

Farmacologia cellulare e molecolare

Prof.ssa Patrizia Romualdi, PhD

II Parte

Modulazione farmacologica dell'espressione genica

- Meccanismi intracellulari di regolazione dell'espressione genica
- Farmacologia della trascrizione genica
- Recettori intracellulari

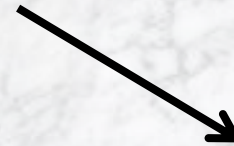
- Uso Farmacologico degli oligonucleotidi sintetici
- Terapia genica
- Vettori e modalità di trasferimento genico.

Meccanismi intracellulari di regolazione dell'espressione genica

Con **ESPRESSIONE GENICA** si intende → quella serie di eventi che dall'attivazione della trascrizione di un gene, conducono alla produzione della proteina corrispondente.

La regolazione di questi processi è molto fine e la sua complessità aumenta salendo nella scala evolutiva.

□ **Scopo:** differenziamento cellulare, ovvero espressione coordinata nel tempo di geni diversi in cellule diverse.



Geni costitutivi cioè trascritti e tradotti in tutte le cellule

Geni housekeeping

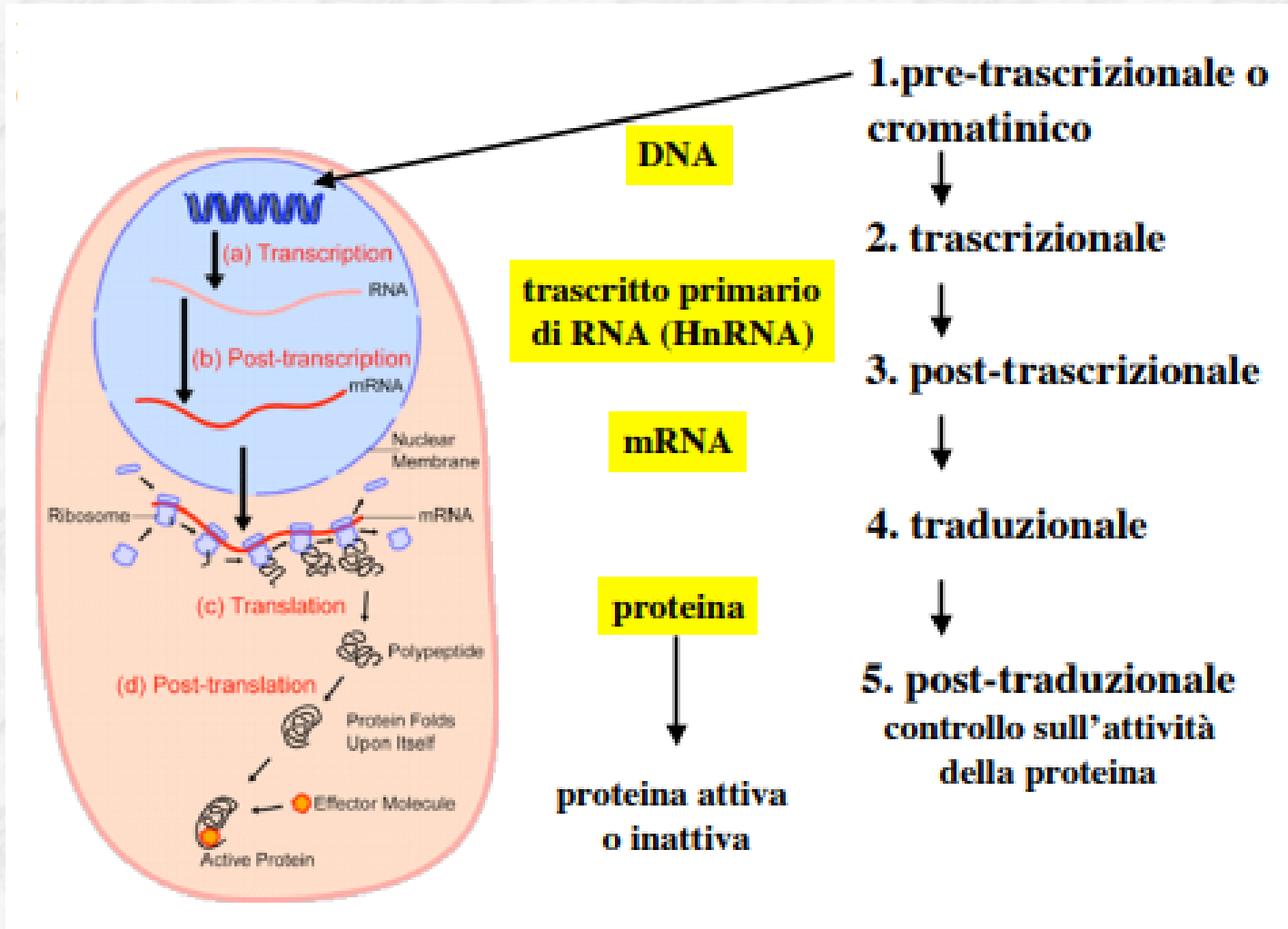
Geni specifici attivati selettivamente da meccanismi di regolazione genica

I livelli delle varie espressioni geniche sono funzionali alle richieste

(insulina >> cellule β in risposta alla concentrazione di glucosio)

I meccanismi molecolari che controllano i livelli di espressione di una determinata proteina operano regolando la trascrizione a diversi livelli dentro e fuori dal nucleo → fino ad arrivare al controllo della sintesi della proteina prodotta

Punti di controllo dell'espressione genica

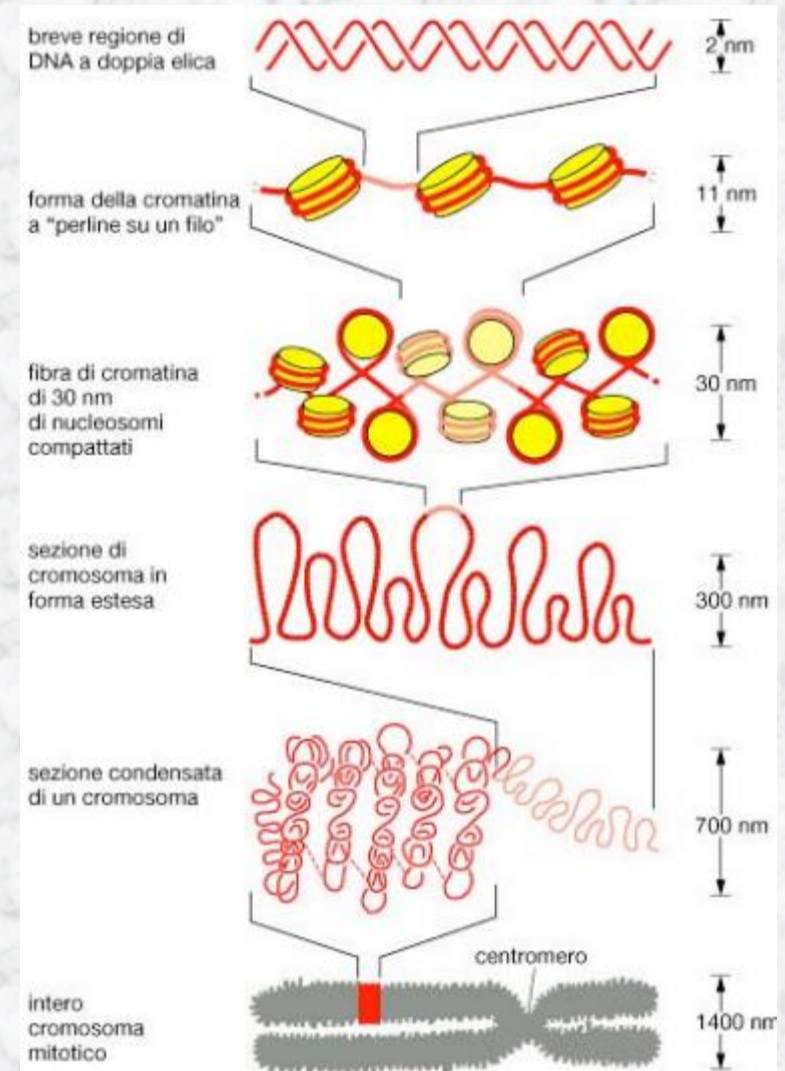


1. Controllo pre-trascrizionale, o cromatinico (sul DNA)

Il materiale genetico nel nucleo è organizzato in una struttura complessa formata da DNA e proteine = **CROMATINA**

