

Fig. 15.7 La presenza di unità regolatorie funzionalmente silenti lungo il filamento sottile riduce la cooperatività e la sensibilità al calcio (Ca^{2+}) del meccanismo di generazione di forza. **a**, Protocollo sperimentale: la relazione pCa-forza di una fibra muscolare scheletrica di psoas di coniglio (muscolo che esprime l'isoforma scheletrica rapida fsTnC, da *fast skeletal TnC*) viene misurata esponendo il preparato demembrato a soluzioni che presentano concentrazioni di Ca^{2+} crescenti (pCa decrescente, numeri riportati sotto i tracciati) in condizioni di controllo (in alto), dopo estrazione della fsTnC endogena e ricostituzione della fibra con proporzioni variabili (40 e 60% nel caso illustrato nel grafico centrale) di fsTnC esogena isolata da muscoli rapidi e di fsTnC ricombinante mutata (xxfsTnC), in cui i siti regolatori di interazione per il Ca^{2+} sono entrambi resi inattivi mediante sostituzione di due residui aminoacidici e (grafico in basso) dopo estrazione della fsTnC endogena e ricostituzione della fibra con 100% fsTnC esogena. **b**, In seguito alla procedura di estrazione-ricostituzione con miscele di fsTnC e xxfsTnC, nel filamento sottile vengono a coesistere unità regolatorie normali (con complessi Tn verdi) e unità che non possono essere attivate (con complessi Tn rossi); si interrompe così la continuità tra le unità regolatorie attivabili lungo il filamento sottile senza che le unità regolatorie risultino prive di alcun complemento. **c**, Le relazioni pCa-forza di fibre ricostituite mostrano che la massima forza di contrazione è tanto minore quanto maggiore è il numero di unità regolatorie funzionalmente silenti: xxfsTnC 0% (cerchi blu), 20% (cerchi rossi), 40% (cerchi verdi), 80% (cerchi viola) e 85% (cerchi grigi). **d**, Le stesse relazioni illustrate in **c** sono state normalizzate per il massimo valore di forza generato dalla fibra in ciascuna condizione per meglio evidenziare il marcato effetto della presenza di unità regolatorie silenti sulla pendenza della relazione e sulla sensibilità al calcio. Entrambi gli effetti accrescono, aumentando la proporzione delle unità regolatorie inattivabili. pCa = $-\log_{10} c_{\text{Ca}^{2+}}$ (modificata da M. Regnier et al., Thin filament near-neighbour regulatory unit interactions affect rabbit skeletal muscle steady-state force- Ca^{2+} relations, *J Physiol* 540: 485-97, 2002).

dazione della forza di contrazione indipendente dalla concentrazione di Ca^{2+} sarcomerica.

15.4 Accoppiamento eccitazione-contrazione nel muscolo scheletrico

Le miofibrille delle cellule muscolari scheletriche e cardiache si contraggono in seguito all'insorgenza del potenziale d'azione nel sarcolemma. I processi, grazie ai quali l'eccitazione elettrica della membrana avvia la

contrazione di strutture all'interno della cellula, sono stati definiti con il termine di *accoppiamento eccitazione-contrazione*. In entrambi i tipi di muscolo striato è stato dimostrato che il segnale elettrico di membrana attiva la risposta meccanica provocando un transitorio aumento della concentrazione intracellulare di ioni Ca^{2+} (*transiente di calcio*), che sale dai valori submicromolari di riposo a livelli micromolari. Nella sezione 15.3 sono state descritte le modalità con cui il segnale di Ca^{2+} indotto dal potenziale d'azione attiva la contrazione; in questa sezione vengono descritte le modalità con cui il potenziale d'azione provoca il transiente di Ca^{2+} .

Le relazioni temporali tra potenziale d'azione,

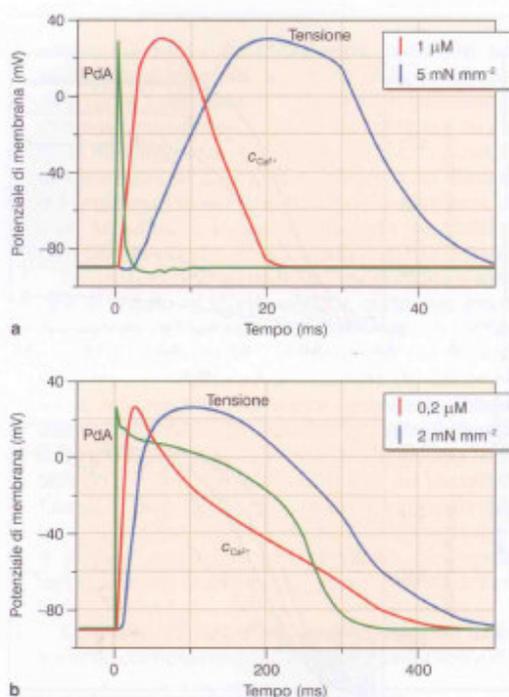


Fig. 15.8 Sequenza degli eventi implicati nell'accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico (a) e cardiaco (b). In entrambi i tipi di muscolo striato la contrazione è avviata dal transitorio incremento della concentrazione intracellulare del calcio ($C_{Ca^{2+}}$) indotto dal potenziale d'azione (PdA). L'ampiezza del transiente di calcio e l'andamento temporale di ciascun evento sono molto diversi nei due tipi muscolari.

transiente di Ca^{2+} e contrazione in fibre muscolari scheletriche e miociti cardiaci sono illustrate nella figura 15.8. A parte le differenze cinetiche, in linea di principio i segnali dell'accoppiamento eccitazione-contrazione risultano simili nei due tipi di muscolo striato. Tuttavia, tra muscolo scheletrico e miocardio esistono notevoli differenze che riguardano l'origine del Ca^{2+} che genera il transiente, i meccanismi che rilasciano il catione nel citoplasma promuovendo la contrazione e i meccanismi che rimuovono il catione dal citoplasma promuovendo il rilascio. Il muscolo scheletrico ha sviluppato modalità di liberazione e rimozione del Ca^{2+} che, in condizioni fisiologiche, sono del tipo tutto-o-nulla, cioè estremamente rapide ed efficaci, ma che si prestano poco a essere modificate da fattori di controllo. Il muscolo cardiaco presenta modalità graduate, meno rapide e potenti, ma capaci di grandi possibilità di modulazione, ampiamente utilizzate dai sistemi di controllo della prestazione meccanica del cuore.

