

Farmacologia cellulare e molecolare

PR

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.

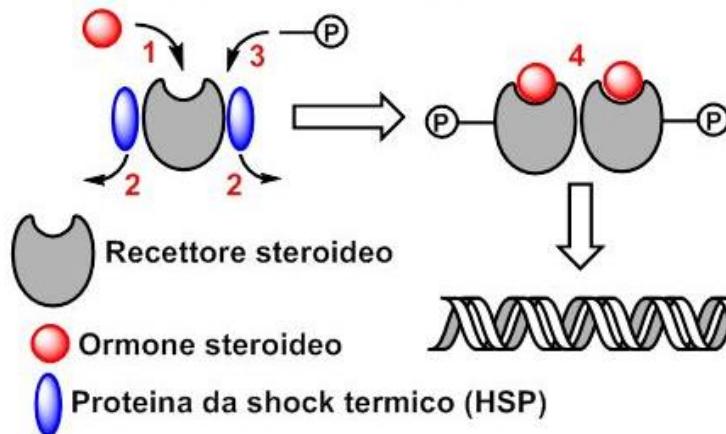
Recettori intracellulari

Gli ormoni steroidei, tiroidei, la vitamina D e l'acido retinoico (grazie alla struttura altamente lipofila che li caratterizza) sono in grado di attraversare passivamente la membrana cellulare e di interagire con specifici recettori localizzati a livello intracellulare

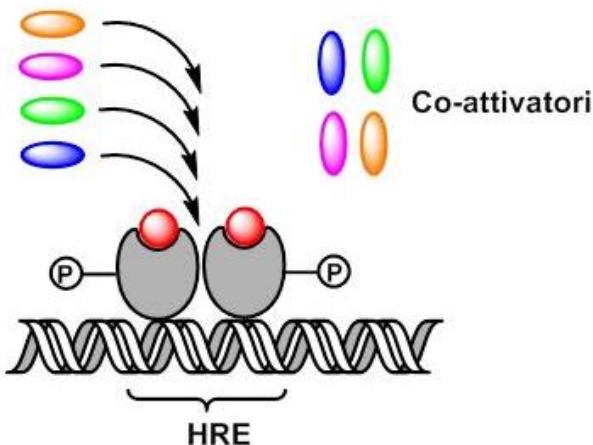
Il complesso ormone-recettore è in grado di riconoscere direttamente sequenze specifiche di DNA e di modulare la trascrizione di geni bersaglio.

L'attivazione di questi recettori comporta quindi modificazioni del corredo proteico della cellula e non è associata alla rapida e complessa cascata di eventi ionici e biochimici che invece caratterizza l'attivazione dei recettori di membrana

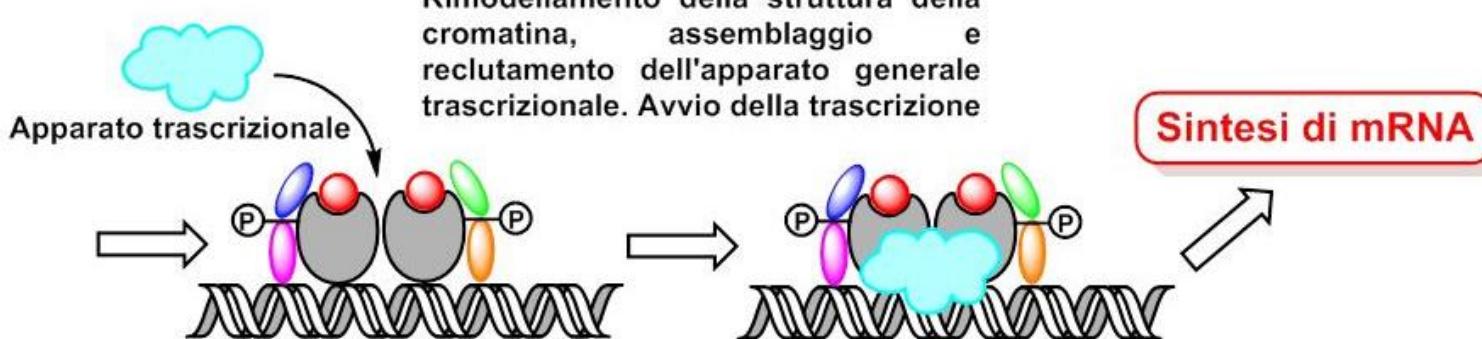
Forma monomerica inattiva legata alla proteina da shock termico. Legame con l'ormone (1), dissociazione della proteina da shock termico (2), fosforilazione (3), dimerizzazione (4)



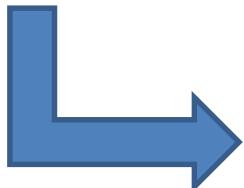
Legame con gli elementi di risposta dell'ormone (HRE) sul DNA e reclutamento a cascata di co-attivatori



Rimodellamento della struttura della cromatina, assemblaggio e reclutamento dell'apparato generale trascrizionale. Avvio della trascrizione



- **Negli anni '60 E. Jensen:** Il meccanismo di azione degli ormoni steroidei fu ipotizzato in seguito all'osservazione che estradiolo somministrato *in vivo* veniva rapidamente concentrato nel nucleo delle cellule degli organi bersaglio.



Lo **studio delle cinetiche di accumulo intracellulare dell'ormone radiomarcato e della comparsa**, a livello citoplasmatico, di proteine specifiche, rafforzò l'ipotesi che gli ormoni steroidei potessero regolare l'espressione genica.

