

# ***Farmacologia cellulare e molecolare***

***Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD***

## Modulazione delle risposte recettoriali:

tolleranza

*up-regulation e down-regulation*

desensitizzazione

internalizzazione

traffico endocitico

*Biased agonism*

# FENOMENI DI ADATTAMENTO

- Si instaurano dopo alterazioni di segnali endogeni (NT, ORM)
- Si instaurano dopo trattamenti farmacologici (AGO, ANTAG)

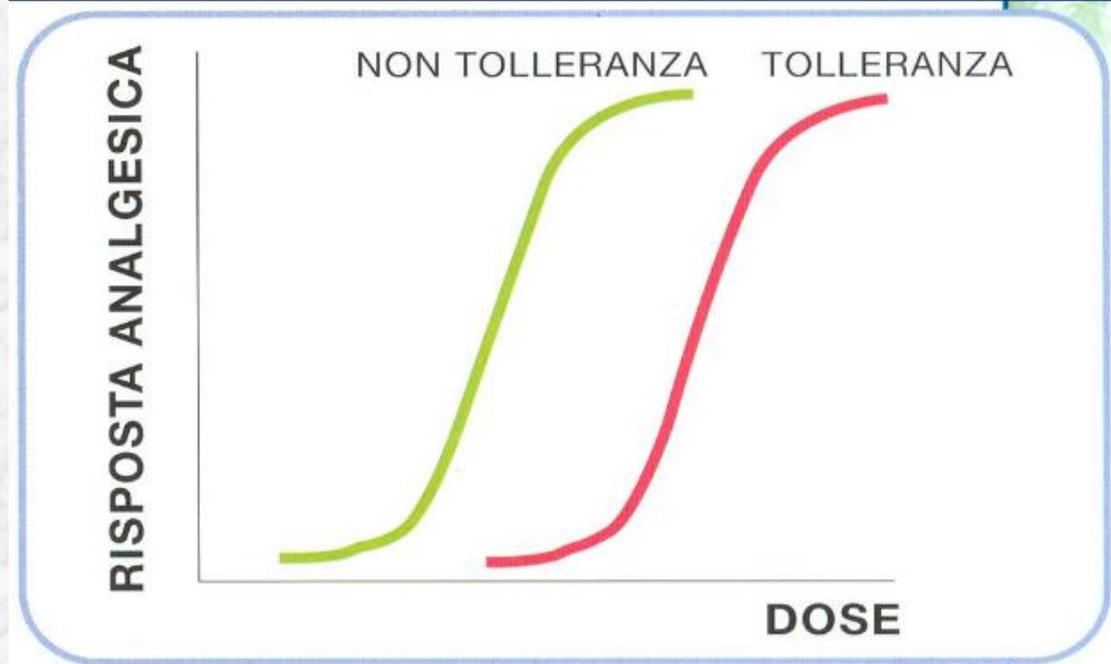
**Tolleranza:** riduzione/scomparsa di efficacia farmacologica come conseguenza di somministrazioni ripetute del farmaco stesso → a causa di insorgenza dei fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali

**Velocità di instaurazione + entità stato dipendono dall'entità del trattamento farmacologico e dal recettore coinvolto**

Trattamento prolungato / Reversibile

I pazienti che sono tolleranti ad un farmaco hanno bisogno di dosi più elevate per ottenere effetti equivalenti a quelli che si ottengono con dosi più basse prima che si sviluppi tolleranza.

## Tolleranza agli oppioidi



# Ci sono tre condizioni di tolleranza ai farmaci:

**1) tolleranza farmacodinamica** = associata con la somministrazione a lungo termine di farmaci come morfina ed eroina. Il soggetto necessita di conc. aumentate di farmaco per produrre effetti che precedentemente si ottenevano con conc. inferiori dello stesso farmaco  
→ la concentrazione minima efficace (MEC) di un farmaco diventa più elevata!!

Si pensa che la tolleranza farmacodinamica sia il risultato di processi adattativi che intervengono in risposta ad occupazione cronica del recettore.

**2) tolleranza metabolica** = è definita come una tolleranza che risulta da un metabolismo accelerato del farmaco. Questa forma di tolleranza è dovuta alla capacità di alcuni farmaci (per es., i barbiturici) di indurre la sintesi di enzimi epatici metabolizzanti → causando aumentato metabolismo. A causa dell'aumentato metabolismo, il dosaggio deve essere aumentato per mantenere copertura terapeutica. **La tolleranza metabolica non influenza la MEC**

**3) Tachifilassi** = è una forma di tolleranza meno frequente che può essere definita come una riduzione della sensibilità al farmaco dovuta a dosi ripetute in un breve periodo di tempo. Quindi, differentemente dalla tolleranza farmacodinamica e metabolica, che ha bisogno di più tempo per svilupparsi, la tachifilassi si sviluppa rapidamente.

**Tolleranza** → conseguenza diretta sull'efficacia della terapia

**Tolleranza** → dipendenza

**Tolleranza** → effetto rimbalzo per sospensione rapida

Tutti i meccanismi di modulazione dei recettori sono  
**BIDIREZIONALI**

**Tolleranza bidirezionale:**

**trattamento AGO** → ↓ risposta recettoriale → **desensitizzazione**

**trattamento ANTAGO** → ↑ risposta recettoriale → **up-regulation**

# Desensitizzazione

- Sia i recettori-canale che i recettori accoppiati a proteine G vanno incontro a **desensitizzazione, anche se è diversa tra i due tipi di recettori**



si riferisce al processo in base al quale l'esposizione persistente ad un agonista porta a riduzione dell'effetto

## **Omologa**

Specifica per il recettore che viene attivato

## **Eterologa (o crociata)**

se è estesa anche ad altri recettori che utilizzano la stessa via di trasduzione del segnale o gli stessi effettori.

Ciascun recettore può andare incontro a desensitizzazione con modalità proprie.

- Nonostante ciò è possibile riconoscere meccanismi e strategie comuni di desensitizzazione all'interno di ciascuna delle quattro grandi superfamiglie recettoriali

## **Avviene a tre livelli:**

- Riduzione affinità
- Incapacità di trasdurre il segnale
- Riduzione numero di Recettori (DOWN REGULATION)  
(Hanno cinetiche diverse: la down-regulation è più lenta)

# Recettori Canali

- 1) La **desensitizzazione è una proprietà intrinseca dei recettori canali.**
- 2) Essa equivale a una riduzione della capacità di andare incontro al cambio conformazionale necessario per produrre l'apertura del canale ionico transmembranario
- 3) Hanno minor importanza se non nulla la riduzione dell'affinità per il ligando e la riduzione del numero di recettori (down regulation)

# Il recettore-canale **desensitizza rapidamente**

Il passaggio da una struttura conformazionale all'altra viene innescato dalla presenza del neurotrasmettitore.

Il passaggio dallo stato di **riposo (R)**

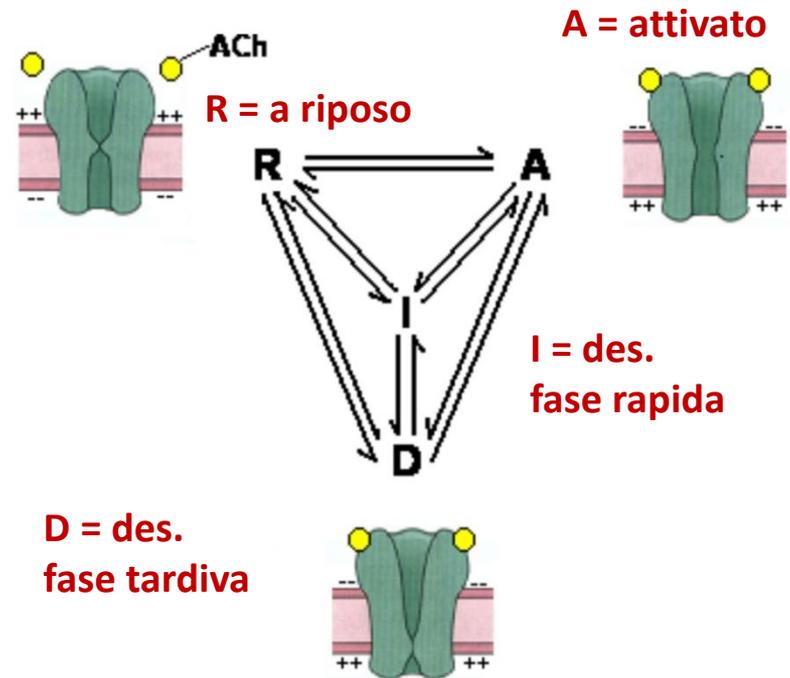
→ ad uno stato **attivo (A)** → il canale si apre e conduce gli ioni.

Il canale passa spontaneamente allo stato inattivo, **ma**

**se il farmaco agonista persiste**

il canale permane per un tempo più

lungo in uno stato conformazionale inattivo che è lo stato che non conduce = è **quello desensitizzato**



Questo passaggio allo stato desensitizzato è modulato da protein-chinasi (di tipo A o di tipo C) che possono fosforilare la parte intracellulare del recettore.

**FASE (I) = desensitizzazione Rapida** → in cui il 50% dei recettori si inattiva in poche centinaia di millisecondi;

**FASE (D) = desensitizzazione Tardiva** → dove il 50% dei recettori si inattiva in un tempo più lungo.

**È un fenomeno completamente reversibile**  
**Infatti, appena il farmaco (o il ligando in generale) si staccano dal recettore-canale il fenomeno si interrompe**

Es. **la desensitizzazione del recettore-canale nicotinic**

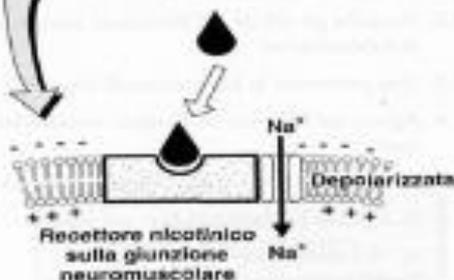
**avviene per somministrazione di stimolanti della giunzione neuromuscolare (carbacolo, succinilcolina)** → spostano l'equilibrio verso la forma D

Proprio la succinilcolina inizialmente causa depolarizzaz. ma poi porta a paralisi proprio perché resta legata al rec. N , impedisce il legame di Ach e induce desensitizzazione a livello della placca neuromuscolare => usata in anestesia generale

# BLOCCANTI NEUROMUSCOLARI DEPOLARIZZANTI: LA SUCCINILCOLINA

## Fase I

La membrana si depolarizza dando luogo a una scarica iniziale che produce fascicolazioni transitorie seguite da paralisi flaccida



## Fase II

La membrana si ripolarizza ma il recettore è desensibilizzato all'effetto dell'acetilcolina



**Figura 5.9**

Mecanismo d'azione dei farmaci bloccanti neuromuscolari depolarizzanti.

## **BLOCCO IN FASE II (desensitizzazione):**

Chiusura del canale del  $\text{Na}^+$ ,  
ripolarizzazione di membrana,  
persistenza del legame della  
succinilcolina al recettore,  
insensibilità all'agonista endogeno.

Dopo poco le caratteristiche del  
blocco diventano identiche a quelle di  
un blocco non-depolarizzante

Questo passaggio allo stato desensitizzato è modulato da **PKA o PKC** che possono fosforilare la parte intracellulare del recettore.

