

# 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)

# Recettori metabotropici

Sono proteine di membrana che in seguito all'interazione con il mediatore chimico evocano una risposta che coinvolge in varia misura le attività metaboliche cellulari.

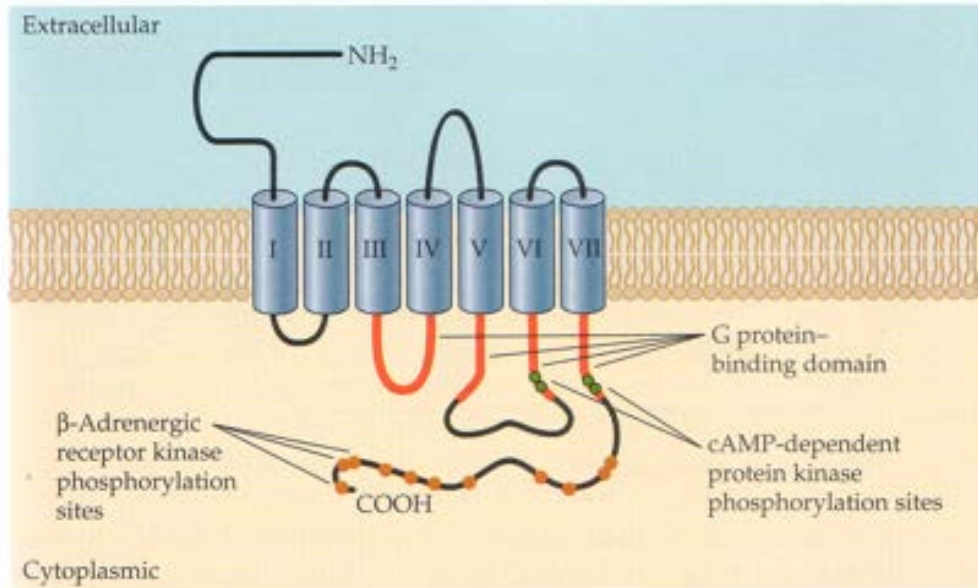
Si possono suddividere in cinque grandi classi: recettori a sette passaggi transmembrana, recettori ad attività tirosinchinasica, recettori integrinici, recettori ad attività guanilatociclasica e recettori fosfatasici

La classe più numerosa è quella dei **recettori a sette passaggi transmembrana** che sono nella stragrande maggioranza **recettori accoppiati alle proteine G trimeriche**. Essi promuovono l'apertura o la chiusura di canali ionici o ne modulano le proprietà **attivando una proteina che lega GTP (proteina G)** che spesso dà inizio ad una cascata di reazioni che portano alla sintesi di secondi messaggeri.

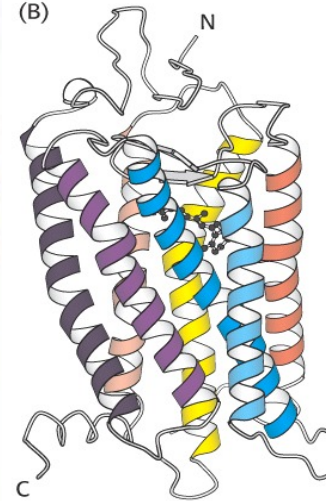
**Recettori metabotropici accoppiati alle  
proteine G (GPCR, G-protein coupled  
receptors)**

# Caratteristiche strutturali del recettore

(A)



(B)



I recettori accoppiati alle proteine G hanno sette domini transmembrana, il terminale NH<sub>2</sub> è extracellulare e quello COOH intracellulare. Il secondo e il terzo anello citoplasmatico e la coda intracellulare mediano il legame con la proteina G. Sul terzo anello citoplasmatico e sulla coda intracellulare sono presenti i siti di fosforilazione associati con la desensibilizzazione del recettore.

(B) Receptor for amines, nucleotides, eicosanoids

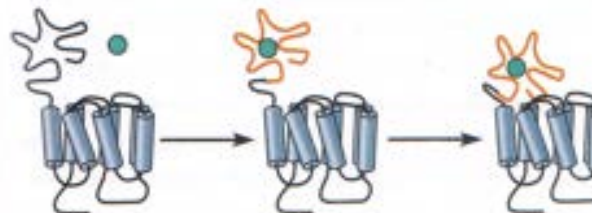


(C) Peptide hormone receptors

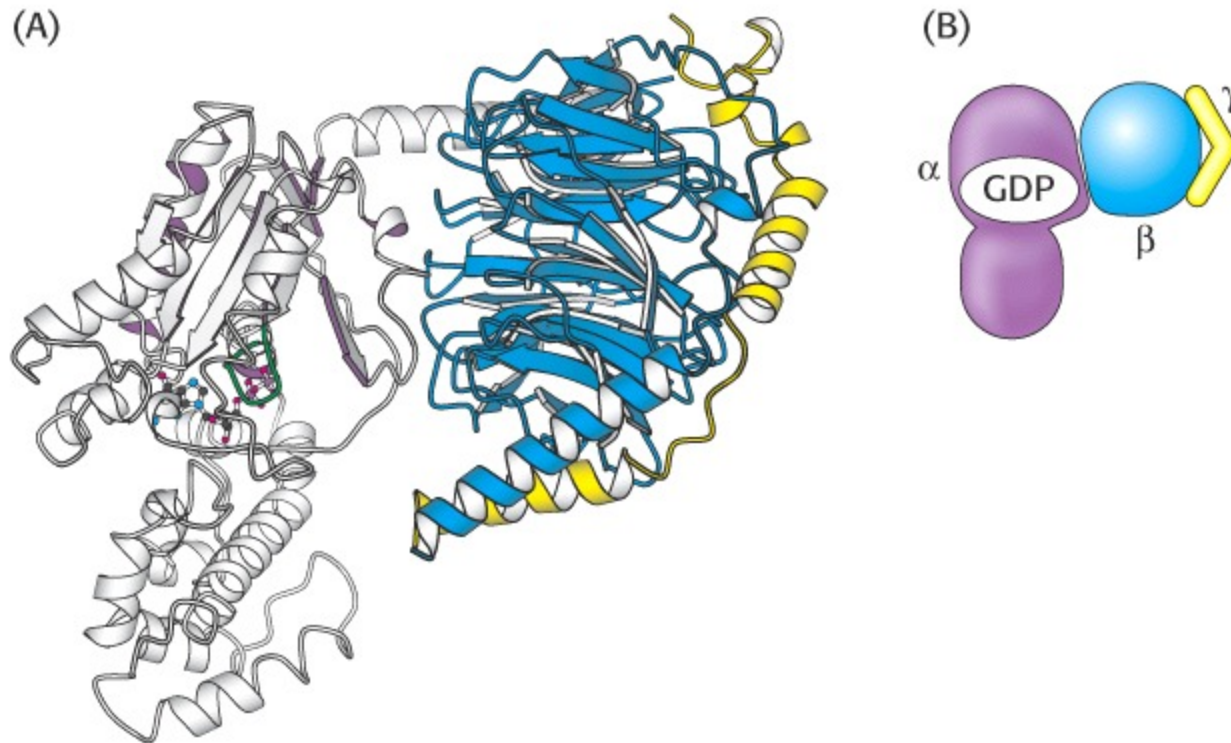


Il sito di interazione con il recettore è diverso per i diversi ligandi

(D) Neurotransmitter (glutamate, GABA) receptor

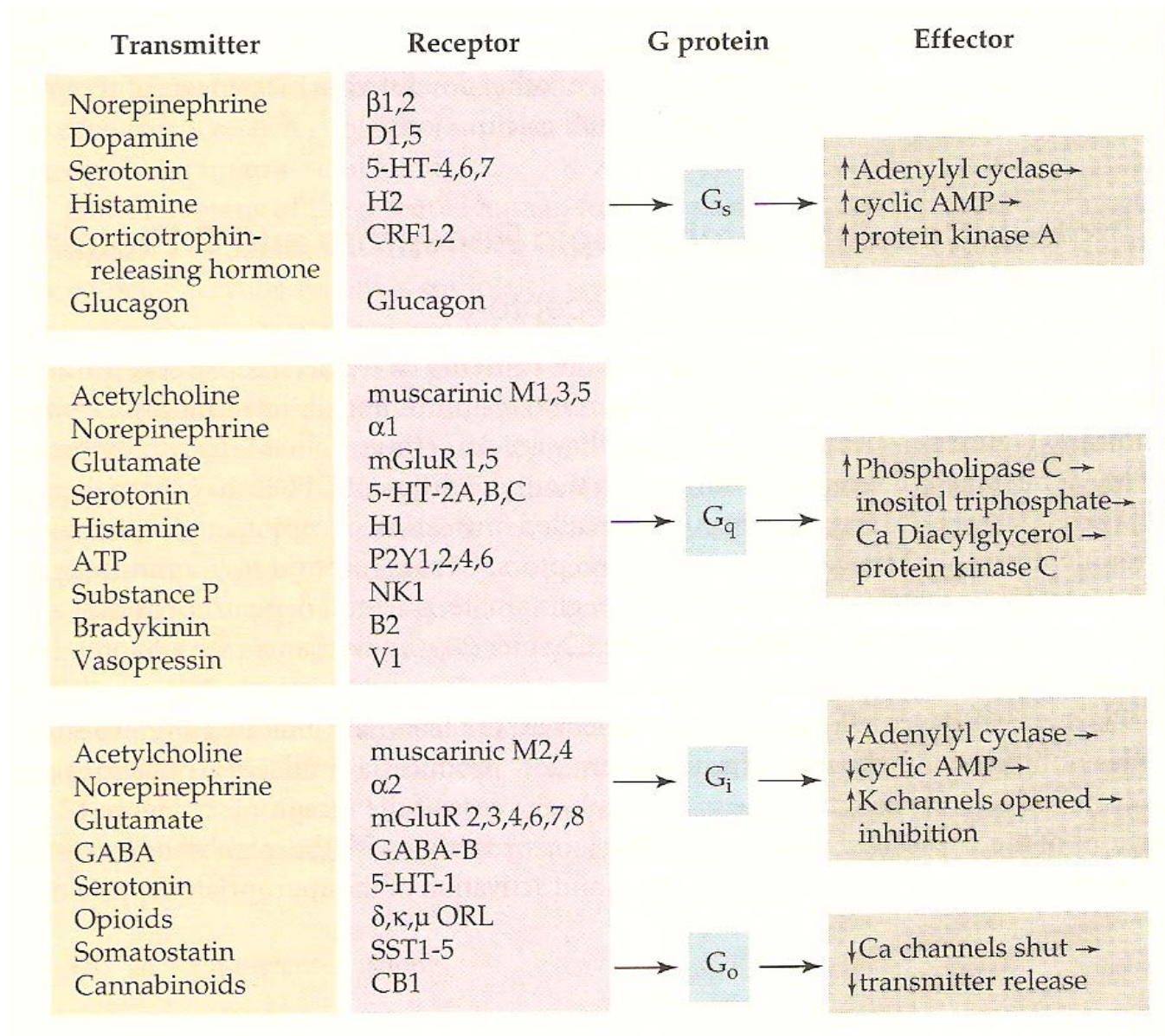


# Struttura della proteina G

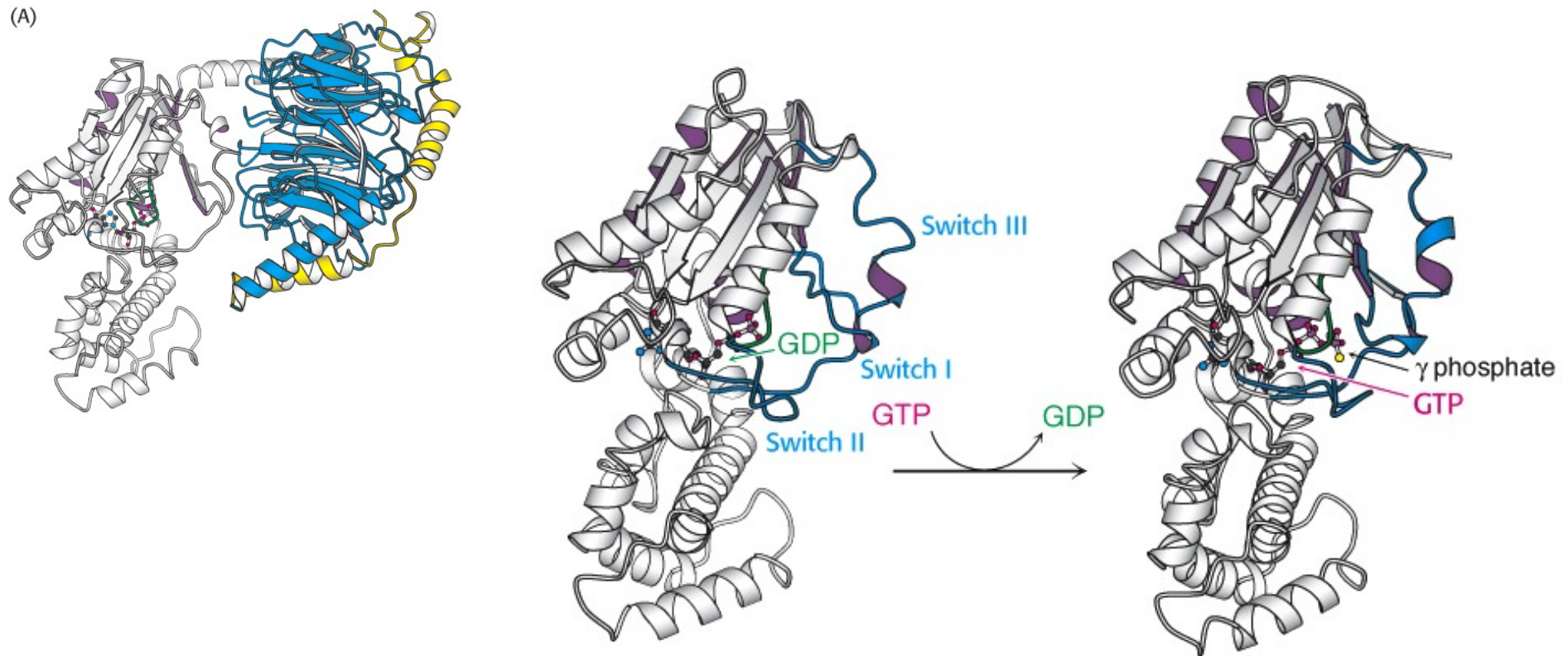


Le proteine G accoppiate ai recettori metabotropici sono **trimeri**, formati dalle subunità  $\alpha$  (21 isoforme),  $\beta$  (6 isoforme) e  $\gamma$  (12 isoforme).

# Classificazione delle proteine G



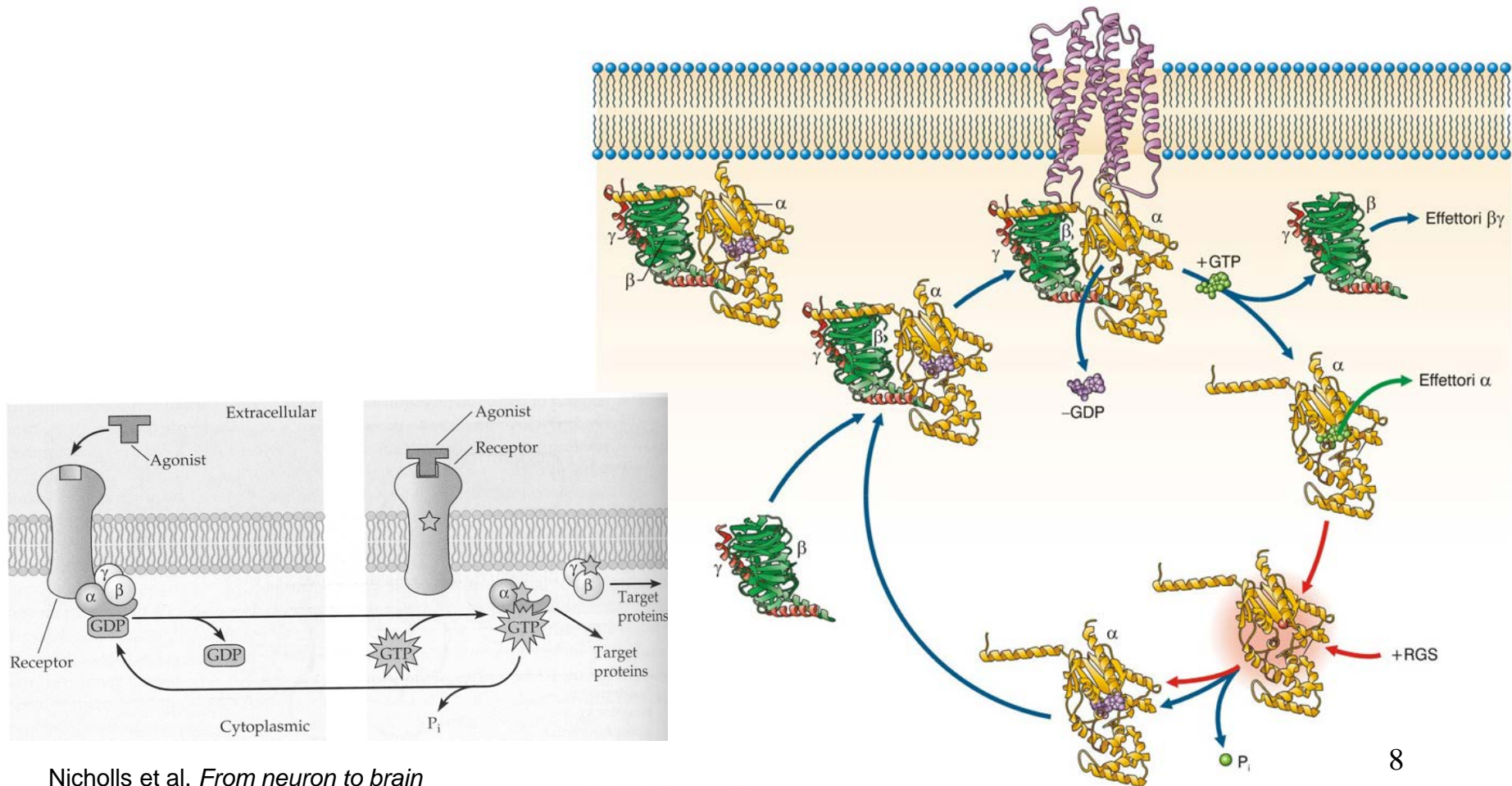
## Attivazione della proteina G



L'attivazione della proteina G consiste nella sostituzione di *GDP* con *GTP* che porta alla dissociazione del dimero  $\beta\gamma$  dalla subunità  $\alpha$ -*GTP*.