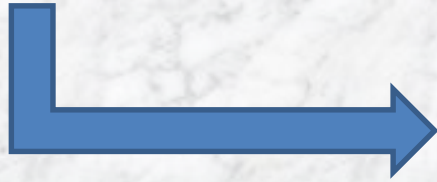
L'organizzazione dinamica della struttura cromatinica influenza, potenzialmente, tutte le funzioni del genoma!!

un **nucleosoma** = è l'unità fondamentale della cromatina in cui il **DNA** è avvolto intorno a **gruppi di proteine chiamate istoni**
Il nucleosoma è il primo livello di compattazione del DNA nel nucleo



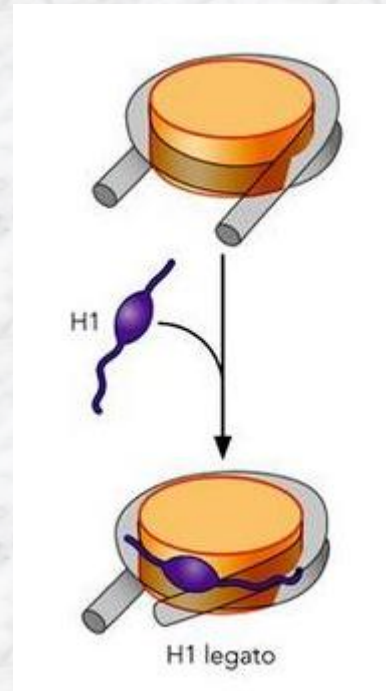
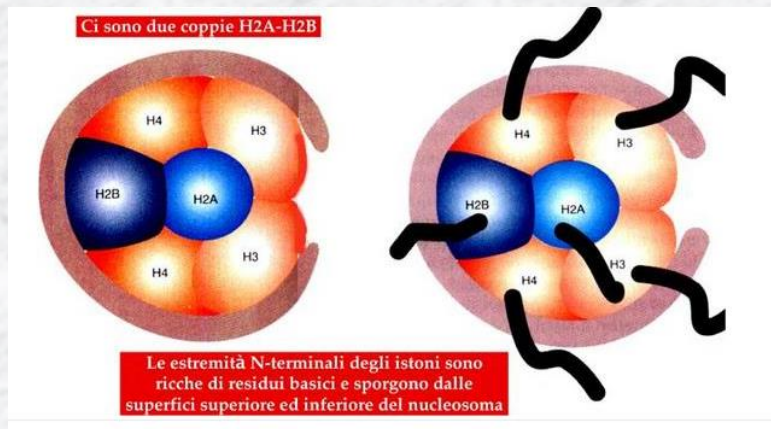
RISULTATO NETTO: CIASCUNA MOLECOLA DI DNA È STATA COMPATTATA IN UN CROMOSOMA MITOTICO CHE È 10 000 VOLTE PIÙ CORTO DELLA SUA LUNGHEZZA ESTESA

Un nucleosoma è formato da un ottamero istonico

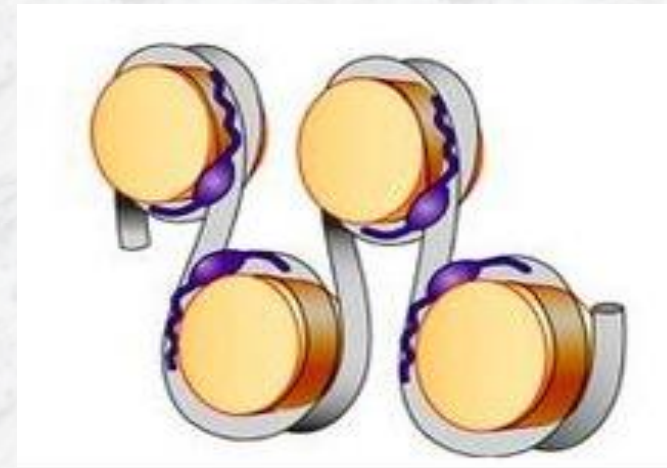


otto proteine istoniche, attorno al quale si avvolge il DNA. Ogni centro nucleosomico contiene: **due istoni H2A, due istoni H2B, due istoni H3 e due istoni H4.**

H1 è un istone linker che unisce le unità

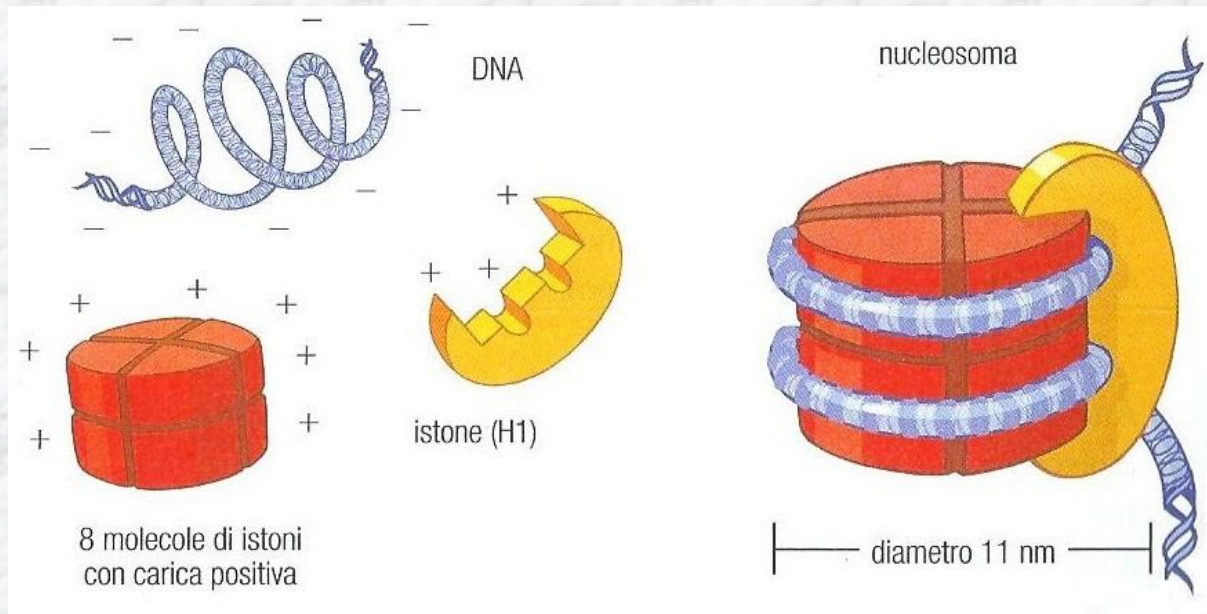


«Cromatina a perline su un filo»



