7. Giugno.

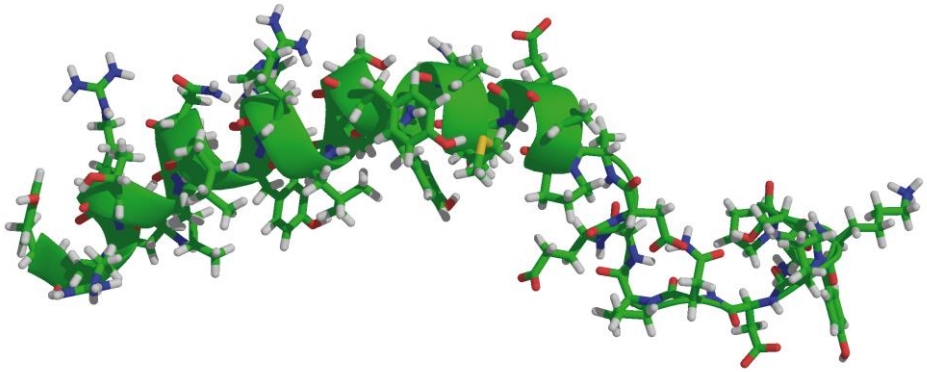
Quando il cervello parla: i neuropeptidi

Il nostro giocattolo più grande è il cervello.
Charlie Chaplin

La comunicazione tra i neuroni nel cervello comporta il rilascio di ***neurotrasmettitori rapidi (ad esempio glutammato, acido γ-aminobutirrico) o lenti (ad esempio catecolamine, istamina) dal terminale presinaptico, da soli o insieme a neuromodulatori.***

I neurotrasmettitori veloci inducono correnti ioniche nel neurone postsinaptico.
Al contrario, i neurotrasmettitori lenti e i neuromodulatori agiscono sui recettori metabotropici accoppiati alle proteine G (GPCR) nella membrana postsinaptica per innescare cascate di secondi messaggeri intracellulari.

I neuropeptidi sono piccole catene di aminoacidi che svolgono ruoli vitali nel sistema endocrino e nervoso, regolando diverse funzioni come il metabolismo, la percezione del dolore, il sonno e il ritmo circadiano, l'umore e l'apprendimento.



I neuropeptidi e i loro recettori sono molecole di segnalazione antiche, potenti e onnipresenti che possono esercitare un controllo persistente della fisiologia e del comportamento.
sono una superfamiglia di neuromodulatori: ne sono stati identificati più di 100.

Malfunzionamenti nella segnalazione dei neuropeptidi sono stati implicati in molte malattie, tra *cui l'insonnia, il diabete e la depressione.*
Il monitoraggio dei neuropeptidi con elevata risoluzione spaziotemporale in vivo potrebbe fornire informazioni sulle loro funzioni in condizioni fisiologiche e nella patofisiologia della malattia e promuovere lo sviluppo di nuovi farmaci.

Tuttavia, lo studio dei neuropeptidi è impegnativo a causa dei limiti degli strumenti disponibili per la loro rilevazione. Inoltre, nonostante decenni di sviluppo di farmaci mirati ai neuropeptidi-GPCR, né la loro localizzazione né la dinamica dell'attivazione indotta dal ligando sono sufficientemente comprese.
Tuttavia, nonostante l'elevata importanza funzionale dei neuropeptidi, non è ancora chiaro quando, dove e come esercitano i loro effetti nei sistemi cerebrali complessi.

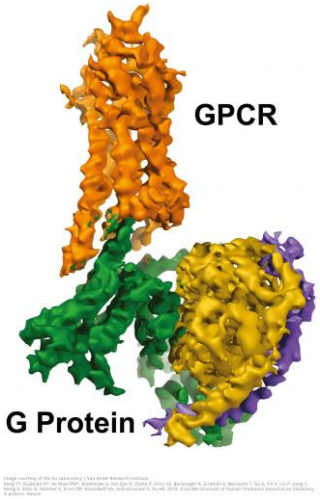
State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking University School of Life Sciences, Beijing

ha sviluppato e caratterizzato una serie di sensori geneticamente codificati per il rilevamento dei neuropeptidi

Wang H et al
A tool kit of highly selective and sensitive genetically encoded neuropeptide sensors.
Science. 2023 Nov 17;382(6672):eabq8173.

Questi sensori hanno avuto una risposta altamente sensibile, specifica e robusta ai rispettivi ligandi sia nelle linee cellulari che nei neuroni primari senza influenzare le vie di segnalazione endogene ed offrono l'opportunità di affrontare domande chiave riguardanti i neuropeptidi, la loro funzione e il loro ruolo sia nella salute che nella malattia.

