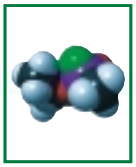

a cura di Pierfausto Seneci
Director of Chemistry, NAD AG, Monaco (D)

Noi chimici assistiamo da alcuni anni ad una progressiva (o, meglio, esponenziale) espansione delle discipline biologiche legate alla genetica e alla genomica che a volte ci spaventa. È da tempo che, nei luoghi e nelle circostanze opportune, uso la mia voce per stressare un approccio al problema completamente diverso (per fortuna scienziati molto più qualificati del sottoscritto fanno lo stesso da pulpiti più credibili e conosciuti): l'evoluzione della genomica e della post-genomica creano opportunità significative per i chimici moderni, cioè per i chimici non attenti solo al proprio orticello ma anche all'impatto della loro ricerca su altre discipline.
Ciò richiede una sempre maggiore multidisciplinarietà, ma permette anche di riconquistare quello che (a mio modesto parere…) è il ruolo delle discipline chimiche nell'identificazione di nuovi principi attivi e di nuovi obiettivi terapeutici.
La presentazione per linee generali di alcuni fra i lavori più affascinanti in questa e in altre future occasioni può essere di ispirazione per la (relativamente) piccola ma qualificata comunità chimica italiana.

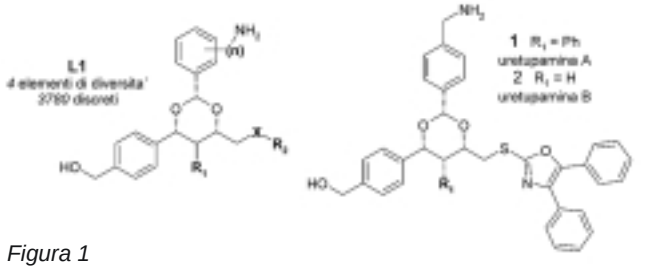

Figura 1

Un gruppo spesso citato in questa rubrica recentemente (F.G. Kuruvilla *et al., Nature,* 2002, **416,** 653) ha presentato un esempio di elucidazione del ruolo e del network biologico nel quale è inserita una proteina del lievito chiamata Ure2p. Pur essendo essa stata oggetto di molti studi, fra cui la produzione di organismi dove il corrispondente gene Ure2 è stato rimosso, un quadro completo delle funzioni della proteina non è noto, così come non lo è la struttura di composti chimici interagenti con Ure2p.
Una libreria **L1** di discreti (Figura 1) composta da 3.780 membri e preparata secondo il protocollo "one bead-one stock solution" è stata testata in presenza di Ure2p usando tecniche miniaturizzate di sintesi e screening (*Chemistry and Biology,* 2001, **8,** 1167 e 1183; *JACS,* 1999, **121,** 7967 e 2000, **122,** 7849) che forniscono risultati affidabili con minimo consumo di composti e di reagenti biologici. Otto composti sono risultati positivi e sono stati ripreparati e testati *in vivo* su una linea cellulare geneticamente modificata; fra essi **1** (Figura 1, uretupamina A) ha confermato sia la attività sia la specificità per Ure2p.
Utilizzando **1** ed il derivato più solubile **2** (Figura 1) come probes biologici Schreiber ha identificato proteine interagenti con Ure2p e ha potuto correlarne le funzioni con il livello di glucosio presente; ha determinato la specificità di **1** per alcune delle funzioni di Ure2p ma non per tutte, ottenendo così un probe estremamente specifico e non distruttivo, quali sono mutazioni genetiche irreversibili.
Al Lettore è consigliata la lettura dell'articolo per apprezzare la complessità e la versatilità dell'infrastruttura creata per l'elucidazione di sistemi biologici attraverso la cosiddetta "chemical genetics".

Un altro settore di interesse nell'ambito dell'identificazione e validazione di nuovi obiettivi è l'uso dei microarrays, cioè di microchips funzionalizzati con sequenze oligonucleotidiche (DNA microarrays) o peptidiche (protein microarrays). La miniaturizzazione permette di testare l'influenza di mutazioni genetiche, o di composti chimici, sull'espressione di uno o più geni in tessuti sani o malati, e di determinare quali geni o proteine siano obiettivi per lo sviluppo di nuovi farmaci.
La realizzazione e l'ottimizzazione di questi microarrays è un settore di cruciale importanza dove la chimica di sintesi e dei materiali giocano un ruolo essenziale.
Un gruppo della Corning Incorporated ha riportato (Y. Fang *et al., JACS,* 2002, **124,** 2394) la prima preparazione di microarrays contenenti proteine di membrana in un intorno che mima la situazione fisiologica delle proteine di membrana (presenza di microenvironment lipidico, corretto grado di fluidità per la diffusione dei composti da testare ecc.). Gli autori hanno identificato un supporto vetroso modificato con γ-amminopropilsilano (GAPS) ed hanno determinato la miscela ideale lipidica (dipalmitoil e dimiristoilfosfatidilcolina) per ricreare l'ambiente fisiologico delle proteine di membrana; hanno verificato la funzionalità dello screening su microarray analizzando noti inibitori di proteine espresse sui microarrays; in una parola, hanno messo a punto un sistema versatile che permetterà di testare l'effetto di composti a potenziale interesse farmaceutico su un pannello vasto di proteine di membrana espresse e immobilizzate in condizioni quasi-fisiologiche.

Per finire recentemente è stata riportata la sintesi e la caratterizzazione di due enantiomeri (**3** e **4**, Figura 2) disegnati per "tagliare" con selettività ed efficienza e caratterizzare alcune proteine dopo attivazione fotochimica (C.V. Kumar *et al., PNAs,* 2002, **99,** 5810).

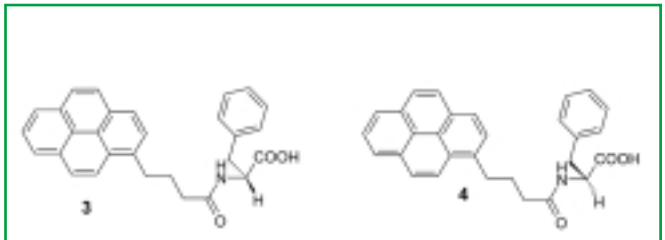

Figura 2

Le molecole contengono una parte chirale aminoacidica ed una achirale responsabile, dopo fotoattivazione, del cleavage di proteine attraverso un intermedio pirenico radicalcationico; le due porzioni sono separate da uno spacer a tre atomi di carbonio. Entrambe le molecole sono specifiche per lo stesso sito di binding e di cleavage su due proteine (lisozima, residui 108-109, e BSA, residui 346-347): ciò mostra che il sito di binding non è influenzato dalla chiralità.
Al contrario, l'efficienza del cleavage dell'albumina è significativamente diversa: **3** è circa 100 volte più efficace di **4**, e ciò è riflesso dalla maggiore affinità di binding per **3** su BSA. In più, la creazione di ibridi a spacer allungato permette di allontanare il sito di cleavage dal sito di binding senza influire sulla potenza di binding del costrutto.
Queste osservazioni rinforzano il concetto di probes chimici per la caratterizzazione accurata e affidabile di componenti del genoma e del proteoma umano.