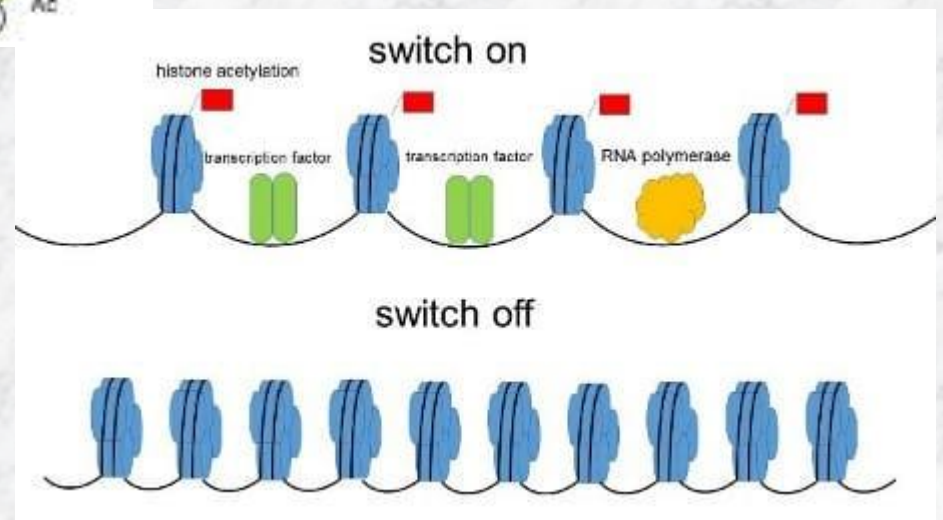
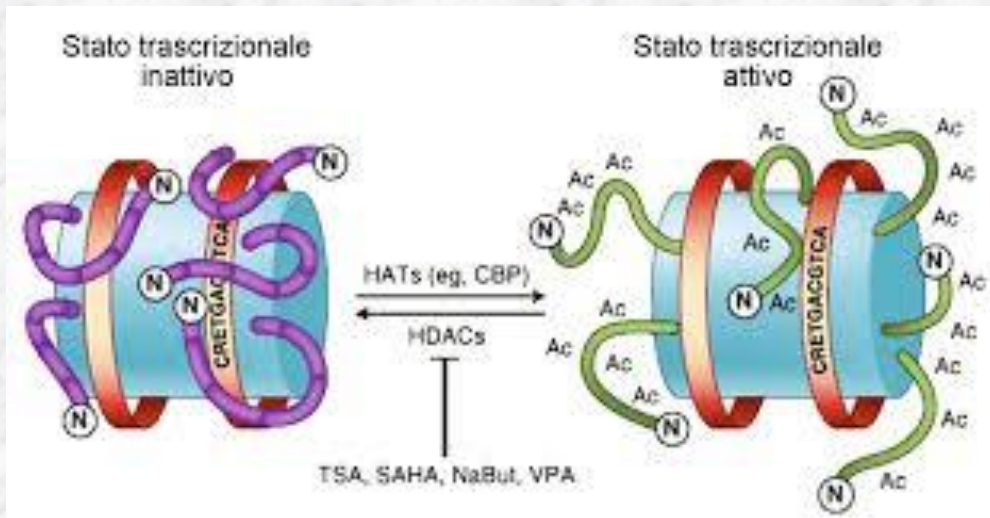
Gli istoni sono proteine basiche cariche positivamente, poiché posseggono un gran numero (circa il **20%**) di amminoacidi con catena laterale **basica**, in particolare lisina e arginina.

Gli istoni interagiscono con **il DNA che è carico negativamente a causa dell'abbondanza di gruppi fosfato per formare il nucleosoma**.



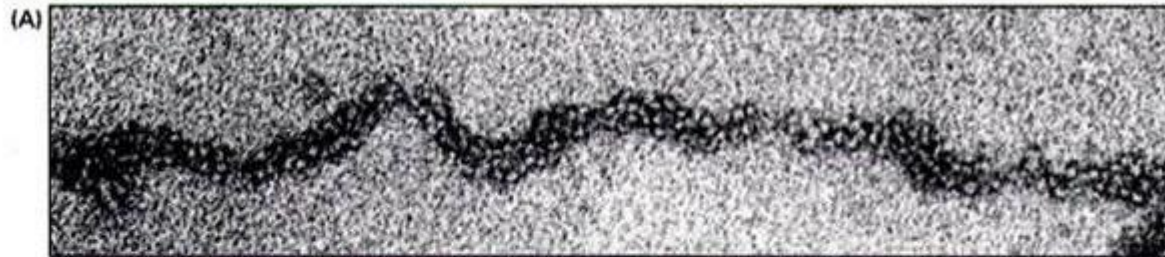
Dagli istoni sporgono code istoniche NH2-terminali che possono essere soggette a modificazioni → CHE INFLUENZANO IL GRADO DI CONDENSAZIONE DELLA CROMATINA

(+/- accessibile ai fattori di trascrizione)

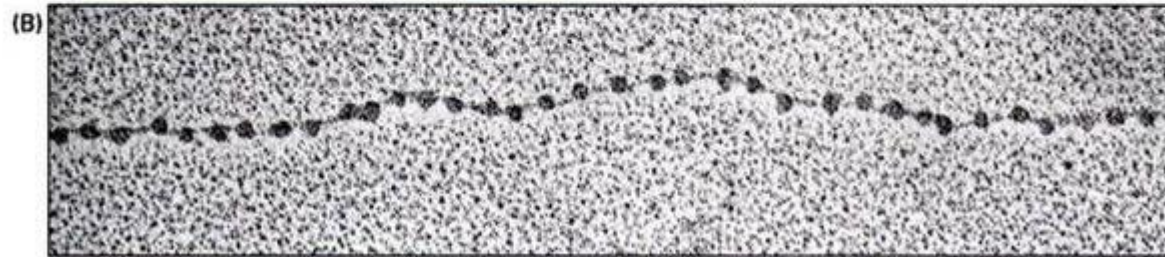


I nucleosomi sono distribuiti in modo regolare lungo il genoma a formare un nucleofilamento che può assumere diversi livelli di compattezza (Fig. A e B)

Cromatina al microscopio elettronico



fibra da 30 nm (cromatina condensata)



fibra da 11 nm (cromatina de-condensata)

**Etero cromatina
Impacchettata (più condensata)**

**Eucromatina
Meno impacchettata (de-condensata)**

**1. Controllo pre-trascrizionale,
o cromatinico
dipende profondamente dalla →**

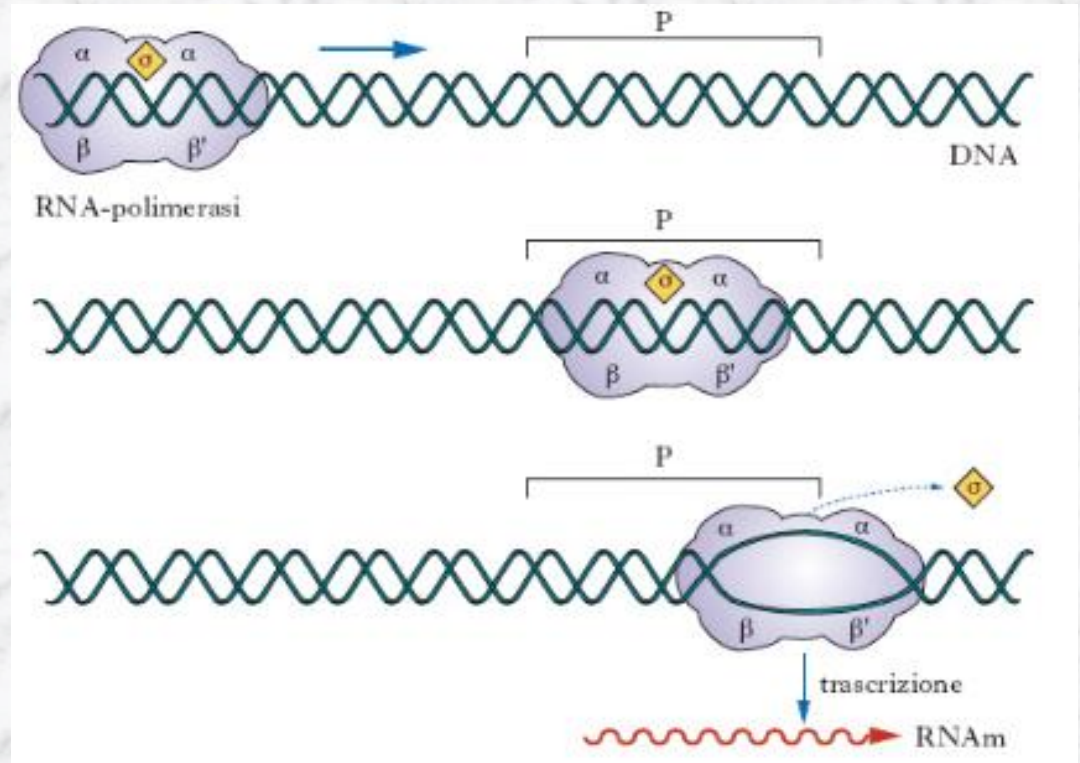
**organizzazione della cromatina
(eucromatina/eterocromatina)
→ modificazioni strutturali della
cromatina operate da COMPLESSI
PROTEICI di rimodellamento ed
enzimi che modificano gli istoni
→ modulazione della espressione
genica (HATs-HDACs)**

È un controllo nucleare !!!

