

Farmacologia cellulare e molecolare

Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD

PRESENTAZIONE DEL CORSO, 4 CFU

I PARTE

Modulazione farmacologica dell'interazione farmaco-recettore

Metodi di studio delle interazioni farmaco-recettore; Analisi delle curve dose-risposta dei farmaci; Recettori e trasduzione del segnale; Classificazione dei recettori e Modulazione delle risposte recettoriali.

Recettori canale, recettori accoppiati alle proteine G, recettori per i fattori di crescita e altri: Organizzazione molecolare, attivazione e modulazione.

Modulazione farmacologica dei meccanismi intracellulari di trasduzione del segnale.

Trasduzione di membrana: secondi messaggeri, i sistemi effettori; le chinasi e i meccanismi di fosforilazione, principali vie di segnalazione: mTOR, MAPK, PPARs.

Modulazione delle risposte recettoriali: desensitizzazione – *down-regulation* – internalizzazione, *up-regulation* – traffico endocitico. *Biased agonism*.

Modulazione farmacologica dell'espressione genica

Meccanismi intracellulari di regolazione dell'espressione genica. Farmacologia della trascrizione genica - Recettori intracellulari - Gli inibitori del codice genetico - Uso farmacologico degli oligonucleotidi sintetici - Terapia genica - I vettori e le modalità di trasferimento genico.

II PARTE

Regola delle 3R e sperimentazione preclinica in modelli animali - applicazioni in farmacologia.

Modelli alternativi nella sperimentazione preclinica (colture cellulari, cellule staminali , c. *elegans*, zebrafish) - applicazioni in farmacologia.

Impiego di metodiche di biologia molecolare per la caratterizzazione farmacologica di farmaci peptidici e loro recettori, applicate alla farmacologia.

III PARTE

Trasmissione neuronale

Sistema oppioide endogeno - vecchie e nuove evidenze

Sistema endocannabinoide - vecchie e nuove evidenze

Sistema della dopamina - vecchie e nuove evidenze

Sistema della serotonina - vecchie e nuove evidenze

Fattore neurotrofico BDNF e fattore di rilascio della corticotropina CRF - vecchie e nuove evidenze

Sistema glutammatergico - vecchie e nuove evidenze

Sistema GABAergico - vecchie e nuove evidenze

Stress ossidativo e proteasoma – applicazioni in farmacologia.

Epigenetica e farmaci epigenetici.

Testi consigliati:

F. Clementi, G. Fumagalli, "Farmacologia generale e molecolare" EDRA, V^a Edizione, 2018.
Goodman and Gilman "La basi farmacologiche della Terapia" ZANICHELLI XII^a Edizione 2016.
Katzung, Farmacologia e Farmacoterapia clinica , PICCIN 2017.

Afferenza: Dipartimento FaBiT, sede ex Farmacologia, via Irnerio 48 Bologna
E-mail: patrizia.romualdi@unibo.it

Modalità di svolgimento dell'esame: orale

Orario di ricevimento: su appuntamento

I PARTE

Modulazione farmacologica dell'interazione Farmaco - Recettore

INTERAZIONI FARMACO-RECETTORE

Concetto di sito specifico in grado di riconoscere una sostanza e di mediarne l'effetto

1850 Ehrlich



deve avvenire il
contatto fisico

Langley



concetto di sostanza ricettiva
F moderna = **RECETTORE**

1970 (BINDING)

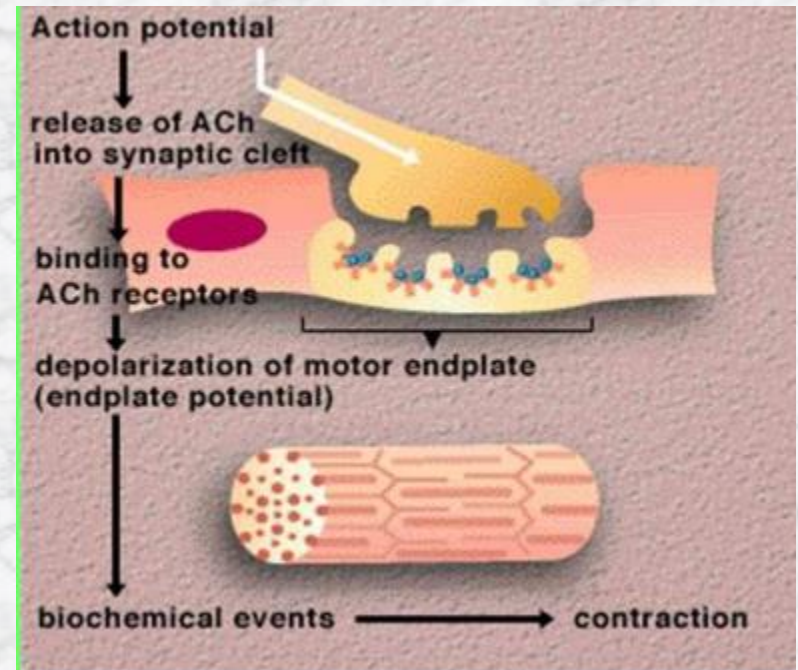
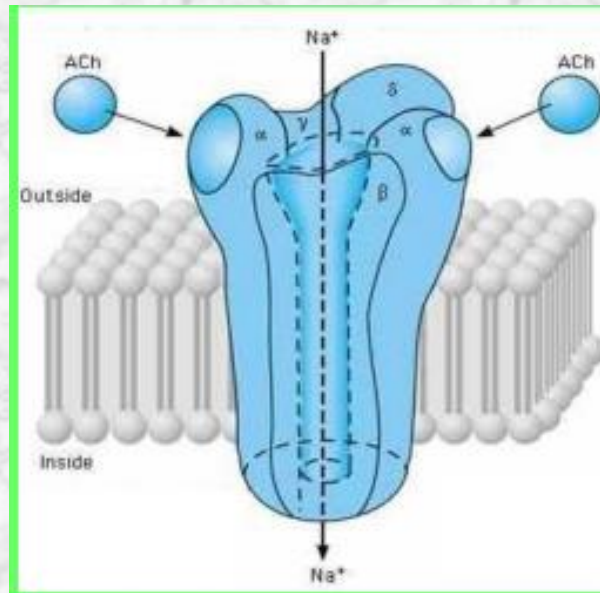
RECETTORE: *macromolecole specifiche, presenti sulla superficie cellulare o all'interno cellula*

