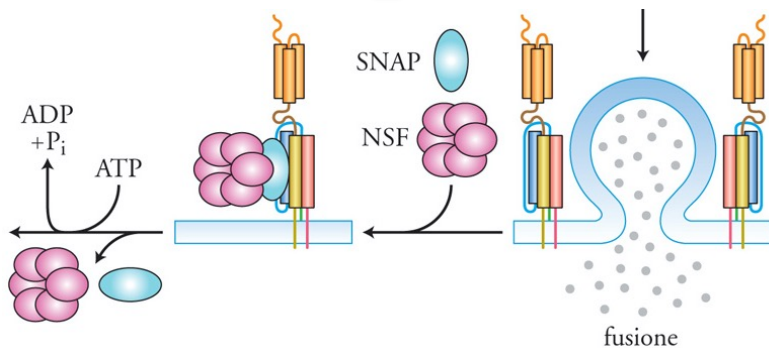
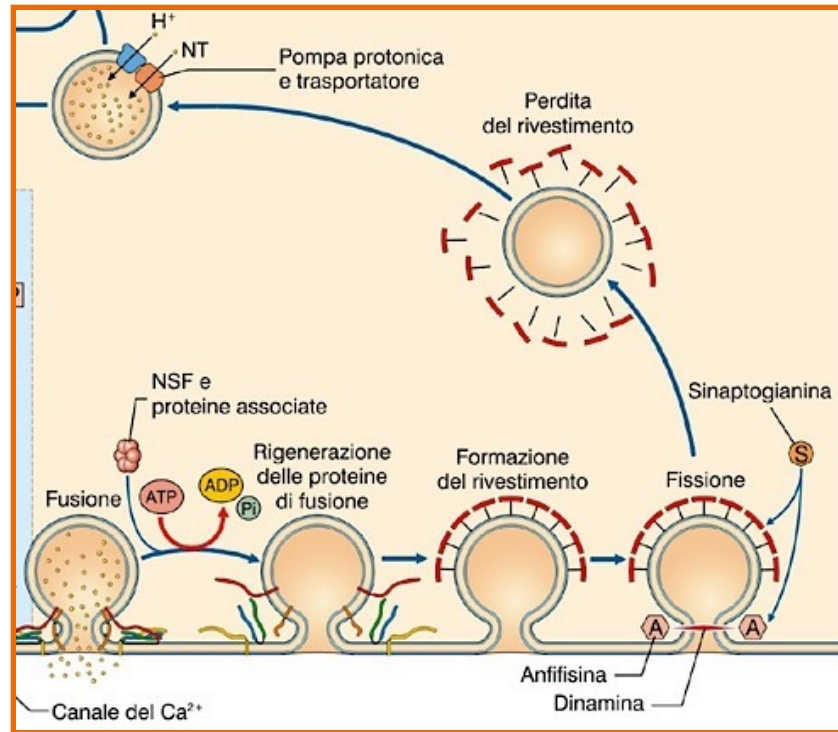
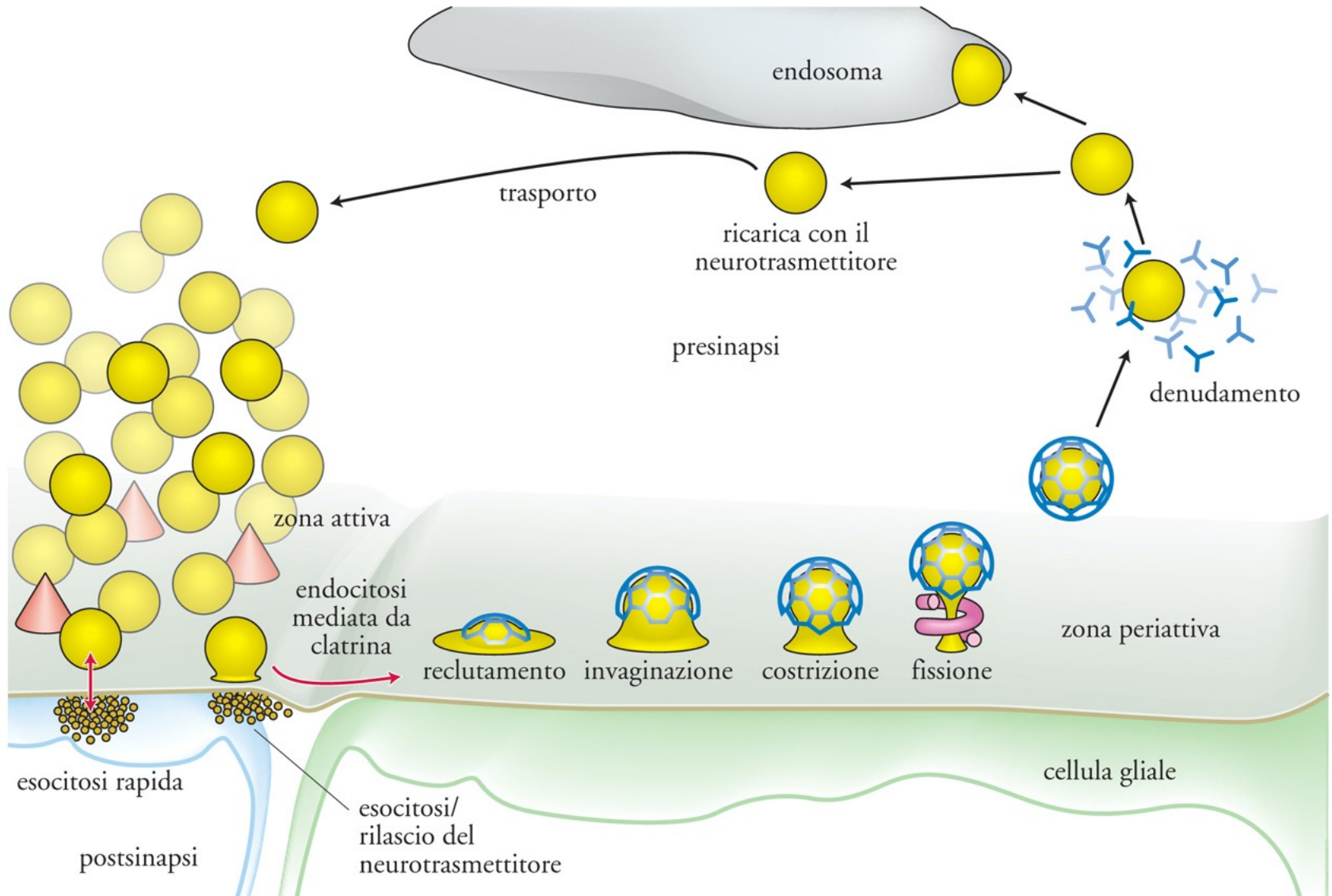