# Ciclo della proteina G

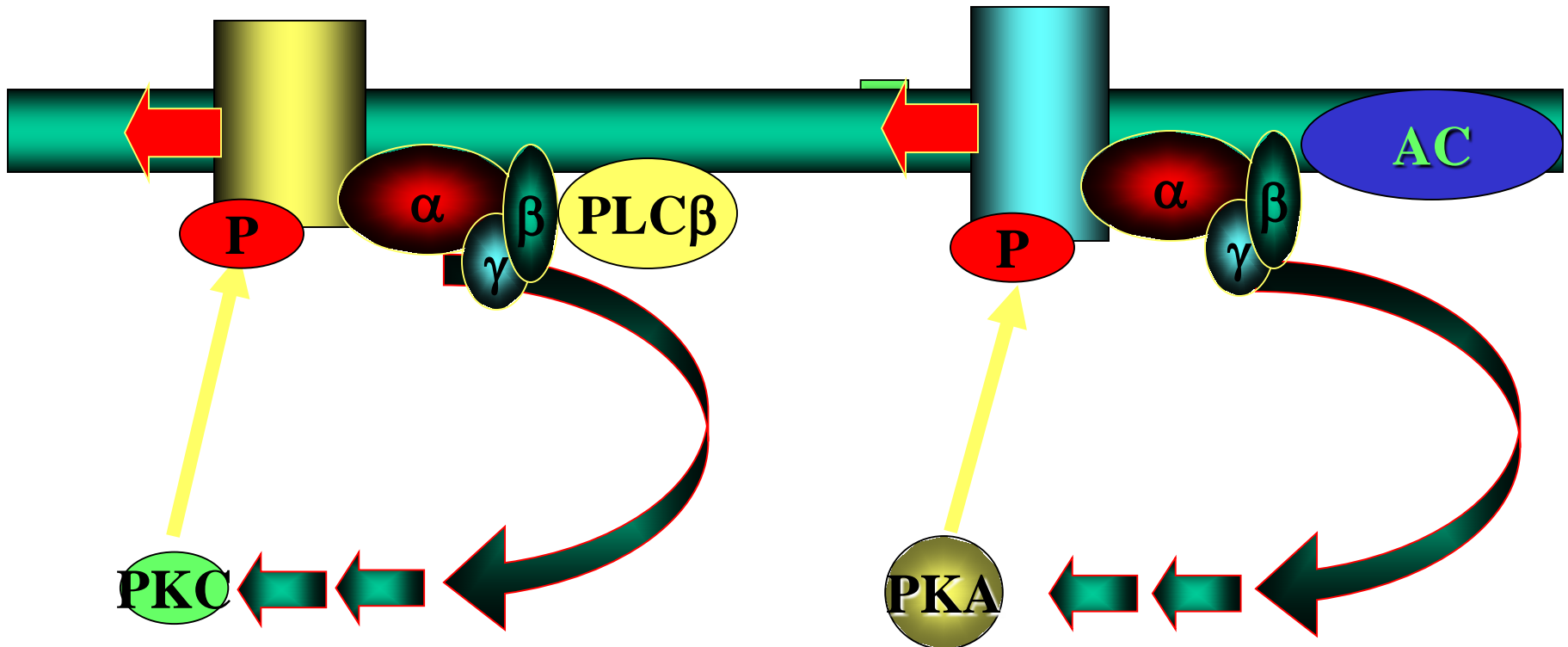
La proteina G viene attivata quando il mediatore chimico interagisce con il recettore metabotropico. Le due forme attivate ( $\alpha$ -GTP e **dimero**  $\beta\gamma$ ) interagiscono con le proteine bersaglio. L'idrolisi di GTP a GDP e  $P_i$  da parte della subunità  $\alpha$  determina la cessazione della risposta e la ricomposizione del trimero. L'attività GTP-asi dell' $\alpha$ -GTP è potenziata da **proteine RGS** (regulator of G protein signaling), che aumentano fino a 1000 volte la velocità di idrolisi.





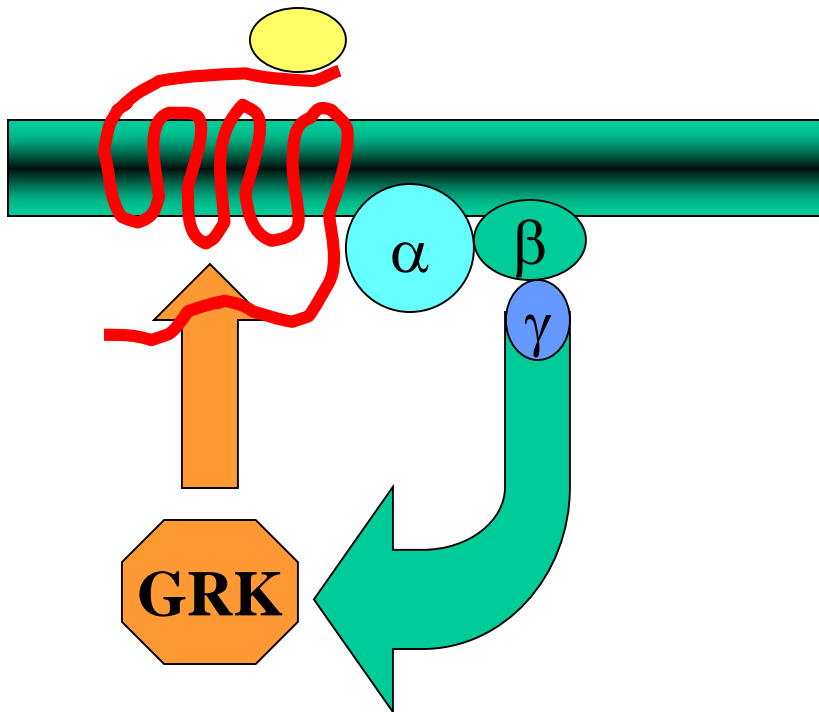
## Desensibilizzazione eterologa

Desensibilizzazione attraverso disaccoppiamento recettore-proteine G in risposta alla **fosforilazione del recettore tramite PKA e/o PKC**

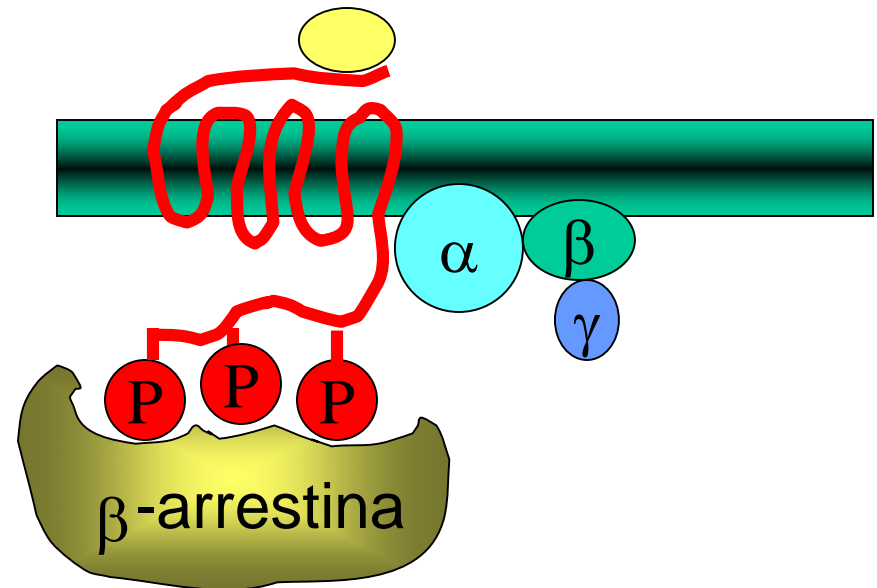


## Desensibilizzazione omologa

Disaccoppiamento recettore-proteine  $G$  in risposta alla **fosforilazione del recettore tramite le GRK** (G protein-coupled receptor kinase) promossa dal dimero  $\beta\gamma$

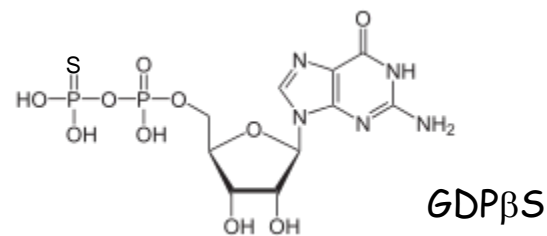
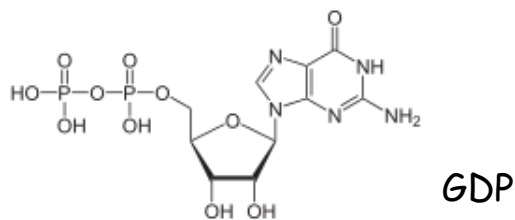
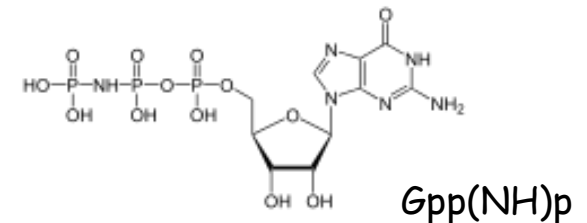
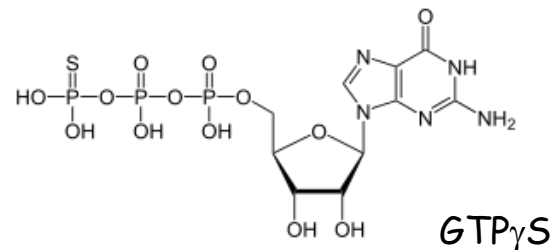
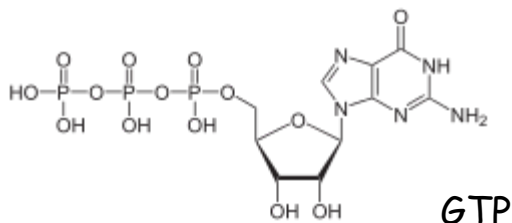


La fosforilazione tramite GRK spesso non è sufficiente per inattivare completamente i recettori; la completa inattivazione richiede un componente aggiuntivo, l'**arrestina**



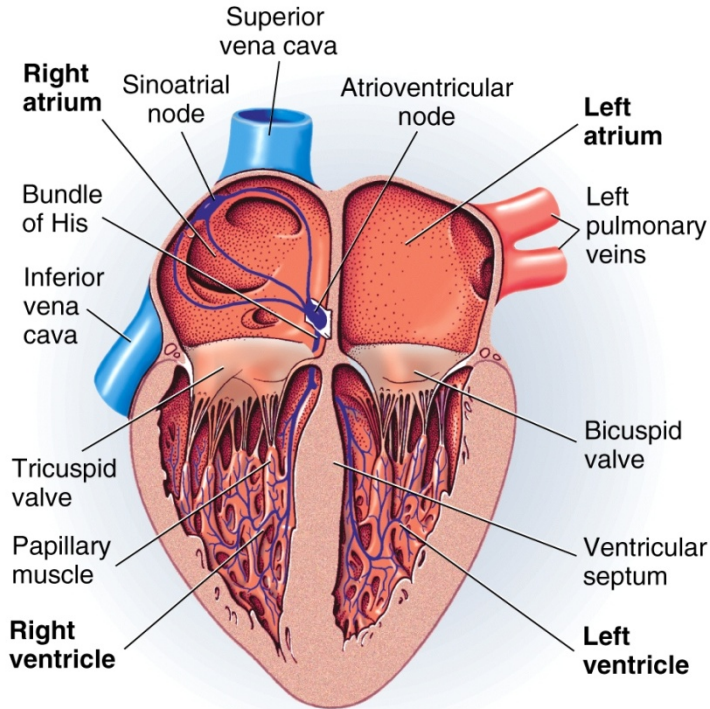
# Identificazione delle risposte mediate da proteine G

- 1) Perfusione con **soluzioni prive di GTP**: si impedisce l'attivazione della proteina G
- 2) Uso di analoghi **non idrolizzabili** di GTP, come il **GTP $\gamma$ S** e il **Gpp(NH)p**: si attiva permanentemente la subunità  $\alpha$
- 3) Uso di analoghi di GDP, come il **GDP $\beta$ S**, **non sostituibili** da GTP: si impedisce l'attivazione della proteina G
- 4) Uso della **tossina colerica** per attivare irreversibilmente le proteine G<sub>s</sub> (inibisce l'attività GTPasica)
- 5) Uso della **tossina della pertosse** per inibire irreversibilmente le proteine G<sub>i</sub> e G<sub>o</sub> (inibisce il legame con il recettore)

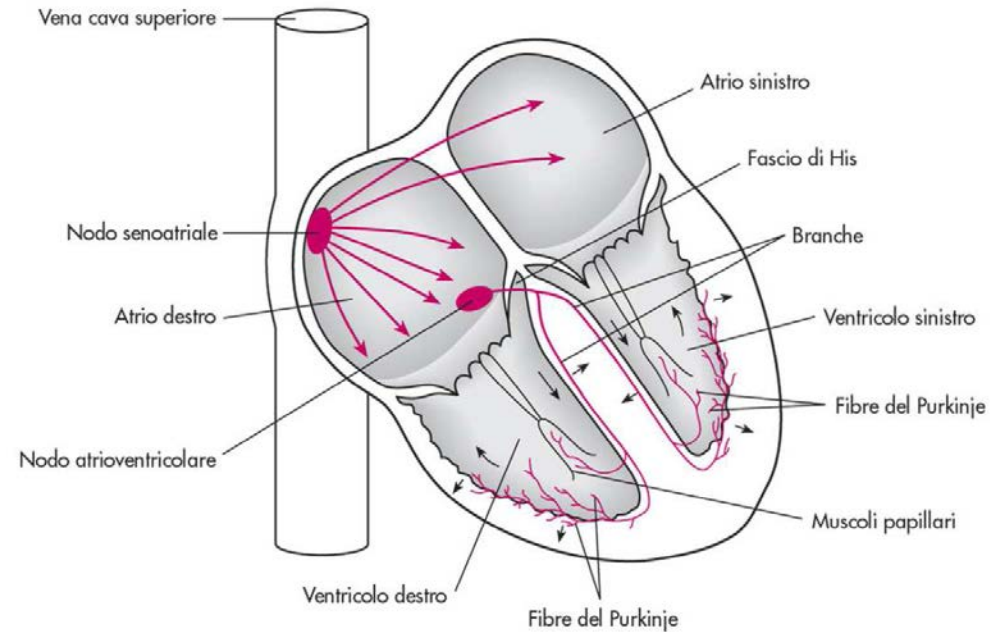


# Azione diretta della proteina G

# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del $K^+$ nel cuore (1)



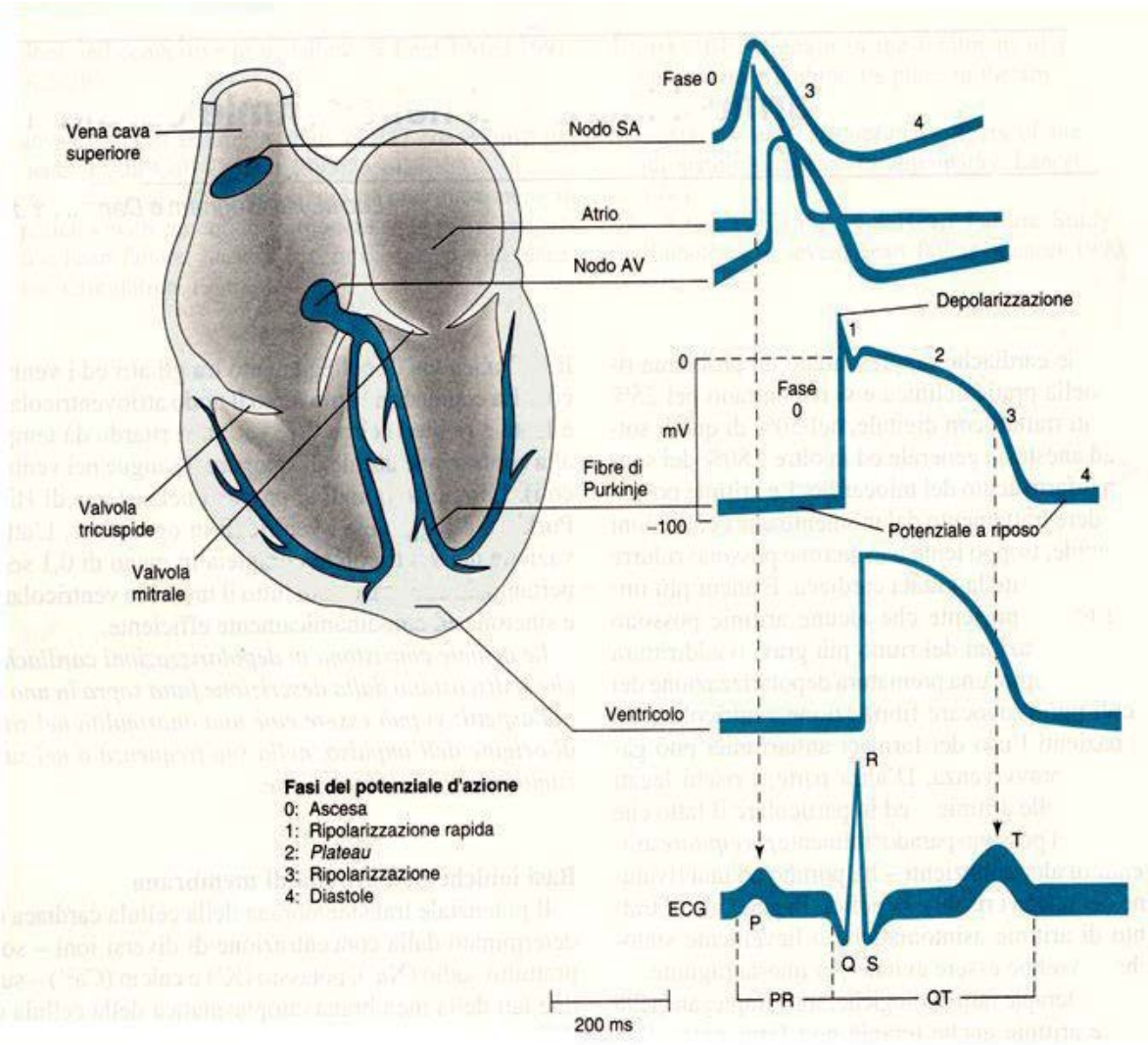
## Tessuto pace-maker nel cuore



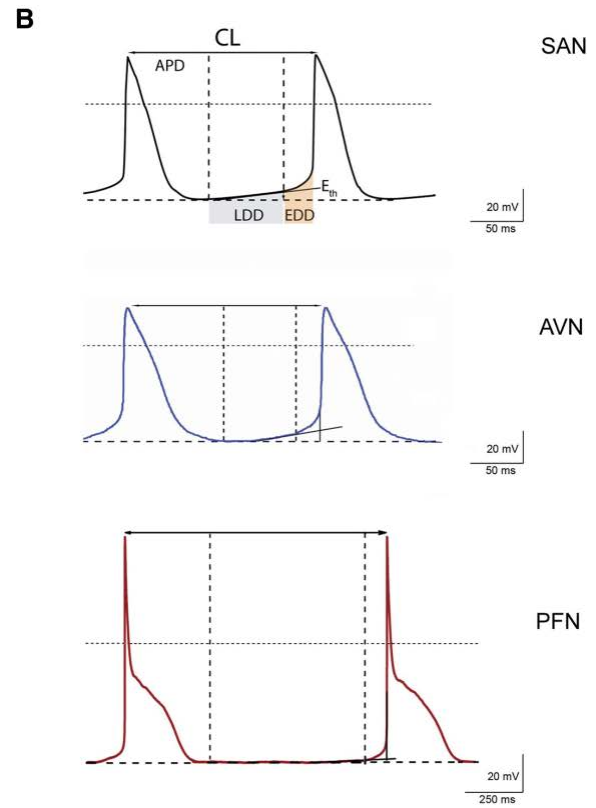
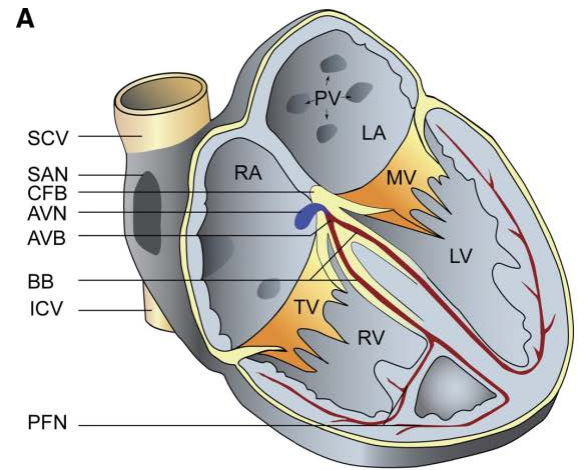
Nel cuore di mammifero il tessuto **pace-maker** è localizzato nel **nodo seno-atriale**, nel **nodo atrio-ventricolare** e nelle **fibre di Purkinje**.

# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del K<sup>+</sup> nel cuore (2)

Il potenziale d'azione cardiaco assume forme diverse a seconda del tipo di cellula miocardica (pacemaker o di lavoro)

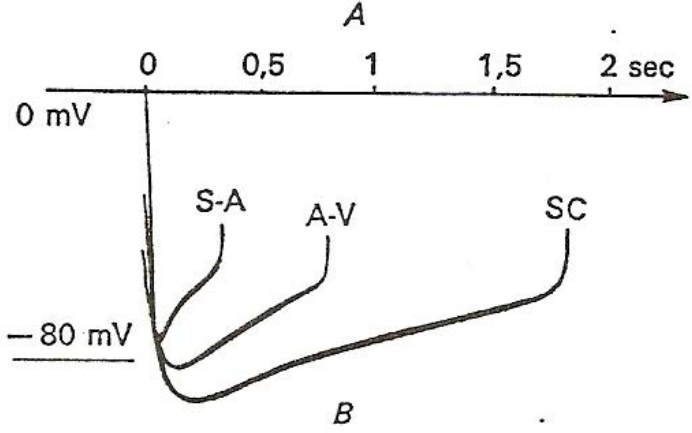
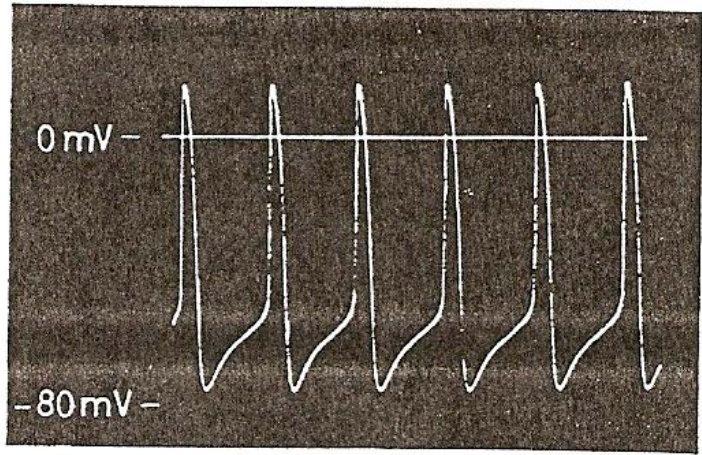


- Fasi del potenziale d'azione**
- 0: Ascesa
  - 1: Ripolarizzazione rapida
  - 2: Plateau
  - 3: Ripolarizzazione
  - 4: Diastole

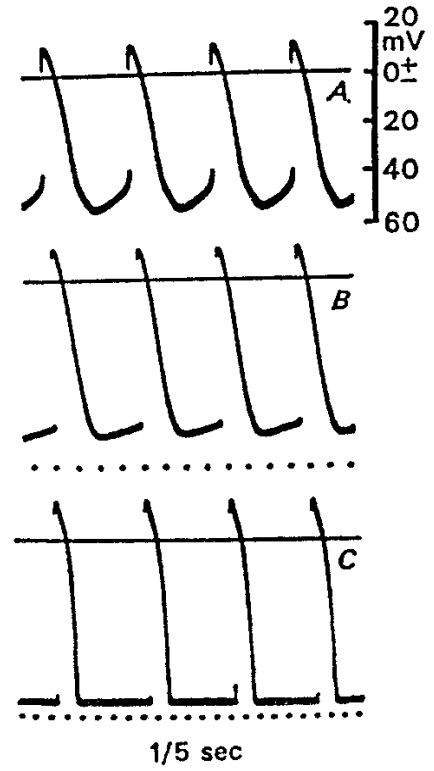


# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del K<sup>+</sup> nel cuore (3)

Il **pace-maker fisiologico cardiaco** è il **nodo seno-atriale** le cui cellule hanno la frequenza spontanea più elevata.



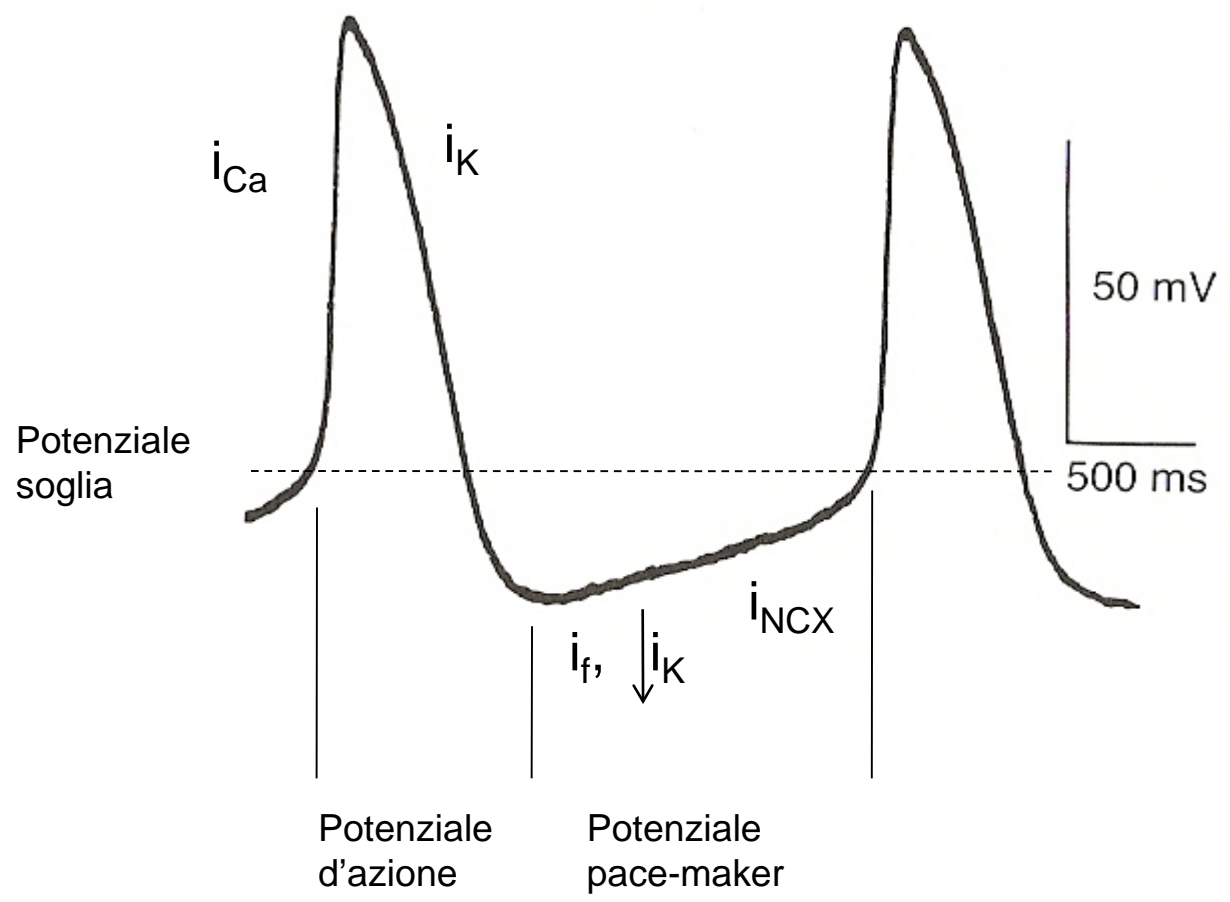
La sovrapposizione della porzione negativa dei potenziali d'azione del nodo seno-atriale (S-A), del nodo atrio-ventricolare (A-V) e delle fibre di Purkinje (SC) mette in evidenza la differente velocità della depolarizzazione diastolica nei tre distretti.



Registrazioni dei pdA da tre diversi distretti dell'atrio: A: cellule pace-maker principali, il pdA nasce dalla depolarizzazione diastolica (dd) quando viene raggiunta la soglia; B: cellule pace-maker secondarie, il pdA nasce durante la dd, prima che questa abbia raggiunto la soglia, "guidato" dalle cellule pace-maker principali; C: cellule miocardiche di lavoro, il pdA dipende dalla propagazione del pdA che ha inizio nelle cellule pace-maker.

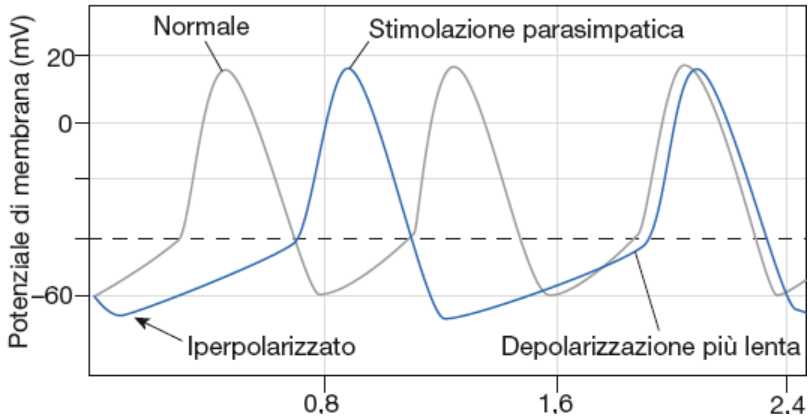
# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del $K^+$ nel cuore (4)

*Il potenziale d'azione nelle cellule pace-maker cardiache*

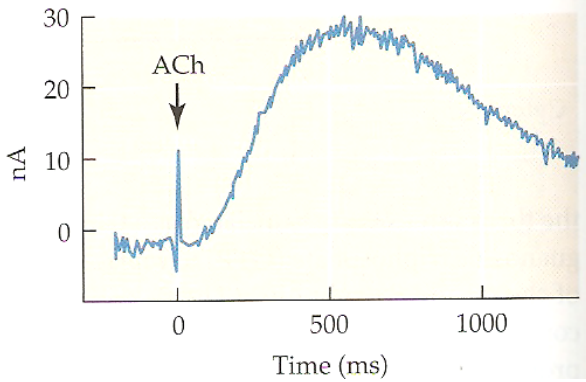
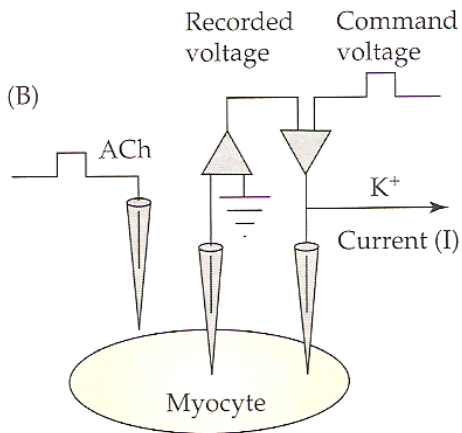
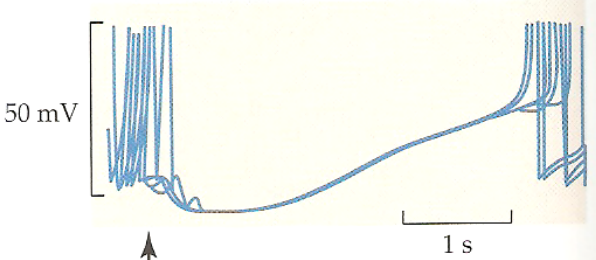
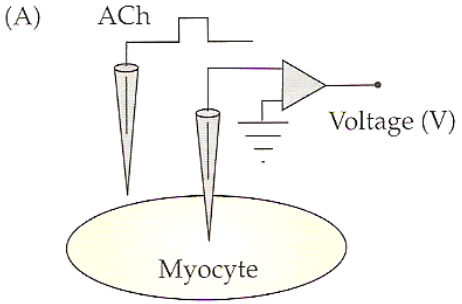




# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del K<sup>+</sup> nel cuore (5)



La stimolazione del nervo vago **rallenta** la frequenza del battito cardiaco. Questa azione è mediata dall'**ACh** che promuove l'iperpolarizzazione della membrana delle cellule pacemaker.



A. L'applicazione ionoforetica di **ACh iperpolarizza temporaneamente la membrana cellulare** e blocca per 3 s la nascita dei potenziali d'azione spontanei in cellule del nodo seno-atriale.

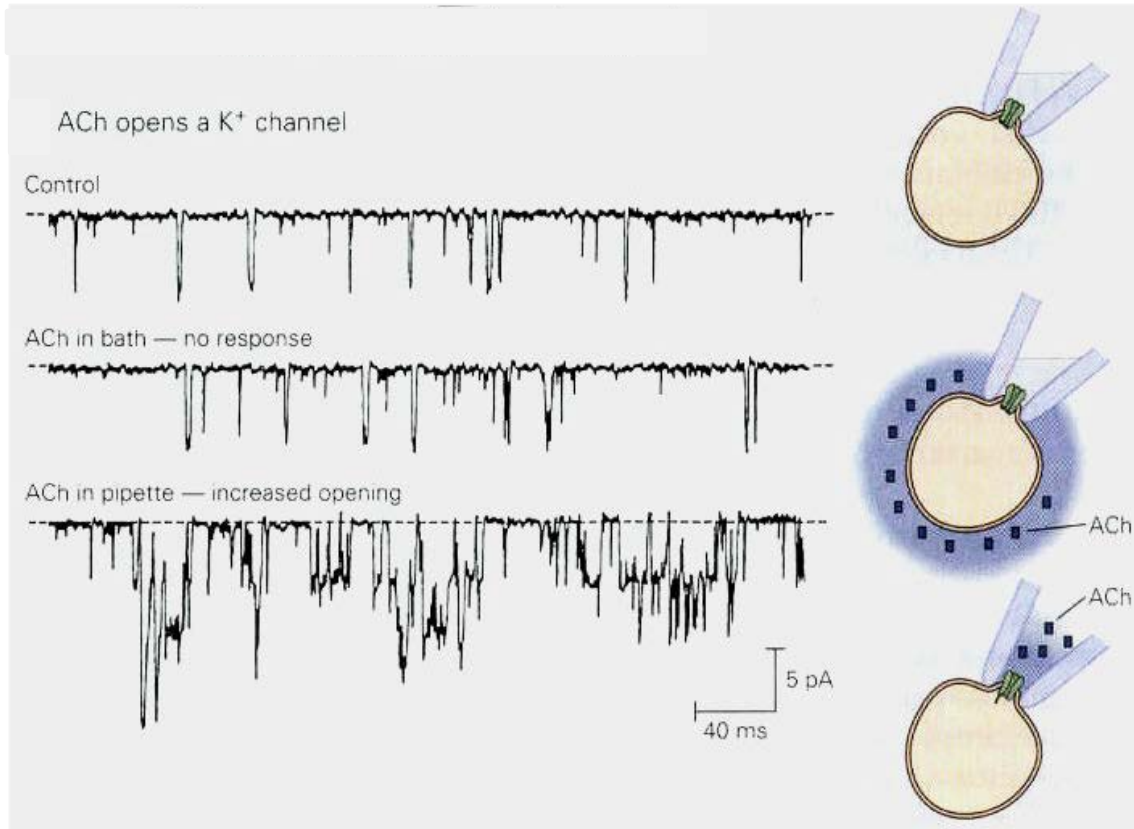
B. In condizioni di blocco del voltaggio una simile applicazione di ACh provoca una corrente in uscita di K<sup>+</sup>, che inizia dopo circa 50 ms e permane per circa 1.5 s.

