AUREL ARDELEAN

BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEDICAMENTULUI



„VASILE GOLDIȘ" UNIVERSITY PRESS, ARAD 2009

AUREL ARDELEAN

BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEDICAMENTULUI

„VASILE GOLDIŞ" UNIVERSITY PRESS
ARAD - 2009

REFERENT ŞTIINŢIFIC:
PROF. UNIV. DR. MIHAI CRUCE

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României
AUREL, ARDELEAN
Biologia moleculară a medicamentului/ Aurel Ardelean – Arad: „Vasile Goldiş University Press", 2009
Bibliogr.
ISBN 978-973-664-343-9
615

577.2
A73

MINISTERUL EDUCAŢIEI, CERCETĂRII ŞI INOVĂRII
UNIVERSITATEA DE VEST „VASILE GOLDIŞ" DIN ARAD

AUREL ARDELEAN

BIOLOGIA MOLECULARĂ A MEDICAMENTULUI

BIBLIOTECA JUDEŢEANĂ
NR. 668756
„A. D. XENOPOL" ARAD

15,00.

„VASILE GOLDIŞ" UNIVERSITY PRESS
ARAD - 2009

PREFAŢĂ

Biologia moleculară este implicată major în cercetările privind noile strategii terapeutice. Astfel, dacă se identifică gena/proteina care se află la originea unei maladii ereditare sau dobândite există posibilitatea descoperirii unor noi piste pentru „concepţia" unor medicamente destinate să reducă deficitele sau excesele de activitate a acestei gene/proteine. De exemplu, în cazul anomaliei unui anumit receptor (proteină a suprafeţei celulare destinată să transmită mesajul extern la structurile celulare interne) care determină o anumită maladie este posibilă concepţia şi dezvoltarea unor molecule, viitoare medicamente, capabile să acţioneze specific asupra receptorului sau să suplinească funcţia deficitară a acestuia printr-o altă cale. Cercetările efectuate asupra moleculelor terapeutice se bazează acum pe tehnici de modelare a moleculelor asistate pe calculator, pe sinteza unor analogi de sinteză a acestor molecule şi pe teste de selecţie de nivel înalt ale acestor numeroşi analogi. Ansamblul acestor tehnici va permite, în timp record, o selecţie a eficacităţii terapeutice a unei anumite ţinte dintre numeroasele molecule candidate.

În prima parte a cărţii pe baza studiului molecular, mai precis al semnalelor moleculare, sunt analizate diferite tehnologii de testare celulară. Şi, când amintim de aceste tehnici ne referim nu doar la simpla detectare a unui singur produs celular ci la urmărirea unei mari varietăţi de procese metabolice având drept scop final caracterizarea fenotipică multidimensională a comportamentului celular. Cel de al doilea capitol familiarizează cititorul cu modelele genelor knock-out, o tehnică care ne permite să creem şi să introducem un model de mecanism patologic într-un organism complex urmărind astfel să obţinem un instrument analitic cu relevanţă crescută în biologĭa moleculară a medicamentului. Următorul capitol prezintă detaliile unei tehnici de analiză moleculară axată pe aşa-numitele „gene reporter".

Descifrarea recentă a genomului uman a oferit un nou sprijin întregii arii de cercetare. Dintr-o dată un număr mare de ţinte moleculare puteau fi supuse analizei. Mai întâi trebuie să răspundem la întrebarea: ce realizează această moleculă ţintă la nivelul proceselor biochimice celulare şi cum este ea controlată? Acestei întrebări îşi propune să raspundă capitolul 4, care se ocupă de receptorii „orfani" cuplaţi cu proteina G (GPCR) şi încearcă implicit să

prezinte noi provocări şi oportunităţi în găsirea unor noi liganzi cu efecte biologice încă necunoscute.

Cea de-a doua parte a acestei cărţi este dedicată în întregime procesului de sinteză a medicamentelor. Două arii de interes major pot beneficia enorm în urma cercetării procesului de sinteză în cadrul biologiei moleculare şi utilizării în acest scop a tehnicilior corespunzătoare: elucidarea sintezei stereoselective a compuşilor naturali şi analogilor lor şi sintetizarea compuşilor farmacologici derivaţi din ADN sau proteine. Primul capitol al acestei părţi secunde oferă o privire de ansamblu, cuprinzătoare, despre utilizarea enzimelor în sinteza stereoselectivă, implicând utilizarea tehnicilor de recombinare genetică. Domeniul fascinant al produşilor farmacologici care interacţionează cu acizii nucleici, structura şi sinteza acestora, agoniştii lor şi mecanismele de acţiune fac obiectul capitolului 6.

Partea a treia prezintă metodele analitice implicate în determinarea interacţiuni medicament-ţintă. În acest sens se discută utilizarea proteinelor în cromatografia de afinitate şi enantioseparare a enantiomerilor (moleculă parte a unui compus alcătuit din două molecule din care una este imaginea în oglindă a celeilalte fără să fie identică cu ea). Utilizarea rezonanţei magnetice nucleare (NMR) şi a tehnicilor înrudite în studiul structurilor moleculare este un alt subiect din această parte a cărţii.

Elementele de cinetică, metabolism şi toxicologie implicate în domeniile farmacogenomicii şi toxicogenomicii constituie partea finală a acestei cărţi.

Acum ştim că o maladie este rezultatul combinat a sute de proteine şi în acest context este dificil să sperăm că vom găsi un principiu unic activ capabail să vindece boala. Într-adevăr, din 100 de medicamente care depăşesc stadiul de testare pe om, numai trei ajung pe piaţă. Celelalte se vor dovedi a fi toxice sau ineficiente. Probabil că toate ţintele „bune" asupra cărora un medicament poate să exercite un efect au fost deja găsite. Ceea ce presupune că pentru a produce noi medicamente trebuie să se revină la cele vechi, care vor fi altfel reutilizate. Ca şi natura, cercetătorii vor face cu ajutorul biologiei moleculare, noul din vechi.

Autorul

CUPRINS

PARTEA I: CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A INTERACŢIUNILOR MEDICAMENT-ŢINTĂ.....15
1. TESTELE CELULARE: UTILIZAREA ŞI IMPACTUL LOR ÎN DESCOPERIREA MEDICAMENTELOR.....15
1.1. Introducere.....15
1.2. Proteinele membranare şi răspunsurile celulare rapide.....20
1.3. Evaluarea expresiei genelor şi proteinelor în cadrul unor sisteme de analiză de mare capacitate.....30
1.4. Reacţiile celulare spaţio-temporale şi analizele subpopulaţiilor.....38
1.5. Analizele fenotipice 47

2. IMPLICAREA GENELOR KNOCKOUT ÎN ÎNŢELEGEREA MECANISMELOR BOLII ŞI DEZVOLTAREA UNOR NOI STRATEGII TERAPEUTICE 55
2.1. Introducere 55
2.2. Gene knockout la şoareci 55
2.3. Expresia genelor ţesut specifice.....67
2.4. Şoareci transgenici 75
2.5. Lezarea genelor ţintă la Drosophila 77
2.6. Inactivarea genelor ţintă la peştele zebră 78
2.7 . Deleţia tulpinilor ţintă de Caenorhabditis elegans 80

3. SISTEME DE TESTE BAZATE PE GENE REPORTER CARE INVESTIGHEZĂ RECEPTORII CUPLAŢI CU PROTEINA G IMPLICAŢI ÎN DESCOPERIREA DE NOI MEDICAMENTE.....82
3.1. Receptorii şi comunicarea celulară 82
3.2. Afinitatea şi activitatea liganzilor GPCR.....86
3.3. Rolul factorilor de transcripţie în expresia genelor.....88
3.4. Genele reporter.....90
3.5. Sisteme de teste bazate pe gene reporter pentru investigarea GPCRs.....96

4. DE LA GENOMUL UMAN LA NOILE MEDICAMENTE: POTENŢIALUL RECEPTORILOR ORFANI CUPLAŢI CU PROTEINELE G..... 103
4.1.Introducere.....103
4.2. GPCRs şi genomul uman 105
4.3. Investigarea liganzilor.....109
4.4. Screeningul pentru liganzi oGPCR folosind teste funcţionale.....115
4.5. Perspective.....126

PARTEA A II-A: SINTEZA MEDICAMENTELOR PE BAZA ENZIMELOR ŞI ACIZILOR NUCLEICI..... 129
5.SINTEZA STEREOSELECTIVĂ A MEDICAMENTELOR CU AJUTORUL ENZIMELOR RECOMBINANTE.....129
5.1. Sinteza stereoselectivă înainte de apariţia ingineriei genetice.....129
5.2. Metode clasice de îmbunătăţire a tulpinilor pentru sinteza stereoselectivă 133
5.3. Ingineria genetică şi apariţia enzimelor recombinante pentru sinteza stereoselectivă.....134
5.4. Antibioticele β-lactamice 137
5.5. Antibioticele poliketide.....143
5.6. Vitaminele.....146
5.7.Steroizii.....153
5.8. Alte medicamente 153
5.9. Concluzii 157

6. MEDICAMENTE PE BAZĂ DE ACIZI NUCLEICI.....158
6.1. Introducere 158
6.2. Sinteza chimică a oligonucleotidelor 159
6.3. Modificări chimice ale oligonucleotidelor.....161
6.4. Mecanismul de acţiune.....171
6.5. Identificarea poziţionării situsurilor accesibile ribozimelor la nivelul ARN ţintă.....182
6.6. Distribuirea exogenă a ribozimelor.....183
6.7. Aplicaţiile oligonucleotidelor în inhibarea expresiei genelor 185
6.8. Concluzii 186

PARTEA III: METODE ANALITICE IMPLICATE ÎN PRODUCEREA ŞI UTILIZAREA MEDICAMENTELOR.....187
7. TENDINŢE RECENTE ÎN ENANTIOSEPARAREA MEDICAMENTELOR CHIRALE.....187
7.1. Introducere 187
7.2. Situaţia actuală a dezvoltării şi utilizării medicamentelor chirale.....190

7.3. Rolul tehnologiilor de separare în producerea, cercetarea şi utilizarea medicamentelor chirale....192
7.4. Prepararea medicamentelor enantiomeric pure....193
7.5. Bioanaliza medicamentelor chirale....204
7.6. Perspective....215

8. CROMATOGRAFIA DE AFINITATE: APLICAŢII ÎN BIOFARMACEUTICĂ....216
8.1. Introducere....216
8.2. Principiile cromatografiei de afinitate....217
8.3. Ligandul....220
8.4. Matricea de afinitate....224
8.5. Principii de operare....228
8.6. Modele de cromatografie de afinitate....230
8.7. Aplicaţiile interacţiunilor de afinitate....237

9. IDENTIFICAREA MEDICAMENTELOR PE BAZA REZONANŢEI MAGNETICE NUCLEARE....249
9.1. Introducere....249
9.2. Relaţia structură-activitate (SAR) prin RMN....250
9.3. Monitorizarea moleculelor mici....261
9.4. Concluzii....274

10. MARCAREA PROTEINELOR CU IZOTOPII C^{13} ŞI N^{15} PENTRU ANALIZA STRUCTURII ŞI DINAMICII MACROMOLECULELOR BIOLOGICE....275
10.1. Introducere....275
10.2. Sisteme de expresie ale încorporării *in vivo* a izotopilor C^{13} şi N^{15} în proteine....276
10.3. Marcarea izotopică acelulară....289

11. UTILIZAREA FRAGMENTELOR DE ANTICORPI CA MEDIATORI AI CRISTALIZĂRII PROTEINELOR MEMBRANARE ÎN VEDEREA DESCOPERII DE NOI MEDICAMENTE....303
11.1. Introducere....303
11.2. Cristalizarea proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorp....307
11.3. Concluzii....322

PARTEA IV: ELEMENTE DE CINETICĂ, METABOLISM ŞI TOXICOLOGIE ALE MEDICAMENTELOR.....323
12. FARMACOGENETICA: EFECTUL VARIANTELOR GENETICE ÎN DISPONIBILITATEA ŞI RĂSPUNSUL MEDICAMENTELOR.....323
12.1. Consideraţii generale.....323
12.2. Relaţii între genotip şi fenotip.....324
12.3. Stabilirea relaţiilor între genotip şi fenotip 325
12.4. Fenotiparea versus genotipare şi predicţia răspunsului individual la medicamente 328
12.5. Polimorfismul genetic al enzimelor de metabolizare a medicamentelor (DMEs) 329
12.6. Polimorfismul CYP2D6.....335
12.7. Polimorfsmul genetic al transportorilor de medicamente 337
12.8. Gena de rezistenţă multiplă la medicamente (MDR) – marker versus polimorfismul funcţional 338
12.9. Polimorfismul genetic al ţintelor medicamentelor.....339
12.10. Concluzii 343

13. FARMACOGENOMICA BIODISPONIBILITĂŢII ŞI ELIMINĂRII MEDICAMENTELOR.....345
13.1. Introducere 345
13.2 Contribuţia metabolismului la clearance-ul medicamentelor 346
13.3. Transportorii medicamentelor: Glicoproteina P (P-gp) 354
13.4. Concluzii 357

14. TOXICOGENOMICA: INTEGRAREA NOILOR METODE PROPRII BIOLOGIEI MOLECULARE ÎN TOXICOLOGIE.....358
14.1. Dezvoltarea toxicologiei.....358
14.2. Genomica funcţională: noi tehnologii ale biologiei moleculare.....360
14.3. Integrarea tehnologiilor genomice funcţionale în toxicologie 370
14.4. Aplicaţiile toxicogenomicii în studiul mecanismului hepatotoxicităţii indusă de bromobenzen.....374
14.5. Concluzii 375

15. IMPORTANŢA POLIMORFISMULUI GENETIC ŞI A INTERACŢIUNILOR MEDICAMENTOASE ÎN TRATAMENTUL DURERII.....376
15.1. Introducere.....376
15.2. Polimorfismul genetic:efectele asupra diferitelor analgezice 379
15.3. P-gp:un alt exemplu al variabilităţii genetice.....390
15.4. Fenotipaj şi genotipaj: perspective.....392
15.5. Concluzii 394
BIBLIOGRAFIE.....395

ARGUMENT

Progresul uriaş înregistrat de biologia moleculară de-a lungul ultimelor decenii a condus la dezvoltarea a numeroase metode de cercetare inovatoare cu impact implicit asupra descoperirii şi dezvoltării de noi agenţi farmacologici.

Tehnicile moderne de identificare şi validare a unor molecule ţinte pe de o parte şi descoperirea şi ulterior descrierea de noi medicamente şi mecanisme de acţiune pe de cealaltă parte necesită un spectru extrem de larg de metode şi tehnici care depăşeşte cu mult repertoriul metodologiilor clasice. Descrierea moleculară detaliată a interacţiunii medicament-moleculă ţintă este la fel de importantă şi solicitantă ca şi cunoaşterea interacţiunii medicament-întregul sistem fiziologic. Acum ne sunt la îndemână conceptele şi informaţiile despre transportul medicamentelor, metabolismul şi stabilitatea acestora. De asemenea, putem să prezicem şi să determinăm modalitatea de reacţie a întregului sistem la administrarea unui medicament, chiar dacă se ştie că acest medicament ar acţiona doar la nivelul unei ţinte specifice. Metodele şi conceptele moderne care fac obiectul farmacogenomicii şi toxicogenomicii au demonstrat clar acest principiu.

Lucrarea are patru părţi: (1) *Caracterizarea moleculară a interacţiunii medicament-ţintă* (2) *Sinteza medicamentelor pe baza enzimelor şi acizilor nucleici*, (3) *Metode analitice implicate implicate în producerea şi utilizarea medicamentelor* şi în final, (4) *Cinetică, metabolism, toxicologie şi dezvoltarea agenţilor farmacologici.*

Cel dintâi capitol al primei părţi prezintă contextul biologic oferind o descriere la zi a testelor celulare care ne sunt la îndemână, aplicabilitatea şi impactul lor asupra descoperirii agenţilor farmacologici. Se analizează testele implicate în studiul proteinelor membranare, a răspunsurilor celulare rapide, testările pentru cercetarea expresiei proteice şi genice celulare, analiza spaţio-temporală şi a subpopulaţiilor celulare şi nu în ultimul rând determinarea fenotipului. În capitolul doi al primei părţi, se descriu elemente referitoare la şoareci „knock-out" (şoareci transgenici obţinuţi prin recombinare omologă, cu modificări genetice care pot conduce la eliminarea funcţiei unei gene) şi la tehnicile necesare generării unor asemenea animale.

Receptorii cuplaţi cu proteina G fac obiectul capitolelor trei şi patru. În primul dintre ele accentul este pus pe caracterizarea receptorilor cuplaţi cu proteina G şi aplicabilitatea genelor „reporter" ca sisteme de transcriere, în timp

ce capitolul următor făcând referire la etapa postgenomică oferă strategii de identificare a liganzilor pentru receptorii „orfani" cuplaţi cu proteina G.

Partea a-II[a] a cărţii se ocupă de diferite aspecte ale sintezei medicamentelor. Se oferă o combinaţie clasică între elemente de sinteză organică şi biotehnologie realizând tabloul sintezei stereoselective a medicamentelor cu ajutorul enzimelor recombinante. Prima parte a acestui capitol ne prezintă o imagine de ansamblu asupra acestor elemente şi oferă numeroase exemple evaluând rezultatele unor asemenea strategii.

În perspectivă vor fi utilizaţi agenţi farmacologici care interacţionează cu acizii nucleici. Atractivitatea lor ca şi liganzi cu specificitate mare a intrat mereu în conflict cu numeroase probleme de farmacocinetică. Cu toate acestea, numeroase concepte cu privire la stabilizarea acestor molecule, potenţialul fascinant de a interacţiona cu ARN-ul (RNAi) au făcut ca primele medicamente aprobate să fie extrem de similare acestor molecule, spre exemplu manipulatorii semnalizării celulare. Capitolul 6 discută mai multe aspecte, incluzând sinteza şi aplicabilitatea unor asemenea tipuri de compuşi, incluzând tehnica interacţiunii cu ARN (RNAi).

Partea a-III[a] se ocupă de aspecte analitice. Separarea enantiomerilor (enantioseparareа) medicamentelor chirale şi cromatografia de afinitate sunt instrumente importante ale dezvoltării medicamentelor şi elementele lămuritoare asupra acestor aspecte sunt prezentate în capitolele 7 şi 8.

Metode analitice bazate pe tehnici de biologie moleculară sunt incluse într-o serie de trei capitole. Două dintre acestea se axează pe descrierea tehnicilor RMN care au cunoscut o dezvoltare deosebită în ultimele decenii. Această dezvoltare a condus ulterior la definirea tehnicii RMN ca un instrument de bază în determinarea atât a structurilor macromoleculare dar şi a detectării şi caracterizării interacţiunilor dintre ligand şi molecula ţintă. Capitolele 9 şi 10 analizează aplicabilitatea tehnicii RMN în descoperirea agenţilor farmacologici şi descrie tehnici de marcare a proteinelor cu izotopi radioactivi de C^{13} şi N^{15}.

Realizarea unor modele de structuri medicamentoase realiste are la bază cunoştinţe exacte obţinute prin cristalografie cu raze X. În ciuda, îmbunătăţirilor evidente pe care le-a suferit metodologia în acest domeniu de cercetare, structurile receptorilor membranari, care reprezintă de fapt ţintele cele mai importante ale medicamentelor, sunt încă neelucidate. Un pas uriaş către rezolvarea acestei enigme l-ar putea constitui utilizarea fragmentelor de anticorpi drept elemente de potenţare ale cristalizării. Detalii despre această nouă şi captivantă tehnică sunt oferite cititorului în capitolul final al părţii a-III[a].

Farmacogenomica şi toxicogenomica sunt domenii noi cu un considerabil impact asupra viitoarei dezvoltări a agenţilor farmacologici. Ultima parte a cărţii se ocupă de aceste subiecte noi, care vor reuşi probabil cu timpul să genereze schimbări, renunţându-se la concepţiile iniţiale „aceeaşi doză este recomandată pentru toţi pacienţii care au aceeaşi boală". Direcţiile moderne se

vor baza pe ideea „*medicamentul adecvat, doza adecvată, persoana adecvată*".

Pe de o parte, medicamentele vor acţiona de manieră mai ţintită şi vor antrena mai puţine efecte nedorite, iar eficacitatea lor va creşte. Pe de altă parte, medicii vor fi în măsură să decidă plecând de la profilul genetic al pacientului, dacă un tratament are şanse să reuşească şi dacă nu să opteze pentru un alt tratament. Riscurile personale „ascunse" în genele unui anumit pacient vor putea fi identificate de către medic şi ţinând cont de specificitatea şi individualitatea lor se va alege strategia pentru prevenţie şi tratament.Totalitatea medicamentelor cunoscute sunt dirijate asupra 400 de biomolecule diferite ale organismului nostru, molecule cunoscute sub numele de ţinte terapeutice (drug targets) dintre care menţionăm: enzime, receptori şi alte biomolecule care sunt inhibate sau asupra cărora acţionează într-o manieră sau alta. Datorită decriptajului genomului uman se vor descoperi între 3000-10000 de biomolecule noi care vor fi utilzate ca situsuri de atac molecular.

Terapia genică este o cale nouă de cercetare, care suscită un foarte mare interes. Ea îşi propune să vindece sau să atenueze efectul unei maladii „reparând" o genă defectă sau activând sute de gene utile. Strategia introduce în celulele umane (cu excepţia celulelor sexuale sau gameţi) o genă „corectoare" sau „terapeutică" destinată să reducă defectele genei afectate, în cazul maladiilor genetice, sau să acţioneze într-un alt mod, de exemplu să ajute sistemul imunitar să elimine cancerul. În aceste cazuri se acţionează asupra genomului pentru ca organismul să producă o proteină de interes terapeutic, ceea ce presupune implicarea „*ADNului ca medicament*". Deşi sunt puţine maladii care pot fi tratate pe baza terapiei genice această strategie ne dă numeroase speranţe, chiar dacă ea nu poate fi utilizată curent având în vedere dificultăţile pe care trebuie să le depăşească.

PARTEA I

CARACTERIZAREA MOLECULARĂ A INTERACȚIUNILOR MEDICAMENT-ȚINTĂ

CAPITOLUL 1
TESTELE CELULARE: UTILIZAREA ȘI IMPACTUL LOR ÎN DESCOPERIREA MEDICAMENTELOR

1.1. Introducere

1.1.1.Testele/experimentele celulare

Experimentele bazate pe studiul celulelor permit studierea funcţiilor preparatelor farmaceutice sau a ţintelor bolilor în cadrul unui mediu complex şi al contextului biologic de ansamblu. Aplicarea noilor tehnologii în biologia moleculară, împreună cu introducerea noilor metode de analiză a mutat cadrul experimentelor celulare de la nivelul fenotipic cum ar fi, proliferarea celulară, moartea celulară, respiraţia şi diferenţierea funcţională, către analizele celulare ale funcţiilor moleculelor semnal - specifice şi ale componentelor metabolice.

În momentul de faţă, experimentele celulare presupun măsurători mecanice, asociate ţintelor specifice, care permit identificarea componenţilor chimici cu funcţie specifică ţintei sau funcţie modulatoare asociată. Se poate aşadar afirma că analizele celulare vor juca un rol din ce în ce mai important în descoperirea medicamentelor, în special a componentelor pentru validarea şi optimizarea ţintei, precum şi în selecţia modulatorilor cu molecule mici şi în opimizarea modulării. În contrast cu testele biochimice ale substanţelor chimice pentru modularea activităţii ţintelor moleculare, sistemele celulare pot oferi informaţii adiţionale cu privire la transportul, metabolismul şi stabilitatea medicamentelor. Cel mai important aspect este acela că ţintele farmacologice rămân în mediul lor natural atunci când este analizată modularea, astfel ca datele să aibă o valoare predictivă înaltă (Fig 1.1).

Cu toate acestea, mai trebuie spus că, pentru a utiliza experimentele celulare, celulele trebuie scoase din mediul lor natural şi crescute în culturi. Acest lucru va conduce inevitabil la alterări ale repertoriului genelor şi ale expresiei proteice şi deci ale fenotipului. Celulele utilizate în astfel de

experimente trebuie deci să fie caracterizate din punctul de vedere al funcţiilor reţelelor intracelulare, răspunsului la stimuli externi - cel puţin pentru calea de semnalizare de interes - şi comparate cu răspunsul şi evenimentele ce au loc la nivelul ţesutului sau organului. În multe cazuri, acest lucru nu este încă pe deplin realizabil.

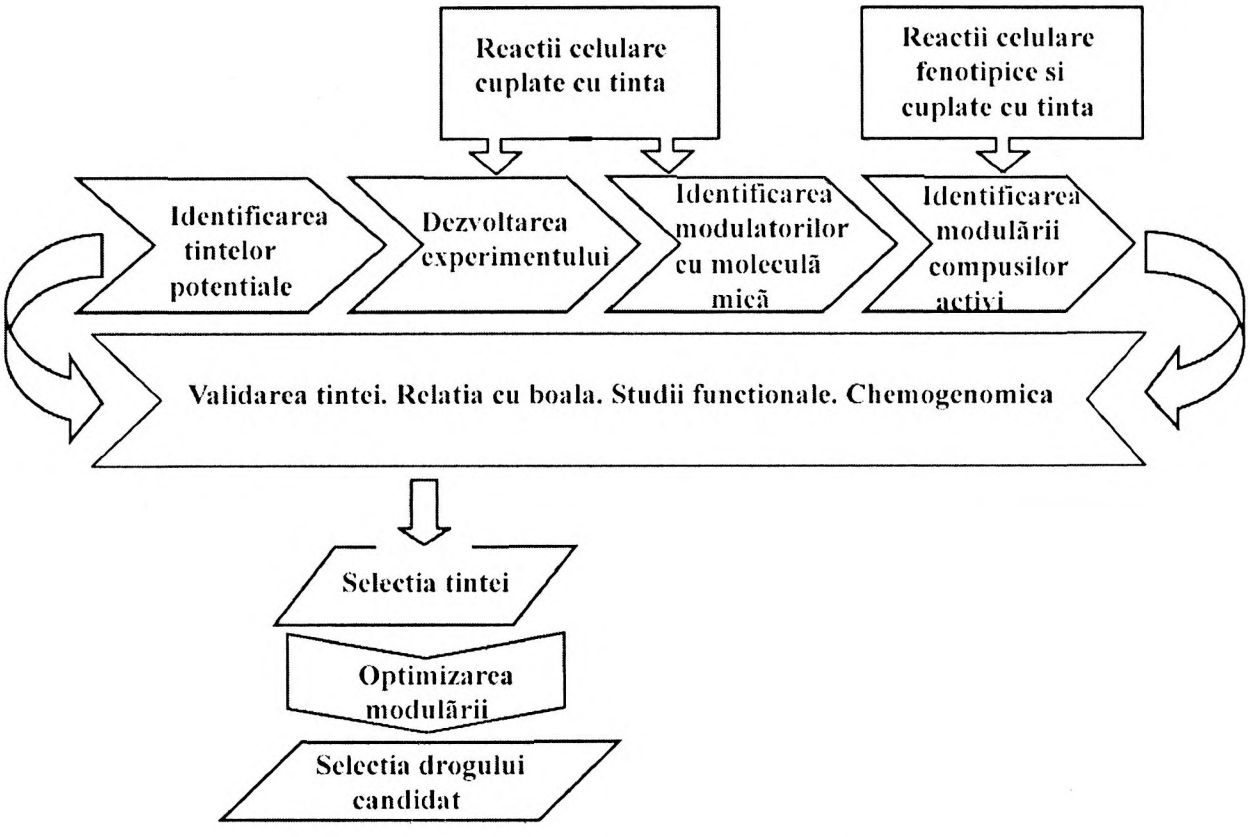


Fig. 1.1 Selecţia ţintelor farmaceutice. Numărul mare al ţintelor farmaceutice potenţiale necesită un proces eficient de selectare a acelor ţinte pentru modularea căilor şi fenotipurilor relevante pentru anumite afecţiuni. Experimentele celulare, care sunt strâns legate cu ţintele de interes, permit calificarea modulatorilor cu moleculă mică identificaţi în experimentele celulare sau biochimice de înaltă capacitate, în conformitate cu funcţionalitatea într-un mediu fiziologic relevant. Experimentele celulare care nu sunt strâns legate cu ţinta vor indica efectele sistemice ale componenţilor şi pot fi interpretate ca şi clasificare celulară „de siguranţă". Testele celulare pot fi utilizate pentru prioritizarea ţintelor şi a componenţilor.

1.1.2. Impactul asupra descoperii medicamentelor

În timpul descoperii şi dezvoltării medicamentelor, multe elemente sunt pierdute datorită efectelor nedorite sau toxicităţii şi lipsei eficacităţii dorite. O mare parte din aceste efecte pot fi determinate de interacţiunile potenţialelor medicamente cu alte ţinte decât cele considerate iniţial ca modulatoare ale unei afecţiuni. Sistemele de teste celulare au potenţialul de a elucida multitudinea interacţiunilor medicamentoase şi deci de a contribui la o mai bună înţelegere a acţiunii şi selectării medicamentelor.

Celula, prin structura şi funcţiile sale, este organizată în cascade metabolice şi de transducţie a semnalului. Majoritatea acestor cascade sunt complexe şi non-lineare [Stephaopoulos, Kelleher, 2001]. În plus, diferitele cascade comunică unele cu altele, formând circuite şi domenii intracelulare. Majoritatea bolilor nu pot fi explicate prin afectarea unei singure etape a unei căi, de semnalizare, ci prin multiple alterări care afectează reţelele într-o manieră complexă [Hanahan, Weinberg 2000, Somogyi, Greller 2001]. Similar, medicamentele, fie că interacţionează specific cu o singură ţintă sau cu mai multe molecule, vor perturba cascadele metabolice şi de semnalizare, într-un mod complex. În plus, din moment ce multe tipuri de celule utilizează aceleaşi molecule pentru semnalizare în contexte diferite, multe tipuri celulare pot fi afectate în grade diferite de acelaşi medicament. Introducerea recentă a evaluării expresiei genice şi proteice pe baza unor sisteme de analiză de mare capacitate, ca şi a analizelor metaboliţilor [Glassbrook şi colab. 2000, Raamsdonk şi colab. 2000] permit o mai bună înţelegere a gradului şi localizării interferenţelor. Experimentele celulare oferă astfel o soluţie pentru studierea modulării unei ţinte farmacologice în reţeaua sa naturală complexă precum şi a potenţialelor efecte asupra altor reţele.

Bolile umane sunt caracterizate prin una sau mai multe alterări ale căilor metabolice şi de semnalizare implicate major în menţinerea homeostaziei celulare şi diferenţierea funcţională. Testele celulare pot oferi o reprezentare a acestor alterări şi devin astfel modele funcţionale relevante pentru evaluarea acţiunii medicamentelor.

În zilele noastre, experimentele celulare oferă oportunitatea de a identifica punctele de interferenţă care conduc la alterări fenotipice sau modificări finale. Frecvent, multiple nivele de intervenţie sunt necesare pentru a altera efectele unor reţele biologice. Reguli similare se pot aplica pentru numărul de ţinte terapeutice care trebuie modulate, în special pentru maladii complexe. Ţintele potrivite şi combinaţiile medicamentoase pot fi selectate numai în cazul în care fiecare component individual al unei căi particulare poate fi studiat individual, acest lucru fiind posibil prin utilizarea sistemelor celulare.

Combinaţia componentelor care duc la efectul dorit poate fi identificată prin analiza mai multor parametri. Mai mult, aceste analize pot facilita aprecierea efectului componentelor individuale asupra mai multor căi. Aceasta permite o estimare a efectelor nedorite (profilul de siguranţă), dar poate conduce de asemenea la identificarea unor aplicaţii în noile condiţii. În acest fel testele realizează o selecţie rapidă a componentelor chimice cu variate profile. Ierarhic, citirea spaţio-temporală va genera o bună cunoaştere a mecanismelor de acţiune a medicamentelor şi va permite prezicerea efectelor sistemice (Fig 1.2).

Dezvoltarea şi aplicarea mijloacelor computerizate şi a modelelor căilor intracelulare sunt o condiţie obligatorie pentru siguranţa evaluării şi a interpretării [Gifford, 2002, Karp, 2001]. Înţelegerea nivelelor sistemelor este posibilă numai prin urmărirea rezultatelor experimentale la nivel celular sau sub-celular.

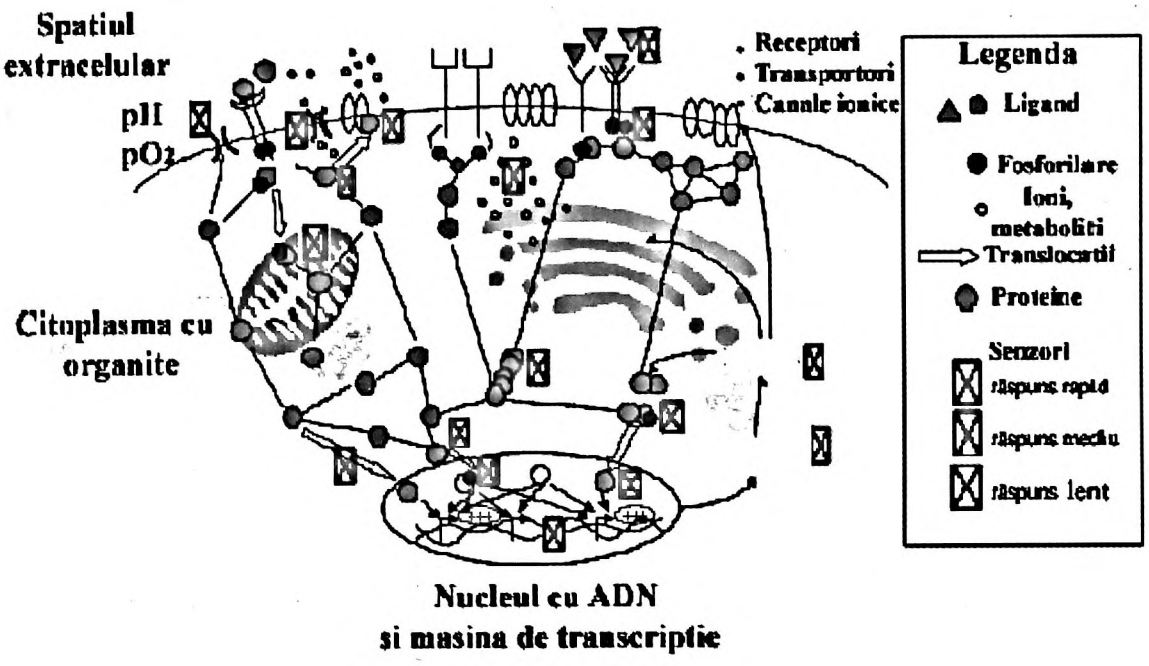


Fig. 1.2. Circuitul celular schematic şi conceptul analizei sistemelor celulare. Celulele se conectează cu mediul înconjurator printr-o varietate de receptori, canale şi transportori. Semnalizarea intracelulară, căile şi reţelele metabolice reacţionează la stimulii intra- şi extracelulari într-o manieră dependentă spaţio-temporal. Diferitele tipuri de celule reacţionează diferit la acelaşi stimul. Diferite tipuri de celule ale ţesuturilor normale şi patologice sau celule manipulate genetic pot fi expuse la stimuli diferiţi în prezenţa şi în absenţa medicamentelor şi reacţiile celulare pot fi evaluate. Analizele multiparametrice identifică compuşii cu efecte asupra homeostaziei celulei care pot fi specifice ţintei, nelegate de ţintă, reversibile sau ireversibile.

1.1.3. Clasificarea testelor celulare

Testele celulare au avantajul că nu necesită purificarea ţintelor farmacologice. Totuşi, în multe cazuri, testele celulare necesită manipularea celulară pentru a permite citirea specifică a semnalului. Supraexprimarea receptorilor de suprafaţă celulară sau a proteinelor intracelulare pot avea efecte substanţiale asupra fiziologiei celulei şi trebuie luate în considerare atunci când se utilizează aceste teste pentru descoperirea noilor medicamente.

Reacţiile precoce ale hormonilor, factorilor de creştere şi neurotransmiţătorilor sunt deseori mediate prin intermediul mesagerilor secunzi sau influxului şi efluxului rapid de ioni. Modificările proteinelor posttranslaţionale şi translocaţia proteinelor sunt următoarele etape care alterează statusul fiziologic al unei celule. Asemenea modificări sunt capabile să conducă la modificări rapide ale căilor metabolice, precum şi la alterări ale activităţii genelor şi expresiei proteice, ducând în final la noi fenotipuri celulare, ce includ proliferarea şi moartea celulară.

Testele celulare pot fi clasificate în funcţie de evenimentele temporale care apar atunci când o celulă este expusă la alterări ale mediului extra- şi

intracellular (Tabelul 1.1). Răspunsurile rapide indicatoare de modificări ale concentraţiilor ionilor sau mesagerilor secunzi conduc în final la modificari funcţionale şi fenotipice.

Unele dintre evenimentele celulare pot fi refăcute în aşa numitele sisteme model, care pot fi mai uşor de manevrat şi manipulat genetic faţă de celulele mamiferelor. Drojdiile s-au dovedit a fi organismele cel mai frecvent utizate în aceste sisteme, deoarece semnalele metabolice şi interacţiunile proteină-proteină sunt relevante pentru transducţia semnalului, putând fi traduse într-un răspuns al creşterii uşor măsurabil [White, 1996, Ito şi colab., 2001]. Câteva modificări ale dublului sistem hibrid al drojdiilor s-au dovedit utile în identificarea compuşilor care interferă funcţional cu mecanismele intracelulare specifice. Tucker şi Fields (2001) au descries un sistem senzor pentru descoperirea medicamentelor bazat pe activarea conformaţională, după legarea medicamentului, sau a unei enzime implicate major în proliferare. Cu toate acestea, comparativ cu celulele mamiferelor, drojdiile prezintă unele diferenţe care includ prezenţa peretelui celular, lipsa genelor pentru complementul total al mamiferelor şi alterări ale sistemelor metabolice.

Mesageri secunzi şi canale	nivelele Ca^{2+} canale ionice transportori nucleotide ciclice
Dinamica proteinelor	modificari posttranslaţionale (fosforilarea) translocaţiile proteice
Expresia genică	tehnologiile pe chip-uri tehnologia ADN ramificat senzori oligonucleotidici
Expresia proteică	tehnologia genelor reporter reacţia ELISA array-uri ale proteinelor pe chip-uri
Profilul metaboliţilor	profilul analitic cantitativ
Răspunsurile metabolice şi fenotipice	proliferarea celulară, citotoxicitatea, moartea celulară/ apoptoza, acidifierea diferenţierea celulară

Tabelul 1.1 Clasificarea tipurilor de reacţii celulare funcţionale

1.1.4. Progrese ale mijloacelor și tehnologiilor pentru profilul componentelor celulare

Perfecţionarea sistemelor analitice [Straub şi colab., 2001] şi a sistemelor de citire permite cercetătorilor să obţină aspecte clare ale alterărilor expresiilor genice şi proteice [Celis şi colab., 2000], precum şi a metaboliţilor [Glassbrook şi colab., 2000, Nicholson şi colab., 2002]. În afara situaţiei în care este necesară o analiză pe scară largă, tehnologiile curente permit obţinerea unor rezultate convenabile pentru profilul medicamentelor. Pentru studiile expresiei genice, experimentele care utilizează sonde fluorescente pot substitui sistemele, bazate pe cipuri cel puţin pentru unele cazuri bine selecţionate [Broach, Thorner, 1996; Goetz şi colab, 2000].

Actual sunt disponibile câteva sisteme de imagistică celulară sau microscopie de mare capacitate şi scanare laser, precum şi dezvoltarea unor noi markeri fluorescenţi şi anticorpi specifici. Aceste combinaţii permit studiul traficului proteinelor în celule. Studiile dinamicii şi interacţiunii proteinelor a fost facilitat de identificarea proteinelor florescente [Raamdonk şi colab., 2000, Remington, 2002; Schaufele, 2001] şi a altor coloranţi fluorescenţi [Mitchell, 2001], împreună cu aplicaţiile fluorescenţei cu transfer de energie prin rezonanţă (fluorescence resonance energy transfer - FRET). Alte tehnologii, precum spectroscopia cuplată multipolară (multipole coupling spectroscopy - MCS) [Hefti, Kumar, 1999] şi biochip-urile pentru monitorizarea celulară multiparametrică [Baumann, 1999] sunt pe cale de a fi utilizabile.

Sistemul FLIPR^{TM} (Cititorul de plăci fluorometrice; Molecular Devices, Sunnyvale, CA) utilizat pentru studiul răspunsurilor rapide ale mesagerilor secundari, precum eliberarea Ca^{2+}, a fost recent îmbunătăţit pentru a permite analiza canalelor ionice. Aplicaţiile FLIPR sunt discutate în detaliu mai jos. În secţiunile următoare, vom descrie în detaliu un set selectat de aplicaţii.

Discuţiile sunt grupate, pe baza tabelului 1.1, în răspunsuri rapide sau sistemele mesagerilor secundari, alterări ale expresiei genice sau proteice, alterări metabolice, precum şi efectele asupra fenotipului [Dingerman şi colab., 2004].

1.2. Proteinele membranare și răspunsurile celulare rapide

O varietate de proteine membranare au fost exprimate în diferite celule eucariote (linii celulare ale mamiferelor, celule ale insectelor, drojdii) cu ajutorul tehnologiei ADN recombinant, pentru a studia receptorii de suprafaţă celulară, canalele ionice sau proteinele de transport.

1.2.1 Receptorii

Receptorii de suprafaţă celulară mediază semnalizarea celulară de la suprafaţa celulară la citoplasmă şi/sau nucleu prin intermediul a două procese majore, semnalizarea prin intermediul receptorilor legaţi la enzime sau a proteinelor de legare a GTP (proteinele G). Receptorii legaţi la enzime includ receptorii guanilat ciclazici, receptorii tirozin-kinazici, receptorii asociaţi tirozin kinazei, receptorii tirozin fosfatazici şi receptorii serin/treonin kinazici [Schlessinger, 1993]. În toate cazurile, în urma activării este iniţiată o cascadă de evenimente care afectează statusul receptorilor şi concentraţia uneia sau mai multor molecule mici de semnalizare intracelulare. În cele ce urmează, vom discuta monitorizarea semnalelor mediate de proteinele G, care sunt activate de receptorii cuplaţi cu proteina G în urma legării unui ligand specific. Consecutiv stimularii au loc modificari ale AMPc intracellular sau concentraţiei Ca^{2+}. Aceste două molecule semnal specifice sunt implicate în procesele reglatoare ale sistemelor cardiovascular şi nervos, mecanismelor imune, diferenţierii şi creşterii celulare şi metabolismului. Ambii mesageri acţionează ca efectori alosterici pe proteine ţintă specifice ale celulei, incluzând kinazele (protein kinaza A şi C), lipazele (fosfolipaza Cβ), proteinele de legare a Ca^{2+} (calmodulina) şi canale ionice (receptori glutamat ionotropici). Concentraţiile citoplasmatice ale mesagerilor secundari sunt reglate prin intermediul enzimelor membranei plasmatice - în cazul căii AMPc enzima adenilat ciclaza produce direct AMPc, iar în cazul căii Ca^{2+} lipazele sunt stimulate să producă mesagerul solubil inozitol trifosfatul (IP3) care induce eliberarea Ca^{2+} din reticulul endoplasmic. În unele cazuri canalele ionice sunt activate prin interacţiunea directă cu subunităţile proteinei G [Cruce M, 2000].

În prezent au fost realizate diferite tehnologii pentru monitorizarea intracelulară a mesagerilor secundari în celule. Detectarea Ca^{2+} este în general bazată pe indicatorii fluorescenţi, care au proprietatea de a penetra cu uşurinţă membranele celulare şi a-şi altera emisia fluorescentă în urma legării Ca^{2+}. Pentru măsurătorile unui răspuns rapid şi tranzitor, reacţia de legare a Ca^{2+} trebuie să fie reversibilă, oferind date cinetice importante care permit diferenţierea unui semnal tranzitor tipic datorat activării specifice a receptorului de un semnal nespecific care afectează homeostazia Ca^{2+} şi permeabilitatea membranară.

În mod curent se utilizează numeroase sisteme, diferite, pentru a detecta AMPc în testele celulare. În cele mai multe cazuri celulele sunt lizate în urma expunerii la un ligand specific, iar cantitatea de AMPc este determinată printr-o imunoreacţie competitivă (Perkinelmer Life Sciences, Boston, Ma; Molecular Devices; Biomol Research Laboratories, Plymouth Meeting, Ca) sau printr-o reacţie enzimatică competitivă de complementare (Discoverx, Fremont, Ca).

Tipic, receptorii cuplaţi cu proteina G sunt supraexprimaţi în liniile celulelor eucariote pentru a monitoriza concentraţia mesagerilor secundari în urma stimulării cu un ligand specific [Sullivan şi colab., 1999]. În multe cazuri,

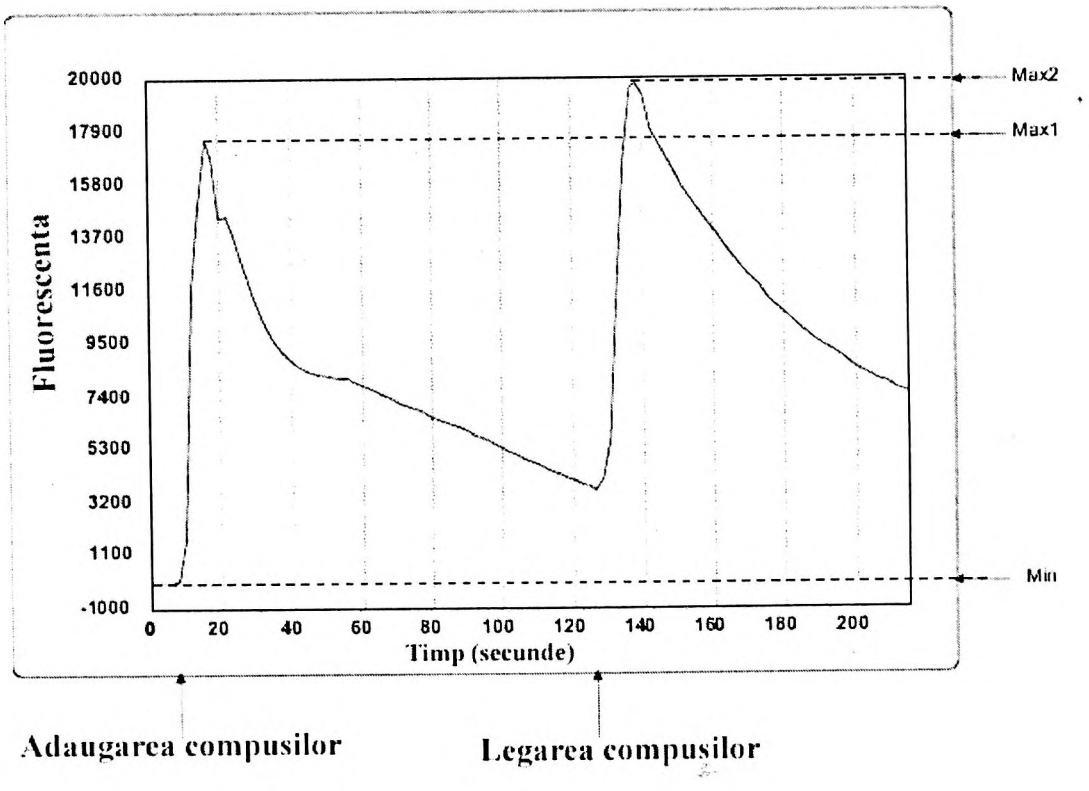
co-exprimarea unei subunităţi corespunzătoare sau a proteinelor G himerice este necesară pentru a obţine un semnal suficient pentru detecţie [Milligan, Rees, 1999].

1.2.1.1 Tehnologia FLIPR pentru detecţia eliberării Ca^{2+} intracelular

Sistemul FLIPR permite „citiri" repetate pentru sistemele de analiză de mare capacitate în reacţiile celulare. Pe scurt, celulele sunt încărcate cu un indicator fluorescent (ex. Fluo-4 AM pentru Ca^{2+}) care arată un spectru de absorbţie compatibil cu o excitaţie la 488 nm de la o sursă laser argon mergând până la o emisie maximă la 516 nm în prezenţa Ca^{2+}. Emisia fluorescentă este indusă simultan în toate situsurile unei plăci cu 96 sau 384 de situsuri, iar cinetica eliberării Ca^{2+} intracelular, declanşată de expunerea la un ligand specific, poate fi monitorizată la o rată de maxim 60 de ori pe minut. Sistemul FLIPR distinge rapid agoniştii compleţi, agoniştii parţiali şi antagoniştii pentru a accelera screening-ul primar şi secundar.

Figura 1.3 (a) ilustrează un experiment tipic efectuat pe o linie de celulară de mamifer transfectată cu un vector ce conţine gena GPCR. Componentele positive reprezentate în figura 1.3(b) au fost verificate prin măsurători în duplicat, iar modulatorii cu moleculă mică au fost ulterior testaţi pentru relaţia doză-răspuns prin experimente EC50/IC50.

(a)



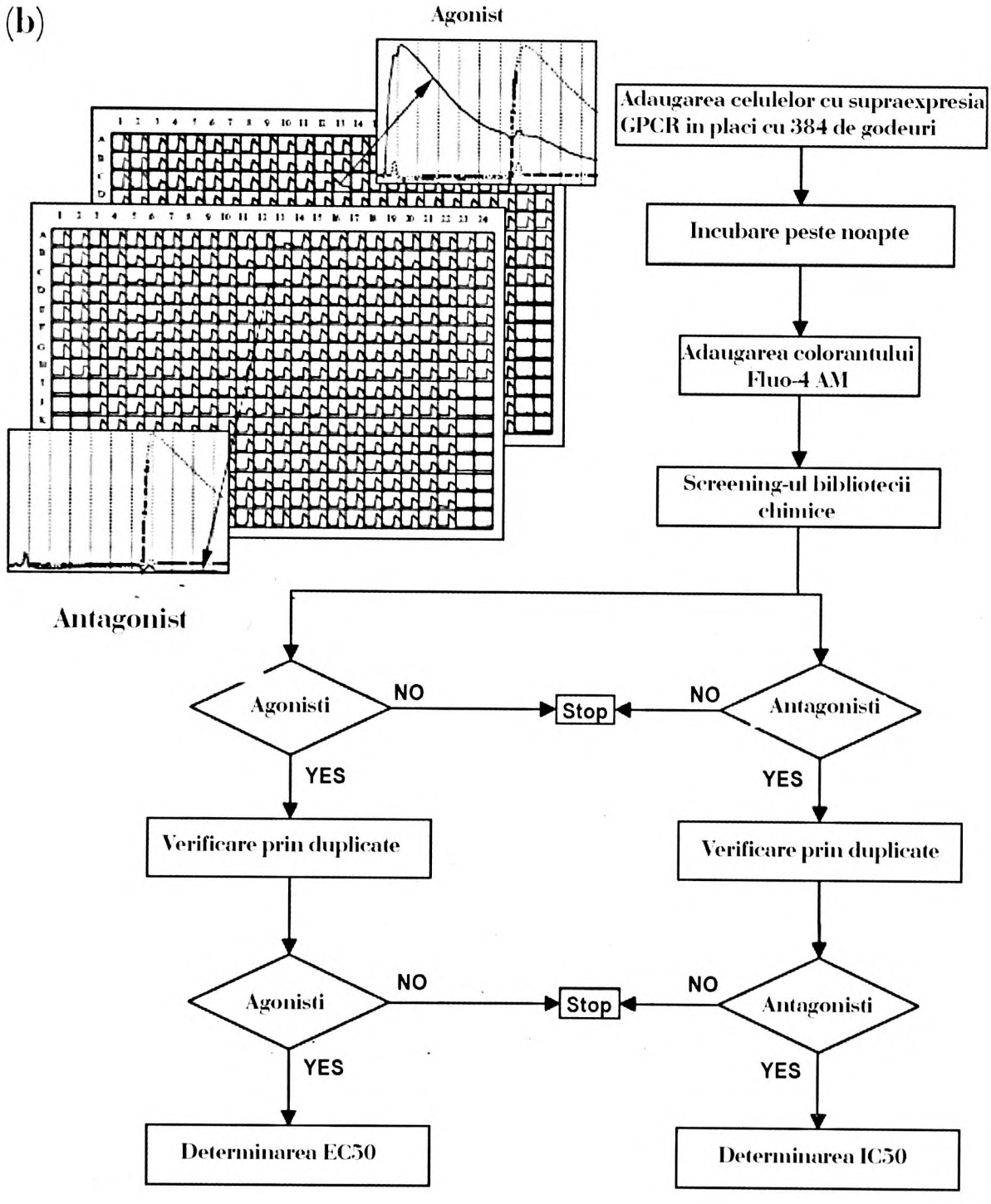


Fig 1.3. Determinarea Ca^{2+} intracelular prin sistemul FLIPR.

Fig 1.3.(a) Curbă a cineticii Ca^{2+}tipice, precum şi parametrii utilizaţi pentru calcularea semnalului fluorescent maxim. În acest exemplu maximele au fost măsurate înainte şi după adiţia ligandului (Max 1 si Max 2) şi au fost standardizate prin diviziune la minima masurată înainte de adăugarea compusului (Min). Media controalelor pozitive a fost stabilită control 100%, iar media controalelor negative a fost stabilită control 0%. Pentru fiecare godeu, au fost calculate activităţile relative în funcţie de controale.

Fig 1.3 (b) Diagramă a fluxului pentru un experiment tipic. Celulele modificate genetic care au ţinta GPCR supraexprimată au fost adăugate în plăci cu 384 de godeuri peste noapte. Celulele au fost spălate cu soluţie tampon înainte de adaugarea soluţiei tampon ce conţinea colorantul Fluo-4 AM, urmată de o incubare de 45 de minute. După o etapă

adiţională de spălare, plăcile au fost transferate în aparatul FLIPR şi au fost adăugaţi compuşii chimici, urmaţi de adiţia ligandului. Emisia fluorescenţei a fost monitorizată începând de la un moment anterior adiţiei compusului şi continuată până când s-a observat o descompunere substanţială a semnalului. În graficele mărite sunt prezentate exemple de agonist şi antagonist.

1.2.1.2. Tehnica reacţiilor competitive în detecţia AMPc intracelular

Cele mai multe experimente utilizate pentru detecţia AMPc intracelular sunt bazate pe anticorpi monoclonali care recunosc specific AMPc. Clasic, lizatele celulare sunt amestecate cu AMPc biotinilat exogen pentru a forma un heterotrimer cu un anticorp specific şi streptavidina. Formarea acestui complex este în competiţie cu AMPc endogen nebiotinilat. Streptavidina şi anticorpii se pot lega covalent la un fluorofor donor şi acceptor (criptat de europiu şi aloficocianina), formând o pereche FRET interactivă după formarea complexului. Un semnal scăzut este observat atunci când este crescută producţia de AMPc intracelular, datorită competiţiei pentru legarea la anticorpul specific.

Tehnologia AlphaScreen™ (PerkinElmer Life Sciences) este o tehnologie alternativă care permite detecţia cantitativă a unei game variate de componente celulare, inclusiv AMPc. AlphaScreen are la bază utilizarea unor particule „donor" şi „acceptor" care sunt acoperite cu un strat de hidrogel care oferă grupări funcţionale pentru bioconjugare. Când particulele sunt aduse una lângă alta, este iniţiată o cascadă de reacţii chimice pentru a produce un semnal înalt amplificat. Înainte de excitarea laser, un fotosensibilizator din particula „donoare" converteşte oxigenul ambiental la starea excitată de singlet. Moleculele de oxigen în starea de singlet difuzează pentru a reacţiona cu chemiluminiscentul de la nivelul particulei „acceptoare", ceea ce activează fluoroforii conţinuţi în aceeaşi particulă. AlphaScreen a fost utilizat în testele funcţionale ale GPCR pentru detecţia producţiei endogene de AMPc.

În toate sistemele menţionate mai sus, celulele sunt supuse lizei înainte de realizarea măsurătorilor, adăugând nu numai un pas suplimentar procedurii, dar, mai important, făcând imposibile măsurătorile cinetice deoarece datele pot fi obţinute numai la final. În plus, au fost dezvoltate metode FRET care au la bază studiul celulei ca întreg pentru studiul dinamicii temporale şi spaţiale a nucleotidelor ciclice (vezi 1.4.4).

1.2.1.3. Tehnologia Complementării Fragmentelor Enzimatice (EFC)

EFC are la bază organisme modificate genetic ce conţin două fragmente legate de o reacţie enzimatică, de exemplu acceptorul enzimei (EA) şi donorul enzimei (ED). Fragmentele separate sunt inactive şi numai formarea spontană de heterodimeri duce la forma enzimatică activă [Zabin, 1982]. Tehnologia HitHunter™ (DiscoveRx) este bazată pe o variantă modificată a enzimei β-galactozidaza care formează perechea EA/ED. Această tehnologie a fost adaptată pentru utilizarea în multe reacţii în care sunt implicate: kinaza,

receptorul progesteronic, receptorul estrogenic şi AMPc. În acest capitol vom discuta numai despre aplicaţia specifică pentru detecţia intracelulară a AMPc. Pe scurt, este utilizat un conjugat peptidic ED-AMPc din care AMPc este recunoscut de un anticorp specific. În absenţa anticorpului specific, fragmentul ED este capabil să complementeze EA pentru a forma un complex - activ. În această reacţie, anticorpul AMPc este titrat pentru inhibiţia completă a formării enzimei. Expunerea lizatului celular la o anumită cantitate de anticorp permite formarea complexului anticorp-AMPc, reducând astfel cantitatea liberă de anticorp. Ca urmare, adăugarea de conjugat ED în urmatoarea etapă a reacţiei va conduce la scăderea formării complexului anticorp-ED, promovând astfel complementarea enzimei active. ED-conjugat liber din reacţie este proporţional cu concentraţia AMPc intracelular, acelaşi principiu putând fi aplicat pentru măsurarea activităţii β- galactozidazei.

1.2.2. Proteine de transport membranar

O mare varietate de substanţe sunt transportate în interiorul organismelor complexe, în unele cazuri prin intermediul transportului pasiv, prin difuziune facilitată datorată gradientului de concentraţie scăzut, sau prin intermediul căilor paracelulare sau transcelulare. Absorbţia şi distribuţia multor constituenţi alimentari precum ionii, monozaharidele, aminoacizii şi nucleotidele sunt mediate/facilitate de proteine specifice de transport membranar, care formează canale prin membranele celulare. Mecanisme similare sunt necesare pentru îndepărtarea activă a xenobioticelor, produşilor de metabolism din ţesuturi. Aceste proteine specifice de transport „carrier" sunt divizate în două clase, transportori uniport (sisteme uniport), respectiv transportori cuplaţi (sisteme de transport cuplat), primii transportând un singur tip de moleculă de pe o faţă pe alta a membranei, iar transportorii cuplaţi transferă o moleculă în funcţie de transportul simultan sau secvenţial al celei de-a doua [Ardelean, Tripşa, 2001].

Sistemele de transport cuplat sunt la rândul lor divizate în transportori simport, care transportă simultan moleculele în aceeaşi direcţie şi transportori antiport, care transportă moleculele în direcţii opuse. Unii transportori specifici acţionează într-o manieră pasivă, transferând moleculele în funcţie de gradientul de concentraţie; acesta este cazul multor nutrienţi precum glucoza, găsită în concentraţii mari în spaţiul extracelular. O situaţie similară este reprezentată de canalele ionice cu poartă comandată de ligand sau de voltaj din sistemul nervos, care eliberează ionii după stimularea de către neurotransmiţători, respectiv depolarizarea membranară. În schimb, transportorii activi sunt dependenţi de hidroliza ATP-ului şi ei transferă moleculele împotriva gradientului de concentraţie.

Cel mai bine cunoscut şi variat grup de proteine de transport activ îl constituie super-familia de transportori ABC (casetă legată la ATP) [Dean şi colab., 2001]. Au fost descrise peste 50 de transportori ABC, substraturile transportate fiind foarte variate: aminoacizi, monozaharide, ioni anorganici,

polizaharide, peptide şi chiar proteine mari. Unul dintre cei mai studiaţi transportori ABC, proteina de rezistenţă la mai multe medicamente - MDR1 (multi-drug resistance) [Brinkmann, Eichelbaum, 2001], a fost în centrul atenţiei multor eforturi de descoperire a medicamentelor în ultimii ani deoarece supraexpresia acestei proteine în celulele canceroase umane poate determina rezistenţa simultană a acestor celule la o varietate de chimioterapice din clase diferite.

Alte procese importante în care se implică transportorii ABC includ rezistenţa la clorochină în malarie, prezentarea peptidelor antigenice celulelor imune în maladia genetică fibroza chistică [Hwang şi colab., 2001].

1.2.2.1. Canalele ionice

Majoritatea celulelor menţin un potenţial electric de o parte şi de alta a membranei,care este cel mai bine studiat la nivelul neuronilor şi celulelor musculare al căror potenţial atinge o valoare înaltă de aproximativ -70mV. Potenţialul membranar este menţinut de pompa de sodiu şi potasiu (Na^+, K^+ - ATPaza) care funcţionează ca o pompă antiport de transport activ ce scoate din celula 3 ioni de Na^+ şi introduce 2 ioni de K^+ pentru fiecare molecula de ATP hidrolizat, creând astfel o încărcătură negativă în interiorul celulei [Ardelean, Tripşa, 2001].

Proteinele canal formează pori hidrofili care traversează bistratul lipidic, permiţând anumitor ioni să treacă de pe o parte pe cealaltă a membranei datorită gradientului de concentraţie. O caracteristică a canalelor ionice este prezenţa unui mecanism cu „poartă" care controlează mişcarea ionilor. În acest capitol vom insista asupra canalelor ionice exprimate în neuroni şi celulele musculare, care au astfel un rol important în semnalizarea neuronală şi contracţia musculară. Schimbările potenţialului membranar pot fi induse într-o manieră limitată spaţial, prin intermediul canalelor de Na^+ cu poartă comandate de ligand – în acest caz neurotransmiţătorul.

Deschiderea ulterioară a canalelor de Na^+ comandate de voltaj induce autopropagarea depolarizării de-a lungul membranei celulare (potenţialul de acţiune), inducând în final deschiderea canalelor de Ca^{2+} cu poartă comandate de voltaj de la nivelul sinapsei. Influxul de Ca^{2+} induce eliberarea neurotransmiţătorilor în fanta sinaptică, propagând semnalul în celula post-sinaptică. Funcţionarea deficitară a canalelor ionice stă la baza multor afecţiuni incluzând afecţiuni musculare şi cardiace, epilepsia, migrena, depresia şi ataxia.

Deschiderea canalelor ionice este în cele mai multe cazuri monitorizată prin măsurarea modificărilor potenţialului membranar. Standardul de aur utilizat în acest scop este tehnologia *patch clamp*, care oferă o sensibilitate foarte înaltă, rezoluţie temporală bună, precum şi măsurarea conductanţei unui singur canal la un voltaj precis. Această tehnologie oferă cele mai bune informaţii pentru evaluarea funcţională a canalelor ionice; dezavantajele majore ale acestei tehnici include participarea operatorilor experimentaţi, experimente laborioase

şi rezultate puţine. În prezent, diferite companii sunt implicate în dezvoltarea noilor echipamente pentru automatizarea procedurilor patch-clamp. Unul dintre cele mai avansate echipamente este staţia IonWorks™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) care utilizează tehnicile de fluidică integrată pentru poziţionarea automată a unei singure celule în godeurile unui suport special. Înregistrări ale unui singur canal ionic au fost obţinute la o rată de până la 2000 de reacţii pe zi. Rezultate mai bune sunt obţinute prin utilizarea coloranţilor solvatocromatici pentru care celulele sunt permeabile, precum DiBAC (Molecular Probes, Eugene, OR) sau prin utilizarea colorantului recent descoperit FMP (Molecular Devices). Asocierea cu sistemul FLIPR permite monitorizarea funcţiei canalelor ionice prin sisteme de analiză de mare capacitate, depăşind numărul de 30000 de compuşi analizaţi pe zi. Detalii cu privire la alte tehnologii de analiză a canalelor ionice au fost descrise de Xu şi colab., (2001).

Tehnologia FLIPR şi analiza canalelor ionice. Pentru identificarea compuşilor care modulează activitatea canalelor ionice este imperativă disponibilitatea evaluărilor rapide şi economice ale activităţilor biologice prin analize de mare capacitate. Una din metodele bazate pe fluorescenţă care testează modificările potenţialului membranar utilizează o sondă fluorescentă potenţiometrica – acid bis-(1,3-dibutilbarbituric) trimetin oxonol [DiBAC4(3)], care separă compartimentele intracelulare şi extracelulare în funcţie de potenţialul electric de o parte şi de alta a membranei. În urma depolarizării celulei, colorantul pătrunde în celulă, iar legarea la situsurile hidrofobe intracelulare se traduce într-o creştere a intensităţii semnalului fluorescent. Invers, hiperpolarizarea membranei declanşează eliminarea colorantului din celulă şi scăderea fluorescenţei deoarece cuantumul producţiei DiBAC4(3) este scăzut în mediu apos. Deoarece separarea DiBAC4(3) este un proces lent, aceasta tehnologie nu este aplicabilă pentru evaluarea canalelor cu o cinetică rapidă la nivelul porţii sau cu desensibilizare rapidă. Îmbunătăţiri substanţiale au fost obtinuţe odată cu descoperirea colorantului FMP [Baxter şi colab., 2002] care are o cinetică de separare mai rapidă. Figura 1.4 prezintă un experiment tipic condus cu miotuburi diferenţiate (linia celulară C2C12).

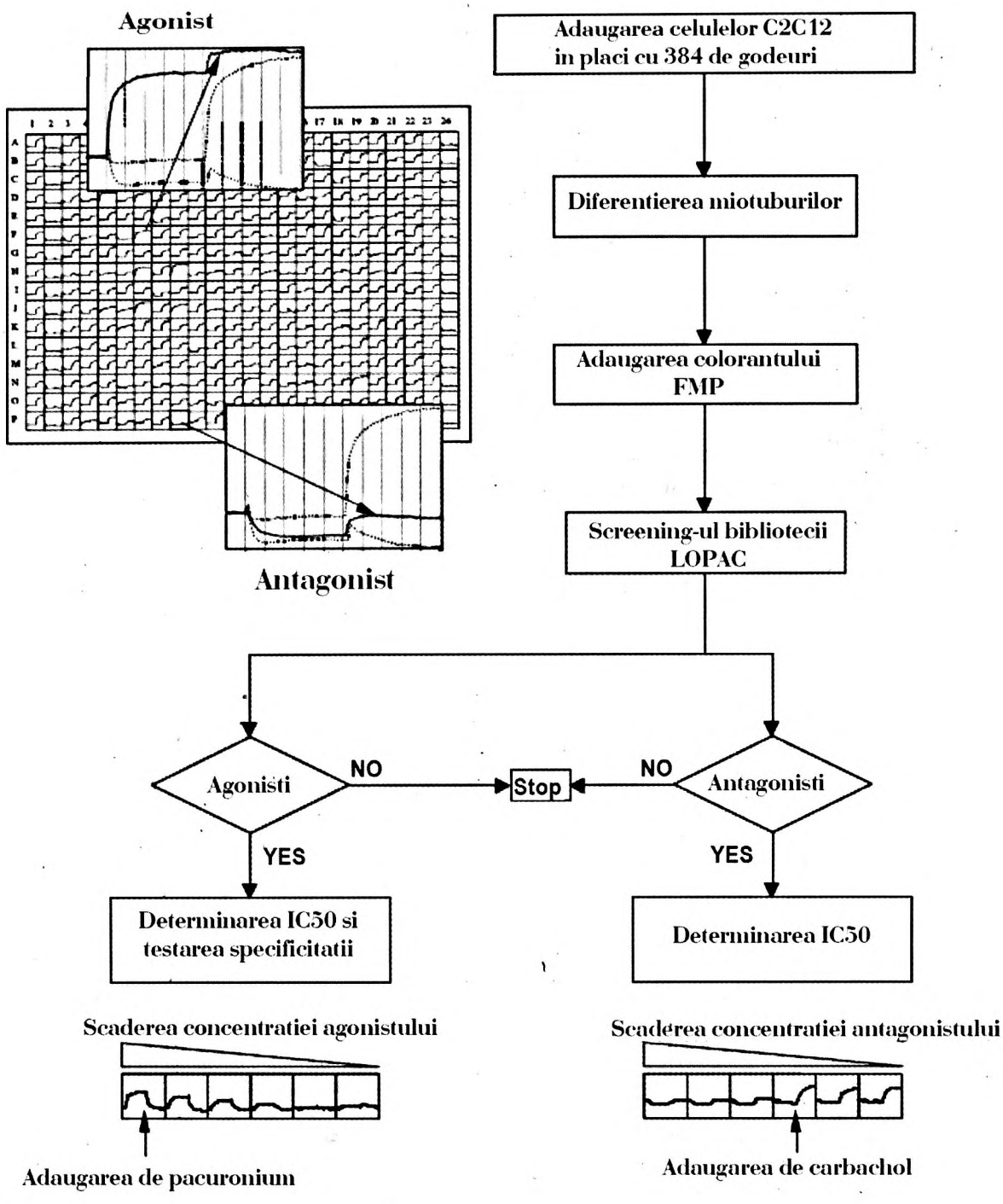


Fig 1.4 Activitatea canalelor ionice în miotuburi diferenţiate. Linia celulară de celule musculare murine C2C12 a fost utilizată pentru validarea colorantului FMP. Celulele C2C12 au fost adăugate în plăci şi diferenţiate în miotuburi prin expunerea la ser de cal. Celulele C2C12 diferenţiate exprimă nAchR, iar depolarizarea celulelor poate fi indusă cu un agonist specific pentru receptor, precum carbacol. Exemple de agonist şi antagonist sunt reprezentate în graficele mărite.

Biblioteca LOPAC (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) a compuşilor farmacologici activi a fost supusă screening-ului pentru identificarea compuşilor care exercită efecte agoniste sau antagoniste asupra receptorului nicotinic al acetilcolinei (nAChR). Pe scurt, celulele au fost spălate cu o soluţie tampon şi încărcate cu colorant FMP timp de 30 de minute la temperatura camerei. 644 de

compuşi din libraria LOPAC au fost adaugaţi în FLIPR, urmaţi de stimularea cu carbacol.

În contrast cu semnalizarea tipică prin intermediul Ca^{2+}, depolarizarea membranară nu prezintă o cinetică tranzitorie. Evaluarea datelor şi identificarea modulatorilor poate fi efectuată după modelul descris în figura 1.3. Identificarea agoniştilor şi antagoniştilor este posibilă într-un singur experiment. Compuşii pozitivi au fost supuşi determinării EC50/IC50 şi, în cazul agoniştilor, antagonistul specific al AChR - pancuronium a fost utilizat pentru a evidenţia reversul semnalului carbacol (vezi fig. 1.4). Iniţial, 21 de compuşi au fost identificaţi ca agonişti, iar 12 compuşi au avut specificitate pentru AChR.

Tehnologia VIPR™ (Voltage Ion Probe Reader) şi analiza canalelor ionice. Tehnologia VIPR (electrod folosit la măsurători de potenţial între mediul intern şi extern al unei celule) (Aurora Bioscience, San Diego, CA) este bazată pe FRET şi utilizează două molecule fluorescente. Prima moleculă, oxonol este un ion hidrofob, înalt fluorescent, încărcat negativ, care poate fi rapid redistribuit între două situsuri de legatură pe cele două feţe ale membranei plasmatice ca răspuns la modificările potenţialului membranar. Cea de-a doua moleculă fluorescentă, lipidul coumarina se leagă specific pe o faţă a membranei plasmatice şi funcţionează că un donor FRET pentru molecula acceptoare de oxonol sensibil la voltaj. Când molecula de oxonol ajunge la nivelul situsului intracelular al membranei plasmatice în urma depolarizării, FRET este scăzut, ceea ce se traduce în creşterea fluorescenţei donorului şi descreşterea emisiei oxonolului. Această tehnologie permite dezvoltatea cercetărilor în domeniul biologiei canalelor ionice. Tehnologia VIPR poate furniza cadre de citire subsecvenţe real-time în urma reacţiilor efectuate în microplăci.

1.2.2.2. Proteinele MDR

MDR (proteina rezistentă la medicamente) este în principal legată de supraexpresia proteinelor superfamiliei de transportori ABC. Cel mai studiat membru al acestei superfamilii este produsul genei MDR1 (glicoproteina P) care este exprimată în intestin, rinichi, ficat, bariera hemato-encefalică şi în multe celule tumorale. În ultimul caz, supraexpresia genei MDR1 este unul din factorii principali ai rezistenţei celulelor la chimioterapia cancerului. Această rezistenţă este rezultatul pompării medicamentelor anticanceroase în exteriorul celulelor, rezultând scăderea nivelelor intracelulare ale acestora. Moleculele mici, capabile să reversibilizeze efluxul pot restaura sensibilitatea la medicamente a celulelor tumorale rezistente.

Cele mai utilizate metode pentru identificarea inhibitorilor pompei MDR sunt bazate pe substraturile fluorescente ale glicoproteinei P, precum Hoechst 33342, rodamina 123 şi rodamina 6G. Celulele sunt încărcate cu substratul, iar colorantul extracellular este îndepărtat prin spălarea cu detergenţi anterior lizei [Sarver şi colab., 2002].

Măsurătorile emisiei fluorescenţei oferă rezultate cantitative, proporţionale cu acumularea intracelulară a substratului. Expunerea celulelor la inhibitorii pompei MDR va reduce efluxul substratului şi deci va determina înregistrarea unui semnal fluorescent crescut. Aceste reacţii nu sunt omogene şi implică etape de spălare după încărcarea celulelor cu colorantul corespunzator. Un nou substrat pentru pompa MDR a fost dezvoltat recent pentru realizarea unor reacţii omogene într-un sistem FLIPR.

Tehnica FLIPR pentru Multirezistenţa la Medicamente (FLIPR Multidrug Resistance Assay) (Molecular Devices) este o aplicaţie omogenă care necesită numai 15 minute de incubare la temperatura camerei cu un colorant proprietar, care este transportat de către produsul genei MDR1 şi el îşi modifică proprietăţile fluorescente numai în urma acţiunii enzimelor intracelulare asupra sa. Aceasta permite performanţa reacţiilor cinetice asupra celulelor vii pentru screening-ul inhibitorilor pompei MDR. Eliminarea etapelor de spălare şi controlul temperaturii a determinat automatizarea reacţiei [Sarver şi colab., 2002].

1.3. Evaluarea expresiei genelor și proteinelor în cadrul unor sisteme de analiză de mare capacitate

Profilul expresiei genelor şi proteinelor poate fi aplicat în descoperirea medicamentelor cu cel puţin două scopuri diferite.

Prima aplicaţie este pentru descoperirea noilor medicamente potenţiale. În acest caz, ţinta de interes o constituie fie o componentă a sistemului de expresie, fie monitorizarea expresiei ca indicator pentru ţinta din amonte ce reflectă răspunsul celular cuplat [Broach, Thorner, 1996].

Pentru a face un screening de mare capacitate (HTS) posibil, secvenţele promotoare de interes, care sunt cuplate cu evenimentele celulare din amonte, sunt legate la aşa-numitele gene reporter, care servesc ca indicatori pentru activarea transcripţiei şi translaţiei.

Cea de-a doua aplicaţie este utilizarea profilului expresiei pentru a obţine informaţii asupra specificităţii la nivel celular a unui medicament candidat sau pentru identificarea unor markeri surogat pentru acţiunea medicamentelor. În acest caz, ar trebui investigată expresia genică sau proteică a cât mai multor gene sau proteine ca răspuns la un potenţial medicament candidat. Modelele de expresie pot fi utilizate ca un indicator pentru numărul interacţiunilor dintr-o celulă. Asemenea date pot fi relevante pentru înţelegerea impactului modulării unei singure ţinte terapeutice asupra întregului sistem celular. Chip-uri de expresie genică au fost introduse recent pentru măsurarea simultană a sute de gene exprimate la nivelul ARNm [Epstein, Butow, 2000]. Utilitatea acestei abordări, a fost recent validată la drojdii; în acest caz profilurile expresiilor au identificat căi ale unor mutaţii necaracterizate anterior

sau au identificat noi potenţiale ţinte terapeutice. Similar, au fost introduse chip-uri pentru caracterizarea expresiei proteice pentru a captura o fracţiune particulară a proteinelor şi a permite analiza cu o cantitate rezonabilă de probă [Weinberger şi colab, 2002]. În plus, tehnicile de proteomică au fost introduse de Celis şi colab., (2000).

Analiza a mii de probe devine o condiţie obligatorie dacă profilurile de expresie sunt utilizate în identificarea unui modulator. Selecţia modulatorilor cu molecule mici şi optimizarea modulării vor necesita analize de mare capacitate care să fie la nivelul a sute sau mii de componente. Ambele pot fi obţinute prin focalizarea asupra unor gene indicatoare selectate sau a produşilor lor, indicatori mai degrabă ai ţintei de interes decât ai profilului complet al expresiei.

În secţiunea următoare ne vom axa pe exemple care pot fi aplicate în descoperirea iniţială a medicamentelor. Chip-urile pentru expresia genică [Epstein, Butow, 2000; Weinberger şi colab, 2002] şi tehnologiile de proteomică sunt subiectul multor recenzii recente.

1.3.1. Analiza genelor reporter pentru identificarea modulării compuşilor biologici activi

Factorii de transcripţie pot fi clasificaţi atât în funcţie de natura structurală, cât şi în funcţie de modul în care răspund pentru modularea transducţiei semnalului. O astfel de clasificare, esenţială pentru tehnologiile ce implică genele reporter, aparţine lui Brivanlou şi Darnell (2002). Conform acestei clasificări, factorii de transcripţie pot fi grupaţi în două mari clase – aceia care sunt activaţi constituţional şi cei a căror activitate este reglată într-o manieră spaţio-temporală, cantitativă şi calitativă. Din clasa factorilor de transcripţie reglaţi face parte clasa factorilor de transcripţie dependenţi de semnal, care sunt activaţi în urma unui semnal intracelular sau extracelular. Genele reglate prin intermediul acestor factori de transcripţie dependenţi de semnal sunt atractive ca gene reporter deoarece cuplează căile de semnalizare cu răspunsul transcripţional.

Semnalele extracelulare, în urma interacţiunii cu moleculele receptoare corespunzătoare de pe suprafaţa celulei, iniţiază o cascadă de evenimente intracelulare care conduc la alterări ale expresiei unui set de gene. Una sau câteva dintre aceste gene pot fi utilizate ca indicatori pentru modularea ţintelor în cadrul unor căi de semnalizare specifice. Activarea unei anumite gene poate fi uşor identificată prin „ataşarea" la gena de interes a unei aşa-numite gene reporter. Pentru acest scop, trebuie create plasmide care conţin promotorul sau regiunea reglatoare a genei de interes lângă gena reporter. Aceste plasmide sunt apoi introduse într-o linie celulară care exprimă calea de interes ce conţine ţintele farmacologice şi cuplează indicatorul reporter cu calea particulară de interes. Un număr de gene au fost descrise ca fiind gene reporter [Broach, Thorner, 1996]. Expresia poate fi monitorizată prin intermediul fluorescenţei, de exemplu prin utilizarea unei proteine fluorescente verzi (GFP) ca reporter

sau prin detecţia cu anticorpi marcaţi fluorescent. Alternativ, este utilizată activitatea enzimatică a reporterului, aşa cum se întâmplă în cazul luciferazei care converteşte substratul într-un produs luminescent, sau reporterul este detectat cu ajutorul fluorescenţei, luminescenţei sau reacţiilor colorate ale produşilor secundari.

Tehnologia ce implică utilizarea genelor reporter a fost utilizată pe scară largă pentru a realiza HTS pentru o varietate de ţinte de interes în descoperirea medicamentelor. Pentru multe ţinte, precum receptorii transmembranari pentru care alte metode de screening erau dificil de realizat, tehnologia genelor reporter a devenit metoda cea mai bună pentru identificarea modulării compuşilor biologici/ farmacocinetici activi (*lead finding*). Exemplele selectate includ utilizarea reacţiilor ce implică genele reporter în identificarea agoniştilor şi antagoniştilor pentru o mare varietate de GPCR [Goetz şi colab., 2000] transfectaţi într-o linie de celule ovariene de hamster (CHO) cu un construct al reporterului luciferazei 6xCRE. Această linie celulară a servit ca un indicator pentru GPCR, precum receptorul pentru melanocortina-1 care în urma stimulării modulează nivelele de AMPc în celulă. Aceasta reacţie poate fi realizată într-o placă cu 384 godeuri, oferind astfel economii substanţiale de timp, cost şi realizare a culturilor celulare. În aceeaşi linie celulară a fost stabilit un sistem HTS pentru receptorul metabotropic al glutamatului mGluR7. Receptorul mGluR7 este cuplat negativ cu adenilat/adenilil ciclaza şi stimularea sa duce la scăderea nivelelor de AMPc. Celulele CHO au fost transfectate stabil cu ADNc pentru mGluR7 de la şobolan şi o genă reporter care răspunde la AMPc. Aplicabilitatea pentru HTS a fost demonstrată într-o linie în care nivelele de AMPc induse de forskolina (un activator al adenilat ciclazei) au fost reduse semnificativ de către agoniştii receptorilor. Xing şi colab. (2000) au descris o metodă directă pentru investigarea receptorilor cuplaţi negativ cu adenilat ciclaza. Linia celulară CHO transfectată stabil a conţinut trei plasmide distincte: (i) o proteina himerică $G_{q/i}$ – care redirecţionează semnalul G_i negativ într-un semnal G_q pozitiv; (ii) un GPCR cuplat cu G_i, în acest caz receptorul μ-opioid sau receptorul pentru 5-hidroxitriptamina şi, (iii) reporterul 3xNFAT β-lactamazei. Astfel, activarea GPCR cuplat cu G_i s-a translatat într-o activare NFAT prin intermediul căii de semnalizare mediata de G_q, permiţând monitorizarea expresiei β-lactamazei într-un format HTS.

O mare varietate de linii celulare diferite au fost utilizate pentru a stabili reacţiile genelor reporter. Celule din rinichiul embrionar uman (HEK) 293-EBNA crescute în culturi celulare în suspensie au fost utilizate pentru expresia receptorilor prostanoizi cuplaţi cu un reporter CRE-SEAP (fosfataza alcalină secretată de placenta umană). Celulele ECV304, o linie celulară transformată spontan, derivată din celule endoteliale ale venei ombilicale umane, au fost transfectate cu un reporter ICAM-1 pentru screening-ul componenţilor care inhibă expresia ICAM-1 în urma stimulării cu interleukina IL-1b. Linia celulară provenită din celule de cancer mamar uman MDAMB- 453 a fost utilizată ca

gazdă a transfecţiei pentru a stabili reporterii stabili sub controlul promotorului virusului tumorii mamare la şoarece (MMTV) pentru a studia agoniştii receptorilor androgeni şi glucocorticoizi. Celulele MDA-MB exprimă atât receptorii glucocorticoizi cât şi receptorii androgeni, servind astfel ca o celulă gazdă ideală pentru reporterii construiţi.

Ca un exemplu practic, datele obţinute cu ajutorul reacţiilor care implică genele reporter în condiţiile HTS, sunt prezentate în figura 1.5 şi tabelul 1.2. Celulele transfectate stabil cu gena reporter a luciferazei au fost aplicate într-o placă cu 384 de godeuri şi dozate cu diluţii seriate ale unui compus care activează promotorul genei reporter. După o incubare de 24 de ore, celulele au fost spălate, lizate şi a fost adăugat substratul luciferazei (LucLite2; PerkinElmer Life Sciences). Cantitatea exprimată de proteina luciferază s-a corelat direct cu cantitatea de substrat metabolizat într-un compus luminiscent, care a fost detectat cu ajutorul unui cititor de plăci luminometric (TopCount2 NXT; PerkinElmer Life Sciences). Datele prezentate au oferit informaţii asupra concentraţiei minime a compusului de referinţă pozitiv necesar ca standard pe fiecare placă pentru HTS a 100000 de compuşi. Pentru a obţine rezultate de calitate pentru fiecare placă individuală în timpul HTS, este calculat un criteriu numit factor Z' (diferenţa dintre mediile semnalului de fond şi godeurile de control pozitiv) şi deviaţia standard (SD) a godeurilor de control pentru fiecare placă. Din moment ce factorul Z' ia în considerare atât intensitatea semnalului, cât şi variaţia intrinsecă, el oferă o măsură a stabilităţii unei reacţii. Screening-ul este considerat posibil dacă $0<Z'<1$; cu toate acestea, în practică, valoarea minimă a factorului Z' este deseori mai mare. O concentraţie de cel puţin 3mM a agonistului în controlul pozitiv poate fi necesară pentru a obţine o valoare a $Z'>0.5$. Astfel, în acest experiment concentraţia controlului pozitiv a fost de 10mM.

Concentraţia (μM)	Media a 8 godeuri	SD	Factorul Z'
0	6364	641	
0,1	6347	314	n.d.
0,3	9028	458	-0,238
1	12006	509	0,389
3	20436	1476	0,549
10	31292	1181	0,781
30	38343	2027	0,750

Tabelul 1.2 Activarea genei reporter a luciferazei şi performanţa reacţiei

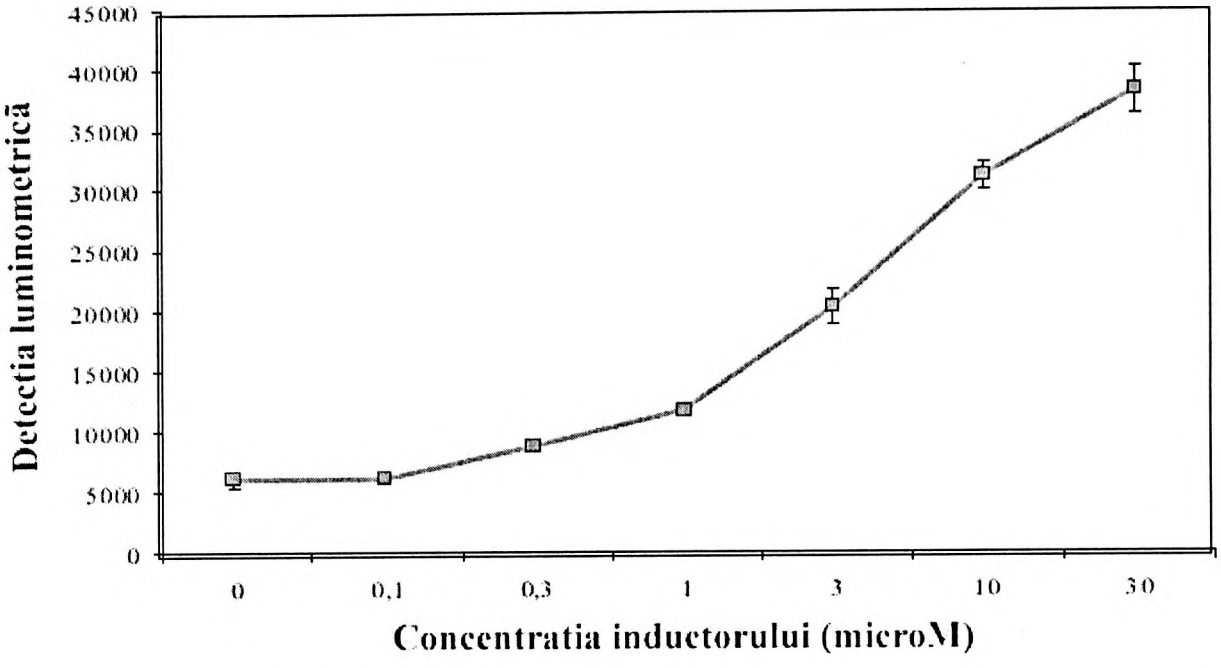


Fig 1.5 Inducţia dependentă de doză a genei reporter a luciferazei de către o substanţă inductoare utilizată ca şi control agonist în HTS. Fiecare valoare reprezintă media a 8 determinări separate, barele de eroare indică 1 SD. Media determinărilor luminometrice măsurate cu TopCount NXT (PerkinElmer Life Science) este reprezentată împotriva concentraţiei substanţei inductoare (mM). Valorile obţinute în absenţa compusului se referă la expresia bazală a genei reporter a luciferazei şi constituie fundamentul reacţiei.

Analizele genelor reporter pot fi înalt informative dacă produsul genei de interes şi calea de inducţie sunt bine caracterizate. Este necesar să se ţină cont de faptul că o genă reporter poate fi modulată de orice tip de stimul care influenţează oricare dintre etapele cascadei de transducţie a semnalului cuplat. Astfel, efectele expresiei asupra genelor reporter observate ca răspuns la compuşii testaţi trebuie întotdeauna estimaţi prin reacţii care se adresează unor etape specifice ale căii, pentru a exclude mecanisme asociate indirect cu ţinta de interes.

Deşi în general expresia genelor reporter nu influenţează homeostazia celulei, un anumit component artificial este introdus în sistem. În primul rând, este necesar sa se stabilească în ce măsură calea de transducţie a semnalului ce conduce la activarea unui anumit promotor este prezentă şi funcţională activ în celulele de interes. Introducerea unei gene reporter în celule poate să perturbe caracteristicile transcripţionale normale, datorită eliminării unor factori transcripţionali sau prin efectele de poziţie datorate integrării plasmidului în timpul generării clonelor celulare stabilizate. De aceea, trebuie să existe grijă în alegerea promotorului şi a liniei celulare în care se realizează analiza genei reporter. Limitările pot să apară în legatură cu liniile celulare utilizate, metodele de transfecţie şi eficienţa expresiei genei reporter. Nu în ultimul rând, deşi generarea liniilor celulare bine caracterizate din punct de vedere al genelor re-

porter este consumatoare de timp, ele constituie un sistem foarte eficient pentru programele HTS.

1.3.2. Teste de detecție genică pentru optimizarea modulării compușilor activi farmacocinetici

Utilizarea array-urilor de expresie genică pentru monitorizarea simultană a expresiei a sute sau mii de gene a fost menţionată anterior. Array-urile de expresie sunt metode utile nu numai pentru caracterizarea fenotipurilor de expresie ale celulelor şi ţesuturilor în vederea clasificării, dar ele permit şi monitorizarea impactului mutaţiilor sau medicamentelor asupra fenotipului celular. Array-urile sunt utilizate pe scară largă în studiile toxico- şi farmacogenomice. În plus, datele obţinute au fost utilizate pentru crearea unor modele predictive în scop diagnostic.

Utilizarea array-urilor de expresie necesită producerea unor probe adecvate pentru hibridizare, care pot fi foarte dificil de obţinut. Mai mult, analiza seturilor de date obţinute necesită soft-uri sofisticate, precum şi cunoştinţe cu privire la semnificaţia şi relevanţa multiplicităţii de răspunsuri observate. În unele cazuri, numai o fracţie particulară a genelor măsurate oferă informaţii referitoare la ţinta cercetată. Thomas şi colab. (2001) au analizat expresia a 1200 de transcripturi din ficat utilizând array ADNc, după administrarea la şoareci a 24 de tratamente diferite divizate în cinci categorii. Un set de 12 transcripturi a fost identificat şi considerat de importanţă diagnostică pentru clasificarea tratamentului în clase de toxicitate. Interesant, adăugarea altor transcripturi a condus la un declin al acurateţei predictive a „individualităţii" unui profil terapeutic specific. Într-un studiu similar, Bartosiewicz şi colab. (2001) au utilizat un set de 260 de gene implicate în faza I şi II a metabolismului medicamentelor pentru a testa efectele a 10 substanţe toxice asupra profilurilor de expresie în diferite ţesuturi la momente diferite ale expunerii şoarecilor. Diferite grupuri de clase chimice pot fi corelate cu profiluri de expresie diferite ale unui număr relativ scăzut de transcripturi. Studii similare ale profilurilor expresiei evaluate pe celulele HepG2 şi pe ficat de şobolan tratat au aratat că numai cu un set de gene înalt selectate pot fi identificate clase diferite de substanţe chimice prin intermediul modulării expresiei setului de gene selectate.

În zilele noastre, cea mai bună metodă pentru evaluarea profilului expresiei genice *in vivo* constă în utilizarea oligonucleotidelor sau microarray-urilor ADNc sau a chip-urilor de gene. Cu toate acestea, datorită costurilor crescute şi a efortului depus pentru prepararea probelor (care în general exclude o metoda de înaltă capacitate) studiile au fost efectuate în special în faza tardivă a procesului de descoperire a medicamentelor. De aceea, una sau mai multe componente sunt analizate pentru modelele de expresie ale multor gene. Pentru

a reduce uzura în faza tardivă a medicamentelor potenţial candidate datorită efectelor adverse neobservate, sunt necesare sistemele de profil al expresiei justificabile pentru HTS. A fost descrisă o abordare care utilizează analiza genelor reporter. Albano şi colab. (2001) au selecţionat un set de promotori care răspund la stres din genele Escherichia coli pentru a genera construcţii ale genei reporter GFP ca o unealtă pentru screening-ul mecanicistic al medicamentelor antitumorale într-o placă cu 96 de godeuri. Zhu şi Fahl (2000) au generat clone celulare stabile HepG2 care exprimaă GFP sub controlul elementului de răspuns electrofil (EpRE), care permite HTS pentru inducţia enzimelor fazei a II-a a metabolismului medicamentelor. Un alt avantaj al construcţiilor genelor reporter GFP este faptul că expresia poate fi detectată în celule vii, permiţând monitorizarea facilă în dinamică, precum şi reversibilitatea inducţiei.

Utilizarea genelor reporter din liniile celulare pentru profilurile expresiei a fost mai profund documentată de Farr şi Todd (1998), care au stabilit un model de linii celulare ce conţin gena reporter pentru N-acetiltransferaza cloramfenicolului (CAT) sub controlul promotorilor indicatori pentru răspunsurile la stresurile celulare. Inducţia unor construcţii de reporteri de către compuşii chimici poate oferi indicaţii cu privire la acţiunea compuşilor la nivel subcelular. Astfel, construcţiile promotorgenă reporter exprimate în linii celulare bine caracterizate pot oferi sisteme utile pentru profilul compuşilor ţinând seama de activarea căilor de transducţie a semnalului recunoscut care se asociază cu anumite fenotipuri. Sistemul de analiză va detecta compuşi care modulează direct expresia genei reporter şi pe aceia care interferă cu expresia provocată prin stimuli externi cum ar fi factorii de creştere şi citokinele. Când un tablou de analize ale genelor reporter este utilizat pentru profilul compuşilor, modele de expresie similară pot demonstra mecanisme comparabile de acţiune ale compuşilor testaţi în celule intacte. Modificări ale modelelor expresiilor ca răspuns la căi de semnalizare specifice şi în linii celulare diferite pot adduce informaţii cu privire la specificitatea compuşilor testaţi. Aceste sisteme pot fi uşor adaptate pentru HTS şi pentru analiza în dinamică şi a dependenţei de doză a inducţiei. În consecinţă, crearea profilului modulatorilor identificaţi sau a seturilor de compuşi rezultaţi din optimizarea modulării compuşilor activi farmacocinetici poate permite organizarea compuşilor în grupe cu răspunsuri farmacologice similare. De exemplu, activarea genelor reporter cuplate la elementul p53-responsiv (p53RE) va arăta că acel compus testat conduce la lezări ale ADN; activarea reporterilor sub controlul elementului de răspuns la xenobiotice (XRE) va conduce la inducţia transcripţionala a enzimelor ce catalizează metabolismul medicamentelor, precum citocromul P450 şi altele. Astfel, realizarea profilului genelor reporter *in vitro* cu un set de gene bine definite şi validate poate contribui nu numai la clasificarea compuşilor, dar şi la identificarea unor posibile efecte adverse ale compuşilor testaţi.

Recent, cu ajutorul unor tehnici mai sensibile de monitorizare a expresiei genice, a fost raportat un nou set de analize. În timp ce analizele genelor

reporter au fost coroborate cu ideea vizualizării unui eveniment particular al expresiei genice prin cuplarea cu o proteină care poate fi monitorizată cu uşurinţă, tehnicile noi monitorizează direct expresia genică prin cuantificarea nivelelor de ARNm pentru până la câteva mii de gene simultan. Mai mult, aceste tehnici nu necesită introducerea anterioară a unui sistem de detecţie ceea ce permite alegerea în funcţie de tipul de celulă sau ţesut derivate din organe.

Tabelul 1.3 oferă o privire de ansamblu asupra unor tehnici dezvoltate pentru aplicaţiile HTS care sunt disponibile în momentul actual.

Tehnologia	Metodologia	Gene ţintă	Probe
SAGE	transcriptul capturat prin amprenta SAGE, identifica-rea şi cuantificarea prin secven-ţierea concatemerelor seriate	HTcompatibil	puţine
GeneCalling	(profilarea transcriptului) amprentarea prin endonucleaze de restricţie a ADNc, confirma-re prin PCR competitiv	96 de reacţii	puţine
TOGA	PCR bazat pe ADNc, identificarea ARNm cu capăt 3'poli(A) prin secvenţiere	256 de reacţii	puţine
Microarray/ oligoarray ADN	hibridizarea ARN total la sonde ale genelor aranjate pe chip-uri de silicon sau lame de sticlă	HTcompatibil	puţine
RT-PCR Cantitativ (Taqman™)	eliberarea mediată prin PCR a unor sonde fluorogenice specifice genelor; limita de detecţie este invers proporţională cu concentraţia	puţine sonde	format cu 96 de godeuri
ADN ramificat (branched DNA) (Quantigene™)	detecţia directă a ARNm prin hibridizarea cu un linker specific genei şi amplificarea sondei	1 sondă	format cu 96 de godeuri
HPSA™	detecţia directă a ARNm prin hibridizarea cu captură specifică genei şi amplificarea sondei	2 sonde	format cu 96 de godeuri

Tabelul 1.3. Tehnici pentru identificarea expresiei genelor

În funcţie de aplicabilitatea pentru HTS a acestor noi tehnologii, pot fi diferenţiate două mari clase. Dintre metode menţionăm analiza seriată a expresiei genice (SAGE), GeneCalling (realizarea profilului expresiei prin amprentarea cu endonucleaze de restricţie) şi analiza expresiei genice totale (TOGA), unde prepararea probei iniţiale este foarte dificilă, dar detecţia poate fi realizată în parallel pentru mai multe gene diferite. Aceste tehnici sunt denumite

colectiv sisteme „deschise" deoarece nu este necesară nici o informaţie despre secvenţă şi virtual toate genele induse de un compus particular pot fi detectate. Sistemele deschise pun sub semnul întrebării tehnologia ADN microarray, oferind o alternativă la costurile înalte şi la necesarul înalt al materialului iniţial asociate cu aceste tehnici. În practică, ele se vor dovedi utile dacă trebuie analizate doar câteva probe pentru detecţia produşilor mai multor gene diferite.

Reacţia de polimerizare în lanţ cantitativă (RT-PCR), tehnologia ADN ramificat (branched DNA) promovată de Bayer (Emeryville, CA) şi amplificarea de înaltă performanţă a semnalului (high-performance signal amplification - HPSA™) promovată de Chromagen (San Diego, CA) pot detecta moleculele de ARNm. Acestea sunt denumite sisteme „închise" deoarece pot fi aplicate numai genelor cu secvenţă cunoscută. Totuşi, aceste metode pot fi utilizate pentru HTS deoarece reacţiile pot fi realizate în plăci, permiţând procesarea simultană a mai multor probe. Mai mult, au avantajul de a fi mai flexibile şi pot fi realizate pe orice sursă şi detecţia noilor gene necesită doar design-ul şi sinteza unor sonde specifice genelor. Aceste noi tehnologii promit o creştere a sensibilităţii, cu rezultate necompromise de efectele secundare datorate genelor reporter, dar încă nu sunt atât de larg utilizate ca sistemele genelor reporter.

1.4. Reacțiile celulare spațio-temporale și analizele subpopulațiilor

Reacţiile celulare care se adresează nivelelor expresiei proteinelor, distribuţiei spaţiale şi temporale ale proteinelor în interiorul celulei şi dinamicii semnalizării intracelulare sunt utilizate curent pentru o mai bună înţelegere a funcţiilor ţintelor farmaeutice în celule. Exista un număr în creştere de reactivi pentru marcare şi de sonde fluorescente, incluzând anticorpii specifici ţintei, enzimele complementare, coloranţii (Alexa Fluor dye series; Molecular Probes), reactivii de afinitate şi proteinele fluorescente codificate genetic.

Sistemele care permit analize de mare capacitate ale celulelor includ tehnici bazate pe citometria în flux, precum sistemul farmacologic de mare capacitate recent descris [Edwards şi colab., 2001]. Acest sistem permite caracterizarea multifactorială a celulelor, dar nu permite cuantificarea rearanjamentelor spaţiale din interiorul celulei.

Tehnologiile de imagistică microscopică recent dezvoltate au aplicaţii variate. Ele permit analiza unor funcţii celulare variate incluzând motilitatea celulară, morfologia celulară, motilitatea proteinelor în interiorul celulelor, localizarea proteinelor, mesagerii secunzi intracelulari şi măsurătorile „capătului" cascadelor de semnalizare. Dezvoltarea unui sistem de imagistică automat a făcut posibil screeningul compuşilor într-un format bogat în infor-

maţii. Avantajul major al imagisticii automate şi al tehnicilor de scanare îl constituie creşterea considerabilă a sistemelor de analiză de mare capacitate comparativ cu microscopia manuală. În cazul microscopiei cu fluorescenţă, multiple sonde fluorescente pot fi detectate şi cuantificate simultan.

Sistemul ArrayScan II a fost introdus în 1999 de către Cellomics [Brunet şi colab. 1999] şi a fost unul dintre primele instrumente de imagistică automate pentru screeningul bogat în informaţii de pe piaţă. Pentru moment, alte instrumente, software-uri şi hardware-uri au fost dezvoltate de câteva companii incluzând Acumen-Biosciences (www.acusite.co.uk), Amersham Bioscience (www.amersham.com), Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com), Q3DM (www.q3dm.com), CompuCyte (www.compucyte.com), Kinetics Imaging (www.kinetikimaging.com), Universal Imaging (www.imagel.com), Axon Instruments (www.axon.com) şi Evotec OAI (www.evotecoai.com).

Progresul rapid în dezvoltarea sistemelor analitice pentru analizele subcelulare în combinaţie cu reactivii de marcare pentru identificarea specifică a moleculelor de interes va permite analiza semnalizării specifice şi a etapelor metabolice prin sisteme de analiză de mare capacitate.

1.4.1. Anticorpii specifici etapei de fosforilare

De un interes deosebit pentru imagistica automată sunt reactivii dependenţi de o activitate, precum anticorpii fosfospecifici care permit analiza selectivă a căilor de semnalizare din celule. Fosforilarea şi defosforilarea proteinelor de către fosfataze şi kinaze sunt procese componente ale reţelei complexe de semnalizare a proceselor dinamice fin reglate. Fosforilarea proteinelor se traduce frecvent în redistribuţia subcelulară a moleculelor semnalizatoare cheie, care este importantă pentru activitatea lor biologică. Distribuţia spaţială a două proteine cheie în semnalizare în urma fosforilarii, kinaza extracelulară reglată de semnal (Erk) şi MAP kinaza p38, a fost analizată cu anticorpi fosfotirozin-specifici care recunosc numai forma fosforilată a proteinei [Vogt şi colab., 2001]. Expunerea celulelor la un inhibitor al fosfatazei Cdc25 s-a tradus într-o acumulare nucleară dependentă de concentraţie a fosfo-Erk şi fosfo-p38, dar nu şi a factorului nuclear κB (NF-κB). Aceste experimente au aratat că inhibiţia Cdc25 a crescut fosforilarea Erk şi acumularea sa în nucleu, indicând că statusul de fosforilare al Erk este reglat de către fosfataza Cdc25.

Un anticorp fosfo-histonic H3 care ţinteşte situsul de fosforilare Ser10 al histonei H3 şi anticorpul fosfo-histonic H1 au fost utilizaţi pentru a detecta fosforilarea mitogen şi oncogen-stimulată în regiunile nucleozomale mici care sunt sensibile la hiperacetilare [Chadee şi colab., 1999].

Statusurile kinazei active au fost analizate cu un set de anticorpi monoclonali anti-kinazici fosfospecifici. Specificitatea anticorpilor pentru kinaza specifică a fost verificată prin analiza Western blot şi cu inhibitori

specifici pentru kinazele din amonte. Utilizând citometria în flux multiparametrică, Perez şi Nolan (2002) au putut identifica subseturi de limfocite cu ajutorul a patru kinaze intracelulare active.

Această tehnică permite pentru prima data investigarea simultană a diferitelor kinaze active într-o singură celulă. În timp ce această tehnologie poate fi cel mai bine aplicată celulelor în suspensie, microscopia de înaltă capacitate este tehnica cea mai adecvată pentru celulele aderente. În plus, aplicaţiile microscopiei permit analiza distribuţiei spaţiale intracelulare care nu este posibilă prin citometria în flux. Celulele în mitoză sunt caracterizate prin creşterea nucleolinei fosforilate, o proteină nucleară fosforilată în celulele care intra în mitoză. Utilizând un anticorp monoclonal care recunoaşte specific nucleolina fosforilată, Mayer şi colab. (1999) au dezvoltat o analiza de mare capacitate „whole-cell immunoblot".

Componentele care opresc celulele în mitoză prin noile metode de acţiune au putut fi identificate după sortarea componentelor cu o a doua reacţie.

Alte modificări ale proteinelor precum acetilarea pot fi de asemenea detectate cu anticorpi specifici. Organizarea cromatinei active transcripţional şi activitatea acetiltransferazei şi deacetilazei histonelor nucleare au fost investtigate prin utilizarea unui anticorp specific acetil-histonei H3. Componentele care afectează modificările stimulate de ligand în structura cromatinei pot fi cel mai bine scanate cu aceşti anticorpi prin tehnici de imagistică automate.

1.4.2. Anticorpi specifici ţintelor proteice

Multe proteine joacă roluri importante atât în citoplasmă cât şi în nucleu. Deci, ele necesită traficul dintr-un compartiment în altul pentru a-şi îndeplini funcţiile. Exemple tipice sunt factorii de transcripţie citoplasmatici latenţi sau factorii de transport nucleari. Au fost descrise reacţii pentru factorii de transport nuclear care utilizează formarea heterocarionului în asociere cu proteine fluorescente. Traficul factorilor de transcripţie citoplasmatici latenţi în urma activării către nucleu poate fi monitorizat şi cuantificat prin imagistica fluorescentă automată. Translocaţia în nucleu a NF-κB indusă de IL-1 şi de factorul de necroză tumorală α a fost cuantificată cu ajutorul aplicaţiilor tehnnologiei Cellomics ArrayScan II [Ding şi colab, 1998].

Celulele nestimulate conţin NF-κB inactiv distribuit în interiorul citoplasmei care poate fi detectat cu anticorpi specifici pentru NF-κB legaţi la anticorpi secundari marcaţi fluorescent. În celulele stimulate cu IL-1α, cea mai mare parte a NF-κB este activată şi este transportată în nucleu într-o manieră dependentă de moment şi de doză (fig. 1.6 şi 1.7). În urma stimulării de către IL-1α, celulele HeLa au fost analizate cu ajutorul sistemului ArrayScan II utilizând un software specific care permite analiza cantitativă a fluorescenţei în nucleu şi în citoplasma adiacentă. Celulele sunt identificate ca obiecte de către

software prin colorarea nucleară cu Hoechst 33324 sau DAPI şi sunt acoperite pentru măsuratori ale fluorescenţei nucleare şi citoplasmatice (fig 1.8).

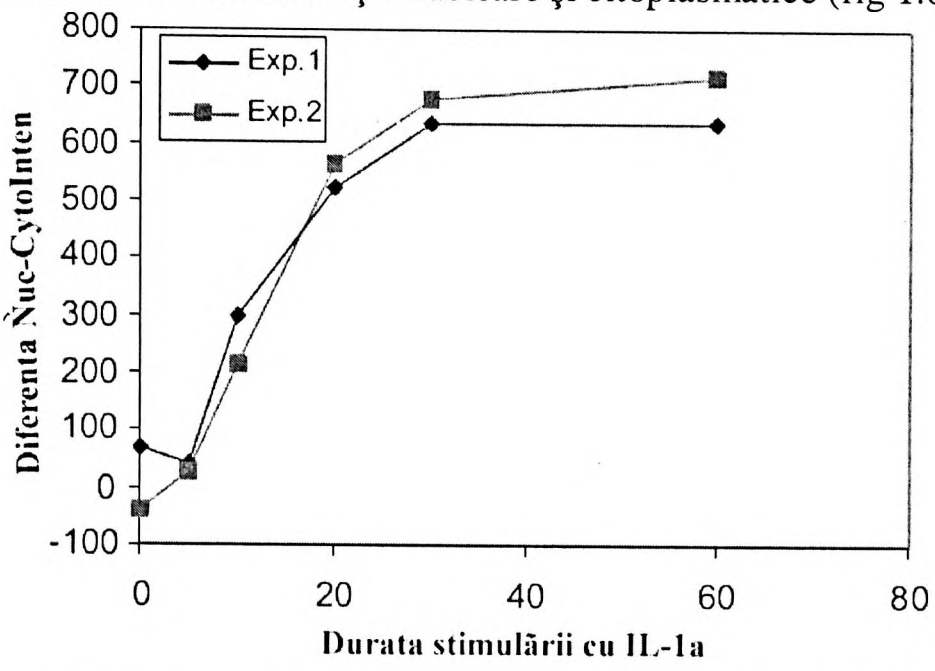


Fig 1.6. Translocaţia nucleară a NF-κB în dinamică. Celulele HeLa au fost stimulate cu 1 ng/ml de IL-1a la 37°C. Sunt reprezentate valorile medii a 100 de celule măsurate în fiecare godeu în două experimente separate (Exp 1 si Exp 2). Nuc-CytoInten = intensitatea fluorescenţei nucleare minus intensitatea fluorescenţei citoplasmatice.

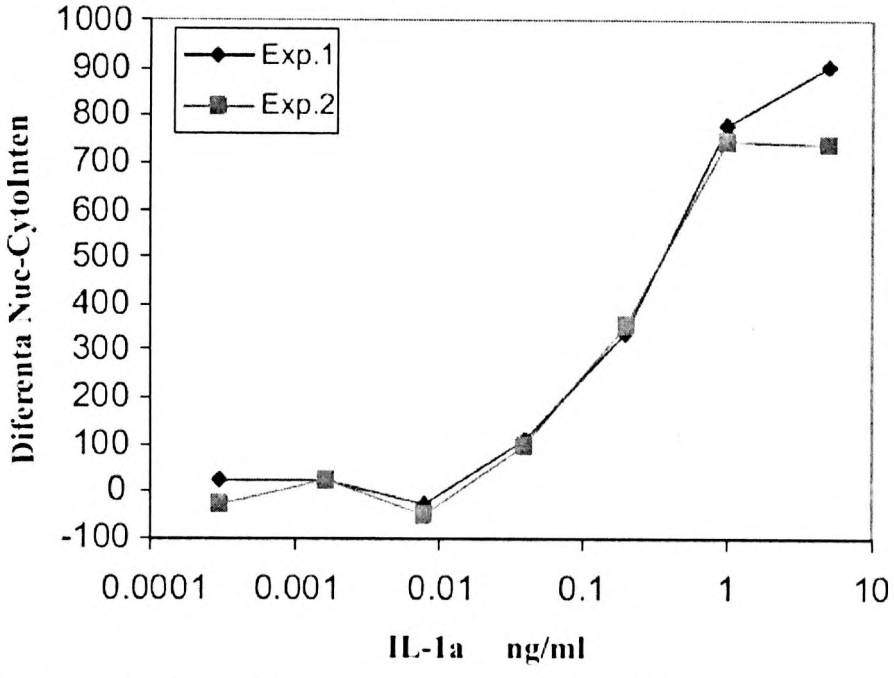


Fig 1.7 Relaţia doză-răspuns a translocaţiei nucleare a NF-κB indusă de IL-1a. Celulele HeLa au fost stimulate cu concentraţiile indicate de IL-1a pentru 30 de minute la 37°C. Sunt reprezentate valorile medii a 100 celule măsurate per godeu în două experimente separate (Exp 1 si Exp 2). Nuc-CytoInten = intensitatea fluorescenţei nucleare minus intensitatea fluorescenţei citoplasmatice

GFP au fost realizate cu spectre de excitaţie şi emisie diferite, incluzând proteina fluorescentă albastră intensificată (eBFP), proteina fluorescentă galbenă intensificată (eYFP) şi proteina fluorescentă azurie intensificată (eCFP). Natura structurilor acestor proteine evaluează aceste proteine ca extrem de stabile şi rezistente la degradare de către majoritatea proteazelor. Acest înalt nivel de stabilitate nu reprezintă în mod necesar un avantaj pentru aplicaţiile celulare.

Dacă se doreşte monitorizarea modificărilor expresiei genice. prin reacţiile reporterilor transcripţiei, este de preferat un reporter cu un timp de înjumătăţire redus. În consecinţă, au fost create forme cu timp de înjumătăţire redus ale eGFP pentru a putea fi utilizate ca proteine reporter ale transcripţiei şi ele sunt denumite proteine eGFP destabilizate. În acelaşi timp, au fost clonate alte proteine fluorescente din nevertebratele marine,cum ar fi proteinele fluorescente din recifurile de corali. Combinaţia variantelor spectrale distincte ale proteinelor fluorescente permite o mare varietate de aplicaţii, precum analiza simultană a cascadelor expresiei mai multor gene sau translocaţia diferitelor proteine.

Măsurarea co-internalizarii β-arestinei legată de GPCR poate fi utilizată pentru monitorizarea activării şi reciclării receptorului. Barak şi colab. (1997) au demonstrate cu ajutorul microscopiei confocale, translocaţia proteinelor de fuziune β-arestina-2- GFP din citoplasma la GPCR ancoraţi la membrană. Acest lucru a fost demonstrate pentru mai mult de 15 GPCR activaţi de ligand în celulele HEK-293. În absenţa activării receptorului, β-arestinele sunt distribuite în citosol şi sunt absente în nucleu. Dupa adăugarea ligandului la celule, proteinele de fuziune β-arestina-2-GFP sunt translocate prin membrana plasmatică şi mai departe prin veziculele de endocitoză. Acumularea proteinelor GFP-ataşate poate fi cuantificată cu ajutorul tehnicilor imagistice fluorescente.

Cu ajutorul proteinei de fuziune β-arestina-2-GFP, se realizează cointernalizarea arestinei cu receptorul 1 al TRH (thyrotropin-releasing hormone) ca răspuns la agonist, reacţia fiind monitorizată şi fotografiată. NORAK Biosciences (Research Triangle Park, NC; www.norakbio.com) explorează mişcarea complexului arestina-GFP sub denumirea de tehnologia Transfluor™ ca o platforma HTS aplicabilă pe scară largă, stabilă, care permite identificarea modulării compuşilor semnalizării prin GPCR.

Internalizarea receptorului şi traficul său au fost explorate prin utilizarea liganzilor marcaţi fluorescent, ca de exemplu ligandul pentru receptorul transferinei [Ghosh şi colab., 2000]. Screening-ul a fost condus cu un sistem ArrayScan II, iar internalizarea şi reciclarea receptorului transferinei cu ligandul legat a putut fi monitorizată şi cuantificată.

Activarea şi internalizarea GPCR a fost monitorizată cu ajutorul proteinelor de fuziune fluorescente GPCR-GFP. Conway şi colab. (1999) au utilizat sistemul de screening ArrayScan pentru a monitoriza internalizarea

receptorului pentru hormonal paratiroid şi receptorului β2-adrenergic după stimularea de către liganzii specifici.

Alte exemple în care a fost utilizată fuziunea cu proteine fluorescente pentru a cuantifica traficul proteinelor includ translocaţia nucleară a calmodulinei sau reglatorul transcripţional legat de membrana după hidroliza fosfoinozitidului.

În alte aplicaţii, domeniile de translocaţie precum domeniul C2 sensibil la Ca^{2+} al protein kinazei Cδ a fost fuzionat cu YFP şi exprimat în celule leucemice de şobolan. Tehnologia „evanescent wave single-cell array" (radiaţii cu scădere exponenţială a intensităţii în funcţie de distanţă) a fost aplicată ca o tehnologie imagistică pentru a monitoriza traficul proteic dupa adiţia factorului activator plachetar.

Analiza simultană a populaţiilor celulare mixte poate fi efectuată prin transfecţia fiecărei linii celulare cu o singură proteină de fuziune fluorescentă. Vectorii BFP şi YFP au fost utilizaţi pentru transfecţia stabilă a două linii diferite de cancer colonic, linia parentală cu gena K-ras mutantă şi o variantă unde gena mutantă a fost deletată. Pentru a realiza screening-ul compuşilor care omoară selectiv numai varianta tumorigenică cu gena mutantă, ambele populaţii au fost amestecate şi testate simultan pentru supravieţuirea celulară utilizând măsurători ale intensităţii fluorescenţei. Au putut fi identificaţi compuşi care afectează preferenţial celulele cu alela ras mutantă.

1.4.4. Fluorescență cu transfer de energie prin rezonanță (FRET)

FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) a devenit o metodă utilizată frecvent pentru studiul dinamicii proteinelor în celule. FRET este bazată pe transferul energiei absorbite de o moleculă fluorescentă la o altă moleculă, determinând excitarea celei de-a două molecule. Pentru a realiza FRET, cele două molecule fluorescente cu spectre diferite de excitaţie/emisie trebuie sa fie într-o strânsă proximitate. Cea mai generală strategie pentru crearea unor astfel de indicatori este interpunerea domeniului de interes sensibil conformaţional între două mutante GFP. În cazul legării ligandului sau al modificării domeniului, cele două jumătăţi fluorescente se găsesc în strânsă proximitate, ceea ce permite realizarea FRET.

Într-un studiu de pionierat, Mahajan şi colab. (1998) au utilizat construcţii plasmidice care au exprimat proteinele de fuziune GFP-Bax şi BFP-Bcl-2. Bax şi Bcl-2 sunt doi modulatori cheie ai apoptozei, dar interacţiunea lor directă nu fusese niciodată demonstrată la nivel celular. Pe baza FRET s-a evidenţiat interacţiunea directă a celor două proteine la nivelul mitocondriei .

FRET a fost de asemenea aplicată pentru a determina activităţile kinazei în celule vii. Pentru acest scop, au fost creaţi reporteri constând din fuziunea CFP, un domeniu de legare a fosfo-aminoacizilor, un substrat de consens pentru kinaza de interes şi YFP. În celulele transfectate cu reporteri şi

stimulate pentru activitatea particulară a kinazei, proteina de fuziune după fosforilare a suferit modificări conformaţionale şi a permis realizarea FRET între YFP şi CFP. Modificarea raportului între emisia galbenă şi azurie a putut fi cuantificată şi determinată temporal şi spaţial. Aceasta tehnologie a fost aplicată cu succes pentru protein kinaza A şi cele trei tirozin kinaze Abl, Scr şi receptorul EGF.

Într-o abordare similară, Honda şi colab. (2001) au utilizat un indicator fluorescent codificat genetic pentru a investiga dinamica GMPc în celule individuale. Indicatorul GMPc a fost construit din mutanţi cu deleţii ai protein kinazei GMPc dependente între mutanţii galben şi azuriu ai GFP. Legarea GMPc la indicatorul proteinei de fuziune a alterat FRET dar şi raportul între emisia galbenă şi azurie, care a fost selectiv peste AMPc. Prin utilizarea acestei metode, dinamica temporală şi spaţială a nivelelor de GMPc intracelular în fibroblastele plămânului fetal de şobolan şi în neuronii Purkinje a fost monitorizată în urma adăugării diferiţilor stimuli. De asemenea au fost studiaţi senzori similari pentru AMPc .

Senzorii bazaţi pe FRET au fost de asemenea utilizati pentru a demonstra comportamentul spaţio-temporal al proteinelor de legare a GTB în urma stimulării celulare cu factori de creştere. A fost creată o proteină de fuziune ce cuprinde H-Ras, domeniul de legare al Ras la Raf şi a fost flancată de o pereche de mutanţi galben şi azuriu ai GFP. H-Ras a fost înlocuită în cea de-a doua construcţie cu proteina analoagă Rap1. Activarea căii Ras/Rap de către factorii de creştere a indus FRET. Localizarea spaţio-temporală a proteinei de fuziune a indicat că stimularea de către EGF a celulelor COS-1 a activat Ras la nivelul membranei plasmatice, iar Rap la nivelul regiunii perinucleare. În plus, acest studiu a demonstrat că factorii de creştere activează numai o subpopulaţie a Ras şi Rap şi numai la nivelul unor arii restrânse din celulă. Această tehnologie în combinaţie cu imagistica celulară va creşte sensibilitatea şi va facilita abordările HTS celulare pentru evenimente specifice ale semnalizării celulare.

1.4.5. Activarea GPCR prin bioluminiscența cu transfer de energie prin rezonanță (BRET)

BRET (Bioluminiscence Resonance Energy Transfer) este un fenomen care apare în mod natural. Peştele cartilaginos A. victoria sau Renilla reniformes produc fluorescenţa verde prin BRET. În cazul anterior al emisiei de lumină albastră, aequorina se asociază cu GFP, în timp ce în ultimul caz, energia generată în urma degradării coelanterazinei de către luciferază este transferată către GFP. Acest transfer apare numai în cazul în care luciferaza şi GFP formează un heterodimer. BRET a fost utilizat pentru a demonstra interacţiunea proteinelor ceasului circadian de la cianobacteriile exprimate în E.

coli. Mai recent, BRET a fost aplicată pentru studiul activarii GPCR de câteva grupuri de cercetatori [Angers şi colab., 2000].

Pentru a demonstra dimerizarea receptorului β2-adrenergic (β2-AR), construcţiile β2AR-Renilla luciferaza şi β2AR-GFP supus efectului Doppler (redshift) (YFP) au fost co-exprimate în celulele HEK-293. Apariţia BRET a fost un indicator al dimerizării receptorului. În acelaşi studiu, β-arestina, cunoscută a se asocia cu domeniul intracelular al receptorilor cuplaţi cu proteina G activaţi, a fost exprimată ca o construcţie arestina-YFP împreună cu luciferaza-β2AR-Renilla. A fost prezentă BRET între două proteine, dar a fost în totalitate dependentă după activarea receptorului, indicând asocierea arestinei cu domeniul intracelular al β2AR în starea activă a receptorului. Aceasta reacţie a fost dezvoltată ca o tehnologie pentru HTS de către PerkinElmer Life Sciences.

1.4.6. Teste de detecţie prin complementaritate a fragmentelor proteice (Protein Fragment Complementation Assays - PCA)

Metodele descrise anterior pentru studiul interacţiunilor proteină-proteină sunt asociate cu unele neajunsuri. Dublul sistem al drojdiilor este bazat pe transcripţie, care necesită disponibilitatea proteinelor în nucleu. În FRET, proteinele fluorescente trebuie să fie exprimate în celule la nivele relativ înalte şi interacţiunea trebuie sa aibă loc într-un asemenea mod încât proteinele să fie în strânsă proximitate pentru a permite transferul energiei.

Complementarea enzimelor şi utilizarea PCA în studiul interacţiunilor proteină-proteină a fost dezvoltată pentru β-galactozidaza la E. coli, dihidrofolat reductaza (DHFR) şi mai recent pentru β-lactamaza. În cazul β-galactozidazei, doi mutanţi cu deleţii, complementari sunt fuzionaţi cu două proteine pentru a proba interacţiunea. Numai în cazul în care cele două proteine interacţionează ele sunt cele două părţi ale galactozidazei forţate să se completeze una pe cealaltă şi să exercite activitate enzimatică. Sistemul a fost dezvoltat pentru demonstrarea interacţiunii FRAP şi FKBP12 în prezenţa rapamicinei.

Mai recent, complementarea β-galactozidazei a fost utilizată pentru a crea sisteme HTS pentru screening-ul antagoniştilor dimerizării EGF-R mediată de către EGF. Pentru acest scop, mutanţii cu deleţii complementari ai β-galactozidazei au fost fuzionaţi cu domeniile intracelulare ale EGF-R şi cotransfectate în mioblaste de şoarece C2C12. Activitatea enzimei a fost reconstruită în urma adăugării EGF la celulele din cultură. Cu ajutorul acestei reacţii, adaptată la un format cu 384 de godeuri, modulatorii cu molecule mici primar identificaţi în reacţia EGF-R au fost supuşi screening-ului pentru specificitate cu doi mutanţi cu deleţii complementari ai β-galactozidazei fuzionaţi cu β2-adrenoreceptorul şi β-arestina umană. Prin utilizarea reactivilor chemiluminiscenţi şi a galactozidazei fluorescente, această tehnică permite măsurarea interacţiunilor proteină-proteină în celulele vii pentru aplicaţii HTS.

Reasamblarea DHFR activ din fragmente create raţional a fost realizată de către Pelletier şi colab. (1998) într-un sistem procariot. DHFR a E. coli este inhibată selectiv de către antifolatul trimetoprim. DHFR murin poate salva celulele E. coli. Fragmentele complementare ale DHFR murin fuzionate cu proteine homo- sau heterodimerizate au fost utilizate pentru a transforma E. coli crescute într-un mediu cu trimetoprim. Supravieţuirea a fost considerată ca o măsură pentru interacţiunile proteice şi complementarea enzimei. În alt studiu, partenerii proteici fuzionaţi pentru complementarea fragmentelor DHFR murin au fost introduşi în celule de mamifere DHFR-negative crescute în absenţa nucleotidelor. Celulele în care proteinele se asociază şi DHFR poate complementa sunt capabile să supravieţuiască în aceste condiţii. Ca o alternativă, interacţiunea proteică şi complementarea DHFR pot fi monitorizate prin adăugarea de metotrexat conjugat cu fluoresceină. Metotrexatul se leagă la DHFR numai în condiţiile co-exprimării şi reasamblării fragmentelor complementare. Semnalele fluorescente pot fi monitorizate prin microscopie fluorescentă FACS sau prin metode spectroscopice utilizate în HTS. Complexul FKBP-rapamicina-FRAP şi activarea receptorului pentru eritropoietină au fost utilizate ca sisteme model [Remy, Michnick, 1999].

Mai recent, reacţia PCA-DHFR a fost utilizată pentru a analiza totalitatea reţelelor biochimice în celule vii. Celulele ce exprimă perechi de proteine asociate au fost selectate şi metotrexatul conjugat cu fluoresceina, care se leagă la DHFR reconstituit a fost aplicat pentru a localiza partenerii proteici interacţionaţi şi pentru a studia inhibitorii care previn interacţiunea. Aceeaşi metodă a fost utilizată cu success pentru protoplastele plantelor care exprimă fragmente complementare ale DHFR fuzionate cu proteinele interacţionate.

Legarea metotrexatului conjugat cu fluoresceina ca o măsură a interacţiunii proteină-proteină a fost monitorizată prin microscopie fluorescentă [Subramaniam şi colab., 2001].

1.5. Analizele fenotipice

1.5.1 Proliferarea/Respiraţia/Toxicitatea

Multe reacţii pentru citotoxicitate şi proliferare se bazează pe măsurarea radioactivităţii şi măsurarea încorporării nucleotidelor marcate radioactiv precum [H^3] timidina în ADN-ul celular. Deşi foarte sensibilă, reacţia ce utilizează [H^3] timidina este relativ costisitoare şi consumatoare de timp şi presupune manipularea şi înlăturarea deşeurilor radioactive. Alte reacţii de citotoxicitate, precum MTT [3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5difeniltetrazolium bromide], Alamar Blue, lactat dehidrogenaza şi conţinutul de ATP, necesită adiţia unor reactivi specifici pentru generarea semnalului.

Dintre aceste tehnici, cea mai utilizată este MTT. Această sare de tetrazoliun este redusă în interiorul mitocondriilor celulelor pentru a forma un precipitat colorat formazan. Utilitatea MTT este limitată de faptul că poate fi susceptibilă la interferenţa cu medicamentele, fie prin reacţia cu grupările reducătoare ale medicamentelor, fie prin difuzarea absorbanţei ce rezultă din precipitarea în spectrul vizibil a luminii absorbite de medicamente. Măsurarea viabilităţii celulare prin reacţia MTT se bazează pe reacţia sa cu succinat dehidrogenaza mitocondrială, care poate ea însăşi să perturbe celulele. Mai mult, testul în sine nu este reversibil şi, datorită faptului că se realizează o citire la finalul reacţiei, citirea pentru fiecare moment necesită o reacţie separată. Trebuie notat faptul că reacţiile de toxicitate şi proliferare sunt utilizate atât separat şi independent una faţă de cealaltă, cât şi în combinaţie.

Combinaţia ambelor reacţii permite o investigare detaliată a efectelor compuşilor asupra unei linii celulare particulare. Reacţiile omogene şi reversibile sunt în mod considerabil necesare. Sistemul Oxygen Biosensor System (OBS™; BD Biosciences, Bedford, MA) poate fi privit că un prototip reprezentativ. În acest sistem nu este necesară adăugarea niciunui reactiv pentru generarea semnalului.

OBS este o reacţie realizată într-o microplacă care permite monitorizarea cinetică a oxigenului dizolvat. Colorantul sensibil la oxigen este învelit cu o matrice de silicon care este permanent ataşată de baza fiecarui godeu al microplăcii. Matricea permeabilă pentru gaze permite oxigenului din vecinătatea colorantului să fie în echilibru cu oxigenul din mediul lichid. Oxigenul atenuează capacitatea colorantului de a emite fluorescenţa într-o manieră predictibilă, dependentă de concentraţie. Prin urmare, pe măsură ce oxigenul este depletat din godeu (celulele consumă oxigenul din mediul înconjurator pe măsură ce cresc), concentraţia oxigenului în matrice descreşte şi fluorescenţa creşte. Nivelul fluorescenţei se corelează direct cu consumul de oxigen din godeu. Consumul de oxigen este în legatură directă cu numărul sau viabilitatea relativă a celulelor din fiecare godeu. Orice reacţie care poate fi legată de consumul sau generarea de oxigen poate fi potenţial măsurată de către acest system (fig. 1.9). Semnalul este dinamic şi este citit în timp real. Probele pot fi citite oricât de frecvent şi de câte ori se doreşte. Semnalul este complet reversibil şi va creşte pe măsură ce celulele proliferează şi va descreşte pe măsură ce celulele mor, oferind o imagine completă a cineticii proliferării şi toxicităţii.

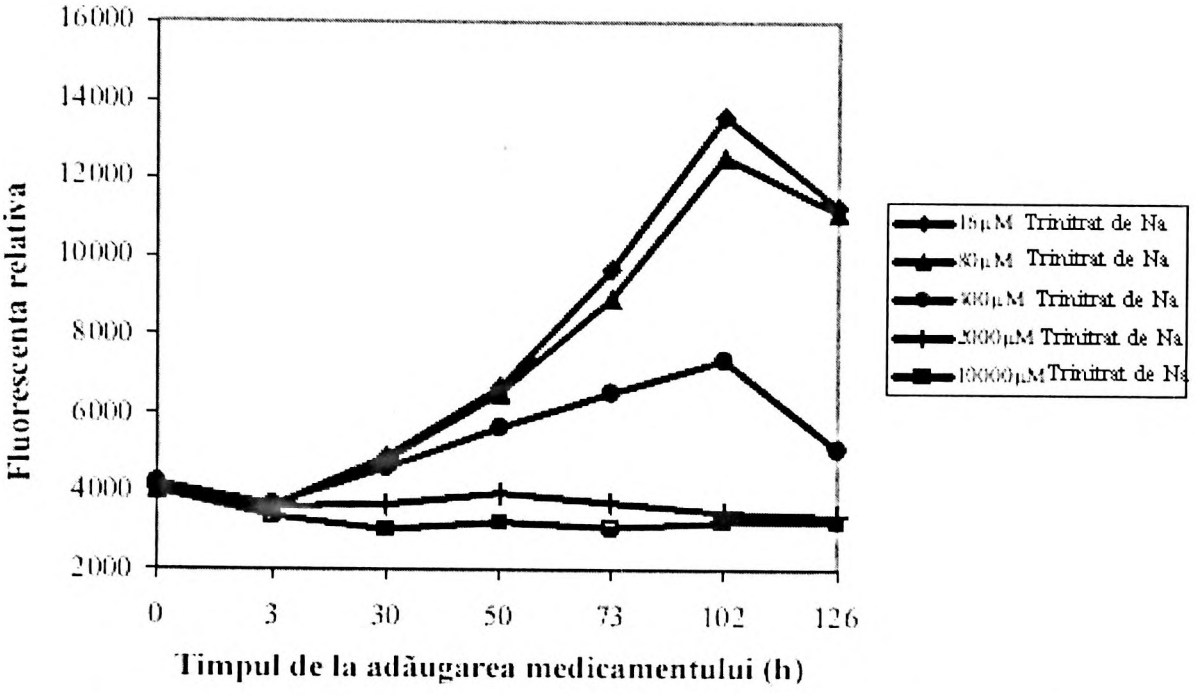


Fig 1.9. Consumul de oxigen de către celulele HeLa în urma expunerii la trinitrat de sodiu. Celulele ($1x10^5$), au fost adăugate în godeuri separate ale unei plăci cu biosenzori pentru oxigen şi tratate cu trinitrat de sodiu în concentraţiile indicate. Celulele au fost cultivate şi fluorescenţa a fost măsurată la momentele indicate. Concentraţiile micromolare mici ale trinitratului nu au influenţat creşterea celulelor HeLa. În schimb, concentraţiile micromolare ale trinitratului de Na sunt toxice şi fluorescenţa relativă este menţinută la un nivel constant. Descreşterea consumului de oxigen la 126 de ore după adăugarea medicamentului indică faptul că celulele au confluat şi au încetat să prolifereze.

1.5.2. Apoptoza

Apoptoza, sau moartea celulară programată, este unul dintre cele mai complexe procese celulare. Evenimentele timpurii şi tardive care apar în celulele supuse apoptozei cuprind activarea diferitelor caspaze, modificări ale citoscheletului, modificări ale potenţialului membranei mitocondriale şi a masei mitocondriale, condensarea sau fragmentarea nucleară, mişcarea de *flip* a fosfatidilserinei pe faţa externă a membranei celulare şi dezorganizarea membranei plasmatice.

Modificări ale morfologiei nucleare, reorganizarea actinei şi a potenţialului şi conţinutului mitocondriei pot fi detectate şi cuantificate prin analiza multiparametrică a apoptozei [Woo şi colab., 1999]. Mărirea sau îngustarea ariei nucleare şi distribuţia cromatinei în interiorul nucleului este analizată prin colorarea celulelor cu un colorant ADN fluorescent, precum DAPI sau Hoechst 33342.

Gruparea filamentelor intracelulare de actină F şi mărirea conţinutului în actină a celulelor apoptotice sunt detectate cu ajutorul faloidinei fluorescente.

Această falotoxină, izolată din ciuperca Amanita phalloides, se leagă foarte înalt specific la actina F şi poate fi marcată cu un colorant fluorescent. Cu toate acestea, creşterea conţinutului de actina F nu este observată în toate cazurile în celulele apoptotice, depinzând de tipul de celulă sau de inducator.

Colorantul cationic specific mitocondriilor, Mitotracker^{R} Red, care se acumulează în mitocondriile active, este utilizat pentru a estima potenţialul membranar şi conţinutul mitocondrial [Camilleri-Broet şi colab., 1998]. În ambele cazuri, cantitatea de colorant de la nivelul mitocondriei este o masură a nivelului apoptozei. În cazul aplicaţiei multiparametrice a apoptozei, algoritmul ArrayScan II nu numai că cuantifică marcajul, dar ia în considerare distribuţia colorantului fluorescent în compartimentele celulare şi calculează fragmentarea nucleară şi creşterea conţinutului mitocondial. Acest algoritm a fost aplicat cu succes în detecţia apoptozei induse de anumiţi compuşi şi poate fi utilizat pentru HTS.

1.5.3. Diferenţierea

Celulele stem umane de diferite tipuri au capacitatea de a se diferenţia într-un număr de tipuri de celule mature. Asemenea celule stem fiind în mod curent utilizate în transplantul de măduvă osoasă şi în cercetarea medicamentelor. Noi medicamente, precum factorul stimulator al coloniilor de granulocite şi eritropoietina au fost create pentru a acţiona direct asupra acestor celule, fiind esenţiale pentru succesul transplantului de maduvă osoasă. Expansiunea progenitorilor din maduva osoasă este extrem de sensibilă la o varietate de chimioterapice şi alţi agenti toxici. În unele cazuri, efectele adverse toxice ale medicamentelor sunt specifice pentru liniile hematopoietice.

În trecut, utilizarea progenitorilor hematopoietici pentru descoperirea medicamentelor pe baza analizelor de mare capacitate şi screening-ul toxicologic era limitată de disponibilitatea ţesutului. Ţinând seama de disponibilitatea actuală a progenitorilor hematopoietici umani de înaltă calitate, impasul curent îl constituie utilizarea acestor celule în reacţiile fenotipurilor lor de diferenţiere. Cea mai utilizată reacţie *in vitro* pentru a determina răspunsul diferenţierii celulelor progenitoare hematopoietice este reacţia coloniei [Eaves, 1995]. Această reacţie utilizează populaţii progenitoare selectate din măduva osoasă umană, cordonul ombilical sau sângele periferic mobilizat în reacţii clonogenice într-un mediu semisolid. După o perioadă de 14 zile apar colonii ale diferitelor tipuri de celule sanguine diferenţiate care sunt numărate manual. Diferite tipuri de colonii sunt identificate datorită morfologiei lor (mieloide sau eritroide) sau prin tehnici de colorare citochimică (megacariocite). Deşi parametrii acestei reacţii au fost optimizaţi pentru a obţine date cantitative, rezultatele extrem de reduse şi natura subiectivă a acestei reacţii determină anumite probleme atunci când reacţia este utilizată pentru screening-ul

bibliotecii de compuşi chimici, descoperirea iniţiala a medicamentelor şi screening-ul toxicităţii prin analize de mare capacitate.

Răspunsuri diferenţiate pot fi obţinute şi prin transfecţia unei celule ţintă cu o genă pentru un receptor legată de expresia unui marker specific de diferenţiere. Aceasta necesită transfecţia unei celule ce conţine cascade de transducţie a semnalului caracteristice progenitorilor hematopoietici intacţi.

O altă abordare a fost descrisă de Warren şi colab. (1995). Autorii au descris o imunoreacţie celulară în care celulele sunt transferate într-o placă de reacţie tratată cu fixator, şi fixate anterior incubării cu anticorpii primari şi secundari. Deşi această reacţie a fost utilizată cu succes, transferul celulelor din placa de cultură în placa de reacţie este consumator de timp şi nu este justificabil pentru HTS. Recent, această reacţie a fost revizuită şi îmbunătăţită de către Greenwalt şi colab. (2001) pentru a reduce numărul de manipulări necesare. La finalul perioadei de cultură, supernatantul culturii celulare este îndepărtat prin filtrare prin vacuum şi este adăugat un anticorp specific. Pentru a obţine sensibilitatea dorită, anticorpii monoclonali au fost conjugaţi cu un chelat de europium DELFIA. Pe lângă sensibilitate, emisia relativ lungă a chelatului de europium DELFIA a permis utilizarea TRF (time-resolved fluorescence) pentru a preveni fluorescenţa fundalului endogen care este deseori o problemă semnificativă în analizele biologice. Îndepărtarea supernatantului culturii, a anticorpilor nelegaţi şi etape ulterioare de spălare sunt realizate într-o placă cu filtru cu 96 de godeuri. Deoarece este prezentă numai o contaminare redusă de la un ciclu de spălare la altul, îndepărtarea anticorpului nelegat este foarte eficientă. Sunt posibile spălari repetate fără pierderea celulelor. Pentru detecţia semnalului, a fost adăugată o soluţie de intensificare şi fluorescenţa europiului (excitare la 340 nm şi emisie la 615 nm) şi a fost măsurată cu ajutorul unui spectrofluorometru după o perioadă de 400 μs după întârzierea iniţială de 400 μs.

1.5.4. Monitorizarea metabolismului cellular

Determinarea directă a metaboliţilor la nivel celular sau *in vivo* oferă un system sensibil pentru evaluarea acţiunii medicamentului deoarece metaboliţii reprezintă produşii finali ai proceselor reglatoare celulare. În plus, metaboliţii celulari sunt în general mult mai puţin abundenţi decât proteinele. În mediul celular, transducţia semnalului, iniţierea expresiei genice, sinteza proteinelor şi răspunsurile metabolice la stres trebuie să fie secvenţiale. În ultimii ani s-au dezvoltat domeniile metabolomicii, care investighează reglarea metabolică şi fluxurile celulelor individuale sau tipurilor de celule, şi metabonomicii, care determină profilurile biochimice sistemice şi reglarea funcţiei în organismul ca întreg prin analiza fluidelor biologice şi a ţesuturilor [Nicholson şi colab., 2002].

Studiul efectelor adverse ale medicamentelor asupra celulelor sau a întregului organism prin metabonomică se bazează pe măsurători multipara-

metrice ale alterărilor metabolice în timp, ca răspuns la un factor de stres. Probele sunt cartografiate în funcţie de compoziţia lor biochimică [Nicholson şi colab., 1999].

Metaboliţii s-au dovedit extrem de utili în caracterizarea fenotipurilor mutante, aşa cum s-a aratat recent la plante [Fiehn, 2002] şi în caracterizarea aşa-numitor mutaţii silenţioase la drojdii [Raamsdonk şi colab., 2000]. Multe gene sunt silenţioase, ceea ce înseamnă că dacă suferă o mutaţie, ele nu conduc la modificări fenotipice uşor observabile, precum alterări ale ratei de creştere. Rata de creştere poate să nu fie modificată deoarece concentraţiile diferiţilor metaboliţi intracelulari sunt adaptate într-un mod care compensează efectul mutaţiei. Corespunzător, analize metabolomice pot releva un fenotip al metaboliţilor anterior considerat ca silenţios. În plus, cuantificarea modificărilor relative ale concentraţiei metaboliţilor cauzată de o mutaţie face posibilă identificarea unui situs de acţiune al produsului genic alterat, după cum a demonstrat Raamsdonk şi colab. (2000). Prin utilizarea aplicaţiilor rezonanţei magnetice nucleare sau spectrometriei de masă (MS)/cromatografia lichidă/MS, este posibilă analiza de mare capacitate. Aceasta va permite utilizarea analizelor metabolomice şi metabonomice în descoperirea medicamentelor ca o estimare sensibilă a acţiunii medicamentelor [Nicholson şi colab., 2002].

O abordare nouă, care permite analiza statusului metabolic în celule intacte, este analiza funcţională a celulelor vii în medii controlate fiziologic pe perioade mari de timp (biochip-uri). Eforturile sunt direcţionate către dezvoltarea, adaptarea şi integrarea senzorilor microelectronici în biochip-uri miniaturizate pentru monitorizarea celulară multiparametrică („Cell Monitoring System"). Unele dintre citirile posibile ale activităţilor celulare corespunzatoare sunt sumarizate în tabelul 1.4.

Monitorizarea schimburilor oxigenului celular poate fi utilizată pentru evaluarea activităţii mitocondriale. Mitocondria, pe lângă faptul că furnizează energie celulei, se presupune că este implicată şi în îmbătrânirea celulară accelerată datorată speciilor reactive de oxigen (ROS), în apoptoză şi mecanismele toxice ale multor medicamente. Monitorizarea activităţii mitocondriale prin coloranţi lipofilici precum rodamina 123 prezintă riscul unor potenţiale artefacte şi deci, tehnicile non-toxice şi neinvazive sunt în mod particular valoroase.

OBS a fost descrisă mai sus ca una dintre primele tehnici neinvazive pentru monitorizarea consumului de oxigen. O limitare a OBS este determinată de necesitatea unui număr mare de celule. Sistemul necesită cel puţin 50000 de celule în fiecare godeu pentru a produce rezultate viabile (un număr mai mic de celule nu consumă suficient oxigen pentru a compensa difuzia oxigenului din mediul exterior la biosenzor). Comparativ, tehnologiile bazate pe microsenzori permit, în condiţii ideale, înregistrarea semnalelor de la o singură celulă.

Înregistrarea pH-ului bazată pe microsenzori este predominant utilizată pentru determinarea ratelor de acidifiere extracelulare. Câteva căi metabolice contribuie la acidifierea celulară şi, astfel, pot fi privite ca un indicator global al

activităţii metabolice. În acest sens, modificările rapide (minute) tind să reflecte evenimentele activării celulare (semnalizarea mediată de receptor), pe când modificarile lente (ore) sunt de obicei atribuite creşterii sau morţii celulare.

Monitorizarea adeziunii celulare (metastazele tumorale) sau a creşterii spre exterior (neurite) poate fi obţinută prin creşterea celulelor plasate direct pe perechi de electrozi interdigitaţi. Semnalul impedanţei celulare rezultă din izolarea prin membranele celulare. Dacă celulele sunt plasate pe electrozi, ele blochează fluxul curentului într-un mod pasiv şi astfel impedanţa creşte. Astfel, impedanţa unui system oferă o privire asupra comportamentului de adeziune al celulelor.

Această metodologie se bazează pe achiziţia datelor utilizând dispozitive multiparametrice cu microsenzori. Un sistem de fluide pentru suplimentarea mediului de cultură/soluţiei de medicamente şi pentru realizarea măsurătorilor metabolice este conectat la chip. De asemenea este necesară menţinerea precisă a condiţiilor micromediului *in vitro*. Parametrii celulari răspunzători de citirea chip-urilor cu senzori sunt activitatea metabolică (ratele acidificării extracelulare şi respiraţiei celulare), proprietăţile morfologice şi unele fluxuri ionice. Chip-urile cu senzor la scară mică necesită cantităţi foarte mici ale probei celulare. Au fost dezvoltate metode care permit testarea unui număr mare de compuşi, iar formatul în plăci cu 96 de godeuri ar putea deveni disponibil în curând.

Citirea	Activitatea celulară corespunzatoare
Modificări ale nivelului de oxigen	activitate mitocondrială (metabolism energetic, îmbătrânire celulară, apoptoză)
Acidifierea mediului	indicator global pentru activitatea metabolică; modificări rapide: activări celulare; modificări lente: creştere sau moarte celulară
Modificari ale impedanţei	adeziune celulară: ataşarea la matrix, metastaze tumorale; excrescenţe celulare: diferenţierea neuritelor
Fluxul ionic	influx sau eflux de Ca^{2+}, Na^{+}, K^{+}
Metaboliţi	preluarea glucozei, excreţia lactatului
Emisia de lumină	inducţia expresiei genei reporter cuplată cu generarea de bioluminiscenţă

Tabelul 1.4. Citirile pentru sistemele multiparametrice de monitorizare a activităţii celulare

1.5.5. Alte reacții fenotipice

Datorită unor limitări ale tehnologiilor existente actual, se înregistrează o creştere a necesităţilor pentru observaţii în timp real, fără compuşi marcanţi ai proteinelor şi celulelor în condiţii naturale (neperturbate). Un dezavantaj major al tehnologiilor actuale este necesitatea marcării şi supraexpresiei proteinei de interes. Datorită supraexpresiei şi modificării, activitatea biochimică a proteinei şi localizarea sa pot să nu reflecte condiţiile naturale (neperturbate) şi de aceea rezultatele trebuie interpretate cu precauţie. O tehnologie care se adresează acestei probleme utilizează unde de radiofrecvenţă [Hefti, Kumar, 1999] pentru a proba statusul fiziologic al unei proteine în contextul celulei că întreg. MCS utilizează microunde, care corespund frecvenţei naturale a dinamicii proteice, permiţând măsurarea proprietăţilor electrodinamice ale proteinelor şi celulelor. MCS nu permite utilizarea nici unor adaosuri sau markeri şi poate fi realizată în orice mediu, de la soluţii apoase simple la mixturi foarte complexe (celule), permiţând o abordare directă pentru determinarea modificărilor în fenotipul celular (diferenţiere).

Proteinele izolate în soluţii tampon fiziologice expuse la o serie de frecvenţe ale microundelor, demonstrează două proprietăţi: răspunsul spectral („semnătura" proteinelor) şi profilul biofizic. Prima proprietate determină un răspuns natural al fiecarei proteine într-un interval de frecvenţe. Profilul biofizic descrie modul în care o proteină interacţionează cu mediul – volumul molecular, complexarea cu apa, interacţiunea cu alţi compuşi/proteine – precum şi modul în care se compară cu alte proteine aparţinând unor clase similare. Prin scanarea unui interval de frecvenţe şi evaluarea diferitelor medii (condiţiile de tamponare, prezenţa cofactorilor), această analiză defineşte o „semnătură" multidimensională pentru fiecare proteină chiar şi în medii complexe (celulare). Aceasta ar putea permite dezvoltarea unor reacţii „cellbased" prin care profilul biofizic al proteinelor ţintă să poată fi analizat într-un mediu care mimează situaţia din ţesuturile primare afectate de boală.

CAPITOLUL 2
IMPLICAREA GENELOR KNOCKOUT ÎN ÎNȚELEGEREA MECANISMELOR BOLII ȘI DEZVOLTAREA UNOR NOI STRATEGII TERAPEUTICE

2.1. Introducere

Lezarea genelor ţintă la şoareci reprezintă a nouă tehnologie care revoluţionează cercetarea biomedicală, constituind un puternic instrument pentru producerea modelelor animale pentru studiul dezvoltării umane şi a bolilor ereditare. Chiar dacă proiectul genomului uman a ajutat la stabilirea celor aproximativ 35000 de gene candidate, doar o mică parte din aceste gene au fost caracterizate précis pentru funcţia lor *in vivo*.

Genele ţintă au un mare impact în încercările de a elucida rolul funcţional al acestor gene. Beneficiul major al acestei tehnologii este acela de a permite analiza funcţiei proteinei produsă de o anumită genă *in vivo*. Astfel funcţia genei poate fi determinată în toate tipurile de celule normale, luând în considerare şi interacţiunile complexe între molecule sau celule. Este astfel posibilă determinarea produsului genei în condiţii de repaus al corpului, dar şi în diferite situaţii patologice şi fiziologice.

Multe modele de gene knockout la şoareci simulează fenotipul bolilor umane. Modelele de şoareci modificate genetic reprezintă oportunităţi unice pentru dezvoltarea şi testarea diferitelor strategii terapeutice înainte ca acestea să fie introduse în clinică.

În viitor, ingineria genetică pe modele animale va fi indispensabilă pentru realizarea unor descoperiri importante în ceea ce priveşte mecanismele moleculare care stau la baza semnalizării celulare, dezvoltării, dar şi a patogenezei, diagnosticului, prevenirii şi tratamentul bolilor.

2.2. Gene knockout la șoareci

Modelele animale sunt deosebit importante pentru cercetarea biomedicală deoarece ajută la întelegerea patogenezei bolilor şi permit dezvoltarea de strategii terapeutice care să permită studiul eficacităţii noilor tratamente cu consecinţe asupra costului şi timpului alocat trialurilor clinice [Malakoff, 2000; Smithies, 1993]. În unele cazuri, lipsa de modele animale a împiedicat progresul în direcţia dezvoltării de terapii eficiente pentru bolile

genetice. Şoarecii de laborator au devenit rapid cele mai utilizate mamifere în biomedicină datorită dimensiunilor reduse, ciclului de reproducere scurt, informaţiei lor genetice cunoscute şi mai ales datorită posibilităţii de a induce modificări genetice precise în celulele stem embrionare şi de a le transfera la linii de şoareci. Prin urmare manipularea genetică a şoarecilor este actualmente larg răspândită, şoarecii fiind utilizaţi ca modele animale ce ne ajută să înţelegem dezvoltarea, prevenirea şi tratamentul bolilor. Multe alte specii ca Drosophila [Gloor, 2001], viermele nematod Caenorhabditis elegans [Jorgensen, Mango, 2002] şi peştele zebră [Udvadia, Linney, 2003] au fost utilizaţi în experimente de mutageneză pentru studiul proceselor de dezvoltare şi transducţie a semnalelor.

Dintre mamifere şoarecii s-au dovedit a fi cele mai bune modele animale, deoarece ei sunt capabili să mimeze fenotipic bolile şi afecţiunile umane. Motivul pentru generarea de gene knockout la şoareci purtători de gene inactivate sau mutante, este de cele mai multe ori bazat pe supoziţii sau necunoaşterea funcţiilor proteinei codificate de gena candidată, modelului ei de expresie, studiilor farmacologice sau a locilor cromozomiali implicaţi, în cohortele de pacienţi din cadrul studiului. În urma publicării schiţei genomului uman, mulţi cercetători au adoptat strategii pe şoareci knockout pentru a contura, *in vivo*, funcţiile genelor de interes şi implicarea lor fiziopatologică în producerea bolilor. Procesul de dezvoltare a şoarecilor knockout cu o genă modificată începe de la ADN-ul genei. Dacă secvenţa de nucleotide a genei sau un fragment mare din genă este necunoscut, nu se poate realiza designul vectorilor ţintă. ADN-ul celor mai mulţi şoareci poate fi obţinut din bazele de date ce conţin bioinformaţii despre ADNul din genomul şoarecilor, proiect care a fost 60 completat cu succes în 2002 [Blake JA şi colab., 2003]. Informaţiile despre ADN-ul genelor permit construirea de vectori ţintă care oferă posibilitatea de manipulare a genomului celulelor stem embrionare şi de inducţie a unor alterări în gena de interes.

2.2.1. Celulele stem embrionare

În anii 60 după ce primele experimente de deleţie genică au fost efectuate în celulele stem embrionare (ES) ale murinelor [Thomas şi colab., 1987], s-a obţinut un număr remarcabil de şoareci knockout. O condiţie obligatorie pentru realizarea acestui obiectiv a fost posibilitatea de obţinere a murinelor. Celulele embrionare au caracteristici ce le face uşor de cultivat. Celulele ES sunt linii de culturi celulare, colectate iniţial din masa celulară internă a blastociştilor la 3,5 zile postcoitus la stadiul blastulă de dezvoltare (fig. 2.1.).

Figura 2.1. Diagrama izolării şi multiplicării celulelor stem embrionare

Deoarece aceste celule provin din stadii timpurii ale dezvoltării ele sunt celule pluripotente. Toate genele lor pot fi activate şi toţi produşii lor genici pot fi sintetizaţi. De asemenea ES pot fi subcultivate cu o eficienţă rezonabilă,

permiţând ca un număr crescut de celule să fie folosite în procese ca transfecţia şi recombinarea secvenţelor omooage. În plus, celulele ES ale şoarecilor pot fi menţinute într-un stadiu nediferenţiat, în monostraturi de tip fibroblastic şi când mediul de cultură este îmbogăţit cu factor inhibitor leucemic.

În ciuda acestui tratament, celulele ES păstrează capacitatea lor de a contribui la toate tipurile de ţesuturi şi toate liniile celulare când sunt reintroduse într-un blastocist gazdă [Nagy, şi colab., 1993].

2.2.2. Vectori ţintă

Pentru a stabili modelul de şoarece knockout, este realizată o construcţie de ADN, numit vector ţintă ce conţine forma mutantă a genei de interes (fig. 2.2). Iniţial, primii vectori ţintă utilizaţi pentru a leza funcţia genei ţintă prin deleţia de secvenţe specifice şi înlocuirea lor cu ADN heterolog, erau o genă de selecţie pentru medicamente sau o genă marker pentru analiza expresiei genei ţintă [Zhang şi colab., 1994].Cum este arătat în figura 2.2 vectorul ţintă cuprinde trei elemente principale ordonate specific: i) o regiune 5' omoloagă genei ţintă, ii) o genă marker de rezistenţă la medicamente pentru selecţia pozitivă a celulelor care integrează vectorul ţintă, iii) o regiune 3' omoloagă genei ţintă.

Secvenţele ADN de la nivelul regiunilor 3' şi 5' din vectorul ţintă reprezintă substratul pentru crossing-overul reciproc sau pentru mecanismul de conversie genică care trasferă caseta marker de selecţie în locusul endogen. Secvenţele omoloage provin din fragmente genomice clonate ale genei ţintă şi delimitează sevenţele genei ţintă, care sunt înlocuite de caseta marker de selecţie pentru a genera locusul mutant. Pentru a deveni ţintă ADNul genomic izogenic trebuie utilizat împreună cu cel al celulelor ES în vederea construirii ţintelor. Specificitatea şi lungimea secvenţei ADN care delimitează regiunea ţintă poate fi maximalizată pentru o recombinare omoloagă eficientă, ce presupune de exemplu înlăturarea secvenţelor repetitive. Când construcţia a fost completă, vectorul este liniarizat la sfârşitul regiunilor omoloage 5' sau 3', astfel încât capetele ADN-ului să poată servi ca substrat pentru iniţierea recombinării omoloage cu locusul ţintă.

