



UNIVERSITÀ DI PISA

Dipartimento di Ricerca Traslazionale e delle Nuove Tecnologie

in Medicina e Chirurgia

Corso di Laurea Specialistica in Medicina e Chirurgia

Tesi di Laurea

**FARMACI DOPAMINERGICI
E ATTIVAZIONE DELLE CHINASI ERK1 E ERK2**

Relatore

Dott. Marco Scarselli

Candidato

Stefano Aringhieri

Anno Accademico 2012/2013

Alla mia famiglia.

*Un particolare ringraziamento al
Dott. M. Scarselli per l'alta
professionalità e la costante
presenza ed al Prof. G. U. Corsini
per i suoi insegnamenti e la sua
disponibilità nel trasmetterli.*

RIASSUNTO

La dopamina attraverso i suoi recettori dopaminergici modula numerose funzioni soprattutto a livello del sistema nervoso centrale quali l'attività psichica, cognitiva e motoria. Dal punto di vista patologico, il sistema dopaminergico ha un ruolo di primaria importanza in alcune malattie, come per esempio il morbo di Parkinson e la schizofrenia. Nella malattia di Parkinson vengono utilizzati farmaci che mimano gli effetti della dopamina ridotta nel tratto nigro-striatale (dopamino-agonisti), mentre nella schizofrenia e nelle psicosi vengono somministrati farmaci con azione di antagonismo rispetto ad una eccessiva produzione di dopamina nel tratto mesolimbico (dopamino-antagonisti). Tuttavia, il meccanismo di azione di tali farmaci non è stato ancora completamente chiarito ed altri neurotrasmettitori o altre proteine sono state studiate per comprendere meglio queste patologie. In particolare, nelle malattie del sistema nervoso centrale, un ruolo importante è svolto dalle chinasi ERK 1 e ERK 2 (dall'inglese *Extracellular signal-regulated kinases*) le quali sono coinvolte in meccanismi neuronali come la sopravvivenza cellulare, la sinaptogenesi e neurogenesi, fenomeni che risultano rilevanti nella malattia di Parkinson e la schizofrenia. L'azione di farmaci dopaminergici sulla attivazione di ERK 1 e ERK 2, seppur riportata nella letteratura, non è stata ancora studiata in modo sistematico e completo. Questa tesi ha analizzato in dettaglio l'effetto di farmaci dopaminergici agonisti ed antagonisti, di prima e di seconda (nuova) generazione, sulla attivazione di ERK 1 e ERK 2. I dati sperimentali *in vitro* su colture cellulari che esprimevano i vari recettori presi in esame hanno evidenziato che farmaci anti-Parkinson di nuova generazione, come ropinirolo, sono potenti attivatori delle chinasi ERK 1 e ERK 2,

mentre i farmaci di prima generazione, come bromocriptina, non inducono tale fenomeno. Per quanto riguarda invece i farmaci antipsicotici-antischizofrenici, quelli cosiddetti “atipici” di nuova generazione, come clozapina, sono in grado ugualmente di attivare ERK 1 e 2, mentre quelli “tipici” di prima generazione, come aloperidolo, sono inattivi su tale meccanismo. Inoltre, mentre per i farmaci antiParkinson tale effetto è mediato dal recettore dopaminergico D₂, per i farmaci antipsicotici “atipici” il meccanismo è differente e non coinvolge recettori dopaminergici, serotoninergici o adrenergici. L’attivazione delle chinasi ERK 1 e ERK 2 potrebbe avere un ruolo importante nei meccanismi di neuroprotezione indotta dai farmaci utilizzati nella malattia di Parkinson e/o nel miglioramento dei sintomi cognitivi e negativi presenti nella schizofrenia a seguito dell’utilizzo di antipsicotici come la clozapina.

SOMMARIO

1	INTRODUZIONE	8
1.1	Dopamina	8
1.2	Malattia di Parkinson	12
1.3	Schizofrenia	14
1.4	ADHD (Disturbo da deficit dell'attenzione e dell'iperattività)	17
1.5	Dipendenza da sostanza d'abuso e meccanismo della ricompensa	18
1.6	Recettori dopaminergici	19
1.7	Trattamento farmacologico della malattia di Parkinson	23
1.8	Trattamento farmacologico della Schizofrenia con dopamino-antagonisti	27
1.9	Ruolo del sistema serotoninergico sulla funzione dopaminergica.....	30
1.10	Recettori accoppiati a proteine G (GPCRs)	34
1.11	ERK	38
1.12	GPCR e recettori tirosin chinasi nella attivazione di ERK	40
1.13	GPCR: selettività funzionale o "biased agonism"	44
2	MATERIALI E METODI	48
2.1	Materiali	48
2.2	Colture cellulari	48
2.3	Costrutti plasmidici	49
2.4	Trasfezione cellulare mediante elettroporazione	52
2.5	Western blotting	53

2.6	Microscopia a fluorescenza	58
2.7	Statistica	58
3	RISULTATI E DISCUSSIONE	59
3.1	Caratterizzazione della espressione cellulare del costrutto genico del recettore D ₂ utilizzando il fluoroforo mEos analizzato in microscopia fluorescente.....	59
3.2	Caratterizzazione dell'effetto di antipsicotici tipici ed atipici sull'attività di ERK 1 e ERK 2 in cellule HeLa non trasfettate	60
3.3	Caratterizzazione dell'azione di clozapina su ERK 1 e 2 nelle cellule HeLa.....	63
3.3.1	Caratterizzazione della curva concentrazione/risposta di Clozapina sulla fosforilazione di ERK	63
3.3.2	Time-course di Clozapina ERK	66
3.3.3	Caratterizzazione dell'effetto massimale di Clozapina, Serotonina, Isoprotenerolo e Carbacolo sull'attività di ERK in cellule HeLa	68
3.3.4	Caratterizzazione di clozapina, isoprotenerolo, carbacolo e apomorfina nella linea cellulare SH5YSY.....	70
3.3.5	Caratterizzazione del ruolo dei recettori muscarinici, adrenergici e serotoninergici sulla fosforilazione di ERK mediato da clozapina in cellule HeLa	72
3.3.6	Caratterizzazione del ruolo della transattivazione dei recettori tirosin chinasi nella fosforilazione di ERK indotta da Clozapina	80

3.3.7	Caratterizzazione del ruolo dei trasportatori MRP (Multidrug resistant proteins) nella fosforilazione di ERK	82
3.4	Caratterizzazione dell'attività di farmaci dopamino-agonisti su cellule HeLa trasfettate con recettore dopaminergico D ₂	84
4	CONCLUSIONI	87
	BIBLIOGRAFIA	88

INTRODUZIONE

1.1 Dopamina

La dopamina ha percorso una lunga strada dal momento della sua scoperta. Inizialmente considerata come un esclusivo precursore della noradrenalina, essa si è gradualmente guadagnata il titolo di uno fra i più importanti neurotrasmettitori alla base di processi fisiologici e patologici a carico del Sistema Nervoso Centrale (SNC), tanto da essere divenuto nel tempo anche un fondamentale target farmacologico. Un esempio tangibile dell'importanza di questo neurotrasmettitore è rappresentato dall'assegnazione del premio Nobel per la Medicina nel 2000 ad Arvid Carlsson, Paul Greengard ed Eric Kandel, i quali hanno fatto della dopamina un elemento principale dei loro studi.

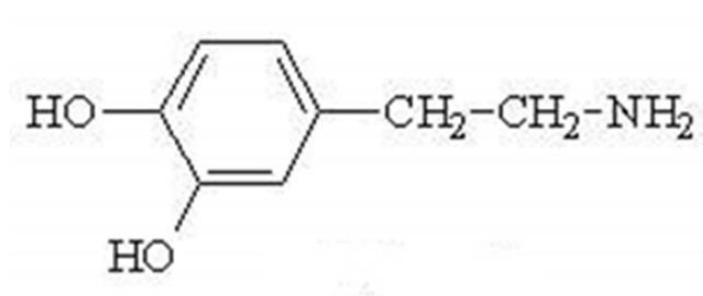


Fig. 1 Struttura chimica della Dopamina

Anche se sintetizzata nei primi anni del '900 (Barger ed Ewins, 1910; Mannich e Jacobsohn, 1910), la dopamina ha assunto un importante ruolo biologico a partire dal 1951. In quest'anno infatti Goodall individua, per la prima volta, il neurotrasmettitore in tessuti di mammifero, in particolare nel cuore e nella midollare surrenalica di pecora.

Possiamo comunque dire che i primi concetti sull'importanza di un ruolo fisiologico della dopamina, indipendentemente dalla sua funzione di precursore della noradrenalina e della adrenalina, vengono avanzati dalla metà degli anni '50 in poi.

Nel 1957 Blaschko ipotizza per la prima volta un ruolo fisiologico indipendente della dopamina come neurotrasmettitore; sempre nello stesso anno Hornykiewicz dimostra una proprietà intrinseca vasodepressiva della dopamina e della L-Dopa nel maialino d'India.

Sempre nel 1957 Carlsson e altri collaboratori dimostrano che la D,L-dopa è in grado di antagonizzare la catalessi indotta da reserpina nei topi e nei conigli; tale osservazione viene presto confermata da Everett e Toman (1959) e Blaschko e Chrusciel (1960) anche nella specie umana.

Nello stesso periodo Carlsson, e, poco più tardi anche Everett e Wiegand, osservano che la D,L-dopa è in grado di ripristinare i livelli di dopamina, ridotti dalla reserpina.

L'ultimo step importante avviene nel laboratorio di Carlsson, in cui, nel 1959, Bertler e Rosengren localizzano, in un cervello di cane, la maggior concentrazione di dopamina a livello del corpo striato; poco dopo tale osservazione viene confermata anche nel cervello umano. Su questa scoperta viene ipotizzata la fisiopatologia della malattia di Parkinson indotta da reserpina negli animali di laboratorio: riduzione dei livelli di dopamina nei centri motori extra-piramidali a livello del corpo striato.

Ad oggi la dopamina è considerata un importante neurotrasmettitore non solo nella modulazione dell'attività psichica e motoria, ma svolge un ruolo fondamentale anche nella modulazione del tono dell'umore, della secrezione di alcuni ormoni ipofisari e, molto probabilmente, anche di alcuni aspetti dei processi cognitivi.

A livello del SNC si identificano 4 compartimenti regolati dal neurotrasmettitore dopamina (Clementi e Fumagalli, Farmacologia generale e molecolare, 1999):

1. *Sistema dopaminergico nigrostriatale*. Possiede i corpi cellulari di origine nel mesencefalo ventrale e comprende: i neuroni A10 dell'area tegmentale ventrale (VTA) mesencefalica, i neuroni A9 della pars compacta della substantia nigra e i neuroni A8 dell'area retrorubrale in posizione più caudale. I neuroni A9 nella pars compacta della substantia nigra rappresentano l'origine della componente dorsale del sistema mesostriatale. I dendriti di questa popolazione neuronale innervano la pars reticolata della substantia nigra dove il rilascio di dopamina regola l'attività delle terminazioni afferenti originate dai gangli della base. Gli assoni dei neuroni A9 proiettano al nucleo caudato e al putamen che insieme costituiscono il corpo striato.
2. *Sistemi dopaminergici mesolimbico e mesolimbocorticale*. Originano soprattutto nei neuroni A10 della VTA e nella parte mediale della substantia nigra. Questa componente innerva il nucleo accumbens, il tubercolo olfattorio e il nucleo interstiziale della stria terminalis. Altre fibre che originano dai neuroni A10 innervano il setto (soprattutto il nucleo laterale del setto), l'ippocampo, l'amigdala, la corteccia entorinale, la corteccia prefrontale, la corteccia peririnale e la corteccia piriforme.
3. *Sistema dopaminergico mesotalamico*. Possiede i suoi neuroni di origine nell'area A10; questi neuroni innervano le strutture del ponte, del diencefalo e del telencefalo. Un fascio mesotalamico molto ben caratterizzato origina nella VTA e termina nell'abenula, in particolare nelle sue parti laterale e mediale.

4. *Sistemi dopaminergici tuberoinfundibolare e tuberoinfundibolare e tuberoinfundibolare.* Originano dai corpi cellulari dei neuroni dopaminergici, detti neuroni A12, localizzati nei nuclei arcuato e periarcuato dell'ipotalamo. Il sistema tuberoinfundibolare origina nella parte anteriore dell'area A12 e innerva la parte intermedia e posteriore dell'ipofisi, dove inibisce rispettivamente la secrezione dell'ormone melanocitostimolante (α MSH) e della β -endorfina, e il rilascio degli ormoni ossitocina e vasopressina. I neuroni del sistema tuberoinfundibolare innervano lo strato esterno dell'eminenza mediana, dove sono strettamente in contatto con i capillari del sistema portale ipofisario; la dopamina rilasciata nel sistema portale ipofisario, raggiunge l'ipofisi anteriore in cui media l'inibizione della secrezione di prolattina.

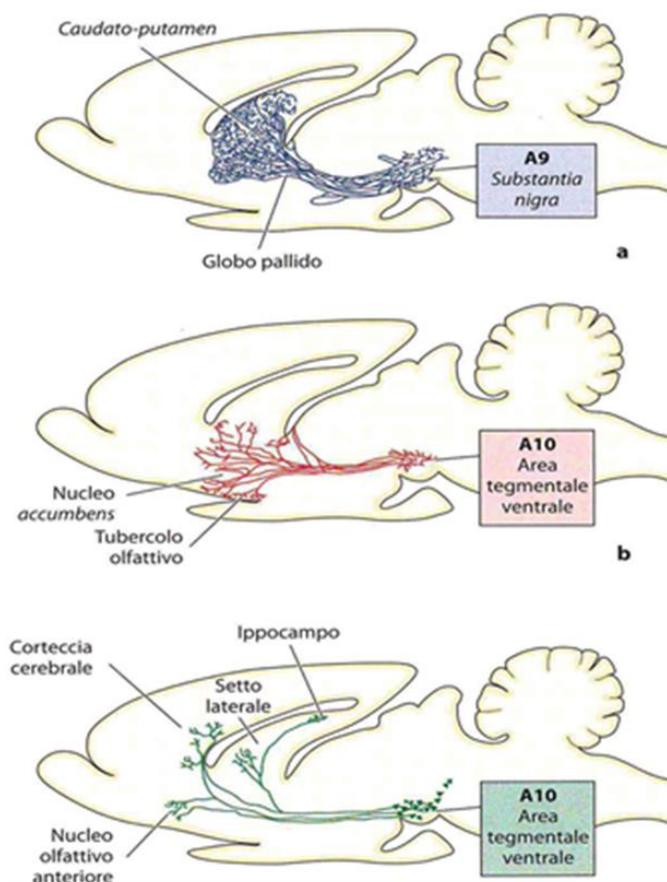


Fig. 2 Vie principali del sistema dopaminergico

Dal punto di vista patologico, il sistema dopaminergico detiene un ruolo di primaria importanza in alcune malattie, come il morbo di Parkinson, la Schizofrenia, la sindrome da deficit d'attenzione e iperattività (ADHD), e il meccanismo alla base della dipendenza da sostanze d'abuso (circuito di gratificazione, reward).

1.2 Malattia di Parkinson

Il morbo di Parkinson è una sindrome neurologica caratterizzata da quattro sintomi fondamentali: bradicinesia, rigidità muscolare, tremore a riposo e anomalie del tono posturale e del movimento. Esso riconosce come principale causa patogenetica la degenerazione e la conseguente riduzione del numero e dell'attività dei neuroni dopaminergici a livello nigrostriatale. Le vie nigrostriatali fanno parte di un complesso circuito neuronale che collega tra loro la corteccia, i nuclei della base (striato, pallido e amigdala), il talamo e la Sostanza Nera. Questo circuito, che essenzialmente riceve informazioni dalla corteccia e le riinvia elaborate alla corteccia stessa, è coinvolto non solo nel controllo del movimento, ma anche nei processi che controllano la genesi del movimento, nella memorizzazione e nel recupero di informazioni sia motorie che psichiche.

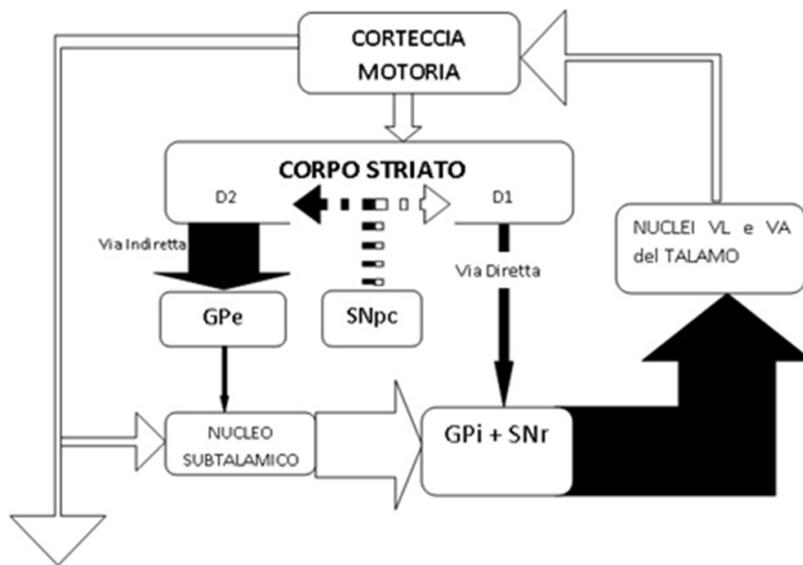


Fig. 3 Fisiopatologia della malattia di Parkinson

Il costante tono regolatorio dopaminergico si può ridurre in almeno 2 condizioni:

- degenerazione dei neuroni dopaminergici nigrali. Tale degenerazione presenta un ampio ventaglio patogenetico; esistono infatti forme di Parkinson idiopatiche, che sono le più diffuse e caratterizzate da inclusioni eosinofile neuronali citoplasmatiche costituite principalmente da α -sinucleina, dette “corpi di Lewy”; esistono poi forme ereditarie, caratterizzate da mutazioni del gene Park 1 (codificante per l' α -sinucleina) responsabili di una forma autosomica dominante di malattia di Parkinson, e mutazioni del gene Park 2, codificante per la parkina, legate a forme di Parkinson familiari autosomiche recessive ad esordio giovanile. In alcune famiglie sono state riscontrate altre associazioni genetiche (Park 3, Park 4, Park 5) (Puschmann, 2013).

Esistono infine forme tossiche di degenerazione neuronale; il modello più rappresentativo è quello della metil-fenil-tetraidropiridina (MPTP), un sottoprodotto della sintesi di droghe d'abuso, capace nell'uomo di indurre una

grave sindrome parkinsoniana sensibile alla L-dopa. L'esame istologico dell'encefalo in tali casi mostra una perdita di neuroni dopaminergici nella sostanza nera e la presenza di corpi di Lewy come nella malattia di Parkinson idiopatica. Studi farmacologici sulla scimmia hanno dimostrato che l'effetto dell'MPTP viene bloccato dagli inibitori della MAO B, un enzima necessario per la trasformazione dell'MPTP in MPP+, il quale è di fatto il principio tossico. All'interno dei neuroni dopaminergici l'MPP+ si lega con la neuromelanina dalla quale viene rilasciato in maniera progressiva. Questo viene quindi captato dai mitocondri ove inibisce il complesso I della catena respiratoria e i meccanismi di riduzione dei radicali liberi, la cui accumulazione sarebbe responsabile delle lesioni neuronali. Sostanze presenti nell'ambiente, come ad esempio il rotenone, potrebbero avere proprietà analoghe all'MPTP (Corsini et al., 2006).

- trattamento cronico con antagonisti di recettori dopaminergici (antipsicotici o neurolettici).

1.3 Schizofrenia

L'importanza dei sistemi dopaminergici centrali nel controllo delle funzioni psichiche è dimostrato dal fatto che la potenza clinica dei farmaci antipsicotici (neurolettici) utilizzati nella terapia della schizofrenia è linearmente correlata alla capacità di bloccare i recettori dopaminergici, specialmente del sottotipo D₂ (vedi dopo per la classificazione) (Ginovart et al., 2012). L'ipotesi che una alterazione della trasmissione dopaminergica fosse responsabile della patogenesi della schizofrenia è stata suggerita dal fatto che un importante e frequente effetto

collaterale dei farmaci antipsicotici è l'induzione di una sintomatologia simile a quella propria del morbo di Parkinson.

L'ipotesi è ulteriormente avvalorata dall'osservazione che farmaci che causano un aumento dei livelli di dopamina (L-DOPA, cocaina, amfetamine) provocano una psicosi simile alla forma paranoide della schizofrenia. Dati più recenti ottenuti in vivo mediante la tecnica PET (Positron Emission Tomography) da pazienti schizofrenici non ancora esposti a trattamento farmacologico, hanno dimostrato un considerevole aumento dei recettori D₂ a livello dei nuclei caudato e accumbens e nel tubercolo olfattorio (Suhara et al., 2007).

Occorre però tenere ben presente che questi cambiamenti potrebbero anche non essere la causa primaria delle psicosi ma solo la conseguenza di alterazioni funzionali a carico di altri sistemi neuronali.

