

CAPITOLO 3. SISTEMA COLINERGICO.

3.1 Sistema colinergico ed AD.

L'acetilcolina (ACh) è sintetizzata nella parte pre-sinaptica dei neuroni a partire dalla colina e dall'acetil-CoA ad opera dell'enzima colinacetiltransferasi (ChAT). La colina entra nel corpo cellulare grazie a sistemi di trasporto ad alta e bassa affinità ed è anche prodotta dalla demolizione di fosfolipidi contenenti colina. L'Acetil-CoA si forma all'interno della cellula, mediante processi aerobici. L'ACh che viene sintetizzata, viene dunque immagazzinata sotto due forme, una vescicolare ed una citoplasmatica e viene rilasciata sia spontaneamente (probabilmente quella citoplasmatica), sia per depolarizzazione della membrana cellulare (forse quella vescicolare).

Una volta rilasciata l'ACh agisce su due classi di recettori colinergici: quelli muscarinici e quelli nicotinici, a loro volta suddivisi in sottotipi. I recettori sono localizzati sia sulla parte presinaptica sia su quella postsinaptica delle cellule nervose e possono esplicare azione inibitoria o eccitatoria. La terminazione degli effetti dell'ACh avviene per allontanamento tramite diffusione, ma soprattutto ad opera dell'enzima Acetilcolinesterasi (AChE) (Fig.3.1).

Molto probabilmente la colina che si produce per catabolisi enzimatica, viene poi riassorbita per ricominciare il ciclo.

Nei pazienti colpiti da AD si è notata una diminuzione del 60-95% dell'attività del ChAT; tale attività è un indice affidabile per la funzionalità dei neuroni colinergici [Becker *et al.* 1991].

Si è notata inoltre la diminuzione nel trasporto ad alta affinità della colina ed un decremento, in vitro, della sintesi dell'ACh e del suo rilascio.

Per quanto riguarda i recettori colinergici è stata osservata una diminuzione in numero di quelli nicotinici e degli M2 muscarinici presinaptici ma non degli M1 postsinaptici [Pomponi *et al.* 1990].

Terapie.

La possibile efficacia di un intervento sul sistema colinergico nel trattamento sintomatico dell'AD, ha portato la ricerca a muoversi in diverse direzioni. Una prima via è volta ad aumentare la funzionalità delle sinapsi

colinergiche mediante precursori dell'ACh o mediante modulatori della secrezione e dell'immagazzinamento del neurotrasmettitore (aminopiridine, già utilizzate nella terapia della Sclerosi Multipla) o uso di fattori trofici.

Un'altra via è quella che prevede l'impiego di agenti colinergici diretti che includono gli agonisti (sia muscarinici che nicotinici) che stimolano direttamente i recettori.

Infine è possibile utilizzare agenti colinergici che aumentino la concentrazione dell'acetilcolina inibendo la sua idrolisi enzimatica e prolungandone così la funzione fisiologica [Pomponi *et al.* 1990].

Questa tipologia di farmaci verrà descritta nel capitolo 5 dopo aver presentato la funzionalità e la struttura dell'Acetilcolinesterasi.

3.2 Le colinesterasi.

Le colinesterasi sono una famiglia di enzimi costituiti dall'Acetilcolinesterasi (AChE) e dalla Butirilcolinesterasi (BChE). I vertebrati possiedono entrambi gli enzimi che probabilmente provengono dalla duplicazione di un singolo gene.

L'AChE è presente principalmente nel sistema nervoso centrale e periferico, nei muscoli scheletrici e nella membrana eritrocitaria.

La BChE è invece presente nel fegato, dove viene sintetizzata e secreta nel plasma, nell'intestino, nel cuore, nei reni e nei polmoni.

Bisogna sottolineare l'alta omologia di queste due colinesterasi: su 539 residui la *h*AChE e la *h*BChE hanno 52.8% identità e il 69.8 % di omologia.

Questi due enzimi si distinguono essenzialmente per la specificità di substrato: l'AChE idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina (ACh) più velocemente rispetto agli esteri di colina aventi una catena acilica più ingombrante (come la butirrilcolina) (Fig.3.2). La BChE invece mostra la stessa attività verso entrambi i substrati ed è, per questo, meno selettiva. L'AChE inoltre presenta una "inibizione da substrato" contrariamente alla BChE che è attiva solo ad alte concentrazioni di substrato.