Fase III: Riciclo delle vescicole

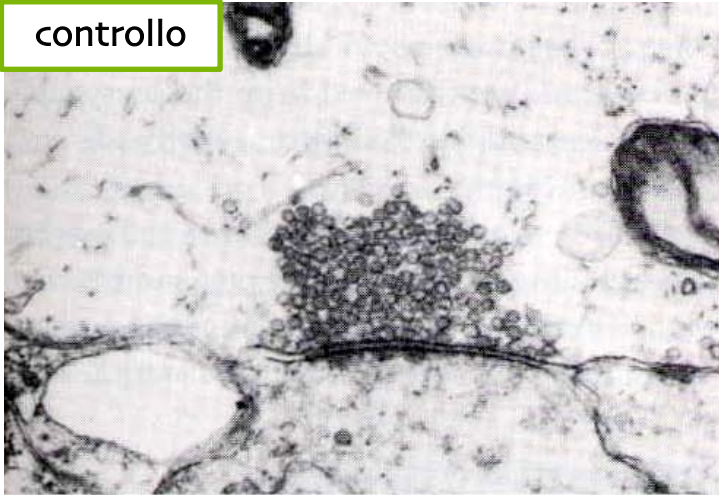


Fase III: Riciclo delle vescicole

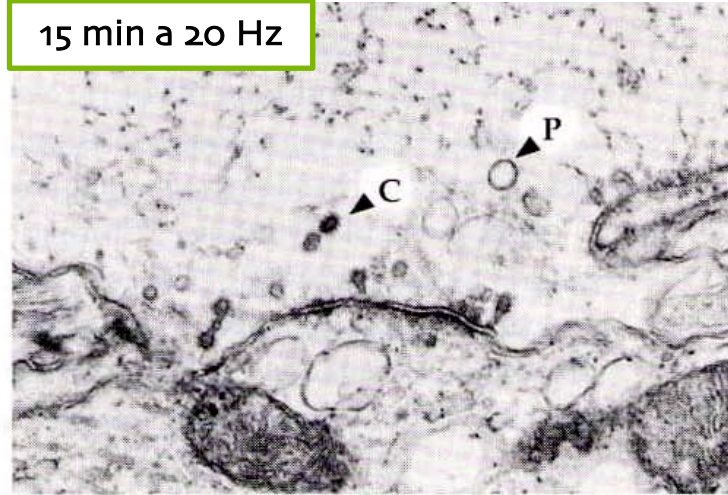


Riciclo delle vescicole sinaptiche

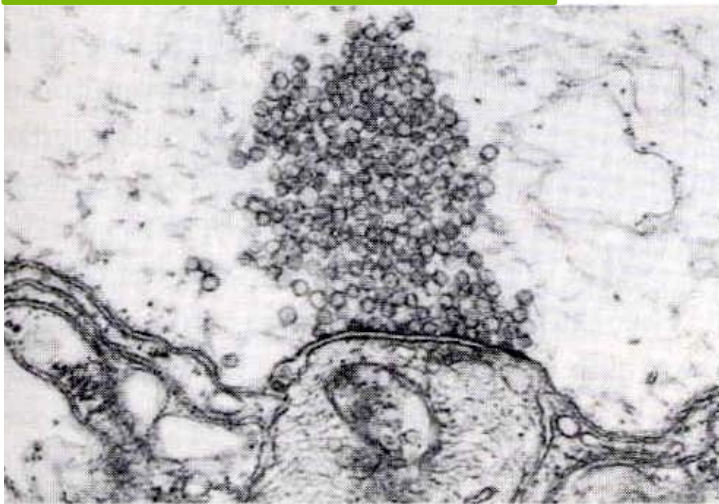
controllo



15 min a 20 Hz



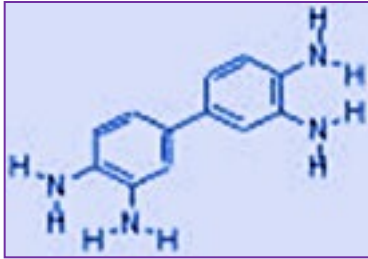
60 min dopo cessato stimolo



Assone gigante e sinapsi gigante
di lampreda

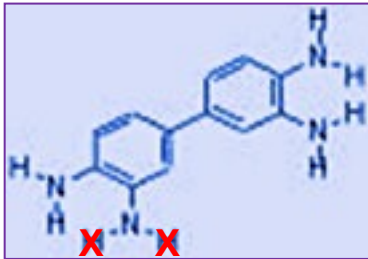
Deplezione del contenuto di
vescicole dopo uno stimolo
sostenuto e successivo recupero

Diaminobenzidina
(DAB)



+ H₂O₂

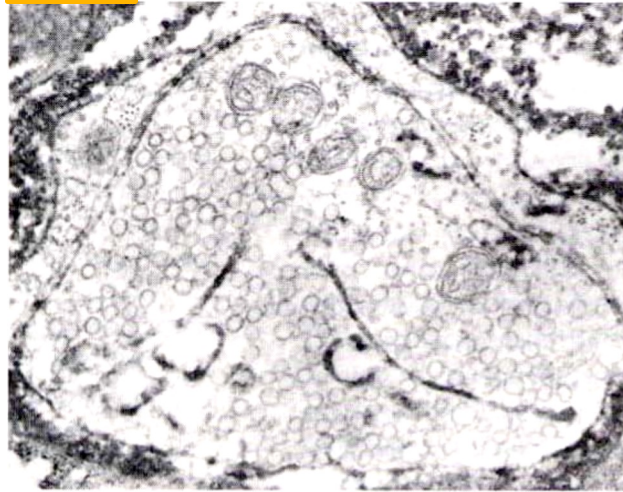
↑ Reazione catalizzata
dalla perossidasi di
rafano (HRP)
↓



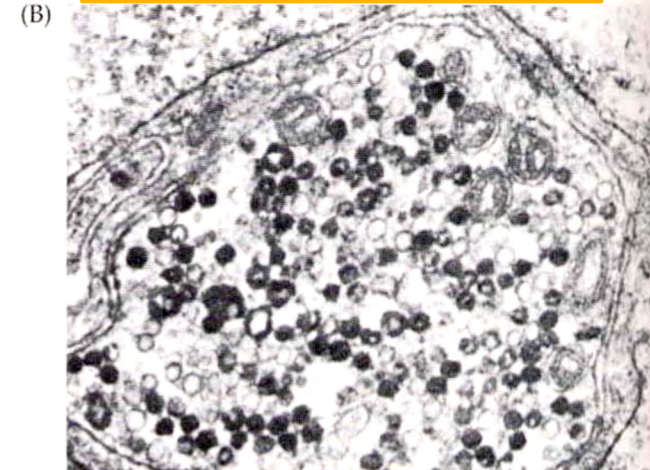
+ 2 H₂O

Riciclo delle vescicole sinaptiche

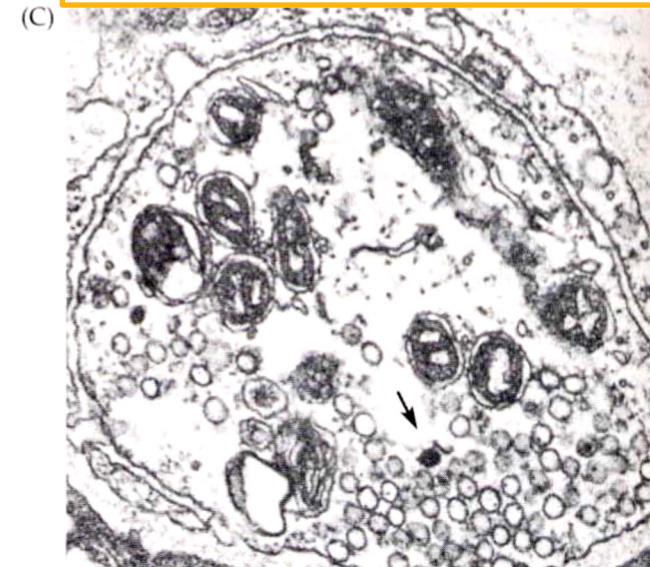
1 min



15 min 20 HZ + 1 h recupero

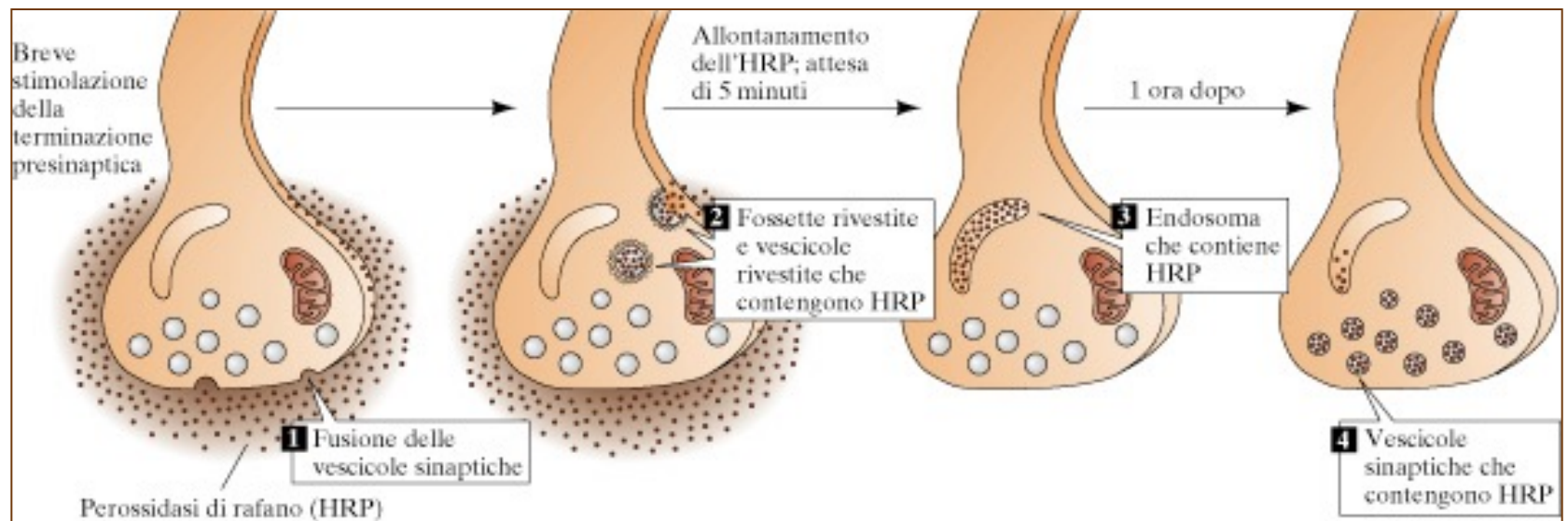


-HRP 15 min 20 HZ + 1 h recupero

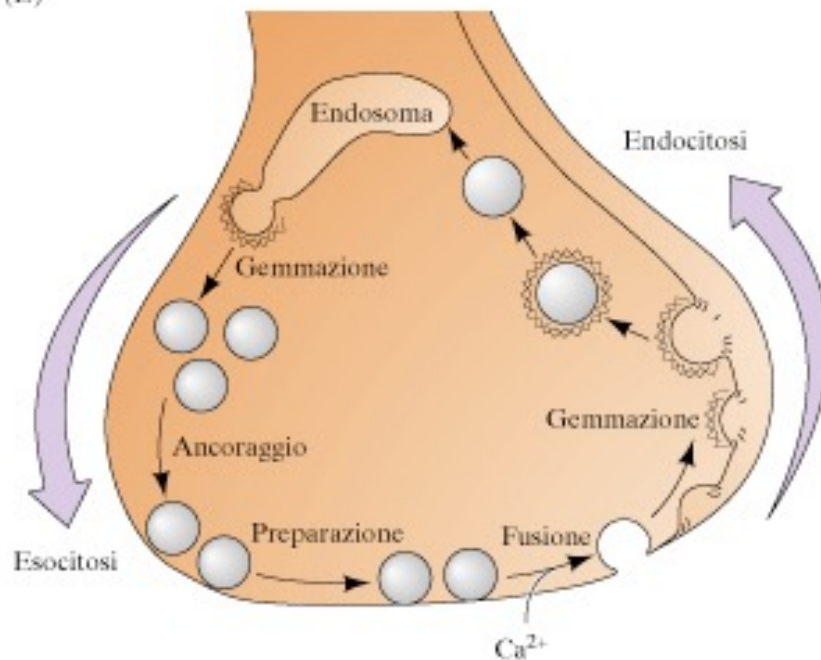


Giunzione neuromuscolare di rana

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 H₂O₂ e il cromogeno 3-3'-diaminobenzidina nel mezzo extracellulare

