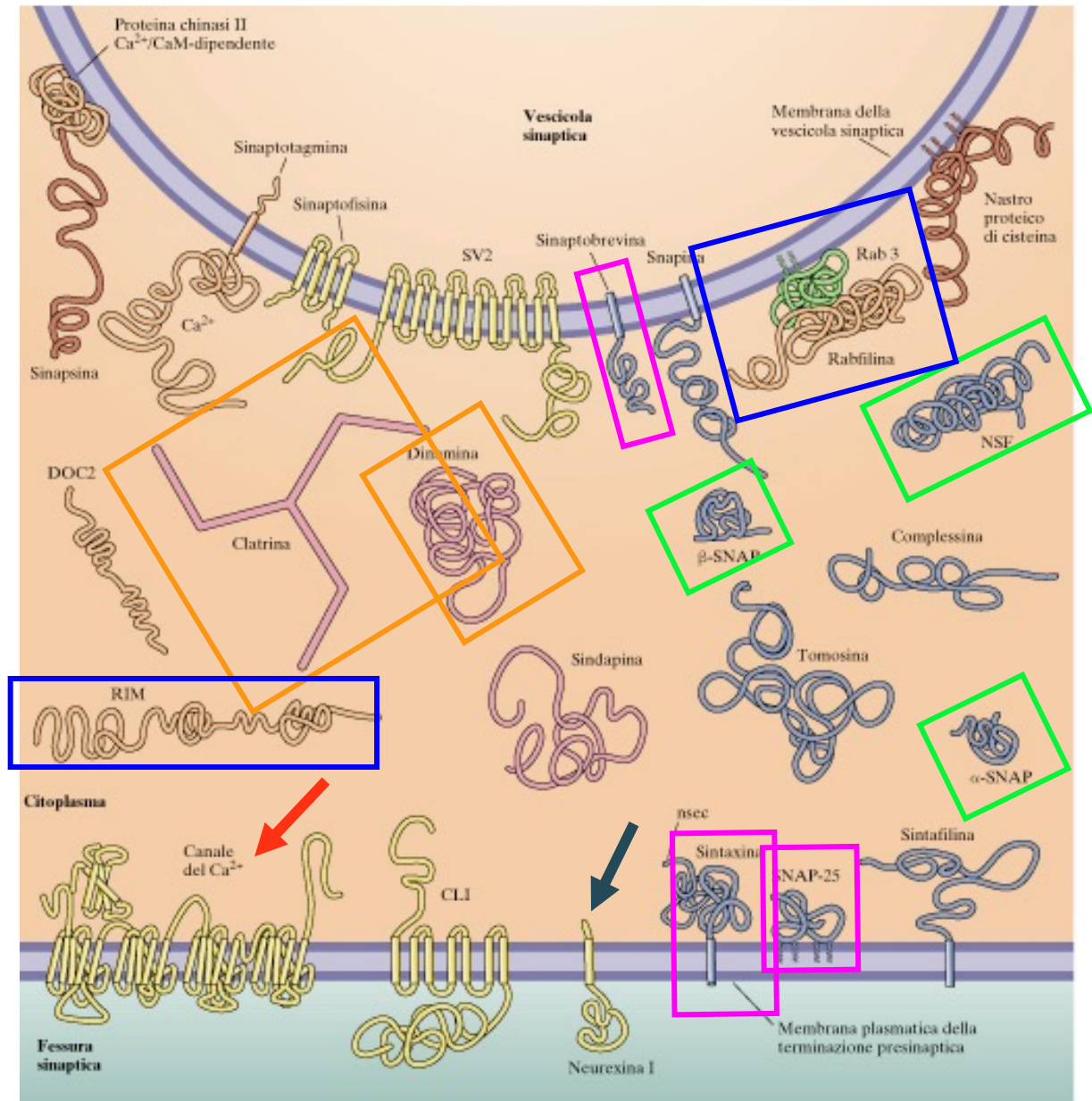


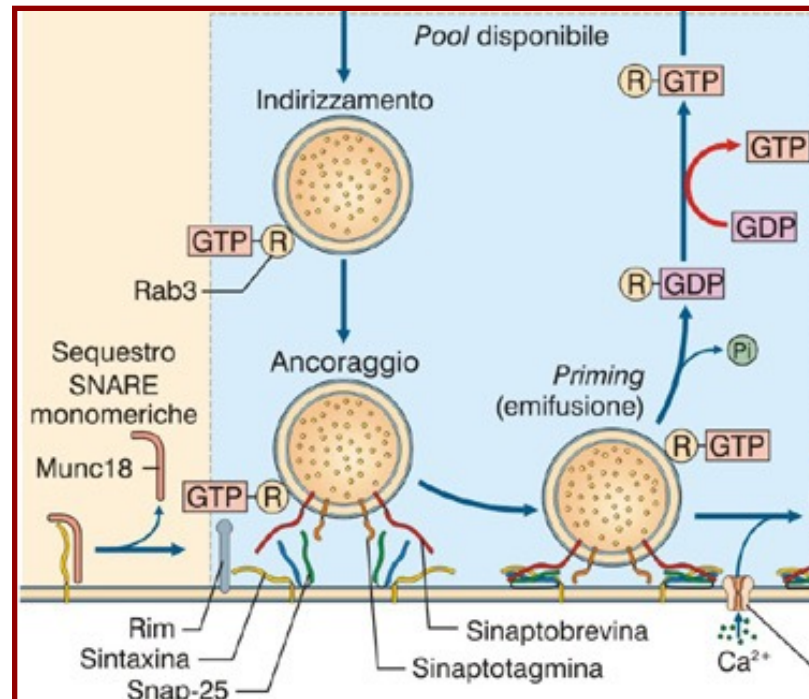
SNARE: SNAP-receptors (v-SNARE e t-SNARE)

NSF: Fattore sensibile alla N-ethylmaleimide

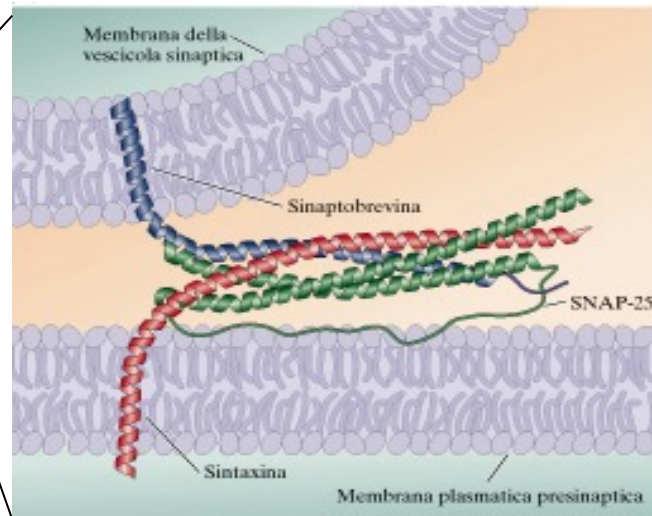
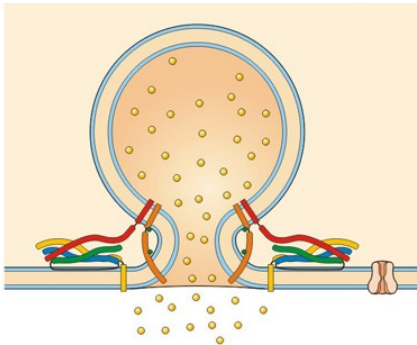
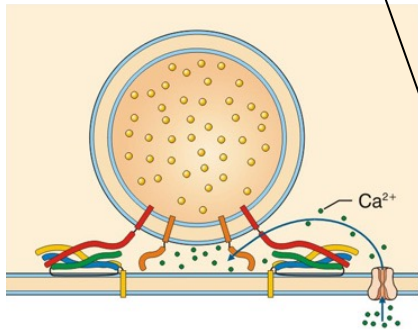
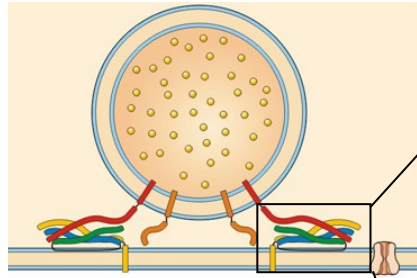
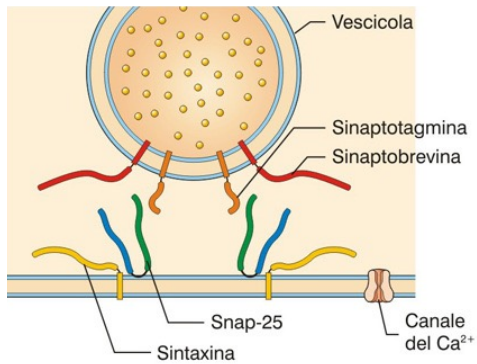
SNAP: proteine solubili di attacco a NSF