I vari sistemi dopaminergici descritti in precedenza sembrano svolgere funzioni psichiche in parte distinte e peculiari. Il sistema mesolimbico sembra coinvolto nei processi di memoria e in quelli emotivi: modificazioni della percezione e delle capacità intellettuali compaiono in alcuni tipi di epilessia psicomotoria e sono molto simili a quelle che si osservano nei pazienti schizofrenici. Lesioni patologiche dell'area tegmentale laterale (da cui origina il sistema dopaminergico mesolimbico) provocano demenza e l'insorgenza di episodi psicotici. Il sistema dopaminergico mesocorticale proietta alla corteccia prefrontale che è coinvolta in importanti funzioni psichiche superiori quali l'attenzione, la motivazione, la pianificazione, l'organizzazione temporale del comportamento e la socializzazione. Si ritiene che l'attivazione di questo sistema giochi un ruolo importante nei fenomeni di dipendenza da farmaci e sostanze d'abuso, quali eroina, cocaina e alcool. È

importante ricordare che i pazienti affetti da morbo di Parkinson, in cui vi è una riduzione generalizzata dei neuroni dopaminergici, accanto alla sintomatologia motoria extrapiramidale mostrano anche ridotte capacità affettive e di motivazione e scarsa spontaneità.

L'insieme dei dati anatomici, funzionali, patologici e farmacologici ottenuti dai pazienti psicotici fa pensare che nei pazienti schizofrenici coesistano due diverse alterazioni dei sistemi dopaminergici. La prima, dovuta ad un aumento dell'attività del sistema mesolimbico e probabilmente mediata dai recettori D₂, D₃ e D₄ è responsabile dei sintomi "positivi" della schizofrenia (deliri, pensieri disordinati, allucinazioni tattili, uditive, visive, olfattive e gustative) e risponde molto bene al trattamento con antipsicotici; la seconda, caratterizzata da una riduzione dell'attività dopaminergica nell'area prefrontale, è responsabile dei sintomi "negativi" (sfera affettiva piatta o poco accentuata, scarsità a provare emozioni, alogia, anedonia, asocialità, abulia) e non risponde altrettanto bene ai farmaci antipsicotici.

L'ipotesi unificante che è stata proposta suggerisce che il difetto primario della schizofrenia sia una riduzione dell'attività delle proiezioni dopaminergiche mesocorticali alla corteccia prefrontale; quest'ultima eserciterebbe in condizioni normali un effetto inibitorio a feed-back sul sistema mesolimbico. Venendo a mancare l'inibizione prefrontale, si genererebbe l'iperattività dopaminergica della via mesolimbica, tipica della schizofrenia.

È importante però tener presente che l'ipotesi dopaminergica, benché attraente, rimane pur sempre una delle molte ipotesi di lavoro e offre anche il fianco a numerose critiche. Tra queste va ricordato che diversi farmaci antipsicotici mancano di selettività e sono attivi anche sui recettori 5-HT₂ e 5-HT₁ per la serotonina, e che

spesso la sintomatologia recede dopo diversi giorni o settimane di trattamento e non subito come sarebbe da aspettarsi per un semplice blocco recettoriale. È quindi probabile che queste disfunzioni siano da attribuirsi ad alterazioni di complessi circuiti regolatori che coinvolgono anche altri sistemi neurotrasmettitoriali.

1.4 ADHD (Disturbo da deficit dell'attenzione e dell'iperattività)

L'ADHD (abbreviazione in inglese) è uno dei più comuni disturbi neurocomportamentali e si manifesta nella prima infanzia. Questo disturbo è considerato ad oggi una condizione eterogenea potenzialmente cronica, che presenta sintomi rilevanti e problematiche associate che vanno a colpire diversi aspetti funzionali della vita di tutti i giorni. Studi epidemiologici indicano che il 3-7% dei bambini in età scolare e il 4-5% degli adolescenti e dei giovani adulti, rientra nei criteri del disturbo da deficit di attenzione stabiliti nel DSM-IV-TR.

I soggetti affetti da ADHD presentano delle difficoltà nei seguenti campi relativi all'attenzione e alle funzioni neuropsicologiche come soluzione dei problemi, abilità di pianificazione, grado di allerta e di attenzione, flessibilità cognitiva, attenzione mantenuta, inibizione delle risposte automatiche, memoria di lavoro non verbale. Oltre all'ADHD sono pochi quei disturbi relativi alla psichiatria infantile che presentano forti elementi di correlazione neurobiologica. I risultati di recenti studi neurofisiologici sostengono l'ipotesi che l'ADHD comporta un ipofunzionamento dei sistemi catecolaminergici e in particolar modo di quelli che agiscono nella corteccia prefrontale, evidenziando quindi l'importanza del ruolo che i circuiti dopaminergici fronto-striatali assumono nella patofisiologia dell'ADHD.

La dopamina è implicata nel controllo esecutivo, un processo che viene spesso attivato durante l'esecuzione di compiti che, come è stato dimostrato, stimolano quelle aree del cervello ricche di dopamina, come ad esempio la corteccia cingolata anteriore e la prefrontale laterale. Esistono prove concrete a dimostrazione del fatto che trattamenti farmacologici con sostanze psicostimolanti, come il metilfenidato (MPH), la destro-amfetamina o anche l'atomoxetina (inibitore della neurotrasmissione catecolaminergica), agiscono positivamente sui sintomi dell'ADHD. Gli psicostimolanti facilitano il rilascio delle catecolamine dalle zone di accumulo sulle sinapsi del sistema nervoso centrale e inibiscono il riassorbimento (reuptake). Sebbene l'esatto meccanismo di questo processo non sia del tutto noto, si pensa che gli psicostimolanti aumentino la concentrazione di noradrenalina e dopamina nei gangli della base, nel mesencefalo e nella corteccia prefrontale; questi neurotrasmettitori a loro volta aumentano la durata del processo attentivo e la capacità di concentrazione. Inoltre, recenti studi nel campo della genetica molecolare hanno messo in evidenza che una predisposizione genetica all'ADHD è attribuibile ad un malfunzionamento del sistema dei neurotrasmettitori.

1.5 Dipendenza da sostanze d'abuso e meccanismo della ricompensa

La dopamina regola i comportamenti e le emozioni attraverso il sistema dopaminergico mesolimbico. Cambiamenti a livello della neurotrasmissione mesolimbica sono spesso associati alla modificazione comportamentale. Agenti psicostimolanti, sostanze d'abuso, e ricompense naturali come ad esempio il cibo o il sesso possono causare alterazioni sostanziali a livello del sistema dopaminergico mesolimbico.

Sostanze psicoattive, come la cocaina e l'amfetamina, agiscono come rinforzi positivi aumentando la liberazione di dopamina a livello delle terminazioni assionali dei neuroni dell'area tegmentale ventrale. Alcune di queste sostanze provocano quest'effetto bloccando il trasportatore della dopamina (DAT) posizionato a livello del terminale presinaptico, prolungando così il tempo di permanenza della dopamina nella fessura sinaptica.

Sebbene molte sostanze responsabili delle tossicomanie modulino la trasmissione dopaminergica, non tutte lo fanno agendo sul trasportatore della dopamina. Ad esempio, la nicotina aumenta la liberazione di dopamina agendo a livello dei recettori colinergici presinaptici. Al contrario, gli agonisti dei recettori μ degli oppioidi agiscono da ricompensa perché inibiscono i neuroni GABAergici che, in condizioni normali, sopprimono l'attività dei neuroni dopaminergici dell'area tegmentale ventrale.

1.6 Recettori dopaminergici

La prima evidenza dell'esistenza dei recettori alla dopamina a livello del Sistema Nervoso Centrale si ha nel 1972, quando studi biochimici rivelano che la dopamina è in grado di stimolare l'enzima Adenilato Ciclasi (effettore). Successivamente, nel 1978, sulla base di studi farmacologici e biochimici, viene proposta la teoria secondo la quale esistono due famiglie di recettori alla dopamina, una stimolante l'attività dell'Adenilato Ciclasi e l'altra indipendente dal sistema generante AMP ciclico (cAMP). Viene infatti dimostrato che a livello dell'ipofisi la dopamina è in grado di inibire la secrezione di prolattina senza stimolare produzione di cAMP, ed inoltre che la sulpiride (un farmaco antipsicotico) è un antagonista della dopamina a livello

dell'ipofisi anteriore, ma non blocca l'enzima Adenilato Ciclasi sensibile alla dopamina a livello dello striato. Nel 1979, Keabian e Calne riassumono tutte queste osservazioni proponendo un recettore chiamato D₁ in grado di stimolare l'Adenilato Ciclasi e un recettore detto D₂ non collegato con tale enzima.

Studi successivi hanno confermato questa classificazione; così, nel tempo, questi due sistemi recettoriali sono stati differenziati dal punto di vista farmacologico, biochimico, fisiologico e anatomico.

Inoltre, sempre intorno alla fine degli anni '70, attraverso studi funzionali sul cane (flusso ematico a livello renale e accelerazione della frequenza cardiaca) è stata dimostrata l'esistenza di specifici recettori dopaminergici a livello periferico. Tali recettori sono stati chiamati DA₁ e DA₂, per distinguerli da quelli centrali; tuttavia nel tempo, studi biochimici e di biologia molecolare a livello dei tessuti periferici hanno rivelato notevoli similitudini tra il sistema recettoriale a livello del SNC e quello periferico, così che tale aspetto dicotomico è stato ben presto abbandonato.

Per almeno un decennio, il concetto di un sistema recettoriale duale D₁ e D₂ ha rappresentato la base per lo studio di questi recettori; in seguito all'introduzione di procedure di clonaggio genico, sono stati caratterizzati tre nuovi sottotipi di recettori dopaminergici, che sono stati chiamati D₃, D₄ e D₅/D_{1b} (fig. 4).

Dettagliati studi di tipo strutturale, farmacologico e biochimico hanno evidenziato che tutti i sottotipi dei recettori alla dopamina ricadono all'interno della classificazione D₁-D₂. I recettori D₁ e D₅/D_{1b} condividono, infatti, un'elevata omologia a livello dei domini transmembrana. In modo analogo, le sequenze transmembrana sono altamente conservate anche tra i recettori D₂, D₃, D₄. Farmacologicamente, il recettore D₅/D_{1b} mostra le classiche caratteristiche ligando-

recettore proprie del recettore D₁, mentre i recettori D₃ e D₄ possiedono elevata affinità di legame nei confronti di molecole specifiche per D₂. Inoltre, l'iniziale distinzione tra recettori D₁ che sono legati "positivamente" all'Adenilato Ciclasi, e recettori D₂ legati "negativamente" a tale effettore, sembra poter essere applicata anche ai recettori D₅/D_{1b} (stimolazione di AC) e D₃, D₄ (inibizione di AC).

La classificazione odierna prevede dunque (Missale et al, 1998):

- i recettori "tipo D₁" che comprendono i recettori D₁ e D₅/D_{1b}. Ad oggi sappiamo che la forma D₅ e la forma D_{1b} rappresentano rispettivamente l'equivalente umano e del ratto dello stesso recettore.

Questa famiglia di recettori è accoppiata ad una proteina G del tipo G_s, che attiva l'Adenilato Ciclasi, l'enzima che converte l'ATP in cAMP.

Questi recettori vengono espressi soprattutto dai neuroni della corteccia e dell'ippocampo (D₁ viene in parte espresso dai neuroni del nucleo caudato) ed hanno un'affinità molto bassa per la maggior parte degli psicofarmaci.

- i recettori "tipo D₂" comprendono i recettori D₂, D₃, D₄.

Essi sono accoppiati ad una proteina G del tipo G_i; questa inibisce l'attività dell'Adenilato Ciclasi, con un conseguente decremento dei livelli di cAMP.

Questi recettori vengono espressi in modo particolarmente spiccato dai neuroni del nucleo caudato, del putamen e del nucleo accumbens, ma sono anche presenti nell'amigdala, nell'ippocampo e in gran parte della corteccia cerebrale.

Famiglia genica	Sottotipo	Sistema di trasduzione
D ₁ – like	D ₁	↑ Adenilato Ciclasi
	D ₅	
D ₂ – like	D ₂ (D _{2S} , D _{2L})	↓ Adenilato Ciclasi ↑ canali K ⁺ ↓ canali Ca ²⁺
	D ₃	
	D ₄	

Fig. 4 Classificazione dei recettori dopaminergici

I recettori alla dopamina sono essenzialmente recettori accoppiati a proteine G (GPCR in inglese), possiedono 7 domini transmembrana e sono accoppiati, come già visto, a proteine G, siano esse di natura stimolante o inibitoria.

Dal punto di vista strutturale, esistono notevoli analogie all'interno della stessa famiglia recettoriale: ad esempio i recettori D₁ e D₅ possiedono l'80% d'identità all'interno dei loro domini transmembrana, D₂ e D₃ il 75%, e D₂ e D₄ il 53%.

Interessante è la presenza di varianti, tra cui le più importanti sono:

- il recettore D₂ esiste in 2 isoforme, definite D_{2S} (short) e D_{2L} (long) derivanti da uno *splicing* alternativo; la differenza sussiste essenzialmente nell'inserzione di un tratto di 29 aminoacidi a livello del terzo loop intracellulare. Poiché questo loop riveste un ruolo centrale nell'accoppiamento del recettore con la proteina G, l'esistenza di queste 2 forme implica probabilmente una differenza nel funzionamento, anche se per il momento non ci sono importanti dati a riguardo.

Entrambe le forme possiedono principalmente la stessa distribuzione, lo stesso profilo farmacologico, la stessa capacità di inibire l'adenilato ciclasi (anche se l'affinità di D_{2S} è maggiore rispetto al D_{2L}).

Le 2 isoforme si accoppiano probabilmente a subunità α delle proteine G differenti (G_{i-2 α} e G_{i-3 α}); inoltre sembrano possedere 2 differenti pattern di regolazione.

- Anche il recettore D₄ esiste in alcune isoforme che differiscono per il numero di ripetizioni di un tratto di 16 aminoacidi a livello del terzo loop intracellulare. La forma con quattro ripetizioni, detta D_{4.4} è la forma più diffusa nella specie umana.

Il significato funzionale di queste varianti non è ancora stato ben chiarito; sussistono alcune differenze per quanto riguarda l'affinità nei confronti del farmaco clozapina, ma nessuna di queste isoforme sembra essere correlata ad un aumento dell'incidenza di schizofrenia.

1.7 Trattamento farmacologico della malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson è caratterizzata principalmente dall'insorgenza di disturbi del movimento, ma è apparso evidente negli ultimi anni come la sintomatologia motoria sia associata a sintomi non motori e non dopaminergici, presenti inevitabilmente durante la progressione naturale della malattia, e talvolta anche nella fase che precede l'esordio del disturbo motorio. I sintomi non motori possono divenire rilevanti nelle fasi avanzate, divenendo determinanti sulla disabilità e la qualità della vita, anche in considerazione della scarsa responsività alla terapia con L-dopa (Rascol et al., 2011). La terapia farmacologica dopaminergica inoltre, appare

efficace nel migliorare solo alcuni dei sintomi del Parkinson, peraltro perdendo efficacia con l'avanzare della condizione, e mostrandosi scarsamente utile nel modificare i sintomi cosiddetti assiali, rappresentati dai disturbi del linguaggio, dalla rigidità assiale, dall'alterazione della postura, del cammino e della stabilità posturale. Il corredo di sintomi non motori concorrono nel determinare la grave disabilità del paziente compromettendo la sua stessa qualità di vita e, di conseguenza, di quella dei caregiver.

A oggi non esiste un trattamento risolutivo in grado di migliorare la degenerazione e arrestare la progressione di malattia. Le strategie terapeutiche adottate hanno pertanto una efficacia sintomatica, mirata al controllo dei sintomi senza capacità di interferire, modificandolo, con il decorso della malattia.

A fronte di una riconosciuta efficacia terapeutica della L-dopa nel controllo dei sintomi motori, associata a un relativamente basso profilo di rischio, la ricerca sul trattamento farmacologico del paziente parkinsoniano si è orientata alla individuazione di trattamenti alternativi che consentissero di ritardare l'inserimento di L-dopa modificando i tempi di comparsa degli effetti indesiderati da trattamento a lungo termine e il deterioramento della risposta. La terapia prolungata con L-dopa può, infatti, dar luogo a diverse complicazioni. Le discinesie e altri sintomi motori sono tra le più frequenti, assieme a una riduzione e una fluttuazione della risposta al trattamento. La riduzione della risposta al trattamento è legata alla natura cronico-degenerativa della patologia che determina una progressiva compromissione del sistema dopaminergico. La fluttuazione giornaliera della risposta è invece legata alla durata dell'emivita del farmaco, che può determinare una variazione delle

concentrazioni plasmatiche di principio attivo, a una variazione della risposta dei recettori dopaminergici o un'alterazione dell'assorbimento intestinale del farmaco.

Nuove categorie farmacologiche sono state inserite in commercio nel corso degli anni, con l'obiettivo di posticipare l'inserimento, e/o di migliorarne l'efficacia riducendo le fluttuazioni motorie, la durata delle fasi off, in cui maggiore appare la disabilità motoria legata al diminuito livello di disponibilità del farmaco, e ridurre le complicazioni, motorie e non, rappresentate da discinesie e fluttuazione di sintomi non motori.

La L-dopa (3,4-diidrossi-L-fenilalanina) è un precursore della dopamina che trova il suo razionale impiego nel ripristino dei livelli di dopamina nel sistema nervoso centrale, basandosi sul presupposto che i sintomi motori della malattia sono principalmente determinati dalla degenerazione del circuito dopaminergico nigrostriatale.

L'utilizzo di L-dopa, un precursore della dopamina, è legato al fatto che, a differenza della dopamina stessa, essa è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica, essendo poi metabolizzata a dopamina. Tuttavia, il catabolismo di un grosso contingente di farmaco avviene a livello periferico, determinando l'insorgenza di diversi eventi avversi, e riducendo notevolmente la quota di farmaco poi disponibile a livello centrale, che si rivela quindi scarsamente efficace sui sintomi. Allo scopo di ridurre tali problematiche, la L-dopa viene attualmente somministrata in associazione a una molecola che inibisca la dopa-decarbossilasi (DDI), un enzima di degradazione, riducendone il metabolismo periferico e aumentandone così la biodisponibilità a livello centrale.

Le due combinazioni farmaceutiche di L-dopa e DDI più diffuse sono L-dopa-benserazide e L-dopa-carbidopa.

La prima classe di farmaci studiata, in grado di attivare i recettori dopaminergici in assenza di dopamina, è rappresentata dai cosiddetti agonisti dopaminergici. Gli agonisti della dopamina sono classificabili in due gruppi, ergolinici e non ergolinici, sulla base della molecola da cui è derivato il principio attivo. Gli agonisti della dopamina (DA) ergolinici (bromocriptina e cabergolina), sono derivati dall'ergolina, un alcaloide prodotto dall'ascomiceta *Claviceps purpurea*. Tra gli agonisti della dopamina non ergolinici più utilizzati ci sono apomorfina, lisuride, pramipexolo, ropinirolo, rotigotina.

Diversi effetti avversi sono stati recentemente segnalati in associazione al trattamento con queste due categorie farmacologiche. Gli agonisti della dopamina ergolinici sembrano associati a un aumentato rischio di valvulopatia e fibrosi pleuropolmonare, cardiaca e retroperitoneale, mentre entrambi i gruppi sono stati associati a un aumento del rischio di disturbi del controllo degli impulsi e aumentata sonnolenza. Recentemente, per i farmaci pramipexolo e ropinirolo sono stati identificati con una certa prevalenza effetti collaterali come il "gambling" patologico e l'ipersessualità (Bonuccelli et al., 2013). E' stata considerata anche un'altra categoria farmacologica con l'obiettivo di aumentare la disponibilità di dopamina, riducendone il catabolismo attraverso la inibizione di uno degli enzimi di degradazione, la monoamino-ossidasi (MAO). Gli inibitori delle MAO, I-MAO, disponibili in commercio sono selegilina e rasagilina.

Gli inibitori delle catecol-O-metiltransferasi (COMT), tolcapone ed entacapone, bloccano questi enzimi di degradazione, a livello centrale e/o periferico, della

dopamina, e sono utilizzati con lo scopo di aumentare la biodisponibilità della L-dopa, riducendone il dosaggio, le fluttuazioni (wearing off) e le complicazioni motorie, principalmente discinesie.

Anche altre classi di farmaci sono stati testate e utilizzate negli anni, tra cui anticolinergici e amantadina. Recentemente, anche molti integratori alimentari, quali omega 3, tocoferolo e coenzima Q10, sono stati studiati per identificare una loro possibile azione protettiva o terapeutica dei sintomi motori e/o non motori della malattia di Parkinson.

1.8 Trattamento farmacologico della Schizofrenia con dopamino-antagonisti

Fino agli anni '50 non esistevano trattamenti efficaci per la schizofrenia. Il primo trattamento utile fu la clorpromazina, la cui storia è molto interessante. Il neurochirurgo francese Henri Laborit pensò che lo stato d'ansia che provano i pazienti prima di un intervento chirurgico potesse determinare una liberazione massiva di istamina da parte dei mastociti e che l'istamina, così liberata, potesse essere responsabile di alcuni effetti collaterali dell'anestesia, ivi compresi i casi di morte improvvisa. Alla ricerca di qualche farmaco in grado di calmare lo stato ansioso dei pazienti, Laborit saggiò una serie di prodotti antistaminici. Nella sperimentazione di queste sostanze, Laborit osservò che la clorpromazina risultava particolarmente efficace.

