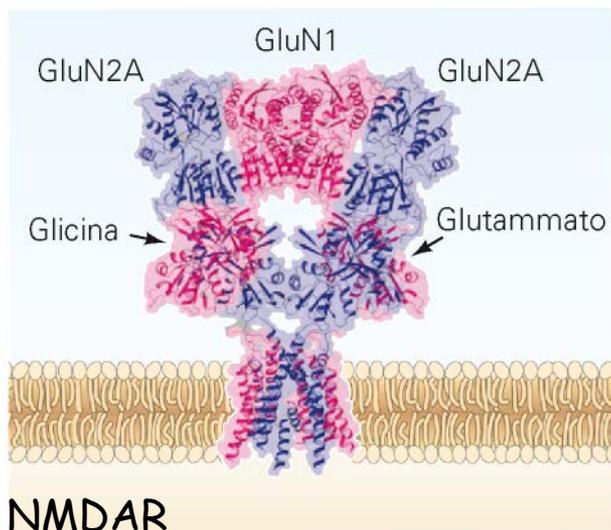
## Recettori per il kainato

Sono costituiti dalla combinazione eteromera di cinque diverse subunità: *GluK1*, *GluK2*, *GluK3*, *GluK4* e *GluK5*. Hanno caratteristiche simili agli AMPAR e per questo si parla spesso di recettori AMPA/kainato o **recettori non NMDA**. Spesso sono localizzati sulla membrana presinaptica.

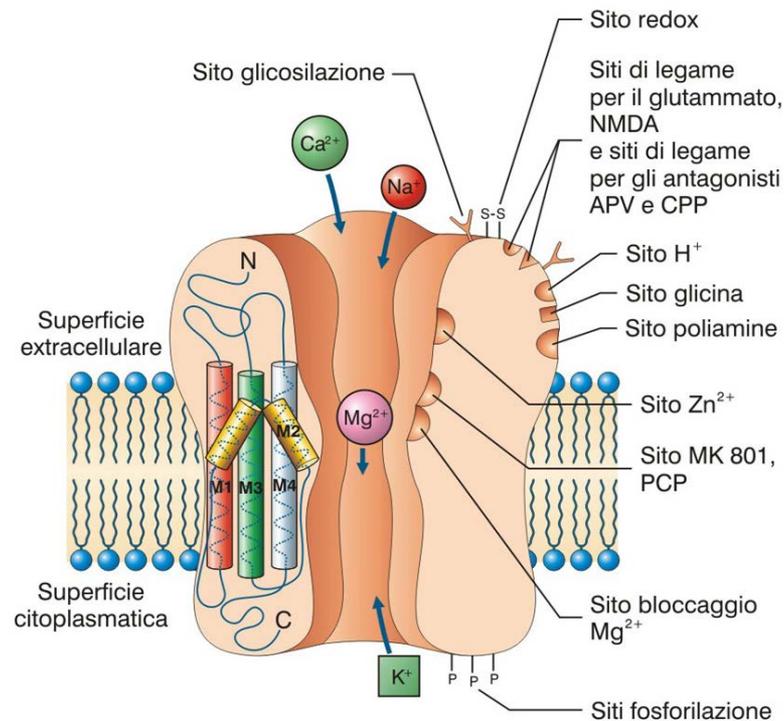
I recettori non NMDA sono bloccati selettivamente dal composto CNQX (6-Ciano-7-NitroQuinoXalin-2,3-dione)

# Recettori ionotropici per il glutammato

## Recettori NMDA (1)



Purves et al. *Neuroscienze*.