Farmaco non “crea” l’effetto → ma modula una funzione preesistente alterando lo stato funzionale del recettore

Recettore:

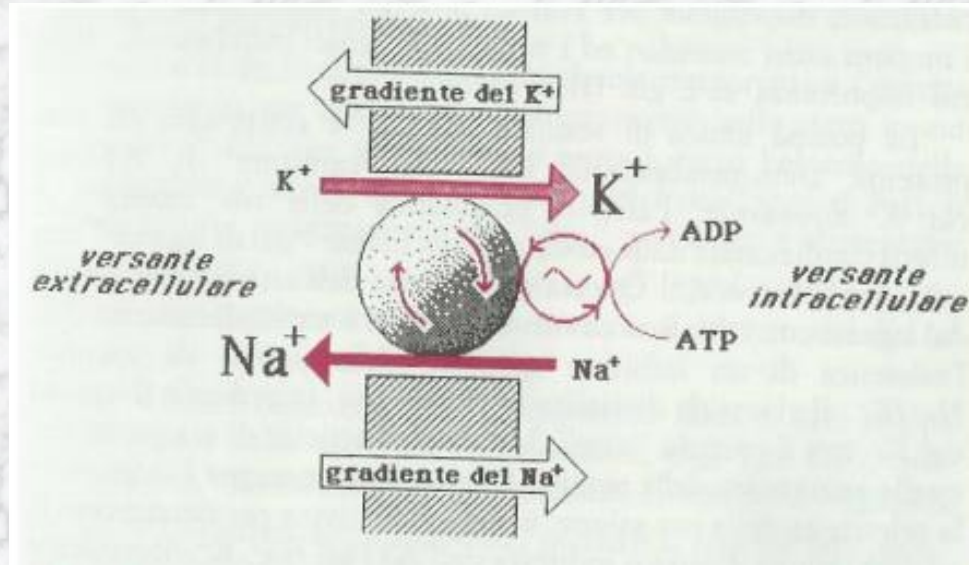
- non solo per gli **endogeni** (ormoni, neurotrasmettitori, fattori di crescita)
- ma anche per gli **esogeni** → farmaci

Esempio 1: Recettore nicotinico **ACh** lo stesso per D-Tubocurarina miorilassante “bloccante neuromuscolare competitivo non depolarizzante”

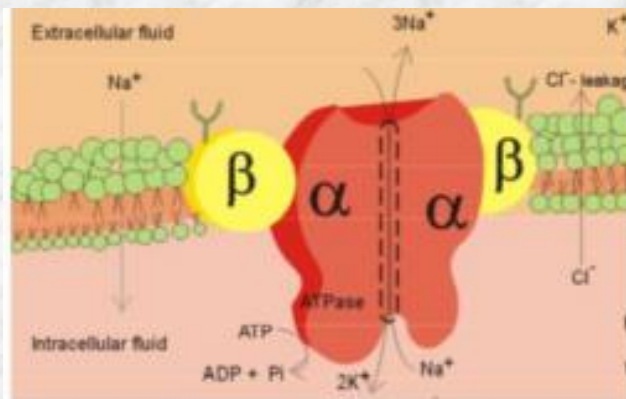


Esempio 2: Recettore per Digossina → **ENZIMA** Na^+ / K^+ ATPasi

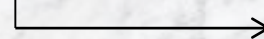
E' la pompa più diffusa, si trova sulla membrana plasmatica delle cellule di tutti i tessuti. E' un trasporto attivo primario



- Regolazione intrinseca che dipende dalle conc. di ioni
- Regolazione genica → Stimolazione dei geni codificanti le proteine di pompa
- **Regolazione Farmacologica**



subunità α



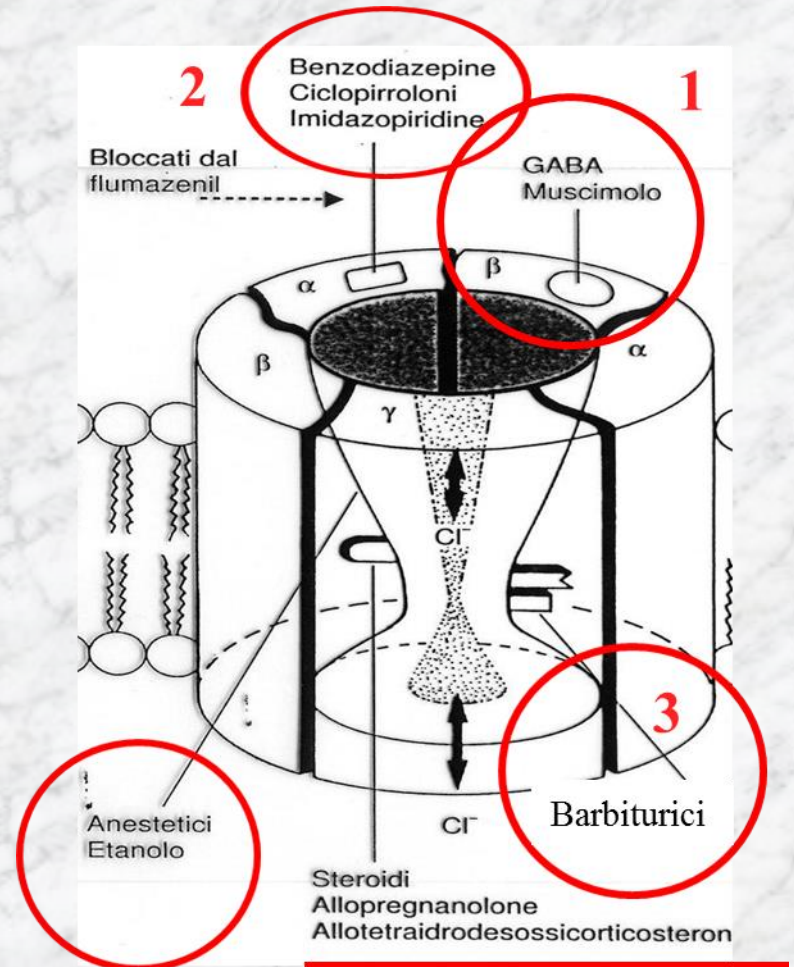
altamente affine per le molecole dei glicosidi cardioattivi che legandosi deprimono l'attività della pompa → aumento Na^+ → aumento Ca^{2+} → contrazione cardiaca

