

Farmacologia cellulare e molecolare

Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD

RECEPTORI-CANALE

I recettori canale sono canali idrofilici attraverso i quali passano ioni spinti dal gradiente elettrochimico

- espressi in quasi tutte le cellule
- presenti in maggior quantità nelle cellule nervose
- alta densità post-sinaptica, sia nel SNC, sia nel muscolo

- sono oligomeri formati da 4 o 5 subunità
- **(le porzioni M2 conferiscono le caratteristiche per gli ioni permeanti esistono varie isoforme delle subunità)**
- i geni che codificano per le subunità appartengono ad una singola famiglia
- il sito di legame per l'agonista è nella porzione extracellulare
- il canale è formato dai segmenti M2

- **la zona citoplasmatica controlla la funzionalità:**
- **l'ansa che unisce M3 ed M4 contiene i siti di fosforilazione**
che controllano la velocità di progressione del fenomeno di desensitizzazione

- **la PKA aumenta l'apertura spontanea del canale,**
- **la PKA aumenta la velocità di desensitizzazione del recettore**
- **la tirosinchinasi può avere un effetto di regolazione sul R**
(interplay tra R diversi)

Quali sono?

TABELLA 6.1 Neurotrasmettitori con recettori a trasduzione del segnale veloce e lenta

Neurotrasmettitore	Risposta veloce	Risposta lenta
Acetilcolina	Nicotinici	Muscarinici
GABA	GABA _A	GABA _B
Glutammato	Ionotropi (AMPA, Kainico, NMDA)	Metabotropi (mGLUR1-mGLUR8)
Serotonina	5-HT ₃	5-HT _{1,2,4,5}
ATP	P _{2x}	P _{2y}

Modulazione dell'attività dei recettori canale

L'entità della risposta prodotta è modulabile da due variabili:

- 1. la differenza di potenziale → per recettori che dip. dal potenziale**
- 2. la durata della stimolazione → per recettori che dip. dal ligando**

1. la differenza di potenziale

- direzione ed entità del flusso ionico dipendono dal potenziale di membrana
- flusso proporzionale al potenziale (eccetto rec. NMDA)

Una caratteristica del recettore canale è l'aver scarsa capacità di selezione per lo ione permeante

(rACh ↓ Na, e anche il Ca fino a 0mV, ma anche ↑ K a mV superiori)

→ questo significa che la stimolazione di un recettore canale permeabile a cationi è priva di effetto se la cellula è già depolarizzata

Per i recettori permeabili **ad anioni**, invece, l'influsso di Cl si ha fino a potenziali superiori a -70 mV, ma a -80/-100 mV il Cl esce e riporta il potenziale di equilibrio

questo significa che la stimolazione di un recettore canale permeabile ad anioni porta sempre ad inibizione dell'attività sinaptica perché il Potenziale di M Viene mantenuto lontano dalla soglia di -55 mV

2. la durata della stimolazione

L'attivazione continua di questi recettori porta a desensitizzazione

L'entità dipende dalla durata

Per l'AchR il legame con gli agonisti lentamente idrolizzabili o con bloccanti la degradazione dell'Ach, porta ad una stimolazione continua del recettore che passa da stato conduttivo a non conduttivo fino al fenomeno di desensitizzazione (affinità 1000 volte maggiore, ma non trasduce)

Meccanismi d'azione dei farmaci che modulano l'attività dei recettori canale

- 1) Farmaco interagisce con il sito del NT e agisce da Agonista o Antagonista**
- 2) Farmaco interagisce con sito allosterico**

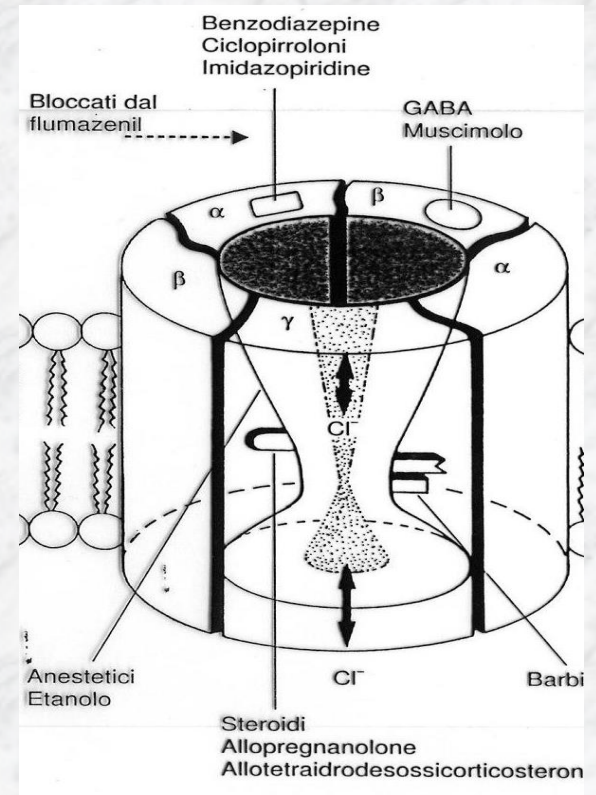
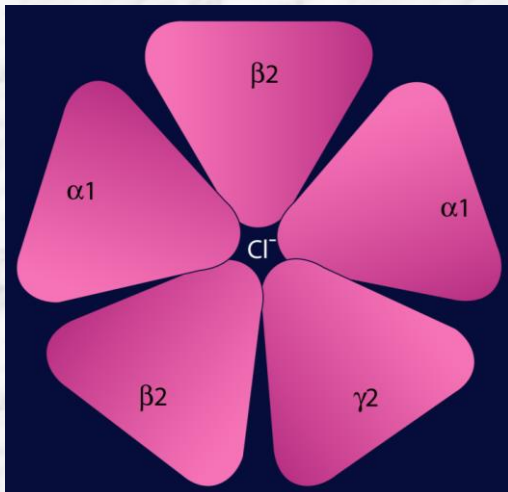
GABA_A

BDZ e **betacarboline** modulano il legame del GABA sulla subunità α del R

L'apertura del canale è modulata da

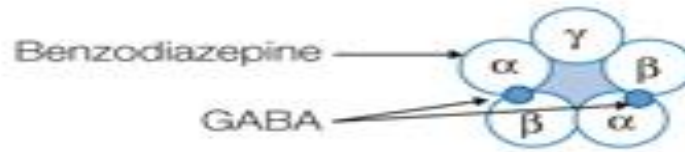
steroidi, **barbiturici** e da una tossina, la **picrotossina**

Il canale aperto può essere chiuso da **penicilline**



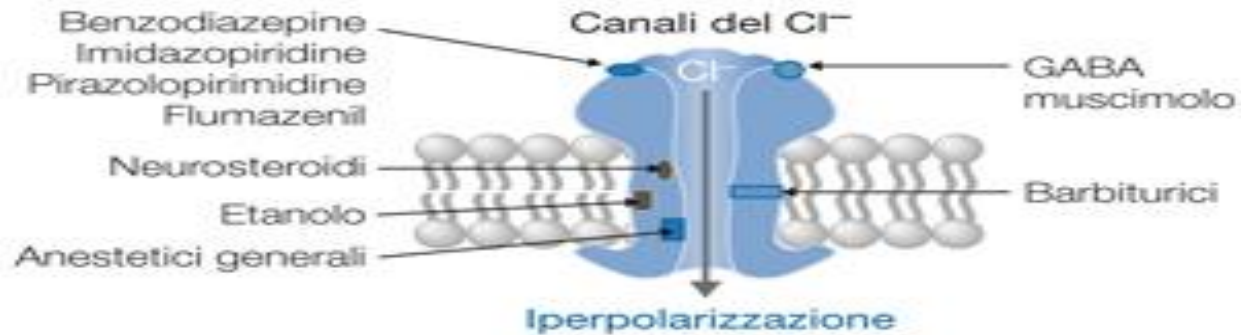
Struttura molecolare del recettore GABA_A

A Subunità del recettore GABA_A

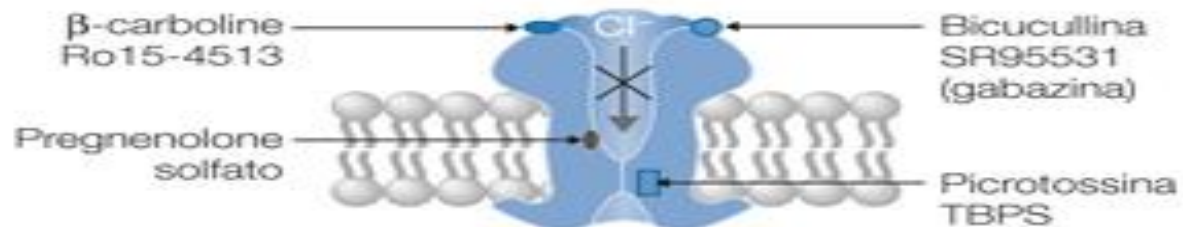


α 1-6
 β 1-3
 γ 1-3
 δ
 ϵ
 θ
 π
 ρ 1-3

B Agonisti e modulatori positivi



C Agonisti e modulatori negativi



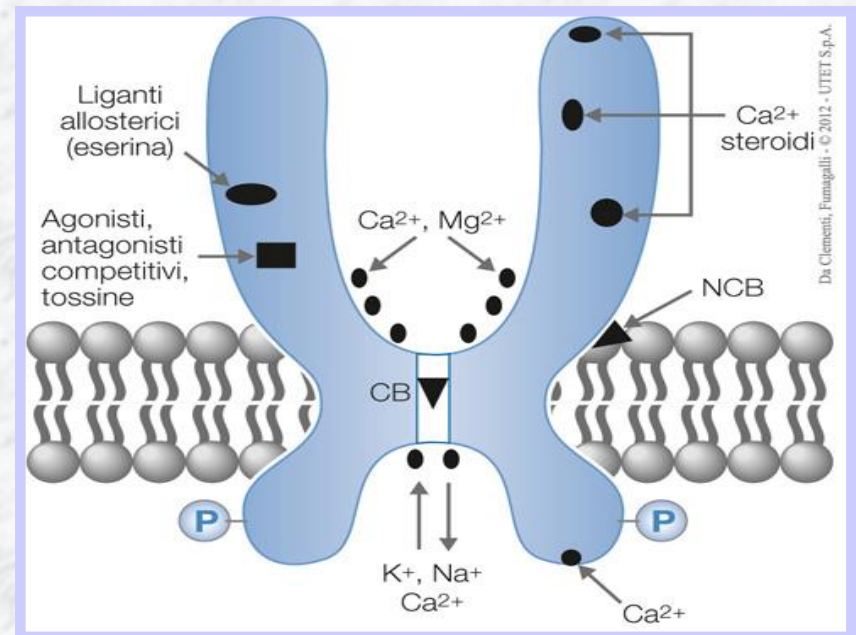
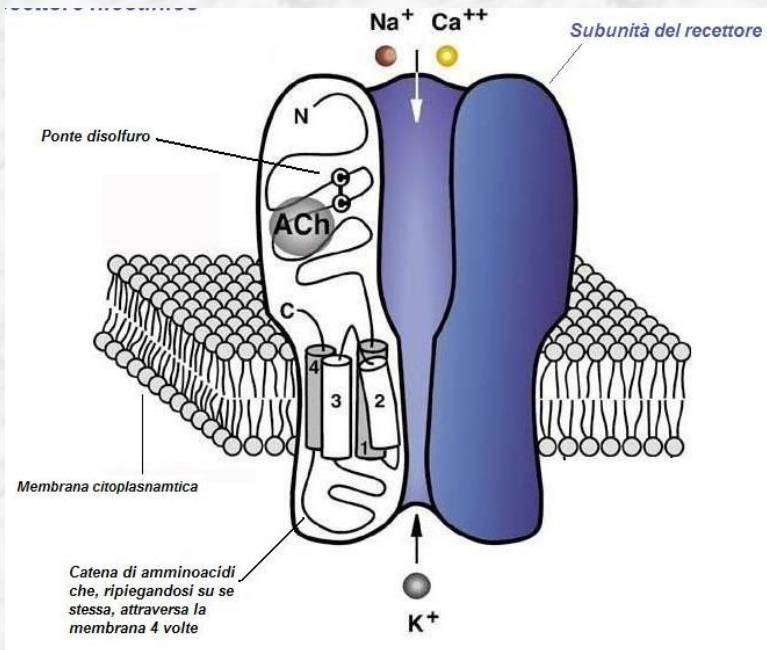
AchR - nicotinic

- eserina** (2 azioni: • inibisce colinesterasi +
• potenzia l'att. Ach)

Ca - Mg

steroidi (corticosteroidi inibiscono AchR nicotinic)

→ STUDI DI MUTAGENESI CONSENTONO DI COMPRENDERE LA FUNZIONALITA' DI RESIDUI E SITI DI LEGAME



I recettori NMDA sono bloccati dagli ioni Mg^{2+}
in maniera voltaggio-dipendente