In questo paragrafo sono descritti i processi di accoppiamento eccitazione-contrazione nel muscolo scheletrico, mentre le peculiarità di questi processi nel miocardio vengono prese in esame nella sezione 15.5.

15.4.1 Propagazione dell'eccitazione nella fibra muscolare scheletrica

La diffusione di ioni Ca^{2+} dal liquido extracellulare verso l'interno della fibra muscolare scheletrica è un processo troppo lento per giustificare il breve periodo di latenza (1-3 ms) che intercorre tra l'insorgenza del potenziale d'azione e l'avvio della contrazione. In altre parole, il diametro delle fibre muscolari scheletriche è troppo grande per garantire che un meccanismo di diffusione a partenza dal sarcolemma sia in grado di attivare la contrazione in tempi sufficientemente rapidi.

Gli esperimenti di A.F. Huxley e R.E. Taylor (1958) furono i primi a suggerire l'esistenza nel sarcolemma di strutture deputate a propagare l'eccitazione elettrica dalla superficie verso l'interno della fibra muscolare. Questi ricercatori, applicando con un microlettrodo piccoli impulsi di corrente depolarizzante in corrispondenza delle linee Z di una fibra muscolare intatta di rana, riuscirono a evocare contrazioni locali e graduate dei due emisarcomeri adiacenti alla linea Z (Fig. 15.9); l'aumento dell'intensità della stimolazione reclutava nella contrazione emisarcomeri di miofibrille situate in zone via via più profonde della fibra. La stimolazione locale di zone di membrana corrispondenti a punti del sarcomero diversi dalla linea Z non risultava, invece, efficace a indurre la contrazione.

Ricerche di microscopia elettronica, quasi contemporanee agli esperimenti di Huxley e Taylor, dimostrarono l'esistenza di profonde invaginazioni del sarcolemma (*tubuli trasversi* o *tubuli T*) localizzate a livello delle linee Z nel muscolo scheletrico di Anfibia e a livello delle giunzioni tra bande A e I nel caso dei muscoli scheletrici dei Mammiferi. I tubuli T rappresentano, dunque, le strutture capaci di trasmettere rapidamente l'eccitazione elettrica nella profondità della fibra muscolare e di ridurre a circa 1 μ m la distanza richiesta per la diffusione del segnale chimico necessario per l'attivazione di un emisarcomero.

L'interruzione della continuità tra tubuli T e membrana cellulare, prodotta mediante *shock* osmotico da esposizione a glicerolo di fibre muscolari scheletriche intatte, causa disaccoppiamento della contrazione dal potenziale d'azione, fornendo una drammatica dimostrazione della funzione essenziale svolta dai tubuli T nell'accoppiamento eccitazione-contrazione.

15.4.2 Liberazione del calcio

Nel muscolo scheletrico l'eccitazione elettrica si propaga lungo i tubuli T, ma il Ca^{2+} necessario per la contrazione viene liberato da depositi intracellulari e non origina dal lume dei tubuli T (in continuità con lo