I terminali nervosi della giunzione neuromuscolare:

- Liberano il neurotrasmettitore che lega il recettore
- Ma anche liberazione di un peptide (CGRP -peptide correlato al gene della calcitonina) che attiva meccanismi che portano ad un aumento della conc. intracellulare di cAMP → che attiva la PKA → che fosforila la parte interna del recettore favorendo lo stato desensitizzato di questo canale.

Tale peptide ha un ruolo importante nel danno che si instaura dopo stimolazione cronica con questi farmaci!!

# La NICOTINA

Azione agonista sul recettore nicotinic colinergico, ma dopo esposizione cronica la sua azione porta alla desensitizzazione dei recettori nicotinici neuronali (con sviluppo di tolleranza)



Questo meccanismo determina una riduzione persistente della trasmissione che causa un fenomeno paradossale = che è la *up-regulation*.



*Gli stessi recettori nicotinici desensitizzati per l'uso cronico di nicotina vanno incontro ad una maggiore sintesi per cui aumenta il numero a livello della sinapsi colinergica.*

## **Desensitizzazione** dei recettori accoppiati alle Prot G

→ si ha una **perdita della risposta recettoriale dovuta soltanto al trattamento cronico con farmaci agonisti del recettore.**

trattamento cronico che può indurre un fenomeno di *tolleranza farmacologica* su base farmacodinamica correlato alle modificazioni dei recettori che vengono esposti cronicamente ad un farmaco.

**È un fenomeno che si reverte con la sospensione della terapia!!**

**I meccanismi responsabili sono 2:**

- 1) la fosforilazione del recettore su residui di serina e treonina**
- 2) l'internalizzazione del complesso recettore-ligando.**

1) **Il processo di fosforilazione** è la prima tappa del processo che è mediato **da PKA e PKC** a livello della terza ansa citoplasmatica (PUNTO DI INTERAZIONE CON LA prot. G).

→ **Comporta la perdita della capacità del recettore di attivare la proteina G** (disaccoppiamento tra recettore e proteina G)

non viene così trasdotto il segnale fino ad arrivare alla riduzione del numero di recettori di membrana con il seguente fenomeno della *down-regulation* cioè quel fenomeno che porta alla riduzione del numero dei recettori di membrana.

# Le fosforilazioni avvengono ad opera di chinasi:

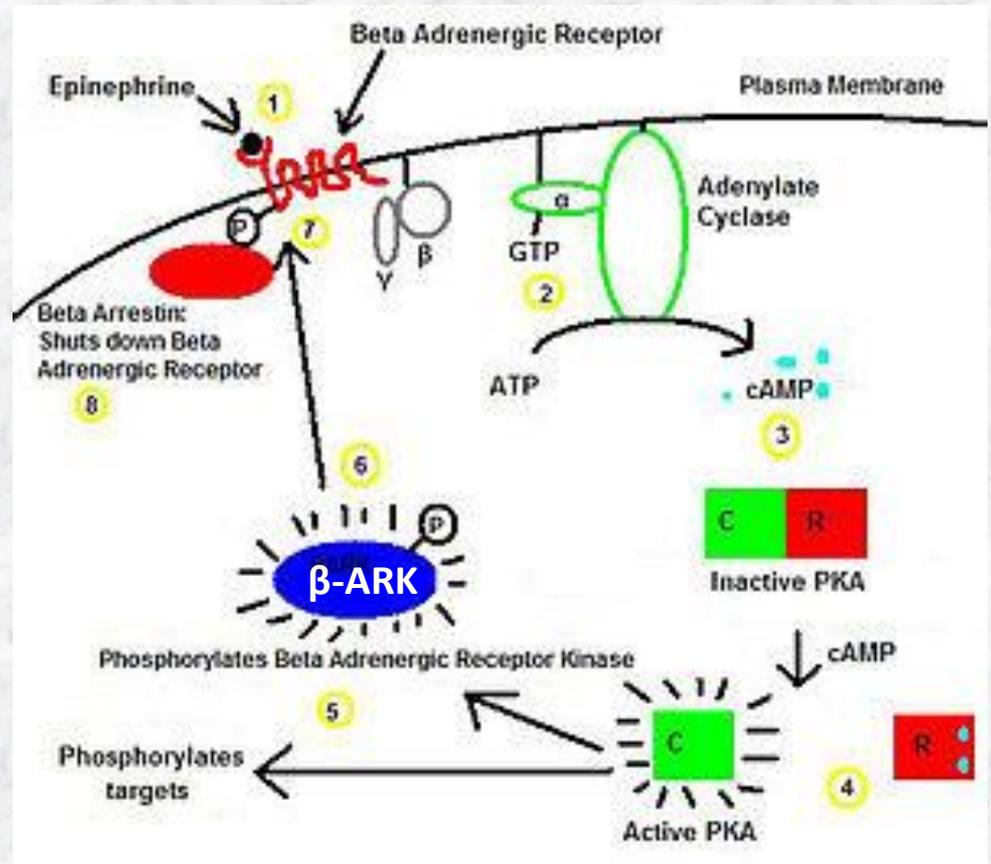
Es. x il  $\beta$ -adrenergico sono le  $\beta$ -ARK (sono beta adrenergic receptor kinase)

$\beta$ -ARK fanno parte di una famiglia di chinasi caratterizzate dalla proprietà di fosforilare solo il recettore occupato dall'AGONISTA

$\beta$ -ARK una volta fosforilata dalla PKA su residui di serina e treonina, va a sua volta a fosforilare residui di ser. e treon. sul recettore  $\beta$ -adrenergico

→ questa fosforilazione dovrebbe facilitare il legame della  $\beta$ -arrestina al recettore che rende impossibile ulteriore stimolazione da parte del ligando (endogeno o esogeno)

→ → **RIDUZIONE DELL' AFFINITA'**



*In condizioni di non stimolazione → l'enzima è citoplasmatico  
di attivazione rec → l'enzima trasloca sulla membrana*

**L'induzione dell'attività enzimatica di β-ARK sembra essere dovuta anche ad interazioni con il complesso βγ della G<sub>s</sub> attivata.**

**L'evento è rapido, la β-ARK fosforila il 50% dei recettori in 2 sec. dall'applicazione AGONISTA.**

**La fosforilazione avviene nel sito specifico di interazione con la prot G. con conseguente disaccoppiamento!!!**

# Recettore $\beta$ -adrenergico e desensitizzazione

→ Ad opera delle  $\beta$ -ARK attivate dalla PKA, avviene la fosforilazione che favorisce il legame con la  $\beta$ -arrestina

→ cooperazione del complesso  $\beta\gamma$  attivato dalla Gs

→ presenza AGONISTA + specificità  $\beta$ -ARK  
alla base di desensitizzazione omologa

**fosforilazione e legame  $\beta$ -arrestina  
cooperano per desensitizzazione**

- **Riduzione di affinità**
- **Disaccoppiamento funzionale**  
**G<sub>s</sub> protein**

rappresentano eventi precoci della desensitizzazione

Infatti l'interazione X-R-G è stabile in condizioni basali

La fosforilazione nel sito di interaz con la prot G modifica la stabilità e ↓ l'affinità verso il NT

→ **desensitizzazione dei recettori β-adrenergici può avvenire anche da parte di altri Recettori (desensitizzazione eterologa)**

**Il recettore può essere fosforilato anche *direttamente dalla PKA cAMP dip.***  
(effetto molto + lento)

**La fosforilazione avviene su siti specifici R, non tutti i recettori desensitizzano**

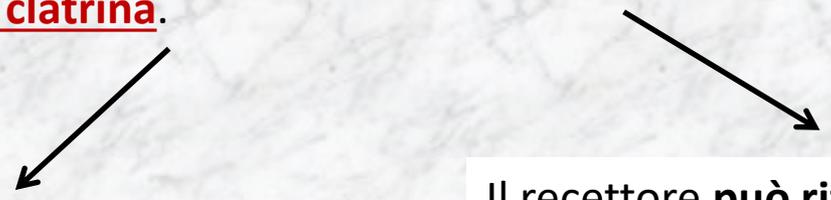
**R ≠ → sensibilità ≠ alle varie chinasi**

NT/ormoni inducono desensitizzazione eterologa → ACTH e subP → eterologa sui muscar.

## 2) L'**internalizzazione** del complesso recettore-ligando

Il dimero  $\beta\gamma$  recluta *chinasi specifiche dei recettori accoppiati alla proteina G*, che sono le GRK

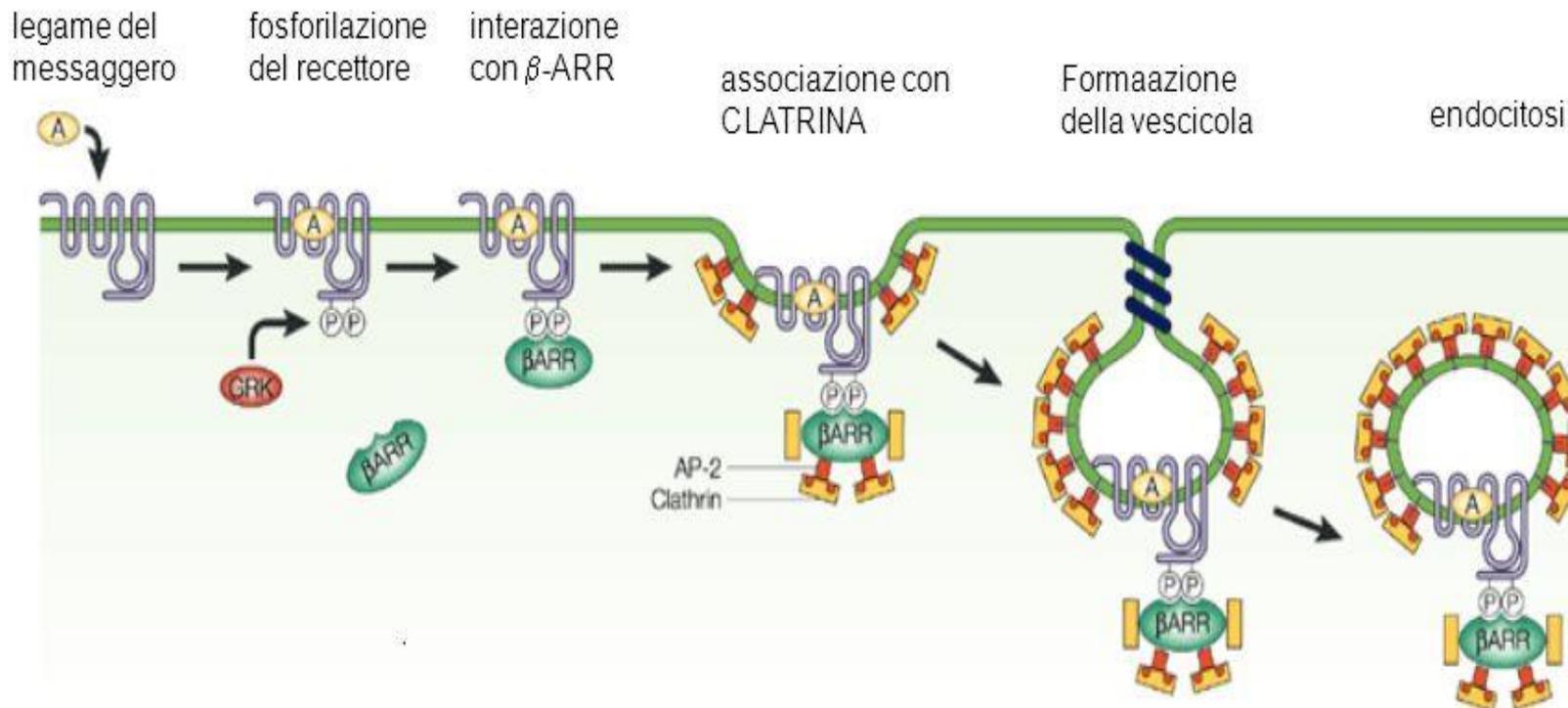
- le GRK fosforilano il recettore su residui di serina e treonina sulla parte intracellulare del recettore.
- Questa fosforilazione fa aumentare l'affinità del recettore per una proteina citoplasmatica denominata *beta-arrestina* che trasloca sulla membrana e determina il distacco del recettore dalla proteina G.
- A questo punto il recettore può essere internalizzato in endosomi dopo essere stato rivestito da clatrina.