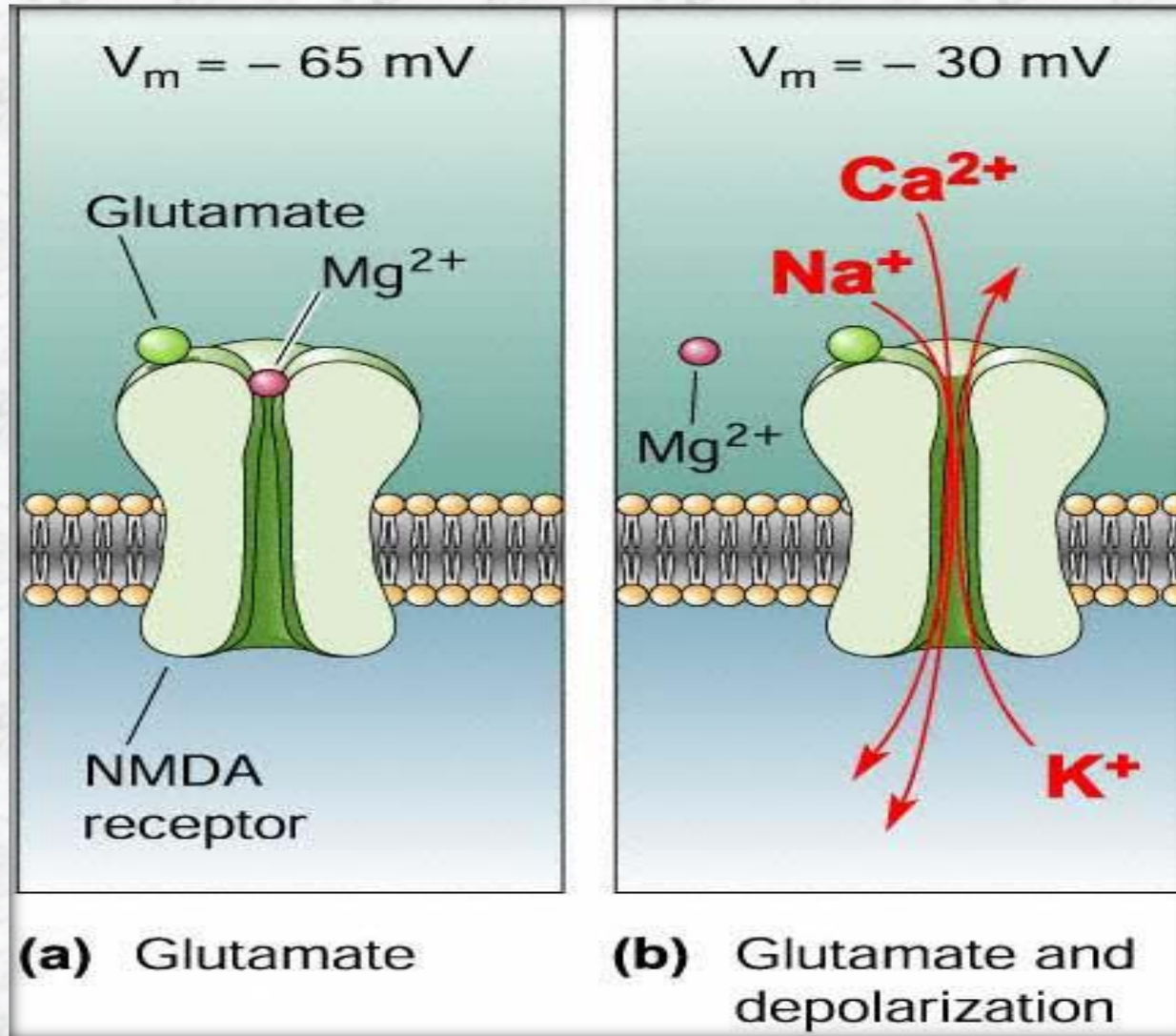


TABELLA 12.1 Recettori-canale e loro subunità clonate

Recettori		Sigla	Trasmittitore	Subunità clonate
Recettori permeabili a cationi	Recettore nicotinic muscolare	AChR	Acetilcolina	$\alpha_1, \beta_1, \gamma, \delta, \epsilon$
	Recettore nicotinic neuronale	nAChR	Acetilcolina	$\alpha_{2-10}, \beta_{2-4}$
	Recettori glutammatergici ionotropi	AMPA - KAR NMDAR	Amminoacidi eccitatori	GluA ₁₋₄ - GluK ₁₋₅ - Glu N1 - Glu N2 _{A-D} - GluN3 _{A, B}
	Recettore serotoninergico	5-HT ₃	Serotonina	5-HT _{3A-C}
	Recettore purinergico	P2X	ATP	P2X ₁₋₇
	Recettori aperti dai nucleotidi ciclici	CNG	cAMP e cGMP	CNCA ₁₋₄ - CNCB _{1,3}
Recettori permeabili ad anioni	Recettore GABAergico	GABA _A	GABA	$\alpha_{1-6} - \beta_{1-3} - \gamma_{1-3} - \delta, \epsilon, \pi, \theta - \rho_{1-3}$
	Recettore glicinerico	Gly-R	Glicina	$\alpha_{1-3} - \beta$

Recettori accoppiati alle proteine G

80% di tutti i R

organizzazione molecolare: monomeri 7TM

sito per il NT extracellulare, sito per G-protein intracellulare

quali sono?

TABELLA 13.1 Esempi di recettori accoppiati alle proteine G*

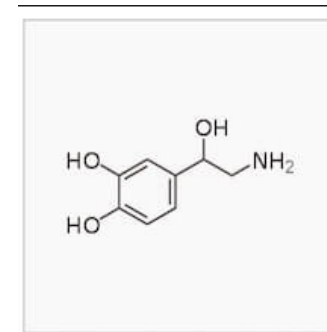
Recettore per	Proteina G	Effettore	Recettore per	Proteina G	Effettore
Neurotrasmettitori			Vasopressina		
Catecolamine			V ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Adrenergico β ₁ , β ₂ , β ₃	G _s	↑ Adenilato ciclasi	V ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C	Glucagone	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Adrenergico α ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Secretina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Dopamina			VIP	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₁	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Ormone paratiroideo (PTH)	G _s	↑ Adenilato ciclasi
D ₂	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
Serotonina			Calcitonina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
5-HT ₁ , 5-HT ₅	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G _q	↑ Fosfolipasi C
5-HT ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C	Altri mediatori		
5-HT ₄ , 5-HT ₆ , 5-HT ₇	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Istamina		
Acetilcolina			H ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Muscarinico M ₁ , M ₃ , M ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	H ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
Muscarinico M ₂ , M ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	H ₃ , H ₄	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↓ Canali al Ca ²⁺
GABA			Adenosina		
GABA _B	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	A ₁ , A ₃	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺
Glutammato			A ₂	G _s	↑ Adenilato ciclasi
mGlu ₁ , mGlu ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C	ATP		
mGlu ₂ , mGlu ₃ , mGlu ₄ , mGlu ₆ , mGlu ₇ , mGlu ₈	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
Oppioidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , P2Y ₁₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
Cannabinoidi	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺	Angiotensina II		
Ormoni			AT ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
ACTH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Bradichinina	G _q	↑ Fosfolipasi C
LH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Trombina		
	G _q	↑ Fosfolipasi C	PAR-1	G _i	↓ Adenilato ciclasi
FSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G _q	↑ Fosfolipasi C
TSH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G ₁₂	↑ RhoGEF
	G _q	↑ Fosfolipasi	PAR-4	G _q	↑ Fosfolipasi C
GHRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi		G ₁₂	↑ RhoGEF
CRH	G _s	↑ Adenilato ciclasi	Acido lisofosfatidico		
GnRH	G _q	↑ Fosfolipasi C	LPA ₁ , LPA ₂ , LPA ₄	G _i	↓ Adenilato ciclasi
TRH	G _q	↑ Fosfolipasi C		G _q	↑ Fosfolipasi C
Somatostatina	G _i /G _o	↓ Adenilato ciclasi ↑ Canali al K ⁺ ↓ Canali al Ca ²⁺		G ₁₂	↑ RhoGEF
			LPA ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
				G _q	↑ Fosfolipasi C
			LPA ₅	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Eicosanoidi		
			Prostaglandina PGE₂		
			EP ₁	G _q	↑ Fosfolipasi C
			EP ₂ , EP ₄	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			EP ₃	G _i	↓ Adenilato ciclasi
			Prostaglandina PGF _{2α}	G _q	↑ Fosfolipasi C
			Prostaciclina	G _s	↑ Adenilato ciclasi
			Trombossano A ₂	G _q	↑ Fosfolipasi C
				G ₁₂	↑ RhoGEF
			Fotoni		
			Rodopsina	G _t	↑ cGMP fosfodiesterasi

Primo sito: per il ligando

7TM formano una tasca con siti specifici di legame

Es. R. adren α o β hanno due residui fondamentali per il legame con le catecolamine:

che sono il **COOH di un acido aspartico localizzato nel III dominio TM** che interagisce con l'NH₂ della catecolamina

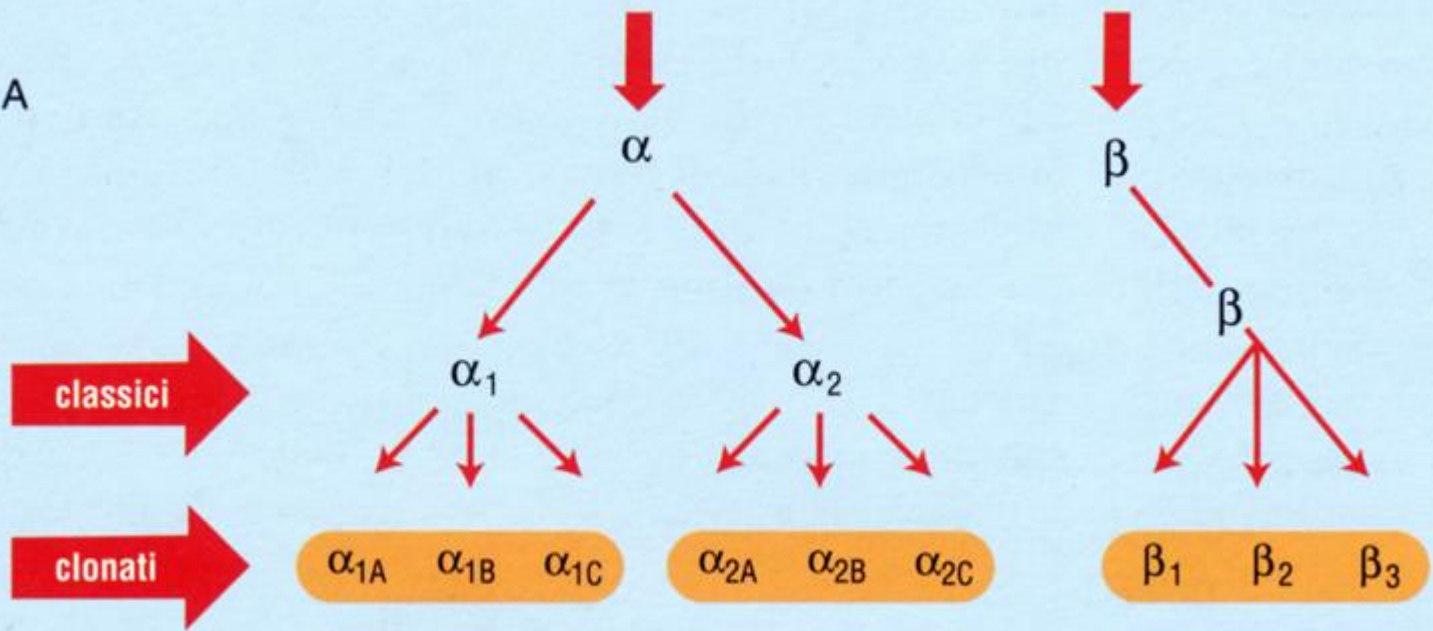


Noradrenalina

due **residui serinici del V TM** che interagiscono con il COOH dell'anello catecolico