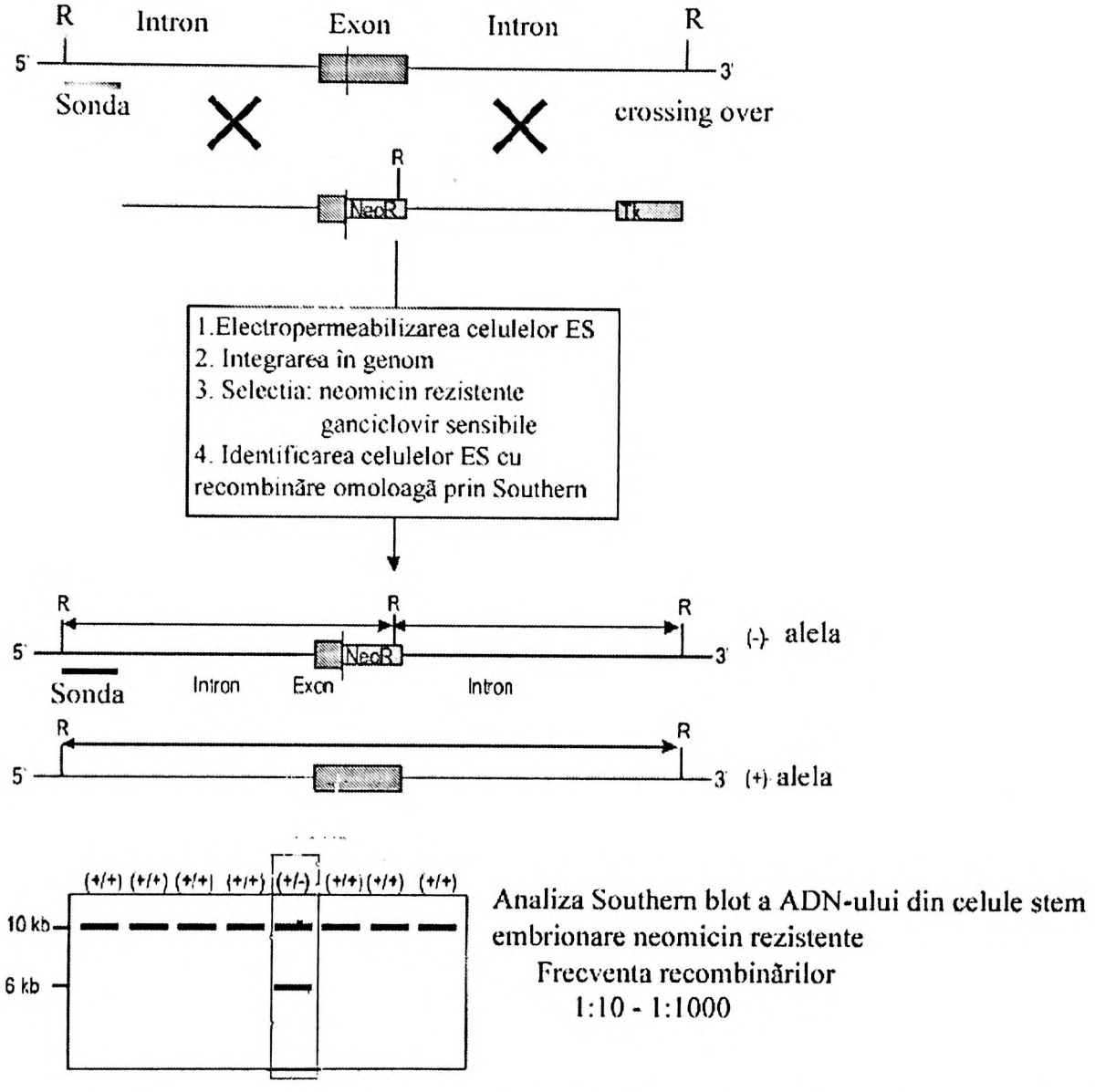


Figura 2.2. Secvenţa de înlocuire a vectorului pentru selecţia pozitivă-negativă în celulele ES. Vectorul conţine caseta de expresie a genei de rezistenţă Neo şi gena HSV Tk. După recombinarea omoloagă caseta de selecţie pozitivă la medicament este încorporată în locusul ţintă şi caseta de selecţie negativă este înlăturată. Alela (-) indică alela mutantă după recombinarea omoloagă. R indică situsurile enzimei de restricţie utilizate pentru excizia ADN înainte de detecţia recombinării omoloage prin tehnica Southern blot cu ajutorul unei sonde specifice derivată din afara regiunii ţintă.

După transfecţia vectorului ţintă liniarizat în celule ES, se face o selecţie a medicamentelor, pentru a îmbogăţi aceste celule ES, care s-au integrat în vectorul ţintă şi se exprimă ca gene sensibile la medicament. Caseta de exprimare a genei marker include toate secvenţele, de reglare necesare pentru transcriere. Cei mai frecvent utilizaţi markeri de selecţie au fost gena neomicin fosfotransferaza (Neo), care conferă rezistenţă la analogul de neomicină G418. Metoda utilizată pe scară largă pentru a îmbogăţi clonele de celule ES pentru recombinare omoloagă este o strategie a genelor ţintă care implică un vector conceput pentru a fi utilizat într-o dublă selecţie de droguri, protocol cunoscut

ca selecţie pozitivă-negativă (fig. 2.2). În afară de selecţia pozitivă a markerului Neo poziţionat între regiunile 5 şi 3 omoloage ale genei ţintă, este inclusă o genă casetă suplimentară de selecţie negativă amplasată la capătul regiunilor omoloage. Gena de selecţie negativă cel mai frecvent folosită este gena caseta de expresie a virusului herpes simplex timidin kinaza (Tk), care conferă sensibilitate la guanozin analog al ganciclovirului. Produsul genei Tk fosforilează ganciclovirul, şi îi permite acestuia să fie încorporat în ADN-ul replicat acţionând ca un inhibitor de sinteză al ADN-ului (fig. 2.3).

Într-un experiment tipic de gene-ţintă, vectorul de selecţie pozitivă/negativă va fi aleatoriu integrat de către capetele liniare în genomul multor celule, care păstrează ambele casete de selecţie Neo şi Tk şi conferă rezistenţă la neomicină şi sensibilitate pentru ganciclovir. Totuşi, în cazul în care în celule ES a apărut recombinarea omoloagă între vectorul ţintă şi gena omoloagă, caseta Neo-CAS va fi integrată în locusul ţintă în timp ce caseta Tk se pierde şi aceste celule vor supravieţui fiind pozitive, dar şi sensibile la ganciclovir .

Prin folosirea schemei de selecţie pozitivă/negativă, numărul absolut al coloniilor de celule ES care supravieţuiesc selecţiei duble de medicamente este de aproximativ 10 ori mai mic decât numărul de colonii care supravieţuiesc doar selecţiei pozitive.

Reducerea numărului de colonii fiind un screening pentru evenimentele genei ţintă. Empiric, nu toate clonele de ES care supravieţuiesc selecţiei pozitivă/ negativă sunt recunoscute ca prezentând recombinări omoloage ce vor fi evidenţiate prin tehnica Southern blot care utilizează sonde specifice pentru locusul ţintă în celulele ES (fig. 2.2), motiv pentru care acestea, ar putea conţine gena marker de selecţie negativă care dobândeşte mutaţii de inactivare, înainte de integrarea aleatorie a vectorului ţintă în genomul celulei ES.

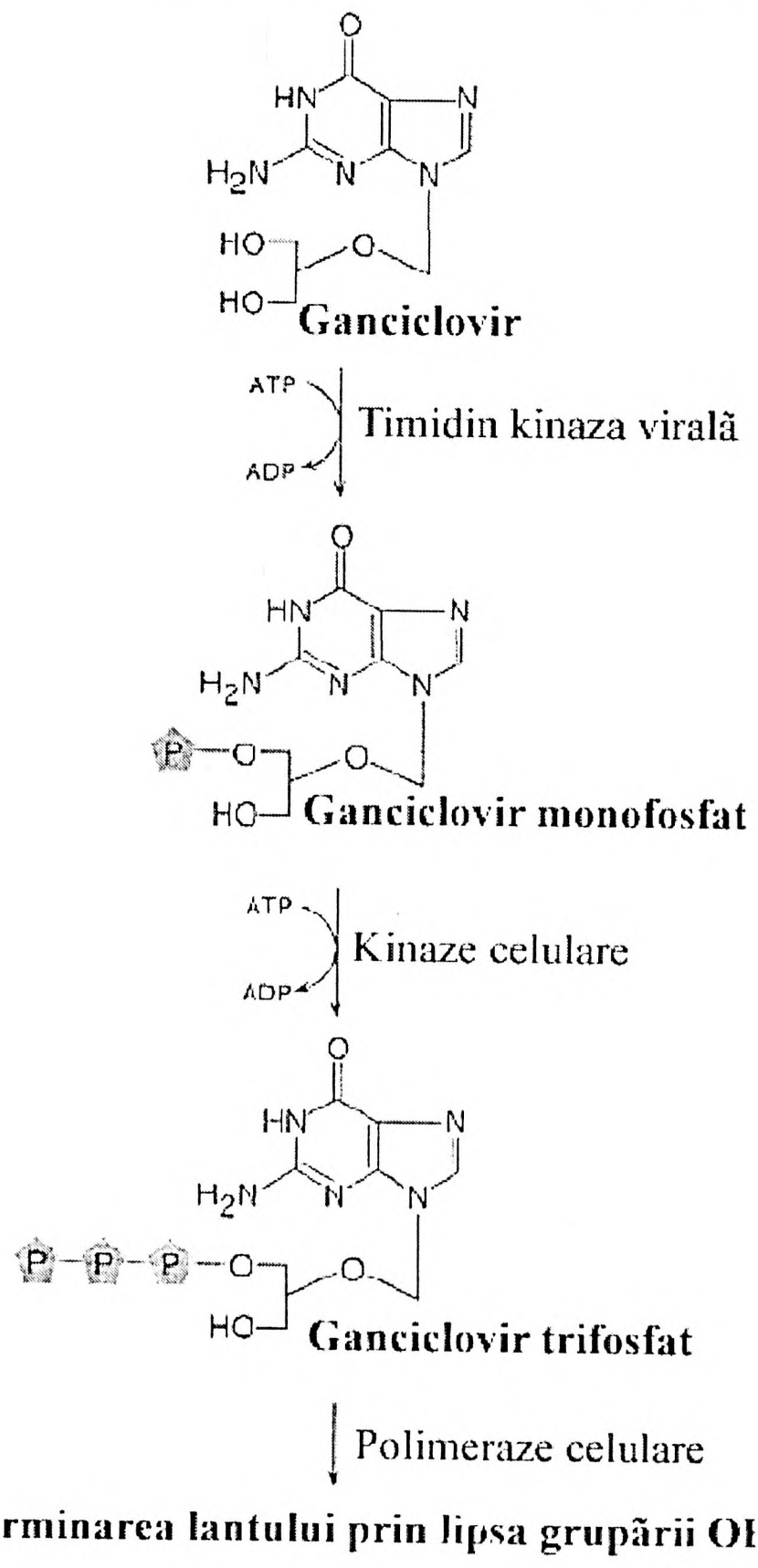


Figura 2.3. Mecanismul toxicității celulare a ganciclovirului utilizat pentru selecția negativă în screening-ul celulelor stem embrionare cu recombinare omoloagă.

2.2.3. Selectarea celulelor stem embrionare recombinate

Vectorul ţintă liniar este introdus în celulele stem embrionare prin amestecare cu prealabilă cu aceste celule într-o cuvetă de electropermebilizare, anterior construirii unui câmp electric. Câmpul electric deschide porii membranei celulelor ES, permiţând intrarea vectorului ţintă. Când curentul electric este întrerupt , membrane celulelor ES revine la situaţia normală.

Secvenţa ADN construită difuzează prin citoplasmă şi intră în nucleu. Toate celulele ES care au suferit electropermeabilizare sunt crescute în culturi celulare care conţin soluţie de antibiotic. După transfecţie, recombinarea omoloagă dintre vectorul ţintă şi locusul endogen din celulele ES este rară, iar prezenţa de gene marker pentru selectarea medicamentelor permite îmbunătăţirea recuperării celulelor ES recombinate. Coloniile de celule ES crescute vizibil şi dezvoltate în prezenţa unor compuşi de selecţie sunt recoltate ca şi candidate probabile ce pot să conţină gene mutante în genomul lor.

Celulele ES care au suferit recombinari omoloage vor fi genetic heterozigote, la nivelul locilor cromozomiali vizaţi. Astfel, în planificarea oricărui experiment cu gene ţintă, este important să avem o strategie de genotipare, strategie care va face uşor discriminări între tipul sălbatic (wild type) şi locii mutanţi din celulele cu evenimente de recombinare omoloagă. La selectarea regiunilor omoloage din gena ţintă pentru clonare în vectorul ţintă, este important de a se anticipa utilizarea analizei Southern blot (sau analiza PCR), considerând disponibile situsurile enzimei de restricţie pentru a genera fragmente de diagnostic.

Succesul acestor analize este dependent de selecţia sondelor ADN din afara regiunilor de recombinare şi de alegerea situsurilor de restricţie care vor conduce la identificarea fragmentelor de restricţie care sunt unice pentru alelele mutante şi respectiv alelele de tip sălbatic (fig. 2.2).

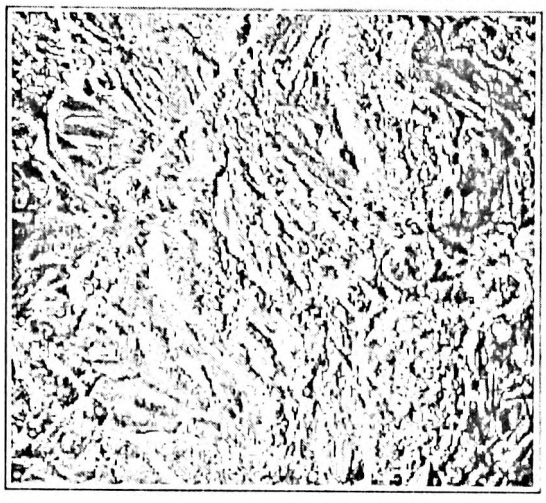
2.2.4. Injectarea celulelor ES recombinate în blastociști și transferul blastocistului la primitori pseudoînsărcinați

Coloniile de celule ES ce prezintă recombinările omoloage presupuse sunt individualizate prin tripsinizare şi colectate cu un ac fin, subţire care este conectat la un micromanipulator. Blastociştii destinaţi microinjectării cu celule ES sunt prelevaţi de la femele donatoare. Cu un ac ascuţit se penetrează brusc şi precis blastocistul şi se eliberează 15-25 celule ES, prin presiune pozitivă. Embrionii injectaţi trebuie implantaţi la femele. Succesul de transfer al embrionilor depinde de calitatea mediului gazdei materne. Împerecherea cu şoareci masculi este necesară pentru modificările hormonale necesare stabilirii sarcinii. Femelele nu pot purta embrionii lor adevăraţi şi sunt puse să se împerecheze cu şoareci vasectomizaţi.

Femelele de şoareci au ovulaţie spontană şi pot fi fals însărcinate prin împerecherea cu masculi vasectomizaţi în timpul estrului, ele vor afişa profilul hormonal al unei femele gravide normal.

Fibroblasti în monostrat

Colonii de celule ES



Injectarea celulelor stem embrionare în blastocisti

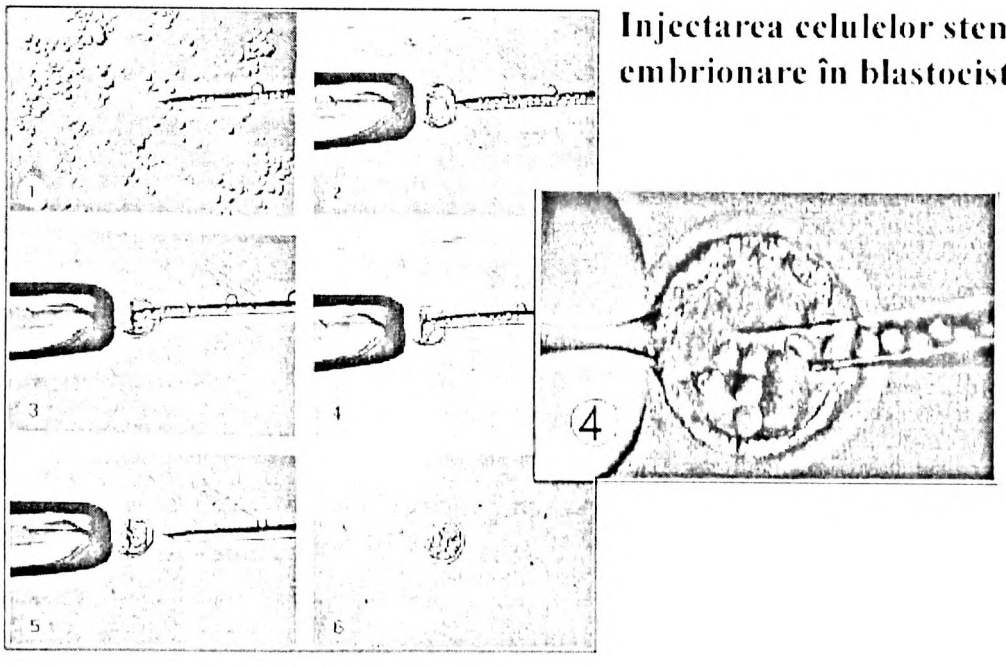


Figura 2.4.

Figura de sus. Clone celulare multiple de celule stem embrionare ce cresc formând monostraturi de fibroblaşti. Fibroblaştii provin de la embrioni de şoareci transgenici purtători ai casetei de selecţie Neo, conferind rezistenţă la geneticină pentru selecţia pozitivă. Fibroblaştii sunt iradiaţi pentru a preveni proliferarea lor ulterioară, după pregătirea acestora din embrioni,

Figura de jos. Injectarea celulelor ES în blastocist. Celule ES individualizate sunt încărcate într-o pipetă de injectare. (1), vârful ascuţit al pipetei pătrunde în cavitatea blastocistului (2) cu grijă şi încet se împinge vârful de injecţie al pipetei în embrion fără ruperea sau înţeparea peretelui opus(3), celulele ES sunt expulzate prin presiune pozitivă, (4), acul este retras din embrion (5), şi blastociştii injectaţi sunt colectaţi pentru transferul la femele recipient(surogat) (6).

2.2.5. Himera și puii F1 și F2

Succesul microinjectării celulelor stem embrionare în blastocist duce la formarea unui embrion care conţine celule din blastocistul iniţial şi în plus celulele embrionare implantate în blastocist. Celulele de origini diferite cresc împreună pentru a forma un nou embrion. Şoarecele hibrid rezultat are ţesuturile şi organele formate dintr-un amestec de celule derivate din celulele de origine (de obicei cu provenienţă din şoareci C57/BL6 cu blana neagră) şi celule ES (de obicei cu provenienţă din şoareci SV129 cu blana galben/maronie). Hibridul este denumit himeră pentru că acesta conţine celule din două surse independente. Blana hibrizilor himerici este un amestec de galben-maroniu şi negru. Dacă nici o celulă ES nu este încorporată în stadiul de blastocist, puii vor avea blana neagră. Aspectul blănii este un marker precoce util pentru succesul unei mutaţii. Şoarecii himeră sunt identificaţi odată ce culoarea blănii devine detectabilă. Când încorporarea celulelor mutante este numai la nivelul celulelor somatice, care se dezvoltă în ţesuturi nonreproductive, himerele vor exprima mutaţia, dar puii lor nu. Când încorporarea are loc în celule care se dezvoltă din celulele germinale mutaţia ţintă este transmisă la generaţia următoarea de pui de himeră (fig.2.5).

Pentru a detecta trasmiterea pe linie germinală se realizează încrucişarea între himeră şi şoareci de tip sălbatic. Himera este încrucişată cu rase de şoareci normali, ca C57/BL6. Puii F1, rezultat al încrucişării, sunt analizaţi pentru exprimarea mutaţiei (fig. 2.5). Un pui de şoarece F1 care primeşte gena mutantă de la progenitorul himeric este heterozigot pentru gena mutantă. Tehnica Southern blot şi tehnica PCR cu sonde specifice se efectuează pe ADN-ul genomic dintr-un mic eşantion de ţesut de la coada puiului de şoarece, în scopul identificarii heterozigoţilor pozitivi. Fiecare heterozigot pozitiv este un potenţial fondator pentru o linie de şoareci mutanţi.

Puii heterozigoţi F1 identificaţi sunt împerecheaţi unul cu celălalt pentru a produce o generaţie F2. Teoretic, populaţia F2 va urma principiile de segregare mendeliană, rezultatul fiind 25% homozigoţi mutanţi, 25% homozigoţi control tipul sălbatic şi 50% heterozigoţi mutanţi. În cazul în care deleţia genei este letală, homozigoţii mutanţi nu vor supravieţui.

În cele din urmă, lipsa produsului genei la homozigoţii mutanţi este evidenţiată prin anticorpi specifici prin tehnica Western blot folosind ţesut unde proteina este, de obicei, exprimată.

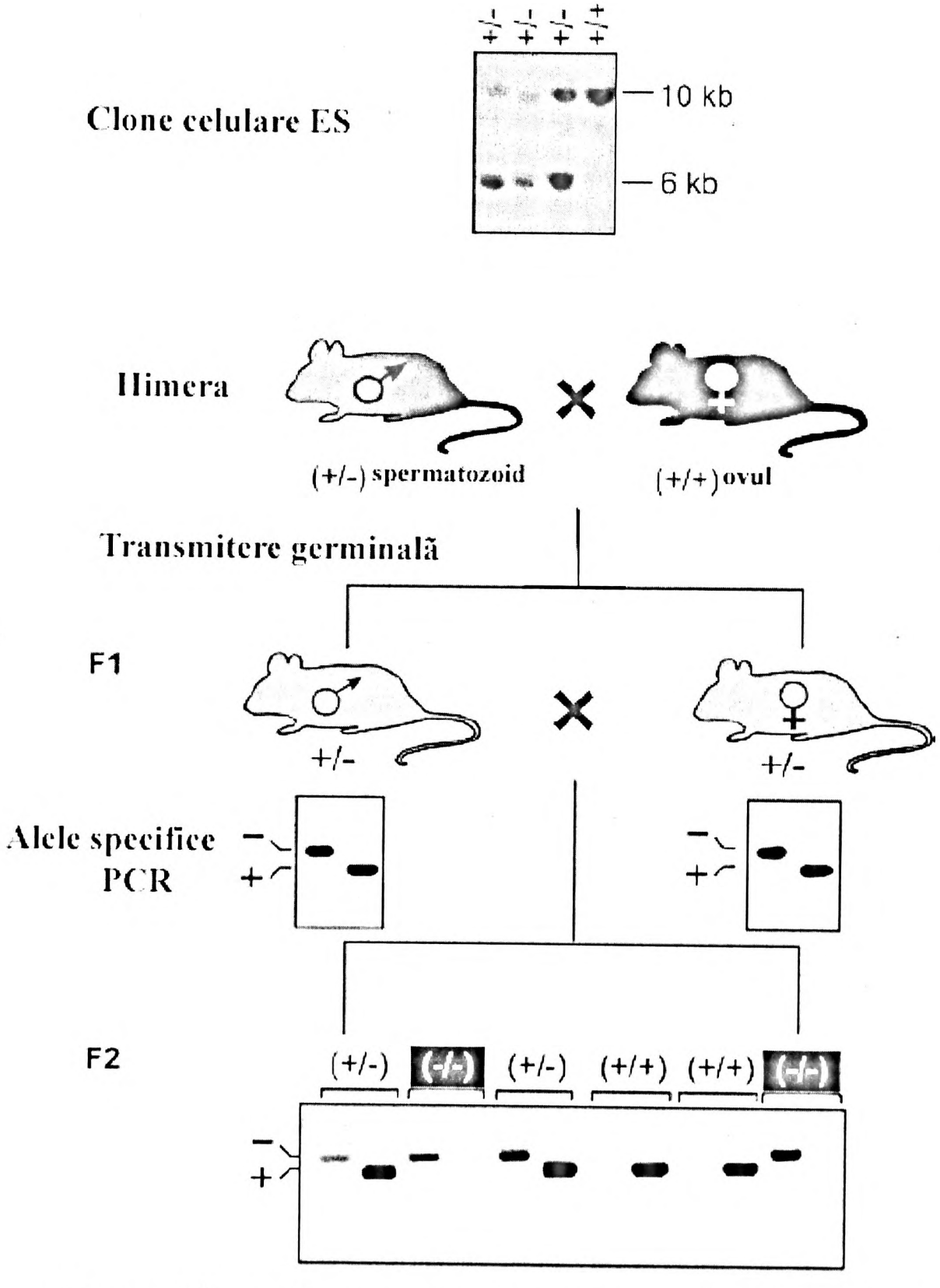


Figura 2.5. Împerecherea şoarecilor himeră, cu şoareci de tip sălbatic(wild type) pentru obţinerea de heterozigoţi mutanţi. Clonele de celule stem embrionare putătoare a unei alele de tip sălbatic şi unei alele mutante (+/-) sunt injectate în blastocişti.Se observă analiza Southern blot caracteristică pentru clonele de celule ES. Blastociştii injectaţi sunt transferaţi la femele recipient care vor da naştere la himere. De obicei celulele ES purtătoare de mutaţii dominante care determină culoarea maroniu-gălbuie a blănii (rasa

SV129), sunt injectate la blastocişti de la şoareci de rasă neagră (rasa C57B16). Prin urmare, gradul de hibridizare poate fi uşor recunoscut prin contribuţia culorii maroniu/gălbuie la culoarea blănii. Himerele sunt apoi, împerecheate cu şoareci C57B16 de culoare neagră. În cazul transmiterii mutaţiei pe linie germinală, şoarecii heterozigoţi F1 (+/-) vor fi cu blana maroniu-gălbuie.Ca urmare a împerecherii şoarecilor heterozigoţi între ei, un sfert din şoareci vor fi homozigoţi F2, dacă viabilitatea nu este compromisă de mutaţii.

Se generează apoi o linie de şoareci cu gena mutantă. Şoarecii homozigoţi cu mutaţie nulă au deficiente ambele alele, iar heterozigoţii au deficientă doar una din cele două alele ale genei. Genotipul este -/- pentru mutaţie nulă, +/-pentru heterozigoţi şi +/+ pentru alela de tip sălbatic obişnuită, de control (wild-type). Fenotipul reprezintă setul de caracteristici determinate de mutaţie şi se referă la caracteristici biochimice, anatomice, fiziologice şi comportamentale.

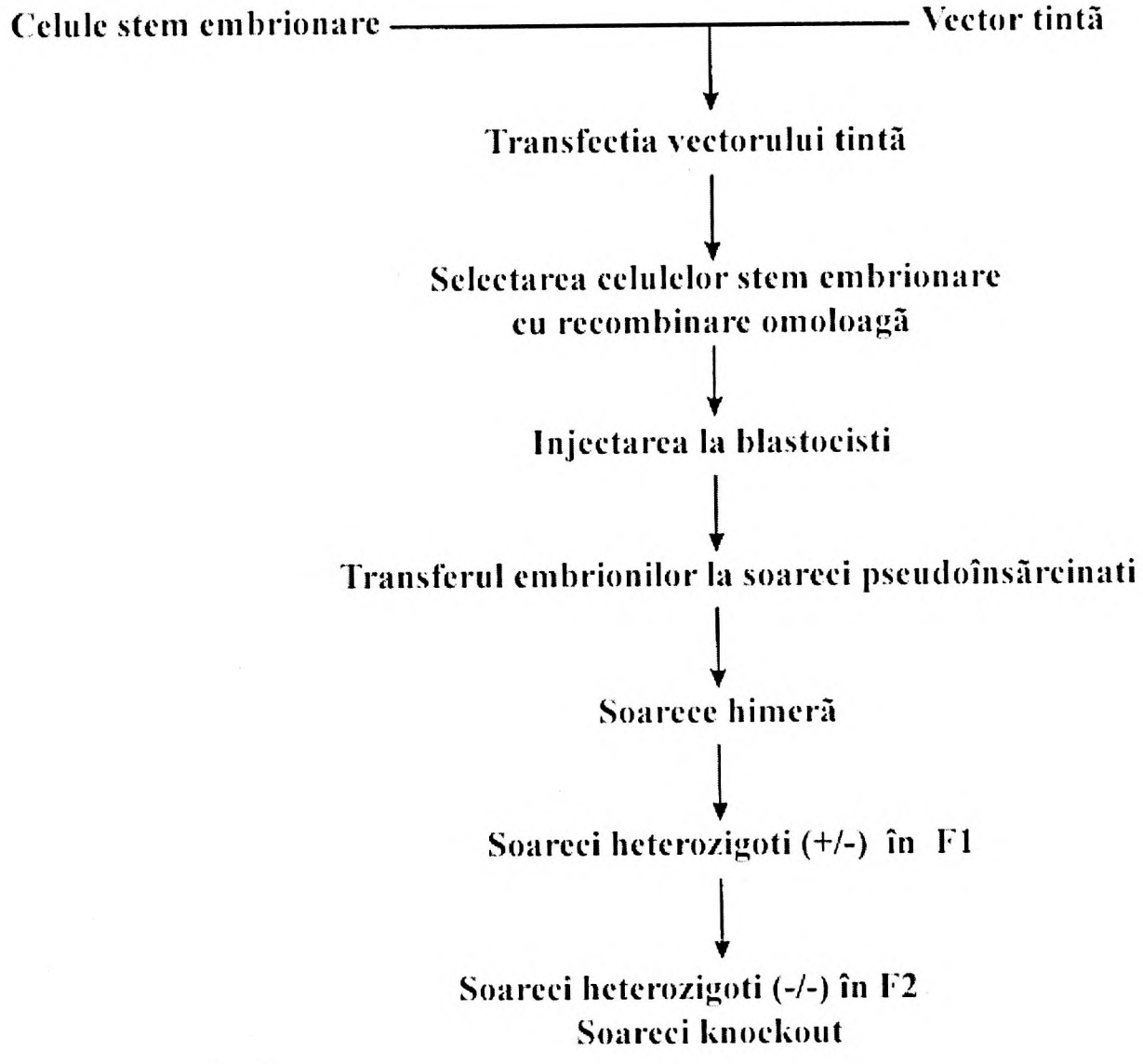


Figura 2.6. Diagrama fluxului pentru genele knockout

Caracteristicile şoarecilor mutanţi sunt identificate, în comparaţie cu şoarecii de control normali, iar cele relevante pentru bolile umane sunt cuantificate. Aceste caracteristici specifice bolii sunt apoi folosite ca variabile de test pentru evaluarea eficienţei tratamentelor. Tratamente general acceptate sunt administrate la şoarecii mutanţi. Un tratament care previne sau înlătură caracteristicele bolii la şoarecii mutanţi este folosit pentru mai multe teste suplimentare ca un tratament potenţial terapeutic pentru boli genetice umane.

2.3. Expresia genelor ţesut specifice

Tehnologia convenţională de gene knockout este limitată de moartea embrionară sau postnatală imediată întrucât rolul unor astfel de gene nu poate fi investigat. În plus, rolul unei anumite gene în ţesuturile adulte poate fi mascat la orice şoareci knockout, generaţi prin anomalii sau compensări de dezvoltare, sub forma intensificării sau atenuării expresiei altor gene. Implementarea de situsuri specifice de recombinare, cum ar fi sistemul bacteriofag P1 LoxP / CRE, permit dezvoltarea unui knockout condiţionat de absenţa unei anumite gene numai într-un ţesut specific sau după un stadiu de dezvoltare specific [Gu şi colab., 1993]. Enzima CRE este izolată de la bacteriofagul P1 şi acţionează ca un situs specific de recombinare. Secvenţa recombinată de către CRE, denumită LoxP, constă din două scurte repetiţii de ADN (situsul de recunoaştere CRE) şi o secvenţă intermediară, între cele două. Două secvenţe LoxP cu aceeaşi orientare vor conduce la excizia ADN-ului cuprins între cele 2 secvenţe de către CRE lăsând intact un situs LoxP (fig. 2.7). În contrast, în cazul în care două situsuri LoxP sunt orientate opus, CRE va inversa acest segment intermediar de ADN.

Construcţiile ţintă pentru inserţia situsurilor LoxP în ADN-ul genomic sunt similare cu cele utilizate pentru realizarea de gene knockout convenţional în celule ES (fig. 2.2). În plus faţă de aceste aspecte, design-ul construcţiei de gene knockout condiţionat necesită un număr important de considerente suplimentare: knockoutul convenţional este, de obicei, conceput astfel încât caseta Neo lezează transcrierea genei endogene. În knockout-ul condiţionat, gena endogenă trebuie să funcţioneze în mod normal, până la recombinarea de către CRE recombinaza şi, astfel, orice modificări trebuie să fie în afara regiunilor de codificare, adică introni, şi nu trebuie să interfereze cu regiunile de reglare (fig. 2.7). Situsul LoxP trebuie să fie introdus într-un mod în care splicing-ul, va avea ca rezultat excizia unei cantităţi suficiente de ADN pentru ca gena să fie inactivată. Acest lucru poate fi deosebit de dificil pentru genele cu introni de dimensiuni mari, în cazul în care numai cantităţi mici de secvenţe codificatoare pot fi înlăturate.

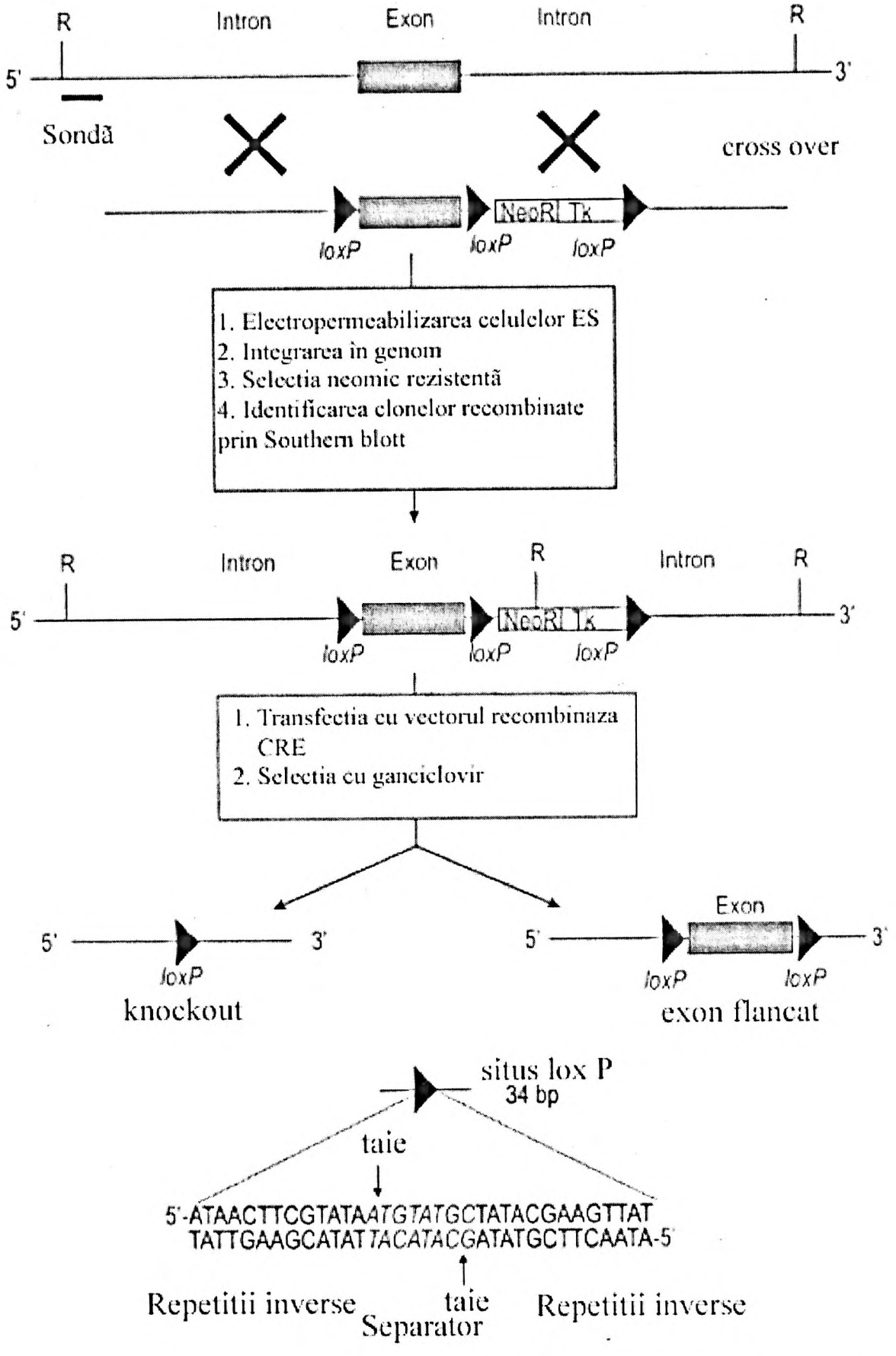


Figura 2.7. Knockout condiţional utilizând LoxP/ CRE. Locusul de tip sălbatic şi construcţia ţintă condiţională prezintă trei situsuri LoxP ce flanchează caseta marker de selecţie a tandemului Neo/Tk şi exonul care va fi deletat. O prima ţintă este recombinarea

dintre această construcţie şi locusul ales. O clonă recombinată pozitiv este aleasă pentru a doua fază , ce cuprinde trasfecţia cu vectorul ADNc - recombinaza CRE . După expunerea la CRE sunt posibile 3 evenimente recombinatorii. Populaţia celulară A prezintă excizia completă şi poate fi utilizată pentru injectarea blastociştilor pentru a genera knockout total la şoareci. Populaţia de celule B este forma în care caseta de selecţie a fost eliminată, dar gena nu este încă deletată. Aceste celule ES sunt preluate pentru a stabili knockoutul condiţional, unde exonul flancat este deletat mai târziu, adică după încrucişarea animalelor rezultate cu şoareci transgenici ce exprimă recombinaza CRE sub un promotor ţesut specific. Secvenţa palindromică parţială de nucleotide a situsurilor LoxP este prezentată în partea inferioară.

Astfel, situsurile LoxP trebuie să fie poziţionate pentru a înlătura exonii care codifică un important domeniu funcţional şi ca rezultat ar avea loc schimbarea cadrului de citire. Genele de rezistenţă incluse pentru selecţia clonelor ţintă conţin de obicei mai multe kilobaze de ADN străin, care are potenţialul de a influenţa expresia genei ţintă înainte de recombinare. Pentru a minimaliza această potenţială influenţă asupra expresiei genei, este posibil să se înlăture gena de rezistenţă din clonele celulelor ES ţintă *in vitro*, înainte de microinjectarea blastociştilor. Pentru a elimina genele de rezistenţă, un situs suplimentar LoxP trebuie să fie inclus pentru a flanca gena de rezistenţă (fig. 2.7). ADN-ul genomic modificat ar include, astfel, trei situsuri LoxP, două poziţionate pe flancuri, însoţind gena de rezistenţă, precum şi cel de-al treilea situs situat pentru producerea deleţiei dorite, atunci când apar recombinari. Transfecţia clonelor celulare ţintă de celule ES cu un vector care conţine ADNc al recombinazei CRE produce celule ES cu trei configuraţii genomice alternative în plus faţă de clonele non-recombinate (fig. 2.7).

Pentru a limita numărul evenimentelor de recombinare şi pentru a facilita selecţia dorită de clone, o selecţie negativă poate fi realizată prin adăugarea ganciclovirului în celule ES. Această strategie necesită utilizarea unei casete marker de selecţie care conţine atât gena Tk cât şi gena Neo de rezistenţă pentru selecţie. Adaosul de ganciclovir în culturile celulare de ES va permite creşterea clonelor cu : i) exonul de interes flancat de două situsuri LoxP, şi anume exonul delimitat pentru knockout-ul condiţionat şi ii) clonele de celule ES cu un singur situs LoxP, gata de utilizare pentru stabilirea knockout-ului general. Astfel, folosind trei site-uri LoxP şi caseta marker de selecţie Neo/Tk introduse în genomul celulei ES se produc ambele tipuri de clone clasice pentru: knockout-ul general şi knockout-ul condiţionat. Selecţia clonelor în care gena de rezistenţa a fost deletată şi ADN-ul genomic, cu modificări adecvate, a fost lăsat intact, poate fi realizată prin screening folosind tehnica Southern blot. Când injectarea blastociştilor şi transmiterea pe linie germinală a celulelor ES cu knockout condiţionat este realizată şi şoareci cu exonul flancat au fost obţinuţi, recombinaza CRE este exprimată în ţesutul sau tipul cellular de interes (fig. 2.8). Recombinaza înlătură specific exonul fundamental din alela modificată şi creează o excizie CRE knockout dependentă. Pentru a realiza acest lucru, o linie CRE transgenică care exprimă recombinaza sub un promotor

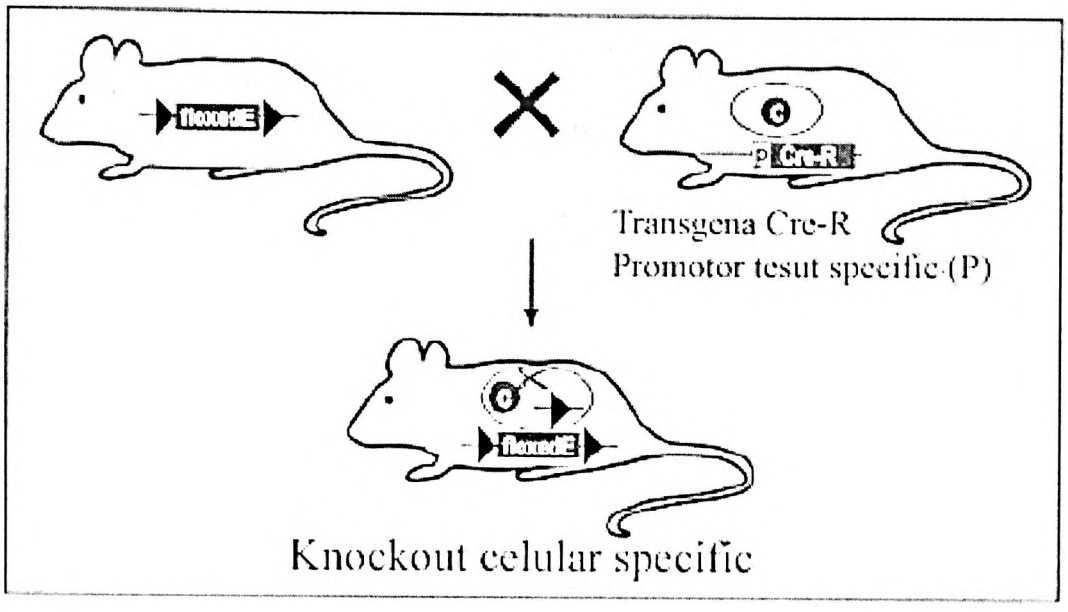
celular sau ţesut specific este încrucişată cu şoareci knockout condiţionat cu exonul flancat. Numai în celulele unde recombinaza CRE este exprimată, are loc excizia exonului, rezultând o deleţie a genei ţesut specifică. Între timp, linii de şoareci CRE transgenici sunt disponibili, fiecare exprimând recombinaza cu specific diferit. Astfel, sistemul de recombinare LoxP/CRE este un instrument puternic pentru deleţia condiţionată şi specific celulară a genelor. Introducerea acestui sistem la şoarecii transgenici facilitează studiile cu privire la pierderea funcţiei genelor într-un anumit tip de celule. Prin inserţia situsurilor Lox pe calea recombinarii omoloage în gena de interes şi expresia recombinazei CRE ţintă pentru un anumit tip de celule folosind un promoter ţesut specific, va fi posibilă introducerea deleţiilor predeterminate în genomul mamiferelor.

2.3.1. Recombinaza CRE ligand activatoare

În ultimii ani, au fost dezvoltate tehnologii, care permit noi abordări în scopul de a controla temporal şi ţesut specific mutaţia dorită pentru expresia genelor inductibile la şoareci transgenici şi care pot fi combinate cu mai multe gene ţintă convenţionale. De exemplu, o metodă pentru genele ţintă condiţionate este bazată pe supraexpimarea recombinazei CRE care ar putea permite inactivarea genei ţintă flancată, ţesut-specific, în orice moment din timpul dezvoltării şi la şoarecele adult (fig. 2.8., figura de jos).

Fuziunea domeniului de legare la ligand (LBD) al receptorilor de estrogen cu recombinaza CRE generează o recombinază himerică a cărei activitate este dependentă de prezenţa receptorilor de estrogen sau de tamoxifen modulator al receptorilor de estrogen [Metzger, 2001]. Pentru a obţine gene ţintă condiţionate la şoareci, în cazul în care estradiolul endogen este prezent, s-a indus fuziunea recombinazei CRE cu LBD mutant al receptorilor de estrogen uman. LBD mutant al receptorilor de estrogen nu este legat de estradiol, întrucât acesta se leagă de ligandul sintetic pentru tamoxifen.

S-au produs linii de şoareci transgenici ce exprimă recombinaza CRE fuzionată cu LBD mutant al receptorului de estrogen sub controlul unor promotori diferiţi ţesut specific (P) (fig. 2.8, figura de jos).



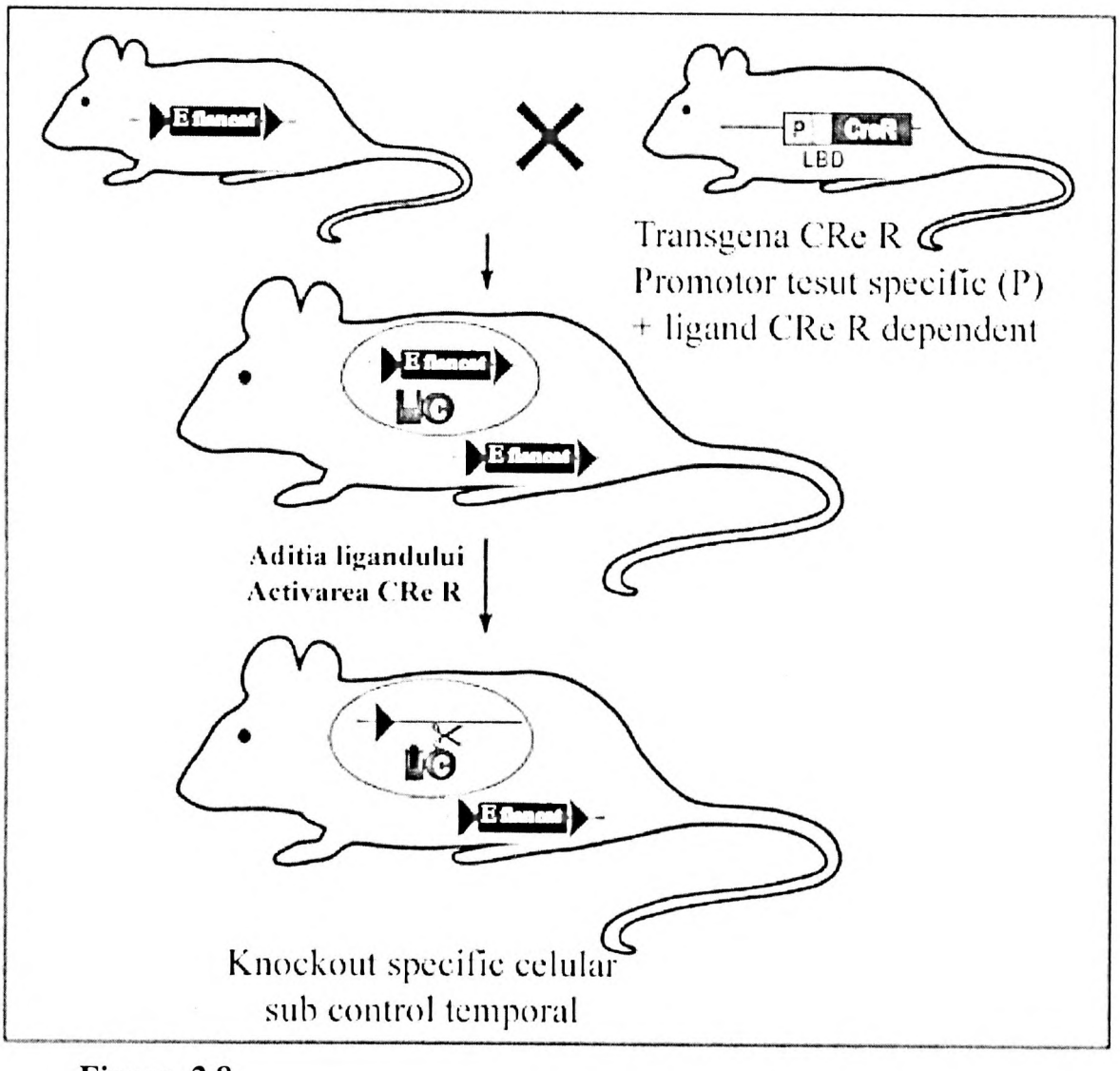


Figura. 2.8.

Figura de sus. Strategie de reproducere pentru obţinerea unor şoareci cu knockout celular specific. Şoarecii care prezintă alele nule, şi în plus sunt purtători ai alelei

unde gena sau exonul care vor fi deletaţi sunt flancaţi de două situsuri LoxP (exoni flancaţi) sunt fenotipic şoareci heterozigoţi. Când sunt împerecheaţi cu şoareci transgenici care exprimă recombinaza CRE (C) sub un promotor ţesut specific aceşti şoareci devin homozigoţi mutanţi nuli în ceea ce priveşte acest ţesut.

Figura de jos. Strategie de reproducere pentru obţinerea de şoareci cu knockout celular specific sub control temporal. Transgena-recombinaza CRE fuzionează cu ADNc domeniului de legare al ligandului receptorului de estrogen. Activarea recombinazei CRE este dependentă de prezenţa tamoxifenului, care poate fi furnizat şoarecilor în apa potabilă. Adaosul de tamoxifen permite knockoutul genei sau exonului de interes oricând în punctul dorit.

Un astfel de şoarece transgenic poate fi împerecheat cu un şoarece ce prezintă un exon flancat în interiorul genei care ar trebui deletat. Puii lor exprimă ambele modificări, exonul flancat şi recombinaza CRE ligand dependentă, şi li se administrează tamoxifen. Exonul flancat este ulterior eliminat din genomul acestor ţesuturi, în cazul în care proteina recombinazei CRE de fuziune este exprimată.

Exprimarea celulară specifică a recombinazei CRE fuzionată la un receptor de estrogen LBD mutant, la şoarecii transgenici, poate fi astfel utilizată pentru eficientizarea recombinării CRE mediată de tamoxifen (tamoxifen dependentă), la nivelul locilor ce conţin situsuri LoxP pentru a genera mutaţii somatice situs specifice într-o manieră spaţio-temporală controlată.

2.3.2. Expresia sistemului tetraciclin/ doxiciclin inductibil

Capacitatea de a controla expresia genei, şi în cele din urmă, a genei, ţintă, la şoarecii transgenici prin simpla administrare de substanţe exogene oferă un nou nivel de de control asupra sistemului CRE/LoxP, pentru a induce mutaţii genice la şoareci. Sistemul ce răspunde la tetraciclină este compus dintr-o proteină tetraciclin represoare (TetR), fuzionată la un domeniu activator de transcriere pentru virusul herpes, precum şi o secvenţă tetraciclin operator (tetO) legate de un mic promotor pentru controlul transcripţiei unei gene ce intervine după legarea TetR de tetO [Gossen, 2002]. Vectorii de exprimare TetR şi promotorul minimal tetO ce dirijează transcripţia genei în celulele de mamifere sunt disponibile în comerţ.

Sistemul tetraciclin-responsiv poate fi folosit împreună cu tehnologia CRE/LoxP pentru a permite controlul temporal al genei ţintă la şoareci, prin plasarea expresiei genei CRE sub controlul unui promotor minimal tetO. Pentru mai multă specificitate, un promotor ţesut specific poate fi folosit pentru a regla expresia genei TetR. Mai mult decât atât, există variaţii Tet-off şi Tet-on pentru controlul expresiei genei tet responsive, care depind de legarea de tetraciclină a TetR.

În versiunea Tet-off a acestui sistem, proteina transactivatatoare TetR, tTA, se va lega la promotorul tetO minimal în prezenţa tetraciclinei pentru a represa expresia genei. Când administrarea de tetraciclină este oprită, tTA nu se mai leagă de de promotorul tetO minimal şi transcrierea este indusă de mai multe mii de ori în ţesuturile şoarecilor transgenici. După cum este ilustrat (fig. 2.9), este necesar să se genereze două linii de şoareci care sunt homozigoţi pentru gena tTA şi heterozigoţi pentru locii mutanţi „de tip sandwich", şi homozigoţi pentru transgena CRE şi respectiv, heterozigoţi pentru pentru locii mutanţi „de tip sandwich". Prin reproducerea celor două linii de şoareci, 25% dintre pui vor fi homozigoţi pentru locusul mutant condiţional şi heterozigoţi atât pentru transgena tTA cât şi CRE.

Pentru a menţine expresia genei CRE reprimată şi pentru a preveni recombinarea LoxP-mediată de la nivelul locilor ţintă în timpul embriogenezei puilor, doxiciclina poate fi administrată în apa potabilă. La îndepărtarea doxiciclinei, expresia genei CRE este dezinhibată, şi determină recombinarea LoxP mediată, perturbând genele ţintă. Ca dezavantaj al acestui sistem a fost raportată inconstanţa, adică pierderi ale expresiei genei CRE în starea represată.

În versiunea Tet-On a acestui sistem, expresia genei CRE controlată de promotorul tetOminimal este mai degrabă indusă, decât represată, de administrarea doxiciclinelor (fig. 2.9). Astfel, rezultă o formă mutantă a TetR, rtTA, care în mod normal represează promotorul minimal tetO. După adăugarea de doxiciclină, rtTA este eliberat din tetO permiţând exprimarea genei CRE. De asemenea, acestui sistem, ca revers celui descris mai înainte, îi lipseşte o reprimare mică a promtorului tetO minimal.

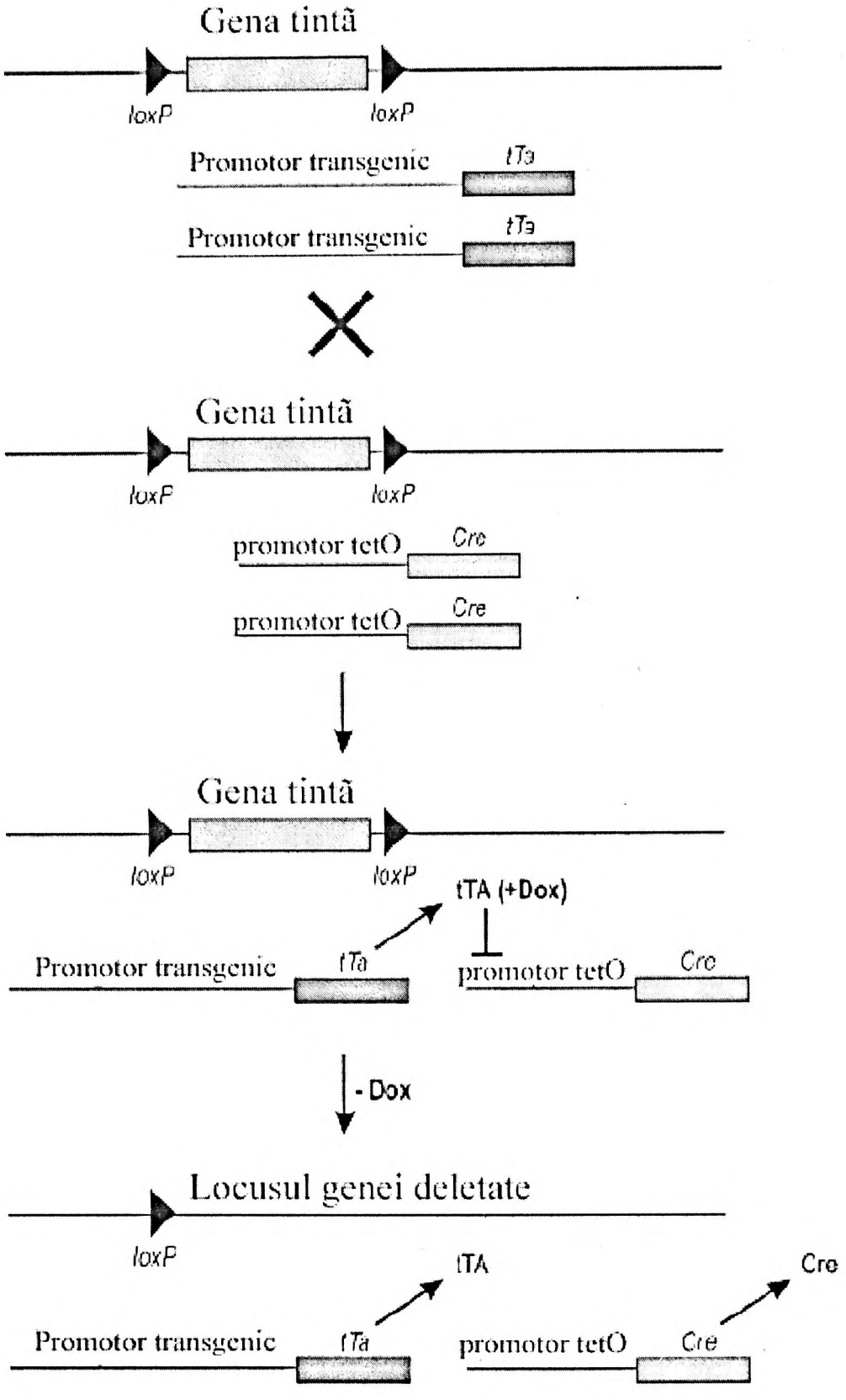


Fig. 2.9. Ţintele genei Tet-off inducibile. Linie de şoareci heterozigoţi pentru un locus ţintă mutant condiţional cu situsurile LoxP flancând gena de interes şi linie de şoareci homozigoţi pentru transgena care exprimă proteina tetraciclin represoare. De asemenea, linia

de şoareci este încrucişată cu alta care este heterozigotă pentru transgena CRE responsivă la tetraciclină. Încrucişarea acestor linii produce progenitori care sunt heterozigoţi pentru ambele transgene, pentru a menţine represia genei CRE şi care vor transmite locusul mutant condiţional şi locusul de tip sălbatic conform transmiterii mendeliene. Eliminarea doxicilinei are ca rezultat exprimarea genei CRE şi crearea unui locus ţintă mutant. Alela de tip sălbatic a locusului ţintă endogen nu este ilustrată.

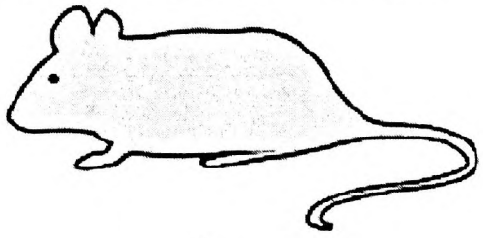
2.4. Șoareci transgenici

Având în vedere că şoarecii knockout au o genă cu deleţie, şoarecii transgenici pot avea o nouă genă adăugată sau o extracopie a unei gene existente, în scopul de a investiga supraexpresia genei. Tehnicile transgenice încep cu dezvoltarea construcţiei genei de fuziune în care ADNul transgenic este dirijat de un promotor specific [Rossant, 1995]. ADN-ul transgenic construit este apoi microinjectat în pronucleii ovocitelor fecundate de şoarece, care au fost recoltate după tratamente hormonale, de la femele de şoareci la care a fost stimulată ovulaţia (fig. 2.10).

Celula ou este suficient de mare pentru a fi văzută la microscop. Prin procese de recombinare aleatorii, gena de fuziune construită se integrează în genom. În cazul în care transgena este integrată în genomul celulei înainte de prima diviziune, embrionii se dezvoltă cu gene străine conţinute în fiecare celulă somatică şi germinală.

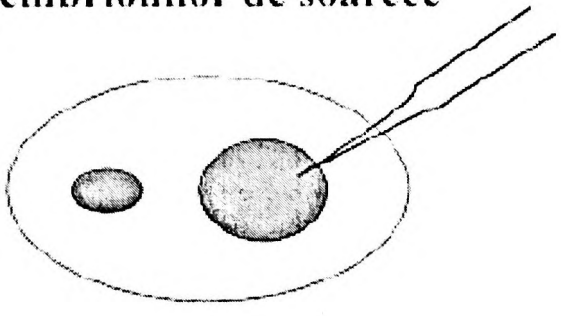
Ouăle microinjectate sunt transferate în oviductele femelei şoarece fals însărcinate, genetic normală. Şoarecele care se dezvoltă din fiecare ou microinjectat este fondator de linie mutantă. Probabil transgena se integrează în locaţii cromozomiale diferite în genomul fiecarui şoarece fondator, care generează linii mutante. Utilizând promotori ţesut specifici, se încearcă definirea situsului de încorporare. ADN-ul modificat se introduce într-o locaţie cromozomială omoloagă cu ADN-ul promotorului. Transgena se introduce numai într-un cromozom. Astfel, embrionul, se dezvoltă ca heterozigot pentru transgenă. Heterozigoţii sunt apoi împerecheaţi unii cu alţii pentru a genera homozigoţi transgenici, heterozigoţi, şi de tip sălbatic (wildtype), după modelul transmiterii mendeliene. ADNul realizat conţine adesea o genă reporter controlată, de aceleaşi promotor, astfel că prezenţa genei reporter în celule indică prezenţa celulară a transgenei. Concentraţiile de genă reporter, de transgenă şi produs genic se analizează cantitativ pentru a determina supraexprimarea genei în ţesutul de interes. Cartografierea anatomică a localizării genei reporter, transgenei şi produsului genei este realizată pentru a descrie distribuţia anatomică a expresiei transgenei în perioada de dezvoltare a animalului.

Soarecele femelã donator de ovule
si colectarea embrionilor



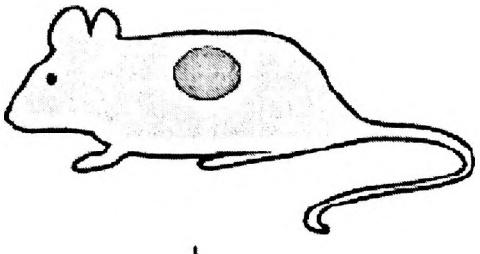


Microinjectarea cu gene a pronucleilor
embrionilor de soarece



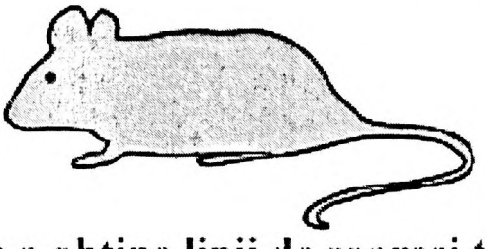


Implantarea la mame pseudoînsãrcinate





Nasterea de soareci transgenici



Încrucisare pentru a obtine linii de soareci transgenici/mutanti

Figura. 2.10. Diagrama producerii şoarecilor transgenici

2.5. Lezarea genelor țintă la Drosophila

Completarea cartografierii secvenţializării genomului [Adams, şi colab., 2000] oferă acces nelimitat la toate genele de *Drosophila melanogaster*. Cu toate acestea şi aproape după un secol de genetică pe Drosophila, există mai multe gene pentru care mutaţiile corespondente nu sunt încă disponibile. Mijloacele pentru a depăşi aceste impedimente au fost situsurile selectate de traspozonii mutageni şi de interferenţă ARN-mediată. În timp ce transpozonii mutageni implică screeningul PCR complex, ARNi generează numai fenocopii specifice mutaţiilor cu pierderea funcţiei şi nu provoacă întotdeauna un fenotip cu adevărat nul. Ca urmare, s-au dezvoltat metode de inducţie a unor gene ţintă knockout. Genele ţintă în Drosophila sunt realizate prin tehnici elegante, care profită de recombinarea omoloagă endogenă germinală la aceste insecte zburătoare [Rong, şi colab., 2002]. Tehnica se aseamănă cu cea de knockout ţintă în celulele ES la şoareci şi poate viza o mutaţie în orice locus din genomul Drosophilei.

Această metodă implică trei componente: i) o transgenă, care exprimă o recombinază de şoc termic situs specifică inductibilă, (recombinaza FLP din drojdia de bere), ii) o a doua transgenă, care exprimă o endonuclează de şoc termic inductibilă situs specifică (I-SceI), iii) un vector transgenic donator care poartă situsurile de recunoaştere pentru ambele enzime (două situsuri FRT de 18 de perechi de baze şi respectiv un situs I-SceI), în plus faţă de gena ţintă de tip sălbatic, şi gena albă ca marker de selecţie pozitivă (permite screeningul descendenţilor pentru ochi albi). Primul pas este introducerea aleatorie, a endonucleazei I-SceI inductibilă de şoc termic situs specifică şi a recombinazei FLP folosind un element de sistem P. Elementul P- este un element genetic mobil ce codifică o transponază care permite elementului P- inserarea în ADN. Vectorul donator (fig. 2.11) este, de asemenea, introdus în mod aleatoriu în genom prin transformarea mediată de elementul P. Pentru recombinare, musculiţele purtătoare a ambelor transgene atât a I-SceI inductibilă de şoc termic cât şi a FLP sunt încrucişate cu musculiţe care poartă gene care urmează să fie flancate ţintit de situsurile de recunoaştere FRT. Prin şoc termic, recombinaza FLP situs specifică şi endonucleaza (I-SceI) situs specifică, excizează apoi, *in vivo*, o moleculă de ADN extracromozomial purtătoare de rupturi dublu catenare recombinatorii în cadrul genei de interes. Prezenţa acestei rupturi dublu catenare (DSB) stimulează recombinarea omoloagă între donorul excizat şi locusul ţintă omolog cromozomial (fig. 2.11). Câteva categorii de recombinare la nivelul locusului ţintă incluzând substituţiile alelice şi inserţia ADN-ului donor sunt observabile la gameţii femelelor. În multe cazuri, produsul inserţiei este o duplicaţie în tandem parţială a genei ţintă, cu ambele copii cu defecte, deoarece fiecare are un fragment lipsă a genei (fig. 2.11). Având în vedere că evenimentele de recombinare apar germinal, progenitorii sunt obţinuţi cu gena knockout ţintă în afara fiecărei celule.

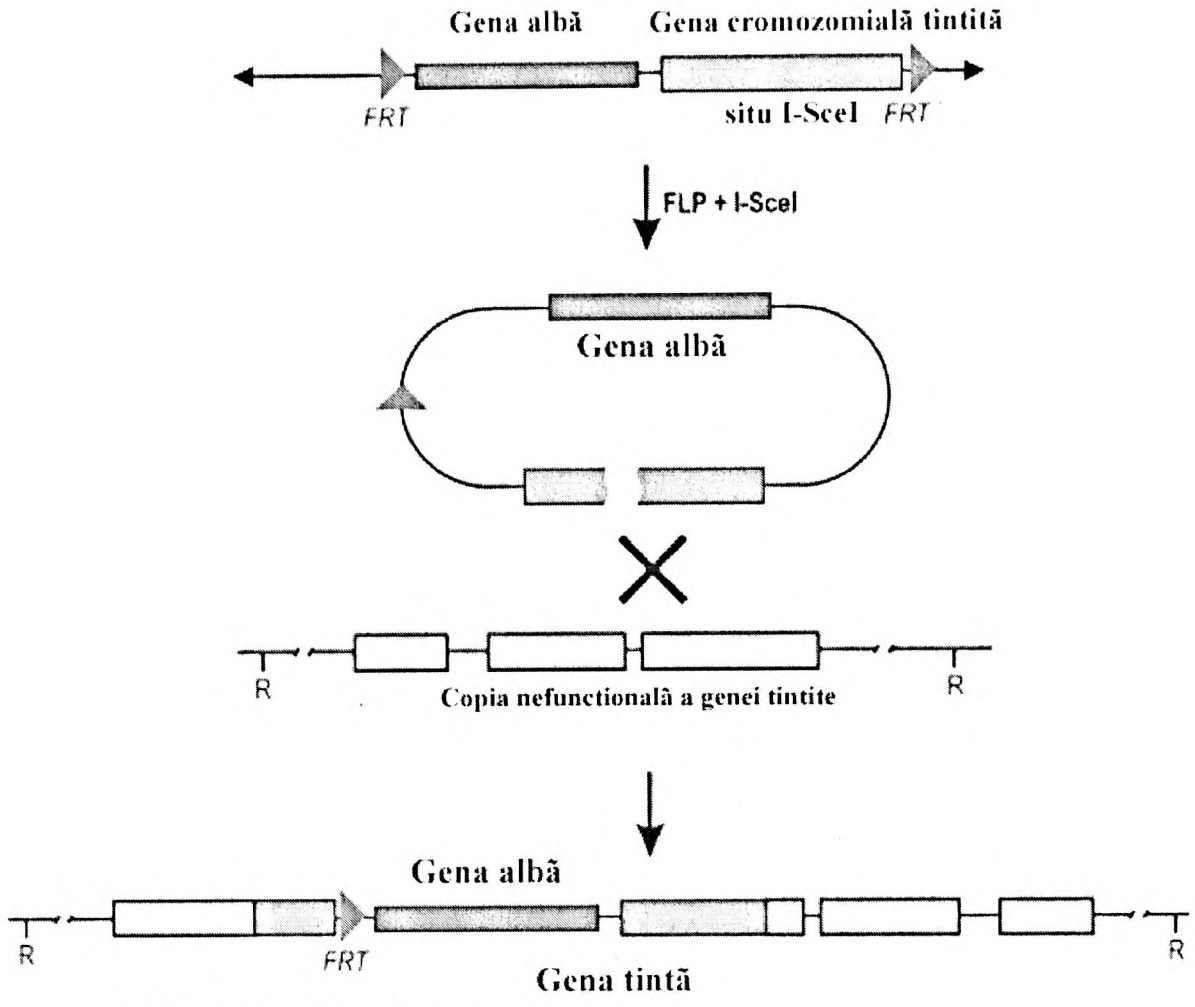


Figura 2.11. Gene ţintă la Drosophila.

Vectorul ţintă transgenic conţine gena ţintă într-o formă trunchiată cu un situs rar pentru endonucleaza I-SCE-I, împreună cu gena albă, pentru a permite selecţia ochilor albi la Drosophila. Construcţia este flancată de două situsuri FRT care sunt recunoscute de recombinaza FLP. Recombinaza FLP mediază excizia, iar endonucleaza I-SceI mediază tăierea ţintelor AND extracromozomiale din vectorii donori transgenici. ADN-ul ţintă, este de aşteptat să se recombincu locusul genei endogene pentru a produce o duplicaţie în tandem nefuncţională.

2.6. Inactivarea genelor țintă la peștele zebră

Recent genomul peştelui zebra cu dimensiuni de 2 până la 4 cm a fost complet secvenţializat. Genomul haploid are $1,7x10^9$ bp, comparativ cu genomul uman care are $3 x10^9$ bp.

Cartografierea comparativă arată conservarea extinsă a blocurilor de gene conservate, spaţial localizate pe cromozomi (syntenies) între genomul peştelui zebră şi mamifere. Date directe despre funcţia majorităţii celor 30 000 de gene din genomul peştelui zebră sunt facilitate de dezvoltarea rapidă a tehnologiei pe bază de morfoline, care poate fi aplicată la acest model de organism.

Morfolinele (fig. 2.12) sunt oligonucleotide antisens modificate, care sunt eficiente şi specifice inhibitorilor translaţionali când sunt injectate în ouăle fecundate ale peştelui zebră [Heasman J., 2002]. Ele se leagă şi inactivează secvenţe de ARNm selectate. Oligonucleotidele sunt asamblate în patru subunităţi, fiecare dintre ele conţinând una dintre cele patru baze azotate: adenina, citozina, guanina şi timina legate în poziţia 6 la inelul morfolinelor, ceea ce conferă o înaltă rezistenţă nucleazică.

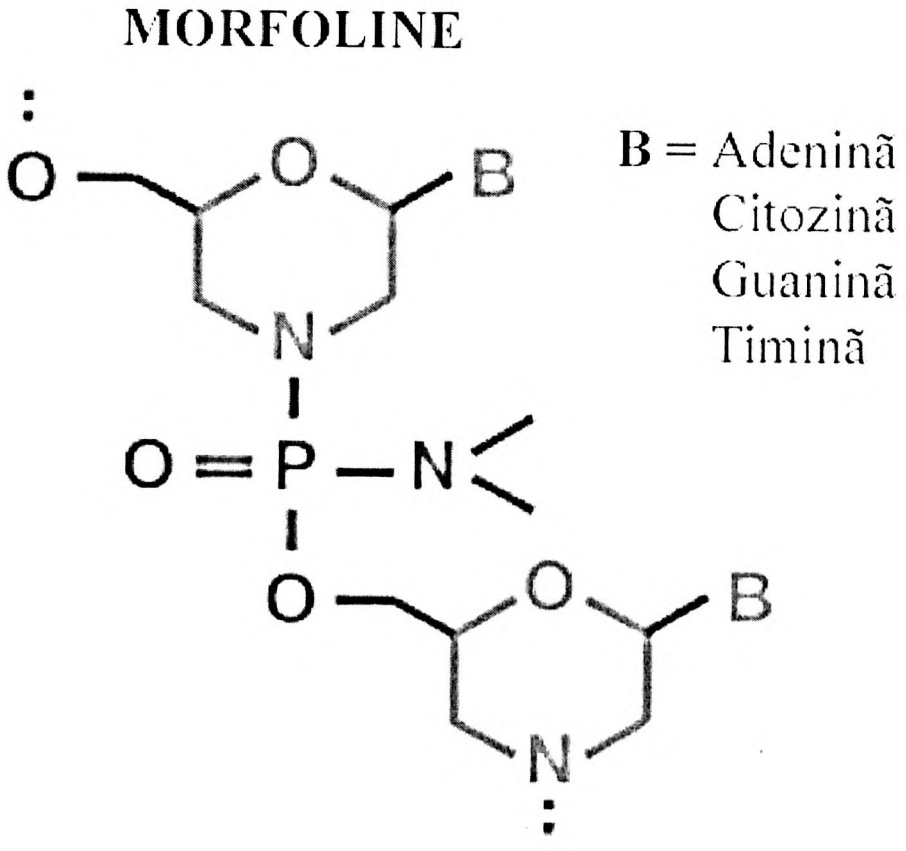


Figura. 2.12 . Structura chimică a morfolino oligonucleotidelor. Segmentul morfolino nucleotidelor cuprinde 2 subunităţi unite printr-o subunitate de linkage.

Morfolinele conţin 21-25 de baze într-o ordine specifică. Oligonucleotidele sunt concepute pentru a se lega la regiunea 5' netranslatată şi includ aminoacidul de iniţiere metionină specific ARNm. Ele acţionează prin intermediul unui bloc steric al complexului de iniţiere translaţională, iar datorită secvenţei specifice şi afinităţii mari, ele au randament fiabil şi reproductibilitate fenotipică. Pentru inactivarea unei singure sau mai multor gene, morfolinele sunt injectate în gălbenuşul de ou aflat în etapa embrionară, de 1 la 4 celule. Embrionii se dezvoltă în afara mamei şi, prin urmare, nu sunt resorbiţi în cazul în care mor în timpul embriogenezei datorită morţii cauzate de inactivarea genelor.

După fertilizarea ouălor, organismul cu toate organele sale se dezvoltă în termen de 24 de ore (echivalentul a aproximativ 9 zile la şoareci). Embrionii

sunt, de asemenea, complet transparenţi facilitând observarea celulelor condamnate la moarte. Embrionii au fost analizaţi morfologic la 1-5 zile după injectarea de morfoline, adică într-un stadiu de dezvoltare, când peştele zebră deja înoată liber. În contrast cu genele ţintă de la şoareci, care în mod normal necesită luni sau chiar ani pentru determinarea funcţiei genei, inactivarea genelor ţintă pe bază de morfoline la peştele zebră permite determinarea funcţiei genei la nivel de zile. Modelul animalul este, deosebit de potrivit pentru gene importante implicate în procese privind dezvoltarea vertebratelor, cum ar fi somitogeneza şi organogeneza.

2.7 . Deleţia tulpinilor ţintă de Caenorhabditis elegans

Genomul acestui nematod a fost, de asemenea secvenţializat şi constă din şase cromozomi ce au în total 97 Mb de perechi de baze (mărime haploidă) şi cuprinde 19099 de gene. Nematodul adult, este format din exact 959 de celule somatice, ce include 302 neuroni şi 95 de celule musculare. Generaţiile C. elegans au nevoie de un timp foarte scurt pentru a se dezvolta de la stadiul de ou fecundat până la stadiul de adult matur. Trei zile de la fecundarea oului, viermele poate produce singur descendenţi. Strategia de gene knock-out presupune deseori utilizarea sporadică de trimetilpsoralen, care este mutagen pentru un număr foarte mare de viermi [Jansen, 1997]. Expunerea la mutageni are ca rezultat mutaţii aleatoare în celulele embrionare. De exemplu, un spermatozoid ar putea fi un mutant pentru o genă specifică. Fertilizarea ovului de acest spermatoizoid va avea ca rezultat indivizi heterozigoţi. Pentru că este un vierme hermafrodit care realizează singur fertilizarea, se vor produce ovule şi spermatozoizi, care poartă această genă mutantă; un sfert din următorii săi descendenţi vor fi homozigoţi pentru alela mutantă, rezultatul fiind un fenotip specific. Un astfel de animal poate fi investigat în termen de trei zile, dacă fenotipul mutant este complet.

Screeningul viermilor expuşi la un mutagen se face după cum urmează: viermi sunt împărţiţi în mai multe subculturi mici, permiţându-le să aibă descendenţi. O porţiune din fiecare subcultură este păstrată în viaţă în congelator, şi ADN genomic este luat de la restul de cultură. Prin urmare, acest ADN este sintetizat de fraţii viermilor congelaţi şi poartă aceleaşi mutaţii ca şi viermii congelaţi. Cu o foarte mică frecvenţă (aproximativ 1 din 200 000 genomuri mutagene) mutageneza va produce o deleţie mică (100-1000 bp) la nivelul oricărei gene. Dacă primerii PCR ce flanchează zona genei de interes sunt folosiţi pentru a amplifica probe de ADN genomic, deleţiile dintre primeri pot fi detectate, generându-se ampliconi PCR de dimensiuni mai mici decât cei din ADN-ul genomic de tip sălbatic amplificat.

Astfel, ADN-ul, reprezentând mai multe mii de genomuri cu mutaţii poate fi supus screening-ului şi ampliconii generaţi ce prezintă deleţii din aceste genomuri vor fi detectaţi. După ce un fragment de ADN care conţine o anumită

deleţie este astfel evidenţiată, se pot identifica subculturile de viermi în care a avut loc deleţia; viermii congelaţi din această subcultură pot fi decongelaţi, şi animalele vii purtătoare ale mutaţiei, pot fi identificate. Indivizii mutanţii care au fost detectaţi, pot fi recuperaţi şi crescuţi în continuare pentru a studia funcţia genei. La sârşitul anului 2002 aproximativ 10% din genele lui C. elegans au fost identificate prin mutaţii. O treime din aceste gene au corespondent la mamifere, şi înţelegerea funcţiilor la C.elegans ne-ar ajuta să stabilim dacă acestea funcţionează la animale mai evoluate.

CAPITOLUL 3
SISTEME DE TESTE BAZATE PE GENE REPORTER CARE INVESTIGHEZĂ RECEPTORII CUPLAȚI CU PROTEINA G IMPLICAȚI ÎN DESCOPERIREA DE NOI MEDICAMENTE

3.1. Receptorii și comunicarea celulară

Organismele superioare, printre care, şi omul, conţin milioane de celule care au un rol important în reglarea funcţiilor fiziologice. În consecinţă, celulele au capacitatea de a comunica una cu cealaltă şi o disfuncţie de comunicare celulară poate conduce la diverse boli. În controlul funcţiei celulare, o influenţă considerabilă o au moleculele de semnalizare extracelulară şi complementar acestora numeroase proteine receptor [Uings, 2000]. Fiecare celulă răspunde la un anumit set de semnale care acţionează în diverse combinaţii pentru a regla comportamentul celulelor. Din cauza structurii unice tridimensionale a proteinei receptor, numai câteva molecule de semnalizare sunt capabile de a se lega de un anumit receptor. Prin urmare, fiecare celulă acţionează într-un mod caracteristic şi programat.

Cele mai multe molecule de semnalizare extracelulară, cum ar fi adrenalina, serotonina, dopamina şi neuropeptidul Y sunt hidrofile, şi pot activa receptorii proteinelor numai la suprafaţa celulelor ţintă. În consecinţă, receptorii transmit semnalul prin conversia evenimentelor extracelulare în semnale intracelulare care modifică comportamentul celulelor ţintă.

Există trei mari familii de receptori de suprafaţă celulară, care aparţin la aceeaşi familie de proteine transmembranare: i) receptorii cuplaţi cu canale ionice, ii) receptorii de suprafaţă cu activitate enzimatică şi iii) receptorii cuplaţi cu proteine G. Fiecare familie asigură o transducţie specifică a semnalelor extracelulare.

3.1.1. Receptorii cuplați cu canale ionice

Una din clasele de receptori de suprafaţă celulară sunt receptorii cuplaţi cu canale ionice, cunoscuţi, de asemenea, ca şi canale ionice dependente de ligand (LGICs). Aceşti receptori sunt diferiţi de receptorii cuplaţi cu proteine G (GPCRs) şi sunt implicaţi în semnalizarea sinaptică rapidă prin circulaţia ionilor prin canalele cu poartă controlate de neurotransmiţători. De obicei, canale ionice cu poartă dependente de ligand sunt închise în stare de repaus, dar se deschid ca răspuns la agonişti. După activare, canalele implicate se

desensibilizează spontan. Schimbările de potenţial membranar produse constituie un semnal care poate fi ulterior prelucrat de către celule receptoare.

În prezent, se cunosc trei superfamilii de canale ionice cu poartă dependente de ligand: superfamilia de receptori nicotinici, familia de receptori glutamatergici şi de receptorii ATP.

Superfamilia de receptori nicotinici este compusă din mai multe familii de receptori, inclusiv receptorii nicotinici pentru acetilcolină, receptorii 5-hidroxitriptamină $(HT)_3$ pentru serotonină, receptori pentru acidul γ-aminobutiric GABAA şi GABAc, şi receptorii pentru glicină sensibili la stricnină [Chebib M, 2000]. Cei mai studiaţi şi cel mai bine-înţeleşi dintre aceşti receptori sunt receptori GABA şi cei pentru acetilcolină. Aceştia se consideră a fi compuşi pentamerici ai subunităţilor de proteine şi sunt caracterizaţi printr-un domeniu N-terminal extracelular mare.

Cea de-a doua superfamilie de receptori, receptorii glutamatergici excitatory sunt abundenţi în cele mai multe regiuni ale sistemului nervos central la mamifere. Din această superfamilie fac parte: receptorii pentru N metil-D-aspartat (NMDA), receptorii pentru acidul propionic α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol (AMPA) şi receptorii kainat [Burnashev, 2000]. Receptorii nativi conţin patru sau cinci subunităţi care sunt asamblaţi ca homomeri, dubleţi sau triplete.

Subtipul de receptori ATP P2x sunt membrii ai celei de a treia superfamilii, şi au o distribuţie largă în cadrul sistemului nervos central şi sistemului cardiovascular.

3.1.2. Receptorii de suprafaţă cu activitate enzimatică

Receptorii cu activitate enzimatică sunt legaţi de proteinele transmembrane prin domeniul de legare al ligandului de pe suprafaţa exterioară a membranei plasmatice. Domeniul lor citosolic fie are o activitate enzimatică intrinsecă, fie este asociat direct cu o enzimă. Fiecare subunitate a unui receptor catalitic are doar un domeniu transmembranar. Cei mai importanţi receptori din această familie sunt receptorii tirozin kinazici şi receptori asociaţi tirozin kinazei. Mulţi receptori cunoscuţi, cum ar fi receptorii factorului de creştere epidermic (EGF) [Leof, 2000], receptorii pentru insulină, receptorii pentru factorul de creştere derivat din trombocite (PDGF) şi receptorii pentru factorul de creştere al endoteliului vascular (VEGF) aparţin grupului de receptori tirozin kinazici [Simon, 2000].

Aceşti receptori sunt singurii cu helixuri transmembranare care dimerizează după legarea ligandului, excepţia fiind cea a receptorului de insulină, ce este deja un dimer transmembranar [Cruce, 2000]. După dimerizare, are loc autofosforilarea receptorilor, care determină fosforilarea a mai multor tipuri de molecule de semnalizare la nivelul resturilor tirozin specifice. De exemplu, activitatea Ras este stimulată, şi, astfel, nivelul de mesager secund crescut

modulează factori de transcripţie şi alte proteine celulare. Receptorii tirozin kinazici joacă un rol important în reglarea metabolismului celular, proliferarea şi diferenţierea celulară. Receptorii pentru citokine aparţin receptorilor asociaţi tirozin kinazei. Aceştia prezintă un domeniu extracelular de legare al ligandului, un singur domeniu transmembranar şi un domeniu intracelular. Domeniul intracelular nu are activitate catalitică. Receptorii pentru interleukine sunt exemple de receptori asociaţi tirozin kinazei. După legarea ligandului, o tirozin kinaza asociată cu receptorul este activată prin fosforilare. Kinazele Src sau Jak sunt exemple de tirozin kinaze de acest tip. Activarea tirozin kinazei are ca rezultat fosforilarea proteinelor cu rol în transducţia semnalului şi activarea transcripţiei (STAT) care acţionează ca factori de transcriere.

Mai mult decât atât, receptorii serin/treonin kinazici mai sunt cunoscuţi sub numele de receptori cu activitate enzimatică de suprafaţă, fiind implicaţi în mai multe procese celulare, cum ar fi proliferarea, migrarea şi diferenţierea. Aceşti receptori conţin o mică regiune extracelulară, un singur domeniu transmembranar şi o regiune citoplasmatică, care acţionează ca o serin/treonin kinază. Un reprezentant al acestei familii [Zhu, 2001] este receptorul factorului de creştere transformant (TGF)-β. O altă familie de receptori celulari de suprafaţă cu activitate enzimatică sunt receptorii pentru guanilil/guanilat ciclaza. Receptorul pentru peptidul natriuretic atrial este cel mai cunoscut membru al acestei familii şi catalizează formarea de GMPc. Efectele majore sunt natriureza, diureza şi inhibarea sintezei de aldosteron.

3.1.3. Receptori cuplaţi cu proteina G (GPCRs)

GPCRs reprezintă cea mai mare şi cea mai importantă familie de receptori transmembranari caracterizaţi prin secvenţe de aminoacizi, care conţin şapte domenii hidrofobe. Aceste domenii reprezintă regiuni transmembranare întinse ale proteinelor (7 domenii transmembranare) care au dat cel de-al doilea nume pentru această superfamilie - 7TM / receptorii în heptahelix [Lefkowitz, 2000]. La mamifere, această familie conţine mai mult de 600 de membri. Ei sunt implicaţi într-un spectru larg de procese biologice care au rol în medierea semnalelor pentru o mare varietate de stimuli, cum ar fi hormoni peptidici (glucagonul, angiotensina, bradykinina), neurotransmiţători (adrenalina, serotonina, dopamina), neuropeptidele (neuropeptidul Y), lumina şi odorizantele. În consecinţă, ei joacă un rol important în reglarea fiziologică, iar funcţionarea lor defectuoasă poate să inducă numeroase boli.

În general, ligandul se leagă la GPCRs şi produce o schimbare conformaţională care conduce la asocierea de proteine G intracelulare. Aceste proteine G sunt membrii ai superfamiliei de GTP-aze ce sunt caracterizate printr-o compoziţie heterotrimerică ce cuprinde subunităţile α, β şi γ. Clasificarea structurală şi funcţională a proteinelor G - a fost definită de subunităţile α , în funcţie de care pot fi împărţite trei clase de proteine: Gαs, Gαi

şi Gαq (fig. 3.1). Asocierea proteinei G la receptorul transmembranar provoacă modificări conformaţionale în proteinele G care facilitează eliberarea GDP şi legarea GTP. Legarea GTP determină separarea subunităţii α de subunităţile β şi γ (Cruce, 2000). Proteinele Gαs cunoscute ca proteine G de stimulare, activează adenilil ciclaza (AC) care catalizează producerea de mesager secund AMPc. În schimb, proteina Gαi inhibă AC, conducând la scăderea nivelului de AMPc (fig. 3.1).

Activarea proteinei Gαq este urmată de stimularea fosfolipazei C (PLC) care induce producerea celui de-al doilea mesager secund diacilglicerolul(DAG) sau inozitol trifosfatul (IP3) (fig. 3.1), în timp ce Gαq interacţionează cu canalele de K. Activarea celui de-al doilea mesager conduce la o amplificare imensă a semnalului [Marinissen şi colab., 2001]. De exemplu, AMPc poate activa protein kinaza A (PKA), care stimulează fosforilarea altor proteine (fig. 3.1). În plus, se ştie că subunitatea βγ a proteinelor G poate activa proteina activatoare a mitozei (MAP) pe calea MAPK kinazei (fig. 3.1).

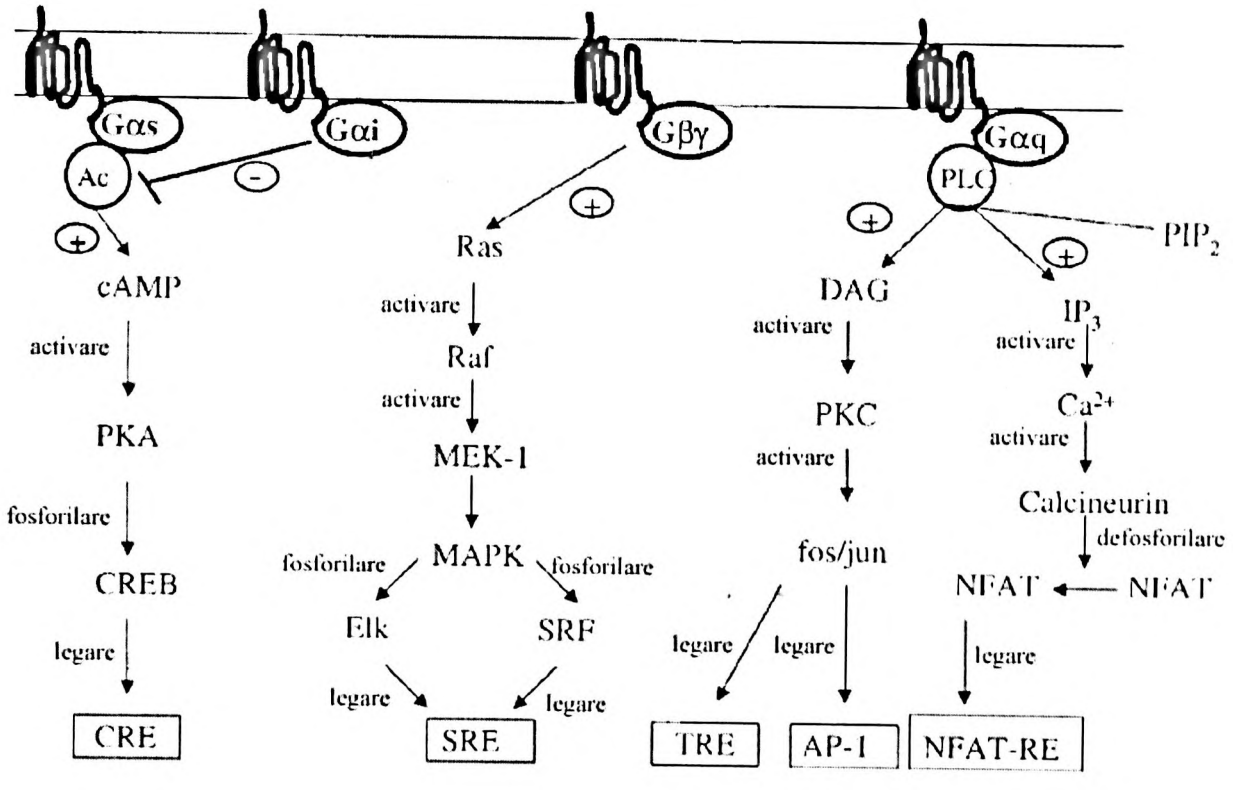


Fig. 3.1 Diagrama schematică a căilor de transducţie a semnalului de la GPCR şi a diferitelor căi ale mesagerilor secunzi care comunică cu elemente promotor nucleare. (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de răspuns la AMPc; proteina de legare CREB; DAG, diacil glicerol, IP3, inozitol trifosfat; MAPK, protein kinaza mitogen activată; MEK, MAPK kinaza; NFAT, factor nuclear al celulelor T activate; NF-AT-RE, elementul de răspuns NF-AT; PKA, protein kinaza A; PKC, protein kinaza C; PLC, fosfolipaza C; PIP2, fosfatidilinozitol-4 ,5-bifosfat; SRE, element de răspuns seric; SRF,factor de răspuns seric; TPA, 12-O-tetradecanoilforbol - 13-acetat; TRE, TPA- elementul de răspuns).

Pe lângă căile clasice, există căi independente de proteina G, ceea ce înseamnă că GPCRs poate activa molecule cum ar fi kinaza 2 legată la semnal extracellular (ERK) 2 sau STATS fără stimularea proteinei G [Cruce şi colab., 2004].

GPCRs au fost clasificaţi în trei subfamilii: subfamilia rodopsinei (clasa 1), subfamilia calcitoninei (clasa 2) şi subfamilia receptorilor pentru glutamatul metabotropic (clasa 3) [Beck-Sickinger, 1996]. Clasa 1 conţine aproximativ 90% din toţi GPCRs şi se caracterizează printr-un segment N-terminal care este puternic glicozilat, şi dispune de o punte disulfidică caracteristică între bucla 1 extracelulară şi bucla 2 extracelulară. Odorizantele, peptidele şi alte molecule mici, precum şi multe glicoproteine se leagă de receptorii familiei din clasa 1, cum ar fi receptorii pentru adrenalină, serotonină sau pentru neuropeptidul Y. Cel mai cunoscut membru din această familie este rodopsina, care conferă întreagii familii numele său. Structura cristalizată a rodopsinei a fost determinată de către Palczewski şi colab. (2000). În principal, hormonii peptidici şi neuropeptidele, cum ar fi secretina, glucagonul şi calcitonina se leagă de receptorii din familia GPCR din clasa 2. Aceştia au un domeniu extracelular N-terminal mare, comun, care conţine şase reziduri de cisteină. Cel de-al treilea şi, de departe, cel mai mic grup de GPCRs (clasa 3) se caracterizează printr-un domeniu uriaş N-terminal constituit din două lobi care se închid asemănător plantei *Venus flytrap* pe ligandul prins. Receptorii pentru glutamatul metabotropic şi receptorii GABAb aparţin acestei subfamilii de receptori. Mai mulţi receptori pentru liganzii de fungi şi de plante au fost, de asemenea, caracterizaţi şi clasificaţi în subtipuri speciale. GPCRs sunt proteine cheie în reglarea fiziologică şi funcţionarea lor defectuoasă determină câteva boli,ale căror mecanisme au fost elucidate prin studii pe şoareci GPCR knockout [Edwards şi colab., 2001]. În prezent, GPCRs sunt ţintele pentru mai mult de 50% din actualii agenţi terapeutici şi, ca atare, industria farmaceutică, este interesată foarte mult de investigarea GPCRs [Sautel M, 2000]. În ceea ce priveşte dezvoltarea de noi medicamente, este important să se producă compuşi foarte specifici care se leagă cu un înalt grad de afinitate şi selectivitate de un anumit GPCR. Numai aceste caracteristici sunt garanţia eficienţei terapeutice în special în ceea ce priveşte tolerabilitatea şi specificitatea reacţiilor adverse.

3.2. Afinitatea și activitatea liganzilor GPCR

După cum s-a menţionat mai sus, GPCRs sunt ţinte pentru o varietate de medicamente, pentru că afinitatea şi activitatea unui ligand pentru receptor trebuie să fie cunoscute în scopul producerii de noi medicamente. Afinitatea ca proprietate descrie aviditatea sau tenacitatea cu care un ligand se va leaga de receptorul său. De asemenea, activitatea numită eficacitate intrinsecă, este proprietatea unui ligand de a produce un răspuns biologic. Potenţialele medicamente ar trebui să aibă o mare afinitate şi selectivitate. O selectivitate

înaltă garantează o reducere a reacţiilor adverse, iar o afinitate mare permite reducerea dozei de medicament. Liganzii naturali ai GPCR sunt adesea folosiţi ca şablon pentru design-ul medicamentelor şi de aceea sunt generaţi noi liganzi cu structuri similare.

Teste convenţionale cu un radiotrasor sunt în general utilizate pentru a determina afinitatea unui ligand de un receptor. Toate celulele sau membranele celulare ce exprimă GPCRs sunt incubate cu un ligand radiomarcat în prezenţa ligandului nemarcat care trebuie investigat. Sunt utilizate o concentraţie constantă de radiotrasor şi diferite concentraţii de ligand nemarcat. După ce se ajunge la echilibru, celulele sau membranele sunt separate de supernatant şi radioactivitatea ligandului radiomarcat legat poate fi măsurat cu un aparat de măsurare. Radioactivitatea măsurată este proporţională cu concentraţia de ligand radiomarcat, care se leagă de receptor. Curba de legare poate fi determinată prin utilizarea de concentraţii diferite de ligand nemarcat în prezenţa unui radiotrasor cu concentraţie constantă şi valoarea IC50 poate fi obţinută şi transformată în valoare Ki conform ecuaţiei Cheng-Prussof. Ki reflectă afinitatea ligandului pentru GPCR, o valoarea Ki este cu atât este mai mică, cu cât afinitatea este mai mare.

Pentru a determina eficacitatea intrinsecă a liganzilor, potenţialul lor agonist sau antagonist, au fost introduse diferite teste care măsoară activitatea proteinelor G sau mesagerilor secundari intracelulari după legarea de ligand. Mesagerii secundari investigaţi depind de receptorii de activare a proteinelor G. Aceste metode sunt de cele mai multe ori mari consumatoare de timp şi foarte costisitoare. Mai întâi, este posibil să se măsoare legarea GTP după activarea receptorilor prin intermediul ligandului. Celule sau membranele care exprimă receptorii sunt incubate în prezenţa GTP-ului radiomarcat şi ligandului cercetat. Radioactivitatea poate fi măsurată după separarea celulelor sau membranelor de supernatant. Valorile radioactivităţii sunt corelate cu stimularea receptorilor care sunt asociaţi cu proteina G.

Testele ELISA convenţionale pot fi utilizate pentru a măsura mesagerii secunzi ca: AMPc, GMPc, diacil glicerol sau IP3. Concentraţia de AMPc mesager second depinde de tipul de proteină G activată şi poate duce fie la creşterea (Gαs,) sau fie la scăderea (Gαi) mesagerului secund. Determinarea semnalului de la nivelul celui deal doilea mesager este uneori foarte dificilă pentru că nu toate celulele exprimă optim proteine G sau mesagerul secund care este imediat degradat. Prin urmare, genele reporter în combinaţie cu promotori speciali şi elemente intensificatoare sunt folosite pentru a genera un set nou de tehnici. După legarea ligandulului la GPCR, este modulată concentraţia de mesager secund, activităţile enzimelor, şi prin urmare legarea factorilor de transcriere de elementele intensificatoare. În consecinţă, expresia genelor reporter este dependentă direct de activarea GPCR şi de calea de transducţie a semnalului activată. Semnalul rezultat este mai stabil şi mai uşor de cuantificat.

3.3. Rolul factorilor de transcripție în expresia genelor

Informaţia necesară pentru sinteza unei anumite proteine este codificată în secvenţa de nucleotide din ADN. Aceste informaţii trebuie să fie transcrise în ARN, molecula mesager, care apoi este tradusă în citoplasmă, de aparatul de sinteză proteică.

Enzime specializate, numite ARN polimeraze, catalizează procesul de transcripţie al ADN-ului în ARN. ARN polimeraza II transcrie majoritatea genelor; cu toate acestea, multe alte proteine accesoare care interacţionează cu polimeraza sunt esenţiale pentru transcripţia genelor. Numeroşi factori de transcripţie nucleari sunt cunoscuţi şi rolul lor este, fie de a activa, fie de a inhiba expresia genelor [Brivanlou şi colab., 2002]. Ei se leagă de secvenţele scurte cu semnificatie biologică, din regiunile de ADN dublu catenar, de lungimi variabile, de obicei 5-20 bp. Aceste secvenţe scurte sunt situate în amonte de promotorul de bază şi, în general, sunt specifice pentru un singur factor de transcripţie sau pentru un membru al unei singure familii de factori de transcripţie. Factorii de transcripţie se pot lega ca monomeri, homodimeri sau heterodimeri la secvenţele repetitive specifice. După legarea de situsul lor specific de legare, factorii de transcripţie interacţionează între ei, cu ARN polimeraza II şi cu alţi factori bazali pentru a regla expresia genei.

În prezent, mai mult de 300 de factori de transcriptie au fost identificaţi în genomul vertebratelor. Activitatea unor factori de transcriere este modulată de fosforilarea lor. Dintre factorii de trascripţie bine înţeleşi şi studiaţi menţionăm: proteina de legare a elementului de răspuns la AMPc (CREB), factorul de legare a elementului de răspuns seric, factorul nuclear al celulelor T activate (NF-AT), proteinele c-Jun şi STAT. Situsurile de recunoaştere a acestor factori de transcripţie sunt adesea folosite în promotori pentru realizarea de sisteme de teste care utilizează genele reporter pentru investigarea GPCRs (fig. 3.1).

3.3.1. CREB (proteina de legare la elementul de răspuns la AMPc)

CREB este implicată în calea AMPc. După activarea receptorilor cuplaţi cu proteina Gαs, care reglează pozitiv AC, nivel intracelular de AMPc este crescut. AMPc activează proteina kinaza A (PKA), care permite unităţii catalitice a PKA să intre în nucleu unde fosforilează CREB, pe serină în poziţia 133.

CREB fosforilată se leagă de elementul intensificator al elementului de răspuns la AMPc (CRE). Transcrierea genelor linkate este activată după legarea proteinei de legare CREB (CBP) la CREB. Stimularea GPCRs cuplaţi cu Gαi scade AMPc intracelular şi determină o reducere a transcripţiei genei reporter CRE-linkată.

3.3.2. SRF

Calea MAPK este o cale foarte importantă de semnalizare pentru receptorii tirozin kinazici şi este necesară pentru fosforilarea SRF. SRF se leagă la elementul de răspuns seric, la situsul de legare ADN prezent, de exemplu, în promotorul c-FOS, care conduce la transcrierea c-FOS, un alt factor de transcriere. Numai în combinaţie cu factorul complexului ternar (TCF/Elk1), SRF se poate lega la SRE şi active transcripţia genei. Ambii factori de transcripţie, SRF şi TCF sunt activaţi prin fosforilarea MAPK. S-a arătat că subunităţile βγ ale proteinelor Gαi activează această cale, via activarea MAPK RAS-dependentă. Stimularea MAPK via receptori cuplaţi cu Gαq are în principal ca rezultat activarea protein kinazei C (PKC) [Cruce şi colab., 2004].

3.3.3. Proteinele STAT

Proteinele care sunt factorii de transcriere STAT sunt activate după stimularea receptorilor de citokine şi receptorilor tirozin kinazici. În prezent, sunt cunoscute 6 proteine STAT (STAT1-STAT6).

După activarea receptorilor prin legarea ligandului aceşti receptori se asociazăcu tirozin kinaza JAK, care, la rândul său este fosforilată. Ulterior, JAK kinazele activate pot activa din nou proteinele STAT prin fosforilare, urmate de formarea dimerilor. Dimerii sunt translocaţi în nucleu şi se leagă de situsurile de legare AND ale elementului de răspuns stimulate de interferon (ISRE), şi este iniţiată transcrierea genelor. Studii recente demonstrează activarea şi implicarea căii STAT3 în căile Gαi şi Gαo protein mediate [Ram, 2001].

3.3.4. c-Jun

Factorul de transcripţie c-Jun este fosforilat de o protein kinază, JNK (c-Jun-Nterminal kinaza), care este un membru nou al familiei MAPK. De asemenea această kinază, fosforilează factorul de transcripţie ATF2. ATF2 şi c-Jun constituie un heterodimer, care se leagă de situsul de legare ADN al elementului de răspuns TPA (TRE) în promotorul c-Jun.

3.3.5. NF-AT

NF-AT este prezent ca factor de transcriere în limfocite şi este indus de stimularea receptorului antigenic. NF-AT este fosforilat şi situat în citoplasma celulelor în repaus. Controlul transcripţiei mediată de NF-AT în limfocite este dependent de semnalizarea simultană prin Ca şi MAPK care sunt activate după stimularea receptorilor de antigen. Calea Ca activează calcineurin fosfataza. Calcineurina defosforilează NF-AT şi conduce la o translocare nucleară a NF-AT. Apoi, NF-AT se asamblează într-un complex multimeric cu AP1 şi se leagă în amonte la un intensificator major al genei pentru citokina IL-2 după care are loc transcripţia genei. Izoforme distincte de NF-AT care se găsesc la oameni şi şoareci, sunt exprimate în celulele nonlimfoide.

3.4. Genele reporter

O genă reporter este o secvenţă de ADN, al cărei produs este sintetizat ca răspuns la activarea cascadei de semnalizare investigată. Expresia genelor reporter poate fi controlată de elemente intensificatoare, şi situsuri de legare pentru factorii de transcripţie specifici. Alegerea unei gene reporter specifice, depinde de următoarele condiţii:

- linia de celule utilizată pentru experimente; activitatea endogenă din fiecare celulă este diferită şi este important să demonstrăm că linia de celule utilizată nu exprimă gena reporter aleasă;
- natura experimentului, deoarece trebuie să fie utilizate gene reporter diferite pentru investigarea dinamicii expresiei genei şi a eficienţei transfecţei în acelaşi experiment;
- alegerea genei reporter depinde de asemenea, de metoda de detecţie.

Genele reporter au caracteristici speciale. Ele sunt caracterizate printr-o secvenţă definită de nucleotide, activitate de fond scăzută, sensibilitate mare şi răspunsul care trebuie să fie uşor de detectat fenotipic. În scopul de a efectua măsurători, activitatea genelor reporter trebuie să fie cantitativă, rapidă, uşoară, reproductibilă şi sigură. Metodele de măsurare care sunt folosite de cele mai multe ori sunt măsurători de radioactivitate, fluorescenţă, luminiscenţă şi colorimetrie.

Semnalul genelor reporter trebuie să fie semnificativ peste activitatea bazală care depinde de chimia reporterului, linia de celule utilizată, sensibilitatea instrumentelor şi interferenţele activităţilor chimice.

Sisteme genetice reporter au fost elaborate cu scopul de a studia expresia şi reglarea genelor de la eucariote. Mai mult, ele sunt utilizate pentru studiul promotorului şi secvenţelor intensificatoare, mediatorilor cum ar fi factorii de transcripţie, procesarea ARNm şi translaţia. De asemenea, sistemele de gene reporter sunt aplicate pentru a monitoriza eficienţa transfecţiei şi pentru a studia interacţiunea proteină-proteină, localizarea subcelulară a proteinelor şi de asemenea indicatorii activităţii transcripţionale în celule.

În zilele noastre, sistemele de gene reporter au aplicaţii în screeningul biologic pentru descoperirea de noi medicamente [high-throughput screening = screening de mare capacitate (HTS)] [Goetz şi colab., 2000], pentru investigarea căilor de semnalizare şi în terapia genică. Acestea sunt, de asemenea utilizate pentru investigarea interacţiunilor receptor-ligand, în special pentru investigarea GPCRs.

Sunt cunoscute mai multe gene reporter, de exemplu, cloramfenicol acetiltransferaza (CAT), β-galactozidaza (β-Gal), β-glucuronidaza, fosfataza alcalină (AP), fosfataza alcalină secretată (SEAP), β-lactamaza, luciferaza şi proteina fluorescentă verde (GFP). Avantaje şi dezavantajele lor sunt prezentate în tabelul 3.1. Unele din aceste gene reporter sunt utilizate pentru investigarea GPCRs.

3.4.1. CAT

CAT a fost prima genă reporter utilizată pentru a monitoriza activitatea transcripţională în celule. CAT a fost izolată din *Escherichia coli* şi este o proteină trimerică care este formată din trei subunităţi identice, fiecare cu o greutate moleculară de 25 kDa [Leslie şi colab., 1988]. În celulele de mamifere, proteina CAT este relativ stabilă, şi fără transfecţie nu există exprimare endogenă. CAT are proprietăţile necesare pentru a fi utilizată în teste tranzitorii concepute, pentru a investiga acumularea proteinelor exprimate.

Reacţia enzimatică naturală a CAT, transferul grupării acetil de la acetil-CoA la poziţia 3-hidroxil a cloramfenicolului, este utilizată pentru a efectua teste reporter. Acetil-CoA radiomarcată permite transferul de acetil radiomarcat la substratul de cloramfenicol.

Produşii formaţi pot fi determinaţi prin separare fizică utilizând cromatografia în strat subţire (TLC). TLC separă substratul şi produsul, radioactivitatea putându-se observa prin expunerea plăcii de TLC pe filme de radiografie sau prin fosfoimagini.

Metoda TLC permite vizual confirmarea reacţiei. Cuantificarea este posibilă prin răzuirea spoturilor, TLC, extragerea cu un solvent organic şi numărarea probelor cu un dispozitiv de numărare pe bază de scintilaţie.

Alte teste izotopice se bazează pe extracţia organică directă a celor mai mulţi produşi nepolari. Alternativ, anticorpii împotriva CAT sunt acum disponibili şi ei permit cuantificarea prin Western blotting sau ELISA.

Gena reporter	**Avantaje**	**Dezavantaje**
Cloramfenicol acetiltransferaza (CAT)	- fără expresie endogenă în celule mamiferelor - confirmarea vizuală a activităţii enzimei	- costuri ridicate pentru izotopi şi sisteme TLC - radioactivitate - liză celulară - substraturi suplimentare
β-Galactosidase (β -Gal)	- formate de teste variate pentru utilizare cu extract celular - uşor de testat	- teste colorimetrice nu foarte sensibile - activitate endogenă în anumite tipuri de celule - liză celulară
β-Glucuronidaza	- formate de teste variate	- activitate endogenă în celulele mamiferelor - liză celulară
Fosfataza alcalină (AP)	- formate de teste variate - uşor de testat - necostisitor	- activitate endogenă în celulele mamiferelor - teste colorimetrice nu foarte sensibile - liză celulară

Fosfataza alkalină secretată (SEAP)	- proteină secretată - formate de teste variate - sensibilă (teste fluorimetrice)	- adiţie de substrat
Luciferaza	- rapidă şi uşoară - de mare sensibilitate - fără activitate endogenă	- liză celulară - adiţie de substrat - proteină relativ stabilă
Proteina fluorescentă verde (GFP)	- variante GFP pot fi detectate în aceeaşi celulă - investigaţii în celule vii - autofluorescenţă (nu necesită substrat)	- cititor fluorescent sensibil

Tabelul 3.1. Comparea celor mai frecvent utilizate gene reporter

3.4.2. β -Gal

β -Gal este o enzimă bacteriană bine caracterizată şi este compusă din patru subunităţi, fiecare cu o greutate moleculară de 116 kDa. Cataliza hidrolizei zaharurilor de β-Gal cum ar fi lactoza este raportat ca un test funcţional. Activitatea enzimatică din extractele celulare poate fi analizată cu diferite substraturi speciale, care să permită cuantificarea activităţii enzimei cu un spectrofotometru, fluorimetru sau luminometru.

De asemenea, au fost dezvoltate metode de colorimetrie simplă cu o-nitrofenil-BD-galactopiranozid (ONPG) sau clorofenol roşu BD-galactopiranzoid (CPRG) [Eustice şi colab., 1991]. Metodele colorimetrice, care nu sunt foarte sensibile şi au doar o gama dinamică îngustă, au fost înlocuite în mare parte cu metode fluorescente sau luminiscente mai sensibile. Substraturi, cum ar fi β -metil umbeliferil galactozidul şi fluorescein digalactozidul (FDG) pot fi folosite pentru teste bazate pe fluorescenţă, iar 1,2-dioxetanul pentru teste pe bază de luminescenţă. Testele reporter cu β-galactozidază sunt larg utilizate, în special pentru a monitoriza eficienţa transfecţiei.

3.4.3. β –Glucuronidaza

β -Glucuronidaza este o glicoproteină tetramerică de la E. coli, formată din patru subunităţi identice de 68 kDa, localizate în special în mediul acid al lizozomilor. Enzima înlătură rezidurile de acid β -glucuronic terminale de la capătul neredus al glicozaminoglicanilor şi altor glicoconjugaţi. Teste colorimetrice ce pot fi detectate prin spectrofotometrie, au fost elaborate cu scopul de a măsură activitatea acestei enzime. Metodele chemiluminescente au fost create pentru îmbunătăţirea sensibilităţii. β -glucuronidaza este de cele mai multe ori folosită pentru investigaţii la plante superioare, şi din cauza activităţii sale endogene în unele celule de mamifere [Paigen,1989].

3.4.4. AP (fosfataza alcalină)

AP este o proteină relativ stabilă şi care la pH alcalin defosforilează o gamă largă de substraturi. Metode spectrofotometrice standard se bazează pe hidroliza p-nitrofenil fosfatului (PNPP) de AP. Acest test este ieftin, rapid şi simplu, dar îi lipseşte sensibilitatea obţinută prin alte metode. O metodă bioluminescentă în 2 trepte a fost elaborată cu scopul de a îmbunătăţi sensibilitatea. În această abordare cu două etape, mai întâi AP hidrolizează d-luciferin-O-fosfatul la d-luciferin, care serveşte în cea de a doua etapă ca un substrat pentru luciferază. Deşi sensibilitatea este mult mai mare, manipularea este mai puţin convenabilă. Ca o alternativă a fost dezvoltată o metodă chemiluminescentă pentru detecţia AP într-o singură etapă [Schaap, 1989].

3.4.5. SEAP (fosfataza alcalină secretată)

SEAP este o formă mutantă de AP placentară umană, căreia îi lipsesc 24 de aminoacizi la capătul C-terminal al proteinei. Eliminarea acestor aminoacizi împiedică ancorarea enzimei la membrana plasmatică, şi, în consecinţă, este secretată de celule şi poate fi detectată prin prelevarea de probe din mediu de cultură [Berger şi colab., 1988]. Celule rămâne intacte şi viabile pentru experimente ulterioare. SEAP poate fi uşor detectat prin hidroliza p-nitrofenol fosfatului, care determină o schimbare de culoare. Această modificare poate fi cuantificată.

Metodele chemiluminescente pot fi, de asemenea, utilizate în plus faţă de metodele colorimetrice. Un avantaj major al SEAP este stabilitatea la căldură a enzimei şi la L-homoarginina fosfataz inhibitoare. Prin urmare, celulele lizate pot să fie tratate cu căldură sau L-homoarginină pentru a inactiva activitatea bazală a AP, în celule în care poate a intrat în mediul de cultură. Astfel, activitatea bazală observată cu sisteme reporter AP este, în principal, eliminată cu sistemul SEAP. Asocierea de proteine reporter secretate, cu activitate de fond puţin endogenă, precum şi cu o varietate largă de teste uşoare şi sensibile fac din SEAP un sistem convenabil şi flexibil.

3.4.6. β –lactamaza

Proteina β-lactamaza (penicilin amido- β -lactamhidrolaza) este o proteină monomerică de 29-kDa, izolată din E. coli. Această enzimă are activitate esterazică şi funcţia sa naturală este clivarea ampicilinei şi altor antibiotice, de exemplu, penicilina şi cefalosporina. β –lactamaza este produsă industrial în trei forme: secretată, citosolică şi asociată membranei plasmatice [Moore şi colab., 1987]. În consecinţă, activitatea enzimei poate fi analizată din extracte celulare sau, atunci când este secretată, direct din mediu.

Metode colorimetrice sunt aplicate pentru măsurători, de exemplu pentru substraturi ca nitrocefin sau (PADAC) [acid 3 -(2,4-dinitrostiril)-(6R, 7R)-7-(2-tienilacetamido)-cef-3-em-4-carboxilic] îşi schimbă culoarea după reacţia cu β -lactamaza. Activitatea enzimei cu PADAC ca substrat este monitorizată prin scăderea absorbanţei la 570 nm şi cu nitrocefin prin creşterea absorbanţei la 570 nm. Recent, un substrat fluorescent foarte sensibil pentru β -lactamază a fost dezvoltat ca un ester membranar permeabil, care ar putea fi aplicat pentru a monitoriza expresia genei la o singură celulă vie. Acest substrat fluorogenic CCF2/AM este o cefalosporină derivată, ataşată la doi fluorofori. În cazul în care substratul fluorogenic este intact, fluorescenţa cu transfer de energie prin rezonanţă (FRET) apare între cei doi fluorofori [Zlokarnik şi colab., 1998]. În cazul în care substratul este de clivat de către β -lactamază, cele două părţi fluorescente ale moleculei sunt separate şi efectul FRET este întrerupt. Schimbarea lungimi de undă rezultată este detectabilă în suspensie celulară folosind sortarea celulară pe bază de fluorescenţă, în monostraturile celulare utilizând cititoare de plăci convenţinale iar în celule individuale utilizând microscopia confocală. Tehnicile de gene reporter cu β -lactamază sunt foarte sensibile, la utilizarea acestui substrat fluorogenic, dar şi costisitoare.

3.4.7. Luciferaza

Luciferaza se referă la o familie de enzime care catalizează oxidarea de substraturi diferite ca luciferina şi coelenterazina, ceea ce conduce la emisie de lumină. Lucifereazele cunoscute sunt luciferaza bacteriană, luciferaza Firefly *(Photinus pyralis)* (*firefly* = gândac nocturn din America tropicală care produce lumina, corpul este luminiscent datorita organelor abdominale), şi mai recent, luciferaza renilla din panseaua de mare bioluminiscentă, *Renilla reniformis.*

Luciferazele bacteriene sunt, în general, proteine dimerice labile termic. În consecinţă, aplicarea lor ca gene reporter în celulele de mamifere este limitată.

Cea mai cunoscută luciferază este luciferaza firefly. Acestă enzimă de 60kDa, o monooxigenază, catalizează o reacţie utilizând D-luciferin şi ATP, în prezenţa oxigenului şi Mg, conducând la emisie de lumină [Branchini şi colab., 2001]. Valoarea totală a luminii măsurate într-un anumit interval de timp este proporţională cu activitatea luciferazei din probă. Structura cu raze X a acestei luciferaze, descoperită în 1996, a evidenţiat că arginina din pozitia 218 constituie situsul de legarea al luciferinei.

Mai recent, au fost dezvoltaţi reactivi care prelungesc timpul de înjumătăţire a flash-ului. Prelungirea luminii produse creşte sensibilitatea testului şi asigură o mai mare durată de înjumătăţire a luminiscenţei şi, astfel, o perioadă mai lungă de măsurare.

Luciferaza din *R. reniformis* [Lorenz şi colab., 1996] catalizează oxidarea coelenteramidei şi este de cele mai multe ori folosită în formate de testare cu luciferaze duale. Aceste teste permit măsurarea ambelor luciferaze

firefly şi renilla din acelaşi extract celular. Prin urmare, luciferaza firefly poate fi folosită ca genă reporter şi luciferaza renilla ca un standard intern pentru a cuantifica eficienţei transfecţiei [Parsons şi colab., 2000]. Luciferaza firefly, este utilizată de cele mai multe ori pentru studiul reglării promotorului şi efectelor reglatoare ale agenţilor ce cresc AMPc.

În prezent, luciferaza rămâne în continuare reporterul ales pentru măsurătorile dinamice ale expresiei genelor, datorită sensibilităţii înalte şi duratei de înjumătăţire a vieţii, relativ scurtă. Aceasta a permis, de exemplu, investigarea ritmurilor circadiene la plante.

Mai mult decât atât, tehnici de gene reporter cu luciferaza firefly au fost generate pentru investigarea GPCRs şi pentru identificarea receptorilor agonişti şi antagonişti. Acest sistem este foarte popular în industria farmaceutică şi este utilizat pentru HTS.

3.4.8. Proteina fluorescentă verde (GFP)

GFP din peştele jeleu *Aequorea victoria* este o fotoproteină cu 238 amino-acizi care emite lumină verde, cu o emisie maximă la 509 nm după excitarea la 488 nm [Tsien, 1998]. ADNc a fost clonat în 1991 şi structura cristalină identificată în 1996 [Ormo, 1996]. GFP are marele avantaj că este un fluorescent natural, care nu are nevoie de oricare alte substraturi, iar fluorescenţa nu este specifică speciei. Mai mult decât atât, GFP poate fi folosit în celulele vii şi pentru producerea de proteine de fuziune.

Cromoforul activ din GFP, necesar pentru fluorescenţă, este un hexapeptid care conţine un trimer ciclizat Ser-dehidroTyr-Gly [Fukuda, 2000]. Acest cromofor este situat în centrul proteinei, a cărei structură este menţionată ca o posibilă structură β. Mutaţii în cromoforul activ al alelei GFP de tip sălbatic a condus la dezvoltarea de variante GFP cu fluorescenţă verde îmbunătăţită. Au rezultat trei variante mutante: proteina fluorescentă albastru-gălbuie (PCP), proteina galben fluorescentă (YFP) şi o proteină albastru fluorescentă (BFP). Expresia GFP poate fi monitorizată direct în organismele vii, ca şi în celule. Alte avantaje sunt stabilitatea termică, pH-ul extreme şi denaturanţii chimici.

În ultimii ani, mai multe proteine de fuziune cu GFP au fost construite pentru a investiga proteinele de transport şi localizarea lor [Welsh, 1997]. Imaginea expresiei genei este uşor de realizat datorită proprietăţilor GFP [Chalfie, 1994]. Dezvoltarea GFP şi a variantelor sale spectrale permit urmărirea simultană a diferitelor proteine la celulele vii.

Mai mult, investigarea interacţiunii proteină-proteină este posibilă cu ajutorul tehnicii FRET, pentru că GFP şi variantele sale pot fi utilizate ca perechi FRET [Sorkin, 2000].

S-au efectuat experimente cu proteine de fuziune GFP pentru a investiga reglarea GPCR. GFP a fost de asemenea utilizat pentru a genera

sisteme de teste de gene reporter pentru investigarea GPCRs. Dinger şi Beck-Sickinger (2002) au identificat agoniştii şi au determinat afinitatea ligandului.

3.5. Sisteme de teste bazate pe gene reporter pentru investigarea GPCRs

În ultimii ani, sisteme de teste bazate pe gene reporter au fost dezvoltate pentru investigarea GPCRs, sisteme care oferă o alternativă la testele biochimice convenţionale, cum ar fi testele de competiţie şi testele AMPc. Acum este posibilă investigarea căilor de transducţie a semnalului de la nivelul receptorilor de la suprafaţa celulelor până la transcripţia genelor nucleare în celule. Prin utilizarea aceste sisteme de testare poate fi uşor măsurată schimbarea mesagerului secund după activarea GPCR prin creşterea sau scăderea exprimării genei reporter. Până acum nivelul intracelular de mesager secund trebuia să fie detectat prin metode metabolice speciale, dificile tehnic, incomode, consumatoare de timp şi de cele mai multe ori costisitoare.

Dezvoltarea vectorilor de gene reporter cu o secvenţă promotor şi o secvenţă genă reporter este esenţială în scopul de a investiga GPCRs cu un sistem de teste pe bază de gene reporter. Alegerea promotorului depinde de natura căii de semnalizare pentru GPCR studiat, şi determină sensibilitatea şi specificitatea reporterului. Situsurile ADN de legare ale factorilor de transcripţie, numite elemente intensificatoare sunt utilizate în combinaţie cu un promotor de bază care controlează transcripţia genei reporter. În consecinţă, calea pentru GPCR studiat trebuie să fie cunoscută (fig. 3.1).

Dezavantajul promotorilor naturali, cum ar fi c-FOS este că trebuie să conţină situsuri de legare pentru un număr de factori de transcripţie şi, astfel, reglarea unor astfel de promotori depinde de mai mulţi factori de transcripţie. Cu scopul de a genera teste pe bază de gene reporter pentru o singură cascadă de semnalizare, au fost construiţi promotori sintetici care conţin numai un singur tip de situsuri pentru legarea factorilor de transcripţie.

Secvenţele promotorilor sintetici cele mai cunoscute pentru investigarea GPCRs cuprind: elemente CRE, elemente SRE, elemente TRE şi elemental intensificator NF-AT; promotorul natural c-FOS, situsul de legare AP1 şi secvenţa activatoare GAL4. Datele publicate demonstrează că luciferaza este cea mai populară genă reporter pentru investigarea GPCRs. În plus, punerea în practică a β- lactamazei şi SEAP este, de asemenea, posibilă.

Recent, a fost prezentată o GFP ca genă reporter pentru investigarea GPCRs, care prezintă unele avantaje faţă de alte gene reporter menţionate.

3.5.1. Aplicarea luciferazelor ca gene reporter

Luciferaza firefly (vezi 3.4.7) este cea mai utilizată genă reporter pentru investigarea GPCRs [Stratowa şi colab., 1995]. Gena pentru luciferază este asociată cu diferite elemente promotor cum ar fi: elementele CRE, elementele TRE, promotorul c-FOS şi elementul intensificator NF-AT. Elementul intensificator CRE este folosit pentru investigarea receptorilor cuplaţi cu Gαs şi Gαi. Prin urmare, expresia luciferazei este reglată de creşterea sau scăderea AMPc. După stimularea receptorilor cuplaţi cu Gαs, urmează o creştere a nivelului de AMPc. AMPc determină fosforilarea CREB urmată de creşterea expresiei luciferazei. În scopul de a efectua teste cu receptori cuplaţi cu Gαs, testele sunt de obicei, efectuate în prezenţă de forskolină, un stimulator al AC, care creşte nivelul de AMPc, astfel încât inhibiţia este mai uşor detectabilă. Stimularea forskolinei este măsurată în paralel (fig. 3.2).

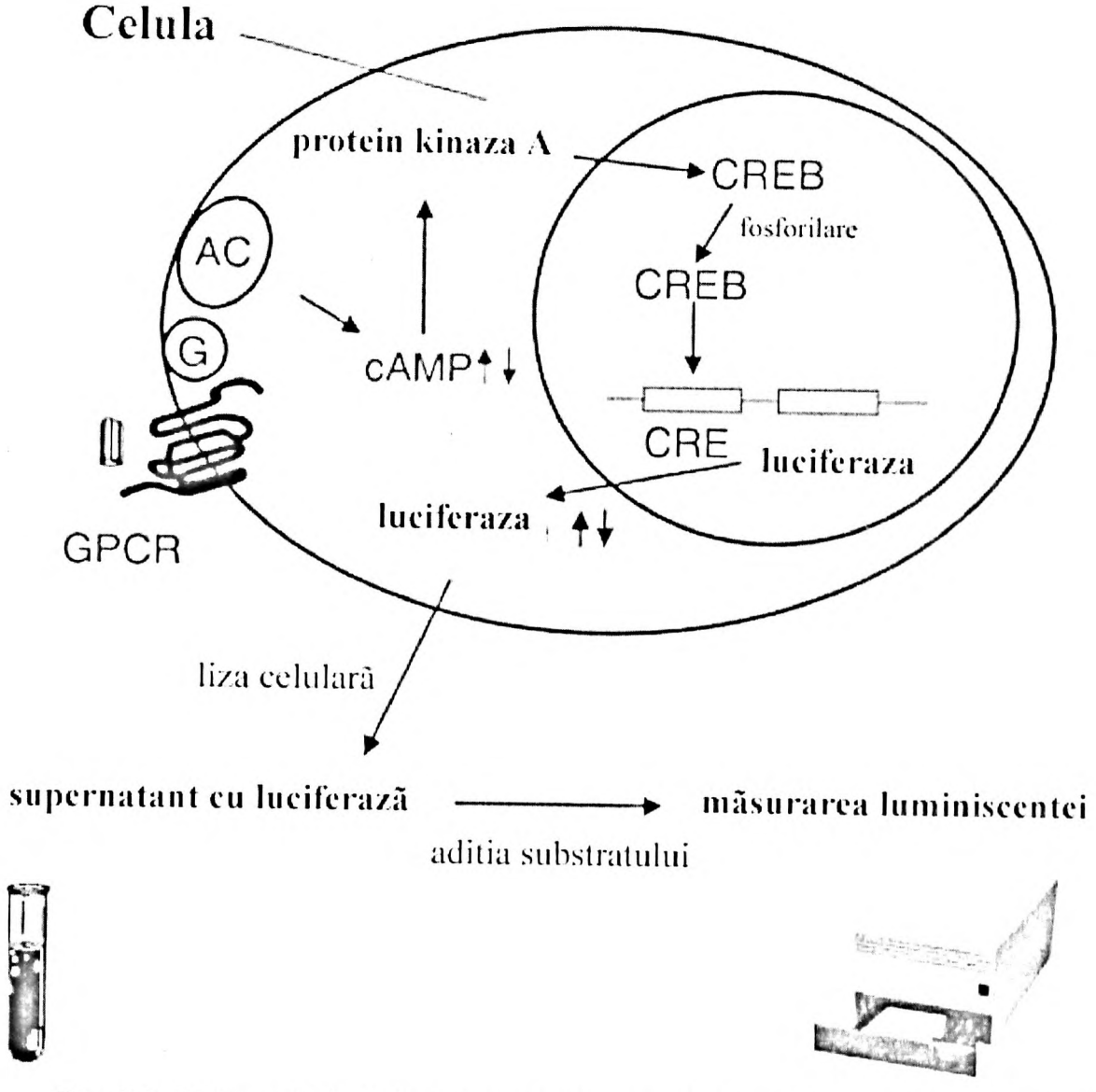


Fig. 3.2. Sisteme de teste bazate pe gene reporter ce utilizează elemente CRE şi luciferaza pentru investigarea GPCRs. Celulele ce coexprimă GPCR, cuplaţi fie cu Gαs, fie cu Gαi au fost incubate cu ligandul. După ce are loc stimularea sau inhibarea AC se

produce o creştere sau respectiv, o scădere a AMPc. O creştere a nivelului de AMPc conduce la activarea PKA, care activează prin CREB fosforilarea. Forma fosforilată a CREB interacţionează cu elemente CRE. Ulterior, este iniţiată transcripţia luciferazei. Pentru investigarea receptorilor cuplaţi cu Gαi, celulele trebuie să fie incubate cu ligandul în prezenţa forskolinei. Luciferaza este exprimată în citoplasmă, şi activitatea poate fi măsurată după liza celulelor şi adăugarea substratului, de exemplu luciferin luciferaza. O activitate mare a luciferazei cauzează o luminiscenţă puternică. Activitatea luciferazei poate fi corelată cu activitatea ligandului care activează GPCR. (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de legare AMPc; CREB, proteina de legare CRE; G, proteina G.)

Himmler şi colab. (1993) a utilizat sisteme de teste pe bază de gene reporter cu CRE şi luciferaza pentru a investiga receptorii dopaminergici D1 şi D5 la om, ambii receptori fiind cuplaţi cu Gαs. Ei au observat o creştere a expresiei luciferazei după stimularea cu forskolin sau cu agonişti ai dopaminei.

Identificarea compuşilor agonişti sau antagonişti a fost o reuşită. Un test similar a fost aplicat pentru investigarea comportamentului de legare a diferiţilor liganzi de serotonină, receptori 5-HT1B şi receptori C1A de calcitonină [George şi colab., 1997].

De asemenea, luciferaza în asociere cu CRE este folosită în industria farmaceutică pentru realizarea unor screeninguri de mare capacitate (HTSs). Punerea în aplicare a acestui sistem a fost raportată de diferite grupuri care au stabilit teste pentru investigarea rapidă şi sensibilă a receptorilor cuplaţi cu Gi şi Gs. Testele pentru screeningurile de mare capacitate sunt realizate de cele mai multe ori în microplăci.

Cu scopul de a investiga receptorii cuplaţi cu Gαs, Gαi şi Gαq prin acelaşi sistem de teste, elemente CRE au fost combinate cu elemente MRE. De asemenea, acest sistem permite investigarea receptorilor cuplaţi cu Gαq [Fitzgerald şi colab., 1999]. Această regiune promotor poate răspunde la creşterea intracelulară de calciu, pentru a stimula PKC şi pentru a schimba nivelurile de AMPc. Răspunsul poate fi măsurat prin creşterea sau scăderea activităţii luciferazei, şi este util pentru caracterizarea farmacologică a agoniştilor şi antagoniştilor. Parsons şi colab. (2000) au utilizat luciferaza firefly şi renilla în asociere cu CREs pentru investigarea receptorilor factorilor 1 şi 2 umani de eliberare a corticotropinei (CRFR1 şi CRFR2). De asemenea s-a reuşit identificarea agoniştilor şi antagoniştilor.

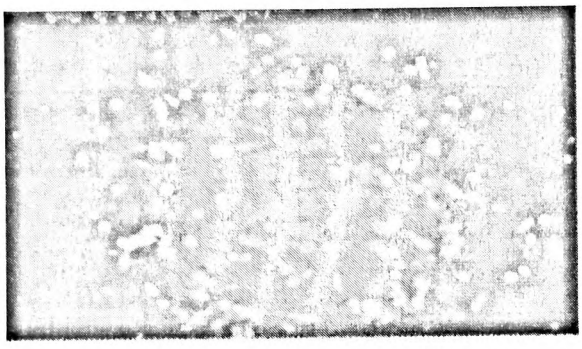
În scopul de a investiga receptorii a căror căi de transducţie a semnalului modifică nivelul intracelular de AMPc sau nivelurile IP3/DAG, s-a fost folosit ca sistem pentru testele celulare o genă, luciferaza cu elemente TRE ca promotor. Acest sistem a permis caracterizarea receptorilor diferitelor neurokinine NK1, NK2 şi NK3. Mai mult decât atât, un alt sistem ce foloseşte luciferaza şi elemente TRE a fost dezvoltat pentru de screeningul liganzilor [Kotarsky şi colab., 2001]. Sistemul a fost, de asemenea, cuplat cu GFP, în scopul de a selecta celulele care exprimă stabil sistemul reporter. Aceste celule au fost folosite pentru investigarea GPCRs. Agoniştii şi antagoniştii receptorilor

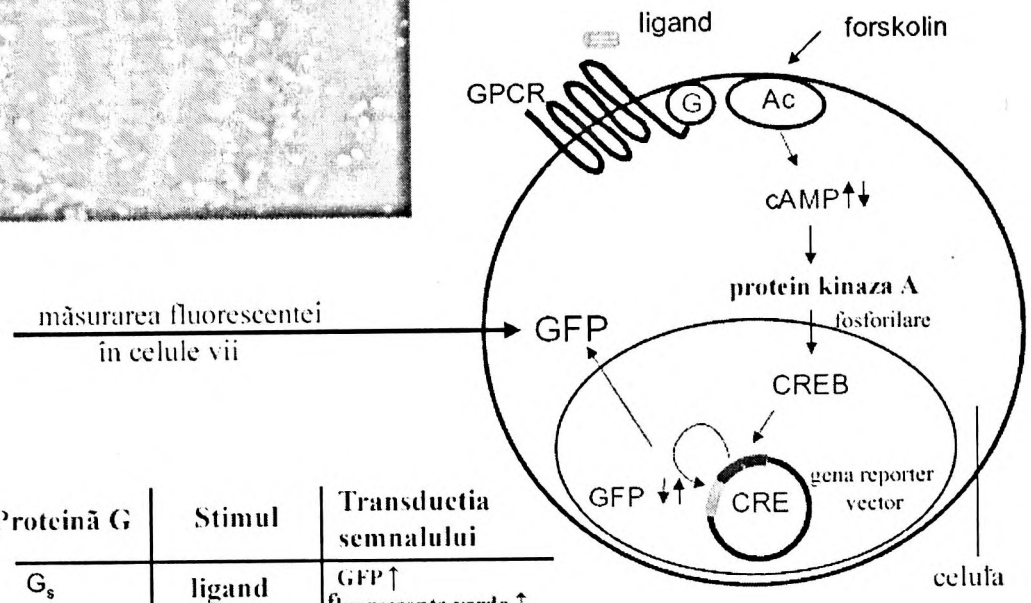
hormonului de eliberare a gonadotropinei (GnRH receptorii) au fost investigaţi cu succes, cu un sistem de teste bazat pe gene reporter pentru luciferază în combinaţie cu promotorul C-FOS. Receptorii GnRH sunt cuplaţi la calea inozitol-fosfolipid şi, după activarea receptorului, transcripţia genei luciferaza este indusă de promotorul c-FOS.

3.5.2. Utilizarea altor gene reporter pentru investigarea GPCRs

De asemenea s-a raportat utilizarea β lactamazei şi SEAP pentru investigarea GPCRs. Xing şi colab. (2000) au realizat un sistem de teste bazat pe gene reporter cu β lactamaza ca genă reporter, în combinaţie cu promotorul NF-AT [Xing H şi colab., 2000] şi l-a folosit pentru a investiga GPCRs care sunt cuplaţi cu proteinele Gαq. Schimbarea concentraţiei mesagerului secund ar putea fi detectată prin creşterea expresiei β lactamazei. Pollok şi colab. (1999) au folosit, de asemenea, acest sistem, pentru a investiga receptorii cuplaţi cu proteina Gαi. Pentru a efectua aceste teste, semnalul proteinei Gαi a fost convertit în semnal de la proteină Gαq şi activitatea β lactamazei a putut fi măsurată.

Liganzi DP şi PE pentru receptorii prostanoizi GPCRs au fost caracterizaţi prin tehnica CRE-SEAP [Durocher şi colab., 2000]. Activarea receptorilor ar putea fi detectată prin schimbarea nivelurilor intracelulare ale SEAP. Un dezavantaj important de măsurare a activităţii luciferazei şi β lactamazei îl constituie necesitatea de a pregăti extracte de celule şi de a adăuga un substrat. Aceste celule nu pot fi utilizate pentru o analiza ulterioară, iar prepararea celulelor lizate este consumatoare de timp, adiţia unui substrat putând perturba sistemul celulelor sensibile. În consecinţă, un sistem de teste pe bază de gene reporter cu elemente CRE şi GFP ca genă reporter a fost dezvoltat pentru investigarea GPCRs pentru celule vii (fig. 3.3). Avantajul acestui sistem îl constituie faptul că adăugarea substratului nu este necesară
şi nu necesită liza celulelor.





Proteină G	Stimul	Transductia semnalului
G_s	ligand	GFP ↑ fluorescenta verde ↑
G_i	forskolin	GFP ↑ fluorescenta verde ↑
	forskolin/ ligand	GFP ↓ fluorescenta verde ↓

Fig. 3.3. Sisteme de teste bazate pe gene reporter utilizând GFP şi CREs pentru investigarea GPCRs. Cu ajutorul vectorului de genă reporter ce conţine GFP şi CRE are loc transfecţia în celulele care exprimă o GPCR, fie o Gαs sau Gαi cuplată. După legarea ligandului este indusă stimularea sau inhibarea AC, ceea ce determină o creştere sau o scădere a AMP. O creştere a nivelului de AMPc duce la activarea PKA care activează CREB prin fosforilare. Forma fosforilată a CREB se leagă acum la elementele CRE. În consecinţă, transcripţia GFP este iniţiată. Pentru investigarea receptorilor cuplaţi cu Gαi, celulele trebuie să fie incubate cu un ligand în prezenţa forskolinei. GFP este exprimată în citoplasmă şi poate fi măsurată în mod direct în celule în viaţă, folosind un cititor de fluorescenţă. Liza celulelor sau adiţia substratului nu este necesară (AC, adenilil ciclaza; CRE, elementul de legare AMPc; CREB, proteina de legare CRE; G, proteina G; GFP, proteina verde fluorescentă)

Diferiţi vectori cu gene reporter cu prezintă un număr crescut de elemente CRE (4, 8 şi 12) au fost clonaţi pentru stabilirea acestui sistem nou. Studiile au demonstrat că sensibilitatea acestui test a fost dependentă de numărul de CREs - vectorul cu 12 elemente CRE a furnizat cele mai semnificative date. Acest system poate fi, de asemenea, aplicat la celulele vii şi a fost folosit pentru investigarea receptorului NPY Y5, o Gαi cuplată cu GPCR. Receptorul NPY activat de ligand determină o scădere a nivelului de AMPc şi, în consecinţă, o expresie scăzută a GFP (fig. 3.3).

S-a determinat expresia dependentă de doză a neuropeptidului Y şi valoarea EC50 găsită a fost comparabilă cu valoarea EC50 obţinută prin teste de competiţie. Acum, un astfel de sistem este disponibil şi el ne permite efectuarea de măsurători într-o singură celulă. Pentru prima oară GFP a fost folosită ca genă reporter în teste pentru investigarea GPCR cuplaţi cu Gαi. În plus, noul sistem de teste bazat pe gene reporter are unele caracteristici unice, care îl fac superior oricărui alt test. Datele prezentate arată că testul este cel puţin la fel de sensibil ca testul pentru luciferază. În celulele vii, analiza este mai rapidă şi mai uşoară, fără tulburarea sensibilităţii sistemului celular.

În afară de investigarea GPCRs, sistemele de teste bazat pe gene reporter pot fi folosite, de asemenea pentru a investigarea căilor de transducţie a semnalului. Fiecare treaptă a căii de transducţie a semnalului poate fi perturbată, iar efectele pot fi uşor măsurate. Deoarece producerea de gene reporter este punctul final al unei întregi cascade de semnalizare, funcţionalitatea fiecărui pas al căii de semnalizare poate fi descifrată. În plus, este posibil să se determine care reactiv poate influenţa calea de transducţie a semnalului, iar prin utilizarea sistemului de teste bazate pe gene reporter GFP fiecare pas al semnalului de transducţie poate fi cu uşurinţă detectat. După investigare celulele sunt încă în viaţă şi pot fi utilizate pentru alte analize.

În general, sistemele de teste bazate pe gene reporter sunt sisteme convenabile şi uşor de detectat pentru investigarea GPCRs (Tabelul 3.2), dar şi pentru alţi receptori ca receptorii tirozin kinazici. În consecinţă, aceste sisteme reprezintă oportunităţi pentru screening-ul rapid al liganzilor şi pentru investigarea interacţiunii receptor-ligand. Mai mult, investigarea şi caracterizarea receptorilor orfani este mult mai uşoară, iar evidenţierea liganzilor lor naturali este accelerată.

Aplicaţiile testelor de gene reporter	**Probleme şi limitări**
Identificarea agoniştilor GPC R	Aparatura sensibilă pentru măsurători
Studii farmacologice pe celulele vii	Dezvoltarea unui sistem de testare adecvat
Identificarea căilor mesagerilor secunzi de la receptor la nucleu	Transfecţia celulelor
Screening de medicamente de mare capacitate	Nu toate sistemele sunt disponibile comercial
Identificarea receptorilor orfani şi a Liganzilor	

Tabelul 3.2 Aplicaţiile şi limitările testelor pentru genele reporter

Cu toate acestea, interpretarea datelor din testele pentru genele reporter necesită unele precauţii. Testele pentru genele reporter necesită o incubaţie de 4-6 h pentru exprimarea produsului genei reporter şi expunerea la unii agonişti ai GPCR pentru această perioadă de timp determină desensibilizarea receptorilor şi pot induce o schimbare a valorii EC50.

De asemenea expresia bazală a produsului genei reporter poate determina o serie de probleme. Pentru a înlătura acest impediment, celulele trebuie să fie investigate pentru expresia lor endogenă şi o genă reporter potrivită trebuie să fie selectată. Având în vedere că produsul genei reporter este punctul final al întregii cascade de semnalizare, există de asemenea multe posibilităţi pentru interferenţe cu căile de semnalizare de la alte surse. De exemplu, activitatea reporterului CRE poate fi, de asemenea, activată de ser. Ligandul poate activa în aval alţi componenţi ai cascadei de semnalizare care pot influenţa citirea reporterului. Cercetatori trebuie să fie conştienţi de aceste probleme care pot fi detectate prin feed-back negativ.

În concluzie, testele de gene reporter sunt instrumente valoroase pentru investigarea GPCRs. Aceste teste sunt rapide, sigure, comode, simple şi ieftine. Determinarea activităţii ligandului este posibilă şi aceste teste reprezintă un ajutor extraordinar în căutarea continuă de noi medicamente.

CAPITOLUL 4
DE LA GENOMUL UMAN LA NOILE MEDICAMENTE: POTENȚIALUL RECEPTORILOR ORFANI CUPLAȚI CU PROTEINELE G

4.1. Introducere

Secvenţierea iniţială a genomului uman, completată de Proiectul Genomului Uman şi Celera [Venter şi colab., 2001] a stimulat comunitatea biomedicală oferind numeroase oportunităţi pentru înţelegerea bolilor umane şi pentru dezvoltarea de terapii medicamentoase inovatoare. Funcţionarea anormală a anumitor celule în unele părţi ale corpului uman determină apariţia unor maladii. Funcţionarea celulelor este în principal reglată de o varietate de semnale chimice care sunt eliberate de către diferite tipuri de celule care controlează funcţiile organismului uman. După legarea mesagerilor chimici la receptori specifici exprimaţi de celulele ţintă, receptorii vor fi activaţi şi vor iniţia diferite semnale în celule, determinând modificări în funcţionarea lor. Medicamentele afectează funcţia celulară prin interacţiunea cu receptorul, mimând sau blocând legarea receptorului de ligand şi, prin urmare, controlând procesul bolii. În acest capitol, pentru a înţelege importanţa secvenţializării genomului uman în descoperirea medicamentelor, ne vom focaliza pe producerea medicamentelor legate de receptorii cuplaţi cu proteina G (GPCRs).

Programele pentru descoperirea medicamentelor, a mai multor companii farmaceutice, s-au concentrat asupra superfamiliei GPCR. De ce? pentru că aceşti receptori sunt o clasă foarte utilă pentru ţintele medicamentelor şi aproximativ 50% dintre produsele farmaceutice comercializate în prezent au ca ţintă GPCRs. În multe boli, GPCRs sunt cunoscuţi sub numele de "ţinte validate", de exemplu liganzii ce interacţionează cu GPCR sunt cunoscuţi pentru că pot induce anumite boli la om. În tabelul 4.1. se prezintă câteva exemple de medicamente ce au ţintă GPCRs şi se subliniază importanţa şi frecvenţa utilizării lor.

Analiza bioinformatică a secvenţelor genomului uman a evidenţiat mai multe sute de noi membri ai familiei GPCR. Cum GPCRs este una dintre cele mai importante familii ţintă pentru descoperirea medicamentelor în industria farmaceutică, este de aşteptat ca diferiţi receptori noi identificaţi să ofere un potenţial similar şi de asemenea să se dovedească că sunt ţinte bune pentru medicamente [Jensen şi colab., 2001]. Aici, vom trece în revistă etapele care în cele din urmă, traduc gene umane identificate ce codifică GPCR pentru medicamente ţintă validate.

Tabelul 4.1 Principalele medicamente care au drept ţintă GPCRs

GPCR ţintă	Terapie	Indicaţie	Subtip GPCR
Receptor pentru acetilcolină	Diciclomin (Bemote)	Sindrom de intestine iritabil	Antagonist M1
	Ipratropium (Atrovent)	COPD	Antagonist M3
	Tiotropium (Spiriva)	COPD	Antagonist M1/M3
Adrenoreceptor	Atenolol (Tenormin)	Hipertensiune	Antagonist β1
	Timolol (Timuptol, Inderal)	Glaucom/Hipertensiune	Antagonişti β amestecaţi
	Salmeterol (Albuterol)	Astm	Agonist β2
	Albuterol (Ventolin)	Astm	Agonist β2
	Doxazosin (Cardura)	Hipertrofie de prostată Antihipertensiv	Antagonist α1
	Carvedilol (Coreg)	Insuficienţă cardiacă congestivă, Antihipertensiv	β1/β2/α1
	Clonidina	Antihipertensiv	Agonist α2
	Propranolol (Inderal)	Antiaritmic, antihipertensiv, angină, anxietate	Antagonist β
	Terazosin (Hytrin)	Hipertrofie de prostată Antihipertensiv	Antagonist α1
Receptorul angiotensinei II	Losartan (Cozaar)	Hipertensiune	Antagonist AT1
	Eprosartan (Teveten)	Hipertensiune	Antagonist AT1
Receptor pentru histamină	Cetirizină, Loratadină	Alergii	Antagonist H1
	Cimetidină, Ranitidină	Ulcere	Antagonist H2
Receptorul pentru leukotriene	Pranlukast (Onon)	Astm, rinite alergice	Antagonist CysLTR1
	Zafirlukast (Accolat)	Astm	Antagonist CysLTR1
Receptor opioid	Buprenorfină	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ/antagonist κ
	Butorfanol	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ/antagonistκ
	Alfentanil (Alfenta)	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ
	Morfină (Roxanol)	Analgezic narcotic, combaterea durerii	Agonist μ
Receptor prostanoid	Epoprostenol (Flolan)	Hipertensiune pulmonară primară	Agonist al receptorului pentru prostaciclină
	Misoprostol (Cytotec)	Ulcere	Agonist al receptorului pentru prostaglandină
Somatostatin	Octreotid (Sandostatin)	Boli abdominale, tumori intestinale	Agonist sst2 şi sst5

Receptor pentru serotonină	Sumatriptan (Imitrex) Buspironă (Buspar) Olanzapină (Zyprexa) Ritanserin (Tisterton) Cisaprid (Prepulsic) Trazodonă (Desyrel) Clozapină (Leponex)	Migrenă Anxietate Psihoze Antidepresiv Arsuri gastroesofagiene nocturne Antidepresiv Schizofrenie	Agonist 5HT1B/1D Agonist 5HT1A Antagonist 5HT2/D2 Antagonist 5HT2 Agonist 5HT4 Amestec antagonişti 5HT2
Receptorul factorului de eliberare al gonadotropinei	Goserelin (Zoladex)	Cancer	Agonist GnRHR/LHRHR
Receptor pentru dopamină	Ropinerol (Requip)	Boala Parkinson	Agonişti D2, D3, D4

4.2. GPCRs și genomul uman

4.2.1. Arhitectura GPCR , semnalizarea și acțiunea medicamentelor

GPCRs formează cea de-a patra familie de proteine în genomul uman [Venter şi colab., 2001], şi joacă un rol important în multe procese fiziologice şi patofiziologice. Familia cuprinde un număr mare (mai mult de 1000) de proteine transmembranare ce prezintă o arhitectură similară: un domeniu extracelular Nterminal, trei bucle extracelulare şi trei bucle intracelulare, şapte helixuri transmembrane care se conectează la buclele extra şi intracelulare. Datorită prezenţei celor 7 domenii transmembranare aceşti receptori au fost denumiţi „şerpuitori" din cauza asemănarii lor cu un şarpe spiralat, în mişcare. Ei conţin un situs extracelular de legare a ligandului, important pentru activarea lor diferenţiată, precum şi domenii intracelulare de cuplare la proteine, cum ar fi proteinele G. Deşi GPCRs formează o familie înrudită de receptori transmembranari, aceştia au tendinţa de a fi activaţi selectiv de un set foarte divers de liganzi, incluzând amine biogene, peptide, lipide analoage, nucleotide, aminoacizi derivaţi, $Ca2^{+}$, stimuli senzoriali, cum ar fi lumina (fotoni), gustul şi mirosul (fig. 4.1). În consecinţă, superfamilia de GPCRs poate fi împărţită în mai multe subgrupuri, cum ar fi familia rodopsinei (familia A), familia receptorilor asemănători celor pentru secretină (familia B) şi familia receptorilor pentru glutamatul metabotropic (familia C). Diverse familii GPCR reflectă diferite elemente structurale, care permit receptorilor să lege diverşi liganzi.

Acestă specificitate mare pentru recunoaşterea liganzilor este, de asemenea, valorificată de la liganzii ţintă exogeni (medicamente) la proteinele GPCR specifice, explicând de ce GPCRs au un succes aşa de mare ca medicamente ţintă. Mai mult decât atât, GPCRs sunt relativ răspunzători pentru

dezvoltarea medicamentelor datorită localizării lor transmembranare, facilitând nevoia medicamentelor de a intra în celule pentru a fi eficiente.

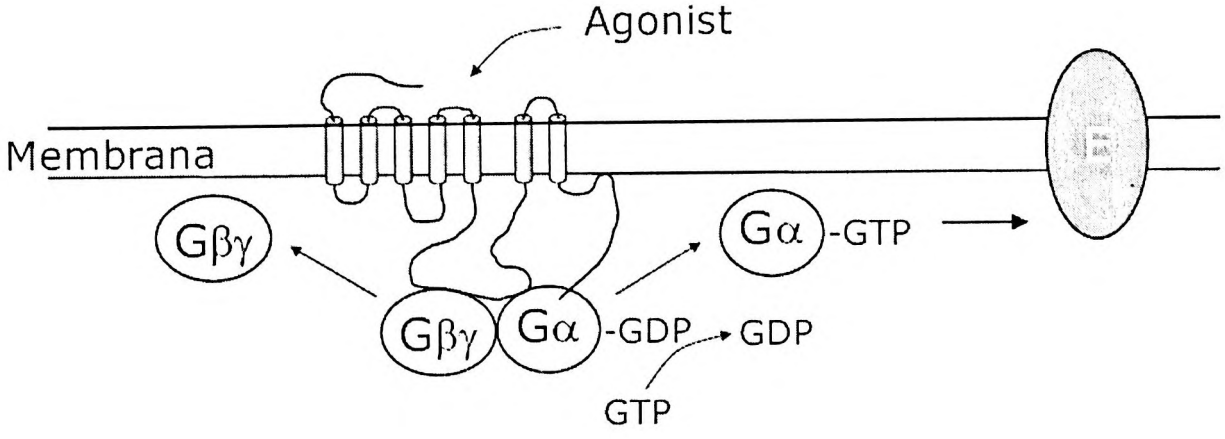


Fig. 4.1. Semnalizarea prin GPCR. GPCR sunt alcătuiţi dintr-un domeniu extracelular Nterminal, trei bucle extracelulare şi trei bucle intracelulare, care sunt conectate prin şapte domenii helicoidale transmembranare. GPCR este situat la nivelul membranei plasmatice şi poate fi activate prin liganzi extracelulari. Activarea receptorilor are ca rezultat activarea intracelulară a proteinelor G heterotrimerice prin promovarea şi favorizarea schimbării GDP-GTP la nivelul subunităţii Gα. Odată cu activarea proteinei G heterotrimerice, proteina G se disociază în subunităţile Gα şi Gαγ, care pot activa proteine (E) efectoare în celule pentru a genera mesageri secunzi.

O dată cu recunoaşterea moleculei de semnalizare extracelulară, o schimbare conformaţională determină proteinele G heterotrimerice intracelulare să moduleze în aval o varietate de căi biochimice [Jensen şi colab., 2001]. GPCR este în echilibru între două (sau mai multe) stări diferite: o stare inactivă şi o stare activă [Kenakin, 2002]. În stare activă, GPCR este capabil să se cupleze la proteina G, pentru a produce un răspuns biologic. În starea inactivă, receptorul nu este în măsură să producă un răspuns biologic. Legarea moleculelor care activează GPCR (agonişti) schimbă echilibru, astfel că GPCR este stabilizat în starea activă. Multe dintre medicamentele existente pe piaţă în 2009 acţionează asupra funcţiei GPCRs, împiedicând acţiunea moleculelor de semnalizare endogene ce au ţintă GPCR. Aceşti liganzi, cunoscuţi anterior sub denumirea de antagonişti, pot fi clasificaţi acum ca „agonişti inverşi", care, stabilizează GPCR într-o conformaţie inactivă, şi „antagonişti neutri", care nu schimbă echilibrul conformaţional, dar împiedică interacţiunea cu agoniştii endogeni prin legarea la GPCR.

4.2.2. Identificarea GPCRs

Se consideră că cele şapte domenii structurale transmembranare rezultă din structuri foarte bine conservate. În timpul anilor 1980, tehnologia ADN-ului recombinant a fost introdusă în neuroştiinţe, amplificând descoperirea receptorilor şi a genelor ce codifică peptide/proteine ligand. Purificarea şi, ulterior,

clonarea în 1986 a genei receptor β2 la hamster [Dixon,1986] poate fi apreciată ca un reper, în acest domeniu. S-a evidenţiat ca punct comun, cele şapte structuri transmembranare GPCR şi o secvenţă ADN similară în regiunile transmembranare cu rodopsina bovinelor (primul GPCR care a fost clonat). Omologia de secvenţă între ambii GPCRs a permis clonarea multor GPCRs între anii 1980-1990, pe baza omologiei. Pentru a identifica secvenţe GPCR înrudite au fost utilizate, fie screening-ul prin hibridizare mai puţin rigurosă, fie reacţia de polimerizare în lanţ degenerată(PCR). Această abordare a condus la un număr mare de GPCRs pentru care liganzii nativi au fost iniţial necunoscuţi. Cu toate acestea, alinierea secvenţelor relativ simplă a permis previziuni rezonabile despre liganzi pentru un număr de receptori orfani clonaţi mai devreme.

Iniţial, identificarea noilor medicamente ţintă au fost axate în principal pe testarea liganzilor endogeni împotriva receptorilor puternic înrudiţi. Această abordare a condus la identificarea a numeroase subtipuri de receptori. Primul GPCR „deorfanizat" a fost receptorul pentru 5-hidroxitriptamină $(HT)_{1A}$ care a fost clonat pe baza omologiei de secvenţă înrudită cu a receptorului β2 [Fargin, 1988], apărut pentru a răspunde la serotonină. Cu toate acestea, modul de abordare nu a constituit întotdeauna un succes, deoarece depindea de identitatea aminoacizilor din receptori deja identificaţi. Timp de mai mulţi ani diverse grupuri academice şi industriale au încercat, de exemplu, să cloneze receptorul pentru histamina H3, care este definit farmacologic. În ciuda disponibilităţii genelor ce codifică receptorii umani H1 şi H2, încă de la începutul anilor 1990, pana în 1999 clonarea nu a reuşit. Dar, Lovenberg şi colab., (1999) au reuşit în cele din urmă să cloneze gena receptorului uman H3 histaminic folosind informaţii din baza de date Incyte referitor la expresia secvenţelor scurte.

Analiza filogenetică indică faptul că, gena ce codifică receptorul uman H3 nu este strâns legată de genele care codifică receptorii umani H1 sau H2 (omologia totală este de aproximativ 22%); de fapt, gena receptorului H3 seamănă mai mult cu genele care codifică α2 adrenoreceptorii. Aceste trei gene diferite ale receptorilor pentru histamină, au evoluat de la diferiţi strămoşi şi se pare că toate cele trei au dobândit elemente de o importanţă deosebită pentru recunoaşterea de către histamină. Asemănarea slabă a genei receptorului H3 cu genele ce codifică alte două subtipuri de receptori pentru histamină explică de ce nu au reuşit diferite abordări bazate pe omologie pentru clonarea genei receptorului H3 [Leurs şi colab., 2000].

Succesul clonării genei receptorului H3 a fost urmat imediat de clonarea genei ce codifică receptorul H4 pentru histamină, pentru care au fost disponibile puţine dovezi farmacologice. Gena receptorului H4 a fost clonată de mai multe grupuri, concomitent, pe baza secvenţei receptorului H3, care a devenit disponibilă [Liu şi colab., 2001]. Noul receptor pentru histamină prezintă o exprimare foarte restrânsă în sistemul imunitar şi în prezent este considerat ca o potenţială ţintă pentru medicamente în condiţii inflamatorii.

4.2.3. GPCRs în era postgenomică: receptorii orfani

Pe baza informaţiilor disponibile despre genomul uman, numai o analiză sistemică a genomului GPCR uman printr-o abordare genomică funcţională, va permite descoperirea de noi medicamente ţintă. Pentru a descoperi noi GPCRs în genom sunt utilizate secvenţe motiv foarte conservate cum ar fi cele şapte domenii transmembranare care sunt comune la toţi GPCRs. O astfel de utilizare a bioinformaticii a permis identificarea *in silico* a multor secvenţe de ADN ce codifică GPCRs umani validaţi. Deşi genomul complet a fost secvenţializat, numărul total de GPCRs nu este încă pe deplin stabilit. Se consideră că numărul total de GPCRs în genomul uman variază de la 1000 până la 2000. Progrese recente în cercetarea genomului au relevat un total de circa 300 GPCRs, care prezintă valoare farmaceutică ca ţinte potenţiale pentru medicamente [Civelli şi colab., 2001]. Dintre aceştia, GPCRs sunt activaţi de 97 transmiţători cunoscuţi, incluzând amine biogene, aminoacizi, peptide, nucleotide, acizi graşi derivaţi şi polipeptide. Cu toate acestea, aproximativ 140 din aceşti noi GPCRs nu leagă orice ligand endogen cunoscut şi oferă noi oportunităţi interesante pentru descoperirea de medicamente care vizează aceste aşa-numiţii „GPCRs orfani" (oGPCRs) - GPCRs a căror funcţie şi liganzi sunt încă necunoscuţi.

