

LA BIOLOGIA STRUTTURALE NELLA SCOPERTA DI NUOVI INTERVENTI TERAPEUTICI: FORME E SOSTANZA

Menico Rizzi

A cura di Sandra Simonelli

La biologia strutturale studia la struttura delle componenti dei sistemi viventi a partire dalle molecole sino all'intero organismo. Per analizzare la conformazione delle molecole biologiche si è dovuto ricorrere alla diffrazione dei raggi X prodotta dalle biomolecole opportunamente isolate e cristallizzate. I raggi X, infatti, data la piccola lunghezza d'onda, hanno un potere risolutivo sufficiente ad evidenziare particolari a livello atomico.

Dalla determinazione della struttura dell'emoglobina e della mioglobina ad oggi sono state determinate migliaia di strutture molecolari, in prevalenza proteine, ciò a permesso di capire i principi da cui dipende la loro stabilità e in che modo sono coinvolte nei processi funzionali.

La biologia strutturale, a livello molecolare, è attualmente utilizzata in campo farmaceutico nella ricerca di farmaci per il trattamento di malattie batteriche o virali, ed anche nel trattamento dei tumori e di patologie neurologiche. La progettazione razionale di una molecola a scopo terapeutico, infatti, è facilitata se si conosce la struttura tridimensionale del bersaglio del farmaco.

Nel campo dell'ingegneria proteica, invece, la conoscenza della struttura proteica di una molecola, ad esempio di un enzima, consente di progettare come intervenire su di essa per modificarne o modularne la funzione.

Un esempio di come le informazioni fornite dall'analisi strutturale delle biomolecole siano applicabili in campo bio-medico, è fornito dai *canali del potassio*, proteine transmembranali presenti sia nei procarioti che negli eucarioti. I canali del potassio svolgono una funzione essenziale nel processo di trasmissione dell'impulso nervoso trasportando cariche attraverso la membrana cellulare.

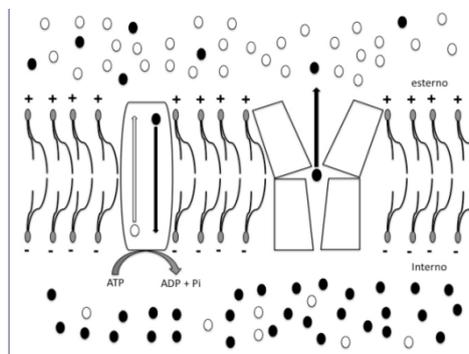


Figura 1. Schema semplificato del meccanismo di polarizzazione della membrana plasmatica. Le sfere nere indicano gli ioni potassio e quelle bianche gli ioni sodio. L'azione concertata di canali del potassio (parte destra dello schema) e di pompe sodio/potassio ATP dipendenti (sulla sinistra dello schema) determina l'instaurarsi di una differenza di potenziale a cavallo della membrana; nei neuroni ciò costituisce la base del segnale elettrico che determina l'impulso nervoso.

In questo processo il compito dei canali del potassio è quello di trasportare ioni K^+ attraverso la membrana, dall'interno all'esterno della cellula. Ciò avviene in modo fortemente selettivo anche nei confronti del Na^+ che ha un raggio inferiore a quello del K^+ e quindi dovrebbe passare più facilmente attraverso il canale.

I canali del potassio, assieme ai canali del Na e del Ca, appartengono ad una famiglia di proteine con struttura quaternaria tetramerica, nelle quali è individuabile una regione, detta *filtro di selettività*, che consente ad uno specifico ione di attraversare la membrana plasmatica. La sequenza

amino-acidica e l'organizzazione strutturale di queste proteine è fortemente conservata in diversi organismi, anche filogeneticamente distanti, dai procarioti agli eucarioti.

La prima struttura tridimensionale di un canale del potassio ad essere determinata è stata quella della proteina KcsA, in *Streptomyces lividans*. (fig.2).

E' evidente che i canali del potassio batterici non hanno la funzione di generare l'impulso nervoso ma altre funzioni come, per esempio, eliminare gli ioni K^+ in eccesso in quei batteri che vivono in ambienti ricchi di potassio, tuttavia lo studio di queste proteine è stato di grande utilità nella comprensione del funzionamento dei canali di potassio umani.

Il canale del potassio batterico ha una struttura molto complessa e fortemente simmetrica, costituita da quattro monomeri, costituiti da due alfa-eliche ciascuno, che racchiudono un canale delimitato da quattro alfa-eliche, una per ogni monomero, che attraversa la membrana e ospita il "filtro di selettività". (Fig. 2A e 2B).

