

## **Vedere le cellule che si parlano e rispondono agli stimoli**

### Le cellule si parlano

Lo sviluppo armonico e il regolare funzionamento di un organismo pluricellulare richiedono una forte coordinazione e quindi la necessità di scambi di informazione fra le varie parti dell'organismo stesso. Esiste quindi un "dialogo molecolare" fra le cellule, che può essere a breve o lunga distanza.

La segnalazione molecolare può essere fatta da una cellula mediante molecole presenti sulla superficie o tramite molecole secrete al di fuori della cellula. Nel primo caso la trasmissione dell'informazione si può avere solo se le due cellule sono a contatto; nel secondo caso ci possono essere diverse situazioni: a) le molecole secrete possono raggiungere solo cellule molto vicine (secrezione paracrina), perchè poco diffusibili o a vita breve; b) le molecole vengono secrete nel torrente circolatorio (secrezione endocrina) e quindi possono raggiungere tutto il corpo; c) il segnale viene trasmesso elettricamente (e molto velocemente) lungo gli assoni dei neuroni e a livello delle sinapsi vengono rilasciati neurotrasmettitori che arrivano alle cellule bersaglio.

La molecola segnale (detta ligando) si lega a un recettore, che può essere sulla superficie della cellula (in genere una proteina transmembrana) o all'interno della cellula (in questo caso la molecola segnale deve poter diffondere attraverso la membrana plasmatica, e quindi essere idrofobica); il legame ligando-recettore scatena una cascata di reazioni che permettono la trasduzione del segnale e culminano nella risposta della cellula al segnale ricevuto.

Ogni cellula è esposta contemporaneamente a moltissimi segnali con diverso significato. Perchè una cellula continui a vivere sono necessari fattori di sopravvivenza. In mancanza di questi, la cellula inizia un programma di apoptosi; come visto precedentemente, una delle funzioni dell'apoptosi è quella di bilanciare il numero di cellule dei diversi tessuti durante lo sviluppo. In presenza di segnali di sopravvivenza, segnali diversi possono indurre la divisione o il differenziamento secondo specifiche vie.

La capacità della cellula di rispondere e il tipo di risposta dipendono dal tipo di recettori e dal macchinario di risposta che la cellula possiede. Per esempio, cellule cardiache e cellule delle ghiandole salivari hanno gli stessi recettori per l'acetilcolina, ma danno risposte diverse: il legame dell'acetilcolina ai recettori nella cellula cardiaca induce decontrazione, mentre nella cellula salivare induce la secrezione. Le cellule cardiache e le cellule di muscolo scheletrico hanno recettori per l'acetilcolina diversi e danno risposte opposte: in seguito al legame dell'acetilcolina ai recettori, la cellula cardiaca si decontrae, mentre la cellula di muscolo scheletrico si contrae.

### Tipi di recettori

I recettori possono essere di vario tipo:

- a) recettori legati a canali ionici: il legame ligando-recettore provoca la rapida apertura o chiusura di canali ionici. E' la situazione tipica delle sinapsi, in cui il neurotrasmettitore secreto dalla terminazione nervosa si lega ai canali ionici della cellula bersaglio, generando un flusso di ioni che altera il potenziale elettrico della membrana, trasmettendo lo stimolo
- b) recettori legati a un enzima: il legame ligando-recettore provoca l'attivazione di un enzima e quindi di una reazione
- c) recettori legati a una proteina G: il legame ligando-recettore attiva una proteina G, che a sua volta attiva un enzima

Trasduzione del segnale: serie di reazioni intracellulari innescate dal legame ligando recettore, che inducono la risposta della cellula al segnale. Questa catena di reazioni comprende piccole molecole (dette SECONDI MESSAGGERI) e proteine. Le risposte a valle possono essere diverse,

per esempio: modifica dell'attività enzimatica, modifica dell'espressione genica, alterazione del citoscheletro. Abbiamo visto per esempio che nel caso dei linfociti il legame tra l'antigene e un recettore di membrana del linfocita scatena diverse risposte, tra cui la proliferazione del linfocita e la produzione massiccia di anticorpi che vengono secreti.

“Vedere le cellule che rispondono agli stimoli” significa evidenziare al microscopio le variazioni dei parametri implicati ai diversi livelli. Potremo mettere in evidenza la comunicazione cellulare e la risposta agli stimoli evidenziando in cellule vive, soprattutto tramite indicatori fluorescenti, presenza di recettori, legame del ligando al recettore, variazione di di pH, variazioni di concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  e di vari altri ioni, traslocazione di proteine da nucleo a citoplasma, riarrangiamento del citoscheletro, modificazione della forma della cellula, modificazione dell'espressione dei geni, variazione di potenziale ecc.

Presenza di recettori: può essere messa in evidenza utilizzando un ligando (o un suo analogo) reso fluorescente: per esempio la bungarotossina (neurotossina presente nel veleno di certi serpenti), si lega a recettori dell'acetilcolina, e può essere coniugata con rodamina (che dà fluorescenza rossa); osservando al microscopio a fluorescenza con gli opportuni filtri cellule alle quali è stata somministrata la bungarotossina rodaminata, le zone che danno fluorescenza rossa indicano la localizzazione dei recettori per l'acetilcolina.

#### Livello di $\text{Ca}^{++}$

Lo ione  $\text{Ca}^{++}$  è coinvolto nella regolazione di molti processi cellulari. Oltre a funzionare come secondo messaggero, è coinvolto tra l'altro nella contrazione muscolare, nel rilascio di neurotrasmettitori, nella motilità cellulare, nella regolazione dell'attività di certi enzimi, nella fecondazione.

La concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  all'esterno della cellula è  $\approx 10^{-3}\text{M}$ ; nel citosol è mantenuta a  $\approx 10^{-7}\text{M}$ ; questo è possibile per l'attività di pompe e proteine canale sulle diverse membrane della cellula: sul plasmalemma è presente un canale del calcio attraverso il quale, a causa della differenza di concentrazione, il  $\text{Ca}^{++}$  tende ad entrare nel citosol. Sul plasmalemma c'è però anche una pompa del calcio, che pompa gli ioni  $\text{Ca}^{++}$  fuori della cellula. Sulla membrana del reticolo endoplasmico e dei mitocondri ci sono pompe del calcio che assorbono  $\text{Ca}^{++}$  dal citosol accumulandolo nel RE e nei mitocondri, dai quali può essere rilasciato rapidamente nel citosol attraverso l'apertura di canali del calcio presenti sulle stesse membrane. In questo modo il livello di  $\text{Ca}^{++}$  può variare rapidamente e anche in maniera localizzata in diverse zone della cellula.

Si può misurare il livello dello ione  $\text{Ca}^{++}$  utilizzando indicatori fluorescenti che legano specificamente  $\text{Ca}^{++}$  con grande affinità e legandosi con  $\text{Ca}^{++}$  modificano le loro caratteristiche spettrali. Per esempio, nel caso del fluorocromo Fura-2 il legame del fluorocromo a  $\text{Ca}^{++}$  cambia lo spettro di assorbimento, nel caso di Indo-1 il legame del fluorocromo a  $\text{Ca}^{++}$  cambia lo spettro di emissione.

Fura-2: fluorocromo che si eccita in UV e emette a 510 nm; il legame di Fura-2 a  $\text{Ca}^{++}$  cambia lo spettro di assorbimento: l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  aumenta l'assorbimento a 340 nm e diminuisce quello a 380 nm; perciò il rapporto fra la fluorescenza emessa con eccitazione a 340 e quella emessa con eccitazione a 380 nm aumenta con l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$ .

Indo-1: fluorocromo che si eccita in UV (338 nm) e emette a 400-500 nm; il legame di Indo-1 a  $\text{Ca}^{++}$  cambia lo spettro di emissione: l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  aumenta l'emissione a 400 nm ma non quella a 475 nm; perciò il rapporto fra la fluorescenza emessa a 400 nm e quella emessa a 475 nm aumenta con l'aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$ .

Un altro modo di determinare la variazione del livello di  $\text{Ca}^{++}$  è quello di usare una combinazione di due fluorocromi, per esempio Fluo-3 e Fura-red. Fluo-3 si eccita nel blu (488 nm) e fluoresce nel verde (500-550 nm); Fura Red si eccita nel blu (488 nm) e fluoresce nel rosso (600-700 nm). In assenza di  $\text{Ca}^{++}$  (concentrazione 0 mM), la fluorescenza di Fura Red è alta, e quella di fluo-3 è bassa; aumentando la concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  la fluorescenza di Fura Red diminuisce e quella di fluo-3 aumenta.

In tutti questi casi, quindi, il rapporto fra l'intensità della fluorescenza emessa nelle due diverse condizioni dipende dalla concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$ : Perciò le variazioni del rapporto riflettono variazioni di concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$ , e quindi dal valore del rapporto si può risalire alle variazioni del livello di  $\text{Ca}^{++}$ . Con sistemi di acquisizione digitale e di analisi d'immagine è possibile visualizzare il livello di  $\text{Ca}^{++}$  nelle diverse zone della cellula: questa tecnica è detta **Calcium imaging**. A grandi linee questa tecnica comporta i seguenti passaggi. Innanzitutto le cellule devono essere caricate con il fluorocromo ("loading"): si somministra una forma modificata lipofila, che è in grado di attraversare il plasmalemma e non lega il  $\text{Ca}^{++}$ ; all'interno della cellula le parti lipofile vengono tagliate da enzimi intracellulari, esponendo cariche negative; in queste condizioni il fluorocromo è in grado di legare  $\text{Ca}^{++}$ , ma non può più attraversare il plasmalemma e resta intrappolato nel citosol. Le cellule vengono quindi sottoposte al trattamento del quale si vuole studiare l'effetto sul livello di  $\text{Ca}^{++}$ . A intervalli di tempo successivi vengono acquisite in scala di grigi le immagini della fluorescenza emessa con le due eccitazioni (nel caso di Fura-2), e con un apposito software viene calcolato il rapporto tra le due fluorescenze per ogni pixel o gruppo di pixel dell'immagine. Un aumento del rapporto  $I_{340}/I_{380}$  indica un aumento della concentrazione di  $\text{Ca}^{++}$  in quella zona della cellula. Generalmente i risultati vengono rappresentati in pseudocolori, secondo una scala rapportata al livello di  $\text{Ca}^{++}$ , che va dal blu (che di solito indica basse concentrazioni) al rosso (concentrazioni più alte).

#### Variazioni di pH

Come per il  $\text{Ca}^{++}$ , ci sono molti indicatori fluorescenti che cambiano le proprietà spettrali al variare del pH, e che possono quindi essere utilizzati per studiare il ruolo del pH in molti processi cellulari, secondo lo stesso principio visto prima.