Recettore per un farmaco :

- a)** un recettore per un endogeno (la maggior parte)
- b)** un enzima (digossina, aspirina)
- c)** un canale (Ca antagonisti, anestetici locali)
- d)** un acido nucleico (antibiotici, antimitotici)
- e)** una proteina strutturale (antigottosi, *colchicina*, interferisce con la polimerizzazione di una α -tubulina)

Farmaci di natura chimica ≠ possono interagire con lo stesso complesso recettoriale (GABA / BDZ / Barbiturici → recettore GABA_A) ma ognuno si lega ad un sito ≠ presente sulla stessa macromolecola, cioè

i Recettori possono avere più siti



Non tutti i farmaci (anche se sono la maggior parte)
necessitano di un recettore

- H_2O_2 proprietà ossidante
- NaHCO_3 proprietà acido-base
- Mannitolo proprietà osmotiche

Però i primi hanno la specificità = dosi basse per interagire con i Recettori

I secondi sono aspecifici = necessitano di dosi molto alte

Farmaci si legano anche a proteine aspecifiche (con funzione di trasporto es. proteine plasmatiche) senza produrre un effetto (non sono R)

Complesso: interazione farmaco-recettore 1 : 1

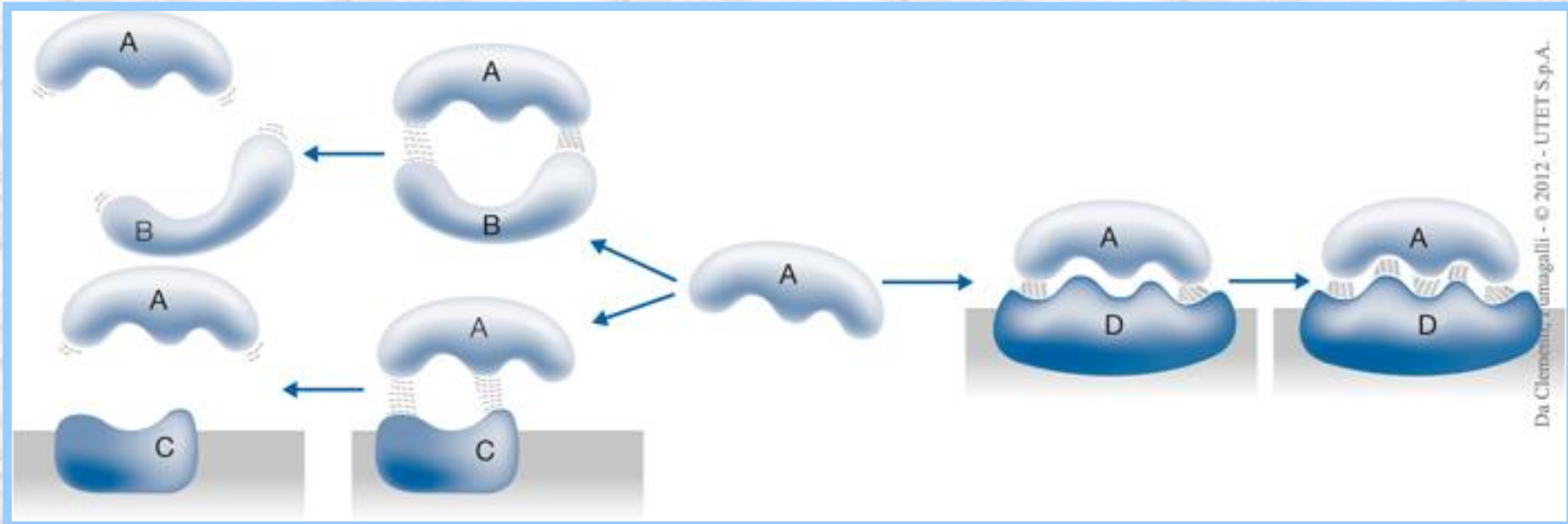
1) $R + X \leftrightarrow RX$ (complesso farmaco - recettore)

(Questo complesso scatena **eventi** che portano alla risposta finale)

2) $RX \rightarrow RX^*$ modificazione conformazionale \rightarrow evento biochimico cellulare \rightarrow
effetto (effetto finale biologico)

Perché il contatto Farmaco-Recettore porti all'effetto ci devono essere:

- numerosi legami deboli
- superficie FARMACO e superficie RECETTORE devono essere complementari



La formazione di legami deboli è responsabile del processo di riconoscimento tra farmaco e recettore. La molecola A, a causa del moto termico, incontra casualmente altre molecole (in questo esempio B è una molecola solubile, C e D sono proteine intrinseche di membrana). Mentre con B e C si possono formare soltanto pochi legami deboli, che si scindono rapidamente, le superfici di A e D sono complementari fra loro nelle zone di contatto e si formano numerosi legami; in questo caso l'interazione è più duratura.

Da questi concetti necessari per l'effetto finale emerge
il concetto di

SPECIFICITA' del farmaco

che dipende dalla sua **struttura** ma anche dalla **concentrazione**
(esempio i farmaci β_2 a basse dosi, diventano anche β_1 ad alte dosi)

L'interazione F-R può essere:

REVERSIBILE

IRREVERSIBILE

- le forze sono in no. alto
- energia del sistema biologico che circonda F-R è insufficiente a staccare il legame

Metodi di studio delle interazioni Farmaco-Recettore

✓ Caratteristiche del RECETTORE:

- tipologia
- localizzazione
- conformazione
- clonaggio
- sequenza

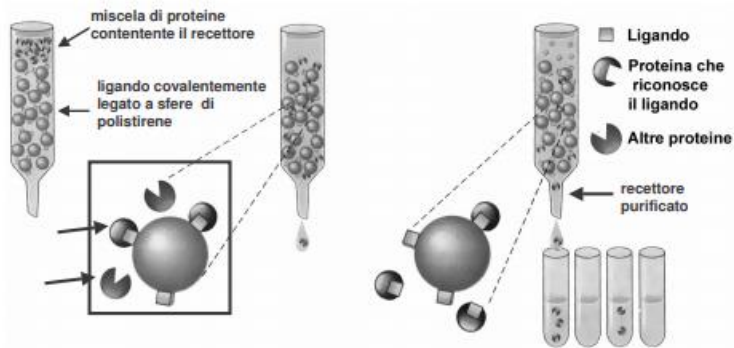


conoscere EFFETTO

Isolamento e purificazione di recettori

- Isolamento dell'organo
- Omogenazione
- Trattamento con detergenti

Tecniche di purificazione: la cromatografia di affinità



Sequenziamento dei recettori proteici

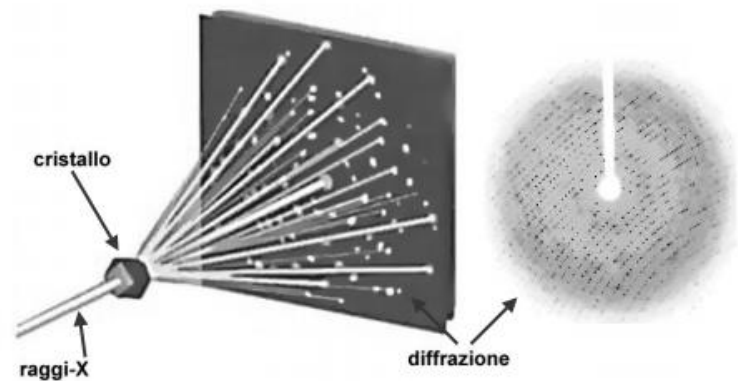
La degradazione di Edman
in quattro passi:

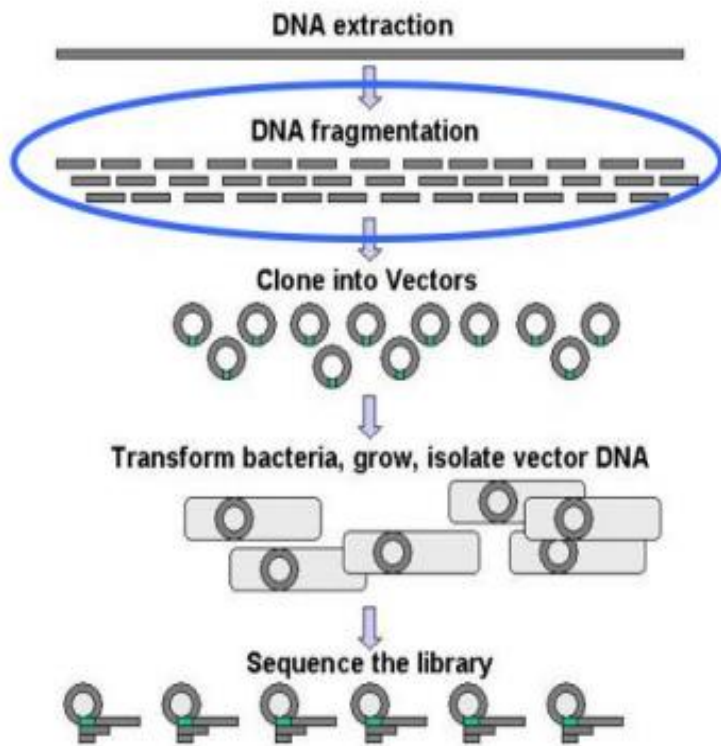
- 1) PITC si lega all'estremità N-terminale
- 2) Liberazione del derivato PITC/aminoacido (PTH)
- 3) Identificazione del PTH mediante HPLC
- 4) Si ripete dal punto 1) fino all'idrolisi della proteina intera



Sequenziatore automatizzato

Determinazione della struttura tridimensionale

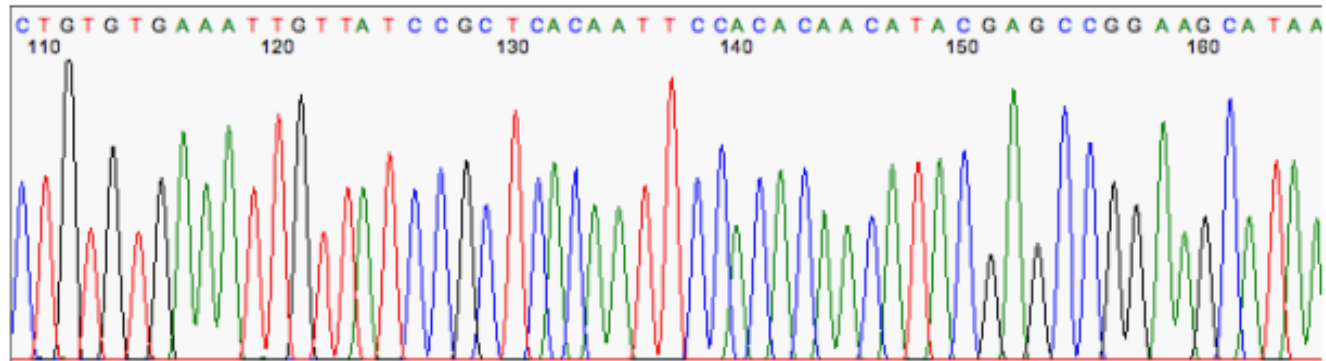




Sequenziatori automatici a capillari tramite metodo di Sanger

I metodi più recenti di sequenziamento =>
Next Generation Sequencing
Pyrosequencing

CROMATOGRAMMA



Emissioni in fluorescenza che identificano ciascuna delle 4 basi del DNA

VANTAGGI :

- possibilità di identificare e decodificare le sequenze che codificano **per sottotipi recettoriali , isoforme**
- **medicina personalizzata:** ad esempio, l'analisi di tratti che rendono più o meno sensibili ad un farmaco può consentire la produzione dello stesso farmaco a dosaggi differenziati, che possono essere adeguatamente somministrati ad individui in possesso di una “carta d'identità genomica”

SVANTAGGI :