2. Controllo trascrizionale

TRASCRIZIONE

Sintesi di una molecola di RNA da uno stampo di DNA, ad opera della RNA polimerasi II



E' un controllo che si esercita sull'attività **della RNA polimerasi** → **sul suo riconoscimento ed aggancio al promotore** → **sulla sua efficienza della trascrizione.**

1- La trascrizione negli eucarioti è controllata da diversi elementi posizionati lungo il DNA che rappresentano delle **sequenze regolatrici** → quindi se la RNA polimerasi potrà iniziare la trascrizione dipenderà anche dal legame di queste proteine regolatorie (attivatrici o repressori)

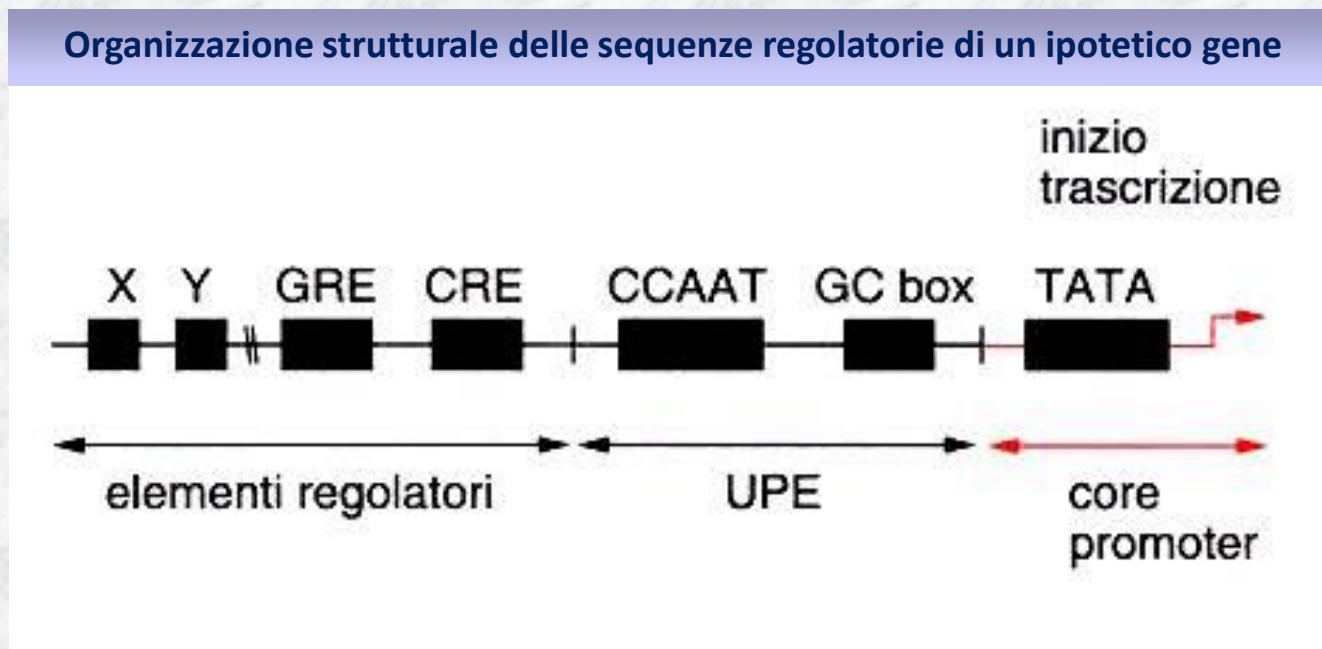
2- La trascrizione richiede la formazione di un complesso di inizio a livello dei promotori



quasi tutti i promotori contengono una serie di sequenze conservate, che possono essere riconosciute da specifici fattori trascrizionali che servono da innesco per la formazione e la stabilizzazione di tale complesso di inizio.

- **Promotore** = è una sequenza di DNA che inizia a monte del TSS (sito di inizio della trascrizione) suddiviso in regioni prossimali o distali. Ha una affinità più o meno elevata per la RNA Pol. II

Contiene diverse sequenze regolatrici (quali TSS e TATA BOX, GC box e altre come la CCAAT box) sono tutte localizzate a monte del sito di inizio della trascrizione, **controllano l'esatto posizionamento della RNA pol II e l'efficienza della trascrizione**



Altre **sequenze o elementi regolatori** che possono essere anche molto lontane da TSS:

- **Intensificatori (o Enhancers)** = aumentano la capacità di iniziare la trascrizione, intensificano la trascrizione

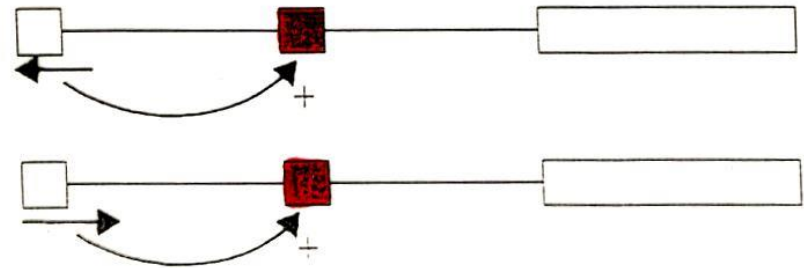
- **Silenziatori (o Silencers)** = spengono o reprimono la trascrizione

Caratteristiche funzionali degli *enhancers* e dei *silencers*

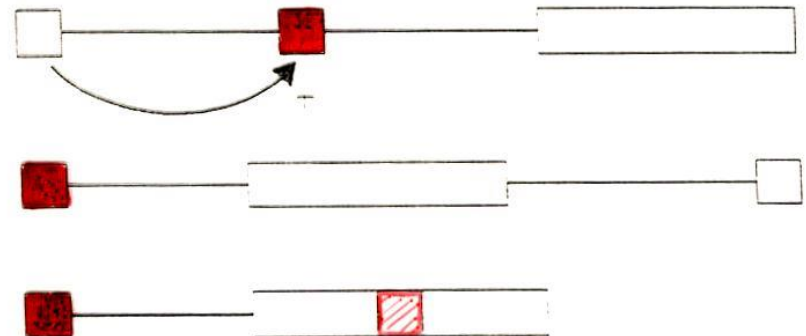
A) Attivazione indipendente dalla distanza
enhancer promotore unità trascrizionale



