



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Chimiche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOSCIENZE E BIOTECNOLOGIE
INDIRIZZO IN BIOTECNOLOGIE
CICLO XXII

CARATTERIZZAZIONE DI DOMINI STAS DI PROTEINE DELLA FAMIGLIA SULP MEDIANTE TECNICHE DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Giuseppe Zanotti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Valle

Supervisore :Ch.mo Prof. Stefano Mammi

Dottorando : Lorenzo Gesiot

INDICE

ABSTRACT/SOMMARIO p. 5

1. INTRODUZIONE

- p. 9 **1.1 IL CICLO DELLO ZOLFO NEGLI ORGANISMI VIVENTI**
- p. 11 **1.2 IL TRASPORTO DEL SOLFATO**
- p. 12 **1.3 IL TRASPORTO DEL SOLFATO NEI BATTERI**
- p. 14 **1.4 ILTRASPORTO DEL SOLFATO NEGLI EUCARIOTI**
- p. 15 **1.5 ILTRASPORTO DEL SOLFATO NELLE PIANTE**
- 1.5.1 L'ASSORBIMENTO DEL SOLFATO
 - 1.5.2 LA TRASLOCAZIONE DEL SOLFATO NEI COMPARTIMENTI SUBCELLULARI
 - 1.5.3 IL TRASPORTO DEL SOLFATO A LUNGA DISTANZA
 - 1.5.4 LA REGOLAZIONE DELL'ASSORBIMENTO DEL SOLFATO
- p. 19 **1.6 ILTRASPORTO DEL SOLFATO NEGLI ANIMALI**
- p. 21 **1.7 LE PERMEASI DEL SOLFATO SulP NEI MAMMIFERI**
- 1.7.1 SLC26A1
 - 1.7.2 SLC26A2
 - 1.7.3 SLC26A3
 - 1.7.4 SLC26A4
 - 1.7.5 SLC26A5
 - 1.7.6 SLC26A6
 - 1.7.7 SLC26A7
 - 1.7.8 SLC26A8
 - 1.7.9 SLC26A9
 - 1.7.10 SLC26A10
 - 1.7.11 SLC26A11
- p. 37 **1.8 SCOPO DELLA TESI**

2. ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DI DOMINI STAS

- p. 39 **2.1 INTRODUZIONE**
- p. 39 **2.2 MATERIALI E STRUMENTAZIONI**
- 2.2.1 TERRENI DI COLTURA
 - 2.2.2 TAMPONI PER CROMATOGRAFIA
 - 2.2.3 GEL E TAMPONI PER ELETTROFORESI SDS-PAGE
- p. 42 **2.3 PROTOCOLLO DI ESPRESSIONE**
- 2.3.1 TRASFORMAZIONE BATTERICA
 - 2.3.2 COLTURE CELLULARI - ARRICCHIMENTO ISOTOPICO
 - 2.3.3 INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE
- p. 44 **2.4 PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE**
- 2.4.1 PREPARAZIONE DI ESTRATTI PRIVI DI CELLULE
 - 2.4.2 CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ
 - 2.4.3 TAGLIO PROTEOLITICO
 - 2.4.4 CROMATOGRAFIA PER ESCLUSIONE DIMENSIONALE
 - 2.4.5 PURIFICAZIONE DI DOMINI STAS CON CODE DI ISTIDINA
- A. SISTEMA pET-20b(+)

- Prova di espressione del dominio STAS di Rv1739c di *Mycobacterium tuberculosis* con (His)₆-tag C-terminale
- B. SISTEMA pET-28a-c(+)**
- 2.4.6 B TAGLIO PROTEOLITICO**
- 2.4.7 B ELUIZIONE**
Espressione e purificazione del dominio STAS di Rv1739c di *Mycobacterium tuberculosis* con (His)₆-tag rimuovibile
- C. SISTEMA DI CLONAGGIO “CHAMPION™ pET SUMO PROTEIN EXPRESSION SYSTEM”**
- 2.4.6 C ELUIZIONE DELLA PROTEINA DI FUSIONE**
- 2.4.7 C CAMBIO DEL TAMPONE (PER LA PROTEOLISI)**
- 2.4.8 C TAGLIO PROTEOLITICO**
- 2.4.9 C RIMOZIONE DEI DOMINI SUMO E DI ULP**
Espressione e purificazione del dominio ¹⁵N-STAS di SULTR 1;2 di *Arabidopsis thaliana* con dominio SUMO rimuovibile
Espressione e purificazione del dominio ¹⁵N-STAS di Prestina di *Rattus norvegicus* con dominio SUMO rimuovibile
Espressione e purificazione del dominio ¹⁵N, ¹³C-STAS di Prestina di *Rattus norvegicus* con dominio SUMO rimuovibile

3 ESPERIMENTI DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE PER L’ASSEGNAZIONE DELLE PROTEINE

- p. 69 **3.1 NMR BIDIMENSIONALE**
3.1.1 NMR BIDIMENSIONALE ETERONUCLEARE
- p. 75 **3.2 NMR TRIDIMENSIONALE**
3.2.1 ESPERIMENTI TRIDIMENSIONALI IN TRIPLA RISONANZA
1. ESPERIMENTI PER L’ASSEGNAZIONE DELLA CATENA PRINCIPALE
2. ESPERIMENTI PER L’ASSEGNAZIONE DELLE CATENE LATERALI ALIFATICHE E AROMATICHE
3.2.2 ESPERIMENTI TRIDIMENSIONALI IN DOPPIA RISONANZA
1. ESPERIMENTI PER L’ASSEGNAZIONE DELLE CATENE LATERALI
2. ESPERIMENTI SENSIBILI ALLE DISTANZE INTER-PROTONICHE
- p. 87 **3.3 ESPERIMENTI NMR SUI DOMINI STAS**
3.3.1 DOMINIO STAS DI Rv1739c (*Mycobacterium tuberculosis*)
3.3.2 DOMINIO STAS DI SULTR 1;2 (*Arabidopsis thaliana*)
3.3.3 DOMINIO STAS DI PRESTINA (*Rattus norvegicus*)
3.3.4 ASSEGNAZIONE DELLE FREQUENZE DI RISONANZA DI ¹H, ¹³C E ¹⁵N DEL DOMINIO STAS DI PRESTINA
3.3.5 INFORMAZIONI STRUTTURALI DAI CHEMICAL SHIFT
3.3.6 OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

BIBLIOGRAFIA p. 125

ABSTRACT

The Sulfate Permease SulP is a ubiquitous family of membrane transporters that uptake or exchange inorganic anions. In bacteria and plants, these transporters mediate the uptake of sulfate, a source of sulfur, a key element in bacterial and eukaryotic metabolism. Genes involved in sulfur metabolism have been found to be virulence determinants in mammalian pathogens. In *Mycobacteria*, for example, overexpression screening of several bacterial genes related to environmental stresses revealed inducible, stable accumulation of the high affinity sulfate-specific SulP transporter Rv1739c. In mammals, the SulP transporters are represented by the SLC26 family (Solute Linked Carrier). Mammalian anion transporters are versatile anion exchangers, with important roles in normal physiology and human pathophysiology. The clinical relevance of the *Slc26* gene family has been highlighted with the identification of pathogenetic mutations in four genes involved in inherited human diseases (*Slc26A2* - diastrophic dysplasia, *Slc26A3* - congenital chloride diarrhoea, *Slc26A4* - Pendred syndrome, *Slc26A5* - non-syndromic deafness).

The SulP proteins consist of a N-terminal hydrophobic core composed of a variable number of trans-membrane stretches and a C-terminal cytoplasmic portion that includes a STAS (Sulphate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist) domain. The N-terminal domain is associated with anion transport, while the function of the STAS domain remains unknown; nevertheless, in plant SulP and mammalian SLC26 transporters, STAS is considered to play a fundamental role, essential for plasma membrane targeting and transport function. Sequence analysis revealed an unexpected similarity between the C-terminal cytoplasmic part of SulP transporters and the bacterial antisigma-factor antagonists ASA, typified by *Bacillus subtilis* SPOIIAA (117 aa). SpoIIAA consists of a four-strands β -sheet surrounded by four α -helices. Unlike the bacterial ASA, the STAS domains of the anion transporters are poorly characterized in terms of both their function and structure. In the STAS domains, the β -scaffold and the loop between strand β_3 and helix α_2 are highly conserved, while a variable loop of different length is predicted between helix α_1 and strand β_3 and a variable extension is present at the C-terminal. These elements indicate that, probably, the 3D structure of the anion transporters STAS domains deviates unpredictably from that of the bacterial ASA. Thus, the structural characterization of the STAS domains of the SulP transporters family is important to understand their physiology and the role of mutations in the related pathologies. As far as the structural organization of these proteins is concerned, no three dimensional structures of domains or full-length sequences are available yet, either for mammalian SLC26 anion transporter or for other members of the SulP family. This is the main aim of this project. In fact, the limited dimensions of the protein make it investigable by solution NMR techniques.

We focused our attention on three STAS domains, which were expressed in *E. coli* and studied by NMR:

- 1) Rv1739c STAS from *Mycobacterium tuberculosis*: we expressed a single ^{15}N -labelled sample which allowed us to collect HSQC experiments of good quality; unfortunately, the protein revealed to be extremely temperature sensitive and denatured while testing different temperature conditions. However, the real trouble with this protein was the poor yield in its expression. Unfortunately, just before changing the

expression strategy to improve the expression (from a common thrombin-removable His-tag to a removable SUMO fusion domain), NMR assignment of the same protein was published.

2) SULTR1;2 STAS from *Arabidopsis thaliana*: we expressed a single ^{15}N -labelled sample which allowed us to collect HSQC experiments that revealed a self-aggregation compatible with the formation of homodimers. The protein showed to be very unstable and precipitated quantitatively within few hours after the beginning of the experiments.

3) Prestin STAS from *Rattus norvegicus*. Prestin (SLC26A5) is highly and almost exclusively expressed in the outer hair cells (OHCs) of the organ of Corti in the inner ears of mammals; unlike the other members of the SLC26 family, it has the unique property of voltage-dependent conformational changes and it is considered the key player in the OHCs electromotility. In response to changes in the trans-membrane voltage, the motor protein is thought to undergo a structural rearrangement that changes its area in the plasma membrane with the consequence that the cell changes its length by up to 5%. Mutations of Prestin have been shown to cause severe hearing deficit.

We were able to produce the recombinant ^{15}N -labeled and ^{15}N - ^{13}C -labeled STAS domain of Prestin, stable at millimolar concentration (1.2 mM) in the form of a well-folded monomer. We collected the following ^{13}C , ^{15}N heteronuclear NMR experiments: HNCO, HNCA, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB, H(CA)NH, HBHA(CBCACO)NH, H(CCCO)NH, (H)CC(CO)NH, HCCH-TOCSY, CBHD, aromatic- ^{13}C -HSQC, (H)C(NC)H-His, (HB)CB(CGCC)H-TOCSY (for Tyr and Phe), ^{13}C -NOESY (aromatic and aliphatic), ^{15}N -NOESY. Besides, a C-detected HCACO experiment was collected. All these experiments required about 45 days. The assignment of the backbone and the side chains is now complete for about 90% of the residues. Unfortunately this protein has some problems of conformational exchange that quenches the HN backbone signals of two stretches of residues (35-55 and 73-80). Nevertheless, it was possible to obtain some interesting structural information.

SOMMARIO

Le Permeasi del Solfato (SulP) rappresentano una famiglia di trasportatori di membrana che assorbono o scambiano anioni inorganici. Nei batteri e nelle piante, questi trasportatori mediano l'assorbimento del solfato, una fondamentale fonte di zolfo, essenziale per il metabolismo di Procarioti ed Eucarioti. È stato dimostrato che alcuni geni coinvolti nel metabolismo dello zolfo costituiscono dei fattori di virulenza in alcuni patogeni di mammifero. Nei Micobatteri, ad esempio, l'analisi dell'espressione genica in risposta a *stress* ambientali ha dimostrato un accumulo inducibile e stabile della proteina Rv1739c, un trasportatore ad alta affinità e specifico per il solfato appartenente alla famiglia SulP. Nei mammiferi, i trasportatori SulP sono rappresentati dalla famiglia SLC26 (*Solute Linked Carrier*). I trasportatori di mammifero sono degli scambiatori anionici molto versatili, essenziali per normale fisiologia e coinvolti nella fisiopatologia umana. La rilevanza clinica della famiglia *Slc26* è stata evidenziata con l'identificazione di mutazione patogeniche in quattro geni coinvolti in patologie ereditarie (*Slc26A2* -

displasia diastrofica, *Slc26A3* - diarrea congenita con perdita di cloruro, *Slc26A4* - sindrome di Pendred, *Slc26A5* - sordità non sindromica).

Le proteine SulP sono costituite da una regione idrofobica N-terminale composta da un numero variabile di segmenti *trans*-membrana e da una porzione C-terminale citoplasmatica che include un dominio STAS (*Sulphate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist*). Il dominio N-terminale è associato al trasporto anionico, mentre la funzione del dominio STAS rimane sconosciuta; ciononostante, nei trasportatori SulP vegetali e SLC26 di mammifero, lo STAS è considerato fondamentale per il corretto indirizzamento verso la membrana plasmatica e per la funzione di trasporto. L'analisi di sequenza ha dimostrato un'inattesa similarità tra la regione citoplasmatica C-terminale dei trasportatori SulP e le proteine batteriche ASA (*AntiSigma-factor Antagonist*), caratterizzate grazie alla determinazione strutturale di SPOIIAA (117 aa) di *Bacillus subtilis*. SpoIIAA presenta un foglietto β costituito da quattro filamenti, circondato da quattro α -eliche. A differenza degli ASA batterici, i domini STAS dei trasportatori anionici sono scarsamente caratterizzati per quanto riguarda sia la loro funzione, sia la loro struttura. Nei domini STAS, il foglietto β e il *loop* compreso tra il filamento β_3 e l'elica α_2 sono molto conservati, mentre, a livello del *loop* compreso tra l'elica α_1 e il filamento β_3 e in posizione C-terminale, sono previste delle estensioni variabili di differente lunghezza. Queste osservazioni indicano che, probabilmente, la struttura tridimensionale dei domini STAS dei trasportatori anionici devia in modo imprevedibile da quella degli ASA batterici. Pertanto, la caratterizzazione strutturale degli STAS della famiglia SulP è fondamentale per comprenderne la fisiologia e il ruolo che le mutazioni hanno nell'insorgere delle patologie. Attualmente non è disponibile alcuna struttura tridimensionale sperimentale né dei trasportatori SulP, né dei loro domini. La determinazione strutturale dei domini STAS è il principale scopo di questo progetto. In effetti, le dimensioni limitate di queste proteine le rendono studiabili mediante tecniche di NMR in soluzione.

I domini STAS delle proteine presentate qui di seguito sono stati espressi in *E. coli* e studiati mediante NMR:

1) STAS di Rv1739c da *Mycobacterium tuberculosis*: abbiamo espresso un campione marcato con l'isotopo ^{15}N , che ci ha consentito di raccogliere esperimenti HSQC di ottima qualità; la proteina tuttavia si è dimostrata estremamente sensibile alla temperatura e si è denaturata mentre venivano testate diverse condizioni. Il principale problema con questa proteina è comunque stata la bassa resa ottenuta dalla sua espressione. Sfortunatamente, poco prima di cambiare strategia di clonaggio (passando da una comune *His-tag* rimuovibile con trombina ad un dominio di fusione SUMO rimuovibile), l'assegnazione NMR della stessa proteina è stata pubblicata.

2) STAS di SULTR1;2 da *Arabidopsis thaliana*: abbiamo espresso un campione marcato con l'isotopo ^{15}N , che ci ha consentito di raccogliere esperimenti HSQC che hanno dimostrato un livello di aggregazione compatibile con la formazione di omodimeri. La proteina si è dimostrata molto instabile ed è precipitata in modo massivo entro poche ore dall'inizio degli esperimenti.

3) STAS di Prestina da *Rattus norvegicus*. La Prestina (SLC26A5) è espressa in grandi quantità e in modo quasi esclusivo nelle cellule cigliate esterne OHC (*Outer Hair*

Cell) dell'organo del Corti, nell'orecchio interno dei mammiferi; a differenza degli altri membri della famiglia SLC26, ha la proprietà unica di subire modificazioni conformazionali voltaggio-dipendenti, ed è considerata fondamentale nell'elettromotilità delle cellule OHC. In risposta a variazioni del voltaggio *trans*-membrana, agisce come un motore molecolare, subendo riarrangiamenti strutturali che ne alterano la sezione nella membrana plasmatica, modificando di conseguenza la lunghezza cellulare di anche il 5%. Mutazioni della Prestina sono state individuate come la causa di gravi *deficit* uditivi.

Abbiamo prodotto un campione di STAS marcato con ^{15}N e un campione doppiamente marcato con ^{15}N e ^{13}C ; questo dominio si è dimostrato stabile alle concentrazioni millimolari (1.2 mM), nella forma di un monomero ben strutturato. Abbiamo raccolto i seguenti esperimenti NMR ^{13}C , ^{15}N -eteronucleari: HNCO, HNCA, HN(CA)CO, CBCA(CO)NH, HNCACB, H(CA)NH, HBHA(CBCACO)NH, H(CCCO)NH, (H)CC(CO)NH, HCCH-TOCSY, CBHD, ^{13}C -HSQC per gruppi aromatici, (H)C(NC)H-His, (HB)CB(CGCC)H-TOCSY (per Tyr e Phe), ^{13}C -NOESY (per gruppi aromatici and alifatici), ^{15}N -NOESY, oltre ad un *C-detected* HCACO. Tutti questi esperimenti hanno richiesto un tempo macchina di oltre 45 giorni. L'assegnazione della catena principale e delle catene laterali è completa per circa il 90% dei residui. Purtroppo questa proteina presenta alcuni problemi di scambio conformazionale che ne sopprimono i segnali dei gruppi HN in catena principale di due sequenze (35-55 and 73-80). È stato tuttavia possibile fare alcune interessanti considerazioni di tipo strutturale.

1 INTRODUZIONE

1.1 IL CICLO DELLO ZOLFO NEGLI ORGANISMI VIVENTI

Lo zolfo è un costituente essenziale per i processi biosintetici di tutti gli organismi viventi. Le forme più comuni, in cui questo elemento è disponibile, sono gli anioni inorganici solfuro (S^{2-} , S(-II)) e solfato (SO_4^{2-} , S(+VI)), entrambi ampiamente diffusi sulla crosta terrestre. Il primo è presente, principalmente, sotto forma di complessi con metalli, solubili solo nel caso dei metalli alcalini e alcalino-terrosi; analoghe osservazioni valgono per il solfito. Al contrario, il solfato è certamente l'anione più diffuso sotto forma di sali solubili (tranne pochi casi, tra cui il più rilevante in natura è probabilmente $CaSO_4$), ed è pertanto, in generale, il più accessibile per gli organismi viventi.

L'incorporazione dello zolfo in composti bio-organici essenziali per la vita (ad esempio, gli amminoacidi cisteina e metionina, o cofattori come tiamina, biotina, acido lipoico, CoA, cofattore molibdeno) richiede che il solfato venga ridotto attraverso complesse vie enzimatiche; batteri, funghi e piante sono in grado di compiere tale processo di organificazione.

Lo *step* iniziale dell'assimilazione è il trasporto facilitato (energia-dipendente) attraverso proteine integrali di membrana dette Permeasi (ad es. CysTWA in *E. coli*).

Il solfato, quindi, deve essere attivato ad adenosina-5-fosfosolfato (APS) dall'ATP Solforilasi (CysND nei batteri) e quindi a 3'-fosfoadenosina-5-fosfosolfato (PAPS) dalla APS Chinasi (CysC). Il PAPS è un donatore di solfato ad alta energia, detto anche "solfato attivo".

Fino a questa reazione il percorso di assimilazione del solfato è comune anche nei mammiferi, anche se la ATP Solforilasi dei batteri non è omologa a quella degli animali, nei quali un'unica proteina svolge la doppia funzione di ATP Solforilasi e APS Chinasi (N. B. Schwartz et al. 1998).

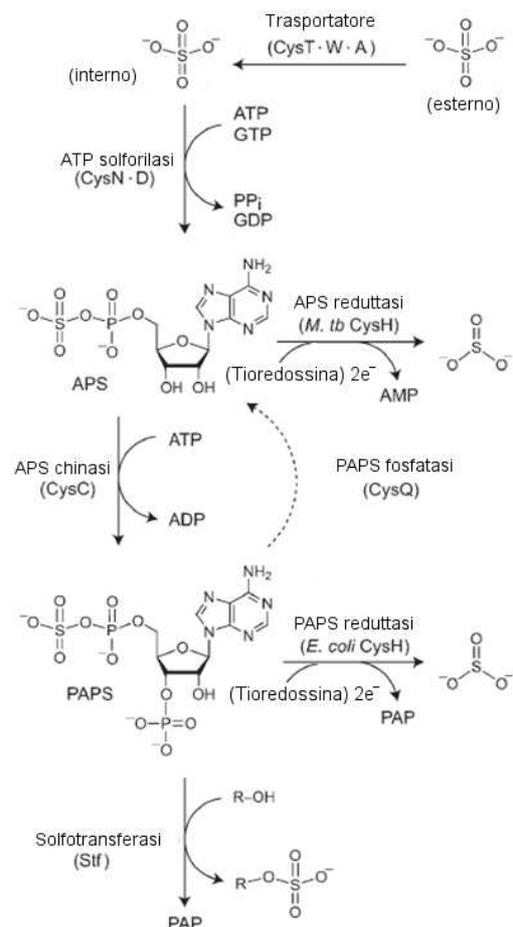
In batteri e funghi, il PAPS è successivamente ridotto dalla PAPS Reduttasi a solfito (SO_3^{2-} , S(+IV)) e adenosina-3',5'-bisfosfato (PAP).

Nelle piante, ma anche in alcuni batteri (come *Micobacterium tuberculosis*), il solfito è sintetizzato direttamente dalla riduzione dell'APS, producendo solfito e adenosina-5'-monofosfato (AMP).

Figura 1.1-1: Schema del *pathway* di assimilazione del solfato nei batteri (*Escherichia coli*, *Micobacterium tuberculosis*).

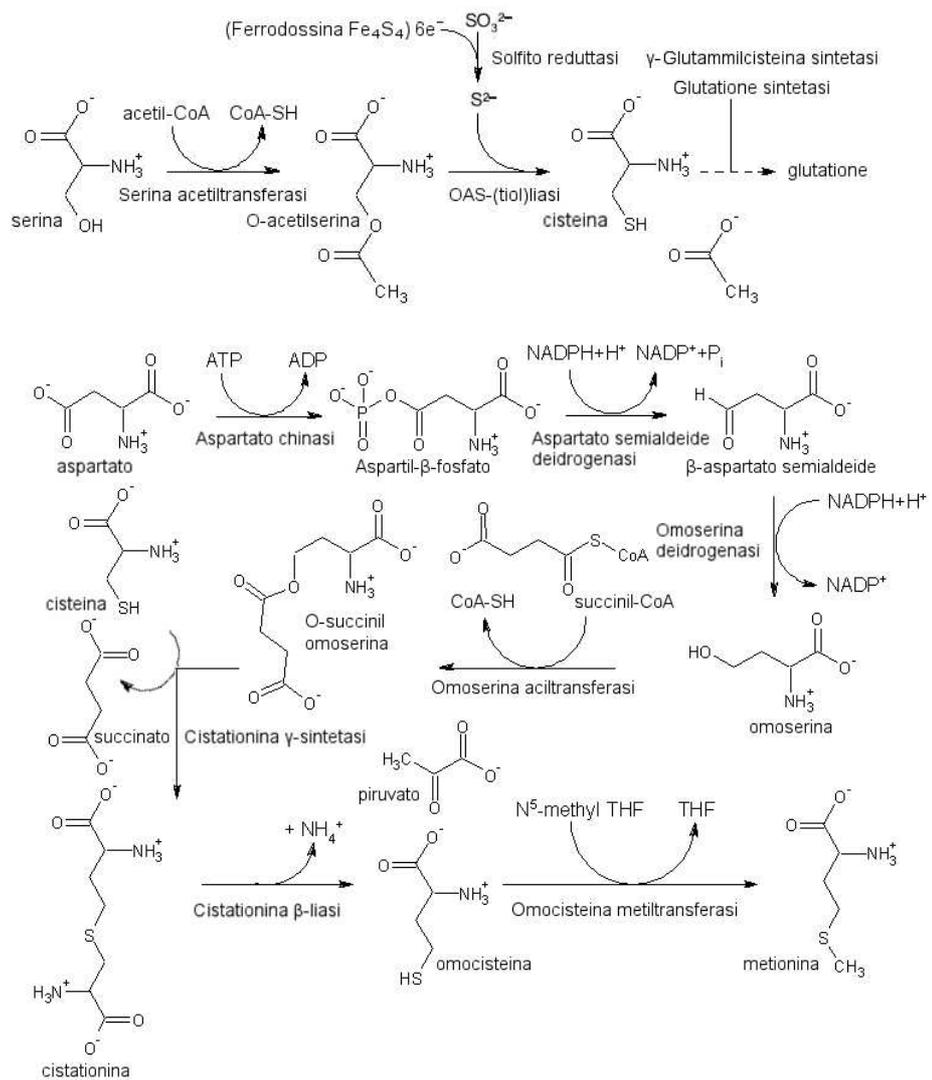
Analogamente a *M. tuberculosis*, anche le piante riducono direttamente l'APS.

Adattata da M. W. Schelle & C. R. Bertozzi, 2006.



Il solfito viene quindi ridotto a solfuro (S^{2-} , S(-II)) dalla Solfito Reduttasi; il solfuro può infine essere incorporato nella O-acetil serina (OAS) per intervento della OAS-(tiol)Liasi a dare cisteina (R. Hell, 1997; M. J. Hawkesford & L. J. De Kok, 2006). Gli elettroni necessari per le riduzioni sono forniti da proteine come la Tioredossina (che può ossidare un suo sito ditiolico a disolfuro) e da proteine ferro-zolfo (nei vegetali, una ferrodossina

Figura 1.1-2: Schema del pathway di sintesi di cisteina e metionina (nei vegetali).



omodimerica contenente due gruppi siroeme e due cluster Fe_4S_4). Dalla cisteina, attraverso alcuni passaggi enzimatici, si può produrre la metionina (uno degli aminoacidi essenziali per i mammiferi).

Oltre alla sintesi di aminoacidi e cofattori, anche il processo di solforilazione ha un ruolo cruciale in molti processi biologici. L'aggiunta di $-SO_3^-$ a gruppi funzionali nucleofili ossidrilici o amminici costituisce, infatti, una modificazione in grado di aumentare o diminuire specifiche interazioni biologiche, ed è pertanto fondamentale nella modulazione di processi extracellulari (come sviluppo neuronale, risposta immune, regolazione ormonale, fisiologia della matrice extracellulare...). La solforilazione è operata dalle Solfotransferasi (Stf), che catalizzano l'attacco del nucleofilo del substrato allo zolfo elettrofilo del cosubstrato PAPS.

I mammiferi, che sono privi degli enzimi per ridurre il solfato, utilizzano il PAPS nella solforilazione dei carboidrati che costituiscono i glicosamminoglicani (come la N-acetil-D-galattosammina-4/6-solfato e la N-acetil-D-glucosammina-4/6-solfato) o particolari galattocerebrosidi noti come solfatidi (il galattosio-3-solfato); tali

modificazioni post-traduzionali sono effettuate nell'apparato di Golgi, sulla cui membrana è stata riscontrata una PAPS-Traslocasi, con la funzione di importare il PAPS sintetizzato nel citoplasma.

La solfoconiugazione è, inoltre, un'importante reazione di biotrasformazione di molecole endogene e degli xenobiotici, finalizzata ad aumentarne la solubilità e l'escrezione.

Geni coinvolti nel metabolismo dello zolfo, tra cui quelli delle Solfotransferasi (*stf*), sono stati proposti come determinanti importanti nella virulenza di diversi microorganismi patogeni; nei micobatteri, ad esempio, i solfolipidi (SL-1) che si trovano nella parete cellulare, esternamente allo strato di peptidoglicano, hanno una funzione osmoprotettiva e sembrano agire come regolatori della patogenicità. Negli stessi batteri, altre molecole di fondamentale importanza sono i micotoli (come l'1-D-*mio*-inositol-2-(N-acetil-L-cisteinil)ammido-2-deossi- α -D-glucopiranoside), che hanno un ruolo rilevante nella protezione contro lo stress ossidativo e i gruppi elettrofilici (in modo analogo al glutatione).

In presenza di favorevoli fonti esterne di zolfo organico, come gli aminoacidi cisteina e metionina, il *pathway* di assimilazione del solfato descritto in precedenza viene inibito dalla cellula; in effetti, oltre ad essere molto costoso in termini energetici, espone le cellule all'assorbimento di altri tetra-ossianioni (alcuni molto tossici) come SeO_4^{2-} , TeO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} .

Lo zolfo necessario per i processi biosintetici può anche essere ricavato da composti organici come i solfonati (R-SO_3) e gli esteri solforici (ROSO_3), molto comuni nei sedimenti e nel suolo. Queste molecole devono essere scomposte in solfiti e solfati (da enzimi come la Metansolfonato Monoossigenasi o le Alchil/Aril Solfatasi), e rientrano quindi nel ciclo che coinvolge gli anioni inorganici.

Oltre all'assimilazione, vanno menzionati altri due impieghi del solfato e dei composti organosolforici. Alcuni batteri chemiolitotrofi possono utilizzare il solfato (o i solfonati) come accettore terminale di elettroni.

Sono infine noti batteri capaci di utilizzare i solfonati (ad es. il toluensolfonato) come fonte di carbonio (anziché di zolfo).

Questi organismi, oltre al sistema di importazione, richiedono anche un efficiente sistema di esportazione per eliminare l'eccesso di zolfo (in genere solfito) che risulterebbe tossico.

1.2 IL TRASPORTO DEL SOLFATO

Solfato, solfonati ed esteri solforici, a pH fisiologico, si trovano in forma dissociata; pertanto, la loro captazione richiede un trasporto facilitato attraverso le membrane biologiche.

La maggior parte delle Permeasi del solfato appartengono a tre sottoclassi (S. Piłsyk & A. Paszewski, 2009): i trasportatori dei procarioti (Batteri e Archeobatteri) sono principalmente membri della sottoclasse 3.A.1, i trasportatori degli eucarioti (Piante, Funghi, Monere, Animali) appartengono alle sottoclassi 2.A.47 e 2.A.53.

Verrà data particolare enfasi ai trasportatori della famiglia SulP, che sono il soggetto di questa tesi.

Tabella 1.2-1: Classificazione generale delle varie classi di Trasportatori. La tabella descrive in particolare quelli coinvolti nella traslocazione dello zolfo nelle forme di anioni inorganici o contenuto in molecole organiche (amminoacidi, vitamine...). Adattata da M. H. Saier, 2000.

Classe	Sottoclasse	Proteine di trasporto	Esempi
1		Canali/Pori	
2		Trasportatori dipendenti da potenziale elettrochimico (Uniporti, Simporti, Antiporti)	
	2.A		
	2.A.1	Famiglia MFS (<i>Major Facilitator Superfamily</i>) Composti Organici (Peptidi, Zuccheri, Vitamine...) B, A, E	<i>AstA Aspergillus nidulans</i>
	2.A.3	Famiglia APC (<i>Amino acids, Polyamines, Choline</i>) Composti Organici (Amminoacidi...) B, A, E	
	2.A.20	Famiglia PiT (<i>Inorganic Phosphate Transporter</i>) BG+	<i>CysP Bacillus subtilis</i>
	2.A.29	Famiglia MC (<i>Mitochondrial Carrier</i>) Y, Mit	<i>DIC Homo sapiens</i>
	2.A.47	Famiglia DASS (<i>Divalent Anion/Na⁺ Symporter</i>) An	<i>NaS-1 Mus musculus</i>
	2.A.51	Famiglia CHR (<i>Chromate transporter</i>) B	<i>ChrA Alcaligenes eutrophus</i>
	2.A.53	Famiglia SulP (<i>Sulfate Permease</i>) Simporto di H ⁺ o Antiporto di HCO ₃ ⁻ B, Y, F, Pl, An	<i>SB Aspergillus nidulans</i>
3		Trasportatori Attivi dipendenti dall'idrolisi di ATP (rottura di esteri fosforici)	
	3.A		
	3.A.1	Famiglia ABC (<i>ATP-Binding Cassette</i>) Composti Organici (Anioni Inorganici B, Organosolfonati B, Peptidi, Vitamine...)	<i>CysTWA Escherichia coli</i> <i>TauBC E. coli</i>
4		Traslocatori di gruppi	
5		Trasportatori elettronici	
8		Fattori accessori di trasporto	
9		Sistemi di trasporto non caratterizzati (meccanismo biochimico sconosciuto)	
	9.A		
	9.A.29	Famiglia TSUP (<i>4-Toluene Sulfonate Uptake Permease</i>) B, Pl	<i>CysZ Corynebacterium glutamicum</i>

B: batteri (G±, Gram positivi o negativi), A: archeobatteri, Y: lieviti, F: funghi, Pl: piante, An: animali, Mit: mitocondri, E: eucarioti

1.3 IL TRASPORTO DEL SOLFATO NEI BATTERI

Le due principali famiglie di sistemi di captazione presenti nei batteri sono la SulT (TC 3.A.1.6) della superfamiglia ABC, e la SulP (TC 2.A.53).

Il sistema più studiato è il trasportatore di solfato e tiosolfato 3.A.1.6 del gruppo SulT. Come tutti i trasportatori della superfamiglia ABC, è dotato di una *ATP-Binding Cassette* (da cui la sigla ABC) e ricava l'energia per il trasporto dall'idrolisi dell'ATP.

I trasportatori di questo tipo sono costituiti da tre componenti (M. A. Kertesz, 2001): un'unità periplasmatica che lega il substrato ad alta affinità, una permeasi di membrana eterodimerica e la componente che lega l'ATP, anch'essa presente come dimero e localizzata sul lato citoplasmatico della membrana. Nei batteri Gram-negativi (come *E. coli*), le subunità periplasmatiche Sbp (*Sulfate Binding Protein*) e CysP conferiscono la specificità per il substrato e legano ad alta affinità, rispettivamente, gli ioni solfato e tiosolfato a livello del periplasma (Kd ~ 100 nM). La proteina del periplasma, che lega il substrato attraverso una serie di ponti a idrogeno all'interno di una profonda fessura, interagisce, a livello della membrana interna, con le due subunità CysT e CysW, che costituiscono il canale. L'energia per il trasporto è fornita dalla subunità omodimerica

CysA che contiene sia il sito di legame per l'ATP, sia il dominio regolatorio che subisce la transizione conformazionale in seguito al legame del nucleotide.

Figura 1.3-1: Proteine coinvolte nel percorso biosintetico della L-cisteina in *E. coli*. In grigio chiaro sono evidenziate le proteine del sistema TC 3.A.1.6.1, coinvolte nella captazione di SO_4^{2-} e $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e quelle coinvolte nella organificazione del zolfo; l'espressione di queste proteine (Sbp, CysPTWA, CysDNC, CysJIH, CysK e CysM) è stimolata dall'omotetramero CysB, un fattore di trascrizione di tipo LysR, che viene attivato dal legame dell'O-acetilserina e inibito dall'adenosina-5-fosfosolfato o dal tiosolfato.

La captazione degli organosolfonati alifatici (taurina, idrossietansolfonato, acido cisteico, metansolfonato, solfolipidi...) o degli aril-solfonati dipende da proteine della famiglia TC 3.A.1.17.1, come i complessi TauA/SsuA (legame del solfonato) – TauC/SsuC (permeasi) – TauB/SsuB (idrolisi dell'ATP) di *E. coli*.

In grigio scuro sono evidenziate le proteine coinvolte nel trasporto e nella desolfonazione di fonti organiche di zolfo come la taurina e gli organosolfonati alifatici. Queste proteine (TauABCD e SsuEADCB) sono indotte dal fattore Cbl (CysB-like).

Anche i solfonati arilici hanno dei trasportatori specifici (come il sistema TC 3.A.1.17.1 AsfC – AtsB – AtsC di *Pseudomonas putida*).

Per quanto riguarda gli esteri solforici, si ritiene vengano idrolizzati da Alchil/Aril Solfatasi extracellulari. Sono comunque state individuate anche delle solfatasi intracellulari e dei trasportatori ABC (come l'enzima AtsA e il sistema di trasporto TC 3.A.1.17.1 AtsR-B-C di *Pseudomonas aeruginosa*).

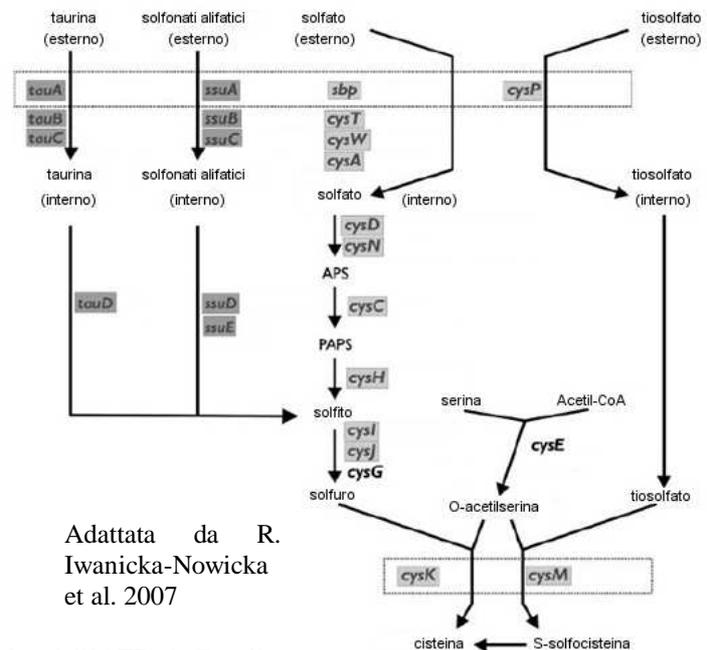
Inoltre, molti patogeni umani, che occupano una nicchia ecologica in cui cisteina e metionina sono largamente disponibili, dispongono di molteplici sistemi di captazione di amminoacidi contenenti zolfo (ad es. il sistema TC 3.A.1.3.10 di *Escherichia coli*, costituito da FliY (legame della cisteina) – YecS (permeasi) – YecC (ABC) per la cisteina, oppure il TC 3.A.1.3.8 di *Rhizobium leguminosarum* per la metionina).

La funzione di Sbp e CysP può essere mutualmente complementata (a causa del loro parziale *overlap* funzionale), mentre CysA o CysT danno luogo ad auxotrofia per amminoacidi contenenti zolfo (come la doppia mutazione di Sbp e CysP).

Il trasporto è inibito da SO_3^{2-} , SeO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , CrO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , probabilmente per competizione tra i ligandi.

Nei batteri Gram positivi, il trasporto del solfato che è stato caratterizzato (CysP di *Bacillus subtilis*) è peculiarmente omologo alla famiglia di trasportatori per il fosfato TC 2.A.20 di altri organismi (ad es. PitA di *E. coli*).

In alcuni organismi che sembrano mancare del trasportatore ABC (*Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis*...) è stato inoltre individuato un trasportatore della famiglia SulP, costituito da 10-13 domini transmembrana, ed operante come un simporto $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$. Tale trasportatore è stato rilevato anche in specie che possiedono trasportatori SulT (*Pseudomonas aeruginosa*). Altri batteri contengono un gene *sulP*, ma non è, ad oggi, stato chiarito se tale gene sia espresso e funzionale (ad es. *ychM* di *E. coli*).



Adattata da R. Iwanicka-Nowicka et al. 2007

È stato tuttavia verificato che nel patogeno Gram positivo *Mycobacterium tuberculosis* un trasportatore SulP, noto come Rv1739c, sembra essere funzionale (A. S. Zolotarev, 2008).

Studi di sovra-espressione di questo gene in *E. coli* hanno dimostrato un aumento specifico della captazione del solfato (con $K_M = 4.04 \mu\text{M}$ per il solfato extracellulare), che risulta massima a pH 6 e viene inibita a pH più bassi (pH 5) o più alti (pH 8). In particolare, l'aumentato passaggio del solfato è dovuto alla porzione N-terminale (amminoacidi 1-436) di Rv1739c; sulla base degli indici di idrofobicità, si ritiene che questa porzione sia un dominio di membrana organizzato in circa 12 attraversamenti della membrana stessa.

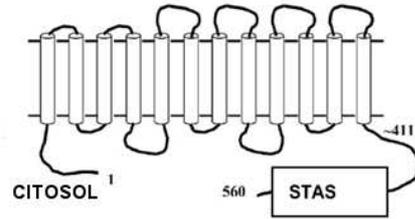


Figura 1.3-2: Schema dell'ipotetica struttura del trasportatore SulP di *Mycobacterium tuberculosis* (Rv1739c).
Tratta da A. S. Zolotarev, 2008

Il dominio citoplasmatico C-terminale (ammino-acidi 437-560), noto come STAS (si veda più avanti), non sembra rilevante per l'aumento della captazione (perlomeno quando espresso da solo).

Inoltre, ci sono indicazioni che l'attività di Rv1739c sia subordinata alla presenza di CysA, la subunità che lega l'ATP nei trasportatori ABC (CysTWA di *E. coli*). A conferma degli studi di *knock-out* genico che supportano questa ipotesi, è stato in effetti dimostrato che l'aumentato trasporto di solfato attribuibile a Rv1739c è abolito sia da inibitori generici del trasporto anionico (niflumato, diisotiocianato-4',4''-disolfono-stilbene), sia da analoghi del solfato (SO_3^{2-} , SeO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, MoO_4^{2-}), sia da inibitori aspecifici dell'attività ATPasica (N-etilmaleimmide, carbonil cianuro 3-cloro-fenilidrazone).

L'analisi trascrittomica ha rilevato che un consistente aumento del trascritto di *rv1739c* si verifica in seguito a stimoli come l'ipossia e l'elevata concentrazione di ossido di azoto, condizioni che probabilmente il batterio incontra all'interno del proprio ospite.

1.4 IL TRASPORTO DEL SOLFATO NEGLI EUCARIOTI

Mentre il ruolo dei trasportatori SulP nei procarioti non è chiaro, la maggior parte dei membri di questa famiglia negli eucarioti è coinvolta nella captazione del solfato. Le proteine di questa famiglia sono essenzialmente coinvolte nel trasporto *trans*-membrana del solfato (simporti $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$ o $\text{SO}_4^{2-}/\text{HCO}_3^-$) o nello scambio (antiporto) di anioni.

Questi trasportatori hanno una topologia comune, con un dominio di trasporto costituito da 8-14 (o forse 10-12) attraversamenti della membrana. Il punto isoelettrico è generalmente elevato a causa del cospicuo contenuto di amminoacidi basici, sia a livello dei *loop* che dei tratti *intra*-membrana; in particolare, si ritiene che i residui di arginina dei *loop* extracellulari abbiano un ruolo importante nel reclutamento del solfato. L'attività delle permeasi SulP può essere regolata tramite fosforilazione. La maggior parte dei SulP eucariotici presenta un dominio regolatorio conservato C-terminale noto come STAS (si veda la sezione 1.7). La rilevanza funzionale di questo dominio è

dimostrata dal fatto che mutazioni che alterano la fosforilazione dello STAS determinano la perdita della funzione di trasporto. La struttura tridimensionale dettagliata di questi trasportatori è tuttora sconosciuta, ma si ritiene che alcuni di essi siano organizzati nella membrana come dei dimeri, mentre altri si presentino come tetrameri.

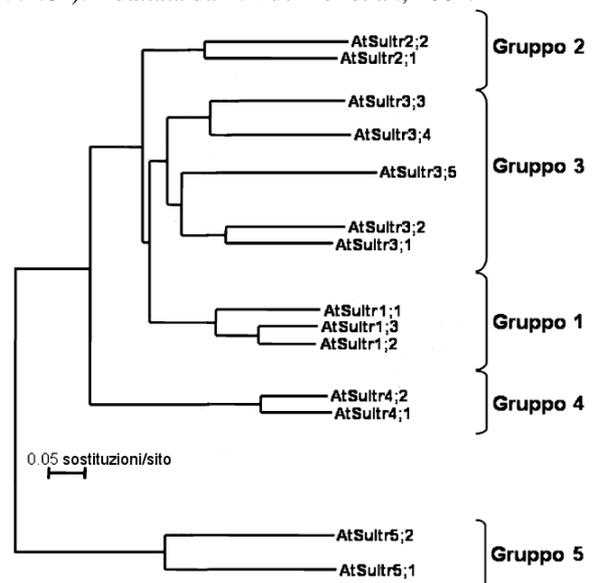
1.5 IL TRASPORTO DEL SOLFATO NELLE PIANTE

Anche per le piante, come per tutti gli organismi, lo zolfo è un nutriente essenziale per la crescita, e viene assorbito dal suolo sotto forma di solfato inorganico. Data la rilevanza fondamentale che le piante hanno nella catena alimentare degli animali (di cui rappresentano la fonte principale di amminoacidi e di cofattori) l'assorbimento e l'organificazione dello zolfo da parte dei vegetali costituiscono passaggi chiave nel ciclo naturale di questo elemento.

Il solfato, oltre ad essere la principale fonte di zolfo che viene assorbita dal suolo, è anche l'anione che viene trasportato a lunga distanza verso i plastidi dei diversi organi deputati all'assimilazione dello zolfo nei composti organici, nonché la principale riserva di questo elemento nei vacuoli. L'assimilazione del solfato nelle piante è un processo che viene accuratamente bilanciato, sulla base delle necessità metaboliche dei tessuti in accrescimento e differenziamento, che richiedono un continuo apporto di amminoacidi e cofattori. Un'elevata richiesta di zolfo (perlopiù riducente) proviene inoltre dalla risposta a stress ambientali come lo stress ossidativo (che determina un maggior consumo di glutazione), l'esposizione ai metalli (che richiedono produzione di Fitochelatine capaci di sequestrarli) e l'aggressione da parte di patogeni (che richiede la produzione di molecole anti-patogeno contenenti zolfo, quali le γ -Tionine, peptidi di 45-54 amminoacidi capaci di inibire le α -Amilasi, le alline e i glucosinolati).

Come gli altri eucarioti superiori, le piante hanno sviluppato un ampio numero di trasportatori del solfato tessuto-specifici. La maggior parte di questi è codificata da una famiglia genica strettamente correlata con i trasportatori di SO_4^{2-} della famiglia SulP degli animali e opera con un meccanismo di simporto $\text{SO}_4^{2-}/\text{H}^+$; si presume che la stechiometria più probabile sia $3 \text{H}^+ : 1 \text{SO}_4^{2-}$. Nel sistema modello *Arabidopsis thaliana* (ma anche in *Brassica oleracea*, *Oryza sativa* e in altre specie) sono stati individuati quattordici tipi di trasportatori (P. Buchner, 2004), organizzati filogeneticamente in cinque gruppi, sulla base della loro similarità di sequenza, della localizzazione tessuto-specifica e dell'affinità per il substrato. Ciascun trasportatore ha una funzione specifica nella captazione o nella distribuzione del solfato e differisce nell'affinità per gli ioni trasportati.

Figura 1.5-1: Albero filogenetico della famiglia genica SULTR di *Arabidopsis thaliana* ottenuto tramite analisi per allineamento multiplo (ClustalX V.1.81). Adattata da P. Buchner et al., 2004.



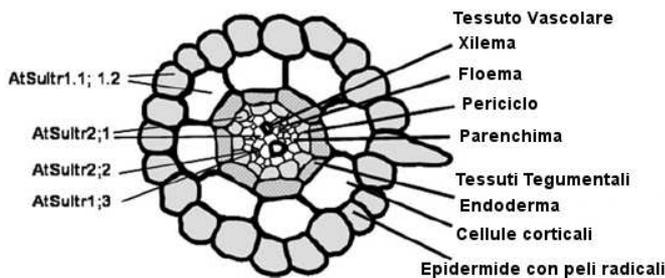


Figura 1.5-2: Rappresentazione semplificata di una sezione radicale e della cellulose specificità dei trasportatori. Adattata da P. Buchner et al., 2004.

1.5.1 L'ASSORBIMENTO DEL SOLFATO

I trasportatori SULTR1;2 e SULTR1;1 del gruppo 1 (N. Yoshimoto, 2002) sono trasportatori ad alta affinità (K_M comprese tra 1.5 e 10 μM) espressi, rispettivamente, in modo costitutivo e inducibile, in modo particolare nell'epitelio dell'epidermide radicale (rizoderma) e dei peli radicali, e nelle cellule corticali. Questi trasportatori rappresentano, pertanto, il meccanismo di assorbimento primario degli anioni solfato dal terreno. Dopo aver diffuso nell'apoplasto (il compartimento costituito dal *continuum* delle pareti cellulari e dagli spazi extracellulari che circondano le cellule), gli ioni attraversano la membrana plasmatica delle cellule, mediante una traslocazione attiva all'interno del simplasto (il compartimento costituito dall'insieme dei protoplasti delle cellule costituenti un tessuto, e comunicanti attraverso ponti citoplasmatici detti plasmodesmi).

