

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CHIMICHE
XXI CICLO**

**STUDI STRUTTURALI E IDENTIFICAZIONE DI
LIGANDI DELLA PROTEINA UMANA PED:
UN’APPLICAZIONE DELLA SPETTROSCOPIA NMR
*AL DRUG DISCOVERY***

TUTORE

Prof. Carlo Pedone

CANDIDATA

Biancamaria Farina

COTUTORE

Prof. Roberto Fattorusso

RELATORE

Prof. ssa Lucia Falcigno

COORDINATORE

Prof. Aldo Vitagliano

2005-2008

INDICE

Abbreviazioni	V
1 Introduzione	
1.1 Ricerca e sviluppo di un farmaco	1
1.2 NMR nel <i>drug discovery</i>	3
1.3 Strategie di ottimizzazione basate sull’NMR	6
1.3.1 Approcci <i>fragment-linkage</i>	7
1.3.2 Approccio di ottimizzazione iterativa <i>structure-based</i> : SUBITO	9
1.4 Collezione di frammenti molecolari	10
1.5 PED: una proteina di interesse farmacologico	13
1.6 Domini di PED e loro relazioni struttura-funzione	16
1.7 Scopo della tesi	18
2 Metodi NMR per l’identificazione di interazioni ligando-proteina e per lo studio della dinamica del <i>backbone</i> di una proteina	
2.1 Introduzione	20
2.2 Tecniche NMR per rivelare e caratterizzare il legame di un ligando ad una proteina	20
2.3 Metodi basati sull’osservazione del ligando	21
2.3.1 <i>Saturation Transfere Difference</i> (STD)	23
2.3.2 <i>Water Ligand Observed by Gradient Spectroscopy</i> (waterLOGSY)	26
2.3.3 <i>transferred</i> NOE (trNOE)	28
2.4 Metodi basati sull’osservazione della proteina: <i>chemical shift mapping</i>	30
2.5 NMR e dinamica delle proteine	31
	I

2.6	Il rilassamento	33
2.7	Meccanismi che generano campi magnetici fluttuanti	34
2.8	Densità spettrale	36
2.8.1	Funzione di correlazione	36
2.8.2	Scala dei tempi del campo fluttuante	39
2.9	Misura delle velocità di rilassamento del ^{15}N	42
2.10	Interpretazione dei dati di rilassamento	46
2.11	Mappatura delle densità spettrale ridotte	47
2.12	<i>Model-free</i>	48

3 Materiali e Metodi

3.1	Allestimento della <i>library</i> di frammenti molecolari e sua caratterizzazione mediante spettri protonici monodimensionali	53
3.2	Espressione e purificazione della proteina PED non marcata e marcata con ^{15}N	54
3.3	Espressione e purificazione della proteina D4 α	55
3.4	Spettroscopia NMR per lo studio di interazioni proteina-ligando	56
3.4.1	1D ^1H STD	56
3.4.2	waterLOGSY	56
3.4.3	2D [^1H , ^1H] NOESY	57
3.4.4	2D [^{15}N , ^1H] HSQC	57
3.5	Spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC per la misura di R_1 , R_2 e NOE	58
3.6	Analisi di R_1 , R_2 e NOE	59
3.7	Analisi statistica dei parametri di rilassamento con il <i>model-free</i> e le funzioni densità spettrali ridotte	59
3.8	Misura del coefficiente di diffusione da esperimenti DOSY	61
3.9	Misura del coefficiente di diffusione traslazionale dalla struttura tridimensionale mediante HYDRO	62
3.10	Sintesi di composti bidentati	62
3.11	Docking proteina-ligando	73

4 Risultati e discussione: identificazione di ligandi della proteina PED

4.1	Allestimento e caratterizzazione della <i>library</i> di piccole molecole organiche	74
4.2	<i>Screening</i> NMR della <i>library</i> di piccole molecole organiche contro PED	78
4.3	Validazione degli <i>hit</i> e determinazione della loro K_D con PED	81
4.4	Caratterizzazione strutturale NMR dell'interazione dei frammenti molecolari con PED	85
4.4.1	<i>Chemical Shift Mapping</i>	86
4.4.2	NOE interligando (ILOE)	105
4.5	Progettazione e sintesi di composti bidentati	107
4.6	Docking proteina-ligando	116

5 Risultati e discussione: studi NMR della dinamica del *backbone* della proteina PED e della sua interazione con D4 α

5.1	Dinamica del <i>backbone</i> della proteina PED in forma libera	123
5.2	Misure di rilassamento del ^{15}N del <i>backbone</i> di PED	123
5.3	Stima del tempo di correlazione e del modello di diffusione rotazionale	132
5.4	Analisi <i>model-free</i>	133
5.5	Mappatura delle densità spettrali ridotte	135
5.6	Misura del coefficiente di diffusione traslazionale da esperimenti DOSY e da HYDRO	139
5.7	Interazione PED-D4 α mediante spettroscopia NMR	141

6	Conclusioni	146
7	Bibliografia	154
8	Appendice	
A1.	Dati supplementari sull'identificazione di ligandi di PED	162
A2.	Dati supplementari sulla dinamica del <i>backbone</i> di PED	172
	Pubblicazioni	204

ABBREVIAZIONI

AcCN	acetoneitrile
CAMK2	calcio-camodulina chinasi 2
CPMG	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
CSA	anisotropia del chemical shift
DAG	diacilglicerolo
DCM	diclorometano
DED	<i>death effector domain</i>
DIPEA	N,N-Diisopropilettilammina
DMSO	dimetilsolfossido
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FADD	<i>fas-associated death domain</i>
HSQC	heteronuclear single-quantum coherence
HTS	high-throughput screening
ILOE	NOE interligando
INEPT	<i>Insensitive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer</i>
K_D	costante termodinamica di dissociazione protein-ligando
LS	modelli di moto Lipari e Szabo
MeOH	metanolo
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy
PED	<i>phosphoprotein enriched in diabetes</i>
PKB	protein Chinasi B
PKC	protein Chinasi C
PLD1	fosfolipasi D 1
PyBop	<i>(Benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate</i>
R_1	costanti di velocità di rilassamento longitudinale
R_2	costanti di velocità di rilassamento trasversale
RMSD	root mean square deviation

SAR	relazione struttura-attività
STD	<i>Saturation Transfer Difference</i>
SUBITO	ottimizzazione iterativa <i>structure-based</i>
SUBITO	ottimizzazione iterativa <i>structure-based</i>
trNOE	<i>transferred nuclear Overhauser effect</i>
WaterLOGSY	<i>water ligand observed by gradient spectroscopy</i>
ω	frequenza di Larmor
τ_c	tempo di correlazione
τ_e	tempo di correlazione interno

Capitolo 1

Introduzione

1.1 Ricerca e sviluppo di un farmaco

La ricerca di una nuova molecola farmacologicamente attiva è un processo estremamente lungo e complesso che prevede due grandi fasi: scoperta (*discovery*) e sviluppo (*development*) (fig. 1.1). Il *drug discovery* si basa sull'identificazione e sull'ottimizzazione di un composto guida (*lead compound*), ossia di una molecola capace di modulare l'attività di un bersaglio biologico *in vitro*, mentre il *drug development* consiste nello sviluppo clinico *in vivo* del miglior candidato farmaco ottenuto dalla precedente fase di *drug discovery*.

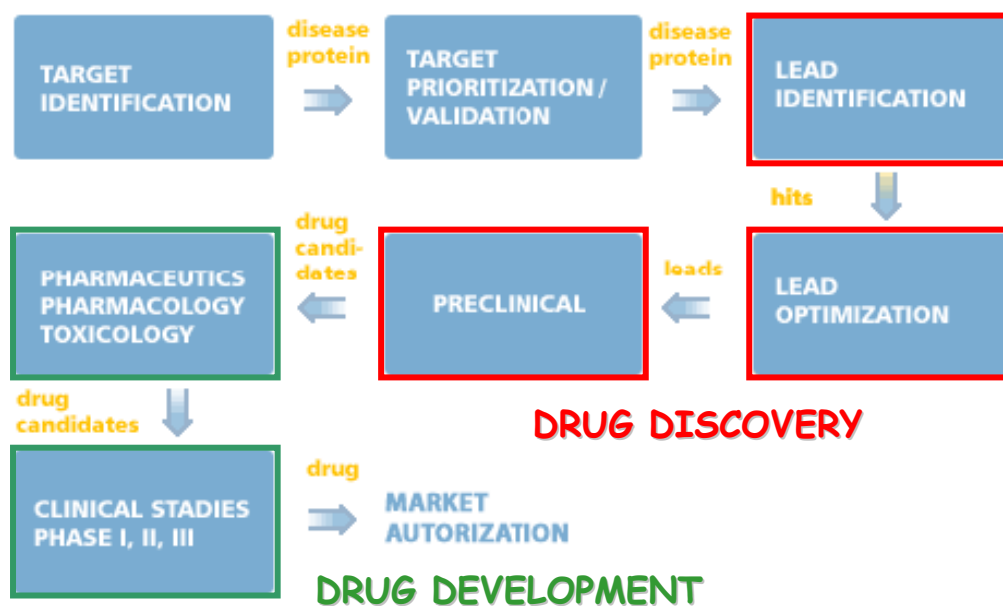


Figura 1.1 Schema delle diverse fasi della ricerca e dello sviluppo di una nuova molecola farmacologicamente attiva.

Il primo passaggio cruciale in un progetto di *drug discovery* è la rapida identificazione del *lead compound*. Per questo scopo, la strategia più comunemente impiegata nella ricerca di un nuovo farmaco è basata sullo

screening di collezioni chimiche mediante metodi HTS (*High-Throughput Screening*). Tali metodi sono basati su saggi funzionali di tipo spettrofotometrico o immunologico e prevedono il rapido *screening* di un grande numero di composti (10^4 - 10^6 molecole) di relativa complessità con metodi automatizzati. Generalmente, i composti analizzati con i saggi HTS derivano da tecniche di chimica combinatoriale. Tali tecniche, a differenza di quelle tradizionali di sintesi della chimica organica, che sono dirette alla preparazione di un singolo ben determinato composto, si prefiggono la sintesi di librerie comprendenti un numero di composti dalle decina alle migliaia. Queste librerie vengono prima progettate attraverso metodologie computazionali, per far sì che siano costituite da elementi differenti tra di loro, e poi realizzate mediante tecniche di sintesi automatizzate. Sebbene tali approcci sono stati indubbiamente capaci di fornire utili *lead compound*, in tempi relativamente brevi, essi hanno avuto un minore impatto nella identificazione di *lead compound* rispetto a quello originariamente predetto, questo a causa delle seguenti limitazioni:

- Elevata possibilità di selezione di falsi positivi
- Bassa velocità di individuazione di *hit*
- Bassa sviluppabilità farmaceutica nella fase di ottimizzazione di *lead compound*.

Oltre ai saggi biochimici HTS, anche gli *screening* effettuati con metodi computazionali presentano un'elevata efficienza nell'identificazione di composti guida. I metodi *in silico* però richiedono non solo una preliminare conoscenza della struttura del target biologico, ma forniscono dati computazionali, che necessitano di dati sperimentali che devono essere convalidati.

Alla luce di quanto detto, numerosi studi sono stati rivolti allo sviluppo di nuovi metodi di *screening* per l'identificazione di *lead compound*, che risultino più efficaci, semplici e generali, e che siano meno soggetti a falsi positivi rispetto ai saggi HTS (Pellecchia *et al.*, 2004).

In tale ambito la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare è risultata essere, in aggiunta al suo classico utilizzo per il *drug design*, ottimizzazione di ligandi e studi di struttura tridimensionale di biomolecole, un'eccellente tecnica di *screening* per l'identificazione di possibili *lead compound*.

1.2 NMR nel *drug discovery*

L'importanza della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare nella comprensione della struttura e della dinamica di biomolecole è da tempo ben accettata. Negli ultimi anni il numero di nuove tecnologie e di applicazioni dell'NMR è rapidamente cresciuto. In particolare, sempre più numerosi sono stati i contributi riportati in letteratura (Pellecchia *et al.*, 2008; Jahnke, 2007; Zartler e Shapiro, 2006; Hajduk e Greer, 2007) che hanno dimostrato l'ampia applicabilità dell'NMR in diverse fasi della ricerca e dello sviluppo di nuove molecole farmacologicamente attive, dallo screening alla validazione di *hit*, all'ottimizzazione di ligandi. La spettroscopia NMR infatti è l'unica tecnica biofisica che è in grado di rivelare e quantificare interazioni intermolecolari in soluzione e, contemporaneamente, fornire importanti informazioni strutturali con risoluzione a livello atomico sulla formazione di complessi proteina-ligando.

La figura 1.2 mostra uno schema generale di applicazione dell'NMR a un programma di *drug discovery* (Coles *et al.*, 2003). Tipicamente, il passaggio iniziale è lo *screening* di una piccola collezione di molecole a basso peso molecolare per l'identificazione di possibili *lead compound*. In alcuni casi i ligandi identificati possono essere usati per degli *screening* virtuali con tecniche computazionali. Alternativamente, è possibile utilizzare la spettroscopia NMR per validare l'interazione di *hit* ottenuti da saggi HTS o *in silico*. Qualora si utilizzino approcci basati sull'osservazione della proteina è possibile anche definire l'orientamento e la posizione del ligando, oltre che confermare il legame. Siccome le tecniche NMR utilizzate nelle fasi iniziali sono in grado di rivelare legami a bassa affinità, è necessario ottimizzare il ligando, sintetizzando analoghi che leghino con maggiore affinità (approcci di ottimizzazione iterativa), o legare chimicamente tra di loro due ligandi che occupano simultaneamente due siti adiacenti della proteina per sintetizzare un ligando ad alta affinità (approcci *fragment-linkage*).

Tra i vantaggi degli approcci basati sull'utilizzo dell'NMR rispetto ai saggi HTS e ai metodi *in silico* sopra descritti vi sono:

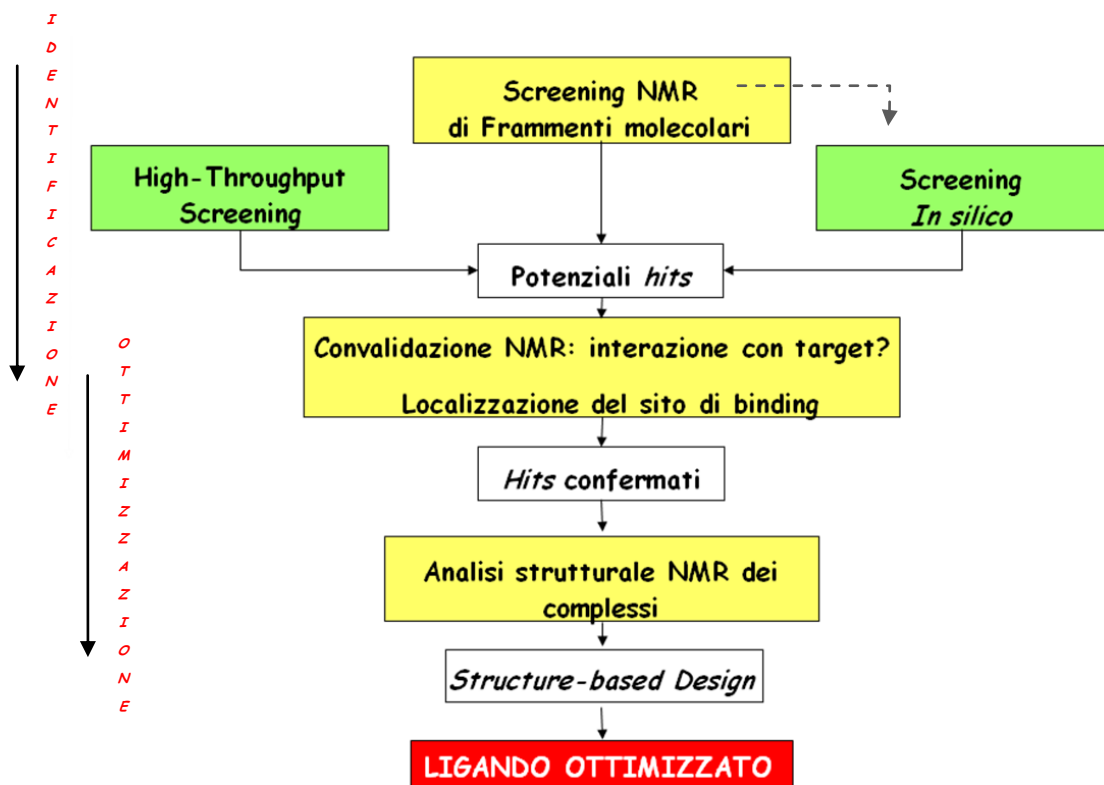


Figura 1.2 Diagramma di flusso che mostra il coinvolgimento dei metodi basati sull’NMR in un programma di *screening* integrato.

- minimizzazione del numero di falsi positivi, grazie alla capacità di analizzare direttamente l’interazione tra il ligando e il *target* molecolare e di rivelare aggregazioni o reazioni indesiderate, principali cause di falsi positivi nei saggi HTS.
- maggiore capacità di individuare interazioni ligando-proteina deboli (dell’ordine del mM) rispetto ad altre tecniche, caratteristica particolarmente vantaggiosa in strategie basate sull’utilizzo dei cosiddetti frammenti molecolari, ossia di piccole molecole organiche con peso molecolare di 200-300 Da (Zartler and Shapiro, 2005).
- universalità delle tecniche di *screening* NMR che, a differenza dei saggi biochimici e *in silico*, non richiedono conoscenze preliminari sulla funzione o sulla struttura della proteina *target*. Tale proprietà è particolarmente importante per l’analisi di proteine che sono state

identificate su base genetica e per le quali non è disponibile un saggio specifico.

- Media efficienza, poiché in grado di analizzare miscele di composti (2-24), in alcuni casi senza necessità di deconvoluzione, in quanto ciascun composto preserva le sue proprietà di legame al *target* in presenza di altre molecole che non legano, riducendo così i tempi necessari per la ricerca di una molecola candidata a diventare un farmaco.

Teoricamente, tutti i parametri spettroscopici dell’NMR potrebbero servire come indicatore del legame di un ligando a una proteina. In pratica, sono più utilizzati e significativi i parametri che possono essere ottenuti in modo facile e con alta sensibilità. Vengono utilizzati i cambiamenti di chemical shift, cambiamenti nei tempi di rilassamento, delle costanti di diffusione, dei NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) (Meyer e Peters, 2003).

In generale, esistono due principali approcci sperimentali. Il primo si basa sull’osservazione del ligando, e sfrutta le differenti proprietà di moto e NMR di una piccola molecola nel suo stato libero e nel suo stato legato ad una macromolecola. Il secondo, in cui si osserva la proteina, studia la perturbazione dei *chemical shift* della proteina bersaglio in seguito al legame. I due approcci sono complementari e hanno differenti vantaggi e svantaggi.

Gli esperimenti di *screening* NMR basati sull’osservazione del ligando hanno il grosso vantaggio di non richiedere una preliminare marcatura della proteina *target*, di richiedere quantità relativamente piccole di proteina (generalmente 0,5 ml di soluzione 1-10 μ M), di non avere limiti superiori di grandezza della proteina, e di permettere lo studio di più composti contemporaneamente (in genere 6-24). Inoltre, essi sono caratterizzati da una media efficienza, poiché sono basati sull’utilizzo di esperimenti NMR monodimensionali, che hanno tempi di acquisizione relativamente brevi, e sono in grado di saggiare miscele di potenziali ligandi senza la necessità di deconvoluzione. Uno degli svantaggi di queste tecniche è rappresentato dalla solubilità dei composti analizzati, poiché tali composti sono utilizzati ad elevate concentrazioni (0,5-1mM) nelle soluzioni di

screening costituite da tamponi acquosi, in cui non sempre risultano completamente solubili.

Per quanto riguarda gli esperimenti NMR basati sull'osservazione della proteina, essi hanno il grosso vantaggio di fornire fondamentali informazioni sul sito di legame della macromolecola. Allo stesso tempo presentano alcuni svantaggi quali l'utilizzo di grandi quantità di proteine (0.5 ml di soluzione 100 μM – 1mM) marcate con isotopi stabili come ^{15}N o ^{13}C . Inoltre sono tecniche difficili da automatizzare a causa del maggiore tempo e del maggior numero di parametri richiesti per l'acquisizione degli spettri multidimensionali.

1.3 Strategie di ottimizzazione basate sull'NMR

L'altro importante aspetto della spettroscopia NMR nel *drug discovery* è la sua capacità di potere, successivamente alla rivelazione dell'interazione di ligandi che si legano alla proteina con bassa affinità, ottimizzare tali composti, convertendoli in ligandi forti e/o selettivi. Tra le strategie che sono state sperimentate con successo e che hanno consentito una rapida identificazione e ottimizzazione di *lead compound* vi sono gli approcci di ottimizzazione iterativa *structure-based* e gli approcci *fragment-linkage* (Pellecchia *et al.*, 2004) (fig. 1.3).

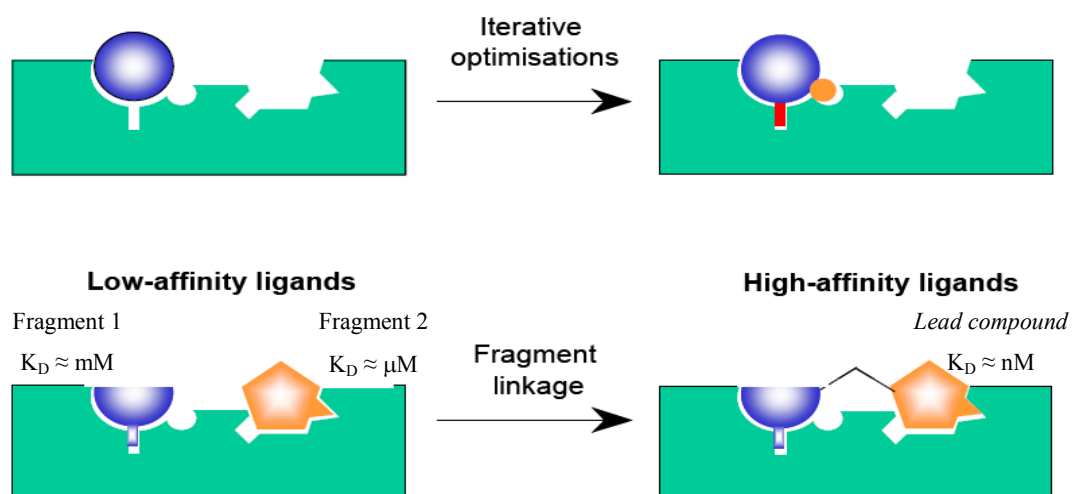


Figura 1.3 Strategie di ottimizzazione di ligandi basate su tecniche NMR: ottimizzazione iterativa (a) e *fragment-linkage* (b) (Pellecchia *et al.*, 2004).

1.3.1 Approcci *fragment-linkage*

Una promettente strategia per convertire un iniziale candidato in un potente *lead compound* consiste nel legare attraverso un opportuno *linker* due composti che si legano in modo debole alla proteina bersaglio e che occupano tasche adiacenti nel sito di legame.

I pionieri in questo campo sono stati Fesik e collaboratori che svilupparono la strategia denominata “SAR (Relazione Struttura Attività) by NMR” (Shuker *et al.*, 1996) che può essere descritta attraverso cinque principali passaggi (fig. 1.4):

1. Identificazione di un primo ligando dallo *screening* di una collezione di piccole molecole organiche mediante esperimenti di [¹⁵N,¹H] HSQC e di *chemical shift mapping* in modo da identificare con precisione il sito di legame;
2. Ottimizzazione del ligando attraverso modificazioni chimiche;
3. Identificazione di un secondo ligando che lega in presenza di una quantità saturante del primo ligando, ottimizzato mediante esperimenti [¹⁵N,¹H] HSQC. Il secondo ligando deve legare nelle vicinanze del primo sito di legame e contemporaneamente al primo;
4. Ottimizzazione del ligando per il secondo sito;
5. Legame dei due ligandi in varie posizioni e ulteriore prova di legame.

Per dirigere la sintesi chimica di un ligando bidentato che mantenga l'orientazione spaziale dei due ligandi l'uno rispetto all'altro e rispetto alla proteina, nel SAR by NMR viene determinata la struttura del complesso ternario. Questa strategia è stata applicata con successo (Hajduk *et al.*, 1999), ma per poter essere utilizzata è necessario disporre di elevate quantità di proteina uniformemente marcata.

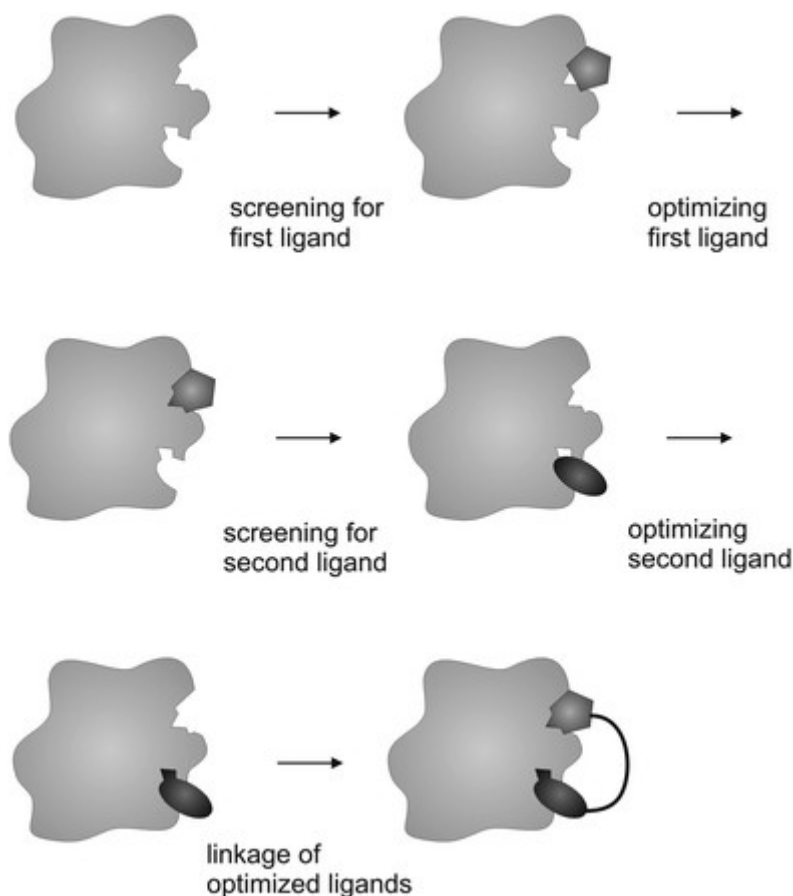


Figura 1.4 Schema della strategia SAR by NMR.

Un valido approccio alternativo al SAR *by* NMR è la strategia denominata “SAR *by* ILOE” (NOE interligando; Becattini e Pellecchia, 2006), in cui piccole molecole che si legano in modo debole (-10mM) alla proteina bersaglio e occupanti tasche adiacenti nel sito di legame, sono identificate mediante uno screening basato sull’utilizzo di trNOE e NOE interligando (ILOE). In generale, piccole molecole ruotano rapidamente in soluzione e in un esperimento 2D [^1H , ^1H] NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) presentano deboli NOE positivi (picchi di correlazione con segno opposto rispetto alla diagonale). Al contrario, quando il ligando lega transitoriamente una proteina target, esso assumerà il suo lungo tempo di correlazione e i segnali NOE risulteranno forti e negativi (stesso segno rispetto alla diagonale). Così, utilizzando esperimenti 2D NOESY di miscele di composti in presenza di quantità sub stechiometriche della proteina (non marcata), è possibile distinguere tra molecole che legano e molecole non interagenti. Inoltre, se due o più ligandi legano simultaneamente siti adiacenti

sulla superficie della proteina, forti NOE negativi ligando-ligando (ILOE) possono essere osservati (Li *et al.*, 1999). La scelta del *linker* tra i due ligandi può essere aiutata dalle misure di velocità di *build-up* dei segnali ILOE, poiché forniscono una stima qualitativa delle distanze tra i nuclei di idrogeno di ogni frammento. Inoltre, qualora la struttura tridimensionale della proteina sia nota, studi di *virtual docking* di possibili composti bidentati possono essere utilizzati per indirizzare la sintesi chimica. Il SAR by ILOE è stato usato con successo per il *design* di un ligando bidentato della proteina proapoptotica Bid che è risultato essere un inibitore della proteina sia *in vitro* che in saggi su cellula (Becattini *et al.*, 2004).

1.3.2 Approccio di ottimizzazione iterativa *structure-based*: SUBITO

La strategia di ottimizzazione denominata SUBITO (ottimizzazione iterativa *structure-based*; Fattorusso *et al.*, 2005) è illustrata in figura 1.5. Il punto di partenza di tale strategia è la selezione di una collezione di *scaffold* in grado di rappresentare un ampio spazio chimico, in cui ciascuno sia rappresentativo di un grande numero di analoghi disponibili in collezioni commerciali (fig. 1.5a). I composti sono analizzati tramite saggi NMR di legame o enzimatici, al fine di trovare un ligando con affinità in genere dall'alto μM al mM o un inibitore (fig. 1.5b). Su questo *scaffold* che interagisce con la proteina *target* si crea una collezione focalizzata come mostrato nella figura 1.5c.

Siccome il numero di composti che derivano da questo *scaffold* è molto più numerosa, si procede con un approccio iterativo, durante il quale ad ogni passaggio è aumentata la complessità strutturale. Nel caso in cui è nota anche la struttura tridimensionale della proteina si può aumentare l'efficienza della strategia traendo vantaggio da studi di *virtual docking* valutando la capacità di legame del ligando con uno *screening in silico* (fig. 1.5d). In questo caso lo *screening in silico* è usato dopo che dati sperimentali hanno confermato il legame di un composto al *target*. In questo modo si possono selezionare composti derivati

dall'iniziale *scaffold* che mostrano una maggiore affinità per la proteina *target* (fig. 1.5e, f), che sarà confermata o con tecniche NMR o con metodi classici.

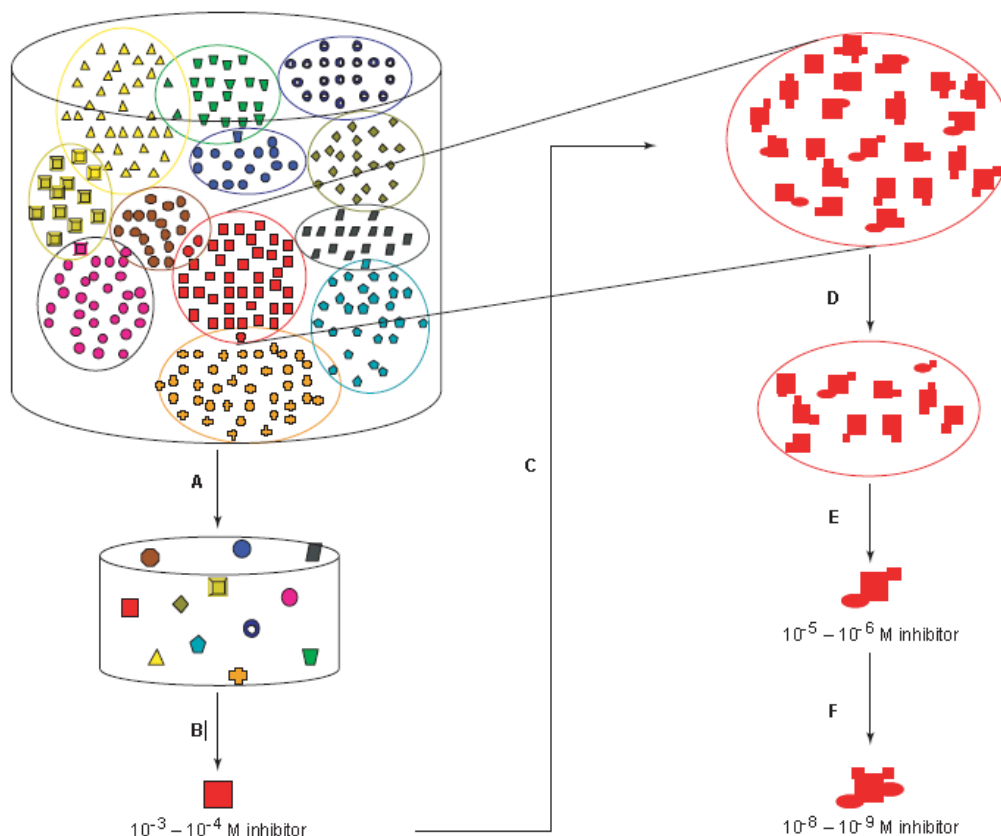


Figura 1.5 Diagramma dell'approccio di ottimizzazione iterativa *structure-based* (Pellecchia et al., 2004).

Il chiaro vantaggio di questa strategia consiste non solo nel ridotto numero di composti che devono essere testati, ma anche nel fatto che si possono ottenere informazioni strutturali intrinseche al sito di legame. Infatti se dal *docking* è stato trovato un composto con una migliore affinità, c'è anche un buon motivo nel ritenere che i modelli strutturali ottenuti corrispondano alla realtà. Senza dubbio il più grande vantaggio di questa strategia è che il processo è molto veloce ed economico (Pellecchia *et al.*, 2004).

1.4 Collezione di frammenti molecolari

In un progetto di *drug discovery* è necessario disporre di una collezione su cui effettuare lo *screening*. Attualmente esistono due tipi di collezioni che sono maggiormente utilizzate: quelle focalizzate e quelle di frammenti molecolari.

Le collezioni focalizzate sono piccole collezioni rappresentanti le sub-strutture che sono conosciute per la loro capacità di inibire una data famiglia di proteine, e che quindi hanno un'alta probabilità di essere potenti inibitori di proteine omologhe.

Le collezioni di frammenti molecolari sono costituite da piccole e semplici molecole (250 Da). Per la loro generalità, esse sono maggiormente utilizzate rispetto alle precedenti.

La complessità delle molecole e la grandezza della collezione sono fattori da tenere in considerazione per disegnare una *library* da sottoporre a *screening*.

Studi rivolti a comprendere l'effetto della complessità molecolare sul successo di uno screening (Hann *et al.*, 2001) hanno mostrato che piccoli e semplici composti hanno una maggiore capacità di formare un complesso molecolare, sebbene con una minore attività e selettività. La possibilità di trovare una modalità di legame unico e misurabile dipende dalla probabilità di misurare il legame e dalla probabilità di avere un'unica modalità di legame (fig. 1.6).

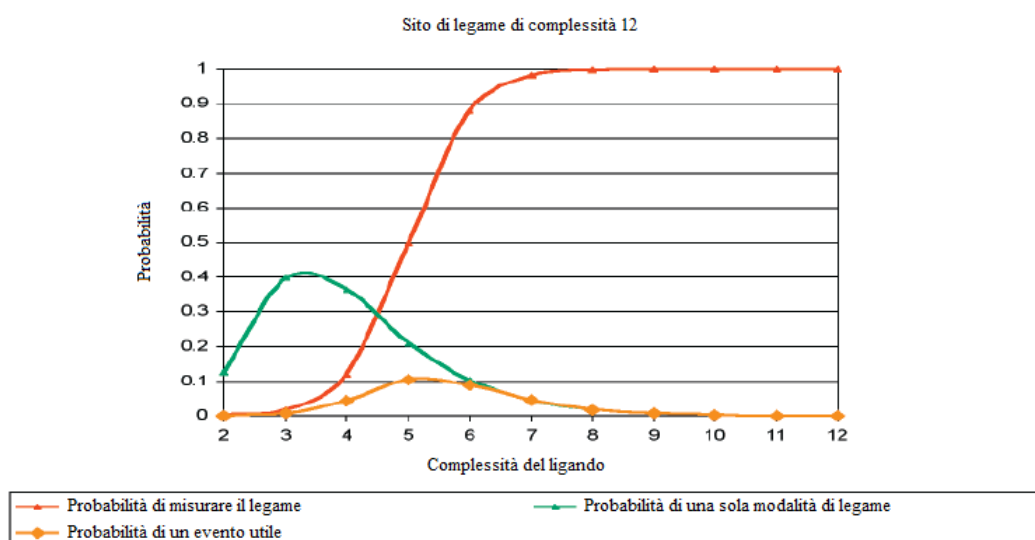


Figura 1.6 Schema che raffigura l'andamento della probabilità di misurare un legame, di trovare un'unica modalità di legame e di misurare il legame in funzione della complessità del ligando.

In particolare, la probabilità di misurare il legame incrementa con la complessità del ligando, mentre la probabilità di avere un'unica modalità di *binding* aumenta fino ad un massimo e poi diminuisce con la complessità del ligando, in quanto molecole più grandi hanno una maggiore possibilità di dare interazioni negative. Da tali studi quindi si evince che, partendo da molecole semplici, c'è una maggiore probabilità di trovare una molecola che allo stesso tempo lega la proteina bersaglio e che lo faccia in modo unico. In questo modo i *lead compound* che derivano dallo *screening* di collezioni di frammenti molecolari sono più semplici e forniscono uno spazio chimico maggiore nella fase di ottimizzazione.

Come detto anche la grandezza della collezione, ossia il numero di molecole che la costituiscono, è un aspetto importante. Il numero di componenti di una collezione di frammenti dipende dalla tecnica con la quale sarà poi analizzata la stessa collezione. Quelle che vengono sottoposte a *screening* con saggi biologici sono più grandi (10^4 composti), mentre quelle che sono sottoposte a *screening* con metodi biofisici, come cristallografia ai raggi X o NMR, sono di dimensioni minori (10^2 - 10^3 composti); le collezioni HTS possono contenere anche 10^5 - 10^6 composti.

Dalla tecnica usata per lo *screening* dipende anche la concentrazione del ligando utilizzata. Infatti, *screening* effettuati con saggi biologici utilizzano concentrazioni del ligando nell'ordine del μM , mentre quelli effettuati con tecniche NMR e raggi X utilizzano concentrazioni più alte, tipicamente 1mM . Motivo per il quale la solubilità di questi composti rappresenta un parametro critico durante la fase di *screening*, ma anche nella fase di *drug development*. In tal senso sono state proposte da Lipinski delle regole (Lipinski *et al.*, 2000), le cosiddette “regole del 5”, che vanno a definire i parametri associati con la solubilità e la permeabilità dei composti.

1. peso molecolare medio ≤ 500 g/mol (opt ≈ 350);
2. numero di donatori di legame H ≤ 5 (opt ≈ 2);
3. numero di accettori di legame H ≤ 10 (opt ≈ 5);
4. numero di legami con libera rotazione ≤ 5 ;
5. coefficiente di partizione ottanolo/acqua, clogP, compreso tra -2 e 5 (opt ≈ 3);

1.5 PED: una proteina di interesse farmacologico

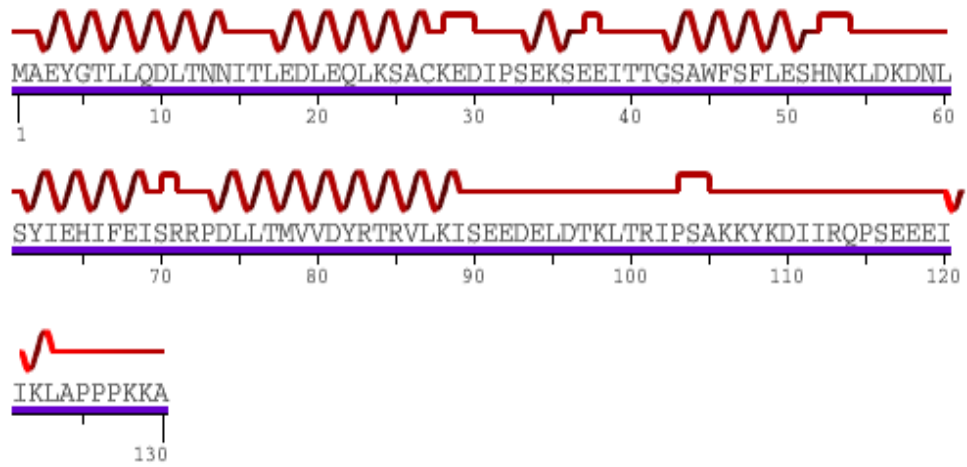
Il target farmacologico scelto come oggetto di studio nel presente lavoro di tesi è la proteina PED (*Phosphoprotein Enriched in Diabetes*), anche nota come PEA15 (*Phosphoprotein Enriched in Astrocytic*), una proteina citosolica di 130 residui (peso molecolare 15.5 kDa), espressa in maniera pressoché ubiquitaria nei tessuti umani, ed ampiamente conservata nei mammiferi.

La struttura tridimensionale della proteina PED, determinata mediante spettroscopia NMR (Hill *et al.*, 2002), è costituita da una regione globulare N-terminale di 89 residui (M1-I89) ed una lunga coda C-terminale di 41 residui (S90-A130) non strutturata, ad eccezione di una piccola elica 3_{10} (I120-L123) (fig. 1.7). La regione globulare N-terminale presenta un *fold* che è quello canonico di un dominio DED (*Death Effector Domain*), originariamente definito dalla proteina proapoptotica FADD (*Fas-Associated Death Domain*) e tipicamente coinvolto in interazioni omotipiche tra proteine coinvolte in processi apoptotici. Il dominio DED risulta costituito da sei α -eliche anfipatiche e antiparallele, strettamente impacchettate intorno ad un *core* idrofobico centrale. Le α -eliche sono connesse da brevi *loop*, due dei quali (K28-P32 e H52-S60) contengono β -*turn*, e sono arrangiate in una topologia a chiave greca, con $\alpha 1$ e $\alpha 2$ disposte centralmente, $\alpha 3$ e $\alpha 4$ da un lato e $\alpha 5$ e $\alpha 6$ dall'altro. La coda C-terminale, come detto, non ha una struttura secondaria regolare e contiene due siti di fosforilazione in corrispondenza della serina 104 e 116. La serina 104 è fosforilata dalla Protein Chinasi C (PKC) (Araujo *et al.* 1993; Estelles *et al.* 1996), la 116 è fosforilata da altre due chinasi, la Protein Chinasi B (PKB), chiamata anche Akt, (Trencia *et al.* 2003) e Calcio-camodulina chinasi 2 (CAMK2) (Kubes *et al.* 1998).

PED è coinvolta in due importanti processi di trasduzione del segnale intracellulare:

- inibizione dell'apoptosi, indotta da Fas e TFN- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), tramite il dominio DED, e interazione con FADD e caspasi 8 (Concorelli *et al.*, 1999; Estelles *et al.*, 1999; Kitsberg D. *et al.*, 1999);

(a)



(b)

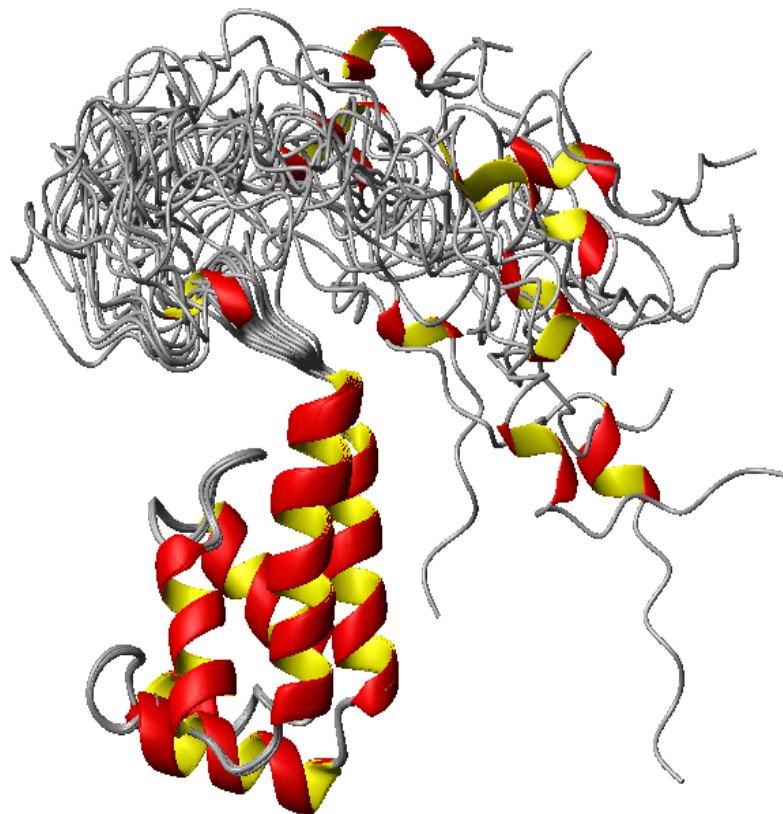


Figura 1.7 Sequenza amminoacidica e corrispondente struttura secondaria (a) e terziaria (b) della proteina PED/PEA15 (Hill *et al.*, 2002)

- cascata delle ERK/MAPK chinasi, attraverso il legame con ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*; Zhang *et al.*, 2000) e l'alterazione della sua localizzazione subcellulare (dominio NES all'N-terminale) (Formstecher *et al.*, 2001), che impedisce la trasmissione di segnali proliferativi al nucleo, in risposta all'insulina o a fattori di crescita simili all'insulina.

Un recente studio (Renganathan *et al.*, 2005) ha dimostrato che la fosforilazione di PED a carico della Ser104 e Ser116 rappresenta un “interruttore” molecolare che fa sì che tale proteina possa influenzare l'apoptosi o la cascata delle ERK/MAPK chinasi, tramite la diversa specificità di legame per FADD o per ERK. In particolare, la fosforilazione della Ser104 blocca il legame ad ERK sia *in vitro* che *in vivo*, mentre la fosforilazione della Ser116 promuove il suo legame a FADD.

Un altro interessante ruolo della proteina PED è emerso da studi effettuati da Condorelli *et al.* nel 1998, e riguarda l'induzione da parte di tale proteina dell'insulino-resistenza in individui affetti da diabete mellito o di tipo II.

La proteina PED risulta essere sovraespressa nei diabetici, nei tessuti *target* dell'azione insulinica: tessuto muscolare scheletrico e tessuto adiposo. In questi tessuti è noto che il trasporto del glucosio è mediato da due trasportatori: GLUT1, responsabile del trasporto basale, e GLUT4, responsabile del trasporto insulino-stimolato. PED sarebbe patologica ad elevati livelli, poiché ostacolerebbe il reclutamento del GLUT4, determinando così l'incremento di glucosio, dopo lo stimolo insulinico. Studi volti a chiarire il meccanismo molecolare attraverso cui PED induce resistenza all'insulina, hanno mostrato che a monte vi è l'interazione di PED con la fosfolipasi D 1, PLD1 (Viparelli *et al.*, 2008b). In particolare, quando PED lega la fosfolipasi D la induce, aumentando il livello citoplasmatico di diacilglicerolo (DAG) e l'attività di aPKC, che va a bloccare un'importante via attraverso cui l'insulina stimola il trasporto del glucosio nei tessuti periferici (fig. 1.8). Alla luce di questi studi, l'inibizione dell'interazione tra PED e PLD1 rappresenta un passaggio fondamentale nello sviluppo di farmaci in grado di migliorare la sensibilità all'insulina e la tolleranza al glucosio in individui affetti da diabete di tipo II.

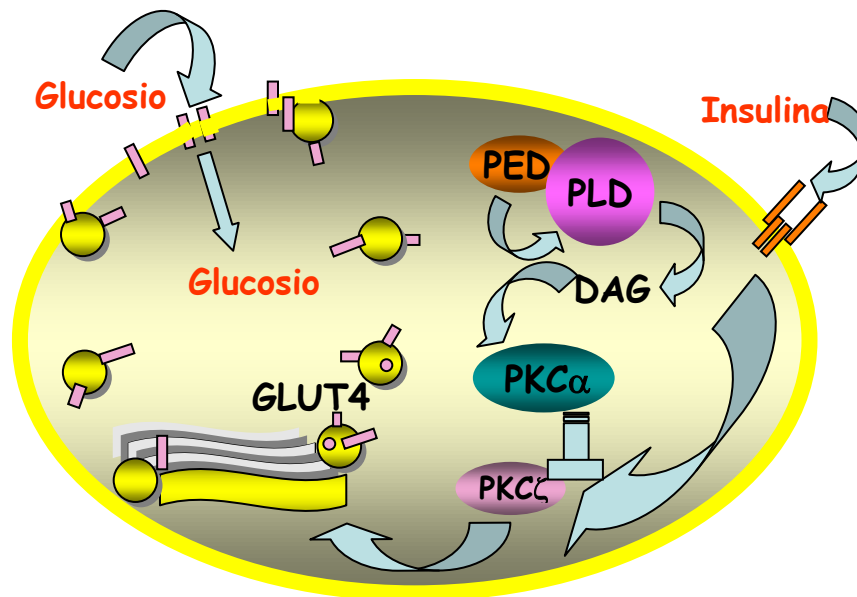


Figura 1.8 Meccanismo dell'insulino-resistenza periferica indotta da PED.

1.6 Domini di PED e loro relazioni struttura-funzione

Come emerge dal precedente paragrafo, PED è un piccolo scaffold proteico multifunzionale, che regola diverse funzioni cellulari tramite la sua interazione con altre proteine, quali FADD e caspasi 8 in processi apoptotici, ERK1/2 nella cascata delle ERK/MAPK chinasi e la fosfolipasi PLD1 nel diabete di tipo II.

L'azione antiapoptotica di PED, come detto, è esplicata tramite l'interazione con FADD e/o procaspasi 8 attraverso il dominio DED. Nonostante siano note le strutture tridimensionali di queste proteine, le regioni coinvolte nell'interazione tra queste proteine non sono state ancora identificate.

Studi strutturali volti a comprendere il meccanismo di riconoscimento di motivi omologhi DED e DD (*Death Domain*) (Hill *et al.*, 2004) hanno mostrato che esistono due distinte e opposte superfici di interazioni all'interno del dominio DED. Tali superfici possono essere ben esemplificate andando a guardare le superfici di interazione tra i domini DD della proteina TUBE e della serina/treonina chinasi PELLE da *Drosophila* (Xiao *et al.*, 1999).

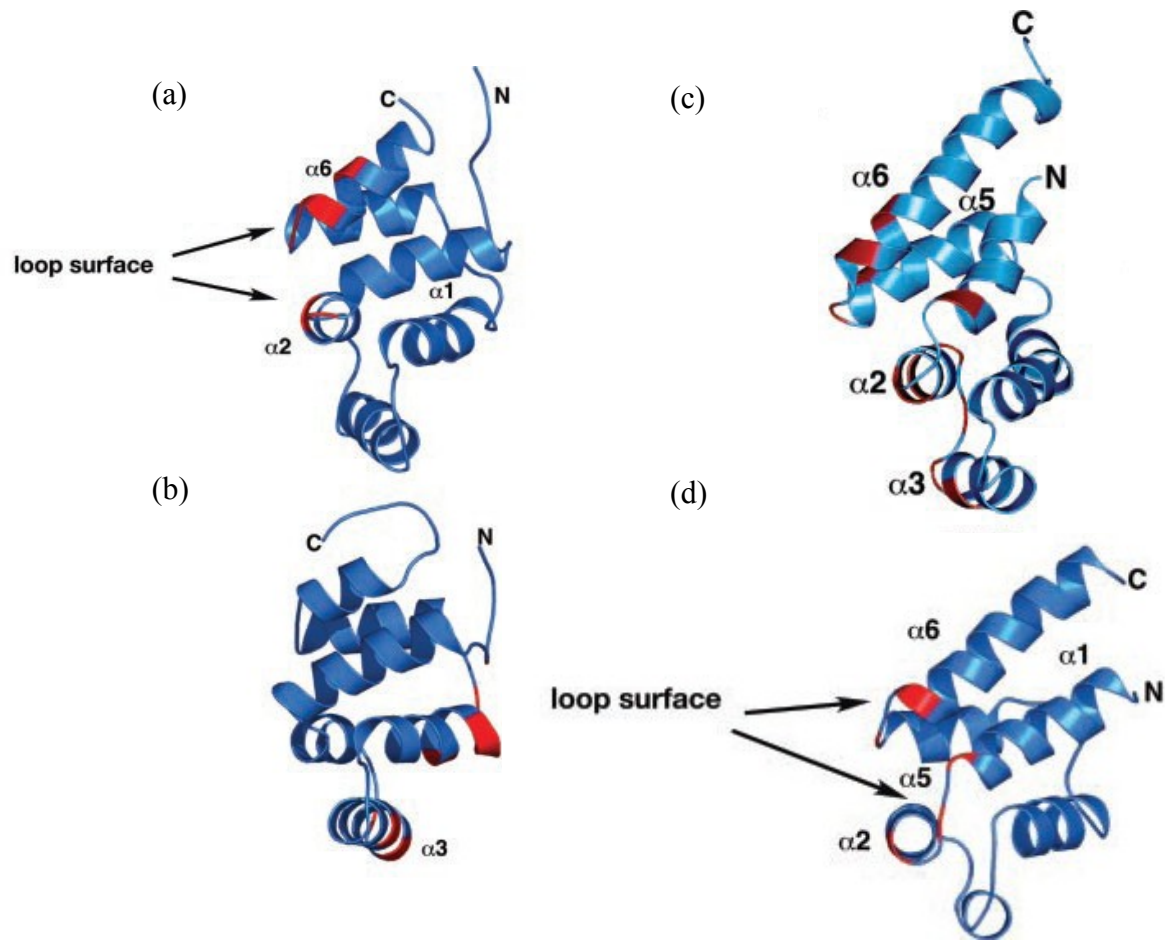


Figura 1.9 Superfici di interazioni conservate di *death domains* e *death effector domains*. Rappresentazione a nastro di Tube DD (a), Pelle DD (b), FADD (c) e PED (d). I residui importanti per il legame con le loro proteine target sono evidenziati in rosso (Hill *et al.*, 2004).

Una prima superficie, denominata superficie *loop*, è formata principalmente dal *loop* tra le eliche $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e quello tra le eliche $\alpha 5$ e $\alpha 6$, come esemplificato in Tube DD (Fig. 1.9a). Una seconda superficie, esemplificata da Pelle DD, è formata dalle eliche 3 e 4 e il *loop* che connette le eliche 4 e 5, localizzate sul lato opposto del motivo della superficie *loop* (Fig. 1.9b).

Studi di mutagenesi sito-diretta hanno mostrato che la superficie *loop*, insieme alla porzione delle eliche 2 e 3 che si trovano dallo stesso lato di tale superficie, sono importanti anche nell'interazione tra il dominio DD di FADD e quello citoplasmatico di un suo altro partner proteico naturale, CD95 (Fas o Apo-1) (fig. 1.9c).

Esperimenti NMR di *chemical shift mapping* associati a mutagenesi sito-diretta (Hill *et al.*, 2002) rivolti all'identificazione degli epitopi di legame di PED con

ERK1/2, hanno mostrato che la proteina PED utilizza una superficie tipo-TUBE per legare ERK (fig. 1.9d), senza che tra PED ed ERK vi sia alcuna similarità di sequenza e di struttura. Oltre ai residui della regione N-terminale, anche residui nella coda C-terminale, Ile121, Lys122, Leu123 (tutti nell'elica 3_{10}), Lys128 e Lys129, sono importanti per l'interazione con ERK.

Studi rivolti all'identificazione dei determinanti strutturali di PED coinvolti nell'interazione con PLD1 mediante il sistema del doppio ibrido (Zhang *et al.*, 2000) hanno consentito di identificare una regione di PED abbastanza ampia tra il dominio N- e C-terminale che va dall'Asn53 alla Ile112 (fig. 1.13). Più recenti studi (Viparelli *et al.*, 2008b) hanno mostrato che il peptide Met1-Lys24 è in grado non solo di legare D4, il dominio minimo di interazione di PLD1 con PED, di spiazzare l'interazione tra PED e PLD1 ma anche di ripristinare in cellula i livelli basali di trasporto del glucosio.

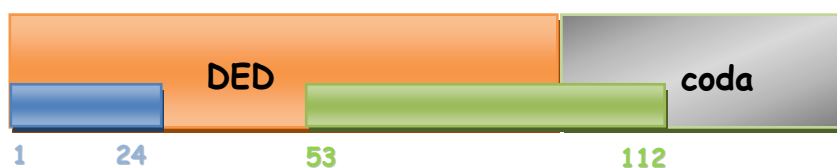


Figura 1.10 Rappresentazione schematica delle regioni di PED coinvolte nell'interazione con il dominio D4 di PLD1.

1.7 Scopo della tesi

Sulla base di tali premesse, la presente tesi di dottorato si inserisce nell'ambito di un progetto di *drug discovery* che ha avuto come obiettivo lo studio strutturale e l'identificazione di ligandi della proteina PED, mediante l'utilizzo principalmente di tecniche di spettroscopia NMR. In particolare, dallo *screening* NMR di una *library* di piccole molecole organiche inizialmente allestita e caratterizzata sono stati identificati e validati diversi frammenti molecolari in grado di legare la proteina PED con bassa affinità (1-5 mM). Al fine di migliorare il legame delle molecole validate nei confronti della proteina PED, sono stati effettuati studi di *Chemical Shift Perturbation* mediante esperimenti [^{15}N , ^1H] HSQC sulla proteina PED uniformemente marcata con ^{15}N , e di NOE interligando (ILOE) effettuati su miscele di composti in presenza di proteina PED non marcata per rivelare la

presenza di ligandi che occupano siti adiacenti sulla superficie della proteina e determinare la loro orientazione relativa. Da tali studi è stato possibile avviare la sintesi chimica di ligandi bidentati connessi da diversi tipi di *linker*, ed i composti sintetizzati sono stati sottoposti a studi di *binding* NMR per verificare la loro capacità di interagire con la proteina PED e la loro affinità rispetto alle molecole di partenza.

Inoltre, sono stati effettuati esperimenti di *docking*, alla luce di quelli di *chemical shift mapping* e di ILOE, che hanno consentito di identificare due cavità idrofobiche in cui si possono localizzare i ligandi identificati.

Infine, studi della dinamica del *backbone* della proteina PED in forma libera e analisi di *chemical shift mapping* di PED in presenza del suo partner proteico naturale D4, hanno consentito di chiarire delle relazioni struttura-attività della proteina PED.

Capitolo 2

Metodi NMR per l'identificazione di interazioni ligando-proteina e per lo studio della dinamica del *backbone* di una proteina

2.1 Introduzione

Per giungere alla determinazione strutturale e dinamica di una proteina e per studiare le interazioni proteina-ligando mediante spettroscopia NMR è necessario acquisire, analizzare e interpretare spettri NMR mono e multidimensionali, omo o eteronucleari. In questo capitolo verranno illustrati in una prima parte le tecniche NMR per lo studio delle interazioni proteina-ligando e in una seconda la teoria NMR per lo studio della dinamica del *backbone* di una proteina in soluzione.

2.2. Tecniche NMR per rivelare e caratterizzare il legame di un ligando ad una proteina

Come detto nel precedente capitolo, tutti i parametri spettroscopici NMR in teoria potrebbero servire per monitorare il legame di un ligando ad una proteina. In pratica, sono più utilizzati e significativi solo i parametri che possono essere ottenuti in modo facile e con alta sensibilità, quali cambiamenti di chemical-shift, dei tempi di rilassamento, delle costanti di diffusione, dei NOE (*Nuclear Overhauser Effect*) o scambi di saturazione (Meyer e Peters, 2003).

In questo lavoro di tesi sono stati utilizzati due differenti approcci sperimentali: metodi che si basano sull'osservazione del ligando, in cui si sfruttano le differenti proprietà di moto e NMR di una piccola molecola nel suo stato libero e nel suo stato legato ad una macromolecola (§ 2.3) e metodi in cui si osserva la proteina, che studiano le perturbazioni dei *chemical shift* della proteina in seguito al legame (§ 2.4).

2.3 Metodi basati sull'osservazione del ligando

Un ligando in soluzione, in presenza di una proteina recettore (R), può trovarsi in equilibrio tra due stati diversi: ligando libero (L) e ligando legato (RL) (fig. 2.1). Quando una piccola molecola lega una macromolecola acquista le proprietà idrodinamiche e NMR di quest'ultima comportandosi come un composto ad alto peso molecolare. Quindi le proprietà grandezza-dipendente quali i tempi di rilassamento trasversale e longitudinale, il coefficiente di diffusione e il trasferimento di magnetizzazione inter- e intramolecolare risentiranno del cambiamento del peso molecolare nel momento in cui ci sarà la formazione del complesso.

