

# **I RECETTORI PER NEUROTRASMETTITORI E ORMONI: CARATTERISTICHE GENERALI**

I Recettori per neurotrasmettitori e ormoni (per ligandi endogeni) si distinguono in base alla loro localizzazione subcellulare in:

## **RECETTORI DI MEMBRANA E RECETTORI INTRACELLULARI**

I recettori di membrana vengono suddivisi in base al loro meccanismo di trasduzione del segnale portato dal primo messaggero (neurotrasmettitore, ormone, ecc) e in base alla struttura molecolare che sottende il modo di funzionare del recettore stesso

Le classi di recettori di membrana che più interessano dal punto di vista farmacologico sono i recettori-canale e i recettori accoppiati a proteine G

I recettori-canale agiscono modificando rapidamente la concentrazione ionica intracellulare e il potenziale transmembrana

I recettori a proteine G agiscono per lo più attivando cascate enzimatiche che portano alla produzione di II messaggeri e attivazione di chinasi (enzimi che fosforilano): l'effetto biologico di questi recettori è per lo più legato al cambiamento dell'attività di proteine una volta fosforilate. I secondi messaggeri più studiati sono il ciclico-AMP e lo ione calcio.

La stimolazione prolungata di un recettore porta a desensitizzazione (perdita della capacità di rispondere all'agonista) e/o riduzione del numero di recettori presenti sulla membrana plasmatica (downregulation)

L'assenza di stimolazione (ad esempio causata dal trattamento cronico con un antagonista) può portare ad aumento del numero di recettori sulla superficie cellulare (upregulation) e conseguente aumento della sensibilità della cellula all'azione dell'agonista endogeno (per maggiori informazioni sulla regolazione delle risposte recettoriali, vedi estratto "Fumagalli")

I recettori intracellulari sono attivati da ormoni liposolubili (corticosteroidi, ormoni sessuali, tiroidei, vitamina D, ecc). L'attivazione di questi recettori porta alla loro interazione con sequenze specifiche del DNA, a modulazione della trascrizione genica e modificazioni del tipo o del numero di proteine contenute in una cellula responsiva

**Estratto da**

**I RECETTORI**

Francesco Clementi

Dipartimento di Farmacologia, Chemioterapia e Tossicologia Medica, Università degli Studi di Milano

**Da: Farmacologia Generale e Molecolare, di Clementi e Fumagalli, UTET**

## 5

# I RECETTORI

Francesco Clementi

Per potersi adattare alla variazione dell'ambiente in modo coordinato con il resto dell'organismo o svolgere funzioni specifiche di entità e durata controllata, occorre che le cellule possano comunicare tra loro. Quando le cellule sono distanti tra loro, la comunicazione avviene attraverso molecole, chiamate *mediatori* o *trasmettitori* o *ormoni*, capaci di diffondere dal sito di produzione e di legare in modo specifico macromolecole proteiche presenti nella cellula ricevente, chiamate *recettori*. Il recettore è non solo capace di riconoscere e legare il messaggero ma anche, attraverso una modifica della sua struttura, di generare una risposta cellulare.

Molti dei farmaci attualmente in uso agiscono attraverso la interazione con un recettore per mediatore endogeno: la loro attività è non solo funzione del numero di recettori da essi legati, ma anche delle proprietà biologiche, della regolazione funzionale, della distribuzione tissutale e delle modificazioni patologiche di questi ultimi. La conoscenza dei recettori e delle loro interazioni con ormoni, neurotrasmettitori o farmaci fornisce la chiave di volta per la comprensione della moderna farmacologia.

### *La storia dei recettori è recente*

La prima ipotesi di recettore (*Receptive Substance*) è posta da John Langley, attorno al 1880, in base ai suoi esperimenti eseguiti sul sistema autonomo del gatto nel quale aveva scoperto l'antagonismo tra nicotina e curaro. Contemporaneamente Paul Ehrlich arrivava alle stesse ipotesi studiando un sistema diverso e più semplice quale le interazioni tra tossine-antitossine e tra coloranti e batteri. A lui si deve la famosa frase «*corpora non agunt nisi fixata*». Negli anni '20 si ebbero poi le ricerche di H. Dale in Inghilterra e di O. Loewi in Germania sui mediatori chimici e sui loro effetti biologici, spiegati dall'ipote-

si dell'esistenza di recettori diversi e specifici. Di quel periodo è anche l'introduzione da parte di A. Clark della legge di massa che diede una prima spiegazione modellistica della interazione tra farmaco e recettore (v. anche il Cap. 4). Negli anni '40 e '50 vi è il trionfo della chimica farmaceutica che, attraverso fini modifiche della struttura chimica dei mediatori o dei loro agonisti ed antagonisti, porta alla definizione di alcune delle caratteristiche del sito di legame di molti recettori e fornisce la base per un disegno logico e non casuale di farmaci; è in questo periodo che dai laboratori di Furneaux a Parigi prima e di Daniel Bovet poi nascono i sulfamidici, gli anestetici locali, i curari, gli antistaminici. Ma il grande progresso nello studio dei recettori è stato possibile solo con l'aiuto della biologia molecolare. Nel 1982 Numa, in Giappone, clonava dall'organo elettrico della Torpedine il recettore colinergico nicotinico e da quel momento una nuova prospettiva si apriva nella comprensione di queste molecole. Come risulterà chiaro leggendo i capitoli successivi, la maggioranza dei recettori sono stati clonati; di essi si conosce la struttura molecolare, i punti essenziali per la interazione con i farmaci e con le molecole effettrici, i meccanismi della trasduzione del segnale ed i meccanismi con i quali le cellule regolano il numero di recettori attivi alla loro superficie.

La possibilità di conoscere la struttura dei recettori ci permette di dividerli non più soltanto in base ai farmaci per i quali essi sono affini ma in base alla loro struttura primaria. Si assiste così alla graduale sostituzione di una nomenclatura basata sugli effetti o sulla sensibilità ai farmaci con una basata sulla struttura. Un dato assai importante che è emerso dagli studi di biologia molecolare è che ogni recettore è presente in molti sottotipi, ciascuno con diverse caratteristiche biofisiche e farmacologiche, ed essi sono più numerosi di quanto supposto prima osservando solo gli effetti della attivazione recettoriale e le caratteristiche di

legame dei farmaci. Questo significa che la modulazione delle singole risposte esercitata attraverso i recettori è molto fine, si potrebbe dire "personalizzata" per ogni cellula. Tuttavia una spiegazione esauriente di questo fatto e del suo significato biologico non sempre è stata trovata e volta per volta se ne accennerà nei vari capitoli.

## CLASSI DI RECETTORI

Prenderemo qui in considerazione i recettori per sostanze modulatorie endogene: in questo contesto per *recettore* si intende una molecola che lega in modo specifico, definito e con affinità precisa uno o più mediatori endogeni e che da questo legame subisce una trasformazione conformazionale capace di far scaturire un effetto biologico. Non è quindi sufficiente che una proteina leghi un ormone od un neurotrasmettitore per definirla un recettore: ad es. l'albumina, che lega gli acidi grassi, o la ceruloplasmina, che lega il rame, non sono, in questo contesto, recettori.

In base alla loro localizzazione subcellulare, i recettori si dividono in due grandi classi: recettori di membrana e recettori intracellulari. I primi trasducono il segnale portato da mediatori idrofilici che difficilmente passano la membrana cellulare (neurotrasmettitori classici e peptidici, fattori di crescita, citochine, ecc.); i secondi invece trasducono il segnale portato da ormoni e altri mediatori lipofilici che diffondono facilmente attraverso le membrane cellulari (ormoni steroidei e tiroidei, acido retinoico, vitamina D, ecc.).

Le due classi di recettori differiscono anche per il meccanismo di trasduzione del segnale. I recettori di membrana trasducono il segnale generando modificazioni biofisiche oppure attraverso la generazione di 2° messaggeri. I recettori intracellulari interagiscono con tratti specifici del genoma, inducendo modificazioni dell'espressione genica e quindi della composizione proteica della cellula.