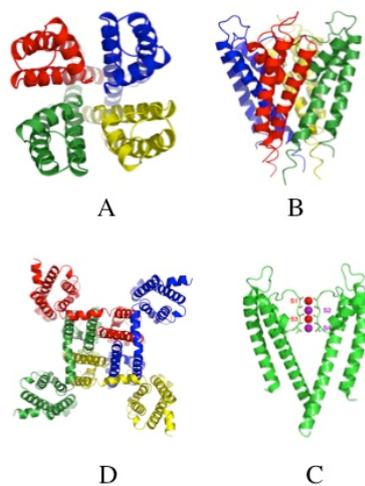


Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura tridimensionale di canali del potassio. (A) Struttura tetramerica del canale del potassio KcsA del batterio *Streptomyces lividans* vista dall'alto della membrana plasmatica. (B) Stessa struttura di (A) in una proiezione perpendicolare alla precedente in cui la parte superiore del tetramero si affaccia sul lato extracellulare. (C) Dettaglio della struttura in (B) in cui solo due monomeri sono rappresentati insieme agli ioni potassio (sfere) all'interno del filtro di selettività. (D) Struttura tetramerica del canale del potassio KvAP di *Aeropyrum pernix* orientata rispetto alla membrana plasmatica come in (A). Si noti la presenza per ognuno dei quattro monomeri di un ulteriore dominio strutturale in cui si osserva la presenza di molti residue di arginina carichi positivamente.

Lo ione potassio, una volta accolto nel "filtro di selettività", attraversa tutto il canale all'interno della proteina, senza mai venire in contatto con il doppio strato della membrana. La selettività del canale è dovuta al fatto che la regione del "filtro" espone un certo numero di atomi d'ossigeno carbonilici della proteina che si coordinano con lo ione stabilizzandolo esattamente come le molecole d'acqua nel citoplasma e nel liquido extracellulare, nei quali lo ione si presenta in forma idratata. Pertanto lo ione si trova sempre nella stessa situazione energetica ed il passaggio non richiede dispendio di energia, anche perché avviene da una soluzione a concentrazione maggiore di ioni potassio ad una minore.

Per lo ione Na^+ , invece, la posizione degli atomi d'ossigeno all'interno del filtro non è tale da soddisfare la coordinazione perciò, dal punto di vista energetico, è economicamente più vantaggioso che lo ione resti in soluzione dove l'idratazione lo rende più stabile.

La struttura delle proteine implicate nel trasporto deve poter assumere due configurazioni, una configurazione aperta che consente il passaggio dello ione ed una chiusa che lo impedisce, perché soltanto così è possibile ottenere la periodica polarizzazione e depolarizzazione della membrana,

necessaria alla generazione dell'impulso elettrico, si è cercato quindi di definire con quali meccanismi le molecole assumano l'una o l'altra di queste forme.

In alcuni casi la chiusura e l'apertura del canale del potassio è determinata dalla differenza di potenziale che si instaura sulle due facce della membrana (fig 1), in altri casi da stimoli meccanici o dal legame con effettori, quali AMP o ioni calcio.

Il meccanismo di apertura-chiusura dei canali del potassio voltaggio-dipendenti è stato studiato in *Aeropyrum pernix*, (KvAP). In questo caso, su ciascuno dei quattro monomeri della tipica struttura del canale del potassio batterico, è presente un dominio ricco di arginina, un aminoacido dotato di carica positiva (Fig. 2D). L'analisi cristallografica ha evidenziato che questo dominio può posizionarsi sia sul lato citoplasmatico della membrana sia dal lato extracellulare assumendo due forme diverse (fig 3) una delle quali permette il passaggio dello ione mentre l'altra non lo consente.

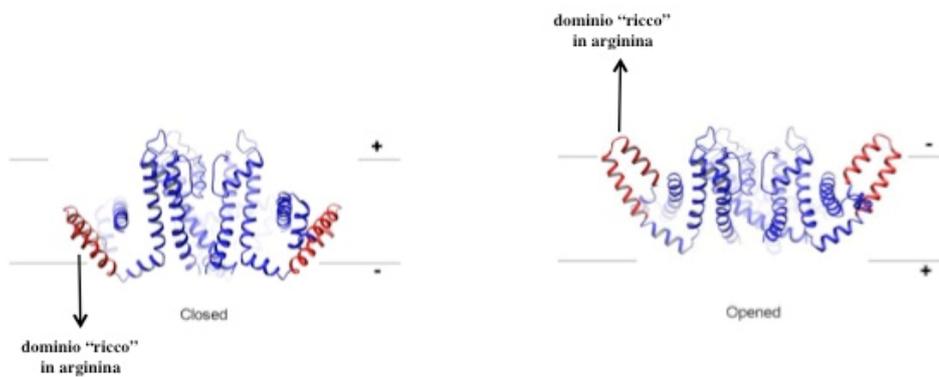


Figura 3. Modello di apertura e chiusura in canali del potassio voltaggio-dipendenti. Sono riportate le rappresentazioni della conformazione chiusa (sinistra del pannello) e aperta (destra del pannello); la membrana plasmatica è indicata da linee continue immaginando la porzione extracellulare nella parte superiore del disegno. La condizione di carica dai due lati della membrana è indicata; per maggior chiarezza grafica, solo un dimerico del canale del potassio è riportato.