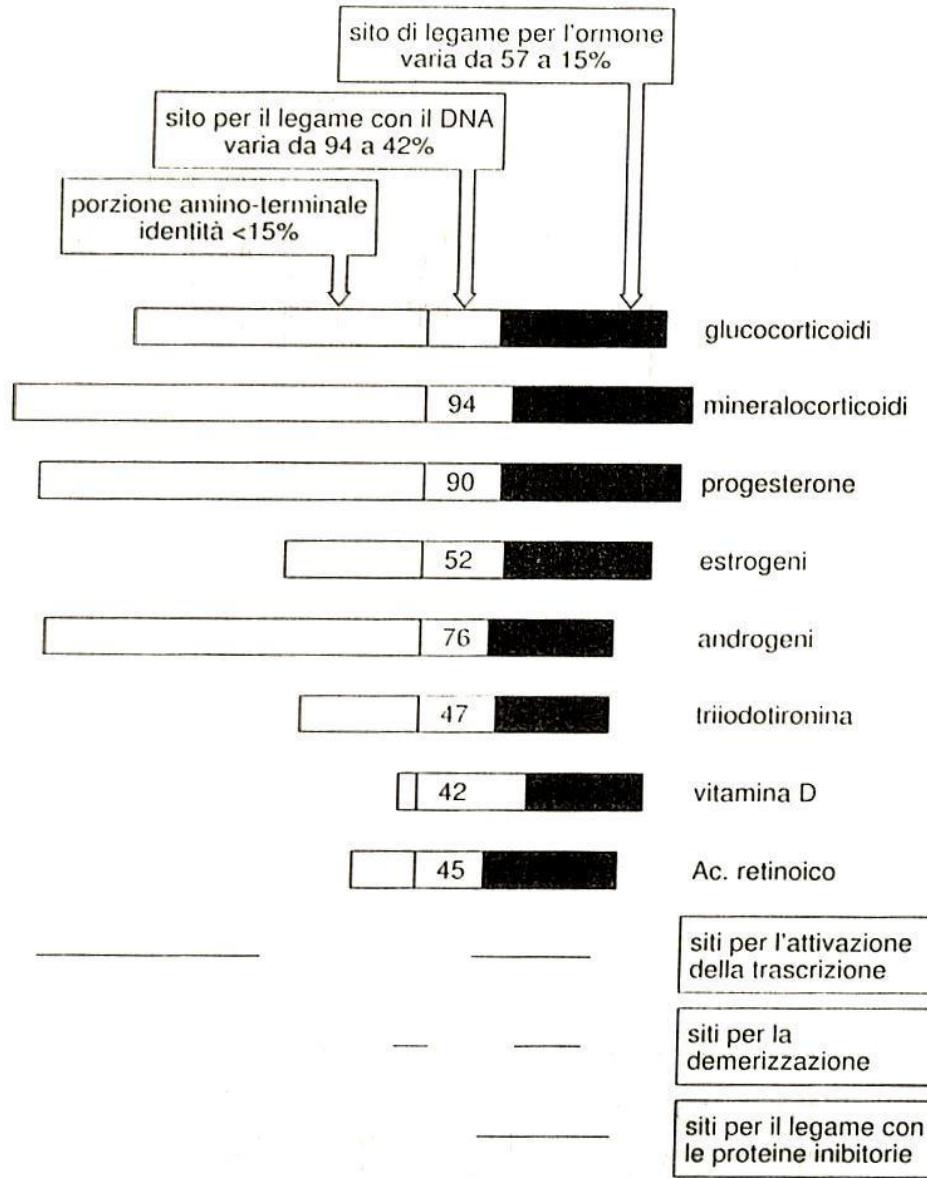
- **O'Malley e collaboratori:** i primi studi di purificazione dei recettori steroidei dimostrarono che il complesso recettore-ligando purificato aveva la capacità di legarsi con alta affinità a frammenti di DNA.

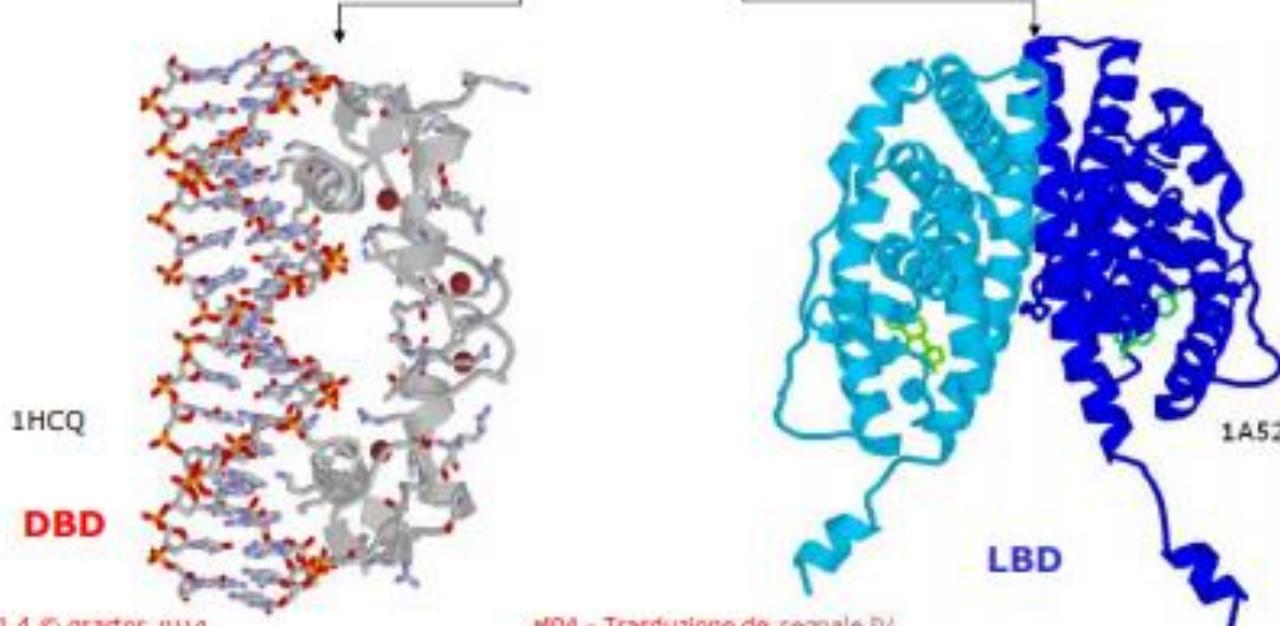
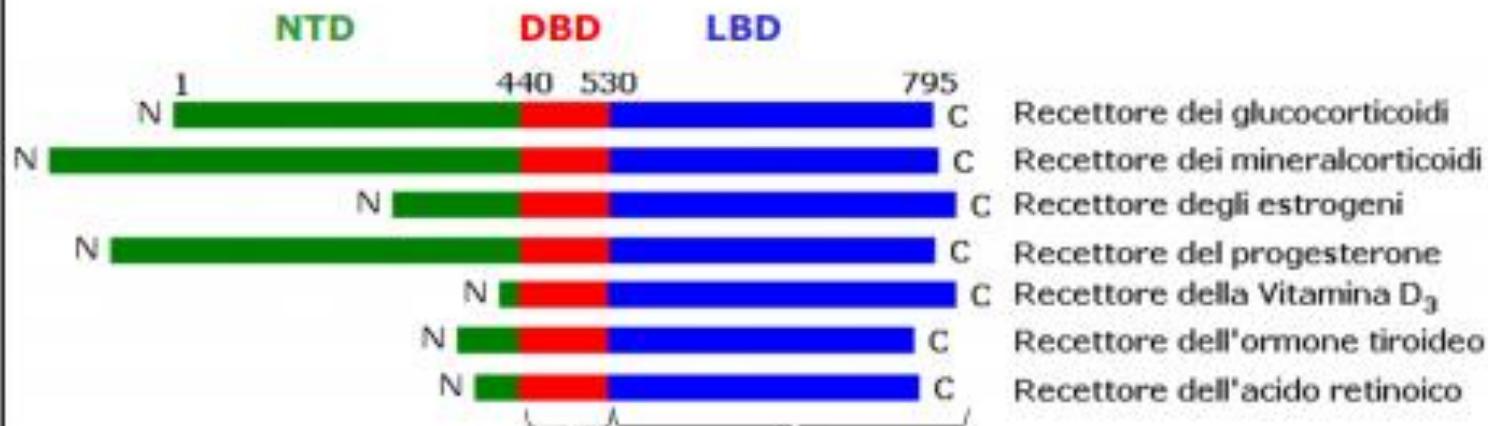
Studi di frazionamento cellulare: dimostrarono che alcuni recettori degli ormoni steroidei erano localizzati a livello citoplasmatico e che l'interazione con il ligando dovesse svolgere un ruolo fondamentale anche nel trasferimento del recettore stesso dal citoplasma al nucleo.