Fase I: ancoraggio e *priming*

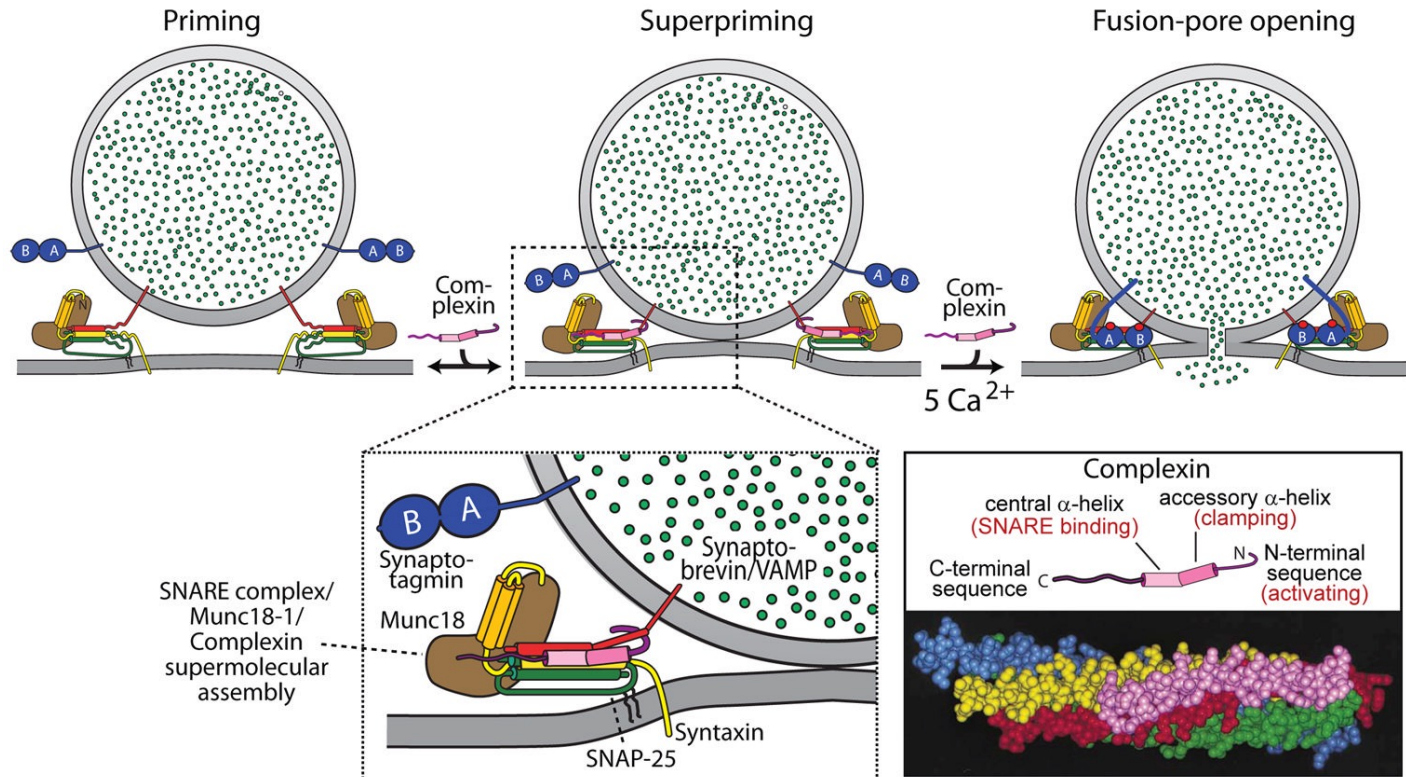


Fase II: Rilascio del neurotrasmettitore. v-SNARE e t-SNARE:



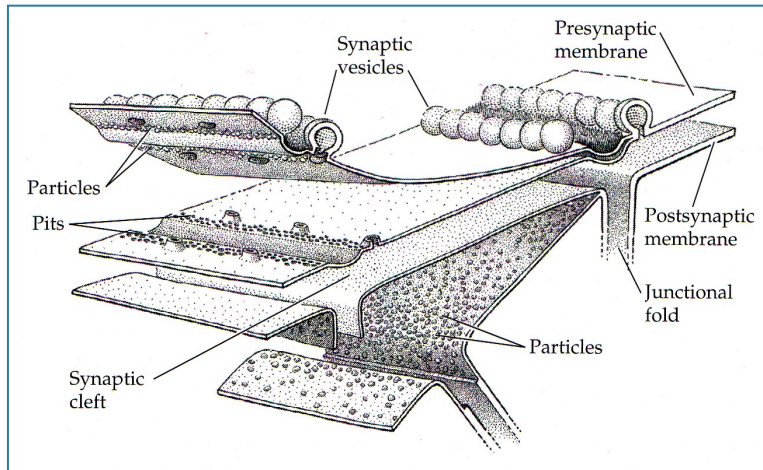
Complexine: un nuovo membro del complesso SNARE

Sudhof, Schekman e Rothman, premio Nobel per la Fisiologia e Medicina 2013 per le loro scoperte sul macchinario che regola il traffico vescicolare

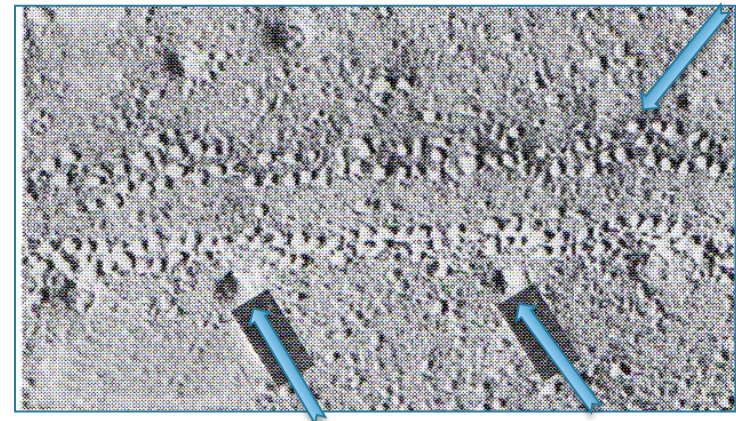


- Piccole proteine solubili (120 residui amminoacidici)
- Altamente conservate durante l'evoluzione
- Dominio centrale di 20 residui che si inserisce nel complesso Sinatobrevina – Sintaxina
- Si può legare al complesso SNARE solo dopo che sia assemblato al 50%
- 4 isoforme; due nel cervello e resto dell'organismo e due specifiche della retina
- Topi KO per le complexine sviluppano un fenotipo simile a quelli KO per la Sinaptotagmina: Riduzione del rilascio sincrono di neurotrasmettitore

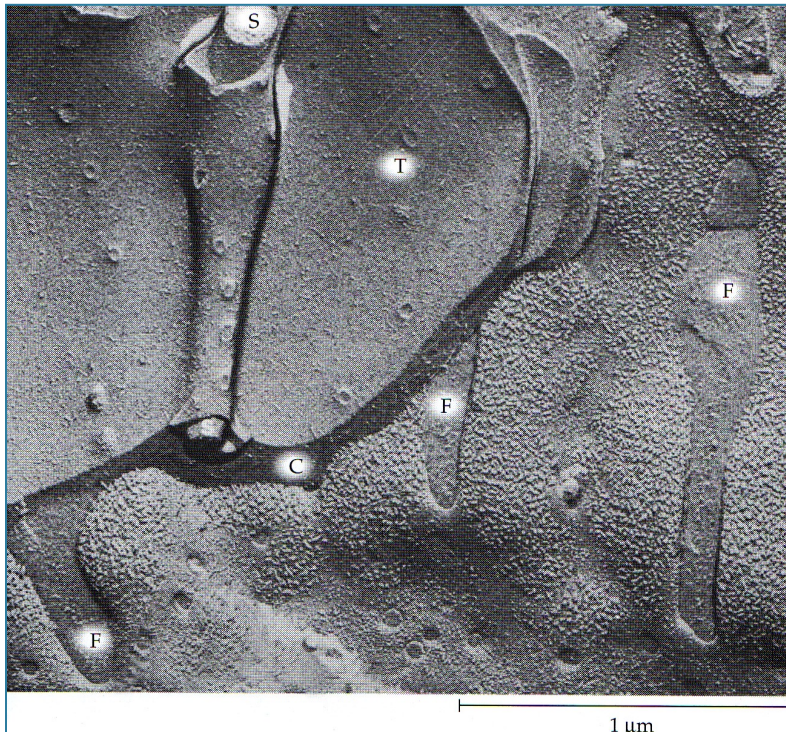
Il rilascio del neurotrasmettitore avviene per esocitosi



Vescicole stabilizzate ai siti attivi

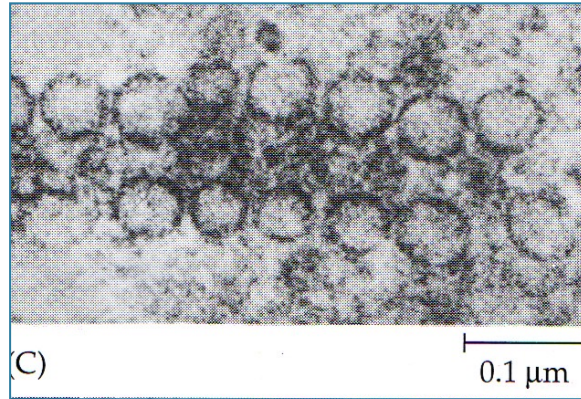


Vescicole Esocitate

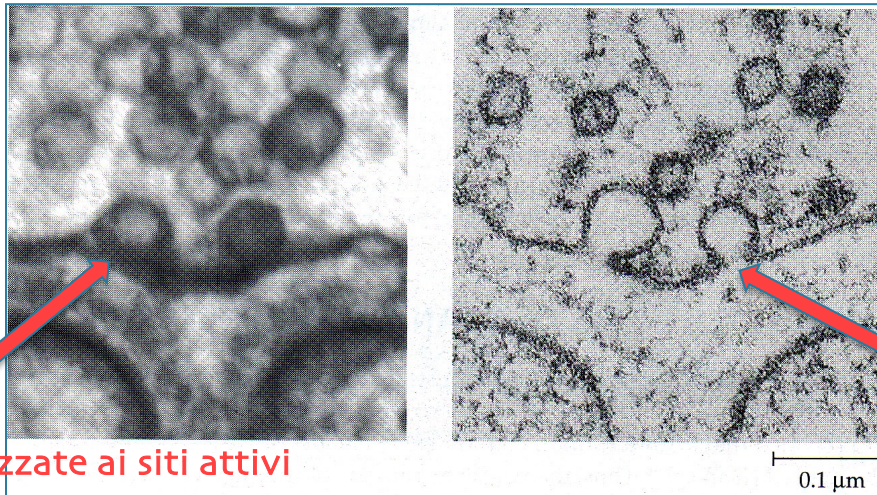


Microscopia elettronica a scansione dopo stimolazione presinaptica (anche in presenza di 4-aminopiridina) e congelamento rapido