- **Problemi di assemblaggio**
- **Sequenze ripetute**
- **Gap di sequenze**

➤ Caratteristiche dell'interazione F-R

(in condizioni normali si parla di interazioni e legami reversibili)

- ❖ studi di *binding*
- ❖ studi di curve dose-risposta o concentrazione-risposta

Studi di *binding* = valutazione quantitativa dell'interazione fra un ligando marcato con un isotopo radioattivo ed una preparazione contenente il recettore
(eventualmente isolato e purificato)

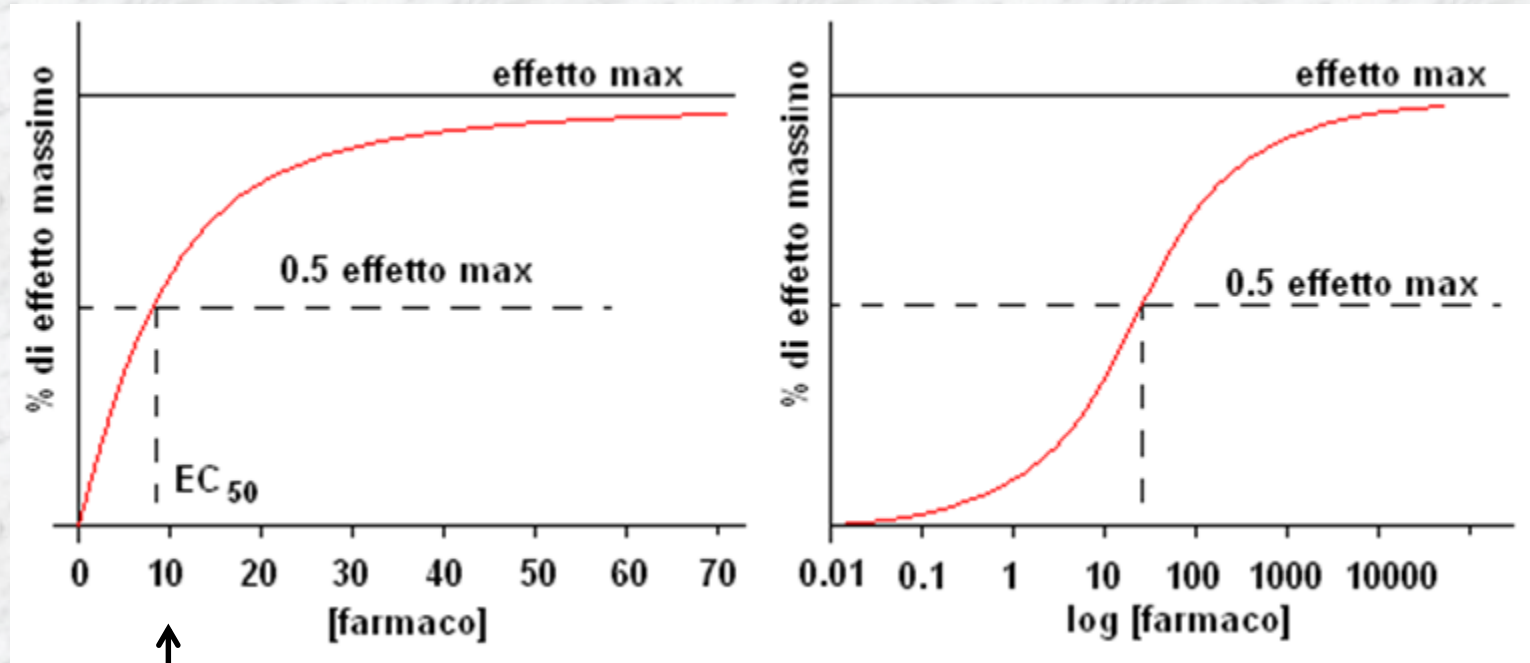
❖ **VANTAGGI:**

- *Determinare la specificità farmacologica*
- *Determinare caratteristiche dell'interazione F-R, es. affinità*
- *Determinare la localizzazione dei recettori*

❖ **SVANTAGGI : non distinguiamo agonisti da antagonisti**

Analisi delle curve dose-risposta dei farmaci

AGONISTA PIENO attività intrinseca = 1



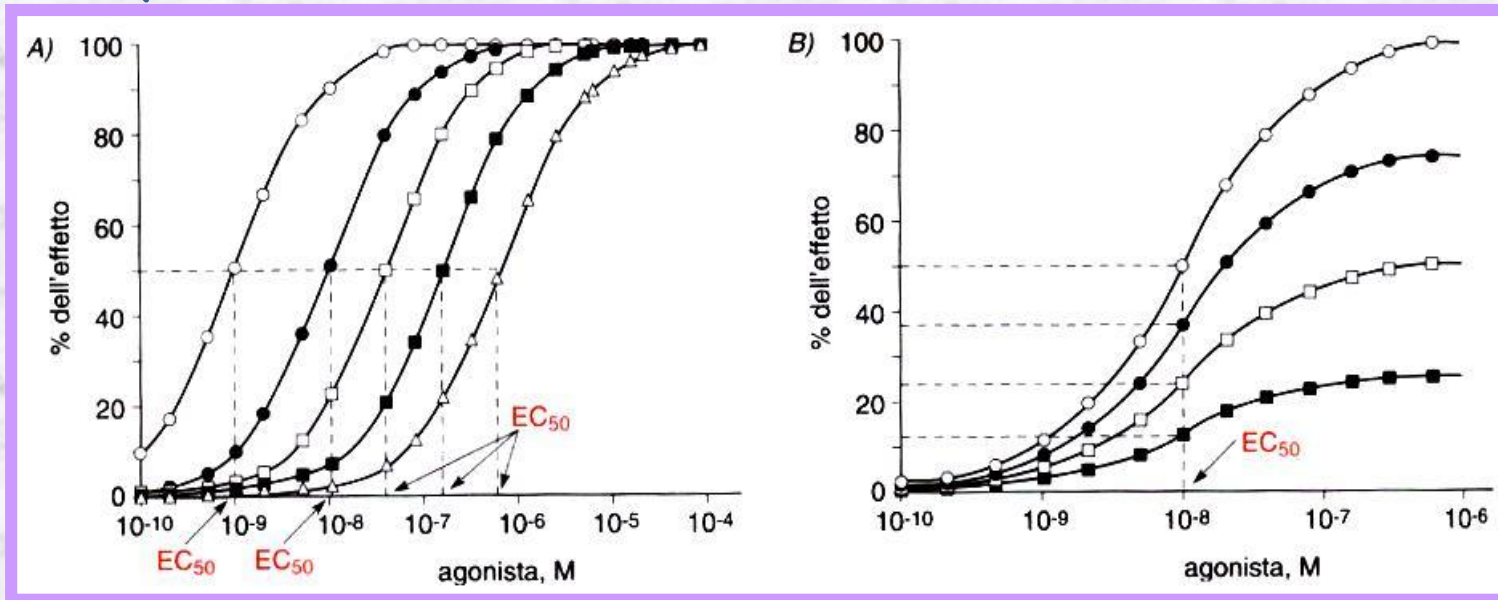
ED50 (o EC50)