În plus faţă de aceşti GPCRs de origine umană, agenţii patogeni pot purta gene ce codifică GPCR care pot fi exprimate la gazdă. De exemplu, virusul herpesului uman Karposi asociat (HHV-8), codifică ORF74, un receptor foarte activ, care se consideră că joacă un rol important în dezvoltarea bolii [Cesarman şi colab., 2000]. De asemenea, citomegalovirusul uman (CMV) codifică patru GPCRs în genomul său. Unul dintre GPCRs codificaţi de CMV uman, US28, este extrem de activ [Casarosa şi colab., 2001], având un rol important în dezvoltarea aterosclerozei şi, după ultimele descoperiri ale agoniştilor inverşi nonpeptidergici, aceşti receptori ar putea constitui posibile ţinte pentru medicamente.

Având în vedere că există un număr mare de GPCRs „neţintiţi", în prezent numeroase companii cu profil farmaceutic/biotehnologic dar şi laboratoare academice, fac eforturi pentru identificarea liganzilor pentru receptorii existenţi şi cei nou descoperiţi. Programele de cercetare ale multor companii de medicamente include strategii care încearcă să exploateze Proiectul Genomului Uman pentru a avea acces la noi familii de GPCR, inclusiv oGPCRs, pentru a obţine noi medicamente. Pentru a „deorfaniza" oGPCRs se impune identificarea liganzilor endogeni naturali sau native pentru aceşti receptori. Funcţiile acestor noi receptorii sunt elucidate folosind abordări de genomică funcţională. Căutarea liganzilor pentru receptorii orfani poate implica metode clasice de screening, cum ar fi monitorizarea schimbărilor de nivel ale mesagerilor secunzi bine-cunoscuţi, cum ar fi AMPc şi Ca^{2+}, sau poate implica tehnologii foarte sofisticate care sunt în mare parte bazate pe o înţelegere profundă a biologiei care este implicată în procesul de activare a receptorilor, pe

mai multe niveluri bazate pe cercetările de biologie moleculară, metode de calcul şi bioinformatică, microfluide şi nanotehnologii, etc. Ca atare, deorfanizarea receptorilor a devenit cu adevărat o abordare multidisciplinară, şi în următoarele secţiuni vom indica în ce măsură cunoştiinţele fundamentale de bioinformatică, exprimarea receptorilor şi sistemele de traducere a semnalului sunt exploatate pentru identificarea liganzilor pentru oGPCRs.

4.3. Investigarea liganzilor

4.3.1. Abordări de farmacologie inversă pentru oGPCRs

Istoric, conceptul de receptori a fost dezvoltat pe baza efectelor biologice observate ale medicamentelor administrate exogen. Mulţi receptori şi subtipuri de receptori pentru mesageri chimici endogeni cunoscuţi au fost descoperiţi prin investigarea acţiunii moleculelor biologic active. Dezvoltarea domeniului de farmacologie moleculară bazată pe conceptele de receptor timpuriu a optimizat drumul spre designul raţional de medicamente, pe baza interacţiunii dovedite cu un sistem receptor cunoscut. Modul de acţiune al medicamentelor a relevat existenţa unui sistem receptor care a fost „exploatat chimic". Acest proces a condus la descoperirea mai multor medicamente importante din ziua de astăzi şi reprezintă, încă, o abordare utilă pentru sistemele receptor cunoscute.

Cu toate acestea, situaţia este foarte diferită cu oGPCRs. Cunoştinţele despre moleculele endogene de semnalizare sunt deficitare. Mai mult decât atât, este foarte dificil să se prevadă în prealabil potenţialul liganzilor specifici, care acţionează „la alegere" cu oGPCR. Prin urmare, procesul de identificare a liganzilor endogeni pentru receptorul orfan este numit „farmacologie inversă". Mai întâi trebuie să se stabilească ligandul endogen pentru oGPCR, apoi trebuie să se investigheze funcţia perechii oGPCR - ligand în procese fiziologice, în cazul în care, după potenţialele medicamente ţintă, oGPCR ar putea fi dezvoltat. Deşi farmacologia inversă este o abordare necesară şi cu un grad de risc ridicat, rezultatele finale în procesul pentru descoperirea medicamentelor sunt, de obicei, extrem de avantajoase. Mai mult decât atât, în ultimii ani, evoluţiile tehnologice şi creşterea înţelegerii funcţiei GPCR au contribuit la dezvoltarea unor strategii de succes.

4.3.2. Abordări *in silico*

Bazele de date pot fi folosite pentru a obţine informaţii cu privire la relaţiile filogenetice, expresia ţesutului, existenţa unor „variante polimorfice" şi potenţiala legare de un anumit fenotip în vederea identificării unui oGPCR *in silico*. Analiza filogenetică a secvenţelor GPCR poate dezvălui relaţia oGPCR cu alţi receptori deja cunoscuţi şi poate fi folosită ca un instrument pentru predicţia clasei liganzilor pentru receptorii orfani [Joost şi colab., 2002]. De exemplu pentru receptorii H4 pentru histamină, o analiză filogenetică a

secvenţei receptorilor H4 corespunde în mod clar cu a receptorilor H3 pentru histamină (fig. 4.2).

În prezent, foarte multe date despre aranjamentul genelor şi analiza lor atentă ne va permite să obţinem informaţii importante despre expresia genelor *in silico.*

Pentru a evalua potenţialul unui oGPCR pentru aplicaţii terapeutice, o cunoaştere detaliată a expresiei ţesutului este de cea mai mare importanţă. Dacă cineva este interesat să sintetizeze medicamente împotriva tulburărilor sistemului nervos central, nu va fi interesat doar de oGPCRs care sunt exprimaţi la periferie. De asemenea informaţii cu privire la expresia ţesutului sunt foarte importante pentru „căutarea" de liganzi endogeni.

Disponibilitatea secvenţei genomului uman, precum şi a altor specii cum ar fi şoarecii permite analiza largă a genomului; de exemplu, polimorfismul unui singur nucleotid (SNPs) care poate fi legat de un anumit fenotip,va permite cunoaşterea funcţiei unei anumite gene şi a proteinei codificate. Analiza la nivel de genom adduce un avans important în înţelegerea funcţiei genei şi a rolului ei în producerea bolii. O astfel de abordare de genomică funcţională a fost aplicată cu succes pentru identificarea genei PTC ce codifică un GPCR sensibil la feniltiocarbamid, care este responsabil pentru gustul sensibil la feniltiocarbamidă. Mai multe SNPs în această genă determină pierderea sensibilităţii gustului [Kim şi colab., 2003].

Alternativ, generarea de şoareci în care expresia unui anumit GPCR a fost eliminată prin manipulare genetică (receptori „knock-out") poate furniza indicii pentru potenţialul rol fiziologic al receptorilor. În cazul în care un anumit ligand este codificat de genom, cum este cazul liganzilor peptidergici, poate fi de asemenea generat knockout, dacă un anumit trasmiţător lipseşte. Prin urmare, fenotipul knockout potenţial poate aduce indicii cheie pentru funcţia receptorului şi ajută la validarea unui GPCR ca un potenţial medicament ţintă [Zambrowicz şi colab., 2003]. Knockout-ul receptorilor legaţi de densitate, de exemplu, a demonstrat că aceşti oGPCR sunt implicaţi în remodelarea vasculară.

Dicţionarul Deltagen şi de Genetică, oferă în prezent tehnologii de knockout la mamifere *in vivo* de mare capacitate pentru a genera diferiţi şoareci knockout (inclusiv diferiţi GPCR knockout) şi analiza lor fenotipică [Abuin şi colab., 2002].

Accesul la baze de date relevante (comerciale) permite obţinerea de informaţii cu privire la potenţialul rol al oGPCR în fiziologie.

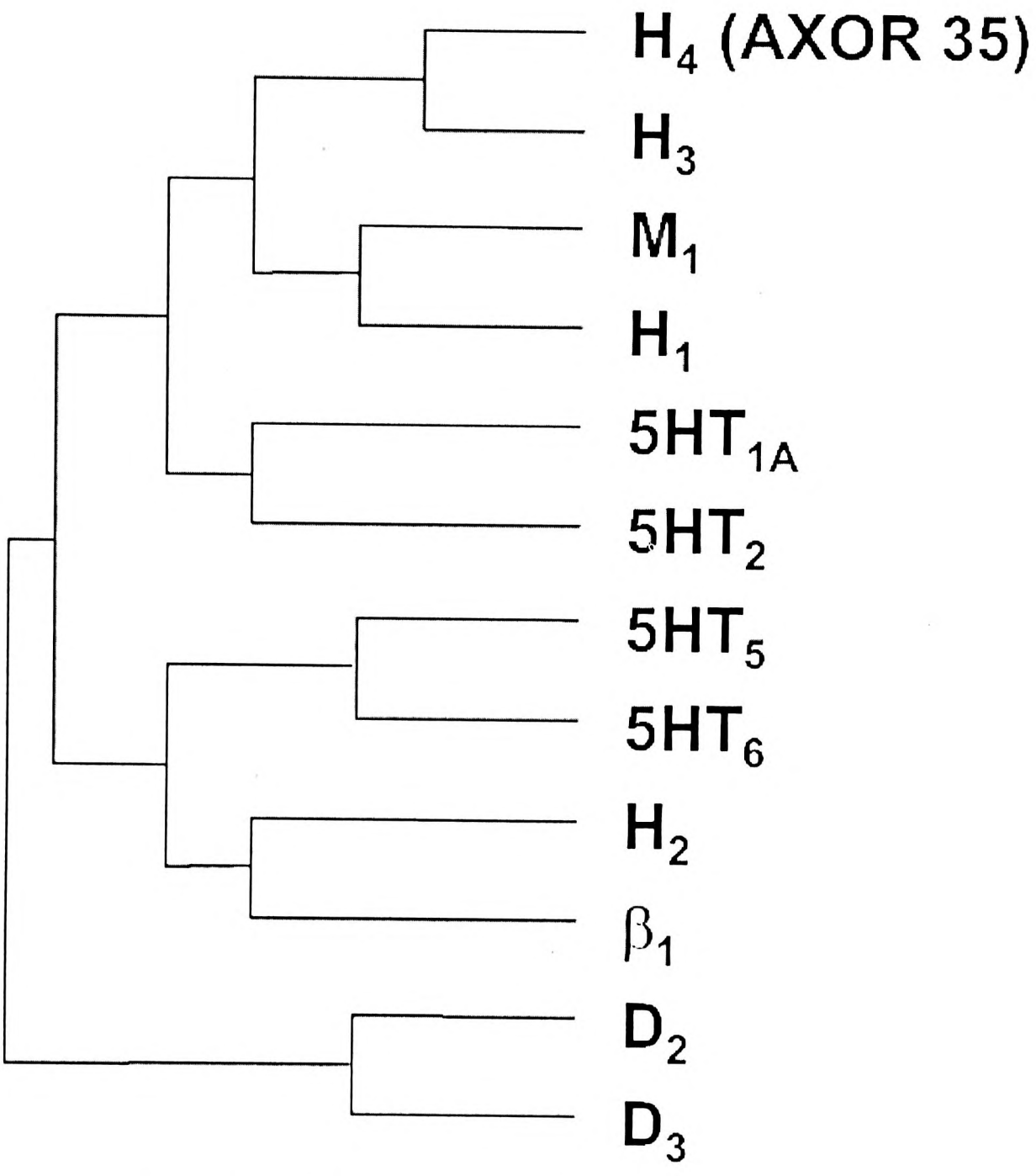


Fig. 4.2. Analiza arborelui filogenetic a mai multor GPCRs aminergici plasează AXOR 35 aproape de receptorul H3 pentru histamină. Analiza farmacologică ulterioară a confirmat că AXOR 35 reprezintă un nou receptor uman pentru histamină, receptorul H4 (după Dingermann şi colab., 2004).

4.3.3. Expresia tisulară

După cum s-a menţionat anterior, cunoaşterea expresiei tisulare a oGPCR este unul dintre primii paşi care decide dacă oGPCR este cu adevărat de interes terapeutic. În plus faţă de abordările *in silico*, există diverse alte mijloacele necesare pentru a obţine date privind exprimarea tisulară a oGPCR. Cele mai populare tehnici pentru profilul tisular au fost analiza expresiei ARNm prin analiza Northern blot, revers transcripţia RT-PCR sau hibridizarea *in situ*.

În analiza Northern blot, ARNm din diferite ţesuturi este separat în funcţie de mărime prin electroforeză în gel, transferat şi imobilizat pe membrane de nitroceluloză sau nylon, şi incubat cu oligonucleotide radioactive sau fluorescente marcate sau sonde de ADNc, care se bazează pe secvenţa ADNului, oGPCR de interes. Prin intermediul asocierii cunoscute a bazelor perechi specifice moleculelor de ADN şi ARN, hibridizarea sondelor se va produce doar cu moleculele ARNm al oGPCR. Analiza semnalului radioactiv sau fluorescent ce rămâne pe plăci după spălare ne permite să deducem expresia tisulară. Alternativ, prin efectuarea de spălări mai puţin stricte, (screening prin hibridizare mai puţin riguroasă), sonda poate hibridiza cu molecule ARN codificatoare pentru noi GPCRs care prezintă suficiente secvenţe omoloage cu sonda. În prezent, bloturi cu diferite ţesuturi umane pot fi obţinute comercial.

De asemenea expresia ARNm tisulară poate fi obţinută printr-o variantă a tehnicii PCR. Utilizând enzima revers transcriptaza, ARNm de la nivelul ţesutului este transcris în ADNc, unde apoi moleculele de ADNc din oGPCR sunt amplificate printr-o reacţie PCR cu două oligonucleotide specifice oGPCR.

Datele cele mai detaliate despre expresia ARNm pot fi obţinute prin hibridizare *in situ*. Fragmentele de ţesut sunt incubate în condiţii adecvate cu oligonucleotide radioactiv sau fluorescent marcate sau sonde ADN, care se bazează pe secvenţa AND a oGPCR de interes. După spălare, citirea oferă informaţii detaliate cu privire la variaţiile nivelurilor expresiei în ţesuturi complexe, cum ar fi creierul. Cum expresia ARNm nu reflectă real expresia proteinei, poate că ar trebui încercat să se măsoare nivelurile de expresie a proteinelor în loc de expresia ARNm.

Cu toate acestea, pentru profilul expresiei proteinelor este nevoie de un anumit anticorp pentru analiza Western blot sau analiza imunohistochimică. Deşi generarea de anticorpi pentru oGPCRs nu este imposibilă, deseori necesită resurse substanţiale şi de aceea nu este foarte atractivă.

Informaţiile despre expresia GPCR sunt fundamentale pentru întregul process de farmacologie inversă, abordări anatomice moleculare la scară mare, cartografierea nivelului expresiei (profilul expresiei) tuturor GPCRs cunoscuţi, inclusiv a receptorilor orfani, permiţând descoperirea timpurie a acelor GPCRs care se pot dovedi utili în descoperirea medicamentelor.

4.3.4. Expresia oGPCR de interes

Pentru a identifica ligandul endogen pentru un oGPCR de interes, trebuie stabilizate liniile celulare care exprimă receptori orfani şi folosirea acestor linii celulare pentru screening-ul potenţialilor liganzi. Multe linii de celule de mamifere sunt în prezent disponibile pentru aşa numita „expresie heterologă" a oGPCRs.

Pentru a exprima un oGPCR de interes, secvenţa ADNc a oGPCR este mai întâi clonată dintr-un ţesut relevant sau ADNul genomic, un *epitop tag*, cum ar fi un FLAG, c-myc, V5 sau hemaglutinin este adesea încorporat în

domeniu N-terminal al receptorilor, pentru a permite detectarea proteinelor receptor de la suprafaţa celulelor folosind anticorpi îndreptaţi împotriva epitopilor tag. ADNc al oGPCR se inserează în vectori ADN speciali, care sunt transferaţi („transfecţie") în celule mamiferelor (fig. 4.3). O varietate de tehnici (transfecţia chimică, electropermeabilizarea, utilizarea tehnicilor de infecţie şi lipofecţie, de exemplu, baculovirusul, adenovirusul sau Virusul Semliki Forest) sunt disponibile în prezent, pentru a transfera în mod eficient ADN-ul într-o varietate de celule. Exemple de linii de celule frecvent utilizate pentru exprimarea GPCRs includ celulele HEK 293 (human embryonic kidney) şi celulele CHO (Chinese hamster ovary).

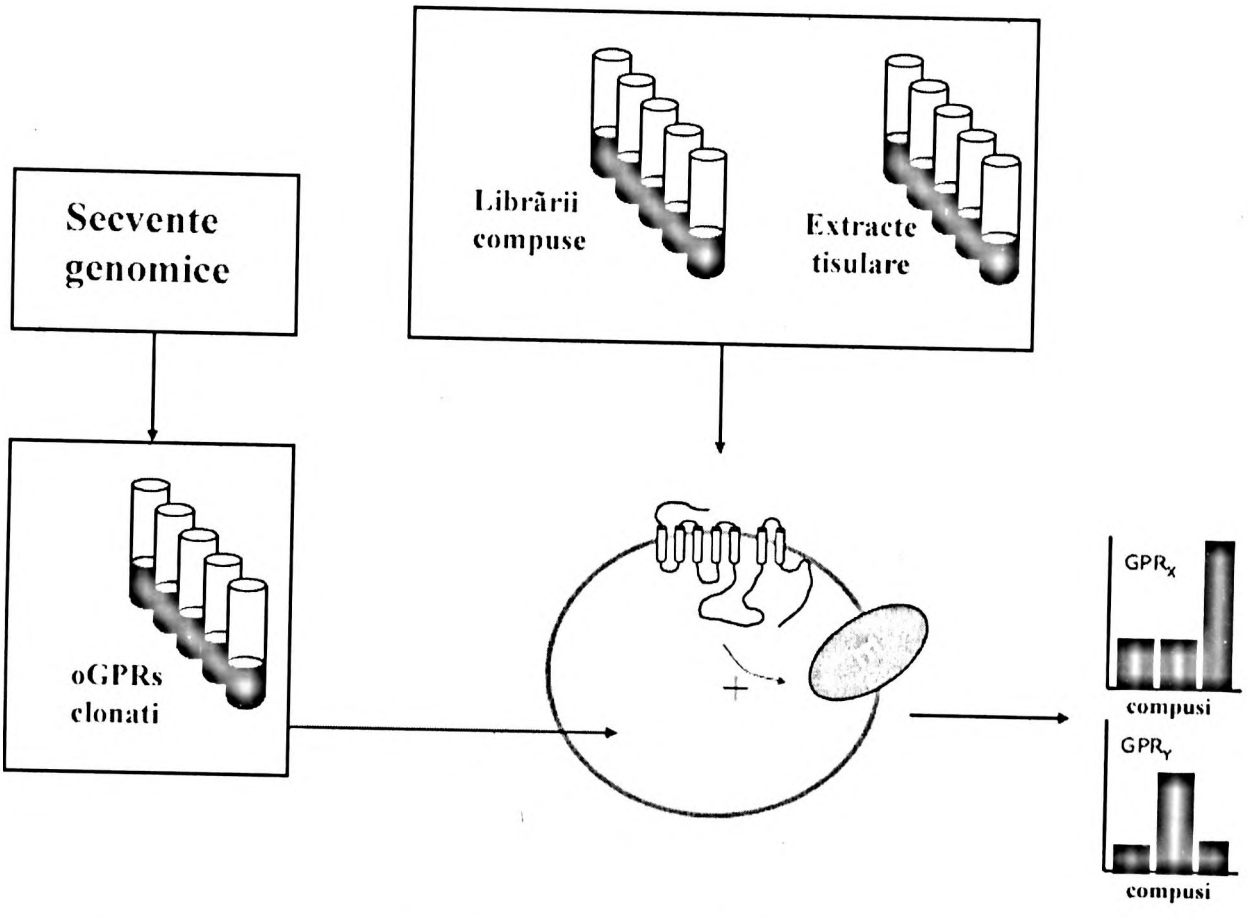


Fig. 4.3. ADNc ce codifică GPCRs proveniţi din genom sunt clonaţi în vectori de expresie adecvaţi cu scopul de a obţine o expresie adecvată a receptorului în celulele utilizate în procesele de identificare a liganzilor. În cazul în care celulele exprimă receptorii de interes, celule pot fi stimulate prin liganzi care pot fi obţinuţi din biblioteci compuse sau extracte tisulare şi celulele sunt apoi monitorizate de exemplu, pentru schimbări în activitatea celulară prin efectuarea de teste funcţionale (a se vedea secţiunea 4.3.5). Prin repetarea acestei strategii, GPCRs pot să inducă răspunsuri specifice pentru anumite perechi GPCR-ligand.

De obicei, transfecţia genelor GPCR, în aceste celule, are ca rezultat niveluri de expresie relativ înalte, care facilitează întreg procesul de farmacologie inversă. Trebuie luate precauţii în ceea ce priveşte potenţialele

interferenţe cu sistemul de screening al GPCRs exprimate endogen de celulele gazdă. Dimpotrivă, s-ar putea foarte bine ca aceste sisteme de exprimare să nu prevadă condiţii corespunzătoare celulare în ceea ce priveşte expresia proteinei G sau, poate mai surprinzător, sunt exemple ale asocierii proteinelor modificatoare ale activităţii receptorilor (RAMPs) cu GPCR şi formarea de GPCRs heterodimerici care sunt importanţi pentru formarea de GPCR complet funcţionabili [Sexton şi colab., 2001]. În plus faţă de această mare varietate de linii celulare de mamifere, câteva linii celulare care nu sunt de mamifere, incluzând celule de insecte, de *Xenopus laevis* broasca pigmentată şi de drojdie de bere sunt, de asemenea, folosite pentru expresia heteroloagă şi caracterizare a GPCRs, inclusiv identificarea de liganzi nativi şi surogat [Brown şi colab., 2002] potenţiali pentru oGPCRs. Un important avantaj al sistemului de expresie al drojdiei este setul limitat de proteine G native şi GPCRs din drojdia de bere.

4.3.5. Abordări de screening

Există două strategii de pornire în identificarea liganzilor nativi pentru receptori orfani. Prima foloseşte ţesuturi native în care este exprimat un receptor. Prezenţa receptorilor care oferă un anumit situs de legare al ligandului în anumite ţesuturi şi, care odată cu legarea ligandului, induce răspunsuri funcţionale ce nu sunt mediate prin oricare dintre GPCRs cunoscuţi capabili să lege liganzi înrudiţi sugerează existenţa de GPCRs suplimentari. Astfel, un ligand identificat este legat la un receptor neidentificat. Acesta a fost cazul pentru nocistatin, un ligand de natură peptidică derivat din acelaşi precursor ca nociceptinul, ligandul endogen pentru receptorul 1 pentru opiozi [Klein şi colab., 1998]. Un alt exemplu de oGPCR, care a fost deorfanizat în acest mod este Bonzo coreceptorul HIV ca receptor de chemokine CXCL16 (CXCR6) [Matloubian şi colab., 2000]. Prima căutare în baza de date EST, a identificat CXCL16 ca fiind un potenţial nou ligand pentru receptorul pentru chemokine legat de membrană.

Studiile ulterioare au evidenţiat tipuri de celule specifice care leagă celule ce exprimă CXCL16. O abordare în ceea ce priveşte clonarea expresiei a fost apoi folosită cu succes pentru a identifica un receptor pentru CXCL16. O bibliotecă de expresie de ADNc cu ARNm, a fost făcută din celulele CXCL16-legate şi transfectate în celule HEK293, care au fost apoi evaluate pentru CXCL16 legate prin analiza FACS. În cele din urmă, clonele de ADNc individual au fost identificate astfel că, atunci când sunt exprimate în celule HEK293, au arătat o legare puternic specifică de CXCL16. Secvenţierea completă a ADNc a dezvăluit identitatea CXCR6.

De obicei, atunci când s-a încercat să se identifice un ligand pentru un oGPCR, cercetătorii au stabilizat linii de celule care exprimă oGPCR şi apoi au folosit acest sistem artificial pentru screening-ul potenţialilor liganzi. Într-o astfel de strategie complexă (a doua) genetică şi chimică, celulele ce exprimă oGPCR sunt utilizate ca vehicule în identificarea moleculelor ţintă mici.

Apoi, celulele care exprimă receptorul de interes pot fi utilizate fie pentru teste de legare a radioligandului (teste non-funcţionale) sau teste funcţionale, care implică măsurarea răspunsurilor celulare care pot să apară odată cu activarea receptorilor. Datorită necesităţii de ligand marcat radioactiv, abordările de legare a radioligandului sunt mai puţin utile pentru receptorii deorfanizaţi, cu excepţia cazului în care există o şansă bună ca receptorul orfan să aibă o omologie ridicată cu un GPCR existent, pentru care este disponibilă o afinitate crescută a liganzilor.

Această abordare a constituit un succes pentru deorfanizarea, de exemplu, a receptorilor pentru α-laurotoxină [Ichtchenko K. şi colab., 1999] şi poate ajuta deorfanizarea receptorilor prin confirmarea legării ligandului identificat de receptor. Cu toate acestea, testele funcţionale sunt de multe ori esenţiale pentru identificarea liganzilor nativi pentru oGPCRs.

Pentru identificarea liganzilor nativi pentru receptorii orfani, folosind teste funcţionale, diverse biblioteci ce conţin colecţii mari de potenţiali liganzi endogeni sunt concentrate pe răspunsurile lor biologice în celule care exprimă receptorul. Astfel de biblioteci compuse pot cuprinde mulţi dintre agoniştii cunoscuţi care sunt disponibili, inclusiv peptide noi, care pot fi identificate pe bază de analiză bioinformatică a genelor ce codifică peptide validate.

În cazul în care nu se obţin rezultatele aşteptate de la aceşti agonişti GPCR cunoscuţi sau validaţi, o căutare de liganzi noi poate fi apoi iniţiată prin screening în ciuda extractelor biologice ale ţesuturilor în care oGPCR sunt cunoscuţi a fi exprimaţi, la fel pentru fluide şi supernatantul celular.

4.4. Screeningul pentru liganzi oGPCR folosind teste funcţionale

Răspunsul fiziologic care este observat în urma activării GPCR este de cele mai multe ori reglat de cuplarea şi de activarea proteinelor G de către receptori activaţi. GPCRs se cuplează la mecanismele cascadei de semnalizare prin mesageri secunzi pe calea proteinelor heterotrimerice. Cele mai multe teste clasice funcţionale folosite pentru a măsura activitatea GPCR sunt de obicei bazate pe măsurarea fie a proteinei G, fie a activării efectorilor. De obicei screening-ul pentru liganzii oGPCRs este efectuat prin mijloace de exploatare a biologiei sistemelor receptorilor, şi poate implica metodele clasice de depistare, cum ar fi monitorizarea schimbărilor nivelurilor mesagerilor secunzi bine cunoscuţi (AMPc şi Ca^{2+}) sau poate implica tehnologii foarte sofisticate care se bazează în mare parte pe o profundă înţelegere a biologiei, care este implicată în activarea mediată de receptori a cascadelor de transducţie a semnalui.

Aceste noi teste de screening de mare capacitate (HTS) utilizează automatizarea şi miniaturizarea, şi pot fi efectuate mai repede şi mai eficient decât tehnicile de screening pentru descoperirea medicamentelor tradiţionale. La acestea se adaugă tehnici de analiză şi utilizarea sistemelor de teste convenabile pentru identificarea liganzilor pentru oGPCRs. Tabelul 4.2. prezintă câţiva

dintre oGPCRs care au fost împerecheaţi cu ligandul lor nativ în ultimii ani. După ce astfel de perechi receptor-ligand sunt identificate, testele HTS pot fi axate pe găsirea potenţialului terapeutic pentru aceste noi ţinte. În continuare vom evidenţia diversele abordări experimentale care au fost dezvoltate pentru funcţionarea screening-ului pentru oGPCRs. În unele cazuri metodologia va fi evidenţiată prin succesul deorfanizării oGPCRs specifici.

4.4.1. Teste de legare GTPγS

Testele de legare GTPγS monitorizează activarea proteinelor G asociate receptorilor şi, cu toate că testul este specific pentru receptorii cuplaţi cu Gi şi Go, s-a demonstrat că el este, de asemenea, aplicabil pentru proteinele Gq (proteine G) cuplate cu GPCRs ce urmează după procedura de imunoprecipitare [Carrillo JJ. Şi colab., 2002]. Prin substituţia GTP pentru GTPγS[S35], activarea proteinelor Gα au ca rezultat încorporarea GTPγS nonhidrolizabil şi marcat radioactiv [S35], permiţând cuantificarea proteinelor Gα activate.

Deşi există exemple de oGPCRs care au fost deorfanizaţi folosind acest test, inclusiv identificarea eicosanoizilor ce prezintă activităţi agoniste împotriva oGPCR TG1019 [Hosoi şi colab., 2002], testul este foarte rar utilizat în calitate test de screening primar. Cu toate acestea, testul poate fi utilizat pentru confirmarea cuplării şi stimulării proteinelor Gi de oGPCR activat odată ce potenţialii liganzi au fost identificaţi.

Tabelul 4.2. Receptorii deorfanizaţi şi liganzii identificaţi (după Dingermann şi colab. 2004)

Ligand	Receptor	Testul utilizat	Anul identificării
5-HT	5-HT1A	Legare a radioligandului	1988
Adenozina	A2A	AMPc	1990
Adenozina	A1	AMPc	1991
5-HT	5-HT1D	AMPc	1991
Peptide înrudite cu bombesina	bombesina	Ovocite	1993
Nociceptina/orfanina FQ	ORL-1	AMPc	1995
Neuropeptidul	Y Y2	Legare a radioligandului	1995
AZ3B	C3a	$[Ca^{2+}]i$, ovocite	1996
Factorul 1 derivat din celule stromale	CXCR4 (LESTR, fusin)	$[Ca^{2+}]i$	1996
CIRL	α laurotoxina	Legare a radioligandului	1997
Peptidul legat de gena pentru calcitonină	Receptorul CGRP; CRLR	AMPc	1996, 1998

Grelina	GHS-R	$[Ca^{2+}]i$	1996, 1999
Leukotriena B4	BLTR	Legare a radioligandului	1997
Hipocretina/orexina	Orexina A şi B	$[Ca^{2+}]i$	1998
Hormonul de eliberare al tirotropinei	THR2	Legare a radioligandului	1998
Peptidul de eliberare al prolactinei	GPR10 (hGR3)	Acid arahidonic	1998
Apelin	APJ	Ext.pH (citosenzor)	1998
CRLR	CGRP	ovocite	1998
Chemoatractantul pentru limfocite B	BLR1	Activitate chemotactică	1998
1 fosfat sfingozina	EDG 1, 3, 5, 6 şi 8	$[Ca^{2+}]i$, AMPc, ovocite	1998-2000
Acidul lizofosfatic	EDG 2, 4 şi 7	$[Ca^{2+}]i$, AMPc, drojdia de bere	1998-2000
CIRL-2	α-laurotoxina	Legare a radioligandului	1999
Histamina	H3 (GPCR97) AMPc,	legare a radioligandului	1999
Hormonul de concen-trare al melaninei	SLC-1 (MCH1, GPR24)	$[Ca^{2+}]i$	1999
Urotensina II	UII (GPR14, SENR)	$[Ca^{2+}]i$	1999
Motilina Motilina	GPR38)	$[Ca^{2+}]i$, aequorina	1999
Leukotriena D4	Cys-LT1R (HG55, HMTMF81)	$[Ca^{2+}]i$	1999
Leukotriena B4	BLT2 (GPR16) AMPc,	legare a radioligandului	2000
Neuromedin U	NMU1R (FM-3, GPR66)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuromedin U	NMU2R (FM-4, TGR-1)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Prostaglandina D2	PGD2 (CRTH2)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuropeptidul FF şi AF	NPFF2 (HLWAR77)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Neuropeptidul FF	NPFF1 (OT7T022), NPFF2	Ovocite	2000
Sfingozilfosforilcolina	SPC (OGR-1)	$[Ca^{2+}]i$	2000
Histamina	H4 (AXOR35) AMPc	legare a radioligandului	2000

UDP	glucoza P2Y14 (KIAA0001, GPR105)	Drojdia de bere	2000
Leukotriena C4 şi D4	Cys-LT2R (PSECO146, AXOR54)	$[Ca^{2+}]i$, ovocite	2000
Eskina	CCR10 (GPR2)	$[Ca^{2+}]i$	2000
CXCL16	BONZO, STRL33 TYMSTR (CXCR6)	Analiză prin Flowcitometrie $[Ca^{2+}]i$	2000
β-PEA şi triptamina	TA1, TA2 Ovocite, AMPc,	legare a radioligandului	2001
Hormonul de concentrare al melaninei	MCH2 (AXOR21)	$[Ca^{2+}]i$	2001
ADP	P2Y12 (SP1999)	Ovocite	2001
Amine biogene, trace amine	TA1, TA2	Ovocite	2001
Psicozin	TDAG-8	AMPc	2001
Lizofosfatidil colina	G2A	$[Ca^{2+}]i$	2001
KISS-1	metastatin (GPR54, hOT7T175, AXOR12)	$[Ca^{2+}]i$ i	2001
Sfingozilfosforilcolina şi lizofosfatidilcolina	GPR4	Legarea radioligandului, Teste de gene reporter	2001
NPAF	mrgA4	$[Ca^{2+}]i$	2001
NPFF	mrgA1	$[Ca^{2+}]i$ i	2001
Relaxina	LGR7	AMPc	2001
Relaxina	LGR8	AMPc	2001
Anioni de acid carboxilic cu lanţ scurt	GPR41, GPR43	Drojdie de bere	2002
Fragmente complement	C5L2	Legarea radioligandului	2002
Neuropeptidul W	GPR7 şi GPR8	GTPγS	2002
Acizi biliari	M-bar (BG37)	AMPc	2002
5,8,11 Acid eicosatrinoic	GPR40	[Ca2+]I, Teste de gene reporter	2002
Adenina	Receptor pentru adenină la şobolan	$[Ca^{2+}]i$	2002
Produsul genei proencefalina A	GPCRs (SNSRs) Specifici neuronilor senzoriali	$[Ca^{2+}]i$	2002
Acid nicotinic	HM74 (GPR109)	$[Ca^{2+}]i$ aequorina, AMPc, GTPγS	2003

Acid nicotinic	HM74A	GTPγS	2003
Sfingozilfosforilcolina	GPR12	[Ca^{2+}]i, aequorina	2003

4.4.2. Evaluările AMPc

AMPc este unul dintre cele mai importanţi mesageri secunzi pentru controlul diferitelor căi metabolice. De-a lungul anilor au fost dezvoltate o serie de teste pentru a măsura formarea de AMPc din AMP prin adenilil ciclază (AC) după stimularea receptorilor. Enzima efectoare AC este activată de către proteinele Gs şi inhibată de proteinele Gi, şi, prin urmare, aceste teste pot fi folosite pentru a monitoriza activarea unei game variate de GPCRs.

Dezvoltarea de radioimumoteste, tehnici sensibile şi reproductibile şi imunoteste bazate pe fluorescenţă au înlocuit tehnicile vechi care se bazau pe ATP marcat, urmate de extracţia şi de determinarea cantităţii de AMPc marcat, nou format sau pe dispariţia precursorilor.

Testele pentru evaluarea AMPc au fost utilizate pe scară largă pentru a ajuta deorfanizarea oGPCRs (tabelul 4.2), incluzând, de exemplu, receptorii pentru relaxină şi histamina H3.

4.4.3. Evaluările Ca^{2+}

Diverşi GPCRs cresc Ca^{2+} intracelular prin stimularea eliberării Ca^{2+} din depozitele intracelulare şi a influxului extracelular de Ca^{2+}. Un răspuns tipic de Ca^{2+} mediat de GPCR se caracterizează printr-o creştere rapidă tranzitorie a concentraţiei intracelulare de Ca^{2+}, care este urmată de o creştere susţinută a concentraţiei de Ca^{2+}.

Este acceptat pe scară largă faptul că activarea mobilizării Ca2+, prin GPCRs este asociată cu fosfolipaza C (PLC) – ce catalizează hidroliza inozitol fosfolipidelor membranare. Receptori cuplaţi cu Gq pot activa proteine G care aparţin familiei de proteine Gq, pentru a activa hidroliza mediată de PLC a fosfatidil-4,5-bifosfatului [PI (4,5) P2] ce conduce la formarea de inozitol-1 ,4,5-trisfosfat [Ins (1,4,5) P3] şi 1,2-diacilglicerol (DAG). Receptorii Ins (1,4,5) P3 din reticulul endoplasmic (ER) mediază ulterior eliberarea de Ca2+ din ER şi, prin urmare, creşte[Ca^{2+}]i, întrucât eliberarea DAG poate activa alţi efectori cum ar fi izoformele proteinazei C (PKC) şi protein kinazei D (PKD) şi afectează influxul de [Ca^{2+}]i prin activarea tranzitorie a canalelor receptorilor cu potenţial de canal (TRPC)[Hofmann şi colab., 1999]. Prin monitorizarea modificărilor nivelurilor intracelulare de Ca^{2+} în celule, s-au identificat orexinele, o familie de neuropeptide hipotalamice care au fost izolate din extracte tisulare, ca liganzi naturali pentru receptorii orfani anteriori, care sunt acum cunoscuţi ca receptori pentru orexină [Sakurai şi colab., 1998]. Autorii au folosit Fura-2, unul dintre fluoroforii comercial disponibili care îşi schimbă fluorescenţă caracteristică la legarea de Ca^{2+}. În ultimii ani au devenit

disponibile numeroase modele care pot fi utilizate pentru măsurarea modificărilor [Ca^{2+}]i [Zacharias şi colab., 2000]. Unul dintre cei mai cunoscuţi cititori de plăci pentru măsurarea [Ca^{2+}]i este cititorul de plăci cu imagine fluorometrică (FLIPRTM), care a fost, de asemenea, utilizat pe scară largă pentru deorfanizarea oGPCRs. Sistemul FLIPR monitorizează răspunsul populaţiilor celulare în plăci (godeuri) la medicamente potenţial candidate.

Unul dintre ultimii oGPCRs care au fost deorfanizaţi folosind FLIPR este GPR40, un GPCR pentru lanţul lung al acizilor graşi, cum ar fi acidul eicosatrinoic [Briscoe şi colab., 2002]. Un alt test de sistem de monitorizare a [Ca Ca^{2+}]i se bazează pe fotoproteina aequorina prezentă la peştele *Aequorea Victoria*. Legarea Ca^{2} la aequorină determină oxidarea substratului coelenterazina pentru producerea de fotoni, care pot fi detectaţi cu luminometru (fig. 4.4).

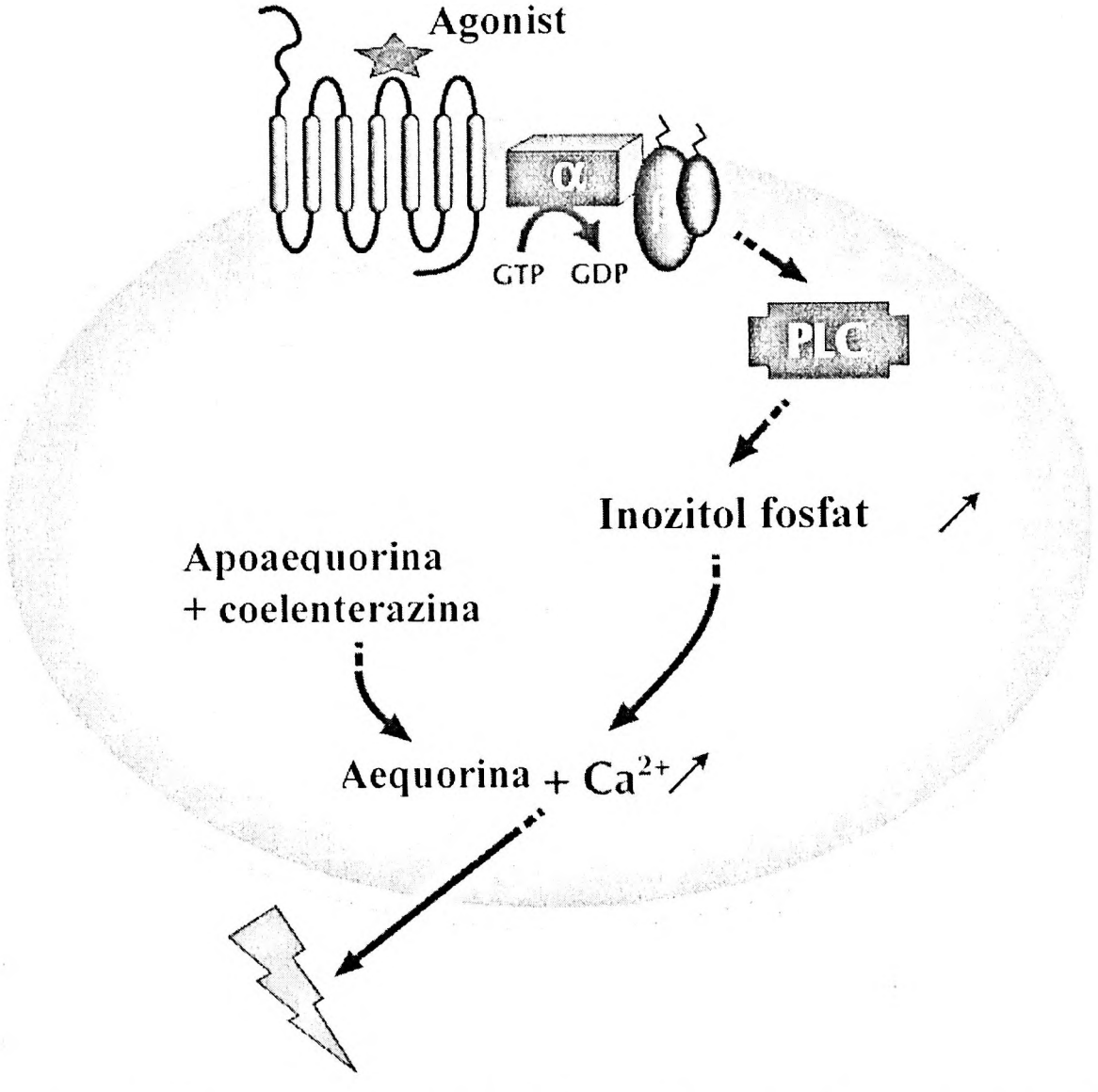


Fig. 4.4 Evaluarea modificărilor Ca^{2+} mediate de receptor pe calea sistemului de aequorine. Activarea mediată prin stimularea receptorilor a PLC fie prin intermediul Gαq/11, sau, de exemplu, prin Gαq5i himerice au ca rezultat formarea inozitolfosfatului şi ulterior creşterea intracelulară a Ca^{2+} (a se vedea secţiunile 4.4.3 şi 4.4.6). Interacţiunea Ca^{2+}

cu aequorina, o fotoproteină care este coexprimată împreună cu receptorul de interes, duce la oxidarea coelenterazinei, cu care celulele sunt încărcate înainte de stimularea receptorilor pentru a produce fotoni, care pot fi detectaţi printr-un luminometru (după Dingermann şi colab., 2004).

4.4.4. Microfiziometru citosenzor

În contrast cu evaluarea schimbărilor de Ca^{2+} sau AMPc intracelular, mai multe teste generice pot fi de asemenea folosite pentru măsurarea activării receptorilor. „Citosensorul" este un microfiziometru care utilizează modificările pH-ului extracelular care sunt însoţite de schimbări ale activităţi celulare (de exemplu, activarea GPCR), şi a fost utilizat cu succes pentru a identifica liganzii pentru receptorii CCR5 şi pentru caracterizarea farmacologică a numeroşi GPCRs [Wu şi colab., 1997]. Testul are o specificitate mai degrabă scăzută, motiv pentru care multe alte teste au câştigat popularitate faţă de acest sistem de testare. Cu toate acestea, testul poate fi util pentru deorfanizarea GPCRs acolo unde nu este nevoie de cunoştinţe anterioare despre căile de transducţie a semnalelor care pot fi activate de aceşti oGPCRs.

4.4.5. Teste bazate pe gene reporter

De asemenea modificările nivelurilor intracelulare de mesageri secunzi pot determina modificarea expresiei diferitelor gene, ca urmare a modulării activităţii factorilor de transcripţie. Aceşti factori de transcriere se pot lega la factori de transcripţie specifici prezenţi în regiunile promotor ale genelor pentru a intensifica sau reprima expresia genelor. Testele bazate pe gene reporter vor monitoriza activarea diferiţilor factori de transcripţie cum ar fi CRE, TRE, SRE, NF-kB şi AP-1, transcripţie mediată, de exemplu, de luciferaza şi β-galactozidaza, pentru care activitatea enzimatică poate fi analizată în lizatul celular, şi cu proteina fluorescentă verde (GFP). Tehnologia bazată pe gene reporter este acum utilizată pe scară largă pentru monitorizarea evenimentelor celulare asociate cu transducţia semnalului şi expresia genelor. Principalul avantaj al acestor teste îl constituie sensibilitatea mare, fiabilitatea, convenabilitatea şi adaptabilitate la scară largă a măsurătorilor [Hill şi colab., 1999].

Testele bazate pe gene reporter au fost utilizate pentru a ajuta deorfanizarea diferiţilor oGPCRs, incluzând, de exemplu, receptorul pentru sfingozilfosforilcolina care induce transcripţia genei mediată de SRE [Zhu şi colab., 2001] şi receptorul H4 pentru histamină.

În plus, genele reporter pot fi utilizate ca gene marker pentru a cuantifica răspunsurile proliferative celulare sau formarea AMPc. În aceste cazuri, genele reporter nu se află sub control transcripţional direct ca în cazul testelor bazate pe gene reporter. O platformă de tehnologie bazată pe celule pentru evaluarea funcţională a familiilor genelor pentru medicamente, inclusiv GPCRs, se numeşte Tehnologie de Amplificare şi Selecţie de Receptor (R-SATTM) şi utilizează o astfel de genă marker ca o citire funcţională [Croston şi

colab., 2002]. Acest test a fost recent utilizat pentru dezvoltarea de liganzi nonpeptidergici pentru receptorul pentru urotensină II şi a arătat că aplicarea de teste pe bază de celule poate produce liganzi cu situsuri de legare pentru receptori care sunt diferite de situsurile de legare care sunt utilizate de liganzi receptorilor nativi [Spalding şi colab., 2002].

4.4.6. Cuplarea proteinelor G cu GPCR

Pentru a creşte probabilitatea de a identifica un ligand nativ pentru un receptor orfan, screeningul funcţional care este utilizat trebuie să fie adaptat pentru o gamă largă de GPCRs. Astfel, activarea GPCRs care se cuplează cu membrii din familii distincte de proteine G heterotrimerice necesită un răspuns uniform.

Receptorii au o eterogenitate în specificitatea cuplării faţă de legarea lor şi de activarea proteinelor G, şi, ca rezultat un receptor poate activa proteine G care aparţin de diverse familii de proteine. Deşi unii GPCRs se cuplează cu membrii de la toate familiile de proteine G heterotrimerice, cei mai mulţi GPCRs se cuplează cu o anumită specificitate la diferite proteine G. Cu toate acestea, contextul celular, va determina, de asemenea, care proteine G sunt activate în cele din urmă odată cu activarea anumitor GPCR. Astfel în afară de afinitatea anumitor GPCRs pentru diferite proteine G, cantităţile specifice de proteine G exprimate au un rol important.

Pe baza acestui principiu, proteinele G specifice pot fi coexprimate împreună cu GPCRs pentru a promova activarea acestor proteine G ca să fie direcţionate pentru transducţia semnalului prin căi comune. Aceasta tehnică s-a dovedit funcţională în special pentru Gα16 şi omologul său murin Gα15, proteine G care afişează un model de expresie foarte restrâns al exprimării endogene. Aceste proteine G eterogene aparţin familiei Gq de proteine G, a căror activare are ca rezultat activarea PLC, care duce la producerea de diacilglicerol şi inositolfosfat, şi creşte concomitent nivelul intracelular de Ca^{2+} şi al efectoriilor lor din aval, şi prin urmare, este ideal pentru diferite screeninguri (a se vedea secţiunea 4.4.3) [Offermanns şi colab., 1995].

Având în vedere faptul că expresia atât a receptorilor cît şi a proteinelor G este adecvată, variabilitatea receptorilor, în principiu, ar trebui virtual să permită oricărui receptor să semnalizeze prin proteine G specifice pentru a activa o anumită cascadă de transducţie a semnalului. Cu toate acestea, nu toţi receptorii par a interacţiona cu proteinele G cu aceeaşi afinitate şi pentru unii receptori nu este foarte evident că sunt pregătiţi pentru teste de screning funcţional.

Domeniul C-terminal al proteinei Gα este un domeniu cheie în interacţiunea GPCR- proteină G [Hamm şi colab., 2001]. Proteine G himerice, în care ultimii dintre aminoacizi au fost înlocuiţi cu aminoacizi corespunzători care sunt prezenţi în alte familii de proteine G, au fost utilizate pe scară largă în teste de screening pentru a facilita o cuplare funcţională a receptorilor, care să

permită un screening funcţional pentru liganzii care modifică activitatea receptorilor. Probabil, cele mai frecvent utilizate proteine G himerice sunt cele în care în ultimii cinci aminoacizi ai Gαq au fost înlocuiţi de către cei ai Gαi, Gαo sau Gαz, şi sunt în mod obişnuit numiţi Gαqi5, Gαqo5 şi Gαqz5. Aceste proteine himerice Gαq au o eterogenitate crescută în legătură cu receptorii cuplaţi cu Gαi/o, permiţând receptorilor cuplaţi cu Gαi/o să se cupleze cu creşterea nivelului de intracelular Ca^{2+}; ele sunt de obicei utilizate în teste de screening, folosind FLIPR (a se vedea secţiunea 4.4.3) [Coward şi colab., 2000].

Alternativ, un amestec de proteine G, inclusiv proteine G himerice, pot fi coexprimate împreună cu oGPCR de interes pentru a creşte probabilitatea oGPCR cuplaţi cu proteine G adecvate să producă un răspuns biologic şi astfel, să crească probabilitatea de a identifica un ligand nativ pentru oGPCR.

Eterogenitatea receptorilor poate fi prelungită prin forţarea receptorilor de a se cupla cu o proteină G proiectată care se leagă fizic de proteine GPCR, cu sensul de proteine de fuziune. Astfel de receptori ai proteinelor de fuziune şi proteinelor G pot fi folosiţi ca un instrument pentru screeningul liganzilor şi în prezent au fost descrise pentru receptorii fuzionaţi fie cu Gs, Gi sau Gq [Milligan şi colab., 2000]. Receptori legaţi la agonişti pot interacţiona cu proteinele G şi activează proteinele G associate din aceste proteine de fuziune. Astfel de fuziuni GPCR-proteine G sunt folosite în scop de screening, aşa cum a fost exemplificat de oGPCR TG1019, care a fost fuzionat cu proteine Gαi1 şi a fost exprimat în celulele de insecte pentru evaluarea funcţională a TG10119 folosind teste de legare GTPγS, care au condus la identificarea mai multor eicosanoizi ce manifestă activităţi agoniste împotriva TG1019.

4.4.7. Activitatea GPCR independentă de ligand

Expresia eteroloagă a GPCRs poate determina niveluri de expresie relative ridicate şi, permite adesea detectarea ',,activităţii receptorilor constitutive" indepenentă de agonist. Această proprietate a GPCRs a fost constatată, de asemenea, pentru mai mulţi oGPCRs, incluzând diverşi GPCRs virali [Murphy şi colab., 2001].

Studii recente au demonstrat că mulţi antagonişti, pentru o mare varietate de tipuri de receptori au capacitatea intrinsecă de a scădea activitatea receptorilor constitutivi (Dingermann şi colab.,2004). De aceea mulţi antagonişti au fost reclasificaţi ca agonişti inverşi pe baza mai multor teste funcţionale diferite, care spre deosebire de tehnicile de legare a radioligandului pot diferenţia antagoniştii competitivi de agoniştii inverşi. Au fost utilizate cu succes teste funcţionale pentru identificarea medicamentelor candidate, care reduc răspunsul celular rezultat din activitatea receptorilor constitutivi, cum ar fi agoniştii inverşi, şi medicamentele implicate în tratarea bolilor în care activitatea receptorilor independentă de ligand poate fi importantă.

Totuşi ar trebui să se aibă în vedere, că răpunsul biologic agonist independent, observat aparent poate fi consecinţa unei permanente stimulări prin liganzi ubiquitari, care sunt produşi de linia de celule utilizată pentru exprimarea receptorilor.

Activitatea receptorilor constitutivi este folosită ca o metodă pentru identificarea liganzilor pentru receptori. Chiar dacă nu toţi GPCRs de tip sălbatic prezintă un înalt grad de activitate constitutivă, coexprimarea acestor receptori cu proteine G adecvate poate creşte proprietăţile de semnalizare bazală, ca să permită oportunităţi mai bune pentru identificarea de compuşi, care reduc activitatea intrinsecă a unor astfel de receptori [Burstein şi colab., 1997]. Alternativ, aceştia pot fi proiectaţi ca receptori „mutanţi activi constitutive" (CAM) ce sunt creaţi prin modificări induse de substituţia unor aminoacizi în conformaţia receptorilor.

Receptorii CAM sunt, de obicei, creaţi pe baza unei analogii cu efectele activităţii receptorilor care apar odată cu mutaţia resturilor specifice în alţi GPCR. O secvenţă care este adesea analizată când un receptor CAM este dorit, este secvenţa DRY de aminoacizi tipică GPCR care se găseşte în aval de al treilea domeniu transmembranar (TM3) al celor mai mulţi GPCRs şi este implicată în interacţiunea receptor-proteină G.

Un alt domeniu care poate fi luat în considerare pentru a genera CAM este TM6. Orientarea relativă TM3 şi TM6 este considerată a fi importantă pentru activitatea receptorilor în trecerea de la forma inactivă la forma activă a GPCR şi este însoţită de o schimbare în orientarea relativă a acestor două domenii TM concomitant cu rotaţia TM6.

Crearea unui receptor CAM face ligandul agonist (natural) incapabil să inducă un răspuns funcţional al receptorilor într-un test celular, aceasta constituind baza tehnologiei de activare a receptorilor constitutivi (CART) [Chalmers şi colab., 2002]. Când astfel de receptori CAM sunt creaţi şi folosiţi în screeningul funcţional, cea mai importantă este identificarea liganzilor prin capacitatea lor de a reduce activitatea intrinsecă a receptorilor; cu alte cuvinte, pentru a identifica agoniştii inverşi pentru receptorul mutant.

Ligandul identificat şi /sau analogii apropiaţi de acesta pot fi apoi utilizaţi pentru studiul interacţiuni lor potenţiale cu receptorul de tip sălbatic.

4.4.8. Strategii noi de screening

Pe lângă metodele de screening descrise de mai sus, mai multe tehnologii noi devin disponibile pentru caracterizarea GPCR şi, deci, pentru screening-ul oGPCR. GPCRs transduc cea mai mare parte a semnalelor la proteine G heterotrimerice. După schimbarea GDP legat de subunitatea Gα în GTP, proteinele G heterotrimerice activate se disociază de receptor într-o subunitate Gα legată la GTP şi un heterotrimer Gβγ. Testele bazate pe fluorescenţă cu transfer de energie prin rezonanţă (FRET) – utilizează mecanismul de transfer al energiei de la o componentă donor la o componentă

acceptor, care este în funcţie de distanţa dintre aceste două componente. Prin urmare, testele bazate pe FRET pot fi folosite pentru a monitoriza distanţa între fluorofori. Recent, un astfel de test bazat pe FRET a fost adaptat pentru disocierea proteinelor G heterotrimerice odată cu activarea receptorilor [Janetopoulos şi colab., 2001], rezultând un test funcţional care, în principiu, ar putea fi folosit pentru orice GPCR, cu condiţia ca proteinele G fluorescente să interacţioneze cu GPCRs în acelaşi mod ca şi cu proteinele G de tip sălbatic.

Una din cele mai recente tehnologii implicate în domeniul de evaluare a activităţilor biologice la nivel celular este componenta mare de screening. Principiul pentru această tehnică de screening se bazează pe reamenajarea spaţială a proteinelor care „apar" în timpul iniţierii proceselor de transducţie a semnalului şi, de aceea, aceste tipuri de teste sunt cunoscute sub numele de teste de translocare a proteinelor. Proteinele translocate pot fi monitorizate în timp, de exemplu, stimularea receptorilor pe baza proteinelor de fuziune fluorescente, cum ar fi, GFP din peştele *A.Victoria* [Ghosh RN. şi colab., 2000]. Valoarea testului o constituie recunoaşterea spaţială automată şi cuantificarea fluoroforilor în celule prin algoritmii proiectaţi special, care teoretic poate fi realizată pentru mai mulţi fluorofori simultan, permiţând astfel monitorizarea automată a activării cascadelor de transducţie a diferitelor semnale în aceeaşi celulă în acelaşi timp. La fel ca multe proteine care participă în cascadele de transducţie a semnalului activate de GPCR, o întreagă gamă de proteine poate fi luată în considerare prin marcare fluorescentă în scopuri de screening cu conţinut înalt, incluzând GPCRs, proteine G, arestine şi de factori de transcripţie, cum ar fi NF-kB [Dingermann şi colab., 2004]. GPCRs sunt translocaţi în mod normal de la suprafaţa celulară în endozomii acizi intracelulari, odată cu stimularea prelungită de către agonişti. Prin urmare, marcarea fluorescentă a GPCRs, utilizând, de exemplu GFP este utilizată adesea pentru a confirma ţintirea corectă a GPCR exprimaţi de membrana plasmatică permiţând detecţia noninvazivă a receptorului marcat odată cu stimularea receptorilor (fig. 4.5). Cu toate acestea, marcarea receptorului, poate modifica proprietăţile farmacologice ale receptorului. Alternativ, proteinele marcate fluorescent care joacă un rol în desensibilizarea receptorilor pot fi de asemenea utilizate. Membrii familiei arestinelor sunt cel mai frecvent utilizate [Groarke şi colab., 1999]. O nouă metodă pentru a determina specificitatea ligandului pentru GPCRs este imobilizarea funcţională a GPCRs pe suprafaţă de sticlă [Fang, 2002]. În acest mod, mai mulţi GPCRs pot fi evaluaţi simultan pentru ligandul lor sau pentru potenţialul de legare al proteinei G, folosind liganzi marcaţi fie radioactiv sau fluorescent, fie prin folosirea rezonanţei plasmatice de suprafaţă [Cooper şi colab., 2002]. Cu toate că aceste tehnici trebuie să fie încă puse la punct, generarea de GPCRs funcţionali pentru strategii noi HTS va oferi potenţialul pentru deorfanizarea GPCRs prin screening-ul lor împotriva liganzilor cunoscuţi .

nicotinic, oferind posibilitatea de a dezvolta noi terapii. În mod similar au fost identificaţi LGR7 şi LGR8 [Hsu şi colab., 2001], receptori pentru hormonul relaxina, unul dintre primii hormoni de reproducere identificaţi [Civelli şi colab., 1999]. Aceştia sunt GPCR care aparţin la o familie bogată în domenii de leucină care se repetă. În ceea ce priveşte oportunităţile pentru descoperirea medicamentelor, receptorii orfani arată un incredibil potenţial ca ţinte în descoperirea medicamentelor. Multe proiecte care au ca scop descoperirea medicamentelor ţintă utilizează genomul GPCR uman pentru abordarea genomică funcţională cu scopul de a descoperi noi medicamente ţintă. Legăturile anticipate între validarea ţintelor bazate pe genomică şi procesele de identificare de mare capacitate a liganzilor vor defini căile de exploatare farmacologică a datelor genomului.

Căutarea de liganzi nativi pentru receptori orfani a fost iniţiată pentru a permite descoperirea de numeroase neuropeptide noi care sunt propuse pentru a deveni punctul central al programelor implicate în descoperirea de noi medicamente.

Într-adevăr, numeroase programe pentru deorfanizarea receptorilor au identificat de exemplu orfanina FQ/nociceptina [Meunier şi colab., 1995], orexinele/hypocretinele [Sakurai şi colab., 1998], peptidul de eliberarea de prolactină [Hinuma şi colab., 1998], peptidul ciclic urotensina II [Ames şi colab., 1999], grelina [Kojima şi colab., 1999] şi apelina [Tatemoto şi colab., 1998], ca liganzi neuropeptidici pentru receptori orfani. Identificarea liganzilor pentru aceşti receptori a amplificat cercetarea neuropeptidelor, şi aceşti receptori sunt acum implicaţi într-o mare varietate de situaţii fiziologice şi patofiziologice, incluzând reglarea apetitului, aterosclerozei şi transmiterea durerii.

Pe baza omologiei secvenţei oGPCR a fost identificată o întreagă familie de gene *mas* legate ce codifică oGPCRs. Aceste gene sunt exprimate doar în anumite subtipuri de neuroni senzoriali care sunt cunoscuţi ca detectori de stimuli dureroşi [Dong şi colab., 2001]. MrgA1 şi mrgA4, au fost ulterior identificaţi ca potenţiali NPFF şi respectiv NPAF GPCRs. MrgA1 şi MrgC11 s-au dovedit de asemenea, a fi activaţi specific de agonişti surogat, sugerând că liganzii endogeni ai receptorilor Mrg sunt susceptibili de a fi peptide înrudite cu amidele RF (Y) G şi / sau RF (Y) [Dong şi colab., 2001]. Interesant este că un oGPCR legat de MrgA1 a fost identificat ca receptor pentru adenină [Bender şi colab., 2002]. Mai mult decât atât, SNSR1, un receptor care aparţine la familia de GPCRs neuro-senzoriali specifici, este strâns legat de MrgC11 şi s-a dovedit că este activat de produşii genei proencefalina A [Lembo şi colab., 2002].

În final, odată cu activarea ligandului s-a descris cea mai mare şi mai provocatoare etapă ce implică utilizarea ligandului identificat pentru a evalua rolul fiziologic al receptorului şi potenţialul acestuia ca o ţintă terapeutică pentru descoperirea de medicamente. Prin urmare, rămâne încă provocarea pentru stabilirea de sisteme fiziologice şi de biologie celulară relevante, în care să se testeze eficacitatea acestor molecule.

Este important ca în această etapă să avem informaţii complete şi detaliate despre profilurile expresiei receptorilor şi liganzilor atât în ţesuturi normale, cât şi patologice, cu scopul de a direcţiona aceste studii în modul cel mai eficient. În plus, disponibilitatea animalelor transgenice sau cu gene knockout poate fi de asemenea utilă în evaluarea funcţiei receptorului. Interesant, GPR8, identificat ca un receptor pentru neuropeptidul W [Shimomura şi colab., 2002], este absent, la rozătoare, făcând validarea ţintei pentru un astfel de receptor mai dificilă.

În cele din urmă, cei mai mulţi, dacă nu toţi, receptorii orfani vor fi deorfanizaţi. Liganzii nativi nu au fost identificaţi încă pentru toţi oGPCRs. Deşi dezorfanizarea oGPCRs poate părea destul de simplă, de multe ori nu este aşa de simplu. Există, de exemplu, oGPCRs pentru care se cunosc liganzi sintetici care se pot lega şi chiar activa proteinele G, cu toate că liganzii naturali pentru aceşti receptori rămân necunoscuţi. Un exemplu de un asemenea receptor pentru care ligandul agonist sintetic a fost identificat este receptorul pentru bombesina 3 [Weber şi colab., 2002]. Cu toate că disponibilitatea acestor agonişti a permis studii de farmacologie a receptorilor, inclusiv evaluarea căiilor de semnalizare care sunt activate de acest receptor, liganzii naturali pentru aceşti GPCRs rămân necunoscuţi.

Unora dintre oGPCRs li s-a atribuit importante roluri fiziologice. Pentru unii dintre oGPCRs exprimarea este indusă de stimuli speciali care furnizează indicii potenţiale pentru funcţia receptorilor. Un exemplu de oGPCR cu un important rol fiziologic potenţial este GPR30 [Carmeci şi colab., 1997], un GPCR care este asociat cu exprimarea receptorului pentru estrogen în cancerul de sân şi care pare a inhiba creşterea celulelor [Ahola şi colab., 2002].

Aceşti oGPCRs oferă un incredibil potenţial de ţinte medicamentoase pentru dezvoltarea de terapii valoroase. Este puţin probabil ca actualul interes pentru GPCRs ca ţinte pentru medicamente se va diminua, după ce mai mulţi oGPCRs se vor asocia cu ligandul lor natural. Implicarea acestora într-o multitudine procese fiziologice conservă interesul pentru oGPCRs. Progresele tehnologice viitoare vor accelera ritmul de descoperire a medicamentelor, şi timpul va decide dacă GPCRs deorfanizaţi vor oferi medicamentele ţintă anticipate în viitor.

PARTEA A II-A

SINTEZA MEDICAMENTELOR PE BAZA ENZIMELOR ȘI ACIZILOR NUCLEICI

CAPITOLUL 5
SINTEZA STEREOSELECTIVĂ A MEDICAMENTELOR CU AJUTORUL ENZIMELOR RECOMBINANTE

5.1. Sinteza stereoselectivă înainte de apariția ingineriei genetice

Obţinerea prin fermentaţie (în 1880) a acidului lactic **1** optic activ a fost unul dintre primele procese de sinteză stereoselectivă evidenţiate care a utilizat microorganisme naturale (fig. 5.1).

În 1858, Pasteur a demonstrat că fermentaţia sării de amoniu a acidului tartric cu *Penicillium glaucum* a indus formarea acidului tartric (S,S) **2**.

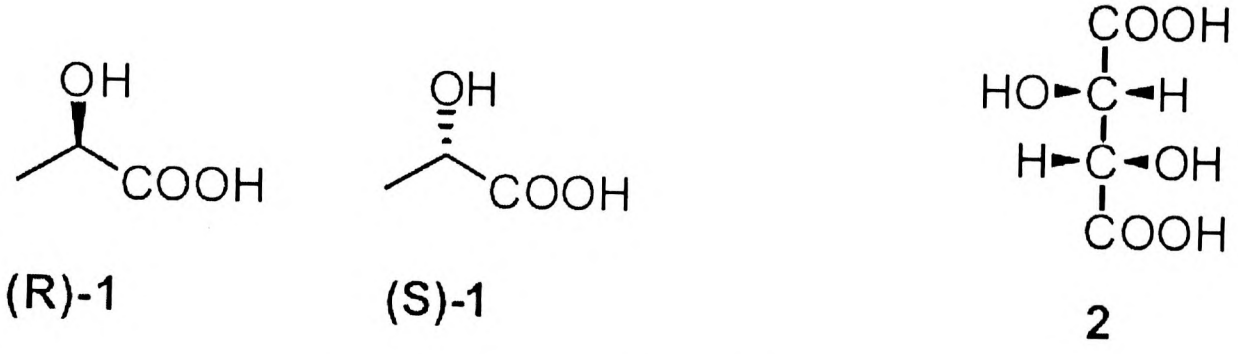
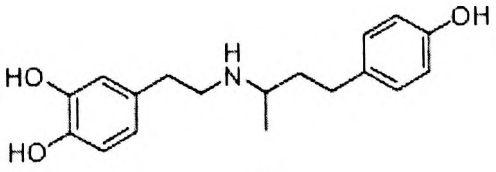
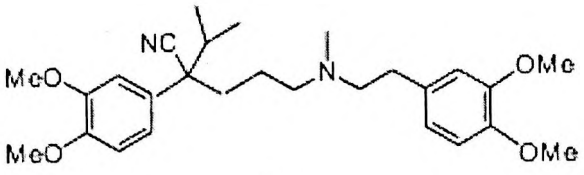
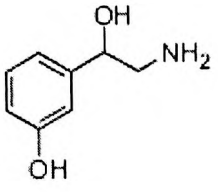
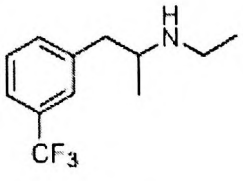
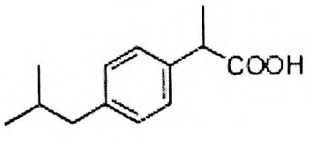
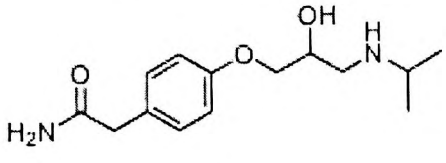
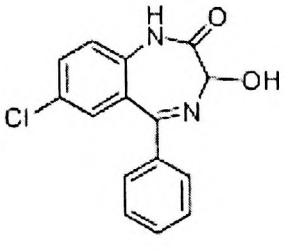


Fig. 5.1 (R)- şi (S)- acid lactic 1; (S,S)-acid tartric (2)

Pe măsură ce descoperirea noilor medicamente, cu origine atât naturală cât şi sintetică a progresat, şi structura medicamentelor a fost elucidată, ele au fost obţinute fie prin extracţie din sursele naturale, fie prin procedee sintetice clasice. În ultimul caz, aceasta a condus în general la formarea amestecurilor racemice când moleculele au avut centrii optici activi.

Tabelul 5.1 prezintă câteva medicamente care erau disponibile în anii '80 ca amestecuri racemice.

Nume	Structură chimică	Observații
Dobutamina	 3	cardiotonic
Verapamil	 4	antagonist de calciu dilatator coronarian
Norfenefrina	 5	adrenergic
Fenfluramina	 6	anorexic
Ibuprofen	 7	antiinflamator
Atenolol	 8	blocant beta adrenergic
Oxazepam	 9	sedativ

Tabelul 5.1. Exemple de medicamente disponibile în 1980 ca amestecuri racemice

De curând a fost demonstrat faptul ca enantiomeri diferiţi ai aceleiaşi molecule optic active nu îndeplinesc obligatoriu aceleaşi acţiuni farmacologice. Dimpotrivă, în câteva cazuri, enantiomerii (vezi capitolul 7) au manifestat arii total diferite ale activităţii farmacologice, iar în unele cazuri au fost chiar toxici. Tabelul 5.2 prezintă exemple de medicamente ai căror enantiomeri au activităţi farmacologice diferite.

Cercetarea legăturilor între structura şi activitatea unei molecule a ajutat la înţelegerea acţiunilor farmacologice ale moleculelor medicamentelor.

Necesitatea cercetării medicamentelor chirale este bazată pe următoarele fapte:

• receptorii de pe suprafaţa celulară sunt molecule biologice care sunt deseori chirale (vezi capitolul 7) în ele însele;

• moleculele eficiente ale medicamentelor trebuie să fie simetrice cu receptorul;

• complianţa cu necesităţile reglatorii. FDA (Food and Drug Administration) recomandă companiilor de cercetare farmaceutică să evalueze strict dacă o moleculă nouă a unui medicament poate sau nu poate să fi produsă sub forma unui singur izomer.

Tabelul 5.2 Influenţa stereochimiei asupra activităţii farmacologice a unor medicamente

Nume	Enantiomer D	Enantiomer L
Metildopa	inactiv	antihipertensiv
Penicilamina	antiartritic	foarte toxic
Propoxifen	analgezic	Antitusiv
Metorfan	antitusiv	analgezic
Izoproterenol	activitate bronhodilatatoare puternică	activitate bronhodilatatoare slabă

Se cunoştea că procesele de fermentaţie implicau etape stereoselective. De asemenea s-a constatat, în cazul penicilinelor, că enzimele au capacitatea de a cataliza reacţii chimice într-o manieră stereoselectivă. Fermentaţia şi biotransformarea la nivelul celulei cu enzime izolate au constituit bazele sintezei stereoselective. În 1921, Neuberg şi Hirsch au descoperit procesul de condensare a benzaldehidei **10** şi acetaldehidei în prezenţa drojdiilor care conduce la formarea 1-hidroxi-1-fenil-2- propanonei **12** optic active (fig. 5.2), cu formarea acidului piruvic **11** ca intermediar.

Reacţia este catalizată de enzima piruvat decarboxilaza. Compania farmaceutică germană Knoll AG a utilizat acest component pentru a sintetiza chimic L-(-)-efedrina **13** printr-o metodă patentată în 1930.

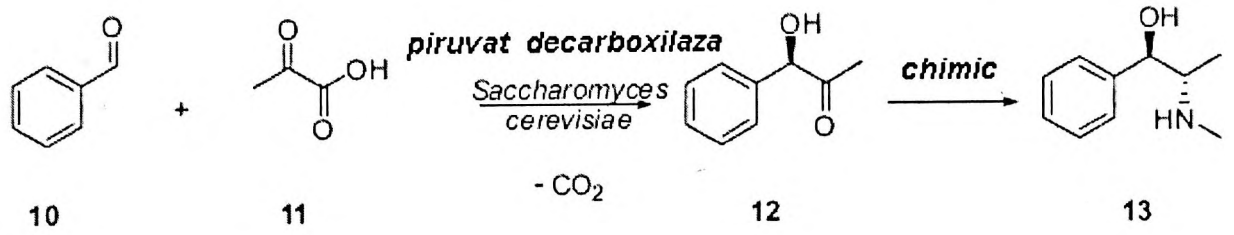


Fig. 5.2 Producţia de L-efedrină prin biotransformarea stereoselectivă microbiană

O altă etapă importantă în biotransformarea stereoselectivă înainte de dezvoltarea ingineriei genetice a constituit-o descoperirea hidroxilării stereo- şi regioselective de către *Rhizopus arrhuis* a progesteronului **14** la 11-α-progesteron **15**, un intermediar important pentru sinteza cortizonului **16** (fig. 5.3). Sinteza chimică a cortizonului este extrem de dificilă şi neviabilă din punct de vedere economic.

Descoperirea căii microbiene pentru hidroxilare a redus preţul cortizonului la 3% din preţul anterior.

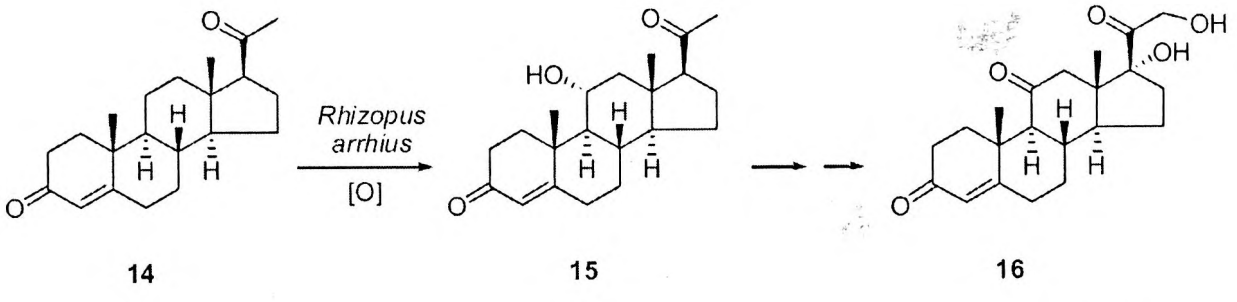


Fig. 5.3 Reducerea microbiană stereo- şi regioselectivă a progesteronului la 11-α-hidroxiprogesteron

Varietatea substraturilor şi tipurile reacţiilor catalizate stereoselectiv de către biocatalizatori sunt în continuă creştere. În tabelul 5.3 se prezintă exemple de reacţii stereoselective tipice din domeniul chimiei medicale, realizate cu biocatalizatori naturali.

Tabelul 5.3. Reacţii stereoselective tipice realizate cu ajutorul biocatalizatorilor naturali

Tipul reacţiei	Biocatalizatorul	Substratul	Produsul
Oxidare	Oxigenaza	Simvastatina 6-β	hidroximetilsimvastatina
Dezaminare oxidativă D-aminoacid	oxidaza	cefalosporina C	α-ceto-adipinil-7-ACA
Hidroxilare	benzoatdioxigenaza	Benzen	1,2-*cis*-dihidroxicatecol
Reducere	piruvatdecarboxilaza	Benzaldehida	(1*R*)-fenilacetilcarbinol
Aminare reductivă	leucin dehidrogenaza	acid trimetilpiruvic	L-tert-leucina
Esterificare	Lipaza	acid 3-benziltio-2-metil propanoic	catena laterală a zofenopril
Hidroliza	Lipaza	(*S*)-ibuprofen metoxietil ester	ibuprofen
Izomerizare	Izomeraza	Glucoza	D-fructoza
Condensarea aldolilor	Aldolaza	*N*-acetilmanozamina	Acid *N*-acetilneruaminic

5.2. Metode clasice de îmbunătățire a tulpinilor pentru sinteza stereoselectivă

Metodele clasice de identificare a noilor enzime şi microorganisme sunt bazate pe tehnici de screening, de exemplu a probelor de sol, sau colectarea tulpinilor prin îmbogăţirea culturilor.

În general, microorganismele izolate din natură produc enzima dorită la nivele prea mici pentru a realiza un proces de producţie eficient din punct de vedere al costului. De aceea, clonarea şi supraexpresia acestora este foarte benefică pentru dezvoltarea procesului. Nu toate microorganismele pot fi cultivate cu ajutorul tehnologiei comune de fermentaţie. Procentul microorganismelor accesibile din totalitatea celor prezente într-o probă este estimat a fi între 0,001 şi 1%, în funcţie de originea probei. Problema este că numai o mică parte din enzimele prezente în natură sunt potrivite pentru evenimentele sintetice, iar anumite caracteristici precum activitatea, stabilitatea, specificitatea substratului şi enantioselectivitatea pot fi mult sub necesităţi [Bornsheuer, 2001].

Până recent aceste limitări au fost depăşite prin metode precum screening-ul biocatalizatorilor alternativi, modificări ale sistemului de reacţie (de la hidroliză la esterificare), modificări ale parametrilor reacţiei, etc. Din acest motiv, modificarea microorganismului este foarte utilă pentru dezvoltarea procesului. Îmbunătăţirea tulpinilor prin evoluţie directă, ca în cazurile îmbunătăţirii prin mutaţie şi selecţie, a fost mulţi ani utilizată cu succes în multe aplicaţii microbiologice industriale.

Succesul obţinut cu metoda mutaţiilor genetice aleatorii şi recombinarea cauzată de evoluţia direcţionată *in vitro* a fost semnificativ. Screening-ul sau selecţia ulterioară pentru proprietăţile dorite conduce la identificarea enzimei necesare. Atunci când procesele evolutive sunt realizate în laborator, această aşa-numită microevoluţie ce apare în culturile bacteriene crescute în chemostat dă naştere la o specificitate enzimatică alterată. Rata producţiei enzimelor existente şi exprimarea genelor anterior dormante sunt fenomene tipic afectate de către microevoluţie.

Metodele clasice de îmbunătăţire a tulpinilor s-au bazat pe utilizarea mutagenilor chimici şi pe tehnici de selecţie creative pentru identificarea tulpinilor superioare pentru atingerea unui anumit obiectiv. Aceste metode au fost utilizate cu succes în producţia industrială a antibioticelor, vitaminelor şi aminoacizilor. Cu toate acestea, profilurile genetice şi metabolice ale tulpinilor mutante au fost foarte puţin caracterizate, iar mutageneza a rămas un proces aleatoriu [Stephanopoulus şi colab., 1998].

Metodele clasice ale îmbunătăţirii tulpinilor pot fi sumarizate după cum urmează:

- tehnici de screening;
- colectarea tulpinilor prin culturi îmbogăţite;
- mutaţii genetice aleatorii;
- evoluţia direcţionată *in vitro*;
- mutageneza chimică.

Mutageneza tradiţională nu are capacitatea de a înzestra o celulă cu gene de la alt microorganism şi nici nu poate să transfere funcţiile. Asemenea posibilităţi au devenit realizabile odată cu implementarea tehnologiei ADN-ului recombinant.

5.3. Ingineria genetică și apariția enzimelor recombinante pentru sinteza stereoselectivă

Noile tehnologii pentru descoperirea şi construirea enzimelor constituie motorul utilizării acestora în industria farmaceutică. Stereoselectivitatea este unul dintre avantajele majore ale căilor biocatalizei pentru producţia compuşilor chirali.

Ingineria genetică împreună cu identificarea şi amplificarea genelor structurale relevante au devenit alternative viabile la mutageneză şi la procedurile de screening aleatoriu. Introducerea genelor în organisme prin utilizarea tehnicilor AND recombinant este o metodă importantă pentru construirea tulpinilor cu genotipul dorit. Efectul net este plasarea genei transferate în noua gazdă pentru a îndeplini un scop biotehnologic specific. Oportunitatea de a introduce gene heterologe şi elemente reglatoare permite construcţia unor configuraţii metabolice cu noi caracteristici benefice. În plus,

această abordare înlătură complicaţiile mutaţiilor necaracterizate care sunt obţinute frecvent în urma mutagenezei celulelor. Îmbunătăţirea activităţilor celulare prin manipularea funcţiilor enzimatice, de transport şi reglatorii ale celulei cu ajutorul tehnologei ADN recombinant conduce la obţinerea de tulpini industriale relevante ale microorganismelor.

În ultimele două decade, pentru multe microorganisme industriale au fost identificate şi descoperite - prin intermediul tehnicilor ADN recombinant – grupurile de gene pentru producţia metaboliţilor secundari, în special antibiotice. În ultimul deceniu progresele în domeniile biochimiei, chimiei proteinelor, clonării moleculare, mutagenezei aleatorii şi direcţionate, tehnologiei de fermentaţie, au oferit accesul nelimitat la o varietate de enzime şi culturi microbiene ca procedee în sinteza organică. Acest proces a fost şi mai mult accelerat prin chimia combinatorică, screening-ul biologic de mare capacitate şi design-ul structural al medicamentelor. Cu toate acestea, succesele au fost modeste, parţial datorită dificultăţii în predicţia structurii exacte a proteinei necesare pentru reacţia stereoselectivă a unui anumit substrat.

A fost înregistrat un progres semnificativ în implementarea metodologiei mutaţiilor şi selecţiei. Tehnologia *DNA shuffling* -cunoscută şi sub denumirea de PCR sexual- este o metodă prin care se propagă rapid mutaţii genetice benefice într-un experiment direcţionat către evoluţie, presupunând recombinarea omologă *in vitro* a genelor mutante selectate printr-o fragmentare întâmplătoare şi reasamblare prin PCR. Această metodă care mimează evoluţia naturală este implicată în recombinarea artificială a ADN şi o bancă de peptide cu un număr mic de secvenţe (1-200) de la fagi (care este disponibilă în comerţ) permite selecţia rapidă a proteinelor exprimate de gene mutante.

Progresul rapid al ingineriei genetice şi dezvoltarea mai multor tehnici noi ale ADN recombinant ne oferă mijloacele necesare pentru design-ul, modificarea şi proiectarea biomoleculelor naturale. Pentru aplicaţii industriale, biomoleculele proiectate trebuie să fie stabile şi active pentru utilizare mai îndelungată în condiţii neobişnuite, în intervale largi de temperatură, pH şi mediu de reacţie. Activitatea şi stabilitatea susţinute pot fi necesare în prezenţa solvenţilor puternici, substraturilor înalt reactive, concentraţiilor înalte de săruri sau pH-ului extrem. Din acest motiv, eforturile sunt direcţionate spre ingineria fiziologiei celulare pentru a obţine îmbunătăţirea procesului. Obiectivul final al ingineriei metabolice este design-ul şi crearea unor biocatalizatori potriviţi, care sunt capabili să producă cantităţi maxime ale produşilor doriţi. De asemenea, un obiectiv important este eliminarea sau reducerea formării produşilor secundari. Selecţia genetică ne permite alterarea selectivităţii biocatalizatorilor, mărirea tipurilor de substraturi şi termostabilitatea, şi conferirea de noi funcţii proteinelor existente. De asemenea ne permite optimizarea proceselor în mai multe etape, şi identificarea noilor peptide ligand pentru receptorii biologici şi caracterizarea interacţiunilor ligand-receptor *in vivo* [Taylor şi colab., 2001].

Pentru a încerca rezolvarea problemelor industriale relevante ale proceselor enzimatice, s-au făcut încercări pentru a crea enzime care vor conferi sau îmbogăţi proprietăţi utile prin utilizarea tehnicilor biomoleculare. Deşi o abordare raţională a modelului bazat pe relaţia structură-funcţie este larg utilizată, abordarea evoluţiei direcţionate este în general preferată pentru multe enzime industriale datorită dificultăţilor de a lega aplicaţiile dorite de proprietăţile solicitate. Genomica funcţională, proteomica, fluxomica şi fiziomica vor contribui semnificativ la dezvoltarea ingineriei căii metabolice.

Bacteriile sunt gazde ideale pentru ADN-ul recombinant. Ele cresc rapid în supa nutritivă şi acceptă ADN-ul unei specii străine pentru a fi copiat împreună cu genele proprii. Multe bacterii posedă ADN extracromozomial (plasmide) care se replică separat de genomul bacterian. Până la jumătatea anilor 1990, *Escherichia coli* a fost gazda dominantă pentru producţia polipeptidelor şi proteinelor farmaceutice.

Prin utilizarea unei noi perechi ARNt-codon, o aminoacil ARNt sintetază şi un aminoacid, codul genetic al *E. coli* a fost extins pentru a încorpora aminoacizi nonnaturali „cu o fidelitate care o rivalizează pe cea a aminoacizilor naturali". În ultimii ani, din punct de vedere economic, producţia compuşilor farmacologici de către celulele mamiferelor a depăşit *E. coli*.

Principalele metodele moderne de îmbunătăţire a tulpinilor sunt următoarele:

- identificarea şi amplificarea genelor structurale relevante;
- ADN recombinant şi tehnicile ADN recombinant pentru manipularea funcţiilor enzimatice, de transport şi reglatorii;
- mutageneza direcţionată, în particular a reziduurilor cu situsuri active;
- mutageneza aleatorie prin diminuarea proteinelor cu selecţie;
- clonarea moleculară;
- chimia combinatorială;
- screening-ul biologic de mare capacitate;
- tehnicile shuffling DNA;
- alterarea topologiei proteinelor prin utilizarea mutazelor monomerice sau evoluţiei direcţionate.

Odată ce prin tehnicile de inginerie genetică au început să se obţină microorganisme şi enzime cu nivele dorite de activitate şi alte proprietăţi pentru exploatarea industrială, câteva procedee de sinteză stereoselectivă au fost dezvoltate şi îmbunătăţite. Aceasta a avut o influenţă profundă asupra metodelor de fabricaţie ale unor compuşi farmacologici activi, aminoacizi, vitamine, şi alţi compuşi de interes medicinal. Tehnicile de inginerie genetică au permis obţinerea pe scară largă a multor enzime la preţuri scăzute. Biocatalizatorii au fost implicaţi comercial pentru sinteza intermediarilor complecşi ai medicamentelor, substanţelor chimice produse pentru utilizare specializată (specialty chemicals), substanţelor chimice cu valoare monetară scăzută care sunt

comercializate în cantităţi mari (commodity chemicals) utilizate în industria alimentară, farmaceutică şi agrochimică [Liese şi colab., 2000].

5.4. Antibioticele β-lactamice

Studiile biosintetice au dovedit că antibioticele sunt derivate din precursori metabolici primari. Exemple ale unor astfel de precursori includ acizii graşi cu lanţ scurt (acetat şi propionat) şi aminoacizii. Genele structurale ale unor astfel de enzyme implicate în sinteza antibioticelor au fost clonate şi caracterizate cu succes. În cazul antibioticelor *β*-lactamice, aceste gene includ genele structurale ale L-*δ*- (aminoadipoil)-l-cisteinil-D-valin (ACV) sintetaza. ACV este intermediarul tripeptidic din calea de biosinteză a antibioticelor *β*-lactamice.

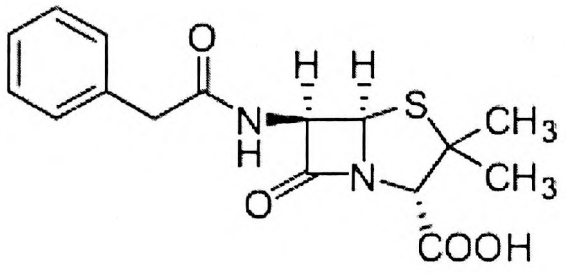
5.4.1. Penicilinele

Penicilin acilaza de la *E. coli* a fost larg studiată pentru sinteza antibioticelor semisintetice. Strategiile implicate în îmbunătăţirea expresiei penicilin-acilazei includ schimbarea sursei de carbon, coexpresia penicilin-acilazei cu proteine chaperone, creşterea eficienţei transcripţionale şi translaţionale şi utilizarea combinaţiilor potrivite ale sistemelor gazdă-vector.

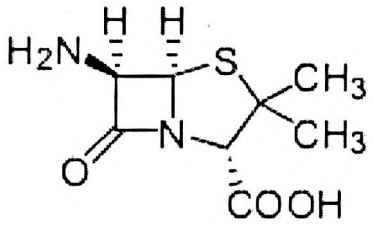
Necesitatea dezvoltării sistematice a strategiei optime de expresie pentru supraproducţia penicilin-acilazei la *E. coli* a devenit extrem de relevantă. Aceasta deoarece produsul, acidul 6-aminopenicilanic (6-APA) **18**, format prin hidroliza penicilinei G **17**, este un compus iniţial important pentru sinteza unui număr mare de antibiotice semisintetice *β*-lactamice **19** (fig. 5.4). Vohra şi colab., (2001) au clonat gena penicilin G - acilazei (PGA) (*pac*) într-un vector *asd*+ stabil (pYA292) şi l-au exprimat la *E. coli.* Această tulpină recombinantă a produs 1000 U PGA/g de masă uscată de celule, de 23 de ori mai mult PGA produs de *E. coli* ATCC 11105 parentală.

Creşterea semnificativă a producţiei *pac* a fost însoţită de absenţa represiei catabolitului glucoza, absenţa necesităţii inductorilor precum acidul fenilacetic şi izopropil-*β*-D-tiogalactopiranozidul, stabilitatea 100% a plasmidului pRT4 în absenţa unui marker selectiv în mediul de creştere, şi absenţa formării corpilor de incluziune.

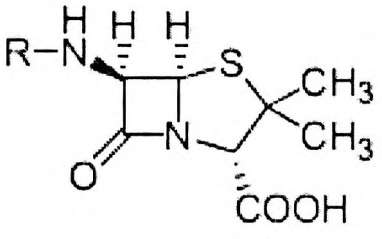
Asemenea proprietăţi sunt necesare pentru aplicaţiile industriale.



17



18



R = acil

19

Fig. 5.4. Structurile penicilinei G 17, 6-APA 18 şi penicilinelor semisintetice 19.

PGA de la *E. coli* este o enzimă industrială importantă utilizată pentru producţia antibioticelor semisintetice din precursorii *β*-lactamici 6-APA şi acidul 7- aminodezacetoximetilcefalosporanic (7-ADCA) **20**. Au fost dezvoltate diferite sisteme recombinante pentru expresia înaltă în care gena PGA clonată este sub controlul unui promotor puternic şi în consecinţă PGA este supra-produsă. Expresia genei cromozomiale este represată într-un mediu nesuplimentat cu inductor şi expresia sa necesită prezenţa acidului fenilacetic (PAA) în mediu. PAA inhibă de asemenea proteoliza intracelulară a pre-proenzimei (ppPA) în citoplasmă. Maresova şi colab., (2001) au îmbunătăţit o tulpină recombinantă de *E. coli* – RE 3 (pKA18) care supraproduce PGA din gena PGA a plasmidului utilizând tehnica culturii continue în chemostat. Cultura în chemostat a bacteriilor recombinante conduce la obţinerea componentelor pentru crearea unei noi tulpini de producţie. În acest caz particular, nouă tulpină recombinantă cu caracteristici modificate a fost construită prin retransformarea gazdei dezvoltate ERE3 cu plasmidul ancestral pKA18.

Penicilin amidaza (acilaza) a fost pentru prima dată descoperită la *Penicilliun chrysogenum* Q176 în 1950. Descoperirea acestei enzime a contribuit în mare măsură la obţinerea industrială a antibioticelor *β*-lactamice. În zilele noastre, *E. coli* şi *Bacillus megaterium* sunt tulpini utilizate în special ca sursă de enzimă. Tehnicile de inginerie genetică au fost aplicate încă din anul 1979 pentru a obţine tulpina hibridă de *E. coli* 5K, care a avut o activitate de 10x mai mare în ceea ce priveşte producţia de enzimă.

Calea lizinei de la *P. chrysogenum* a fost supusă ingineriei genetice pentru supraproducţia de β-lactam. Acest exemplu demonstrează faptul că dezmembrarea genelor bifurcaţiilor divergente a căii biosintetice conduce la canalizarea intermediarilor către produşii finali doriţi. Pe de altă parte, amplificarea unei gene specifice care codifică o enzimă prespusă importantă a unei căi biosintetice nu se traduce obligatoriu în tulpini supraproductive din moment ce alte obstacole pot apărea după îndepărtarea primului [Dingermann şi colab., 2004].

Gena penicilin-acilazei (*pac*) din ADN-ul genomic al *E. coli* ATCC 11105 a fost clonată în vectorul pUC19 utilizând tehnicile convenţionale [Gumusel şi colab., 2001]. S-a demonstrat că tulpina *E. coli* JM 109 transformată prin această construcţie posedă stabilitate plasmidică înaltă. Glucoza manifestă un efect represor asupra producţiei de penicilin acilază.

Au fost stabiliţi parametrii optimi pentru enzima *pac* izolată şi purificată. Lin şi colab., (2001) au observat că producţia penicilin acilazei recombinante poate fi crescută la *E. coli* prin creşterea concentraţiei intracelulare a proteazei periplasmatice DegP. Procesarea periplasmatică şi corpii de incluziune au limitat supraproducţia *pac*. Cantitatea acestor corpi de incluziune periplasmatici a fost semnificativ redusă şi activitatea *pac* crescută în urma coexprimării DegP. Stabilitatea *pac* recombinantă nu a fost afectată de expresia DegP. În acest caz, pentru prima data, s-a utilizat proteaza pentru reducerea cantităţii corpilor de incluziune şi îmbunătăţirea producţiei proteinei recombinante.

Acelaşi grup a exprimat heterolog la *E. coli* gena pac a *Providencia rettgeri* pentru producţia la temperatură înaltă a penicilin-acilazei bacteriene. A fost posibilă producerea enzimei la o temperatură de 37oC, pH-ul culturii fiind aproximativ neutru [Huang şi colab., 2000].

Activitatea de rezistenţă la antibiotice a fost în mod surprinzător descoperită la fragmente de ADN fără legătură funcţională. Organismul hipertermofilic *Pyrococcus furiosus* nu prezintă activitate β-lactamazică. Cu toate acestea, un fragment de AND care conferă o rezistenţă la ampicilină foarte scăzută, a fost izolată din biblioteca ADN-ului său genomic. După desfăşurarea a 50 de runde de shuffling şi screening ADN la concentraţii de ampicilină crescânde, activitatea de rezistenţă la ampicilină a acestei clone la *E. coli* a crescut semnificativ [Zhau şi colab., 2002].

5.4.2. Cefalosporinele

A fost dezvoltată şi patentată o tulpină supusă ingineriei genetice de *Pseudomonas cepacia* BY21 (KCTC 8922F), care este capabilă să producă o cantitate mare de acid glutaril 7-aminocefalosporanic. Această acilază catalizează reacţia care produce acidul 7-aminocefalosporanic (7-ACA) **21**, care este materia primă pentru antibioticele cefalosporinice semisintetice.

Kim şi colab., (2001) au clonat şi exprimat gena care codifică acilaza glutaril 7-ACA de la *Pseudomonas diminuta* KAC-1 în *E. coli*. Precizăm că *E. coli* BL 21 care poartă pET2B, construcţia plasmidică pentru expresia înaltă a genei acilazei glutaril 7-ACA, produce această enzimă în procent de aproximativ 30% din proteinele totale, cu 3,2 U/mg de proteine. Creşterea la o temperatura sub 31°C şi deleţia peptidului semnal au jucat un rol major în exprimarea înaltă a genei acilazei 333 a *P. dimunita* KAC-1 în celulele recombinante de *E. coli*.

Acilazele cefalosporinelor sunt un grup important de enzime industriale care hidrolizează cefalosporina C (CPC) **22** şi/sau GL-7-ACA **23** la **21** (fig. 5.5). Zheng şi colab., (2001) au obţinut prin inginerie două bacterii ce pot exprima gena care codifică acilaza GL-7-ACA a *Pseudomonas sp.* 130 cu activitate înaltă. Cea mai specifică activitate a acilazei GL-7-ACA a fost prezentă în celulele intacte comparativ cu cea a construcţiilor transformante.

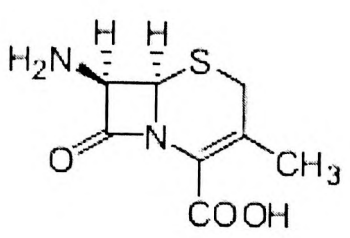
Activitatea specifică a acilazei GL-7-ACA a rămas constantă la cea de-a 50-a generaţie a mutanţilor transferaţi pe o placă de agar.

Tulpina de *Pseudomonas* SY-77-1 care produce GL-7-ACA **23** atunci când a fost supusă unei mutaţii a condus la obţinerea unei tulpini, numită GK-16, a cărei abilitate de a produce GL-7-ACA a fost de 20 de ori mai mare decât a tulpinii parentale. Aceasta s-a dovedit a fi potrivită pentru producţia industrială de 7-ACA.

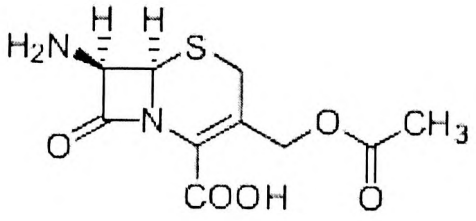
Mai târziu, gena amidazei GL-7-ACA a fost sub-clonată în mai multe copii de plasmid pentru a îmbunătăţi activitatea de încă 6 ori.

Procesele de producţie a cefalosporinelor 7-ADCA şi 7-ACA de către *P. chrysogenum* ce exprimă o enzimă cu activitate intensă au fost studiate timp de câţiva ani şi oferă exemple tipice de inginerie metabolică pentru extinderea spectrului produşilor biocatalizatorilor [Nielsen, 2001]. DSM produce penicilina G/V prin fermentaţie cu ajutorul tulpinilor de *P. chrysogenum* care au fost îmbunătăţite atât prin metode clasice cât şi prin inginerie genetică.

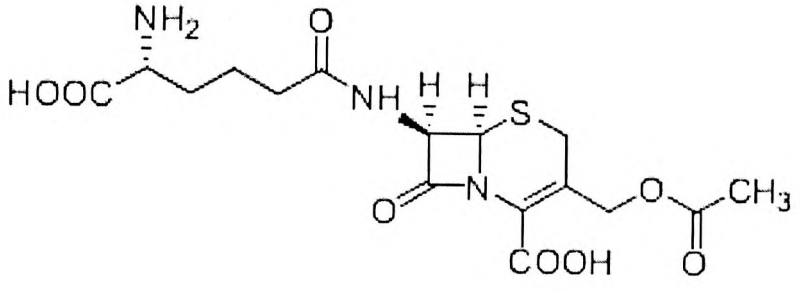
Conversia *in vitro* a analogilor penicilinei N la cefalosporine a fost pentru prima dată demonstrată la celulele în stare dormantă şi extractele de *Streptomyces clavuligerus* NP1. Sim şi colab., (2001) au optimizat rata de conversie a unei surse solubile înalt exprimată de deacetoxicefalosporina C sintetaza a *S. clavuligerus* recombinante NRRL 3585 (ScDAOCS) prin intermediul caracterizării detaliate a necesarului de cofactori. Conversia penicilinei G şi a ampicilinei au fost crescute de 21, respectiv 35 de ori. Excluderea ditiotreitolului (DTT) şi a ascorbatului din reacţie a avut un efect benefic asupra produşilor de reacţie. De asemenea, sulfatul de magneziu şi clorura de potasiu nu sunt esenţiale pentru aceste reacţii. Îmbunătăţirea produşilor prin ingineria metabolică a fost demonstrată şi pentru alte sisteme. Skatrud şi colab., (1989) au crescut producţia de cefalosporină C de către *Cephalosporium acremonium* cu 15% prin supraexpresia genei cefEF.



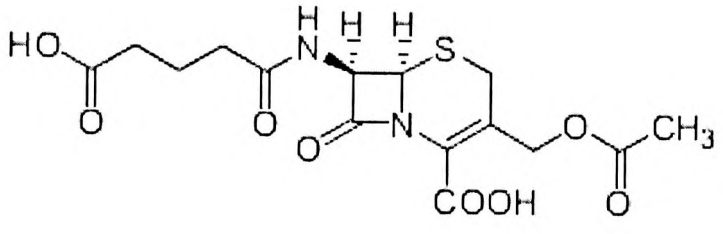
20



21



22



23

Fig. 5.5. 7-ADCA 20, 7-ACA 21, CPC 22 şi GL-7-ACA 23.

Unul din primele exemple care demonstrează importanţa ingineriei căii metabolice este cel al producţiei de cefalosporine. Până în anul 2000, sinteza cefalexinei consta dintr-o etapă de sinteză organică (etapa 1), o etapă de fermentaţie (etapa 2) şi două etape enzimatice (etapele 3, 4) (fig. 5.6).

Etapa 1:	Conversia benzaldehidei la D-fenilglicinamida
Etapa 2:	Fermentaţia cu glucidul şi acidul adipic pentru a obţine amida acidului adipic 7-ADCA
Etapa 3:	Hidroliza enzimatică a amidei acidului adipic 7-ADCA la 7-ADCA acid adipic
Etapa 4:	Condensarea enzimatică a 7-ADCA cu Dfenilglicinamida pentru a obţine cefalexina

Fig. 5.6. Progresul metodelor de sinteză a cefalexinei

Procesul a fost comercializat de DSM şi este bazat pe productivitatea înaltă a tulpinii de *Penicillium*. Genele enzimelor tulpinilor de *Cephalosporium* au fost implantate tulpinilor de *Penicillium*. Această tulpină supusă ingineriei a fost capabilă sa convertească zaharul direct la jumătate de 7-ADCA. Acest proces, care este mai efficient face ca ruta chimică să fie inutilă. Ca urmare, compuşii chimici toxici precum acidul peracetic, diclormetanul, pentacloridul fosforic, clorura de trimetilsilil, trimetilamina clorhidrică, bis(trimethyulsilil) ureea, acidul fenilacetic şi *n*-butanolul, care erau necesare pentru sinteza chimică, nu mai sunt utilizate.

Procesul ce constă din două etape pentru 7-ADCA conduce la o reducere a consumului de solvent cu aproximativ 90%, a reactivilor auxiliari cu 100%, a energiei cu aproximativ 40% şi a deşeurilor cu aproximativ 15%. Recent, Bristol-Myers Squibb a patentat un proces pentru producţia directă a dezacetilcefalosporinei C prin cultivarea unei tulpini de *Acremonium chrysogenum* care conţine acid nucleic recombinant ce codifică esteraza cefalosporinei *Rhodosporidium toruloides*. Producţia 7-ACA a fost facilitată prin utilizarea tehnicilor de inginerie genetică. D-aminoacid oxidaza (DAAO) este o flavoenzimă înalt stereoselectivă ce catalizează dezaminarea oxidativă a D-aminoacizilor pentru a produce α-cetoacizii corespunzători şi amoniac. Enzima este larg răspândită la mamifere şi eucariote. Numai câteva enzime, precum cele din rinichiul de porc şi din drojdiile *Rhodotorula gracilis* şi *Trigonopsis variabilis,* au oferit o preparare omogenă. Coenzima, FAD redusă, este reoxidată spontan de către oxigenul molecular pentru a forma peroxidul de hidrogen.

Studii detaliate asupra proprietăţilor DAAO a *R. gracilis* (RgDAAO) au arătat că această oxidază are proprietăţi favorabile pentru aplicaţii industriale. Cea mai importantă aplicaţie industrială este bioconversia cefalosporinei C în prima reacţie a căii de două etape pentru obţinerea 7-ACA, iar cea de-a doua reacţie o constituie dezacilarea catenei cefalosporinei C de către GL-7-ACA acilaza.

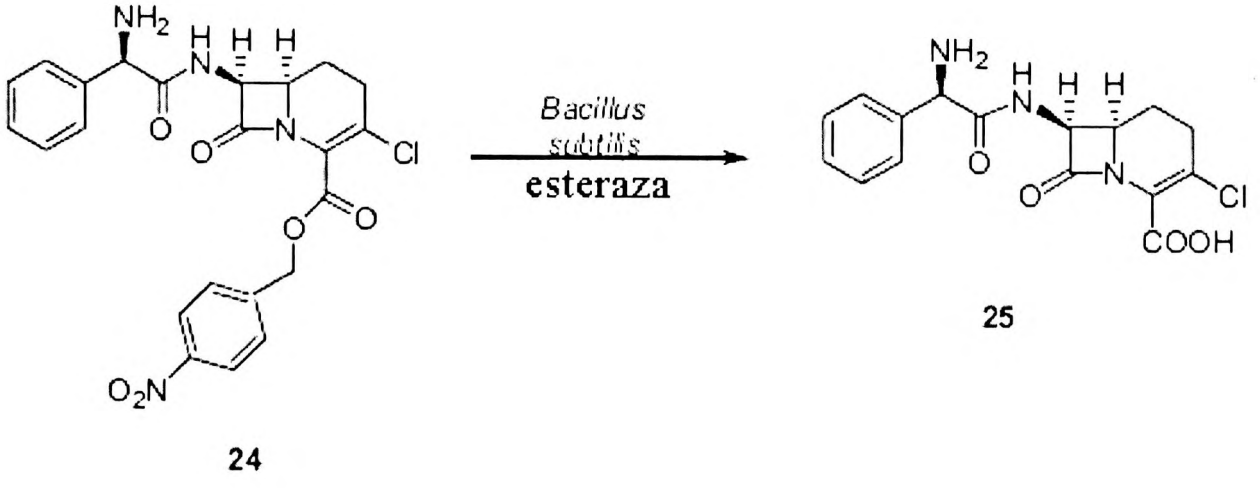
Utilizarea acestei flavozime este deseori însoţită de probleme care provin din procesul de purificare costisitor, turnover-ul scăzut al enzimei şi pierderea coenzimei. Acelaşi grup a creat His-tagged RgDAAO pornind de la o proteină himerică recombinantă cu şase reziduuri de aminoacizi la capătul N-terminal.

Această proteină His-tagged a fost exprimată cu succes la *E. coli* ca o proteină solubilă şi o holoenzimă complet activă. Nu au fost observate în cantităţi semnificative activităţi secundare, precum activitate β-lactamazică sau catalazică.

Enzima a fost activă şi a avut o stabilitate termică crescută după imobilizarea covalentă la matrice. Enzima a putut fi utilizată repetat după simpla recuperare din mediul de reacţie [Dingerman şi colab., 2004].

Ca şi în cazul obţinerii cefalexinei, fabricarea 7-ACA din cefalosporina C prin utilizarea DAAO s-a dovedit a fi un proces de „chimie verde". Utilizarea solvenţilor clorinaţi, aditivilor toxici şi a temperaturilor extrem de scăzute sunt evitate. Procesarea în continuare este simplificată datorită purităţii produşilor rezultaţi. Faptul că există peste 50 de patentări referitoare la biotransformarea cu DAAO indică semnificaţia sa industrială.

Tehnicile de inginerie genetică au fost utilizate cu succes pentru modificarea caracteristicilor enzimelor în vederea creşterii producţiei de medicamente. Esterul pnitrobenzil **24** al cefalosporinei Loracarbef® **25** este puţin solubil în apă şi dimetil formamida este utilizată ca şi cosolvent. Cu toate acestea, esteraza din *Bacillus subtilis*, care hidrolizează esterul la Loracarbef®, este inhibată de DMF (fig. 5.7).



24 25

Fig. 5.7. Biotransformarea stereoselectivă în sinteza Loracarbef 25.

Combinaţia epPCR şi DNA shuffling a condus la generarea unei variante cu o activitate de 150 de ori mai mare comparativ cu tipul sălbatic în DMF 15%. Termostabilitatea acestei enzime a fost crescută cu aproximativ 14oC prin evoluţie dirijată [Giver şi colab., 1998].

5.5. Antibioticele poliketide

Antibioticele poliketide sunt compuşi naturali produşi de către organisme eucariote, procariote şi plante. Ele sunt parţial alcătuite dintr-un lanţ de atomi de carbon carbociclic sau aliciclic derivat din condensarea acizilor carboxilici. Ele sunt construite din unităţi simple ale unor structuri specifice ce conţin între 2 şi 5 atomi de carbon. Biosinteza lor de către poliketid sintaza este similară cu biosinteza acizilor graşi, cu condensări repetitive ale tioesterilor acil.

Modul în care aceste unităţi sunt asamblate de către un complex enzimatic determină structura finală a compuşilor produşi. Ele exprimă un spectru larg de activităţi biologice, incluzând activitate antiinfecţioasă (eritromicina), imunosupresoare (rapamicina) şi carcinogenetică (aflatoxina).

Poliketidele au reprezentat aproximativ 3% din vânzările globale de produse farmaceutice în 1998, cu o valoare estimată de 8,5 miliarde de dolari. In tabelul 5.4 se prezintă microorganismele supuse ingineriei genetice utilizate pentru producţia poliketidelor de interes farmacologic.

Tabelul 5.4. Microorganisme supuse ingineriei genetice pentru sinteza poliketidelor

Tulpina obţinută prin inginerie genetică	**Produsul, observaţii**
Streptomyces peucetius SGF107	producţie crescută de daunomicină
Saccharopolyspora erytrea recombinantă	producţie îmbunătăţită de eritromicină
Mutantul ATCC 31780 şi L9 al *Streptomyces avermitilis*	producţie crescută de avermectină
Streptomyces coelicolar, clonat şi exprimat cu genele *Sorangium cellulosum*	biosinteza eficientă a agentului anticanceros epotilona
Streptomyces galilaeus, clonat şi exprimat cu genele pentru biosinteza actinorodinei	biosinteza antrachinonelor aloesaporanina II şi dezoxieritrolacina

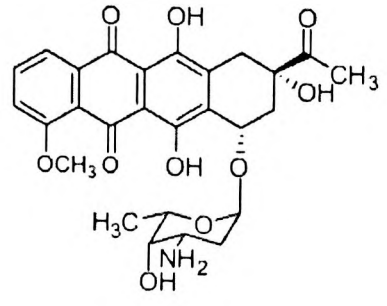
Primul exemplu de generare a unei poliketide noi prin manipulare genetică a genei poliketid sintazei (PKS) a fost raportat în 1990 de către grupul lui Strohl (1997). Clonarea genelor de biosinteză a actinorhodinei la tulpinile producătoare de aclarubicină ale *Streptomyces galilaeus* a condus la biosinteza de antrachinone aloesaponarin II şi dezoxieritrolacina.

Laboratoarele lui Hopwood (1997) au dezvoltat şi utilizat cu succes o abordare combinatorială a generaţiei unui nou tip de produşi PKS II prin combinarea şi potrivirea unor gene diferite ale tipului II al PKS.

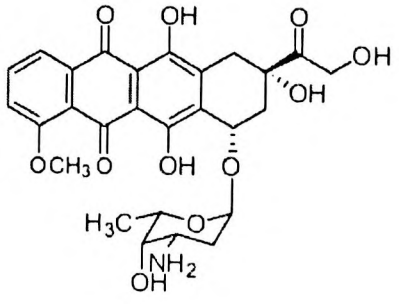
Poliketidele semisintetice sunt create prin modificarea poliketidelor bioactive, naturale [Strohl, 1997]. De când microorganismele au început să dezvolte gradat rezistenţă la poliketide, ingineria genetică oferă mijloacele pentru crearea unei noi diversităţi şi eficacităţi.

Antraciclinele precum daunorubicina **26** (daunomicina) şi doxorubicina **27** (adriamicina) (fig. 5.8) sunt antibiotice cu activitate antitumorală importantă. Cu toate acestea, ele sunt foarte scumpe datorită titrurilor scăzute şi a formării unui amestec complex de compuşi de către bacteriile producătoare, *Streptomyces lividans*, conducând la utilizarea unor tehnici subsecvente costisitoare. Rosabal şi colab., (2001) au clonat şi secvenţiat fragmentul de ADN cromozomial de la *Streptomyces peucetius* SGF-107 producătoare de daunomicină, care activează biosinteza a două antibiotice poliketidice, daunomicina şi actinorhodina.

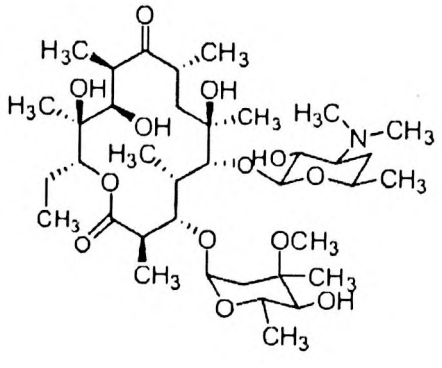
Secvenţierea parţială a ADN-ului fragmentului activator a arătat că există două cadre de citire, ai căror produşi prezintă similarităţi cu aceia ai altor factori reglatori ai transcripţiei din familiile MarR şi ArsR. Producţia daunomicinei a crescut de 8 ori la tulpina recombinantă. Prezenţa plasmidului recombinant a fost testată în timpul şi după procesul de fermentaţie. El a fost evidenţiat la sfârşitul procesului de fermentaţie. Activarea a fost observată la câteva tulpini.



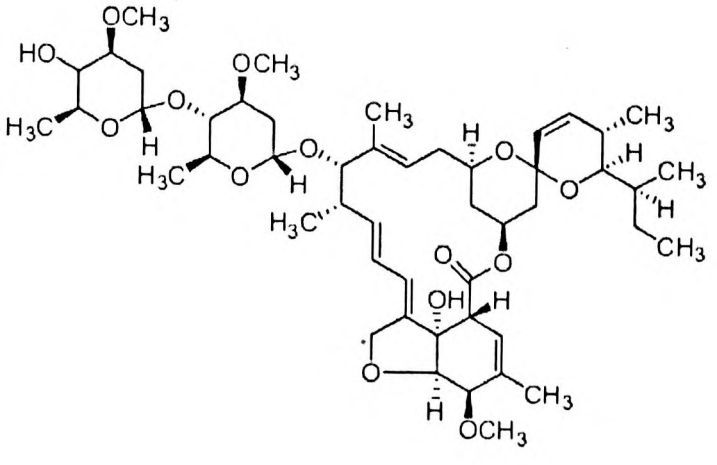
26



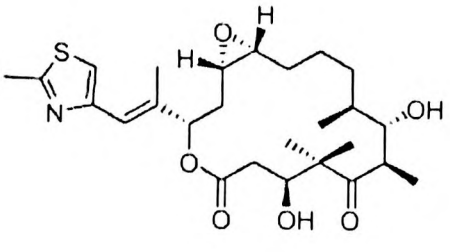
27



28



29



30

Fig. 5.8. Structurile daunorubicinei 26, doxorubicinei 27, eritromicinei A 28, avermectin A1a 29 şI epotilonei A 30.

Majoritatea activităţii în domeniul ingineriei biosintezei poliketidelor s-a concentrat asupra ingineriei biosintezei eritromicinei **28**, care este în mod natural produsă de către *Saccharopolyspora erythrea.* Biosinteza implică numai

trei gene gigant, fiecare codificând o proteină de peste 300kDa. Fiecare proteină este în schimb constituită din două domenii ce se repetă inexact şi care pot fi divizate în şase module.

De fapt, moleculele noi pot fi generate prin utilizarea diferitelor combinaţii şi permutări ale acestor modele, precum şi prin introducerea mutaţiilor punctiforme în domeniile funcţionale.

Actinomicetele în general, şi speciile *Streptomyces* în particular, au fost considerate ca fiind printre cele mai importante microorganisme din punct de vedere industrial, datorită abilităţii lor de a sintetiza o gamă largă de antibiotice şi alţi metaboliţi secundari. Dintre toţi metaboliţii secundari ce au activitate antihelmintică, avermectina **29** este considerată cel mai important metabolit datorită potenţei comerciale superioare.

Avermectina a înlocuit câteva medicamente convenţionale datorită activităţilor antihelmintice excelente. Câteva studii de biologie moleculară au fost desfăşurate pentru a înţelege calea şi reglarea biosintetică.

Hwang şi colab., (2001) au studiat condiţiile optime de pH pentru transformarea eficientă a protoplastelor şi celulelor intacte la mutanţii de *Streptomyces avermitilis* ATCC 31780 şi L9 producători de avermectină. Ei au descoperit că pH-ul tamponului protoplastului a fost cel mai important factor care influenţează eficienţa transformării. Ei au dezvoltat şi optimizat un proces de electroporare a celulelor intacte fără tratament cu lizozim pentru a compensa scăderea productivităţii ca rezultat al procesului de formare a protoplastelor.

Agentul poliketid anticanceros epotilon **30** stabilizează microtubulii într-o manieră similară taxolului. Calea sa biosintetică a putut fi transplantată la o gazdă cu proprietăţi de producţie mai bune. Astfel, se pare că acest produs natural poate fi transferat la alte gazde pentru a creşte cantitatea şi productivitatea. În timp ce producătorul de epotilon *Sorangium cellulosum* produce numai aproximativ 20mg/L de poliketide, cu un timp de dublare de 16 ore, clonarea şi expresia genelor la actinomicetul *Streptomyces coelicolar* a produs epotilone A şi B la o replicaţie de 10 ori mai rapidă.

5.6. Vitaminele

Tehnicile de inginerie genetică au influenţat metodele de producţie a diferitelor vitamine.

5.6.1 Acidul L-ascorbic (vitamina C)

Microorganismele au jucat întotdeauna un rol important în obţinerea industrială a vitaminei C **38**. Încă din 1923 s-a descoperit că bacteria *Acetobacter suboxydans* avea abilitatea să realizeze oxidarea regiospecifică a D-sorbitol **32**, care a fost obţinut prin reducerea chimică a D-glucozei **31** la L-sorboză **33** (fig. 5.9). Această biotransformare este realizată şi de

Gluconobacter oxydans. L-sorboza este un intermediar important pentru obţinerea vitaminei C prin acest procedeu, cunoscut şi sub numele de procedeu Reichstein-Gruessner.

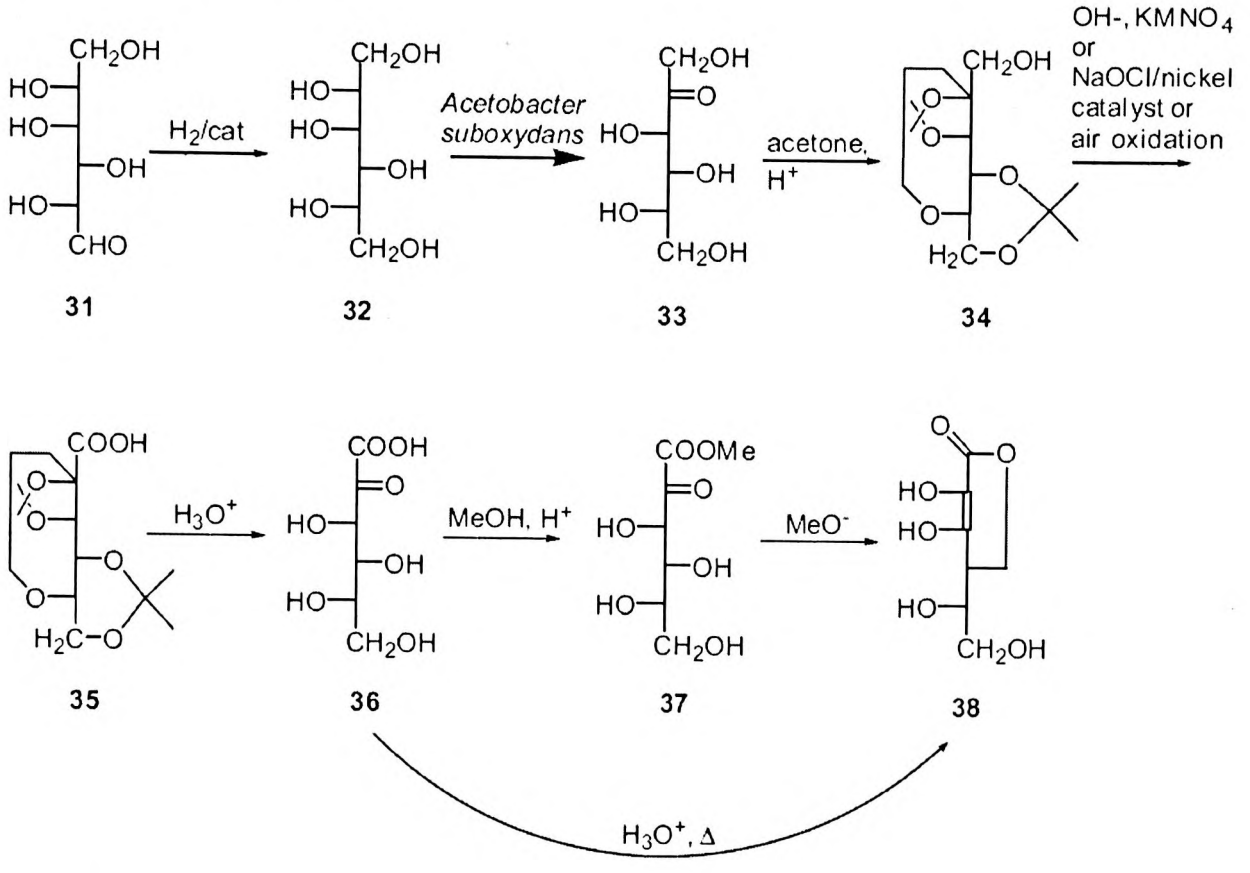


Fig. 5.9. Procedeul Reichstein–Gruessner pentru sinteza acidului L-ascorbic 38.

Procedeul Reichstein-Gruessner este foarte laborios şi prezintă limitări din punct de vedere economic şi al mediului. Din acest motiv, au fost depuse eforturi pentru a descoperi şi dezvolta tehnologii alternative cu ajutorul ingineriei genetice (tabelul 5.5). Sonoyama şi colab., (1982) au descris un proces de fermentaţie în tandem în care oxidarea microbială a D-glucozei la 2,5–diceto-D-gluconat (2,5-DKG) este realizată de speciile de *Erwinia*. Reducerea ulterioară a 2,5-DKG la intermediarul 2-ceto-L-gulonat (2-KLG) este catalizată de speciile *Corynebacterium*.

Într-un efort de a restrânge toate aceste etape într-un proces cu o singură etapă, speciile de *Erwinia herbicola* au fost transformate genetic cu gena *Corynebacterium*, care codifică 2,5-DKG reductaza, enzima care catalizează conversia 2,3-DKG la 2- KLG. După optimizarea condiţiilor de cultură, aceste tulpini recombinante de *Erwinia* au produs aproximativ 120g/L de 2-KLG în 20 de ore, cu o producţie molară din glucoză de aproximativ 60%, comparativ cu aproximativ 50% pe calea clasică.

Studiile ulterioare au ilustrat viabilitatea economică potenţială a tulpinilor supuse ingineriei metabolice pentru producţia de vitamina C şi au condus la un număr mare de licenţe în SUA [Hardy şi colab., 1990].

Tabelul 5.5. Microorganisme supuse ingineriei genetice pentru sinteza acidului L-ascorbic (după Dingermann şi colab., 2004)

Microorganism	Reacţia catalizată	Observaţii
Acetobacter suboxydans *Gluconobacter oxydans*	D-sorbitol la L-sorbitol	Oxidare
Specii de Erwinia	D-glucoza la 2,5-DKG	2 etape, fermentaţie în tandem
Specii de Corynebacterium	2,5-DKG la 2-KLG	fermentaţie într-o singură etapă
Erwinia herbicola cu gena *Corynebacterium* ce codifică 2,5-DKG Reductaza	D–glucoza la 2-KLG	
Gluconobacter oxydans T-100 clonat cu gene de la *Gluconobacter melanogenus* sau *gluconobacter oxydans* UV10	D-sorbitol la 2-KLG via L-sorbozonă	cantităţi îmbunătăţite de 2-KLG
Culturi combinate de *Flavimonas oryzihabitans* OA2 şi substraturi *Pseudomonas*	D-glucoza la 2,5-DKG via D-gluconat şi 2-KDG	transformare microbiană cu cepacia 3/27

O altă abordare este convertirea D-sorbitolului sau L-sorbozei la 2-KLG prin intermediul L-sorbozonei. *Gluconobacter melanogenus* şi *Gluconobacter oxydans* UV10 au enzimele necesare, o dehidrogenază sorboză-FAD localizată în membrană (SDH) şi NAD(P)- L-sorbozona DH (SNDH) citoplasmică. Genele care codifică SDH şi SNDH au fost clonate la tulpina *G. oxydans* T-100 producătoare de 2-KLG. Lsorboza a fost consumată complet. Tulpinile recombinante au fost capabile să îmbunătăţească cantităţile de 2-KLG la 230%.

Sulo şi colab., (2001) au convertit D-glucoza la 2,5-DKG cu o producţie de 92% în 150 de ore prin fermentaţie utilizând o cultură combinată de două bacterii Gram-negative izolate din sol. Prima tulpină, *Flavimonas oryzihabitans* OA2, produce 2-KDG din D-glucoză via D-gluconat. Cea de-a doua tulpină, *Pseudomonas cepacia* 3/27 converteşte 2-KDG la 2,5-DKG. Această abordare a oferit o nouă posibilitate de a produce acid ascorbic prin transformare microbiană cu substraturi mai convenabile şi oferă căi importante pentru ingineria genetică.

5.6.2. Biotina (Vitamina B8, Vitamina H)

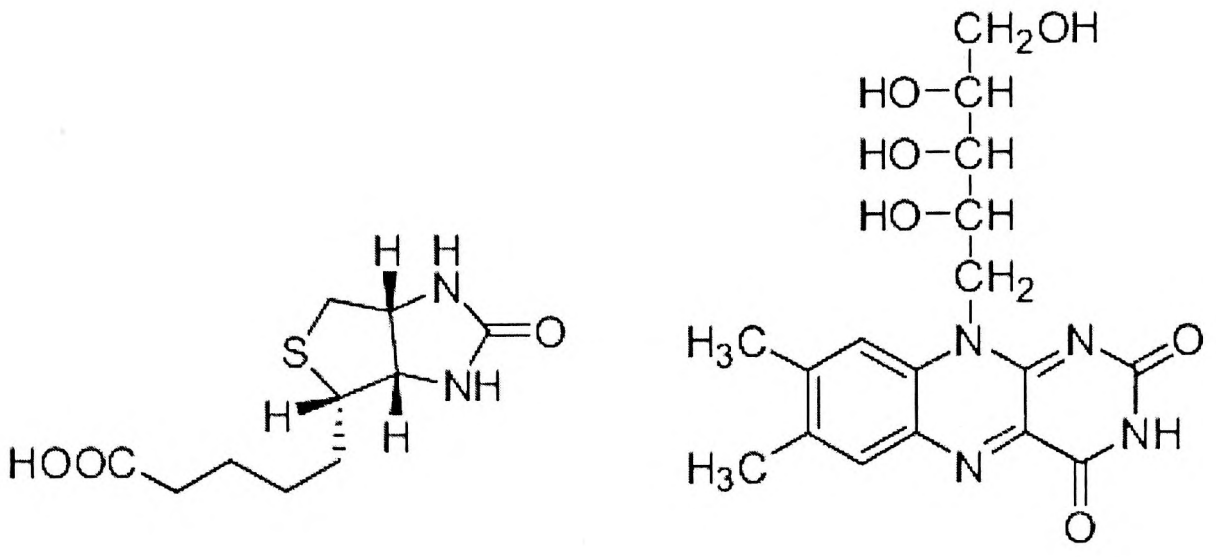
Un nutrient esenţial pentru multe microorganisme şi animale, biotina **39** este obţinută printr-o metodă de sinteză chimică complicată şi costisitoare – aşa-numitul proces Goldberg şi Sternbach. Studiile conectate la calea metabolică pentru sinteza biotinei din CoA-pimelică au fost pentru prima dată realizate la *E. coli*. În continuare au fost identificate toate enzimele implicate în sinteza biotinei din acidul pimelic de la *Bacillus sphaericus*. S-a descoperit că mutanţii *B. sphaericus* şi *Serratia marcescens*, care erau rezistenţi la acidomicin – analogii biotinei şi acidul 5-(2- tienil)-*n*-valeric, secretau cantităţi semnificative de intermediari ai căii biotinei.

Aceasta a condus la izolarea genelor de interes din aceste organisme. Genele implicate în sinteza biotinei sunt organizate în două grupuri, bioXUF şi bioDAYB şi au fost clonate la vectori *E. coli*. După care *E. coli* transformată cu aceste gene a produs concentraţii relativ înalte de biotină şi intermediari.

Similar, pentru a creşte şi mai mult productivitatea de biotină a mutanţilor *S. marcescens*, operonii biotinei au fost clonaţi pe câteva plasmide. Aceste plasmide hibride purtau fragmente de ADN de 7,2 kb, ce codificau cinci gene ale sintezei biotinei. Reintroducerea la mutanţii de *S. marcesens* a permis selecţia unei tulpini recombinante ce prezintă un nivel înalt de producţie a biotinei [Baets şi colab., 2000].

5.6.3. Riboflavina (Vitamina B2)

Riboflavina 40 (fig. 5.10) utilizată în nutriţia şi terapia umană este produsă atât prin procese sintetice cât şi de fermentaţie. Deşi bacteriile (speciile de *Clostridium*) şi drojdiile (speciile de *Candida*) sunt producători eficienţi, doi fungi asemănători, *Ashbya gossypii* şi *Eremothecium ashbyii*, sunt consideraţi producători excelenţi de riboflavină. Calea de biosinteză a riboflavinei implică o etapă cheie de conversie a ribuloz-5-fosfatului la 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfat. Această etapă este catalizată de enzima 3,4-dihidroxi-2-butanon-4-fosfat sintetaza. Această enzimă a fost purificată din drojdia flavinogenică *Candida guilliermondii* precum şi din *E. coli*. Gena sintetazei *E. coli* a fost clonată, secvenţiată şi exprimată. Această genă codifică o proteină de 24 kDa, având aceeaşi mărime ca şi enzima drojdiei. Se aşteaptă ca procesele de fermentaţie fie cele mai utilizate în viitor [Baets şi colab., 2000].



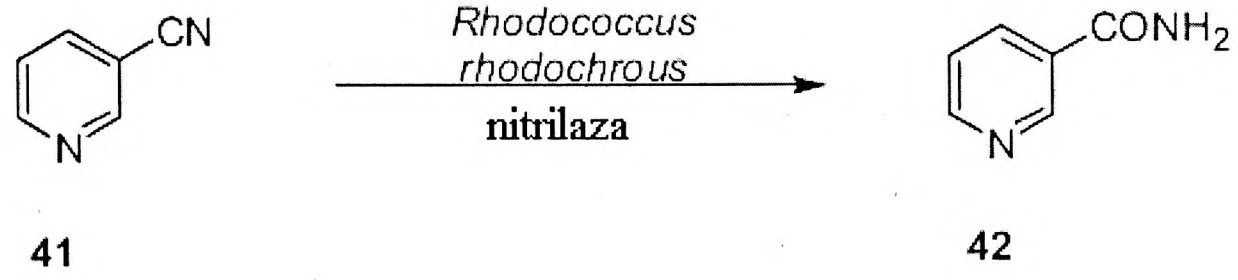
39 40

Fig. 5.10. Structurile biotinei 39, riboflavinei 40 şi nicotinamidei 42.

5.6.4 Nicotinamida (vitamina B3 sau PP)

Un proces microbian pentru conversia 3-cianopiridinei **41** la nicotinamida **42** a câştigat relevanţă industrială în ultimii ani. Hidroliza alcalină chimică a 3- cianopiridinei la nicotinamidă (fig. 5.11) este acompaniată de o cantitate de 4% de acid nicotinic.

Microorganismul utilizat pentru biotransformare este o tulpină de *Rhodococcus rhodochrous* J1 ce exprimă activitate 3-cianopiridinazică (nitrilază). Când enzima este indusă cu benzonitril, amoniacul rezultat este utilizat ca sursă de azot pentru creştere. Acidul nicotinic nu este metabolizat ulterior. Acest microorganism a câştigat importanţă industrială pentru producerea acrilamidei prin hidroliza acrilonitrilului [Petersen, Kiener, 1999].



41 42

Fig. 5.11. Hidroliza 3-cianopiridinei 41 la nicotinamida 42

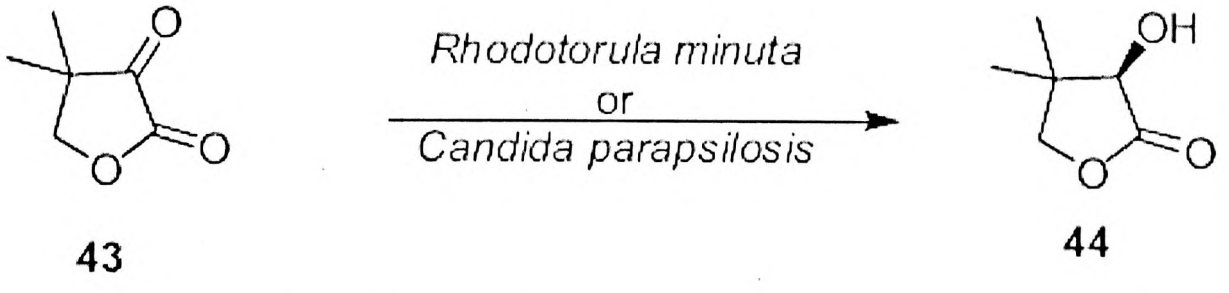
5.6.5 Vitamina B12

Sursa naturală primară de vitamina B12 o constituie activitatea metabolică bacteriană. În industrie, *Propionibacterium shermanii* şi *Pseudomonas denitrificans* au fost utilizate pentru cantităţile mari produse şi pentru abilitatea lor de a creşte rapid. Tratamente mutagene, precum lumina UV, etileneimina, nitrozometiluretanul, etc., au condus la o îmbunătăţire a productivităţii, dar adăugarea ionilor de cobalt şi frecvent 5,6-dimetilbenzimidazol (5,6-DBI) nu pot fi realizate. Precursorii potenţiali precum glicina, treonina şi acidul D-aminolevulinic au un efect benefic asupra sintezei vitaminei B12. S-a descoperit că betaina şi colina au un efect stimulator puternic asupra producţiei de vitamina B12. Mai mult, mutanţii cu porfirină puţină şi mutanţii catalază-negativi sunt în general supraproducători de vitamină B12. Fermentaţia industrială este realizată în două etape: o etapă iniţială anaerobă care declanşează creşterea şi biosinteza cobamidei, şi o trecere ulterioară la un proces aerob, care promovează biosinteza 5,6-DBI şi conversia cobamidei la cobalamină. Creşterea *P. denitrificans* are loc în paralel cu sinteza cobalaminei în condiţii de aerobioză atunci când 5,6-DBI şi sărurile de cobalt sunt adăugate direct la cultură. Prin tehnici de mutaţie şi selecţie, au fost obţinute tulpini care produc peste 150 mg de vitamina B12/L. Mai mult, câteva derivate ale vitaminei B12, precum hidroxicobalamina şi coenzima B11, pot fi produse prin fermentaţie directă. Câteva tulpini de *P. denitrificans* obţinute prin inginerie genetică au fost construite systematic în laboratoarele Aventis, liderul mondial în producerea vitaminei B12.

5.6.6 Acidul pantotenic (vitamina B5)

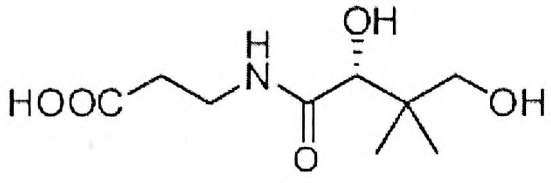
În producţia industrială a acidului D-(-)-pantotenic **45**, este realizată reducerea stereospecifică, microbiană, a ketopantoil lactonei **43** la D-(-)-pantoilactona **44** cu celule spălate de *Rhodotorula minuta* sau *Candida parapsilosis* (fig. 5.12).

Condensarea subsecventă cu β-alanina conduce la obţinerea acidului pantotenic. Takeda Chemical Industries a dezvoltat un proces de fermentaţie direct pentru acidul D-pantoic **46** şi acidul D-pantotenic **45** (fig. 5.13).

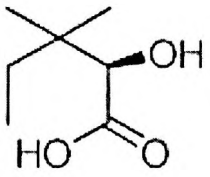


43 **44**

Fig. 5.12. Reducerea microbiană stereospecifică a cetopantoil lactonei 43 la D-(-)-pantoillactona 44



45



46

Fig. 5.13 Acidul D-pantotenic 45 şi acidul D-pantoic 46

Câteva genuri de *Enterobacteriaceae (Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter* şi *Escherichia*), cu rezistenţă la acidul salicilic şi/sau acidul α-cetoizovaleric, acidul acetobutiric, acidul α-aminobutiric, acidul β-hidroxi-aspartic şi O-metil treonina, au fost selectate ca tulpini cu productivitate mare. Mutanţii de *E. coli* şi tulpinile recombinante, care au fost transformate cu plasmide purtătoare de gene implicate în biosinteza acidului pantotenic, produc cantităţi de acid D-pantotenic din glucoză, β- alanina ca precursor [Baets şi colab., 2000].

Degussa a patentat recent un proces pentru prepararea acidului D-pantotenic prin fermentaţia bacteriilor Coryneforme în care secvenţa nucleotidelor ce codifică pentru gena Zwa1 este supraexprimată [Dusch, Thierbach, 2002]. Procesul include următoarele etape:

- fermentarea bacteriilor producătoare de acid D-pantotenic la care cel puţin o genă ce codifică Zwa1 este supraexprimată;
- concentrarea acidului D-pantotenic în mediu sau în celulele bacteriene;
- izolarea acidului D-pantotenic produs.

5.6.7. Vitamina A

Un alt exemplu de aplicaţie a ingineriei metabolice pentru a converti intermediarii metabolici nativi la produşii finali este producţia β-carotenului precursor al vitaminei A. Transformarea genetică a *Zymomonas mobilis* şi *Agrobacterium tumefaciens* cu patru gene ale β-carotenului a condus la formarea coloniilor galbene pe placa de agar. Aceste colonii conţineau cantităţi suficiente de precursor [Misawa şi colab., 1990].

5.6.8. Vitamina K (Menaquinona)

Un factor antihemoragic larg utilizat în medicină pentru variate tipuri de simptome hemoragice, vitamina K este produsă prin sinteza chimică. Vitamina K2 este prezentă numai la bacterii (nu şi la fungi şi drojdii). Bacteriile facultative anaerobe conţin în particular vitamina K2 şi omologii săi. *Flavobacterium meningosepticum* a fost identificat ca un producător important al metabolitului. Un mutant al acestui microorganism, care a fost rezistent la inhibitorul biosintezei vitaminei K2, 1-hidroxi-2-naftoat (HNA) a fost

selecţionat. Acest mutant produce o cantitate mare de vitamina K2 intracelulară într-un mediu ce conţine _-tirozină şi izopentanol. Procesele de fermentaţie microbiană pentru sinteza specifică a analogilor vitaminei K pot deveni disponibile pentru comercializare în viitorul apropiat [Baets şi colab., 2000].

5.7. Steroizii

Mutanţii speciilor de *Mycobacterium*, care sunt lipsiţi de activitatea de degradare a inelului steroidian, au fost utilizaţi la Schering pentru producţia androstendionei şi androstadiendionei la o scală de 200m3. Aceşti intermediari sunt utilizaţi pentru sinteza ulterioară a medicamentelor steroidiene utilizând căile chimice şi biotehnologice. Căile biotehnologice care au obţinut semnificaţie comercială include hidroxilarea (la poziţiile 11α sau 11β cu specii de *Curvularia*), dehidrogenarea (poziţia δ1; hidrocortizon la prednisolon) şi reducerea (17-ceto reducerea). Au fost utilizate de asemenea proteine mediator. Pe baza tehnicilor de inginerie genetică, s168 au produs noi tulpini care au fost utilizate în sinteza compuşilor steroizi. Dumas şi colab., (2002) au produs tulpini cu activitate 20 α-hidroxisteroid dehidrogeneza scăzută. Astfel, cantitatea şi selectivitatea proceselor de biotransformare a steroizilor sunt îmbunătăţite. Mai mult, produsul obţinut este de puritate înaltă.

5.8. Alte medicamente

5.8.1. L-Dihidroxifenil alanina (L-DOPA)

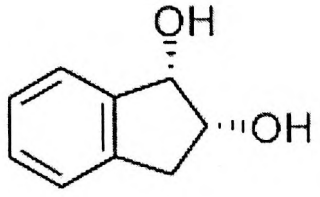
L-DOPA este un aminoacid optic activ utilizat în tratamentul bolii Parkinson.

Metoda tradiţională de producere a **L**-DOPA porneşte de la compusul dihidroxifenil şi implică fie cataliza omogenă, fie biocataliza. Deoarece **L**-tirozina are o grupare hidroxil fenolică mai puţin decât **L**-DOPA, eforturile s-au îndreptat către hidroxilarea cu ajutorul biocatalizatorilor. Până recent acest lucru nu era posibil datorită faptului că hidroxilarea subsecventă conducea la formarea contaminanţilor trihidroxilaţi.

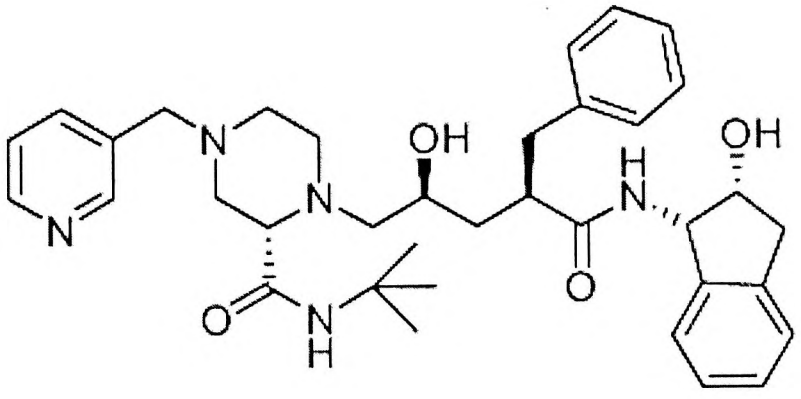
Kramer şi colab., (2001) au clonat genele pentru constituirea 4-hidroxifenilacetat-3- hidroxilazei, monooxigenazei şi FADH2-NADH oxidoreductazei, într-un vector pentru *E. coli*. Genele corespunzătoare hpaB şi hpaC au fost exprimate funcţional şi s-a produs sinteza directă a **L**-DOPA din **L**-tirozina.

5.8.2 Crixivan®

Compusul cis-(1S2R)-indandiol **47** este un precursor al unei căi biosintetice pentru producţia inhibitorului proteazei virusului imunodeficienţei umane Crixivan®, care este forma sulfat a indinavirului **48** (fig. 5.14). Cu ajutorul mutagenezei aleatorii genei care codifică dioxigenaza toluenului din *Pseudomonas putida,* Zheng şi colab.,(2000) au îmbunătăţit obţinerea de indinavir.



47

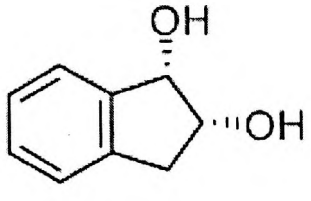


48

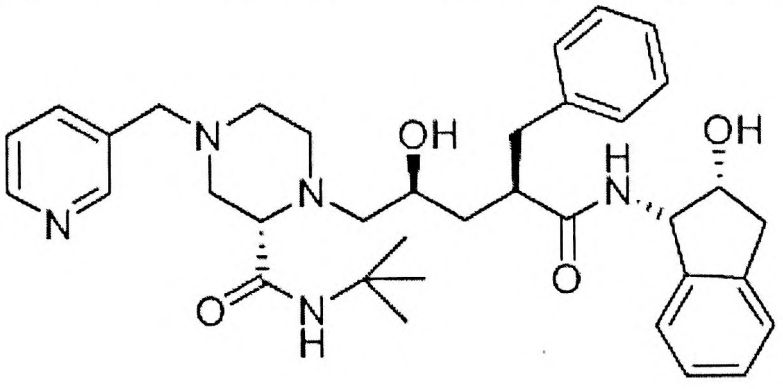
Fig. 5.14. Cis-(1S,2R)-indandiol 47 şi indinavir 48.

5.8.3 Acidul N-Acetil Neuraminic (NANA)

NANA **51**, cunoscut şi sub denumirea de acid sialic, este substratul neuraminidazei virusului influenza. Această enzimă a fost prima enzimă descoperită asociată unui virus. Câţiva analogi ai NANA au fost dezvoltaţi şi unii dintre ei, precum Zanamivir® sunt inhibitori eficienţi ai virusului influenza A. Enzima Neu5Ac (NANA) aldolaza (sintaza) catalizează formarea NANA din N-acetil–D-manozamina **50**, un epimer al N-acetil–D-glucozaminei **49** (fig. 5.15).



47



48

Fig. 5.15 Biotransformarea N-acetil-D-glucozaminei 49 la NANA 51 via N-acetil-Dmanozamina 50.

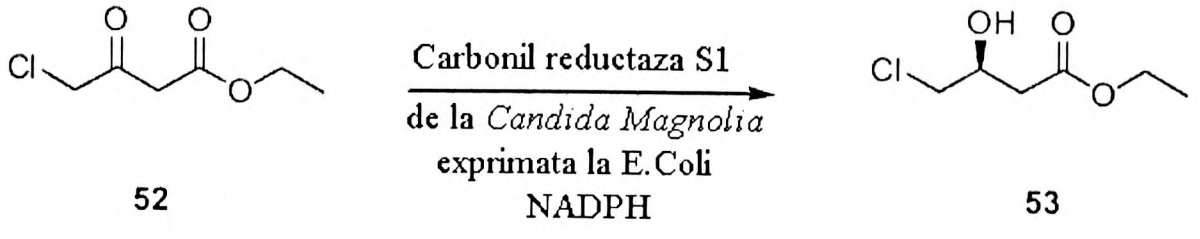
Tehnicile de inginerie genetică şi-au propus să obţină o expresie mai bună a acestei enzime. Mahmoudian şi colab., (1997) au dezvoltat şi imobilizat procesul enzimatic pentru producţia NANA utilizând Neu5ac aldolaza din tulpinile recombinante de *E. coli*. Tulpina de *E. coli* TG1 (pMexAld) a fost construită şi produce cantităţi mai mari de Neu5Ac aldolaza. Sintetaza NANA de la *Neisseria meningitidis* serogrup B a fost obţinută prin expresia genei clonate. Gena siaC a serogrupului B al *N. meningitidis* a fost clonată prin PCR cu ajutorul primerilor derivaţi dintr-o secvenţă disponibilă. Necesităţile substratului sintetazei indică faptul că are un numeroase avantaje faţă de alte aldolaze.

Tehnicile de inginerie genetică au fost introduse în procesul enzymatic dezvoltat pentru NANA de către Kragl şi colab., (1991). Tabata şi colab., (2002) au cuplat bacteriile ce exprimă N-acetil-D-glucozamin 2-epimeraza şi sintetaza acidului N-acetil-D-neuraminic pentru a produce NANA. Gena srl1975 a *Synechocystis* sp. PCC6803, o cianobacterie fototropică, a fost clonată prin PCR şi exprimată la *E. coli*, iar *E. coli* recombinant prezintă activitate GlcNAc2-epimerazică. Acesta este primul exemplu de clonare a genei GlcNAc2-epimeraza de la procariote.

5.8.4. Inhibitorii biosintezei colesterinei (HMG-CoA Reductase Inhibitors)

Compusul chiral (S)-4-cloro-3-hidroxibutanoate (CHBE) **53** este un element important în sinteza acizilor 4-(2-(ariletil)hidroxifosfinil)-3-hidroxibutanoici, o nouă clasă de inhibitori selectivi ai biosintezei colesterolului. CHBE a fost produs prin reducerea ceto-esterului corespunzător, esterul acidului 4-cloro-3-oxo-butanoic cu alcoolul etilic (COBE) **52** cu ajutorul unei dehidrogenaze NADPH-dependente de la *Geotrichum candidum* SC 5469 (fig. 5.16).

Cu ajutorul clonării moleculare şi a supraexpresiei genei ce codifică pentru carbonil reductaza NADPH-dependentă a *Candida magnoliae*, aceeaşi biotransformare a fost realizată pentru a obţine un produs cu exces enantiomeric 100%. Gena S1 a fost supraexprimată la *E. coli*, iar enzima astfel exprimată a fost purificată şi a avut aceleaşi proprietăţi catalitice ca şi enzima *C. magnoliae*. Biotransformarea a avut loc într-un sistem cu două etape utilizând n-butil acetatul.



52 53

Fig. 5.16 Reducerea stereoselectivă a esterului acidului (R)-4-cloro-3-oxobutanoic cu etanolul (COBE) 52 la (S)-4-cloro-3-hidroxibutanoat (CHBE) 53.

5.8.5. Omapatrilat

Omapatrilat (BMS-186716) **55** este un nou inhibitor de vasopeptidaze în dezvoltare, în care compusul BMS-199541-01 **54** este un intermediar chiral. Pentru a sintetiza BMS-199541-01, a fost izolată o tulpină de *Sphingomonas paucimobilis* SC 16113 care avea o _-lizină ε-aminotransferază nouă.

Gena corespunzătoare (lat) a fost clonată şi supraexprimată la *E. coli.* Un produs al reacţiei de 65-70% a fost obţinut în biotransformarea utilizând biocatalizatori (fig. 5.17).



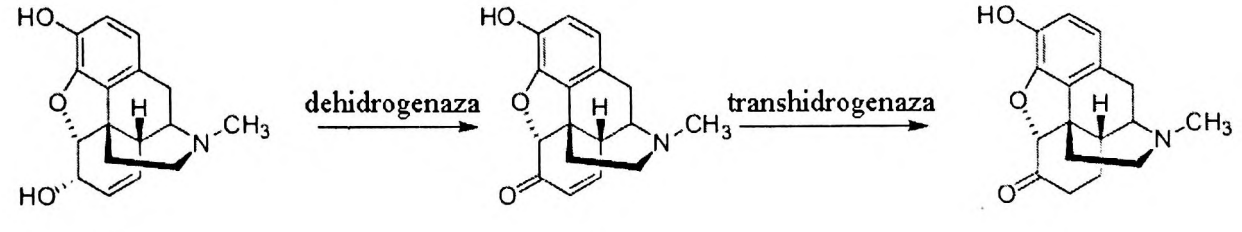
54 **55**

Fig. 5.17 BMS-199541-01 54 şi omapatrilat 55.

5.8.6 Hidromorfona

Sinteza drogului opiaceu semisintetic hidromorfona implică oxidarea microbiană a morfinei **56** la morfinona **57** de către o dehidrogenază, urmată de reducerea dublei legături printr-o transhidrogenază pentru a obţine hidromorfona **58**.

Transhidrogenaza nucleotidelor piridinice solubilă (STH) a *P. fluorescenes* a fost supraexprimată la *E. coli*, şi aplicată pentru regenerarea NADH şi NADPH în producţia hidromorfonei (fig. 5.18).



56 **57** **58**

Fig. 5.18 Biotransformarea stereo- şi regioselectivă a morfinei 56 la hidromorfona 58 via morfinona 57.

5.9. Concluzii

Recunoaşterea importanţei chiralităţii moleculelor de medicamente în ceea ce priveşte activitatea farmacologică şi dezvoltarea unor tehnici noi şi mai eficiente pentru ingineria genetică a condus la o nouă abordare a sintezei medicamentelor chirale. Cercetările intensive în câteva arii ale biologiei moleculare crează o mai bună înţelegere a metodelor naturale de biotransformare, pe lângă faptul că ajută la elucidarea cauzelor unor boli. Sintezele stereoselective cu ajutorul microorganismelor recombinante sau biocatalizatorilor izolaţi de la acestea au oferit un suport excelent pentru eforturile chimiştilor de a sintetiza molecule de medicamente chirale. In 2001, aproximativ 36% din vânzările mondiale de produse farmaceutice în valoare de 410 miliarde de dolari au fost efectuate pentru medicamente cu un singur enantiomer.

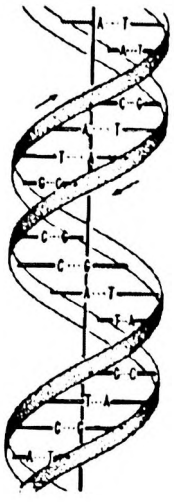
CAPITOLUL 6
MEDICAMENTE PE BAZĂ DE ACIZI NUCLEICI

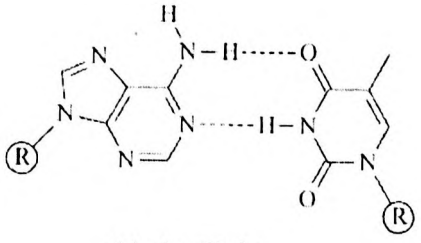
6.1. Introducere

Acizi nucleici conţin toate informaţiile despre viaţa fiecărei plante şi fiecarui animal. Acizi nucleici sunt parte a fiecărei celule sau fiinţe vii. Acidul dezoxiribonucleic (ADN) este format din două lanţuri dublu catenare de nucleotide. Nucleotidele sunt compuse dintr-o parte glucidică (riboza pentru acidul ribonucleic (ARN) şi 2-dezoxiriboza pentru a ADN), o grupare fosfat şi o bază azotată. În general, doar patru baze azotate diferite pot fi găsite în ADN şi ARN. Acestea sunt adenina, guanina, citozina şi timina în ADN, şi uracil în loc de timină în ARN. Lanţurile de nucleotide, numite oligonucleotide sunt dublu catenare în nucleu. Aceste lanţuri dublu catenare sunt menţinute împreună în principal, datorită legăturilor de hidrogen dintre bazele azotate. Perechile de baze sunt întotdeauna guanină-citozină şi adenină timină (uracil) (fig. 6.1) [Saenger şi colab., 1984].

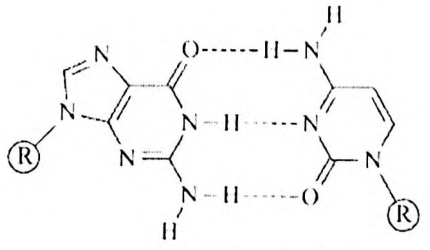
Informaţiile înmagazinate în ADN trebuie să fie traduse în proteine. Prin urmare ADN-ul, trebuie mai întâi să fie transcris în ARN mesager (ARNm), care părăseşte nucleul.

ARNm va fi tradus în proteine la nivelul ribozomilor. Toate aceste procese sunt posibile puncte de „atac" ale medicamentelor bazate pe acizi nucleici. Mai multe concepte sau mecanisme de acţiune ale medicamentelor pe bază de acizi nucleici sunt acum în curs de investigare. Cel mai important este conceptul antisens (vezi subcapitolul 6.4.1). Alte concepte în curs de investigare sunt conceptul triplului helix (triplex), conceptul ARN-ului de interferenţă (ARNi) şi conceptul ribozimelor ca medicamente.





Adenină-Timină



Guaninã-Citozinã

Fig.6.1. Baze perechi Watson-Crick

6.2. Sinteza chimică a oligonucleotidelor

Oligonucleotidele sunt molecule cu lanţ lung construite în orice ordine a secvenţei nucleotidelor. Sinteza chimică constă în condensarea individuală a nucleotidelor până când secvenţa şi lungimea cerută este atinsă. Nu este important pentru sinteză dacă nucleotidele sunt ADN, ARN sau blocuri modificate construite. Condiţiile de reacţie diferă numai în ceea ce priveşte timpii de reacţie şi alegerea agenţilor activatori. Sinteza oligonucleotidelor în fază solidă a fost dezvoltată de Letsinger în 1975.

Principalul avantaj al sintezei nucleotidelor în fază solidă este că purificarea este implicată doar după ultima etapă de sinteză, şi nu după fiecare reacţie. În plus, este posibil să se sintetizeze mai mult de un oligonucleotid, în acelaşi timp cu un oligonucleotid sintetizator. De-a lungul ultimilor 25 de ani au fost puse la punct mai multe metode de sinteză a oligonucleotidelor. Pentru fiecare metodă este necesară producerea unor blocuri de nucleotide cu grupuri diferite de protecţie. Aceste metode sunt: metoda fosfordiester, metoda fosfortriester, metoda fosfonat H şi metoda fosforamidată. În zilele noastre, numai metoda pe bază de fosforamidaţi joacă un rol important în sinteza în fază solidă a oligonucleotidelor. Figura 6.2 prezintă ciclul de sinteză al metodei fosforamidaţilor.

Primul nucleotid fixat pe suport solid, este deprotejat/descoperit în poziţia 5', cu ajutorul acidului tricloroacetic (TCA). Apoi, următorul bloc construit este adăugat, activat cu un activator şi cuplat la primul nucleotid. Tetrazolul sau un derivat al său este folosit ca un activator în cele mai multe cazuri. Grupările hidroxil nereactive sunt acoperite cu anhidridă acetică, pentru a opri construirea lanţului de la această poziţie, şi acoperirea evită sinteza de secvenţe nedorite. Dimerul cuplat este oxidat de un amestec de iod şi apă.

Sinteza poate fi oprită după acest pas sau nucleotidul final din lanţ poate fi „descoperit" pentru a începe un nou ciclu de cuplare.