L'azione calmante di questa sostanza risultava talmente efficace che Laborit cominciò a pensare che la clorpromazina potesse avere un campo d'azione assai più ampio di quello ipotizzato e, effettivamente, egli si rese subito conto che questa sostanza era in grado di calmare molti pazienti affetti da sindromi di carattere

psichiatrico. Nel 1951, quest'idea fu saggiata da John Delay e Pierre Deniker che osservarono come alti dosaggi di clorpromazina avessero un pronunciato effetto calmante in pazienti agitati ed aggressivi che presentavano sintomi di schizofrenia o di frenosi maniaco-depressiva.

Si pensava dapprima che la clorpromazina agisse come un tranquillante, calmando il paziente senza sedarlo in maniera troppo drastica. Tuttavia, a partire dal 1964, risultò ben chiaro che questa sostanza, così come molte altre del gruppo delle fenotiazine, esercitavano effetti specifici nel trattamento dei sintomi psicotici della schizofrenia. Il trattamento con questi farmaci, infatti, mitiga o abolisce del tutto i deliri, le allucinazioni e alcune forme di alterazione del pensiero. Inoltre, nei pazienti in cui la forma va incontro a periodi di remissione, se la somministrazione di queste sostanze viene protratta anche durante queste fasi, la frequenza delle ricadute si riduce.

Queste osservazioni hanno permesso di caratterizzare un gruppo di farmaci, che oggi vengono chiamati antipsicotici tipici, e che comprendono le fenotiazine (a partire dalla clorpromazina), i butirofenoni (aloperidolo) ed i tioxanteni. Più recentemente, è stata provata anche l'efficacia, nel trattamento della schizofrenia, di un secondo gruppo di sostanze, i cosiddetti antipsicotici atipici (clozapina, risperidone, olanzapina). Gli antipsicotici atipici sono assai più efficaci di quelli tipici per la terapia dei sintomi negativi (e delle turbe cognitive) della schizofrenia ed esercitano effetti secondari più lievi a carico del sistema extrapiramidale.

È naturale chiedersi quale sia il meccanismo d'azione di questi farmaci. Paradossalmente, i primi indizi sul tipo di attività cellulare esercitata da queste sostanze furono desunti dall'analisi dei loro principali effetti collaterali. Questi farmaci determinano spesso la comparsa di una sindrome che assomiglia al

parkinsonismo, denominazione che raccoglie un insieme di sindromi che dipendono da una deficienza di dopamina. Seguendo un suggerimento di Arvid Carlsson, una serie di ricerche dimostrò che molti psicofarmaci agiscono bloccando i recettori della dopamina. Si pensò, di conseguenza, che un'eccessiva attività della trasmissione dopaminergica potesse rappresentare un elemento importante nella patogenesi della schizofrenia.

I farmaci antipsicotici tipici hanno un'elevata affinità per i recettori D₂, che vengono perciò ritenuti uno dei siti principali dell'azione terapeutica di queste sostanze. In effetti, l'efficacia terapeutica di questi agenti antipsicotici nei pazienti affetti da schizofrenia è strettamente correlata con la loro affinità per i recettori D₂; come già detto, i recettori D₂ appartengono ad una famiglia di recettori correlati fra loro (tipo D₂), che comprende anche i recettori D₃ e D₄, e sono in grado di inibire l'Adenilato Ciclasi. Poiché i recettori D₂ vengono espressi nel nucleo caudato e nel putamen, essi, con ogni probabilità, contribuiscono alla comparsa degli effetti collaterali di tipo extrapiramidale provocati dai farmaci antipsicotici. Anche l'amigdala, l'ippocampo ed il neocortex, rappresentano, tuttavia, possibili siti d'attacco.

Le sostanze antipsicotiche atipiche come la clozapina si legano ai recettori D₃ e, con affinità ancora maggiore, ai recettori D₄. Questi due sottotipi di recettori del gruppo D₂ vengono espressi soprattutto nel sistema limbico e nella corteccia, mentre vengono scarsamente espressi nei nuclei della base.

Il meccanismo di azione dei farmaci antipsicotici atipici che li differenzia dai tipici è piuttosto complesso e dovuto principalmente ad una minore affinità per il recettore D₂ ma anche all'attività su altri recettori, come quelli serotoninergici per esempio, che possono contrastare il blocco dopaminergico della via nigro-striatale.

1.9 Ruolo del sistema serotonergico sulla funzione dopaminergica

Il sistema serotonergico è in grado di modulare il rilascio di dopamina a livello del SNC sia attraverso collegamenti diretti, sia attraverso circuiti neuronali complessi, che coinvolgono altri neurotrasmettitori, come l'acido γ -amminobutirrico (GABA) e il glutammato (Di Matteo et al, 2009).

La serotonina gioca dunque un ruolo importante nella modulazione del comportamento; infatti alterazioni a carico di entrambe le trasmissioni serotonergica e dopaminergica, sono implicate nella fisiopatologia di alcuni disordini neuropsichiatrici, tra cui la schizofrenia e la malattia di Parkinson.

Lo sviluppo di agenti farmacologici con attività agonista od antagonista sui diversi tipi recettoriali della serotonina, ha permesso di capire meglio il ruolo del sistema serotonergico nella modulazione dell'attività dopaminergica a livello limbico, striatale e corticale.

La precisa natura dell'interazione tra il sistema dopaminergico e quello serotonergico è ancora oggi oggetto di dibattito, in quanto molto complicata.

I corpi cellulari serotonergici presenti a livello dei nuclei del rafe dorsale e mediale proiettano le proprie terminazioni verso le cellule dopaminergiche dell'area tegmentale ventrale (A10) e della substantia nigra (A9), raggiungendo infine lo striato, il nucleo accumbens e la corteccia prefrontale: si realizza in questo modo una complicata connessione modulatoria tra sistema serotonergico e sistema dopaminergico che spesso è diretta, mentre altre volte è mediata da una complessa rete interneuronale che coinvolge anche altri sistemi, come quello eccitatorio glutammatergico e quello inibitorio gabaergico.

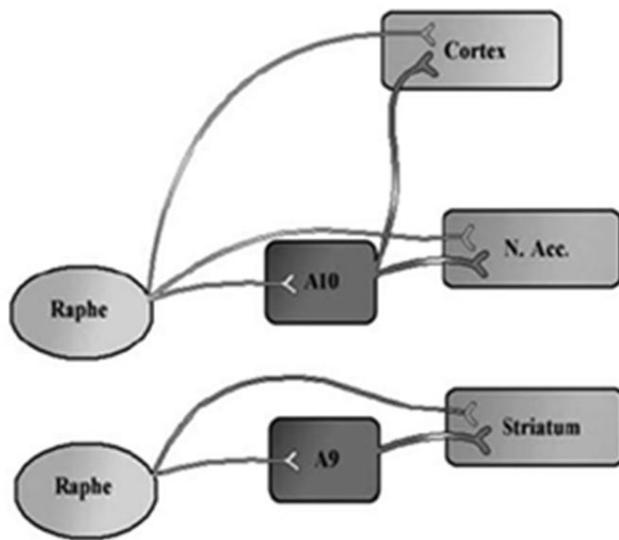


Fig. 5 Rappresentazione schematica dell'interazione serotonina-dopamina a livello del sistema dopaminergico mesolimbico e nigrostriatale.

Fatta eccezione per il recettore ionotropico 5-HT₃, i recettori serotoninergici fanno parte della famiglia dei GPCR: sono divisi principalmente in 7 classi (5-HT₁ – 5HT₇) ognuna delle quali è a sua volta suddivisa in sottotipi; ogni sottotipo recettoriale è associato ad una specifica proteina G, ed è dunque in grado di modulare un segnale eccitatorio od inibitorio.

Tra i vari recettori serotoninergici, quelli che ad oggi mostrano una particolare importanza nel capitolo della patologia schizofrenica, sono il 5-HT_{1A} e la famiglia dei 5-HT₂.

Numerosi studi dimostrano che la maggior parte degli antipsicotici atipici possiedono una importante affinità per i recettori 5HT₂ del cervello umano e si comportano da antagonisti nei confronti di questi. Studi clinici preliminari evidenziano che l'antagonista selettivo 5-HT_{2A/2C} ritanserina migliora i sintomi negativi e attenua gli

effetti collaterali motori extrapiramidali indotti dal trattamento con antipsicotici tipici.

L'importanza dell'antagonismo sul recettore 5-HT₂ nella farmacoterapia della schizofrenia è sottolineato dal fatto che la clozapina si comporta come antagonista non solo sul recettore D₂, ma anche sul recettore 5-HT_{2A}, per il quale mostra un'elevata affinità di legame. █

Famiglia genica	Sottotipo	Sistema di trasduzione
5-HT ₁	1 _A , 1 _B , 1 _D , 1 _E , 1 _F	Proteina G _i /G _o
5-HT ₂	2 _A , 2 _B , 2 _C	Proteina G _q /G ₁₁
5-HT ₃		Canale ionico Na ⁺ e K ⁺
5-HT ₄		Proteina G _s
5-HT ₅	5 _A , 5 _B	Proteina G _i /G _o
5-HT ₆		Proteina G _s
5-HT ₇		Proteina G _s

Fig. 6 Classificazione dei recettori serotoninergici

Infatti, attraverso vari esperimenti condotti in vitro, Meltzer et al. (1989) realizzarono che una delle differenze importanti tra antipsicotici tipici ed atipici è l'elevata affinità di questi ultimi nei confronti non solo dei recettori D₂ ma anche dei 5-HT_{2A}. Inoltre, suggerirono che il meccanismo antipsicotico di questi farmaci derivava dalla loro capacità di raggiungere un antagonismo equilibrato su entrambi i sistemi dopaminergico e serotoninergico.

Altri studi hanno dimostrato che la maggior parte degli antipsicotici atipici (clozapina, olanzapina, risperidone, fluperlapina, tenilapina) si comporta anche da agonista inverso nei confronti del recettore 5-HT_{2C}, implementando così la

conoscenza sui meccanismi responsabili dei miglioramenti clinici sviluppati da questa classe farmacologica.

Infine, un largo numero di composti antipsicotici atipici mostra un'attività agonista nei confronti del recettore 5-HT_{1A}; questo recettore possiede un'attività funzionale opposta rispetto a quella del recettore 5-HT_{2A}, e ciò suggerisce che gli agonisti 5-HT_{1A} possono modulare la trasmissione dopaminergica nel SNC nello stesso modo in cui lo fanno gli antagonisti 5-HT_{2A}.

Riassumendo, l'efficacia clinica sui sintomi negativi caratteristica degli antipsicotici atipici è in parte ascrivibile alla loro capacità di modulare l'attività dopaminergica soprattutto a livello della corteccia prefrontale attraverso il sistema serotoninergico.

Poiché le proiezioni serotoninergiche dai nuclei del rafe innervano tutte le componenti del circuito dei gangli della base è verosimile che la serotonina giochi un ruolo importante nella modulazione del sistema dopaminergico anche a questo livello.

Ciò è di fondamentale importanza per lo sviluppo di nuovi composti per il trattamento della malattia di Parkinson; in questo i sottotipi recettoriali di particolare interesse sono il 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{2C}.

1.10 Recettori accoppiati a proteine G (GPCRs)

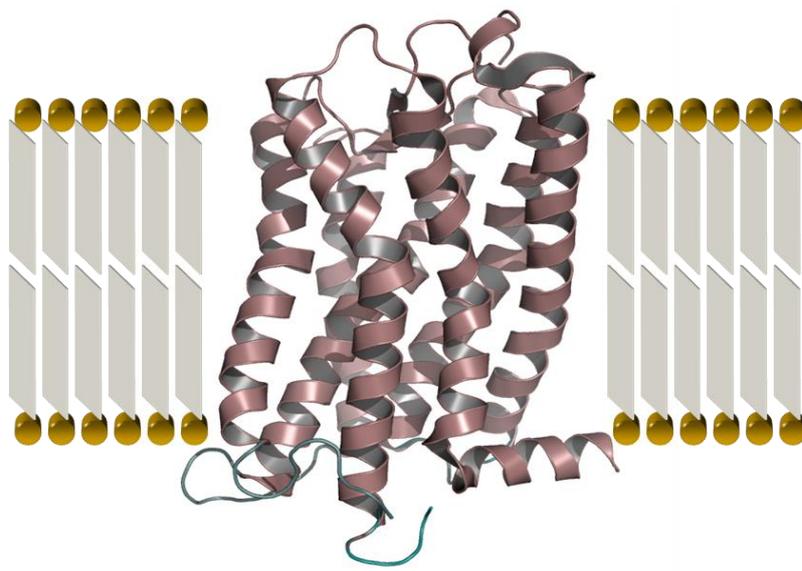


Fig. 7 Struttura tridimensionale di un GPCR

I recettori accoppiati a proteine G (GPCR in inglese) rappresentano la più grande famiglia di proteine di membrana, formata da più di 800 recettori. Essi mediano un'enorme quantità di risposte cellulari ad ormoni e neurotrasmettitori, nonché a stimoli visivi, olfattivi e gustativi.

Dal punto di vista strutturale, sono essenzialmente costituiti da 7 segmenti transmembrana con struttura ad α -elica, collegati attraverso loop disposti in modo alternato a livello intra ed extracellulare.

Analizzando le sequenze aminoacidiche, si individuano tre principali famiglie di GPCRs (Bockaert et al.,1999), che sono poi ulteriormente suddivise in sottogruppi:

- La *famiglia 1a* comprende GPCRs per piccoli ligandi; alcuni modelli sono il recettore alla rodopsina e i recettori beta-adrenergici;

- La *famiglia 1b* comprende recettori per peptidi il cui sito di legame include la porzione N-terminale e i loops extracellulari del recettore.
- La *famiglia 1c* contiene recettori per ormoni glicopeptidici, come LH, TSH, FSH; è caratterizzato da un grande dominio extracellulare.
- I recettori della *famiglia 2* possiedono una morfologia simile a quelli del gruppo 1c, pur non possedendo alcuna omologia nelle sequenze aminoacidiche; i ligandi includono molecole ad alto peso molecolare, come il glucagone, la secretina.
- La *famiglia 3* contiene i recettori metabotropici al glutammato, i recettori al calcio, e i recettori GABA-B.
- La *famiglia 4* comprende i recettori ai ferormoni (VNs) associati alla proteina G_i.
- La *famiglia 5* include i recettori “frizzled” e “smoothened” coinvolti particolarmente nello sviluppo embrionale.

La via che parte dall'attivazione del recettore, all'attivazione della proteina G, fino all'attivazione dell'effettore legato alla membrana segue una sequenza di eventi che non dipende dallo stimolo specifico (Karp, biologia cellulare e molecola, II^a edizione).

Il legame del ligando al suo recettore accoppiato a una proteina G causa un cambiamento nella conformazione del recettore che aumenta la sua affinità per la proteina G. Il recettore unito al ligando si lega alla proteina G sulla superficie interna della membrana, formando un complesso recettore-proteina G. L'interazione con il recettore induce un cambiamento conformazionale della subunità α che causa il

rilascio del GDP ad essa legato e la sostituzione con il GTP. Mentre è nel suo stato attivato, un singolo recettore è capace di attivare una successione di molecole di proteina G, fornendo la prima fase di amplificazione nella via di attivazione.

Lo scambio del GDP con il GTP cambia la conformazione della subunità $G\alpha$, provocando la sua dissociazione dal recettore e dalle altre due subunità della proteina G, che rimangono assieme come un complesso $G\beta\gamma$. Ogni subunità $G\alpha$ dissociata (con attaccato GTP) è libera di attivare una molecola di effettore, come l'Adenilato Ciclasi o la Fosfolipasi C, che rende operativo il sistema del secondo messaggero. Il complesso delle subunità $G\beta\gamma$ potrebbe legarsi a sua volta ad effettori a valle, la maggior parte delle volte a canali ionici, fornendo un'ulteriore via per la trasmissione di segnali nella cellula bersaglio. La segnalazione da parte della subunità $G\alpha$ attivata viene spenta attraverso l'idrolisi della molecola di GTP a GDP. Le subunità $G\alpha$ possiedono una debole attività GTPasica, che permette loro di idrolizzare lentamente il GTP legato e di inattivarsi da sole. La fine della risposta è accelerata dall'interazione con una proteina accessoria (GAP) che aumenta l'efficienza di catalasi GTPasica da parte della subunità $G\alpha$. Una volta che il GTP è idrolizzato, la $G\alpha$ -GDP può riassociarsi con le subunità $G\beta\gamma$ per riformare il complesso trimetrico inattivo e riportare il sistema allo stato di riposo.

A questo punto, dopo essere stato attivato, il recettore viene "spento" attraverso meccanismi di desensibilizzazione e internalizzazione. Il fenomeno della desensibilizzazione recettoriale si verifica principalmente in 2 fasi. Nella prima fase il dominio citoplasmatico del recettore GPCR attivato viene fosforilato da uno specifico tipo di chinasi chiamata chinasi del recettore accoppiato a proteine G (G Protein-Coupled Receptor kinase, GRK). La fosforilazione del recettore GPCR

“prepara” per la seconda fase, rappresentata dal legame di una proteina chiamata *β-arrestina*, che inibisce la capacità del recettore di attivare altre proteine G; la cellula smette di rispondere allo stimolo, anche quando quello stimolo è ancora presente sulla superficie esterna della cellula.

Le molecole di *arrestina*, mentre sono legate ai recettori GPCR fosforilati, sono anche in grado di legarsi a molecole di clatrina situate in fossette rivestite di questa proteina. L'interazione fra l'*arrestina* legata e la clatrina promuove l'internalizzazione del recettore fosforilato mediante endocitosi.

I recettori rimossi dalla superficie per endocitosi possono essere defosforilati e ritornare sulla membrana plasmatica, oppure possono essere distrutti dall'apparato endocitico della cellula.

Recentemente il dogma secondo il quale l'attività di trasduzione del segnale da parte del GPCR è confinata alla membrana cellulare è stato in parte superato; attraverso l'utilizzo di un nanoanticorpo (Nb-37) legato ad una proteina fluorescente (GFP) in grado di riconoscere esclusivamente un GPCR attivato, è stato possibile dimostrare che l'attività di tale recettore (recettore β_2 -adrenergico) presenta una prima fase, principale, a livello della membrana citoplasmatica, ed una seconda fase a livello dell'endosoma, una volta che il recettore è stato internalizzato. Inoltre, la seconda fase di attivazione contribuisce alla produzione di cAMP. Inibendo la formazione dell'endosoma (e quindi l'internalizzazione del recettore) il livello di cAMP tende a diminuire, soprattutto nel periodo di attivazione più tardivo (Irannejad et al., 2013).

1.11 ERK

Le MAPKs, (mitogen-activated protein kinases) sono delle serin-treonin kinasi che mediano il segnale all'interno della cellula a partire da uno stimolo esterno, e sono associate ad una larga varietà di attività cellulari, come ad esempio la proliferazione, la differenziazione, la protezione, la morte, e la trasformazione.

La famiglia delle MAPKs include numerose proteine, tra cui le più importanti sono rappresentate dalle ERK 1-2 (extracellular signal-regulated kinases 1-2), p38, JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase). Per ognuno di questi enzimi esistono inoltre diverse isoforme.

Ogni pathway legato alle MAPK comprende almeno 3 componenti: una MAPK chinasi chinasi (MAP3K), una MAPK chinasi (MAP2K) ed una MAPK: ciò rende conto della notevole amplificazione di segnale a cui questa "cascata" fosforilativa è soggetta.

La famiglia delle ERK rappresenta uno dei più importanti e dunque più studiati meccanismi di signaling intracellulare. Esso media la trasmissione del segnale da una larga varietà di recettori attivati a livello della membrana, a effettori presenti a livello citoplasmatico e nucleare.

Gli elementi principali del segnale mediato da ERK 1 e 2 comprendono le Raf chinasi (B-Raf e Raf1) che fosforilano e attivano le MAP chinasi chinasi (MEK 1 e 2), le quali a loro volta attivano ERK 1 e ERK 2.

Le ERK fosforilano e attivano altre protein chinasi (tra cui RSK1-4, MSK1/2, MNK 1/2) che sono responsabili della regolazione della trascrizione e della traduzione genica.

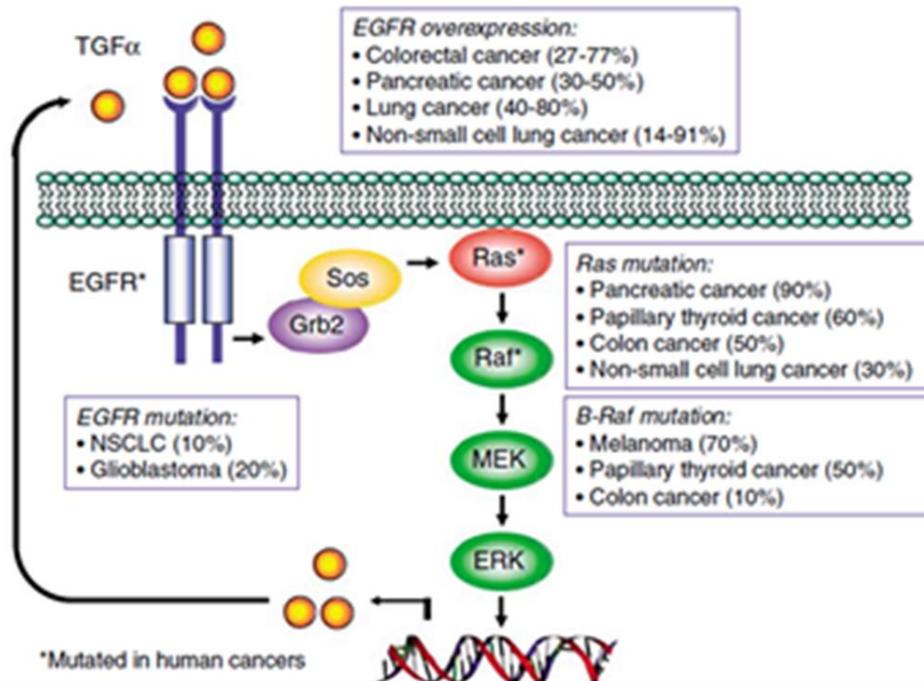


Fig. 8 Via di segnalazione di EGFR/Ras/ERK (Roberts and Der, 2007)

ERK 1 e 2 condividono l'84% dell'identità di sequenza, ma poco sappiamo rispetto all'azione specifica delle singole isoforme. Entrambe le isoforme sono espresse in maniera ubiquitaria, sono attivate in modo coordinato, e possiedono gli stessi targets. L'espressione di ERK 2 è maggiore rispetto a ERK 1; inoltre sia ERK 1 che 2 sono maggiormente espresse a livello neuronale, rispetto ad altri tipi cellulari.