## Recettori intracellulari

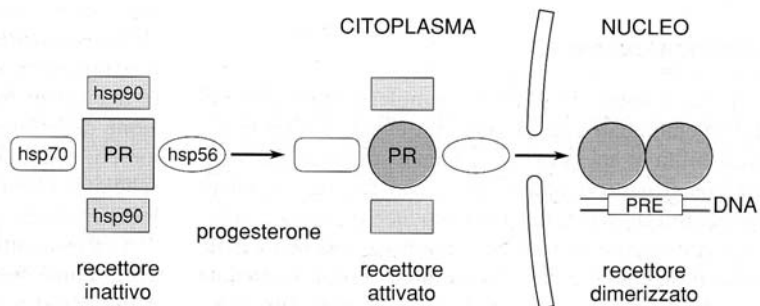
A questa famiglia appartengono i recettori per gli steroidi, per la tirossina, per le vitamine A e D e per fattori di differenziamento quali gli acidi retinoici. Essi sono proteine citosolubili capaci di legare il DNA e di regolare la trascrizione di geni specifici. Questi recettori sono molto simili tra loro dal punto di vista strutturale essendo composti da una singola catena polipeptidica in cui si riconoscono tre territori: uno al terminale carbossilico, dove risiede il sito di legame specifico per l'ormone, uno centrale nel quale vi è il sito di riconoscimento per sequenze specifiche di DNA, il terzo al terminale amminico che è essenziale per la specificità d'azione a livello di transattivazione. In assenza di ligando, il recettore può essere presente nel citoplasma o nel nucleo in forma inattiva; lo stato quiescente è mantenuto dall'interazione con proteine inibitorie specifiche, per lo più della classe delle *heat shock proteins* (hsp). Il legame dell'ormone, o di un farmaco agonista, produce un cambiamento conformazionale tale da dissociare il recettore dalle heat shock proteins; liberato dall'inibizione il recettore dimerizza e, se nel citoplasma, si trasferisce nel nucleo. Qui si associa a sequenze specifiche, dette *responsive elements*, presenti nei promotori dei geni sensibili all'ormone la cui trascrizione viene così regolata (Fig. 5.1). I farmaci analoghi degli ormoni steroidei, sia agonisti che antagonisti, agiscono interferendo con l'attivazione recettoriale che inizia questo meccanismo di trasduzione del segnale (per una descrizione più dettagliata vedi i Capp. 19 e 20).

## Recettori di membrana

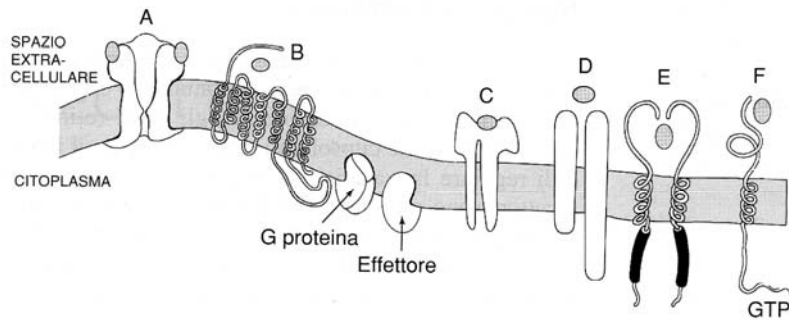
### Sei superfamiglie recettoriali

I recettori di membrana si possono raggruppare in sei grandi famiglie composta ciascuna da numerosi membri: recettori-canale, recettori accoppiati alle proteine G, recettori dotati di attività tirosin chinasi

**Fig. 5.1.** Schema del meccanismo di trasduzione del segnale dei recettori per gli ormoni steroidei. In questo esempio il recettore per il progesterone (PR) è associato con tre *heat-shock proteins* (hsp) ed è inattivo. Quando il progesterone si lega al recettore, esso cambia conformazione, si dissocia dalle HSP, dimerizza ed è quindi trasportato nel nucleo. Qui interagisce con sequenze specifiche di DNA, dette *progesteron-responsing element* (PRE) presenti nel promotore di geni sensibili al progesterone. In tal modo viene attivata la trascrizione del gene.







**Fig. 5.2.** Schema che illustra le varie famiglie di recettori di membrana. **A)** Canali ionici aperti dal legame con il neurotrasmettitore. **B)** Recettori accoppiati a proteine G con la caratteristica struttura a sette zone transmembranaie. **C)** Recettori per la matrice extracellulare (integrine). **D)** Recettori per le citochine. **E)** Recettori che possiedono attività protein chinasi intrinseca (cilindri neri) che fosforila residui aminoacidici tirosinici. **F)** Recettori che possiedono una attività guanilato ciclasi intrinseca. Il simbolo colorato rappresenta il ligando.

intrinseca, recettori dotati di attività guanilato ciclasi intrinseca, recettori per l'adesione cellulare e recettori per le citochine (Fig. 5.2).

La stimolazione da parte di un neurotrasmettitore di un tipo di recettore rispetto ad un altro non è evento indifferente. Come vedremo più avanti l'apertura di un canale comporta una trasduzione del segnale molto rapida, mentre l'attivazione di una proteina G o di una protein chinasi porta a una risposta più lunga e più lenta. Quasi tutti i neurotrasmettitori possono attivare sia recettori-canali che recettori accoppiati a proteine G (Tab. 5.1) e indurre quindi nella cellula bersaglio risposte rapide o lente. È quindi importante conoscere quali tipi recettoriali siano presenti in una cellula per prevedere quale sarà la sua risposta ad un determinato neurotrasmettitore o farmaco.

**Tab. 5.1.** Neurotrasmettitori con recettori a trasduzione del segnale veloce e lenta.

Neurotrasmettitore	Risposta veloce	Risposta lenta
Acetilcolina	Nicotinici	Muscarinici
GABA	GABA <sub>A</sub>	GABA <sub>B</sub>
Glutammato	Ionotropi	Metabotropi
Serotonina	5-HT <sub>3</sub>	5-HT <sub>1,2,4,5</sub>
ATP	P <sub>2x</sub>	P <sub>2y</sub>

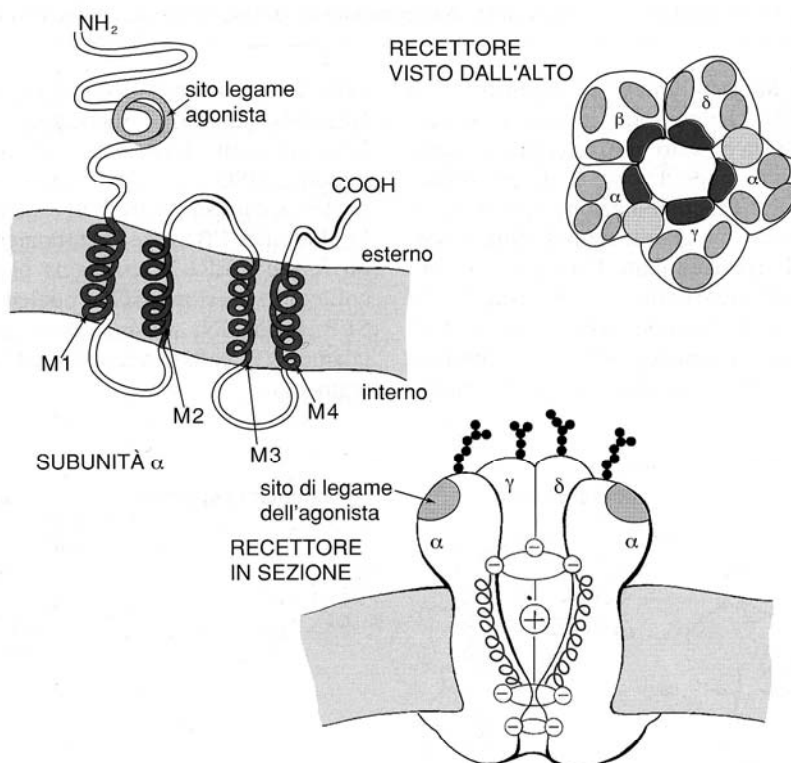
### Recettori-canale

I recettori-canale sono dei complessi macroproteici transmembranari che formano un canale ionico la cui probabilità di apertura è fortemente stimolata dal legame con il neurotrasmettitore o con farmaci agonisti. L'apertura di questi recettori produce un'entrata veloce e consistente di ioni con rapidi cambiamenti delle concentrazioni ioniche intracellulari e del potenziale elettrico transmembranario. A questa famiglia

appartengono i recettori nicotinici, il recettore GABA<sub>A</sub> per il GABA, il recettore per la glicina, i recettori ionotropi per il glutammato, il recettore 5-HT<sub>3</sub> per la serotonina, i recettori P<sub>2x</sub> per le purine. Essi hanno tutti una struttura simile: sono composti da 4 o 5 subunità che delimitano un canale idrofilico attraverso il quale passano gli ioni (Fig. 5.3). Ogni subunità è formata da una catena polipeptidica che attraversa almeno quattro volte la membrana plasmatica in corrispondenza di altrettante regioni ricche di aminoacidi idrofobici (regioni chiamate M). Il canale è delimitato dalle regioni M2 di ciascuna subunità. La selettività della carica ionica che attraversa il canale è data dalla presenza di aminoacidi elettricamente carichi posti in posizione tale da costituire degli anelli di carica positiva o negativa all'interno del canale.