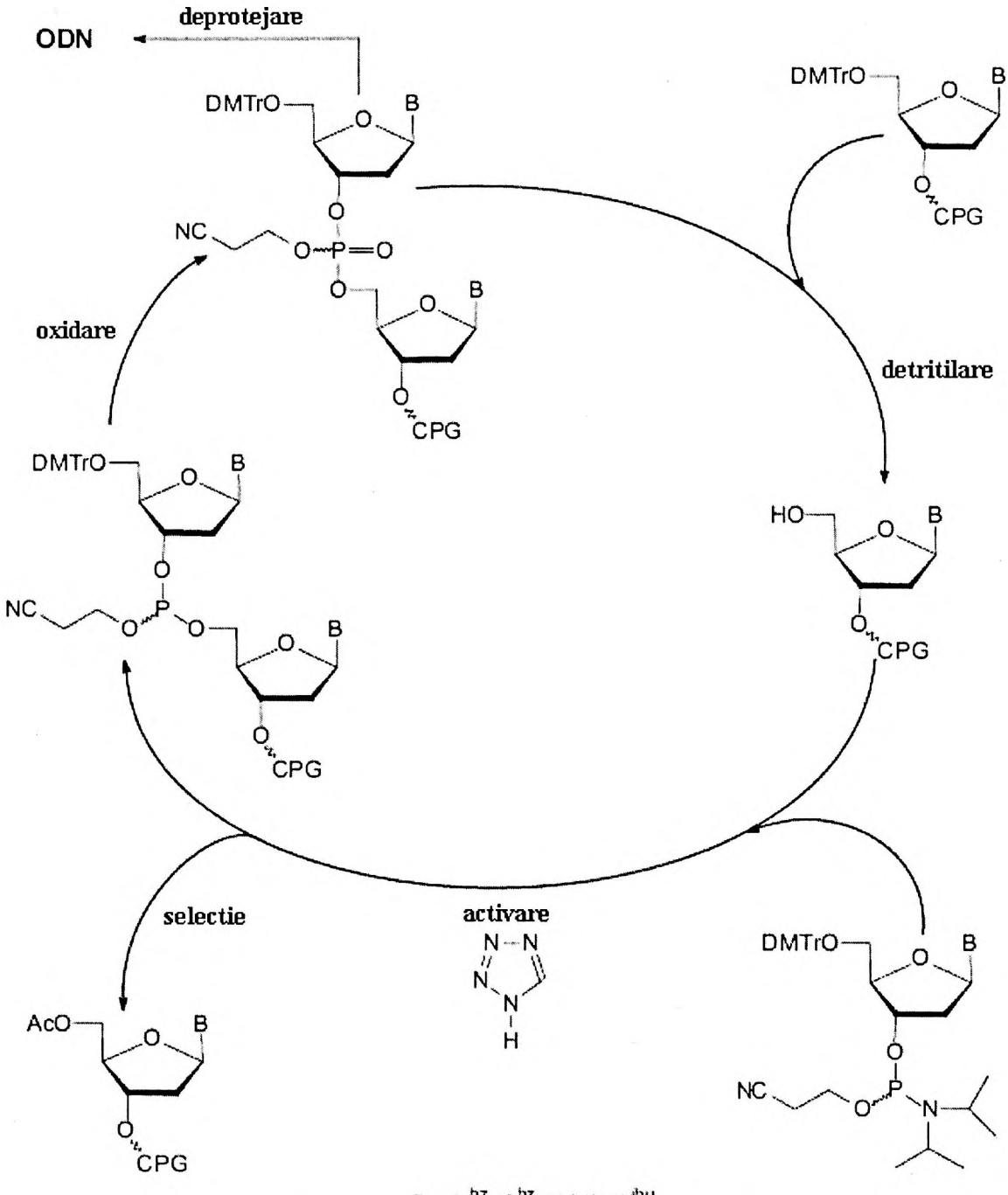


Figura 6.2. Sinteza în fază solidă a oligonucleotidelor acoperire

Toate grupurile de protecţie, sunt clivate după sfârşitul sintezei oligonucleotidului dorit. Purificarea poate fi realizată prin cromatografie lichidă de înaltă performanţă (HPLC) sau prin electroforeză în gel. O altă posibilitate de a obţine oligonucleotide este sinteza enzimatică, în special pentru oligo-

nucleotidele lungi. Sinteza enzimatică utilizând unităţi construite modificat sunt o alternativă viabilă la sinteza chimică. Încorporarea enzimatică a nucleotidelor trifosfat naturale sau modificate adecvat de ARN polimerazele bacteriofagilor (de exemplu T7) a fost folosită cu succes, deşi această abordare este limitată de acceptarea polimerazei pentru zaharuri, scheletul de susţinere al moleculei sau modificări ale bazei.

6.3. Modificări chimice ale oligonucleotidelor

În aceast subcapitol vom evidenţia structura chimică şi proprietăţile oligonucleotidelor derivate. Diversitatea chimică a structurii oligonucleotidelor naturale este necesară pentru a face aceste substanţe utile în sistemele biologice.

Condiţiile necesare pentru ca medicamentele pe bază de acizi nucleici să fie bune sunt următoarele:

- trebuie să fie suficient de stabile împotriva nucleazelor din ser şi din celule;
- ar trebui „să intre" în diferite organe din corp, iar după distribuirea în ţesutul dorit, acestea trebuie să fie capabile să penetreze membrana celulară pentru a ajunge la nivelul situsului lor de acţiune;
- trebuie să formeze complexe Watson-Crick sau Hoogsteen stabile cu secvenţe ţintă complementare sau complexe în condiţii fiziologice.

În figura 6.3 sunt prezentate posibilităţile de modificare pentru oligonucleotide. S-au efectuat modificări la nivelul scheletului moleculei, prin modificări ale zaharurilor sau substituţia la nivelul părţii fosfat, precum şi încorporarea bazelor azotate care sunt substituite sau complet schimbate.

De asemenea, ar trebui să fie menţionate: încorporarea conjugaţilor la capătul 3' sau 5', precum şi acizii nucleici ce modifică complet scheletul macromoleculei ca acizii nucleici peptidici (ANPs) sau acizi nucleici inaccesibili (ANLs). În ultimii ani toţi aceşti acizi nucleici modificaţi au fost sintetizaţi şi testaţi.

Oligonucleotidele nemodificate sunt larg utilizate ca instrumente în biologia moleculară. Cu toate acestea, în experimentele celulare şi animale s-a observat că oligonucleotidele cu un fosfodiester natural internucleozid legat sunt degradate în ser în decurs de câteva ore, în principal, prin acţiunea rapidă a 3' exonucleazelor de clivare care sunt însoţite de endonucleaze de clivare lente. De asemenea, în anumite ţesuturi a fost observată o activitate semnificativă 5'-exonucleazică. Oligonucleotidele modificate chimic vor fi descrise în următoarele secţiuni.

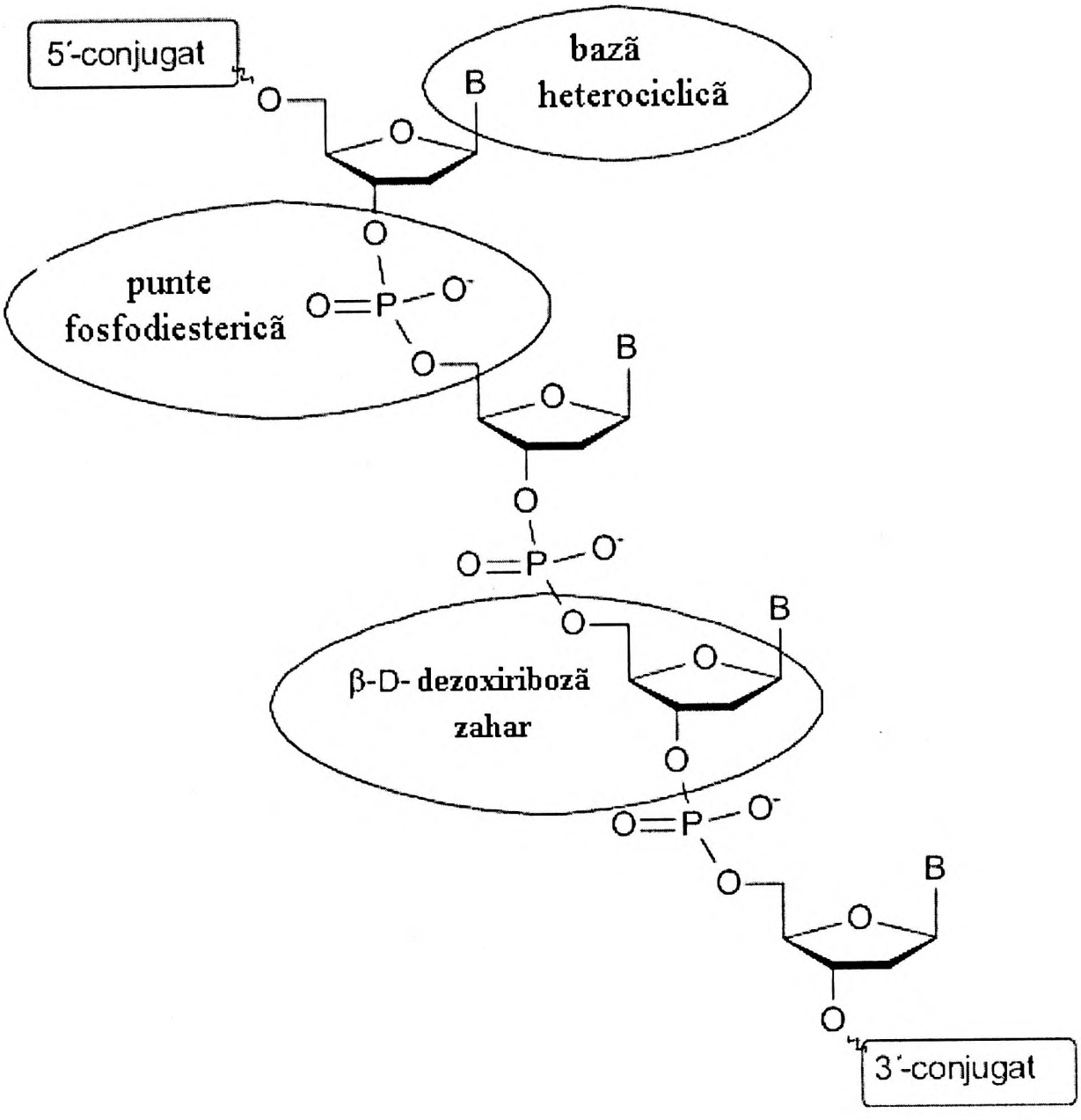


Figura 6.3. Modificarea oligonucleotidelor

6.3.1. Modificări 2'

Oligonucleotidele 2'-O-modificate (fig. 6.4) pot fi considerate ca analogi ai oligoribonucleotidelor. 2'-O-metil-eterul poate fi găsit în stare naturală, de exemplu în ARN în anumite poziţii în ARNt, ARNr şi ARNsn (ARN de talie mică). Stabilitatea heteroduplexurilor (ARN)·(2'-O-alchil - ARN) [Freier, Altmann şi colab., 1997] depinde clar de natura grupării 2'-O-alchil şi creşte în ordinea 2'-O-dimetilalil <2'-Obutil <2'-OH <2'-O-alil <2'-O-metil <20-metoxietoxi. Anterior anului 1987, s-a raportat că 2'-O-metil ARN formează un duplex mai stabil, cu o catenă complementară de ARN decât cu

ADN nemodificat sau chiar ARN [H Inoue şi colab., 1987]. 2'-O-alkilribonucleotidele preferă endo conformaţia C (3') într-un duplex cu ARN. Acest glucid pliat a fost considerat un element structural cheie în duplexurile ARN-ARN, care sunt, în general, mai stabile decât duplexurile ADN-ADN ale aceleaşi secvenţe.

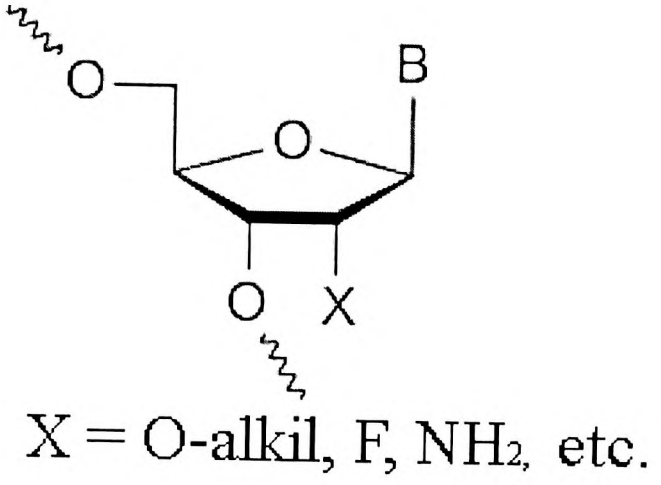


Figura 6.4. Modificări 2' ale oligonucleotidelor

Merită de menţionat că modificarea 2'-O-metoxietoxi nu are ca rezultat numai intensificarea afinităţii de legare la ARN, dar în acelaşi timp face ca oligomerul să fie mai stabil faţă de degradarea nucleazică. Activitatea RNazei H nu este susţinută de modificările 2' -O, astfel încât acestea ar trebui localizate pe flancurile oligonucleotidelor antisens în principal constând din ferestre fosforotioat cu anumite modificări care reduc efectul negativ al fosforotioaţilor (vezi subcapitolul 6.3.3).

În multe cazuri, în special în aplicaţii pe modelele animale, chiar flancurile conţin fosforotioaţi pentru a îmbunătăţi stabilitatea lor. Aparent efectele secundare citotoxice ale fosforotioaţilor nu sunt chiar atât de grave în situaţia cu o modificare a 2'-O-alchil. În plus, pentru modificări 2'-O-alchil, sunt cunoscute nucleotide 2'- substituite cum ar fi 2'-fluoro-amino sau 2'.amino. Oligonucleotidele 2'-deoxi-2'- fluoro modificate uniform prezintă o afinitate considerabil crescută de legare pentru ARN, comparativ cu nucleotidele ADN, fără a compromite specificitatea bazelor perechi, având în vedere că modificarea 2'-amino destabilizează duplexul cu ARN [Kawasaki şi colab., 1993; Aurup şi colab., 1994]. Cu toate acestea sunt necesare modificări suplimentare, cum ar fi punţile de fosforotioat, pentru a produce derivaţi oligonucleotidici suficienţi de stabili la nucleaze. Introducerea constantă a zaharurilor 2'-deoxi-2'-fluoro duce la pierderea activării RNazei H.

6.3.2. Alchil-și arilfosfonații

În ultimii ani au fost investigaţi mai mulţi alchil-şi arilfosfonaţi diferiţi (fig. 6.5). Principalii reprezentanţi ai acestor grupuri sunt metil- şi

fenilfosfonaţii. În afară de fosforotionaţi, metilfosfonaţii sunt probabil, cea de a doua clasă investigată de derivaţi oligonucleotidici cu modificare a fosforului şi ei au fost utilizaţi precoce pentru inhibarea antisens specifică a expresiei genelor [Miller şi colab., 1985]. În metilfosfonaţi oxigen fosfatul încărcat negativ este înlocuit de o grupare metil neutră. Legăturile metilfosfonaţilor sunt foarte stabile la degradarea nucleazelor. Cu toate acestea, o mare problemă este reprezentată de chiralitatea punţilor metilfosfonaţilor, care au fie o configuraţie Rp, fie Sp.

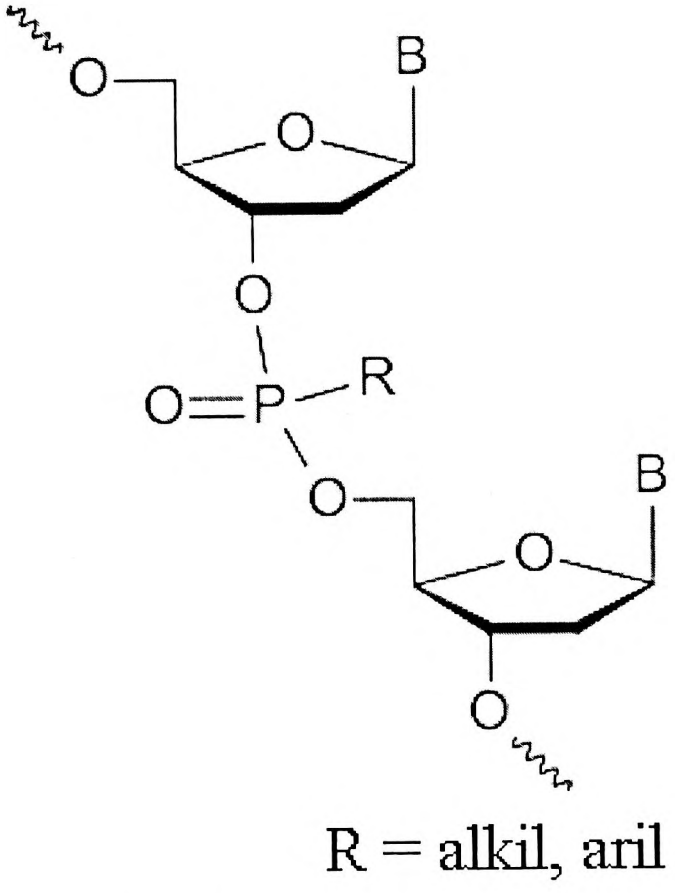


Figura 6.5. Oligonucleotide aril şi alkilfosfonate

Prin urmare, ca şi în cazul fosforotionaţilor, oligonucleotidele metilfosfonate rezultă de obicei prin sinteza standard, ce constă dintr-un amestec de 2n diastereomeri, unde n este numărul de astfel de legături. S-a arătat că oligonucleotidele scurte cu un schelet metilfosfonat prezintă toate un punct de topire (Tm) mult mai mare decât un amestec de diastereomeri sau chiar corespunzător oligonucleotidelor fosfodiester atunci când hibridizează cu acizi nucleici complementari.

Oligonucleotidele metilfosfonate modificate uniform nu formează duplexuri cu ARN care induce clivajul RNazei H. Acest lucru poate să limiteze utilizarea lor ca oligonucleotide antisens şi ar putea explica nivelul relativ ridicat de concentraţie necesar pentru oprirea efectivă a translaţiei în experimente antisens. Oligonucleotidele himerice care conţin metilfosfonaţi şi o

porţiune de cel puţin cinci până la şapte legături fosfodiester menţin activitatea RNazei H, şi astfel solubilitatea săracă a compuşilor modificaţi uniform în sisteme biologice poate fi depăşită.

Alkilfosfonaţii sunt disponibili prin sinteza automată de oligonucleotide utilizând metilfosfonamidaţi cum ar fi sintonii. Având în vedere că punţile alkilfosfonate sunt mai labile decât legăturile naturale fosfodiester, sunt necesare condiţii mult mai uşoare pentru clivajul de pe suportul solid şi pentru „descoperire". În mod similar, fenilfosfonaţii şi fenilfosfonotioaţii care conţin oligonucleotide pot fi preparaţi din nucleozid-3'-fenilfosfonamidaţi corespunzători [Dingermann şi colab., 2004]. Afinitatea de legare a arilfosfonaţilor care conţin oligomeri depinde puternic de secvenţă, astfel încât unele duplexuri sunt destabilizate de la - 0,3 la – 1,3 K, în timp ce altele sunt stabilizate de la +0,2 la +0,5 K , relativ cu congenerii lor naturali. De asemenea a fost descrisă sinteza pentadecamerilor oligodeoxinucleotidici care conţin doi octilfosfonaţi legaţi cu o chiralitate stereoregulară sau stereorandomizată [Mag şi colab., 1996]. Diferenţa în Tm a fost de - 3,4 K per modificarea stereorandomizată şi de aproximativ - 2,3 până la - 4,0 K per modificare a oligonucleotidelor configurate stereoregular.

6.3.3. Fosforotioaţii

Nucleazele degradează oligonucleotidele printr-un atac nucleofilic la nivelul legăturii fosfodiester. Înlocuirea oxigen fosfatului nelegat de alţi atomi este o modalitate uşoară de a face rezistente oligonucleotidele împotriva nucleazelor. Modificarea fosforotioaţilor (fig. 6.6) asigură o stabilizare semnificativă împotriva degradării de către nucleaze. Punţile fosforotioat reprezintă de asemenea un centru de chiralitate. Trebuie menţionat, totuşi, că, rezistenţa la nucleaze depinde puternic de configuraţia fosforului. Diastereomerii Sp sunt substraturi pentru nucleazele S1 sau P1, în timp ce diasteromerii Rp sunt clivaţi de fosfodiesteraza din veninul de şarpe. Absorţia celulară a oligonucleotidelor fosforotioaţi este similară oligonucleotidelor fosfodiester. O proprietate importantă a fosforotioaţiilor este capacitatea lor de a media degradarea prin RNaza H a ARN-ului după hibridizare.

Această modificare sporeşte stabilitatea oligonucleotidelor împotriva degradarii enzimatice şi, în acelaşi timp, este compatibilă cu activarea RNazei H. În ciuda tuturor acestor caracteristici promise, fosforotioaţii prezintă unele dezavantaje.

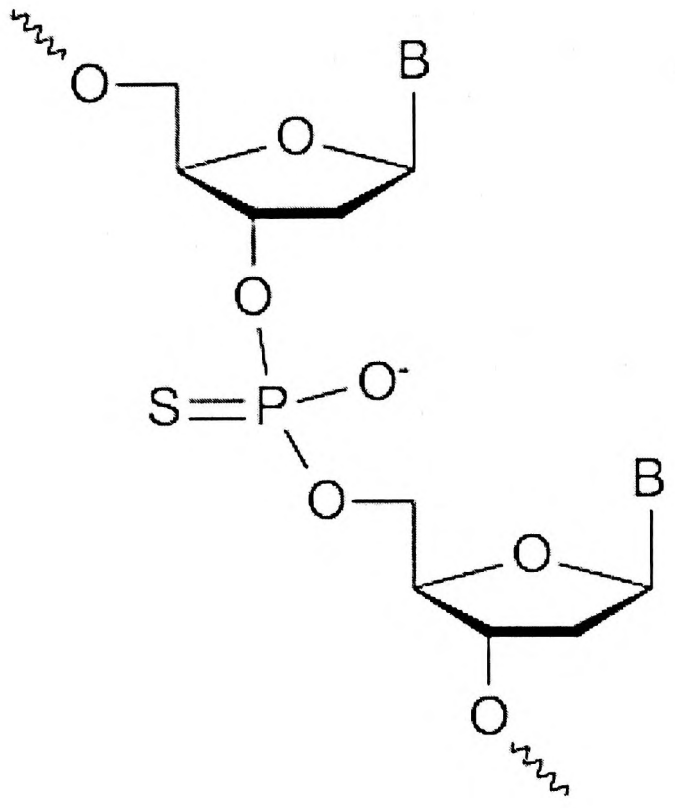


Figura 6.6. Oligonucleotide fosforotioaţi

Stabilitatea termică a complexului format cu ARN-ul ţintă nu este la fel de stabilă ca cea formată cu oligonucleotide nemodificate. Proprietatea de hibridizare a fosforotioaţilor diasteroizomerici este suficient de puternică pentru ai putea utiliza în condiţii *in vivo*, cu toate că există o pierdere medie de – 0,5 K per legătura de fosforotioat în T*m* pentru amestecul racemic. Mai mult decât atât, pentru motive care nu sunt bine înţelese, oligonucleotidele fosforotioat pot avea o afinitate mult mai mare pentru anumite proteine, cum ar fi cele responsabile de legarea polianionilor. Acest lucru poate duce la efecte secundare nedorite adesea asociate cu citotoxicitate.

De asemenea un fosforotioat, reprezintă o moleculă care poartă un alt centru de chiralitate în comparaţie cu nucleotidele nemodificate. Fosforotioaţii Sp şi Rp au arătat diferite proprietăţi fiziochimice. Heterodimeri formaţi între oligoribonucleotide şi toţi fosforotioaţii Rp au arătat o *Tm*, comparabilă cu heterodimerii mai puţin stabili formaţi cu toţi fosforotioaţii Sp sau amestecul randomizat, aleatoriu al diasteromerilor [Koziolkiewicz şi colab., 1995]. Complexul ADN-ARN conţinând fosforotioaţii configuraţiei tuturor Rp este mai sensibil la degradarea dependentă de RNaza H în comparaţie cu hibrizi care au fie toţi Sp omologi sau un amestec aleatoriu de diastereomeri. Interesant, 3'exonucleaza prezentă în plasma umană pare a degrada fosforotioaţii ai configuraţiei Rp, dar nu şi pe cei ai configuraţiei Sp [Dingermann şi colab.,2004].

6.3.4. N3'-P5' fosforamidați

Oligonucleotidele N3'-P5' fosforamidate (fig. 6.7) arată o rezistență remarcabilă la nucleaze și hibridizare puternică, dar nu activează RNaza H. Probabil că se vor face numeroase studii despre inhibarea expresiei genei .

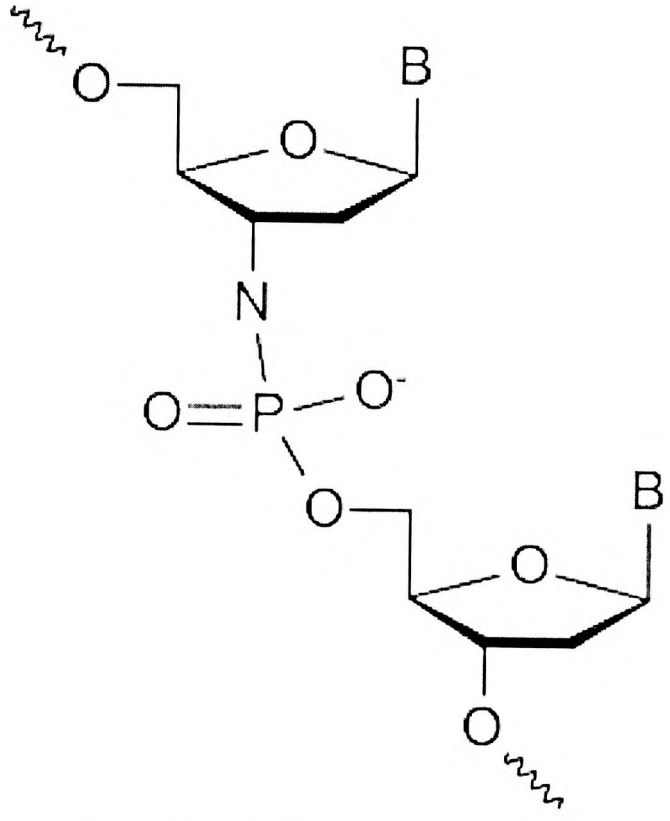


Figura 6.7. Oligonucleotide 3'fosforamidate

6.3.5. Morfolino-oligonucleotidele

Morfolino-oligonucleotidele sunt foarte stabile la nucleaze și nu sunt sensibile la RNaza H. Ele au fost studiate în special în cercetările privind dezvoltarea embrionară a peștelui zebră și a lui Xenopus, unde ambele sisteme de compuși pot fi administrate (injectate) la embrion.

6.3.6 Acizii nucleici peptidici (ANPs,peptid nucleic acid)

Într-un ANP scheletul zaharofosfat este înlocuit de o structură poliamidă bazată pe N aminoetilglicină (fig. 6.8). Un avantaj al ANPs este că ei se leagă cu o afinitate mai mare la acizii nucleici complementari decât omologii lor naturali după regulile perechilor de baze Watson Crick [Egholm și colab., 1993]. Capătul N-terminal al unui ANP corespunde cu capătul 5' și capătul C-terminal cu capătul 3' al ADN. În cazul duplexurilor ADN-ANP antiparalel sau respectiv ANP-ARN, Tm este crescută cu aproximativ 1 sau 1,5 K / de bază, respectiv, în comparație cu duplexul ADNADN sau ADN-ARN. Un alt avantaj al ANP este că împerecherea greșită a bazelor dă naștere adesea la o reducere semnificativ mai mare a Tm în comparație cu ADN. ANP este extrem de stabil

la nucleaze şi peptidaze. Cu toate acestea, ANPs nu poate stimula clivajul RNazei H. În consecinţă, s-a constatat că ANPs sunt mai puţin eficienţi ca agenţi antisens decât fosfodiesterii şi oligonucleotidele fosforotioat [van der Laan şi colab., 1998].

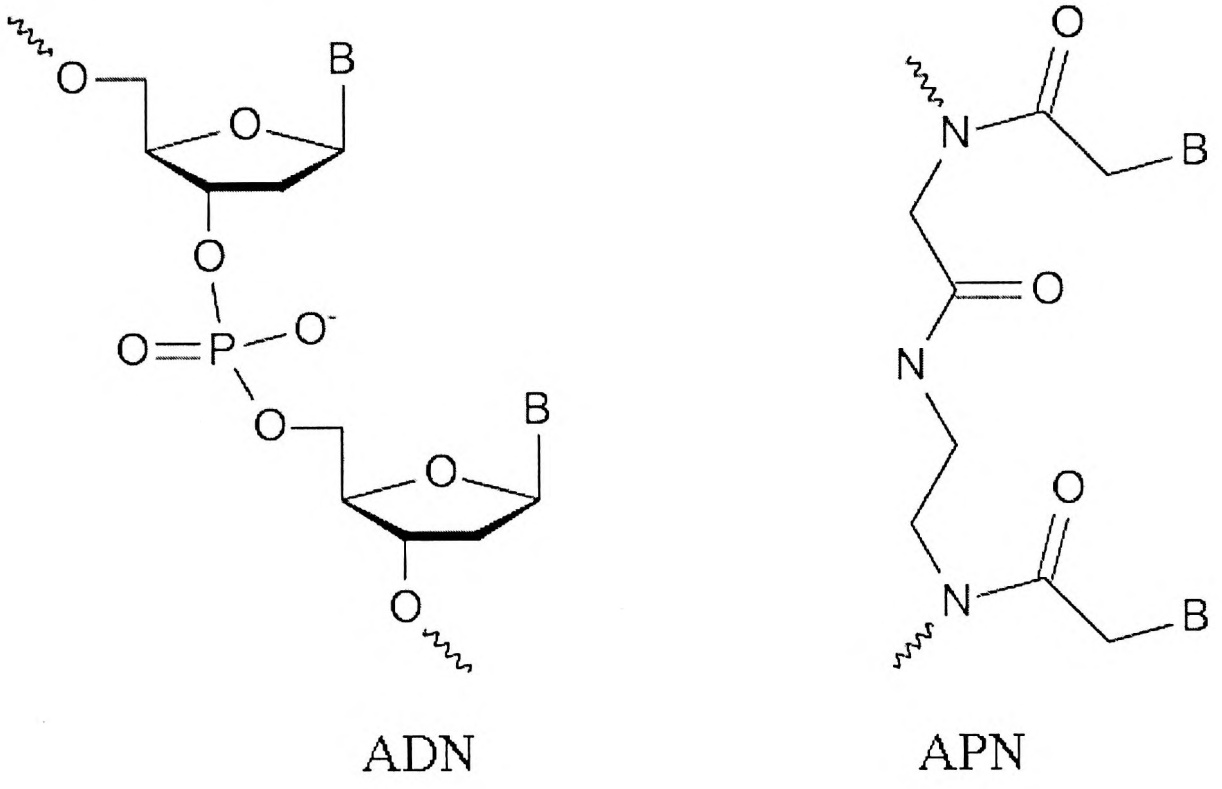


Figura 6.8. Oligonucleotide ADN şi ANP

În contrast, himerele ADN/ANP[19], cu mai mult de patru nucleotide sunt capabile de a stimula clivajul ARN de RNaza H prin formarea unui duplex himeră- ARN. Clivajul ARN se produce la ribonucleotidele cu baze perechi cu partea ADN a himerei. De asemenea, himerele ANP/ADN se supun regulilor Watson-Crick privind legarea de ADN şi ARN complementar [van der Laan şi colab., 1997], aşa cum Tm depinde puternic de raportul ANP/ADN din himeră.

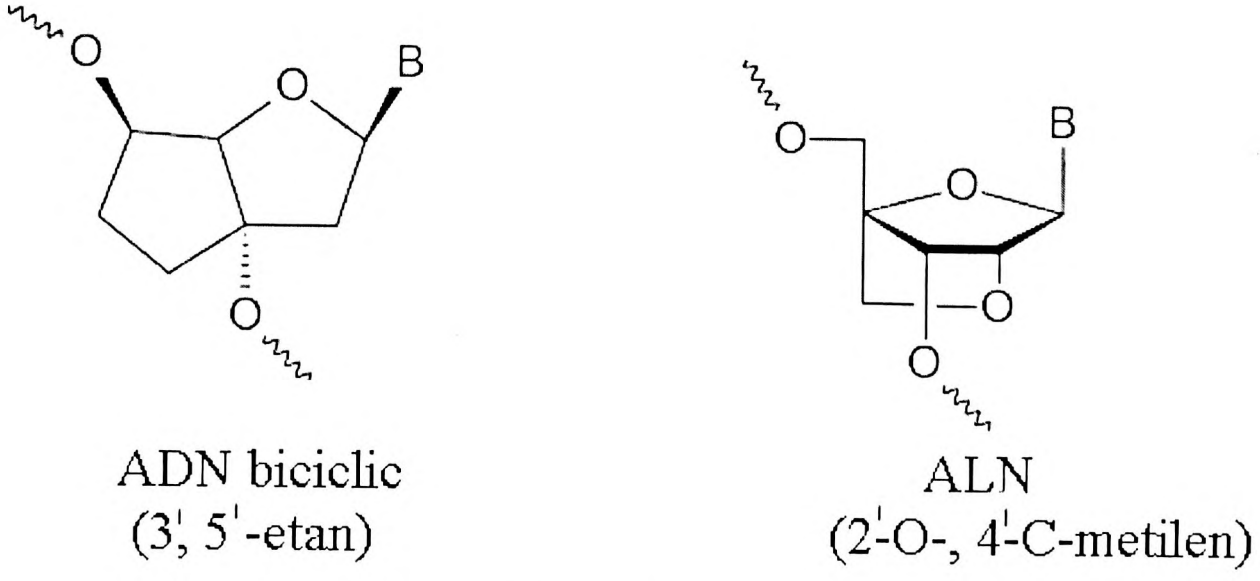
Tm al himerelor 5'-ADN/3'-ANP, în care părţile de ANP şi ADN au lungime egală, se situează aproximativ între cele observate pentru ANP şi ADN pur corespunzător. În contrast cu ANP-ul pur, în condiţii fiziologice himerele 5'- ADN/ANP se leagă exclusiv cu orientare antiparalelă la ADN şi ARN. De asemenea, himerele arăta o asimilare celulară mult mai bună decât ANP pur.

6.3.7. Acizii nucleici inacesibili (LNAs, locked nucleic acid) sterici

S-a constatat că ANLs, analogi ai acizilor nucleici cu schelet de susţinere reprezentat de fosfoglucide limitate conformaţional, pe bază de (3'S,5'R)-2-deoxi- 3'5'-etano-βD-ribofuranozil-adenina şi timină (ADN biciclic) formează duplexuri mai stabile decât congenerii naturali corespunzători (fig. 6.9) [Tarkov şi colab., 1993]. ADN-ul biciclic (A10) formează triplexuri mai

stabile cu d (T10) din elementul motiv pirimidină-purină-pirimidină decât naturalul d (A10).

A fost descris un nou ADN analog, "ADN- [3.2.1]- biciclic", [Epple şi colab., 1998], ce are un schelet fosfodiester rigid, imitând conformaţia ADN-ului de tip B , la care sunt ataşate baze azotate pe calea unui lanţ deschis de legare flexibil. Deşi ADN-ul [3.2.1] biciclic formează duplexuri mai puţin stabile cu ADN complementar decât cu ADN natural, discriminarea bazelor împerecheate greşit este uşor îmbunătăţită, comparativ cu duplexurile de ADN pure. Important, oligomerii de and [3.2.1] biciclic sunt rezistenţi la degradarea 3' exonucleazei. O nouă modificare cu afinitate de legare neobişnuit de mare afinitate este ANL, în care 2'oxigenul este legat printr-o punte metilen la carbonul 4' formând un nucleozid ribofuranozil biciclic metilen-legat.



ADN biciclic
(3', 5'-etan)

ALN
(2'-O-, 4'-C-metilen)

Figura 6.9. Oligonucleotide blocate steric

Conformaţia glucidică a acestui derivat este blocată la conformaţia tip N (3'-endo) [Koshkin şi colab., 1998]. O creştere fără precedent de +3 până la +8 K pe modificare în stabilitate termică a duplexurilor cu privire atât la ADN cât şi la ARN a fost raportată când s-a realizat evaluarea secvenţelor amestecate ale ANL codificate parţial sau total.

6.3.8. Oligonucleotide conjugate

De asemenea ataşamentul covalent al moleculelor nonnucleozidice fie la capătul 3' sau 5' al oligonucleotidelor poate modula proprietăţile oligonucleotidelor antisens. Acest tip de derivaţie este chimic simplu şi permite modularea stabilităţii nucleazei, asimilarea celulară şi distribuţia în organe a oligonucleotidelor.

6.3.8.1. Conjugații 5'terminal

Conjugarea moleculelor la capătul 5' al oligonucleotidelor se poate face simplu prin cuplarea fosforamiditei sau a unui derivat fosfonat H al moleculei dorite la gruparea 5'-hidroxi a oligomerului, ce rezultă după elongarea lanţului prin sinteză în fază solidă. O gamă largă de liganzi derivaţi din fosforamidite, cum ar fi fluoresceina, biotina, colesterolul, dinitrofenolul, acridina şi derivaţii de psoralen sunt disponibili comercial. Alternativ, gruparea terminală 5'- hidroxi a oligonucleotidelor reacţionează cu o fosforamidită aminoalkil legată, care după „descoperire" are ca rezultat un aminoalkil nefuncţionabil. Funcţia amino a oligonucleotidelor poate fi apoi reactivată post-sinteză în soluţie cu derivaţi ai moleculelor activate corespunzător, cum ar fi esteri, izotiocianaţi sau iodoacetamide.

6.3.8.2. Conjugaţii 3' terminal

Conjugarea moleculelor la capătul 3' al oligonucleotidelor este convenabilă şi poate fi obţinută prin utilizarea suporturilor solide funcţionale în mod corespunzător, care în plus poartă o funcţie hidroxil de la care lanţul de oligonucleotide se prelungeşte în timpul sintezei în fază solidă.

După ce sinteza oligonucleotidelor este completă, oligonucleotidul conjugat este clivat de pe suportul solid şi este „descoperit" prin tratament cu amoniac. Folosind această metodă, derivaţii relativ exotici, cum ar fi jumătatea anionoforică a pamamicinei [Uhlmann, 1998], pot fi uşor de introdus. În mod similar conjugării 5' terminale, suporturi solide adecvate 3'-amino-modificatoare sunt disponibile comercial şi permit cuplarea derivaţilor moleculei activaţi corespunzător să fie conjugaţi cu gruparea alkil 3'amino în etapa de dizolvare, postsintetică. Conjugarea la capătul 3' al oligonucleotidelor are de obicei ca rezulat o stabilizare puternică împotriva exonucleazelor 3', care sunt nucleaze predominante în serul uman.

6.4. Mecanismul de acțiune

Încă de la descoperirea structurii ADN-ului de către Watson şi Crick în 1953, mai multe idei diferite despre mecanismele de acţiune ale medicamentelor pe bază de acizi nucleici au fost dezvoltate. Cele mai promiţătoare sunt prezentate în figura 6.10. Ele sunt concepte antisens, anti-gene (triplu helix) şi conceptul ARNi, precum şi conceptul utilizării acizilor ribonucleici ca ribozime.

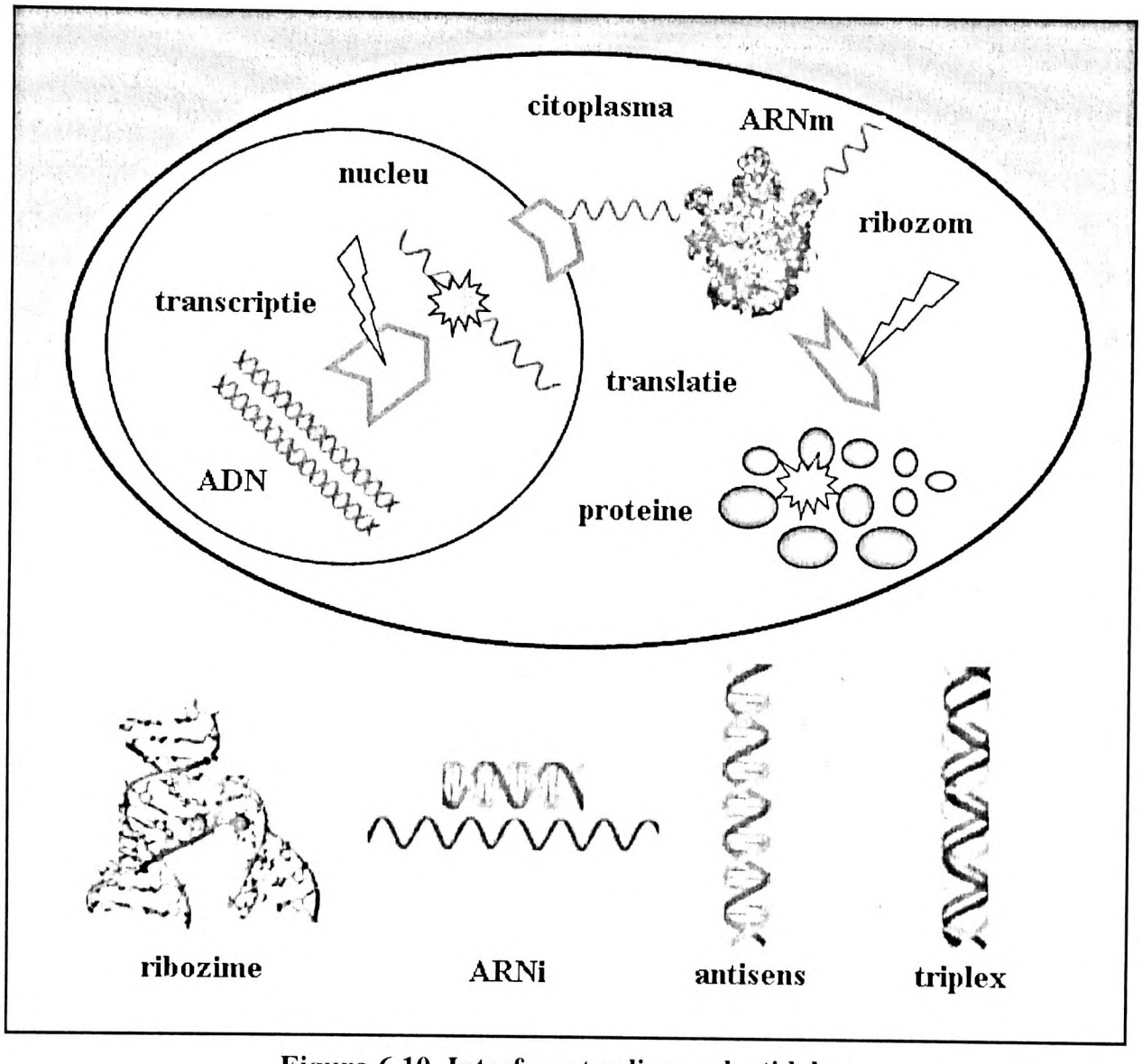


Figura 6.10. Interferenţa oligonucleotidelor

Mecanismul de acţiune al acestor concepte este discutat în această secţiune. Până în prezent numai medicamentele pe bază de acizi nucleici ce urmează conceptul antisens şi ribozime sunt pe piaţă sau în faze clinice de testare (a se vedea subcapitolul 6.7).

6.4.1. Conceptul antisens

Conceptul antisens urmăreşte cea mai importantă modalitate de acţiune pentru a modula transferul informaţiei genetice în proteine. Unele mecanisme de acţiune prin care un oligonucleotid poate induce un efect biologic sunt complexe. Oligonucleotidele antisens pot fi clasificate în două mari clase, pe baza mecanismului lor de acţiune: oligonucleotidele RNaz H-dependente, care induc degradarea ARNm de către RNaza H şi oligonucleotide de blocaj steric, care previn fizic sau inhibă splicing-ul sau aparatul translaţional. Cele mai multe dintre oligonucleotidele antisens merg pe calea mecanismului RNaz H-dependent.

6.4.1.1. Blocarea sterică

Informaţia genetică a vieţii este stocată în ADN-ul dublu helix şi ADN-ul trebuie să fie tradus în proteine, pentru a obţine această informaţie, adică ADN-ul va fi transcris în ARNm, care va fi tradus în proteine. Oligonucleotidele antisens interacţionează cu aceste catene ARNm pentru a bloca translaţia ARNm în proteine la nivelul ribozomilor. Prin urmare, oligonucleotidele antisens formează în mod special legături de hidrogen cu bazele azotate pe bază de complementaritate după modelul Watson-Crick. Legarea este specific de secvenţă, astfel încât o împerechere greşită reduce semnificativ stabilitatea duplexurilor formate. În cele mai multe cazuri, în condiţii fiziologice, un duplex, cu una sau mai multe împerecheri greşite va fi rapid clivat. De aceea, este necesar să se cunoască exact secvenţa ARNm care ar trebui să fie blocată. Acum multe secvenţe sunt cunoscute, iar odată cu secvenţierea întregului genom uman au devenit disponibile mai multe informaţii cu privire la efectele produse de ARNm corespunzător. Această cunoaştere face posibilă sinteza oligonucleotidelor antisens specifice.

Un oligonucleotid antisens se poate lega la ARNm corespunzător prin legături de hidrogen Watson-Crick, şi oligonucleotidele antisens şi ARNm formează un nou duplex. Translaţia ARNm la proteine este blocată prin legarea la ARNm şi formarea unui dublu helix care împiedică enzimele translaţionale să traducă helixul dublucatenar. Din cauza stabilităţii temporare a acestor helixuri duble, au loc modificări ale nucleotidelor pentru a obţine helixuri mai stabile în condiţii fiziologice pentru îmbunătăţirea blocării sterice. Obiectivul acestor studii va fi de a forma un dublu helix, care va avea o durată de viaţă mai lungă decât cea a ARNm corespunzător cu scopul singular de a optimiza mecanismul de acţiune.

6.4.1.2. Activarea RN-azei H

Cel de-al doilea şi cel mai important mecanism de acţiune al oligonucleotidelor antisens după blocarea sterică este activarea RNazei H [Walder şi colab., 1988]. RNaza H degradează în mod normal primeri ARN în timpul replicări ADN-ului sau excizează selectiv nucleotidele ARN încorporate

greşit în catenele de ADN. În heteroduplexurile ADN-ARN, RNaza H hidrolizează selectiv catena ARN. ARNm clivat va fi imediat degradat de exonucleaze în timp ce ARNm intact este protejat de structuri specifice 5' şi 3' împotriva degradării de exo-şi endonucleaze. De asemenea, mecanismul RNazei H explică de ce ARN-ul antisens nu prezintă nici un efect de inhibare a translaţiei. Activitatea de clivare ARN a RNazei H nu va fi indusă de către duplexurile ARN – ARN [Uhlmann, 1990].

Oligonucleotidele antisens modificate chimic trebuie, de asemenea, să activeze RNaza H. În timp ce fosforotioaţii activează RNaza H, alţii ca metilfosfonaţii sau nucleotidele ANP şi ANL nu activează această enzimă. Activarea RNazei H în fosforotioaţi depinde de stereochimia atomului de fosfor. Parţial, pentru oligonucleotidele antisens acest dezavantaj al activării nespecifice a fosfodiesterilor sau a oligonucleotidelor fosforotioaţi este schimbat în avantaj. Încorporarea a cinci sau şase nucleotide modificate într-o catenă nemodificată este de ajuns pentru a activa RNaza H. Cu toate acestea, având în vedere labilitatea oligonucleotidelor nemodificate împotriva nucleazelor şi efectele antisens reduse (observate pentru cei mai mulţi derivaţi care nu activează RNaza H), dezvoltarea oligonucleotidelor cu schelet mixt sau oligomeri himerici, în care avantajele elementelor structurale individuale sunt combinate, pare a fi modul de abordare ales în prezent.

6.4.2. Conceptul de triplu helix

Primele publicaţii despre triplu helix au apărut la numai 4 ani după descoperirea de către Watson şi Crick a structurii în dublu helix a ADN-ului . Triplu helixurile/ helixurile triple constau dintr-o singură catenă polipurinică şi două catene polipirimidinice. În timp ce triplu helixurile TxA·T apar rar în celule, triplu helixurile CxG·C nu sunt stabile în condiţii fiziologice (fig. 6.11). Citozina în a treia catenă trebuie să fie protonată pentru a forma un triplu helix stabil. Pentru a protona citozina a fost necesar un pH de 6.0. Legarea celei de a treia catenă la helixul dublu Watson-Crick este rezultatul legăturilor de hidrogen Hoogsteen sau Hoogsteen inverse (fig. 6.11 şi 6.12).

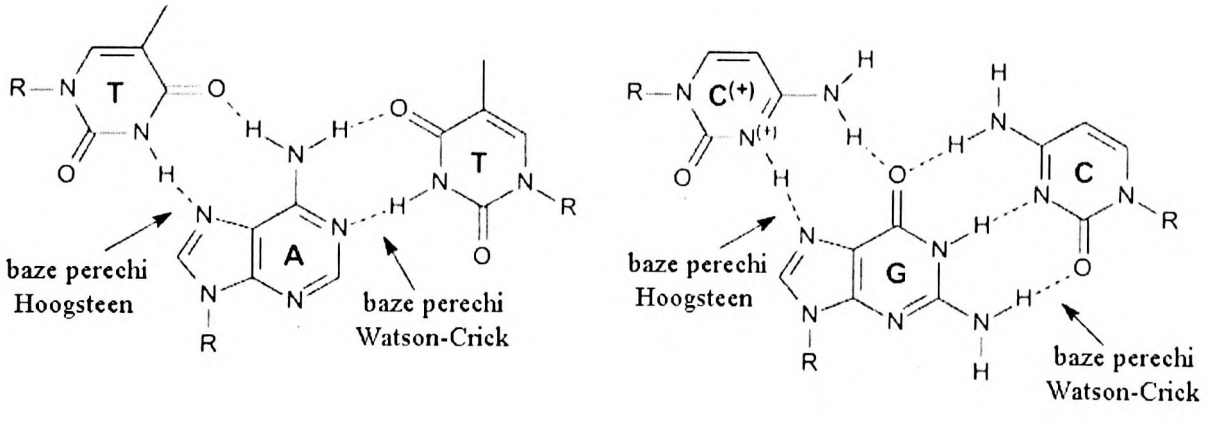


Figura 6.11. Baze perechi Watson-Crick şi Hoogsteen

Oligonucleotide scurte pot lega baze-specific, formând legături de hydrogen Hoogsteen sau Hoogsteen inverse la nivelul incizurii mari a dublui helix al and într-un mod specific de secvenţă. Triadele TxA·T şi CxG·C s-au format într-un mod paralel şi triadele GxG·C, AxA·T şi TxA·T s-au format într-un mod antiparalel (X=Hoogsteen şi · = legături de hidrogen Watson Crick) (fig. 6.12).

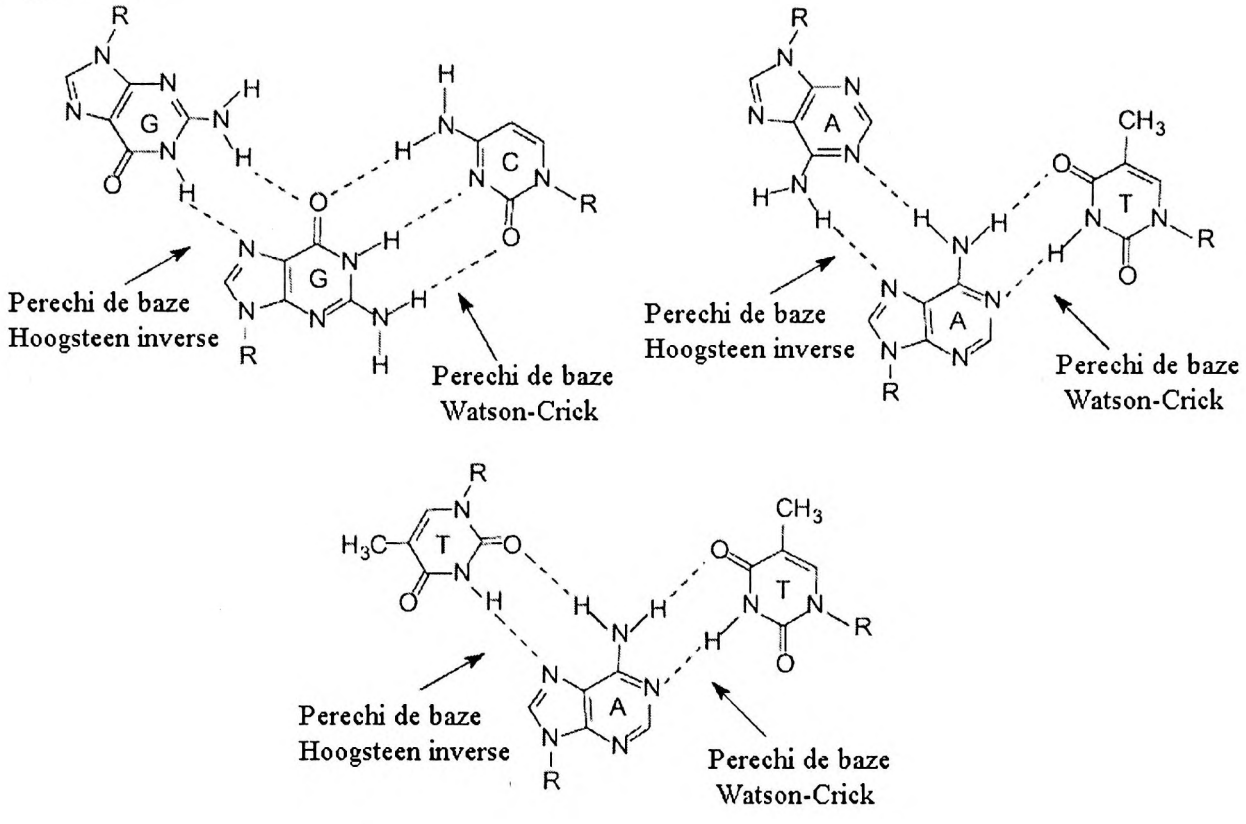


Figura 6.12. Motive triplu helix posibile

Acizii nucleici în triplu helix pot fi utilizaţi pentru a regla expresia genei *in vivo*. În conceptul triplu-helix (concept anti-genă), cea de-a treia catenă a acidului nucleic ar trebui să hibridizeze cu ADN-ul în dublu helix din nucleu inhibând translaţia ADN-ului în ARNm corespunzător. Un avantaj major al conceptului de anti-genă comparativ cu conceptul antisens îl constituie faptul că fiecare celulă are doar un set diploid de cromozomi, astfel că ar trebui să fie inhibate numai două secvenţe egale de ADN per celulă şi nu sute sau mii de catene ARNm . Există patru mecanisme posibile de acţiune a acizilor nucleici în triplu helix:

- oligonucleotidele ce formează triplexuri pot interacţiona cu poziţia de legare al unui component al transcripţiei sau secvenţă de replicare;
- schimbarea conformaţiei cauzată de formarea triplu helixului poate perturba legarea unei enzime importante pentru translaţie;
- oligonucleotidele formatoare de triplex se leagă în aval de o regiune promotor a ARN polimerazei care ar putea inhiba iniţierea transcripţiei;

• oligonucleotidele ce formează triplexuri se leagă la ADN şi pot acţiona ca o barieră pentru enzimele de transcripţie sau replicare.

Utilizarea *in vivo* a oligonucleotidelor formatoare de triplex sunt similare cu cele pentru oligonucleotidele antisens, adică asigură stabilitatea în medii biologice, absorbţia la nivelul nucleului şi farmacocinetica.

6.4.3. Ribozimele

Ribozimele sunt componente catalitice ale ARNs care apar în mod natural sau au fost obţinute prin selecţie *in vitro* [34, 35]. De cele mai multe ori ribozimele care apar natural catalizează clivarea ARN şi reacţiile de legare.

Vom analiza ribozimele de tip *cap de ciocan* şi *agrafă de păr* care aparţin clasei de ribozime mici (fig. 6.13-6.15) [Sigurdsson şi colab., 1998; Carola şi colab., 1999]. Ribozimele s-au bucurat de o atenţie considerabilă, din cauza posibilei lor sinteze chimice, şi în special, pentru încorporarea analogilor nucleotidelor.

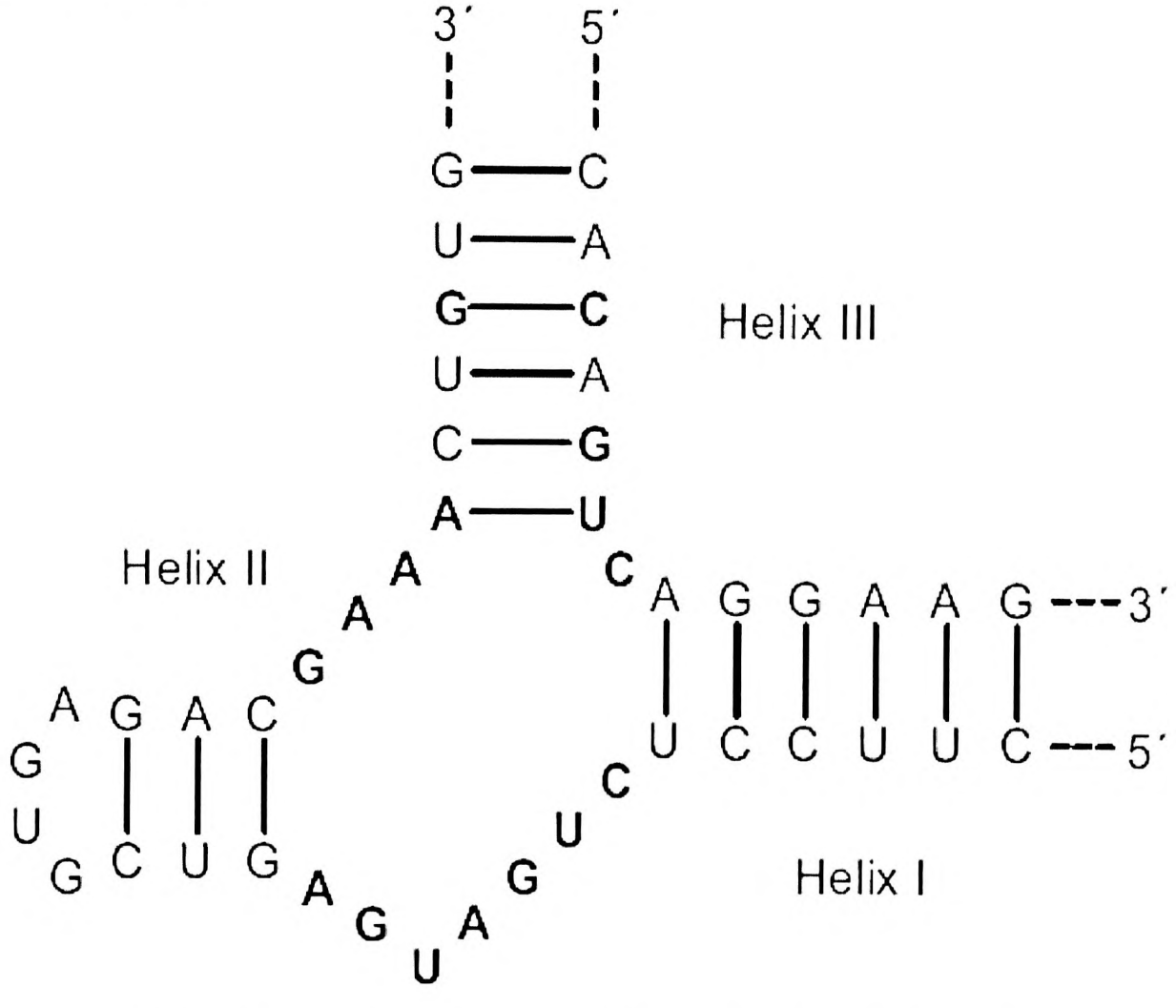


Figura 6.13 Structura schematică a unei ribozime de tip cap de ciocan

De asemenea, ribozimele sunt implicate în inhibarea expresiei genei la nivel de ARN. Aceste ribozime au fost observate iniţial ca motive structurale în

anumiţi viroizi patogeni ai plantelor pentru auto-clivarea ARN catenar [Symons, 1992]. Acest clivaj este o reacţie intramoleculară de transesterificare, care ulterior a fost utilizată în reacţii intermoleculare prin plasarea substratului şi părţii ribozimelor în molecule de ARN separate [Uhlenbeck, 1987]. Astfel, a devenit posibilă analiza ribozimelor care din punct de vedere cinetic, asemănător unor enzime convenţionale, permit o mai bună înţelegere a relaţiei structură-funcţie. Mai mult, separarea substratului de ribozime le fac potrivite pentru clivarea oricărui ARN şi adecvat pentru inhibarea specific de secvenţă a expresiei genei [Bramlage şi colab., 1998].

6.4.3.1. Structura și mecanismul de reacție

Structura de tip cap de ciocan a ribozimelor a fost determinată prin cristalografie cu raze X în stare bazală la fel ca şi în stadiul premergător construcţiei stării de tranziţie a reacţiei [Scott şi colab., 1996]. În figura 6.14 este reprezentată imaginea bidimensională a ribozimei cap de ciocan complexată cu un substrat, iar în figura 6.15 apare structura ribozimei în agrafă de păr.

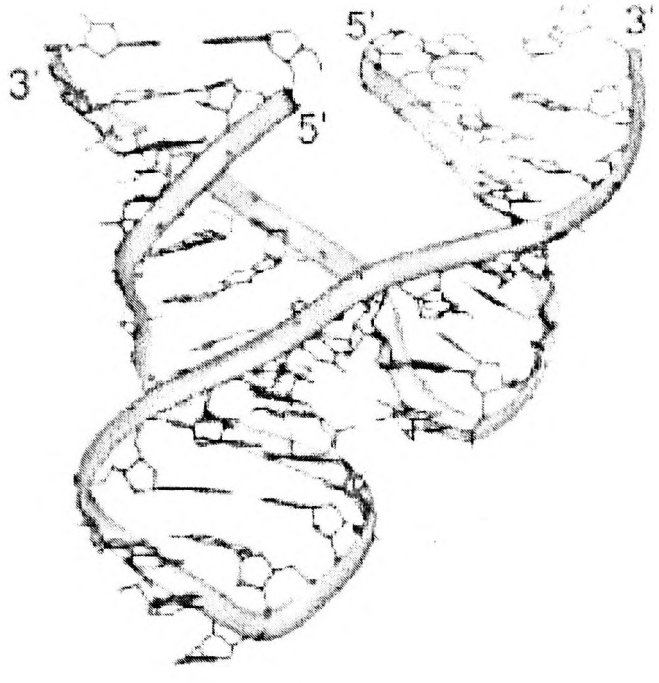


Figura 6.14 Structura unei ribozime de tip cap de ciocan folosind raze X

În cele mai multe studii se arată că ribozimele sunt pregătite prin sinteză chimică să permită introducerea de nucleotide modificate în anumite poziţii. Ribozimele conţin un miez central cu nucleotide neschimbate, un helix II care stabilizează miezul şi două braţe de legare cu substratul, care formează helixurile I şi III. Magneziu este necesar pentru o activitate optimă şi unul din rolurile ionilor metal este de a induce modificări conformaţionale pentru a îmbogăţi structura catalitică.

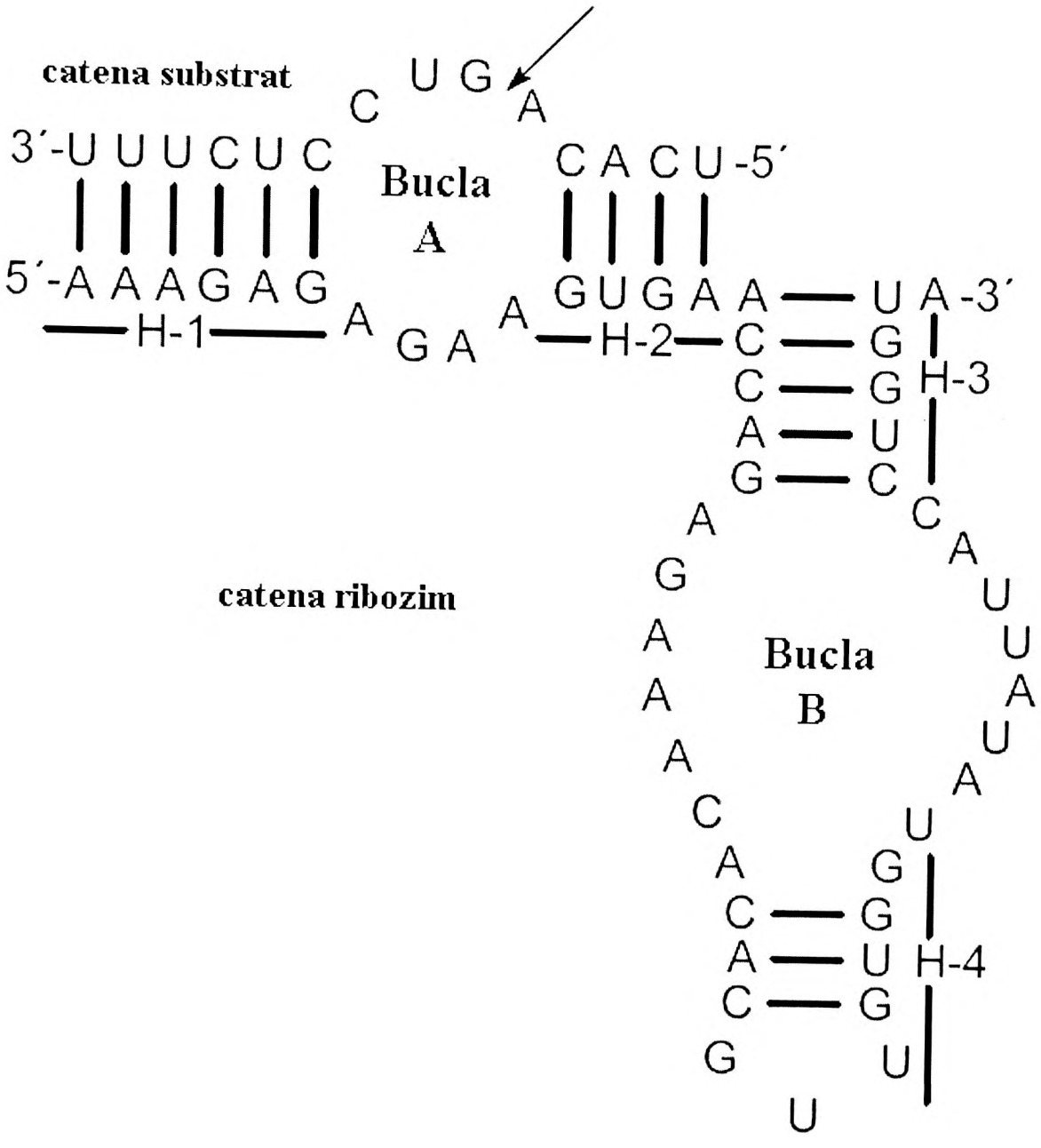


Figura 6.15 Ribozimă de tip agrafă de păr

Ribozimele catalizează o reacţie fosforil de transesterificare a 3',5' fosfatului internucleotidic al substratului la 2', 3' fosfat nucleozidul ciclic care are ca rezultat clivarea legăturii internucleotidice (fig. 6.16) [Kuimelis şi colab., 1998]. Reacţia este specific de secvenţă, în care clivajul se produce la nivelul 3' al tripletului din formula generală NUH în care N este orice nucleotid, U este uridină şi H este orice nucleotid cu excepţia guanozinei. Ţinta unui anumit triplet NUH de clivare în ARN este determinată de succesiunea, secvenţa braţelor de legare a ribozimelor care trebuie să fie complementară cu secvenţele din amonte şi din aval ale tripletului pentru a forma complexe ribozimă-substrat.

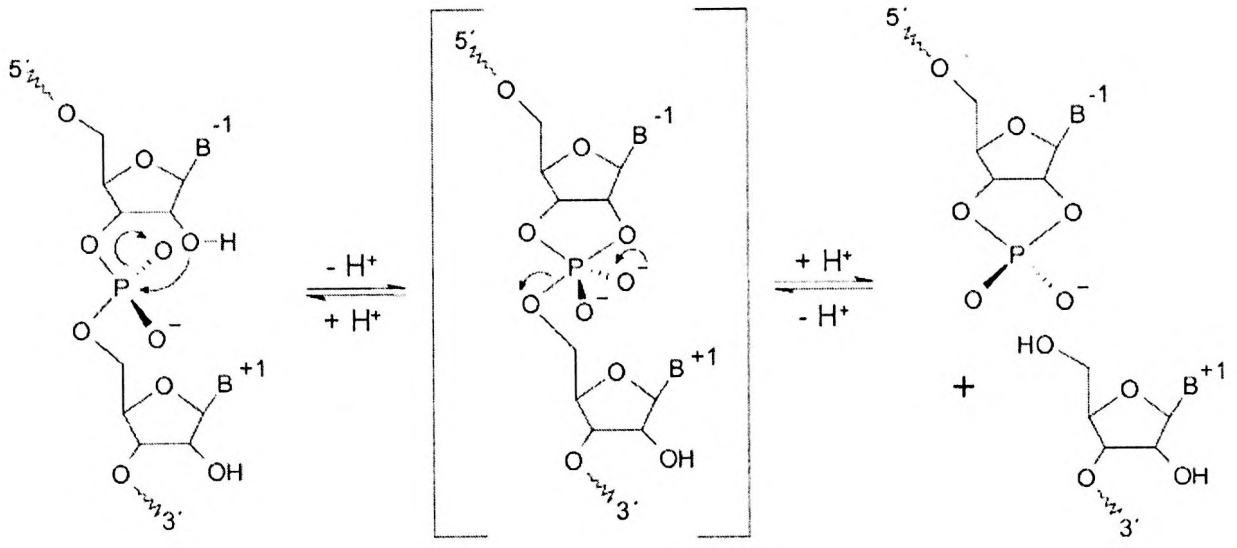


Figura 6.16. Mecanismul clivării ribozimelor

Ribozima este clivată cu o inversare a configuraţiei fosforului, indicând astfel mecanismul de intrare pentru reacţia de transesterificare [Yoshinari şi colab., 2000]. Mecanismul favorit pentru ribozima cap de ciocan se realizează în prezenţa unui ion metalic, care are un rol activ în cataliză. Cu toate acestea există posibilitatea implicării unui grup funcţional al unei baze nucleotidice,care este mecanismul favorit pentru ribozimele în agrafă de păr. Astfel grupările funcţionale ale nucleobazelor pot acţiona, în principiu, ca şi catalizatori generali pentru acizi-baze.

6.4.3.2. Specificitatea tripletului

Ribozimele naturale clivează 3' din tripletele NUH. Structura cu raze X a fost realizată nu numai în forma de bază, dar de asemenea aproape de starea de tranziţie. Aceasta pune accentul pe dinamica sistemului, care trebuie să adopte structura activă prin clivaj conformaţional încă necunoscut. Cu toate acestea, eforturile de a obţine ribozime cap de ciocan cu specificitate de clivaj modificată au avut mai multe reuşite. O ribozimă ar putea fi selectată să cliveze 3' la NUR unde R poate fi guanozina sau adenozina [Vaish şi colab., 1998]. Acesta arată că secvenţă specifică pentru clivajul NUG este foarte limitată. O caracteristică interesantă a acestei ribozime o constituie capacitatea sa de a cliva triplete în cazul în care U centrală poate să fie C sau G, care diferă considerabil de ribozimele convenţionale de tip cap de ciocan ce are cerinţe stricte pentru U centrală. Cu toate acestea, ribozimele noi extind spectrul situsurilor de clivare din ARN, lucru care este important pentru inhibarea expresiei genei.

6.4.3.3. Stabilizarea ribozimelor

Ribozimele sunt uşor hidrolizate de RNaze care sunt deosebit de active în ser. Când ribozimele sunt implicate exogen pentru inhibarea expresiei genei, ele vor veni în contact cu serul şi, prin urmare, stabilizarea lor împotriva unei astfel de degradări este o condiţie esenţială pentru producerea cu succes a medicamentelor. O protecţie simplă împotriva RNazelor se realizează prin îndepărtarea grupării 2' -OH, menţinâdo în acele poziţii, care sunt esenţiale pentru activitatea catalitică a ribozimelor. Întradevăr, schimbarea ribozei a nucleozidului pirimidină cu 2'-fluoro-2'-dezoxiriboză va creşte considerabil timpul de înjumătăţire, cu o mică scădere a puterii catalitice [Pieken şi colab., 1991]. Acest lucru a fost îmbunătăţit prin înlocuirea uridinei din poziţiile 4 şi 7 cu 2'-amino-2'-deoxiuridina . Ulterior acest lucru a arătat că gruparea amino poate fi inclusă în toate poziţiile nucleozidului pirimidină cu efectul dorit Beaudry şi colab., 1999]. De asemenea alkilarea grupării 2'-OH asigură protecţia împotriva degradării şi ea poate fi încorporată în toate poziţiile (în afara de nucleozidele purinice din centrul regiunii), fără afectarea activităţii [Jarvis şi colab., 1996]. Degradarea de către exonucleaze poate fi prevenită, fie prin introducerea de fosforotioaţi sau nucleotide inversate cu o legătură 3',3'. Combinarea acestor modificări creşte timpul de înjumătăţire al ribozimelor de la câteva minute la zile fără afectarea gravă a capacităţii catalitice. În concluzie, problema stabilizării ribozimelor împotriva degradării nucleazice poate fi considerată rezolvată.

6.4.3.4. Inhibarea expresiei genei

Pentru suprimarea expresiei genei, ribozimele de tip cap de ciocan şi, într-o măsură mai mică, cele în agrafă de păr au fost investigate, şi numeroase exemple de aplicaţii de succes au fost descrise [Klebba şi colab., 2000]. Aceste abordări pot fi împărţite în două categorii în funcţie de modul de distribuire a ribozimelor în celule. Prima abordare, descrisă ca aplicaţie endogenă, constă în clonarea secvenţei pentru ribozime după un promotor potrivit într-un vector, fie o plasmidă sau un vector retroviral. După transfecţie sau transducţie, ribozima este transcrisă în celule pentru a-şi găsi ARNm ţintă. Această abordare a fost adoptată de mai multe laboratoare şi avut succes, de exemplu, în interferenţa cu replicarea HIV [Muotri şi colab., 1999]. Un avantaj al acestui mod de transmitere este că gena poate fi integrată stabil în ADN-ul gazdei, ca într-un protocol de terapia genetică. De asemenea, odată integrată, aprovizionarea ribozimelor devine permanentă. Cu toate acestea, alegerea vectorului este esenţială, în special pentru om, unde siguranţa vectorului este o preocupare considerabilă. Printr-un alt mod de distribuţie exogenă, ribozimele sunt pregătite, fie prin sinteză chimică, fie prin transcriere şi sunt adăugate în celule de la exterior.

6.4.3.5. Colocalizarea

Un aspect important pentru o interferenţă eficientă cu expresia genei este colocalizarea ribozimelor cu ARN-ul lor ţintă. În acest sens, disitribuţia endogenă are avantajul că ribozimele pot fi direcţionate spre nucleu sau spre citoplasmă, fie prin alegerea promotorului sau prin combinarea cu semnale de localizare subcelulară [Lee şi colab., 1999]. Colocalizarea ribozimelor şi a ţintei în nucleol demonstrează convingător acest punct de vedere [Michienzi şi colab., 2000]. În prezent, ribozimele sintetice concepute pentru distribuţie exogenă pierd aceste semnale şi localizarea nu poate fi dirijată. Cu toate acestea se speră că ataşarea de peptide semnal, cele importante pentru importul nuclear, ar putea ameliora această situaţie. Modificarea chimică poate influenţa aparent o anumită localizare. Astfel, grupuri de fosforotioaţii, introduse pentru a realiza stabilitatea nucleazelor, direcţionează preferenţial ribozimele spre nucleu, cu toate că interferenţa cu expresia genei pare să aibă loc în citoplasmă [Bramlage şi colab., 1999].

6.4.4 ARN-ul de interferenţă (ARNi)

O nouă abordare pentru ARNm ţintă este denumită silenţionarea genei postranscripţionale sau ARNi [Fire şi colab., 1998; Tuschl şi colab., 2002] (fig. 6.17). ARNi este un procedeu prin care ARN dublu catenar ţinteşte ARNm pentru clivare într-un mod dependent de secvenţă. Mecanismul ARNi implică iniţial prelucrarea ARN-ului dublu catenar de lungime mare (în jur de 500-1000 nucleotide) în fragmente de „declanşare" de 21 – 25 bp ' [Elbashir şi colab., 2001] de către un membru al familiei III de RNaze ale nucleazelor numite DICER [Hammond, 2001]. Când sunt încorporate într-un complex de nucleaze larg, multicomponent numit RISC (complex de silenţionare ARN indus), catenele prelucrate formează "o secvenţă ghid" care are ţintă RISC la secvenţa ARNm dorită şi contribuie la distrugerea sa [Ketting şi colab., 2001]. ARNi a fost folosit cu succes pentru silenţionarea genelor în diferite sisteme experimentale, incluzând petunia, planta de tutun, neurospora, Caenorhabditis elegans, insecte şi peştele zebră. Utilizarea de ARN dublu catenar lung pentru silenţionarea expresiei în celulele de mamifere a fost încercată, în mare măsură fără succes [Yang şi colab., 2001].

Numeroase studii au sugerat că ARNsi (ARN dublu catenar cu o lungime în jur de 21-22 nucleotide) nu pune în acţiune acest răspuns de apărare al gazdei, şi, prin urmare ar putea să stopeze expresia în celulele somatice de mamifere dacă sunt modificate corespunzător, adică conţin grupările 3'-hidroxi şi 5'-fosfat [Zamore şi colab., 2000]. Universalitatea aceastei abordări şi tipurile de gene, care pot fi modificate, folosind această strategie în celulele de mamifere sunt în conformitate cu studiile intense din acest moment.

6.5. Identificarea poziționării situsurilor accesibile ribozimelor la nivelul ARN țintă

Ribozimele de tip cap de ciocan ce acţionează pe molecule diferite pot să desfacă orice ARN, atâta timp cât aceasta conţine oricare din tripletele clivabile. Prezenţa unor astfel de triplete nu este de obicei limitată, dar identificarea regiunilor accesibile ribozimelor din ARN-ul ţintă este un aspect important pentru succesul inhibării expresiei genei. ARNs au structuri secundare extinse şi este de aşteptat ca aceste regiuni care sunt deschise pentru andocarea unei oligonucleotide antisens, cum ar fi oligodeoxinucleotidele sau ribozimele să fie limitate. Până de curând astfel de situsuri au fost identificate de cele mai multe ori prin trialuri sau erori. Cu toate acestea, au fost elaborate noi abordări teoretice şi experimentale pentru a facilita detectarea situsurile ARN accesibile. O astfel de abordare este scanarea ARN-ul ţintă marcat prin hibridizare pentru o bancă de oligonucleotide cu secvenţa cunoscută prin microarray [Sohail şi colab., 2000].

O altă abordare este cea a renaturării oligodeoxinucleotidelor randomizate la un transcript al ARN şi clivajul ulterior al acestui complex prin RNaza H. Situsurile de clivare pot fi apoi scanate pentru tripleţi susceptibili pentru clivaj de către ribozime. Analiza transcripţilor nu este în întregime satisfăcătoare pentru că structura secundară a ARNm în celule ar putea fi destul de diferită de cea a transcriptului. În plus, o parte din ARNm ar putea fi acoperit de proteine prevenind renaturarea oligonucleotidelor. Astfel, extinderea unor astfel de analize pentru ARNm nativ este lucrul cel mai de dorit, chiar dacă experimental este foarte provocator din cauza stabilităţii scăzute a produşilor de clivaj. Într-adevăr, analiza la murine a ADN metiltransferazei ARNm în extractul celular a fost realizată cu succes cu ajutorul oligonucleotidelor şi RNaza H [Scherr şi colab., 2000]. Siturile, astfel, selectate au fost eficiente în mod egal pentru inhibarea prin oligodeoxinucleotide şi ribozime.

Metode computaţionale au fost, de asemenea puse la punct pentru a identifica astfel de situsuri [Patzel şi colab., 1999]. O comparaţie directă a demonstrat că situsurile identificate prin metode computaţionale şi metode cu RNaza H au fost în concordanţă. S-a constatat, că ribozimele cu braţe

randomizate de legare a substratului au fost folosite pentru clivarea transcripţilor de ribozime în agrafă de păr [Putlitz şi colab., 1999].

6.6. Distribuirea exogenă a ribozimelor

Distribuţia exogenă a ribozimelor depăşeşte problema alegerii vectorului, dar se confruntă cu probleme de degradare nucleazică a ribozimelor din ser şi asimilare celulară eficientă. Problema degradării ribozimelor distribuite exogen de nucleazele din ser a fost în esenţă soluţionată prin modificări chimice aşa cum s-a discutat mai sus. În general asimilarea celulară în culturi celulare este realizată prin utilizarea de lipide cationice ca purtători, când încărcarea pozitivă este la exteriorul lipidelor, pentru interacţiunea electrostatică cu sarcina negativă a oligonucleotidelor.

Acum sunt disponibile diverse compoziţii de astfel de lipide, unele mai potrivite pentru anumite linii celulare decât altele. Probabil că în viitor asocierea ribozimelor cu peptide cu proprietăţi de transport cunoscute ar putea atenua această situaţie. De asemenea, o astfel de strategie ar putea deschide calea pentru distribuirea ribozimelor legată de tipul celular corespunzător. Cu toate acestea, există tipuri de celule în cultură, care preiau ribozimele destul de uşor, fără astfel de ajutoare, atât timp cât acestea sunt modificate chimic [Mariani şi colab., 2000]. Se presupune că astfel de celule, de exemplu celule ovariene de hamster chinezesc au o membrană foarte activă care facilitează transportul oligonucleotidelor.

Foarte interesant, ribozimele stablizate chimic sunt preluate de ţesut după aplicare locală pe modele animale, fără purtători [Salmi şi colab., 2000]. Acest accept de aplicare *in vivo* a oligodeoxinucleotidelor antisens este, de asemenea, realizată fără purtători [Crooke, 2000]. Astfel, asimilarea oligonucleotidelor diferă în culturi celulare şi animale, şi înţelegerea acestor procese este încă nesatisfăcătoare.

Ţintele pentru ribozomii modificaţi chimic în culturi celulare au fost c-myb, Nras, luciferaza, receptorul factorului de creştere al endoteliului vascular, mai multe gene de rezistenţă la medicamente şi repetiţia 5'terminală a virusului hepatitei C. Modele de studii *in vivo* cu ribozime sintetice au fost realizate pentru inhibarea expresiei amelogeninei, protein kinazei C, ARNm stromelizinei şi a receptorilor dopaminergici D2.

În continuare vor fi detaliate numai experimentele pe culturi celulare. Surprinzător gradul de inhibiţie nu variază foarte mult în aceste studii între – 51 - 77% inhibiţie (tabelul 6.1). Cu toate acestea, rezultatele sunt dificil de comparat, cu diferenţele existente între liniile celulare, ţintele ARNm, concentraţiile de ribozime, tipurile de modificări chimice şi purtătorii, şi, adesea, fără nici un screening pentru renaturarea ribozimelor bune sau situsul de clivare. Factorii care afectează eficienţa inhibării ribozimelor includ, de

asemenea, durata de viaţă a proteinelor şi ARNm. Evident, cu cât durata de viaţă a proteinelor este mai mare cu atât mai dificilă va fi inducţia inhibiţiei. Dimpotrivă, ARNs cu un timp de înjumătăţire lung sunt consideraţi cele mai bune substraturi pentru ribozime [Jensen, 2000]. Interesant, majoritatea autorilor observă un anumit grad de inhibiţie a expresiei proteinelor chiar de către ribozimele inactive. Cea mai simplă explicaţie invocată de majoritatea investigatorilor este o oprire a translaţiei. Un alt mecanism care explică inhibiţia ar putea fi clivajul ARN-ului ţintă de o RNază dublu-catenară care a fost identificată în celule umane [Yuen, 2001], sau chiar un mecanism ARNi.

Tabelul 6.1. Medicamente antisens comerciale

Ţinta	Indicaţia	Compania	Produsul	Faza
CMV	Retinite	CMV	ISIS Vitravene	Medicament
PKC-α	Cancer pulmonar fără celule mici	ISIS/Lilly	Affinitac	III
C-RAF	cancer ovarian	ISIS	ISIS 5132	II
H-ras	Cancer pancreatic	ISIS	ISIS 2503	II
ICAM-1	Boală Crohn	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	III
ICAM-1	Psoriazis	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	II
ICAM-1	Colite ulcerative	ISIS	ISIS2302/Alicaforsen	II
HCV	Hepatită C	ISIS	ISIS 14803	II
Factorul α de necroză tumorală	Boală Crohn, psoriazis	ISIS	ISIS 104838	II
c-myc	Cancer, restenozare	AVI-Biopharm	Resten-NG	III
Bcl	Cancer	Genta/Aventis	Genasense	III
HIV	SIDA	Enzo Biochem	HGTV43	II
Adenozina A1	Boli respiratorii	EpiGenesis	EPI2010	II
Protein kinaza	Cancer	Hybridon	Gem 231	II
Ribonucleotid reductaza	Cancer	Lorus Therapeutics	GTI2040	II
Factorul de creştere β2 tansformant	Cancer	Pharma antisens	AP 12009	I / II

Receptorul 1 al factorului de creştere vascular	Cancer	Ribozyme Pharmaceuticals	Angiozyme	II
HCV	hepatită C	Ribozyme Pharmaceuticals	Heptazyme	I
HER2	Cancer	Ribozyme Pharmaceuticals	Herzyme	I

6.7. Aplicațiile oligonucleotidelor în inhibarea expresiei genelor

Literatura de specialitate care descrie aplicaţiile oligonucleotidelor pentru inhibarea expresiei genelor este destul de cuprinzătoare. Tabelul 6.1 rezumă în acest sens cele mai sugestive exemple obţinute din trialuri de fază clinică chiar dacă ele sunt încă incomplete. Nu este surprinzător, ca aceste investigaţii să fie aproape exclusiv efectuate de către companii având în vedere cheltuielile enorme implicate. Singura excepţie notabilă este studiul laboratorului Gewirtz pe leucemie mieloidă cronică pentru tratament *ex vivo* [Luger şi colab, 2002]. Nu toate exemplele menţionate pot fi discutate aici, astfel încât uneori sunt suficiente puţine comentarii. Toate oligonucleotidele utilizate în studiile clinice au în comun un aspect al naturii lor chimice, şi anume toate sunt oligonucleotide conţinând fosforotioaţi. Primul medicament antisens aprobat a fost realizat de ISIS, Fomivirsen sau VitraveneR, un nume comercial de la Novartis. Cu toate acestea, numărul de pacienţi cu retinită cauzată de citomegalovirus (CMV) a crescut mai puţin din cauza tratamentului de succes al SIDA, cel puţin în emisfera vestică. Moleculele de adeziune intracelulare (ICAM) -1 de la aceeaşi companie folosite ca medicaţie pentru boala Crohn, nu a fost încă aprobate, dar se fac cercetări în continuare pentru ca medicamentul sub numele comercial AlicaforsenTM să fie pe piaţă. Dezvoltarea oligonucleotidelor Genta anti BCL2 GenasenseTM pentru tratamentul melanomului malign coroborată cu chimioterapia, este destul de avansată [Jensen şi colab., 2000]. Genasense este implicată în trialuri clinice de fază a III dezvoltate împreună cu Aventis. AffinitacTM este un potent inhibitor al protein kinazei C în cancerul pulmonar fără celule mici, care arată o rată aproape dublă de supravieţuire (16 luni în loc de 8), în combinaţie cu carboplatin/taxol. Obiectivul principal este de a obţine un profil sinergistic bun în combinaţie cu agenţi chemoterapeutici (aşa cum este obiectivul cu Genasense), cu Taxol în acest caz. Affinitac este, de asemenea, testat într-un trial cu un singur agent (faza II) împotriva limfomului nonHodgkin. În acest ultim caz este în curs o colaborare împreună cu Eli Lilly [Yuen şi colab., 2001].

6.8. Concluzii

Acizi nucleici, în special oligonucleotidele antisens, sunt acum considerate ca fiind medicamente candidate. Compusul, Vitravene, este în prezent pe piaţă şi mai mulţi compuşi promiţători sunt în prezent în studii clinice de fază III. Succesul lor va defini potenţialul impact al oligonucleotidelor antisens. În plus, utilizarea ribozimelor pare să aibă rezultate pozitive în aplicaţii ale medicamentelor, cu toate că unele obstacole încă mai trebuie să fie depăşite. Cel mai recent concept, ARNi, este în fază incipientă dar are un foarte mare potenţial, deoarece presupune un concept natural. Cele mai serioase limitări sunt determinate de asimilarea celulară săracă, şi distribuţia încă ineficientă în organe. Probabil că rezolvarea acestor impedimente va decide viitorul oligonucleotidelor ca medicamente.

PARTEA III

METODE ANALITICE IMPLICATE ÎN PRODUCEREA ȘI UTILIZAREA MEDICAMENTELOR

CAPITOLUL 7
TENDINȚE RECENTE ÎN ENANTIOSEPARAREA MEDICAMENTELOR CHIRALE

7.1. Introducere

Domeniul enantioseparării atrage atenţia din două perspective: (1) prepararea compuşilor chirali biologic activi puri din punct de vedere enantiomeric şi (2) analize enantioselective ale medicamentelor chirale în procesul de producţie, formulare, depozitare şi folosire al acestora.

În cadrul proceselor de producţie, tehnicile de enantioseparare cromatografică au concurenţi puternici precum cristalizarea diastereomerică, separarea kinetică, rezervele chirale, sinteza catalitică asimetrică, tehnologii bazate pe membrane etc. Totuşi în domeniul analizei nu există alternative viabile pentru tehnicile bazate pe metode separative.

Tehnicile chiroptice cum ar fi metodele tradiţionale polarimetrice, cele bazate pe dispersie (rotaţia planului luminii polarizate) sau spectrometrice, precum şi spectroscopia de rezonanţă magnetică nucleară (RMN), nu pot concura în termeni de acurateţe, sensibilitate, simplitate, timp de analiză, costuri, etc. cu tehnicile pe bază de separare cum ar fi cromatografia gazoasă (GC), cromatografia în lichid de înaltă performanţă (HPLC), cromatografia supercritică în fluid (SFC), electroforeza capilară (CE) şi electrocromatografia capilară (CEC).

Scopul acestui capitol este să discute tendinţele actuale şi să prezinte perspectiva evoluţiei domeniului enantioseparării.

7.1.1. Stereochimia în acțiunea medicamentelor. Substanțele chirale și enantiomerii

Medicamentele chirale au două forme structurale similare care se pot comporta foarte diferit în sisteme biologice datorită formelor lor diferite în spaţiul tridimensional.

Aceste două forme posibile sunt denumite *enantiomeri* iar cei doi enantiomeri ai unui medicament chiral ar trebui să fie considerate două medicamente diferite.

Chiralitatea este definită ca şi proprietatea geometrică a unui obiect rigid (precum o moleculă sau un medicament) de a nu putea fi superpozabil cu imaginea sa în oglindă. Moleculele ce pot fi superpozabile cu imaginile lor în oglindă sunt achirale (non-chirale). Chiralitatea este o proprietate a materiei identificată în majoritatea sistemelor biologice pornind de la elementele de bază ale vieţii aminoacizii, carbohidraţii şi lipidele. Chiralitatea este adesea ilustrată prin ideea de nesuperpozabilitate a mâinilor dreaptă şi stângă: mâna stângă şi mâna dreaptă sunt reciproc imaginile în oglindă ale celeilalte dar nu sunt superpozabile. Cele două imagini în oglindă ale unei molecule chirale sunt denumite *enantiomeri.* Ca şi mâinile, enantiomerii sunt perechi. Ambele molecule ale unei perechi de enantiomeri au aceiaşi compoziţie chimică şi pot fi schiţaţi identic în două dimensiuni, dar în medii chirale cum ar fi receptorii şi enzimele din organism acestea pot avea un comportament diferit. Un *amestec racemic* reprezintă un amestec de cantităţi egale din ambii enantiomeri ai unui medicament chiral. Frecvent, chiralitatea la medicamente îşi are sursa într-un atom de carbon la care sunt ataşate patru grupări diferite însă pot exista şi alte surse pentru chiralitate. Sub termenii de *stereoizomeri* sau *izomeri unici* sunt uneori denumiţi enantiomerii singuri/unici. Aceşti termeni se pot aplica şi în cazul medicamentelor sau moleculelor achirale şi nu indică faptul că în acest caz este prezent un enantiomer. De exemplu, molecule izomere au aceeaşi formulă moleculară stoichiometrică dar pot avea structuri foarte diferite. Aşadar, termenii *enantiomer, izomer unic* şi / sau *stereoizomer unic* se pot folosi unul în locul celuilalt.

Cei 2 enantiomeri ai unui medicament chiral se pot identifica cel mai bine pe baza configuraţiei absolute a acestora sau pe baza rotaţiei optice. Alte denumiri cum ar fi D sau L sunt utile în cazul zaharurilor sau aminoacizilor dar ele sunt specifice acestor molecule şi nu sunt general aplicabile altor compuşi. Termenii *dextro* sau *levo* sunt consideraţi învechiţi şi ar trebui evitaţi. În locul lor ar trebui folosit sistemul *R/S* pentru configuraţia absolută (*R* = *rectus* = dreapta, în sensul acelor de ceasornic *S=sinister*= stânga, în sens invers acelor de ceasornic, din lb. latină) şi sistemul +/– pentru rotaţia optică, termeni ce ţin cont de reguli precise bazate pe numărul atomic şi masă pentru a determina dacă centrul unei particule chirale are o configuraţie *R* sau *S*.

Un medicament chiral poate avea mai mult decât un singur centru chiral, iar în astfel de cazuri este necesară determinarea configuraţiei absolute pentru fiecare centru chiral. Rotaţia optică este folosită deseori pentru că este mai uşor de determinat experimental decât configuraţia absolută, însă ea nu oferă informaţii despre configuraţia absolută a unui enantiomer. Pentru o pereche dată de enantiomeri, unui enantiomer îi poate fi alocată notaţia (+) iar celuilalt (–) pe baza direcţiei în care ei rotesc planul luminii polarizate. Ro-

taţiile optice au fost descrise ca fiind *dextrorotatorii* (+) sau *levorotatorii* (–). Amestecurile racemice sunt notate (*R,S*) sau (±).

7.1.2 Medicamentele chirale în sistemele biologice

Enantiomerii aceluiaşi medicament chiral au proprietăţi fizice şi chimice identice în medii achirale, însă în medii chirale ele prezintă comportamente chimice şi farmacologice diferite (fig.7.1). Deoarece sistemele vii sunt ele însele medii chirale, fiecare enantiomer ai unui medicament chiral se comportă foarte diferit *in vivo*. De aceea, pentru un medicament chiral dat, cei doi enantiomeri se consideră a fi două medicamente diferite, dacă nu este demonstrat contrariul.

În cazul ilustrat mai sus, unul din enantiomeri este activ biologic, iar celălalt enantiomer nu este. Domeniile A,B şi C ale medicamentului trebuie să interacţioneze cu regiunile corespunzătoare ale situsului de legare *a,b* şi *c* pentru ca medicamentul să poată avea efectul farmacologic.

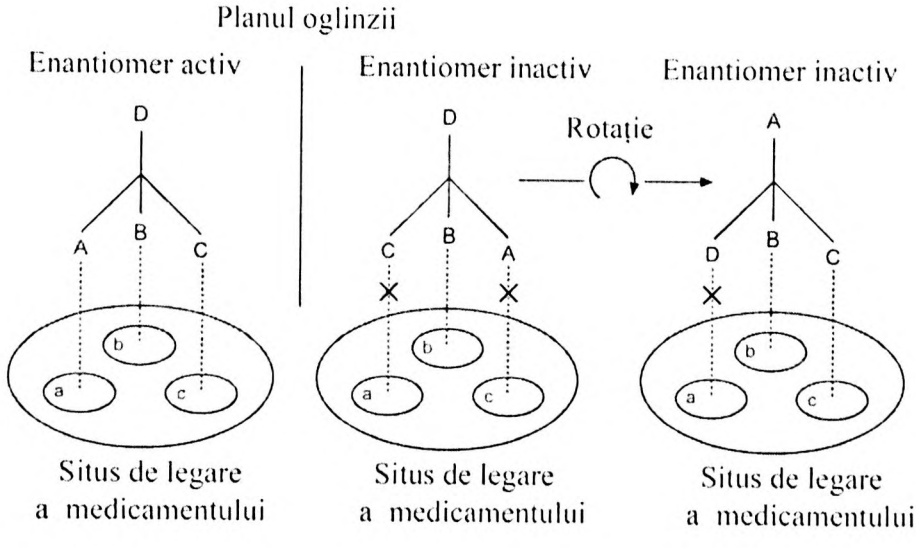


Fig.7.1 Diferenţa dintre doi enantiomeri ai unui medicament prin intermediul unei interacţiuni ipotetice între un medicament chiral şi situs-ul său de legare chiral.

Enantiomerul activ are o structură 3D care permite domeniului A al medicamentului să interacţioneze cu situsul de legare *a* , B să interacţioneze cu *b* şi C să interacţioneze cu *c*. În contrast, enantiomerul inactiv nu poate fi aliniat astfel încât să lege cele trei situsuri simultan, deşi posedă aceleaşi grupări A, B, C şi D. Aceste diferenţe structurale 3D nu permite enantiomerului inactiv să aibă efect biologic la nivelul acestui situs. În unele cazuri, porţiunea unei molecule care conţine centrul/centrii chirali poate fi situată într-o regiune care nu joacă un rol în capacitatea moleculei de a interacţiona cu ţinta acesteia. În aceste cazuri enantiomerii pot avea proprietăţi farmacologice foarte asemănătoare sau chiar similare la nivelul situsului de legare. Chiar şi în aceste cazuri, enantiomerii au un profil metabolic diferit, afinitate diferită faţă de alţi receptori, transportori sau enzime (Dingermann şi colab.,2004).

7.1.3. Importanța chiralității pentru medicamente

Aproximativ 50% din medicamentele de pe piaţă sunt chirale, iar dintre acestea aproximativ 50% sunt mixturi de enantiomeri. Clinicianul poate avea la dispoziţie în acelaşi timp un medicament sub formă de amestec de enantiomeri sau sub forma unui singur-enantiomer, fiind astfel foarte importantă distincţia dintre cele două deoarece între acestea pot exista diferenţe de dozaj, eficacitate, efecte secundare şi chiar de indicaţii. Decizia utilizării formei de un „singur-enantiomer" – IC sau a amestecului de enantiomeri pentru un anumit medicament ar trebui luată pe baza datelor din trialuri clinice şi a experienţei clinice.

Folosirea medicamentelor „enantiomerice unice" poate favoriza un profil farmacologic mai simplu şi mai selectiv, indici terapeutici îmbunătăţiţi, farmacodinamică mai simplă şi scăderea interacţiunilor medicamentoase. În trialuri clinice (S) albuterolul, agonist al receptorilor β2 adrenergici utilizat în tratamentului astmului şi (S) omeprazolul, inhibitor al pompei de protoni utilizat în tratamentul refluxului gastroesofagian, s-au dovedit a fi superioare faţă de formele de prezentare racemice. În alte cazuri însă la efectele terapeutice contribuie ambii enantiomeri, iar utilizarea unor „enantiomeri singuri" poate avea efecte mai reduse sau poate chiar să fie dăunătoare faţă de forma racemică, aşa cum se întâmplă enantiomerului (-) al sotalolului, cu activitate β blocantă şi antiaritmică, în timp ce enantiomerul (+) al acestuia are proprietăţi antiaritmice însă nu are efecte antagoniste β adrenergice.

7.2. Situația actuală a dezvoltării și utilizării medicamentelor chirale

Necesităţile industriei farmaceutice şi ingeniozitatea chimiştilor au determinat o creştere continuă a vânzărilor compuşilor cu structură specifică unui „enantiomer-singur" [Stinson , 2001].

Conform unor prognoze de actualitate, cererea de materiale chirale brute, ingrediente intermediare şi active, va creşte cu 9,4% în anii următori. Această creştere spectaculoasă este determinată de industria farmaceutică. Astfel, de la o cifră de vânzare aşteptată de 15,1 miliarde de dolari, producătorii de medicamente vor fi responsabili pentru 11,5 miliarde de dolari (76%). Ce face domeniul compuşilor chirali un domeniu atât de atractiv pentru dezvoltatorii şi producătorii de medicamente? Unele aspecte majore favorizează dezvoltarea afacerilor cu compuşi chirali, în mod special în cadrul industriei farmaceutice.

Primul şi cel mai important aspect care reprezintă baza tuturor activităţilor din acest domeniu este reprezentat de diferenţa semnificativă ce se constată între proprietăţile farmacologice şi cele toxicologice ale enantiomerilor

compuşilor chirali biologic activi. Se cunosc multe exemple şi în numeroase cărţi, capitole de cărţi şi overview-uri s-a analizat acest subiect [Mehvar , Brocks , 2001; Vakily şi colab., 2002].

Al doilea aspect important este reprezentat de un mecanism de protecţie care permite companiilor farmaceutice să îşi prelungească drepturile de proprietate asupra medicamentelor chirale, pe care anterior le-au comercializat sub forma racemică şi vor fi dezvoltate şi patentate ca şi entitate a unui „singur-enantiomer". Exemple recente de acest fel includ compusul „enantiomer-singur" al inhibitorului înalt potent al secreţiei acide gastrice omeprazol introdus pe piaţa europeană în 2001 de AstraZeneca, S-enantiomerul medicamentului antidepresiv chiral citalopram al Forest Laboratories, R-enantiomerul medicamentului chiral antialergic cetirizina introdus în 2001 de către UCB Pharm, şi S-ibuprofen folosit în Austria şi Elveţia de câţiva ani şi introdus recent şi pe piaţa din Germania.

Al treilea aspect care favorizează domeniul compuşilor chirali este cel al reglementărilor. De exemplu, în actul Agenţiei Europene pentru Evaluarea Produselor Medicinale (EMA) activ de la 1 Ianuarie 1998, se menţionează: „dacă un nou amestec racemic pare promiţător, ambii enantiomeri ar trebui studiaţi separat cât mai curând posibil pentru a se evalua relevanţa stereoizomerismului asupra efectului şi evoluţiei acestuia „*in vivo*". Astfel de reglementări facilitează intrarea pe piaţă a medicamentelor chirale nou dezvoltate ca şi a unui „singur-enantiomer". Exemplele includ medicamentul cu efect de scădere a nivelului colesterolului atorvastatina (Lipitor) aprobat în 1996 şi cu vânzări de 4 miliarde de dolari americani, fiind unul din cele mai bine vândute medicamente în Statele Unite în 1999. O creştere puternică a vânzărilor pe o perioadă scurtă a fost observată şi pentru alte medicamente chorale de tip „enantiomer singur" precum amprenavirul, care a fost aprobat în 1999 de către FDA (Administraţia Alimentelor şi Medicamentelor a SUA) pentru tratamentul infecţiilor HIV şi pentru primul reprezentant al unei clase noi de antibiotice, Linezolid, care a fost aprobat de FDA în Aprilie 2000. Această listă include şi medicamentul chiral cu efect asupra sistemului respirator montelucast, antireumatoidul (iniţial cu efect gastrointestinal) infliximab, agentul tamsulosin cu efect pe hiperplazia prostatei şi medicamentul oftalmic latanaprost pentru tratamentul glaucomului (Dingermann şi colab.,2004).

Diferite companii folosesc în mod curent câteva strategii pentru a intra pe piaţa de afaceri cu compuşi chirali. Unele companii re-lansează propriile medicamente sau medicamente deja cunoscute ca fiind chirale de la alte companii, ca şi noi produse a unui „singur enantiomer". Astfel, de exemplu, o listă de produse internaţionale patentate de compania Sepracor în 1999 include enantiomerii următoarelor medicamente: (S)- şi (R)-terodilina, (-)- şi (+)-pantoprazol, (-)- şi (+)-zileuton, (-)-şi (+)-ketoconazol, (+)- şi (-)-doxazosin, (+)- şi (-)-cetirizina, (+)- şi (-)-sibutramina, (-)- şi (+)-pirbuterol, (R)- şi (S)-ondasetron, (+)- şi (-)-cisaprid, şi (+)- şi (-)-zopiclon. Alte companii dezvoltă

metaboliţi chirali farmacologic activi ai medicamentelor chirale sau prochirale ca şi noi medicamente sub formă de „enaniomer-singur". Exemplele includ (R)- şi (S)-norfluoxetina produsă de Eli Lilly şi metabolitul activ al zopiclon-ului. Astfel, aşa cum se poate vedea din exemplele menţionate mai sus, chiralitatea este un domeniu important al industriei farmaceutice. Ca şi în practica clinică, chiralitatea are în vedere stabilirea unor corelaţii mai bune între concentraţiile medicamentului şi efectele terapeutice, evitarea efectelor adverse ale medicamentelor ţinând cont mai bine de efectele vârstei, genotipurilor, dietei, interacţiunilor medicamentoase, etc. asupra eficacităţii terapiei cu medicamente chirale.

Aşa cum am menţionat mai sus, tehnicile de separare nu sunt singurele metode disponibile pentru producerea medicamentelor chirale în forme pure din punct de vedere enantiomeric. Alternative valoroase sunt reprezentate de strategii bazate pe pool-ul chiral, sinteza catalitică asimetrică etc. Totuşi, în cazul oricărui medicament chiral, sunt necesare tehnici de enantioseparare analitică pentru a avea control asupra purităţii enantiomerice a etapei de producţie (tehnologie de producţie) şi de stocare, precum şi pentru a se urmări efectele enantioselective din cursul acţiunii şi biotransformării acestuia.

7.3. Rolul tehnologiilor de separare în producerea, cercetarea și utilizarea medicamentelor chirale

Revoluţia tehnologiei chirale s-a bazat pe capacitatea măsurării purităţii enantiomerice *[Stinson 2002].*

Impactul tehnicilor de enantioseparare instrumentale asupra producerii şi utilizării medicamentelor chirale este imens. Pentru a evalua rolul efectelor enantiospecifice din cadrul acţiunii medicamentoase chirale, enantiomerii trebuie preparaţi în cantităţi cel puţin suficiente pentru studii elementare farmacologice şi toxicologice. Împreună cu metoda clasică a cristalizării diasteromerice, tehnicile de separare cromatografică au avut o contribuţie importantă în producţia medicamentelor chirale enantiomeric pure. De fapt, la începuturile dezvoltării acestei ramuri, s-a aplicat metoda cromatografiei pe coloană lichidă de joasă presiune în cea mai simplă formă a acesteia pentru enantiosepararea acelor medicamente chirale care erau imposibil de sintetizat prin tehnicile existente la acel moment datorită lipsei grupărilor funcţionale adecvate sau a proprietăţilor structurale necesare. La începutul anilor '70, tehnicile cromatografice au făcut posibilă obţinerea enantiomerilor medicamentelor chirale precum metfenithoina, metiprilona, glutetimid, hexobarbital, chlortalidona, oxazepam, biglumid, etc. Enantiomerii talidomidei, care a fost sintetizată iniţial pe baza unui compus intermediar foarte scump, au devenit disponibili uşor pentru studiile farmacologice pentru prima dată prin intermediul enantioseparării cromatografice directe.

La începutul anilor '80 s-a comercializat prima coloană pentru enantioseparare pe scară-analitică folosind HPLC. Acest fapt, urmat de extensia pe piaţă a coloanelor HPLC chirale au fost evenimente cheie în promovarea pe scară largă a tehnicilor de enantioseparare în cadrul analizelor farmaceutice şi analitice. GC chirală, deşi cu un istoric mai îndelungat decât HPLC nu are un rol important în dezvoltarea medicamentelor chirale, iar utilizarea acestuia este limitată datorită caracterului polar şi a volatilităţii scăzute a majorităţii medicamentelor. Merită menţionate câteva studii excelente ce fac excepţie de la situaţia mai sus precizată [Schurig şi colab., 1995; Juza şi colab., 1998]. Aşa cum se arată în aceste studii, GC chirală poate asigura un potenţial însemnat nu numai pentru separarea la scară analitică, ci şi pentru separarea la scară preparativă a unor gaze chirale.

SFC chirală posedă un potenţial cert pentru enantioseparare la scară analitică [Phinney, 2002.] şi, în mod special, pentru enantioseparare la scară preparativă [Terfloth, 2001]. Totuşi, această tehnică nu şi-a câştigat locul pe care aparent îl merită în acest domeniu. Unul din motivele pentru care lucrurile stau în acest fel pare a fi lipsa de sprijin din partea companiilor de instrumente precum şi activitatea de cercetare relativ redusă susţinută de către laboratoarele academice din domeniul enantioseparării prin SFC.

Prima publicaţie ce a descris enantioseparare prin CE a apărut în acelaşi an (1985) cu publicaţia ce descria SFC chirală. După 1992, CE chiral se bucură în continuare de o dezvoltare rapidă şi de o utilizare în creştere în mediul industrial. Aplicaţiile precoce ale altei tehnici de electromigrare, CEC, în domeniul enantioseparării a apărut în 1992 – 1993. În ciuda unor realizări impresionante, această tehnică are încă un loc important în domeniul enantioseparării. Cerinţele viitoare vor arăta care tehnici vor supravieţui mai bine din paleta largă de tehnici disponibile în prezent pentru enantioseparare analitică şi de producţie.

7.4. Prepararea medicamentelor enantiomeric pure

Există trei surse principale de enantiomeri puri: amestecuri racemice, marea diversitate de molecule chirale (carbohidraţi, terpene, alcaloizi, peptide) ce se găsesc în mod natural ca şi enantiomeri puri şi compuşii prochirali. Principalele metode de obţinere a enantiomerilor puri pornind de la sursele amintite sunt prezentate în figura 7.2. Metodologia prezentată în acest subcapitol porneşte de la utilizarea amestecurilor racemice ca şi sursă pentru enantiomerii puri. Modul de transformare a amestecurilor racemice în enantiomeri puri se bazează pe separarea kinetică sau cristalizare. Fiecare din aceste metode poate fi efectuată în mai multe moduri, care sunt discutate pe scurt mai jos.

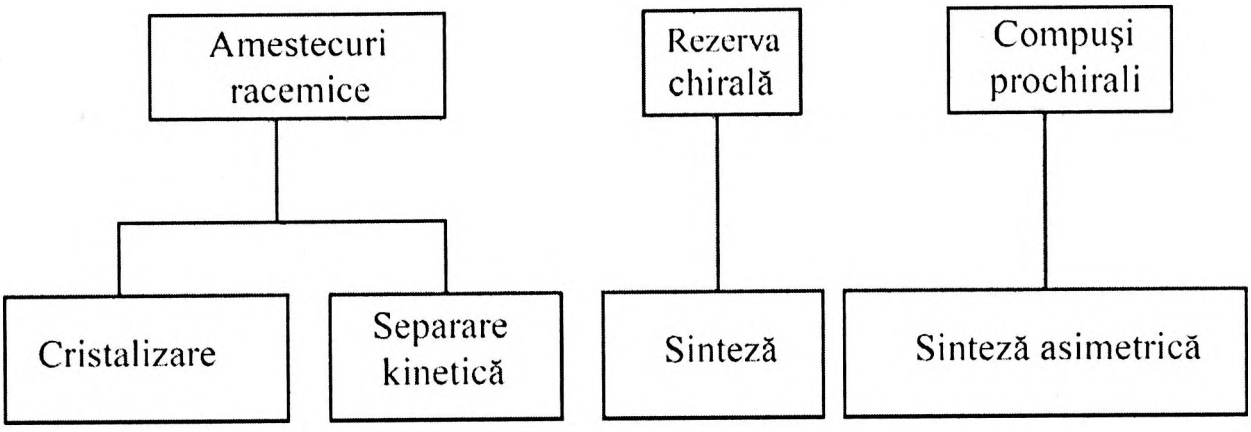


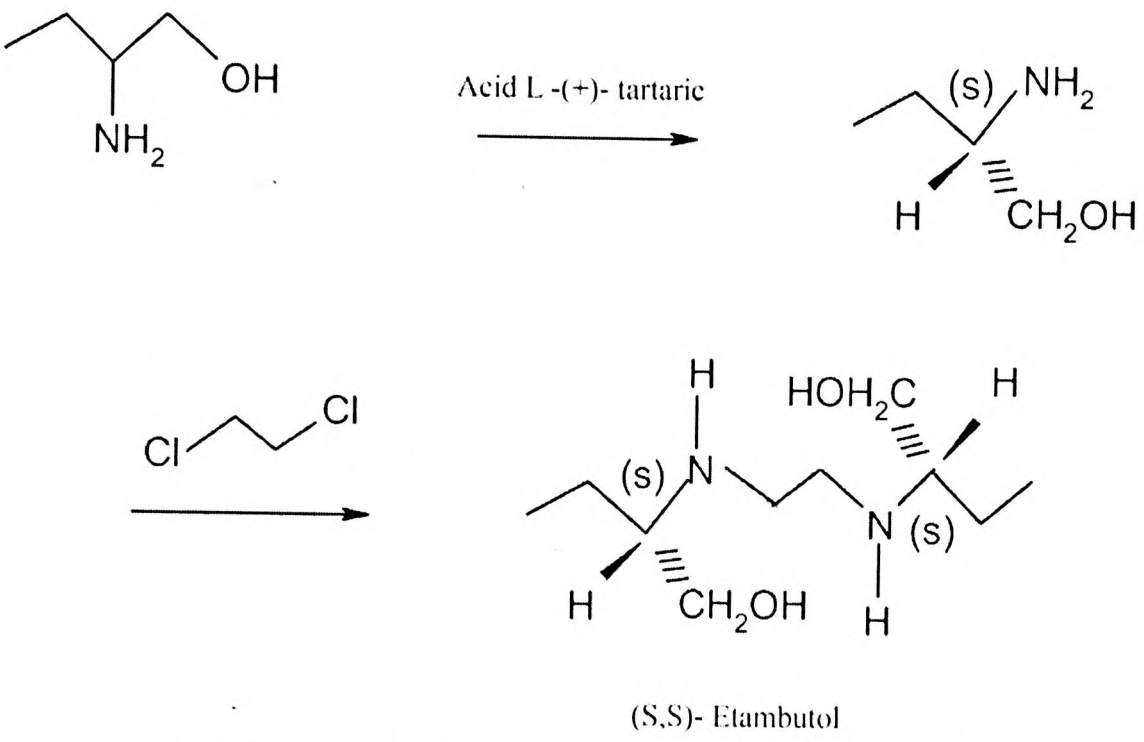
Fig. 7.2 Principalele metode pentru obţinerea enantiomerilor puri.

7.4.1. Separarea amestecurilor racemice

Separarea amestecurilor racemice este cea mai veche tehnică şi rămâne în continuare principala metodă de sinteză industrială a moleculelor biologic active enantiomeric pure. Compuşii chirali puri sau îmbogăţiţi enantiomeric din amestecurile racemice pot fi obţinuţi prin cristalizare preferenţială, separarea kinetică sau separarea prin membrană.

Cristalizarea preferenţială este fezabilă din punct de vedere tehnic numai pentru amestecurile racemice aşa-numite conglomerate. Mai puţin de 20% din toate amestecurile racemice sunt conglomerate. Această tehnică este folosită la scară industrială în producţia cloramfenicolului şi α-meti-L-dopa. În câteva cazuri este posibilă şi cristalizarea directă a sărurilor cu acizi sau baze non-chirale. De exemplu, separarea DL-lizinei poate fi realizată prin cristalizarea preferenţială a sării acesteia *p*-aminobenzen-sulfonate. Naproxen poate fi separat în acelaşi fel prin intermediul sării acestuia cu etilamina.

Derivarea unui amestec racemic prin reacţia cu un compus optic pur produce un amestec de diasteromeri cu proprietăţi fizice diferite. Astfel de mixturi pot fi separate prin metode fizice cum ar fi cristalizarea. Adesea prin separare clasică ne referim la această metodă. Deşi nu vom analiza această tehnică menţionăm că ea poate fi foarte utilă pentru obţinerea medicamentelor chirale enantiomeric pure pentru studii experimentale şi clinice precoce. În plus, această tehnică este încă folosită pentru producerea medicamentelor chirale enantiomeric pure cum ar fi amoxicilina, captopril, *cis*-diltiazem, naproxen, cefalexin, cefadroxil, timolol, dextrometorfan, etambutol, etc. În figura 7.3 este exemplificată metoda industrială de obţinere a (*S,S*)- etambutolului.



(S,S)- Etambutol

Fig. 7.3 Etapele industriale de preparare a (S,S) –etambutolului prin cristalizare diastereomerică (după Sheldon , 1993).

Cristalizarea diastereomerică are dezavantajul valabil pentru toate procedeele de enantioseparare. Concret, produsul enantiomerului dorit nu depăşeşte niciodată 50%. Dacă enantiomerul nedorit nu poate fi separat sau nu se poate folosi în alte scopuri, 50% din produsul nedorit însoţeşte producţia enantiomerului dorit. Aceasta poate constitui o problemă serioasă în cadrul fabricaţiei pe scară largă a enantiomerilor, nu însă şi în cazul producţiei enantiomerilor în cantităţi de câteva grame sau kilograme. O altă problemă delicată a cristalizării diastereoizomerice constă în imposibilitatea raţionalizării acestei tehnologii pe baza cunoştinţelor actuale. Metodele de cristalizare trebuie să fie îmbunătăţite prin trialuri şi studiul erorilor, pe baza intuiţiei şi experienţei. În anumite cazuri trebuie luată în discuţie problema tehnică a disponibilităţii unor agenţi de separare chirali naturali în cantităţi mari.

Metoda de separare kinetică pentru obţinerea de compuşi chirali enantiomeric puri devine din ce în ce mai importantă. Această metodă poate fi definită ca un proces prin care este transformat predominant unul dintre enantiomerii unui amestec racemic în comparaţie cu celălalt. Metoda de separare kinetică poate fi aplicată cu ajutorul catalizatorilor chimici sau biologici. Prin acest proces se poate obţine până la maxim 50% produs enantiomeric, procent similar cu cel al cristalizării diastereoizomerice. Astfel, devine foarte necesară o tehnică de enantioseparare la scară analitică sau industrială, cu racemizarea enantiomerului nedorit.

Dintre avantajele enzimelor ca şi catalizatori se pot aminti eficienţa ridicată a acestora, selectivitatea de substrat, selectivitatea chimică, selectivitatea de regiune şi stereoselectivitatea. În plus, enzimele funcţionează în medii

uşoare şi nu necesită solvenţi organici. În procesul de producţie a medicamentelor pure din punct de vedere enantiomeric, pot fi folosiţi reprezentanţii tuturor claselor principale de enzime, respectiv oxidoreductazele, transferazele, hidrolazele, enzime litice, izomerazele şi ligazele. S-au pus la punct tehnici de fabricare viabile comercial a (S)-naproxen, cisdiltiazem şi a altor câteva medicamente.

Tehnologiile de separare cu membrană sunt şi ele considerate promiţătoare în domeniul producţiei de compuşi chirali enantiomeric puri. De fapt există două metode pentru utilizarea membranelor în acest scop şi anume transportul enantioselectiv [Brice, Pirkle, 1996.] şi bioreactorii membranari [Bormarius şi colab.,1992.]. Prima dintre acestea nu a fost încă aplicată pe scară largă pentru fabricarea medicamentelor chirale enantiomeric pure sau intermediarilor acestora, în timp ce bioreactorii membranari sunt bine cunoscuţi pentru obţinerea L-α-aminoacizilor.

7.4.2. Rezerva chirală

Compuşii enantiomeric puri disponibili în natură sau prin producţia pe scară largă prin procese de fermentare reprezintă materii prime valoroase pentru producţia medicamentelor enantiomeric pure. Multe dintre aceste materiale, cum ar fi carbohidraţii, amino-acizii, terpene, alcaloizi etc., au preţuri comparabile cu a produselor petrochimice şi îşi găsesc o multitudine de aplicaţii industriale ca şi substrat chiral, auxiliari chirali şi surse de liganzi chirali pentru cataliză asimetrică.

Carbohidraţii neprelucraţi, ca şi produşii rezultaţi în urma prelucrării lor (reacţii simple de oxidare sau reducere) sunt larg utilizaţi ca şi intermediari chirali în industria farmaceutică şi chimică uşoară. Dintre hidroxi-acizi, atât D- cât şi L- acidul lactic reprezintă materii prime utile pentru obţinerea ierbicidelor enantiomeric pure, respectiv (R)-fluazifop-butil, (R)-mecoprop şi (R)-flampropisopropil. Acidul (R,R) tartaric, solvent larg utilizat, reprezintă şi materii prime chirale de interes. De exemplu, în cadrul companiei farmaceutice Zambon este utilizat în sinteza (S)- naproxen –ului. Şi acidul (S,S) tartaric este un produs natural, destul de rar. Totuşi, acesta poate fi obţinut sintetic şi este folosit la producerea fosfomicinei. În privinţa altor hidroxi-acizi, acidul β-hidroxibutiric prezintă un interes deosebit pentru industria farmaceutică. Acidul (R)-β-hidroxibutiric poate fi utilizat pentru sinteza intermediarilor carba-penemului şi a captoprilului, în timp ce acidul (S)-β- hidroxibutiric este util în sinteza catenei laterale a vitaminei E.

Aminoacizii naturali, uşor disponibili în cantităţi mari, reprezintă cea mai importantă clasă de compuşi pentru rezerva chirală. De exemplu, L-prolina provenită din fermentaţie, este materia primă cheie pentru o varietate de medicamente inhibitoare ale acetilcolin-esterazei (ACE) precum captopril, enalapril, lisinopril, etc.

Alţi aminoacizi uşor disponibili, cum ar fi acidul L-glutamic, acidul L-aspartic şi L-treonina, s-au utilizat ca şi unităţi structurale pentru sinteza aztreonamului şi a antibioticelor carbapenemice precum thienamicina. Împreună cu compuşii mai sus amintiţi, în strategia rezervei chirale, ca şi materie primă pot fi folosiţi şi unii aminoacizi sintetici, fabricaţi la scară largă, terpene, alcaloizi etc.

7.4.3. Sinteza catalitică asimetrică

Sinteza catalitică asimetrică devine importantă pentru obţinerea materialelor enantiomeric pure. Sinteza asimetrică se poate face prin cataliza biologică, aşa cum sa menţionat în paragraful 7.4.1. În cele ce urmează se vor discuta cataliza chimică, cum este cataliza metalică heterogenă, complexe omogene şi acizii şi bazele chirale solubile.

S-au făcut studii mai vechi în acest domeniu al catalizei asimetrice heterogene având ca scop înţelegerea originii chiralităţii. Pentru aceasta s-au folosit ca substrat pentru cataliza metalică materiale solid chirale precum cuarţul, mătasea, celuloza etc. Procesul de sinteză al L-dopa elaborat de Knowles şi Sabacky la Monsanto în 1966–1968, a fost primul procedeu elaborat pentru producţia la scară industrială a unui medicament farmaceutic enantiomeric pur prin cataliză asimetrică. În 1971, Kagan şi Dang au descris un catalizator de hidrogenare asimetric ce conţine o difosfină chirală, derivată din acidul L-tartaric. În anii '80, Noyori şi colaboratorii a introdus aşanumita serie BINAP a liganzilor chirali derivaţi din gruparea binaftil chirală axială [Noyori , 2002].

Acum, hidrogenarea asimetrică catalitică pe baza metodelor mai sus amintite şi cele înrudite cu acestea reprezintă una din cele mai comune moduri de fabricare a medicamentelor chirale enantiomeric pure. Ca exemple amintim (S)-naproxen, catena laterală a vitaminei E, alcaloizi izochinolin precum morfina, benzomorfani şi morfinani precum antitusivul dextrometorfan, antibiotice carbapenemice, (R)-1,2-propandiolul intermediar al levofloxacin-ului, carnitina, statinele, fosfomicina, intermediari ai antraciclinelor, denopamina, fluoxetin, duloxetin, orfenadrin, neobenodin, prostaglandinele, β-blocantele, medicamentul antihelmintic (şi antiinflamator) levamisol, etc.

Metodele oxidative asimetrice, incluzând epoxidarea, hidroxilarea şi aminoxidarea reprezintă căi importante de obţinere a produselor farmaceutice enantiomeric pure la scară comercială [Sharpless , 2002]. Epoxidarea de precizie mai mică este folosită pentru fabricarea (R)- şi (S)-glicidol–ului, intermediari importanţi în sinteza β-blocantelor enantiomeric pure. Dihidroxilarea asimetrică este folosită în sinteza antagonistului canalelor de calciu *cis*-diltiazem.

Sulfoxidarea catalitică asimetrică poate căpăta importanţă în viitor datorită unei creşteri a cererii pe piaţă pentru inhibitorii chirali ai secreţiei acide

gastrice cu structură sulfoxidică, precum omeprazol, pantoprazol, rabeprazol, peprazol şi lansoprazol. Primul medicament enantiomeric pur al acestei clase, (S)-omeprazol –ul (esomeprazol), există deja pe piaţă. Acest medicament se obţine prin sulfoxidarea asimetrică catalitică, aşa cum este prezentată schematic în figura 7.4

În plus faţă de cele câteva tipuri de reacţii menţionate în acest subcapitol, pentru sinteza medicamentelor enantiomeric pure se pot aplica o mare varietate de transformări asimetrice catalitice, cum ar fi reacţii de hidrogenare a legăturii C=N, hidroxililare, izomerizare, hidroformilare, ciclopropanare, adiţie, hidrocianare, condensare etc.

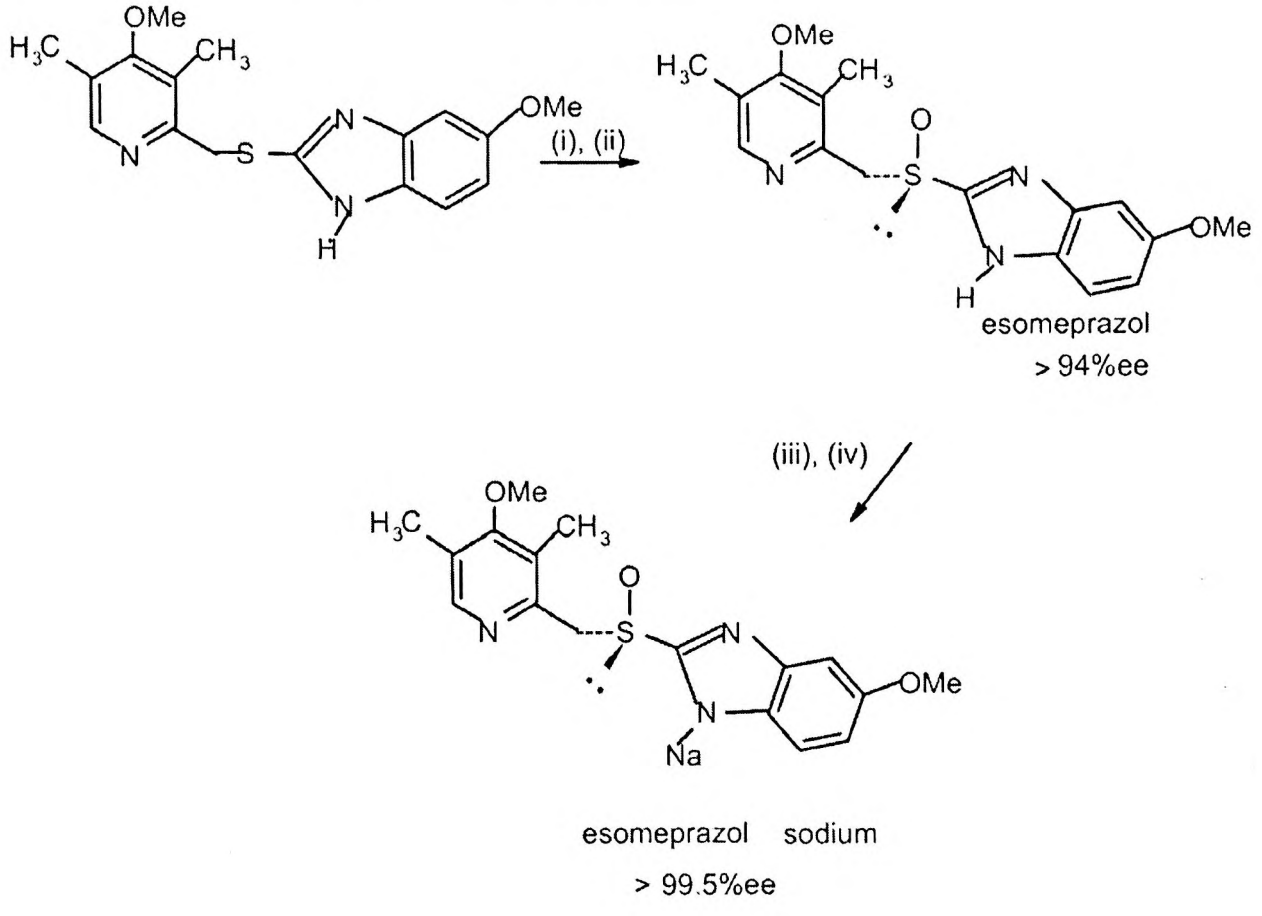


Fig. 7.4 Reprezentare schematică a obţinerii (S)-omeprazol-ului la scară industrială (după Cotton şi colab.,2002)

7.4.4. Tehnici de cromatografie

Aşa cum am mai precizat, metoda cromatografiei pe coloană în cea mai simplă formă a acesteia, tehnica discontinuă, a avut o contribuţie importantă la obţinerea unor cantităţi relativ mici de produse farmaceutice chirale enantiomeric pure [Blaschke şi colab., 2000]. Totuşi, datorită capacităţii mici de producţie, diluţiei mari a produselor obţinute şi a consumului crescut de solvenţi organici utilizaţi în producţie, această metodă s-a arătat a fi ineficientă

economic pentru producţia pe scară largă a medicamentelor enantiomeri. Dintre tehnicile cromatografice, cromatografia în straturi în mişcare simulată (SMB) este metoda principală pentru prepararea în cantităţi mici sau în producţia pe scară largă a medicamentelor enantiomeric pure. Această tehnică este discutată în detaliu în cele ce urmează. În plus, în secţiunea 7.4.4.2 sunt prezentate succint câteva aplicaţii noi ale GC-SMB cromatografiei în contra-curent şi enantioseparareа în cantităţi mici prin tehnici de electromigrare.

7.4.4.1. Cromatografia în straturi în mișcare simulată (SMB)

SMB este un proces cromatografic continuu care simulează o mişcare în contra-curent a fazei staţionare şi a fazei mobile. Funcţionarea continuă a sistemului este asigurată prin alimentarea solventului şi a amestecului componentei ce trebuie separată şi prin extracţia continuă a componentelor separate (fig. 7.5). Alimentarea cu solvent şi mixturii de enantiomeri precum şi extracţia fracţiilor separate este asigurată de patru pompe independente. O a cincea pompă este folosită pentru reciclarea în interiorul sistemului a circuitului de lichid principal. Această montare ne permite să economisim o cantitate importantă de diluant, deoarece este necesară adăugarea doar a unor cantităţi reduse din faza mobilă reînnoită pentru compensarea pierderii fazei mobile prin retragerea enantiomerilor dizolvaţi.

Un alt avantaj semnificativ al tehnologiei SMB este faptul că acesta este un proces continuu, în timp ce toate celelalte tehnici cromatografice sunt discontinue. Mişcarea în contracurent a fazelor mobile şi staţionare este simulată în următorul fel: faza staţionară este separată în câteva coloane cromatografice separate, care sunt conectate într-o serie ciclică. Fiecare intrare în coloană este echipată cu valve care permit completarea cu solvent şi alimentarea, precum şi extracţia produsului rafinat . Liniile de intrare şi ieşire vor fi schimbate după un interval de timp dat de la o coloană la următoarea coloană în direcţia fazei mobile, simulând astfel mişcarea fazei staţionare în direcţie opusă. După un ciclu complet, cele patru linii ajung în poziţia iniţială. Parametrii tehnologici de funcţionare a unui sistem SMB în condiţii optime poate fi calculat prin programe software disponibile bazate pe funcţii analitice.

În tabelul 7.1 sunt prezentate sumar câteva exemple de enantioseparare a medicamentelor chirale prin tehnica SMB. Per ansamblu, cromatografia SMB reprezintă un mijloc de mare capacitate pentru producţia compuşilor enantiomeric puri la scară industrială, cu o dezvoltare într-un interval de timp scurt.

Disponibilitatea programelor software ce permit determinările corespunzătoare pentru enantioseparareа analitică prin tehnologia SMB este un avantaj esenţial.

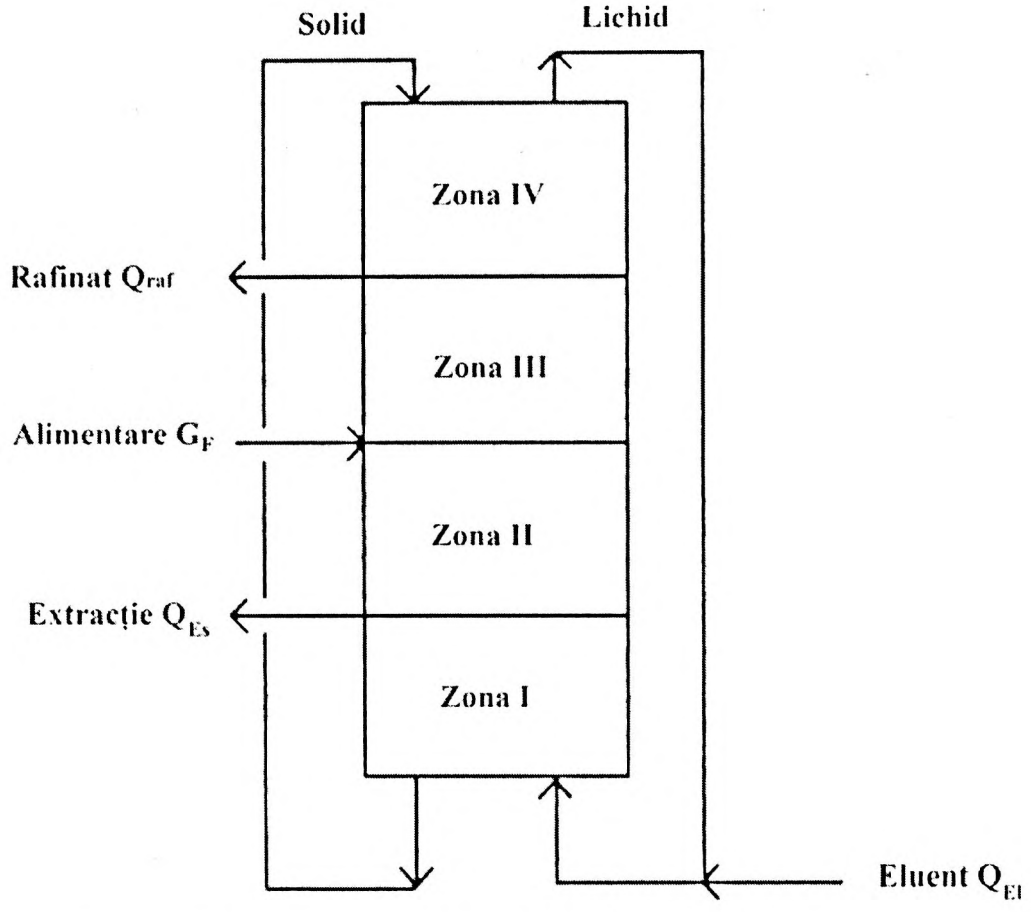


Fig. 7.5 Reprezentare schematică a unei unităţi SMB.[după Francotte , Richert ,1997]

Caracteristicile cromatografiei SMB, respectiv asigurarea unor produşi (ambii enantiomeri) puri într-o manieră predictibilă şi reducerea pierderilor, reduce timpul necesar elaborării, indicând premizele unei tehnici promiţătoare. Aplicabilitatea tehnologiei SBM unei mari varietăţi de compuşi poate favoriza transformarea cromatografiei dintr-o metodă de ultimă instanţă într-o metodă de elecţie pentru desfăşurarea într-o manieră rapidă şi predictibilă a procesului.

SMB permite o scădere drastică a costurilor enantioseparării, în principal datorită reducerii volumelor fazei staţionare chirale (CSP) (cu 50-60% mai mică decât în cazul HPLC) şi a consumului de dizolvant (cu până la 10 ori faţă de procedeul cromatografic discontinu).

Permite cote de producţie de 10-100 tone pe an, cu costuri de separaţie de 30 dolari/kg enantiomer pur. Combinarea SMB cu tehnicile de racemizare sau cristalizare enantioselectivă este şi mai promiţătoare. Câteva companii farmaceutice sau de chimie uşoară şi-au instalat unităţi SMB de capacităţi diferite. Printre primele a fost UCB Pharm (Belgia), care în 1997 a adoptat o unitate SMB la scară-largă pentru producţia de medicament enantiomeric pur de ordinul tonelor. Cea mai mare unitate SMB este instalată de Aeroject Fine Chemicals (Rancho Cordova, CA) cu o capacitate de 50 tone de enantiomer pe an.

Tabelul 7.1 Exemple selectate ale aplicaţiilor cromatografiei SMB în producţia compuşilor enantiomeric puri. [după Chankvetadze , 2001])

Compus chiral	CSP	Capacitate	Consum al fazei mobile (l/g)
Aminoglutethimid	Chiralcel OJ	7,5 g/h·kg CSP	0,740 ml
1,1'-Binaphthyl-2,20-diol	Pirkle-type 3,5-DNBPG	2000 g separate pe zi	
Medicament chiral candidat (agonist parţial potent al receptorilor muscarinici)	Chiralpak AD	~30–60 g/h·kg	~0,190–0,380 ml
CGS 26 214	Chiralcel OJ	47 g/zi·kg	4,561
Cycloalkanon	Chiralcel OC	1082 g/zi·kg	0,280
DOLE	Chiralcel OF	272 g/zi·kg	0,440
EMD 53 986	poliacrilamida	319 g/zi·kg	2,540
EMD 53 986	Chiralpak AD	432 g/zi·kg	2,600
EMD 77 697	Chiralcel OD	451 g/zi·kg	1,640
EMD 122 347	Chiralpak AD	311 g/zi·kg	0.590
Formoterol	Chiralcel OJ	1,2 g/h·kg	0,515
Hetrazepina	triacetat de celuloză (CTA)	119 g/h·kg	0,094
Guaifenezina	Chiralcel OD	10,0 g/h·kg	0,380
Oxo-oxazolidina	L-Chiraspher	6,8 g/h·kg	0,900
Feniletilalcool	Chiralcel OD	0,98 g/l	5,300
Praziquantel	CTA	4,7 g/h·kg	0,056
Propranolol	Chiralcel OD	3,3 g/h·kg	0,200
Sandoz-epoxide	CTA	59 g/zi·kg	0,800
Sandoz-epoxide	Chiralcel OD	37 g/zi·kg	0,500
1a,2,7,7a-Tetrahidro-3-methoxi-napht(2,3–6) oxirane	CTA	1,45 g/h·kg	0,400
Threonina	Chirosolve L-prolina	Au fost separate 30 g	
Tramadol	Chiralpak AD	50 g/h·kg	0,500

Alături de companiile mai-sus menţionate, Bayer (Leverkusen, Germany), Universal Pharma Technologies (Lexington, MA), Daicel (Himeji, Japan) şi alte câteva companii posedă unităţi SMB de capacităţi diferite. Recent, compania daneză H. Lundbeck a pus în funcţiune o unitate SMB cu o capacitate anuală de zeci de tone. Unitatea va fi folosită în producţia celui mai bine vândut medicament al companiei, S-enantiomerul andidepresivului citalopram, care s-a pus în vânzare în locul formei racemice a citalopram începând din 2002.

Aşa cum am precizat mai sus în privinţa procesului SMB, liniile sunt schimbate sincron. În consecinţă, numărul de coloane din fiecare zonă rămâne

acelaşi în fiecare moment, indiferent de locaţia liniilor de intrare/ieşire. Recent a fost propus un analog asincron al SMB, denumit VARICOL [Ludemann-Hombourger şi colab., 2000]. Prin numeroase calcule şi experimente s-a arătat că această tehnică oferă avantaje certe faţă de tehnologia SMB. Calculele numerice au indicat că un sistem VARICOL cu cinci coloane permite aceeaşi puritate a produsului ce poate fi atinsă cu SMB cu aceeaşi productivitate. La acelaşi număr de coloane şi aceeaşi puritate, productivitatea VARICOL este cu 18,5% mai mare.

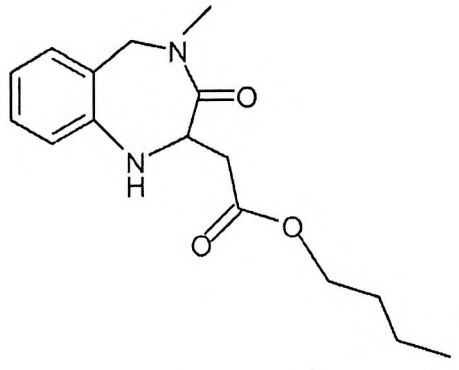


Fig. 7.6 Structura SB-553261 (după Ludemann-Hombourger şi colab.,2000)

Numărul coloanelor din aceeaşi zonă poate varia la sistemul VARICOL. Astfel unitatea VARICOL este mai complexă decât SMB, oferind o serie de avantaje: dacă este proiectat adecvat, fluxul de alimentare nu contaminează cursul de extracţie sau rafinat, în zonele II, respectiv III numărul de coloane fiind temporar zero. Când numărul de coloane din zonele I şi IV este egal cu zero fluxul de eluent nu va face o diluţie suplimentară nedorită a componentei extrase sau rafinate.

Tabelul 7.2 Comparaţie între procesele SMB şi VARICOL
(după Ludemann- Hombourger şi colab.,2002)

	Productivitate (kgprod/kgCSP/zi)	*Consum eluent (m3 eluent/kgprod)*
SMB şase coloane (1/2/2/1)	0,604	0,922
VARICOL şase coloane ({1}/{2.25}/{2}/{0.75})	0,664	0,888
VARICOL cinci coloane ({0.95}/{1.85}/{1.5}/{0.7})	0,725	1,050
VARICOL patru coloane ({0.85}/{1.5}/{1.15}/{0.5})	0,906	1,392

Enantiomerii produsului SB-553261 de cercetare a GlaxoSmithKline (fig. 7.6) au fost separaţi prin procesul VARICOL în amiloză tris (3,5-dimetilfenilcarbamat) (Chiralpak AD). Separarea SMB s-a putut realiza cu şase coloane, iar prin VARICOL cu şase, cinci sau patru coloane. Rezultatele

comparative din tabelul 7.2 indică faptul că pentru un sistem de şase coloane (aceeaşi cantitate de CSP), VARICOL se comportă mai bine decât SB în materie de specificitate care este crescută şi de reducere a consumului de eluent. Prin precizia distribuţiei coloanelor în zone de lucru, VARICOL face posibilă reducerea numărului de coloane din sistem. Totuşi acest lucru se face cu preţul unui consum mai mare de eluent.

7.4.4.2. Alte tehnici cromatografice şi electroforetice pentru prepararea enantiomerilor

Cromatografia pe coloană de presiune joasă, cromatografia cu reciclare în circuit închis şi tehnicile de peak-shaving nu sunt discutate aici, nefiind utilizate frecvent datorită capacităţii reduse, consumului crescut de eluent şi costurilor ridicate. Mai jos sunt discutate pe scurt cromatografia contra-curent (CCC) şi enantioseparareа electroforetică de capacitate mică.

Relatând sumar situaţia în privinţa enantioseparării în CCC şi cromatografiei prin partiţie centrifugă (centrifugal partition chromatography) (CPC), unul din experţii în domeniu nota recent faptul că „un număr total de 18 publicaţii în 18 ani constituie un rezultat modest faţă de literatura destinată celorlalte tehnici de separare chirală". Autorul, menţionând potenţialul CCC şi al CPC ca tehnici de preparare importante datorită capacităţii mari, al costurilor reduse ale fazei staţionare (amestecul solvent) şi consumul redus de solvent (de 10 ori mai mic decât în cazul HPLC), accentuează eficienţa mai degrabă scăzută ca principala problemă a enantioseparării prin aceste tehnici. În plus, recent a fost publicată o aplicaţie promiţătoare a derivaţilor alcaloizi de cinchona ca şi selectori chirali în CCC [Franco şi colab., 2002].

Câteva rapoarte asupra enantioseparării medicamentelor chirale în cantităţi mari prin GC sau GC-SMB indică faptul că aceste tehnici pot fi utile pentru anumite aplicaţii speciale. Primul studiu destinat explorării potenţialului clasicii electroforeze în plăci de gel pentru enantioseparareа în cantităţi reduse a fost publicat în 1998 de către Stalcup şi colaboratorii. Folosind exemplul agonistului β-2 adrenergic cu durată scurtă de acţiune terbutalina, s-a arătat că electroforeza în gel este într-adevăr o metodă viabilă de separare a compuşilor chirali în cantităţi de ordinul miligramelor. În acelaşi an grupul Thormann şi Stalcup şi colaboratorii au arătat faptul că dispozitive pentru electroforeza în mediu liber disponibile pentru comerţ, precum RF3 şi MiniPhor de la Protein Technologies (Tucson, AZ) şi Mini Prep Cell de la Bio-Rad (Hercules, CA) pot fi utilizate pentru prepararea cantităţilor de ordinal miligramelor de enantiomeri. Fracţiile R-(–)- şi S-(+)- metadonei colectate într-un studiu au fost îmbogăţite semnificativ la extremităţile anterioară şi posterioară, dar a fost imposibil să se obţină fracţii enantiomeric pure.

Analiza CE a fracţiilor piperoxanului colectat în cantitate de 0,5mg într-un interval de migrare de 9-10 ore a arătat că fracţiile au fost aproape pure enantiomeric. Glukhovsky şi Vigh (1997) au descris enantioseparareа în cantităţi

mici a DNS-Phe pe principiul focalizării izoelectrice şi folosind unitatea electroforetică de migrare în mediu liber Octopus, disponibilă comercial.

Alături de electroforeza în plăci de gel şi electroforeza în mediu liber, şi electroforeza capilară poate fi utilizată pentru separarea enantiomerilor în cantităţi mici. Bazându-se pe calcule teoretice, Kaniansky şi colaboratorii (1999) au demonstrat că deobicei capacitatea probei poate fi de câteva ori mai mare când se execută o separare izotacoforetică în comparaţie cu electroforeza capilară zonală (CZE). În continuare, în sistemul experimental cu utilizarea unei combinaţii de 0,1mm I.D. şi 0,8mm I.D. capilare copolimer etilenă-propilenă fluorinate, au fost separate cantităţi de micrograme de 2,4-dinitrofenil-DL-norleucină cu puritate enantiomerică mare şi o recuperare de aproximativ 75% în 20 minute.

Chankvetadze şi colaboratorii (2001), lucrând la creşterea selectivităţii separării în electroforeza capilară bazată pe principiul contracurentului, a arătat că enantioseparareа continuă în cantităţi mici poate fi efectuată în format capilar prin folosirea contrapresiunii, presiunea hidrodinamică, curgerea electro-osmotică (EOF) sau proprietatea de „carrier" a unui selector chiral în contracararea mobilităţii împotriva mobilităţii electroforetice efective a enantiomerilor analizaţi. Aşa cum s-a arătat experimental în studiul lor, contrapresiunea poate fi ajustată de aşa manieră încât cei doi enantiomeri vor migra către electrozi opuşi sau doar un enantiomer va migra din recipientul de intrare către recipientul de ieşire. Glukhovsky şi Vigh (1997) au aplicat principiul migrării contra-curent pe baza proprietăţii de „carrier" a unui singur izomer al heptacis-(6-sulfato)-β-ciclodextrinei în combinaţie cu mai sus amintita unitate electroforetică Octopus şi au raportat enantioseparareа terbutalinei cu productivitate de 0,1mg/h (pentru fiecare enantiomer) şi o puritate enantiomerică de 99,99%. Schneiderman şi colaboratorii (2002) au raportat enantioseparareа electroforetică în cantităţi mici a medicamentului chiral Ritalina.

7.5. Bioanaliza medicamentelor chirale

Metodele de separare (GC, HPLC, SFC, CE şi CEC) reprezintă mijloace importante pentru bioanaliza enantioselectivă. Aceste tehnici sunt larg acceptate în laboratoarele universitare şi industriale şi îşi regăsesc locul în farmacopeele naţionale şi internaţionale, înlocuind tehnica tradiţională polarimetrică. Toate tehnicile mai-sus menţionate oferă avantaje ce ţin de acurateţea înaltă, pierderile reduse de probe şi sensibilitatea ridicată (limită de detecţie scăzută). Acoperirea substanţelor de analizat, flexibilitatea, robusteţea, desfăşurarea metodei şi necesarul aplicaţiei, costurile şi aspectele ce ţin de mediu sunt variabile de la metodă la metodă, iar alegerea metodei trebuie făcută

pe baza problematicii specifice. Totuşi există unele direcţii generale în aplicarea fiecărei metode, care sunt discutate în detaliu mai jos.

7.5.1. Cromatografia gazoasă (GC)

Dacă nu luăm în considerare puţinele studii de început asupra cromatografiei plane şi pe coloană, GC reprezintă prima tehnică instrumentară care a făcut fezabilă enantioseparareа. Eficienţa crescută în GC permite o enantioseparare chiar şi atunci când factorul de enantioseparare este scăzut (în jur de 1,1). GC a fost folosit relativ pe scară largă pentru analiza enantioselectivă a multor substanţe de importanţă biomedicală şi a unor medicamente în anii '70 şi la începutul anilor '80. GC chirală este utilă în special pentru gaze chirale pentru care este imposibilă analiza prin tehnici în fază lichidă. De exemplu, în figura 7.7 este prezentată enantioseparareа simultană a anestezicelor inhalatorii chirale desfluran, izofluran şi enfluran. Deşi enantioseparareа s-a realizat într-un timp scurt (sub 2,5min), autorii au putut scurta şi mai mult timpul de analiză a enfluranului, sub 10sec (fig. 7.8).

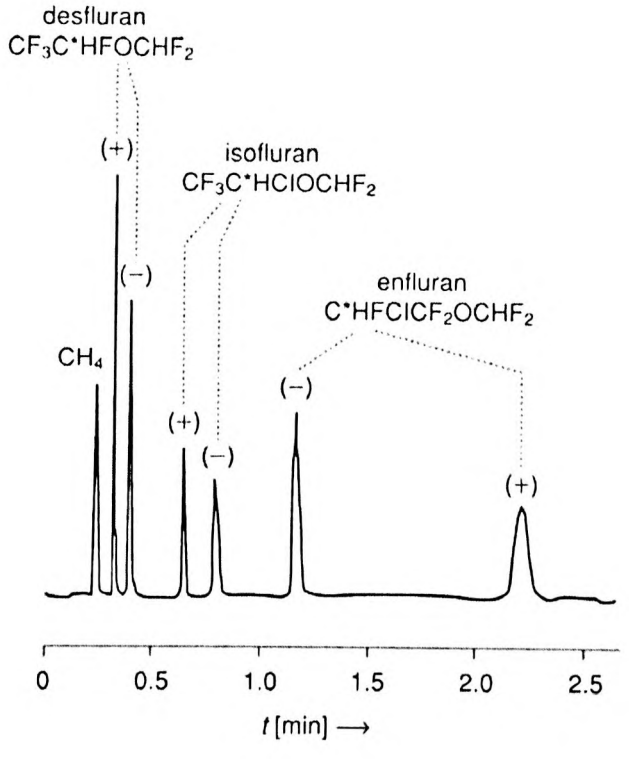


Fig. 7.7. Enantioseparareа simultană în GC a anestezicelor inhalatorii chorale
(după Schurig şi colab. 1995)

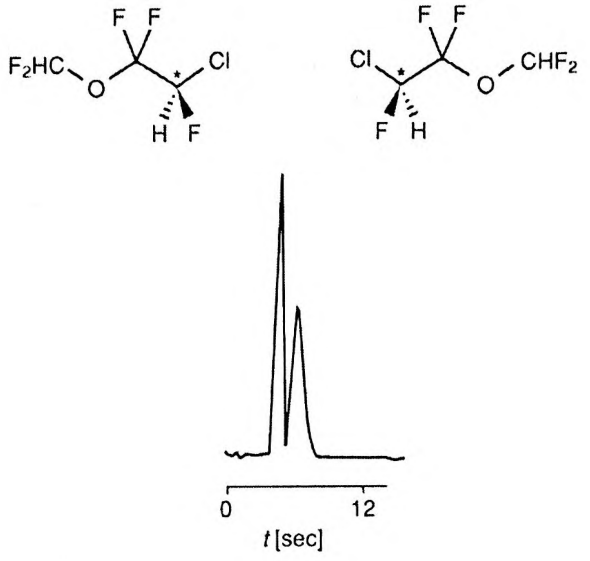


Fig. 7.8 Enantioseparareа enfluranului cu un timp de analiză foarte scurt
(după Schurig şi colab. 1995)

Astfel de enantioseparări ultrarapide sunt, dacă nu cumva imposibile, cel puţin foarte greu de realizat în HPLC. Timpii de analiză foarte scurţi pot fi avantajoşi când sunt monitorizate procese farmacocinetice rapide sau relaţii farmacocineticfarmacodinamice în organismele vii.

Determinarea cantitativă a anesteziculuі inhalator izofluran în probele de sânge în timpul şi după intervenţia chirurgicală s-a putut realiza prin GC enantioselectivă head-space (constituenţii gazoşi ai unui spaţiu închis deasupra unui lichid sau solid ce emite vapori) / spectrometria de masă (MS).

O tendinţă relativ recentă în domeniul GC enantioselective o constituie studiul de enantiomerizare prin cromatografia dinamică în gaz (DGC) sau cromatografia în gaz cu flux oprit (sfGC). Acest subiect este important deoarece multe reglementări cer ca „protocolul de stabilitate pentru substanţele sau produsele medicamentoase enantiomerice ar trebui să includă o metodă capabilă să aprecieze integritatea stereochimică a produsului sau substanţei medicamentoase".

În tabelul 7.3 sunt prezentate rezultatele determinării barierei de enantiomerizare a medicamentului chiral thalidomida. Alte exemple de acest fel sunt diazepinele chirale. Ambele tehnici mai sus amintite, DGC şi sfGC, necesită probe doar de câteva minute. În plus, în sfGC posibilul efect catalitic datorat prezenţei unei CSP(faze staţionare chirale) poate fi preîntâmpinat prin izolarea coloanei de separare de coloana rector. Doar câteva substanţe medicamentoase sunt compuşi gazoşi şi volatili. Metodele de obţinere a compuşilor derivaţi sunt disponibile pentru unele substanţe de analizat care nu aparţin acestui grup. Oricum, acestea presupun costuri suplimentare, cu creşterea timpului de procesare, ele pot să nu respecte întotdeauna cantităţile implicate în proces şi pot afecta raportul enantiomeric din proba iniţială.

Din aceste motive GC acoperă doar un spectru redus în bioanaliza medicamentelor chirale în prezent, în timp ce tehnicile în fază lichidă precum HPLC şi CE predomină.

Tabelul 7.3 Comparaţie a barierelor de enantiomerizare a thalidomidei obţinută prin cromatografie dinamică şi simulare pe computer cu ChromWin şi prin sfGC
(după Trapp şi colab.2002)

T (°C)	*$\Delta G^{\neq}$(DGC) (kJ/mol)*	*$\Delta G^{\neq}$(sfGC) (kJ/mol)*
200	154±2	150±3
210	157±2	154±3
220	159±2	155±3

7.5.2. Cromatografia în lichid de înaltă performanţă (HPLC)

HPLC reprezintă acum cea mai importantă tehnică de bioanaliză enantioselectivă în laboratoarele industriale. Ca avantaje, această tehnică este adecvată compuşilor nonvolatili şi termolabili, arată disponibilitate pentru serii mari de CSP şi coloane chirale, şi o bună compatibilitate cu probele biologice. În plus este disponibilă pentru o mare varietate de detectori sensibili şi precişi. Atât HPLC normală cât şi cea în fază-inversă pot fi aplicate în bioanaliză. Totuşi cea de-a doua tehnică pare a fi mai avantajoasă datorită prelucrării mai simple a probelor. Probele biologice pot fi injectate direct în coloana de fază-inversă, după precipitarea proteinelor. Dacă sunt necesare, sunt posibile şi extracţia de fază solidă (SPE) şi preconcentrarea probelor. În cazul separării în fază normală, probele biologice trebuiesc extrase în solvenţi organici înainte de a fi injectate în coloana de separare. Acest lucru pare a fi laborios, necesită timp şi este costisitor. În plus mai pot să apară probleme din punct de vedere al recuperării probelor din matricea biologică. Aproape toate tipurile principale de CSP, utilizate iniţial doar în metoda separării în fază normală pot fi adaptate şi pentru aplicaţii în fază-inversă. Împreună cu metodele de separare mai sus amintite, aşa-numita metodă polar-organică a devenit din ce în ce mai populară în ultimul deceniu. Ea presupune folosirea unui singur solvent organic polar (de obicei metanol, etanol 2-propanol sau acetonitril) sau amestecuri ca şi faze mobile. Avantajele metodei ar fi creşterea numărului de CSP adecvate, în unele cazuri selectivităţi unice, care nu sunt întâlnite nici în cazul fazei normale, nici cu eluenţi apoşi-organici, factori de separare foarte mari observaţi pentru substanţe de analizat selecţionate şi compatibilitate bună cu tipuri variate de detectori, în special cu spectrometrele de masă. De asemenea, alcoolurile cu masă moleculară mică (ca şi fază mobilă), sunt mai puţin poluante decât acetonitrilul sau agenţii dizolvanţi clorinaţi.

Coloana chirală este cea mai importantă componentă a sistemului de enantioseparare HPLC . Numărul de CSP descrise în literatura din domeniu se

apropie de 200. Pe de o parte, aceasta ilustrează marea capacitate a tehnicii, dar pe de altă parte, face extrem de dificilă alegerea CSP optime. Nu există date teoretice care să permită alegerea coloanei pe baza structurii substanţei de analizat. Totuşi, apelând la bazele de date existente şi prin abordări statistice/chemometrice, se poate anticipa destul de bine un sistem de separare.

Dintre CSP (faze staţionare chirale) care sunt disponibile în comerţ în mod curent, CSP cel mai mult utilizate în bioanaliză includ materialele pe bază de polizaharide precum Chiralcel OD, Chiralpak AD, Chiralcel OJ and Chiralpak AS. CSP pe bază de antibiotice macrociclice precum vancomicina şi teicoplanina şi coloana chirală tip Pirke modificată Welk-1 sunt de asemenea bine studiate pentru studii bioanalitice.

CSP pe bază de polizaharide au fost elaborate pentru aplicaţii în fază normală. Totuşi, aşa cum arată studii recente, aceste materiale sunt foarte versatile şi sunt folositoare şi în aplicaţii în fază-inversă.

Hage (2001) a prezentat câteva exemple ale aplicaţilor CSP pe bază de ciclodextrină pentru bioanaliza enantioselectivă. În schimb, aplicaţiile materiallelor pe bază de proteine sunt în scădere. Totuşi, cele mai noi dintre CSP par a fi foarte utile în studierea aspectelor stereoselective ale interacţiunilor proteină – medicament.