Il rilascio del neurotrasmettitore avviene per esocitosi



Vescicole stabilizzate ai siti attivi

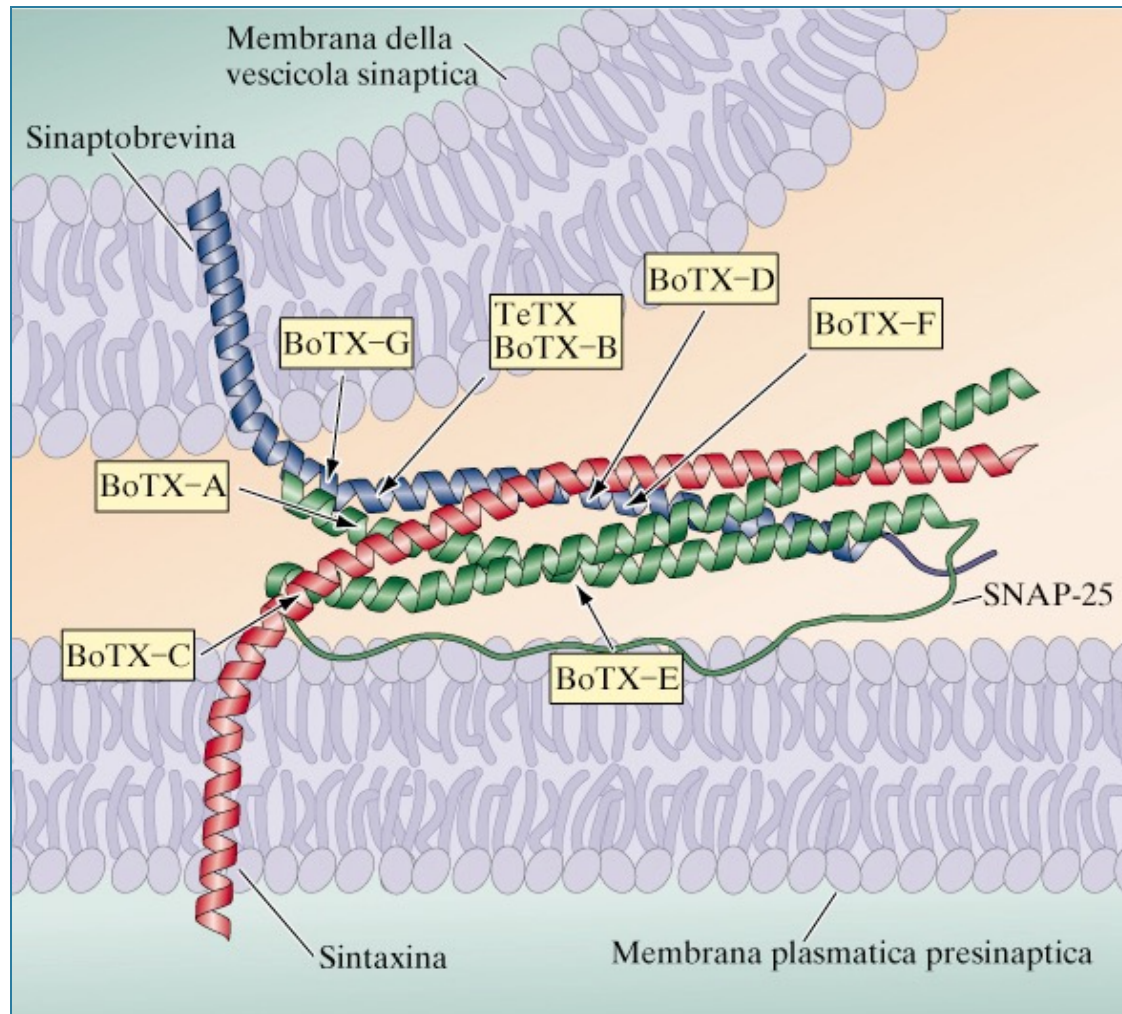


Vescicole stabilizzate ai siti attivi

Esocitosi: strutture omega

Immagini in microscopia
elettronica a trasmissione

Tossine che interferiscono con il rilascio del neurotrasmettitore



Tossina tetanica e Tossine botuliniche inducono blocco del rilascio del neurotrasmettitore

Tossina tetanica: nota già ai tempi di Ippocrate causare paralisi per contrazione eccessiva dei muscoli scheletrici (**tetanos** in greco significa **contrazione**)
Prodotta dal batterio *Clostridium tetani*, un batterio anaerobico (germina nelle ferite, abrasioni, anche causate da piercing e tatuaggi).

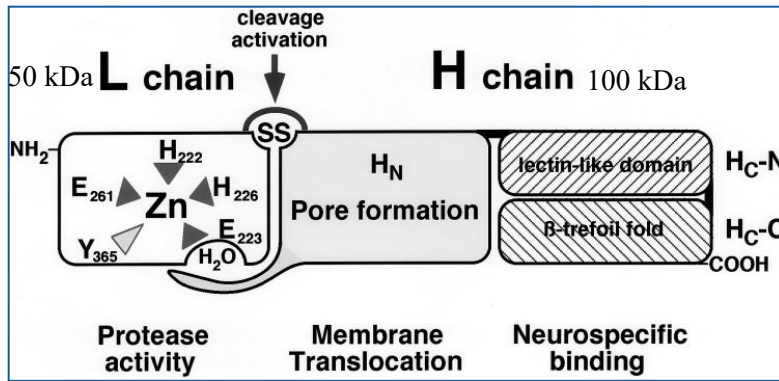
La tossina è rilasciata a seguito della autolisi del batterio

Tossina botulinica: di scoperta molto più recente (circa 25 anni fa). Prodotta dal *Clostridium botulinum*, causa flaccidità muscolare, che inizia a livello oculare e alla gola, per poi estendersi ai muscoli scheletrici.

Il botulismo è causata dall'intossicazione con una delle sette tossine botuliniche (A-G).
Le spore hanno differente tossicità e germinano in varie condizioni.

Via di intossicazione preferenziale è attraverso l'assunzione di cibo contaminato.