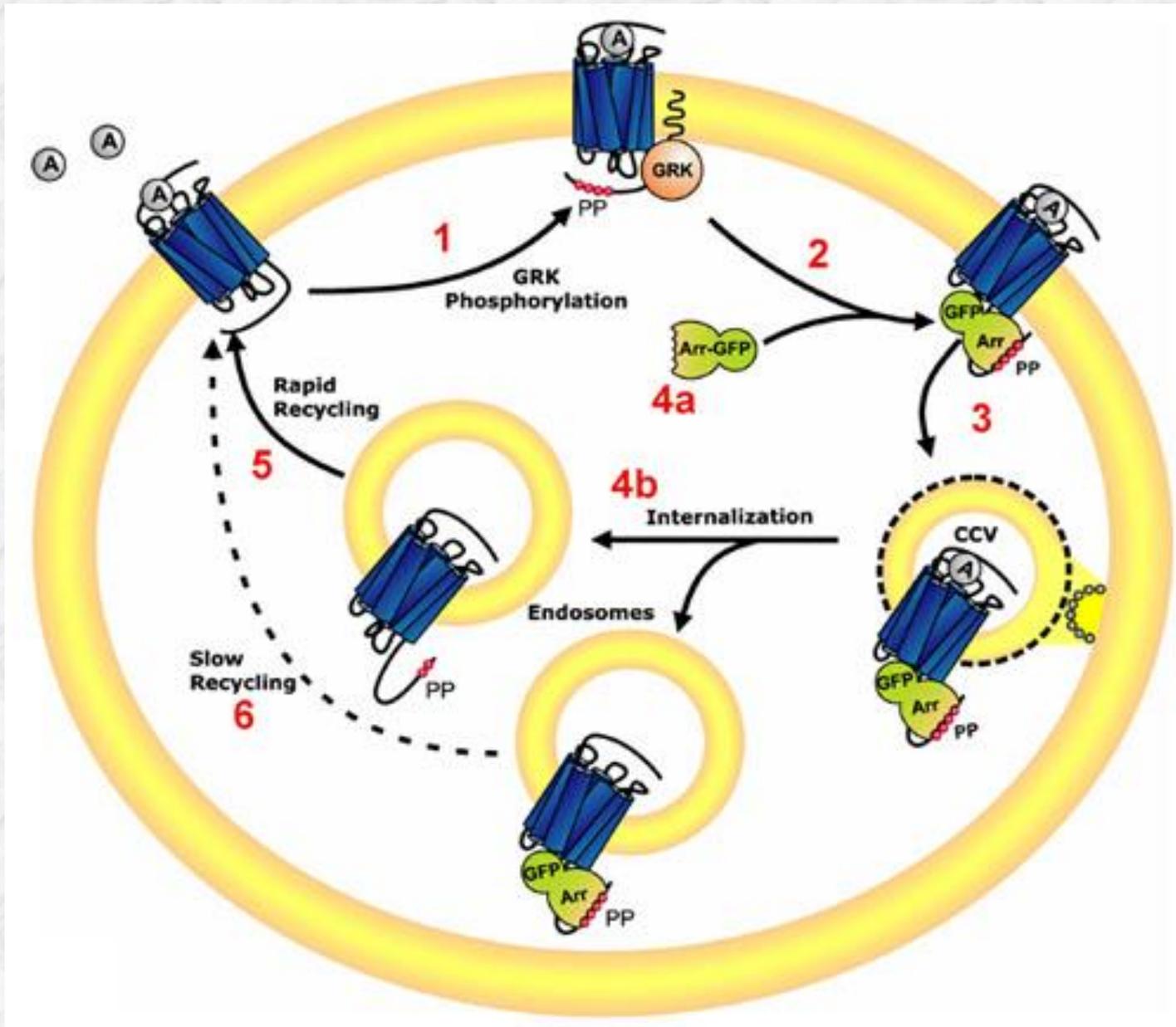
Il recettore può essere degradato da enzimi lisosomiali (quindi si ha down-regulation)

Il recettore può ritornare sulla membrana cellulare (risensitizzazione o riciclo) grazie a defosfatasi che provocano il distacco della *beta-arrestina*.

## RUOLO DELLA $\beta$ -ARRESTINA NELLA REGOLAZIONE DEI RECETTORI ACCOPPIATI A G-PROTEINE



# INTERNALIZZAZIONE E RICICLO DEL RECETTORE SULLA MEMBRANA



# Down regulation rapida e tardiva dei R. $\beta$ -adrenergico

**Rapida:** porta alla riduzione del numero dei recettori → evento tardivo rispetto desensitizzazione ↓aff/disaccopp. Prot. G

**Meccanismo rapido:** (50% effetto massimo in 2 min) dovuto a trasporto di R mediato da vescicole rivestite di clatrina dentro la cellula (**INTERNALIZZAZIONE**) → no. recettori sulla membrana si riducono!!! Ma può rimanere un pool intracellulare di recettori.

Il segnale che stimola la internalizzazione è una fosforilazione. **MA**, dentro la cellula il R può essere defosforilato da fosfatasi e così tornare sulla superficie (meccanismo rapido → reversibile) → **Riciclo**

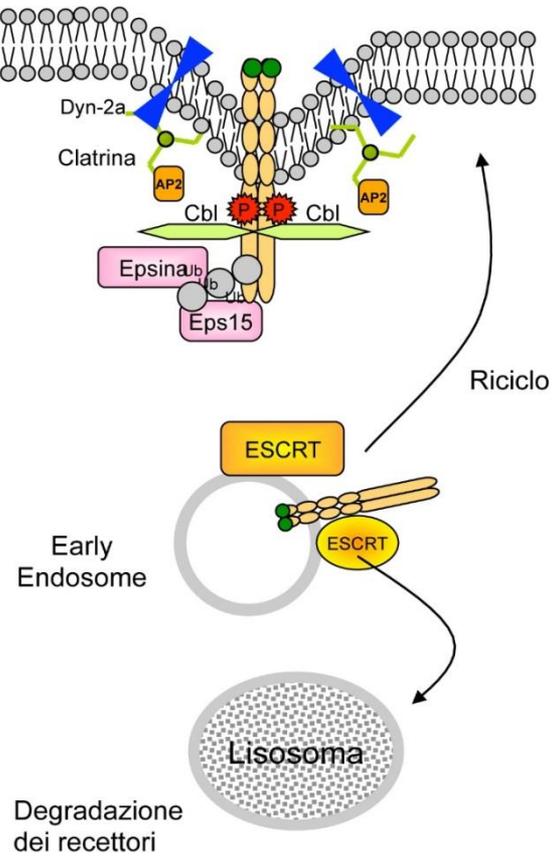
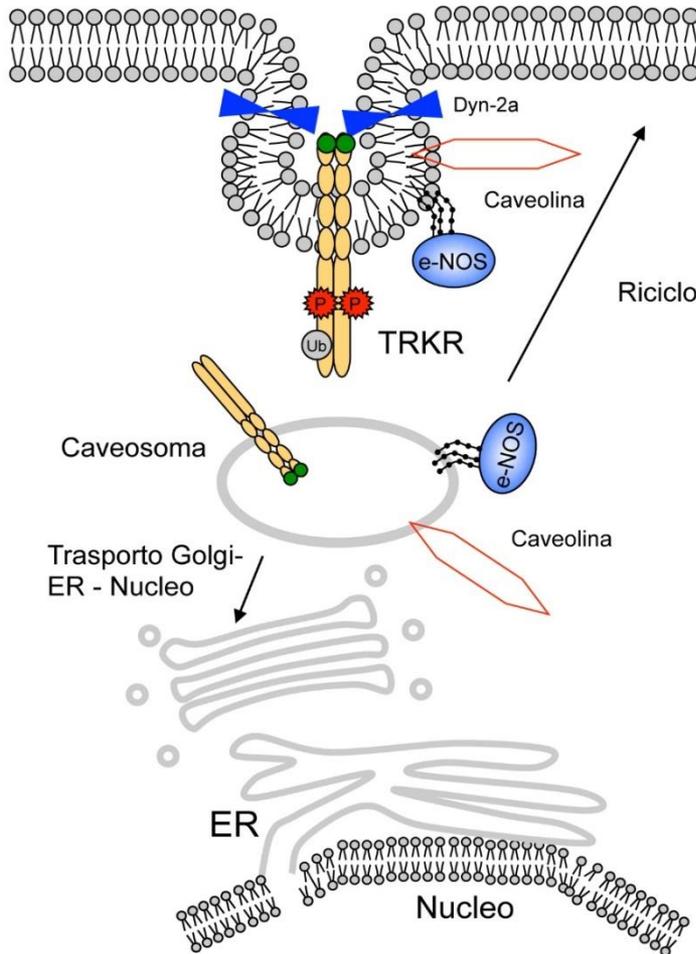
**Tardiva:** per alterazioni dell'equilibrio degradazione/sintesi (metabolismo dei R tramite azione dei lisosomi o alterazioni della sintesi mRNA)

**Desensitizzazione dei recettori accoppiati a prot. G avviene per modulazione dell'attività delle proteine G, e può portare tramite una serie di fosforilazioni:**

- ❖ a riduzione dell'affinità con l'agonista
  - ❖ a disaccoppiamento con la prot. G
  - ❖ a redistribuzione del recettore tra membrana e citoplasma
- 
- **può avvenire x Gs, Gi/o, Gq (è specifica)**
  - **può anche portare alla degrad/alteraz. espressione mRNA**

### Clatrina indipendente

### Clatrina dipendente



# TRAFFICO ENDOCITICO

Recettori e ligandi possono essere internalizzati dalla superficie della cellula in diversi modi:

**internalizzazione** mediata da rivestimento di clatrina, da caveolina oppure in modo indipendente sia da clatrina che da caveolina.

In questi ultimi due casi, l'internalizzazione avviene in corrispondenza delle "zattere lipidiche" (lipid raft).

**LA CLATRINA** = varie molecole di clatrina formano una struttura curva intorno alla vescicola che distorce la membrana causando una curvatura che induce la formazione e la gemmazione delle vescicole.