Alături de cele prezentate mai sus, CSP pe bază de cinchona recent comercializată pare a fi de real interes pentru studii bioanalitice de enantioselectivitate.

Cea mai recentă direcţie din domeniul materialelor pe bază de polizaharide o reprezintă imobilizarea covalentă a acestora cu scopul de a lărgi sfera de aplicabilitate a fazelor mobile către aplicaţii la scară analitică (cantităţi mici) şi preparativă (cantităţi mari). Miniaturizarea a devenit o tendinţă majoră în HPLC în ultimii ani şi este intens promovată prin cele mai recente progrese în domeniile proteomicii, genomicii, metabonomicii, sintezei combinative şi a tehnologiilor cu circuite integrate (cip-uri). Această tendinţă nu este încă suficient de puternică în HPLC chirală. Doar câteva grupuri ce lucrează în domeniul CEC chirale fac cercetări şi în LC capilară. Această direcţie de dezvoltare ar merita mai multă atenţie deoarece, cele mai recente progrese din domeniul cercetării proteomicii şi sintezei combinative vor pune în discuţie aceleaşi necesităţi vizând rapiditatea, economia, eficienţa, înalta sensibilitate şi poluarea redusă a mediului pentru separarea chirală, deoarece multe dintre substanţele candidate pentru a deveni medicamente sintetizate prin procedee combinative, ca şi compuşii de origine biologică, sunt chirale. Metodele de separare capilare combinate cu interfeţe nanospray par a fi mai sensibile decât cele cu coloane de dimensiuni obişnuite.

Tendinţele actuale ale bioanalizei enantioselective cuprind combinaţii ale HPLC şi MS, detectori fluorescenţi laser ultra-sensibili şi polimeri imprimaţi molecular pentru prepararea/preconcentrarea probei prin intermediul computerului.

7.5.3 Electroforeza capilară (CE)

CE reprezintă o tehnică eficace de enantioseparare analitică. Aplicaţiile acestei tehnici sunt prezentate în review-uri recente [Scriba, 2002; Amini, 2001]. În acest capitol se fac referiri la caracteristicile CE şi tehnicilor de enantioseparare cromatografice folosind ca exemple câteva aplicaţii recente ale CE chirale în analiza biomedicală şi farmaceutică. Se vor discuta criterii cum ar fi oportunitatea probelor de interes, rata de succes (puterea de separare, sensibilitatea), fiabilitatea rezultatelor (acurateţea, reproductibilitatea), uşurinţa în a învăţa şi a folosi tehnica, viteza (de învăţare a tehnicii şi de desfăşurare a metodei), poluarea mediului (materiale periculoase utilizate şi gradul lor de periculozitate), costurile (echipamente, consumabile necesare cum ar fi selectori chirali, medii tampon, accesorii etc.) şi acceptarea în mediul universitar şi în cel industrial. CE chirală pate fi folosită în stadiile timpurii ale conceperii şi perfecţionării unui medicament (sinteza unui candidat pentru un viitor medicament chiral), în procesul de producţie al unui medicament chiral, studii de formulare, studii de fază preclinică şi clinică, precum şi depozitarea şi utilizarea medicamentului.

În fazele precoce ale sintezei unui medicament enantiomerii sunt detectaţi ca şi compuşi chirali puri sau ca mixturi, împreună cu alţi intermediari sintetici şi produşi secundari. Pentru acest gen de substanţe de analizat, CE asigură avantaje faţă de GC (cu excepţia celor câteva anestezice gazoase mai sus amintite) şi este cel puţin la fel de adecvată ca şi HPLC. Cerinţe precum eficienţa crescută a separării, selectivitatea crescută, automatizarea, etc. sunt chiar mai bine îndeplinite prin CE decât prin HPLC.

Formele de prezentare ale medicamentelor solide (dar şi a unor lichide) conţin în mod obişnuit o matrice (derivaţi celulozici, amidon, oligozaharide cu greutate moleculară mică etc.) care pot să creeze anumite probleme datorită adsorbţiei acestora la nivelul peretelui intern capilar şi să afecteze EOF. Compuşii cu greutate moleculară mare pot da probleme şi în cazul HPLC (contaminarea coloanei, adsorbţia ireversibilă a fazei staţionare, precipitarea pe filtru etc.). O posibilă soluţie pentru aceste probleme în CE ar putea fi pre-acoperirea peretelui capilar. Ca soluţie alternativă, ingredientele matricei pot fi îndepărtate de pe probă prin diverse metode de pre-tratare ale probei (filtrare prin membrane, extracţie lichid-lichid etc.).

În studii de fază preclinică şi clinică o substanţă candidată pentru a devein medicament, posibilii săi metaboliţi (faza I şi faza II) trebuie determinaţi în medii biologice precum plasmă, ser, urină, salivă LCR şi omogenate tisulare. Majoritatea acestor probe sunt mai compatibile cu CE decât cu tehnicile cromatografice. Constituenţii plasmatici cu greutate moleculară mare pot fi sursa unor probleme asemănătoare polizaharidelor mai sus menţionate datorită adsorbţiei acestora pe peretele capilar intern. Medicamentul sursă poate avea structură polară sau poate suferi transformări metabolice către compuşi cu astfel de structură. Acestea pot avea loc în special pentru metaboliţi de fază II precum

glucuronoconjugaţi, sulfaţi, mercapturaţi etc. CE este tehnica de elecţie pentru analiza compuşilor ce pun astfel de probleme.

Desigur, este foarte dificil ca prin GC şi HPLC să se poată realize enantioseparareа unui medicament chiral sau a metaboliţilor săi de ordinul I sau II din prima etapă de separare. Totuşi, acest lucru este posibil prin CE chirală. Figura 7.9 prezintă ca exemplu enantioseparareа simultană a metaboliţilor de ordinul I şi II ai antihistaminicului chiral dimetindena. Astfel, aşa cum ilustrează acest exemplu, CE poate funcţiona mai bine pentru un medicament chiral şi metaboliţii săi ce au polarităţi diferite. Rata de succes a metodei este unul din cele mai importante criterii de selecţie a unei tehnici analitice. Aşa cum a fost menţionat în subcapitolul precedent, numărul de CSP pentru procedeele de enantioseparare descrise în literatură ating numărul de 200. Numărul de selectori CE chirali efectivi este mai scăzut. Deşi CE permite un screening al selectorilor chirali mult mai rapid şi mai eficient din punct de vedere al costurilor în comparaţie cu HPLC iar perfecţionarea metodei în cazul CE poate fi mult mai redusă ca durată în general şi doar în cazul a doi enantiomeri ratele de succes pentru cele două tehnici par a fi comparabile. Totuşi, superioritatea metodei CE faţă de HPLC devine evidentă în cazul în care este necesară separarea şi enantioseparareа simultană a amestecurilor ce conţin medicamentul chiral sursă, metaboliţii săi de ordinul I şi II, intermediarii sintetici şi/sau produşii de degradare. În Figura 7.9 este prezentat ca exemplu enantioseparareа simultană a metaboliţilor de ordinul I şi II ai antihistaminicului chiral dimetindena.

Un alt exemplu al unei enantioseparări mai complexe este prezentat în figura 7.10.

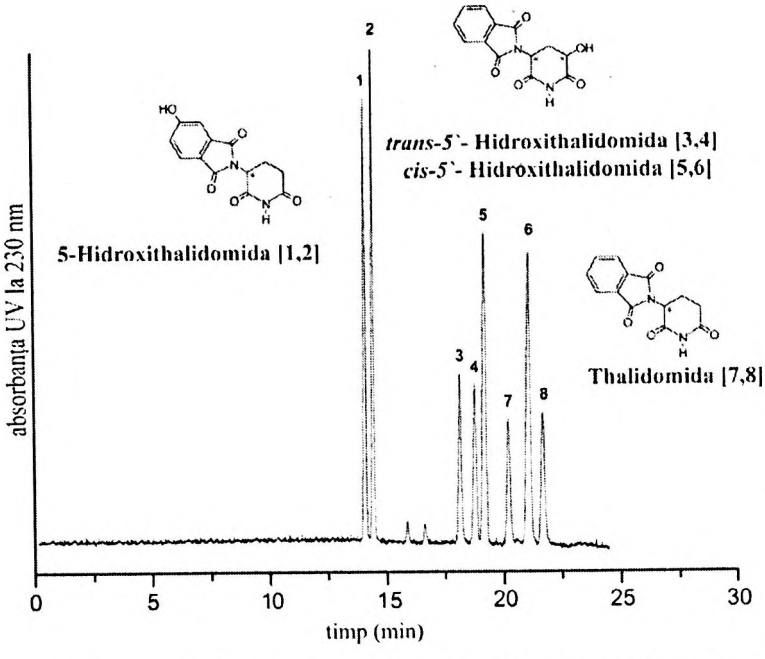


Fig. 7.9 Enantiseparare simultană prin CE a metaboliţilor de ordinul I şi II ai dimetindenei: 1,6-hidroxidimetindina; 2,6-hidroxi-N-demetildimetindina; 3,6-hidroxidimetindinglucoronid; 4,6-hidroxi-N-demetildimetindina-glucoronid (după Rudolf , Blaschke 1999)

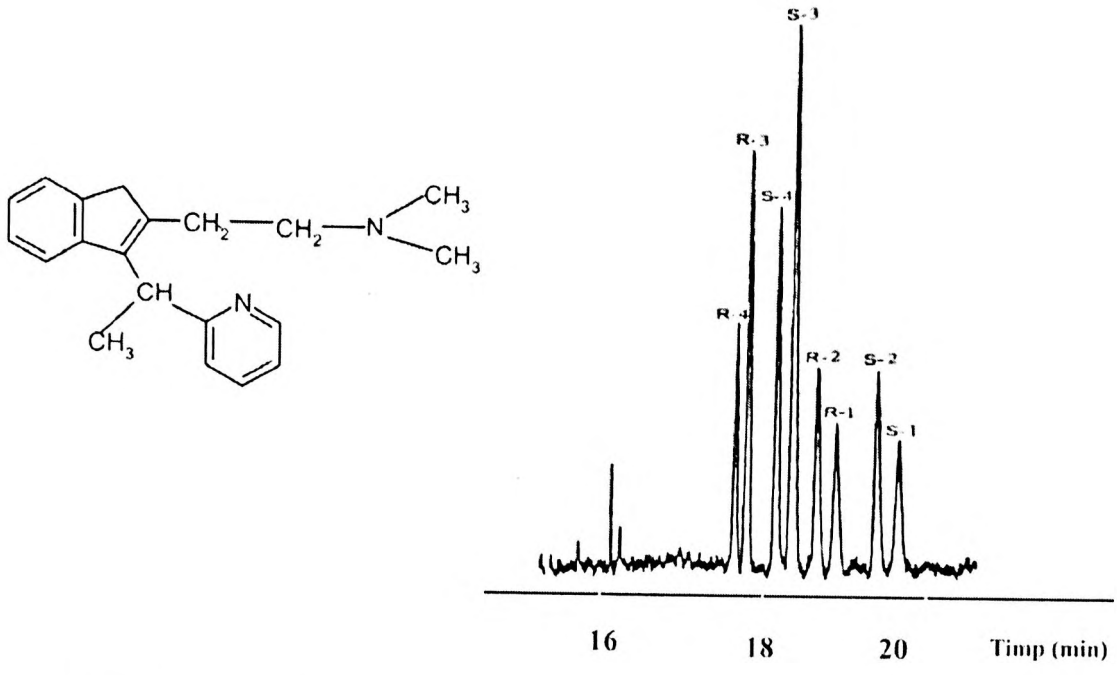


Fig. 7.10. Enantioseparareа simultană prin CE a thalidomidei şi a metaboliţilor ei de fază I (după Meyring şi colab.,1999)

Enantioseparareа thalidomidei prin HPLC, CE sau CEC nu constituie o problemă. Mai dificilă este mai degrabă enantioseparareа simultană a thalidomidei şi metaboliţilor importanţi ai acesteia ce au fost detectaţi recent în probe de plasmă şi ficat, incubate cu fracţiunea S9, ce conţin amestec racemic de thalidomidă, provenite de la voluntari de sex masculin cărora li s-a administrat per os thalidomidă racemică.

Thalidomida a fost retrasă în 1961 datorită potenţialului său teratogen. Totuşi, acest compus are efecte remarcabile împotriva leprei, inhibă HIV-1, inhibă eliberarea TNF-α etc. Recent, thalidomida a fost aprobată de către FDA pentru tratamentul erythema nodosum leprosum. Astfel, investigaţiile asupra mecanismelor teratogene ale acestui medicament sunt foarte importante. Metaboliţii thalidomidei par a fi agenţii potenţial teratogeni, aceştia formându-se stereoselectiv. Înseamnă că unii metaboliţi se formează în principal prin transformarea metabolică a (R)- iar ceilalţi a (S)-thalidomidei. Pentru a putea urmări fenomenul, este necesară o metodă pentru enantioseparareа simultană a thalidomidei şi a metaboliţilor acesteia. Toate încercările experimentale de separare şi enantioseparare a thalidomidei şi a celor trei metaboliţi importanţi ai acesteia într-o singură etapă de lucru folosind fie HPLC cu coloană chirală, fie CE cu un singur selector chiral în modul normal de polaritate, au eşuat. Totuşi, au putut fi toate separate într-o singură etapă folosind CE cu o combinaţie de doi selectori chirali (Fig. 7.10). În tehnicile cromatografice este posibilă şi o combinare a doi selectori chirali prin schimbarea coloanelor. Totuşi această tehnică este asociată cu câteva probleme tehnice (presiune retrogradă crescută, creşterea volumului mort, dispersia în exces a vârfurilor etc.). în plus, selectorii

chirali pot fi amestecaţi în CE în orice raport dorit (aspect limitat doar de solubilitate). Acest lucru este dificil şi consumă mult timp în HPLC şi GC.

Comparând selectorii chirali ce exprimă aceeaşi enantioselectivitate termodinamică de recunoaştere într-un experiment în condiţii ideale, devine clar faptul că rata de succes a unei enantioseparări este mult mai mare în CE decât în HPLC. Acest avantaj este explicat prin faptul că eficienţa de vârf este mult mai mare în CE iar factorul de solubilizare creşte proporţional la $N1/2$. În plus, interacţiunile selector – selectat pot fi enorm intensificate în CE prin creşterea concentraţiei selectorului chiral. Acest lucru poate fi limitat de către solubilitatea unui selector chiral, vâscozitatea mare a electrolitului de fond sau curentul crescut în cazul selectorilor chirali încărcaţi (ionic). Totuşi, suporturile de migrare sunt destul de cuprinzătoare pentru optimizarea separării. Astfel, puterea de separare a CE este în mod cert mai mare iar instrumentele disponibile pentru ajustarea unei separări chirale sunt mult mai numeroase decât în cazul tehnicilor cromatografice.

Reproductibilitatea timpilor de migrare şi a separării în întregime au fost motive de incertitudine în CE timp îndelungat. Totuşi, aşa cum indică cele mai recente progrese, acesta nu mai este un aspect critic. Pentru eliminarea intervenţiei peretelui capilar asupra motilităţii substanţei analizate, au apărut câteva tehnici eficiente, fie prin ajustarea motilităţii EOF, fie prin supresia acesteia. În plus, selectorii chirali utilizaţi în CE devin din ce în ce mai bine şi mai uniform caracterizaţi. Ambele tendinţe descrise facilitează evoluţia către buna reproductibilitate a metodelor CE chirale.

Sensibilitatea a fost considerată o problemă majoră în CE timp îndelungat şi „este improbabil ca CE chirală va fi folosită în bioanaliza medicamentelor deoarece enantiomerii trebuie determinaţi la niveluri foarte scăzute, adesea de ordinul ng/ml". Cele mai recente progrese din acest domeniu contrazic practic această idee, iar CE chirală este aplicată cu mare succes în domeniul bioanalizei. Există o serie de metode de preconcentrare a probelor precum (micro)extracţia capilară pe fază solidă, filtrarea/preconcentrarea pe membrană, „aşezarea" probei şi maturarea probei. În plus, trebuie să luăm în considerare şi o mare varietate de celule de detecţie cu un interval de detecţie optică extins. Comparând limita de detecţie (LOD) în CE şi HPLC, trebuie să luam în considerare că o zonă de probă eluează sub forma unui vârf mult mai ascuţit într-un interval de timp mult mai scurt şi este mult mai puţin diluată în CE decât în HPLC. Însă cel mai important argument în favoarea unui viitor promiţător al CE chirale în bioanaliza medicamentelor este faptul că această tehnică este compatibilă cu o metodă de detecţie atât de sensibilă, specifică şi universală precum MS.

Un alt aspect al sensibilităţii ce nu poate rămâne în afara scopului acestei discuţii este următorul. În majoritatea cazurilor este importantă detecţia impurităţii enantiomerului minor în prezenţa celui major. De aceea, se poate întâmpla ca limita de detecţie a impurităţii enantiomerului minor în prezenţa

celui major să devină un obiectiv mai important decât LOD de ansamblu. În acest caz, în final factorul de separare va deveni la fel de important pentru succesul metodei ca şi sensibilitatea de ansamblu a sistemului. Acest lucru se întâmplă deoarece metoda trebuie să permită o diferenţă suficientă între timpii de migrare a doi enantiomeri pentru a permite detecţia enantiomerului minor fără suprapunerea acestuia cu cel major. În acest caz poate fi foarte utilă şi ajustarea secvenţei de migrare a enantiomerilor. CE asigură avantaje evidente faţă de HPLC atât pentru optimizarea separării cât şi pentru proiectarea secvenţei de migrare a enantiomerilor.

Remarcabila simplitate a tehnicii CE este fascinantă. Nu sunt necesare pompe, valve şi nici celule de detecţie separate. Astfel, pe lângă simplificarea metodologiei experimentale, sunt eliminate sursele suplimentare de lărgire a peak-ului datorat injectării probei şi detecţiei. Un singur set de materiale poate fi folosit cu succes nu doar pentru efectuarea a diverselor moduri de separare CE (electroforeză capilară zonală, cromatografie capilară electrokinetică micelară, izotacoforeză capilară, focalizare capilară izoelectrică, electroforeză capilară în gel), dar şi separări prin HPLC şi CEC. CE este mai rapidă decât tehnicile cromatografice din punct de vedere al elaborării metodologiei. Schimbarea şi întreţinerea unei coloane în cromatografie necesită mult timp. În schimb, în CE, schimbarea unui capilar şi/sau unui selector chiral necesită doar câteva minute. CE necesită cantităţi mici de solvenţi, ca tehnică microanalitică, fiind nepoluantă şi ieftină. Cantităţile foarte mici de selectori chirali şi soluţii tampon atrag reduceri suplimentare ale costurilor. Este permisă astfel studierea proprietăţilor de recunoaştere chirală ale unor materiale scumpe sau/şi rare, disponibile doar în cantităţi mici. Capilarele din siliciu topit folosite în CE sunt relativ ieftine, ca şi majoritatea accesoriilor. Echipamentul de bază pentru CE de calitate medie nu costă mai mult decât instalaţia HPLC sau GC, însă costurile de utilizare pentru acestea din urmă depăşesc pe cele ale CE.

În prezent în laboratoarele universitare CE este acceptată. În industrie HPLC rămâne principala tehnică de separare chirală. Însă având în vedere experienţa din instituţiile academice, se pare că e foarte probabil ca în viitorul nu prea îndepărtat CE va deveni tehnica de elecţie pentru enantioseparareа analitică în industriile farmaceutică, chimică, alimentară, agrochimică, dar şi în laboratoarele clinice şi de bioanaliză.

7.5.4. Electrocromatografia capilară (CEC)

În subcapitolul 7.5.3 au fost evidenţiate câteva avantaje mai importante ale CE faţă de HPLC şi GC în enantioseparare. Avantajele mai sus amintite sunt datorate prezenţei unui selector chiral mobil în cazul CE, ca şi pentru mecanismul de separare electrokinetic, în comparaţie cu suportul staţionar în cazul tehnicii cromatografice. Pe de altă parte, selectorul chiral mobil nu este ideal deoarece: (1) trebuie să fie schimbat după fiecare analiză, ceea ce duce la un consum crescut de selector chiral şi dificultăţi de reproductibilitate de la

determinare la determinare pentru o separare dată şi (2) prezenţa unui selector chiral în capilarul de separaţie creează probleme semnificative în cuplarea CE cu un spectrometru de masă şi face practic imposibilă utilizarea detectorilor chiroptici în CE. Din acest motiv, la începutul anilor '90 a fost introdusă o tehnică hibridă între HPLC şi CE, denumită „CEC". De la această tehnică se aşteaptă să combine eficienţa înaltă caracteristică mijloacelor de separare potenţate electric cu selectivitatea de separare ridicată a CSP disponibile în HPLC. În plus, suportul staţionar ne permite evitarea problemelor mai sus amintite legate de aplicarea selectorului chiral mobil în CE. Evoluţia recentă a CEC chiral au fost prezentate sumar în câteva articole review-uri [Lämmerhofer şi colab., 2002]. Deşi CEC chiral a fost utilizat cu succes la enantioseparareа substanţelor de analizat cu diverse structuri, în literatură sunt publicate doar câteva aplicaţii pentru probleme ale analizei în domeniile farmaceutic, biomedical şi mediu înconjurător.

Doar o publicaţie prezintă o încercare nu prea reuşită de enantioseparare simultană a thalidomidei şi metaboliţilor hidroxilaţi de fază I ai acesteia [Meyring şi colab., 2000]. În acest studiu, CSP a fost un amestec destul de complex între doi derivaţi polizaharidici. În afară de acest exemplu, a fost publicată o încercare validată de CEC pentru enantiomerii β-blocantului metoprolol folosind CSP ce conţin vancomicină în modul polar-organic [Carlsson şi colab., 2000]. Altă lucrare descrie enantioseparareа antidepresivului venlafaxina şi a principalului său produs metabolic , folosind tot CSP pe bază de vancomicină.

Metoda a fost aplicată şi pe probe de plasmă a unor pacienţi sub tratament cu venlafaxină [Fanali şi colab., 2001]. Alături de aplicaţiile acesteia pe medicamente pure şi probe biologice, CEC poate fi aplicată şi pentru controlul purităţii enantiomerice al formelor de prezentare ale medicamentelor chirale, aşa cum s-a arătat în cazul contraceptivului Tigoa ce conţine levonorgestrel şi etinilestradiol ca şi ingredienţi activi.

Alte aplicaţii ale CEC legate de unele dificultăţi existente în domeniul farmaceutic şi biomedical vor apărea în viitorul apropiat. Această concluzie optimistă este susţinută de numeroasele aplicaţii ale acestei tehnici în separarea amestecurilor racemice standard ale enantiomerilor, de timpii de analiză scăzuţi descrişi deja în cazuri selecţionate şi de o mai bună înţelegere a mecanismelor subsidiare ale CEC (chirală).

7.6. Perspective

Analiza celor mai recente progrese în domeniul enantioseparării indică o continuă creştere a importanţei acordate dezvoltării de noi medicamente şi a eficienţei în utilizarea celor în uz. Tehnicile miniaturizate de analiză cum ar fi CE, LC capilară şi CEC care funcţionează cel puţin la fel de bine ca şi HPLC, vor deveni mai importante. Tehnicile miniaturizate sunt mai flexibile, mai ieftine şi mai puţin poluante. Pentru aplicaţii în domeniul producţiei medicamentelor chorale enantiomeric pure, cromatografia SMB şi variantele sale mai eficiente în anumite cazuri sunt aparent mai avantajoase decât cristalizarea diastereomerică, separarea enzimatică, rezerva chirală şi sinteza catalitică asimetrică. Totuşi, decizia finală trebuie luată de la caz la caz, ţinând cont de timp, etapele elaborării medicamentului, aspectele economice, nivelul producţiei etc.

CAPITOLUL 8

CROMATOGRAFIA DE AFINITATE: APLICAȚII ÎN BIOFARMACEUTICĂ

8.1. Introducere

Conform definiţiei IUPAC, termenul „cromatografie de afinitate" caracterizează varianta particulară de cromatografie în care pentru separare este utilizată specificitatea unică a interacţiunilor substanţa de analizat – ligand. Ligandul este imobilizat pe un suport solid iar substanţa de analizat (de cele mai multe ori o proteină) este adsorbită specific la trecerea pin coloană. Eluţia de pe suportul de afinitate se realizează într-o etapă separată în condiţii definite. În timp ce iniţial noţiunea descria interacţiuni biologice sau biospecifice cum ar fi legarea dintre o enzimă şi substratul acesteia sau anticorpului cu antigenul, termenul este acum folosit şi când sunt implicaţi liganzi non-biologici, ca de exemplu liganzi precum boraţi, complexe ionice metalice sau vopseluri sintetice.

Tehnica a fost utilizată încă din 1910 când Starkenstein a izolat α-amilaza prin adsorbţia pe amidon, însă conceptul modern şi termenul ca atare au fost introduse de Cuatrecasas şi colab., (1968). În acelaşi timp s-a dezvoltat tehnica activării polizaharidelor cu cianură de brom, fapt ce a permis cuplarea nucleofilelor la o matrice de afinitate. De atunci au devenit cunoscute multe alte tehnici de cuplare şi au fost comercializate multe suporturi activate şi matrice. S-a estimat că peste 60% din protocoalele de purificare a proteinelor publicate implică cromatografie de afinitate.Datorită specificităţii, moleculele ţintă pot fi izolate dintr-un amestec foarte complex de compuşi adesea foarte apropiaţi ca structură, cu un randament al purificării de sute până la câteva mii într-o singură etapă. În acelaşi timp se poate face şi concentrarea compusului de interes.

Aceste avantaje au determinat o largă răspândire a aplicaţiilor cromatografiei de afinitate în biochimie, farmaceutică, ca şi în chimia mediului sau cea clinică. De la doar două lucrări pe tema tehnicii, listate în *Chemical Abstracts* şi Medline în 1968 când se puneau bazele tehnicii, în 2001 la căutarea termenului „cromatografie de afinitate" bazele de date arată 1383 rezultate (Chemical Abstracts), respectiv 666 rezultate (Medline).

Pentru a enumera doar câteva, au fost recent publicate cărţi [Bailon şi colab., Affinity Chromatography, Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2000], capitole de cărţi precum şi o întreagă ediţie pe tema acestei tehnici. Acest capitol face o scurtă sinteză a principiilor şi a celor mai importante metode ale cromatografiei de afinitate, ţinând cont de utilizarea acestei tehnici în chimia medicală şi/sau purificarea proteinelor în farmaceutică, precum şi de aplicaţiile analitice.

8.2. Principiile cromatografiei de afinitate

Spre deosebire de „convenţionalele" faze staţionare care separă substanţele de analizat pe baza încărcării electrice sau a proprietăţilor hidrofobe / hidrofile, cromatografia de afinitate se bazează pe interacţiuni specifice a unei regiuni definite a unei biomolecule cu un ligand.

Biomolecule cum ar fi proteinele au caracteristici unice ale distribuţiei încărcării, a domeniilor hidrofobe şi a celor hidrofile, rezultate din resturile de aminoacizi expuşi la suprafaţa situsurilor active. Ligandul, ce poate fi o moleculă mică sau o altă macromoleculă, interacţionează în mod complementar cu situsurile respective de legare. Complexul este format printr-o combinaţie de interacţiuni de tip electrostatic, punţi de hidrogen, hidrofobe şi van der Waals. Cum, de multe ori doar forma activă a unei biomolecule îşi expune situsurile de legare corespunzătoare, tehnica poate fi folosită şi pentru separarea formei active de conformaţiile inactive. Exemple de perechi ligand – substanţă dizolvată utilizate în cromatografia de afinitate sunt prezentate în tabelul 8.1.

Tabelul 8.1. Exemple de complexe ligand – substanţă dizolvată utilizate în cromatografia de afinitate

Ligand	*Substanţe dizolvate reţinuţe*
Anticorpi	medicamente, hormoni, peptide, proteine, celule, virusuri
Substraturi, inhibitori, cofactori, coenzime	enzime, receptori, proteine carrier
Lectine	polizaharide, glicoproteine, glicolipide, receptori celulari de suprafaţă
Acizi nucleici	proteine de legare a acizilor nucleici, secvenţe complementare de baze
Proteina A, proteina G	imunoglobuline
Coloranţi triazinici	proteine şi enzime de legare a nucleotidelor
Chelatori metalici	peptide şi proteine ce conţin resturi histidinice, cisteinice şi/sau de triptofan, proteine de fuziune His
Boraţi	zaharuri, glicoproteine

Principiul cromatografiei de afinitate este schiţat în figura 8.1. Ligandul este imobilizat pe un suport solid plasat într-o coloană cromatografică.

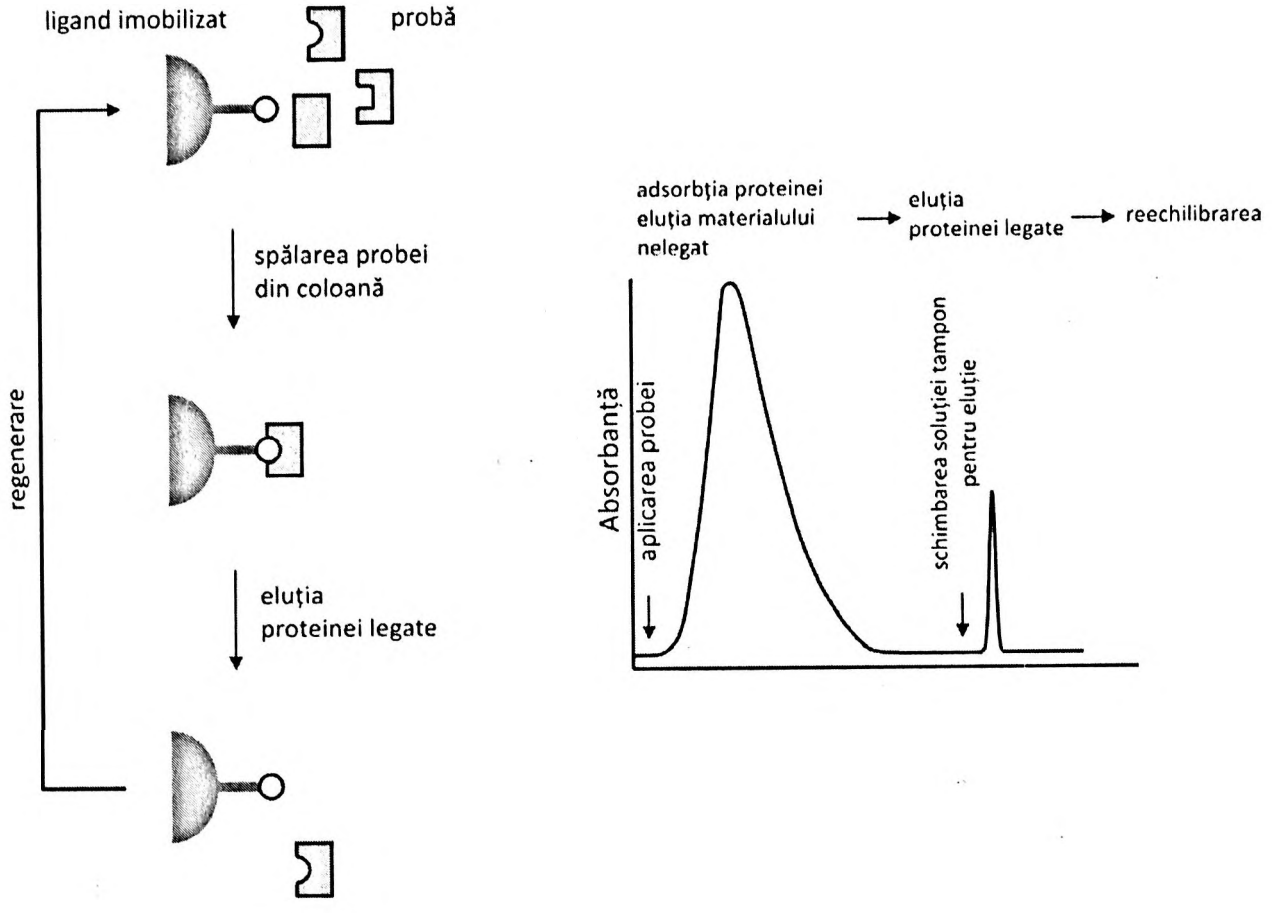


Fig. 8.1 Principiile cromatografiei de afinitate

La aplicarea probei, numai molecula capabilă de interacţiuni specifice cu ligandul este reţinută pe coloană în timp ce restul componentelor sunt dizolvate împreună cu fracţiunile ce sunt îndepărtate. Dizolvarea moleculei legate se realizează prin întreruperea interacţiunilor ligand–substanţă dizolvată consecutivă unei modificări a diluantului, cum ar fi creşterea încărcării ionice a substanţei tampon sau adăugarea de ligand la faza mobilă. Coloana de afinitate poate fi reutilizată după o regenerare corespunzătoare.

Retenţia sau eluţia unui compus pe o coloană de afinitate depind de intensitatea interacţiunilor ligand–subtanţă dizolvată, cantitatea de ligand imobilizat şi cinetica asocierii şi disocierii complexului. Considerând un singur situs de legare ce determină un raport 1:1 de formare a complexului între un dizolvant S şi un ligand L, formarea complexului poate fi descrisă prin relaţia:

$$[S] + [L] \underset{k_D}{\overset{k_A}{\rightleftarrows}} [S \cdot L] \quad (1)$$

$$K_A = \frac{k_A}{k_D} = \frac{[S \cdot L]}{[S] + [L]} \quad (2)$$

$$K_D = \frac{1}{K_A} \quad (3)$$

unde [S] este concentraţia substanţei dizolvate în faza mobilă, [L] şi [S·L] reprezintă concentraţiile de suprafaţă ale ligandului, respectiv complexului ligand–substanţă dizolvată. k_A şi k_D sunt constantele de asociere şi disociere ale reacţiilor, iar K_A este constanta de asociere a complexului. Menţinerea echilibrului soluţiei este definită prin relaţia:

$$k' = \frac{K_A \cdot m_L}{V_m} = \frac{t_r}{t_m} - 1 \quad (4)$$

unde k' este factorul de capacitate al substanţei dizolvate, m_L reprezintă molii de ligand din coloană, V_m este volumul neocupat al coloanei, t_r este timpul de retenţie al substanţei dizolvate (SD), iar t_m este timpul nul al coloanei. Astfel, factorul de capacitate al unei anumite SD depinde de valoarea constantei de asociere şi de cantitatea de ligand din coloană. Considerând o constantă de asociere (K_A) de 10^8 - 10^9 M^{-1} şi o concentraţie a ligandului (m_L/V_m) de 10_{-5} M, k' devine 1000 – 10.000, iar tipul de eluţie a substanţei analizate legate va tinde către câteva zile.

Singura modalitate de a realiza eluţia într-un interval de timp rezonabil este prin modificarea variabilelor astfel încât constanta de asociere să fie micşorată considerabil în condiţii experimentale. Acest lucru se poate obţine prin schimbarea soluţiei tampon de eluţie fie intr-o singură etapă, fie gradual. Din motivele cele mai practice, constanta de asociere K_A ar trebui să fie egală sau mai mare decât 10^5-10^6 M^{-1}, ceea ce corespunde unei constante de disociere K_D de 1-10 μM, pentru a asigura buna adsorbţie a substanţei de analizat.

Totuşi, chiar şi o valoare KA în intervalul 10^3 -10^6 M^{-1} poate avea ca rezultat o întârziere convenabilă a proteinei de interes dacă densitatea ligandului este sufficient de mare. Pe de altă parte, având interacţiuni ce depăşesc 10^{10} - 10^{11} M^{-1}, vor fi necesare condiţii severe de eluţie a proteinei legate, ceea ce va determina denaturarea proteinei. Constante de disociere în intervalul 10^{-3} - 10^{-5} M (ce se transpun în K_A= 10^3 - 10^5 M^{-1}) sunt în general adecvate pentru eluţia în condiţii blânde, fără denaturare a proteinelor.

8.3. Ligandul

Alegerea ligandului de afinitate este cea mai importantă pentru matricea de afinitate, afectând specificitatea de legare, procesul de imobilizare şi costul matricei. Un bun ligand îndeplineşte următoarele criterii [Carlsson şi colab. 1998]:

- ligandul trebuie să formeze complexe reversibile cu proteina pentru a fi izolat sau separat cu o specificitate adecvată pentru aplicaţia urmărită;
- stabilitatea complexului ar trebui să fie destul de crescută încât să asigure o întârziere cromatografică suficientă a proteinei;
- complexul ar trebui să fie uşor de disociat printr-o schimbare a soluţiei tampon, fără ca aceasta să afecteze stabilitatea proteinei ce trebuie izolată sau a ligandului;
- ligandul trebuie să aibă proprietăţi adecvate pentru a-i permite imobilizarea pe suport;
- ideal, ligandul ar trebui să fie ieftin şi uşor disponibil.

Pe baza tipului de interacţiuni ce îi caracterizează, liganzii se pot clasifica în biospecifici, biomimetici, respectiv liganzi pseudospecifici. Exemple de liganzi biospecifici sunt anticorpii, substraturile sau coenzimele, liganzii biomimetici cuprind solvenţii, iar natura interacţiunilor cu chelatori metalici este de tip pseudospecific. Totuşi, mai obişnuit liganzii sunt clasificaţi ca monospecifici sau grup-specifici cu subclasificare consecutivă în funcţie de greutatea moleculară în liganzi cu greutate moleculară mică şi liganzi macromoleculari.

8.3.1. Liganzi monospecifici

Liganzii monospecifici cum ar fi substraturile, hormonii sau anticorpii leagă cu înaltă specificitate structurile complementare cum ar fi enzime, receptori, proteine carrier sau antigene, astfel încât este legată în complex doar una sau un număr mic de proteine ale unui tip particular de extract celular sau fluid fiziologic. Astfel, pentru fiecare proteină dată este necesară o matrice de afinitate unică. De exemplu, vitamina B12 se leagă doar de factorul intrinsec din sucul gastric sau de transcobalamina II plasmatică. Anticorpii sunt liganzi macromoleculari monospecifici foarte utili în cromatografia de afinitate, în special când trebuie purificat un compus fără un situs de legare direct. Ei pot fi folosiţi pentru a izola aproape orice, de la peptide până la celule întregi. Ca rezultat al tehnologiei moderne a hibridomului, anticorpii monoclonali au înlocuit masiv anticorpii policlonali. În principiu, această tehnologie asigură şi o sursă constantă de anticorpi uniformi cu reproductibilitate ridicată de la o serie de producţie la alta. Ca avantaje menţionăm afinitatea de legare ridicată, de cele mai multe ori de cel puţin 10 ori mai mare decât a anticorpilor policlonali, rezultând factori de purificare de câteva mii într-o singură etapă. Dezavantajele sunt reprezentate de costurile ridicate şi susceptibilitatea la degradare

proteolitică. În consecinţă nu ar trebui aplicate extracte neprelucrate/brute direct pe coloanele de afinitate bazate pe anticorpi monoclonali.

În general, liganzii nonspecifici se leagă mai intens şi necesită condiţii de eluţie mai severe decât în cazul liganzilor cu specificitate de grup ale căror complexe pot fi de obicei disociate în condiţii blânde. Un exemplu de legare extrem de strânsă este complexul avidină-biotină cu constantă de disociere K_A de 10^{15}

8.3.2. Liganzi cu specificitate de grup

Liganzii cu specificitate de grup sunt compuşi care leagă o clasă sau o familie de proteine înrudite. Cel mai mare grup de liganzi aplicaţi în mod curent sunt liganzii cu greutate moleculară mică cu ar fi cofactori enzimatici şi analogi enzimatici (tabelul 8.2). aceştia pot fi de origine biologică sau non-biologică.

Pentru purificarea dehidrogenazelor şi kinazelor NAD^+- şi $NADP^+$-dependente sau folosit în special nucleotide adeninice sau analogi precum 5'-AMP şi solvenţii triazinici Cibacron Blue F3G-A and Procion Red HE-3B, dar acestea sunt legate şi de alte proteine precum albumina sau interferoni. În ciuda specificităţii relativ largi, s-au obţinut randamente de purificare ridicate folosindu-se protocoale de eluţie specifice sau prin valorificarea formării de complexe terţiare pe bază de cofactori sau substraturi.

Tab. 8.2 Exemple de liganzi cu specificitate de grup

Ligand	*Exemple de molecule legate*
Liganzi cu greutate moleculară mică	
5'-AMP	dehidrogenaze NAD^+- dependente, kinaze ATP- şi cAMP – dependente
Cibacron Blue F3G-A	dehidrogenaze NAD^+- dependente, proteine de legare a acizilor nucleici, albumina, interferon, α2- macroglobulina, factori procoagulanţi
Procion Red HE-3B	enzime $NADP^+$- dependente, aldehid-reductaza, dihidrofolat-reductaza, carboxi-peptidaza G, interferon, plasminogen şi activatorul plasminogenului
Benzamidina	tripsina, trombina, factorul X_a al coagulării
Arginina	proteaze serice, factori procoagulanţi, plasminogen şi activatorul plasminogenului
Lizina	ARNr, plasminogen şi activatorul plasminogenului
Liganzi macromoleculari	
Heparina	factorii VII, IX, XI, XII, XIIa ai coagulării, trombina, antitrombina III, factorii complement, lipaze, lipoproteine, ARN şi ADN polimeraze, receptori steroizi, antigenul de suprafaţă al virusului B hepatic, interferon

Calmodulina	ATP-aze, protein-kinaze, fosfodiesteraze, neurotransmiţători, interferon
Lectine	glicoproteine, proteine de membrană, glicolipide, lipoproteine, polizaharide, hormoni, α_1-antitripsina, interferon
Proteina A	anticorpi policlonali şi monoclonali
Proteina G	anticorpi policlonali şi monoclonali

Liganzii cu specificitate de grup includ lectine, heparina şi proteinele bacteriene A şi G (tabelul 8.2). Lectinele interacţionează cu glucidele care le conferă proprietăţi deosebite de purificare a glicoproteinelor solubile sau membranare precum hormonii, proteinele plasmatice, antigenele, anticorpii sau antigenele de grup sanguin. Pot fi legate chiar celule sau organite celulare. Lectinele diferă în raport de specificitatea faţă de glucide în funcţie de sursa lectinelor. Concanavalina A şi lectina din linte (*Lens culinaris*) leagă α-D-manoza şi β-D-glucoza comune şi reziduurile înrudite stereoizomeric. Cele două lectine diferă în ceea ce priveşte puterea lor de legare, concanavalina A formând în cele mai multe cazuri complexele cele mai stabile. Glicoproteinele care conţin un număr mare de grupări N-acetilglucozamină, precum α_2-macroglobulina, glicoproteinele α_2-acide sau mucinele pot fi purificate folosind lectina din germeni de grâu. Heparina polizaharid-sulfatată este folosită frecvent pentru izolarea factorilor de coagulare plasmatici şi alte proteine plasmatice, dar şi pentru purificarea enzimelor precum endonucleazele sau ARN şi AND polimerazele şi receptorii steroizi. Proteinele bacteriene A şi G sunt cel mai mult folosite în etapele de purificare ale anticorpilor. Ambele proteine diferă în ceea ce priveşte specificitatea lor faţă de clasele de imunoglobuline provenite de la om sau care au sursă animală. Proteina G este o proteină de suprafaţă celulară provenită de la streptococi de grup G, în timp ce proteina A este izolată din *Staphylococcus aureus*. Este utilizată şi proteina A recombinată.

8.3.3. Obţinerea ligandului

Deşi prezintă selectivitate înaltă, liganzii de provenienţă naturală au adesea un potenţial restrâns datorită disponibilităţii limitate. Prin dezvoltarea chimiei şi biologiei, asociată adesea cu tehnici de modelare computerizată, spectroscopie cu raze-X şi rezonanţă magnetică nucleară, apare o nouă oportunitate de a obţine liganzi de afinitate non-naturali, înalt specifici.

Tehnologiile „phage-display" permit identificarea liganzilor peptidici pentru o moleculă ţintă dată dintr-o imensă bancă de peptide diferite exprimate pe suprafaţa bacteriofagilor. Prezentarea băncii de peptide pe suprafaţa bacteriofagilor („phage display") ca pe o fuziune de peptide şi o proteină de înveliş fagică permite legarea fizică între peptidul prezentat şi secvenţa ADN ce codifică pentru secvenţa de aminoacizi a acestuia. Varietatea de peptide/proteine poate fi introdusă prin mutageneza combinativă a genei de

fuziune. Pot fi creaţi, replicaţi, selectaţi şi amplificaţi un număr extrem de mare de fagi printr-un proces numit „biopanning". Băncile sunt incubate cu o moleculă ţintă, fie ca ţintă imobilizată, fie înaintea captării complexului pe un suport solid. Ca şi în cromatografia de afinitate, peptidele şi proteinele ce nu interacţionează sunt „spălate" şi îndepărtate, urmând ca ulterior moleculele ce au interacţionat să fie eluate.

Peptidele sau proteinele ce interacţionează prin phage-display pot fi amplificate prin infecţie bacteriană, pentru a le creşte numărul de copii. Procesul de selecţie/amplificare poate fi repetat pentru a îmbogăţi în continuare acei membrii ai băncii cu afinitate relativ mai crescută faţă de ţintă. Rezultatul este o populaţie finală de peptide ce este dominată de secvenţe care leagă ţintele cel mai bine. Un ligand identificat în acest fel poate fi ulterior imobilizat pe un suport şi aplicat pentru izolarea unei molecule ţintă dintr-o probă. Prin această abordare, liganzii derivaţi din domeniul proteinei A au fost selectaţi pentru bănci combinative prin phage-display şi utilizaţi pentru izolarea prin cromatografie de afinitate de imunoglobuline A plasmatice de origine umană [Rönnmark şi colab., 2002], anticorpi monoclonali umanizaţi [Ehrlich , Bailon, 2001] şi factor VIII de coagulare de origine umană recombinat [Nord şi colab., 2001].

O abordare similară cu „phage-display" pentru peptide, valorifică băncile de oligonucleotide ce permit identificarea anumitor secvenţe nucleotidice, cunoscute ca aptameri, care se leagă cu înaltă afinitate şi specificitate de o moleculă ţintă dorită. Înalta afinitate a aptamerilor este atribuită capacităţii lor de a „încorpora" molecule în structura lor şi de a se integra în structura moleculelor mari precum peptidele. În timp ce în soluţii sunt deseori astructuraţi, aptamerii se pliază la legarea moleculei lor ţintă. Secvenţele nucleotidice sunt identificate printr-un proces denumit evoluţie sistematică a liganzilor prin îmbogăţire exponenţială (SELEX). Secvenţele de legare sunt izolate din băncile aleatorii folosind o colană de afinitate cu molecula ţintă dorită şi ulterior amplificate prin reacţia de polimerizare în lanţ (PCR). Acestea sunt urmate de alte câteva tratamente ciclice similare. Rezultatul este o populaţie de oligonucleotide în care predomină secvenţele care leagă cel mai bine ţinta. Un ADNaptamer specific L-selectinei umane a fost utilizată efectiv pentru purificarea unei proteine de fuziune imunoglobulină – L-selectină umană recombinată din mediu de condiţionare pentru celule ovariene de hamster chinezesc.

Pentru purificarea la scară redusă în laborator sau ca liganzi „de deschidere", liganzii de origine biologică prezintă câteva neajunsuri în cazul aplicării lor la scară largă. Astfel, aceştia necesită şi ei înşişi purificare, putând fi contaminaţi cu ADN-ul gazdei sau virusuri şi prezintă variabilitate de la lot la lot. În plus, procedeele de sterilizare pot determina degradarea, iar instabilitatea ligandului poate cauza contaminarea produsului final cu produşi de extracţie potenţial toxici sau imunogeni. Pe de altă parte, liganzii sintetici sunt compuşi

bine definiţi care pot fi preparaţi pe scară largă fără probleme. Chimia combinatorie (combinatorial chemistry) în combinaţie cu tehnicile de modelare computerizată şi spectroscopia prin raze-X sau prin rezonanţă magnetică nucleară au condus către conceperea şi obţinerea de noi liganzi.

Screening-ul unei bănci de peptide de sinteză combinatorie a avut rezultat obţinerea de tri- şi tetrapeptide dimerice şi tetramerice care s-au dovedit a fi liganzi utili pentru izolarea imunoglobulinelor şi anticorpilor monoclonali [Fassina şi colab., 2001]. Un exemplu este utilizarea „phage display" pentru identificarea unui ligand „de deschidere" urmată de optimizarea prin sinteză peptidică în fază solidă asociată cu modelarea moleculară care a dus la obţinerea unei pentapeptide ca şi ligand pentru regiunea de legare a unui anticorp monoclonal îndreptat împotriva unui steroid. Peptidul imobilizat a fost ulterior utilizat pentru purificarea anticorpului [Murray şi colab., 2001].

Conceperea *de novo* a liganzilor de afinitate a fost de asemenea obţinută prin recuperarea informaţiei structurale a proteinei ţintă din rezultatele cristalografiei cu raze-X, RMN sau omologe, şi identificarea situsurilor de legare adecvate fie ca situsuri active, un situs implicat în legarea ligandului natural, fie ca o regiune sau un domeniu pe suprafaţa proteinei. Până acum au fost realizate trei abordări [Lowe şi colab., 2001]: (1) investigarea structurii interacţiunilor normale proteină – ligand ca şablon pe baza căruia este modelat un ligand biomimetic, (2) modelarea unui ligand complementar resturilor aminoacizilor expuşi la nivelul situsului ţintă şi (3) imitarea directă a interacţiunilor naturale de recunoaştere biologică. Exemple de utilizare a chimiei combinatorii pot fi modelarea de novo a liganzilor pe structura de bază a triazinei. Acest mod de abordare pe bază de şablon a fost utilizat pentru obţinerea liganzilor de afinitate modelaţi pe proteina A pentru izolarea şi purificarea imunoglobulinei G umane. Modelarea prin complementaritate a fost aplicată la obţinerea unui ligand pentru un precursor recombinat al insulinei iar imitarea interacţiunilor biologice s-a realizat prin obţinerea unei lectine artificiale ca adsorbant de afinitate pentru glicoproteine. O parte din aceste medii de afinitate au fost comercializate.

8.4. Matricea de afinitate

8.4.1. Materialul de suport

Suportul solid de susţinere a ligandului în coloană controlează numeroşi factori cum ar fi proprietăţile chimice de imobilizare şi caracteristicile fluxului. Un material ideal trebuie să îndeplinească câteva criterii:

- suportul trebuie să prezinte macroporozităţi pentru a permite interacţiunea liberă cu molecule mari;
- suportul trebuie să fie neutru şi hidrofil pentru a fi preîntâmpinate interacţiunile nespecifice cu matricea;

• suportul trebuie să conţină grupări funcţionale adecvate pentru ataşarea liganzilor prin obţinerea derivaţilor cu acesta, prin intermediul unei mari varietăţi de reacţii chimice;
• suportul trebuie să fie chimic stabil în condiţiile adesea severe în cursul obţinerii derivaţilor şi regenerării (inclusiv sterilizării) coloanei;
• suportul trebuie să fie fizic stabil sub presiunea hidrodinamică din cursul cromatografiei;
• suportul trebuie să fie uşor disponibil cu costuri reduse.

Matricele de provenienţă naturală se bazează pe polizaharide ce formează spontan geluri care îndeplinesc majoritatea condiţiilor de mai sus. Agaroza, un polizaharid cu structură liniară compus din molecule alternante de D-galactoză cu legături în poziţiile 1, 3 şi 3,6-anhidro-L-galactoză cu legături în poziţiile 2, 4, a fost menţionată prima oară în 1968 şi este încă cel mai utilizat suport datorită proprietăţilor deosebite ale gelului şi pentru că este relativ inertă biologic.

Principalul inconvenient al agarozei native este instabilitatea sa chimică şi fizică, dar a fost în cea mai mare parte depăşit prin crearea de legături chimice încrucişate. Alte material de suport includ celuloza, dextrani cu legături chimice încrucişate, poliacrilamida, tris(hidroximetil)acrilamida polimerizată (trisacril), geluri hidroxialkil metacrilat, vinildimetil azlacton-N,N'-metilen-bis(acrilamid) copolimeri, derivaţi ai polistirenului precum şi derivaţi ai gelului de siliciu, perle de sticlă şi ceramice poroase. Mai sunt folosite şi copolimeri micşti agaroză-acrilamidă şi dextran-acrilamidă.

În funcţie de suport, cromatografia de afinitate se poate subclasifica în tehnică de joasă performanţă şi tehnică de înaltă performanţă. Cromatografia de afinitate de joasă performanţă utilizează geluri nonrigide cu particule de dimensiuni mari. În această categorie intră majoritatea materialelor pe bază de carbohidraţi şi polimeri. Datorită presiunilor de împingere relativ mici coloana poate funcţiona chiar şi la un flux generat gravitaţional sau folosind pompe peristaltice.

În cromatografia de afinitate de înaltă performanţă suportul este constituit de un material rigid cum ar fi derivaţi ai gelului de siliciu, sticlă poroasă, polistiren hidroxilat sau perle de agaroză cu legături chimice încrucişate dense cu dimensiune mică a particulelor care rezistă presiunilor mari aplicate în condiţii standard în cromatografia lichidă de înaltă performanţă (HPLC). Această tehnică este utilizată în special pentru aplicaţii analitice.

8.4.2. Imobilizarea ligandului

Materialele de suport diferă şi în funcţie de metodele disponibile de obţinere a derivaţilor. Majoritatea metodelor de imobilizare a liganzilor s-au axat pe valorificarea grupărilor hidroxil prezente în suporturile pe bază de carbohidraţi. Unul din avantajele agarozei este faptul că îşi menţine structura microporoasă în solvenţii organici. Cum majoritatea reacţiilor organice sunt efectuate în medii organice, aceste reacţii pot fi aplicate şi agarozei. Acesta poate fi un alt motiv al utilizării frecvente a acestui material.

Reacţiile de imobilizare sunt determinate de grupări funcţionale prezente în suportul solid şi în ligand, ca şi de condiţiile de reacţie tolerate de către suport şi ligand. O proteină necesită în general condiţii de reacţie mai blânde decât o moleculă organică mică. În majoritatea cazurilor, procedeul este constituit din trei etape:

- activarea suportului pentru a crea grupări funcţionale reactive;
- cuplarea ligandului ;şi
- dezactivarea grupărilor reactive reziduale ale suportului printr-un exces de compus cu greutate moleculară mică.

În tabelul 8.3 sunt exemplificate metodele uzuale de imobilizare utilizate în cromatografia de afinitate. În cele mai multe cazuri este introdusă în matrice o grupare electrofilică, care va reacţiona cu grupările nucleofilice ale ligandului, precum grupările amino, tiol sau hidroxil.

Cuplarea prin grupări electrofilice ale ligandului şi grupări nucleofilice ale matricei este mai rar pusă în practică. Se poate efectua oxidarea diolilor cu periodat de potasiu pentru obţinerea unei aldehide înaintea imobilizării ligandului.

Tabelul 8.3 Metode de imobilizare în cromatografia de afinitate

Grupare funcţională	*Substanţă imobilizată*
Amino	Bromură de cian (CNBr)
	Carbonil diimidazol (CDI)
	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
	Esterii N-hidroxi succimidei
	Introducerea grupărilor amino- prin reacţii de reducere (de ex. reducerea nitroderivaţilor)
	Activare epoxi sau bioxiran
	Clorură de tosil
	Clorură de tresil
	Divinilsulfonă
	2-fluoro-1-metilpirimidin toluen-4-sulfonat (FMP)
	Activarea azlactonei
	Clorură cianurică

Hidroxil	Carbonil diimidazol (CDI)
	Activare epoxi sau bioxiran
	Divinilsulfonă
	Clorură cianurică
Tiol	Iodoacetil
	Bromoacetil
	Maleimid
	Piridil disulfat
	Activare epoxi sau boxiran
	Divinilsulfonă
	2-fluoro-1-metilpiridină toluen-4-sulfonat (FMP)
	Acid 5-tio-2-nitrobenzoic (TNB) –tiol
Aldehidă	Metoda hidrazidei
	Introducerea grupărilor amino- prin reacţii de reducere
Carboxil	Carbonil diimidazol (CDI)
	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)
Hidrogen activ (CH)	Sinteza diazo
	Condensarea Mannich

Reacţiile puse în practică depind de suportul folosit, gelul de siliciu şi perlele de sticlă necesitând introducerea grupărilor adecvate înainte de a se putea efectua cuplarea. Pentru a evita reacţiile cu componentele probei, poate fi necesară blocarea grupărilor active ce rămân după ataşarea ligandului. În plus, grupările de blocare nu ar trebui să prezinte proprietăţi de legare nespecifică.

Sunt deseori folosite molecule mici precum aminoetanol, mercaptoetanol, mercaptoetilamina sau tris(hidroximetil)aminometan. Numeroşi producători pun la dispoziţie multe suporturi activate şi de asemenea informaţii detaliate asupra procedurilor de cuplare. Alegerea substanţei chimice pentru imobilizare joacă un rol important pentru funcţionarea finală a coloanei de afinitate. Condiţii de reacţie improprii sau nespecifice pot afecta reactivitatea sau o varietate de posibile orientări ale ligandului pe gel. Aşa numita ataşare multi-situs se referă la legarea pe mai mult de o grupare reactivă a ligandului. Deşi prin aceasta se obţine o legare mult mai stabilă decât cea pentru un singur situs, ataşarea pe mai multe situsuri poate determina distorsiunea sau denaturarea situsului activ al liganzilor proteinei. Orientarea aleatorie se referă la ataşarea de grupările funcţionale localizate la nivelul unor situsuri variabile ale ligandului. Deşi o anumită cantitate de ligand este ataşat în poziţia adecvată, o parte poate fi ataşat eronat, afectând reactivitatea sau blocând situsul activ. Per ansamblu, la aceste materiale se observă o activitate scăzută a ligandului.

Chiar şi când se păstrează orientarea adecvată, afectarea sterică a reactivităţii poate avea loc şi atunci când ligandul este ataşat prea aproape de suprafaţa suportului sau de alţi liganzi. Fenomenul de afectare sterică a reactivităţii prin molecule de vecinătate poate fi redus prin scăderea gradului de acoperire a ligandului cu ajutorul unui distanţator („spacer") ce măreşte distanţa

dintre suport şi ligand. Sunt disponibile diverse molecule şi substanţe distanţatoare. Molecula distanţator poate fi ataşată iniţial pe suport urmată de cuplarea ligandului sau aceasta poate fi încorporată în ligand cu imobilizarea consecutivă pe matrice. Molecula distanţator nu ar trebui să intervină prin interacţiuni nespecifice cu nici una din componentele probei. Molecule distanţator frecvent utilizate în cromatografia de afinitate sunt acidul 6-aminocapronic, diaminodipropilamina, 1,6-diaminohexan, etilendiamina, acidul succinic, glutaraldehida şi epoxizii aminaţi.

Ataşarea liganzilor pe suport ar trebui realizată print-o legătură chimică cât mai stabilă posibil, pentru prevenirea pierderii ligandului în timpul operării coloanei. Totuşi, în anumite circumstanţe poate fi utilă ataşarea ligandului printr-o legătură chimică ce poate fi clivată dacă este necesar. Un exemplu este legătura disulfidică ce se poate forma şi cliva în condiţii blânde prin reacţii de schimbare tiol-disulfid.

Conceperea unui mediu de activitate presupune trei paşi cheie: (1) selecţia matricei, (2) selecţia ligandului şi (dacă este necesar) a moleculei distanţator, şi (3) alegerea metodei de cuplare. Din literatură sau de la producători sunt disponibile multe protocoale standardizate; totuşi, în special pentru liganzii noi, trebuiesc studiate metode special concepute, pentru a asigura în final o bună capacitate de legare a coloanei. Câţiva distribuitori pun la dispoziţie şi matrice de afinitate ce conţin diferiţi liganzii cu specificitate de grup.

O nouă strategie de imobilizare este oferită de fazele staţionare monolitice caracterizate prin viteze crescute de transfer a masei. În acest caz un ligand este conjugat cu unul din monomerii unui amestec de polimeri. Polimerizarea *in situ* are ca rezultat un monolit de afinitate cu o structură poroasă, prezentatoare de liganzi definiţi.

8.5. Principii de operare

Condiţiile de legare şi eluţie pentru o substanţă analizată dată depind de natura interacţiunilor dintre ligand şi molecula ţintă. Afinitatea prea scăzută va determina producţii scăzute, iar substanţa analizată fiind antrenată prin coloană se pierde. O legare prea puternică poate duce la producţii scăzute printr-o eluţie insuficientă. Metodele de preparare a probei premergătoare aplicării probei pe coloană ar trebui să asigure legarea moleculei ţintă. De asemenea, coloana trebuie să fie echilibrată cu substanţa tampon de legare înaintea utilizării. Când se lucrează cu interacţiuni slabe ce ating lent starea de echilibru, trebuie reglat un flux lent faţă de interacţiunile de afinitate ce ating rapid echilibrul. Deoarece cromatografia de afinitate este o tehnică ce implică legături chimice, volumul probei nu afectează separarea atâta timp cât condiţiile experimentale asigură o legare suficient de solidă între ligand şi substanţa de analizat.

După ce tot materialul nedorit este îndepărtat („spălat") de pe coloană, se poate face eluţia compuşilor legaţi. Nu există o schemă general aplicabilă tuturor mediilor de afinitate. Complexele ligand – substanţă de analizat sunt menţinute printr-o combinaţie de interacţiuni electrostatice şi de tip hidrofob atâta timp cât hidrogenul menţine legăturile. Condiţiile care slăbesc aceste interacţiuni determină detaşarea compuşilor legaţi. În plus, stabilitatea ligandului şi a moleculelor ţintă trebuie să fie tratate cu atenţie, mai ales în cazul proteinelor. Adesea trebuie făcut un compromise între condiţiile severe necesare pentru o bună eluţie şi riscul denaturării proteinelor.

Condiţiile de eluţie în cromatografia de afinitate pot fi clasificate în selective şi neselective. Condiţiile selective sunt folosite în cazul interacţiunilor cu specificitate de grup. În aceste cazuri substanţa tampon conţine compuşi care competiţionează fie pentru legarea de ligandul de afinitate în coloană, fie pentru legarea de molecula ţintă. Eluţia selectivă este deseori efectuată în esenţă sub aceleaşi condiţii de solubilizare ca şi cele folosite pentru probă. Condiţiile de eluţie neselective sunt în mod frecvent aplicate pentru interacţiuni cu înaltă specificitate. Acestea includ modificări ale pH-ului, tăria ionică sau polaritatea soluţiei tampon pentru eluţie. pH-ul determină gradul de ionizare sau de încărcare a grupărilor ligandului şi/sau substanţei de analizat legate astfel că o modificare a pH-ului influenţează direct situsurile de legare prin scăderea afinităţii sau modificarea conformaţională. O scădere abruptă a pH-ului soluţiei tampon este metoda de eluţie a materialelor puternic legate cea mai frecvent folosită. Stabilitatea chimică a proteinei şi a matricei de afinitate limitează utilizarea în acest sens a pH-ului. O creştere a tăriei ionice a tamponului va determina eluţia proteinelor care sunt legate predominant prin interacţiuni de tip electrostatic. Aceasta este o tehnică blândă de desorbţie, în special pentru enzime, 1M NaCl fiind de obicei suficient. Diverse proteine pot de asemenea să fie dizolvate prin gradiente continui sau discontinui. Reducerea polarităţii poate fi obţinută prin adăugarea dioxanului sau etilenglicolului în eluent. În cazul legăturilor strânse dominate de interacţiuni de tip hidrofob, eluţia poate fi obţinută prin utilizarea aşa numiţilor agenţi chaotropi care denaturează structura proteinelor, cum ar fi ureea, guanidină hidroclorat sau detergenţii. Totuşi acestea sunt condiţii drastice care pot cu mare probabilitate să denatureze proteinele. Adesea pe toată durata procesului de purificare atunci când sunt manipulate proteine membranare sau în cursul purificării anticorpilor, sunt folosite concentraţii scăzute de detergenţi pentru a se inhiba adsorbţia sau agregarea de tip hidrofob nespecifică. Se pot aplica şi combinaţii de condiţii selective şi neselective.

Reutilizarea adsorbanţilor de afinitate depinde de natura probei ca şi de stabilitatea ligandului şi a matricei, ţinându-se cont de condiţiile de eluţie şi curăţare. De regulă este necesară reechilibrarea atentă a coloanei înainte de folosire. În plus, suporturile pe bază de carbohidraţi şi liganzii proteici sunt predispuse la degradare microbiană şi poate avea loc şi contaminarea coloanei

cu resturi celulare degradate, lipide şi proteine. Acestea trebuie îndepărtate complet. În plus poate fi necesară decontaminarea pentru îndepărtarea bacteriilor, virusurilor şi piogenilor, dar astfel de condiţii severe ar putea să nu fie aplicabile liganzilor proteici, de exemplu. Este recomandată depozitarea coloanelor la temperaturi mici.

8.6. Modele de cromatografie de afinitate

Spectrul larg al interacţiunilor de afinitate a generat o mare varietate de tehnici speciale ce poartă fiecare propria nomenclatură (tabelul 8.4). Dintre acestea nu toate se bazează pe specificitatea unică între ligand şi molecula ţintă, ci mai degrabă pe fenomene mai generale; altele se referă la aplicaţii specifice. Principalele modele vor fi discutate pe scurt.

8.6.1. Cromatografia de bioafinitate

Cromatografia de bioafinitate sau cromatografia de afinitate prin bioadsorbţie reprezintă tehnica prin care o moleculă de origine biologică este folosită ca ligand de afinitate. Aceasta a fost primul tip de cromatografie de afinitate şi reprezintă categoria de tehnici cea mai diversă.

Câţiva dintre liganzi sunt prezentaţi în tabelele 8.1 şi 8.2, iar în literatură au fost descrişi mulţi alţii. Aceştia includ molecule mici precum aminoacizi, peptide, carbohidraţi, cofactori, substraturi şi inhibitori nucleotidici, precum şi molecule mari cum ar fi proteine, polizaharide şi acizi nucleici.

Unele forme ce utilizează un anumit tip de interacţiune sunt recunoscute ca metodă de sine stătătoare, ca de exemplu cromatografia de afinitate a lectinei, care se bazează pe interacţiunea dintre lectine şi carbohidraţi şi cromatografia de afinitate avidină-biotină ce utilizează legarea de înaltă specificitate a biotinei de avidină.

Tabelul 8.4 Tipuri de cromatografie de afinitate şi tehnici associate

Cromatografia de bioafinitate
Cromatografia de imunoafinitate
Cromatografia de afinitate pentru lectină
Cromatografia de afinitate avidină – biotină
Cromatografia de afinitate ligand – colorant
Cromatografia de afinitate prin ioni metalici imobilizaţi
Cromatografia prin interacţiuni hidrofobe
Cromatografia tiofilică
Cromatografia prin inducţie de încărcare hidrofobă
Cromatografia prin afinitate de covalenţă
Cromatografia de afinitate joasă
Cromatografia prin afinitate de receptor

Cromatografia prin afinitate – respingere
Cromatografia prin afinitate de perfuzie
Cromatografia prin afinitate de centrifugare
Cromatografia prin amprentare moleculară (molecular imprinting)
Cromatografia prin afinitate de membrană
Partiţia de afinitate
Precipitarea de afinitate
Cromatografia prin afinitate de înaltă performanţă
Electroforeza de afinitate
Electroforeza de afinitate capilară

8.6.2. Cromatografia de imunoafinitate

Cromatografia de imunoafinitate poate fi privită ca o subcategorie de cromatografie de bioafinitate din moment ce ligandul ,un anticorp, are de regulă origine biologică. Uneori sunt denumite în acest fel metodele de imobilizare a antigenelor pentru purificarea anticorpilor. În funcţie de natura antigenului, ligandul poate fi sau nu de origine biologică. Înalta selectivitate a interacţiunilor antigenanticorp şi posibilitatea de producere a anticorpilor îndreptaţi împotriva unei mari varietăţi de substanţe solubile au transformat cromatografia de imunoafinitate într-un instrument foarte util de purificare şi analiză a compuşilor. Se pot exemplifica astfel medicamente, hormoni, peptide, enzime, proteine recombinate, anticorpi, receptori, organite celulare, celule şi virusuri. În plus faţă de folosirea ca tehnică de sinteză, utilizarea în scopuri analitice a cromatografiei de imunoafinitate devine din ce în ce mai atractivă.

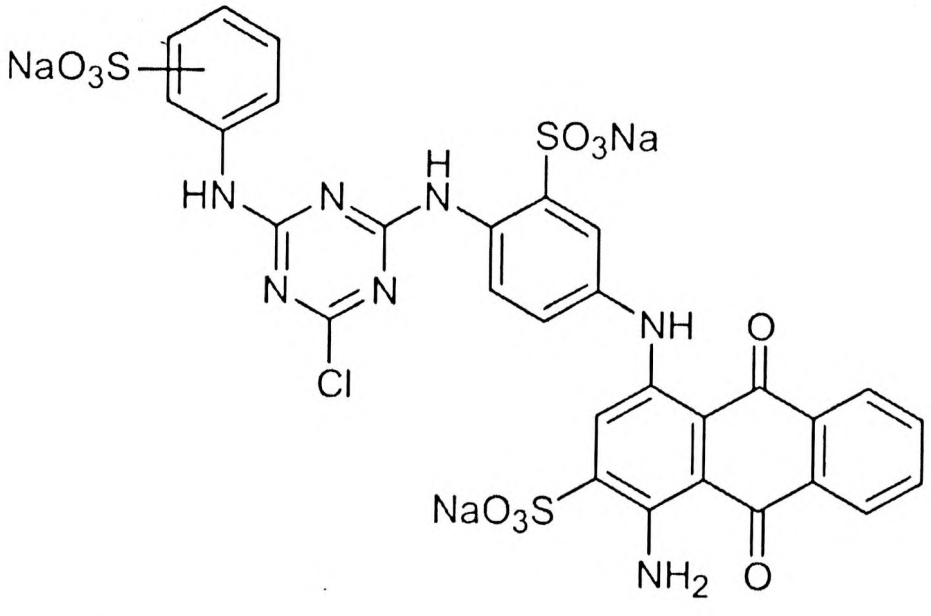


Fig. 8.2 Structura Cibacron Blue F3G-A

8.6.3. Cromatografia de afinitate ligand-colorant

Cromatografia de afinitate ligand-colorant utilizează drept liganzi coloranţi textili reactivi pe bază de triazinil. În timp ce mulţi liganzi de afinitate naturali sunt scumpi datorită costurilor mari de producţie şi purificare, disponibili în cantităţi limitate şi au şi alte inconveniente, coloranţi sintetici pot fi obţinuţi în cantităţi mari la un preţ scăzut dând posibilitatea întocmirii facile a unei colane de afinitate. În plus, aceşti compuşi prezintă o stabilitate chimică şi biologică excelentă. Cibacron Blue F3G-A (fig. 8.2) a fost primul ligand de afinitate utilizat, iar de atunci s-au folosit mulţi compuşi derivaţi ai coloranţilor. Coloranţii sunt imobilizaţi pe suport prin intermediul ionilor de clor reactivi pe jumătate, triazina heterociclică. În multe studii cinetice s-a demonstrat că trazinil–coloranţii interacţionează cu situsurile de legare a liganzilor nucleozidici NAD^+, NADH, $NADP^+$, NADPH, ATP sau GTP. Până în momentul de faţă prin cromatografia de afinitate ligand–colorant s-au izolat molecule precum enzime (kinaze, dehidrogenaze, endonucleaze, hidroxilaze, fosfodiesteraze şi multe altele), factori ai coagulării, interferoni şi albumină serică.

Deşi coloranţii textili pot interacţiona cu o remarcabilă specificitate cu proteine, în unele cazuri interacţiunile acestora cu un număr mare de proteine apparent neînrudite compromit inevitabil specificitatea lor de legare ceea ce le conferă dezavantaje majore. Preocuparea în ceea ce priveşte puritatea, toxicitatea şi scăpările în produsul final a coloranţilor comerciali le-a limitat utilizarea în domeniul biofarmaceutic. Tehnicile raţionale de proiectare moleculară incluzând cristalografia cu Raze X, modelarea moleculară şi chimia combinatorie au dus la obţinerea de „coloranţi – liganzi biomimetici" cu înaltă specificitate pentru o proteină dată, păstrând şi majoritatea avantajelor coloranţilor comerciali.

8.6.4. Cromatografia de afinitate prin ioni metalici imobilizaţi (IMAC)

În IMAC sau cromatografia de afinitate prin chelare metalică, o tehnică introdusă în 1975, un ion metalic este complexat cu un agent chelator imobilizat. Ionul metalic formează legături coordinative cu aminoacizi cu grupări donor de electroni precum histidina, triptofanul sau cisteina. În timp ce interacţiunile dintre ionii metalici şi catenele laterale ale aminoacidului sunt uşor reversibile, acestea pot fi utilizate pentru adsorbţie şi ulterior pot fi desfăcute în condiţii blânde fără denaturare. Chelatorii utilizaţi în mod obişnuit includ acidul iminodiacetic, acidul nitrilotriacetic, acid carboximetilat aspartic sau N,N,N'-tris(carboximetil) - etilendiamină. Selectivitatea în IMAC este determinată de ionii metalici care pot fi împărţiţi pe baza reactivităţilor preferenţiale faţă de nucleofile în ioni tari, intermediari şi slabi. Ionii metalici tari sunt Fe^{3+}, Al^{3+}, Ca^{2+}, care manifestă afinitate faţă de oxigen. Ionii metalici slabi cum sunt Cu^+, Hg^{2+} sau Ag^+ au afinitate faţă de sulf, în timp ce ionii

intermediari Cu^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} şi Co^{2+}, formează legături coordinative cu azotul, oxigenul şi sulful.

În ciuda faptului că multe resturi de aminoacizi cu perechi libere de electroni pot participa la formarea legăturilor, în practica IMAC retenţia proteică se bazează în principal pe disponibilitatea resturilor histidil de la suprafaţa proteinelor. Ionii metalici intermediari utilizaţi de obicei pot fi ordonaţi după creşterea specificităţii: $Cu^{2+} < Ni^{2}+ < Zn^{2}+ \leq Co^{2}+$. Astfel, Cu^{2+} va reţine mai multe proteine iar numărul va scădea în cazul Ni^{2+}, Zn^{2+} şi Co^{2+} datorită afinităţii mai scăzute pentru situsurile de legare. Dintre proteinele care au fost purificate prin IMAC cu ajutorul resturilor expuse ale histidinei sunt proteinele serice umane, interferonul, lactoferina şi activatorul tisular al plasminogenului. Afinitatea pentru resturile histidinice a dus la sinteza moleculelor de afinitate terminate în histidină pentru proteine şi peptide recombinate. Aceste terminaţii conţin multiple histidine legate la capătul C sau N terminal. După ce au fost evaluate câteva terminaţii formate din 1 până la 8 peptide repetitive ce conţin histidină, astăzi de departe cele mai folosite terminaţii histidinice sunt formate din 6 resturi consecutive de histidină, care sunt comercial cunoscute sub diverse denumiri. Terminaţiile histidinice par a fi compatibile cu toate sistemele de expresie folosite astăzi astfel încât proteinele cu terminaţii histidinice pot fi produse cu succes în celule procariote şi eucariote, intracelular sau ca proteine secretate.

Ca tehnică mai degrabă nespecifică de purificare a proteinelor, IMAC este în prezent una dintre cele mai utilizate metode pentru izolarea proteinelor recombinate. S-a estimat că peste 50% din proteinele recombinate exprimate la celulele gazdă procariote sunt purificate prin IMAC. De obicei, prelungirile polihistidinice nu compromit funcţionalitatea biologică a unei proteine şi nu au imunogenitate importantă. Totuşi, mai ales în cazul proteinelor implicate în terapie, clivarea terminaţiei ar putea fi necesară, nefiind întotdeauna uşor de realizat. În general clivarea enzimatică este aplicabilă în purificarea amestecului rezultat din proteina de fuziune clivată, enzimă, proteina neclivată şi alţii produşi de clivare. În plus, trebuie luată în considerare toxicitatea ionilor metalici ce scapă din coloana IMAC. Mai mult, ionii metalici de multe ori catalizează reacţii de oxidare ce pot duce la degradarea oxidativă a proteinelor. Cei mai predispuşi la reacţii de oxidare sunt în special aminoacizii cisteina şi metionina ce conţin sulf.

8.6.5. Cromatografia prin interacţiuni hidrofobe (HIC)

HIC se bazează pe asocierea grupărilor hidrofobe pe suprafaţa proteinelor cu liganzi mobilizaţi prin legături de tip hidrofob slabe pe suporturi cromatografice. HIC este efectuată în soluţii apoase, fapt ce o diferenţiază de tehnica de cromatografie cu fază inversă, unde sunt folosiţi solvenţi organici pentru eluţia proteinelor. În plus densitatea ligandului în cromatografia cu fază inversă este mai mare, astfel că faza staţionară poate fi privită ca o fază

continuă, în timp ce în HIC liganzii interacţionează individual cu moleculele ţintă. Liganzi folosiţi uzual sunt resturi butil, octil sau fenil adesea legaţi prin intermediul unui eter glicidil. Sunt folosiţi ca liganzi şi oligoetilenglicol şi hidroxipropil.

Retenţia substanţei dizolvate este controlată de tipul şi concentraţia sării utilizate şi a aditivilor organici care schimbă polaritatea solventului. Adăugarea de etilen glicol în soluţia tampon modifică structura de ansamblu a apei în sensul unei structuri ce se aseamănă unei faze organice, scăzând astfel interacţiunea dintre proteină şi liganzi. Influenţa sărurilor asupra legării poate fi corelată cu poziţia sării în seria Hoffmeister, clasificând anionii şi cationii în liotropici sau chaotropici. Sărurile liotropice cum sunt sulfatul de amoniu sau fosfatul de potasiu vor scădea solubilitatea apei în proteine crescând astfel retenţia lor în HIC; sărurile chaotropice vor determina desorbţia proteinelor. În practică desorbţia proteinelor va fi realizată prin scăderea concentraţiei saline. Alegerea corectă a sării este un factor important ce determină specificitatea separărilor. După încărcarea probei în coloană folosind o soluţie tampon cu o concentraţie a sării suficient de mare pentru a determina legarea proteinei ţintă dar suficient de scăzută pentru a evita precipitarea proteinei, componentele nelegate din probă sunt spălate şi eliminate din coloană. Ulterior concentraţia de sare este scăzută în trepte sau continuu sub forma unui gradient pentru a se realiza eluţia selectivă a proteinei de interes. Alţi factori care trebuiesc controlaţi pentru obţinerea rezultatelor reproductibile includ pH-ul, temperatura şi aditivii ce influenţează stabilitatea proteinei. În general, HIC este o metodă de separare blândă datorită acţiunii stabilizatoare a sărurilor iar rata de recuperare este adesea ridicată.

Cromatografia prin interacţiuni tiofilice poate fi considerată o metodă din aceeaşi categorie cu HIC. Matricea poartă liganzi liniari ce conţin atomi de sulf. Iniţial structurile tiofilice erau obţinute din suporturi activate cu vinil sulfonă şi din 2- mercapto – etanol. Ambele grupări funcţionale, sulfonă şi tioeter, prezente în structura ligandului păreau să acţioneze într-o manieră complementară pentru a amplifica afinitatea de legare a proteinei. Realizările mai recente în special în domeniul industrial implică mai mult liganzi compuşi din heterociclii cu atomi de azot sau de sulf. Această metodă de separare a fost aplicată în special pentru purificarea anticorpilor din surse naturale sau proveniţi din recombinare datorită specificităţii certe a agenţilor adsorbanţi faţă de această clasă de proteine.

Prin modul său de funcţionare, cromatografia prin interacţiune tiofilică seamănă cu HIC prin faptul că adsorbţia proteinelor este favorizată de săruri cu concentraţii ridicate iar eluţia are loc când concentraţia salină este scăzută. Totuşi, câteva diferenţe între cele două tehnici arată modurile diferite de adsorbţie a proteinelor. Interacţiunile hidrofobe nu au loc cu adsorbanţi tiofilici din moment ce structurile tioetilsulfonice nu posedă o hidrofobie pronunţată. Spre deosebire de HIC, interacţiunile dintre ligand şi proteină sunt relativ

independente de temperatură şi clorura de sodiu stimulează desorbţia proteinelor. În timp ce albumina este puternic adsorbită de liganzi hidrofobi, agenţii de adsorbţie tiofilici manifestă o afinitate deosebită pentru imunoglobuline.

Cromatografia prin inducţie de încărcare hidrofobă (HCIC) este o tehnică recentă de adsorbţie a proteinelor ce implică liganzi bazici sau acizi slabi care sunt neîncărcaţi la pH fiziologic. Adsorbţia se bazează pe asocieri hidrofobe în timp ce desorbţia rezultă din respingerea ionică dintre ligand şi proteina adsorbită când pH-ul este schimbat într-o direcţie adecvată. Selectivitatea crescută pentru anticorpi poate fi obţinută când sunt folosiţi liganzi ce combină un situs tiofilic cu structure heterociclice ionizabile cum ar fi 4-mercaptoetil piridină [Boschetti, 2002]. Acest ligand (pK^a 4.8) este neîncărcat la pH neutru şi se încarcă prin scăderea pH-ului la 4-5, rezultând desorbţia ca şi consecinţă a forţelor de respingere dintre mediul adsorbant şi anticorpul încărcat pozitiv.

8.6.6. Cromatografia prin covalenţă

Cromatografia prin covalenţă, spre deosebire de alte tehnici de afinitate, presupune formarea şi ruperea unor legături covalente între SD şi ligand. Liganzii proteicii sunt adesea ataşaţi prin intermediul grupărilor N- sau C- , cu scopul de a forma legături stabile care sunt rezistente la condiţiile cromatografice şi dificil de eliberat fără distrugerea proteinei. Singura grupare funcţională cu structură chimică adecvată pentru formarea unei legături covalente stabile şi care de asemenea poate fi desfăcută în condiţii uşoare este grupul tiol. Astfel cromatografia prin covalenţă a fost aproape exclusiv aplicată în scopul izolării peptidelor ce conţin grupări tiol. Această tehnică este denumită de unii autori şi cromatografie de adsorbţie tiofilică.

În timp ce grupările tiol pot participa la un număr de racţii chimice datorită proprietăţilor de nucleofilie, aşa numitul schimb tiol-disulfid este utilizat în cromatografia prin covalenţă. Reacţia poate fi descrisă astfel:

$$R - S - S - R + 2R1 - SH \rightarrow 2R - SH + R1 - S - S - R1 \qquad (5)$$

Reacţia poate fi privită fie ca o înlocuire nucleofilă, fie ca un proces redox, deoarece starea oxidativă a fiecărui atom de sulf se modifică în cursul reacţiei. Schimbul tiol-disulfid joacă un rol important în procesele biochimice cum ar fi biosinteza proteinelor, agregarea proteinelor şi interacţiunilor ligand - receptor. În practică ligandul este un complex reactiv disulfidic constituit dintr-un tiol alifatic şi un tiol aromatic ca de exemplu 2-tiopiridina. În timpul aplicării, o proteină ce conţine tiol va fi imobilizată pe faza solidă ca urmare a reacţiei tiol-disulfid. Desorbţia proteinei se realizează utilizându-se un exces de tiol alifatic cu greutate moleculară mică în faza mobilă. Mai nou, sunt utilizate pentru imobilizarea reversibilă a tiolilor matrici cu tiosulfonaţi şi tiosulfinaţi.

Aşa cum se poate intui din mecanismul de reacţie prin intermediul cromatografiei prin covalenţă se pot izola proteine ce conţin nativ grupări tiol sau proteine la care grupările tiol pot fi introduse de exemplu prin reacţii de reducere ale punţilor disulfidice existente.

8.6.7. Cromatografia de afinitate membranară

Termenul de cromatografie de afinitate membranară se referă la formatul suportului. În timp ce la cromatografia de afinitate „normală" matricea de afinitate este susţinută de coloane în timpul procesului cromatografic, în metoda prezentată sunt utilizate membrane. Prin utilizarea membranelor pot fi depăşite limitările cromatografiei lichide în coloană cu strat compact date de procesele de compactare ce necesită timp, suplimentarea cu lichid la presiune mare în coloană şi restricţiile de transfer ale maselor. În straturile poroase, transferul maselor este limitat prin difuziunea lentă a substanţelor analizate în pori (la final) a materialului. Membranele sunt constituite din canale poroase consecutive ce permit difuziunea filmului la suprafaţa membranei în interiorul canalelor ca singura rezistenţă opusă transportului. Difuziunea filmului este de obicei de câteva ori mai rapidă decât difuziunea prin pori, ceea ce permite ca limitarea proceselor de adsorbţie să fie permutate la interacţiunile ligand – substanţă dizolvată. Aceste procese sunt identice cu cele din cromatografia pe coloană şi în general foarte rapide. Structura macroporoasă şi faptul că membranele suprapuse în teancuri sunt subţiri în comparaţie cu straturile compacte din cromatografie determină curgeri la presiuni mici ceea ce permite un flux crescut şi prin urmare timpi de separaţie mai mici. Capacitatea de legare necesară este atinsă prin folosirea unor suprafeţe interne ale membranelor suficient de mari. Avantajul unor fluxuri mari se poate transforma în dezavantajul unui timp prea scurt de contact al soluţiei. Un singur strat de membrană poate avea teoretic o capacitate mare, dar capacitatea poate fi mult mai mică datorită timpului de interacţiune limitat al probei. În cazul interacţiunilor de afinitate puternice, procesul de eluţie al moleculei ţintă limitează şi mai mult acest procedeu prin faptul că timpul de contact poate să nu fie suficient pentru o eluţie rapidă a materialului legat, rezultând diluţii crescute ale probelor recuperate. Abordări menite să depăşească aceste inconveniente include folosirea de straturi multiple de membrane în cazul legării insuficiente sau reciclarea eluentului tampon în cazul unei desorbţii lente.

Compoziţia chimică a membranelor este destul de variată. Sunt folosite materiale pe bază de celuloză şi derivaţi ai acestora, poliamidă, poliacrilamidă, poliacrilonitril, polisulfonă, polivinildienă, polistiren, polipropilen, polietilenă şi altele. În principiu aceste materiale pot fi conjugate cu orice ligand cu structură chimică similară acelora din modulul de pe coloană. Ca şi în acest din urmă caz, toate tipurile de cromatografie de afinitate pot fi efectuate şi în modul membranar. Acum sunt disponibile comercial membrane activate şi cuplate cu ligand, care au deja multiple aplicaţii.

8.7. Aplicațiile interacțiunilor de afinitate

Interacţiunile de afinitate pot fi exploatate atât pentru aplicaţii analitice cât şi de sinteză. Pentru scopuri preparative modul de lucru va fi în cele mai multe cazuri cromatografia de joasă presiune sau tehnologia membranelor, în timp ce HPLC, electroforeza capilară sau biosenzorii vor fi utilizaţi în primul rând pentru aplicaţii analitice. În plus, tehnicile de afinitate analitice nu sunt folosite doar pentru determinarea unei anumite molecule în analiza farmaceutică, chimică, clinică sau a mediului, dar şi pentru identificarea ligandului şi studiul interacţiunilor ligandsubstanţa dizolvată.

8.7.1. Purificarea proteinelor farmaceutice

Datorită evoluţiei în biotehnologie, proteinele recombinate cuprind acum, pe lângă produşii sanguini şi proteine de origine umană sau animală, un număr crescut de produse farmaceutice. Indiferent de sursă, ţesut animal sau uman, ouă, plasmă sanguină, culturi celulare obţinute de la mamifere sau culturi bacteriene, sau animale/plante transgenice, toate aceste produse au origine biologică şi necesită o purificare riguroasă. În funcţie de originea materialului, impurităţile includ bacterii, virusuri, lipopolizaharide (endotoxine), prioni, ADN, ARN, proteine ale celulei gazdă, carbohidraţi, fosfolipide etc. În conformitate cu criteriile Administraţiei pentru Alimentaţie şi Medicamente a Statelor Unite (FDA) precum şi ale Agenţiei Europene de Evaluare a Produselor Medicale (EMEA), produsul final biotehnologic trebuie să fie bine caracterizat; el trebuie să aibă puritate, eficienţă, stabilitate, farmacocinetică, farmacodinamică, toxicitate şi imunogenicitate bine definite. Acestea trebuie analizate pentru identificarea materialelor contaminante menţionate mai sus ce provin de la sursă; totuşi proteinele terapeutice conţin adesea un amestec de izoforme ce îşi au originea în modificările posttranslaţionale, plierea defectuoasă, agregarea şi alte reacţii de degradare chimică sau fizică.

Purificarea proteinelor poate varia de la un procedeu simplu de precipitare într-o singură etapă până la procese de producţie la scară largă care au fost validate. În majoritatea cazurilor vor fi necesare mai mult de o etapă pentru îndepărtarea tuturor impurităţilor. Prelucrarea ulterioară a materialelor de producţie, oricare ar fi sursa acestora, presupune de obicei trei etape majore: captarea, purificarea intermediară şi rafinarea uneori cunoscute ca şi CIPP. După prepararea extractului şi separarea de resturi celulare prin procedee ca filtrarea sau extracţia lichid/lichid, obiectivul etapei de captare este izolarea concentrarea şi stabilizarea proteinei. Masa majoritară de impurităţi este îndepărtată în timpul purificărilor intermediare ce urmează etapei descrise, urmând ca în faza finală de rafinare să se atingă puritatea înaltă. Toate cele trei etape implică adesea proceduri cromatografice; etapa de rafinare este uneori compusă din două proceduri de purificare (cromatografice). Cromatografia de

afinitate este folosită cel mai eficient în etapele de captare şi purificare intermediară, adesea acestea reducându-se la o singură etapă dacă sunt utilizaţi liganzi cu înaltă selectivitate. Alte tehnici cromatografice frecvent utilizate în purificarea proteică includ filtrarea în gel, cromatografia de schimb ionic şi cromatografia de fază inversă. Cunoaşterea proprietăţilor proteinei ţintă şi ale impurităţilor va fi utilă în cursul efectuării proceselor de purificare.

Până la 50-80 % din costurile de producţie totale ale unui medicament proteic se datorează proceselor de purificare. Multe dintre tehnicile biochimice şi de biologie moleculară standardizate nu sunt neapărat echivalente cu eficienţa de lucru şi de cost a procesului tehnologic. Astfel, din motive economice, de asigurare a calităţii şi de complianţă, protocoalele de purificare convenţionale ce presupuneau precipitarea în săruri, la temperatură, pH sau cu polimeri cu greutate moleculară mare au fost schimbate cu tehnici selective bazate pe cromatografia de afinitate. Totuşi şi această abordare are inconvenientele ei. Astfel, când se foloseşte un ligand de afinitate provenit din sursă naturală, FDA pretinde ca ligandul folosit la obţinerea produsului biologic să îndeplinească aceleaşi standarde ca şi produsul final. Aşadar poate fi necesară o purificare riguroasă a ligandului. În plus în cursul cromatografiei vor avea loc inevitabil scăpări ale ligandului în produsul final. Faţă de aspectele toxicologice ce ţin de ligand, trebuie să avem în vedere faptul că ligandul va fi asociat cu produsul, formarea complexelor selective fiind un aspect inerent al purificării. Aceste complexe pot fi dificil de îndepărtat din produs. Pe de altă parte prin cromatografia de afinitate este posibilă îndepărtarea substanţelor pirogene şi endotoxinelor. Liganzii biologici pot fi scumpi, crescând astfel costurile de producţie. O parte din aceste dezavantaje pot fi depăşite prin folosirea liganzilor sintetici, care de altfel pot fi înalt selectivi. Limitele coloanelor de afinitate datorate presiunii mari de lucru şi limitărilor cineticii de transfer a maselor pot fi depăşite folosind tehnologia membranelor.

8.7.1.1. Proteine plasmatice

Proteine cu efect terapeutic cum ar albumina, factorii de coagulare şi imunoglobulinele au fost izolate din sângele uman cu mulţi ani în urmă. În ciuda apariţiei produselor obţinute prin recombinare, cea mai importantă sursă pentru asemenea produse rămâne în continuare izolarea din sângele uman. Deşi metodele tradiţionale de fracţionare a plasmei bazate pe etape de precipitare cu etanol sunt încă cele mai folosite în producţia curentă a preparatelor de albumină şi imunoglobulină G cu rol terapeutic, cromatografia de afinitate a fost introdusă în prepararea industrială a factorilor de coagulare VIII, IX şi XI, von Willebrand, fibronectina, antitrombina III, inhibitorul inter–α–tripsinei şi proteina C derivată plasmatic. În timp ce cromatografia de afinitate este folosită pentru captarea factorului VIII şi factorului IX folosind heparină imobilizată sau anticorpi monoclonali ca şi liganzi de afinitate, şi antitrombină III prin captarea pe un ligand de heparină din probe proaspete, tehnica este folosită ca etapă de

rafinare intermediară în cazul altor produşi. Uneori cromatografia de afinitate este folosită la îndepărtarea impurităţilor cum ar fi fibronectina de pe factorul von Willebrand folosind un ligand de gelatină. Factorul von Willebrand nu se leagă de gelatină şi este recuperat în fracţia de ieşire, fibronectina fiind adsorbită pe coloană. Deşi albumina poate fi legată de coloranţi, nici un procedeu comercial nu foloseşte cromatografia de afinitate pentru izolarea acestei proteine.

8.7.1.2. Proteine recombinate

Proteine recombinate cu implicaţii terapeutice denumite şi produse farmaceutice biotech (biotech pharmaceuticals), sunt produse prin tehnologia recombinării ADN. Acestea susţin o piaţă de desfacere mare cu o cifră de vânzare estimată de 16-17 miliarde de dolari americani în 2001. Actualmente pe piaţă se regăsesc mai mult de 50 de astfel de produse iar peste 40 sunt în faza III şi peste 60 în faza II de trialuri clinice. Anticorpii monoclonali reprezintă segmentul cu cea mai rapidă creştere, cu peste 20 de produse comercializate şi peste 20, 45 de produse în faza III respectiv în faza II. Insulina, hormonii de creştere, eritropoietina, interferonii, interleukinele, factorii de stimulare ai coloniilor granulocitare, enzime, factori de coagulare, vaccinuri şi anticorpi monoclonali reprezintă produse farmaceutice biotech. Deşi procesele de producţie nu sunt dezvăluite din cauza drepturilor de autor, acestea conţin cu siguranţă etape de cromatografie de afinitate. Mai mult, tehnica este utilizată şi mai extins în laboratoare, în cercetare şi dezvoltare.

Se pot distinge două tipuri de abordări generale. În primul tip proteina „nativă" interacţionează cu ligandul, iar a doua abordare implică aşa numitele terminaţii de afinitate fuzionate cu proteina de interes în care terminaţia se ataşează la ligand în timp ce proteina propriu-zisă nu se ataşează. Tehnologia de fuziune proteică a devenit un instrument important în producţia de proteine recombinate. Au fost elaborate o varietate de vectori de expresie cu secvenţe terminale diferite pentru fuziunea aproape oricărui tip de proteine ţintă ce poate fi clonată şi exprimată în celule gazdă.

Interacţiunile ce au fost utilizate ca bază pentru afinitatea proteinei de fuziune includ interacţiuni ale enzimelor cu substraturi sau inhibitori, interacţiuni carbohidrat - proteină, domenii de legare a biotinei, interacţiuni antigen – anticorp, aminoacizi încărcaţi pentru metode bazate pe încărcătură şi resturi poli(His) pentru legări metalchelator (tabelul 8.5) [Einhauer, Jungbauer, 2001]. Fiecare secvenţă terminală are propriile avantaje şi dezavantaje şi selecţia trebuie făcută pe baza proteinei de interes şi tehnicii de afinitate adecvată.

Tabelul 8.5. Secvenţe terminale de afinitate pentru proteine recombinate

Secvenţă terminală fuzionată	*Dimensiune*	*Fuziune la capătul C- sau N- terminal*
Enzime		
glutation-S-transferaza	26 kDa	N
β-galactozidaza	116 kDa	C, N
Domenii de legare polipeptidice		
domeniul de legare IgG al proteinei A	14 – 31 kDa	N
domeniul de legare IgG al proteinei G	28 kDa	C
Domenii de legare ale carbohidraţilor		
proteina de legare a maltozei	40 kDa	N
domeniul de legare al celulozei	111 aninoacizi	N
Domenii de legare streptavidină-biotină		
domeniul de legare al biotinei	8 kDa	N
Strep-tag	9 aminoacizi	C, N
Epitopi antigenici		
FLAG™ –tag	8 aminoacizi	N
Aminoacizi încărcaţi		
poli(Arg)	5 -15 kDa	C
poli(Asp)	5 16 kDa	C
Interacţiuni metal – chelator		
poli(His)	4 – 9 kDa	C, N

Se consideră că, o secvenţă terminală nu ar trebui să intervină asupra modului natural de pliere al proteinei şi nu ar trebui să inhibe funcţia ei normală sau situsurile ei active şi ar trebui să fie expusă pe suprafaţa proteinei pentru un maxim de interacţiune cu ligandul.

În plus secvenţa terminală ar trebui să fie potrivită unor procedee de afinitate uşoare şi de preferat ieftine, şi ar trebui să poată fi uşor îndepărtată. În mod curent în tehnologia proteinelor recombinate sunt folosite predominant secvenţele terminale poli(His), deoarece par a fi compatibile cu toate sistemele de expresie folosite în prezent.

Prin folosirea unor suporturi de afinitate adecvate, cum ar fi suporturi magnetice, abordările bazate pe secvenţe terminale pot fi aplicate şi în procesarea robotizată a probelor pentru purificarea automatizată a proteinelor. Întrebarea dacă secvenţa terminală trebuie sau nu trebuie să fie îndepărtată, depinde de utilizarea finală a proteinei. Pentru caracterizarea proteinelor sau pentru scopuri diagnostice poate fi posibil ca secvenţa terminală să rămână ataşată; totuşi pentru aplicaţii farmaceutice îndepărtarea precisă a peptidului fuzionat va fi necesară în cele mai multe cazuri pentru a certifica autenticitatea produsului.

În plus, secvenţele terminale pot fi imunogenice, în special terminaţia FLAG™ care a fost concepută pentru a fi imunogenă. Astfel, în proteinele de

fuziune au fost concepute situsuri de clivaj destinate proteazelor. Totuşi acest lucru necesită îndepărtarea în siguranţă a enzimei şi a secvenţei clivate de pe proteina de interes şi adaugă în plus etape de purificare şi costuri adiţionale.

De asemenea poate avea loc degradarea proteolitică a produsului. Astfel, deşi în laborator este o tehnică excelentă, pentru producţia industrială, la scară largă a proteinelor, folosirea acestor secvenţe terminale de afinitate poate să nu fie întotdeauna adecvată.

În afara folosirii lor la purificarea prin afinitate a proteinelor recombinate, anumite secvenţe terminale pot fi utilizate şi în domeniul detecţiei specifice în aplicaţii imunochimice în condiţii ce produc denaturarea în tehnica Western blot dar şi în stare nativă pentru ELISA, constituindu-se într-un instrument de analiză util pentru monitorizarea nivelului expresiei proteinelor sau pentru urmărirea unei proteine în timpul proceselor de purificare.

8.7.2. Aplicaţii analitice

Cromatografia de afinitate poate fi folosită sub diverse forme pentru separarea sau analiza anumitor substanţe solubile. Separarea cromatografică a unei substanţe care acţionează cu un ligand de afinitate poate fi primul pas în cuantificarea concentraţiei sale în soluţie. Sistemele ce utilizează cromatografia de afinitate de înaltă performanţă (HPAC) şi electroforeza de afinitate capilară, au fost construite pentru a creşte viteza acestui proces şi pentru automatizarea măsurătorilor. Metodele tradiţionale de imunoanaliză pot fi proiectate pe baza liganzilor de afinitate imobilizaţi folosind suporturi cum ar fi perle, geluri sau plăci. Detecţia electronică a interacţiunilor de afinitate au dus la dezvoltarea biosenzorilor de afinitate care nu fac doar determinarea concentraţiei substanţei de analizat ci pot face şi o caracterizare cantitativă a interacţiunilor de afinitate. În plus tehnica poate fi adaptată şi screeningului de mare capacitate (HTS).

Tehnicile de afinitate sunt întrebuinţate şi pentru îndepărtarea specifică a componentelor dintr-o probă ce interferă cu capacitatea sistemului analitic. Una dintre dificultăţile majore ale analizei peptidelor şi proteinelor din serul uman este intervalul mare de concentraţii pe care le pot atinge proteinele în probă. Albumina serică umană variază de la aproximativ 55% la 75%, iar imunoglobulinele variază de la aproximativ 8 până la 25%. Îndepărtarea acestor proteine poate fi realizată cu ajutorul matricelor de „depleţie prin afinitate" disponibile comercial ce conţin anticorpi pentru proteina G care reduc semnificativ încărcarea proteică a probei permiţând analiza componentelor minoritare.

„Extracţia prin afinitate" defineşte procedeul prin care substanţa analizată este izolată specific şi concentrată prin cromatografie de afinitate dintr-o probă înaintea analizei prin altă metodă fie off-line fie online. Metoda off-line utilizează tipic coloane de afinitate de joasă performanţă ambalate în cartuşe de unică folosinţă. În metoda online, la coloana analitică este conectată

o coloană HPLC ce conţine matricea de afinitate prin intermediul unei valve de pornire.

Tehnicile analitice sunt din ce în ce mai mult folosite la descoperirea medicamentelor pentru identificarea liganzilor (ligand fishing) şi a structurilor precursoare şi în ADME (adsorbţie, distribuţie, metabolism şi excreţie) precoce cu scopul studierii interacţiunilor dintre ligand şi substanţa analizată, cum ar fi legarea medicament proteină, inclusiv aspecte stereochimice, pentru determinarea complexului stoichiometric, pentru estimarea constantelor de legare şi a dinamicii de legare. Desigur metodele pot fi utilizate şi în stadii ulterioare ale elaborării unui medicament pentru analiza potenţialelor medicamente.

8.7.2.1. Cromatografia de afinitate de înaltă performanţă (HPAC)

HPAC combină specificitatea interacţiunilor ligand - substanţă de analizat cu viteza, eficienţa şi automatizarea HPLC. Teoretic orice ligand poate fi mobilizat pe suporturi ce pot rezista presiunilor înalte aplicate în HPLC. Exemple de suporturi de afinitate ce sunt adecvate acestor condiţii includ gelul de siliciu sau sticlă modificat, perle de azlactonă sau medii de polistiren hidroxilat. Stabilitatea şi eficienţa acestor suporturi permite utilizarea lor în echipamentul standard HPLC. Deşi materialele din HPLC fac din HPAÇ o metodă mai scumpă în comparaţie cu cromatografia de afinitate de joasă performanţă, HPAC poate fi un instrument foarte util pentru determinări analitice în plus faţă de potenţialul său de purificare a compuşilor cu viteze ridicate.

Probabil cel mai cunoscut exemplu de aplicaţie analitică a cromatografiei de afinitate este determinarea hemoglobinei glicozilate în laboratorul clinic, ca expresie a nivelurilor medii ale glucozei sanguine în timp, pentru controlul diabetului. Hemoglobina glicozilată poate fi separată de varianta nativă folosind acid aminofenilboric ca ligand, şi raporturile relative ale fracţiunilor glicozilate şi neglicozilate sunt cuantificate prin absorbanţa hemoglobinei la 414nm. Anterior au fost prezentate succint şi alte aplicaţii clinice. HPAC ce foloseşte proteina A imobilizată ca şi ligand a fost utilizată pentru analiza imunoglobulinelor plasmatice sau din diferite medii de cultură, iar cromatografia de afinitate cu lectină a fost utilizată pentru determinarea izoenzimelor sau microheterogenităţii glicoformelor glicoproteinelor. Totuşi, majoritatea aplicaţiilor recente ale cromatografiei de afinitate analitice au fost în domeniul interacţiunilor proteină-medicament. Concret, HPAC a fost folosit pentru analiza ataşării medicamentului de proteină (albumina), inclusiv a aspectelor legate de stereospecificitate [Hage, 2002], dar este posibilă şi determinarea interacţiunilor enzimă-substrat.

În tehnica de eluţie zonală (cea mai folosită metodă de studiere a interactţiunilor medicamentoase cu o fază staţionară proteică în HPAC) schimbarea timpului de retenţie al factorului de capacitate k' este monitorizat ca o

funcţie a concentraţiei a unui agent ce competiţionează în faza mobilă. Metoda de eluţie frontală este o altă tehnică utilizată în HPAC. Coloana este constant alimentată cu o soluţie ce are o concentraţie cunoscută a substanţei dizolvate. În timp ce SD se leagă de ligand, ligandul devine saturat şi cantitatea de compus ce eluează din coloană creşte, formând o curbă ascendentă. Din aceste experimente poate fi obţinută informaţia calitativă şi cantitativă, incluzând comparaţii ale afinităţii relative de legare, înlocuirea prin competiţie a unei substanţe analizate de către alţi compuşi sau determinarea constantelor de echilibru şi de debit.

Cromatografia de imunoafinitate de înaltă performanţă (HPIAC) devine un instrument din ce în ce mai comun pentru analiza compuşilor biologici şi sintetici. În plus faţă de utilizarea acesteia pentru detecţia directă a substanţelor utilizate în analize cromatografice şi imunoextracţia substanţelor analizate, coloanele de imobilizare pentru anticorpi şi antigene sunt aplicate pentru diverse tipuri de imunoanalize. Această abordare cunoscută şi ca imunoanaliză cromatografică este adecvată în special pentru determinarea unor urme de substanţe care prin ele însele nu produc un semnal detectabil facil. Acest impediment este depăşit prin imunoanalizele cromatografice folosind un anticorp marcat sau un analog al substanţei de analizat pentru detecţia indirectă. Modalităţile comune includ analize de competitivitate, analize sandwich şi analize imunometrice one-site (un situs). În locul anticorpilor pot fi folosite şi fragmente Fab. Iniţial marcajele erau reprezentate de enzime sau capete terminale fluorescente.

Ca şi în analizele „staţionare", principiul imunoanalizelor prin legare competitivă implică incubarea probelor cu o cantitate prestabilită de substanţă de analizat marcată în prezenţa unei cantităţi limitate de anticorpi. Analiza poate fi efectuată prin injectarea simultană, detectându-se fie marcajul care eluează cu fracţiunile spălate fie compusul marcat care eluează în etapa de disociere. În injecţia secvenţială, marcajul este realizat după injectarea probei şi este analizat fie în materialul nereţinut, fie în materialul reţinut. În metoda prin substituţie, coloana este întâi saturată cu analogul marcat, urmând injectarea probei, analiza cantităţii de compus marcat care este spălat şi îndepărtat din coloană prin disocierea locală şi reconstituirea complexului. În analizele imunometrice tip sandwich two-site (două situsuri), sunt utilizaţi doi anticorpi diferiţi care se leagă de substanţa de analizat. Primul se ataşează de suportul solid şi este utilizat pentru extracţia moleculei ţintă iar al doilea anticorp este marcat şi este adăugat probei fie înainte, fie după injecţia acestuia în coloană. Al doilea anticorp marchează substanţa de analizat pentru a permite detecţia acesteia. În analizele imunometrice one-site, proba este incubată cu o cantitate în exces cunoscută de anticorp marcat. Acest amestec este ulterior aplicat unei coloane cu un analog imobilizat al substanţei de analizat care serveşte la extracţia anticorpilor care nu au fost legaţi de proba de analizat. Detecţia se face prin măsurarea fie a componentei marcate nereţinute fie a anticorpului care este disociat ulterior din coloană în etapa de eluţie. Prin HIPAC au fost analizaţi

mulţi compuşi printre care enzime, hormoni şi proteine dar şi molecule sintetice cum este teofilina. De asemenea este posibilă şi imunodetecţia post-coloană pentru cuantificarea unei anumite substanţe de analizat ce eluează dintr-o coloană HPLC prin utilizarea unui reactor post-coloană şi a unei coloane cu anticorp sau antigen imobilizat conectat la ieşirea coloanei HPLC analitice.

8.7.2.2. Electroforeza capilară de afinitate

Electroforeza capilară de afinitate este o tehnică analitică în care sunt înregistrate modelele de migrare ale interacţiunilor moleculare în câmp electric. Metoda este o variantă a electroforezei capilare folosită la identificarea legăturilor specifice şi la estimarea constantelor de legare cu condiţia ca interacţiunile să nu fie inhibate de condiţiile de separare şi ca moleculele ce formează complexe să poată fi diferenţiate de cele necomplexate. Astfel interacţiunea trebuie să schimbe molecula ca şi dimensiune, formă, încărcare sau orice alţi parametrii responsabili pentru o încărcare în sistemul de separare electroforetic. Avantajele folosirii electoforezei capilare sunt marea varietate de substanţe ce pot fi analizate, viteza de analiză şi consumul redus de probe şi substanţe. Un dezavantaj este limita concentraţiei detectabile adesea nesatisfăcătoare, în special când se aplică detecţia UV. În principiu metoda poate fi transferată şi tehnologiei chip.

Liganzii pot interacţiona cu substanţa analizată fie înainte, fie în timpul desfăşurării propriu-zise a electroforezei. Ultimul procedeu reprezintă metoda clasică de electroforeză de afinitate care este analogă cromatografiei de afinitate. Pentru analiza interacţiunilor cu afinitate slabă sau intermediară liganzii sunt utilizaţi liberi în soluţie sau imobilizaţi pe peretele capilar şi substanţa de analizat se deplasează în concentraţii constante de liganzi. În timpul interacţiunii cu ligandul se observă o schimbare a timpului de migrare a substanţei de analizat ce depinde de concentraţia ligandului. Această metodă nu necesită o concentraţie cunoscută a probei şi nici compuşii nu trebuie să fie puri. Pot fi analizate bănci de compuşi. Prin electroforeza capilară sunt studiate în mod tipic interacţiuni puternice, ca metodă de separare şi cuantificare a substanţei de analizat liberă sau legată într-un amestec de preincubare într-o singură etapă.

Electroforeza capilară de afinitate a fost utilizată la analiza constantelor de legare, a dinamicii de legare şi a stoichiometriei de legare a numeroase complexe ligand – substanţă de analizat, incluzând interacţiuni peptidă – peptidă, peptidă – oligonucleotidă, peptidă – heparină, proteină – ion metalic şi antigen – anticorp. Electroforeza capilară de afinitate cu schimb de migrare poate fi utilizată în scopul cercetării amestecurilor de compuşi pentru studiul afinităţii faţă de ligand, mai ales asociată cu spectrometria de masă, şi pentru studii structură-funcţie. În plus electroforeza capilară de afinitate este un element valoros pentru determinarea legării medicament-proteină inclusiv a aspectelor legate de stereochimia acestor interacţiuni.

Un domeniu de aplicaţii analitice în extindere este imunoanaliza bazată pe electroforeză capilară, definită şi electroforeză capilară de afinitate a probei. În aceste tehnici, substanţei de analizat i se permite să acţioneze cu un anticorp iar complexul rezultat este separat de substanţa de analizat liberă prin electroforeză capilară. Au fost descrise două tipuri distincte. În analiza directă sau noncompetitivă, proba pentru studiul de afinitate marcată de regulă cu un fluorofor este adăugată probei pentru legarea de molecula ţintă. Detecţia complexului reprezintă o măsură directă a probei în soluţia probă. În analiza competitivă, o ţintă marcată fluorescent şi o cantitate limitată de anticorp sunt adăugate probei permiţând ţintei marcate şi ţintei din probă să competiţioneze pentru anticorp. Moleculele marcate libere sau în complexe sunt separate şi detectate, cantităţile relative de compuşi marcaţi liberi sau legaţi depinzând de concentraţia substanţei de analizat din probă. Imunoanalizele prin electroforeză capilară s-au dovedit a fi metode versatile pentru o varietate de substanţe de analizat şi matrice probă [Heegaard, Kennedy, 2002]. S-au făcut determinări pe medicamente, hormoni, peptide, proteine, toxine, şi chiar virusuri şi bacterii. Substanţele de analizat pot fi măsurate direct în ser sau urină dar şi în probe de celule sau tisulare. Interesant, prima imunoanaliză pentru scrapia, prototipul encefalopatiei spongiforme, s-a bazat şi pe electroforeza capilară. În plus, imunoanalizele pot fi transferate şi pe chip-uri permiţând timpi de analiză extrem de reduşi. Un exemplu este dezvoltarea unei imunoanalize electroforetice capilare bazate pe chip pentru determinarea teofilinei în ser, unde electroforeza este completă în 35 secunde.

8.7.2.3. Biosenzori de afinitate

Realizările tehnicilor de imobilizare şi inovaţiile din domeniul bioelectronicii au dus la elaborarea unor noi dispozitive de detecţie bazate pe interacţiunea specifică dintre receptori, enzime şi anticorpi cu moleculele lor ţintă specifice, creându-se dispozitive de detecţie noi pentru domenii diverse cum ar fi controlul diagnosticului, tratamentului, controlul mediului şi al deşeurilor şi analiza dinamică a interacţiunilor substanţelor biologice. Deşi nu se bazează pe principii de separare cromatografice sau electroforetice, pentru funcţionarea lor aceşti senzori implică interacţiuni de afinitate. În plus biosenzorii sunt utilizaţi din ce în ce mai mult în multe domenii ale descoperirii de medicamente, incluzând identificarea ţintei, „ligand fishing", selecţia precursorului, elaborarea analizei, studii ADME precoce şi controlul calităţii [Cooper, 2002].

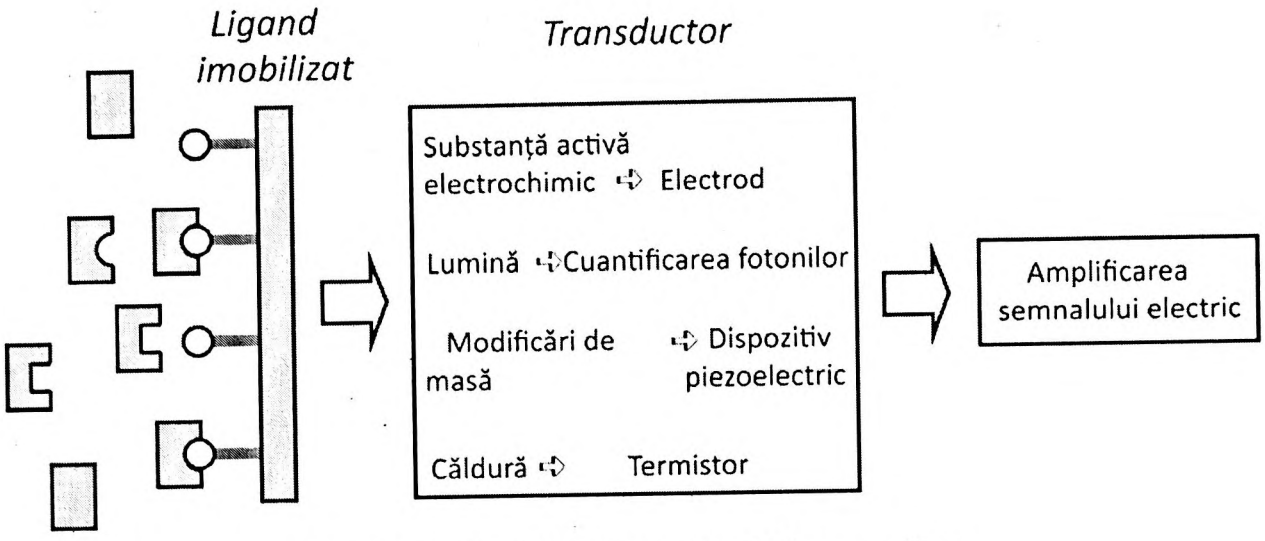


Fig. 8.3. Principiu schematic al biosenzorilor

Biosenzorii de afinitate sunt dispozitive biosenzor cu tranzistori ce funcţionează fără piese mobile bazate pe afinitatea ligandului în care interacţiunea moleculară ligand-ţintă este cuplată la un transductor ce converteşte reacţia biologică într-un semnal de ieşire electronic (fig. 8.3). Ligandul imobilizat poate fi orice moleculă (bio)specifică care interacţionează cu o moleculă ţintă. Poate fi chiar şi o celulă vie intactă care interacţionează cu substanţe specifice în soluţie cu care vine în contact. Transductorul „simte" modificările chimice subtile care au loc între ligandul imobilizat şi substanţa analizată. Procesul de detecţie poate implica efecte electrice cum ar fi modificări potenţiometrice sau fluctuaţii amperometrice, efecte optice cum ar fi absorbţia sau difracţia luminii, modificări ale densităţii sau masei precum şi diferenţe termice. Semnalele electronice sunt ulterior amplificate şi înregistrate. Dintre toate sistemele de detecţie probabil cel mai răspândit sistem este sistemul optic SPR (surface plasmon resonance), fiind disponibile comercial câteva tipuri de astfel de instrumente. SPR detectează modificări ale indicelui de refracţie din imediata vecinătate a stratului de suprafaţă a chip-ului senzor datorită legării moleculelor de suprafaţa liganzilor imobilizaţi. Această modificare este urmărită în timp real pentru determinarea concentraţiei unei substanţe analizate legate, a afinităţii substanţei analizate faţă de ligand şi a dinamicii interacţiunilor de asociere şi disociere (fig. 8.4). Pot fi analizate o varietate extrem de mare de molecule, de la celule şi bacteriofagi până la compuşi cu greutate moleculară mică cu mase relative până la 200 Da. Pot fi cercetate interacţiuni de afinitate înaltă sau joasă.

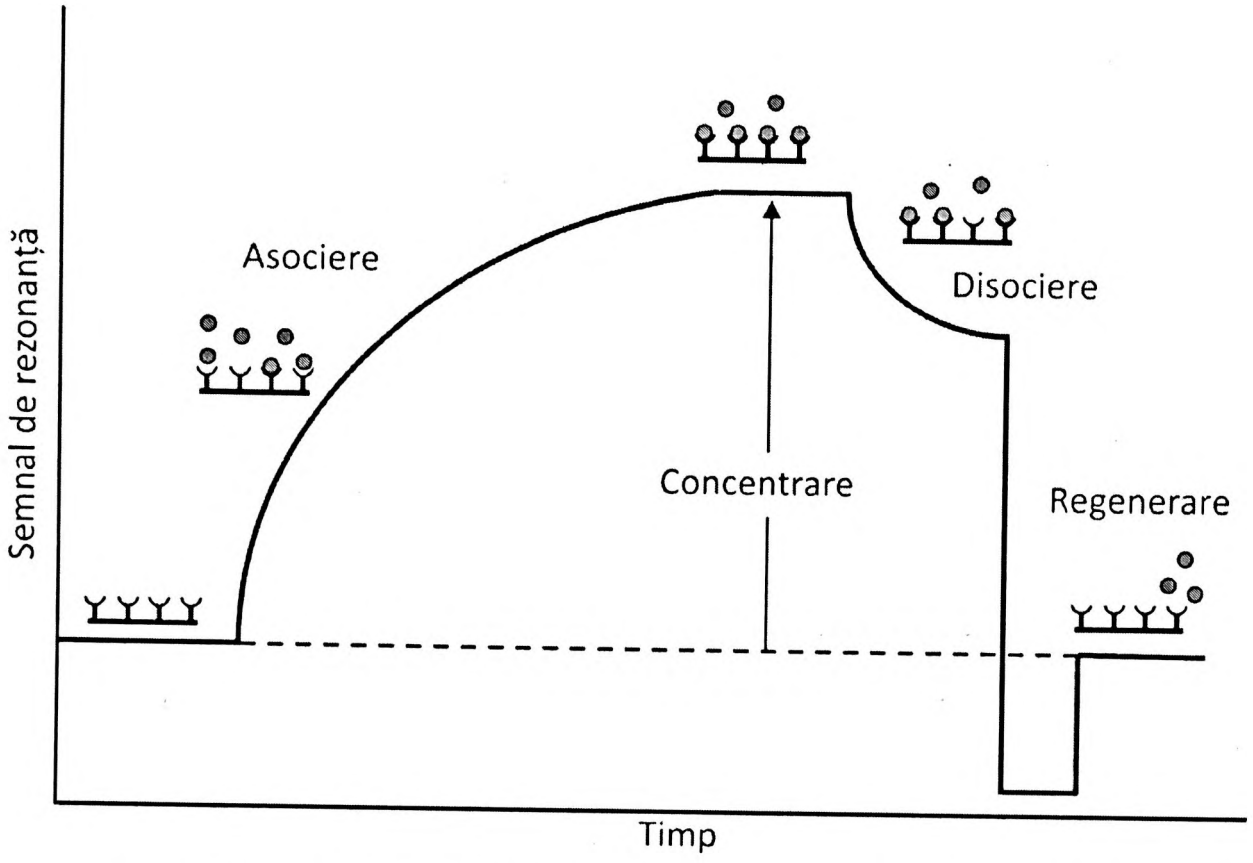


Fig. 8.4 Curba de legare tipică a unui biosenzor optic. Concentraţia substanţei de analizat rezultă din nivelul de răspuns la echilibrul curbei, în timp ce dinamica de legare poate fi calculată din rata de asociere respectiv rata de disociere observate. De obicei, este necesară refacerea ligandului prin eluţia în trepte, multe interacţiuni având durată de supravieţuire considerabilă. Ciclul de legare este repetat folosind diferite concentraţii ale substanţei de analizat, pentru obţinerea unor date compatibile unui algoritm de legare.

Substanţele chimice utilizate pentru imobilizarea ligandului sunt comparabile cu cele folosite pentru coloanele de afinitate. Un procedeu special este chimioadsorbţia spacer–ilor (distanţatorilor) ce conţin sulf pe suprafeţe de aur. Stabilitatea acestor legături o depăşeşte pe cea a legăturilor covalente de silan (SiH_4) cu sticla. Ulterior se poate realiza ataşarea ligandului prin intermediul grupărilor reactive ale distanţatorului. Ditiobis-succinimidil propionat este un distanţator comun al protocoalelor de imobilizare bazate pe chimioadsorbţie. În plus sunt disponibile comercial chip-uri cu suprafeţe preactivate.

În principiu orice moleculă şi chiar celule întregi pot fi imobilizate în biosenzori pentru analiza unui compus–ţintă dat. Există şi metode prin care receptori transmembranari au fost reconstituiţi în lipozomi sau în straturi lipidice ataşate sau adsorbite pe suprafaţa chip–ului. Când se analizează anumite molecule, aşa numiţii imunosenzori ce conţin anticorpi imobilizaţi sunt utilizaţi frecvent în laboratorul clinic şi în chimia mediului, dar şi pentru detecţia bacteriilor şi virusurilor în monitorizarea proceselor de igienizare şi alimentaţie. Există şi o lucrare asupra elaborării unui biosenzor constituit dintr-un anticorp monoclonal împotriva lipopolizaharidelor pirogene utilizat pentru detecţia

substanţelor pirogene în apă având limite de detecţie mai joase decât limitele reglementate prin Farmacopeea Statelor Unite [Taylor, şi colab., 2002]. „Aptasensori" ce conţin aptameri imobilizaţi par a profila o nouă clasă de biosenzori datorită avantajelor pe care aceştia le au faţă de anticorpi [O'Sullivan, 2002].

În prezent, biosenzorii optici sunt folosiţi în elaborarea medicamentelor pentru a confirma semnalele provenite de la HTS fluorescent, chemoluminiscent sau radiometric, şi pentru optimizarea precursorilor. În plus faţă de identificarea legăturilor intermoleculare, biosenzorii permit cercetarea dinamicii interacţiunilor biospecifice între liganzi şi molecule ţintă în timp real. Biosenzorii pot fi folosiţi şi pentru identificarea partenerilor de legare în cursul experimentelor ligand – fishing, inclusiv a băncilor combinatorii sau cercetarea extractelor tisulare şi celulare. O dată identificată o substanţă de legare, poate fi efectuată secvenţierea aminoacizilor prin spectrometrie de masă folosind biosenzorul ca dispozitiv de purificare prin afinitate micro – preparativă. Biosenzorii apropiaţi de TOFMS (time-of-flight mass spectrometry) desorbţie/ionizare laser matrix asistată pot fi folosite şi pentru studierea evenimentelor consecutive de legare, sistemelor de legare competitive şi pentru caracterizarea funcţională şi structurală a proteinelor incluzând modificările posttranslaţionale în proteomică. Metode integrative de detecţie prin spectrometrie de masă şi biosenzori pot furniza informaţii suplimentare despre funcţia ţintei şi specificităţile de legare, ceea ce poate duce la accelerarea elaborării de noi medicamente. În afară de determinarea interacţiunii medicament – ţintă, biosenzorii au fost utilizaţi la monitorizarea producerii anticorpilor şi citokinelor, pentru precizarea legării medicament – proteină în estimarea precoce a ADME şi în controlul calităţii, metodele de analiză putând fi validate în concordanţă cu recomandările Conferinţei Internaţionale pentru Armonizare (IHC) ale Cerinţelor Tehnice pentru Înregistrarea Produselor Farmaceutice de Uz Uman. Ulterior, tehnologia a fost aplicată analizelor serologice ale probelor din clinică pentru determinarea titrurilor anticorpilor.

CAPITOLUL 9

IDENTIFICAREA MEDICAMENTELOR PE BAZA REZONANȚEI MAGNETICE NUCLEARE

9.1. Introducere

Obţinerea medicamentelor se confruntă cu noi provocări, odată cu numărul mare de proteine produse în era post-genomică. Determinarea structurii, care este acum îmbunătăţită şi mult mai rapidă datorită cristalografiei cu raze X şi a spectroscopiei prin rezonanţă magnetică nucleară (RMN), oferă bazele pentru noile posibilităţi de producţie a medicamentelor pe baza structurii. Astfel, screening-ul proteinelor pentru băncile de molecule mici, a devenit o problemă importantă. In timp ce metodele de screening de mare capacitate (HTS) permit sute sau mii de scanări într-un timp scurt, necesitatea tehnologiilor de screening „inteligent" care pot detecta componente omise de filtrul HTS, este în continuă creştere.

Screening-ul inteligent, care poate identifica aspecte ale funcţiilor proteinelor, devine din ce în ce mai important, pe măsură ce noi ţinte sunt obţinute din baza de date genomică. Deşi analizele cu raze X pot determina structurile proteinelor fără limitări datorită dimensiunii, mult mai rapid decât spectroscopia RMN, cea din urmă are avantajul unei analize mai detaliate a interacţiunilor liganzilor. In ciuda complexităţii unor parametrii RMN, există parametri sensibili şi uşor accesibili care sunt supuşi modificărilor în spectrul corespunzător proteinelor, în urma legării ligandului. Mulţi dintre aceşti parametri au putut fi utilizaţi pentru a dezvolta protocoale rapide de screening. În relaţia structură-activitate (SAR) prin RMN, sunt observate rezonanţele proteinelor.

Modificările în structura proteinelor induse de legarea ligandului, care cauzează transformări chimice (*chemical shift,* dependenţa energiei magnetice nucleare de mediul electronic din moleculă), sunt utilizate pentru a detecta localizarea la nivelul proteinei a locului interacţiunii cu ligandul. Tehnica este utilizată pentru screening-ul iniţial şi pentru rafinarea subsecventă. SAR prin RMN necesită marcarea izotopică a proteinei şi este de obicei limitată la proteine cu o greutate moleculară mai mică de 30-40 kDa. Această limită a fost recent extinsă la proteine cu greutatea moleculară de aproximativ 100 kDa prin utilizarea unor noi strategii de marcare.

Alternativ, poate fi observat spectrul RMN al ligandului. Această clasă de tehnici oferă informaţii asupra legării ligandului. Mulţi parametri RMN ai ligandului sunt utilizaţi pentru a detecta interacţiunea cu proteina. Unele dintre aceste tehnici permit cartografierea epitopilor de legare, oferind astfel informaţii importante pentru obţinerea medicamentelor. Alte metode bazate pe ligand au un potenţial important pentru HTS.

Cele două abordări sunt complementare, oferind informaţii referitoare la cele două feţe ale interacţiunii. Prima parte a acestui capitol descrie SAR prin RMN, iar cea de-a doua parte descrie tehnici pentru observarea liganzilor. Câteva review-uri au descris aspecte diferite ale screening-ului prin RMN [Roberts, 2000; Shapiro, Wareing, 1998; Diercks şi colab., 2001]. Un referat general recent oferă o descriere comprehensivă a acestui domeniu, cu numeroare detalii tehnice. Intenţia acestui capitol este de a oferi o privire generală asupra celor mai importante tehnici utilizate în screening-ul RMN [Stockmann, Dalvit, 2002].

9.2. Relaţia structură-activitate (SAR) prin RMN

SAR prin RMN, propus pentru prima dată de Fesik şi colab. (1996), este bazată pe observarea modificărilor transformărilor chimice în spectrele H1-N15-heteronuclear single quantum spectroscopy (HSQC) datorate interacţiunilor liganzilor. Semnalele în spectrele H^1 N^{15}-HSQC(coerenţa cu cuantum simplu a unui heteronucleu C^{13} sau N^{15}) reprezintă scheletul amidic al proteinelor (grupările NH_2 ale Asn şi Gln).

Din moment ce transformările chimice ale amidelor sunt foarte sensibile la conformaţia aminoacizilor şi la interacţiunile electrostatice ale scheletului HN şi CO, rearanjamente minore la nivelul proteinelor, iniţiate de legarea ligandului pot cauza modificări chimice semnificative. Este importantă definirea pragului standard pentru evaluarea transformărilor chimice. Hajduk (2000) a arătat că modificările chimice $\Delta\delta$ sunt semnificative în evaluarea de ansamblu a dimensiunilor spectrale mai mari de 0,1 ppm:

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta(^1H))^2 + (0.2 \cdot \Delta\delta(^{15}N))^2} \geq 0.1\ ppm$$

Această presupunere este aproape identică cu definiţia anterioară:

$$\Delta\delta = 5 \cdot |\Delta\delta(^1H)| + |\Delta\delta(^{15}N)| \geq 4.5\ ppm$$

Ambele relaţii reprezintă aproximativ o perturbare a transformărilor chimice cu o valoare similară cu mărimea tipică a semnalului în spectrul HSQC.

Figura 9.1 prezintă exemple ale spectrelor HSQC obţinute pentru concentraţii crescânde de liganzi. Cele două spectre au fost înregistrate pentru domeniul SH_2 Nterminal al fosfatidilinozitol-3-kinazei în urma utilizării a doi liganzi diferiţi, fosfotirozina (ptyr, stânga) şi un ligand peptidic care se leagă cu o constantă de disociere micromolară. Cei doi liganzi determină seturi diferite de modificări ale spectrului, reprezentând interacţiuni diferite ale ligandului cu proteina. Peptidul mai mare (EEEpYMPME-NH_2) determină efecte adiţionale comparativ cu Ac-ptyr-NH_2 şi perturbări mai importante ale transformărilor chimice.

În SAR prin RMN, sunt adăugaţi simultan câţiva liganzi la o proteină şi perturbările transformărilor chimice sunt desfăşurate în experimente subsecvente cu un singur ligand. Procesul descoperirii modulatorilor cu molecule mici şi optimizării ligandului este prezentat în figura 9.2. Screening-ul iniţial oferă liganzi cu afinitate scăzută care trebuie optimizaţi. Modulatorii cu molecule mici pentru două situsuri de legare diferite trebuie să fie identificaţi în procesul iniţial de screening. Două fragmente optimizate sunt unite pentru a forma un ligand mai mare cu afinitate crescută pentru proteină. Combinarea cu informaţiile structurale referitoare la proteină ajută la adaptarea sintetică a ligandului la situsul de legare al proteinei. Publicaţia iniţială a SAR prin RMN de către Fesik şi colab. (1996) a prezentat experimente de legare cu proteina de legare FK506 (FKBP). Au fost identificaţi numeroşi compuşi cu afinitate scăzută pentru două situsuri de legare diferite. La final, două molecule au fost delimitate cu ajutorul liganzilor cu lungimi diferite. În acest proces au fost obţinuţi inhibitori cu afinitate nanomolară.

Principiul SAR prin RMN era cunoscut şi utilizat ocazional cu mult timp înainte de introducerea sa ca metodă de screening.

În unele experimente iniţiale, interacţiunile domeniului SH_2 au fost probate cu ajutorul HSQC şi spectroscopiei totale de corelaţie (total correlation spectroscopy - TOCSY) [Gunther şi colab., 1996]. Cu toate acestea, lucrarea lui Fesik despre SAR prin RMN a iniţiat dezvoltarea screening-ului prin RMN ca o tehnologie pentru descoperirea compuşilor modulatori cu afinitate scăzută.

În cazul screening-ului iniţial, semnalele spectrului HSQC de obicei nu sunt datorate reziduurilor aminoacizilor din structura proteinelor. Astfel, informaţiile obţinute din SAR prin RMN sunt doar de natură calitativă, pentru a determina dacă vreun reziduu este implicat într-o interacţiune cu ligandul prezent în soluţie. Pentru etapa de purificare, este important ca semnalele HSQC să fie atribuite la reziduurilor. Tehnicile de identificare a structurii proteinelor sunt tehnici de rutină în laboratoarele de RMN şi pot fi obţinute în câteva zile până la câteva săptămâni pentru proteine cu o greutate moleculară mai mică de 30 kDa [Clore, Schwieters, 2002]. Astfel este posibilă cartografierea regiunii de legare în structură, la locul unde ligandul interacţionează cu proteina. Deşi reziduurile care prezintă efecte la SAR prin RMN nu sunt în mod necesar în

contact direct cu ligandul, modelul transformărilor chimice oferă de obicei informaţii importante pentru producţia medicamentelor.

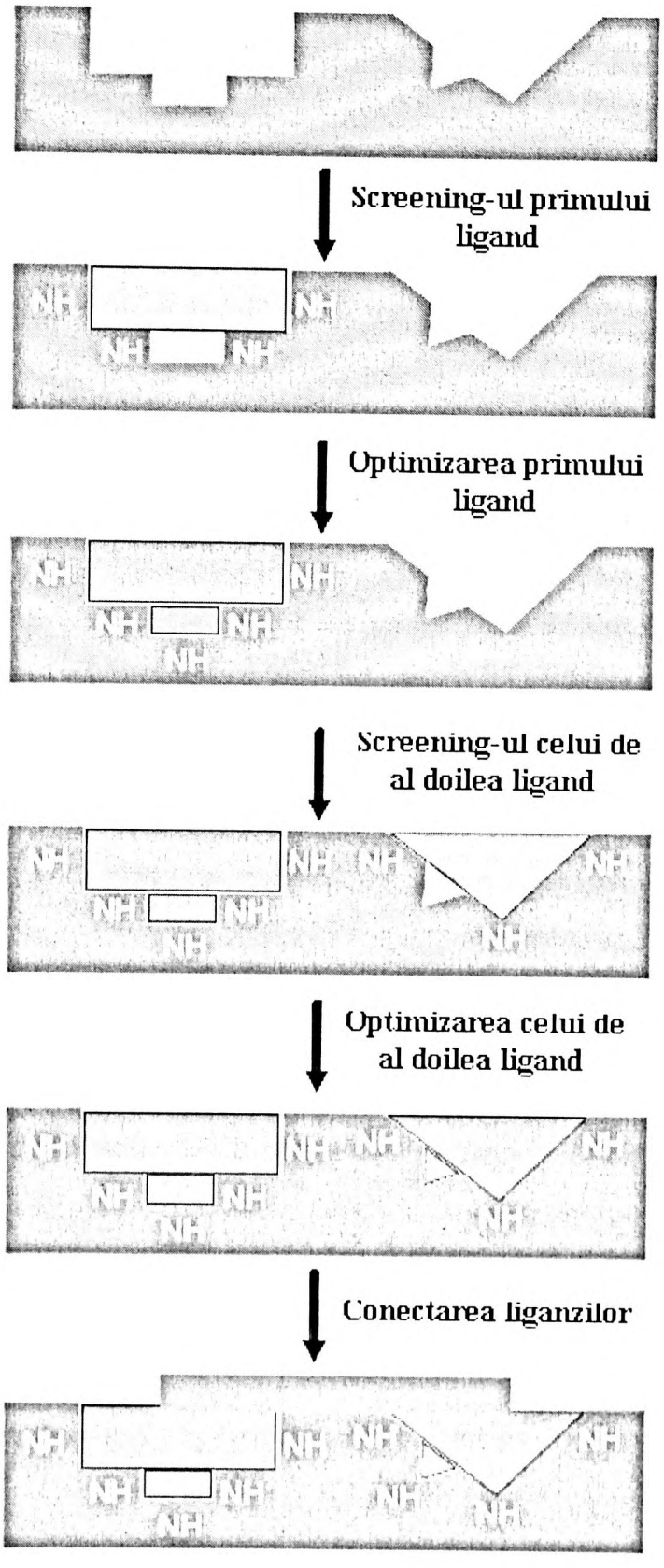


Figura 9.2. Reprezentare schematică a SAR prin RMN. Screening-ul iniţial detectează compuşi cu afinitate scăzută pentru cele două situsuri de legare. După ce

afinitatea moleculelor modulatoare a fost optimizată, cele două fragmente sunt conectate într-un mod care menţine legarea la ambele situsuri.

Exemplul din figura 9.1 va fi utilizat pentru a demonstra potenţialul metodei pentru a evalua contribuţia la interacţiunea cu proteina a diferitelor părţi ale unui ligand. Interacţiunile domeniului SH_2 cu fosfopeptide a fost iniţial descris printr-un model în care peptida se leagă la fosfotirozină într-un situs/buzunar al proteinei şi cu reziduurile +1 şi +3 în al doilea situs al proteinei, înconjurat de o buclă mare. Perturbările chimice observate pentru interacţiunea ptyr sunt reprezentate cu albastru pe diagrama structurii domeniului p85 N-SH_2 în figura 9.3 (A). Aceste efecte include reziduurile Arg care coordonează inelul fosfotirozin fenil şi reziduurile înconjurătoare. Extinderea ligandului la AcpYM-NH_2 (fig. 9.3 B) arată efecte adiţionale determinate de M în poziţia +1 după ptyr (roşu), în timp ce multe dintre transformările chimice observate pentru ptyr sunt conservate (albastru cu valori identice ale $\Delta\delta$, azuriu cu valori $\Delta\delta$ diferite). Extinderea limitei ligandului la EEEpYMPME-NH_2 determină efecte adiţionale la nivelul celui de-al doilea buzunar de legare (fig. 9.3 C).

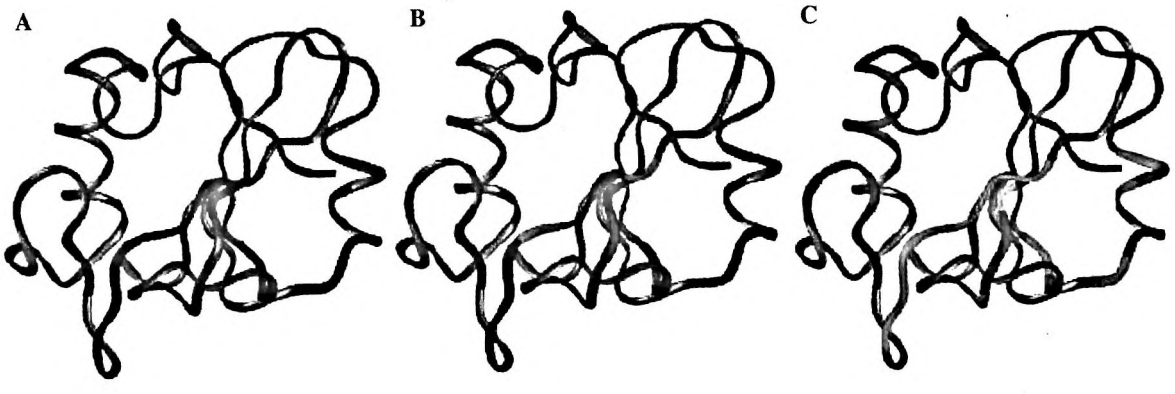


Figura 9.3 Diagramele Ribbon ale p85 N-SH_2 a PI3 kinazei, codificate cu diferite culori ce indică transformările chimice pentru diferiţi liganzi. (A) Ac-pY-NH_2, (B) pYM-NH_2 şi (C) EEEpYMPME. (A) Modificările chimice pentru complexul Ac-pY-NH_2-SH_2. Reziduurile sunt colorate cu albastru atunci când suferă o transformare chimică a ambilor nuclei (eq. 2) de cel puţin 0,45 p.p.m. În figurile (B) şi (C), transformările chimice care nu au fost alterate comparativ cu (A) sunt marcate cu albastru, cele marcate cu roşu reprezintă noi modificări chimice neobservate pentru AcpY-NH_2, iar verdele este utilizat pentru reziduurile care au prezentat modificări chimice în (A), dar nu şi în (B) sau (C).

Câteva perturbări suplimentare sunt observate la nivelul regiunii de legare a ptyr, iar valoarea majorităţii transformărilor chimice la nivelul acestei regiuni este modificată comparativ cu aceea a ptyr. Extinderea modificărilor chimice pentru peptidele cu afinitate înaltă reflectă regiunile de legare unde peptidul interacţionează cu proteina. În plus, modificările regiunii ptyr arată că potrivirea ptyr depinde de interacţiunile de la nivelul regiunii opuse a proteinei.

Această observaţie a fost ulterior confirmată prin studierea legării altor peptide şi liganzi sintetici [Gunther şi colab., 1996]. Acest exemplu demonstrează faptul că poate fi util să se înceapă cu liganzi peptidici derivaţi din parteneri de legare naturali. În cazul domeniului SH_2, peptidul cu dimensiuni mici a fost derivat din antigenul T mijlociu. Deseori peptidele cu dimensiuni mici reprezintă puncte de start excelente pentru producerea medicamentelor. Figura 9.4 ilustrează o schemă posibilă a modului în care SAR prin RMN poate fi utilizat în cazul disponibilităţii unor parteneri de legare naturali.

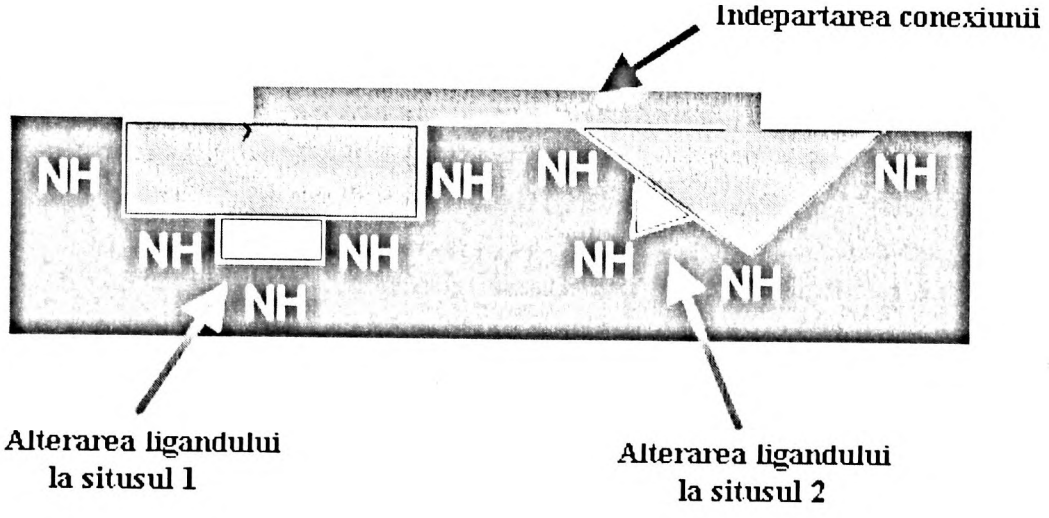


Fig 9.4 Reprezentare schematică a proiectării ligandului utilizând SAR prin RMN, pornind de la liganzii naturali ai unei proteine. Forma moleculei legate este alterată gradat la ambele situsuri de legătură, iar conexiunea este îndepărtată pentru a studia legarea independent la ambele situsuri. Un ligand cu afinitate înaltă poate fi obţinut prin delimitarea celor două fragmente cu un linker alternativ.

9.2.1. Prepararea probelor

Probele proteice pentru SAR (relaţia structură-activitate) prin RMN trebuie să fie supraexprimate şi marcate N^{15}. Aceste caracteristici sunt obţinute fie prin exprimarea proteinei utilizând lizatul algal marcat N^{15}, fie prin utilizarea mediului minimal M^9 cu N^{15} H_4Cl ca unică sursă de azot. Tehnicile utilizate pentru marcarea izotopică sunt discutate în capitolul 10. N^{15} H_4Cl este disponibil la un preţ relativ scăzut, ceea ce permite marcarea proteică în cantităţi mari pentru SAR prin RMN. Probele utilizate pentru SAR prin RMN trebuie să aibă o concentraţie de 0,3 mM sau peste, pentru a obţine spectre HSQC bune în 10-30 de minute. Liganzii adăugaţi la soluţia proteică trebuie să aibă o concentraţie mai mare (1mM pentru fiecare ligand).

Acest fapt impune tehnicii o limită deoarece concentraţia totală a liganzilor nu trebuie să depăşească 5-10 mM. Astfel, numărul compuşilor este limitat la aproximativ 10 per probă. Capacitatea maximă a acestui sistem este de

aproximativ 100 de probe şi 1000 de compuşi pe zi. Problemele pot apărea datorită solubilităţii scăzute a moleculelor organice (deseori sub 1 mM). Soluţiile de proteine trebuie tamponate la un pH de 5-7. La valori mai mari ale pH-ului, schimbul protonilor NH cu protonii apei poate determina intensităţi semnificativ scăzute ale semnalului. De obicei este adăugat între 5 şi 10% D_2O la soluţia proteică pentru blocarea deuteriului utilizat pentru stabilizarea câmpului magnetic. pH-ul soluţiilor stoc de liganzi trebuie ajustat pentru a evita modificările chimice induse de pH. De asemenea, trebuie evitată o concentraţie mare de săruri în soluţia de liganzi. Este recomandată prepararea soluţiilor stoc în dimetilsulfoxid (DMSO) pentru a obţine concentraţii de aproximativ 100 mM. Aceasta permite adăugarea de volume mici (3-5 ml) la soluţia tamponată de proteine. Pentru compuşii care nu sunt solubili în apă, DMSO poate fi adăgat şi la soluţia proteică. Majoritatea proteinelor sunt încă active în cazul prezenţei DMSO într-un volum de 20-30% în soluţia tampon.

9.2.2. Evaluarea cantitativă

9.2.2.1 Afinităţi de legare

Spectrele HSQC (heteronuclear single quantum spectroscopy) obţinute pentru concentraţii diferite ale ligandului poartă informaţii semnificative referitoare la afinitatea de legare locală. Nivelul transformării chimice observat în spectrul HSQC pentru o proteină titrată cu un ligand depinde de afinitatea şi de rata de reacţie a ligandului. În figura 9.3, se observă modificarea poziţiei peak-ului (vârfului), care este tipică pentru schimbările rapide între forma liberă şi legată a proteinei.

Rata de schimb relevantă este rata disocierii (k_{off}) complexului proteină-ligand. Pentru reacţiile simple de legare de tipul P + L $\leftrightarrow$ PL, constanta de disociere este $kD = k_{off}/k_{on}$. În consecinţă, afinitatea scăzută este corelată cu rate mari. Deplasările vârfurilor la concentraţii crescânde ale ligandului sunt observate numai în cazul interacţiunilor cu afinitate scăzută ($kD > 10^{-6}$ mM).

Pentru liganzii cu afinitate crescută, în cazul cărora rata de disociere a complexului este scăzută, spectrele HSQC vor prezenta caracteristici de "schimbări lente". În acest caz rezonanţele la nivelul proteinei libere şi noi rezonanţe apar succesiv cu transformările chimice ale complexului proteic. Acest comportament este o consecinţă a ratei de disociere scăzute a complexelor cu afinitate înaltă. În asemenea titrări, semnalele complexului proteic trebuie adesea reatribuite, în timp ce semnalele spectrelor cu schimburi rapide pot fi atribuite prin modificări ulterioare ale transformărilor chimice datorate adăugării subsecvente de ligand în cantităţi mici.

În limitarea schimburilor rapide, afinitatea de legare poate fi calculată din valoarea transformărilor chimice şi din concentraţiile corespunzătoare de ligand[1]). Aceasta presupune ca interacţiunea să fie o reacţie de legare într-o singură etapă (P + L ↔ PL). Această presupunere nu este întotdeauna valabilă. Raportări recente demonstrează că mecanismul legării ligandului la proteină poate fi conectat cu formarea intermediarilor [Gunther, Schaffhausen, 2002]. Pentru mecanisme mai complexe, parametrii de legare pot fi obţinuţi prin stimularea formelor semnalului în spectrul HSQC. O asemenea analiză detaliată este mult mai complexă faţă de o analiză de rutină în procedeele de screening. Cu toate acestea, o analiză detaliată a interacţiunilor proteină-ligand se poate dovedi benefică în procesul de îmbunătăţire sintetică a producţiei de medicamente (Dingermann şi colab.,2004).

9.2.2.2. Determinarea structurii pe baza perturbării transformărilor chimice

SAR (relaţia structură-activitate) prin RMN a fost utilizată pentru evaluarea calitativă a interacţiunilor liganzilor. Cu toate acestea, s-a descris recent o abordare pe baza capaităţii de ancorare a proteinelor (protein docking) numită HADDOCK (high ambiguity driven protein–protein docking) care poate utiliza perturbările transformărilor chimice pentru a determina structurile complexelor proteină-proteină şi proteină-ligand (Dingermann şi colab., 2004). Această metodă a fost validată pentru două proteine diferite pentru care au fost disponibile structurile complexelor. Pentru un complex EIN-HPr, RMSD la interfaţa între raza X şi structura calculată prin HADDOCK a fost 2,75 Å; pentru un complex E2A-HPr, RMSD la interfaţă a fost 2,1 Å. În mod cert, HADDOCK este o legătură importantă între SAR prin RMN şi determinarea structurii şi oferă un acces rapid la structura complexelor proteice atunci când sunt disponibile filtrările HSQC.

1) $K_D = ([P]_0 - [PL])([L]_0 - [PL])/[PL]$, unde $[P]_0$ şi $[L]_0$ sunt concentraţiile proteinei libere şi ligandului, iar [PL] este concentraţia complexului proteină-ligand. [PL] poate fi estimat din transformările chimice, care pot fi evaluate din perturbările chimice ($[PL] = |(\delta_{liber} - \delta_{obs})/\Delta\delta_{total}|$, unde δ_{liber} şi δ_{obs} sunt transformări chimice ale proteinei şi complexului la o concentraţie dată a ligandului [PL], iar $\Delta\delta_{total}$ este perturbarea totală a transformărilor chimice.

9.2.3. Tehnologii avansate în SAR prin RMN

Utilizând tehnologia crioprobelor care a fost adaptată pentru aparatura RMN, concentraţiile proteinelor pot fi scăzute la 50 μM [Hajduk şi colab., 1999]. Screeningul moleculelor mici cu ajutorul crioprobelor este posibil la concentraţii de 50 μM în mixturi de 100 de compuşi, în timp ce se păstrează concentraţia totală a liganzilor sub 5 mM. Această creştere de 10x a capacităţii creşte numărul de compuşi supuşi screening-ului la 10000 pe zi. Necesitatea solubilităţii scăzute a liganzilor (50-10 μM) creşte de asemenea variabilitatea compuşilor adecvaţi pentru screening. În plus, îndepărtarea prin tăiere a afinităţii pentru compuşii care pot fi detectaţi este redusă la k_D ~ 0,15 mM comparativ cu k_D ~ 1 mM la concentraţii proteice mai mari. Această diferenţă este o consecinţă a cantităţii de proteină relativ scăzute în forma legată pentru concentraţii proteice mici. Îndepărtarea prin tăiere deşi este redusă prezintă dezavantajul nedetectării compuşilor cu afinitate scăzută. Pentru HTS, rata scăzută hit reduce necesitatea mixturilor vaste de deconvoluţie. Luând în considerare deconvoluţia, poate fi atinsă capacitatea de 200000 de compuşi pe lună.

Experimentul RMN ce permite studiul proteinelor cu molecule mari şi a complexelor (TROSY, transverse relation optimized spectroscopy) [Hajduk şi colab., 2000] face accesibile (SAR prin RMN) proteinele de 30-50 k_{Da}. Degenerarea transformărilor chimice devine o problemă importantă pentru proteinele mari. Utilizarea probelor cu markeri selectivi pentru aminoacizii individuali poate reduce numărul semnalelor suprapuse.

Alternativ, pentru screening-ul RMN a fost testată utilizarea proteinelor marcate C^{13} în locul celor marcate N^{15}. Această abordare este promiţătoare dacă sunt marcate numai grupările metil deoarece numărul semnalelor este redus la aminoacizii care conţin grupări metil. Sunt obţinute linii relativ înguste datorită proprietăţilor de relaxare favorabile ale carbonilor din grupările metil. În plus, intensităţile semnalului grupărilor metil sunt mai mari deoarece la semnal contribuie şi protonii. Fesik şi colab. (2000) au dezvoltat un protocol de expresie eficient utilizând precursorii marcaţi ai aminoacizilor [3,3'-αC]-α-cetoizovalerat şi [3^{-13}C]-α-cetobutirat.

În urma adăugării mediului de creştere, aceşti compuşi sunt transformaţi biosintetic, specific şi eficient, în izoleucină şi, respectiv valină/leucină. Pentru proteinele cu o greutate moleculară mai mică de 30 k_{Da}, screening-ul bazat pe H^1-C^{13} a fost de trei ori mai sensibil decât screening-ul bazat pe H^1-N^{15} TROSY (fără utilizarea crioprobelor), cu spectre ale probelor cu concentraţia de 50 μM obţinute în aproximativ 10 minute. Prin utilizarea crioprobelor, a devenit accesibilă utilizarea concentraţiilor de 15 μM pentru proteinele mici. Pentru proteinele cu o greutate moleculară peste 40 k_{Da}, abordarea bazată pe C^{13} a fost mult mai sensibilă decât TROSY, dar insuficientă pentru screening. Screening-ul proteinelor mai mari devine practicabil când probele sunt perdeuterizate protonii ne-schimbabili sunt înlocuiţi cu H_2. Pentru

proteinele marcate H^2-C^{13} cu o greutate moleculară de aproximativ 120 k_{Da}, spectrele H^1-C^{13} ale proteinelor cu concentraţii de 0,3 mM au fost obţinute în 30 de minute prin tehnologia ce utilizează crioprobele. Fesik (2000) raportează că marcarea cu C^{13} prin utilizarea [3,3'-αC]-α- cetoizovaleratului şi [3-C^{13}]-α-cetobutiratului este aproape la fel de eficientă din punct de vedere al costului ca şi marcarea cu N^{15} şi mult mai puţin costisitoare decât utilizarea marcării uniforme cu C^{13} sau marcări metil-C^{13} prin utilizarea [U-C^{13}]-α-cetoizovaleratului şi [3-C^{13}]-α-cetobutiratului. Sinteza proteinelor în afara celulelor poate deveni o alternativă interesantă pentru protocoalele complexe de expresie dacă aminoacizii marcaţi pot fi produşi cu costuri mici.

9.2.4. Evaluarea datelor

Interpretarea screening-ului actual prin utilizarea a mii de spectre necesită software-uri care pot vizualiza modificări ale spectrelor într-o manieră grafică simplă. Spectrele suprapuse şi inspecţia manuală sunt impracticabile pentru cantităţi mari de date. Sunt necesare metode de analiză mai sofisticate.

Cel mai comun mecanism utilizat pentru studiul variaţiilor în serii de spectre este utilizarea analizei componentului principal (PCA). PCA este o metodă statistică clasică utilizată pentru a reduce dimensiunea problemelor şi pentru a transforma coordonatele interdependente în coordonate semnificative şi independente. PCA transformă datele originale (intensităţile şi poziţiile semnalului într-un spectru) întrun set de „scoruri" pentru fiecare probă, măsurate în funcţie de axele componentelor principale. Scorurile componenteler principale înlocuiesc variantele originale şi sunt corelate cu componentele principale succesive contorizând descreşterea variaţiei şi ortogonal, fară nicio corelaţie între scorurile diferitelor axe. Ca o consecinţă a acestor proprietăţi, un număr mic de componente principale pot înlocui variabilele originale fără o pierdere importantă de informaţii.

Diagramele de împrăştiere (scatter plot) ale scorurilor primelor componente principale utilizate oferă un mijloc excelent de a vizualiza şi uneori de a arăta adunarea la un loc a probelor similare, separarea tipurilor diferite de probe sau prezenţa selecţiei probelor cu valori diferite. Diagramele pot fi utilizate pentru a explora care dintre compuşi este mai implicat în separarea probelor în grupuri: cei mai importanţi compuşi tind să corespundă celor mai mari valori absolute. De obicei primele patru componente principale sunt importante. Figura 9.5 prezintă o diagramă de împrăştiere tipică obţinută pentru 92 de spectre ale SAR prin RMN pentru factorul declanşator al *Mycoplasma genitalium* [23]. Spectrele se împart în trei clase.

9.3. Monitorizarea moleculelor mici

În plus faţă de metodele bazate pe spectrele RMN ale proteinelor, au fost dezvoltate numeroase tehnici bazate pe spectrele liganzilor. Multe dintre aceste tehnici depind de condiţiile schimburilor rapide între proteină şi ligand. În cazul schimburilor rapide şi cu un exces de ligand, rezonanţele ligandului în soluţie vor prezenta parţial proprietăţile spectrale ale ligandului legat la proteină. [2)]

O proprietate spectrală care este transferată rapid este lăţimea liniei rezonanţei. Semnalul ligandului legat la proteină va fi lărgit deoarece semnalele proteinelor au o lăţime mai mare decât aceea a moleculelor mici de ligand. Lăţimea mare a liniei semnalului proteic este o consecinţă directă a timpului de autocorelare al proteinelor în soluţie.[3)] În acelaşi mod, transferul unor proprietăţi de relaxare tipice pentru proteinele mari, a fost utilizat pentru studierea interacţiunilor şi pentru screening-ul legării ligandului. Cele mai utilizate tehnici pentru observarea rezonanţelor ligandului sunt bazate pe transferul magnetizării prin efectul nuclear (nuclear Overhauser effect – NOE – transferul polarizării de spin de la o populaţie de spin la alta prin intermediul cross-relaxării). Aceste tehnici nu necesită marcarea izotopică a proteinei, cantitatea de proteină necesară este de obicei foarte mică şi nu există o limită superioară a mărimii proteinei.

În schimb, trebuie utilizate soluţii relativ pure deoarece orice impuritate contribuie la semnal. Din păcate, liganzii cu afinitate foarte mare au rate de disociere din complex foarte mari şi sunt înregistraţi ca nelegaţi. Experimentele competiţionale pot ajuta la rezolvarea acestei probleme. Un alt factor limitator este solubilitatea ligandului deoarece multe dintre aceste metode necesită un exces de ligand. Unele dintre aceste metode sunt utile pentru HTS, unele oferă informaţii mai detaliate referitoare la legarea ligandului, iar altele pot fi utilizate pentru cartografierea epitopilor de legare ai ligandului. Metodele bazate pe relaxare vor fi descrise pe scurt, în timp ce tehnicile ce implică transferul magnetizării vor fi descrise în detaliu.