La correttezza dell'ipotesi di Jensen inizialmente oggetto di molte critiche, è stata provata solo recentemente mediante l'applicazione delle metodologie di DNA ricombinante che

→ hanno permesso la ricostruzione *in vitro* dei diversi passaggi necessari all'attivazione della trascrizione genica da parte di recettori citosolici, nonché l'isolamento dei geni codificanti per questi recettori e, di conseguenza, l'analisi dettagliata della relazione struttura-funzione di queste macromolecole.

Organizzazione strutturale e funzionale dei recettori intracellulari





La distribuzione intracellulare dei recettori è eterogenea:

- i recettori per **estrogeni, progesterone, ormoni tiroidei, vitamina D e acido retinoico** sono localizzati unicamente a livello nucleare,
- mentre i recettori per **mineral- e glucocorticoidi** sono citoplasmatici ed entrano nel compartimento nucleare quando legati al ligando.

(Le informazioni più dettagliate sugli eventi molecolari associati all'attivazione dei recettori intracellulari sono stati ottenuti da studi su recettori per gli ormoni steroidei)

Sequenza nucleotidica degli elementi responsivi dell'azione ormonale

A Classe	Reettore e sottotipi	Ligando	HRE	Dimeri
1	TR α, β	ormoni tiroidei	RGGTCA; Pal, DR-4, PI	E
	RAR α, β, γ	acido retinoico	AGTTCA; DR-2, DR-5	E
	PPAR α, β, γ	acidi grassi, PGJ ₂	AGGTCA; DR-1	E
	VDR	vitamina D ₃	RGKTCA; DR-3, PI-9	E
	LXR	ossisteroli	RGKTCA; DR-4	E
	FXR	acidi biliari	AGATCA; DR-4, IR-1	E
	SXR	steroidi, xenobiotici	RGKTCA; DR-3	E
2	CAR	fenobarbital, xenobiotici	RGKTCA; DR-3	E
	RXR α, β, γ	acido 9-cis retinoico	AGGTCA; Pal, DR-1	O, E
	COUP-TF α, β, γ	(sconosciuto)	RGGTCA; Pal, DR-5	O, E
3	HNF4		AGGTCA; DR-1, DR-2	O
	ER α, β	estrogeni	RGGTCA; Pal	O
	ERR 1,2	(sconosciuto)	TCAGGTCA; Pal, emiPal	M, O
	GR	glucocorticoidi	AGAACCA; Pal	O
	MR	aldosterone	AGAACCA; Pal	O
	PR	progesterone	AGAACCA; Pal	O
	AR	testosterone	AGAACCA; Pal	O

Hormon Responsive Elements = HRE o elementi responsivi all'ormone
sequenze palindromiche di DNA specifiche presenti nei promotori dei geni bersaglio

Caratteristiche molecolari dei recettori intracellulari:

- 400-1000 aa
- la loro struttura presenta 3 regioni:

N-terminale = dominio di transattivazione

C-terminale = la presenza di aa idrofobici forma una tasca per il legame con l'ormone, anche in questa regione ci sono molte analogie tra recettori della stessa famiglia

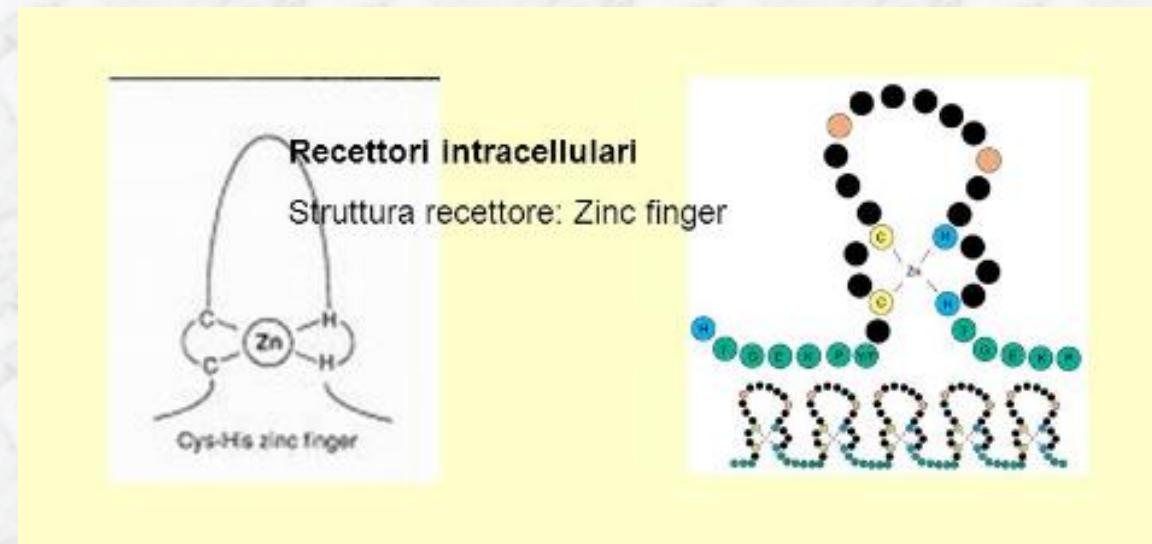
Regione centrale = per il legame con il DNA, altamente conservata composta da circa 70 aa in prevalenza basici, che facilitano il legame con il DNA.