1 Il ligando lega il recettore di membrana.

Liquido extracellulare

9 Esocitosi

2 Il complesso ligando-recettore migra in fossette rivestite di clatrina.

8 La vescicola di trasporto e la membrana cellulare si fondono (riciclaggio di membrana).

3 Endocitosi

Fossette rivestite di clatrina

Recettore

Clatrina

4 La vescicola perde il rivestimento di clatrina.

7 Le vescicole di trasporto con i recettori si spostano verso la membrana cellulare.

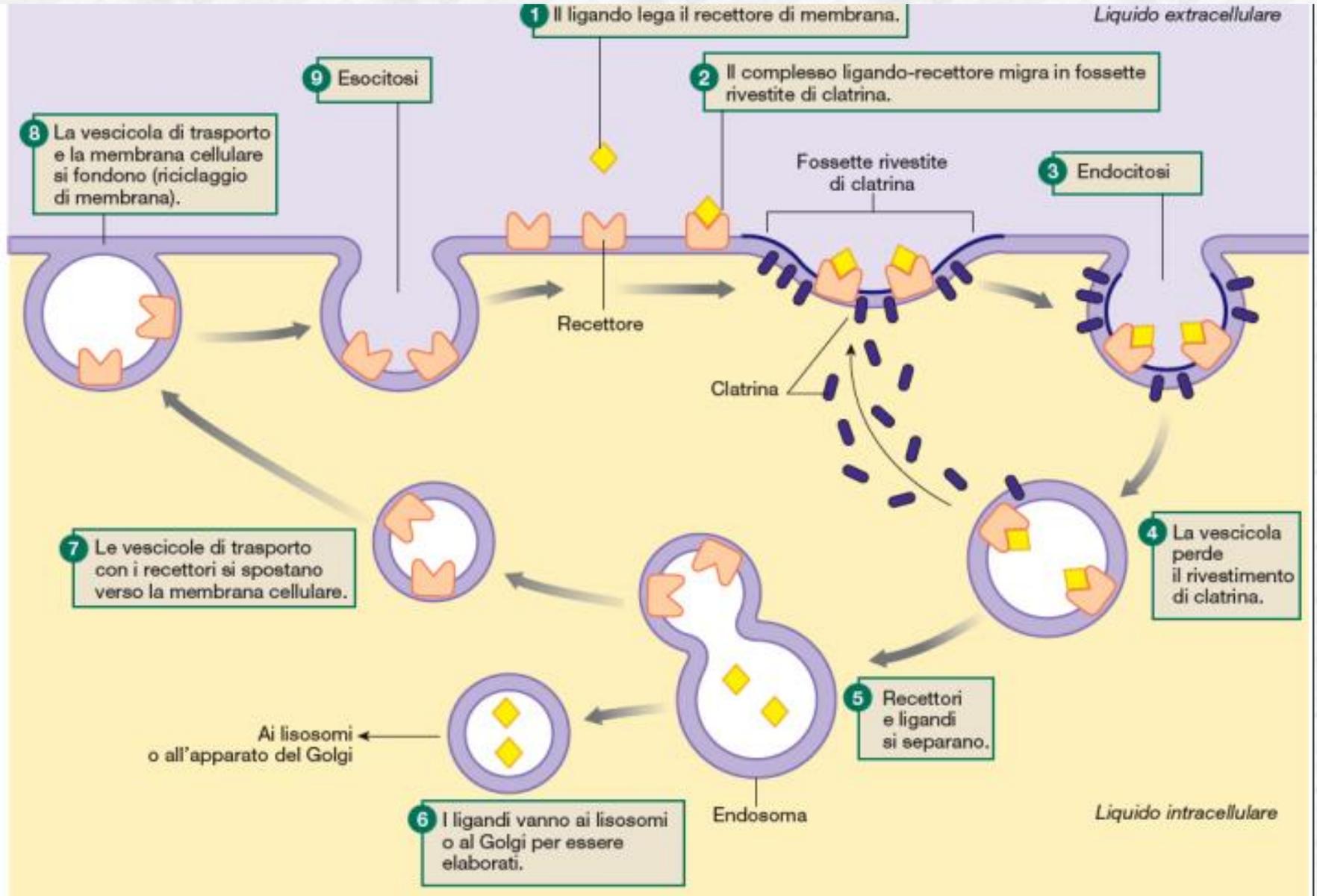
5 Recettori e ligandi si separano.

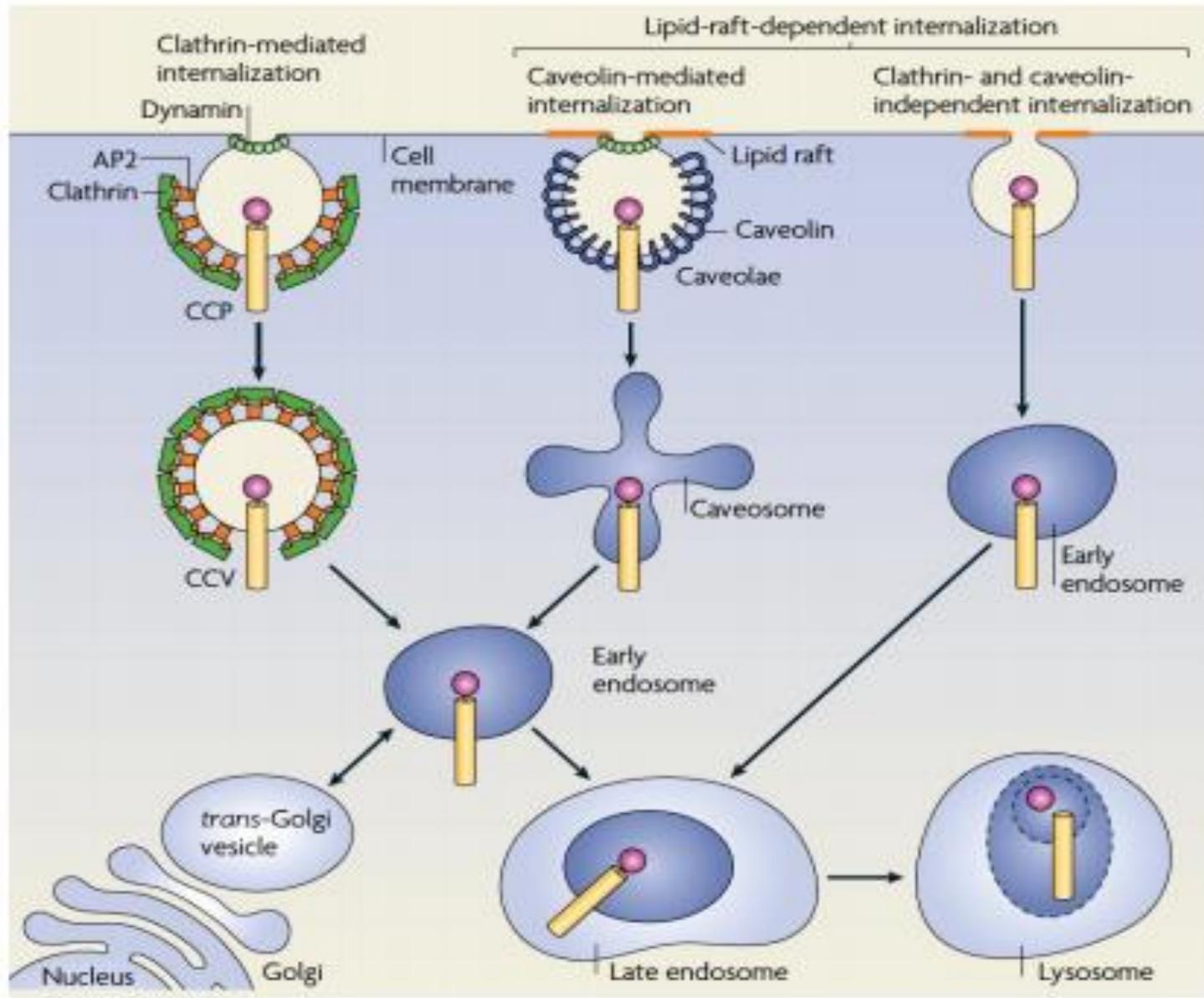
Ai lisosomi o all'apparato del Golgi

6 I ligandi vanno ai lisosomi o al Golgi per essere elaborati.

Endosoma

Liquido intracellulare





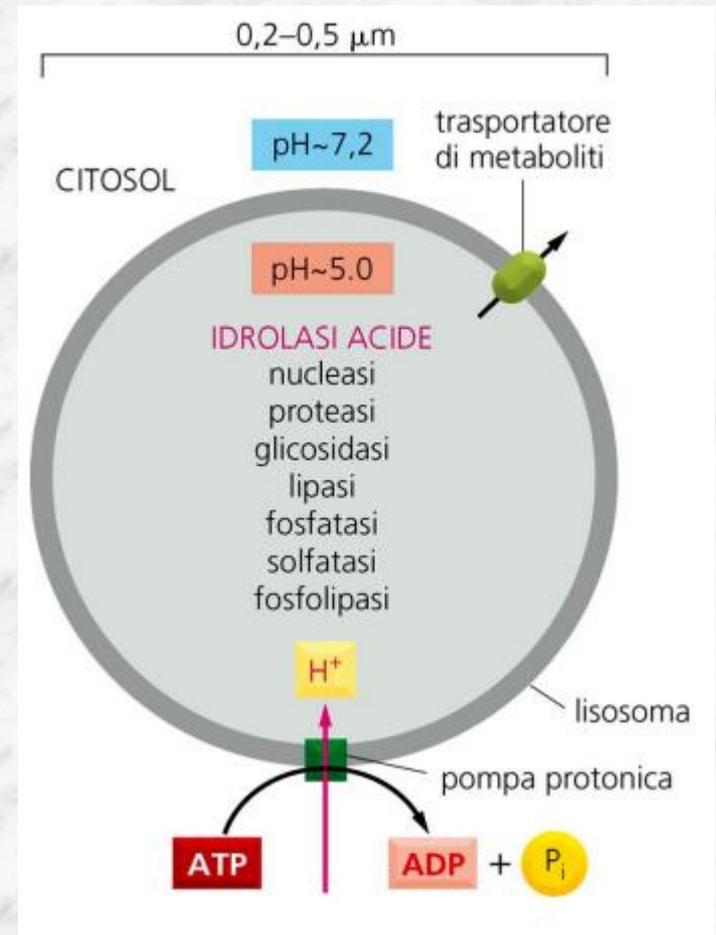
**I LISOSOMI** = sono organelli/vescicole che **rappresentano il sistema digerente della cellula in quanto è responsabile della degradazione e della distruzione** di diversi tipi di molecole endogene e recettori oppure estranee.