ED50 (o EC50)

Analisi delle curve dose-risposta dei farmaci

AGONISTA PIENO

← POTENZA



↑ EFFICACIA

AGONISTA PARZIALE

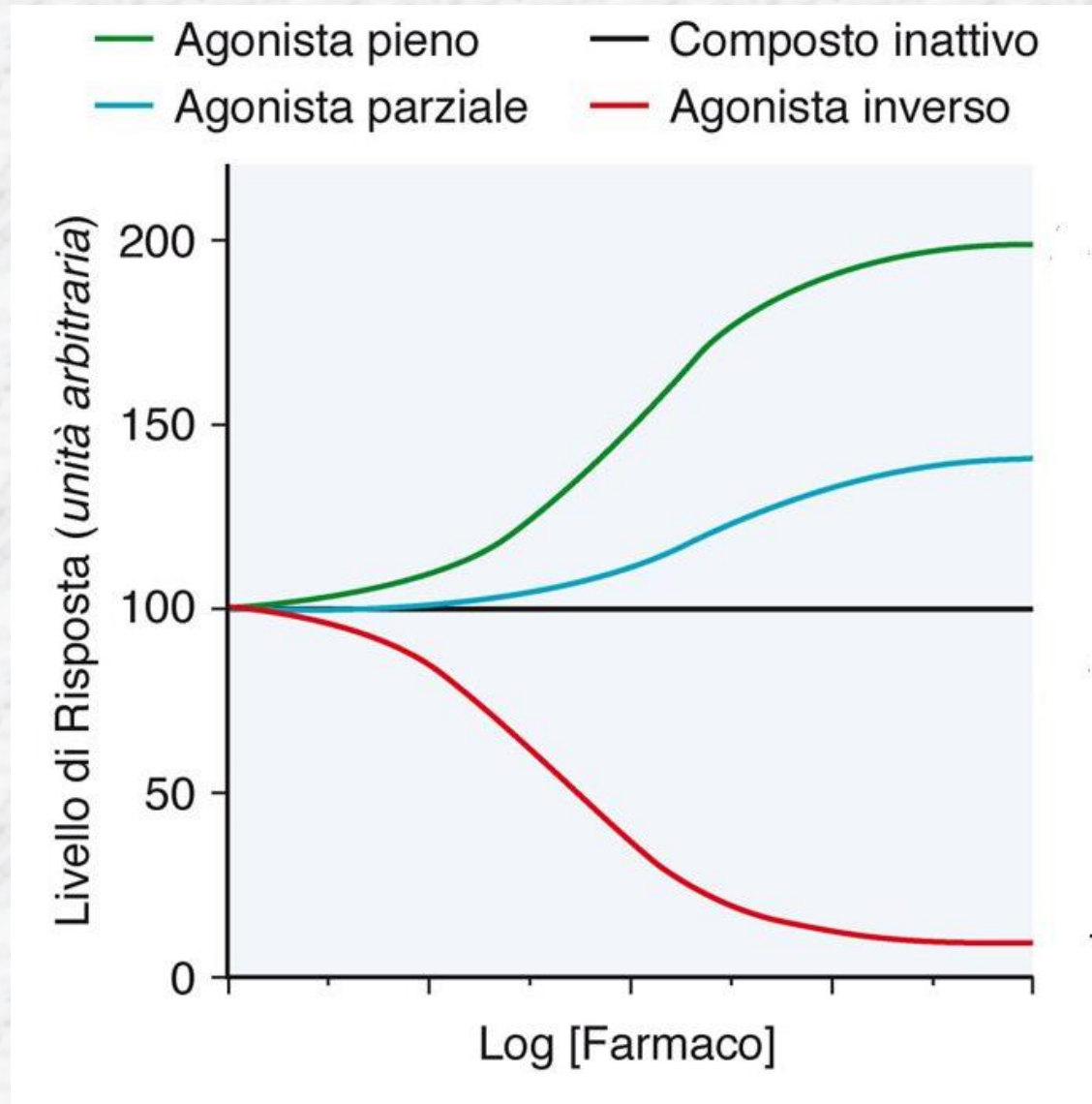
L'AGONISTA parziale è un

intermedio tra

AGO e ANTAGO >> INIBISCE in
parte la risposta AGO
completa

Attività intrinseca < 1

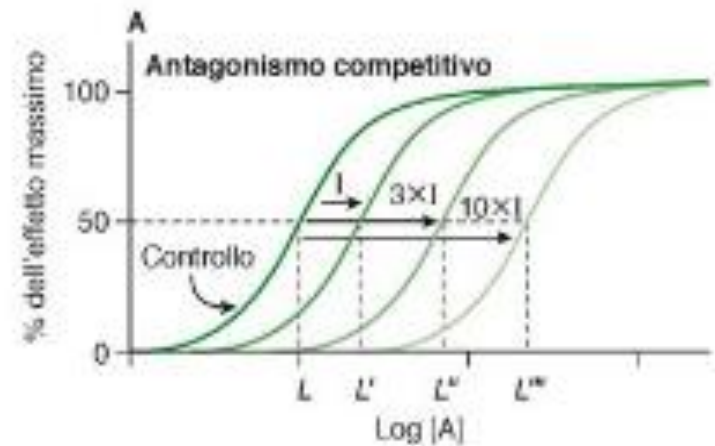
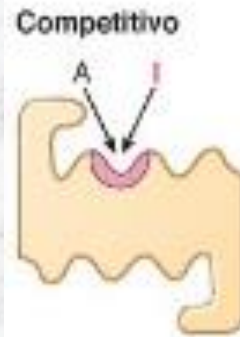
L'AGONSITA inverso =
posseggono attività
intrinseca opposta a quella
del ligando (-1)



