

# Il $\text{Ca}^{2+}$ come messaggero intracellulare

- L. Munaron, D. Lovisolo. *Fisiologia della cellula*. Bollati Boringhieri.
- V. Taglietti, C. Casella. *Fisiologia e Biofisica delle cellule*. EdiSES
- J. G. Nicholls, A. R. Martin, P. A. Fuchs, D.A. Brown, M.E. Diamond, D.A. Weisblat. *From neuron to brain*. Fifth Edition, Sinauer Associates, Inc.
- M. J. Berridge, M. D. Bootman, P. Lipp. Calcium – a life and death signal. *Nature* **395**, 645-648, 1998.
- M. J. Berridge, P. Lipp, M. D. Bootman. The versatility and universality of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **1**, 11-21, 2000.
- D. E. Clapham. Calcium Signaling. *Cell* **131**, 1047- 1058, 2007.

# Azioni fisiologiche dello ione $\text{Ca}^{2+}$

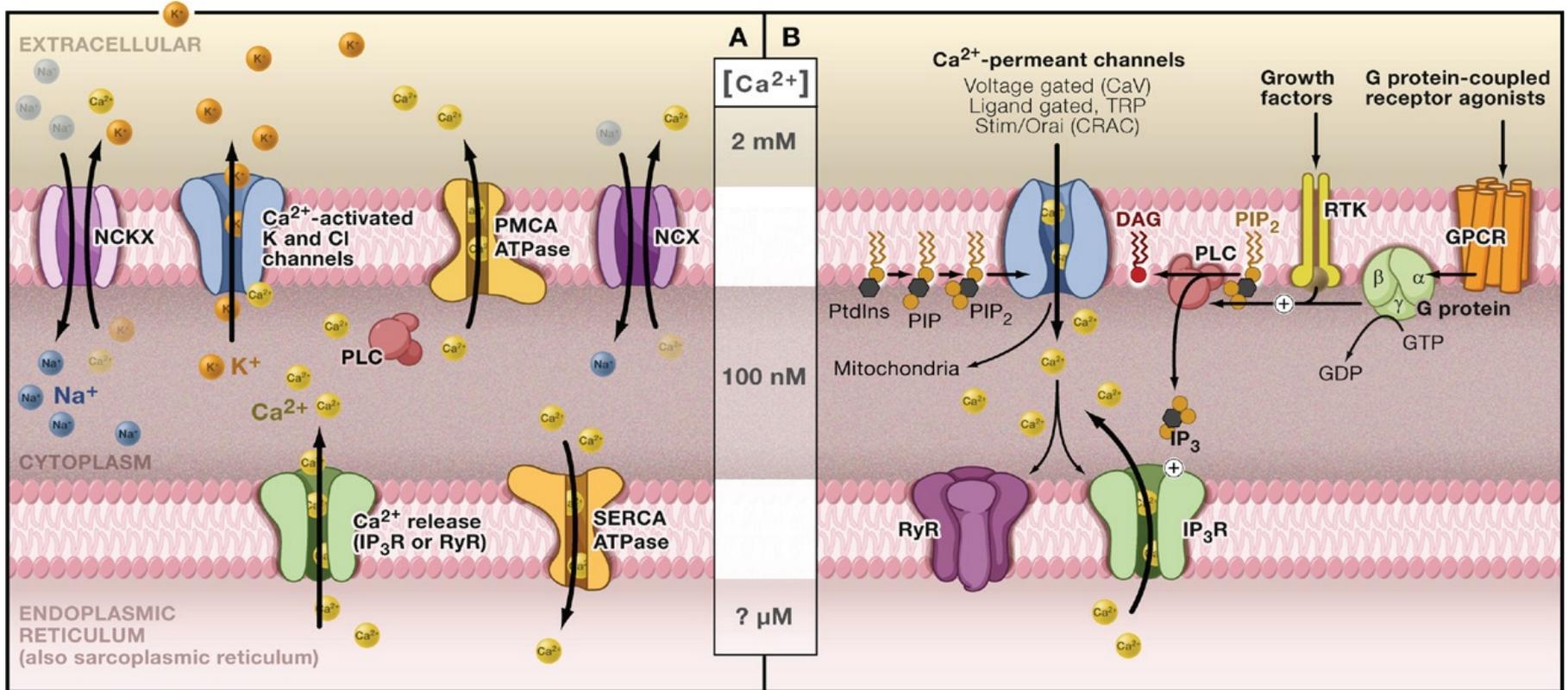
## Azioni intracellulari

- Contrazione muscolare
- Rilascio di neurotrasmettitori e secrezione in generale
- Plasticità neuronale
- Fecondazione della cellula uovo
- Proliferazione e differenziamento cellulare
- Morte cellulare

## Azioni extracellulari

- Coagulazione del sangue
- Componente del tessuto osseo
- Adesione cellulare
- Permeabilità delle membrane