A livello del sistema nervoso, così come negli altri tessuti, ERK 1 e 2 sono coinvolte in diversi processi, tra cui la genesi di cellule staminali neurali, apprendimento, e memoria. Durante lo sviluppo le ERK rispondono principalmente ai fattori di crescita attraverso l'attivazione dei recettori tyrosin-chinasici. Nel sistema nervoso maturo, le ERK sono essenziali nella plasticità sinaptica.

Il pathway di MAPK è implicato in alcune patologie umane, come ad esempio i disordini neurodegenerativi, tra cui malattia di Alzheimer (AD) e morbo di Parkinson (PD) (Eun Kyung Kim et al., 2011). In realtà, ERK 1 e 2 sono coinvolte in numerose malattie, tra cui per esempio nella patologia del cancro (McCubrey, 2012).

1.12 GPCR e recettori tirosin chinasi nella attivazione di ERK

Un concetto di fondamentale importanza nella cascata fosforilativa di ERK 1 e ERK 2 è il meccanismo di transattivazione da parte di un GPCR nei confronti dei recettori tirosin chinasi (in inglese RTK). I RTK sono considerati da sempre come le strutture recettoriali di membrana maggiormente implicate nei meccanismi di sopravvivenza e proliferazione cellulare; essi infatti sono attivati da una larga varietà di fattori trofici, come EGF, FGF, PDGF, VEGF, BDNF, GDNF e NGF. La maggior parte di questi recettori esiste in forma monomeric, con una regione extracellulare N-terminale, una regione idrofobica transmembrana di circa 30 aa, e una regione intracitoplasmatica C-terminale responsabile dell'attività chinasi. L'attivazione del recettore comporta la dimerizzazione dello stesso: il legame con il ligando provoca un cambiamento conformazionale dell' N-terminale del recettore che, causando la dimerizzazione dei domini extracellulari, permette la diffusione laterale dei domini citoplasmatici, consentendo quindi il contatto tra i C-terminali e attivando l'attività chinasi.

La scoperta che l'attivazione di ERK mediata dai GPCR è molto spesso indistinguibile da quella mediata dal recettore EGFR ha portato a proporre un modello di convergenza di queste due vie recettoriali sull'attivazione del pathway di ERK.

Successivamente i ricercatori hanno identificato due modelli di transattivazione di RTK indotta dai GPCR (Christopoulos et al., 2005).

Il primo modello è indipendente dal ligando e richiede un'associazione fisica tra gli RTKs e i GPCR e/o dei secondi messaggeri più a valle come il Ca^{2+} e la proteina Src (è una proteina ad attività chinasica importante nell'amplificazione del segnale, coinvolta spesso nella patogenesi tumorale). Il secondo modello, ligando dipendente, definito anche modello "inside-out", è ben rappresentato dal modello EGFR. I secondi messaggeri che si formano a valle dell'attivazione dei GPCR attivano delle metalloproteasi intracitoplasmatiche (MMP) che clivano il dominio di ancoraggio alla membrana dal pro-ligando del recettore EGFR, rilasciando la forma attiva Hb-EGF in ambiente extracellulare che interagisce con il recettore EGFR. Ciò porta all'autofosforilazione di tale recettore con l'attivazione del segnale ERK.

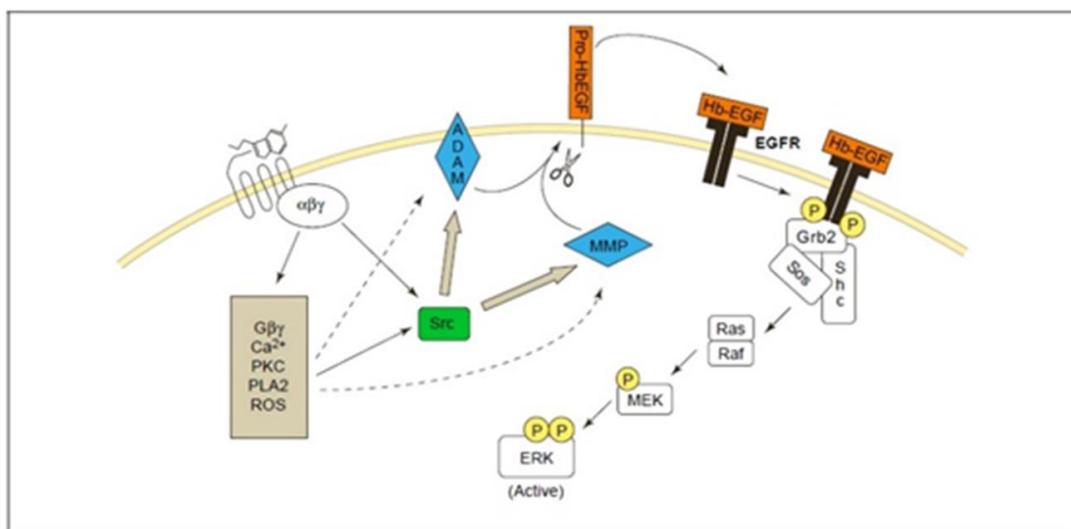


Fig. 9 Modello di transattivazione "inside-out" del recettore EGFR (Christopoulos et al., 2005)

Il meccanismo della transattivazione è descritto in maniera dettagliata in alcune recenti review (Wetzker et al.,2003; Shah et al.,2004).

L'interazione tra i recettori GPCR e i recettori tirosin chinasi è di notevole interesse nello sviluppo di nuove terapie farmacologiche di alcune patologie neurodegenerative, come la malattia di Alzheimer (AD) e la malattia di Parkinson (PD).

È stato ampiamente dimostrato che i recettori di GPCR sono in grado di modulare l'attività di altre proteine di membrana, come i canali ionici e i recettori tirosin chinasi. L'interazione corretta tra questi tre attori è essenziale per molte attività del sistema nervoso centrale (SNC), compresa la plasticità sinaptica, che si ritiene essere alla base dei processi di apprendimento e memoria (Davis et al., 2006; Samuels et al. 2009). Al contrario, sia la disfunzione sinaptica che la perdita di sinapsi sono altamente correlate al declino cognitivo nella malattia di Alzheimer (AD). Di conseguenza, numerosi interventi farmacologici sono stati testati per il recupero della disfunzione sinaptica e del decadimento cognitivo in modelli AD dove i recettori metabotropici al glutammato (mGluR) possono avere una notevole rilevanza (Nisticò et al., 2012).

Ciò che risulta peculiare dei mGluRs, e anche di altri GPCRs (come quelli dopaminergici), è la loro capacità di controllare l'attività dei recettori ionotropici in modi differenti, consentendo di ottenere una risposta modulata a livello della sinapsi glutammatergica. Essi, infatti, hanno anche la capacità di modulare l'attività dei RTKs che hanno un ruolo importante nella modulazione della plasticità sinaptica (La Rosa et al., J Alzheimers Dis., 2013).

E' ben noto che le neurotrofine, come NGF, siano efficaci nei modelli di AD e molecole che hanno come target i recettori TrkA e TrkB sono proposte per il trattamento della AD (Longo et al., 2007).

Anche nella malattia di Parkinson è evidente l'importanza di un corretto sinergismo tra la via recettoriale dopaminergica e quella associata a recettori tirosin chinasi. Poiché entrambe queste vie convergono nella cascata fosforilativa di ERK, è ragionevole pensare che una terapia farmacologica volta ad attivare entrambi i pathway (utilizzo di alcuni dopamino agonisti associata alla somministrazione di alcuni fattori di crescita come GDNF, BDNF) potrebbe potenziare l'effetto neuroprotettivo a livello dei nuclei della base.

1.13 GPCR: selettività funzionale o “biased agonism”

Il concetto di “Biased Agonism” (in inglese bias significa “preferenza”) o della “funzionalità selettiva” è un concetto relativamente recente.

Sino a poco tempo fa, l’attivazione di un recettore GPCR era un processo considerato principalmente lineare: il legame con il ligando promuove il cambiamento conformazionale del recettore che si lega ed attiva la proteina G la quale a sua volta, a seconda dell’isoforma, attiva o inibisce alcuni effettori (tra cui Adenilato Ciclasi, Fosfolipasi C, etc) con la produzione o meno di secondi messaggeri (cAMP, DAG, IP₃, etc) che agiscono a loro volta su substrati ancora più a valle di questo pathway.

Nel tempo, è divenuto sempre più evidente che i GPCRs possono adottare conformazioni multiple in seguito al legame con l’agonista, e dunque sono in grado di attivare vie di segnale differenti; di conseguenza, l’efficacia di un recettore, che sino a poco tempo fa era considerata classicamente lineare, è adesso riconosciuta come pluridimensionale (Reiter et al., 2012).

In particolare, le regioni aminoacidiche di un GPCR si muovono indipendentemente l’una dall’altra; perciò il fissaggio di un specifica regione recettoriale ottenuto attraverso il legame con un ligando, produce una possibile varietà di conformazioni dell’intero recettore, di cui alcune saranno più stabili, e quindi maggiormente espresse a livello della membrana, ed altre meno stabili, e dunque meno probabilmente espresse. Dunque, dato uno specifico recettore, ogni ligando (A, B, C) può indurre un certo numero di differenti strutture conformazionali, la cui realizzazione è per alcune più probabile, e per altre meno (Kenakin, 2012).

È facilmente intuibile che, ad ogni gruppo di conformazioni simili indotte dal ligando, corrisponde l'attivazione di un particolare pathway intracellulare; così, ad esempio un recettore è in grado di associarsi a famiglie di proteine G differenti (Gs, Gi, Gq), ottenendo un'elevata capacità di modulazione del segnale.

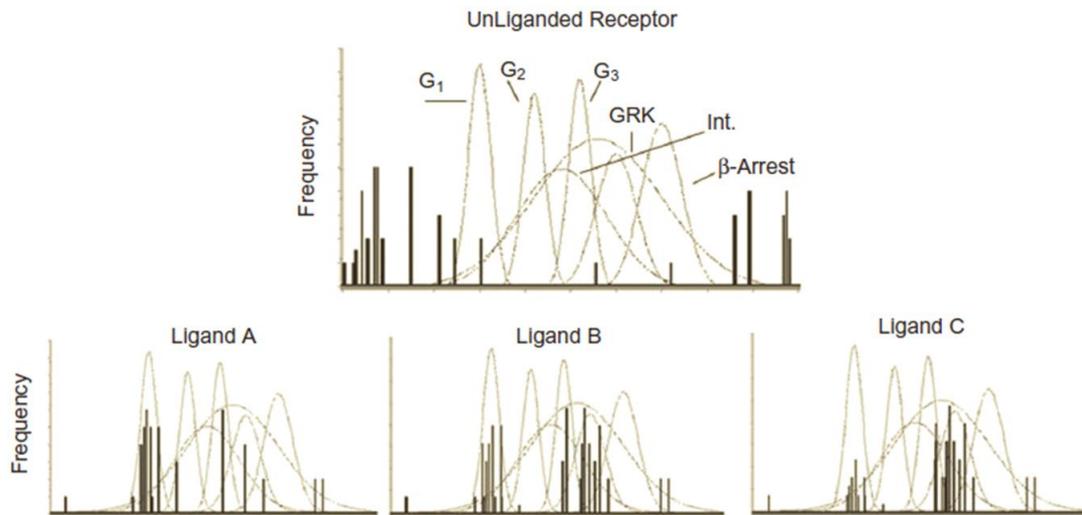


Fig. 10 Frequenza distribuzionale di differenti conformazioni dello stesso recettore (Kenakin et al., 2012)

Uno dei più importanti e più studiati pathway legati al concetto del “biased agonism” è senza dubbio quello mediato dalla proteina β -arrestina (Reiter et al., 2012; Shukla et al, 2011)

La famiglia delle β -arrestine (ne esistono 4 isoforme, di cui le più importanti sono la β -arrestina 1 e β -arrestina 2) originariamente scoperte come agenti modulatori del segnale d'arresto dell'attività di un GPCR, sono ad oggi riconosciute come proteine fondamentali nel processo di endocitosi del recettore, di ubiquitilazione, e come mediatori di vie di segnale proteine G-indipendenti.

Una tra le più importanti e sorprendenti osservazioni è quella che vede β -arrestina reclutare la proteina c-Src (facente parte del sistema trasduzionale legato ai recettori

tirosin-chinasi) e collegarla ad un recettore β_2 -adrenergico attivato, portando infine alla fosforilazione e dunque attivazione di ERK 1 e ERK 2 (Luttrell, L.M. et al. 1999).

Tale evidenza non solo ha rappresentato il primo passo nel concepimento di β -arrestina come una molecola di segnale, ma ha posto le basi per la scoperta e la conoscenza di quelli che oggi vengono definiti “GPCR signaling pathway β -arrestina dipendenti e proteina G indipendenti”.

Infatti le β -arrestine possono interagire con altri membri della famiglia di c-Src, come Hck, Fgr e Yes, trasportandole in stretta prossimità del recettore attivato. Inoltre, le β -arrestine sono in grado di trasportare altri protagonisti cruciali della via di segnale associata a MAPK, come ERK 1/2, p38 e JNK3.

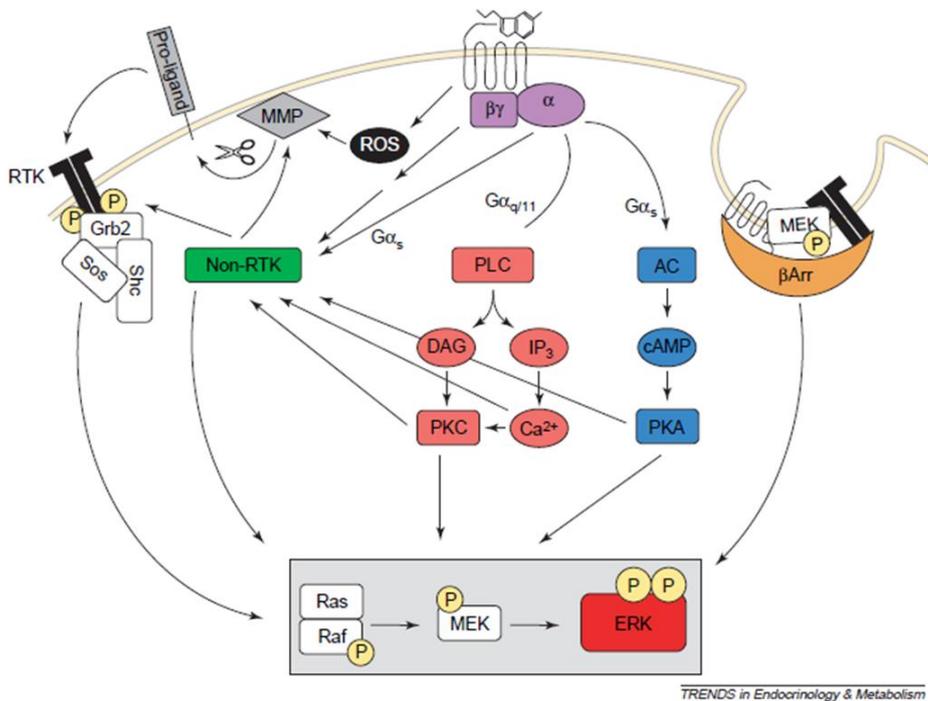


Fig. 11 Attivazione del segnale ERK mediato da β -arrestina (Pyne et al., 2011)

Prendendo in considerazione il concetto del biased agonism è facile capire come questo sia stato impiegato per lo sviluppo di nuovi farmaci che sfruttino il concetto stesso, ovvero che privilegino l'attivazione di una via di segnale, quella ritenuta "benefica", piuttosto che l'altra, ritenuta responsabile di effetti collaterali.

Ad esempio, è stato possibile, a partire dalla struttura molecolare di un antipsicotico atipico, l'aripiprazolo, sintetizzare tre molecole, UNC9975, UNC0006, UNC9994 che, legandosi al recettore D₂, si comportano da antagonisti sulla via veicolata dalla proteina G_i, e da agonisti parziali sulla via mediata da β -arrestina; in particolare la molecola UNC9975 presenta una potente attività antipsicotica (dimostrata su modelli animali) senza indurre effetti collaterali di tipo motorio (John A. Allen et al., 2011).

Il premio Nobel Lefkowitz ha recentemente contribuito alla fondazione di una società che si occupa di sintetizzare "biased ligands" ovvero farmaci che attivano in modo specifico una sola via di segnale; al momento sono in sperimentazione farmaci utilizzati nello scompenso cardiaco e nel trattamento del dolore

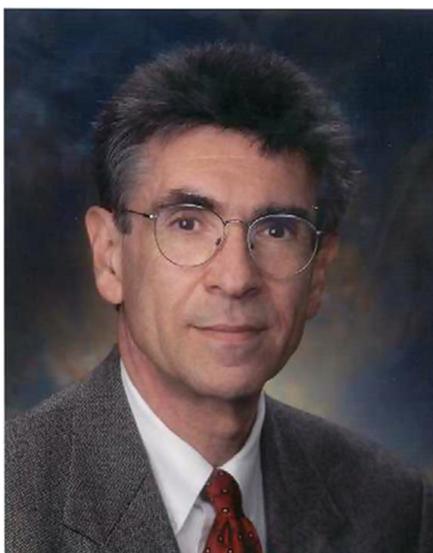


Fig. 12 Robert Joseph Lefkowitz, Premio Nobel per la Chimica 2012

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

I composti utilizzati quali clozapina, sulpiride, isoprotenerolo, carbacolo, scopolamina, serotonina (5-HT), apomorfina, pindololo, ICI118,551, WAY100,165, marimastat, ropinirolo, bromocriptina, provengono dalla Sigma-Aldrich Corporation, mentre quetiapina, olanzapina e MK571 ci sono stati gentilmente forniti dal Prof. Roberto Maggio (Università dell'Aquila).

Gli anticorpi primari e secondari utilizzati, quali AbI anti-ERK-P (prodotto nel topo), AbI anti-ERK (prodotto nel coniglio), AbII anti-Mouse-HRP coniugato (da capra) e AbII anti-Rabbit-HRP coniugato (da capra) sono stati acquistati da Sigma Aldrich Corporation.

Il materiale utilizzato per il terreno di coltura cellulare (DMEM, L-glutamina, aminoacidi non essenziali, penicillina e streptomicina, glucosio, timidine e ipoxantina, metotrexato, geneticina) è stato acquistato dalla Sigma Aldrich Corporation.

Le linee cellulari HeLa e SH-SY5Y sono state ordinate dalla compagnia ATCC (LGC Standards, Molsheim, France).

2.2 Colture cellulari

Le linee cellulari utilizzate sono state le HeLa e le SH-SY5Y. Le HeLa sono una linea cellulare tumorale umana isolata da un cancro della cervice uterina, mentre le

cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y sono un subclone neuroblastico di un neuroblastoma metastatico caratterizzato della linea cellulare SK-N-SH.

Queste cellule sono state coltivate in un terreno di coltura composto da DMEM (Dulbecco's modified Eagles's medium-Sigma) al quale è stato aggiunto siero fetale bovino al 10% (Sigma), penicillina-streptomicina (Sigma) ed L-glutammina (Sigma).

Le colture cellulari vengono cresciute in monostrato in supporti quali fiasche di plastica o piastre Petri sterili monouso trattate che vengono mantenute in incubatore a 37 °C in presenza di anidride carbonica del 5% per mantenere il pH a 7.4.

Le cellule vengono cresciute fino ad una confluenza dell'80% per poi essere tripsinizzate e ripiastrate ad una confluenza minore. Il giorno della piastrazione le cellule vengono sottoposte ad alcuni lavaggi con PBS e successivamente tripsinizzate e infine centrifugate.

Il pellet cellulare derivante dalla centrifuga viene contato con una camera contacellule. Una aliquota di queste cellule viene rimessa in fiasche con medium, mentre un'altra aliquota viene conservata nel frigorifero a -80°C in DMSO al 7%.

2.3 Costrutti plasmidici

I nostri costrutti recettoriali sono espressi nel vettore di espressione di tipo plasmidico pcDNA3.1.

Il plasmide è formato da importanti sequenze geniche quali il sito di origine per la replicazione batterica (pUCori), quello per la poliadenilazione del virus SV40 ed il promotore.