Recettori adrenergici

A



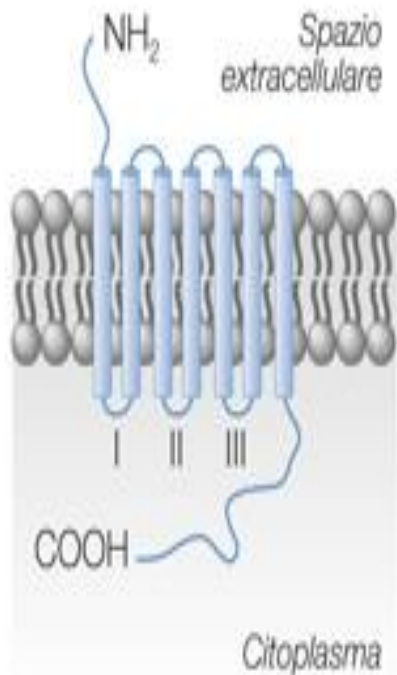
Primo sito: legame con il ligando

7TM formano una tasca con siti specifici di legame

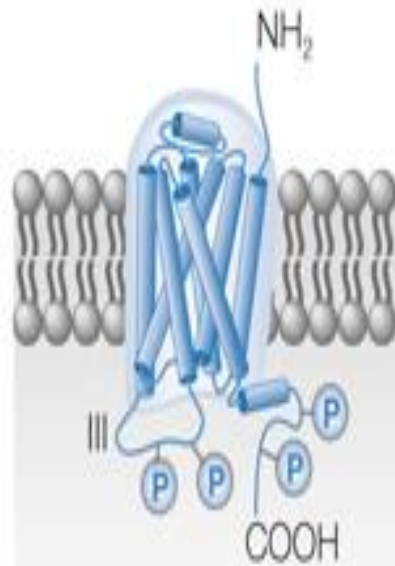
- Es. nel caso di **Neuropeptidi**, invece, l'interazione coinvolge porzioni extracellulari del recettore
- Es. nel caso di ormoni **FSH, LH, TSH** l'estremità N-terminale è necessaria per orientare l'ormone nel legame
- Es. nel caso di **trombina** e **glutammato** l'attivazione rec. è dovuta ad un'interazione tra la porzione N-terminale del recettore con i TM del recettore stesso

Recettori accoppiati alle proteine G

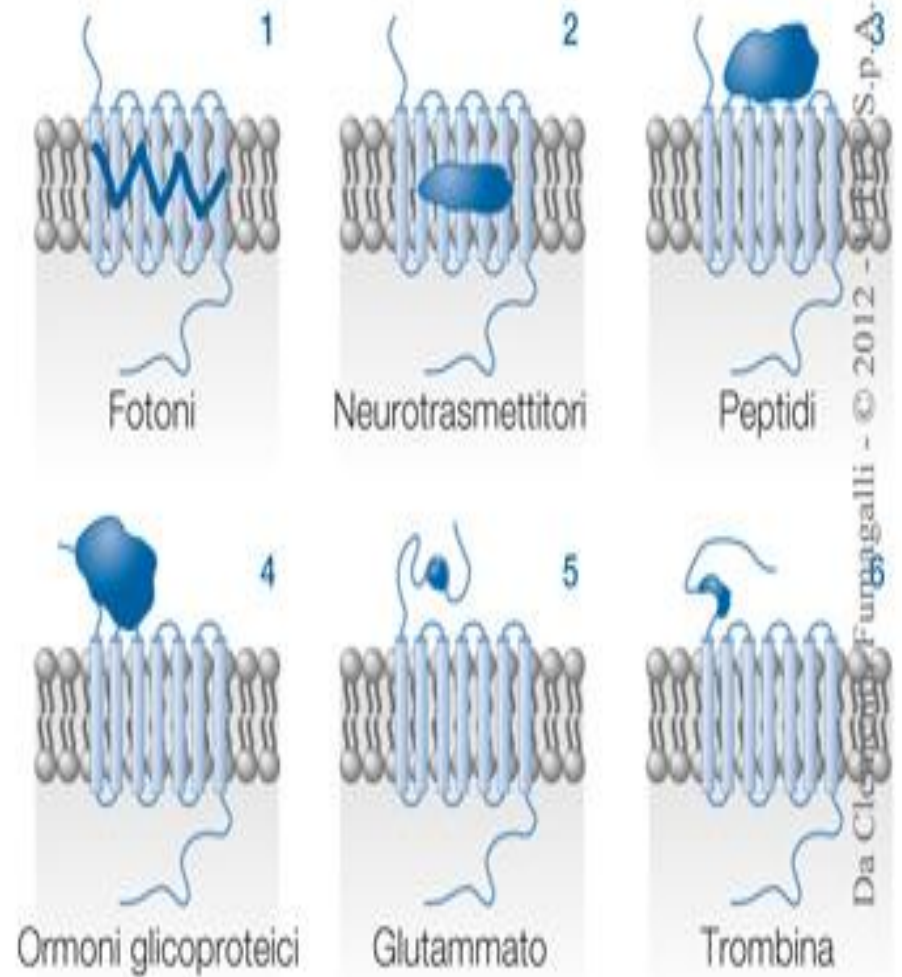
A



B



C



Secondo sito: quello di legame alla Prot G

La struttura del 3 loop e del COOH terminale intracellulare conferiscono la specificità di legame alle diverse proteine G

(presenza di siti di fosforilazione importanti per il disaccoppiamento del R alla G, fenomeno della desensitizzazione)

***Tanti farmaci per il primo,
nessuno per il secondo!!!!!!***

Mutazioni di residui aa del 3 loop citoplasmatico rendono il R costitutivamente attivato → vale a dire indipendentemente dall'agonista



base di patologie anche tumorali

(mutazione R TSH adenomi tiroidei
o R LH in pubertà precoce
o R VP diabete insipido congenito)

Ricerca in Farmacologia Applicata!!!!

MUTAGENESI del RECETTORE

RECETTORI CHIMERE

PROTEINE G

sono circa 20 α
 6 β
 10 γ

- le **G α** legano il nucleotide guanilico GTP e sono dotate di **attività GTPasica intrinseca**
- sono localizzate nella superficie citoplasmatica della membrana
- fanno parte di un ciclo regolato dal GTP
- alternano forma attiva-forma inattiva

il recettore accende

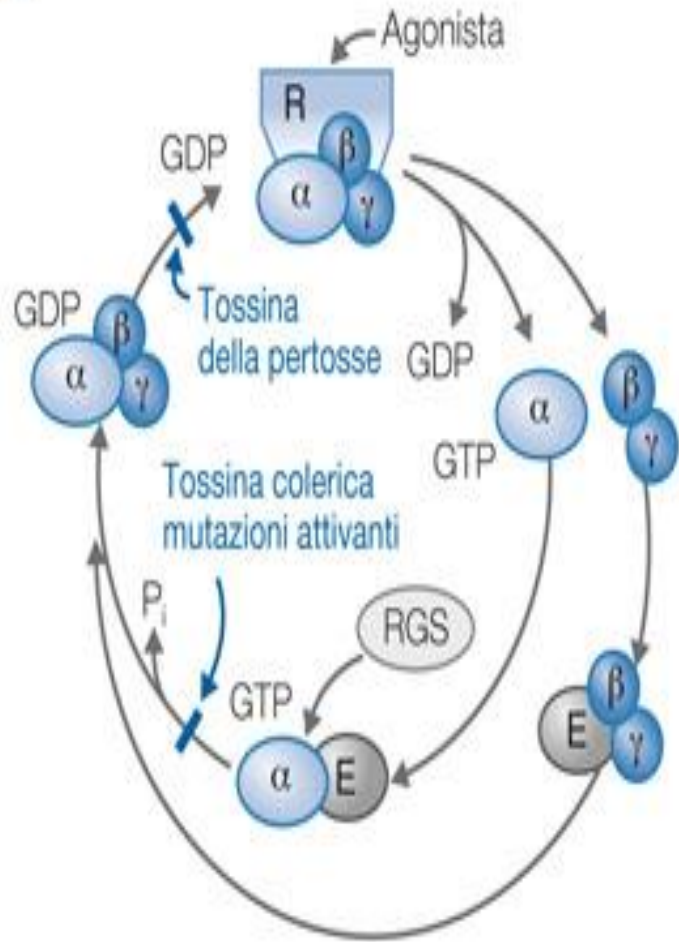
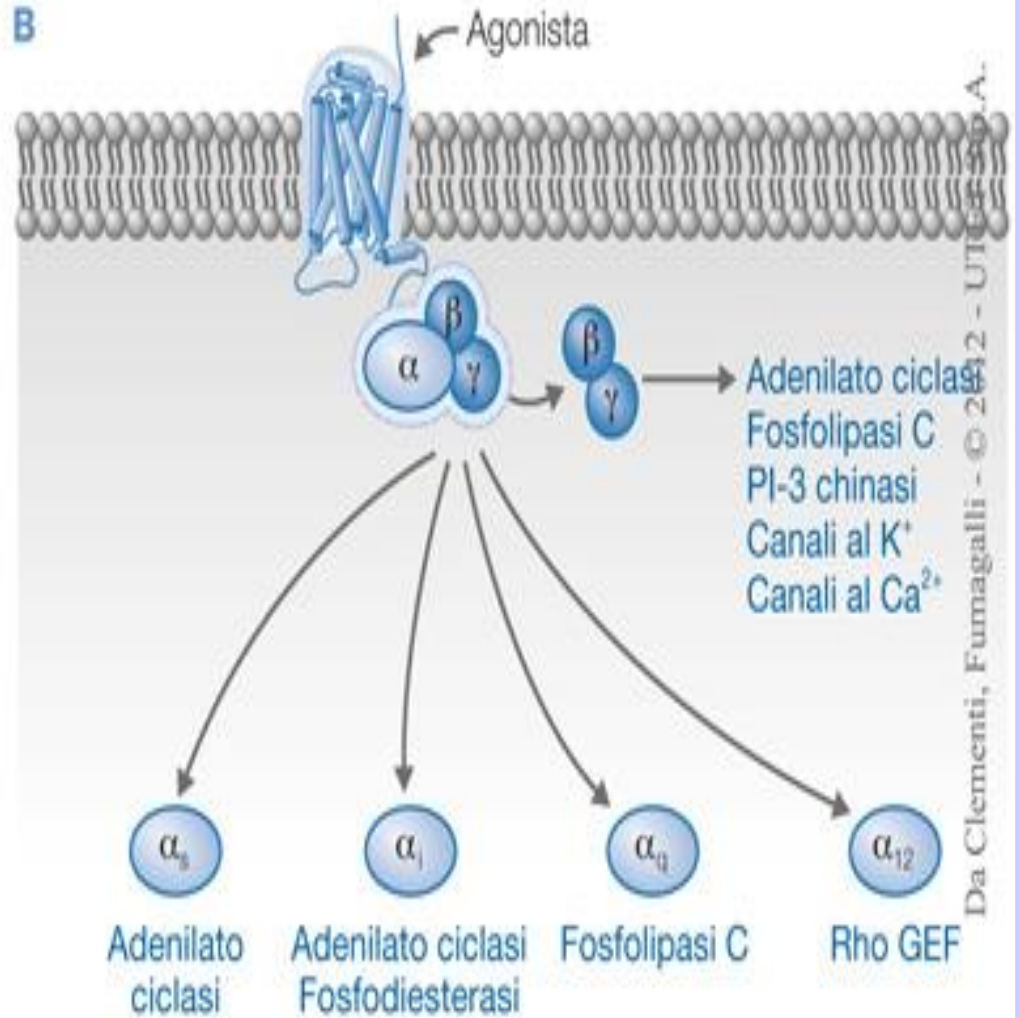
l' α spegne

il segnale

*(eccezione la Gq che stimola la fosfolipasi C, l'effettore partecipa
↑↑ velocità di idrolisi GTP da parte di α)*

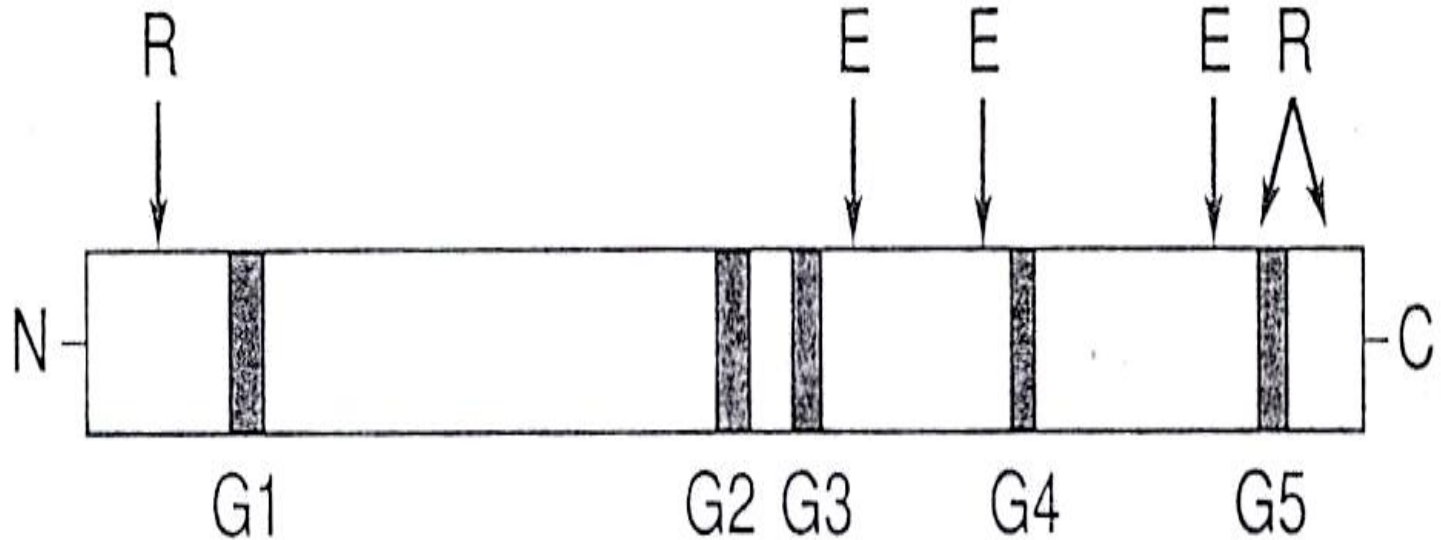
CICLO

1. riposo α -GDP \rightarrow alta affinità per β - γ
2. NT-R, R interagisce con l'eterotrimerico, dissociando l' α dal GDP e sostituendo il GTP
3. l' α -GTP modificato si dissocia dal complesso β - γ -R
4. l' α -GTP interagisce con l'effettore (AC o canale ionico) stimolando o inibendo la sua attività
5. l' α idrolizza il GTP a GDP e termina la regolazione dell'effettore
6. l' α -GDP si riassocia a β - γ e il trimero è disponibile per un'altra molecola agonista