# Omeostasi del $\text{Ca}^{2+}$ intracellulare



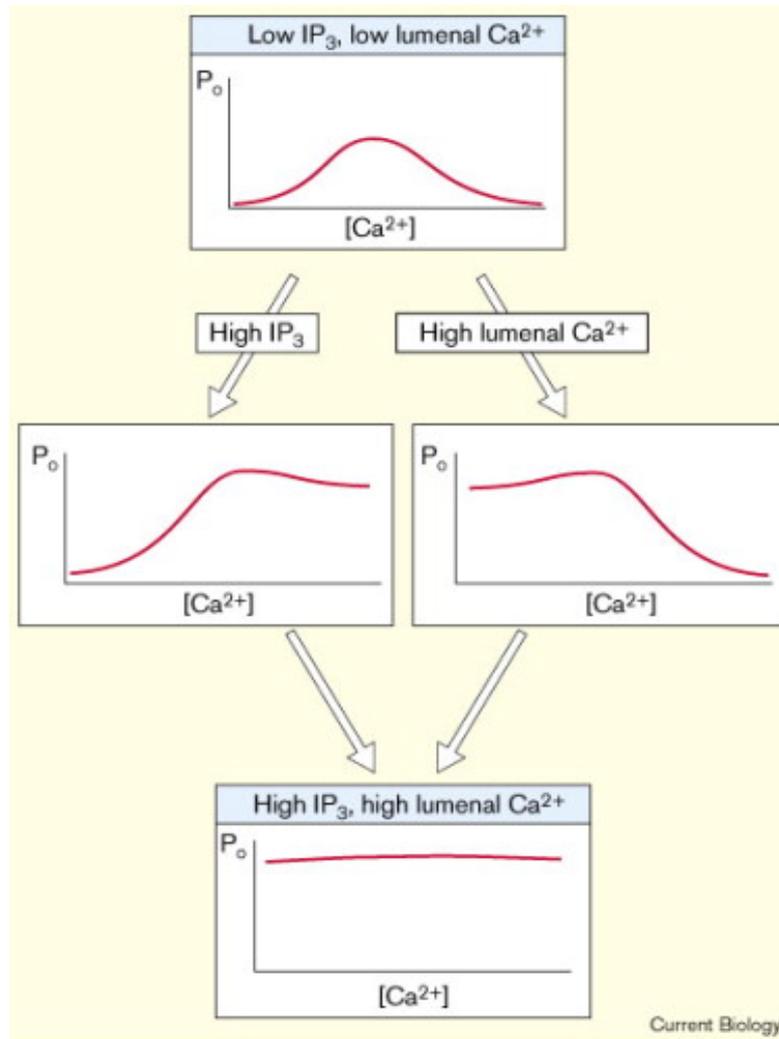
Clapham. *Calcium Signaling*.

**Meccanismi di estrusione:** pompe del  $\text{Ca}^{2+}$  (sulla membrana plasmatica, **PMCA** e del reticolo endoplasmatico, **SERCA**), scambiatore Na/Ca (**NCX**) e Na/Ca-K (**NCKX**) sulla membrana plasmatica

**Meccanismi di immissione:** canali presenti sulla membrana plasmatica (voltage-dipendenti (**VOC**), ligando-dipendenti (**ROC**), attivati dallo svuotamento delle riserve intracellulari (**SOC**), attivati da secondi messaggeri (**TRP**)), canali presenti sul reticolo endoplasmatico (recettore per IP<sub>3</sub> (**IP<sub>3</sub>R**) e recettore per la rianodina (**RyR**))

**Tamponamento da parte di proteine intracellulari** (esempi: calsequestrina, calreticulina, calbindina, parvalbumina, troponina C, calmodulina, calpaina)

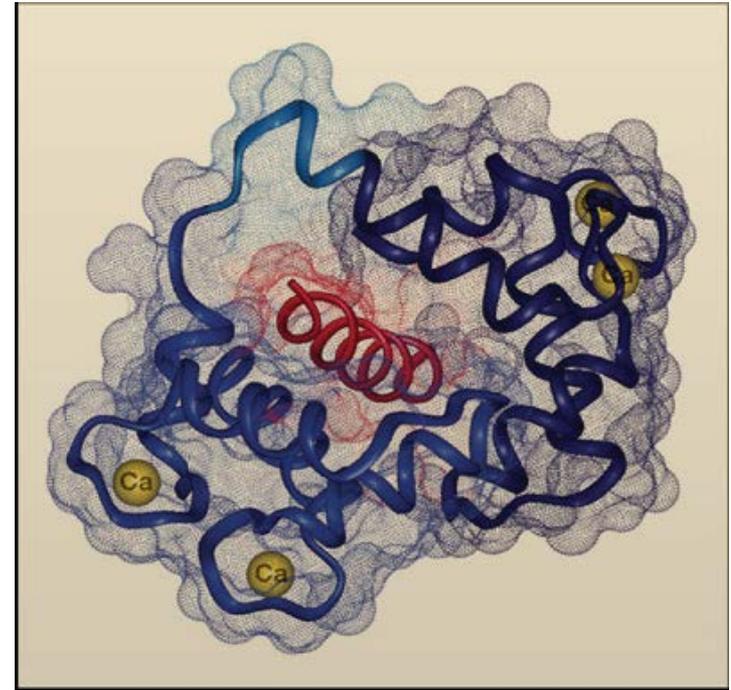
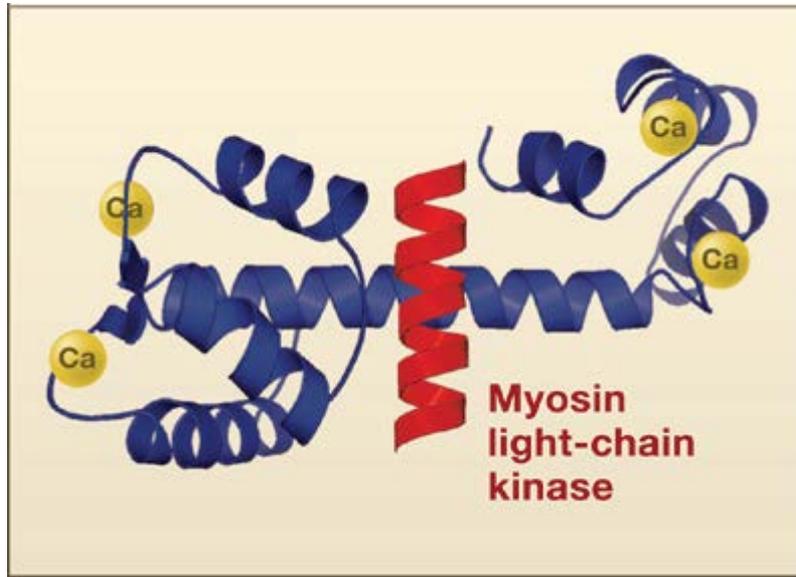
# Interazione $[Ca^{2+}]$ - $[IP_3]$