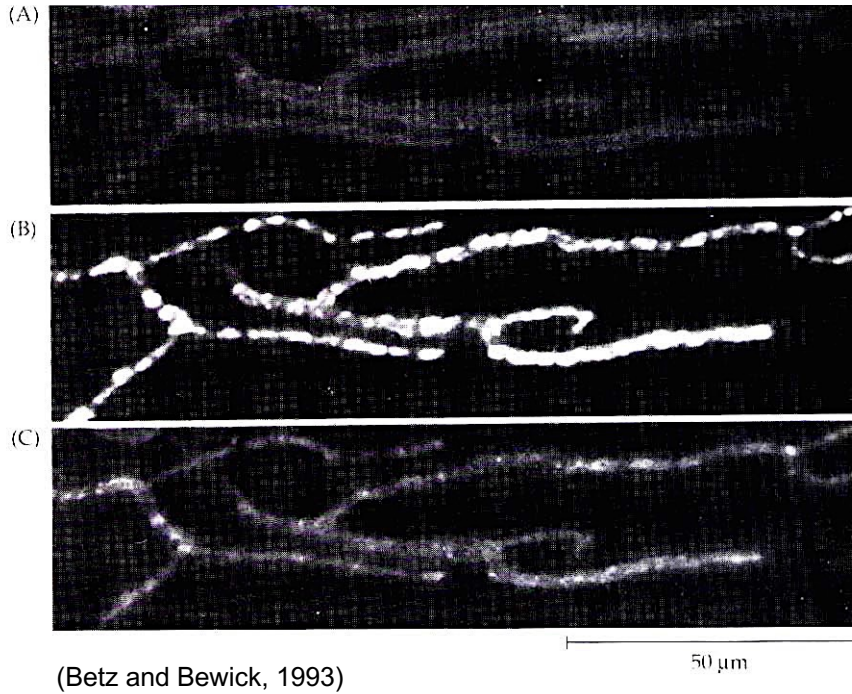


(E)



Intero ciclo: 30'' - 1'

Giunzione neuromuscolare di rana – Live imaging al microscopio ottico



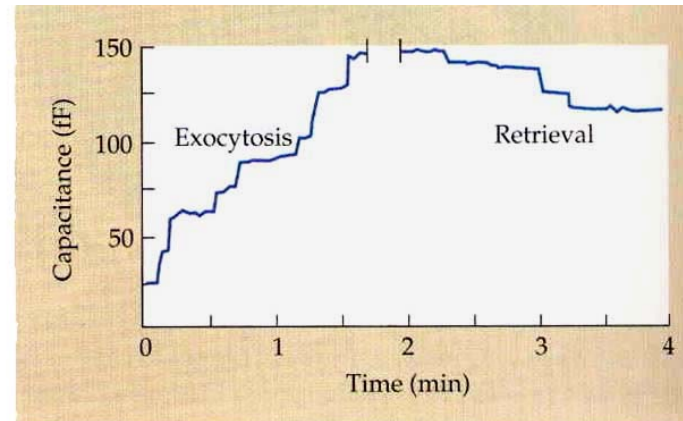
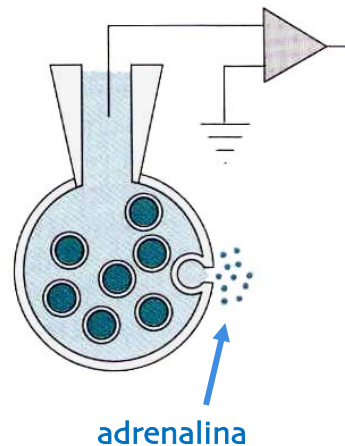
5' 2 μM FM1-43 ► 30' lavaggio

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

5' stimolazione 10 Hz ► 30' lavaggio

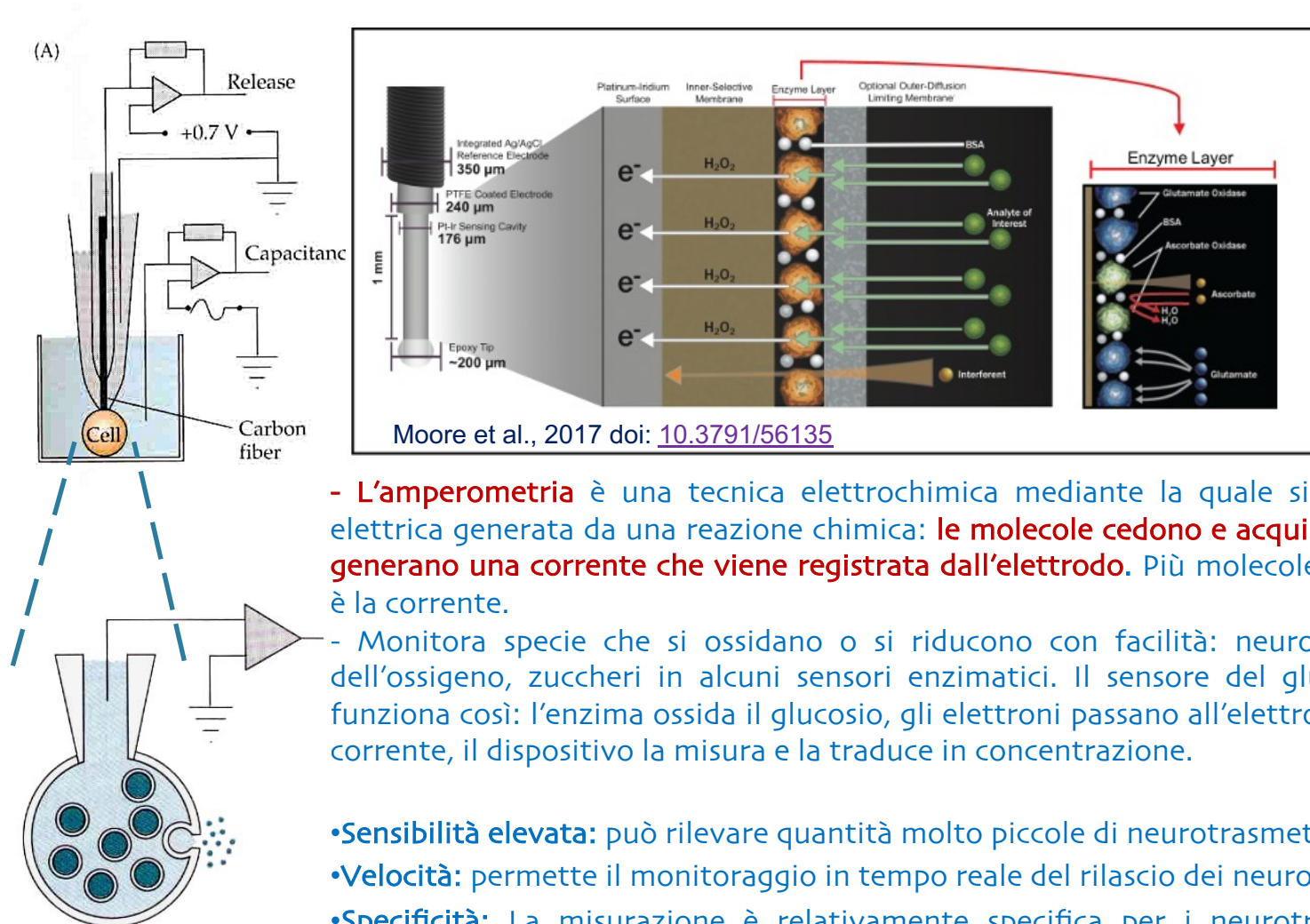
Cellule cromaffini o mast-cells

Misurazione della capacità
come indicatore di esocitosi



Fernandez, Neher, Gomperts, 1984; doi: [10.1038/312453a0](https://doi.org/10.1038/312453a0)