Le diversità, se pur lievi, della sequenza di questa regione sono alla base della specificità del legame con le sequenze HRE del DNA nel promotore del gene bersaglio.

ORGANIZZAZIONE MOLECOLARE DEI RECETTORI INTRACELLULARI

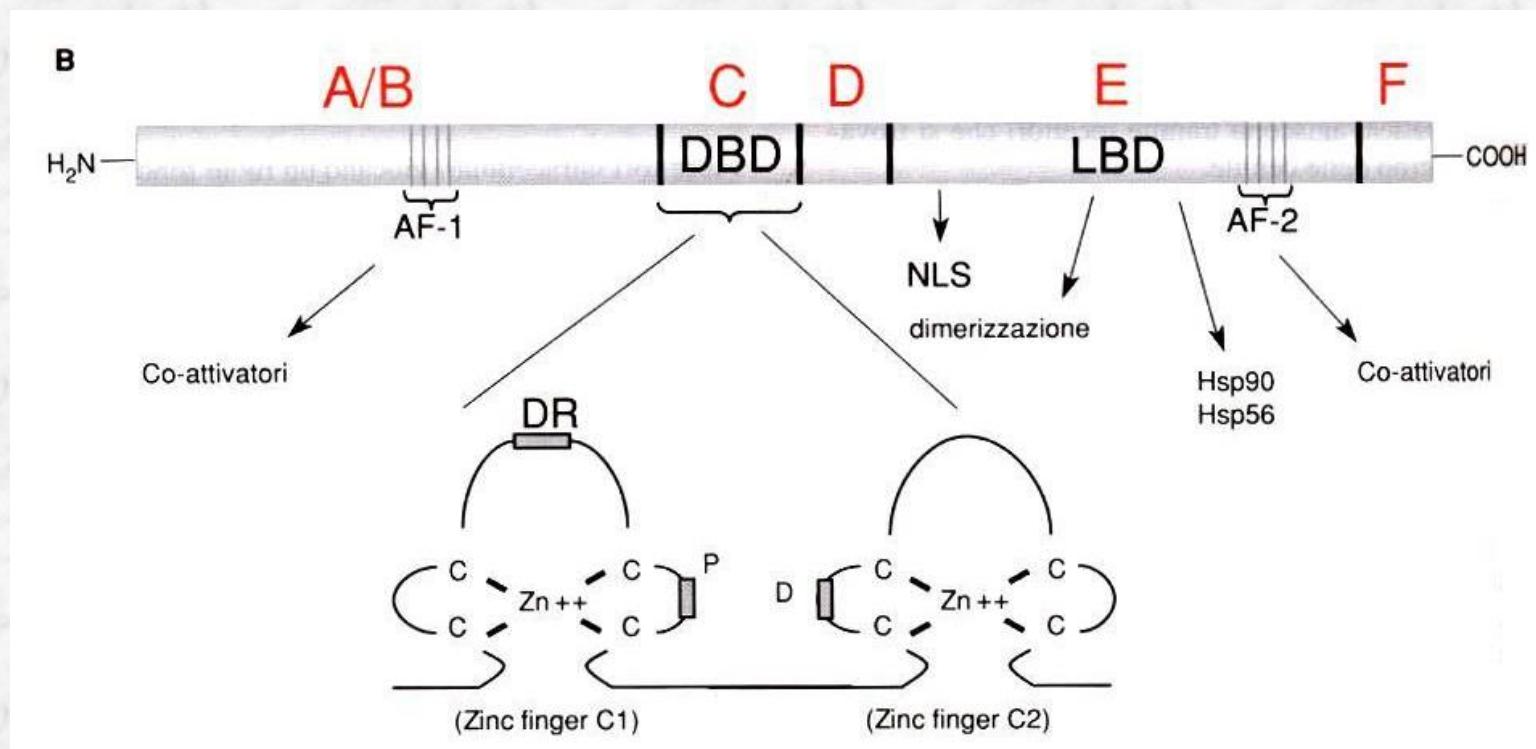
Si dice che questi recettori contengono nella porzione centrale dei “lacci di aminoacidi che sono delle cisteine e delle istidine, che formano legami di coordinazione con atomi di Zinco.

La presenza di **molte cisteine** stabilizza la proteina recettoriale in una conformazione spaziale “a dita” denominata → **“Zinc finger”**



ORGANIZZAZIONE MOLECOLARE DEI RECETTORI INTRACELLULARI

Rappresentazione schematica della struttura dei recettori intracellulari – Struttura “a dita” *zinc finger*