Recettori accoppiati a ***proteine G (GPCR)*** ***con la proteina fluorescente verde circolarmente permutata (cpGFP)*** hanno portato allo sviluppo di diversi sensori basati sull'attivazione GPCR (GRAB) in grado di rilevare neuromodulatori con elevata risoluzione spaziotemporale.

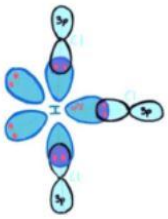


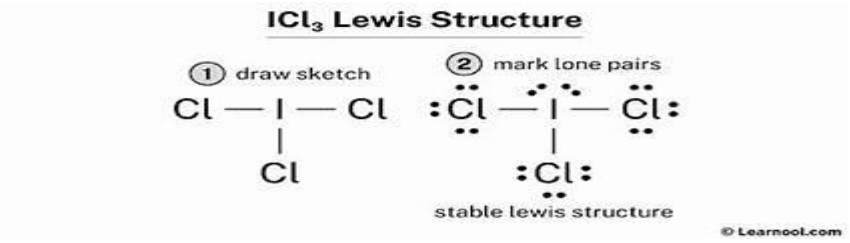
Poiché la maggior parte dei recettori dei neuropeptidi appartengono alla ***superfamiglia GPCR,*** che a livello endogeno ha elevata affinità e specificità per i loro ligandi, si potrebbero, in linea di principio, sviluppare sensori di fluorescenza geneticamente codificati per ciascun neuropeptide.

Tuttavia, data la diversità dei neuropeptidi e dei loro ***GPCR affini***, lo sviluppo e l'ottimizzazione di un sensore GRAB con ciascun GPCR de novo potrebbe richiedere molto lavoro. Nonostante le variazioni nelle loro sequenze e strutture, i ***GPCR*** dei neuropeptidi condividono un cambiamento strutturale comune in seguito all'attivazione indotta dal ligando.

Pertanto, un approccio semplificato trapiantando ***l'intero circuito intracellulare 3 (ICL3)*** contenente cpGFP dai sensori GRAB esistenti ai nuovi sensori GRAB del neuropeptide potrebbe conferire ai nuovi sensori la capacità di modificare la fluorescenza in seguito al legame del ligando senza modificare e ottimizzare ciascun sensore individualmente.

ICl3 (tricloruro di iodio)
*è un composto interalogeno di colore **giallo brillante** costituito da un atomo di iodio e tre atomi di cloro. È una molecola a forma di T con sp3d ibridazione. Allo stato solido forma il dimero (I2Cl6) con due atomi di cloro a ponte. Questo dimero ha una struttura planare.*





Questa strategia potrebbe accelerare notevolmente lo sviluppo di un'ampia varietà di sensori GRAB su misura per rilevare le dinamiche in tempo reale di diversi neuropeptidi endogeni con un'ottimizzazione minima necessaria.

Utilizzando questa strategia di innesto, sono stati sviluppati una serie di ***sensori neuropeptidici geneticamente codificati*** altamente selettivi e sensibili in grado di rilevare:

Somatostatina (SST)
Fattore di rilascio della corticotropina (CRF)
Colecistochinina (CCK)
Neuropeptide Y (NPY)
Neurotensina (NTS)
Peptide intestinale vasoattivo (VIP)

Questi sensori sono progettati ***sostituendo l'ICL3*** in ogni nuovo ***peptide GPCR*** con l'intero ICL3 contenente cpGFP dal sensore GRAB NE precedentemente ottimizzato per norepinefrina (NE) .

Questa serie di sensori peptidici consente il rilevamento di neuropeptidi specifici a ***concentrazioni nanomolari*** con interruzioni minime dell'attività neuronale, del profilo trascrizionale e dei comportamenti animali. Abbiamo dimostrato in dettaglio le utilità dei sensori SST e CRF.

Nello specifico, abbiamo utilizzato il sensore SST1.0 per rilevare il rilascio di SST attività-dipendente nei neuroni corticali di ratto in coltura e nelle isole pancreatiche di topi e per rivelare la dinamica SST durante l'apprendimento condizionato nei topi. Inoltre, il sensore CRF1.0 ha riportato in modo affidabile il rilascio evocato dalla stimolazione elettrica di CRF in fettine cerebrali acute di topi, ha monitorato i cambiamenti in vivo nei livelli di CRF nell'ipotalamo e ha visualizzato la dinamica corticale CRF risolta spazialmente in risposta a stimoli che inducono stress in topi.