L'espressione del trasportatore SULTR1;2, deputato all'assorbimento costitutivo del solfato nelle cellule radicali ($K_M \sim 7 \mu\text{M}$), è relativamente insensibile a variazioni della concentrazione esterna del solfato (aumenta di solo 2-3 volte e in modo transitorio in seguito a stress da carenza di solfato nel terreno).

Il trasportatore SULTR1;1, anch'esso ad alta affinità, è al contrario fortemente inducibile (con un aumento dell'espressione fino a 10 volte) in condizioni di carenza di solfato.

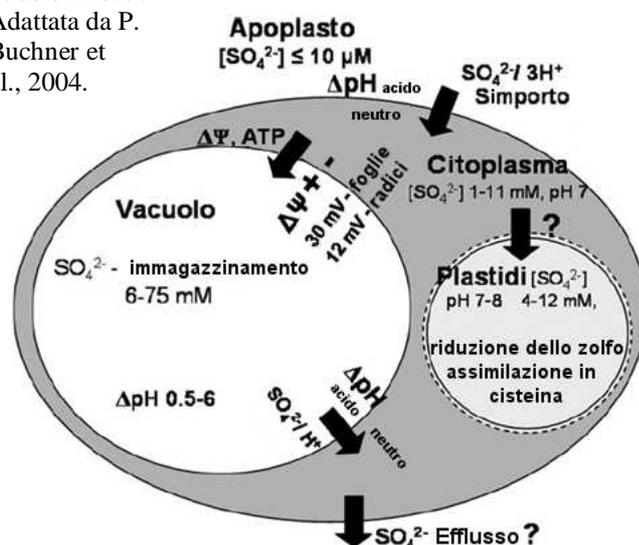
1.5.2 LA TRASLOCAZIONE DEL SOLFATO NEI COMPARTIMENTI SUBCELLULARI

Il trasporto del solfato all'interno dei plastidi è un passaggio fondamentale, poiché all'interno di questi organelli avviene l'assimilazione dell'anione nell'APS e la sua riduzione da parte della APS Reduttasi.

Lo spostamento del solfato tra diversi compartimenti subcellulari è inoltre coinvolto nell'omeostasi idrosalina del citoplasma. L'eccesso di solfato, infatti, viene attivamente rimosso attraverso i trasportatori del tonoplasto

Figura 1.5-3: Rappresentazione semplificata del trasporto trans-membrana del solfato. Le frecce indicano la direzione dei flussi. Sono indicate anche le possibili fonti energia per i trasferimenti.

Adattata da P. Buchner et al., 2004.



del vacuolo, dove si costituisce una riserva mobilizzabile all'occorrenza.

La natura dei trasportatori coinvolti in questi scambi non è stata chiarita in modo inequivocabile, tuttavia ci sono indicazioni che i trasportatori del gruppo 4 siano coinvolti nel trasporto tra i diversi compartimenti intracellulari (SULTR4;1 nelle membrane dei cloroplasti delle foglie e nei tonoplasti, SULTR4;2 nei tonoplasti). Queste proteine, in effetti, presentano una sequenza di indirizzamento ai plastidi. Inoltre, il gradiente di pH attraverso il tonoplasto sembrerebbe favorire un meccanismo di efflusso dal vacuolo accoppiato al trasporto di protoni.

Per quanto riguarda il trasporto direzionato verso il vacuolo, ci sono indicazioni che suggeriscono un ruolo della proteina SULTR5;1 (espresso nelle radici, nello stelo o tronco, nelle foglie e nel tonoplasto). Il quinto gruppo di trasportatori, pur essendo chiaramente correlato agli altri SULTR, presenta delle differenze nella dimensione (più piccola) ed è caratterizzato dall'assenza del dominio STAS.

L'altro trasportatore del gruppo 5, SULTR5;2, non sembra coinvolto nel trasporto attraverso il tonoplasto, ma presenta invece un'elevata affinità per il molibdato ed è anche noto come MOT1 (*Molybdenum Transporter 1*).

Alcune piante e le alghe verdi, infine, possiedono anche un particolare trasportatore cloroplastico appartenente alla superfamiglia ABC (TC 3.A.1.6) e caratterizzato da solo 7 attraversamenti della membrana. Questo trasportatore, probabilmente originario dal genoma del cloroplasto, non è comunque presente nelle piante vascolari.

1.5.3 IL TRASPORTO DEL SOLFATO A LUNGA DISTANZA

L'accesso delle soluzioni al cilindro centrale della radice, che ospita il sistema vascolare, è sottoposto ad uno stretto controllo esercitato dall'endoderma, uno strato di cellule che formano l'ultimo strato del cilindro corticale. Le pareti tangenziali e radiali di queste cellule presentano una banda di materiale impermeabile (suberina e lignina), detta "di Caspary", che costituisce un ostacolo al movimento dei liquidi che fluiscono attraverso le pareti cellulari (apoplasto).

Per proseguire il loro cammino verso il cilindro centrale le sostanze in entrata nel sistema di conduzione sono obbligate ad entrare nelle cellule dell'endoderma, che pertanto funzionano come un filtro. Al contrario, nell'ambito del cilindro corticale le soluzioni possono liberamente fluire sia attraverso i protoplasti delle cellule (simplasto) che attraverso le loro pareti (apoplasto). Ciò implica che soltanto il solfato presente all'interno del simplasto dell'epidermide possa diffondere radialmente verso l'interno, nelle cellule corticali e dell'endoderma, attraverso i plasmodesmi che mettono in comunicazione i citoplasmici cellulari. Infine, per essere trasportati a lunga distanza (ad esempio verso la chioma) gli ioni solfato devono entrare nello xilema.

Il sistema di efflusso dal simplasto non è ancora noto e non ci sono prove che i trasportatori dei gruppi 1 e 2 possano operare la traslocazione in modo bidirezionale (ovvero, sia dall'esterno verso l'interno sia dall'interno verso l'esterno). Non è chiaro se un canale anionico rinvenuto nell'ipocotile di *Arabidopsis thaliana*, controllato dal voltaggio e attivato dal solfato, possa essere coinvolto nel trasporto di questo anione dal

parenchima verso il sistema vascolare.

Figura 1.5-4: Modello generale di assorbimento e mobilizzazione del solfato attraverso il sistema vascolare secondo le necessità tessutali.

Lo Xilema è il tessuto adibito alla conduzione dell'acqua e dei soluti in essa disciolti dalle radici alle foglie; il floema è il tessuto di conduzione della linfa elaborata, la soluzione zuccherina che viene trasportata da una "sorgente", un'area di produzione (come la foglia matura), ad un "pozzo", una regione della pianta che richiede gli zuccheri per la propria crescita (meristemi, radici, semi, frutti) o per accumularli come sostanze di riserva.

1. Radice matura: assorbe il solfato con alta affinità dal suolo e lo trasporta nel tessuto di conduzione (xilema).

2. Apice radicale in accrescimento (ricco di tessuti meristemati, embrionali): ha una grande necessità di zolfo, che può essere assorbito sia direttamente dal terreno, sia, in caso di necessità, dal tessuto di conduzione (floema).

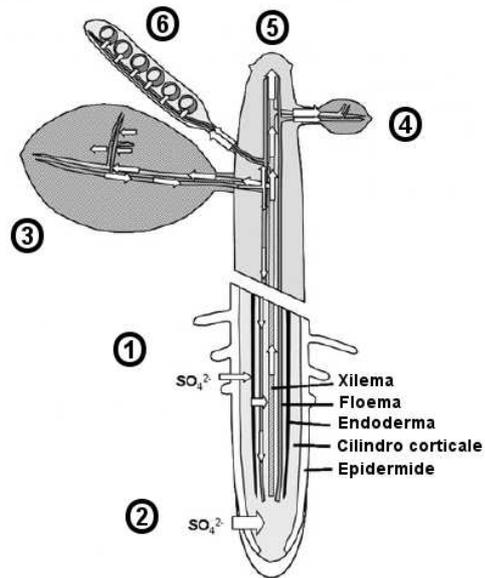
3. Foglia matura: è in grado di assorbire il solfato dallo xilema (immagazzinandolo nei vacuoli) o di mobilizzarlo verso il floema in caso di necessità (fungendo quindi da "sorgente").

4. Foglia in fase di sviluppo: ha una grande necessità di zolfo, che viene assorbito dal tessuto di conduzione.

5. Germoglio in accrescimento e differenziamento (ricco di tessuti meristemati): ha una grande necessità di zolfo, che viene assorbito dal tessuto di conduzione.

6. Organi riproduttivi: hanno necessità di zolfo durante il loro sviluppo. Lo possono, in seguito, rimobilizzare verso gli altri tessuti, o immagazzinare nel seme, dove serve da riserva per la nuova pianta.

Adattata da P. Buchner et al., 2004.



I trasportatori del gruppo 2 sono i trasportatori caratteristici del sistema vascolare e sono quindi coinvolti nel trasporto a distanza; la loro funzione è il trasporto degli ioni solfato dai vasi (xilema e floema) al simplasto del tessuto parenchimatico.

Questi trasportatori hanno bassa affinità, con K_M comprese tra 0.9 e 1.2 mM, e un *pattern* di espressione peculiare. In *Arabidopsis thaliana*, il trasportatore SULTR2;1 ($K_M \sim 0.4$ mM) è espresso nel parenchima dello xilema di foglie e radici, e nelle cellule del floema delle foglie. SULTR2;2 ($K_M \sim 1.2$ mM) è espresso nelle cellule del floema delle radici. In condizioni di carenza di zolfo, nelle cellule del floema può essere indotto anche il trasportatore ad alta affinità SULTR1;3.

La proteina SULTR3;5 è costitutivamente espressa nelle cellule che contengono anche SULTR 2;1 (la cui espressione è invece potenziata dalla carenza di zolfo) e sembra che le due proteine possano operare nella forma di un eterodimero a più alta efficienza. Questo complesso, coinvolto in una sorta di risposta adattativa, opera in effetti con una velocità tre volte maggiore rispetto al trasportatore SULTR2;1 da solo (T. Kataoka, 2004). Per quanto riguarda gli altri membri del gruppo 3, essi sono prevalentemente espressi nelle foglie, ma non ne è nota la localizzazione tessutale né la funzione.

Sono inoltre stati trovati alcuni trasportatori della famiglia DIC (tipici dei mitocondri animali), ubiquitari nei tessuti vegetali e coinvolti nel trasporto di malato, succinato, fosfato, ossalacetato, solfato e tiosolfato.

Oltre che come solfato, lo zolfo è movimentato tra i tessuti della pianta nelle molecole di glutatione e S-metilmetionina, che possono essere trasportate attraverso le membrane da Permeasi ABC della famiglia TC 3.A.1 o da altri trasportatori per amminoacidi.

1.5.4 LA REGOLAZIONE DELL'ASSORBIMENTO DEL SOLFATO

La regolazione della trascrizione dei trasportatori vegetali dipende da elementi in *cis* noti come SURE (*SULfur-Responding Elements*), identificati con le sequenze GAGAC o GTCTC nei promotori di alcuni geni, e da elementi agenti in *trans* come il fattore di trascrizione SLIM1 (*Sulfur LIMitation 1*) che regola positivamente la trascrizione di geni coinvolti nell'assimilazione dello zolfo, tra cui i trasportatori dei gruppi SULTR1, SULTR3 e SULTR4. È recentemente stato scoperto, inoltre, che la regolazione operata da SLIM1 può essere modificata mediante RNA-interference dal microRNA-395, in modo tessuto specifico.

Infine, il dominio STAS dei trasportatori può subire una fosforilazione specifica che consente di formare un complesso con un'isoforma citosolica di Cisteina Sintasi (CS). È interessante notare che la O-acetilserina, il substrato della CS, agisce come regolatore positivo nell'assimilazione del solfato nelle piante; non è tuttavia noto nel dettaglio quale sia il meccanismo di segnalazione della carenza di zolfo e il suo effetto sulla trascrizione genica.

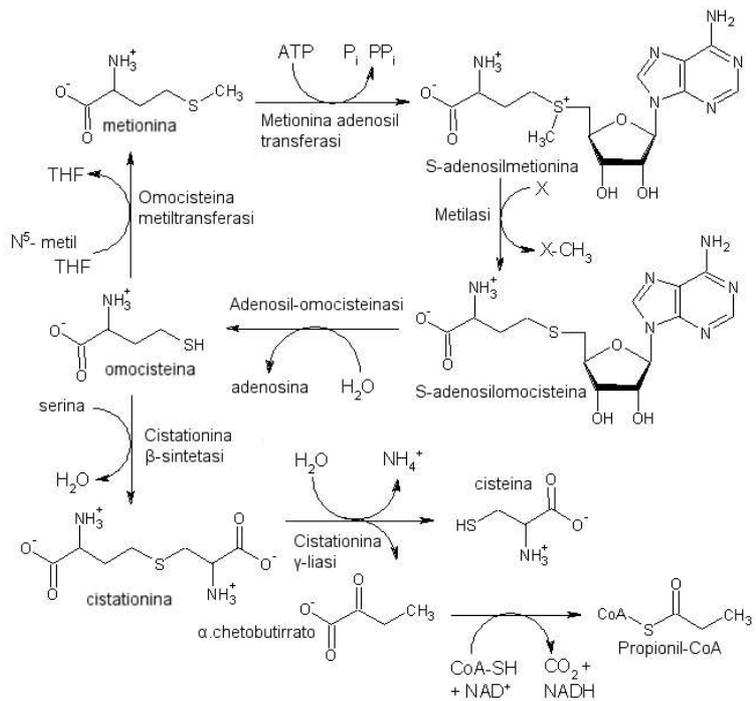
1.6 IL TRASPORTO DEL SOLFATO NEGLI ANIMALI

Gli animali mancano degli enzimi necessari a ridurre il solfato e ad incorporarlo in amminoacidi o cofattori, che devono necessariamente essere costantemente riforniti con la dieta. Tra gli amminoacidi essenziali per i

mammiferi (che non possono essere prodotti endogenamente) c'è infatti la metionina. La cisteina può invece essere ricavata dalla degradazione del precedente amminoacido attraverso alcuni passaggi enzimatici.

Pur non essendo coinvolto nella sintesi di amminoacidi, il solfato, sia nella forma di anione, sia nella forma di estere, è tuttavia fondamentale in una serie di processi biologici. L'anione solfato, ad esempio, è il quarto anione più rappresentato nel plasma umano (300 μM) e partecipa all'omeostasi cellulare.

Figura 1.6-1: Schema dei passaggi enzimatici che degradano la metionina a cisteina e propionil-CoA.



A livello epatico, la coniugazione con il solfato rappresenta un'importante reazione metabolica di fase II coinvolta nell'inattivazione, nella detossificazione e nella solubilizzazione di sostanze endogene (steroidi, catecolammine...) o esogene (xenobiotici, farmaci) precedentemente funzionalizzate dalle reazioni di fase I (ossidoriduzioni, idrolisi di esteri, ammidi, anidridi).

Infine, la solforilazione di specifici saccaridi, come ricordato in precedenza, è essenziale per la sintesi dei glicosaminoglicani della matrice extracellulare, dei cerebrosidi della mielina, del glicocalice di alcuni tipi cellulari.

Sono state identificate due famiglie principali di trasportatori che operano nelle cellule animali. La famiglia SulP (SLC26 nei mammiferi) è composta da trasportatori piuttosto eterogenei per la specificità di substrato e possono in taluni casi trasportare molti tipi diversi di anioni. I trasportatori appartenenti a questa famiglia saranno estesamente trattati nelle sezioni successive.

La seconda famiglia di trasportatori (nota nei mammiferi come SLC13) è la DASS (*Divalent Anion/Sodium Symporter*), che cotrasporta cationi Na^+ e anioni polivalenti (dicarbossilati, SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$, SeO_4^{2-}) con una stechiometria 3:1. Si ritiene che il meccanismo di trasporto sia di tipo ordinato, con il legame dei cationi seguito dall'associazione dell'anione; questi canali sono caratterizzati dalla presenza di una sequenza consenso di 17 amminoacidi (TSFAFLLPVANPPNAIV in NaS1) nota come "*sodium:sulphate symporter family signature*" (PROSITE PS01271), altamente conservata tra i vari membri della famiglia. La struttura di questi trasportatori (costituiti da 572-627 amminoacidi) dovrebbe comprendere 8-13 domini trans-membrana, con i domini C-terminali implicati nel riconoscimento del substrato (TMD 5-11) e nel meccanismo di traslocazione (TMD 8-9). Si ritiene che questi canali operino come dimeri.

Questi canali possono essere suddivisi in due sottofamiglie, i NaS (che trasportano preferenzialmente il solfato) e i NaC (che trasportano soprattutto intermedi del ciclo di Krebs).

Tabella 1.6-1: Trasportatori della famiglia SLC13. Adattata da D. Markovich & H. Murer, 2004.

Trasportatore	Locus (<i>Homo s.</i>)	Cotrasporto	Distribuzione Tessutale
SLC13A1 (NaS-1)	7q31-q32	$\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SeO_4^{2-}	membrana apicale dell'epitelio del tubulo prossimale (nefrone), orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino tenue e crasso
SLC13A2 (NaC-1)	17p11.1-q11.1	Na^+ /succinato, citrato, α -cheto- glutarato	membrana apicale dell'epitelio del tubulo prossimale, orletto a spazzola degli enterociti dell'intestino tenue, epitelio di bronchioli e alveoli, fegato (epatociti peri-venosi), epididimo
SLC13A3 (NaC-2)	20q12-q13.1	Na^+ /succinato, citrato, α -cheto- glutarato	membrana baso-laterale dell'epitelio del tubulo prossimale, meningi, fegato, pancreas, placenta
SLC13A4 (NaS-2)	7q33	$\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$	placenta, endotelio delle venule tonsillari, testicolo, cuore
SLC13A5 (NaC-3)	12p12-13	Na^+ /succinato, citrato, piruvato	membrana baso-laterale dell'epitelio del tubulo prossimale, fegato, meningi, testicolo, placenta

I NaS sono coinvolti nell'assorbimento del solfato dalla dieta, nel suo riassorbimento dal filtrato glomerulare, nella regolazione della concentrazione del sol-

fato nel siero, nel trasferimento dell'anione verso il feto. I NaC sono coinvolti nell'assorbimento degli intermedi del ciclo di Krebs (come il succinato e il citrato) dalla dieta, nel riassorbimento di oltre il 65% degli stessi dal filtrato glomerulare, nell'assorbimento di questi intermedi metabolici circolanti nel plasma da parte di alcuni organi, per fini biosintetici (fegato) o per le proprie necessità metaboliche (meningi, spermatoцитi...). La regolazione della trascrizione di questi trasportatori non è molto conosciuta, ma si ritiene che almeno per alcuni di loro (NaS) sia operato un controllo trascrizionale dipendente da ormoni (glucocorticoidi, colecalciferolo, ormone della crescita, prostaglandine, ormoni tiroidei...). Malgrado non siano state ancora individuate delle correlazioni evidenti tra mutazioni di questi trasportatori e specifiche patologie, non è escluso che alterazioni dei NaS (visto il loro considerevole contributo all'assorbimento e al riassorbimento del solfato) possano produrre disordini legati a carenze nel trasporto/metabolismo del solfato.

Sembra infine che nel trasporto del solfato siano coinvolti alcuni trasportatori di una terza famiglia, nota come DIC (*DICarboxylate carrier*). Nei mammiferi è stato individuato un membro di questa famiglia, SLC25A10, (*locus in H. sapiens 17q25.3*), un trasportatore di circa 28 kDa (287 amminoacidi), localizzato nella membrana mitocondriale interna, dove può mediare lo scambio di malonato, malato e succinato con anioni inorganici ($H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$). Si ritiene che questo trasportatore rifornisca quindi i mitocondri di intermedi per il ciclo di Krebs, per la gluconeogenesi, per il ciclo dell'urea, per la sintesi di acidi grassi... L'espressione di questo trasportatore sembra essere particolarmente abbondante in fegato e reni (G. Fiermonte et al., 1999). Questo trasportatore consiste di tre ripetizioni omologhe di circa 100 amminoacidi, ciascuna delle quali è costituita da 2 α -eliche trans-membrana, connesse da una regione polare; le ripetizioni sono connesse da brevi loop caratterizzati dal motivo conservato P-h-D/E-X-h-K/R-X-K/R-(20-30 amminoacidi)-D/E-G-(4 amminoacidi)-a-K/R-G (dove h indica un residuo idrofobico, a un residuo aromatico).

1.7 LE PERMEASI DEL SOLFATO SulP NEI MAMMIFERI

Nei mammiferi, la famiglia genica *slc26* codifica per un cospicuo numero di scambiatori anionici molto versatili, che sono coinvolti sia nella normale fisiologia cellulare, sia nella fisiopatologia umana. Ad oggi, ne sono stati individuati undici membri, ma, tra questi, si ritiene che *slc26a10* sia in realtà uno pseudogene. Dall'albero filogenetico dei trasportatori si può notare che i primi dieci membri della famiglia sono tutti imparentati tra loro, più o meno strettamente; *slc26a11*, al contrario, sembra più correlato ai trasportatori vegetali SULTR, suggerendo che la sua origine potrebbe essere più antica, e che il gene potrebbe avere un maggior grado di conservazione rispetto al gene ancestrale.

I membri della famiglia SLC26 sono proteine di 700 - 1'000 amminoacidi, ed hanno tra loro un'identità di sequenza compresa tra il 21% e il 43%. È stato osservato che il livello di conservazione tra alcuni ortologi SLC26 in uomo e topo è relativamente basso, con un'identità di sequenza variabile tra il 95% (SLC26A5) e il 76% (SLC26A8), valore ben al di sotto dell'identità media tra ortologi di uomo e topo (86%).

Inoltre, membri SLC26 in *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabditis elegans* presentano un'identità con le proteine di mammifero di solo il 25-40%, rendendo impossibile individuare per ciascun paralogo di mammifero il relativo gene ortologo.

Tra i processi che coinvolgono trasportatori appartenenti a questa famiglia si possono ricordare lo sviluppo osseo, la sintesi degli ormoni tiroidei, il trasporto transepiteliale di Na^+ e Cl^- , l'escrezione di HCO_3^- dal nefrone distale, la secrezione di HCO_3^- dal pancreas esocrino.

Gli scambiatori SLC26 trasportano anioni monovalenti come Cl^- , I^- , OH^- , HCO_3^- , HCOO^- oppure divalenti come SO_4^{2-} o $^- \text{OOC}-\text{COO}^-$. I diversi paraloghi differiscono in modo significativo, oltre che per la specificità nei confronti di uno o più ioni, anche per la selettività verso la carica degli ioni stessi.

Per tutti gli SLC26 di mammifero è stata predetta una struttura generale costituita da un *core* idrofobico N-terminale consistente di 8-14 segmenti *trans*-membrana, al cui livello si concentra il grado più alto di identità di sequenza. Un'altra regione altamente conservata è costituita dalla sequenza consenso per il trasporto del solfato (Prosite PS01130: P/A/V - x - F/Y/L/C/V/I - G/S - L - Y - S/T/A/G - S/T/A/G/L - x₄ - L/I/V/F/Y/A - L/I/V/M/S/T - Y/I - x₃ - G/A - G/S/T - S/R/V - K/R/N/P), un segmento di 22 amminoacidi, molti dei quali invariati e presumibilmente fondamentali per il trasporto di anioni. Una terza regione conservata, nota come "motivo di Saier", include una tripletta invariante -NQE- (residui 417-419 di SCL26a2 murina) e i residui N425 e L483; tali posizioni risultano essere estremamente delicate, al punto che le mutazioni N425D e L483P in SLC26A2 umana sono state riscontrate in pazienti affetti da acondrogenesi di tipo 1B e/o atelosteogenesi di tipo 2. Parallelamente, è stato osservato che oociti di *Xenopus* portatori della muta-

Figura 1.7-1: Albero filogenetico della famiglia genica *slc26*. Adattato da M. R. Dorwart et al., 2008.

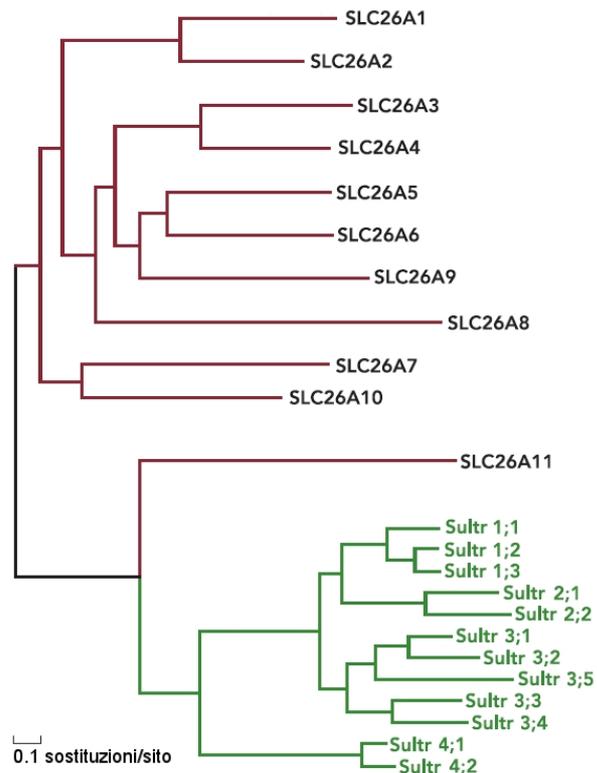
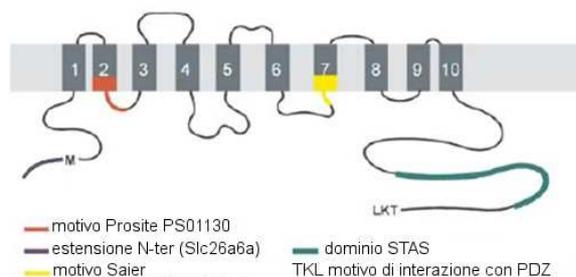


Figura 1.7-2: Topologia predetta da HMMTop (*transmembrane topology prediction server*) per lo scambiatore SLC26a6 murino. Tale configurazione è stata dedotta dall'osservazione che sia l'N-ter che il C-ter della proteina sono intracellulari. Oltre ai segmenti transmembrana (stimati tra 10 e 14), sono evidenziati i motivi e i domini conservati. (D. B. Mount, M. F. Romero, 2004)



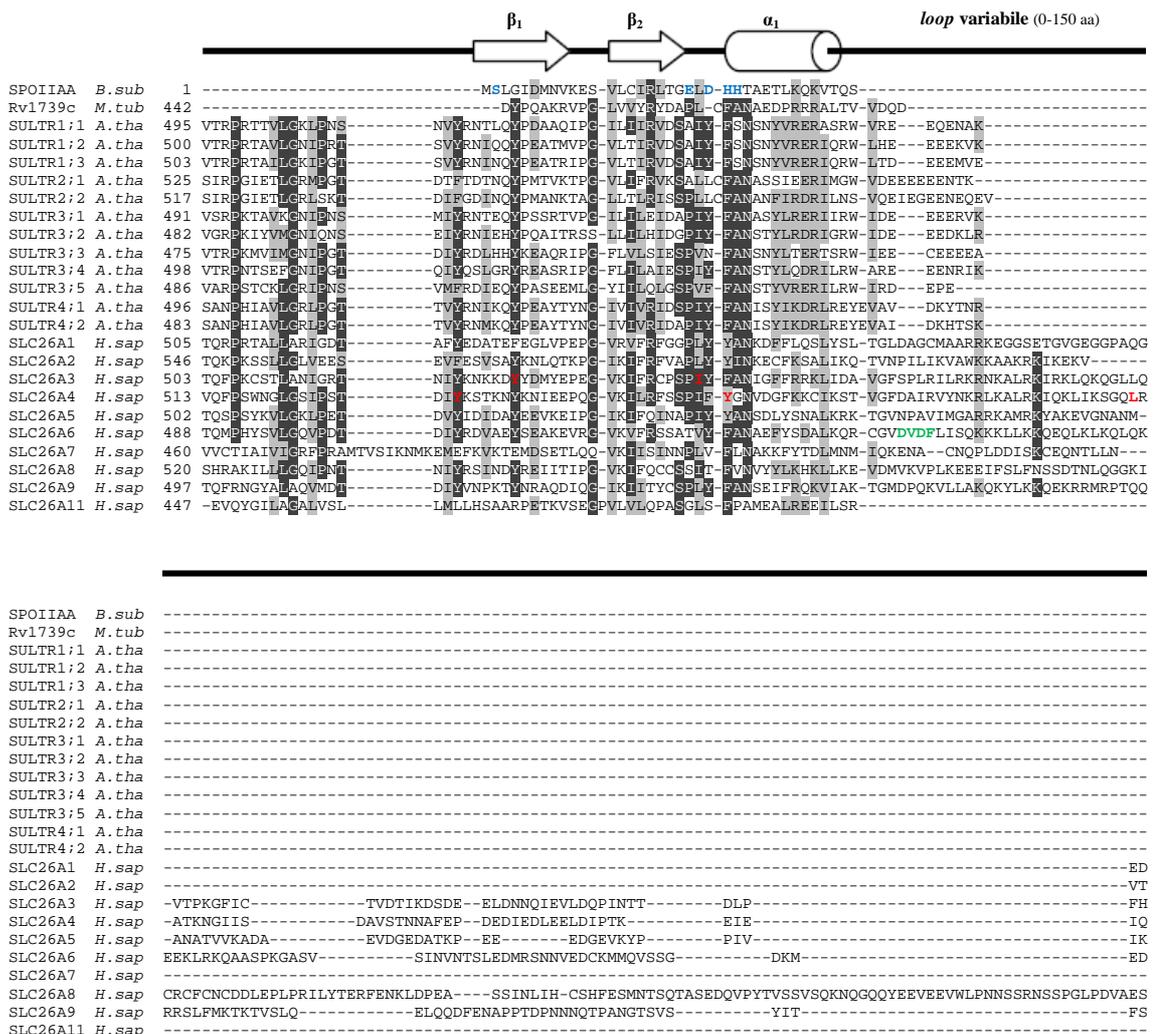
estremamente delicate, al punto che le mutazioni N425D e L483P in SLC26A2 umana sono state riscontrate in pazienti affetti da acondrogenesi di tipo 1B e/o atelosteogenesi di tipo 2. Parallelamente, è stato osservato che oociti di *Xenopus* portatori della muta-

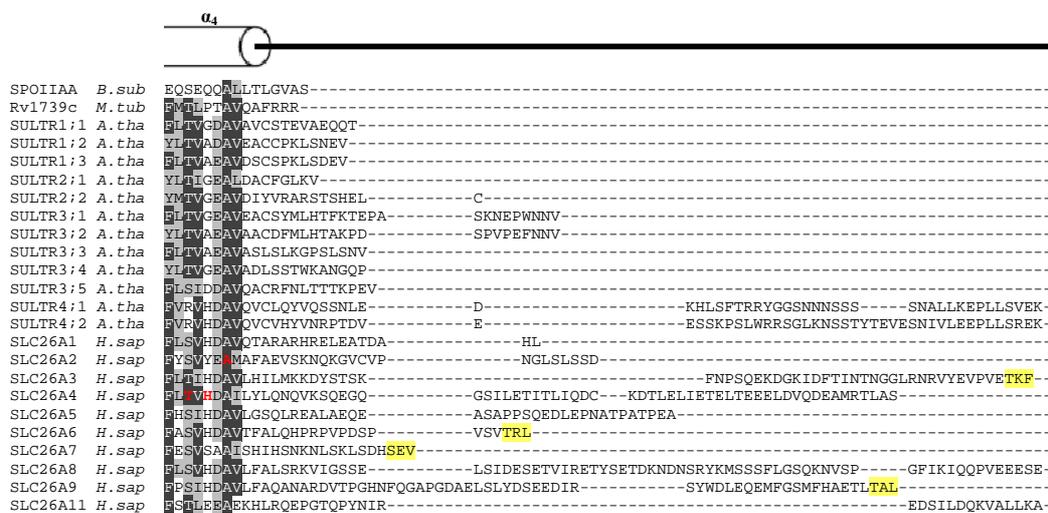
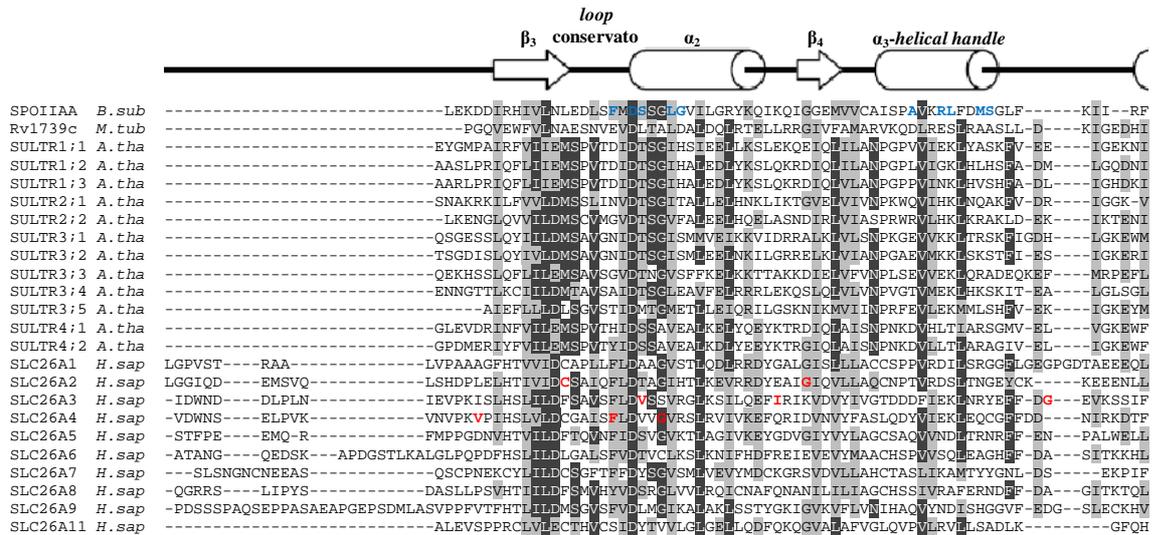
zione N425D non sono funzionali.

La regione citoplasmatica C-terminale di tutti gli SLC26 è costituita da un dominio STAS (*Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist*), la cui funzione fisiologica è tuttora ignota. La struttura di questo domino non è ancora stata determinata, ma ne è stata ricavata una predizione basata sulla struttura tridimensionale dell'*Anti Sigma factor Antagonist (ASA) SPOIIAA* di *Bacillus subtilis* ottenuta tramite Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

L'allineamento multiplo dei domini C-terminali di diversi membri della famiglia è stato utilizzato per la predizione di struttura secondaria (CLUSTALW e PSI-BLAST), e tali informazioni hanno quindi consentito effettuare il *threading* sulla struttura tridimensionale di SPOIIAA (L. Aravind & E. V. Koonin, 2000). Secondo gli autori, gli ASA e la regione C-terminale dei trasportatori anionici costituiscono un unico tipo di dominio, precedentemente non definito, molto antico e conservato (il domino STAS). Altre proteine, appartenenti al medesimo *fold* e simili agli ASA, sono state trovate in diversi organismi, tra cui batteri Gram-positivi, Attinomiceti, Cianobatteri, Clamidie.

Figura 1.7-3: Allineamento multiplo delle sequenze di domini STAS (di ASA e trasportatori anionici) di diverse specie.





B. sub: *Bacillus subtilis*; *M. tub*: *Mycobacterium tuberculosis*; *A. tha*: *Arabidopsis thaliana*; *H. sap*: *Homo sapiens*. I numeri che precedono le sequenze allineate indicano le posizioni del primo amminoacido da cui viene considerato il rispettivo dominio STAS.

Le mutazioni patologiche sono evidenziate in rosso e riguardano i trasportatori umani SLC26A4 (Pendrina: trasportatore di I^- mutato nella sindrome di Pendred), SLC26A2 (DTDST: trasportatore per SO_4^{2-} mutato nella displasia diastrofica/acondrogenesi di tipo IB), SLC26A3 (CLD: scambiatore $Cl^- - HCO_3^-$ mutato nella diarrea congenita con perdita di Cl^-). In azzurro sono evidenziate i residui di SPOIIAA coinvolti nell'interazione con SPOIIAB. In verde sono evidenziate i residui coinvolti nell'interazione di SLC26A6 con l'Anidrasi Carbonica. In giallo sono evidenziate i motivi di interazione con domini PDZ.

Gli elementi di struttura secondaria sono ricavati dalla struttura di SPOIIAA.

Adattata da M. R. Dowart et al., (2008).

Figura 1.7-4: Modello ipotetico del *fold* di un dominio STAS, basato sulla struttura NMR di SPOIIAA.

Sono evidenziate gli elementi strutturali caratteristici del dominio:

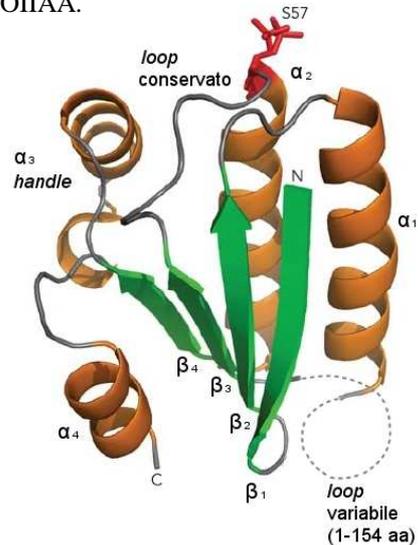
α : α -eliche (arancione)

β : filamenti β (verde)

S57: serina fosforilabile (rosso)

N, C: terminali amminico e carbossilico

Adattata da M. R. Dorwart et al. 2008



La struttura degli STAS comprenderebbe uno *scaffold* costituito da quattro β -strands (β -sheet

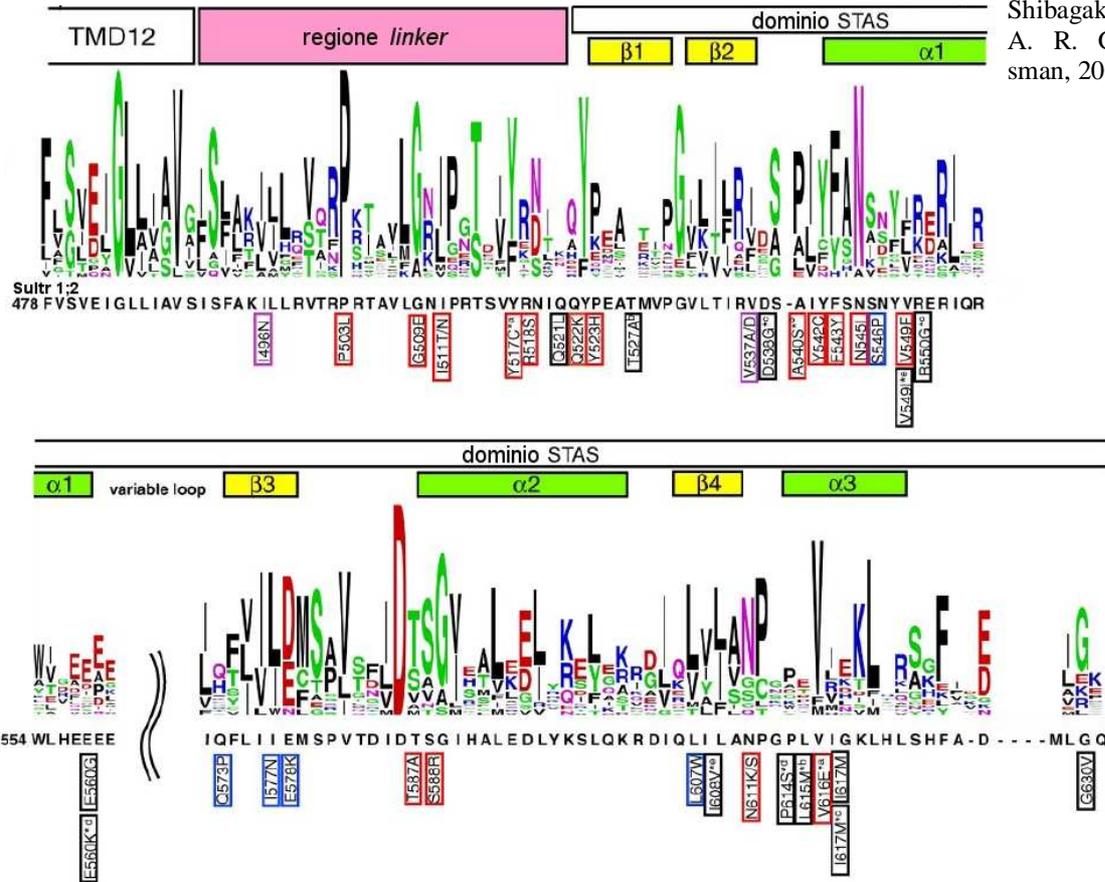
centrale), un' α -elica a valle di β_2 (α_1) e una seconda elica a monte di β_4 (α_2), entrambe localizzate dallo stesso lato del foglietto centrale. Tra β_3 e α_2 è situato un *loop* conservato, forse implicato nel legame di nucleotidi; tra α_1 e β_3 si colloca un *loop* molto variabile, con rilevanza funzionale ignota, comprendente estese inserzioni, in parte disordinate, in parte elicoidali. Al C-terminale è prevista una regione elicoidale di lunghezza variabile, distorta e scarsamente conservata (α_3 *handle* - α_4); la parte terminale di questa regione elicoidale (α_4) si dispone sul lato opposto del foglietto centrale.

SPOIIAA è un regolatore della trascrizione capace di interagire con il fattore anti-sigma SPOIIB, la cui funzione è il sequestro del fattore di trascrizione σ^F (A. L. Decatur & R. Losick, 1996). Quando questo fattore è nella forma complessata, non è in grado di interagire con la RNA polimerasi e non può quindi avviare la trascrizione dei geni che controllano la endosporulazione. SPOIIAA (l'antagonista del fattore anti-sigma) induce pertanto il rilascio di σ^F da parte di SPOIIB. Quest'ultimo fattore è anche una chinasi, e può fosforilare SPOIIAA a livello della serina 57 (il residuo di confine tra il *loop* conservato e l'elica α_2); tale modifica induce l'inattivazione di SPOIIAA e ne provoca la dissociazione da SPOIIB. Anche la fosfatasi SPOIIE può interagire con SPOIIAA e, defosforilandolo, lo riattiva. L'avvio della sporulazione è pertanto un evento finemente controllato dall'equilibrio fosforilazione/defosforilazione del fattore SPOIIAA e dipende dalla disponibilità di ATP. È stato inoltre dimostrato che SPOIIAA è in grado di interagire con ATP e GTP, accomodandole tra il β -sheet e il *loop* conservato; questo dominio sembra anche possedere una debole attività NTPasica, che viene abolita dalla fosforilazione della serina conservata. Non è chiaro se la presenza di questo sito di interazione con nucleotidi possa costituire anche un meccanismo di regolazione dei trasportatori anionici in funzione della concentrazione di GTP intracellulare.

È stato ipotizzato che il dominio STAS, al pari di SPOIIAA, possa mediare l'interazione con altri partner proteici, espletando una funzione modulatoria. Malgrado la funzione dei domini STAS dei trasportatori non sia ancora chiara, si ritiene comunque che abbiano un ruolo importante nella regolazione dell'attività di trasporto e nel corretto ripiegamento globale dei trasportatori a livello della membrana plasmatica, poiché la presenza di specifiche mutazioni nella sua sequenza è associata a patologie ereditarie umane.

Esperimenti di mutagenesi sito-specifica (N. Shibagaki & A. R. Grossman, 2006) hanno consentito di individuare amminoacidi essenziali per la funzione di trasporto, localizzati preferenzialmente nella regione di collegamento tra i domini trans-membrana e il dominio STAS (regione *linker*) e sulla superficie delineata dagli N-terminali delle α -eliche α_1 e α_2 , dall'N-terminale di β_1 e dal C-terminale di β_2 . Questa superficie dello STAS corrisponde alla superficie che in SPOIIAA media l'interazione con SPOIIB. Sono inoltre stati individuati amminoacidi importanti per il corretto ripiegamento nella membrana plasmatica; tali amminoacidi sono situati soprattutto a livello di β_3 e β_4 , o in regioni contigue.

Figura 1.7-5: Rappresentazione delle frequenze con cui gli amminoacidi ricorrono in ciascuna posizione della sequenza (in 12 trasportatori di *A. thaliana*, 5 di *H. sapiens* e SPOIIAA di *B. subtilis*). Tratta da N. Shibagaki & A. R. Grossman, 2006.



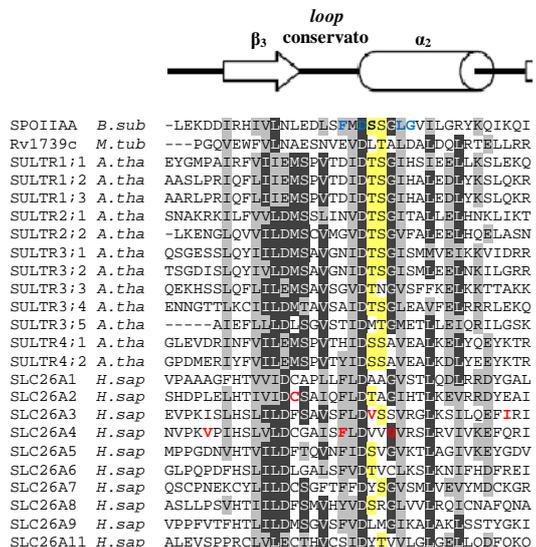
Gli amminoacidi basici (K, R, H) sono colorati in blu, quelli acidi (D, E) in rosso, quelli polari (G, S, T, Y, C) in verde, quelli idrofobici (A, V, L, I, P, W, F, M) in nero. Solo gli amminoacidi con un certo grado di conservazione sono mostrati. La sequenza riportata è quella del trasportatore SULTR1;2 di *A. thaliana*, su cui è stata condotta la mutagenesi.

Le mutazioni che sono state studiate sono incorniciate in:

- Blu: mutazioni che determinano una ridotta localizzazione della proteina sulla membrana
- Rosso: mutazioni che determinano una ridotta funzionalità della proteina ma una localizzazione normale
- Magenta: mutazioni che riducono sia la funzionalità della proteina sia la corretta localizzazione
- Nero: mutazioni che riducono la corretta localizzazione sulla membrana, ma che preservano una qualche attività. Gli asterischi indicano la presenza di mutazioni multiple in un certo allele (a: Y517C, V616E*; b: T527A*, L615M, T637A; c: D538G*, R550G, I617M; d: E560K, I608V, P614S*; e: A540S, V549I, I608V*).

Figura 1.7-6: Potenziali siti di fosforilazione (giello) in diversi domini STAS. *B. sub*: *Bacillus subtilis*, *M. tub*: *Mycobacterium tuberculosis*, *A. tha*: *Arabidopsis thaliana*, *H. sap*: *Homo sapiens*.
Adattata da M. R. Dorwart et al. 2008.

Nella posizione corrispondente alla serina 57 di SPOIIAA (o una posizione adiacente) è riscontrabile un elevato grado di conservazione per un residuo fosforilabile. Anche la sostituzione di tale residuo (treonina 587 in SULTR1;2) inattiva la funzione del trasportatore.



Molte delle proteine SLC26 (A3, A6, A7, A9) terminano con sequenze consenso T/S-X-Φ (dove Φ è un residuo idrofobico) per l'interazione con domini PDZ (*PSD-95/Disc-large/ZO-1*), strutture terziarie che mediano interazioni proteina-proteina, fondamentali nell'assemblaggio di complessi multi-proteici coinvolti nella determinazione della polarità cellulare (interazione con componenti del citoscheletro), nell'indirizzamento alla membrana plasmatica e nella regolazione dell'attività (H. Lohi et al. 2003). Nel caso degli scambiatori SLC26, tali motivi di interazione mediano presumibilmente il contatto con proteine adattatrici, che, a loro volta, interagiscono con altri trasportatori tra cui, ad esempio, NHE3 e CFTR. I membri della famiglia SLC26 dotati di motivi di interazione con domini PDZ sono in grado di formare complessi macromolecolari associandosi con proteine *scaffold* come E3KARP (*NHE3 kinase A Regulatory Protein*) o CAP70 (*CFTR-Associated Protein of 70 kDa*) nel caso di SLC26A3, oppure E3KARP e NHERF (*NHE3 Regulatory Factor*) nel caso di SLC26A7, tramite i domini PDZ di queste ultime.