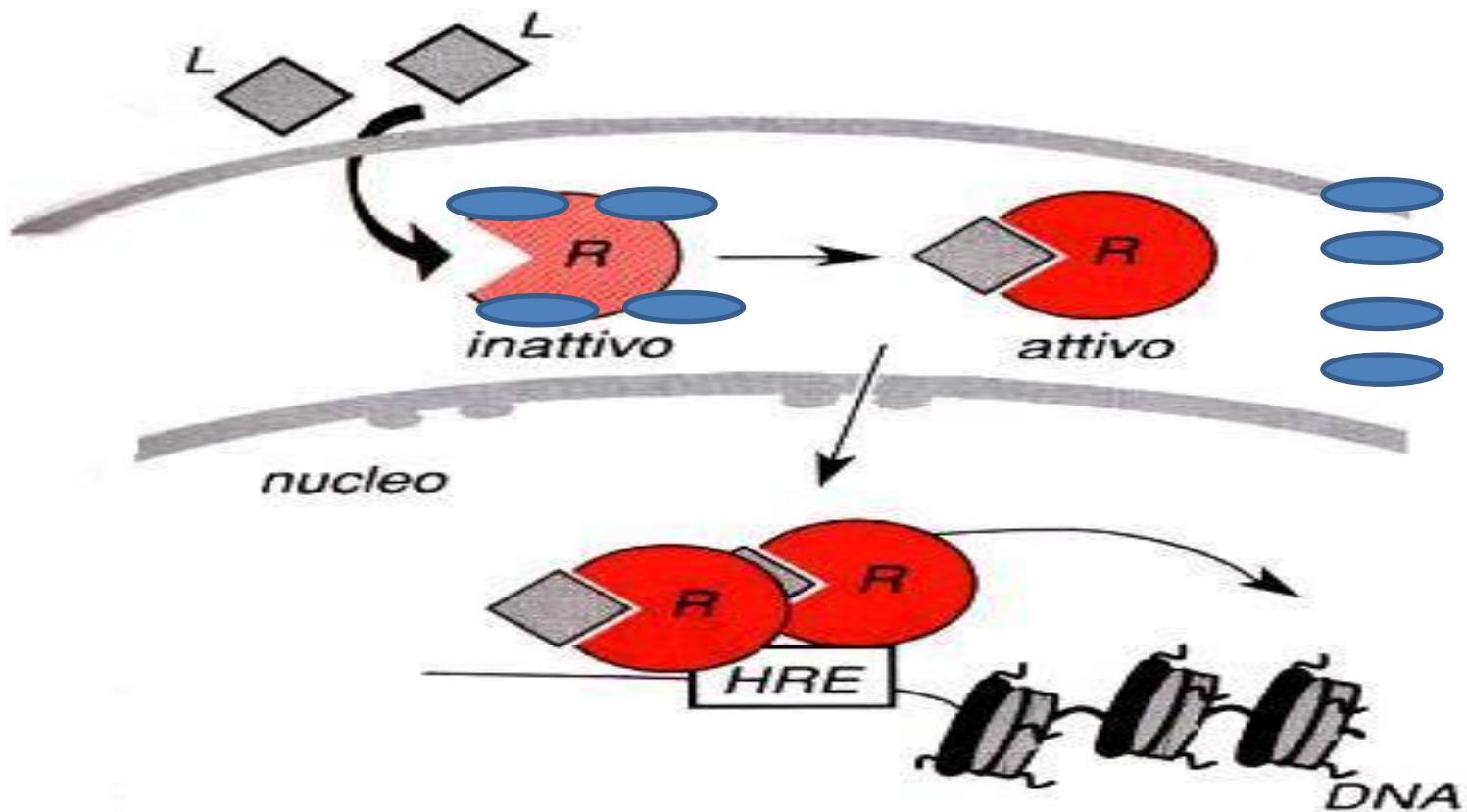


1- Attivazione recettoriale dipendente dal ligando

In generale, l'interazione con il proprio ligando comporta modificazioni biochimiche e conformazionali del recettore intracellulare che ne determinano l'attivazione.

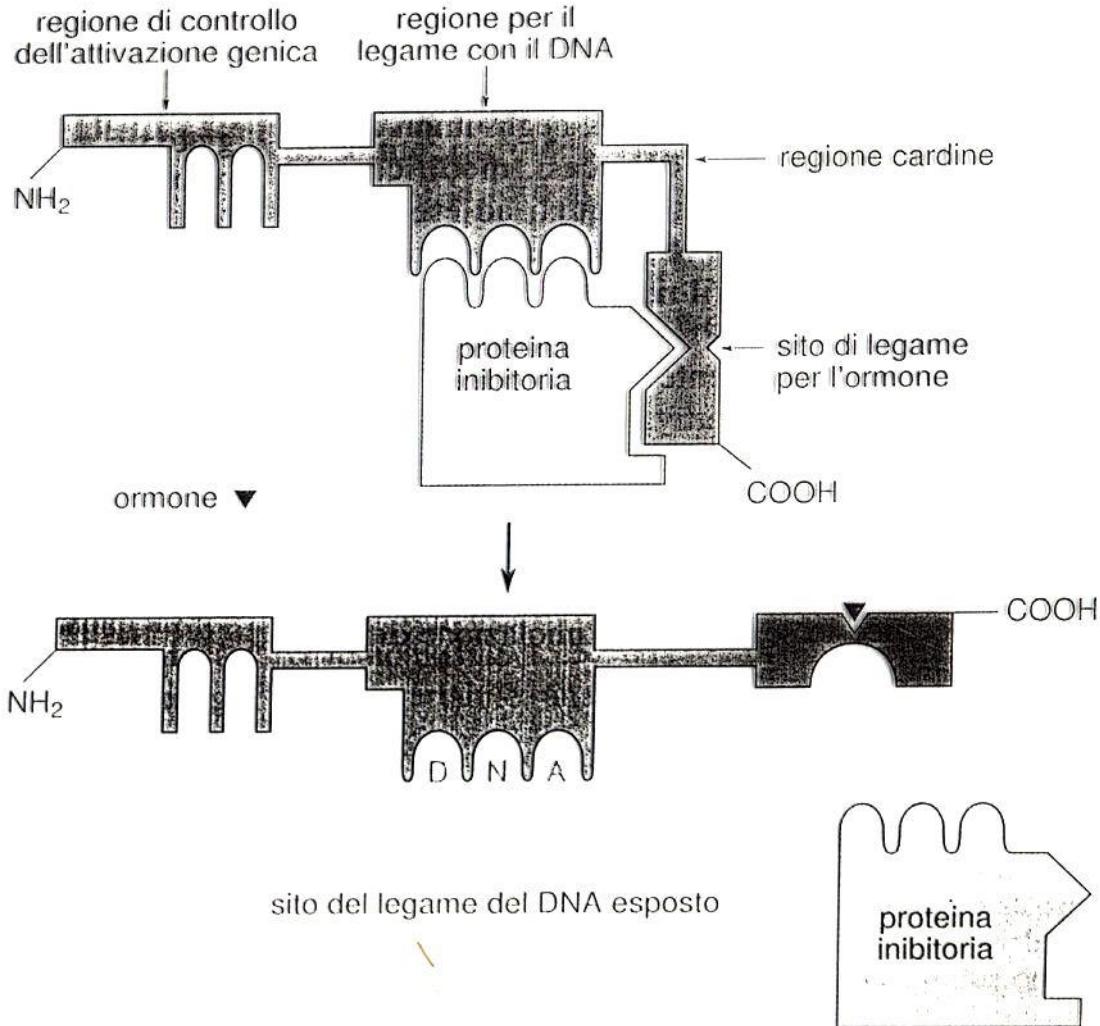
Il legame dell'ormone su un sito specifico del recettore:

- provoca modificazioni conformazionali che alterano la struttura chimico-fisica della molecola recettoriale che consentono al recettore di dissociarsi da complessi proteici inibitori (Hsp) a cui è normalmente legato
- fosforilazioni del recettore operate da una serie di *chinasi* la cui attività sembra dipendere dalla formazione del complesso ormone-recettore.
- Il recettore dimerizza ed interagire con sequenza specifiche nel genoma della cellula bersaglio per intervenire nella regolazione della trascrizione di geni specifici.



modello classico

Modello di attivazione di recettori steroidei

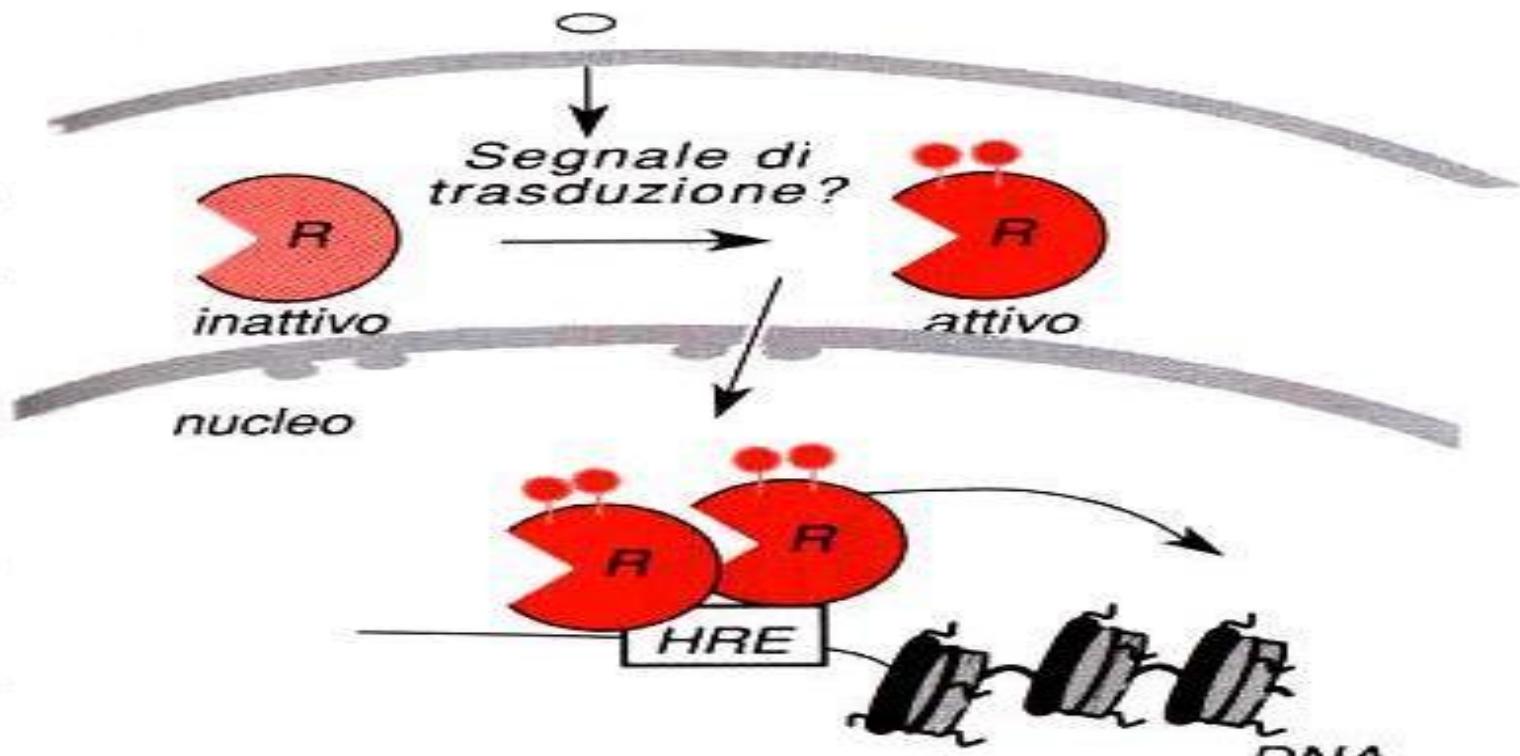


Le regioni che mediano l'interazione con le proteine inibitorie sono in parte nella porzione centrale e in parte nella C-terminale.

Inoltre nelle stesse aree vi sono le sequenze responsabili della dimerizzazione

(il fenomeno della dimerizzazione aumenta l'affinità per il DNA)

2- Attivazione indipendente dal ligando



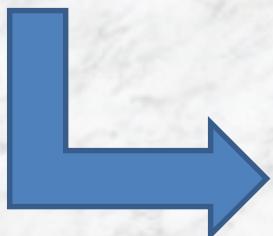
*modello di attivazione
indipendente dal ligando*

Negli ultimi anni è stato dimostrato che, in alcuni casi, **modificazioni post-trasduzionali del recettore quali ad esempio la fosforilazione**, ne possono mediare l'attivazione.

Es. 1 è stato dimostrato che i recettori del progesterone, degli estrogeni, degli ormoni tiroidei e per alcuni recettori orfani, vengono **attivati anche in assenza del ligando specifico** in seguito alla stimolazione di recettori dopaminergici → fosforilazione come risultato di una cascata di eventi che inizia con la stimolazione di recettori di membrana, la produzione di secondi messaggeri e attivazione di proteine chinasi!