**L'ACh apre i canali del K<sup>+</sup> nelle cellule seno-atriali del cuore di coniglio**

# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del K<sup>+</sup> nel cuore (6)

Il recettore attivato dall'ACh è il **recettore muscarinico M2**

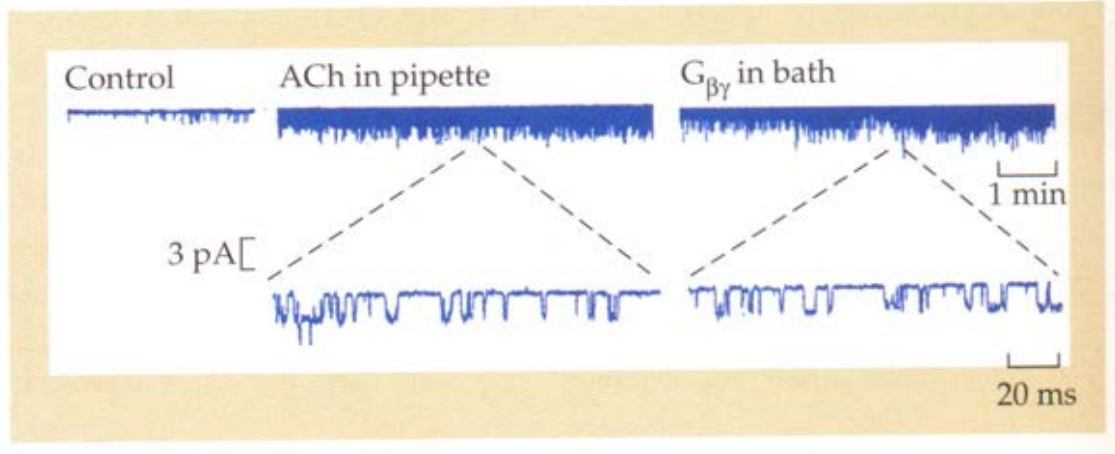
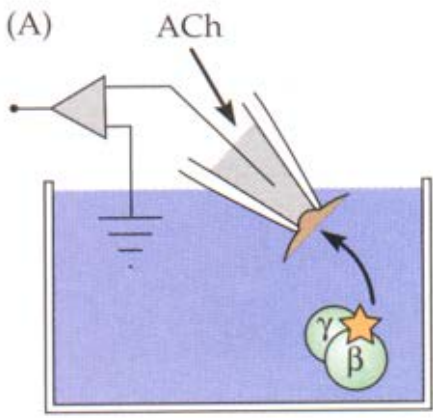
La risposta è mediata da una **proteina G<sub>i</sub>**: è necessaria la presenza di GTP intracellulare, l'applicazione di analoghi non idrolizzabili del GTP prolunga l'azione dell'ACh, l'attivazione del canale del K<sup>+</sup> non si osserva in presenza della tossina della pertosse.



L'attività dei canali del K<sup>+</sup> aumenta quando l'ACh è aggiunta alla soluzione della pipetta (in un esperimento di patch clamp in configurazione cell-attached) e non quando viene aggiunta al bagno.

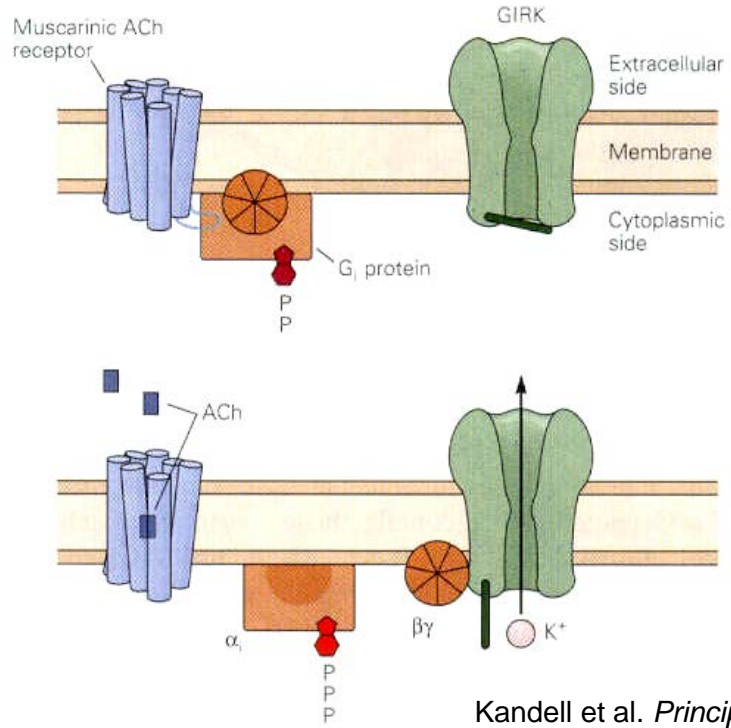
**L'azione della proteina G sui canali del K<sup>+</sup> è diretta e non implica la sintesi di un secondo messaggero intracellulare.**

# Azione diretta della proteina G: attivazione dei canali del K<sup>+</sup> nel cuore (7)



A Model of G protein activation of a K<sup>+</sup> channel

Nicholls et al. *From neuron to brain*



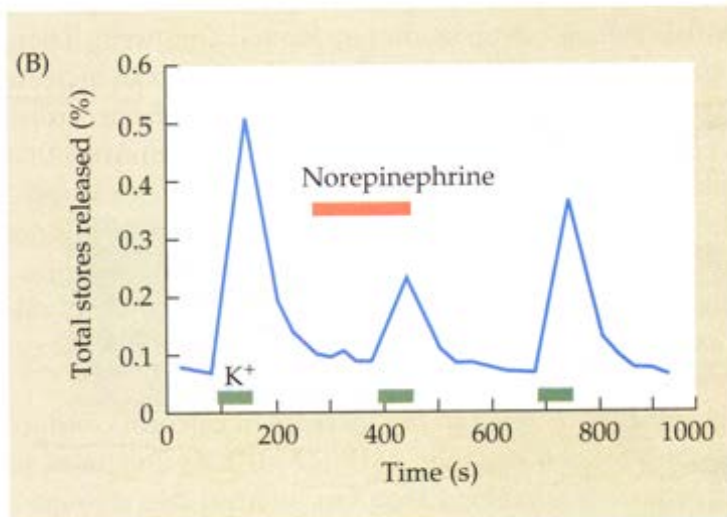
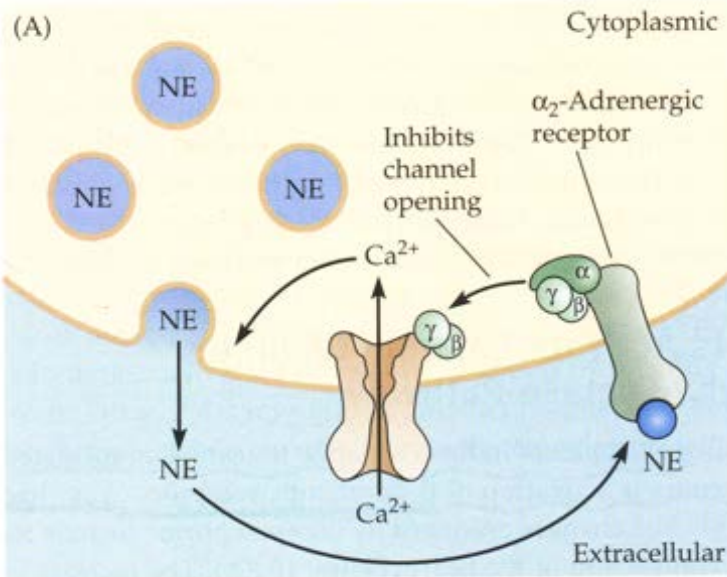
L'apertura dei canali del K<sup>+</sup> in seguito all'attivazione dei mACHR è promossa dalla subunità  $\beta\gamma$  della proteina G.

Kandell et al. *Principles of neural science*

## Azione diretta della proteina G: **autoinibizione dei canali N del $\text{Ca}^{2+}$** (1)

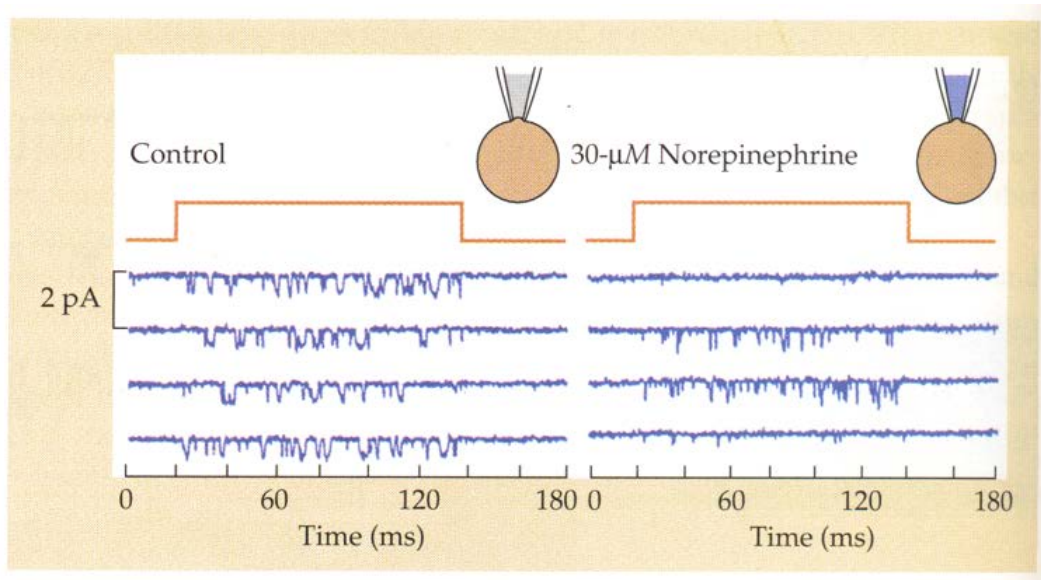
I neuroni dei gangli simpatici della rana liberano **nor-adrenalina** (NE) che agisce non solo sui recettori post-sinaptici degli organi effettori, ma anche su **autorecettori** presenti sulle terminazioni presinaptiche stesse, regolando la liberazione di neurotrasmettitore (NT) con un meccanismo di **feed-back negativo**. L'applicazione di NE nel bagno di perfusione di neuroni di gangli simpatici di rana riduce significativamente la quantità di NE liberata in risposta ad uno stimolo depolarizzante rappresentato da un aumento della  $[\text{K}^+]_o$ .

**FIGURE 10.6 Presynaptic Autoreceptors Reduce Transmitter Release.** (A) Norepinephrine (NE) released from sympathetic neurons combines with  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in the terminal membrane (called autoreceptors), activating a G protein. The activated  $\beta\gamma$  complex binds to calcium channels, decreasing calcium influx and so limiting further transmitter release. (B) Norepinephrine reduces the release of transmitter from sympathetic ganglia. Ganglia were loaded with radioactive norepinephrine and then enclosed in a perfusion chamber. Transmitter release was evoked by depolarization with a solution containing 50 mM potassium (green bars). Addition of 30  $\mu\text{M}$  unlabeled norepinephrine to the perfusion solution (red bar) reduced the amount of radiolabeled transmitter released in response to potassium-induced depolarization. (B after Lipscombe, Kongsamut, and Tsien, 1989.)

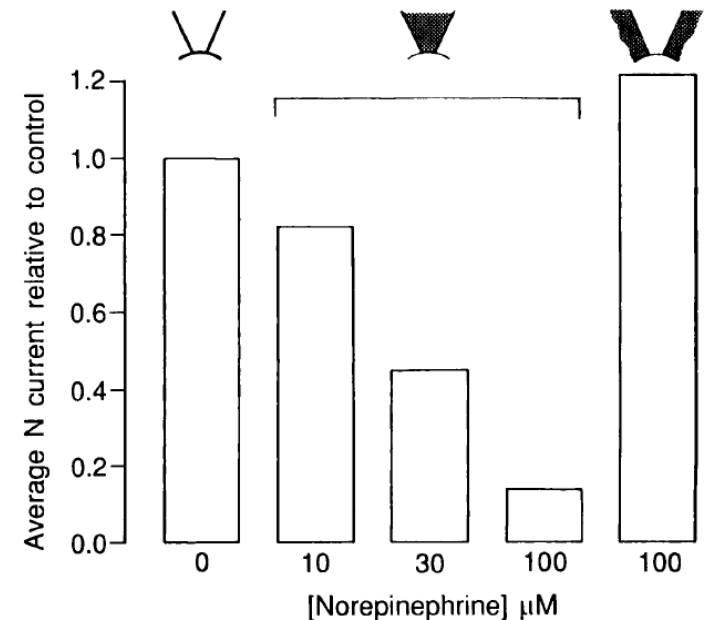


## Azione diretta della proteina G: **autoinibizione dei canali N del $\text{Ca}^{2+}$** (2)

La NE aggiunta alla soluzione di una micropipetta in un esperimento di patch clamp in configurazione cell-attached provoca una **riduzione della probabilità di apertura dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$**  che spiega la ridotta liberazione di neurotrasmettitore. L'applicazione di NE nel bagno non ha nessun effetto, suggerendo un'interazione diretta tra proteina  $G_o$  e canale del  $\text{Ca}^{2+}$ .

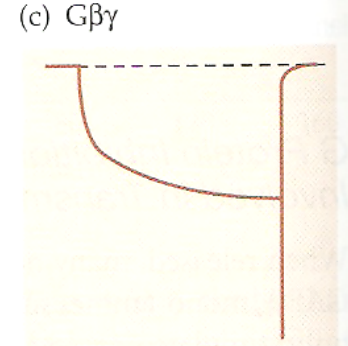
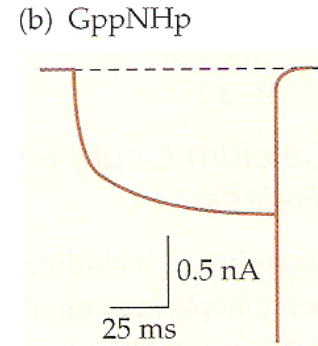
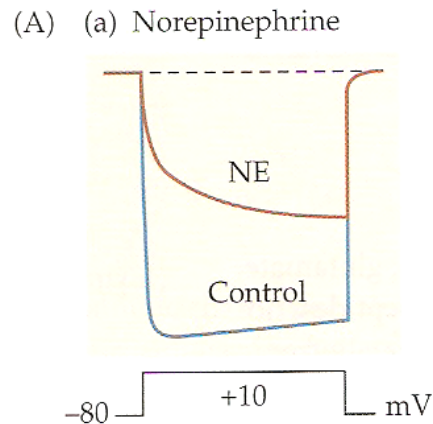
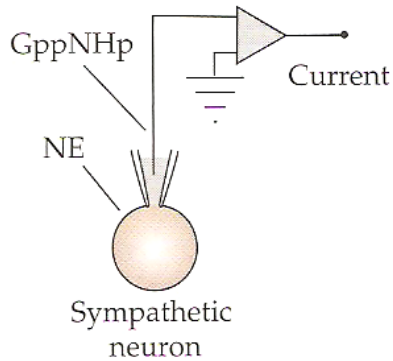


**FIGURE 10.7 Norepinephrine Inhibits Calcium Channel Activity.** Single-channel currents were recorded in cell-attached patches; channels were activated with a depolarizing pulse (top trace). When norepinephrine was included in the patch electrode, the unitary currents did not change in size, but channel openings were less frequent and of shorter duration. (After Lipscombe, Kongsamut, and Tsien, 1989.)



L'azione della NE è dose-dipendente e si osserva solo quando viene aggiunta nella micropipetta. Le correnti registrate in configurazione cell-attached sono normalizzate per il valore registrato nel controllo (0 NE).

# Azione diretta della proteina G: **autoinibizione dei canali N del $\text{Ca}^{2+}$** (3)



Nicholls et al. *From neuron to brain*

(B) Controllo

(C) In presenza di  $\beta\gamma$

Victor Ruiz-Velasco, and Stephen R. Ikeda J. Neurosci. 2000;20:2183-2191, modificata

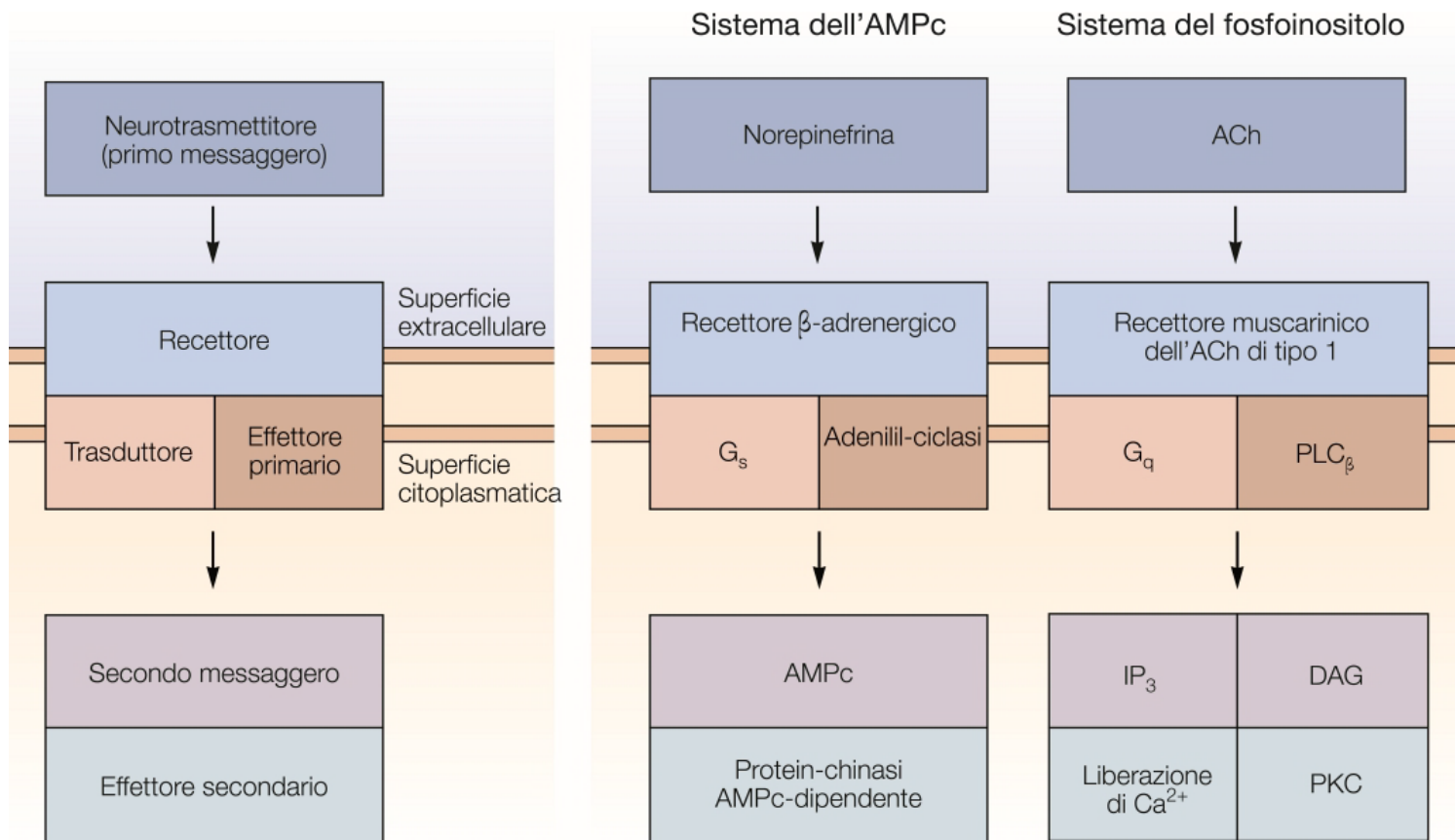
## **L'inibizione dei canali N del $\text{Ca}^{2+}$ è mediata dalla subunità $\beta\gamma$ della proteina G**

Patch clamp in configurazione whole cell su neuroni simpatici di ratto.