Per consentire lo sviluppo rapido e scalabile di sensori neuropeptidici, è stato sviluppato ***un metodo di innesto ICL3*** che genera in modo efficiente sensori fluorescenti geneticamente codificati.

Sfruttando questo metodo, è stato così realizzato un ***pannello di sensori*** per rilevare la dinamica in tempo reale di sei neuropeptidi comunemente studiati.

In particolare i sensori **GRAB SST e CRF** possono essere utilizzati per monitorare la dinamica dei neuropeptidi in vitro, ex vivo e in vivo con buona sensibilità, selettività e risoluzione spaziotemporale.

Questa strategia ingegneristica "flessibile" e un kit di strumenti di sensori peptidici ottimizzati aprono la strada allo studio del rilascio, della regolazione e delle funzioni di diversi neuropeptidi in stati sia fisiologici che fisiopatologici.

Allegato: 1

Neuropeptidi

Esistono oltre 100 neuropeptidi conosciuti, che rappresentano la classe più ampia e diversificata di molecole di segnalazione nel sistema nervoso. I neuropeptidi sono sintetizzati da grandi proteine precorritrici che vengono scisse e trasformate in modo post-traduzionale, quindi confezionate in vescicole centrali dense. Sono spesso rilasciati insieme ad altri neuropeptidi e neurotrasmettitori in un singolo neurone, producendo una moltitudine di effetti. Una volta rilasciati, i neuropeptidi possono diffondersi ampiamente per influenzare un'ampia gamma di bersagli.

Sintesi

I neuropeptidi sono sintetizzati da grandi proteine precorritrici inattive chiamate prepropeptidi. I prepropeptidi contengono sequenze di una famiglia di peptidi distinti e spesso contengono copie ripetute degli stessi peptidi, a seconda dell'organismo.Oltre alle sequenze peptidiche precorritrici, i prepropeptidi contengono anche un segnale peptide, peptidi spaziatori e siti di scissione

La sequenza segnale peptidica guida la proteina alla via secretoria, a partire dal reticolo endoplasmatico. La sequenza segnale peptidica viene rimossa nel reticolo endoplasmatico, producendo un propeptide che viaggia verso l'apparato del Golgi dove viene scisso proteoliticamente e trasformato in più peptidi. I peptidi sono confezionati in dense vescicole centrali, dove possono verificarsi ulteriori scissioni ed elaborazioni, come l'ammidazione C-terminale. Le vescicole del nucleo denso vengono trasportate attraverso il neurone e possono rilasciare peptidi nella fessura sinaptica, nel corpo cellulare e lungo l'assone.

Meccanismo
I neuropeptidi vengono rilasciati dalle vescicole del nucleo denso dopo la depolarizzazione della cellula. Alcune prove mostrano che i neuropeptidi vengono rilasciati dopo lo sparo o esplosione ad alta frequenza, distinguendo la vescicola del nucleo denso dal rilascio della vescicola sinaptica. I neuropeptidi utilizzano la trasmissione del volume e non vengono ricaptati rapidamente, consentendo la diffusione su vaste aree (da nm a mm) per raggiungere gli obiettivi. Quasi tutti i neuropeptidi si legano ai GPCR, inducendo cascate di secondi messaggeri a modulare l'attività neurale su scale temporali lunghe.

L'espressione dei neuropeptidi nel sistema nervoso è diversa. I neuropeptidi sono spesso rilasciati insieme ad altri neuropeptidi e neurotrasmettitori, producendo una varietà di effetti a seconda della combinazione di rilascio. Ad esempio, il peptide intestinale vasoattivo viene tipicamente rilasciato insieme all'acetilcolina

Scoperta
Il primo neuropeptide, la sostanza P, fu scoperto da Ulf von Euler e John Gaddum nel 1931.[4][9] All'inizio del 1900, i messaggeri chimici venivano estratti grossolanamente da cervelli e tessuti di animali interi e studiati per i loro effetti fisiologici. Nel tentativo di isolare e studiare l'acetilcolina, von Euler e Gaddum ricavarono un estratto in polvere grezza dall'intero cervello e intestino di equini e scoprirono che induceva contrazioni muscolari e abbassamento della pressione sanguigna. Gli effetti non sono aboliti dall'atropina e quindi non possono essere attribuiti esclusivamente all'acetilcolina. La sostanza P è stata purificata e sequenziata per la prima volta nel 1971 da Michael Chang e Susan Leeman, rivelando la sua catena peptidica di 11 amminoacidi.[10] Metodi simili furono usati per identificare altri neuropeptidi all'inizio degli anni 1950, come la vasopressina e l'ossitocina
Il termine "neuropeptide" è stato utilizzato per la prima volta negli anni 1970 da David de Wied, che ha studiato gli effetti degli ormoni peptidici ACTH, MSH e vasopressina sull'apprendimento e sulla memoria.