È interessante notare che anche il canale CFTR (trasportatore di Cl⁻ della famiglia ABC, responsabile, in talune sue forme mutate, del fenotipo della Fibrosi Cistica) è in grado di legare queste stesse proteine *scaffold*. Ci sono prove che questo canale e alcuni membri SLC26 (SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6) siano in grado di attivarsi reciprocamente tramite l'associazione del dominio regolatorio R di CFTR e il dominio STAS degli SLC26, in presenza del secondo messaggero cAMP (3',5'-*cyclic Adenosine MonoPhosphate*). La chinasi PKA (cAMP-dipendente) fosforila il dominio R in varie posizioni (fino ad 8-9 siti), aumentandone l'affinità per il dominio STAS. Al contrario, almeno un altro trasportatore SLC26 (SLC26A9) è inibito nella sua attività di trasporto in seguito all'interazione con il dominio R (M. H. Chang et al. 2009).

La sintomatologia tipica della Fibrosi Cistica e l'alterazione della funzionalità di specifici organi (bronchiectasia, insufficienza pancreatica, disfunzione ileale, cirrosi epatica biliare, sterilità maschile) sembrerebbero indicazioni tra loro coerenti della presunta relazione tra il canale CFTR e alcuni trasportatori SLC26.

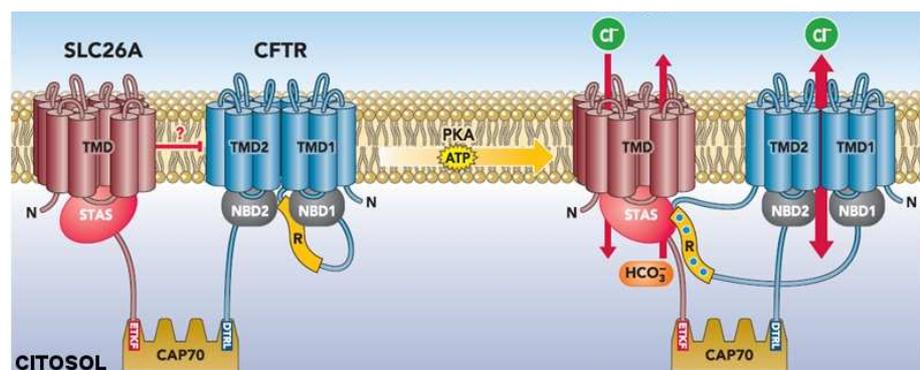


Figura 1.7-7 Interazione tra i trasportatori SLC26 e CFTR in condizioni di riposo e in seguito a stimolazione. Una proteina *scaffold*, mediante il suo dominio PDZ, assembla un trasportatore SLC26 e il canale CFTR. A riposo, il dominio R di CFTR (in particolare la sequenza 654-673, detta RE, *Regulatory Extension*) interagisce con il dominio NBD1 (*Nucleotide Binding Domain*) della stessa proteina (J. B. Baker et al. 2007), impedendone l'interazione con NBD2. Si ritiene che SLC26 stabilizzi tale interazione inibitoria, ma non è noto il meccanismo. L'attivazione della PKA fosforila il dominio R, alterandone l'interazione con NBD1 e favorendone l'interazione con il dominio STAS. Questo stabilizza l'associazione tra NBD1 e NBD2, alla cui interfaccia sono localizzati due siti di legame per l'ATP. Il legame e l'idrolisi dell'ATP, come anche la fosforilazione da parte di PKA sono eventi necessari per la normale apertura di CFTR. Molte mutazioni associate alla Fibrosi Cistica coinvolgono siti di fosforilazione compresi nel dominio R. Tratta da M. R. Dorwart et al. 2008

È stato dimostrato che delle varie Permeasi esistono diverse isoforme, originate da *splicing* alternativo di un medesimo mRNA, espresse in differenti tessuti o momenti dello sviluppo, e dotate di una diversificata specificità di substrato (Lohi et al., 2003).

Anche se non è chiaro quale sia lo stato di aggregazione fisiologico di queste proteine, è stato ipotizzato che almeno alcuni dei trasportatori operino come omodimeri (M. H. Chang, et al. 2009); altri, verosimilmente, operano come omotetrameri che, sul versante citoplasmatico, presentano degli ammassi costituiti dai rispettivi domini STAS (Mio e al, 2008).

1.7.1 SLC26A1 (Sat-1, Sulfate Anion Transporter 1)

SLC26A1 è una proteina di 701 amminoacidi (in *H. sapiens*) che opera come trasportatore per gli anioni SO_4^{2-} e ossalato. La sua attività sembra fortemente incrementata dal Cl^- extracellulare (ma anche da altri alogenuri e dal formiato) e dal pH esterno acido; la rilevanza fisiologica di tale dipendenza è ignota. Non è noto se l'attività del trasportatore consista in un simporto $\text{H}^+/\text{SO}_4^{2-}$ oppure in un antiporto $\text{SO}_4^{2-}/\text{OH}^-$ o $\text{SO}_4^{2-}/\text{HCO}_3^-$, né che rilevanza fisiologica possa avere.

Il trasportatore è stato individuato principalmente a livello dei canalicoli epatici, dove potrebbe operare come scambiatore anionico, e nei nefroni, a livello della membrana baso-laterale del tubulo prossimale. Data la sua capacità di trasportare l'ossalato, potrebbe agire di concerto con il trasportatore apicale SLC26A6 per la secrezione di questo anione (si veda la figura 1.7-12).

Trascritti genici di *slc26a1* sono stati inoltre riscontrati in cervello, cuore, muscolo scheletrico, pancreas e testicolo, ma si ignora il ruolo che il trasportatore potrebbe avere in tali organi.

Non si conoscono patologie Mendeliane associate a mutazioni nella sua sequenza.

1.7.2 SLC26A2 (DTDST, DiasTrophic Dysplasia Sulfate Transporter)

SLC26A2 è un trasportatore di 739 amminoacidi con il 45% di identità con SLC26A1. L'attività di trasporto dell'anione SO_4^{2-} è inibita dalla presenza di Cl^- , ossalato e altri anioni extracellulari; si ritiene che SLC26A2 possa operare come trasportatore versatile per anioni monovalenti e divalenti.

SLC26A2 è stato riscontrato, in quantità più o meno rilevante, nella maggior parte dei tessuti, ma risulta particolarmente abbondante nella membrana apicale dell'epitelio del colon e nella cartilagine.

La rilevanza del trasportatore nello sviluppo embrionale è testimoniata dall'elevato livello di espressione nei condrociti della cartilagine ialina e nell'osso fetale. Inoltre, è interessante notare che, durante il differenziamento in vitro dei fibroblasti murini in osteoblasti (T. Kobayashi et al., 1997), l'espressione di SLC26A2 è indotta dal fattore BMP-2 (*Bone Morphogenetic Protein*), uno dei morfogeni delle ossa del cranio nell'embrione (altri sono BMP-4 e BMP-7), responsabili dell'ossificazione intra-membranosa delle cellule mesenchimatiche derivate dalle creste neurali craniali (mediante il controllo dell'espressione di proteine della matrice extracellulare, come osteocalcina e osteopontina).

Una perdita di funzione del trasportatore ha come risultato una riduzione nell'assorbimento di SO_4^{2-} , e una conseguente carenza nella solfatazione dei proteoglicani che costituiscono la matrice extracellulare della cartilagine. L'esito di tale carenza sembra essere una riduzione della proliferazione dei condrociti (H. Satoh et al., 1998) in risposta al fattore mitogeno FGF-2 (*Fibroblast Growth Factor*).

Negli altri tessuti in cui il trasportatore è espresso in modo significativo (intestino, trofoblasto placentale, ghiandole sudoripare, ghiandole sottomuose bronchiali, ...) si presume che il deficit sia compensato da trasportatori paraloghi.

Slc26A2 è stato individuato come il gene responsabile di quattro patologie autosomiche recessive, la displasia epifisaria multipla (MED, *Multiple Epiphyseal Dysplasia*, OMIM 226900), la displasia diastrofica (DTD, *DiasTrophic Dysplasia*, OMIM 222600), l'atelosteogenesi di tipo II (AO2, *AtelOsteogenesis*, OMIM 256050) e l'acondrogenesi di tipo 1B (ACG1B, *AChondroGenesis*, OMIM 600972). La prima patologia è considerata una condrodiplosia lieve, i cui sintomi più rilevanti sono deformità e dolori articolari, deambulazione difettosa e statura bassa. La seconda patologia è caratterizzata da nanismo normocefalico e da una generalizzata displasia articolare, ma i pazienti possono presentare diversi difetti scheletrici tra cui cifoscoliosi, palatoschisi, piede torto, deformità delle dita e dei padiglioni auricolari. La terza patologia è frequentemente letale durante il periodo neonatale a causa di insufficienza respiratoria, ed è caratterizzata da arti gravemente accorciati, torace ridotto, scoliosi, piede torto, pollice addotto, palatoschisi. La quarta patologia (associata generalmente ad un genotipo omozigote per mutazioni gravi) pregiudica lo sviluppo scheletrico ed è così grave da risultare letale nel periodo prenatale o neonatale precoce.

Sono state identificate più di 30 mutazioni, tra cui mutazioni con cambiamento di significato (singoli amminoacidi mutati) nel 49% dei casi, delezioni (33%), mutazioni con codoni di stop, non-senso (10%), alterazioni dello splicing (5%), inserzioni (3%). Esiste una correlazione fenotipo-genotipo tra la severità della patologia e la gravità della mutazione. Ad esempio, troncamenti (R178X) o sostituzioni non conservative nei domini trans-membrana (G255E, N425D o L483P) producono patologie molto gravi, mentre sostituzioni di amminoacidi non trans-membrana (R279W) o alcune mutazioni nei siti di *splicing* (IVS1+2T>C nell'introne 1) producono dei fenotipi più lievi (P.A. Dawson & D. Markovich, 2005).

1.7.3 SLC26A3 (DRA, Down-Regulated in Adenoma, o CLD, Chloride Losing Diarrhea)

SLC26A3 è un trasportatore di 764 amminoacidi, ha un'identità di sequenza del 29% con SLC26A1, ed è in grado di trasportare SO_4^{2-} e ossalato, ma ci sono evidenze che possa operare anche come scambiatore $2\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (o OH^-). Fu inizialmente proposto come potenziale soppressore tumorale, poiché è generalmente sottoespresso nelle cellule di adenoma (da cui il nome DRA, *Down-Regulated in Adenoma*); questo fenomeno va probabilmente attribuito al fatto che il trasportatore costituisce un *marker* proprio dell'epitelio differenziato del colon, ed è verosimile che venga perduto dalle cellule neoplastiche indifferenziate. Tuttavia, va riportato che la sovraespressione inducibile di SLC26A3 in colture cellulari *in-vitro* ne sopprime la

crescita; pertanto, un ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare non è completamente escluso.

L'espressione di SLC26A3 è rilevante nell'apparato digerente, in particolare a livello dell'epitelio della membrana apicale degli enterociti che rivestono la superficie dei villi e delle cripte di Lieberkühn nell'intestino tenue (duodeno e ileo) e crasso (cieco e colon distale). Si ritiene che, nell'intestino, lo scambio Cl^-/base mediato da SLC26A3 collabori sinergicamente con lo scambio Na^+/H^+ effettuato da NHE3 per l'assorbimento trans-epiteliale di NaCl.

Mutazioni con perdita di funzione danno luogo a una patologia autosomica recessiva nota come diarrea congenita con perdita di cloruro (CLD, *congenital Chloride Losing Diarrhea*, OMIM 214700 e 126650). I pazienti con questa malattia nascono in genere prematuramente, a causa del *polidramnios* determinato dalla diarrea fetale; i neonati presentano una diarrea acquosa acida e con elevata concentrazione di Cl^- , associata a disidratazione, squilibri elettrolitici, complicazioni renali (iperplasia iuxtaglomerulare), pressorie (iper-reninemia e iper-aldosteronismo), ed alcalosi metabolica, una condizione che può risultare fatale se non trattata con un adeguato supplemento di acqua, KCl e NaCl per via endovenosa o, in età più avanzata, nella dieta. Se la condizione è opportunamente trattata, i pazienti hanno uno sviluppo e una speranza di vita normali.

Sono state individuate oltre 30 mutazioni del gene (P.A. Dawson & D. Markovich, 2005) che sono responsabili della malattia, e comprendono delezioni e inserzioni (47%), mutazioni con cambiamento di senso (23%), difetti nello *splicing* (17%) e mutazioni non-senso (13%). Alcune mutazioni (V317Del, I675/6Ins, G702TIns) determinano un ripiegamento non corretto della proteina (*misfolding*) e quindi la precipitazione della proteina, altre (Y526/7Del, I544N), pur non avendo effetto denaturante, compromettono alcune interazioni intramolecolari, strutturalmente o funzionalmente fondamentali. Molte di queste alterazioni producono trasportatori che rimangono intrappolati nel reticolo endoplasmatico e che non possono svolgere la loro funzione nella posizione fisiologica appropriata.

1.7.4 SLC26A4 (Pendrina)

SLC26A4 è un trasportatore di 780 amminoacidi, ha il 44% di identità di sequenza con SLC26A3 e il 30% con SLC26A1 e SLC26A2.

Si ritiene che operi come scambiatore Cl^-/base , ma anche come scambiatore Cl^-/I^- ; il trasporto sembra selettivo per anioni monovalenti (può coinvolgere ad esempio il formiato, ma non SO_4^{2-} o l'ossalato, malgrado la similarità di sequenza con trasportatori che possono farlo). Recentemente è stato osservato che, in cellule modello, la Pendrina può mediare anche il trasporto di fruttosio e mannosio.

Questo scambiatore è espresso in modo rilevante nella membrana apicale (luminale) delle cellule epiteliali dei follicoli tiroidei (in contatto con la colloide). L'anione I^- (assorbito a livello della membrana baso-laterale da parte del simporto Na^+/I^- SLC5A5) viene secreto, attraverso SLC26A4, nel lume follicolare, dove l'enzima Perossidasi tiroidea ossida I^- (utilizzando come accettore di elettroni H_2O_2) e lo lega in posizione 3 e 5 ai residui di tirosina della Tireoglobulina costituente la

colloide. I residui di 3-monoiodotirosina e 3,5-diiodotirosina sono i precursori per la sintesi degli ormoni tiroidei 3,5,5'-triiodotironina e 3,3',5,5'-tetraiodotironina (tiroxina).

SLC26A4 è inoltre espresso nella membrana luminale delle cellule intercalate dei tubuli distali e dei dotti collettori del nefrone, e nel sistema tubulo-vescicolare sottostante a questa membrana. La funzione del trasportatore in queste cellule (normalmente coinvolte nella secrezione attiva di H^+ e nel riassorbimento di HCO_3^- attraverso la proteina BND3L della membrana baso-laterale) è, verosimilmente, l'escrezione di HCO_3^- , che verrebbe scambiato con il Cl^- in caso di necessità (come durante la condizione di alcalosi metabolica). In effetti, è stato dimostrato che l'alcalosi sistemica aumenta la presenza del trasportatore sulla membrana apicale, l'acidosi la riduce.

Figura 1.7-8: La secrezione acido/base nel nefrone distale. Nei dotti collettori sono presenti due tipi di cellule, quelle principali e quelle intercalate.

Le prime secernono K^+ e assorbono Na^+ (tramite canali ENaC, *Epithelial sodium Channels*) e acqua (tramite acquaporine 2, 3 e 4). Le seconde, sono, a loro volta, suddivise in due categorie.

Le cellule α secernono attivamente H^+ attraverso la membrana apicale, tramite una H^+ -ATPasi, e riassorbono attivamente K^+ , tramite la H^+/K^+ -ATPasi.

Le cellule β riassorbono Cl^- e secernono HCO_3^- grazie, si ritiene, all'intervento della Pendrina (SLC26A4).

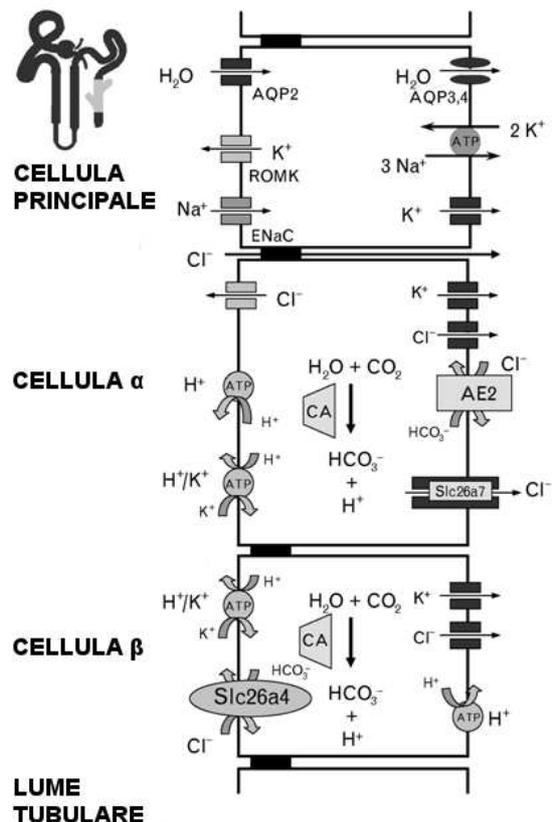
AQP: Acquaporine

AE2 (*Anion Exchanger 2*): noto anche come BND3L (*BaND 3-like*) o SLC4A2, opera come scambiatore Cl^-/HCO_3^- .

ROMK: noto anche come Kir1 (*ATP-sensitive K^+ inward rectifier channel*), è un canale per il K^+ operante come rettificatore debole del potenziale di membrana.

CA (*Carbonic Anhydrase*): Anidrasi carbonica

Tratta da A. Sindić et al. 2007



Nell'orecchio interno, questo trasportatore è espresso a livello del labirinto membranoso, dove si presume abbia un ruolo nel riassorbimento dell'endolinfa, operando come scambiatore Cl^-/HCO_3^- .

Mutazioni della Pendrina sono responsabili della sindrome di Pendred (OMIM 274600), una sindrome recessiva che comprende sordità (sindromica) e gozzo, talvolta associato a ipotiroidismo. Le strutture cocleari dei pazienti sono malformate e presentano una dilatazione della scala vestibolare e/o una displasia di Mondini (caratterizzata da una coclea arrotolata per un giro e mezzo anziché per due giri e mezzo), una dilatazione del canalicolo e del sacco endolinfatico (dove, in condizioni normali, l'endolinfa secreta dalle cellule della stria vascolare viene riassorbita), e degli otoliti maculari di dimensioni anomale. A livello tiroideo è stata riscontrata una deficienza nell'organificazione dello iodio, senza riduzione dell'assorbimento di iodio o deficit nel *signaling* della tireotropina (TSH) secreta dall'ipofisi anteriore.

Sono state identificate oltre 80 mutazioni (P.A. Dawson & D. Markovich, 2005) comprendenti cambiamento di amminoacidi (58%), delezioni (19%), alterazioni dei siti di splicing (12%), inserzioni (7%) e mutazioni non-senso (4%). Mutazioni che impediscono alla proteina una corretta localizzazione nella membrana plasmatica (G102R, V138F, E384G, T416P, Y556C) provocano un fenotipo più grave (la sindrome di Pendred), mutazioni che alterano la funzionalità ma non la localizzazione (L117F, I490L) provocano una forma di sordità non sindromica, senza coinvolgimento tiroideo.

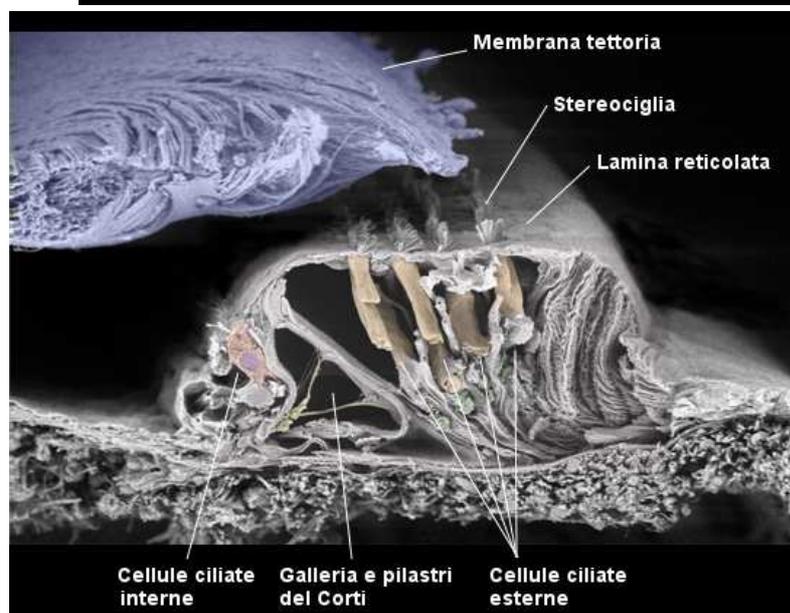
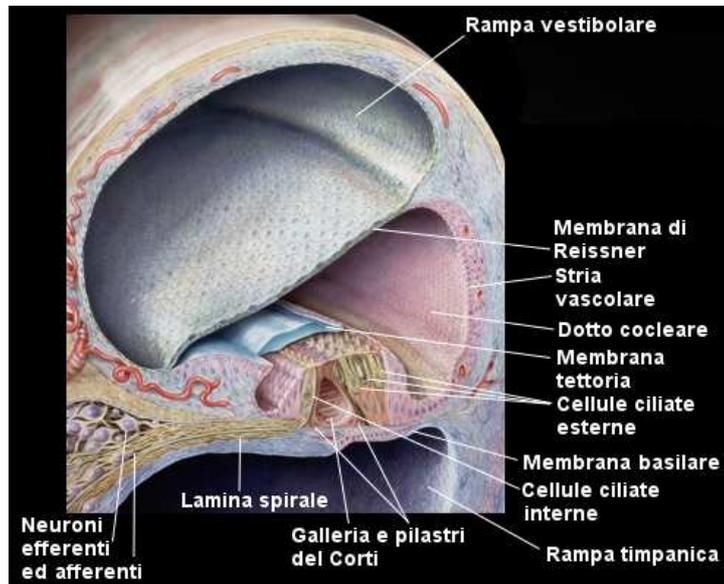
1.7.5 SLC26A5 (Prestina)

SLC26A5 è una proteina di 644 amminoacidi, ha un'identità di sequenza del 36% con SLC26A3 e SLC26A4, ma, diversamente dagli altri membri della famiglia, non sembra coinvolto nel trasporto anionico trans-membrana. A differenza degli altri membri della famiglia SLC26, l'identità di sequenza con i geni ortologhi di altre specie risulta molto elevata, oltre il 90%.

Questa proteina è espressa nelle cellule cigliate esterne dell'organo del Corti nella coclea (J. Zheng et al., 2000), in particolare nelle loro membrane laterali, dove si raggiunge la concentrazione di $2 \cdot 500$ unità per μm^2 .

Figure 1.7-9 e 1.7-10: Rappresentazione schematica e fotoingrandimento di una sezione cocleare.

L'apparato acustico è ospitato all'interno della coclea, una galleria a chiocciola che si avvolge in quasi tre giri attorno ad un processo osseo detto modiollo. La lamina spirale del modiollo e la sua continuazione membranosa, la membrana basilare, dividono il canale in due rampe sovrapposte, la rampa superiore, o vestibolare, e la rampa inferiore, o timpanica. Queste rampe decorrono insieme fino al vertice della coclea, dove sono messe in comunicazione tra di loro attraverso l'elicotrema (un'interruzione nella membrana basilare). La rampa superiore è ulteriormente divisa longitudinalmente dalla membrana di Reissner, che separa la rampa vestibolare propriamente detta dal dotto cocleare. Questa terza rampa differisce per la composizione del liquido in essa contenuto, detto endolinfa, che ha una composizione simile al liquido intracellulare (mentre le rampe vestibolare e timpanica contengono la perilinfa, con composizione simile al liquido extracellulare).



L'apparato recettoriale della coclea è costituito da cellule cigliate disposte ai lati (una fila interna e tre/quattro file esterne) dei pilastri del Corti. Sopra a queste strutture fibrose è distesa una lamina reticolata che ricopre le cellule recettoriali, lasciandone sporgere le stereociglia recettoriali (delle specie di microvilli). Queste, a loro volta, sono in contatto con la membrana tettoria.

I movimenti della catena degli ossicini che comunicano con il timpano si trasmettono alla perilinfia e inducono la vibrazione della membrana basilare in settori diversi, a seconda dell'altezza del suono.

Le oscillazioni della membrana basilare fanno oscillare il pilastro esterno del Corti e determinano lo sfregamento tangenziale delle ciglia contro la membrana tettoria.

Lo spostamento reciproco delle stereociglia determina la distensione di speciali micro-filamenti che connettono ciglia tra loro adiacenti. La tensione viene quindi trasmessa a dei meccano-recettori che (per le particolari proprietà elettrochimiche dell'endolinfa, ricca di K^+ e con voltaggio positivo) lasciano entrare nella cellula una corrente depolarizzante di K^+ . Mentre le cellule interne trasformano questo potenziale in segnali sinaptici trasmessi alle vie neuronali acustiche, quelle interne lo convertono in una variazione della lunghezza delle cellule stesse.

Figura 1.7-9: adattata da: Medical Art Service, Munich, Education resources.

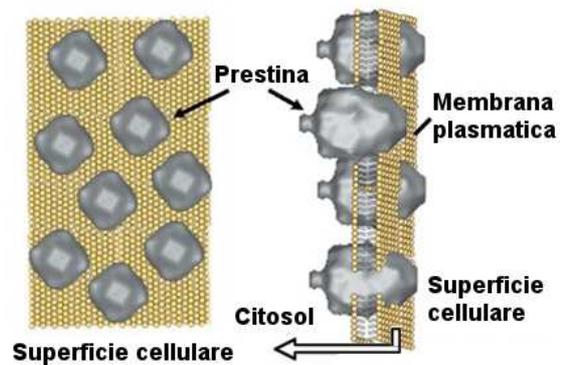
Figura 1.7-10: Fotografia di microscopia elettronica a scansione, adattata da: Uppsala Universitet, Research, Surgical Diseases (Ear).

L'organizzazione strutturale della Prestina funzionale è quella di un omotetramero alto 11.5 nm e con un diametro massimo di 7.7 nm, costituito da due unità dimeriche, stabilizzate al loro interno da ponti disolfuro.

Figura 1.7-9: Ricostruzione tridimensionale di unità funzionali di Prestina (risoluzione 2 nm) immerse nella membrana plasmatica delle cellule cigliate esterne.

Il modello è stato dedotto da una serie di immagini di microscopia elettronica a trasmissione (55'000X).

Tratta da K. Mio et al., 2008



Le cellule cigliate esterne dell'organo del Corti hanno la peculiare proprietà di modificare la propria lunghezza anche del 5%, accorciandosi in risposta a stimoli depolarizzanti, e allungandosi in risposta a stimoli iperpolarizzanti. Questa variazione sembra essere conseguente a cambiamenti conformazionali della prestina, in risposta a variazioni del voltaggio di membrana; questa proteina agisce quindi come una specie di motore piezoelettrico molecolare, che genera forza alla frequenza del suono stimolante (fino ad oltre 20 kHz). La contrazione periodica delle cellule cigliate esterne, sincronizzata con l'oscillazione della membrana basilare, rende più rigido l'accoppiamento tra questa membrana e la membrana tettoria. Il risultato è l'amplificazione dell'oscillazione dell'organo del Corti e, dunque, una più pronunciata deformazione meccanica della stereociglia delle cellule cigliate interne. L'amplificazione raggiunge i 40 dB alle intensità sonore basse e medie, e diminuisce progressivamente fino a saturazione, quando l'intensità sonora diventa maggiore.

È stato inoltre osservato che, in risposta a variazioni del voltaggio, SLC26A5 lega anioni citoplasmatici come Cl^- e HCO_3^- (ma ci sono prove che questa interazione può coinvolgere anche altri anioni inorganici e organici mono- e poli-valenti). Non è tuttavia chiaro se questi anioni costituiscano una sorta di sensore estrinseco del voltaggio di membrana, o se piuttosto siano dei modulatori allosterici di un sensore intrinseco.

Figura 1.7-11: Modelli proposti per spiegare la sensibilità della Prestina al voltaggio.

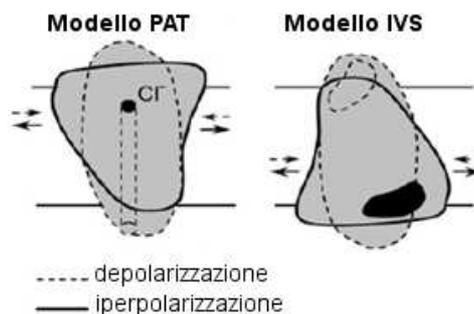
- Modello PAT (*Partial Anion Transporter*): è stato ipotizzato che gli anioni intracellulari possano agire come sensori del voltaggio estrinseci, e che il loro spostamento all'interno della membrana (in direzione citoplasma → esterno), in una sorta di trasporto incompleto, possa alterare direttamente la conformazione della Prestina.

Tuttavia, si stima che i riarrangiamenti strutturali della Prestina determinino una variazione della superficie della proteina pari a 8 nm², e sembra improbabile che possano essere imputabili al semplice passaggio di un anione del diametro 3.6 Å.

- Modello IVS (*Intrinsic Voltage Sensor*): un secondo modello propone che gli anioni modulino allostericamente (o elettrostaticamente) un sensore del voltaggio intrinseco, costituito da una regione mobile di residui carichi. L'alterazione del profilo di energia libera di questo sensore ne provocherebbe quindi l'avvicinamento o l'allontanamento dalla membrana. La transizione conformazionale della Prestina sarebbe quindi determinata dall'effetto allosterico generato dal legame o dalla dissociazione dell'anione dal sensore.

Qualunque sia il meccanismo reale di funzionamento della Prestina, appare chiaro che, per poter subire riarrangiamenti strutturali così significativi da riflettersi sulla forma e le dimensioni complessive della proteina e tali da compiersi in cicli molto brevi (potenzialmente con frequenze fino a 70 kHz), la Prestina deve aver sviluppato proprietà termodinamiche che la rendono vicina all'instabilità meccanica.

Adattata da V. Rybalchenko & J. Santos-Sacchi, 2008.



Proteine ortologhe a SLC26A5, trovate in *Danio rerio* (zebrafish) e *Gallus gallus*, funzionano come scambiatori SO₄²⁻/Cl⁻. È stato inoltre osservato che, in cellule modello, la Prestina (come la Pendrina) può mediare il trasporto di fruttosio e mannosio, e questo suggerisce un altro potenziale ruolo funzionale di questa proteina nelle cellule cigliate esterne, come trasportatore di zuccheri. Non è tuttavia nota la rilevanza fisiologica di queste proprietà.

L'inattivazione del gene codificante questa proteina in organismi modello causa sordità, con una perdita di sensibilità cocleare pari a 40 – 60 dB. Mutazioni della Prestina sono state individuate come causa di sordità non sindromica anche nell'uomo. Una mutazione ricorrente, IVS2-2A>G, sembra interferire con il normale processo di *splicing* dell'esone 2.

L'esame della struttura del gene della Prestina ha consentito di individuare una potenziale sequenza di risposta agli ormoni tiroidei TRE (*Thyroid hormone Response Element*), capace di legare il recettore complessato con la triiodotironina. Questa forma di regolazione potrebbe essere importante durante lo sviluppo; l'ipotiroidismo congenito è in effetti associato a sordità.

1.7.6 SLC26A6 (PAT-1, Putative Anion Transporter-1 o CFEX, Cl/Formate EXchanger)

SLC26A6 è un trasportatore di 637 amminoacidi, molto versatile, e può operare come scambiatore Cl⁻/ossalato, SO₄²⁻/ossalato, SO₄²⁻/Cl⁻, Cl⁻/formiato, Cl⁻/OH⁻, ma soprattutto Cl⁻/HCO₃⁻, probabilmente con una stechiometria 1Cl⁻/2HCO₃⁻.

SLC26A6 è uno dei membri più ampiamente espressi di questa famiglia, in particolare nelle membrane apicali dei tessuti epiteliali a livello renale, pancreatico, intestinale, cardiaco, muscolare e placentare. Di questo trasportatore sono state identificate isoforme (almeno 5: a, b, c, d, e) piuttosto eterogenee, prodotte per *splicing* alternativo.

SLC26A6 potrebbe essere lo scambiatore anionico coinvolto nel riassorbimento di NaCl e nella secrezione di bicarbonato (e ossalato) a livello della membrana luminale nelle cellule del tubulo prossimale del nefrone.

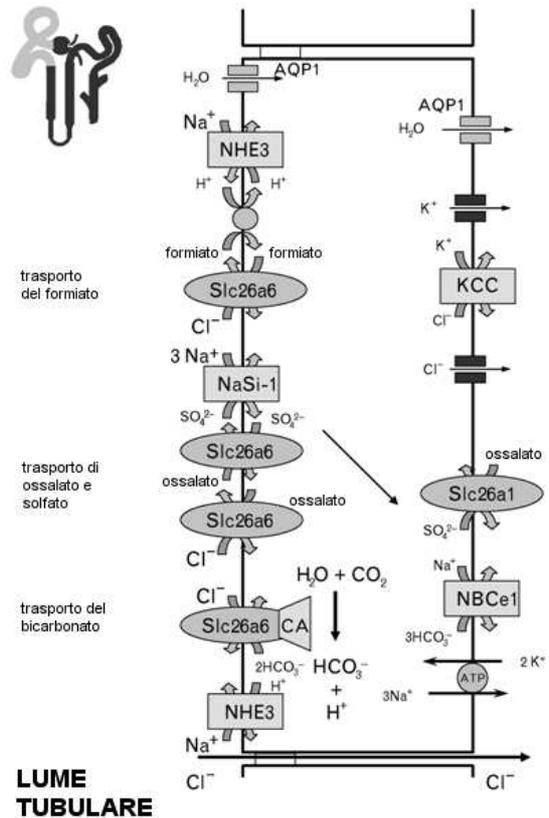
Figura 1.7-12: Il riassorbimento di NaCl e SO_4^{2-} nel tubulo prossimale.

Nel tubulo prossimale viene riassorbito il 65% di Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- , H_2PO_4^- e acqua, il 90% di SO_4^{2-} e il 100% di glucosio e amminoacidi.

Il trasportatore SLC26A6, di concerto con i trasportatori di Na^+ (lo scambiatore $\text{Na}^+/\text{SO}_4^{2-}$ SLC13A1, o NaSi-1, lo scambiatore Na^+/H^+ NHE, il cotrasporto $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBCe1), partecipa al riassorbimento di NaCl e alla secrezione di HCO_3^- . SLC13A1 aumenta la concentrazione intracellulare di SO_4^{2-} , favorendone il riassorbimento basolaterale attraverso SLC26A1.

CA: Anidraasi Carbonica

Tratta da A. Sindić et al., 2007



A livello renale, l'espressione di SLC26A6 è stata riportata anche nell'ansa di Henle e nelle cellule intercalate del dotto collettore, ma la sua funzione in questi contesti non è ancora stata compresa.

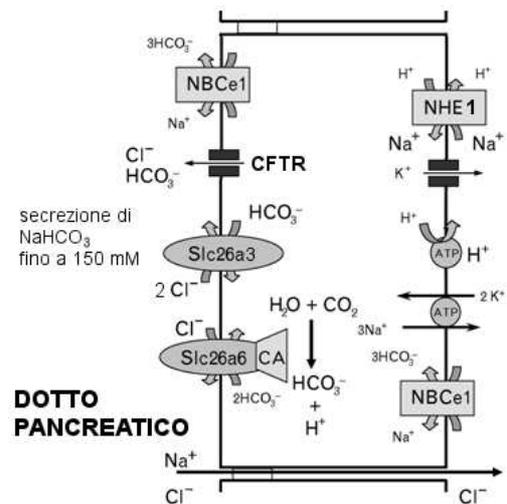
SLC26A6 è inoltre abbondantemente espresso nell'epitelio secernente del pancreas esocrino, dove regola la secrezione di HCO_3^- in modo cAMP-dipendente grazie all'intervento di CFTR.

Figura 1.7-13: Modello della secrezione di NaHCO_3 da parte dell'epitelio del dotto pancreatico.

L'epitelio del dotto pancreatico umano è in grado di secernere una soluzione di NaHCO_3 150 mM. Si ritiene che ciò sia reso possibile dall'attività combinata degli scambiatori $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ SLC26A3 e SLC26A6, del canale per Cl^- CFTR e del cotrasporto $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ NBCe1.

CA: Anidraasi Carbonica

Adattata da D. B. Mount & M. F. Romero 2004



Inoltre, è stato proposto che SLC26A6 partecipi alla secrezione di HCl nello stomaco, data la sua co-localizzazione con la H^+/K^+ -ATPasi nelle cellule parietali. SLC26A6 è stato individuato nel duodeno, dove potrebbe partecipare alla secrezione di HCO_3^- , e

nell'orletto a spazzola dell'ileo, dove potrebbe essere responsabile della secrezione intestinale dell'ossalato.

Non si conoscono patologie associate a mutazioni di *slc26a6*, ma, in modelli murini, il *knock-out* di questo gene è associato a nefrolitiasi da ossalato di calcio.

1.7.7 SLC26A7

SLC26A7 è un trasportatore di 656 amminoacidi ed è coinvolto nel trasporto di Cl^- (e forse di SO_4^{2-}), operando, probabilmente, come scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (H. Lohi et al., 2002). Il pH acido sembra aumentare la selettività del trasportatore per Cl^- .

È espresso nella membrana baso-laterale delle cellule parietali gastriche, nella membrana baso-laterale delle cellule del braccio ascendente dell'ansa di Henle e del dotto collettore, e nella membrana apicale (luminale) del tubulo prossimale del nefrone. È stato identificato anche nell'endotelio delle venule tonsillari, nell'epitelio nasale e nell'epitelio dell'epididimo.

Il ruolo fisiologico di questo trasportatore non è ancora chiaro, ma potrebbe operare come scambiatore anionico nel segmento distale del nefrone, con un ruolo nell'omeostasi degli elettroliti e dell'equilibrio acido-base (agendo forse come sensore del pH nelle cellule secernenti).

Non sono note patologie associate a mutazioni nella sequenza di questo trasportatore.

1.7.8 SLC26A8 (Tat-1, Testis Anion Transporter - 1)

SLC26A8 è un trasportatore di 970 amminoacidi, probabilmente coinvolto nel scambio di Cl^- (e forse I^-) con SO_4^{2-} (H. Lohi et al., 2002). Tra gli amminoacidi 600 e 652, e al C-terminale, questo trasportatore presenta ampie inserzioni che lo rendono 200-300 residui più lungo degli altri membri della famiglia.

La sua espressione è stata individuata negli spermatoцитi durante la fase meiotica, sulla membrana luminale delle cellule che sostengono gli stessi (le cellule del Sertoli) e nel cervello.

In modelli murini, il *knock-out* per il gene *slc26a8* ha prodotto esemplari maschi sterili, a causa della perdita di motilità spermatica, forse dovuta ad anomalie flagellari. Non sono stati tuttavia individuati casi di sterilità umana dovuti ad anomalie di questo trasportatore.

1.7.9 SLC26A9

SLC26A9 è un trasportatore di 791 amminoacidi, coinvolto nel trasporto di Cl^- , verosimilmente come scambiatore $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (H. Lohi et al., 2002). La sua attività è inibita da NH_4^+ .

È espresso nella membrana luminale delle cellule cigliate dell'epitelio bronchiale e nelle cellule dell'epitelio alveolare. È stato riscontrato anche nelle cellule dell'epitelio gastrico, ma anche nel cervello, nel cuore, nei reni, nell'intestino, nel timo e nelle ovaie. A livello del sistema respiratorio, questo trasportatore potrebbe essere coinvolto nel controllo della composizione idrosalina delle secrezioni, che hanno un ruolo fondamentale per la normale fisiologia respiratoria e come meccanismo di difesa.

Questo trasportatore è anche stato riportato in pancreas, prostata e ghiandole gastriche dove, è stato ipotizzato, potrebbe avere un ruolo gastroprotettivo secernendo HCO_3^- in prossimità alla membrana luminale.

Non sono note patologie associate a mutazioni nella sequenza di questo trasportatore.

1.7.10 SLC26A10

Non è ancora chiaro se *slc26a10* sia effettivamente tradotto in un trasportatore (di 563 amminoacidi) o se si tratti di uno pseudogene. Ci sono solamente alcune evidenze della sua trascrizione.

1.7.11 SLC26A11

SLC26A11 è un trasportatore di 606 amminoacidi che, si ritiene, sia coinvolto nel trasporto di SO_4^{2-} . La sua espressione è ubiquitaria; è particolarmente abbondante in reni, cervello, placenta, meno rilevante in pancreas, muscolo scheletrico, fegato, polmone e cuore. Il ruolo fisiologico del trasportatore è ignoto.

Non sono note patologie associate a mutazioni nella sequenza di questo trasportatore.

Tabella 1.7-1: Tabella riassuntiva di alcune proprietà dei trasportatori SLC26 noti: localizzazione cromosomica, substrati individuati, principali siti di espressione, correlazione a patologie umane.

Adattata da P.A. Dawson & D. Markovich, 2005.

Gene/ Trasportatore	Locus (Homo s.)	Substrati noti	Distribuzione tessutale	Patologie correlate
SLC26A1	4p16.3	SO_4^{2-} , Cl^- , ossalato	rene, pancreas, fegato, cervello	-
SLC26A2	5q31-34	SO_4^{2-} , Cl^-	ubiquitario	condrodisplasie
SLC26A3	7q31	SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^- , OH^- , ossalato	intestino (ileo, colon), pancreas, prostata, ghiandole sudoripare	diarrea congenita con perdita di cloruro
SLC26A4	7q31	Cl^- , HCO_3^- , I^- , formiato, fruttosio, mannosio	orecchio interno, tiroide, reni, cervello	sindrome di Pendred, sordità non sindromica
SLC26A5	7q22	fruttosio, mannosio	cellule cigliate esterne della coclea	sordità non sindromica
SLC26A6	3p21.3	SO_4^{2-} , Cl^- , HCO_3^- , OH^- , ossalato, formiato	reni, pancreas	-
SLC26A7	8q23	SO_4^{2-} , Cl^- , ossalato	reni	-
SLC26A8	6p21	SO_4^{2-} , Cl^- , ossalato	testicoli, cervello	-
SLC26A9	1q31-32	SO_4^{2-} , Cl^- , ossalato	polmoni	-
SLC26A10	12q13	-	cervello (trascritto)	-
SLC26A11	17q25	SO_4^{2-}	ubiquitario	-

1.8 SCOPO DELLA TESI

La caratterizzazione della struttura molecolare a livello atomico è un punto fondamentale per la comprensione del possibile meccanismo d'azione delle proteine e quindi della loro funzione fisiologica. Inoltre, la comprensione delle anomalie strutturali determinate da certe mutazioni può chiarire, a livello fine, le cause del funzionamento aberrante che sta alla base dei meccanismi fisiopatologici.

Come ricordato in precedenza, i domini C-terminali dei trasportatori SulP presentano, diversamente dai fattori ASA batterici, un *loop* variabile (tra le strutture secondarie α_1 e β_3) comprendente estese inserzioni (fino a 150 amminoacidi), ed un prolungamento nella regione C-terminale. La predizione della struttura secondaria nella regione N-terminale si è rivelata, d'altro canto, piuttosto difficoltosa a causa dell'incerta determinazione del punto preciso in cui dovrebbe iniziare il dominio STAS. Queste valutazioni suggeriscono che la struttura dei domini C-terminali dei SulP potrebbe deviare in modo significativo ed imprevedibile dalla conformazione degli ASA. Non è escluso che tali differenze abbiano una qualche rilevanza funzionale. L'importanza di questi domini per la funzione complessiva dei trasportatori che li contengono è testimoniata dalla patogenicità di alcune mutazioni, che sono alla base di malattie ereditarie.

Allo stato attuale, pertanto, i domini C-terminali delle proteine della famiglia SulP sono scarsamente caratterizzati, sia in termini di funzione che di struttura. non sono disponibili. Il principale scopo del progetto, all'interno del quale si colloca il lavoro esposto in questa tesi, è la determinazione della struttura tridimensionale dei domini STAS di questi trasportatori.

La dimensione abbastanza contenuta dei domini STAS risulta adeguata per lo studio mediante tecniche di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR) in soluzione. Il primo passo per la determinazione della struttura proteica mediante NMR è la produzione di quantità piuttosto rilevanti (fino a 5-10 mg) di proteina ricombinante, contenente specifici isotopi, attivi in NMR (^1H , ^{15}N e ^{13}C). Quindi, devono essere acquisiti degli esperimenti eteronucleari multidimensionali, al fine di assegnare le frequenze di risonanza di tutti i nuclei (particolarmente importanti sono i protoni) costituenti la proteina. Tali informazioni, oltre a consentire un'accurata determinazione della struttura secondaria, permettono di identificare in modo non ambiguo tutti (o la maggior parte) i diversi nuclei. Questo passaggio è il requisito fondamentale per la determinazione della struttura terziaria, mediante esperimenti sensibili alle distanze *inter*-protoniche. L'NMR consente inoltre di ottenere informazioni riguardanti la flessibilità e la dinamica molecolare.

Nei capitoli successivi saranno presentate le strategie seguite per la produzione delle proteine studiate e i risultati strutturali fin qui raggiunti.

2 ESPRESSIONE E PURIFICAZIONE DI DOMINI STAS

2.1 INTRODUZIONE

Al fine di utilizzare esperimenti di risonanza magnetica nucleare in doppia e tripla risonanza, è necessario che soltanto alcuni particolari isotopi, attivi in NMR e con numero quantico di spin uguale a 1/2, siano incorporati nella molecola studiata. Il problema fondamentale, a questo proposito, è la scarsa abbondanza relativa naturale degli isotopi di interesse di azoto e carbonio. Risulta pertanto necessario arricchire artificialmente con gli isotopi di interesse il terreno in cui vengono coltivati i microrganismi preposti alla biosintesi delle macromolecole da studiare, nel nostro caso proteine.

Isotopo	Abbondanza naturale	I	$\gamma \cdot 10^7$ rad/Ts	ν_0 (MHz), dato $B_0 = 14.0952$ T
^1H	99.98%	1/2	26.7519	600.13
^{13}C	1.11%	1/2	6.7283	150.94
^{15}N	0.37%	1/2	-2.7126	-60.85

Tabella 2.1-1: Isotopi attivi in Risonanza Magnetica Nucleare. I: numero quantico di spin nucleare, γ : rapporto giromagnetico, ν_0 : frequenza di Larmor

L'espressione di proteine ricombinanti con marcatura isotopica specifica richiede l'utilizzo di terreni a composizione controllata, possibilmente privi di contaminanti formati da isotopi naturali; tali terreni (come il Minimal Medium) sono per definizione poveri di nutrienti, in quanto contengono essenzialmente composti inorganici e un'unica fonte di carbonio. Ciò impone ai microrganismi un notevole sforzo biosintetico finalizzato alla produzione di tutte le molecole organiche necessarie ai processi cellulari. È evidente che queste condizioni non sono generalmente ottimali per la crescita delle cellule e per l'espressione proteica. In parte tali carenze possono essere compensate dal supplemento di cofattori e oligoelementi; inoltre, esistono degli integratori di aminoacidi a composizione isotopica controllata, ma si tratta di prodotti economicamente molto onerosi.

2.2 MATERIALI E STRUMENTAZIONI

- La maggior parte dei reagenti chimici (sali, vitamine, antibiotici...) utilizzati sono prodotti SIGMA, FLUKA o Carlo Erba.
- IPTG e DTT sono prodotti INALCO.
- Gli isotopi di ^{15}N e ^{13}C sono stati introdotti nelle colture nella forma di $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ ad arricchimento isotopico superiore al 98% acquistati dalla SPECTRALAB.
- La linea batterica utilizzata è *E. coli* BL21(DE3). Questa linea contiene il batteriofago lisogeno λ DE3 integrato nel proprio genoma; il genoma fagico contiene un costrutto *lac* costituito dal gene per la T7-RNA Polimerasi sotto il controllo del promotore *lacUV5*, in grado di rispondere all'IPTG. Il costrutto contiene inoltre il gene *lacI*, che reprime l'espressione della polimerasi in assenza di induttore. Infine, è presente una porzione del gene *lacZ*, codificante la β -galattosidasi. Il costrutto *lac* è inserito nel gene *int* in modo da inattivarlo, prevenendo così la sintesi di una delle proteine responsabili dell'excisione del fago (ciclo litico). La linea batterica manca della proteasi *lon* e della proteasi di membrana *OmpT*. La mancanza di queste proteasi riduce notevolmente la degradazione delle proteine eterologhe espresse.