Il principale ruolo dell'AChE è noto da tempo ma quello della BChE rimane ancora una questione aperta; sembra che questa colinesterasi abbia un ruolo importante nella differenziazione e nello sviluppo cellulare [Chatonnet *et al.* 1989; Taylor 1991; Massoulié *et al.* 1993; Layer *et al.* 1995]. E' stato inoltre recentemente ipotizzato che la BChE non sia essenziale per la sopravvivenza ma possa giocare un ruolo importante, per

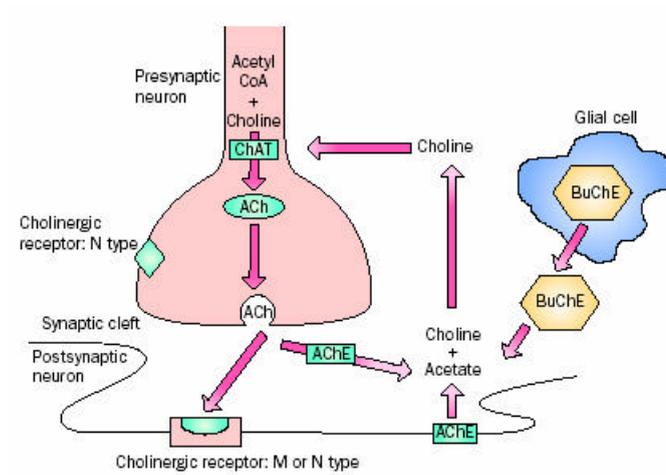


Fig.3.1 Funzionamento della sinapsi colinergica.

ACh= acetilcolina

AChE = Acetilcolinesterasi

BuCh = butirrilcolina

BuChE = Butirrilcolinesterasi

ChAT = Colina acetil trasferasi

M = muscarinico

N = nicotinico

esempio come “riserva” dell’AChE, qualora essa si trovi in condizioni di attività minore o assente [Li *et al.* 2000].

Entrambi gli enzimi sono inibiti da un’ampia gamma di sostanze naturali e sintetiche: tra le naturali ricordiamo la fascicolina, una tossina presente nel veleno del serpente “*green mamba*” [Karlsson *et al.* 1984] e l’alcaloide tubocurarina, mentre tra le sintetiche citiamo gli insetticidi ed i gas nervini.

3.3 L’Acetilcolinesterasi.

Funzione.

La più importante funzione dell’AChE è la terminazione della trasmissione del segnale nervoso nelle sinapsi colinergiche. Per interrompere il trasferimento del segnale e ripristinare l’eccitabilità della membrana postsinaptica, l’AChE idrolizza il neurotrasmettitore acetilcolina in colina e acido acetico [Lester *et al.* 1977] (Fig.3.3 e Fig.1.1).

Le molecole di AChE sono situate nella tasca sinaptica e spesso sono ancorate direttamente alla membrana postsinaptica.

E’ stato stimato che l’AChE idrolizzi circa un terzo delle molecole di ACh prima che raggiungano i recettori, ed il restante dopo che abbiano interagito con gli stessi [Lester *et al.* 1977].

L’enzima ha un alto numero di turnover di circa 20000 sec^{-1} (una molecola di ACh viene idrolizzata in $50 \mu\text{sec}$); è dunque uno degli enzimi più efficienti esistenti in natura avendo una velocità che si avvicina al limite controllato dalla diffusione [Rosenberry *et al.* 1975; Hasinoff *et al.* 1982; Bazelyansky *et al.* 1986].

Questa rapidità nel legare ed idrolizzare il neurotrasmettitore permette all’intero processo della trasmissione neuromuscolare di essere ripetuto svariate centinaia di volte in un secondo [Lester *et al.* 1977].

L’Acetilcolinesterasi si trova anche in regioni dove la sua funzione non è chiara, come le regioni non sinaptiche del muscolo scheletrico e in vari neuroni cerebrali con funzioni non colinergiche [Greenfield 1984]; è presente anche sulla superficie delle membrane cellulari degli eritrociti dove, probabilmente, è coinvolta nell’adesione cellulare [Layer *et al.* 1993].

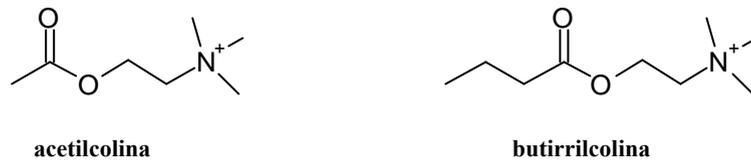


Fig.3.2 Formule di struttura dell'ACh e della BCh.

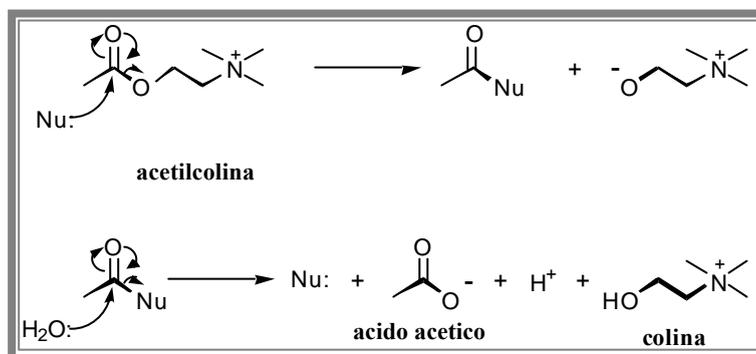


Fig.3.3 Meccanismo di idrolisi dell'ACh.