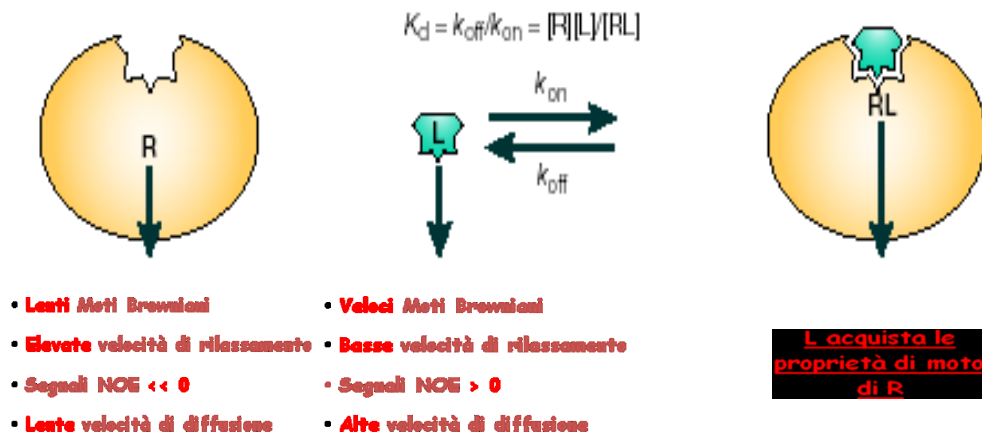


Figura 2.1 Proprietà idrodinamiche e NMR di macromolecole e di piccole molecole. Quando una piccola molecola (L) lega una macromolecola (R), L acquisterà le proprietà rotazionali di R, e di conseguenza, le proprietà NMR di L saranno alterate. K_d , costante termodinamica di dissociazione; k_{off} , costante cinetica di dissociazione del complesso RL; k_{on} , costante cinetica per la formazione del complesso R-L (Pellecchia *et al.*, 2002).

La natura dinamica del complesso e la presenza del ligando in forma libera o legata, influenza anche l'aspetto degli spettri NMR, come mostrato nella figura 2.2.

Se il processo di scambio è lento, rispetto alla scala dei tempi della differenza di chemical shift del ligando nello stato libero e nello stato legato, si parla di *slow exchange* e si osserveranno due diversi picchi di risonanza corrispondenti ai

chemical shift dei protoni del ligando nei due stati. Se il processo è veloce rispetto alla scala dei tempi della differenza di chemical shift dei due stati, il sistema è nella condizione di *fast exchange* e si osserverà un solo picco di risonanza, la cui posizione è la media dei *chemical shift* dei segnali del ligando nei due stati. Tra questi due estremi ci sono dei casi intermedi.

In generale, quando la costante cinetica di formazione del complesso è limitata soltanto dalla diffusione, i ligandi che hanno una $K_d > 10^{-5}$ M si troveranno nella condizione di *fast exchange*, quelli che hanno una K_d compresa tra 10^{-6} - 10^{-7} M si troveranno in una condizione intermedia, e ligandi che presentano un K_d di 10^{-8} M o più piccola saranno in una condizione di *slow exchange*. Gli effetti di legame su una popolazione di ligandi liberi possono essere visibili solo quando il legame ricade nel regime di *fast exchange*, ligandi più forti come quelli nello *slow exchange* potrebbero non essere rivelati negli esperimenti basati sull'osservazione dei ligandi, in quanto la maggior parte di questi misurano i segnali del ligando libero che dopo la formazione del complesso porta in soluzione l'informazione del legame.

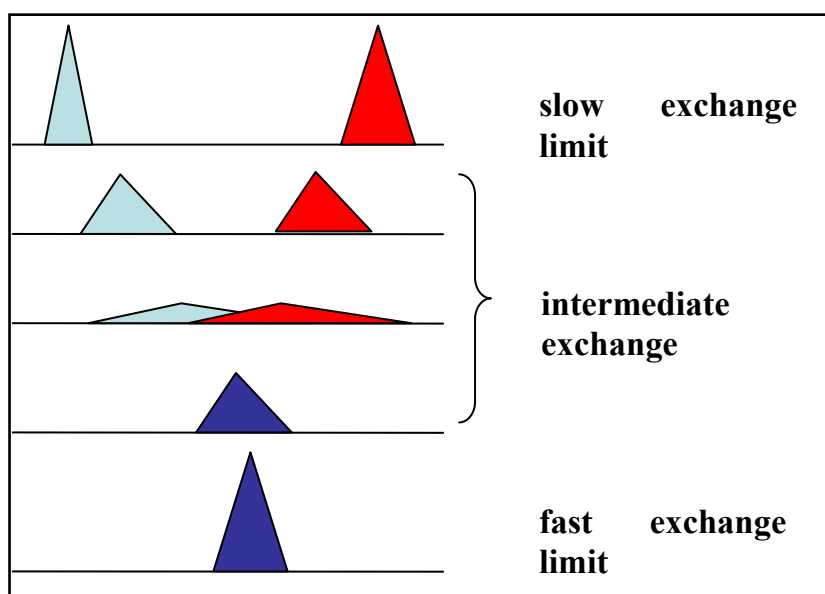


Figura 2.2 Effetti della velocità di scambio del ligando tra lo stato libero e legato ad una macromolecola sul tipo di segnali osservati in uno spettro NMR.

I metodi che si basano sull'osservazione del ligando possono essere distinti in due principali classi:

- Metodi che si basano sul trasferimento di magnetizzazione tra il *target* e il ligando.
- Metodi che si basano sulla rilevazione di un'alterata proprietà idrodinamica.

Fanno parte della prima classe, che è quella maggiormente utilizzata, il *Saturation Transfer Difference* (STD) (Mayer e Meyer, 1999), il *Water Ligand Observed by Gradient Spectroscopy* (*WaterLOGSY*) (Dalvit *et al.*, 2000 e 2001), e il *transferred Nuclear Overhauser Effect* (trNOE) (Meyer *et al.*, 1997). Metodi che appartengono alla seconda classe sono esperimenti di diffusione (Lin *et al.*, 1997) e di rilassamento ($T_{1\rho}$) (Hajduk *et al.*, 1997).

2.3.1 Saturation Transfere Difference (STD)

L'STD è una tecnica basata sul trasferimento di saturazione da una proteina a un ligando legato che in seguito allo scambio con il ligando libero ritorna in soluzione, dove viene rilevato. Grazie alla registrazione di uno spettro differenza è possibile mediante spettroscopia NMR protonica monodimensionale ottenere uno spettro ben risolto del solo ligando. Come mostrato in figura 2.3, un primo spettro (I_{SAT}) è registrato con la saturazione selettiva delle risonanze della proteina *target* (*on-resonance*), mentre un secondo spettro di riferimento (I_0) è acquisito con la frequenza di irradiazione impostata a valori lontani rispetto a quelli della saturazione della proteina e del ligando (*off-resonance*). Lo spettro differenza che si ottiene ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) conterrà i segnali della proteina *target* e del ligando. Di solito però i segnali della proteina o non sono visibili in quanto è presente in bassissime concentrazioni (1-20 μ M), o eventualmente possono essere eliminati utilizzando dei filtri di rilassamento.

E' importante sottolineare che molecole che non legano la proteina non verranno saturate e non daranno quindi alcun segnale nello spettro STD. Pertanto questa tecnica può essere utilizzata per analizzare miscele di composti in cui sono

contemporaneamente presenti ligandi in presenza di molecole non interagenti la proteina target.

Per ottenere la selettività desiderata, si utilizza un treno di impulsi sagomati lunghi ciascuno 50 ms e separati di 1ms con la frequenza di irradiazione impostata tra 1 ppm e -1 ppm, in quanto in questa regione in genere non ci sono segnali del ligando mentre si ritrovano diversi segnali della proteina (fig 2.4).

Quando una proteina viene irradiata con un impulso selettivo, la saturazione è propagata da un protone della proteina ad altri protoni della proteina attraverso spin diffusione e ai protoni del composto legato che si trovano all'interfaccia ligando-proteina. Quando il ligando si dissocia dalla proteina, trasferirà questa saturazione in soluzione dove i segnali del ligando libero possono essere misurati.

La sensibilità di un esperimento STD dipende dal numero di ligandi che hanno ricevuto la saturazione e può essere descritta in termini di numero di ligandi saturati che viene prodotto da ogni molecola *target*.

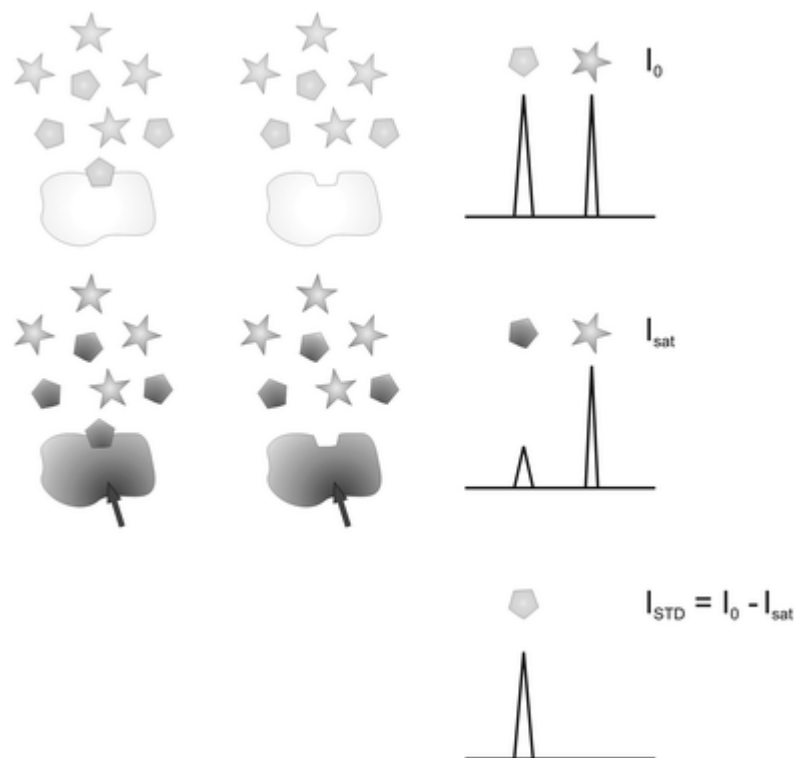


Figura 2.3 Rappresentazione schematica di un esperimento STD. I pentagoni e le stelle rappresentano ligandi e non-ligandi della proteina bersaglio, rispettivamente.

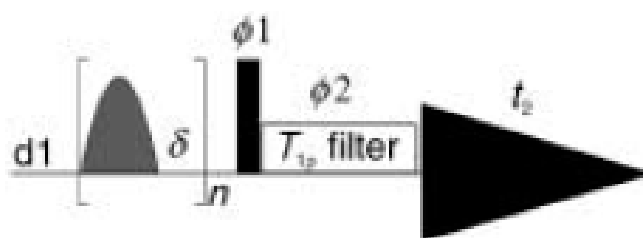


Figura 2.4 Sequenza di impulsi per una spettroscopia NMR-STD. La lunghezza dell'impulso selettivo è di 50ms e il *delay* (δ) tra gli impulsi è di 1ms, la durata del periodo di presaturazione è registrato da un numero di impulsi n (di solito $n=40$), $d1$ è un piccolo *delay* di rilassamento addizionale.

Durante il tempo di saturazione (τ_{sat}) il sito di legame della proteina è occupato da n molecole di ligandi con $n = f_{\text{PB}} * \tau_{\text{sat}} / \tau_{\text{res}}$, dove f_{PB} è la frazione di siti di legame della proteina occupati e τ_{res} è il tempo di residenza del ligando nel sito di legame (fig. 2.5).

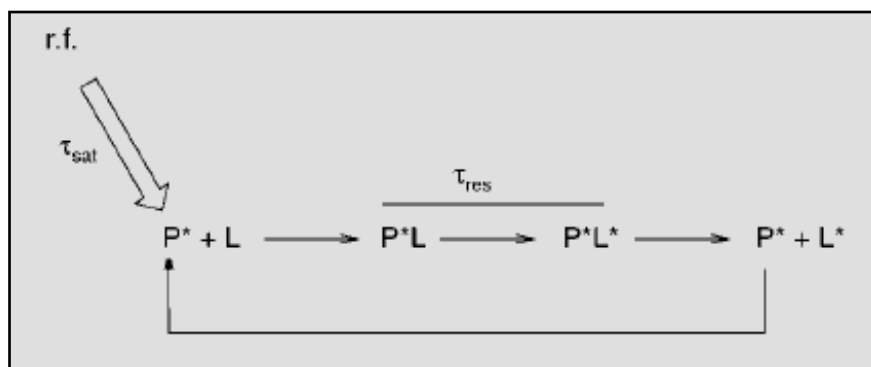


Figura 2.5 Lo schema mostra ciò che accade in una soluzione contenente il ligando e il recettore dopo l'iniziale tempo di saturazione, τ_{sat} ; τ_{res} : tempo di residenza del ligando nel sito di legame; P^* : proteina saturata; L : ligando non saturato; L^* : ligando saturato.

Questo *turnover* è responsabile dell'amplificazione dei segnali ottenuti. È intuitivo, quindi, che lavorando con un eccesso di ligandi è possibile saturare un numero maggiore di ligandi in pochi secondi, e di conseguenza amplificare l'intensità del segnale. Inoltre l'entità della saturazione del ligando dipende dal tempo di residenza del ligando nella tasca di legame della proteina. Infatti se il legame è molto forte, ad esempio quando i valori della K_D sono inferiori a 1nM, il

trasferimento di saturazione al ligando non è molto efficiente. Se, invece, i valori di K_D sono 100 nM o maggiori, lo scambio veloce del ligando tra la forma libera e legata porterà ad un maggior numero di ligandi in soluzione a cui sarà trasferita la saturazione (Meyer e Peters, 2003).

2.3.2 Water Ligand Observed by Gradient Spectroscopy (waterLOGSY)

Il waterLOGSY è un metodo strettamente correlato all'STD. Come nell'STD il complesso proteina-ligando è selettivamente “etichettato” tramite una particolare sequenza di impulsi. Invece della diretta perturbazione delle risonanze della proteina, nel waterLOGSY il ligando viene “etichettato” indirettamente tramite la perturbazione selettiva della magnetizzazione dell'acqua. In particolare, il segnale dell'acqua è invertito e trasferito al ligando via *cross-relaxation* intermolecolare. L'inversione selettiva della magnetizzazione dell'acqua generalmente viene prodotta con una sequenza denominata NOE-ePHOGSY (Dalvit, 1996).

Tre sono i meccanismi mediante i quali avviene il trasferimento della magnetizzazione invertita dell'acqua al ligando legato (fig. 2.6) (Dalvit *et al.*, 2000 e 2001).

Un primo meccanismo è attraverso lo scambio chimico di protoni carbossilici, amminici, ammidici, idrossilici e imidazolici del sito di legame. Un secondo meccanismo è un trasferimento indiretto di magnetizzazione tramite spin diffusione a protoni scambiabili che non si trovano nel sito di legame. La magnetizzazione invertita viene trasferita a sua volta ad altri spin non scambiabili mediante spin diffusione. Questi due schemi di *cross-relaxation* permettono a composti legati di prendere la magnetizzazione invertita, mentre risiedono nel sito di legame della proteina. Infine, un ultimo schema prevede una diretta *cross-relaxation* ^1H - ^1H tra il ligando legato e le molecole di acqua legate all'interno del sito di legame.

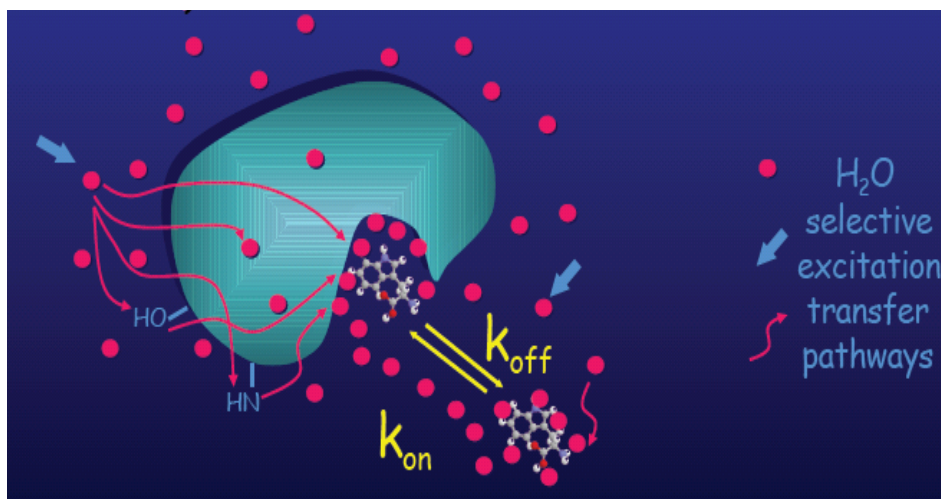


Figura 2.6 Meccanismi di trasferimento della magnetizzazione dell'acqua al ligando dopo eccitazione selettiva nell'esperimento waterLOGSY.

Il gran numero di protoni scambiabili con l'acqua in un complesso proteina-ligando potrebbe spiegare l'elevata sensibilità dell'esperimento waterLOGSY per rilevare in modo selettivo il legame di un ligando, rendendolo uno dei metodi maggiormente utilizzati come tecnica di *screening* per l'identificazione di ligandi. Composti interagenti con la proteina si distinguono da composti non interagenti per le loro diverse proprietà di *cross-relaxation* con l'acqua. Negli schemi di trasferimento di magnetizzazione descritti sopra, i ligandi che interagiscono direttamente o indirettamente con gli spin invertiti dell'acqua danno luogo a velocità di *cross-relaxation* negative. Così nello spettro waterLOGSY i ligandi che avranno ricevuto la magnetizzazione dall'acqua avranno fase opposta rispetto a molecole non leganti la proteina.

In figura 2.7 è mostrato il risultato di un esperimento waterLOGSY effettuato su una miscela di dieci composti in presenza della proteina chinasi ciclina-dipendente 2 (CDK2) (a) confrontato con lo spettro protonico della miscela (b) (Dalvit *et al.*, 2001). Segnali positivi e negativi nello spettro waterLOGSY sono identificativi di molecole interagenti e non interagenti, rispettivamente, con la proteina CDK2.

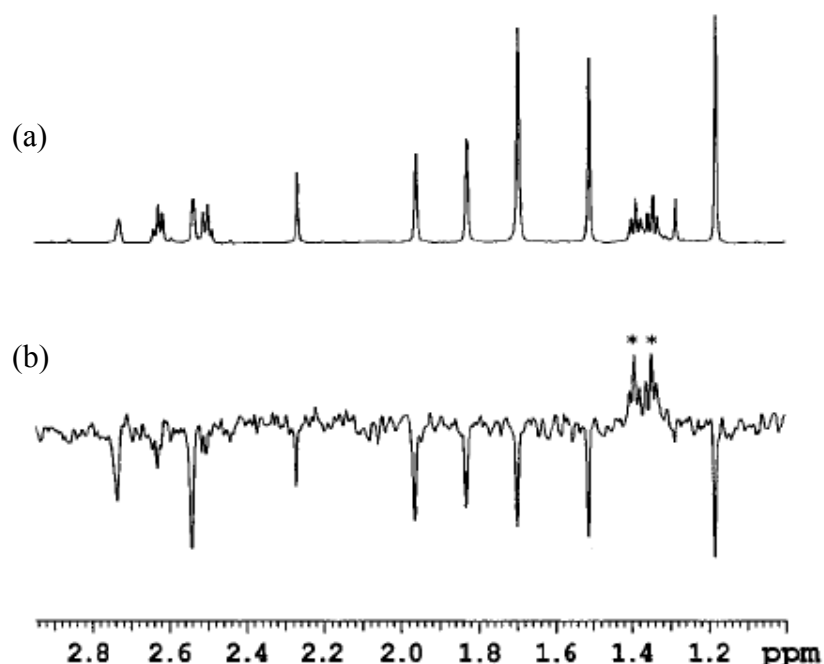


Figura 2.7 Spettro WaterLOGSY di una miscela di dieci composti in presenza di CDK2 (a) e spettro protonico di riferimento della stessa miscela (b). I segnali della molecola interagente sono marcati con l'asterisco.

2.3.3 *transferred* NOE (trNOE)

Il trNOE ha trovato un ampio utilizzo nella determinazione della struttura tridimensionale di ligandi legati a proteine recettori. Questo esperimento è basato sul differente tempo di correlazione τ_c delle molecole di ligando nello stato libero e nello stato legato. Molecole di basso o medio peso molecolare (< 1000-2000 Da) hanno un breve τ_c e, quindi, presentano o NOE positivi o nessun NOE o NOE negativi molto deboli, a seconda del loro peso molecolare, forma e forza del campo magnetico esterno. Grandi molecole, invece, esibiscono NOE negativi molto intensi. Quando una piccola molecola è legata ad una proteina di alto peso molecolare, essa si comporterà come una parte della macromolecola e adotterà il corrispondente comportamento NOE, ossia essa mostrerà forti NOE negativi, denominati trNOE. I trNOE del ligando legato si differenziano dai NOE del ligando libero anche per la velocità di *build-up*, ossia per il tempo richiesto per raggiungere la massima intensità, che per il trNOE è nel range di 50-100 ms, mentre per molecole non leganti è da quattro a dieci volte più lungo (fig. 2.8).

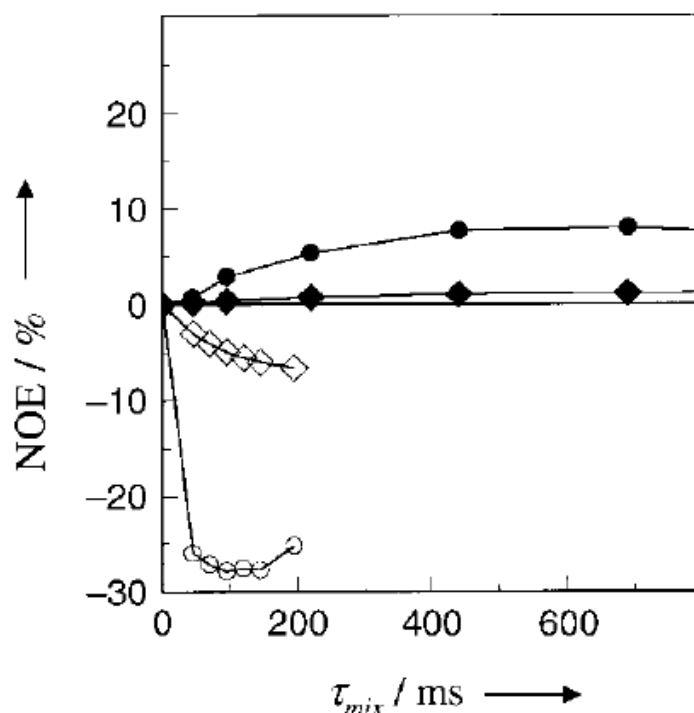


Figura 2.8 Andamento del NOE di due protoni di una piccola molecola non legata (cerchi e rombi pieni) e del trNOE degli stessi protoni della molecola in presenza di proteina (cerchi e rombi vuoti) in funzione del tempo di *mixing* (Meyer e Peters, 2003).

In generale, è possibile osservare trNOE inter- e/o intramolecolari. I NOE intramolecolari sono la chiave per definire la conformazione del ligando legato, NOE intermolecolari sono quelli che occorrono tra un ligando e la proteina recettore e, quindi, in principio permettono la determinazione dell'orientazione del ligando nel sito di legame della proteina.

Generalmente, per la misura di trNOE intramolecolari si registra un classico esperimento 2D NOESY. In un esperimento NOESY, un piccolo ligando in soluzione in presenza di una quantità sub stechiometrica del suo recettore mostrerà un NOE negativo (stesso segno rispetto alla diagonale) dovuto al ligando libero che in soluzione porta l'informazione dello stato legato. E' possibile inoltre discriminare tra molecole che sono capaci di formare un complesso con una proteina e quelli senza questa capacità, sulla base del segno del trNOE che è l'opposto rispetto a quello del NOE, e sul fatto che è necessario un tempo minore per raggiungere il massimo valore (Meyer *et al.*, 1997).

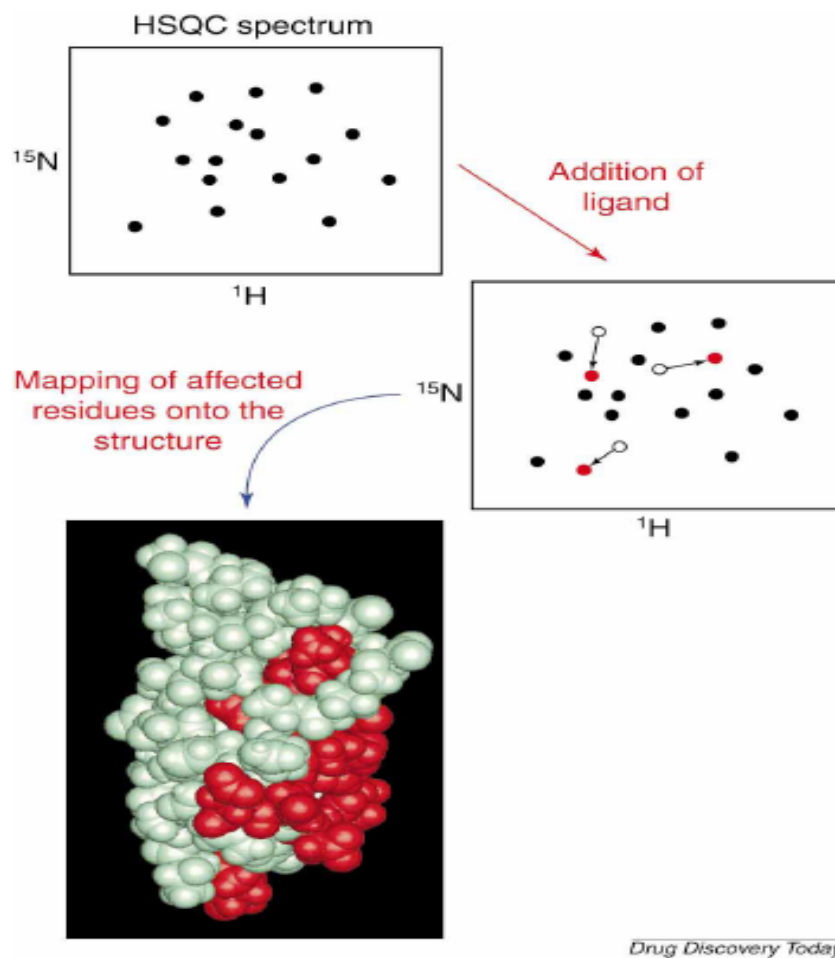
Anche in questo caso come nell'STD e nel waterLOGSY, l'esperimento trNOESY lavora bene per ligandi con affinità μM - mM , per ligandi più forti con costante di dissociazione nell'ordine del nM l'applicabilità di tale esperimento è limitata.

2.4 Metodi basati sull'osservazione della proteina: *chemical shift mapping*

Gli esperimenti di *screening* NMR in cui si osserva la proteina, come detto precedentemente, sono basati sulle perturbazioni di *chemical shift* dei nuclei della macromolecola in seguito al legame del ligando. Questi cambiamenti vengono osservati utilizzando esperimenti NMR di eterocorrelazione ^1H - ^{15}N e/o ^1H - ^{13}C . Sebbene valide informazioni sulle interazioni intermolecolari possono essere ottenute dal *chemical shift mapping*, anche in assenza delle assegnazioni dei segnali NMR, la potenzialità di questo approccio può essere sfruttata quando sono note le assegnazioni delle risonanze della proteina bersaglio. In quest'ultimo caso, il *chemical shift mapping* può fornire precise informazioni sulla localizzazione del sito di legame. In genere, tale metodo può essere utilizzato per uno *screening* primario, qualora si disponga di sistemi ad elevati livelli di espressione della proteina marcata con ^{15}N o ^{13}C , e/o per identificare gli epitopi di legame della proteina, dopo aver stabilito con altri metodi che un composto lega la proteina di interesse.

Il concetto del *chemical shift mapping* è illustrato nella figura 2.9. Nella sua forma più semplice, esso si basa sull'acquisizione di uno spettro ^1H - ^{15}N (o ^{13}C) HSQC (*heteronuclear single quantum correlation*) in assenza e in presenza del ligando. Quando il ligando interagisce in modo relativamente debole (*fast exchange*), la sua aggiunta in concentrazioni crescenti provocherà un progressivo spostamento dei picchi di correlazione di quei residui che sono coinvolti o direttamente nel legame o indirettamente a causa di un cambio conformazionale nella struttura della proteina. Sebbene non è possibile distinguere tra questi due tipi di cambiamenti solo sulla base di questo esperimento, in genere, se i residui

coinvolti dal cambiamento si trovano sulla superficie della struttura della proteina è più facile pensare che si tratta di amminoacidi coinvolti direttamente nel legame.



Drug Discovery Today

Figura 2.9 Principio del *chemical shift mapping*. La figura mostra uno spettro ^1H - ^{15}N HSQC in cui i protoni che hanno subito uno spostamento in seguito al legame del ligando (picchi rossi), sono mostrati sulla superficie della proteina, definendo il sito di legame.

Al contrario amminoacidi che si trovano all'interno della proteina possono subire una modificazione in seguito ad un cambio conformazionale della struttura.

2.5 NMR e dinamica delle proteine

Uno degli aspetti più importanti per la comprensione *in toto* dei meccanismi molecolari attraverso lo studio delle proteine, è quello di valutare le relazioni che intercorrono tra struttura e funzione.

La struttura tridimensionale statica di una proteina da sola non riesce a spiegare completamente le sue funzioni biologiche. Infatti, in molti casi l'attività biochimica di una proteina dipende da movimenti in scale dei tempi molto veloci (ps-ns) o da cambi conformazionali. Questi ultimi possono essere indotti dall'interazione o con altre proteine (riconoscimento molecolare) o con piccole molecole (substrati enzimatici, ormoni, etc.). Stabilire sperimentalmente il comportamento di una proteina quando è legata e quando non è coinvolta nella formazione di legami, risulta difficile, in quanto i cambiamenti strutturali, indotti dall'interazione con altre molecole nella proteina stessa, possono essere trasferiti anche in regioni lontane dal sito di legame mediante opportuni movimenti della proteina stessa. Pertanto, risulta chiaro che per ottenere una descrizione completa della struttura di una proteina, e quindi della sua attività, è necessario studiarne il comportamento dinamico (Palmer, 2004).

Uno dei metodi più solidi in grado di fornire informazioni sulla dinamica di una proteina, ossia sui moti dell'intera molecola o specificamente su quelli del *backbone* o delle catene laterali, risulta essere la misura di parametri NMR, quali i tempi di rilassamento longitudinale e trasversale, T_1 e T_2 , di un eteronucleo, ^{15}N o ^{13}C e il NOE eteronucleare $\{^1\text{H}\}-^{15}\text{N}$ o $\{^1\text{H}\}-^{13}\text{C}$, può essere utilizzata per determinare le velocità dei moti interni di una proteina e per costruire un modello dinamico della sua struttura mediante programmi di calcolo come il *model-free* (Lipari e Szabo, 1982a e 1982b).

Tra i vantaggi dell'NMR in questo campo vi è la sua sensibilità a rivelare movimenti interni in un ampio *range* di scale di tempo, che va dai picosecondi (*fast time-scale*), come vibrazioni molecolari e rotazioni di catene laterali, a diversi millisecondi-secondi e più (*slow time-scale*), come scambi chimici, movimenti globali (fig. 2.10) (Palmer, 2004).

Questa scala copre tutti i più importanti processi biologici e oltre a fornire la caratterizzazione della struttura della proteina nel suo ambiente nativo permette di avere un'immagine completa, con risoluzione a livello atomico, delle dinamiche della proteina.

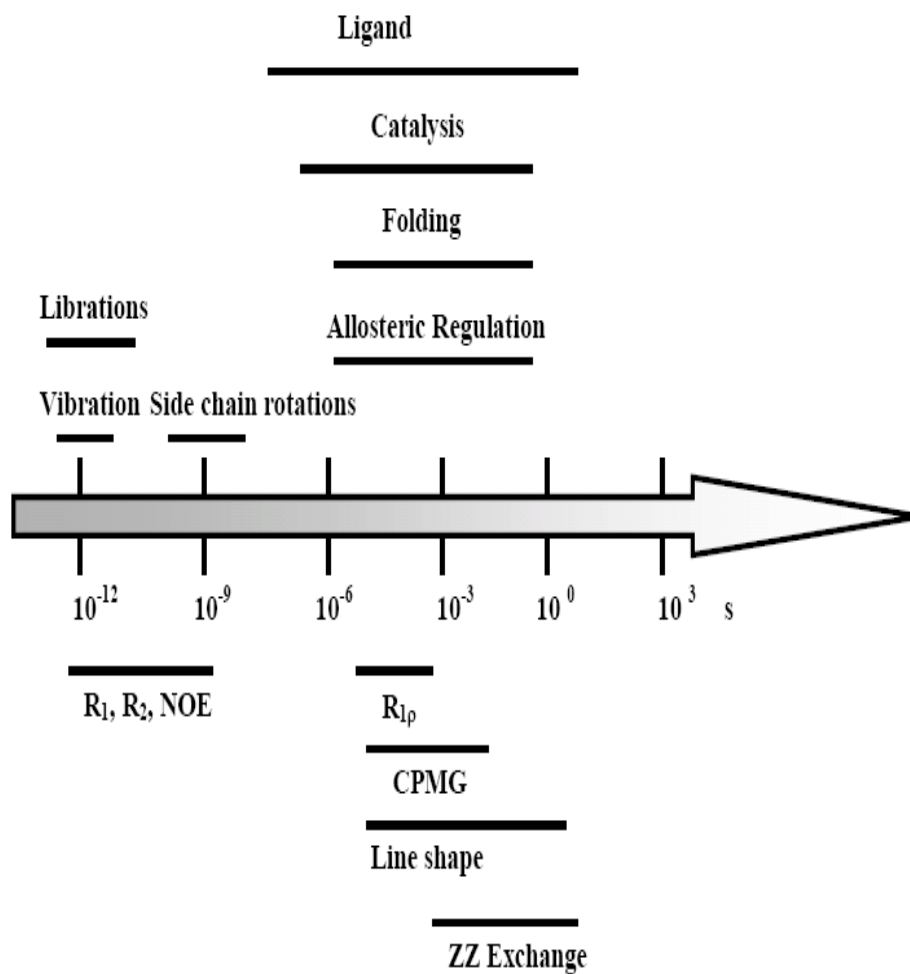


Figura 2.10 Metodi NMR per la dinamica delle proteine. Movimenti misurati attraverso Risonanza Magnetica Nucleare. Ciascun movimento che avviene in una differente scala dei tempi è sensibile alle misure di uno specifico rilassamento di spin nucleare (Palmer, 2004).

2.6 Il rilassamento

Nella spettroscopia NMR ad impulsi in seguito ad interazione con un impulso di radiofrequenza, particolari nuclei posti in un campo magnetico vengono eccitati passando da uno stato a basso contenuto energetico (α), ad uno stato ad alto contenuto energetico (β). Il processo di ritorno degli spin da β a α è quello che viene chiamato **rilassamento**.

I due principali meccanismi attraverso cui avviene il rilassamento sono il **rilassamento spin-reticolo** o longitudinale e **rilassamento spin-spin** o trasversale. La velocità di rilassamento spin-reticolo dipende dalla costante R_1 ($1/T_1$), che descrive il decadimento della magnetizzazione dovuto ai sistemi di

spin che ritornano ad uno stato di equilibrio. La velocità di rilassamento trasversale, descritta dalla costante R_2 ($1/T_2$), rappresenta il tempo che impiega la magnetizzazione trasversale per decadere a zero, per effetto della perdita della coerenza di fase.

La velocità di emissione spontanea per una transizione di spin nucleare è approssimativamente $\sim 1/\omega^3$, che è un valore molto piccolo, per cui tutto il rilassamento nucleare avviene mediante processi stimolati. La transizione tra livelli energetici nucleari richiede l'accoppiamento dello stato eccitato e di quello fondamentale con una radiazione di frequenza che corrisponde alla differenza di energia tra i due stati. In generale, i campi magnetici fluttuanti tempo-dipendenti prodotti dai moti degli atomi e delle molecole circostanti inducono il rilassamento di un nucleo. Una misura del movimento molecolare è espresso dal **tempo di correlazione τ_c** che rappresenta il tempo medio impiegato da una molecola per riorientarsi.

2.7 Meccanismi che generano campi magnetici fluttuanti

Ci sono diversi meccanismi che generano campi magnetici oscillanti e che causano il rilassamento di nuclei con spin $1/2$. I due processi principali sono le interazioni dipolari fluttuanti e l'anisotropia di chemical shift (CSA). Questi due meccanismi insieme ad altri responsabili del rilassamento sono descritti di seguito.

🌈 **Interazioni dipolo-dipolo.** In tutti i nuclei ed elettroni di ogni molecola vi sono oscillazioni termiche. Ad ogni nucleo con numero quantico di spin $I=1/2$ è associato un dipolo magnetico. Poiché questo dipolo magnetico oscilla in modo *random* a causa di fluttuazioni termiche, viene generato un campo magnetico oscillante. In particolare, quest'ultimo potrebbe oscillare ad una frequenza appropriata per causare il rilassamento di nuclei vicini. Se consideriamo una coppia di nuclei legati, come il ^{15}N e l' ^1H nel *backbone* di una proteina in un magnete NMR, il vettore ^{15}N - ^1H ruoterà continuamente; a causa del *tumbling* molecolare o di oscillazioni

strutturali interne della proteina. La velocità di oscillazione è caratterizzata dal tempo di correlazione τ_c del vettore $^{15}\text{N}-^1\text{H}$. Il nucleo ^1H indurrà un campo magnetico sul nucleo ^{15}N , che varierà continuamente. Se il campo oscillante sarà di una appropriata frequenza, indurrà rilassamento del nucleo ^{15}N (Cavanagh, 1996), questo fenomeno è noto come rilassamento o accoppiamento dipolare. Nell'accoppiamento dipolare, la magnetizzazione e la direzione del campo magnetico esercitato da un altro spin varierà, indotto da rotazione molecolare (fig. 2.11 a).

La forza dell'accoppiamento dipolare è fortemente dipendente dalla distanza internucleare, così il protone attaccato domina su tutti gli altri nuclei il rilassamento dipolare di un nucleo ^{15}N .

✚ **Chemical shift anisotropico.** L'effetto di schermo causato dalla densità elettronica nell'orbitale di un nucleo è dipendente dall'orientazione della molecola rispetto al campo magnetico esterno (CSA). In particolare, sia l'intensità sia la direzione del campo magnetico locale effettivo cambiano continuamente a causa del *tumbling* della molecola in soluzione, ciò provoca un'oscillazione del campo magnetico locale (figura 2.11 b) che varia con il tempo. Questa variazione del campo oscillante può indurre rilassamento tra gli stati di spin nucleari.

✚ **Interazione scalare.** Un'altra causa di rilassamento è l'accoppiamento scalare. Se si considera azoto ammidico, il ^{15}N è scalarmente accoppiato al suo ^1H a cui è legato. Quando il protone scambia con il solvente, l'accoppiamento scalare costantemente fluttua durante il processo di scambio. Il rilassamento indotto nel nucleo ^{15}N dal protone varierà in dipendenza della costante di accoppiamento scalare.

✚ **Paramagnetico.** È il contributo al rilassamento derivante da elettroni spaiati. Questo tipo di rilassamento è distanza dipendente ed è simile a quello dipolare. Poiché elettroni spaiati non sono comuni in sistemi biologici e a causa del loro elevato rapporto giromagnetico, il loro contributo viene considerato separatamente.

✚ **Cross correlation.** E' l'accoppiamento di campi magnetici fluttuanti causati dai singoli processi di rilassamento. Il più comune è la correlazione

tra la CSA e il meccanismo di rilassamento dipolare, ossia la presenza della CSA può influenzare la velocità di rilassamento dipolo-dipolo e viceversa.

✚ **Scambio chimico.** Questo fenomeno è comunemente osservato in macromolecole in soluzione e ha una scala dei tempi molto più lenta rispetto a quella del rilassamento dipolare e della CSA. Se si considera un singolo nucleo di spin $\frac{1}{2}$ in una molecola esibente due differenti conformazioni, lo scambio chimico tra questi due conformeri ha differenti effetti sulla risonanza NMR e sulla larghezza di riga di tale nucleo (vedi fig. 2.2) in dipendenza di quanto veloce esso avviene rispetto al chemical shift. Poiché lo scambio chimico influenza la larghezza di riga, esso ha effetto solo sul rilassamento trasversale (Palmer *et al.*, 2001).

2.8 Densità spettrale

Per meglio comprendere i meccanismi di rilassamento, è necessario introdurre la funzione **densità spettrale**. Nel precedente paragrafo sono stati illustrati i meccanismi che causano fluttuazione di campo magnetico, la densità spettrale descrive queste fluttuazioni di campo che determinano il rilassamento di un nucleo. In particolare, la densità spettrale descrive il numero di oscillatori che danno luogo ad una particolare frequenza del campo magnetico fluttuante e può essere definita come la quantità di energia fornita dall'ambiente circostante ad un nucleo per indurre il rilassamento tra i suoi stati di spin.

2.8.1. Funzione di correlazione

La densità spettrale può essere descritta in termini di funzione di correlazione. La funzione di correlazione consente di confrontare il campo fluttuante ad un certo tempo t con il suo valore dopo un intervallo di tempo τ . In particolare è una misura della probabilità che il campo assume lo stesso valore dopo un certo tempo τ . Nel caso più semplice, la funzione di autocorrelazione $G(t)$ è descritta dalla seguente espressione (Levitt, 2001):

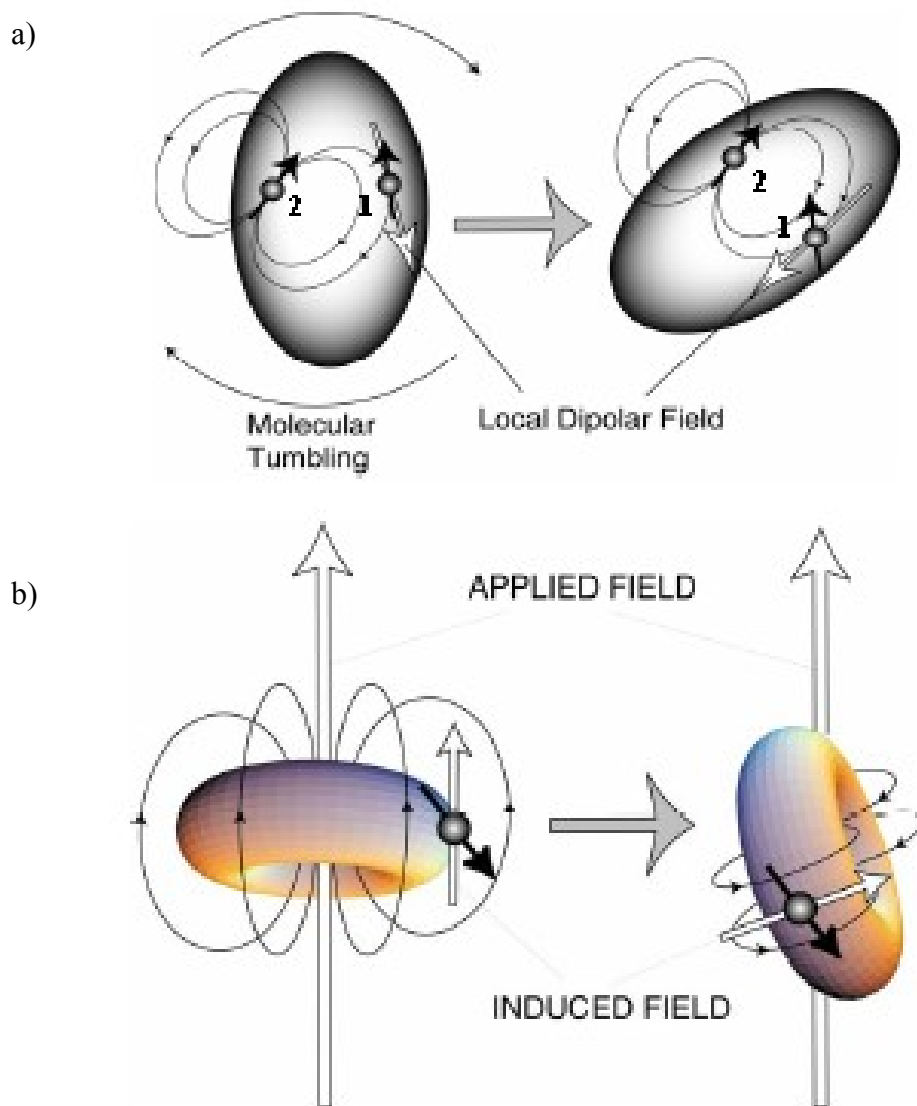


Figura 2.11 *Descrizione degli effetti dipolo-dipolo e CSA sul rilassamento (Levitt, 2001).*

(a) Modulazione del campo locale dipolare indotto da rotazione molecolare. La variazione del campo al sito 1 causerà un cambiamento nel campo del sito 2, inducendo rilassamento.

(b) Modulazione del CSA indotto da rotazione molecolare. La direzione e la magnetizzazione del campo locale (indotto da un campo esterno) cambiano,

$$G(\tau) = \langle B_x^2 \rangle e^{-|\tau|/\tau_c}$$

Dove B_x è il campo lungo l'asse x e τ_c è il tempo di correlazione. Da tale equazione si osserva che $G(t)$ decade esponenzialmente da $\langle B_x^2 \rangle$ quando $t=0$ ad un valore di 0 quando $t \rightarrow \infty$. La velocità di decadimento della funzione di correlazione tra questi due estremi dipende dal tempo di correlazione. Quando τ_c è breve (es. 0,2 ns) il campo oscilla più rapidamente e la funzione $G(t)$ decade rapidamente a 0 (fig. 2.12a). Quando invece il tempo di correlazione è più lungo (es. 2 ns), il campo fluttua più lentamente e la funzione $G(t)$ decade più rapidamente a 0 (fig. 2.12b).

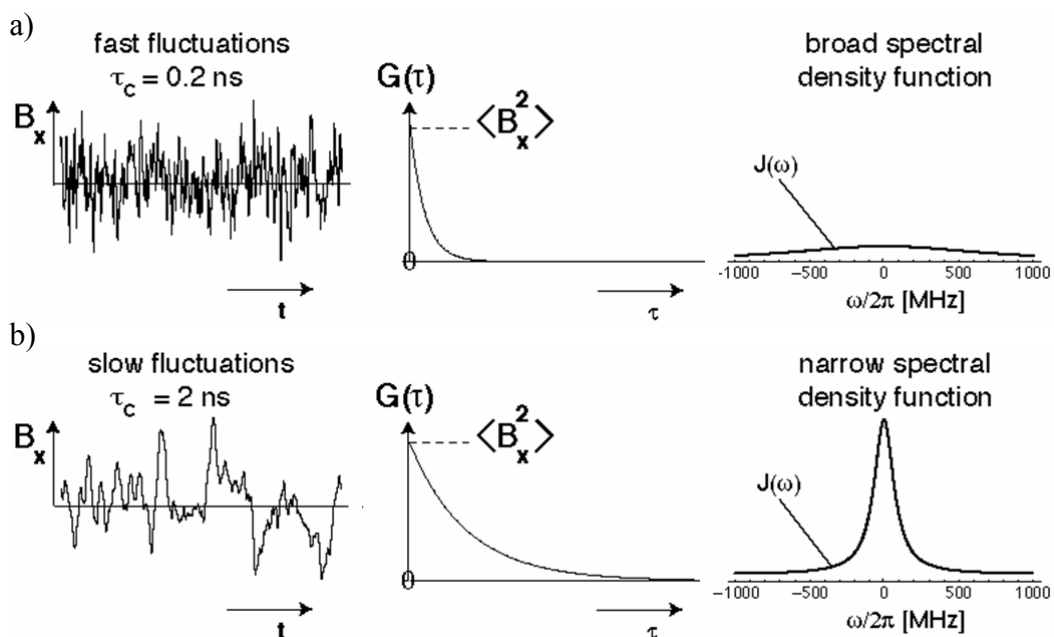


Figura 2.12 Relazione tra campo magnetico fluttuante, funzione di correlazione e densità spettrale (Levitt, 2001).

- Rapido decadimento e larga funzione densità spettrale di un campo fluttuante rapidamente.
- Lento decadimento e stretta funzione densità spettrale di un campo fluttuante lentamente. L'area sottostante le due curve che descrivono la densità spettrale è simile, ma nel caso del campo fluttuante rapidamente la curva copre un più ampio intervallo di frequenze.

La densità spettrale è la trasformata di Fourier di una funzione di autocorrelazione per il campo magnetico locale fluttuante.

$$\exp(-|\tau|/\tau_c) \stackrel{FT}{=} \frac{2\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2} = J(\omega)$$

Dove ω è la frequenza di Larmor .

La relazione tra campo fluttuante e densità spettrale è mostrata in figura 2.12. Campi magnetici fluttuanti rapidamente hanno un breve tempo di correlazione e la densità spettrale è larga. Viceversa, se il campo fluttua lentamente, il tempo di correlazione è lungo e la densità spettrale è stretta. Poiché il tempo di correlazione decresce, la funzione densità spettrale è ridistribuita su un più ampio intervallo di frequenze.

La teoria di Bloch-Wangsness-Redfield (Bloch, 1956; Redfield, 1965; Wangsness, 1953) prevede che il moto di riorientazione causante il rilassamento di spin è descritto dalla funzione densità spettrale come:

$$J(\omega) = \int C(t) \cos(\omega t) dt$$

Dove $C(t)$ è la funzione del tempo di correlazione rotazionale della porzione del reticolo con cui interagisce lo spin che ne determina il rilassamento.

2.8.2. Scala dei tempi del campo fluttuante

La funzione densità spettrale descrive come la distribuzione delle frequenze contenute nei moti rotazionali dei vettori N-H (interni o dell'intera molecola) influenza cinque differenti frequenze angolari: $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$, $J(\omega_H)$ e $J(\omega_H - \omega_N)$ (figure 2.13) (Peng e Wagner, 1992). Ciascuna di queste frequenze angolari rappresenta movimenti in specifiche scale dei tempi. $\omega_H + \omega_N$, ω_H e $\omega_H - \omega_N$ misurano movimenti sulla scala dei picosecondi, ω_N misura movimenti nei nanosecondi e 0 misura movimenti su scale dei tempi più lente (millisecondi). La frequenza del campo fluttuante può assumere qualsiasi di queste frequenze angolari e causare il rilassamento dello spin. Le frequenze dei campi fluttuanti sono misurate in termini di velocità di rilassamento mediante le seguenti espressioni (Abragam, 1961):

$$R_1 = \left(\frac{d^2}{4} \right) \left[J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H + \omega_X) \right] + c^2 J(\omega_X)$$

$$R_2 = \left(\frac{d^2}{8} \right) \left[4J(0) + 3J(\omega_H - \omega_X) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_H + \omega_X) \right] + \left(\frac{c^2}{6} \right) \left[4J(0) + 3J(\omega_X) \right] + R_x$$

$$NOE = 1 + \left(\frac{d^2}{4R_1} \right) \left(\frac{\gamma_X}{\gamma_H} \right) \left[6J(\omega_H + \omega_X) - J(\omega_H - \omega_X) \right]$$

Dove $d = \mu_0 h \gamma_X \gamma_H \langle r_{XH}^{-3} \rangle / (8\pi^2)$ e $c = \omega_X \Delta\sigma / \sqrt{3}$; μ_0 è la permeabilità del vuoto; h è la costante di Planck; γ_X and γ_H , r_{XH} e ω_H and ω_X sono rispettivamente il rapporto giromagnetico, la distanza e la frequenza di Larmor dei due spin ^1H and X (^{15}N); $\Delta\sigma$ è l'anisotropia di chemical shift.

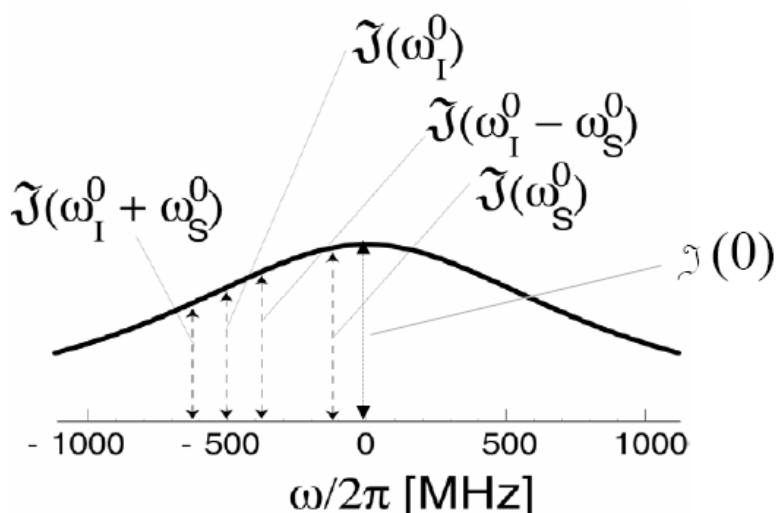


Figure 2.13 Densità spettrale ad un campo magnetico di uno spettrometro di 500MHz. Con I è indicato l' ^1H e con S il ^{15}N (Levitt, 2001).

Poiché il tempo di correlazione di una proteina influenza la densità spettrale influenzando il campo fluttuante, a sua volta influenzerà anche i valori di R_1 , R_2 e NOE. La relazione tra il tempo di correlazione e tali parametri di rilassamento misurabili è mostrato in figura 2.16. A tempi di correlazione molto brevi, i valori di R_1 e R_2 sono uguali. Questo è il cosiddetto *extreme narrowing limit*. Ma quando il tempo di correlazione aumenta R_1 passa attraverso un massimo e poi decresce, mentre la velocità di rilassamento R_2 continua ad aumentare. Nel caso del NOE, la magnetizzazione del ^{15}N cambia segno quando il moto molecolare diminuisce; quindi più grandi tempi di correlazione daranno un valore più positivo del NOE.

Per il ^{13}C , il NOE diminuisce con l'aumento del tempo di *tumbling* fino ad un valore di ~ 1 .

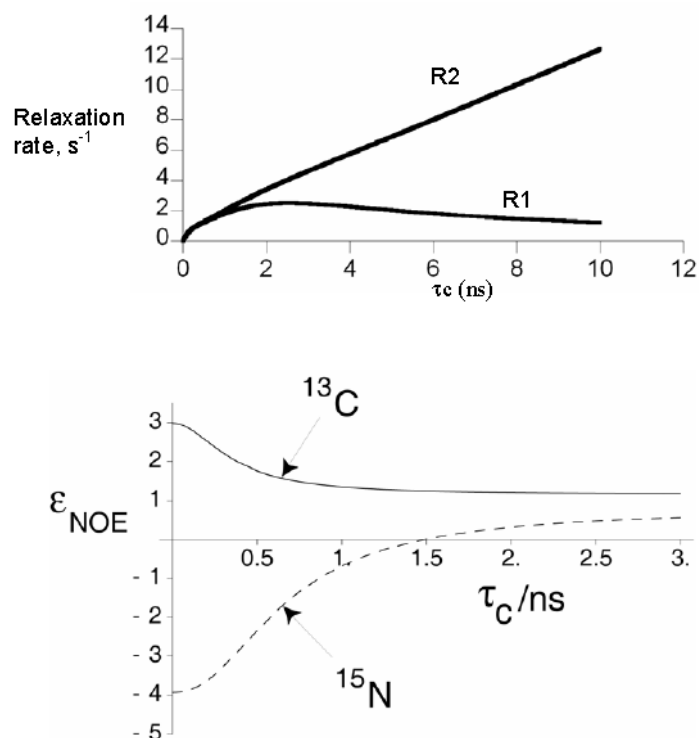


Figura 2.16 Relazione tra parametri di rilassamento e tempo di correlazione (Levitt, 2001).

Alla luce di quanto detto, i movimenti di una proteina possono essere interpretati in termini di densità spettrale, che può essere misurata come velocità di rilassamento e NOE. La relazione tra dinamica di proteine, funzione densità spettrale e i parametri di rilassamento è riassunta nella figura 2.17 (Atkinson, 2004). Le velocità di rilassamento dei vari stati di spin, misurati usando il decadimento tempo -dipendente del segnale $I_s(t)$, sono dati da combinazioni lineari delle densità spettrali a frequenze discrete, ω_i . I parametri di moto possono essere derivati dal *fitting* dei parametri a_i and τ_i ad osservate densità spettrali. Per un moto semplice tra due stati, la scala dei tempi è direttamente legata alla barriera energetica (ΔE_a) tra gli stati mediante la relazione di Arrhenius. Moti di una proteina caratterizzati da valori di $\Delta E_a > 5 \text{ kcal mol}^{-1}$ (μs - ms) possono contribuire a elevate velocità di rilassamento.

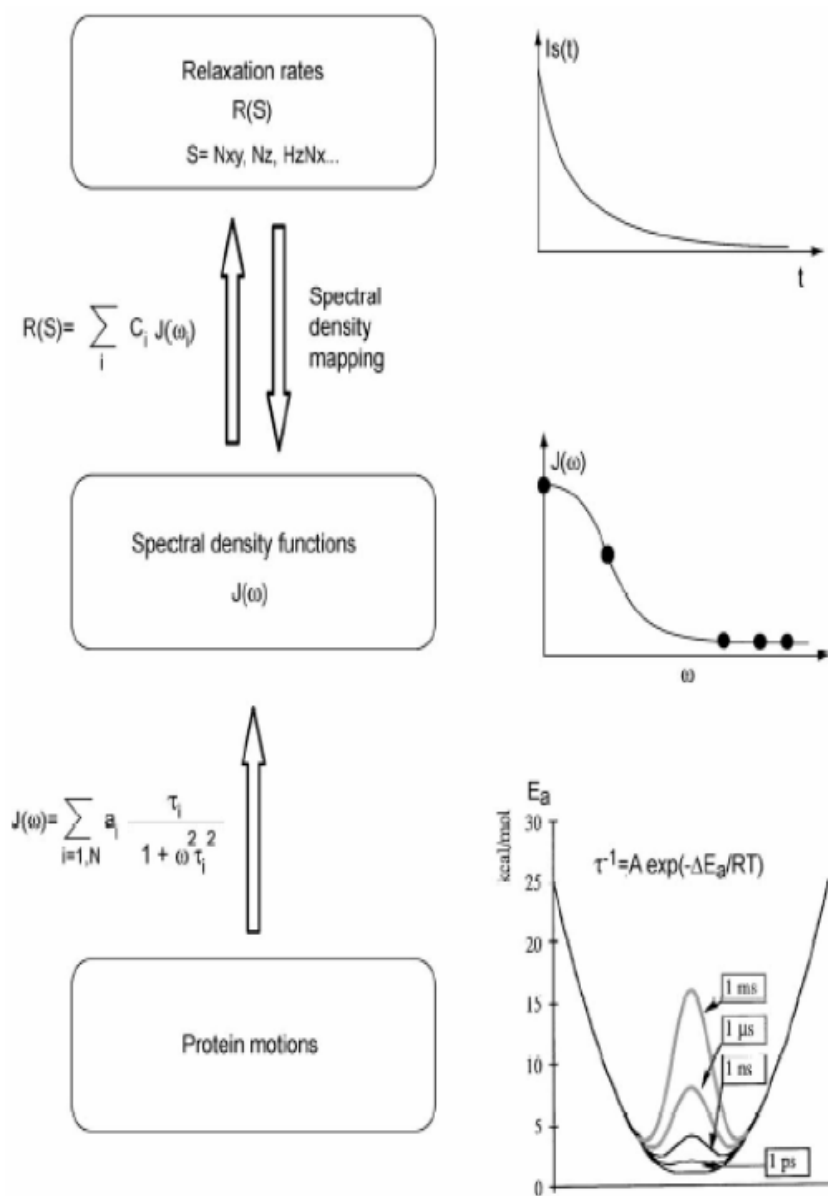


Figura 2.17 Relazione tra moti molecolari, velocità di rilassamento e densità spettrale (Atkinson, 2004).

2.9 Misura delle velocità di rilassamento del ^{15}N

Negli studi di dinamica del *backbone* di gruppi N-H delle proteine, le costanti di velocità (o i tempi) di rilassamento longitudinale R_1 (o T_1) e trasversale R_2 (o T_2) del ^{15}N e il NOE eteronucleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N sono generalmente misurate mediante esperimenti inseriti all'interno di una sequenza di impulsi HSQC (fig. 2.18).

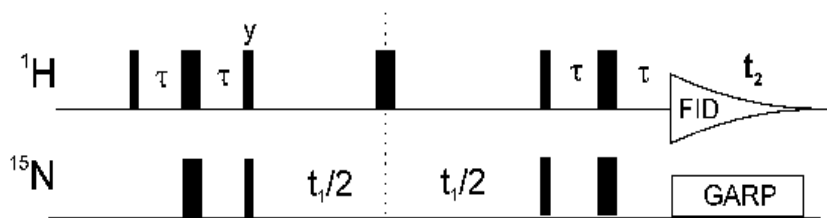


Figura 2.18 Sequenza di impulsi in un esperimento HSQC.

La sequenza di impulsi HSQC utilizza un INEPT (*Insenstive Nuclei Enhancement by Polarization Transfer*), sviluppato da Morris and Freeman nel 1979, e un *reverse* INEPT, per trasferire la magnetizzazione dall' ^1H al ^{15}N e per poi farla ritornare al protone nella fase di rivelazione in cui il ^{15}N viene disaccoppiato. L'HSQC utilizzato per la misura delle velocità di rilassamento del ^{15}N R_1 e R_2 e del NOE eteronucleare è modificata in quanto contiene gradienti di impulsi (PFG) per la selezione di particolari *pathway* di coerenza (Bax, 1992), che consentono di eliminare artefatti dovuti ad impulsi imperfetti, e impulsi simultanei di 90° e 180° che consentono di aumentare la sensibilità di circa un fattore $\sqrt{2}$ (*sensitivity enhancement*) (fig. 2.19) (Kay *et al.*, 1992 e 1995).