Il sito di legame per il neurotrasmettitore o per i farmaci è posto in un sito all'esterno della membrana cellulare; generalmente esso è localizzato principalmente su una delle subunità che costituiscono il recettore-canale (la  $\alpha$ , per es. nel recettore nicotinic), ma alla sua formazione contribuiscono anche piccole porzioni delle subunità adiacenti (per es. la  $\beta$  nel recettore nicotinic). Spesso la parte contribuita dalla subunità adiacente ne precisa le caratteristiche di specificità di legame ai farmaci. Per es. la proprietà di legame di farmaci colinergici nei recettori neuronali  $\alpha_3\beta_4$  è diversa da quella di  $\alpha_3\beta_2$ . Sulla superficie extracellulare del recettore sono spesso presenti siti di legame per altre sostanze regolatrici, detti *siti allosterici*, in quanto la loro occupazione modifica le caratteristiche di attivazione recettoriale da parte dell'agonista principale. Nella parte citoplasmatica i recettori possono contenere dei siti di fosforilazione, importanti per la regolazione delle cinetiche di apertura e chiusura del canale ionico, e dei siti di legame con le proteine del citoscheletro che ne garantiscono la stabilità e la giusta localizzazione nella membrana cellulare.

I farmaci attivi su questa classe di recettori possono avere come bersaglio il sito di legame per l'agonista naturale (ad es. i curari sul recettore nicotinic), oppu-



**Fig. 5.3.** Schema della struttura di un recettore canale: il recettore nicotinico muscolare. Esso è composto da 5 subunità (2 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), che nel loro insieme formano un pentamero e delimitano un canale ionico che attraversa la membrana cellulare ed è permeabile ai cationi (prevalentemente Na<sup>+</sup>). Ogni subunità è costituita da una catena peptidica che presenta, al terminale amminico, un'estesa porzione extracellulare; qui, nelle subunità  $\alpha$ , e, in parte, nelle subunità adiacenti è posto il sito di legame per l'acetilcolina. I quattro territori transmembrana sono identificati dalle sigle M1-M4. Essi sono organizzati spazialmente in modo che i tratti M2 delle 5 subunità formino le pareti del canale, come si può vedere bene nell'immagine del recettore visto dall'alto. Nello schema del recettore visto in sezione sono stati visualizzati i tre anelli carichi che sono importanti per la selezione degli ioni che passano attraverso il canale. Essi sono formati da aminoacidi posti in registro nei tratti M2 di ciascuna delle 5 subunità.

re possono legarsi ai siti allosterici (ad es. le benzodiazepine sul recettore GABA<sub>A</sub>). Infine, alcuni farmaci possono interferire con le proprietà biofisiche e funzionali del canale legandosi a siti posti nel lume del canale stesso (ad es. esametonio nel recettore nicotinico gangliare). Per maggiori dettagli relativi ai vari recettori-canale, vedi il capitolo 6 e quelli specifici per i singoli sistemi neurotrasmettitoriali.

### Recettori accoppiati alle proteine G

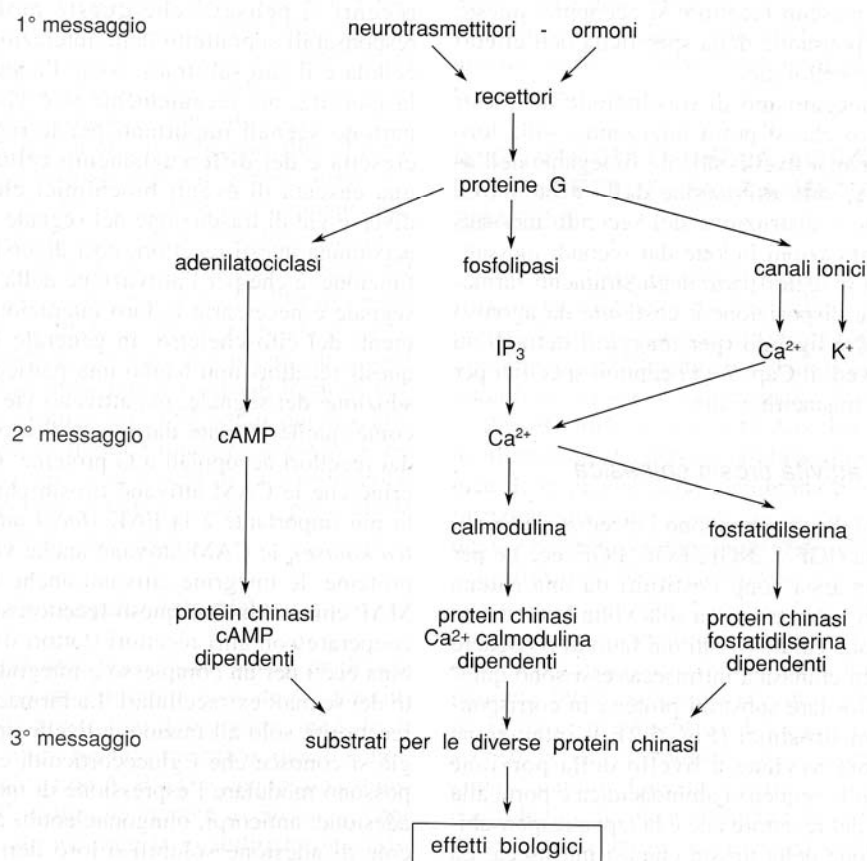
Questa è la famiglia più numerosa di recettori ed il bersaglio della maggior parte dei farmaci utilizzati a scopi terapeutici. La caratteristica di questi recettori è di trasdurre il segnale generato dal legame con il mediatore attivando una proteina G. Le proteine G rappresentano una famiglia di molecole proteiche ete-

rotrimeriche e derivano il loro nome dalla capacità di legare il GTP e di possedere una attività GTPasica intrinseca. Le tre subunità che costituiscono ciascuna proteina G vengono chiamate  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  ma è solo la subunità  $\alpha$  che è capace di legare ed idrolizzare il GTP.

Quando uno di questi recettori viene attivato dal suo agonista, esso subisce una modificazione conformazionale grazie alla quale riesce ad attivare una specifica proteina G che, a sua volta, incorpora una molecola di GTP presente nel citoplasma; il legame con il GTP provoca la dissociazione delle tre subunità e l'attivazione della subunità  $\alpha$ . Quest'ultima rimane attiva finché non riesce ad idrolizzare il GTP in GDP grazie alla sua attività GTPasica intrinseca. Durante la fase di attivazione, la subunità  $\alpha$  modula l'attività di effettori enzimatici (ad es. adenilato ciclasi e le fosfolipasi) ed

alcuni canali ionici. Recentemente si è osservato che in alcuni casi (per es, canali ionici) anche il complesso  $\beta/\gamma$  è capace di attivare degli effettori. Ogni proteina G attiva in modo specifico solo determinati effettori (v. Cap. 7). L'attivazione della adenilato ciclasi e delle fosfolipasi produce la sintesi di secondi messaggeri (come cAMP,  $IP_3$ , diacilglicerolo) che attivano una serie di reazioni enzimatiche a cascata che sono responsabili dell'effetto biologico indotto dall'attivazione recettoriale (Fig. 5.4). Quindi il legame dell'agonista con un recettore accoppiato a proteine G può portare alla produzione di molte molecole di secondi messaggeri ciascuna delle quali può attivare numerose altre molecole enzimatiche in una cascata che sempre più si amplifica.

Una conseguenza di questa cascata amplificatrice di eventi biochimici è che la durata degli effetti indotti



**Fig. 5.4.** Cascata amplificante innescata dalla interazione tra un neurotrasmettitore e un suo recettore accoppiato a proteina G. L'interazione trasmettitore-recettore attiva proteine G specifiche (per semplicità nello schema ne è mostrata solo una) che, a loro volta, possono attivare più molecole enzimatiche, dette effettori (es. fosfolipasi o ciclasi). Ognuna di esse sintetizza o libera numerose molecole di secondi messaggeri (es. cAMP,  $IP_3$ ) che a loro volta possono attivare numerose protein chinasi. La fosforilazione di substrati specifici dà inizio alla reazione cellulare che sfocia nella risposta biologica. Questa cascata amplifica il segnale generato dall'interazione agonista-recettore; il suo sviluppo può essere controllato ad ogni livello, sia positivamente che negativamente.

dall'attivazione di questa classe di recettori può essere anche dell'ordine di minuti; essa dipende non solo dalla durata dell'interazione farmaco-recettore, ma soprattutto dalla efficienza di meccanismi cellulari specifici preposti alla riduzione della concentrazione del secondo messaggero e alla abolizione delle modificazioni postraduzionali da esso indotte.

I recettori accoppiati a proteine G sono inclusi in un'unica superfamiglia genica in quanto hanno una organizzazione molecolare comune: essi sono formati da una singola catena polipeptidica che attraversa sette volte la membrana plasmatica in corrispondenza di altrettante regioni idrofobiche e che si organizza spazialmente nella membrana in modo da costituire una particella globulare (Fig. 5.2). Il sito di legame per il neurotrasmettitore si trova nelle porzioni transmembrinarie o extracellulari della sequenza aminoacidica. Il tratto di sequenza compresa tra la regione transmembrana 5 e 6 è rivolta verso il citoplasma ed è importante per il riconoscimento delle proteine G specifiche con cui ciascun recettore si accoppia; questo sito è quindi responsabile della specificità dell'effetto dell'attivazione recettoriale.