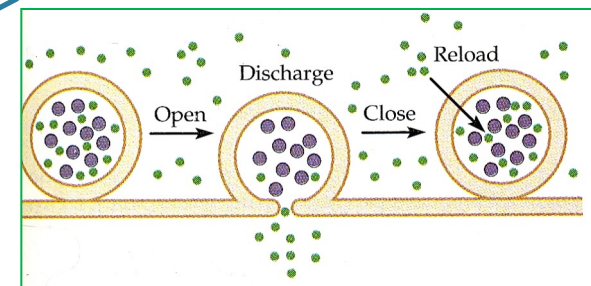
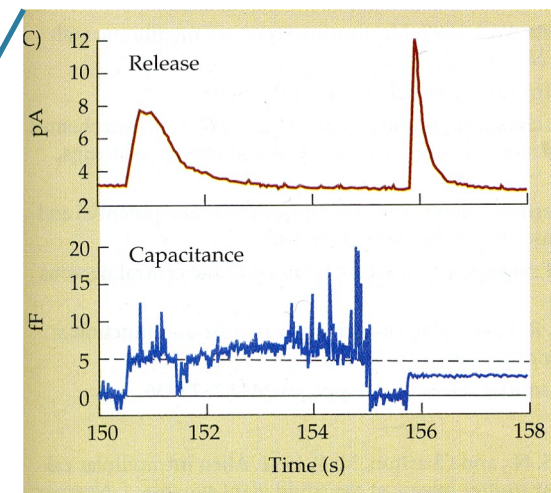
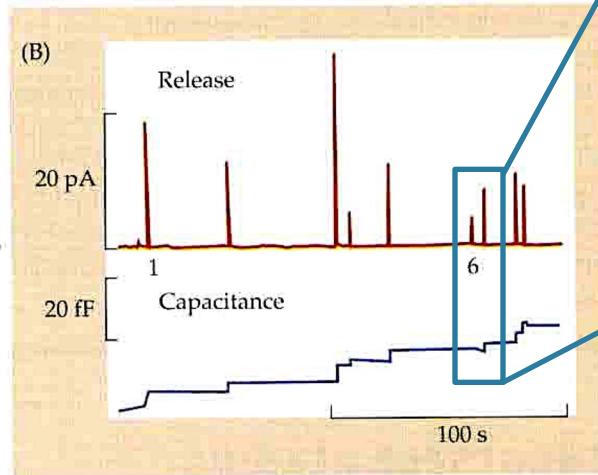
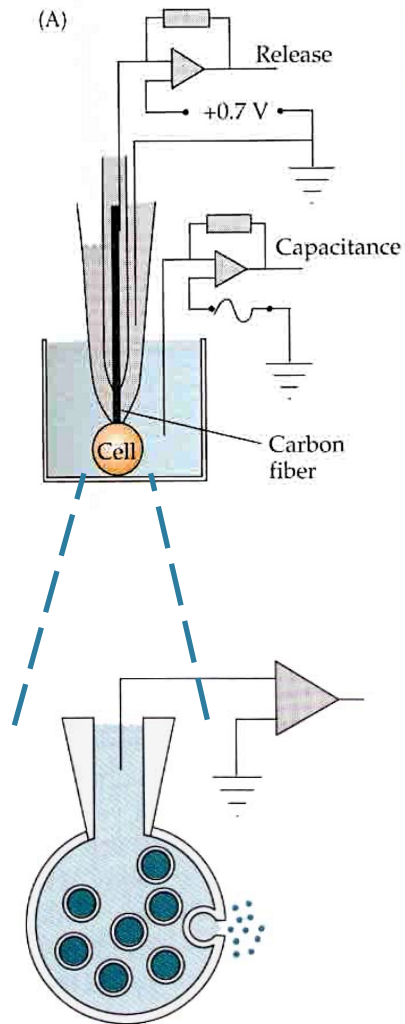
AMPEROMETRIA: Registrazione della corrente prodotta dall'ossidazione del neurotrasmettitore (ossidazione elettrochimica)



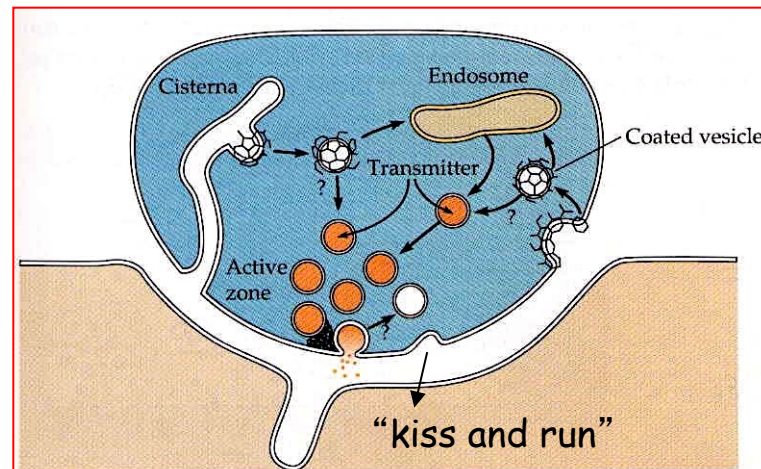
- **L'amperometria** è una tecnica elettrochimica mediante la quale si misura una corrente elettrica generata da una reazione chimica: **le molecole cedono e acquistano elettroni, quindi generano una corrente che viene registrata dall'elettrodo**. Più molecole reagiscono maggiore è la corrente.

- Monitora specie che si ossidano o si riducono con facilità: neurotrasmettitori, radicali dell'ossigeno, zuccheri in alcuni sensori enzimatici. Il sensore del glucosio nei glucometri funziona così: l'enzima ossida il glucosio, gli elettroni passano all'elettrodo, l'elettrodo genera corrente, il dispositivo la misura e la traduce in concentrazione.

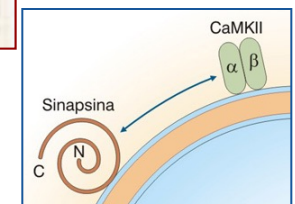
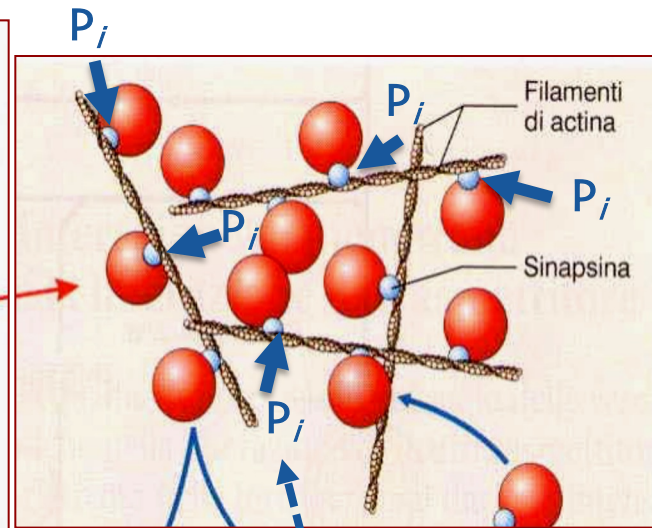
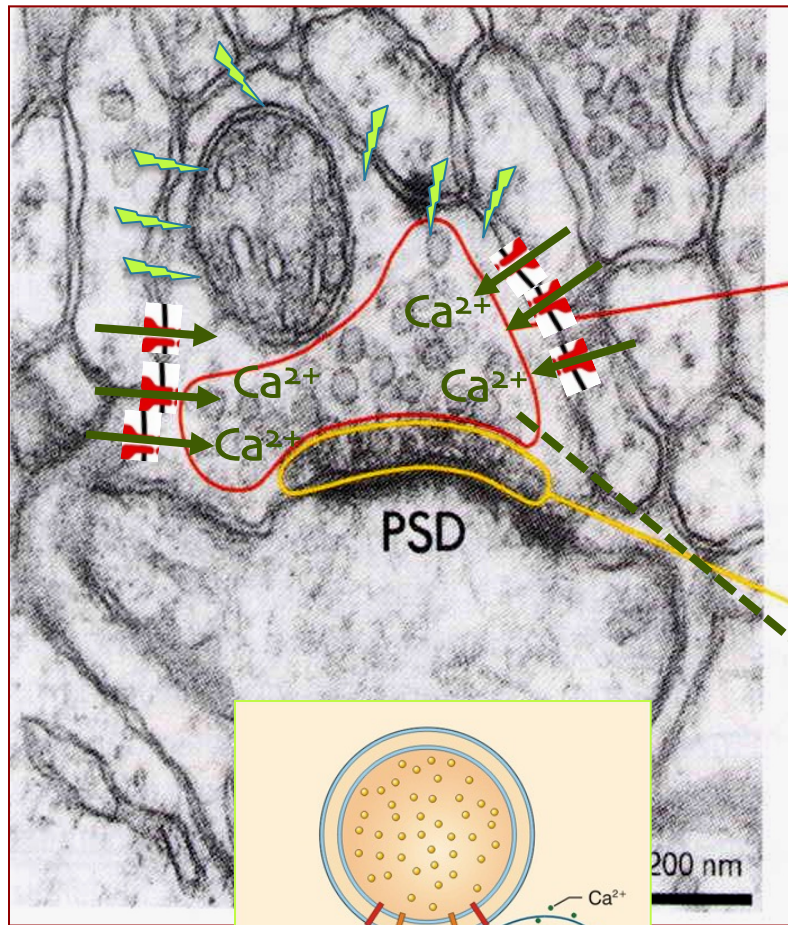
- **Sensibilità elevata:** può rilevare quantità molto piccole di neurotrasmettitori.
- **Velocità:** permette il monitoraggio in tempo reale del rilascio dei neurotrasmettitori.
- **Specificità:** La misurazione è relativamente specifica per i neurotrasmettitori che sono elettrochimicamente attivi. Non adatta a tutti i neurotrasmettitori perché non tutti sono elettrochimicamente attivi