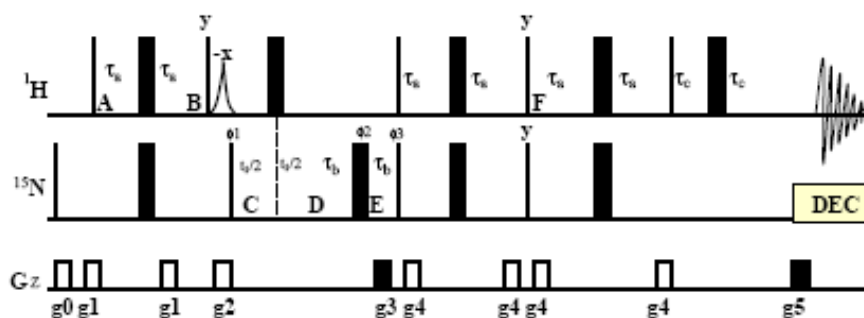


Figura 2.19 Sequenza di impulsi *gradient-selected sensitività-enhanced* HSQC (Kay *et al.*, 1995) Le linee sottili verticali rappresentano impulsi non selettivi di 90° , mentre quelle più doppie impulsi RF di 180° , che vengono applicati lungo l'asse x, se non diversamente specificato.

Le sequenze di impulsi per la misura del T_1 e T_2 consentono di misurare la velocità di decadimento dell'intensità dei picchi di eterocorrelazione (fig. 2.20a e 2.20b).

Nell'HSQC per la misura del T_1 , l'iniziale impulso sul ^{15}N e il successivo gradiente distruggono tutta la magnetizzazione del ^{15}N , in modo che tutta la magnetizzazione parta dall' ^1H . La sequenza INEPT poi trasferisce la magnetizzazione dall' ^1H al ^{15}N . Un *delay* variabile è utilizzato per l'*inversion recovery*, dopo che la magnetizzazione è ritrasferita all' ^1H mediante il *reverse* INEPT per la rivelazione.

Nell'HSQC per la misura del T_2 , una sequenza CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) $[\tau-180^\circ-\tau]_n$ è impiegata con tempi di *mixing* variabili prima che la magnetizzazione sia ritrasferita al protone per la rivelazione (Farrow *et al.*, 1994). Per l'acquisizione di spettri $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE (fig. 2.20c) è utilizzato un treno di impulsi che fa ruotare la magnetizzazione del protone di 120° . Spettri di riferimento (NO NOE) sono invece registrati utilizzando una sequenza identica eccetto che per il fatto che il treno di impulsi è applicato ad una potenza più bassa (60 dB). Questa sequenza inizia con un impulso sul protone di 90° seguito da un gradiente per assicurare che la magnetizzazione è originata dal ^{15}N . Un impulso *flipback* selettivo sull'acqua di 90° è applicato immediatamente prima dell'impulso *hard* sul protone per minimizzare fenomeni di *radiation damping* e per migliorare la linea di base spettrale (Grzesiek, 1993).

I valori di R_1 ($1/T_1$) e R_2 ($1/T_2$) del ^{15}N per ogni picco di correlazione sono determinati dal *fitting* del reciproco delle loro intensità ad ogni tempo di *mixing* mediante una curva di regressione lineare. Il NOE eteronucleare $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N è ottenuto dal rapporto dell'intensità dei picchi con e senza saturazione del protone. E' importante sottolineare che nelle sequenze per la misura del T_1 e del T_2 il trasferimento della magnetizzazione inizia e finisce alla frequenza di risonanza dei protoni legati covalentemente all'eteroatomo, e la sensibilità di questi esperimenti NMR dipende dal rapporto giromagnetico di entrambi i nuclei, secondo la formula:

$$I \sim \gamma_A \gamma_D^{3/2}$$

Dove γ_A è il rapporto giromagnetico del protone e γ_D quello dell'eteroatomo. Pertanto, l'aumento della sensibilità per i nuclei di azoto è $(\gamma_H/\gamma_N)^{2.5}=300$.

Nell'esperimento per la determinazione del NOE eteronucleare del $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$, il trasferimento della magnetizzazione inizia con le risonanze dell'eteronucleo così che la sensibilità può essere aumentata solo di un fattore di 75.

Per la minore sensibilità, i dati NOE sono generalmente più suscettibili ad errori rispetto a quelli di R_1 e R_2 . Inoltre i valori del NOE sono derivati solo da due *set* di dati, mentre i dati di R_1 e R_2 sono ottenuti facendo un *fit* di set multipli di dati.

2.10 Interpretazione dei dati di rilassamento

Il passo successivo all'acquisizione e all'analisi dei parametri di rilassamento è la loro interpretazione. I moti molecolari possono essere molto complessi ed un numero molto elevato di parametri sono necessari per descrivere accuratamente le loro scale dei tempi, intensità e direzioni. Considerando che i parametri di rilassamento generalmente analizzati sono tre (o al massimo sei, se analizzati a due campi diversi) e che essi non sono sensibili a tutte le frequenze a cui avvengono i moti molecolari, non è possibile ottenere una completa descrizione di tutti i moti molecolari. Tutti gli approcci utilizzati per l'interpretazione dei dati di rilassamento forniscono limitate ma utili informazioni sui movimenti dei nuclei all'interno delle proteine. Un primo approccio consiste nel caratterizzare la funzione densità spettrale assumendo un appropriato modello per il moto del vettore N-H e poi calcolando la funzione densità spettrale $J(\omega)$ analiticamente (London, 1978; Wittebort e Szabo 1978). In questo tipo di approccio il risultato è spesso compromesso dalla scelta del modello o dall'assunzione fatta. Un approccio alternativo è quello di caratterizzare la dinamica della proteina senza fare alcuna ipotesi a priori. I due principali metodi di questo tipo sono: la *mappatura* delle densità spettrali e il *model-free* Lipari-Szabo (Lipari e Szabo, 1982a e 1982b). La *mappatura* delle densità spettrali fornisce accurate informazioni circa la prevalenza di moti ad un limitato numero di frequenze, ma non fornisce indicazioni sulla natura di tali moti. L'approccio *model-free* separa il *tumbling* complessivo della proteina dai moti interni di ogni gruppo N-H e fornisce un utile stima del grado di ordine di ogni sito. Tuttavia, questo approccio fa alcune ipotesi circa la dipendenza dalle frequenze dei moti interni e globali, limitando la potenziale accuratezza del metodo. Il *model-free* è stato di gran lunga

il più popolare approccio, sebbene la mappatura della densità spettrale è stata spesso applicata in casi per i quali le ipotesi del *model-free* sono inadeguate (Jarymowycz e Stone, 2006).

2.11 Mappatura delle densità spettrale ridotte

La *mappatura* delle densità spettrali, descritto per la prima volta da Peng e Wagner (1992), è il metodo più diretto per analizzare misure di rilassamento. Questo metodo aiuta ad estrarre proprietà di moto indipendenti dalla struttura della molecola ed è anche indipendente da qualsiasi modello di moto. Come già detto prima, la funzione densità spettrale mostra come l'energia delle interazioni dipolo-dipolo e della CSA tra l'azoto e il protone è distribuita su cinque differenti frequenze angolari: $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$, $J(\omega_H)$ e $J(\omega_H - \omega_N)$ (figure 2.13) (Peng e Wagner, 1992). Una più semplice versione è ottenuta quando le densità spettrali ad alte frequenze, $J(\omega_H + \omega_N)$, $J(\omega_H)$ e $J(\omega_H - \omega_N)$, sono approssimate tramite un'espansione di Taylor ad un'unica frequenza di $0.87 \omega_H$, $J(0.87\omega_H)$ (Farrow *et al.*, 1994). Questa approssimazione è nota come mappatura delle densità spettrali ridotte. Il principale vantaggio è quello di essere capace di eliminare un indeterminato set di equazioni quando tre parametri di rilassamento sono usati per estrarre valori di densità spettrale alle cinque differenti frequenze. Lo svantaggio di questo metodo è quello di essere più qualitativo che quantitativo.

Le funzioni densità spettrali usando tale approccio possono essere calcolate dai dati di rilassamento come (Bracken *et al.*, 1999):

$$J_{\text{eff}}(0) = [6R_2 - 3R_1 - 2.72\sigma_{NH}] / [3d^2 + 4c^2]$$

$$J(\omega_N) = [4R_1 - 5\sigma_{NH}] / [3d^2 + 4c^2]$$

$$J(0.87\omega_H) = 4\sigma_{NH} / (5d^2)$$

dove $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$ e $J(0.87\omega_H)$ sono i valori delle densità spettrali alle frequenze $\omega=0$, ω_N (60MHz) e $0.87\omega_H$ (516MHz), rispettivamente; il pedice "eff" in $J_{\text{eff}}(0)$

sta ad indicare che la densità spettrale non è corretta dagli effetti di scambio chimico. Gli altri parametri sono dati da:

$$\sigma_{NH} = R_1(NOE - 1)\gamma_N / \gamma_H$$

$$d = (\mu_0^3 \gamma_N \gamma_H / 8\pi^2) \langle r^{-3} \rangle$$

$$c = \omega_x \Delta\sigma / \sqrt{3}$$

dove $\gamma_H = 26.75 \times 10^7$ rad/Ts; $\gamma_N = -2.7 \times 10^7$ rad/Ts; $\mu_0 = 1.257 \times 10^{-6}$ kg m s⁻² A⁻²; $h = 6.626176 \times 10^{-34}$ J s; $\pi = 3.14$; $r = 1.02 \times 10^{-10}$ m, $\Delta\sigma = -160$ ppm (Farrow *et al.*, 1994).

2.12 Model-free

Il formalismo cosiddetto *model-free* è stato introdotto da Lipari e Szabo nel 1982 con l'obiettivo di fornire una visione meccanicistica della dinamica di una proteina mediante la separazione dei moti interni da quelli globali. Esso è stato applicato per la prima volta ai dati di rilassamento del ¹⁵N di una nucleasi da stafilococco da Kay, Torchia e Bax nel 1989.

Secondo il formalismo di Lipari e Szabo, l'informazione sui moti interni veloci contenuta nelle misure di rilassamento può essere ottenuta da una parametrizzazione della funzione densità spettrale in termini di due quantità modello-dipendenti: il parametro d'ordine generalizzato (S^2), che è una misura della restrizione spaziale del moto di un vettore di legame, e l'effettivo tempo di correlazione (τ_e), che è la misura della velocità di moto dello stesso vettore di legame (Lipari e Szabo, 1982a e 1982b).

Come detto la principale assunzione in questo formalismo è che i moti interni sono separabili dall'orientazione globale della proteina, e può essere scritto come il seguente prodotto:

$$C(t) = C_0(t) * C_1(t)$$

Dove $C_0(t)$ e $C_1(t)$ sono le funzioni di correlazione rotazionale che descrivono i moti globali e i moti interni rispettivamente. Quando il moto globale è isotropico, $C_0(t)$ è dato da:

$$C_0(t) = \frac{1}{5} \cdot e^{-6D_M t} = \frac{1}{5} \cdot e^{-t/\tau_M}$$

$\tau_M = \frac{1}{6D_M}$ è il tempo di correlazione globale isotropico della proteina e D_M è la costante di diffusione. La funzione di correlazione per il moto interno $C_1(t)$ al tempo $t=0$ assume valore 1, mentre al tempo $t=\infty$ assume la forma:

$$C_1(t) = S^2 + (1-S^2)e^{-t/\tau_c}$$

Come mostrato in figura 2.21, $C_1(t)$ decade da un valore di 1 ad un valore asintotico pari a S^2 , che potrebbe o meno essere uguale a 0. In generale S^2 assume valori compresi tra 0 e 1.

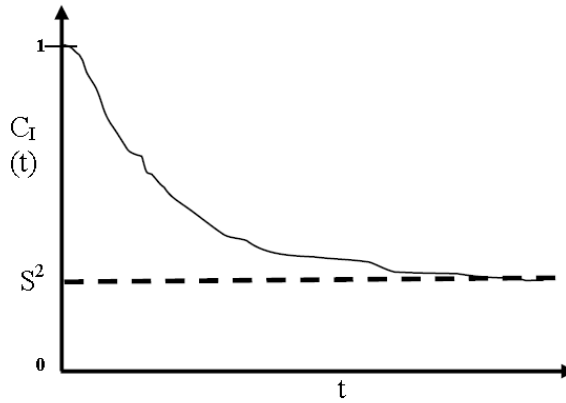


Figura 2.21 Decadimento della funzione di correlazione con il tempo dovuto ai moti interni del vettore N-H in una proteina.

Nel caso di moto globale isotropico, la funzione di correlazione totale sarà quindi data da:

$$C(t) = \frac{1}{5} \cdot S^2 e^{-t/\tau_M} + \frac{1}{5} \cdot (1-S^2) e^{-t/\tau'}$$

Dove $\tau'^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_c^{-1}$. La corrispondente densità spettrale è:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \left(\frac{S^2 \tau_M}{1 + (\omega \tau_M)^2} + \frac{(1-S^2) \tau'}{1 + (\omega \tau')^2} \right) \quad [1]$$

Che può essere espansa per un tensore di diffusione assialmente simmetrico come (Palmer, 2004;)

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \cdot \sum_{j=0}^2 A_j \left(\frac{S^2 \tau_j}{1 + (\omega \tau_j)^2} + \frac{(1-S^2) \tau'_j}{1 + (\omega \tau'_j)^2} \right)$$

In cui $\tau_j' = 6D_{\perp} - J^2(D_{\perp} - D_{\parallel})$, D_{\perp} e D_{\parallel} sono le componenti di un tensore di diffusione assialmente simmetrico, $A_0 = (3\cos^2\theta - 1)^2/4$, $A_1 = 3\sin^2\theta \cos^2\theta$, $A_2 = 3/4\sin^4\theta$, dove Analogamente, per una molecola con moto anisotropico è possibile scrivere un'equazione approssimata. Se due processi di moto interni sono necessari per descrivere il rilassamento dei siti esibenti una dinamica complessa (Clare, 1990), $J(\omega)$ sarà data da:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} S_f^2 \sum_{j=0}^2 A_j \left(\frac{S_s^2 \tau_j}{1 + (\omega\tau_j)^2} + \frac{(1 - S_s^2) \tau_j'}{1 + (\omega\tau_j')^2} \right)$$

Dove $S^2 = S_f^2 S_s^2$, S_f è il parametro d'ordine per moti su una scala dei tempi veloce ($\tau_f < 10\text{ps}$, generalmente assunto essere circa 0 come nell'equazione 1), S_s è il parametro d'ordine su una scala dei tempi più lenta ($\tau_s < 2 \text{ nsec}$, $\tau_f < \tau_s < \tau_m$) e $\tau_j' = (1/\tau_j + 1/\tau_s)$.

Nel *model-free* cinque modelli di moto semplici (Mandel *et al.*, 1995) derivati dall'equazione della densità spettrale in funzione dei parametri S^2 , τ_M e τ_e sono usati per il *fitting* dei dati sperimentali. I vari modelli si differenziano per il numero e il tipo di parametri necessari per il *fitting* delle velocità di rilassamento R_1 , R_2 e NOE. Il modello più semplice LS1, che ha come parametri “aggiustabili” S^2 e τ_M , è applicabile quando i moti su scale dei tempi lente ($\mu\text{s}/\text{ms}$) sono trascurabili e i moti su scale dei tempi veloci (ps/ns) sono molto veloci ($\tau_e = 0$). Il modello LS2 (S^2 , τ_M , τ_e) assume che i moti su scale dei tempi lente sono ancora trascurabili, ma i moti su scale dei tempi veloci sono descritti da $\tau_e > 0$. Il modello LS3 (S^2 , τ_m , R_{ex}) include un termine R_{ex} per il contributo dello scambio chimico ai moti lenti, ma i moti veloci sono assunti essere molto veloci ($\tau_e \sim 0$). Il modello LS4 (S^2 , τ_M , τ_e , R_{ex}) include moti interni veloci insieme con moti più lenti dovuti allo scambio chimico. Tutti questi modelli assumono $S_f^2 = 1$ mentre il modello LS5 (S^2 , S_f^2 , τ_m , τ_s) assume moti interni su scale dei tempi veloci (ps) e lente (ns) con $S_f^2 < 1$. Una descrizione di questi parametri relativi al moto di una macromolecola è rappresentata in figura 2.22.

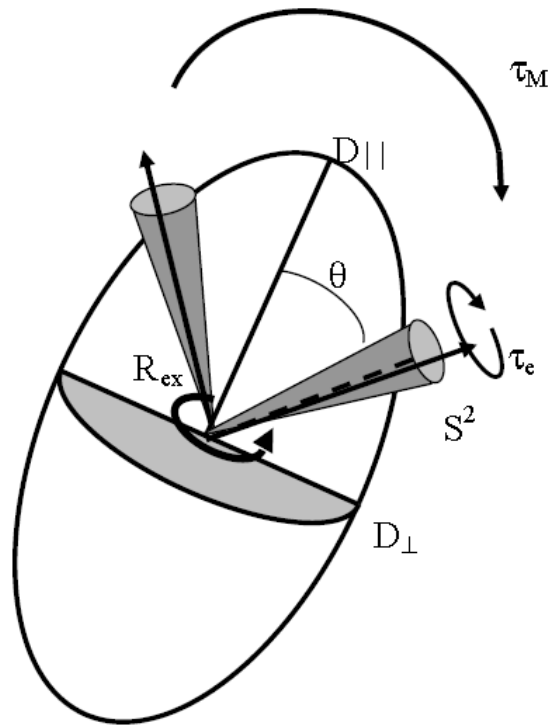


Figura 2.22 Parametri *model-free* per un tensore di diffusione assialmente simmetrico. Le costanti di diffusione sono D_{\parallel} per la diffusione intorno all'asse di simmetria del tensore di diffusione e D_{\perp} per la diffusione intorno ai due assi ortogonali. Il vettore di legame forma un angolo θ con l'asse di simmetria. I movimenti globali sono descritti dal tempo di correlazione, τ_M . Dinamiche locali sono rappresentati come movimenti all'interno del cono, caratterizzati dal parametro d'ordine S^2 e dal tempo di correlazione interno τ_e . Lo scambio chimico tra due siti è descritto dal termine R_{ex} (Palmer, 2004).

Il programma *Model-free* associa sempre S_s^2 con τ_e ; non cerca di ottimizzare S_f^2 e τ_e come una coppia. Altri modelli potrebbero essere testati con ulteriori dati acquisiti a differenti campi magnetici.

La validità dell'assunzione di Lipari-Szabo della separazione dei moti interni da quello globale è valida quando sono verificate le seguenti due condizioni (Vugmeyster *et al.*, 2003):

1. $\tau_e/\tau_m \gg 1$, quando il vettore N-H può essere considerato fisso nel sistema di riferimento molecolare. Moti più lenti rispetto al tempo di *tumbling* globale non influenzerà S^2 , ma si manifesterà come scambio chimico (modelli LS3 e LS4 che includono R_{ex}).
2. $\tau_e/\tau_m \ll 1$, caratterizzato dal valore medio dell'orientazione del vettore N-H nel sistema di riferimento molecolare. Questa condizione non è

soddisfatta quando i moti interni sono lenti abbastanza da violare la separazione dei moti interni e del moto globale. Questo generalmente porta ad un valore di S^2 sovrastimato e a quello di τ_e sottostimato (Tugarinov *et al.*, 2001; Vugmeyster *et al.*, 2003). Tali grandezze non tengono conto della presenza di moti nella scala dei nanosecondi nelle macromolecole (Korzhenov *et al.*, 1997).

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Allestimento della *library* di frammenti molecolari e sua caratterizzazione mediante spettri protonici monodimensionali

I frammenti molecolari della *library* sono stati acquistati da collezioni commerciali della *Maybridge*, Sigma-Aldrich e ACB Blocks. Ogni molecola della *library* è stata caratterizzata registrando uno spettro protonico (^1H) monodimensionali (1D) utilizzando uno spettrometro Varian Inova 600MHz alla temperatura di 298 K, con 9600 *data points*, 128 scansioni e una finestra spettrale di 13.3 ppm. La soppressione del segnale HOD è stata effettuata presaturando alla frequenza di risonanza dell' H_2O . Gli spettri NMR ^1H sono stati utilizzati per un controllo qualità dei composti delle *library*. Una stima della solubilità è stata ottenuta dalla misura delle aree dei segnali NMR, corrispondenti ad un protone, dei frammenti molecolari in esame (A_F) rispetto all'area del segnale del dimetilsolfossido (DMSO) (A_D) presente in ciascuna soluzione¹. Sono stati inoltre scelti quattro intervalli di A_F/A_D a cui sono state associate le seguenti stime di solubilità:

$A_F/A_D = 0$	→	-
$0 < A_F/A_D \leq 0,5$	→	+
$0,5 < A_F/A_D \leq 1,5$	→	++
$A_F/A_D > 1,5$	→	+++

Una stima della purezza è stata, invece, ottenuta confrontando il rapporto delle aree dei segnali NMR delle impurezze e dell'area del segnale del DMSO e il

¹ E' stato assunto che l'area del segnale del HCD2 del DMSO sia pressoché uguale in tutti gli spettri, poiché tutti i campioni sono stati preparati e trattati nello stesso modo. Inoltre è stato tenuto conto del fatto che alcune molecole sono sciolte in d_6 DMSO alla concentrazione di 50 mM e altre di 100 mM.

valore di A_F/A_D . Si sono considerati puri (+) composti che presentavano una purezza maggiore del 95%.

3.2 Espressione e purificazione della proteina PED non marcata e marcata con ^{15}N

La proteina PED è stata fornita dal laboratorio di biologia molecolare e di biologia strutturale dell'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini (IBB) di Napoli del CNR, nel quale sono stati messi a punto sistemi ad elevati livelli di espressione sia della proteina non marcata che della proteina marcata.

Il cDNA codificante PED è stato clonato nel vettore di espressione pETM30 che permette l'espressione della proteina come prodotto di fusione con il *tag* Gst e una coda di istidine (His_6) nella regione N-terminale. L'espressione di PED è avvenuta nel ceppo BL21 (DE3) a 22°C per 16 ore in presenza di 1 mM di IPTG. La purificazione di tale proteina è stata effettuata in due passaggi di purificazione. Il primo passaggio ha previsto una cromatografia di affinità. L'estratto proteico è stato caricato mediante FPLC su His-Trap e le proteine sono state eluite in un gradiente lineare d'imidazolo. I tamponi utilizzati sono riportati di seguito: Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, imidazolo 40 mM, PMSF 0.1 mM, pH8 (Tampone d'iniezione); Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, Imidazolo 500 mM, PMSF 0,1 mM, pH8 (Tampone di eluizione).

Dopo il primo passaggio di purificazione il *tag* di fusione è stato allontanato mediante idrolisi con la TEV (1:100 W/W). Infine, la miscela risultante è stata nuovamente purificata su His-trap. In tal caso PED è stata recuperata nel *flow-through*. Il livello di purezza così ottenuto è del 90%. L'analisi mediante spettrometria di massa della proteina intera e digerita con tripsina ha confermato la sua identità.

La proteina PED uniformemente marcata con ^{15}N è stata espressa in *Escherichia coli*, utilizzando il ceppo BL21 (DE3) e il vettore di espressione pETM30 all'interno del quale è stato clonato il gene *ped*, come per la proteina non marcata. Per la crescita è stato scelto il terreno M9 all'interno del quale è stato disciolto $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (1 g/L). La composizione del terreno di crescita obbliga le cellule

batteriche ad utilizzare $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ come unica fonte di azoto e di conseguenza all'espressione della proteina di interesse con ^{15}N . La proteina ^{15}N , così espressa, è stata poi purificata come fatto per la proteina non marcata.

3.3 Espressione e purificazione della proteina D4 α

La proteina D4 α è stata fornita dal laboratorio di biologia molecolare dell'IBB di Napoli. La procedura di espressione e di purificazione di D4 α di seguito riportata è stata eseguita come descritto nella tesi di dottorato della dott.ssa Doti (2008).

La proteina D4 α è stata espressa nel ceppo BL21(DE3) per 16 ore a 22°C, 0.1 mM isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside (IPTG).

Gli estratti proteici ottenuti dopo lisi nel tampone Tris-HCl 50mM, NaCl 500mM, lisozima 10 mg/mL, inibitori di proteasi 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, TritonX-100 0.1%, PMSF 1 mM, pH 7.5 per 20 minuti in agitazione a temperatura ambiente e successiva sonicazione per 12 minuti (20'' on, 20'' off); sono stati sottoposti ad un primo passaggio di purificazione mediante cromatografia di affinità su resine di Amilosio. Gli estratti sono stati quindi, incubati per un'ora su resine di Amilosio (BioLabs) a temperatura ambiente in continua agitazione. Le proteine sono state eluite con un gradiente a step di L-Maltosio (0÷20 mM). La composizione del tampone di lavaggio è Tris-HCl 50 mM, NaCl 250 mM e PMSF 0.1 mM, pH 8; nel tampone di eluizione è stato aggiunto L-Maltosio 20 mM.

La miscela proteica ottenuta dopo il primo passaggio di purificazione è stata sottoposta quindi a cromatografie a scambio ionico mediante colonne MonoQ. La purificazione è stata condotta con uno strumento FPLC (GE Healthcare). Le proteine sono state eluite in una gradiente lineare a crescente forza ionica. La composizione dei tamponi utilizzati è la seguente: Tris-HCl 50 mM, NaCl 50mM e PMSF 0.1mM, pH 8 (Tampone d'iniezione); Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, PMSF 0.1 mM, pH8 (Tampone di eluizione).

3.4 Spettroscopia NMR per lo studio di interazioni proteina-ligando

Tutti gli spettri NMR mono e bidimensionali sono stati acquisiti alla temperatura di 298 K, utilizzando uno spettrometro Varian Inova 600MHz equipaggiato di un *coldprobe* ottimizzato per la rivelazione del protone, collocato presso il laboratorio di Risonanza magnetica nucleare dell'IBB di Napoli.

3.4.1 1D ¹H STD

Gli spettri STD (Mayer e Meyer, 1999) sono stati registrati utilizzando la sequenza Varian *dpfgse_satxfer* con 8912 *data points*, 516 scansioni, con una finestra spettrale di 11.2 ppm, una lunghezza dell'impulso selettivo di 100 ms, un tempo di presaturazione di 4 sec e le frequenze di irradiazione *on-* e *off-resonance* di 0.7 e 20 ppm, rispettivamente. La frequenza di irradiazione *on-resonance* è stata scelta in modo tale da saturare selettivamente i protoni della proteina, infatti essa corrisponde alla frequenza di risonanza di alcuni protoni della proteina PED e non dei potenziali ligandi.

3.4.2 waterLOGSY

Gli esperimenti waterLOGSY (Dalvit *et al.*, 2000 e 2001) sono stati eseguiti utilizzando la sequenza *wlogsy_noe*. Gli spettri sono stati registrati con 4096 *data points*, 516 scansioni, con una finestra spettrale di 11.2 ppm e un *mixing time* di 2 sec.

Per determinare la costante di dissociazione (K_D) ligando-proteina sono state utilizzate le intensità dei segnali waterLOGSY corrette dei protoni del ligando a varie concentrazioni.

Tali intensità riportate in funzione della concentrazione del ligando, sono state sottoposte mediante il programma *GraphPad Prism* ad un *fit* non lineare utilizzando l'equazione 3-1 che descrive il legame di un ligando ad un solo sito di una proteina.

$$Y=B_{\max} * X / (K_D + X) \quad (\text{eq. 3-1})$$

Y rappresenta l'intensità waterLOGSY corretta del ligando alla concentrazione X, B_{\max} è il massimo valore di Y, K_D è la costante di dissociazione proteina-ligando, nonché la concentrazione di ligando a cui Y è uguale a $B_{\max}/2$.

Per ogni protone del ligando è possibile ottenere un valore della K_D . Pertanto la stima finale della K_D del complesso ligando-PED è ottenuta dalla media dei valori delle K_D dei singoli protoni, mentre l'errore ad esso associato è dato dalla deviazione standard.

3.4.3 2D [^1H , ^1H] NOESY

Gli esperimenti 2D [^1H , ^1H] NOESY (Anil-Kumar *et al.*, 1980) sono stati tutti acquisiti alla temperatura di 298 K, utilizzando in tutti i casi uno spettrometro Varian Inova 600 MHz equipaggiato di un *coldprobe*. Sono stati acquisiti con 1637*128 *data points*, 8 transienti per incremento di t_1 , una finestra spettrale di 10.,8 ppm e un *mixing time* compreso tra 300 e 500 ms.

3.4.4 2D [^{15}N , ^1H] HSQC

Gli esperimenti 2D [^{15}N , ^1H] HSQC (Kay *et al.*, 1992 e 1995) sono stati tutti acquisiti con 8 o 16 transienti e 128 o 256 incrementi. La finestra spettrale del protone è stata posta uguale a 11.2 ppm e dell'azoto a 34,0 ppm. Nella trasformazione è stata utilizzata una matrice 4096 (H^{N})* 1024 (N) e "square shifted sine bell" come funzione di pesatura.

Una stima della costante di dissociazione del complesso ligando-PED è stata ottenuta da esperimenti HSQC, calcolando una differenza di chemical shift dei picchi ammidici mediati sull' ^1H e sull' ^{15}N , $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$, che tiene conto delle finestre spettrali di ogni nucleo e che permette di quantificare con buona affidabilità le perturbazioni di chemical shift negli esperimenti bidimensionali eteronucleari.

$$\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}} = \sqrt{\frac{1}{2} \left((\Delta\delta\text{H})^2 + \left(\frac{1}{5} \Delta\delta\text{N}\right)^2 \right)}$$

$\Delta\delta H$ e $\Delta\delta N$ rappresentano le differenze dei chemical shift dell' 1H e dell' ^{15}N della proteina in presenza del ligando e della proteina libera.

Il $\Delta\delta HN_{av}$ è calcolato per tutti i picchi ammidici visibili negli spettri HSQC e per ciascuno degli esperimenti della titolazione.

Riportando in grafico i valori di $\Delta\delta HN_{av}$ calcolati per ciascun esperimento della titolazione è possibile ricavare la K_D di ligando-PED, eseguendo un *fitting* non lineare con la seguente equazione:

$$[PL] = 1/2(K_D + [P]_0 + [L]_0) - \sqrt{1/4(K_D + [P]_0 + [L]_0)^2 - [L]_0[P]_0}$$
$$[PL] = A \cdot \Delta\delta HN_{av}$$

Dai dati ottenuti con questo tipo di analisi è possibile ricavare una stima della K_D data dalla media delle costanti di dissociazione ottenute dal $\Delta\delta HN_{av}$ dei residui che danno un *fitting* migliore ($R^2 > 0,97$); l'errore ad essa associato è dato dalla deviazione standard.

3.5 Spettri 2D [^{15}N , 1H] HSQC per la misura di R_1 , R_2 e NOE

Tutti gli esperimenti 2D [^{15}N , 1H] HSQC per la misura di R_1 , R_2 e NOE (Farrow *et al.*, 1994) sono stati acquisiti con 1024 (HN) * 128 (N) *data points* con un totale di 16 transienti. La finestra spettrale è stata posta uguale per il protone a 11.2 ppm e per l'azoto a 34.0 ppm. Nella trasformazione è stata utilizzata una matrice 4096 (H^N)* 516 (N) e "square shifted sine bell" come funzione di pesatura.

Le sequenze d'impulso *gradient-enhanced* sono state usate per minimizzare il segnale dell'acqua (Farrow *et al.*, 1994).

Per le misure di R_1 sono stati eseguiti sei esperimenti di Inversion Recovery 1H - ^{15}N HSQC, usando 6 diversi valori di tempi di *mixing*: 0.01, 0.1, 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 s. I set di dati di R_2 sono stati ottenuti mediante sei esperimenti di Spin Echo 1H - ^{15}N HSQC ai seguenti tempi di *mixing*: 0.01, 0.03, 0.05, 0.07, 0.11, 0.15 s.

Per la misura dei ^{15}N $\{^1H\}$ NOE sono stati registrati due esperimenti 1H - ^{15}N HSQC; in uno i protoni sono stati saturati per 3 s durante un *delay* di 3s, nell'altro durante il *delay* di 3 lo stesso treno di impulsi è stato utilizzato, ma il livello della

potenza impiegata è minore per cui non c'è saturazione del protone e nello stesso tempo vi è una maggiore precisione e accuratezza nella misura dei NOE.

3.6 Analisi di R₁, R₂ e NOE

Tutti i dati di rilassamento sono stati elaborati con il software VNMRJ 1.1.D Varian e analizzati con MONOSCOPE, uno strumento di CARRA (disponibile sul sito <http://www.nmr.ch>).

Le intensità dei picchi di correlazione negli spettri 2D [¹⁵N, ¹H] HSQC acquisiti per la misura degli R₁ ed R₂ sono state utilizzate per calcolare il logaritmo naturale delle intensità, lnI. Quest'ultimo ha una dipendenza lineare con il tempo, secondo la relazione (Viles *et al.*, 2001)

$$\ln I = \ln I_0 - Rt \quad (\text{eq. 3.2})$$

Dove t è il tempo di delay (sec), I₀ è l'intensità del picco in esame quando t=0 e R è la costante di velocità di rilassamento (sec⁻¹).

Come si può osservare dall'equazione 3.2, la costante di velocità di rilassamento è la pendenza della retta che si ottiene dal *fitting* dei dati lnI-t. L'incertezza sui valori di R₁ ed R₂ così ottenuti è stata ricavata dall'errore sul *fitting*.

I ¹⁵N {¹H} NOE sono stati calcolati per ciascun gruppo NH come rapporto tra l'altezza del picco di correlazione in condizioni di saturazione (I) e quella dello stesso picco non saturato (I₀):

$$NOE = \frac{I}{I_0}$$

Le incertezze nei valori dei NOE sono del 5% (Beeser *et al.*, 1997; Viles *et al.*, 2001).

3.7 Analisi statistica dei parametri di rilassamento con il *model-free* e le funzioni densità spettrali ridotte

I tre parametri di rilassamento R₁, R₂ e NOE del ¹⁵N a 600MHz sono stati analizzati in accordo con il formalismo di Lipari-Szabo (§ 2.10.2) usando il

programma *model-free* (versione 4.15) (Palmer *et al.*, 1991; Mandel *et al.*, 1995). L'analisi dei dati di rilassamento mediante il *model-free* prevede tre passaggi:

1. iniziale stima del tempo di correlazione rotazionale e del tensore di diffusione,
2. selezione del modello
3. ottimizzazione finale dei parametri microdinamici (S^2 , τ_e , R_{ex})

La stima del tempo di correlazione τ_m della proteina PED è stata ottenuta dal rapporto R_2/R_1 di quei residui che soddisfano le seguenti condizioni: (Barbato *et al.*, 1992; Farrow *et al.*, 1994)

$$\frac{R_2}{R_1} < \frac{R_2}{R_{1\text{ av}}} + \text{DEV.STD}$$

$$\text{NOE} > 0.65$$

Mediante il programma *r2r1_tm* (A.G. Palmer, Columbia, University) risolvendo l'equazione (Kay *et al.*, 1989):

$$\frac{R_2}{R_1} = \frac{J(0) + J(\omega_X - \omega_H) + 3J(\omega_X) + 6J(\omega_H) + 6J(\omega_X + \omega_H) + (c^2 / 3d^2) \{4J(0) + 3J(\omega_X)\}}{2J(\omega_X - \omega_H) + 6J(\omega_X) + 12J(\omega_X + \omega_H) + 2(c^2 / 3d^2)J(\omega_X)}$$

In cui

$$J(\omega) = \frac{2}{5} S^2 \left[\frac{\tau_m}{1 + (\omega\tau_m)^2} \right]$$

Le componenti del tensore di diffusione sono state determinate usando il programma *quadric_diffusion* (A.G. Palmer, Columbia, University) (Lee *et al.*, 1997), scegliendo il modello di diffusione più appropriato tra quello isotropico, assiale e anisotropico dai valori di χ^2 e dell'F-test. Più basso è il χ^2 migliore è il *fit*. Il valore di F-test indica quanto è buono il *fit* di un modello rispetto a quello più complicato.

La selezione dei modelli e l'ottimizzazione dei parametri *model-free* è stata eseguita mediante i protocolli adottati da Mandel *et al.* 1995. Le equazioni i modelli utilizzate sono descritti in dettaglio nel § 2.10.2.

I tre parametri di rilassamento R_1 , R_2 e NOE del ^{15}N a 600MHz sono stati introdotti nelle equazioni riportate nel § 2.10.1 per calcolare le densità spettrali

ridotte, come descritto da Farrow *et al.* 1994, utilizzando il programma *Microsoft Excel*. La costante che descrive l'anisotropia di chemical shift e la lunghezza del vettore HN sono state poste uguali a -160 ppm e 1.02 Å, rispettivamente. La frequenza di risonanza dell'¹⁵N è uguale a 60.7742 MHz (3.81856 10⁸ rad/sec).

3.8 Misura del coefficiente di diffusione da esperimenti DOSY

Spettri DOSY (*Diffusion Ordered Spectroscopy*) (Thrippleton *et al.*, 2003) sono stati acquisiti su spettrometri VARIAN INOVA a 600 MHz alla temperatura di 298K su un campione di PED di concentrazione 150 e 600 µM in tampone fosfato a pH 7.0 H₂O:D₂O 9:1. La sequenza utilizzate appartenenti al pacchetto DOSY della *Varian Inc.* è la *DgcsteSL_dpfgse*. Sono stati acquisiti 516 scansioni per ognuno dei 15 step dell'*array* del gradiente di campo, la forza del gradiente è stata variata da 1000 a 30000 DAC (unità di Conversione Analogica-Digitale); inoltre sono stato utilizzati 2 ms di gradiente sagomato al 600MHz, e un *delay* di diffusione di 200 ms. I 15 spettri così acquisiti sono stati analizzati con la macro *dosy* presente nel *software* degli spettrometri Varian, che utilizza l'equazione:

$$\frac{I}{I_0} = e^{-G^2 \cdot \gamma^2 \cdot d^2 \cdot (\Delta - \frac{d}{3}) D}$$

Dove

I è l'intensità del segnale NMR misurata

I₀ è il massimo valore dell'intensità del segnale NMR

D è il coefficiente di diffusione traslazionale (in cm²/s)

γ è il rapporto giromagnetico del protone

d è la durata del gradiente

Δ è il delay di diffusione

G è la forza del gradiente (G/cm)

La stima finale del coefficiente di diffusione di PED è ottenuta dalla media dei valori di D ricavati per un set di segnali NMR localizzati sia nella regione a cui risuonano i protoni ammidici sia quella in cui risuonano protoni alifatici della proteina stessa. L'errore è dato dalla deviazione standard.

3.9 Misura del coefficiente di diffusione traslazionale dalla struttura tridimensionale mediante HYDRO

Il programma HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) è stato impiegato per il calcolo del coefficiente di diffusione traslazionale dai modelli di struttura tridimensionale di PED determinati mediante spettroscopia NMR HYDROPRO, infatti, permette di calcolare le proprietà idrodinamiche di proteine globulari dalla loro struttura atomica, specificata in un formato PDB. Utilizzando come parametri principali di *input*:

Temperatura: 298.0 K

Viscosità del solvente: 0.00912 poise

Densità della soluzione: 1.000 g/cm³

È stato calcolato il coefficiente di diffusione traslazionale per ogni modello di struttura di PED e la media di questi valori ha consentito di ricavare una stima finale di D_t della proteina PED. L'errore è dato dalla deviazione standard.

3.10 Sintesi di composti bidentati

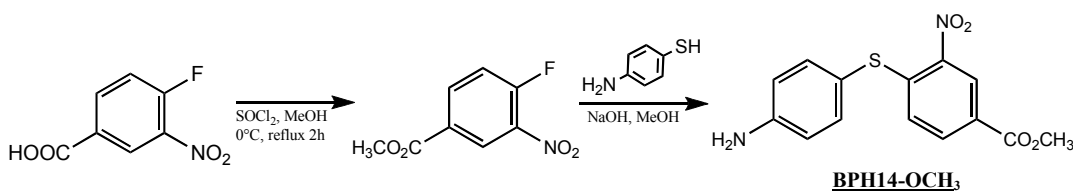
Le reazioni di sintesi sono state condotte presso il laboratorio di sintesi della dott.ssa Zaccaro dell'IBB di Napoli, dal Dott. De Paola e dalla D.ssa Del Gatto. La sintesi delle molecole bidentate ha richiesto il passaggio attraverso diversi intermedi e la loro sintesi è riportata in dettaglio nei paragrafi seguenti.

- **Sintesi di BPH14**

La sintesi dell'acido 4-(4-ammino tiofenil)-3-nitrobenzoico (BPH14) è stata condotta a partire dal *p*-amminotiobenzene, commercialmente disponibile, e il 4-fluoro 3-nitrometilbenzoato. Quest'ultimo è stato sintetizzato dall'acido 4-fluoro 3-nitrobenzoico, commercialmente disponibile, sciogliendo il prodotto in metanolo (MeOH) secco e aggiungendo alla soluzione, a 0°C, 1.5 equivalenti di cloruro di tionile e mandando poi a refluxo la reazione per 2 ore. Dopo aver

concentrato il grezzo di reazione al *rotovapor*, il prodotto è stato risospeso in acetato di etile e lavato con acqua. Recuperata la fase organica, è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al *rotovapor*. La resa della reazione è quantitativa.

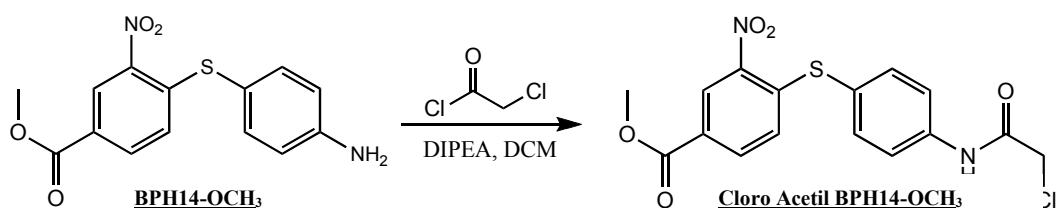
Il 4-fluoro 3-nitrometilbenzoato è stato sciolto in metanolo e alla soluzione è stato aggiunto 1 equivalente di 4-ammino benzentiolo con un equivalente di NaOH. La reazione è fatta avvenire in 30 minuti a temperatura ambiente. Il grezzo di reazione è stato concentrato e una volta ripreso in acetato di etile, lavato con acqua per eliminare la base in eccesso. Il grezzo ottenuto è stato purificato su gel di silice, utilizzando diclorometano (DCM) come eluente. Il prodotto è stato ottenuto con alte rese, 80%.



Il prodotto ottenuto è stato usato come *scaffold* per la sintesi delle molecole bidentate in cui sono presenti sia il nucleo bifenilico, BPH14, che quello pirazolico, oppure due nuclei bifenilici, legati tra di loro da un linker di natura peptidica.

- **Sintesi di Cloro Acetil BPH14-OCH₃**

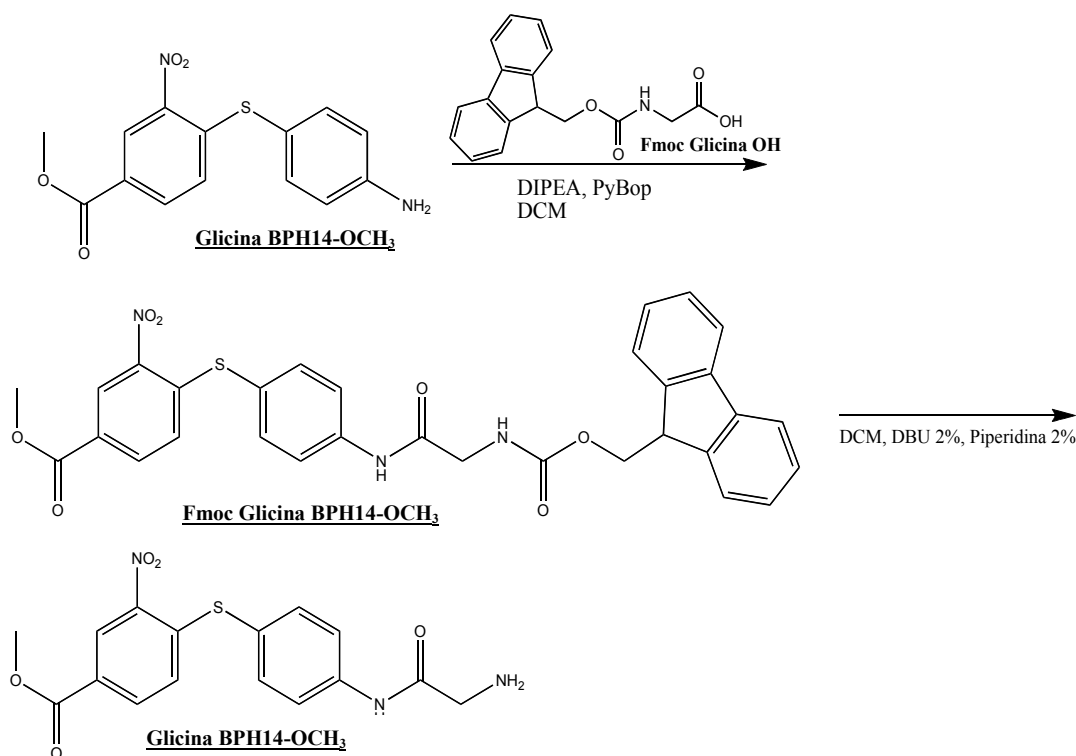
Il BPH14-OCH₃ è stato sciolto in DCM anidro e alla soluzione sono stati aggiunti 1 equivalente di DIPEA e 1,5 di Cloro Acetil cloruro. La sintesi è molto veloce e si ottiene un prodotto con un Rf molto simile a quello di partenza. Alla soluzione è stato aggiunto altro DCM e la fase organica è stata lavata con acqua per eliminare la base il cloruro dell'acido in eccesso. Il DCM è stato separato e anidrificato con sodio solfato anidro, filtrato e concentrato al rotovapor. La resa della reazione è quantitativa.



- **Sintesi di Glicina BPH14-OCH₃**

Fmoc Glicina OH è stata sciolta in DCM anidro e alla soluzione è stato aggiunto 2 equivalenti di DIPEA e 1.5 di PyBop, per l'attivazione dell'amminoacido. A questa soluzione è stato aggiunto 1 equivalente di BPH14-OCH₃ sciolto in DCM e a cui è stato aggiunto 1 equivalente di DIPEA per aumentare la basicità della soluzione e tamponare la quota acida che si libera dall'accoppiamento. La reazione è stata lasciata *overnight*, dopodiché il DCM è stato svaporato e il grezzo di reazione ripreso in acetato di etile e lavato con brine e acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato sciolto in DCM e caricato su gel di silice eluendo con DCM e successivamente con 1% di MeOH. La resa è stata del 70%.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto in una soluzione di DCM, DBU 2%, Piperidina 2% per la deprotezione dell'Fmoc. La reazione è andata in 1 ora e il grezzo di reazione è stato caricato direttamente su gel di silice per una cromatografia, eluendo con DCM/MeOH fino all'1%. La resa è del 90%.



- **Sintesi di β -Alanina BPH14-OCH₃**

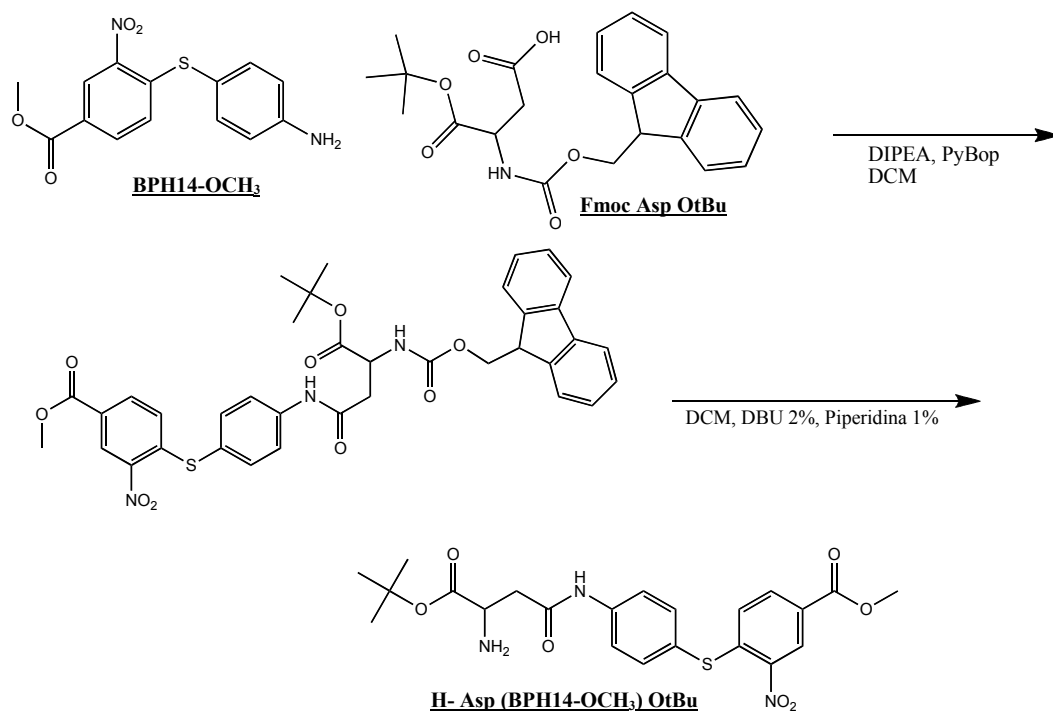
Per la sintesi del derivato di BPH14-OCH₃ legato con la β -alanina è stato utilizzato lo stesso metodo della sintesi del Glicina-BPH14-OCH₃. Fmoc β -alanina OH è stata sciolta in DCM anidro e alla soluzione è stato aggiunto 2 equivalenti di DIPEA e 1.5 di PyBop, per l'attivazione dell'amminoacido. A questa soluzione è stato aggiunto 1 equivalente di BPH14-OCH₃ sciolto in DCM e a cui è stato aggiunto 1 equivalente di DIPEA per aumentare la basicità della soluzione e tamponare la quota acida che si libera dall'accoppiamento. La reazione è stata lasciata overnight, dopodiché il DCM è stato svaporato e il grezzo di reazione ripreso in acetato di etile e lavato con brine e acqua. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato sciolto in DCM e caricato su gel di silice eluendo con DCM e successivamente con 1% di MeOH. La resa della reazione è stata del 73%.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto in una soluzione di DCM, DBU 2%, Piperidina 2% per la deprotezione dell'Fmoc. La reazione è lasciata avvenire in 1 ora e il grezzo di reazione è stato caricato direttamente su gel di silice per una cromatografia, eluendo con DCM/MeOH fino all'1%. La resa della reazione è stata del 75%.

- **Sintesi di H-Asp (BPH14-OCH₃)OtBu**

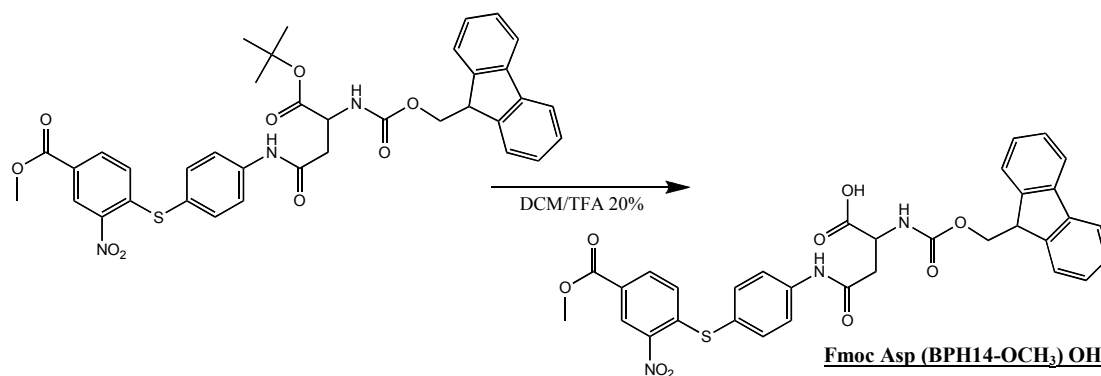
Fmoc Asp OtBu è stato sciolto in DCM anidro e alla soluzione sono stati aggiunti 2 equivalenti di DIPEA e 1.5 equivalenti di PyBop, per l'attivazione dell'amminoacido. A questa soluzione è stato aggiunto il BPH14 sciolto in DCM con un altro equivalente di DIPEA. La reazione è stata lasciata *overnight*. Il grezzo di reazione è stato lavato con acqua per eliminare la base in eccesso e la fase organica recuperata dal *work-up* è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato purificato su gel di silice, utilizzando come eluente una soluzione di DCM/MeOH 1%. La resa della reazione è stata circa del 70%.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto in una soluzione di DCM, DBU 2%, piperidina 1%. La quantità di piperidina è stata ridotta per limitare il problema di formazione di sottoprodotti α -piperididici, β -piperididici e racemizzazione. La reazione è andata in 1 ora e il grezzo è stato caricato direttamente su gel di silice eluendo con DCM/MeOH fino al 2%, per purificarlo. La resa è dell'80%.



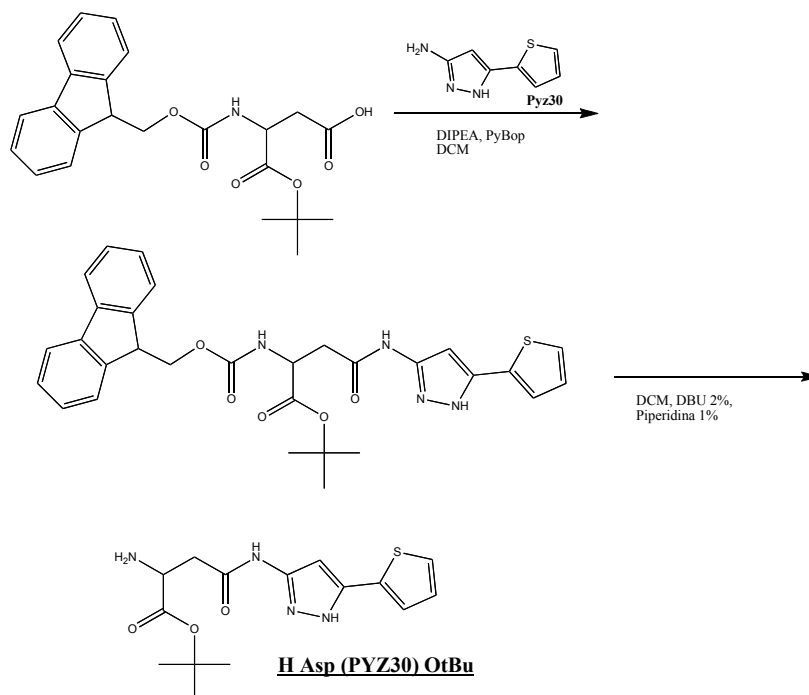
- **Sintesi di Fmoc Asp (BPH14-OCH₃) OH**

Il prodotto di accoppiamento tra Fmoc AspOtBu e il BPH14-OCH₃ è stato utilizzato anche per produrre Fmoc Asp(BPH14-OCH₃)OH. Fmoc Asp(BPH14-OCH₃)OtBu è stato sciolto in una soluzione di DCM/TFA 20% per la deprotezione dell'acido dal 'butil estere. La reazione è andata in 1 ora e il grezzo di reazione è stato caricato direttamente su gel di silice eluendo prima con DCM/MeOH 0,5% e successivamente DCM/MeOH 3%. La resa della reazione è del 70%.



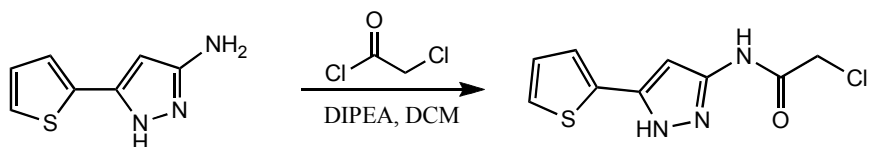
- **Sintesi di H-Asp (PYZ30) OtBu**

Utilizzando lo stesso metodo di sintesi dell'H-Asp(BPH14-OCH₃)OtBu è stato sintetizzato il derivato dell'acido aspartico accoppiato sulla catena laterale con PYZ30.



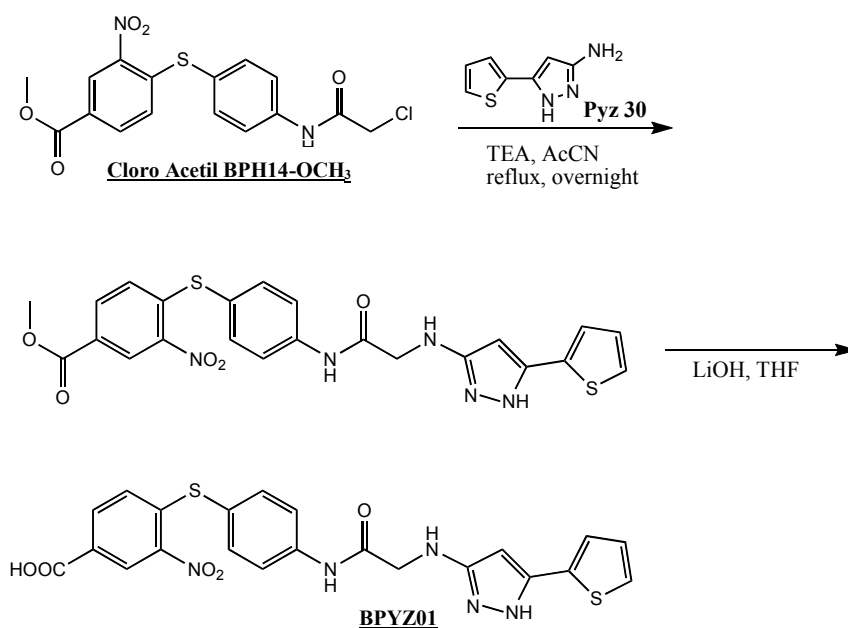
- **Sintesi di Cloro Acetil PYZ30**

Il PYZ30 è stato sciolto in DCM e alla soluzione è stata aggiunto 1 equivalente di DIPEA e 1.5 di cloro acetil cloruro. La reazione è molto veloce e il grezzo di reazione è stato lavato con acqua per eliminare DIPEA e il cloruro dell'acido in eccesso. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato caricato su gel di silice per una purificazione veloce con DCM.



- **Sintesi del composto bidentato BPYZ01**

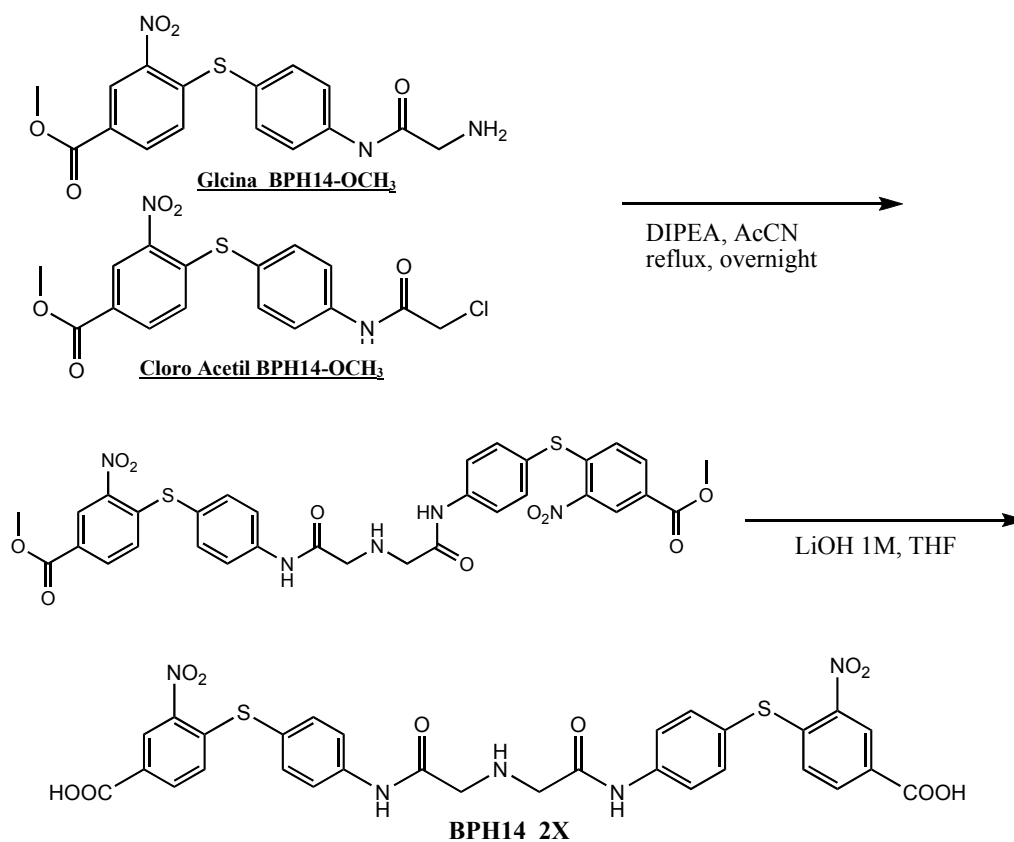
Il Cloro Acetil BPH14-OCH₃ è stato sciolto in acetonitrile (AcCN) con 1.1 equivalenti di PYZ30 e alla soluzione sono stati aggiunti 2 equivalenti di Trietilammina per basicificare la soluzione e spingere la reazione e tamponare la quota di HCl che si libera in seguito alla N-alchilazione. La reazione è stata lasciata a refluxo *overnight*. Quando la reazione è finita è stato svaporato l' AcCN, ripreso il grezzo di reazione in acetato di etile e lavato con acqua fino a neutralità. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato caricato su gel di silice eluendo con DCM/MeOH (0.5%). La resa della reazione è del 32%. Il prodotto ottenuto è stato sciolto in THF e alla soluzione è stato aggiunto il 10% LiOH 1M. L'idrolisi è andata completamente in 2 ore e è stato aggiunto HCl 1M per neutralizzare la base presente nella soluzione e il prodotto è stato estratto con acetato di etile, che è stato lavato con acqua fino a neutralità, anidrificato con sodio solfato anidro, filtrato e concentrato al rotovapor.