In base al meccanismo di trasduzione di questi recettori è chiaro che si potrà intervenire sulla loro funzionalità a diversi livelli: sul sito di legame dell'agonista naturale, sull'attivazione della proteina G, sulla produzione e distruzione del secondo messaggero, sulle modificazioni indotte dai secondi messaggeri. In realtà la maggior parte degli strumenti farmacologici a nostra disposizione è costituita da agonisti od antagonisti del ligando (per maggiori dettagli su questi recettori vedi il Cap. 7 ed i capitoli specifici per i singoli sistemi trasmettitoriali).

**Estratto da**  
**Modulazione delle risposte recettoriali**

Guido Fumagalli

Dipartimento di Medicina e Sanità Pubblica, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi di Verona

**Da: Farmacologia Generale e Molecolare, di Clementi e Fumagalli, UTET**



## MODULAZIONE DELLE RISPOSTE RECETTORIALI

Guido Fumagalli

I recettori per i ligandi endogeni rappresentano lo strumento attraverso cui la cellula risponde a stimoli esterni; l'entità delle risposte da essi generate è di fondamentale importanza per la sopravvivenza sia della cellula che dell'organismo di cui essa fa parte. Probabilmente proprio per questo loro ruolo chiave nei processi di omeostasi cellulare, i recettori e i relativi sistemi di trasduzione sono continuamente soggetti ad un fine controllo sia qualitativo che quantitativo della loro attività. Alterazioni di questi controlli sono alla base di numerosi stati patologici, come, ad es., la Miastenia Grave (dovuta a riduzione del numero di molecole di recettore per l'acetilcolina presente sulla membrana postsinaptica della giunzione neuromuscolare), la sindrome di femminizzazione testicolare (dovuta a mancanza genetica di recettori per gli androgeni), alcune forme di diabete insulina-resistenti (dovute a riduzione del numero di recettori per l'ormone). In altri casi l'alterazione del numero di recettori è secondaria ad alterazione dei meccanismi che ne regolano l'espressione ed è responsabile di almeno parte della sintomatologia della malattia primaria (ad esempio alcuni sintomi cardiovascolari che compaiono in corso di ipertiroidismo sono dovuti all'aumento di recettori  $\beta$ -adrenergici o di proteine  $G_s$  accoppiate all'adenilato ciclasi).

Stati patologici che causano attivazioni prolungate, anche se modeste, di un sistema trasmettitoriale possono portare ad alterazioni del numero dei recettori e/o della capacità di trasdurre il segnale neurotrasmettitoriale. Un esempio tipico è rappresentato dal sistema adrenergico a livello cardiaco dove stati patologici che portano ad attivazione prolungata del sistema simpatico, come l'insufficienza cardiaca o l'infarto, inducono allo stesso tempo un aumento del numero dei recettori

$\beta$ -adrenergici nelle miocellule e una riduzione della capacità dei recettori stessi di trasdurre correttamente il segnale neurotrasmettitoriale.

Infine è ben noto il fenomeno dell'ipersensibilità da denervazione della fibra muscolare: la denervazione o l'inibizione cronica dell'attività di rilascio di neurotrasmettitore (ad es., per avvelenamento da tossina botulinica) provocano un aumento persistente e diffuso del numero di recettori nicotinici per l'acetilcolina sulla membrana della cellula muscolare. L'ipersensibilità da denervazione è un fenomeno caratteristico per le cellule che formano contatti sinaptici e, in minor misura, è presente anche in altri tessuti eccitabili, come i tessuti muscolari lisci e le ghiandole.

È evidente il significato finalistico di questi fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali: l'assenza di segnale induce la cellula ad aumentare il numero di recettori superficiali in modo da aumentare le probabilità di interazione con il trasmettitore e quindi di «sentire» il segnale, l'eccesso viene tamponato attraverso una riduzione della capacità di risposta.

### *Il trattamento con farmaci attivi sui recettori per i mediatori endogeni può indurre tolleranza*

Questi fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali si instaurano non solo a seguito di alterazioni dei segnali endogeni (trasmettitori o ormoni) ma anche in risposta a trattamenti con farmaci agonisti o antagonisti. La scomparsa dell'efficacia farmacologica dovuta ai fenomeni di adattamento delle risposte recettoriali viene comunemente definita *tolleranza*. La velocità con cui la tolleranza si instaura e l'entità dello stato di tolleranza stesso dipendono sia dall'intensità del trattamento farmacologico che dal sistema

recettoriale interessato e può in alcuni casi non manifestarsi affatto (almeno dal punto di vista sintomatologico).

In genere la tolleranza farmacologica si instaura per trattamenti prolungati (di giorni o settimane) ed è reversibile con la sospensione della terapia; quando compare rapidamente (minuti o ore) essa viene detta *tachifilassi*. Sia la tolleranza che la tachifilassi possono essere dovuti a meccanismi diversi e differenti da una modulazione della risposta recettoriale, come ad esempio alterazioni del rilascio del neurotrasmettitore, modificazioni farmacocinetiche o dei processi metabolici deputati all'inattivazione dei farmaci.

La tolleranza può avere conseguenze dirette sull'efficacia della terapia. Innanzitutto, la stessa dose può non essere più sufficiente a controllare la malattia e occorre aumentarla per ottenere l'efficacia precedente. Inoltre, la sospensione rapida della terapia può accompagnarsi ad un effetto «rimbalzo» dovuta allo squilibrio recettoriale che si era instaurato durante il trattamento. Ad es., il trattamento cronico con farmaci broncodilatatori che agiscono come agonisti sui recettori adrenergici  $\beta_2$  riduce le capacità di risposta delle cellule bronchiali alle catecolamine. Il mantenimento di un adeguato livello di efficacia terapeutica può richiedere un aumento del dosaggio; le cellule bronchiali risponderanno con un nuovo livello di adattamento e anche il nuovo dosaggio andrà incontro a tolleranza. Quando la sospensione della terapia sottrarrà al paziente il tono adrenergico dovuto al farmaco, la quantità di catecolamina rilasciata dai terminali simpatici potrà essere insufficiente a stimolare il rilassamento della cellula muscolare liscia bronchiale e il paziente può andare incontro a broncocostrizione.

#### *La modulazione recettoriale è bidirezionale*

Come già si è compreso dagli esempi precedenti, la tolleranza ai farmaci è bidirezionale: il trattamento cronico con agonisti può portare ad una riduzione delle risposte recettoriali mentre il trattamento con farmaci antagonisti può indurre un aumento. La riduzione delle risposte recettoriali dovuta a trattamento con agonisti viene detta refrattarietà o, con un termine «prestato» dall'inglese, *desensitizzazione*; l'aumento delle risposte recettoriali indotte da trattamento cronico con antagonisti è definito con il termine *up regulation*.

Nelle pagine che seguono verranno esaminati soprattutto i meccanismi molecolari che sono alla base dei fenomeni di desensitizzazione in quanto quelli su cui più ampie e dettagliate sono le conoscenze. Prima di addentrarsi nell'argomento, lo studente deve ben comprendere che i fenomeni di adattamento discussi in questo capitolo riguardano solo recettori (o sistemi di trasduzione) per mediatori endogeni e non riguarda-

no (se non occasionalmente) altre classi di bersagli farmacologici quali ad es. canali ionici, enzimi, pompe e trasportatori.

## **LA DESENSITIZZAZIONE**

### *Desensitizzazione omologa ed eterologa*

Studiando gli effetti di alcuni curari depolarizzanti, il ricercatore svedese Thesleff ipotizzò che l'effetto inibitorio sulla contrazione muscolare e sulla trasmissione sinaptica fosse dovuto a perdita di funzionalità del recettore muscolare per l'acetilcolina (nicotinico). Usando muscoli isolati, egli trovò che durante l'applicazione di acetilcolina, decametonio o succinilcolina (v. Cap. 27) la giunzione neuromuscolare si depolarizzava per pochi secondi e poi ritornava al potenziale di riposo nonostante la continua presenza dell'agonista. Lo sviluppo della ripolarizzazione in presenza di farmaci capaci di attivare il recettore nicotinico e quindi di indurre inizialmente depolarizzazione fu chiamato desensitizzazione e fu definita «una condizione in cui l'applicazione di un farmaco depolarizzante ha reso il suo recettore refrattario alla stimolazione».