$P_o$  = probabilità di apertura dell' $IP_3R$   
 $[Ca^{2+}]$  = concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel citosol

La liberazione di  $Ca^{2+}$  da  $IP_3R$  dipende dalla  $[Ca^{2+}]$  citosolica in maniera diversa a seconda della  $[IP_3]$  nel citosol e della  $[Ca^{2+}]$  nel lume dell'ER

# Calmodulina

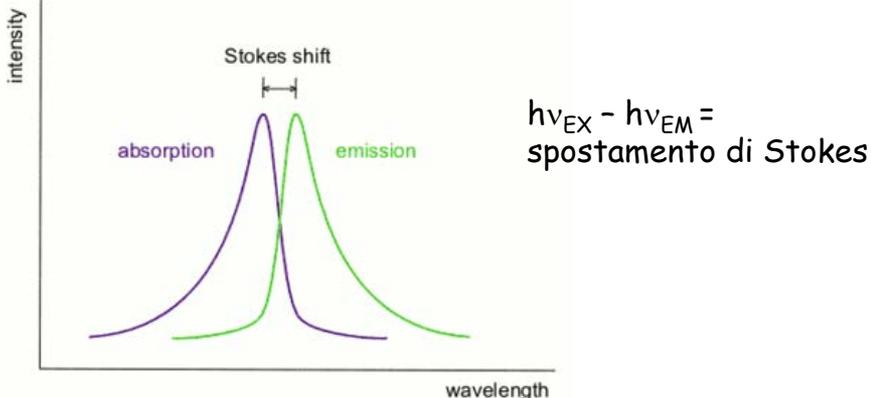
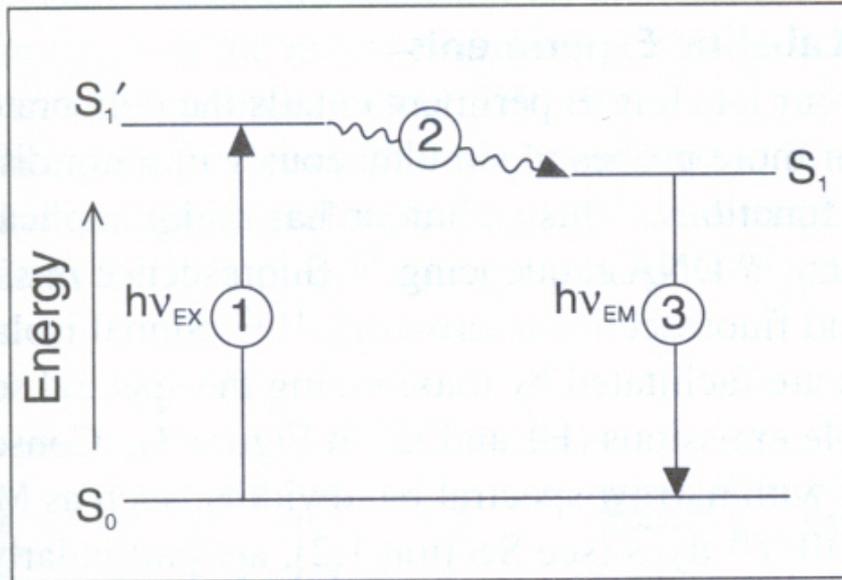


La calmodulina è l'archetipo della proteina sensore/tampone del  $\text{Ca}^{2+}$ . Presenta 4 siti di legame per lo ione detti EF-hands. Quando il  $\text{Ca}$  si lega la calmodulina cambia forma esponendo porzioni idrofobiche che interagiscono con le proteine bersaglio (es. chinasi delle catene leggere della miosina, MLCK, chinasi calmodulina dipendente tipo II, CaMKII, nitrossido-sintasi, NOS). La calmodulina avvolge la regione anfipatica della proteina bersaglio assumendo una forma globulare

# Variazioni spazio-temporali di calcio

Tecniche utilizzate: **sonde fluorescenti** (fura-2, indo-1, fluo-3) o **luminescenti** (equorina ricombinante) e **microscopia confocale**