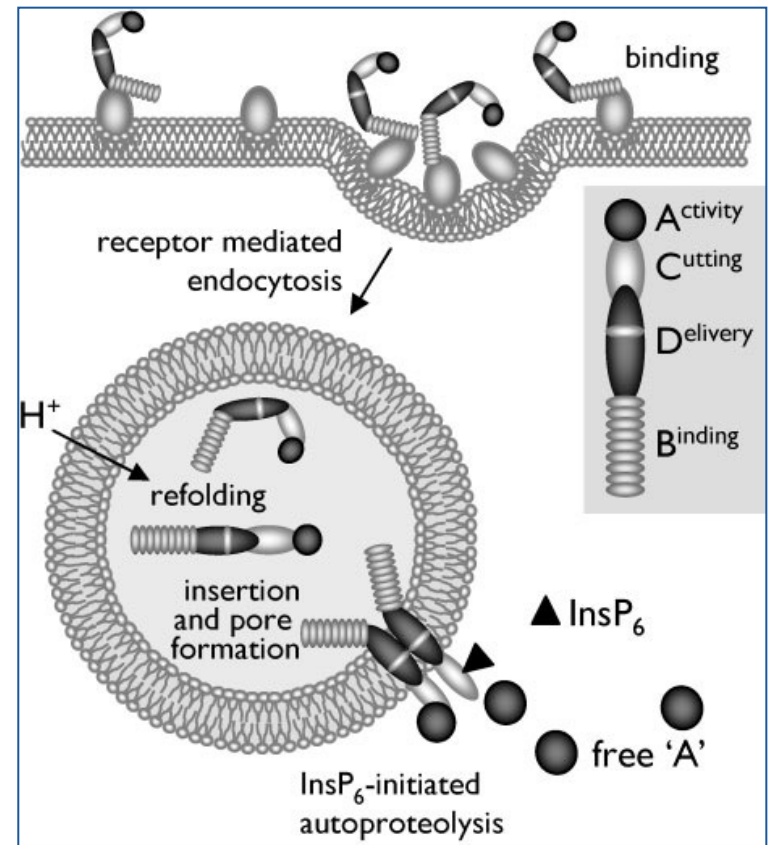
Tossina tetanica



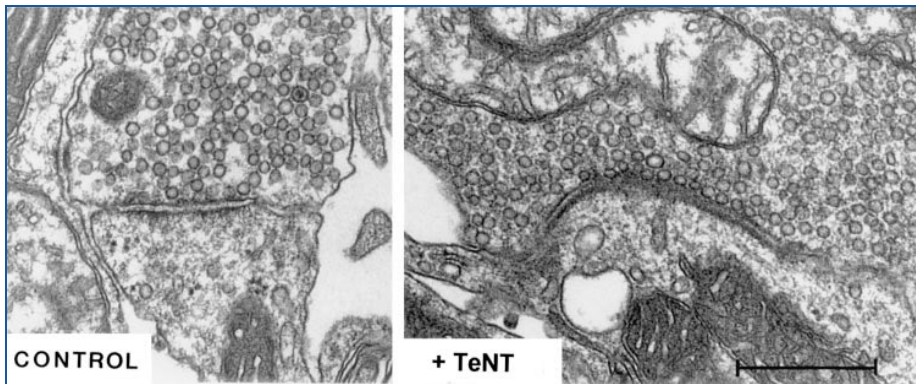
Schiavo et al., 2000, *Physiol Rev*

Traslocazione

Legame con la membrana plasmatica neuronale

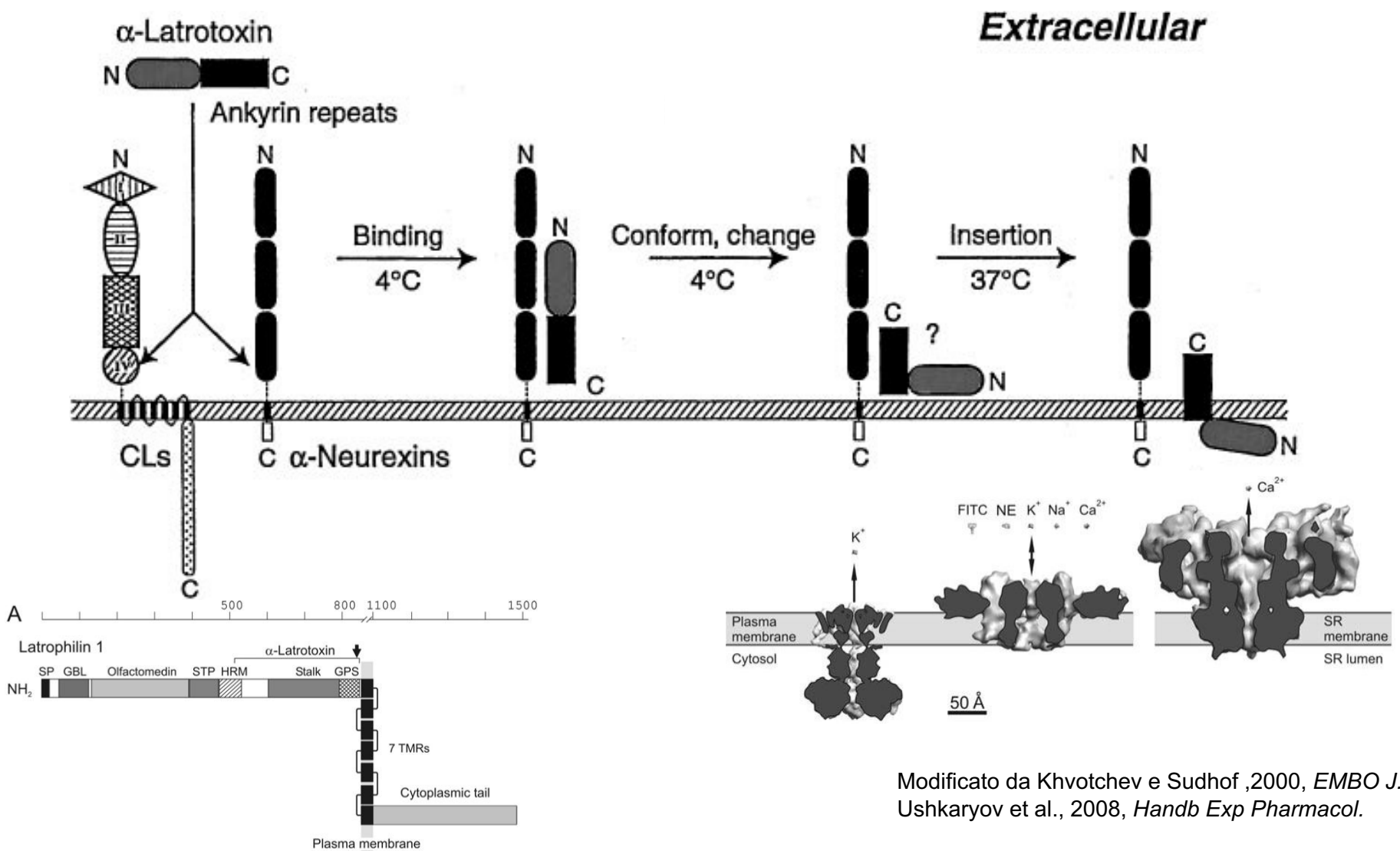


Giesemann et al., 2008, *J Med Microbiol*



- Temperatura ed energia dipendente
- Associato alle vescicole sinaptiche
- Entrata è favorita in terminali con elevata attività
- demolire l'apparato proteico preposto alla secrezione del GABA e della Glicina, neurotrasmettitori che inibiscono la contrazione muscolare

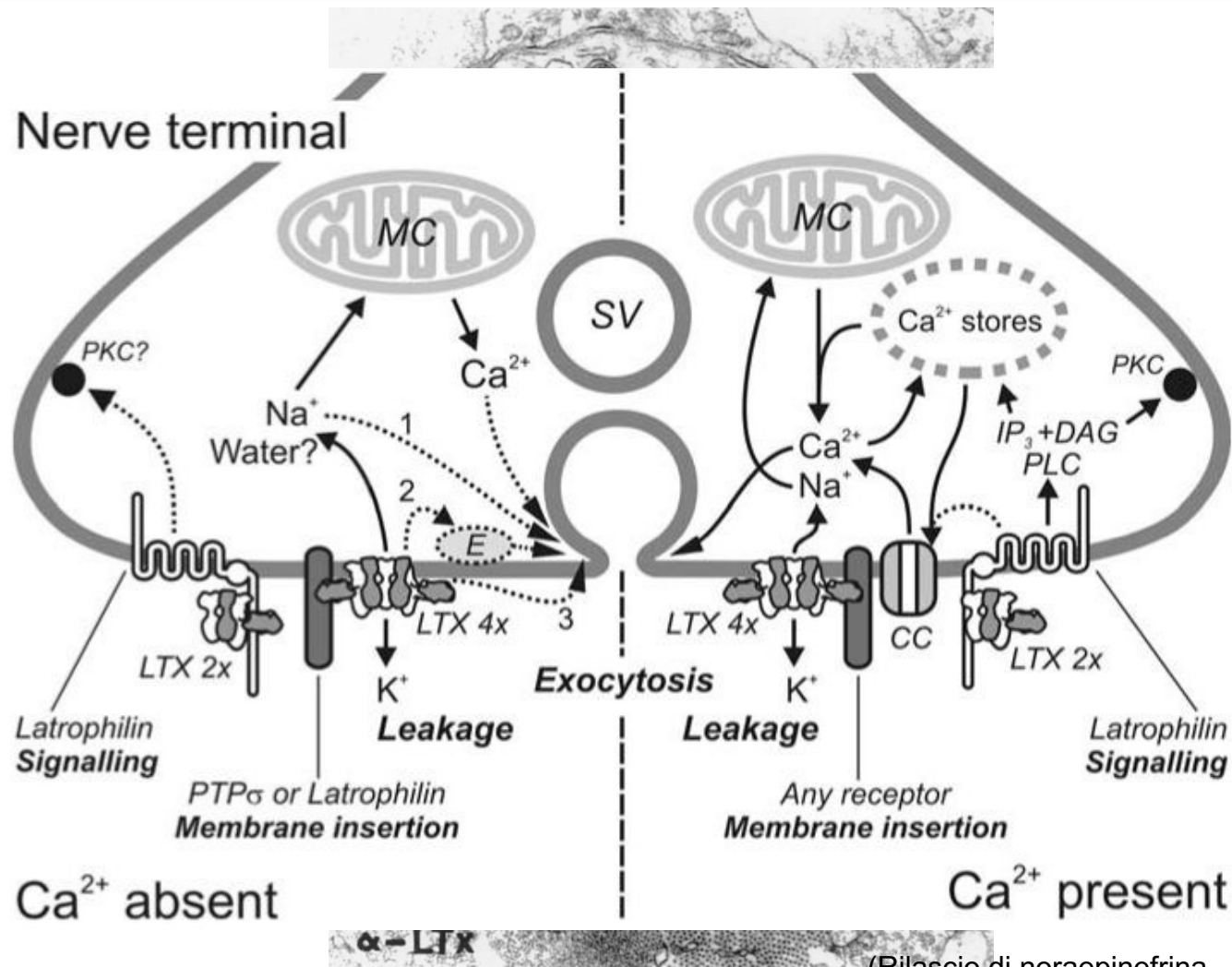
Un'altra tossina che interferisce con il rilascio del neurotrasmettitore: l' α -latrotossina



Modificato da Khvotchev e Sudhof, 2000, *EMBO J.*
Ushkaryov et al., 2008, *Handb Exp Pharmacol.*

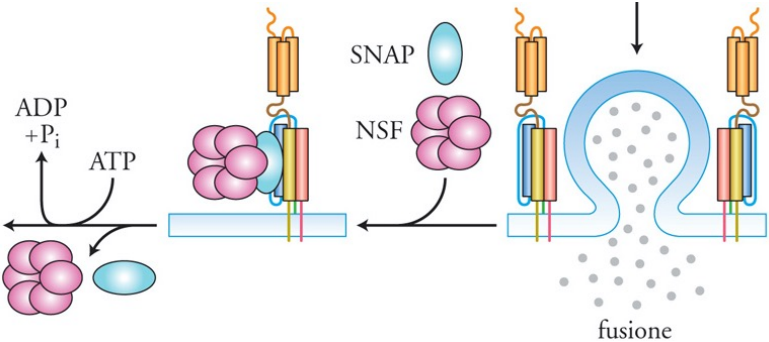
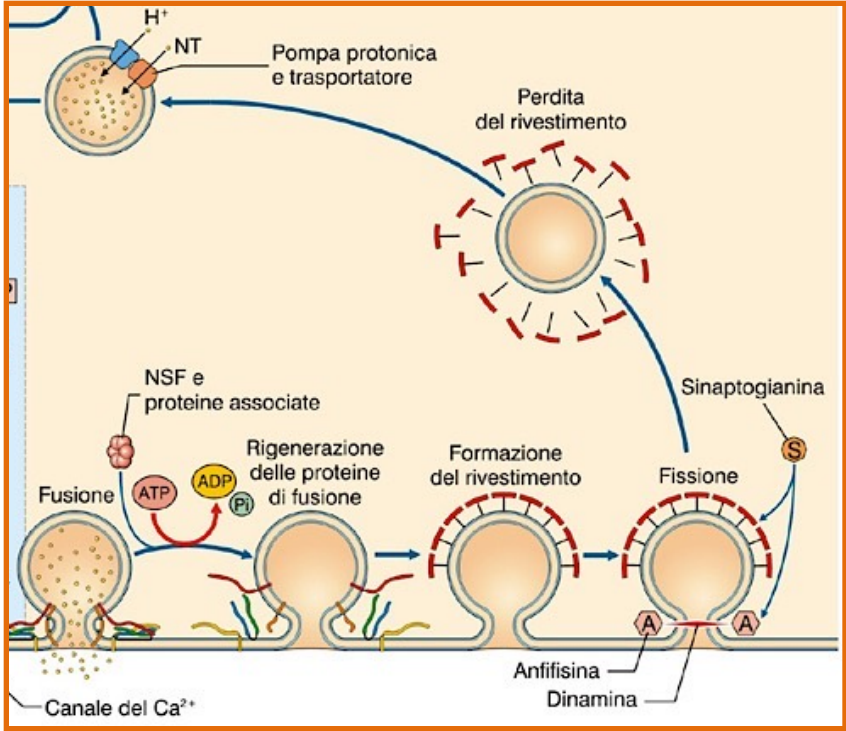
- α -latrotossina (veleno della femmina del ragno *Latrodectus hesperus*), si lega alla neurexina: induce rilascio massivo di neurotrasmettitore

Un'altra tossina che interferisce con il rilascio del neurotrasmettitore: l' α -latrotossina