Il termine desensitizzazione si riferisce al processo in base al quale l'esposizione persistente ad un agonista porta a riduzione dell'effetto stimolatorio. La perdita dell'attività dell'agonista può essere specifica per il recettore di superficie che è attivato: in questo caso si parla di *desensitizzazione omologa*. Spesso però, l'attivazione prolungata di un sistema recettoriale induce desensitizzazione anche degli altri recettori che utilizzano la stessa via di trasduzione del segnale o gli stessi effettori. Questo tipo di desensitizzazione crociata è detta *desensitizzazione eterologa* ed è un evento relativamente diffuso tra i recettori che sono accoppiati a proteine G. Essa può essere dovuta a modificazioni della molecola recettoriale o a modulazione dell'attività di proteine G e di sistemi effettori (ciclasti, fosfolipasi, canali ionici, ecc.) comuni a più recettori.

In linea teorica, la desensitizzazione può avvenire a qualunque livello: riduzione dell'affinità, incapacità di trasdurre il segnale, riduzione del numero di molecole recettoriali. L'ultimo meccanismo viene più comunemente detto *down regulation* (regolazione verso il basso, riduzione). Ciascun recettore può andare incontro a desensitizzazione con modalità proprie, talvolta comuni e spesso diverse da quelle utilizzate da altri recettori anche nella stessa cellula; inoltre, l'entità della desensitizzazione può differire, per uno stesso recettore, tra tessuti diversi. Nonostante la varietà, è possibile riconoscere meccanismi e strategie comuni di desensitizzazione all'interno di ciascuna

delle grandi superfamiglie recettoriali e, a scopi didattici, risulta più conveniente esaminare il fenomeno della desensitizzazione singolarmente in ciascuna classe.

### La desensitizzazione dei recettori-canale

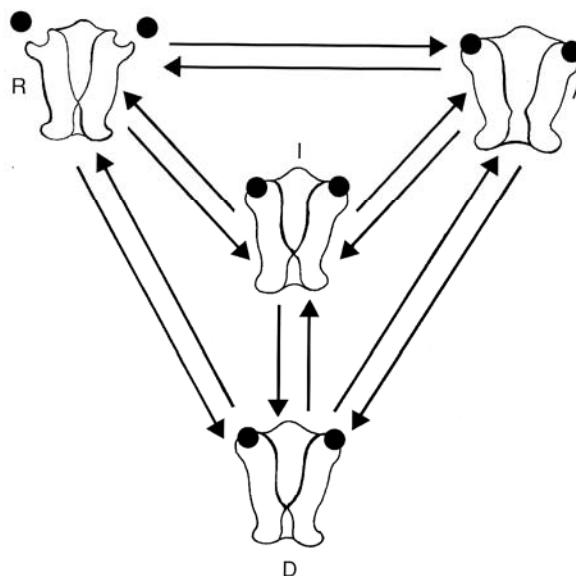
*La desensitizzazione è una proprietà intrinseca dei recettori-canale*

Le informazioni più dettagliate si hanno per quel che riguarda il recettore nicotino per l'acetilcolina di tipo muscolare. Per questo recettore, e probabilmente anche per tutti gli altri recettori di questa superfamiglia, la desensitizzazione equivale ad una riduzione della capacità di andare incontro al cambio conformazionale necessario per produrre l'apertura del canale ionico transmembranario; variazioni del numero di molecole di recettore e dell'affinità per l'agonista hanno invece rilevanza minima nella genesi della desensitizzazione.

Registrazioni di singolo canale hanno dimostrato che l'applicazione di agonisti produce due rapidi cambiamenti nella macromolecola recettoriale. Il primo avviene in circa 1 millisecondo dall'applicazione dell'agonista, è dovuto al legame di questo sul sito attivo del recettore, genera la transizione conformazionale responsabile dell'apertura del canale ionico intrinseco al recettore ed è responsabile del flusso di cationi attraverso la membrana plasmatica. Il secondo cambiamento, anch'esso di natura conformazionale, è responsabile della transizione del recettore nello stato desensitizzato in cui il canale rimane chiuso nonostante l'affinità per l'agonista aumenti notevolmente (Fig. 12.1).

Il recettore muscolare per l'acetilcolina desensitizza molto rapidamente con una cinetica che può essere descritta da due componenti a velocità diversa, dette rapida e lenta. La componente rapida è detta I e ha una costante di tempo di circa 2 al secondo (inattivazione del 50% dei recettori in poche centinaia di millisecondi), la seconda è detta D ed ha una costante di tempo di circa 0,01 al secondo (inattivazione del 50% dei recettori in circa 1 minuto). Quindi il recettore può esistere in 4 stati distinti: di riposo (stato R), attivo (stato A con canale aperto) e nei due stati desensitizzati, D e I (Fig. 12.1). I 4 stati sono interconvertibili, sono di durata discreta e la transizione attraverso i 4 stati può avvenire spontaneamente (transizione allosterica): essi sono perciò in equilibrio tra loro. Legandosi al sito attivo, l'acetilcolina sposta l'equilibrio dallo stato prevalente a riposo, R, verso gli altri tre stati e stabilizza il recettore nello stato D in cui il canale ionico è chiuso.

La desensitizzazione è quindi una proprietà intrinseca della molecola recettoriale che non richiede modificazioni post-traduzionali ed è completamente e rapidamente reversibile. In alcuni recettori nicotinici neuronali la sen-



**Fig. 12.1.** Possibili stati funzionali in cui il recettore nicotino per l'acetilcolina può trovarsi. R = a riposo; A = attivo; I = desensitizzato (fase rapida); D = desensitizzato (fase lenta). I quattro stati sono interconvertibili. L'acetilcolina sposta l'equilibrio tra i 4 stati verso la forma D.

sibilità alla desensitizzazione è così marcata e durevole che l'esposizione cronica all'agonista nicotina (ma non ad altri agonisti!) porta a depressione persistente della trasmissione sinaptica. La prolungata inibizione da desensitizzazione di questi recettori è a sua volta responsabile del fenomeno paradossale della up regulation indotta da nicotina.

La velocità con cui l'equilibrio si sposta verso lo stato D è modulabile da diversi fattori, quali la fosforilazione del recettore, il potenziale transmembranario e l'occupazione di siti allosterici. La fosforilazione del recettore da parte di protein chinasi A (PKA) o di protein chinasi C (PKC) accelera le cinetiche di desensitizzazione e favorisce la presenza dello stato D. È interessante notare che i terminali della giunzione neuromuscolare rilasciano, in condizioni di alta frequenza di stimolazione, anche il neuropeptide CGRP. Poiché il neuropeptide induce un aumento della concentrazione di cAMP nella fibra muscolare, è probabile che la sua funzione sia quella di ridurre la responsività della fibra (accelerando la desensitizzazione mediante attivazione della PKA) e quindi la probabilità di insorgenza di danni muscolari indotti da una stimolazione tetanica prolungata.

L'iperpolarizzazione accelera la desensitizzazione mentre la depolarizzazione ha l'effetto opposto. Gli anestetici locali, e altri composti cationici tra cui alcuni anestetici generali dotati di proprietà paralizzanti, possono accelerare la velocità di desensitizzazione del recettore legandosi a siti allosterici specifici (v. Cap. 6). Recentemente è stato proposto che l'acetilcolina sia in grado di legarsi ad alcuni di questi siti allosterici e di

bloccare il recettore nello stato inattivo: questa azione dell'acetilcolina, detta inibizione isosterica, è voltaggio dipendente e scompare con la depolarizzazione. L'inibizione isosterica sarebbe ancora più rapida della transizione che conduce dallo stato R a quello attivo e ridurrebbe a circa un decimo il numero di recettori in grado di aprirsi e condurre ioni; essendo dipendente dal potenziale transmembranario, l'inibizione isosterica scompare man mano che la membrana postsinaptica si depolarizza.

L'insorgenza dello stato desensitizzato si accompagna a notevoli aumenti dell'affinità per l'agonista: nello stato R l'affinità per l'acetilcolina ha valore «normale» ( $\approx 100 \mu\text{M}$ ), negli stati D e I l'affinità è di  $\approx 1 \mu\text{M}$  e  $\approx 5 \mu\text{M}$  rispettivamente. È curioso il fatto che la costante di dissociazione dello stato D è in un ordine di grandezza vicino a quello prodotto dal rilascio non quantale di acetilcolina nello spazio sinaptico; ciò suggerisce la possibilità che il rilascio non quantale possa avere la funzione di regolare il rapporto tra gli stati R e D in cui il recettore si trova prima della stimolazione presinaptica.

La rapidità con cui la desensitizzazione insorge consente l'uso di farmaci agonisti come paralizzanti utili in anestesia. I curari depolarizzanti, come ad esempio la succinilcolina, sono infatti agonisti del recettore per l'acetilcolina e sono relativamente resistenti all'attività idrolizzante delle colinesterasi: la somministrazione di un bolo di 20 mg endovena nell'uomo provoca fascicolazioni seguite rapidamente da rilassamento che diventa completo nel giro di 2 minuti. La paralisi muscolare dovuta a depressione della trasmissione sinaptica è anche uno dei sintomi dell'intossicazione acuta da anticolinesterasici. In questo caso la desensitizzazione è dovuta alla prolungata persistenza dell'acetilcolina nello spazio intersinaptico secondaria all'inibizione dell'enzima; a differenza di quanto succede con la succinilcolina, l'insorgenza della paralisi è più lenta e generalmente preceduta da affaticabilità, contrazioni e fascicolazioni.