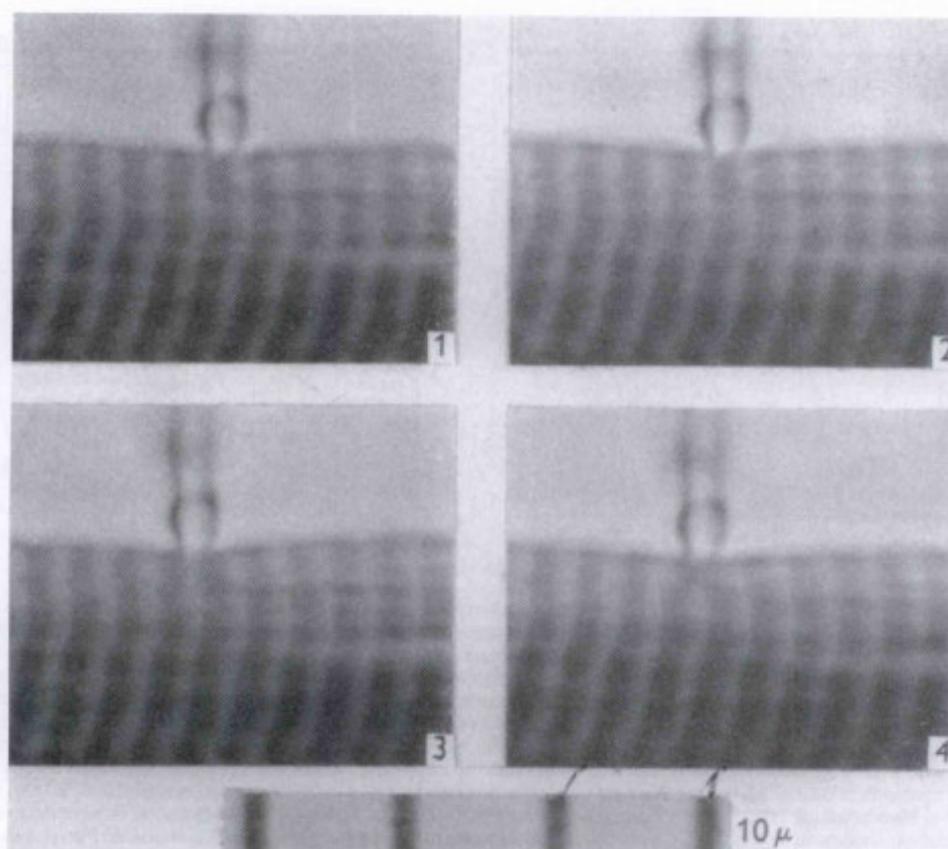


Fig. 15.9 Esperimenti di A.F. Huxley e R.E. Taylor (1958). Attivazione locale di una fibra di muscolo semitendinoso di *Rana temporaria* con applicazione di piccoli impulsi di corrente mediante micropipetta. In alto, la pipetta viene posizionata al centro della banda A (scura); in basso, la pipetta è posizionata al centro della banda I (chiaro) in corrispondenza delle linee Z. Le microfotografie di sinistra e destra mostrano l'aspetto della regione della fibra prossima alla micropipetta rispettivamente prima e durante l'iniezione di corrente (da A.F. Huxley e R.E. Taylor, Local activation of striated muscle fibres, *J Physiol* 144: 426-41, 1958).

spazio extracellulare). Infatti, è noto da tempo che il muscolo scheletrico può contrarsi a lungo anche in totale assenza di Ca^{2+} extracellulare; sono necessari 30-60 min di esposizione a soluzioni contenenti EGTA - ethylene glycol bis-(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid, acido etilenglicotetraacetico, potente chelante del Ca^{2+} - e quindi prive di Ca^{2+} , affinché si manifestino effetti significativi sulla forza di contrazione di una fibra muscolare scheletrica intatta (Fig. 15.10 a). Inoltre, la relazione sigmoideale tra forza di contrazione della fibra muscolare scheletrica e potenziale di membrana (Fig. 15.10 c), che è giustificata da una simile voltaggio-dipendenza dell'ampiezza del transiente di Ca^{2+} citoplasmatico, è molto diversa dalla relazione a campana, descritta per la modesta corrente depolarizzante di Ca^{2+} (I_{Ca}) che nel muscolo scheletrico attraversa la membrana dei tubuli T mediante canali del Ca^{2+} voltaggio-dipendenti. A potenziali di membrana superiori a -10 mV, I_{Ca} si riduce, a causa dell'abbassamento del gradiente elettrochimico favorevole all'ingresso di

Ca^{2+} , mentre sia il transiente di Ca^{2+} sia la risposta meccanica della fibra rimangono stazionari a livelli massimali. Infine, la I_{Ca} scheletrica presenta una cinetica di attivazione estremamente lenta, difficilmente conciliabile con la rapidità dei meccanismi di accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico.

I depositi intracellulari, che in seguito alla depolarizzazione della membrana del tubulo T liberano Ca^{2+} nel citoplasma della fibra muscolare, sono rappresentati dalle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico (RS), localizzate in prossimità dei tubuli T con i quali formano strutture note come *triadi*.

Indizi sulla natura del segnale trasferito dalla membrana dei tubuli T a quella delle cisterne terminali sono emersi da studi sui movimenti di carica che si verificano nel sarcolemma in risposta a variazioni del potenziale di membrana. Tecniche simili a quelle impiegate per studiare le correnti di *gating* negli assoni dei neuroni (cfr. Capitoli 9 e 10) hanno dimostrato che