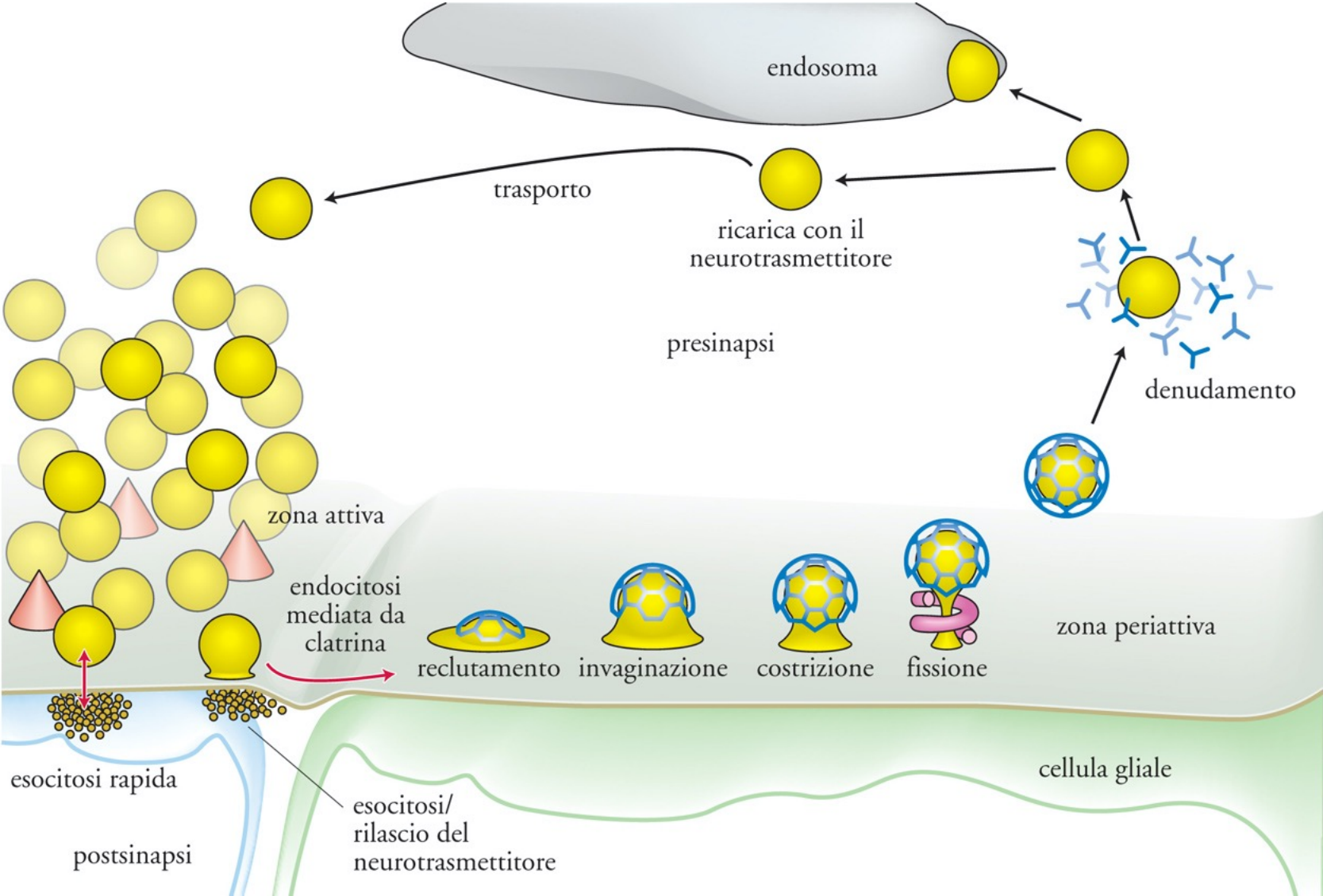


(Rilascio di noraepinefrina, dopamina, neuropeptidi)

Fase III: Riciclo delle vescicole

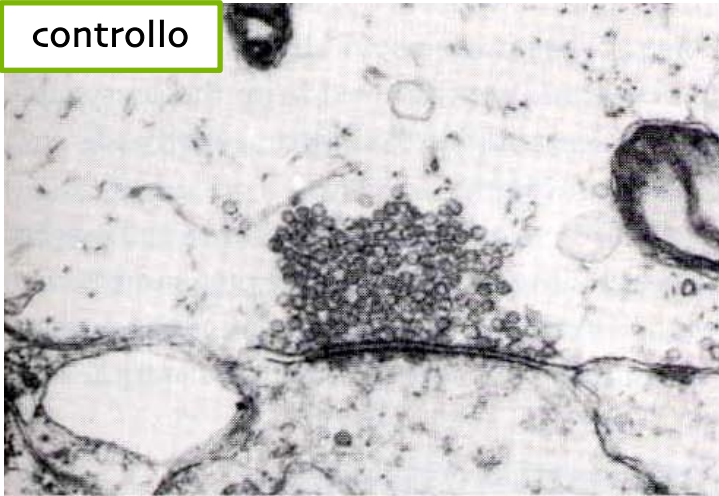


Fase III: Riciclo delle vescicole

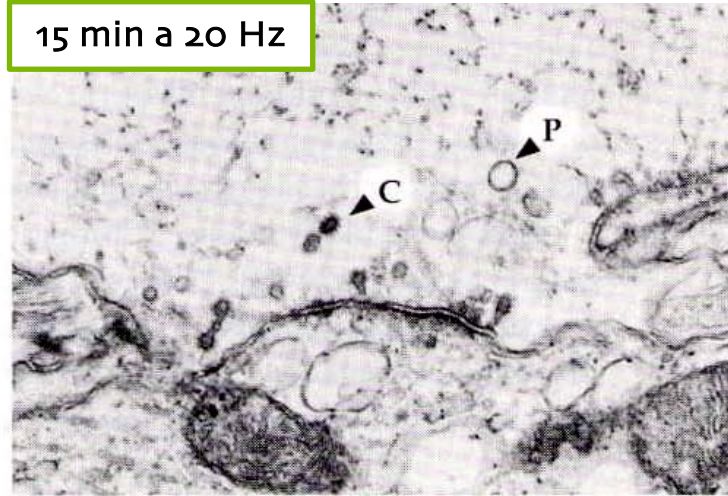


Riciclo delle vescicole sinaptiche

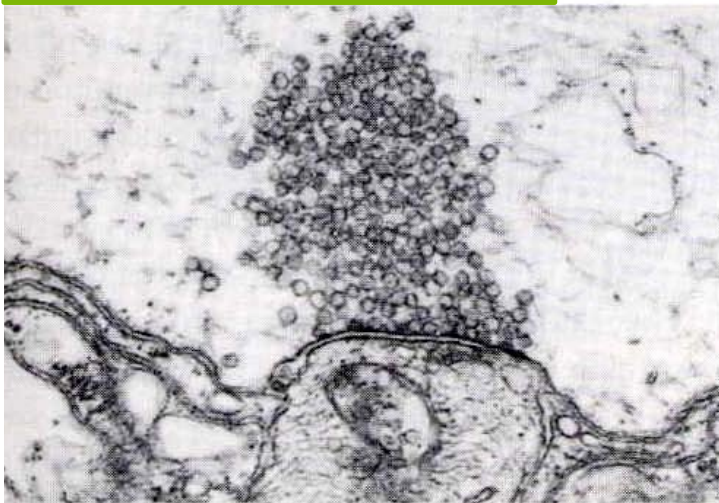
controllo



15 min a 20 Hz



60 min dopo cessato stimolo

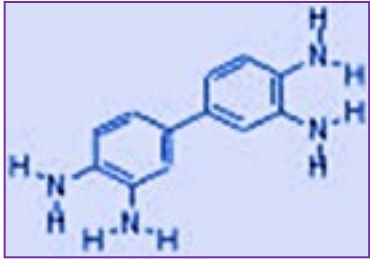


Assone gigante e sinapsi gigante
di lampreda

Deplezione del contenuto di
vescicole dopo uno stimolo
sostenuto e successivo
recupero

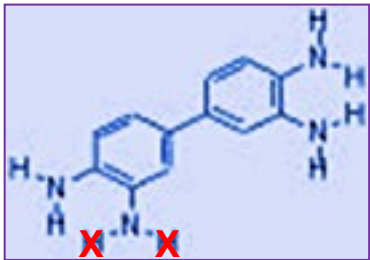
Riciclo delle vescicole sinaptiche

Diaminobenzidina
(DAB)