Ciò che determina l'assunzione di una o l'altra delle due forme, e quindi l'apertura o la chiusura del canale, è l'attrazione elettrostatica esercitata dalla superficie della membrana cellulare: se la superficie citoplasmatica della membrana è carica negativamente, il dominio ricco di arginina, elettricamente positivo, è attratto dal lato interno della membrana, chiudendo il canale, se invece, per l'azione delle pompe del sodio ATP-dipendenti, sul lato interno della membrana si accumula un eccesso di cariche positive, per repulsione elettrostatica il dominio si sposta dal lato opposto aprendo il canale.

Un altro esempio di applicazione della biologia strutturale nel campo biomedico è il trattamento della leucemia mieloide cronica (LMC), un tumore del sangue dovuto alla proliferazione anomala delle cellule staminali pluripotenti che portano alla formazione dei granulociti.

L'insorgenza di LMC è attribuita ad una traslocazione incrociata di alcuni segmenti dei cromosomi 9 e 22 con la formazione di un cromosoma detto "Philadelphia", che consiste in un cromosoma 22 contenente un gene che riunisce parti del gene BCR e del gene ABL, detto *gene di fusione BCR-ABL*. Questo gene codifica per una *proteina di fusione BCR-ABL*, costituita da un frammento BCR in posizione N-terminale e un frammento ABL in posizione C-terminale, che ha attività enzimatica con funzione di tirosina-chinasi.

Le tirosina-chinasi sono proteina-chinasi in grado di fosforilare residui di tirosina su proteine bersaglio ed anche sulla propria struttura (auto fosforilazione) e sono implicate in diverse *cascate di segnale* che, attivate da un preciso segnale metabolico, come ad esempio un fattore di crescita, stimolano la divisione cellulare.

Il processo di divisione cellulare è regolato dall'alternarsi della struttura delle tirosina-chinasi in una forma attiva, che dà inizio alla cascata di segnale, e in una forma inattiva che la blocca. Le mutazioni che impediscono all'enzima di assumere la forma inattiva trasformano la proteina in un oncogene perché la cellula è indotta ad una divisione incontrollata e continua che genera il cancro.

La biologia strutturale ha chiarito che la fosforilazione determina dei significativi cambiamenti nella struttura di particolari regioni della molecola bersaglio, anche nel caso di auto fosforilazione, ossia quando il bersaglio è lo stesso enzima. (fig.4)



Figura 4.

Esempio di strutture aperte e chiuse nei recettori tirosina-chinasi. La figura rappresenta la struttura tridimensionale di ABL nella conformazione chiusa-inattiva (destra del pannello) e aperta-attiva (sinistra del pannello). I domini N- e C-terminali sono indicati, così come l'ansa di attivazione. Il sito attivo è visibile nel centro della struttura, all'interfaccia dei domini N- e C- terminali.

Il sito attivo delle tirosina-chinasi si trova in una cavità centrale delimitata dai domini N-terminale e C-terminale e possiede al suo interno un alloggiamento in cui l'ATP si lega in una posizione che facilita il passaggio del fosfato al peptide bersaglio. La regione del sito attivo che si affaccia all'esterno della proteina è dotata di una struttura ad ansa, detta *ansa di attivazione*, la cui conformazione si modifica in seguito all'autofosforilazione di uno o più residui di tirosina e, modificandosi, determina l'attivazione dell'enzima. L'autofosforilazione, infatti, fa sporgere l'*ansa di attivazione* verso l'esterno della proteina permettendo così ai substrati di accedere al sito attivo e di essere a loro volta fosforilati, mentre quando non è fosforilata, l'ansa di attivazione si chiude e copre l'accesso al sito attivo. L'enzima si comporta come una sedia pieghevole, la cui struttura è sempre utilizzabile soltanto se la sedia è aperta.

A causa della traslocazione cromosomica che l'ha prodotta, la *proteina di fusione* BCR-ABL che, come abbiamo detto, ha funzione di tirosina-chinasi, ha una particolare sequenza aminoacidica che determina una struttura paragonabile alla conformazione aperta e quindi è prevalentemente (anche se non esclusivamente) in una forma attiva ed è proprio lo stimolo eccessivo e continuo alla divisione cellulare indotto da questa proteina a produrre la patologia.