2) Pentru schimburile rapide şi populaţii egale, rata schimburilor trebuie să fie $k/\Delta\nu > \pi/\sqrt{2}$, unde k este rata interacţiunii , iar $\Delta\nu$ este diferenţa transformărilor chimice a statusului legat şi liber al ligandului. Pentru interacţiunile proteină-ligand, rata care determină schimburile cu rate rapide este rata interacţiunii proteină-ligand (P+L↔ PL).

3) Rata relaxării transverse R_2 este mare pentru proteinele cu masă moleculară mare cu timpi de corelaţie crescuţi τ_c. Lăţimea liniei LW este direct proporţională cu rata relaxării ($LW=R_{2/\pi}$).

9.3.1. Metode de relaxare

În spectroscopia RMN, termenul relaxare este utilizat pentru a descrie procesul care restaurează magnetizarea de echilibru şi faza aleatorie. Trebuie distinse două mecanisme de relaxare, relaxarea transversă şi longitudinală, cu ratele de relaxare R_2 şi R_1. Relaxarea transversă poate fi asociată cu fluctuaţii ale câmpului electric cu originea în dezordinea completă (overall tumbling) şi în mişcările din interiorul moleculei. Din moment ce moleculele mari se mişcă lent în soluţie, timpul de corelaţie a mişcării de rotaţie este relativ lung, cauzând rate de relaxare R_2 mari şi de asemenea lăţimi mari ale liniilor semnalelor RMN (LW = $R_{2/\pi}$). Compuşii care interacţionează cu un receptor cu greutate moleculară mare prezintă linii lărgite şi valori R_2 crescute. O descriere mai detaliată a teoriei relaxării depăşeşte obiectivul acestui capitol [vezi Fischer şi colab., 1998].

Un ligand legat la o proteină adoptă proprietăţile de relaxare ale complexului. În cazul schimburilor rapide, moleculele libere de ligand păstrează pentru scurt timp proprietăţile de relaxare ale statutului de ligand legat. Trebuie să existe un exces de ligand pentru a observa semnalele ligandului. Lărgirea rezonanţelor este o proprietate tipică a spectrelor moleculelor mici în prezenţa proteinelor mari. Acest lucru este reflectat în rate de relaxare transverse mai mari. Pentru acest motiv, lăţimea liniei şi rata de relaxare transversă pot fi utilizate drept criterii pentru screening-ul liganzilor.

Lărgirea este mai pronunţată pentru proteine mari sau pentru proteine legate la matrix. Liganzii legaţi pot fi identificaţi prin experimente cu filtru T_2. De obicei, trebuie comparate spectrele cu şi fără proteine. Lărgirea semnalelor liganzilor indusă de legarea la o proteină a fost utilizată frecvent în trecut. Sykes şi colab. (1994) au studiat interacţiunea domeniului extracelular de 85-kDa al receptorului factorului de creştere epidermal (EGFR-ED) cu factorul de creştere transformant α (TGF-α). Linia protonilor metil a prezentat o dependenţă regională ce indica regiunea TGF-α implicată în reacţie. Acest studiu arată că această tehnică oferă informaţii importante pentru o descriere detaliată a interacţiunilor proteină-ligand.

Potenţialul de editare a relaxării pentru screening a fost demonstrat de Fesik şi colab. (1997) prin utilizarea FKBP şi un amestec de nouă compuşi din care a fost identificat un ligand cu o constantă de disociere de 200 μM. Această metodă nu este practică pentru screening-ul eficient al liganzilor deoarece trebuie utilizate diferenţele între spectre cu şi fără ligand pentru a obţine rezultate relevante. T_2 şi $T_{1\rho}$ au fost utilizate pentru a filtra componentele spectrale ce rezultă din durate de relaxare scăzute. Stockmann, Dalvit, (2002) au descris o gamă variată de metode de relaxare, incluzând relaxarea longitudinală, relaxarea transversă în prezenţa spinilor marcaţi şi relaxarea cu cuantuum dublu.

9.3.2 Metode de difuzie

Tehnicile de difuzie se bazează pe faptul că difuziunea translaţională depinde de mărimea proteinei. Conform ecuaţiei Stokes-Einstein $D = kT/6\pi\eta r$, unde k este constanta Boltzmann, T este temperatura, η este vâscozitatea şi r este raza moleculei, coeficientul de difuzie depinde invers proporţional de mărimea moleculei. Acest principiu a fost utilizat pentru a analiza amestecuri de compuşi în cadrul chimiei combinatorii. Shapiro şi colab. (1996) au combinat tehnicile de editare cu spectrele TOCSY pentru a obţine spectre 2-D cu suprapunere mică a vârfurilor şi informaţii valoroase asupra structurii liganzilor (DECODES, spectroscopia de difuziune codificată).

Coeficienţii de difuzie sunt măsuraţi prin RMN prin aplicarea pentru timp scurt a unui gradient de câmp magnetic liniar. Acest gradient aplică câmpuri magnetice diferite la diferite poziţii ale probei şi astfel apare defazarea spaţială a semnalului care poate fi inversată prin aplicarea aceluiaşi gradient codificat spaţial după echo-spin. Refazarea nu este aplicabilă pentru moleculele care s-au mişcat de la aplicarea primului gradient. În consecinţă, moleculele mari cu coeficienţi de difuzie mici vor fi afectate într-un grad mai mic de filtrul de difuzie decât moleculele mici. Coeficientul de difuzie poate fi determinat prin măsurarea intensităţilor semnalelor în funcţie de timpul de difuzie şi tăria gradientului.

În cazul schimbărilor rapide, ligandul liber poate exprima proprietăţi de difuzie ale complexului. În principiu, au fost utilizate două tipuri de experimente de difuzie, PFG-SE (pulsed field gradient spin-echo) şi PFG-STE (pulsed field gradient stimulated-echo). Pierderea magnetizării datorată relaxării transverse este redusă în ultimul caz. PFG-SE are dezavantajul că este observată numai o jumătate din semnal. O secvenţă cu gradiente bipolare şi o întârziere a curentului turbionar sunt frecvent utilizate pentru a minimaliza artefactele turbionare.

Pentru moleculele mici legate la molecule mai mari, coeficientul de difuzie este redus în comparaţie cu moleculele cu mărimi similare, dar care nu se leagă. Coeficienţii de difuzie observaţi vor fi calculaţi în funcţie de rata de schimb. Shapiro şi colab. (1997) au utilizat expresia „afinitate RMN" pentru această abordare deoarece aminteşte de separarea cromatografică pe baza afinităţii. Shapiro a utilizat afinitatea RMN pentru quinină cu un amestec de nouă compuşi din care a putut fi selectat unul prin analiza spectrelor 1-D şi experimente 2-D DECODES.

De asemenea, Shapiro (1998) a aplicat afinitatea RMN pentru a studia legarea tetrapeptidelor la glicopeptidul vancomicina şi pentru a studia legarea moleculelor mici la ADN. În aceste cazuri raportate ligandul şi proteina au fost prezente în cantităţi echimolare la concentraţii de 0,5-1 mM. S- a demonstrat că difuzia RMN poate fi utilizată pentru cartografierea epitopului de legare; aceasta se bazează pe faptul că magnetizarea longitudinală în experimentele STE este supusă relaxării încrucişate între proteină şi ligand.

Prin NOE, magnetizarea e transferată între protoni şi complex. Acest efect induce modificări ale intensităţii semnalului atunci când se aplică intensităţi scăzute şi înalte ale gradientului pentru un timp de difuzie îndelungat, deoarece intensităţile semnalului scad cu rate diferite în timpul perioadei de difuzie. Analizele cantitative au fost realizate prin diagramele intensităţii semnalului pentru gradientul pătrat g^2 .

Hajduk a propus utilizarea diferenţelor între variate spectre pentru a preveni problemele care provin din lărgirea semnalului ligandului şi din semnalele de fundal ale proteinei. În prima etapă, spectrele STE ale amestecului de compuşi în prezenţa proteinei la gradient înalt şi scăzut s-au diminuat. Rezultatul a fost scăzut din nou din spectrul STE al amestecului de compuşi în absenţa proteinei, înregistrat la gradient scăzut. Rezultatul este un spectru care prezintă numai semnalele moleculelor mici care se leagă la proteină. Această abordare dificilă, care necesită trei spectre diferite a fost adecvată pentru identificarea unui inhibitor cu concentraţia 20 μM al stromelisinei dintr-un amestec de nouă compuşi. Această abordare este limitată de asemenea deoarece liganzii legaţi pot avea transformări chimice diferite la schimburi rapide atunci când se utilizează cantităţi egale de proteină şi ligand.

Difuzia RMN poate fi utilizată pentru determinarea directă a afinităţii liganzilor fără a fi necesară titrarea cu liganzi. Pentru ligandul legat şi cel liber pentru schimburi rapide, coeficientul de difuzie observat este o medie în funcţie de timp a speciilor legate şi libere. Fracţia ligandului legat poate fi obţinută din constantele de difuzie ale proteinei D_{legat}, ale ligandului liber D_{liber} şi a ligandului în amestec prin ecuaţia $D_{obs} = x_{liber}D_{liber} + x_{legat}D_{legat}$, presupunând constante egale ale complexului şi ale proteinei libere. Experimentele de difuzie sunt importante în screening-ul medicamentelor şi, într-un grad limitat, pentru cartografierea epitopilor. Principalul dezavantaj este sensibilitatea relativ scăzută a experimentului care necesită cantităţi echimolare ale proteinei şi ligandului la concentraţii de aproximativ 50 μM. Chiar şi cantităţi mai mari de substanţe sunt necesare pentru compuşii cu afinitate scăzută deoarece efectul de difuzie devine foarte mic.

9.3.3 Metode care implică transferul magnetizării

9.3.3.1 NOE transferat (TrNOE)

Efectul TrNOE a fost iniţial descris de către Bothner-By (1972). Peters (1997) a propus utilizarea TrNOE pentru screening-ul compuşilor în amestec. TrNOE combină NOE între spini adiacenţi ai ligandului cu schimburi chimice între ligandul liber şi legat.[4)] Moleculele mici induc NOE pozitive; moleculele mari induc NOE mari cu o magnitudine mai mare.

4) Efectul NOE este bazat pe corss-relaxarea longitudinală dipol-dipol a spinilor adiacenţi. De obicei semnalele sunt observate pentru protonii aflaţi la o distanţă mai mică de 6Å.

Când un ligand îşi schimbă rapid starea între stare legată şi nelegată, el poate transfera NOE de la complexul proteic la populaţia de molecule libere. În spectrul NOESY, semnalele negative apar de la liganzii care se leagă la proteină, în timp ce semnalele de la compuşii slab legaţi sunt pozitive sau dispar.

Este bine înţeleasă dependenţa cantitativă a efectului TrNOE de timpul de amestec, cantitatea ligandului legat, şi timpii corelaţiei libere şi legate a proteinei şi ligandului. TrNOE sunt obţinute din spectre NOESY obişnuite. Semnalele proteinelor nu sunt de obicei observate pentru proteinele mari. Semnalele de fundal ale proteinei pot fi supresate prin filtre T_2 sau T_1.

Peters şi colab. (1999) au utilizat măsurătorile TrNOE pentru screening-ul oligozaharidelor pentru E-selectina deglicozilată/imunoglobulina umană G. Iniţial spectrele NOESY ale amestecului de liganzi au fost înregistrate la temperaturi diferite până când toate semnalele NOE au fost pozitive. Amestecul de compuşi a prezentat NOE negative în prezenţa proteinei. Opt compuşi au putut fi excluşi pe baza absenţei semnalelor TrNOE-NOE în regiuni caracteristice ale spectrului. Din cei doi compuşi rămaşi, a fost identificat un un sialil Lewisx mimetic, a cărui conformaţie bioactivă a fost determinată din TrNOESY. Identificarea epitopilor de legare a fost împiedicată de spinul puternic al difuziei care distribuie magnetizarea asupra tuturor protonilor compusului. Peters şi colab. (2000) au utilizat experimentul 3-D TOCSY-TrNOESY într-o mixtură de 15 carbohidraţi. Deşi această abordare mai laborioasă este utilă pentru a separa amestecurile de compuşi, nu este adecvată screening-ului.

Metoda TrNOE este larg aplicabilă pentru proteinele mari cu constante de disociere între 10^{-7} şi 10^{-3}. Dezavantajele acestei metode sunt legate de necesitatea unor concentraţii relativ mari de ligand, ceea ce presupune compuşi foarte solubili, timpi de înregistrare prelungiţi şi valori mari ale difuziei spin, care nu permit cartografierea epitopilor.

9.3.3.2. Transferul saturaţiei (STD)

STD-RMN (experimente care detectează magnetizarea transferată de la o proteină la ligandul legat) asigură o îmbunătăţire a TrNOE înlăturând multe din deficienţele acesteia. Deşi efectul STD este cunoscut de mult timp, abia recent a fost utilizat pentru screening-ul liganzilor. Principiul STD-RMN este ilustrat în figura 9.6. Iniţal rezonanţa protonică a proteinei este saturată. Pentru molecule mari, efectul de saturaţie se distribuie repede la întreaga proteină prin tranziţia de flip-flop a energiei între protoni adiacenţi.[5)]

5) Rata tranziţiilor flip-flop responsabile pentru distribuţia efectului de saturaţie la nivelul proteinei este direct proporţioală cu timpul de corelaţie τ_c al proteinei. Din acest motiv, saturaţia se distribuie mai rapid în moleculele mari. Tipic, sunt aplicaţi timpi de saturaţie de 2 s.

Transferul magnetizării la ligadul legat cauzează saturaţii diferite ale reziduurilor de liganzi. Este important ca gradul de saturaţie să afecteze numai rezonanţa proteinei, nu şi rezonanţa ligandului. Aceasta garantează că transferul saturaţiei provine de la proteină, nu de la rezonanţele din ligand. Tipic, rezonanţele metil cu transformări chimice sub 0 ppm sunt saturate. Într-un experiment de referinţă, gradul de saturaţie este aplicat la o frecvenţă la care nu rezonează niciun proton al proteinelor sau liganzilor (tipic, 30 ppm). Acest spectru de referinţă nu prezintă niciun efect al saturaţiei. Pentru a minimaliza scăderea artefactelor, diferenţa dintre cele două spectre este obţinută prin măsurarea alternărilor rezonanţei on- off- care sunt adăugate utilizând un ciclu de fază. Programul utilizat pentru aceste două experimente este reprezentat schematic în figura 9.7 Semnalele de fundal ale proteinelor pot fi îndepărtate prin aplicarea unui *spin-lock pulse* care acţionează ca un filtru $T_{1\rho}$.

Meyer şi colab. (1999) au determinat gradul saturaţiei în funcţie de excesul de ligand prin legarea *N*-acetilglucozaminei la aglutinina germenilor de grâu. Efectul de saturaţie creşte cu rata concentraţiei proteinei şi ligandului. Creşterea a fost observată peste rata de 210:1. Un efect STD suficient de puternic a fost observat la o rată de 60:1. Rate rapide de disociere favorizează efecte STD mari. Necesitatea unui exces de ligand permite măsurările STD la o concentraţie scăzută a proteinei. Utilizând un exces de 1igand de 100 de ori, şi o soluţie de ligand 1 μM, concentraţia proteinei poate fi de 10 nM.

Principiul STD poate fi combinat cu experimente 2-D homonucleare şi hetereonucleare. STD-TOCSY a fost prezentat de Meyer şi colab. (2001) prin utilizarea unui amestec de şapte oligozaharide şi aglutinina germenelui de grâu. La oligozaharidele cu şase subunităţi glucidice, grupuri diferite au arătat efecte STD semnificativ diferite. Acei protoni ai glucidelor care sunt în contact direct cu proteina au un grad mai mare de saturaţie. Vogtherr (2000) a utilizat corelaţia STDheteronucleară multi-cuantum (STD-heteronuclear multi-quantum correlation - HMQC) pentru a obţine o bancă de oligozaharide. Potenţialul STD-RMN pentru cartografierea epitopilor a fost recent demonstrat pentru legarea metil *β*-Dgalactozidului la o lectină de 120-kDa, aglutinina. Diferenţe mari ale intensităţii au fost observate pentru diferiţi protoni ai metil *β*-D-galactozidului, indicând contribuţia lor diferită la interacţiunea cu proteina. În aceeaşi lucrare, au fost realizate studii de competiţie, ceea ce a făcut STD-RMN accesibil la liganzi cu constante de disociere nanomolare şi rate de disociere scăzute. STD-RMN a fost de asemenea utilizat în asociere cu HR-MAS (un tip de RMN caracterizat prin prezenţa interacţiunilor anizotropice).

Un exemplu de spectru este prezentat în figura 9.8, unde un compus fenolic a fost legat la o dehidogenază. Spectrul din figura 9.8 (A) reprezintă spectrul STD înregistrat la saturaţia de -0,45 p.p.m (săgeata). Figura 9.8 (B) prezintă un spectru de referinţă al aceluiaşi compus. Spectrele sunt reduse la o scală la intensităţi egale ale semnalelor aromatice la aproximativ 7 ppm. Semnalele alifatice la 3,8, 2,2 şi 2 ppm au o intensitate relativ redusă. Rezultatul

este în conformitate cu supoziţia că gruparea fenil este forţa motrică pentru interacţiunea cu proteina.

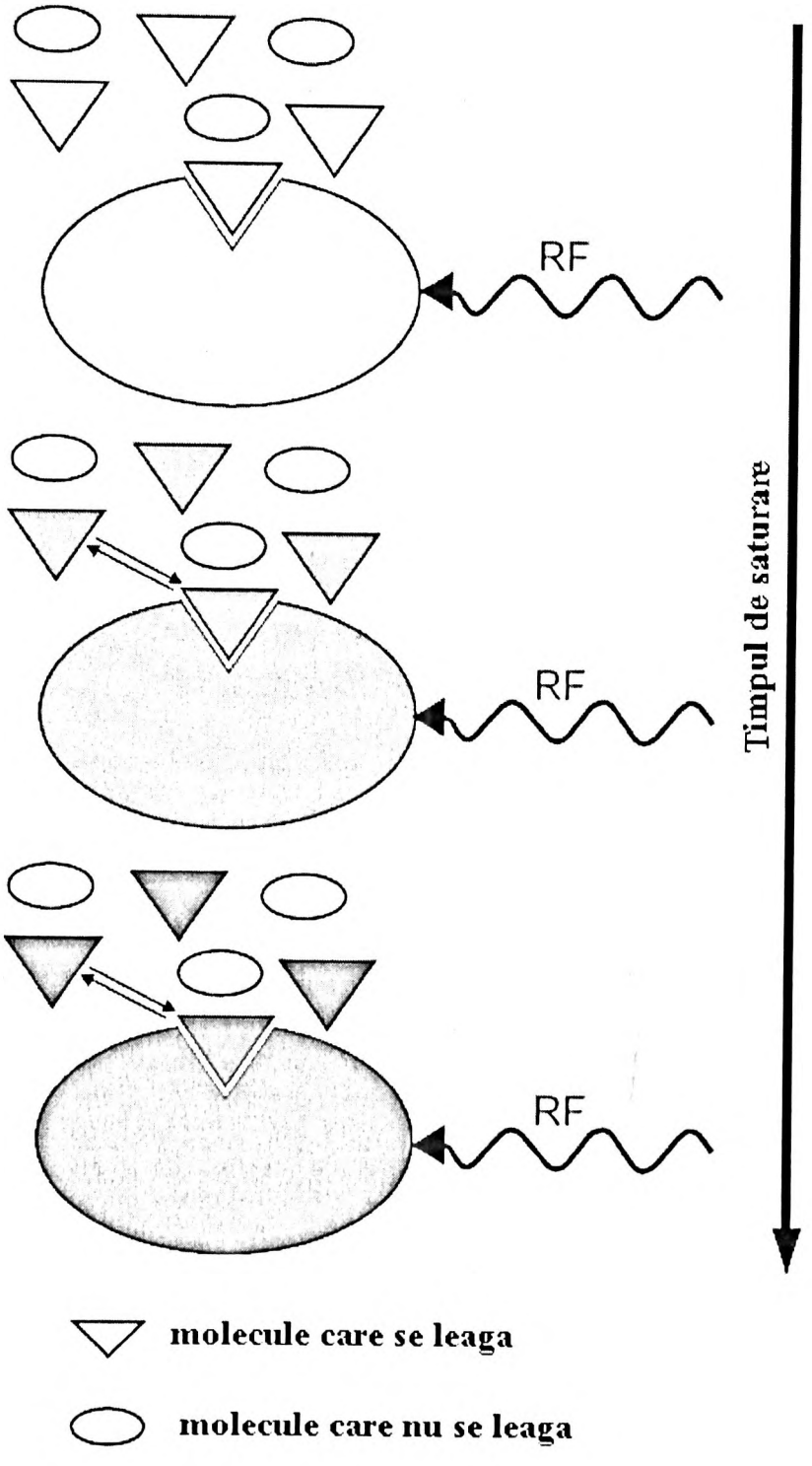


Fig. 9.6 Ilustrare schematică a experimentului STD-RMN. Rezonanţele proteinelor sunt saturate selectiv fără a afecta rezonanţele ligandului. Saturaţia crescătoare este reprezentată prin tonuri mai închise de gri. Compuşii care interacţionează cu proteina (triunghiuri) vor prezenta efectul saturaţiei. Moleculele mici care sunt eliberate în rate de schimburi rapide între complex şi ligandul liber pot fi detectate ulterior. Moleculele care se leagă la proteină au intensităţi ale semnalului mai reduse, ca o consecinţă a transferului saturaţiei. Moleculele care nu se leagă (ovale) nu prezintă niciun efect.

Figura 9.8 (C) este controlul negativ, care nu prezintă nicio proteină în amestec. Spectrul a fost înregistrat la aceeaşi parametrii ca şi spectrul STD din figura 9.8 (A). Dezavantajul STD-RMN este timpul de înregistrare dublat şi faptul că liganzii care se leagă strâns sunt înregistraţi ca nelegaţi, determinând rezultate fals negative ale screening-ului. Necesitatea unui exces de ligand limitează STD-RMN la compuşii solubili (peste 10 mM). Pentru a evita eliminarea artefactelor, spectrometrul şi probele iniţiale trebuie calibrate cu grijă prin noile metode.

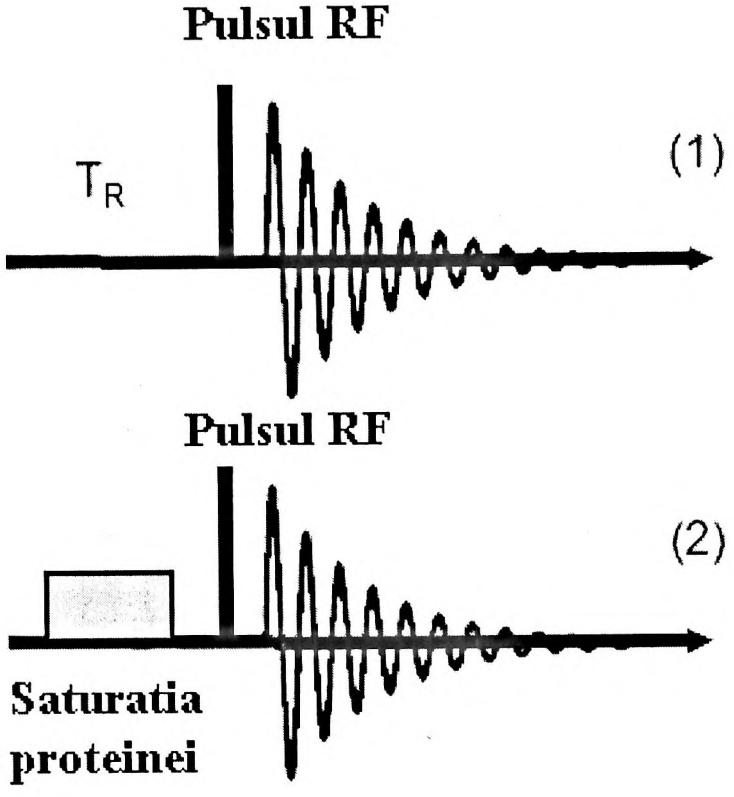


Fig. 9.7 Reprezentare schematică a secvenţei pulsului utilizat pentru STD-RMN. Sunt evidenţiate două spectre, unul cu şi celălalat fără saturaţia rezonanţelor proteice.

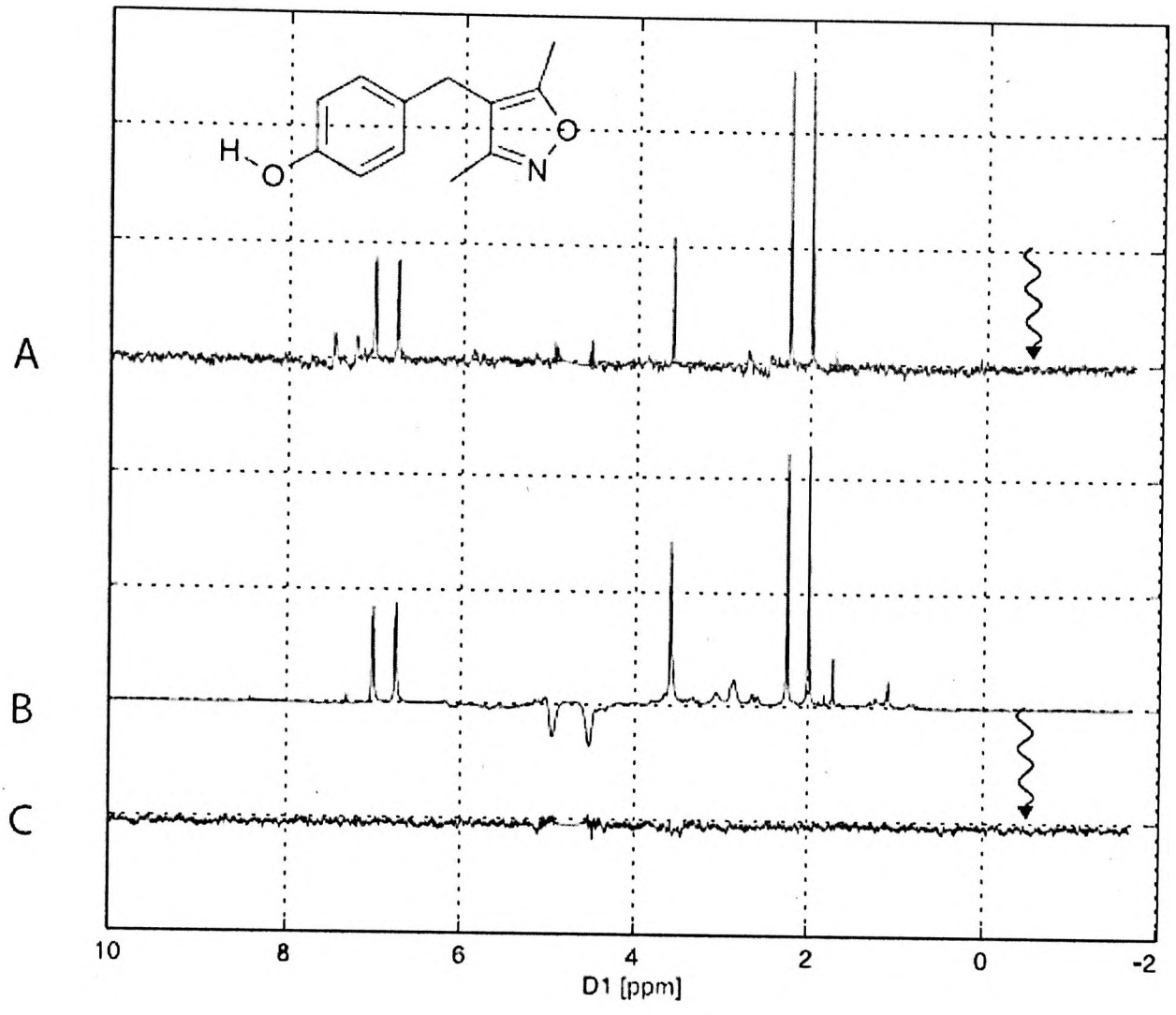


Fig. 9.8 (A) Spectrul STD-RMN al unui compus fenolic legat la dehidrogenaza de 72- kDa. (B) Spectrul de referinţă al aceluiaşi compus. (C) Spectrul STD-RMN de control fără nicio proteină prezentă în soluţie.

9.3.3.3. Pomparea NOE (NOE pumping)

Pomparea NOE este în strânsă legătură cu STD-RMN. În STD-RMN, saturaţia este transferată la ligand; în pomparea NOE, magnetizarea e transferată de la proteină la ligand. Magnetizarea poate fi de asemenea transferată de la ligand la proteină întrun experiment numit pomparea inversă a NOE (RNP). Pentru pomparea NOE, semnalele proteinelor sunt selectate printr-un filtru de difuziune care anulează semnalele ligandului. Magnetizarea este transferată în timpul amestecului prin crossrelaxarea intermoleculară. Sunt detectate moleculele de ligand cu schimburi rapide care au fost supuse transferului magnetizării de la proteină. Toate celelalte molecule nu au semnal. Aceasta a fost evidenţiată utilizând albumina serică umană şi un amestec de trei compuşi – acidul salicilic, acidul L-ascorbic şi glucoza. În spectrul pompării NOE au fost

observate numai semnalele acidului salicilic [Chen, Shapiro, 1998]. Acest ligand nu a fost detectat într-un experiment pur de difuzie fără transferul NOE.

Spectrul ligandului dintr-un experiment revers-NOE este selectat prin intermediul filtrului de relaxare transversă care elimină semnalele proteinei şi inversează semnalele ligandului. Acest filtru exploatează timpul de relaxare mult mai rapid al proteinei - *T*2, comparativ cu timpul mult mai lent al ligandului. Pe parcursul timpului de amestec, magnetizarea ligandului este parţial transferată la proteină via cross-relaxarea intermoleculară. Este retras/scăzut un experiment de referinţă în care nu se realizează niciun transfer al magnetizării. În spectrul diferenţial sunt observate numai acele semnale ale compuşilor care interacţionează cu proteina. Acest experiment a fost utilizat pentru albumina serică umană şi glucoza şi un amestec de acizi graşi neramificaţi ca presupuşi liganzi. În spectrul diferenţial au fost observaţi numai acizii graşi. Ratele intensităţii între diferiţi liganzi au fost utilizate pentru a ordona afinităţile diferiţilor compuşi [Chen, Shapiro, 2000]. Din cele două experimente, revers pomparea NOE este cel mai sensibil.

Pomparea NOE şi RNP sunt considerate experimente foarte sensibile pentru screening-ul RMN primar. Cartografierea epitopilor este limitată de difuzia spin.

9.3.3.4. WaterLOGSY şi ePHOGSY

WaterLOGSY utilizează molecule de apă legate la interfaţa proteină-ligand pentru a transfera magnetizarea de la proteină la ligand. Apa de la interfaţă poate fi implicată în realizarea legăturilor între proteină şi ligand. Este de asemenea posibil ca hidratarea hidrofobă la suprafaţa proteinei în vecinătatea ligandului, să aibă rol de transmiţător. Timpul de rezidenţă a moleculelor de apă în cavităţile proteinei variază de la câteva nanosecunde până la câteva sute de microsecunde [Denisov, Halle, 2002]. Acest timp este suficient de lung pentru a se realiza NOE şi suficient de scurt pentru a menţine rezonanţele apei la schimburi rapide atunci când este observat un singur semnal pentru rezonanţele apei libere şi legate. Principiul waterLOGSY este ilustrat în figura 9.9. NOE transferă magnetizarea de la apă la proteină. Semnul acestei magnetizări este neschimbat de la magnetizarea iniţială.

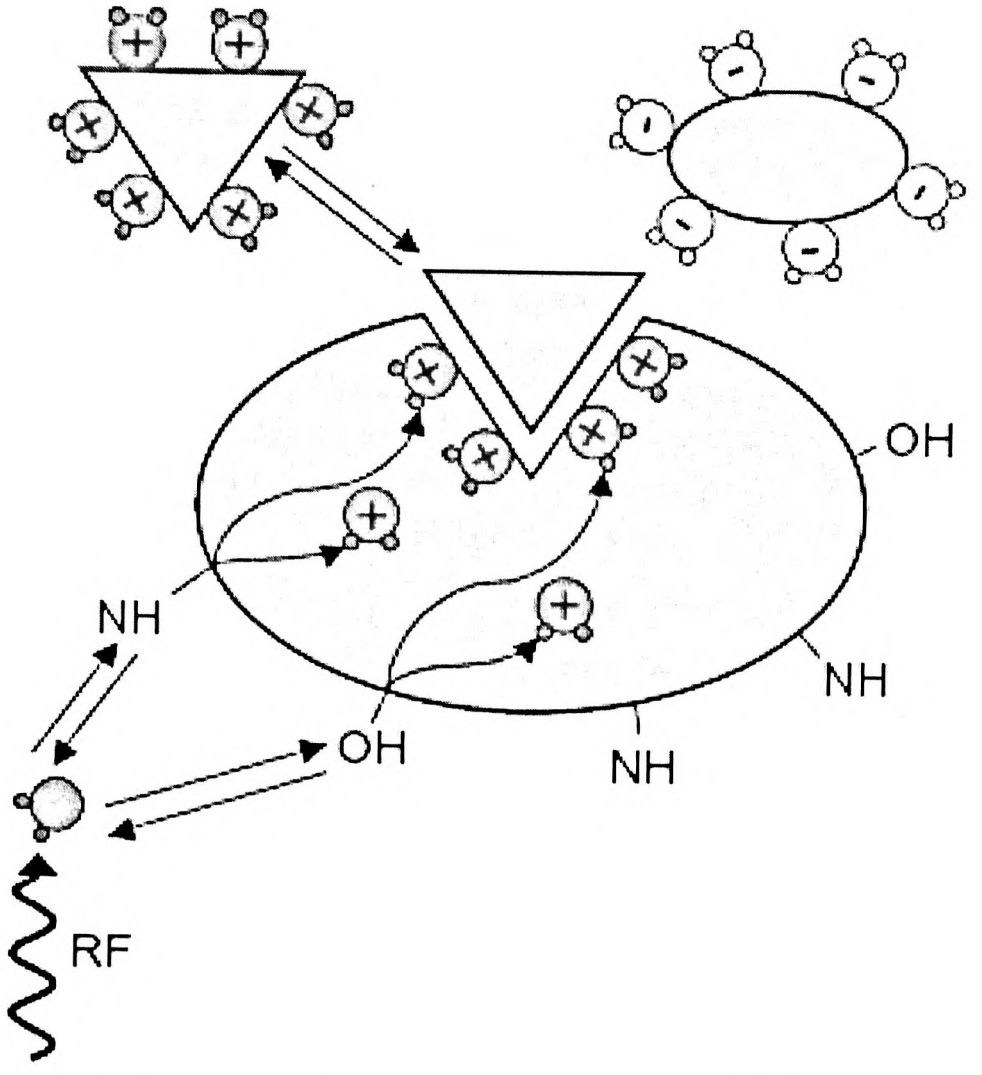


Fig 9.9 Ilustrare schematică a experimentului ePHOGSY. Magnetizarea este transferată de la apă la protonii proteinei prin NOE sau prin schimbul protonilor labili indicaţi prin săgeţi. Ligandul din soluţie prezintă un transfer al magnetizării de la apă. Semnul semnalului diferă pentru moleculele care se leagă la proteină (+) şi acelea care transferă magnetizarea fără a se lega la proteină (-).

Alt mecanism pentru transferul magnetizării de la apă la proteină este schimbul chimic al protonilor apei cu protonii labili ai proteinei. Acest proces conservă semnul magnetizării; aceste două procese sunt asociate la transferul magnetizării de la apă la proteină. În etapa a doua, are loc NOE dintre apa legată şi protonii ligandului. NOE este negativ pentru protonii care cad lent din complexul proteină-ligand, şi pozitiv şi cu magnitudine scăzută pentru moleculele mici precum ligandul liber din soluţie. Din moment ce în experiment este utilizat un exces de ligand, întotdeauna semnalul observat este cel al ligandului. În funcţie de constanta de disociere a complexului, va domina fie contribuţia NOE negativ tipic pentru proteină sau NOE pozitiv al moleculelor mici. Aceasta permite o distincţie rapidă între moleculele care se leagă la proteină şi acelea care nu se leagă deoarece NOE al celor două va avea semnale diferite în spectru.

Cel mai eficient experiment utilizat pentru evaluarea efectului waterLOGSY este denumit ePHOGSY [Dalvit, 1998]. Acest experiment începe cu inversia selectivă a rezonanţelor protonilor apei şi defazarea celorlalte rezonanţe. NOE al protonilor proteinei şi ligandului se formează din protonii selectaţi ai apei. Experimentele de titrare a ligandului au fost realizate pentru a deriva constantele de legare [Dalvit şi colab., 2001] prin experimente ePHOGSY. Potenţialul waterLOGSY a fost demonstrat pentru albumina serică umană în prezenţa triptofanului şi pentru kinaza 2 ciclin-dependentă (cdk2) care leagă doi liganzi de natură necunoscută [Dalvit şi colab., 2001]. Un experiment ePHOGSY pentru dehidrogenaza legată la la 4-*n*-butil fenol este reprezentat în figura 9.10. Amestecul conţine de asemenea imidazol şi DMSOs nici o interacţiune cu proteina şi, în consecinţă, niciun semnal negativ nu a fost observat.

Experimentele ePHOGSY au potenţial pentru screening-ul RMN. Experimentul este foarte sensibil, lipsit de de artefacte, şi necesită concentraţii mici de proteină şi ligand. Semnalele liganzilor nelegaţi sunt de semn opus faţă de semnalele liganzilor care se leagă cu afinitate crescută. Constanta de disociere a complexelor poate fi de 0,1 μM. Din păcate, această metodă nu poate fi utilizată pentru cartografierea epitopilor deoarece intensitatea semnalelor este o funcţie complexă a timpului de rezidenţă a apei şi a distanţei dintre protonii ligandului şi ai moleculei de apă. Cu toate acestea, este o metodă foarte sensibilă pentru screening-ul ligandului.

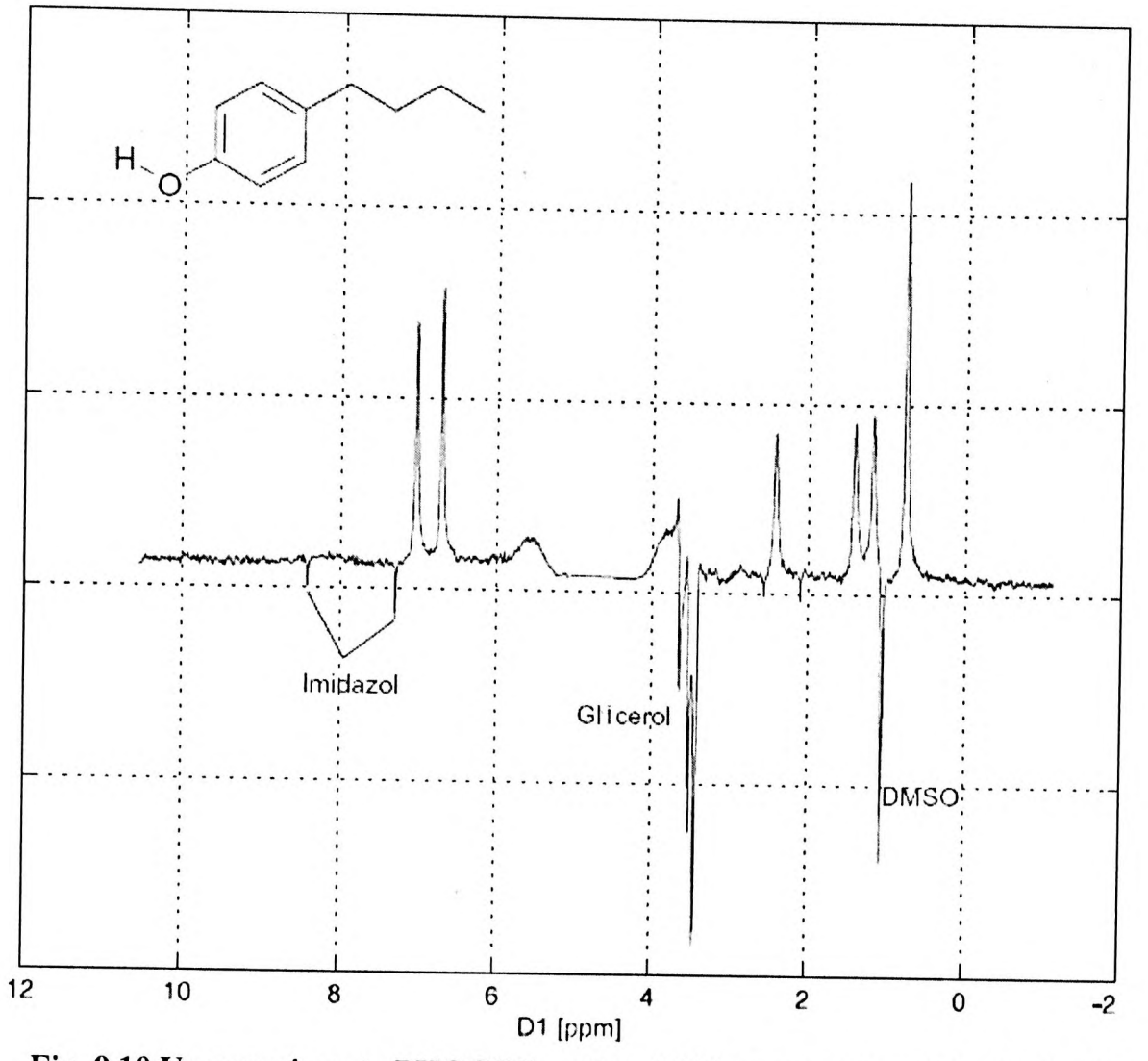


Fig. 9.10 Un experiment ePHOGSY pentru dehidrogenaza legată la 4-*n*-butil-fenol

9.3.4. Prepararea probelor

În comparaţie cu probele de proteine utilizate pentru SAR prin RMN clasic, probele utilizate în tehnicile de detecţie a ligandului trebuie să aibă caracteristici speciale. Evident, nu este necesară marcarea izotopică şi nici supraexpresia proteinei. Chiar şi purificarea proteinei este necesară doar dacă substanţele analizate se leagă de oricare altă proteină din soluţie. Orice alte restricţii sunt mai dificile, luând în considerare pH-ul soluţiei deoarece nu sunt examinaţi protoni labili. Cu toate acestea, poate interfera cu prezenţa moleculelor mici, altele decât liganzii de interes. Un exemplu tipic, glicerolul, deseori utilizat în concentraţii mari pentru a stabiliza proteinele, determină rezonanţe de mare intensitate care pot acoperi alte semnale care se află dedesubt.

Necesitatea de a evita semnalele altor compuşi impune o restricţie stringentă în alegerea soluţiilor tampon fără protoni nelabili. Pot fi utilizate

soluţiile tampon cu protoni labili cu schimburi rapide cu apa, precum fosfatul şi hidrogenul carbonat.

Moleculele mici sunt deseori dizolvate în DMSO şi adăugate în cantităţi mici din soluţiile stoc de DMSO (câţiva microlitri). În particular, pentru compuşii relativ insolubili, creşterea solubilităţii poate fi obţinută atunci când solventul conţine DMSO. Majoritatea proteinelor îşi păstrează funcţia în soluţiile apoase cu concentraţii ale DMSO de 20-30%. Pentru acest scop trebuie utilizat DMSO deuterizat. În acelaşi mod, pot fi adăugaţi alţi solvenţi deuterizaţi. În cazul d^6 – DMSO, este observat un semnal DMSO rezidual ascuţit, mic, la 2,2 ppm care este deseori o referinţă pentru substanţele nelegate. Tetrametilsilanul (TMS) sau acidul 2,2-dimetil-2-silapentan-5-sulfonic (DDS) pot fi adăugate ca standarde pentru transformările chimice.

9.4. Concluzii

În ultimii ani, metodele RMN au pătruns în domeniul sistemelor de analiză de mare capacitate (HTS) al compuşilor ca liganzi ai proteinelor. Această dezvoltare este uimitoare, luând în considerare sensibilitatea relativ scăzută a experimentelor RMN de bază, comparativ cu metodele ce prezintă o sensibilitate ridicată precum spectroscopia cu fluorescenţă. Dezvoltarea recentă a hardware-ului a jucat în mod sigur un rol important în dezvoltarea metodelor de screening RMN. Viteza dezvoltării RMN este încă rapidă, cu câmpuri magnetice care cresc continuu şi noi tehnologii care măresc sensibilitatea şi stabilitatea spectrometrelor RMN curente. Tehnologia crioprobelor a sporit sensibilitatea şi a transformat experimentele RMN în experimente care utilizează concentraţii foarte mici ale probelor. Experimentul SAR prin RMN tipic este acum accesibil pentru concentraţii ale proteinelor de 50 μM. Cu toate acestea, experimentele care înregistrează spectrele proteinelor sunt limitate în mod curent la proteine relativ mici, cu greutăţi moleculare de până la 40 kDa. Proteinele cu greutăţi moleculare de 100 kDa vor putea fi „cunoscute" prin metode de marcare mai sofisticate. Actual, sunt disponibile numeroase tehnici, fără nicio limitare a mărimii proteinei. Cerinţa referitoare la constanta de disociere a complexului proteină-ligand este oarecum limitatoare pentru aceste tehnici. Metodele bazate pe ligand au un potenţial considerabil pentru screening-ul liganzilor (ePHOGSY, NOE pumping), cartografierea epitopilor (transferred NOE, STD-RMN) şi au fost utilizate chiar şi pentru a determina conformaţia liganzilor legaţi. Valoarea reală a RMN-ului în identificarea medicamentelor o constituie cantitatea mare de informaţii care pot fi obţinute numai din câteva măsurători. În acest sens, RMN oferă un sprijin important pentru sistemele de analiză de mare capacitate (HTS tradiţional) şi pentru noile metode de evaluare.

CAPITOLUL 10
MARCAREA PROTEINELOR CU IZOTOPII C^{13} ŞI N^{15} PENTRU ANALIZA STRUCTURII ŞI DINAMICII MACROMOLECULELOR BIOLOGICE

10.1. Introducere

Spectroscopia de rezonanţă magnetică nucleară (RMN) a cunoscut o dezvoltare rapidă de-a lungul ultimului deceniu având o largă aplicabilitate şi un imens potenţial pentru studiul structurii şi dinamicii macromoleculelor biologice. Ne referim mai ales la analiza structurii proteice care este principala beneficiară a progreselor tehnicilor RMN. Noile îmbunătăţiri ale componentelor hardware şi implicit ale spectrometriei RMN cu puteri ale câmpului magnetic de până la 900 MHz au crescut sensibilitatea testărilor şi au redus considerabil numărul de probe necesare analizei. Mai mult, dezvoltarea tehnicii marcării izotopice şi apariţia tehnicilor de analiză multidimensionale constituie adevărate pietre de hotar pentru studiul proteinelor. Structura microproteinelor în limitele a 10 kDa a putut fi analizată fără utilizarea tehnicilor de marcare izotopică după apariţia tehnicii homonucleare bidimensionale (2-D) la sfârşitul anilor 1970 şi începutul anilor 1980.

Cu toate acestea însă, dincolo de această limită de 10 kDa, complexitatea crescută datorată variabilităţii structurale şi fenomenelor translaţionale caracteristice, împiedică analiza structurală detaliată a macroproteinelor prin intermediul acestor tehnici. Prin urmare studiul structurii macroproteinelor necesită marcări multinucleare şi strategii speciale de investigare necesare pentru înlocuirea izotopilor N^{14} şi C^{12} din proteine, predominant inactivi RMN cu izotopii activi RMN C^{13} şi N^{15}. Protocoalele au fost dezvoltate astfel încât să se lucreze fie cu proteine uniform marcate cu C^{13}/N^{15} ori marcarea să fie utilizată doar pentru un situs specific.

Mai mult, experimentele utilizând RMN-ul multidimensional heteronuclear au fost concepute să utilizeze numărul relativ mare de cuplaje scalare mono sau policomponente evidenţiate prin marcare. Folosind combinaţiile chimice C^{13} şi/sau N^{15} induse, rezonanţa H^1 de translaţie poate fi azi uşor separată în trei sau patru dimensiuni. Combinarea acestor tehnici interesează în special limitările impuse asupra studiului macroproteinelor şi permite determinări structurale proteice până la greutăţi moleculare de aproximativ 22kDa. Această limită se poate extinde până la 44kDa prin simpla incorporare a H^2 la nivelul situsurilor proteice nonschimbabile.

În acest capitol vor fi detaliate recent descoperitele tehnici de încorporare a izotopilor N^{15} şi C^{13} în proteine, care au drept rezultat generarea unor analize spectrale extrem de sensibile şi implicit facilitarea analizei structurale a sistemelor proteice cu greutate moleculară mare. Strategiile de marcare convenţionale necesitau supraproducţii de proteine la nivelul structurilor bacteriene sau eucariote şi dintre acestea vom aminti cele mai avansate structuri ca o condiţie indispensabilă a încorporării eficiente a izotopilor în proteine. Pe lângă studiile de structură, tehnica RMN joacă un rol important şi în descrierea dinamicii proteinelor precum şi în stabilirea relaţiei de cauzalitate dintre dinamică şi funcţie.

Prin urmare, vom prezenta tehnicile de marcare izotopică selectivă care ne permit evaluarea dinamicii lanţurilor laterale proteice precum şi a interacţiunii dintre proteină şi ligandul specific.

Cea de a doua parte a capitolului aduce în prim plan noile tehnici *in vitro*, care utilizează extracte acelulare pentru generarea de mostre de proteine. În timp ce sinteza de proteine de către sisteme acelulare, la o scară analitică, este posibilă deja de câţiva ani, producerea programată de proteine utilizând fracţiuni de *Escherichia coli* sau alte surse a devenit una dintre cele mai puternice mijloace de generare a probelor marcate pretabile la analiză RMN.

Prin urmare, ne vom referi la cele mai noi descoperiri în ceea ce priveşte sistemele de sinteză acelulare şi strategiile de marcare.

10.2. Sisteme de expresie ale încorporării *in vivo* a izotopilor C^{13} şi N^{15} în proteine

Dincolo de barierele tehnice, calitatea şi stabilitatea mostrelor de proteine limitează adesea analiza lor cu ajutorul tehnicilor RMN. Sensibilitatea relativ scăzută a majorităţii spectrometrelor RMN necesită pentru analiză concentraţii proteice începând de la 0,2nM, însă în multe cazuri agregarea proteică se realizează cu mult înainte de atingerea acestei limite. Pe lângă aceasta, probele trebuie să rămână stabile mai multe zile, pentru intervalul de timp necesar finalizării unui set întreg de măsurători. Mai mult, pentru a obţine rezoluţie maximă, analiza RMN necesită de regulă temperaturi relativ înalte, între 15-25°C, care pot de asemenea să afecteze stabilitatea proteinelor. Datorită costurilor mari pe care le implică prepararea unor probe de proteine marcate multinuclear, o probă va fi utilizată de mai multe ori, în experimente succesive, iar agregarea, denaturarea sau chiar degradarea proteinelor datorată denaturării cantităţii de proteaze sau activităţii auto-proteolitice, trebuie redusă la minim. Prin urmare producţia de probe trebuie să fie destul de crescută, ceea ce pentru sistemele de expresie proteice convenţionale *in vivo* reprezintă atingerea unei cantităţi minime de câteva miligrame per litru de mediu de cultură. Pentru a obţine o rată de producţie proteică optimă alegerea sistemului de expresie

adecvat este de importanţă extremă. Cel mai folosit microorganism în scopul producerii de proteine recombinate marcate specific este încă enterobacteria *E.coli*. O varietate extraordinară de sisteme de expresie şi vectori au fost creaţi pentru obiectivarea producerii de proteine de către *E.coli*, iar acestă vastă selecţie este unul din motivele principale de alegere a sistemului de expresie proteic propriu lui *E.coli*. Majoritatea sistemele eucariote de producere a proteinelor au la bază speciile extrem de productive de *Pichia pastoris*. Marcarea proteinelor la nivelul celulelor de mamifere este doar rar realizată datorită costurilor mari pe care le implică atât tehnica cât şi obţinerea unor precursori specifici dar şi randamentului scăzut.

Iniţial probele de proteine au fost obţinute prin cultura celulelor pe medii de cultură specifice, minime la care s-au adăugat compuşi marcaţi specific. Cei mai des folosiţi precursori ai marcării includ $N^{15}H_4Cl$, $(N^{15}H_4)_2SO_4$, $K^{15}NO_3$ şi $Na^{15}NO_3$ pentru marcarea cu azot şi $NaH^{13}CO_3$, [C^{13}]glicerol, [C^{13}]glucoză, [C^{13}]acetat pentru marcarea cu carbon. Numeroase elemente suplimentare cum sunt mixturi de elemente trasoare şi cocktailuri de vitamine au fost testate ca elemente de potenţare a creşterii celulare pe medii de cultură minime sau pentru a îmbunătăţi productivitatea. Mai mult mixturi simplu sau dublu marcate de aminoacizi, complexe algale (nutritive) şi agenţi de hidroliză microbiană au fost de asemenea adăugaţi mediilor de cultură [Brandner şi colab., 1999] cu scopul obţinerii unor proteine uniform marcate. În scopul reducerii costurilor izotopilor, celulele pot fi cultivate pe medii de cultură bogate, nemarcate până la obţinerea unor densităţi celulare mari, recoltate şi apoi suspendate în medii de cultură cu volum redus, predefinite şi marcate specific pentru producerea de proteine. Niveluri înalte de încorporare a izotopilor, concomitent cu o creştere a recoltei cu 4 până 8 straturi celulare a fost obţinută pentru *E.coli* utilizând această tehnică [Marley şi colab., 2001].

10.2.1. Producția de proteine și marcarea cu izotopi C^{13} și N^{15} la nivelul sistemelor de expresie proteică din *E.coli*

Tehnicile de îmbogăţire izotopică ale fracţiunilor de *E.coli* sunt realizate deja de câţiva ani şi marea majoritate a proteinelor marcate, analizate prin spectroscopie RMN sunt încă produse prin expresie heterologă la nivelul diferitelor gazde ale lui *E.coli*, însumând până la 50% din totalul proteinelor celulare. În ciuda îmbunătăţirilor considerabile ale sistemelor de expresie eucariote şi acelulare, sistemele bacteriene rămân cele mai rapide şi economice sisteme de producere a proteinelor. Metodele standard de generare a mostrelor de proteine marcate heteronuclear din fracţiuni *E.coli* folosesc mediu minimal M9 sau derivaţi modificaţi ai acestuia, cu supliment de [C^{13}]glucoză, şi [C^{13}]glicerol pentru marcarea cu carbon, şi $(N^{15}H_4)_2SO_4$ şi $N^{15}H_4Cl$ pentru marcarea cu azot. Avantajul major al utilizării sistemului de expresie proteică al lui *E.coli* este reprezentat de selecţia crescută de vectori şi numărul mare de subtipuri disponibile. În ceea ce priveşte supraproducţia de proteine, este adesea

necesar ca transcripţia genelor ţintă să poată fi reprimată pe cât de mult posibil până când celulele ating cea mai potrivită fază a creşterii, optimă inducerii. „Scurgeri" ale procesului de reprimare genică, anterioare inducerii, pot favoriza acumularea de mutaţii la nivelul genei ţintă, cu scopul de a suprima producerea de proteine nedorite, sau pot chiar produce lezarea sau apoptoza celulară secundară efectelor toxice.

Cei mai cunoscuţi agenţi inductori care acţionează la nivelul sistemului de expresie al lui *E.coli* sunt enumeraţi în tabelul 10.1.

Tabelul 10.1. Promotori utilizaţi frecvent în inducerea supraproducţiei de proteine la *E.coli*.

Promotor	Origine	Reprimare	Inducere
P_{lac}	*E.coli.*	LacI	β izopropiltiogalactozidă (IPTG)
P_{ara}	*E.coli*	AraR	L-arabinoza
P_{tet}	*E.coli.*, Tn10	TetR	Tetraciclina
ø1- ø10	Bacteriofagi T7 sau T7 ARN polimeraza	reprimare/inactivare	Necesită intervenţia T7 ARN polimeraza, IPTG
$^{\lambda}PL$	Bacteriofag λ	Represor λ cI	Indusă de căldură, modificări de temperatură de 42°C

Reprimarea puternicului promotor *E.coli.- lac* este realizată de către interacţiunea dintre agentul specific represor LacI cu secvenţe operatorii specifice din P_{lac}, împiedicând prin urmare legarea ARN polimerazei *E.coli*. Proteina LacI este eliberată de către operatorul său prin intervenţia β izopropiltiogalactozidei (IPTG), un analog nonmetabolizabil al inductorului natural. Un dezavantaj al promotorului *lac* îl reprezintă expresia sa de fundal relativ ridicată. Acest eveniment poate fi parţial suprimat fie prin creşterea numărului de copii LacI exprimate pe mediul de producţie, fie prin introducerea de copii adiţionale ale genei *lacI* pe o plasmidă sau prin creşterea expresiei cromozomiale a genei *lacI* printr-o mutaţie capabilă de inducerea transcripţiei promotorului nativ numit $lacI^{q}$. Numeroşi derivaţi cum sunt promotorii *tac* sau *trc*, au fost realizaţi prin fuziunea Plac cu alţi promotori, spre exemplu promotorii triptofanului.

În sistemele de expresie bazate pe promotorii T7, cu înaltă specificitate, producţia de proteine este indusă de rezervele de T7 ARN polimerază. În principal T7 ARN polimeraza poate fi asigurată prin câteva modalităţi. O metodă folosită frecvent este exprimarea sa la nivelul unor regiuni special create purtătoare de copii cromozomiale ale genei 1 T7, care codifică T7 ARN polimeraza.

Această „construcţie", denumită „DE3", reprezintă o fuziune transcripţională a genei 1 cu promotorul *lac* IPTG-indus. Pentru a asigura

reprimarea strânsă a expresiei genice, gena 1 este acompaniată de o extra copie a genei *lacI*^{q}. Pentru a elimina orice cantitate adiţională de T7 ARN polimerază, rezultată din reprimări ineficiente, poate fi indusă expresia genei rezultată din plasmidă care codifică T7 lizozimul. T7 lizozimul se leagă eficient şi inactivează T7 ARN polimeraza, iar exprimarea acestui sistem chiar permite producţia şi marcarea proteinelor toxice ale *E.coli*.

În timp ce analiza structurală a proteinelor native reprezintă obiectivul major al tehnicilor care utilizează marcarea, majoritatea probelor au fost iniţial produse ca fuziuni translaţionale la alte proteine sau la peptide artificiale ţintă (tabelul 10.2).

Tabelul 10.2 Ţinte şi proteine transportoare pentru supraproducţia de proteine în sisteme de fuziune

Fuziune	Efect asupra solubilităţii*	Purificare
Poly(His)$_6$-marker	fără efect	cromatografie cu afinitate pentru ioni de metal imobili (IMAC)
Strep-tag (metoda interact-ţiunii streptavidin-biotină)	fără efect	cromatografie de afinitate
Proteina de legare a maltozei	++	cromatografie de afinitate
Proteina NusA	++	
Glutation S transferaza	+	cromatografia de afinitate
Tioredoxina	+	
Proteina G (domeniul B1)	+	
Proteina D cu capat λ	+	
Proteina A (domeniu Z)	+	cromatografie de afinitate

*Efect asupra solubilităţii proteinelor ţintă

Aceste strategii pot oferi avantaje deosebite în ceea ce priveşte purificarea rapidă şi eficientă a proteinelor ţintă şi stabilizarea acestora. Mai mult, creşte adiţia unui partener de fuziune veritabil la capătul N-terminal al proteinei ţintă ceea ce poate stimula semnificativ producţia acesteia. Complexele proteice de fuziune include de obicei un situs de recunoaştere pentru protеazele cu înaltă specificitate asemenea enterokinazei sau proteazei TEV, în regiunea de unire a celor două proteine. Dacă este necesar, partenerii de fuziune pot fi dezlipiţi de pe proteinele ţintă după purificare, lăsând nemodificate proteinele marcate în vederea analizei. Cel mai frecvent marker peptidic utilizat în scopul unei purificări facile este markerul poly(His)$_6$ adăugat la capătul N- sau C-terminal al proteinei. Asemenea micromarkeri de obicei nu influenţează structura sau activitatea proteică şi îndepărtarea lor postpurificare,

poate chiar să nu fie necesară. Proteinele ce conţin markerul poly(His)6 pot fi purificate cu uşurinţă dintr-un extract celular brut, prin formarea unui complex chelator cu ionii metalici ca Ni^{2+} sau Cu^{2+} imobilizaţi pe o coloană cromatografică. Părţilor imidazolice ale restului adiacent de histidină sunt esenţiale pentru formarea ansamblului chelator iar proteinele de legare pot fi ulterior spălate din coloană cu un gradient competitiv de imidazol. Obţinerea de proteine, utilizând markerul poly$(His)_6$ a devenit o tehnică de rutină pentru evidenţierea expresiei genelor heterologe recombinate, indiferent de gazdă.

Doar aproximativ 25% din supraproducţia de proteine este iniţial pretabilă sau suficient de stabilă pentru a fi supusă analizei structurale [Christendat şi colab., 2000] şi majoritatea experimentelor trebuiesc adaptate şi optimizate cu scopul obţinerii unor „recolte" de proteine corect conformate. Ca parametrii generali ai optimizării sunt frecvent utilizate selecţia unor gazde şi vectori de expresie viabili, variabilitatea condiţiilor de creştere şi stabilirea concentraţiilor de inducere, construcţia de proteine de fuziune şi coexprimarea proteinelor helper. O problemă frecvent întâlnită în ceea ce priveşte expresia heterologă la *E.coli* o reprezintă formarea de corpi de incluziune - mari agregate de proteine inactive. Marcarea proteinelor drept corpi insolubili de incluziune ar putea reprezenta o strategie de împiedicare a activităţii bactericide a proteinelor supraexprimate [Majerle şi colab., 2000]. Au fost descrise mai multe protocoale de solubilizare a corpilor de incluziune după purificare şi de refacere a structurii proteinelor denaturate până la obţinerea structurii lor corecte 3-D. Cu toate acestea, strategia de reconformare trebuie optimizată pentru fiecare proteină în parte şi poate reprezenta o procedură laborioasă cu reuşite şi eşecuri, deşi uneori rezultatele nu sunt satisfăcătoare. Prin urmare, intenţia este aceea de a maximiza obţinerea de proteine în forme complet solubile.

Din fericire, în multe cazuri, formarea corpilor de incluziune în timpul exprimării proteice poate fi prevenită prin legarea la capătul C-terminal al proteinei ţintă, al unui partener de fuziune extrem de solubil.

Mai multe proteine transportoare (carrier) sunt capabile să crească solubilitatea unei proteine de regulă insolubile (tabelul 10.2); în cercetările întreprinse pentru depistarea proteinelor capabile să confere solubilitate proteinelor ţintă insolubile, prin fuziune la nivelul capătului C-terminal, proteina de legare a maltozei din *E.coli* - MalE şi proteina NusA s-au dovedit a fi cele mai eficiente. În condiţiile în care macroproteinele de transport trebuiesc îndepărtate prin intermediul proteazelor specifice, anterior analizei RMN, clivajul proteinelor de fuziune poate reintroduce probleme de solubilitate şi recent eliberatele proteine ţintă, uneori, tind să se precipite la scurt timp după ce nu mai sunt covalent ataşate la o proteină transportoare. Pe lângă acestea utilizarea de macroproteine transportoare ar conduce la pierderea unor cantităţi preţioase de precursori de marcare. Proteine transportoare cu greutate moleculară mai mică, cum ar fi proteina D cu capat λ, domeniile proteinei A a Staphylococului sau proteinei G a Streptococului [Zhou şi colab., 2001] pot fi

utilizate drept elemente de ataşare nonclivatoare cu scopul creşterii stabilităţii microproteinelor şi peptidelor. Fuziunea cu domeniul B1 al proteinei G a dus chiar la îmbunătăţirea spectrului RMN al proteinelor marcate. Pe lângă îmbunătăţirea solubilităţii, proteinele transportoare pot fi folosite pentru a facilita producerea de mici peptide la *E.coli* şi pentru a le stabiliza împotriva degradării.

Asamblarea greşită a proteinelor poate fi o problemă la nivelul expresiei proteinelor eucariote în *E.coli*, în special dacă au încorporate mai multe legături disulfidice, dacă au în alcătuire subunităţi multiple sau conţin grupări prostetice. O strategie frecvent utilizată de abordare a acestor probleme o constituie coexprimarea proteinelor helper accesorii (tabelul 10.3).

Dacă asamblarea proteinelor supraexprimate depinde de factori de monitorizare, creşterea acestor factori de monitorizare prin coexpresia GroEL/ES, DnaKJ/GrpE sau a altor sisteme de monitorizare se poate dovedi extrem de avantajoasă. Rata scăzută de producţie proteică datorată pauzelor translaţionale sau a încorporării greşite a aminoacizilor ca rezultat al utilizării codonilor ar putea fi optimizată prin coexprimarea tARNs corespunzătoare.

Tabelul 10.3 Modificările sistemelor de expresie ale *E.coli*

Probleme/necesităţi	**Modificări**
Formarea de punţi disulfidice	expresie a regiunilor *trx*⁻ şi *gor*⁻, cu obţinerea unui mediu citoplasmatic cu acţiune oxidantă coexpresia disulfid izomerazelor ca DsbA, DsbC sau PDI expresia periplasmatică folosind peptide semnal
Asamblarea proteică dependentă de cofactori de monitorizare	coexpresia factorilor de monitorizare ca GroELS şi/sau DnaKJ/GrpE
Utilizarea rară a codonilor	coexprimarea tARNs corespunzătoare

O problemă frecventă, care în multe cazuri nu îşi găseşte soluţionare, apărută la folosirea sistemelor de expresie ale *E.coli* o reprezintă formarea corectă a legăturilor disulfidice în proteine. Strategiile care să permită formarea corectă de legături disulfidice, *in vivo*, includ exportul proteinelor supraexprimate la nivelul periplasmei cu efect oxidant prin adăugarea de secvenţe semnalizatoare de export exprimate la nivelul unor regiuni special create lipsite de tioredoxină şi de glutation reductază oferind prin urmare un mediu celular oxidant şi coexprimarea izomerazelor disulfidice asemenea proteinelor DsbA şi DsbC ale *E.coli* sau a proteinei eucariote de monitorizare, disulfid-izomeraza (PDI).

10.2.2. Proteinele marcate cu izotopi C^{13} și N^{15} ale *P. Pastoris*

Celulele din drojdia de bere combină multiple avantaje ale sistemelor de expresie pro- şi eucariote. Sunt mici ca dimensiuni, totuşi robuste şi uşor de manevrat. Rata de creştere a celulelor drojdiei de bere este mult mai rapidă comparativ cu alte celule eucariote iar fermentarea acestora este de regulă definitivată în câteva zile. Mai mult, drojdia nu necesită adăugarea de suplimente complexe pe mediul de creştere iar creşterea se poate propaga pe medii simple inextensive sau pe medii de geloză asemenea celor pentru *E.coli*. Rata lor excelentă de creştere pe medii definite minimale, face aceste celule extrem de atractive pentru utilizarea lor în producerea de proteine ţintă necesare analizei RMN. Pe lângă acestea, datorită capacităţii secretorii a proteinelor recombinate de *P. Pastoris*, purificarea se poate realiza rapid într-un singur pas [De Lamotte şi colab., 2001]. Multe proteine de origine eucariotă trebuie să treacă prin modificări specifice posttranslaţionale asemenea glicozilarii sau lipidării, formării de legături disulfidice sau procesării posttranslaţionale. Aceste modificări sunt adesea esenţiale pentru stabilitatea activităţii enzimatice a proteinelor, sau pentru adoptarea conformaţiei lor native. Eşecul formării legăturilor disulfidice corecte poate întârzia sau chiar bloca procesele de asamblare proteică determinând formarea de corpi de incluziune sau chiar degradare proteică. Producerea de proteine modificate nu poate fi abordată într-o manieră satisfăcătoare prin utilizarea unor gazde procariote ca *E.coli*. Exprimarea la nivelul celulelor de drojdie poate fi prin urmare soluţia la căutările noastre a unor gazde cu potenţial de creştere rapid şi posibilitatea de producere a proteinelor modificate şi glicozilate [Cereghino, Cregg, 2000]. Cu toate acestea, trebuie luat în considerare faptul că modelul de modificare proteică obţinut după exprimare la nivelul drojdiei de bere poate să fie diferit de cel prezent la nivelul proteinelor native, spre exemplu, celulele de drojdie sunt capabile doar de ataşarea glicanilor bogaţi în manoză, care reprezintă polizaharida centrală a glicoproteinei.

Abordarea tehnicilor de marcare ar trebui să ia în considerare faptul că producţia de proteine heterologe din *P. Pastoris* este corelată cu o densitate celulară mare. Creşteri de aproare 100 straturi de proteină în cultură au fost obţinute prin fermentaţia celulelor în bioreactoare spre deosebire de aşa numitele culturi proteice agitate sau submerse [Van den Burg şi colab., 2001]. Inducerea producţiei de proteine heterologe ar trebui declanşată după atingerea unei densităţi celulare mari. Au fost înregistrate chiar producţii de peste 100 mg proteină per litru de cultură. În culturile proteice agitate, producţiile raportate de proteine heterologe uniform marcate au variat de la 2 mg/l în cazul proteinei de control a complementului virusului Vaccinia până la cantităţi de 27 mg/l pentru proteina anticoagulantă a căpuşei. Prin urmare, producţia medie de proteine de drojdie obţinută prin tehnica culturilor agitate atinge doar limita inferioară a

cantităţii de proteine produse prin cultivarea extractelor de *E.coli*. În consecinţă, este important să subliniem că în raport cu producţia de proteina la *E.coli*, vor fi necesare cantităţi mult mai mari de izotopi marcaţi specific pentru a induce o creştere rezonabilă a celulelor de drojdie, fiind necesare concentraţii de 5 până la 10 ori mai mari de $(N^{15}H_4)_2SO_4$ şi [C^{13}]glucoză la o cultură celulară submersată de rutină. Pentru a produce 90 mg de fragment C^{13} marcat de trombomodulină în cultura de *P.pastoris*, trebuiesc adăugate de asemenea 143 g [C^{13}]glicerol sau 162g [C^{13}]glucoză la culturile celulare crescute într-un fermentator de 1,25 l. Prin urmare din raţiuni economice, tehnicile care folosesc drojdia de bere devin competitive doar în cazul în care proteinele nu pot fi obţinute utilizându-se *E.coli*.

Pe medii de cultură definite minimale singura sursă de nitrogen pentru *P.pastoris* o reprezintă de obicei NH_4OH, care serveşte în plus la neutralizarea unor cantităţi considerabile de acid produse de drojdie în timpul creşterii. Cu toate acestea însă, din raţiuni economice NH_4OH trebuie înlocuit cu $(N^{15}H_4)_2SO_4$ pentru proteinele de *P.pastoris* marcate cu N^{15}. Atingerea densităţii celulare necesare implică adiţia de cantităţi mari de $(N^{15}H_4)_2SO_4$ cu creşteri concentraţionale de 40 de ori mai mari decât cele necesare în procesul de fermentare al lui *E.coli*. Pentru a evita orice efect negative asupra creşterii celulare care derivă din creşterea puterii ionice a mediului ca urmare a formării de K_2SO_4, $(N^{15}H_4)_2SO_4$ trebuie adăugat fracţionat, la momente diferite, şi opţional combinat cu acţiunea de schimbare a mediului anterior inducerii exprimării proteice.

Pentru marcarea proteinelor cu C^{13} folosind puternicul promotor *AOX1*, sunt necesare de regulă două surse de carbon în timpul fermentării, şi ne referim la glicerol şi glucoză cu scopul de a obţine o densitate celulară mare şi metanol necesar inducţiei promotorului *AOX1*. Deşi *P.pastoris* poate creşte cu metanolul ca unică sursă de carbon, timpul lent de dublare ar împiedica atingerea unor densităţi celulare mari şi necesită prin urmare surse alternative de carbon ca glicerolul sau glucoza. În timp ce glucoza ar putea cu siguranţă să sporească densitatea celulară, are rol şi în reprimarea promotorului *AOX1*, conducând la o descreştere a producţiei de proteine heterologe. Cu toate acestea [C^{13}]glucoza poate fi utilizată în experimentele de marcare ca sursă iniţială de carbon până la atingerea unei densităţi celulare corespunzătoare. Apoi celulele pot fi fermentate mai departe prin adăugarea de [C^{13}]glicerol ca sursă de carbon iar inducţia să aibă loc sub acţiunea [C^{13}]metanolului. Aproximativ 30% din carbonul din proteinele marcate derivă din metanol şi prin urmare devine indispensabilă inducţia producerii de proteine cu [C^{13}]metanol pentru a obţine proteine complet marcate, în special atunci când folosim subtipuri de drojdie cu un genotip *mut*$^+$.

10.2.3. Marcarea cu izotopi C^{13} şi N^{15} a proteinelor exprimate în celulele ovariene ale hamsterului chinezesc (CHO)

Comparativ cu celulele drojdiei de bere, celulele ovariene ale hamsterului chinezesc (CHO) oferă alternativa unui sistem mai avansat care face posibilă generarea de probe marcate care să conţină toate modificările specifice proteinelor eucariote. Asemenea celulelor de drojdie proteinele recombinate pot fi secretate eficient în mediu de cultură, fiind înregistrate rate de producţie proteică la celulele CHO de peste 100 mg/l. Cu toate acestea, celulele provenind de la mamifere necesită de obicei aminoacizi, vitamine, cofactori şi în multe cazuri seruri complexe ca aditivi la mediul de cultură. Pentru a reduce costurile, celulele CHO pot fi de asemenea crescute prin înlocuirea aminoacizilor marcaţi izotopic, care sunt extrem de scumpi, cu compuşi de hidroliză bacteriană sau complexe algale (nutritive) fiind obţinute astfel cantităţi suficiente de proteine recombinate îmbogăţite cu izotopi. Pentru prevenirea diluţiei izotopilor de marcare cu aminoacizi nemarcaţi provenind din ser, ar trebui inclusă o etapă de dializă cu scopul de a elimina din ser compuşii cu greutate moleculară mică. De asemenea un factor extrem de important şi probabil potenţator al costurilor, îl reprezintă necesitatea înregistrării unor concentraţii destul de crescute de glutamină marcată, esenţială circuitului metabolic al multor aminoacizi şi a variatelor componente ale acizilor nucleici. Deşi celulele CHO reprezintă „gazde" scumpe pentru generarea de proteine marcate, ar putea reprezenta cea mai bună opţiune pentru supraexprimarea glicoproteinelor complexe sau a proteinelor care nu pot fi produse de *E.coli*.

10.2.4 Marcarea proteinelor cu izotopi C^{13} şi N^{15} la alte organisme

O altă opţiune de producere a proteinelor marcate glicozilate o reprezintă supraproducţia acestora la nivelul unei specii de amoeba – *Dictyostelium discoideum*. Această gazdă are capacitatea de a se hrăni cu celule bacteriene asemenea celor de *E.coli* care pot fi apoi pre-îmbogăţite cu markeri izotopici utilizând protocoalele standard. Vectori de expresie potriviţi sunt disponibili pentru *D.discoideum* şi o proteină glicozilată de 16 kDa a fost deja marcată într-o proporţie mare cu C^{13}/N^{15} [Cubbedu şi colab., 2000]. În condiţiile în care rata de creştere a *D.discoideum* este destul de lentă, întreaga procedură a durat peste 10 zile. Cu toate acestea, comparativ cu tehnicile de marcare realizate pe celule de drojdie de bere, o cantitate semnificativ mai mică de precursori de marcare a fost folosită acum cu scopul obţinerii unei cantităţi suficiente de proteine pentru măsurătorile RMN, indicând prin urmare *D.discoideum* ca alternativă mai puţin costisitoare pentru producerea de glicoproteine marcate.

În timp ce sistemele de exprimare discutate anterior necesită diferite cantităţi de precursori de marcare, relativ scumpi, în cazul cianobacteriei de fotosinteză *Anabaena sp.* cultivarea se poate face pe medii definite conţinând $Na^{15}NO_3$ şi $NaH^{13}Co_3$ ca unice surse de nitrogen şi carbon. Un domeniu de 24-

kDa a subunităţii B a ADN-girazei din *E.coli* a fost supraexprimată cu succes în *Anabaena sp.* cu ajutorul unui sistem special conceput de vectori de clonare obţinându-se astfel o încorporare de peste 90% a izotopilor de marcare C^{13}/N^{15} [Desplancq şi colab., 2001]. Producţia de proteine (aproximativ 3-6 mg/l) a fost considerată asemănătoare cu aceea obţinută la *E.coli*. Este demn de menţionat că gena exprimată s-a aflat sub controlul promotorului *tac* al *E.coli*, funcţional de asemenea şi în *Anabaena*. În timp ce marcarea cu izotop N^{15} la *Anabaena* poate fi realizată utilizând protocoalele standard de creştere , marcarea cu C^{13} se dovedeşte problematică în condiţii aerobe datorită abilităţii de fixare a CO_2 endogen, având drept rezultat o marcare incompletă cu C^{13} uneori de sub 30%. Cu toate acestea însă, îmbogăţirea cu izotop C^{13}, de peste 90%, poate fi obţinută prin cultivarea celulelor de *Anabaena* pe medii aerate cu nitrogen în condiţii anaerobe controlate. Procesul de fermentare al *Anabaena* necesită iluminare iar durata sa totală este de aproximativ cinci ori mai mare decât cea a lui *E.coli*, datorită timpului de dublare mai lent. Cu toate acestea în condiţiile în care pot fi utilizaţi precursori de marcare mai ieftini, costurile totale se pot reduce cu aproximativ 10%. Poducţia de proteine heterologe la *Anabaena* poate constitui o opţiune pentru generarea de proteine cu o rată de producţie scăzută care necesită cantităţi mai mari de mediu de cultură. Pe lângă toate acestea trebuie luat în considerare că natura deprotonată a rezervelor de carbon final se poate dovedi avantajoasă şi economică pentru generarea unor probe de proteine deuterate necesare analizei structurale a macroproteinelor sau studiilor dinamice (Dingermann şi colab., 2004).

Deşi producerea de proteine heterologe reprezintă abordarea cea mai comună, microproduşii peptidici au fost de asemenea marcaţi în mediul lor nativ. O condiţie esenţială este aceea ca organismul să se poată adapta la creşterea pe medii specifice îmbogăţite cu precursori corespunzători. Exemple de abordări încununate de succes sunt reprezentate de marcarea ciclosporinei A la *Tolypocladium inflatum*, alamethicina din *Trichoderma viride*, belenaminei la *Streptomyces nashvillensis* şi cianoficinei în sporii *Synechocystis*.

10.2.5. Strategii de producere a proteinelor marcate selectiv cu izotopi C^{13} şi N^{15}

Spectrul RMN al proteinelor uniform marcate a devenit din ce în ce mai complex odată cu creşterea dimensiunilor proteice. Au fost elaborate mai multe metode care permit marcarea selectivă a unor domenii specifice, a aminoacizilor sau chiar marcarea uninucleară a proteinei cu scopul simplificării analizei spectrale. Utilizând tehnici de marcare *in vivo*, acest tip de marcare se poate realiza prin „hrănirea" celulei gazdă cu precursori de marcare special creaţi, obţinuţi în majoritatea cazurilor prin sinteză chimică. Simplificarea spectrală care derivă, facilitează distribuirea exactă a rezonanţei în macroproteine.

Alegerea strategiei de marcare corecte poate fi prin urmare deosebit de importantă pentru distribuirea rezonanţei la nivel proteic.

10.2.5.1. Marcarea selectivă a aminoacizilor

În general orice rest de aminoacid dintr-o proteină supraexprimată poate fi marcat specific prin suplimentarea mediului de cultură cu cantităţi mari din aminoacidul respectiv, conţinând izotopul de marcare dorit. Rezonanţa corespunzătoare aminoacizilor unici poate fi uşor identificată raportând-o la spectrul unei proteine care conţine alţi aminoacizi marcaţi iar asemenea abordări ar putea creşte considerabil rezonanţa macroproteinelor. Cu toate acestea, costurile mari pe care le implică marcarea aminoacizilor previn aplicarea acestei tehnici ca analiză de rutină folosită pentru determinări structurale. Metoda marcării selective îşi găseşte aplicabilitate în caracterizarea dinamică şi funcţională a resturilor de aminoacizi, spre exemplu analiza interacţiunii cu liganzii. Marcarea specifică este de asemenea folosită pentru studiul denaturării proteinelor. Proteinele neasamblate au în general o dispersie joasă a rezonanţei, dar urmărirea unui număr limitat de resturi de AA marcate, care ideal sunt distribuite uniform în întreaga proteină, poate facilita analizaprocesului de asamblare. Într-un studiu anterior, marcarea selectivă cu [N^{15}]izoleucină a fost utilizată pentru detectarea intermediarilor de asamblare care acţionează la nivelul unei proteine complexe [Biekofsky şi colab., 2002].

Ca o alternativă la marcarea selectivă a aminoacizilor, prin marcarea izotopică inversă, produsul în exces al unuia sau mai multor aminoacizi nemarcaţi este adăugat la mediul de cultură în combinaţie cu compuşi de marcare generală ca $N^{15}H_4Cl$ sau [C^{13}]glucoză.

O formă de aplicabilitate interesantă o reprezintă marcarea inversă a resturilor aromatice asemenea fenilalaninei sau tirozinei în condiţiile în care lanţurile lor laterale sunt adesea implicate la nivelul interfeţelor de ataşare de ligand saupoziţionate în miezul hidrofobic al proteinei, ceea ce face ca restricţiile de distanţă să fie extrem de importante pentru mediul intern al acestor particule [Goto, Kay, 2000]. Aplicarea marcării izotopice inverse depinde clar de complexitatea proteinei analizate şi este în general mai utilă în studiul proteinelor cu greutate moleculară mică care să conţină doar puţine din resturile de aminoacizi analizate. Aplicarea tehnicilor de marcare izotopică specifice sau selective este limitată datorită efectului de dezorganizare pe care izotopul de marcare îl are asupra celorlalte reziduuri.

Mutanţii auxotrofici (bacterieni) specifici lui *E.coli* poate fi utilizat pentru supraexprimarea şi marcarea specifică a proteinelor recombinate pentru a minimaliza acest efect.

10.2.5.2 Marcarea specifică cu izotopul C13

Aminoacizi marcaţi la nivelul unor poziţii selectate ale carbonului pot fi adăugaţi la medii de creştere specifice cu scopul încorporării lor în proteina recombinată. Aceşti compuşi marcaţi parţial au fost de obicei generaţi prin sinteză chimică şi indroduşi pentru a optimiza rezoluţia spectrală a macroproteinelor supuse experimentelor RMN.

Protonii catenelor alifatice laterale pot fi dificil de abordat dacă numărul de reziduuri alifatice creşte. Reziduurile de fenilalanină marcate cu izotop C^{13} doar în poziţia ε pot ajuta la distribuirea rapidă a protonilor inelului aromatic. Mai mult, proteinele complet marcate cu izotop C^{13} prezintă cuplări scalare nedorite $C^{13}\alpha$- $C^{13}\beta$. Încorporarea aminoacizilor marcaţi în centrul izotopului C^{13} duce la depăşirea acestei probleme. Marcarea fracţionată a aminoacizilor cu C^{13} poate fi obţinută prin creşterea celulelor producătoare de proteine împreună cu o mixtură specifică de surse de carbon marcate cu C^{13} şi C^{12} [Atreya, Chary, 2001].

Analiza dinamicii porţiunii interne a lanţurilor laterale ale proteinelor uniform marcate cu izotop C^{13} poate fi de asemenea complicată datorită efectelor diferitelor interacţiuni dintre diverşi factori care contribuie la relaxare şi implicit, datorită contribuţiei cuplărilor scalare şi dipolare C^{13}- C^{13}. Pentru a rezolva această problemă proteinele pot fi sintetizate cu un model de marcare alternativ C^{12}- C^{13}- C^{12} realizat printr-o procedură de marcare izotopică elaborată care utilizează fie [2- C^{13}] glicerol sau [1,3- $C^{13}{}_2$] glicerol ca unică sursă de carbon.

Mai multe strategii de marcare carbon selective se dovedesc extrem de valoroase mai ales în combinaţie cu protonarea selectivă pentru analiza structurală a proteinelor cu greutate moleculară mare.

10.2.5.3. Marcarea izotopică segmentară

În ciuda dezvoltării tehnicilor RMN heteronucleare multidimensionale, complexitatea crescută a determinărilor spectrale datorată lipsei de rezoluţie, suprapunerii crescute a semnalelor care induc modificări chimice similare, limitează încă analiza structurală a macroproteinelor. Cu toate acestea tentative promiţătoare de extindere a dimensiunii limită proteice care se pretează evaluării structurale prin spectroscopie RMN, sunt reprezentate de tehnicile de marcare segmentare sau în bloc (Dingermann şi colab., 2004).

În principiu proteinele de lungime completă, parţial marcate, pot fi produse de legarea posttranslaţională *in vitro* de domenii nemarcate în asociere cu domenii marcate obţinute prin diferite experimente pentru inducerea expresiei. Rezonanţa domeniilor unice ale macroproteinelor poate fi interesată secvenţional iar structura proteică completă poate fi obţinută printr-o abordare combinatorie, divizând o macroproteină ţintă în părţi de dimensiuni cu care să se poată opera. Gândindu-ne la elucidarea structurii domeniilor proteice izolate nu trebuie să uităm că structura domeniilor marcate specific prin intermediul

tehnicii de marcare segmentară este analizată în contextul proteinei complete, oferind prin urmare informaţii asupra interacţiunilor structurale şi funcţionale dintre domenii, păstrând totodată caracterul structural de bază al proteinei. Procesul de legare este catalizat de enzime autorestrictive - intronii. Intronii sunt secvenţe de inserţie clivate după translaţie prin auto-excizie, lăsând regiunile de flancare proteice, exonii, unite prin structura de legare nativă peptidică.

În funcţie de natura intronilor şi de solubilitatea domeniului ţintă, au fost elaborate mai multe protocoale modificate de marcare segmentară.

• Intronul este secţionat la nivelul porţiunii de mijloc al unei secvenţe din interiorul regiunii formate din bucle flexibile iar cele două fragmente sunt exprimate separat ca elemente de fuziune la domeniul ţintă. Proteinele izolate denaturate sunt amestecate iar cele două fragmente de intron se asociază eficient în timpul asamblării, având drept rezultat legarea celor două domenii ţintă. Această strategie are o aplicabilitate deosebită dacă intronii de fuziune sunt exprimaţi sub formă de corpi de incluziune insolubili şi dacă un protocol eficient de reasamblare este disponibil. Folosind introni diferiţi la fiecare îmbinare/joncţiune se pot genera chiar proteine care conţin domenii marcate central.

• Ataşarea chimică a proteinelor asamblate sub condiţii native foloseşte un etil α tioester la capătul C terminal al unei proteine recombinate, generat de clivajul unui intron de fuziune, în scopul fuzionării cu o altă proteină sau peptidă care conţine reziduuri de cisteină la capătul N terminal. Ambii parteneri de fuziune pot fi combinaţi într-o structură corect asamblată, la un pH fiziologic, iar această strategie ar putea fi extinsă în principal la legarea a mai mult de două domenii.

• Mini intronul din gena dnaE a cianobacteriei *Synechocystis* sp. conţine mai puţin de 200 de resturi de aminoacizi şi este divizată în fragmente N- şi C-terminale care sunt exprimate separat. Dacă sunt combinate după purificare cele două fragmente interacţionează eficient, în condiţii native, cu scopul de a cataliza reacţiile de îmbinare şi fuziune ale proteinelor covalent ataşate [Evans şi colab., 2000]. Domeniile ţintă de fuziune trebuie exprimate ca fuziuni N- sau C- terminale cu fragmentele de introni.

Deşi au fost înregistrate creşteri ale fuziunilor *in vitro* de până la 90%, o serie de probleme potenţiale trebuie luate în considerare atunci când încercăm o abordare a tehnicii marcării segmentare. În timp ce majoritatea reziduurilor enzimatice importante sunt localizate în interiorul intronilor, un mecanism eficient de excizie şi fuziune necesită şi implicarea unor reziduuri cu originea în exon, reacţia nefiind prin urmare complet independentă de secvenţa de joncţiuni proteice nou formate. Capătul C-terminal al exonului necesită resturi de cisteină sau treonină iar la capătul Nterminal serină. Asigurarea acestor necesităţi nu trebuie să afecteze structura sau activitatea proteinei analizate. Condiţiile de asamblare şi fuziune trebuiesc optimizate şi individualizate pentru fiecare

proteină în parte, iar joncţiunea de fuziune/îmbinare ar trebui localizată într-o regiune buclă pentru a asigura flexibiliate maximă. În ceea ce priveşte marcarea în bloc aceasta pare a se aplica mai bine la studiul proteinelor compuse din domenii independent asamblate cu proprietăţi biochimice distincte.

10.3. Marcarea izotopică acelulară

Sinteza de proteine acelulară reprezintă o alternativă promiţătoare şi atractivă la tehnologiile convenţionale de producere a proteinelor cu ajutorul culturilor de celule bacteriene sau eucariote. În contrast cu metodele *in vivo* de exprimare genică în care sinteza de proteine este realizată într-un context celular cuprinzând pereţi şi membrane celulare, sinteza acelulară de proteine se realizează într-un sistem complet deschis. Acest tip de sistem permite controlul direct şi accesul la reacţie în orice moment. Compuşi care pot îmbunătăţi producţia de proteine sau care pot stabiliza proteinele recombinate, cum sunt proteinele de însoţire/chaperone, detergenţii sau inhibitorii de protează, se pot adăuga uşor fără a determina efecte secundare asupra metabolismului celular sau sistemului de transport celular prin membrană. Majoritatea funcţiilor celulare, cu excepţia transcripţiei şi translaţiei, nu trebuiesc întreţinute în timpul expresiei proteice acelulare. Prin urmare aplicabilitatea poate fi extinsă la proteine sau condiţii care nu pot fi tolerate de către organismele vii. În timp ce producţia *in vivo* de proteine este adesea limitată prin formarea de corpi de incluziune insolubili sau datorită instabilităţii proteice cauzată de proteazele intracelulare, sistemele acelulare oferă noi posibilităţi de sinteză a proteinelor complexe (tabelul 10.4).

Asamblarea proteinelor şi stabilitatea acestora poate fi promovată prin adăugarea directă de proteine de însoţire/chaperone, PDI şi cofactori necesari. În contrast supraexprimarea chaperonelor *in vivo* poate conduce la filamentarea celulară sau la exprimarea altor fenotipuri nedorite care se pot dovedi dăunătoare pentru viabilitatea celulelor *E.coli* şi a expresiei proteice. Parametrii de reacţie asemenea pH-ului, potenţialului redox şi puterii ionice pot fi determinate fară apariţia de efecte nocive asupra creşterii şi viabilităţii celulare dar cu siguranţa că aceşti parametrii vor influenţa direct reacţiile relevante. Această nouă oportunitate de expresie genică *in vitro* permite controlul deplin şi flexibilitatea înaltă a condiţiilor de testare şi totodată oferă noi perspective asupra dificultăţilor acociate cu citotoxicitatea, degradarea proteolitică, asamblarea improprie ori agregarea proteinelor sintetizate.

Tab. 10.4 Avantaje şi dezavantaje potenţiale ale sintezei proteice acelulare

Avantaje potenţiale	Dezavantaje
Sistem complet deschis (acces uşor) → adaptarea condiţiilor de reacţie la proteinele sintetizate Încorporarea de aminoacizi marcaţi, glicozilaţi, modificaţi sau sintetici Translaţia directă a produşilor PCR→rată de transfer înaltă Producţia de proteine toxice Producţia de proteine de ataşare la membrană Expresia de cofactori de solicitare a proteinelor Adiţia uşoară de proteine de însoţire /chaperone sau PDI Miniaturalizarea (reacţii de 50 µl) Eliminarea organismelor vii→fără restricţii de creştere Posibilitatea izolării directe a produşilor cu scopul scurtării intervalului de preparare a proteinelor purificate	Productivitate scăzută adesea Sisteme complexe comparate cu sinteza de proteine *in vivo* Tehnică costisitoare comparativ cu modalitatea de exprimare *in vivo* Numărul mic de sisteme comerciale şi kituri Standardizarea dificilă datorată multitudinii componentelor de reacţie Costuri ridicate

Cu ajutorul PDI, chaperonelor sau virusurilor funcţionale s-a observat producţia de proteine citotoxice, proteine de membrană. Cel mai important însă este faptul că sinteza de proteine acelulară oferă noi posibilităţi de incorporare a aminoacizilor marcaţi, glicozilaţi, modificaţi sau sintetici. Un alt element promiţător al sintezei proteice acelulare poate fi constatat la nivelul implicării sale la expresia de proteine cu rată înaltă de transfer prin translaţia directă a produşilor reacţiei de polimerizare în lanţ (PCR). Limitele actuale ale sistemelor acelulare sunt corelate cu înalta lor complexitate, costurile mari şi adesea productivitatea scăzută.

10.3.1. Componentele sistemelor de expresie acelulare

În ceea ce priveşte sistemele de producţie acelulare, toate componentele implicate în expresia genică şi sinteza proteică trebuiesc adăugate în amestecul de reacţie (fig. 10.1). Componente precum ADN-ul, nucleotid trifosfaţii (NTPs), ARNul mesager (ARNm), ARN-ul de transfer (ARNt), aminoacil-ARNt-sintetaza (ARSases), polimerazele, ribozomii, factorii de transcripţie şi translaţie precum factorii de iniţiere (IFs), factorii de elongare (EFs) sau factorii de eliberare (RFs) şi de asemenea aminoacizii trebuie optimizaţi din punct de vedere al concentraţiei, salinităţii şi pH-ului mediului. Procesul de transcriere/translaţie necesită cantităţi mari de energie liberă asigurată prin hidrolizarea GTP şi ATP trifosfaţilor. Prin urmare, sinteza *in vitro* de proteine

necesită implicarea unui sistem ATP de regenerare a energiei care să menţină stabilă concentraţia trifosfatului. În scopul acesta au fost folosiţi fosfaţi donori de înaltă energie cum sunt acetil fosfatul (AcP), creatin fosfatul (CrP) sau fosfoenol piruvatul (PEP) în prezenţa kinazelor proprii (acetat kinaza, creatin kinaza şi piruvat kinaza).

Un component important este un extract celular bazat pe celule brute lizate care conţine componentele necesare de reacţie precum IFs, EFs, RFs, ARS-aze, ARNt şi enzime ca acetat kinaza, necesare regenerării energetice. Sistemele de expresie acelulare pot fi clasificate în funcţie de originea extractului. În principiu, sistemele funcţionale *in vitro* pot fi realizate din orice tip de celule, însă la eficacitatea producţiei de proteine contribuie mulţi factori. Cele mai comune reacţii *in vitro* au la bază extracte de *E.coli,* germeni de grâu sau reticulocite lizate de iepure (tabelul 10.5).

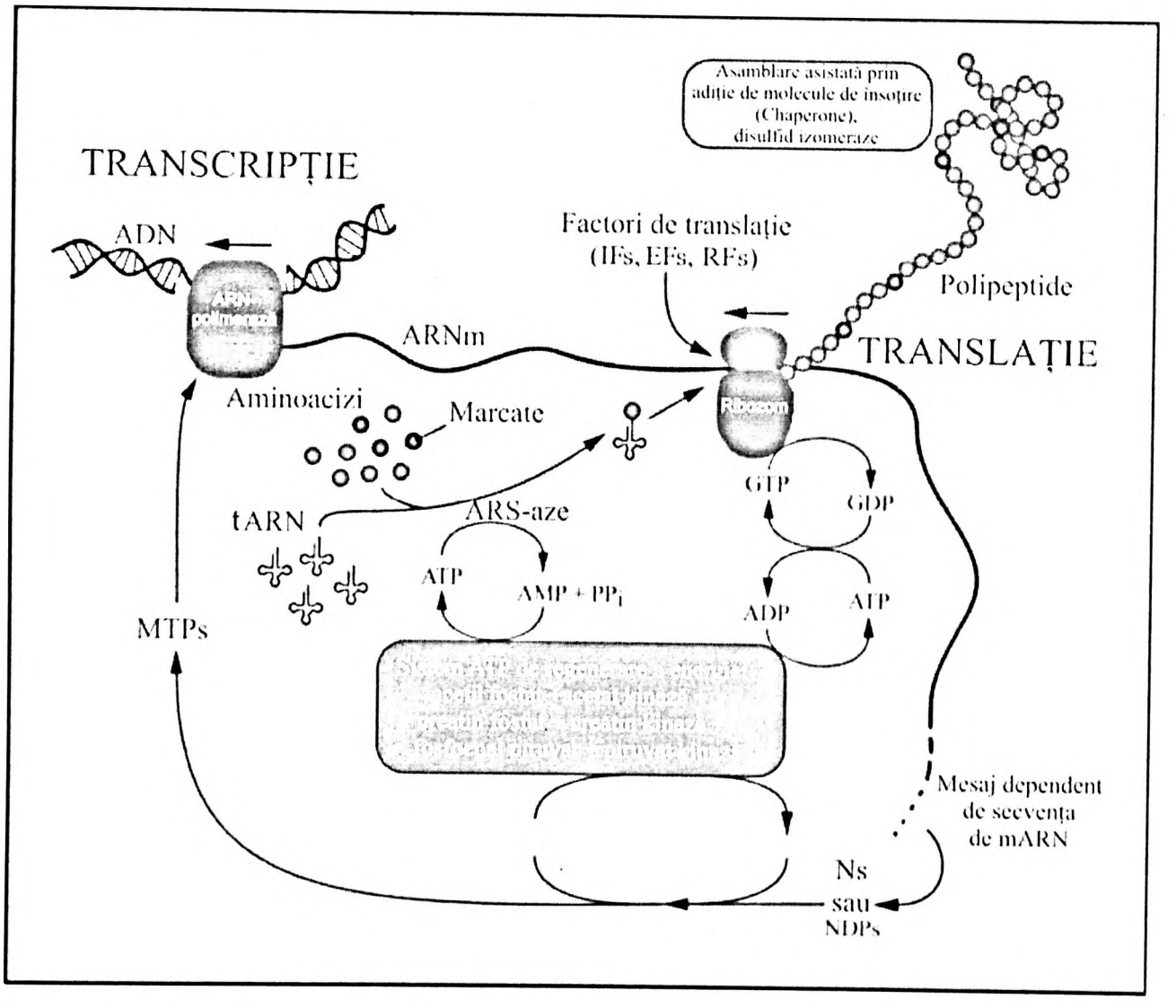


Fig. 10.1 Ilustrarea schematică a sintezei proteice acelulare, evidenţiind procesele cuplate de transcripţie şi translaţie într-un sistem bacterian. Iniţial celulele sunt cultivate, lizate iar extractul celular este pregătit prin adăugare de ribozomi, factori de translaţie asemenea factorilor de iniţiere (IFs), factori de elongare (EFs) sau factori de eliberare (RFs) şi pe lângă aceştia acetat kinaza şi aminoacil-tARN-sintetaza (ARS-aza).

Substraturile precum aminoacizii, componentele sistemului de regenerare al energiei ori nucleozid trifosfatul (NTPs) sunt tratați cu o sare și apoi adăugați la extract iar sinteza de proteine este inițiată după adăugarea copiei de ADN. ADN-ul este transcris prin adăugarea unei ARN polimeraze. tARN-ul adăugat este încărcat cu aminoacizi de către ARS-azele, aminoacizi care vor fi utilizați în translația mARN. Incorporarea unor aminoacizi marcați cu izotopi stabili (particulele întunecate) poate fi realizată cu ușurință în sistemul acelular, ceea ce conduce la obținerea unei proteine marcate izotopic selectiv. Regenerarea ATP și GTP și chiar NTPs din sistemul acelular este obținută printr-un sistem ATP de regenerare a energiei bazat pe hidroliza substraturilor generatoare de energie înaltă în prezența kinazelor proprii. Moleculele de însoțire (chaperonele) pot fi ușor adăugate la mixtura de reacție pentru a asista asamblarea proteinei țintă.

Tabelul 10.5. Sisteme de expresie acelulare bacteriene și eucariote

Sisteme bacteriene		**Sisteme eucariote**	
Escherichia coli		**Germeni de grâu**	**Reticulocite de iepure**
Prepararea extractului S30	**Prepararea extractului S100**	**Extract de germeni de grâu**	**Reticulocite lizate de iepure**
Fracțiunea de supernatant centrifugată la 30000g din extract de *E.coli* preincubată pentru a diminua ADNul și mARN	Fracțiunea de supernatant centrifugată la 10000g privată de toți acizii nucleici, spre exemplu prin tratament DEAE cu celuloză	Utilizat direct pentru expresia copiilor endogene și exogene	Tratate cu RN-aze dependente de Ca2+
Conține: ARN polimeraza, ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație	Conține: ARN polimeraze, ARS-aze și factori de translație	Conține: ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație	Conține: ribozomi, tARNs, ARS-aze, factori de translație
24 - 38° C (optim 37° C)a	Ribozomi, tARNs adăugați la 24-38°C (optim la 37°C)[a]	20-27°C până la 32°Ca [Tulin și colab., 1995][b]	30- 38°Ca [Craig și colab., 1992][b]

[a]Temperetura de reacție
[b]Referințe

Elemente de adăugat:
ADN (plasmidă cu promotor potrivit pentru SP6, T7 ARN-polimeraza)+ polimeraza (bacteriofagul SP6 sau T7 ARN polimeraza) sau mARN
Aminoacizi.
Componente energetice: ATP sau GTP.
Sistem NTP de regenerare al energiei: PEP+PK sau CP+CrP sau AcP.

Formil tetrahidrofolat sau omonimele sale metenil tetrahidrofolat sau acid folinic.
Compus-SH: mercaptoetanol sau ditiotreitol (DTT).
Mg^{2+} şi K^+ în concentraţii optime.

Necesare uneori:
Ca^{2+} şi NH^4
+ în concentraţii optime.
cAMP.
Poliamine, spre exemplu spermidina

Extractele obţinute din *E.coli* conţin aşa numita fracţie de supernatant S30, numit după fracţia solubilă centrifugată la 30000 g, care conţine ribozomi endogeni, enzime ca acetat kinaza şi factori necesari transcripţiei şi translaţiei, ARS-aze, ARNt, ARNm. ARNm endogen este îndepărtat de ribozomi în timpul preincubării extractului celular brut într-o etapă de evacuare şi apoi distrus de ribonucleazele endogene. O altă modalitate de manevrare a extractelor bacteriene este descrisă în cadrul sistemului Gold-Schweiger. Ribozomii sunt adăugaţi la fracţia supernatant a unui extract S100 special purificat de aminoacizii endogeni şi acizii nucleici prin cromatografie schimbătoare de ioni. Acest sistem oferă o acoperire destul de scăzută datorită sintezelor endogene şi a condiţiilor de reacţie mai bine controlate în detrimentul unei preparări mai complicate.

Sistemul *E.coli* funcţionează bine la variaţii de temperatură între 24-38°C, optimă fiind temperatura de 37°C. Extractele de germeni de grâu prezintă un nivel scăzut de mesageri exprimaţi endogeni şi prin urmare, poate fi direct utilizat în exprimarea modelelor endogene şi exogene. În sistemul bazat pe extracte de germeni de grâu temperatura variază între 20-27°C, însă poate fi crescută până la 32°C asigurând o exprimare mai ridicată a anumitor compuşi. Extractul de reticulocite este preparat prin lizarea directă a celulelor sanguine obţinute de la iepuri anemici, existenţei acestei patologii permite creşterea numărului de proeritrocite sau reticulocite care ulterior sunt tratate cu RN-aze dependente de Ca^{2+} cu scopul eliminării ARNm-ului endogen. Acest sistem funcţionează la valori ale temperaturii cuprinse între 30-38°C. În ceea ce priveşte temperatura de reacţie trebuie notat că, pe lângă orice efect asupra procesului enzimatic de transcripţie/translaţie şi asupra degradării ARNm, temperatura afectează implicit şi asamblarea proteinelor sintetizate. Pentru a asista asamblarea proteinelor, chaperonele asemenea sistemului GroEL/ES sau DnaK ori DnaJ se pot adăuga la mixtura de reacţie. De regulă, temperaturile mai joase vor conduce la recolte mai mari de proteine recombinate, în absenţa chaperonelor, însă în prezenţa acestora recoltele nu sunt neapărat mai scăzute. Mai mult, pentru a asista formarea de legături disulfidice, PDI se poate adăuga la mixture de transcripţie/translaţie.

Sistemele de translaţie mai puţin comune bazate pe extracte de drojdie de bere, pe celule de mamifer asemenea celulelor umane HeLa şi celulelor L de şoarece sau pe cloroplaste de tutun, care depind mult de adăugarea exogenă de ARNm, prezintă nivele înalte de degradare şi producţii de proteine relativ scăzute. În ceea ce priveşte marcarea proteică acelulară, s-au folosit doar extracte de *E.coli* şi germeni de grâu. Folosind o abordare extrem de elaborată, Shimizu şi colab.,(2001) au elaborat un sistem de translaţie acelular reconstruit din factori de translaţie purificaţi poli(His)- marcaţi. Sistemul lor numit „sinteza de proteină realizată cu ajutorul elementelor recombinate" (PURE), conţine 32 de componente purificate individual, cu activitate înalt specifică, care să permită producerea eficientă de proteine. Un avantaj al sistemului PURE, în afară de lipsa substanţelor inhibitoare asemenea nucleazelor, proteazelor şi enzimelor care hidrolizează nucleozid trifosfaţii, îl reprezintă procesul simplu de purificare al proteinei sintetizate realizat prin eliminarea proteinei marcate prin cromatografie de afinitate.

Una dintre limitările sistemului acelular o reprezintă degradarea ARNm-ului de provenienţă exogenă. Activităţile variate ale RN-azelor prezente în extractele celulare restricţionează de obicei durata de viaţă a ARNm, şi consecutiv inhibă eficacitatea sintezei proteice. Această problemă ar putea fi rezolvată prin reintroducerea periodică în mixtura de reacţie a unui sistem de translaţie simplu al mesagerilor [Madin şi colab., 2000]. Sistemele de cuplare ale transcripţiei cu translaţia, în care ARNm este continuu sintetizat din copia ADN adăugată la mixtura de reacţie, se pot dovedi avantajoase pentru sistemele de translaţie care conţin mesageri presintetizaţi. Transcripţia directă din mixtura de reacţie poate fi relizată din promotori potriviţi, de către ARN polimeraza endogenă din *E.coli* sau de către ARN polimeraza, bacteriofag exogen din sistemele bacteriene sau eucariote. Pentru a evita degradarea rapidă a mesagerilor, în special în sistemele acelulare *E.coli*, sunt folosiţi inhibitori de RN-aze parţial lipsiţi de ribonuclează. O alegere optimă de copie ADN în sistemele procariote o reprezintă plasmida circulară ADN. În sistemul bazat pe extracte de germeni de grâu cu activitate nucleazică scăzută, atât plasmidele ADN cât şi fragmentele lineare PCR au o funcţionalitate optimă. Eficienţa translaţiei ARNm-ului depinde de trăsăturile sale structurale. Majoritatea secvenţelor de cADN sunt de regulă sufficient de bine exprimate şi fără adiţia suplimentară a potenţiatorilor de translaţie. Secvenţei care prezintă interes trebuie doar sa-i fie asigurată o secvenţă favorabilă Kozak pentru sistemele acelulare eucariote şi o secvenţă Shine-Dalgarno pentru cele procariote, care reprezintă secvenţele codonului ATG responsabil de iniţierea translaţiei (Dingermann şi colab., 2004).

O altă problemă implicată în sinteza proteică acelulară o reprezintă consumul crescut de energie biochimică oferită de rezervele de ATP şi GTP. Atât creatin fosfatul cât şi creatin kinaza care sunt de obicei folosite pentru regenerarea ATP-ului şi GTP-ului în sistemele eucariote acelulare, sau

combinaţia de PEP şi piruvat kinază, acetil fosfat şi acetat kinaza sau un amalgam al ambelor au fost aplicate modelului de sinteză bacteriană proteică *in vitro*. Sistemul generator de energie bazat pe acetil fosfat ar putea prezenta avantajul că nivelul de ATP este menţinut de două ori mai mult în prezenţa PEP. Din moment ce acetat kinaza este prezentă în cantitate suficientă în extractele bacteriene, în sistemele bazate pe extracte de *E.coli* adăugarea exogenă a acesteia nu mai este necesară. Studii referitoare la nivelul de energie biochimică prezent în diferite sisteme acelulare a evidenţiat un procent crescut al hidrolizei trifosfatului la mono- şi difosfaţi în timpul sintezei proteice atât în extractele de germeni de grâu cât şi în extractul S30 de *E.coli*. S-a demonstrat că peste 80% din hidroliza ATP-ului şi GTP-ului, din sistemele bazate pe extracte de germeni de grâu, se produce iniţial independent de sinteza proteică şi a fost sugerat faptul că fosfatazele acide sunt responsabile de hidroliza nespecifică a nucleotide trifosfaţilor.

Studiile întreprinse cu scopul creşterii producţiei de proteine în reacţiile acelulare, s-au concentrat asupra compoziţiei mixturii de reacţie, în special asupra compoziţiei în aminoacizi [Kim, Swartz, 2000] şi asupra metodelor de preparare ale extractului celular. Spre exemplu fosfatazele endogene au fost eliminate folosind extractul S30 preparat din sferoplastele de *E.coli* [Kang şi colab., 2000] sau prin imunodepleţia fosfatazei. Tentativele de concentrare ale componentelor extractului prin ultrafiltrare sau prin dializă au fost de asemenea semnalate.

10.3.2. Tehnici de exprimare acelulară

În reacţiile acelulare desfăşurate într-un mod discontinuu, condiţiile de reacţie se modifică ca rezultat al consumării substratului şi al acumulării de produşi. Procesul de translaţie se opreşte de îndată ce orice substrat esenţial este epuizat. De fapt, sistemele bacteriene acelulare sunt active doar pentru 10-30 min la 37°C. Sistemele bazate pe reticulocite lizate de iepure sau germeni de grâu sunt capabile de funcţionare pe intervale de până la o oră. Cu toate acestea, sistemele de sintetizare a proteinelor *in vitro*, sisteme cu modalitate de lucru discontinuă funcţionează optim pentru majoritatea scopurilor analitice, însă durata scurtă de viaţă şi productivitatea scăzută le limitează aplicabilitatea în ceea ce priveşte sinteza unor cantităţi prestabilite de proteine. Motivele productivităţii scăzute sunt reprezentate de degradarea ARNm, depleţia nucleotid trifosfaţilor şi acumularea produşilor de hidroliză. Timpi prelungiţi de reacţie pentru sistemele de expresie acelulare au fost iniţial obţinuţi prin utilizarea unui dispozitiv de translaţie cu flux continuu acelular (CFCF) (fig. 10.2A). Ideea de bază este aceea de a asigura continuu aminoacizi, elemente regeneratoare ale energiei (AcP, CrP sau PEP) şi NTPs printr-o soluţie nutritivă, şi de a elimina continuu produşii micromoleculari (în special produşi obţinuţi prin hidroliza trifosfatului asemenea fosfaţilor anorganici şi nucleozid monofosfaţii) printr-un flux activ (forţat) al soluţiei nutritive printr-o membrană

de ultrafiltrare (greutatea moleculară este redusă în limitele a 10-300 kDa). În acest caz, toţi produşii, inclusiv proteinele sintetizate, sunt permanent eliminate din compartimentele de reacţie dacă mărimea porilor este suficient de mare (fig. 10.2A). Amestecarea permanentă a mixturii de reacţie şi în anumite contexte aplicarea metodei fluxului ascendent asupra soluţiei nutritive sunt aplicate pentru reducerea formării aglomerărilor membranare.

Sistemul CFCF poate funcţiona peste 20 de ore şi are drept rezultat producţia proteică de circa 0,1-1 mg proteine/ml de volum de reacţie ori mai mult. Modelul pentru acest sistem poate fi reprezentat fie de ARNm, ADN-ul transcripţionat de ARN polimeraza bacteriană endogenă, sau de adăugarea bacteriofagul ARN polimeraza sau a ARN-ului auto-replicativ. Folosind sistemul CFCF, au fost sintetizate cu succes proteine cum ar fi, proteina de acoperire bacteriofagul MS2, proteina de acoperire a virusului brom mozaicat, polipeptid calcitonina, globina, dihidrofolat reductaza funcţional activă (DHFR), cloramfenicol acetiltransferaza (CAT), interleukinele (IL)-2 şi IL-6 .

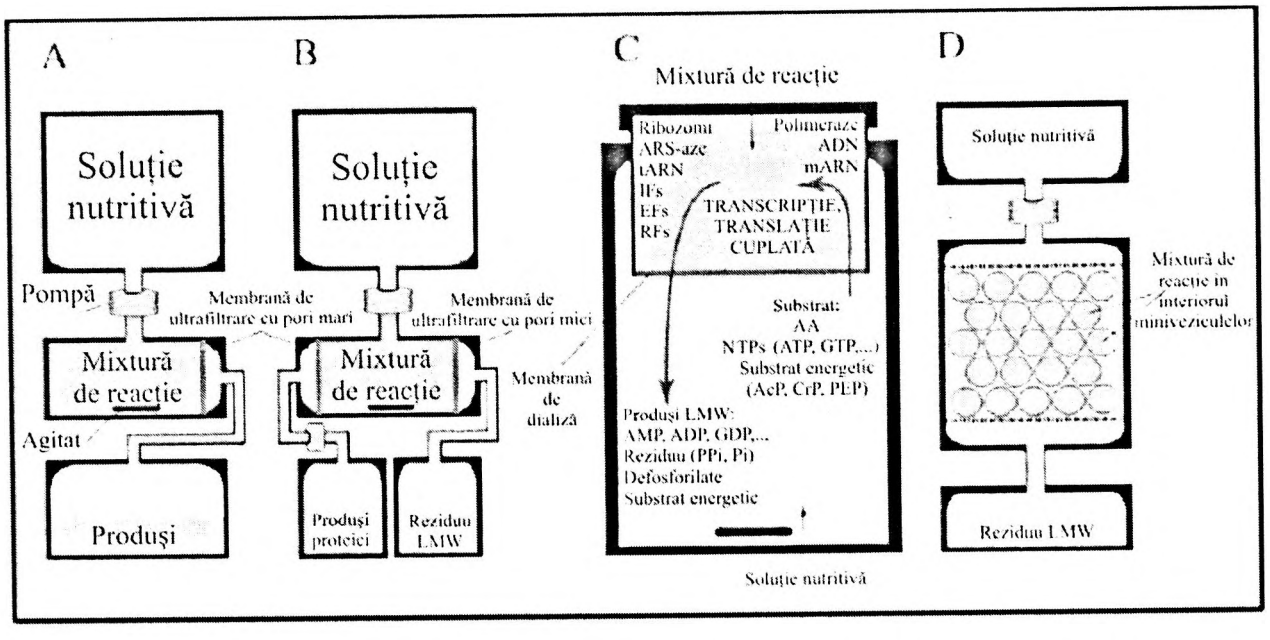


Fig. 10.2 Ilustrarea reactoarelor acelulare pentru sistemele acelulare de flux continuu (A şi B) şi schimb continuu (C şi D). Ilustrarea schematică a unui reactor CFCF cu flux continuu unde elementele de substrat sunt pompate iar produşii sunt eliminaţi prin filtrarea forţată a soluţiei nutritive printr-o pompă. (B) Reactorul CFCF cu flux Y, care conţine două membrane de ultrafiltrare cu pori de dimensiuni diferite, care separă produşii proteici de reziduurile cu greutate moleculară mică. (C) Reactorul CFCF ilustrat cu explicitarea soluţiei nutritive (gri deschis) şi componentele mixturii de reacţie (gri închis). Compartimentele sunt separate printr-o membrană de dializă semipermeabilă, care permite schimburile de difuziune ale substratului şi ale produşilor cu greutate moleculară mică precum şi retenţia componentelor mixturii de reacţie. (D) Reactorul coloană pentru fluxul de schimb alcătuit din mini-vezicule grupate în coloană, conţinând mixtura de reacţie, înconjurate de soluţia nutritivă, modificate de fluxul din coloană. Produşii cu greutate moleculară mică şi substratele sunt modificate de difuziunea prin membrana mini-veziculelor. Modificat după Shirokov şi colab. [Shirokov şi colab., 2002].

Avantajul major al sistemului CFCF îl reprezintă extragerea permanentă a proteinelor sintetizate din mixtura de reacţie, ceea ce se poate solda cu o puritate de 80- 85% a produsului proteic aşa cum am demonstrat, permanent prin filtrarea într-un sistem bacterian CFCF sintetizator de DHFR şi într-un sistem CFCF bazat pe extract de germeni de grâu, sintetizator de IL-6. Proteina sintetizată difuzează din reactorul CFCF într-o cantitate considerabilă şi este destul de diluată. Pentru a reduce efectul de diluţie a fost propusă folosirea aşa numitului reactor cu flux în Y, având caracteristic o separare a fluxului.

Reactorul cu flux Y (fig. 10.2B) are două membrane cu pori de dimensiuni diferite. Iniţial, produşii cu greutate moleculară mică sunt transportaţi printr-o membrană cu pori mici, la o rată crescută, iar proteina sintetizată este colectată în consecinţă şi transportată printr-o membrană cu pori mari la o rată scăzută. Aici, fluxul produsului proteic este controlat de o pompă de separare. Cu toate acestea un număr mare de tentative laborioase de realizare a sistemului CFCF au întâmpinat dificultăţi în elaborarea şi calibrarea acestui sistem complex. Problemele principale sunt reprezentate de degradarea ARN consecutivă folosirii extractelor bacteriene, chiar şi în modele de cuplare ale transcripţiei cu translaţia şi eficacitatea scăzută a formării complexului de iniţiere, care poate cauza scurgeri şi prin urmare pierderea unor componente ale procesului de translaţie prin ultrafiltrare sau blocarea membranei de ultrafiltrare. Cu toate acestea, există o cale alternativă de îndeplinire a sintezei proteice prelungite, care foloseşte în special difuziunea în loc de pomparea rezervelor de substrat şi eliminarea produşilor cu greutate moleculară mică (fig. 10.2C). Acest sistem care foloseşte o mixtură de reacţie separată de soluţia de hrănire prin aplicarea unei membrane de dializă, este denumit sistem acelular de schimb continuu (CECF) ori sistem acelular cu flux semicontinuu (SFCF). Cel mai simplu dispozitiv de asigurare permanentă a substratului şi de eliminare a produşilor cu greutate moleculară mică folosind schimbul pasiv cu o mixtură nutritivă, este reprezentat de o pungă de dializă. În practică, pungile de dializă, simple, fabricate manual sau dializoarele standard comerciale, cum sunt MicroDialyzer® sau DispoDialyzer® de la Spectrum se pot utiliza cu succes. Dimensiunea porilor membranelor reactoarelor este de regulă situată între 10-50kDa. Cu toate acestea au fost raportate şi performanţe bune ale reactoarelor cu membrană cu dimensiuni mai crescute ale porilor. Amestecarea doar a soluţiei de hrănire sau atât a soluţiei de hrănire cât şi a mixturii de reacţie este necesară pentru asigurarea unor rezerve eficiente de substrat. Folosind această abordare s-a observat sinteza a 1,2mg/ml de CAT pe durata a 14 ore din extractul S30 de *E.coli*. Obţinerea acestui produs, cuantifiactă prin ELISA, a depăşit cantitativ producţia obţinută prin reacţia analog discontinuă de 10 până la 12 ori. Apoi s-a reuşit sinteza proteinelor CAT şi Ras în cantităţi de până la 6mg/ml pe o perioadă de 18 ore folosind varianta lor de sistem bacterian CECF,

iar Madin şi colab. (2000) au atins producţii de 1-4 mg/ml pentru mai multe proteine active funcţional precum DHFR, proteina verde fluorescentă (GFP), luciferaza sau ARN replicaza a virusului mozaicul tutunului (TMV). Figura 10.3 descrie sinteza acelulară a GFP printr-o metodă CECF care utilizează un MicroDialyzer®.

Avantajul sistemului CECF este reprezentat de acumularea produşilor sintetizaţi în mixtura de reacţie. Sinteza de proteine şi polipeptide fuzionate cu GFP oferă o modalitate directă şi înalt demonstrativă de a vizualiza acumularea de produs prin intermediul fluorescenţei jumătăţii GFP a complexului. Sinteza unei proteine HIV, aşa numitul antigen Nef, fuzionată cu GFP [Chekulayeva şi colab., 2001] şi a unei polipeptide antibacteriane Cecropina P1 fuzionată cu GFP [Martemyanov şi colab., 2001], au fost raportate într-un sistem bacterian de transcripţie/translaţie CECF T7.

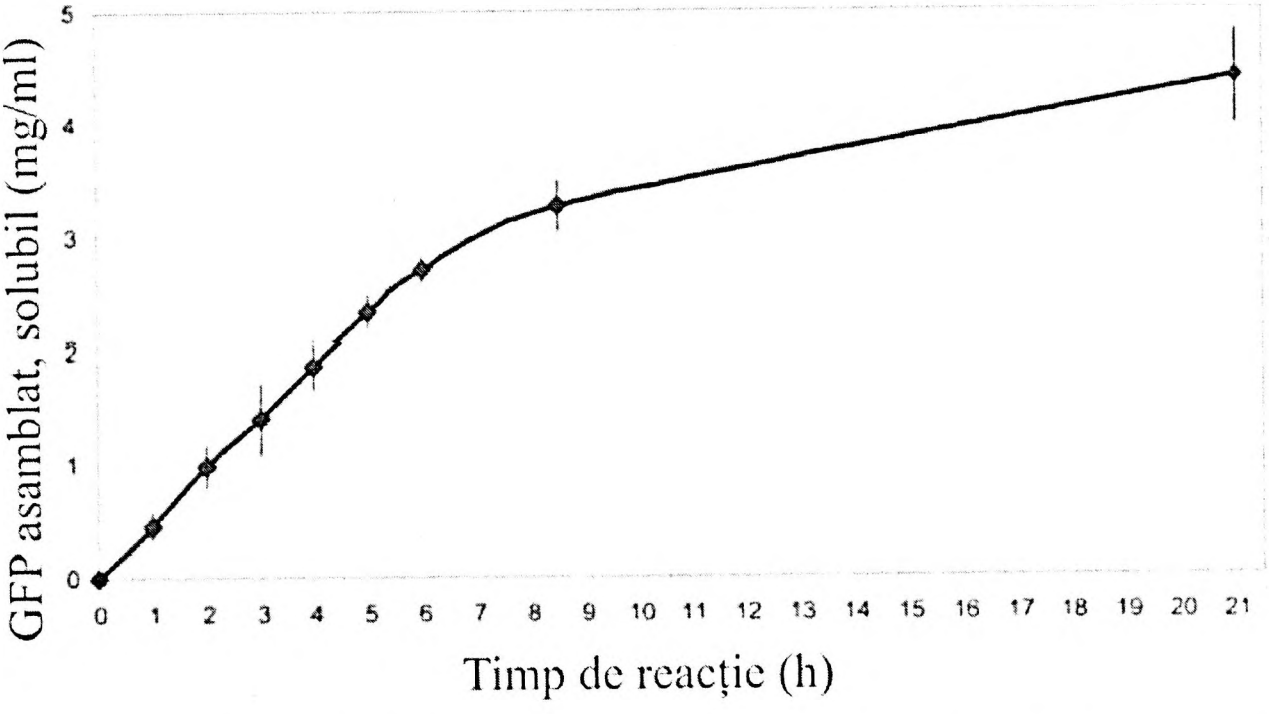


Fig. 10.3 Sinteza acelulară a GFT într-un sistem bacterian CECF folosind un MicroDialyzer® de 100 µl. Punctele kinetice arată media a trei reacţii iar barele de eroare indică deviaţia mediei. Reacţia a fost realizată la 30°C folosind o mixtură nutritivă de 17 straturi comparativ cu volumul mixturii de reacţie şi sub următoarele condiţii de reacţie: 0,05% NaN_3, 2% fosfoenolglicol, 196 µM acid folinic, 2mM 1.4-ditiotreitol, 1,2 mM ATP, 0.8 mM din următoarele: CTP, GTP şi UTP, 20mM acetil fosfat, 1mM din fiecare aminoacid cu excepţia argininei, acidului aspartic, cisteinei , acidului glutamic, metioninei şi triptofanului din care au fost utilizaţi 2mM, 100mM HEPES-KOH (pH 8.0), 2,8mM EDTA, 1X inhibitor complet de protează (Roche), 280mM K^+, 13mM Mg^{2+}, 40µl/ml piruvat kinaza, 500µg/ml tARN (*E.coli*), 3U/µl T7-ARN polimeraza, 0.3 U/µl RNasin, 35% extract S30 (*E.coli*) şi 15µg/ml plasmidă.

De asemenea cu ajutorul unor reactoare s-a combinat atât tehnica de schimb cât şi cea de flux. În una dintre aceste versiuni, mixtura de reacţie este încapsulată în minivezicule polizaharide care se pot dispune în coloană, şi în care soluţia nutritivă este vehiculată prin coloana respectivă (fig. 10.2.D). În acest caz schimbul produssubstrat de-a lungul pereţilor veziculelor are loc în cursul fluxului. Versiuni mai sofisticate ale reactorului CECF sunt azi în curs de dezvoltare pentru obţinerea unor prototipuri care să corespundă cerinţelor oamenilor de ştiinţă şi biotehnicienilor. Primul reactor CECF comercial a fost lansat de curând pe piaţă de către Roche Diagnostics. Sistemul CECF Roche oferă o producţie mare de proteine de peste 2mg/ml.

Alte sisteme comerciale au la bază sistemul de creştere discontinuu, în care nutrientul este adăugat în totalitate de la început, dar şi ele au cunoscut recente şi reale îmbunătăţiri. Spre exemplu a fost propus un sistem inovator de regenerare a NTP, care să evite acumularea de fosfaţi anorganici prin adăugarea de piruvat oxidază, care generează AcP din piruvat şi fosfaţii anorganici direct în mixtura de reacţie. Ulterior s-a demonstrat că adiţia de oxalat, un inhibitor potent al PEP sintetazei, va creşte substanţial producţia de CAT sintetază prin îmbogăţirea rezervei de ATP cu circa 47% [Kim, Swartz, 2000]. Mai mult Kim şi Swartz (2000) au reuşit prin cultivări în sistem semidiscontinuu (fed-batch), cu adăugarea treptată de nutrient limitator al creşterii, în care adăugarea coordonată de PEP, magneziu şi aminoacizii: arginina, cisteina şi triptofan, permite obţinerea unei concentraţii finale de CAT sintetizat acelular de aproximativ patru ori mai mare decât într-un sistem discontinuu (batch). Drept rezultat al acestor îmbunătăţiri a devenit posibilă sintetizarea a circa 350μg/ml CAT sau 450μl/ml de proteină recombinantă umană trombopoietina printr-o reacţie de tip discontinuu.

10.3.3 Aplicaţii specifice ale tehnicii de marcare acelulară

Tehnicile convenţionale de marcare *in vivo* sunt adesea urmate de producţii scăzute de proteine datorate creşterii întârziate pe un mediu minimal iar, în cazul marcării izotopice selective, datorită efectului de amestecare ce reduce drastic eficacitatea şi selectivitatea marcării. Prin urmare un avantaj major al tehnicilor de marcare acelulare îl reprezintă absenţa oricărul efect de amestecare sau conversie metabolică a aminoacizilor marcaţi [Betton şi colab., 2002]. Încorporarea selectivă a aminoacizilor în proteine sintetizate acelular destinate cercetării RMN a fost deja demonstrată în repetate rânduri [Guignard şi colab., 2002]. Similar în tehnica reversă a marcării izotopice, majoritatea aminoacizilor sunt simplu sau dublu (N^{15}, C^{13}) marcaţi, excepţie făcând câteve reziduuri.

Figura 10.4 (A) ilustrează spectografia heteronucleară 2-D H^1-N^{15}, cu spectru RMN, utilizând un singur spectru de corelare (HSQC) pentru evaluarea domeniului C-terminal de legare a ADN al factorului reglator transcripţional RcsB (cRcsB), generat acelular şi marcat izotopic reversibil, care a fost uniform

marcat cu N^{15} cu excepţia resturilor de asparagină (N) şi glutamină (Q). cRcsB marcat uniform cu N15 şi exprimat *in vivo* este reprezentat în fig. 10.4(B). Spectrul 2-D H1-N15 HSQC al proteinei marcate cRcsB sintetizate *in vitro* este în concordanţă cu cel al proteinei sintetizate *in vivo*, uniform marcate (excepţie făcând vârfurile de asparagină şi glutamină care lipsesc în sistemul *in vitro*).

Exprimarea în sistem acelular este extrem de potrivită pentru generarea de mostre de proteine marcate doar la nivelul unor resturi distincte de aminoacizi. Marcarea unor situsuri specifice este extrem de utilă pentru simplificarea procedurilor de observare şi de distribuire a rezonanţei aminoacizilor a unor resturi prestabilite de aminoacizi care prezintă un interes particular, şi îşi poate de asemenea dovedi utilitatea în analiza structurilor locale ale macroproteinelor şi a interacţiunilor proteină-proteină. Încorporarea unui reziduu specific, marcat C13 la nivelul unui codon stop prin translatarea secvenţei modificate într-un sistem *in vitro* suplimentat cu supresorul încărcat ARNt a permis detectarea reziduurilor marcate prin spectroscopie RMN în urma denaturării şi reasamblării proteice. Cantităţi de ordinul miligramelor de proteină marcată izotop specific la nivelul unui situs pot fi obţinute într-un sistem acelular implicând strategia de supresie a unei secvenţe specifice de codon stop, secvenţa UAG. Supresorul *E.coli* al secvenţei codonice, ARNt, poate fi preparat prin transcripţie *in vitro* cu T7 ARN polimeraza şi ulterior prin adăugare de aminoacil, prin introducerea amino ARS-azei *E.coli*, potrivit purificată, şi a aminoacidului marcat specific. Codonul specific pentru restul de aminoacid selectat din proteină a fost anterior modificat într-un codon UAG (codon stop) prin tehnici standard.

Marcarea segmentară *in vivo* este limitată de cerinţele specifice cum ar fi, organizarea proteinei ţintă în domenii, prezenţa reziduurilor specifice şi problemelor de asamblare. Pavlov şi colab., (1997) au pus la punct o tehnică acelulară bazată pe translaţia *in vitro* a mARNs matrix-cuplate, care în principal este lipsită de orice cerinţă conformaţională sau la nivelul secvenţelor. Dimensiunea regiunii marcate este controlată prin folosirea codonilor fără a exista o limită superioară intrinsecă a dimensiunii proteinelor care pot fi marcate izotopic la nivelul regiunii selectate. Această metodă are la bază folosirea mixturilor de translaţie lipsite fie de un aminoacid şi/sau de ARNt propriu şi/sau de amino ARS-aza în trei etape. Folosirea de copii ARN cuplate columnar face ca mixtura de reacţie să fie uşor schimbabilă. Iniţial regiunea nemarcată N-terminală, cu ajutorul unei mixturi de reacţie nemarcate, este sintetizată până la primul codon fără existenţa unui amino acil-ARNt potrivit în extract. La acest nivel datorită pauzei ribozomale mixtura de translaţie poate fi înlocuită cu o alta conţinând aminoacizi marcaţi izotopic, aceasta din urmă deficitară în alt aminoacid, ARNt sau amino ARS-ază.

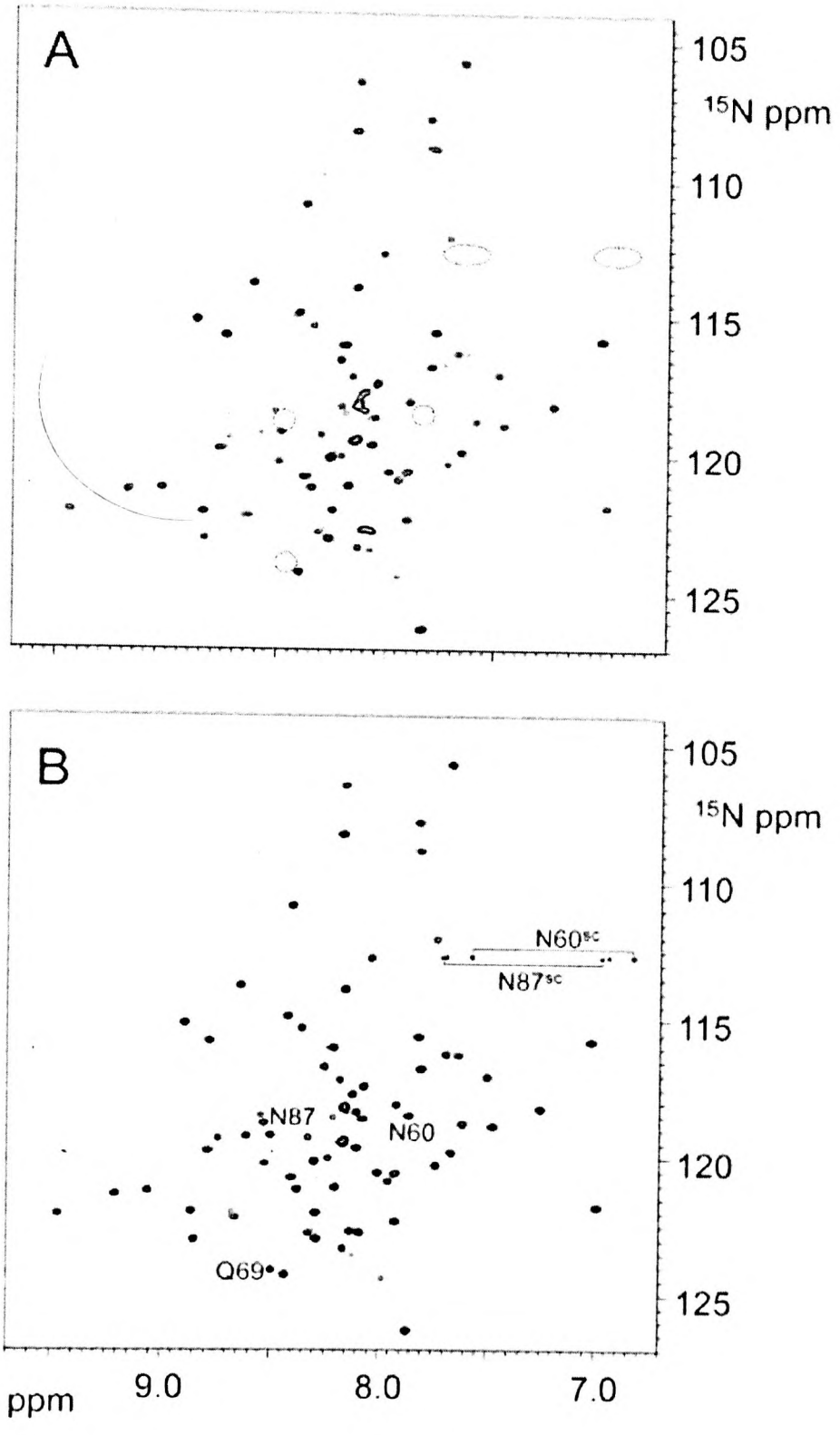


Fig. 10.4 Comparaţie între spectrul 2-D HSQC H^1-N^{15} al generărilor *in vitro* şi *in vivo* ale domeniului C-terminal purificat al factorului bacterian reglator transcriptţional RcsB (cRcsB) folosind un spectometru Bruker DRX-800 MHz RMN cu o crioprobă. (A) Marcarea acelulară cu izotop N^{15} a cRcsB sintetizat într-un sistem CECF optimizat, utilizând un DispoDialyzer®. Toţi aminoacizii cu excepţia asparaginei (N) şi glutaminei (Q) au fost marcaţi cu N^{15}. Cum era de aşteptat, resturile de N şi Q (cercuri) sunt absente în spectrul 2-D HSQC H^1-N^{15}.(B) cRcsB exprimat *in vivo* uniform marcat izotopic cu N^{15}. Acest spectru este în bună dependenţă cu cRcsB marcat izotopic generat acelular, iar resturile de N şi Q pot fi uşor identificate. (după Dingermann şi colab., 2004).

Un avantaj, destul de promiţător al marcării izotopice acelulare îl reprezintă posibilitatea efectuării măsurătorilor RMN *in situ* aşa cum ne descriu Guignard şi colab.,(2002). Aceştia au prezentat analize RMN ale proteinelor sintetizate *in vitro* fără a folosi purificări cromatografice şi cu o manevrare minimă a probelor utilizând un reactor CECF optimizat la care s-a adăugat sensibilitatea unei crioprobe. Aşa cum era de aşteptat, ei nu au observat nici o urmă de trecere pentru nici un aminoacid marcat N^{15} şi doar proteina ţintă a fost îmbogăţită cu resturile izotop marcate. Ei sugerează o nouă posibilitate de analiză proteică rapidă şi economică aplicabilă pe scară largă în proteomică, în care proteinele selectiv marcate pot fi expimate în 0,5 ml de mediu de reacţie, utilizând cantităţi reduse de aminoacizi marcaţi şi pretabilă analizei RMN. Toate etapele de la exprimare până la efectuarea spectrului RMN complet au fost finalizate în mai puţin de 24 de ore. Datorită avantajelor excepţionale ale sintezei proteice acelulare, marcarea izotopică poate fi obţinută şi pentru proteine care sunt în mod normal dificil de exprimat. Utilizând tehnici de marcare acelulare poate deveni posibilă sintetizarea unor proteine marcate izotopic care sunt toxice, tehnici ce necesită cofactori sau chaperone pentru adoptarea unei conformaţii active, sau chiar a proteinelor membranare. Marcarea subunităţilor de oligomeri, cercetările mai amănunţite asupra formării punţilor disulfidice sau oxidarea proteică sunt tehnici care probabil vor deveni posibile în viitorul apropiat.

CAPITOLUL 11
UTILIZAREA FRAGMENTELOR DE ANTICORPI CA MEDIATORI AI CRISTALIZĂRII PROTEINELOR MEMBRANARE ÎN VEDEREA DESCOPERII DE NOI MEDICAMENTE

11.1. Introducere

O dată cu decodarea genomului uman şi după ce au devenit disponibile din ce în ce mai multe genomuri ale organismelor patogene, cum ar fi Helicobacter pylori, Mycobacterium tuberculosis şi Plasmodium falciparum, au crescut speranţele legate de stimularea descoperirii de noi medicamente. Deoarece majoritatea genelor acţionează la nivelul proteinelor, acum se fac eforturi uriaşe în proiecte de genomică structurală pentru accelerarea determinărilor experimentale ale structurii proteinelor prin intermediul cristalografiei cu raze-X şi rezonanţei magnetice nucleare. În descoperirea medicamentelor sunt utilizate structuri intens disociate: (1) prin modelarea raţională a medicamentelor; (2) prin analiza complexelor structurale ţintă – ligand pentru validarea variantelor reuşite sau pentru îmbunătăţirea raţională a liganzilor care au fost obţinuţi prin screening-ul sistematic al băncilor de compuşi rezultaţi prin procedee chimice combinatoriale; sau (3) prin screening-ul liganzilor *in-silico* ce permite reducerea costurilor experimentelor şi accelerează descoperirile. În final, dar nu în ultimul rând, structurile intens disociate sunt sursa unor informaţii esenţiale pentru înţelegerea mecanismelor moleculare ale proteinelor ce acţionează în celule într-o mare varietate de structuri specifice care constituie baza funcţiilor lor foarte diverse.

Cea mai utilizată metodă pentru determinarea structurii atomice a proteinelor cu masa moleculară mai mare de 30kDa (inclusiv proteine membranare) este cristalografia cu raze-X, pentru care sunt necesare cristale bine coordonate tridimensional (3-D) provenite din soluţii proteice.

În ciuda interesului foarte mare pentru structura proteinelor membranare (ţinte moleculare pentru majoritatea medicamentelor), după 1985 când a fost prezentată prima structură a unei proteine membranare a centrului reactiv de fotosinteză la o bacterie s-au determinat până acum structurile integrale pentru mai puţin de 50 de proteine membranare.

Moleculele detergenţilor sunt amfofile, fiind alcătuite dintr-o extremitate (un capăt) polarizată sau încărcată electric şi o coadă hidrofobă. La concentraţii mici, detergenţii sunt prezenţi în soluţii apoase sub formă de monomeri şi formează un monostrat la interfaţa lichid – aer. Peste o anumită

concentraţie a detergentului, denumită concentraţie micelară critică (CMC), se formează micelii prin inter-asocieri. În alcătuirea acestor agregate sferice, cozile hidrofobe ale moleculelor de detergenţi sunt orientate către interiorul miceliilor iar grupările de la extremitatea hidrofilă se orientează către exterior. Proteinele membranare sunt solubile în soluţii micelare de detergenţi şi formează complexe proteină – detergent. Un miceliu detergent acoperă suprafaţa hidrofobă a proteinei membranare ca un brâu, în acest caz, grupările de la extremităţile polarizate orientându-se către faza apoasă (fig. 11.1) .

Pornind de la complexele detergent – proteină, proteinele membranare pot fi reconstituite într-un bistrat fosfolipidic prin îndepărtarea detergentului şi adăugarea concomitentă a fosfolipidelor prin dializă sau prin adsorbţie în fază solidă. În anumite condiţii determinate empiric proteinele respective formează structuri bine ordonate, bidimensionale (2-D), aşa numitele cristale 2-D care pot fi utilizate pentru determinarea structurii prin microscopie electronică [Dingermann şi colab.,2004]. Astfel, au fost obţinute structurile câtorva proteine membranare la rezoluţie medie (în jur de 5- 10A). Determinări structurale la rezoluţii apropiate de cele atomice prin microscopie electronică sunt posibile dar sunt anevoioase. Încercările experimentale de cristalizare 2-D necesită cantităţi mai mici de proteine iar obţinerea cristalelor prin această metodă ar putea fi mai rapidă. Totuşi, atunci când pot fi obţinute cristale 3-D de bună calitate, determinarea rapidă a structurii la rezoluţie mare prin cristalografie cu raze X este mult mai eficientă. Caracterul amfifil al suprafeţei proteinelor membranare permite formarea cristalelor 3-D în două moduri (vezi fig. 11.1).

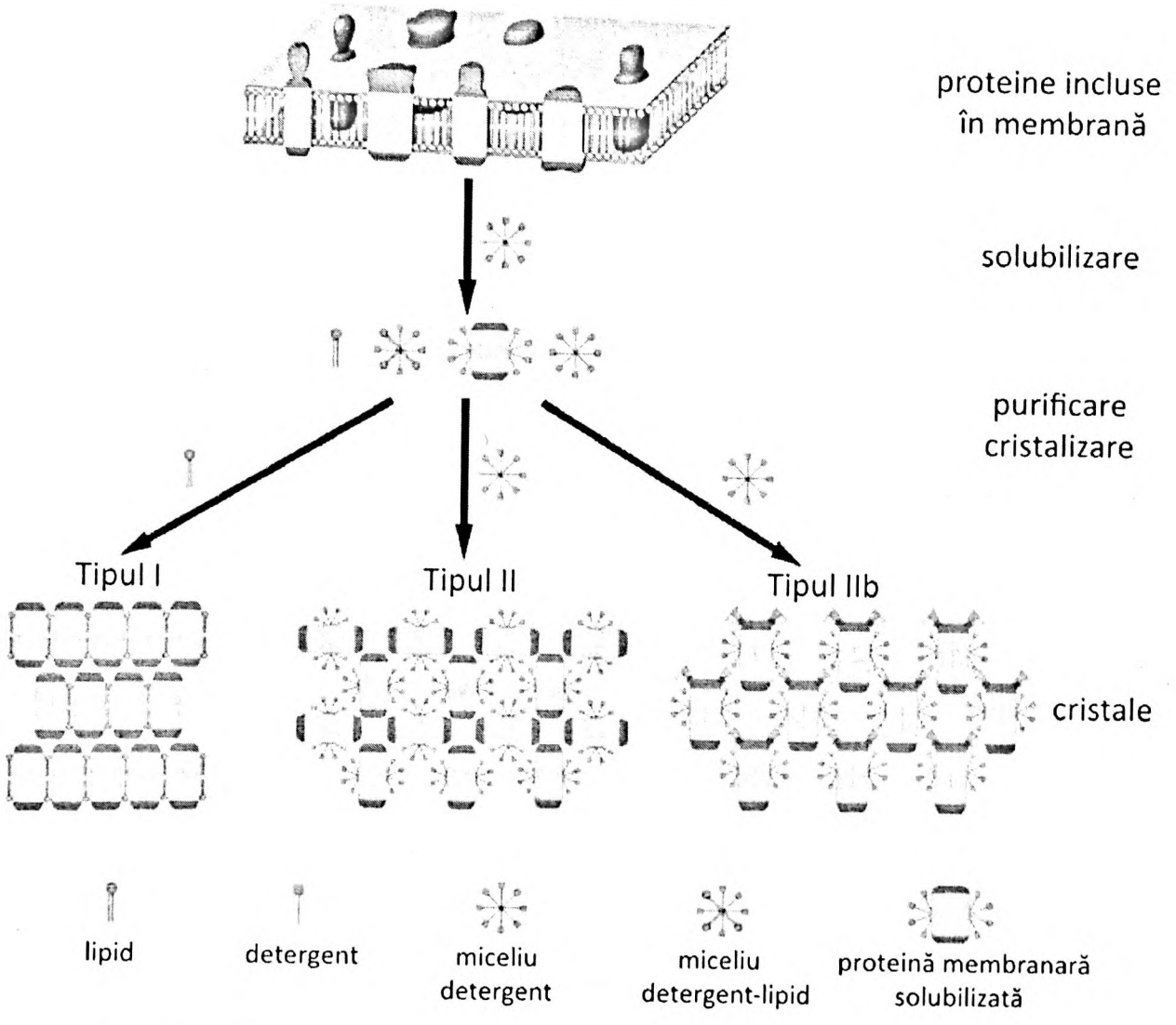


Fig. 11.1. Tipurile elementare de cristale 3-D ale proteinelor membranare. Cristalele tip I sunt constituite din straturi ordonate de cristale 2-D care sunt prezente în bistrat. Suprafeţele hidrofobe ale proteinelor membranare sunt acoperite de un miceliu în conformaţie solubilizată prin detergent. Aceste complexe detergent-proteină membranară formează aşa-numitele cristale 3-D tip II. Contactele de legătură stabile din cristale se formează între suprafeţele hidrofile ale proteinei. Într-o formă modificată a tipului II (tip IIb), fragmente de anticorp legate strâns şi specific adaugă un domeniu hidrofil complexului. Aceste expansiuni ale suprafeţei conferă noi situsuri pentru contacte de legătură şi spaţiu pentru miceliile detergent.

Cristalele de tip I sunt în principiu straturi suprapuse ordonat de cristale 2-D ce conţin moleculele proteice ordonate între aceste planuri. Cristalele de tip II se pot forma prin integrarea proteinelor membranare în micelii de detergenţi într-un mod asemănător proteinelor solubile. În acest din urmă caz asamblarea cristalelor se face prin intermediul suprafeţelor polare ale acelor domenii ale proteinelor care proemină din miceliul detergent. În acest caz condiţiile de cristalizare sunt foarte similare acelora pentru proteinele solubile. Este posibilă şi formarea cristalelor mixte tip I şi II, deşi cele mai multe cristale ale proteinelor membranare aparţin tipului II.

Evident, miceliile de detergent necesită spaţiu în matricea cristalelor. Deşi forţele de atracţie dintre micelii permit stabilizarea structurii cristaline, acestea nu pot contribui la constituirea contactelor de legătură rigide din cadrul structurii cristaline. Astfel, sunt dificil de cristalizat în mod special proteine cu domenii hidrofile mici, cum ar fi multe proteine transportoare sau proteine canal care sunt alcătuite în principal din porţiuni transmembranare helicoidale şi bucle foarte scurte expuse mediului solvent. O metodă menită să crească probabilitatea de a obţine cristale de tip II bine ordonate este creşterea suprafeţei polare a proteinei membranare prin ataşarea de domenii polare cu fragmente de anticorpi cu legare specifică. Această metodă dezvoltată de Michel şi colab.,(2001) a fost pentru prima dată aplicată cu succes pentru cristalizarea şi determinarea structurii Citocrom C oxidazei (COX) din Paracoccus denitrificans legat cu un Fv (fragment variabil) de anticorp.

Pe lângă cerinţele specifice pe care trebuie să le îndeplinească un detergent pentru cristalizarea 3D a proteinelor membranare, a doua problemă în cadrul analizei structurale este procurarea unor cantităţi suficiente de proteine. Cristalizare 3D presupune consumul a cel puţin 10 mg de proteină pură per etapă de examinare. Aproape toate structurile proteinelor de membrană care au fost determinate aparţin proteinelor ce se găsesc în cantităţi mari în mediul lor natural, cum ar fi proteinele lanţului respirator sau de membrane fotosintetice. Totuşi, majoritatea proteinelor membranare cum ar fi receptorii şi proteinele transportoare sunt prezente intracelular în concentraţii mici. Prin folosirea sistemelor de producţie bazate pe recombinare, inserţia proteinei într-o membrană limitează eficienţa producţiei, cu excepţia cazurilor în care decidem producerea prin intermediul formării corpului de incluzie şi repliere. Ultima metodă a fost aplicată cu mult succes pentru proteine membranare β – barrel foarte stabile, din membranele bacteriene externe. S-au realizat progrese însemnate în aplicarea sistemelor de supraexpresie pentru proteine membranare cu origine bacteriană, ca de exemplu pentru determinarea structurii canalului ionic mecano-senzitiv din M. Tuberculosys produs în Escherichia Coli. Este foarte importantă dezvoltarea în continuare a sistemelor de supraexpresie la nivel înalt pentru producerea de proteine membranare recombinate din eucariote pentru explorarea cu succes a structurii acestora. În plus, tehnicile de recombinare au avantajul că proteinele pot fi proiectate să fie sintetizate cu terminaţii de afinitate ce permit o purificare facilă. De asemenea, secvenţa poate să fie modificată pentru a conferi o sursă proteică omogenă ca de exemplu prin îndepărtarea situsurilor de glicozilare. Mai mult, cu secvenţele genomice disponibile în număr din ce în ce mai mare, sistemul de recombinare permite o nouă abordare: evaluarea expresiei şi purificarea proteinelor omoloage din câteva organisme prin testarea proprietăţilor de cristalizare a acestora. Pentru determinarea cu succes a structurii canalului mecanosenzitiv MscL au fost supuse unor experimente de cristalizare omologi proveniţi de la 9 specii procariote. Proteinele omoloage provenite de la diferite specii au nu numai

proprietăţi esenţiale diferite cum ar fi stabilitatea proteinei sau capacitatea de producţie, dar pot prezenta şi mici variaţii ale proprietăţilor de suprafaţă ce pot fi responsabile pentru reuşita cristalizării, deoarece contactele de legătură în cristal sunt mediate prin suprafaţa proteinei.

În acest capitol, ne vom concentra asupra descrierii metodei de cristalizare a proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorpi, această abordare promiţătoare fiind deja folosită cu succes pentru determinarea structurii a 5 complexe proteină membranară – anticorp.

11.2. Cristalizarea proteinelor membranare mediată prin fragmente de anticorp

11.2.1. Considerații generale

După aplicarea cu succes a cristalizării mediate prin fragmente de anticorp pentru COX (cicloxigenaza)bacteriană, metoda a fost utilizată pentru determinarea structurilor câtorva proteine membranare, ce vor fi prezentate mai jos. COX din *P. denitrificans* a fost cristalizat sub formă de complex cu un fragment Fv de anticorp recombinat. A fost determinată structura acestui complex la o rezoluţie de 2,8Å, compusă din toate cele patru subunităţi ale COX şi cele două polipeptide ale fragmentului Fv. Fragmentele Fv sunt implicate în toate contactele de legătură din cristal. Totuşi, lipsa interacţiunilor directe proteină – proteină pe axa-*c* determină anizotropie în difracţie şi dificultăţi de reproducere a cristalelor. S-au obţinut cristale mai bine ordonate printr-o sinteză a COX ce conţine numai cele două subunităţi catalitice esenţiale I şi II. Cristalele produc difracţia razelor X la o rezoluţie mai mică de 2,5Å. Noul mod de asamblare al cristalului implică interacţiunea directă dintre suprafeţele citoplasmatică şi periplasmatică cu moleculele COX adiacente. Toate celelalte contacte sunt mediate exclusiv prin intermediul fragmentului Fv. În toate aceste structuri, complexul COX-Fragment Fv a fost purificat prin cromatografie indirectă de imunoafinitate (a se vedea mai jos). Complexul este format prin combinarea membranelor solubilizate cu periplasmă ce conţine fragment Fv şi apoi este purificat într-o singură etapă prin cromatografie de afinitate cu streptavidină, folosindu-se secvenţa terminal strep (strep-tag) fuzionată la fragmentul Fv.

A doua proteină membranară cristalizată prin această tehnică este complexul citocrom bc_1 (QCR) din drojdie, o componentă fundamentală a lanţului respirator mitocondrial. Ca şi în cazul COX bacteriene, complexul a fost cristalizat cu un fragment Fv recombinat. Acesta din urmă se leagă la domeniul extrinsec al subunităţii catalitice Rip1p, aşa numita proteină Rieske.

Anticorpul monoclonal parental 18E11 a fost obţinut prin tehnici standard de hibridom prin imunizarea şoarecelui cu QCR din drojdie solubilizat cu detergent şi purificat. Anticorpul nu recunoaşte proteina în Western Immunoblot după separarea complexului prin electroforeză în gel poliacril

amidă-duodecil sulfat sodic (SDSPAGE), dar se leagă de un epitop discontinuu nativ. Deşi acest complex format din mai multe subunităţi (230kDa per monomer) are un domeniu hidrofil mare ce pătrunde în spaţiul matriceal (aproximativ 86kDa) şi o porţiune hidrofilă destul de mare prezentă în spaţiul intermembranar (aproximativ 46kDa), cristale de QCR din drojdie adecvate pentru analiza în raze-X au fost obţinute doar în complex cu fragment Fv. Structura complexului a fost determinată la rezoluţie de 2,3Å. Fragmentele Fv legate au determinat o asamblare spaţială rarefiată a cristalului (grup spaţial C2) cu un conţinut ridicat de solvent de 74%, făcând loc miceliilor – detergent de mari dimensiuni ale detergentului undecilmaltopiranozidă (fig. 11.2). Principalele contacte de legătură în cristal sunt mediate prin fragmente de anticorp. Acelaşi mod de lucru a fost utilizat şi pentru cristalizarea QCR din drojdie cu legătura substratului său citocromul *c*.

Condiţiile de cristalizare diferite au determinat alterarea reţelei cristaline (P21). Din nou, fragmentele Fv au avut contribuţia majoră în interacţiunile dintre moleculele adiacente. Acestea nu au stânjenit nici legarea citocromului *c* şi nici nu au interferat cu activitatea QCR (Dingermann şi colab., 2004).

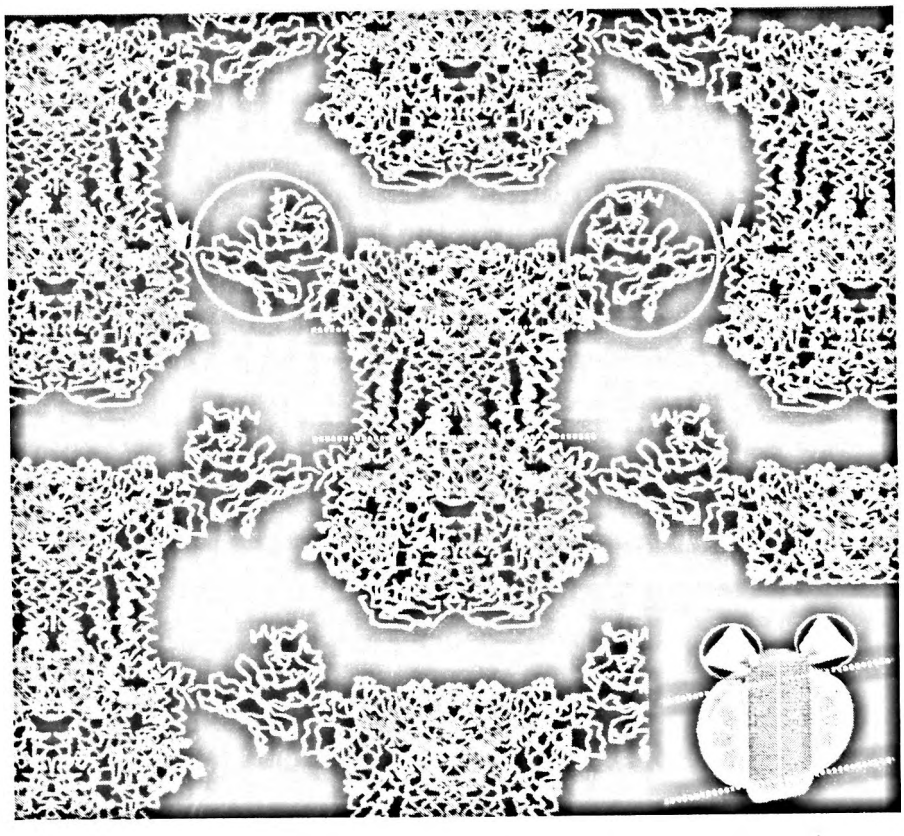


Fig. 11.2 Fragmentele de anticorp sunt esenţiale pentru cristalizarea citocromului *bc*1 din drojdie, contactele de legătură ale cristalului (săgeţile albe) din cocomplexul Fv18E11 – complex citocrom *bc*1 din drojdie fiind mediate de fragmentul Fv (încercuit). Fragmentul se leagă de domeniul extrinsec al subunităţii Rip1p şi oferă spaţii ample pentru miceliile detergent în care este împachetată porţiunea transmembranară a complexului (linii punctate), prezentată schematic în detaliu.