## La fluorescenza



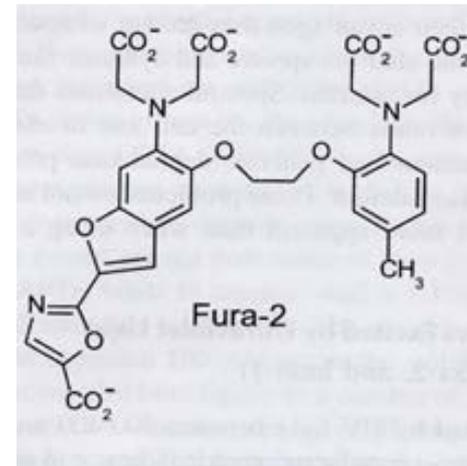
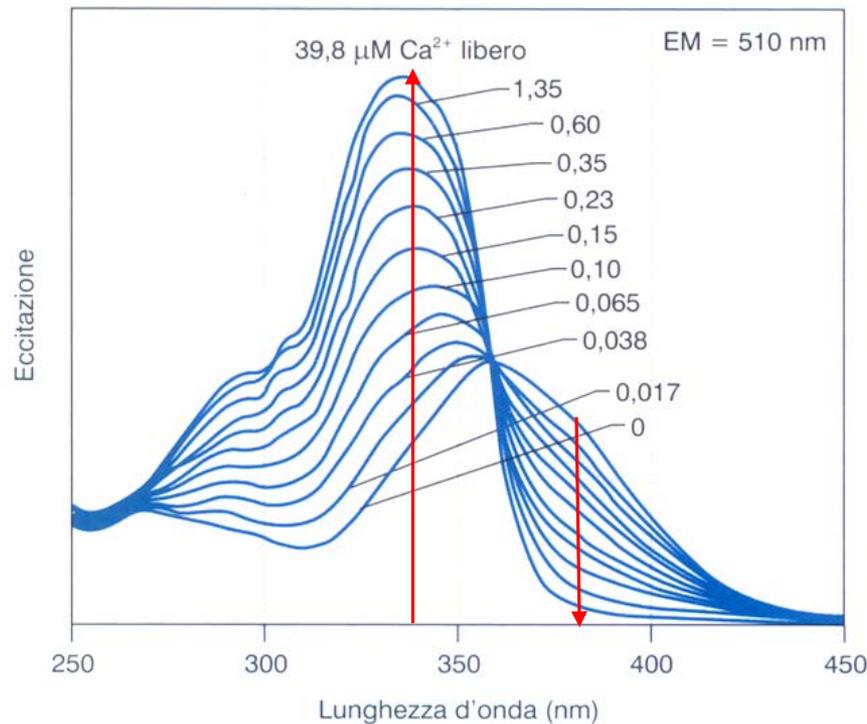
**Step 1 ECCITAZIONE**: Quando un fluoroforo (una sostanza in grado di produrre il fenomeno della fluorescenza) assorbe un fotone di energia  $h\nu_{EX}$ , un elettrone passa dal livello fondamentale  $S_0$  ad un livello elettronico eccitato  $S_1'$  (detto **singoletto**).

**Step 2 STATO ECCITATO**: Lo stato eccitato  $S_1'$  permane per un breve lasso di tempo ( $1-10 \times 10^{-9}$  sec), durante il quale parte dell'energia assorbita viene dissipata a causa di moti vibrazionali, passando ad uno stato eccitato  $S_1$  (detto **singoletto rilassato**) a energia lievemente inferiore.

**Step 3 FLUORESCENZA**: il fluoroforo ritorna al livello fondamentale  $S_0$  in seguito ad emissione di un fotone di energia  $h\nu_{EM}$ . A causa della parziale dissipazione di energia durante lo stato eccitato, l'energia del fotone emesso è minore rispetto a quella del fotone assorbito, pertanto la lunghezza d'onda è maggiore.



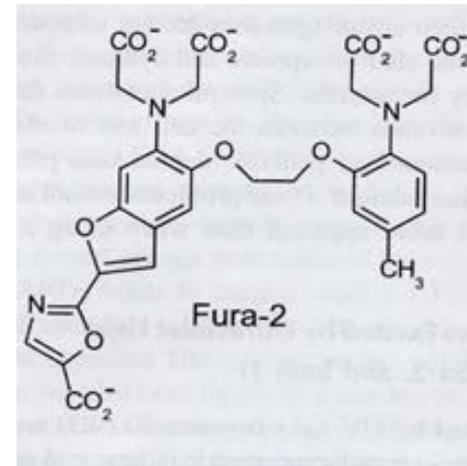
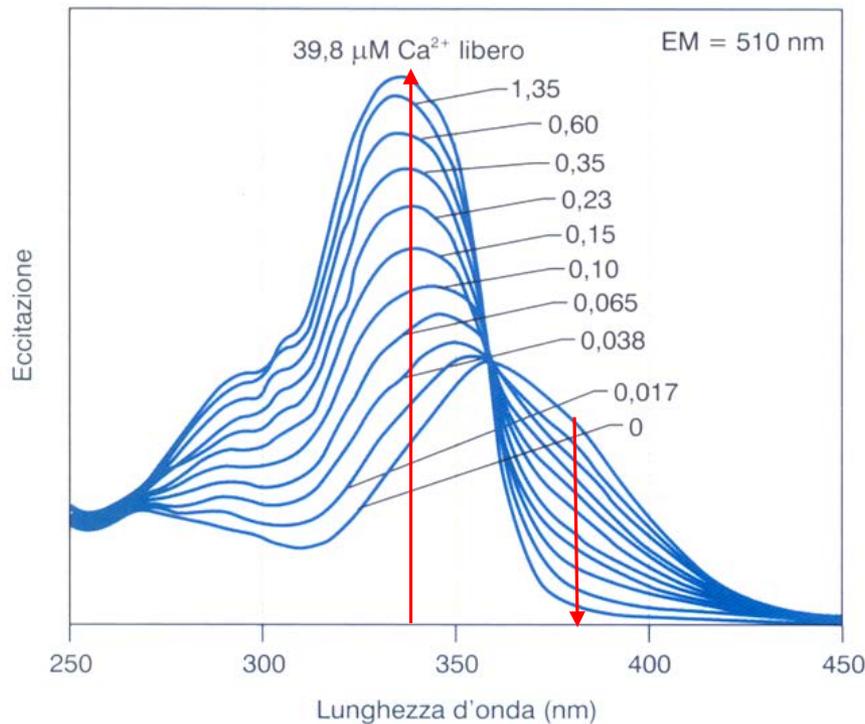
# Coloranti fluorescenti raziometrici: il Fura-2



Il FURA-2 manifesta la singolare caratteristica di subire uno spostamento dello spettro di assorbimento in funzione della  $[Ca^{2+}]_{libero}$

In assenza di  $Ca^{2+}$ , il fura-2 presenta uno spettro di eccitazione piuttosto ampio, con un picco a circa 365 nm. Quando si lega al  $Ca^{2+}$ , lo spettro di eccitazione si sposta ancora di più nell'UV: picco a circa 335 nm con  $[Ca^{2+}] > 1 \mu$ M. Aumentando la  $[Ca^{2+}]$ , quindi, l'intensità della fluorescenza emessa dal fura-2 (misurata a 510 nm) aumenta se si eccita a 340 nm ( $F_{340}$ ) e diminuisce se si eccita a 380 nm ( $F_{380}$ ).