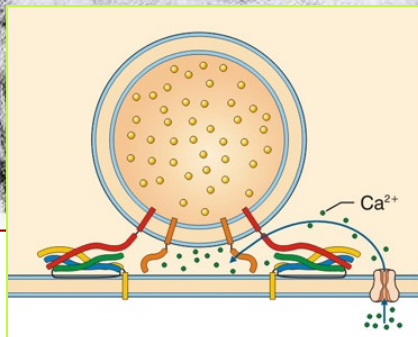
Possibili due meccanismi di riciclo



Come si mobilizzano le vescicole di riserva?

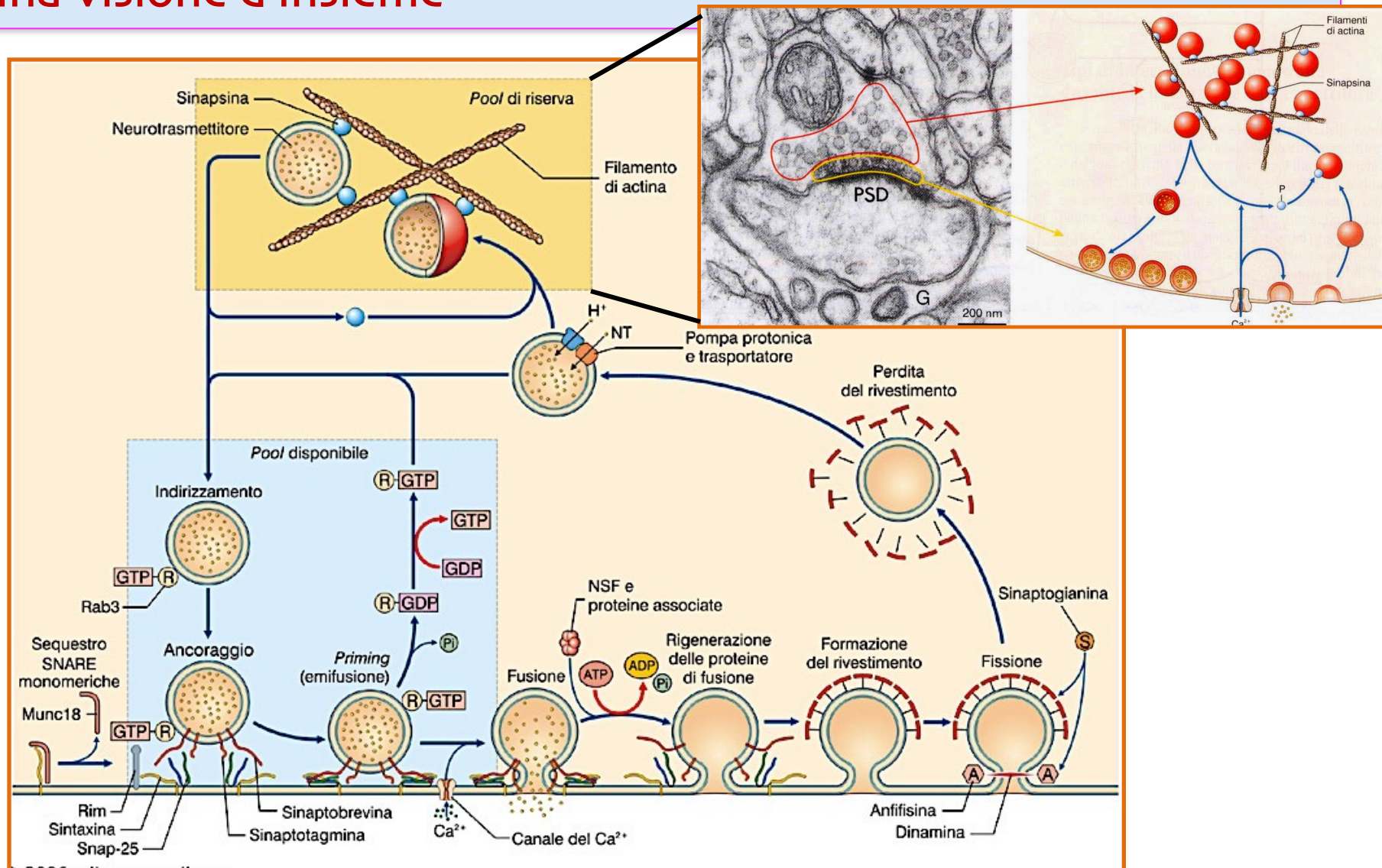


Attivazione della CamK-dipendente



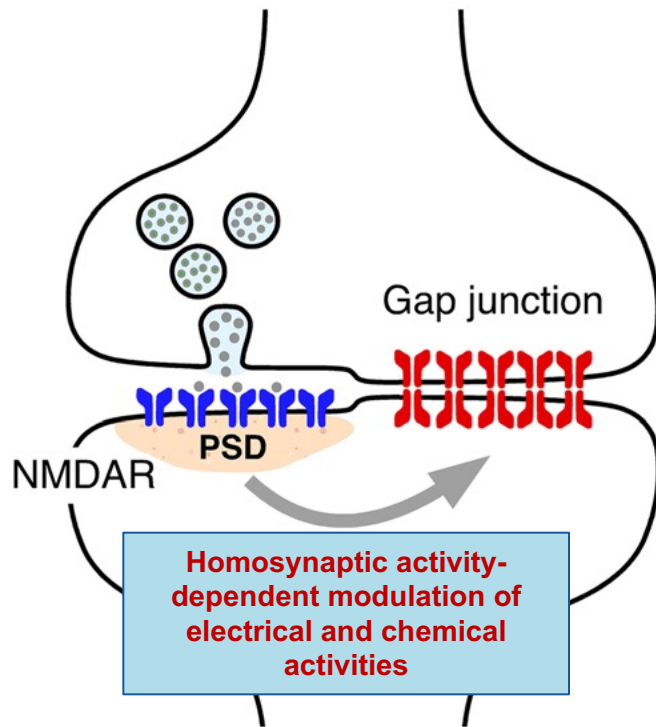
Esocitosi e mobilizzazione delle vescicole richiedono un Ca^{2+} «differente»

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

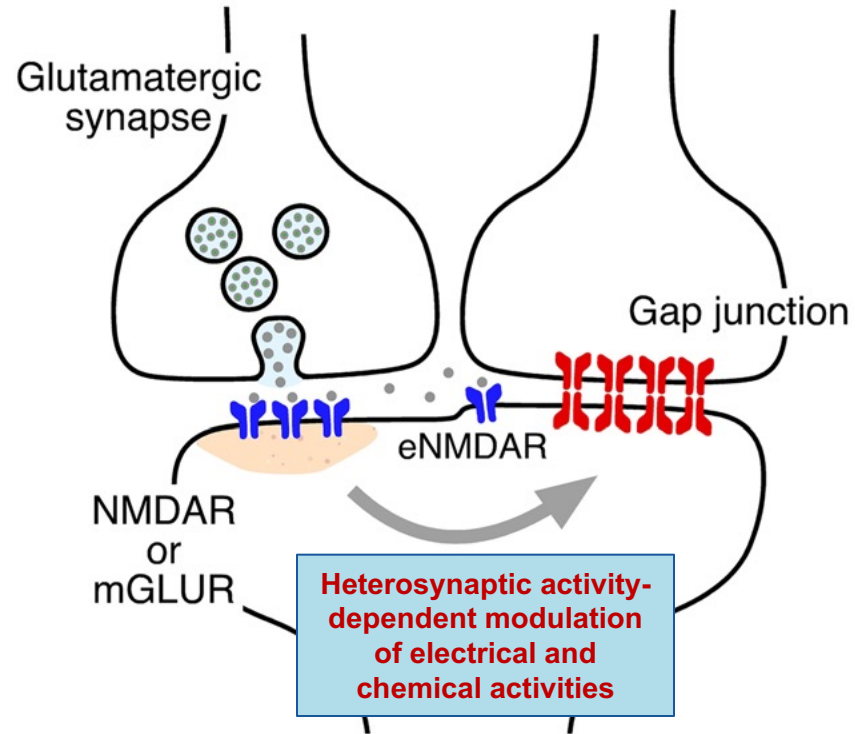


Sinapsi miste: un altro (e alto) grado di modulazione della trasmissione sinaptica elettrica e chimica