A**B**

Caratteristiche funzionali delle subunità α

Subunità α delle proteine G eterotrimeriche



- le sequenze G1-5 riunite formano il sito per l'attacco dei nucleotidi guanilici
- termine COOH importante per interagire con il R

- ❑ Tossine batteriche del **colera** e della **pertosse** agiscono alterando la funzione di subunità α ;

sono dotate di attività ADP-ribosil-transferasica

- ❑ La **tossina colerica** ADP-ribosila una αG_s a livello di un ARG in G_2 , regione coinvolta nell'idrolisi del GTP \rightarrow la conseguenza è **il blocco della α nella forma attiva** in quanto **non più in grado di svolgere attività GTPasica** \rightarrow si induce una stimolazione permanente dell'AC e una continua produzione di cAMP
- ❑ La **tossina pertosse** ADP-ribosila una $\alpha G_i/o$ a livello di una cisteina nella regione di interazione tra R e proteina G \rightarrow si interrompe il segnale e si blocca la possibilità di attivare la proteina G $\alpha i/o$

tre classi di α

1) α_s STIMOLATORIA

che accoppia il R di membrana (β adren, TSH) alla stimolazione dell'adenilato ciclasi

2) α_{i1} , α_{i2} , α_{i3} , α_o INIBITORIE

che accoppiano R come α_2 adren, somatostatina, all'inibizione dell'adenilato ciclasi

- *le α_i inibiscono AC e attivano canali al K*
- *l' α_o inibisce l'attività di canali per il calcio*

3) α_q

stimola la fosfolipasi C da parte di R come il muscarinico M1 e R per TRH

Alterazioni della funzionalità delle subunità α delle varie proteine G sono alla base di numerose patologie

- ❖ mutazioni possono determinare α_s costitutivamente attive in tumori tiroidei oppure α_{i2} alterate in tumori dell'ovaio
- ❖ i geni mutanti che codificano per le α diverse agiscono come oncogeni, cioè inducono crescita cellulare incontrollata

Trasduzione del segnale:

i sistemi effettori

secondi messaggeri

i meccanismi di fosforilazione

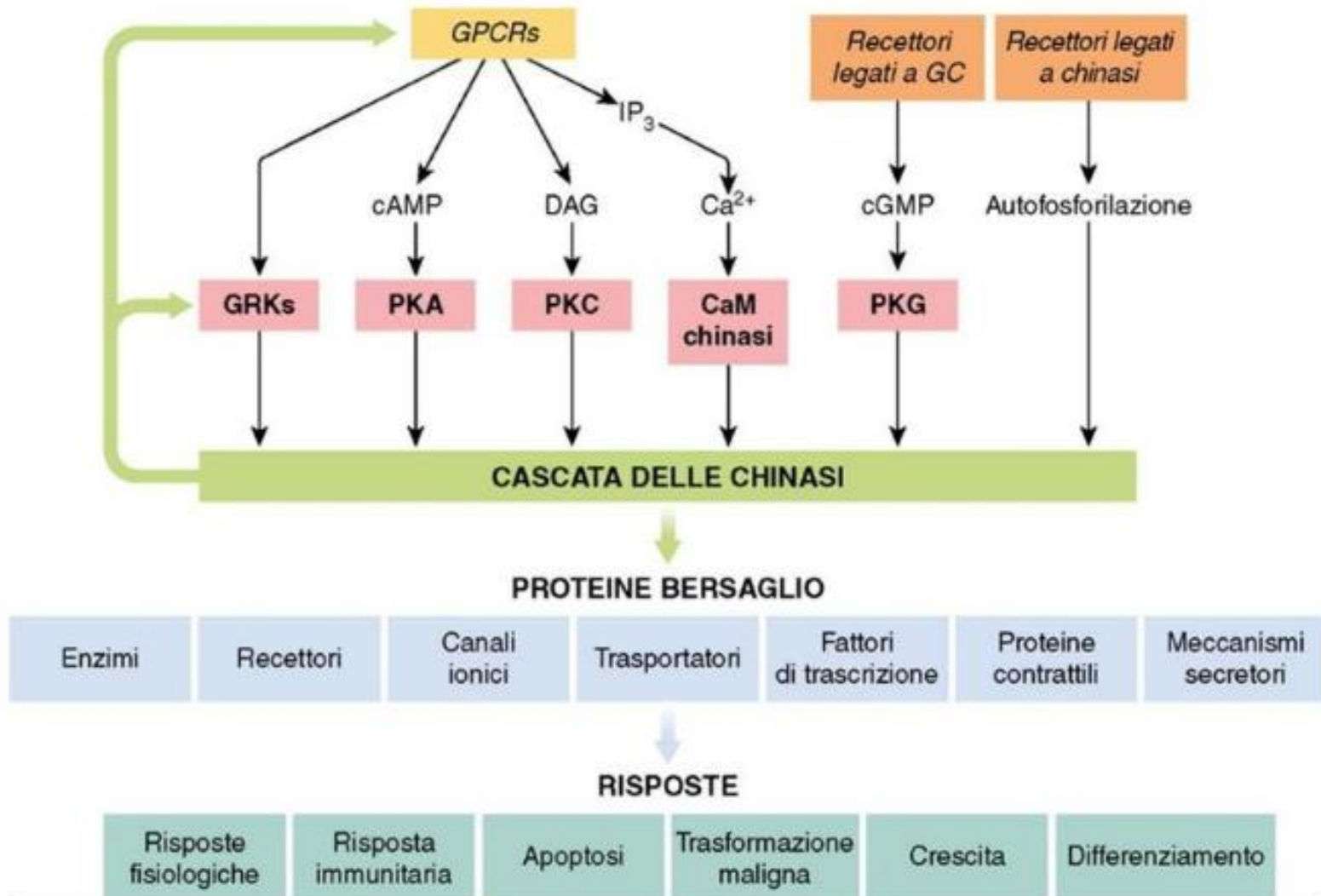
le chinasi

IL CONCETTO DI

TRASDUZIONE DEL SEGNALE → un fenomeno che avviene quando una molecola «segnale» esterna attiva uno specifico recettore cellulare (dentro o fuori la cellula).

Questo recettore A SUA VOLTA attiva una via di segnalazione biochimica dentro la cellula, creando una risposta cellulare

trasduzione del segnale



SISTEMI EFFETTORI e secondi messaggeri

EFFETTORI ENZIMATICI

formazione di molecole attive



- eff. Adenilato Ciclasi → cAMP
- eff. Guanilato Ciclasi → cGMP
- eff. Fosfolipasi C → IP3/DAG

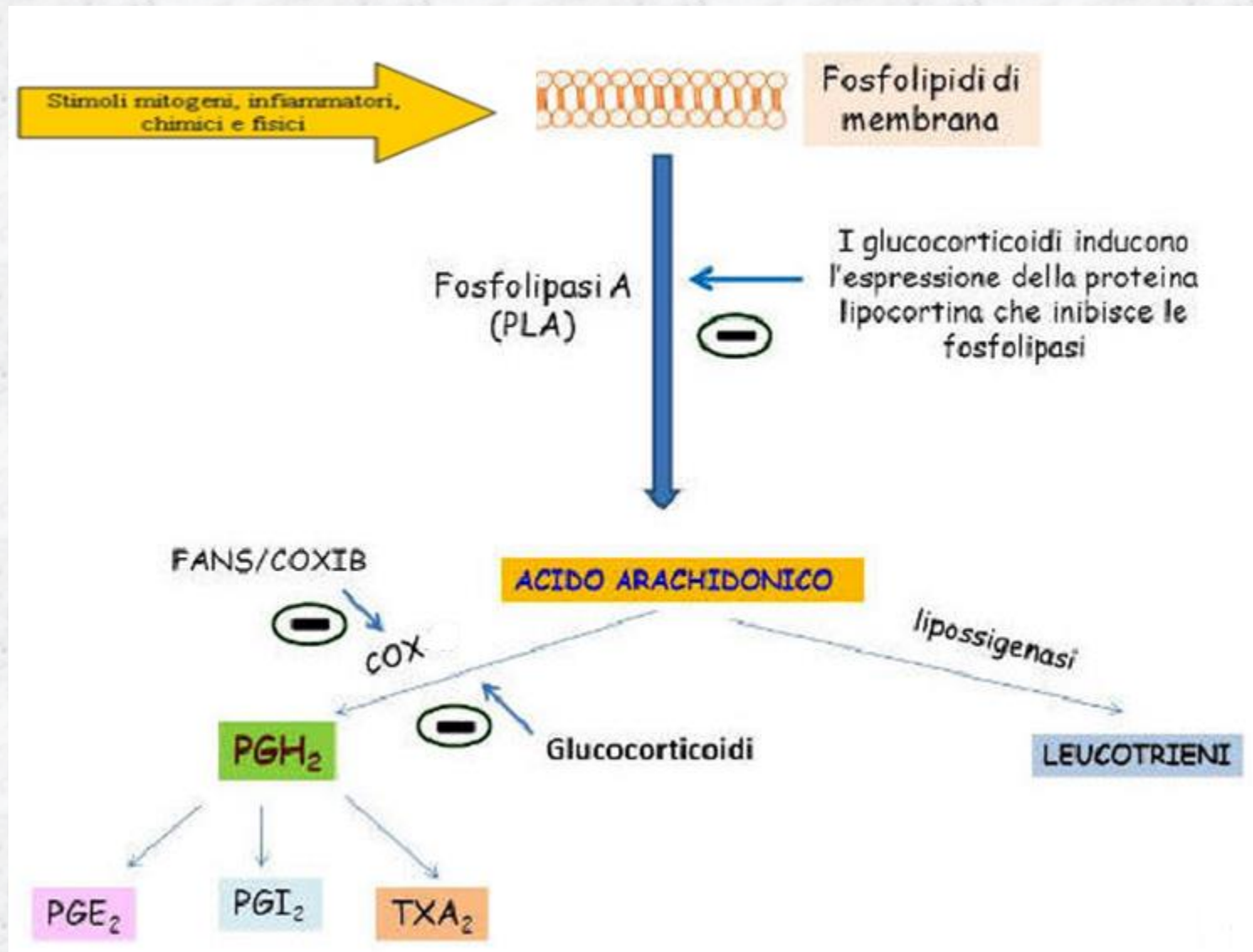
- canali al Ca aperti da secondi messaggeri come l'IP3

