

Questo mese esamineremo una classe di bersagli molecolari, deputata alla fosforilazione di proteine, e cioè le chinasi. Queste sono fra i bersagli molecolari, o target, più considerati al momento in malattie multifattoriali, quali le malattie neurodegenerative e i tumori. Il loro stretto legame con i processi di regolazione e di trasmissione dei segnali a livello cellulare ne fa un obiettivo privilegiato per combattere anomalie patologiche nei suddetti meccanismi di regolazione fisiologica; la loro abbondanza (>500 chinasi nel genoma!) e la loro grande omologia strutturale li rende però difficilmente validabili come singoli bersagli e rende difficile l'ottenimento di inibitori selettivi verso una sola fra le tante chinasi.

Fra gli articoli da segnalare, ve ne sono alcuni che utilizzano strumenti e metodiche basate sulla chimica per chiarire il ruolo di specifiche chinasi in eventi cellulari durante il loro verificarsi, permettendo di osservarne l'influenza e la rilevanza per una corretta (o anormale) regolazione cellulare. Ad esempio, un sistema "sensorio" (Q. Wang, D.S. Lawrence, *JACS*, 2005, **127**, 7684) capace di misurare l'attività fosforilante di una chinasi (nell'esempio

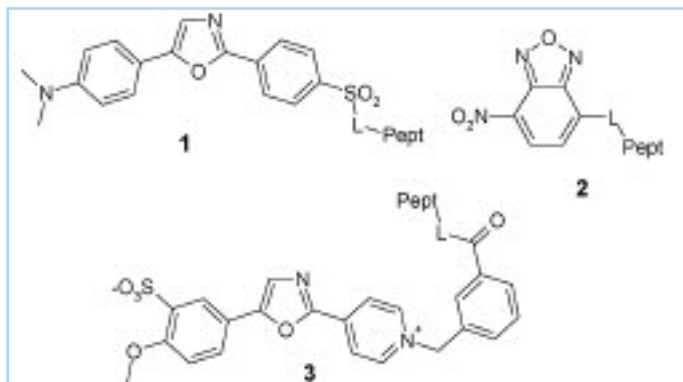


Fig. 1

Src, un potenziale target biologico in campi quali l'oncologia e l'infarto), è basato sulla fusione di uno fra vari reporters di fluorescenza (vedi Figura 1, **1-3**) su un substrato peptidico riconoscibile dalla chinasi in questione, ed è stato validato in vitro attraverso la sintesi di librerie di substrati-fluorofori-linkers atte a studiare la natura del fluoroforo e il suo punto di ancoraggio sulla sequenza substrato.

L'uso di vari fluorofori a diversa sensibilità permette di ipotizzare, fra le altre cose, l'uso di reporters ortogonali capaci di monitorare l'attività di più di una chinasi simultaneamente, permettendo di distinguere coppie chinasi-substrato "teoriche" in vitro da coppie che, in sistemi cellulari vivi, producono fosforilazioni del substrato stesso. Lo screening biologico di chinasi è anche oggetto di ricerca, perché spesso le classiche campagne di saggi in vitro danno risultati poco attendibili, oppure non sono in grado di evidenziare deboli inibitori competitivi con il sito del substrato naturale di una chinasi, e cioè l'ATP.

Di recente è stato riportato da un gruppo di ricercatori industriali (M.A. McCoy *et al.*, *JACS*, 2005, **127**, 7978) uno screening basato su spettroscopia NMR, che permette di testare le più disparate molecole ad attività potenzialmente inibente, che non richiede l'attivazione della chinasi (spesso problematica nelle condizioni di saggio biologico), che può essere effettuata in presenza di varie concentrazioni di ATP (quindi determinando il livello di competitività, e riproducendo alte concentrazioni fisiologiche di ATP), che può evidenziare inibitori potenti fino a 20 nM, e deboli fino a 5 mM. Una volta ottenuto un inibitore di una specifica chinasi da un saggio di attività, è difficile caratterizzarne approfonditamente la selettività verso gli altri congeneri, ed è ancor più difficile capire quali fra le potenziali chinasi bersaglio siano effettivamente inibite in un sistema cellulare. A questo proposito, vale la pena citare che i più recenti inibitori di chinasi sul mercato in oncologia (Gleevec, Iressa e Tarceva) hanno un profilo di selettività "sporco" in vitro, mentre in vivo sono in grado di garantire utilità terapeutica senza insormontabili problemi di tossicità, e che a volte potenti inibitori in vitro di una chinasi fortemente coinvolta in una patologia risultano essere completamente privi di effetti terapeutici in animali, o nell'uomo.

Un gruppo leader nello studio delle chinasi e nella razionalizzazione degli effetti di loro inibitori ha recentemente riportato (C. Kung *et al.*, *PNAS*, 2005, **102**, 3587) un sistema accurato ispirato alla "chimica genetica" che permette di identificare senza alcun dubbio i target intracellulari di un inibitore delle cyclin-dependent kinases (CDKs), la cui struttura **4** è riportata in Figura 2.

È sorprendente vedere dal lavoro in questione, che utilizza microarrays contenenti chinasi ingegnerizzate geneticamente, come questo inibitore, che in vitro inibisce almeno cinque chinasi a concentrazioni nanomolari, in vivo agisca solo per azione combinata su due chinasi, chiamate CDK1 e Pho85. La prima è effettivamente inibita in vitro con $IC_{50}=46$ nM, mentre sorprendentemente la seconda è debolmente inibita in vitro con $IC_{50}=1,5$ μ M. Altre CDKs, inibite in vitro a concentrazioni uguali od inferiori a 10 nM, non sono inibite in un sistema cellulare più "predittivo" di una situazione fisiologica.

Questo lavoro illustra chiaramente come il campo delle chinasi sia complesso, poco facilmente razionalizzabile e come richieda l'uso di metodiche avanzate per una migliore comprensione delle cause e degli effetti di squilibri di fosforilazione in sistemi cellulari, od addirittura viventi.

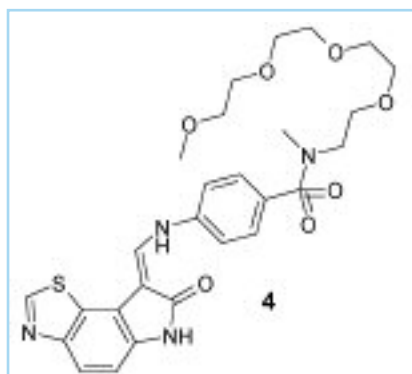


Fig. 2