- **Sintesi del composto bidentato BPH14-2X**

Anche per la sintesi di BPH14-2X è stato utilizzato lo stesso schema sintetico, partendo da Cloro Acetil BPH14-OCH₃ e Glicina BPH14-OCH₃. I prodotti sono stati sciolti in AcCN e alla soluzione sono stati aggiunti 2 equivalenti di Trietilammina, per basificare la soluzione e spingere la reazione e tamponare la quota di HCl che si libera in seguito alla N-alchilazione. La reazione è lasciata a refluxo overnight. Quando la reazione è finita, l'AcCN è stato svaporato, il grezzo di reazione ripreso in acetato di etile e lavato con acqua fino a neutralità. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato caricato su gel di silice eluendo con DCM/MeOH (1%). La resa della reazione è del 40%.

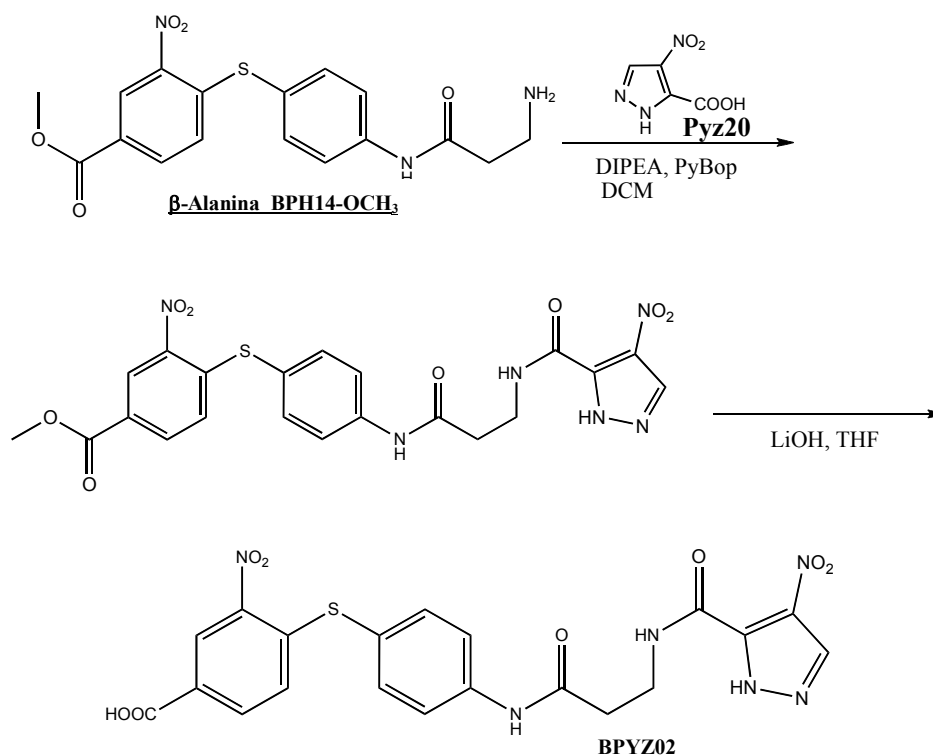
Il prodotto ottenuto è stato sciolto in THF e alla soluzione è stato aggiunto il 10% LiOH 1M. L'idrolisi è andata completamente in 2 ore e è stato aggiunto HCl 1M per neutralizzare la base presente nella soluzione e il prodotto è stato estratto con acetato di etile, che è stato lavato con acqua fino a neutralità, anidrificato con sodio solfato anidro, filtrato e concentrato al rotovapor.



- **Sintesi del composto bidentato BPYZ02**

Il BPYZ02 presenta un nucleo pirazolico, PYZ20, diverso rispetto a quello di BPYZ01 e anche lo schema sintetico è leggermente diverso in quanto il nucleo pirazolico è stato legato attraverso un legame ammidico, rispetto a quello amminico usato nel caso del BPYZ01.

Il PYZ20 è stato sciolto in DCM anidro e alla soluzione è stato aggiunto 2 equivalenti di DIPEA e 1.5 equivalenti di PyBop, per l'attivazione dell'acido carbossilico. A questa soluzione è stato aggiunto β -Alanina BPH14-OCH₃ sciolta in DCM con 1 equivalente di DIPEA, per aumentare la basicità della soluzione e tamponare la quota acida che si libera dall'accoppiamento. La reazione è stata lasciata il tempo necessario a che tutto il PYZ20 si accoppiasse alla β -Alanina BPH14-OCH₃, dopodiché è stato aggiunto ulteriore DCM e lavato con acqua per eliminare la base in eccesso. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione ottenuto è stato caricato su gel di silice ed eluito con DCM/MeOH 10%. La resa è stata alta pari al 74%, a conferma di un metodo sintetico più efficace e che produce meno sottoprodotti.



Il prodotto ottenuto è stato sciolto in THF e alla soluzione è stato aggiunto il 10% LiOH 1M. L'idrolisi è andata completamente in 2 ore e è stato aggiunto HCl 1M per neutralizzare la base presente nella soluzione e il prodotto è stato estratto con acetato di etile, che è stato lavato con acqua fino a neutralità, anidrificato con sodio solfato anidro, filtrato e concentrato al rotovapor.

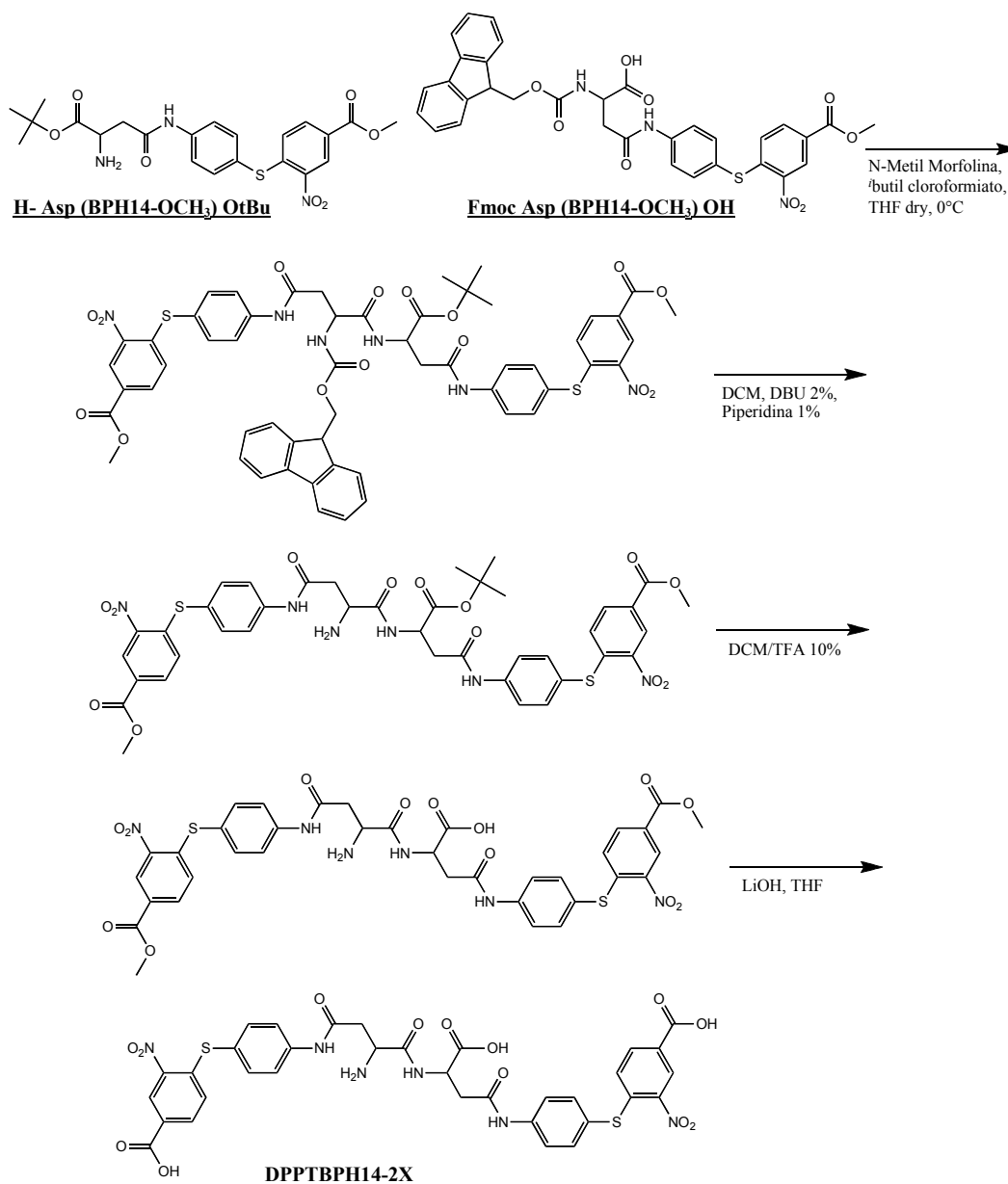
- **Sintesi del composto bidentato DPPTBPH14-2X**

I BPH derivati dell'acido aspartico e dell'acido diammino propionico deprotetti sono stati utilizzati per la sintesi di composti bidentati con un *linker* di peptidico. Tale composto è stato sintetizzato accoppiando i derivati dell'acido aspartico sostituiti sulla catena laterale con BPH14.

Fmoc Asp(BPH14-OCH₃)OH è stato sciolto in THF anidro a cui sono stati aggiunti 1.1 equivalenti di N-Metil Morfolina e successivamente, dopo aver messo la reazione a 0° C, 1,1 equivalenti di butil cloroformiato. L'aggiunta del cloroformiato provoca la formazione di un precipitato, il sale di morfolonio, indice anche della formazione dell'anidride mista, utilizzata per la formazione del legame peptidico tra i due ammino acidi sostituiti. Alla soluzione è stato aggiunto H-Asp(BPH14-OCH₃)OtBu sciolto in THF. La reazione è stata lasciata 3 ore, necessarie per il completamento dell'accoppiamento. La soluzione è stata diluita con acetato di etile e lavata con acqua per eliminare la base in eccesso e i sali che si sono formati. La fase organica è stata recuperata, anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e concentrata al rotovapor. Il grezzo di reazione è stato caricato su gel di silice flash ed eluito con CHCl₃/MeOH 1%. La resa è del 60%.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto in una soluzione di DCM/DBU 2%/Piperidina 1% per l'eliminazione del Fmoc. La reazione è stata lasciata per due ore e il grezzo di reazione caricato direttamente su gel di silice flash, eluendo con CHCl₃/MeOH 5%. Il prodotto di deprotezione del Fmoc è stato sciolto in una soluzione di DCM/TFA 10% per la deprotezione del ^tbutil estere. La reazione è stata lasciata per 2 ore. Il grezzo di reazione è stato caricato direttamente su gel di silice flash, eluendo con CHCl₃ inizialmente e con CHCl₃/MeOH 10% successivamente.

Il prodotto ottenuto è stato sciolto in THF e successivamente alla soluzione è stato aggiunto 10% di LiOH 1M, per l'idrolisi dei metil esteri. La reazione è stata lasciata per 2 ore, dopodiché è stato aggiunto una piccola quantità di HCl 1M per neutralizzare LiOH e il prodotto è stato estratto in acetato di etile. La fase organica è stata anidrificata con sodio solfato anidro, filtrata e seccata al rotovapor.



3.11 Docking proteina-ligando

Gli studi di *docking* proteina-ligando sono stati condotti con il programma Arguslab (<http://www.ArgusLab.com>; Joy *et al.*, 2006) utilizzando il modello 4 della struttura tridimensionale di PED determinata mediante spettroscopia NMR (cod. PDB 1N3K; Hill *et al.*, 2002), che è quella più rappresentativa tra i 20 modelli di struttura. Il sito di legame corrispondente alla regione LEU17-SER70 è stato incluso in una scatola di dimensioni: 22.5 (x), 33.1 (y) e 29.8 (z) Å. Una risoluzione di griglia di 0.4 Å è stata utilizzata. La proteina è stata considerata rigida, mentre il ligando flessibile. Per ogni composto un massimo di 100 soluzioni sono state generate e i complessi sono stati ordinati in accordo alla funzione AScore. Le figure dei complessi sono state generate con lo stesso programma Arguslab.

Capitolo 4

Risultati e discussione: identificazione di ligandi della proteina PED

4.1 Allestimento e caratterizzazione NMR della library di piccole molecole organiche

Al fine di identificare piccole molecole organiche capaci di legare la proteina PED, non ancora note prima di questo studio, una strategia basata sull'utilizzo di frammenti molecolari e tecniche NMR è stata utilizzata. Per questo scopo l'attività di ricerca è stata inizialmente incentrata sull'allestimento di una nuova collezione di frammenti molecolari e sulla sua caratterizzazione attraverso spettroscopia NMR. Come detto in § 1.4, nella progettazione di una collezione di frammenti molecolari bisogna tener conto: del metodo sperimentale utilizzato per lo *screening*, della capacità di rappresentare uno spazio chimico quanto più ampio possibile e, nello stesso tempo, della necessità di avere frammenti adatti per essere evoluti in *lead compound*. Alla luce di tali premesse, per il presente lavoro di tesi sono stati selezionati 210 frammenti molecolari da collezioni commerciali in modo tale da:

- rappresentare le substrutture più ricorrenti nei farmaci finora noti (Bemis e Murcko, 1996);
- soddisfare le regole di Lipinski (Lipinski *et al.*, 2000) (§. 1.4);
- contenere gruppi funzionali amminici, carbossilici, idrossilici, nitro e ciano, tali da aumentarne la solubilità in acqua e da consentirne un eventuale utilizzo come *building block* in un successivo approccio di tipo *fragment-linkage*;
- non contenere gruppi funzionali molto reattivi, quali anidridi, epossidi, aldeidi, immine, esteri, ecc.

I composti selezionati sono stati poi distinti in 24 classi sulla base della loro struttura chimica (tab. 4.1), inseriti in un *database* molecolare mediante il

programma *ChemFinder Ultra*, e sciolti in dimetilsolfossido deuterato (d6-DMSO) alla concentrazione di 50-100 mM per la preparazione di soluzioni madre.

SCAFFOLD	CODICE	QUANTITA'
Benzoimidazole	BIM	6
Benzothiazole	BTA	10
Biphenyl	BPH	12
Furan-Benzofuran	FUR	2
Imidazole	IMD	7
Indole-indene	IND	22
Naphthalene	NPH	11
Phenyl	PHE	11
Piperazine-Piperidine	PIP	12
Purine	PUR	10
Pyran-Benzopyran	PYN	1
Pyrazole	PYZ	29
Pyridine	PYR	11
Diazine	DAZ	3
Pyrrolidine	PYD	12
Quinoline-Isoquinoline e derivati	QUI	6
Thiazole	TAZ	7
Thiadiazole	TAD	17
Thiophene-Benzothiophene	TPH	6
Isoxazol	OXA	8
Pyrrole	PYL	2
Triazole-Benzotriazole	TRZ	3

Tabella 4.1 Classificazione degli *scaffold* della *library* costruita.

La scelta del DMSO come solvente delle soluzioni *stock* è dettata da una parte dalla sua bassa volatilità, elevata inerzia chimica e stabilità, dall'altra dalle ottime capacità del DMSO di solubilizzare un ampio numero di composti, sia di natura polare che apolare. Il 95% delle molecole della collezione sono risultate solubili in DMSO, l'insolubilità del restante 5% di molecole è stata attribuita, per alcune (3%), alla capacità di formare legami idrogeno intra- e inter-molecolari per la contemporanea presenza di un gruppo carbossilico e di uno amminico, separati da

uno o due legami, come nel caso dell'IND03, NPH02 e PHE10, per altre (2%), all'elevata apolarità (es. PHE01) o polarità delle molecole (es. PUR05) (fig. 4.1). Le 11 molecole insolubili in DMSO sono risultate non solubili anche in $^2\text{H}_2\text{O}$, pertanto si è provato a scioglierle direttamente nella soluzione di *screening*, costituita da tampone fosfato 40 mM pH 7.5. Delle 11 molecole solo una, il PHE01, è risultato non solubile nel tampone fosfato, come era da aspettarsi in base alla sua elevata apolarità.

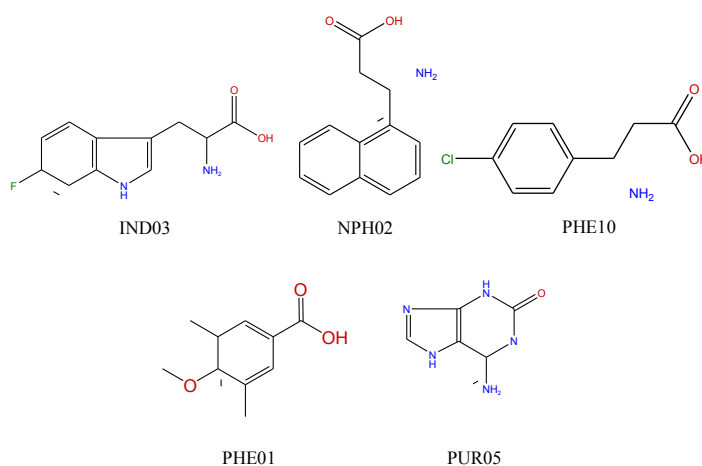


Figura 4.1 Scaffold non solubili in DMSO.

Un altro aspetto importante da tenere presente è la solubilità dei composti in acqua, poiché i saggi di *screening* NMR vengono eseguiti in tampone acquoso a concentrazioni del composto relativamente alte. È necessario, quindi, che i composti della *library* abbiano una solubilità 0.5-1mM in soluzioni acquose, per poter essere sottoposti ad esperimenti di *screening* NMR. Sulla base di tale osservazione, è stata valutata la solubilità di ciascun composto nella soluzione di *screening*, diluendo le molecole della collezione precedentemente sciolte in d_6 -DMSO alla concentrazione di 1 mM nella soluzione di *screening*, e acquisendo spettri NMR protonici (^1H) monodimensionali (1D). Gli spettri NMR 1D ^1H registrati sono stati utilizzati per valutare la solubilità in tampone fosfato come descritto in Materiali e Metodi (§. 2.1), fornendo i risultati riportati in tab. 4.2.

Da tali dati è possibile osservare che circa il 10% dei composti è completamente insolubile nel tampone fosfato, e pertanto non può essere analizzato con tecniche NMR, mentre il restante 90% è parzialmente o totalmente solubile. La diversa solubilità in tampone fosfato è stata tenuta in considerazione per la preparazione

delle miscele dei composti che sono stati sottoposti a *screening* NMR, al fine di ottenere miscele di frammenti molecolari la cui concentrazione sia paragonabile.

Percentuale di frammenti molecolari	Solubilità in tampone fosfato 40 mM pH 7.5
9.6%	-
8.1%	+
24.9%	++
57.4%	+++

Tabella 4.2 Solubilità dei composti della collezione in tampone fosfato.

Un altro aspetto che è stato valutato ai fini di un controllo qualità dei composti della *library* è stato la purezza delle 189 molecole che sono risultate totalmente o parzialmente solubili nel tampone fosfato, come descritto in Materiali e Metodi (§ 3.1). Come si osserva dalla tabella 4.3, solo l'8.5% delle molecole presenta un grado di purezza inferiore al 95%.

Percentuale di frammenti molecolari	Purezza (> 95%)
8.5%	-
91.5%	+

Tabella 4.3 Purezza dei composti della collezione.

Infine, è stata valutata la consistenza dello spettro NMR con la struttura, assegnando le risonanze nello spettro protonico ai corrispondenti protoni. Tale assegnazione è importante per la successiva fase di identificazione di molecole interagenti in presenza della proteina senza la necessità di fare una deconvoluzione.

4.2 *Screening* NMR della *library* di piccole molecole organiche contro PED

Alla luce delle osservazioni fatte nei capitoli che descrivono i metodi NMR per la rivelazione delle interazioni ligando-proteina, è stato effettuato uno *screening* NMR della collezione di frammenti molecolari contro la proteina PED, utilizzando esperimenti NMR basati sull'osservazione dei segnali dei potenziali ligandi, per poi caratterizzare in maggior dettaglio i ligandi individuati anche con metodi che utilizzano la proteina uniformemente marcata con ^{15}N . In particolare, gli esperimenti utilizzati per lo *screening* sono stati l'STD (*Saturation Transfer Difference*) (Mayer e Meyer, 1999) e il waterLOGSY (*water Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*) (Dalvit *et al.*, 2000 e 2001).

Come è stato sottolineato nella trattazione delle tecniche NMR, uno dei vantaggi dei metodi NMR basati sull'osservazione dei potenziali ligandi è la capacità di studiare miscele di composti che, se opportunamente progettate, consentono l'individuazione di ligandi senza dover effettuare una successiva deconvoluzione. Pertanto sono state progettate 25 miscele ciascuno contenente 7-8 composti in modo tale che ogni miscela contenga molecole che presentano una paragonabile solubilità nella soluzione di *screening* (di cui è stata fatta precedentemente una stima) e non contenga composti appartenenti alla stessa classe. Quest'ultima condizione consente di minimizzare le sovrapposizioni dei segnali NMR delle molecole presenti in una stessa miscela, e quindi di individuare un ligando in presenza di altre molecole che non legano la proteina bersaglio.

Le miscele così progettate sono state analizzate registrando spettri NMR 1D protonici, WaterLOGSY e STD in presenza di proteina bersaglio PED non marcata (20 μM), fornita dal laboratorio di biologia molecolare dell'IBB di Napoli. Negli spettri WaterLOGSY la presenza di segnali positivi dei potenziali ligandi in presenza della proteina bersaglio e la presenza degli stessi segnali negli spettri STD sono una forte indicazione dell'interazione con la proteina *target*.

Al fine di ridurre i falsi positivi dovuti a fenomeni di aggregazione delle molecole in esame, sono stati registrati spettri waterLOGSY delle stesse miscele in assenza di proteine e sono stati scartati quei composti che presentavano segnali waterLOGSY positivi anche in assenza della proteina bersaglio. A titolo di

esempio, sono riportati di seguito gli spettri waterLOGSY (fig. 4.2) e STD (fig. 4.3) della miscela 1 (tab. 4.4), in assenza e in presenza di PED.

Miscela 1
BPH03
IND02
PYD06
PYR11
PYZ01
PUR01
TDA04

Tabella 4.4 Frammenti molecolari costituenti la miscela 1.

Come è possibile osservare dalla figura 4.2, in assenza di PED (a) la miscela 1 presenta segnali waterLOGSY negativi, mentre questi segnali divengono positivi in presenza della proteina PED. Data la buona separazione dei segnali è stato possibile stabilire per ciascun protone la molecola di appartenenza, grazie al confronto con gli spettri protonici di ogni singolo composto acquisiti in precedenza. In particolare, le molecole positive a questo tipo di saggio nella miscela 1, sono risultate il BPH03, l'IND02 e il TDA04.

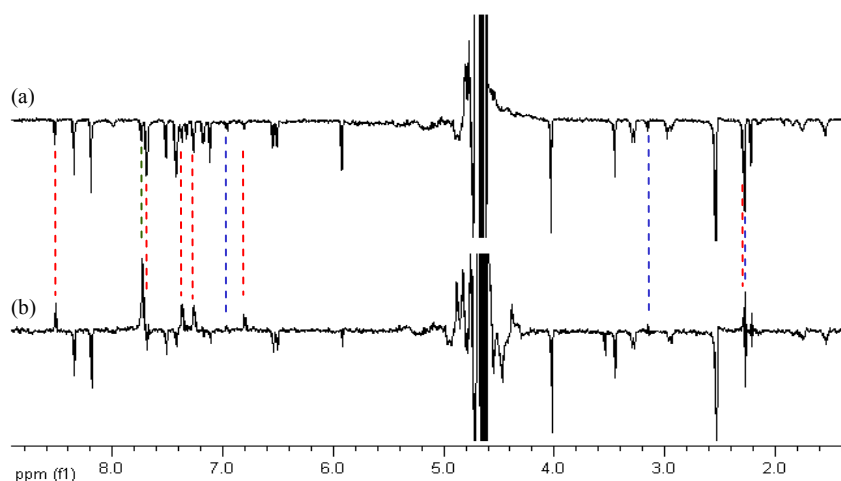


Figura 4.2 Spettri waterLOGSY della miscela 1 (1 mM) in assenza (a) e in presenza (b) di PED 20 μ M. I picchi positivi dei protoni di BPH03 (linea tratteggiata rossa), IND02 (linea tratteggiata blu) e TDA04 (linea tratteggiata verde) sono sintomatici della loro interazione con PED.

La negatività del segnale waterLOGSY dei protoni di tali molecole in assenza di PED, evidenziata da linee tratteggiate rosse, blu e verdi per il BPH03, l'IND02 e il TDA04, rispettivamente, suggerisce che non vi è per queste aggregazione in miscela.

Per quanto riguarda l'esperimento STD, lo spettro della miscela 1 in presenza di PED presenta dei segnali che appartengono alle stesse tre molecole risultate positive nell'esperimento waterLOGSY. Anche questi dati, quindi, suggeriscono che vi è un'interazione di BPH03, IND02 e TDA04 con PED.

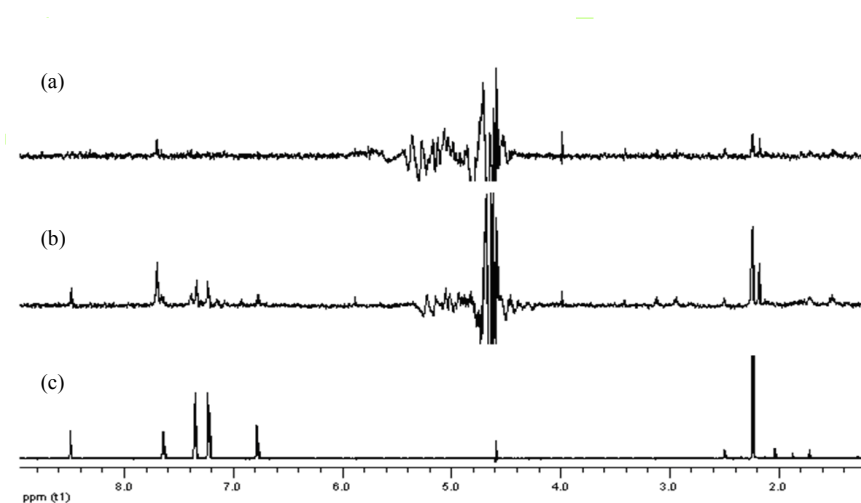


Figura 4.3 Spettri STD della miscela 1 (1 mM) in assenza (a) e in presenza (b) di PED 20 μ M. Spettro NMR protonico di BPH03 (c).

E' inoltre interessante notare che i segnali del BPH03 nello spettro STD sono di maggiore intensità rispetto a quelli del TDA04 e dell'IND02 in confronto con quella nello spettro protonico standard. Tale osservazione potrebbe essere collegata ad una maggiore affinità del BPH03 rispetto agli altri due ligandi, in quanto in uno spettro STD la maggiore intensità di un segnale, anche all'interno di una stessa molecola ligando, è sintomatica di una maggiore interazione con la proteina (Mayer e Meyer, 2001).

Procedendo in maniera analoga per le altre ventiquattro miscele, sono stati individuati 39 possibili ligandi (*hit*) (tab. A1.1 in appendice e tab. 4.5). Come è evidenziato nella tab. 4.5, i 39 ligandi individuati appartengono solo ad alcune delle ventiquattro classi su cui è stato effettuato lo *screening*, e in particolar modo

è stata riscontrata una maggiore numero di composti positivi per gli *scaffold* dei bifenili, degli indoli, dei pirazoli, dei tiazoli, dei tiodiazoli e dei tiofeni.

Scaffold	Quantità	HIT	Scaffold	Quantità	HIT
AZP	2	0	PUR	10	0
BIM	6	1	PYN	1	0
BTA	10	2	PYZ	29	12
BPH	12	4	PYR	11	0
DAZ	3	0	PYL	2	0
FUR	2	0	PYD	12	0
IMD	7	1	QUI	6	0
IND	22	6	TDA	17	5
OXA	8	1	TAZ	7	3
NPH	11	1	TPH	6	2
PHE	11	0	TRZ	3	0
PIP	12	1			

Tabella 4.5 Molecole positive allo *screening* NMR della *library* allestita contro PED. Sono evidenziati gli *scaffold* che hanno dato il maggior numero di *hit*.

4.3 Validazione degli *hit* e determinazione della loro K_D con PED

Una volta identificati gli *hit* dallo *screening* NMR della collezione di frammenti molecolari, è stata effettuata una successiva fase di validazione dell'interazione di alcune singole molecole con la proteina PED ed è stata ricavata una stima delle loro costanti apparenti di dissociazione con la proteina (K_D). Dato il numero di molecole risultate positive allo *screening*, è stata intrapresa la validazione di una molecola per ciascuna delle classi di *scaffold* selezionate. In particolare, per la validazione sono stati registrati, oltre agli spettri monodimensionali waterLOGSY e STD di ogni singola molecola in presenza di una quantità sub-stechiometrica di PED (1:60), anche esperimenti protonici bidimensionali 2D NOESY, per la misura di *transferred* NOE (trNOE). Al fine di ottenere una stima della costante di dissociazione apparente del complesso ligando-proteina, sono stati registrati spettri waterLOGSY aggiungendo ad una quantità costante di proteina PED (10 μ M) quantità crescenti del ligando. Le intensità dei segnali waterLOGSY misurate sono state poi corrette con il coefficiente di idratazione, che rappresenta il

coefficiente angolare della retta che interpola i valori delle intensità dei segnali waterLOGSY di un protone della molecola in assenza di proteina a diverse concentrazioni (Dalvit *et al.*, 2001).

Nella figura 4.4a sono riportati gli spettri protonico, waterLOGSY e STD acquisiti per la validazione dell'interazione del BPH03 (fig. 4.4a) con PED. Nella parte più alta è mostrato lo spettro protonico della molecola BPH03, i cui segnali waterLOGSY sono positivi in presenza della proteina PED (fig. 4.4b al centro). I suoi segnali protonici sono presenti anche nello spettro STD (fig. 4.4b sotto), confermando così l'interazione del ligando con PED.

Inoltre, dallo spettro protonico omonucleare 2D NOESY è stato osservato che la molecola BPH03 in presenza di PED presenta trNOE negativi (stesso segno rispetto alla diagonale), mentre in assenza di PED i NOE intramolecolari risultano positivi (segno opposto rispetto alla diagonale). Tale comportamento è tipico di piccole molecole che hanno un basso tempo di correlazione e che, in seguito all'interazione con una proteina, acquistano le sue proprietà di moto, come un più lento *tumbling* molecolare (fig. 4.5), confermando ulteriormente l'interazione tra PED e il frammento BPH03 (Meyer *et al.*, 1997).

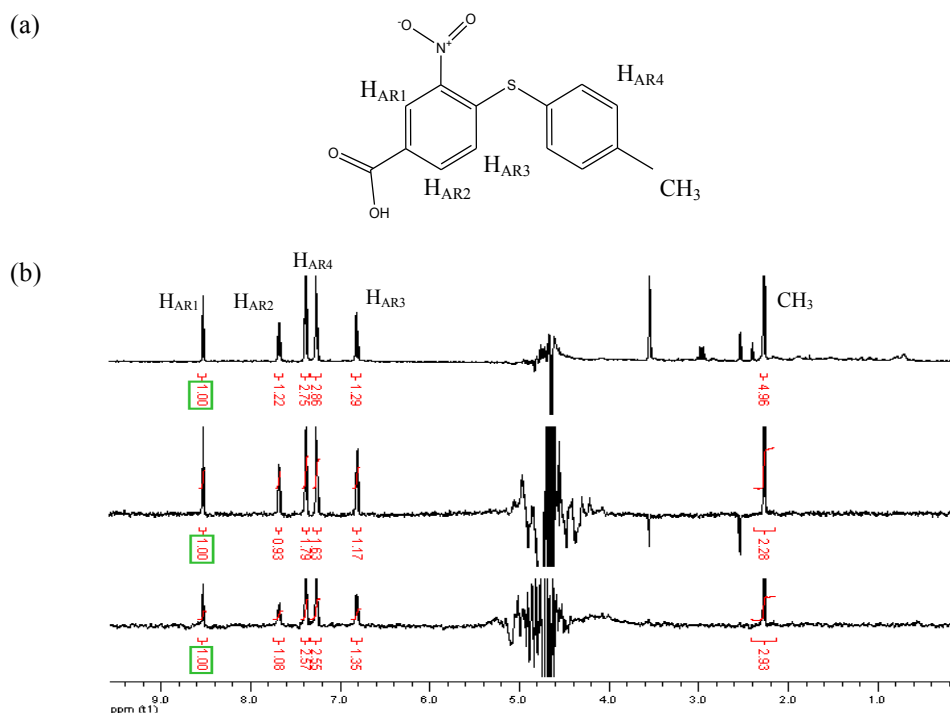


Figura 4.4 (a) Struttura chimica del BPH03. (b) Spettri protonico (sopra), waterLOGSY (centro) e STD (sotto) di BPH03 (1.2 mM) in presenza di PED 20 μ M.

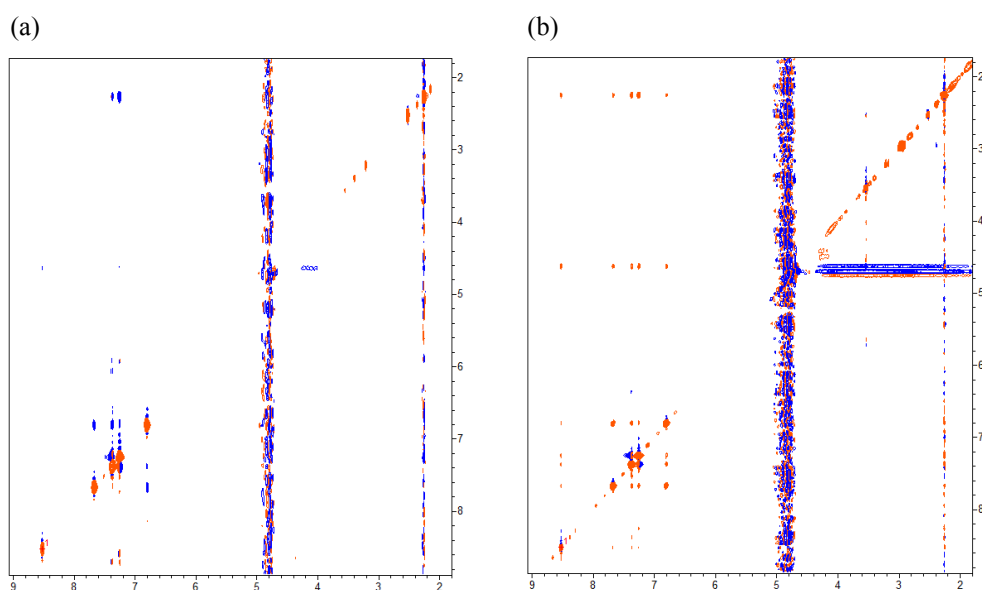


Figura 4.5 Spettro 2D [^1H , ^1H] NOESY del BPH03 (1,2 mM) in assenza (a) e in presenza (b) di PED (20 μM). I picchi positivi sono rossi, mentre quelli negativi blu.

E' interessante notare che in presenza di proteina sono presenti NOE intramolecolari non solo tra i protoni dello stesso anello aromatico, come in assenza di PED, ma anche tra i protoni dei due anelli aromatici. Tre ipotesi sono state fatte per spiegare tali NOE:

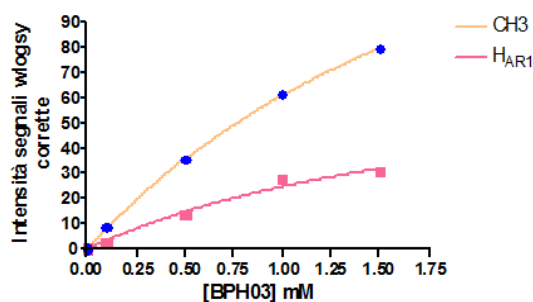
1. una particolare conformazione che assume il BPH03 quando è legato alla proteina.
2. spin-diffusione
3. NOE interligando tra due molecole del BPH03 che legano contemporaneamente siti adiacenti della proteina.

Per determinare la K_D del complesso BPH03-PED sono state utilizzate le intensità del protone aromatico che risuona a 8.52 ppm, H_{AR1} , e dei protoni alifatici del CH_3 che risuonano a 2.14 ppm, poiché entrambi i segnali si presentano come dei singoletti e i valori delle intensità possono essere misurati con maggiore accuratezza.

Le intensità waterLOGSY di H_{AR1} e di CH_3 corrette sono state utilizzate per la determinazione della K_D , come descritto in materiali e metodi (§. 3.4.2).

In Figura 4.6 è mostrata la curva di *binding* del BPH03 a PED (a), ottenuta dal *fitting* non lineare ipotizzando un solo sito di legame, e i relativi dati statistici (b).

(a)



(b)

$$Y = \frac{B_{\max} \cdot X}{K_D + X}$$

	H _{AR1}	CH ₃
One site binding (hyperbola)		
Best-fit values		
BMAX	73.9	204
KD	2.00	2.35
Std. Error		
BMAX	25.8	6.38
KD	1.09	0.109
Goodness of Fit		
Degrees of Freedom	3	3
R ²	0.986	1.00

Figura 4.6 Curva di legame di BPH03 a PED (a); equazione utilizzata per il *fitting* e tabella dei risultati ottenuti dall'analisi dei dati mediante il *fitting* con il programma *GraphPad Prism* (b). B_{max} è il massimo valore che assume Y quando il sistema va a saturazione.

La stima finale della K_D apparente per il complesso BPH03-PED è stata determinata dalla media delle K_D estrapolate dal *fitting* delle intensità di ciascun segnale:

$$K_D = 2.2 \pm 0.2 \text{ mM}$$

In maniera analoga sono state validate e determinate le costanti di dissociazione per le molecole riportate nella tabella 4.6.

Quello che si evince da tale tabella è che tutte le molecole analizzate risultano legarsi alla proteina PED con un'affinità nel basso mM, come era da aspettarsi dallo *screening* di una *library* di frammenti molecolari.

Frammenti molecolari	Validazione	K _D (mM)
BPH03	+	2.5 ± 0.2
IND10	+	4.2 ± 1.6
PYZ19	+	2.4 ± 0.4
TAZ02	+	3.5 ± 0.7
TPH01	+	2.6 ± 0.4

Tabella 4.6 Frammenti molecolari validati e loro K_D apparenti determinate mediante *waterLOGSY*.

4.4 Caratterizzazione strutturale NMR dell'interazione dei frammenti molecolari con PED

Lo *screening* primario di una collezione di piccole molecole organiche spesso porta all'identificazione di diversi *hit*, che possono presentare differenti modalità e forza di legame; tale risultato è auspicabile quando si vuole migliorare il loro legame ad una proteina bersaglio. Al fine di migliorare il legame delle molecole validate nei confronti della proteina PED, diverse strategie basate sull'utilizzo della spettroscopia NMR potrebbero essere utilizzate (§. 1.3). Una di queste è l'approccio *fragment-linkage*, in cui piccole molecole che si legano in modo debole alla proteina bersaglio e occupanti siti differenti e adiacenti della proteina sono legate opportunamente, per dare un unico composto con maggiore affinità di *binding* per la proteina bersaglio.

Allo scopo di verificare se vi siano tra le molecole risultate positive allo *screening* NMR di PED, frammenti che si legano in siti adiacenti della proteina, sono stati effettuati studi di:

- *Chemical Shift Mapping* mediante esperimenti [¹⁵N,¹H] HSQC per identificare il sito di legame della proteina;
- NOE interligando (ILOE) per rivelare la presenza di composti che occupano siti adiacenti sulla superficie della proteina ed eventualmente determinare la loro orientazione relativa.

4.4.1 Chemical Shift Mapping

Per effettuare esperimenti di *chemical shift mapping* è stata utilizzata la proteina PED uniformemente marcata con ^{15}N , fornita dal laboratorio di biologia molecolare della dott.ssa E. Pedone dell'IBB di Napoli. Lo spettro di eterocorrelazione [^{15}N , ^1H] HSQC di tale proteina conferma l'elevato contenuto di struttura secondaria elicoidale, come aspettato dagli studi NMR effettuati da Hill *et al.* 2002. Inoltre, grazie alla disponibilità delle assegnazioni di tutti i ^{15}N e gli ^1H , gentilmente forniti dal prof. M. H. Werner, è stato possibile riassegnare quasi totalmente tutti i picchi di correlazione dello spettro HSQC, sebbene siano state osservate delle differenze di chemical shift. Per confrontare i chemical shift della proteina PED, di cui è stata determinata la struttura tridimensionale, con quelli della proteina PED in esame, è stata calcolata la variazione dei chemical shift del protone e dell'azoto mediata, $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ (Hajduk *et al.*, 1997), per ciascun HN visibile nello spettro HSQC e riportata in grafico in figura 4.7. Da tale grafico è possibile notare che le differenze di chemical shift più significative (superiori a 0,35 ppm, corrispondente al valore medio di $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ più la deviazione standard) sono osservate per i residui: A2, E3, Y4, G5, K35, E37, K57, N59 (ϵNH_2), E64, H65, V80, T84, L87, I89. Andando a localizzare tali residui sulla struttura tridimensionale di PED è possibile osservare che, ad eccezione dei residui Lys35 e Glu37, tutti gli altri sono spazialmente vicini. Tenendo conto che la proteina PED è stata analizzata nelle stesse condizioni, (tampone fosfato 10 mM pH 7), ma differisce da quella di cui è stata determinata la struttura per la presenza di due residui, Gly-2 e Ala-1, prima della Met1, che rimangono dopo l'idrolisi della proteina di fusione GST-PED, è possibile ipotizzare che tali variazioni siano dovute direttamente o indirettamente alla presenza di questi due residui.

Da un punto di vista funzionale, studi biochimici hanno anche dimostrato che la proteina PED in esame è attiva sia *in vitro* che *in vivo* (Viparelli *et al.*, 2008 a e b).

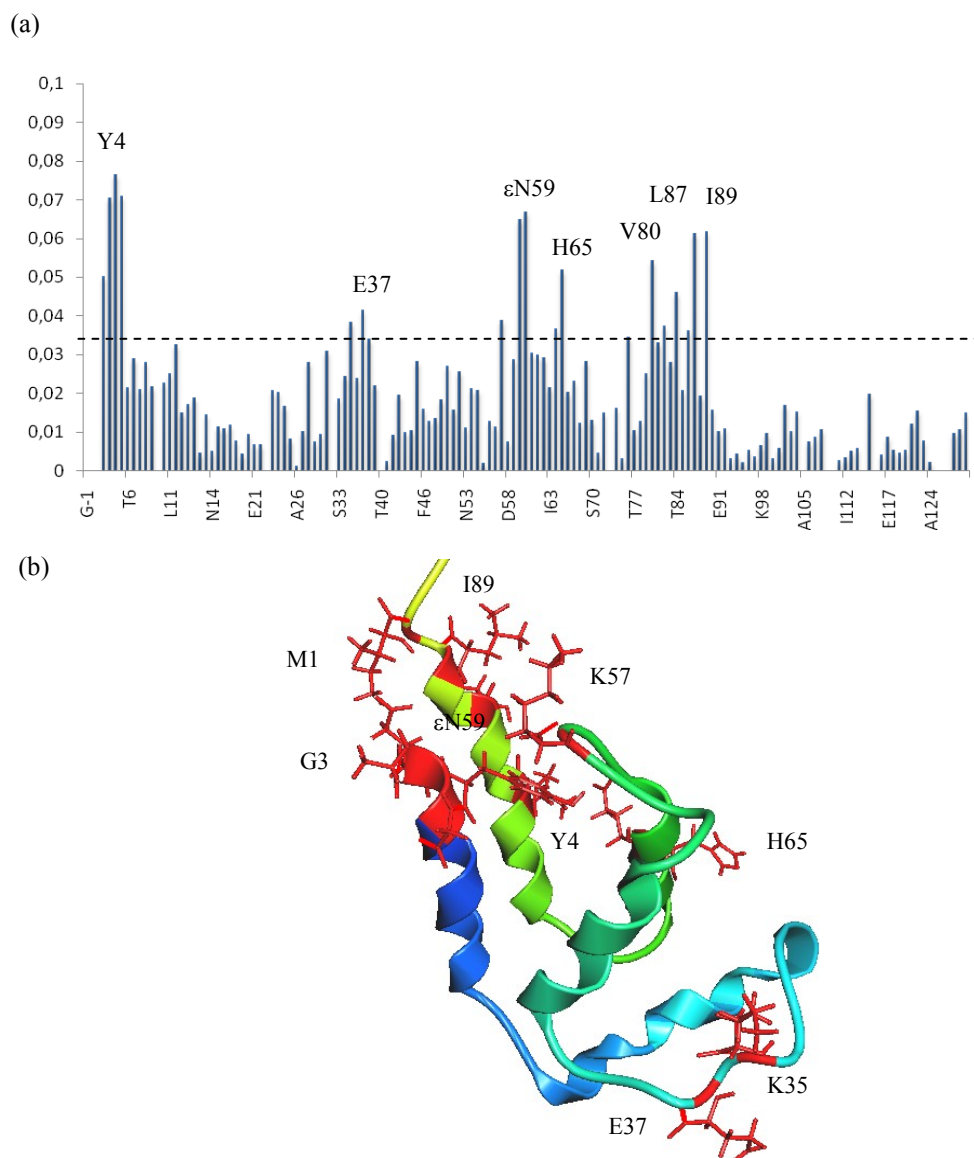


Figura 4.7 Confronto dei chemical shift di PED di cui è stata determinata la struttura 3D NMR e della proteina PED in esame (a). *Mapping* dei residui che presentano valori di $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ maggiori di 0.35 ppm nel quarto modello della struttura 3D di PED più rappresentativo (codice PDB 1N3K).

Sulla base di queste premesse, lo studio del/i sito/i di legame di alcuni dei ligandi identificati sulla superficie di PED è stato effettuato mediante una titolazione eseguita aggiungendo quantità crescenti delle singole molecole alla proteina PED uniformemente marcata con ^{15}N , e seguendo le variazioni di chemical shift dell' ^1H e dell' ^{15}N ammidici della proteina target dagli spettri ^{15}N -HSQC, in assenza e in presenza di concentrazioni crescenti dei frammenti molecolari in esame. Per altri ligandi è stata effettuata un'analisi di *chemical shift mapping* aggiungendo 10 equivalenti di ligando alla proteina ^{15}N PED. Di seguito

è riportato in dettaglio lo studio di *chemical shift mapping* delle singole molecole raggruppate per classe di *scaffold*.

- **Bifenili: BPH03 e BPH08**

L'analisi di *chemical shift mapping* di ^{15}N PED con il frammento molecolare BPH03 (fig. 4.4b) è stata effettuata registrando spettri [^{15}N , ^1H] HSQC della proteina in seguito all'aggiunta di quantità crescenti di tale molecola (tab. 4.7).

[PED] (mM)	[BPH03] mM	Rapporto PED:BPH03
0,150	0	1:0
0,150	0,29	1:2
0,149	0,77	1:5
0,148	1,53	1:10
0,146	3,01	1:20

Tabella 4.7 Titolazione di ^{15}N -PED con BPH03.

In figura 4.8 è riportata per maggiore chiarezza solo la sovrapposizione degli spettri HSQC della proteina PED in assenza e in presenza di BPH03 con rapporto molare di 1:5 (verde) e 1:10 (rosso), e sono evidenziati in fucsia i residui che presentano maggiori spostamenti (H52, H65) e in nero quelli che hanno variazioni rilevanti, ma di minore intensità rispetto ai precedenti (I31, S36, E38, I39, E50, S51, Y62, I63, I66, F67, I69).

La maggior parte dei residui presentano variazioni nel regime del *fast exchange* rispetto alla scala dei tempi NMR (§ 2.3), sebbene alcuni di essi, quali la Lys35, l'Ile39 e l'His65, mostrano anche un significativo slargamento del segnale. Inoltre, il Glu37 presenta un minore spostamento del segnale, ma la sua intensità diminuisce con l'aggiunta del BPH03.

Per meglio visualizzare le variazioni di chemical shift, il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ è stato calcolato per tutti i picchi ammidici visualizzati nello spettro HSQC, e riportato in grafico in funzione del residuo amminoacidico.

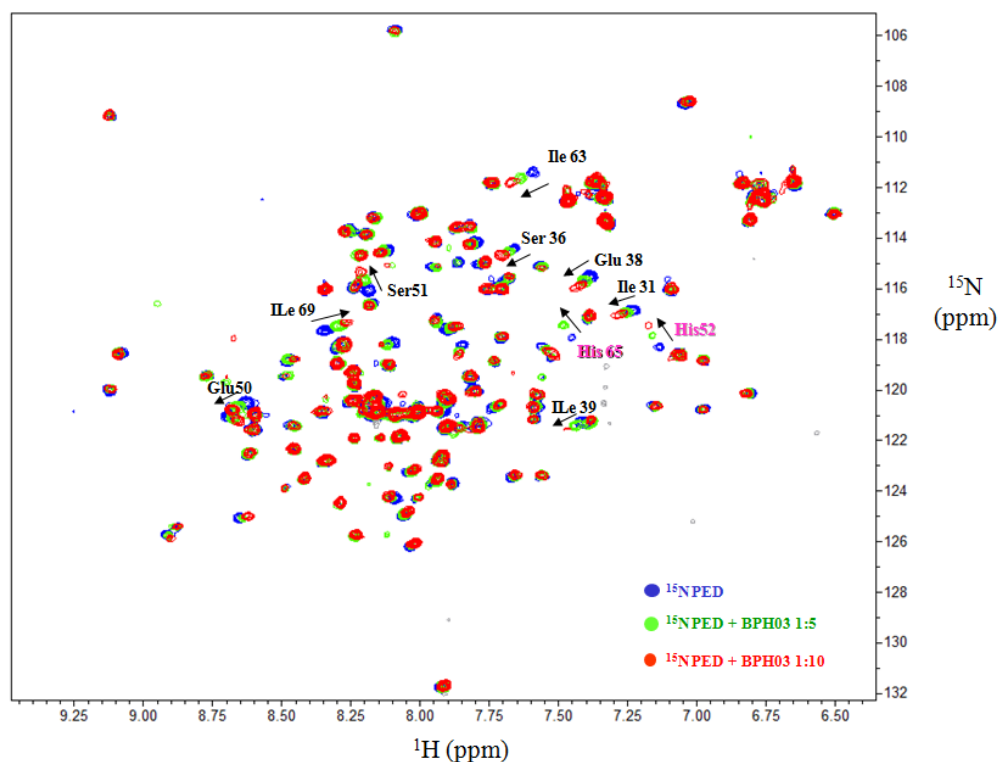
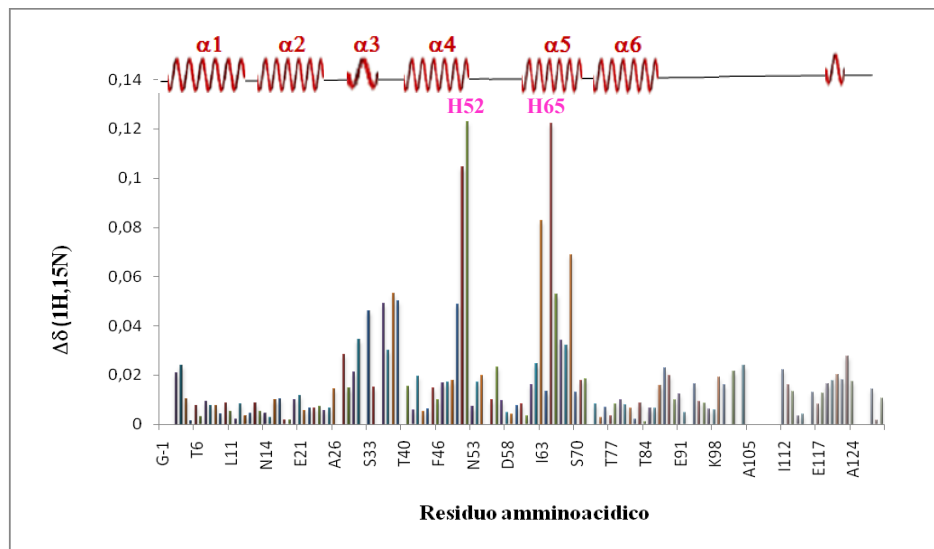


Figura 4.8 Sovrapposizione degli spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC di ^{15}N -PED 150 μM in assenza (blu) e in presenza di 5 eq. (verde) e 10 eq. (rosso) di BPH03. I picchi che presentano i maggiori spostamenti sono indicati in fucsia, mentre quelli che hanno variazioni rilevanti, ma di minore intensità rispetto ai precedenti in nero.

A titolo di esempio è riportato in figura 4.9a il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ in cui il BPH03 è stato aggiunto in un rapporto di 10:1 rispetto alla proteina. Da questi dati si osserva che le maggiori variazioni riguardano i residui del dominio DED N-terminale di PED, in particolare quelli del *loop* 2 (K28, I31), dell' α 3 (S36), del *loop*3 (E37, E38, I39), dell' α 4 (E50, S51), del *loop*4 (H52) e dell' α 5 (I63, H65, I66, F67, E68, I69). Nel caso della Lys35 lo slargamento è tale che non è possibile calcolare il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$.

(a)



(b)

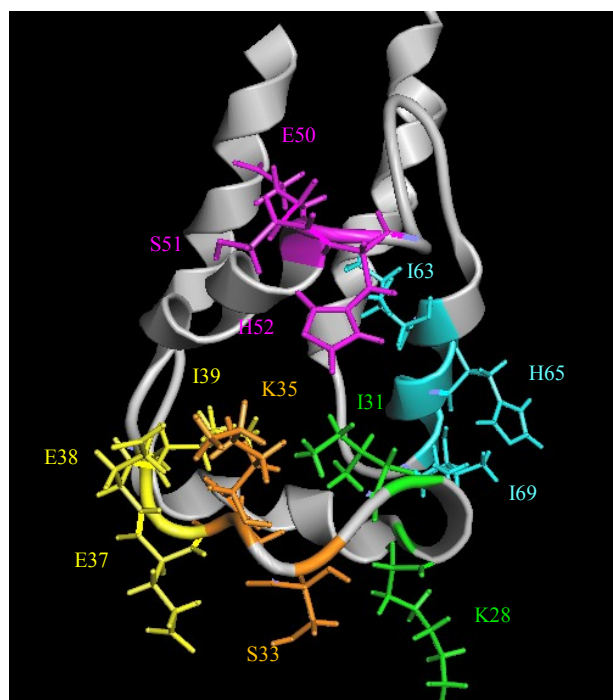


Figura 4.9 Chemical shift mapping di ^{15}N -PED 150 μM in presenza di 10 equivalenti di BPH03 (a); i residui che variano maggiormente sono evidenziati con colori diversi, a seconda della struttura secondaria a cui appartengono, nel diagramma a nastro della struttura tridimensionale di PED (b).

E' inoltre interessante osservare che diversi residui della regione C terminale, che sono poco visibili nello spettro della proteina PED in assenza di BPH03, aumentano di intensità in seguito all'interazione con BPH03.

In figura 4.9b si può osservare che i residui che risultano maggiormente perturbati dall'aggiunta del BPH03, quale l'His52 e la Lys35, sono vicini nella struttura tridimensionale ($\sim 3\text{\AA}$), mentre l'His65 dell'elica 5 si trova ad una distanza di $\sim 17\text{\AA}$ da questi residui. Alla luce di tale osservazione è possibile individuare due distinte regioni di cui: 1) solo una potrebbe essere quella di interazione diretta, mentre l'altra potrebbe risultare perturbata in seguito a dei cambiamenti conformazionali indotti dall'interazione del BPH03 con PED, oppure 2) entrambe potrebbero includere due distinti siti.

Per ottenere un'ulteriore stima della costante di dissociazione PED-BPH03, e per vedere se i residui localizzati nelle due distinte regioni presentano un diverso comportamento è stato calcolato il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ciascun residuo ad ogni punto della titolazione e, per quei residui che mostrano un maggiore spostamento, tale valore è stato utilizzato per eseguire un *fitting* non lineare come descritto in § 3.4.4.

Nella Figura 4.10 è riportata un'espansione di tutti gli spettri [^{15}N , ^1H] HSQC della titolazione sovrapposti, in cui si trovano i picchi dei residui Ile69 e Ser51 (fig. 4.10a) e le rispettive curve ottenute con il *fitting* non lineare del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ in funzione della concentrazione del BPH03 (fig. 4.10b).

In figure A1.1 e in tabella A1.2 (in appendice) sono riportati le curve di legame e i valori delle K_D ricavate dal *fitting* non lineare del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$, in funzione della concentrazione di BPH03, per i residui che presentano i maggiori spostamenti con i relativi dati statistici.

Da tali dati si osserva che solo nel caso del residuo S36 i punti hanno un andamento pressoché lineare e il valore della K_D non è stato considerato per la determinazione della stima finale della K_D apparente, ottenuta dalla media delle singole K_D :

$$K_D = (2.3 \pm 0.5) \text{ mM}$$

Tale valore è in accordo entro l'errore sperimentale con quello ottenuto mediante esperimenti waterLOGSY ($2.2 \pm 0.2 \text{ mM}$).

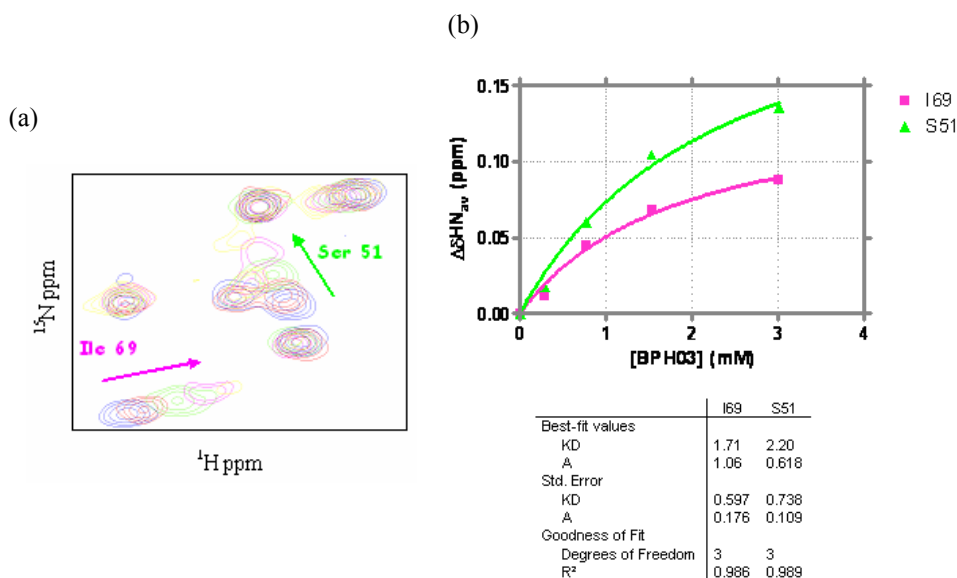


Figura 4.10 (a) Espansione degli spettri 2D [¹⁵N,¹H] HSQC sovrapposti di ¹⁵N-PED 150 μM in assenza (blu) e in presenza di 2 equivalenti (rosso), 5 eq. (verde), 10 eq. (viola) e 20 eq. (giallo) di BPH03. (b) curva ottenuta con il *fitting* non lineare del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ in funzione della concentrazione di BPH03.