A Goldfish mixed synapse

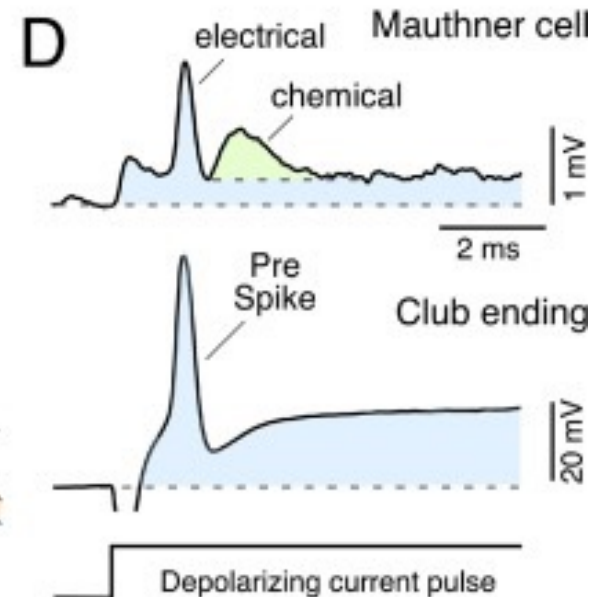
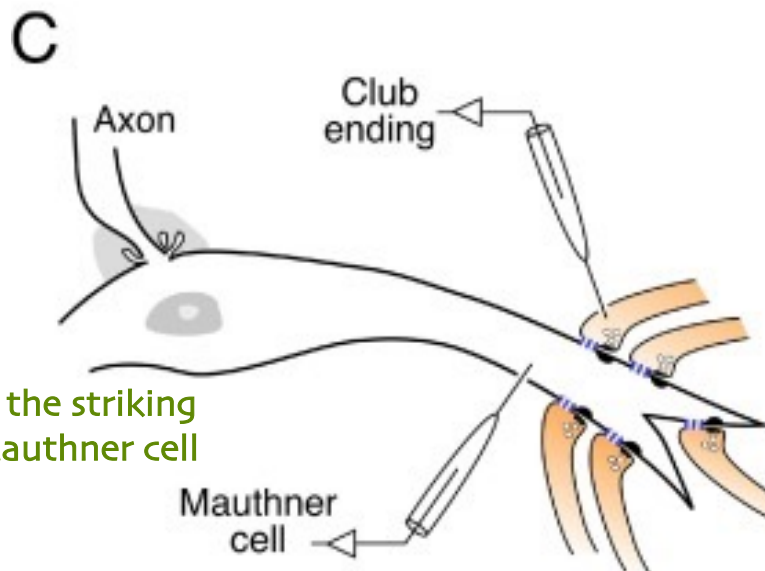
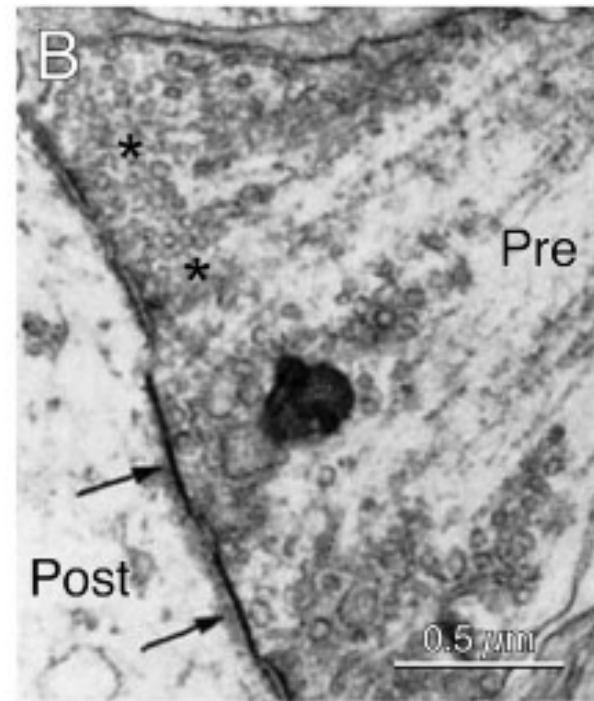
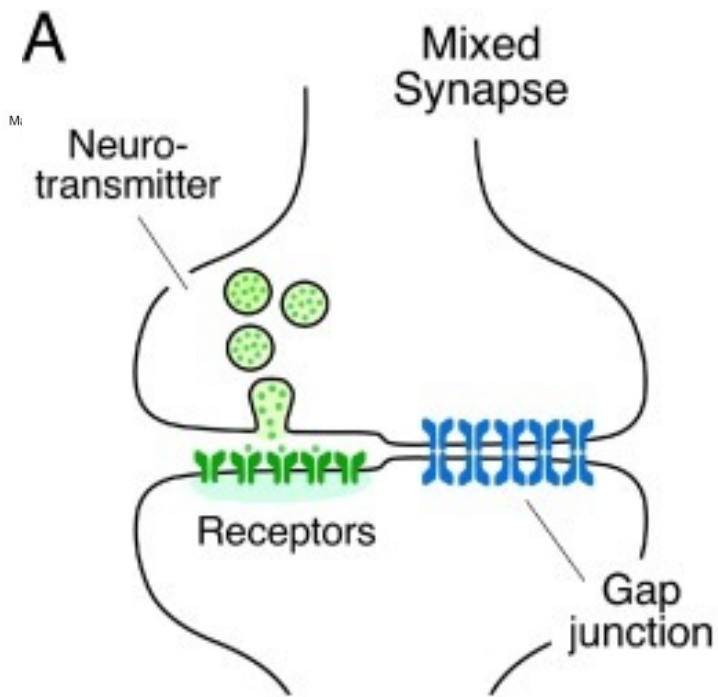
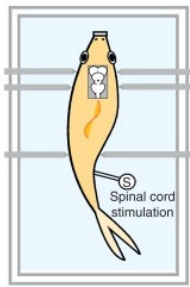


B Heterosynaptic interaction in mammals



Haas et al., 2016; doi: 10.1186/s12860-016-0090-z

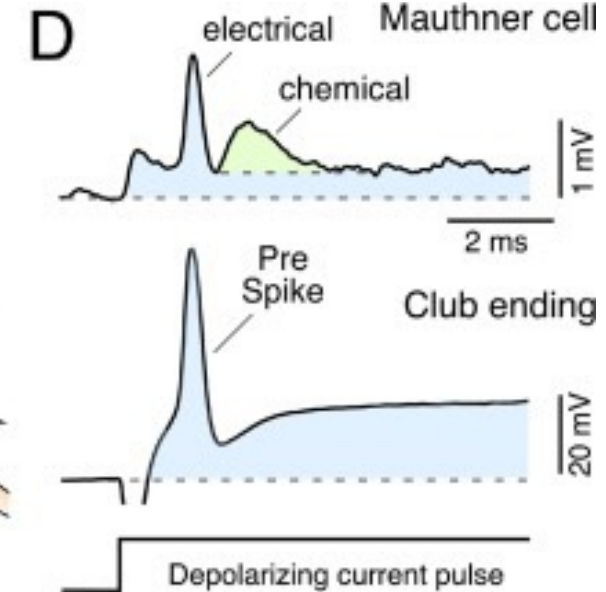
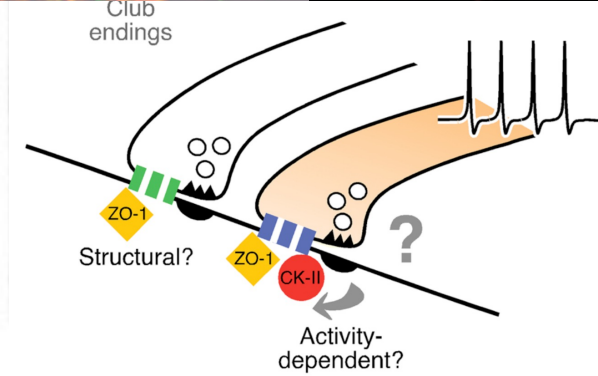
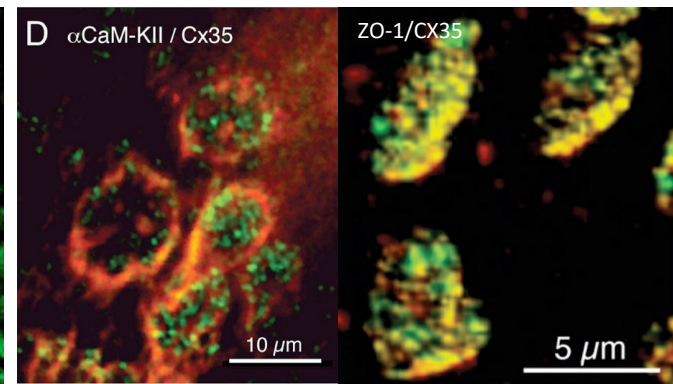
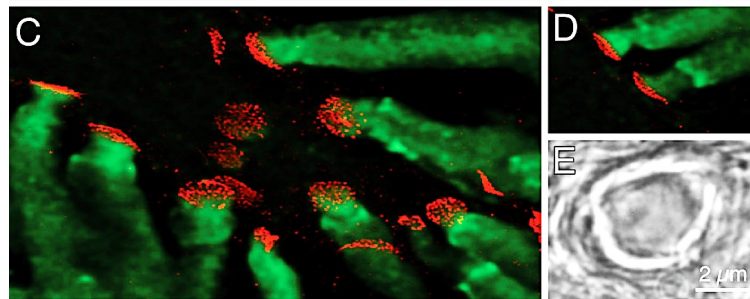
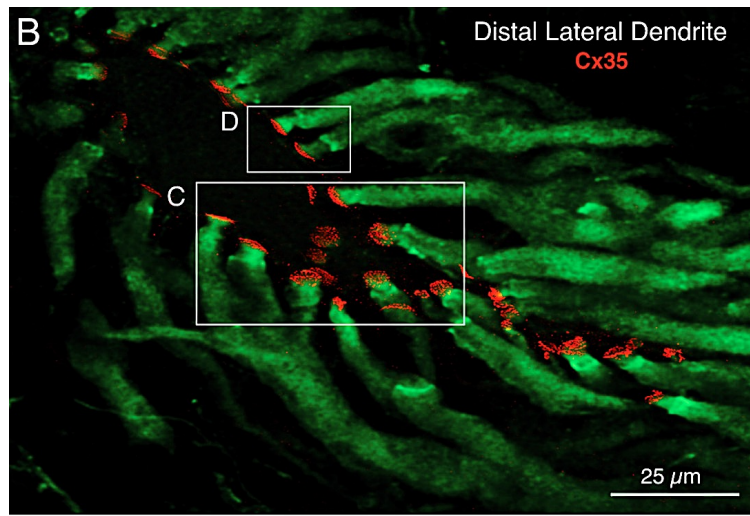
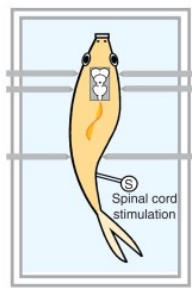
- La *dual transmission* documentata per la prima volta nel sistema nervoso autonomo degli uccelli, e in seguito nel sistema nervoso centrale di pesci, anfibi e rettili
- Sinapsi miste sono state descritte anche in diverse aree del CNS dei mammiferi
- Solo in associazione con sinapsi eccitatorie (colinergiche,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



