

PROGETTO PER IL XXXIX° Ciclo di Dottorato in Scienza del Farmaco

Tutor: Diego Brancaccio (RTDb - SSD CHIM/08) – Alfonso Carotenuto (PO - SSD CHIM/08)

Titolo: Sviluppo di ligandi che interagiscono con il recettore Adenosinico A2A

Background: I recettori accoppiati a proteina G (GPCR) sono proteine di membrana responsabili della trasduzione di un'ampia gamma di segnali dall'esterno all'interno della cellula. Le molecole segnale, che possono essere ligandi endogeni e/o esogeni, si legano ai siti ortosterici extracellulari provocando il trasferimento del segnale allosterico al sito di legame intracellulare per le proteine effettrici, tra cui le proteine G. Un membro farmacologicamente rilevante dei GPCR è il recettore dell'adenosina A2A, che regola molte funzioni vitali in diversi distretti del nostro organismo. La via di segnalazione del recettore A2A svolge un ruolo importante nell'attività cardiaca¹ così come nel rilascio di glutammato e dopamina nel cervello, in particolare nelle regioni coinvolte nel controllo motorio e nelle funzioni cognitive.² Inoltre, l'A2A può sopprimere le cellule immunitarie, proteggendo così il tessuto dall'infiammazione.³ Tuttavia, molti tumori solidi sfruttano la via dell'A2A, promuovendo l'immunosoppressione delle cellule tumorali nel microambiente tumorale. Pertanto, bloccare l'A2A può inibire la progressione di alcune varietà di tumori solidi.⁴ In questo contesto, comprendere come i ligandi interagiscono con il recettore A2A è di estrema rilevanza per la progettazione razionale di nuovi agenti terapeutici per un gran numero di malattie, tra cui diversi tipi di tumori, malattie infiammatorie e cardiovascolari, Parkinson ed Alzheimer.⁵⁻⁷ Finora, la scoperta di farmaci si è concentrata sui siti di legame ortosterici extracellulari e più recentemente sui siti di legame allosterici, con l'ambizione di progettare ligandi capaci di promuovere selettivamente l'interazione del GPCR con un sottotipo specifico di proteina G, attivando così una specifica via cellulare rispetto alle altre (*biased signaling*) e migliorando eventualmente la loro attività e profilo di tossicità.

Progetto: Contrariamente a studi precedenti, in questo progetto ci concentriamo sul sito di legame intracellulare del GPCR per la proteina G con l'obiettivo di sviluppare una piccola libreria di ligandi dotati di un'affinità di legame selettiva per una specifica coppia GPCR-proteina G. Inizialmente, i composti provenienti da diverse banche dati verranno testati tramite studi di *docking* verso il sito di legame intracellulare del recettore dell'adenosina A2A per la proteina Gs. I migliori ligandi, considerando la loro energia di legame e le interazioni con la proteina, saranno acquistati e valutati sperimentalmente utilizzando esperimenti NMR, quali *Saturation Transfer Difference* (STD) e *WaterLOGSY* (WL). A tale scopo, il recettore A2A, la proteina Gs e alcuni mutanti saranno espressi in *P. pastoris*, purificati e sospesi in opportuni mezzi detergenti. Successivamente, i composti capaci di interagire con i target saranno caratterizzati farmacologicamente per la loro attività intrinseca (agonista, agonista parziale, antagonista inverso, antagonista), utilizzando il saggio del cAMP in cellule Hek293 trasfettate con il recettore A2A.

Bibliografia

1. Paganelli F, Gaudry M, Ruf J, Guieu R. Recent advances in the role of the adenosinergic system in coronary artery disease. *Cardiovasc Res.* 2021;117(5):1284-1294. doi:10.1093/cvr/cvaa275
2. Morelli M, Di Paolo T, Wardas J, Calon F, Xiao D, Schwarzschild MA. Role of adenosine A2A receptors in parkinsonian motor impairment and L-DOPA-induced motor complications. *Prog Neurobiol.* 2007;83(5):293-309. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.07.001
3. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature.* 2001;414(6866):916-920. doi:10.1038/414916a
4. Sun C, Wang B, Hao S. Adenosine-A2A Receptor Pathway in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2022;13:837230. doi:10.3389/fimmu.2022.837230
5. Dall'Igna OP, Porciúncula LO, Souza DO, Cunha RA, Lara DR. Neuroprotection by caffeine and adenosine A2A receptor blockade of beta-amyloid neurotoxicity. *Br J Pharmacol.* 2003;138(7):1207-1209. doi:10.1038/sj.bjp. 0705185
6. Gołembiowska K, Dziubina A. Striatal adenosine A(2A) receptor blockade increases extracellular dopamine release following L-DOPA administration in intact and dopamine-denervated rats. *Neuropharmacology.* 2004;47(3): 414-426. doi:10.1016/j.neuropharm.2004.04.018
7. Headrick JP, Ashton KJ, Rose'meyer RB, Peart JN. Cardiovascular adenosine receptors: expression, actions and interactions. *Pharmacol Ther.* 2013;140(1):92-111. doi:10.1016/j.pharmthera.2013.06.002