La corrente inward di  $\text{Ca}^{2+}$  indotta dalla depolarizzazione (da -80 a +10 mV) è inibita dall'applicazione di NE (a). Lo stesso effetto si osserva con l'aggiunta di un analogo non idrolizzabile di GTP (b) e quando la subunità  $\beta\gamma$  è sovraespressa (c). Il legame di  $\beta\gamma$  al canale del  $\text{Ca}^{2+}$  è voltaggio-dipendente: l'inibizione della corrente diminuisce durante la depolarizzazione mantenuta nel tempo (A); una forte depolarizzazione ( $V_m = +80$  mV) riduce fortemente l'effetto della NE (B) e neutralizza l'azione del dimero  $\beta\gamma$  (C)

**Attivazione della sintesi di secondi  
messaggeri intracellulari da parte  
della proteina G**

# Schema riassuntivo del sistema dei secondi messaggeri accoppiati alle proteine G

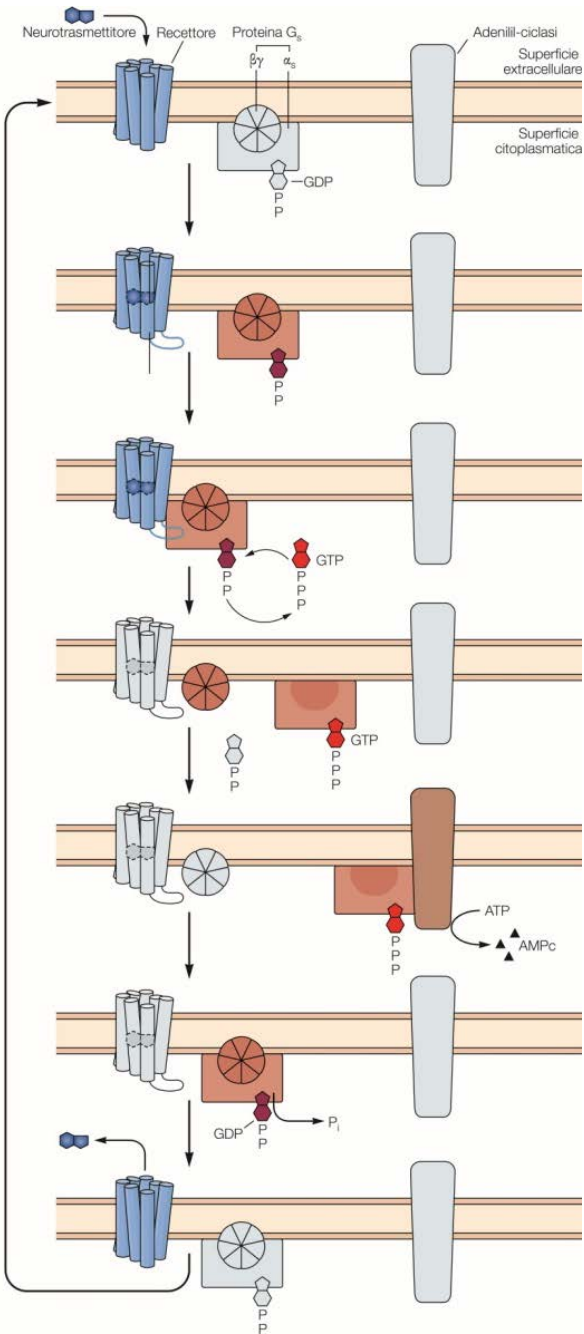


I sistemi dei secondi messaggeri mostrano una serie di passi in comune nel processo di trasduzione del segnale: i neurotrasmettitori legati al recettore attivano le proteine G che a loro volta attivano gli effettori primari (es. adenilato ciclasi, fosfolipasi C), enzimi che catalizzano la sintesi di messaggeri intracellulari (cAMP, IP $_3$  e DAG). Il messaggero intracellulare attiva un effettore secondario (PKA, rilascio di Ca $^{2+}$  e PKC) o agisce direttamente su un bersaglio.



Attivazione della sintesi di secondi  
messaggeri intracellulari da parte della  
proteina G: **la via del cAMP**

# La via del cAMP



Il legame del trasmettitore altera la conformazione del recettore scoprendo il sito di legame per la proteina G

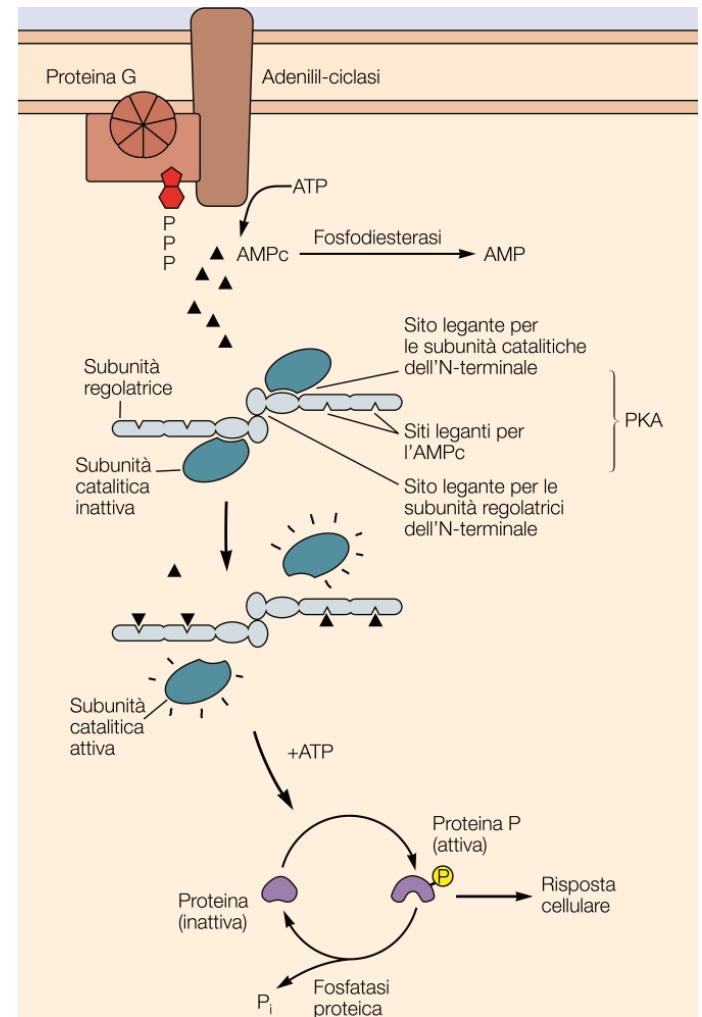
La diffusione nel doppio strato porta all'associazione del complesso trasmettitore-recettore con la proteina G, attivandola per lo scambio GDP-GTP

La sostituzione del GDP con il GTP promuove la dissociazione della subunità  $\alpha$  dal complesso  $\alpha\beta\gamma$ , esponendo su di essa un sito di legame per l'adenil-ciclastasi

La subunità  $\alpha$  si lega alla ciclastasi e la attiva catalizzando la sintesi di numerose molecole di cAMP

L'idrolisi del GTP ad opera della subunità  $\alpha$  riporta la subunità alla sua conformazione originale causando la sua dissociazione dalla ciclastasi (che così diventa inattiva) e la riassociazione con il complesso  $\beta\gamma$

L'attivazione della ciclastasi si ripete fino a che la dissociazione del trasmettitore riporta il recettore alla sua configurazione originale



4 molecole di cAMP si legano alla subunità regolatrice della protein chinasi cAMP dipendente (PKA), liberando le due subunità catalitiche che possono così fosforilare i residui serina e treonina di specifici substrati proteici che regolano una risposta cellulare. Questa via è regolata da due enzimi: le fوسفodiesterasi che convertono il cAMP in AMP (inattivo) e le fوسفatasi che defosforilano la proteina bersaglio liberando  $P_i$

La risposta cellulare ad un neurotrasmettitore è mediata dal cAMP se è mimata da:

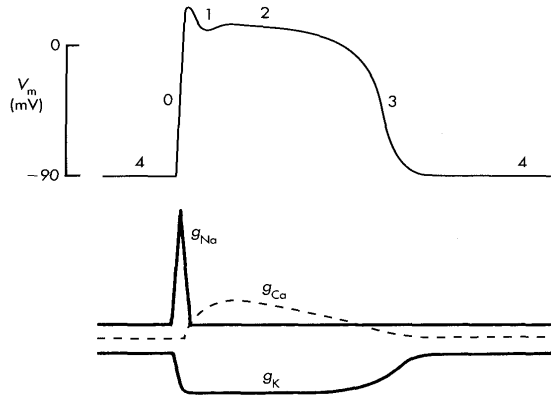
- **Iniezione intracellulare di cAMP** e aggiunta di derivati permeabili del cAMP (es. dibutiril-cAMP)
- Attivazione diretta dell'adenil ciclasi con **forskolina**
- Inibizione delle fosfodiesterasi mediante **metilxantine** (teofillina, caffeina)

Il coinvolgimento della PKA è dimostrato da:

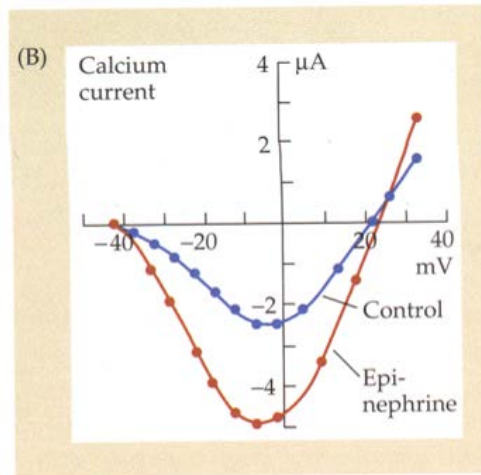
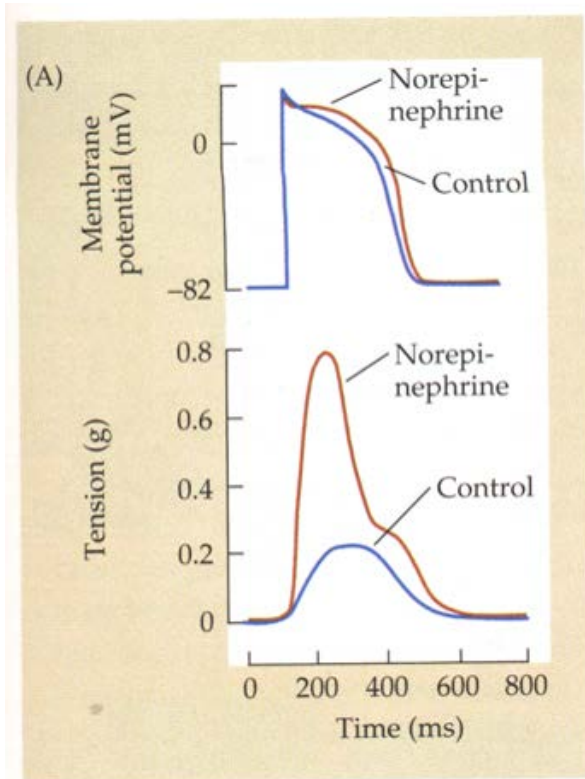
- **Inibizione** della risposta indotto da un **eccesso di subunità regolatrici**
- **Potenziamento** o **induzione** della risposta conseguente all'**iniezione di subunità catalitiche**

La fosforilazione delle proteine bersaglio è dimostrata **dall'aumento della risposta indotto dall'inibizione delle fosfatasi**

# Modulazione dei canali L del $\text{Ca}^{2+}$ mediante stimolazione adrenergica

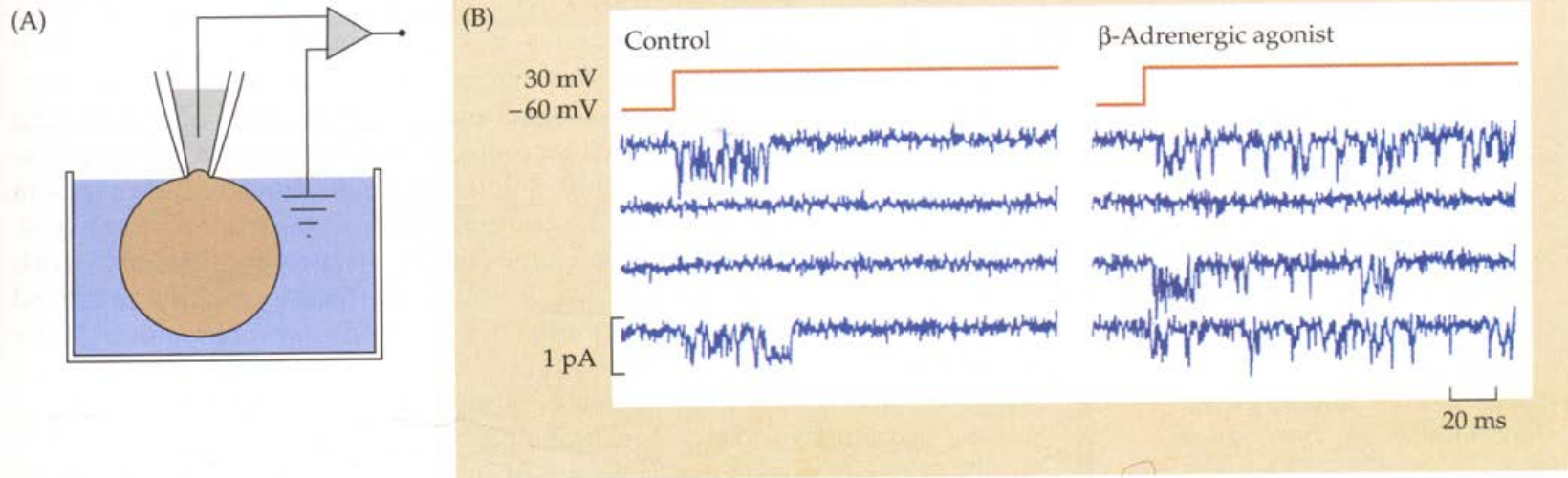


Potenziale d'azione nei miociti ventricolari e variazioni di conduttanza associate.



Nel cuore, le cellule del miocardio di lavoro rispondono alla stimolazione simpatica o all'applicazione di NE con un **aumento della forza contrattile** associata ad un **aumento della durata del potenziale d'azione**. Questi effetti sono dovuti ad un **aumento della corrente lenta del  $\text{Ca}^{2+}$**  (vedi le relazioni corrente:voltaggio nel controllo e in presenza di NE).

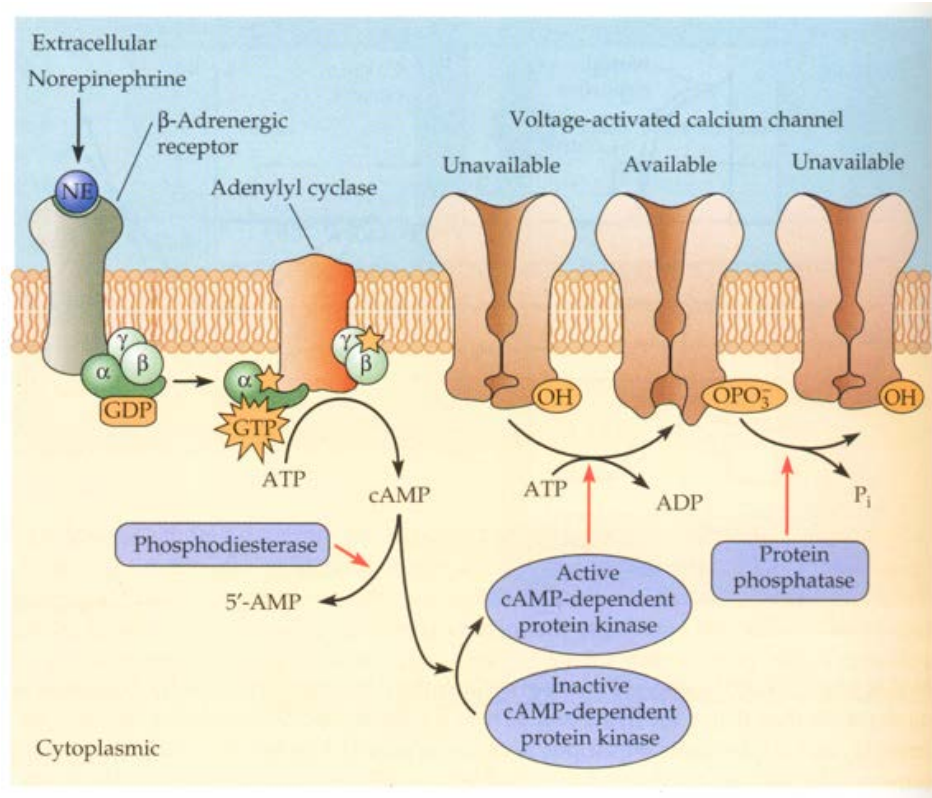
# Modulazione dei canali L del $\text{Ca}^{2+}$ mediante stimolazione adrenergica



In esperimenti di patch clamp in configurazione cell-attached, l'aggiunta di NE alla soluzione dentro la micropipetta o nel bagno produce un aumento della corrente attraverso i canali del  $\text{Ca}^{2+}$  dentro il patch, indicando che la NE promuove la sintesi di un **secondo messaggero diffusibile** nel citoplasma.

L'uso di metodi specifici mostra che la risposta è mediata da proteine G e che viene attivata la via del cAMP.

# La stimolazione dei recettori $\beta$ -adrenergici attiva i canali L del $\text{Ca}^{2+}$ attraverso la via del cAMP



Nicholls et al. *From neuron to brain*

L'attività dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  **augmenta** in presenza di forskolina, di inibitori della fosfodiesterasi, dopo iniezione intracellulare di cAMP, della subunità catalitica di PKA, di  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ , **diminuisce** dopo iniezione della subunità regolatrice di PKA e di protein fosfatasi.