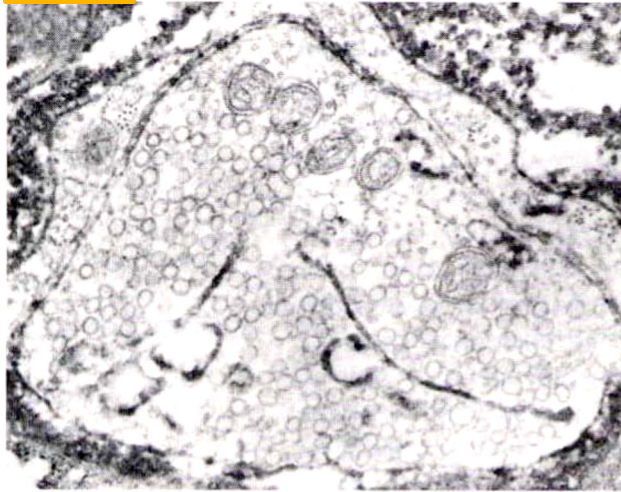
+ H_2O_2

↑ Reazione catalizzata
dalla perossidasi di
rafano (HRP)
↓

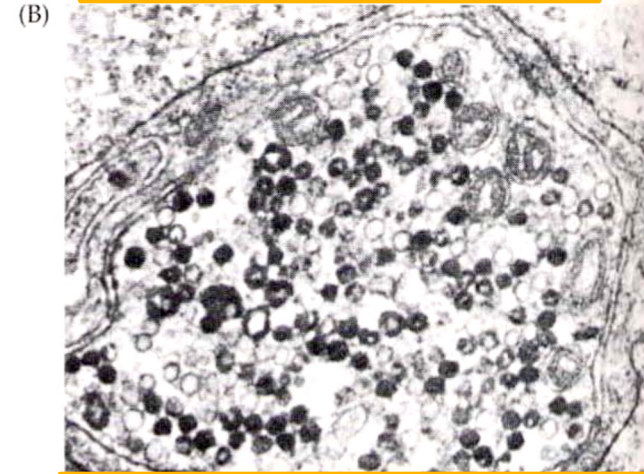


+ $2 H_2O$

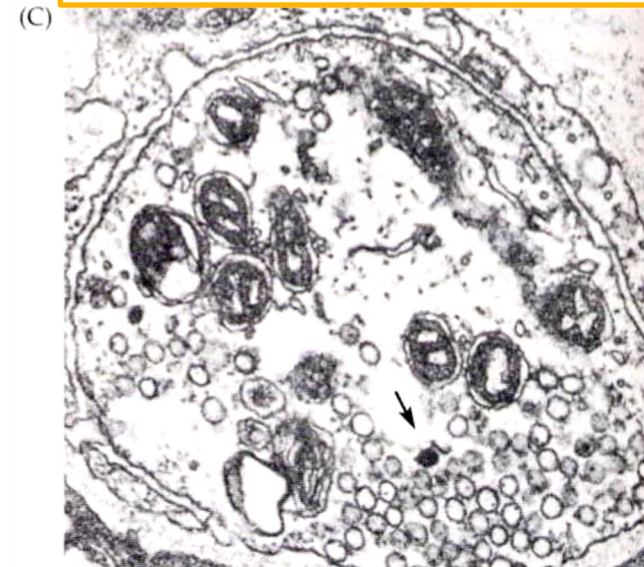
1 min



15 min 20 HZ + 1 h recupero

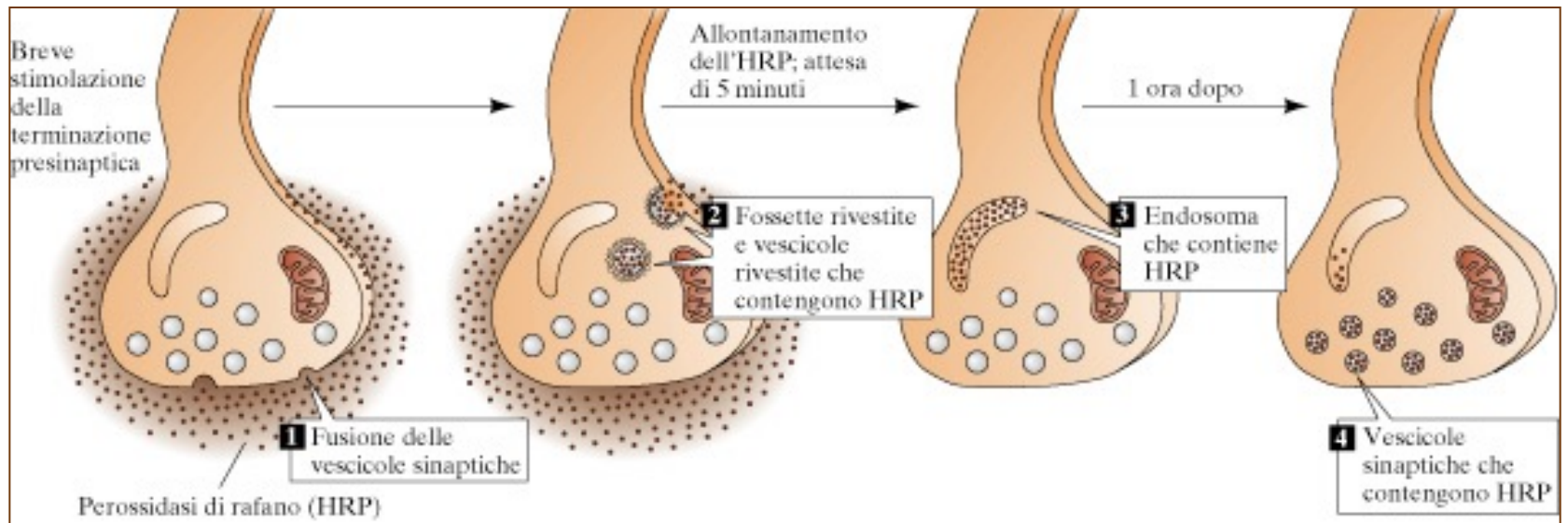


-HRP 15 min 20 HZ + 1 h recupero

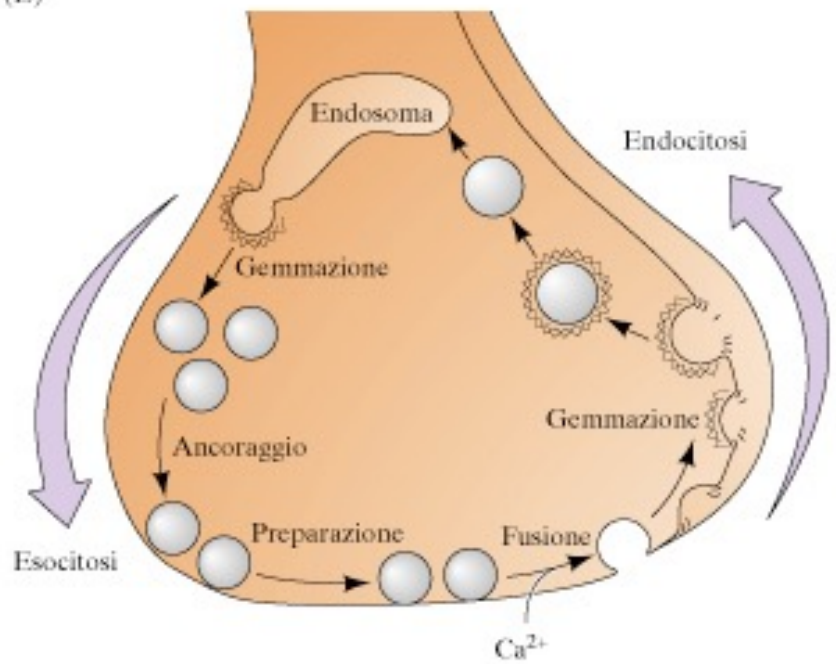


Giunzione neuromuscolare di rana

Dimostrazione della presenza di un meccanismo di recupero della membrana pre-sinaptica per nuove vescicole sinaptiche mediante aggiunta di HRP (perossidasi di rafano, il suo substrato H_2O_2 e il cromogeno 3-3'-diaminobenzidina nel mezzo extracellulare

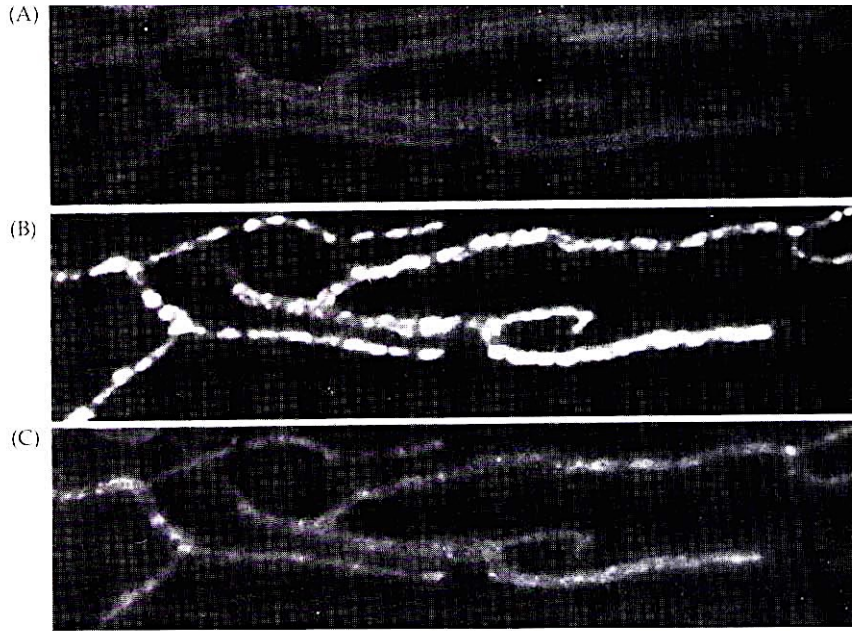


(E)



Intero ciclo: 30'' - 1'

Giunzione neuromuscolare di rana – Live imaging al microscopio ottico



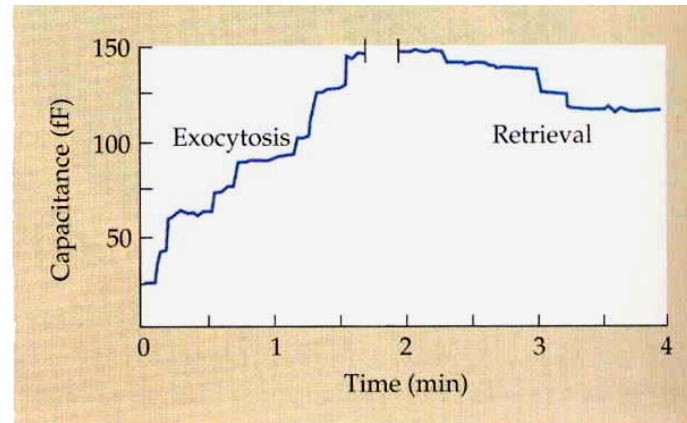
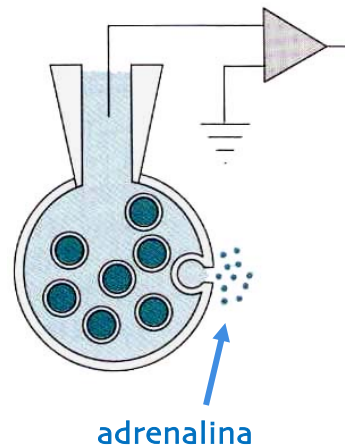
(Betz and Bewick, 1993)

5' 2 μM FM1-43 ▶ 30' lavaggio

5' 2 μM FM1-43 + stimolazione 10 Hz ▶ 30' lavaggio

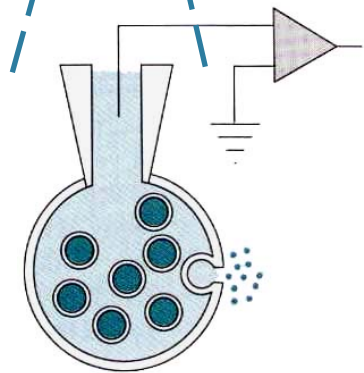
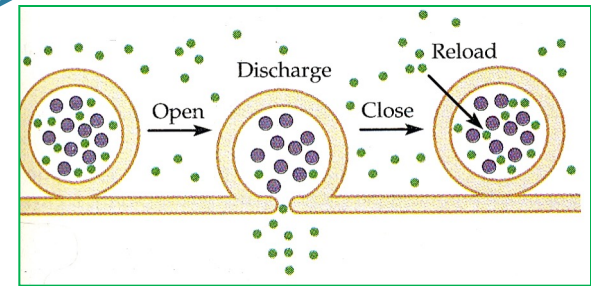
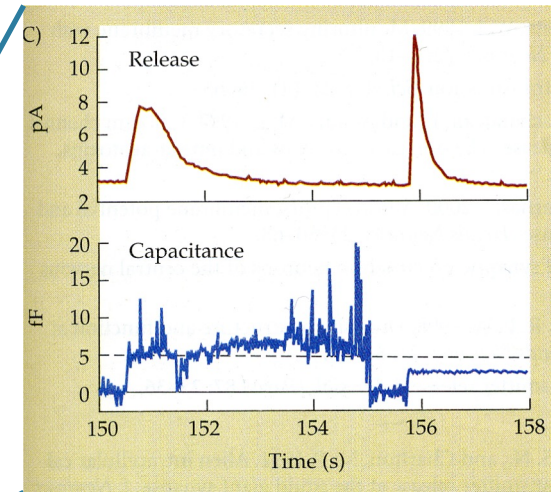
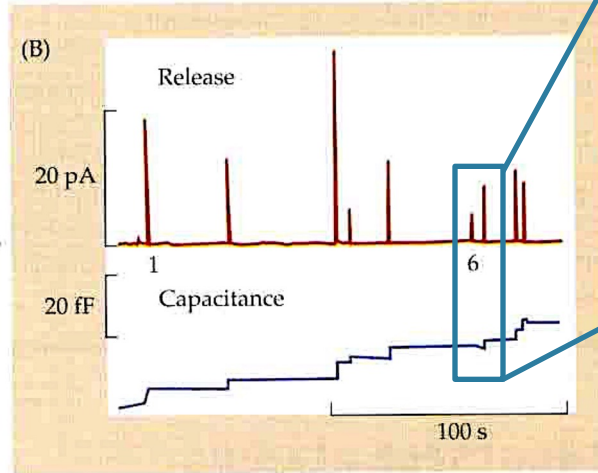
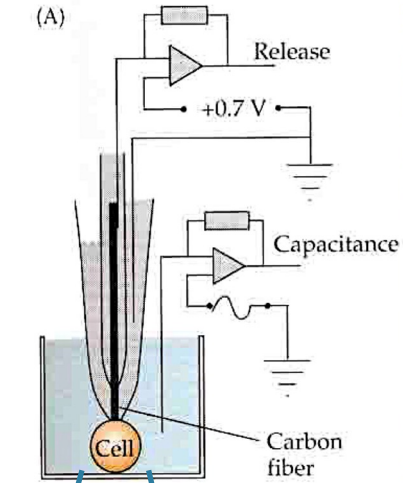
5' stimolazione 10 Hz ▶ 30' lavaggio