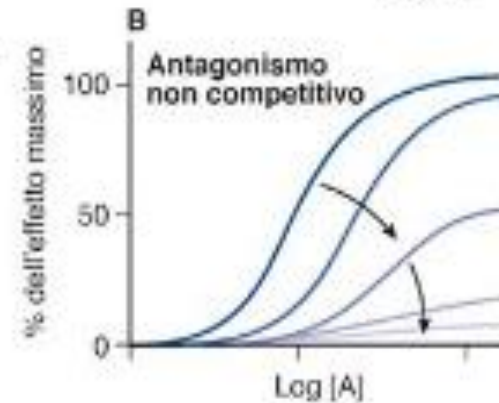
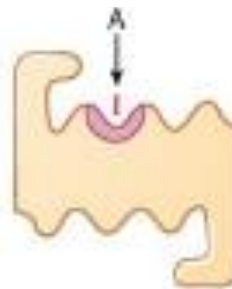
ANTAGONISTA

Possiede affinità ma non
attività intrinseca = 0

COMPETITIVO → → →



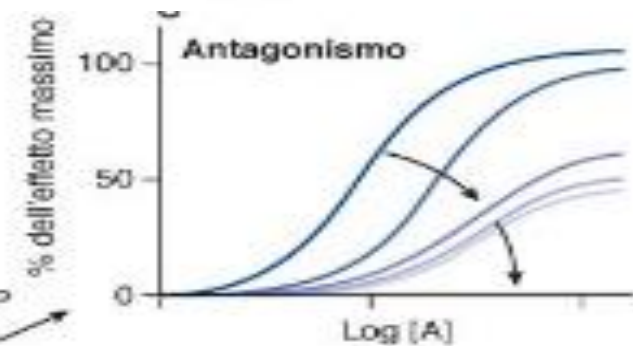
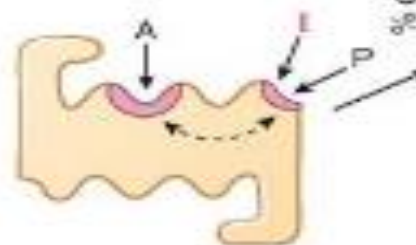
Irreversibile