- I vettori di clonaggio pET-20b(+) e pET-28a-c(+) sono della Novagen.
- La proteasi trombina è della GE-Healthcare.
- Il sistema *Champion™ pET SUMO Protein Expression System* (comprensivo di proteasi di SUMO) è quello commercializzato dalla Invitrogen Life Technologies.
- I plasmidi recanti i domini STAS sono stati gentilmente concessi dal laboratorio del Prof. R. Battistutta (Istituto Veneto di Medicina Molecolare, VIMM di Padova).
- I passaggi di purificazione cromatografica sono stati condotti su FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) ÄKTA-purifier della Amersham Pharmacia Biotech. Le colonne utilizzate per le cromatografie sono la HisTrap FF crude da 1 ml (cromatografia per affinità di proteine con *(His)₆-Tag*) e la HiLoad 16/60 o 26/60 Superdex75 (cromatografia per esclusione dimensionale).
- Per la concentrazione dei campioni o il cambio tampone sono stati utilizzati concentratori da centrifuga Vivaspin della Sartorius Stedim, da 6 o 20 ml, con membrana in Polietilensulfone con porosità per molecole da 10'000, 5'000 o 3'000 Da.
- Le elettroforesi SDS-PAGE sono state eseguite su apparecchiature della BIORAD o della Amersham Pharmacia Biotech.

2.2.1 TERRENI DI CULTURA

- LB-AGAR:	Tryptone: 10 g/l		
(terreno solido per la	Estratto di lievito: 5 g/l		
coltura di cellule	NaCl: 5 g/l		
trasformate)	Agar: 15 g/l		
- LB (<i>Luria Bertani broth</i>):	1% bactotriptone		
(Terreno liquido per la	0.5% Bacto yeast extract		
precoltura dei	0.5% NaCl		
microrganismi)	portato a pH 7.5 con NaOH		
- MINIMAL MEDIUM:	Na ₂ HPO ₄	47.749 mM	MM = 141.96 g/mol
(Terreno liquido per la	KH ₂ PO ₄	22.044 mM	MM = 136.09 g/mol
coltura e l'espressione	NaCl	8.555 mM	MM = 58.443 g/mol
proteica)	NH ₄ Cl	18.695 mM	MM = 53.49 g/mol
	C ₆ H ₁₂ O ₆	22.2 - 222 mM	MM = 180.16 g/mol
	MgSO ₄	2·10 ⁻³ mM	MM = 246.48 g/mol
	CaCl ₂	0.1·10 ⁻³ mM	MM = 110.986 g/mol
(Miscela di	H ₃ BO ₃	12.8·10 ⁻⁶ mM	MM = 61.83 g/mol
Microelementi	MnCl ₂ ·4H ₂ O	23.6·10 ⁻⁶ mM	MM = 197.91 g/mol
in HCl 0.1 M)	ZnSO ₄ ·H ₂ O	17.4·10 ⁻⁶ mM	MM = 179.47 g/mol
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	8.3·10 ⁻⁶ mM	MM = 241.95 g/mol
	CoCl ₂	7.7·10 ⁻⁶ mM	MM = 129.84 g/mol
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	26.3·10 ⁻⁶ mM	MM = 278.01 g/mol
	CuCl ₂ ·2H ₂ O	2.8·10 ⁻⁶ mM	MM = 170.48 g/mol
(Miscela di	D-pantotenato·1/2Ca ²⁺	0.42·10 ⁻³ mM	MM = 238.27 g/mol
vitamine)	Choline·Cl ⁻	0.72·10 ⁻³ mM	MM = 139.62 g/mol
	Acido Folico·2H ₂ O	0.21·10 ⁻³ mM	MM = 477.43 g/mol
	<i>mio</i> -Inositolo	1.1·10 ⁻³ mM	MM = 180.16 g/mol

Nicotinammide	$0.82 \cdot 10^{-3}$ mM	MM = 122.12 g/mol
Piridossina·HCl	$0.49 \cdot 10^{-3}$ mM	MM = 205.64 g/mol
Riboflavina	$26.6 \cdot 10^{-6}$ mM	MM = 376.36 g/mol
Tiamina·HCl	$0.29 \cdot 10^{-3}$ mM	MM = 337.27 g/mol

LB-Agar, LB e le prime tre componenti del Minimal Medium possono essere autoclavati a 120 °C per 20 minuti. Le componenti organiche devono essere sterilizzate per microfiltrazione attraverso membrana con pori da 22 µM in quanto l'elevata temperatura potrebbe infatti causarne la degradazione. È preferibile microfiltrare anche le soluzioni di sali dei metalli di transizione e alcalino-terrosi che, al fine di evitare la precipitazione di idrossidi o fosfati, vanno aggiunte quando il terreno è stato portato quasi al volume finale.

2.2.2 TAMPONI PER CROMATOGRAFIA

- TAMPONE PER LISI / CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ (A) – ELUIZIONE IN GRADIENTE DI IMIDAZOLO (B):

pH 8.0	Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄	50 mM	
	NaCl	300 mM	
	Imidazolo	0 (A) - 500 (B) mM	MM = 68.08 g/mol
	β-mercaptoetanololo	10 mM	(699.3 µl/l)

- TAMPONE PER PROTEOLISI:

pH 7.5	Tris·HCl	5 mM	MM = 157.60 g/mol
	NaCl	150 mM	
	DTT	5 mM	MM = 154.2 g/mol

- TAMPONE PER CROMATOGRAFIA PER ESCLUSIONE DIMENSIONALE:

	K ₂ HPO ₄	27 mM	MM = 174.18 g/mol
	KH ₂ PO ₄	5 mM	MM = 136.09 g/mol
	NaCl	50 - 100 mM	
	EDTA	1 mM	MM = 372.24 g/mol
	DTT	5 - 10 mM	

2.2.3 GEL E TAMPONI PER ELETTROFORESI SDS-PAGE

- RUNNING GEL (pH 8.8): 14% o 16% di acrilammide/bisacrilammide (16 ml, 2 gel):

Acrilammide/Bisacrilammide 40%: 5.6 – 6.4 ml
 TrisHCl 1.5M pH 8.8: 4 ml
 SDS al 10%: 160 µl
 TEMED: 8 µl
 APS al 10%: 80 µl
 Acqua: 6.152 – 5.352 ml

- STACKING GEL (pH 6.8): 4% di acrilammide/bisacrilammide (6 ml, 2 gel):

Acrilammide/Bisacrilammide 40%: 0.585 ml
 TrisHCl 0.5M pH 6.8: 1.5 ml
 SDS al 10%: 60 µl
 TEMED: 6 µl
 APS al 10%: 50 µl
 Acqua: 3.799 ml

- **RUNNING BUFFER:** Tris-base 3.02 g/l
Glicina 14.4 g/l
SDS 1 g/l
Acqua (quanto basta)
- **LOADING BUFFER (2×):** Tris- HCl 125 mM pH 6.8
4% SDS
20% Glicerolo
10% β-Mercaptoetanol (da aggiungere al momento)
Tracce di Blu di Bromofenolo
Acqua (quanto basta)
- **SOLUZIONE DI COLORAZIONE CON BLU COOMASSIE:**
(sensibilità 0.2-0.5 µg) 0.25% Coomassie Brilliant BlueR-250
30% etanolo
7% acido acetico
Acqua (quanto basta)
- **SOLUZIONE DI DECOLORAZIONE:**
30% etanolo
7% acido acetico
2% glicerolo
Acqua (quanto basta)

2.3 PROTOCOLLO DI ESPRESSIONE

2.3.1 TRASFORMAZIONE BATTERICA

Ad un'aliquota di cellule batteriche (100 µl, $A_{600nm} \in (0.3 - 0.5)$) precedentemente rese competenti tramite due cicli di trattamento con $CaCl_2$ 50 mM, a 0 °C per 20 minuti, si aggiungono 10 µl di una soluzione 0.5 ng/µl di plasmide. Mantenendo le cellule in ghiaccio, si lascia interagire per altri 15 minuti. Le cellule vanno quindi trasferite in bagno termico a 42 °C per 90 secondi e, successivamente, di nuovo in ghiaccio per 2-5 minuti. Si aggiunge un volume di LB alla coltura in rapporto 9:1 e si lascia incubare a 37 °C per 45 minuti. Trascorso tale tempo, la soluzione viene centrifugata a 3'000 rpm per 2 minuti (in centrifuga da banco) e si elimina il 90% del surnatante. Il restante volume viene piastrato su agar, in presenza dell'antibiotico necessario. Le cellule sono lasciate crescere a 37 °C *overnight*.

2.3.2 COLTURE CELLULARI

Prima di allestire in mezzo minimo la coltura per la produzione in larga scala di una proteina isotopicamente arricchita, è opportuno effettuare alcuni passaggi di precultura. Un protocollo da noi sviluppato e risultato particolarmente soddisfacente nel miglioramento della crescita batterica viene descritto qui di seguito.

A. SEQUENZA PER L'ARRICCHIMENTO ISOTOPICO CON ^{15}N

Precultura in scala ridotta in LB: una singola colonia trasformata è trasferita dalla piastra a un terreno liquido ricco (10 ml di LB) contenente l'antibiotico e lasciata incubare a 37 °C per alcune ore, sotto agitazione orbitale (180-190 rpm). Questo

passaggio consente un rapido sviluppo della popolazione batterica, che non risente di carenze metaboliche. Il trasferimento diretto in mezzo minimo risulta spesso del tutto inefficace.

Precoltura in mezzo minimo contenente NH_4Cl 18.695 mM e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 222 mM (opzionale): un'aliquota della precedente coltura è trasferita in mezzo minimo non marcato (rapporto 1:100) contenente l'antibiotico. Questo passaggio consente di rimuovere in modo consistente i residui di terreno ricco che comprometterebbero il grado di marcatura isotopica della coltura successiva. Inoltre, dà modo ai batteri di adattarsi alle nuove condizioni di coltura, più limitanti delle precedenti. Questa precoltura è incubata per alcune ore a 37 °C.

Precoltura in mezzo minimo contenente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 18.695 mM e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 222 mM: un'aliquota della precedente coltura è trasferita in mezzo minimo (con l'antibiotico) contenente come unica fonte di azoto il $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (rapporto 1:100). Questo passaggio consente di abbattere drasticamente il contenuto di ^{14}N (l'isotopo preponderante in natura) presente nella coltura. Ciò consente di innalzare al massimo il grado di arricchimento isotopico nella proteina prodotta. Questa precoltura (100 ml) è lasciata crescere sotto agitazione a 37 °C *overnight*. Dopo 12-14 ore si ottiene un'assorbanza compresa in genere tra 2 e 3.

Coltura in larga scala in mezzo minimo contenente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 18.695 mM e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 21.494 mM: la precedente precoltura viene riversata in un volume di terreno liquido fresco, in modo da avere un rapporto compreso tra 1:10 e 1:20 con il volume finale (a seconda dell'assorbanza a cui si desidera indurre). Il pre-riscaldamento del terreno a 37 °C favorisce sensibilmente la crescita batterica nella fase successiva al trasferimento dei batteri e riduce l'impatto che lo shock termico avrebbe sulla moltiplicazione cellulare durante le prime ore.

B. SEQUENZA PER L'ARRICCHIMENTO ISOTOPICO CON ^{15}N E ^{13}C

Precoltura in scala ridotta in LB.

Precoltura in mezzo minimo contenente NH_4Cl 18.695 mM e $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 22.2 mM (opzionale): prima di allestire la precoltura doppiamente marcata (con 1/10 della concentrazione di glucosio), si può valutare l'opportunità di effettuare un passaggio intermedio per preparare le cellule alla riduzione della fonte di carbonio. Essenzialmente, questo passaggio consente di verificare che le cellule siano in grado di svilupparsi, prima di sacrificare del terreno doppiamente marcato; inoltre, consente di rimuovere l'eccesso di glucosio a composizione isotopica naturale, un contaminante per i successivi passaggi di coltura. Questa precoltura è incubata per alcune ore a 37 °C.

Precoltura in mezzo minimo contenente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 18.695 mM e $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 22.2 mM: un'aliquota della precedente coltura è trasferita in mezzo minimo fresco (rapporto 1:100), contenente come unica fonte di azoto il $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ e come unica fonte di carbonio il $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Questo passaggio consente di abbattere drasticamente il contenuto di ^{14}N e ^{12}C presenti nella coltura. Questa precoltura (100ml) è lasciata crescere sotto agitazione a 37°C *overnight*.

Coltura in larga scala in mezzo minimo contenente $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 18.695 mM e $^{13}\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 22.2 mM.

2.3.3 INDUZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RICOMBINANTE

Quando la coltura batterica ha raggiunto la concentrazione di cellule desiderata, viene indotta l'espressione della proteina ricombinante aggiungendo al terreno l'isopropil-1-tio- β -D-galattopiranoside (IPTG) in modo da ottenerne una concentrazione finale di 0.5-1 mM. Il legame dell'induttore IPTG al repressore I ne determina la dissociazione dall'operatore O dell'operone *lac*; questo consente l'inizio della trascrizione del gene a valle (la proteina ricombinante). L'espressione è lasciata proseguire per le successive 4 ore.

2.4 PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE

2.4.1 PREPARAZIONE DI ESTRATTI PRIVI DI CELLULE

Prima di solubilizzare la proteina, i batteri sono stati separati dal terreno di coltura per centrifugazione ad un'accelerazione di 4500 g ($g = 9.81 \text{ m/s}^2$). Quindi sono stati risospesi in 30-40 ml di tampone per affinità per ogni litro di coltura.

Inibizione delle proteasi: prima di lisare le cellule è stata aggiunta una miscela di inibitori di proteasi per evitare la degradazione della proteina espressa. Le miscele commerciali contengono, in genere, inibitori per proteasi seriniche (come aprotinina, 4-(2-amminoetil)benzensolfonil fluoruro, leupeptina...), cisteiniche (E-64, leupeptina...), aspartiche (pepstatina) e metalloproteasi (fosforamidone, bestatina). È sconsigliato l'utilizzo di acido etilendiamminotetracetico (EDTA) perché non è compatibile con le successive fasi di purificazione tramite cromatografia di affinità IMAC.

Lisi cellulare: I batteri sono stati lisati tramite 2-4 cicli di French Press regolata ad una pressione di 1'000 Psi ($\sim 6.88 \cdot 10^6 \text{ Pa}$). La French Press è un omogenizzatore ad alta pressione costituito da una pressa idraulica che comprime un pistone dentro ad un cilindro contenente la sospensione cellulare. Il campione ad alta pressione viene quindi fatto fluire attraverso una valvola a spillo determinando una rapida decompressione. A causa della viscoelasticità di membrane e pareti cellulari, la pressione intracellulare diminuisce meno velocemente della pressione esterna; tale differenza pressoria determina l'esplosione delle cellule e il rilascio del contenuto citoplasmatico. Questo trattamento risulta più uniforme e meno aggressivo di altre tecniche di lisi meccanica e preserva l'integrità biochimica del campione. Inoltre, il surriscaldamento del campione può essere assai limitato dall'utilizzo di un cilindro pre-refrigerato.

Chiarificazione del lisato: Il lisato è stato quindi centrifugato a 20'000 g per 20 minuti alla temperatura di 4 °C ed il surnatante è stato recuperato.

2.4.2 CROMATOGRAFIA PER AFFINITÀ

Il surnatante è stato quindi diluito 1 : 2 e caricato, tramite pompa peristaltica, su colonna da cromatografia per affinità IMAC (*Immobilized Metal Affinity Chromatography*) HisTrap FF crude da 1 ml della GE-Healthcare.

La matrice di questa colonna è costituita da sfere di diametro medio di 90 μm costituite da agarosio (Sephariosio 6%) ad elevato *cross-link*, derivatizzate con un gruppo chelante Ni^{2+} . L'elevata densità di gruppi chelanti, corrispondenti ad un contenuto metallico di circa 15 μmol per ml di matrice, determina un'elevata capacità

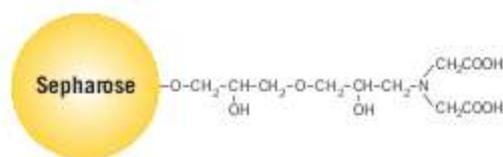
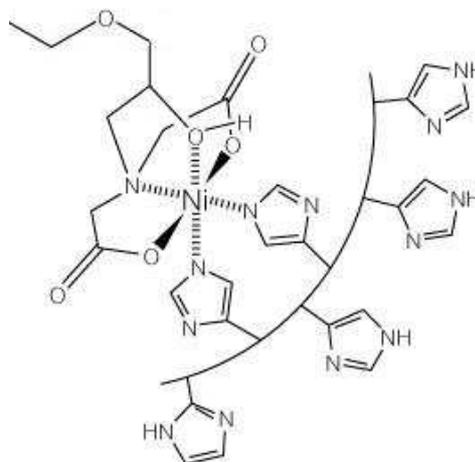


Figura 2.4-1: Rappresentazione del gruppo chelante il catione Ni^{2+} (potenzialmente tetradentato) immobilizzato su matrice di Sepharosio. In assenza di istidine o imidazolo, la coordinazione del metallo è completata da molecole di acqua.



di legame dinamico di proteina con $(\text{His})_6\text{-Tag}$, circa 40 mg per ml di resina. Per evitare il legame aspecifico di proteine contaminanti, si è utilizzato imidazolo 10 mM come legante competitivo. Essendo state utilizzate diverse strategie di clonaggio dell' $(\text{His})_6\text{-Tag}$ nelle diverse proteine, si rimanda alle relative sezioni per una trattazione completa del protocollo di purificazione mediante cromatografia per affinità.

2.4.3 TAGLIO PROTEOLITICO

Per ottenere la proteina nativa è in genere desiderabile eliminare la sequenza addizionale contenente la coda di Istidine. Il taglio proteolitico è eseguito per via enzimatica con l'opportuna proteasi. Per i dettagli sul taglio proteolitico, si vedano le sezioni relative alle diverse strategie di clonaggio.

2.4.4 CROMATOGRAFIA PER ESCLUSIONE DIMENSIONALE

La fase conclusiva della strategia di purificazione da noi seguita è la cromatografia per esclusione dimensionale (previa concentrazione del campione da caricare in colonna). Oltre che come passaggio purificativo in senso stretto (che permette di eliminare eventuali contaminanti di diversa massa molecolare), questa cromatografia può anche essere intesa come metodo *soft* per il cambio del tampone, in condizioni di pH e forza ionica controllate, che non sottoponga la proteina a variazioni brusche. Infine, la cromatografia per esclusione dimensionale consente di stimare la massa molecolare della proteina in condizioni native, verificando, ad esempio, lo stato di aggregazione.

Definiamo:

- Volume di eluizione (V_e) il volume di fase mobile che attraversa la colonna dall'istante di caricamento del campione fino al massimo del picco cromatografico.
- Volume di esclusione (V_0) il volume compreso tra i granuli (accessibile alle sostanze escluse dal poro).
- Volume totale (V_T) il volume che include V_0 e il volume interstiziale (V_i) dei pori (accessibile solo alle molecole che diffondono nei pori).

Con opportuna calibrazione del sistema, è possibile stabilire un intervallo di linearità in cui sia valida la seguente relazione tra il coefficiente di partizione K_{AV} (il rapporto tra il volume dei pori accessibile alla molecola e il volume totale dei pori) e la massa molecolare (MM) della molecola che si distribuisce tra fase stazionaria e fase mobile:

$$K_{AV} = [(V_e - V_0)/(V_T - V_0)] \propto \log(\text{MM}) .$$

La colonna utilizzata è la HiLoad 16/60 Superdex75 della GE-Healthcare (o la 26/60 dello stesso produttore), la cui matrice è formata da sfere di diametro medio di 34 μm costituite da Sepharosio ad elevato *cross-link*, derivatizzato con catene di destrano.

2.4.5 PURIFICAZIONE DI DOMINI STAS CON CODE DI ISTIDINA

A. SISTEMA pET-20b(+)

In primo luogo è stata esplorata la possibilità di produrre domini STAS provvisti di *(His)₆-Tag* C-terminale non rimuovibile. Questa strategia presenta il vantaggio di non

richiedere passaggi purificativi aggiuntivi legati alla rimozione proteolitica dell'*(His)₆-Tag*.

La purificazione della proteina ricombinante risulta semplificata (quella esposta in precedenza), consentendo di minimizzare le perdite di materiale. Sfortunatamente, la coda di istidine non viene sempre accettata dalla struttura nativa della proteina, e il *folding* non corretto può determinarne la precipitazione nelle cellule.

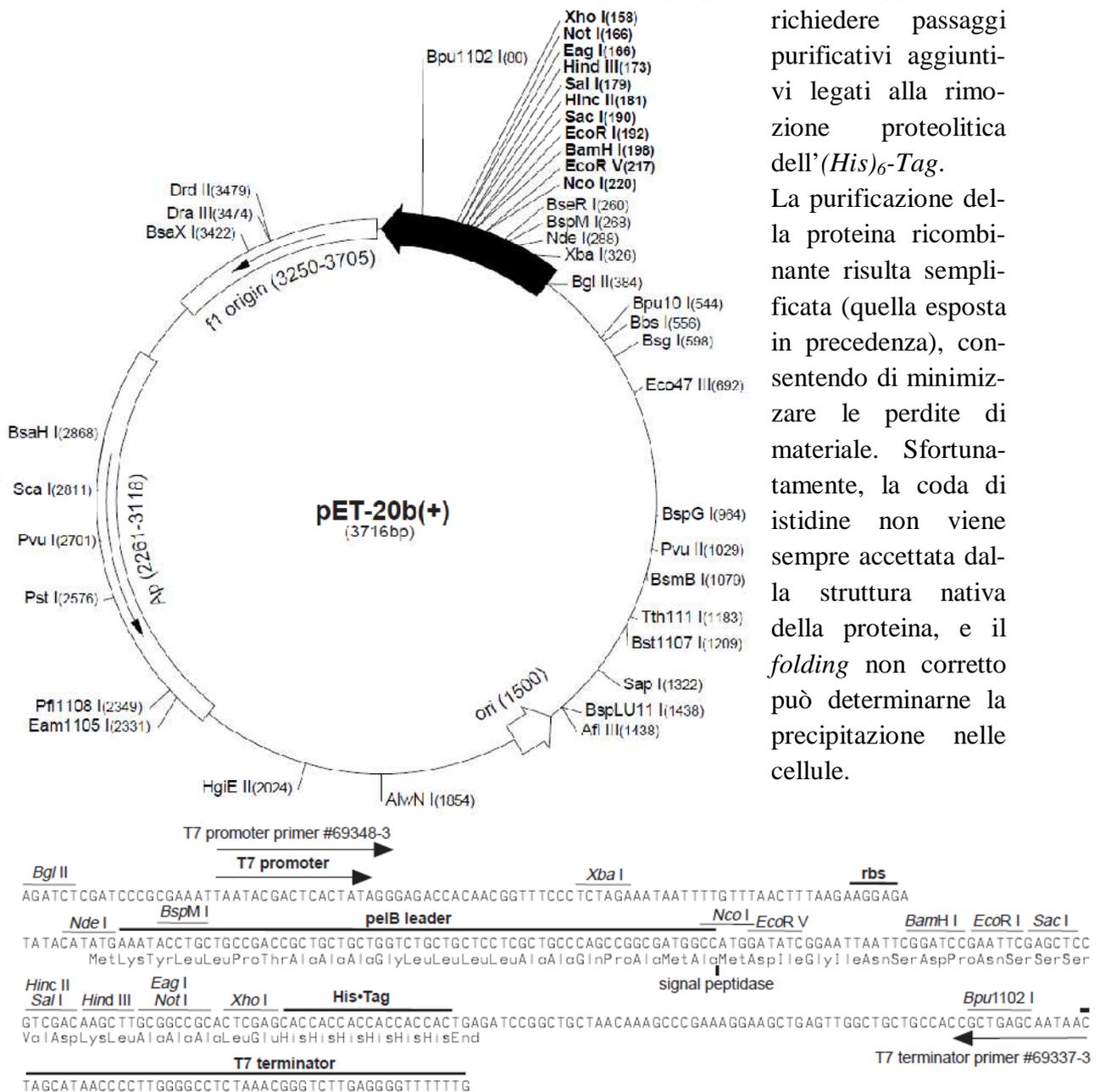


Figura 2.4-2: Schema del plasmide pET-20b(+)

(3716 nucleotidi)

Il vettore di espressione sfrutta elementi di regolazione della trascrizione del batteriofago T7.

- T7 (basi 353-369) – lacO: promotore che controlla l'espressione ad alta efficienza, dipendente dall'induzione tramite isopropil-1-tio- β -D-galattopiranoside (IPTG)
- RBS (*Ribosome binding site*, basi 419-425): sequenza polipurinica (Shine-Dalgarno) per l'appaiamento dell'mRNA all'rRNA 16S del ribosoma
- ATG (basi 297-299): sito iniziale della traduzione (formil-metionina)

- pelB (224-289): sequenza segnale per l'indirizzamento della nel periplasma, dove viene rimosso da una pelB peptidasi
- MCS (158-225): sito di clonaggio multiplo
- $(His)_6$ -Tag (140-157): coda di istidine C-terminale
- Terminatore T7 (basi 26-72): sequenza nucleotidica comprendente regioni parzialmente palindrome che, formando uno *stem-loop* di RNA duplex, rallentano e interrompono la trascrizione
- ori (basi 1500): origine pBR322 di replicazione a basso numero di copie (per il mantenimento del plasmide in *E. coli*)
- Ap (basi 2261-3118): gene per la resistenza all'Ampicillina, codifica per l'enzima β -lattamasi
- fl origin (basi 3250-3705): origine di replicazione per la produzione di copie del plasmide a singolo filamento, in presenza del plasmide F e del fago helper M13.

Dopo aver effettuato lavaggi con tampone contenente 10 e quindi 20 mM di imidazolo per rimuovere il materiale aspecificamente legato alla colonna, l'eluizione della proteina dalla colonna è effettuata con tampone contenente imidazolo tra 150 e 500 mM.

Prova di espressione del dominio STAS di Rv1739c di *Mycobacterium tuberculosis* con $(His)_6$ -tag C-terminale

La sequenza amminoacidica del dominio (amminoacidi da 438 a 560), provvisto di $(His)_6$ -Tag C-terminale, è la seguente:

MDIDDYPQAK RVPGLVVYRY DAPLCFANAE DFRRRALTVV DQDPGQVEWF
 VLNAESNVEV DLTALDALDQ LRTELLRRGI VFAMARVKQD LRESLRAASL
 LDKIGEDHIF MTLPTAVQAF RRLEHHHHH H

N° amminoacidi: 131

MM = 15'173.2 Da

pI teorico: 5.94

L'espressione è stata condotta in terreno MM, in presenza di 100 μ g/ml di Ampicillina.

Precoltura in LB:

Assorbanza $A_{600\text{ nm}} = 7.0$

Coltura in MM:

$V_{\text{precoltura}} : V_{\text{coltura}} = 1 : 48$

Curva di crescita (STAS Rv1739c in pET 20)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.15
55	0.158
85	0.182
115	0.239
180	0.403
210	0.532
237	0.643
249 (Induzione IPTG 0.5 mM)	0.701
429	1.676
489	1.906
549	2.129
609	2.15

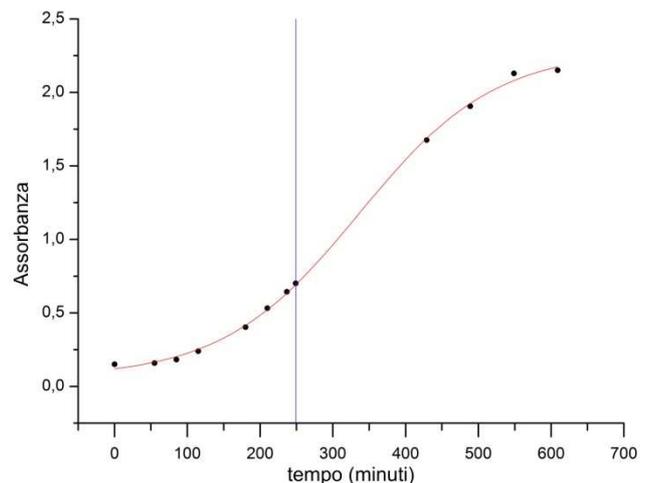


Tabella 2.4-1 – Figura 2.4-3: Curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS Rv1739c – $(His)_6$ -Tag. La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è: $A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t-t_{1/2})/\tau}} + A_2$

$A_1 = 0.05981 \pm 0.02549$ (valore iniziale asintotico)

$A_2 = 2.2877 \pm 0.04057$ (valore finale asintotico)

$t_{1/2} = 335.72328 \pm 5.77967$ (valore di ascissa centrale)

$\tau = 93.55742 \pm 4.74214$ (costante di tempo)

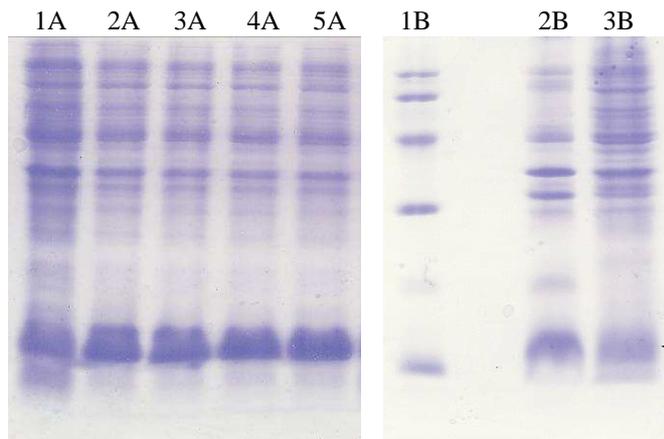


Figura 2.4-4: SDS-PAGE (14%)

- 1A: Coltura non indotta
- 2A: Coltura a 3 ore dall'induzione
- 3A: Coltura a 4 ore dall'induzione
- 4A: Coltura a 5 ore dall'induzione
- 5A: Coltura a 6 ore dall'induzione

Di ciascun campione sono stati caricati volumi di coltura normalizzati sulla base dell'assorbanza (tali cioè da contenere la stessa quantità di batteri)

$$V_x = 200 \mu\text{l} \cdot 0.701/A_x$$

- 1B: Standard di pesi molecolari, 5 μ l
- 2B: *Pellet* lisato, 5 μ l di 12ml
- 3B: Surnatante, 10 μ l di 12 ml

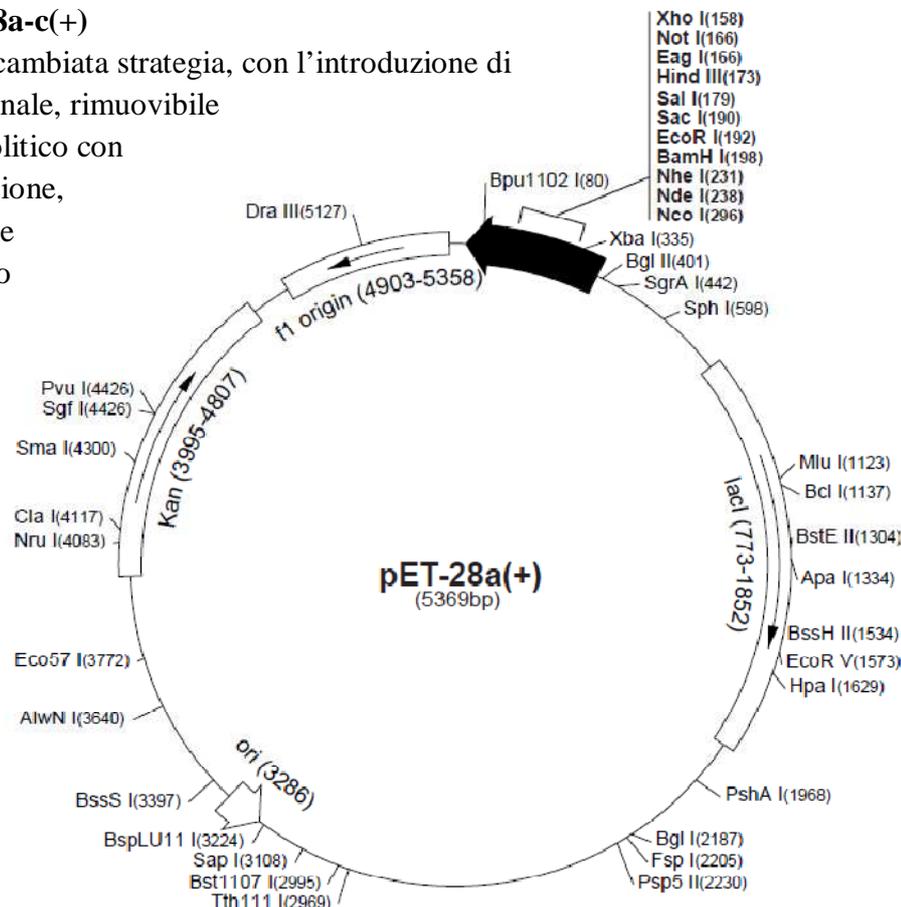
Standard molecolari (dall'alto):

- Fosforilasi b (muscolo di coniglio) 97kDa, 0.335 μ g/ μ l
- Albumina (siero bovino) 66kDa, 0.415 μ g/ μ l
- Ovalbumina (albume d'uovo di gallina) 45kDa, 0.735 μ g/ μ l
- Anidrasi carbonica (eritrocita bovino) 30kDa, 0.415 μ g/ μ l
- Inibitore della tripsina (seme di soia) 20.1kDa, 0.4 μ g/ μ l
- α -Lattoglobulina (latte bovino) 14.4kDa, 0.58 μ g/ μ l

La SDS-PAGE dimostra, oltre alla presenza di un livello basale di espressione, una produzione di proteina costante tra le 3 e 6 ore dopo l'induzione (banda indicata dalla freccia). Tuttavia, risulta anche evidente che una parte molto consistente di proteina è insolubile e rimane confinata nel *pellet*. La strategia di clonaggio con *(His)₆-Tag C*-terminale non sembra pertanto ben tollerata dal dominio STAS.

B. SISTEMA pET-28a-c(+)

È stata quindi cambiata strategia, con l'introduzione di un *(His)₆-Tag N*-terminale, rimuovibile mediante taglio proteolitico con trombina. La purificazione, in questo caso, richiede il passaggio aggiuntivo del taglio proteolitico.



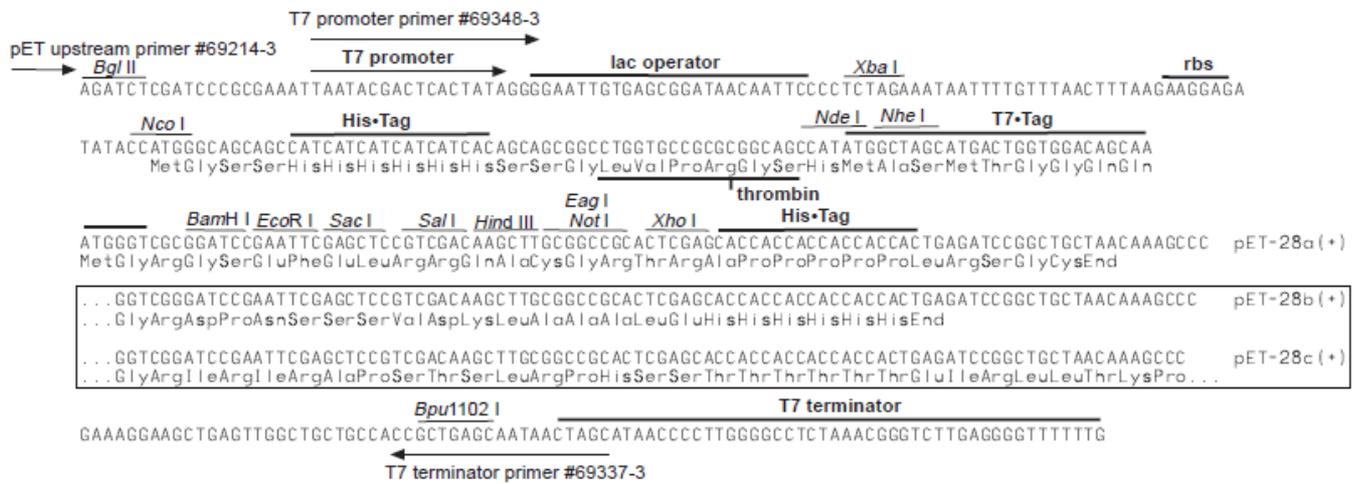


Figura 2.4-5: Schema del plasmide pET-28a-c(+)
(5369 nucleotidi)

- T7 (basi 370-386) – lacO
- RBS (*Ribosome binding site*, basi 419-425)
- ATG (basi 297-299)
- (*His*)₆-*Tag* (270-287): coda di istidine N-terminale
- T7-*Tag* (207-239): *Tag* per purificazione con colonna di affinità derivatizzata con anticorpi per la proteina 10 di T7
- MCS (158-203)
- (*His*)₆-*Tag* (140-157): coda di istidine C-terminale opzionale
- Terminatore T7 (basi 26-72)
- ori (basi 3286)
- Kan (basi 3995-4807, C): gene per la resistenza alla Kanamicina, codifica per l'enzima amminglicoside chinasi
- fl origin (basi 4903-5358)
- lacI (773-1852, C): gene codificante il repressore *lac*, che lega l'operatore lacO per ridurre la trascrizione basale della proteina ricombinante
- (C): filamento complementare

2.4.6 B TAGLIO PROTEOLITICO

Dopo aver caricato il campione sulla colonna per affinità si effettuano lavaggi con tampone contenente tra 0 e 10 mM di imidazolo (8-10 volumi di colonna) e in seguito con tampone contenente tra 10 e 20 mM di imidazolo (10-12 volumi di colonna). In questo modo si dovrebbe favorire il distacco di eventuali contaminanti specifici a bassa affinità per la resina.

Si procede quindi con l'incubazione con trombina, una serin-proteasi che idrolizza selettivamente il legame peptidico tra arginina e glicina; 1 ml di tampone contenente la proteasi (circa 5 unità per milligrammo stimato di proteina da tagliare) viene caricato direttamente sulla colonna per affinità, mediante siringa. È opportuno recuperare il volume in uscita e verificare che non contenga proteina. La colonna è quindi posta sotto agitazione (per ribaltamento) a 4 °C *overnight*.

2.4.7 B ELUIZIONE

Si procede quindi con il lavaggio con tampone con 10 mM di imidazolo (4-6 ml), durante il quale dovrebbe eluire la proteina tagliata.

Successivamente, si lava la colonna con tampone contenente imidazolo 500 mM, per rimuovere le (*His*)₆-*Tag* e l'eventuale proteina non tagliata.

Espressione e purificazione del dominio STAS di Rv1739c di *Mycobacterium tuberculosis* con $(His)_6$ -tag rimuovibile

La sequenza amminoacidica (da 438 a 560) del dominio è presentata qui di seguito; la sequenza dell' $(His)_6$ -Tag rimossa per via proteolitica è evidenziata in rosso:

MGSSHHHHHHH **SSGLVPR**GSH MDIDDYPQAK RVPGLVVYRY DAPLCFANAE
 DFRRRALTVV DQDPGQVEWF VLNAESNVEV DLTALDALDQ LRTELLRRGI
 VFAMARVKQD LRESLRAASL LDKIGEDHIF MTLPTAVQAF **RRR**

N° amminoacidi: 126 + 17

MM = 14'389.4 Da (senza Tag)

^{15}N -MM = 14'570.7 Da (senza Tag)

pI teorico: 5.36 (senza Tag)

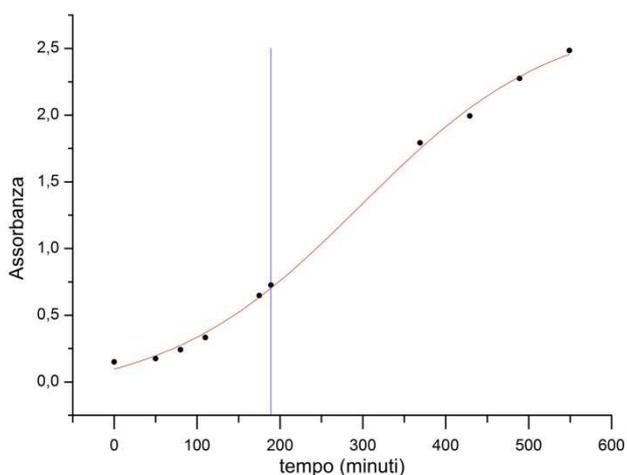
Prima di allestire una coltura in larga scala, anche in questo caso si è scelto di verificare la crescita delle cellule, il livello di espressione e la solubilità della proteina. L'espressione è stata condotta in terreno MM, in presenza di 50 µg/ml di Kanamicina.

Precoltura in LB:

Assorbanza $A_{600\text{ nm}} = 5.3$

Coltura in MM:

$V_{\text{precoltura}} : V_{\text{coltura}} = 1 : 35$



Curva di crescita (STAS Rv1739c in pET 28)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.15
50	0.175
80	0.242
110	0.333
175	0.648
189 (Induzione IPTG 0.5 mM)	0.727
369	1.792
429	1.994
489	2.275
549	2.485

Tabella 2.4-2 – Figura 2.4-6: curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS Rv1739c – $(His)_6$ -Tag. La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è: $A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t - t_{1/2})/\tau}} + A_2$

$A_1 = -0.11332 \pm 0.09633$ (valore iniziale asintotico)

$A_2 = 2.75351 \pm 0.12849$ (valore finale asintotico)

$t_{1/2} = 296.86745 \pm 12.59301$ (valore di ascissa centrale)

$\tau = 117.0179 \pm 13.18842$ (costante di tempo)

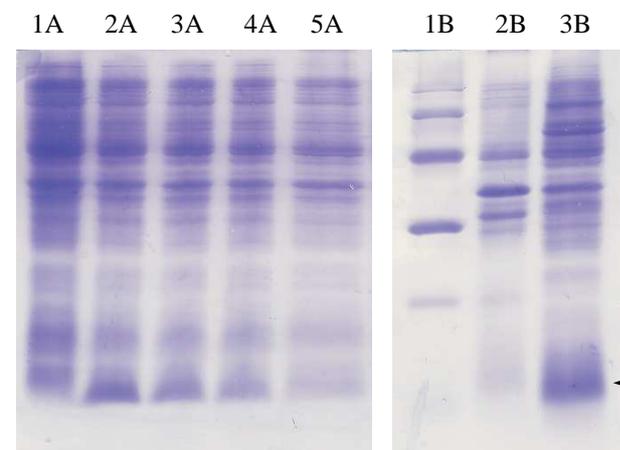


Figura 2.4-7: SDS-PAGE (14%)

1A: Coltura non indotta

2A: Coltura a 3 ore dall'induzione

3A: Coltura a 4 ore dall'induzione

4A: Coltura a 5 ore dall'induzione

5A: Coltura a 6 ore dall'induzione

Di ciascun campione sono stati caricati volumi di coltura normalizzati sulla base dell'assorbanza (tali cioè da contenere la stessa quantità di batteri)

$V_x = 186 \mu\text{l} \cdot 0.727/A_x$

1B: Standard di pesi molecolari, 5 µl

2B: Pellet lisato, 5 µl di 12 ml

3B: Surnatante, 10 µl di 12 ml

In questo caso, il livello basale di espressione sembra più limitato, ma la produzione di proteina non è più costante tra le 3 e 6 ore dopo l'induzione. Risulta evidente che il livello massimo di espressione per batterio sia raggiunto dopo 3 ore. Considerato il numero totale di batteri, è probabile che la produzione complessiva di proteina sia massima tra le tre e le quattro ore.

Inoltre, la presenza di proteina nel *pellet* è decisamente limitata, in favore della forma solubile. La strategia di clonaggio con *(His)₆-Tag* N-terminale sembra essere pertanto ben tollerata dal dominio STAS. Dal confronto con le bande delle proteine endogene, è tuttavia chiaro che la quantità di proteina prodotta è piuttosto modesta. Si è comunque deciso di procedere con una coltura in più larga scala.

Precoltura in LB e MM.

Precoltura in ¹⁵N-MM:

Assorbanza $A_{600\text{ nm}} = 3.4$

Coltura in ¹⁵N-MM (2 litri):

$V_{\text{precoltura}} : V_{\text{coltura}} = 1 : 35$

Curva di crescita (STAS Rv1739c in pET 28)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.097
120	0.120
240	0.214
300	0.307
360	0.460
420 (Induzione IPTG 0.5 mM)	0.665
540	1.142
660	1.353

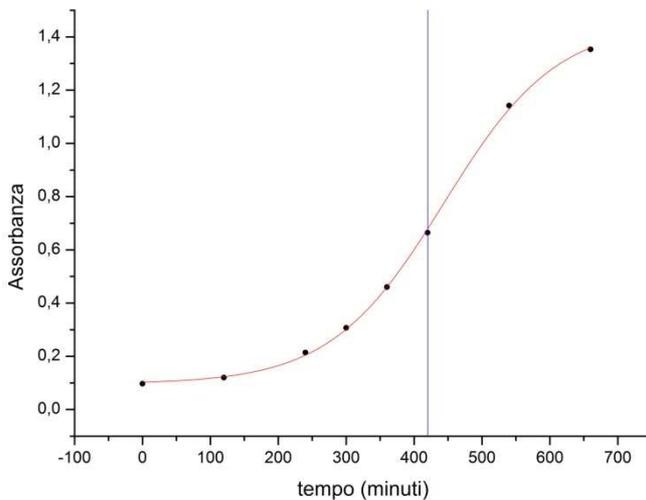


Tabella 2.4-3 - Figura 2.4-8: curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS Rv1739c - *(His)₆-Tag*. La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è: $A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t - t_{1/2})/\tau}} + A_2$

$A_1 = 0.09624 \pm 0.00982$ (valore iniziale asintotico)

$A_2 = 1.45245 \pm 0.02318$ (valore finale asintotico)

$t_{1/2} = 443.52558 \pm 4.2999$ (valore di ascissa centrale)

$\tau = 83.13161 \pm 3.49654$ (costante di tempo)

Risospensione del pellet in 30 ml di tampone per affinità.

Lisi mediante 2 cicli di French Press.

Chiarificazione del lisato per centrifugazione.

Diluizione del surnatante (da 30 a 60 ml), con aggiunta di imidazolo (10 mM).

Cromatografia in colonna per affinità HisTrap FF crude.

Incubazione con trombina a 4 °C *overnight*.

Eluizione con tampone contenente 10 mM imidazolo.

Eluizione con tampone contenente 500 mM imidazolo.

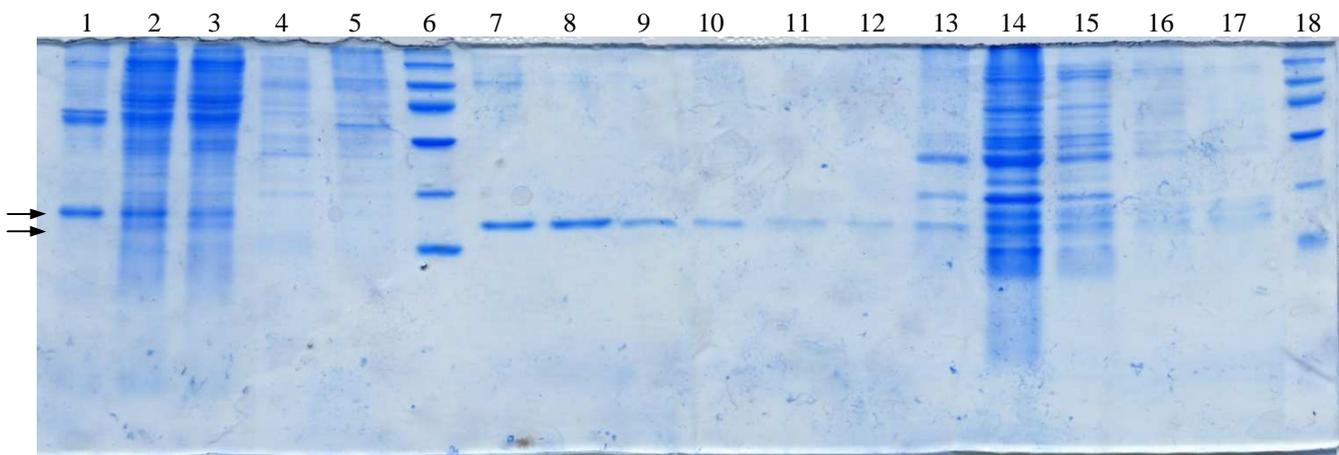


Figura 2.4-9: SDS-PAGE (16%). 1: *Pellet* lisato, 3.5 μ l (di 30 ml)
 2: Surnatante, 3.5 μ l (di 30 ml)
 3: *Flowthrough* dalla colonna di affinità, 7 μ l (di 60 ml)
 4: Lavaggio con imidazolo 20 mM, 7 μ l (di 12 ml)
 5: *Flowthrough* dopo aggiunta della soluzione di trombina, 10 μ l (di 1 ml)
 6: Standard di pesi molecolari, 3.5 μ l
 7, 8, 9, 10, 11, 12: Frazioni 1, 2, 3, 4, 5, 6 dell'eluato (10 mM imidazolo) dopo il taglio dell'(*His*)₆-*Tag*, 10 μ l (di 1 ml)
 13, 14, 15, 16, 17: Frazioni 7, 8, 9, 10, 11 dell'eluato (500 mM imidazolo), 10 μ l (di 1 ml)
 18: Standard di pesi molecolari, 3.5 μ l
 La freccia in alto indica la proteina prima del taglio, quella in basso dopo il taglio.