Alterazioni della capacità di compiere la trasformazione conformazionale necessaria per aprire il canale transmembranario sono alla base della desensitizzazione anche di altri recettori-canale. Anche per essi, la fosforilazione di siti specifici delle diverse subunità ha il significato di modulare la capacità di compiere la transizione allosterica necessaria al loro funzionamento. Per es., la fosforilazione da parte di PKA in siti consensu specifici mantiene il recettore GABA<sub>A</sub> più a lungo nello stato attivo; la rimozione del fosfato da tali siti da parte della fosfatasi calcineurina, o la fosforilazione di altri siti da parte di PKC accelerano la desensitizzazione. Maggiori dettagli sulla modulazione dell'attività dei recettori per il glutammato di tipo NMDA e sulla loro regolazione allosterica da parte di magnesio e glicina sono descritti nel capitolo 30.

## La desensitizzazione dei recettori accoppiati a proteine G

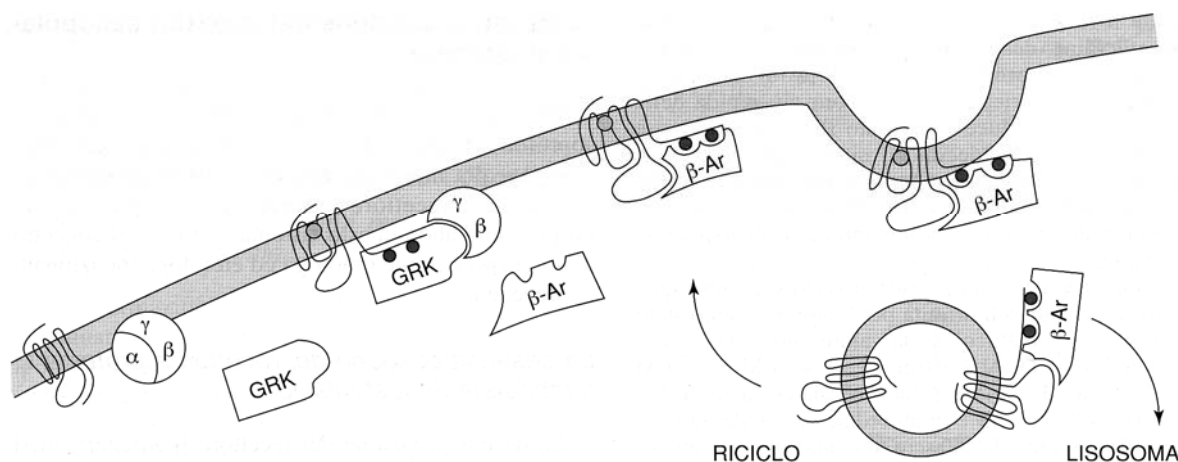
Per questa superfamiglia recettoriale, gli studi più approfonditi sono stati condotti sui sistemi recettoriali associati alla modulazione dei livelli intracellulari di cAMP e sul recettore  $\beta$ -adrenergico in particolare. Proprio studiando questo sistema è emerso il concetto di desensitizzazione omologa ed eterologa menzionato in precedenza.

### La desensitizzazione dei recettori a proteine G è modulata da fosforilazioni

La desensitizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico si attua mediante tutti e tre i meccanismi generali di desensitizzazione: perdita di affinità per l'agonista, riduzione della capacità di attivare la proteina G, riduzione del numero. I tre eventi hanno caratteristiche cinetiche diverse (la down regulation è la più lenta) ma sono tutti dipendenti da fosforilazione del recettore.

Le chinasi coinvolte possono essere molteplici ma senza dubbio quella che gioca il ruolo più rilevante è una chinasi specifica per il recettore  $\beta$ -adrenergico detta  $\beta$ ARK (*Beta-Adrenergic Receptor Kinase*). Questa proteina appartiene ad una nuova famiglia di protein chinasi (chinasi dei recettori accoppiati a proteina G o GRK), caratterizzate dalla proprietà di essere in grado di fosforilare esclusivamente il recettore occupato dall'agonista: essa è quindi funzionalmente diversa dalle altre chinasi dipendenti da secondi messaggeri. In condizioni di non stimolazione l'enzima è prevalentemente localizzato nel citoplasma e viene traslocato alla membrana plasmatica a seguito di attivazione del recettore. La nuova localizzazione subcellulare e l'induzione della sua attività enzimatica sono probabilmente dovute ad interazione con complessi  $\beta\gamma$  della proteina G<sub>s</sub> attivata dal recettore. L'evento è molto rapido e la  $\beta$ ARK è in grado di fosforilare circa il 50% dei recettori nel giro di pochi secondi dall'applicazione dell'agonista (Fig. 12.2). La fosforilazione avviene su treonine e serine presenti nei territori coinvolti nell'interazione con la proteina G; al recettore fosforilato si lega la proteina  $\beta$ -arrestina che stericamente impedisce ulteriori interazioni recettore-proteina G. La necessità della presenza dell'agonista sul sito di legame recettoriale e la specificità della  $\beta$ ARK per il recettore  $\beta$ -adrenergico sono alla base della desensitizzazione omologa.

La riduzione dell'affinità e il disaccoppiamento funzionale dalla G<sub>s</sub> sono eventi rapidi ed iniziali della desensitizzazione. In condizioni basali, il complesso ternario ligando-recettore-proteina G è stabile e, in queste condizioni, l'affinità delle catecolamine per il recettore  $\beta$ -adrenergico è molto maggiore rispetto al



**Fig. 12.2.** Desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico. L'interazione agonista-recettore provoca la dissociazione della proteina G trimerica (agonista: pallino rosa). Il complesso  $\beta/\gamma$  funge da ancoraggio alla membrana di una chinasi specifica per il recettore  $\beta$ -adrenergico, detta  $\beta$ ARK, che è membro di una famiglia di chinasi che fosforilano i recettori accoppiati a proteina G (GRK). Il recettore fosforilato da  $\beta$ ARK/GRK (pallini sulla coda citoplasmatica del recettore nella figura) viene riconosciuto da una proteina citosolica detta  $\beta$ -arrestina ( $\beta$ -Ar) che impedisce ulteriori possibili interazioni tra recettore e proteina G (desensibilizzazione omologa). Fosforilazione del recettore da PKA attivata da altri recettori della cellula associati ad adenilato ciclasti produce gli stessi effetti della fosforilazione da GRK (desensibilizzazione eterologa). Il complesso arrestina/recettore-fosforilato viene internalizzato per endocitosi mediata da clatrina e confinato nel compartimento endosomale intracellulare. Se il recettore viene defosforilato da fosfatasi esso ritorna in membrana (riciclo); se la fosforilazione persiste, il recettore viene inviato ai lisosomi e degradato (down-regulation).

recettore non accoppiato. La fosforilazione, modifica la stabilità del complesso ternario e riduce notevolmente l'affinità per il neurotrasmettitore.

Il recettore può essere fosforilato anche da PKA attivata dall'aumento del cAMP. Gli effetti della PKA sono cinematicamente più lenti rispetto a quelli dovuti ad attivazione della  $\beta$ ARK (50% dell'effetto massimo in circa 2 minuti) ma, per molti aspetti simili. Un'ovvia conseguenza di questo è che qualunque altro sistema recettoriale sia in grado di stimolare adeguatamente la formazione di cAMP è potenzialmente in grado di indurre desensibilizzazione del recettore  $\beta$ -adrenergico: questo fenomeno viene detto desensibilizzazione eterologa.

È però importante realizzare che la fosforilazione deve avvenire su residui specifici del recettore, che non tutte le fosforilazioni hanno effetti desensibilizzanti e che recettori diversi hanno sensibilità diverse alle varie chinasi: infatti mentre sia PKA che PKC sono in grado di fosforilare e desensibilizzare il recettore  $\beta$ -adrenergico, la desensibilizzazione del recettore muscarinico cardiaco avviene esclusivamente per attivazione di una chinasi GRK specifica mentre l'eventuale fosforilazione da PKA è priva di effetti desensibilizzanti.

Numerosi neuropeptidi e ormoni sono in grado di indurre desensibilizzazione eterologa di recettori accoppiati a proteine G anche indipendentemente dalla produzione di secondi messaggeri (ad es., ACTH e Sostanza P sul recettore muscarinico, Neuropeptide Y

sui recettori purinergici  $A_2$ , Prolattina sui recettori dopaminergici). Si ritiene che in questi casi la desensibilizzazione avvenga anche per modulazione allosterica o per competizione del legame dell'agonista ai recettori.