Per meglio comprendere la natura delle variazioni indotte dal BPH03 sulla proteina PEDun altro scaffold bifenilico, il BPH08, con la stessa sub-struttura ma con differenti gruppi funzionali, è stato analizzato (fig. 4.11).

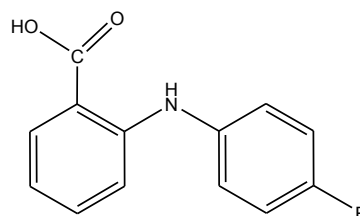
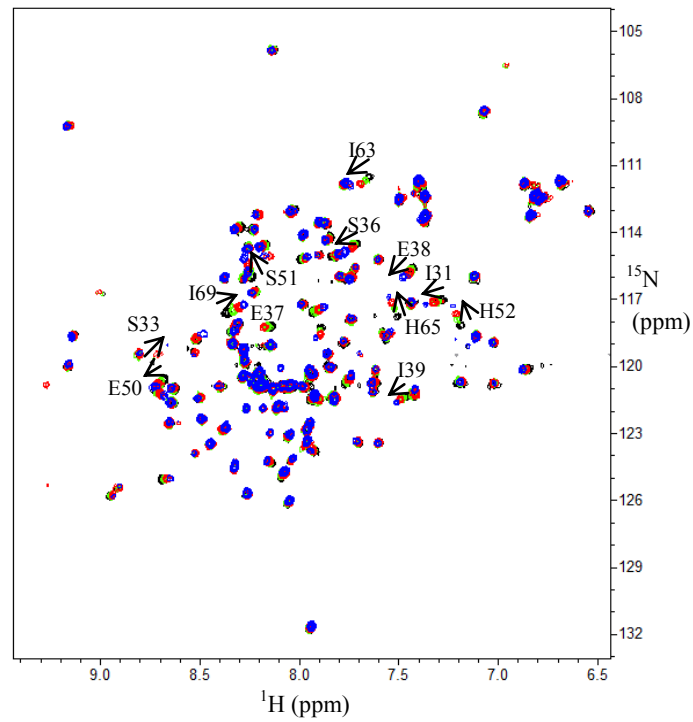


Figura 4.11 Struttura chimica del frammento BPH08.

In particolare, è stata eseguita una titolazione analoga a quella effettuata con il BPH03 (vedi tab.4.8) e gli spettri HSQC in assenza e presenza di 5, 10 e 20 eq. di BPH08 sono stati sovrapposti (fig. 4.12a). Da tale sovrapposizione e dal $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ dei residui visibili nello spettro HSQC acquisito con 20 eq. di BPH08 (fig. 4.12b) si osserva che gli stessi residui sono coinvolti nel legame del BPH08 a PED, come era da attendersi in quanto aventi la stessa sub-struttura chimica, sebbene delle differenze sono osservate nella regione 30-39. In particolare, una notevole variazione del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ della Ser33, paragonabile a quella della Ser51, dell'His52

(a)



(b)

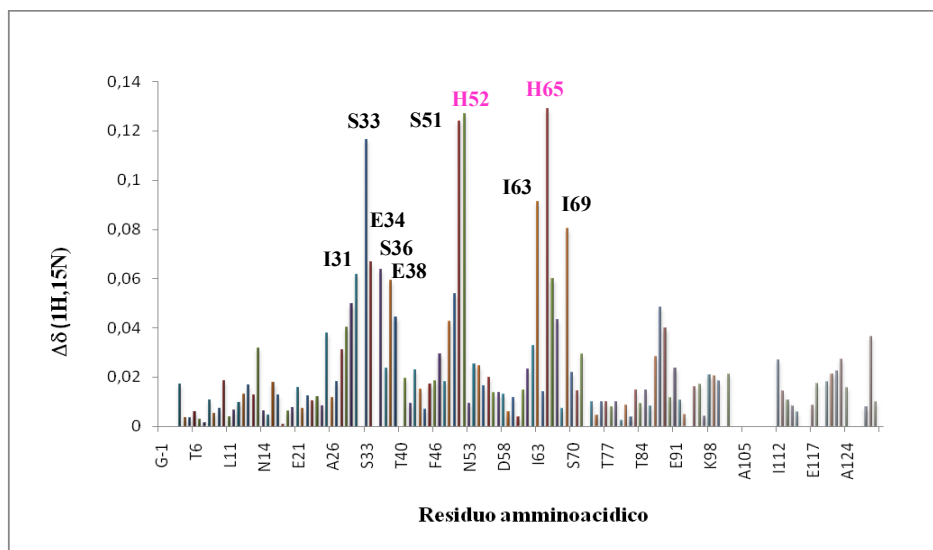


Figura 4.12 (a) Sovrapposizione degli spettri $[^{15}\text{N},^1\text{H}]$ HSQC di ^{15}N -PED $150\ \mu\text{M}$ in assenza (nero) e in presenza di 5 eq. (verde) e 10 eq. (rosso), 20 eq (blu) di BPH08; (b) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N -PED $150\ \mu\text{M}$ in presenza di 20 equivalenti di BPH08.

e dell'His65 è riscontrata. Anche in questo caso, la maggior parte dei residui presentano variazioni nel regime del *fast exchange* rispetto alla scala dei tempi NMR, con alcuni di essi, quali l'Ile31, il Glu37, l'Ile39 e l'His65, che mostrano anche una significativa diminuzione dell'intensità del segnale.

In figure A1.2 e in tabella A1.3 (in appendice) sono riportati le curve di legame e i valori delle K_D ricavate dal *fitting* non lineare del $\Delta\delta H_{N_{av}}$, in funzione della concentrazione del BPH08, per i residui che presentano i maggiori spostamenti con i relativi dati statistici. Da tali dati si osserva che i residui nel *loop* 2, nell'elica 3 e nel *loop* 3, hanno un valore molto alto della K_D dovuto ad un andamento pressoché lineare, mentre i dati relativi ai residui da Asp50 a Ile69 si dispongono lungo una curva dose-risposta, pertanto solo il valore delle K_D di tali residui è stato considerato per la determinazione della stima finale della K_D apparente:

$$K_D = (4.6 \pm 1.3) \text{ mM}$$

Da tale valore della costante si evince che l'affinità del BPH03 è maggiore di quella del BPH08.

- **Tiozoli: TAZ02 e TAZ05**

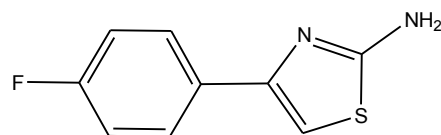
Al fine di individuare il sito di *binding* di *scaffold* tiazolici, analogamente al BPH03 e al BPH08, è stato effettuato un esperimento di titolazione NMR di ^{15}N -PED con TAZ02 (fig. 4.13a). In questo caso, anche quando sono stati aggiunti 20 equivalenti di TAZ02, non sono state osservate variazioni significative dei chemical shift della proteina, se non delle piccole variazioni della parte C-terminale (fig. 4.13b).

Sono state quindi effettuate altre due aggiunte di 40 e 60 equivalenti di TAZ02. In figura 4.14 è riportata la sovrapposizione degli spettri HSQC della proteina PED in assenza e in presenza di TAZ02 con rapporto molare di 1:60, e sono evidenziati in nero i residui che presentano maggiori spostamenti (K88, I89, I121, K122, A124) e in verde quelli che hanno variazioni di minore intensità rispetto ai precedenti (T16, K28, E29, F48, Y62, I63, D74).

Per verificare se tali variazioni sono dovute all'aggiunta di DMSO 8%, è stato registrato uno spettro ^{15}N HSQC di PED in assenza e in presenza di DMSO 8%.

La perturbazione dei chemical shift è risultata analoga a quella indotta dai 60 equivalenti di TAZ02 (dati non mostrati).

(a)



(b)

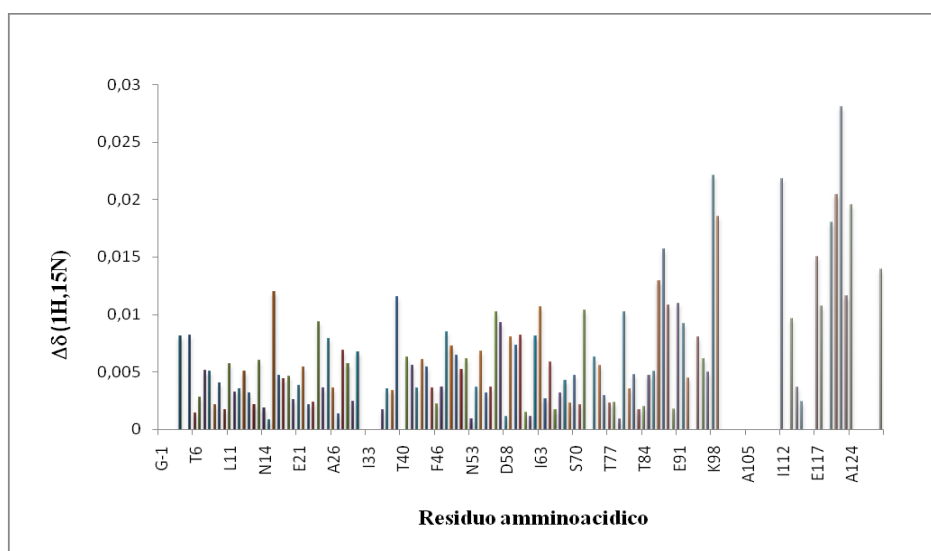


Figura 4.13 (a) Struttura chimica del frammento TAZ02; (b) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N -PED 150 μM in presenza di 20 equivalenti di TAZ02.

Pertanto, l'assenza di apprezzabili variazioni di chemical shift dei picchi ammidici di PED in presenza di TAZ02 e la sua positività al legame con PED in esperimenti basati sull'osservazione del ligando, potrebbero essere dovute ad un'interazione aspecifica tra TAZ02 e PED.

Al fine di identificare il sito di *binding* di scaffold tiazolici, è stata effettuata un'analisi di *chemical shift mapping* di PED con il TAZ05 (fig. 4.15a), un altro tiazolo risultato positivo allo *screening* della *library*, avente una sottostruttura chimica differente, in quanto al posto dell'anello aromatico è legato all'anello tioazolico un anello tiofenico. In questo caso sono state fatte solo due aggiunte del

TAZ05, corrispondenti a 5 e 10 equivalenti, in quanto a concentrazioni maggiori di 1.3 mM (10 eq.), si osserva la formazione di un precipitato.

Riportando in grafico il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ calcolato per ogni residuo amminoacidico per il TAZ05 nell'esperimento in cui sono stati aggiunti 10 eq. non si osservano variazioni di chemical shift di intensità rilevanti, se non una variazione del chemical shift dell' ^1H e dell' ^{15}N ammidico e indolico del W45 e della Q9 (fig. 4.15b). Questi residui risultano però lontani nella struttura terziaria della proteina, pertanto da questi dati non è possibile identificare la regione di legame di tale scaffold su PED.

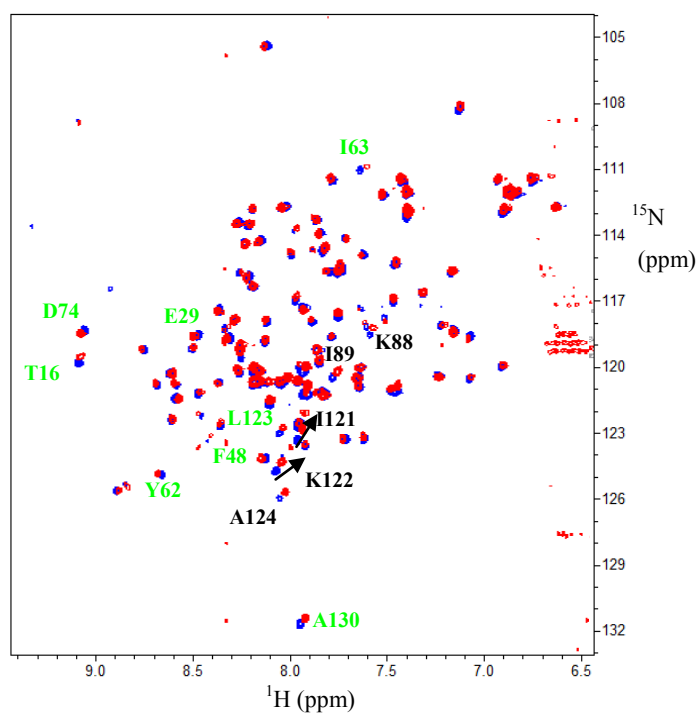


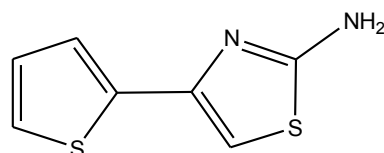
Figura 4.14 Sovrapposizione degli spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC di ^{15}N -PED 150 μM in assenza (blu) e in presenza di TAZ02 9 mM (rosso). I picchi che presentano i maggiori spostamenti sono indicati in nero, mentre in verde sono indicati quelli che hanno variazioni rilevanti, ma di minore intensità rispetto ai precedenti.

- **Pirazoli: PYZ19 e PYZ07**

Dall'analisi delle molecole risultate positive allo *screening* si osserva che tra gli *scaffold* pirazolici, PYZ19, di cui è stata determinata la K_D mediante waterLOGSY (2.4 ± 0.4 mM), ha una similarità del 38% con il TAZ05 (fig.

4.16a). Inoltre, avendo osservato per questo una maggiore solubilità in tampone fosfato è stata effettuata un'analisi di *chemical shift mapping* aggiungendo a PED marcata con ^{15}N 20 eq di tale molecola.

(a)



(b)

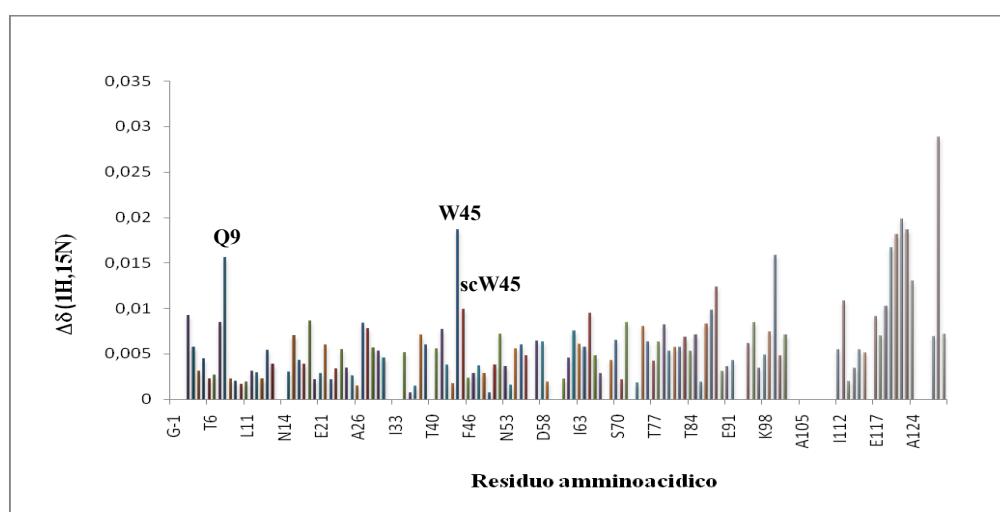


Figura 4.15 (a) Struttura chimica del frammento TAZ05; (b) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N -PED 150 μM in presenza di 10 equivalenti di TAZ05.

In figura 4.16b è riportata la sovrapposizione degli spettri HSQC della proteina PED in assenza e in presenza di PYZ19 con rapporto molare di 1:20 e in figura 4.16c il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ calcolato per ogni residuo.

Da tale analisi, considerando solo variazioni maggiori di 0.015 ppm si osservano oltre ai residui della regione C-terminale che, come precedentemente osservato, sono dovuti all'aggiunta di DMSO, anche perturbazioni di chemical shift di alcuni residui nella regione del dominio N-terminale (C27, K28, scW45, S51, I63, H65, S70). I residui Lys28, Ser51, Ile63 e His65 sono coinvolti anche nell'interazione con BPH03, sebbene le variazioni osservate per il PYZ19 siano di minore intensità rispetto a quelle indotte da BPH03. E' da notare che l'NH indolico del

Trp45, che non risultava perturbato con BPH03, risultava invece perturbato dall'aggiunta del TAZ05, che come detto ha un'elevata omologia di struttura con il PYZ19.

Andando a visualizzare i residui del dominio DED maggiormente influenzati dall'aggiunta del PYZ19 (fig. 4.16), si osserva che tali residui sono localizzati nelle due regioni identificate nel caso del BPH03, pertanto anche per il PYZ19 non è possibile definire esattamente quale sia il possibile sito di legame su PED. In ogni caso, tale sito potrebbe essere lo stesso o potrebbe sovrapporsi parzialmente a quello del BPH03.

Gli *scaffold* pirazolici sono quelli che hanno dato il maggior numero di *hit* in proporzione al loro numero nella collezione. I pirazoli che sono risultati positivi allo *screening* NMR contro PED presentano in alcuni casi diversa substruttura chimica. Pertanto, per meglio caratterizzare il sito di legame degli *scaffold* pirazolici sulla proteina PED, è stata effettuata un'analisi di *chemical shift mapping* su un altro scaffold pirazolico che possiede un anello naftalenico legato all'anello pirazolico, il PYZ07 (fig. 4.17a).

Anche per questo composto è stata effettuata una titolazione fino ad un rapporto di 10:1 come per TAZ05 a causa dell'insolubilità del PYZ07 alla concentrazione maggiori di 1.5 mM. Nella figura 4.17b sono riportate la sovrapposizione degli spettri HSQC di PED in presenza di 5eq. e 10eq. di PYZ07 e il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ calcolato per i residui che sono ben visibili nello spettro HSQC con 10 eq. di PYZ07.

L'analisi di *chemical shift mapping* ha mostrato che il PYZ07 induce significative variazioni dei chemical shift di diversi residui della proteina nel regime del *fast-exchange* che si trovano nel dominio DED, simili a quelle osservate con l'aggiunta del BPH03 (I31, K35, S36, E37, L49, E50, S51, H52, I63, H65, I66, F67, I69). In maniera analoga, due residui, la Lys35 e il Glu37, presentano non solo uno spostamento del segnale, ma anche uno slargamento, suggerendo per questi uno scambio intermedio rispetto alla scala dei tempi NMR. Inoltre, le perturbazioni osservate in presenza del PYZ07 sono molto più rilevanti rispetto a quelle del PYZ19 e più simili a quelle indotte dal BPH03. La similarità del *chemical shift mapping* suggerisce un'analogia regione e/o un'analogia modalità di interazione del PYZ07 e del BPH03.

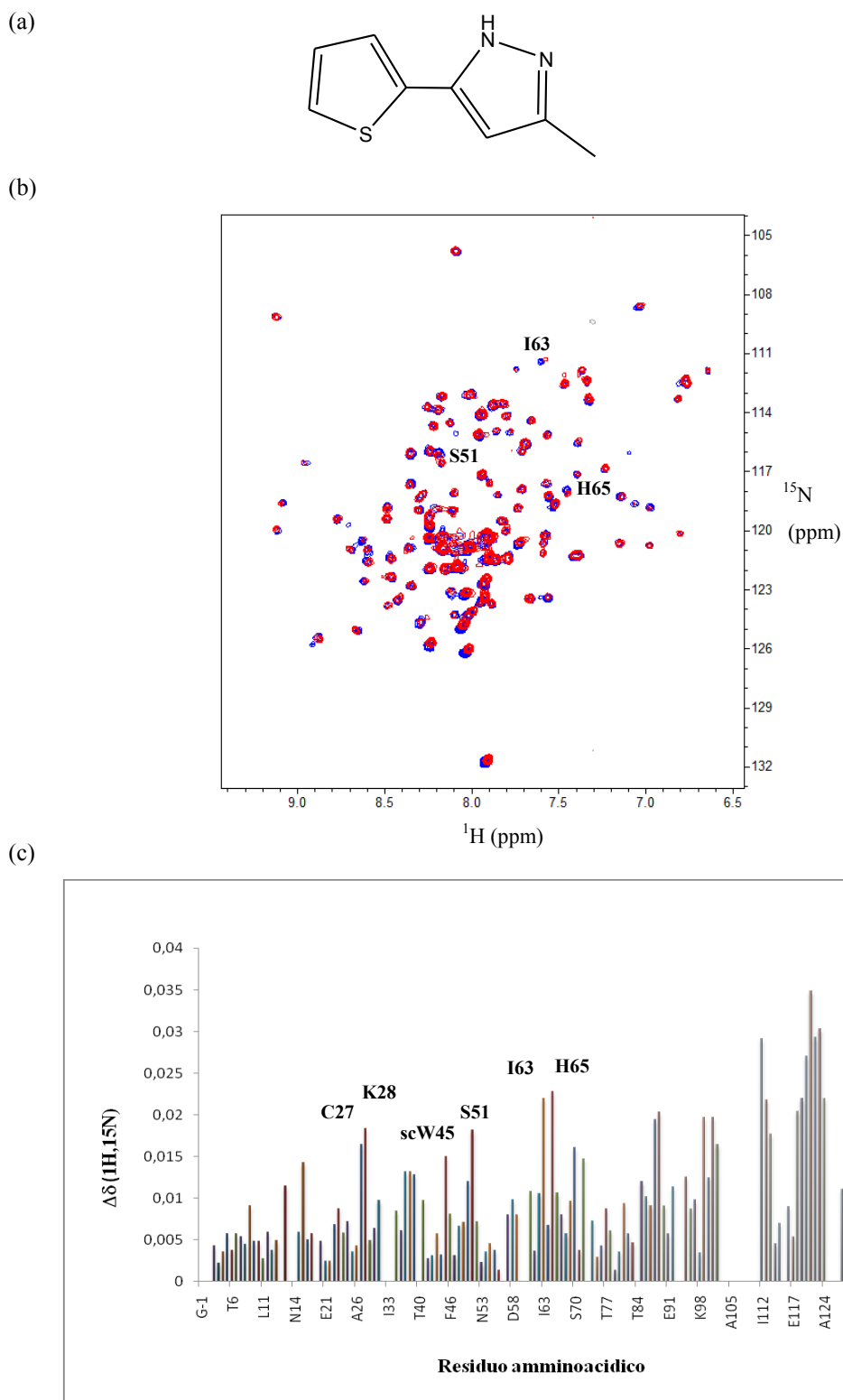


Figura 4.16 (a) Struttura chimica del frammento PYZ19; (b) sovrapposizione degli spettri 2D [$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$] HSQC di ^{15}N -PED 150 μM in assenza (blu) e in presenza di 20 equivalenti di PYZ19 (rosso). Sono indicati solo i picchi che presentano i maggiori spostamenti del dominio N-terminale; (c) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N -PED 150 μM in presenza di 20 equivalenti di PYZ19.

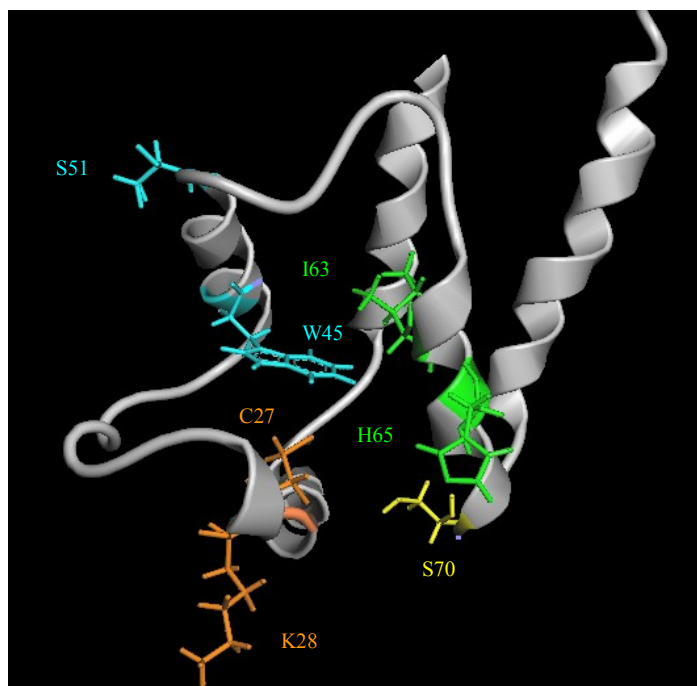


Figura 4.17 *Chemical shift mapping* di ^{15}N -PED 150 μM in presenza, i residui del dominio DED che variano maggiormente sono evidenziati con colori diversi, a seconda della struttura secondaria a cui appartengono, nel diagramma a nastro della struttura tridimensionale di PED.

Da un'attenta analisi degli spettri HSQC di PED in assenza e in presenza del PYZ07 e del BPH03 sono state osservate alcune analogie e differenze. In particolare:

- Lo spostamento dei residui I31, E50, S51, H52, I63, H65, I69 avviene nella stessa direzione per il BPH03 e il PYZ07. E' da notare che nel caso del PYZ19 lo spostamento dei residui I63 e H65 avviene nella direzione opposta.
- L'entità della variazione è più piccola nel caso del PYZ07.

L'analogia degli spostamenti di chemical shift tra il BPH03 e il PYZ07, intorno all'His52 e all'His65, potrebbe essere dovuta al fatto che tali variazioni siano il risultato di un riarrangiamento conformazionale indotto da tali ligandi. Come precedentemente detto, le due istidine si trovano ad una distanza tale per cui è possibile ipotizzare che solo una delle due è quella di interazione diretta, mentre l'altra può essere perturbata per un effetto allosterico. Tra le due istidine, l'His52

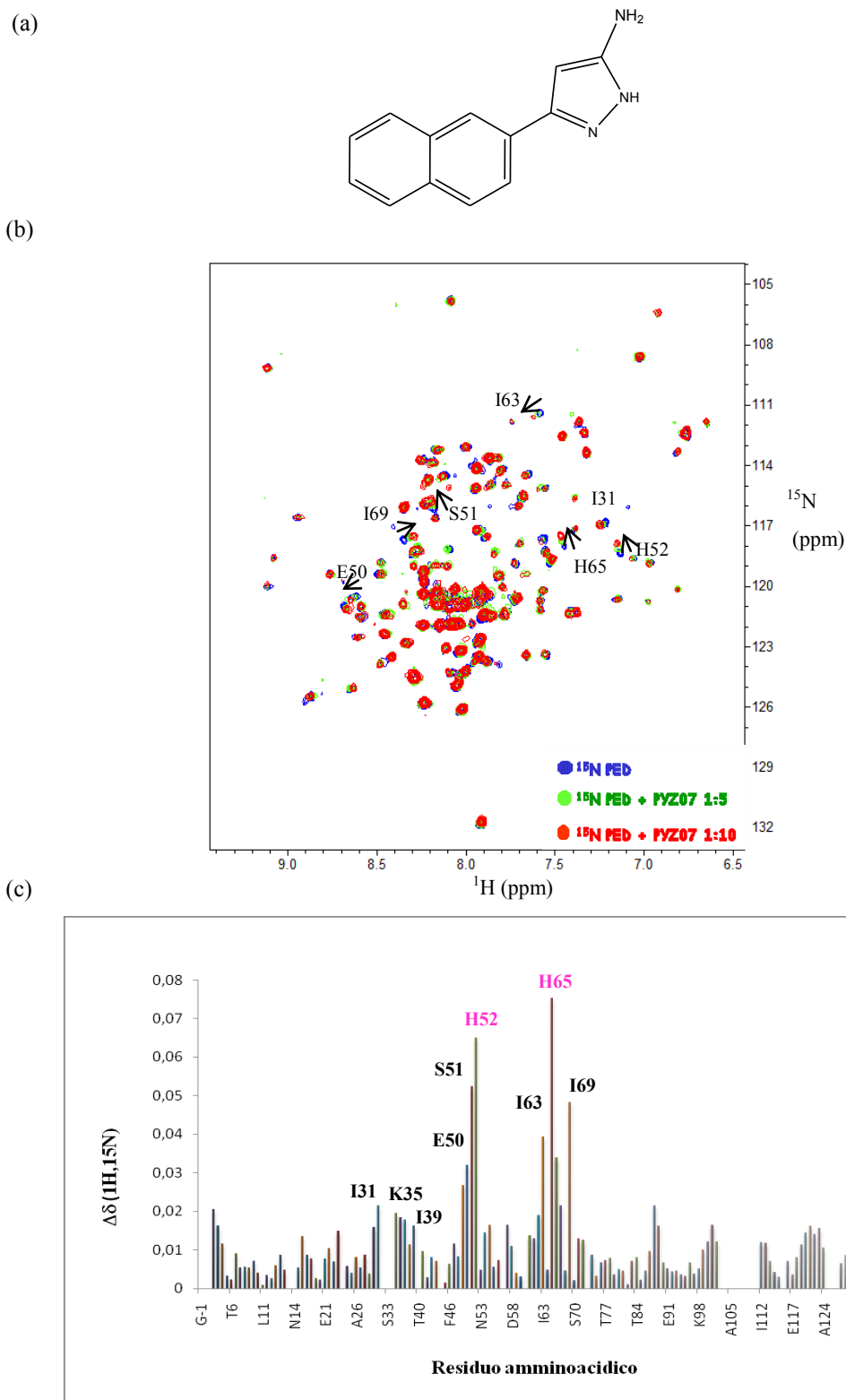


Figura 4.18 (a) Struttura chimica del frammento PYZ07; (b) sovrapposizione degli spettri 2D $[^{15}\text{N}, ^1\text{H}]$ HSQC di ^{15}N -PED $150\mu\text{M}$ in assenza (blu) e in presenza di 10 equivalenti di PYZ07 (rosso). (c) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N -PED $150\mu\text{M}$ in presenza di 10 equivalenti di PYZ07.

è più vicina ai residui del *loop2*, dell' $\alpha3$ e del *loop3*, pertanto è più plausibile pensare che l'His52 sia quella di interazione diretta mentre l'His65 cambi per effetto allosterico. Alla luce di questi ultimi dati è possibile ipotizzare che anche la notevole variazione osservata per l'His52 sia il risultato di un riarrangiamento conformazionale.

- **Indolo: IND10**

L'analisi di *chemical shift mapping* di PED in presenza di IND10 (fig. 4.18), scelto come rappresentante degli *hit* appartenenti alla classe degli indoli e di cui è stata determinata la K_D mediante waterLOGSY (4.2 ± 1.6 mM), è stata condotta aggiungendo alla proteina PED (75 μ M) 1.5 mM di tale composto (20 eq).

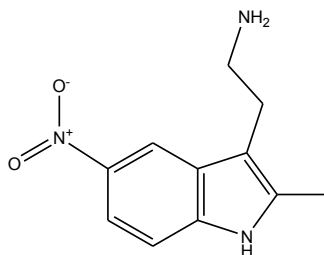
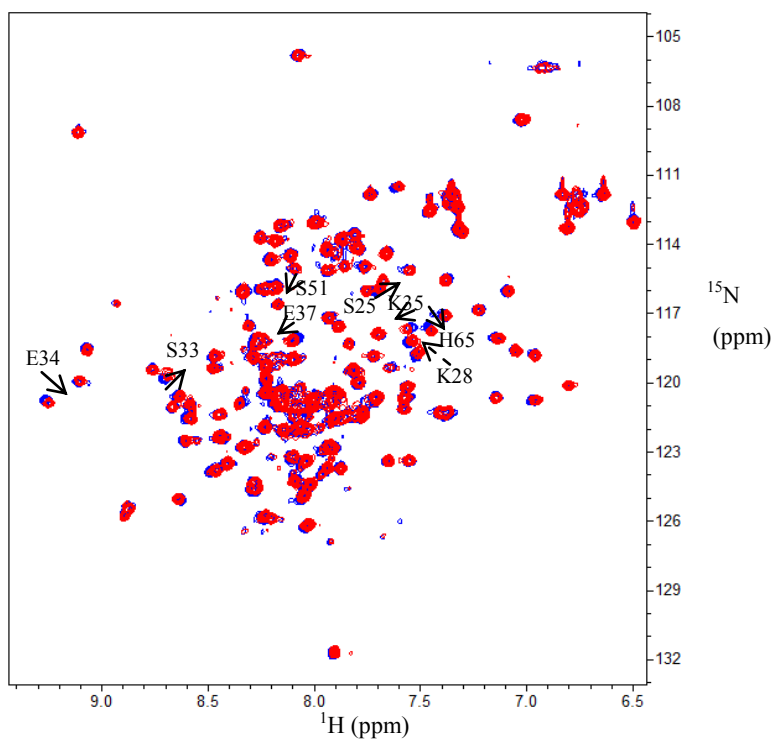


Figura 4.18 Struttura chimica del frammento IND10.

La sovrapposizione degli spettri HSQC in assenza e in presenza di ligando e il $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ dei residui visibili in tali spettri sono riportate in figura 4.18a e b. In questo caso, significative variazioni delle risonanze della proteina PED riguardano i residui Ser25, Lys28, Ser33, Glu34, Glu37 che sono localizzati nell'elica 2, nel *loop 2*, nell'elica 3 e nel *loop 3*. Andando a visualizzare tali residui nella struttura tridimensionale di PED è possibile ipotizzare un diverso sito di interazione per l'IND10 (fig. 4.21), che è localizzato in un'altra faccia della proteina ma comunque adiacente al possibile sito di interazione degli scaffold bifenilici e pirazolici. E' da notare che anche questo ligando induce una variazione dei residui Ser51 e His65, sebbene in misura minore rispetto a quella osservata per gli altri ligandi, quali il BPH03, il BPH08 e il PYZ07.

(a)



(b)

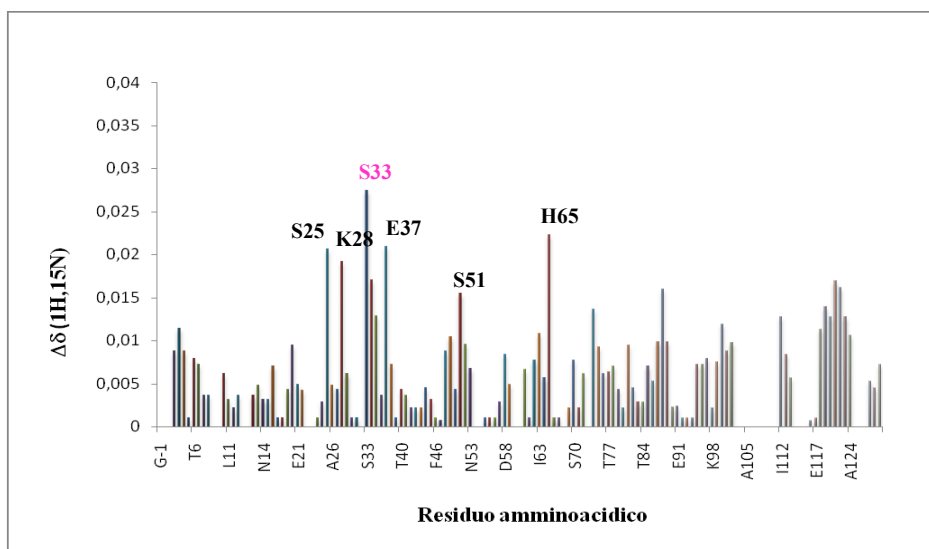


Figura 4.20 (a) Sovrapposizione degli spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC di ^{15}N -PED 75 μM in assenza (blu) e in presenza di 20 eq. (rosso) di IND10. I picchi che presentano i maggiori spostamenti sono indicati con le frecce. (b) Variazioni mediate dei chemical shift del ^{15}N e del ^1H di ^{15}N PED 75 μM in presenza di 20 equivalenti di IND10.

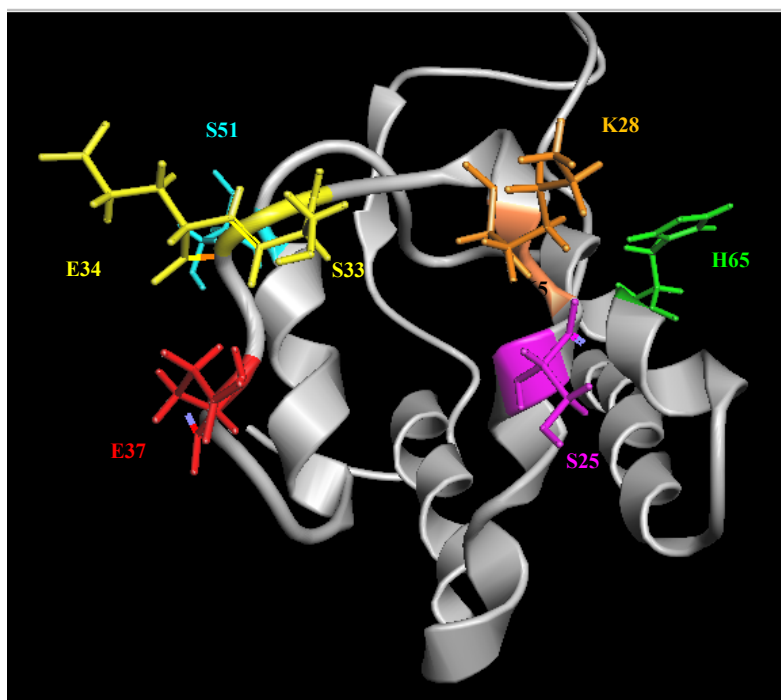


Figura 4.21 Mappa delle perturbazioni dei chemical shift di PED in presenza di IND10.

- **Tiofene: TPH01**

Un ultimo scaffold il cui sito di legame è stato studiato mediante *chemical shift mapping* è il TPH01 (fig.4.20) la cui costante mediante esperimenti waterLOGSY è risultata di 2.6 ± 0.4 mM. Anche in questo caso, come per l'IND10, tale analisi è stata effettuata mediante l'aggiunta di 1.5 mM del ligando alla proteina PED marcata con ^{15}N (150 μM).

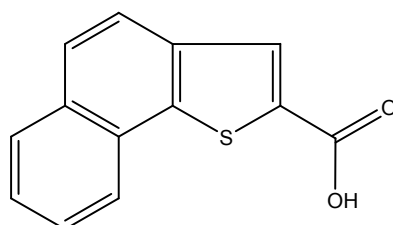


Figura 4.19 Struttura chimica del frammento TPH01.

Dalla sovrapposizione degli spettri HSQC in assenza e in presenza di ligando e dal $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ (fig. 4.21a e b) è possibile osservare che i residui che vengono perturbati dall'aggiunta del TPH01 sono gli stessi che cambiano per la presenza del BPH03, del BPH08 e del PYZ07. E' interessante notare che il TPH01, appartenente alla classe dei tiofeni e dei benzotiofeni, ha una similarità del 35% con il PYZ07. Tale osservazione potrebbe quindi giustificare le analoghe perturbazioni indotte da questi composti. A differenza di questo però si osserva una variazione maggiore per il residuo Ile39 e la Ser51.

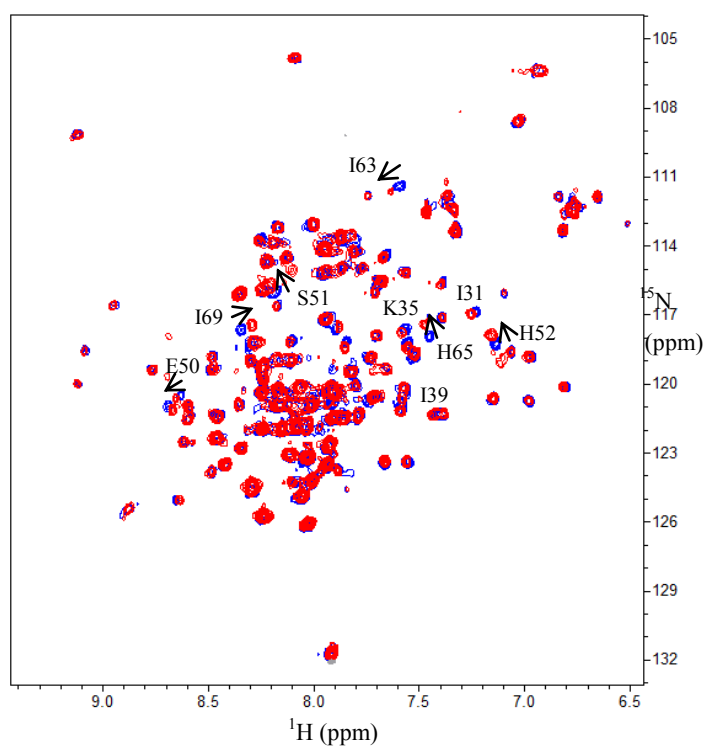
4.4.2 NOE interligando (ILOE)

Dagli studi di *chemical shift* mapping, si osserva che i diversi *scaffold* analizzati perturbano residui in regioni contigue e in parte sovrapposte della proteina PED, sebbene non sia possibile definire con esattezza i loro siti di legame, in quanto talvolta riguardano regioni troppo estese. Al fine di verificare se vi siano composti che si legano in siti adiacenti sulla superficie di PED, esperimenti omonucleari 2D-NOESY per la misura di NOE Interligando (ILOE) sono stati effettuati su miscele di questi composti in presenza di quantità substechimometriche della proteina PED non marcata. Dal momento che i composti più promettenti dai precedenti studi di *chemical shift mapping* risultano essere gli *scaffold* bifenilici, sono state analizzate miscele del BPH03 con uno o due rappresentanti delle classi di *scaffold* che hanno dato il maggior numero di *hit* (tab. 4.9).

MISCELE	ILOE
BPH03-IND10	-
BPH03-PYZ19	++
BPH03-PYZ07	++
BPH03-TDA13	-
BPH03-TPH01	+

Tabella 4.9 Miscele sottoposte a misure di NOE interligando

(a)



(b)

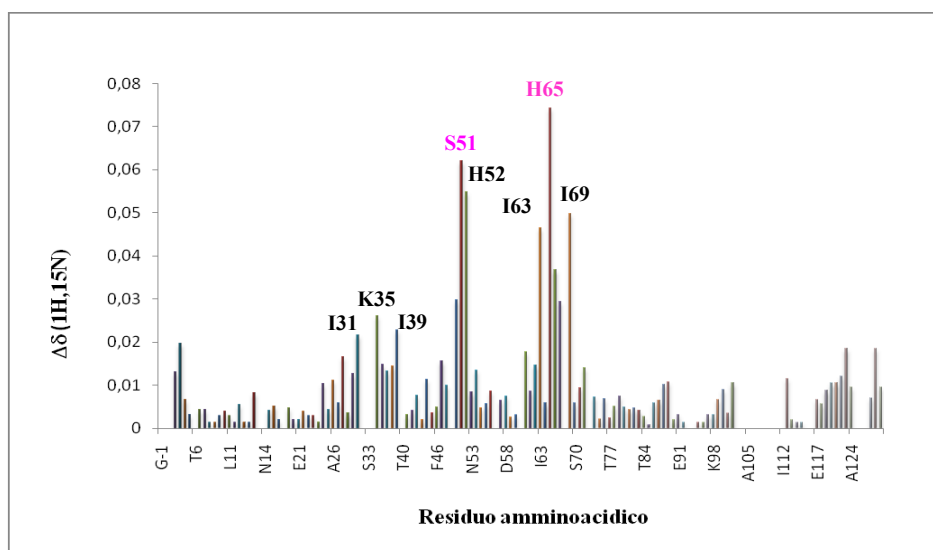


Figura 4.22 (a) Sovrapposizione degli spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC di ^{15}N -PED 150 μM in assenza (blu) e in presenza di 10 eq. (rosso) di TPH01. (b) $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ di ^{15}N PED 150 μM in presenza di 10 equivalenti di TPH01.

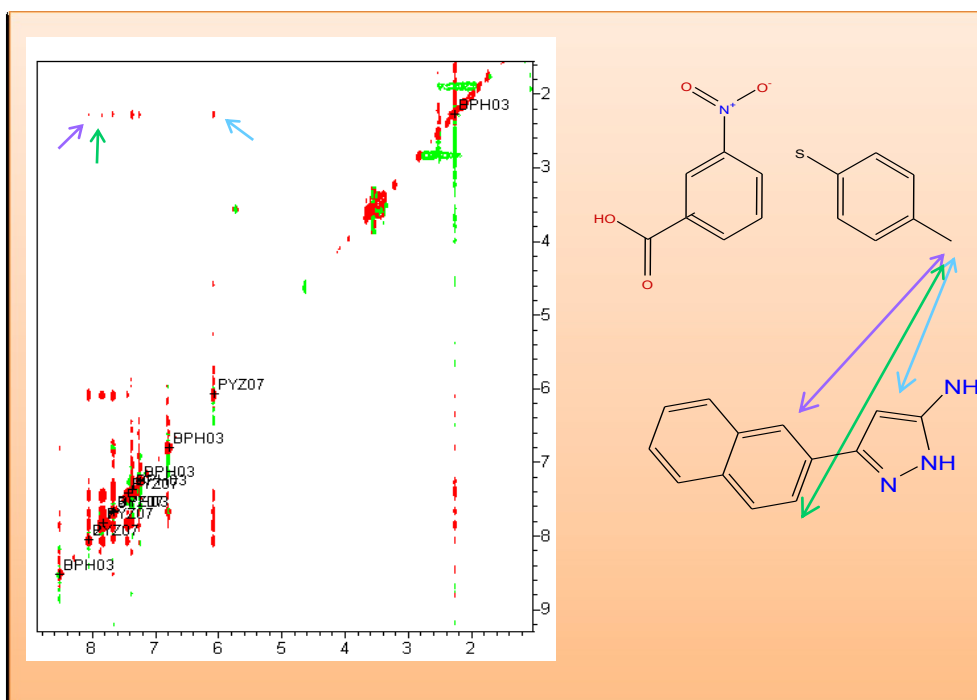
Tali studi hanno evidenziato che il frammento molecolare BPH03 presenta dei segnali NOE interligando mediati dalla proteina PED con i due frammenti pirazolici, PYZ07 e PYZ19 (fig. 4.23), e con il TPH01 (fig. 4.24), suggerendo che tali frammenti si trovano in siti adiacenti sulla superficie di PED. In particolare, nel caso dei pirazoli, i NOE tra l'anello metilbenzenico e quello pirazolico indicano che le due molecole sono orientate sulla superficie di PED con l'anello pirazolico rivolto verso il metile del BPH03 (fig. 4.23b). Nel caso del TPH01 è sempre l'anello anello aromatico con il metile del BPH03 che presenta contatti NOE con i protoni del gruppo naftotiofenico (fig. 4.24), ma in questo caso l'orientazione relativa risulta essere meno chiara.

4.5 Progettazione e sintesi di composti bidentati

La conoscenza dell'orientazione relativa dei frammenti sulla superficie di PED fornisce le basi per la progettazione di ligandi bidentati, partendo o dagli stessi composti o da loro analoghi che abbiano delle funzioni chimiche, come COOH, NH₂, OH, in corrispondenza o nelle vicinanze dei protoni che presentano NOE interligando. In tal modo è possibile legare chimicamente i frammenti mediante la formazione di ammidi o esteri.

Tra i possibili ligandi bidentati che potrebbero essere sintetizzati, la scelta si è orientata sulla sintesi di un composto che contenga un analogo del BPH03, denominato BPH14, che possiede al posto del gruppo metilico un gruppo amminico, ed un analogo del PYZ19, chiamato PYZ30, che al posto del metile sull'anello pirazolico abbia anch'esso un gruppo amminico. Tale scelta è dettata sia dalla maggiore chiarezza dei contatti NOE interligando tra i frammenti BPH03 e PYZ19 sia per la maggiore solubilità che il ligando bidentato dovrebbe avere rispetto a quello che si otterrebbe con l'altro *scaffold* PYZ07. Il TPH01, come detto, presenta degli ILOE con il BPH03 che non consentono di definire in maniera univoca l'orientazione dei due frammenti, in ogni caso anche per questo vi sarebbe un problema di solubilità data l'assenza di gruppi idrofilici sull'anello naftotiofenico.

(a)



(b)

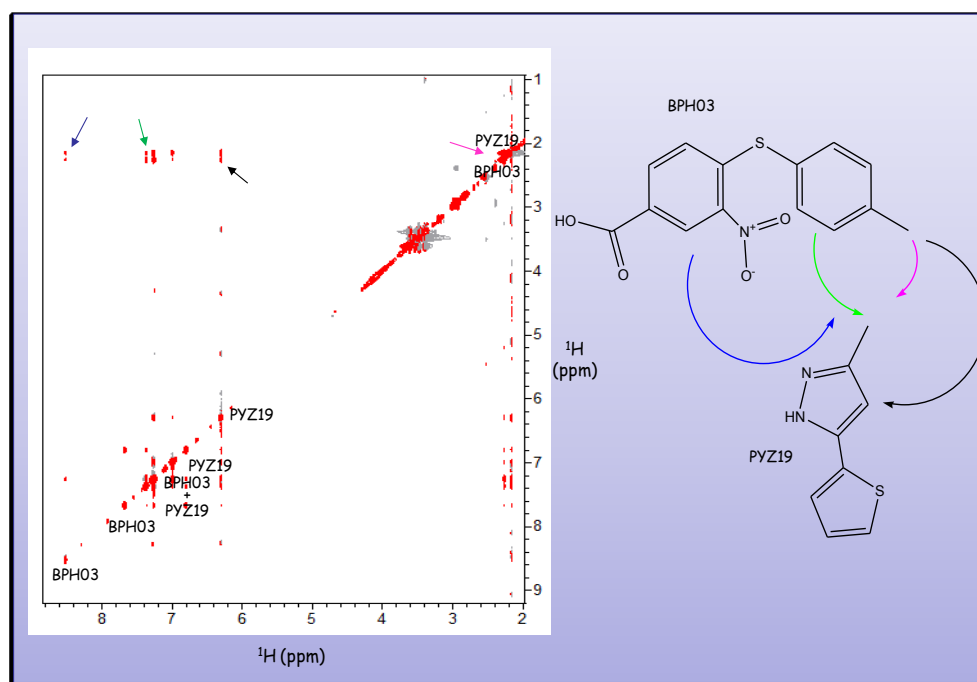


Figura 4.23 Espansione dello spettro 2D [^1H , ^1H] NOESY (tempo di *mixing* 500ms) di BPH03 e PYZ19 (1mM) (a) e BPH03 e PYZ07 (1mM) (b) in presenza di PED (20 μM). I segnali NOE interligando sono evidenziati con le frecce sullo spettro e sulle strutture chimiche.

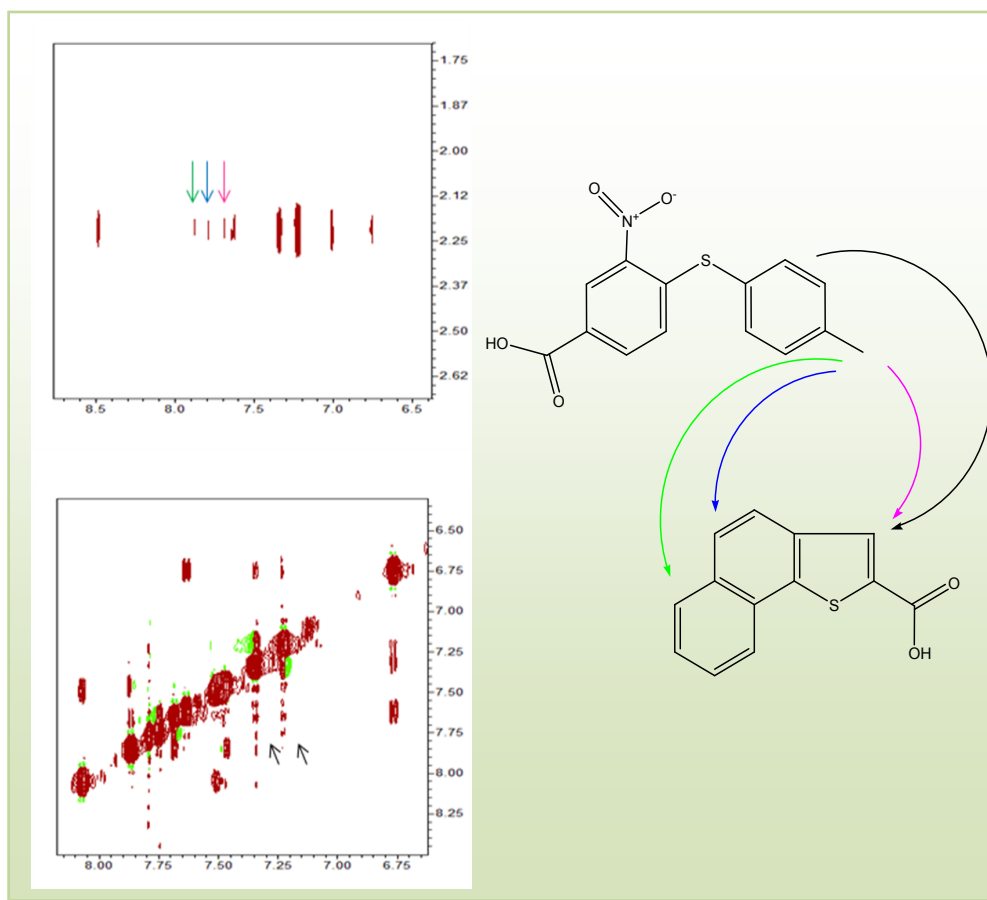


Figura 4.24 Espansioni dello spettro 2D [^1H , ^1H] NOESY (tempo di *mixing* 500ms) di BPH03 e TPH01 (1mM) in presenza di PED (20 μM). I segnali NOE interligando sono evidenziati con le frecce sullo spettro e sulle strutture chimiche con lo stesso colore.

Infine, l'osservazione di segnali NOE tra i protoni dei due anelli aromatici del BPH03 in presenza di PED e l'individuazione di due regioni di interazione sulla superficie della proteina ha suggerito la sintesi di un composto bidentato in cui due molecole del BPH03 sono legate insieme.

Nella progettazione di un composto bidentato anche il tipo di *linker* può avere un ruolo importante. Un *linker* ottimale dovrebbe soddisfare diversi criteri. In primo luogo, permettere ai due ligandi di occupare nel composto bidentato lo stesso sito di legame e nella stessa orientazione così come nei frammenti non legati. Inoltre, mentre ai due composti è concesso avere una flessibilità sufficiente per adottare un'orientazione di legame ottimale, il *linker* dovrebbe essere abbastanza rigido in modo da rendere possibile la conformazione attiva del composto e ridurre i costi

entropici del legame. Infine, il *linker* non deve avere interazioni sfavorevoli con la proteina.

Alla luce di tali premesse e tenendo presente che la chimica utilizzata nel legame di frammenti deve essere più semplice possibile, in modo da potere esplorare diversi parametri come la lunghezza e la natura chimica del *linker*, è stata avviata la sintesi di diversi composti bidentati con diversi tipi di *linker*. Tutti i composti bidentati progettati, riportati in figura 4.25, sono stati sintetizzati dal laboratorio di sintesi della dott.ssa L. Zaccaro dell'IBB di Napoli, utilizzando gli schemi descritti in dettaglio nella sezione di materiali e metodi (§. 3.10).

Il composto denominato BPYZ01 deriva dal legame del frammento BPH14, e il PYZ30 tramite un *linker* costituito da un $-CO-CH_2-$. Il composto BPYZ02 è stato sintetizzato legando il BPH14 e un anello nitropirazolico a cui è legato un gruppo carbossilico anziché un gruppo amminico, con il *linker* $-CO-CH_2CH_2-NH-$. La scelta di questo composto è dettata dalla particolare reattività del gruppo amminico sull'anello pirazolico che determina basse rese di reazione della sintesi del BPYZ01. Il composto denominato BPH14-2X è invece costituito da due frammenti di BPH14 legati da un *linker* costituito da $-CO-CH_2-NH-CH_2-CO-$.

Ciascuno di questi composti è stato prima sciolto in DMSO a concentrazioni di 50-100mM e poi in tampone fosfato a pH 7, dove è stato analizzato mediante spettroscopia NMR mediante spettri protonici, waterLOGSY, STD e NOESY di ogni singola molecola in assenza di proteina. Da tali spettri si è osservato che il BPYZ01 e il BPH14-2X presentano dei segnali waterLOGSY e dei NOE positivi già in assenza di proteina (dati non mostrati). Tale comportamento, che potrebbe essere correlato a fenomeni di aggregazione, rende tali molecole non adatte per potere essere analizzate ad alte concentrazioni in tampone acquoso mediante i metodi NMR precedentemente utilizzati. Al contrario, sul composto BPYZ02, presentando in assenza di proteina segnali waterLOGSY negativi e NOE positivi, è stato possibile effettuare l'analisi NMR del legame con PED sia con metodi basati sull'osservazione del ligando che su quelli basati sull'osservazione della proteina.

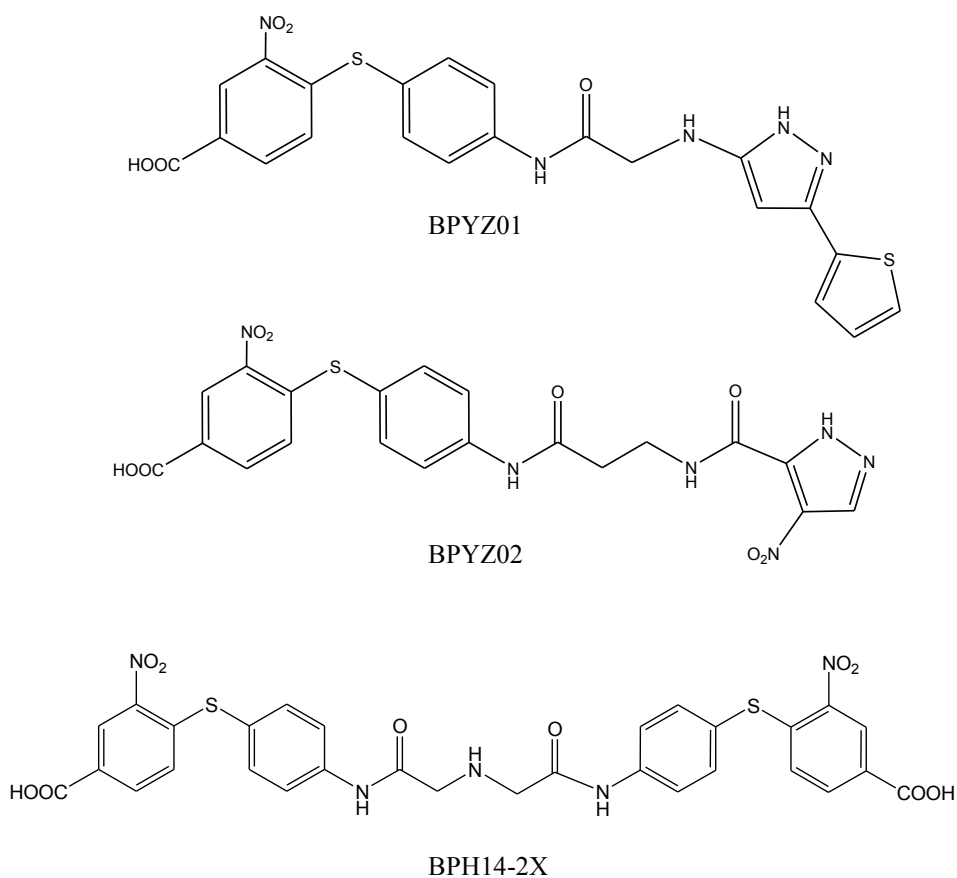


Figura 4.25 Composti bidentati progettati e sintetizzati.

In particolare, sono stati registrati spettri 1D protonico, waterLOGSY e STD, e 2D NOESY, del BPYZ02 in presenza di una quantità sub-stechiometrica di PED (1:60) (fig. 4.26). La positività dei segnali waterLOGSY e la presenza di segnali del solo BPYZ02 confermano l'interazione di tale molecola con PED. E' interessante osservare che il protone aromatico del BPH14 tra il gruppo -COOH e quello -NO₂ che risuona a 8.52 ppm ha un'intensità maggiore sia nello spettro waterLOGSY sia nell'STD rispetto a quella nello spettro protonico, sintomatico di un maggiore affinità di tale protone per la proteina PED.