Il promotore usato è quello del Citomegalovirus (Pcmv), il quale permette l'espressione della proteina ricombinante inserita nel sito policlonale. Invece il sito di

poliadenilazione per il distacco dell'enzima RNA polimerasi dal DNA è quello dell'ormone bovino della crescita (BGH pA). Il plasmide contiene inoltre il gene per la resistenza alla Neomicina e all'Ampicillina, la quale viene utilizzata per la selezione delle colonie batteriche contenenti il plasmide.

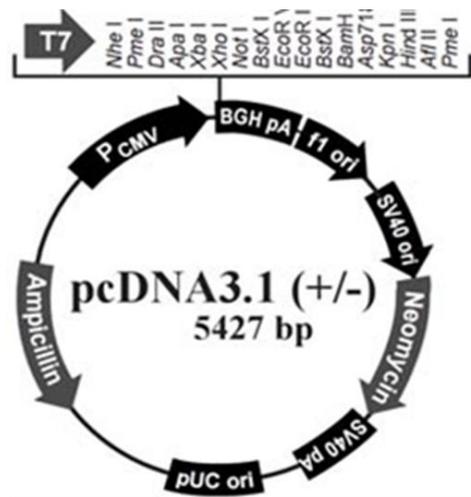


Fig. 13 Vettore plasmidico pcDNA 3.1 utilizzato per la trasfezione batterica

La concentrazione dei plasmidi contenenti il recettore D2, $\beta 2$ ed M3 è stata determinata sia analizzando su gel di agarosio l'intensità di banda in presenza di etidio bromuro confrontato col il marker (fig. 14) sia misurando l'assorbanza con lo spettrofotometro (BIORAD Smart Spec 3000).



Fig. 14 Elettroforesi per determinare la concentrazione dei plasmidi contenenti il recettore D2, $\beta 2$ ed M3

Per controllare la sequenza genica di D2, $\beta 2$ ed M3 abbiamo utilizzato gli enzimi di restrizione *ApaI* e *BglI* (fig. 15a), mentre per la sequenza genica di M3, D2, $\beta 2$, $\beta 2$ Meos è stato usato il solo enzima *ApaI* (fig. 15b).



Fig. 15a Elettroforesi con taglio *ApaI* e *BglI*

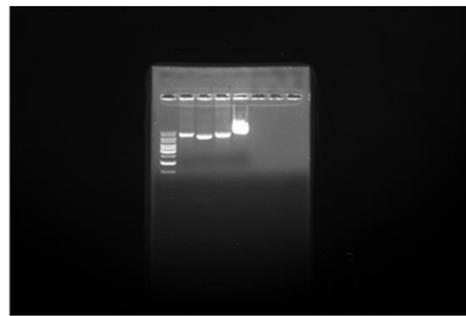


Fig. 15b Elettroforesi con taglio *ApaI*

I plasmidi contenenti i recettori desiderati sono stati amplificati in batteri E. Coli da cui successivamente sono stati estratti col KIT di estrazione QIAGEN attraverso il protocollo fornito dalla casa stessa.

2.4 Trasfezione cellulare mediante elettroporazione

Il metodo da noi usato per la trasfezione genica è stato quello dell'elettroporazione in cui le cellule vengono poste in una soluzione contenente DNA e vengono esposte ad un breve impulso elettrico che produce transitoriamente dei pori nelle loro membrane i quali favoriscono l'ingresso delle molecole di DNA. Le condizioni per l'elettroporazione prevedono un voltaggio di 1005 V, una durata d'impulso di 35 ms e 2 scariche elettriche utilizzando l'elettroporatore della ditta Neon (Invitrogen).

Come primo passaggio la fiasca è stata sottoposta ad alcuni lavaggi con PBS. Successivamente è stata tripsinizzata, in modo tale da poter raccogliere le cellule e centrifugarle.

Il pellet derivante dalla centrifuga è stato contato con una camera contacellule. Per ogni trasfezione, sono state utilizzate circa $0.5-1 \cdot 10^6$ cellule alle quali sono stati aggiunti 100 μ L della soluzione R (Invitrogen) e 4 μ g del DNA di interesse.

Con la siringa metallica è stato prelevato il contenuto dalla eppendorf, che è stato poi elettroporato e ripartito in 4 pozzetti di una piastra da 12 contenenti 1 ml di terreno privo di antibiotici.

La piastra è stata incubata overnight a 37°C.

2.5 Western Blotting

Per la determinazione della fosforilazione di ERK 1 e 2, abbiamo utilizzato la tecnica del Western Blotting che permette di ottenere la separazione delle proteine presenti nel campione in base alla loro carica ed al loro peso molecolare. Per ottenere le proteine di interesse, le cellule sono state tripsinizzate, coltivate in una camera contacellule e piastrate 100.000 per pozzetto.

Circa 24 ore prima dell'inizio dell'esperimento, il medium completo nei pozzetti è stato cambiato con medium privo di siero, in modo tale da ridurre l'attività basale della fosforilazione di ERK (starvation overnight).

Il giorno dell'esperimento, abbiamo proceduto con l'aggiunta dei farmaci in esame utilizzati a diverse concentrazioni per circa 10 minuti.

Per ottenere la curva tempo-risposta il farmaco è stato somministrato a finestre temporali differenti.

Negli esperimenti dove sono stati utilizzati gli antagonisti, essi sono stati aggiunti circa 30 minuti prima dell'aggiunta dell'agonista per consentire all'antagonista di bloccare il suo target recettoriale e raggiungere lo stato stazionario di interazione. Per stoppare la reazione di attivazione di ERK, dopo aver aspirato il medium dai pozzetti abbiamo aggiunto 130 μ l di lisi buffer, composto da una soluzione di RIPA buffer (Tris.HCl a pH 8.0, NaCl, EDTA, Triton, SDS) a cui abbiamo aggiunto un cocktail di inibitori di proteasi (Pepstatina, Leuceptina, Aprotinina, PMSF) e di fosfatasi (Sodio ortovanadato 1 mM, Sodio pirofosfato 10 mM, Sodio fluoruro 20 mM), e abbiamo proceduto allo scerpaggio.

Dopo aver raccolto in ghiaccio e successivamente centrifugato i campioni, abbiamo prelevato il sovranatante che conteneva le proteine di interesse.

Una parte del lisato è stata trasferita in una eppendorf il cui contenuto proteico è stato quantificato allo spettrofotometro, utilizzando un kit commerciale basato sulla metodica di Bradford.

Per valutare la concentrazione proteica incognita nei campioni è stata costruita una curva di taratura, utilizzando concentrazioni crescenti di Siero Albumina di Bue (BSA), sciolta in acqua distillata. Tutte le prove, compresa la curva di taratura, sono state allestite in duplicato.

Il metodo Bradford è basato sul legame del colorante Coomassie blue alle proteine. Il colorante Coomassie blue cambia colore (da marrone a blu), in seguito al legame con arginine e altri amminoacidi. Le concentrazioni finali sono espresse in mg/ml.

Per la determinazione di ERK-P e ERK, abbiamo utilizzato 20µg per esperimento.

Al campione prima del caricamento su gel è stato aggiunto Laemmli Buffer (Tris.HCl 0.5 M pH 6.8, SDS 20%, glicerolo, 2-mercaptoetanolo, blu di bromofenolo 0.2%).

Questo tampone ha il compito di conferire un elevato peso molecolare al campione (grazie alla presenza di glicerolo), e una colorazione blu intensa (per la presenza di blu di bromofenolo), in modo da agevolare le operazioni di caricamento del campione sul gel di elettroforesi; la presenza di SDS (sodio dodecil-solfato), sostanza che denatura le proteine, conferisce loro una carica negativa, cosicché, durante la fase di elettroforesi, le proteine si separeranno solo in base al loro peso molecolare e non alla propria carica. Il tutto è stato fatto bollire per 5 minuti per completare la denaturazione già avviata dall'SDS.

Per la separazione elettroforetica di proteine è stato usato un gel di poliacrilamide che è composto da due parti, una inferiore denominata gel di corsa, contenente

acrilamide al 12% (acrilamide/bis-acrilamide 30%), in cui avviene la separazione delle proteine, ed una superiore, chiamata gel di caricamento, contenete acrilamide al 10%, in cui abbiamo costruito i pozzetti per il caricamento del campione. Per la preparazione del gel di corsa abbiamo preparato una soluzione composta da H₂O distillata, Acrilamide 30% (Sigma Aldrich), Tris-base HCl pH 8,8 (Sigma), SDS 10% (Sigma), Temed (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), APS (ammonio persolfato) 10%.

Dopo circa 45 minuti si procede con la preparazione della soluzione per il gel di caricamento (Stacking) composta da H₂O distillata, Acrilamide 30% (Sigma), Tris-base HCl pH 6,8 (Sigma), SDS 10%, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine) (Sigma), APS 10% (ammonio persolfato) (Sigma).

Anche per questa reazione di polimerizzazione occorrono circa 45 minuti.

I vetrini contenenti il gel polimerizzato sono stati trasferiti nella vaschetta per l'elettroforesi contenente un tampone di corsa elettroforetica, il Running Buffer, la cui preparazione è composta da Tris-base (Sigma), Glicina (Sigma), SDS 1% (Sigma), H₂O distillata. La corsa elettroforetica è stata eseguita facendo passare una corrente a 200V per circa 1 ora, o comunque fino a quando il fronte non ha raggiunto il fondo del gel.

Il campione è stato caricato in ogni pozzetto, tranne nel primo dove è stato caricato il marcatore di peso molecolare noto, il cosiddetto marker.

Una volta che è terminata la corsa, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di PVDF (polivinildenfluoruro).

Abbiamo riposto il tutto dentro la vaschetta per elettroforesi che abbiamo riempito di Transfer Buffer (composto da Tris base e da Glicina) fino a completa sommersione del “sandwich”.

L'alimentatore lo abbiamo programmato in modo da fornire un voltaggio pari a 100V per 1 ora.

Abbiamo messo la membrana in una soluzione di bloccaggio composta da latte magro in polvere al 5% diluito in TBS-Tween 1 × (TBS 1x, Tween20 0,1%) per 1 ora in agitatore e a temperatura ambiente.

Dopo la fase di bloccaggio la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi con TBS-Tween 1× in agitazione. Per la determinazione della fosforilizzazione della proteina ERK, abbiamo proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario (AbI anti-ERK-P alla diluzione di 1:2000 in TBS-Tween + BSA 5%) per tutta la notte a 4°C.

Il giorno seguente dopo aver effettuato 3 lavaggi con TBS-Tween, abbiamo incubato la membrana con l'anticorpo secondario, AbII anti-Mouse diluito 1:20000 in TBS-Tween + BSA 5% per 1 ora a temperatura ambiente in agitazione. Durante questa fase all'anticorpo primario si lega in maniera specie-specifica l'anticorpo secondario coniugato ad un enzima perossidasi che leggerà, nel passaggio successivo, il luminolo per la reazione di chemiluminescenza.

Abbiamo proceduto quindi ad una serie di lavaggi con TBS-Tween in agitazione allo scopo di rimuovere tutto l'anticorpo secondario non legato.

La membrana è stata sviluppata in soluzione Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipor) dove nella stessa rimane per 3 minuti circa in agitazione.

L'enzima perossidasi, presente sull'anticorpo secondario, catalizza l'ossidazione del luminolo, che viene a trovarsi perciò in uno stato eccitato, dal quale decade mediante emissione di luce.

L'impressione della lastra fotografica è stata realizzata mediante lo strumento *Kodak X-Omatic*.

Per la determinazione della proteina ERK totale, abbiamo immerso la membrana in metanolo per 5 minuti e successivamente nella soluzione di Stripping (composta da Glicina, H₂O, Tween, HCl a pH 2).

Abbiamo ripreso con i lavaggi in TBS-Tween e successivamente abbiamo immerso la membrana nella soluzione di bloccaggio composta da latte magro in polvere al 5% diluito in TBS-Tween per 1 ora in agitatore e a temperatura ambiente.

A questo punto abbiamo eseguito dei lavaggi rapidi in TBS-Tween, e abbiamo proceduto all'incubazione con l'anticorpo primario (AbI anti-ERK-TOT alla diluizione di 1:40000 in TBS-Tween + BSA 5%) overnight in agitazione.

La tappa successiva è stata quella di mettere l'anticorpo secondario (AbII anti-Rabbit alla diluizione di 1:5000), per 1 ora in agitazione.

La membrana è stata messa per 3 minuti nella soluzione di sviluppo in agitazione e successivamente abbiamo sviluppato. Quest'ultimo sviluppo ci ha permesso di vedere le ERK totali, che sono state poi confrontate con le ERK fosforilate ottenute dal primo sviluppo.

Per ogni esperimento, la determinazione della fosforilazione di ERK è stata ottenuta dividendo l'intensità della banda di ERK-P su l'intensità della banda di ERK dello stesso esperimento. Questa normalizzazione dei risultati ci consente di eliminare

eventuali artefatti dovuti ad un caricamento differente di quantità diverse di proteina per esperimento.

2.6 Microscopia a fluorescenza

Per gli esperimenti di microscopia fluorescente, le cellule trasfettate col costrutto D2-mEos sono state piastrate su vetrini circolari di 18 e 24mm e, dopo 24h, sono state fissate in soluzione di formaldeide al 2%. Le immagini sono state ottenute utilizzando un microscopio in fluorescenza ZEISS con un obiettivo 63X. Le immagini sono state poi analizzate utilizzando il software Adobe Photoshop.

2.7 Statistica

Le curve e i valori di EC50 sono stati ottenuti da 3 esperimenti indipendenti ed è riportata la media \pm SD.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Caratterizzazione della espressione cellulare del costrutto genico del recettore D₂ utilizzando il fluoroforo mEos analizzato in microscopia fluorescente

Come esperimenti preliminari, prima di procedere ai saggi funzionali, abbiamo deciso di controllare se i nostri costrutti recettoriali venissero correttamente espressi dalle cellule HeLa e per questo abbiamo utilizzato la microscopia a fluorescenza. Per determinare l'espressione del recettore D₂ utilizzando un microscopio a fluorescenza, abbiamo analizzato il costrutto D₂-mEos inserito nel vettore plasmidico pcDNA 3.1 trasfettato nelle cellule HeLa.

Come si può vedere dalla fig. 16, il costrutto D₂-mEos è ben espresso sulla membrana plasmatica indicando che quindi il recettore D₂ è stato correttamente espresso dalla cellula.

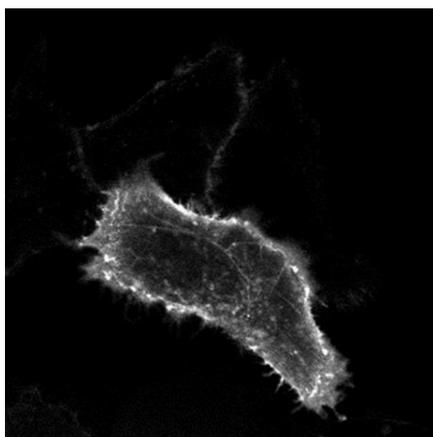


Fig. 16 Espressione in membrana del recettore D₂.
Immagine ottenuta con un microscopio a fluorescenza

3.2 Caratterizzazione dell'effetto di antipsicotici tipici ed atipici sull'attività di ERK 1 e ERK 2 in cellule HeLa non trasfettate

Prima di utilizzare cellule HeLa trasfettate con i vari recettori presi in esame, come esperimento preliminare, è stata determinata in cellule HeLa non trasfettate la fosforilazione/attivazione di ERK 1 e 2 indotta da composti dopamino-antagonisti (antipsicotici tipici ed atipici) somministrati a differenti concentrazioni, sulla base della loro dose terapeutica.

Sorprendentemente antipsicotici atipici come clozapina e quetiapina hanno indotto chiaramente un'attività fosforilativa delle chinasi ERK 1 ed ERK 2; viceversa, farmaci antipsicotici tipici come sulpiride e aloperidolo non hanno dimostrato alcuna efficacia biologica su questo pathway cellulare (fig. 17 e 18).

Come visibile in fig. 17, clozapina presenta un'attività fosforilativa di circa 4 volte superiore rispetto all'attività basale già ad una concentrazione di 10 uM; alla concentrazione di 100 uM clozapina mostra un'attività di circa 9 volte superiore all'attività basale.

Anche quetiapina presenta un'attività fosforilativa di 3 e 5 volte superiore rispetto all'attività basale, rispettivamente ad una concentrazione di 10 uM e 100 uM.

Sulpiride non ha dimostrato un aumento significativo dell'attività fosforilativa.

Anche aloperidolo, come sulpiride, non presenta effetti significativi sull'attivazione di ERK 1 e ERK 2 (fig. 18). Questi esperimenti sono stati ripetuti altre due volte con indicazioni simili a quella riportata in questo paragrafo. La diversità degli effetti indotti su ERK tra gli antipsicotici atipici e tipici potrebbe contribuire a spiegare l'efficacia degli atipici nel migliorare i sintomi negativi della schizofrenia. Infatti,

l'attivazione di ERK ha un effetto trofico a livello neuronale con conseguenze sulla sinaptogenesi e neurogenesi (Sweatt, 2004; Molteni et al, 2009).

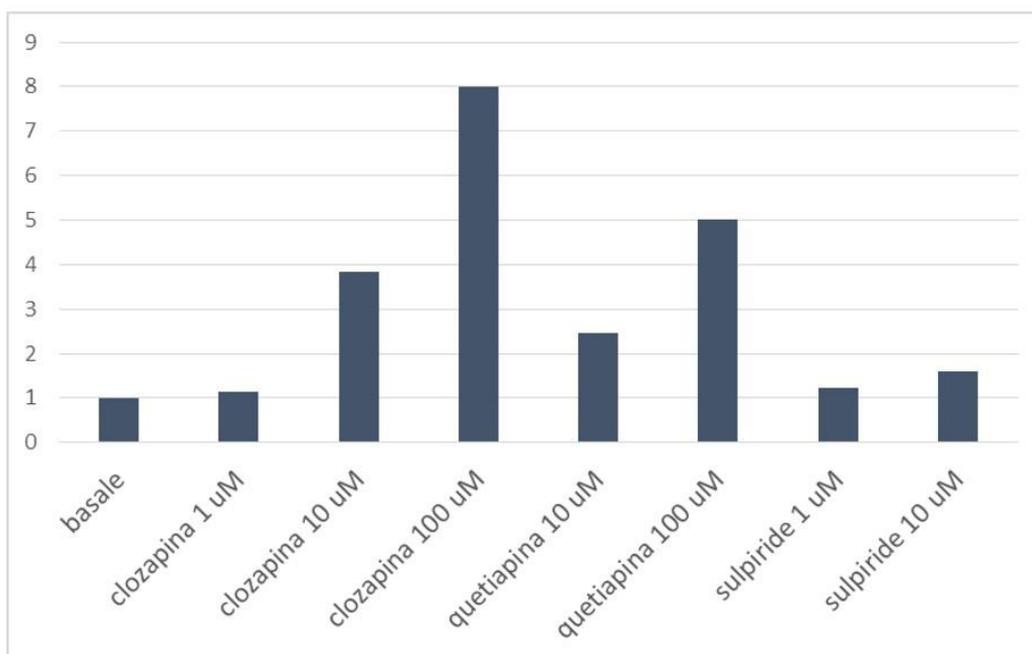
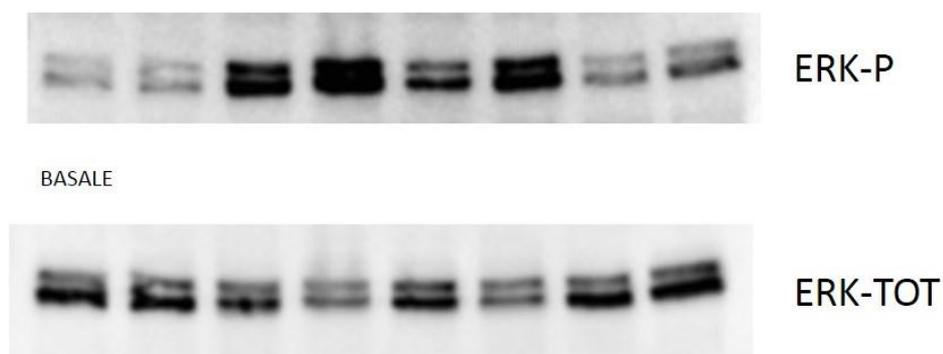


Fig. 17 Fosforilazione di ERK 1 e ERK 2 in presenza di antipsicotici tipici e atipici. (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

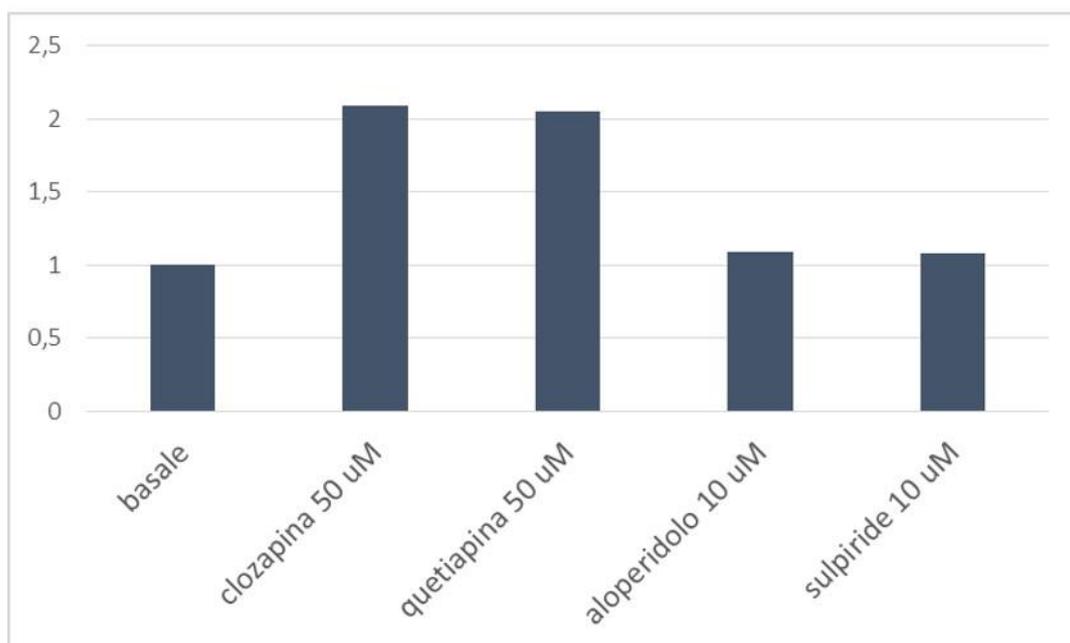
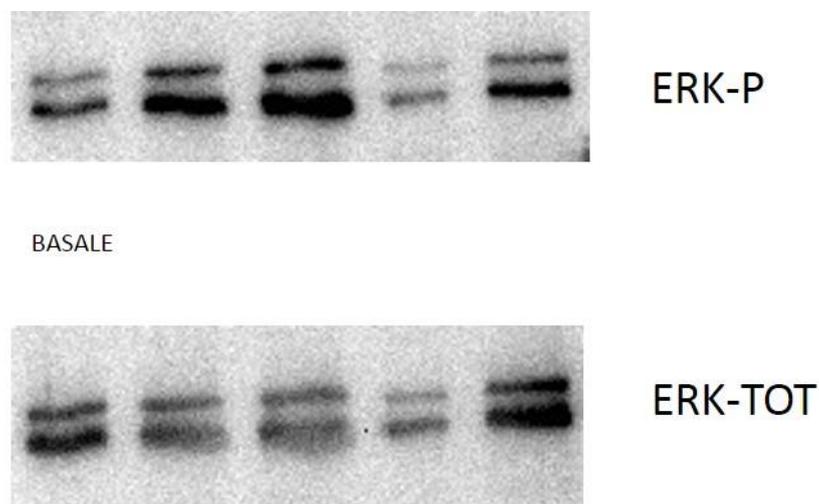


Fig. 18 Fosforilazione di ERK 1 e ERK 2 in presenza di antipsicotici tipici e atipici. (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3 Caratterizzazione dell'azione di clozapina su ERK 1 e 2 nelle cellule HeLa

L'evidenza di una forte attività fosforilativa di ERK 1 e 2 indotta da clozapina in cellule HeLa non trasfettate ha portato alla decisione di caratterizzare il meccanismo di azione di questo farmaco responsabile di tale effetto biochimico.