Misurazione della capacità
come indicatore di
esocitosi



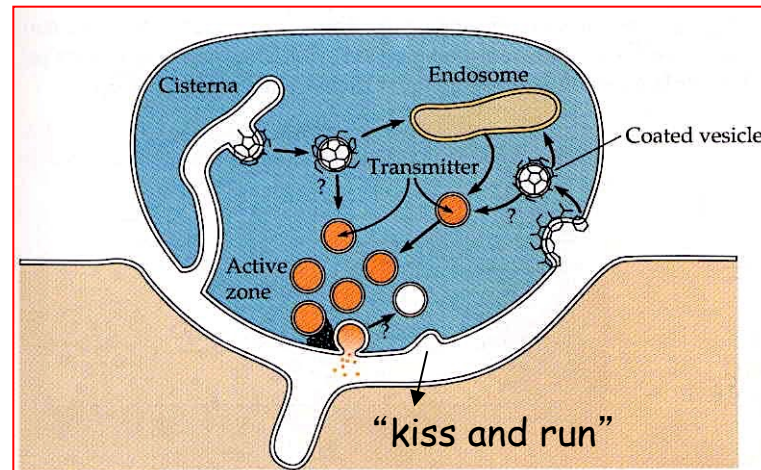
(Fernandez, Neher, Gomperts, 1984)

Amperometria (registrazione della corrente prodotta dall'ossidazione del neurotrasmettitore)

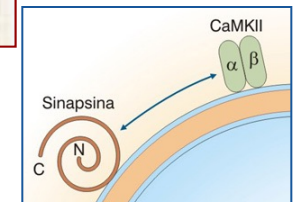
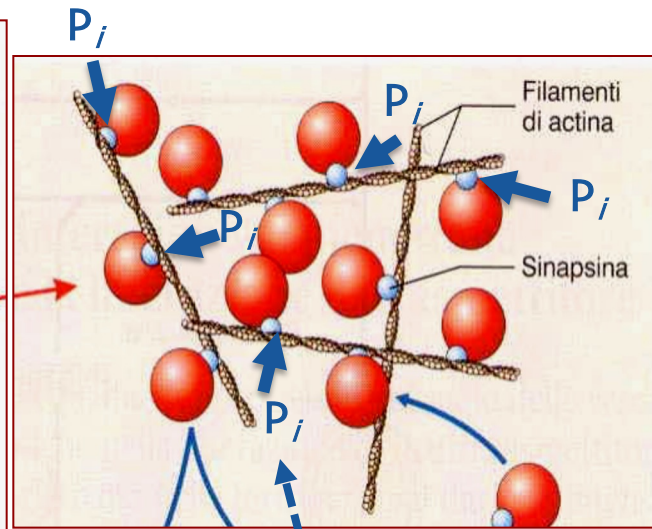
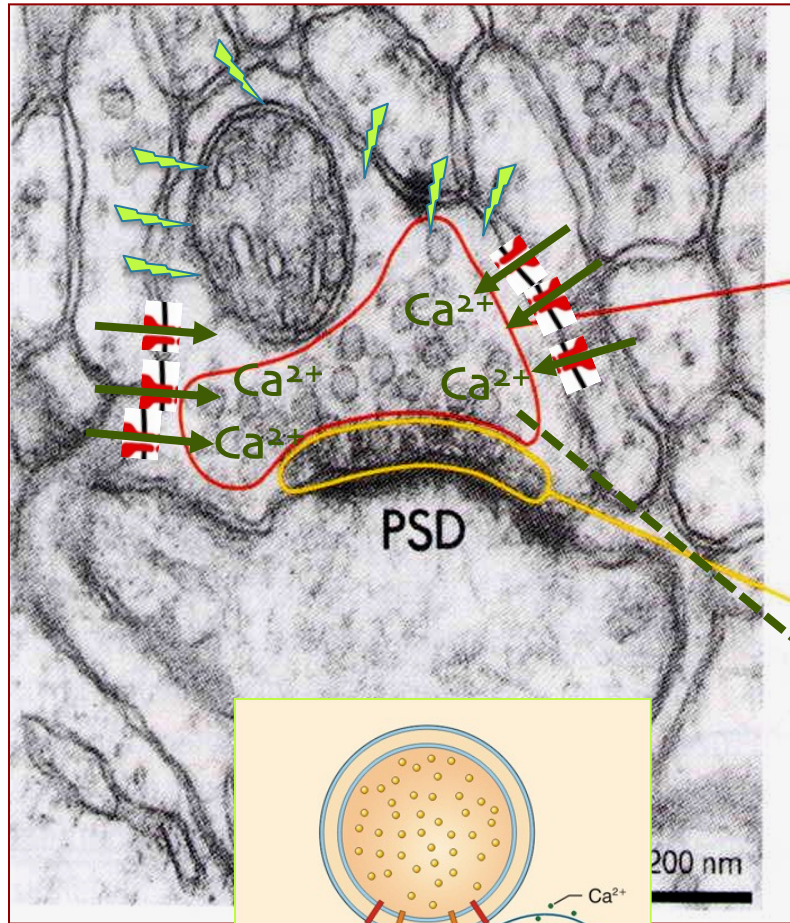


(Fernandez, Neher, Gomperts, 1984)

Possibili due meccanismi di riciclo



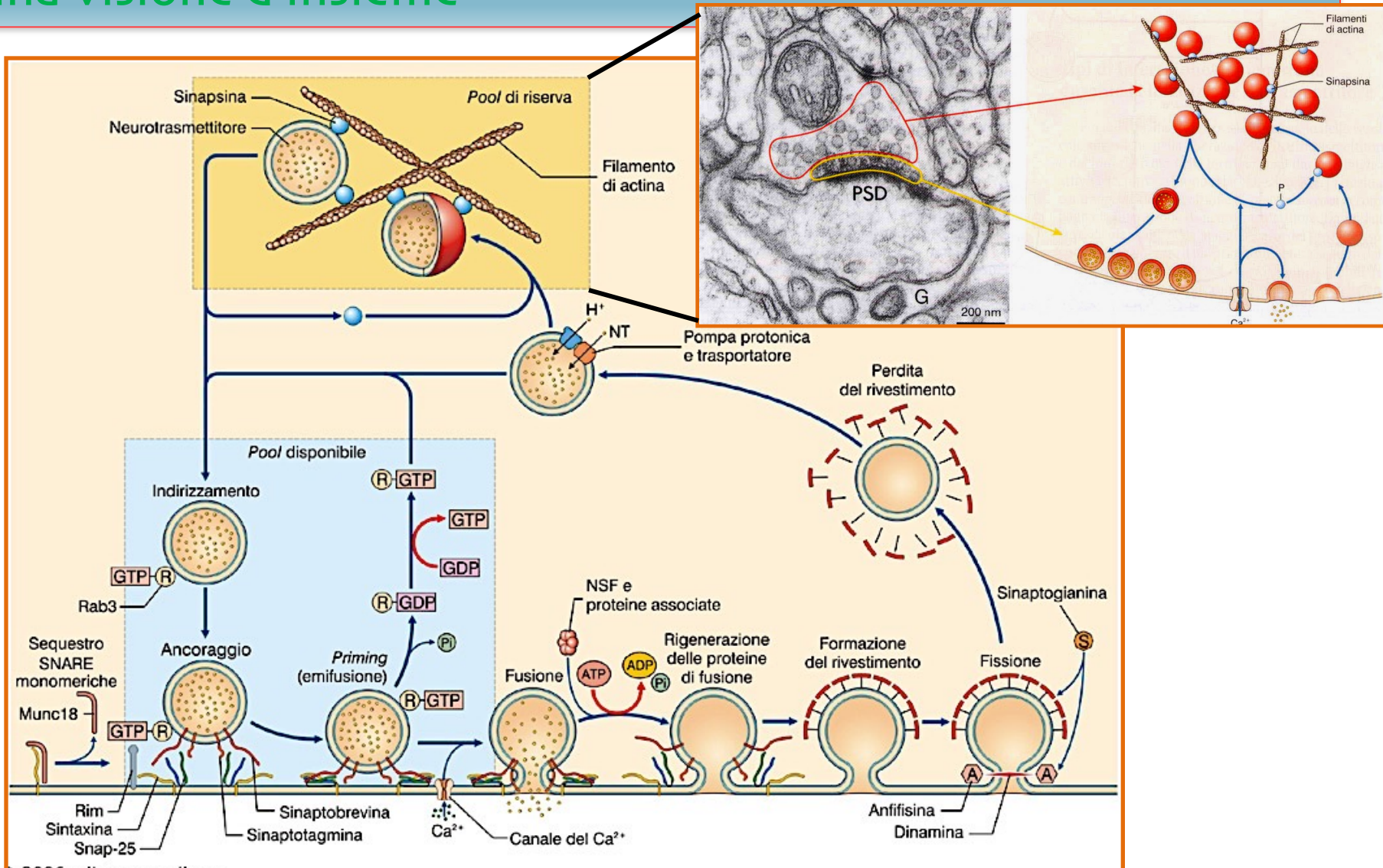
Come si mobilizzano le vescicole di riserva?