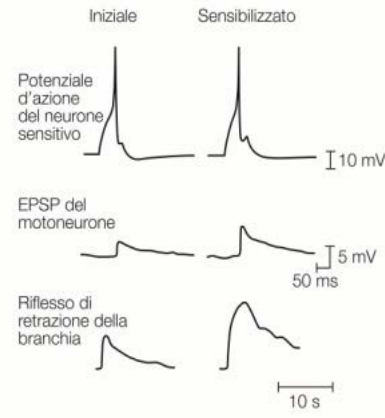
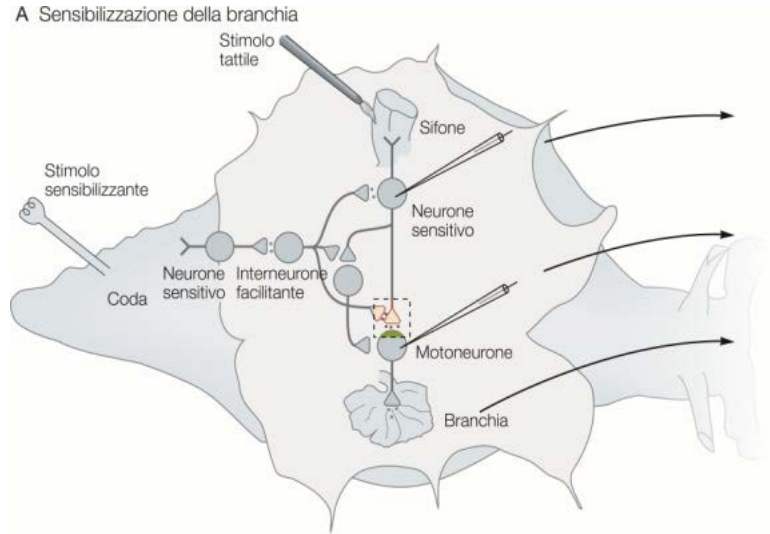
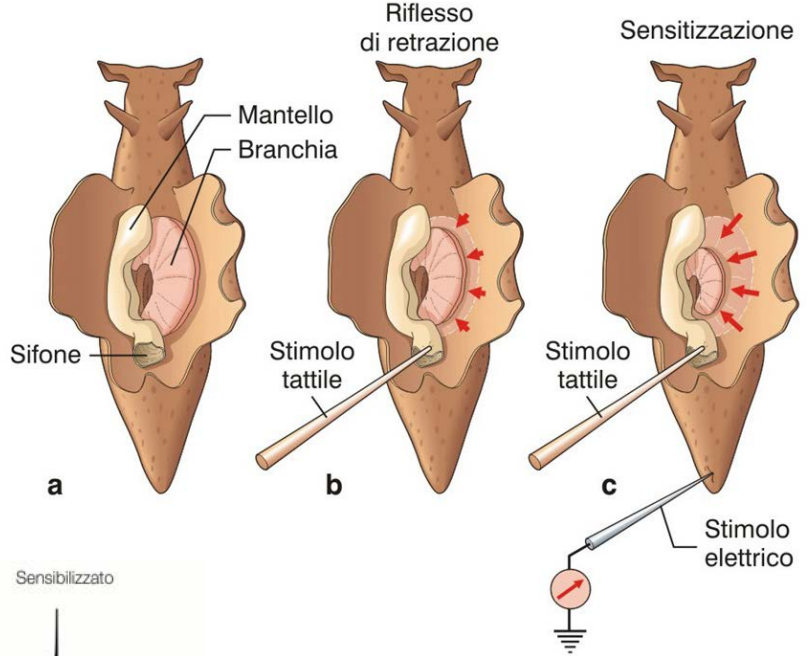
La fosforilazione dei canali del  $\text{Ca}^{2+}$  ad opera della PKA rende i canali **disponibili all'apertura** quando la membrana viene depolarizzata, **NON** determina l'apertura del canale. L'azione della stimolazione  $\beta$ -adrenergica è perciò quella di **modulare** la risposta alla depolarizzazione.

La cascata enzimatica che caratterizza la via del cAMP produce un'enorme amplificazione del segnale: ogni adenil-ciclasti attivata catalizza la sintesi di numerose molecole di cAMP che attivano le PKA, ciascuna delle quali è in grado di fosforilare numerosi canali.

# Inibizione del canale S del K<sup>+</sup> in Aplysia



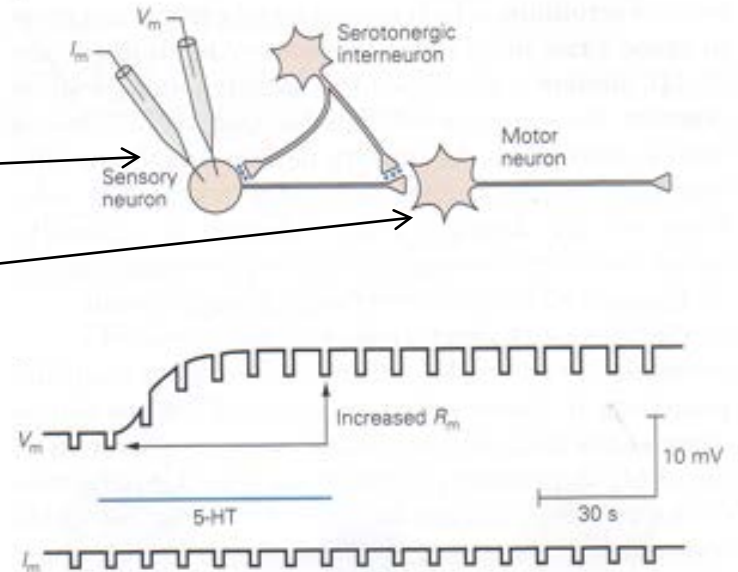
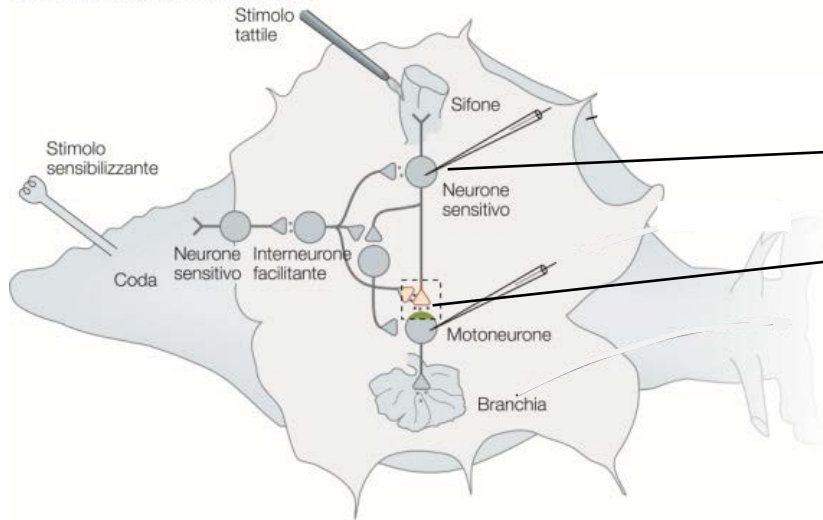
In Aplysia la stimolazione di interneuroni serotoninergici determina il fenomeno della sensibilizzazione del riflesso di retrazione delle branchie attraverso l'attivazione di una via in cui il cAMP agisce come messaggero intracellulare.



Kandel et al. *Principles of neural science*

# Inibizione del canale S del K<sup>+</sup> in *Aplysia*

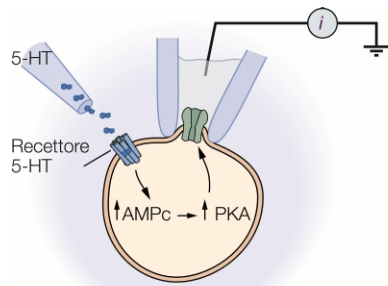
A Sensibilizzazione della branchia



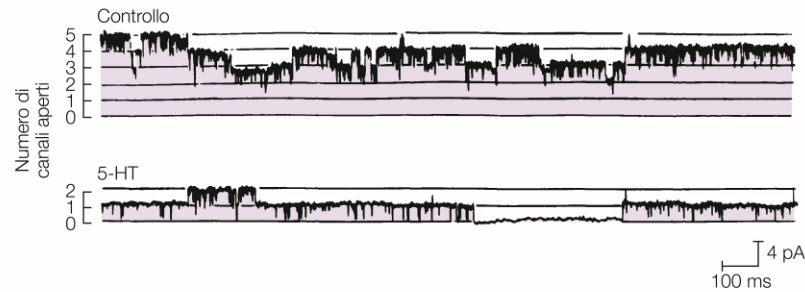
Impulsi test di corrente applicati durante la stimolazione del neurone serotoninergico mostrano che la depolarizzazione della membrana postsinaptica dovuta alla liberazione del NT è associata alla riduzione della conduttanza di membrana. Questa risposta si può spiegare con la riduzione della  $g_K$ : il  $V_m$  si sposta a valori meno negativi perché aumenta il peso relativo della  $g_{Na}$ .



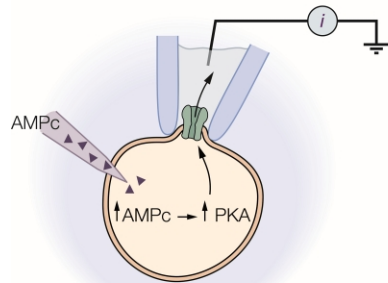
# Inibizione del canale S del K<sup>+</sup> in *Aplysia*



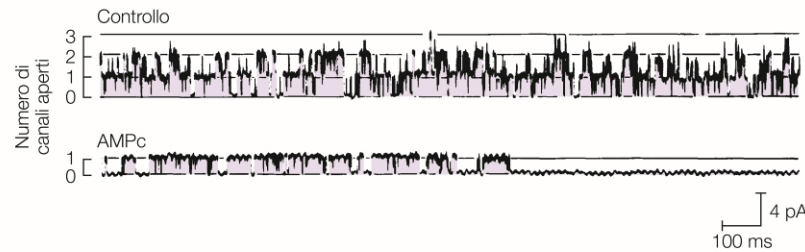
A Azione della 5-HT



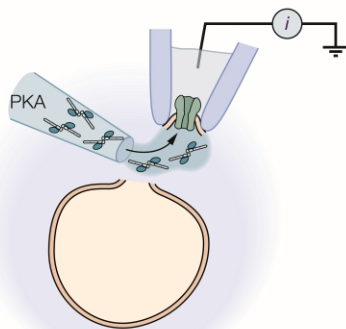
Sintesi di un messaggero intracellulare



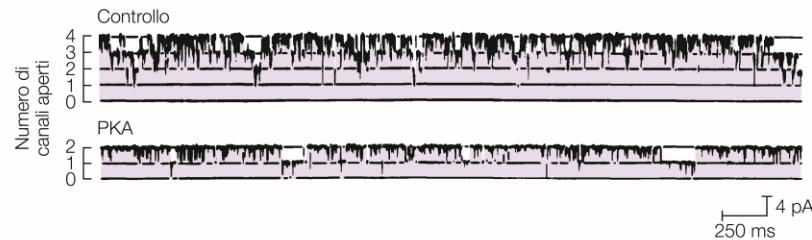
B Azione dell'AMPc



Il messaggero intracellulare è il cAMP



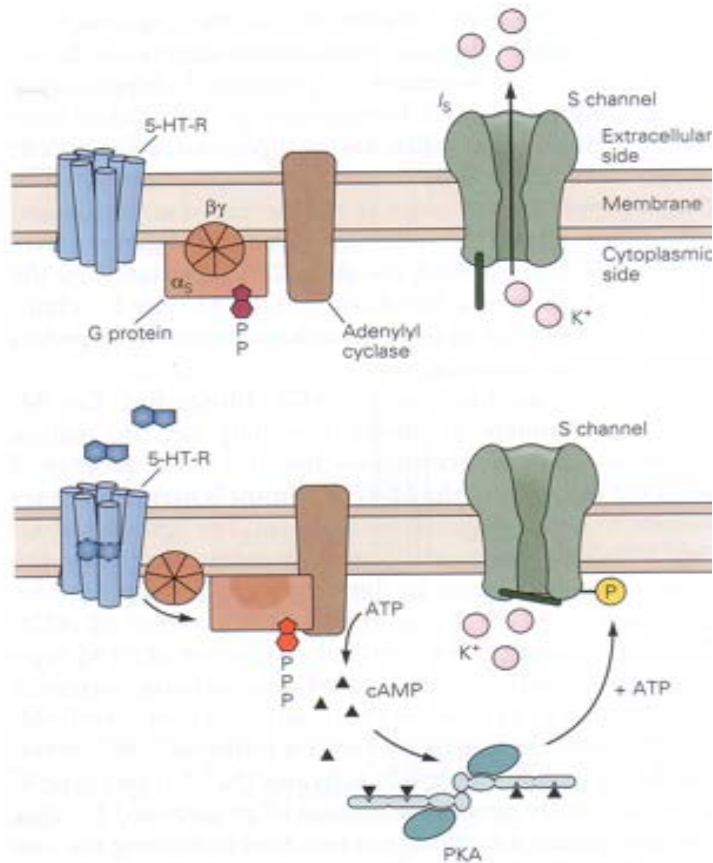
C Azione della PKA



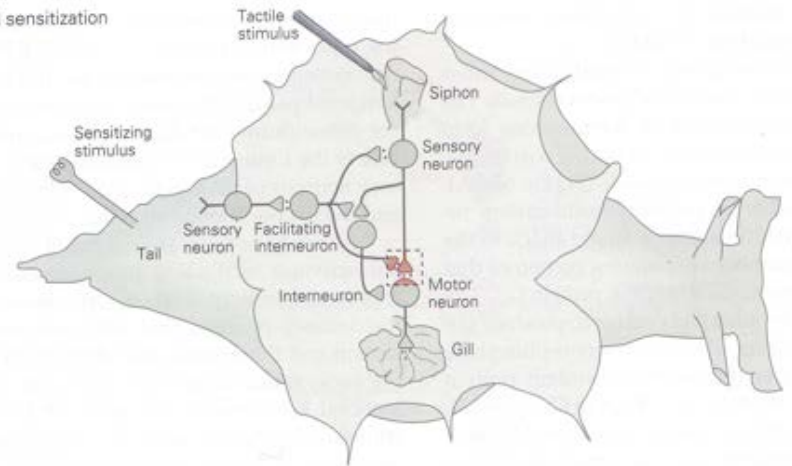
Il cAMP agisce attivando la PKA

Esperimenti di patch clamp in cui viene misurata l'attività dei canali del K<sup>+</sup> in risposta a: aggiunta di 5-HT al bagno (A); iniezione di cAMP nella cellula (B); applicazione di PKA purificata sulla superficie citoplasmatica della membrana (C) evidenziano la chiusura dei canali del K<sup>+</sup>

# Inibizione del canale S del K<sup>+</sup> in Aplysia



A Gill sensitization

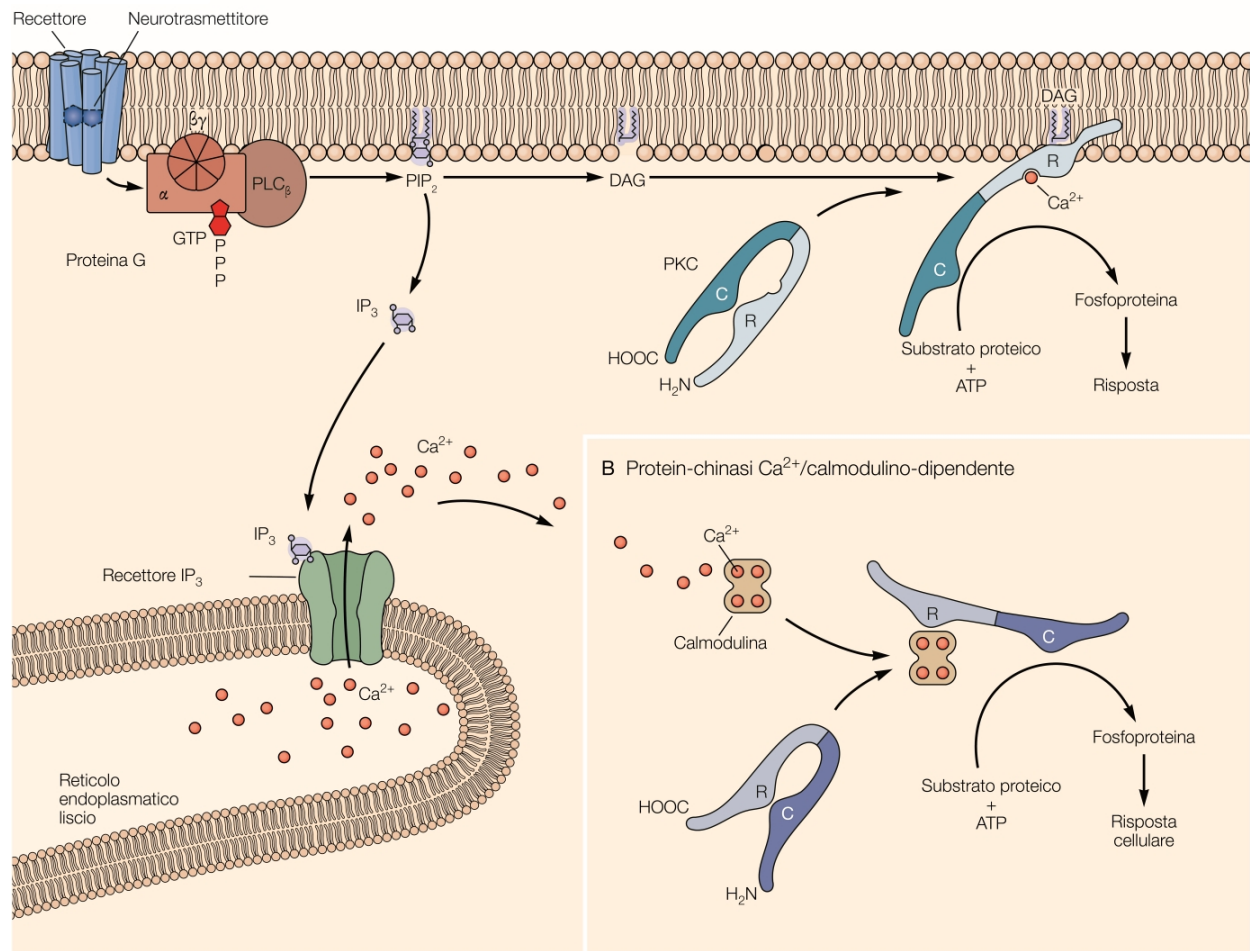


Il legame della serotonina (5-HT), liberata dalle terminazioni dell'interneurone facilitante, con i recettori specifici situati sul soma e sulla terminazione presinaptica del neurone sensoriale del sifone promuove l'aumento del livello intracellulare di cAMP, che attiva la PKA. La subunità catalitica della PKA fosforila il canale S del K<sup>+</sup> determinandone la chiusura.

A livello del soma questo provoca una depolarizzazione della membrana del neurone sensoriale che si somma a quella prodotta dallo stimolo tattile determinando una più elevata frequenza dei PdA. A livello della terminazione presinaptica del neurone sensoriale, la chiusura del canale S del K<sup>+</sup> si manifesta come una riduzione della corrente ripolarizzante di K<sup>+</sup>, che provoca una maggior durata del PdA con il conseguente aumento della corrente in ingresso del Ca<sup>2+</sup> che a sua volta determina l'aumento della liberazione del NT e quindi dell'ampiezza dell'EPSP.