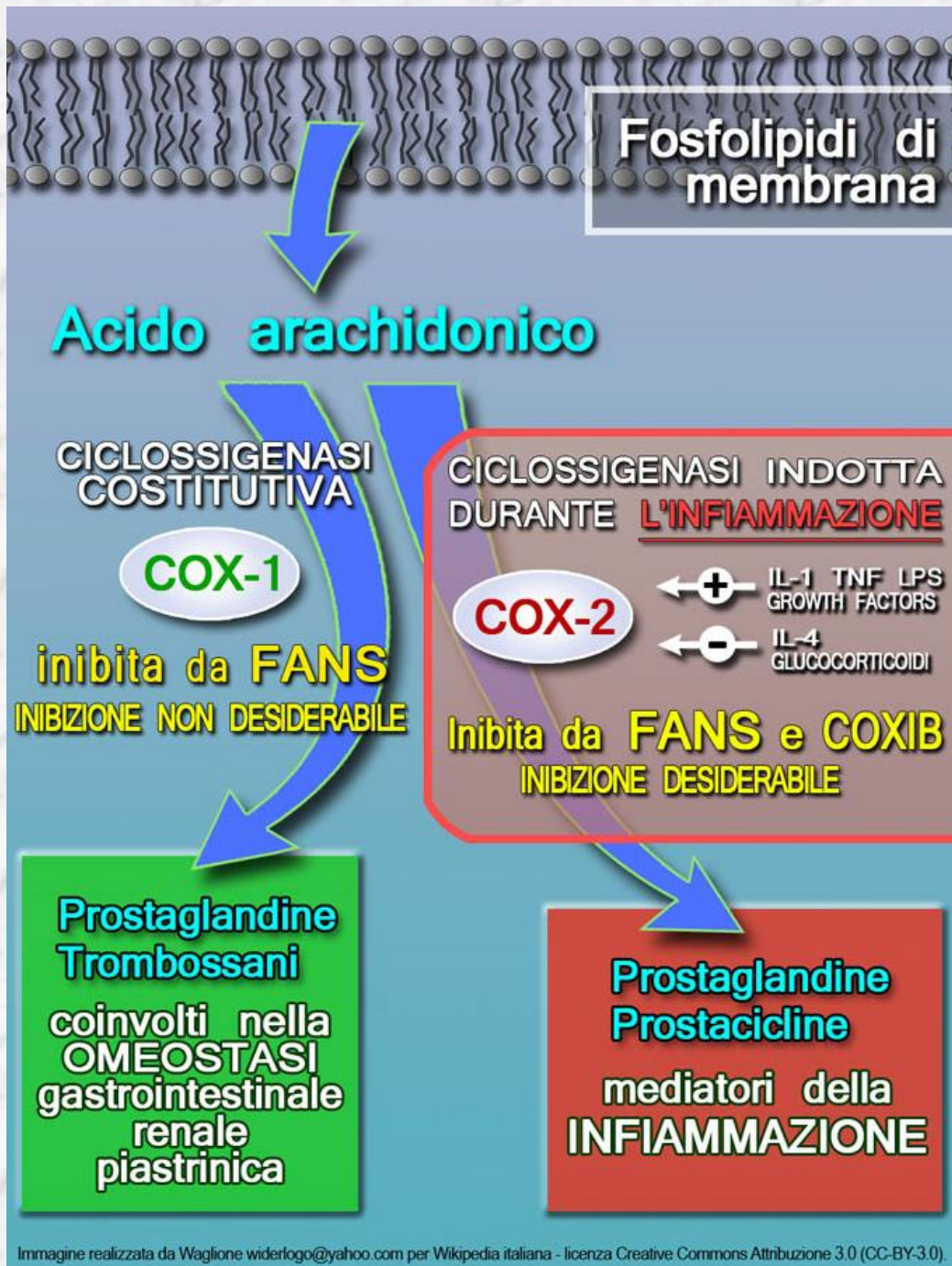
- eff. Fosfolipasi A2 → acido arachidonico

CANALI IONICI

modificazione delle concentrazioni
ioniche intracellulari

Acido arachidonico → eff. fosfolipasi A2



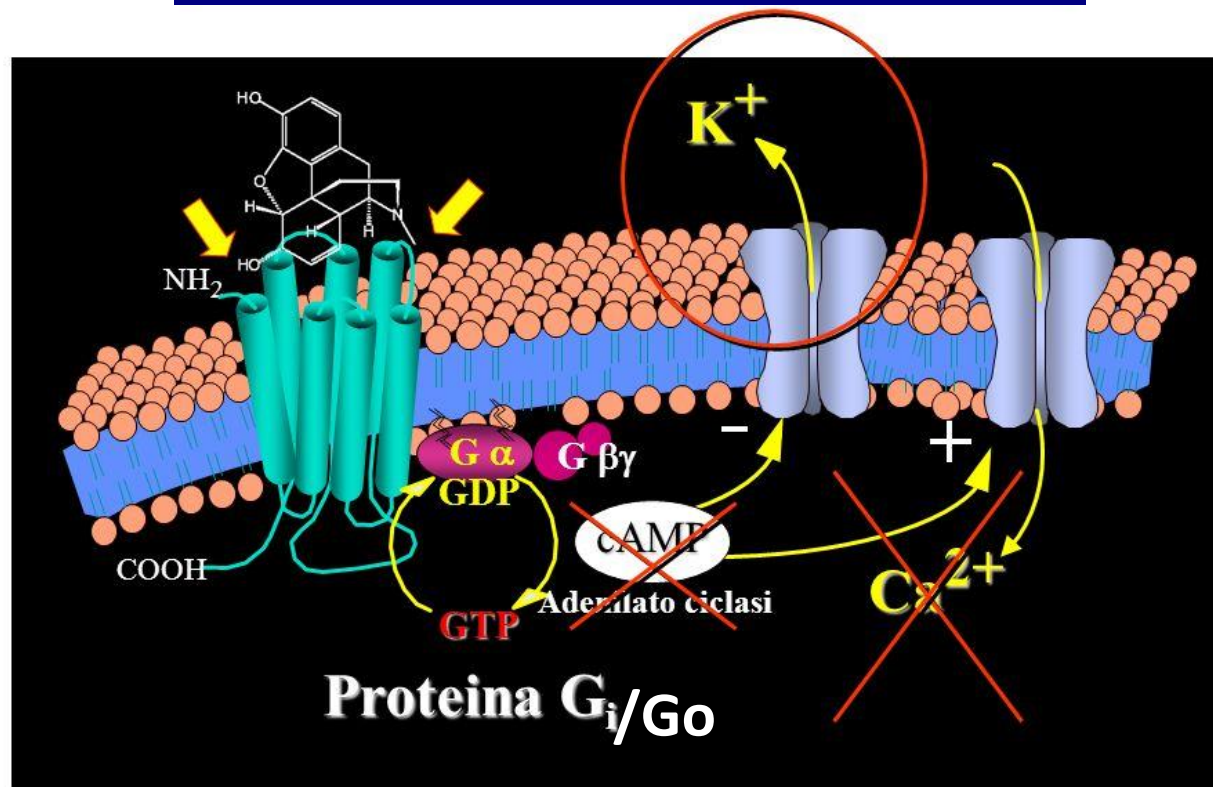


Un recettore può regolare diversi effettori

Recettori oppioidi attivano proteine G, con $G\alpha$ i/o per cui inducono:

- sia l'inibizione di Adenilato Ciclasi che l'attivazione del canale al K tramite G_i
- sia l'inibizione di Adenilato Ciclasi che l'inibizione dei canali del Calcio tramite G_o

Recettori per gli oppioidi



Es. attivazione R accoppiato a Prot. G α s

Il legame di G α s con ATP induce la dissociazione della subunità α da β/γ e le permette di interagire con due principali enzimi a valle
→ **le proteine effettrici**

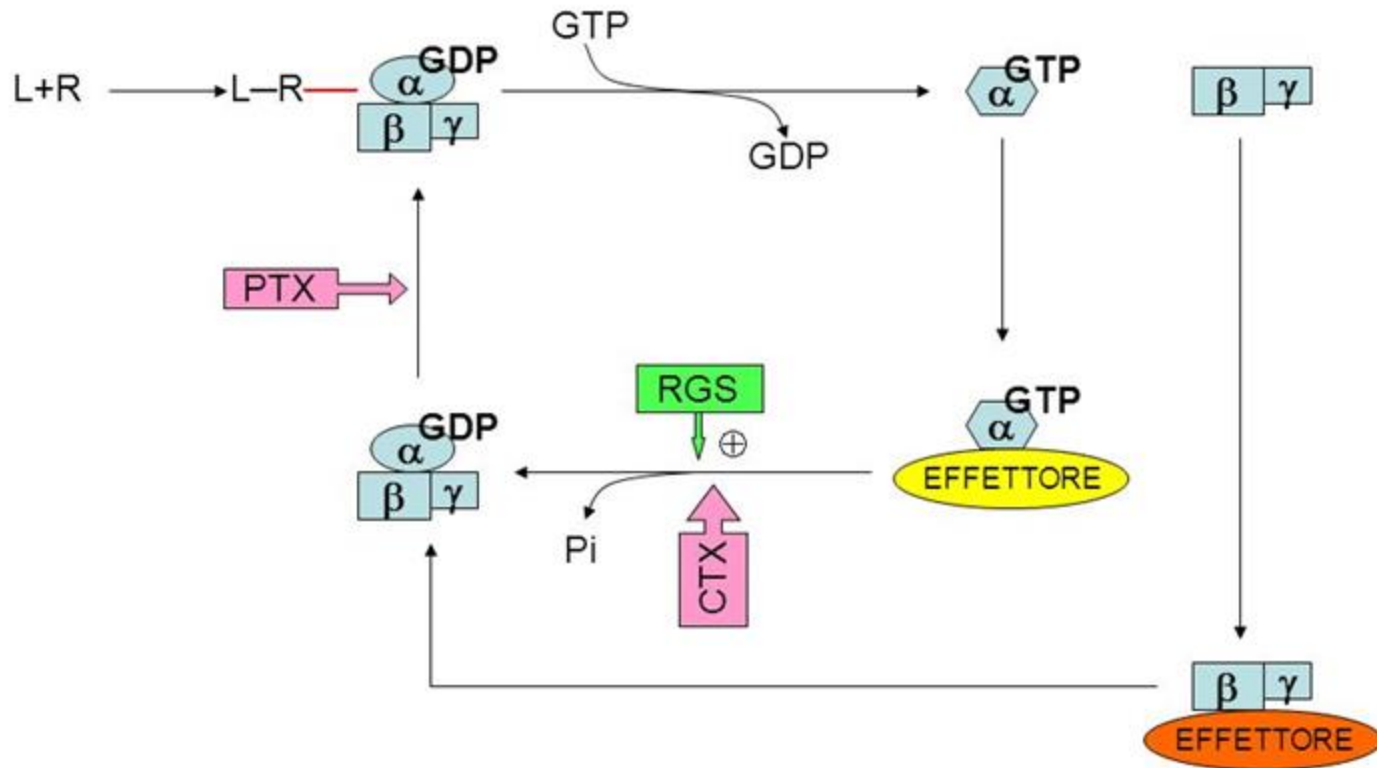
- Le proteine effettrici enzimatiche sono enzimi che catalizzano la formazione di un secondo messaggero (adenilato-ciclasti, guanilato-ciclasti, fosfolipasi C) il quale, a sua volta, entra in vario modo nelle catene di trasduzione del segnale che portano alla risposta finale della cellula.

Principali proteine effettrici sono:

➡ adenilato ciclasti che catalizza la conversione di ATP in cAMP;

➡ fosfolipasi C che converte un fosfolipide di membrana in due differenti molecole (DAG e IP3), entrambe secondi messaggeri.

Ciclo delle proteine G



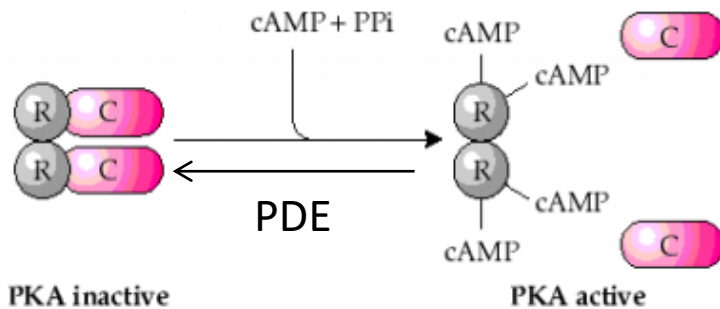
Ion channels,
PI3K γ , PLC- β ,
adenylyl cyclases

RGS: *regulators of G protein signaling*:

Interagiscono con la subunità α e > notevolmente la velocità di idrolisi del GTP
→ controllano la durata del segnale

Esistono almeno nove tipi di Adenilato Ciclasi (isoforme I-IX)

- il cAMP regola delle proteine chinasi dette PKA = PK dipendenti da cAMP



Le protein-kinasi A (A = attivata da AMP ciclico) (PKA) sono costituite da 2 siti regolatori e da 2 siti catalitici. Due molecole di cAMP si legano ai siti regolatori e tale legame libera le subunità catalitiche che possono agire sui vari substrati citoplasmatici.

L'idrolisi dell'AMPc da parte delle fosfodiesterasi permette la ricostituzione della forma inattiva della PKA.