3.3.1 Caratterizzazione della curva concentrazione/risposta di Clozapina sulla fosforilazione di ERK

Come primo esperimento, abbiamo caratterizzato la curva concentrazione/risposta di clozapina. Le dosi utilizzate sono state 2 uM, 5 uM, 10 uM, 25 uM, 50 uM con un tempo di incubazione di 10'.

La fig. 19 mostra in modo evidente una correlazione diretta tra l'attività fosforilativa di ERK 1 e 2 e la concentrazione utilizzata. Alla concentrazione di 100 uM (dato non mostrato) la curva tende a scendere, probabilmente per un effetto generale di inibizione o di tossicità indotto dal farmaco sulla cellula. Questi esperimenti sono stati ripetuti altre due volte con indicazioni simili a quella riportata in questo paragrafo.

Nonostante la variabilità sperimentale nel determinare la fosforilazione di ERK, siamo riusciti a determinare la EC₅₀ di clozapina da 3 esperimenti indipendenti che è risultata 37 ± 6 uM.

Generalmente, durante l'uso in clinica della clozapina, si raggiunge una concentrazione plasmatica di circa 1-5 uM (Mauri et al., 2007).

Pertanto, se consideriamo il fatto che nel nostro modello cellulare clozapina già a 10 uM induce una rilevante fosforilazione di ERK, i nostri dati sperimentali sono stati

ottenuti ad una concentrazione non particolarmente differente rispetto alla concentrazione utilizzata nella clinica medica.

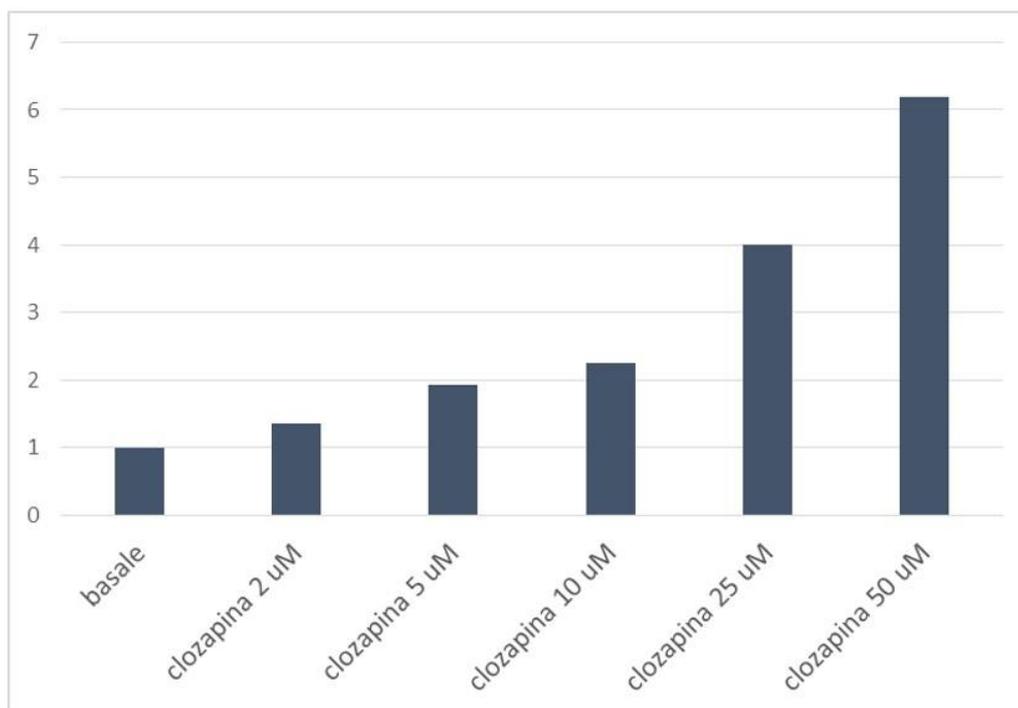
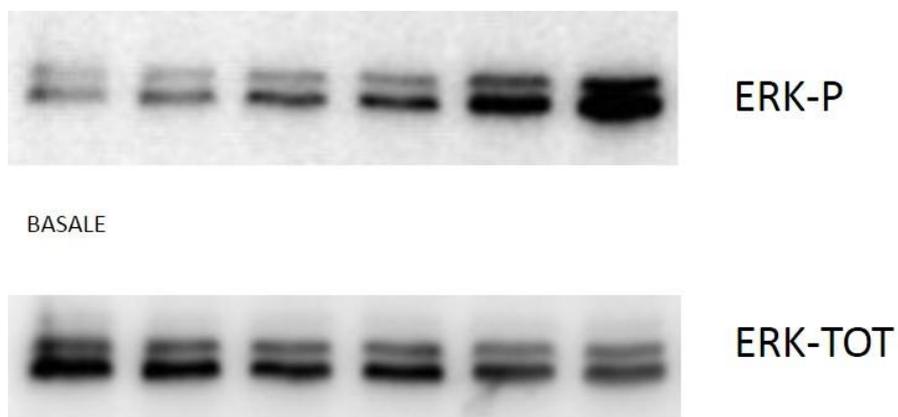
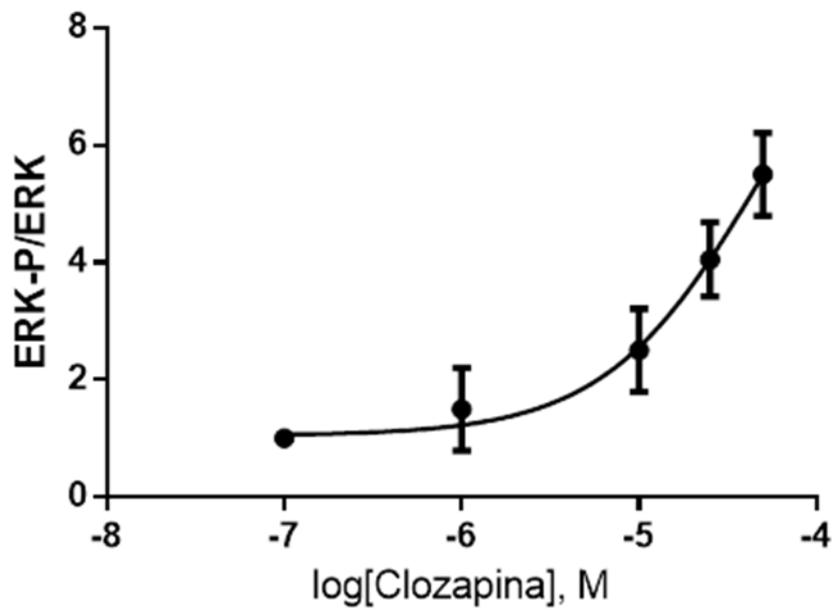


Fig. 19 Curva concentrazione/risposta di clozapina sulla fosforilazione di ERK. (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).



$EC_{50} = 37 \pm 6 \text{ uM}$

Fig. 20 Calcolo EC_{50} di clozapina

3.3.2 *Time-course di Clozapina*

Successivamente è stata caratterizzata l'attività fosforilativa di ERK 1 e 2 in relazione a differenti finestre temporali (2', 5', 10', 30') di somministrazione di clozapina alla concentrazione 10 uM.

Come metodo di controllo, è stata determinata la curva tempo-dipendente di isoproterenolo, un farmaco agonista dei recettori β -adrenergici, recettori endogeni delle cellule HeLa.

Come risultato (fig. 21), il tempo al quale la clozapina ha mostrato la sua massima efficacia biologica sul pathway di ERK è stato a 10 minuti; la stessa efficacia è stata raggiunta da isoproterenolo in seguito ad una stimolazione di 5 minuti.

Negli esperimenti successivi, la finestra temporale di stimolazione di clozapina è dunque stata stabilita a 10 minuti, tempo al quale questo farmaco induce il massimo effetto sulla fosforilazione di ERK.

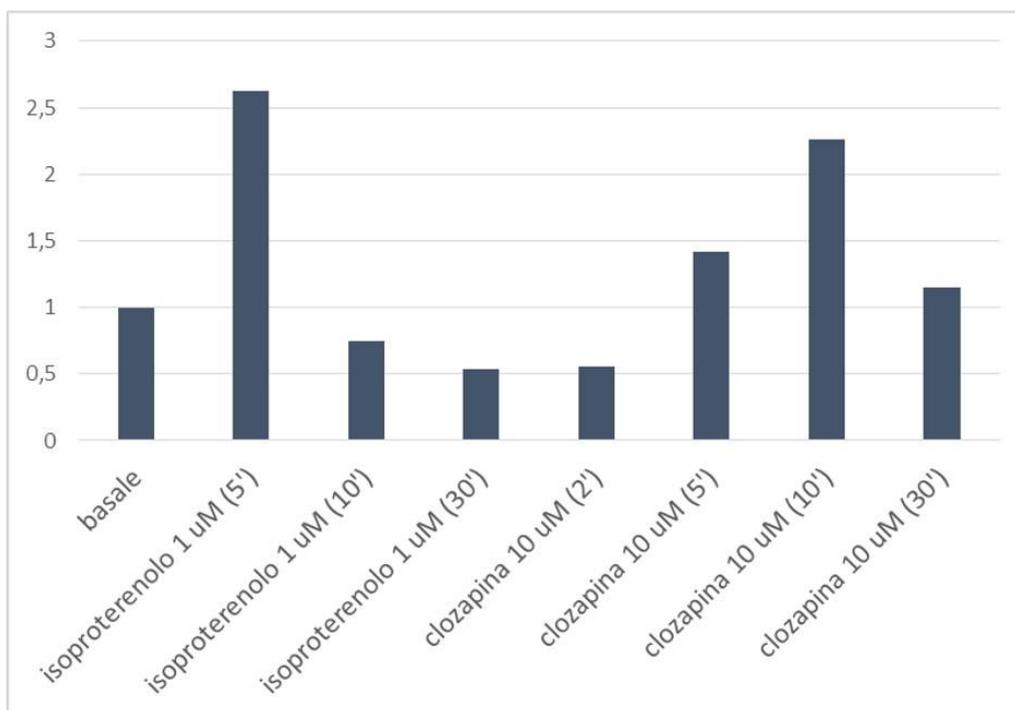
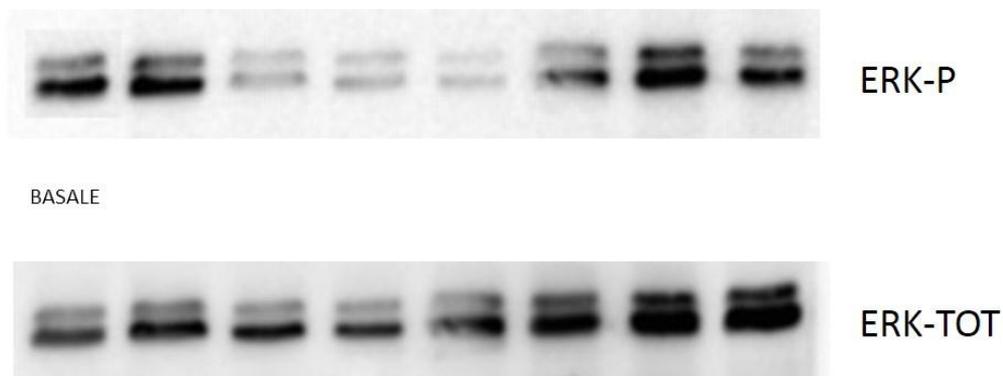


Fig. 21 Time-course di Clozapina e Isoproterenolo sulla fosforilazione di ERK (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3.3 Caratterizzazione dell'effetto massimale di Clozapina, Serotonina, Isoprotenerolo e Carbacolo sull'attività di ERK in cellule HeLa

In seguito alle informazioni ottenute con clozapina e isoproterenolo è stata esaminata la capacità di indurre un'attività fosforilativa di ERK anche da parte di altri farmaci coinvolti in altri sistemi recettoriali, come carbacolo, agonista dei recettori muscarinici, e la serotonina (5-HT), l'agonista endogeno del sistema neurotrasmettitoriale serotoninergico.

Come risultato (fig. 22), carbacolo e 5-HT non hanno mostrato un'attività fosforilativa nei confronti di ERK 1 e 2. Questi esperimenti sono stati ripetuti altre due volte con indicazioni simili a quella riportata in questo paragrafo. E' interessante notare che l'effetto massimale di clozapina è simile all'agonista del recettore β_2 isoproterenolo a dimostrazione di una sua azione da agonista pieno verso un recettore endogeno presente nelle cellule HeLa.

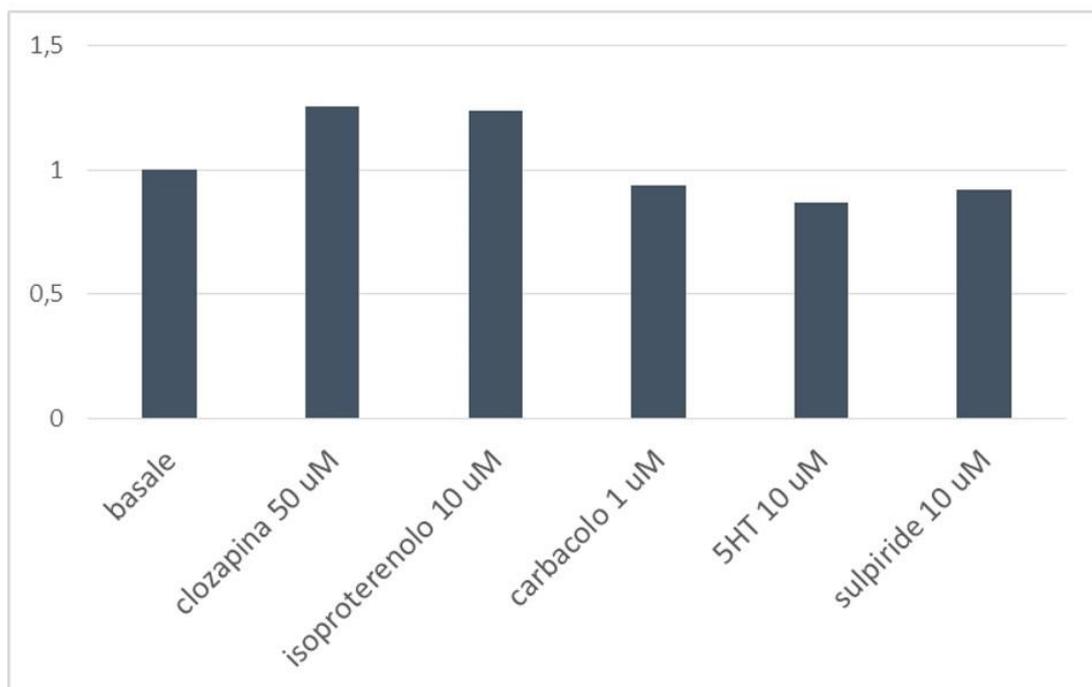
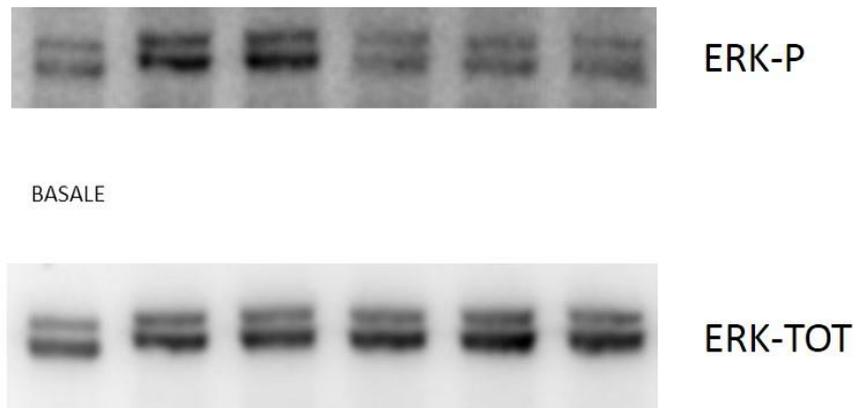


Fig 22. Effetto massimale di Clozapina, Serotonina, Isoproterenolo e Carbacolo sull'attività di ERK.

(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3.4 Caratterizzazione di Clozapina, Isoproterenolo, Carbacolo e Apomorfina nella linea cellulare SH5YSY

Visti i risultati ottenuti su linee cellulari HeLa, è stata effettuata la scelta di testare l'efficacia biologica di clozapina e altri farmaci su un'altra linea cellulare, la SH5YSY, cellule derivate da un neuroblastoma.

In questa linea cellulare è stato evidenziato come l'unico farmaco, tra quelli utilizzati, ad indurre un'attività fosforilativa significativa su ERK 1 e 2 sia stato carbacolo (fig. 23).

L'attività fosforilativa indotta da carbacolo è mediata dalla stimolazione dei recettori muscarinici, dato che la preincubazione con scopolamina (antagonista dei recettori muscarinici) ne ha annullato l'effetto.

Tale risultato sottolinea come l'attività di clozapina sulla via di ERK non è applicabile a tutte le linee cellulari, ma coinvolge recettori specifici presenti nelle HeLa.