Dall' SDS-PAGE si possono fare le seguenti osservazioni: nel *pellet* è presente una quantità rilevante di proteina, forse a causa di incompleta lisi cellulare o, più probabilmente, a causa di precipitazione in corpi di inclusione. Anche il *flowthrough* ne contiene, ma la quantità totale di proteina non sembra tale da provocare sovraccarico della colonna (si ricordi che può trattenere fino a 40 mg di proteina). È inoltre presente della proteina tagliata e non tagliata nel lavaggio con 500 mM imidazolo, fatto che suggerisce una non ottimale esposizione del sito di taglio, forse dovuto a parziale precipitazione in colonna.

Cromatografia per esclusione dimensionale: il campione (frazioni 1-6), concentrato a circa 2 ml è stato caricato in colonna 26/60 Superdex75.

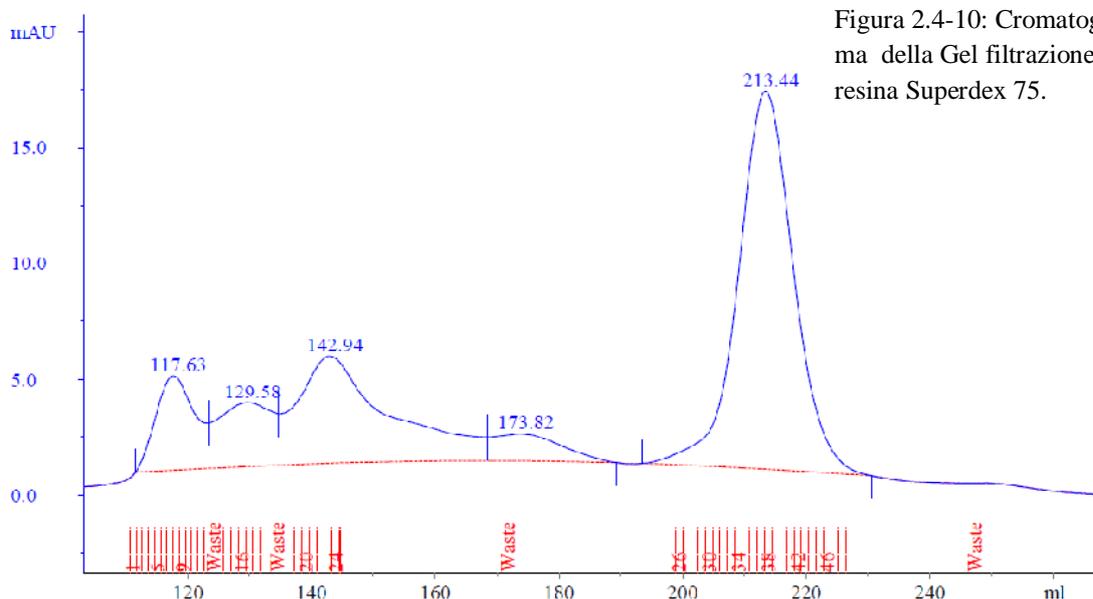


Figura 2.4-10: Cromatogramma della Gel filtrazione su resina Superdex 75.

Stima della resa (picco corrispondente a 213.4 ml): $A \cdot V = A_{1g/l}^{280} \cdot l \cdot m$, dove $A \cdot V$ è l'area sotto la curva ($169 \cdot 10^{-6} \text{ AU} \cdot \text{l}$), $A_{1g/l}^{280} = \epsilon^{280} / \text{MM}$ è l'assorbanza teorica di una soluzione di proteina con concentrazione di 1 g/l ($0.684 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l il cammino ottico (0.5 cm), m è la quantità (g) e MM la massa molecolare (14'570.7 Da), ϵ^{280} è l'assorbidività molare teorica ($9970 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). $m = 0.49 \text{ mg}$.

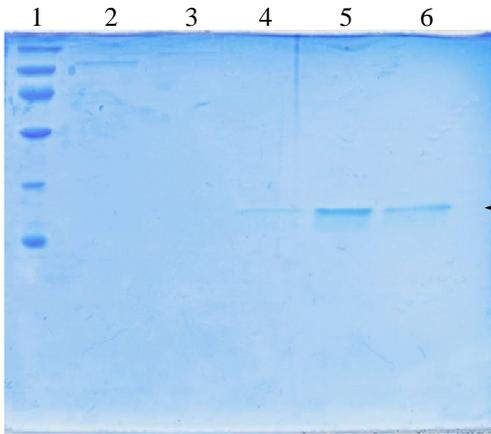


Figura 2.4-11: SDS-PAGE (16%)
 1: Standard di pesi molecolari, 3.5 μl
 2: Frazione 6 dell'eluato, 20 μl
 3: Frazione 23 dell'eluato, 20 μl
 4: Frazione 32 dell'eluato, 20 μl
 5: Frazione 38 dell'eluato, 20 μl
 6: Frazione 43 dell'eluato, 20 μl

Stima della massa molecolare della proteina purificata (si veda paragrafo 2.4.4)

Soluto	MM (kDa)	Volumi (ml)		K_{AV}	MM (kDa) stimata dalla retta di regressione
Blu di destrano	~ 2000	V_0	107 ± 1.1		
Picco di conducibilità	< 0.5	V_T	343 ± 3.4		
Albumina	67.4 ± 6.7	V_e	138 ± 1.4	0.1325 ± 0.0074	
Ovalbumina	49.1 ± 6.4		159 ± 1.6	0.2204 ± 0.0083	
Chimotripsinogeno A	20.4 ± 6.2		194 ± 1.9	0.3668 ± 0.0102	
Ribonucleasi A	15.6 ± 2.0		208 ± 2.1	0.4267 ± 0.0111	
STAS Rv1739c	?		213.4 ± 2.1	0.4508 ± 0.0113	

Tabella 2.4-4- Figura 2.4-12: Data la relazione di dipendenza tra la variabile dipendente z e le variabili indipendenti x, y, \dots : $z = x + y + \dots$, e, nell'ipotesi che gli scarti sulla variabile x, y , ecc. siano noti (s_x, s_y, \dots), per la teoria della propagazione degli errori è possibile stimare lo scarto su z :

$$s_z = \sqrt{\left(\frac{\partial z}{\partial x}\right)^2 s_x^2 + \left(\frac{\partial z}{\partial y}\right)^2 s_y^2 + \dots}, \quad s_x = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}, \dots$$

Per determinare lo scarto su K_{AV}

$$\text{si utilizzerà pertanto: } s_{K_{AV}} = \sqrt{\left(\frac{1}{V_T - V_0}\right)^2 s_{V_e}^2 + \left[\frac{V_0 - V_e}{(V_T - V_0)^2}\right]^2 s_{V_T}^2 + \left[\frac{V_e - V_T}{(V_T - V_0)^2}\right]^2 s_{V_0}^2}$$

lo scarto quadratico medio dei volumi (che useremo come stima dell'errore) va dallo 0.5% all'1% dei volumi; per semplicità, assumeremo per tutti i volumi un errore pari all'1%.

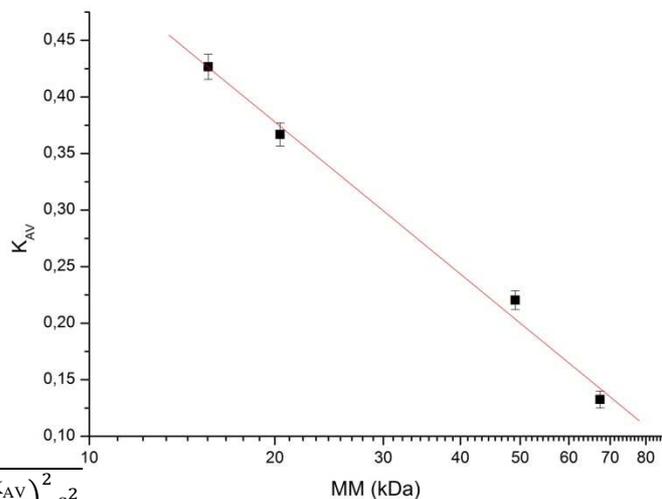
La relazione di proporzionalità tra K_{AV} e $\log(\text{MM})$ può essere sfruttata per costruire una curva di calibrazione con equazione:

$$K_{AV} = A + B (\log \text{MM})$$

$$A = 0.9519 \pm 0.04226$$

$$B = -0.44191 \pm 0.02765$$

$$s_{MM} = 10^{\frac{K_{AV} - A}{B}} \cdot \frac{\ln 10}{|B|} \cdot \sqrt{s_{K_{AV}}^2 + s_A^2 + \left(\frac{A - K_{AV}}{B}\right)^2 s_B^2}$$



Osservazioni: La stima della massa molecolare della proteina corrispondente al picco maggiore del cromatogramma in Figura 2.4-10 (13.6 ± 3.8 kDa) è in accordo con la massa molecolare del dominio STAS di Rv1739c in forma monomerica.

La resa, alla fine della purificazione (0.49 mg da due litri di coltura batterica), risulta del tutto insoddisfacente per l'obiettivo di determinare la struttura del dominio mediante tecniche NMR; tali tecniche, infatti, richiedono l'arricchimento isotopico del campione con il costoso nucleo ^{13}C e necessitano di almeno un campione di proteina con volume di 0.25 – 0.5 ml e concentrazione superiore a 0.5 mM (come minimo 1.8 – 2 mg per un dominio come lo STAS di Rv1739c). Pertanto, la strategia di clonaggio in pET 28(+) non sembra idonea ad ottenere quantitativi adeguati di proteina.

C. PURIFICAZIONE DI DOMINI STAS NEL SISTEMA DI CLONAGGIO “CHAMPION™ pET SUMO PROTEIN EXPRESSION SYSTEM”

Come detto in precedenza, l'espressione di proteine ricombinanti con marcatura isotopica specifica per l'NMR richiede l'utilizzo di terreni poveri di nutrienti, in genere non ottimali per la crescita batterica e l'espressione proteica; abbiamo verificato che l'espressione dei domini STAS (si veda il caso di Rv1739c) risulta severamente compromessa.

Nel tentativo di ovviare a tale inconveniente è stato scelto di utilizzare il sistema *Champion™ pET SUMO Protein Expression System*. Tale metodica prevede la fusione della proteina di interesse con Smt3 di *Saccharomyces cerevisiae*, una proteina di 11 kDa omologa di SUMO-1 (*Small Ubiquitin-like MOdifier*) di mammifero. La famiglia delle proteine SUMO è coinvolta nella regolazione di processi cellulari come apoptosi, trasporto nucleare, progressione nel ciclo cellulare; come l'ubiquitina, anche SUMO viene attaccata covalentemente a residui di lisina delle proteine bersaglio; tuttavia la SUMOilazione non indirizza alla degradazione, ma determina un cambiamento di funzione.

Il clonaggio del costrutto di fusione in *Escherichia coli* migliora l'espressione e la purificazione di proteine ricombinanti sia in termini di resa che di solubilità e stabilità. Inoltre, la struttura terziaria di SUMO è riconosciuta in modo specifico dalla proteasi cisteinica Ulp (SUMO-Proteasi); quando SUMO è fusa all'N-terminale della proteina di interesse, il taglio proteolitico mediato dall'enzima (preferibilmente a monte

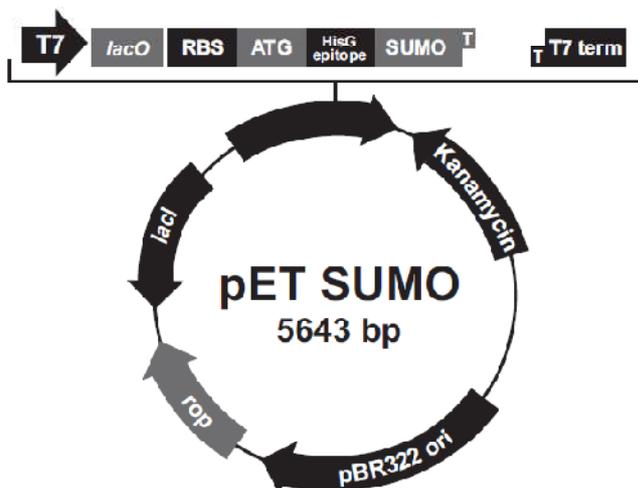


Figura 2.4-13: Schema del plasmide pET SUMO (5643 nucleotidi)

Il vettore di espressione sfrutta elementi di regolazione della trascrizione del batteriofago T7.

- T7 (basi 209-225) – lacO (basi 228-252)
- RBS (*Ribosome binding site*, basi 282-288)
- ATG (basi 297-299)
- Epitopo HisG (basi 309-329): coda di Poli-Istidina N-terminale (His_6) per l'ancoraggio della proteina di fusione alla colonna di affinità
- SUMO ORF (basi 360-653): Proteina di fusione SUMO N-terminale
- Siti SUMO forward priming (basi 549-571) e T7 reverse priming (basi 783-802,

```

121 ATAGGGGCCA GCAACGGCAC CTGTGGCGCC GGTGATGCCG GCCACGATGC GTCCGGCGTA GAGGATCGAG ATCTCGATCC

201 CGCGAATTA ATACGACTCA CTATAGGGGA ATTGTGAGCG GATAACAATT CCCCTCTAGA AATRAATTTG TTTAACTTTA
      T7 promoter          lac operator
      HisG epitope
281 AGAAGGAGAT ATACAT ATG GGC AGC AGC CAT CAT CAT CAT CAT CAC GGC AGC GGC CTG GTG CCG CGC GGC AGC
      RBS          Polyhistidine region
      Met Gly Ser Ser His His His His His His Gly Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser
354 GGT AGC ATG TCG GAC TCA GAA GTC AAT CAA GAA GCT AAG CCA GAG GTC AAG CCA GAA GTC AAG CCT GAG AOT
      SUMO fusion protein
      Ala Ser Met Ser Asp Ser Glu Val Asn Gln Glu Ala Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Val Lys Pro Glu Thr
426 CAC ATC AAT TTA AAG GTG TCC GAT GGA TCT TCA GAG ATC TTC TTC AAG ATC AAA AAG ACC ACT CCT TTA AGA
      His Ile Asn Leu Lys Val Ser Asp Gly Ser Ser Glu Ile Phe Phe Lys Ile Lys Lys Thr Thr Pro Leu Arg
      SUMO forward priming site
498 AGG CTG ATG GAA GCG TTC GCT AAA AGA CAG GGT AAG GAA ATG GAC TCC TTA AGA TTC TTG TAC GAC GGT ATT
      Arg Leu Met Glu Ala Phe Ala Lys Arg Gln Gly Lys Glu Met Asp Ser Leu Arg Phe Leu Tyr Asp Gly Ile
570 AGA ATT CAA GCT GAT CAG ACC CCT GAA GAT TTG GAC ATG GAG GAT AAC GAT ATT ATT GAG GCT CAC AGA GAA
      Arg Ile Gln Ala Asp Gln Thr Pro Glu Asp Leu Asp Met Glu Asp Asn Asp Ile Ile Glu Ala His Arg Glu
642 CAG ATT GGT GGT PCR product AGACAAG CTTAGGTATT TATTGGCGC AAAGTGGGTC GGGTGATGCT
      GTC TAA CCA CCA TCTGTTT GAATCCATAA
      Gln Ile Gly Gly
      SUMO cleavage site
701 GCCAACTTAG TGGAGCACCA CCACCACCAC CACTGAGATC CGGCTGCTAA CAAGCCCGA AAGGAAGCTG AGTTGGGTGC

781 TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC
      T7 reverse priming site

```

C): consentono l'amplificazione di una sequenza di DNA contenente la proteina di interesse, al fine di verificarne il corretto orientamento

- Sito di clonaggio TA (basi 653-654): sito per il clonaggio di prodotti amplificati con PCR tramite Taq polimerasi (che aggiunge una singola deossadenosina ai terminali 3' degli amplificati PCR)
 - Terminatore T7 (basi 744-872)
 - Kanamycin (basi 1431-2246, C)
 - pBR322 origin (basi 2342-3015)
 - ROP ORF (basi 3383-3574): Interagisce con l'origine pBR322 per facilitare la replicazione a basso numero di copie in *E. coli*.
 - *lacI* ORF (basi 4383-5474, C)
- (C): filamento complementare

di una serina, non prima di prolina, lisina, valina o leucina) produce la proteina nativa senza amminoacidi aggiuntivi tra il sito di taglio e l'inizio della sequenza. Infine, sia la SUMO che la SUMO-Proteasi, essendo dotate di *His₆-Tag*, possono facilmente essere rimosse con cromatografia per affinità tramite una resina chelante Ni²⁺.

2.4.6 C ELUIZIONE DELLA PROTEINA DI FUSIONE

Dopo aver caricato il campione sulla colonna per affinità si effettuano lavaggi (8-12 volumi di colonna) con tampone contenente 10, 20, 150, 300 e 500 mM di imidazolo. Durante le prime due fasi eluiscono le proteine legate in modo aspecifico, mentre con 150 mM imidazolo eluisce la proteina di fusione con il dominio SUMO N-terminale.

2.4.7 C CAMBIO DEL TAMPONE (PER LA PROTEOLISI)

Per ottenere un'efficienza ottimale, la reazione di proteolisi deve essere condotta in tampone contenente NaCl non superiore a 300 mM e imidazolo non superiore a 150 mM, ma preferibilmente inferiore a 10 mM. Il cambio del tampone è effettuato tramite ripetuti passaggi di concentrazione (in centrifuga) e diluizione con tampone per proteolisi.

2.4.8 C TAGLIO PROTEOLITICO

Si procede quindi con l'incubazione del campione con la proteasi cisteinica Ulp (circa 10 unità per milligrammo stimato di proteina da tagliare), che idrolizza in modo specifico il legame peptidico a valle della struttura-consenso di SUMO. Dopo 5 minuti di attivazione a 20 °C, il campione è posto sotto agitazione (per ribaltamento) a 4 °C *overnight*.

2.4.9 C RIMOZIONE DEI DOMINI SUMO E DI ULP

Il campione, contenente proteina nativa, proteina di fusione non tagliata, dominio SUMO libero e proteasi Ulp viene nuovamente caricato in colonna IMAC precedentemente equilibrata con tampone senza imidazolo (A).

Si procede quindi con il lavaggio con tampone con 0, 10, 20, 150 e 500 mM di imidazolo (4-6 ml), durante il quale dovrebbe uscire la proteina tagliata. Durante i lavaggi a bassa concentrazione di imidazolo eluisce la proteina nativa; oltre la concentrazione di 150 mM eluiscono in modo massiccio SUMO, la proteina di fusione e la proteasi (provviste di *(His)₆-Tag*).

Una volta separati il dominio SUMO e la proteina di interesse (in questo caso il dominio STAS), il campione può essere concentrato per la cromatografia per esclusione dimensionale.

Espressione e purificazione del dominio ¹⁵N-STAS di SULTR 1;2 di *Arabidopsis thaliana* con dominio SUMO rimuovibile

La sequenza amminoacidica del dominio (da 517 a 653) è presentata qui di seguito; la sequenza del dominio SUMO, rimossa per via proteolitica, è evidenziata in rosso:

```
MGSSHHHHHH  GSGLVPRGSA  SMSDSEVNQQ  AKPGVKPEVK  PETHINLKVS
DGSSEIFFKI   KKTTPLRRLM  EAFKRQGE    MDSLRFYDYG  IRIQADQTPE
DLDMEDNDII   EAHREQIGGY  RNIQQYPEAT  MVPGVLTIRV  DSAIYFSNSN
YVRERIQRWL   HEEEEKVKAA  SLPRIQFLII  EMSPVTDIDT  SGIHALEDLY
KSLQKRDIQL   ILANPGPLVI  GKLHLSHFAD  MLGQDNIYLT  VADAVEACCP
KLSNEV
```

N° amminoacidi: 137 + 119

MM = 15'553.8 Da (senza SUMO)

¹⁵N-MM = 15'736.1 Da (max.)

pI teorico: 5.30 (senza SUMO)

L'espressione è stata condotta in terreno MM, in presenza di 50 µg/ml di Kanamicina.

Precoltura in LB e MM.

Precoltura in ¹⁵N-MM:

Assorbanza A_{600 nm} = 3.0

Coltura in ¹⁵N-MM (1 litro):

V_{precoltura} : V_{coltura} = 1 : 11

Tabella 2.4-5.

Curva di crescita (STAS SULTR 1;2 in pET SUMO)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.274
70	0.275
125	0.292
190	0.413
250	0.596
280	0.739
310	0.864
330 (Induzione IPTG 1 mM)	0.963
445	1.416
565	1.686

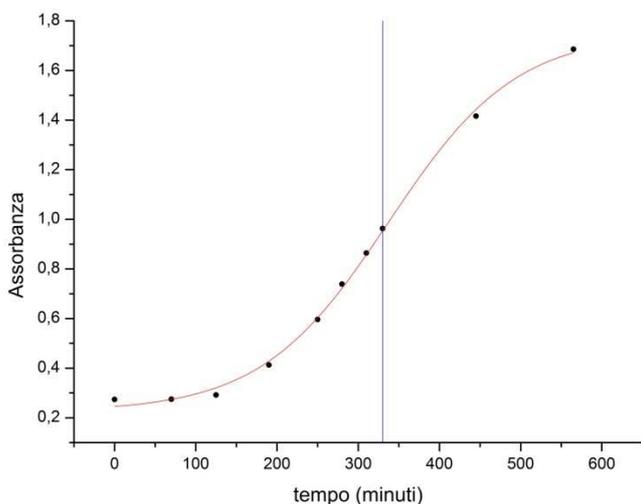


Figura 2.4-14: curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS SULTR 1;2 in pET SUMO.

La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t-t_{1/2})/\tau}} + A_2$$

$$A_1 = 0.22506 \pm 0.02102$$

$$A_2 = 1.75136 \pm 0.03929$$

$$t_{1/2} = 337.22786 \pm 5.55924$$

$$\tau = 78.48211 \pm 5.7674$$

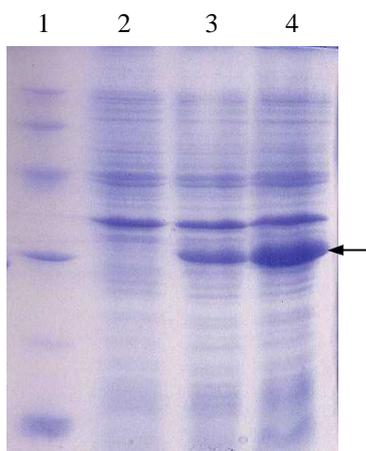


Figura 2.4-15: SDS-PAGE (14%)

1: Standard di pesi molecolari, 5 μ l

2: Coltura non indotta

3: Coltura a 3 ore dall'induzione

4: Coltura a 4 ore dall'induzione

4A: Coltura a 5 ore dall'induzione

5A: Coltura a 6 ore dall'induzione

Di ciascun campione è stato caricato l'equivalente di 153 μ l coltura.

L' SDS-PAGE dimostra come non sia rilevabile un livello basale di espressione e come la proteina ricombinante si accumuli in modo via via più significativo durante le 4 ore dopo l'induzione.

Risospensione del pellet in 40 ml di tampone per affinità.

Lisi mediante 3 cicli di French Press.

Chiarificazione del lisato per centrifugazione.

Diluizione del surnatante (da 40 a 80 ml), con aggiunta di imidazolo (10 mM).

Cromatografia 1 in colonna per affinità IMAC HisTrap FF crude.

Lavaggi con imidazolo 10 mM (98% di tampone A e 2% di tampone B in FPLC) e poi imidazolo 20 mM (96% di tampone A e 4% di tampone B).

Eluizione con 150, 300 e 500 mM imidazolo (30%, 60% e 100% di tampone B in FPLC). Sono state riunite le frazioni dalla 7 alla 17.

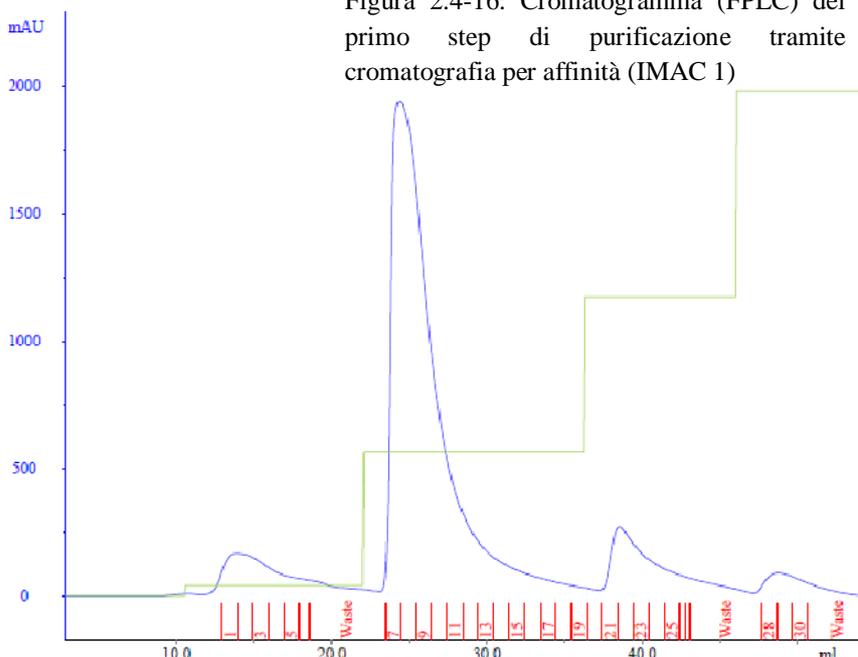


Figura 2.4-16: Cromatogramma (FPLC) del primo step di purificazione tramite cromatografia per affinità (IMAC 1)

Cambio del tampone (tramite concentrazioni e diluizioni successive) per eliminare l'imidazolo (da 150 mM a 11 mM), volume totale: 11.1 ml

Incubazione con Ulp (~ 240 unità) a 4 °C *overnight*.

Cromatografia 2 in colonna per affinità IMAC

HisTrap FF crude: il campione sottoposto al taglio è stato centrifugato e caricato in colonna. L'eluizione della proteina nativa, del dominio SUMO e il lavaggio della colonna sono stati completati in FPLC (0%, 2%, 4%, 30% e 100% di tampone B).

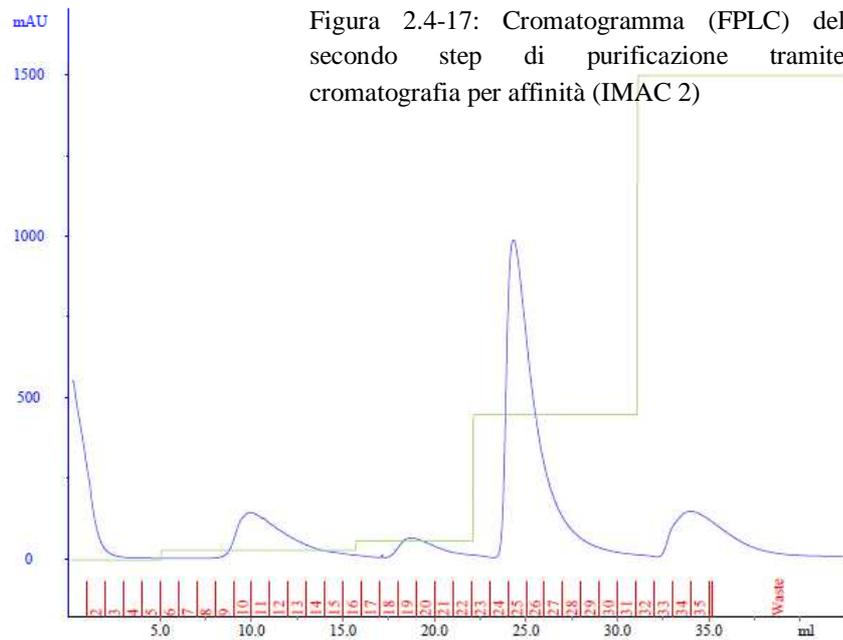


Figura 2.4-17: Cromatogramma (FPLC) del secondo step di purificazione tramite cromatografia per affinità (IMAC 2)

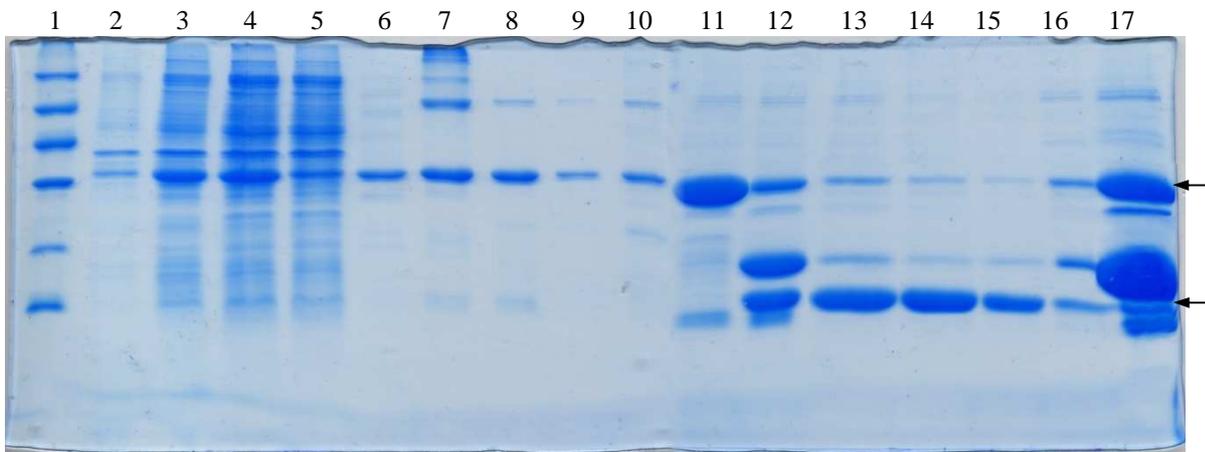
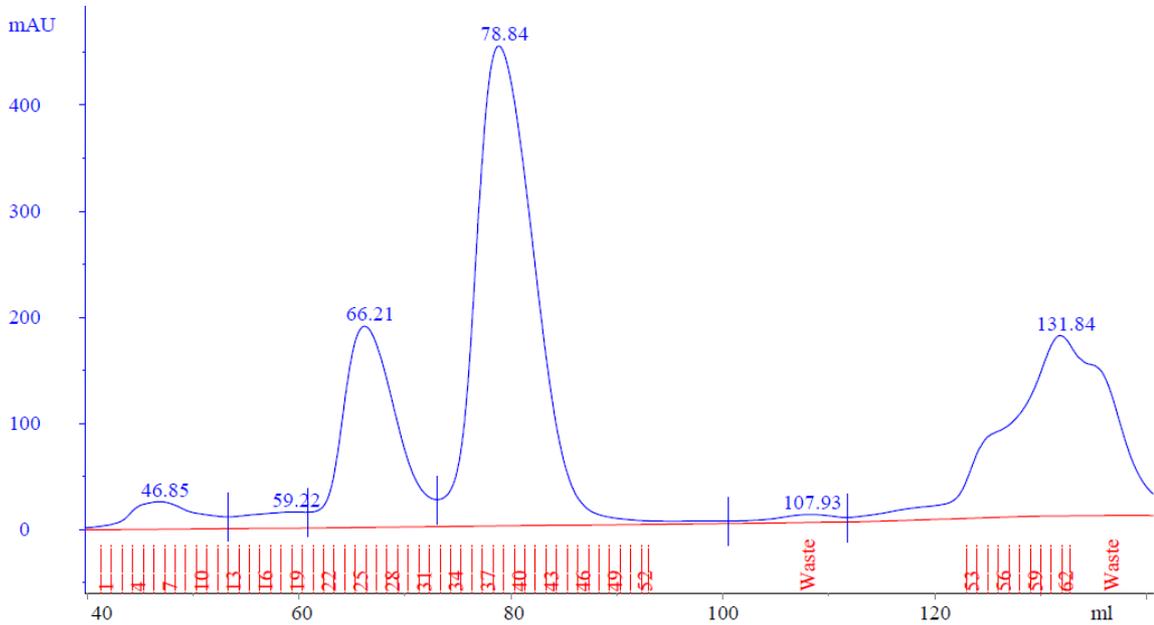


Figura 2.4-18: SDS-PAGE (16%)

- 1: Standard di pesi molecolari, 4 µl
 - 2: *Pellet* lisato, 4.5 µl (di 40 ml)
 - 3: Affioramento gelatinoso (proteico) in fase di centrifugazione, 5 µl (in rapporto non quantitativo)
 - 4: Surnatante, 4.5 µl (di 40 ml)
 - 5: *Flowthrough* dalla colonna di affinità, 9 µl (di 80 ml) IMAC 1
 - 6: Lavaggio con imidazolo 20 mM (frazione 2), 8 µl (di 1 ml) IMAC 1
 - 7, 8, 9,: Frazioni 7, 12, 17 (150 mM imidazolo) dell'eluato, 8 µl (di 1 ml) IMAC 1
 - 10: Frazione 22 (300 mM imidazolo) dell'eluato, 8 µl (di 1 ml) IMAC 1
 - 11: Campione prima del taglio, 12 µl (di 11 ml)
 - 12: Campione dopo il taglio con Ulp, 12 µl (di 11 ml)
 - 13: *Flowthrough* dalla colonna di affinità, 12 µl (di 11 ml) IMAC 2 (dominio STAS)
 - 14: Frazione 1 dell'eluato (0 mM imidazolo), 20 µl (di 1 ml) IMAC 2
 - 15: Frazione 11 dell'eluato (10 mM imidazolo), 20 µl (di 1 ml) IMAC 2
 - 16: Frazione 20 dell'eluato (20 mM imidazolo), 20 µl (di 1 ml) IMAC 2
 - 17: Frazione 25 dell'eluato (150 mM imidazolo), 20 µl (di 1 ml) IMAC 2
- La freccia in alto indica la proteina prima del taglio, quella in basso dopo il taglio.

Cromatografia per esclusione dimensionale: sono stati riuniti il *flowthrough* IMAC 2 e le frazioni da 1 a 14. Il campione così ottenuto è stato concentrato a circa 4.5 ml e caricato in colonna 16/60 Superdex75.

Figura 2.4-19: Cromatogramma della Gel filtrazione su resina Superdex 75



Stima della resa (picco corrispondente a 78.8 ml):

L'area sotto la curva ($A \cdot V$) è $2.759 \cdot 10^6$ AU·l, $A_{1\text{g/l}}^{280} = 0.926 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon^{280} = 14.565 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l (cammino ottico) è 0.5 cm.

$m = 5.96$ mg.

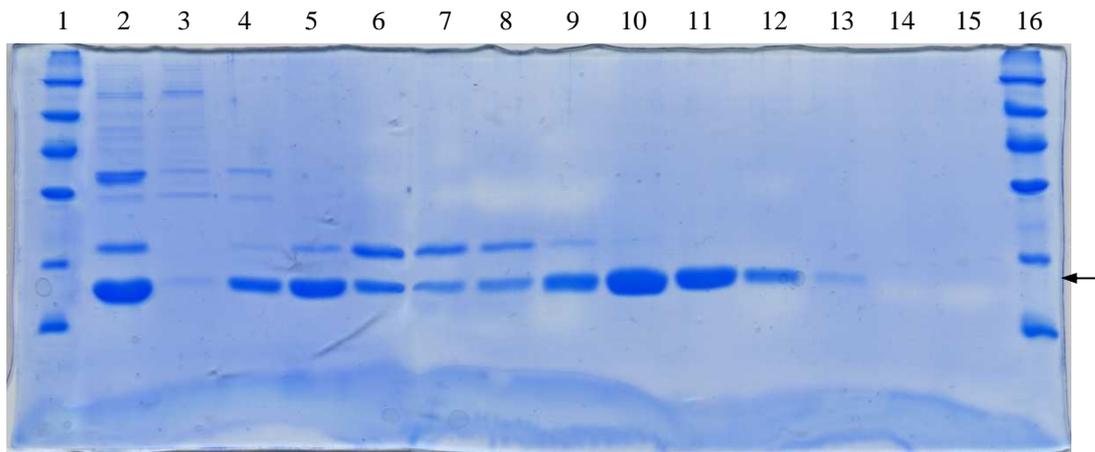


Figura 2.4-20: SDS-PAGE (16%)

1: Standard di pesi molecolari, 4 μl

2: Campione caricato in colonna per esclusione dimensionale, 4 μl

3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15: Frazioni 6, 23, 26, 30, 32, 33, 35, 37, 42, 45, 48, 53, 62 dell'eluato, 16 μl (di 1 ml)

16: Standard di pesi molecolari, 4 μl

La freccia inferiore indica la SULTR1;2.

Stima della massa molecolare della proteina purificata

Tabella 2.4-6

Soluto	MM (kDa)	Volumi (ml)		K_{AV}	MM (kDa) stimata dalla retta di regressione
Blu di destrano	~ 2000	V_0	43.0 ± 0.4		
Picco di conducibilità	< 0.5	V_T	123 ± 1.2		
Albumina	67.4 ± 6.7	V_e	53.6 ± 0.5	0.1325 ± 0.0087	71.5 ± 24.9
Ovalbumina	49.1 ± 6.4		60.6 ± 0.6	0.2204 ± 0.0100	45.2 ± 14.9
Chimotripsinogeno A	20.4 ± 6.2		72.3 ± 0.7	0.3668 ± 0.0118	21.1 ± 6.3
Ribonucleasi A	15.6 ± 2.0		77.1 ± 0.8	0.4267 ± 0.0135	15.4 ± 4.4
STAS SULTR 1;2	?		78.9 ± 0.8	0.4487 ± 0.0124	13.7 ± 3.9
Picco 62.2	?		62.2 ± 0.6	0.2400 ± 0.0091	40.8 ± 13.2

Osservazioni: La stima della massa molecolare della proteina corrispondente al picco maggiore del cromatogramma in Figura 2.4-19 (13.7 ± 3.9 kDa) è in buon accordo con la massa molecolare del dominio STAS di SULTR 1;2 in forma monomerica (15.7 kDa).

Per quanto riguarda il picco minoritario ($V_e = 62.2$ ml), corrisponde ad una massa molecolare apparente di circa 40 kDa, in posizione intermedia tra i volumi attesi per la forma dimerica e quella trimerica. L'errore nella determinazione della massa non consente tuttavia di discriminare lo stato di aggregazione. Il gel in Figura 2.4-20 dimostra chiaramente che in entrambi i picchi è presente la SULTR1;2, pertanto il picco satellite contiene una forma aggregata di SULTR1;2. Si nota tuttavia la presenza di una seconda proteina che eluisce tra le frazioni 26 e 33.

La resa, alla fine della purificazione (quasi 6 mg da un litro di coltura batterica), dimostra che la strategia di clonaggio in pET SUMO sembra garantire rese più consistenti ed è preferibile quando la proteina da studiare ha problemi di solubilità.

Espressione e purificazione del dominio ^{15}N -STAS di Prestina di *Rattus norvegicus* con dominio SUMO rimuovibile

La sequenza amminoacidica del dominio (un costrutto chimerico che si estende dall'amminoacido **505** al **563** e, tramite un linker **GS** si congiunge alla sequenza dall'amminoacido **637** al **727**) è presentata qui di seguito; la sequenza del dominio SUMO, rimossa per via proteolitica, è evidenziata in rosso:

```

MGSSHHHHHH  GSGLVPRGSA  SMSDSEVNQQ  AKPGVKPEVK  PETHINLKVS
DGSSEIFFKI  KKTTPLRRLM  EAFAKRQKKE  MDCLRFLYDG  IRIQADQTPE
DLDMEDNDII  EAHREQIGGS  PSYTVLGQLP  DTDVYIDIDA  YEEVKEIPGI
KIFQINAPIY  YANSPLYSSA  LKRKTGVNGS  ENIHTVILDF  TQVNFMDSVG
VKTLGIVKE  YGDVGIYVYL  AGCSAQVVND  LTSNRFFENP  ALKELLFHSI
HDAVLGSQVR  EAMAEQETTV  L

```

N° amminoacidi: 152 + 119

MM = 16'756.9 Da (senza SUMO)

^{15}N -MM = 16'941.1 Da (max)

$^{15}\text{N}, ^{13}\text{C}$ -MM = 17'681.0 Da (max)

pI teorico: 4.53 (senza SUMO)

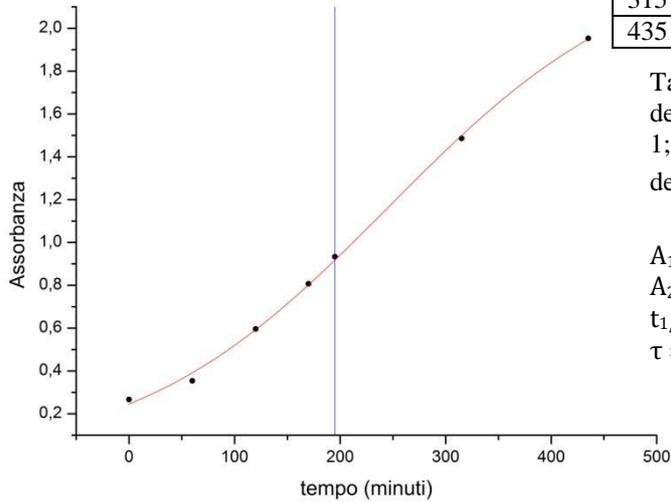
Precoltura in LB e MM.

Precoltura in ^{15}N -MM:

Assorbanza $A_{600\text{ nm}} = 2.8$

Coltura in ^{15}N -MM (1 litro):

$V_{\text{precoltura}} : V_{\text{coltura}} = 1 : 9$



Curva di crescita (STAS PRESTINA in pET SUMO)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.267
60	0.354
120	0.596
170	0.807
195 (Induzione IPTG 1 mM)	0.933
315	1.486
435	1.953

Tabella 2.4-7 – Figura 2.4-21: curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS SULTR 1;2 in pET SUMO. La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è: $A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t-t_{1/2})/\tau}} + A_2$

$$A_1 = -0.03009 \pm 0.11337$$

$$A_2 = 2.35997 \pm 0.17071$$

$$t_{1/2} = 245.70094 \pm 13.60829$$

$$\tau = 120.50552 \pm 18.9976$$

Risospensione del pellet in 40 ml di tampone per affinità.

Lisi mediante 4 cicli di French Press.

Chiarificazione del lisato per centrifugazione.

Diluizione del surnatante (da 40 a 80 ml), con aggiunta di imidazolo (10 mM).

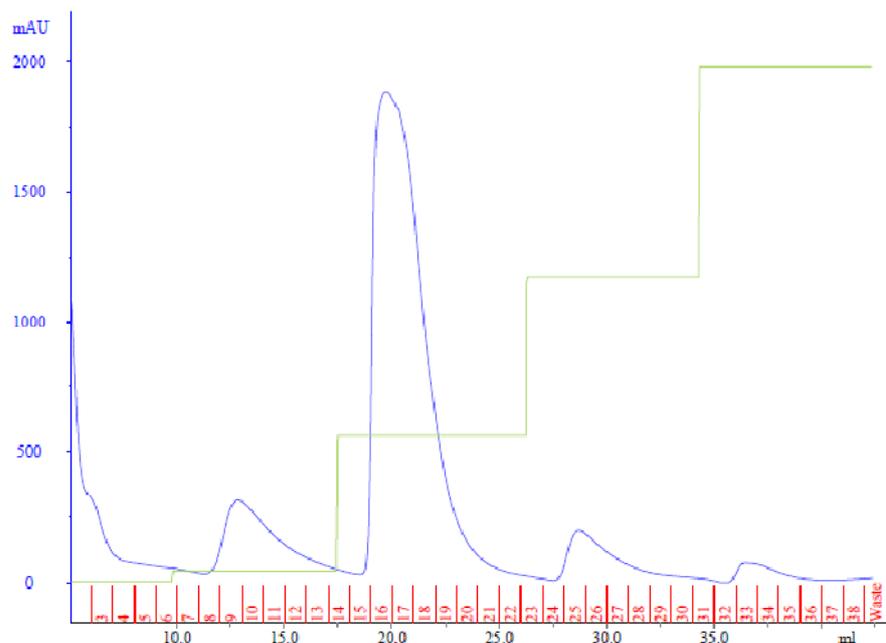
Cromatografia 1 in colonna per affinità IMAC

HisTrap FF crude.

Lavaggi con 10 mM imidazolo (2% di tampone B in FPLC) e poi 20 mM imidazolo (4% di tampone B).

Eluizione con 150, 300 e 500 mM imidazolo (30%, 60% e 100% di tampone B in FPLC). Le frazioni dalla 15 alla 22 sono state riunite per conti-nuarne la purificazione.

Figura 2.4-22: Cromatogramma (FPLC) della prima fase di purificazione tramite cromatografia per affinità (IMAC 1).



Cambio del tampone (tramite concentrazioni e diluizioni successive) per eliminare l'imidazolo (da 150 mM a meno di 2 mM), volume totale: 4.1 ml

Incubazione con Ulp (~ 200 unità) a 4 °C *overnight*.