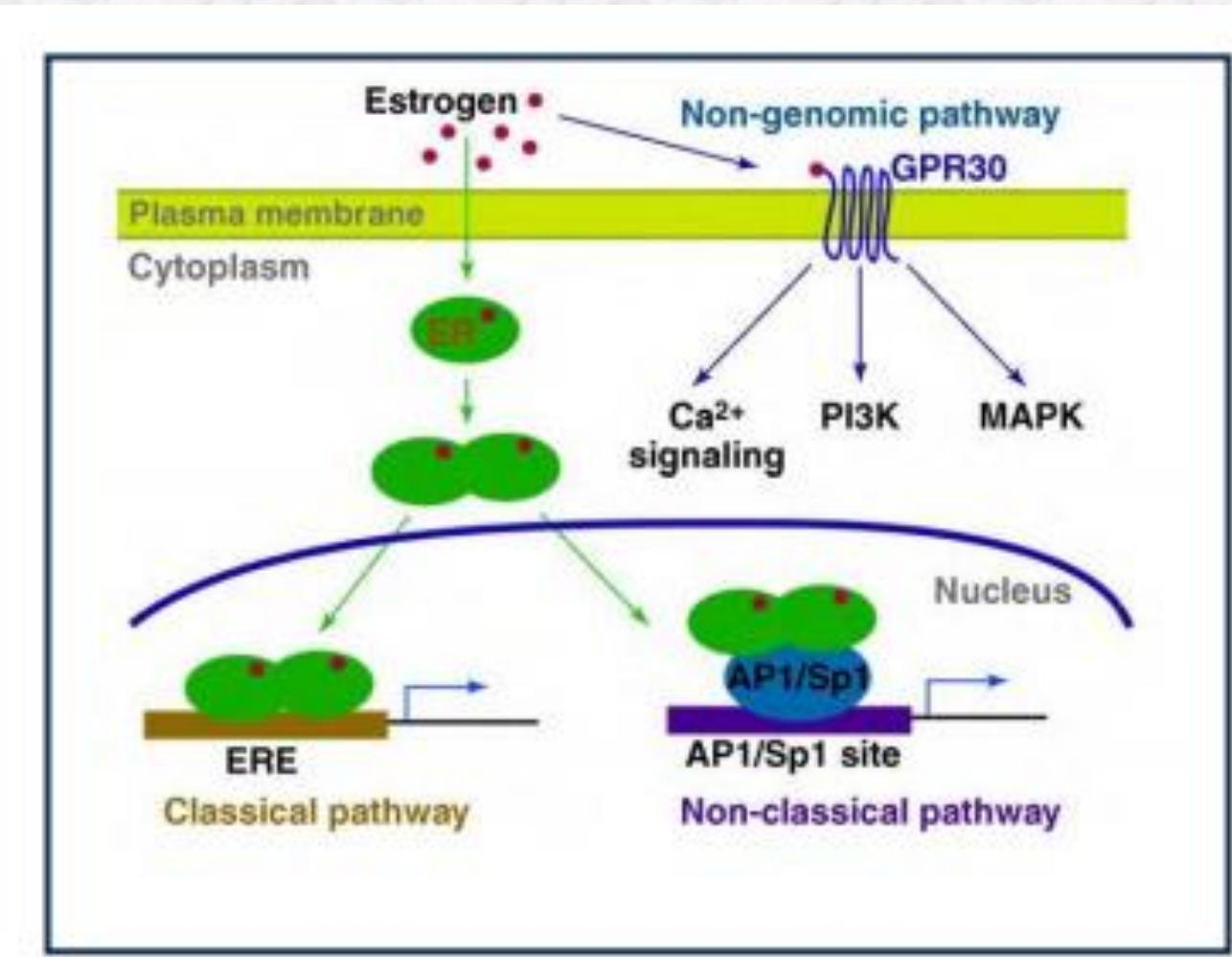
L'identificazione di questo nuovo meccanismo di attivazione dei recettori intracellulari si offre ad alcune considerazioni di carattere generale

Di recente scoperta è proprio l'esistenza di una connessione tra i recettori per i fattori di crescita, quali il fattore di crescita epidermico (o EGF), il fattore di crescita tumorale (o TGF) e il fattore di crescita insulino-simile I (o IGF-I)



e il recettore degli estrogeni che verrebbe attivato indirettamente da questi peptidi tramite l'azione delle protein-chinasi A e C o dalla cascata di fosforilazioni determinate dall'attivazione della proteina RAS.

Il recettore GPCR-30 potrebbe avere un ruolo significativo nella proliferazione delle forme di carcinoma mammario che non esprimono il recettore per gli estrogeni



Si ritiene che i complessi ormone-recettore:

- interagiscano anche con i diversi componenti del complesso di inizio *aumentando o rallentando* la velocità e l'efficienza di trascrizione.
- si deve poi aggiungere che i recettori intracellulari **sono controllati** a loro volta, **da elementi regolatori** posti sul *promotore* del gene che possono modulare e quindi interferire sull'effetto finale di espressione genica di un gene bersaglio dell'azione ormonale.

RECETTORI CHIMERICI

Al recettore per gli estrogeni sostituendo la regione di interazione con il DNA con quella del recettore per i glucocorticoidi

→ si forma un recettore che si attiva solo con gli estrogeni, ma regola solo i geni bersaglio dei glucocorticoidi.

Modulazione farmacologica dei recettori intracellulari

TERAPIA farmacologica di disfunzioni endocrine :

- 1) può regolare **l'insorgenza del segnale endocrino** (*per azione sulla sintesi, storage e release di un ormone*)
- 2) può regolare **la sensibilità dei tessuti al segnale ormonale** (*per azione sulla sintesi del recettore*)

I primi due non alterano l'attività del recettore, ma modulano i sistemi biologici deputati al controllo del sistema.