The Club endings: the striking synapses of the Mauthner cell

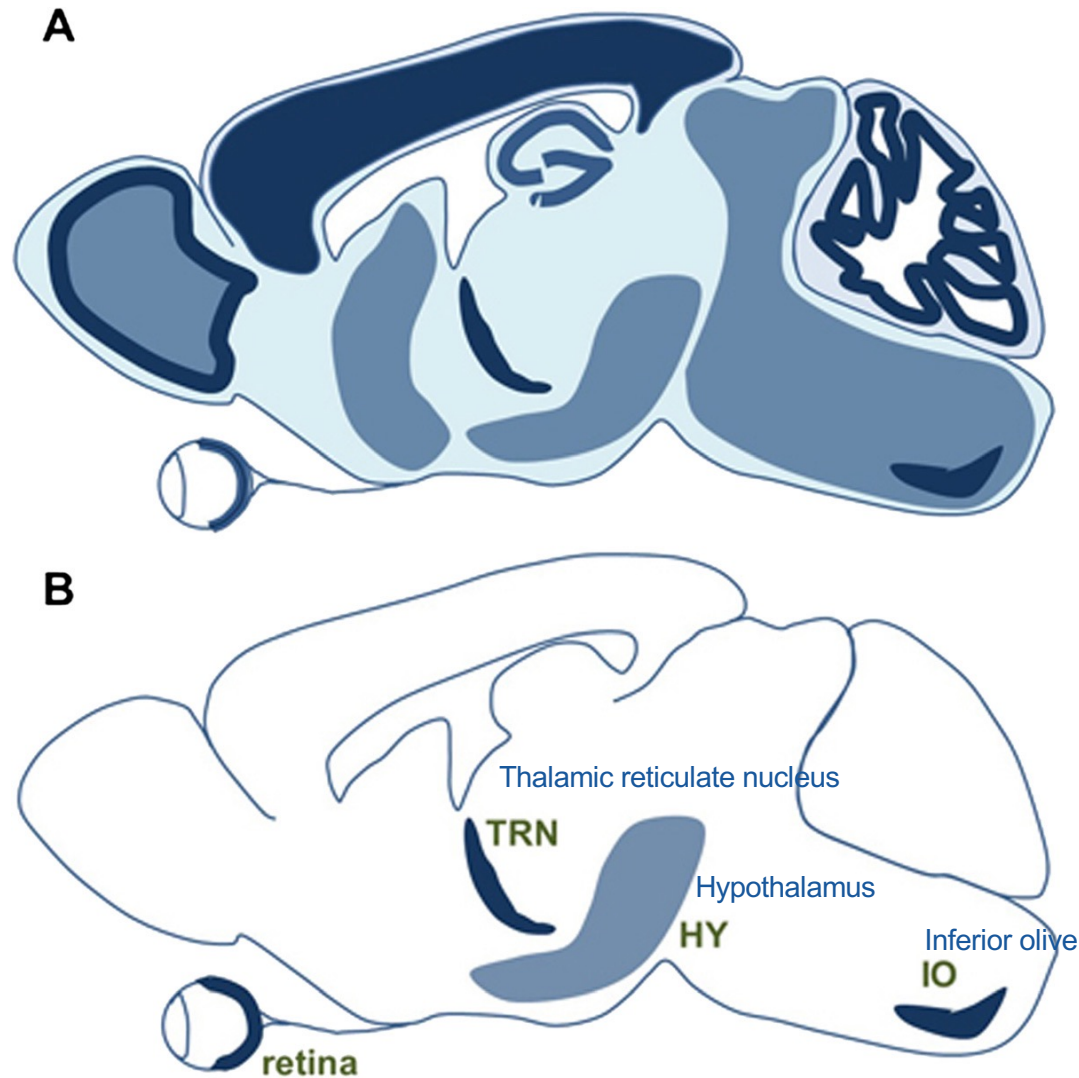
Nagy et al., 2019, doi: 10.1016/j.neulet.2017.09.021

Flores Nakandakare et al., 2010, doi:10.1523/JNEUROSCI.4466-09.2010

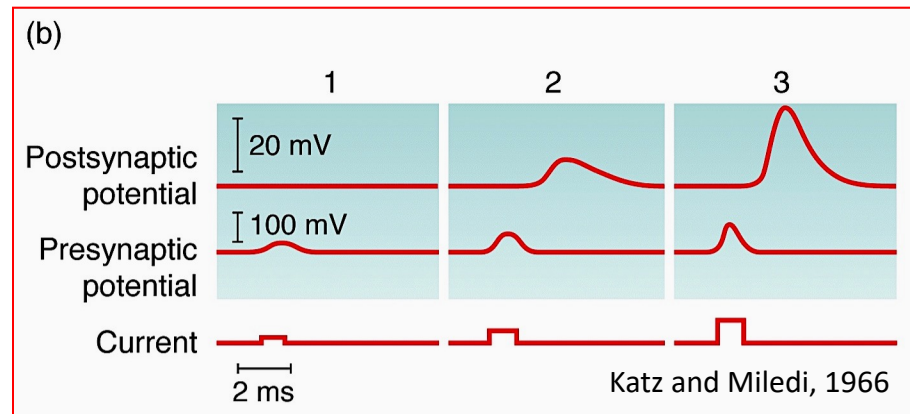
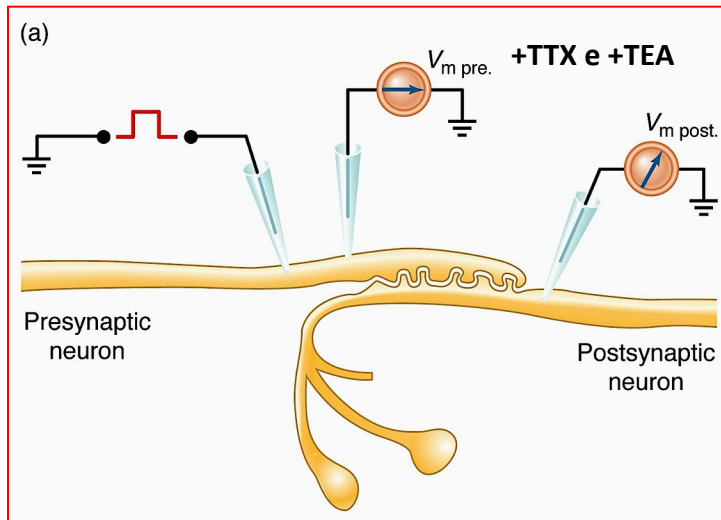