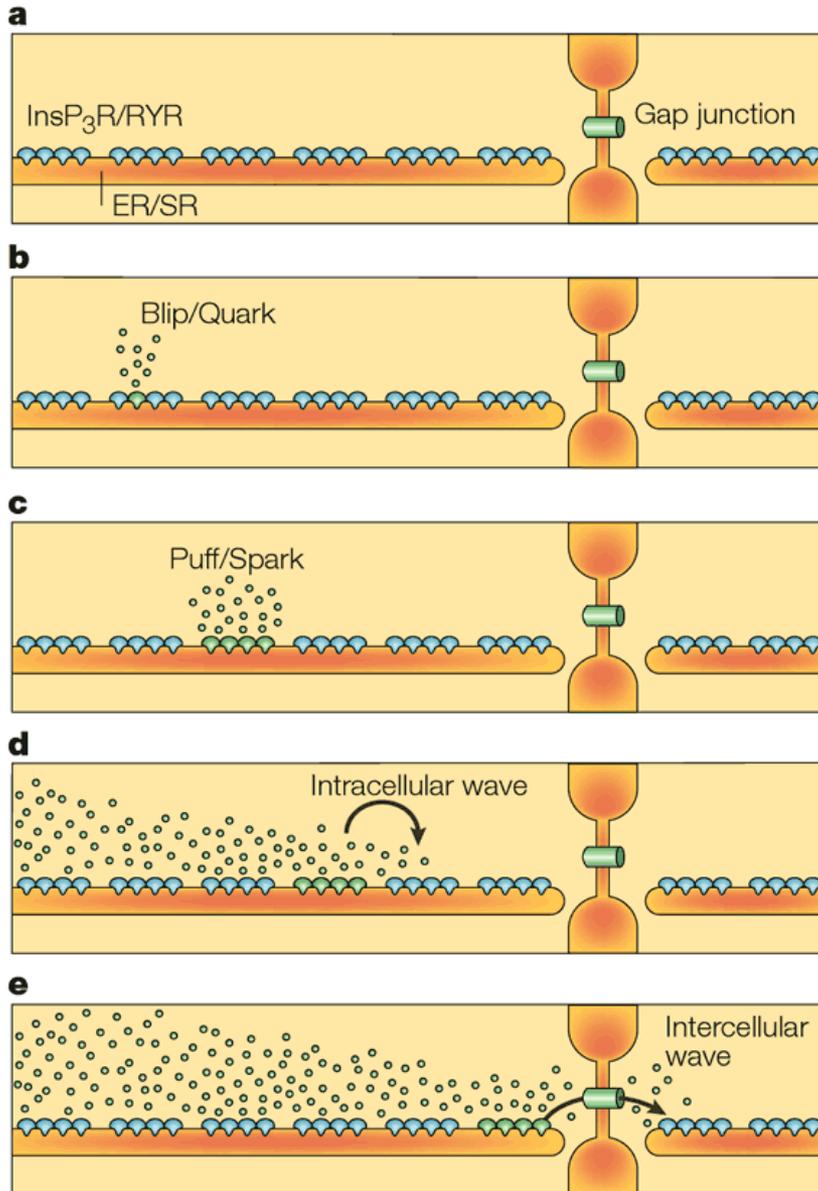
# Coloranti fluorescenti raziometrici: il Fura-2



Ne consegue che eccitando alternativamente alle lunghezze d'onda di 340 nm e 380 nm si raccoglie una coppia di segnali alla lunghezza d'onda di emissione di 510 nm per ogni concentrazione di calcio.

Effettuando il rapporto dei due valori è possibile, quindi, ottenere una misura che è indipendente dalla concentrazione dell'indicatore nel campione, dall'intensità di eccitazione, dal percorso ottico e dall'efficienza di rilevazione.