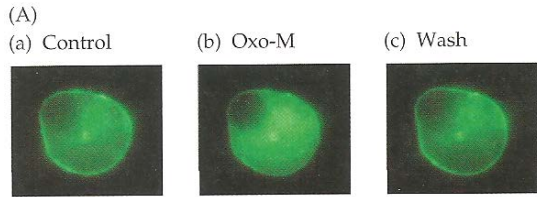
Attivazione della sintesi di secondi  
messaggeri intracellulari da parte della  
proteina G: **la via del DAG e dell'IP<sub>3</sub>**

# La via dell'IP<sub>3</sub> e DAG

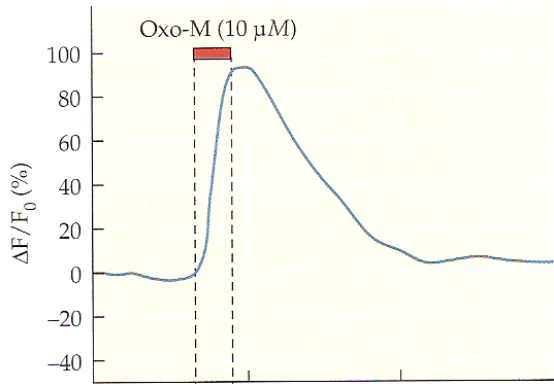


Il legame trasmettitore-recettore attiva una proteina G<sub>q</sub> che a sua volta attiva l'enzima fosfolipasi C che agisce sul fosfolipide di membrana fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) scindendolo in inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacil glicerolo (DAG). L'IP<sub>3</sub> diffonde nel citoplasma e promuove la liberazione di Ca<sup>2+</sup> dalle riserve intracellulari, il DAG rimane localizzato nella membrana e rende attivo, in presenza di Ca<sup>2+</sup>, l'enzima protein chinasi C (PKC) che fosforila le proteine bersaglio. Il Ca<sup>2+</sup> può agire anche su altri bersagli intracellulari, es. la chinasi Ca/calmodulina dipendente. Inoltre il PIP<sub>2</sub> è una molecola segnale e la sua idrolisi ha conseguenze funzionali nella cellula.

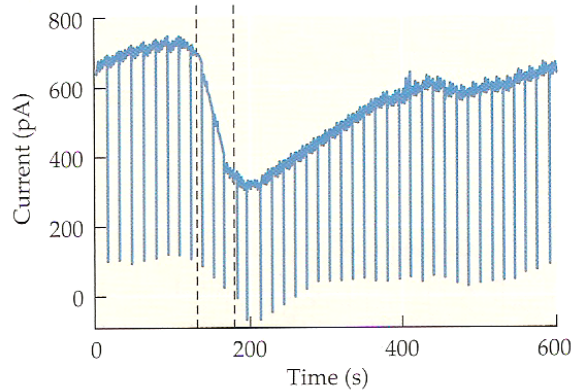
# Azione diretta del PIP<sub>2</sub>: modulazione dei canali M del K<sup>+</sup>



(B) Cytoplasmic fluorescence



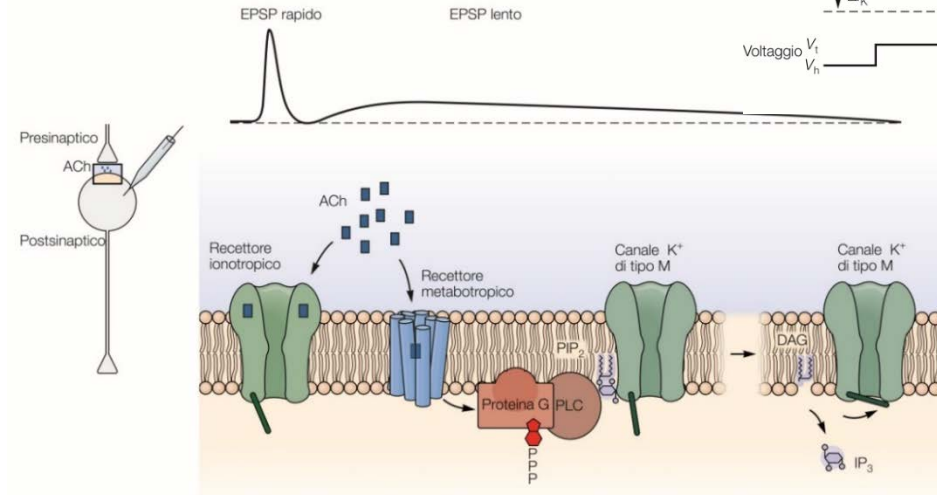
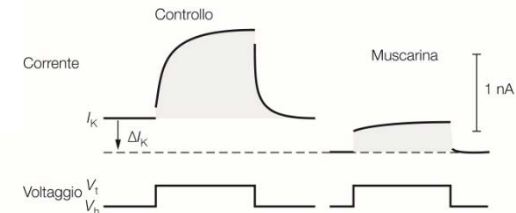
(C) Membrane current



Nicholls et al. *From neuron to brain*

$V_m$  bloccato a  $-60$  mV: nel **controllo** il gradino a  $-30$  mV determina una corrente di K<sup>+</sup> in uscita, in presenza di **muscarina** la corrente durante il gradino è ridotta e si osserva anche una riduzione della corrente necessaria a mantenere  $V_m$  al potenziale di blocco di  $-60$  mV.

Effetto della muscarina sulla corrente K<sup>+</sup> di tipo M



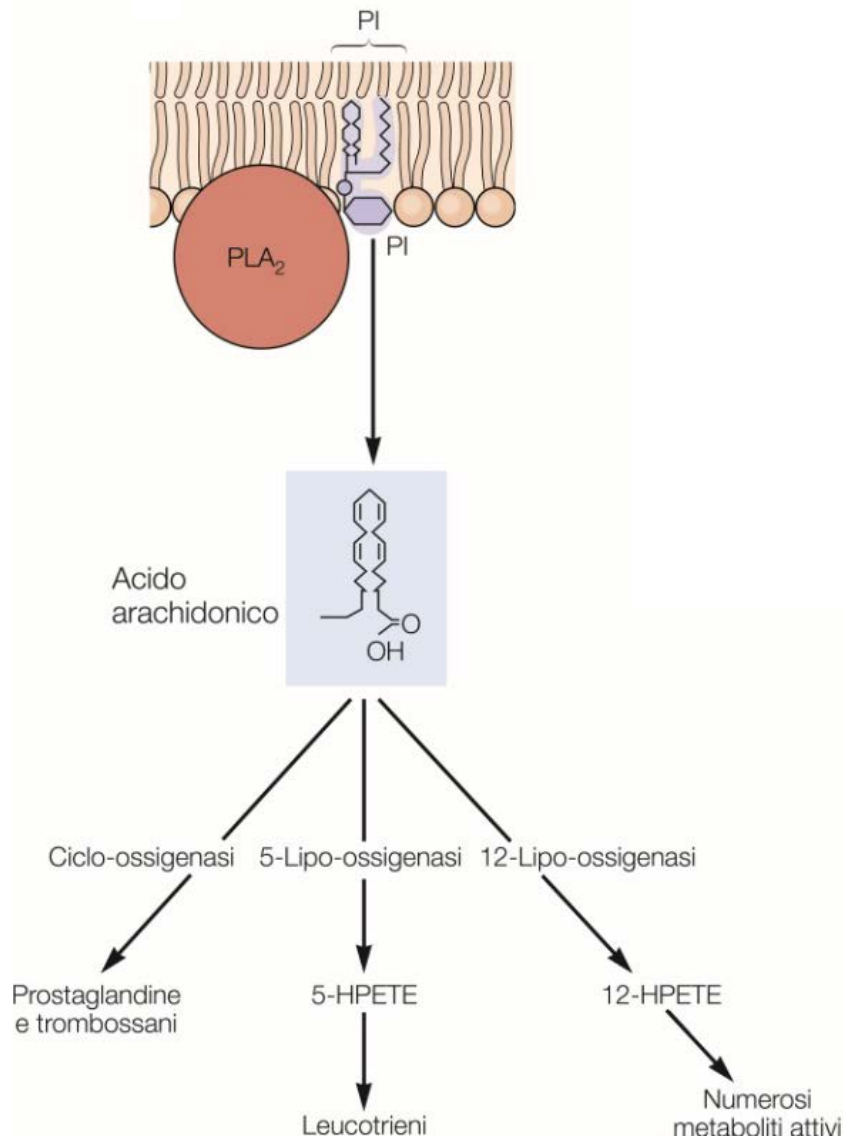
Il PIP<sub>2</sub> modula il canale M del K<sup>+</sup> implicato nel controllo dell'eccitabilità dei neuroni centrali e periferici. La stimolazione muscarinica determina la chiusura del canale M attraverso l'attivazione della fosfolipasi C e la conseguente idrolisi del PIP<sub>2</sub>.

L'uso di una sonda fluorescente mette in evidenza il PIP<sub>2</sub> legato alla membrana a riposo (A,a). In A,b l'aggiunta di un agonista muscarinico (Oxo-M) promuove l'idrolisi del PIP<sub>2</sub>, con conseguente riduzione della fluorescenza nella membrana e aumento di quella citoplasmatica (A,b). Dopo rimozione di Oxo-M il PIP<sub>2</sub> è risintetizzato e la fluorescenza di membrana ricompare (A,c).

L'andamento temporale dell'inibizione della corrente in uscita dai canali M del K<sup>+</sup> dopo trattamento con Oxo-M (C) è sovrapponibile a quello dell'aumento della fluorescenza nel citosol (B) (parallelo alla diminuzione della fluorescenza nella membrana). La risposta a impulsi iperpolarizzanti di ampiezza costante mostra la riduzione di conduttanza della membrana associata alla riduzione della corrente M.

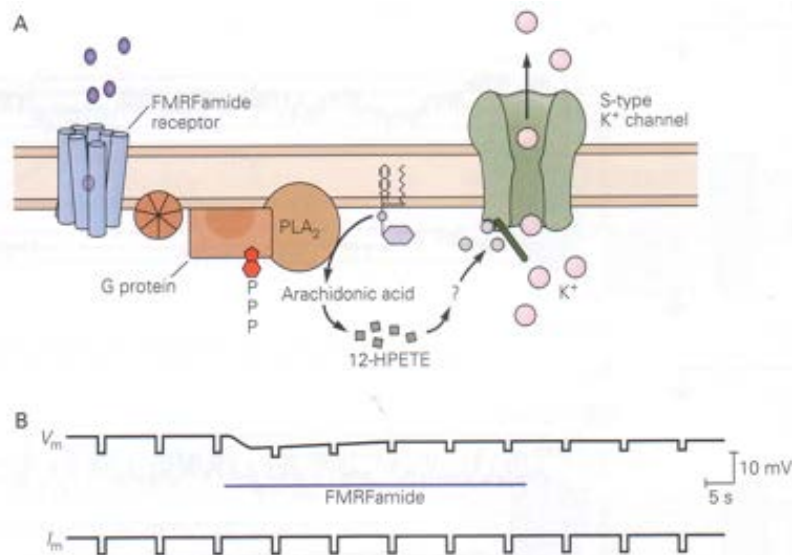
**Messaggeri intracellulari che sono anche  
messaggeri retrogradi**

# La via dell'acido arachidonico

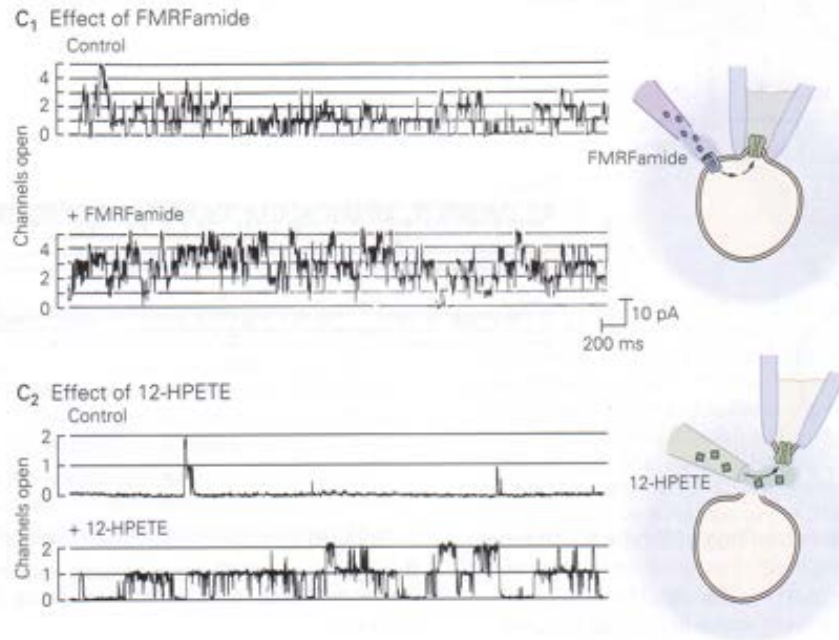


La proteina G attiva un enzima di membrana, la **fosfolipasi A<sub>2</sub>** (PLA<sub>2</sub>), che catalizza la formazione di **acido arachidonico** a partire da fosfatidilinositolo (PI). L'acido arachidonico subisce le trasformazioni indicate nella figura che portano alla sintesi di **eicosanoidi**, molecole a 20 atomi di C, liposolubili e perciò diffusibili attraverso le membrane, che possono esercitare il loro effetto biologico all'interno della cellula o su cellule vicine, neuroni presinaptici inclusi. Diversi neuromodulatori (glutammato, serotonina, istamina, bradichinina) possono stimolare la formazione di acido arachidonico.

# Modulazione del canale S del K<sup>+</sup> in Aplysia



La probabilità di apertura del canale S del K<sup>+</sup> in Aplysia aumenta per l'azione del neuropeptide Phe-Met-Arg-Phe-amide (FMRFamide) che promuove la sintesi di acido 12-idroperossieicosatetraenoico (12-HPETE) attraverso l'attivazione della via dell'acido arachidonico e della lipossigenasi. La **somatostatina** ha un effetto analogo a quello della FMRFamide nell'ippocampo di mammifero, dove promuove l'**apertura dei canali M del K<sup>+</sup>**.

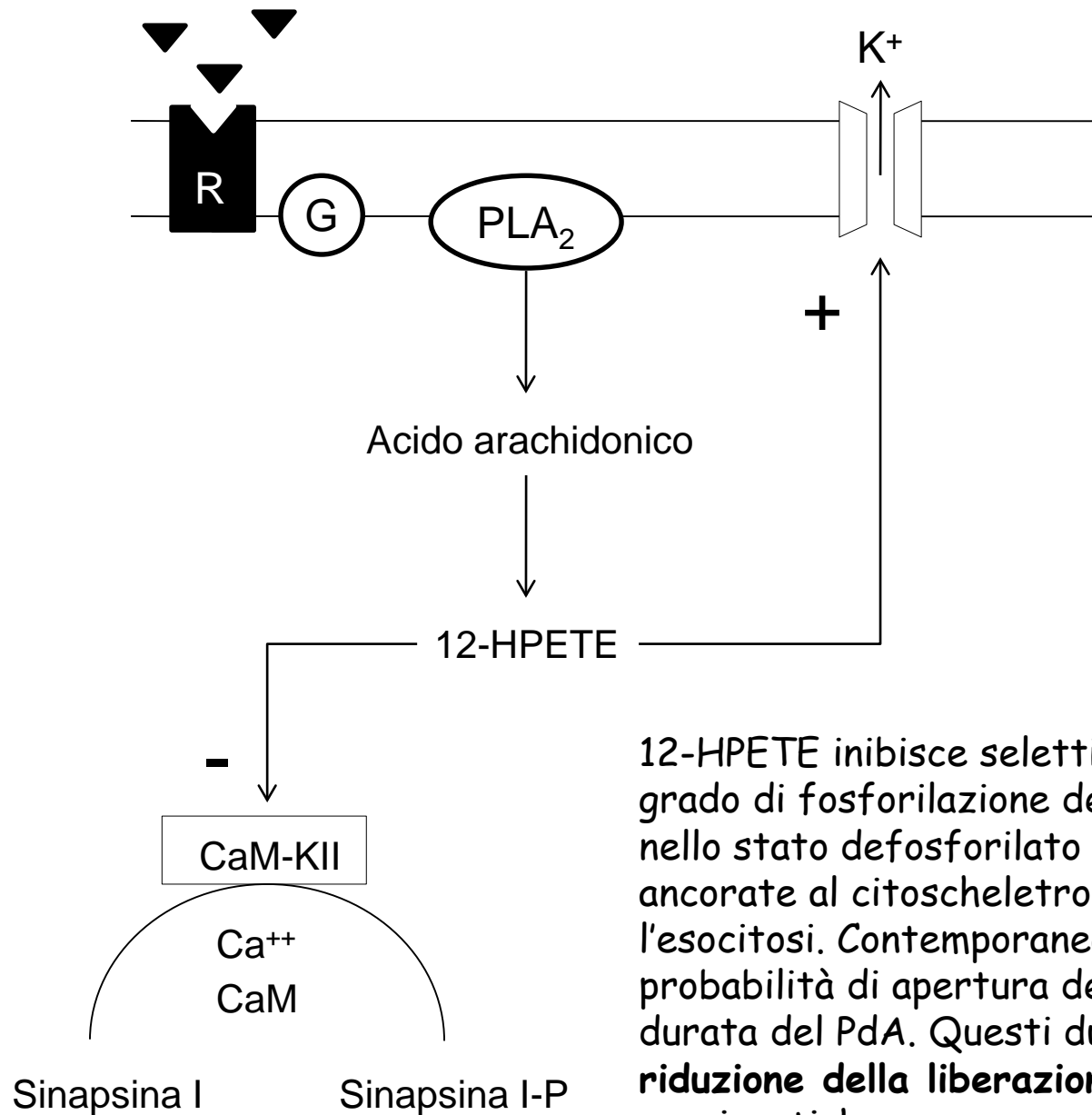


Sintesi di un messaggero intracellulare

Il messaggero intracellulare è il 12 HPETE



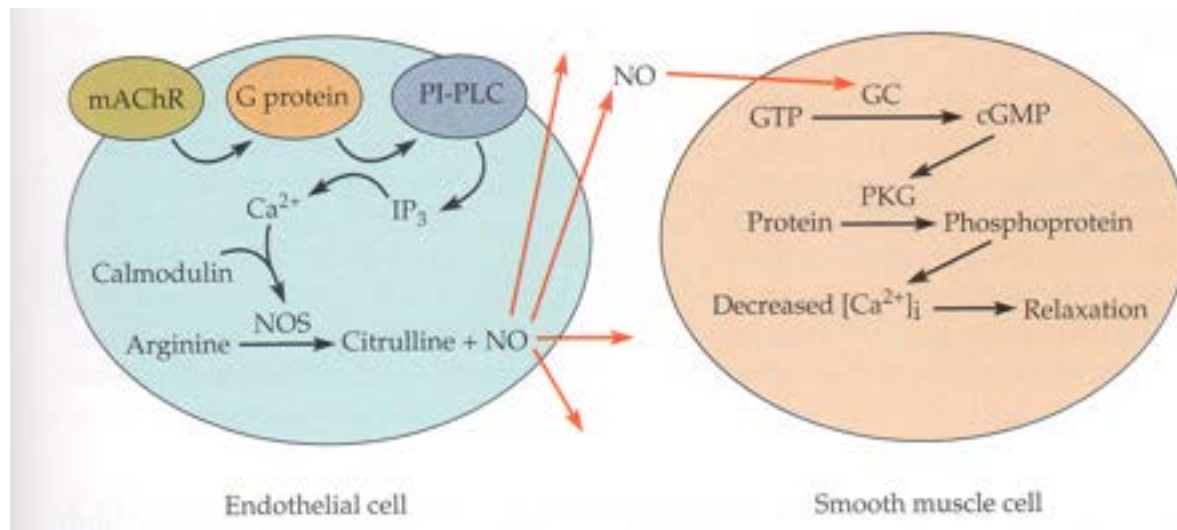
## Inibizione presinaptica mediata da secondo messaggero



12-HPETE inibisce selettivamente la CaM-KII riducendo il grado di fosforilazione della sinapsina I. Questa proteina nello stato defosforilato mantiene le vescicole sinaptiche ancorate al citoscheletro limitandone la disponibilità per l'esocitosi. Contemporaneamente il 12-HPETE aumenta la probabilità di apertura dei canali del K<sup>+</sup> riducendo la durata del PdA. Questi due effetti concorrono alla **riduzione della liberazione del NT** dalle terminazioni presinaptiche.