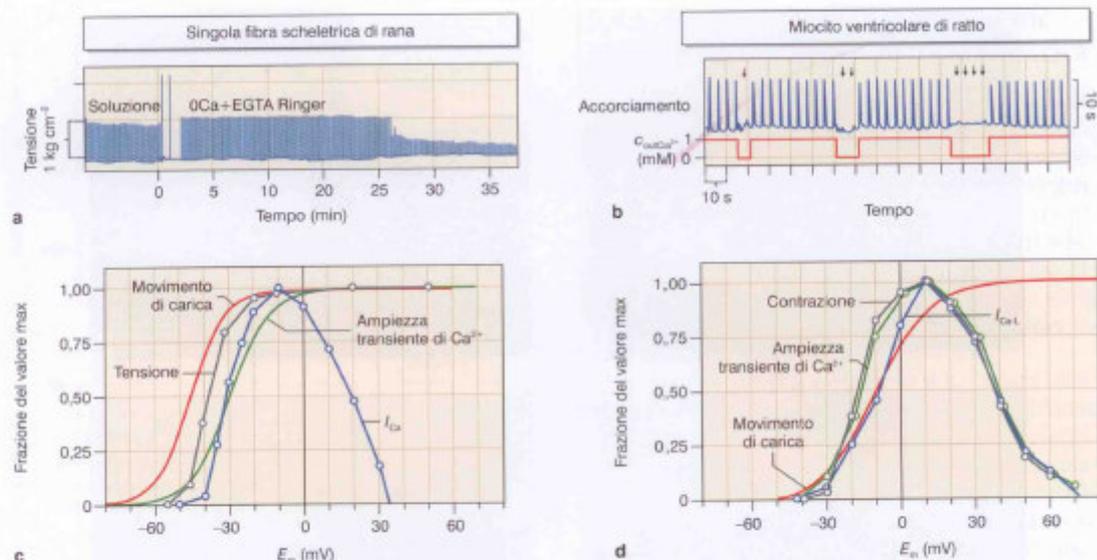


Fig. 15.10 Effetti del calcio extracellulare e del potenziale di membrana sulla contrazione del muscolo scheletrico (a, c) e cardiaco (b, d). **a.** La rimozione del calcio (Ca²⁺) extracellulare dalla soluzione di perfusione di una fibra muscolare scheletrica intatta di rana non modifica la forza della scossa isometrica (frequenza di stimolazione 0,1 Hz) per un lungo periodo di tempo. La riduzione osservata dopo oltre 25 min è attribuibile alla graduale depolarizzazione cui il preparato va incontro in questa condizione sperimentale. **b.** Un miocito cardiaco, isolato dal ventricolo di ratto e stimolato ad accorciarsi (contrazioni isotoniche a carico zero) a frequenza di 0,2 Hz, cessa immediatamente di contrarsi quando il Ca²⁺ extracellulare viene improvvisamente rimosso grazie a un sistema di cambio rapido della soluzione di perfusione. Le frecce sono in corrispondenza degli stimoli elettrici che non evocano la risposta meccanica. **c, d.** Dipendenza del movimento di carica nel sarcolemma, della corrente di Ca²⁺ che attraversa il sarcolemma (I_{Ca} oppure I_{Ca-L}), dell'ampiezza del transiente di Ca²⁺ e della contrazione dal potenziale di membrana (E_m) in fibre muscolari isolate di Anfio (c) e in miociti ventricolari di Mammifero (d). I dati relativi a ciascun parametro sono normalizzati per il loro valore massimo. Per il muscolo scheletrico, i dati relativi al movimento di carica, a I_{Ca} e all'ampiezza del transiente di Ca²⁺ sono stati ricavati controllando il potenziale di membrana mediante blocco di voltaggio; quelli relativi alla forza di contrazione sono stati ottenuti riducendo il potenziale di membrana mediante aumento della concentrazione extracellulare di potassio e misurando il livello di forza generato nella contrazione prodotta dalla depolarizzazione (in queste condizioni sperimentali si generano contratture da potassio che persistono per alcuni secondi; contratture massimali, di ampiezza simile a quella della contrazione tetanica, si ottengono quando il potenziale di membrana si depolarizza oltre -20 mV). Nel caso del muscolo cardiaco, le misure sono state tutte ottenute impiegando tecniche di blocco del voltaggio (*patch-clamp* in miociti ventricolari isolati); l'ampiezza della contrazione è stata misurata dall'entità dell'accorciamento a carico zero. EGTA, acido etilenglicotetraacetico (ridisegnata da D.M. Bers, 2001).

L'applicazione di depolarizzazioni a fibre muscolari scheletriche in condizioni di blocco di voltaggio determina l'insorgenza di movimenti di carica (correnti indipendenti da flussi ionici e da correnti capacitive di membrana) che presentano componenti originate nelle membrane dei tubuli T e correlate con la liberazione di Ca²⁺ dal RS. Queste componenti del movimento di carica presentano una soglia e una dipendenza dal potenziale di membrana molto simili a quelle del transiente di Ca²⁺ e della risposta meccanica della fibra (cfr. Fig. 15.10 c). Il significato di queste osservazioni è divenuto più chiaro dopo la scoperta della natura delle molecole coinvolte nel trasferimento di informazione tra le due membrane.

15.4.2.1 MACROMOLECOLE DI MEMBRANA IMPLICATE NELLA LIBERAZIONE DEL CALCIO

Gli studi elettrofisiologici e strutturali del meccanismo di trasferimento del segnale dalla membrana del

tubulo T a quella della cisterna terminale, coadiuvati da approcci genetici e di biologia molecolare, hanno portato all'identificazione di due gruppi di molecole che svolgono un ruolo chiave nei processi di accoppiamento eccitazione-contrazione: i *recettori delle diidropiridine* (*dihydropyridine receptor*, DHPR), canali del Ca²⁺ voltaggio-dipendenti, presenti in gran numero nella membrana dei tubuli T dove sono raggruppati a gruppi di quattro a formare le tetradi e i recettori della rianodina (*ryanodine receptor*, RyR), i canali di liberazione del Ca²⁺ delle cisterne terminali del RS che danno origine a strutture (piedi) che si proiettano verso le tetradi dei tubuli T (Fig. 15.11).

Recettori delle diidropiridine

Il DHPR è un canale del Ca²⁺ di tipo L, bersaglio specifico di antagonisti e agonisti della classe delle diidropiridine. È un eteroligomero la cui subunità α₁ da sola manifesta le principali caratteristiche funzionali del canale e include i siti di legame per le dii-