# Variazioni spazio-temporali di calcio

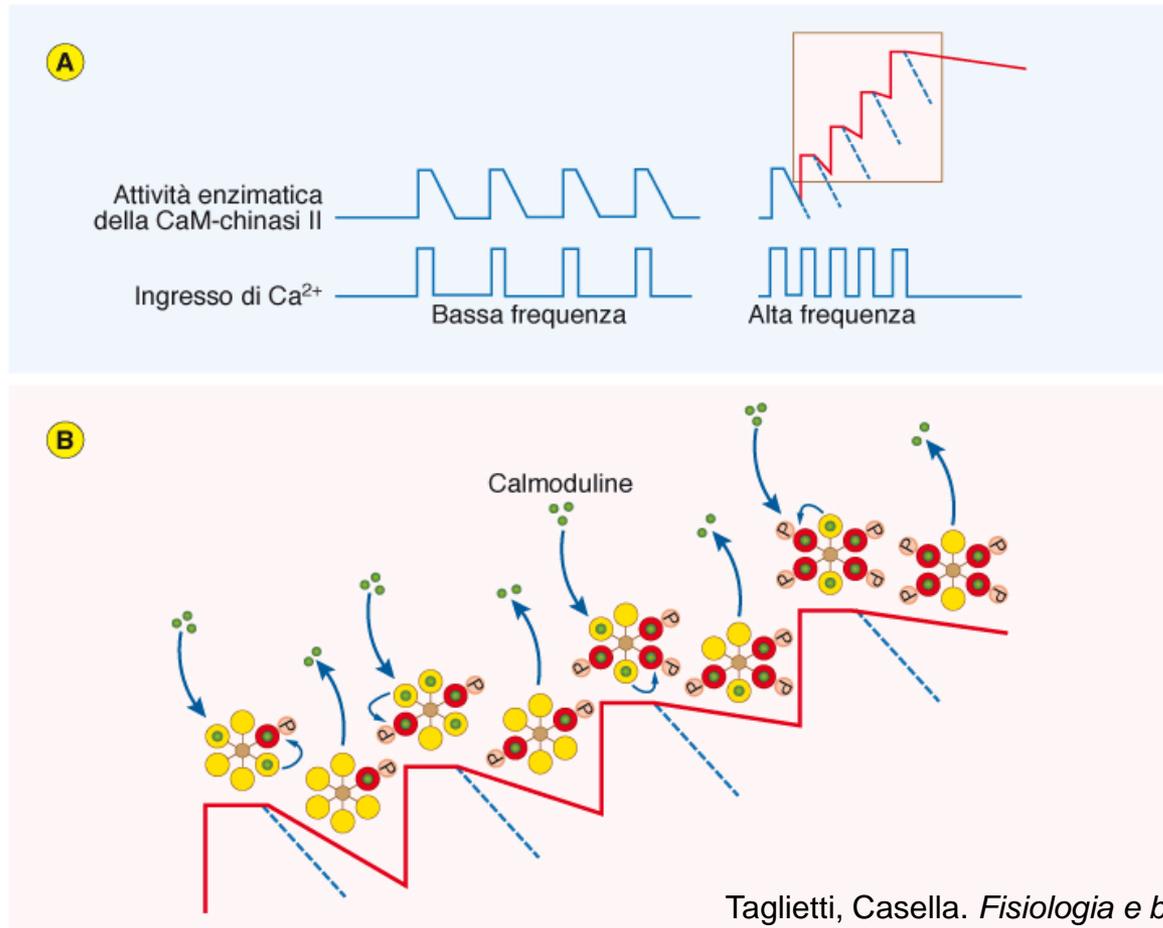


**Variazioni spaziali del Ca<sup>2+</sup> intracellulare:** blips e quarks, puffs e sparks sono responsabili di processi cellulari localizzati (rilasciamento del muscolo liscio per attivazione dei canali del K<sup>+</sup> Ca-dipendenti), onde intracellulari e onde intercellulari generano eventi globali di variazione di Ca<sup>2+</sup> a livello cellulare (contrazione del muscolo liscio conseguente ad un'onda globale di Ca<sup>2+</sup>).