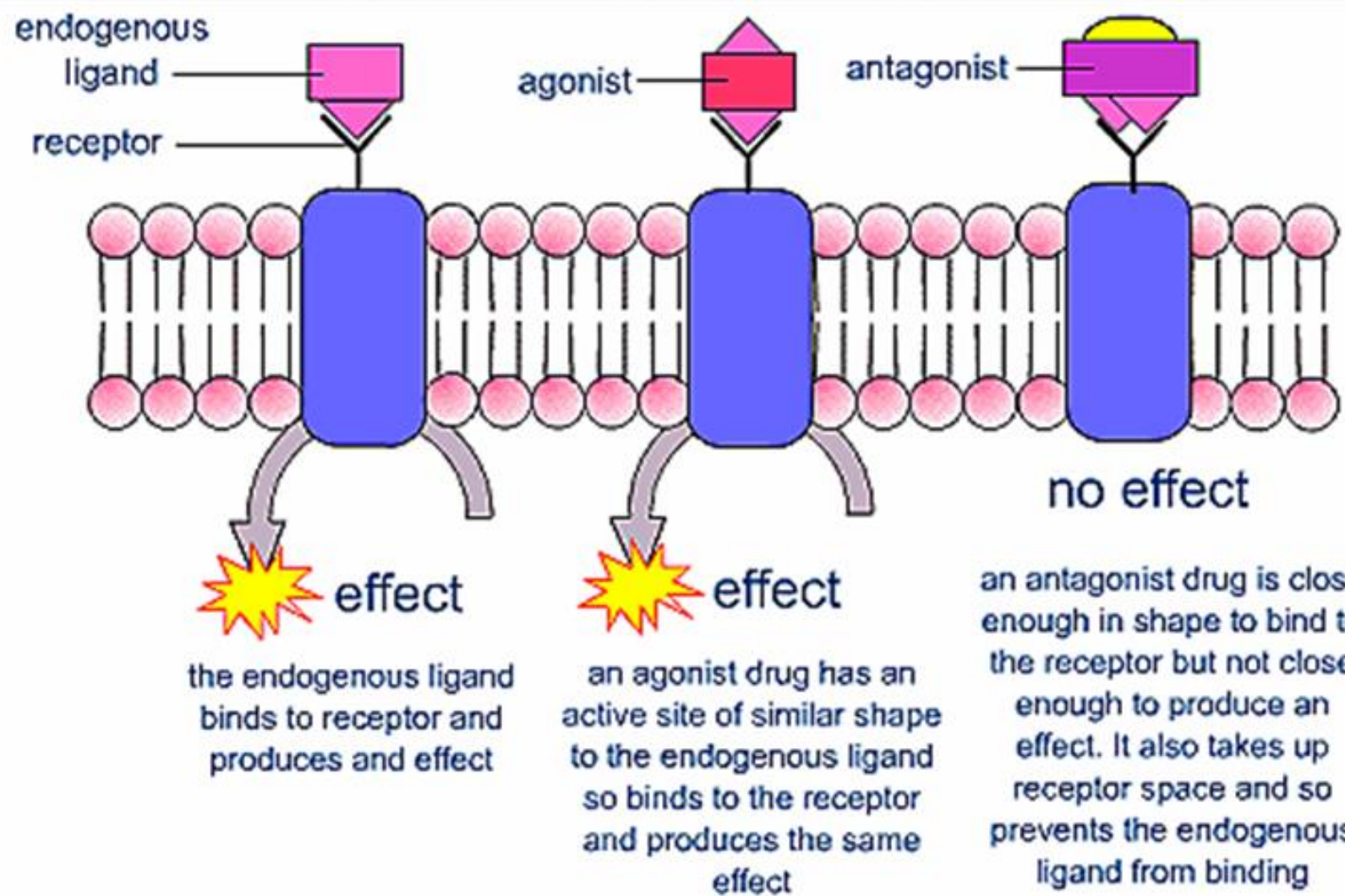


NON COMPETITIVO → →

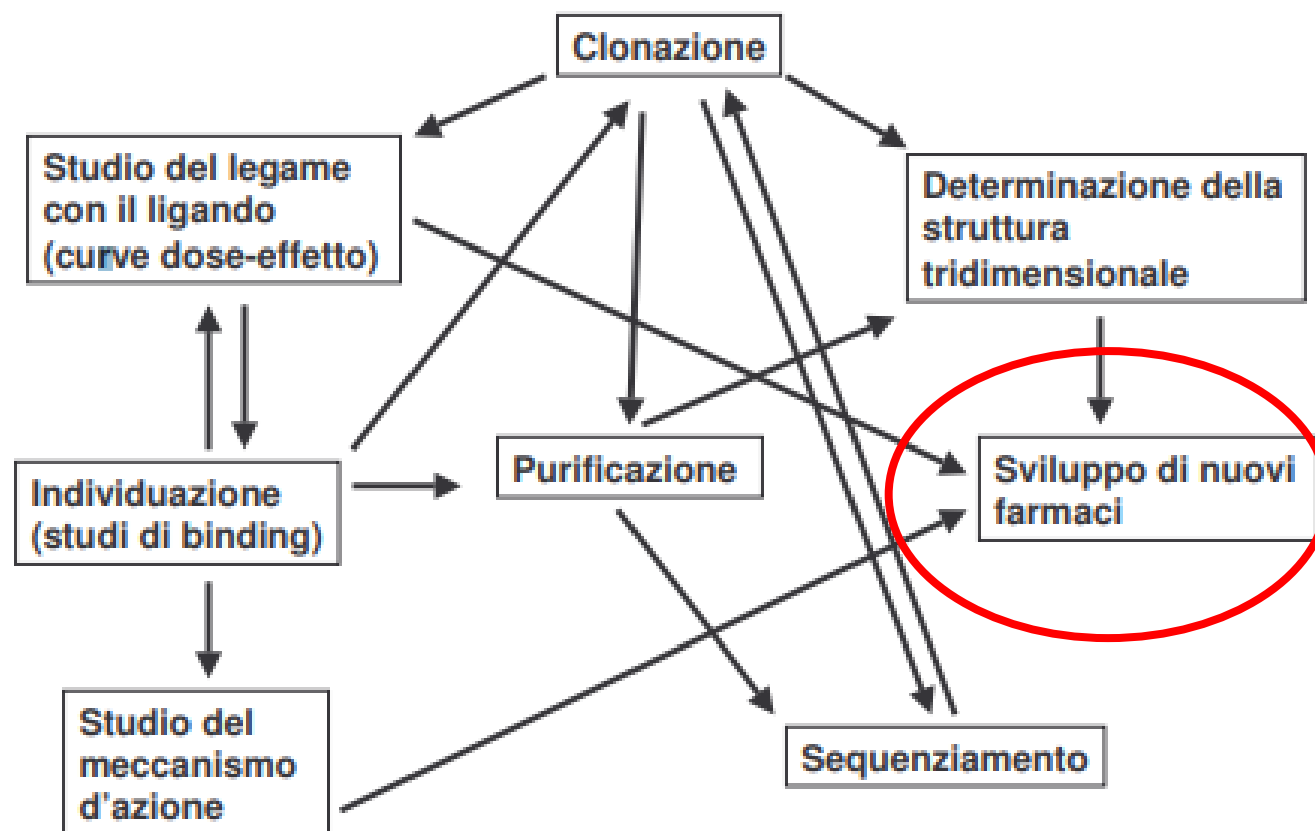
→ non è sormontabile quindi
l'agonista non riesce a generare
una risposta biologica

Allosterico





Approcci allo studio dei recettori



Recettori e Trasduzione del segnale

- **Lo studio dei recettori è fondamentale nelle ricerche farmacologiche per la definizione del meccanismo d'azione dei farmaci e per la comprensione delle risposte cliniche**
- **Per avere la sua azione un farmaco deve raggiungere specifici siti nell'organismo.**
- **Il sito d'azione non è indicatore della qualità dell'effetto farmacologico: lo stesso effetto può essere dato da due farmaci che agiscono su siti differenti**

A livello molecolare i siti d'azione dei farmaci possono essere suddivisi in:

- **siti non cellulari:** l'azione avviene nei fluidi extracellulari
- **siti cellulari:** l'azione deriva da interazioni tra il farmaco e una struttura specifica sulla superficie o all'interno della cellula

I **RECETTORI** sono molecole proteiche che legano in modo specifico, definito e con affinità precisa uno o più mediatori *endogeni* e da questo legame subiscono una *trasformazione conformazionale* capace di far scaturire *un effetto biologico*

Siti cellulari (o recettori in senso ampio) dei farmaci

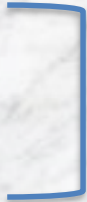
Ogni molecola cellulare (o macromolecola) a cui il farmaco si lega per iniziare la catena di eventi biochimici che portano all'effetto farmacologico osservato

- proteine regolatorie (recettori per i mediatori endogeni)
- Enzimi
- Canali ionici
- Acidi nucleici
- Proteine strutturali
- Trasportatori molecolari

L'interazione farmaco- recettore è l'elemento **CHIAVE** dell'effetto terapeutico!

Grazie alla presenza di una grande variabilità di tipi di recettori (o bersagli molecolari) presenti nelle cellule è possibile effettuare un controllo molto accurato dei segnali fisiologici cellulari a diversi livelli.

**RECETTORE
EFFETTORE
TRASDUTTORE**



VIA DI TRASDUZIONE DEL SEGNALE

- ❑ **I RECETTORI svolgono una importante funzione integrata di coordinamento tra segnali extra-cellulari e intracellulari**
- ❑ **Possono essere divisi in superfamiglie al cui interno i recettori condividono una certa omologia strutturale e meccanismo d'azione**