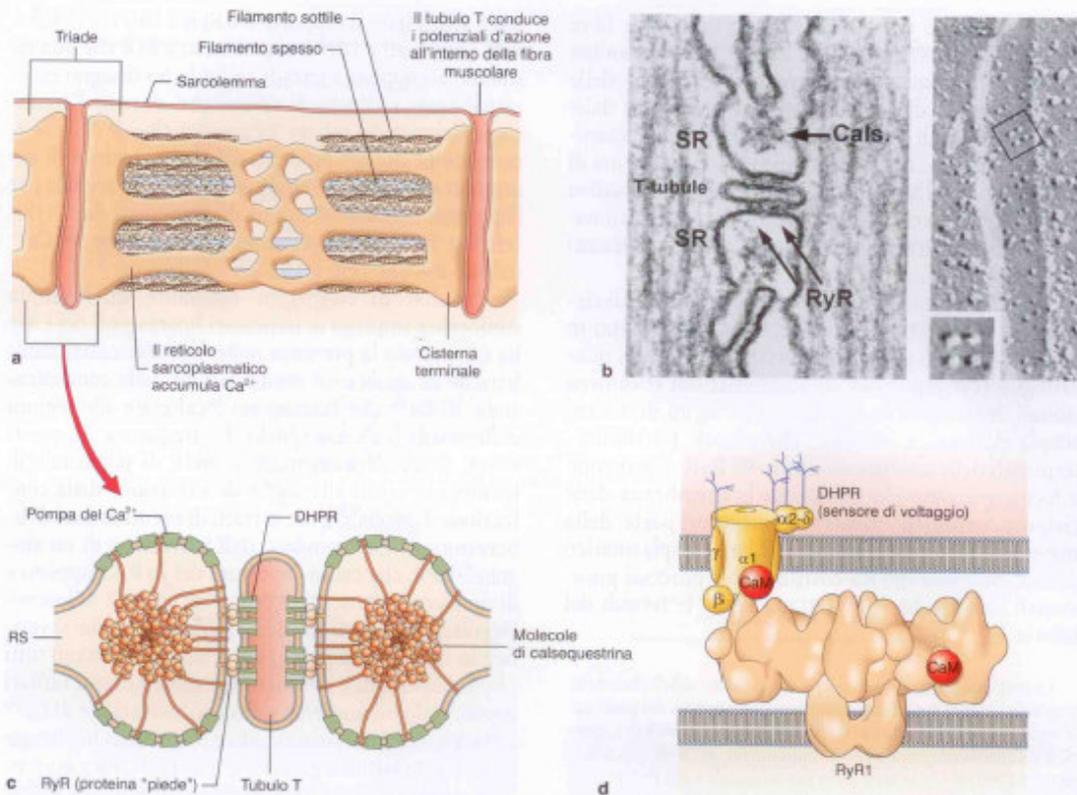


Fig. 15.11 Strutture subcellulari e molecole coinvolte nell'accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico. **a**, Disegno schematico di una porzione di fibra muscolare scheletrica che mostra le relazioni tra tubuli T, regioni giunzionali e longitudinali del reticolo sarcoplasmatico e sarcomeri. **b**, Immagini di microscopia. A sinistra, sezione trasversale di una triade con i piedi (identificati con i recettori della rianodina, RyR) che proiettano dalla membrana delle cisterne terminali verso i tubuli T; nel lume delle cisterne è evidente la presenza di ammassi di molecole di calsequestrina (Cals), una proteina che lega grandi quantità di calcio. A destra, freeze-fracture di un tubulo T che mostra la presenza di tetradi (identificate con i recettori delle diidropiridine, DHPR). **c**, Membrane della triade che mostrano le posizioni di piedi e tetradi; sono anche illustrate le molecole della pompa del calcio (SERCA), presente ad alta densità nelle regioni non giunzionali della membrana del reticolo sarcoplasmatico (RS), e gli ammassi di molecole di calsequestrina nel lume del reticolo sarcoplasmatico. **d**, Macromolecole della membrana dei tubuli T (DHPR) e delle regioni giunzionali delle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico (RyR1) coinvolte nell'accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico. Sia DHPR sia RyR presentano siti di legame per la calmodulina (CaM); le lettere greche si riferiscono alle subunità dei DHPR (b, pgc Clara Franzini-Armstrong, University of Pennsylvania, e Feliciano Protasi, Università di Chieti; d, ridisegnata da S.L. Hamilton et al., Calmodulin and excitation-contraction coupling, News Physiol Sci 15: 281-4, 2000).

dro-piridine. I DHPR sono responsabili del movimento di carica che si verifica nella membrana del tubulo T durante la depolarizzazione e che, nel muscolo scheletrico, si ritiene direttamente implicato nella liberazione di Ca^{2+} da parte delle cisterne terminali del RS.

Il ruolo cruciale dei DHPR nel processo di accoppiamento eccitazione-contrazione è stato dimostrato in modo molto convincente dagli studi sulla disgenesia muscolare (*muscular dysgenesis, mdg*), una malattia genetica recessiva del topo nella quale i DHPR del muscolo scheletrico (subunità α_1) non vengono espressi. Nella *mdg* i processi di accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico non funzionano, nei tubuli T sono assenti le tetradi e non si può registrare il movimento di carica che solitamente guida la liberazione del Ca^{2+} . L'iniezione in miotubi *mdg* di

cDNA che codifica la subunità scheletrica α_1 dei DHPR provoca la comparsa delle tetradi e ristabilisce sia il movimento di carica sia normali processi di accoppiamento eccitazione-contrazione. I risultati di questi esperimenti dimostrano che tetradi e movimento di carica dipendono dalla presenza dei DHPR e accreditano l'ipotesi che i DHPR siano i sensori di voltaggio responsabili del movimento di carica nella membrana del tubulo T, processo critico per l'accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico.

Recettori della rianodina

L'identificazione dei canali di liberazione del Ca^{2+} dalle cisterne terminali del RS è stata favorita dall'impiego della rianodina, un alcaloide di origine vegetale (*Ryania speciosa*) che si lega in modo specifico e selettivo a questi canali nei quali, a basse concentrazioni,

induce uno stato di permanente apertura. Nelle fibre muscolari scheletriche questa azione della rianodina provoca una contrattura irreversibile, a causa delle grandi quantità di Ca^{2+} liberate nel citoplasma dalle cisterne terminali e della scarsa efficacia dei meccanismi di estrusione del Ca^{2+} presenti nel sarcolemma di questo tipo di cellula muscolare. Rianodina radioattiva è stata impiegata come *marker* specifico nell'isolamento e nella purificazione dei RyR espressi nei tessuti muscolari.