Cristalizarea şi determinarea structurii canalelor de potasiu KcsA a fost realizată prin legarea unui fragment *Fab (fragment antibody binding).* Anticorpul monoclonal utilizat a fost obţinut prin tehnologia hibridomului iar clonele au fost selectate pentru recunoaşterea formelor native homotetramerice, nu şi a celor monomerice ale canalului. Cristalizarea s-a efectuat cu fragmente Fab proteolitice obţinute prin proteoliză cu papaină şi purificate prin cromatografie prin schimb anionic. Cristalele – complex canal – fragment Fab au permis determinarea elegantă a structurii. Fazele au fost determinate prin înlocuirea moleculară folosind o structură cunoscută a altui fragment Fab, plierea imunoglobulinei păstrându-se foarte bine. În plus, fragmentul Fab de aproximativ 54 kDa reprezintă cea mai mare componentă a complexului, comparativ cu subunitatea canal de aproximativ 11kDa. Cristalele complexului au prezentat o difracţie substanţial îmbunătăţită (sub 2Å) faţă de precedentele forme ale cristalelor canalelor K^+ KcsA (rezoluţie 3,2Å). Fragmentul Fab formează legături la nivelul suprafeţei extracelulare a subunităţii canalului. Toate contactele de legătură din cristal se formează între fragmentele Fab, lăsând un spaţiu central relativ mare pentru molecula canalului cu miceliul – detergent, decilmaltozida. Dimensiunea unui fragment Fab pare a fi foarte potrivită pentru cristalizarea canalelor şi altor proteine membranare ale căror domenii ce ies în afara bistratului lipidic nu au o dimensiune prea mare.

11.2.2. Generarea anticorpilor adecvați pentru co-cristalizare

Până în prezent, fragmentele de anticorpi folosite cu succes în co-cristalizarea proteinelor membranare erau derivate din anticorpii monoclonali obţinuţi prin clasica tehnologie a hibridomului. Pentru a se realiza stabilitatea complexului necesar pentru cristalizare, anticorpii parentali precum şi derivaţii acestora trebuie: (1) să lege antigenul în conformaţia nativă a acestuia, (2) să aibă o afinitate de legare mare pentru a permite formarea complexelor stoichiomerice stabile şi (3) să formeze un complex rigid cu antigenul lor nativ. Sunt de preferat anticorpi cu afinitate de legare pentru un epitop discontinuu şi nu unul linear. Adesea, într-un răspuns imun sunt recunoscute ca epitopi capetele N- şi C- terminale ale polipeptidelor precum şi buclele expuse. Totuşi, deseori aceste peptide sunt flexibile, iar legarea unei molecule de anticorp va introduce foarte probabil un domeniu mobil ce va fi nefavorabil cristalizării. Specificitatea pentru un epitop discontinuu poate fi uşor verificată prin Western imunoblot după separarea proteinei denaturate prin SDS-PAGE, în care anticorpul nu ar trebui să se lege de polipeptidul linear.

11.2.2.1. Imunizarea

Una din primele etape importante pentru obţinerea cu succes a unor anumite clone de hibridom este imunizarea animalelor cu antigen şi obţinerea unui titru suficient de anticorp. Proteinele membranare solubilizate prin detergent şi purificate au fost utilizate cu succes ca şi antigene pentru obţinerea liganzilor de înaltă afinitate pentru membranare native, ca de exemplu pentru obţinerea anticorpului monoclonal 18E11 specific QCR din drojdie sau diverşi anticorpi monoclonali specifici pentru proteina schimbătoare de ioni Na^+/H^+ (sistem antiport) NhaA.

În general, protocoalele de imunizare pe termen lung sunt folositoare pentru obţinerea multor liganzi de înaltă afinitate. Într-un protocol standard aplicat pentru obţinerea anticorpilor îndreptaţi împotriva QCR din drojdie şi NhaA, şoareci BALB/c femele în vârstă de 10 săptămâni au fost imunizaţi prin injecţii intraperitoneale cu proteină înalt purificată, solubilizată în detergent [100μg proteină în 50% (v/v) adjuvant (ABM2; Pan Biotech, Aidenbach, Germany) într-un volum total de 250μl]. Imunizarea iniţială a fost urmată de 4 injecţii cu suspensie proteică la interval de 4 săptămâni [50μg proteină în 50% (v/v) adjuvant (ABM1; Pan Biotech) într-un volum total de 250μl]. Pentru administrarea finală, ultima injecţie a fost repetată trei zile consecutiv iar în ziua următoare şoareci au fost sacrificaţi pentru recoltarea splinei. Sa recoltat plasmă sanguină de la şoareci înaintea imunizării şi la 10 zile după fiecare injecţie. După a treia imunizare, s-au obţinut semnale clar pozitive până la o diluţie a serului de 10^5 într-un test standard ELISA, folosind NhaA purificat drept antigen.

Evident, un asemenea regim de imunizare la mamifere mici pentru proteine membranare înalt omologe (derivate umane, de murine, de şobolan, de maimuţe) este mai puţin probabil să aibă ca rezultat producerea anticorpilor datorită mecanismelor de self-toleranţă. Totuşi, există câteva modalităţi de stimulare a răspunsului imun cum ar fi imunizarea genetică sau simpla utilizare a adjuvanţilor pe bază de nanoparticule lipidice îmbunătăţite.

11.2.2.2. Selecţia anticorpilor

Anticorpii corespunzători co-cristalizării proteinelor membranare trebuie să recunoască antigenul respectiv ca pe un complex. Totuşi, se impun anumite cerinţe pentru selecţia anticorpilor monoclonali de conformaţie specifică. Tipul şi concentraţia detergentului este foarte importantă pentru menţinerea proteinei în conformaţia sa nativă. Unii detergenţi pot preveni legarea proteinelor de suprafeţele de plastic şi polistiren folosite în mod curent ca suporturi pentru testul ELISA. În plus, adsorbţia pe faza solidă poate determina denaturarea parţială a proteinei. Când s-a realizat obţinerea anticorpilor monoclonali împotriva QCR din drojdie, s-au obţinut 35 de clone ce recunosc proteina denaturată în Western-blot şi a fost selectată numai o clonă ce recunoaşte specific proteina nativă. Pentru aceasta s-a aplicat un test ELISA

standard în care complexul solubilizat în detergent a fost ataşat matricei de polistiren. Pentru îmbunătăţirea randamentului liganzilor nativi pentru proteinele membranare a fost concepută o strategie uşoară şi sigură, aşa numita his-tag ELISA, pentru imobilizarea corespunzătoare şi prezentarea antigenului „nativ" reprezentat de proteinele membranare recombinate his-tagged (cu o secvenţă terminală ataşată polihistidinică), demnstrată pentru sistemul antiport NhaA. Proteina este imobilizată pe plăci ELISA acoperite cu Ni^{2+}-NTA în aceleaşi condiţii tampon ca şi pentru purificarea antiportului prin cromatografie de afinitate metalică. În aceste condiţii, în prezenţa detergentului duodecil-β-D-maltopiranozidă, proteina este pliată corespunzător şi complet funcţională şi se poate face acum trierea anticorpilor pe baza acesteia. Pornind de la peste 2000 de clone hibridom, s-au putut izola prin histag ELISA 6 anticorpi monoclonali tip IgG. Toţi aceşti anticorpi obţinuţi sunt sensibili conformaţional şi leagă antiportul solubilizat în detergent precum şi forma sa membranară. Doar unul din aceştia este pozitiv în Western-blot după separarea SDSPAGE a proteinei. Acest anticorp (1F6) se leagă la un epitop linear expus la suprafaţă localizat la nivelul capătului N-terminal al enzimei. Interesant, anticorpul monoclonal 1F6 leagă NhaA într-un mod dependent de pH ce reflectă dependenţa de pH a activării proteinei şi modificările conformaţionale asociate demonstrate prin digestia cu tripsină. Acest anticorp poate fi folosit pentru purificarea de imunoafinitate a transportorului din extracte membranare neprelucrate prin legarea NhaA de anticorpul monoclonal 1F6 imobilizat şi eluţia acestuia specifică printr-un schimb de pH. His-tag ELISA este o metodă importantă ce combină sensibilitatea, specificitatea şi raportul crescut semnal/zgomot al unui test de imunoadsorbţie cu chimia proteinelor recombinate. Poate fi adaptată uşor la toate proteinele recombinate purificate cu ajutorul unui his-tag. Din cunoştinţele noastre este primul exemplu de selecţie a anticorpilor împotriva epitopilor conformaţionali folosind o proteină membranară solubilizată prin detergent, respectiv cea mai comună formă de creştere a cristalelor 3-D tip II. Au fost raportate şi metode alternative de prezentare a proteinelor membranare în conformaţiile lor native, cum ar fi selecţia cu probe reconstituite prin lipide, fracţiuni membranare native îmbogăţite sau celule intacte.

Etapa cheie a selecţiei anticorpilor adecvaţi din fuziuni hibridom sau bănci de anticorpi recombinaţi este reprezentată de screening-ul ţintit. Cercetările adaptate specific permit selecţia anticorpilor specifici pentru conformaţia proteică definită. Anticorpii selectaţi corect pot ajuta la captarea unei proteine flexibile într-o conformaţie fixă. Co-cristalizarea cu fragmente de anticorpi a facilitat determinarea structurii domeniului flexibil gp120.

11.2.2.3 Fragmentele de anticorpi

Anticorpii nativi nu sunt corespunzători co-cristalizării. Aceştia sunt flexibili în regiunea de legătură dintre domeniile variabile şi cele constante, iar modul de legare bivalent este în cele mai multe cazuri indezirabil. Fragmentele de anticorpi monovalente pot fi obţinute prin clivajul proteolitic al întregului anticorp rezultând două fragmente Fab pentru fiecare moleculă de anticorp. Obţinerea unei cantităţi suficiente de material de start pentru anticorpul monoclonal este realizată fie prin producerea ascitei fie prin culturi celulare cu linii celulare de hibridom de murine. Apoi anticorpii monoclonali sunt purificaţi prin cromatografie de afinitate cu Proteina A. În etapa următoare, fragmentele Fab sunt obţinute în mod obişnuit prin proteoliza cu papainã care clivează specific în regiunea mobilă/balama. Fragmentele Fab pot fi purificate prin depleţia proteinei A a domeniului de clivaj constant al anticorpului, urmată de excluderea dimensională sau cromatografia schimbătoare de ioni. Fragmentele Fab sunt relativ uşor de obţinut prin proteoliză, dar trebuie acordată atenţie pentru producerea omogenă a fragmentelor, adecvate cristalizării. Părţi reziduale ale ligandului flexibil şi în unele cazuri glicozilarea pot împiedica cristalizarea. În ciuda acestor probleme, au fost cristalizate un număr mare din acele fragmente Fab singure sau în complexe cu haptena respectivă sau cu antigenul respectiv, inclusiv cu o proteină membranară (canalul potasic KcsA).

Pe viitor, o alternativă promiţătoare la obţinerea anticorpilor monoclonali de la şoareci va fi adaptarea tehnologiilor phage-display sau ribosome-display la selecţia *in vitro* a liganzilor pentru proteinele membranare. Până acum, sunt rare exemplele de selecţie reuşită a anticorpilor specifici pentru proteinele membranare prin intermediul phage-display a băncilor non-imune. Anticipăm faptul că alte strategii vor fi probabil mai adecvate pentru stabilirea screening-ului anticorpilor acestor ţinte prin phagedisplay, şi anume: (1) punerea în uz a unor bănci de anticorpi mult mai diverse (peste 10^{10} componente diferite), (2) utilizarea unui helper fagic ce permite prezentarea multivalentă a anticorpilor şi (3) screening-ul liganzilor după o singură etapă de biopanning urmată de maturarea de afinitate *in vitro*.

Clonarea fragmentelor de anticorpi. Cel mai mic domeniu de legare pentru antigen a unui anticorp, respectiv fragmentul Fv, este constituit din domeniul variabil al lanţului greu şi a celui uşor, VH, respectiv VL. Fragmentele Fv nu pot fi obţinute prin proteoliză, necesitând recombinarea pentru producerea lor. Pentru acest scop, genele ce codifică VH şi VL trebuie să fie clonate şi exprimate pornind de la linii celulare de hibridom. Aici este descrisă clonarea fragmentelor Fv prin reacţia de polimerizare în lanţ revers-transcriptaza (RT-PCR) (fig. 11.3). ARNm sau ARN total este izolat din linii celulare de hibridom de murine ce produc anticorpul de interes. În etapa următoare, sinteza ADNc poate fi efectuată simplu prin utilizarea oligo(dT) ca şi primer. Pentru a amplifica genele VH şi VL, sunt folosiţi primeri degeneraţi care se potrivesc capătului terminal 5' al cadrului 1 şi capătului 3' al cadrului 4,

corespunzător capetelor N-terminale ale lanţului greu şi uşor ale moleculei de anticorp, respectiv capetelor C-terminale ale domeniilor variabile. Secvenţa regiunilor cadru este foarte bine conservată, fiind elaborat un set de perechi de primeri pentru amplificarea specifică a genelor ce codifică lanţul V_λ, subclasele 1, 2, 3 şi 5 ale lanţului V_k, subclasele 4 şi 6 ale lanţului V_k, şi VH. Aceşti primeri conţin situsuri de restricţie unice, care permit inserţia produsului PCR în plasmida pASK68 care este utilizată pentru producerea fragmentului Fv în periplasma *E. coli* (a se vedea mai jos).

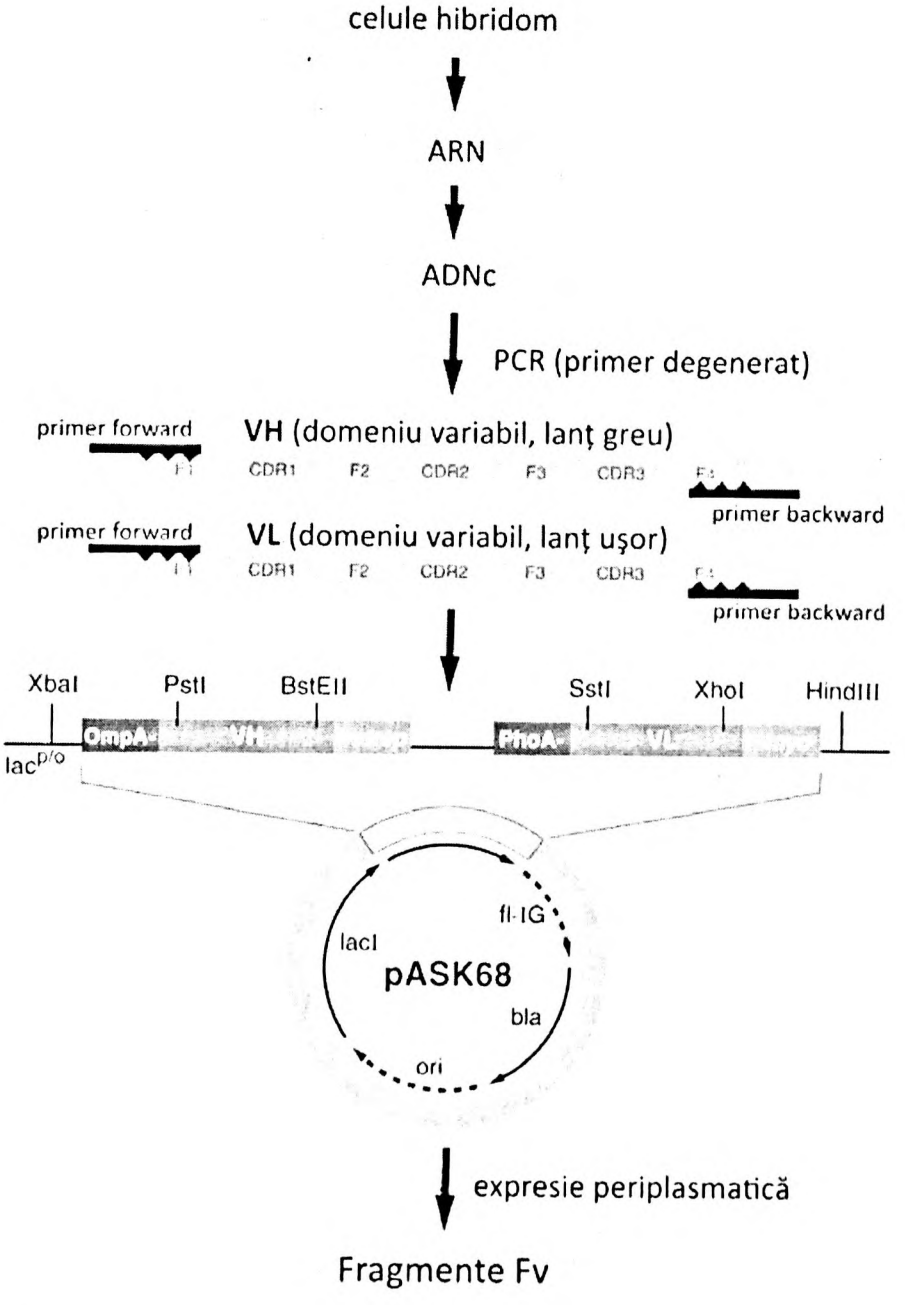


Fig. 11.3. Reprezentare schematică a strategiei pentru clonarea şi expresia fragmentelor Fv din linii celulare hibridom monoclonale prin RT-PCR. Genele care codifică pentru domeniile variabile ale lanţurilor grele şi uşoare (V_H şi respectiv V_L) sunt inserate în plasmida bicistronică pASK68 pentru expresie periplasmatică în *E. coli*. Secvenţele semnal OmpA şi PhoA sunt utilizate pentru ţintirea polipeptidelor la periplasmă.

Pentru purificare este ataşat un strep-tag la lanţul greu; fuziunea myc-tag permite detecţia lanţului uşor cu anticorpul monoclonal 9E10.

Digestia H RN-azei antisens-direcţionată poate fi utilizată pentru inhibarea amplificării produşilor de transcripţie ARNm nefuncţionali introduşi în liniile celulare de hibridom în cursul fuziunii cu linia celulară de mielom nonsecretoare.

Această abordare rapidă şi robustă a fost folosită pentru clonarea câtorva fragmente de anticorpi, inclusiv fragmentele Fv ale anticorpului monoclonal 7E2 specific pentru COX a *P. denitrificans*, anticorpul monoclonal 18E11 specific pentru QCR din drojdie şi anticorpii monoclonali 2C5 şi 5H4 specifici pentru antiporter-ul (proteina transportoare împotriva gradientului) NhaA din *E. coli*. Totuşi, în unele cazuri prin această metodă nu s-a reuşit amplificarea genelor dorite. Din acest motiv, a fost conceput un nou set de primeri care ia în considerare secvenţele diferite ale subgrupelor, aşa cum sunt listate în banca de date Kabat (fig. 11.4).

Pentru fiecare subgrup de anticorpi a fost realizat un anumit forward primer. Poziţia backward-ului primer a fost modificată în aval către regiunea constantă cea mai bine conservată. Mai mult, situsurile de restricţie au fost omise pentru o mai bună acurateţe. Produşii PCR au fost apoi clonaţi fie prin legarea TA, fie la capetele terminale ale vectorilor de secvenţiere. După confirmarea secvenţei anticorpului, s-au introdus prin PCR situsuri de restricţie pentru potrivirea la vectorul de expresie dorit.

O strategie similară, bazată pe primeri degeneraţi, poate fi utilizată pentru clonarea fragmentelor Fab. Mai mult, pot fi produse fragmente Fab hibride prin inserţia genelor V_H şi V_L într-un vector care conţine deja domenii constante ale unei molecule de anticorp.

Au fost publicate şi strategii alternative bazate pe PCR şi seturi de primeri, incluzând clonarea prin amplificarea rapidă a capetelor terminale ale ADNc (RACE). Adesea, sunt legate covalent lanţuri grele şi uşoare prin interpunerea unui peptid de legătură, generând aşa numitele fragmente Fv sc (single-chain, lanţ unic) sau prin conectarea lanţurilor prin intermediul unei punţi disulfidice (fragmente dsFv).

Deşi aceste măsuri sunt menite să stabilizeze fragmentele recombinate, în anumite cazuri pot afecta în mod negativ proprietăţile de legare ale fragmentului. Fragmentele Fv7E2 şi Fv18E11, care au fost utilizate la cristalizarea COX şi QCR nu conţin un ligand sau o punte disulfidică adiţională (vezi fig. 11.4).

A. Set primer I .

regiunea FR1 a lanțului ușor K I, II, III, V (SstI)

VKC1T	GAC	GAC	*GAG*	*CTC*	ACM	CAG	WCT	CCA	KYC	TCC	CTG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR1 a lanțului ușor K IV, VI (SstI)

VKC1T	GAC	GAC	*GAG*	*CTC*	ACC	CAG	TCT	CCA	CGA	ATC	ATG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR4 a lanțului ușor K (XhoI)

VKR1T	CCG	TTT	CAG	*CTC*	*GAG*	CTT	GGT	SCC	WSC	WCC	GAA	CGT
	108	107	106	105	104	103	102	101	100	99	98	97

regiunea FR1 a lanțului greu (PstI)

VHC1T	GAG	GTK	MAG	*CTG*	*CAG*	SAG	TCW	GGG	SCT	GGS	YTG
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

regiunea FR4 a lanțului greu (BstEII)

VHR1T	TGA	GGA	GAC	GGT	GAC	CGT	GGT	CCC	TTG	GCC	CCA
	113	112	111	110	109	108	107	106	105	104	103

simbol	semnificație	simbol	semnificație
A	Aden ină	Y	pYr imidină (C sau T)
C	Cito zină	M	A sau C
G	Guan ină	W	A sau T
T	Tim ină	S	C sau G
R	puRină (A sau G)	K	G sau T

(simbolurile de o singură literă ale nucleotidelor sunt conforme cu nomenclatura IUB)

Fig.11.4 (A). Seturile de primeri folosiți pentru amplificarea genelor ce codifică V_H și V_L ale anticorpilor monoclonali murini. (A). Primerii degenerați cu situsuri de restricție unice au fost elaborați pentru clonarea genelor compatibile pentru inserția în plasmida pASK68 folosită pentru expresia periplasmatică în *E. coli*.

C. secvenţele de aminoacizi ale subtipurilor de anticorpi murini complementari seturilor de primeri

VL-κ	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VK-I	D	I	V	M	T,S	Q	S	P	S
VK-II1	D	V	V,L	M,L	T	Q	T	P	
VK-II2	D	I	V	M	T	Q	A	A	
VK-II3	D	I	V	I,M	T	Q	D	E	L
VK-III	K,D	I	V	L	T	Q	S	P	
VK-IV	Q,E	I,N	V	L	T	Q	S	P	A,T
VK-V1	D	I	Q	M	T	Q	T,S	T,P	S
VK-V2	D	I	V,Q	M	T	Q	S	P	
VK-V3	D	I	V	M	T	Q	S	H	
VK-VI1	Q	I	V	L	T	Q	S	P	A
VK-VI2	E	N	V	L	T	Q	S	P	

VL-κ	116	115	114	113	112	111	110	109
VK-RT	S	V	T	P	A	A	D	S

VH	1	2	3	4	5	6	7	8	9
VH-IA	E,D	V	Q	L	Q	E	S	G	
VH-IB	Q	V	Q	L	K	E,Q	S	G	
VH-IIA	E,Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	
VH-IIB	Q	V	Q	L	Q	Q	P,S	S	
VH-IIC	E	V	Q	L	Q	Q	S	S	
VH-IIIA	E	V	K	L	V	E	S	G	
VH-IIIB	E	V	K	L	L	E	S	G	
VH-IIIC	E	V	K	L	D	E	T	G	
VH-IIID	,D	V	Q,K,M	L	V	E	S	G	
VH-VA	E,Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	

VH	137	136	135	134	133	130	129	128
VH-G1A	M	S	N	T	Q	A	A	
VH-G1B	M	S	N	T	Q	A	A	
VH-G1C	M	S	N	T	Q	A		
VH-G2a/b	S	S	G	T	T	D	G	C

simbol	semnificaţie	simbol	semnificaţie
A	Alan ină	M	Met ionină
G	Glic ină	S	Ser ină
L	Leuc ină	V	Val ină
P	Prol ină	D	Asp artic acid
T	Tre onină	N	Asp aragină
C	Cist eină	E	Glu tamic acid
H	Hist idină	Q	Glu tamină
I	Izol eucină	R	Liz ină

Fig.11.4. (C) Secvenţele corespunzătoare de aminoacizi ale anticorpilor de diferite subgrupuri pentru partea complementară a setului primer II. Resturile V_H şi V_L sunt numerotate în conformitate cu Kabat şi colab.(1991).

Producerea fragmentelor de anticorpi. Pentru producerea fragmentelor de anticorpi recombinaţi, cum ar fi pentru *E. coli*, *Pichia pastoris* sau celule de la mamifere, s-a folosit o varietate de sisteme de expresie. Genele ce codifică domeniile variabile ale lanţurilor uşoare şi grele sunt inserate în operonul digistronic al plasminei pASK68 permiţând expresia periplasmatică în E. coli sub controlul promotorului inductibil *lac*. Fuziunea N-terminală a secvenţelor semnal OmpA şi PhoA facilitează secreţia lanţurilor grele şi uşoare la nivelul periplasmei. O peptidăligand a streptavidinei (strep-tag) este ataşată la nivelul capătului C-terminal al domeniului VH pentru purificare prin cromatografie de afinitate cu streptavidină, iar un myc-tag (recunoscut de anticorpul monoclonal 9E10) este prezent la nivelul capătului C-terminal al

domeniului VL fiind folosit pentru detecţia fragmentului de anticorp prin Western-blot sau Elisa.

Când se produce expresia unui fragment de anticorp care se leagă de o proteină membranară ce îşi are sediul în mod normal la nivelul membranei citoplasmatice a gazdei, noi va trebui să luăm în considerare faptul că anticorpul inhibă activitatea proteinei şi astfel creşterea celulei. În cazul sistemului antiport NhaA, chiar dacă majoritatea anticorpilor au avut un efect inhibitor asupra activităţii acestuia, expresia periplasmatică a fragmentelor Fv şi Fab a fost posibilă deoarece transportorul are importanţă vitală doar în anumite condiţii de creştere, cum sunt concentraţiile mari de sodiu sau litiu, sau pH în prezenţa sodiului. În plus, epitopii respectivi ar putea fi expuşi pe suprafaţa extracelulară sau să nu fie accesibili.

În sisteme de expresie bacteriene, fragmentele Fv şi Fab sunt produse în mod normal în spaţiul periplasmatic, unde mediul oxidativ permite formarea legăturilor disulfidice esenţiale pentru plierea adecvată şi activitatea anticorpilor. Producţia proteică variază pentru diferite fragmente de anticorp cu producţii de 1,5mg de proteină/l de cultură bacteriană în cazul fragmentelor Fv stabile. Fragmentele Fab sunt exprimate în cantităţi şi mai mici (0,1-0,4mg/l de cultură), mai probabil datorită complexităţii mai mari a legăturilor disulfidice şi masei mai mari. Producţia lor reprezintă o problemă delicată în experimentele de co-cristalizare. Producţia fragmentului Fab proteolitic este un proces care implică multe etape, necesită mult timp şi este costisitor. Adesea producţia de proteină pură este sub 30% din proba de proteină iniţială.

Fragmentele Fab au fost produse ca proteine chimerice cu domeniile constante C_H1 şi C_L ale altui anticorp, şi anume anticorpului monoclonal D1.3 specific lizozimului, prin subclonarea domeniilor V_H şi V_L a 3 anticorpi diferiţi în vectorul pASK85-D1.3. Această plasmidă conferă un his-tag la nivelul capătului C-terminal al lanţului greu pentru purificare prin intermediul cromatografiei de afinitate metalică prin imobilizare. Acesta este destinat expresiei periplasmatice în *E. coli* sub controlul sistemului represor/promotor tetraciclinic. Fragmentele de anticorp pentru anticorpul monoclonal 2C5 au rată de producţie bună de 1,5 şi 0,5mg/l pentru Fv respectiv Fab. Fragmentele de anticorp ale 5H4 sunt produse la niveluri mult mai mici (0,1 şi 0,03 pentru fragmentele Fv respectiv Fab).

Înlocuirea resturilor încărcate şi voluminoase ale capătului N-terminal al domeniului variabil al lanţului uşor a îmbunătăţit proprietăţile de pliere şi solubilizare ale ultimilor anticorpi.

Producţia poate fi considerabil crescută prin expresia aceloraşi fragmente hibride într-o citoplasmă bacteriană oxidativă folosind tulpina FA113 *E. coli* şi nou structuratul vector de expresie pFAB1. Aceasta a dus la producţii sporite de 10-30mg fragmente Fab pure, funcţionale pe litru de cultură E. coli, ceea ce reprezintă o cantitate adecvată pentru studii calitative de cristalizare.

În plus, fragmentele scFv derivate din băncile phage-display au fost recent exprimate cu succes într-o tulpină similară co-exprimând chaperone moleculare.

11.2.3. Purificarea și cristalizarea proteinelor

Pornind de la o sursă bună de proteine naturală sau recombinantă, purificarea trebuie să asigure preparate proteice pure şi omogene în cantităţi suficiente. În general metodele de purificare ale proteinelor membranare sunt aceleaşi cu cele aplicate pentru proteine solubile cu excepţia faptului că proteinele membranare integrale sunt purificate ca şi complexe proteină-detergent. Proteinele membranare sunt menţinute solubile în soluţii detergent micelare la o concentraţie de lucru pentru detergent de 1,5 până la 2 ori CMC. Alegerea detergentului pentru solubilizare şi purificare este importantă. Majoritatea materialelor de purificare tolerează o gamă largă de detergenţi. Sistemele de purificare prin afinitate au avantajul vitezei de lucru crescute şi specificităţii mari în comparaţie cu procedeele cromatografice standard cum ar fi cromatografia de schimb anionic sau cromatografia prin excludere de dimensiuni. Pentru anumite aplicaţii, ca de exemplu pentru cristalizare, fragmentele de anticorpi recombinaţi pot fi folosiţi în cromatografia de imunoafinitate indirectă pentru purificarea într-o singură etapă a complexelor membranare proteină-anticorp aşa cum este menţionat mai jos.

11.2.3.1. Purificarea prin imunoafinitate indirectă

Fragmentele de anticorp recombinat sunt instrumente adaptabile pentru analiza structurală a proteinelor. Ele pot fi folosite pentru prepararea complexelor proteice membranare, cu producţie de materiale înalt purificate pentru cristalizare într-o singură etapă de cromatografie prin imunoafinitate. În comparaţie cu metodele clasice cum ar fi cromatografia de schimb anionic sau cromatografia prin excludere de dimensiuni, cromatografia de imunoafinitate oferă un factor de purificare excelent – de obicei între 100 şi 10.000 – datorită înaltei specificităţi a interacţiunilor dintre antigen şi anticorp sau fragmentul de anticorp. Totuşi, datorită acestor interacţiuni puternice, de obicei sunt necesare protocoale de eluţie intensă dacă anticorpii sau fragmentele acestora sunt cuplaţi covalent la matricele activate sau captaţi de Proteina A sau G imobilizată. Fragmentele de anticorpi prelucraţi pot fi totuşi legaţi non-covalent şi reversibil la o matrice corespunzătoare prin intermediul tag-urilor (secvenţelor terminale repetitive adăugate), cum ar fi strep-tag. Ulterior proteina este supusă eluţiei sub formă de cocomplex cu fragmentul de anticorp (fig. 11.5) şi poate fi folosită ca atare pentru experimentele de cristalizare.

Această abordare prin cromatografia de imunoafinitate combină avantajele tehnicilor bazate pe interacţiunea antigen/anticorp şi afinitate, şi anume înalta specificitate şi protocoalele de purificare bine stabilite, rapide de

largă aplicabilitate. Tehnica permite izolarea proteinei din sursa ei naturală precum şi din sistemele de expresie în forma sa nativă fără ataşarea markerilor de afinitate. Evident, proteina purificată este prezentă într-un complex cu fragmentul de anticorp legat, ce nu ar trebui să afecteze activitatea biologică a proteinei, excepţie făcând cazurile când acest lucru este dorit.

COX din *P. denitrificans* precum şi produşii de oxidare quinolici din *P. denitrificans* şi *E. coli* au fost purificaţi eficient prin cromatografia de imunoafinitate indirectă într-o singură etapă folosind fragmente de anticorp recombinat fără afectarea proprietăţilor funcţionale ale acestor complexe proteice membranare.

În contrast, cromatografia de afinitate cu streptavidină nu poate fi utilizată pentru purificarea co-complexului QCR – fragment Fv. Un singur helix transmembranar ancorează subunitatea Rip1p de la periferia porţiunii transmembranare a complexului, iar „tragerea" de domeniul extrinsec prin intermediul fragmentului Fv determină dezintegrarea QCR până la un anumit punct. Din acest motiv, fragmentele Fv şi QCR au fost purificate separat iar complexele au fost formate ulterior prin fragmente Fv în surplus, îndepărtate apoi prin cromatografie de excludere prin dimensiune.

11.2.3.2. Cristalizarea

Cristalele proteice membranare sunt obţinute prin tehnici şi condiţii de cristalizare standard care sunt utilizate de rutină pentru proteine solubile, iar identificarea condiţiilor de cristalizare optime nu pare a fi un impediment. Caracterizarea biochimică riguroasă a preparatelor proteice combinată cu cercetarea detergentului cel mai adecvat poate reprezenta cea mai eficientă strategie pentru face faţă dificultăţilor cristalizării proteinelor membranare. Heterogenitatea proteică trebuie evitată; ea poate fi determinată de proteoliză, diversele condiţii de reacţie sau de modificări post-translaţionale, cum ar fi glicozilarea. Cristalizarea canalului de apă AQP1a fost efectuată cu probe proteice complet deglicozilate. În general, cristalizarea poate fi limitată de terminaţiile flexibile sau buclele şi clivajul proteolitic, iar produsele recombinate ce omit aceste terminaţii pot fi folositoare. De exemplu cristalizarea canalului de potasiu KcSA a fost obţinută numai după clivajul proteolitic a 35 aminoacizi c-terminali.

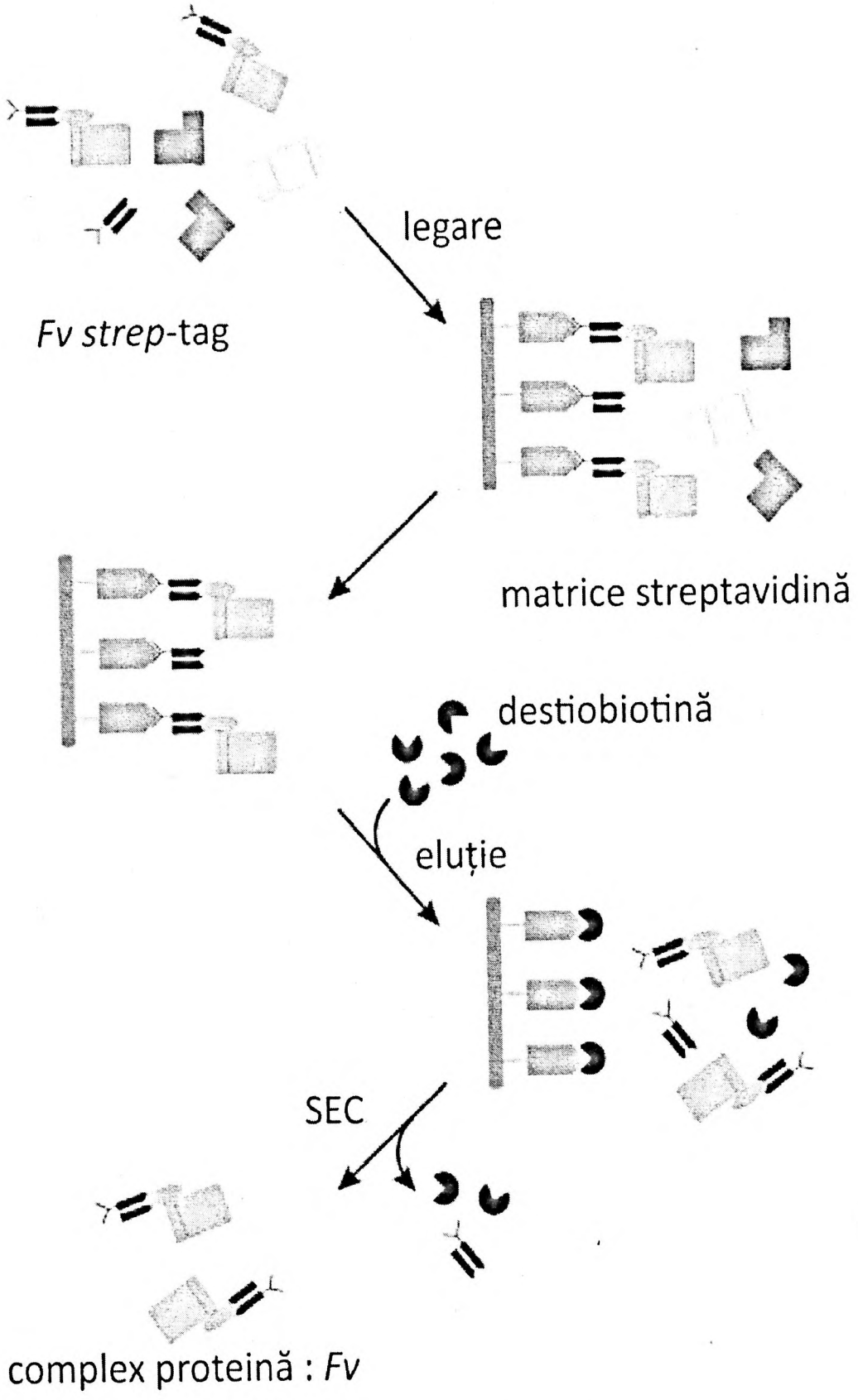


Fig.11.5 Reprezentarea schematică a purificării unei proteine membranare formată din mai multe subunităţi în complex cu un fragment de anticorp (fragment Fv strep-tag) prin cromatografie de imunoafinitate indirectă. Membranele celulare solubilizate sunt combinate cu extracte periplasmatice ale tulpinii de E. coli ce produce fragmentul Fv şi aşa-numitul complex este format. Amestecul este aplicat unei coloane de

afinitate cu streptavidină, ca şi complexul, fragmentele Fv singure fiind de asemenea legate prin intermediul strep-tag. Acestea sunt specific eluate prin înlăturarea competitivă cu un ligand corespunzător după îndepărtarea tuturor celorlalte proteine într-o etapă de spălare. Fv în surplus poate fi separat prin cromatografie de excludere prin dimensiune, rezultând complexul pur al proteinei membranare şi fragmentului Fv.

Mai mult, mutageneza restrânsă la nivelul suprafeţei polare a proteinelor membranare exterioare OmpA şi OmpX a fost folosită pentru optimizarea cristalizării. Aici ar trebui menţionat un alt aspect important. Multe proteine membranare îşi modifică considerabil conformaţia în timpul activităţii biologice. Pentru reuşita cristalizării ar pute fi necesară fixarea anumitor domenii mobile, de exemplu prin utilizarea unor inhibitori specifici. Domeniul mobil extrinsec al subunităţii Rip1p a complexului de citocromi bc_1 nu a fost rezolvat în prima structură a complexului din mitocondria bovină. Structura domeniului a fost vizibilă numai după imobilizarea acestuia prin contactele de legătură din cristal sau prin adiţia inhibitorilor Qo specifici de situs. Pot fi folosite diferite metode pentru îmbunătăţirea stabilităţii unei proteine. Dacă nu pot fi identificate metode sau detergenţi pentru menţinerea proteinei stabile şi adecvate pentru cristalizare, este recomandabilă selecţia mutantelor stabile. Fragmentele de anticorpi pot fixa o conformaţie proteică definită sau pot stabiliza un domeniu flexibil pentru susţinerea încercărilor de cristalizare dacă au fost selectaţi anticorpi adecvaţi. Condiţiile de cristalizare a proteinelor membranare în complex cu fragmente de anticorp cuprind diverse valori al pH-ului şi concentraţiei saline ce indică stabilitatea crescută a complexelor antigen-anticorp. Nu sunt disponibile date referitoare la constantele de legare reale ale exemplelor reuşite; totuşi, în toate cazurile fragmentele de anticorpi sunt folosite în exces molar în cursul purificării iar complexele stoichiometrice sunt obţinute folosind filtrarea în gel ca etapă finală de purificare. Utilizarea complexelor antigen-anticorp stoichiometrice pentru cristalizare este un indicator clar al afinităţii înalte a anticorpilor.

11.2.3.3. Abordări alternative pentru expansiunea suprafeţei polare

Dacă este disponibil un sistem de expresie recombinat, proteinele de adiţie sau fuziune par a fi alternativa rapidă pentru creşterea suprafeţei accesibile pentru solvent a proteinei membranare şi astfel a potenţialului de cristalizare. Totuşi, fuziunile proteice sunt intermediate printr-o regiune de legare cu proteina de interes. Acest linker va permitea introducerea unui domeniu flexibil, un aspect nefavorabil cristalizării. Într-o încercare de a îmbunătăţii calitatea cristalului a citocromului ubiquinol oxidază bo_3 legat de membrană din *E. coli*, proteina a fost produsă ca şi fuziune C-terminală a proteinei Z la subunitatea IV. Proteina de fuziune a cristalizat în condiţii similare cu complexul nativ dar cristalul a fost şi mai puţin ordonat.

Experimentele de înlocuire moleculară nu au fost reuşite iar proteina Z nu a putut fi plasată în model. Acest lucru se poate datora rezoluţiei scăzute a datelor de difracţie (6Å) sau poate indica dezordinii ale proteinei Z. Strategia de fuziune pentru creşterea suprafeţei hidrofile poate fi folositoare în general şi de asemenea poate fi valoroasă pentru proiectele genomice structurale dacă partenerii de fuziune pot fi ataşaţi rigid. S-a încercat adăugarea partenerilor de fuziune nu la nivelul terminaţiei protidice, ci între două porţiuni helicoidale transmembranare. Citocromul solubil *b*562 a fost inserat în una din buclele citoplasmatice ale lactoz-permeazei, o proteină transportoare secundară cu 12 helix-uri transmembranare. „Red-permeaza" (permeaza roşie) avea activitate de transport şi a permis obţinerea de cristale 2-D, însă nu s-a raportat obţinerea de cristale 3-D cu o bună difracţie.

Alegerea partenerilor de reacţie fiziologic stabili sau stabilizarea interacţiunilor proteină- proteină poate reprezenta o alternativă pentru creşterea domeniilor de expunere la solvent a proteinelor membranare pentru cristalizare.

11.3. Concluzii

În ultimii ani, cercetarea în domeniul structurii proteinelor membranare a evoluat rapid, deschizând calea descoperirilor raţionale a medicamentelor. Totuşi, numărul structurilor proteice membranare la rezoluţie aproape atomică este încă mic în comparaţie cu cel al proteinelor solubile. Fragmentele de anticorpi sunt utilizate pentru creşterea suprafeţelor hidrofile a proteinelor membranare îmbunătăţind astfel şansele cristalizării 3-D. Prin această metodă s-au obţinut deja structuri de înaltă rezoluţie pentru 3 proteine membranare diferite. Toate fragmentele de anticorp utilizate pentru co-cristalizarea cu succes a proteinelor membranare până în momentul de faţă au fost derivate din anticorpi monoclonali obţinuţi prin tehnologia clasică a hibridomului. Aceştia recunosc epitopii nativi, non-lineari a antigenelor respective şi se leagă cu înaltă afinitate. Pentru a conferi acestei strategii statutul de metodă cu caracter general în domeniul cristalizării proteinelor membranare, tehnicile de recombinare a anticorpilor trebuie optimizate pentru a permite accesul rapid la liganzii de înaltă afinitate. Cristalizarea mediată prin fragmente de anticorpi poate fi folositoare în mod deosebit pentru proteine membranare constituite în principal din helixuri transmembranare cu bucle expuse la solvent foarte scurte, precum şi pentru consolidarea proteinelor flexibile într-o conformaţie fixă.

PARTEA IV

ELEMENTE DE CINETICĂ, METABOLISM ȘI TOXICOLOGIE ALE MEDICAMENTELOR

CAPITOLUL 12
FARMACOGENETICA: EFECTUL VARIANTELOR GENETICE ÎN DISPONIBILITATEA ȘI RĂSPUNSUL MEDICAMENTELOR

12.1. Considerații generale

Este bine cunoscut faptul că în practica clinică există o variaţie interindividuală remarcabilă în ceea ce priveşte răspunsul biologic al pacienţilor la administrarea unui medicament. Această variabilitate poate fi rezultatul a numeroşi factori, cum ar fi patogeneza şi severitatea bolii tratate, bolile asociate, vârsta pacientului, funcţionarea rinichilor şi a ficatului, starea de nutriţie şi interacţiunile dintre medicamente. În ciuda relevanţei acestor factori, variaţiile comune ale genelor ce codifică enzime de metabolizare a medicamentelor (DMEs), transportatorii de medicamente şi receptorii medicamentelor ţintă - aşa-numitele polimorfisme - contribuie în mod semnificativ la heterogenitatea răspunsului la medicamente observat în cadrul populaţiei [Renegar, 2001].

Investigarea sistematică a influenţei polimorfismului genetic în variabilitatea interindividuală a răspunsului biologic la medicamente este denumită „farmacogenetică". Mai detaliat, farmacogenetica se ocupă cu: detectarea diferenţelor ereditare, moştenite în răspunsul la medicamente, evaluarea mecanismelor moleculare fundamentale de la nivel genetic şi la nivel de proteine, stabilirea de relaţii valabile între genotip şi fenotip, evaluarea relevanţei clinice a răspunsului medicamentelor polimorfice, şi dezvoltarea de metode de testare pentru a identifica pacienţii care ar putea prezenta un risc terapeutic crescut sau beneficiu therapeutic scăzut datorită predispoziţiei lor genetice, înainte de începerea terapiei medicamentoase.

Prima observaţie în ceea ce priveşte diferenţele moştenite în răspunsul la un produs chimic, a constituit-o incapacitatea de a simţi gustul feniltioureei evidenţiată încă din 1932 [Snyder, 1932]. Farmacogenetica îşi are începuturile în anii 1950, atunci când variaţiile determinate genetic au fost considerate a fi

cauza efectelor adverse ale medicamentelor. De exemplu, hemoliza după tratamentul antimalaric a fost corelată cu lipsa activităţii glucozo-6-fosfat dehidrogenazei eritrocitare. În mod similar, o deficienţă în activitatea enzimei de acetilare N-acetiltransferaza 2 (NAT2) a fost considerată cauza neuropatiei periferice după izoniazidă.

Elucidarea bazelor geneticii moleculare a diferenţelor moştenite în răspunsul la medicamente a început la începutul anilor 1980, cu clonarea şi caracterizarea unei gene umane polimorfice ce codifică CYP2D6 (debrisoquin hidroxilaza DME citocrom P450 monooxigenaza II D6) [Gonzalez şi colab., 1988]).

De atunci, au fost stabilite pentru un număr tot mai mare de gene umane relaţii între variantele alelice, modificările funcţionale la nivel de proteină şi rezultatul clinic (răspunsul la medicamente) .

12.2. Relații între genotip și fenotip

Efectul farmacologic global al unui medicament atunci când se administrează la un individ este rezultatul metabolismului medicamentului şi disponibilităţii sale, interacţiunii medicament-ţintă, care la nivel molecular sunt mediate de enzime [Evans, 1999; Weinshilboum, 2003]. Diferenţele genetice pot induce modificări la nivel enzimatic prin diverse mecanisme moleculare:

- gena ce codifică enzima poate să fie absentă, determinând lipsa completă a enzimei;
- dacă mutaţiile survin în regiunea de reglare a genei, poate să conducă la formarea de ARNm puţin şi o cantitate redusă de enzimă;
- o mutaţie la graniţa intron-exon poate duce la splicing-ul incorect al pre-ARN şi astfel, la formarea unei enzime incomplete sau inactive;
- o mutaţie în cadrul unui exon poate provoca schimbări nonsinonime şi nonconservative de aminoacizi în proteine, care au ca rezultat fie pierderea completă sau numai modificarea activităţii enzimatice, dacă schimbările de aminoacizi sunt importante pentru activitarea enzimei sau nu;
- în contrast cu situaţiile care conduc la absenţa sau scăderea activităţii enzimatice, existenţa mai multor copii ale genei în cauză ar putea conduce la creşterea expresiei enzimei codificate.

În contrast cu aceste alterări genetice funcţionale, există de asemenea modificări genetice silenţioase. De exemplu, schimbările de nucleotide de la nivelul intronilor nu vor conduce la nici o variaţie observabilă a structurii/activităţii enzimatice (de fapt, majoritatea polimorfismelor genomice aparţin tipului silenţios).

În plus faţă de aceste mecanisme, la nivel macroscopic relaţia dintre variaţia genetică (genotipul) şi schimbările interindividuale măsurabile/obser-

vabile interindividual în răspunsul la medicamente în populaţie (fenotipul) depinde puternic de numărul de modificări genetice presupuse.

Dacă o singură variaţie genetică determină o trăsătură, fenotipurile vor urma un model de transmitere mendelian sau monogenic. În acest caz, în populaţia observată, rezultatul va fi o frecvenţă de distribuţie bimodală. În special, în studiile familiale, diferitele fenotipuri vor fi clar separate unele de celelalte.

Metabolismul medicamentelor este adesea o trăsătură monogenică, unde concentraţia plasmatică a medicamentelor depinde numai sau în principal de activitatea unei singure enzime de metabolizare [Evans, şi Johnson, 2001]. În acest caz, de obicei, cohortele celor două fenotipuri sunt împărţite în metabolizanţi/metabolizatori lenţi (PMs) şi metabolizanţi/metabolizatori buni/normali (EMs) [Wormhoudt şi colab., 1999]. Un scenariu similar rezultă în cazul în care un polimorfism al unei singure gene determină diferenţe în sensibilitatea receptorilor medicamentelor la un anumit medicament, discriminând fenotipurile responsive şi nonresponsive.

Pe de altă parte, în cazul în care o trăsătură este rezultatul mai multor variaţii genetice, atunci superpoziţia efectelor moleculare diferenţiale va conduce la o frecvenţă de distribuţie mai mult sau mai puţin unimodală, în care diferitele fenotipuri nu mai sunt clar separate unele faţă de altele. În general răspunsul la medicamente este poligenic, din cauza complexităţii cascadelor fiziologice implicate, care, eventual, sunt controlate de jocul combinat al unei varietăţi de gene codificatoare de enzime.

12.3. Stabilirea relațiilor între genotip și fenotip

Până de curând, relaţia dintre fenotip şi genotip a fost stabilită începând cu observaţiile clinice a variaţiilor interindividuale în răspunsul la medicamente. Analiza distribuţiei a condus la descoperirea fenotipurilor. În consecinţă, genele potenţiale de bază şi variantele lor alelice au fost identificate prin clonare şi secvenţiere, în timp ce ereditatea trăsăturilor a fost elucidată prin studii familiale şi ale gemenilor. Fiind bazate pe fenotipul clinic, aceste abordări de farmacogenetică clasică au permis, probabil, ca polimorfismele detectate să fie legate cauzal şi validate clinic. Cu toate acestea, deşi funcţionează destul de bine pentru trăsăturile monogenice, abordările nu sunt capabile de a corelara genotipul cu fenotipul în cazul trăsăturilor poligenice.

Implementarea relaţiilor dintre genotip-fenotip pentru trăsăturile poligenice necesită o strategie diferită şi mai largă, care realizează abordarea de bază a noii discipline- farmacogenetica. Abordarea farmacogenetică este bazată pe faptul că genomul uman conţine polimorfisme numeroase, cum ar fi repetiţii scurte în tandem şi polimorfime mononucleotidice (SNPs), care ar putea sau nu ar putea să determine modificări funcţionale la nivel de proteină, ce ar fi în

dezechilibru de linkage cu alelele funcţionale [Nowotny, 200; Brookes, 1999]. În consecinţă, aceste polimorfisme comune pot acţiona ca markeri pentru alelele funcţionale.

Scanarea unei regiuni ADN pentru aceste polimorfisme produce o hartă a markerilor, care sunt apoi testaţi pentru asocierea cu fenotipul în cauză. Este posibil să se identifice asociaţii între markerii genetici şi răspunsurile individuale la medicamente care pot fi sau nu de cauzalitate, fără a necesita cunoştinţe de biochimie a funcţiei genei implicate. Bazată pe genotip, această abordare poate fi aplicată pentru orice trăsătură, independent de faptul că este monogenică sau poligenică. Scopul final este acela de a crea hărţi de biomarkeri la nivel genomic, care ar putea fi corelate cu anumite fenotipuri pe baza studiilor de asociere nonfamiliale.

În scopul realizării de cartografieri ale polimorfismelor cu densitate înaltă, SNPs par a fi polimorfismele de alegere. În comparaţie cu alte tipuri de variante genetice, cum ar fi variaţii ale numărului de repetiţii în tandem (VNTRs), SNPs oferă o serie de avantaje. SNPs sunt cele mai frecvente forme de polimorfism ale genomului uman, care se produc, în medie, la fiecare 1000-2000 de perechi de baze, ce prezintă prin urmare o densitate de polimorfisme maximă. Ele sunt binare, ceea ce le face, bine adaptate pentru a fi automatizate şi pentru analize de mare capacitate. În cele din urmă, SNPs par să aibă rate de mutaţii reduse, şi, astfel, sunt relativ stabile în timp.

O varietate de tehnologii pot fi utilizate pentru identificarea şi caracterizarea polimorfismelor [Shi, 2001]. Acestea includ:

- polimorfismul conformaţional monocatenar (SSCP);
- electroforeze în gel sensibile conformaţional;
- detecţia clivării nepotrivirii/ împerecherii greşite enzimatice sau chimice;
- electroforeza în gradient de gel denaturant ;
- analiza heteroduplexurilor prin denaturarea cromatografică în fază lichidă de înaltă performanţă (HPLC) ;
- secvenţierea ADN de mare capacitate;
- spectrometrie de masă (MS);
- scanarea şi resecvenţierea pe membrane de nucleotide (scaning array).

Crearea hărţilor SNP ale întregului genom a devenit acum fezabilă odată cu progresele uriaşe făcute în analiza de mare capacitate a genelor.

În 2001, Grupul de Realizare a Hărţilor SNP a publicat o hartă de variaţie a secvenţelor genomului uman conţinând 1,42 milioane SNPs [International SNP Map Working Group., 2001]. Depozitul de date SNP ale consorţiului conţine în present aproape 1,8 milioane SNPs (disponibil prin intermediul websitul-ui TSC Centrul Coordonator de Date la http://snp.cshl.org [Thorisson GA, 2003]).

În ciuda acestui progres semnificativ în cartografierea SNP, încercările de a stabili asociaţii între fenotipurile poligenice şi harta polimorfismelor

genomului încă nu au reuşit. O întrebare esenţială, în acest context, este câţi markeri polimorfici trebuie să fie incluşi într-un studiu de asociere la nivel de genom. În principiu, numărul de polimorfisme pentru a fi evaluate într-un studiu este determinat de extinderea dezechilibrului de linkage.

Cu toate acestea, dezechilibrul de linkage prezintă o variabilitate genomică marcată, care este cauzată de o varietate de factori cum ar fi distanţa între polimorfisme, rata de recombinare, vârsta polimorfismelor, istoricul populaţiei, procesele de selecţie şi abatere genetică. În consecinţă, încercări de a estima numărul minim de SNPs pentru a fi incluse în studii de asociere cu acoperire genomică au produs rezultate discutabile.

Simulări recente utilizând un model simplificat în populaţia generală sugerează că nivelurile dezechilibrului de linkage, nu depăşesc de obicei o distanţă medie de 3 kb (1 kb = 1000 de baze perechi) în cadrul populaţiei generale, ceea ce implică faptul că pentru studii asupra întregului genom, ar fi necesare aproximativ 0,5 milioane de SNPs [Kruglyak, 1999]. Datele experimentale au produs dezechilibre de linkage foarte variate, mărimea blocurilor estimate variază de la 5 la câteva sute de kilobaze (kb), cu diferenţe în ceea ce priveşte dezechilibrul de linkage extins, care este adesea dependent de etnia şi/sau rasa populaţiei examinate [Reich şi colab., 2001; Abecasis, 2001]. În ceea ce priveşte fezabilitatea, mărimea blocurilor cu dezechilibru de linkage poate fi avantajoasă.

De exemplu, un dezechilibru de linkage extins la 60 kb ar permite studii la nivelul genomului cu doar 30000 SNPs [Collins, 1999]. Cu toate acestea, chiar şi în acest caz, numărul de polimorfisme ce urmează a fi luate în considerare depăşeşte capacităţile tehnologice actuale. În plus, chiar şi după ce asocierea între genotip şi fenotip a fost demonstrată, mecanismele care stau la baza acestor asociaţii ar avea nevoie de studii suplimentare. În consecinţă, stabilirea relaţiilor genotip-fenotip pe baza studiilor de asociere la nivel de genom pare a fi deosebit de importantă în viitor.

În acelaşi timp, aplicarea abordărilor farmacogenetice într-o manieră mai concentrată pentru una sau mai multe „gene candidate", care sunt suspectate de a contribui la fenotipul în cauză, pare a fi cea mai indicată. Câteva exemple de success de abordare a genei candidate, sunt cunoscute în literatura de specialitate, demonstrând corelaţiile între polimorfismele ţintei medicamentului în a modifica răspunsul la medicamente *(vide infra).* În unele cazuri SNPs unice au oferit suficiente asociaţii cu răspunsul medicamentelor, în timp ce în altele corelaţia dintre trăsături cu haplotipul complet a dat rezultate mai bune.

12.4. Fenotiparea versus genotipare și predicția răspunsului individual la medicamente

Odată ce un polimorfism este cunoscut, şi relaţia dintre variantele genetice şi fenotip a fost validată, este posibil să se prezică răspunsul la medicamente fie prin fenotiparea, fie prin genotiparea subiecţilor [Lockhart şi colab., 2000; Cronin, 2001]. În general, fenotiparea poate fi efectuată prin măsurarea directă a proprietăţilor oricărui biomarker specific unui sistem, organ sau ţesut, de exemplu, activitatea enzimatică şi interacţiunile medicament-receptor. Abordarea generală include probe de îndepărtare şi determinare a activităţii biomarkerului prin teste biochimice relevante. Acest tip de fenotipare se numeşte fenotipare funcţională [Shi şi colab., 2001]. Deşi fenotiparea funcţională permite un test direct al nivelului de proteine sau enzime, există limitări în cazul în care activităţile enzimatice se suprapun peste substraturi specifice, de exemplu, în cazul de DMEs. Un alt dezavantaj al fenotipării funcţionale este că necesită adesea metode invazive de prelevare a probelor, de exemplu, biopsie hepatică.

În cazul DMEs, fenotiparea funcţională poate fi înlocuită de fenotiparea metabolică. Fenotiparea metabolică necesită aplicarea unui medicament sondă, care este cunoscut a fi metabolizat de enzima în cauză, urmată de determinarea medicamentului nemodificat versus metaboliţii lui în plasmă sau urină.

În mod ideal, o procedură de fenotipare ar trebui să fie uşor de a efectuat şi ieftină. Medicamentul sondă aplicat ar trebui să fie specific pentru enzima polimorfică în cauză, cu model metabolic cunoscut, uşor de testat şi în condiţii de siguranţă. Metoda de analiză ar trebui să fie sensibilă şi simplă.

Metodele de fenotipare au fost utilizate înainte ca instrumentele de biologie moleculară să devină disponibile şi acum ele au fost pe deplin validate. Avantajul fenotipării este acela că rezultatul reflectă în mod real activitatea metabolică individuală. Cu toate acestea, chiar şi în cazul metodelor optimizate, fenotiparea este susceptibilă de a identifica greşit factori, cum ar fi comedicaţia, nutriţia sau boala. În plus, aceasta necesită un efort/timp semnificativ pentru obţinerea de rezultate şi presupune o încărcătură suplimentară de medicamente asupra subiectului testat.

În contrast cu fenotiparea, genotiparea nu se adresează activităţii enzimatice reale, dar anticipează răspunsul individual la medicamente pe baza polimorfismelor genetice identificate [Zuhlsdorf , 1998].

Din punct de vedere tehnic, este relativ uşor a efectua genotiparea cu probe de ADN genomic, deoarece identificarea alelelor unei persoane la nivelul unui anumit locus al genei poate fi realizată folosind diferite metode, incluzând metode de genotipare pe bază de electroforeză în gel, cum ar fi reacţia de polimerizare în lanţ (PCR) polimorfismul lungimii fragmentelor de restricţie (PCR-RFLP), PCR cu allele specifice, genotipare pe bază de coloranţi fluorescenţi omogeni (metoda TaqMan sau metoda Invader), spectrometria de

masă şi tehnologia ADN microarray (ADN cip) [Brennan, 2002; Kwiatkowski şi colab., 1999].

Genotiparea necesită mai puţin timp decât fenotiparea, nu este influenţată de interacţiunile medicament-medicament sau aliment-medicament şi nu există probleme cu complianţa subiecţilor din test. Pe de altă parte, numai polimorfismele bine investigate pot fi determinate, aşa cum diferite alele s-au dovedit a codifica enzime ce induc un polimorfism metabolic, şi trebuie să fie disponibilă secvenţa informaţională a alelelor mutante şi wild-type (de tip sălbatic) . O analiză de corelaţie cu rezultatele de la fenotiparea corespunzătoare este întotdeauna necesară pentru a demonstra valabilitatea procedurii de genotipare. Relevanţa fenotipării şi genotipării constă în potenţialul lor de a anticipa înainte de începerea tratamentului cu un medicament dacă un pacient are sau nu un risc terapeutic crescut sau un beneficiu terapeutic scăzut datorită predispoziţiei genetice. În practică, însă, o serie de provocări rămân. De exemplu, aplicarea unui proceduri de genotipare şi fenotipare la acelaşi individ poate produce rezultate neconcordante. În mod similar, rezultatele fenotipării pot fi influenţate de tipul metodei şi/sau medicamentul sondă. În consecinţă, numeroşi autori au remarcat că procedurile de genotipare şi fenotipare trebuie să fie selectate şi efectuate atent [Zaigler şi colab.,2000].

12.5. Polimorfismul genetic al enzimelor de metabolizare a medicamentelor (DMEs)

Cea mai mare parte a cunoştinţelor farmacogenetice au fost dobândite în domeniul DMEs. De ce? pentru că polimorfismele DME sunt cel mai adesea trăsături monogenice, pentru că efectul individual rezultat, de exemplu, rata metabolică, poate fi uşor analizat cantitativ şi pentru că fenotipurile caracterizate prin diferenţe interindividuale ale ratei metabolice pot fi sesizate cu uşurinţă. Este posibil să se distingă persoanele cu metabolism normal, care sunt în mod implicit EMs, de metabolizanţii/metabolizatorii PMs, la care s-a redus semnificativ activitatea DME. În unele cazuri, este de asemenea, posibil să discrimineze persoanele cu metabolism crescut, care sunt clasificate ca metabolizanţi/metabolizatori ultrarapizi (UMs).

Potentialele consecinţe ale metabolismului medicamentelor polimorfice includ [Meyer, 2000]:

- efect farmacologic extins;
- reacţii medicamentoase adverse;
- lipsa de activare a precursorilor,
- toxicitatea medicamentului;
- creşterea dozei eficace;
- metabolizare alternativă, căi nocive;
- interacţiuni medicament-medicament exacerbate.

DMEs sunt de obicei clasificate în funcţie de tipul modificării metabolice pe care o catalizează. Enzimele de faza I catalizează transformările de grup funcţional, cum ar fi oxidarea, reducerea sau hidroliza. Enzimele de faza a II-a catalizează conjugarea substanţelor cu substituenţi endogeni. Pentru că, DMEs de faza a II- sunt întotdeauna implicate în eliminarea substanţelor bioactive şi metaboliţii acestora, ne putem aştepta că activitatea enzimatică scăzută va conduce la creşterea sistemică a nivelurilor de medicament, care pot fi asociate cu un efect terapeutic crescut, dar de asemenea cu creşterea efectelor adverse şi a toxicităţii. În cazul enzimelor de fază I, consecinţele polimorfismului depind dacă DME catalizează inactivarea unui medicament activ, sau formarea unui metabolit activ, fie dintr-un medicament fie dintr-un precursor. Contribuţia relativă individuală a DMEs la metabolismul global de fază I sau II este redată în figura 12.1.

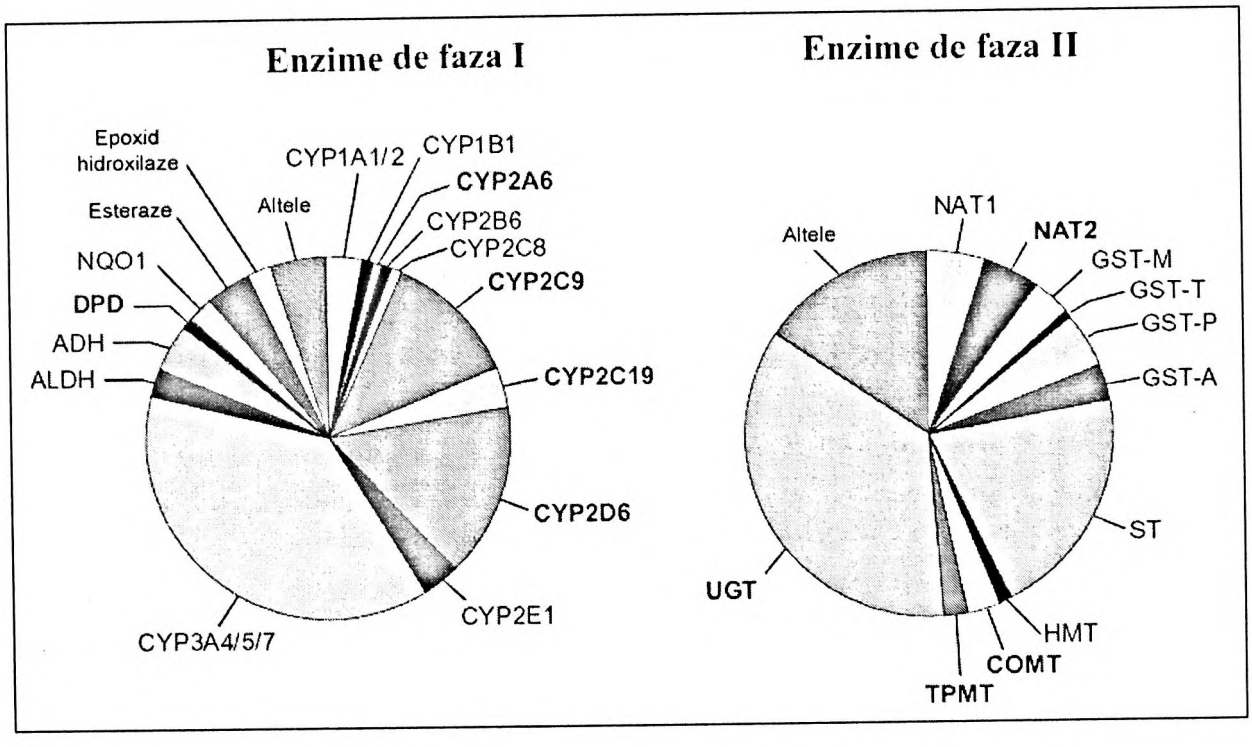


Fig. 12.1 Contribuţia relativă individuală a DMEs în faza I sau II a metabolismului medicamentelor (modificate după [Evans şi Johnson, 2001]). Mărimea secţiunii în graficul figură indică procentul de metabolism de fază I şi II al medicamentelor la care contribuie enzima respectivă. Enzimele cu polimorfisme la care s-a demonstrat deja că determină diferenţe relevante din punct de vedere clinic în răspunsul la medicamente sunt tipărite cu caractere bold.

Abrevieri: ADH = alcool dehidrogenaza; ALDH = aldehid dehidrogenaza; CYP = citocromul P450; DPD = dihidropirimidin dehidrogenaza; NQOH1 = NADPH: quinon oxidoreductaza; COMT = catecol-O-metiltransferaza; GST = glutation S-transferaza; HMT = histamin metiltransferaza; NAT = N-acetiltransferaza; ST = sulfotransferaza; TPMT = tiopurin metiltransferaza, UGT = uridin 5'- trifosfat glucuronoziltransferaza.

Aproape toate DMEs prezintă polimorfism genetic. Cu toate acestea, nu toatepolimorfismele s-au demonstrat a fi relevante clinic. În general, importanţa clinică a metabolismului/răspunsului medicamentului polimorfic creşte sau descreşte în raport terapeutic pentru un medicament dat. Au fost publicate o serie de reviewuri excelente despre farmacogenetica DMEs (vezi capitolul 15). Prin urmare, o descriere detaliată despre polimorfismul DMEs se va concentra pe CYP2D6. O privire de ansamblu asupra diferitelor polimorfisme cunoscute ale DMEs este prezentată în tabelul 12.1.

Tabelul 12.1 Polimorfismul DMEs

Gena/ produsul genei	Substratul medicamentos (efect)
DMEs de fază I	
CYP1A1	Fenacetina
CYP1A2	Acetaminofen Amonafida Cafeina Paraxantina Etoxiresorufin Propranolol Fluvoxamina
CYP1B1	Metaboliţi estrogeni
CYP2A6	Cumarina Nicotina (dependenţa de ţigară) Halotan
CYP2B6	Ciclofosfamida Aflatoxina Mefenitoin
CYP2C9	Tolbutamida (hipoglicemia) Warfarina (variaţii al efectului anticoagulant al warfa-rinei, hemoragie) Fenitoina (toxicitate crescută) Antiinflamatoare nesteroidiene Diazepam Ibuprofen Glipizida (hipoglicemia) Losartan (scăderea efectui antihipertensiv)
CYP2C19	Mefenitoina (PM: toxicitate crescută, EM:eficacitate scăzută) Omeprazol (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută, rate de vindecare mai mari în combinaţie, când este luată cu claritromicina) Hexobarbital (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Mefobarbital (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Propranolol (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate

	scăzută) Proguanil (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Fenitoina (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Citalopram (PM: toxicitate crescută, EM: eficacitate scăzută) Diazepam (PM: toxicitate crescută, sedare prelungită, EM: eficacitate scăzută) Benzodiazepine
CYP2D6	β-blocante (efect β-blocant) Propranolol (PM: bradicardie, hipotensiune arterială) Timolol (PM: eliminare scăzută- acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Bufuralol (PM: eliminare scăzută acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Metoprolol (variaţie în activitatea de β blocare, PM: eliminare scăzută, acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate, bradicardie, hipotensiune arterială) Antipsihotice (diskinezie tardivă de la antipsihotice, PM: toxicitate crescută, UM: eficacitatea insuficientă) Desipramina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, stupoare, UM: eficacitate insuficientă) Nortriptilina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă) Amitriptilina [PM: scăderea eliminării de compuşi iniţiali şi metaboliţi activi (activ=nortriptilina), toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă] Imipramina [PM: scăderea eliminării metabolitului activ (=desipramina)] Clomipramină (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat toxicitate) Codeina [PM: lipsă de eficacitate ca analgezic, scăderea activării medicamentului (activ =morfina) reacţii adverse narcotice, dependenţă] Debrisoquina (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, tensiune ortostatică apreciabilă, UM: eficacitate insuficientă) Dextrometorfan (PM: toxicitate crescută UM: eficacitate insuficientă) Encainida (PM: scăderea activării medicamentului (activ=O-desmetil encainida), EM: lărgirea complexului QRS) Flecainida (PM: eliminare scăzută- acumularea de compuşi iniţiali au ca rezultat toxicitate crescută, β-blocadă inconsistentă, UM: eficacitate insuficientă) Fluoxetin (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Guanoxan (PM: toxicitate crescută, hipotensiune arterială, UM: eficacitate insuficientă) Metoxiamfetamina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate

	insuficientă) Nortriptilina (PM: scăderea eliminării- acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii, UM: eficacitate insuficientă) N-propilajmalina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Perhexilina (PM: toxicitate crescută, neuropatie periferică, agranulocitoză, UM: eficacitate insuficientă) Fenacetina (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Fenformin (PM: toxicitate crescută, acidoză lactică, UM: eficacitate insuficientă) Propafenona (PM: toxicitate crescută, UM: eficacitate insuficientă) Sparteina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii, depresie cardiacă, contracţii uterine, UM: eficacitate insuficientă) Mexiletina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat creşterea toxicităţii) Amiodarona Indoramina Perfenazina (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali, de origine ce au ca rezultat toxicitate) Zuclopentixol (PM: eliminare scăzută - acumularea de compuşi iniţiali ce au ca rezultat toxicitate) Itioridazina Carvedilol (variaţii în blocada α1/β2) Antiaritmice (proaritmic şi alte efecte toxice)
CYP2E1	N-nitrozodimetilamina Acetaminofen Etanol (posibil efect asupra consumului de alcool)
CYP3A4/A5/A7	Macrolide Ciclosporina Tacrolimus Blocante ale canalelor de calciu Midazolam Terfenadina Lidocaina Dapsona Quinidina Triazolam Etoposid Teniposid Lovastatin Alfentanil Tamoxifen Steroizi
ALDH2	Ciclofosfamida Etanol (metabolizatori lenţi: înroşirea feţei, metabolizatori

	rapizi: protecţie faţă de ciroză hepatică)
ALDH3	Etanol (creşterea consumul de alcool şi dependenţă)
DPD	Fluorouracil (posibil toxicitate sporită, 5-fluorouracil neurotoxicitate, mielotoxicitate)
NQO1	Ubiquinona Menadiona (urolitiază asociată menadionei) Mitomicina c
Pseudocolinesteraza plasmatică	Succinilcolina (hidroliză lentă a esterilor: apnee prelungită)
COMT	Levodopa (metilatori săraci: răspuns crescut) Metildopa(metilatori săraci: răspuns crescut) Estrogeni (abuz de substanţe) Acid ascorbic
GSTM1	Aminocrom Dopacrom Adenocrom Noradrenocrom
GSTP1	Acid 13-cis-retinoic Acid etacrinic Acroleina Epirubicina
HMT	Histamina
NAT1	Acid p-aminosalicilic Acid p-aminobenzoic Sulfametoxazol
NAT2	Izoniazida [EM (autozomal dominantă): hepatită, PM: (autozomal recesivă): neurotoxicitate isoniazidică, lupus eritematos, neuropatie periferică, inhibarea oxidazei hepatice, creşterea toxicităţii fenitoinei atunci când este coadministrată] Hidralazina (PM: lupus eritematos indus de hidralazină) Procainamida (PM: dezvoltarea lupusului eritematos mai devreme şi mai frecvent) Fenelzina (PM: greaţă, somnolenţă) Sulfasalazina (PM: reacţii severe, mai probabil, atunci când sunt folosite doze mari) Dapsona (PM: efecte hematologice) Sulfonamide (hipersensibilitate la sulfonamide) Cafeina Amonafida (acetilatori rapizi: eficacitate scăzută, toxicitate crescută, mielotoxicitate, cancer colorectal)
STs	Steroizi Acetaminofen Estrogeni Dopamina Epinefrina Naringenina

TPMT	6-mercaptopurinA (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică, reducere a măduvei osoase) 6-tioguanina (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică) Azatioprina (PM: toxicitate tiopurinică şi eficacitate, risc de cancere secundare, mielotoxicitate, toxicitate hematopoietică)
UGT1A1	Irinotecan (diaree, mielosupresie) Bilirubina Flavopiridol
UGT2Bs	Opioizi Androgeni Morfină Naproxen Ibuprofen

12.6. Polimorfismul CYP2D6

Polimorfismul CYP2D6 a fost pentru prima oară descoperit prin observarea diferenţelor interindividuale în metabolismul debrisoquinei şi sparteinei. Ambele medicamente, la fel ca desipramina şi metoprololul, au fost folosite pentru a fenotipa subiecţii [Tamminga şi colab., 2001; Lledo, 1993], permiţând a distinge PMs de EMs. În unele cazuri UMs ar putea fi, de asemenea, discriminat [Lovlie, 2001].

Gena umană CYP2D6 este localizată la om la nivelul locusului CYP2D de pe cromozomul 22 [Gough, 1993], care conţine, de asemenea, alte două gene, o genă (CYP2D7), ce conţine o mutaţie care lezează cadrul de lectură, precum şi o pseudogenă (CYP2D8P), care conţine mai multe mutaţii şi nu codifică o enzimă funcţională [Kimura, 1989]. În prezent sunt cunoscute mai mult de 75 de variante alelice ale CYP2D6; cu toate acestea, multe dintre variantele genetice nu produc efecte măsurabile la nivel de proteină (compilaţii de diverse alele ale CYP2D6 şi alte CYPs sunt disponibile pe internet la websitul Comisiei de Nomenclatură al Alelelor Citocromului P450 (CYP) http://www.imm.ki.se/cypalleles).

Există cinci alele cu mutaţii silenţioase determinate de modificarea unui singur nucleotid. De obicei alela numită CYP2D6 * 2 [Tsuneoka, 1993] cuprinde un grup de alele cu diverse mutaţii care au ca rezultat schimbarea nivelului enzimatic în acelaşi mod (Arg296→Cys şi Ser486→ Thr). Enzima codificată de CYP2D6 * 2 are o activitate de aproximativ 80% comparativ cu tipul sălbatic. Alte alele ce codifică o enzimă funcţională sunt CYP2D6*33 şi CYP2D6*35 [Marez., 1997]. Toate aceste alele pot fi clasificate ca fiind

corespunzătoare funcţional activităţii enzimei codificate. Alelele funcţionale sunt asociate cu fenotipul EM.

Până în prezent au fost descrise 23 de alele, care codifică o enzimă inactivă. În consecinţă, acestea pot fi clasificate ca alele non-funcţionale. Pierderea activităţiienzimatice este cauzată de diferite mecanisme, cum ar fi decalarea cadrului de citire (de exemplu, CYP2D6 * 3A, CYP2D6 * 6, CYP2D6 * 41), defecte de splicing (de exemplu, CYP26D6 * 4) sau codon stop (CYP2D6 * 8). În cazul alelei CYP2D6 * 5, gena completă este pierdută. Alelele non-funcţionale sunt asociate cu fenotipul PM. Şase alele (CYP2D6 * 9, CYP2D6 * 10A, CYP2D6 * 10B, CYP2D6 * 17, CYP2D6 * 36, CYP2D6 * 41) sunt cunoscute, a codifica o enzimă cu activitate scăzută, comparativ cu tipul sălbatic. Aceste alele cu funcţionare redusă au fost asociate cu un fenotip intermediar de metabolizare [Kagimoto, si colab., 1990].

În cele din urmă, există, de asemenea, alele în care gena completă CYP2D6 a fost duplicată sau chiar multiplicată. În aceste cazuri, unde genele ce codifică enzima complet activă sunt amplificate, adică CYP2D6 * 1XN, CYP2D6 * 2XN şi CYP2D6* 35X2, rezultatul este o creştere a sintezei enzimei. În consecinţă, alelele acestea sunt asociate cu un fenotip UM [Dahl, şi colab., 1995]. Activitatea alelei CYP2D6 variază semnificativ printre grupurile de rase/etnii [Bradford, 2002]. S-a observat că există o frecvenţă semnificativ mai mare de alele nonfuncţionale la caucazieni în comparaţie cu alte populaţii (26% faţă de 6% la asiatici şi africani). În consecinţă, purtătorii homozigoţi ai alelei, reprezintă 6-7% din populaţia caucaziană. Cele mai importante dintre alelele nonfuncţionale sunt CYP2D6*4 şi CYP2D6*5. Alelele cu funcţie redusă sunt mult mai frecvente în Asia şi Africa decât în populaţia caucaziană. Alelele CYP2D6*10 sunt abundente în populaţiile asiatice (41%), dar prezente numai la 3% din caucazieni. Alele moştenite cu funcţie amplificată există, cu o frecvenţă destul de scăzută, în toate populaţiile.

CYP2D6 contribuie în mod semnificativ la metabolismul oxidoreducător general la bărbat (aproximativ 25% din toate medicamentele prescrise, vezi figura 12.1), deşi este doar o formă relativ minoră în ficatul uman, cu o abundenţă de numai 1,5% . De când CYP2D6 a fost, de asemenea, găsită în creier [Gilham, 1997], este posibil ca aceasta să acţioneze ca un mecanism de apărare, protejând sistemul nervos central, de neurotoxinele din mediu. CYP2D6 catalizează metabolismul primar pentru o mare varietate de droguri, inclusiv antidepresive triciclice (TCAs), antiaritmice, β- blocante şi codeină, şi prin urmare sunt susceptibile a fi influenţate de polimorfismul DME. Următoarele exemple vor ilustra relevanţa clinică a polimorfismului CYP2D6.

• Metabolismul TCAs, cum ar fi nortriptilina, desipramina şi imipramina urmează o schemă comună, în care hidroxilarea de către CYP2D6 conduce la inactivarea medicamentelor [Jann, Cohen, 2000]. În consecinţă, tratamentul cu doze normale pot expune PMs trataţi cu debrisoquină la risc crescut de toxicitate, iar doza standard la UMs ar putea eşua în a realiza efectul

farmacodinamic dorit. De asemenea, este important din punct de vedere clinic că un număr de medicamente antidepresive, de exemplu, fluoxetina, haloperidolul şi paroxetina, sunt inhibitori ai CYP2D6 [Brøsen, Gram, 1993]. Acest lucru ar putea duce la creşterea toxicităţii dacă TCAs sunt coadministrate cu astfel de medicamente.

• În mod similar, agenţii β-blocanţi, cum ar fi metoprololul sunt inactivaţi de CYP2D6 [Lee, şi colab., 1990]. PMs ai debrisoquinei sunt supuşi unor concentraţii mai mari de medicament activ şi, în consecinţă, creşte β-blocarea.

• În cazul propafenonei din clasa de antiaritmice 1c, polimorfismul CYP2D6 conduce la o schimbare de profil farmacodinamic [Lee şi colab., 1990]. Farmacodinamic, propafenona acţionează atât ca blocant al canalelor de sodiu, cât şi ca β-blocant. Medicamentul este racemic şi, în timp ce ambii enantiomeri exercită blocade ale canalelor de sodium comparabile, activitatea de β blocare este limitată la izomerul S. CYP2D6 catalizează hidroxilarea propafenonei. Produsul, 5- hidroxipropafenona, este un metabolit activ, care este în principal un blocant al canalelor de sodiu, dar are de asemenea o activitate limitată de β blocare. PMs ai propafenonei sunt supuşi la o β-blocadă crescută şi la un risc înalt de evenimente adverse severe, comparativ cu EMs.

• Medicamentul carvedilol este un amestec racemic de doi enantiomeri cu farmacodinamică şi metabolism diferită. Enantiomerul S arată α1- activitate precum şi β2-activitate, în timp ce enantiomerul R este în primul rând β-blocant. Izomerul R este metabolizat de către CYP2D6 într-o mult mai mare măsură decât enantiomerul S. Ca rezultat activităţile relative α1/β2 sunt dependente de genotipurile CYP2D6 ale pacienţilor trataţi [Swynghedauw, 2001].

• Efectul analgezic al codeinei este mediat prin metabolitul activ morfina. Deoarece codeina este O-demetilată la morfină de CYP2D6, efectul analgezic dorit este dependent de genotipul CYP2D6. În consecinţă, un efect analgezic după tratamentul cu codeină este limitat la EMs (Ems arată o mult mai mare eficacitate decât PMs măsurată prin ventilaţia pe minut în condiţii de odihnă) [Sindrup, Brøsen, 1996].

12.7. Polimorfsmul genetic al transportorilor de medicamente

În contrast cu DMEs, până în prezent nu sunt cunoscute multe despre polimorfismul transportorilor de medicamente. Transportorii membranari sunt responsabili de absorbţia medicamentelor în tractul gastro-intestinal, excreţia urinară sau biliară, transportul de o parte şi de alta a barierei hemato-encefalice şi la nivelul situsurilor de acţiune, cum ar fi ţesutul cardiovascular, celulele tumorale şi microorganismele infecţioase. În consecinţă polimorfismul transportorilor poate influenţa biodisponibilitatea medicamentelor. Transportorii includ glicoproteina P (Pgp; MDR1), α1 acid glicoproteina, MRP1-6 (proteina de rezistenţă multiplă la medicamente) şi perechea ei P-gp (SP-gp).

12.8. Gena de rezistență multiplă la medicamente (MDR) – marker versus polimorfismul funcțional

Gena MDR1 codifică glicoproteina P (P-gp), o proteină membranară cu apartenenţă la superfamilia de transportori membranari de legare la adenozin trifosfat [Choi, şi colab., 1988]. P-gp contribuie la excreţia xenobioticelor de la nivelul rinichilor, ficatului şi intestinului. În celulele endoteliale ale sistemului nervos central împiedică pătrunderea medicamentelor de o parte şi alta a barierei hematoencefalice. Supraexprimarea P-gp în celulele tumorale are ca rezultat un fenomen cunoscut ca rezistenţă multiplă la medicamente, la agenţii antineoplazici. Medicamentele cunoscute a fi eliminate prin P-gp, includ digoxina, antraciclina, vinblastina, daunomicina şi ciclosporina A. Polimorfismul genei MDR1 ce influenţează nivelul de exprimare sau secvenţa proteinei P-gp, ar putea avea prin urmare, un impact asupra biodisponibilităţii acestor medicamente.

Gena MDR1 conţine 28 de exoni, ADNc constând din 3843 bp. Până în prezent, 16 alele au fost identificate; cu toate acestea, cea mai mare parte a polimorfismelor detectate sunt intronice sau silenţioase [Cascorbi şi colab., 2001]. Interesant, un polimorfism mononucleotidic silenţios în exonul 26 (C3435T) a fost asociat cu nivelul de exprimare al P-gp la nivel intestinal şi biodisponibilitatea orală a digoxinei [Hoffmeyer şi colab., 2000].

Persoanele cu genotipul TT au arătat o expresie semnificativ redusă a nivelului de P-gp, comparativ cu persoanele cu genotip CC. Astfel, după administrarea pe cale orală, valorile Cmax digoxinei au fost mai mari în cazul genotipului TT, comparative u genotipul CC. Într-o investigare a distribuţiei polimorfismului MDR1 în populaţia lbă, SNP C3435T par a fi cele mai frecvente polimorfisme, cu mai mult de 50% heterozigoţi şi 28% homozigoţi purtători ai variantei alelice. Alte studii au arătat că polimorfismul C3435T este supus unei remarcabile variaţii interetnice [Ameyaw , şi colab., 2001]. Având în vedere că SNP C3435T nu poate determina o schimbare de aminoacizi la nivelul proteinei, cel mai probabil este, un polimorfism marker pentru un polimorfism funcţional. Un candidat potenţial este un SNP nonsinonim în exonul 16 (G2677T), care este în dezechilibru de linkage cu SNP C3435T SNP. Polimorfismul G2677T a fost asociat cu creşterea funcţiei P-gp *in vitro* şi concentraţii plasmatice mai mici de fexofenadină [Kim, şi colab., 2001]. Întrucât aceste observaţii sunt contradictorii pentru efectele digoxinei raportate, sunt necesare mai multe investigaţii pentru a elucida contribuţia diferitelor polimorfisme MDR1 în biodisponibilitatea la medicamente.

Câteva exemple de polimorfisme ale transportorilor de medicamente sunt redate în tabelul 12.2.

Tabelul 12.2. Polimorfismul transportorilor de medicamente

Gena/Produsul genei	Substratul medicamentului (efect)
MDR-1	Medicamente produse natural anticancerigene Vinblastina (supraexprimare în cancer: rezistenţă la medicamente) Doxorubicina (supraexprimare în cancer: rezistenţă la medicamente) Paclitaxel (supraexprimare în cancer: rezistenţă lamedicamente) Substraturi CYP3A4 Digoxin Fexofenadină
BSEP	conjugaţi
MRPs	Glutation Conjugaţi glucuronid Conjugaţi sulfat Antivirale nucleozide

12.9. Polimorfismul genetic al ţintelor medicamentelor

Polimorfismul ţintei unui medicament influenţează direct efectele farmacodinamice ale medicamentului. Identificarea şi investigarea polimorfismului printre ţintele medicamentelor este o sarcină complicată, pentru că, cel puţin în condiţii *in vivo*, efectul măsurabil al medicamentului este mai mult sau mai puţin sub control poligenic, ceea ce face dificilă segregarea fenotipurilor implicate. În ciuda acestui fapt, au existat numeroase încercări de a stabili relaţii între polimorfismele izolate într-o singură genă ce codifică ţinta unui medicament şi răspunsul anticipat al medicamentului.

Unele din aceste încercări au avut succes, în timp ce altele au arătat inconsecvenţe de-a lungul studiului, sugerând că în aceste cazuri sunt implicate mecanisme genetice mai complexe. Acest lucru va fi ilustrat prin exemplele următoare.

12.9.1. Polimorfismul proteinei de transfer a esterilor de colesterol (CETP) ca biomarker la răspunsul terapiei de scădere a lipidelor

CETP, care este implicată în controlul plasmatic al nivelurile de lipoproteine cu densitate înaltă (HDL), s-a dovedit a fi polimorfică. Polimorfismul CETP include un polimorfism de restricţie în intronul 1 din gena CETP, numit TaqIB. Prezenţa situsului de restricţie este denumită B1 şi absenţa lui este denumită B2. La caucazieni, 30% din populaţie sunt purtători ai genotipului B1B1 şi respectiv, 19% ai genotipului B2B2, ceea ce corespunde la

o frecvenţă de 59% pentru alela B1 şi 41% pentru alela B2 [Kuivenhoven, şi colab., 1998].

Varianta B1 a genei CETP a fost asociată cu concentraţii plasmatice ridicate ale CETP şi mai mici de HDL decât în cazul variantei B2. În plus, s-a constatat o asociere între alelele B1 şi un grad mai mare de ateroscleroză coronariană, cu progresia cea mai pronunţată a aterosclerozei la purtătorii B1B1, un grad intermediar de progresie la purtătorii B1B2 şi cu progresia cea mai redusă la purtătorii B2B2. Terapia cu pravastatin încetineşte progresia aterosclerozei coronariene la transportorii B1B1, dar nu şi la purtătorii B2B2 (reprezentând 16% din pacienţii care iau pravastatin).

Acest lucru a sugerat că polimorfismul CETP pare a anticipa dacă bărbaţii cu boli coronariene ar putea beneficia de tratamentul cu pravastatin pentru a intarsia progresia aterosclerozei coronariene. Totuşi, de când polimorfismul TaqIB este localizat la nivel intronic în gena CETP, o relaţie de cauzalitate între genotip şi răspunsul la medicamente pare să fie exclus.

Este mult mai probabil ca acest polimorfism să constituie un marker nefuncţional, care este în dezechilibru de linkage aproape complet cu polimorfismul CETP /-629, un polimorfism funcţional în regiunea promotorului genei CETP [Maitland-van der Zee şi colab., 2002].

12.9.2. Receptorul β2-adrenergic: predictibilitatea haplotipului versus SNPs

S-a demonstrat că efectul bronhodilator al agoniştilor receptorului β2-adrenergic este condiţionat de polimorfismul receptorilor. Receptorul β2-adrenergic, un exemplu tipic de receptor cuplat cu proteina G, interacţionează cu cotecolaminele endogene şi diverse medicamente. Receptorul există într-o varietate de ţesuturi, şi este implicat în reglarea cardiacă, vasculară, pulmonară şi funcţionarea metabolică. Activarea β2-adrenoreceptorilor în plămâni are ca rezultat relaxarea musculaturii netede a căilor respiratorii şi, astfel, agoniştii β2-adrenoreceptorilor sunt frecvent utilizaţi ca bronhodilatatori la astmatici.

Multiple mutaţii în gena β2-adrenoreceptorului sunt cunoscute, iar unele dintre ele sunt în dezechilibru de linkage. Un studiu recent a identificat un total de 13 SNPs organizate în 12 haplotipuri [Drysdale şi colab., 2000]. Au fost mai multe încercări de a corela răspunsul la terapia cu bronhodilatatoare cu diferite polimorfisme ale genei β2-adrenoreceptorului. De exemplu, răspunsul la albuterol s-a fost dovedit a fi puternic asociat cu un SNP în gena β2-adrenoreceptorului, având ca rezultat schimbări de aminoacizi în receptor la nivelul codonului 16 (Arg→Gly). Creşterea FEV1 a fost de 6,5 ori mai mare la pacienţii care au fost homozigoţi pentru 16Arg/16Arg comparativ cu pacienţii cu genotip Gly/Gly. Totuşi această relaţie nu a putut fi confirmată constant de către alte studii [Tan şi colab., 1997].

Aplicând abordări de gene candidate, un alt grup de cercetători a determinat răspunsul la tratamentul bronhodilator cu albuterol la indivizii cu cele mai frecvente 5 haplotipuri de receptori β2-adrenergici. Ei au arătat că răspunsurile variază de mai mult de 2 ori şi sunt asociate în mod semnificativ cu perechile de haplotipuri, dar nu sunt legate de SNPs individuale.

12.9.3. Polimorfismul ţintei unui medicament poligenic: răspunsul la tratamentul cu Clozapină

Clozapina, un antipsihotic atipic, interacţionează cu o varietate de receptori pentru medicamente, de exemplu, receptorii adrenergici, receptorul dopaminergic D3 şi receptorul pentru neurotransmiţătorul serotonină.

Deşi, se consideră că variaţia alelică a receptorului pentru neurotransmiţătorul serotonină 2A (5-HT2A) este un factor în determinarea răspunsului la clozapină, aceasta nu poate explica decât parţial variaţiile interindividuale [Arranz şi colab., 1998].

Un studiu implicând multiple gene candidat a fost realizat în scopul de a găsi asocieri, cu valori de predicţie îmbunătăţite. Au fost studiaţi nouăsprezece polimorfisme dintr-un set de nouă subtipuri de receptori ţintă pentru clozapină plus un transportor de neurotransmiţător .

Cea mai puternică asociaţie a fost găsită pentru o combinaţie de patru polimorfisme ale 5-HT2A, un polimorfism 5-HT2C, un polimorfism al promotorului transportorului de serotonină (5-HTTLPR) şi receptorului pentru histamină, conducând la 76% predictibilitate pentru răspunsul la clozapină şi o sensibilitate de 95% pentru un răspuns satisfăcător [Arranz şi colab., 2000].

Alte exemple de polimorfism ale receptorilor pentru medicamente sunt redate în tabelul 12.3.

Tabelul 12.3 Polimorfismul receptorilor pentru medicamente

Gena/ produsul genei	Substrat medicamentos (efect)
Proteina de transport a esterilor de colesterol (CETP)	Pravastatin (nivel scăzut de HDL, progresia aterosclerozei)
Receptorul β2-adrenergic	Albuterol (răspuns la astmatici, control slab al astmului) Ventolin (răspuns la astmatici, control slab al astmului)
5-HT2A	Clozapina şi alte neuroleptice (eficacitate medicamentoasă variabilă, răspuns antipsihotic tipic şi rezultate pe termen lung)

5-HT26	Clozapina (răspuns la schizofrenici)
5-HT6	Clozapina şi alte neuroleptice (răspuns la medicamente)
Transportorul serotoninei (5-HTT)	Antidepresive, de exemplu, clomipramina, fluoxetina, paroxeina, fluvoxamina (neurotransmisia 5-HT, răspuns antidepresiv)
Receptori dopaminergici D2, D3, D4	Antipsihotice, de exemplu, haloperidol, clozapina, tioridazina nemoraprida [răspuns antipsihotic (D2, D3,D4), diskinezie tardivă indusă de antipsihotice (D3), akatizie acută indusă de antipsihotice (D3), hiperprolactinemia la femei (D2)]
5-Lipoxigenaza la nivelul promotorului (ALOX 5)	Inhibitori ai sintezei de leukotriene (răspuns la astmatici)
Enzima de conversie a angiotensinei (ACE)	Inhibitori ACE, de exemplu, enalapril, lisinopril, captopril (efecte renoprotective, reducerea bp, reducerea masei ventriculare stângi, îmbunătăţirea funcţiei endoteliale, inhibitorii ACE induc tuse, nefropatie IgA)
Receptorul pentru bradikinina B2	Inhibitori ACE (inhibitorii ACE induc tuse)
Stromelizina	Pravastatin (eficacitate în ateroscleroza coronariană şi restenozare)
β-Fibrinogen	Pravastatin (progresie scăzută a bolii coronariene arteriale)
Lipaza hepatică	Lovastatin/colestipol sau niacin/ colestipol (îmbunătăţirea stenozei coronariene)
Receptorul pentru sulfoniluree	Tolbutamida (eliberare de insulină indusă de sulfoniluree, răspuns la insulină şi peptidul C seric)
Canalul HERG	Quinidina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente)
Canalul KvLQT1	Terfenadina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Meflaquina (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Disopiramida (sindrom de QT lung indus de consumul de medicamente) Cisaprid (polimorfismul Y315C torsada vârfurilor)
Canalul hKCNE2	Bactrim quinidina (aritmie indusă de medicamente) Bactrim (aritmie indusă de medicamente) Procainamida (aritmie indusă de

	medicamente) Oxatomida (aritmie indusă de medicamente) Claritromicina (torsada vârfurilor)
Inozitol-p1p	Litiu (răspuns la boala manico- depresivă)
Apolipoproteina E4	Simvastatin (mortalitate ameliorată) Tacrina (răspuns la boala Alzheimer)
Receptorul ryanodinic	Halotan sau succinilcolina (hipertermie malignă indusă de consumul de medicamente)
Receptorul FC trombocitar (FCR II)	Heparina (trombocitopenie indusă de heparină)
Proteina α Gs	β-blocanţi, de exemplu, metoprololul (effect antihipertensiv)
Glicoproteina IIIa subunitate a receptorului glicoproteinei IIb/IIIa	Aspirină (efect plachetar) inhibitorii glicoproteinei IIb/IIIa, de exemplu, abciximab (efect antiplachetar)
Receptorul de estrogen	Estrogeni conjugaţi (creşterea densităţii minerale osoase); înlocuire hormonală (creşterea HDL)
Proteina G β3	Antidepresiv (răspuns la tratamentul antidepresiv), diuretic (efect diuretic)
α-Adducina	Diuretice (efect hipotensiv)
Angiotensinogen	Inhibitorii ACE (efect hipotensiv ??)
Gena protrombinei	Contraceptive orale (polimorfismul G20210A: tromboză venoasă cerebrală)
Factorul V	Contraceptive orale (polimorfismul G1691A: tromboză venoasă cerebrală)
Metilguanin metiltransferaza	Carmustina (răspuns al gliomului)

12.10. Concluzii

Cercetările farmacogenetice au demonstrat că polimorfismul genetic este un factor important în disponibilitatea şi răspunsul medicamentelor la om. În special în domeniul metabolismului medicamentelor, cunoştinţele actuale ne permit să explicăm diferenţele farmacokinetice interindividuale prin polimorfismul genetic. Cu toate acestea, elucidarea relaţiei dintre răspunsul individual la medicamente şi genotip este mult mai dificilă din cauza naturii sale poligenice şi, prin urmare, aceasta nu poate fi realizată prin abordări de mecanisme farmacogenetice.

Strategiile care sunt capabile să abordeze polimorfismul poligenic sunt la nivel de căutări genomice pentru polimorfismele asociate cu efectele medicamentelor, utilizând hărţi SNP anonime de înaltă densitate şi strategii de

gene candidate, care preiau avantajul cunoştinţelor existente despre farmacodinamica şi disponibilitatea medicamentelor.

În prezent, abordările candidate par a fi mai promiţătoare, pentru că se concentrează pe un număr uşor de manageriat de gene şi polimorfisme care par a fi importante, şi primele rezultate par a fi promiţătoare (de exemplu, în cazul răspunsului la tratamentul cu clozapină, aşa cum s-a prezentat anterior).

Dincolo de capacităţile tehnologice curente şi cerinţele rezonabile de resurse, abordările genomului la nivel farmacogenetic are potenţialul de a descoperi determinanţi genetici în răspunsul la medicamente într-o manieră mai cuprinzătoare şi mai precisă.

Astfel, bazat pe o mai bună înţelegere a relaţiei dintre variabilitatea genetică şi succesul terapeutic, farmacogenetica ne va permite să facem predicţii referitoare la răspunsul individual la terapia medicamentoasă. Cunoştiinţele de farmacogenetică în practica clinică ar trebui să facă posibilă selecţia cea mai potrivită a medicaţiei sau ar trebui să permită ajustarea dozelor individuale, în funcţie de genotipul fiecărui pacient. În ceea ce priveşte dezvoltarea de noi medicamente, preselecţia genetică a pacienţilor care urmează să fie recrutaţi pentru studiile clinice, în respondenţi şi nonrespondenţi ar putea ajuta la optimizarea trialurilor clinice, pentru că eliminarea nonrespondenţilor ar putea determina o reducere a numărului de pacienţi necesară pentru a se atinge semnificaţia statistică.

În cele din urmă se urmăreşte înlocuirea strategiei curente care consideră că un medicament este potrivit pentru toţi indivizii, prin terapii individualizate cu medicamente sigure care sunt administrate in funcţie de constituţia genetică specifică unui anumit pacient.

CAPITOLUL 13
FARMACOGENOMICA BIODISPONIBILITĂȚII ȘI ELIMINĂRII MEDICAMENTELOR

13.1. Introducere

Efectele interindividuale ale medicamentelor fac obiectul unei substanţiale variabilităţi. La baza acestei afirmaţii stau numeroase motive de ordin fiziopatologic, datorate interacţiunilor din mediu intern dar şi raţiuni de ordin genetic. Încă din s-a observat la pacienţii care primeau un medicament tuberculostatic, şi anume izoniazida, că dozarea în urină a produsului acesteia acetilat era diferită de la un pacient la altul. Conceptul de farmacogenetică a fost elaborat prima oară în 1958 de către geneticianul german Vogel, care a observat că variabilitatea individuală a farmacocineticii se supune într-o oarecare măsură eredităţii familiare. De atunci, s-au obţinut succese remarcabile în domeniul farmacogenomicii. În special identificarea polimorfismului genelor sistemului citocromului P450 (CYP) a contribuit considerabil la explicarea variabilităţii individuale a farmacocineticii pentru anumite medicamente. Mai mult, de curând au fost elucidate variaţiile ereditare ale genelor transportorilor membranari ai medicamentelor. Alături de aceşti factori care pot influenţa farmacocinetica s-au făcut eforturi pentru clarificarea rolului polimorfismului genetic al receptorilor sau a proteinelor traducătoare de semnal cu rol în modularea eficienţei medicamentelor. Farmacogenomica încearcă să elucideze interacţiunea complexă a multor gene polimorfice pentru a putea explica şi dezvolta în consecinţă strategii terapeutice optime, în special destinate bolilor frecvente, cum ar fi bolile cardiovasculare şi cancerul. Această încercare reprezintă pe de o parte o adevărată provocare, atât tehnică cât şi logistică, determinată de milioanele de polimorfisme nucleotidice unice (SNPs) cunoscute până acum.

13.2 Contribuția metabolismului la clearance-ul medicamentelor

13.2.1 Enzimele polimorfice ale citocromilor P/CYPs

Enzimele de faza aIa catalizează reacţiile de oxidare şi reducere ale componenţilor metabolici străini precum şi transformarea anumitor lipide şi steroizi.

Tabelul 13.1 Substratele enzimelor polimorfice ale citocromului P450, alelele importante funcţional şi frecvenţa lor la caucazieni [Ingelman-Sundberg, 2001]

CYP	Substrate (selectate)	Alele (ADNc relevant şi/sau varianta proteică)	Consecinţe funcţionale	Frecvenţa alelelor (%)
CYP2A6	-variate: cumarinice, nicotine	*2(T479A,L160H)	enzimă inactivă	1-3
		*4(deleţia genică)	fără enzimă expresie	1
		*9(T-48G)	scăzută	5
CYP2B6	-citostatice: ciclofos-famida,ifosfamida benzodiazepine: diazepam, tenazepam, midazolam -variate: clopidrogel, nicotina, tamoxifen	*5(C1459T,R487C)	activitate scăzută	14
		*7(G516T,Q172H; A785G,K262R; C1459T,R487C)	activitate scăzută	1
CYP2C8	-variate: paclitaxel, rosiglitazona	*2(A805T,1269F)	activitate scăzută	0
		*3(G416A;R139K; A1196G,K399R)	activitate scăzută	13
CYP2C9	antiinflamat. nesteroidiene: diclofenac, ibuprofen, (S) naproxen, meloxicam, piroxicam, tenoxicam -antidiabetice orale: glibenclamid, glipizida, tolbutamina -AT1-antagonişti: irbesartan, losartan, valsartan -variate:amitriptilina, fluoxetina, fenitoina, sulfametoxazol, tamoxifen, torasemid,(S)-varfarina	*2(C430T,R144C)	activitate scăzută	8-13
		*3(A1075C,1359L)	activitate scăzută	7-9
CYP2C1	-inhibitoare de pompă de protoni: lansoprazol, omeprazol, pantoprazol anticonvulsivante:	*2(G681A, mutaţie a situsului de clivare)	enzimă inactivă	13
		*3(G636A, stop)	enzimă inactivă	0

	diazepam, fenitoina, (S)-mefenitoina -antipsihotice: citalopram,clomipramina, imipramina -variate:moclobemid, proguanil, propanolol			
CYP2D6	-β-blocante: alprenolol, carvedilol, metoprolol, propanolol antiaritmice:propafenona, encainida, flecainida, mexiletin, sparteina -neuroleptice: haloperidol, perhexilina, perfenazina, risperidon, tioridazina -antidepresive: amitriptilina, clomipramina, desipramina, fluoxetina, fluvoxamina, imipramina, maprotilina, nortriptilina, paroxetina,codeina, dextrometorfan, tramadol, amfetamina, fenacetina metoxiamfetamina, Debrisoquine, ondasetron,	*2XN(duplicaţie genică) *2(R296C;S486T) *4(G1846A mutaţie a situsului de clivare) *5(deleţie genică) *6[T1707cu decalarea cadrului de citire (frameshift)] *10(P34S) *17(T107I;R296C) *41(G-1584C)	activitate crescută activitate uşor scăzută enzimă inactivă fără enzimă fără enzimă activitate scăzută activitate scăzută expresie scăzută	1-5 12-21 4-6 1 1-2 <1 10-20
CYP2E1	-anestezice: enfluran, halotan, izofluran, metoxifluran, sevofluran, -variate: paracetamol, clorzoxazona, etanol	*2(R76H) *3(V381I) *4(V179I)	activitate scăzută enzimă inactivă enzimă inactivă	0 <1 <1
CYP3A5	se suprapun larg cu substratele CYP3A4	*3 (mutaţia intronului 3 A6986G la nivelul situsului de clivare)	fără enzimă	94

Enzimele CYPs sunt cele mai importante iar familia CYP3A contribuie la aproximativ 50% din totalul activităţii CYP la nivelul ficatului adult uman şi metabolizează aproximativ 60% din toate medicamentele uzuale. Principalul subiect al polimorfismului ereditar îl constituie genele CYP2C9, 2C19 şi 2D6 care contribuie la metabolizarea a circa 30% din medicamente (tabelul 13.1). Mai mult, există polimorfisme cunoscute la nivelul genelor CYP1A1, 1A2, 1B1, 1A6, 2B6, 2C8, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 5A1 şi 8A1 însă importanţa lor funcţională rămâne controversată.

13.2.1.1. CYP2C9

La începutul anului 1999 a fost publicat un studiu în care se arăta că pacienţii care au primit doze scăzute de derivat cumarinic-varfarina pentru profilaxia accidentelor trombotice au prezentat episoade semnificativ mai crescute de hemoragie decât un grup de control care a primit nişte doze superioare. Această descoperire aparent paradoxală a fost determinată de faptul că, un număr mare de metabolizatori lenţi (PMs) ai CYP2C9 au fost decelaţi la grupul care a primit un regim cu dozaj scăzut. Clerance-ul S-enantiomerului efector al varfarinei a fost decelat ca semnificativ scăzut la aceşti pacienţi determinând concentraţii plasmatice intermediar crescute şi nu concentraţii scăzute aşa cum era de aşteptat la pacienţii care au primit doze reduse. Consecutiv, sinteza de factori de coagulare dependenţi de vitamina K a fost puternic inhibată în raport cu valorile Ratei Normalizate Internaţionale (INR) prezentând şi o crescută tendinţă la episoade hemoragice.

CYP2C9 aparţine grupului de gene de pe cromozomul 10, care cuprinde CYP2C8, 2C9, 2C18 şi 2C19. Deficienţa de CYP2C9 este determinată într-o mare proporţie, de două mutaţii punctiforme care conduc la schimbul de aminoacizi: Arg144→Cys (CYP2C9*2) şi Ile359→Leu (CYP2C9*3). Frecvenţa alelelor la populaţia germanică este cuprinsă între 11 şi 7%. Homozigoţi reprezentativi pentru fenotipul PMs au o prevalenţă de 3,2%. În mod interesant, la asiatici o schimbare alternativă de aminoacizi: Ile359→Thr a fost decelată, şi denumită CYP2C9*4. Mai mult, un polimorfism al exonului 7 (2C9*5; Asp360→Glu) [Dickmann şi colab., 2001] şi un codon stop prematur, datorat unui polimorfism de deleţie 818delA care nu a demonstrat activitate (2C9*6), au fost evidenţiate la populaţia afro-americană. Până azi, 12 alele diferite au fost recunoscute de Comitetul de Nomenclatură al Alelelor Citocromului Uman P450 (CYP). Pe lângă varfarină (prezentată însă într-o concentraţie mult mai redusă- fenprocumonul) multe antiflogistice nestreroidiene cum sunt diclofenacul, ibuprofenul şi meloxicamul, antidiabetice orale ca tolbutamida şă glimenclamida, antagonişti ai receptorilor angiotensinei ca irbesartan şi losartan ca şi alte medicamente dintre care amintim fenitoina sunt metabolizate de CYP2C9 [Kirchheiner şi colab., 2003]. Există probe din ce în ce mai certe despre clerance-ul antidiabeticelor orale care este direct dependent de genotipul CYP2C9. Consecinţele nu sunt pe deplin elucidate. După administrarea de glibenclamidă zona de sub curbă (AUG) a crescut cu trei sau patru straturi, însă nivelul de glucoză la purtătorii heterozigoţi de variaţii CYP2C9 nu a fost diferit. La purtătorii homozigoţi de CYP2C9*3 aceste efecte sunt mai pronunţate şi sunt reflectate într-un răspuns accelerat la stimularea cu glucoză.

13.2.1.2. CYP2C19

CYP2C19, aşa numita mefenitoin hidroxilaza, catalizează în special hidroxilarea inhibitorilor pompei de protoni cum sunt omeprazolul şi lanozoprazolul. Pe lângă alte mutaţii, o mutaţie a situsului de clivare conduce la o inactivare completă a enzimei la 3-5% dintre caucazieni. În mod interesant, există unele dovezi că purtătorii PMs profită mai mult de terapia de eradicare a lui *Helicobachter pylori*. Doar 80% dintre pacienţii purtători de tipuri sălbatice de CYP2C19 au fost trataţi cu succes în timp ce purtătorii de CYP2C19*2 au prezentat toţi îmbunătăţiri [Kawamura, 2003]. Aceste rezultate interesante nu au putut fi însă confirmate prin alte studii însă efecte similare celor CYP2C19 dependente pot fi evidenţiate în cadrul tratamentului refluxului gastroesofagian [Furuta, 2002]. CYP2C19 prezintă un polimorfism ridicat, SNPs noi fiind recent descoperite [Blaisdell, 2002]. În prezent sunt confirmate 15 alele diferite, însă majoritatea variantelor genetice identificate sunt caracterizate de o prevalenţă extrem de scăzută. Pe lângă mutaţia situsului de clivare G681A, de asemenea G636A (CYP2C19*3) ar trebui luat în considerare la alcătuirea genotipului persoanelor de rasă neagră şi orientalilor. Cu toate acestea, acest codon stop prematur, din codonul 212 apare rar la caucazieni.

13.2.1.3. CYP2D6

Pe lângă CYP3A, enzima cu înalt polimorfism CYP2D6 este una dintre cele mai studiate enzime CYP. Acum aproximativ 40 de ani s-a observat că variabilitatea interindividuală extrem de crescută a concentraţiilor plasmatice ale nortriptilinei are un fundal genetic extrem de puternic şi este bazată pe ratele metabolice diferite de la individ la individ (pentru detalii vezi Bertilsson şi colab., 2002). Ulterior s-a demonstrat că metabolismul debrisochinei, medicament antihipertensiv, şi al sparteinei, un antiaritmic, este polimorfic iar metabolizarea este realizată de către aceeaşi enzimă CYP2D6. În special antidepresivele şi neurolepticele, care prezintă un număr considerabil de efecte adverse, sunt de asemenea metabolizate de către hidroxilaza sparteinei/debrisochinei. Prin urmare, a devenit clar într-un timp scurt că această trăsătură genetică poate avea consecinţe clinice severe. CYP2D6 este azi cunoscută a fi una dintre cele mai importante gene polimorfice implicate în metabolismul medicamentelor. Aproximativ 7-10% din populaţia europeană a PMs prezintă CYP2D6 şi un metabolism redus pentru numeroase medicamente asemenea antiaritmicelor, antidepresivelor, neurolepticelor şi de asemenea pentru unele β blocante şi opiacee. În cadrul acestui subgrup, apariţia efectelor secundare clinic relevante ale medicamentelor sunt mai probabile comparativ cu persoanele care prezintă metabolizatorii buni/intenşi (EMs). Lipsa ocazională a unor efecte secundare este explicată în unele cazuri pe seama fenomenului de duplicaţie genică şi apare la circa 1-3% din persoanele din Europa Centrală.

CYP2D6 aparţine unei agregări genice a pseudogenei, puternic omolog inactivă, CYP2D7, care conţine un singur cadru de citire ce perturbă inserţia la nivelul primului său exon şi pseudogena reală CYP2D8. Gena CYP2D6 este legată de cromozomul 22q13.1 şi conţine 9 exoni cu un cadru de citire deschis, de 1383 bp, care codifică 461 de aminoacizi. Polimorfismele sunt bine şi extensiv caracterizate de către Sachse şi colab.,(1997). Astăzi, peste 73 de haplotipuri diferite de CYP2D6 sunt înregistrate de către Comitetul de Nomenclatură al Alelelor Citocromul Uman P450 (CYP) (http://www.iim.ki.se/cypalleles). Alelele pot fi clasificate pe baza nivelului de activitate la care codifică enzimele CYP2D6 în grupuri funcţionale, nonfuncţionale şi cu funcţionalitate redusă. Unul dintre defectele genetice primare de la nivelul locusului CYP2D este CYP2D6*4, care apare cu o frecvenţă de 20,7% la caucazieni. O translocaţie a G1846A generează o modificare a situsului de clivare la limita dintre intronul 3 şi exonul 4, determinând în continuare apariţia unor noi proteine nefuncţionale. Întreaga regiune de codificare suferă o deleţie la 4-6% dintre caucazieni şi alte grupuri etnice. Prin urmare, alela *5 este considerată a avea o origine străveche. Alte variante relevante sunt reprezentate de deleţii ale 2549A la nivelul alelei *3 (2,0%) şi ale 1707T la nivelul alelei *6 (0,9%), generând modificări de cadru de citire. Contrastând cu aceste polimorfisme fatale, o deleţie triplă a perechii de bază la nivelul alelei *9 (1,8%) nu alterează neapărat activitatea enzimei, iar un schimb al prolinei cu serina la nivelul codonului 34 este asociată cu o activitate enzimatică mai scăzută şi în mod particular cu o scădere a stabilităţii CYP2D6.10 [Nakamura şi colab., 2002]. Această variantă apare la 1-2% dintre caucazieni, însă reprezintă cauza majoră a activităţii scăzute a CYP2D6 la orientali. La rasa neagrăafricană, alela *17 reprezintă una dintre motivele majore ale activităţii scăzute a CYP2D6.

Activitate extrem de crescută a CYP2D6 a fost identificată la circa 1-2% dintre caucazieni ca urmare a duplicaţiei genice a alelelor *1 (*1X2) şi *2 (*2X2). În Europa de Nord prevalenţa scade sub 2%, însă în anumite regiuni din Spania au fost înregistrate şi frecvenţe de peste 7%. În ţările Arabe, precum şi în nord-estul Etiopiei, au fost raportate prevalenţe ale metabolizatorilor ultrarapizi (UMs) de până la 29%. În câteva cazuri au existat familii cu peste 13 copii genice identificate. În contrast, în China, duplicaţiile genei CYP2D6 sunt extrem de rare, dar media ratei de metabolizare a debrisochinei/4-hidroxidebrisochina este mai crescută decât la caucazieni. Acest fapt se datorează prevalenţei crescute a variantelor alelice CYP2D6 *10 puţin active. Cu toate acestea, la populaţia de culoare pare să existe o heterogenitate extinsă.

Fenotipul metabolizatorilor intermediari (IMs) poate fi şi rezultatul ratelor de expresie scăzute ale CYP2D6, spre exemplu există dovezi considerabile că homozigoţii cu polimorfism C/G 1584, prin contrapoziţionarea codonului strat, prezintă o expresie proteică de doar 50%, comparativ cu purtătorii variantei 1584G [Zanger şi colab., 2001]. Această variantă

CYP2D6*2 linkată, denumită CYP2D6*41 poate îmbunătăţi activitatea aşa numiţilor IMs.

Până acum au fost raportate multe alele, însă unele extrem de rare au fost evidenţiate doar la populaţii specifice [Ingelman-Sundberg şi colab., 2001]. Deşi rata de metabolizare a dextrometorfanului spre exemplu, poate varia foarte mult între indivizii cu acelaşi genotip, cu mai mult de un grad de magnitutidine, genotiparea realizează o valoare predictivă de încredere a statusului PM, IM, EM şi UM pentru CYP2D6. Primul caz de duplicare genică a fost identificat la un pacient care prezenta un nivel plasmatic extrem de scăzut al nortriptilinei post terapie orală. Fenotipul UM al CYP2D6 este azi bine determinat drept cauză relevantă a lipsei de răspuns la terapia antidepresivă. Clerance-ul unor asemenea medicamente cum este nortriptilina, desipramina, şi până la un anumit nivel imipramina şi amitriptilina, depinde în mod evident de polimorfismul CYP2D6. Inhibitori ai recaptării serotoninei ca fluoxetina, citalopramul sau paroxetina au fost demonstraţi drept inhibitori ai CYP2D6. În mod interesant, un studiu axat pe efectele secundare asemenea miclotoniilor şi convulsiilor, post tratament cu antidepresive, nu a putut arăta nici un pacient cu un status PM al CYP2D6, însă jumătate au fost trataţi concomitent cu medicamente ce aveau efecte potenţial inhibitorii asupra CYP2D6.

Efectele polimorfismului CYP2D6 asupra terapiei antipsihotice par a fi mai pronunţate pe neuroleptice. Compuşi ca perfenazina, zuclopentixolul, tioridazina, haloperidolul şi risperidona sunt metabolizaţi până la un nivel ridicat de către CYP2D6. Purtătorii PMs par să prezinte un risc crescut de afectare de către efectele secundare asemenea simpomelor extrapiramidale [Scordo şi colab.,2002; Brockmoller şi colab., 2002]. Mai mult, eficienţa antipsihoticelor pare a fi influenţată de numărul de copii active ale genelor CYP2D6. Descoperirile recente au arătat că este necesară genotiparea anterioară tratamentului cu antipsihotice polimorfic metabolizate [Dahl , 2002].

Impactul enzimelor cu polimorfism ridicat asupra terapiei bolilor cardiovasculare este controversat şi pentru certificare sunt necesare mai multe date, spre exemplu propafenona prezintă o inhibiţie ridicată a receptorilor β, la purtătorii PMs, şi s-a sugerat că determină efecte adverse puternice la un pacient PM pentru CYP2D6. Însă, flecainida este parţial metabolizată de CYP2D6, dar apparent comportarea electrofiziologică a inimii nu a fost influenţată determinant de către genotip. β blocantele, asemenea metoprololului, şi într-o anumită măsură carvedilolul, sunt de asemenea substraturi CYP2D6. Chiar după terapia de durată, la purtătorii PMs, media ajustată a concentraţiilor plasmatice ale metoprololului a fost de circa 6,2 ori mai mare comparativ cu purtătorii EMs [Rau şi colab., 2002]. Dintr-un studiu al efectelor adverse ale terapiei cu metoprolol, acelaşi grup de cercetători au concluzionat că efectele adverse s-ar putea datora genotipului CYP2D6, în condiţiile în care, frecvenţa PMs a fost ridicată la un grup restrâns de pacienţi care prezentau şi efecte adverse extrem de pronunţate [Wuttke şi colab., 2002]. Cu toate acestea, în prezent nu există

date care să ateste dacă rezultatul clinic al terapiei cu β blocante este influenţat de polimorfismul genetic al CYP2D6.

Beneficiul genotipării CYP2D6 asupra terapiei medicamentoase a fost relevant recent, în cadrul tratamentului senzaţiei de greaţă şi simpomatologiei de vomă în cadrul chimioterapiei anticanceroase cu antiemeticul antagonist al receptorului 5-HT3, topisetron [Kaiser şi colab., 2002]. Într-un studiu în care au fost incluşi 42 de pacienţi, cu cancer, care primeau chimioterapie, aproximativ 32% dintre aceştia experimentau senzaţii de greaţă şi vomă. Purtătorii CYP2D6 UMs, însă, prezentau o frecvenţă mult mai crescută a manifestărilor de vomă după terapie. Autorii au concluzionat că tratamentul antiemetic cu topisetron sau, într-o mai mică măsură, cu odansetron ar putea fi îmbunătăţit prin ajustarea dozelor prin genotiparea CYP2D6 şi că aproximativ 50 de pacienţi ar trebui genotipaţi pentru a proteja un singur pacient de efectele emetice severe.

13.2.1.4. CYP3A

Familia CYP3A constă într-un număr determinat de enzime implicate în metabolizarea unor medicamente bine cunoscute. Din această familie fac parte enzime ca CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 fetală şi recent identificata CYP3A43. Variabilitatea interindividuală a activităţii totale a CYP3A este datorată în parte prezenţei sau absenţei CYP3A5 active. Mai puţin de o treime dintre caucazieni şi 66% din populaţia neagră-africană prezintă expresia CYP3A5, datorată unei schimbări G/A de bază ADN în interiorul intronului 3. Această SNP conduce la clivare alternativă şi la generarea unui codon stop prematur în exonul 3B, având drept rezultat inactivarea CYP3A5*3. Acest polimorfism explică, cel puţin parţial, distribuţia bimodală a cineticii midazolamului. Adiţional, în rândul afro-americanilor a fost identificată o SNP G/A rară la nivelul exonului 7, asociată cu reducerea activităţii CYP3A5 (CYP3A5*6).

În afară de CYP3A5, CYP3A4 contribuie la clerance-ul midazolamului. Recent, a fost descoperit un polimorfism semnificativ funcţional al CYP3A4 (L373F). Acesta reduce afinitatea midazolamului la CYP3A4 de la KM de 8,7μM la 36,4μM. Mai mult SNPs nou descoperite conduc parţial la scăderea sau chiar absenţa expresiei. Cu toate acestea, datorită rarităţii acestor polimorfisme, ele nu contribuie la explicarea variabilităţii individuale ale activităţii CYP3A4. CYP3A pot fi puternic induse de medicamente ca rifampicina, carbamazepina, fenobarbitalul sau altele. Ele interacţionează cu receptorul nuclear X (PXR), interacţiune uramată de dimerizarea cu receptorul α al acidului 9-*cis*-retinoic (RXRα) şi legarea la elementele responsive ale promotorului respectiv. Prin urmare, variantele genetice ale genei PXR ar putea fi implicate în determinarea variabilităţii activităţii CYP3A. Într-adevăr, PXR prezintă numeroase variante, cel puţin şase dintre ele generând schimburi de aminoacizi. Varianta 163G induce 15 falduri/împachetări la rifampicină în comparaţie cu doar 5 falduri la cei cu variantă 163D. Alte variante asemenea V140M şi A370T prezintă efecte de semnificaţie minoră. Aceste descoperiri

arată importanţa majoră a interacţiunii dintre gene şi mediu înconjurător, în condiţiile în care, polimorfismul PXR nu afectează activitatea bazală a CYP3A însă inducţia CYP3A suferă modificări. De asemenea, în polimorfismul CYP3A4, prevalenţa SNPurilor PXR este relative acăzută, prin urmare activitatea CYP3A poate fi explicată doar în mică măsură, de către această variabilă.

13.2.2 Enzimele de faza all[a]

13.2.2.1. (Aril)amine N-acetiltransferaze (NAT2)

După o perioadă relativ scurtă de la introducerea izoniazidei în tratamentul clinic al tuberculozei, s-a observat că există diferenţe interindividuale considerabile în ceea ce priveşte excreţia urinară a metabolitului acetilat. Enzima responsabilă, NAT2, catalizează acetilarea unor substraturi ca sulfametazina iar aparentele diferenţe interindividuale ale acetilării izoniazidei au fost cauzate de polimorfismul genetic al genei NAT2. Acetilarea lentă la oameni, s-a demonstrat a fi bazată mai degrabă pe activitatea redusă decât pe ratele scăzute de expresie. NAT2 este exprimată de regulă în ficatul uman, în timp ce gena înrudită NAT1 poate fi exprimată într-o mare varietate de ţesuturi.

Studii ale fenotipului desfăşurate pe parcursul ultimelor patru decenii au relevat o variabilitate etnică a frecvenţei de acetilare lentă. Extremele pot fi găsite în Africa de Nord, cu o frecvenţă a alelelor care codifică acetilarea lentă de 95%, iar la polul opus în regiunea Est Pacifică îndepărtată unde frecvenţa este de doar 11%. Aşa cum era de aşteptat, repartiţia acetilatorilor lenţi, la aceste populaţii, este cuprinsă între 90 şi 1,2%. Determinări ulterioare, datorate genotipărilor adiacente au relevat că modelul alelic diferă semnificativ între populaţia caucaziană, asiatică, aborigenă şi, în special, la populaţia de culoare. La caucazieni, alelele predominante sunt cele lente NAT2*5B (40,9%) şi *6A (28,4%) şi cele rapide *4 (23,4%). Toate celelalte alele au o frecvenţă mai scăzută de 3%. La asiatici, în cadrul acetilatorilor lenţi, alela NAT2*6A este cea mai comună în comparaţie cu alela*5B, spre exemplu frecvenţa este de 23% pentru prima alelă în comparaţie cu 19% pentru a doua în Japonia. În mod interesant, mutaţia 857A care are loc la nivelul alelei *7B, are o frecvenţă de 11% la aborigenii australieni. În Africa, pe lângă mutaţiile G191A, frecvent observate, poate fi de asemenea decelată o mare diversitate a halotipurilor. Pe lângă alela rapidă *4, au fost identificate de asemenea şi *12A şi *3 în probele obţinute de la diferite triburi.

NAT2 este responsabilă de conjugarea unor medicamente ca izoniazida, dapsona, procainamida şi multe altele. Acetilatorul lent NAT2 se presupune a fi supus unui risc crescut de afectare datorită efectelor secundare ca neuropatia periferică post terapie cu izoniazidă sau datorită unor afecţiuni asemenea lupusului eritematos indus medicamentos şi sindromului Stevens-Johnson.

Aceste afecţiuni severe pot fi cauzate, la indivizi susceptibili, de către un număr mare de medicamente implicate în metabolismul de acetilare, cu menţiunea că nu există nici o asociere cu forma idiopatică a lupusului eritematos [Zschieschang şi colab., 2002]. Neuropatia periferică cauzată de supradozajul cu izoniazidă poate reprezenta o problemă reală în cadrul grupurilor etnice cu o frecvenţă crescută a acetilatorilor lenţi aşa cum întâlnim în Africa de Nord. Eficienţa scăzută a medicamentelor este de aşteptat să apară la cei care prezintă acetilare rapidă.

13.2.2.2. Tiopurin-S-metiltransferaza (TPMT)

Un efect secundar rar dar extrem de grav post terapie cu antimetaboliţii 6- mercaptopurina şi azatioprina o reprezintă aplazia medulară severă, care poate devein un efect secundar cu potenţial letal. Detoxifierea are loc prin intervenţia TPMT, o enzimă de fază aII[a] care este homozigot deficitară cu o incidenţă de aproximativ 1:300 de indivizi. La aceşti pacienţi, metabolizarea urmează o cale alternativă apelând la 6-tioguanin nucleotida (6-TGN). Concentraţiile plasmatice ale 6-TGN sunt corelate cu severitatea efectelor secundare medicamentoase. Cu toate acestea, apare o problemă deoarece TPMT poate suferi un număr ridicat de mutaţii care permit doar o genotipare limitată. Până acum 8 mutaţii care determină schimburi de aminoacizi şi o mutaţie a situsului de clivare, sunt cunoscute. Aparent există chiar mai multe mutaţii, dar sunt puţine SNPs care pot determina o PM a TPMT. Multe clinici preferă încă proceduri de stabilire a fenotipului *ex vivo*, dar cunoştinţele actuale despre rarele variaţii şi aplicabilitatea unor tehnici cum ar fi cromatografia de denaturare de înaltă performanţă, vor permite o predicţie viabilă a statusului TMPT prin intermediul genotipării.

13.3. Transportorii medicamentelor: Glicoproteina P (P-gp)

Transportorii medicamentelor aparţin superfamiliei casetei de legare a ATPului (ABC) din membrana proteică, şi ei pot influenţa concentraţia intracelulară a unor compuşi numeroşi dintr-o mare varietate de celule şi ţesuturi. Iniţial s-a observat că transportorii ABC, de tip P-gp au fost supraexprimaţi în celulele tumorale, conferind acestora proprietatea binecunoscută de rezistenţă medicamentoasă multiplă împotriva agenţilor antineoplazici cum sunt paclitaxelul, antraciclina, alcaloizii de vinca şi etoposidul. Gena care codifică P-gp a fost definită prin urmare gena rezistenţei medicamentoase multiple (MDR1) (ABCB1).

Cu toate acestea, este bine stabilit că P-gp este responsabilă de transportul apical al altor medicamente lipofilice variate cum sunt digoxina şi β blocantul celiprolol, şi talinolol, inhibitoare ale sintezei colesterolului ca lovastatina, atorvastatina şi simvastatina, inhitoarele proteazei HIV, indinavir şi

saquinavir, opioide şi de asemenea ciclosporina A cu efect imunosupresor. Din moment ce P-gp mediază transportul acestor compuşi importanţi prin membranele intestinale sau ale celulelor endoteliale de la nivelul capilarelor cerebrale, proteina poate de asemenea servi drept barieră funcţională împotriva pătrunderii medicamentelor sau poate contribui la excreţie (fiind exprimată la nivelul canaliculelor hepatocitelor sau la nivelul celulelor tubulare din rinichi). Mai mult, exprimarea la nivelul celulelor endoteliale ale barierei sanguine cerebrale protejează împotriva penetrării medicamentoase la nivelul sistemului nervos central. Prin urmare şoarecii knockout P-gp prezintă dispoziţii semnificativ înalte ale substraturilor P-gp.

La oameni, expresia P-gp prezintă o mare variabilitate interindividuală şi face subiectul unor interacţiuni medicament-medicament, spre exemplu agentul antituberculos rifampicina este un inductor eficient al P-gp ca şi al MRP2 datorită elementului PXR din regiunea promotor a MDR1. Inducţia P-gp a fost de asemenea observată după coadministrarea de St. John Wort (extract de sunătoare folosit adesea ca antidepresiv). Pe de altă parte competiţia cu verapamilul poate determina de asemenea inhibarea activităţii transportorului.

Deşi pare că P-gp este coreglată, sub multe aspecte, alături de CYP3A4, nu există nici o legătură cu exprimarea CYP3A4, ceea ce explică marea variabilitate interindividuală. Prin urmare identificarea variantelor genetice în cadrul genei MDR1 a stimulat un număr mare de studii care au încercat să investigheze corelaţia dintre expresia P-gp şi activitatea în dependenţă a SNPs din MDR1. MDR1 cuprinde 28 de exoni iar ADNc constă în 3843 bp. Mickley şi colab.,(1998) au descoperit SNPs cu două sensuri, o transversie G2677T în exonul 21 şi o translocaţie a G2995A în exonul 24 al MDR1. Aceste SNPs au condus la un schimb Ala/Ser în codonul 893 şi respectiv o schimbare Ala/Thr în codonul 999. În mod notabil, alelele diferite au arătat exprimări similare la nivelul ţesuturilor normale, liniilor celulare neselectate şi la nivelul limfoamelor maligne netratate. Studii *in vitro* au confirmat aceste observaţii [Kimchi-Sarfaty şi colab., 2002]. Secvenţionarea sistematică a tuturor exonilor MDR1 şi ale regiunii 5' la indivizii caucazieni au relevat multiple SNPs. 12 din 15 mutaţii nu au avut nici un efect asupra secvenţei proteice. În mod ciudat a existat o corelaţie semnificativă a unui polimorfism silenţios la nivelul exonului 26 (C3435T) cu nivelul exprimării intestinale a P-gp şi biodisponibilitatea orală la digoxină. SNPul C3435T prezintă o frecvenţă a alelelor de 53,9% în cadrul unui grup de 461 de germani caucazieni, însă variază semnificativ în cadrul altor grupuri etnice. Prevalenţa este mult mai scăzută (0,17-0,27) la negrii-africani, în timp ce la populaţia orientală valorile sunt cuprinse între 0,41 şi 0,47. Aceste date se pot dovedi importante pentru determinarea probabilităţii diferenţelor interindividuale în ceea ce priveşte răspunsul la medicamente a anumitor populaţii.

În codonul 893, 6 genotipuri diferite pot exista ca şi rezultat al combinaţiilor celor trei alele 2677G, T şi A cu frecvenţe alelice de 56,7%,

41,6% şi 1,7% conducând la aminoacizii Ala, Ser şi respectiv Thr. Studii ulterioare au identificat un număr de mutaţii cu frecvenţă variabilă şi importanţă funcţională discutabilă.

Aşa cum am menţionat mai sus, în investigaţiile iniţiale expresia P-gp a diferit semnificativ fiind dependentă de C3435T, situată într-o poziţie instabilă a codonului 1145. SNP a fost asociată cu expresii scăzute ale P-gp la nivelul mucoasei umane duodenale şi activitate transportoare scăzută. Mecanismul molecular prin care C3435T influenţează expresia P-gp nu este încă pe deplin înţeles din moment ce nu există nici o dovadă a unui dezechilibru genetic linkat al diferitelor variante din regiunile promotoare ale genei MDR1 sau ale secvenţelor care controlează procesarea ARN-ului mesager. Cu toate acestea, descoperirea a fost susţinută prin determinarea efluxului de rodamină 123 din celulele natural killer $CD56^+$ [Hitzi şi colab., 2001]. Acest efect remarcabil a fost de asemenea detectat la nivelul exonului 26 SNP, deşi este mai puţin pronunţat la pacienţi cu o stare stabilă şi trataţi cu 0,25mg digoxină pe zi. Purtătorii TT au prezentat o reducere cu 20% a AUC în primele 4 ore, iar diferenţele au fost mai pronunţate dacă ne gândim la haplotipurile C3435T şi G2677T. Rezultate similare au fost obţinute de un studiu francez asupra digoxinei [Verstuyft şi colab., 2003].

Probabil că asemenea polimorfisme pot juca un rol important în cazul pacienţilor care nu răspund la tratament. Într-adevăr, Schwab şi colab.,(2003) au demonstrat o asociere cu bolile intestinale inflamatorii. Cu toate acestea, impactul funcţional al C3435T nu este consistent. Într-un studiu realizat pe 124 de germani care au suferit transplanturi renale şi care au primit o microemulsie de ciclosporină cu substrat P-gp timp de cel puţin 6 luni s-a constatat absenţa unor probe suficiente. AUCs nu au diferit în funcţie de polimorfismul C3435T. Pe de altă parte, formula administrată conţinea surfactantul nonionic Cremophor EL, care este cunoscut ca inhibitor al P-gp în ceea ce priveşte transportul paclitaxelului. Nici o asociere pentru C3435T nu a fost raportată la un grup de populaţie de provenienţă japoneză, la care sa evaluat dacă expresia MDR1 se corelează cu expresia trofoblastului placentar P-gp şi asta pe 100 de placente obţinute de la femei japoneze. În contrast, în alte două studii japoneze asupra cineticii digoxinei, nivelul AUC a fost semnificativ mai crescut în primele 4 ore la grupul homozigot pentru CC decât la cel pentru TT [Moriya si colab., 2002]. Studii ulterioare au investigat de asemenea efectele polimorfismului MDR1 asupra expresiei duodenale a ARNm, punând în valoare expresii mai crescute la purtătorii TT comparativ cu purtătorii CC, ceea ce ar putea explica concentraţiile scăzute de digoxină la purtătorii 3435CC. Investigaţiile din cadrul unui studiu german care a testat 55 de voluntari aflaţi sub tratament cu β blocantul talinolol, ca şi medicament de testat, au relevat că exonul 26 SNP este de importanţă minoră. Însă, schimbul de aminoacizi Ala893Thr din exonul 21 se află în corelaţie cu concentraţii plasmatice semnificativ alterate de talinolol. La purtătorii variantelor TT/TA ale G2677T/A, valorile AUC ale talinololului

oral au fost uşor dar semnificativ mai ridicate comparativ cu purtătorii a cel puţin unui tip de alelă sălbatică (p=0,014), dar nu au existat modificări ale mARN sau ale expresiei proteice cel puţin în ceea ce priveşte polimorfismele studiate.

Rezumând, importanţa funcţională a polimorfismului MDR1 rămâne încă să fie elucidată. Posibil dezechilibrul de linkaj dintre exonul 26 C3435T şi exonul 21 Ala893→Ser poate contribui la variaţiile activităţii P-gp; cu toate acestea, nu există încă o explicaţie pentru asocierea dintre C3435T şi expresia P-gp aşa cum este descrisă în unele studii. Prin urmare se poate lansa o ipoteză că C3435T reprezintă un marker genetic pentru variante încă neidentificate situate la nivelul regiunii reglatoare a genei MDR1.

13.4. Concluzii

Adaptarea timpurie a schemelor terapeutice la trăsăturile genetice ar putea avea drept rezultat evitarea efectelor secundare şi îmbunătăţirea rezultatelor clinice ale farmacoterapiei. Genotiparea în loc de fenotipare pentru medicamentele de testat este de preferat a se realiza în timpul unei farmacoterapii în desfăşurare, din moment ce unele medicamente pot inhiba, de exemplu, activitatea CYP2D6. Cel puţin majoritatea alelelor deficitare proprii diferitelor grupuri etnice, ar trebui caracterizate şi folosite în aprecierea fenotipului sau genotipului. Beneficiul adaptării dozelor conform genotipului este cel mai bine descris de studiile realizate pe medicaţia antipsihotică; cu toate acestea, există încă o mare nevoie de studii prospective care să genereze dovezi certe. Dozele iniţiale recomandate, dependente de trăsăturile farmacogenetice, au fost publicate pentru toate medicamentele antidepresive de Kirchheiner şi colab.,(2001). Acesta a reprezentat un pas major în încercarea de a îmbunătăţi terapia medicamentoasă individuală, însă este nevoie de studii clinice mult mai standardizate, care să testeze eficacitatea şi efectele secundare genotypic adaptate şi nonadaptate ale diferitelor scheme terapeutice.

CAPITOLUL 14
TOXICOGENOMICA: INTEGRAREA NOILOR METODE PROPRII BIOLOGIEI MOLECULARE ÎN TOXICOLOGIE

14.1. Dezvoltarea toxicologiei

Efectele toxice produse aupra unui organism şi induse de substanţele din mediu au fost studiate ani la rând. Iniţial toxicologii au luat în considerare în studiile lor, morfologia şi fiziologia organismului, incluzând determinarea dozelor de substanţe, potenţial letale, greutatea corpului şi a organelor şi inclusiv patologia brută. Dezvoltarea tehnicilor histopatologice a permis examinarea microscopică a ţesuturilor şi determinarea efectelor toxice la nivel celular. În anii 1980, tehnicile moleculare au devenit accesibile constituind modalităţi de identificare precoce şi cu o înaltă sensibilitate a punctelor moleculare afectate şi a evidenţiat deosebirile existente între diferitele tipuri de toxicitate. Aceste tehnici au avut drept rezultat scurtarea timpului dintre administrarea medicamentului şi detectarea efectelor sale, adică a timpului de expunere. Acum sunt frecvent cercetate modificările legate de nivelul anumitor proteine sau metaboliţi tisulari, din sânge sau urină, în strânsă corelaţie cu tipuri specifice de toxicitate.

Majoritatea parametrilor chimici convenţionali, specifici analizelor clinice, au fost stabiliţi empiric. Ei sunt rezultatul proceselor celulare aberante, în mai mare măsură decât componentelor mecanismului toxic. Spre exemplu pasajul enzimelor la nivelul membranelor lezate este un proces secundar unei faze târzii a apoptozei celulare. Determinarea punctelor lezate având la bază o singură moleculă pot să-şi găsească aplicabilitate dacă există noţiuni prestabilite asupra modului de acţiune al agentului aflat în studiu. Prin urmare aceste experimente primare pot contribui la confirmarea ipotezei. Cercetătorii îşi propun să descopere markeri specifici ai toxicităţii care pot fi găsiţi la nivelul modificărilor nivelelor de expresie genică, proteică şi a metaboliţilor care determină răspunsul celular la o injurie provenită din mediul intracelular. Ca urmare a eforturilor de elucidare a secvenţelor genomice majore, tehnologii funcţionale genomic au fost elaborate ca să înarmeze toxicologii cu noi posibilităţi de studiu ale toxicităţii în organism, la nivel molecular printr-o abordare celulară de anvergură. Teoretic toate biomoleculele celulare pot fi azi determinate concomitent. Toxicogenomica, prin urmare, este definită ca domeniu de aplicare a tehnologiilor funcţionale genomice în toxicologie. În cadrul acestei definiţii, toxicogenomica integrează genomica funcţională cu

metode toxicologice convenţionale. Figura 14.1 prezintă dezvoltarea toxicologiei de la începuturile ei până în era toxicogenomicii.

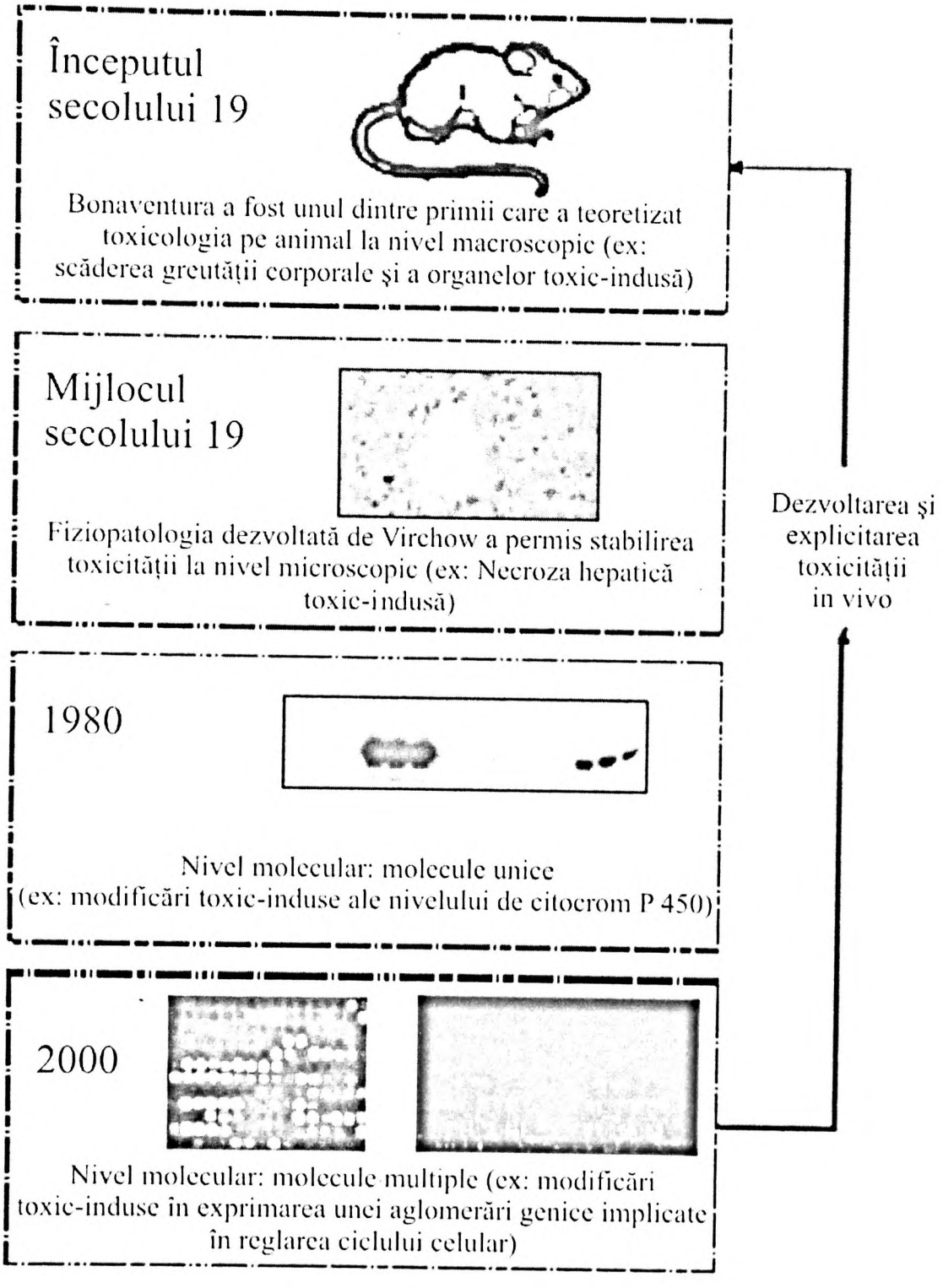


Fig.14.1. Istoricul evoluţiei toxicologiei

În acest capitol, mai întâi, vom trece în revistă diferitele tehnologii genomice funcţionale şi apoi vom discuta despre aplicabilitatea lor în studiile toxicologice. Toxicogenomica are potenţialul de a îmbunătăţi aprecierea efectelor compoziţiei genomice asupra rezultatelor toxicologice, oferind o mai

bună înţelegere a mecanismelor toxicităţii; ea va facilita evaluarea toxicităţii compuşilor necunoscuţi, va ajuta la producerea unor markeri induşi de mecanismul toxicologic, va îmbunătăţi corespondenţa toxicologică între specii şi extrapolările *in vitro-in vivo*, şi nu în cele din urmă va facilita dezvoltarea unor subdiscipline toxicologice care se vor ocupa de mixturile chimice.

14.2. Genomica funcțională: noi tehnologii ale biologiei moleculare

Tehnologiile genomice funcţionale măsoară răspunsurile moleculare, dintr-un organism într-o manieră extinsă din punct de vedere celular. Informaţiile disponibile în ceea ce priveşte secvenţele genomice, proteinele celulare şi conţinutul în metaboliţi, sunt utilizate pentru a deduce rolul funcţional al mecanismelor şi căilor celulare ale diferitelor molecule. Genomica este aria de cercetare care studiază genomul prin intrermediul studiului secvenţelor nucleotidice, structura genomică şi compoziţia sa. Studiul transcripţiei, proteomica şi determinarea metaboliţilor duc la aflarea nivelurilor de expresie ale transcripţiei genice, proteinelor şi respectiv metaboliţilor.

14.2.1. Genomica

O multitudine de oportunităţi au fost oferite biologiei şi stiinţelor care se ocupă cu studiul vieţii de către dezvoltarea proiectelor de secvenţionare genomică, precum şi eforturilor întreprinse în scopul determinării secvenţelor genoamelor altor specii cum ar fi şobolanul sau maimuţa. Acizii nucleici sunt depozitarii informaţiei genetice, care reprezintă informaţia de bază necesară producţiei proteinelor celulare.

Înţelegerea acestei informaţii genetice de bază reprezintă un pas important pentru elucidarea mecanismelor moleculare care au loc la nivelul acestor proteine. Mai mult, detaliile asupra organizării cromozomiale a genelor şi a elementelor reglatoare transcripţionale, contribuie la elucidarea funcţiei genice şi rolul acesteia în procese specifice. Comparaţii între genomul complet al diferitelor organisme facilitează identificarea originii moleculare care determină mecanismele celulare, comune sau specifice şi de asemenea proprietăţile fiziologice ale diferitelor specii.

Un alt nivel în cadrul cercetărilor genomice îl reprezintă identificarea micilor modificări proprii genoamelor individuale, polimorfismele uni-nucleotidice (SNPs), care sunt responsabile pentru multe diferenţe interindividuale şi implicit pentru o mare gamă de boli genetice. Diferenţele interindividuale care se evidenţiază prin intermediul SNPs la nivelul genelor specifice sunt de mare importanţă în cercetările toxicologice. Dacă gena ce codifică o enzimă care metabolizează un medicament,

este uşor diferită, activitatea catabolizatoare a enzimei corespondente ar putea suferi modificări. Rata de activare şi metabolizare a unui xenobiotic şi mecanismele de protecţie stabilesc, în ce măsură, toxicitatea se manifestă în organism.

14.2.2. Transcriptomica

Majoritatea proceselor celulare sunt controlate la nivelul expresiei genice. Determinarea exprimării genetice prin estimări ale nivelurilor ARNm, s-a dovedit importantă pentru evaluarea sintezelor proteice şi implicit a activităţii proteice (activitatea enzimatică totală care acţionează asupra unui substrat), cel puţin pentru anumite clase de enzime. În mod tradiţional concentraţiile de ARNm au fost determinate utilizând tehnici Northern blot cu nucleotide radiomarcate. Determinarea ARNm specific, extrem de sensibilă calitativ, a fost posibilă odată cu dezvoltarea revers transcrierii şi a reacţiei de polimerizare în lanţ (RT-PCR). O metodă adaptată principiului de mai sus (RT-PCR) a fost de asemenea folosită pentru a cuantifica modificările în ceea ce priveşte cantitatea de ARNm comparativ cu o genă cu expresie constitutivă („housekeeping"). Din moment ce aceste tehnici sunt extrem de laborioase şi nu sunt potrivite pentru obţinerea de rezultate pretabile standardizării, determinarea simultană a nivelurilor de expresie a multor gene nu este realizabilă. Analiza seriată a expresiei genelor (SAGE) este o metodă care este corelată cu determinarea secvenţelor de ARNm specific, prezent în cadrul unei populaţii randomizate de ARNm izolat dintr-o celulă. Recent decelarea microstucturilor care au la bază ADNc şi oligonucleotide, au fost realizate pe scară largă ca metode de expresie genică, măsurători care beneficiază de disponibilitatea unor colecţii de fragmente genice cu dispunere cunoscută a secvenţelor şi adesea cu adnotarea funcţiei lor la nivelul celulei. Pe lângă acestea, microstructurile pot fi generate de la nivelul colecţiilor de secvenţe exprimate ale markerilor (EST)-ADNc derivate din moleculele de ARNm pentru cele mai multe dintre ele funcţiile fiind încă supuse determinării. În tehnica Northen blot, capacitatea ADN-ului şi ARN-ului unicatenar de a hibridiza specific catena complementară, este utilizată pentru determinarea nivelului de ARNm al genei de studiat. Cu toate acestea, în loc de o singură genă, moleculele de ADNc unicatenare, pentru mii de gene, sunt depozitate la nivelul unui punct fix de pe suprafaţă (spre exemplu, lamă de sticlă, plastic, membrană de nailon), denumită microstructură ADNc sau cip de ADN. Prin hibridizarea microstructurii ADNc într-o baie de ARNm izolaţi, fiecare ARNm specific va fi hibridizat doar cu ADNc, la nivelul punctului care conţine ADN-ul complementar pentru fiecare genă specifică în parte. Cantitatea de ADNc hibridizat în fiecare punct poate fi detectată prin măsurarea fluorescenţei, încorporată în această mostră. O privire de ansamblu asupra evaluărilor nivelurilor de ARNm bazate pe procesul care cuprinde ADNc şi microstucturi, este prezentată în figura 14.2. În practică, 2 probe sunt întodeauna hibridizate împreună pe microfragmentul ADNc, unde una dintre

probe este marcată cu un anumit tip de fluorofor (exemplu, fluorescenţă verde) şi altă probă de referinţă sau control este marcată cu un alt tip de fluorofor (exemplu, fluorescenţă roşie). Cuantificarea ambelor tipuri de fluorescenţă permite determinarea unei rate de expresie pentru fiecare genă, din proba de cercetat comparativ cu proba de control. În timp ce o mare parte din miile de gene măsurate nu vor prezenta modificări ale nivelurilor de expresie, când probele provenite de la bolnavi sau trataţi sunt comparate cu cele de control, genele găsite ca induse sau reprimate aduc o multitudine de informaţii asupra mecanismelor celulare care sunt afectate la nivelul expresiei genice de către boală sau din contră de către acţiunea terapiei medicamentoase. DeRisi şi colab,(1997) prezintă detalii mai amănunţite asupra tehnologiilor care folosesc microstructurile ADNc.

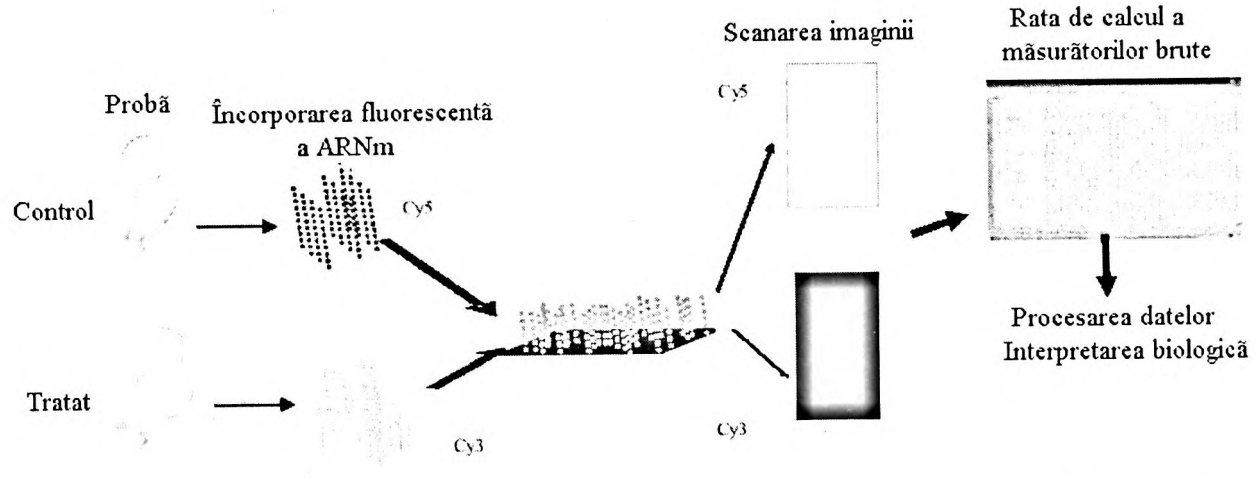


Fig.14.2. Măsurători transcriptomice bazate pe microstructurile de ADNc. ARNm extras din fragmente tisulare este marcat fluorescent şi hibridizat la o microstructură ADNc, care conţine mii de molecule ADNc diferite în poziţii fixate. Scanarea microfragmentelor are drept rezultat două imagini care sunt cuantificate şi utilizate pentru a calcula expresia relativă a genelor la nivelul unui ţesut comparativ cu fragmentul tisular de control.

14.2.3. Proteomica

Nu toate mecanismele celulare pot fi măsurate în ceea ce priveşte nivelul de ARNm. Modificarea rapidă a redistribuirii subcelulare a proteinelor deja prezente la nivelul celulei, ar putea fi necesară, în special în ceea ce priveşte mecanismele protectoare de răspuns celular. Tehnologiile de analiză proteică ar putea permite o vizualizare mai bună a proceselor care nu implică biosinteze active, sau cel puţin, vor putea fi complementare analizei de expresie genică. Termenul de „proteom" este utilizat pentru a nota întreaga populaţia completă de proteine exprimate într-o celulă.

Pe lângă transcriptomică, tehnologiile proprii proteomicii pot fi aplicate pentru măsurarea simultană a miilor de proteine dintr-o celulă. Din moment ce proteinele acţionează cu precădere în reacţiile celulare mai degrabă decât în

transcripţia genică, proteomica se va dovedi a fi mai importantă decât determinările transcriptomice.

Determinarea proteomului este mai complexă decât transcriptomica, unde populaţia totală de ARNm poate fi izolată deodată şi, relativ uşor, miile de elemente de transcripţie care diferă doar în secvenţa nucleotidică, sunt sortate în procesul hibridizării microfragmentelor ADNc. În contrast, separarea tuturor proteinelor diferite dintr-o celulă reprezintă o sarcină extrem de complicată, deoarece proteinele au proprietăţi diferite (masă, punct izoelectric (pI), solubilitate, stabilitate, etc.). Modificările posttranslaţionale şi capacitatea de a forma complexe proteice nu pot fi trecute cu vederea în abordarea proteomicii. Variate metode au fost dezvoltate în cercetarea proteomică.

Prima generaţie de metode proteomice combină tehnicile, relativ vechi, de electroforeză bidimensională în gel de agaroză cu dezvoltarea tehnicilor puternic automatizate de analiză software, evoluează către spectrometria de masă şi schimbul global de informaţii care are la bază Internetul. Cantitatea totală de proteine dintr-o probă este mai întâi separată pe baza punctului izoelectric al proteinelor, folosind o lamă cu un gradient de pH imobil ataşat. Gradiente diferite de pH pot fi alese pentru a obţine o clasificare exactă a elementelor de interes. După axarea pe activitatea izoelectrică, proteinele sunt transferate pe un gel de poliacrilamină, şi având la bază masa proteică se efectuează separarea prin gel electroforeza standard. Proteinele separate sunt apoi vizualizate folosind marcarea fluorescentă sau cu argint. Gelurile sunt scanate, imaginile sunt analizate cu tehnologii de software specifice şi volumele cuantificate.

Drept exemplu, imaginile gel caracteristice reprezintă modele proteice obţinute atât din ficat provenind de la şobolani de control dar şi de la cei expuşi la hepatotoxicul, bromobenzen (fig.14.3). Consecutiv, din gel se pot izola puncte de interes, ulterior purificate şi anlizate prin mijloace de spectrometrie de masă. Proteinele pot fi identificate după o fragmentare specifică (spre exemplu, digestia cu tripsina), care generează fragmente peptidice cu o masă extrem de specifică determinată prin tehnica ionizării prin desorbţie de matrice cu ajutorul laserului şi calculul masei prin măsurarea timpului de zbor (MALDI-TOF-MS). Modelul de fragmentare este apoi utilizat pentru identificarea proteinei care corespunde acestui model dintr-o bază de date în care sunt introduse modele fragmentare prestabilite ale tuturor secvenţelor proteice cunoscute.