**Variazioni temporali del Ca<sup>2+</sup> intracellulare:** transienti, oscillazioni, modulazioni di frequenza

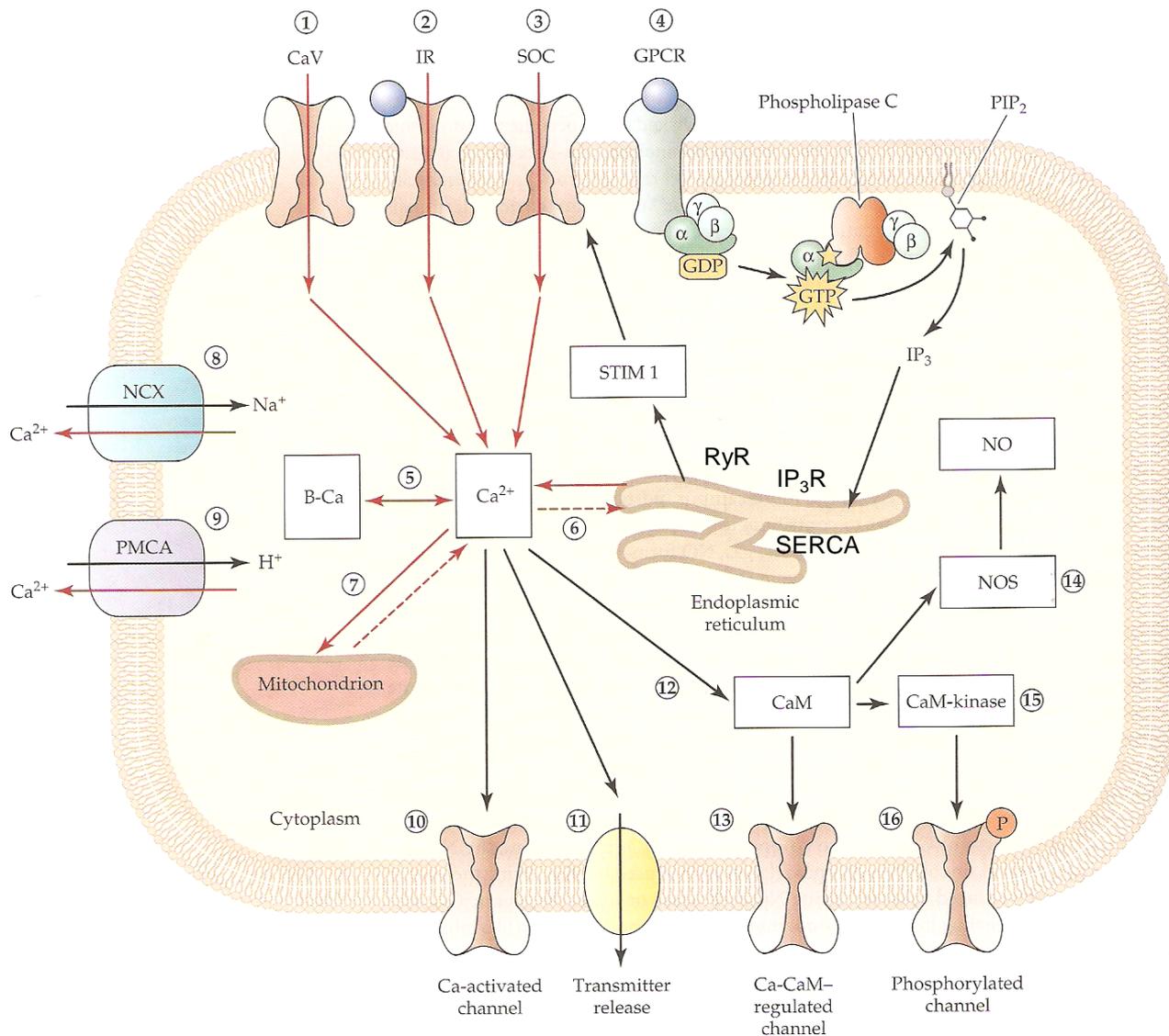
**Variazioni di ampiezza**

# CaMKII come "frequency decoder"



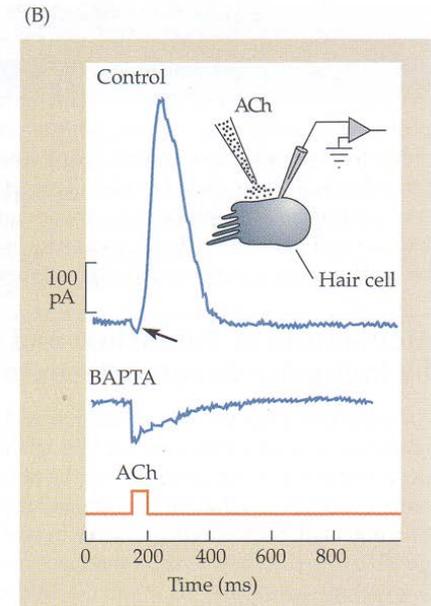
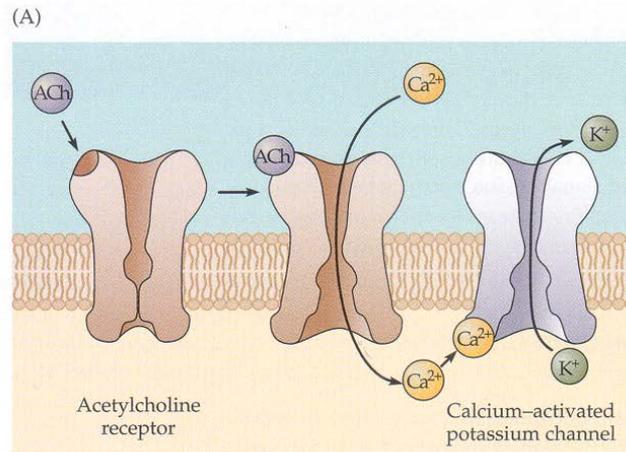
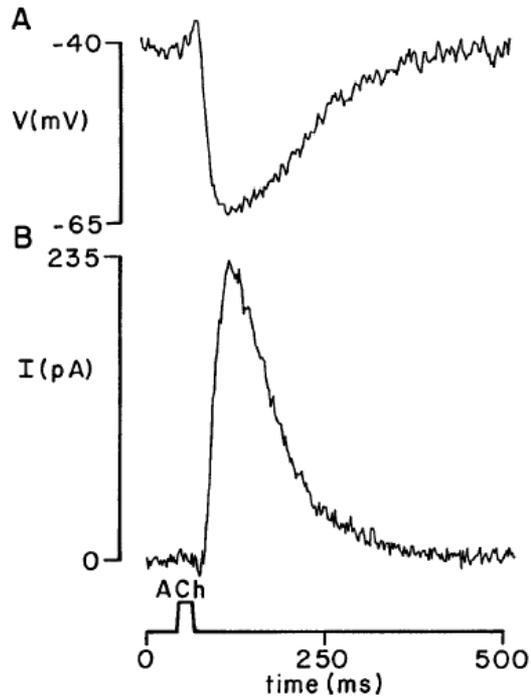
La CaMKII è un enzima composto di più subunità che vengono attivate dal legame con il complesso Ca-calmodulina (CaM). L'attività enzimatica della CaMKII cambia in funzione della frequenza dei segnali di  $\text{Ca}^{2+}$ : quando la frequenza è bassa, la risposta ad ogni transiente di  $\text{Ca}^{2+}$  è costante e l'enzima si deattiva tra due transienti successivi; quando la frequenza è elevata si ha (1) somministrazione degli incrementi di attività prodotti da ogni transiente e (2) rallentamento progressivo della deattivazione. Mentre a bassa frequenza il legame del complesso CaM con la chinasi si risolve nell'intervallo tra due transienti di  $\text{Ca}^{2+}$  successivi, quando la frequenza è elevata, più complessi CaM rimangono legati alla chinasi permettendone l'autofosforilazione. L'enzima fosforilato rimane attivo anche quando la  $[\text{Ca}^{2+}]$  è tornata normale.

# Azioni del $\text{Ca}^{2+}$ intracellulare



- Attivazione diretta di canali  $\text{Ca}$ -dipendenti (canali del  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , cationici)
- Stimolazione della secrezione delle vescicole
- Legame e attivazione della  $\text{CaM}$ . La  $\text{Ca-CaM}$  a sua volta può modulare direttamente l'attività di altri canali o attivare enzimi come la  $\text{CaM}$  chinasi o la NOS.