#### Down regulation rapida e tardiva

Il terzo meccanismo con cui una cellula può ridurre la sua sensibilità ad un agonista è rappresentato dalla riduzione del numero di recettori. Questo fenomeno è detto down regulation e può avvenire non solo per recettori a proteine G ma anche per altri tipi di recettori compreso quelli intracellulari.

Nel caso dei recettori a proteina G il caso meglio studiato è quello del recettore  $\beta$ -adrenergico per il quale si riconosce una down regulation rapida ed una tardiva. La rapida (metà dell'effetto massimo raggiunto nel giro di minuti dall'esposizione all'agonista) è dovuta a rimozione del recettore dalla membrana plasmatica mentre la tardiva comporta distruzione lisosomale del recettore e/o a riduzione della sua sintesi. La desensibilizzazione tardiva richiede generalmente esposizioni prolungate all'agonista (diversi minuti o ore).

La rimozione del recettore  $\beta$ -adrenergico dalla superficie cellulare avviene per un processo di endocitosi mediata da clatrina che trasferisce il recettore dalla membrana al compartimento intracellulare endosomale. L'evento fondamentale che attiva l'internalizzazione del recettore è la sua fosforilazione e la conse-

guente associazione con la  $\beta$ -arrestina. La conseguenza del processo endocitotico è la riduzione del numero di molecole recettoriali esposte sulla membrana cellulare (down regulation) e quindi della capacità della cellula a rispondere all'agonista (desensitizzazione). È però importante notare che il processo di endocitosi del recettore non ha esclusivamente finalità desensitizzanti. Infatti è proprio l'internalizzazione che consente al complesso recettore/ $\beta$ -arrestina di legare c-Src (mediate il dominio aminoterminale della  $\beta$ -arrestina) e di attivare in questo modo la cascata delle MAP chinasi essenziale per produrre gli effetti trascrizionali che possono seguire alla stimolazione recettoriale.

Una volta internalizzato, il recettore fosforilato viene trasferito (accompagnato dalla  $\beta$ -arrestina a cui continua ad essere associato) dal compartimento endosomale a quello lisosomale dove viene degradato. Mentre è nel compartimento endosomale il recettore può anche essere defosforilato da fosfatasi; in questo caso la  $\beta$ -arrestina si dissocia e il recettore può ritornare sulla superficie cellulare (Fig. 12.2). Questo movimento membrana-endosoma-membrana è detto *riciclo*; esso avviene normalmente nella cellula anche in assenza di stimolazione recettoriale ed è un fenomeno comune a molti recettori accoppiati a G proteine. In una singola cellula, il numero di recettori presenti sulla superficie dipende fondamentalmente dall'equilibrio tra le velocità con cui i recettori sono rimossi e riportati nella membrana cellulare. Solo il recettore presente in membrana è in grado di rispondere al mediatore, ma il pool intracellulare rappresenta una riserva funzionale (recettori di riserva) che consente alla cellula di adattare rapidamente il numero di recettori superficiali a variazioni dell'ambiente. L'occupazione recettoriale accelera di circa 100 volte la velocità di internalizzazione, mentre l'allontanamento dell'agonista stimola il ritorno in membrana. In condizioni normali, una certa quota di recettore viene normalmente degradata e rimpiazzata da una pari quantità di recettore neosintetizzato. L'esposizione cronica ad agonisti recettoriali può determinare variazioni importanti di questo equilibrio e causare down regulation tardiva.

I meccanismi cellulari che sono responsabili della down regulation tardiva sono molteplici e possono differire per importanza e tipo a seconda del recettore e del tipo cellulare. Per esempio, la down regulation tardiva del recettore  $\alpha_1$ -adrenergico è principalmente dovuta ad accelerazione della velocità di degradazione (l'emivita del recettore passa da 24 a 3 ore in presenza di agonisti). Nel caso del recettore  $\beta$ -adrenergico, la down regulation tardiva è causata da eventi cellulari diversi: oltre ad un notevole aumento della velocità di degradazione, vi è anche riduzione dell'espressione del mRNA che codifica per il recettore. La riduzione

del mRNA, a sua volta, è dovuta in parte a destabilizzazione dell'acido nucleico e in parte a riduzione della trascrizione. L'ultimo effetto regolatorio si attua generalmente attraverso la modulazione dell'attività di promotori che contengono cAMP responsive elements (v. Cap. 19).

#### *La desensitizzazione può avvenire per modulazione dell'attività delle proteine G*

L'esposizione di cellule ad agonisti di recettori accoppiati a proteine G può portare a riduzione dei livelli cellulari o redistribuzione delle proteine G dalla membrana al citoplasma. Il fenomeno è stato descritto per membri delle varie famiglie di proteine G ( $G_s$ ,  $G_i$ ,  $G_q$ ), dipende in parte dall'intensità della stimolazione recettoriale ed è generalmente limitato alla proteina G con cui quel recettore interagisce. I meccanismi responsabili della riduzione dei livelli cellulari di proteina G sono diversi e possono essere sia dipendenti che indipendenti dalla produzione del secondo messaggero e possono attuarsi sia a livello di degradazione della proteina che di espressione del suo mRNA.

Ad es., la stimolazione cronica del recettore adenosinico  $A_1$ , che è negativamente accoppiato alla produzione di cAMP attraverso una  $G_i$ , causa sia down regulation recettoriale che una riduzione del contenuto cellulare di proteina  $G_i$ , probabilmente dovuta ad aumentata degradazione. In cellule nervose, la stimolazione di recettori  $A_2$  per adenosina e recettori per prostanoidei, entrambi accoppiati a  $G_s$ , produce un'importante riduzione dei livelli cellulari di proteina  $G_s$  e del corrispondente mRNA. Effetti simili si hanno in risposta ad alte dosi di alcool etilico ma non con agenti farmacologici che stimolano direttamente l'attività della adenilato ciclasi ed i livelli di cAMP. Infine, in alcuni casi la desensitizzazione si accompagna a modulazione crociata dell'attività di proteine G ad attività diversa ma funzionalmente accoppiate allo stesso effettore. Per esempio, la stimolazione prolungata dell'attività dell'adenilato ciclasi da parte del recettore  $\beta$ -adrenergico può accompagnarsi a riduzione dei livelli di  $G_s$  (che stimola l'adenilato ciclasi) e ad aumento di quelli di  $G_{i2\alpha}$  (che la inibisce).

#### *Alcune differenze nella regolazione dei recettori accoppiati ad attivazione della fosfolipasi C*

Quanto detto nelle righe precedenti è valido come schema generale dei processi di desensitizzazione e si riferisce soprattutto a recettori, come il  $\beta$ -adrenergico, accoppiati alla produzione di cAMP. Alcune differenze rispetto allo schema generale si hanno nella modulazione della desensitizzazione dei recettori accoppiati alla attivazione della fosfolipasi C (PLC).

La prima peculiarità è che la desensitizzazione di questi recettori è quasi esclusivamente omologa. Per es., la

risposta secretoria di cellule della parotide alla sostanza P scompare completamente nel giro di 1 minuto, mentre è mantenuta la risposta ad altri agenti che pure agiscono stimolando la PLC (muscarinici, colecistochinina e bombesina). Nella midollare del surrene la risposta secretoria all'angiotensina II scompare quasi completamente nel giro di pochi minuti mentre quella all'istamina persiste.

La seconda peculiarità è legata alla presenza di un feed-back negativo di controllo dell'attività GTPasica della proteina G effettuato dalla stessa PLC. A sua volta questa proprietà della PLC sembra essere regolata dagli stessi fosfolipidi di membrana. In sintesi, la deplezione di  $PIP_2$  che si ha nei primi secondi di attivazione recettoriale altera l'efficienza del processo di trasduzione riducendo la durata dell'attivazione delle proteine  $G_q$ . Nel caso di recettori muscarinici  $M_3$  e per colecistochinina, la riduzione dell'efficacia dell'agonista (desensitizzazione) è in parte dovuta anche a disaccoppiamento dalla proteina  $G_q$  indotto da rapida fosforilazione da parte di protein chinasi  $Ca^{2+}$ -calmodulina dipendenti.

È importante ricordare che anche la protein chinasi C, positivamente modulata attraverso questa via di trasduzione del segnale, va incontro a desensitizzazione da down regulation in seguito a stimolazioni prolungate.