Cromatografia 2 in colonna per affinità IMAC HisTrap FF crude: il campione

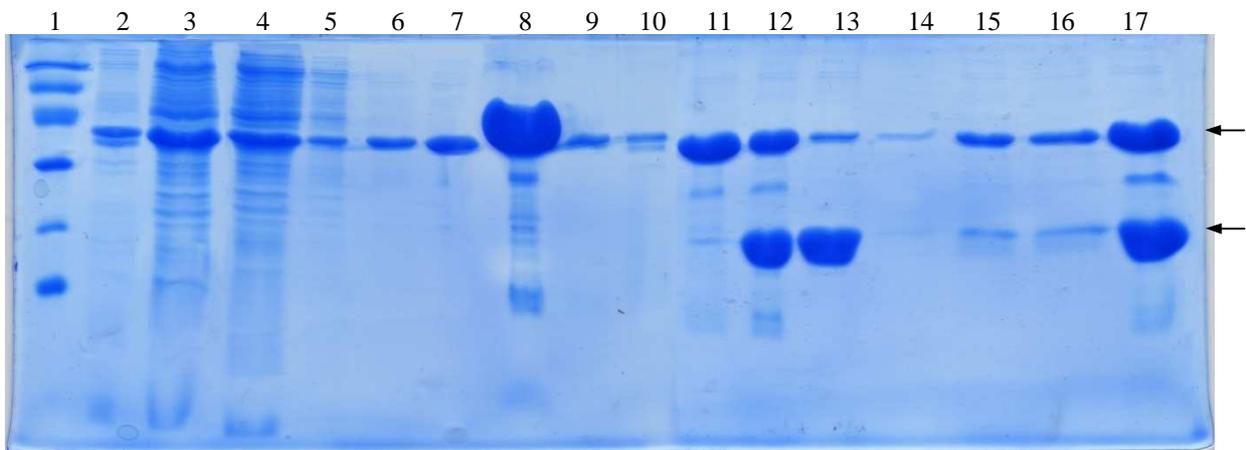
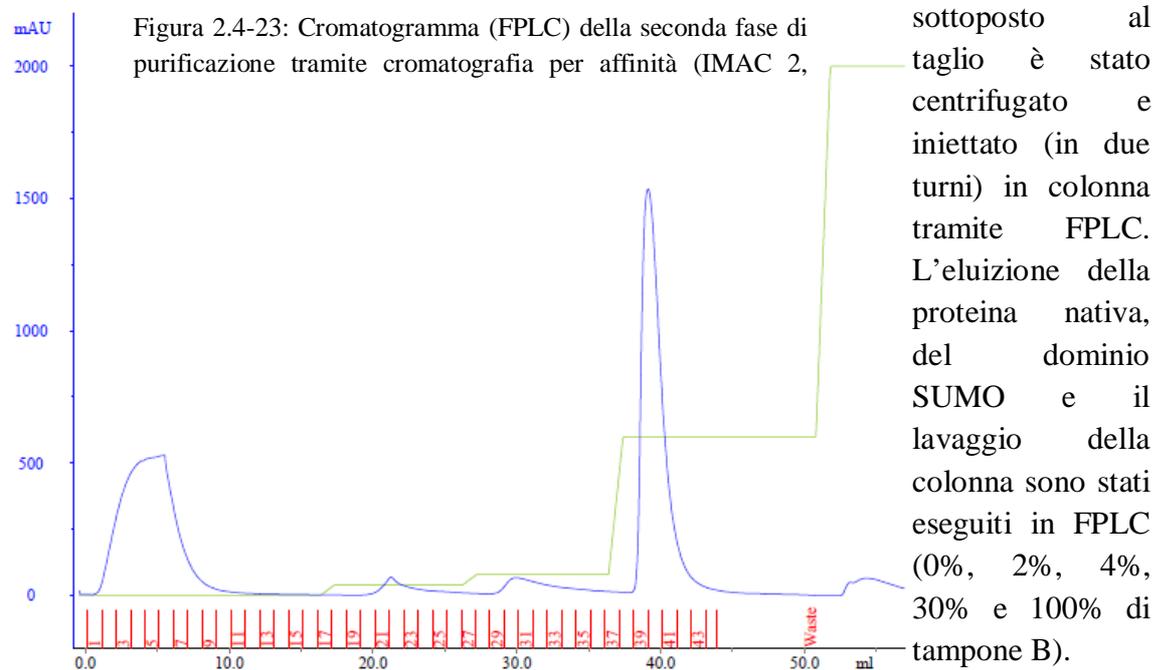


Figura 2.4-24: SDS-PAGE (16%)

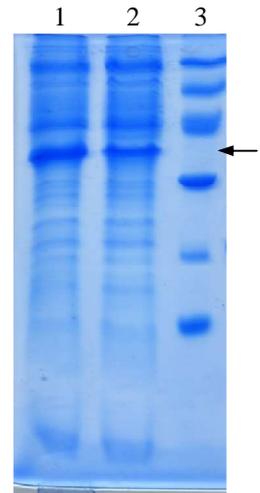
- 1: Standard di pesi molecolari, 4 μ l
 - 2: *Pellet* lisato, 4.5 μ l (di 40 ml)
 - 3: Surnatante, 4.5 μ l (di 40 ml)
 - 4: *Flowthrough* dalla colonna di affinità, 9 μ l (di 80 ml) IMAC 1
 - 5, 6: Lavaggio con imidazolo 10 mM (frazioni 1, 3), 4 μ l (di 1 ml) IMAC 1
 - 7: Lavaggio con imidazolo 20 mM (frazione 9), 4 μ l (di 1 ml) IMAC 1
 - 8, 9: Frazioni 16, 20 (150 mM imidazolo) dell'eluato, 4 μ l (di 1 ml) IMAC 1
 - 10: Frazione 25 (300 mM imidazolo) dell'eluato, 4 μ l (di 1 ml) IMAC 1
 - 11: Campione prima del taglio, 4 μ l (di 4 ml)
 - 12: Campione dopo il taglio con Ulp, 4 μ l (di 4 ml)
 - 13: Frazione 5 dell'eluato (0 mM imidazolo), 8 μ l (di 1 ml) IMAC 2 (dominio STAS)
 - 14: Frazione 15 dell'eluato (10 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2
 - 15: Frazione 21 dell'eluato (20 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2
 - 16: Frazione 30 dell'eluato (150 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2
 - 17: Frazione 40 dell'eluato (150 mM imidazolo), 8 μ l (di 1 ml) IMAC 2
- La freccia in alto indica la proteina prima del taglio, quella in basso dopo il taglio.

La SDS-PAGE in Figura 2.4-25 rivela che dopo il primo passaggio in colonna (pozzetto 4), una quantità molto rilevante di proteina è ancora presente nel *flowthrough* (F1).

Un secondo passaggio in colonna ha consentito di recuperare quasi altrettanta proteina e, in effetti, nel nuovo *flowthrough* (F2) si evidenzia una significativa riduzione dell'intensità della banda corrispondente alla proteina di fusione (Figura 2.4-25, pozzetto 2).

Figura 2.4-25: SDS-PAGE (16%)

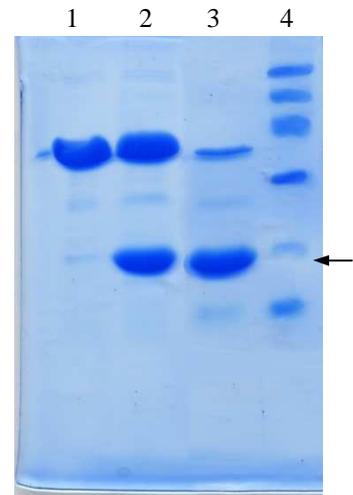
- 1: *Flowthrough* dopo il primo passaggio in IMAC (F1), 9 μ l (di 80 ml)
- 2: *Flowthrough* dopo il secondo passaggio in IMAC (F2), 9 μ l (di 80 ml)
- 3: Standard di pesi molecolari, 4 μ l



Inoltre, il gel in Figura 2.4-24 mostra che il taglio non è stato molto efficiente, in quanto è presente una parte ancora molto significativa di proteina di fusione. Le frazioni che la contengono (ad es. 21-23, 30-33, 39-44 nella IMAC 2 - turno 1) sono state riunite e il taglio è stato ripetuto. Non è stato necessario aggiungere altra proteasi, in quanto anche la Ulp presenta la coda di istidine ed eluisce con il SUMO e la proteina di fusione in presenza di 150 mM imidazolo. È sufficiente eliminare l'imidazolo mediante alcuni cicli di centrifugazione e diluizione e la proteasi già presente in soluzione completa il taglio.

Figura 2.4-26: SDS-PAGE (16%)

- 1: Campione prima del taglio, 4 μ l (di 4 ml)
- 2: Campione dopo il primo taglio con Ulp, 4 μ l (di 4 ml)
- 3: Campione dopo il secondo taglio con Ulp, 4 μ l (di 4 ml)
- 4: Standard di pesi molecolari, 4 μ l



Cromatografia per esclusione dimensionale: tutte le frazioni contenenti la proteina tagliata (comprese quelle ottenute dal campione di proteina sottoposta due volte al taglio o di quella recuperata dal *flowthrough* 1, F1) sono state riunite. Il campione così ottenuto è stato concentrato e caricato in colonna 16/60 Superdex75 (in 3 turni).

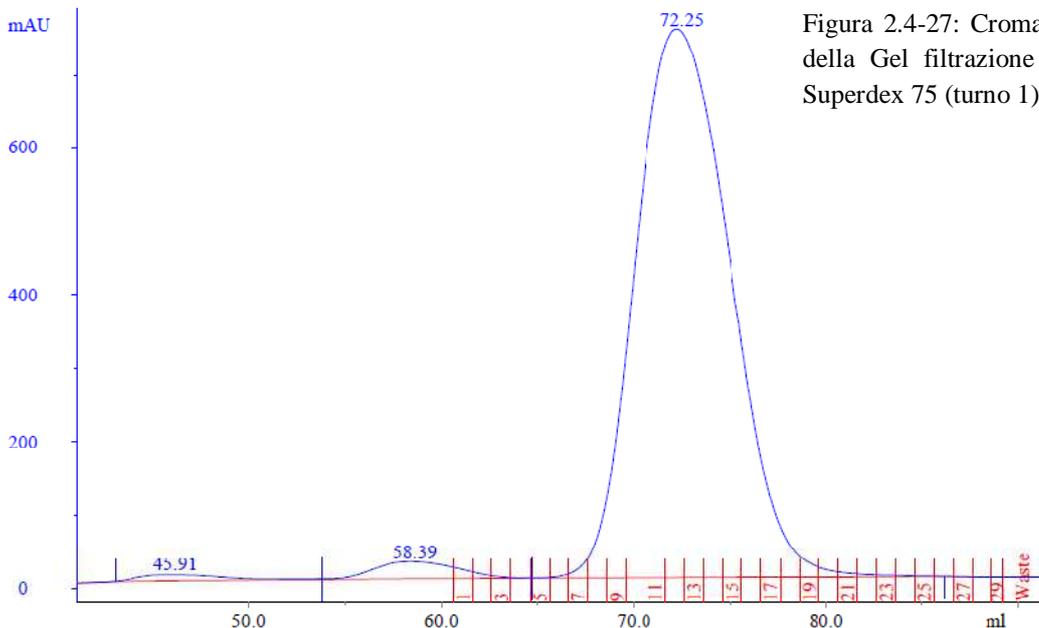


Figura 2.4-27: Cromatogramma della Gel filtrazione su resina Superdex 75 (turno 1)

Stima della resa (picco corrispondente a 72.2 ml):

L'area sotto la curva ($A \cdot V$) del primo turno di cromatografia è $4 \cdot 250 \cdot 10^{-6}$ AU·l, $A_{1g/l}^{280} = 0.792 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon^{280} = 13 \cdot 410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l (cammino ottico) è 0.5 cm.

$m = 10.73$ mg. Considerando anche gli altri due turni di cromatografia (non mostrati) con aree di $2 \cdot 027 \cdot 10^{-6}$ AU·l e $2 \cdot 567 \cdot 10^{-6}$ AU·l, il totale di proteina purificata ammonta a 22.3 mg.

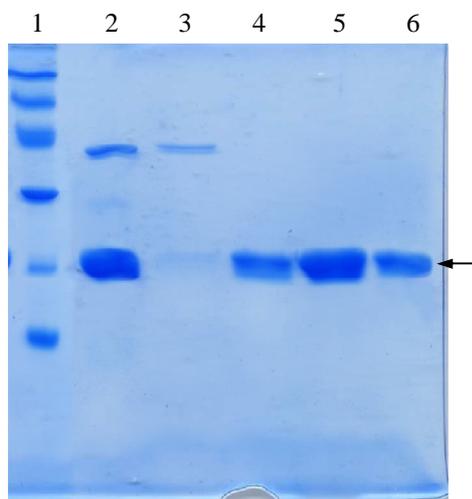


Figura 2.4-28: SDS-PAGE (16%)

1: Standard di pesi molecolari, 4 μ l

2: Campione caricato in colonna per esclusione dimensionale, 4 μ l

3, 4, 5, 6: Frazioni 1, 9, 12, 16 dell'eluato, 7 μ l (di 1 ml)

Stima della massa molecolare della proteina purificata

Tabella 2.4-8

Soluto	MM (kDa)	Volumi (ml)		K_{AV}	MM (kDa) stimata dalla retta di regressione
Blu di destrano	~ 2000	V_0	39.8 ± 0.4		
Picco di conducibilità	< 0.5	V_T	111.5 ± 1.1		
CASEY	?	V_e	72.3 ± 0.7	0.4533 ± 0.0124	13.4 ± 3.8

Osservazioni: La stima della massa molecolare della proteina corrispondente al picco del cromatogramma in Figura 2.4-27 (72.2 ml) è in accordo con la massa molecolare del dominio STAS di Prestina in forma monomerica.

La resa, alla fine della purificazione (oltre 22 mg da un litro di coltura batterica), si è rivelata molto soddisfacente e la stabilità della proteina ha consentito di procedere con la produzione della proteina doppiamente marcata.

Espressione e purificazione del dominio ^{15}N , ^{13}C -STAS di Prestina di *Rattus norvegicus* con dominio SUMO rimuovibile

Essendo la purificazione della proteina del tutto analoga alla precedente, ne saranno più sinteticamente mostrati i tratti salienti.

Precoltura in LB e MM con

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 22.2 mM.

Precoltura in ^{15}N , ^{13}C -MM:

Assorbanza $A_{600 \text{ nm}} = 0.28$

Coltura in ^{15}N , ^{13}C -MM (1 litro):

$V_{\text{precoltura}} : V_{\text{coltura}} = 1 : 20$

Curva di crescita (STAS PRESTINA in pET SUMO)	
Tempo (minuti)	Assorbanza
0	0.014
240	0.249
360	0.791
375 (Induzione IPTG 1 mM)	0.912
495	1.470
615	1.905

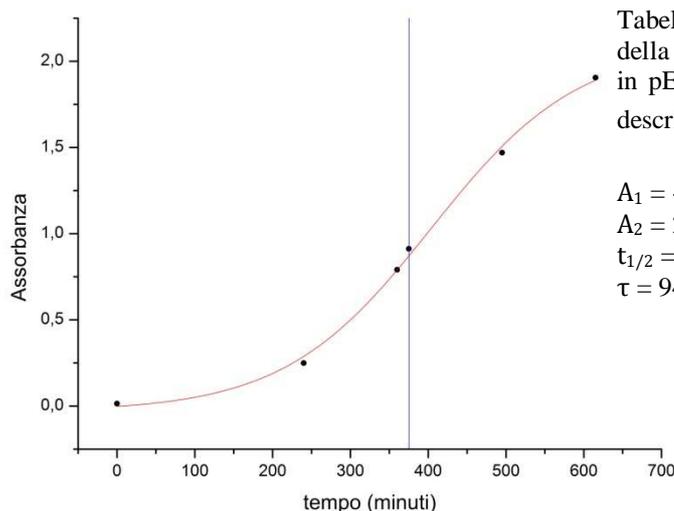


Tabella 2.4-9 – Figura 2.4-29: curva di crescita della coltura per l'espressione di STAS Prestina in pET SUMO. La curva modello utilizzata per descrivere la crescita è: $A = \frac{A_1 - A_2}{1 - e^{-(t-t_{1/2})/\tau}} + A_2$

$$A_1 = -0.03153 \pm 0.06103$$

$$A_2 = 2.09673 \pm 0.1318$$

$$t_{1/2} = 404.17278 \pm 14.73319$$

$$\tau = 94.63683 \pm 14.1685$$

Per verificare che, durante l'espressione della proteina doppiamente marcata non ci fosse un'eccessiva deplezione di glucosio (tale da compromettere l'esito della coltura) si è utilizzato un *kit* commerciale per il monitoraggio del glucosio in fluidi biologici.^{1§}

Figura 2.4-30



Coltura prima dell'induzione
C₆H₁₂O₆: 2.5 – 1.5 g/l



Coltura a 2 ore dall'induzione
C₆H₁₂O₆: 1.5 – 0.5 g/l



Coltura a 4 ore dall'induzione
C₆H₁₂O₆: < 0.5 g/l

Risospensione del pellet in 40 ml di tampone per affinità.

Lisi mediante 4 cicli di French Press.

Chiarificazione del lisato per centrifugazione.

Il pellet è stato quindi sottoposto ad altri 2 cicli di French Press per verificare la possibilità di recuperare altra proteina, ma i passaggi successivi ne hanno rilevato quantità non significative.

Diluizione del surnatante (da 40 a 80 ml), con aggiunta di imidazolo (10 mM).

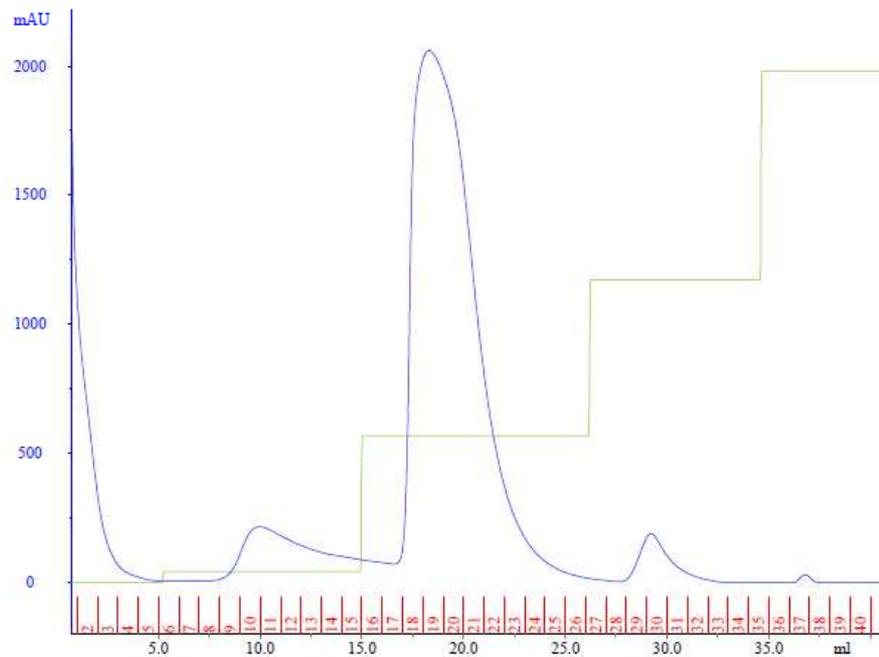
Cromatografia 1 in colonna per affinità IMAC. Per aumentare l'efficienza di questo passaggio, aumentando il legame della proteina alla matrice, sono state utilizzate due colonne HisTrap FF crude connesse in serie (IMAC 1a-b). Il risultante *flowthrough* (F1) è stato in seguito ulteriormente caricato in colonna HisTrap FF crude (IMAC 1c) per ricavarne altra proteina.

Lavaggi con 10 mM imidazolo (2% di tampone B in FPLC) e poi 20 mM imidazolo (4% di tampone B).

^{1§} Questo test sfrutta una serie di reazioni enzimatiche da parte della Glucosio Ossidasi e della Perossidasi che, in ultima analisi, ossidano un cromogeno (la TMB, 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina) e ne alterano la colorazione. In presenza di glucosio e ossigeno, il primo enzima lo ossida a 1, 5-gluconolattone e utilizza l'ossigeno come accettore di elettroni, producendo perossido di idrogeno. Il gluconolattone viene quindi idratato ad acido gluconico, mentre il perossido di idrogeno è utilizzato dalla Perossidasi per ossidare la TMB (incolore) a TMB⁺⁺(giallo); una molecola di TMB e una di TMB⁺⁺ formano un complesso stabilizzato per *stacking*, di colore blu.

Eluizione con 150, 300 e 500 mM imidazolo (30%, 60% e 100% di tampone B in FPLC). Le frazioni dalla 17 alla 25 sono state riunite per continuare la purificazione. **Cambio del tampone** (tramite concentrazioni e diluizioni successive) per eliminare l'imidazolo (da 150 mM a meno di 1 mM).

Figura 2.4-31: Cromatogramma (FPLC) della prima fase di purificazione tramite cromatografia per affinità (IMAC 1a-b)

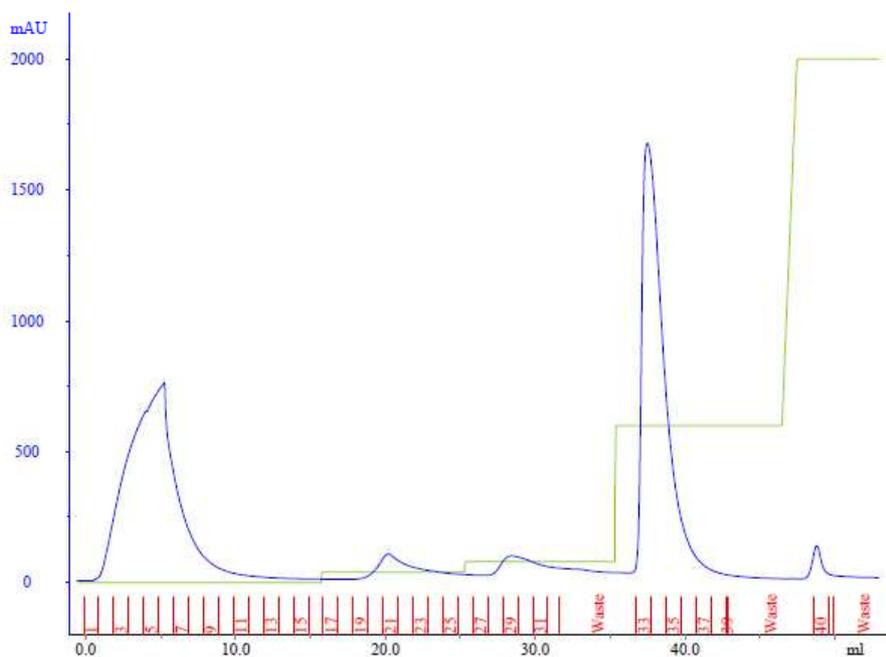


Si è così ottenuto un volume di 8 ml da IMAC 1a-b (diviso in due aliquote, turno 1 e 2) e un volume di altri 2.6 ml da IMAC 1c.

Incubazione con Ulp (~ 340 unità in totale) a 4 °C *overnight*.

Cromatografia 2 in colonna per affinità IMAC HisTrap FF crude: i campioni sottoposti al taglio sono stati centrifugati e iniettati (turni 1 e 2 del campione a-b e turno singolo del campione c) in colonna tramite FPLC. L'eluizione della proteina nativa, del dominio SUMO e il lavaggio della colonna sono stati eseguiti in FPLC (0%, 2%, 4%, 30% e 100% di tampone B).

Figura 2.4-32: Cromatogramma (FPLC) della seconda fase di purificazione tramite cromatografia per affinità (IMAC 2, turno 1 del campione a-b).



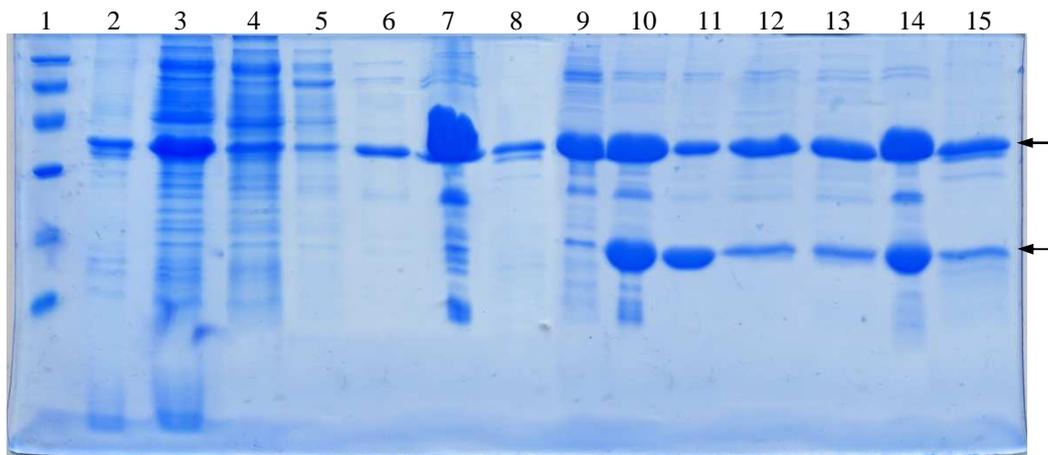


Figura 2.4-33: SDS-PAGE (16%)

- 1: Standard di pesi molecolari, 4 μ l
- 2: *Pellet* lisato, 4.5 μ l (di 40 ml)
- 3: Surnatante, 4.5 μ l (di 40 ml)
- 4: *Flowthrough* dalla doppia colonna di affinità, 9 μ l (di 80 ml) IMAC 1a-b
- 5: Lavaggio con imidazolo 10 mM (frazione 1), 8 μ l (di 1 ml) IMAC 1a-b
- 6: Lavaggio con imidazolo 20 mM (frazione 10), 8 μ l (di 1 ml) IMAC 1a-b
- 7: Frazione 19 (150 mM imidazolo) dell'eluato, 8 μ l (di 1 ml) IMAC 1a-b
- 8: Frazione 30 (300 mM imidazolo) dell'eluato, 8 μ l (di 1 ml) IMAC 1a-b
- 9: Campione prima del taglio, 4 μ l (di 4 ml, turno 1 di IMAC 1a-b)
- 10: Campione dopo il taglio con Ulp, 4 μ l (di 4 ml)
- 11: Frazione 6 dell'eluato (0 mM imidazolo), 4 μ l (di 1 ml) IMAC 2 (dominio STAS)
- 12: Frazione 21 dell'eluato (10 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2 turno 1 del campione a-b
- 13: Frazione 29 dell'eluato (20 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2 turno 1 del campione a-b
- 14: Frazione 33 dell'eluato (150 mM imidazolo), 8 μ l (di 1 ml) IMAC 2 turno 1 del campione a-b
- 15: Frazione 40 dell'eluato (500 mM imidazolo), 20 μ l (di 1 ml) IMAC 2 turno 1 del campione a-b

Come detto in precedenza, dal *flowthrough* si è ottenuta altra proteina che è stata unita alla proteina non tagliata durante la prima incubazione con Ulp.

Cromatografia per esclusione dimensionale: tutte le frazioni contenenti la proteina tagliata (comprese quelle ottenute dal campione di proteina sottoposta due volte al taglio o di quella recuperata dal *flowthrough* 1, F1) sono state concentrate e caricate in colonna 16/60 Superdex75 (in 5 turni).

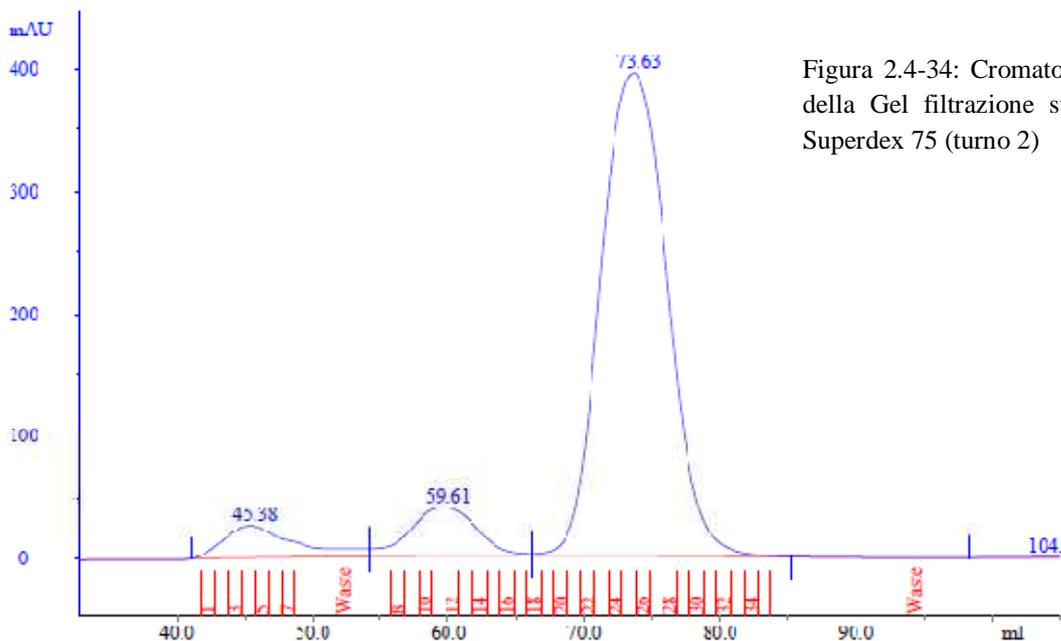


Figura 2.4-34: Cromatogramma della Gel filtrazione su resina Superdex 75 (turno 2)

Stima della resa (picco corrispondente a 73.5 ml):

L'area sotto la curva ($A \cdot V$) del primo turno di cromatografia è $2 \cdot 228 \cdot 10^{-6}$ AU·l, $A_{1g/l}^{280} = 0.758 \text{ l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\epsilon^{280} = 13 \cdot 410 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, l (cammino ottico) è 0.5 cm.

$m = 5.88$ mg. Considerando anche gli altri turni di cromatografia (non mostrati) con aree di $2 \cdot 464 \cdot 10^{-6}$ AU·l, $2 \cdot 010 \cdot 10^{-6}$ AU·l, $1 \cdot 905 \cdot 10^{-6}$ AU·l, e $421 \cdot 10^{-6}$ AU·l, il totale di proteina purificata ammonta a 23.8 mg.

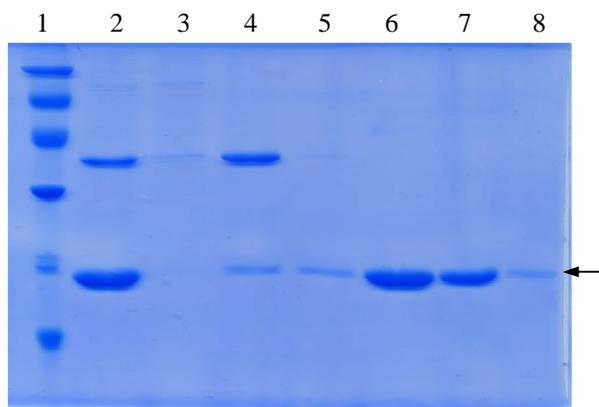


Figura 2.4-35: SDS-PAGE (14%)

1: Standard di pesi molecolari, 4 μ l
 2: Campione caricato in colonna per esclusione dimensionale, 4 μ l
 3, 4, 5, 6, 7, 8: Frazioni 4, 11, 20, 23, 29, 32 dell'eluato, 12 μ l (di 1 ml)

Stima della massa molecolare della proteina purificata

Tabella 2.4-10

Soluto	MM (kDa)	Volumi (ml)		K_{AV}	MM (kDa) stimata dalla retta di regressione
Blu di destrano	~ 2000	V_0	39.8 ± 0.4		
Picco di conducibilità	< 0.5	V_T	111.5 ± 1.1		
CASEY	?	V_e	73.5 ± 0.7	0.4700 ± 0.0130	12.3 ± 3.4

Osservazioni: La stima della massa molecolare della proteina corrispondente al picco del cromatogramma in Figura 2.4-34 (73.5 ml) è abbastanza compatibile con la massa molecolare del dominio in forma monomerica; il parziale disaccordo potrebbe dipendere dalla diversa densità della proteina dovuta alla marcatura isotopica del ^{13}C .

La resa, malgrado la ridotta concentrazione di glucosio presente nella coltura, si è rivelata molto soddisfacente.

3 ESPERIMENTI DI RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE PER L'ASSEGNAZIONE DELLE PROTEINE

3.1 NMR BIDIMENSIONALE

Un esperimento di NMR bidimensionale consta di quattro parti schematizzabili come segue:

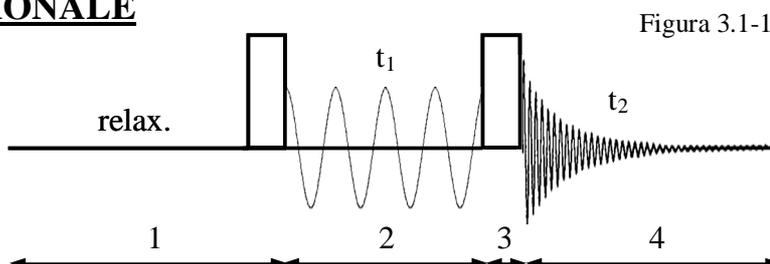


Figura 3.1-1

1. **Preparazione:** durante questo periodo il sistema raggiunge dapprima l'equilibrio termodinamico, e successivamente viene eccitato con una serie di impulsi finalizzati a generare la magnetizzazione desiderata (di un nucleo A) nel piano trasversale.
2. **Evoluzione:** durante il periodo t_1 (il dominio indiretto) la magnetizzazione è lasciata libera di evolvere sotto l'effetto del *chemical shift*^{2§} (di A) e dell'accoppiamento scalare (di A con altri nuclei).
3. **Mescolamento:** durante il periodo t_m si verifica un trasferimento della magnetizzazione (contenente informazioni sul *chemical shift* del nucleo A) ad altri *spin* (B), con modalità dipendenti dal tipo di accoppiamento che viene sfruttato dalla sequenza di impulsi utilizzata. Al termine di questo periodo devono essere create componenti osservabili della magnetizzazione, dette coerenze a singolo quanto.
4. **Acquisizione:** durante il periodo t_2 le coerenze (dello spin di B) evolvono generando il FID (*Free Induction Decay*), un segnale modulato secondo la relazione: $S(t_1, t_2) \propto e^{i(\omega_A t_1)} e^{i(\omega_B t_2)}$, dove ω_A e ω_B corrispondono ai *chemical shift* dei nuclei A e B.

^{2§} *Chemical Shift*: la frequenza di Larmor con cui un nucleo precece in un campo magnetico dipende dall'intensità del campo stesso (\mathbf{B}_0) e dal rapporto giromagnetico (γ), secondo la relazione $\omega_0 = -\gamma \mathbf{B}_0$. Tuttavia, il campo esterno sperimentato da un nucleo può subire una variazione locale determinata dal particolare intorno elettronico. L'entità della variazione è $\delta \mathbf{B} = -\sigma \mathbf{B}_0$, dove σ è una costante di schermo. Pertanto $\mathbf{B}_{\text{locale}} = \mathbf{B}_0 + \delta \mathbf{B}$. La costante di schermo dipende da diversi fattori tra cui:

- Diamagnetismo: ha effetto schermante; la distribuzione elettronica attorno al nucleo viene perturbata dal campo esterno che induce una corrente di carica che a sua volta produce un campo magnetico che si oppone al campo esterno. Questo contributo dipende dalla densità elettronica negli orbitali a simmetria sferica e dalla vicinanza di atomi elettrone-attrattori o elettrone-donatori.
- Paramagnetismo: ha effetto deschermante; dipende dalla distribuzione elettronica in orbitali non sferici.
- Anisotropia magnetica: l'orientazione della molecola rispetto al campo esterno determina l'intensità delle correnti diamagnetiche e paramagnetiche che influenzano la costante di schermo.
- Effetti del solvente: l'esposizione di alcuni atomi al solvente può polarizzarne le densità elettroniche.
- Legami a idrogeno: questi legami diminuiscono la densità elettronica sul protone coinvolto e questo ha un effetto deschermante.

Per individuare la frequenza di risonanza di un nucleo in modo indipendente dall'intensità del campo magnetico esterno, si ricorre al concetto di *chemical shift* δ rispetto a una frequenza di riferimento:

$\delta = [(v - v_{\text{riferimento}})/v_0] \cdot 10^6$, dove v_0 è la frequenza di funzionamento dello spettrometro, e $v_{\text{riferimento}}$ è la frequenza di risonanza di un particolare nucleo di un composto utilizzato come standard.

Per ottenere un esperimento bidimensionale è necessario ripetere la sequenza 1-2-3-4 aumentando progressivamente il tempo t_1 di una quantità costante Δt_1 . Per ciascuno di questi esperimenti, che è detto seriale, si acquisisce il FID separatamente. È così possibile ottenere una matrice bidimensionale di dati del tipo $S(t_1, t_2)$, la cui dimensione in t_2 dipende dal numero di punti di campionamento del FID, mentre la dimensione in t_1 dipende dal numero di incrementi Δt_1 ^{3§}.

Effettuando la trasformata di Fourier lungo la dimensione t_2 si ottiene una serie di spettri monodimensionali in cui l'ampiezza del segnale è modulata secondo t_1 ; il segnale in funzione di t_1 costituisce un interferogramma, che in sostanza è l'analogo del FID nella dimensione t_1 . La trasformazione lungo la dimensione t_1 permette di ottenere uno spettro funzione di due frequenze $S(F_1, F_2)$.

3.1.1 NMR BIDIMENSIONALE ETERONUCLEARE

Gli esperimenti di NMR bidimensionale eteronucleare, grazie all'impiego di particolari sequenze di impulsi, permettono di correlare la magnetizzazione protonica con quella di un eteronucleo accoppiato. In uno spettro NMR eteronucleare un asse individua i *chemical shift* protonici, l'altro asse i *chemical shift* dell'eteronucleo. Ciascun picco individua la correlazione scalare tra una particolare coppia protone-eteronucleo. L'ampia dispersione dei *chemical shift* eteronucleari^{4§} consente di ridurre le sovrapposizioni tra i diversi picchi e questo è particolarmente importante quando si studiano proteine, che presentano un grande numero di segnali.

Inoltre, le costanti di accoppiamento scalare^{5§} dirette 1J sono generalmente molto maggiori delle costanti a lungo raggio nJ con $n \geq 2$, pertanto le coppie protone-eteronu-

^{3§} L'incremento Δt_1 non è scelto arbitrariamente, ma dipende dalla finestra spettrale SW1 nella dimensione F1 (il dominio di frequenze che si desidera esplorare) secondo la relazione di Nyquist: $\Delta t_1 = 1/f_c = 1/[2 \cdot SW1(\text{Hz})]$, che definisce la frequenza di campionamento minima (f_c) necessaria per caratterizzare correttamente una *range* di frequenze spettrali. Segnali che cadono al di fuori della finestra spettrale di un intervallo $\Delta\nu$ non vengono campionate correttamente e compaiono nello spettro ad una frequenza apparente $\nu_{app} = f_c - \nu_{reale}$. Questi picchi sono detti *folded*.

^{4§} L'intervallo di *chemical shift* del ^{13}C per le proteine è 0-190 ppm rispetto allo standard $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$; l'intervallo di *chemical shift* del ^{15}N per le proteine è 0-160 ppm rispetto allo standard CH_3NO_2 .

^{5§} Accoppiamento scalare: l'interazione magnetica è trasmessa attraverso una polarizzazione degli elettroni dei legami chimici e la sua intensità aumenta al diminuire del numero di legami chimici interposti tra i nuclei interagenti. In sostanza, il fatto che un certo *spin* nucleare si trovi in un particolare stato (α o β) fa sì che gli elettroni dell'orbitale di legame non abbiano una distribuzione uniforme, in quanto risulta energeticamente favorita la vicinanza dell'elettrone con *spin* opposto. L'altro elettrone di legame (dotato, per il principio di Pauli, di *spin* opposto) si troverà principalmente vicino all'altro nucleo ed interagirà magneticamente con il suo *spin* nucleare. Il sistema è caratterizzato dall'energia minore quando i due *spin* nucleari hanno uno stato opposto. Quando invece i due *spin* nucleari sono paralleli l'energia del sistema è maggiore. L'intervallo energetico tra lo stato a *spin* paralleli (a più alta energia) e lo stato a *spin* antiparalleli (a più bassa energia) è indicato con 1J (Hz) ed è definito costante di accoppiamento scalare. In presenza di accoppiamento scalare la riga di risonanza di ciascun nucleo subisce *splitting* in due righe. L'accoppiamento tra nuclei separati da due legami si verifica con meccanismo analogo, ma in questo caso lo stato a minore energia è quello in cui gli *spin* sono paralleli. La costante di accoppiamento sarà indicata con 2J . L'energia dell'interazione scalare tra due nuclei è proporzionale al prodotto scalare dei rispettivi momenti magnetici: $E \propto \boldsymbol{\mu}_i \cdot \boldsymbol{\mu}_j = hJ_{ij}m_i m_j$. L'energia dei singoli stati è $E = -h\nu_i m_i - h\nu_j m_j + hJ_{ij}m_i m_j$. Per un sistema di N spin X accoppiati scalarmente la precedente relazione diventa: $E = -\sum_{n=1}^N h\nu_n m_n + \sum_{n=1}^N \sum_{k>n}^N hJ_{nk} m_n m_k$, con un numero di righe pari a $2NI_X + 1$. Le intensità possono essere previste grazie al triangolo di Pascal. Queste regole sono valide per sistemi ad accoppiamento debole (o di primo ordine), per i quali $\Delta\nu/J \geq 10$.

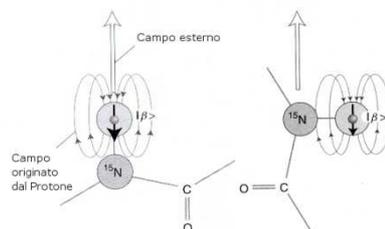
cleo possono essere trattate come sistemi isolati.

Un altro vantaggio delle tecniche eteronucleari è che, data la grande differenza di risonanza, gli impulsi sul protone e sull'eteronucleo possono essere applicati separatamente. Con opportune combinazioni di impulsi e *delay* è possibile rifocalizzare l'evoluzione dei chemical shift e degli accoppiamenti scalari del sistema.

È possibile inoltre effettuare un disaccoppiamento a banda larga sull'eteronucleo durante il periodo di acquisizione t_2 ; tale disaccoppiamento è ottenuto tramite sequenze di impulsi che determinano una veloce inversione di *spin* di una specie mentre si osserva l'altro nucleo. In questo modo è possibile far collapsare gli eventuali multipletti in singoletti, aumentando al contempo la sensibilità e la risoluzione. Senza tale disaccoppiamento, la coppia protone-eteronucleo produrrebbe un doppietto di doppietti in cui ciascuna componente è caratterizzata da diverse proprietà di rilassamento, dovute all'interferenza tra due meccanismi di rilassamento, l'accoppiamento dipolare^{6§} e l'anisotropia^{7§} di *chemical shift* (CSA). Questa interferenza tra meccanismi di rilassamento viene sfruttata dal metodo di acquisizione noto come TROSY (*Transverse Relaxation-Optimized Spectroscopy*)^{8§}.

^{6§} Accoppiamento dipolare: l'interazione dipolare dipende dal fatto che un nucleo con numero quantico magnetico m genera un campo locale $B_{loc} = -\gamma\hbar m \frac{\mu_0}{4\pi R^3} (1 - 3\cos^2\theta)$, dove γ è il rapporto giromagnetico del nucleo, μ_0 la permeabilità magnetica del vuoto, θ l'angolo tra la direzione del campo esterno e la direzione del segmento R congiungente il nucleo al punto in cui è rilevato B_{loc} . Questo fenomeno è rilevante per macromolecole in soluzione che si riorientano lentamente, ma non per le piccole molecole che si riorientano velocemente, perché il termine $(1 - 3\cos^2\theta)$ è mediato a zero.

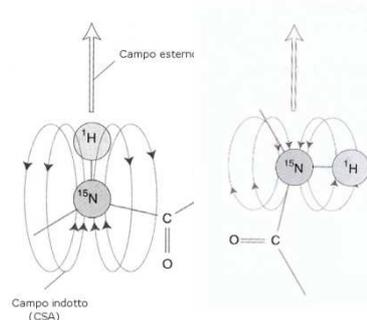
Se si considera il vettore $^1\text{H} - \text{X}$ (dove X può ad esempio essere ^{15}N), quando ^1H ha spin nucleare nello stato β (antiparallelo rispetto al campo esterno) e il vettore internucleare è parallelo al campo, il campo locale presso l'eteronucleo è inferiore al campo esterno. Al contrario, quando il vettore è perpendicolare il campo locale presso l'eteronucleo è maggiore del campo esterno. Il contrario si verifica quando ^1H ha spin nucleare nello stato α (parallelo al campo esterno).



^{7§} CSA ($\Delta\sigma$): il campo magnetico esterno induce delle correnti nelle nubi elettroniche degli atomi (secondo la legge di Lorentz) e questo determina la comparsa di campi magnetici locali (proporzionali al campo esterno) con un effetto sui nuclei vicini. Le costanti di rilassamento associate a tali campi indotti sono proporzionali al quadrato dei campi magnetici locali. Il fenomeno è particolarmente rilevante per gli elettroni degli eteronuclei, più polarizzabili rispetto all'elettrone protonico ($\Delta\sigma_{\text{H}} \approx -16$ ppm, $\Delta\sigma_{\text{N}} \approx -160$ ppm).

L'effetto dei campi indotti dipende dall'orientazione del vettore $^1\text{H} - \text{X}$ rispetto al campo esterno.

Se questi sono paralleli, il campo indotto si somma a quello esterno nei pressi di un nucleo vicino. Opposto è il caso in cui il vettore internucleare è perpendicolare al campo esterno.



^{8§} Il movimento correlato di un nucleo e di un suo partner dipolarmente accoppiato determina un'interferenza (non casuale) tra le due fonti di rilassamento (*cross-correlation*), a seconda degli stati (α o β) dei due spin accoppiati. Quando, ad esempio, il protone ha lo *spin* nello stato β , i contributi di accoppiamento dipolare e anisotropia di *chemical shift* hanno sempre segno opposto, indipendentemente dall'orientazione e il campo locale oscillante (e, quindi, la velocità del rilassamento) è ridotto dall'interferenza distruttiva tra i due fenomeni. Attraverso opportuni cicli di fase, è possibile selezionare esclusivamente le transizioni tra livelli energetici di un certo spin, quando lo spin accoppiato si trova nello stato β (il protone durante l'evoluzione dell'eteronucleo in t_1 e l'eteronucleo durante l'evoluzione protonica in t_2).

Il limite principale della spettroscopia NMR eteronucleare è la bassa sensibilità determinata dalla scarsa abbondanza naturale di eteronuclei come ^{13}C o ^{15}N e dal loro basso rapporto giromagnetico. La sensibilità di un generico esperimento NMR può essere espressa attraverso la seguente relazione: $\frac{S}{N} \propto \frac{n}{T} B_0^{3/2} \gamma_{\text{ecc}} \gamma_{\text{oss}}^{3/2} T_2 (\text{NS})^{1/2}$, dove S/N è il rapporto segnale-rumore, n è il numero di spin attivi all’NMR coinvolti nell’esperimento, T è la temperatura, B_0 l’intensità del campo magnetico statico, γ_{ecc} e γ_{oss} i rapporti giromagnetici del nucleo eccitato e del nucleo osservato.

Utilizzando campioni arricchiti con l’isotopo desiderato e sequenze di impulsi tali da eccitare e osservare il nucleo con il maggior rapporto giromagnetico, è possibile ottenere un notevole guadagno in sensibilità. La sensibilità di ^1H è circa 32 volte maggiore rispetto al ^{13}C (ipotizzando un arricchimento del 100%) e 300 volte rispetto a ^{15}N . Pertanto, generalmente si utilizzano sequenze che trasferiscono l’intensa polarizzazione della magnetizzazione degli *spin* nucleari protonici allo *spin* dell’eteronucleo vicino, e in seguito la trasferiscono nuovamente al protone per la registrazione del segnale. Gli esperimenti utilizzati in questa tesi, salvo un caso, sono tutti di questo tipo.

Un altro limite della spettroscopia bidimensionale eteronucleare è che la dimensione indiretta F1 ha una risoluzione piuttosto bassa a causa dell’ampia finestra spettrale dell’eteronucleo e soprattutto a causa del numero contenuto di esperimenti con incrementi in t_1 che è possibile raccogliere in tempi ragionevoli.

L’esperimento eteronucleare più rilevante nello studio delle proteine è l’HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*); di particolare importanza è il ^{15}N -HSQC dal momento che il ridotto numero di gruppi N – H consente di contenere il numero di segnali e ridurre sensibilmente le sovrapposizioni tra diversi amminoacidi. Anche il ^{13}C -HSQC trova tuttavia alcune applicazioni, come nell’assegnazione delle catene laterali aromatiche (quando non siano troppo numerose). In questa sede non saranno affrontate nel dettaglio le diverse sequenze di impulsi che producono i trasferimenti della polarizzazione tra nuclei, ma si preferirà offrire un’interpretazione visiva degli esperimenti menzionati, in modo da evidenziare le connessioni tra i nuclei interessati.

Il ^{15}N -HSQC permette di eccitare le risonanze protoniche e trasferire la polarizzazione agli atomi di azoto direttamente connessi; quindi, la magnetizzazione evolve sotto l’effetto del *chemical shift* dell’azoto (durante t_1) e viene nuovamente trasferita sul protone per l’acquisizione del segnale (per aumentare la sensibilità). Lo spettro si presenta come un piano avente per dimensioni i *chemical shift* degli atomi ^{15}N (F1) e dei ^1H (F2) ad essi legati, espressi in parti per milione (ppm). Ciascun picco di coordinate (^1H , ^{15}N) individua le frequenze corrispondenti alle transizioni $|\alpha\rangle \leftrightarrow |\beta\rangle$ tra livelli energetici, in accordo con la legge $\Delta E = -\gamma\hbar\Delta m B_0 = \hbar\omega_0$ ^{9§}.

In uno spettro ^{15}N -HSQC, in sostanza, possono essere individuati i gruppi ammidici dei legami peptidici costituenti la catena principale (ad eccezione ovviamente

^{9§} Un nucleo con numero quantico di spin $I = 1/2$ ha due soli orientazioni possibili per il suo momento magnetico rispetto al campo magnetico esterno B_0 . Nello stato $|\alpha\rangle$ i due vettori sono paralleli, nello stato $|\beta\rangle$ antiparalleli; ω_0 è detta frequenza di precessione o anche frequenza di Larmor (anche se da un punto di vista dimensionale si tratta di una velocità angolare, espressa in radianti al secondo) e rappresenta la velocità di precessione del momento magnetico nucleare intorno al campo magnetico esterno. m è il numero quantico magnetico e può assumere $2I + 1$ valori (per $I = 1/2$, $m = \pm 1/2$).

del legame tra la prolina e il residuo che la precede), e i gruppi ammidici delle catene laterali di asparagina e glutammina (che si presentano come coppie di frequenze protoniche corrispondenti ad una stessa frequenza nella dimensione dell'azoto, quello a cui sono entrambi legati). I segnali originati dai gruppi NH_2 possono essere eliminati utilizzando una variante dell'esperimento, conosciuto come *refocused-HSQC*, impostando opportunamente i delay ($\tau = 1/2J$) caratteristici dell'esperimento.