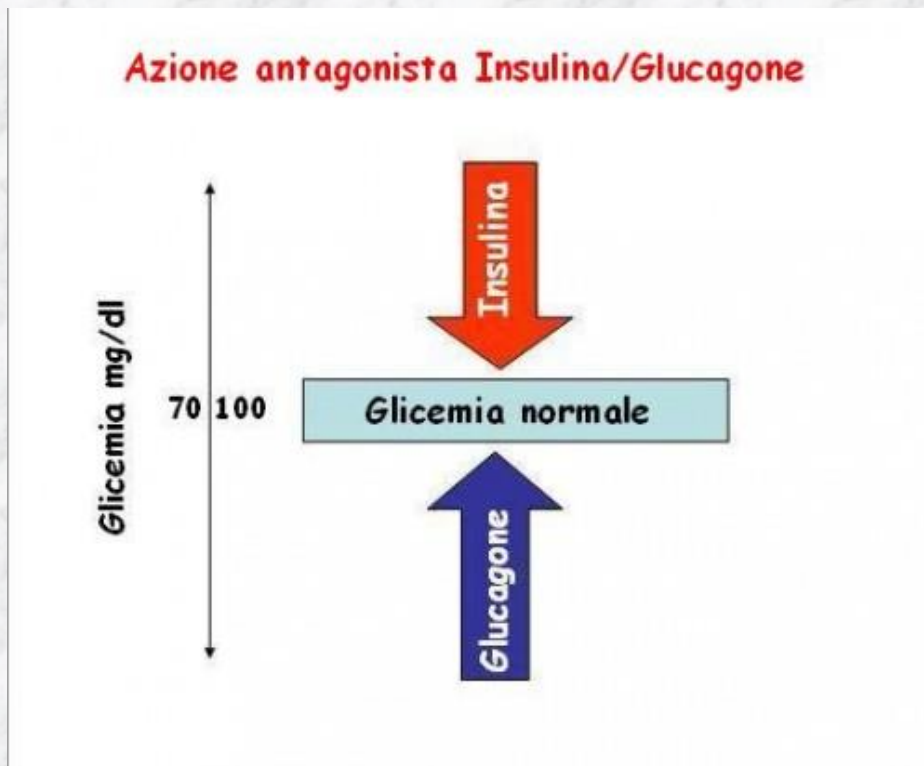
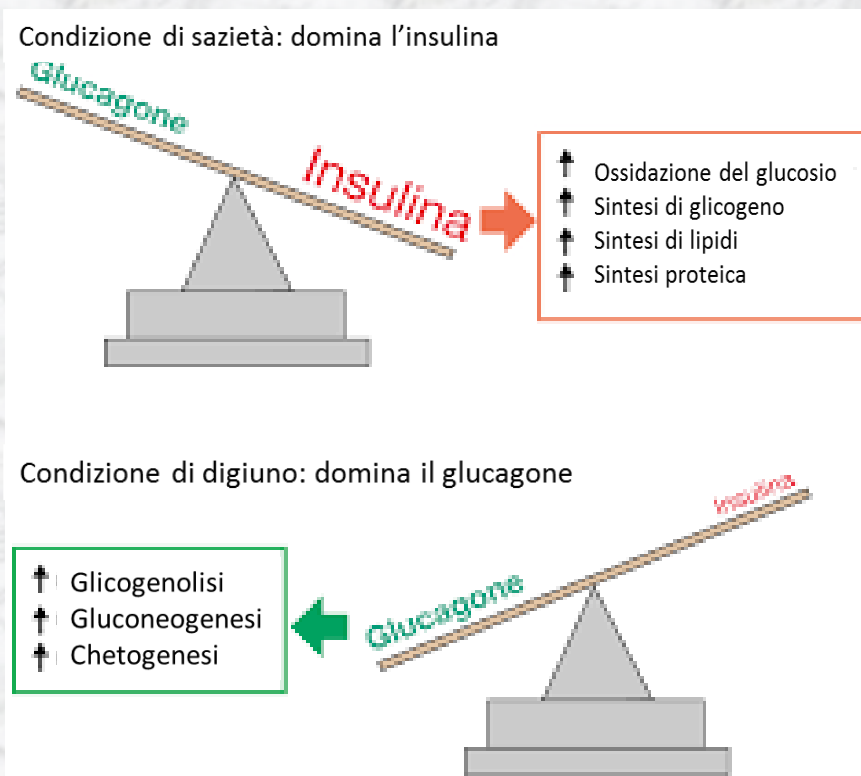
- La PKA una volta attivata è libera di fosforilare residui di serina e treonina di proteine specifiche producendo effetti diversi:
 - ✓ reazioni metaboliche
 - ✓ secrezioni
 - ✓ rilasciamento cellule muscolari lisce
 - ✓ attività di canali ionici
 - ✓ trascrizione di geni specifici

LA VIA DEL GLUCAGONE viene regolata attraverso l'azione della PKA

Il glucagone (ormone secreto dal pancreas in risposta ad una riduzione del glucosio ematico)

→ provoca l'inibizione degli enzimi della glicogenolisi

→ liberazione di glucosio nel sangue

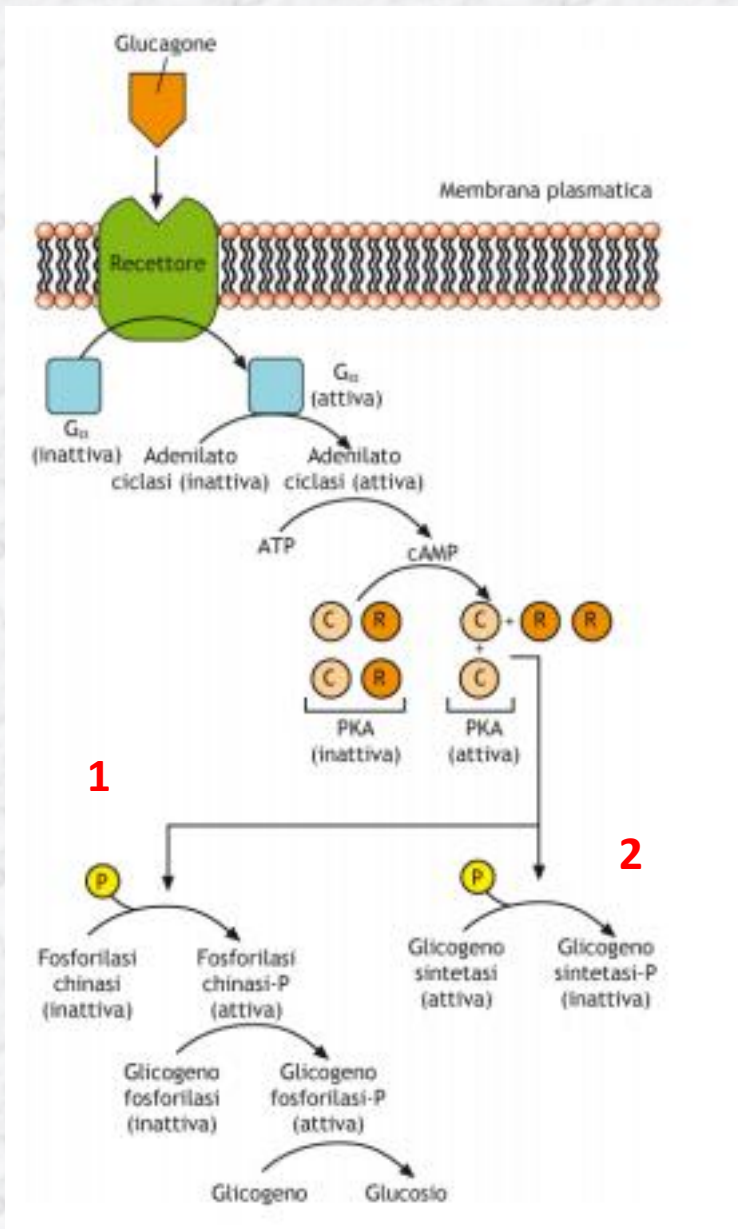


LA VIA DEL GLUCAGONE viene regolata attraverso l'azione della PKA

PKA FOSFORILA:

1 GLICOGENO FOSFORILASI CHINASI (ATTIVANDOLA) → è attiva nella forma fosforilata; il glicogeno viene metabolizzato in glucosio 6-fosfato

2 GLICOGENO SINTETASI (INIBENDOLA) che è responsabile della sintesi del glicogeno a partire dal glucosio ed è attiva quando non è fosforilata



In molti tipi cellulari PKA ATTIVA CREB

ORMONI COME:

ormone luteinizzante (LH)

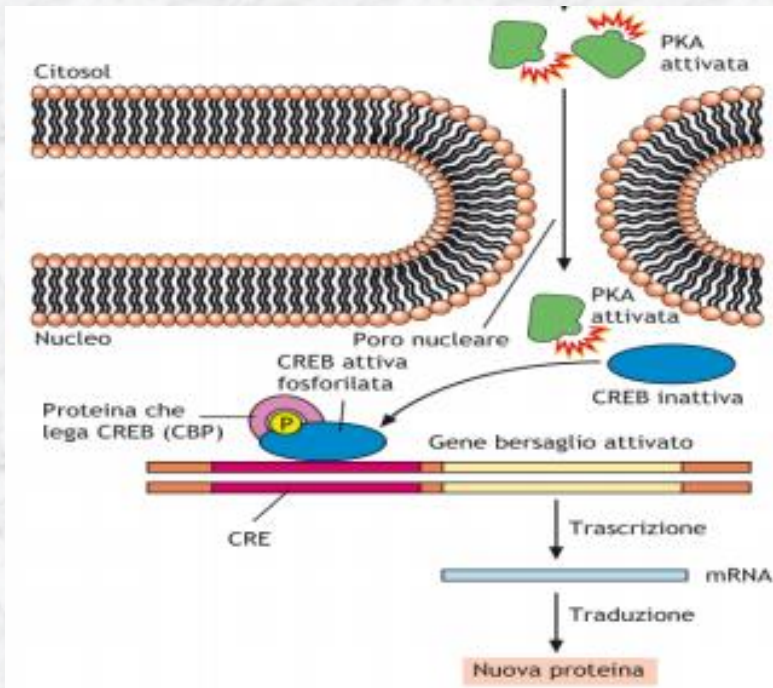
ormone adrenocorticotropo (ACTH)

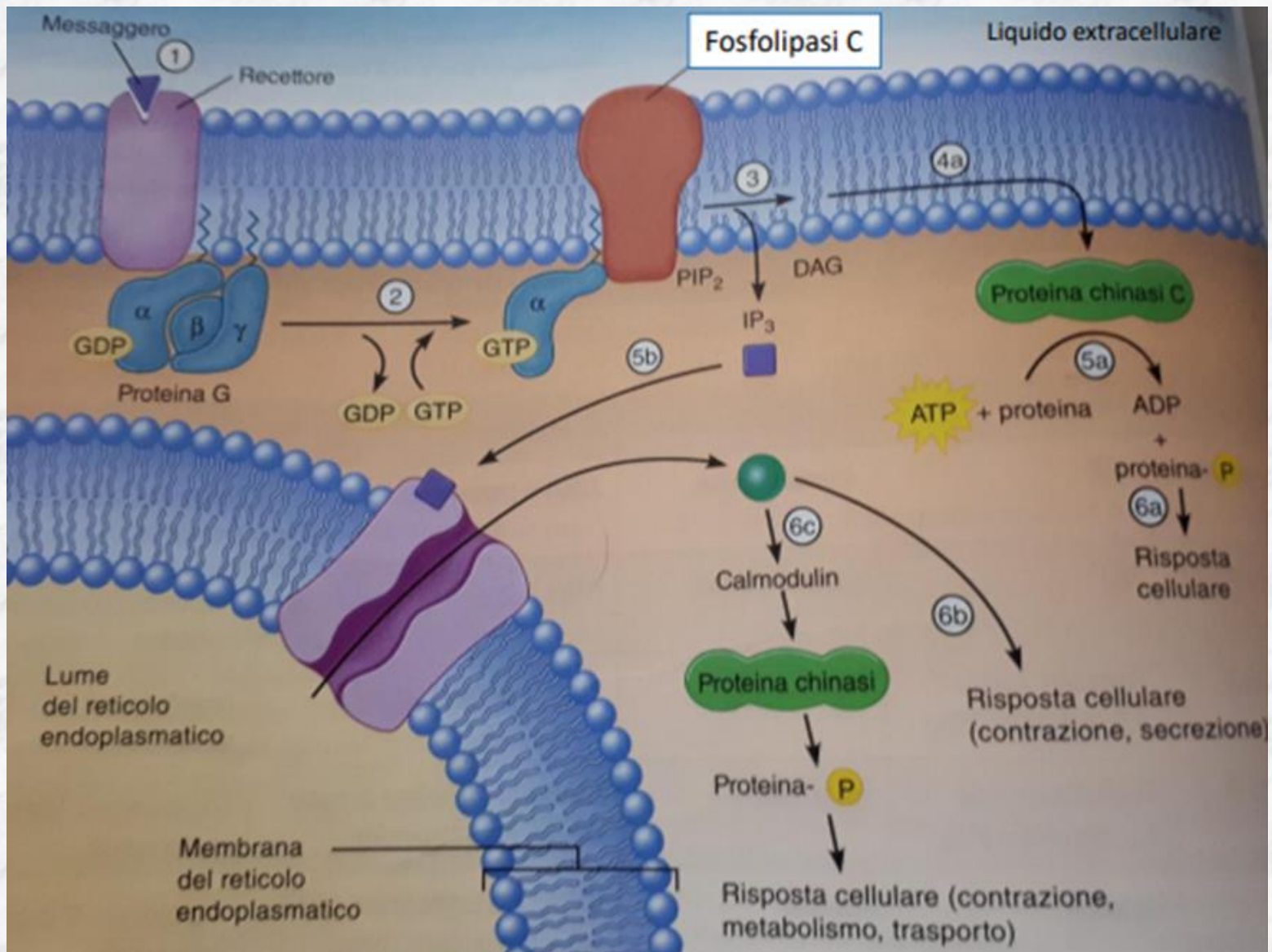
ormone stimolante la tiroide (TSH)

attivano **PKA** → che trasloca nel nucleo e fosforila il fattore di trascrizione **CREB**.