## Secondi messaggeri gassosi: NO

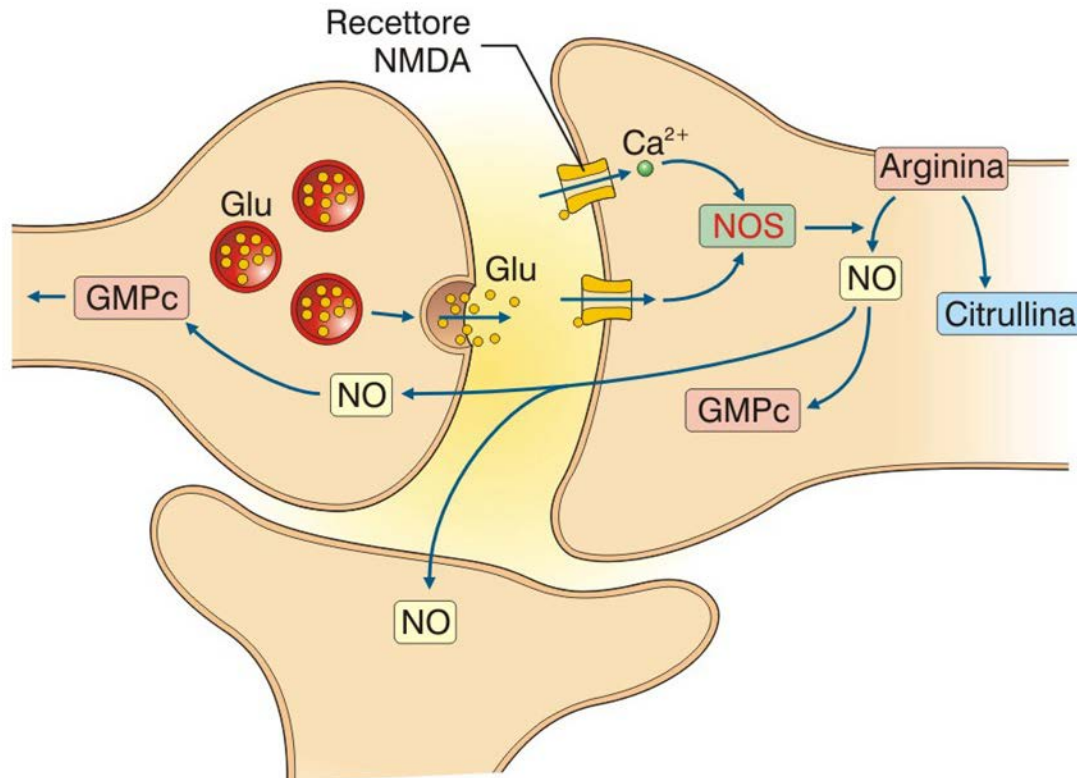
L'NO è formato dalla conversione di arginina in citrullina da parte dell'enzima Ca-CAM dipendente **sintasi del monossido di azoto** (o NO-sintasi, NOS), che è attivato dall'aumento della  $[Ca^{2+}]_i$ . Il bersaglio principale dell'NO è la guanosil-ciclastasi solubile che catalizza la sintesi di cGMP. L'azione dell'NO è stata messa in evidenza per la prima volta a livello delle cellule endoteliali dove media la vasodilatazione indotta dall'ACh.



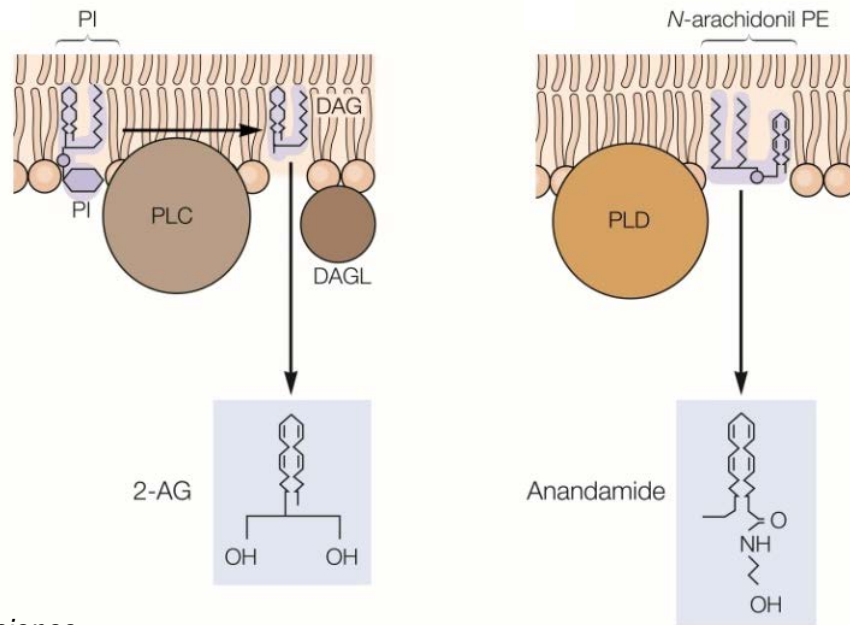
**FIGURE 10.15 Paracrine Signaling by Release of Nitric Oxide.** ACh binds to muscarinic receptors (mAChR) on vascular endothelial cells, activating phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC). PI-PLC forms inositol trisphosphate (IP<sub>3</sub>), which releases calcium from intracellular stores. Calcium, together with calmodulin, activates nitric oxide synthase (NOS), producing nitric oxide (NO). NO diffuses into neighboring smooth muscle cells and stimulates guanylyl cyclase (GC), increasing cGMP. Cyclic GMP activates cGMP-dependent protein kinase (PKG). The resulting increases in protein phosphorylation lead to a decrease in intracellular calcium concentration, causing relaxation. NO is rapidly degraded, so that it affects only nearby cells—hence the term “paracrine.”

## Secondi messaggeri gassosi: NO

In molti neuroni la NOS è localizzata in associazione con i recettori NMDA del glutammato. L'attivazione dei canali NMDA promuove l'aumento della  $[Ca^{2+}]_i$  e la sintesi di NO che non solo esercita la sua azione all'interno della cellula postsinaptica ma agisce anche come un **neurotrasmettitore retrogrado** diffondendo verso la cellula presinaptica, nella quale può modulare la liberazione di NT, e verso i neuroni vicini. E' stato stimato che il raggio d'azione dell'NO nel parenchima cerebrale è tra 0.1 e 0.5 mm nell'arco di una vita media dell'ordine di 5-15 s.



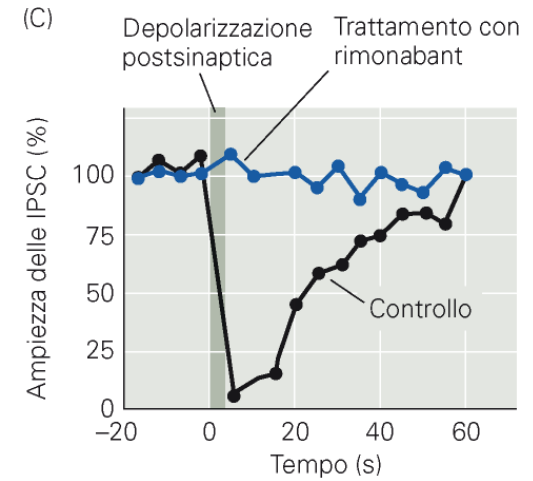
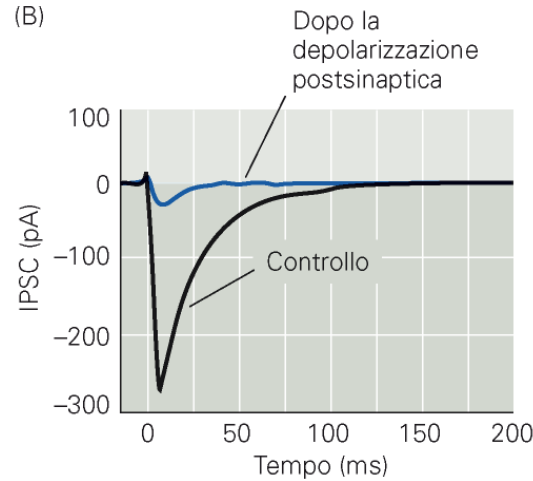
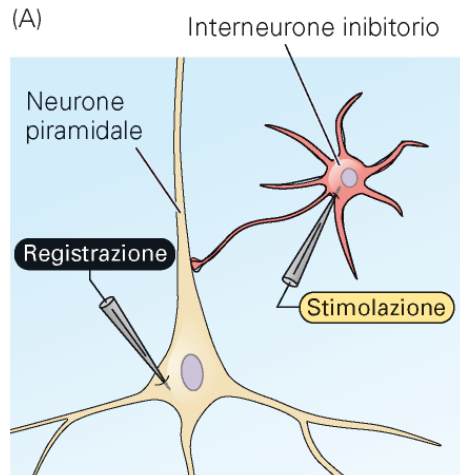
# Segnalazione retrograda mediata da endocannabinoidi



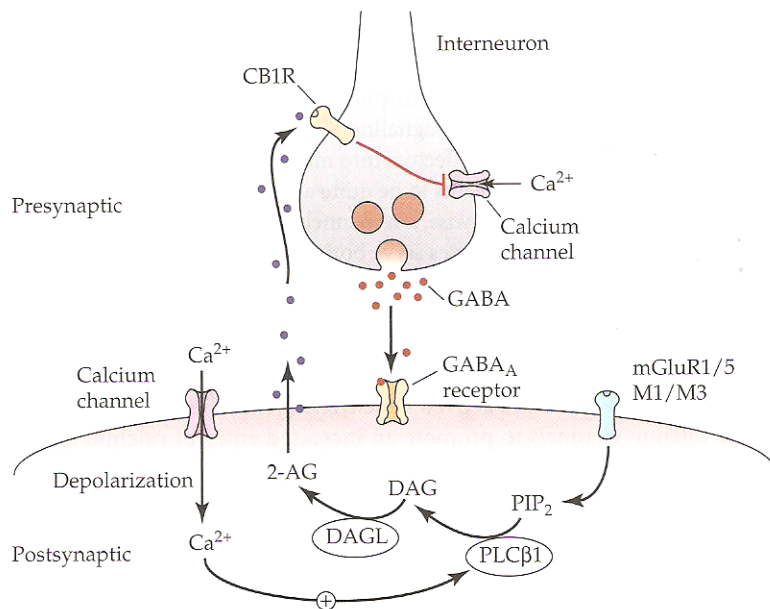
Kandel et al. *Principles of neural science*

Gli endocannabinoidi sono molecole endogene che interagiscono con i recettori dei cannabinoidi (CBR), il bersaglio molecolare del componente psicoattivo della Cannabis, il  $\Delta^9$ -tetraidrocannabinolo. Nelle cellule nervose gli endocannabinoidi si formano per l'attivazione  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente delle **fosfolipasi C** o **D** che catalizzano rispettivamente la formazione di **2-arachidonilglicerolo (2-AG)** e **anandamide** a partire dai fosfolipidi di membrana (PLC catalizza la formazione di DAG su cui agisce la DAG lipasi, PLD agisce su arachidonil fosfatidil etanolamina). La sintesi degli endocannabinoidi è promossa da tutti i processi che portano ad un aumento della  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , come per esempio attivazione della via dei fosfoinositidi con sintesi di  $\text{IP}_3$  e rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  dall'ER o apertura dei canali  $\text{VOC}$  del  $\text{Ca}^{2+}$  in seguito a depolarizzazione della membrana. Anandamide e 2AG sono molecole liposolubili che diffondono attraverso la membrana cellulare e interagiscono con i recettori dei cannabinoidi sulle cellule circostanti.

# Segnalazione retrograda mediata da endocannabinoidi



Purves et al. *Neuroscienze*.



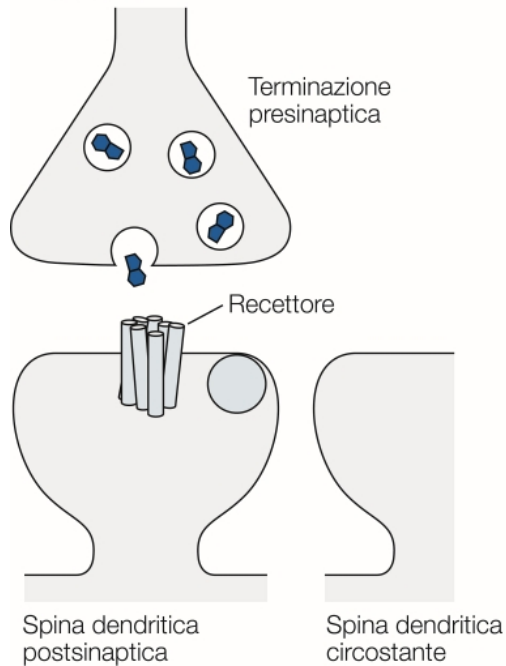
La funzione meglio documentata degli endocannabinoidi è quella di segnale retrogrado che regola il rilascio di GABA a livello delle terminazioni inibitorie in alcuni neuroni dell'ippocampo e del cervelletto.

La depolarizzazione della membrana postsinaptica riduce la IPSC attraverso la riduzione della quantità di GABA rilasciato dalla terminazione presinaptica. Questo effetto è assente dopo trattamento con un antagonista degli endocannabinoidi.

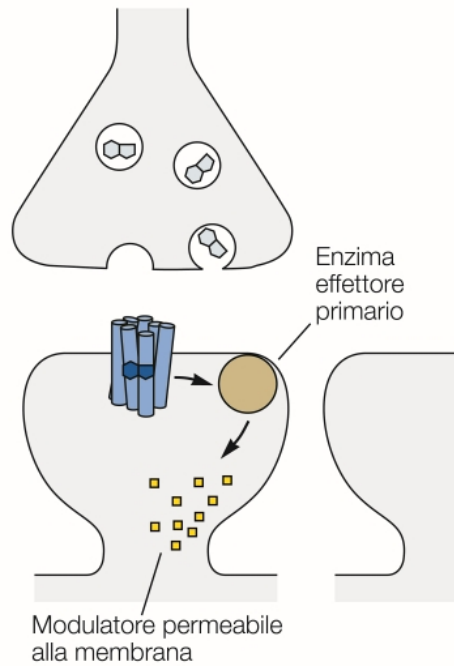
Il meccanismo molecolare alla base di questa risposta è l'attivazione Ca-dipendente della PLC che porta alla sintesi di 2-AG. Il 2-AG retrodiffonde nello spazio sinaptico e interagisce con i CBR presenti sulla membrana sinaptica. Si ritiene che i CBR siano associati ad una proteina G<sub>o</sub> che attraverso il dimero βγ determina la chiusura dei canali N del Ca<sup>2+</sup>

# Schema riassuntivo della trasmissione transcellulare dei segnali

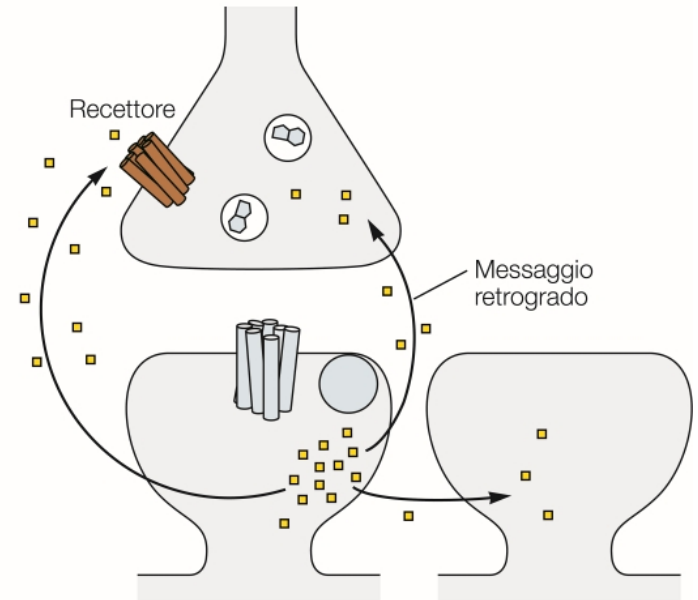
A Liberazione di un neurotrasmettitore chimico



B Reazione enzimatica



C Trasmissione transcellulare di messaggi



Kandel et al. *Principles of neural science*

Il messaggero intracellulare, sintetizzato nella spina dendritica in risposta alla liberazione del neurotrasmettitore dalla terminazione presinaptica, è una sostanza liposolubile che permea la membrana della spina e diffonde sia verso la terminazione presinaptica (messaggero retrogrado) che verso le spine adiacenti. Si verifica quindi una situazione in cui l'informazione viene trasmessa non solo dalla cellula postsinaptica alla cellula presinaptica ma anche alle cellule vicine.