Tabella 3.1-1: Chemical Shifts dei gruppi NH negli amminoacidi.

amminoacido	gruppo	^{15}N	$^1\text{H}_\text{N}$
alanina	NH	123.16 ± 14.72	8.19 ± 2.44
arginina	NH	120.73 ± 15.36	8.24 ± 2.40
	$\text{N}_\epsilon\text{H}_\epsilon$	92.64 ± 59.40	7.34 ± 2.24
	$\text{N}_{\eta 1}\text{H}_{\eta 1,1;1,2}$	73.38 ± 24.96	$6.82 \pm 1.60, 6.76 \pm 1.40$
	$\text{N}_{\eta 2}\text{H}_{\eta 2,1;2,2}$	73.88 ± 26.92	$6.80 \pm 1.64, 6.75 \pm 1.56$
asparagina	NH	119.04 ± 16.88	8.36 ± 2.52
	$\text{N}_\delta\text{H}_{\delta 1,2}$	112.87 ± 9.96	$7.32 \pm 2.04, 7.16 \pm 2.04$
aspartato	NH	120.79 ± 16.12	8.33 ± 2.28
cisteina	NH	119.86 ± 18.56	8.41 ± 2.68
glutammato	NH	120.72 ± 14.76	8.34 ± 2.44
glutammina	NH	119.82 ± 15.12	8.22 ± 2.40
	$\text{N}_\epsilon\text{H}_{\epsilon 1,2}$	111.87 ± 8.04	$7.20 \pm 1.92, 7.04 \pm 1.88$
glicina	NH	109.71 ± 16.72	8.33 ± 2.76
istidina	NH	119.40 ± 17.16	8.25 ± 2.76
	$\text{N}_{\delta 1}\text{H}_{\delta 1}$	193.42 ± 135.96	8.97 ± 11.64
	$\text{N}_{\epsilon 2}\text{H}_{\epsilon 2}$	175.54 ± 83.68	9.95 ± 10.96
isoleucina	NH	121.56 ± 17.72	8.28 ± 2.80
leucina	NH	121.81 ± 16.00	8.22 ± 2.60
lisina	NH	121.07 ± 15.80	8.20 ± 2.48
	$\text{N}_\epsilon\text{H}_\epsilon$	70.05 ± 191.04	7.50 ± 1.68
metionina	NH	120.04 ± 14.64	8.25 ± 2.40
fenilalanina	NH	120.70 ± 17.04	8.39 ± 2.88
serina	NH	116.25 ± 15.16	8.29 ± 2.40
treonina	NH	115.61 ± 19.88	8.26 ± 2.48
triptofano	NH	121.62 ± 17.92	8.29 ± 3.24
	$\text{N}_{\epsilon 1}\text{H}_{\epsilon 1}$	129.50 ± 9.48	10.11 ± 2.28
tirosina	NH	120.80 ± 18.08	8.34 ± 3.00
valina	NH	121.10 ± 19.16	8.29 ± 2.80

Scegliendo opportunamente le finestre spettrali, è possibile includere anche i segnali del $\text{N}_{\epsilon 1}\text{H}_{\epsilon 1}$ del gruppo indolico e del $\text{N}_\epsilon\text{H}_\epsilon$ del gruppo guanidinio nelle catene laterali di triptofano e arginina. Analoga considerazione può essere fatta per gli altri gruppi NH delle catene laterali di arginina, lisina e istidina, tuttavia, in questi casi, diventa particolarmente critico il fenomeno di scambio chimico.

In effetti, in ambiente acquoso, i protoni di tutti i gruppi NH (come anche i gruppi OH e SH), scambiano con i protoni del solvente, ed il processo è catalizzato sia dal pH basico, sia dal pH acido. A pH fisiologico il fenomeno è piuttosto rilevante ed è spesso conveniente condurre gli esperimenti NMR a pH inferiori, al fine di

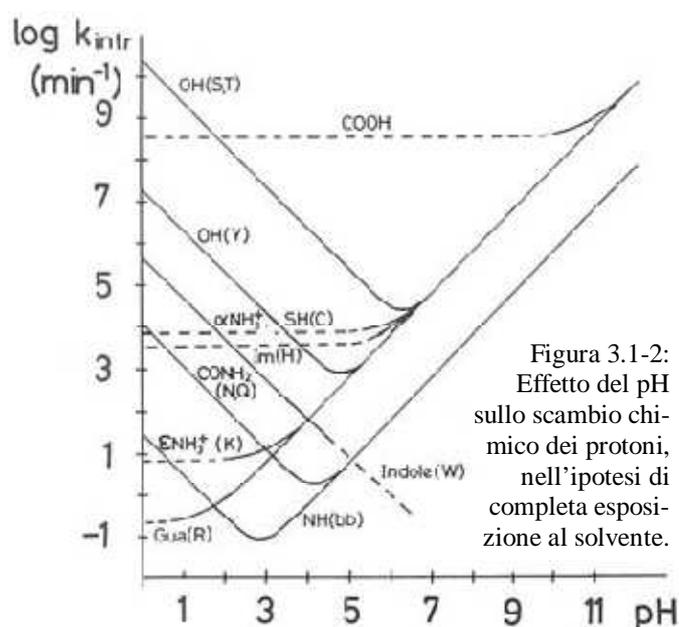


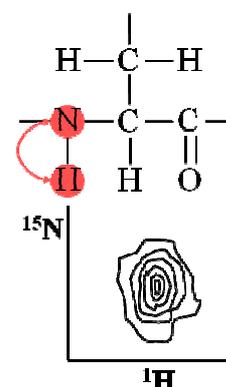
Figura 3.1-2: Effetto del pH sullo scambio chimico dei protoni, nell'ipotesi di completa esposizione al solvente.

migliorarne la sensibilità. Se un protone di un certo gruppo scambia rapidamente con il solvente, il suo segnale subisce uno spostamento della frequenza di risonanza; la frequenza osservata si trova tra frequenza originaria del protone e la frequenza dei protoni del solvente, in una posizione ponderalmente mediata sulla base del tempo trascorso dal protone nei due diversi stati. A causa dell'elevata concentrazione relativa del solvente (55.5 M di H₂O : 1 mM proteina), il segnale del protone che scambia con i protoni del solvente (in determinate condizioni) può scomparire sotto i loro segnali^{10§}. Come si può vedere nella precedente figura, i gruppi NH amminici scambiano fino a 100 volte più rapidamente rispetto ai gruppi ammidici. Se, in aggiunta, si considera che molti gruppi ammidici possono avere una ridotta esposizione al solvente (amminoacidi del *core*) o partecipare alla stabilizzazione di strutture secondarie, non stupisce che i segnali dei gruppi amminici (alcuni dei quali carichi e quindi tendenzialmente idrofili) siano generalmente molto più deboli, o possano non vedersi affatto.

Figura 3.1-3: Rappresentazione schematica degli atomi della catena principale (*backbone*) coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento ¹⁵N-HSQC: ¹H_N → ¹⁵N (t₁) → ¹H_N (t₂)

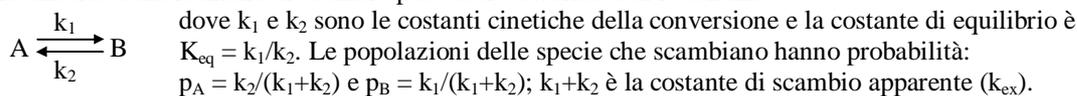
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ¹H a ¹⁵N per accoppiamento scalare ¹J_{HN}
- evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di N
- trasferimento inverso della polarizzazione
- acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici, con disaccoppiamento dell'eteronucleo (o in assenza di



^{10§} Lo scambio tra due (o più) ambienti chimici può avere degli effetti drammatici sull'aspetto dei segnali delle specie coinvolte. In generale lo scambio chimico influenza il *chemical shift* (a causa delle differenze nell'ambiente chimico) e le proprietà di rilassamento della magnetizzazione dello *spin* che scambia.

La cinetica della reazione di scambio può essere descritta con lo schema:

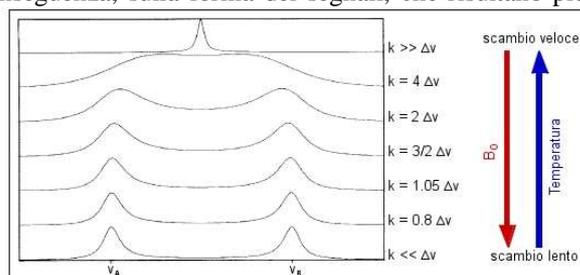


Se i due stati differiscono nella loro frequenza di risonanza ($\Delta\omega = \omega_A - \omega_B = 2\pi\Delta\nu$), la risposta del sistema allo scambio chimico dipende dal rapporto $k_{ex}/\Delta\omega$.

- In regime di scambio veloce ($k_{ex} \gg \Delta\omega/2\pi$) si osserva un singolo segnale di risonanza mediato in base alle frequenze dei singoli stati e della loro probabilità: $\omega_{oss} = p_A\omega_A + p_B\omega_B$. Ciò accade perché lo scambio altera la frequenza di precessione dello *spin* (che scambia tra lo stato A e lo stato B) durante i periodi di evoluzione della magnetizzazione. Essendo il processo di scambio rapido, durante tali periodi esso si verifica molte volte, e questo produce una frequenza di precessione osservata che differisce dai valori originali dei due stati.

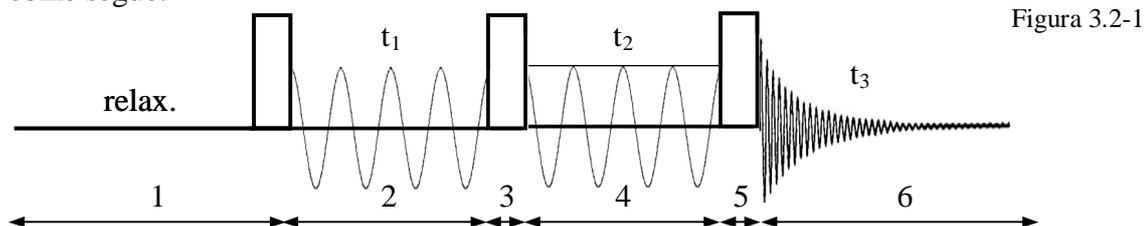
- In regime di scambio lento ($k_{ex} \ll \Delta\omega/2\pi$) non si osserva la mediazione dei *chemical shift*, ma si ottengono due segnali aventi frequenze di risonanza ω_A e ω_B e intensità proporzionali alle popolazioni relative degli stati. L'effetto dello scambio durante i periodi di evoluzione, tuttavia, contribuisce al defasamento di parte della magnetizzazione (quella associata ai pochi *spin* che in un certo istante cambiano ambiente chimico). Questo fenomeno si riflette sulla rapidità con cui il segnale decade (la magnetizzazione rilassa più rapidamente) e, di conseguenza, sulla forma dei segnali, che risultano più allargati.

- In regimi di scambio intermedio ($k_{ex} \approx \Delta\omega/2\pi$), l'effetto di defasamento della magnetizzazione (ovvero la perdita di coerenza delle magnetizzazioni dei singoli *spin* costituenti l'*ensemble*) è molto rilevante. Il rilassamento della magnetizzazione diventa molto rapido (al punto che questa può non essere rilevabile alla fine della sequenza di impulsi costituenti l'esperimento) ed i segnali possono arrivare ad allargarsi fino a non essere distinguibili dalla linea di base (*line broadening*).



3.2 NMR TRIDIMENSIONALE

Un esperimento di NMR tridimensionale consta di quattro parti schematizzabili come segue:



1. **Preparazione:** come negli esperimenti bidimensionali, anche in quelli tridimensionali questo periodo consente al sistema di raggiungere l'equilibrio termodinamico; viene quindi generata la magnetizzazione trasversale desiderata (del nucleo A).
2. **Evoluzione 1:** durante il periodo t_1 la magnetizzazione evolve sotto l'effetto del *chemical shift* (di A) e dell'accoppiamento scalare (di A con altri nuclei).
3. **Mescolamento 1:** durante il periodo t_{m1} si verifica un trasferimento della magnetizzazione (contenente informazioni sul *chemical shift* del nucleo A) ad uno *spin* accoppiato (B).
4. **Evoluzione 2:** durante il periodo t_2 (il secondo dominio indiretto) la magnetizzazione è nuovamente lasciata libera di evolvere sotto l'effetto del *chemical shift* (di B) e dell'accoppiamento scalare (di B con altri nuclei).
5. **Mescolamento 2:** durante il periodo t_{m2} si verifica un trasferimento della magnetizzazione (contenente informazioni sul *chemical shift* dei nuclei A e B) ad un altro *spin* (C).
6. **Acquisizione:** durante il periodo t_3 le coerenze (dello spin di C) evolvono generando il FID, che in questo caso è modulato secondo la relazione:

$S(t_1, t_2) \propto e^{i(\omega_A t_1)} e^{i(\omega_B t_2)} e^{i(\omega_C t_3)}$, dove ω_A , ω_B e ω_C corrispondono ai *chemical shift* dei nuclei A, B e C.

Per ottenere un esperimento tridimensionale è necessario ripetere la sequenza 1-2-3-4-5-6 aumentando progressivamente il tempo t_1 di una quantità costante Δt_1 , e, per ciascun incremento di t_1 , bisogna aumentare progressivamente il tempo t_2 di un numero $t_2/\Delta t_2$ di incrementi. In sostanza, si tratta di acquisire tanti spettri bidimensionali (t_2, t_3) quanti sono gli incrementi stabiliti per t_1 . Nella matrice tridimensionale $S(t_1, t_2, t_3)$ la dimensione in t_3 dipende dal numero di punti di campionamento del FID, mentre le dimensioni in t_1 e t_2 dipendono dal numero di incrementi Δt_1 e Δt_2 . La trasformazione lungo le tre dimensioni permette di ottenere uno spettro funzione di tre frequenze $S(F_1, F_2, F_3)$.

3.2.1 ESPERIMENTI TRIDIMENSIONALI IN TRIPLA RISONANZA

Gli esperimenti tridimensionali in tripla risonanza coinvolgono un secondo eteronucleo, che risuona a frequenze diverse dagli altri nuclei esplorati. Nell'assegnazione delle proteine, i nuclei coinvolti sono ^{15}N , ^{13}C e ^1H . Esperimenti di

questo tipo sfruttano il significativo accoppiamento scalare che esiste tra nuclei adiacenti, sia tra protoni ed eteronuclei, sia tra eteronuclei stessi. Inoltre, tranne il caso della costante di accoppiamento a due legami ${}^2J_{NC\alpha}$, solo le costanti dirette (1J) sono significativamente elevate da consentire trasferimenti di polarizzazione in tempi (specifici *delay* tra gli impulsi delle sequenze) sufficientemente brevi. Come si può vedere nella figura accanto, tali costanti sono tra loro piuttosto diverse, e questo consente di scegliere in modo specifico i *delay* per le evoluzioni sotto l'effetto dei diversi accoppiamenti scalari. Infine, la differenza di

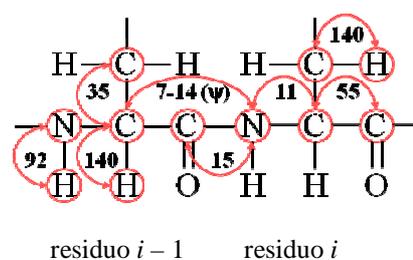
chemical shift tra i C_O e i $C_{\alpha\beta\gamma}$ è tale da consentire di applicare impulsi selettivi per gli uni o per gli altri. Queste ultime proprietà sono alla base di tutti gli esperimenti pensati per l'assegnazione delle proteine. Infatti, la possibilità di selezionare in modo specifico dei trasferimenti della polarizzazione *step by step*, permette di selezionare solo alcuni tipi di connessione per ciascun esperimento, riducendo quindi le fonti di ambiguità.

L'utilizzo combinato di esperimenti che forniscono informazioni in parte diverse, in parte ridondanti, consente di stabilire le connessioni tra specifici nuclei e, in ultima analisi, la sequenzialità tra gli amminoacidi.

L'assegnazione della catena principale (*backbone*) è ottenuta correlando i *chemical shift* del gruppo ammidico (N, H_N) di un sistema di *spin*^{11§} con gli atomi del backbone (in particolare C_O e C_α) e della catena laterale (C_β) *intra-residuo* (residuo *i*) e *inter-residuo* (residuo *i* - 1). Iniziando quindi da un certo residuo Z_i , di cui si conoscano le risonanze $C_{O_{i-1}}$ e/o $C_{\alpha_{i-1}}$ e/o $C_{\beta_{i-1}}$ va ricercato il residuo Y_k tale che siano realizzate le relazioni $C_{O_{i-1}} = C_{O_k}$, $C_{\alpha_{i-1}} = C_{\alpha_k}$ e $C_{\beta_{i-1}} = C_{\beta_k}$. Qualora siano note le risonanze $C_{O_{k-1}}$ e/o $C_{\alpha_{k-1}}$ e/o $C_{\beta_{k-1}}$ si può ricercare un residuo X_l tale che siano realizzate le relazioni $C_{O_{k-1}} = C_{O_l}$, $C_{\alpha_{k-1}} = C_{\alpha_l}$ e $C_{\beta_{k-1}} = C_{\beta_l}$ e così via. L'utilizzo di più atomi (C_O , C_α , C_β , ma, se necessario, anche H_α e H_β) consente di ridurre il numero delle possibili ambiguità e di individuare in sequenza i residui connessi tra loro. Nella pratica, la mancanza di alcuni segnali, dovuta ad ambiguità irrisolvibili, o la presenza delle proline (prive di NH), non consentono di completare la sequenza, ma si riescono ad ottenere solo frammenti di lunghezza variabile.

Per attribuire ad un certo frammento la sua effettiva sequenza amminoacidica, bisogna confrontare i *chemical shift* che si hanno a disposizione nel frammento con quelli di riferimento per gli amminoacidi (determinati su base statistica). È così

Figura 3.2-2: Costanti di accoppiamento eteronucleari nelle proteine. Le costanti sono espresse in Hz e sono indicate a margine delle frecce che connettono i nuclei accoppiati. Tutte queste costanti sono dirette 1J , tranne quella tra N_i e $C_{\alpha_{i-1}}$, che è a due legami, ${}^2J_{NC\alpha}$. Le 1J sono indipendenti dalla struttura secondaria, al contrario, ${}^2J_{NC\alpha}$ dipende dall'angolo ψ .



^{11§} In 1H -NMR, per sistema di spin si intende l'insieme di protoni che possono essere messi in relazione tra loro grazie agli accoppiamenti scalari 2J e 3J . Risultano pertanto esclusi gli atomi distanti 4 o più legami, in quanto le 4J sono generalmente troppo piccole per produrre effetti osservabili. Nel contesto della 3D-NMR eteronucleare, l'accezione di sistema di spin può anche essere estesa in quanto, sfruttando opportuni esperimenti, è possibile mettere in relazione molte più risonanze tra di loro (ad esempio trovando connessioni con le catene laterali aromatiche).

possibile individuare sequenze di amminoacidi nella proteina che siano compatibili con i *chemical shift* del frammento.

L'individuazione di un particolare tipo di amminoacido è fortemente aiutata dall'estensione delle connessioni dalla catena principale alle catene laterali. La combinazione di informazioni su atomi di carbonio e protoni è infatti preziosa per conferire robustezza all'assegnazione di un certo tipo di residuo. Quando si conoscono i tipi di residuo tra loro adiacenti nel frammento, dovrebbe essere possibile assegnare in modo abbastanza inequivocabile la sequenza amminoacidica e la sua posizione all'interno della proteina (a meno di ripetizioni).

È stato sviluppato un gran numero di esperimenti in tripla risonanza per l'assegnazione del *backbone* e delle catene laterali. La nomenclatura corrente per questi esperimenti prevede che siano elencati i nuclei nell'ordine in cui avviene la modulazione tramite *chemical shift*. Quando la magnetizzazione passa attraverso un nucleo ma non conserva traccia del *chemical shift* del suo *spin*, il nucleo è indicato tra parentesi. Come ultima considerazione, quando il nome di un esperimento inizia con HN..., generalmente questo implica che l'esperimento è 'out and back', ovvero che inizia con l'eccitazione della magnetizzazione dello *spin* di H_N e che su tale nucleo è infine trasferita prima dell'acquisizione. Verranno qui di seguito esaminati brevemente gli esperimenti utilizzati nella tesi.

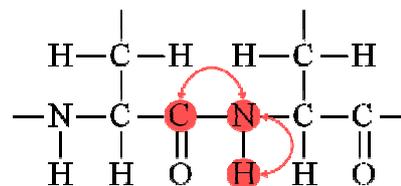
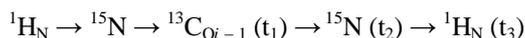
1. ESPERIMENTI PER L'ASSEGNAZIONE DELLA CATENA PRINCIPALE

a) ASSEGNAZIONE DEI C CARBONILICI (C_O)

¹³C, ¹⁵N, ¹H-HNCO

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ¹⁵N-¹H_N di un residuo (*i*) con il carbonio ¹³C_O dell'amminoacido precedente (*i* - 1).

Figura 3.2-3: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HNCO:



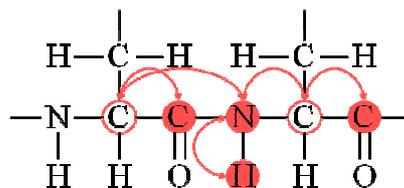
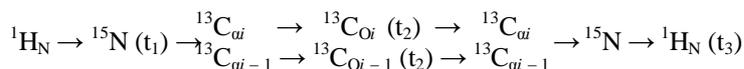
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ¹H a ¹⁵N per accoppiamento scalare ¹J_{HN}
- evoluzione della magnetizzazione di ¹⁵N sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ¹³C_{O_{i-1}} (¹J_{NC_O}) e rifocalizzazione di ¹J_{HN} e trasferimento della polarizzazione da ¹⁵N a ¹³C_{O_{i-1}}
- evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di ¹³C_{O_{i-1}} (con rifocalizzazione dell'accoppiamento scalare ¹J_{NC_O} e ¹J_{C_Oα})
- trasferimento della polarizzazione da ¹³C_{O_{i-1}} a ¹⁵N per accoppiamento scalare ¹J_{NC_O}
- evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di ¹⁵N (sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare ¹J_{HN} e con rifocalizzazione di ¹J_{NC_O})
- trasferimento della polarizzazione a ¹H per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

¹⁵N, ¹³C, ¹H-HN(CA)CO

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ¹⁵N-¹H_N di un residuo (*i*) con il carbonio ¹³C_O dell'amminoacido stesso (*i*) e dell'amminoacido precedente (*i* - 1).

Figura 3.2-4: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HN(CA)CO:



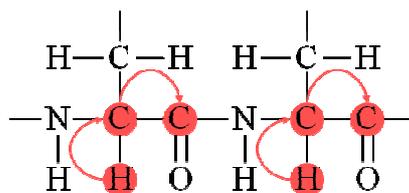
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ${}^1\text{H}$ a ${}^{15}\text{N}$ per accoppiamento scalare ${}^1J_{\text{HN}}$
- evoluzione della magnetizzazione di ${}^{15}\text{N}$ sotto l'effetto del *chemical shift* di ${}^{15}\text{N}$
- evoluzione della magnetizzazione di ${}^{15}\text{N}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$ (${}^{1,2}J_{\text{NC}\alpha}$) e trasferimento della polarizzazione a ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione di ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ${}^{13}\text{C}_{\text{O}, i-1}$ (${}^1J_{\text{C}\alpha\text{C}\text{O}}$) e trasferimento della polarizzazione a ${}^{13}\text{C}_{\text{O}, i-1}$
- evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di ${}^{13}\text{C}_{\text{O}, i-1}$
- trasferimento inverso della polarizzazione a ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$, a ${}^{15}\text{N}$ e poi ${}^1\text{H}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

${}^1\text{H}$, ${}^{13}\text{C}$ -HCACO con acquisizione sul carbonio C_O (*carbon-detected*)

Questo esperimento consente di mettere in relazione tra loro i nuclei ${}^1\text{H}_\alpha$, ${}^{13}\text{C}_\alpha$ e ${}^{13}\text{C}_\text{O}$ di uno stesso residuo (i). Non richiede soppressione del segnale dell'acqua, e questo facilita l'individuazione delle risonanze degli ${}^1\text{H}_\alpha$, che possono frequentemente sovrapporsi al segnale del solvente.

Figura 3.2-5: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HCACO:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

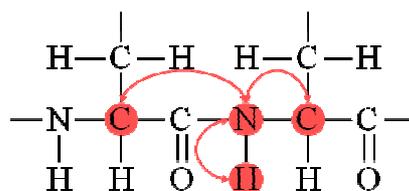
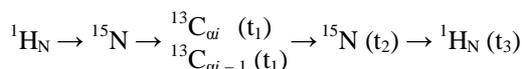
- eccitazione delle frequenze protoniche
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ${}^1\text{H}$ e dell'accoppiamento scalare con ${}^{13}\text{C}_\alpha$ (${}^1J_{\text{H}\text{C}\alpha}$)
- trasferimento della polarizzazione da ${}^1\text{H}$ a ${}^{13}\text{C}_\alpha$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ${}^{13}\text{C}_\alpha$ e dell'accoppiamento scalare con ${}^{13}\text{C}_\text{O}$ (${}^1J_{\text{C}\alpha\text{C}\text{O}}$) e rifocalizzazione di ${}^1J_{\text{H}\text{C}\alpha}$
- trasferimento della polarizzazione da ${}^{13}\text{C}_\alpha$ a ${}^{13}\text{C}_\text{O}$ (e rifocalizzazione di ${}^1J_{\text{C}\alpha\text{C}\text{O}}$)
- acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* dei ${}^{13}\text{C}_\text{O}$

b) ASSEGNAZIONE DI C_α E C_β

${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$, ${}^1\text{H}$ -HNCA

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ${}^{15}\text{N}$ - ${}^1\text{H}_\text{N}$ di un residuo (i) con il carbonio ${}^{13}\text{C}_\alpha$ dell'amminoacido stesso (i) e dell'amminoacido precedente ($i-1$).

Figura 3.2-6: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HNCA:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

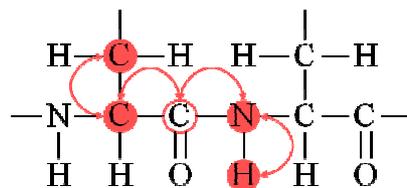
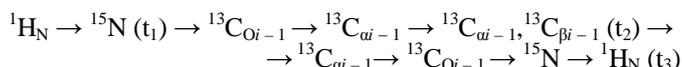
- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ${}^1\text{H}$ a ${}^{15}\text{N}$ per accoppiamento scalare ${}^1J_{\text{HN}}$
- evoluzione della magnetizzazione di ${}^{15}\text{N}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$ (${}^{1,2}J_{\text{NC}\alpha}$) e trasferimento della polarizzazione a ${}^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$ (e rifocalizzazione di ${}^1J_{\text{HN}}$)

- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di $^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$
- trasferimento inverso della polarizzazione a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N (e sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{\text{HN}}$ e rifocalizzazione di $^{1,2}J_{\text{NC}\alpha}$)
- trasferimento della polarizzazione a ^1H per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H-HN(CO)CACB}$

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo $^{15}\text{N}-^1\text{H}_\text{N}$ di un residuo (i) con i carboni $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ dell'amminoacido precedente ($i-1$).

Figura 3.2-7: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HN(CO)CACB:



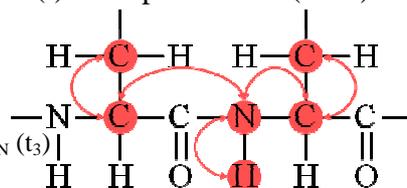
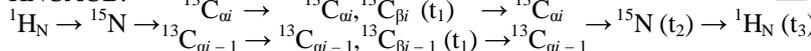
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ^1H a ^{15}N per accoppiamento scalare $^1J_{\text{HN}}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione di ^{15}N sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}\text{C}_{\text{O}i-1}$ ($^1J_{\text{NC}_\text{O}}$) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}\text{C}_{\text{O}i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}\text{C}_{\text{O}i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ ($^1J_{\text{C}_\alpha\text{C}_\text{O}}$) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$
- trasferimento della polarizzazione da $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ a $^{13}\text{C}_{\beta i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ e $^{13}\text{C}_{\beta i-1}$
- trasferimento inverso della polarizzazione a $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$, e poi a ^{15}N
- trasferimento della polarizzazione a ^1H per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H-HNCACB}$

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo $^{15}\text{N}-^1\text{H}_\text{N}$ di un residuo (i) con i carboni $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$ dell'amminoacido stesso (i) e del precedente ($i-1$).

Figura 3.2-8: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HNCACB:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- trasferimento della polarizzazione da ^1H a ^{15}N per accoppiamento scalare $^1J_{\text{HN}}$
- trasferimento della polarizzazione da ^{15}N a $^{13}\text{C}_\alpha$ per accoppiamento scalare $^{1,2}J_{\text{NC}_\alpha}$
- trasferimento della polarizzazione da ^{15}N a $^{13}\text{C}_\alpha$ per accoppiamento scalare $^{1,2}J_{\text{NC}_\alpha}$
- trasferimento della polarizzazione da $^{13}\text{C}_\alpha$ a $^{13}\text{C}_\beta$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di $^{13}\text{C}_\alpha$ e $^{13}\text{C}_\beta$
- trasferimento inverso della polarizzazione a $^{13}\text{C}_{\alpha, i-1}$, e poi a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N
- trasferimento della polarizzazione a ^1H per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

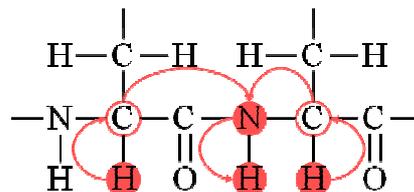
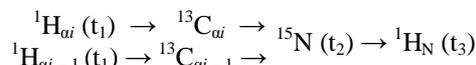
c) ASSEGNAZIONE DI H_α E H_β

$^{15}\text{N}, ^1\text{H-H(CA)NH}$

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo $^{15}\text{N}-^1\text{H}_\text{N}$ di un residuo (i) con il protone $^1\text{H}_\alpha$ dell'amminoacido stesso (i) e dell'amminoacido

precedente ($i - 1$). L'eccitazione dei nuclei H_α subisce una certa interferenza dei segnali del solvente, ma il trasferimento 'out and stay' risulta vantaggioso per i residui che subiscono un rilassamento della magnetizzazione più rapido.

Figura 3.2-9: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento H(CA)NH:



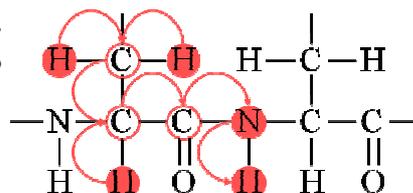
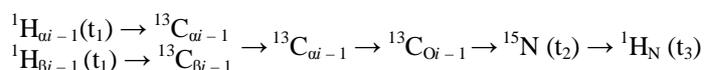
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di 1H
- evoluzione della magnetizzazione di 1H sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}C_{\alpha, i-1}$ ($^1J_{HC\alpha}$)
- trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_{\alpha, i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}C_{\alpha, i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{15}N ($^{1,2}J_{NC\alpha}$)
- trasferimento della polarizzazione da $^{13}C_{\alpha, i-1}$ a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N (e sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{HN}$)
- trasferimento della polarizzazione a 1H_N per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

$^{15}N, ^1H$ -HBHA(CBCACO)NH

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ^{15}N - 1H_N di un residuo (i) con i protoni $^1H_\alpha$ e $^1H_\beta$ dell'amminoacido precedente ($i - 1$).

Figura 3.2-10: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento HBHA(CBCACO)NH:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche $^1H_{\alpha\beta}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di 1H
- evoluzione della magnetizzazione di $^1H_{\alpha\beta i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{13}C ($^1J_{HC}$)
- trasferimento della polarizzazione a ^{13}C
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}C_\beta$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}C_\alpha$ ($^1J_{C\beta C\alpha}$) e trasferimento della polarizzazione da $^{13}C_\beta$ a $^{13}C_\alpha$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}C_{\alpha i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}C_O$ ($^1J_{C\alpha C_O}$) e trasferimento della polarizzazione da $^{13}C_{\alpha i-1}$ a $^{13}C_{O i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}C_{O i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{15}N ($^1J_{C_O N}$) e trasferimento della polarizzazione da $^{13}C_{O i-1}$ a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N
- trasferimento della polarizzazione a 1H_N per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

Tabella 3.2-1: *Chemical Shifts* dei nuclei C_O , C_α , H_α , C_β e H_β negli amminoacidi.

amminoacido	$^{13}C_O$	$^{13}C_\alpha$	$^1H_\alpha$	$^{13}C_\beta$	$^1H_\beta$	
alanina	177.78 ± 8.92	53.18 ± 8.12	4.26 ± 1.76	18.94 ± 7.52	1.37 ± 1.00	
arginina	176.48 ± 8.36	56.84 ± 9.56	4.29 ± 1.80	30.61 ± 7.32	1.80 ± 1.08	1.78 ± 1.12
asparagina	175.34 ± 7.36	53.50 ± 7.88	4.68 ± 1.48	38.63 ± 7.08	2.81 ± 1.32	2.77 ± 1.36
aspartato	176.42 ± 7.20	54.62 ± 8.36	4.61 ± 1.28	40.82 ± 6.64	2.73 ± 1.12	2.68 ± 1.16
cisteina	174.76 ± 8.20	57.56 ± 13.80	4.70 ± 2.24	34.30 ± 26.72	2.96 ± 1.80	2.93 ± 1.96
glutammato	176.99 ± 8.20	57.44 ± 8.56	4.25 ± 1.68	30.01 ± 7.20	2.04 ± 0.88	2.02 ± 0.88
glutamina	176.34 ± 7.96	56.55 ± 8.76	4.28 ± 1.76	29.18 ± 7.68	2.05 ± 1.04	2.03 ± 1.16
glicina	174.02 ± 7.60	45.35 ± 5.40	3.96 ± 1.52 3.91 ± 1.52			
istidina	175.26 ± 8.28	56.46 ± 10.0	4.62 ± 1.88	30.22 ± 8.64	3.10 ± 1.56	3.08 ± 1.56
isoleucina	175.88 ± 7.96	61.58 ± 11.12	4.19 ± 2.24	38.58 ± 8.32	1.80 ± 1.20	
leucina	176.98 ± 8.28	55.63 ± 8.80	4.32 ± 1.88	42.26 ± 7.64	1.63 ± 1.40	1.55 ± 1.44
lisina	176.65 ± 8.64	56.91 ± 9.04	4.27 ± 1.80	32.76 ± 7.44	1.78 ± 1.04	1.76 ± 1.08

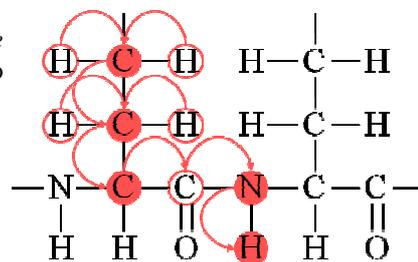
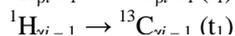
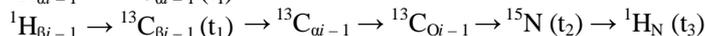
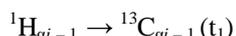
metionina	176.33 ± 8.32	56.21 ± 9.08	4.39 ± 1.92	33.02 ± 9.08	2.04 ± 1.36	2.00 ± 1.44
fenilalanina	175.54 ± 8.08	58.21 ± 10.72	4.62 ± 2.36	39.93 ± 8.36	3.00 ± 1.52	2.96 ± 1.52
prolina	176.75 ± 6.32	63.28 ± 6.56	4.40 ± 1.36	31.76 ± 5.00	2.07 ± 1.44	2.03 ± 1.48
serina	174.63 ± 7.16	58.64 ± 8.76	4.50 ± 1.68	63.81 ± 6.44	3.88 ± 1.08	3.86 ± 1.16
treonina	174.58 ± 7.20	62.15 ± 10.96	4.48 ± 1.92	69.59 ± 8.12	4.17 ± 1.36	
triptofano	176.13 ± 7.92	57.65 ± 10.52	4.71 ± 2.16	29.99 ± 8.24	3.21 ± 1.44	3.15 ± 1.48
tirosina	175.41 ± 8.12	58.07 ± 10.48	4.63 ± 2.28	39.28 ± 8.68	2.91 ± 1.52	2.88 ± 1.52
valina	175.69 ± 7.76	62.47 ± 11.84	4.17 ± 2.32	32.65 ± 7.28	1.99 ± 1.28	

2. ESPERIMENTI PER L'ASSEGNAZIONE DELLE CATENE LATERALI ALIFATICHE (C_χ E H_χ)

¹³C, ¹⁵N, ¹H-(H)CC(CO)NH – TOCSY

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ¹⁵N-¹H_N di un residuo (*i*) con i carboni ¹³C_χ dell'amminoacido precedente (*i* - 1).

Figura 3.2-11: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento (H)CC(CO)NH:



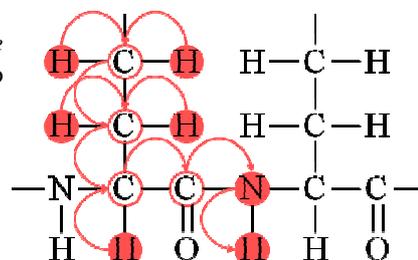
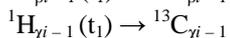
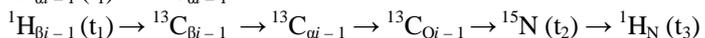
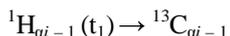
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche ¹H
- evoluzione della magnetizzazione di ¹H_{αβγ*i*-1} sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ¹³C (¹J_{HC}) e trasferimento della polarizzazione a ¹³C
- evoluzione della magnetizzazione di ¹³C_{αβγ} sotto l'effetto dei *chemical shift* di ¹⁵C
- uno *spin-lock*^{12§} consente il trasferimento della magnetizzazione da tutti i ¹³C a ¹³C_α per effetto della prolungata evoluzione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare ¹J_{CC}
- evoluzione della magnetizzazione di ¹³C_{α*i*-1} sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ¹³C_O (¹J_{CαC_O}) e trasferimento della polarizzazione da ¹³C_{α*i*-1} a ¹³C_{O*i*-1}
- evoluzione della magnetizzazione di ¹³C_{O*i*-1} sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ¹⁵N (¹J_{C_ON}) e trasferimento della polarizzazione da ¹³C_{O*i*-1} a ¹⁵N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ¹⁵N
- trasferimento della polarizzazione a ¹H_N per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

¹⁵N, ¹H-H(CCCO)NH – TOCSY

Questo esperimento consente di mettere in relazione il gruppo ¹⁵N-¹H_N di un residuo (*i*) con i protoni ¹H_χ dell'amminoacido precedente (*i* - 1).

Figura 3.2-12: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento H(CCCO)NH:



^{12§} Lo *spin-lock* è costituito un'irradiazione di tutti gli atomi tra loro accoppiati mediante un treno di impulsi, tale da defasare la magnetizzazione in evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift*. Per tutto il periodo di *spin-lock* l'unico tipo di evoluzione consentita è quella per accoppiamento scalare (J). Questo consente un trasferimento della magnetizzazione tra atomi accoppiati, e, se la durata è sufficiente e le costanti J sufficientemente grandi, tale trasferimento può essere trasmesso anche a nuclei distanti diversi legami. Gli esperimenti che utilizzano questa strategia sono detti TOCSY (*Total Correlation Spectroscopy*) e permettono di mettere in relazione tra loro tutti gli atomi costituenti una catena.

L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche ^1H
- evoluzione della magnetizzazione di $^1\text{H}_{\alpha\beta\gamma i-1}$ sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^1H
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{13}C ($^1J_{\text{HC}}$) e trasferimento della polarizzazione a ^{13}C
- uno spin-lock consente il trasferimento della magnetizzazione da tutti i ^{13}C a $^{13}\text{C}_\alpha$ per effetto della prolungata evoluzione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{\text{CC}}$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con $^{13}\text{C}_\text{O}$ ($^1J_{\text{CaCo}}$) e trasferimento della polarizzazione da $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ a $^{13}\text{C}_{\text{O} i-1}$
- evoluzione della magnetizzazione di $^{13}\text{C}_{\text{O} i-1}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{15}N ($^1J_{\text{CoN}}$) e trasferimento della polarizzazione da $^{13}\text{C}_{\text{O} i-1}$ a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N
- trasferimento della polarizzazione a $^1\text{H}_\text{N}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

3.2.2 ESPERIMENTI TRIDIMENSIONALI IN DOPPIA RISONANZA (OMONUCLEARI X-DISPERSI)

Gli esperimenti tridimensionali in doppia risonanza sono ottenuti combinando esperimenti bidimensionali omonucleari ed esperimenti bidimensionali eteronucleari (nel caso di proteine ^{15}N -HSQC o ^{13}C -HSQC). La dimensione dell'eteronucleo consente di aumentare la dispersione dei picchi, riducendo sensibilmente le sovrapposizioni tra sistemi di *spin*. Proiettando tale spettro sul piano $\text{H}_\text{X}-\text{X}$ si ottiene un 2D X-HSQC, proiettandolo lungo il piano $\text{H}_\text{X}-\text{H}$ si ottiene una porzione di uno spettro omonucleare bidimensionale.

1. ESPERIMENTI PER L'ASSEGNAZIONE DELLE CATENE LATERALI

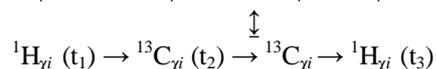
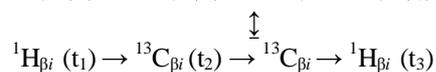
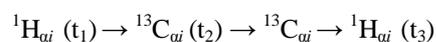
a) ASSEGNAZIONE DI C_α E H_α DELLE CATENE ALIFATICHE

$^{13}\text{C}, ^1\text{H}-\text{HC}(\text{C})\text{H} - \text{TOCSY}$

Questo esperimento consente di correlare tutti gli ^1H alifatici con tutti i gruppi $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ della catena laterale del residuo (*i*).

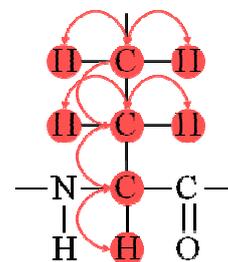
Ciò implica, ad esempio, che ciascun $^{13}\text{C}_\alpha - ^1\text{H}_\alpha$ presenta *cross*-picchi con $\text{H}_\alpha, \text{H}_{\beta\text{n}}, \text{H}_{\gamma\text{n}}$; analogamente, $^{13}\text{C}_\beta - ^1\text{H}_{\beta\text{n}}$ presentano *cross*-picchi con $\text{H}_\alpha, \text{H}_{\beta\text{n}}, \text{H}_{\gamma\text{n}}$, ecc... Non si osservano invece *cross*-picchi originati da trasferimenti di magnetizzazione tra carboni aromatici e alifatici, a causa della grande differenza di frequenza tra i due tipi di nucleo.

Figura 3.2-13: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento $\text{HC}(\text{C})\text{H} - \text{TOCSY}$:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche ^1H
- evoluzione della magnetizzazione di $^1\text{H}_{\alpha\beta\gamma i}$ sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^1H
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{13}C ($^1J_{\text{HC}}$) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}\text{C}_{\alpha\beta\gamma i}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^{13}C
- uno spin-lock consente il trasferimento della magnetizzazione tra tutti i ^{13}C per effetto della prolungata evoluzione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{\text{CC}}$



- trasferimento della polarizzazione a $^1\text{H}_{\alpha\beta\gamma i}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

Tabella 3.2-2: *Chemical Shifts* dei nuclei delle catene laterali alifatiche.

amminoacido	$^{13}\text{C}_\gamma$	$^1\text{H}_\gamma$	$^{13}\text{C}_\delta$	$^1\text{H}_\delta$	$^{13}\text{C}_\epsilon$	$^1\text{H}_\epsilon$
arginina	27.26 ± 5.40	1.58 ± 1.08 1.57 ± 1.12	43.13 ± 4.12	3.13 ± 0.92 3.12 ± 0.96		
glutammato	36.04 ± 5.48	2.30 ± 0.88 2.28 ± 0.88				
glutammina	33.71 ± 4.88	2.32 ± 1.16 2.30 ± 1.16				
isoleucina	27.66 ± 8.16	1.29 ± 1.56 1.23 ± 1.64	13.46 ± 7.08	0.70 ± 1.20		
	17.51 ± 6.32	0.80 ± 1.08				
leucina	26.70 ± 5.16	1.52 ± 1.32	24.59 ± 6.96 24.12 ± 7.12	0.77 ± 1.12 0.75 ± 1.16		
lisina	24.89 ± 5.04	1.38 ± 1.08 1.36 ± 1.16	28.86 ± 5.12	1.61 ± 1.00 1.60 ± 0.96	41.82 ± 3.72	2.92 ± 0.84 2.92 ± 0.84
metionina	32.05 ± 5.36	2.44 ± 1.40 2.40 ± 1.56			17.34 ± 12.28	1.88 ± 1.60
prolina	27.20 ± 4.76	1.94 ± 1.36 1.91 ± 1.40	50.33 ± 4.76	3.65 ± 1.48 3.62 ± 1.56		
valina	21.44 ± 5.92	0.84 ± 1.04				
	21.30 ± 6.60	0.82 ± 1.16				

b) ASSEGNAZIONE DI C_χ E H_χ DELLE CATENE AROMATICHE

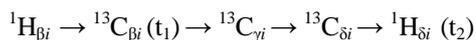
$^{13}\text{C}, ^1\text{H}-(\text{HB})\text{CB}(\text{C})\text{C}_{\text{aro}}\text{H}$

Questo esperimento consente di correlare il C_β del residuo (*i*), e quindi il suo *backbone*, con i gruppi $^{13}\text{C}_\chi - ^1\text{H}_\chi$ costituenti la catena laterale aromatica. Se il numero di amminoacidi aromatici non è molto grande e se la dispersione dei segnali è adeguata, questo esperimento può essere sostituito da una serie di esperimenti bidimensionali, con un grande vantaggio in termini di tempo.

2D $^{13}\text{C}, ^1\text{H}-(\text{HB})\text{CB}(\text{CGCD})\text{HD}$

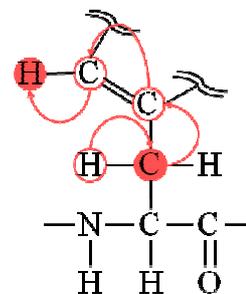
Questo esperimento consente di correlare il C_β del residuo (*i*), e quindi il suo *backbone*, con il/i $^1\text{H}_\delta$ della catena laterale aromatica. Questo esperimento sfrutta il forte accoppiamento scalare tra i carboni C_β e C_γ ($^1J_{\text{C}_\beta\text{C}_\gamma} \approx 25 \text{ Hz}$) e tra i carboni aromatici, e la grande differenza di *chemical shift* tra i C_β (mediamente tra 30 e 40 ppm nei residui aromatici) e C aromatici (mediamente i C_γ hanno *chemical shift* compresi tra 110 e 137 ppm).

Figura 3.2-14: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento $(\text{HB})\text{CB}(\text{CGCD})\text{HD}$:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche $^1\text{H}_\beta$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con ^{13}C ($^1J_{\text{HC}}$) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}\text{C}_\beta$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^{13}C

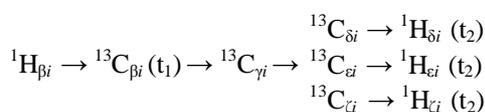


- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{C\beta C\gamma}$ (mentre l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{C\beta C\alpha}$ viene rifocalizzato) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_\gamma$ mediante l'utilizzo di opportuni *delay* e impulsi $^{13}C_\beta$ e $^{13}C_\gamma$ selettivi
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{CaroCaro}$ e trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_\delta$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{CaroHaro}$ con trasferimento della polarizzazione a $^1H_{\delta i}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

2D $^{13}C, ^1H$ -(HB)CB(CGCD)H – TOCSY

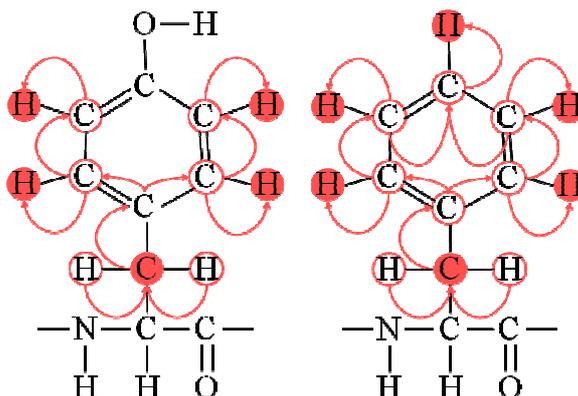
Questo esperimento consente di correlare il C_β di un residuo (*i*) di tirosina o fenilalanina, con i protoni $^1H_\delta$, $^1H_\epsilon$ e (nel caso della fenilalanina) $^1H_\zeta$, della catena laterale aromatica.