## Attivazione di canali del $K^+$ $Ca^{2+}$ -dipendenti

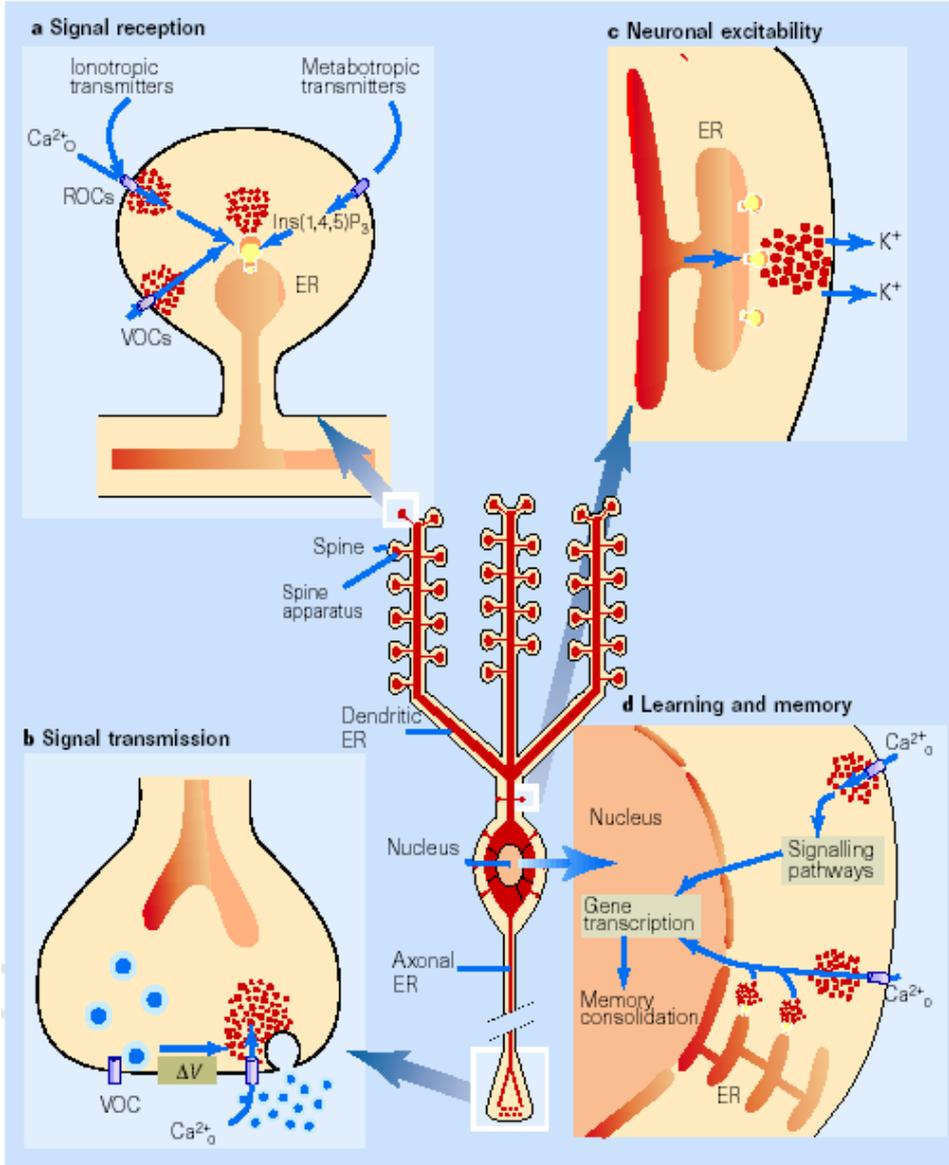


Registrazioni della variazione di  $V_m$  (A) e di  $i_m$  (B) in seguito all'applicazione di ACh a livello delle cellule ciliate cocleari di pulcino. La  $i_m$  è ottenuta con patch clamp in configurazione whole cell.

### Inibizione sinaptica rapida mediata dal $Ca^{2+}$

La risposta è dovuta all'attivazione di canali del  $K^+$  da parte del  $Ca^{2+}$  che entra nella cellula attraverso i canali nACh. Infatti la grande corrente in uscita (iperpolarizzante) che segue la piccola, transitoria corrente in ingresso è abolita dal BAPTA, chelante del  $Ca^{2+}$ .

# Compartimentalizzazione dei segnali del $\text{Ca}^{2+}$ nei neuroni



- Nelle spine dendritiche il  $\text{Ca}^{2+}$  viene liberato dal reticolo endoplasmatico (ER) per azione dell' $\text{IP}_3$  (sintetizzato in risposta alla stimolazione di recettori metabotropi) e in risposta al  $\text{Ca}^{2+}$  entrato attraverso i canali  $\text{ROC}$  e  $\text{VOC}$ . I recettori  $\text{IP}_3$  integrano segnali provenienti da input diversi e agiscono come recettori di coincidenza.
- Alle terminazioni presinaptiche il  $\text{Ca}^{2+}$  entrato attraverso canali  $\text{VOC}$  promuove l'esocitosi del trasmettitore.
- Nel soma del neurone il rilascio localizzato di  $\text{Ca}^{2+}$  può modulare l'eccitabilità neuronale attraverso l'attivazione di canali del  $\text{K}^+$   $\text{Ca}$ -dipendenti.
- A livello del nucleo del neurone il  $\text{Ca}^{2+}$  può intervenire nei processi di consolidamento della memoria mediante l'attivazione della trascrizione di geni.