CREB attivato è in grado di legarsi al promotore di alcuni geni attivando la trascrizione:

- aumento della sintesi di progesterone (LH)
- aumento della secrezione di cortisolo (ACTH)
- aumento della sintesi dell'ormone tiroideo (TSH)



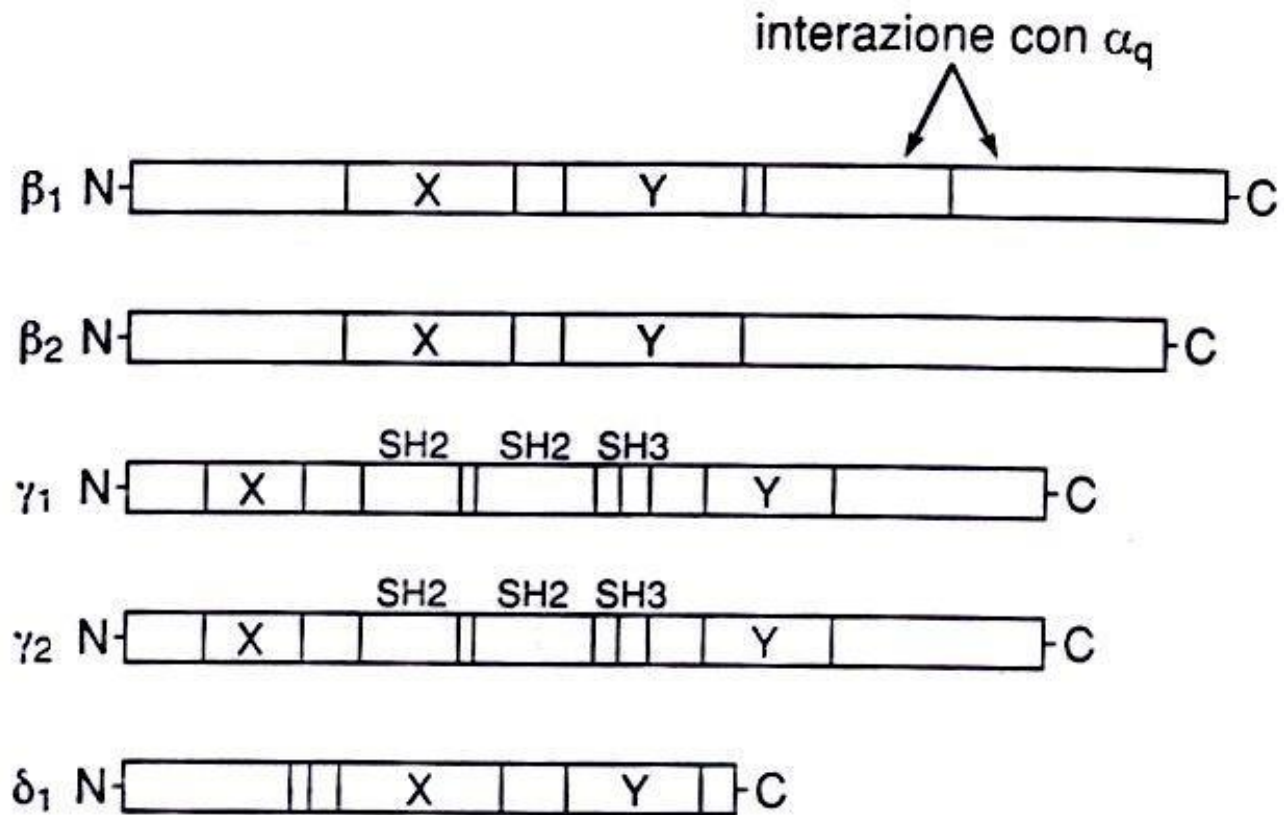


Fosfolipasi C

Tre tipi: β , γ e δ

- ❑ due siti X e Y catalitici, la cui attività *in vitro* è Calcio dipendente
- ❑ la sua attivazione determina la sua traslocazione dal citoplasma alla membrana
- ❑ due meccanismi di attivazione

Famiglia delle fosfolipasi C



Fosfolipasi C: meccanismo di attivazione 1

Mediato dalla Gq:

dopo l'attivazione del R da questo si dissocia la subunità attiva

G α q-GTP che si lega alla fosfolipasi C- β 1

→ la α q-GTP resta sulla membrana quindi la PL C trasloca dal citosol alla membrana

Fosfolipasi C: meccanismo di attivazione 2

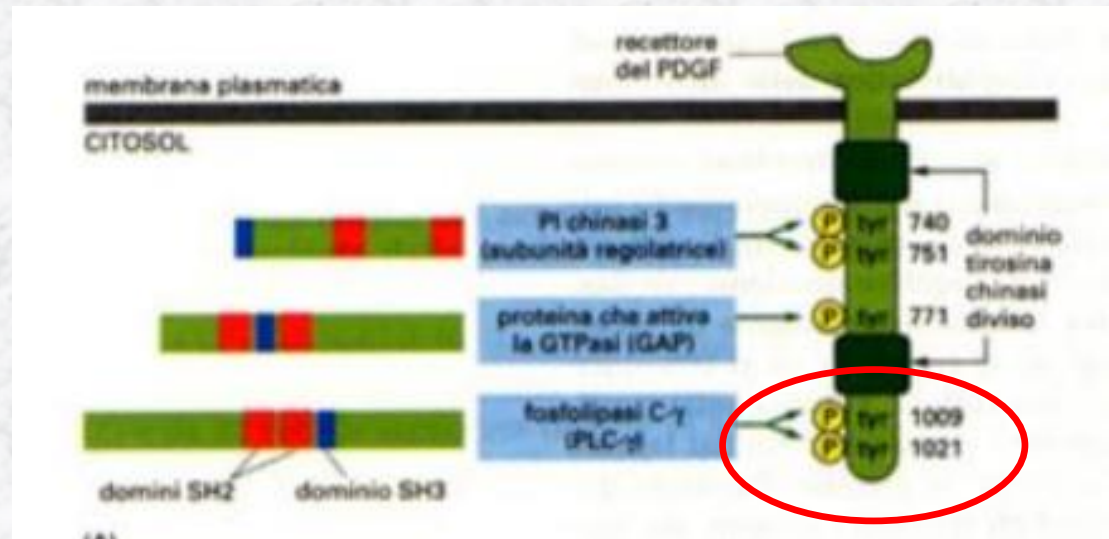
Mediato dalla fosfolipasi C γ \rightarrow tipico di fattori di crescita

questi legano R ad attività tirosin-chinasica intrinseca che si autofosforilano su diversi residui di Tyr che si trovano nella porzione interna al citosol.

1) proteina che attiva la GTPasi (GAP);

2) fosfolipasi C-gamma (PLC-gamma);

3) fosfatidilinositolo 3' chinasi (PI3-chinasi)



Fosfolipasi C: meccanismo di attivazione 2

Mediato dalla fosfolipasi C γ

la Tyr fosforilata sul R si lega a sequenze SH2 specifiche sulla fosfolipasi C γ , che quindi trasloca dal citoplasma alla membrana.

Poiché la C γ a sua volta viene fosforilata → Questo porta il gruppo SH3 ad interagire con la membrana e ad esporre i siti X e Y ai substrati dell'enzima

L'idrolisi dei fosfo inositidi, sono i substrati della PL C

La fosfolipasi C idrolizza il fosfatidil-inositolo 4,5 bifosfato e produce due secondi messaggeri, IP3 e DAG

- ❖ **IP3** libero nel citosol interagisce con un recettore canale e mobilita il Ca dai depositi intracellulari
- ❖ **DAG** legato alla membrana attiva la PKC e aiuta anche la sua traslocazione; a sua volta PKC può fosforilare residui di serina e treonina di diversi substrati

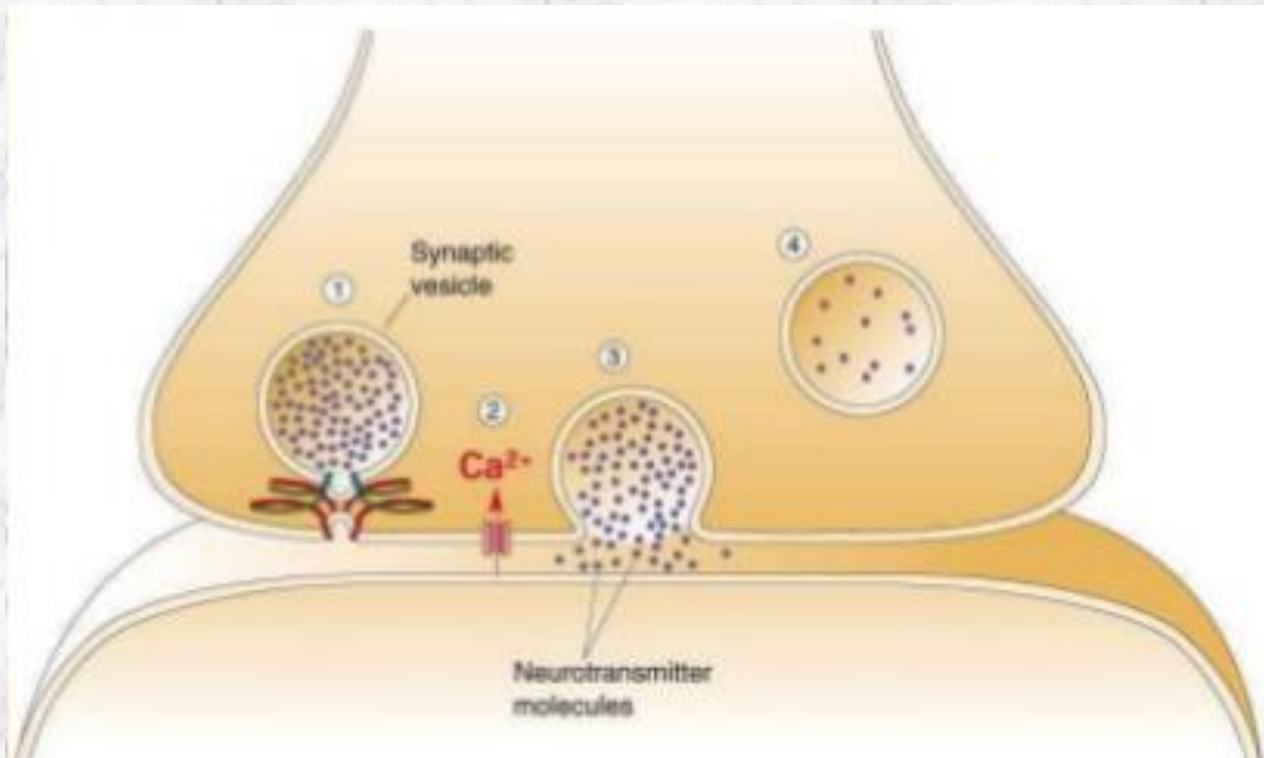
Le due vie di attivazione Calcio e PKC producono effetti:

- ✓ metabolici
- ✓ secrezioni
- ✓ contrazione
- ✓ attività neuronale
- ✓ proliferazione cellulare

TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIANTE CAMBIAMENTI DELLA [Ca²⁺]

Lo ione **Ca²⁺** come **secondo/ terzo messaggero** é coinvolto principalmente in due vie di segnalazione:

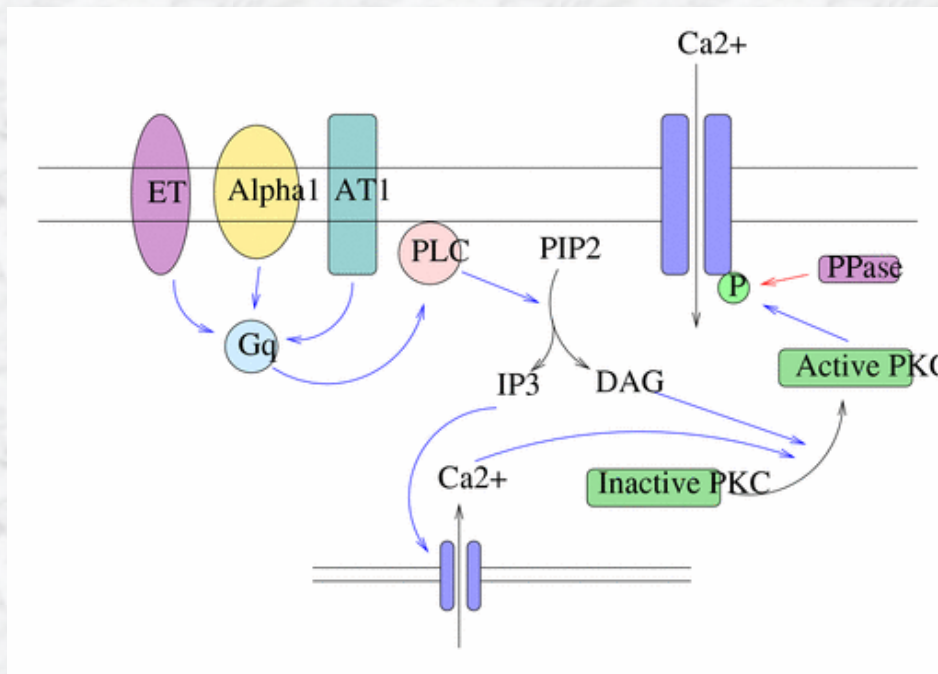
1. nelle cellule nervose, entra nelle cellula attraverso canali ionici → depolarizzazione della membrana plasmatica inducendo il rilascio di neurotrasmettitori nelle sinapsi



TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIANTE CAMBIAMENTI DELLA [Ca²⁺]

Lo ione Ca²⁺ come secondo/ terzo messaggero é coinvolto principalmente in due vie di segnalazione:

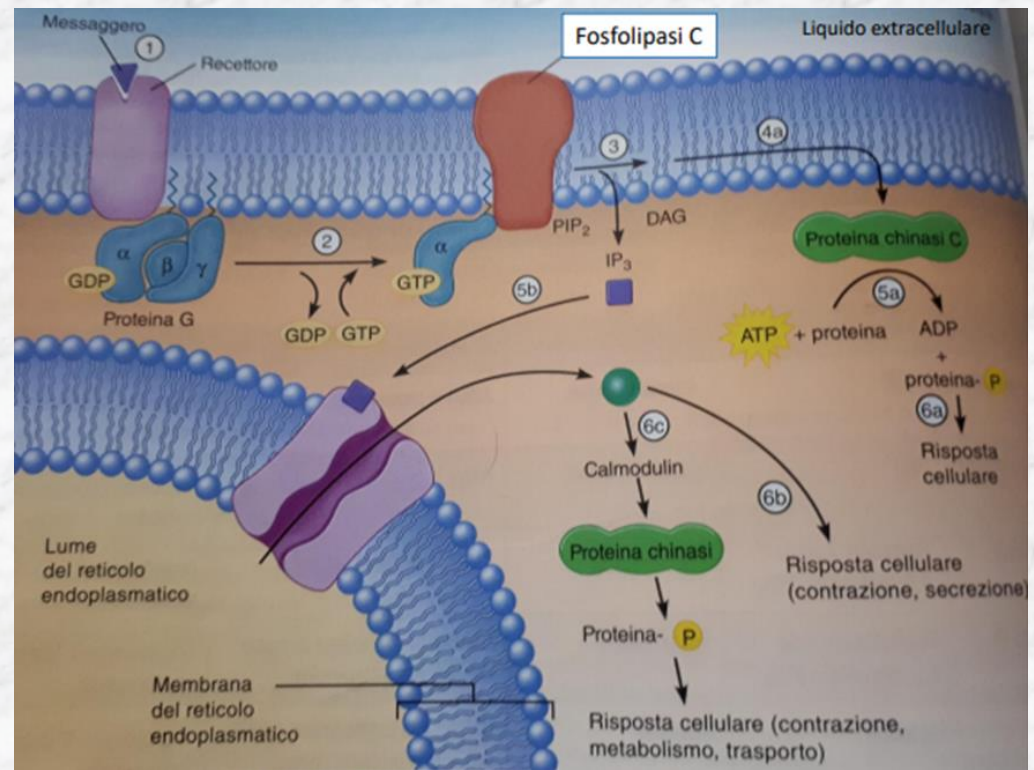
2. Oppure si ritrova nelle vie dei recettori accoppiati a proteine G.



Attivazione prot. Gq → L'IP3 lega i canali per il Ca²⁺ presenti sul reticolo endoplasmatico, che si aprono e rilasciano lo ione (1° risposta);

(il rilascio è un processo a feed-back positivo, cioè si auto-incrementa e termina quando entrano in azione fosfatasi per l'IP3).

L'aumento di concentrazione **attiva la calmodulina (CaM)**, una proteina con alta affinità per questo ione che si lega e la rende attiva tramite autofosforilazione (2° risposta)



CaM-ATTIVATA



La sua attivazione attiva una serie di proteine effettrici → la più conosciuta è **la chinasi Ca-calmodulina dipendente di tipo II (CaMKII)**

Il DAG co-attiva principalmente la proteina chinasi C (PKC) → questo aumenta la sua affinità per il Ca²⁺, altro co-attivatore (3° risposta).

Il più importante recettore (o sensore) intracellulare per il Ca^{2+} è la calmodulina, una piccola proteina ubiquitaria che possiede due domini leganti ciascuno 2 ioni calcio e un dominio cerniera intermedio.

Il legame di 4 ioni calcio determina un cambiamento della struttura terziaria della calmodulina che, ruotando sul dominio cerniera, ne consente l'interazione con i suoi substrati → Tra questi substrati vi sono le chinasi calcio-calmodulina dipendenti (CaMKs) che vengono attivate solo in presenza di calmodulina legata al calcio.

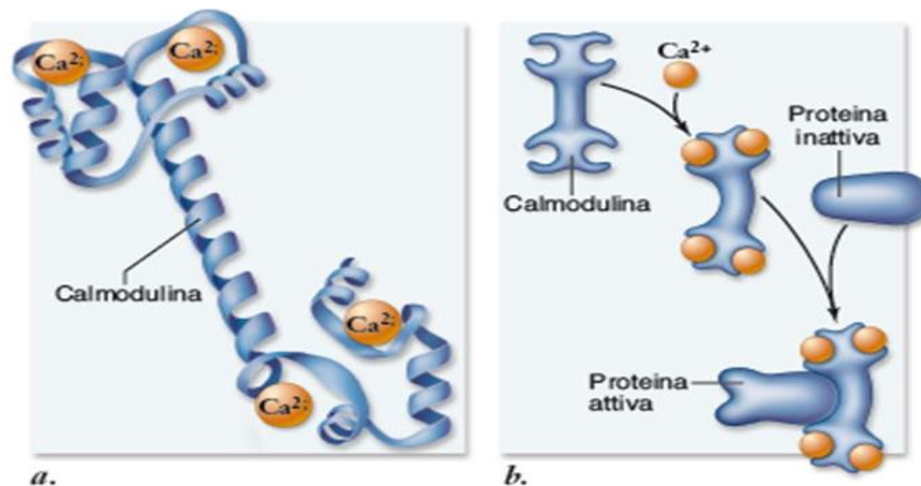
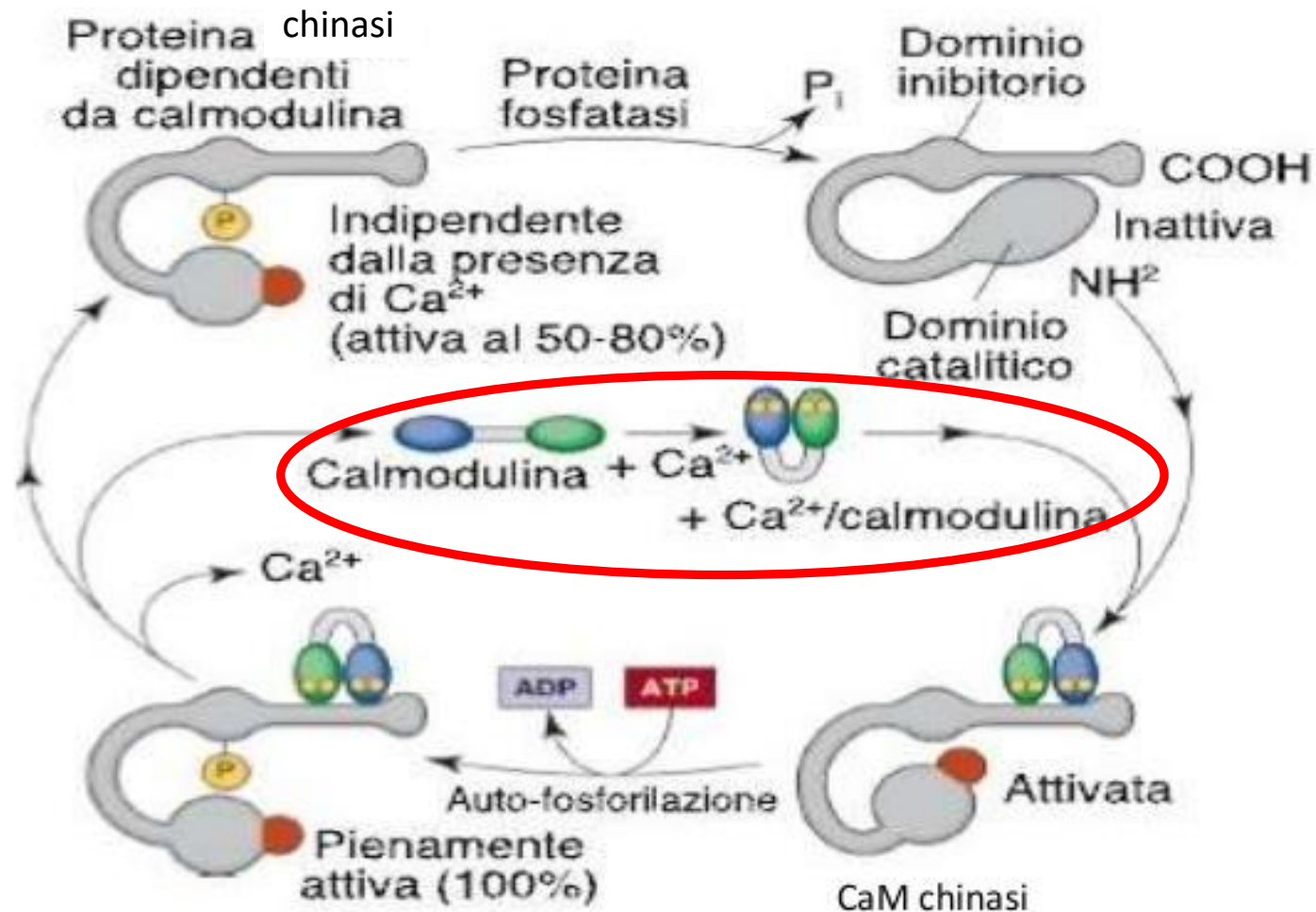


Figura 9.16 La calmodulina. *a.* La calmodulina è una proteina contenente 148 residui amminoacidici che mediano la funzione del Ca^{2+} . *b.* Quando quattro ioni Ca^{2+} sono legati alla molecola di calmodulina, essa subisce un cambiamento conformazionale che la induce a legare altre proteine citoplasmatiche scatenando risposte cellulari.

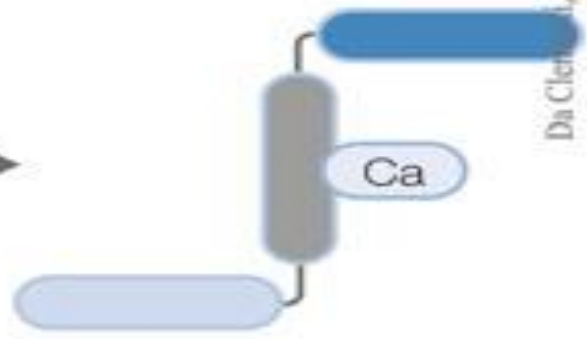
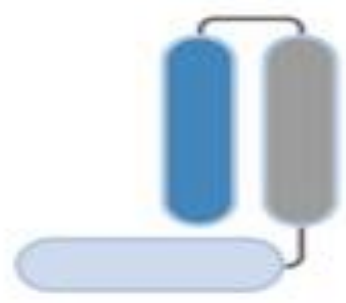
Molte funzioni sono mediate da calmodulina





B ① Inattiva

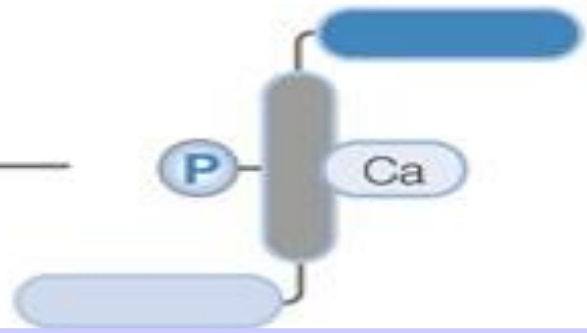
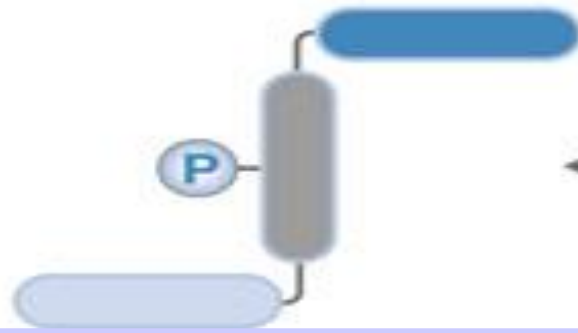
② Attiva calcio-dipendente



Autofosforilazione (Thr286)

④ Attiva calcio-indipendente

③ Attiva calcio-dipendente



Esistono due famiglie di CaMKs:

- **quelle specifiche**, che fosforilano un unico substrato (CaMKIII)
- **quelle multifunzionali**, cioè capaci di fosforilare diversi substrati (CaMKI, CaMKII e CaMKIV)

La **CaMK di tipo II è largamente presente nel sistema nervoso:**

- dove fosforila e quindi attiva l'enzima tirosina idrossilasi, che controlla la sintesi delle catecolamine e importanti ormoni (anche se TH è attivata anche da altre chinasi)
- fosforila la sinapsina I, attivando l'esocitosi dei neurotrasmettitori

Regolazione operata dal complesso Ca^{2+} -calmodulina