- 3) può regolare **la funzionalità di un recettore intracellulare** (*con l'impiego di agonisti e antagonisti recettoriali diretti*)

(terapie sostitutive per carenza ormonale per diete, per fisiologia o per patologia)

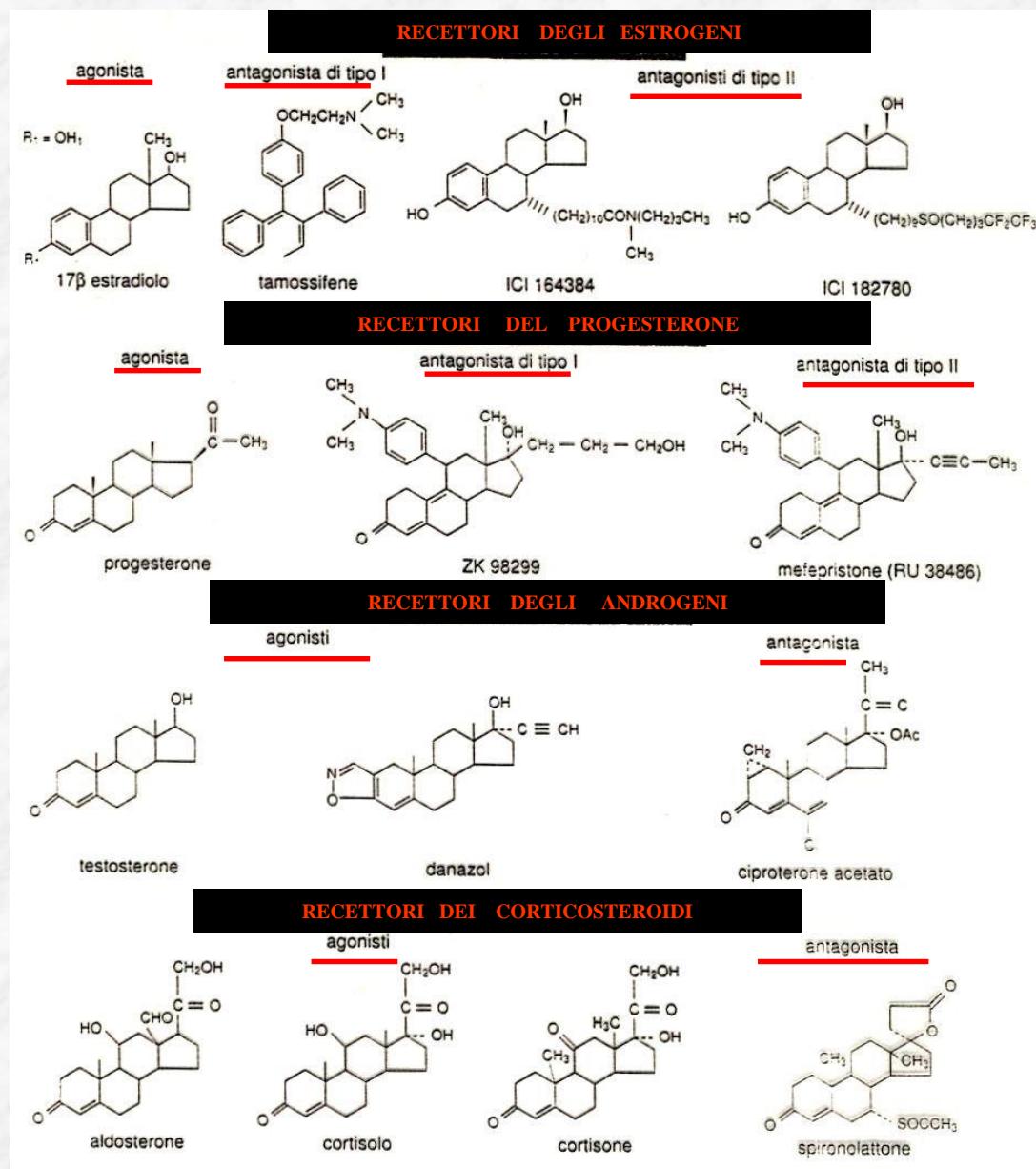
Modulazione farmacologica dei recettori intracellulari

Gli antagonisti = *bloccano il recettore*, possono essere sia antagonisti che agonisti parziali

Tale blocco si esplica con due meccanismi:

- **antagonisti di tipo I**: il complesso recettore-antagonista non è in grado di legare il DNA e si osserva un'alterazione della capacità di dimerizzazione e di interazione del R con la sequenza di DNA.
- **antagonisti di tipo II**: permettono l'interazione recettore-DNA, ma il complesso ha una conformazione tale da non attivare l'apparato di trascrizione.
- **dimeri eterogenei** = *induzione di risposta negativa sull'attivazione della trascrizione* → nuovi farmaci potenziali ad azione diretta

Struttura chimica di agonisti ed antagonisti dei recettori di ormoni steroidei di largo impiego



RECEPATORI DEGLI ESTROGENI

- 17β estradiolo: menopausa come terapia sostitutiva;
- Tamoxifene: antitumorale per cancro al seno;

RECEPATORI DEL PROGESTERONE

- Progesterone: utilizzato come anticoncezionale e nella terapia ormonale sostitutiva;
- Mifepristone: bloccando gli effetti del progesterone interrompe la gravidanza

Es. antiprogestinici, con effetti indesiderati per contemporanea affinità anche per il R dei glucocorticoidi

REGOLAZIONE dei LIVELLI di RECETTORI

→ La **desensitizzazione** dei recettori di membrana non è stata osservata chiaramente per quelli intracellulari

MA = è stata osservata comunque una riduzione dell'emivita dei recettori steroidi legati al proprio ligando, o anche una riduzione dei livelli di mRNA per i recettori sottoposti a iperstimolazione da ormone (down-regulation).

(esistono modulazioni incrociate tra recettori simili, esempio il ER attivato induce la sintesi del PR, mentre il PR induce un'inibizione dei livelli di mRNA per ER)

SPECIFICITA' D'AZIONE

ESISTONO TRE MECCANISMI PRINCIPALI

- 1) TROPISMO DIFFERENZIALE TESSUTO SPECIFICO**
recettore per glucocorticoidi molto simile a quello per il progesterone ma presenti in cellule differenti → per cui il ligando non può esplicare lo stesso effetto perché non c'è uno dei due recettori.
- 2) METABOLISMO TESSUTO-SPECIFICO** ormoni steroidei vengono **metabolizzati** in modo diverso a seconda della cellula in cui sono. Tale metabolismo regola la concentrazione di recettore intracellulare e dell'ormone tissutale.
- 3) INTERAZIONE PREFERENZIALE CON ALTRE PROTEINE** che modulano la trascrizione genica e che possono essere espresse in modo tessuto-specifico.



Nel loro insieme questi meccanismi fanno sì
che **ormoni diversi** interagendo con
recettori simili esplichino effetti **distinti**