B) Attivazione indipendente dall'orientamento

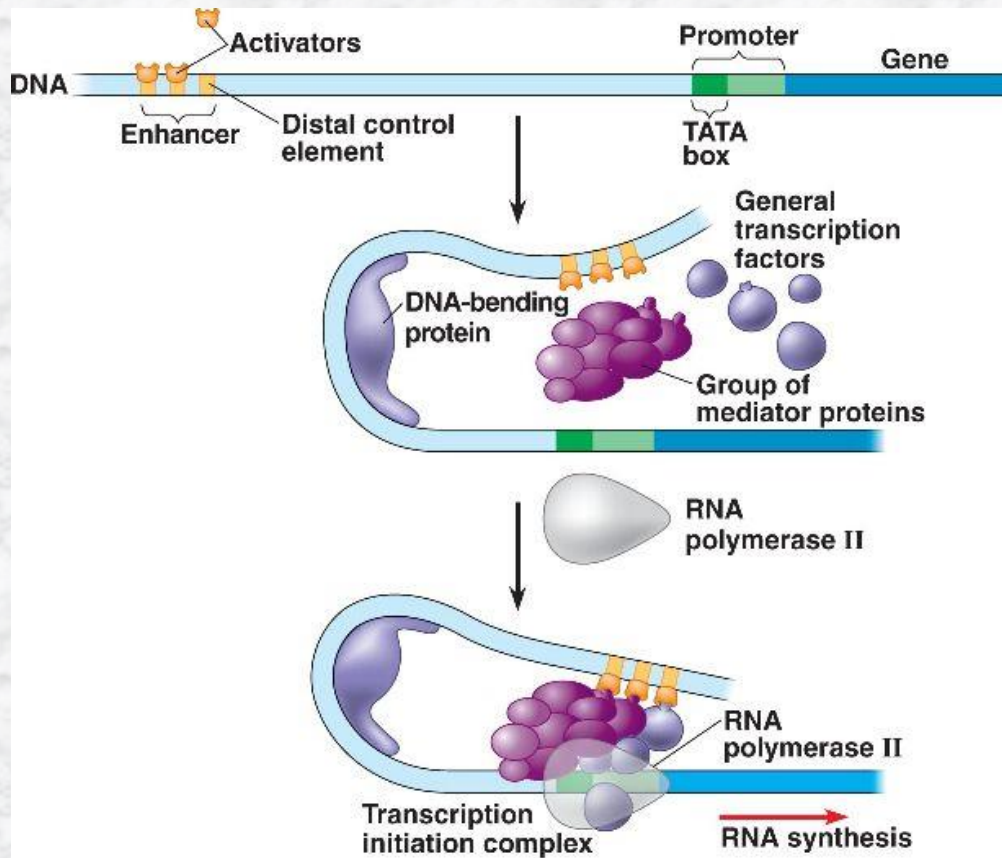


C) Attivazione indipendente dalla posizione



La trascrizione ovvero l'attività della RNA Pol. II sarà dovuta ad un bilancio complessivo tra fattori che la favoriscono o la inibiscono.

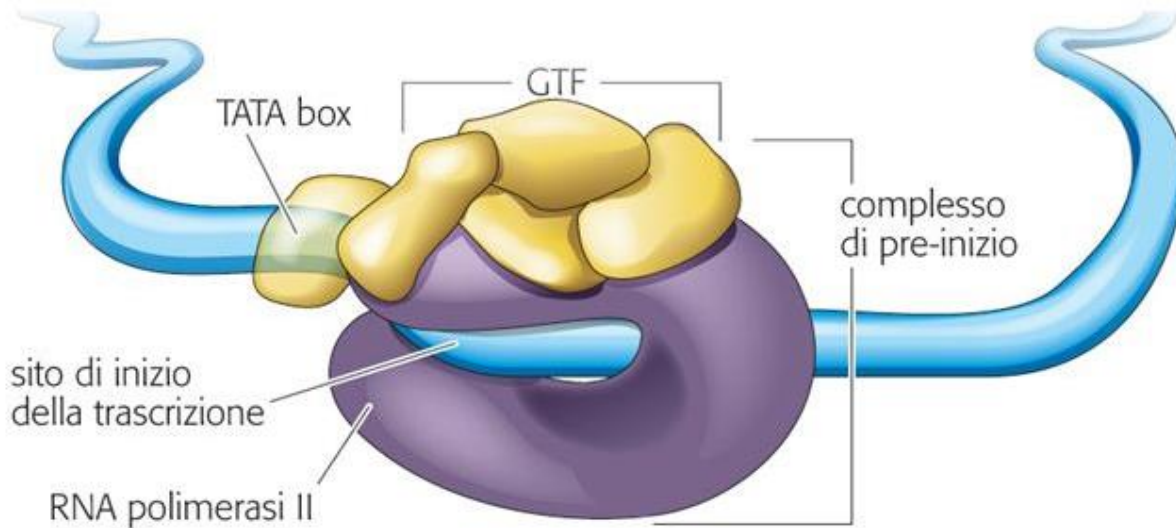
Quando un attivatore si lega ad una sequenza enhancer presente sul DNA → aumenta la capacità di **TFIID** (che è un fattore di trascrizione) di legarsi al **TATA BOX** promuovendo la formazione del complesso di pre-inizio → successiva fosforilazione della RNA Pol II da inizio alla trascrizione



TFIID ha due funzioni:

- ❖ riconosce una sequenza specifica di DNA (il tata-box circa 35 nucleotidi)
- ❖ interagisce con la RNA polimerasi II

Ipotesi: è che il DNA fra la sequenza *enhancer* e il promotore si ripieghi, formando un'ansa, per permettere alle proteine legate all'*enhancer* di interagire direttamente con uno dei TF o con l'enzima RNA-polimerasi.



GTF (fattori di trascrizione generali): proteine di regolazione che si legano al promotore per l'attacco della RNA polimerasi

TATA box sequenza di basi TATA necessaria per regolare la trascrizione

promotori specifiche sequenze di inizio trascrizione

fattori di terminazione sequenze per interrompere la trascrizione

È un controllo nucleare !!!

Esistono diverse categorie di fattori di trascrizione:

- **Fattori generali della trascrizione (GTF)**, come TFIID = che richiamano la RNA Pol II

altri fattori TFIIA, B, C etc. sono importanti nella formazione del complesso di inizio

- **Fattori di trascrizione comuni (o a monte)** = che legano sequenze attivatrici GC box e CCAAT box, o inibitorie
- **Fattori di trascrizione inducibili** = proteine non sempre attive in una cellula; in seguito a stimoli esterni potenziano il loro legame con le sequenze RE dando luogo ad aumentata trascrizione di particolari geni.

Il complesso di inizio rappresenta la struttura necessaria per la trascrizione di un gene, ma è estremamente instabile. Se non ci fossero **agenti stabilizzanti**, che sono fattori di trascrizione, l'attività di trascrizione sarebbe nulla

Sp1 è un fattore di trascrizione comune che riconosce una sequenza di DNA

(GGGCGG) detta **GC box**

localizzata a circa 100 nucleotidi a monte del TATA box e quindi a circa 135 dal sito della trascrizione → **molti geni hanno copie multiple di GC box che, legando molte copie di Sp1 rendono la trascrizione molto efficiente**

TRASCRIZIONE INDUCIBILE DA STIMOLI EXTRACELLULARI

La frequenza con cui un gene viene trascritto può essere il risultato dell'azione positiva e negativa di differenti fattori di trascrizione inducibili → **da stimoli extracellulari**

vale a dire che l'espressione di questi geni è sensibile alle informazioni esterne

Fattore di trascrizione CREB = (cyclic AMP responsive element binding protein) *la cui attivazione rende la trascrizione di alcuni geni **sensibile** e quindi **controllabile** dalle concentrazioni intracellulari di cAMP*

Es. NT o ormoni possono legare Recettori di membrana accoppiati alle proteine Gs

>> adenilato ciclasi >> cAMP che si lega e attiva PKA che può fosforilare i propri substrati cellulari, può anche migrare dal citoplasma al nucleo dove svolge la propria attività

chinasi → **Uno dei substrati della PKA è CREB**

La regolabilità di un gene dipende quindi dalla combinazione di presenze di fattori specifici di trascrizione e da elementi sul DNA da essi riconoscibili.