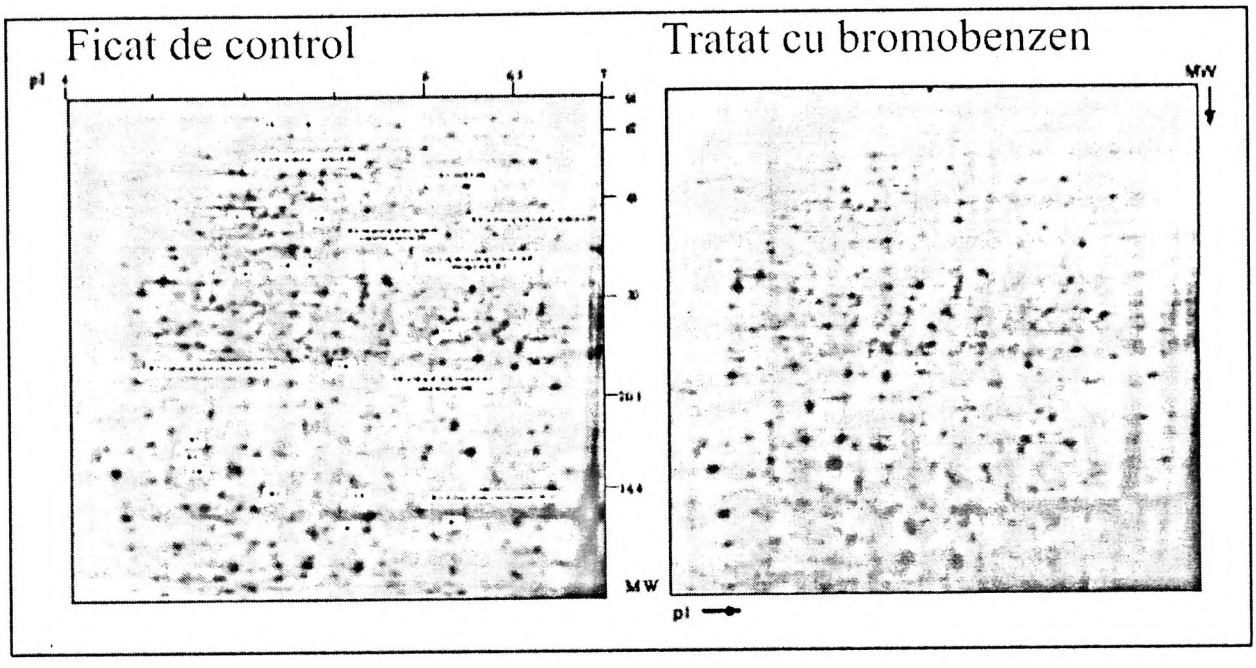


Fig.14.3. Imagini de gel electroforeză bidimensionale ale măsurătorilor proteomice. Este prezentată compoziţia proteică a ficatului de şobolan fără (imaginea 1) şi cu (imaginea 2) tratament cu bromobenzen.

De asemenea, secvenţionarea peptidică poate fi realizată prin tehnicile MS/MS pentru a confirma, şi mai mult, identitatea proteică. În lipsa izolării din gel (tehnică practicată actual) punctele proteice pot fi identificate funcţional pe baza unei asemănări cu o altă proteină identificată anterior în exact aceeaşi poziţie, într-un gel de referinţă.

O altă metodă proteomică, aflată încă în cercetare, este reprezentată de aplicarea microregiunilor proteice într-o manieră comparabilă cu cea a microfragmentelor ADNc din transcriptomică. Proteinele sau anticorpii antiproteine sunt decelaţi pe o suprafaţă solidă şi utilizaţi pentru a lega specific proteinele marcate la o probă. Un mare dezavantaj al acestei tehnici în comparaţie cu microfragmentele

ADNc o constituie variaţia afinităţii de legare printre proteine. Condiţii optimizate de legare pot fi aplicate doar pentru o parte din proteine, iar legarea în condiţii suboptime va genera rezultate părtinitoare. Recent, s-au dezvoltat metode care aplică aceste diferenţe de afinitate de legare pentru a sorta proteinele în funcţie de acestea. Acest fapt permite separarea proteinelor bazată doar pe câteva proprietăţi caracteristice, însă nu separă toate proteinele din mixtura izolată dintr-o celulă.

Diferiţi produşi chimici de suprafaţă sunt utilizaţi pentru a atrage proteinele în regiuni în care apoi vor fi direct analizate prin spectrometrie de masă. Ca exemplu oferim tehnica ICAT®, care oferă o dispoziţie diferită a două probe proteice, folosindu-se de cromatografia lichidă-MS/MS cu markeri de afinitate codificaţi izotopic, şi SELDI (desorbţia/ionizarea de suprafaţă laser dependentă).

14.2.4. Metabolomica

Derularea proceselor celulare este adesea reflectată de către nivelurile de metaboliţi care pot fi determinate atât în celulă cât şi în fluidele extracelulare. Reacţiile biochimice din celulă pot fi studiate, în timpul şi după, desfăşurarea lor prin monitorizarea apariţiei respectiv dispariţiei produşilor de reacţie. Dinamica proceselor celulare poate fi monitorizată utilizând profilul metaboliţilor. Procese precum metabolizarea şi biotransformarea xenobioticelor, pot fi urmărite, şi de asemenea clerance-ul metaboliţilor poate fi determinat în urină. Un alt avantaj important îl reprezintă faptul că, metodele noninvazive pot fi folosite pentru colectarea de probe de sânge (plasmă), urină sau alte fluide corporale. Acestea cresc cu mult aplicabilitatea atât în experimentele animale cât şi în cele efectuate pe om. Recent, analiza RMN a fost de asemenea realizată pe ţesuturi şi celule.

Tehnicile de spectometrie de masă (gaz cromatografia/MS) permit determinarea unor concentraţii scăzute ale componentelor individuale. Pentru un screening global spectroscopia H1-RMN reprezintă o abordare atractivă, deoarece o mare varietate de metaboliţi poate fi cuantificată concomitent fără a fi necesară prepararea de probe costisitoare. Este obţinut un spectru cu vârfuri de rezonanţă caracteristice pentru toate biomoleculele de mică dimensiune. În acest mod este obţinută o amprentă metabolică caracteristică fluidului biologic aflat în studiu. Semnalele individuale pot fi cuantificate şi identificate în spectru pe baza unui spectru de referinţă disponibil. Spectrul RMN al fluidelor biologice este foarte complex datorită mixturii de numeroşi metaboliţi prezenţi în aceste fluide. Variaţiile între probe sunt adesea prea reduse pentru a fi recunoscute cu ochiul liber.

Cu scopul de a îmbunătăţi gradul de comparabilitate al spectrului RMN, şi prin urmare de a maximiza certitudinea analizei consecutive a datelor, un algoritm liniar parţial ajustează micile modificări din spectru şi menţine totodată rezoluţia. Pentru a descoperi diferenţe semnificative este necesară o analiză a datelor multivariată pentru a explora modelele recurente dintr-un număr de spectre RMN. Un factor de spectru este utilizat pentru a identifica vârfurile RMN ale metaboliţilor care diferă în urina unui subiect supus terapiei comparativ cu un subiect de control (fig.14.4). Corelaţiile dintre elementele variabile din complex şi multitudinea de date (mii de semnale în spectru) sunt relaţionate cu o ţintă variabilă cum este statusul toxic. Combinaţia profilului MS cu analiza multivariată a datelor oferă o metodologie de amprentare puternică.
O alăturare a tehnicilor analitice este de dorit pentru o analiză completă a unei mixturi complexe de metaboliţi [Robertson, Orrenius , 2000; Holmes şi colab., 2001].

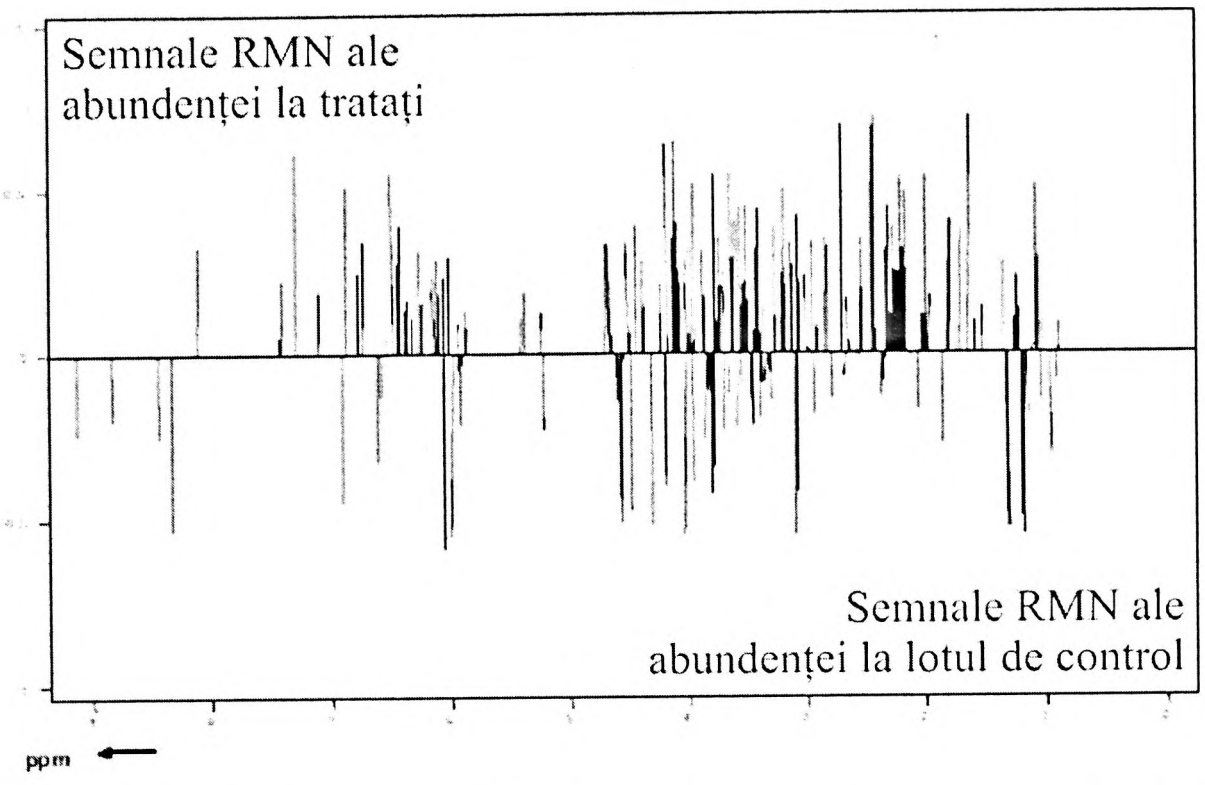


Fig.14.4 Amprenta metabolică. Acest factor de spectru vizualizează diferenţele dintre modelele RMN ale urinii de şobolan cu şi fără tratament toxic inductor. Vârfurile reprezintă metaboliţii care diferă în conţinut între cele două probe.

14.2.5. Procesarea datelor și bioinformatica

Manevrarea datelor obţinute în urma experimentelor desfăşurate la scară mare necesită echipamente de procesare a datelor şi algoritmi. Informatica de laborator care descrie condiţiile experimentale ar trebui înmagazinată şi păstrată imediat [spre exemplu, Sistemul de Management al Informaticii de Laborator(LIMS)] şi organizată într-o manieră care să permită accesul facil. Rezultatele experimentale ar trebui corelate cu informaţiile experimentale şi dipuse într-o manieră organizată folosind o aplicaţie a computerului denumită depozit de date (data warehouse). Procesarea datelor include corecţii (în majoritate tehnice) ale factorilor care influenţează datele, dar nu reprezintă condiţiile supuse studiului. Filtrarea măsurătorilor incerte este esenţială pentru îmbunătăţirea bazei de date. Cuantificarea raportului semnal per zgomot (signal to noise) şi aplicarea unor limite mai scăzute ar putea conduce la excluderea semnalelor slabe din interpretările ulterioare. Deviaţii specifice introduce în baza de date spre exemplu, datorate eficienţei fluorescenţei încorporate, sunt corectate folosind proceduri normalizatoare. Procesarea greoaie a datelor depinde de utilizarea atât a aprecierilor despre originea tehnică cât şi biologică.

În transcriptomică, se presupune frecvent, că majoritatea dintre miile de gene nu-şi schimbă nivelul de expresie în urma modificărilor (modeste) apărute în condiţii experimentale. Standardizarea, normalizarea sau gradarea sunt

metode aplicate pentru a transforma bazele de date în forme apte de a fi comparate între ele în ceea ce priveşte măsurătorile interne şi cele provenite din surse externe. Deviaţiile sistematice care derivă din variate surse tehnologice ar trebui corectate. După procesarea brută a datelor, sunt obţinute fişiere secundare care ar trebui salvate alături de cele care descriu metodele de analiză a datelor.

O nouă provocare pentru cercetarea biomedicală o constiutie transformarea bazelor mari de date, cu cantităţi mari de zgomot şi fără o însemnătate biologică evidentă în descoperiri relevante, care să includă selecţia unor subseturi dintre miile de gene, proteine sau metaboliţi care să aibă caracteristici biologice relevante. Acele subseturi vor putea fi supuse unor cercetări ulterioare elaborate. Tehnici matematice sunt aplicate pentru a aglomera datele în grupuri interpretabile sau modele structurate.

Metodele aplicate în acest scop, algoritmi de agregare asemenea agregării ierarhice (fig.14.5), metoda de clusterizare folosind media (K-mean) şi hărţi cu auto-organizare, apreciază gradul de similaritate dintre profilele de expresie ale genelor.

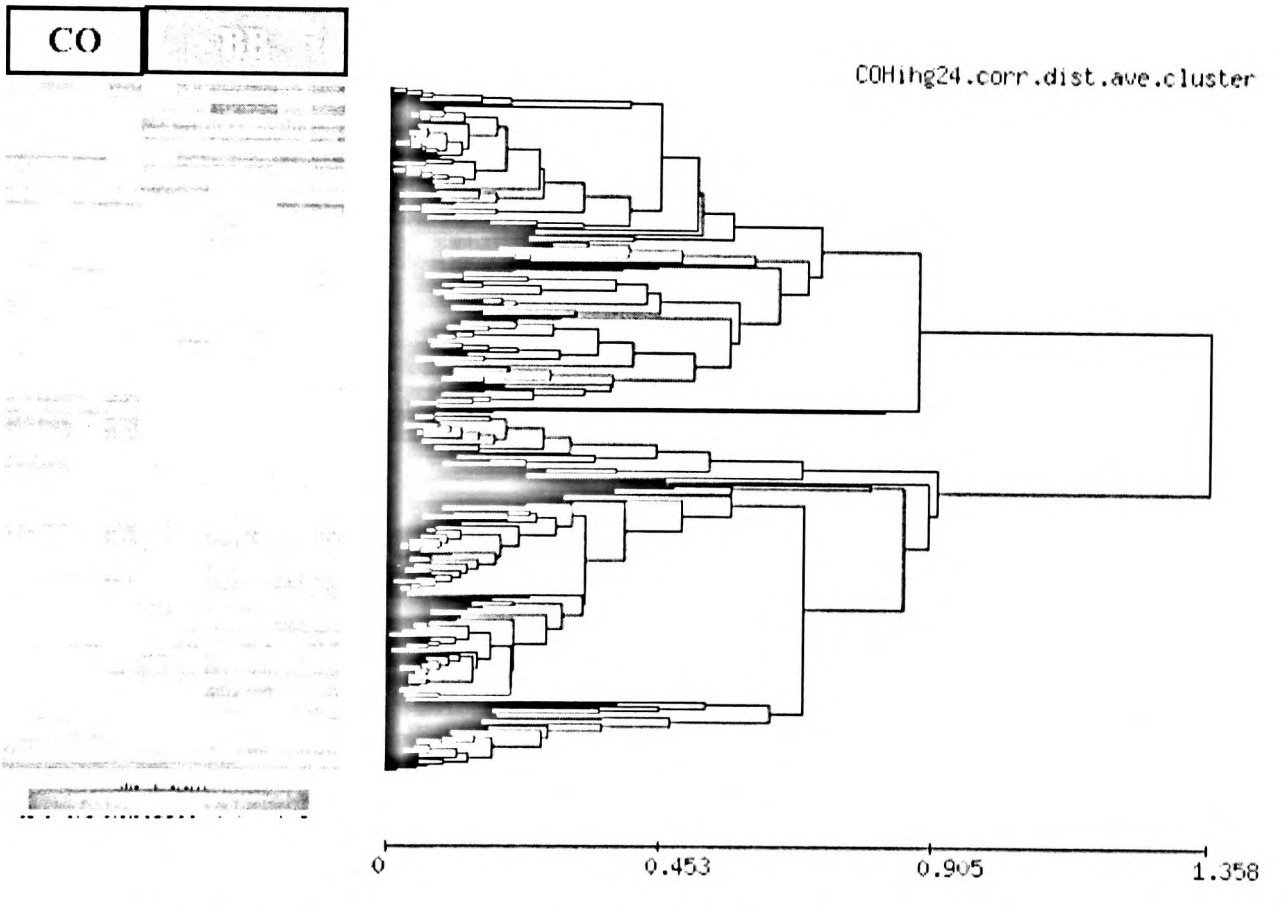


Fig.14.5. Dendrograma agregatelor ierarhice ale datelor transcriptomice provenind din observarea ficatului şobolanilor netrataţi, de control-la care s-a administrat ulei de porumb (CO) şi şobolanii trataţi intens cu bromobenzen (BB). Genele sunt ierarhizate orizontal, în timp ce coloanele, reprezintă fiecare o probă diferită. Intensităţile diferite ale culorii gri corespund nivelurilor de expresie genice crescute şi respectiv scăzute.

Agregatele reprezintă dispuneri ale genelor care se comportă mai asemănător între ele comparativ cu genele provenind din afara aglomerării. Numărul de aggregate formate poate fi introdus în baza de date sau poate fi determinat automat prin utilizarea algoritmilor de agregare. Odată ce subtipurile au fost decelate acestea sunt analizate în ceea ce priveşte modificările induse de condiţiile de mediu, iar moleculele din aceste subtipuri sunt mai departe analizate în ceea ce priveşte relevanţa lor biologică. Alte metode asemenea analizei componentelor principale (PCA) determină structura intrinsecă din interiorul bazei de date, fără cunoştinţe anterioare. Beneficiind de asemenea metode o comparaţie directă între bazele de date este realizată iar subbaze de date sunt obţinute doar pe baza similarităţii spectrelor RMN.

Metodele supervizate asemenea analizei pătratelor parţiale (PLS) şi analizei discriminante a componenţilor majori sunt mijloace mult mai eficiente, care folosesc informaţie adiţională în baza de date precum date biochimice, histopatologice sau clinice pentru a identifica diferenţele dintre grupurile predefinite. Pentru o detaliere a diferitelor metode de analiză a datelor din genomica funcţională vă recomandăm să citiţi Brazma, Vilo , (2000); Fielden şi colab., (2002).

14.2.6. Interpretarea biologică

Nu este posibil să analizăm datele de expresie una câte una, pentru o singură genă sau bază proteică deoarece aceasta ar determina pierderea unei cantităţi mari de informaţii care rezultă din coerenţa datelor colectate în urma unui studiu. Relaţia dintre genele şi proteinele exprimate în anumite situaţii, luând în considerare timpul, localizarea şi condiţiile experimentale sunt cele mai valoroase informaţii care se pot obţine prin studiile genomice funcţionale. Determinarea nivelului de expresie genică, proteine sau metaboliţi nu este suficientă pentru a căpăta un profil biologic intern complet al celulei. Studierea interacţiunii şi integrării diferitelor entităţi biologice este de mare importanţă în descifrarea mecanismelor celulare. Descoperind interacţiunile intracelulare, proprii unei celule, poate fi realizat în consecinţă un model complex, dinamic al căilor celulare. Modificările observate la nivel celular/molecular devin biologic relevante doar dacă se reflectă asupra fiziologiei organismului.

Funcţionalitatea este asumată odată cu interpretarea modificărilor care apar la nivelul exprimării; cu toate acestea, la final, această funcţionalitate trebuie determinată şi la nivel fiziologic.

Privind efectele (asupra fiziologiei) ale anumitor boli genetice, cercetătorii pot privi din interior fenomenul funcţionalităţii genelor care sunt afectate. Spre exemplu, mutaţia unei gene poate avea efecte asupra componentelor din aval, dintr-un mecanism celular, reglat de către gena care a suferit mutaţia. O altă abordare o constituie examinarea funcţiei fiecărei gene, una câte una, cu ajutorul deleţiei unei gene, realizând aşa numitele lanţuri

knockout ale organismului. O mare varietate de aspecte fiziologice şi comportamentale sunt monitorizare fără elaborarea unei ipoteze *a priori.*

Teoria conform căreia cunoaşterea funcţiei unor gene individuale ar fi suficientă pentru înţelegerea mecanismelor complete pe care le presupun aceste gene, este încă discutabilă.Tehnologiile genomice funcţionale sunt concepute ca tehnologii la scară largă de mare capacitate. În consecinţă s-au obţinut cantităţi mari de informaţii (tabelul 4.1), deşi cu un nivel tipic, oarecum scăzut, de încredere din punct de vedere cantitativ şi comparativ cu determinările realizate la nivelul unei singure gene sau proteine. Cu toate acestea, tehnologiile de care vorbeam şi-au dovedit din plin utilitatea în ceea ce priveşte monitorizarea holistică a efectelor, aflarea unor rezultate surprinzătoare şi generarea de ipoteze şi mecanisme de acţiune. Însă, descoperirile majore despre modificările biomoleculelor specifice sau proceselor rămân de confirmat şi investigat, mai mult cu ajutorul unor metode specifice. Aceste fapte necesită de asemenea implicarea unor experţi cercetători din domenii de cercetare specifice, a unei expertize elaborate şi implicit a unui echipament complex.

Tehnici cum este RT-PCR cantitativă şi Northern blot sunt utile pentru validarea tehnică, dar asemenea microregiunilor ADNc, determină niveluri ale ARNm care au doar valoare predictivă. Tehnica Western blot şi tehnicile imunologice (ELISA) pot fi utilizate pentru a confirma prezenţa nivelurilor de proteine în mostre, având o acurateţe mai mare decât tehnologiile proteomice bidimensionale bazate pe gel, cel puţin aunci când ne referim la nivelul de proteine totale. Un dezavantaj al determinărilor unice de genă sau proteină este reprezentat de pierderea de informaţie din parametrii circumstanţiali, precum genele care sunt în relaţie de interdependenţă cu cea studiată. În cel mai bun caz, sunt determinate nivelurile a cel puţin una sau două proteine adiţionale de referinţă în plus, iar aceste determinări se realizează sub premiza că acestea nu se modifică în condiţiile experimentale (aşa numitele proteine „housekeeping"). Cu toate acestea genele şi proteinele chiar dacă se apreciază că sunt prezente la un nivel constant, indiferent de condiţii, de fapt prezintă variaţii ale expresiei în anumite circumstanţe. Determinarea în sine a nivelului proteic nu oferă probe pentru implicarea efectivă a proteinelor în mecanismele celulare.

Teste specifice pentru activitatea enzimatică ne oferă o confirmare în plus ce determină capacitatea funcţională a proteinelor (enzimelor) din mostră. Mai mult, nivelul de metaboliţi oferă informaţii asupra reacţiilor biochimice care au avut déjà loc. Cea mai relevantă confirmare biologică a modificărilor o reprezintă relaţionarea lor cu efectele fiziologice. Doar la acest nivel modificările au relevanţă şi prezintă consecinţe asupra organismului. Modificările expresiei genice şi proteice sau ale conţinutului în metaboliţi pot fi desemnate drept efecte adverse după corelarea cu efectele fiziologice cunoscute ca însoţind stările toxice.

Tabelul 14.1 Referinţe privind genele şi tehnologiile genomice

Swissprot	http://us.expasy.org/
Institutul European de Bioinformatică (EBI)	http://www.ebi.ac.uk/
Profilare a expresiei la EBI	http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST
NCBI's Unigene, GenBank, OMIM, etc.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
GeneCards	http://bioinfo.wiezmann.ac.il/cards/
Hărţi genetice KEGG	http://www.genome.ad.jp/kegg/
Hărţi genetice Biocarta	http://www.biocarta.com/genes/index.asp

14.3. Integrarea tehnologiilor genomice funcţionale în toxicologie

Toxicologia poate fi definită drept distorsionarea proceselor biologice dintr-un organism, organ sau celulă. Mii de expresii ale genelor sau proteinelor şi diferite niveluri de metaboliţi, dintr-o mostră, caracterizează statusul specific al probei în cauză. Prin urmare, prin investigarea mecanismelor celulare/moleculare proprii unei celule, tehnologiile genomice funcţionale pot fi de reală valoare în toxicology precum şi în alte ştiinţe care se ocupă de studiul vieţii. Profilele expresiei genice, spre exemplu, pot fi folosite la descoperirea mostrelor expuse la diferite clase de substanţe toxice, pot prezice toxicitatea unor compuşi necunoscuţi şi pot contribui la studiul mecanismelor celulare ce pot determina efecte toxice, sau pot deriva din efectele toxice. În schimb, transcriptomica, reprezintă un mecanism foarte bun pentru evaluarea răspunsurilor toxice [Bulera şi colab., 2001].

În subcapitolele ce urmează vor fi discutate aplicaţiile majore ale tehnologiilor genomice funcţionale care prezintă un potenţial uriaş pentru îmbunătăţirea ştiinţele toxicologice.

14.3.1. Elucidarea mecanismelor

Interacţiunile dintre genele şi proteinele aflate la baza majorităţii proceselor biologice şi expresia coordonată a genelor sau proteinelor, în circumstanţe specifice, oferă o indicaţie asupra relaţiei dintre molecule într-un mecanism biologic. Un mecanism toxic poate prin urmare să fie reconstruit la nivel molecular prin urmărirea modificărilor de la nivelul expresiei genice care interacţionează sau se influenţează reciproc. Cum mii de molecule sunt investigate simultan, şansa de a identifica molecula ţintă care declanşează un efect toxic la interacţiunea cu xenobioticul, a crescut azi simţitor. Această moleculă ţintă poate fi un receptor celular care iniţiază un efect advers în celulă la ataşarea ligandului (xenobiotic). Experimentele transcriptomice se pot realiza cu scopul de a identifica organele sau organitele, dintr-un organism, care pot forma cel mai uşor situsurile ţintă ale efectelor adverse, fără informaţii

anterioare. Evaluarea multi-organică inițială poate ajuta la decelarea unor modificări caracteristice ale expresiei genice care pot indica organele ce ar trebui alese pentru studii ulterioare toxicologice amănunțite, limitând prin urmare numărul acestor studii extrem de laborioase.

14.3.2. Amprentarea transcriptomică și aprecierea toxicității

O aplicație extrem de avantajoasă a toxicogenomicii poate fi reprezentată de recunoașterea proprietăților toxice, în stadii incipiente, la candidații pentru screening medicamentos. Programele de producere a medicamentelor dezvoltă noi compuși activi ca și candidați pentru diverse terapii, la o rată extrem de crescută, folosind tehnologii precum chimia combinatorie. Mulți dintre miile de compuși nou-sintetizați nu vor ajunge niciodată pe piață, în timp ce doar câțiva, vor fi selectați ca medicamente potențiale, și vor fi evaluați într-un program extrem de elaborat, cu întindere mare în timp și costuri ridicate, care să testeze eficacitatea și toxicitatea.

Alegerea pacienților pentru testarea medicamentelor pentru eventuale efecte toxice poate oferi un criteriu valoros pentru o selecție precoce. Determinarea profilelor expresiilor proteinelor sau genelor, realizate în urma expunerii compușilor la diferite substanțe pot fi utilizate ,asemenea amprentării pentru a clasifica compușii în funcție de asemănare în ceea ce privește comportarea în urma expunerii la substanțe toxice cunoscute (model). Baze mari de date realizate cu informațiile obținute prin integrarea acestor profile expresionale, permit clasificarea modelului de expresie din mostra care prezintă interes toxicologic în ceea ce privește potența toxicului, tipul de mecanism, organele țintă, doza și timpul de expunere.

Prin urmare un nou compus poate fi clasificat din punct de vedere toxic, în funcție de răspunsul transcripțional la substanțele toxice comune. Această aplicabilitate specifică a fost denumită toxicogenomică în anumite publicații, înglobând astfel un conținut mult mai restrâns.

14.3.3. Identificarea markerilor primari ai toxicității

Din moment ce modificările de expresie a mii de gene și proteine sunt azi determinate, se așteaptă identificarea de noi markeri genici sau proteici, specifici, care pot detecta sau chiar prezice anumite tipuri de toxicitate. Cu toate acestea, pentru a diferenția ușor diferitele tipuri de mecanisme moleculare care au condus la rezultate toxice similare, nu vor fi suficienți doar markerii de toxicitate specifici unei singure gene sau proteine. Probabil că niveluri de expresie ușor alterate ale multor gene determină mecanismul de toxicitate, necesitând măsurători precise și pe scară largă a modelelor de expresie a mii de gene și proteine.

Un model pluricelular al expresiei genice și proteice, în analogie cu amprentarea, poate fi utilizat pentru a discerne o celulă sănătoasă de una aflată în diferite faze de distorisiune net diferită de una normală. Cunoașterea

profilului metabolitului aduce un avantaj în plus toxicologiei şi farmacologiei din moment ce toxicul (prin metaboliţii săi) sau medicamentele pot fi detectate în plasmă sau urină şi permit aprecierea gradului de expunere sau pot confirma succesul terapiei.

14.3.4. Extrapolările realizate interspecii

Deşi sunt foarte diferite sub multe aspecte, animalele de laborator şi oamenii incluşi în trialurile clinice prezintă caracteristici extrem de similare la nivel molecular. Majoritatea genelor identificate la oameni sunt de asemenea prezente la alte organisme precum şoarecii sau şobolanii.

Unele gene sunt identice la specii diferite, în timp ce genomul omului şi şobolanului prezintă o similaritate de peste 90%. Utilizând tehnicile de biologie moleculară sau toxicogenomică, similaritatea la nivel molecular se va dovedi un beneficiu mare în ceea ce priveşte extrapolarea rezultatelor. În timp ce răspunsurile fiziologice ar putea fi diferite, mecanismele moleculare evidenţiate ar putea coincide într-o măsură foarte mare între diferitele specii.

14.3.5. Etrapolarea din experimentele *in vitro* la situaţiile *in vivo*

În timp ce efectele toxicităţii asupra fiziologiei nu pot fi identificate *in vitro*, mecanismele moleculare care probabil conduc la apariţia acestor efecte pot fi studiate prin intermediul acestor experimente. În funcţie de sistemul model *in vitro* ales, procesele moleculare sunt mai mult sau mai puţin conservate. Adiţional circumstanţele de realizare a experimentelor *in vitro* pot fi controlate şi monitorizate într-o manieră mai precisă decât cele *in vivo*.

14.3.6. Reducerea utilizării animalelor de laborator

Odată cu posibilitatea de a măsura parametrii celulari multiplii în detaliu, şansa de a observa detaliile toxicităţii este mult crescută. Refacerea multor măsurători ar putea fi necesară pentru a stabili, cât mai precis, modificările la nivelul unui marker empiric al toxicităţii. Este de aşteptat ca odată cu noile tehnologii ale biologiei moleculare, experimentul de generare a efectelor nu va mai trebui refăcut de atâtea ori, dacă sunt descifrate şi înţelese mecanismelor celulare.

Pe lângă acestea, toxicogenomica ne-ar putea ajuta la identificarea efectelor folosind modele alternative mai degrabă decât animale vii. Recunoaşterea precoce a toxicităţii scade utilizarea metodelor de laborator costisitoare şi de lungă durată. În special, atunci când evaluăm proprietăţile carcinogenetice ale compuşilor, putem să preconizăm o ameliorare considerabilă.

14.3.7. Toxicologia combinatorie

Este de aşteptat ca efectele nocive să fie cauzate de mai mult de o singură substanţă la nivelul amestecurilor complexe, cum sunt poluanţii de

mediu. O analiză corectă a toxicităţii acestor mixturi este azi greu realizabilă. Pentru a evalua efectele toxice însumate ale compuşilor, ar trebui realizate studii elaborate care să includă atât expunerea indivizilor la substanţe chimice unice dar şi la combinaţii. De cele mai multe ori markerii descriptivi empirici ai toxicităţii sunt monitorizaţi, dar discriminarea efectelor aditive şi sinergice în diferitele grupuri de tratament este limitată. Tehnologiile genomice funcţionale permit monitorizarea a mii de efecte şi cresc probabilitatea de a găsi efecte diferite ale expunerii. Mecanismul efectelor combinate poate fi studiat şi/sau prezis la nivel molecular. Când molecule similare sau căi celulare se dovedesc a fi ţinte ale diferitelor substanţe din mixtură, este de aşteptat să apară efecte sinergice sau aditive. Când modificările sunt povocate la nivelul diferitelor căi biologice, nu este de aşteptat intervenţia directă a compuşilor de mixtură. Cu toate acestea, datorită complexităţii unui organism, efectele secundare ar putea influenţa alte mecanisme ale toxicităţii. Spre exemplu o depleţie xenobiotic indusă a sistemului antioxidant de apărare intracelulară ar putea coborî valoarea prag de injurie din partea altor xenobiotice care au primar alte situsuri ţintă. În prezent, Heijne şi colab.,(2004) studiază efectele fiziologice ale expunerii combinate la aditivi alimentari, în combinaţie cu o abordare transcriptomică.

Utilizarea aditivilor alimentari este autorizată în Uniunea Europeană cu condiţia de a nu leza în nici un fel consumatorii. Consumarea aditivilor alimentari individuali este sigură în condiţiile în care nu s-a observat nici un efect advers (NOAEL). Cu toate acestea normele NOAEL folosite pentru evaluarea riscurilor consumului acestor aditivi au adesea la bază ştiinţe empirice, inclusiv chimia clinică şi patologia. Însă, sunt puţine informaţii despre potenţialele efecte asupra sănătăţii ale aditivilor consumaţi simultan sau diferit de normele NOAEL. Recent a fost efectuată o evaluare pentru a decela potenţialele interacţiuni care au loc între peste 300 de aditivi alimentari aprobaţi [Groten şi colab., 2000]. Acţiuni posibil combinate nu au putut fi excluse pentru patru aditivi alimentari, care au ficatul drept organ ţintă.

Pentru a evalua efectele create de o expunere joasă la mixturile toxice, şobolanii au fost expuşi timp de 28 de zile la concentraţii scăzute de aditivi alimentari selectaţi, care cauzează efecte hepatice (inducţia enzimelor cu rol în metabolizarea medicamentelor şi hepatomegalie) la concentraţii mai mari însă decât cele utilizate în studiul făcut de Heijne şi colab.,(2004). Efectele asupra ficatului induse de aditivii alimentari sunt destul de subtile şi de aceea au fost explorate modificările ce au loc la nivelul expresiei genice. Experimentele transcriptomice pentru patru compuşi au oferit o multitudine de informaţii biologice, incluzând schimbări ale enzimelor cu rol de metabolizare a medicamentelor, proliferarea peroxozimilor şi alterarea căilor metabolice ADN dependente. Menţionăm că descoperirile transcriptomice au putut fi confirmate la nivel biochimic. Rezultatele vor fi folosite la evaluarea interacţiunilor expunerii combinate la aceşti aditivi alimentari.

Prin urmare, aplicabilitatea mecanismelor de producţie toxicogenomice se va realiza la nivel molecular acolo unde nu s-a putut face identificarea cu ajutorul tehnicilor convenţionale. Studii ale unor mixturi ale acestor aditivi alimentari se află în desfăşurare şi vor fi utilizate pentru a evalua ipotezele formulate în urma studiilor pe compuşi unici.

14.4. Aplicaţiile toxicogenomicii în studiul mecanismului hepatotoxicităţii indusă de bromobenzen

Toxicitatea hepatică este azi monitorizată de rutină cu ajutorul unei largi game de parametrii determinaţi empiric. Modificările de greutate hepatică şi observaţiile patologice, cum sunt culoarea sau textura tisulară sunt indicatori nonspecifici ai toxicităţii. Toxicitatea hepatică specifică cum este necroza, hipertrofia, colestaza, steatoza, hepatita şi hiperplazia implică modificări celulare mai specifice la nivel celular şi molecular. Atunci când apare necroza, hepatocitele se rup iar distrucţia membranară conduce la scurgerea enzimelor intarcelulare în fluidele extracelulare.

Fosfataza alcalină, lactat dehidrogenaza şi aminotransferazele sunt enzime utilizate adesea ca indicatori ai necrozei hepatice. Valoarea tehnologiilor funcţionale genomice reflectată asupra toxicologiei este ilustrată printr-un studiu care demonstrează hepatotoxicitatea bromobenzen indusă la şobolani [Heijne şi colab., 2003]. Scopul studiului a fost acela de a elucida mai bine, mecanismul toxicităţii şi de a identifica proteinele şi genele, markeri specifici ai hepatotoxicităţii. Toxicitatea acută hepatică (24h) a fost indusă de către bromobenzen, iar nivelurile de expresie genică şi proteică au fost determinate la nivelul ficatului. La doze mari de bromobenzen, glutationul celular hepatic scade, evocând procese secundare cum sunt peroxidarea lipidică, care conduce în ultimă instanţă la moartea celulară. În plus, toxicitatea bromobenzenului a fost corelată cu legarea covalentă a metaboliţilor reactivi de bromobenzen la proteinele endogene, în special la cele care conţin grupări sulfidril [Koen şi colab., 2000]. Tratamentul cu bromobenzen a alterat modelul expresiei genice din ficatul de şobolan, aşa cum arată determinarea PCA şi analiza agregatelor (fig. 14.5). Animalele de control la care s-a injectat ulei de porumb, nu au putut fi diferenţiate de grupul animalelor netratate. Importanţa depleţiei nivelului intracelular de GSH datorată hepatotoxicităţii indusă de bromobenzen a fost coroborată cu decelarea unor grade diferite de expresie ale genelor implicate în metabolismul GSH. Subunităţile GST, care catalizează conjugarea metaboliţilor reactivi la GSH, au fost reglate ca şi γ-glutamilcistein sintetaza, care este enzima de limitare a sintezei GSH. La verificare, s-a observat o creştere semnificativă a activităţii GST enzimatice la nivelul fracţiilor citosolice din ficatul de şobolan tratat cu bromobenzen comparativ cu grupul de control. Inducţia epoxid hidroxilazei microsomale este corelată cu rolul acesteia în hidroxilarea intermediarilor de epoxidbromobenzen.

Alte enzime specifice metabolizării medicamentoase au fost de asemenea modificate. S-a arătat că multe dintre genele induse au fost sub controlul transcripţional al elementului de răspuns electrofil (EpRE, cunoscut anterior ca ARE) [Tsuji şi colab., 2000]. Inducţia genică specifică precum hem oxigenaza-1, peroxidoxina1, metalotioneinele, feritina şi TIMP1 indică prezenţa stresului oxidativ.

Doza crescută de bromobenzen facilitează clar un răspuns bine cunoscut cum este răspunsul de fază acută. Tehnologia proteomică care foloseşte gel electroforeza bidimensională a fost utilizată pentru a separa mostrele de proteine din ficat. În figura 14.5(A) este prezentat modelul proteic obţinut de la un animal netratat. Figura 14.5(B) prezintă o analiză gel bidimensională tipică a proteinelor hepatice dintr-un ficat al unui şobolan tratat cu bromobenzen. Modificări semnificative focale au fost identificate în MS. Printre altele, s-a observat că bromobenzenul induce o creştere a aldehid-dehidrogenazei 2 mitocondriale, şi o scădere în stocurile proteinei de şoc termic 60 şi a subunităţii proteice β a ATP-azei. Bromobenzenul a indus specific o modificare a conformaţiei proteice, de la proteine cu greutate moleculară mare către proteine cu greutate moleculară mică şi transcripţia genică a multor factori implicaţi în sinteza proteinelor cum ar fi proteinele ribozomale, iniţierea translaţiei şi factorii de elongare care sugerează o rată crescută a turnoverului proteic. Probe de plasmă şi urină au fost colectate de la şobolanii expuşi la bromobenzen. Spectrul RMN plasmatic şi urinar al şobolanilor trataţi cu bromobenzen a fost diferit faţă de cel obţinut din probele de control.

14.5. Concluzii

Toxicogenomica definită ca o aplicaţie şi un element de integrare al transcriptomicii, proteomicii şi metabolomicii în toxicologie, va servi multor scopuri în ceea ce priveşte recunoaşterea şi tratarea toxicologiei la nivel molecular. Mai întâi este important ca descoperirile experimentelor funcţionale genomice să fie puse în legătură cu cunoştinţele deja existente şi determinările toxicologice convenţionale. Rezultate ale laboratoarelor de specialitate arată că un progres uriaş în domeniul toxicologiei se va realiza odată cu dezvoltarea tehnologiilor funcţionale genomice.

Mecanismele de acţiune ale toxicităţii vor putea fi elucidate în detaliu, la momente iniţiale ale evoluţiei lor şi la doze scăzute, comparativ cu parametrii convenţionali ai toxicităţii. Se aşteaptă îmbunătăţiri în domeniul toxicologiei din aplicarea toxicogenomicii, ce presupun descoperirea unor noi markeri, extrapolări crescute şi evaluarea toxicităţii combinatorii. În special, în ceea ce priveşte testarea siguranţei medicamentelor, unde importanţa unei complete monitorizări a posibilelor efecte adverse induse de către un compus asupra întregului organism este deosebit de importantă, se observă că abordarea genomică funcţională se dovedeşte a fi din ce în ce mai utilă.

CAPITOLUL 15
IMPORTANȚA POLIMORFISMULUI GENETIC ȘI A INTERACȚIUNILOR MEDICAMENTOASE ÎN TRATAMENTUL DURERII

15.1. Introducere

Variabilitatea interindividuală farmacocinetică şi farmacodinamică pentru numeroase analgezice poate fi abordată din punct de vedere farmacogenetic, prin studierea bazelor eredităţii diferenţelor răspunsului la un tratament medicamentos. Anumite enzime ce acţionează pentru metabolizarea medicamentelor, transportul medicamentelor sau pentru medicamentele ţintă sunt într-adevăr supuse unui polimorfism genetic care este definit prin diferenţele existente în expresia genică ce au o frecvenţă mai mare de 1% în populaţie. Polimorfismul enzimatic (mai ales citocromii P450(CYP)) şi transportorii membranari [cum ar fi glicoproteina P(P-gp)] sunt deosebit de importanţi în domeniul analgezic. Populaţia diferă în patrimoniul său genetic şi în răspunsul său la medicamente. Consecinţele clinice posibile ale administrării dozelor standard de substanţe metabolizate de către enzimele supuse unui polimorfism genic vor merge de la toxicitatea medicamentoasă la absenţa eficacităţii după analgezic şi polimorfismul considerat.

Polimorfismul enzimatic este important când medicamentul este eliminat în proporţie de 50% de către o enzima polimorfică, când medicamentul are o fereastră terapeutică îngustă, sau în sfârşit când activitatea medicamentului depinde de un metabolit format de către o enzimă polimorfică (promedicament). De asemenea, interacţiunile medicamentoase sunt o sursă importantă de variabilitate care merită sa fie luată în consideraţie datorită existenţei inhibitorilor şi inductorilor CYP sau P-gp care pot sa imite defectele genetice.

Xenobioticele, şi mai ales medicamentele analgezice sunt frecvent hidrofobe şi de aceea trebuie să fie transformate în compuşi mai hidrofili pentru a fi eliminaţi din organism. Pentru a realiza această transformare, organismul dispune de enzyme capabile să metabolizeze un număr mare de xenobiotice. Aceste enzime sunt clasificate în două categorii: *enzime de funcţionare*, sau de faza Ia, care grupează reductazele,oxidazele, şi hidrolazele, şi *enzimele de conjugare*, sau de faza IIa, care grupează toate transferazele (glucuronidaze, sulfataze, acetilaze, metilaze). Anumite enzime de faza IIa prezintă un polimorfism genetic, şi familia de uridine difosfatice (UDP) glucuroniltransferazele (UGTs) hepatice participă la metabolismul anumitor

analgezice, cum ar fi morfina. Pentru că importanţa clinică a enzimelor de faza a IIa nu a fost pe deplin elucidată, vom prezenta în continuare familia de enzime de faza Ia, enzimele CYP deoarece au un rol important in metabolismul analgezicelor (figura 15.1).

Polimorfismul genetic al CYP şi impactul lor clinic vor fi evidenţiate în cele ce urmează.Transportorii prezintă în egală masură o variabilitate genetică şi P-gp,care este pompa transmembranară de eflux, ar putea influenţa variabilitatea răspunsului la anumite opiacee prin modularea biodisponibilităţii lor sistemice şi cerebrale.

Metodele diagnostice, cum ar fi fenotipajul şi genotipajul, care sunt acum disponibile vor putea permite o individualizare terapeutică selecţionând analgezicul şi pozologia optimă pentru fiecare pacient. De aceea noi vom prezenta în continuare diferitele tehnici şi perspective pentru viitor.

	CYP						
	1A2	2B6	2C9	2C19	2D6	2D1	3A4
Aceclofenac							
Acid mefenamic							
Alfentanil							
Amitriptilina							
Buprenorfina							
Celecoxib							
Citalopram							
Clomipramina							
Codeina							
Dextrometorfan							
Diclofenac							
Dihidrocodeina							
Escitalopram							
Fentanil							
Fluoxetina							
Flurbiprofen							
Fluvoxamina							

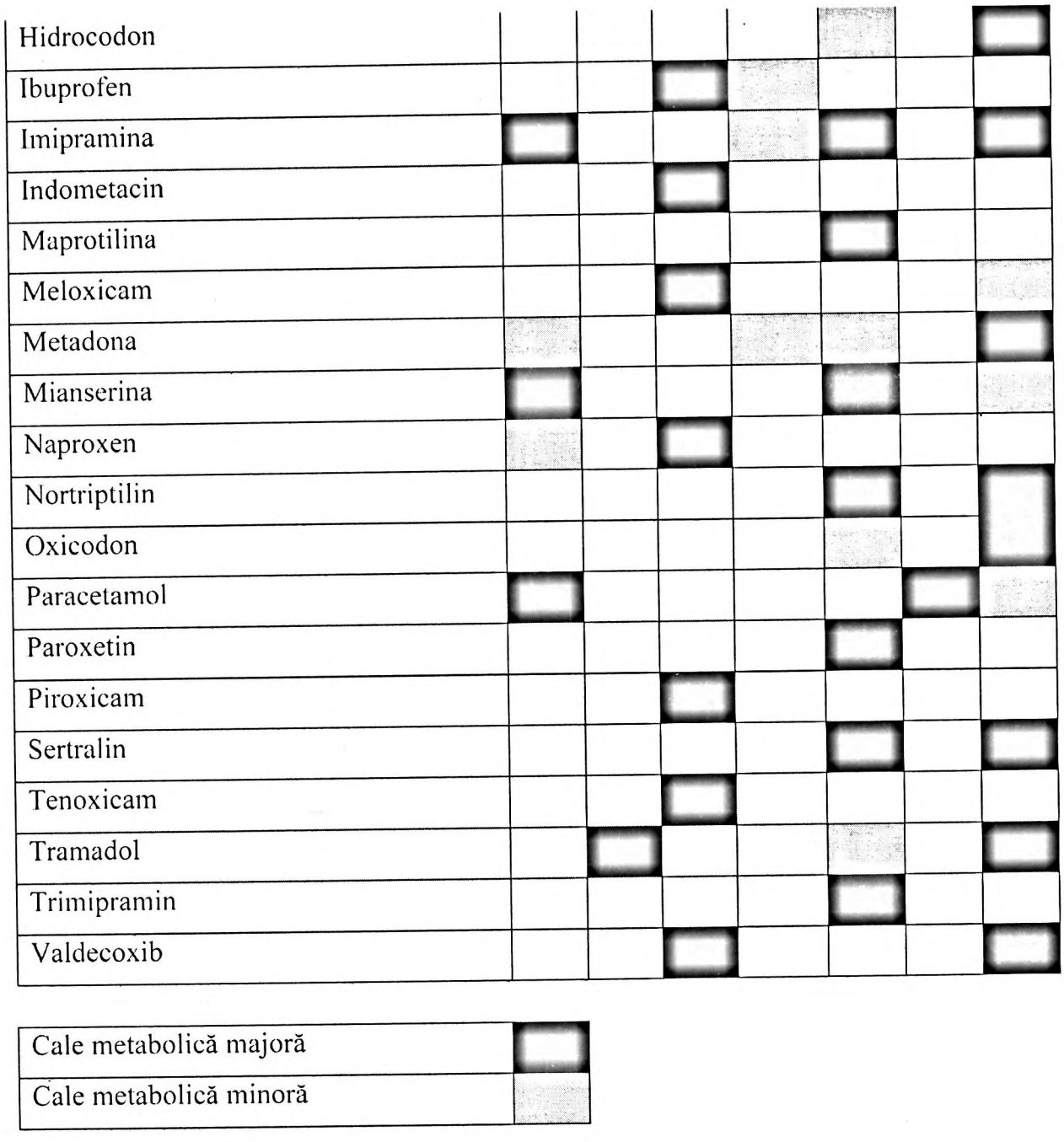


Fig.15.1 Căile metabolice ale analgezicelor substraturi ale citocromilor P450 (CYP) Substraturile sunt clasificate în ordine alfabetică după denumirea lor internaţională (listă non exhaustivă). Diferiţii citocromi P450 implicaţi în metabolismul analgezicelor listate sunt indicate sus. Pătratele negre indică o cale metabolică importantă, pătratele gri: o cale metabolică mai puţin importantă.

15.2. Polimorfismul genetic:efectele asupra diferitelor analgezice

15.2.1. CYP, polimorfism genetic, interacțiuni medicamentoase și consecințe clinice

Localizate în reticulul endoplasmic al celulelor hepatice, CYPs catalizează oxidarea substanţelor lipofile endogene (steroizi, acizi graşi, acizi biliari) şi exogene
(medicamente) transformându-le în produşi mult mai polari facilitând astfel eliminarea lor (Rogers şi colab., 2002).

Superfamilia CYP este clasificată pe baza omologiei secvenţelor de aminoacizi în familii (sub 40% omologie a secvenţei proteice în aceeaşi familie, de ex.CYP2) şi în subfamilii (peste 50% omologie,de ex,CYP2D). Samer şi colab., (2005) arată că superfamilia CYP conţine 74 familii de gene din care 35 la om, şi se clasifică în 14 familii. Membrii subfamiliilor care reprezintă o anumită genă sunt în continuare desemnaţi printr-un număr care succede descripţiei subfamiliei (de ex.CYPD6). O genă care se situează pe un locus specific de pe un cromozom dat se poate manifesta sub diferite forme sau alele. Cele două alele sunt purtate de către un individ pe un locus reprezentând genotipul. Un asterix şi un număr care desemnează o alelă, alela *1 corespunde la o activitate enzimatică normală(alela sălbatică).

Un polimorfism genetic cu o traducere funcţională este descris pentru anumiţi citocromi implicaţi în metabolismul analgezicilor (figura 15.1), cum ar fi CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 şi CYP3A4/5. Aceeaşi citocromi sunt pe de o parte inductibili şi/represibili; cantitatea de proteine enzimatice poate într-adevar să varieze când, la co-administrarea de substanţe cunoscute pentru capacitatea lor de a induce sau inhiba CYPs (figura 15.2 şi 15.3) se va antrena o modificare a profilului activităţii enzimatice (fenotip).

	CYP	
	2C9	3A4
Aminoglutamida		
Amprenavir		
Carbamazepina		
Ciclofosfamida		
Dexametazona		
Efavirenz		
Etanol		
Felbamat		
Ifosfamid		
Meprobamat		
Millepertuis		
Nevirapina		
Oxacarbazepina		
Fenobarbital		
Fenilbutazona		
Fenitoina		
Primidona		
Rifabutin		
Rifampicina		
Ritonavir		
Topiramat		
Inhibitor puternic		
Inhibitor moderat		

Fig.15.2 Principalii inductori ai citocromilorP450(CYP) 2C9 şi 3A4. Inductorii sunt clasificaţi în ordine alfabetică după denumirea lor. Puterea de inducţie este indicată printr-un pătrat negru (inductor puternic) sau gri (inductor moderat). Nu există inductori ai citocromului 2D6. Impactul interacţiunii va depinde de importanţa relativă a căii de eliminare inhibată în raport cu clairence-ul şi concentraţia plasmatică a inhibitorului. Administrarea concomitentă a unui substrat şi a unui inhibitor pentru acelaşi citocrom accelerează eliminarea substratului. Dacă tratamentul inhibitor este oprit,activitatea citocromului revine la normal după eliminarea inhibitorului .

	CYP				CYP		
	2C9	2D6	3A4		2C9	2D6	3A4
Acid valproic				Izoniazida			
Amiodarona				Itraconazol			
Amprenavir				Ketoconazol			
Bupropion				Levomepromazina			
Celecoxib				Losartan			
Silibinina				Metadona			
Clorochina				Metronidazol			
Clorpromazina				Miconazol			
Cimetidina				Moclobemid			
Ciprofloxacin				Nateglinid			
Citalopram				Nefazodon			
Claritromicina				Nelfinavir			
Clomipramina				Nifedipin			
Clopidogrel				Nitrendipin			
Delavirdin				Paroxetin			
Desogestrel				Fenilbutazona			
Dihidralazina				Fenitoin			
Diltiazem				Prometazin			
Difenhidramina				Propafenona			
Efavirenz				Timidina			
Eritromicina				Risperidon			
Etilynestradiol				Ritonavir			
Flecainida				Roxitromicina			
Fluconazol				Saquinavir			
Fluoxetin				Sertralin			
Fluvastatina				Simvastatina			
Fluvoxamin				Terbinafin			
Gemfibrozil				Tioridazin			
Gestoden				Tacrolimus			
Grapefruit				Valdecoxib			
Halofantrin				Venlafaxin			

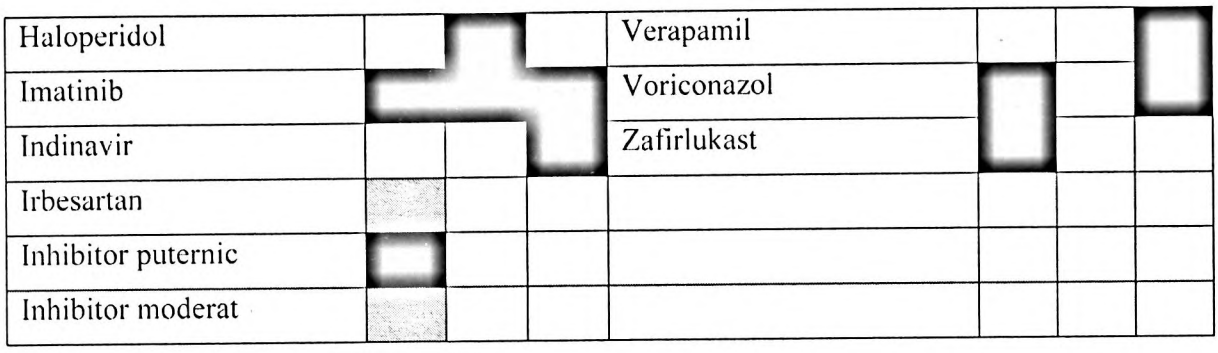


Figura 15.3 Principalii inhibitori ai citocromilor P450(CZP)2C9, 2D6 şi 3A4. Inhibitorii sunt clasificaţi în ordine alfabetică după denumirea internaţională. Puterea de inhibiţie este indicată printr-un pătrat negru (inhibitor puternic) sau gri (inhibitor moderat). Impactul interacţiunii va depinde de importanţa relativă a căii de eliminare inhibată în raport cu clearence-ul total şi concentraţiile plasmatice ale inhibitorului. Administrarea concomitentă a unui substrat şi a unui inhibitor pentru acelaşi citocrom încetineşte eliminarea substratului. Dacă tratamentul inductor este oprit, activitatea citocromului revine progresiv la normal (> 2 săptămâni).

15.2.2. Polimorfismul CYP2C9 și anti-inflamatoarele nonsteroidiene

15.2.2.1. Aspecte genetice

Subfamilia CYP2C cuprinde patru enzime (Samer şi colab,2005): 2C8, 2C9/10, 2C18 şi 2C19 a căror genă este localizată pe cromozomul 10. CYP2C9/10 este proteina cea mai abundentă din această subfamilie. Cea mai mare parte a substraturilor pentru CYP2C9 sunt acizii slabi şi o interacţiune electrostatică pare să fie determinantă în afinitatea compuşilor pentru CYP2C9.Acesta posedă un polimorfism genetic şi şase variante alelice (Scordo şi colab.,2001). Trei dintre ele sunt descrise la caucazieni: CYP2C9*1, *2 şi *3. CYP2C9*1 (80-82%) codifică pentru o enzimă a cărei activitate este normală (tipul sălbatic) în timp ce CYP2C9*2 (11%) prezintă o substituţie a aminoacidului din poziţia 144 unde arginina este înlocuită de către cisteină ceea ce reduce activitatea enzimatică a lui CYP2C9*2. A treia varianta alelică CYP2C9*3 (7 – 9 %) prezintă o substituţie a izoleucinei cu leucina în poziţia 359 ce antrenează o diminuare a activităţii enzimatice de cinci până la zece ori în funcţie de substrat. Există o variabilitate interetnică în distribuţia acestor alele. Astfel, prevalenţa lui CYP2C9*2 este de 4% la etiopieni, în timp ce este absentă în Extremul Orient, pe când CYP2C9*3 este identică în aceste populaţii (2%). De asemenea a fost descris un polimorfism la nivelul promotorului (Shintani şi colab.,2001).

15.2.2.2. Consecinţe clinice

Polimorfismul lui CYP2C9 ar putea juca un rol important în eficacitatea analgezicului şi toxicitatea anti-inflamatoarelor nonsteroidiene (AINS). Studiile *in vitro* au identificat anumite AINS ca substraturi ale CYP2C9: ibuprofen,

indometacin, flurbiprofen, naproxen, diclofenac, piroxicam, lornoxicam, acid mefenamic, meloxicam şi celecoxib. Astfel, la purtătorii homozigoţi ai CYP2C9*3 trataţi cu ibuprofen sau cu celecoxib clairance-ul oral al acestor substanţe este diminuat de peste două ori şi perioada de înjumătăţire este prelungită, în comparaţie cu genotipul CYP2C9*1/*1 (sălbatic). CYP2C9 are un efect enantiospecific asupra parametrilor farmacocinetici ai enantiomerului S de la ibuprofen. El acţionează pe de altă parte asupra parametrilor farmacodinamici inhibând într-o manieră evidentă prostaglandina E2 la purtătorii homozigoţi ai CYP2C9*3 (Kirchheiner şi colab.,2003). Sub celecoxib, concentraţiile plasmatice ale metaboliţilor sunt diminuate la indivizii homozigoţi sau heterozigoţi purtători ai alelei CYP2C9*3. Concentraţiile crescute de celecoxib ar putea altera beneficiile selectivităţii pentru ciclooxigenaza-2 (COX-2), modificând astfel rata sa de eficacitate-toxicitate. Alte studii nu au constatat totuşi impactul semnificativ al CYP2C9 asupra parametrilor farmacocinetici sau selectivităţii diclofenacului sau celecoxibului în condiţii de echilibru (Brenner si colab.,2003). Pe de altă parte, un alt studiu retrospectiv nu a găsit o corelaţie între ulcerele gastrice induse de către substraturile AINS ale CYP2C9 şi genotipul CYP2C9. Totuşi datorită numărului mic de pacienţi (n=24) nu s-a constatat o legatură între genotipul CYP2C9 şi hepatotoxicitatea indusă de diclofenac.

15.2.3. Polimorfismul CYP2D6

15.2.3.1 Aspecte genetice

Polimorfismul CYP2D6 rămâne unul din exemplele cel mai bine studiate şi cel mai bine inţelese ale polimorfismului farmacogentic. Descoperit în anii 70 de două grupuri de cercetare independente el a fost recunoscut ca polimorfismul debrisokină/sparteină, din cauza efectelor indezirabile, neobişnuite şi marcante puse în evidenţă în urma administrării unui antihipertensor simpaticolitic, debrisokina, sau a unui alcaloid antiaritmic, sparteina. Studiile familiale au arătat că deficitul oxidative este sub control monogenic. Gena este situată pe cromozomul 22, transmisă pe cale autosomal recesivă şi are 80 de variante alelice (http://www.imm.ki.se./CYPalleles) (Zanger şi colab., 2004).

Pe baza activităţii enzimatice (fenotip) indivizii au fost împărţiţi în patru grupe:

- metabolizatori lenţi („poor metabolizer" PM) cu o deficienţă enzimatică completă, reprezentând 5 până la 10% dintre caucazieni;
- metabolizatori intermediari („intermediate metabolizers"IM) cu activitate enzimatică diminuată (10% caucazieni);
- metabolizatori buni, care au o activitate enzimatică normală („extensive" EM) reprezintă 60-70 % dintre caucazieni;

• metabolizatori ultrarapizi („ultrarapid metabolizers"UM) care au un metabolism accelerat (1-10% dintre caucazieni).

Metabolizatorii/metabolizanţii lenţi-PM sunt homozigoţi pentru o alelă defectă (cel puţin 15 variante descrise), sau mai rar, combinând două alele defecte distinct. În Europa mai mult de 90% dintre PM pot fi detectaţi prin cercetarea celor trei variante mai frecvente care la caucazieni sunt: CYP2D6*4 (20 la 25%, prezentă la 70-90% dintre PM) datorată unei mutaţii ce antrenează un episaj deficient şi un codon stop prematur, CYP2D6*5 (5%) care prezintă o deleţie completă a genei şi CYP2D6*3 (2%) care este rezultatul deleţiei unei baze. Metabolizanţii intermediari-IM sunt purtătorii unei alele ce antrenează o diminuare a activităţii enzimatice (exemplu: CYP2D6*17). Metabolizanţii ultrarapizi-UM sunt purtători ai unei gene duplicată şi multiplicată (CYP2D6*1,*2x/N) ca urmare a unui crossingover inegal. Duplicaţiile genice şi mutaţiile nu explică totuşi toate fenotipurile.

Polimorfismul genetic al CYP2D6 prezintă o variabilitate interetnică pe care-l explicăm prin distribuţia principalelor variante alelice. Astfel cu excepţia caucazienilor, PM sunt rari în alte populaţii etnice. Ceea ce se explică parţial prin frecvenţa unei variante alelice ce codifică pentru o enzimă inactivă prezentă la 10-20% dintre caucazieni şi cvasiabsentă la asiatici şi africani (sub 2%). Metabolizanţii intermediari-IM sunt mai frecvent prezenţi în Asia, până la 50% dintre asiatici fiind purtători ai CYP2D6*10 care codifică pentru o enzimă instabilă (sub 2% la caucazieni). În sfârsit, duplicaţiile genetice prezintă de asemenea o variabilitate interetnică, frecvenţa UM este estimată la 20% în Orientul Apropiat şi de până la 29% în Etiopia. În Europa, există un gradient Nord/Sud când ne referim la frecvenţa duplicaţiilor genei CYP2D6: 1- 2% la suedezi, 3,6% la germani, 3,9% la elveţieni, 7 până la 10% la spanioli şi 10% la sicilieni care sunt UM (Bertilsson şi colab.,2002).

15.2.3.2. Consecinţe clinice

CYP2D6 joacă un rol primordial în metabolismul unui sfert dintre medicamentele prescrise curent. Acestea au o adesea o marjă terapeutică îngustă cum este în cazul a numeroşi opioizi şi antidepresori. Consecinţele terapeutice vor varia în funcţie de importanţa moleculei mamă sau de activitatea metabolitului în eficacitatea şi toxicitatea moleculei. Astfel, metabolizatorii ultrarapizi ai CYP2D6 care au o activitate enzimatică crescută vor accelera eliminarea antidepresorilor –substraturi ale CYP2D6 şi la doze ordinare ne putem aştepta la o ineficacitate a tratamentului. În schimb la PM, nivelurile plasmatice vor creşte la dozele obişnuite şi de asemenea creşte eficacitatea dar şi toxicitatea, şi ca urmare ajustarea pozologiilor este indispensabilă.

15.2.4. CYP2D6 și opioidele

Opioidele slabe cum ar fi codeina şi tramadolul, dar şi anumite opioide considerate ca puternice cum ar fi hidrocodonul şi oxicodonul sunt bioactivaţi de către CYP2D6, ceea ce poate afecta eficacitatea şi toxicitatea lor.

Codeina trebuie să fie activată de către CYP2D6 (O-demetilare) pentru a-şi desfăşura efectul său analgezic (fig. 15.4). La indivizii EM ai CYP2D6, aproximativ 10% din codeină este bioactivată în morfină (Gasche şi colab., 2004). Studiile randomizate controlate au demonstrat ineficacitatea codeinei la PM. Eficacitatea analgezică a codeinei ar fi deci limitată la pacienţii PM. În schimb, la UM se va constata că efectele codeinei şi a derivaţilor săi se accentuează, iar producţia morfinei creşte. Astfel, o intoxicare severă cu codeină la pozologiile standard a antrenat o comă prelungită la un pacient al cărui genotipaj şi fenotipaj al CYP2D6 a pus in evidenţă un metabolism ultrarapid al CYP2D.

Tramadolul foarte apropiat structural de codeină are o eficacitate opioidă asemănătoare. Analgezic cu acţiune centrală, tramadolul posedă proprietăţi farmacologice care îl diferenţiază de alte opioide. Tramadolul posedă o slabă afinitate pentru receptorul opioid μ, spre deosebire de metabolitul său M1, O-demetiltramadolul, produs sub acţiunea CYP2D6, care are proprietăţi analgezice şi o afinitate pentru receptorul opioid μ ce este de 200 de ori superioară substanţei mamă (Samer şi colab., 2005). Activitatea CYP2D6 are un rol important în efectul analgezic al tramadolului confirmat de studiile experimentale şi clinice. Tramadolul poate sa-şi exercite efectul său analgezic pe calea activării monoaminergicelor inhibitoare descendente, inhibând recapturarea serotoninei şi nonadrenalinei. Din cauza acestui mod dublu de acţiune, tramadolul este deci diferit de opioidele tradiţionale datorită efectelor indezirabile şi activităţii analgezice. Spre deosebire de codeină, el rămâne activ la indivizii PM din cauza proprietăţilor monoaminergice ale substanţei mamă. Astfel la un metabolizator lent, mecanismul analgezic al tramadolului se poate modifica.

Dacă activitatea CYP2D6 scade, efectul opioid se atenuează,în timp ce efectul monaminergic creşte. Dimpotrivă, o creştere a numărului de alele funcţionale ale CYP2D6 creşte cantitatea metabolitului M1, confirmând legătura între producţia metabolitului şi genotipul CYP2D6.

Un studiu prospectiv realizat pe 300 de pacienţi a evaluat impactul genotipului CYP2D6 asupra răspunsului la tramadol în analgezia postoperatorie după chirurgia abdominală. Pacienţii care nu răspund sunt de două ori mai numeroşi printre PM (46,7%), comparativ cu EM (21,6%); PM au de două ori mai frecventă nevoie de antialgice de siguranţă (tramadol şi piritramid) în sala de trezire(43vs 21%) şi consumul de tramadol prin injectarea auto-controlată prin pompa *iv* creşte la PM (26,7% vs11,6%). Consumul de tramadol la PM fiind pe de altă parte mai mare cu 30% faţă de cei EM (Levo şi colab.,2003).

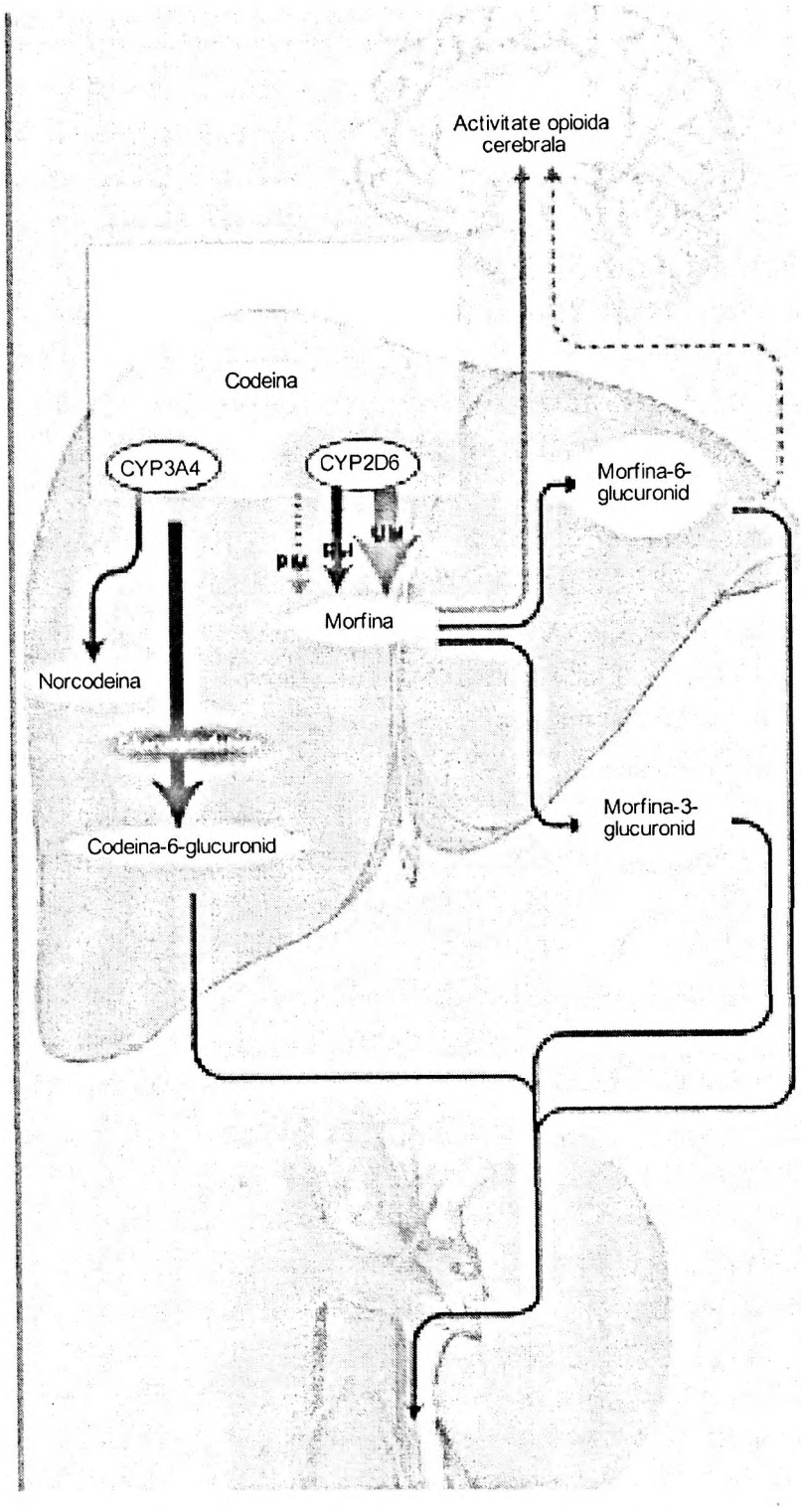


Figura 15.4.Căile de metabolizare ale codeinei şi eliminarea metaboliţilor săi. Codeina este metabolizată în principal (305) în codein 6-glucuronid şi într-o mică măsură în norcodein prin intermediul citocromului P450 3A4. La un individ care este un bun metabolizator pentru citocromul 2D6 proporţia de morfină produsă echivalează în medie cu 10% din doza de codeină. Dimpotrivă, la un metabolizator ultrarapid, producţia de morfină creşte. Morfina este în continuare metabolizată în morfină 6-glucuronid (care posedă o activitate opioidă) şi în morfină 3-glucuronid. Aceşti doi metaboliţi ca şi codeina 6-glucuronid sunt în continuare eliminaţi pe cale renală.

Metadona este un opioid puternic care este uneori utilizat ca analgezic. Există diferenţe inter-individuale importante în concentraţiile metadonei care se explică parţial prin activitatea CYP2D6. Concentraţiile sanguine ale metadonei în stare de echilibru au fost studiate la 256 de pacienţi toxicomani şi au fost mai crescute la PM şi mai scăzute la UM. Mai mult de 70% dintre PM aveau un tratament de substituţie eficace (faţă de 40% la UM). La fel, 50% dintre UM şi numai 28% dintre PM au primit doze de metadonă superioare la 100mg pe zi (Eap şi colab., 2001).

15.2.5 CYP2D6 și blocanții N-metil-D-aspartat(NMDA)

Dextrometorfanul (DEM) este un derivat morfinic şi nonarcotic (analog dextrogirului codeinei) lipsit de activitate opioidă care acţionează *in vivo* ca antagonist necompetitiv al receptorului NDMA. De asemenea DEM pare să posede o activitate neuromodulatoare. El este metabolizat în dextrorfan (DOR) de către CYP2D6 şi este utilizat ca substrat test pentru a fenotipa aceasta cale metabolică. DEM este rapid transformat în DOR la EM. Datele experimentale arată că DEM exercită un efect antinociceptiv şi neuromodulator mai evident la CYP2D6 al PM, spre deosebire de efectele de durată mai scurtă observate la EM. Deci, CYP2D6 ar putea juca un rol important în efectul neuromodulator al DEM şi ar explica contradicţiile asupra impactului său clinic în studiile randomizate controlate perioperator în prevenţia durerilor.

15.2.6. CYP2D6 și dependența de opiacee

Se pare ca PM ar putea fi protejaţi împotriva dependenţei la opiacee pentru anumite molecule. Astfel, niciun PM nu a fost regăsit prin genotipaj şi fenotipaj în grupele de pacienţi dependenţi de opiacee de tipul codeinei, spre deosebire de pacienţii care n-au fost niciodată dependenţi de aceste substanţe (4%) sau dependenţi de numeroase alte substanţe (alcool, cocaină, amfetamine; 6,5%). Această subîmparţire a metabolizatorilor lenţi la pacienţii dependenţi de opiacee sugerează că aceştia au o protecţie farmacogenetică împotriva dependenţei orale la opiacee (odd ratio > 7). Inhibiţia CYP2D6, care blochează producţia de morfină, ar putea astfel să permită modularea riscului de dependenţă blocând aceste căi metabolice. Totuşi primele teste clinice n-au confirmat această ipoteză (Fernandes şi colab., 2002).

15.2.7. CYP2D6 și antidepresorii ca co-analgezice

Antidepresorii sunt utilizaţi adesa drept co-analgezice. Un anumit număr de mecanisme au fost implicate în efectul lor analgezic. Antidepresorii triciclici au rol să inhibe recapturarea presinaptică a adrenalinei (NA) şi serotoninei (5-HT) şi să blocheze receptorii alfa-1 –adrenergici, muscarinci şi histaminici. Inhibitorii selectivi de recapturare a serotoninei (ISRS) acţionează mai ales asupra 5-HT. Venlafaxina este un nou agent chimic specific

triciclicilor şi ISRS, ce inhibă recaptura NA şi 5-HT, mai ales la doze scăzute şi se dovedeşte eficace în tratamentul durerilor neuropatice. Antidepresorii sunt asociaţi cu o incidenţă relativ crescută a efectelor indezirabile care pot limita administrarea lor la pacienţii care au dureri.

Principalii antidepresori sunt metabolizaţi de către CYP2D6 (fig.15.1). Mai mult de 25% dintre pacienţi nu răspund la antidepresori şi fenotipul UM este acum recunoscut ca factor de risc al ineficacităţii terapeutice. Dimpotrivă, PM exprimă efecte toxice la doze uzual recomandate ceea ce s-ar putea explica prin variabilitatea concentraţiilor plasmatice (30 la 40 de ori) observată în urma administrării unor doze similare.

Studiile farmacocinetice indică de exemplu ca la PM, clairence-ul amitriptilinei, clomipraminei, desipraminei, imipraminei, nortriptilin, trimipraminei, paroxetinei, citalopramului, fluvoxaminei, fluoxetinei şi venlafaxinei este diminuat şi în consecinţă concentraţiile plasmatice sunt crescute (Bertilsson şi colab., 2002). De asemenea, asocierea dintre efectele indezirabile şi genotipul CYP2D6 a fost bine studiat. O metaanaliză arată o corelaţie pozitivă între riscul toxicităţii neurologice şi concentraţiile plasmatice medicamentoase (Samer şi colab.,2005). O frecvenţă crescută a CYP2D6 a fost observată la pacienţii PM care prezintă efecte indezirabile. Dintr-un studiu prospectiv al pacienţilor trataţi cu desipramin (100mg/zi $^{-1}$ timp de trei saptămâni), s-a observat că numai pacienţii cu fenotip PM pentru CYP2D6 au prezentat efecte indezirabile (confuzie, sedare, hipotensiune ortostatică). Pe de altă parte, aceste efecte au fost corelate cu nivelurile plasmatice crescute ceea ce necesită reducerea dozei (Spina şi colab., 1997). S-a sugerat că există o relaţie între fenotipul PM şi cardiotoxicitate (palpitaţii, dispnee, aritmie) la pacienţii PM trataţi cu venlafaxina. Printre pacienţii ce prezintă efectele indezirabile la tratamentul cu substraturi antidepresoare pentru CYP2D6 sunt de două ori mai mulţi PM. Trebuie să menţionam că există o variaţie a dozelor eficiente în tratamentul depresiei care ar fi de 25 la 300mg pentru clomipramin fie la PM, fie la UM. Chinezii (majoritatea indivizi UM) metabolizează antidepresorii (desipramin, nortriptilin, clomipramin) mai lent şi vor primi în general doze mai scăzute de antidepresori. Astfel, primele recomandări de doze în funcţie de genotip/fenotip al CYP2D6 privind 14 antidepresori au fost făcute de Kirchheiner şi colab., (2001). Pentru antidepresorii triciclici PM este recomandată o reducere a dozelor de la 50 la 80% ,iar pentru ISRS de 30%. Pentru UM dozele recomandate cresc la 260% pentru desipramin, 300% pentru mianserin, şi 300% pentru nortriptilin (Samer şi colab., 2005). Astfel, genotipajul ar putea să permită individualizarea pozologiilor.

15.2.8. Polimorfismul CYP3A

Familia CYP3A are rol în biotransformarea în proporţie de 45-60% a medicamentelor dintre care menţionăm opioidele naturale (codeina) sau sintetice (tramadol, buprenorfin, metadon, fentanyl şi dextrometorfan)

(Desmeules şi colab., 2004). În anumite populaţii există diferenţe interindividuale în expresia CYP3A. Subfamilia CYP3A cuprinde patru gene: CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 şi CYP3A43 situate pe cromozomul 7.

În subfamilia CYP3A, enzima cea mai abundentă şi mai importantă la nivelul reacţiilor oxidative este CYP3A4. Ea a fost izolată pe baza activităţii sale oxidante asupra nifedipin şi variabilităţii metabolismului nifedipinului (de peste 10 ori), ceea ce sugerează existenţa unui polimorfism genetic. Deşi sunt descrise variantele alelice ale CYP3A, niciuna nu determină o modificare semnificativă a activităţii enzimatice. CYP3A5 este exprimată la 20-30% dintre caucazieni, ceea ce reprezintă cel puţin 50% din conţinutul total al CYP3A hepatice la persoanele care îl exprimă, participând la variabilitatea interindividuală în eliminarea medicamentelor dependente de CYP3A. S-a arătat că numai pacienţii posedând cel puţin o alelă a CYP3A5 *1 exprimă CYP3A5, în timp ce CYP3A5*3 şi CYP3A5*6 nu exprimă CYP3A5 (Kuehl şi colab., 2001). Specificitatea substratului CYP3A5 este asemănătoare cu a CYP3A4 (dar el este în general mai puţin activ) şi CYP3A5 pare să metabolizeze cea mai mare parte a substraturilor CYP3A4. Astfel, chiar dacă s-a raportat o largă variabilitate interindividuală a CYP3A4, nu s-a identificat un polimorfism fenotipic şi noţiunea de metabolizator lent sau de metabolizator ultrarapid nu poate fi aplicată.

15.2.9. Interacțiunile medicamentoase și CYP

Medicamentele administrate concomitent pot, datorită interacţiunii medicamentoase farmacocintetice, să modifice activităţile CYP (fig. 15.1, 15.2 şi 15.3). Inhibiţii competitive pot interfera cu activitatea lor. Astfel concentraţiile plasmatice ale substraturilor CYP2C9 pot să crească odată cu administrarea de amiodaronă, fluvastatin, fluconazol, fenilbutazonă, sulfinpirazon, sulfafenazol sau sulfamide, care sunt inhibitori puternici şi selectivi ai CYP2C9. Dimpotrivă, substraturile CYP2C9 pot fi induse sub acţiunea următoarelor medicamente: carbamazepin, etanol sau fenobarbiton şi o scădere a concentraţiilor şi eficacităţii AINS ar putea fi previzibilă (Desmeules şi colab.,2004).

Nu se cunosc inductori ai CYP2D6, dimpotrivă inhibitorii CYP2D6 sunt bine descrişi cum ar fi de exemplu, antiaritmicele (chinidina) sau neurolepticele cum ar fi clorpromazin, haloperidol, levopromazin sau tioridazin şi un mare număr de antidepresori (fig. 15.3). Odată cu administrarea unui inhibitor şi a unui substrat al CYP2D6 sunt posibile diferite scenarii în funcţie de activitatea moleculei mamă respective. Astfel, se poate pune în evidenţă o creştere a concentraţiilor plasmatice ale antidepresorilor ce sunt substraturi ale CYP2D6 sau o inactivare a promedicamentelor de tipul opioidelor slabe.

Factorii de mediu (de exemplu, la nivel alimentar, sucul de grepfrut fiind inhibitor al CYP3A4) şi interacţiunile medicamentoase (inhibiţia sau inducţia; fig.15. 2 şi 15.3) contribuie în mare parte la variabilitatea activităţii

catalitice a CYP3A4. În plus, consecinţele lor clinice vor depinde de activitatea substanţei mamă şi de metaboliţii săi. Metadona este metabolizată de către CYP3A4 (şi CYP2D6) cum o demonstrează studiile *in vitro* şi studiile indirecte care arată o diminuare sau o creştere a concentraţiilor plasmatice ale metadonei la pacienţii sub tratament de întreţinere după administrarea inductorilor sau inhibitorilor CYP3A4. Astfel, simptomele de sevraj la opioide sunt descrise la pacienţii sub metadonă trataţi pentru tuberculoză prin rifampicină, pe calea reducerii concentraţiilor plasmatice ale metadonei.

Inhibitorii CYP3A4 ca macrolidele şi anumiţi antidepresori ca paroxetin, sau neuroleptice ca olanzapin (fig. 15.3) vor determina pe de altă parte o reducere a clairence-ul metadonei şi vor creşte riscul de supradozaj. Shinderman şi colab., (2003) au observat o corelaţie între concentraţiile plasmatice ale metadonei şi starea de echlibru şi activitate a CYP3A4. Alte studii *in vitro* arată că antiproteazele (ritonavir, indinavir, saquinavir) sunt inhibitori *in vitro* ai metabolismului metadonei şi buprenorfinei. La fel, CYP3A4 este izoforma cea mai responsabilă de dezalchilarea fenantyl, alfentanil şi sulfentanil. Astfel rifampicina un inductor al CYP3A4 creşte de trei ori clereance-ul alfentanil, spre deosebire de macrolide care-l scade de patru la cinci ori.

Midazolamul este un benzodiazepin hidrosolubil cu o scurtă durată de acţiune, care este (ca majoritatea benzodiazepinelor) substrat al CYP3A4. Interacţiunile farmacocinetice cu substanţele inhibtoare ale CYP3A4 (fig.15.2) pot să conducă la o creştere a efectelor sale indezirabile, din cauza creşterii concentraţiilor sale plasmatice. Astfel, la un pacient de 61 de ani a fost descrisă o comă prelungită după ce a primit midazolam (doză totală cumulată 300 mg) pentru o sedare în timpul cardioversiunii electrice, amiodaronă în cadrul episoadelor de tachiaritmii supraventriculare, ca şi pentru o antibioterapie prin eritromicină pentru o pneumopatie acută. Coma (şase zile) a fost indusă în prelungirea perioadei de înjumătăţire a midazolamului mai mult de 24 de ore, de către inhibitorii CYP3A4 care sunt ritromicina şi amiodarona (Samer şi colab., 2005).

15.3. P-gp:un alt exemplu al variabilității genetice

15.3.1 P-gp și aspectele genetice

P-gp este un produs al genei MDR1 (proteină rezistentă la mai multe medicamente) care aparţine la o superfamilie de transportori ABC (caseta de legare la ATP). Iniţial MDR1 a fost identificată şi studiată la nivelul celulelor tumorale rezistente la chimioterapia anticanceroasă. Ea este o proteină de transport membranar care expulzează medicamentele în afara celulelor şi le scade concentraţia la nivelul ţintelor tisulare. Localizarea sa la nivel intestinal, hepatic, renal şi al barierei hematoencefalice explică probabil rolul său protector asupra anumitor regiuni, cum ar fi creierul împiedicând acumularea medicamentelor în organele ţintă. P-gp este acum subiectul unei variabilităţi

interindividuale de expresie şi de funcţionare datorită pe de o parte polimorfismului genetic la care este supusă gena MDR1 şi pe de altă parte datorită posibilelor interacţiuni medicamentoase (inductori şi inhibitori ai P-gp).

Pentru gena MDR1 au fost descrise treizeci de mutaţii (Hoffmeyer şi colab.,2000). Două dintre ele au fost investigate: mutaţia G2677T/A care antrenează o schimbare de aminoacid şi mutaţia silenţioasă C3435T. Această ultimă mutaţie este supusă la o variabilitate interetnică: frecvenţa indivizilor homozigoţi pentru alelele C şi T este prezentă la 25% dintre caucazieni şi asiatici şi numai la 6% dintre africani. Variabilităţile sunt raportate în Europa de Est, frecvenţa genotipurilor CC şi TT fiind de 42%,41% şi 17%. În Quebec ea este de respectiv 16%, 55% şi 29% (Samer şi colab., 2005).

15.3.2 P-gp și consecințele clinice

Variabilitatea expresiei P-gp poate avea un impact asupra absorbţiei şi distribuţei medicamentelor.Când un individ dispune de o cantitate scazută de P-gp intestinală, cantitatea substraturilor absorbite şi concentraţiile plasmatice vor fi mai ridicate. Genotipul 3435TT a fost astfel asociat cu o expresie de două ori mai scăzută a transportorului la nivel de duoden decât genotipul CT şi TT (Hoffmeyer şi colab.,2000). Pe de altă parte s-a constatat că de regulă concentraţiile digoxinei în stare de echilibru sunt mai ridicate la voluntarii sănătoşi purtători ai alelei T (Jolme şi colab., 2002).

Substraturile P-gp au în comun proprietăţi fizice cum ar fi, un ciclu aromatic, o hidrofobicitate, o greutate moleculară cuprinsă între 200 şi 1800Da sau un grup azotat cationic. Pe de altă ,trebuie menţionat că majoritatea substraturilor şi inhibitorilor Pgp sunt de asemenea substraturi şi inhibitori ai CYP3A4. Genele lor sunt dispuse în apropiere pe acelaşi cromozom (7q22.1 şi 7q21.1) şi la nivel intestinal ar putea exista o corelaţie între polimorfismul C3435T al MDR1 şi nivelul expresiei CYP3A4.

Opioidele au în comun o structură aromatică cu trei inele şi un inel piperidin substituit, şi sunt din această cauză candidaţi buni pentru a fi substraturi ale P-gp.

Studiile *in vitro* au demonstrat că loperamidul, morfina, metadona, meperidin, hidromorfon, naloxon, naltrexon, pentozacin sunt transportaţi de către P-gp. Există rezultate contradictorii pentru fentanyl. Sulfentanyl-sulfentanil şi alfentanyl-alfentanil nu sunt substraturi pentru P-gp. Dimpotrivă, aceste ultime trei substanţe sunt inhibitori *in vitro* ai P-gp (la concentraţii puţin comparabile cu cele administrate în clinică). Anumite endorfine şi enkefaline sunt de asemenea substraturi ale P-gp (Oude şi Zadina, 2001).

Studiile experimentale *in vivo* la animale au arătat pe de altă parte un rol posibil al P-gp asupra modulării medicamentelor anti-nociceptive. Astfel la şoarecii deficienţi în P-gp a fost evidenţiată o creştere a efectului anti-nociceptiv al enkefalinei sintetice (DPDE) în comparaţie cu şoarecii normali datorită unei ameliorări a biodisponibilităţii cerebrale. În aceeaşi manieră la şobolanul care a

primit un inhibitor puternic al P-gp şi o doză unică *iv* de morfină, efectele antinonciceptive sunt prelungite în raport cu şobolanii netrataţi. Aceste schimbări nu sunt decât imperfect corelate cu schimbările farmacocinetice plasmatice ale morfinei. Activitatea *in vivo* la animal a altor opioide cum ar fi meperidin, metadonă şi fentanyl ar putea să fie influenţată de expresia P-gp. La om, loperamidul, un opiaceu utilizat pentru efectul său antidiareic, acţionează asupra receptorilor pentru opiaceele intestinale reducând motilitatea intestinală şi este la doze standard, lipsit de efecte centrale. Dimpotrivă, un pretratament cu chinidină (600mg administrată cu o oră înainte), un inhibitor al P-gp conduce la o depresie respiratorie (Skarke şi colab., 2003) şi o diminuare a diametrului pupilar. Deşi chinidina creşte absorbţia şi concentraţiile plasmatice ale morfinei, metadonei şi fentanylului,după administrare orală chinidina nu are efect asupra farmacodinamiei celor trei substanţe după administrarea intravenoasă. Pe de altă parte, utilizarea dozelor unice ai inhibitorilor P-gp (valspodar, chinidină) la voluntari sănătoşi la care s-au administrat *iv* doze mici de morfină nu s-a asociat cu o modificare a parametrilor farmacocinetici sau farmacodinamici ai morfinei (Skarke şi colab.,2003). Aceste rezultate ar putea să indice la om că P-gp nu ar influenţa decât în mică măsură biodisponibilitaea cerebrală a morfinei, metadonei şi fentanylului.

15.4. Fenotipaj și genotipaj: perspective

Anumite metode diagnostice sunt acum disponibile în majoritatea spitalelor universitare. Ele permit identificarea rapidă (1-2 zile) a anomaliilor şi variaţiilor metabolismului la nivelul citocromilor. Sunt mai frecvent utilizate două metode: *fenotipajul* care permite identificarea activităţii enzimatice a citocromilor, fenotipul reflectând caracteristicile observate ale activităţii enzimatice ale unui pacient, şi *genotipajul* care detectează variantele alelice descrise până acum reflectând caracteristicile de la nivelul ADNului.

15.4.1. Tehnici

Fenotipajul estimează activitatea enzimatică a citocromilor. Un substrat test („probe drug „) ce corespunde la un citocrom specific este administrat la un pacient, apoi are loc măsurarea cantităţii de substanţă mamă şi metabolismul său în sânge sau urină. Aceste dozaje permit calculul ratei metabolismului sau raportul între cantitatea de moleculă mamă (neschimbată) şi cantitatea metabolitului său la un anumit timp după ingestia substratului test, dar de asemenea şi a altor parametrii farmacocionetici cum ar fi clairance-ul total. Astfel pentru CYP2D6 substraturile test utilizate sunt sparteina, debrisochina, sau dextrometorfan. De exemplu, după ingestia a 25 mg de dextrometorfan seara la culcare şi vezica goală, urina de peste noapte este colectată la 8-12 ore şi concentraţiile de dextrometorfan (Bexine) şi dextrorfan sunt apoi dozate din urină. După care raporturile metabolice sunt calculate. Ele definesc activitatea

enzimatică şi variază în funcţie de substratul test utilizat. Raporturile metabolice ce definesc fenotipul PM sunt: >12,6 pentru debrisochin, >20 pentru spartein, şi >0,3 pentru dextrometorfan. Fenotipul UM este definit prin următoarele raporturi metabolice: <0,2 pentru debrisochin, <0,15 pentru spartein , <0,003 pentru dextrometorfan. Spre deosebire de PM care constituie un grup distinct, definiţia valorilor prag ce corespund la fenotipul UM este făcută de manieră mai arbitrară. Substraturile test ce pot fi utilizate pentru fenotipajul CYP2C9 sunt flurbiprofen, diclofenac, losartan, tolbutamid, şi warfarina. Fenotipajul CYP3A4 poate fi realizat cu midazolam, cortizol endogen, eritromicină sau dapson (Streetman şi colab.,2000). Amestecuri (cocktails) de substraturi test administrate concomitent au început să fie utilizate sau studiate. Ele au oferit avantajul de a realiza simultan fenotipajul diferiţilor citocromi (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) (Zhou şi colab., 2004; Jerdi şi colab., 2004). Fenotipajul permite detectarea inteacţiunilor medicamentoase pertinente când fenotipul pacientului este cunoscut în prealabil şi dacă un genotipaj este realizat în paralel. Într-adevăr, inhibitorii şi inductorii CYP tesaţi pot să modifice concentraţiile substratului test şi deci rata metabolică fenomen numit "fenocopiere". Fenotipajul prezintă avantajul de a fi o metodă rapidă, simplă, ieftină şi reproductibilă. Administrarea unei substanţe farmacologic active în scop diagnostic poate să pună probleme de ordin etic. Pe de altă parte, informaţiile de care dispunem asupra fenotipajului anumitor grupuri (copiii, persoane în vârstă, insuficienţe renale şi hepatice) sunt limitate.

Genotipajul permite analiza mutaţiilor genetice importante funcţional, care codifică pentru enzime specifice prin tehnica reacţiei de polimerizare în lanţ (PCR) cuplată cu o analiză a polimorfismului prin măsurarea lungimii fragmentelor de restricţie după hidroliză cu ajutorul enzimelor de restricţie. Jannette şi colab.,(2004) descriu în detaliu tehnicile de genotipaj. Informaţiile genetice despre individ sunt determinate în mod direct fară să necesite un substrat test. De altfel testul nu este influenţat de administrarea concomitentă de medicamente, sau de factorii de mediu şi oferă avantajul de a fi realizat odată pentru toată viaţa. Tehnica aceasta este costisitoare şi sensibilitatea sa variază în funcţie de citocromul analizat. Astfel datorită genotipului specific şi/sau mutaţiilor încă necunoscute, CYP2D6 ai UM nu sunt toţi detectaţi (Zanger şi colab.,2004). Progresul ştiinţific în domeniu este rapid şi noi variante alelice sunt puse acum în evidenţă.

Metodele de detecţie rapidă prin microarray ADN sunt frecvent utilizate. Microarray-urile sunt suporturile solide de câţiva centimetrii pătraţi pe care pot să fie fixate de manieră organizată mii de secvenţe de ADN diferite. Aceste fragmente servesc drept sonde genetice pentru a măsura nivelul expresiei genetice. Sondele genetice capturează de manieră foarte specifică fragmentele de ADN complementare conţinute într-un eşantion biologic ce trebuie testat. Acest fenomen (hibridizare) poate fi evidenţiat prin tehnicile optice sub lumină fluorescentă sau prin detecţia radioactivităţii. Cuantificarea

semnalelor obţinute şi identificarea fragmentelor de gene recunoscute sunt posibile datorită unui sistem de achiziţie de imagini, apoi pentru analiza datelor se face apel la programe informatice special concepute. Rezultatele obţinute vor fi în continuare validate statistic şi interpretate în context biologic. Acum sunt utilizate două metode macro şi microarray cu depozitarea directă a moleculelor de ADN pe suportul lor şi cu fragmente de oligonucleotide sintetizate *in situ* ca sonde oligonucleotidice pe o suprafaţă solidă. Ele vor permite detecţia mai rapidă şi la scară mai mare a diferitelor variante alelice.

15.4.2. Indicații în practica clinică și perspective

La ora actuală, genotipajul şi fenotipajul citocromilor se justifcă retrospectiv la pacienţii care nu răspund la un tratament adecvat, adică insuficient (eşec terapeutic) sau dimpotrivă la cei care au parte de un tratament excesiv (toxicitate medicamentoasă). Astfel se poate face distincţia între o problemă de complianţă şi un metabolism foarte rapid, când medicamentul este ineficace sau când concentraţiile sunt infraterapeutice ca în cazul antidepresorilor. Pe de altă parte , aceste tehnici permit distincţia între o suspiciune de dependenţă medicamentoasă şi un deficit metabolic în cazul unui consum important de opiaceu slab, cum ar fi codeine considerată ineficace pentru pacientul PM. Cuplajul celor două tehnici permite pe de altă parte detecţia interacţiunilor medicamentoase pertinente când fenotipul pacientului este cunoscut în prealabil sau dacă un genotipaj este realizat în paralel.

Totuşi, la ora actuală, testele farmacogentice sunt limitate la spitalele universitare şi centrele specializate. Recomandările de doze în funcţie de genotip trebuie să fie considerate într-adevăr ca un concept preliminar care trebuie să fie verificat. Eficacitatea şi utilitatea clinică a acestor teste diagnostice rămâne să fie validată prin studii prospective randomizate controlate, ca şi prin analizele farmacoeconomice (numărul de teste necesar pentru a evita un caz de toxicitate şi costurile asociate).

15.5. Concluzii

Terapia antalgică este un prototip important de individualizare a prescripţiei medicamentoase. Cea mai mare parte a analgezicelor este metabolizată de către CYP, ei înşişi fiind supuşi unui polimorfism genetic. Aceste polimorfisme pot să explice ineficacitatea sau dimpotrivă toxicitatea medicamentului. În perspectivă, detecţia prin fenotipaj şi genotipaj a acestor polimorfisme ar putea să ne ofere metode rapide şi fiabile pentru a optimiza strategiile terapeutice anticipând efectele indezirabile (ineficacitate terapeutică), identificând medicamentul potrivit, prezicând pozologia cea mai eficace şi cea mai sigură pentru fiecare pacient. Pe de altă parte ne permite să distingem o problemă legată de un metabolism ultrarapid, de un abuz medicamentos a unui deficit metabolic. Analiza cost/beneficiu a acestor metode trebuie să fie totuşi confirmată de către studii prospective adecvate.

BIBLIOGRAFIE

ABECASIS G.R., NOGUCHI E., HEINZMANN A., TRAHERNE J.A., BHATTACHARYYA S., LEAVES N.I., ANDERSON G.G., ZHANG Y., LENCH N.J., CAREY A., CARDON L.R., MOFFATT M.F., COOKSON W.O.C., 2001, Extent and distribution of linkage disequilibrium in three genomic regions. Am. J. Hum. Genet.. 68, 191–7.

ADAMS M.D., CELNIKER S.E., HOLT R.A., EVANS C.A., GOCAYNE J.D., AMANATIDES P.G., SCHERER S.E., LI P.W., HOSKINS R.A., GALLE R.F. et al. The genome sequence of Drosophila Melanogaster, 2000, Science 287, 2185–95.

ALBANO C.L., BENTLEY W.E., RAO G, 2001, High throughput studies of gene expression using green fluorescent protein–oxidative stress promoter probe constructs. J.Biomol. Screen. 6, 421– 8.

AMEYAW M.M., REGATEIRO F., LI T., LIU X., TARIQ M., MOBAREK A., THORNTON N., FOLAYAN G.O., GITHANGA J., INDALO A., OFORI-ADJEI D., PRICE-EVANS D.A., MCLEOD H.L., 2001, MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly Pharmacogenetics 11, 217–21.

ANGERS S., SALAHPOUR A., JOLY E., HILAIRET S., CHELSKY D., DENNIS M., BOUVIER M., 2000, Detection of beta 2-adrenergic receptor dimerization in living cells using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3684–9.

ARDELEAN A., 2007, Neurobiologie, Vasile Goldis University Press, Arad.

ARDELEAN A., PRIBAC G., DAMIAN S., 2007, Lucrari practice de biologie celulara si moleculara , Vasile Goldis University Press, Arad.

ARDELEAN A., 2006, Biologie celulara si moleculara, Vasile Goldis University Press, Arad.

ARDELEAN A., TRIPŞA M., 2001, Mecanisme de transport în sistemele biologice. Foreign Languages Press Group, Arad, 9-22, 26-36, 150-195.

ARRANZ M.J., MUNRO J., BIRKETT J., BOLONNA A., MANCAMA D., SODHI M., LESCH K.P., MEYER J.F., SHAM P., COLLIER D.A., MURRAY R.M., KERWIN R.W., 2000. Pharmacogenetic prediction of clozapin response. Lancet 355, 1615–6.

ARRANZ M.J., MUNRO J., SHAM P., KIROV G., MURRAY R.M., COLLIER D.A., KERWIN R.W., 1998, Meta-analysis of studies on genetic variation in 5HT-2A receptors and clozapine response. Schiz. Res. 32, 93–9.

ATREYA HS, CHARY KVR. 2001. Selective "unlabeling" of amino acids in fractionally 13C labeled proteins: an approach for stereospecific NMR assignments of CH3 groups in Val and Leu residues. J. Biomol.NMR 19, 267–72.

BAETS S., VANDEDRINCK S., VANDAMME E.J., in: LEDERBERG J., editor in-chief, 2000, Encyclopedia of Microbiology, 2nd ed., vol. 4, 837–53, Academic Press, San Diego, CA.

BAKKER R.A., LEURS R., 2004, From the human genome to new drugs: The potential of orphan G-protein coupled receptors in: DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G.

eds. Molecular Biology in Medicinal Chemistry, 95 -123, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

BALARAM P., BOTHNER-BY A., DADOK J., 1972, Negative nuclear Overhauser effects as probes of macromolecular structure, J. Am. Chem. Soc. 94, 4015–7.

BARAK L.S., FERGUSON S.S., ZHANG J., CARON M.G., 1997, A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. J. Biol. Chem. 272, 27497–500.

BARTOSIEWICZ M.J., JENKINS D., PENN S., EMERY J., BUCKPITT A., 2001, Unique gene expression patterns in liver and kidney associated with exposure to chemical toxicants. J. Pharmacol. Exp. Ther. 297, 895–905.

BAUMANN W., LEHMANN M., BITZENHOFER M., SCHWINDE A., BIRSCHWEIN M., EHRET R., WOLF B., 1999, Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells. Sensors and Acuators B 55, 77–89.

BAXTER D.F., KIRK M., GARCIA A.F., RAIMONDI A., HOLMQVIST M.H., FLINT K.K., BOJANIC D., DISTEFANO P.S., CURTIS R., XIE Y., 2002, A novel membrane potential-sensitive fluorescent dye improves cell-based assays for ion channels. J. Biomol. Screen. 7.

BĂTRÎNESCU GH. şi colab., 2006, Procese de membrană în biotehnologii. Ars Docendi. Universitatea din Bucureşti, 15-80.

BECK-SICKINGER A.G. 1996. Structural characterization and binding sites of G-proteincoupled receptors. Drug Discov. Today 1, 502–13.

BERGER J., HAUBER J., HAUBER R., GEIGER R., CULLEN B.R., 1988. Secreted placental alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells. Gene 66, 1–10.

BERTILSSON L., DAHL M.L., DALEN P., AL SHURBAJI A., 2002, Molecular genetics of CYP2D6: clinical relevance with focus on psychotropic drugs. Br. J. Clin. Pharmacol. 53, 111–22.

BERTILSSON L., DAHL M.L., DALEN P., et al., 2002, Molecular genetics of CYP 2D6: clinical relevance with focus and psychotropic drugs. Br. J. Clin. Pharmacol., 53: 111-122.

BIEKOFSKY R.R., MARTIN S.R., MCCORMICK J.E., MASINO L., FEFEU S., BAYLEY P.M., FEENEY J., 2002, Thermal stability of calmodulin and mutants studied by 1H-15N HSQC NMR measurements of selectively labeled [15N]Ile proteins. Biochemistry 41, 6850–9.

BLAISDELL J., MOHRENWEISER H., JACKSON J., FERGUSON S., COULTER S., CHANAS B., et al., 2002, Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. Pharmacogenetics 12, 703–11.

BLAKE J.A., RICHARDSON J.E., BULT C.J., KADIN J.A., EPPIG J.T., and the members of the Mouse Genome Database Group. MGD: The Mouse Genome Database. 2003. Nucleic Acids Res 31, 193–5.

BLEICHER K., LIN M., SHAPIRO M., WAREING J., 1998, Diffusion edited NMR: screening compound mixtures by affinity NMR to detect binding ligands to vancomycin, J. Org. Chem. 63.

BOWIE J.U., 2001, Stabilizing membrane proteins, Curr. Opin. Struct. Biol. 11, 397–402.

BRADFORD L.D., 2002, CYP2D6 allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants. Pharmacogenomics 3, 229– 43.

BRANCHINI B.R., MAGYAR R.A., MURTIASHAW M.H., PORTIER N.C., 2001, The role of active site residue arginine 218 in firefly luciferase bioluminescence. Biochemistry 40, 2410–8.

BRANDNER G., PHALIP V., KELLENBERGER E., ZHANG C.C., 1999, Optimization of a cyanobacterial culture for production of isotope-labeled recombinant proteins. Biotechnol. Tech 13, 177– 80.

BRAZMA A., VILO J., 2000, Gene expression data analysis, FEBS Lett 480, 17–24.

BRENNAN M.D., 2002, High throughput genotyping technologies for pharmacogenomics. Am. J. Pharmacogenomics 1, 295–302.

BRENNER S.S., HERRLINGER C., DILGER K., et al., 2003, Influence of age and cytochrome P450 2C9 genotype on the steady-state disposition of diclofenac and celecoxib. Clin. Pharmacokinet., 42:283-292.

BRINKMANN U., EICHELBAUM M., 2001, Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. Pharmacogenomics 1, 59–64.

BRIVANLOU A.H., DARNELL J.E., Jr., 2002, Signal transduction and the control of gene expression. Science 295, 813–8.

BROACH J.R., THORNER J., 1996, Highthroughput screening for drug discovery. Nature 384, 14–6.

BROCKMOLLER J., KIRCHHEINER J., SCHMIDER J., WALTER S., SACHSE C., MULLER-OERLINGHAUSEN B., et al. 2002. The impact of the CYP2D6 polymorphism on haloperidol pharmacokinetics and on the outcome of haloperidol treatment. Clin. Pharmacol. Ther. 72, 438–52

BROOKES A.J., 1999, The essence of SNPs. Gene 234, 177–86.

BRØSEN K., GRAM L.F., 1993, The pharmacogenetics of the selective serotonin reuptake inhibitors. Clin. Invest. 71, 1002–9.

BRUNET A., ROUX D., LENORMAND P., DOWD S., KEYSE S., POUYSSEGUR J., 1999, Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. EMBO J. 18, 664–74.

BULERA S.J. et al., 2001, RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays, Hepatology 33, 1239–1258.

BURMESTER J., PLÜCKTHUN A., 2001, Construction of scFv fragments from hybridoma orspleen cells by PCR assembly, in: KONTERMANN R., DÜBEL S., eds, Antibody Engineering 19– 40, Springer, Berlin.

BURNASHEV N., ROZOV A., 2000, Genomic control of receptor function. Cell Mol. Life Sci. 57, 1499–507.

BYRNE B., IWATA S., 2002, Membrane protein complexes, Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 239–43.

CAMILLERI-BROET S., VANDERWERFF H., CALDWELL E., HOCKENBERY D., 1998, Distinct alterations in mitochondrial mass and function characterize different models of apoptosis. Exp. Cell Res. 239, 277–92.

CARLSSON J., JANSON J-C., SPERRMAN M., in: JANSON J-C, RYDEN L., eds, 1998, Protein Purification: Principles, High- Resolution Methods and Applications, 2nd edn, 375–442, Wiley, New York.

CASCORBI I., GERLOFF T., JOHNE A., MEISEL C., HOFFMEYER S., SCHWAB M., SCHAEFFELER E., EICHELBAUM M., BRINKMANN U., ROOTS I., 2001, Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects. Clin. Pharmacol. Ther. 69, 169–74.

CELIS J.E., KRUHOFFER M., GROMOVA I., FREDERIKSEN C., OSTERGRAAD M., THYKJAER T., GROMOV P., VU J., PÀLSDOTTIR H., MAGNUSSON N., ORTNTOFT T.F., 2000, Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. FEBS Lett 480, 2–16.

CEREGHINO J.L., CREGG J.M., 2000, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia Pastoris. FEMS Microbiol. Rev. 24, 45–66.

CHADEE D.N., HENDZEL M.J., TYLIPSKI C.P., ALLIS C.D., BAZETT-JONES D.P., WRIGHT J.A., DAVIE J.R., 1999, Increased Ser-10 phosphorylation of histone H3 in mitogen-stimulated and oncogenetransformed mouse fibroblasts. J. Biol. Chem. 274, 24914–20.

CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W.W., PRASHER D.C., 1994, Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263, 802–5.

CHANKVETADZE B., 2004, Recent trends in enantioseparation of chiral drugs in: DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G. eds. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. 181 -211, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CHEBIB M., JOHNSTON G.A., 2000, GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. J. Med. Chem. 43, 1427–47.

CHEKULAYEVA M.N., KURNASOV O.V., SHIROKOV V.A., SPIRIN A.S., 2001, Continuous- exchange cell-free protein synthesizing system: synthesis of HIV-1 antigen Nef. Biochem. Biophys. Res. Commun 280, 914–7.

CHEN A., SHAPIRO M.J., 1998, NOE pumping: a novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules, J. Am. Chem. Soc. 120, 10258–9.

CHEN A., SHAPIRO M.J., 2000, NOE Pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR, J. Am. Chem. Soc. 122, 414–5.

CHOI K.H., CHEN C.J., KRIEGLER M., RONINSON I.B., 1988, An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the mdr1 (Pglycoprotein) gene. Cell 53, 519–29.

CHRISTENDAT D., YEE A., DHARAMSI A., KLUGER Y., SAVCHENKO A., CORT J.R., BOOTH V., MACKERETH C.D., SARIDAKIS V., EKIEL I., KOZLOV G., MAXWELL K.L., WU N., MCINTOSH L.P., GEHRING K., KENNEDY M.A., DAVIDSON A.R., PAI E.F., GERSTEIN M., EDWARDS A.M., ARROWSMITH C.H., 2000, Structural proteomics of an archaeon. Nat. Struct. Biol.
7, 903–9.

CLORE G., SCHWIETERS C., 2002, Theoretical and computational advances in biomolecular NMR spectroscopy, Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 146–53.

COLLINS A., LONJOU C., MORTON N.E.,1999, Genetic epidemiology of singlenucleotide polymorphisms. Proc. Natl. Sci. Acad. USA 96, 15173–7.

CONWAY B.R., MINOR L.K., XU J.Z., GUNNET J.W., DEBIASIO R., D'ANDREA M.R., RUBIN R., DEBIASIO R., GIULIANO K., DEBIASIO L., DEMAREST K.T., 1999, Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G protein coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScanTM high-content screening system. J. Biomol. Screen. 4, 75–86.

CRAIG D., HOWELL M.T., GIBBS C.L., HUNT T., JACKSON R.J., 1992, Plasmid cDNA directed synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription–translation system. Nucleic Acids Res. 20, 4987–995.

CRONIN M.T., PHO M., DEBJANI D., FRUEH F., SCHWARCZ L., BRENNAN T., 2001, Utilization of new technologies in drug trials and discovery. Drug Metab. Dispos. 29, 586–90.

CRUCE M., 2000, Biologie celulară şi moleculară. Ed.Aius Craiova, 193-252.

CRUCE M., ARDELEAN A., STĂNOIU B. şi colab., 2004, Căi şi reţele de semnalizare celulară. Ed. Aius Craiova: 49-63, 67-87, 157-173.

CUBBEDU L., MOSS C.X., SWARBRICK J.D., GOOLEY A.A., WILLIAMS K.L., CURMI P.M.G., SLADE M.B., MABBUTT B.C., 2000, Dictyostelium discoideum as expression host: isotopic labeling of a recombinant glycoprotein for NMR studies. Protein Express Purif. 19, 335.

DAHL M.L., JOHANSSON I., BERTILSSON L., INGELMAN-SUNDBERG M., SJOQVIST F., 1995, Ultrarapid hydroxylation of debrisoquine in a Swedish population. Analysis of the molecular genetic basis. J. Pharmacol. Exp. Ther. 274, 516–20.

DAHL M.L., 2002, Cytochrome p450 phenotyping/ genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing? Clin. Pharmacokinet. 41, 453–70.

DALVIT C., FOGLIATTO G., STEWART A., VERONESI M., STOCKMAN B., Water-LOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability, J. Biomol. NMR 21, 349–59, 2001.

DALVIT C.,1998, Effective multi-solvent suppression for the study of organic solvents with macromolecules, J. Biomol. NMR 11, 437–44.

DE LAMOTTE F., BOZE H., BLANCHARD C., KLEIN C., MOULIN G., GAUTIER M.F., DELSUC M.A., 2001, NMR onitoring of accumulation and folding of 15N labeled protein overexpressed in Pichia pastoris. Protein Express Purif. 22, 318–24.

DE WIT R., HENDRIX C.M., BOONSTRA J., VERKLEU A.J., POST J.A., 2000, Largescale screening assay to measure epidermal growth factor internalization. J. Biomol. Screen. 5, 133–40.

DEAN M., HAMON Y., CHIMINI G., 2001, The human ATP-binding cassette (ABC) transporter super family. J. Lipid Res. 42, 1007–17.

DENISOV V., HALLE B., 2002, Hydrogen exchange rates in proteins from water 1H transverse magnetic relaxation, J. Am. Chem. Soc. 124, 10264–5.

DERISI J.L. et al. 1997., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, Science 278, 680–6.

DESMEULES J.A., PIGUET V., EHRET G.B., et al., 2004. Pharmacogenetics, pharmacokinetics, and analgesia. in: Mogil J S(Ed.). The genetics of Pain, Progress in Pain Research and Managenment. IASP Press, 211-238.

DESPLANCQ D., KIEFFER B., SCHMIDT K., POSTEN C., FORSTER A., OUDET P., STRUB J.M., VAN DORSSELAER A., WEISS E., 2001, Cost-effective and uniform 13C- and 15N-labeling of the 24-kDa Nterminal domain of the Escherichia coli gyrase B by overexpression in the photoautotrophic cyanobacterium Anabaena sp. PCC 7120. Protein Express Purif. 23, 207–17.

DICKMANN L.J., RETTIE A.E., KNELLER M.B., KIM R.B., WOOD A.J., STEIN C.M., et al., 2001, Identification and functional characterization of a new CYP2C9 variant (CYP2C9*5) expressed among African Americans. Mol. Pharmacol. 60, 382–7.

DIERCKS T., COLES M., KESSLER H., 2001, Applications of NMR in drug discovery, Curr. Opin. Chem. Biol. 5, 285–91.

DING G.J., FISCHER P.A., BOLTZ R.C., SCHMIDT J.A., COLAIANNE J.J., GOUGH A., RUBIN R.A., MILLER D.K., 1998, Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system. J. Biol. Chem. 273, 28897–905.

DINGER M.C., BECK-SICKINGER A.G., 2002, The first reporter gene assay on living cells: green fluorescent protein as reporter gene for the investigation of Gi-protein coupled receptors. Mol. Biotechnol. 21, 9–18.

DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G., 2004, Molecular Biology in Medicinal Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 133-134

DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G., 2004, Molecular Biology in Medicinal Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 136-137

DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G., 2004. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim 142.

DRYSDALE C.M., MCGRAW D.W., STACK C.B., STEPHENS J.C., JUDSON R.S., NANDABALAN K., ARNOLD K., RUANO G., LIGGETT S.B., 2000, Complex promoter and coding region beta2-adrenergic receptor haplotypes alter receptor expression and predict in vivo responsiveness. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 10483–8.

DUROCHER Y., PERRET S., THIBAUDEAU E., GAUMOND M.H., KAMEN A., STOCCO R., ABRAMOVITZ M., 2000, A reporter gene assay for high-throughput screening of G-proteincoupled receptors stably or transiently expressed in HEK293 EBNA cells.

EAP C.B., BROLY F., MINO A., 2001, Cytochrome P4502D6 genotype and methadone steadystae concentrations. J. Clin. Psychopharmacol., 21:229-234.

EAVES C.J., 1995, Assay of hematopoietic progenitor cells. In Beutler E., M.A. Lichtman, B.S. Collier, T.J. Kipps (eds), Williams Hematology, 5th edn. New York: McGraw-Hill, 22–6.

EDWARDS B.S., KUCKUCK F.W., PROSSNITZ E.R., RANSOM J.T., SKLAR L.A., 2001, HTPS flow cytometry: a novel platform for automated high throughput drug discovery and characterization. J. Biomol. Screen. 6, 83–90.

EDWARDS S.W., TAN C.M., LIMBIRD L.E., 2000, Localization of G-proteincoupled receptors in health and disease. Trends Pharmacol. Sci. 21, 304–8.

ENGBERG J., JENSEN L.B., YENIDUNYA A.F., BRANDT K., RIISE E., 2001, Phage-display libraries of murine antibody Fab fragments, in: KONTERMANN R., DÜBEL S., eds, Antibody Engineering, 65–92, Springer, Berlin.

ENGELS J.E., PARSCH J., 2004, Nucleic acid drugs in: DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G., eds. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. 153 - 179, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

EPSTEIN C.B., BUTOW R.A., 2000, Microarray technology – enhanced versatility, persistent challenge. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 36–41.

EUSTICE D.C., FELDMAN P.A., COLBERG-POLEY A.M., BUCKERY R.M., NEUBAUER R.H., 1991, A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. Biotechniques 11, 739–40, 742–3.

EVANS T.C., MARTIN D., KOLLY R., PANNE D., SUN L., GHOSH I., CHEN L., BENNER J., LIU X.Q., XU M.Q., 2000, Protein trans-splicing and cyclization by a naturally split intein from the dnaE gene of Synechocystis species PCC6803. J. Biol. Chem. 275, 9091–4.

EVANS W.E., JOHNSON J.A., 2001, Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences indrug response. Annu.Rev. Genomics Hum. Genet. 2, 9–39.

EVANS W.E., MCLEOD H.L., 2003, Pharmacogenomics – drug disposition, drug targets and side effects. N. Engl. J. Med. 348, 538–49.

EVANS W.E., RELLING M.V., 1999, Pharmacogenomics: translatingfunctional genomics into rationaltherapeutics. Science 286, 487–91.

FARR S.B., TODD M.D., 1998, Methods and kits for eukaryotic gene profiling. President and Fellows of Harvard College (Cambridge, MA, Xenometrix, Inc.). US Patent 5,811,231.

FERNANDES L.C., KILICARSLAN T., KAPLAN H.L., et al., 2002. Treatment of codeine dependence with inhibitors of cytochrome P450 2D6. J. Clin. Psychopharmacol., 22:326-329.

FIEHN O. 2002. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. Plant. Mol. Biol. 48, 155–71.

FIELDEN M.R. et al., 2002, In silico approaches to mechanistic and predictive toxicology: an introduction to bioinformatics for toxicologists, Crit. Rev. Toxicol. 32, 67–112.

FISCHER M.W., MAJUMDAR A., ZUIDERWEG ERP, 1998, Protein NMR relaxation: theory, application and outlook, Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 33, 207–72.

FITZGERALD L.R., MANNAN I.J., DYTKO G.M., WU H.L., NAMBI P., 1999, Measurement of responses from Gi-, Gs- or Gq-coupled receptors by a multiple response element/cAMP response element-directed reporter assay. Anal. Biochem. 275, 54–61.

FUKUDA H., ARAI M., KUWAJIMA K., 2000, Folding of green fluorescent protein and the cycle3 mutant. Biochemistry 39, 12025–32.

FURUTA T., SHIRAI N., WATANABE F., HONDA S., TAKEUCHI K., IIDA T., et al., 2002, Effect of cytochrome P4502C19 genotypic differences on cure rates for gastroesophageal reflux disease by lansoprazole. Clin. Pharmacol. Ther. 72, 453–60.

GARAVITO R.M., FERGUSON-MILLER S., 2001, Detergents as tools in membrane biochemistry, J. Biol. Chem. 276, 32403–6.

GASCHE Y., DAALI Y., FATHI M., et al., 2004, Codeine intoxication associated with ultrarapid CYP2D6 metabolism.N. Engl. J. Med., 351:2827-2831.

GEORGE S.E., BUNGAY P.J., NAYLOR H., 1997, Functional coupling of edogenous serotonin (5-HT1B) and calcitonin (C1a) receptors in CHO cells to a cyclic AMP-responsive luciferase reporter gene. J. Neurochem. 69, 1278–85.

GHOSH R.N., CHEN Y.T., DEBIASIO R., DEBIASIO R.L., CONWAY B.R., MINOR L.K., DEMAREST K.T., 2000, Cell-based, high-content screen for receptor internalization, recycling and intracellular trafficking. Biotechniques 29, 170–5.

GIFFORD D.K., 2002, Blazing pathways through genetic mountains. Science 293, 2049–51.

GILHAM D.E., CAIRNS W., PAINE M.J., MODI S., POULSOM R., ROBERTS G.C., WOLF C.R., 1997, Metabolism of MPTP by cytochrome P4502D6 and the demonstration of 2D6 mRNA in human foetal and adult brain by in situ hybridization. Xenobiotica 27, 111– 25.

GLASSBROOK N., BEECHER C., RYALS J., 2000, Metabolic profiling on the right path. Nat. Biotechnol. 18, 1142–3.

GLOOR G.B., Gene-targeting in Drosophila validated. 2001. Trends Genet. 17, 549–51.

GOETZ A.S., ANDREWS J.L., LITTLETON T.R., IGNAR D.M., 2000, Development of a facile method for high throughput screening with reporter gene assays. J. Biomol. Screen. 5, 377–84..

GONZALEZ F.J., SKODA R.C., KIMURA S.,UMENO M., ZANGER U.M., NEBERT D.W., GELBOIN H.V., HARDWICK J.P., MEYER U.A., 1988, Characterization of the common genetic defect in humans deficient in debrisoquine metabolism. Nature 331, 442–6.

GOSSEN M., BUJARD H., Studying gene function in eukaryotes by conditional gene inactivation. 2002. Annu. Rev. Genet. 36, 153–73.

GOTO N.K., KAY L.E., 2000, New developments in isotope labeling strategies for protein solution NMR spectroscopy. Curr. Opin. Struct. Biol. 10, 585–92.

GOUGH A.C., SMITH C.A., HOWELL S.M., WOLF C.R., BRYANT S.P., SPURR N.K., 1993, Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. Genomics 15, 430–2.

GREENWALT D.E., SZABO J., MANCHEL I., 2001, High throughput cell-based assay of hematopoietic progenitor differentiation. J. Biomol. Screen. 6, 383–92.

GROTEN J.P. et al.., 2000, An analysis of the possibility for health implications of joint actions and interactions between food additives, Regul Toxicol. Pharmacol. 31, 77–91.

GU H., ZOU Y.R., RAJEWSKY K., Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through CreloxP- mediated gene targeting. 1993. Cell 73, 1155–64.

GÜNTHER U., LIU Y., SANFORD D., BACHOVCHIN W., SCHAFFHAUSEN B., 1996, NMR analysis of interactions of a PI-3 kinase SH2 domain with phosphotyrosine peptides reveals interdependence of major binding sites, Biochemistry 35, 15570–81.

GÜNTHER U., SCHAFFHAUSEN B., 2002. NMRKIN: simulating line shapes from two-dimensional spectra of proteins upon ligand binding, J. Biomol. NMR 22, 201–9.

HAJDUK P., BOYD S., NETTESHEIM D., NIENABER V., SEVERIN J., SMITH R., DAVIDSON D., ROCKWAY T., FESIK S., 2000, Identification of novel inhibitors of urokinase via NMR-based screening, J. Med. Chem. 43, 3862–6.

HAJDUK P., GERFIN T., BOEHLEN J., HABERLI M., MAREK D., FESIK S., 1999, High-throughput nuclear magnetic resonance-based screening, J. Med. Chem. 42, 2315–7.

HAJDUK P., OLEJNICZAK E., FESIK S., 1997, One-dimensional relaxation- and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules, J. Am. Chem. Soc. 119, 12257–61.

HAJDUK P.J., AUGERI D.J., MACK J., MENDOZA R., YANG J., BETZ S.F., FESIK S.W., 2000, NMR-based screening of proteins containing 13C-labeled methyl groups, J. Am. Chem. Soc. 122, 7898–904.

HANAHAN D., WEINBERG R.A., 2000, The hallmarks of cancer. Cell 100, 57–70.

HEASMAN J., Morpholino oligos: making sense of antisense?, 2002, Dev. Biol. 243, 209–214.

HEFTI J.P., KUMAR A., 1999, Sensitive detection method of dielectric dispersions in aqueous based, surface bound macromolecular structures using microwave spectroscopy. Appl. Phys. Lett. 75, 1802–4.

HEIJNE W.H. et al., 2003, Toxicogenomics of bromobenzene hepatotoxicity: a combined transcriptomics and proteomics approach, Biochem. Pharmacol. 651, 857–75.

HITZL M., DRESCHER S., VAN DER K.H., SCHAFFELER E., FISCHER J., SCHWAB M., et

al. 2001, The C3435T mutation in the human MDR1 gene is associated with altered efflux of the P- glycoprotein substrate rhodamine 123 from CD56+ natural killer cells. Pharmacogenetics 11, 293– 8.

HOFFMEYER S., BURK O., VON RICHTER O., ARNOLD H.P., BROCKMOLLER J., JOHNE A., CASCORBI I., GERLOFF T.,ROOTS I., EICHELBAUM M., BRINKMANN U., 2000, Functional polymorphisms of the human multidrug resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with Pglycoprotein expression and activity in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 3473–8.

HOFFMEYER S., BURK O., VON RICHTER O., et al ., 2000, Functional polymorphisms of the human multidrug-resistence gene: multiple sequence variations and correlation of one allele withP-glycoprotein expression and activity in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:3473-3478.

HOLMES E. et al., 2001, Metabonomic characterization of genetic variations in toxicological and metabolic responses using probabilistic neural networks, Chem. Res. Toxicol. 14, 182–91

HONDA A., ADAMS S.R., SAWYER C.L., LEV-RAM V., TSIEN R.Y., DOSTMANN W.R., 2001, Spatiotemporal dynamics of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate revealed by a genetically encoded, fluorescent indicator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2437–42.

HUNTE C., KANNT A., 2003, Antibody fragment mediated crystallization of membrane proteins, in: HUNTE C., VON JAGOW G., SCHÄGGER H., eds, Membrane Protein Purification and Crystallization 205–18, Elsevier Science, Amsterdam.

HUNTE C., MICHEL H., 2002, Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments, Curr. Opin. Struct. Biol. 12, 503–8.

HUNTE C., MICHEL H., 2003, Membrane protein crystallization, in: HUNTE C., VON JAGOW G., SCHÄGGER H., eds, Membrane Protein Purification and Crystallization, 143–60, Elsevier Science, Amsterdam.

HUNTE C., 2001, Insights from the structure of the yeast cytochrome bc1 complex: crystallization of membrane proteins with antibody fragments, FEBS Lett. 504, 126–132.

HWANG L.Y., LIEU P.T., PETERSON P.A., YANG Y., 2001, Functional regulation of immuno-proteasomes and transporter associated with antigen processing. Immunol Res. 24, 245–72.

INGELMAN-SUNDBERG M., OSCARSON M., DALY A.K., GARTE S., NEBERT D.W., 2001, Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 10, 1307–8.

INGELMAN-SUNDBERG M., 2001, Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. Mutat. Res. 482, 11–9.

INTERNATIONAL SNP MAP WORKINGGROUP, 2001, A map of the human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 409, 928–33.

ITO T., CHIBA T., YOSHIDA M., 2001, Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. Trends Biotechnol. 19, S23–7.

JANN M.W., COHEN L.J., 2000, The influence of ethnicity and antidepressant

pharmacogenetics in the treatment of depression. Drug Metab Drug Interact 16, 39–67.

JANNETTO P.J., LALELI-SAHIN E., WONG S.H., 2004, Pharmacogenomic genotyping methodologies. Clin. Chem. Lab. Med., 42:1256-1264.

JANSEN G., HAZENDONK E., THIJSSEN K.L., PLASTERK R.H., Reverse genetics by chemical mutagenesis in Caenorhabditis elegans. 1997. Nat. Genet. 17, 119–21.

JHONE A., KOPKE K., GERLOFF T., et al., 2002, Modulation of steady- state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene. Clin. Pharmacol. Ther., 72:584-594.

JORGENSEN E.M., MANGO S.E., The art and design of genetic screens: caenorhabditis Elegans, 2002, Nat. Rev. Genet. 3, 356–69.

KAGIMOTO M., HEIM M., KAGIMOTO K., ZEUGIN T., MEYER U.A., 1990, Multiple mutations of the human cytochrome P450IID6 gene (CYP2D6) in poor metabolizers of debrisoquine. Study of the functional significance of individual mutations by expression of chimeric genes. J. Biol. Chem. 265, 17209–14.

KAISER R., SEZER O., PAPIES A., BAUER S., SCHELENZ C., TREMBLAY P.B., et al., 2002, Patient-tailored antiemetic treatment with 5-hydroxytryptamine type 3 receptor antagonists according to cytochrome P-450 2D6 genotypes. J. Clin. Oncol. 20, 2805–11.

KANG S.H., OH T.J., KIM R.G., KANG T.J., HWANG S.H., LEE E.Y., CHOI C.Y., 2000, An efficient cell-free protein synthesis system using periplasmic phosphatase-removed S30 extract. J. Microbiol. Methods 43, 91–6.

KARP P.D., 2001, Pathway databases: a case study in computational symbolic theories. Science 293, 2040–4.

KAWAMURA M., OHARA S., KOIKE T., IIJIMA K., SUZUKI J., KAYABA S., et al., 2003, The effects of lansoprazole on erosive reflux oesophagitis are influenced by CYP2C19 polymorphism. Aliment. Pharmacol. Ther.17, 965–73.

KIM D.M., SWARTZ J.R., 2000, Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. Biotech. Prog. 16, 385–90.

KIM R.B., LEAKE B.F., CHOO E.F., DRESSER G.K., KUBBA S.V., SCHWARZ U.I., TAYLOR A., XIE H.G., MCKINSEY J., ZHOU S., LAN L.B., SCHUETZ J.D., SCHUETZ E.G., WILKINSON G.R., 2001, Identification of functionally variant MDR1 alleles among European Americans and African Americans. Clin. Pharmacol. Ther. 70, 189–99.

KIMCHI-SARFATY C., GRIBAR J.J., GOTTESMAN M.M., 2002, .Functional characterization of coding polymorphisms in the human MDR1 gene using a vaccinia virus expression system. Mol. Pharmacol., 62, 1–6.

KIMURA S., UMENO M., SKODA R.C., MEYER U.A., GONZALEZ F.J., 1989, The human debrisoquine 4-hydroxylase (CYP2D) locus: sequence and identification of the polymorphic CYP2D6 gene, a related gene and a pseudogene. Am. J. Hum. Genet. 45, 889–904.

KIRCHHEINER J., BROSEN K., DAHL M.L., GRAM L.F., KASPER S., ROOTS I., et al., 2001, CYP2D6 and CYP2C19 genotype based dose recommendations for antidepressants: a first step towards subpopulation-specific dosages. Acta Psychiatr. Scand. 104, 173–92.

KIRCHHEINER J., MEINEKE I., STEINBACH N., MEISEL C., ROOTS I., BROCKMOLLER J., 2003, Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. Br. J. Clin. Pharmacol., 55, 51–61.

KIRCHHEINER J., STORMER E., MEISEL C., et al., 2003, Influence of CYP2C9 genetic polymorphisms on pharmacokinetics of celecoxib and its metabolites. Pharmacogenetics, 13: 473

KOEN Y.M. et al., 2000, Identification of three protein targets for reactive metabolites of bromobenzene in rat liver cytosol, Chem. Res. Toxicol. 13, 1326–35.

KOTARSKY K., OWMAN C., OLDE B., 2001, A chimeric reporter gene allowing for clone selection and high-throughput screening of reporter cell lines expressing G-protein-coupled receptors. Anal. Biochem. 288, 209–15.

KRUGLYAK L., 1999, Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. Nat. Genet. 22, 139–44.

KUEHL P., ZHANG J., LIN Y., et al., 2001, Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. Nat. Genet., 27: 383-391.

KUHLBRANDT W., 2003, Two-dimensional crystallization of membrane proteins: a practical guide, in: HUNTE C., VON JAGOW G., SCHÄGGER H., eds, Membrane Protein Purification and Crystallization, 253–84, Elsevier Science, Amsterdam.

KUIVENHOVEN J.A., JUKEMA J.W., ZWINDERMAN A.H., DE KNIJFF P., MCPHERSON R., BRUSHCKE A.V., LIE K.I., KASTELEIN J.J., 1998, The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. The Regression Growth Evaluation Statin Study Group. N. Engl. J. Med. 338, 86–93.

KWIATKOWSKI R.W., LYAMICHEV V., DE ARRUDA M., NERI B., 1999, Clinical, genetic, and pharmacogenetic applications of the Invader assay. Mol. Diagn. 4, 353–64.

LANDER ES, et al., 2001, Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature 409, 860–921.

LANGE C., HUNTE C. 2002. Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2800–5.

LEE J.T., KROEMER H.K., SILBERSTEIN D.J., FUNCK-BRENTANO C., LINEBERRY M.D., WOOD A.J., RODEN D.M., WOOSLEY R.L., 1990, The role of genetically determined polymorphic drug metabolism in the beta blockade produced by propafenone. N. Engl. J. Med. 322, 1764–8.

LEFKOWITZ R.J., 2000, The superfamily of heptahelical receptors. Nat. Cell Biol. 2, E133–6.

LEOF E.B., 2000, Growth factor receptor signaling: location location location. Trends Cell Biol. 10, 343–8.

LESLIE A.G., MOODY P.C., SHAW W.V., 1988, Structure of chloramphenicol acetyltransferase at 1.75-A resolution. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4133–7.

LEVO A., KOSKI A., OJANPERA I., 2003. Post-morten SNP analysis of CYP2D6 gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. Forensic Sci Int, 135:9-15.

LIESE A., SEELBACH K., BUCHHOLZ A., HABERLAND J., in: LIESE A., SEELBACH K., WANDREY C., 2000, Eds Industrial Biotransformations, 95–392, Wiley-VCH, Weinheim.
LIN M., SHAPIRO M., 1996, Mixture analysis in combinatorial chemistry, application of diffusion-resolved NMR spectroscopy, J. Org. Chem. 61, 7617–9.

LIN M., SHAPIRO M.J., WAREING J.R., 1997, Diffusion-edited NMR-affinity NMR for direct observation of molecular interactions, J. Am. Chem. Soc. 119, 5249–50.

LLEDO P., 1993, Variations in drug metabolism due to genetic polymorphism. Drug Invest 5, 19–34.

LOCKHART D.J., WINZELER E.A., 2000, Genomics, gene expression and DNA arrays. Nature 405, 827–36.

LORENZ W.W., CORMIER M.J., O'KANE D.J., HUA D., ESCHER A.A., SZALAY A.A., 1996, Expression of the Renilla reniformis luciferase gene in mammalian cells. J. Biolumin. Chemilumin. 11, 31–7.

LOVLIE R., DALY A.K., MATRE G.E., MOLVEN A., STEHEN V.M., 2001, Polymorphisms in CYP2D6 duplicationnegative individuals with the ultrarapid metabolizer phenotype: a role for the CYP2D6*35 allele in ultrarapid metabolism? Pharmacogenetics 11, 45– 55.

MADIN K., SAWASAKI T., OGASAWARA T., ENDO Y., 2000, A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 559–64..

MAHAJAN N.P., LINDER K., BERRY G., GORDON G.W., HEIM R., HERMAN B., 1998, Bcl– 2 and Bax interactions in mitochondria probed with green fluorescent protein and fluorescence resonance energy transfer. Nat. Biotechnol. 16, 547–52.

MAITLAND-VAN DER ZEE A., KLUNGEI O.H., STRICKER B.H.C., VERSCHUREN W.M.M., KASTELEIN J.J.P., LEUFKENS H.G.M., DE BOER A., 2002, Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. Atherosclerosis 163, 213–22.

MAJERLE A., KIDRIC J., JERALA R., 2000, Production of stable isotope enriched. antimicrobial peptides in Escherichia coli: an application to the production of a 15N-enriched fragment of lactoferrin. J. Biomol. NMR 18, 145–51.

MALAKOFF D., The Rise of the Mouse, Biomedicine's Model Mammal., 2000, Science 288, 248–53.

MANNING A.M., 1996, Transcription factors: a new frontier for drug discovery. Drug Discov Today 1, 151–60.

MAREZ D., LEGRAND M., SABBAGH N., GUIDICE J.M., SPIRE C., LAFITTE J.J., MEYER U.A., BROLY F., 1997, Polymorphism of the cytochrome P450 CYP2D6 gene in a European population: characterization of 48 mutations and 53 alleles, their frequencies and evolution. Pharmacogenetics 7, 193–202.

MARINISSEN M.J., GUTKIND J.S., 2001, G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol. Sci. 22, 368–76.

MARLEY J., LU M., BRACKEN C., 2001 A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins. J. Biomol. NMR 20, 71-5

MARTEMYANOV K.A., SHIROKOV V.A., KURNASOV O.V., GUDKOV A.T., SPIRIN A.S., 2001, Cell-free production of biologically active polypeptides: application to the synthesis of antibacterial polypeptide cecropin. Protein Expr Purif 21, 456–61.

MAYER M., MEYER B., 2001, Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor, J. Am. Chem. Soc. 123, 6108–17.

METZGER D., CHAMBON P., Site- and time-specific gene targeting in the mouse., 2001, Methods 24, 71–80.

MAYER T.U., KAPOOR T.M., HAGGARTY S.J., KING R.W., SCHREIBER S.L., MITCHISON T.J., 1999, Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. Science 286, 971–4.

MEYER B., WEIMAR T., PETERS T., 1997, Screening mixtures for biological activity by NMR, Eur. J. Biochem. 246, 705–9.

MEYER U.A., 2000, Pharmacogenetics and adverse drug reactions. Lancet 356, 1667–71.

MICHEL H., 2001, Crystallization of membrane proteins, in: ROSSMANN M.G., ARNOLD E., eds, International Tables of Crystallography F: Macromolecular Crystallography, 94–9, Kluwer, Dordrecht.

MICHIENZI A., CAGNON L., BAHNER I., ROSSI J.J., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8955–60.

MILLIGAN G., REES S., 1999, Chimaeric G alpha proteins: their potential use in drug discovery. Trends Pharmacol. Sci. 20, 118–24.

MITCHELL P., 2001, Turning the spotlight on cellular imaging. Nat. Biotechnol. 19, 1013–7.

MIXIC FR., ARDELEAN AUREL, 2002, Principii fundamentale de biologie moleculara, Ed. Medicala Universitara Craiova.

MOORE J.T., DAVIS S.T., DEV I.K., 1997, The development of beta-lactamase as a highly versatile genetic reporter for eukaryotic cells. Anal. Biochem. 247, 203–9.

MORIYA Y., NAKAMURA T., HORINOUCHI M., SAKAEDA T., TAMURA T., AOYAMA N., et al. 2002, Effects of polymorphisms of MDR1, MRP1, and MRP2 genes on their mRNA expression levels in duodenal enterocytes of healthy Japanese subjects. Biol. Pharm. Bull. 25, 1356– 9.

NAGY A., ROSSANT J., NAGY R., ABRAMOW-NEWERLY W., RODER J.C., Derivation of completely cell culture derived mice from early-passage embryonic stem cells. 1993. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8424–8.

NAKAMURA K., ARIYOSHI N., YOKOI T., OHGIYA S., CHIDA M., NAGASHIMA K., et al. 2002, CYP2D6.10 present in human liver microsomes shows low catalytic activity and thermal stability. Biochem. Biophys. Res. Commun. 293, 969–73.

NICHOLSON J.K., CONNELLY J., LINDON C., HOLMES E., 2002, Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. Nat. Rev. Drug Discov. 1, 153–61.

NICHOLSON J.K., LINDON J.C., HOLMES E., 1999, "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. Xenobiotica 29, 1181–9.

NOWOTNY P., KWON J.M., GOATE A.M., 2001, SNP analysis to dissect human traits. Curr. Opin. Neurobiol. 11, 637–41.

ORMO M., CUBITT A.B., KALLIO K., GROSS L.A., TSIEN R.Y., REMINGTON S.J., 1996, Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. Science 273, 1392–5.

OUDE ELFERNIC R.P., ZADINA J., 2001, MDR1 P-glycoprotein transports endogenous peptides. Peptides, 22:2015-2020.

PADAN E., HUNTE C., REILANDER H., 2003, Production and purification of recombinant membrane proteins, in: HUNTE C., VON JAGOW G., SCHÄGGER H., eds, Membrane Protein Purification and Crystallization, 55–83, Elsevier Science, Amsterdam.

PAIGEN K., 1989, Mammalian betaglucuronidase: genetics molecular biology and cell biology. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 37, 155–205.

PALCZEWSKI K., KUMASAKA T., HORI T., BEHNKE C.A., MOTOSHIMA H., FOX B.A., LE TRONG I., TELLER D.C., OKADA T., STENKAMP R.E., YAMAMOTO M., MIYANO M., 2000, Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. Science 289, 739–45.

PARSONS S.J., RHODES S.A., CONNOR H.E., REES S., BROWN J., GILES H., 2000,Use of a dual firefly and Renilla luciferase reporter gene assay to simultaneously determine drug selectivity at human corticotrophin releasing hormone 1 and 2 receptors. Anal. Biochem. 281, 187–92.

PELLETIER J.N., CAMPBELL-VALOIS F.X., MICHNICK S.W., 1998, Oligomerization domain-directed reassembly of active dihydrofolate reductase from rationally designed fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 12141–6.

PEREZ O.D., NOLAN G.P., 2002, Simultaneous measurement of multiple active kinase states using polychromatic flow cytometry. Nat. Biotechnol. 20, 155–62.

POLLOK B.A., HEIM R., 1999, Using GFP in FRET-based applications. Trends Cell Biol. 9, 57–60.

RAAMSDONK L.M., TEUSINK B., BROADHURST D., ZHANG N., HAYES A., WALSH M.C., BERDEN J.A., BRINDLE K.M., KELL D.B., ROWLAND J.J., WESTERHOFF H.V., VAN DAM K., OLIVER S.G., 2000, A functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations. Nat. Biotechnol. 19, 45–50.

RAM P.T., IYENGAR R., 2001, G protein coupled receptor signaling through the Src and Stat3

pathway: role in proliferation and transformation. Oncogene 20, 1601–6.

RAO N.N., LIESE A., 2004, Stereoselective synthesis with the help of recombinant enzymes in: DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G.. eds. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. 125 -153, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

RAU T., HEIDE R., BERGMANN K., WUTTKE H., WERNER U., FEIFEL N., et al., 2002, Effect of the CYP2D6 genotype on metoprolol metabolism persists during long-term treatment. Pharmacogenetics 12, 465–72.

REICH D.E., CARGILL M., BOLK S., IRELAND J., SABETI P.C., RICHTER D.J., LAVERY T., KOUYOUMJIAN R., FARHADIAN S.F., WARD R., LANDER E.S., 2001, Linkage disequilibrium in the human genome. Nature 411, 199–204.

REMINGTON S.J., 2002, Negotiating the speed bumps to fluorescence. Nat. Biotechnol. 20, 28–.

REMY I., MICHNICK S.W., 1999, Clonal selection and in vivo quantitation of protein interactions with proteinfragment complementation assays. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 5394–.

RENEGAR G., RIESER P., MANASCO P., 2001, Pharmacogenetics: the Rx perspective. Expert Rev. Mol. Diagn. 1, 255–63.

ROBERTS G., 2000, Applications of NMR in drug discovery, Drug Discov. Today 5, 230–40.

ROBERTSON J.D., ORRENIUS S., 2000, Molecular mechanisms of apoptosis induced by cytotoxic chemicals, Crit. Rev. Toxicol. 30, 609–27.

ROGERS J.F., NAFZIGER A.N., BERTINO J.S., 2002, Pharmacogenetics affects dosing, efficacy and toxicity of cytochrome P450- metabolized drugs. Am. J. Med., 113: 746-750.

RONG Y.S., TITEN S.W., XIE H.B., GOLIC M.M., BASTIANI M., BANDYOPADHYAY P., OLIVERA B.M., BRODSKY M., RUBIN G.M., GOLIC K.G., Targeted mutagenesis by homologous recombination in D. melanogaster., 2002, Genes. Dev. 16, 1568–81.

ROSSANT J., NAGY A., Genome engineering: the new mouse genetics. 1995. Nat. Med. 1, 592–4.

SAENGER W., 1984, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer Verlag, New York.

SAMER C.F., PIGUET V., DAYER P., et al., 2005, Polymorphisme genetique et interaction medicamenteuses: leur importance dans le traitement de douleur. Can. J. Anesth., 52:806-821.

SARVER J.G., KLIS W.A., BYERS J.P., ERHARDT P.W., 2002, Microplate screening of the differential effects of test agents on Hoechst 33342, rhodamine 123, and rhodamine 6G accumulation in breast cancer cells that overexpress Pglycoprotein. J. Biomol. Screen. 7, 29–34.

SAUTEL M, MILLIGAN G., 2000, Molecular manipulation of G-proteincoupled receptors: a new avenue into drug discovery. Curr. Med. Chem. 7, 889–96.

SCHAAP A.P., AKHAVAN H., ROMANO L.J., 1989, Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. Clin. Chem. 35, 1863–4.

SCHAUFELE F., 2001, Shedding light on molecular timing. Nat. Biotechnol. 19, 21–2.

SCHERR M., REED M., HUANG C.-F., RIGGS A.D., ROSSI J.J., 2000, Mol. Therapy 2, 26–38.

SCHLESSINGER J., 1993, Cellular signaling by receptor tyrosine kinases. Harvey Lect. 89, 105–23.

SCORDO M.G., AKLILLU E., YASAR U., et. al., 2001, Genetic poymorphism of cytochrome P450 2C9 in a caucasian and a black African population. Br. J. Cin. Pharmacol., 52: 447-450.

SCORDO M.G., SPINA E., ROMEO P., DAHL M.L., BERTILSSON L., JOHANSSON I., et al., 2000, CYP2D6 genotype and antipsychotic-induced extrapyramidal side-effects in schizophrenic patients. Eur. J. Clin. Pharmacol. 56, 679–83.

SCRIBA G., 2004, Affinity chromatography in: DINGERMANN TH., STEINHILBER D., FOLKERS G., eds. Molecular Biology in Medicinal Chemistry. 211 - 242, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

SHAPIRO M., WAREING J., 1998, NMR methods in combinatorial chemistry, Curr. Opin. Chem. Biol. 2, 372–5.

SHARKE K., JARRAR M., SCHMIDT H., et al., 2003, ABCB1 (multidrug resistance transporter) gene mutations on disposition and central nervous effects of loperamide in healthy volunteers. Pharmacogenetics, 74:651-660.

SHI M.M., BLEAVINS M.R., DE LA IGLESIA F.A., 2001, Technologies for detecting genetic polymorphisms in pharmacogenomics. Drug Metab. Dispos. 29, 591–5.

SHINDERMAN M., MAXWELL S., BRAWAND-AMEY M., et al., 2003, Cytochrome p450 3A4 metabolic activity, methadone blood concentrations, and methadone doses. Drug Alcohol Dependence, 69: 205-211.

SHINTANI M., IEIRI I., INOUE K., et al., 2001, Genetic polymorphysms and functional characterization of the 5'- flanking region of the human CYP2C9 gene: in vitro and in vivo studies. Clin. Pharmacol. Ther. 70: 175-182.

SHIROKOV V., SIMONENKO P.N., BIRYUKOV S.V., SPIRIN A.S., 2002, Continuous-flow and continuous exchange cell-free translation systems and reactors. In Spirin AS, ed., Cell free Translation Systems, 91–108, Springer, Berlin.References 299

SHUKER S.B., HAJDUK P.J., MEADOWS R.P., FESIK S.W., 1996, Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR, Science 274, 1531–4.

SIGURDSSON S.T.H., THOMSON J.B., ECKSTEIN F., IN: R.W. SIMONS, M. GRUNBERGMANAGO, 1998, eds, RNA Structure and Function, 339–76, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

SIMON M.A., 2000, Receptor tyrosine kinases: specific outcomes from general signals. Cell 103, 13–5.

SINDRUP S.H., BRØSEN K., 1996, The pharmacogenetics of codeine hypoalgesia. Pharmacogenetics 10, 335–46.

SINGH M., O'HAGAN D.T., 2002, Recent advances in vaccine adjuvants, Pharm. Res. 6, 715.

SMITHIES O., Animal models of human genetic diseases, 1993, Trends Genet. 9, 112–16.

SNYDER L.H., 1932, The inheritance of taste deficiency in man. Ohio J. Sci. 32, 436–68.

SOMOGYI R., GRELLER L.D., 2001, The dynamics of molecular networks: applications to therapeutic discovery. Drug Discov. Today 6, 1267–77.

SONOYAMA T., TANI H., MATSUDA K., KAGEYAMA B., TANIMOTO M., KOBYASHI K., YAGI S., KYOTANI H., MITSUSHIMA K., 1982, Appl. Environ Microbiol. 43, 1064–9.

SORKIN A., MCCLURE M., HUANG F., CARTER R., 2000, Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. Curr. Biol. 10, 1395–8.

SPINA E., GIOTTO C., AVENOSO A., CAMPO G.M., et al., 1997, Relationship between plasma desipramine levels, CYP2D6 phenotype and clinical response to desipramine: a prospective study. Eur. J. Clin. Pharmacol., 51:395-398.

STEPHANOPOULOS G., KELLEHER J., 2001, Biochemistry. How to make a superior cell. Science 292, 2024–5.

STEPHANOPOULUS G.N., ARISTIDOU A.A., NIELSEN J., 1998, Metabolic Engineering – Principles and Methodologies, Academic Press, San Diego, CA.

STOCKMANN B., DALVIT C., 2002, NMR screening techniques in drug discovery and drug design, Prog. Nucl. Magn. Spectrosc. 41, 187–231.

STRATOWA C., HIMMLER A., CZERNILOFSKY A.P., 1995, Use of a luciferase reporter system for characterizing G-protein-linked receptors. Curr. Opin. Biotechnol. 6, 574–81.

STRAUB B., MEYER E., FROMHERZ P., 2001, Recombinant maxi-K channels on transistor, a prototype of ionoelectronic interfacing. Nat. Biotechnol. 19, 121–124.

STREETMAN D.S., BERTINO J.S. JR., NAFZIGER A.N., 2000, Phenotyping of drug-metabolizing enzyme In adults: a review of in vivo cytochrome P450 phenotyping probes. Pharmacogenetics, 10:187-216.

SUBRAMANIAM R., DESVEAUX D., SPICKLER, MICHNICK S.W., BRISSON N., 2001, Direct visualization of protein C interactions in plant cells. Nat. Biotechnol. 19, 769–72.

SULLIVAN E., TUCKER E.M., DALE I.L., 1999, Measurement of [Ca2+] using the Fluorometric Imaging Plate Reader (FLIPR). Methods Mol. Biol. 114, 125–33.

SWYNGHEDAUW B., 2001, Cardiovascular pharmacogenetics and pharmacogenomics. J. Clin. Basic. Cardiol. 4, 205–10.

SYKES B., 1994, Interaction of transforming growth factor-a with the epidermal growth factor receptor: binding kinetics and differential mobility within the bound TGF-a, Biochemistry 33, 15283–92.

TAMMINGA W.J., WERNER J., OOSTERHUIS B., BRAKENHOFF J.P.G., GERRITIS M.G.F., DE ZEEUW R.A., DE LEIJ L.F., JONKMAN J.H., 2001, An optimized methodology for combined phenotyping and genotyping on CYP2D6 and CYP2C19. Eur. J. Clin. Pharmacol. 57, 143–6.

TAN S., HALL I.P., DEWAR J., DOW E., LIPWORTH B., 1997, Association between beta 2 adrenoceptor polymorphism and susceptibility to bronchodilator desensitisation in moderately severe stable asthmatics. Lancet 350, 995–9.

THOMAS K.R., CAPECCHI M.R., Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. 1987. Cell 51, 503–12.

THOMAS R.S., RANK D.R., PENN S.G., ZASTROW G.M., HAYES K.R., PANDE K., GLOVER E., SILANDER T., CRAVEN M.W., REDDY J.K., JOVANOVICH S.B., BRADFIELD C.A., 2001, Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. Mol. Pharmacol. 60, 1189–94.

THORISSON G.A., STEIN L.D., 2003, The SNP Consortium website: past, present and future. Nucleic Acids Res. 31, 124–7.

TSIEN R.Y., 1998, The green fluorescent protein. Annu. Rev. Biochem. 67, 509– 44.

TSUJI Y. et al., 2000, Coordinate transcriptional and translational regulation of ferritin in response to oxidative stress, Mol. Cell Biol., 20, 5818–27.

TSUNEOKA Y., MATSUO Y., IWAHASHI K., TAKEUCHI H., ICHIKAWA Y., 1993, A novel cytochrome P-450ID6 mutant gene associated with Parkinson's disease. J. Biochem. 114, 263–6.

TUCKER C.L., FIELDS S., 2001, A yeast sensor of ligand binding. Nat. Biotechnol. 19, 1042–6.
TULIN E.E., KEN-ICHI T., SHIN-ICHIRO E., 1995, Continuously coupled transcription-translation system for the production of rice cytoplasmic aldolase. Biotechnol. Bioeng. 45, 511–6.

UDVADIA A.J., LINNEY E., Windows intodevelopment: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. 2003. Dev. Biol. 256, 1–17.

UINGS I.J., FARROW S.N., 2000, Cell receptors and cell signaling. Mol. Pathol. 53, 295–9.

VAN DEN BURG H.A., DE WIT P.J.G.M., VERVOORT J., 2001, Efficient 13C/15N double labeling of the avirulence protein AVR4 in a methanol-utilizing strain (Mut+. of Pichia pastoris. J. Biomol. NMR 20, 251–61.

VENTER J.C., et al., 2001, The sequence of the human genome, Science 291, 1304–51.

VENTURI M., HUNTE C., 2003, Monoclonal antibodies for the structural analysis of the Na+/H+ antiporter NhaA from Escherichia coli, Biochim Biophys Acta Biomembr 1610, 46–50.

VENTURI M., SEIFERT C., HUNTE C., 2002, High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm, J. Mol. Biol. 315, 1–8.

VERSTUYFT C., SCHWAB M., SCHAEFFELER E., KERB R., BRINKMANN U., JAILLON P., et al., 2003, Digoxin pharmacokinetics and MDR1 genetic polymorphisms. Eur. J. Clin. Pharmacol. 58, 809–12.

VOGT A., ADACHI T., DUCRUET A.P., CHESEBROUGH J., NEMOTO K., CARR B.I., LAZO J.S., 2001, Spatial analysis of key signaling proteins by high-content solid-phase cytometry in Hep3B cells treated with an inhibitor of Cdc25 dual-specificity phosphatases. J. Biol. Chem. 276, 20544–50.

VOGTHERR M., PETERS P., 2000, Application of NMR based binding assays to identify key hydroxy groups for intermolecular recognition, J. Am. Chem. Soc. 122, 6093–9.
WARREN M.K., ROSE W.L., BEALL L.D., CONE J., 1995, CD34+ cell expansion and expression of lineage markers during liquid culture of human progenitor cells. Stem Cells 13, 167– 74.

WEINBERGER S.R., DALMASSO E.A., FUNG E.T., 2002, Current achievements using Protein Chip Array technology. Curr. Opin. Chem. Biol. 6, 86–91.

WELSH S., KAY S.A., 1997. Reporter gene expression for monitoring gene transfer. Curr. Opin. Biotechnol. 8, 617–22.

WHITE M.A., 1996, The yeast twohybrid system: forward and reverse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 10001–3.

WORMHOUDT L.W., COMMANDEUR J.N., VERMEULEN N.P., 1999, Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, glutathione-S-transferase, and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. Crit. Rev. Toxicol. 29, 59–124.

WUTTKE H., RAU T., HEIDE R., BERGMANN K., BOHM M., WEIL J., et al., 2002, Increased frequency of cytochrome P450 2D6 poor metabolizers among patients with metoprolol-associated adverse effects. Clin. Pharmacol. Ther. 72, 429–37.

XING H., TRAN H., KNAPP T.E., NEGULESCU P.A., POLLOK B.A., 2000, A fluorescent reporter assay for the detection of ligands acting through Gi protein-coupled receptors. J. Recept. Signal Transduct Res. 20, 189–210.

XING H., TRAN H.C., KNAPP T.E., NEGULESCU P.A., POLLOK B.A., 2000, A fluorescent reporter assay for the detection of ligands acting through Gi protein-coupled receptors. J. Recept Signal Transduct Res. 20, 189–210.

XU J.Z., WANG X., ENSIGN B., LI M., WU L., GUIA A., XU J., 2001, Ion-channel assay technologies: quo vadis? Drug Discov. Today 6, 1278–87.

ZABIN I., 1982, A model of protein interaction. Mol. Cell Biochem. 49, 87– 96.

ZAIGLER M., TANTCHEVA-POOR I., FUHR U., 2000, Problems and perspectives of phenotyping for drug-metabolizing enzymes in man. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. 37, 1–9.

ZANGER U.M., FISCHER J., RAIMUNDO S., STUVEN T., EVERT B.O., SCHWAB M., et al. 2001, Comprehensive analysis of the genetic factors determining expression and function of hepatic CYP2D6. Pharmacogenetics 11, 573–85.

ZANGER U.M., RAIMONDO S., EICHELBAUM M., 2004, Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 369:23-37.

ZHANG H., HASTY P., BRADLEY A., Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells., 1994, Mol. Cell Biol. 14, 2404–10.

ZHOU H., TONG Z., MCLEOD J. F., 2004, "Cocktail" approaches and strategies in drug development: valuable tool or flwedscience? J. Clin. Pharmacol. 44:120-134.

ZHOU P., LUGOVSKOY A.A., WAGNER G., 2001, A solubility-enhancement tag (SET) for NMR studies of poorly behaving proteins. J. Biomol. NMR 20, 11–4.

ZHU H.J., BURGESS A.W., 2001, Regulation of transforming growth factor-beta signaling. Mol. Cell Biol. Res. Commun. 4, 321–30.

ZHU M., FAHL W.E., 2000, Development of a green fluorescent protein microplate assay for the screening of chemopreventive agents. Anal. Biochem. 287, 210–7.

ZLOKARNIK G., NEGULESCU P.A., KNAPP T.E., MERE L., BURRES N., FENG L., WHITNEY M., ROEMER K., TSIEN R.Y., 1998, Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. Science 279, 84–8.

ZSCHIESCHANG P., HIEPE F., GROMNICA-IHLE E., ROOTS I., CASCORBI I., 2002, Lack of association between arylamine N-acetyltransferase 2 (NAT2) polymorphism and systemic lupus erythematosus. Pharmacogenetics 12, 559–63.

ZUHLSDORF M.T., 1998, Relevance of pheno- and genotyping in clinical drug development. J. Clin. Pharmacol. Ther. 36, 607–12.