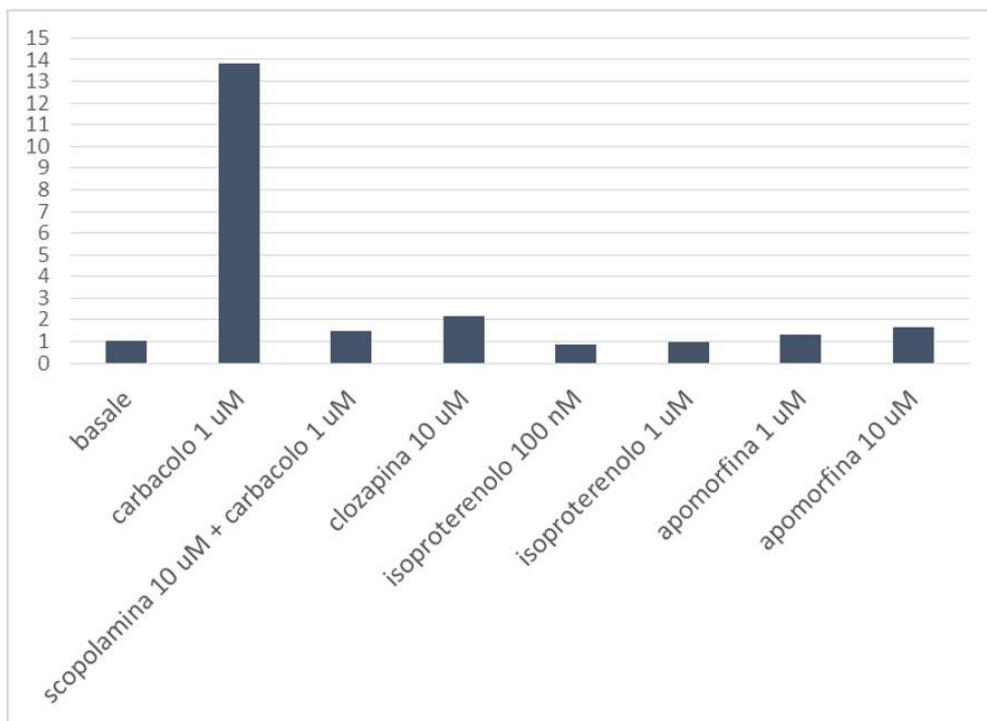
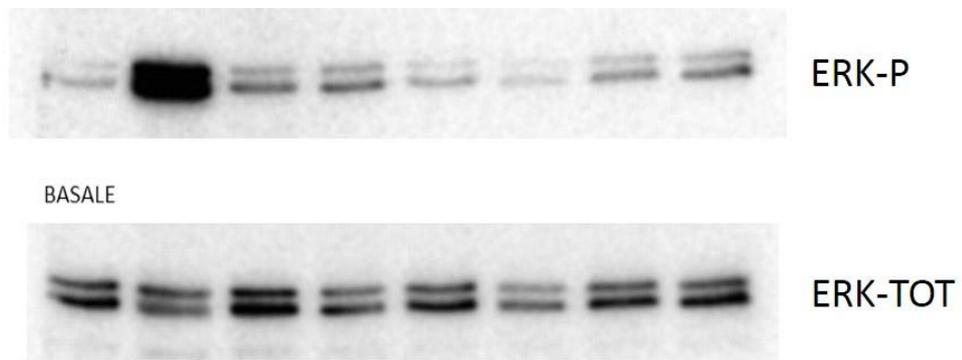


Fig 23. Fosforilazione di ERK1 e ERK2 nelle cellule SHSY5Y in presenza di clozapina e di altri agonisti recettoriali.

(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3.5 Caratterizzazione del ruolo dei recettori muscarinici, adrenergici e serotoninergici sulla fosforilazione di ERK mediato da clozapina in cellule HeLa

A questo punto, abbiamo deciso di caratterizzare il ruolo di alcune vie recettoriali sull'attività di clozapina.

Come prima parte, è stata testata l'attività di clozapina su recettori colinergici di tipo muscarinico, attraverso l'utilizzo di un farmaco antagonista come la scopolamina. D'altra parte l'attività agonistica di clozapina sui recettori muscarinici M₁ e M₄ (Miller, 2009) ci ha portato a prenderli in considerazione come possibili intermediari nella attivazione di ERK.

Come risultato, la preincubazione con scopolamina ad una concentrazione 10 uM non ha ridotto l'efficacia di clozapina sulla fosforilazione di ERK 1 e 2 (fig. 24).

Tale evidenza sottolinea che l'attività fosforilativa su ERK 1 e 2 indotta da clozapina non è mediata dal sistema recettoriale muscarinico.

Lo stimolo con scopolamina a 10 uM è servito come controllo nei confronti dell'attività basale; la scopolamina somministrata singolarmente per un tempo di 10' non induce alcuna significativa alterazione nell'attività di ERK rispetto al valore basale.

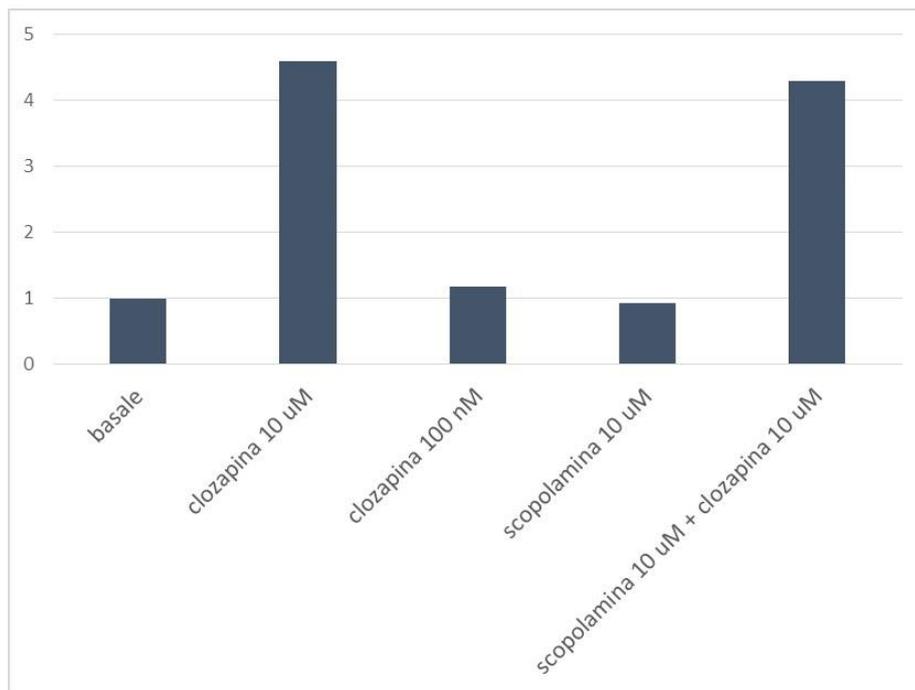
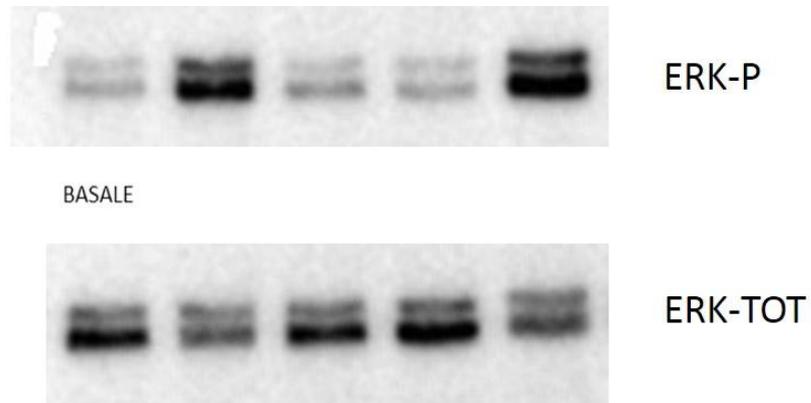


Fig 24. Fosforilazione di ERK indotta da Clozapina in presenza dell'antagonista muscarinico Scopolamina.

(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

Un altro sistema recettoriale che è stato esaminato è quello adrenergico, attraverso l'utilizzo di un antagonista adrenergico, ICI 118,551. Tale farmaco è un antagonista selettivo del recettore β_2 adrenergico, in quanto possiede un'affinità di legame per esso di circa 100 volte superiore rispetto a quella per β_1 e β_3 .

Come evidenziato nel grafico (fig. 25), la preincubazione con ICI alla concentrazione 10 μ M non ha comportato alterazioni nella fosforilazione di ERK 1 e 2 da parte di clozapina.

Dunque, anche il sistema adrenergico, come quello colinergico, non è coinvolto nell'attivazione del pathway di ERK indotto da clozapina.

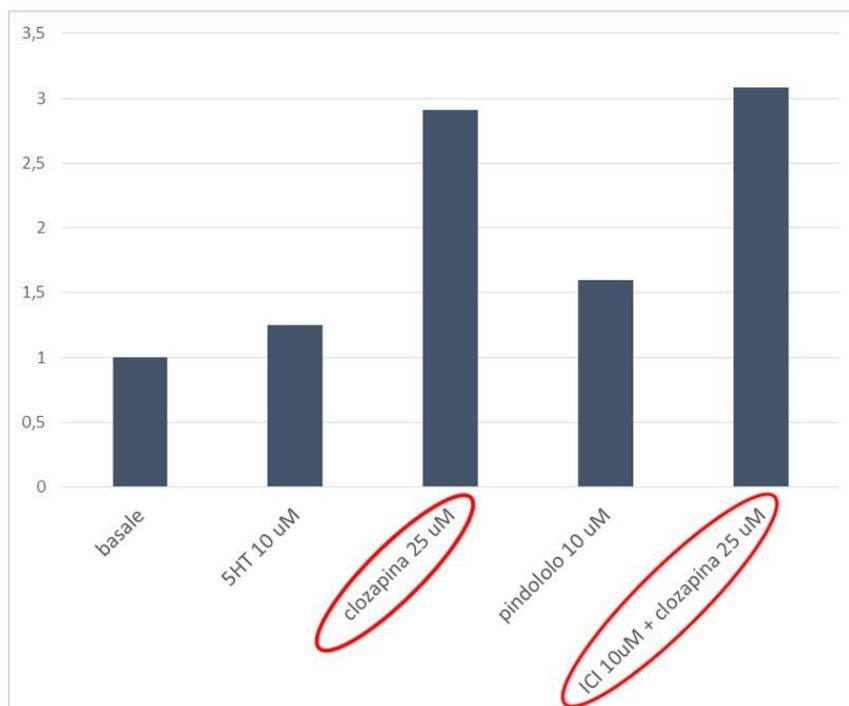
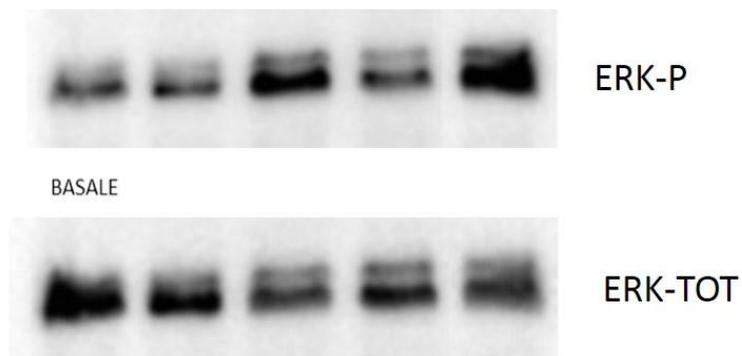


Fig 25. Fosforilazione di ERK indotta da Clozapina in presenza dell'antagonista β -adrenergico ICI 118,551 (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

Per quanto riguarda la determinazione del ruolo dei recettori serotoninergici nell'effetto di clozapina su ERK, è importante ricordare che, come già descritto in letteratura, clozapina si comporta da agonista nei confronti del sottotipo recettoriale 5HT_{1A} e come antagonista sui recettori della famiglia 5HT₂, in particolare 5HT_{2A} e 5HT_{2C}.

L'attività del sistema serotoninergico, come descritto in letteratura, è di fondamentale importanza nella modulazione del rilascio di dopamina sia a livello del tratto mesocorticale sia di quello nigrostriatale.

Così, l'efficacia della clozapina nel migliorare la sintomatologia della schizofrenia è in parte dovuta alla sua capacità di aumentare il rilascio di dopamina a livello corticale attraverso la modulazione del sistema serotoninergico.

Dall'altra parte, è stato anche evidenziato in precedenza come clozapina sia in grado di attivare la fosforilazione di ERK a livello corticale, con possibili conseguenze sulla sinaptogenesi neuronale, attraverso un agonismo parziale sul recettore 5HT_{1A} (Di Matteo, 2009).

Nel nostro studio, per testare il ruolo dei recettori serotoninergici, abbiamo utilizzato il neurotrasmettitore fisiologico serotonina (5HT), l'agonista parziale 5HT_{1A} pindololo e l'antagonista 5HT_{1A} WAY 100,165.

Per quanto riguarda la serotonina, il grafico (fig. 26) evidenzia chiaramente una minima attività fosforilativa su ERK 1 e 2 indotta dal neurotrasmettitore ad una concentrazione 10 uM rispetto all'attività basale. Analogamente, anche pindololo ad una concentrazione 10 uM non induce una significativa attività di fosforilazione su ERK. Entrambi i risultati mostrano come, nel nostro modello sperimentale, l'attività recettoriale serotoninergica non coinvolga l'attività fosforilativa su ERK indotta da

clozapina. Questi esperimenti sono stati ripetuti altre due volte con indicazioni simili a quella riportata in questo paragrafo.

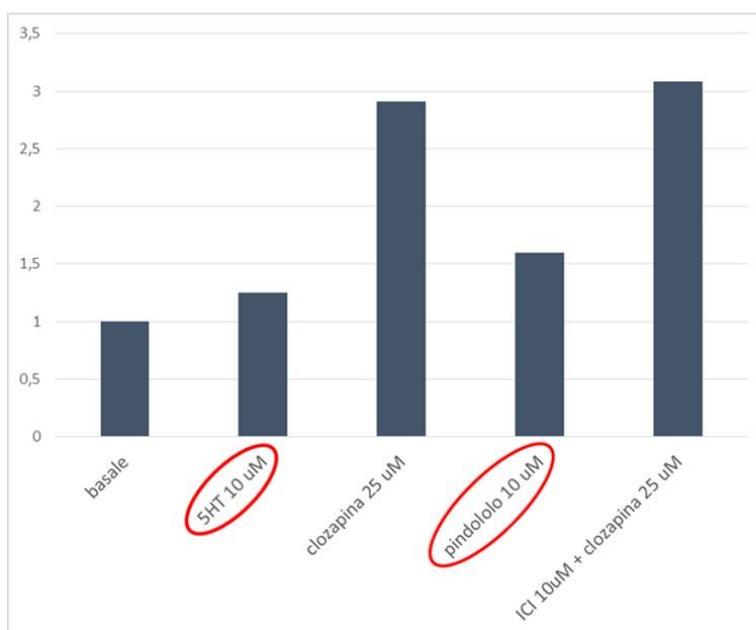
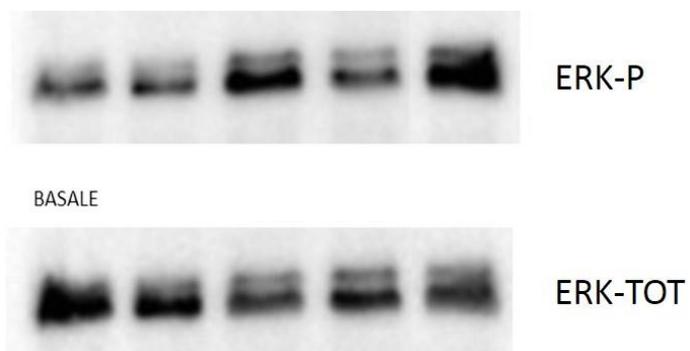


Fig 26. Fosforilazione di ERK indotta da Clozapina confrontata con l'attività di Serotonina (5HT), e Pindololo.

(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

Come ulteriore esperimento di conferma per escludere il ruolo del recettore 5HT_{1A} è stato inoltre utilizzato il farmaco antagonista WAY 100,165.

Ad una prima analisi del grafico (fig. 27) si nota come la preincubazione con WAY ad una concentrazione 10 uM riduca l'attività fosforilativa di clozapina. Tuttavia, già la sola somministrazione del farmaco WAY alla stessa concentrazione (10 uM) riduce l'attività fosforilativa basale cellulare. Nello specifico la riduzione che si osserva in WAY + clozapina rispetto a clozapina, è del tutto simile a quella che si osserva nella riduzione di WAY dell'attività basale.

In conclusione, il farmaco WAY non è un buon strumento per lo studio dell'attività recettoriale 5HT_{1A}, in quanto riduce l'attività basale di fosforilazione di ERK, probabilmente inibendo l'attività basale uno o più recettori endogeni presenti nelle HeLa.

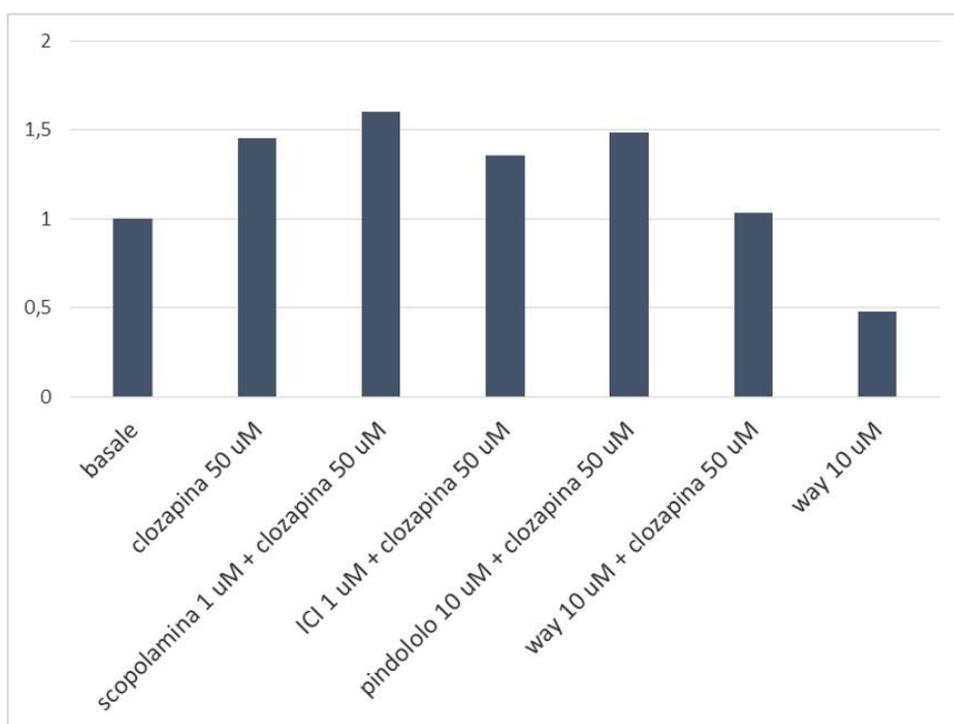
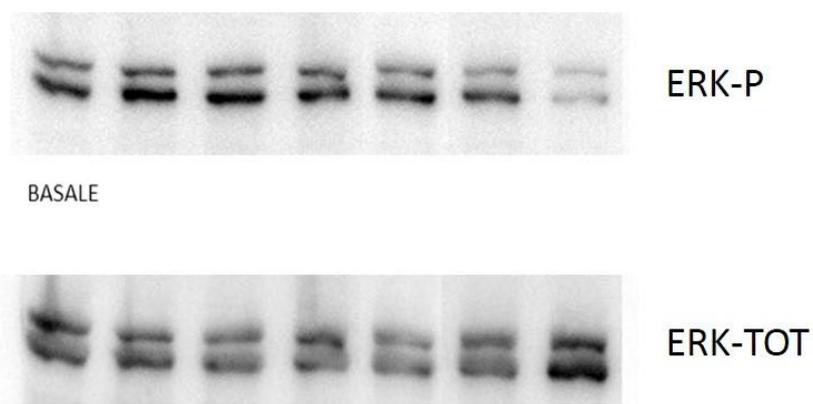


Fig 27. Fosforilazione di ERK indotta da Clozapina in presenza dell'antagonista selettivo 5HT_{1A}, WAY 100,165 (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3.6 Caratterizzazione del ruolo della transattivazione dei recettori tirosin chinasi nella fosforilazione di ERK indotta da Clozapina

Escluso il coinvolgimento di vie recettoriali importanti come quelle colinergiche, adrenergiche e serotoninergiche, sono stati presi in considerazione altri meccanismi che ipoteticamente potessero avere un ruolo fondamentale nella fosforilazione di ERK 1 e 2 da parte di clozapina.

Come già trattato nell'introduzione, la transattivazione da parte di recettori GPCR nei confronti di recettori tirosin-chinasi, mediato da metalloproteinasi intracitoplasmatiche, ricopre una funzione di primaria importanza nell'attivazione di ERK 1 e 2.

In letteratura è riportato come clozapina attivi il segnale ERK 1 e 2 attraverso il recettore all' EGF (recettore tirosin-chinasi) nella corteccia prefrontale e nello striato del topo (Pereira et al., 2011).

In virtù di tali considerazioni, è stata effettuata la scelta di bloccare il meccanismo di transattivazione attraverso un farmaco che blocca l'attività delle metalloproteinasi, marimastat.

Come evidente nel grafico (fig. 28), la preincubazione con marimastat alla concentrazione 10 μ M produce una riduzione di segnale ERK 1 e ERK 2 poco rilevante, soprattutto se confrontato con l'incubazione di marimastat singolarmente dove c'è stata una lieve diminuzione dell'attività basale.

Per cui nel nostro modello sperimentale, anche la transattivazione GPCR-RTK mediata da metalloproteinasi citoplasmatiche non spiega l'elevata attività di clozapina sul pathway ERK 1 e ERK 2, a prescindere da quale recettore clozapina stia attivando.

