



**Q**uesta volta la rubrica è in qualche modo equiparabile ad una caccia al tesoro. Useremo infatti una mappa recentemente riportata in letteratura per verificarne la veridicità, e cioè per riscoprire l'ubicazione di vecchi tesori e scoprire quella di nuovi.

Un lavoro recentemente uscito su *Science* (J. Lamb *et al.*, 2006, **313**, 1929) titola "The connectivity map: using gene expression signatures to connect small molecules, genes, and disease". E allora, direte voi? Forse che non abbiamo parlato di chimica genetica più volte anche in questa rubrica? Primo, il lavoro viene dal Broad Institute di Harvard e MIT, un istituto di prim'ordine; secondo, esso dà un'immagine chiara delle potenzialità di questa "connectivity map" (e delle generazioni future e migliorate che ne deriveranno).

L'idea di base è semplice e la esprimerò senza addentrarmi nei (necessari) dettagli tecnici che ne garantiscono la rigorosità, descritti in maniera molto più precisa e corretta di quanto io non possa fare nel lavoro stesso. Gli autori hanno selezionato alcune linee cellulari molto usate in letteratura (*in primis* MCF7, una linea di cellule epiteliali cancerogene), determinandone i dati di espressione di RNA messaggero in condizioni fisiologiche; questa "firma di espressione genica" è per l'appunto una mappa di connettività da considerare come base di lavoro.

Gli autori hanno poi selezionato 164 molecole ad attività farmacologica nota: fra esse farmaci, altri composti ben caratterizzati, ma anche composti ad azione non legata al processo di trascrizione da DNA ad RNA, quindi non direttamente interagenti con l'espressione genica di una cellula. Per prevenire scarsi segnali di attività, i composti sono stati testati ad una concentrazione di 10  $\mu$ M (un loro sottogruppo a concentrazioni variabili fra 100 nM e 1 mM, per osservare la sensibilità del metodo). Per verificare un loro effetto diretto-primario, invece che osservare effetti mediati e magari autopropagantisi, la firma di espressione genica è stata letta dopo sole 6 ore dall'aggiunta del composto (per un sottogruppo di composti anche dopo 12 ore, per osservare le differenze). Per ogni composto testato è anche stato acquisito allo stesso momento un "bianco" sulla stessa linea cellulare trattata con solvente puro, per annullare l'influenza di crescite diverse di lotti diversi delle stesse cellule. Sono state quindi accumulate, fra linee cellulari, concentrazioni e durate del tempo d'incubazione, più di 450 mappe di connettività in un anno di lavoro.

Gli autori hanno poi scelto delle firme di pubblico dominio, da diversi corredi genici, su cui lavorare. Ad esempio, la firma d'espressione di alcune linee cellulari trattate con tre inibitori delle istone deacetilasi (HDAC - 5 geni down-regolati e 8 up-regola-

ti), verificando che fornissero una firma analoga nella loro mappa; in più, hanno pure confermato la presenza di una firma simile per l'acido valproico e per la tossina HC, composti strutturalmente diversi da quelli usati in origine, seppur noti come inibitori HDAC. Lavorando sull'estrogeno  $17\beta$ -estradiolo e sulla sua firma (ER - 89 geni down-regolati e 40 geni up-regolati) hanno constatato un'alta similitudine con la genisteina, un fitoestrogeno, ed una più ridotta con il  $17\alpha$ -estradiolo, noto per la sua ridotta potenza rispetto allo stereoisomero; hanno pure riscontrato connettività negativa (inversione di segno up- o down- per la maggioranza dei geni della firma) per il fulvestrant e, in minor misura, per tamoxifene e raloxifene, cioè tre composti ad attività antiestrogena: si classificano quindi correttamente sia agonisti che antagonisti dello stesso recettore, purché esso sia espresso nella linea cellulare usata (qui MCF7).

Gli autori sono poi passati a cinque fenotiazine, noti antagonisti del recettore della dopamina, verificando che una firma simile esiste sia per i cinque composti, che per altre fenotiazine similmente attive. Le cellule usate non sono di tipo neuronale, per cui il sistema messo a punto non è condizionato dalla natura della linea cellulare prescelta. Si è poi anche elucidato il meccanismo di azione di un prodotto naturale, la gedunina, noto per abrogare l'attività dell'androgen receptor (AR); la sua firma è risultata essere molto simile a quella della geldanamicina, un inibitore noto della heat shock protein 90 (HSP90). Studi biochimici approfonditi hanno confermato il coinvolgimento della gedunina nell'abrogazione dell'attività di HSP90, da cui poi dipende l'abrogazione di AR: si possono quindi elucidare meccanismi d'azione ed evidenziare connessioni metaboliche ignote. Per finire, lo stesso approccio ha permesso di collegare composti e stati patologici. Si è evidenziata in queste cellule una firma tipica dell'obesità, propria di agonisti noti del recettore PPAR $\gamma$  noti per indurre adipogenesi in vitro; utilizzando firme note della malattia neurodegenerativa di Alzheimer (AD) si è osservato come la 4,5-dianilinoftalimide (DAPI) sia negativamente connessa all'AD, il che torna con la sua capacità in vitro di provocare la disaggregazione delle fibrille di amiloide e ne conferma una probabile utilità terapeutica; si è inoltre identificata l'attività non nota della rapamicina, un composto immunomodulante, nel prevenire la resistenza al dexametazone in chemioterapia.

Le potenzialità, al di là di difetti a mio avviso risolvibili in futuro, sono evidenti. Quasi più interessante per i Lettori, spero, è che l'intero set di mappe e strumenti che permettono analisi individuali è a disposizione sul sito [www.broad.mit.edu/cmap](http://www.broad.mit.edu/cmap).

Buona caccia al tesoro!