The Club endings: the striking
synapses of the Mauthner cell

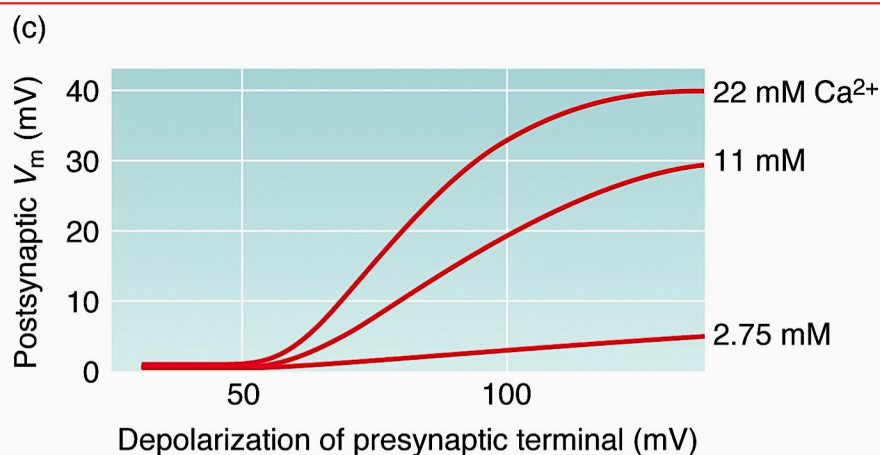
Aree di colocalizzazione tra sinapsi elettriche (connessina CX36) e sinapsi chimiche glutammatergiche



Accoppiamento depolarizzazione-rilascio del neurotrasmettitore



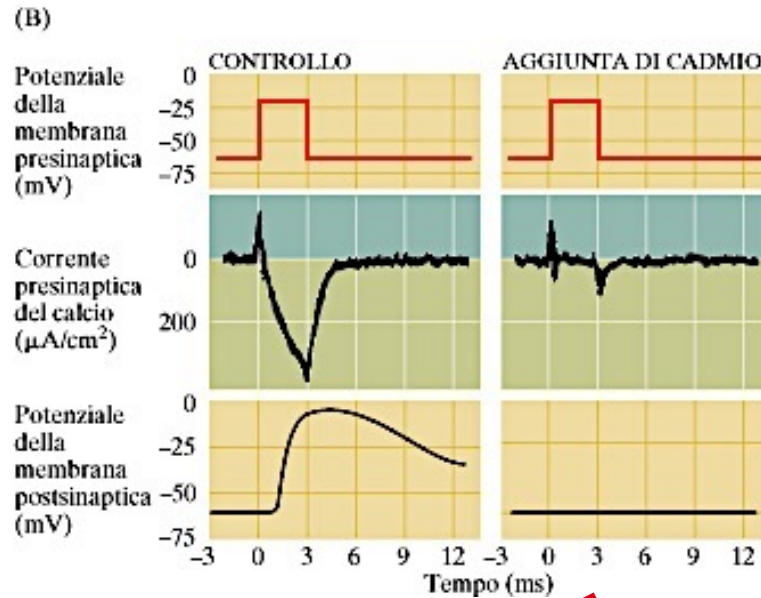
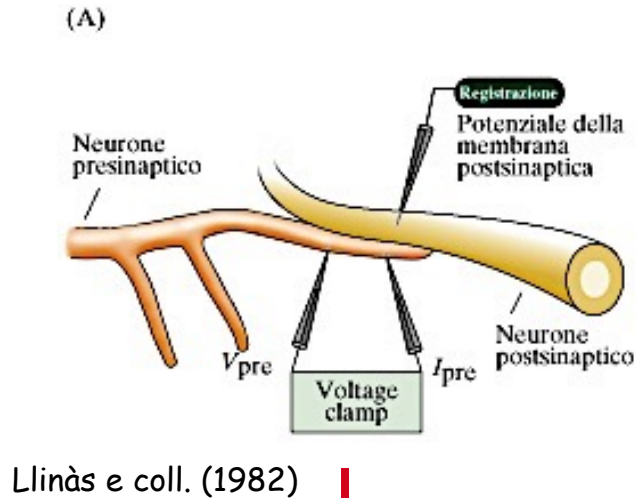
I flussi di Na^+ e K^+ responsabili del PA NON sono necessari per il rilascio del NT



Il Ca^{2+} extracellulare è importante

Riducendo Ca^{2+} extracellulare si riduce l'ampiezza della depolarizzazione della membrana postsinaptica (Katz e Miledi)

...altre prove sperimentali



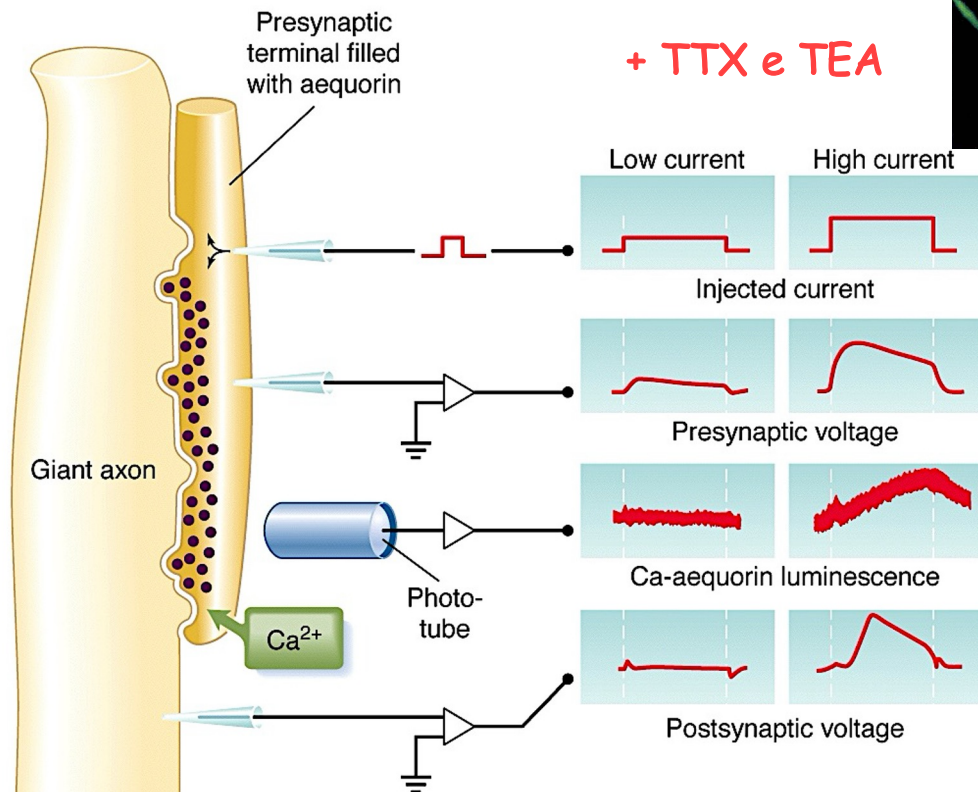
Blocco del voltaggio per studiare le correnti di Ca^{2+}

Aggiunta di cadmio (magnesio, nickel, manganese e cobalto)



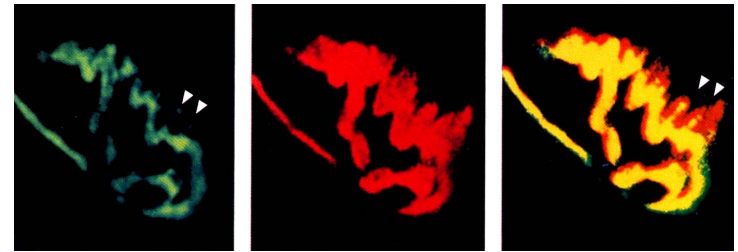
Aggiunta di ω -conotossina, che blocca canali Ca^{2+} -voltaggio dipendenti del tipo N
Ha potenti proprietà analgesiche (100-1000 volte quella della morfina)

Conchiglia del genere *Conus*



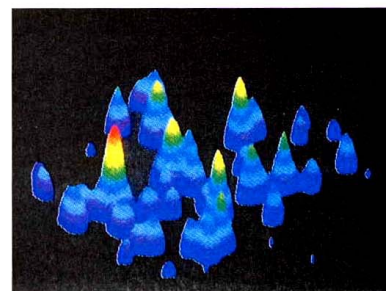
+ TTX e TEA

Anticorpo anti- Ca^{2+} canali del α -bungarotossina sovrapposizione

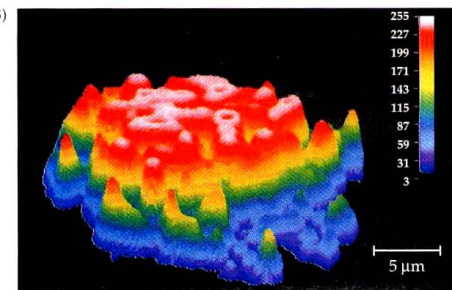


Immunolocalizzazione di canali del Ca^{2+} nel terminale pre-sinaptico

Ca^{2+} raggiunge 100-200 mM in circa 200 ms



(B)



microfluorimetria