I RyR sono composti da subunità proteiche di circa 565 kDa (5.000 residui aa) che si assemblano in omotetrameri di grandi dimensioni a forma di quadrifoglio (cfr. Fig. 15.11 d). Ricostruzioni tridimensionali del tetramero, basate su immagini di microscopia elettronica, indicano che piccole porzioni C-terminali delle quattro subunità del RyR concorrono a formare il poro che attraversa la membrana delle cisterne terminali, mentre la maggior parte della massa della molecola sporge dal lato citoplasmatico della membrana del RS costituendo i processi giunzionali (piedi) che si proiettano verso le tetradi del tubulo T.

La mancata espressione dei RyR del muscolo scheletrico in topi geneticamente modificati impedisce la comparsa dei piedi nelle regioni delle triadi (da cui il termine di topi dispedici) e, quindi, il verificarsi dei processi di accoppiamento eccitazione-contrazione. La riespressione dell'isoforma scheletrica dei RyR in miotubi di topi dispedici ripristina la situazione normale. Questi studi, insieme a quelli condotti sui topi mdg, dimostrano la stretta dipendenza del meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione dall'interazione tra RyR e DHPR.

15.4.2.2 INTERAZIONE TRA RECETTORI DI DIIDROPIRIDINE E RIANODINA

Il modello molecolare generalmente accettato che spiega la marcata dipendenza della liberazione del Ca^{2+} nel muscolo scheletrico dal potenziale di membrana (*voltage-dependent calcium release*, VDCR) prevede che la propagazione della depolarizzazione nella membrana dei tubuli T causi una modificazione strutturale nei DHPR (sensori di voltaggio) che, attraverso un'interazione meccanica con i RyR, si trasforma direttamente nel meccanismo di apertura dei canali del Ca^{2+} del RS (Fig. 15.12). Studi con DHPR e RyR modificati in zone specifiche della loro struttura hanno dimostrato che tra queste molecole esistono siti di stretta interazione che sono presenti solo nelle isoforme scheletriche di queste proteine. Il meccanismo preciso di queste interazioni, tuttavia, non è stato ancora identificato.

L'associazione tra RyR e DHPR osservata nelle giunzioni tra tubulo T e RS del muscolo scheletrico presenta una formidabile organizzazione, illustrata nella figura 15.12 a. Nella giunzione, ciascuna tetraide, formata da quattro DHPR, è associata a un "piede", costituito da un tetramero RyR ma - dato che nel mu-

scolo scheletrico il rapporto fra RyR e DHPR è di 0,5 - RyR accoppiati a DHPR si alternano a RyR che non risultano accoppiati a tetradi secondo un disegno eccezionalmente ordinato. Si ritiene che, durante l'eccitazione elettrica del tubulo T, l'aumento locale della concentrazione di Ca^{2+} prodotto dall'apertura dei RyR accoppiati ai sensori di voltaggio funzioni da segnale per l'apertura dei RyR adiacenti disaccoppiati dai DHPR (cfr. Fig. 15.12 c e meccanismo di liberazione del Ca^{2+} indotto dal Ca^{2+} , cfr. § 15.5.2).

L'analisi di immagini mediante microscopia confocale e impiego di indicatori fluorescenti del Ca^{2+} ha dimostrato la presenza nelle fibre muscolari scheletriche di spontanee modificazioni della concentrazione di Ca^{2+} che rimangono localizzate alle regioni delle triadi (*calcium spark*). La frequenza di questi eventi tende ad aumentare a livelli di potenziale di membrana vicini alla soglia di attivazione della contrazione. È probabile che si tratti di eventi unitari di liberazione di Ca^{2+} prodotti dall'attivazione di un singolo DHPR, che causa l'apertura del RyR accoppiato di un piccolo numero (due-quattro) di RyR adiacenti. Depolarizzazioni di ampiezza pari a quella che si verifica in un normale potenziale d'azione reclutano tutti i RyR disponibili e ne sincronizzano gli eventi unitari provocando un aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare piuttosto rapido e spazialmente omogeneo. Questo sistema garantisce che nella fibra muscolare scheletrica ogni potenziale d'azione sia solitamente in grado di liberare quantità di Ca^{2+} sufficienti a innalzare la concentrazione di Ca^{2+} nei sarcomeri a livelli capaci di attivare in modo massimale il meccanismo contrattile.

I meccanismi di liberazione del Ca^{2+} nel muscolo scheletrico risultano eccezionalmente rapidi ed efficaci, ma anche relativamente stereotipati e poco modulabili e, pertanto, non rappresentano un bersaglio fisiologico utile per la regolazione dell'entità della contrazione muscolare, che è affidata al sistema nervoso centrale attraverso il reclutamento delle unità motorie e il codice di frequenza dei motoneuroni.