Al fine di ottenere una stima della costante di dissociazione apparente del complesso ligando-proteina sono stati registrati spettri waterLOGSY, aggiungendo ad una quantità costante di proteina PED (15 μM) quantità crescenti del ligando fino a 2.3 mM (eccesso di ~150 volte). Per questo scopo sono state

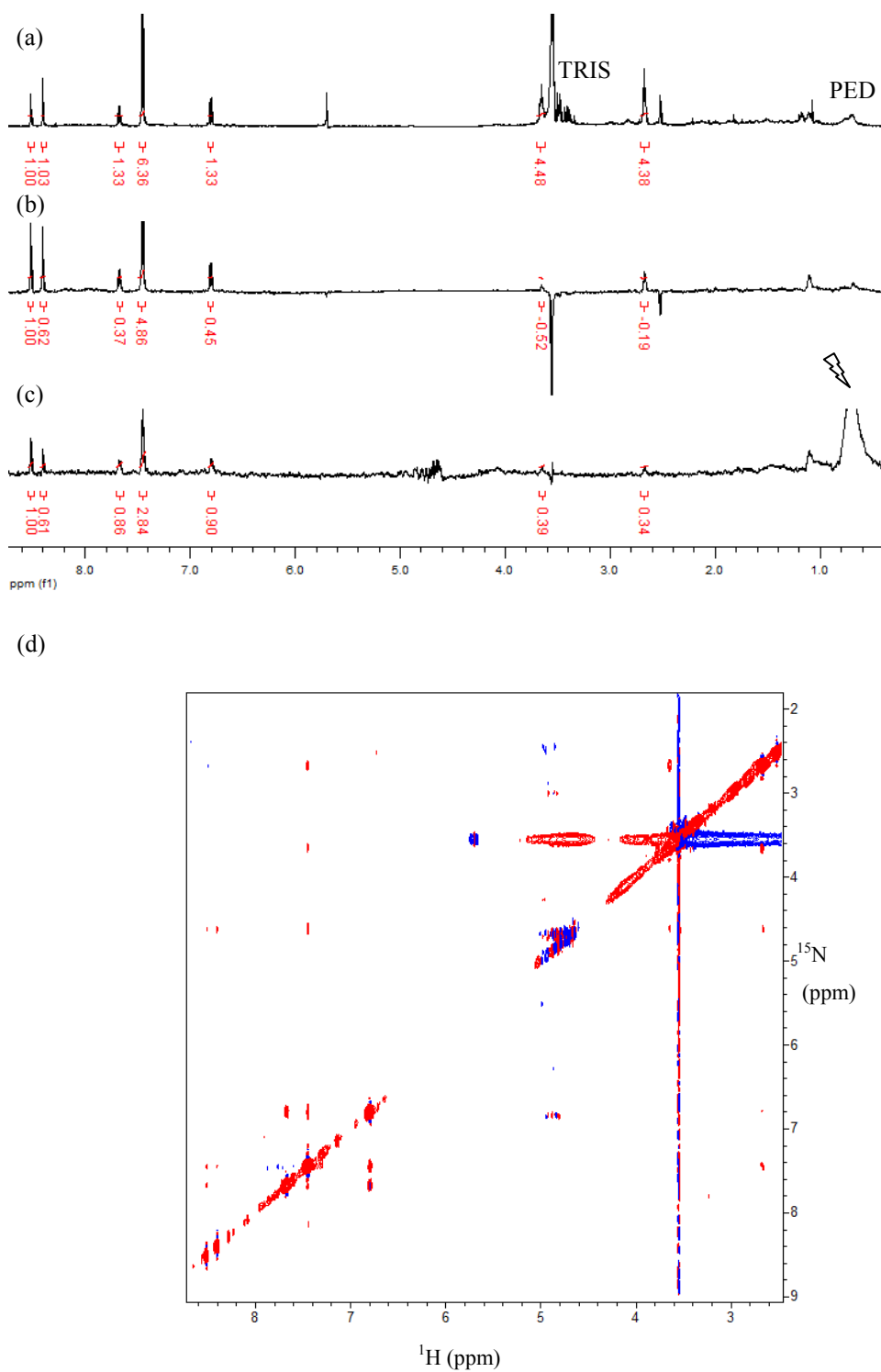


Figura 4.26 Spettro protonico (a), waterLOGSY (b), STD (c) e 2D NOESY a 350 ms di BPYZ02 (1.2 mM) in presenza di PED 20 μM . Il fulmine indica la frequenza di saturazione utilizzata nell'esperimento STD *on-resonance*.

utilizzate le intensità dei segnali waterLOGSY dei protoni aromatici del BPH14 che risuonano a 8.52 ppm ($H_{AR1-BPH}$) e 7.45 ppm ($H_{AR2-BPH}$), e del protone aromatico dell'anello pirazolico a 8.40 ppm (H_{AR-PYZ}), poiché questi segnali si presentano come dei singoletti e i valori delle loro intensità possono essere misurati con maggiore accuratezza. Le intensità waterLOGSY di $H_{AR1-BPH}$, di $H_{AR2-BPH}$ (normalizzate ad un protone), e di H_{AR-PYZ} sono state poi corrette e analizzate come in materiali e metodi (§.3.4.2). Eseguendo un *fitting* non lineare con l'equazione utilizzata per descrivere l'interazione di un ligando ad un solo sito di legame su un recettore, solo i dati relativi ai protoni $H_{AR2-BPH}$ convergono, sebbene con una funzione di correlazione R^2 di 0.97 e fornendo una K_D di 5.1 ± 2.9 mM. Tali dati non consentono di ottenere una stima finale della K_D del complesso BPYZ02-PED e suggeriscono che il composto BPYZ02 presenta una più bassa affinità per PED rispetto al BPH14, probabilmente a causa o dell'assenza di un anello aromatico legato all'anello pirazolico o del tipo di *linker* utilizzato.

Ipotizzando che una delle possibili cause di aggregazione dei composti BPYZ01 e BPH14-2x sia un *linker* troppo rigido che favorisce uno *stacking* degli anelli aromatici, è stata progettata la sintesi di composti bidentati in cui i due frammenti vengono legati ciascuno al gruppo carbossilico di un residuo di aspartico (fig. 4.27).

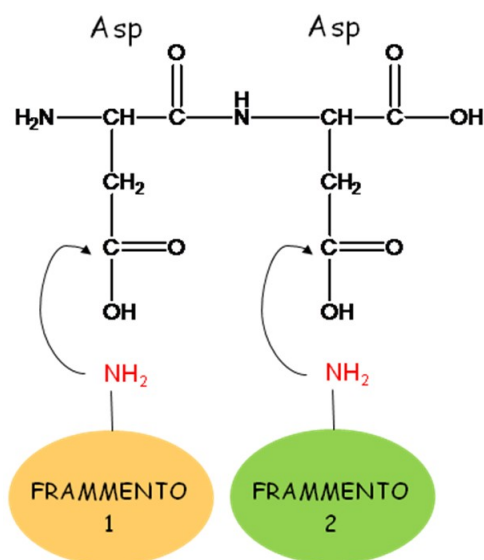


Figura 4.27 Progettazione di un composto bidentato con un *linker* dipeptidico.

In particolare, il ligando bidentato con un *linker* dipeptidico fino ad oggi sintetizzato e analizzato, possiede due BPH14 ed è stato denominato DPPT-BPH14-2X (fig. 4.28).

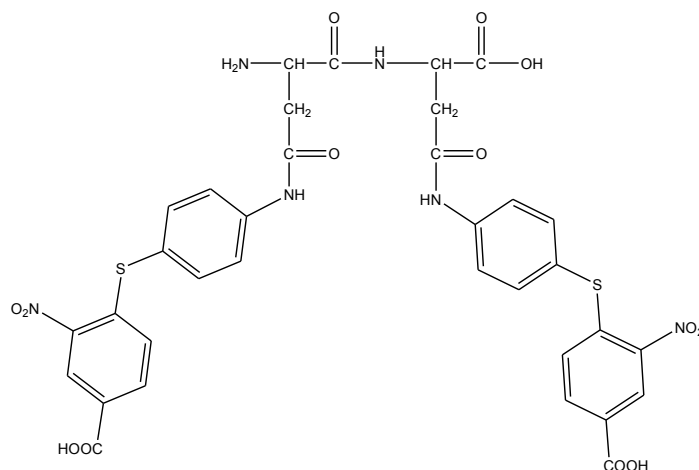


Figura 4.28 Composto bidentato con un *linker* dipeptidico: DPPT-BPH14-2X.

Tale ligando è stato analizzato, in maniera analoga ai precedenti composti bidentati, prima in assenza di proteina. In questo caso i segnali waterLOGSY del DPPT-BPH14-2X risultano essere negativi, nulli o debolmente positivi (fig. 4.29b), compatibili con un composto di peso molecolare 792 Da, suggerendo che tale molecola non presenta fenomeni di aggregazione come i composti bidentati precedentemente sintetizzati.

In presenza di una quantità substechiometrica di proteina il DPPT-BPH14-2X presenta segnali waterLOGSY positivi, segnali STD diversi da zero e NOE intramolecolari negativi, tutti sintomatici dell'interazione con PED. E' inoltre interessante osservare che un sottoprodotto di reazione copurificato con il DPPT-BPH14-2X, costituito da un composto con un solo BPH14 legato ad un Asp e il secondo Asp ciclizzato (fig. 4.29), presenta segnali waterLOGSY e STD molto meno intensi rispetto al DPPT-BPH14-2X. Tale osservazione potrebbe essere sintomatica del fatto che il DPPT-BPH14-2X lega con una maggiore affinità PED rispetto al composto con un solo bifenile. Le basse rese di reazione non hanno per ora consentito di effettuare ulteriori studi sul composto DPPT-BPH14-2X.

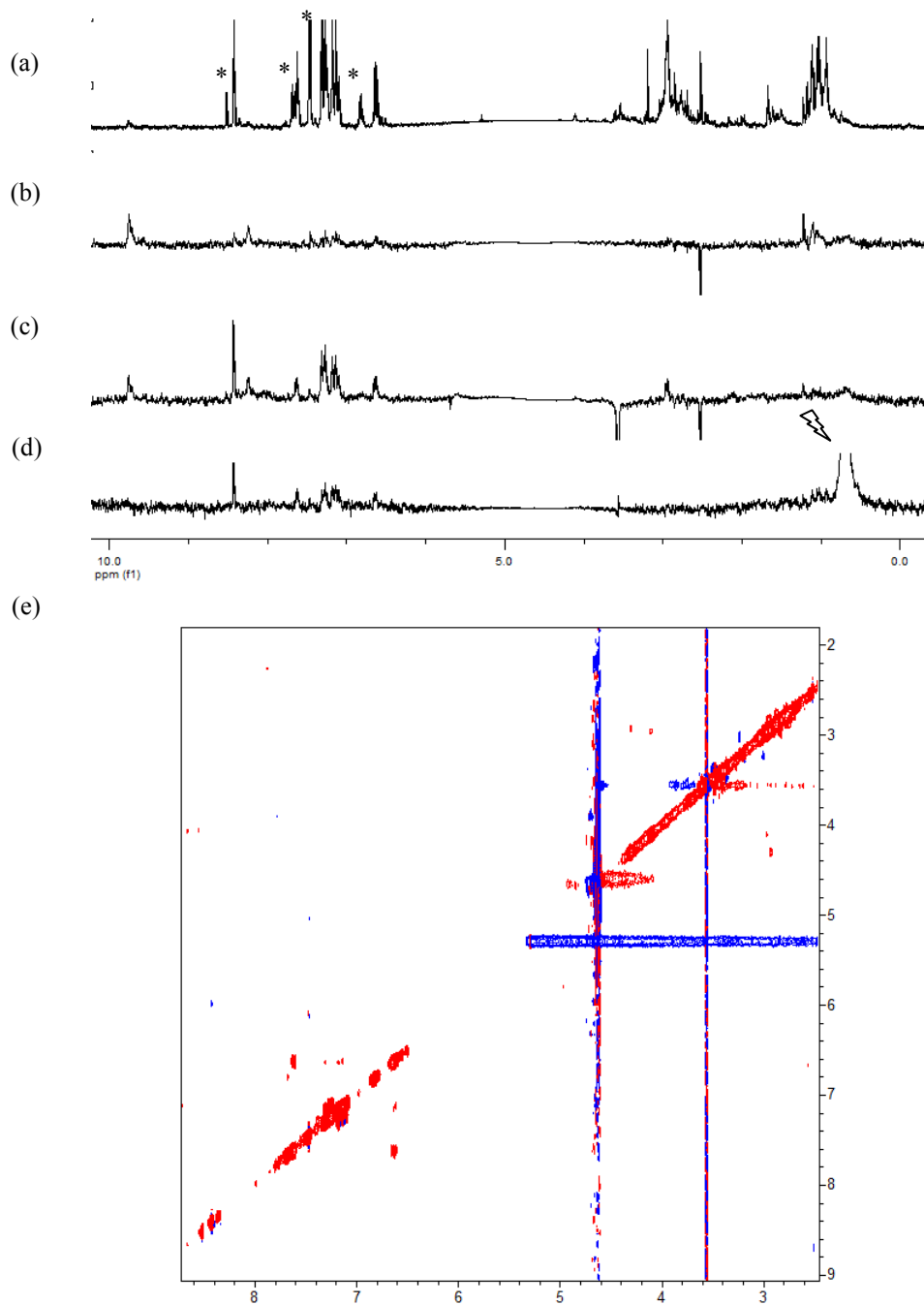


Figura 4.29 Spettri protonico (a) e waterLOGSY (b) di DPPT-BPH14-2X (~1 mM) in assenza di proteina. Con * è indicato un sottoprodotto di reazione copurificato con il DPPT-BPH14-2X. Spettri waterlogsy (c), STD (d) e 2D NOESY a 300 ms (e) di DPPT-BPH14-2X (~1 mM) in presenza di PED 15 μ M.

4.6 Docking proteina-ligando

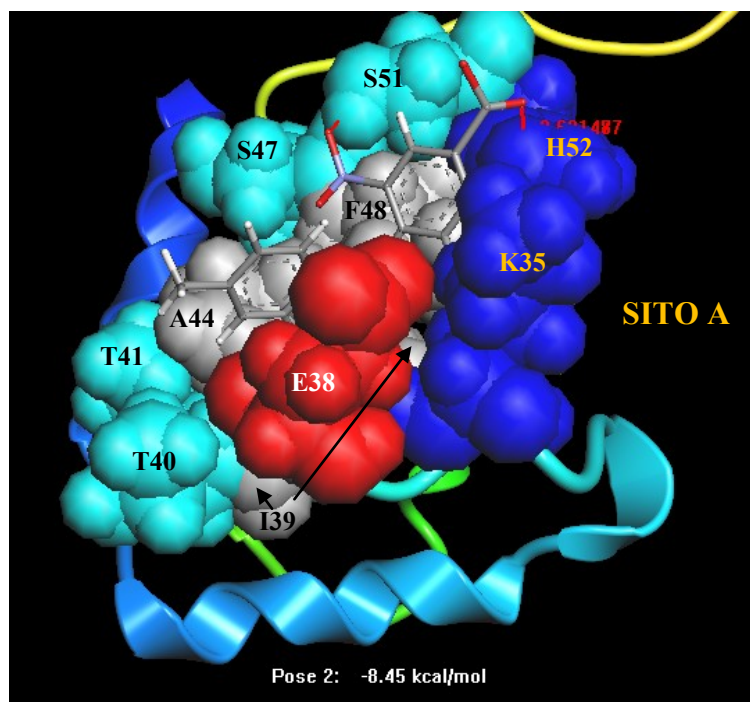
Per confermare e confrontare il sito di legame di alcuni frammenti molecolari, in associazione ai dati di *chemical shift mapping* e quelli di ILOE, e contemporaneamente supportare la sintesi di composti bidentati, un'analisi di *docking* molecolare è stata condotta mediante il programma ArgusLab (<http://www.ArgusLab.com>; Joy *et al.*, 2006) sotto la guida del dott. M. Saviano. In particolare, sono stati sottoposti a studi di *docking* gli *scaffold* bifenilici e quelli pirazolici, utilizzati nella sintesi di composti bidentati, e i loro derivati.

Anche in questa sezione, i ligandi appartenenti alle diverse classi di *scaffold* sono stati trattati separatamente. In tutti i casi gli studi di *docking* sono stati effettuati sul quarto modello della struttura tridimensionale di PED ottenuta dai dati NMR, in quanto è quella con l'RMSD (*Root Mean Square Deviation*) più basso e quindi quella più rappresentativa tra i venti modelli di struttura. Per ciascun frammento molecolare è stato creato un modello di struttura tridimensionale mediante una preliminare minimizzazione energetica della geometria, utilizzando il metodo di meccanica quantistica semi-empirico PM3 (*Parametric Method 3*; Stewart, 1989) disponibile nel programma ArgusLab. Inoltre, il *docking* è stato effettuato in una scatola centrata sulla regione che va dalla Leu17 alla Ser70, contenente i residui della proteina PED che sono risultati perturbati dall'aggiunta dei ligandi nell'analisi di *chemical shift mapping*, e considerando flessibile il ligando e rigida la proteina.

- **Bifenili: BPH03 e BPH08**

Il *docking* del frammento molecolare BPH03 ha fornito come complesso PED-BPH03 con la funzione *score* a più bassa energia (-9.29 Kcal/mol) quello in cui il BPH03 si trova nel sito di legame formato dai residui appartenenti all'elica 1 (M1, A2, Y4, G5, T6, L8, Q9, T12), all'elica 4 (S43, F46, E50) e al *loop* 4 (L55, D56, K57) (dato non mostrato). Tra questi residui solo la Leu50 risulta coinvolta nell'interazione con il BPH03 dai dati NMR, pertanto non sembrerebbe essere questo il sito di interazione osservato mediante NMR. E' invece interessante notare che i due modelli successivi di complesso PED-BPH03 con funzioni di

(a)



(b)

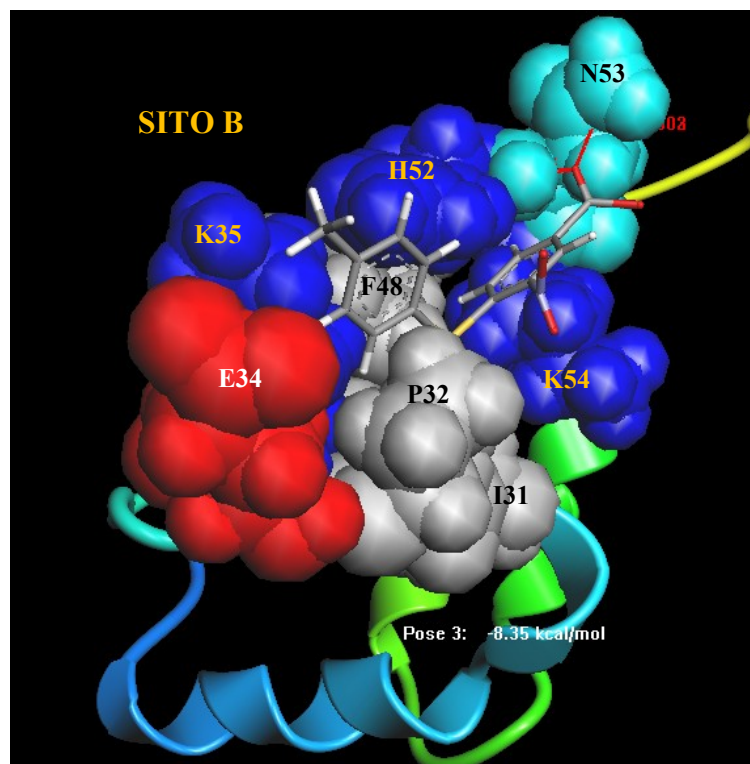


Figura 4.30 Docking del frammento BPH03 nei siti A (a) e B (b) di PED.

score di energie paragonabili, -8.45 Kcal/mol e -8.13 Kcal/mol, presentano il ligando BPH03 in due differenti e adiacenti siti di legame, denominati A e B rispettivamente, che invece includono diversi residui che risultano perturbati dall'analisi di *chemical shift mapping*. In particolare, nel complesso 2 (fig. 4.30a) il sito di legame A è costituito dai residui dell'elica 3 (K35), del *loop* 3 (E38, I39, T40, T41), dell'elica 4 (A44, W45, S47, F48, S51) e del *loop* 4 (H52), in cui si osservano due legami idrogeno, uno tra l'ossigeno del carbossile del BPH03 con l'ossidrilica della Ser51 e l'altro tra un azoto dell'anello imidazolico dell'His52, ed interazioni di Van der Waals (VDW) tra i protoni degli anelli aromatici e lo zolfo del BPH03 con le catene laterali delle Ala44, Phe48 e Lys35. Nel complesso 3 (fig. 4.30b) il sito di legame B è costituito dai residui del *loop* 2 (I31, P32), dell'elica 3 (E34, K35), dell'elica 4 (F48, L49) e del *loop* 4 (H52, N53, K54), stabilizzato dalla formazione di due legami idrogeno tra l'ossigeno del carbossile del BPH03 con l'ossigeno del *backbone* e con l'azoto ammidico della catena laterale dell'Asn53, e diverse interazioni di VDW tra gli anelli aromatici e le catene laterali delle Lys35, His52, Pro32 e Lys54.

E'interessante notare che i due siti hanno in comune la Lys35 e l'His52 entrambi risultanti coinvolti nell'interazione PED-BPH03 dagli studi NMR, inoltre residui che sono presenti solo in un sito e non nell'altro come la Ser51 e l'Ile31 sono perturbati dall'aggiunta del BPH03. Da tali dati e dai dati NMR di *chemical shift mapping* non essendo possibile escludere nessuno dei due siti, è possibile avvalorare l'ipotesi che il BPH03 leghi entrambi i siti di PED, secondo cui i NOE tra i protoni aromatici vicino al carbossile e i protoni del metile sull'altro anello aromatico sono dei NOE interligando tra due molecole di BPH03 legate alla proteina PED in un complesso ternario (fig. 4.31).

Il docking del frammento BPH08 nella regione Leu17-Ser70 di PED fornisce come primo modello a più bassa energia (-9.48 Kcal/mol), un complesso in cui il BPH08 è localizzato nel sito B, con anche l'Asp30 e la Tyr62 coinvolte nell'interazione (fig. 4.32a).

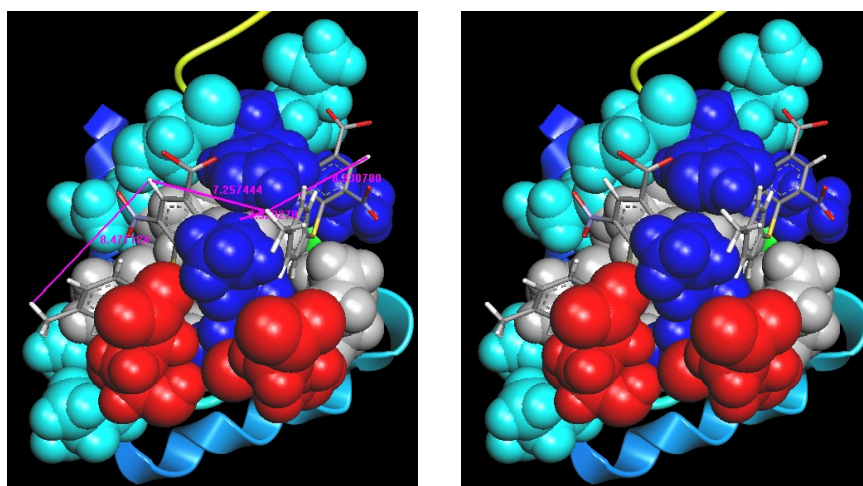


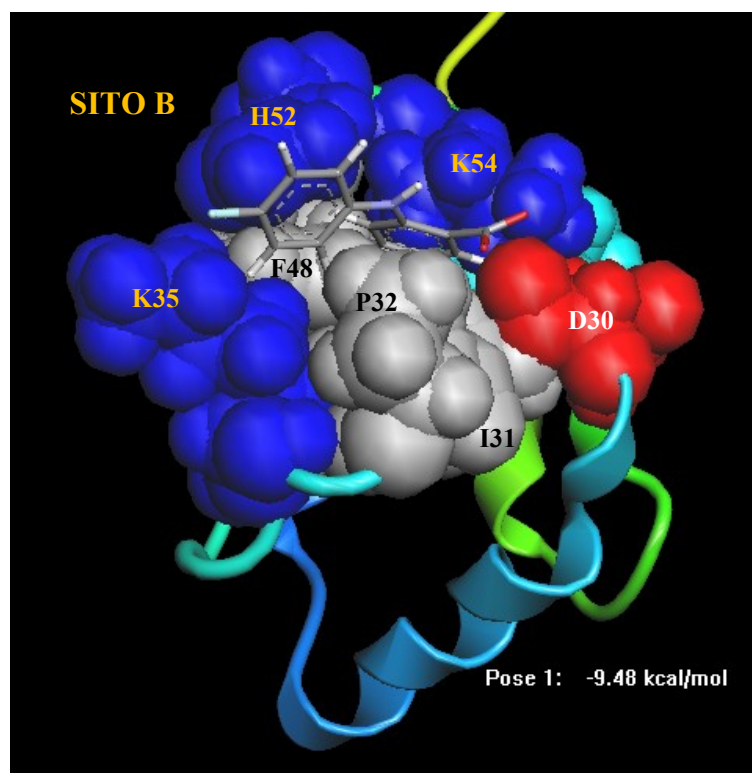
Figura 4.31 Docking di due frammenti di BPH03 contemporaneamente legati nei siti A e B di PED.

In questo caso il carbossile del BPH08 forma un solo legame H con il gruppo amminico della Lys54 anziché con il gruppo ammidico dell'Asn53 come nel caso del BPH03. Andando ad analizzare gli altri complessi a più bassa energia si osserva che il secondo complesso è ancora costituito dal BPH08 nel sito B ma con un'energia abbastanza più bassa (-7.75 Kcal/mol), mentre tra gli altri possibili complessi nei quali il sito di interazione contiene residui che variano dall'analisi di *chemical shift mapping* vi è il quarto modello (fig. 4.32b). In questo complesso di energia pari a -7.13 Kcal/mol il sito di interazione, denominato sito C, comprende i residui His65 e Ile69 dell'elica 5, gli altri residui la Gln22 e l'Ala26 dell'elica 2 e la Ser70 e l'Arg71 del *loop* 5 non risultano però perturbati nell'analisi di *chemical shift mapping*. Nel caso del bifenile BPH08 non è stato trovato dal calcolo effettuato un complesso in cui il BPH08 è localizzato nel sito A, se non tra quelli ad energia molto più bassa (*pose* 42, $E = -6.23$ Kcal/mol) (dato non mostrato).

- **Pirazoli: PYZ19, PYZ30, PYZ07**

L'analisi di docking del frammento PYZ19 nella regione Leu17-Ser70 ha fornito come miglior complesso di energia pari a -7.98 Kcal/mol quello in cui il PYZ19 è localizzato nel sito A, in accordo con la perturbazione dei residui di Ser51 e Trp45 (fig. 4.33a). In questo complesso un legame H è formato tra uno degli atomi di

(a)



(b)

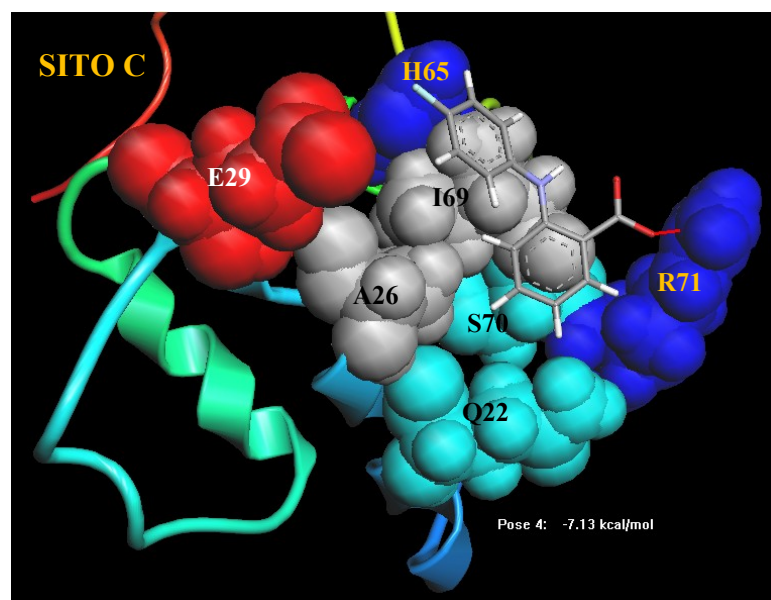
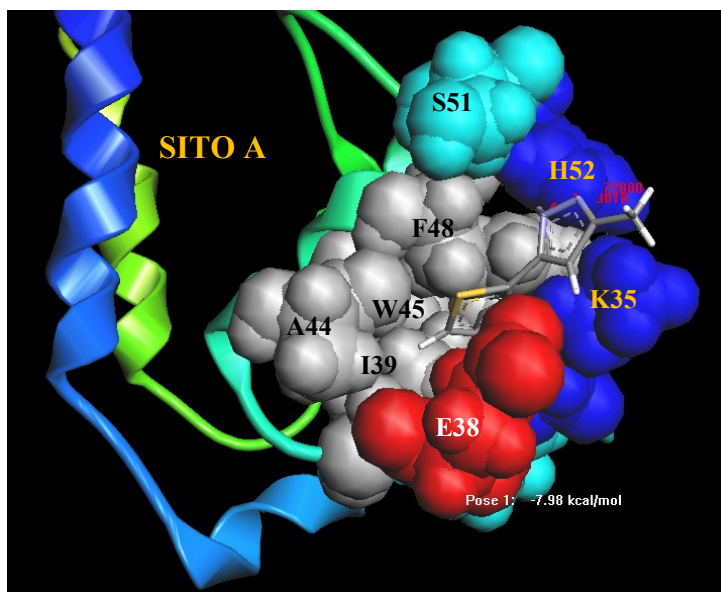


Figura 4.32 Docking del frammento BPH08 nel sito B (a) e C (b) di PED.

(a)



(b)

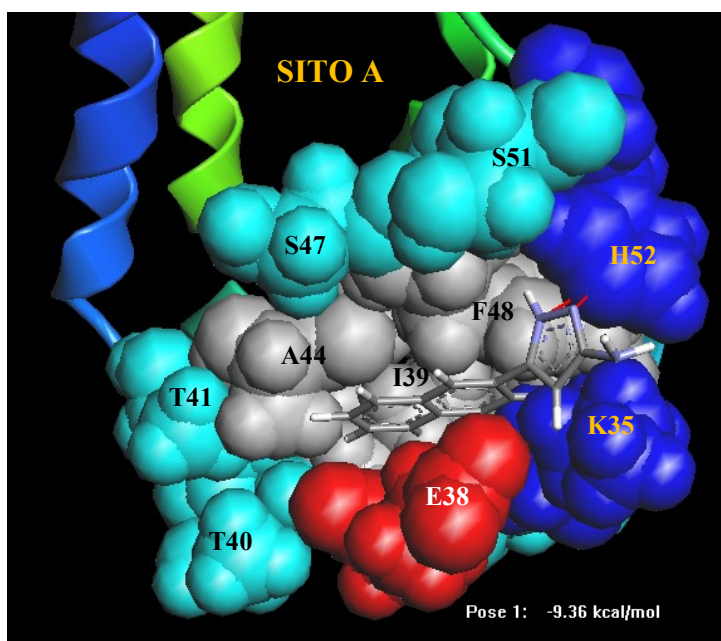


Figura 4.33 Docking del frammento PYZ19 (a) e PYZ07 (b) nel sito A di PED.

azoto dell'anello pirazolico e con un protone dell'anello imidazolico dell'His52, e 19 interazioni di VDW sono stabilite con K35 (10), E38 (1), F48 (7), H52 (1). Gli altri complessi invece non sono compatibili con i dati sperimentali NMR e presentano energie superiori a -7 Kcal/mol.

Il PYZ30, l'analogo del PYZ19 che è stato acquistato per la sintesi di ligandi bidentati e che possiede un gruppo amminico al posto di quello metilico sull'anello pirazolico, è stato sottoposto a studi di *docking* sempre nella regione Leu17-Ser70 di PED. Tale analisi ha mostrato che esso è ancora in grado di legare PED nel sito A formando un complesso di energia paragonabile a quella del PYZ19 pari a -7.37 Kcal/mol (dato non mostrato). La presenza del gruppo amminico consente la formazione di un legame H con uno degli atomi di azoto dell'anello imidazolico, mentre l'HN del pirazolo forma un legame H con l'ossigeno carbossilico del Glu38.

L'altro frammento analizzato mediante *virtual docking* di cui è stata eseguita l'analisi di *chemical shift mapping* e che ha mostrato dei NOE interligando con il BPH03 è il PYZ07. Il *docking* nella regione Leu17-Ser70 del PYZ07 ha fornito come complesso a più bassa energia quello in cui il PYZ07 è situato nel sito A della proteina PED come per il PYZ19, sebbene l'energia di questo complesso risulta essere di circa due unità più bassa di quello tra PED e PYZ19 (-9.36 kcal/mol) (fig. 4.33b). Tale dato potrebbe essere in accordo con le minori variazioni di chemical shift osservate nell'HSQC di PED in seguito all'aggiunta del PYZ19 rispetto a quelle indotte dal PYZ07. In questo caso, nel modello di complesso PED-PYZ07 si formano due legami H tra l'anello pirazolico del PYZ07 e l'anello imidazolico dell'His52, e 25 interazioni di VDW, 22 tra l'anello naftalenico del PYZ07 e le catene laterali di K35 (6), E38 (3), F48 (2), I39 (5), A44 (4), e 3 tra l'anello pirazolico del PYZ07 e le catene laterali di K35 (2) e F48 (1).

Capitolo 5

Risultati e discussione: studi NMR della dinamica del *backbone* della proteina PED e della sua interazione con D4 α

5.1 Dinamica del *backbone* della proteina PED in forma libera

Una migliore comprensione del meccanismo di riconoscimento molecolare di PED tanto con i ligandi identificati quanto con i suoi partner proteici di interazione naturale, FADD (*Fas-Associated Death Domain*), ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) e PLD (fosfolipasi D), può essere ottenuta andando ad analizzare le relazioni che intercorrono tra la struttura e la dinamica di tale proteina.

Al fine di determinare il ruolo della dinamica nei processi di interazione, è necessario caratterizzare i movimenti residuo-specifici di PED nella sua forma libera. Come detto nel capitolo 2, la spettroscopia NMR è in grado di caratterizzare movimenti interni o globali su un'ampia scala dei tempi mediante la misura delle velocità di rilassamento longitudinale e trasversale del ^{15}N , R_1 e R_2 , e del NOE eteronucleare $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$. In particolare, tutti e tre i parametri di rilassamento possono fornire informazioni relative ai movimenti della proteina PED che avvengono nei pico- e nanosecondi (*fast time scale*), in più la velocità di rilassamento R_2 anche sui movimenti molecolari nell'ambito dei milli- e microsecondi (*slow time scale*).

5.2 Misure di rilassamento del ^{15}N del *backbone* di PED

I tre parametri di rilassamento, R_1 , R_2 e $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ NOE, sono stati misurati acquisendo particolari esperimenti bidimensionali di eterocorrelazione [^{15}N , ^1H] HSQC (§ 2.9) della proteina PED uniformemente marcata con ^{15}N a 600MHz alla temperatura di 298K. Nello spettro [^{15}N , ^1H] HSQC, oltre alle sette proline non rilevabili per l'assenza del protone ammidico, vi sono altri residui non ben

visibili: Thr40, Arg101, Ser104, Ala105, Lys106, Lys107, Tyr108, Lys109, Asp110, Ile111, ciò potrebbe essere dovuto al fatto che tali residui presentano uno scambio chimico intermedio che determina un allargamento dei corrispondenti picchi di correlazione. Escludendo inoltre i residui con picchi di correlazione sovrapposti ad altri, un totale di 101 residui sono stati utilizzati per la misura dei T_2 e dei NOE, e 103 residui per la misura dei T_1 .

In Figura 5.1a-d sono riportati gli spettri HSQC di *inversion recovery* e *CPMG* (§ 3.8) acquisiti al più breve e al più lungo tempo di *mixing* per la misura dell' R_1 e dell' R_2 del ^{15}N di ciascun residuo. Mentre in Figura 5.1e-f sono mostrati i due esperimenti HSQC con e senza saturazione del ^1H per l'analisi dei NOE eteronucleare.

Le intensità dei picchi di correlazione di ciascun residuo amminoacidico nei tre tipi esperimenti sono state misurate (tabb. A2.1, A2.2 3 A2.3 in appendice) e rielaborate come descritto in materiali e metodi (§ 3.9). I valori di R_1 e di R_2 e dei NOE eteronucleare di ciascun residuo con il rispettivo errore (tab. A2.4 in appendice) sono mostrati nel grafico in figura 5.2a-b e 5.3b. La media di tali valori con il rispettivo errore, dato dalla deviazione standard, è:

$$R_{1_{av}} = (1.6 \pm 0.2) \text{sec}^{-1}$$

$$R_{2_{av}} = (11.9 \pm 3.1) \text{sec}^{-1}$$

$$\text{NOE}_{av} = (0.60 \pm 0.03) \text{sec}^{-1}$$

Dai valori di R_1 e di R_2 è stato poi calcolato il rapporto R_2/R_1 per ogni amminoacido (tab. A2.4 in appendice), e riportato in grafico in funzione del numero del residuo (fig 5.3a).

Il valore medio del rapporto R_2/R_1 è dato da:

$$\left\langle \frac{R_2}{R_1} \right\rangle = 7.5 \pm 2.5$$

Per meglio valutare l'andamento delle costanti di velocità di rilassamento in relazione alla struttura secondaria sono stati calcolati i valori medi degli R_1 , R_2 , NOE e del rapporto R_2/R_1 per ciascun elemento di struttura secondaria (tab. 5.1) e riportati nei grafici nelle figure 5.3 e 5.4.

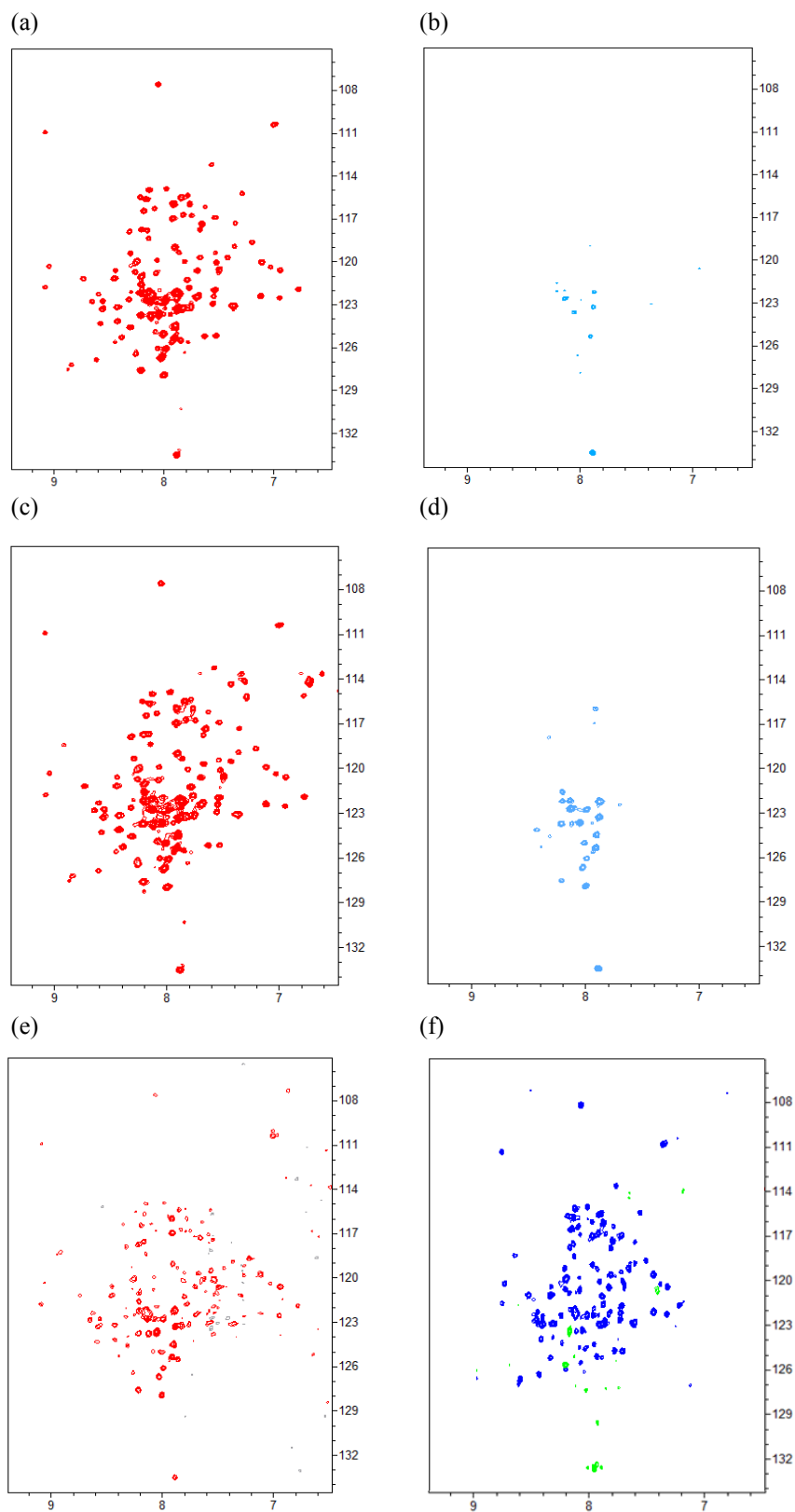


Figura 5.1 Spettri 2D [^1H , ^{15}N] HSQC di *Inversion Recovery* con $\tau = 0.01$ s (a) e $\tau = 1$ s (b) per la misura degli R_1 , e *Spin echo* con $\tau = 0.01$ s (d) e $\tau = 0.15$ s (e) per la misura degli R_2 ; spettri 2D [^1H , ^{15}N] HSQC acquisiti in condizioni di non saturazione (f) e saturazione (g) del protone per la misura dei $^{15}\text{N} \{^1\text{H}\}$ NOE. In (g) i picchi positivi sono in blu e quelli negativi in verde.

I dati ottenuti dalla misura degli R_1 , si presentano piuttosto omogenei nella regione del dominio DED, sebbene:

- I residui delle eliche $\alpha 1$ (Y4, G5, Q9), e $\alpha 6$ (D74, L75, M78, V80, D81, Y82, R83, R85, V86), del *loop4* (L60) e del *loop5* (S70) presentano valori più bassi rispetto al valore medio, con il minimo valore per il residuo Leu75, suggerendo per queste regioni una maggiore flessibilità nella scala dei ps-ns.
- I residui dell'elica $\alpha 3$ (S36) e dei *loop2* (K28), *loop3* (E38) e *loop4* (H52 e N53) mostrano valori più alti rispetto al valore medio, con il massimo valore per il residuo His52 (1.86 s^{-1}), indicando che queste regioni potrebbero avere movimenti lenti nella scala dei ps-ns.

Struttura	Residui	R_1	R_2	R_2/R_1	NOE
$\alpha 1$	A2-N13	1.46	13.96	9.62	0.77
<i>Loop1</i>	N14-T16	1.59	13.22	8.31	0.84
$\alpha 2$	L17-C27	1.60	12.18	7.61	0.84
<i>Loop2</i>	K28-P32	1.71	12.81	7.49	0.79
$\alpha 3$	S33-S36	1.68	12.75	7.61	0.50
<i>Loop3</i>	E37-T41	1.68	14.13	8.45	0.68
$\alpha 4$	G42-S51	1.61	12.40	7.68	0.85
<i>Loop4</i>	H52-L60	1.57	12.07	7.78	0.87
$\alpha 5$	S61-I69	1.59	15.47	9.72	0.75
<i>Loop5</i>	S70-P73	1.46	13.04	8.97	0.73
$\alpha 6$	D74-I89	1.40	14.14	10.17	0.78
<i>Coda1</i>	S90-D119	1.93	8.27	4.30	0.27
3_{10}	I120-L123	1.86	6.43	3.45	0.03
<i>Coda2</i>	A124-A130	1.38	6.08	4.17	-0.7

Tabella 5.1 Valori medi degli R_1 , R_2 , R_2/R_1 e NOE per ciascun elemento di struttura secondaria di PED.

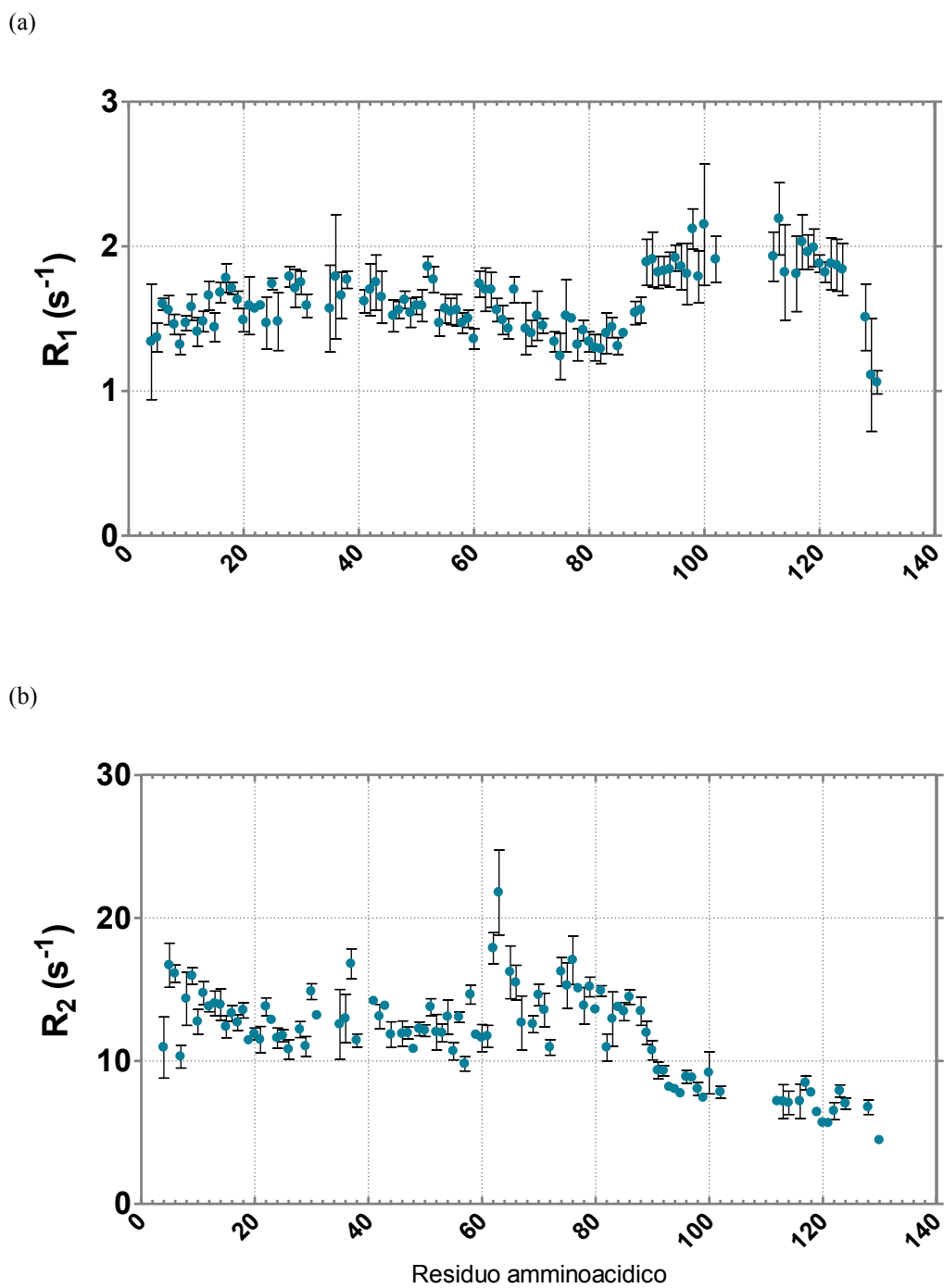
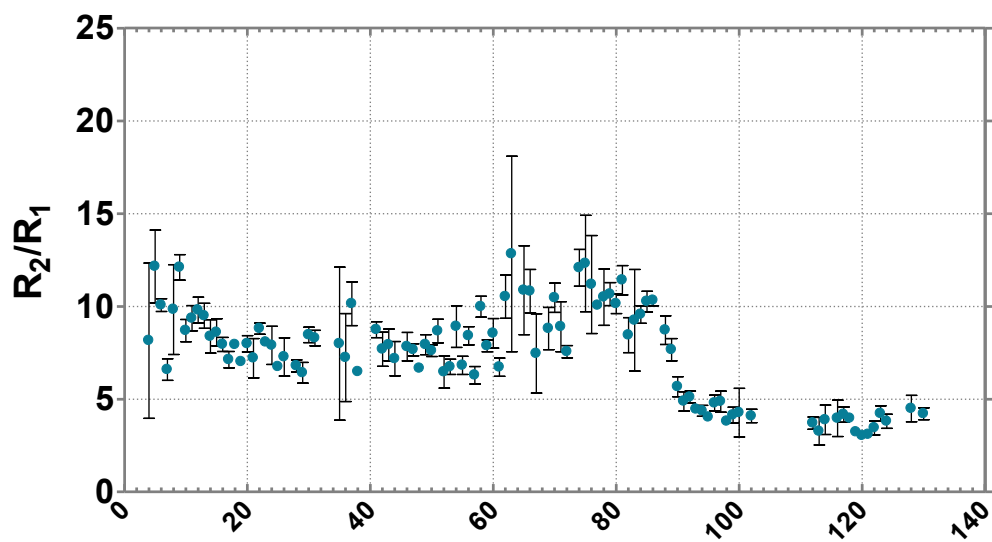


Figura 5.2 Costanti di velocità di rilassamento longitudinale (a) e trasversale (b) di PED a 600 MHz. Le barre di errore nei grafici indicano gli errori del *fitting*.

(a)



(b)

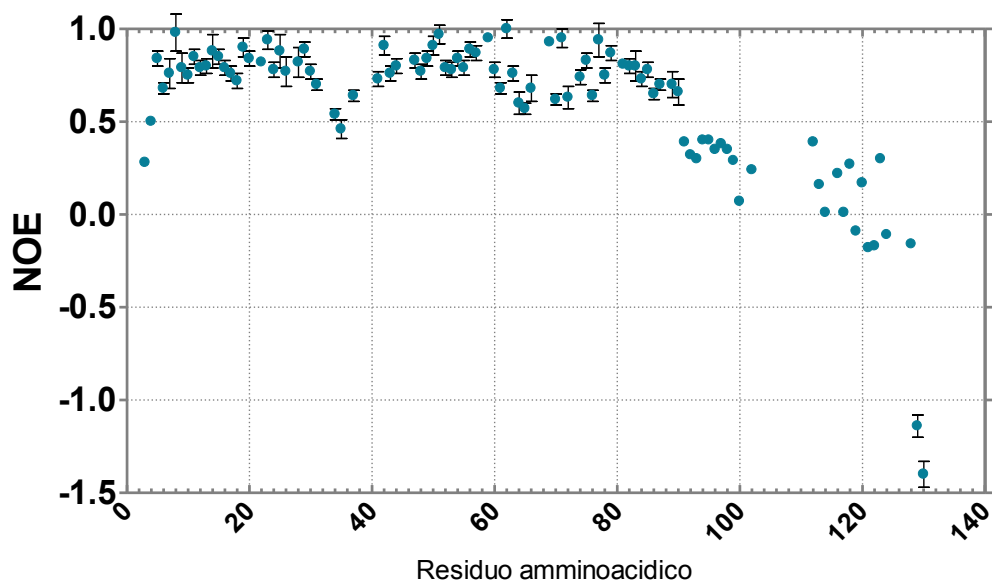


Figura 5.3 Rapporto delle costanti di velocità di rilassamento R_2/R_1 (a) e NOE eteronucleare (b) di PED a 600 MHz. Gli errori nel grafico (a) sono ottenuti dalla legge di propagazione degli errori, mentre nel grafico (b) sono uguali al 5% del valore.

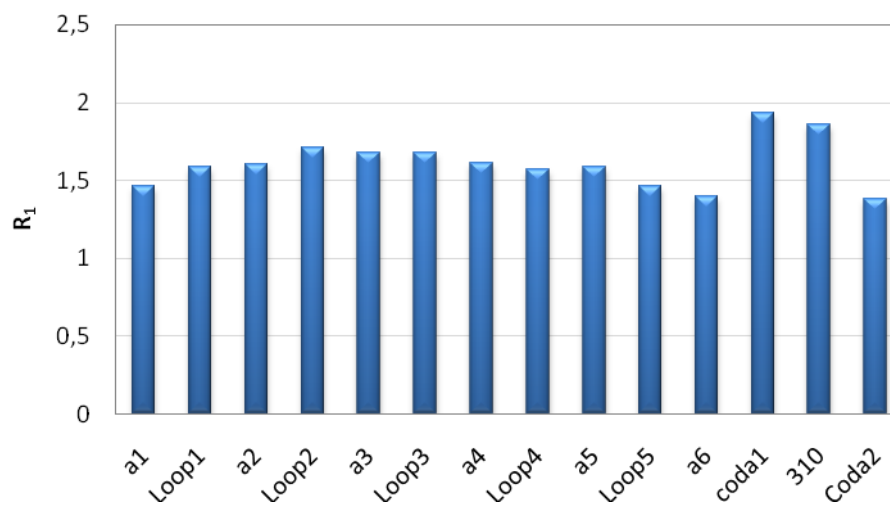
Inoltre, è interessante notare che i residui della coda C-terminale, in particolare quelli della coda 1 e dell'elica 3₁₀, hanno più alti valori rispetto alla media. Elevati valori di R₁ potrebbero essere correlati con fluttuazioni interne nei nanosecondi (Jin *et al.*, 1998). Gli ultimi residui della coda C-terminale (K128-K130, coda2) presentano valori degli R₁ più bassi rispetto al valore medio sintomatici di movimenti veloci nella scala dei ps-ns.

Dall'analisi degli R₂ è possibile osservare che i residui coinvolti nella formazione delle α -eliche 1 (G5, T6, Q9), 5 (Y62, I63, H65, I66) e 6 (D74, L75, L76, T77, V79) e un residuo del *loop3* (E37) esibiscono elevati valori di R₂, con il massimo valore per il residuo Ile63 (21.78 s⁻¹), suggerendo per questi un lento movimento su *slow time-scale* (μ s-ms). Inoltre, i residui della coda C-terminale mostrano un notevole decremento dei valori di R₂ sintomatici di movimenti veloci nella scala dei μ s-ms.

I valori del NOE eteronucleare della regione carbossi-terminale presentano un andamento analogo a quello degli R₂, infatti la loro diminuzione fino a valori negativi, osservati per Asp119, Ile121, Lys122, Ala124, Lys128, Lys129, Ala130, è sintomatica di una elevata flessibilità nella scala dei ps-ns. Inoltre, anche secondo questo parametro la proteina PED assume una struttura abbastanza rigida (NOE > 0.65) in corrispondenza delle α -eliche 1 (ad eccezione di E3 e Y4), 2 e 4 e dei *loop* 1, 2 e 4. Mentre i residui dell' α -elica 3 (E34, K35), alcuni residui delle α -eliche 5 (E64, H65) e 6 (L76, V86) e dei *loop3* (E37) e 5 (S70, R72) presentano dei valori dei NOE eteronucleari inferiori a 0.65, sintomatici di veloci movimenti nella scala dei ps-ns.

L'andamento dei dati di R₂/R₁ risulta analogo a quello precedentemente osservato per quelli di R₂. Infatti, i residui delle eliche α 1, α 5 e α 6 e del *loop5*, presentano maggiori rapporti R₂/R₁ rispetto alla media mentre tutti i residui della coda C-terminale mostrano un forte decremento dei valori di R₂/R₁.

(a)



(b)

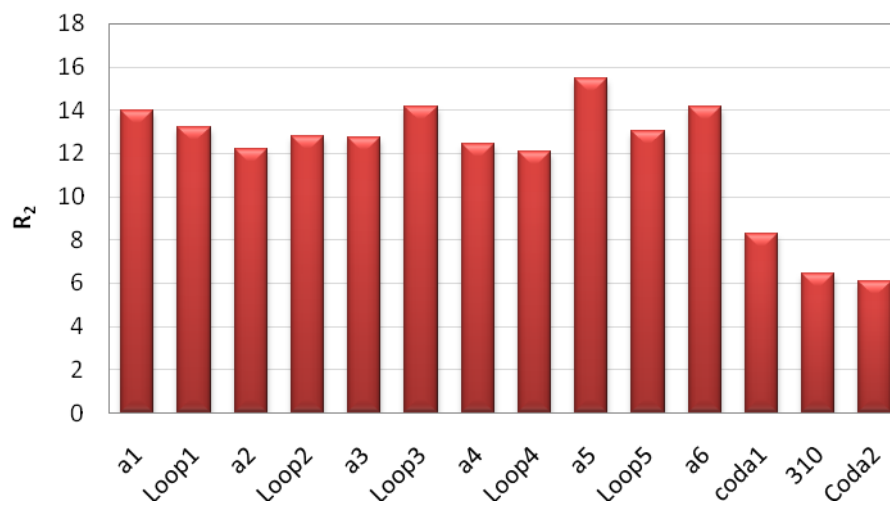
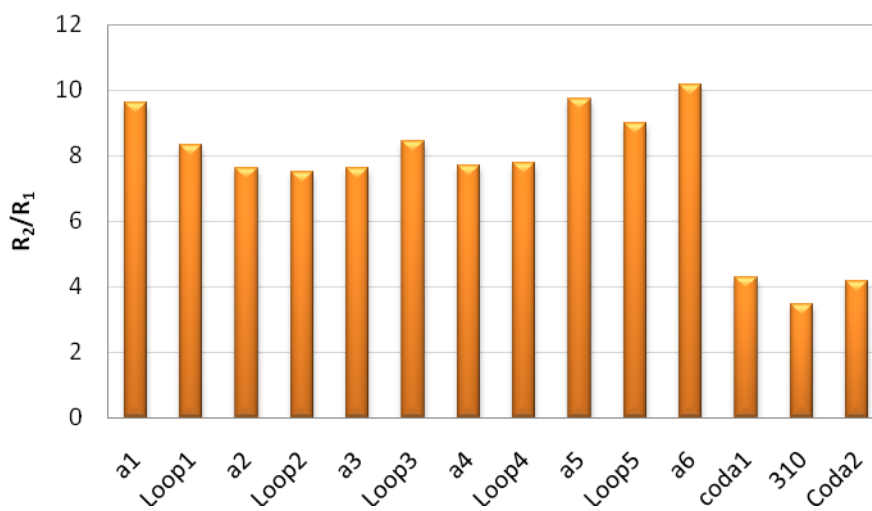


Figura 5.4 Andamento delle costanti di velocità di rilassamento del ^{15}N di PED R_1 (a) e R_2 (b) in relazione ai suoi elementi di struttura secondaria.

(a)



(b)

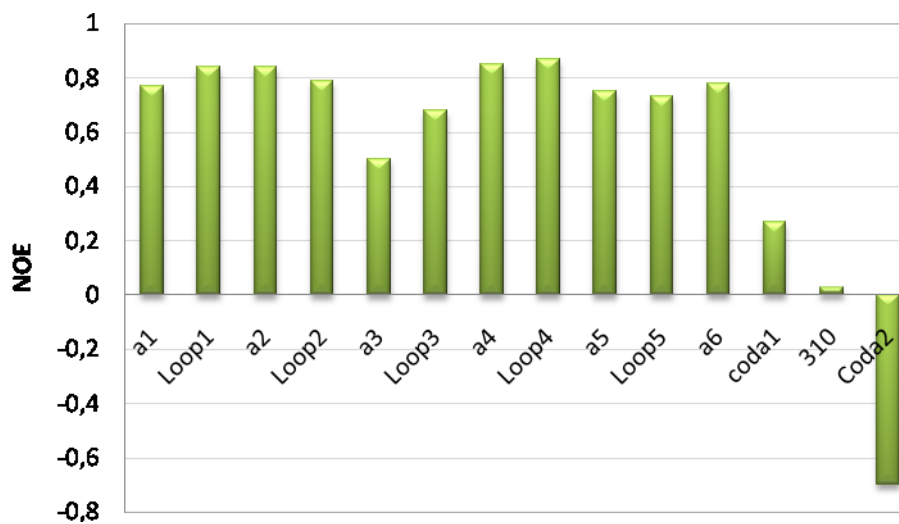


Figura 5.5 Andamento del rapporto $^{15}\text{N } R_2/R_1$ (a) e dei $^{15}\text{N } \{^1\text{H}\}$ NOE (b) di PED in relazione ai suoi elementi di struttura secondaria.

Il diverso andamento degli R_1 e degli R_2 può essere spiegato con la diversa dipendenza dal τ_c delle velocità di rilassamento longitudinale e trasversale del ^{15}N (fig. 2.16). In particolare, R_1 aumenta e poi diminuisce con il τ_c con un valore massimo che dipende dal campo magnetico esterno e dal tempo di correlazione effettivo. R_2 invece è circa uguale ad R_1 nel regime *extreme narrowing* e poi incrementa linearmente con l'aumentare del τ_c . Le proteine generalmente presentano un rapporto $R_2/R_1 > 1$. E' possibile ipotizzare che i residui della coda hanno un valore di τ_c minore rispetto a quello del dominio DED e pertanto presentano valori di R_1 più alti e valori di R_2 più bassi.