All'inizio del 2000 è stato messo a punto un farmaco (Imatinib) in grado di inibire selettivamente BCR.ABL, senza interferire con le altre tirosina-chinasi.

Gli studi di biologia strutturale con cristallografia a raggi X hanno chiarito che il farmaco ha una struttura simile a quella dell'ATP ed è quindi in grado di occupare parte del sito di legame di quest'ultimo, e di instaurare, inoltre, una serie di interazioni stabilizzanti con la regione dell'ansa di attivazione quando l'enzima è nella conformazione aperta.

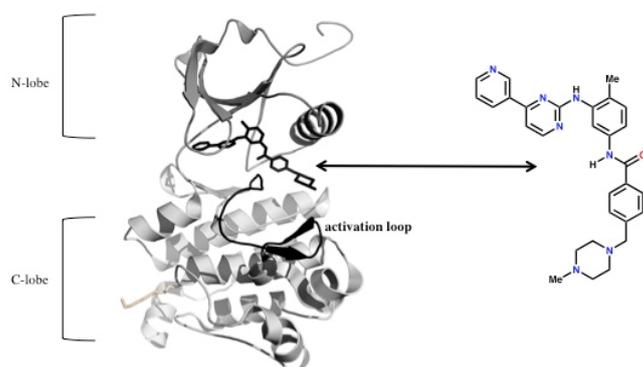


Figura 5.

Rappresentazione della struttura tridimensionale di BCR-ABL (sola porzione ABL) nella forma chiusa-inattiva e in complesso con il farmaco Imatinib di cui è riportata la struttura chimica nella parte destra del pannello. I domini N- e C-terminale sono indicati come l'ansa di attivazione (in nero). Il farmaco imatinib, evidenziato con rappresentazione a bastoncini di colore nero, si "siede" nel sito attivo dell'enzima grazie ad una serie di interazioni stabilizzanti instaurate con la matrice proteica, impedendo l'accesso ai substrati e bloccando quindi l'azione enzimatica di BCR-ABL.

L'inibizione dell'enzima è dovuta al fatto che il farmaco non permette all'ATP di legarsi alla proteina impedendo la catalisi.

Dal momento che la regione che costituisce il sito di legame dell'ATP è molto simile in tutte le tirosina-chinasi occorre evitare che il farmaco inibisse anche altre catalisi, interferendo con molti processi cellulari risultando fortemente tossico, perciò si è sfruttato il fatto che le conformazioni aperte delle tirosina-chinasi differiscono in alcuni dettagli strutturali che le rendono adatte a riconoscere e legare un particolare substrato da fosforilare ed si è sintetizzato un farmaco che potesse instaurare interazioni soltanto con BCR-ABL nella sua conformazione aperta.

Con la scoperta dell'Imatinib la mortalità dovuta a LCM ha avuto un sensibile decremento tuttavia si sono osservati casi in cui è insorta una resistenza al trattamento col farmaco. Ciò è dovuto alla comparsa di mutazioni puntiformi in BCR-ABL che rendono troppo debole il legame dell'enzima col farmaco, rendendo quest'ultimo inefficace.

L'analisi strutturale ha permesso di individuare le ragioni per cui la mutazione impedisce al farmaco di legarsi all'enzima e quindi di progettare una seconda generazione di farmaci che risultano efficaci nella grande maggioranza dei casi di resistenza a Imatinib.

La biocristallografia a raggi X, dunque, dopo i primi risultati ottenuti negli anni '50, è oggi una delle tecniche prevalentemente utilizzate nella biologia strutturale moderna. Ad essa, oltre alla determinazione della conformazione di molte proteine, dobbiamo anche la scoperta dell'organizzazione strutturale del DNA che ha segnato una svolta decisiva nello studio della biologia molecolare.

Grazie allo sviluppo della tecnologia del DNA ricombinante, alla disponibilità della luce di sincrotrone ad alta brillantezza e ampio spettro di lunghezza d'onda, a rivelatori di raggi X sempre più sensibili e al progresso nell'elaborazione dei dati dovuto sia alla potenza di calcolo che alla grafica dei computer sia a nuovi approcci matematici, è stato possibile studiare molte strutture biologiche complesse, anche di notevoli dimensioni molecolari come, ad esempio, il capsido di alcuni virus o il ribosoma, e attualmente si cerca di determinare la struttura tridimensionale di interi genomi, si progettano nuovi farmaci e si cerca di capire quali siano le basi molecolari di alcune malattie.

Ovviamente la conoscenza sia pur dettagliata di una singola biomolecola non è sufficiente a comprendere un sistema biologico complesso e attualmente si stanno tentando diversi approcci, indicati col nome generico di "System biology", che utilizzano diverse tecniche innovative integrate da trattazioni matematiche nell'intento di trovare risposte che incrementino la comprensione dei sistemi biologici.