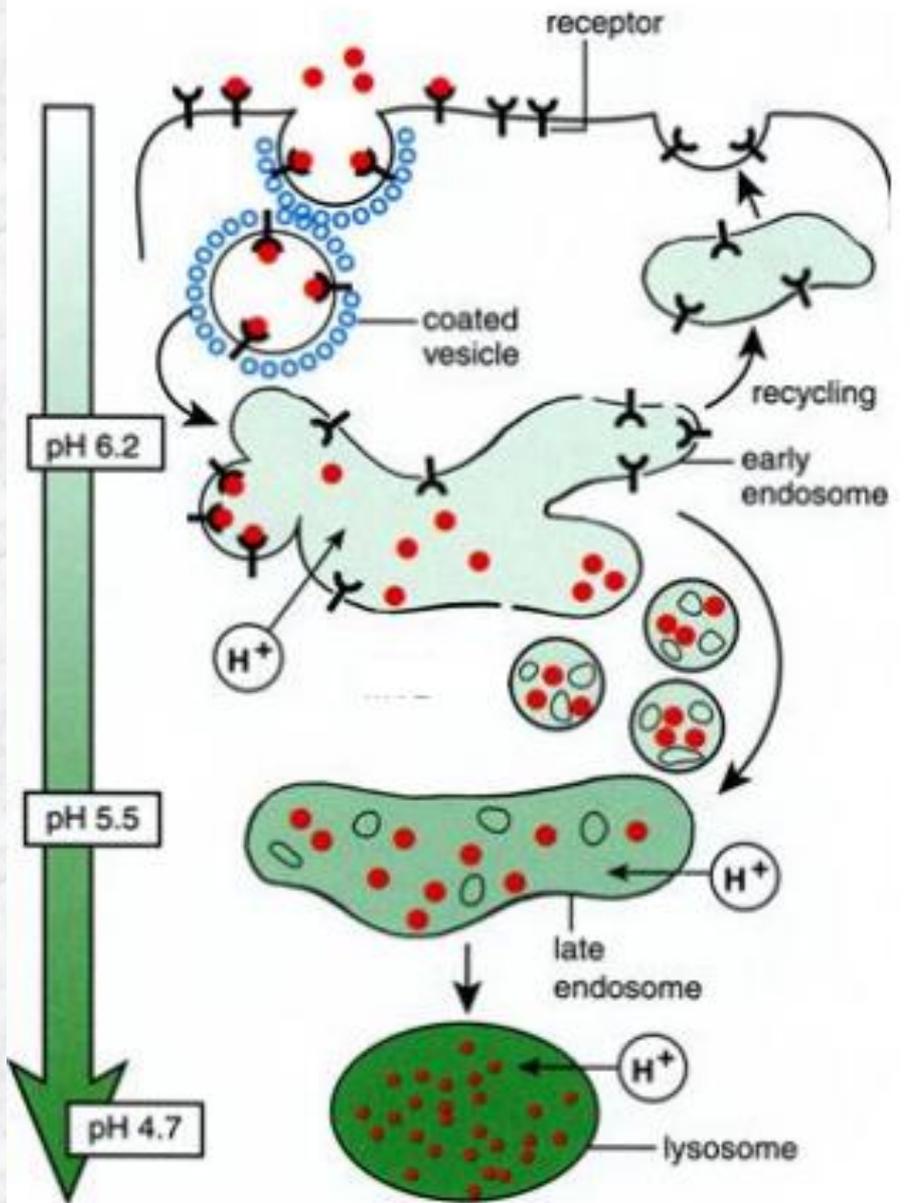
I lisosomi si occupano del turnover degli altri organelli della cellula stessa.

La degradazione avviene ad opera di **ENZIMI DENOMINATI IDROLASI ACIDE**, che sono attivi solo a PH acido.

**Infatti i lisosomi hanno sulla loro superficie pompe protoniche che trasferiscono contro gradiente ioni H<sup>+</sup> dal citosol al lume**

Il set degli enzimi lisosomiali può variare a seconda del tipo di cellula e dell'organismo considerato, in tutti i casi, però, è sempre presente la **fosfatasi acida**, che è quindi **l'enzima marcatore** dei lisosomi.



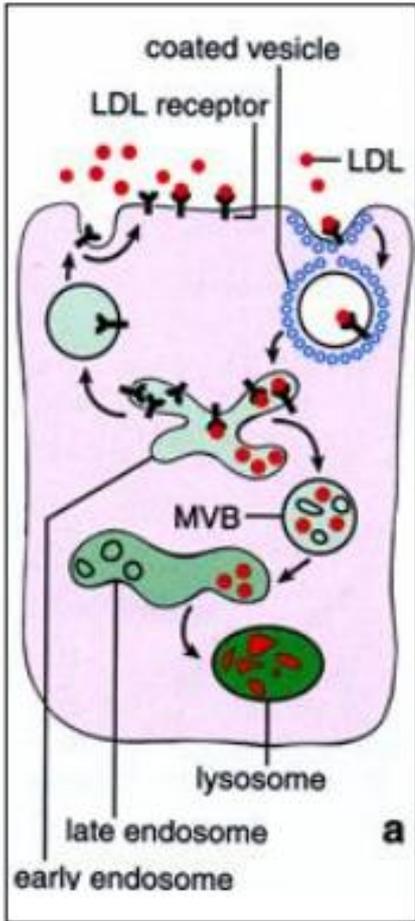


**I lisosomi** si formano dalla fusione di vescicole primarie con endosomi precoci (vescicole endocitotiche che hanno perso il rivestimento clatrinico), fagosomi, autofagosomi....

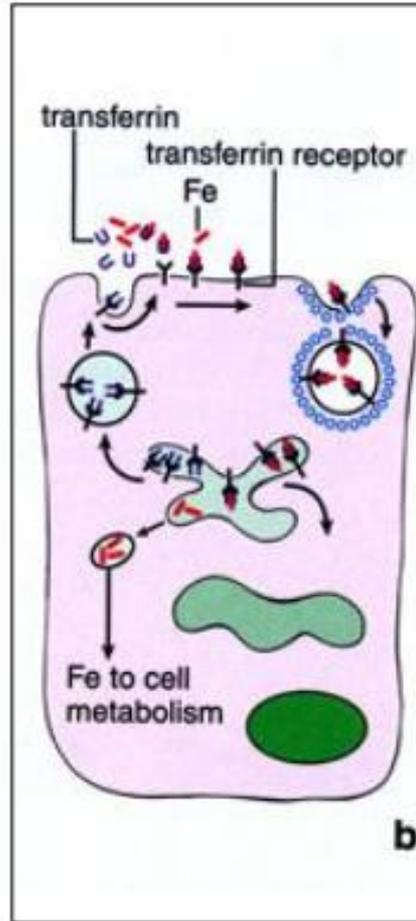
**La fusione porta al progressivo aumento del numero di pompe protoniche e al conseguente abbassamento del pH.**

L'abbassamento del pH favorisce il distacco tra ligando e recettore, la denaturazione delle molecole e infine la loro degradazione quando il pH raggiunge il valore di circa 5.0 (nei lisosomi maturi), dove sono attive le idrolasi acide

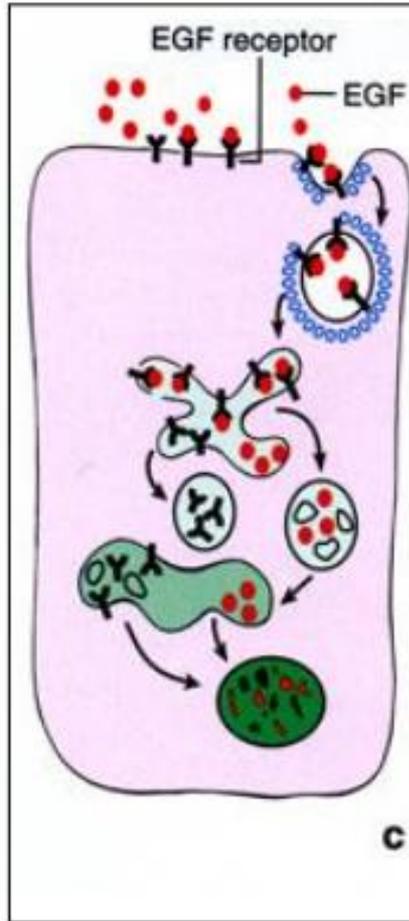
Recettore riciclato e  
ligando degradato



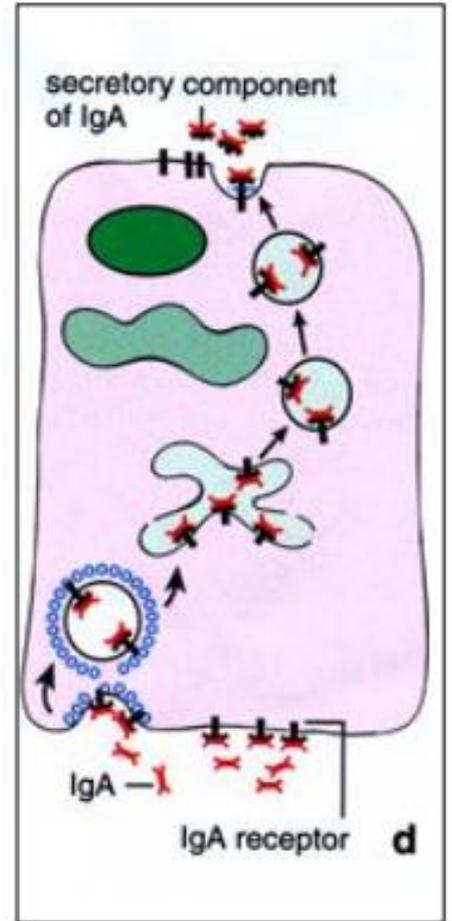
Recettore e ligando  
riciclati



Recettore e ligando  
degradati



Recettore e ligando  
trasportati (transcitosi)

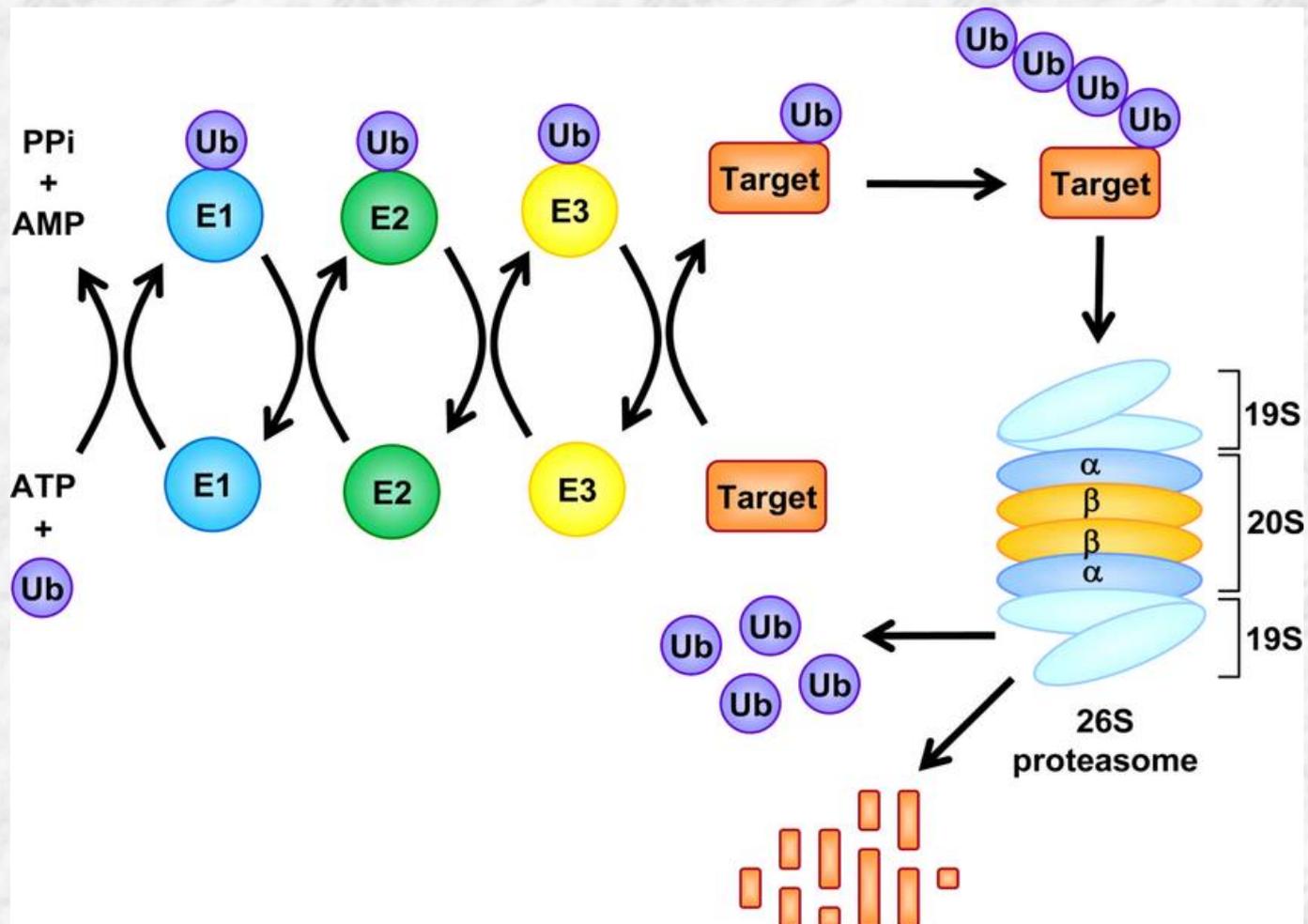


# Degradazione delle proteine

Le vie intracellulari sono almeno due:

- **Lisosomale**

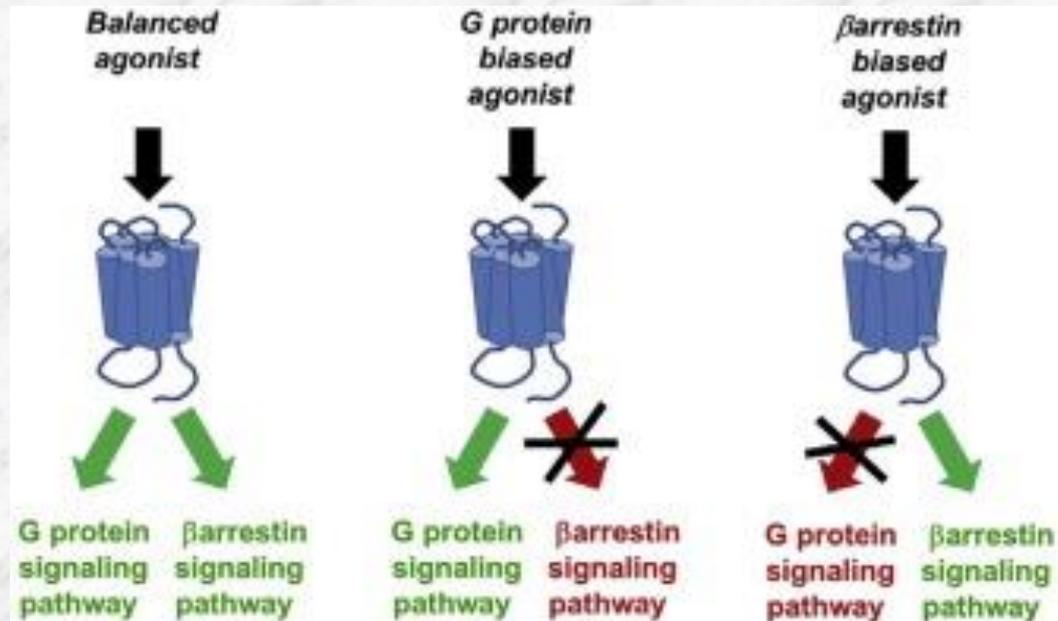
- **Proteasomica ubiquitina-dipendente (UPS)**

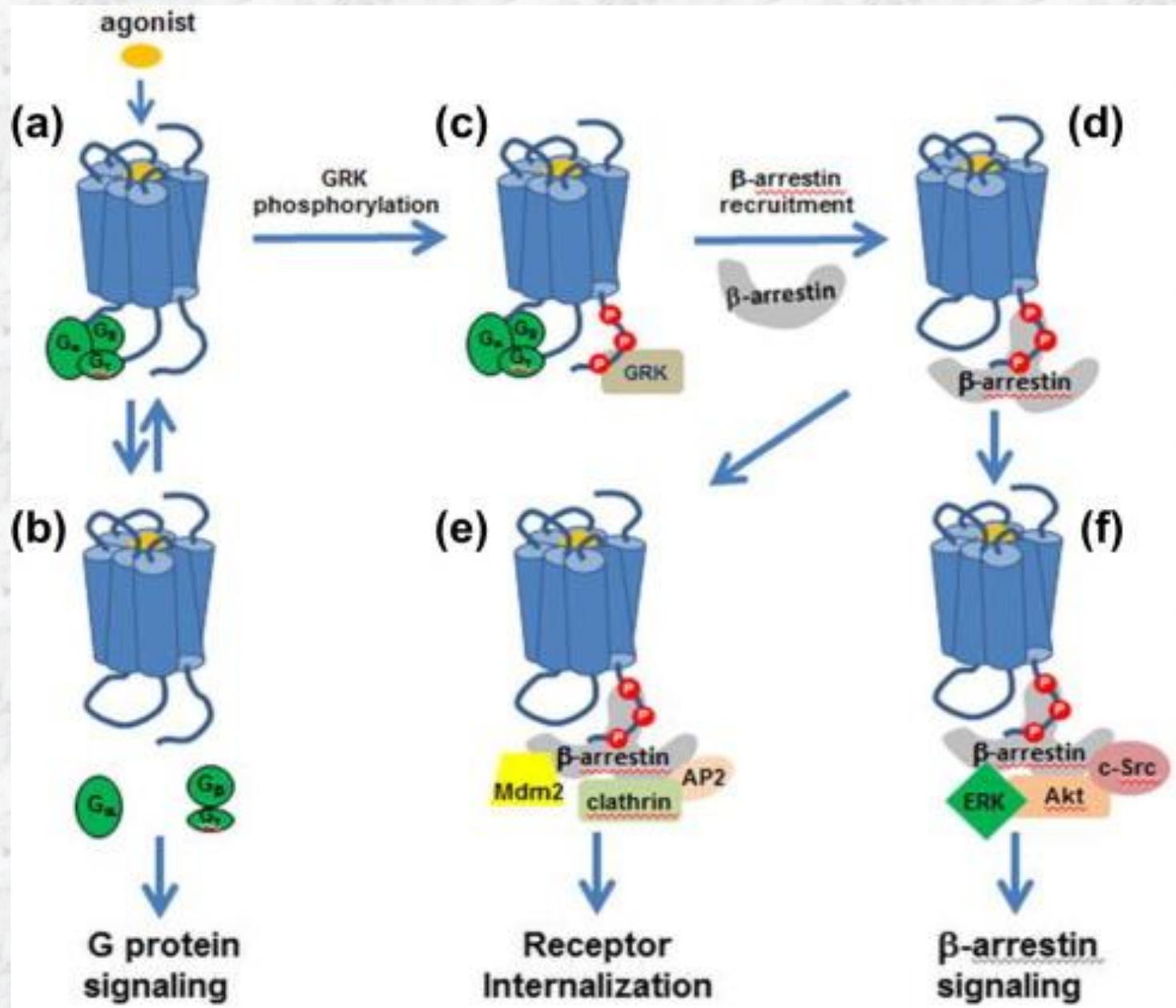


# AGONISMO BIASED

Un ligando biased è = un ligando che possiede una “selettività funzionale”, che attiva alcune vie di trasduzione del segnale rispetto ad altre.

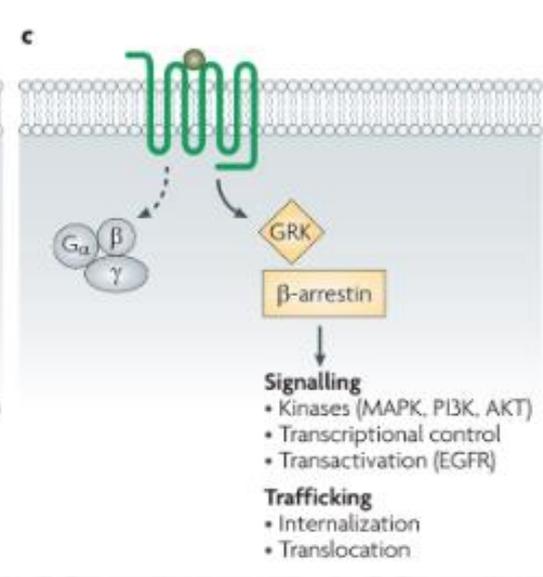
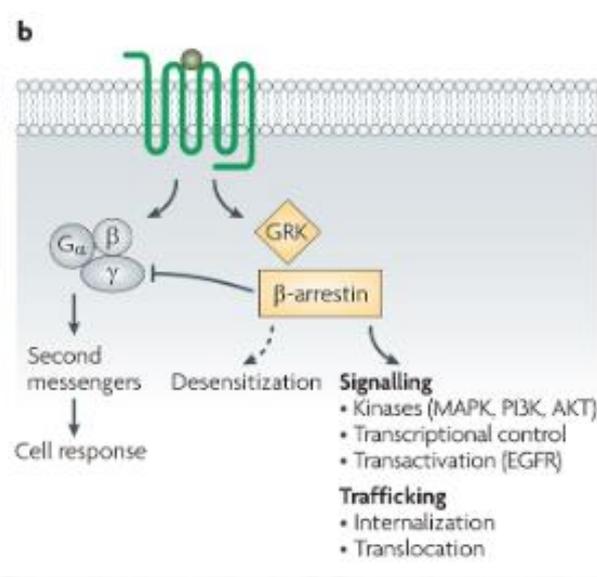
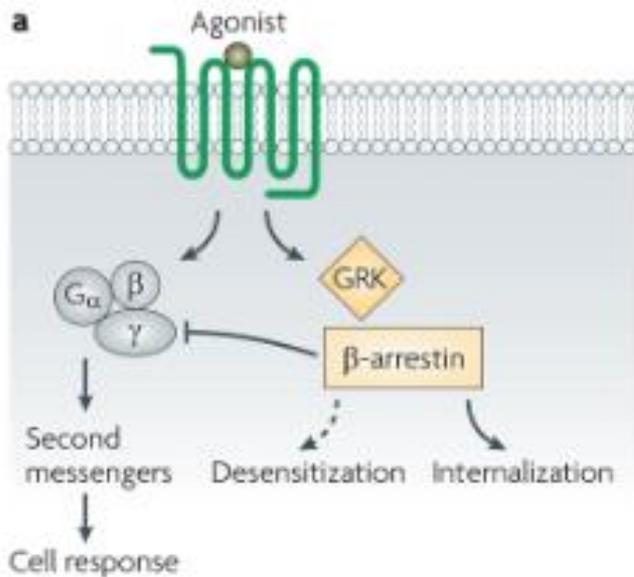
La selettività funzionale può essere **presente quando un recettore ha diverse possibili vie di trasduzione del segnale**. In che misura viene attivata ciascuna via, dipende da quale ligando si lega al recettore.