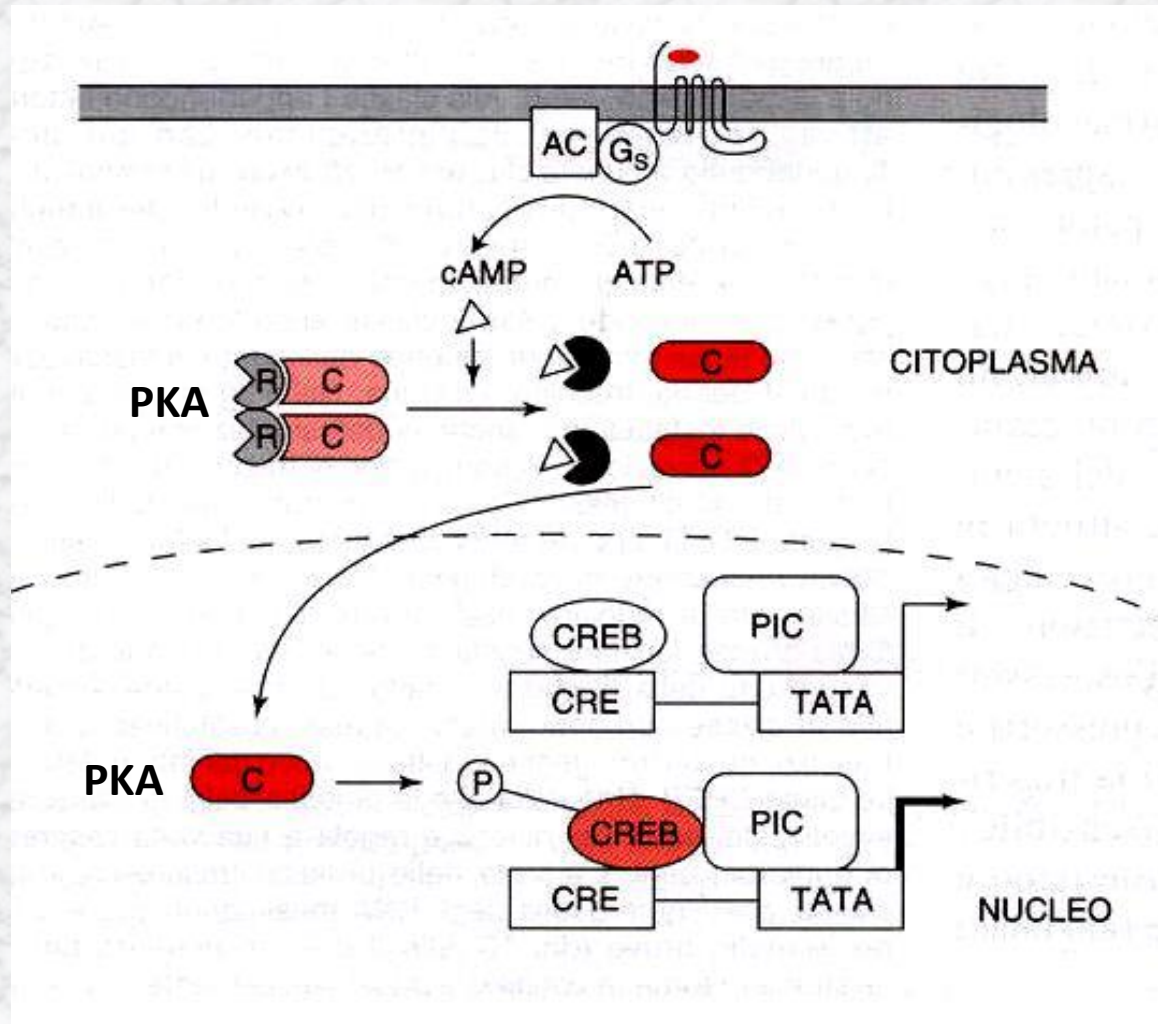
Solo i geni che portano un certo elemento possono essere regolati da quel fattore di trascrizione che lo riconosce.

CREB riconosce sequenze specifiche sul DNA che si chiamano CRE, a cui è legato ma in maniera inattiva

La fosforilazione da parte della PKA attivata determina modificazioni strutturali capaci di far interagire il fattore di trascrizione con componenti del complesso di inizio

A questo punto **fosfatasi nucleari** potrebbero essere responsabili della defosforilazione di CREB, che tornerebbe allo stato inattivo, con spegnimento del segnale di trascrizione.

Meccanismo di attivazione di CREB

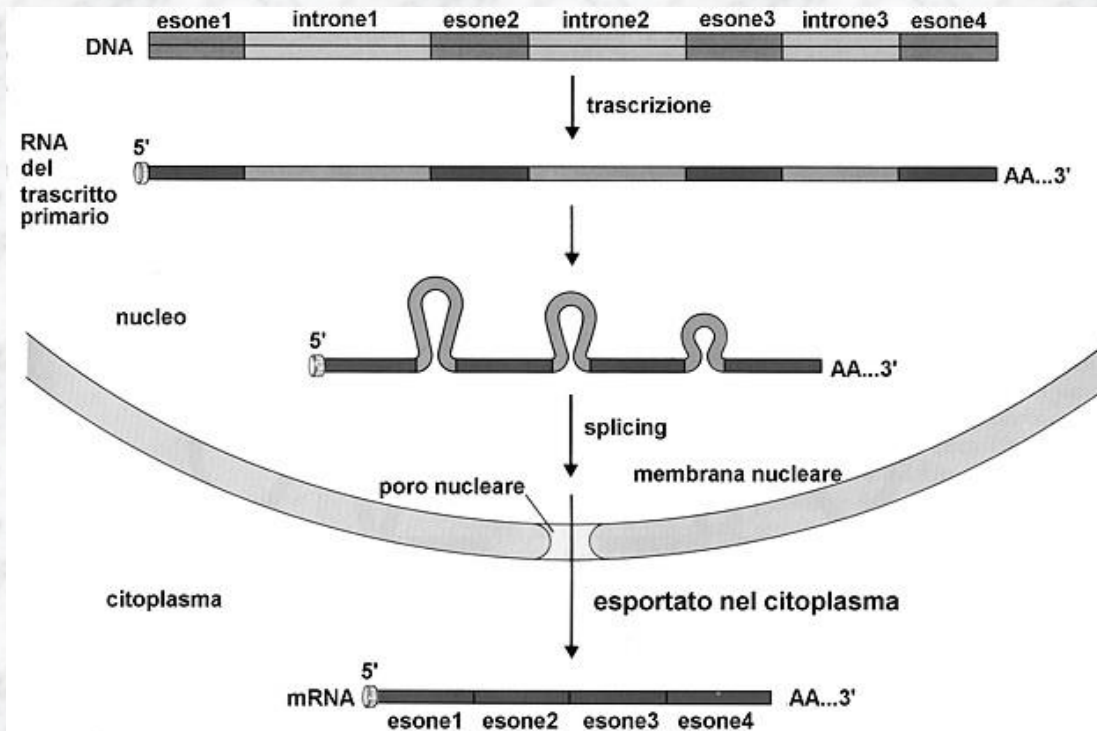


3. Controllo post-trascrizionale

A- aggiunta del cappuccio metilato (CAP, aggiunta in 5' di una 7metil-guanosina: preserva il trascritto dalla degradazione ed è segnale di aggancio per il ribosoma