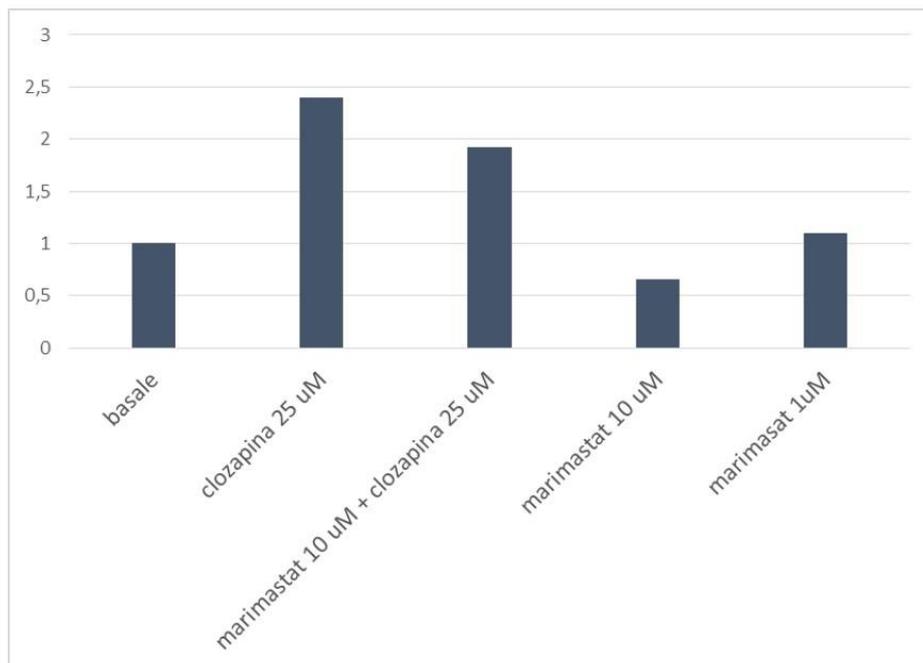
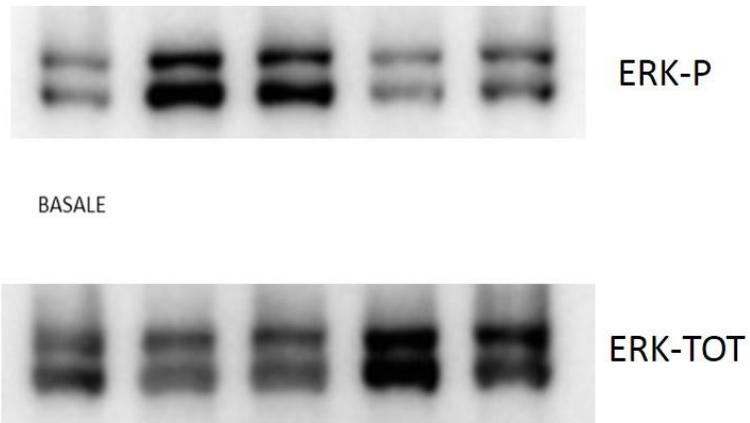


Fig 28. Ruolo dell'inibitore delle metalloproteinasi marimastat sulla attività fosforilativa indotta da Clozapina.
(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.3.7 *Caratterizzazione del ruolo dei trasportatori MRP (Multidrug resistant proteins) nella fosforilazione di ERK*

Dopo aver analizzato possibili meccanismi attraverso cui Clozapina inducesse la fosforilazione di ERK, abbiamo preso in considerazione il ruolo dei trasportatori dell'efflusso della famiglia MRP (Multidrug associated resistant proteins), tenendo conto che clozapina ha affinità per alcuni di questi trasportatori (Wang et al, 2006). Le proteine MRP non solo hanno un ruolo nella resistenza ai farmaci ma anche nella modulazione di messaggeri cellulari come cAMP e i leucotrieni (Zhou et al, 2010). Pertanto, ipotizzando un meccanismo di blocco di clozapina sulla espulsione di secondi messaggeri, abbiamo testato il composto MK-571 il quale inibisce numerose MRP, soprattutto la MRP1 e la MRP4 (Takeuchi et al, 2012). Tale inibitore dei trasportatori dell'efflusso non ha indotto nessuno effetto sulla fosforilazione di ERK, dimostrando che questo non fosse il meccanismo responsabile (fig. 29).

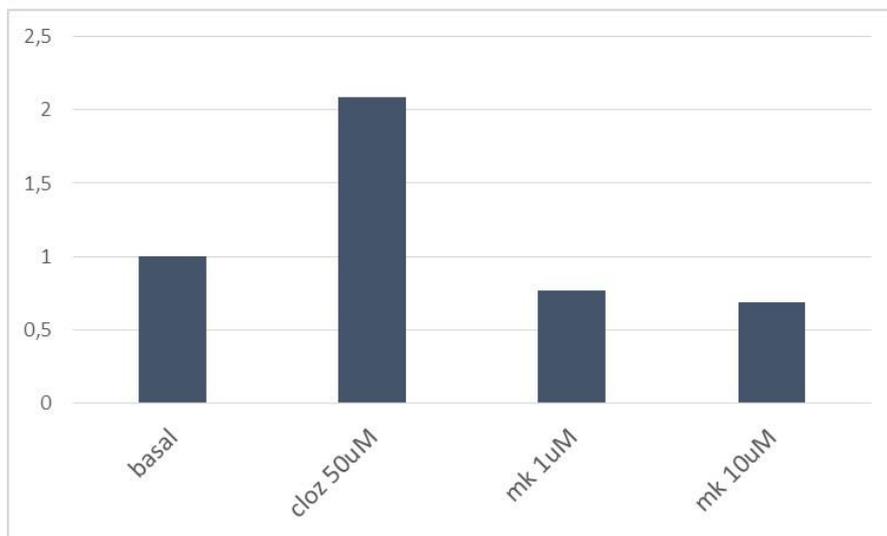
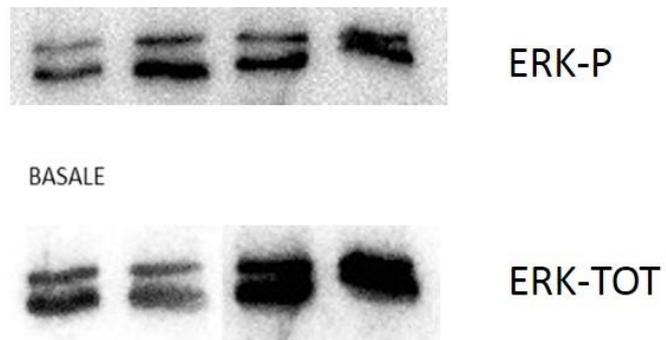


Fig 29. Effetto di MK-571 sull'attività fosforilativa di ERK.
 (Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).

3.4 Caratterizzazione dell'attività di farmaci dopamino-agonisti su cellule HeLa trasfettate con recettore dopaminergico D₂

È ben noto dalla letteratura che farmaci dopamino-agonisti di prima e seconda generazione possiedono un'analogia efficacia nell'inibizione dell'effettore Adenilato Ciclasi attraverso l'attivazione D₂ mediata della proteina Gi. Invece, per quanto riguarda l'effetto sul pathway di ERK, non ci risultano evidenze sperimentali. Per tale motivo, abbiamo deciso di testare due rappresentanti di prima e seconda generazione, quali Bromocriptina e Ropinirolo, sulla fosforilazione di ERK. Come esperimento iniziale, abbiamo verificato che questi farmaci non avessero alcun effetto sulle cellule HeLa non trasfettate fino alla concentrazione di 10 μ M.

Come dimostrato, la somministrazione di ropinirolo, con un effetto concentrazione-dipendente, ha indotto un'attività significativa sulla fosforilazione di ERK 1 e ERK 2, mentre bromocriptina no (fig. 30).

Anche per ropinirolo, è stata calcolata la EC₅₀, risultata essere $3 \pm 1.4 \mu$ M (fig. 31).

Tali dati dimostrano come l'attivazione del pathway di segnale ERK indotta dalla somministrazione di farmaci dopamino-agonisti di seconda generazione come ropinirolo, potrebbe ricoprire un potenziale ruolo neuroprotettivo nella malattia di Parkinson, come evidenziato da alcuni trial clinici (Zhang et al., 2013). Inoltre, alla luce del ruolo funzionale di β -arrestina nella attivazione di ERK, ipotizziamo che l'interazione tra recettore D₂ e questa proteina abbia un ruolo importante nella fosforilazione di ERK. Questa intrigante ipotesi deve essere ancora confermata da evidenze sperimentali.

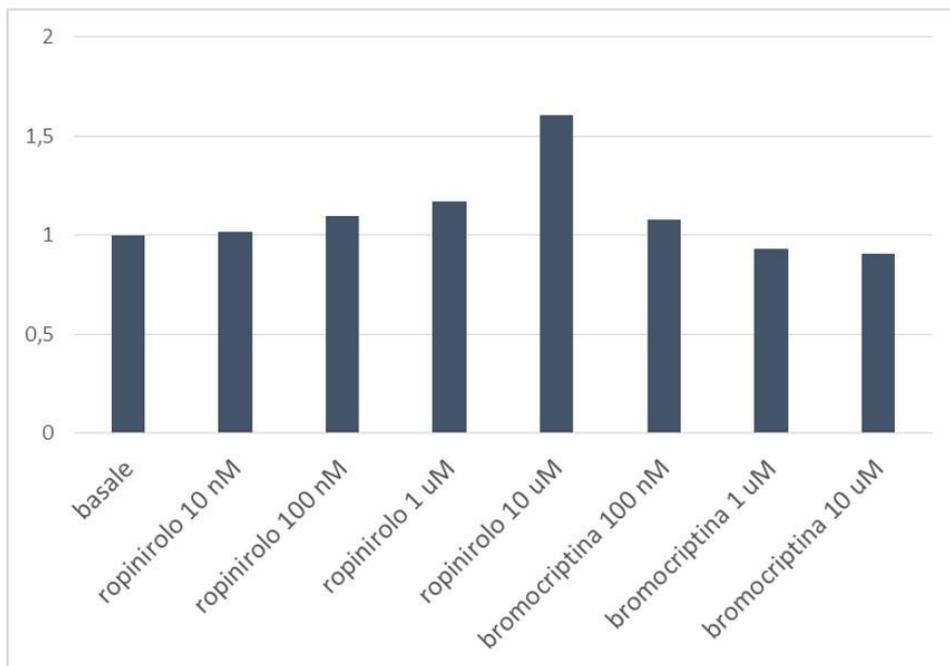
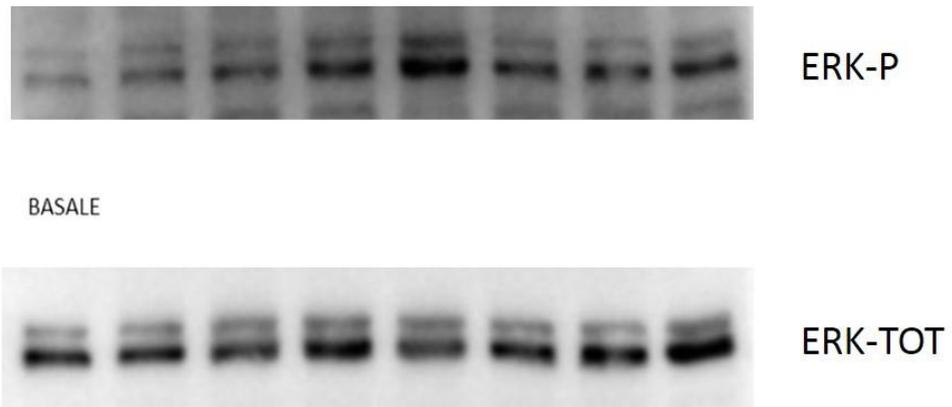
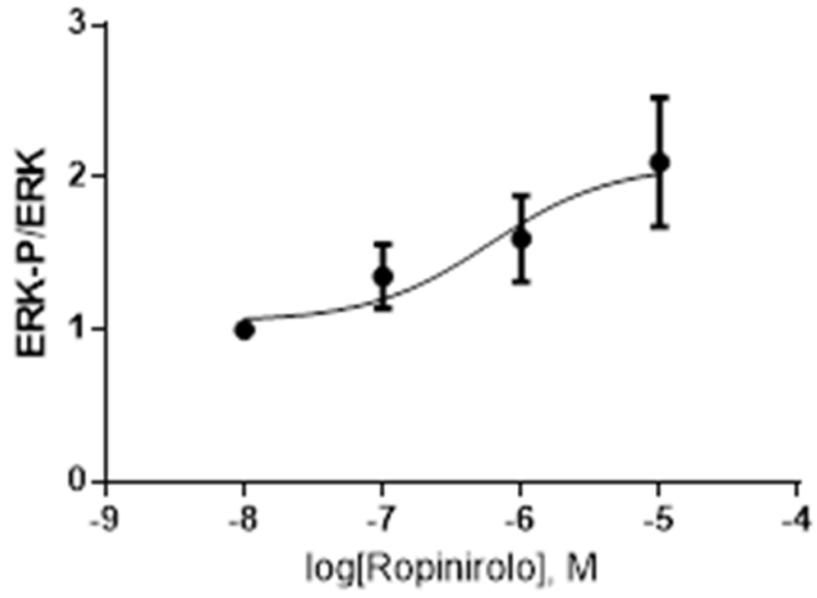


Fig 30. Effetto di farmaci dopamino-agonisti sull'attività fosforilativa di ERK in cellule HeLa trasfettate con recettore D₂.

(Sull'asse delle Y è riportato il rapporto ERK-P/ERK-TOT valutato in multipli rispetto alla attività basale).



$EC_{50} = 3 \pm 1.4 \mu M$

Fig. 31 Calcolo EC_{50} di ropinirolo

4. CONCLUSIONI

- 1) Farmaci antipsicotici atipici, come clozapina, sono potenti attivatori delle chinasi ERK 1 e ERK 2 nelle cellule HeLa, mentre gli antipsicotici tipici, come aloperidolo, sono inefficaci su tale meccanismo.
- 2) L'effetto di clozapina non è mediato da meccanismi noti come per esempio attività agonistica su recettori muscarinici, adrenergici e serotoninergici. Al momento, stiamo investigando su altri potenziali target recettoriali e non.
- 3) L'attivazione di proteine importanti per la funzionalità neuronale come ERK 1 e ERK 2 da parte degli antipsicotici atipici potrebbe contribuire agli effetti di tali farmaci sui sintomi negativi e cognitivi della schizofrenia.
- 4) Simili evidenze sono state ottenute per i farmaci anti-Parkinson, dove un farmaco di nuova generazione come ropinirolo ha attivato le chinasi ERK 1 e ERK 2 attraverso il recettore dopaminergico D₂, mentre un farmaco di vecchia generazione come bromocriptina è risultato inefficace su tale attivazione.
- 5) L'effetto di ropinirolo su ERK 1 e ERK 2 potrebbe contribuire al suo potenziale ruolo neuroprotettivo nella malattia di Parkinson.
- 6) L'attivazione delle chinasi ERK 1 e ERK 2 da parte di clozapina e ropinirolo potrebbe essere mediata dall'interazione recettore- β arrestina attraverso il nuovo meccanismo recettoriale del "biased agonism" o "selettività funzionale". Al momento, stiamo verificando questa ipotesi.

BIBLIOGRAFIA

1. Discovery of β -arrestin-biased dopamine D2 ligands for probing signal transduction pathways essential for antipsychotic efficacy.
Allen JA, Yost JM, Setola V, Chen X, Sassano MF, Chen M, Peterson S, Yadav PN, Huang XP, Feng B, Jensen NH, Che X, Bai X, Frye SV, Wetsel WC, Caron MG, Javitch JA, Roth BL, Jin J.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Nov 8;108(45):18488-93. doi:10.1073/pnas.1104807108. Epub 2011 Oct 24.
2. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success.
Bockaert J, Pin JP.
EMBO J. 1999 Apr 1;18(7):1723-9. Review.
3. Assessing neuroprotection in Parkinson's disease: from the animal models to molecular neuroimaging in vivo.
Ceravolo R, Sgadò P, Frosini D, Corsini GU.
J Neural Transm Suppl. 2006;(71):133-41. Review.
4. Mitogen-activated protein kinase/extracellular regulated kinase signalling and memory stabilization: a review.
Davis S, Laroche S. *Genes Brain Behav.* 2006;5 Suppl 2:61-72. Review.
5. Role of serotonin in central dopamine dysfunction.
Di Giovanni G, Esposito E, Di Matteo V.
CNS Neurosci Ther. 2010 Jun;16(3):179-94. doi: 10.1111/j.1755-5949.2010.00135.x. Review.
6. Role of dopamine D(2) receptors for antipsychotic activity.
Ginovart N, Kapur S.
Handb Exp Pharmacol. 2012;(212):27-52. doi: 10.1007/978-3-642-25761-2_2. Review.
7. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes.
Irannejad R, Tomshine JC, Tomshine JR, Chevalier M, Mahoney JP, Steyaert J, Rasmussen SG, Sunahara RK, El-Samad H, Huang B, von Zastrow M.
Nature. 2013 Mar 28;495(7442):534-8. doi: 10.1038/nature12000. Epub 2013 Mar 20.

8. New concepts in pharmacological efficacy at 7TM receptors: IUPHAR review 2.
Kenakin T.
Br J Pharmacol. 2013 Feb;168(3):554-75. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02223.x. Review.

9. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases.
Kim EK, Choi EJ.
Biochim Biophys Acta. 2010 Apr;1802(4):396-405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009. Epub 2010 Jan 14. Review.

10. Small molecule neurotrophin receptor ligands: novel strategies for targeting Alzheimer's disease mechanisms.
Longo FM, Yang T, Knowles JK, Xie Y, Moore LA, Massa SM.
Curr Alzheimer Res. 2007 Dec;4(5):503-6. Review.

11. Clinical pharmacokinetics of atypical antipsychotics: a critical review of the relationship between plasma concentrations and clinical response.
Mauri MC, Volonteri LS, Colasanti A, Fiorentini A, De Gaspari IF, Bareggi SR.
Clin Pharmacokinet. 2007;46(5):359-88. Review.

12. Mechanisms of action of antipsychotic drugs of different classes, refractoriness to therapeutic effects of classical neuroleptics, and individual variation in sensitivity to their actions: Part II.
Miller R.
Curr Neuropharmacol. 2009 Dec;7(4):315-30. doi: 10.2174/157015909790031184.

13. Antipsychotic drug actions on gene modulation and signaling mechanisms.
Molteni R, Calabrese F, Racagni G, Fumagalli F, Riva MA.
Pharmacol Ther. 2009 Oct;124(1):74-85. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.06.001. Epub 2009 Jun 21. Review.

14. A single-center, cross-sectional prevalence study of impulse control disorders in Parkinson disease: association with dopaminergic drugs.
Poletti M, Logi C, Lucetti C, Del Dotto P, Baldacci F, Vergallo A, Ulivi M, Del Sarto S, Rossi G, Ceravolo R, Bonuccelli U.
J Clin Psychopharmacol. 2013 Oct;33(5):691-4. doi: 10.1097/JCP.0b013e3182979830.

15. Monogenic Parkinson's disease and parkinsonism: clinical phenotypes and frequencies of known mutations.
Puschmann A.
Parkinsonism Relat Disord. 2013 Apr;19(4):407-15. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.01.020. Epub 2013 Feb 23. Review.
16. MAP'ing CNS development and cognition: an ERKsome process.
Samuels IS, Saitta SC, Landreth GE.
Neuron. 2009 Jan 29;61(2):160-7. doi: 10.1016/j.neuron.2009.01.001. Review.
17. GPCR-mediated transactivation of RTKs in the CNS: mechanisms and consequences.
Shah BH, Catt KJ.
Trends Neurosci. 2004 Jan;27(1):48-53. Review. No abstract available.
18. Distribution and function of dopamine D1, D2 receptor.
Suhara T, Miyoshi M.
Rinsho Shinkeigaku. 2007 Nov;47(11):826-8. Review. Japanese.
19. Mitogen-activated protein kinases in synaptic plasticity and memory.
Sweatt JD.
Curr Opin Neurobiol. 2004 Jun;14(3):311-7. Review.
20. Expression levels of multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4) in human leukemia and lymphoma cell lines, and the inhibitory effects of the MRP-specific inhibitor MK-571 on methotrexate distribution in rats.
Takeuchi K, Shibata M, Kashiyama E, Umehara K.
Exp Ther Med. 2012 Sep;4(3):524-532. Epub 2012 Jun 29.
21. Evaluation of antipsychotic drugs as inhibitors of multidrug resistance transporter P-glycoprotein.
Wang JS, Zhu HJ, Markowitz JS, Donovan JL, DeVane CL.
Psychopharmacology (Berl). 2006 Sep;187(4):415-23. Epub 2006 Jun 30.
22. "Ins and outs" of seven-transmembrane receptor signalling to ERK.
Werry TD, Sexton PM, Christopoulos A.
Trends Endocrinol Metab. 2005 Jan-Feb;16(1):26-33. Review.
23. Transactivation joins multiple tracks to the ERK/MAPK cascade.
Wetzker R, Böhmer FD.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Aug;4(8):651-7.

24. The efficacy and safety of ropinirole prolonged release tablets as adjunctive therapy in Chinese subjects with advanced Parkinson's disease: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study.
Zhang Z, Wang J, Zhang X, Chen S, Wang Z, Zhang B, Liu C, Qu Q, Cheng Y, Li J, Cao H, Cai M, Zhu R.
Parkinsonism Relat Disord. 2013 Nov;19(11):1022-6. doi: 10.1016/j.parkreldis.2013.07.009. Epub 2013 Aug 6.
25. Substrates and inhibitors of human multidrug resistance associated proteins and the implications in drug development.
Zhou SF, Wang LL, Di YM, Xue CC, Duan W, Li CG, Li Y.
Curr Med Chem. 2008;15(20):1981-2039. Review.