5.3 Stima del tempo di correlazione e del modello di diffusione rotazionale

Quando il movimento di rotazione della proteina è isotropico, il rapporto R_2/R_1 è dipendente solo dal *tumbling* complessivo della molecola e la relazione tra il tempo di correlazione rotazionale globale della molecola (τ_m) e R_2/R_1 è data da una semplice relazione (Kay *et al.*, 1989; § 3.7). Tale condizione è verificata per quei residui che non presentano moti interni molto veloci rispetto a *fast time scale* ($\text{NOE} < 0.65$) e/o contributi di scambio chimico/conformazionale al rilassamento del ^{15}N ($R_2/R_1 > R_2/R_1_{\text{av}} + \text{S.D.}$) (§ 3.7). In tal modo, 53 residui dei 101 considerati nella misura degli R_2 e R_1 sono stati utilizzati per ricavare il tempo di correlazione di ciascun residuo, equivalente al tempo di correlazione globale della molecola (tab. A2.5 in appendice). Una stima iniziale del τ_m è stata ricavata dalla media dei valori dei singoli τ_m :

$$\tau_m = (8.3 \pm 0.6) \text{ nsec}$$

Questo valore è pressoché consistente con il tempo di correlazione globale aspettato per una proteina di monomericità di 130 residui, come si osserva dalla correlazione del τ_m e della massa molecolare di 26 proteine studiate mediante rilassamento del ^{15}N (Maciejewski *et al.*, 2000). Questo risultato sembra quindi suggerire che tale proteina è prevalentemente monomericità nelle condizioni analizzate.

Il basso numero di residui che supera i filtri suddetti, principalmente a causa dei bassi valori dei NOE della regione C-terminale, suggerisce che la descrizione del *tumbling* molecolare in termini di un solo tempo di correlazione potrebbe essere inadatta per la proteina PED. Per stimare i possibili effetti di diffusione rotazionale anisotropica, i momenti principali del tensore di inerzia della proteina PED sono stati determinati dalle coordinate del modello di struttura NMR più rappresentativo (modello 4) utilizzando il programma *pdb-inertia* (Lee *et al.*, 1997). I rapporti dei momenti principali di PED risultano essere: 1.00:0.61:0.42, indicando una diffusione rotazionale vicina a quella assialmente simmetrica.

5.4 Analisi *model-free*

L'analisi *model-free* mediante il formalismo di Lipari Szabo è l'approccio più comunemente utilizzato per l'interpretazione dei dati di rilassamento in termini di parametri di moto. L'assunzione fondamentale di questo approccio, che i moti interni e globali sono separabili, consente di esprimere le funzioni densità spettrali in termini del parametro d'ordine generalizzato, S^2 , che descrive l'ampiezza del moto, e il tempo di correlazione del vettore H-N. Un passaggio fondamentale nell'analizzare le velocità di rilassamento usando il *Model-free* è di identificare un appropriato modello di diffusione. Per questo scopo, il modello di diffusione è stato determinato con il programma *quadric_diffusion* (Lee *et al.*, 1997) dal rapporto R_2/R_1 dei 53 residui che non presentano movimenti interni veloci e scambi conformazionali che influenzano significativamente le misure di rilassamento. L'appropriato modello di diffusione è stato scelto dal confronto dei valori del χ^2_{red} e dell'F-test dei modelli isotropico, assiale e anisotropico. Tutti e tre i modelli hanno fornito valori alti del χ^2_{red} , con il valore più basso osservato per il modello di diffusione assialmente simmetrico:

Isotropico	$\chi^2_{\text{red}} = 147$
Assialmente isotropico	$\chi^2_{\text{red}} = 131$
Anisotropico	$\chi^2_{\text{red}} = 153$

Considerando l'F-test, il modello assialmente simmetrico è risultato più appropriato sia rispetto a quello isotropico (F-test = 3.2), sia rispetto a quello

anisotropico ($F\text{-test} < 1$). Pertanto, il modello di diffusione che meglio descrive il comportamento rotazionale della proteina PED è quello assialmente simmetrico, per cui l'iniziale stima del rapporto D_{\parallel}/D_{\perp} risulta pari a 1.3 ± 0.1 e quella di θ e ϕ uguali a 0.16 ± 0.23 e -0.74 ± 0.91 radianti, rispettivamente.

Degli 83 residui che sono stati analizzati mediante il Model-free, 13 sono stati *fittati* con il modello LS1, 17 con il modello LS2, 13 con il modello 3, (tab. A2.6 in appendice e fig. 5.6). 40 residui non sono stati fittati con nessuno dei cinque tradizionali modelli del model-free. I valori di S^2 dei residui del dominio DED sono molto vicini ad 1 ($\langle S^2 \rangle = 0.96 \pm 0.05$), mentre quelli della coda hanno un valore medio di 0.53 ± 0.08 . Inoltre, i tempi di correlazione interni per i residui Ser90-Ala130 approssimano a 1 ns (0.98 ± 0.14).

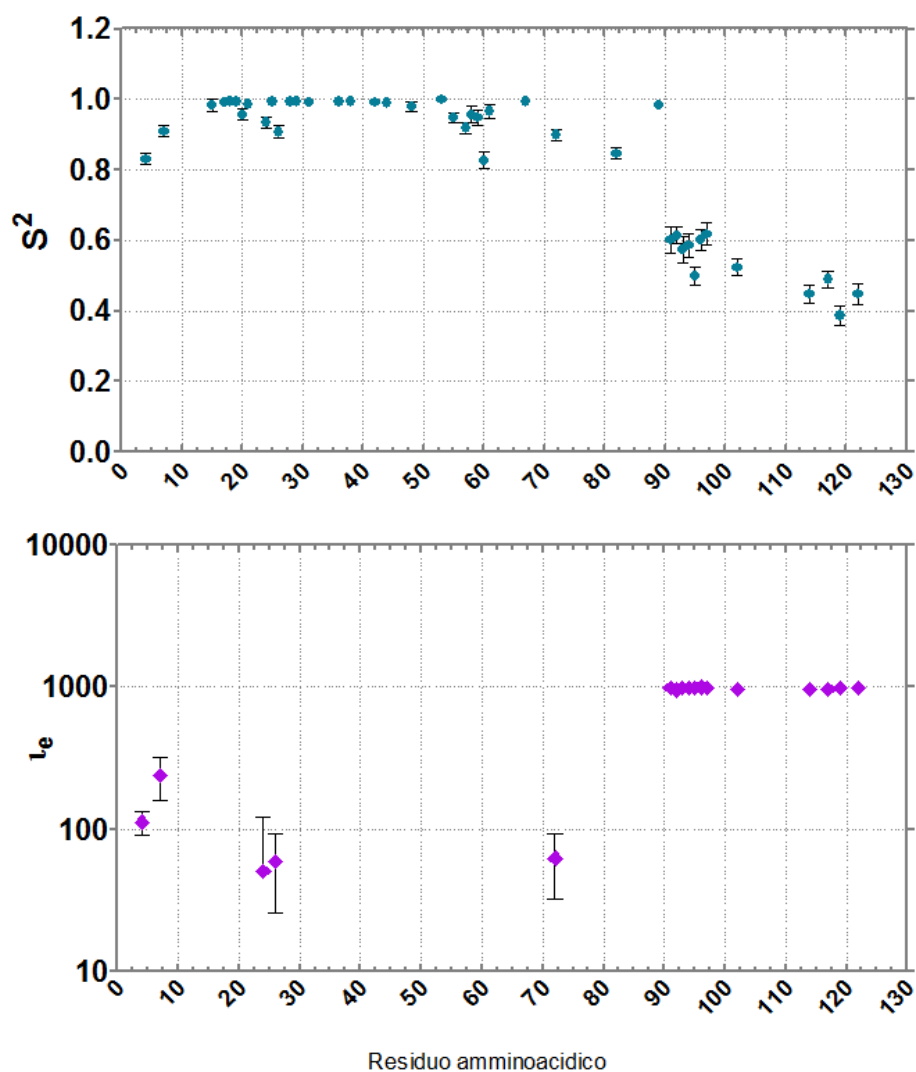


Figura 5.6 Parametri microdinamici ottenuti dall'analisi *model-free* dei dati di rilassamento del *backbone* della proteina PED.

Tutti questi dati indicano che il *model-free* fallisce nel descrivere adeguatamente i movimenti della proteina PED. Infatti, quando il valore di $S^2 \rightarrow 1$, il parametro d'ordine perde sensibilità alle velocità di rilassamento osservate e diventa meno affidabile. Inoltre, il fatto che i residui della coda presentano movimenti nei nanosecondi ($\tau_e \sim 1000$ ps), introduce un notevole errore nel calcolo del *model-free* e preclude un'interpretazione quantitativa dei parametri ottenuti dal *fitting* (Korzhenov *et al.*, 1997; Vugmeyster *et al.*, 2003).

5.5 Mappatura delle densità spettrali ridotte

Per ottenere più informazioni sulle scale dei tempi dei movimenti che influenzano il rilassamento, le funzioni densità spettrali ridotte $J_{\text{eff}}(0)$, $J(\omega_N)$ e $J(0.87\omega_H)$ sono state calcolate per ogni residuo. (tab. A2.7 in appendice). In Figura 5.7 si osserva che vi sono differenze di moto tra i residui della coda C-terminale e quelli del dominio DED. Ricordando che $0.87\omega_H$ misura i movimenti sulla scala dei picosecondi, ω_N misura i movimenti sui nanosecondi e 0 misura movimenti su scale dei tempi più lente (μs - ms), si può affermare che i più bassi valori di $J_{\text{eff}}(0)$ (2.5 ± 0.5 ns/rad) e i più alti valori di $J(0.87\omega_H)$ (0.024 ± 0.007 ns/rad) indicano che movimenti ad elevate frequenze dominano il rilassamento dei residui della coda C-terminale. Nel dominio DED, i residui Lys35 ($\alpha 3$) e Glu37, Glu38 (*loop3*) presentano valori di $J(0.87\omega_H)$ maggiori rispetto alla media, pari a 0.013, 0.009 e 0.015 ns/rad, rispettivamente. Di questi il residuo Glu37 presenta anche un elevato valore di $J(0)$ (6.1 ns/rad), insieme ai residui Tyr62 e Ile63 che hanno i maggiori valori di $J(0)$, 6.52 e 8.0 ns/rad, suggerendo per questi un possibile scambio chimico o conformazionale, come evidenziato anche dagli elevati valori di R_2 .

A differenza di altre code flessibili in cui il valore di $J(0)$ è inferiore a 1.5 ns/rad (Bhattacharya *et al.*, 2007; Vial *et al.*, 2001) il valore di $J(0)$ medio della coda C-terminale di PED non è molto basso, sintomatico di una non così elevata flessibilità di tale coda. Infatti, più piccolo è il valore di $J(0)$ più grande è la flessibilità nei sub-nanosecondi del vettore N-H. E' interessante inoltre notare che i valori di $J(\omega_N)$ della coda, esclusi gli ultimi due residui (0.44 ± 0.05 ns/rad), sono più alti rispetto a quelli della porzione N-terminale (0.38 ± 0.04 ns/rad).

Questo comportamento, che è anomalo rispetto a quello di altre code terminali, in cui il valore di $J(\omega_N)$ è o uguale (Bhattacharya *et al.*, 2007) o leggermente più basso (Viles *et al.*, 2001), suggerisce che i residui della coda C-terminale hanno non solo differenti movimenti interni rispetto a quelli del dominio DED, ma anche diversi movimenti globali, così come evidenziato dal diverso andamento degli R_1 e degli R_2 . In particolare, dai valori medi delle densità spettrali ridotte è possibile calcolare separatamente i valori del tempo di correlazione effettivo per la coda e per il dominio DED, mediante l'equazione (Blumenschein *et al.*, 2006):

$$\tau_{\text{eff}} = \omega_N^{-1} \left(\frac{\langle J_{\text{eff}}(0) \rangle - \langle J(\omega_N) \rangle}{\langle J(\omega_N) \rangle} \right)^{1/2} \quad (\text{eq. 5.1})$$

I valori così ottenuti, $\tau_{\text{eff,DED}} = 8.9\text{ns}$ e $\tau_{\text{eff,coda}} = 5.8\text{ns}$, confermano il differente tempo di correlazione delle due regioni. Se il dominio DED di 10,5 KDa si muovesse in maniera indipendente dovrebbe avere un tempo di correlazione teorico di ~ 5.2 ns. La differenza tra il valore teorico è quello stimato dall'equazione 1 suggerisce che non vi è una completa indipendenza del dominio DED e della coda C-terminale e che i movimenti della porzione N-terminale sono influenzati da quelli della coda. E' inoltre interessante notare che il valore di $\tau_{\text{eff,coda}}$ si discosta maggiormente da quello teorico, risultando uguale a quello di una proteina di 10.6 KDa, che è circa uguale a quello del dominio DED, anziché di 4.7 KDa. Tale osservazione potrebbe fare ipotizzare non solo che il movimento globale della coda non è indipendente da quello del dominio DED, ma addirittura che vi possa essere una interazione intramolecolare tra la coda e il dominio DED. L'interazione tra un dominio globulare e una coda ad esso legata è stata osservata per la proteina PrSH3 (Bhattacharya *et al.*, 2007) che presenta un comportamento dinamico analogo a quello di PED. Tale interazione rappresenta per PrSH3 un meccanismo di regolazione, in cui una superficie del dominio globulare viene coperta quando vi è il legame con la coda, impedendo la formazione della forma dimerica. Anche per questa proteina l'analisi *model-free* non è del tutto adeguata per descrivere i movimenti interni e globali e un'analisi delle densità spettrali ridotte è stata condotta. Da tale studio gli autori osservano che i residui del dominio SH3 che interagiscono con la porzione flessibile Pr hanno tutti un

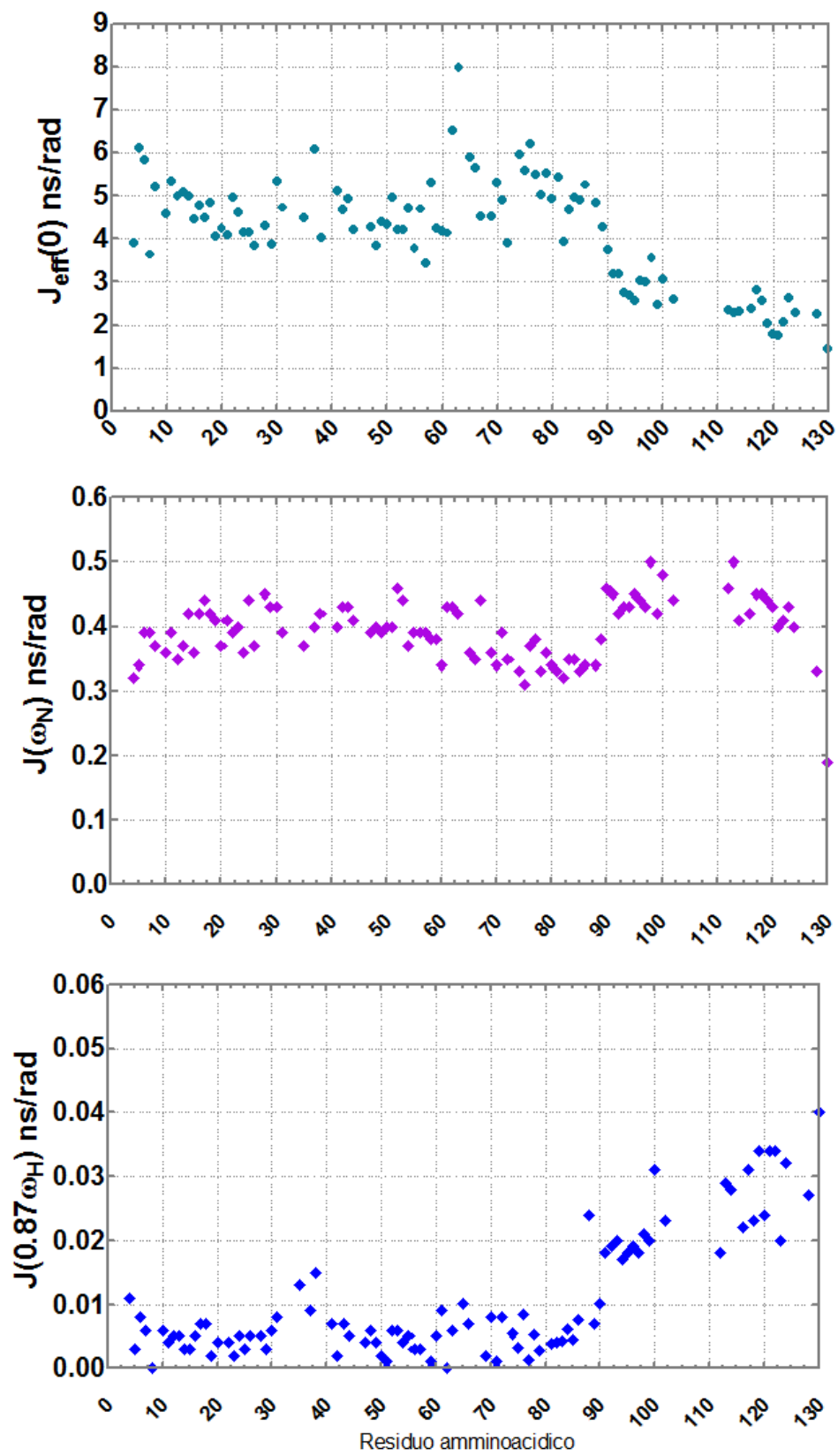


Figura 5.7 Analisi delle densità spettrali ridotte dei dati di rilassamento del *backbone* delle proteina PED.

comportamento analogo a quello della coda per quanto riguarda $J(0.87\omega_H)$, mentre i valori di $J(0)$ di alcuni hanno un valore più basso (come quelli della coda), quelli di altri un valore più alto. Il più alto valore di $J(0)$ di questi residui è stato dimostrato essere dovuto ad uno scambio conformazionale. Se anche per PED vi fosse l'interazione tra il dominio globulare e la coda ci si potrebbe chiedere quali potrebbero essere i residui del dominio che sono coinvolti nell'interazione. E' da premettere che dai dati NMR di Hill *et al.* 2002 non sono stati osservati NOE tra il dominio DED e la coda C-terminale che consentano di definirne l'orientazione relativa. Inoltre dai venti modelli di struttura NMR si osserva che solo nel modello 13 vi è una struttura più compatta in cui i residui terminali della coda sono vicini all'elica 1, al *loop3* e all'elica 4. Nel caso di PED si osserva un comportamento analogo delle densità spettrali del dominio DED e della coda rispetto a quelli di PrSH3 per i residui dell'elica 3 (K35) e del *loop 3* (E37, E38), e pertanto potrebbero interagire con la coda C-terminale. Tale interazione potrebbe coprire una superficie del dominio DED che è importante per il legame con i partner proteici di PED. Diversi lavori riportati in letteratura mettono in luce l'importanza dell'elica 3 nella modulazione del legame di proteine con domini *death* (Xiao *et al.*, 1999; Eberstadt *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2004). Infatti, la regione tra l'elica 2 e l'elica 4, che include l'elica 3, è quella strutturalmente più diversa nelle proteine appartenenti alla superfamiglia dei domini di morte cellulare. Questa regione può accomodare più lunghi *loop* come nella proteina PYD o addizionali eliche come in TUBE o addirittura può essere ridotta in lunghezza o non essere presente per niente. Pertanto, oltre ad avere un ruolo nelle interazioni proteina-proteina, l'elica 3 risulta essere un *hot spot* per la diversità strutturale nella superfamiglia dei domini di morte cellulare (Natarajan *et al.*, 2006). Inoltre, studi di dinamica sulla proteina NALP1 appartenente alla superfamiglia dei domini *death* (Hiller *et al.*, 2003) e studi della cinetica di scambio con il solvente degli HN ammidici sulla proteina FADD da topo (Jeong *et al.*, 1999) hanno mostrato che tale elica presenta la maggiore flessibilità rispetto alle altre eliche del dominio, così come osservato per PED.

5.6 Misura del coefficiente di diffusione traslazionale da esperimenti DOSY e da HYDRO

Il coefficiente di diffusione traslazionale, D_t , è stato misurato da esperimenti NMR DOSY effettuati sulla proteina PED a due diverse concentrazioni: 0.15 mM e 0.60 mM. Da tali esperimenti, è stato misurato D_t per un set di segnali NMR protonici dalla proteina PED. A titolo di esempio sono riportati in Figura 5.8, i valori del coefficiente di diffusione misurati per protoni alifatici di PED a 0.15 mM.

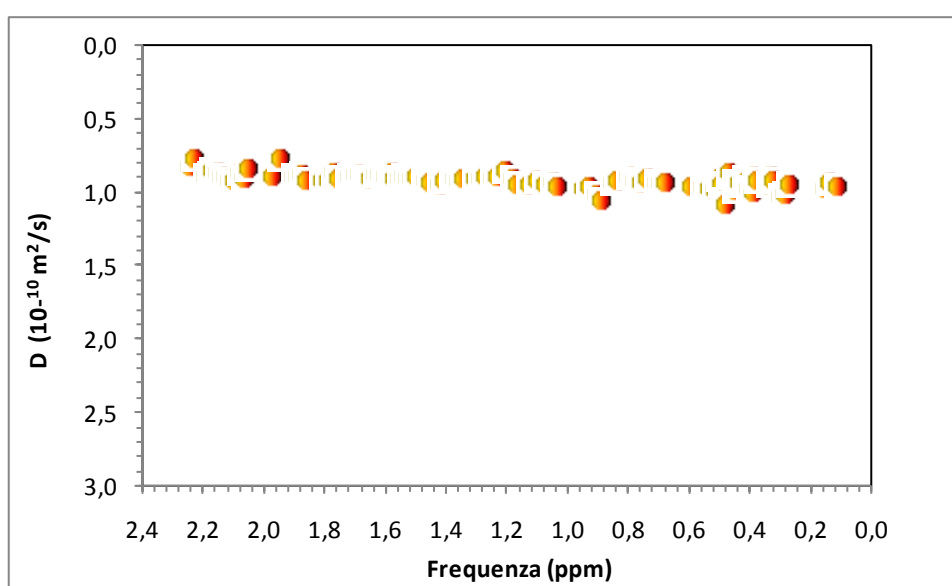


Figura 5.8 Spettro DOSY della proteina PED 0.15 mM.

Dalla media dei valori di D_t così misurati è stata ricavata una stima del coefficiente di diffusione alle due diverse concentrazioni (tab. 5.2).

D (10^{-10} m ² /s)	D (10^{-10} m ² /s)
0.60 mM PED	0.15 mM PED
0.93 ± 0.06	0.93±0.05

Tabella 5.2 Coefficienti di diffusione traslazionale di PED a 0,15 e 0,60 mM.

Come si può osservare, i due valori di D_t misurati a differenti concentrazioni sono perfettamente consistenti, indicando che non sono rilevabili effetti di auto

aggregazione tra 0.15 e 0.60 mM. La mancanza di variazione di D_t con la concentrazione suggerisce che la proteina PED esiste prevalentemente in uno stato nelle condizioni analizzate. Dal valore del coefficiente di diffusione traslazionale, $0.93 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$, è possibile ipotizzare che tale stato sia quello monomero, in accordo con quanto precedentemente osservato dal calcolo del τ_m a partire dal rapporto R_2/R_1 . E' da notare che il valore di D_t misurato per PED è più piccolo rispetto a quello di una proteina globulare di 130 residui. Infatti utilizzando l'equazione di Stokes il raggio idrodinamico (r_H) di PED risulta essere di $\sim 26 \text{ \AA}$, usando invece l'equazione empirica

$$r_H = 4.75 \cdot N^{0.29}$$

Dove N è il numero di amminoacidi della proteina, l' r_H dell'intera proteina PED di 132 amminoacidi è di $\sim 20 \text{ \AA}$, mentre quello del dominio globulare DED di 91 residui è di $\sim 18 \text{ \AA}$. Il maggiore raggio idrodinamico determinato dal coefficiente di diffusione traslazionale misurato rispetto a quello teorico riflette l'influenza della regione C-terminale disordinata sulle proprietà idrodinamiche della proteina PED.

Il valore di D_t misurato mediante esperimenti NMR è stato inoltre confrontato con quello calcolato con il programma HYDRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000), a partire dalla struttura tridimensionale di PED. In particolare, sono stati calcolati i coefficienti di diffusione da ciascuno dei 20 modelli di struttura (tab. 5.3).

Modelli di struttura NMR di PED	$D \cdot 10^{-10} \text{ (m}^2/\text{sec)}$
1	0.964
2	0.948
3	0.937
4	0.939
5	0.923
6	0.975
7	0.965
8	1.017
9	0.943
10	0.994

11	0.972
12	0.965
13	1.025
14	0.952
15	0.958
16	0.963
17	0.936
18	0.965
19	0.943
20	0.909

Tabella 5.3 Coefficienti di diffusione traslazionale dei 20 modelli di struttura

Dalla media di tali coefficienti è stata ricavata una stima finale del coefficiente di diffusione, che è risultato pari a

$$D_{\text{HYDRO}} = (0.96 \pm 0.03) 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$$

La consistenza di D_t , misurato attraverso NMR, con quello calcolato dalla struttura, è un'ulteriore indicazione che la proteina PED è monomericamente nelle condizioni analizzate.

5.7 Interazione PED-D4 α mediante spettroscopia NMR

La proteina PED è un piccolo *scaffold* proteico che esplica le sue funzioni biologiche mediante le interazioni con diverse proteine, sia appartenenti alla stessa superfamiglia, quali FADD e procaspasi 8, sia appartenenti a famiglie strutturalmente differenti, quali ERK1/2 e PLD1. Tra queste l'interazione con PLD1 è stato dimostrato essere coinvolta nell'insulino-resistenza in individui affetti da diabete di tipo II (Condorelli *et al.*, 1998). Ad oggi poche sono le informazioni strutturali note sul meccanismo di riconoscimento molecolare PED-PLD1. Studi mediante il sistema del doppio ibrido (Zhang *et al.*, 2000) hanno consentito di identificare una regione di PED abbastanza ampia tra il dominio DED e la coda C-terminale, che va dall'Asn53 alla Ile112. Più recenti studi (Viparelli *et al.*, 2008b) hanno mostrato che il peptide Met1-Lys24 è in grado non solo di legare D4, il dominio minimo di interazione di PLD1 con PED, ma anche

di spiazzare l'interazione tra PED e PLD1 e di ripristinare in cellula i livelli basali di trasporto del glucosio. In particolare, D4 è la regione C-terminale di PLD1 che contiene uno dei due domini HKD (un motivo molto carico di sequenza HxKx₄Dx₆GSxN) la cui dimerizzazione è richiesta per l'attività di PLD1 (Xhie *et al.*, 1998 e 2000). D4 esiste sia come monomero che come dimero ed è stato dimostrato che PED interagisce solo con la forma monomerica (Viparelli *et al.*, 2008a). Recenti studi (Doti, tesi dottorato 2008) hanno mostrato mediante saggi biologici che D4 α (espressa come proteina di fusione con l'MBP), un sottodominio di D4 che non presenta dimerizzazione, è in grado di legare PED con una K_D di circa 0.8 μ M, paragonabile a quella di D4 (0.5 μ M).

Al fine di validare l'interazione tra la proteina PED e la proteina D4 α mediante spettroscopia NMR e di identificare i residui coinvolti in tale interazione è stata effettuata un'analisi di *chemical shift mapping* della proteina PED in presenza della proteina di fusione MBP-D4 α . Per questo scopo è stato acquisito lo spettro di eterocorrelazione [¹⁵N, ¹H] HSQC di PED uniformemente marcata con ¹⁵N, alla concentrazione di 75 μ M in tampone fosfato 20 mM pH 7.

L'analisi di *chemical shift mapping* è stata eseguita registrando lo spettro [¹⁵N, ¹H] HSQC della proteina ¹⁵N PED in presenza di MBP-D4 α alla concentrazione di 25 μ M (0.33 equivalenti). In figura 5.9 è riportata la sovrapposizione degli spettri HSQC della proteina PED in assenza e in presenza di MBP-D4 α , dove sono stati evidenziati i residui che presentano una significativa diminuzione dell'intensità del segnale (A2, S33, E34, R101, S104, K106, K129) e quelli che mostrano un rilevante spostamento del picco di eterocorrelazione (I31, E50, S51, H52, I63, H65, I69).

L'effetto differente osservato sui picchi di correlazione può dipendere da diversi fattori. La diminuzione dell'intensità del segnale NMR può essere correlato sia alla formazione del complesso PED/ MBP-D4 α di ~55 KDa, che avendo un lungo tempo di correlazione può causare uno slargamento del segnale, sia ad una condizione di scambio intermedio tra la proteina PED nella sua forma libera e nella sua forma legata rispetto alla scala dei tempi NMR, in accordo con una costante di dissociazione dell'ordine del μ M. Lo spostamento del chemical shift del protone e dell'azoto ammidico è sintomatico di residui che si trovano in una

condizione di scambio veloce rispetto alla scala dei tempi NMR e potrebbe essere correlato a degli effetti allosterici indotti dall'interazione PED/ MBP-D4 α .

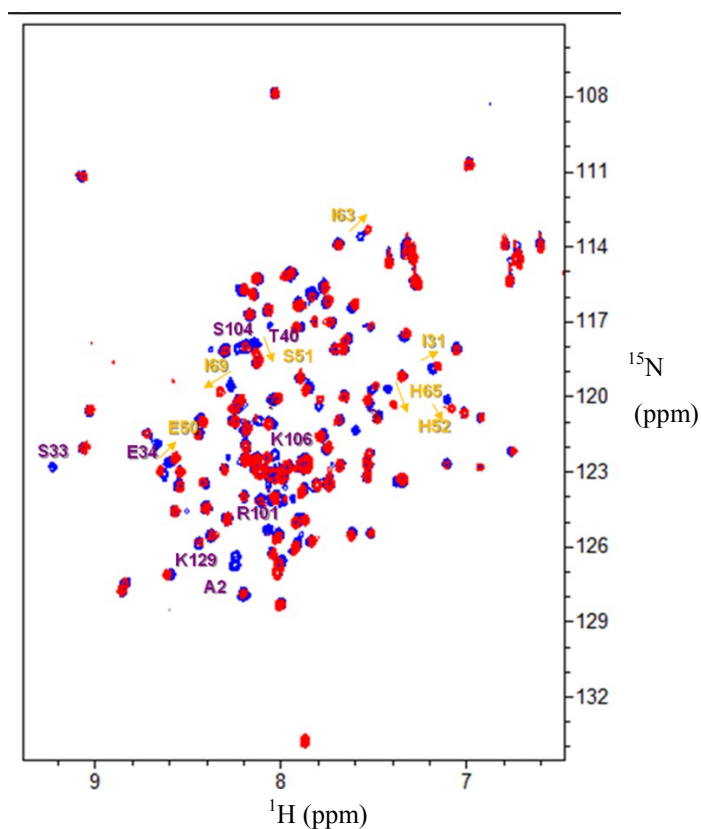


Figura 5.9 Sovrapposizione degli spettri 2D [^{15}N , ^1H] HSQC di ^{15}N -PED 75 μM in assenza (blu) e in presenza di 0.33 eq. (rosso) di MBP-D4 α . I picchi che presentano una significativa diminuzione di intensità sono indicati in viola, mentre quelli che hanno degli spostamenti di chemical shift in giallo.

Per meglio visualizzare le variazioni dei chemical shift e delle intensità dei picchi di correlazione ^{15}N - ^1H indotte dall'MBP-D4 α , è stato calcolato per tutti i picchi ammidici visualizzati nello spettro HSQC il rapporto dell'intensità del segnale NMR in presenza e in assenza di MBP-D4 α (ΔI), e la differenza mediata dei chemical shift del protone e dell'azoto ammidico dopo l'aggiunta del ligando ($\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$) (fig. 5.10a). I residui che presentano un $\Delta I > 0.3$ e un $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}} > 0.025$ ppm sono stati visualizzati nella struttura tridimensionale della proteina PED (fig. 5.10b). Da questi dati si osserva che le maggiori variazioni di intensità del segnale riguardano circa la metà dei residui della coda C-terminale e alcuni residui della

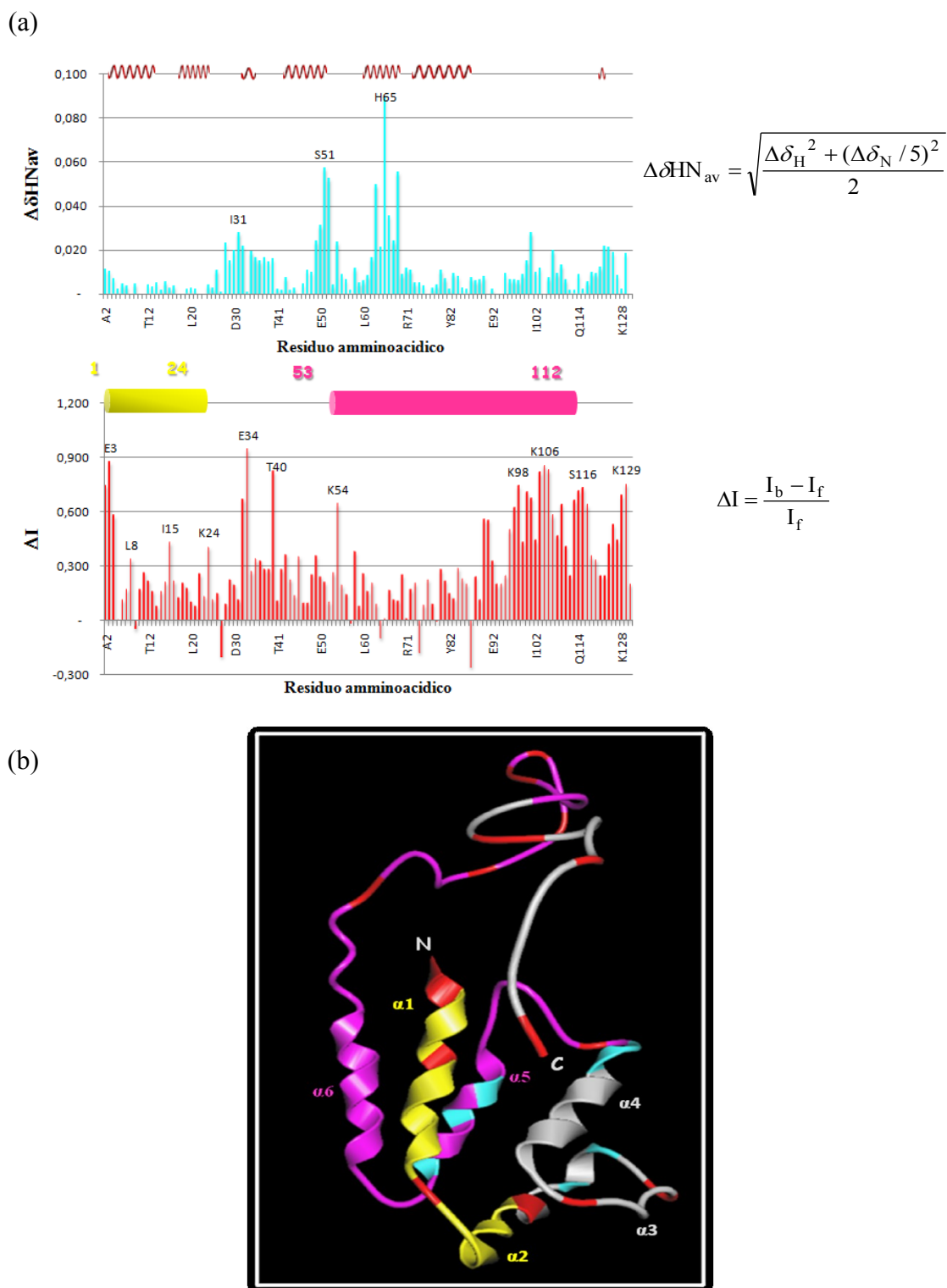


Figura 5.10 (a) ΔI e $\Delta\delta\text{HN}_{av}$ calcolati per ciascun residuo amminoacidico di ^{15}N -PED 75 μM in presenza di 0.33 equivalenti di MBP-D4 α ; (b) *Chemical shift mapping* di PED/ MBP-D4 nel diagramma a nastro della struttura tridimensionale di PED. I residui che hanno $\Delta I > 0.3$ sono evidenziati in rosso, mentre quelli con $\Delta\delta\text{HN}_{av} > 0.025$ in celeste. In giallo è evidenziato il peptide 1-24 (Viparelli *et al.*, 2008b) e in viola il segmento 53-112 (Zhang *et al.*, 2000), che sono risultate essere due regioni di interazione di PED con PLD1.

porzione N-terminale del dominio DED di PED, in particolare quelli dell' $\alpha 1$ (A2, E3, Y4, L8), del *loop1* (I15), dell' $\alpha 2$ (K24), dell' $\alpha 3$ (S33, E34), del *loop3* (T40). In figura 5.10b, si può osservare che la maggior parte di questi residui, evidenziati in rosso, si trovano su una stessa faccia della proteina, coprendo una regione abbastanza estesa della proteina stessa ($\sim 500 \text{ \AA}^2$ nel dominio DED) come è da aspettarsi per un'interazione proteina-proteina. E' interessante notare che la maggior parte di questi residui appartengono al segmento peptidico 1-24, mentre alcuni della coda che hanno una significativa diminuzione del segnale si trovano nella regione 53-112. Invece, i residui che hanno un $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}} > 0.025$ si trovano su una faccia opposta della proteina, supportando l'ipotesi di un effetto allosterico. E' importante evidenziare che molti di questi residui con $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}} > 0.025$ e i residui dell' $\alpha 3$ (S33, E34) che diminuiscono di intensità risultano perturbati in seguito all'aggiunta del BPH03 e di altri frammenti molecolari (§ 4.4.1), suggerendo che la più ampia regione di interazione tra PED e D4 α potrebbe includere il sito di legame delle piccole molecole in grado di legare PED precedentemente identificate.

Capitolo 6

Conclusioni

PED è una proteina espressa in maniera pressoché ubiquitaria nei tessuti umani ed ampiamente conservata nei mammiferi. Essa è coinvolta in due importanti e integrati processi di trasduzione del segnale intracellulare: apoptosi e cascata delle ERK/MAPK chinasi. L'azione antiapoptotica di PED è esplicita tramite il legame con FADD e procaspasi 8 mediante l'interazione omotipica dei domini DED (Condorelli *et al.*, 1999; Estelles *et al.*, 1999; Kitsberg D. *et al.*, 1999), mentre il coinvolgimento nella cascata delle ERK/MAPK chinasi è dovuto alla sua associazione con ERK (Zhang *et al.*, 2000) mediante sia residui del dominio DED che residui della coda C-terminale (Hill *et al.*, 2002). La fosforilazione di PED a carico della Ser104 e della Ser116 rappresenta un "interruttore" molecolare che fa sì che tale proteina possa influenzare l'apoptosi o la cascata delle ERK/MAPK chinasi, tramite la diversa specificità di legame per FADD o per ERK (Renganathan *et al.*, 2005).

La sovraespressione della proteina PED, osservata in alcuni tipi di diabete di tipo II, riduce il trasporto del glucosio insulino-stimolato mediante il legame con la fosfolipasi PLD1. È stato infatti dimostrato che l'inibizione dell'interazione tra PED e PLD1 ripristina il trasporto basale del glucosio (Viparelli *et al.*, 2008). Tale risultato conferma che la proteina PED è un target farmacologico per lo sviluppo di farmaci in grado di migliorare la sensibilità all'insulina e la tolleranza al glucosio in individui affetti da diabete di tipo II.

Prima di questo studio, piccole molecole in grado di legare la proteina PED non erano ancora state individuate, pertanto una parte del presente lavoro di tesi è stato rivolto all'identificazione di ligandi di tale proteina che possano essere utilizzati o come base per la progettazione razionale di farmaci o come strumenti molecolari per una migliore comprensione delle funzioni biologiche della proteina PED. Per questo scopo, una piccola collezione di circa 200 frammenti molecolari, è stata prima opportunamente allestita e caratterizzata mediante spettroscopia NMR, e

poi sottoposta ad uno *screening* contro PED mediante due tipi di esperimenti NMR, il waterLOGSY e l'STD, entrambi basati sull'osservazione dei segnali dei potenziali ligandi. Dal confronto degli spettri waterLOGSY e STD delle miscele positive allo *screening*, con gli spettri protonici delle singole molecole, sono state identificate diverse molecole interagenti (circa 20%) con la proteina PED. L'identificazione di diversi *hit*, che non è inusuale da un primo *screening* di una collezione di piccole molecole organiche, è stata seguita da una fase di validazione dell'interazione delle singole molecole con la proteina PED. In particolare, sono state validate solo alcune molecole appartenenti alle classi di *scaffold* che hanno dato il maggior numero di *hit*, effettuando esperimenti waterLOGSY, STD e NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) di ogni singola molecola in assenza e in presenza di proteina PED. Inoltre, in questa fase una stima approssimata della costante di dissociazione proteina-ligando è stata determinata mediante esperimenti waterLOGSY. Tutte le molecole così analizzate sono risultate legare la proteina PED e con affinità nell'ordine del basso millimolare (2-5 mM), come era da aspettarsi per frammenti molecolari.

Al fine di migliorare il legame delle molecole validate nei confronti della proteina PED, sono stati effettuati studi di *chemical shift mapping* mediante esperimenti [¹⁵N, ¹H] HSQC, sulla proteina PED uniformemente marcata, per identificare i siti di legame della proteina, e di *interligand* NOE (ILOE), su miscele di composti in presenza di quantità sub-stechiometriche di proteina PED non marcata, per rivelare la presenza di ligandi che occupano siti adiacenti sulla superficie della proteina e determinare la loro orientazione relativa.

Dagli studi di *chemical shift mapping* i frammenti più promettenti sono risultati quelli appartenenti alla classe di *scaffold* dei bifenili, e, in particolar modo, il composto BPH03. Infatti, l'aggiunta di un eccesso di tale molecola induce le più rilevanti variazioni di chemical shift della proteina PED, con i residui maggiormente influenzati dall'interazione localizzati nel dominio DED N-terminale di PED, in particolare, nel *loop* 2 (K28, I31), nell' α 3 (K35, S36), nel *loop* 3 (E37, E38, I39), nell' α 4 (E50, S51), nel *loop* 4 (H52) e nell' α 5 (I63, H65, I66, F67, E68, I69).

Gli studi di *chemical shift mapping* effettuati su altri *hit* appartenenti ad altre classi di *scaffold*, quali il PYZ07 e il TPH01, hanno mostrato un'analogia regione di interazione con analoghi cambiamenti. La similarità degli spostamenti di chemical shift, in particolar modo intorno all'His52 e all'His65, potrebbe essere dovuta al fatto che le variazioni osservate siano il risultato di un riarrangiamento conformazionale indotto da tali ligandi. Tra le due istidine, l'His52, localizzata in un *turn* nel *loop* 4, è più vicina ai residui del *loop* 2, dell' α 3 e del *loop* 3, pertanto è più plausibile pensare che la regione di interazione diretta sia quella vicina all'His52.

E' interessante notare che i residui delle α -eliche 3 e 4 e quelli del *loop* 4, che connette le eliche 4 e 5, costituiscono una delle due superfici conservate di interazione dei *death domains* e *death effector domains* (Hill *et al.*, 2004), come esemplificato nel complesso della proteina TUBE e della serina/treonina chinasi PELLE da *Drosophila* (Xiao *et al.*, 1999). Inoltre, un'isoforma di PED, che deriva da uno *splicing* alternativo, risulta mancante di un segmento di 22 amminoacidi che va dalla Ser36 alla Lys57, con una sostituzione Asp-Asn 58 (Underhill *et al.*, 2001). Tale regione include la porzione terminale dell'elica 3, il *loop* 3, l'elica 4 e quasi tutto il *loop* 5. Da tali osservazioni si evince che la regione coinvolta nelle interazioni con i frammenti analizzati è importante per l'attività biologica di queste classe proteina, suggerendo che questi composti possano essere un interessante punto di partenza per lo sviluppo di molecole farmacologicamente attive o di *tool* molecolari.

Dagli esperimenti ILOE effettuati su miscele del BPH03 con uno o due rappresentanti delle classi di *scaffold* che hanno dato il maggior numero di *hit* è stato osservato che alcune molecole presentano NOE interligando in presenza della proteina con il BPH03, suggerendo che tali frammenti leghino PED in siti adiacenti. Inoltre, l'osservazione di segnali NOE tra i protoni dei due anelli aromatici del BPH03 in presenza di PED e l'individuazione di due sottoregioni di interazione sulla superficie della proteina attraverso studi di *docling* ha permesso di ipotizzare che due molecole del BPH03 possano legare contemporaneamente due siti differenti e adiacenti di PED.

Sulla base di questi studi è stato quindi possibile progettare e avviare la sintesi chimica di ligandi bidentati connessi da opportuni *linker* di diversa natura e lunghezza. I composti sintetizzati sono stati analizzati mediante spettroscopia NMR e quelli che hanno superato i criteri di controllo qualità sono stati sottoposti a studi di *binding* NMR per verificare la loro capacità di interagire con la proteina PED e la loro affinità rispetto alle molecole di partenza. Ad oggi, tra i composti bidentati sintetizzati che sono stati analizzati quello più promettente sia per i criteri di qualità che per il legame a PED contiene un *linker* di natura dipeptidica che connette due frammenti bifenilici.

Ulteriori studi volti a meglio caratterizzare i siti di interazione su PED e, contemporaneamente, a supportare la sintesi di composti bidentati sono stati effettuati mediante esperimenti di *docking*, con il programma *ArgusLab*. Tali studi, alla luce di quelli di quelli di *chemical shift mapping* e ILOE, hanno consentito di identificare due cavità idrofobiche, denominate sito A e sito B, che hanno in comune la His⁵² e la Lys³⁵ in cui si possono localizzare i ligandi identificati (fig. 6.1). Inoltre, non sono stati ottenuti modelli di complessi proteina-ligando consistenti con i dati sperimentali in cui l'His⁶⁵ è direttamente coinvolta nell'interazione.

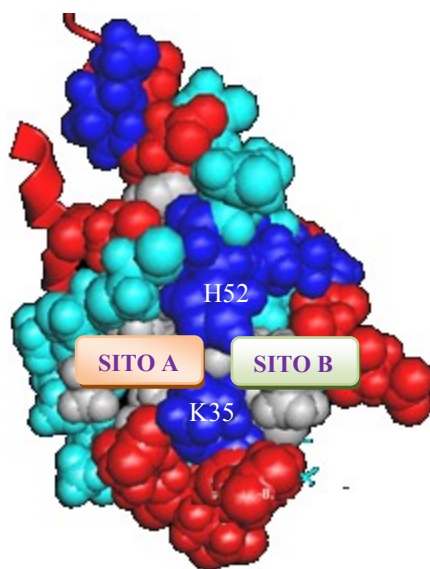


Figura 6.1. Sito A e sito B di PED. I residui acidi, basici, neutri e apolari sono mostrati nella rappresentazione CPK in rosso, blu, indaco e grigio, rispettivamente

Al fine di ottenere una migliore comprensione del meccanismo di riconoscimento molecolare di PED tanto con i ligandi identificati quanto con i suoi partner proteici di interazione naturale, un'altra parte del lavoro di tesi è stata rivolta agli studi strutturali della proteina PED mediante spettroscopia NMR. A tale scopo, è stato effettuato uno studio della dinamica del *backbone* di PED in forma libera attraverso la misura delle velocità di rilassamento R_1 e R_2 del ^{15}N e del NOE eteronucleare $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$. Come indicato da valori dei NOE eteronucleari inferiori a 0.65, sono stati evidenziati movimenti veloci sulla scala dei ps-ns per i residui della coda C-terminale, ma anche per alcuni residui del dominio DED e in particolar modo per quelli dell' $\alpha 3$ (E34, K35), dell' $\alpha 5$ (E64, H65) e dei *loop* 3 (E37) e 5 (S70, R72). La maggiore flessibilità dell'elica 3 rispetto alle altre eliche del dominio DED è stata osservata anche in altre proteine appartenenti alla superfamiglia dei domini di morte cellulare (Jeong *et al.*, 1999; Hiller *et al.*, 2003).

Inoltre i residui della coda C-terminale presentano dei valori di R_1 più alti rispetto alla media, che possono essere correlati con fluttuazioni interne nei nanosecondi (Jin *et al.*, 1998). Infine, i residui coinvolti nella formazione delle α -eliche 1 (G5, T6, Q9), 5 (Y62, I63, H65, I66) e 6 (D74, L75, L76, T77, V79) e un residuo del *loop* 3 (E37) esibiscono elevati valori di R_2 , con il massimo valore per il residuo Ile63 (21.78 s^{-1}). Questi ultimi possono essere dovuti o a scambi conformazionali o a fenomeni di autoaggregazione. Studi dei parametri idrodinamici mediante NMR e il programma HYDROPRO (Garcia de la Torre *et al.*, 2000) hanno indicato che la proteina PED è prevalentemente monomerica nelle condizioni analizzate. Infatti, è stata osservata un'identità del coefficiente di diffusione traslazionale misurato attraverso NMR a due diverse concentrazioni (0.15 e 0.60 mM), in accordo anche con quello di una proteina di 15 KDa, e una consistenza dello stesso coefficiente con quello calcolato.

Nel caso dell'elica $\alpha 5$, in cui è localizzata l'His⁶⁵, la presenza di movimenti lenti nella scala dei μs -ms potrebbe essere in accordo con l'osservazione che le variazioni osservate per l'Ile63, l'His65 e l'Ile69 in presenza dei ligandi siano dovute ad effetti allosterici piuttosto che ad interazioni dirette con i ligandi analizzati.

Al fine di effettuare un'analisi quantitativa dei dati di rilassamento è stato utilizzato l'approccio *model-free* (Lipari e Szabo, 1982a e 1982b); quest'ultimo però non è stato in grado di descrivere adeguatamente i movimenti della proteina PED, probabilmente a causa del fatto che i residui della coda C-terminale presentano movimenti nei nanosecondi, che non consentono di separare i moti interni da quelli globali, e/o la definizione di un unico tensore di diffusione non è adeguata per descrivere il comportamento della proteina PED, in quanto il *tumbling* del dominio globulare è influenzato dalla presenza della lunga e disordinata coda C-terminale. Come approccio alternativo per l'analisi dei parametri di rilassamento è stato utilizzato il metodo della mappatura delle densità spettrali ridotte, che non fa alcuna assunzione sul modello di diffusione rotazionale globale della proteina (Farrow *et al.*, 1995). Da tali studi è stato osservato un diverso comportamento dinamico del dominio globulare DED e della coda C-terminale non strutturata. In particolare, i residui del dominio DED hanno più alti valori di $J_{\text{eff}}(0)$ e più bassi valori di $J(0.87\omega_H)$, mentre l'andamento opposto è osservato per i residui della coda, indicando che movimenti più lenti contribuiscono al rilassamento del dominio DED e movimenti più veloci dominano il rilassamento dei residui della coda. Inoltre, i valori di $J(\omega_N)$ della coda, come quelli di R_1 , sono più elevati rispetto a quelli del dominio DED, suggerendo che i residui del *backbone* della coda hanno un movimento globale diverso rispetto a quello del dominio globulare N-terminale. Utilizzando i valori medi delle densità spettrali è stato possibile calcolare il t_{eff} (Blumenschein *et al.*, 2006) per la coda e per il dominio DED che sono risultati uguali a 8.9 ns e 5.8 ns, rispettivamente. Il valore del tempo di correlazione apparente della coda corrisponde a quello di una proteina di massa molecolare di circa 10.6 KDa. Tale valore è molto più elevato rispetto a quello della coda C-terminale (4.75 KDa) e più basso di quello di tutta la proteina (15.3 KDa), ma in modo interessante è circa uguale alla massa molecolare del solo dominio DED (10.5 KDa). Tale osservazione ha permesso di ipotizzare che la coda C-terminale non solo non si muove in modo indipendente, ma addirittura potrebbe interagire con il dominio DED. Questa interazione tra un dominio globulare e una coda ad esso legata è stata osservata in diverse proteine riportate in letteratura (Bhattacharya *et al.*,

2007; Blumenschein *et al.*, 2006) e rappresenta un meccanismo di regolazione della proteina PED. Dall'andamento delle densità spettrali ridotte è stato osservato un comportamento analogo a quello della coda per i residui dell'elica 3 (K35) e del *loop* 3 (E37, E38), permettendo di ipotizzare che tale regione sia quella di interazione con la coda C-terminale. Diversi lavori riportati in letteratura mettono in luce l'importanza della regione tra l'elica 2 e l'elica 4 ed in particolar modo dell'elica 3 nella modulazione del legame di proteine con domini *death* (Xiao *et al.*, 1999; Eberstadt *et al.*, 1997; Qin *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2004). Inoltre, l'elica 3 risulta essere un *hot spot* per la diversità strutturale nella superfamiglia dei domini *death* (Natarajan *et al.*, 2006).

Sempre nell'ambito della comprensione delle relazioni struttura-funzione, esperimenti NMR di *chemical shift mapping* sono stati rivolti all'identificazione degli epitopi di legame di PED con D4 α , una porzione di D4 che è il più piccolo dominio di PLD1 in grado di interagire con PED, che non presenta dimerizzazione (Viparelli *et al.*, 2008a). Tale analisi ha messo in evidenza che diversi residui della coda C-terminale sono coinvolti nell'interazione, sebbene non sia chiaro se la diminuzione dell'intensità del segnale dei residui è dovuta all'interazione diretta o ad un effetto allosterico. Inoltre, i residui del dominio N-terminale che sembrano essere più direttamente coinvolti nell'interazione con D4 α , sulla base della significativa diminuzione dell'intensità del segnale, sono localizzati nell' α 1 (A2, E3, Y4, L8), nel *loop* 1 (I15), nell' α 2 (K24), nell' α 3 (S33, E34) e nel *loop* 3 (T40). Molti di questi residui si trovano nel segmento peptidico 1-24 che è stato dimostrato da recenti studi (Viparelli *et al.*, 2004b) essere in grado di legare e spiazzare l'interazione con PED. Inoltre, altri residui del dominio globulare, che sono risultati coinvolti anche nell'interazione con BPH03 e altri frammenti, presentano uno spostamento chimico più sintomatico di una variazione conformazionale indotto dall'associazione con D4 α .

In conclusione, la presente tesi di dottorato contribuisce a chiarire la relazione struttura-attività della proteina PED, attraverso il primo studio della sua dinamica in soluzione e della definizione delle regioni di PED coinvolte nell'interazione con il suo partner naturale PLD1. Inoltre, attraverso uno *screening* di una nuova collezione di composti organici, costruita nella fase iniziale del lavoro di tesi, sono

state identificate coppie di ligandi che interagiscono con regioni adiacenti della proteina PED, ed è stata intrapresa la progettazione e la sintesi di ligandi aventi, potenzialmente, una elevata affinità.

Capitolo 7

Bibliografia

Abraham A. Principles of Nuclear Magnetism. 1961.

Anil-Kumar, Ernst RR, Wüthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton–proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980; 95: 1-6.

Araujo H, Danziger N, Cordier J, Glowinski J, Chneiweiss H. Characterization of PEA-15, a major substrate for protein kinase C in astrocytes. *J Biol Chem.* 1993; 268: 5911-20.

Atkinson RA, Kieffer B. The role of protein motions in molecular recognition: insights from heteronuclear NMR relaxation measurements. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy.* 2004; 44:141-187.

Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A. Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry.* 1992; 31: 5269-78.

Bax A, Pochapsky SS. Optimized Recording of Heteronuclear Multi-Dimensional NMR Spectra Using Pulsed Field Gradients. *J Magn Reson.* 1992; 99: 638-643.

Becattini B, Pellecchia M. SAR by ILOEs: an NMR-based approach to reverse chemical genetics.. *Chemistry* 2006; 20: 2658-62.

Becattini B, Sareth S, Zhai D, Crowell KJ, Leone M, Reed JC, Pellecchia M. Targeting apoptosis via chemical design: inhibition of bid-induced cell death by small organic molecules. *Chem Biol.* 2004; 11: 1107-1117.

Beeser SA, Goldenberg DP, Oas TG. Enhanced protein flexibility caused by a destabilizing amino acid replacement in BPTI. *J Mol Biol.* 1997; 269: 154-64.

Bemis GW and Murcko MA The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks. *J Med Chem.* 1996; 39: 2887-93.

- Bhattacharya N, Yi M, Zhou HX, Logan TM.** Backbone dynamics in an intramolecular prolylpeptide-SH3 complex from the diphtheria toxin repressor, DtxR. *J Mol Biol.* 2007; 374: 977-92.
- Bloch F.** The dynamical theory of nuclear induction II. *Phys Rev.* 1956; 102:104-135.
- Blumenschein TM, Stone DB, Fletterick RJ, Mendelson RA, Sykes BD.** Dynamics of the C-terminal region of TnI in the troponin complex in solution. *Biophys J.* 2006; 90: 2436-44.
- Bracken C, Carr PA, Cavanagh J and Palmer AG. 3rd.** Temperature dependence of intramolecular dynamics of the basic leucine zipper of GCN4: implications for the entropy of association with DNA. *J Mol Biol.* 1999; 285: 2133-2146.
- Cavanagh J, Fairbrother WJ, Palmer AG III, Skelton NJ.** Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice. *Academic Press: San Diego, CA*, 1996.
- Clore GM, Szabo A, Bax A, Kay LE, Driscoll PC, Gronenborn AM.** Deviations from the simple two-parameter model-free approach to the interpretation of nitrogen-15 nuclear magnetic relaxation in proteins. *J Am Chem Soc.* 1990; 112: 4989-4991.
- Coles M, Heller M, Kesler H.** NMR-based screening technologies. *Drug Discov Today* 2003; 8: 115-124.
- Condorelli G, Vigliotta G, Cafieri A, Trencia A, Andalo P, Oriente F, Miele C, Caruso M, Formisano P, Beguinot F.** PED/PEA-15: an anti-apoptotic molecule that regulates Fas/TNFR1-induced apoptosis. *Oncogene* 1999; 18: 4409-4415.
- Condorelli G, Vigliotta G, Iavarone C, Caruso M, Tocchetti CG, Androozzi F, Cafieri A, Tecce MF, Formisano P, Beguinot L, Beguinot F.** PED/PEA-15 gene controls glucose transport and is overexpressed in type 2 diabetes mellitus. *EMBO J.* 1997;17: 3858-66.
- Dalvit C, Fogliatto G, Stewart A, Veronesi M, Stockman B.** WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *J Biomol. NMR* 2001; 21: 349-359.

- Dalvit C, Pevarello P, Tato M, Veronesi M, Vulpetti A, Sundstrom M.** Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *J. Biomol. NMR* 2000;18: 65-68.
- Dalvit C.** Homonuclear 1D and 2D NMR Experiments for the Observation of Solvent-Solute Interactions. *J Magn Reson B.* 1996; 112: 282-288.
- Doti N.** Analisi di interazioni biomolecolari coinvolte in patologie. Tesi dottorato 2008
- Eberstadt M, Huang B, Olejniczak ET, Fesik SW.** The lymphoproliferation mutation in Fas locally unfolds the Fas death domain. *Nat. Struct. Biol.* 1997; 4: 983-5.
- Estelles A, Charlton CA and Blau HM.** The phosphoprotein protein PEA-15 inhibits Fas- but increases TNF-R1-mediated caspase-8 activity and apoptosis. *Dev. Biol.* 1999; 216: 16-28.
- Estelles A, Yokoyama M, Nothias F, Vincent JD, Glowinski J, Vernier P, Chneiweiss H.** The major astrocytic phosphoprotein PEA-15 is encoded by two mRNAs conserved on their full length in mouse and human. *J Biol Chem.* 1996; 271: 14800-06.
- Farrow NA, Muhandiram R, Singer AU, Pascal SM, Kay CM, Gish G, Shoelson SE, Pawson T, Forman-Kay JD, Kay LE.** Backbone dynamics of a free and phosphopeptide-complexed Src homology 2 domain studied by ¹⁵N NMR relaxation. *Biochemistry* 1994; 33: 5984-6003.
- Fattorusso R, Jung D, Crowell KJ, Forino M, Pellicchia M.** Discovery of a novel class of reversible non-peptide caspase inhibitors via a structure-based approach. *J Med Chem.* 2005 Mar 10; 48: 1649-1656.
- Formstecher E, Ramos JW, Fauquet M, Calderwood DA, Hsieh JC, Canton B, Nguyen XT, Barnier JV, Camonis J, Ginsberg MH, Chneiweiss H.** PEA-15 mediates cytoplasmic sequestration of ERK MAP kinase. *Dev. Cell.* 2001, 1: 239-250.
- Garcia de la Torre J, Huertas ML and Carrasco B,** Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* 2000; 78: 719-730

Hajduk PJ and Greer J. A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned. *Nature Rev Drug Discov.* 2007; 6: 211-219.

Hajduk PJ, Dinges J, Miknis GF, Merlock M, Middleton T, Kempf DJ, Egan DA, Walter KA, Robins TS, Shuker SB, Holzman TF, Fesik SW. NMR-based discovery of lead inhibitors that block DNA binding of the human papillomavirus E2 protein. *J. Med. Chem.* 1997; 40: 3144-50.

Hajduk PJ, Olejniczak ET, Fesik S. One dimensional relaxation and diffusion-edited NMR methods for screening compound that bind to macromolecules. *J Am Chem Soc.* 1997; 119: 12257-61.

Hann MM, Leach AR, Harper G: Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery. *J Chem Inf Comput Sci.* 2001; 41:856-864.