Bersagli del recettore
La maggior parte dei neuropeptidi agisce sui recettori accoppiati alle proteine G (GPCR). I neuropeptidi-GPCR si dividono in due famiglie: la classe della rodopsina e la secretina. La maggior parte dei peptidi attiva un singolo GPCR, mentre alcuni attivano più GPCR (es AstA, AstC, DTK). Le relazioni di legame peptide-GPCR sono altamente conservate negli animali. A parte le relazioni strutturali conservate, alcune funzioni del peptide-GPCR sono conservate anche in tutto il regno animale.

Letture consigliate

Neuropeptidi: opportunità per la scoperta di farmaci.
I neuropeptidi e i loro recettori accoppiati alle proteine G sono ampiamente distribuiti in tutto il corpo e comunemente si trovano insieme ai neurotrasmettitori classici e sono complementari agli stessi. Le funzioni dei neuropeptidi vanno dal neurotrasmettitore al fattore di crescita. Sono presenti nelle cellule gliali, sono ormoni nel sistema endocrino e sono messaggeri nel sistema immunitario. Numerose evidenze indicano che i neuropeptidi sono di particolare importanza quando il sistema nervoso è messo a dura prova (p. es., da stress, lesioni o abuso di farmaci). Queste caratteristiche e il gran numero di neuropeptidi e recettori neuropeptidici offrono molte opportunità per la scoperta di nuovi bersagli farmacologici per il trattamento dei disturbi del sistema nervoso. Infatti, sono stati sviluppati antagonisti e agonisti selettivi del sottotipo recettoriale e recentemente un antagonista del recettore della sostanza P (neurochinina 1) ha dimostrato

di avere efficacia clinica nel trattamento della depressione maggiore e dell'emesi indotta dalla chemioterapia.

Hökfelt T, Bartfai T, Bloom F. Neuropeptides: opportunities for drug discovery. Lancet Neurol. 2003 Aug;2(8):463-72. doi: 10.1016/s1474-4422(03)00482-4. PMID: 12878434.

15

Sistemi di segnalazione umani: abbinamento di peptidi a recettori accoppiati a proteine

Il sistema peptidergico è la rete più abbondante di segnalazione mediata dai recettori ligandi negli esseri umani. Tuttavia, i ruoli fisiologici rimangono sfuggenti per numerosi peptidi e più di 100 recettori accoppiati a proteine G (GPCR). Qui riportiamo l'accoppiamento di peptidi e recettori affini. Integrando la genomica comparativa tra 313 specie e la bioinformatica su tutte le sequenze proteiche e le strutture dei GPCR umani di classe A, identifichiamo caratteristiche universali che scoprono ulteriori potenziali sistemi di segnalazione peptidergica. Utilizzando tre test biochimici ortogonali, abbiamo accoppiato 17 ligandi endogeni proposti con cinque GPCR orfani associati a malattie, inclusi disturbi genetici, neoplastici, nervosi e riproduttivi. Identifichiamo anche ulteriori peptidi per nove recettori con ligandi e ruoli fisiopatologici riconosciuti. Questo approccio sperimentale computazionale integrato e sfaccettato espande la rete peptide-GPCR e apre la strada agli studi per chiarire il ruolo di questi sistemi di segnalazione nella fisiologia e nella malattia umana.

Foster SR, Hauser AS, Vedel L, Strachan RT, Huang XP, Gavin AC, Shah SD, Nayak AP, Haugaard-Kedström LM, Penn RB, Roth BL, Bräuner-Osborne H, Gloriam DE. Discovery of Human Signaling Systems: Pairing Peptides to G Protein-Coupled Receptors. Cell. 2019 Oct 31;179(4):895-908.e21. doi: 10.1016/j.cell.2019.10.010. PMID: 31675498; PMCID: PMC6838683.

Ruolo della somatostatina nella regolazione dei fattori centrali e periferici di sazietà e obesità.