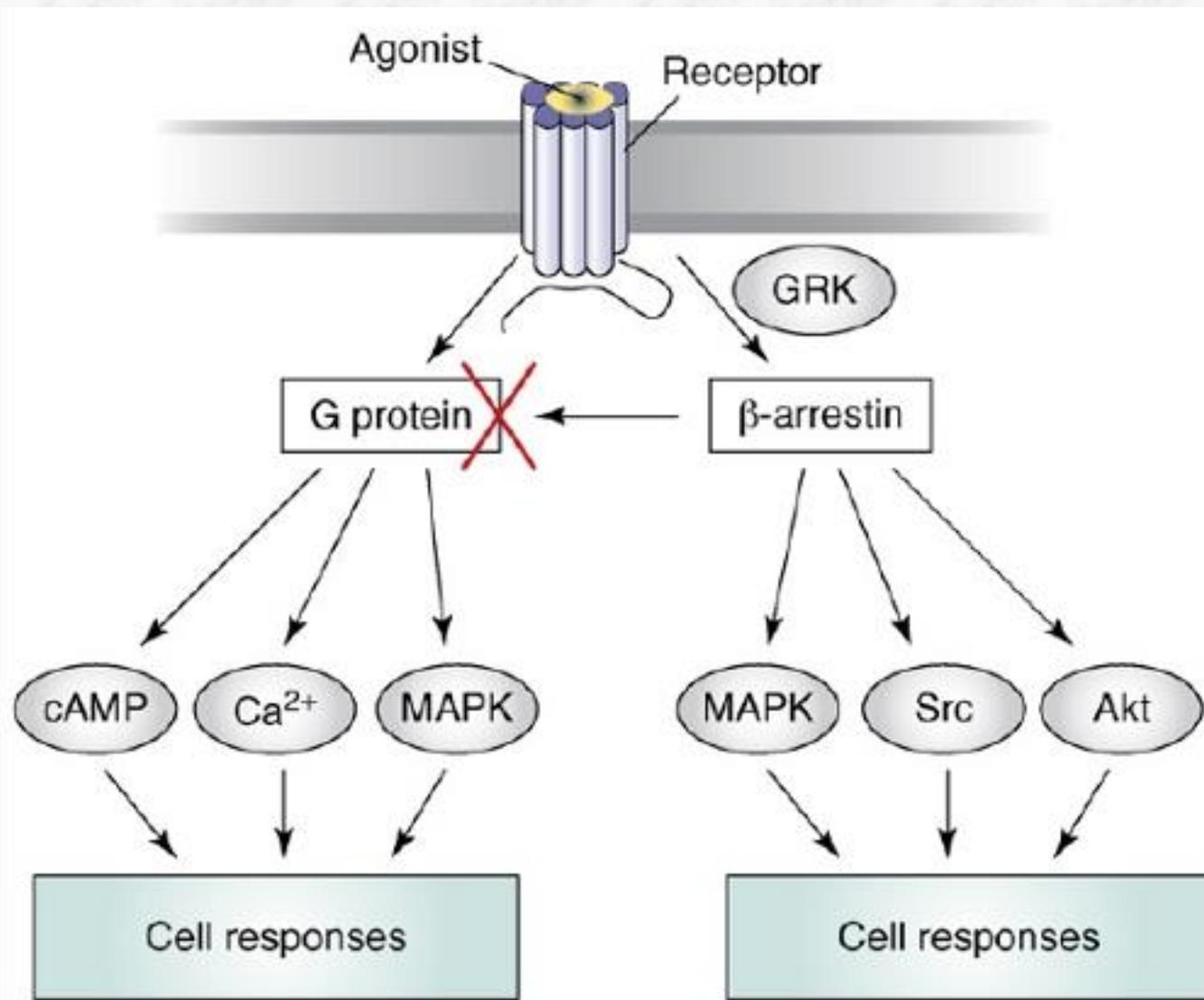




La selettività funzionale, o segnalazione polarizzata, è maggiormente caratterizzata nei recettori accoppiati a proteine G (GPCR)

Prima si pensava che l'attivazione delle beta arrestine fosse proporzionale a quella delle proteine G.



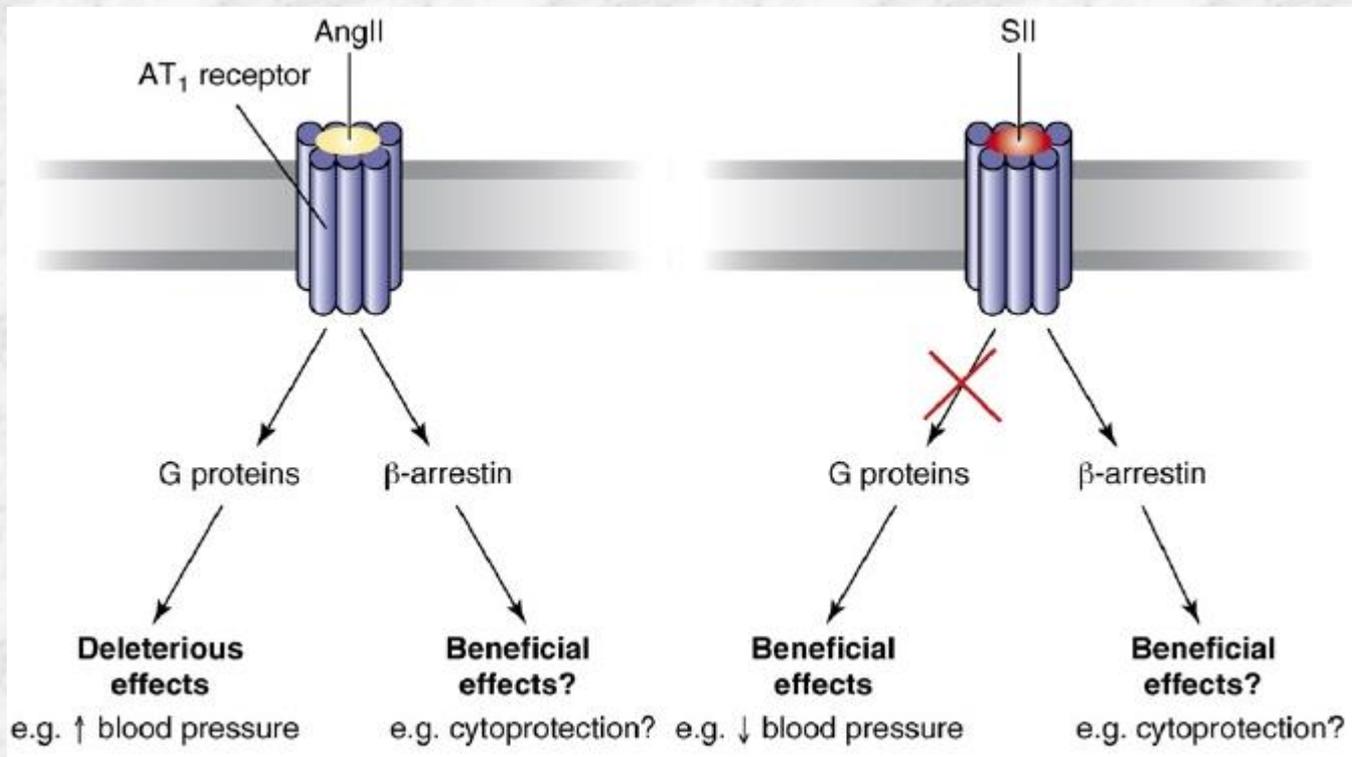


# E' stato dimostrato che molti ligandi sono biased (cioè hanno un bias, una preferenza) e attivano uno o l'altro pathway.

Es. ligandi con bias totale → attivano ad es. solo la beta-arrestina

Es. ligandi con bias parziale → che attivano i due pathway con stechiometria variabile.

**Ang = angiotensina II ligando naturale di AT1 | SII = è una angiotensina modificata "biased"**



[Trends Pharmacol Sci](#). 2007 Aug;28(8):416-22. Epub 2007 Jul 20.

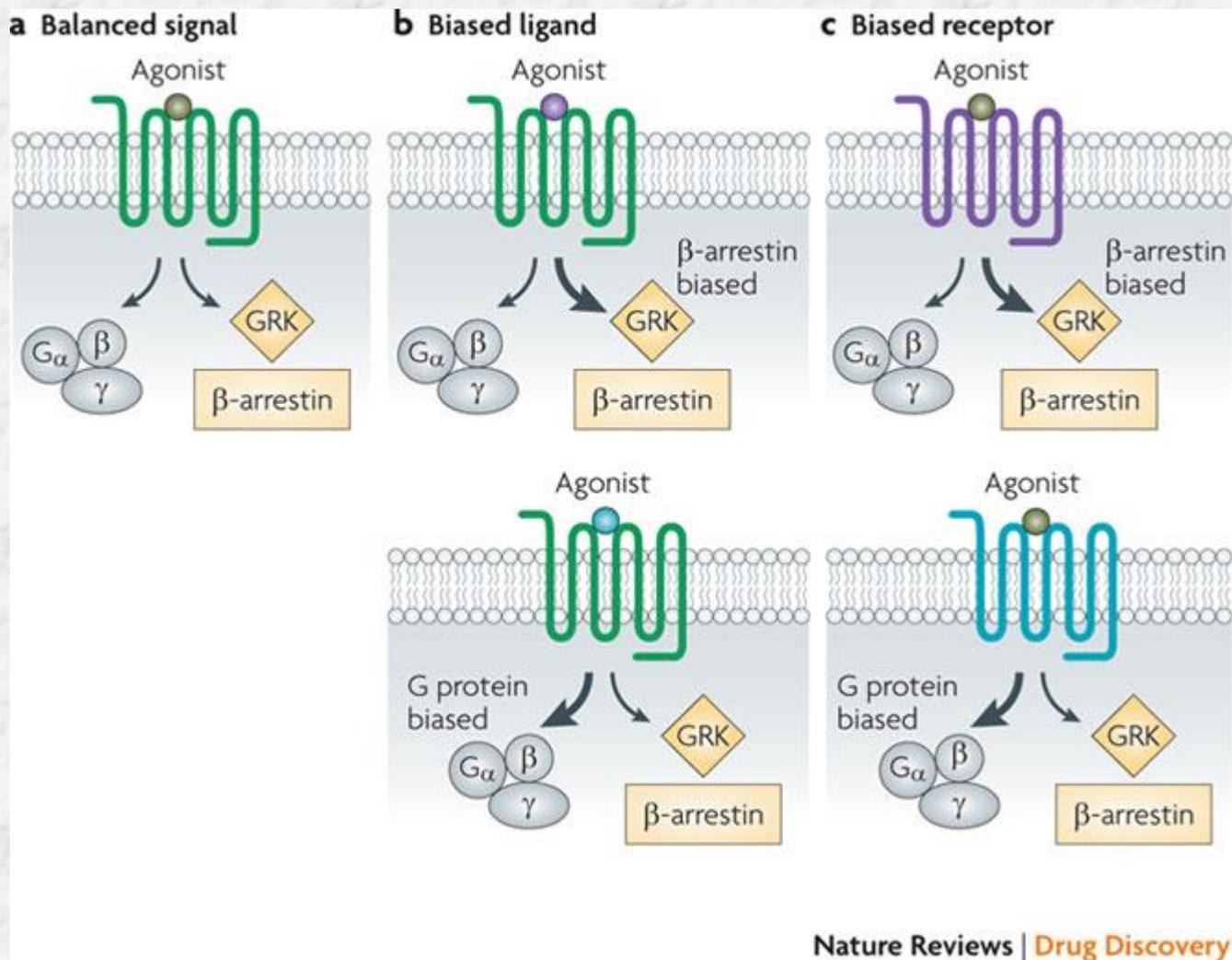
## **Beta-arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors.**

[Violin JD<sup>1</sup>](#), [Lefkowitz RJ](#).