Hill JM, Morisawa G, Kim T, Huang T, Wei Y, Wei Y, Werner MH Identification of an Expanded Binding Surface on the FADD Death Domain Responsible for Interaction with CD95/Fas. *J Biol Chem.* 2004; 279: 1474–1481.

Hill JM, Vaidyanathan H, Ramos JW, Ginsberg MH, Werner MH. Recognition of ERK MAP kinase by PEA-15 reveals a common docking site within the death domain and death effector domain. *EMBO J.* 2002; 21: 6494-504.

Hiller S, Kohl A, Fiorito F., Herrmann T, Wider G, Tschopp J, Grutter MG, Wuthrich K. NMR Structure of the Apoptosis and Inflammation-Related NALP1 Pyrin Domain. *Structure* 2003; 11: 1199–1205.

Jahnke W. Perspectives of biomolecular NMR in drug discovery: the blessing and curse of versatility. *J. Biomol. NMR* 2007; 39: 87-90.

Jarymowycz VA, Stone MJ. Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem Rev.* 2006; 106: 1624–1671

Jeong EJ, Bang S, Lee TH, Park YI, Simi WS, Kim KS. The Solution Structure of FADD Death Domain. *J Biomol Chem.* 1999; 274: 16337–16342.

Jin D, Andrec M, Montelione GT, Levy RM. Propagation of experimental uncertainties using the Lipari-Szabo model-free analysis of protein dynamics. *J Biomol NMR.* 1998; 12: 471-492.

Joy S, Nair PS, Hariharan R, Pillai MR. Detailed comparison of the protein-ligand docking efficiencies of GOLD, a commercial package and ArgusLab, a licensable freeware. *In Silico Biol.* 2006; 6: 601-5.

Kay LE, Keifer P, Saarinen T. Pure Absorption Gradient Enhanced Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy with Improved Sensitivity. *J Am Chem Soc.* 1992; 114:10663-10665.

Kay LE, Torchia DA and Bax A. Backbone dynamics of proteins as studied by ¹⁵N inverse detected heteronuclear NMR spectroscopy—Application to staphylococcal nuclease. *Biochemistry* 1989; 28: 8972–8979.

Kitsberg D, Formstecher E, Fauquet M, Kubes M, Cordier J, Canton B, Pan G, Rolli M, Glowinski J, Chneiweiss H. Knock-out of the neural death effector domain protein PEA-15 demonstrates that its expression protects astrocytes from TNF- α induced apoptosis. *J. Neurosci.*, 1999; 19: 8244-8251.

Korzhnev DM, Orekhov VY and Arseniev AS. Model-free approach beyond the borders of its applicability. *J Magn Reson.* 1997; 127(2): 184-191.

Kubes M, Cordier J, Glowinski J, Girault JA, Chneiweiss H. Endothelin induces a calcium-dependent phosphorylation of PEA-15 in intact astrocytes: identification of Ser104 and Ser116 phosphorylated, respectively, by protein kinase C and calcium/calmodulin kinase II in vitro. *J Neurochem.* 1998; 71: 1307-14.

Levitt MH. Spin dynamics: Basics of nuclear magnetic resonance. *Wiley Publications.* 2001.

Li D, De Rose EF, London RE. The inter-ligand Overhauser effect: A powerful new NMR approach for mapping structural relationships of macromolecular ligands. *J. Biomol. NMR.* 1999; 15: 71–76.

Lin M, Shapiro MJ, Wareing JR. Diffusion-edited NMR – affinity NMR for direct observation of molecular interactions. *J Am Chem Soc.* 1997; 119: 5294-5250.

Lipari G, Szabo A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules. 1. Theory and Range of Validity. *J Am Chem Soc.* 1982a: 104: 4546-4559.

Lipari G, Szabo A. Model-Free Approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic resonance relaxation in macromolecules. 2. Analysis of Experimental results. *J Am Chem Soc.* 1982b; 104: 4559-4570.

Lipinski CA Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2000; 44: 235-249.

London RE and Avitabile J. Calculated ¹³C NMR relaxation parameters for a restricted internal diffusion model. Application to methionine relaxation in dihydrofolate reductase. *J Am Chem Soc.* 1978; 100: 7159-7165.

Maciejewski MW, Liu D, Prasad R, Wilson SH, Mullen GP. Backbone dynamics and refined solution structure of the N-terminal domain of DNA polymerase beta. Correlation with DNA binding and dRP lyase activity. *J. Mol. Biol.* 2000; 296: 229-53.

Mandel AM, Akke M and Palmer AG 3rd. Backbone dynamics of Escherichia coli ribonuclease HI: correlations with structure and function in an active enzyme. *J Mol Biol.* 1995; 246: 144-163.

Mayer M, Meyer B. Characterization of ligand binding by saturation transfer difference by NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Edn Engl.* 1999; 38: 1784-1788.

Mayer M, Meyer B. 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.* 2001; 123: 6108 – 6117.

Meyer B, Peters T. NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2003; 42: 864-90.

Meyer B, Weimar T, Peters T. Screening mixtures for biological activity by NMR. *Eur. J. Biochemistry* 1997; 246: 705-709.

Natarajan A, Ghose R, Hill JM. Structure and Dynamics of ASC2, a Pyrin Domain-only Protein That Regulates Inflammatory Signaling. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 31863–31875.

Palmer AG. 3rd. NMR characterization of the dynamics of biomacromolecules. *Chem Rev.* 2004; 104: 3623-3640.

Palmer AG., Rance M. and Wright PE. Intramolecular motions of a zinc finger DNA-binding domain from Xfin characterized by proton-detected natural

abundance ¹³C heteronuclear NMR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.* 1991; 113: 4371-4380.

Pellecchia M, Sem DS, Wuthrich K. NMR in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1: 211-9.

Pellecchia M., Becattini B., Crowell K.J., Fattorusso R., Forino M., Fragai M., Jung D., Mustelin T., Tautz L. NMR-based techniques in the hit identification and optimisation processes. *Expert Opin Ther Targets.* 2004; 8: 597-61.

Pellecchia M., Bertini I., Cowburn D., Dalvit C., Giralt E., Jahnke W., James L.T., Homans S.W., Kessler H., Luchinat C., Meyer B., Oschkinat H., Peng J., Schwalbe H. and Siegal G. Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age *Nature Rev Drug Discov.* 2008; 7: 738-745.

Peng JW and Wagner G. Mapping of the spectral densities of N-H bond motions in eglin c using heteronuclear relaxation experiments. *Biochemistry* 1992. 31: 8571-8586.

Qin H, Srinivasula SM, Wu G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, Shi Y. Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature.* 1999; 399: 549-57.

Redfield AG. The Theory of Relaxation Processes. *Adv. Magn. Reson.* 1965; 1: 1-32.

Renganathan H, Vaidyanathan H, Knapinska A, Ramos JW. Phosphorylation of PEA-15 switches its binding specificity from ERK/MAPK to FADD. *Biochem J.* 2005;390: 729-35.

Shuker SB, Hajduk PJ, Meadows RP, Fesik SW. Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science* 1996; 274: 1531-1534.

Stewart JJP. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods II. Applications. *J. Computational Chemistry* 1989; 10: 221-264.

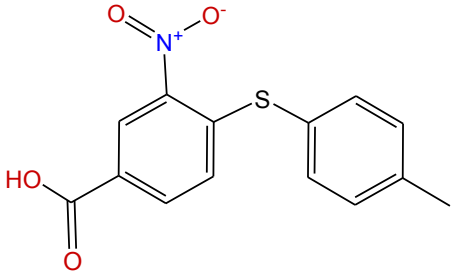
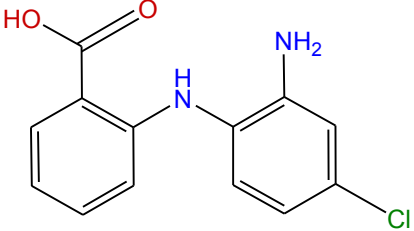
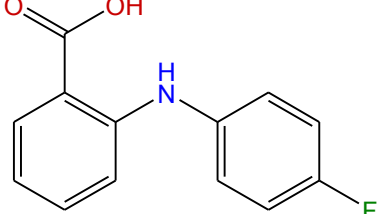
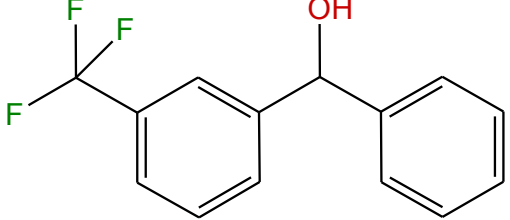
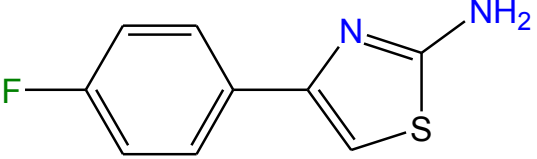
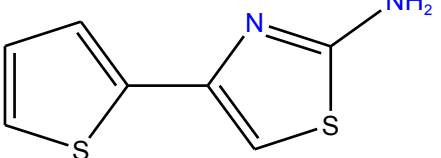
Trencia A, Perfetti A, Cassese A, Vigliotta G, Miele C, Oriente F, Santopietro S, Giacco F, Condorelli G, Formisano P, Beguinot F. Protein kinase B/Akt binds and phosphorylates PED/PEA-15, stabilizing its antiapoptotic action. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 4511-21.

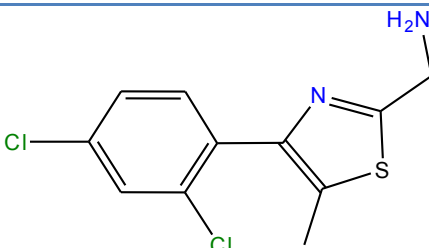
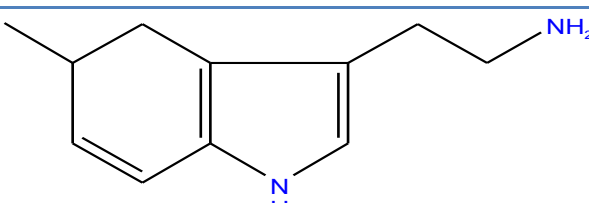
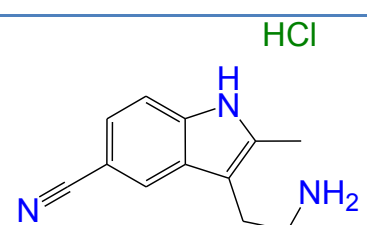
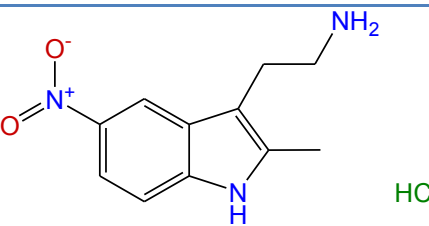
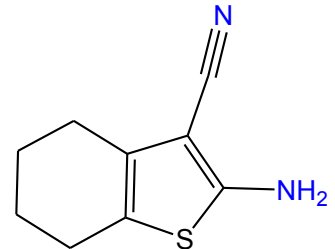
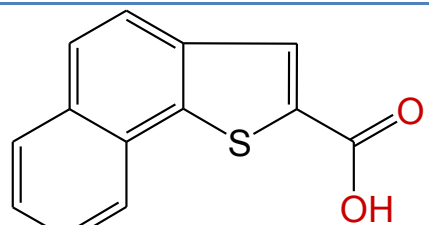
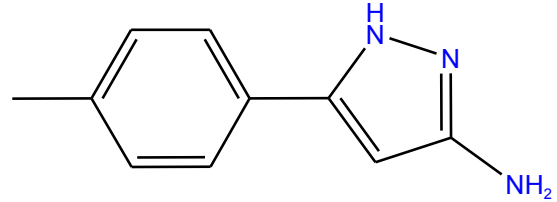
- Thrippleton MJ, Loening NM and Keeler J.** A fast method for the measurement of diffusion coefficients: one-dimensional DOSY. *Magn. Reson. Chem.* 2003; 41: 441–447.
- Tugarinov V, Liang Z, Shapiro YE, Freed JH and Meirovitch E.** A structural mode-coupling approach to ¹⁵N NMR relaxation in proteins. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(13): 3055-3063.
- Underhill DA, Vogan KJ, Underhill TM, Gros P.** Identification of a novel, alternatively spliced isoform and single nucleotide polymorphisms in the murine Pea-15 gene. *Mamm. Genome.* 2001; 12: 172-4.
- Vugmeyster L, Raleigh DP, Palmer AG 3rd and Vugmeister B.E.** Beyond the decoupling approximation in the model free approach for the interpretation of NMR relaxation of macromolecules in solution. *J Am Chem Soc.* 2003; 125(27): 8400-8404.
- Wangsness RK, Bloch F.** The dynamical theory of nuclear induction. *Phys. Rev.* 1953; 89:728-739.
- Wittebort RJ and Szabo A.** Theory of NMR relaxation in macromolecules: restricted diffusion and jump models for multiple internal rotations in amino acid side chains. *J Chem Phys.* 1978; 69: 1722-1736.
- Xiao T, Towb P, Wasserman SA, Sprang SR.** Three-dimensional structure of a complex between the death domains of Pelle and Tube. *Cell.* 1999; 99: 545-55.
- Xie Z, Ho WT, Exton J.** Association of the N- and C-terminal domains of Phospholipase D is required for catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 34679-34682.
- Xie Z, Ho WT, Exton J.** Association of the N- and C-terminal domains of Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 24962-24969.
- Zartler ER and Shapiro PJ.** Fragonomics: fragment-based drug discovery *Curr. Opinion in Chem Biol.* 2005; 9:366-370.
- Zartler ER and Shapiro MJ.** Protein NMR-based screening in drug discovery *Curr Pharm Des.* 2006; 12:3963-3972.
- Zhang Y, Redina O, Altshuller YM, Yamazaki M, Ramos J, Chneiweiss H, Kanaho Y and Frohman MA.** Regulation of expression of phospholipase D1

and D2 by PEA-15, a novel protein that interacts with them. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 35224-35232.

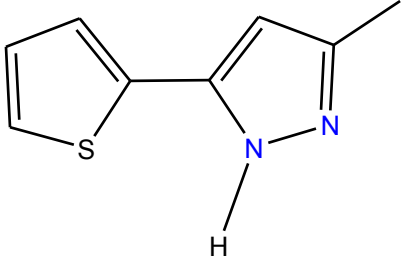
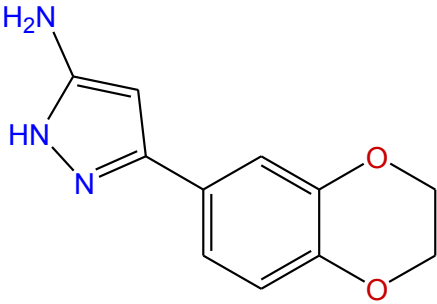
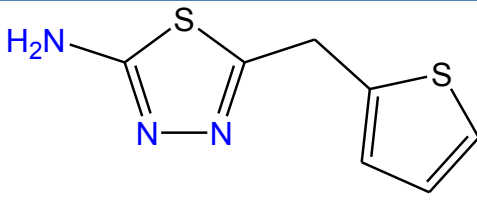
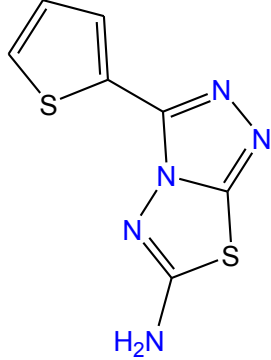
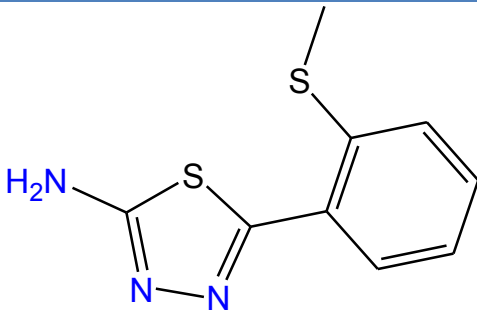
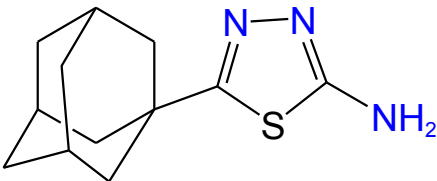
Appendice A1
Dati supplementari sull'identificazione
di ligandi di PED

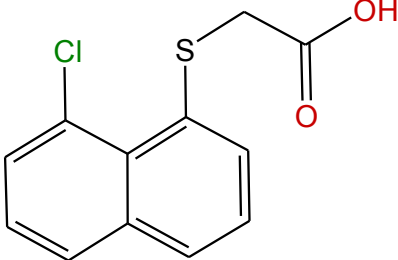
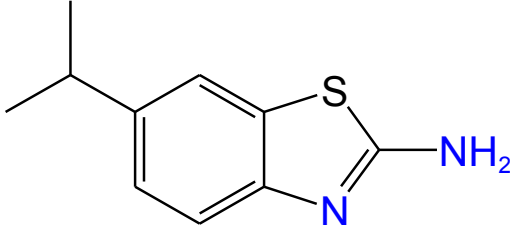
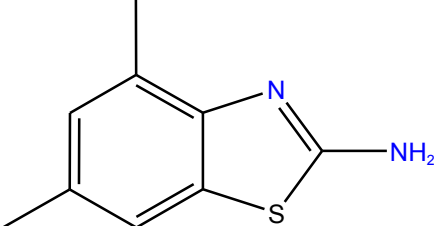
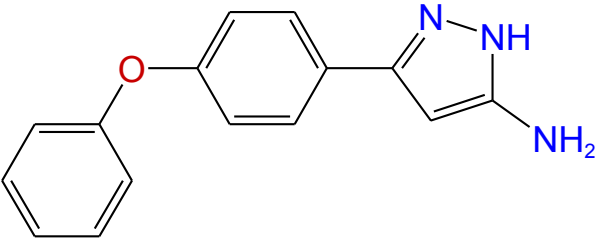
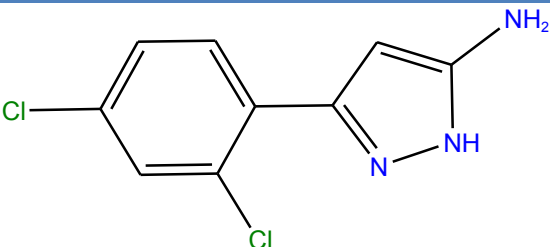
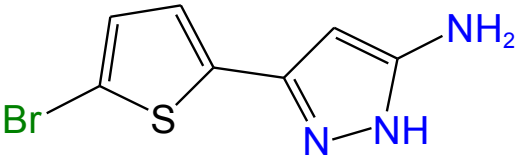
Tabella A1.1 Frammenti molecolari positivi allo *screening* NMR di PED

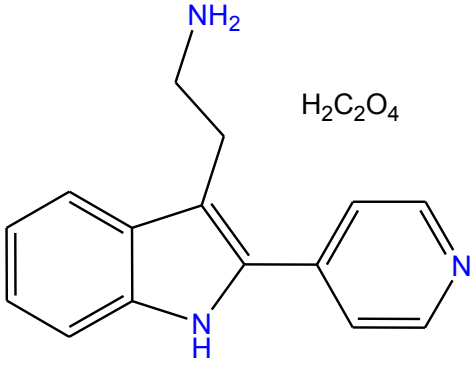
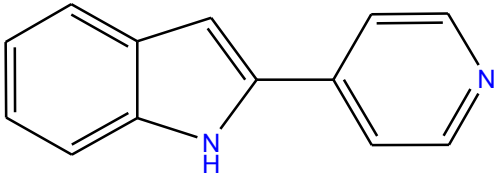
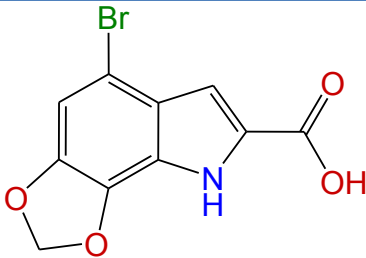
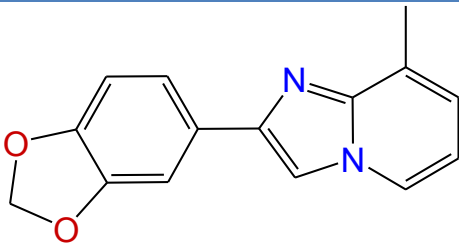
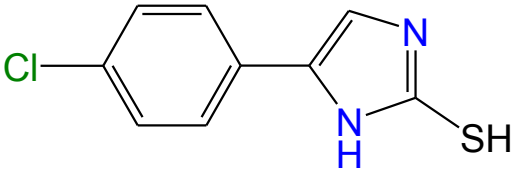
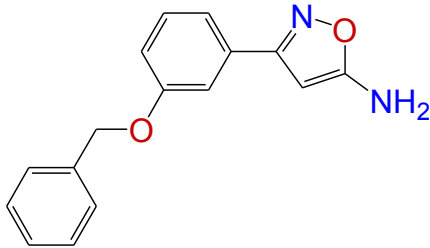
Nr	CODICE	STRUTTURA CHIMICA
1	BPH03	
2	BPH07	
3	BPH08	
4	BPH11	
5	TAZ02	
6	TAZ05	

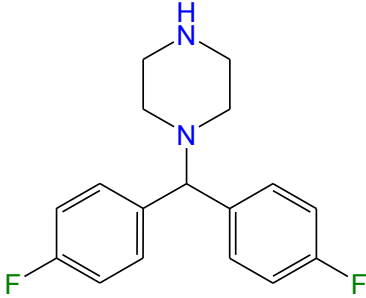
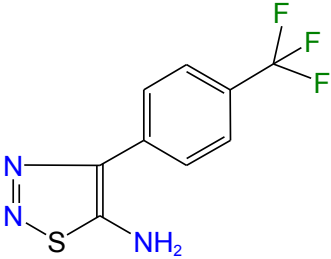
7	TAZ07	
8	IND02	
9	IND08	
10	IND10	
11	TPH04	
12	TPH01	
13	PYZ01	

14	PYZ05	
15	PYZ06	
16	PYZ07	
17	PYZ08	
18	PYZ09	
19	PYZ11	

20	PYZ19	
21	PYZ29	
22	TDA13	
23	TDA14	
24	TDA15	
25	TDA17	

26	NPH08	
27	BTA04	
28	BTA05	
29	PYZ03	
30	PYZ13	 <p style="text-align: right;">HCl</p>
31	PYZ15	<p style="text-align: center;">HCl</p> 

32	IND06	
33	IND16	
34	IND18	
35	BIM06	
36	IMD01	
37	OXA02	

38	PIP03	 <chem>Cc1ccc(F)cc1C(c2ccc(F)cc2)N3CCNCC3</chem>
39	TDA04	 <chem>Nc1ncnc(s1)C2=CC=C(C=C2)C(F)(F)F</chem>

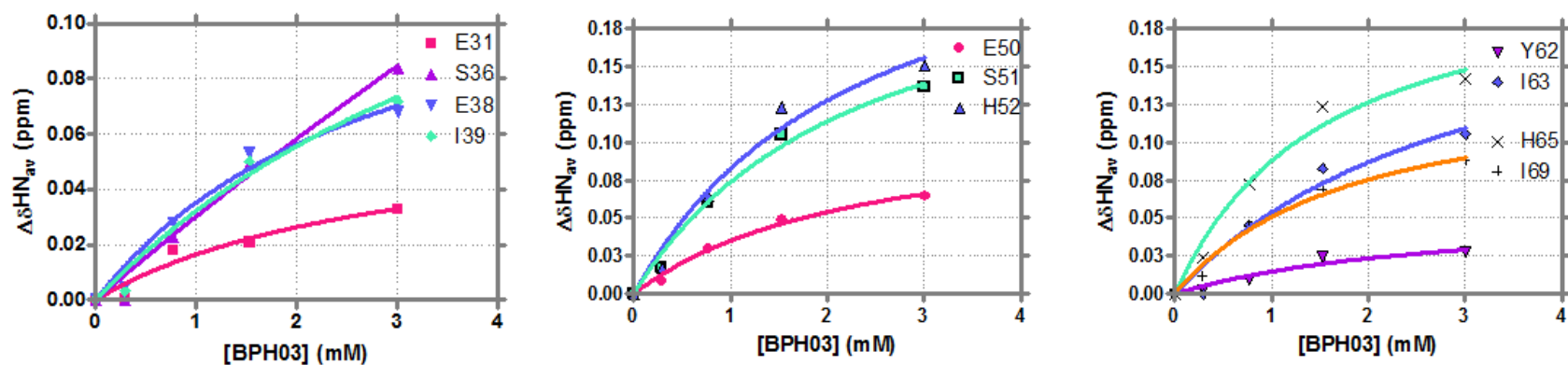


Figura A1.1 Curve di legame del frammento BPH03 ottenute dal *fitting* non lineare del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ dei residui di PED che presentano le maggiori variazioni di chemical shift in funzione della concentrazione del ligando, mediante il programma *GraphPad Prism*.

	I31	S36	E38	I39	E50	S51	H52	Y62	I63	H65	I69
Best-fit values											
KD	2.87	27.7	2.81	5.15	2.19	2.20	2.21	2.63	3.01	1.42	1.71
A	2.30	0.173	1.09	0.745	1.30	0.618	0.549	2.71	0.680	0.683	1.06
Std. Error											
KD	2.70	63.8	1.68	3.59	0.668	0.738	1.09	2.21	2.56	0.554	0.597
A	1.25	0.383	0.375	0.357	0.208	0.109	0.143	1.28	0.339	0.119	0.176
Goodness of Fit											
Degrees of Freedom	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
R ²	0.934	0.981	0.971	0.979	0.990	0.989	0.976	0.942	0.949	0.980	0.986

Tabella A1.2. Sommario dell'*output* dell'analisi di regressione non lineare, effettuata mediante di *GraphPad Prism*, dei dati di *chemical shift mapping* di PED in presenza del BPH03.

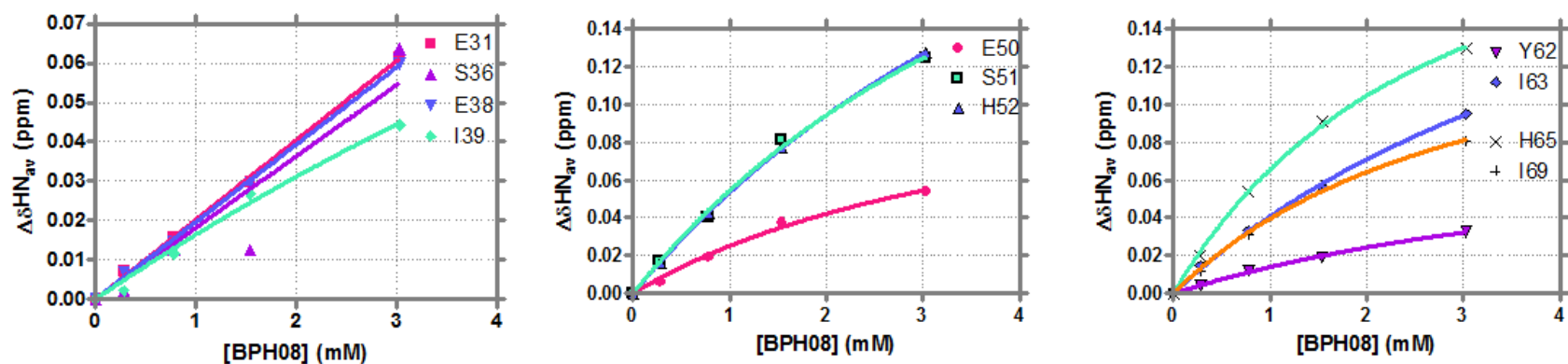


Figura A1.2 Curve di legame del frammento BPH08 ottenute dal *fitting* non lineare del $\Delta\delta\text{HN}_{\text{av}}$ dei residui di PED che presentano le maggiori variazioni di chemical shift in funzione della concentrazione del ligando, mediante il programma *GraphPad Prism*.

	I31	S36	E38	I39	E50	S51	H52	Y62	I63	H65	I69
Best-fit values											
KD	768	691	945	17.0	3.98	5.19	6.30	5.34	5.44	2.71	3.08
A	0.00965	0.0119	0.00807	0.503	1.17	0.438	0.379	1.65	0.562	0.601	0.905
Std. Error											
KD	14067	101751	19587	19.3	1.26	1.30	0.345	1.12	0.929	0.308	0.679
A	0.177	1.80	0.168	0.495	0.236	0.0758	0.0150	0.240	0.0669	0.0385	0.117
Goodness of Fit											
Degrees of Freedom	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
R ²	0.998	0.879	0.999	0.990	0.994	0.997	1.00	0.998	0.999	0.999	0.996

Tabella A1.3 Sommario dell'*output* dell'analisi di regressione non lineare, effettuata mediante di *GraphPad Prism*, dei dati di *chemical shift mapping* di PED in presenza del BPH08.

Appendice A2

Dati supplementari sulla dinamica del
backbone di PED

Tabella A2.1 Intensità dei picchi di correlazione ^{15}N - ^1H negli spettri HSQC per la misura degli R_1 a differenti tempi di *mixing* della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T.

Residuo	Tempo di <i>mixing</i> (sec)					
	0,01	0,1	0,3	0,6	0,8	1
G-2						
A-1						
M1						
A2	1107	657	484	350	307	166
E3	664	607	421	138	194	44
Y4	1409	982	620	500	242	454
G5	2681	1991	1604	1020	746	690
T6	3788	2985	2202	1389	1000	753
L7	3246	2625	1822	1157	787	728
L8	2322	2006	1313	904	715	537
Q9	3900	3323	2474	1782	1223	1084
D10	4460	3706	2716	1704	1301	1057
L11	2700	2168	1714	952	691	596
T12	2999	2452	1922	1261	795	807
N13	4044	3396	2596	1615	1374	867
N14	3602	2964	2429	1493	1061	638
I15	3199	2772	2064	1460	1170	685
T16	2527	2186	1604	997	748	450
L17	2967	2060	1453	872	598	491
E18	5665	4516	3178	1947	1424	1005
D19	5115	3936	2887	1757	1355	964
L20	3311	2572	1785	1243	999	683
E21	4682	3880	2710	1699	1634	817
Q22	4821	4284	2976	1892	1457	1005
L23	3638	3028	2160	1386	1009	732
K24	2461	2136	1282	1095	595	618
S25	5369	4591	3270	2027	1292	978
A26	4740	4043	2886	1541	1273	1218
C27						

K28	3341	2620	1694	1036	769	539
E29	4505	3503	2390	1280	1019	853
D30	4719	3685	2377	1453	1138	782
I31	4078	3151	2221	1413	1170	765
S33						
E34						
K35	1644	1093	845	342	466	321
S36	3439	2222	1626	1015	385	757
E37	4096	2792	2121	1149	888	789
E38	4711	3771	2730	1619	1052	835
I39	4519	3589	2348	1479	1150	1205
T40						
T41	4398	3454	2472	1431	1151	862
G42	1716	1219	749	451	375	303
S43	4116	2919	1783	1161	1098	590
A44	4073	3224	2188	1436	812	886
W45						
F46	3302	2743	2077	1092	994	742
S47	4644	3941	2608	1842	1332	949
F48	3728	3183	2137	1293	1049	729
L49	3135	2335	1665	1013	845	644
E50	3782	3221	2103	1412	1073	752
S51	4453	3529	2487	1527	1058	970
H52	2757	2075	1374	899	604	398
N53	3791	2983	1815	1177	879	617
K54	2208	1802	1326	851	591	541
L55	4077	3286	2245	1511	1264	767
D56	3902	2992	2236	1399	971	846
K57	2279	1784	1428	777	569	517
D58	3771	2913	2188	1390	1116	836
N59	4908	3889	2940	1792	1476	1049
L60	3386	2838	2173	1497	1014	913
S61	4754	3509	2606	1467	1219	760
Y62	3025	2370	1558	971	613	605
I63	2326	1702	1270	781	660	363
E64	4327	3586	2443	1475	1256	892

H65	2665	2198	1636	998	703	650
I66	2670	2048	1562	1022	766	629
F67	3558	3065	2287	1412	835	709
E68						
I69	3358	2652	2071	1202	824	925
S70	3519	2991	2363	1560	1002	946
R71	3525	3174	2324	1485	829	928
R72	3277	2807	2167	1401	955	812
D74	3282	2934	2185	1342	1076	922
L75	2483	2103	1658	977	759	825
L76	3042	2431	2028	1046	629	843
T77	4101	3392	2561	1618	1207	915
M78	2873	2479	1768	1455	867	795
V79	3169	2904	1968	1245	1011	809
V80	2699	2278	1761	1298	850	716
D81	4094	3507	2558	1581	1421	1133
Y82	3543	3008	2259	1386	1151	1034
R83	2546	2227	1562	1017	683	721
T84	3440	2796	1991	1497	1073	762
R85	3078	2541	1901	1254	1090	798
V86	3438	2846	2275	1526	1120	825
L87						
K88	2979	2403	1618	1181	782	628
I89	4699	3616	2432	1667	1244	944
S90	3904	2756	1672	954	739	576
E91	3914	2636	1476	922	794	504
E92	8499	5824	3985	2442	1724	1296
D93	18606	13163	8957	5258	3821	2866
E94	17555	12303	8246	4829	3463	2725
L95	8232	5862	3873	2467	1597	1135
D96	8694	5510	3678	2139	1720	1213
T97	3822	2191	1456	893	681	555
K98	2300	1439	909	539	388	237
L99	9018	5879	3769	2400	1658	1441
T100	2226	1149	675	581	297	-
R101						

I102	4109	2681	1727	1039	700	590
S104						
A105						
K106						
K107						
I108						
K109						
D110						
I111						
I112	6408	4422	2861	1678	1027	967
R113	2580	1613	1018	720	369	-
Q114	2553	1342	889	440	407	386
S116	2156	1356	742	585	512	262
E117	3734	2189	1333	847	603	422
E118	8988	6438	3938	2481	1865	1117
D119	9103	6099	3793	2391	1605	1149
I120	9948	7470	5161	3072	2030	1500
I121	9027	6885	4618	2682	2078	1386
K122	3329	2155	1404	874	550	499
L123	4968	3255	1928	1352	1081	623
A124	6235	3744	2455	1603	1115	881
K128	3160	1902	1306	817	803	599
K129						
A130	16995	13339	10308	7913	6700	5571

Tabella A2.2 Intensità dei picchi di correlazione ^{15}N - ^1H negli spettri HSQC per la misura degli R_2 a differenti tempi di *mixing* della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T.

Residuo	Tempo di <i>mixing</i> (sec)					
	0,01	0,03	0,05	0,07	0,09	0,15
G-2						
A-1						
M1						
A2						
E3						
Y4	829	825	406	602	332	186
G5	2052	1410	769	596	398	201
T6	2721	1993	1312	975	819	276
L7	2106	1415	1361	955	864	467
L8	1640	1383	1036	640	374	261
Q9	2958	2179	1504	1243	905	308
D10	3128	2332	1824	1422	1341	490
L11	1796	1459	1066	651	539	243
T12	2360	1629	1300	994	782	326
N13	2763	2002	1519	1153	728	402
N14	2369	2052	1709	1087	1014	347
I15	2697	1942	1656	1322	1138	443
T16	1761	1448	1202	890	641	284
L17	2304	1806	1269	960	844	386
E18	3730	3049	2429	1895	1393	572
D19	3245	2712	2174	1708	1329	672
L20	2364	1863	1475	1158	835	459
E21	3505	2326	2003	1530	1095	684
Q22	3560	2810	2176	1827	1293	515
L23	2714	2075	1637	1311	1011	441
K24	1908	1544	1365	915	706	398
S25	3902	3069	2324	1909	1379	766
A26	3200	2499	1721	1631	1247	686
C27						

K28	2215	1715	1332	1011	732	414
E29	3026	2484	2050	1645	1104	684
D30	3398	2402	1935	1515	967	425
I31	3067	2266	1751	1379	1056	475
S33						
E34						
K35	1188	698	344	412	331	171
S36	2498	1541	1703	1281	675	407
E37	2670	1967	1573	1243	824	251
E38	3445	2769	2061	1768	1493	675
I39						
T40						
T41	3567	2700	2135	1537	1181	492
G42	1358	1017	871	545	533	212
S43	3048	2214	1794	1314	1043	429
A44	2731	1984	1580	1064	916	520
W45						
F46	2476	1913	1591	1205	787	493
S47	3536	2473	2149	1678	1331	632
F48	2452	1986	1655	1292	1076	537
L49	2608	1913	1569	1293	1038	447
E50	2842	1982	1602	1299	995	498
S51	3075	2337	1616	1459	1060	434
H52	1961	1459	964	779	826	334
N53	2757	2119	1550	1438	1120	492
K54	1945	1379	833	710	617	293
L55	2978	2369	1719	1371	1184	663
D56	3109	2276	1787	1477	1033	493
K57	1722	1312	1152	950	698	436
D58	2722	2032	1522	1141	980	337
N59	3641	2979	2419	1807	1410	715
L60	2404	1806	1560	1349	1124	442
S61	3538	2387	1846	1634	1170	648
Y62	2138	1407	1142	826	625	163
I63	1613	1142	913	788	508	70
E64	3414	2523	1985	1559	1247	625

H65	1704	1312	1078	920	681	167
I66	1677	1310	1052	853	624	188
F67	2587	2026	1553	835	709	484
E68						
I69	2216	1624	1310	887	786	376
S70	2714	2266	1749	1129	807	384
R71	2613	2115	1618	1439	1137	376
R72	2593	2157	1714	1440	1232	550
D74	2157	1600	1259	973	524	236
L75	1829	1371	1113	925	762	200
L76	1988	1502	1314	993	713	178
T77	3120	2345	1803	1229	969	381
M78	1984	1363	1127	834	480	298
V79	2315	1813	1286	855	773	277
V80	1978	1488	1134	911	652	294
D81	3015	2200	1501	1156	879	370
Y82	2328	1780	1483	986	826	518
R83	1905	1368	931	669	434	332
T84	2257	1668	1273	1016	719	327
R85	2214	1876	1246	985	702	357
V86	2531	2014	1401	1018	741	350
L87						
K88	1991	1551	1284	1147	717	303
I89	3543	2586	2100	1575	1535	618
S90	2937	2308	1684	1360	1093	656
E91	2985	2184	2049	1495	1332	782
E92	6020	4876	3779	3422	2706	1615
D93	14068	11770	9872	8563	7267	4439
E94	13430	11166	9446	8175	7021	4306
L95	5996	5162	4501	3850	3460	2004
D96	6776	5463	4243	3621	3121	1918
T97	3103	2475	2038	1729	1440	887
K98	1696	1500	1245	1075	237	573
L99	6799	5620	4703	4120	3733	2338
T100	1748	1164	1078	814	574	482
R101						

I102	3006	2401	2140	1842	1696	959
S104						
A105						
K106						
K107						
I108						
K109						
D110						
I111						
I112	4303	3568	2916	2652	2359	1529
R113	1936	1449	1287	900	947	686
Q114	1625	1476	1175	1004	783	641
S116	1969	1343	1178	920	904	665
E117	3076	2438	1923	1793	1421	917
E118	6930	5715	5065	4403	3800	2277
D119	6722	5809	5241	4660	4042	2712
I120	7530	6736	6033	5450	4997	3362
I121	6136	5455	4770	4412	4034	2738
K122	2214	1795	1754	1352	1185	896
L123	3927	3231	2568	2304	2093	1253
A124	4648	3667	3343	2964	2430	1693
K128	2618	2451	1832	1749	1503	1034
K129	345	279	275	380	177	212
A130	11082	10253	9430	8860	8165	5897

Tabella A2.3 Intensità dei picchi di correlazione ^{15}N - ^1H in presenza (I) e in assenza (I_0) di saturazione dell' ^1H della proteina PED 0.150 mM a 298K e 600 MHz.

Residuo	I_0	ΔI_0	I	ΔI
G-2				
A-1				
M1				
A2				
E3	111	6	31	2
Y4	151	8	75	4
G5	148	7	124	6
T6	260	13	176	9
L7	203	10	154	8
L8	97	5	95	5
Q9	229	11	180	9
D10	243	12	182	9
L11	149	7	127	6
T12	188	9	149	7
N13	226	11	181	9
N14	197	10	174	9
I15	173	9	147	7
T16	145	7	115	6
L17	151	8	115	6
E18	258	13	186	9
D19	284	14	257	13
L20	166	8	139	7
E21	194	10	198	10
Q22	250	13	206	10
L23	201	10	188	9
K24	144	7	112	6
S25	234	12	207	10
A26	253	13	194	10
C27				
K28	163	8	133	7
E29	182	9	162	8

D30	239	12	183	9
I31	195	10	136	7
S33				
E34	67	3	36	2
K35	120	6	55	3
S36				
E37	212	11	135	7
E38				
I39				
T40				
T41	221	11	162	8
G42	121	6	110	6
S43	240	12	182	9
A44	203	10	163	8
W45				
F46	217	11	180	9
S47	266	13	206	10
F48	218	11	184	9
L49	145	7	132	7
E50	184	9	178	9
S51	240	12	190	10
H52	153	8	119	6
N53	200	10	168	8
K54	120	6	95	5
L55	192	10	170	9
D56	193	10	167	8
K57	99	5	110	6
D58	176	9	168	8
N59	235	12	184	9
L60	202	10	138	7
S61	219	11	218	11
Y62	176	9	133	7
I63	161	8	96	5
E64	279	14	160	8
H65	193	10	132	7
I66	126	6	142	7

F67	193	10	179	9
E68				
I69	225	11	139	7
S70	167	8	159	8
R71	235	12	147	7
R72	182	9	135	7
D74	215	11	178	9
L75	177	9	114	6
L76	152	8	143	7
T77	254	13	190	10
M78	164	8	143	7
V79	140	7	142	7
V80	139	7	113	6
D81	220	11	175	9
Y82	205	10	165	8
R83	148	7	108	5
T84	183	9	143	7
R85	199	10	130	7
V86	166	8	116	6
L87				
K88	114	6	80	4
I89	159	8	105	5
S90	184	9	72	4
E91	185	9	59	3
E92	292	15	89	4
D93	675	34	269	13
E94	675	34	269	13
L95	326	16	115	6
D96	315	16	119	6
T97	168	8	59	3
K98	114	6	33	2
L99	327	16	22	1
T100	108	5	26	1
R101				
I102	127	6	50	3
S104				

A105				
K106				
K107				
Y108				
K109				
D110				
I111				
I112	228	11	37	2
R113	105	5	1	0
Q114	129	6	28	1
S116	117	6	1	0
E117	166	8	44	2
E118	285	14	-25	-1
D119	286	14	49	2
I120	270	14	-48	-2
I121	278	14	-46	-2
K122	100	5	30	2
L123	167	8	-19	-1
A124	195	10	-32	-2
K128	94	5	-107	-5
K129	20	1	-28	-1
A130	130	7	-871	-44

Tabella A2.4 ^{15}N R_1 , R_2 e R_2/R_1 e ^{15}N $\{^1\text{H}\}$ NOE, con i rispettivi errori, della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T

Residuo	R_1	ΔR_1	R_2	ΔR_2	R_2/R_1	$\Delta R_2/R_1$	NOE	ΔNOE
A-2								
G-1								
M1								
A2								
E3							0.28	0.01
Y4	1.34	0.40	10.94	2.14	8.2	2.2	0.50	0.02
G5	1.37	0.10	16.69	1.55	12.2	1.5	0.84	0.04
T6	1.60	0.04	16.10	0.61	10.1	0.6	0.68	0.03
L7	1.56	0.10	10.30	0.79	6.6	0.8	0.76	0.08
L8	1.46	0.07	14.34	1.86	9.8	1.4	0.98	0.10
Q9	1.32	0.07	15.94	0.57	12.1	0.9	0.79	0.08
D10	1.47	0.05	12.74	0.87	8.7	0.8	0.75	0.04
L11	1.58	0.09	14.74	0.82	9.4	0.9	0.85	0.04
T12	1.41	0.10	13.79	0.35	9.8	0.9	0.79	0.04
N13	1.48	0.07	14.02	0.86	9.5	0.9	0.80	0.04
N14	1.66	0.10	13.93	1.11	8.4	1.0	0.88	0.09
I15	1.44	0.10	12.39	0.77	8.6	0.9	0.85	0.04
T16	1.68	0.07	13.33	0.55	8.0	0.7	0.79	0.04
L17	1.78	0.10	12.68	0.55	7.1	0.7	0.76	0.04
E18	1.71	0.04	13.54	0.54	7.9	0.5	0.72	0.04

D19	1.63	0.06	11.43	0.21	7.0	0.5	0.90	0.05
L20	1.49	0.08	11.89	0.40	8.0	0.7	0.84	0.04
E21	1.59	0.20	11.49	0.93	7.2	1.1	1.02	0.05
Q22	1.57	0.03	13.79	0.62	8.8	0.6	0.82	0.04
L23	1.59	0.02	12.86	0.26	8.1	0.4	0.94	0.05
K24	1.47	0.18	11.59	0.70	7.9	1.1	0.78	0.04
S25	1.74	0.04	11.75	0.43	6.7	0.5	0.88	0.09
A26	1.48	0.20	10.80	0.69	7.3	1.1	0.77	0.08
C27		0.13						
K28	1.79	0.07	12.19	0.56	6.8	0.6	0.82	0.08
E29	1.71	0.13	11.01	0.7	6.4	0.8	0.89	0.04
D30	1.75	0.08	14.85	0.55	8.5	0.7	0.77	0.04
I31	1.59	0.08	13.18	0.15	8.3	0.7	0.70	0.03
P32								
S33								
E34							0.54	0.03
K35	1.57	0.30	12.55	2.45	8.0	2.0	0.46	0.05
S36	1.79	0.43	12.96	1.70	7.2	1.6		
E37	1.66	0.16	16.78	1.05	10.1	1.2	0.64	0.03
E38	1.77	0.06	11.43	0.46	6.5	0.5		
I39								
T40								
T41	1.62	0.08	14.18	0.21	8.7	0.7	0.73	0.04

G42	1.70	0.18	13.10	0.86	7.7	1.0	0.91	0.05
S43	1.75	0.19	13.84	0.29	7.9	0.9	0.76	0.04
A44	1.65	0.18	11.84	0.9	7.2	1.0	0.80	0.04
W45								
F46	1.52	0.11	11.90	0.89	7.8	1.0		
S47	1.56	0.06	11.95	0.42	7.7	0.6	0.83	0.04
F48	1.63	0.06	10.83	0.2	6.7	0.5	0.77	0.04
L49	1.54	0.10	12.24	0.48	7.9	0.8	0.84	0.04
E50	1.59	0.06	12.12	0.41	7.6	0.6	0.91	0.05
S51	1.59	0.11	13.76	0.59	8.7	0.9	0.97	0.05
H52	1.86	0.07	12.01	1.24	6.5	0.8	0.79	0.04
N53	1.77	0.09	11.96	0.63	6.7	0.7	0.78	0.04
K54	1.47	0.09	13.07	1.20	8.9	1.1	0.84	0.04
L55	1.57	0.10	10.68	0.60	6.8	0.8	0.79	0.04
D56	1.55	0.09	13.05	0.36	8.4	0.7	0.89	0.04
K57	1.56	0.11	9.80	0.50	6.3	0.7	0.87	0.04
D58	1.47	0.07	14.63	0.66	10.0	0.8	1.11	0.06
N59	1.50	0.06	11.83	0.26	7.9	0.6	0.95	0.05
L60	1.36	0.07	11.60	0.95	8.5	1.0	0.78	0.04
S61	1.74	0.09	11.72	0.77	6.7	0.7	0.68	0.03
Y62	1.70	0.15	17.88	1.09	10.5	1.2	0.90	0.05
I63	1.70	0.12	21.78	2.97	12.8	2.0	0.76	0.04
E64	1.56	0.08				0.0	0.60	0.06

H65	1.49	0.10	16.20	1.84	10.9	1.5	0.57	0.03
I66	1.43	0.07	15.47	1.22	10.8	1.1	0.68	0.07
F67	1.70	0.09	12.66	1.89	7.5	1.3	0.90	0.06
E68								
I69	1.43	0.18	12.56	0.59	8.8	1.1	0.93	0.05
S70	1.40	0.09	14.61	0.76	10.5	1.0	0.62	0.03
R71	1.52	0.17	13.56	1.18	8.9	1.3	0.95	0.05
R72	1.45	0.05	10.94	0.54	7.5	0.6	0.63	0.06
P73								
D74	1.34	0.07	16.23	1.01	12.1	1.1	0.74	0.04
L75	1.24	0.16	15.27	1.60	12.3	1.8	0.83	0.04
L76	1.52	0.25	17.04	1.70	11.2	1.8	0.64	0.03
T77	1.50	0.02	15.08	0.28	10.1	0.4	0.94	0.09
M78	1.32	0.11	13.85	1.28	10.5	1.3	0.75	0.04
V79	1.42	0.07	15.17	0.68	10.7	0.9	0.87	0.04
V80	1.34	0.07	13.59	0.22	10.1	0.7	1.01	0.10
D81	1.30	0.09	14.89	0.38	11.4	0.9	0.81	0.04
Y82	1.29	0.10	10.94	0.94	8.4	1.1	0.80	0.04
R83	1.40	0.14	12.93	1.90	9.2	1.7	0.80	0.08
T84	1.44	0.07	13.76	0.25	9.6	0.7	0.73	0.04
R85	1.31	0.06	13.45	0.64	10.3	0.8	0.78	0.04
V86	1.40	0.03	14.46	0.51	10.3	0.6	0.65	0.03
L87		0.17					0.70	0.03

K88	1.54	0.08	13.47	0.98	8.7	0.9		
I89	1.56	0.09	11.96	0.8	7.7	0.8	0.70	0.07
S90	1.89	0.16	10.74	0.67	5.7	0.8	0.66	0.07
E91	1.91	0.19	9.33	0.59	4.9	0.8	0.39	0.02
E92	1.82	0.11	9.30	0.36	5.1	0.6	0.32	0.02
D93	1.83	0.10	8.17	0.09	4.5	0.5	0.30	0.02
E94	1.84	0.12	8.02	0.11	4.4	0.5	0.40	0.02
L95	1.92	0.09	7.73	0.29	4.0	0.5	0.40	0.02
D96	1.86	0.16	8.89	0.45	4.8	0.7	0.35	0.02
T97	1.81	0.21	8.83	0.27	4.9	0.8	0.38	0.02
K98	2.12	0.14	8.04	0.47	3.8	0.3	0.35	0.02
L99	1.79	0.18	7.42	0.28	4.1	0.7	0.29	0.01
T100	2.15	0.42	9.16	1.47	4.3	1.1	0.07	0.00
R101								
I102	1.91	0.16	7.81	0.42	4.1	0.6	0.24	0.01
P103								
S104								
A105								
K106								
K107								
Y108								
K109								
D110								

I111									
I112	1.93	0.17	7.18	0.34	3.7	0.3	0.39	0.02	
R113	2.19	0.25	7.16	1.18	3.3	0.7	0.16	0.01	
Q114	1.82	0.33	7.07	0.82	3.9	0.8	0.01	0.00	
P115									
S116	1.81	0.26	7.18	1.2	4.0	1.0	0.22	0.01	
E117	2.03	0.19	8.46	0.49	4.2	0.4	0.01	0.00	
E118	1.96	0.12	7.78	0.22	4.0	0.2	0.27	0.01	
D119	1.99	0.13	6.42	0.13	3.2	0.2	-0.09	0.00	
I120	1.88	0.06	5.68	0.19	3.0	0.1	0.17	0.01	
I121	1.82	0.07	5.64	0.21	3.1	0.1	-0.18	-0.01	
K122	1.88	0.18	6.49	0.6	3.4	0.4	-0.17	-0.01	
L123	1.87	0.18	7.90	0.42	4.2	0.4	0.30	0.02	
A124	1.84	0.18	7.02	0.38	3.8	0.4	-0.11	-0.01	
P125									
P126									
P127									
K128	1.51	0.23	6.76	0.51	4.5	0.7	-0.16	-0.01	
K129	1.11	0.39					-1.14	-0.06	
A130	1.06	0.08	4.45	0.23	4.2	0.3	-1.40	-0.07	

Tabella A2.5 Stima del τ_m dal rapporto R_2/R_1 con il rispettivi errori $\Delta\tau_m$ della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T

Residuo	τ_m (nsec)	$\Delta\tau_m$ (nsec)
7	7.57	0.05
8	9.56	0.05
10	8.91	0.05
11	9.29	0.05
12	9.54	0.05
13	9.37	0.05
14	8.72	0.05
15	8.85	0.05
16	8.46	0.05
17	7.93	0.04
18	8.45	0.05
19	7.86	0.05
20	8.48	0.05
21	7.99	0.05
22	8.97	0.05
23	8.53	0.05
24	8.43	0.05
25	7.68	0.05
26	8.02	0.05
28	7.70	0.05
29	7.45	0.04
30	8.77	0.05
31	8.67	0.05
36	8.00	0.05

38	7.49	0.04
41	8.94	0.06
42	8.30	0.05
43	8.44	0.05
44	7.97	0.05
46	8.38	0.05
47	8.28	0.05
48	7.61	0.05
49	8.45	0.05
50	8.24	0.05
51	8.89	0.05
52	7.48	0.04
53	7.67	0.05
54	9.04	0.05
55	7.72	0.05
56	8.74	0.05
57	7.35	0.04
59	8.41	0.05
60	8.82	0.05
61	7.66	0.05
62	9.92	0.05
67	8.15	0.05
69	8.98	0.05
71	9.03	0.05
82	8.76	0.05
83	9.23	0.05
84	9.41	0.05
88	8.92	0.05

89

8.28

0.05

Tabella A2.6 Parametri microdinamici *model-free* della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T

Residuo	Modello	S ²	ΔS ²	τ _e (nsec)	Δτ _e (nsec)
A-2					
G-1					
M1					
A2					
E3					
Y4	LS2	0.830	0.016	112.2	21.7
G5					
T6					
L7	LS2	0.910	0.015	238.7	80.3
L8					
Q9					
D10					
L11					
T12					
N13					
N14					
I15	LS1	0.984	0.017		
T16					
L17		0.992	0.012		
E18		0.993	0.011		
D19	LS1	0.993	0.01		
L20	LS1	0.957	0.015		
E21	LS1	0.985	0.013		
Q22					

L23					
K24	LS2	0.934	0.016	50.9	70.6
S25	LS1	0.994	0.009		
A26	LS2	0.907	0.017	59.4	33.7
C27					
K28	LS1	0.994	0.009		
E29	LS1	0.994	0.009		
D30					
I31	LS3	0.991	0.012		
P32					
S33					
E34					
K35					
S36	LS3	0.993	0.011		
E37					
E38	LS1	0.994	0.009		
I39					
T40					
T41					
G42	LS3	0.991	0.012		
S43					
A44	LS3	0.99	0.012		
W45					
F46					
S47					
F48	LS1	0.979	0.014		
L49					
E50					

S51					
H52					
N53	LS1	0.999	0.004		
K54					
L55	LS1	0.947	0.015		
D56					
K57	LS1	0.919	0.016		
D58	LS3	0.956	0.023		
N59	LS3	0.948	0.021		
L60	LS3	0.826	0.024		
S61	LS3	0.966	0.019		
Y62					
I63					
E64					
H65					
I66					
F67		0.994	0.01		
E68					
I69					
S70					
R71					
R72	LS2	0.899	0.016	62.6	30.6
P73					
D74					
L75					
L76					
T77					
M78					

V79					
V80					
D81					
Y82	LS1	0.847	0.015		
R83					
T84					
R85					
V86					
L87					
K88					
I89	LS3	0.983	0.013		
S90					
E91	LS2	0.602	0.038	986.9	46.4
E92	LS2	0.614	0.024	953.3	46.5
D93	LS2	0.573	0.039	988.5	42.9
E94	LS2	0.585	0.032	992.0	25.0
L95	LS2	0.498	0.024	989.1	20.4
D96	LS2	0.601	0.03	996.9	14.6
T97	LS2	0.618	0.033	992.9	27.6
K98					
L99					
T100					
R101					
I102	LS2	0.524	0.025	968.3	35.9
P103					
S104					
A105					
K106					

K107					
Y108					
K109					
D110					
I111					
I112					
R113					
Q114	LS2	0.447	0.025	965.8	33.5
P115					
S116					
E117	LS2	0.49	0.024	970.0	32.1
E118					
D119	LS2	0.387	0.027	992.4	17.7
I120					
I121					
K122		0.447	0.029	992.9	19.3
L123					
A124					
P125					
P126					
P127					
K128					
K129					
A130					

Tabella A2.7 Densità spettrali ridotte della proteina PED 0.150 mM a 298K e 14.1 T

Residuo	Jeff(0)	J(ω_N)	J(0.87ω_H)
G-2			
A-1			
M1			
A2			
E3			
Y4	3.92	0.32	0.011
G5	6.12	0.34	0.003
T6	5.85	0.39	0.008
L7	3.64	0.39	0.006
L8	5.21	0.37	0.000
Q9	5.84	0.33	0.004
D10	4.59	0.36	0.006
L11	5.34	0.39	0.004
T12	5.00	0.35	0.005
N13	5.08	0.37	0.005
N14	5.01	0.42	0.003
I15	4.46	0.36	0.003
T16	4.77	0.42	0.005
L17	4.50	0.44	0.007
E18	4.85	0.42	0.007
D19	4.06	0.41	0.002
L20	4.26	0.37	0.004
E21	4.09	0.41	-0.001
Q22	4.97	0.39	0.004

L23	4.62	0.40	0.002
K24	4.15	0.36	0.005
S25	4.16	0.44	0.003
A26	3.84	0.37	0.005
C27			
K28	4.32	0.45	0.005
E29	3.88	0.43	0.003
D30	5.34	0.43	0.006
I31	4.73	0.39	0.008
P32			
S33			
E34			
K35	4.49	0.37	0.013
S36			
E37	6.10	0.40	0.009
E38	4.02	0.42	0.015
I39			
T40			
T41	5.11	0.40	0.007
G42	4.69	0.43	0.002
S43	4.95	0.43	0.007
A44	4.21	0.41	0.005
W45			
F46			
S47	4.27	0.39	0.004
F48	3.83	0.40	0.006
L49	4.39	0.39	0.004

E50	4.33	0.40	0.002
S51	4.96	0.40	0.001
H52	4.23	0.46	0.006
N53	4.23	0.44	0.006
K54	4.72	0.37	0.004
L55	3.78	0.39	0.005
D56	4.70	0.39	0.003
K57	3.45	0.39	0.003
D58	5.32	0.38	-0.003
N59	4.24	0.38	0.001
L60	4.18	0.34	0.005
S61	4.14	0.43	0.009
Y62	6.52	0.43	0.000
I63	8.00	0.42	0.006
E64			
H65	5.90	0.36	0.010
I66	5.64	0.35	0.007
F67	4.53	0.44	-0.003
E68			
I69	4.53	0.36	0.002
S70	5.32	0.34	0.008
R71	4.90	0.39	0.001
R72	3.90	0.35	0.008
P73			
D74	5.95	0.33	0.005
L75	5.60	0.31	0.003
L76	6.22	0.37	0.008

T77	5.48	0.38	0.001
M78	5.04	0.33	0.005
V79	5.53	0.36	0.003
V80	4.95	0.34	0.000
D81	5.44	0.33	0.004
Y82	3.93	0.32	0.004
R83	4.68	0.35	0.004
T84	4.98	0.35	0.006
R85	4.89	0.33	0.004
V86	5.26	0.34	0.008
L87			
K88	4.83	0.34	0.02
I89	4.27	0.38	0.01
S90	3.74	0.46	0.01
E91	3.18	0.45	0.02
E92	3.19	0.42	0.02
D93	2.75	0.43	0.02
E94	2.70	0.43	0.02
L95	2.57	0.45	0.02
D96	3.03	0.44	0.02
T97	3.01	0.43	0.02
K98	2.65	0.50	0.02
L99	2.47	0.42	0.02
T100	3.06	0.48	0.03
R101			
I102	2.60	0.44	0.02
P103			

S104			
A105			
K106			
K107			
I108			
K109			
D110			
I111			
I112	2.36	0.46	0.02
R113	2.29	0.50	0.03
Q114	2.33	0.41	0.03
P115			
S116	2.38	0.42	0.02
E117	2.81	0.45	0.03
E118	2.58	0.45	0.02
D119	2.04	0.44	0.03
I120	1.79	0.43	0.02
I121	1.77	0.40	0.03
K122	2.08	0.41	0.03
L123	2.64	0.43	0.02
A124	2.30	0.40	0.03
P125			
P126			
P127			
K128	2.27	0.33	0.03
K129			
A130	1.46	0.19	0.04

PUBBLICAZIONI

Lavori su riviste internazionali:

Kaczmarek K., **Farina B.**, Zubrzak P., Jankowski J., Zimecki M., Suder P., Benedetti E., Fattorusso R., Saviano M., Zabrocki J. “Synthesis, Conformational Analysis and Immunological Activity of β^3 -Phenylalanine-Substituted Cyclolinopeptide A Analogues”

In press J.Pept.Sci.