L'obesità rappresenta uno dei maggiori problemi sociali e sanitari a livello globale e spesso è associata a diverse altre condizioni patologiche. Oltre al comportamento alimentare non regolamentato, la secrezione ormonale circolante mediata dai peptidi e le vie di segnalazione svolgono un ruolo fondamentale nell'obesità indotta dall'assunzione di cibo. Tra i tanti peptidi coinvolti nella regolazione del comportamento di ricerca del cibo, la somatostatina (SST) è quello che svolge un ruolo determinante nel complesso processo dell'appetito. La SST è coinvolta nella regolazione del rilascio e della secrezione di altri peptidi, nell'integrità neuronale e nella regolazione ormonale. Sulla base di studi passati e recenti, l'SST potrebbe fungere da ponte tra i tessuti centrali e periferici con un impatto significativo sull'obesità associata al comportamento di assunzione di cibo e al dispendio energetico.

Kumar U, Singh S. Role of Somatostatin in the Regulation of Central and Peripheral Factors of Satiety and Obesity. Int J Mol Sci. 2020 Apr 7;21(7):2568. doi: 10.3390/ijms21072568. PMID: 32272767; PMCID: PMC7177963.

La cellula δ pancreatica che secerne somatostatina in salute e malattia.

Le cellule δ che secernono somatostatina comprendono circa il 5% delle cellule delle isole pancreatiche. Le cellule δ hanno una morfologia complessa e potrebbero interagire con molte più cellule insulari di quanto suggerito dal loro basso numero. Le cellule δ contengono canali del potassio sensibili all'ATP, che si aprono a bassi livelli di glucosio ma si chiudono quando il glucosio è elevato. Questa chiusura avvia la depolarizzazione della membrana, l'attività elettrica e l'aumento della secrezione di somatostatina. I fattori rilasciati dalle cellule α o β vicine amplificano gli effetti indotti dal glucosio sulla secrezione di somatostatina da parte delle cellule δ, che agiscono localmente all'interno delle isole come inibitori paracrini o autocrini della secrezione di insulina, glucagone e somatostatina. Gli effetti della somatostatina sono mediati dall'attivazione dei recettori della somatostatina accoppiati alla proteina G inibitoria, che culmina nella soppressione dell'attività elettrica e nell'esocitosi nelle cellule α e β. La secrezione di somatostatina è alterata nei modelli animali di diabete mellito, il che potrebbe spiegare la perdita di un'appropriata secrezione di glucagone indotta dall'ipoglicemia, un difetto che potrebbe essere mitigato dagli antagonisti del recettore 2 della somatostatina. Gli antagonisti della somatostatina o gli agenti che sopprimono la secrezione di somatostatina sono stati proposti in aggiunta alla terapia con insulina. In questa recensione, riassumiamo la fisiologia cellulare della secrezione di somatostatina, cosa potrebbe andare storto nel

diabete mellito e il potenziale terapeutico degli agenti che mirano alla secrezione o all'azione della somatostatina.

Rorsman P, Huising MO. The somatostatin-secreting pancreatic δ-cell in health and disease. Nat Rev Endocrinol. 2018 Jul;14(7):404-414. doi: 10.1038/s41574-018-0020-6. PMID: 29773871; PMCID: PMC5997567

La famiglia dei fattori di rilascio della corticotropina: fisiologia della risposta allo stress.

La risposta fisiologica allo stress è responsabile del mantenimento dell'omeostasi in presenza di sfide reali o percepite. In questa funzione, il cervello attiva risposte adattative che coinvolgono numerosi circuiti neurali e molecole effettrici per adattarsi alle richieste attuali e future. Una risposta disadattiva allo stress è stata collegata all'eziologia di una varietà di disturbi, come l'ansia e i disturbi dell'umore, i disturbi alimentari e la sindrome metabolica. Il neuropeptide fattore di rilascio della corticotropina (CRF) e i suoi parenti, le urocortine 1-3, insieme ai loro recettori (CRFR1, CRFR2), sono emersi come componenti centrali della risposta fisiologica allo stress. Questo sistema peptidergico centrale influisce su un ampio spettro di processi fisiologici che sono la base per un adattamento di successo e integrano contemporaneamente le risposte allo stress autonomo, neuroendocrino e comportamentale. Questa recensione si concentra sulla fisiologia dei peptidi correlati al CRF e sui loro recettori affini con l'obiettivo di fornire una panoramica completa e aggiornata del campo.

Deussing JM, Chen A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. Physiol Rev. 2018 Oct 1;98(4):2225-2286. doi: 10.1152/physrev.00042.2017. PMID: 30109816.