15.4.3 Recupero del calcio, SERCA e rilascio muscolare

La scoperta del ruolo fondamentale svolto dalla pompa del Ca^{2+} presente nelle membrane del RS nel determinare il rilascio muscolare risale alla metà del Novecento, quando fu osservato che il soprannatante ottenuto dopo centrifugazione a bassa velocità di omogenati di tessuto muscolare impediva la contrazione solitamente provocata dall'aggiunta di ATP a sospensioni di miofibrille in stato di *rigor*. Nei primi anni Sessanta, W. Hasselbach e S. Ebashi indipendentemente scoprirono che il fattore rilasciante presente in quelle frazioni soprannatanti non era un fattore solubi-

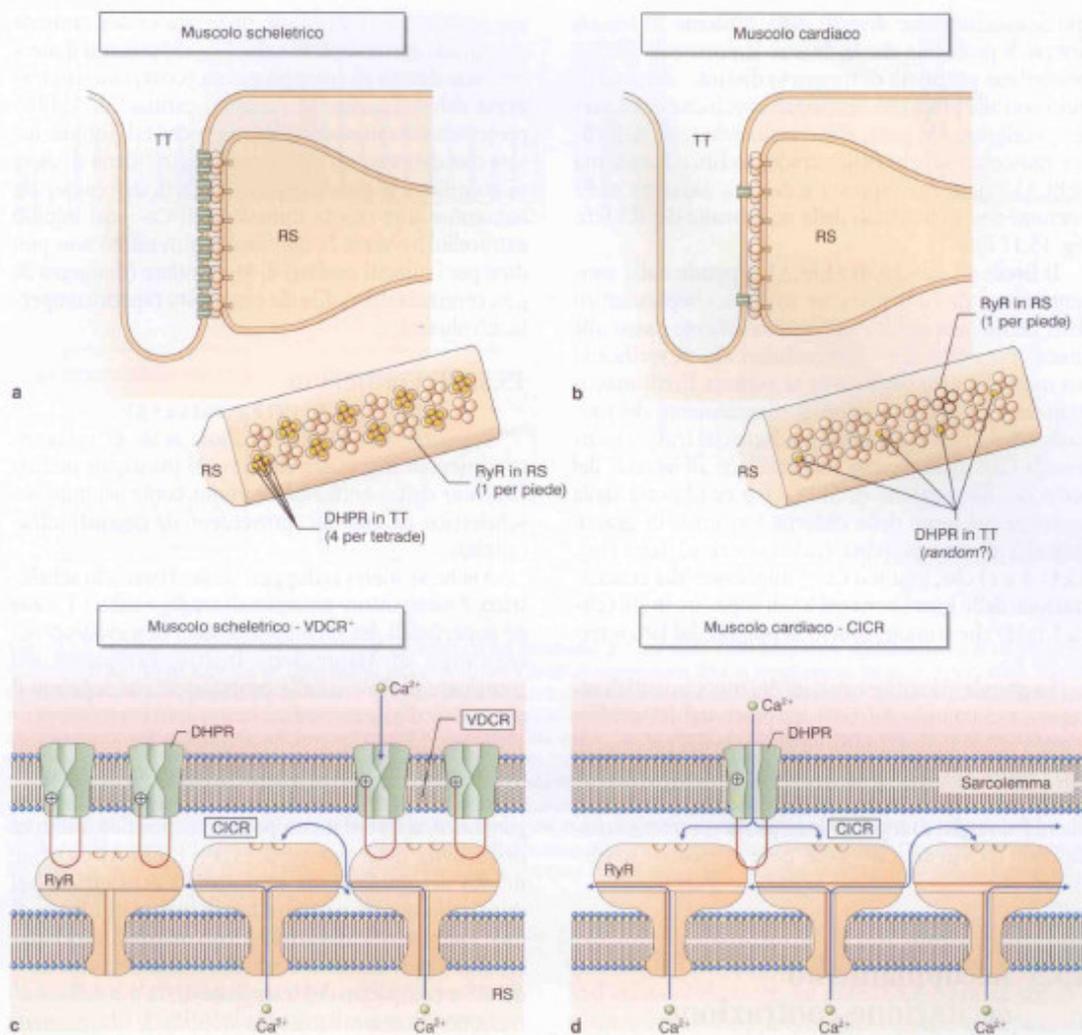


Fig. 15.12 Accoppiamento tra recettori della rianodina (RyR) e recettori delle diidropiridine (DHPR) e meccanismi di liberazione del calcio nel muscolo scheletrico (a, c) e cardiaco (b, d). RS, reticolo sarcoplasmatico; TT, tubuli T; VDCR (*voltage-dependent calcium release*, liberazione del calcio voltaggio-dipendente); CICR (*calcium induced calcium release*, liberazione del calcio indotta dal calcio) (modificate da D.M. Bers, 2001).

le, ma era rappresentato da microsomi (piccoli frammenti vescicolari) di RS che erano capaci di idrolizzare ATP per accumulare attivamente Ca^{2+} al proprio interno. Con la concomitante scoperta che concentrazioni micromolari di Ca^{2+} sono indispensabili per attivare la contrazione delle miofibrille isolate, divenne evidente che il rilasciamento del muscolo è prodotto da un meccanismo di trasporto attivo del Ca^{2+} nel RS, dal quale il catione può essere poi liberato nuovamente per attivare la contrazione. Nel giro di pochi anni, studi biochimici *in vitro* hanno potuto dimostrare che le membrane del RS possiedono sia la capacità di trasporto sia l'affinità per il Ca^{2+} che sono necessarie per

indurre il rilasciamento di muscoli contratti e per mantenerli rilasciati a riposo. Studi successivi della Ca^{2+} -ATPasi del RS, culminati recentemente con la descrizione della struttura della molecola cristallizzata, hanno svelato molti aspetti del funzionamento della pompa.

La pompa del Ca^{2+} è espressa ubiquitariamente nelle membrane del reticolo endoplasmatico di tutti i tipi cellulari (da cui il nome di SERCA, *Sarcoplasmic-endoplasmic reticulum calcium ATPase*, Ca^{2+} -ATPasi del reticolo sarcoplasmatico-endoplasmatico), ma si trova a concentrazioni elevate solo nel RS delle cellule muscolari. Sono stati identificati tre geni distinti che

codificano isoforme diverse della proteina in tessuti diversi. È probabile che le diverse isoforme di SERCA possiedano proprietà di trasporto distinte, che contribuiscono alle proprietà funzionali specifiche dei diversi tipi cellulari. Un gene, attivo esclusivamente nelle fibre muscolari scheletriche rapide, codifica l'isoforma SERCA1, che viene espressa a densità altissima nelle porzioni non giunzionali delle membrane del RS (cfr. Fig. 15.11 c).