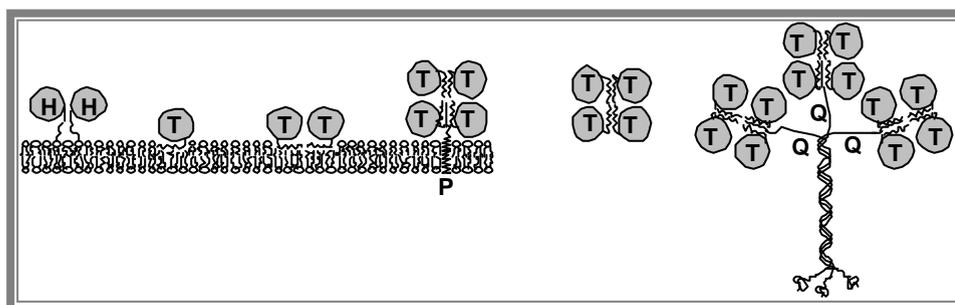


Fig.3.4 Forme molecolari di AChE.

Forme molecolari.

L'AChE in tutti gli organismi superiori può essere presente in varie forme molecolari che sono dovute sia a due modelli di “*splicing*” del gene che codifica per l'enzima, sia a modificazioni post traslazionali ed alla associazione delle subunità strutturali.

Ci sono due forme principali di subunità catalitiche: la forma H (*Hydrophobic*) che consiste di circa 540 residui e la forma T (*Tailed*) che contiene circa 40 residui in più [Giles 1997].

La struttura quaternaria dell'AChE delle subunità H è un dimero ancorato alla membrana plasmatica pre- e postsinaptica mediante un ponte di glicofosfatidilinositolo (GPI-G2), legato covalentemente all'estremità C-terminale delle subunità catalitiche [Silman *et al.* 1987].

Le subunità T danno luogo a svariate strutture quaternarie, dal semplice monomero globulare (G1) al dimero (G2) e al tetramero, sia ancorato che solubile (G4), fino alla forma asimmetrica costituita da tre tetrameri connessi ad una lunga coda di collagene (A12) (Fig.3.4).

Non è nota la cooperatività tra le subunità; sembra che l'idrolisi sia indipendente dalle forme molecolari dell'enzima.

TcAChE.

Negli organi elettrici della *Torpedo Californica* si trovano varie forme oligomeriche dell'AChE; la più abbondante è un omodimero (GPI-G2) che ha una struttura primaria la cui omologia con l'enzima umano è pari al 74.6%; molti, infatti, sono i residui identici, il 57.6% su 540 sovrapposti, e molti altri sono quelli omologhi. Non solo sono conservati gli amminoacidi “chiave”, (il Trp84 *Tc*, *Torpedo Californica*, corrisponde al Trp86 *h*, human; il Trp279 *Tc* al Trp286 *h*; la Ser200 *Tc* alla Ser203 *h*; l'His440 *Tc* alla His447 *h*; il Glu327 *Tc* al Glu334 *h*) ma anche molte parti di sequenza di varia lunghezza sono conservate (Fig.3.5).

L'omodimero GPI-P2 inoltre è facilmente purificabile dagli organi elettrici utilizzando una fosfolipasi C batterica PI-specifica (Fig.3.6). Queste condizioni hanno permesso di utilizzare la *TcAChE* come modello attendibile dell'enzima umano.

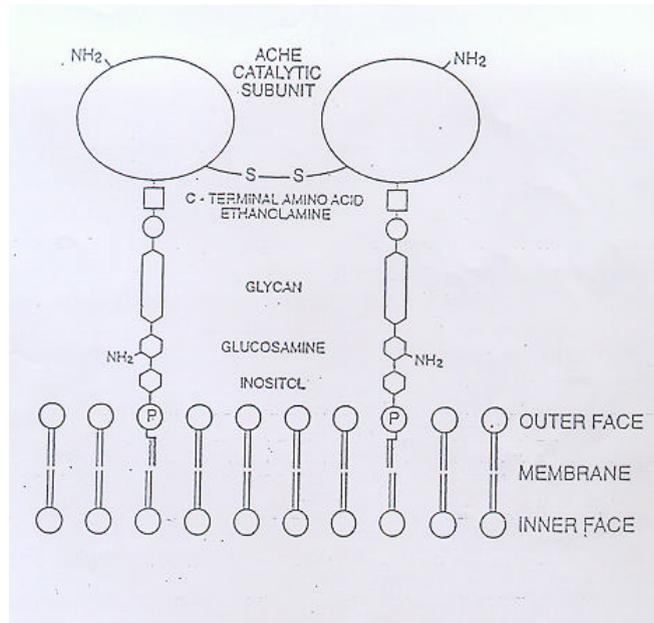


Fig.3.6 Omodimero della *TcAChE* ancorato alla membrana cellulare.