#### *La tolleranza agli oppioidi è multifattoriale*

I meccanismi responsabili della dipendenza fisica da oppioidi sono complessi e tuttora non chiariti. A differenza di quanto ci si potrebbe aspettare, la somministrazione continua di agonisti dei recettori per gli oppioidi non provoca significative alterazioni della affinità e del numero di recettori nel SNC. In alcune zone del SNC, ed in particolare nell'importante stazione delle vie catecolaminergiche rappresentata dal locus coeruleus, sono state invece dimostrate alterazioni importanti delle capacità di trasduzione dei recettori  $\mu$  e  $\delta$ . Questi recettori sono negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi tramite una  $G_i$ . La somministrazione prolungata di oppioidi provoca un parziale disaccoppiamento funzionale dei recettori dalla  $G_i$  che è probabilmente dovuto ad aumentata attività di una chinasi del gruppo delle GRK (v. Cap. 31). Si ritiene che sia il parziale disaccoppiamento dalla  $G_i$  che un aumento compensatorio dei sistemi di produzione del cAMP siano responsabili della tolleranza ai farmaci e, allo stesso tempo, dell'ipereccitabilità dei neuroni del locus coeruleus che si manifesta (ed è responsabile di molti dei sintomi cardiovascolari) nel corso della sindrome da astinenza. Ha implicazioni terapeutiche il fatto che nello stesso nucleo centrale sono presenti recettori adrenergici  $\alpha_2$  anch'essi negativamente accoppiati all'adenilato ciclasi; infatti la somministrazione dell'agonista clonidina, mantenendo alto il tono inibitorio sull'adenilato ciclasi, consente di ridurre o sopprimere una parte dei sintomi della crisi da astinenza da oppiacei.

Le alterazioni dell'attività adenilato ciclasi nel locus coeruleus non possono essere considerate le uniche responsabili della tolleranza e della dipendenza in quanto esse si sviluppano con un decorso temporale diverso. Come descritto nel capitolo 31, i recettori per gli oppioidi utilizzano come effettori anche canali ionici per calcio o potassio; sono state descritte alterazioni dell'eccitabilità neuronale secondarie ad alterazioni dell'accoppiamento con i canali al potassio che potrebbero avere un ruolo nella genesi dell'ipereccitabilità neuronale che compare con la crisi da astinenza. Infine, la ricerca di una spiegazione unitaria delle basi molecolari e cellulari della tolleranza e della dipendenza da oppioidi è ulteriormente complicata dal fatto che nei tossicodipendenti si sviluppano alterazioni a lungo termine della sintesi e del rilascio di neuropeptidi oppioidi.

#### **La desensitizzazione dei recettori per i fattori di crescita**

Nella maggioranza dei casi l'attivazione dell'attività tirosinocinasica recettoriale funge da segnale per l'internalizzazione del complesso fattore di crescita/recettore. Questo evento è spesso fondamentale per consentire l'interazione del recettore attivato con i suoi diversi trasduttori; d'altro canto l'internalizzazione riduce il numero di molecole recettoriali presenti nella membrana cellulare. Tale riduzione è generalmente transitoria in quanto i recettori per i fattori di crescita possono, se defosforilati, essere riciclati alla membrana plasmatica. Tuttavia se la fosforilazione è persistente, il recettore viene riconosciuto da particolari proteine (nexin I nel caso del recettore per l'EGF) che lo trasportano ai lisosomi dove viene distrutto; si ha così una vera e propria down regulation recettoriale che porta la cellula ad essere meno sensibile al fattore di crescita finché non sarà stata in grado di sopperire alla perdita attraverso la sintesi di nuove molecole recettoriali.

Qualche ulteriore informazione sui meccanismi di desensitizzazione dei recettori per i fattori di crescita si ha per il recettore per l'insulina. La capacità di legare l'ormone e di trasdurre il segnale di questo recettore sono modulati da fosforilazione su residui di serina e treonina della subunità  $\beta$  del recettore da parte di varie chinasi, in particolare PKC. La fosforilazione ha invece effetti opposti sulla ridistribuzione del recettore IGF-II per l'insulina. Questo recettore, che non sembra essere responsabile degli effetti metabolici dell'insulina, è normalmente contenuto in un compartimento intracellulare: l'insulina stimola la fosforilazione del recettore e allo stesso tempo induce il suo trasferimento alla membrana plasmatica.

Anche nel caso del recettore per l'EGF, la fosforilazione da parte della PKC gioca un ruolo importante sui processi di desensitizzazione; in particolare essa comporta inibizione dell'attività tirosinocinasica, riduzione

dell'affinità per l'EGF e internalizzazione e down regulation del recettore. Data la non specificità della PKC in termini di attivazione, il recettore per l'EGF è quindi esposto a regolazione eterologa da parte di altri primi messaggeri che agiscono attraverso questa via di trasduzione del segnale, come PDGF, FGF, bombesina e vasopressina. È curioso notare che accanto a questi eventi desensitizzanti, l'attivazione di recettori accoppiati alla via  $PLC_{\gamma_1}/PKC$  può produrre anche un aumento considerevole del contenuto cellulare di mRNA codificante per il recettore per l'EGF.

### La desensitizzazione dei recettori intracellulari

Anche per questa classe di recettori le informazioni sono scarse e per lo più limitate ai recettori per gli estrogeni. Questi ultimi vanno incontro a desensitizzazione omologa dovuta a down regulation. La riduzione del numero di recettori è strettamente dipendente dal controllo dell'espressione del mRNA codificante; in particolare la prima fase della down regulation è caratterizzata da una riduzione della trascrizione del mRNA mentre in un secondo momento la trascrizione ritorna a valori normali ma è fortemente aumentata la degradazione del mRNA stesso.

### LA UP REGULATION

Le informazioni relative ai meccanismi che controllano in senso positivo la capacità di trasdurre il segnale recettoriale sono molto limitate. Ciò è dovuto al fatto che il fenomeno è generalmente meno intenso e diffuso rispetto alla desensitizzazione; inoltre il fenomeno attira meno la curiosità degli scienziati ed è assunzione comune che l'unico meccanismo operativo (al di là della inibizione di qualunque fenomeno desensitizzante) sia la *up regulation*, cioè la capacità di aumentare il numero totale di molecole recettoriali esposte in superficie.

In effetti la *up regulation* assume caratteristiche rilevanti quasi esclusivamente nelle cellule nervose e nel tessuto muscolare e, in genere, è di notevole intensità solo a seguito di denervazione.

Le notizie più dettagliate si hanno per il recettore nicotinico muscolare. Nel muscolo striato, dopo denervazione, compare sulla superficie cellulare un elevato numero di recettori nicotinici distribuiti nelle zone extragiunzionali. Questo fenomeno è responsabile della ipersensibilità da denervazione agli agenti colinomimetici (v. Capp. 6 e 27). La *up regulation* è diret-

tamente dipendente da aumentata espressione genica di alcune delle subunità del recettore ed è dovuta alla rimozione dell'inibizione di fattori miogenici transattivanti da parte di proteine normalmente fosforilate da PKC e/o da chinasi  $Ca^{2+}$ -calmodulina-dipendenti. Quindi l'evento fondamentale che attiva la *up regulation* di questo recettore è la mancanza degli aumenti della  $[Ca^{2+}]_i$  che si hanno durante la contrazione e della conseguente attivazione delle chinasi. Nel muscolo, la *up regulation* coinvolge solo le porzioni della membrana plasmatica che normalmente non fanno parte della giunzione neuromuscolare (dove invece il numero di molecole di recettore diminuisce dopo qualche settimana di denervazione); il recettore inserito in queste porzioni extrasinaptiche della fibra muscolare ha una composizione in subunità diversa da quella del recettore postsinaptico presente nel muscolo innervato. Anche per altri recettori-canale la *up regulation* da denervazione si accompagna a modificazioni della composizione in subunità ma non è chiaro se anche nelle cellule nervose la *up regulation* sia accompagnata da modificazioni della distribuzione subcellulare dei nuovi recettori.

### Lecture consigliate

CHANGEUX J.P., *The Nicotinic Acetylcholine Receptor*, Fidia Foundation Neurosci. Research Award Lectures, Vol. 4, Raven Press, New York, 1990.

HADCOCK J.R., MALBON C.C., *Regulation of Receptor Expression by Agonists: Transcriptional and Post-transcriptional Controls*, Trends in Neurological Sciences, 14:242-247, 1991.

HUGANIR R.L., GREENGARD P., *Regulation of Receptor Function by Protein Phosphorylation*, Trends in Pharmacolog. Sciences, 8:472-477, 1987.

MILLIGAN G., *Agonist Regulation of Cellular G Protein Levels and Distribution: Mechanisms and Functional Implication*, Trends in Pharmacolog. Sciences, 14:413-418, 1993.

SILBEY D.R., BENOVIC J.L., CARON M.G., LEFKOWITZ R.J., *Regulation of Transmembrane Signalling by Receptor Phosphorylation*, Cell, 48:913-922, 1987.

WOJCIKIEWICZ R.J.H., TOBIN A.B., NAHORSKI S.R., *Desensitization of Cell Signalling Mediated by Phosphoinositidase C*, Trends in Pharmacolog. Sciences, 14:279-285, 1993.