### **+ Author information**

#### **Abstract**

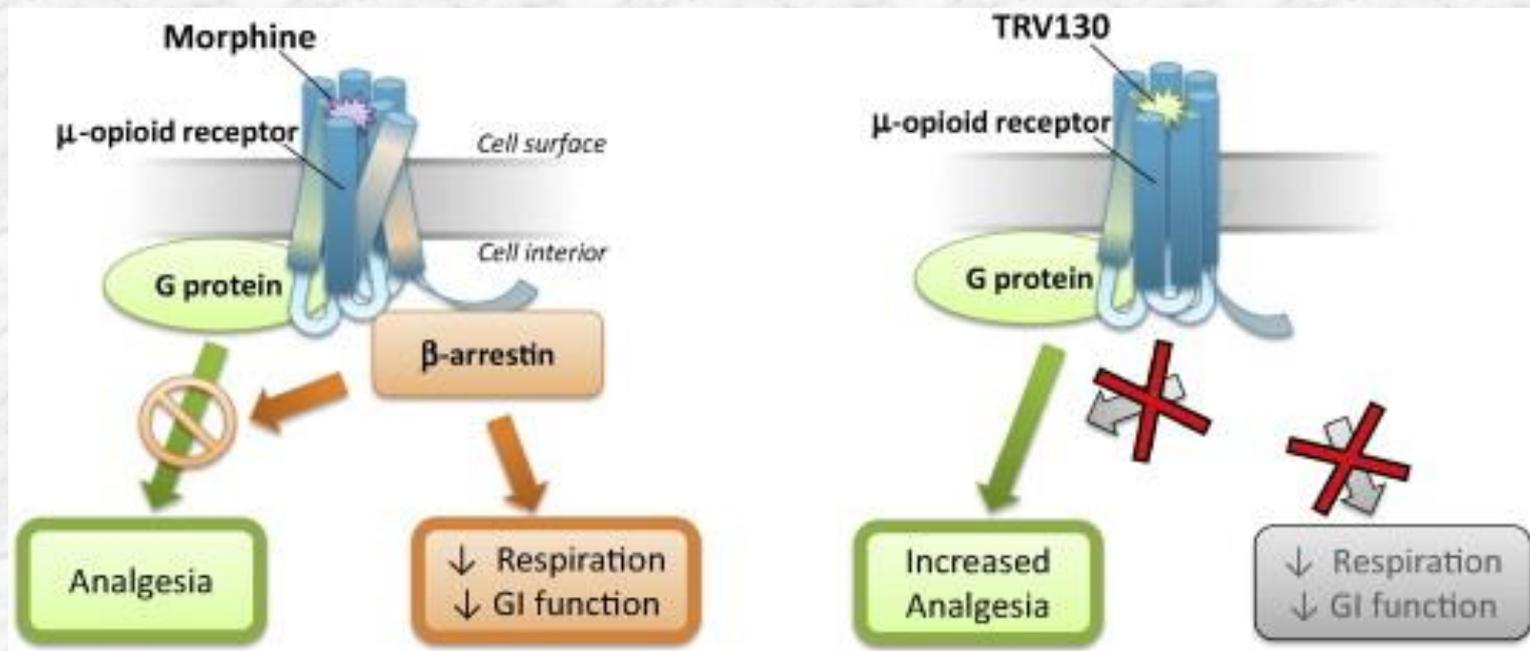
Seven-transmembrane receptors (7TMRs), the most common molecular targets of modern drug therapy, are critically regulated by beta-arrestins, which both inhibit classic G-protein signaling and initiate distinct beta-arrestin signaling. The interplay of G-protein and beta-arrestin signals largely determines the cellular consequences of 7TMR-targeted drugs. Until recently, a drug's efficacy for beta-arrestin recruitment was believed to be proportional to its efficacy for G-protein activities. This paradigm restricts 7TMR drug effects to a linear spectrum of responses, ranging from inhibition of all responses to stimulation of all responses. However, it is now clear that 'biased ligands' can selectively activate G-protein or beta-arrestin functions and thus elicit novel biological effects from even well-studied 7TMRs. Here, we discuss the current state of beta-arrestin-biased ligand research and the prospects for beta-arrestin bias as a therapeutic target. Consideration of ligand bias might have profound influences on the way scientists approach 7TMR-targeted drug discovery.



**Figure 2. Biased ligands and biased receptors**

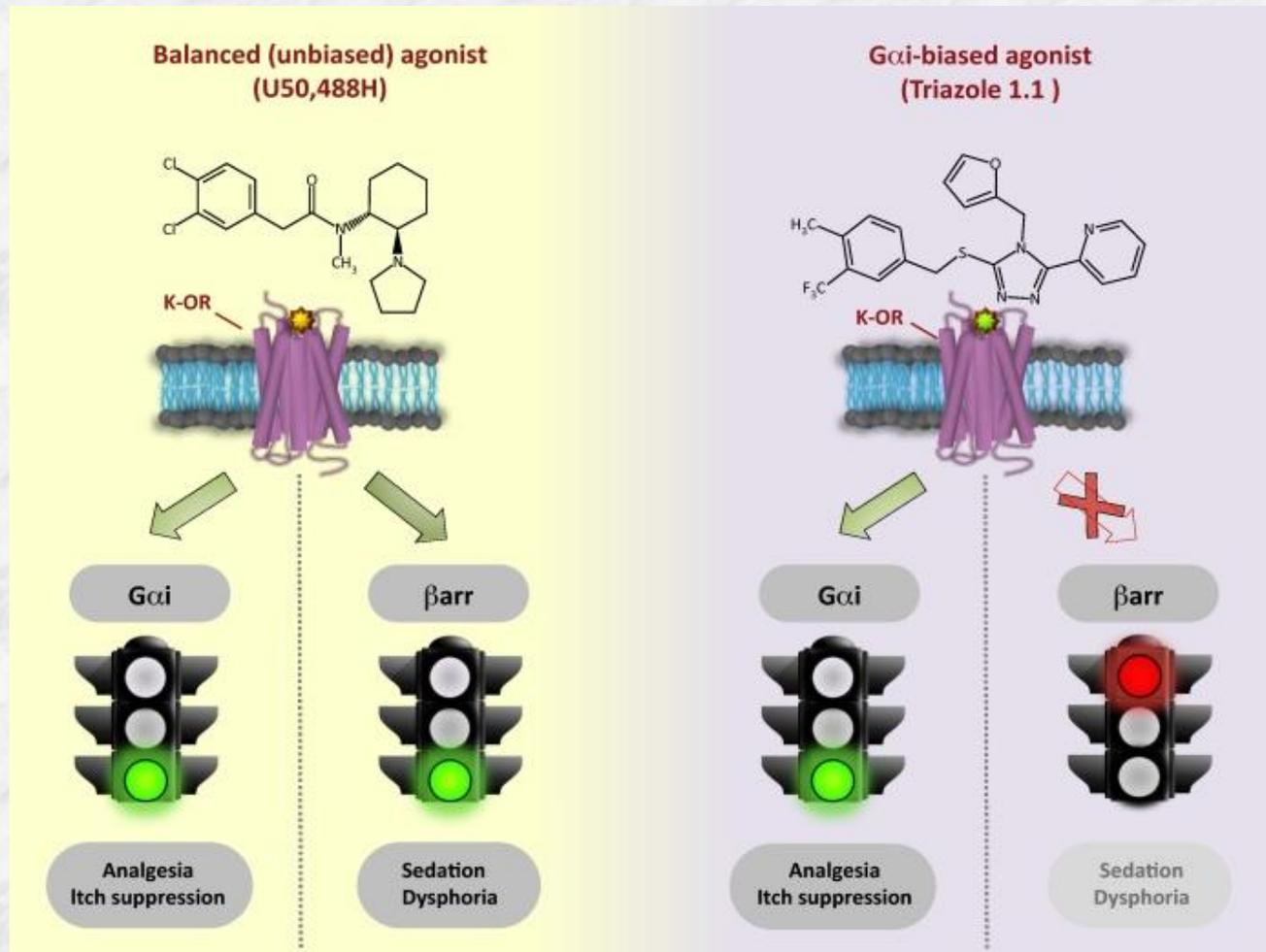
In balanced signalling (a; green), binding of a ligand results in activation of signalling by G proteins and  $\beta$ -arrestins, as well as desensitization and internalization by  $\beta$ -arrestin alone. Two cases of biased agonism exist. In the case of a biased ligand (b), binding of a ligand ( $\beta$ -arrestin-biased, purple; G protein-biased, blue) to an unbiased receptor results in a biased response. In the case of a biased receptor (c), binding of an unbiased ligand to the biased receptor ( $\beta$ -arrestin-biased, purple; G protein-biased, blue) also results in a biased response. GRK, G protein-coupled receptor kinase.

Ad esempio, studi preclinici con **agonisti biased al recettore  $\mu$  oppioide** mostrano un'efficacia equivalente per il trattamento del dolore con rischio ridotto di potenziale di dipendenza e depressione respiratoria  $\rightarrow$  riducendo gli effetti collaterali

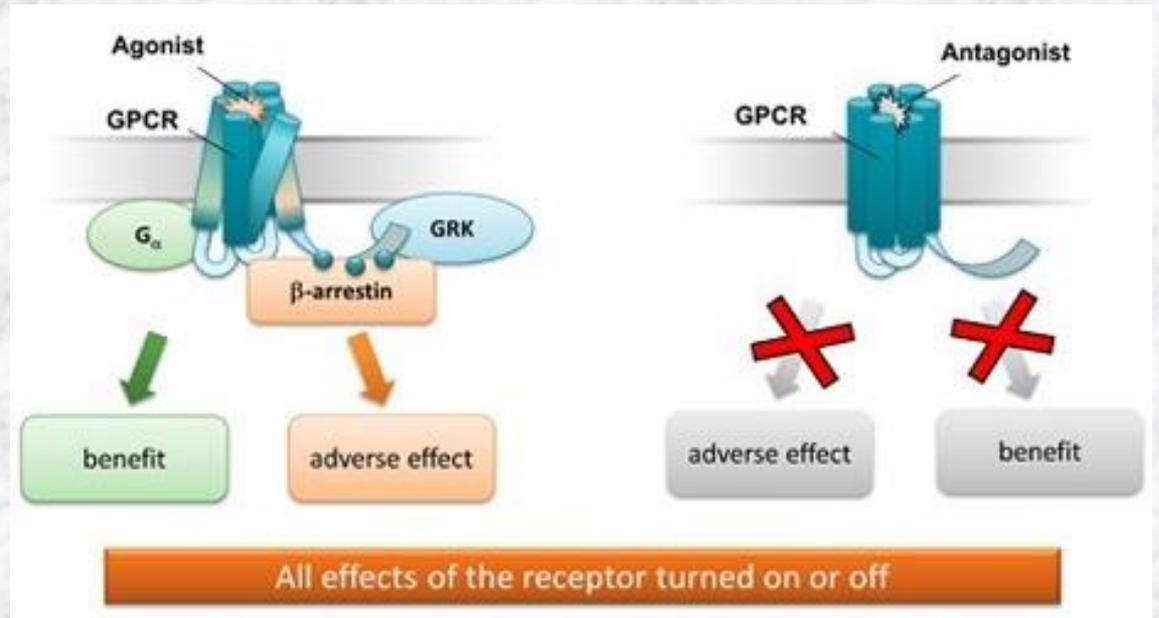


## Biased Opioid Receptor Ligands: Gain without Pain.

Ranjan R<sup>1</sup>, Pandey S<sup>1</sup>, Shukla AK<sup>2</sup>.



# Vecchio approccio



# Nuovo approccio