Attivazione della CamK-dipendente

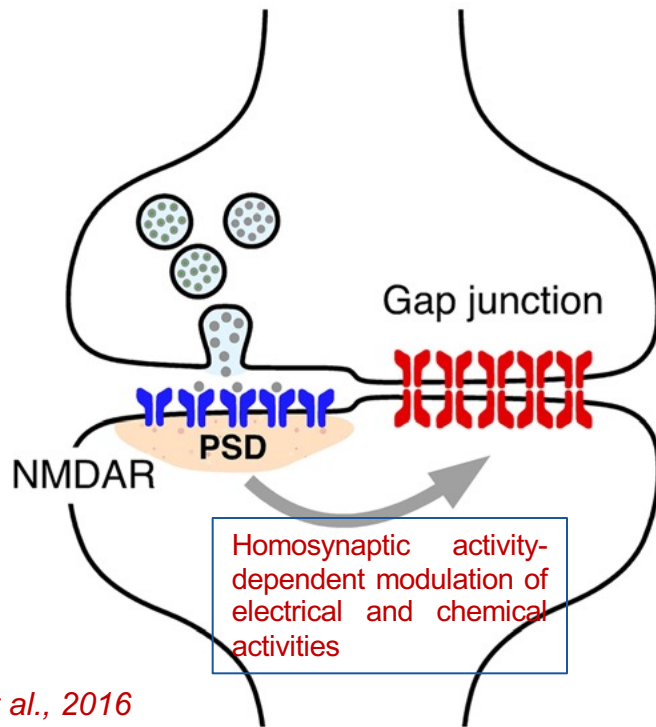
Esocitosi e mobilizzazione delle vescicole richiedono un Ca^{2+} «differente»

Meccanismo molecolare di rilascio del neurotrasmettitore: una visione d'insieme



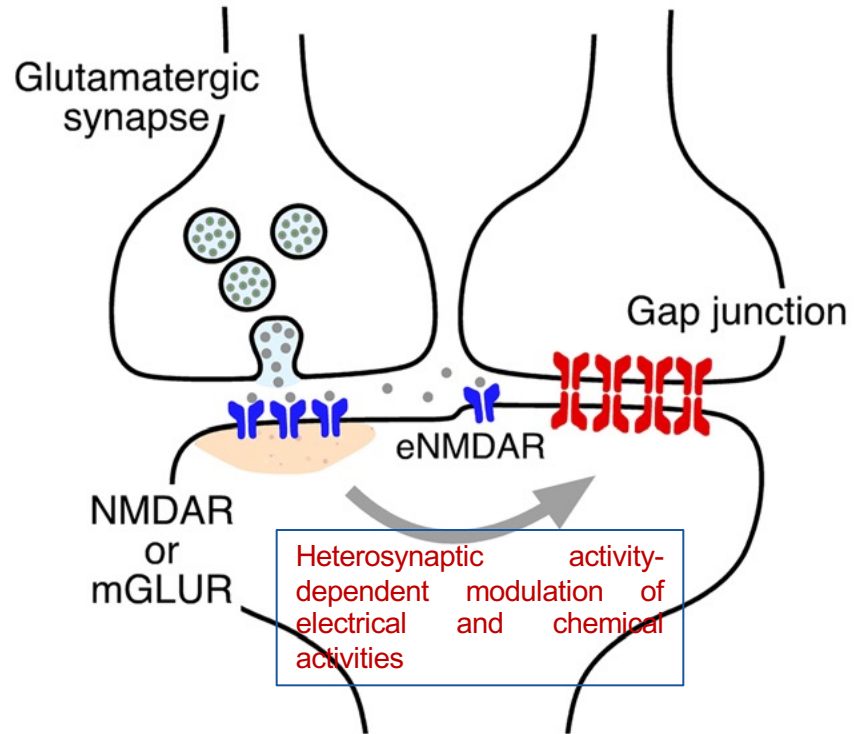
Sinapsi miste: un altro (e alto) grado di modulazione della trasmissione sinaptica elettrica e chimica

A Goldfish mixed synapse

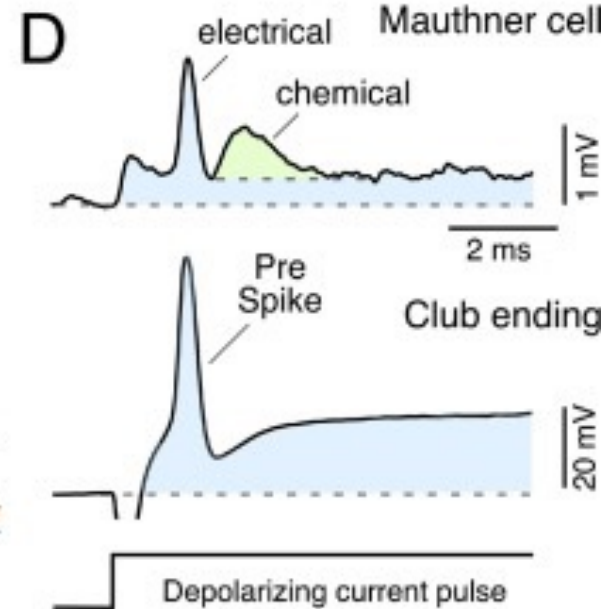
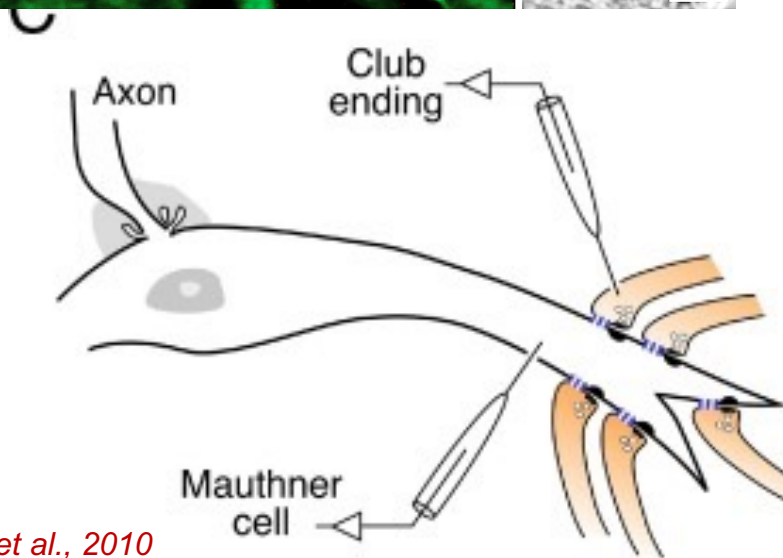
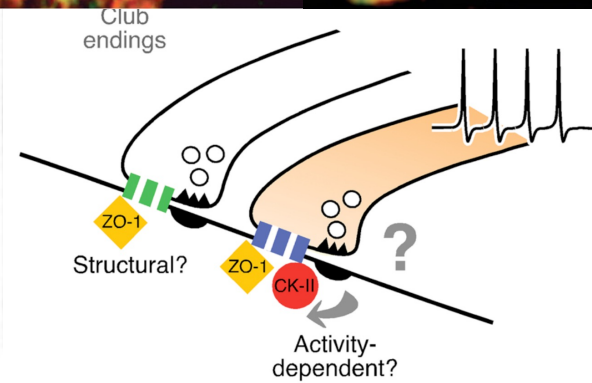
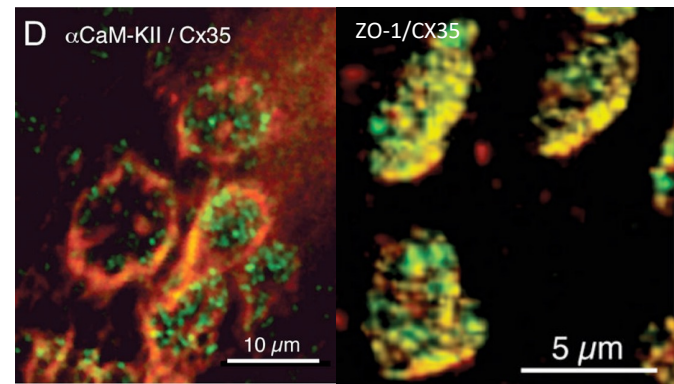
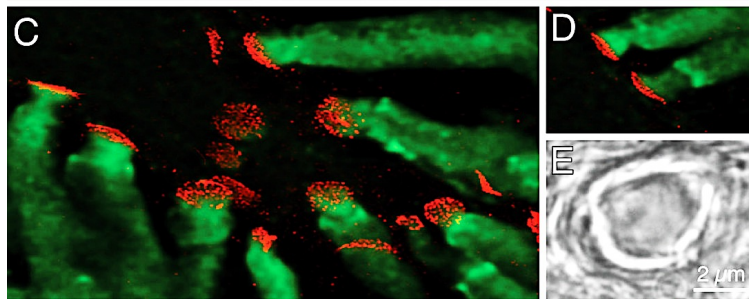
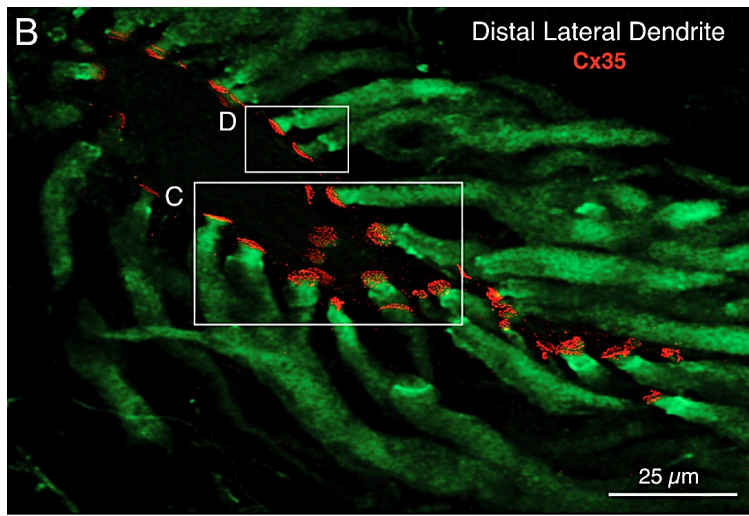


Haas et al., 2016

B Heterosynaptic interaction in mammals



- La *dual transmission* documentata per la prima volta nel sistema nervoso autonomo degli uccelli, e in seguito nel sistema nervoso centrale di pesci, anfibi e rettili
- Sinapsi miste sono state descritte anche in diverse aree del CNS dei mammiferi
- Solo in associazione con sinapsi eccitatorie (colinergiche, glutamatergiche)



Aree di colocalizzazione tra sinapsi elettriche (connessina CX36) e sinapsi chimiche glutammatergiche