B- poli-adenilazione che consente il passaggio al citoplasma

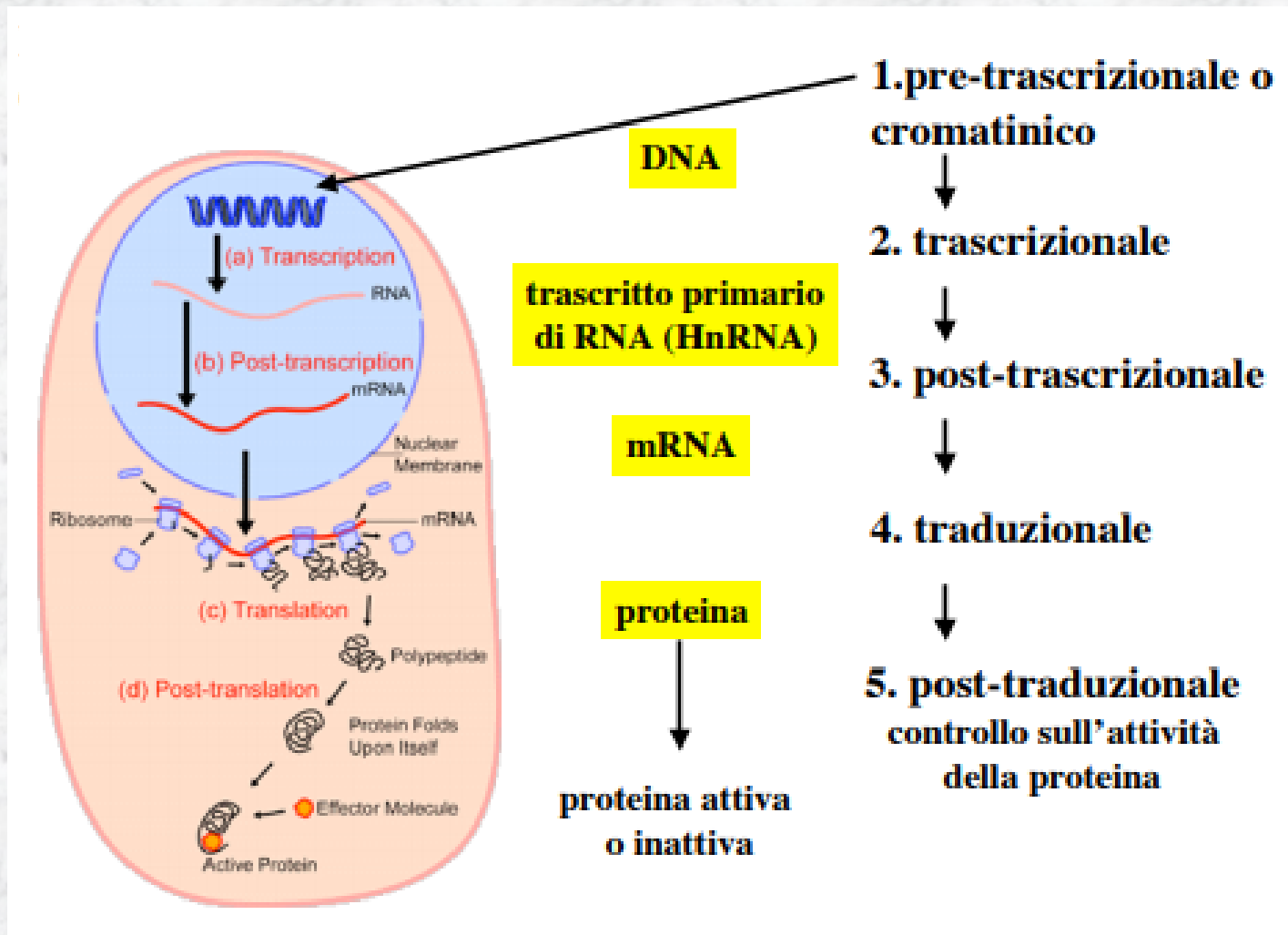
C- splicing processo di taglia e cuci per eliminare gli introni



È un controllo nucleare !!!

4. Controllo traduzionale

5. Controllo post-traduzionale



4. Controllo traduzionale

Es. meccanismi che impediscono temporaneamente che l'mRNA si attacchi ai ribosomi, modificando chimicamente la configurazione della sequenza di inizio della traduzione.

Es. Coinvolgimento della **proteina repressore della traduzione**, la quale si lega all'mRNA quando la proteina da esso codificata è già presente nel citoplasma in quantità sufficiente.

5. Controllo post-traduzionale

Es. L'aggiunta di alcuni gruppi funzionali in grado di modificare la funzionalità della proteina. ad es. aggiunta di gruppi acetile, fosfato, lipidici o glucidici.

Es. Regolare la longevità di una proteina.

Il meccanismo che attiva la degradazione → ubiquitinazione

MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI

TABELLA 8.1 Classificazione delle più importanti modificazioni post-traduzionali e principali funzioni e caratteristiche

Tipo di modificazione	Stabilità	Funzione e caratteristiche
Fosforilazione pTyr, pSer, pThr	+ / +++	Reversibile. Attivazione/inattivazione di attività enzimatiche, modulazione di interazioni proteina-proteina, signalling
SUMOilazione	+ / ++	Reversibile. Regolazione della localizzazione cellulare e dell'interazione proteina-proteina; protezione dalla degradazione
Ubiquitinazione	+ / ++	Reversibile. Ruolo nella degradazione di proteine danneggiate, mal funzionanti e con un folding alterato
Acetilazione Miristilazione, prenilazione, palmitilazione	+++	Reversibile. Regolazione della stabilità delle proteine, regolazione dell'interazione proteine-DNA
Idrossilazione	++	Regolazione della stabilità della proteina
Carbossilazione	+++	Modulazione della capacità di legare lo ione calcio
Metilazione	+++	Regolazione dell'espressione genica
Legami disolfuro	+++	Irreversibile. Stabilizzazione della struttura terziaria
Glicosilazione	+ / ++	Reversibile. Regolazione della localizzazione cellulare, protezione dall'attacco di proteasi, regolazione del turnover
Aggiunta di lipidi	++ / +++	Regolazione della localizzazione cellulare
Aggiunta di glicosilfosfatidilinositoli	++ / +++	Ancoraggio alla membrana plasmatica, localizzazione sulla superficie cellulare

Farmacologia della trascrizione genica

Diversi geni codificanti per :

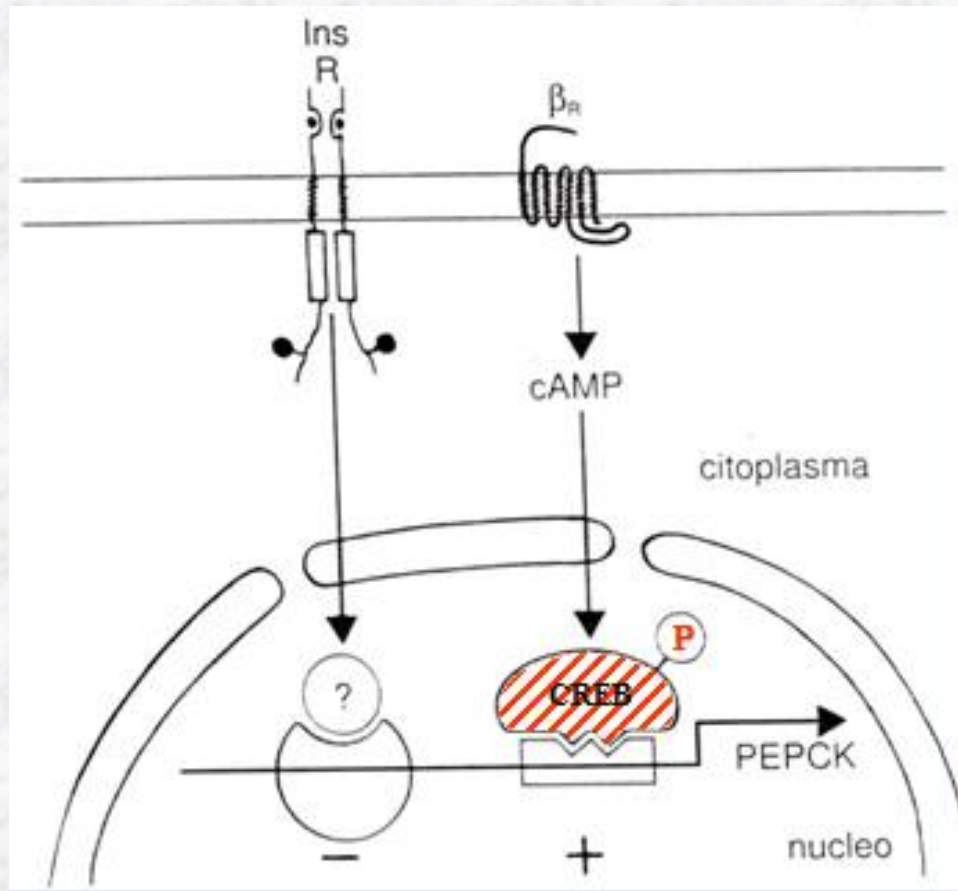
- Ormoni
- Neuro Trasmettitori (oppioidi)
- Enzimi (Tirosina idrossilasi, TH)

sono regolati anche da CREB → quindi il controllo della trascrizione genica è evidentemente una componente della funzionalità del sistema endocrino e SNC e della plasticità neuronale.