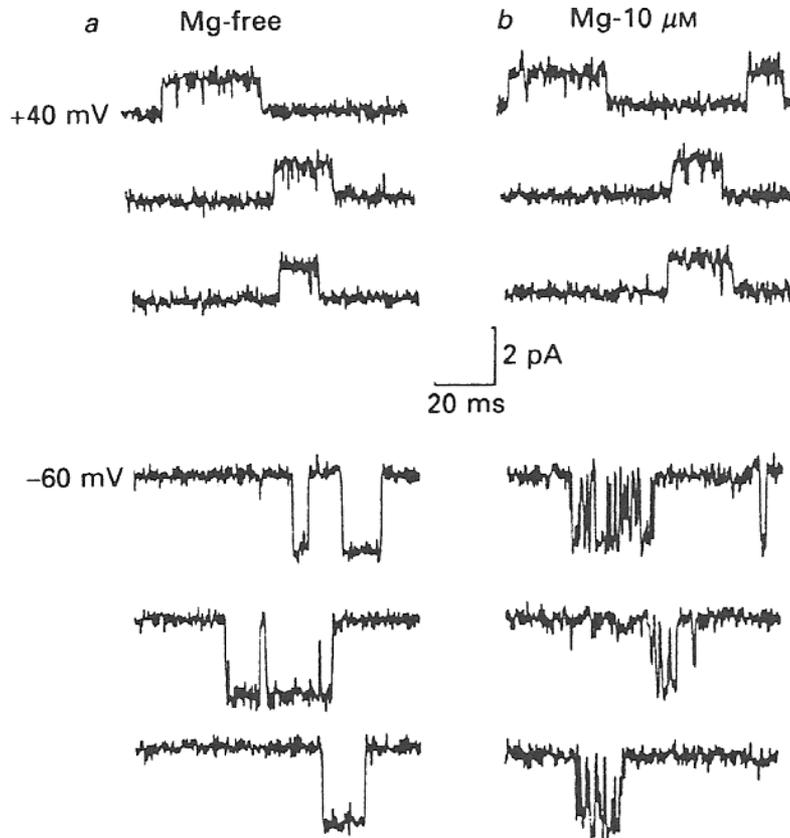


D'Angelo, Peres. *Fisiologia. Molecole, cellule, sistemi*.

Sono attivati in modo specifico da **N-Metil-D-Aspartato** ed hanno una affinità per il Glu mille volte maggiore degli AMPAR. Sono state clonate varie subunità componenti del recettore: una GluN1, quattro GluN2 (A-D) e due GluN3 (A e B). I recettori NMDA funzionali sono eterotetrameri composti da almeno una subunità di tipo GluN1 e una o più di tipo GluN2. Sono canali ad elevata conduttanza (50 pS) permeabili al Ca<sup>2+</sup>, mostrano una caratteristica voltaggio-dipendenza legata all'azione dello ione Mg<sup>2+</sup> e sono caratterizzati da correnti sinaptiche con cinetica lenta (tempo di salita circa 20 ms, durata dell'ordine delle centinaia di ms).  $V_{inv} = 0$  mV. Il canale presenta siti di legame per agonisti (Glu, NMDA, glicina, poliamine a basse concentrazioni, H<sup>+</sup>) e antagonisti (acido fosfono valerico, Zn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, MK801, fenciclidina).

## Recettori NMDA (2)

### Effetto dello ione $Mg^{2+}$ sulle correnti di singolo canale indotte dal glutammato

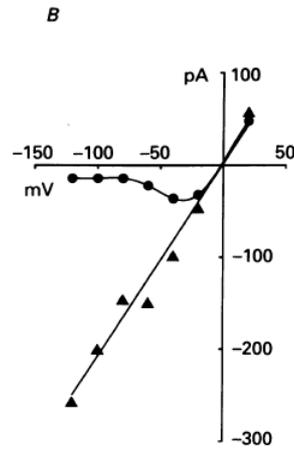
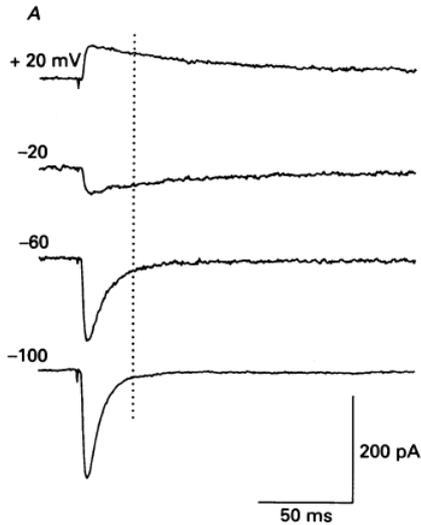


In assenza di  $Mg^{2+}$  i canali NMDA rimangono aperti per diversi ms, indipendentemente dal potenziale di membrana, mentre in presenza di  $Mg^{2+}$  e a potenziali negativi si osservano brevi periodi di apertura del canale alternati a periodi di chiusura (flickering) suggerendo che, a potenziali di membrana negativi, lo ione  $Mg^{2+}$  può bloccare un canale NMDA, diminuendone la probabilità di apertura.

In condizioni fisiologiche il canale NMDA presenta una forte voltaggio-dipendenza e per aprirsi è necessaria la presenza contemporanea di glutammato (per attivare il canale) e depolarizzazione della membrana (per allontanare lo ione  $Mg^{2+}$  dal poro).

## Risposte sinaptiche nelle sinapsi glutamatergiche

L'EPSP evocato dal glutammato ad una sinapsi glutamatergica presenta due componenti, una rapida legata all'attivazione dei recettori AMPA ed una lenta dovuta all'attivazione dei recettori NMDA.



La corrente sinaptica registrata in esperimenti di patch clamp nella configurazione whole cell ha una duplice dipendenza dal potenziale di blocco: i valori di picco (triangoli) evidenziano una relazione I-V lineare (conduttanza di canale indipendente da V) mentre i valori di corrente misurati 25 ms dopo l'applicazione di glutammato mostrano una relazione I-V fortemente non lineare (conduttanza voltaggio-dipendente). L'applicazione di inibitori specifici degli NMDAR (acido fosfonovalerico, APV) e degli AMPAR (CNQX) evidenziano le due componenti nella risposta al glutammato. La voltaggio-dipendenza della corrente NMDA è legata alla voltaggio-dipendenza del processo di rimozione del  $Mg^{2+}$ .