Il livello di attività di SERCA1 dipende dalla concentrazione di Ca^{2+} presente sul lato citoplasmatico della membrana del RS ed è estremamente basso alle concentrazioni di Ca^{2+} intracellulari che si verificano nel muscolo a riposo, mentre si esalta a livelli massimali durante la contrazione. Il rilasciamento del muscolo scheletrico è, pertanto, prodotto dal trasporto attivo di Ca^{2+} dallo spazio miofibrillare all'interno del lume del RS. L'azione di SERCA1 è coadiuvata dalla presenza nel lume delle cisterne terminali di grandi quantità di una proteina (*calsequestrina*) (cfr. Fig. 15.11 b e c) che, legando Ca^{2+} , impedisce alla concentrazione dello ione libero nel RS di superare livelli (circa 1 mM) che stimolerebbero la pompa dal lato interno del RS.

La grande velocità e capacità dei meccanismi di recupero e accumulo del Ca^{2+} da parte del RS confermano l'eccezionale rapidità ed efficacia dei processi di accoppiamento eccitazione-contrazione del muscolo scheletrico, ma anche le scarse possibilità dei meccanismi fisiologici di regolare la risposta meccanica modulando il ciclo del Ca^{2+} nelle fibre muscolari scheletriche.

15.5 Accoppiamento eccitazione-contrazione nel miocardio

15.5.1 Origine del calcio

A differenza di quanto avviene nel muscolo scheletrico, la presenza di Ca^{2+} extracellulare è indispensabile per la contrazione dei miociti cardiaci (cfr. Fig. 15.10 b). In queste cellule, inoltre, la dipendenza dell'ampiezza del transiente di Ca^{2+} e della forza di contrazione dal potenziale di membrana è a forma di campana, proprio come la voltaggio-dipendenza dell'intensità della corrente di Ca^{2+} che si verifica durante il potenziale d'azione cardiaco e che è mediata da canali di tipo L (I_{Ca-L}) (cfr. Fig. 15.10 d). Infine, a differenza di quanto avviene nel muscolo scheletrico, la cinetica di attivazione di I_{Ca-L} è piuttosto rapida e compatibile con la velocità di attivazione della contrazione.

Queste osservazioni, tuttavia, non implicano necessariamente che il Ca^{2+} impiegato dal muscolo cardiaco

per indurre la contrazione provenga esclusivamente dal liquido extracellulare e che I_{Ca-L} rappresenti il meccanismo diretto di accoppiamento eccitazione-contrazione del miocardio. Se i miociti cardiaci di Anfibio presentano caratteristiche geometriche tali (cellule fuse con diametro di pochi micrometri, meno di dieci miofibrille e grande rapporto superficie/volume) da consentire una rapida diffusione di Ca^{2+} dal liquido extracellulare verso le miofibrille, altrettanto non può dirsi per i miociti cardiaci di Mammifero (diametro 20 μm , centinaia di miofibrille e modesto rapporto superficie/volume).

15.5.1.1 CONTRIBUTO DEL CALCIO INTRACELLULARE

Nel cuore dei Mammiferi, una serie di evidenze sperimentali suggerisce che il ruolo principale nell'attivazione della contrazione è svolto, come nel muscolo scheletrico, da ioni Ca^{2+} provenienti da depositi intracellulari.

Anche se meno sviluppati che nel muscolo scheletrico, RS e strutture giunzionali tra RS e tubuli T o zone superficiali del sarcolemma sono ben evidenti nel miocardio di Mammifero. Inoltre, l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} e della contrazione che seguono il potenziale d'azione cardiaco sono estremamente sensibili a sostanze che interferiscono selettivamente con la normale funzione del RS. Per esempio, la tapsigargina, un composto isolato dalle radici della *Tharpsia garganica*, si è rivelata un potente e specifico inibitore dell'attività delle pompe del Ca^{2+} (SERCA) espresse nel RS del muscolo sia cardiaco sia scheletrico. Nel miocardio questa sostanza lascia inalterati i flussi di Ca^{2+} che si verificano attraverso la membrana cellulare, ma riduce drammaticamente il contenuto in Ca^{2+} del RS e l'ampiezza del transiente di Ca^{2+} e della contrazione (oltre a rallentare la velocità di rilasciamento dei miociti cardiaci). Risultati analoghi vengono prodotti nel miocardio anche dall'applicazione di rianodina, che blocca i canali del Ca^{2+} delle cisterne terminali del RS (RyR) in uno stato aperto. A differenza di quanto accade nel muscolo scheletrico, nel miocardio il Ca^{2+} perso dai depositi intracellulari per azione della rianodina viene espulso dalle cellule grazie a meccanismi di trasporto sarcolemmalari in grado di mantenere la concentrazione di Ca^{2+} citoplasmatica di riposo al di sotto della soglia di contrazione. In questa condizione, come nel caso della tapsigargina, il transiente di Ca^{2+} e la contrazione delle cellule cardiache, che diventano esclusivamente dipendenti da meccanismi di trasporto sarcolemmalari e da ioni Ca^{2+} di origine extracellulare, risultano marcatamente depressi.

Gli effetti dell'intervallo temporale tra i battiti cardiaci sull'ampiezza della contrazione (relazione intervallo-forza e restituzione meccanica) non possono essere giustificati da meccanismi di liberazione del Ca^{2+}