- ✓ **I segnali extracellulari possono modulare positivamente o negativamente la trascrizione genica**
- ✓ **alla base della regolazione ci può essere anche la variazione delle concentrazioni intracellulari di CALCIO o attivazione di recettori per fattori di crescita**

Es. il R per l'insulina, la cui attivazione determina attivazione gene GluT4 ma anche una inibizione rapida della trascrizione del gene fosfoenol-piruvato carbossichinasi

Regolazione del gene per la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK)



Esistono due farmaci che agiscono con meccanismi particolari **inibendo (in modo diretto o indiretto) l'attivazione di altrettanti fattori di trascrizione.**

Essi sono: **aspirina e ciclosporina**

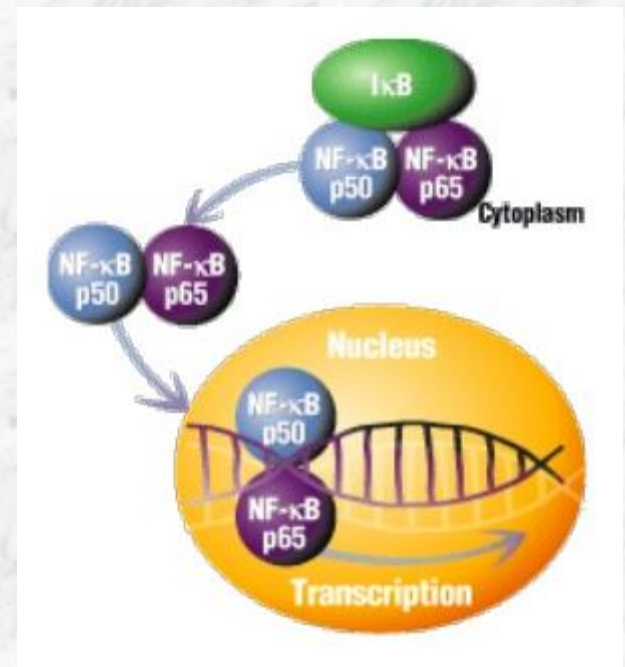
1- NF-kB e aspirina

NFkB è un fattore di trascrizione si trova in tutti i tessuti in forma inattiva nel citoplasma, ancorato ad una proteina inibitoria chiamata IκB (anche nei linfociti B, dove regola l'espressione della catena leggera K delle immunoglobuline).

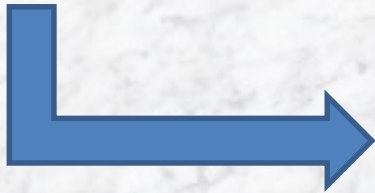
Stimoli extracellulari di **natura biologica** (virus) o **chimica** (H_2O_2) o **fisica** (raggi UV) o ancora **alcune sostanze come citochine (IL1, IL2 o TNF α e β)**



scindono il legame **NFkB-IκB** che **libero migra nel nucleo** e **stimola la trascrizione genica** dei suoi organi bersaglio



L'aspirina è un FANS il cui meccanismo di azione consiste nell'inibizione dell'enzima ciclossigenasi (COX1 e 2)



Ha anche un altro effetto: alte dosi di aspirina inibiscono la dissociazione di NF-kB da IκB → impedendo l'attivazione trascrizionale di geni di geni codificanti per fattori coinvolti nei processi infiammatori

Un'altra considerazione: **il virus HIV usa NF-kB per replicarsi nei linfociti T**

l'aspirina *in vitro* si è dimostrata in grado di interferire negativamente con alcuni dei meccanismi replicativi virali.

2- ciclosporina A = azione immuno soppressiva tramite NF-AT

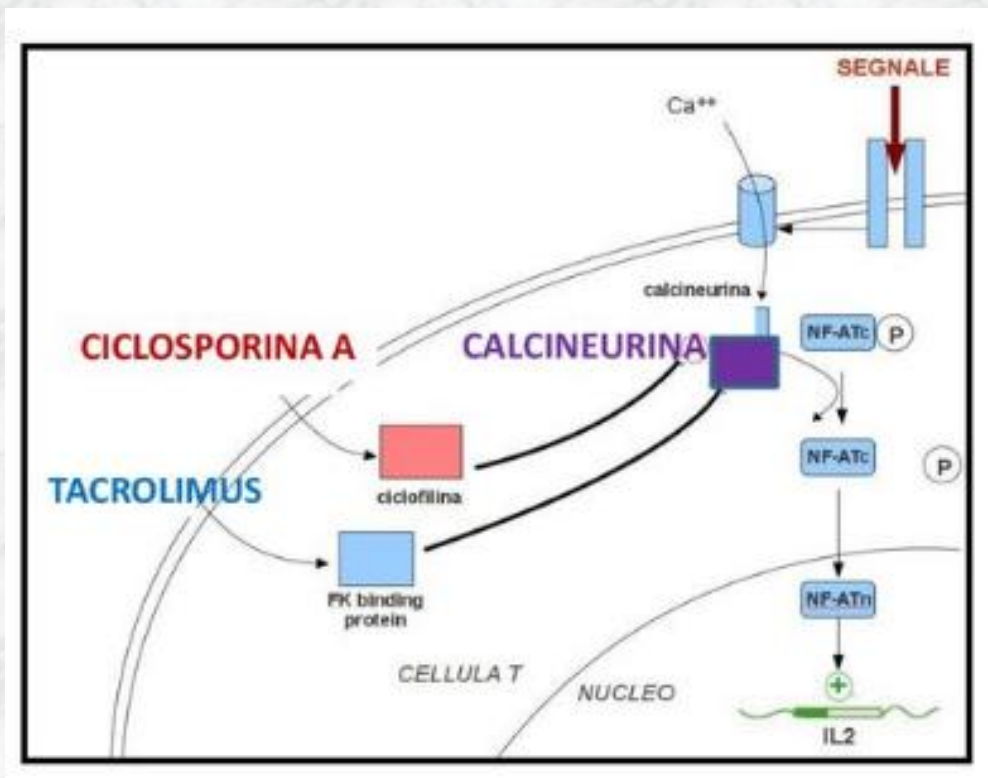
Ciclosporina come **farmaco immunosoppressivo** blocca l'induzione Calcio-dip. della **trascrizione di geni codificanti per le interleuchine** (come IL2 → importante per la risposta immune) **nei linfociti T**

L'antigene stimola la T cell a produrre secondi messaggeri come IP3, responsabile dei rapido aumento di calcio intracellulare → provoca l'attivazione di calcineurina (una fosfatasi calcio-calmodulina dipendente) che ha **diversi substrati tra cui il più importante è NF-AT** (*nuclear factor activated T-lymphocyte*)

NF-AT risiede nel citoplasma in forma fosforilata.

La sua defosforilazione ad opera di calcineurina gli consente di migrare nel nucleo → legarsi al suo sito di DNA sul gene per IL2 e attivarne la trascrizione.

La **ciclosporina**, interagendo con la calcineurina, previene l'attivazione di questo gene, arrestando la cascata di eventi che portano alla produzione di IL2.



- Altro effetto della ciclosporina è quello di **inibire un enzima rotamasi** → responsabile del corretto ripiegamento di alcune proteine.
- Altro effetto della ciclosporina è quello di interagire con **l'enzima immunofillina, che è una isomerasi**. Questa interazione sembrerebbe generare una conformazione altamente affine della ciclosporina alla calcineurina, andandola ad intrappolare.

(idee per nuovi farmaci)