Figura 3.2-15: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento (HB)CB(CGCD)H – TOCSY:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche $^1H_\beta$
- trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_\beta$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^{13}C
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{C\beta C\gamma}$ (mentre l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{C\beta C\alpha}$ viene rifocalizzato) e trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_\gamma$ mediante l'utilizzo di opportuni *delay* e impulsi $^{13}C_\beta$ e $^{13}C_\gamma$ selettivi
- uno spin-lock consente il trasferimento della magnetizzazione a tutti i ^{13}C aromatici per effetto dell'evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{CaroCaro}$; la durata del tempo di mescolamento può essere ottimizzata per il tipo di amminoacido (7.1 ms per la tirosina, 8.6 ms per la fenilalanina)
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{CaroHaro}$ con trasferimento della polarizzazione a $^1H_{\delta i}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici



2D $^{13}C, ^1H$ -(H)C(NC)H

Questo esperimento consente di correlare tra loro i $^{13}C_\chi$ - $^1H_\chi$ costituenti la catena laterale aromatica di un residuo (*i*) di istidina (mentre per la catena laterale del triptofano può essere utilizzato l'esperimento (H)C(NC)H – TOCSY). Il trasferimento della magnetizzazione in questo esperimento è bidirezionale e coinvolge l'accoppiamento scalare ^{13}C - ^{15}N . In genere la costante efficace è solamente $^1J_{CN}$, e solo quando l'azoto è nella forma tautomerica protonata ($^1J_{C(N-H)} \geq 11$ Hz, $^1J_{C(N)} \approx 1$ Hz, $^2J_{C\delta_2(N\delta_1-H)} \approx 5$ Hz). Pertanto, il trasferimento può avvenire solo quando il gruppo imidazolico sia in forma cationica o quando sia presente come tautomero $N_{\epsilon 2}$ - $H_{\epsilon 2}$.

Figura 3.2-16: Rappresentazione degli atomi del *backbone* coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento (H)C(NC)H:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche 1H aromatiche

- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{H(C\delta_2, \epsilon_1)}$
- trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_{\delta_2, \epsilon_1}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dei *chemical shift* di ^{13}C e dell'accoppiamento con $^{15}N_{(H)\epsilon_2}$, $^1J_{C(N-H)}$, (mentre l'accoppiamento $^1J_{C\delta_2 C\gamma}$ viene rifocalizzato)
- trasferimento della polarizzazione a ^{15}N (tramite impulsi selettivi per le risonanze degli N_H)
- trasferimento della polarizzazione a $^{13}C_{\epsilon_1, \delta_2}$
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare $^1J_{(C\epsilon_1, \delta_2)H}$ con trasferimento della polarizzazione a $^1H_{\epsilon_1, \delta_2}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici

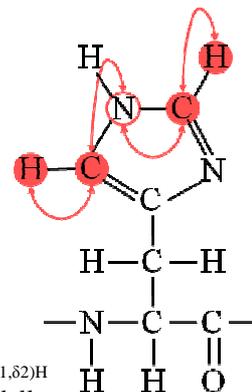


Tabella 3.2-3: *Chemical Shifts* dei nuclei delle catene laterali aromatiche.

amminoacido	gruppo	^{13}C	1H
istidina	$C_{\delta_2} - H_{\delta_2}$	119.59 ± 10.92	7.07 ± 1.92
	$C_{\delta_2} - H_{\delta_2}$	136.80 ± 9.12	8.04 ± 2.20
fenilalanina	$C_{\delta} - H_{\delta}$	131.44 ± 5.36	7.06 ± 1.36
		131.45 ± 5.08	7.07 ± 1.32
	$C_{\epsilon} - H_{\epsilon}$	130.57 ± 6.16	7.10 ± 1.28
		130.67 ± 4.12	7.11 ± 1.28
$C_{\zeta} - H_{\zeta}$	129.19 ± 7.12	7.03 ± 1.72	
triptofano	$C_{\delta_1} - H_{\delta_1}$	126.42 ± 7.88	7.16 ± 1.36
	$C_{\epsilon_3} - H_{\epsilon_3}$	120.59 ± 9.36	7.35 ± 1.60
	$C_{\zeta_2} - H_{\zeta_2}$	114.17 ± 5.68	7.29 ± 1.32
	$C_{\zeta_3} - H_{\zeta_3}$	121.34 ± 7.68	6.87 ± 1.76
	$C_{\eta_2} - H_{\eta_2}$	123.60 ± 6.68	7.00 ± 1.68
tirosina	$C_{\delta} - H_{\delta}$	132.65 ± 5.20	6.95 ± 1.20
		132.46 ± 6.84	6.95 ± 1.24
	$C_{\epsilon} - H_{\epsilon}$	117.82 ± 5.96	6.71 ± 0.96
		117.85 ± 7.00	6.72 ± 0.96

2. ESPERIMENTI SENSIBILI ALLE DISTANZE *INTER-PROTONICHE*

Mentre l'accoppiamento scalare è mediato dalle densità elettroniche e fornisce informazioni sui legami tra gli atomi, esiste un altro tipo di interazione tra *spin* nucleari che dipende dai campi magnetici locali prodotti dagli *spin* stessi e dai loro momenti magnetici. Questo tipo di interazione si sviluppa attraverso lo spazio e dipende dalla distanza tra i gli *spin* accoppiati. In soluzione (dove le molecole sono in rapida rotazione), tale interazione non altera l'energia media dei livelli energetici e non dà quindi origine a *splitting* dei segnali, diversamente da quanto accade per l'accoppiamento scalare. Tuttavia, l'importanza di questo tipo di interazioni si manifesta sulle proprietà di rilassamento della magnetizzazione non in equilibrio. La rapida rotazione delle molecole produce oscillazioni nei campi magnetici generati dagli *spin*, e queste contribuiscono al rilassamento della magnetizzazione (ovvero la sua tendenza a ritornare all'equilibrio).

L'effetto dell'accoppiamento dipolare può essere misurato come una variazione nelle popolazioni dei livelli energetici degli *spin* accoppiati. Tale effetto è noto come NOE (*Nuclear Overhauser Enhancement*): dati due *spin* I e S tra loro dipolarmente accoppiati, se viene perturbato l'equilibrio di S si verifica una variazione nella

magnetizzazione di I proporzionale a una costante di *cross*-rilassamento (σ_{IS}) e alla variazione di S dal suo equilibrio:

$\frac{d(I_z - I_z^0)}{dt} = -R_I(I_z - I_z^0) - \sigma_{IS}(S_z - S_z^0)$, dove I_z e S_z sono le componenti della magnetizzazione lungo il campo magnetico esterno e R_I è una costante di auto-rilassamento. L'efficacia di questo trasferimento della polarizzazione tra spin vicini (al di sotto dei 5 – 5.5 Å) è proporzionale a $1/d^6$ (dove d è la distanza internucleare).

Gli esperimenti di tipo NOESY (*Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy*) sfruttano l'effetto NOE per ricavare informazioni sulla distanza reciproca tra nuclei dipolarmente accoppiati.

¹H-2D NOESY

Questo esperimento consente di correlare tra loro nuclei ¹H tra loro sufficientemente vicini da potersi scambiare magnetizzazione tramite accoppiamento dipolare. Questo esperimento (o, a seconda delle necessità, il ROESY) si rivela essenziale in vari passaggi dello studio delle proteine (o dei peptidi). Oltre a fornire delle distanze internucleari relative piuttosto precise (con un errore del 10-15%), rappresenta un supporto essenziale nell'assegnazione sequenziale (il NOE fra $H_{\alpha i}$ e $H_{N_{i+1}}$ è generalmente molto intenso) e nella definizione delle strutture secondarie.

Tabella 3.2-4: picchi NOE caratteristici delle strutture secondarie

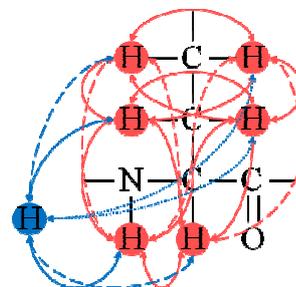
NOE	α -elica	3_{10} -elica	β paralleli	β antiparalleli
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{N_{i+1}}$)	medio/debole	medio/debole	molto intenso	molto intenso
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{N_{i+2}}$)		debole		
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{N_{i+3}}$)	medio/debole	debole		
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{N_{i+4}}$)	debole			
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{\beta i+3}$)	medio/debole	medio/debole		
NOE($H_{\beta i}$ - $H_{N_{i+1}}$)	medio/debole	medio/debole	debole	debole
NOE(H_{N_i} - $H_{N_{i+1}}$)	intenso/medio	intenso/medio	debole	debole
NOE(H_{N_i} - $H_{N_{i+2}}$)	debole	debole		
NOE($H_{\alpha i}$ - $H_{\alpha j}$)			intenso	debole
NOE($H_{\alpha i}$ - H_{N_j})			medio/debole	debole
NOE(H_{N_i} - H_{N_j})			medio/debole	medio/debole

Figura 3.2-17: Rappresentazione schematica dell'interazione dipolare tra i protoni di un amminoacido nell'esperimento ¹H-NOESY:

$${}^1H_{I,S}(t_1) \xrightarrow{\text{NOE}} {}^1H_{S,I}(t_2)$$

L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- eccitazione delle frequenze protoniche ¹H (ad esempio I e S)
- evoluzione della magnetizzazione trasversale sotto l'effetto del *chemical shift* protonico
- una componente della magnetizzazione di I e di S (modulata, rispettivamente, secondo la funzione $\cos(\omega_I t_1)$ o $\cos(\omega_S t_1)$) viene riportata longitudinalmente (lungo l'asse parallelo al campo esterno); questa magnetizzazione non è in equilibrio e tende a rilassare, anche mediante NOE
- durante il tempo di mescolamento si verifica il trasferimento della magnetizzazione per *cross*-rilassamento tra *spin* vicini (alla magnetizzazione di I si aggiunge una componente modulata secondo $\cos(\omega_S t_1)$ e alla magnetizzazione di S si aggiunge una componente modulata secondo $\cos(\omega_I t_1)$)

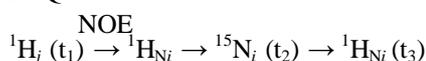


- evoluzione della magnetizzazione, riportata trasversalmente, sotto l'effetto del *chemical shift* protonico (si ottengono componenti della magnetizzazione che sono modulate secondo entrambe le frequenze degli *spin* dipolarmente accoppiati; queste danno origine a dei cross-picchi, nello spettro NOESY, i cui volumi sono proporzionali a $1/d^6$)

$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -3D NOESY – HSQC (o TROSY)

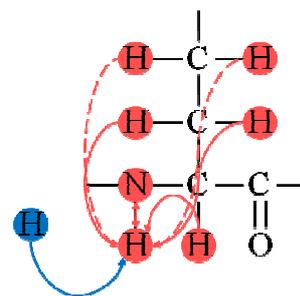
Questo esperimento consente di individuare tutti i nuclei ^1H che sono spazialmente vicini ai $^1\text{H}_\text{N}$ dei gruppi ammidici, sia degli stessi residui che di altri. Inoltre, i segnali sono dispersi in una terza dimensione secondo le frequenze dei nuclei di azoto. Oltre a fornire informazioni sulle distanze interatomiche ($V \propto 1/d^6$), questo esperimento è un valido supporto per l'assegnazione sequenziale grazie alla presenza del NOE($\text{H}_{\text{ai}} - \text{H}_{\text{Ni}+1}$).

Figura 3.2-18: Rappresentazione schematica dell'interazione dipolare tra i protoni di un amminoacido nell'esperimento $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NOESY – HSQC:



L'esperimento si compone delle seguenti parti:

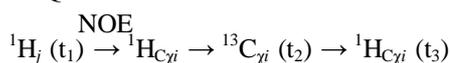
- eccitazione delle frequenze protoniche ^1H
- evoluzione della magnetizzazione trasversale sotto l'effetto del *chemical shift* protonico
- durante il tempo di mescolamento si verifica il trasferimento della magnetizzazione per *cross*-rilassamento tra spin vicini
- evoluzione della magnetizzazione dei nuclei $^1\text{H}_\text{N}$ sotto l'effetto dell'accoppiamento scalare con i nuclei ^{15}N direttamente legati ($^1J_{\text{HN}}$) e trasferimento della polarizzazione a ^{15}N
- evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N
- trasferimento della polarizzazione a $^1\text{H}_\text{N}$ per l'acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici



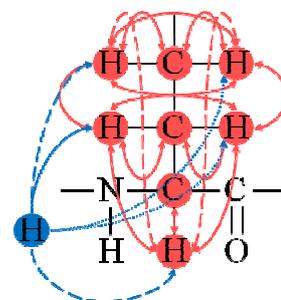
$^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -3D NOESY – HSQC (o TROSY) ALIFATICO/AROMATICO

Questo esperimento consente di individuare tutti i nuclei ^1H che sono spazialmente vicini a dei gruppi $^{13}\text{C}_\chi - ^1\text{H}_\chi$, sia degli stessi residui che di altri. $^{13}\text{C}_\chi - ^1\text{H}_\chi$ sta ad indicare una coppia carbonio-protone in una qualsiasi posizione sulla catena laterale alifatica o aromatica, nonché la coppia $^{13}\text{C}_\alpha - ^1\text{H}_\alpha$. I segnali sono dispersi nella terza dimensione secondo le frequenze dei nuclei di carbonio alifatici o aromatici. Data la notevole differenza di frequenza tra carboni alifatici e aromatici, vengono acquisiti due esperimenti separatamente.

Figura 3.2-18: Rappresentazione schematica dell'interazione dipolare tra i protoni di un amminoacido nell'esperimento $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -NOESY – HSQC Ali/Aro:



Le considerazioni che si possono fare su questa sequenza sono del tutto analoghe a quanto detto per il $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -NOESY – HSQC.



3.3 ESPERIMENTI NMR SUI DOMINI STAS

Tutti gli esperimenti che saranno mostrati in seguito sono stati acquisiti su spettrometri Bruker AVANCE operanti a diversi campi, e processati con il software

TOPSPIN (versione 1.2 o 2.1). Le figure sono state create grazie al software CARA (R. Keller, Ref.).

3.3.1 DOMINIO STAS DI Rv1739c (*Mycobacterium tuberculosis*)

^{15}N -HSQC: Numero di campionamenti (TD): 2048 (F2) \times 320 (F1)

Numero di scansioni in F2 (NS): 12

Finestra spettrale (SW): 14 ppm (F2) \times 38 ppm (F1)

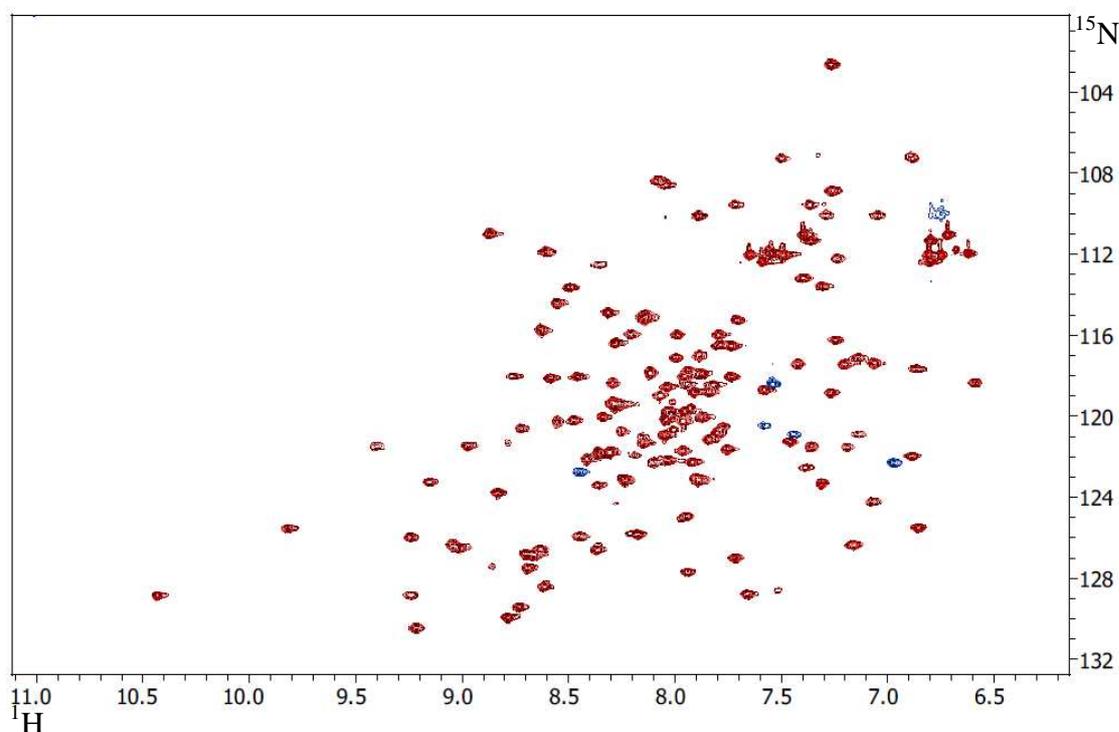
Campo: 14.09 T, corrispondente a una frequenza di Larmor protonica di 600.01 MHz

Concentrazione dello STAS: 500 μM

Tampone: 35 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.0

Temperatura: 298 K

Figura 3.3-1: Ingrandimento della regione N- H_N dello spettro ^{15}N , ^1H -HSQC di STAS (Rv1739c). In blu sono indicati i picchi *folded*.



Lo spettro ^{15}N -HSQC del dominio STAS di Rv1739c presenta una buona dispersione dei segnali, indicativa di un buon livello di strutturazione secondaria. I picchi, inoltre sono ben risolti ed hanno una ridotta larghezza di riga (compatibile con le dimensioni della proteina e con una struttura terziaria compatta).

Una stima approssimativa dell'ordine di grandezza del tempo di rilassamento trasversale T_2 , del tempo di correlazione τ_c e della massa molecolare (MM) può essere ottenuta misurando la larghezza dei segnali a metà altezza, secondo le relazioni:

$W_{1/2}(\text{Hz}) = \frac{1}{\pi T_2}$, $\tau_c(\text{ns}) \approx \frac{1}{5T_2}$, $\text{MM}(\text{kDa}) \approx 2\tau_c$ a 20 °C. Utilizzando alcuni segnali ben risolti e con forma abbastanza simmetrica, si ottiene una larghezza media $\bar{W}_{1/2} = 16.3 \pm 3.2$ Hz (nella dimensione di ^1H) che corrisponde ad una massa molecolare $\overline{\text{MM}} = 20.5 \pm 4.0$ kDa. Considerato che, a pH 7.0, lo scambio chimico non è affatto trascurabile e rappresenta un'importante fonte di rilassamento per i gruppi ammidici, tale stima,

seppur grossolana, è in discreto accordo con la massa reale del monomero del dominio STAS (14.5 kDa).

Sfortunatamente, la proteina si è dimostrata estremamente sensibile alla temperatura; il passaggio da 298 K a 308 K, finalizzato all'ulteriore riduzione della larghezza di riga (all'aumentare della temperatura, il tempo di correlazione diminuisce¹³⁸ e la magnetizzazione rilassa più lentamente) ha infatti provocato la completa precipitazione della proteina.

Malgrado la qualità dello spettro ¹⁵N-HSQC rendesse questa proteina estremamente promettente, mentre si programmava il clonaggio in un sistema di espressione a più alto rendimento (*Champion™ pET SUMO Protein Expression System*, paragrafo 2.4.6), è stata pubblicata l'assegnazione NMR della stessa proteina da parte di A. K. Sharma et al. (Ref.) ed il progetto è stato abbandonato.

3.3.2 DOMINIO STAS DI SULTR 1;2 (*Arabidopsis thaliana*)

¹⁵N-HSQC: Numero di campionamenti (TD): 2048 (F2) × 320 (F1)

Numero di scansioni in F2 (NS): 24

Finestra spettrale (SW): 14 ppm (F2) × 38 ppm (F1)

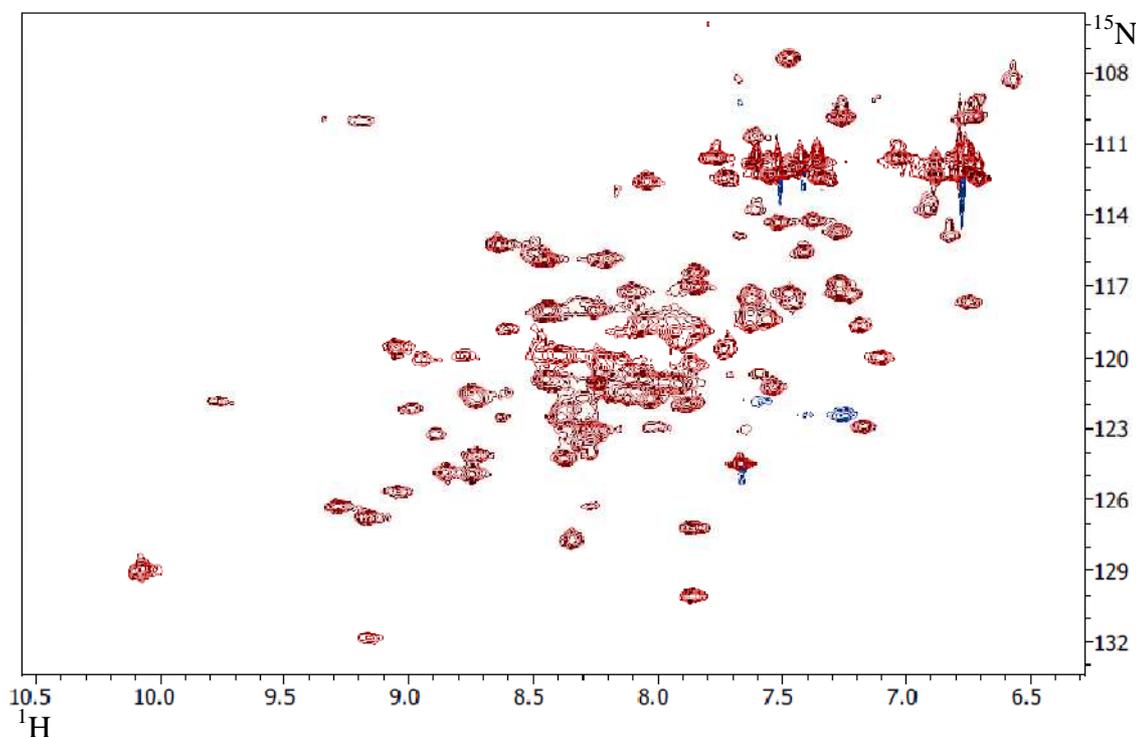
Campo: 14.09 T

Concentrazione dello STAS: 500 μM

Tampone: 35 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, pH 7.0

Temperatura: 298 K

Figura 3.3-2: Ingrandimento della regione N-H_N dello spettro ¹⁵N,¹H -HSQC di STAS (SULTR 1;2).



¹³⁸ $\tau_c = 4\pi\eta r^3/3kT$, pertanto sussiste una relazione di proporzionalità inversa rispetto alla temperatura (T). Inoltre, all'aumento di temperatura diminuisce anche la viscosità del solvente (η) e questo fattore riduce ulteriormente il tempo di correlazione. Un modesto aumento della temperatura di 10 K provoca un aumento di T_2 pari al 24% e riduce sensibilmente la larghezza dei segnali, migliorando la sensibilità e la risoluzione.

Da un'analisi qualitativa dello spettro ^{15}N -HSQC del dominio STAS di SULTR 1;2 si vede chiaramente che la maggior parte dei segnali è distribuita nella zona centrale dello spettro, e questo rivela un elevato livello di struttura disordinata. Inoltre, i picchi sono scarsamente risolti ed hanno una larghezza di riga propria di un sistema che rilassa rapidamente (verosimilmente compatibile con una forma aggregata del dominio). Utilizzando alcuni tra i segnali più risolti e con forma più simmetrica, si ottiene una larghezza media $\overline{W}_{1/2} = 30.0 \pm 6.6$ Hz (nella dimensione di ^1H) che corrisponde ad una massa molecolare $\overline{MM} = 37.6 \pm 8.2$ kDa. Tale stima è decisamente superiore alla massa reale del monomero del dominio STAS (15.7 kDa) e potrebbe dipendere dalla compresenza di proteina monomerică e oligomerică (verosimilmente dimerica).

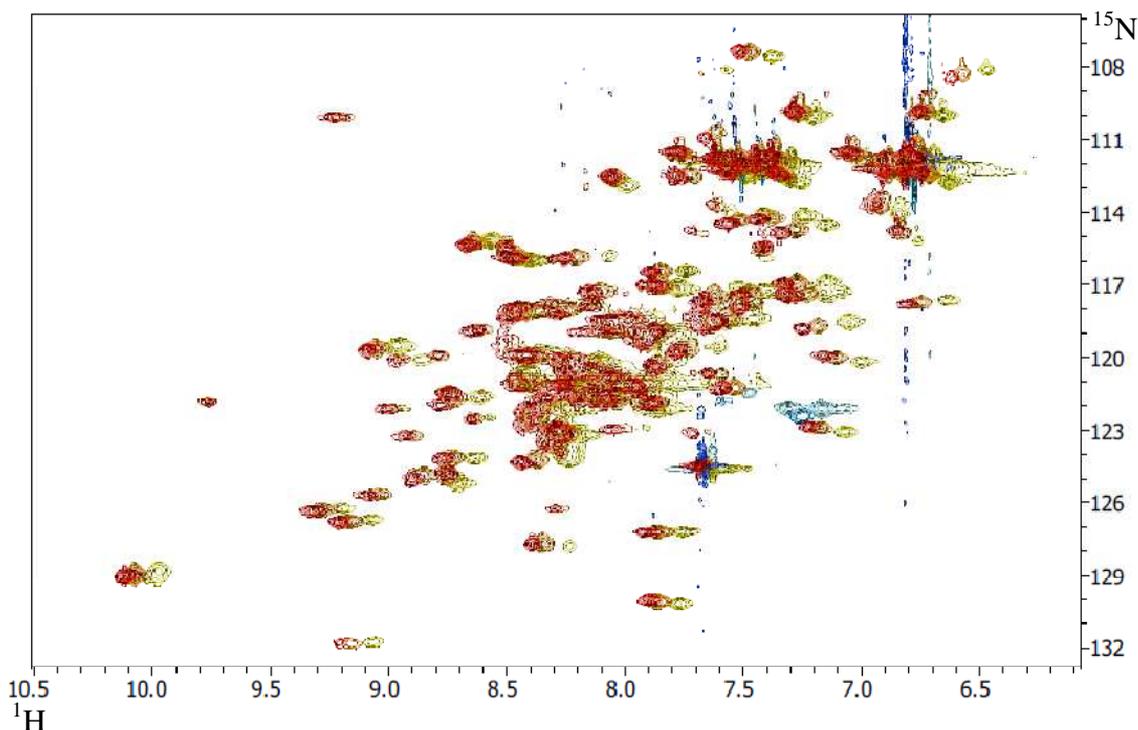
Per verificare che l'allargamento dei segnali dipendesse effettivamente dalle dimensioni molecolari e non piuttosto da meccanismi di scambio chimico, è stata analizzata l'intensità di alcuni picchi ben risolti nella regione metilica di spettri monodimensionali, variando i tempi di evoluzione della magnetizzazione trasversale.

Si è quindi sfruttata la relazione $I \propto e^{-t/T_2}$, dove I è l'intensità del segnale e t la durata dell'evoluzione trasversale. Dal rapporto tra le intensità dei segnali di spettri raccolti per tempi di evoluzione diversi, si ottiene $T_2 = \frac{(t_x - t_y)}{\ln(I_y/I_x)}$.

Essendo il Δt utilizzato pari a 0.0056 s e il rapporto tra le intensità $I_y/I_x = 1.44088 \pm 0.00115$, si ottiene una stima della massa molecolare $\overline{MM} = 26.1 \pm 1.0$, che conferma la presenza di dimero in soluzione.

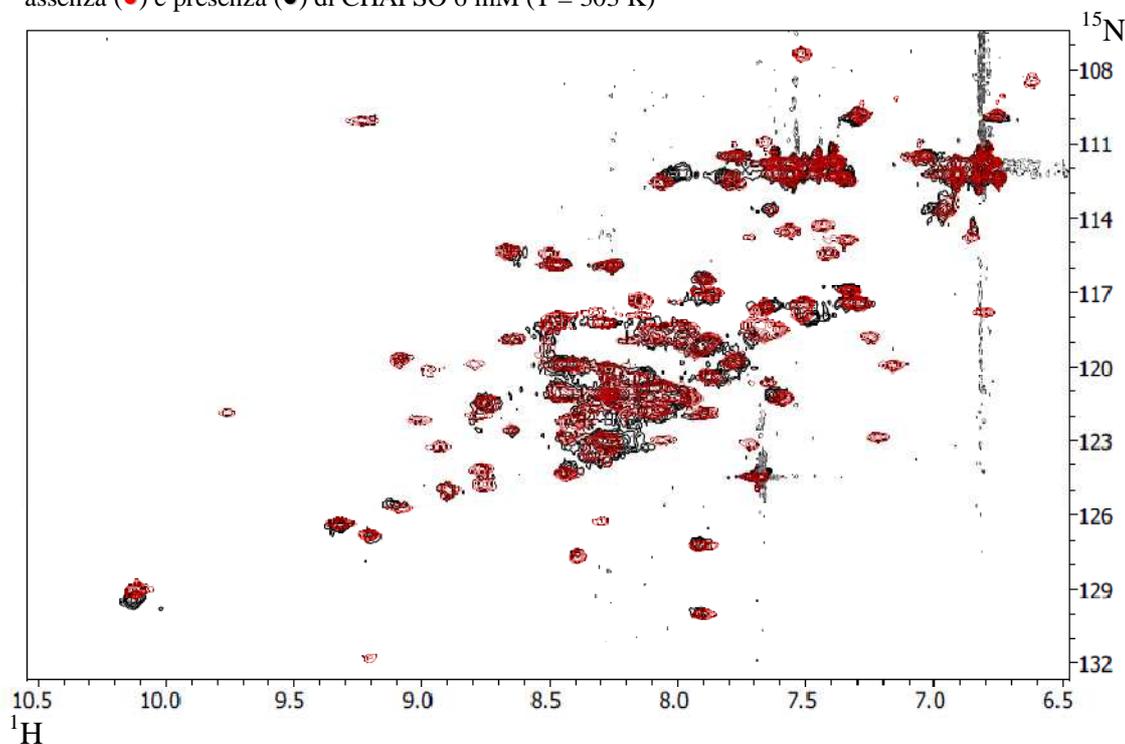
L'acquisizione di spettri a diverse temperature ha infine dimostrato l'impossibilità di migliorare significativamente la qualità degli spettri.

Figura 3.3-3: Ingrandimento della regione N- H_N dello spettro $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HSQC di STAS (SULTR 1;2) a tre temperature diverse: ●/○: 288 K, ●/○: 298 K, ●/○: 303 K. I picchi *folded* sono evidenziati in azzurro/blu.



Si è ipotizzato che, essendo la proteina immersa in un tampone con caratteristiche riducenti (5 mM DTT)^{14§}, l'interazione tra i monomeri fosse mediata da superfici idrofobiche. L'aggiunta di detergente (6 mM CHAPSO) non ha tuttavia fatto regredire tali interazioni, né ha stabilizzato la forma monomerica.

Figura 3.3-4: Ingrandimento della regione N-H_N dello spettro ¹⁵N,¹H -HSQC di STAS (SULTR 1;2) in assenza (●) e presenza (●) di CHAPSO 6 mM (T = 303 K)



Dopo circa 60 ore dall'inizio degli esperimenti, il campione ha iniziato a dimostrare una progressiva opalescenza ed è infine precipitato in modo massivo, rendendo impossibile effettuare altre analisi. Data la sua instabilità, il dominio STAS della proteina SULTR 1;2 si è quindi rivelato del tutto inadeguato ad effettuare gli studi strutturali prefissati.

3.3.3 DOMINIO STAS DI PRESTINA (*Rattus norvegicus*)

¹⁵N-HSQC: Numero di campionamenti (TD): 2048 (F2) × 360 (F1)

Numero di scansioni in F2 (NS): 16

Finestra spettrale (SW): 12 ppm (F2) × 30 ppm (F1)

Campo: 14.09 T

Concentrazione dello STAS: 500 μM

Tampone: 35 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 7.0

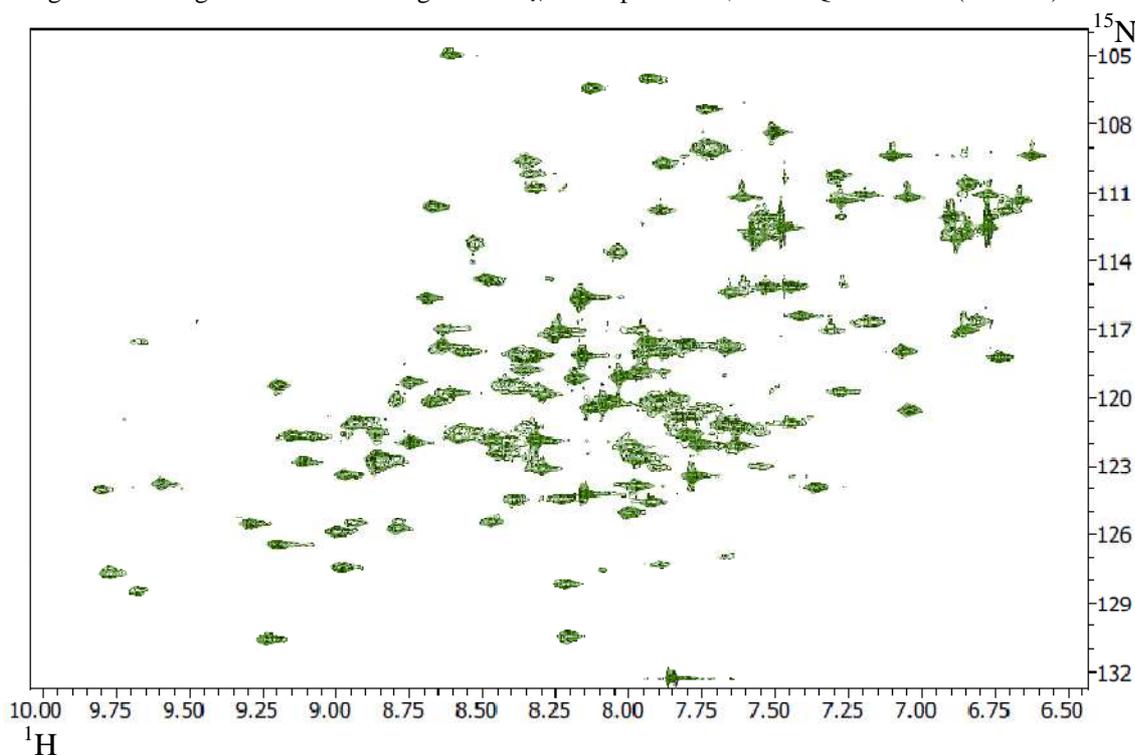
^{14§} La purificazione della proteina in ambiente riducente (5 mM DTT o 10 mM β-mercaptoetanolo) o in ambiente non riducente non ha dimostrato significative differenze nei cromatogrammi di gel filtrazione, che, in entrambi i casi, hanno presentato un picco minoritario compatibile con le proprietà idrodinamiche del dimero.

Sottoponendo la proteina a concentrazione per ottenere un campione adeguato alle esigenze dell'NMR, è verosimile che l'equilibrio venga spostato verso la formazione del dimero.

La proteina si è inoltre rivelata estremamente sensibile all'agitazione meccanica e al congelamento, nonché alla proteolisi del dominio SUMO ad essa legato.

Temperatura: 298 K

Figura 3.3-5: Ingrandimento della regione N-H_N dello spettro ¹⁵N, ¹H -HSQC di STAS (Prestina).



Da un'analisi qualitativa dello spettro ¹⁵N-HSQC del dominio STAS di Prestina si vede che la proteina è sostanzialmente strutturata, ma presenta alcune regioni in *random coil* (alcuni picchi molto stretti e intensi nella zona centrale dello spettro). Il livello di dispersione non è ottimale per l'assegnazione, in quanto sono presenti molte sovrapposizioni.

Inoltre, molti picchi presentano delle severe asimmetrie, probabilmente attribuibili alla compresenza di conformazioni minoritarie stabili, con risonanze protoniche H_N molto simili a quelle della conformazione principale.

Infine, la grande differenza nelle intensità dei picchi dello spettro suggerisce che alcuni residui subiscano un rilassamento particolarmente rapido. A differenza del dominio STAS di SULTR 1;2, pertanto, non c'è quindi un problema di aggregazione che altera il tempo di correlazione della proteina (determinando un allargamento di tutti i segnali), ma piuttosto uno scambio chimico/conformazionale in un regime di tempi intermedi ($k_{ex} \approx \Delta\omega/2\pi$) che coinvolge alcune regioni della proteina.

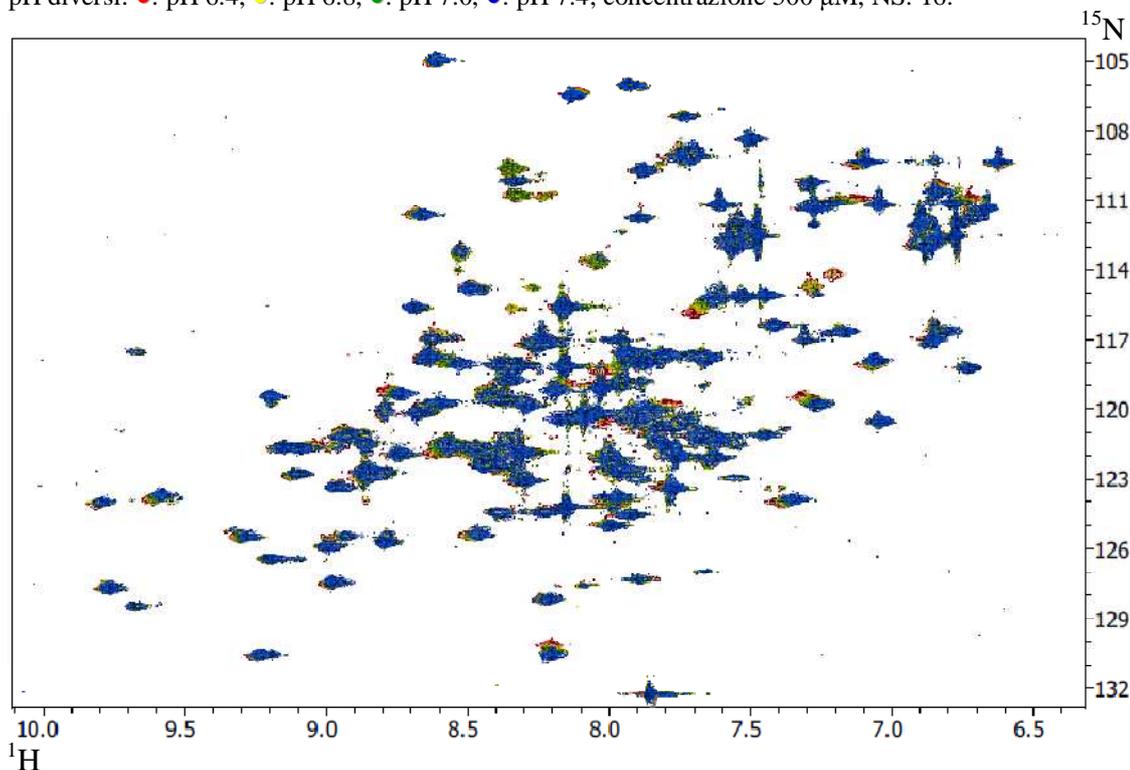
Stimando la massa molecolare sulla base del rapporto tra le intensità degli stessi segnali per t diversi si ottiene: $I_y/I_x = 1.31264 \pm 0.06963$, $\overline{MM} = 19.4 \pm 3.6$. L'accordo con la massa reale del monomero del dominio STAS (16.9 kDa) è abbastanza buono.

Per verificare se attribuire l'allargamento dei segnali allo scambio chimico tra i protoni ammidici e i protoni del solvente, sono stati raccolti spettri a diversi pH. I protoni più sensibili a questo fenomeno sono evidentemente quelli più esposti al solvente e non stabilizzati dalla presenza di strutture secondarie o da ponti idrogeno in generale. La diminuzione del pH (fino a pH 3, si veda figura 3.1-2) rallenta molto

sensibilmente questo scambio e può determinare un notevole aumento di intensità di alcuni picchi.

Naturalmente, la scelta del pH è condizionata dal punto isoelettrico (pI) della proteina in quanto, soprattutto alle alte concentrazioni, un avvicinamento del pH al pI può determinare la precipitazione della proteina.

Figura 3.3-6: Ingrandimento della regione N-H_N dello spettro ¹⁵N, ¹H -HSQC di STAS (Prestina) a quattro pH diversi: ●: pH 6.4, ●: pH 6.8, ●: pH 7.0, ●: pH 7.4; concentrazione 500 μM, NS: 16.



Dagli spettri appare evidente che, passando da pH 7.4 a 6.4 alcuni picchi compaiono e diventano progressivamente più intensi. Per evitare l'effetto dello scambio con il solvente sui segnali dei gruppi ammidici si è quindi scelto di operare a pH 6.5 negli esperimenti successivi.

Un altro fenomeno particolarmente evidente è lo spostamento graduale di alcuni segnali; ciò dipende dalla prossimità di alcuni gruppi ammidici a dei gruppi ionizzabili (in questo *range* di pH, si tratta essenzialmente dei gruppi imidazolo delle catene laterali di istidina). L'abbassamento progressivo del pH tende a spostare l'equilibrio del gruppo imidazolo dalla forma neutra verso la forma carica (protonata). Il processo di scambio $N \rightleftharpoons N-H$ risulta estremamente rapido (anche a causa del processo di tautomerizzazione tra i gruppi δ_1 e ϵ_2) e, di conseguenza, anche la variazione dell'ambiente chimico locale è molto rapida. Pertanto, un gruppo ammidico posto nelle vicinanze, sperimenta una rapida interconversione tra ambienti chimici e le sue frequenze di risonanza ω_H e ω_N rappresentano dei valori medi, ponderati sulla base delle due popolazioni ($N \rightleftharpoons N-H$ dell'imidazolo). Pertanto, al variare del pH, il picco ammidico si sposta gradualmente tra due valori limite, corrispondenti agli ambienti chimici determinati dalla completa deprotonazione (N) o dalla completa protonazione (N-H).

Dopo aver verificato la stabilità nel tempo della proteina a variazioni di pH e ad elevati livelli di concentrazione (fino a 1.2 mM), è stato deciso di proseguire gli studi strutturali tramite tecniche di NMR tridimensionale in doppia e tripla risonanza.

A tale scopo è stato prodotto un campione con doppia marcatura isotopica ^{13}C , ^{15}N .

Gli esperimenti necessari per l'assegnazione completa delle risonanze e per la determinazione della struttura sono stati acquisiti presso il Biocentro dell'Istituto di Chimica Biofisica dell'Università Johann Wolfgang Goethe di Frankfurt am Main (Marie Curie-Strasse 9, 60439 Frankfurt, Germania). Tali esperimenti hanno richiesto circa 45 giorni di tempo macchina su spettrometri (dotati di *Cryoprobe*) di diverso campo magnetico statico \mathbf{B}_0 , compreso tra 11.7 T ($\nu_{\text{H}} = 500$ MHz) e 22.313 T ($\nu_{\text{H}} = 950$ MHz), uno dei più intensi campi disponibili in Europa. L'accesso a questo centro è stato reso possibile grazie al progetto europeo EU-NMR, finanziato dalla Commissione Europea.

3.3.4 ASSEGNAZIONE DELLE FREQUENZE DI RISONANZA DI ^1H , ^{13}C E ^{15}N DEL DOMINIO STAS DI PRESTINA

Gli esperimenti che verranno mostrati in seguito sono stati condotti su un campione di STAS 1.15 mM, in tampone 35 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, a pH 6.5 e alla temperatura di 298 K. Tutti gli esperimenti sono stati acquisiti in modalità TROSY.

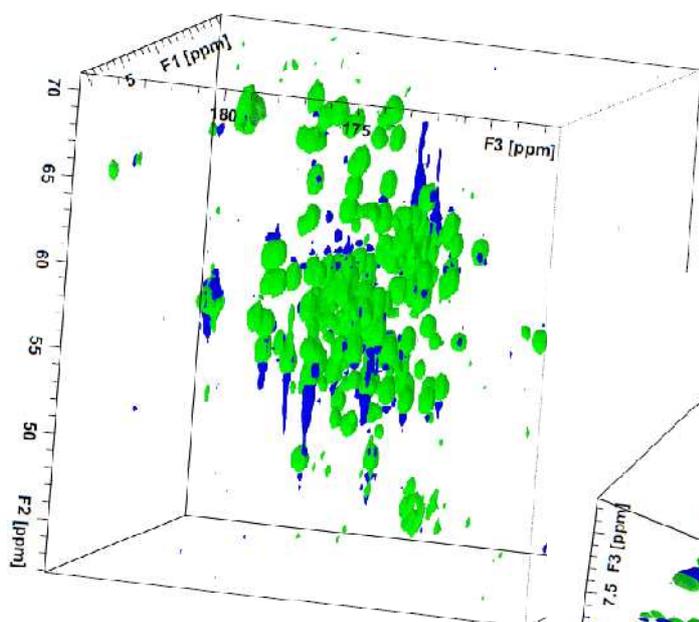
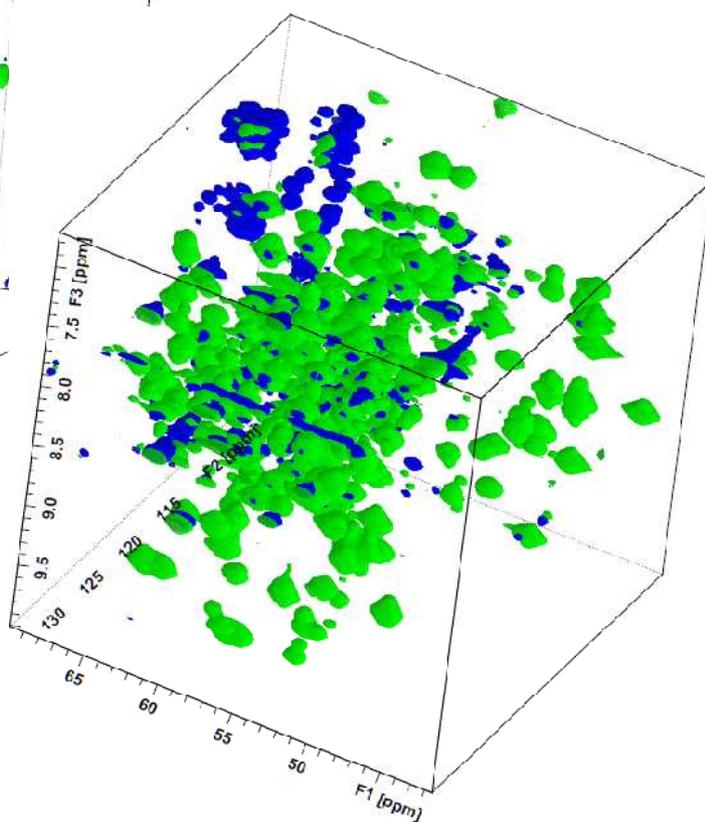


Figura 3.3-7: Rappresentazione tridimensionale dello spettro ^1H , ^{13}C -HCACO (con acquisizione sul carbonio). Le dimensioni dello spettro sono: $^1\text{H}_{\alpha i}$ (F1), $^{13}\text{C}_{\alpha i}$ (F2), $^{13}\text{C}_{\text{O}i}$ (F3).

Figura 3.3-8: Rappresentazione tridimensionale dello spettro ^{13}C , ^{15}N , ^1H -HNCA. Le dimensioni dello spettro sono: $^{13}\text{C}_{\alpha i, i-1}$ (F1), $^{15}\text{N}_i$ (F2), $^1\text{H}_{\text{N}i}$ (F3).



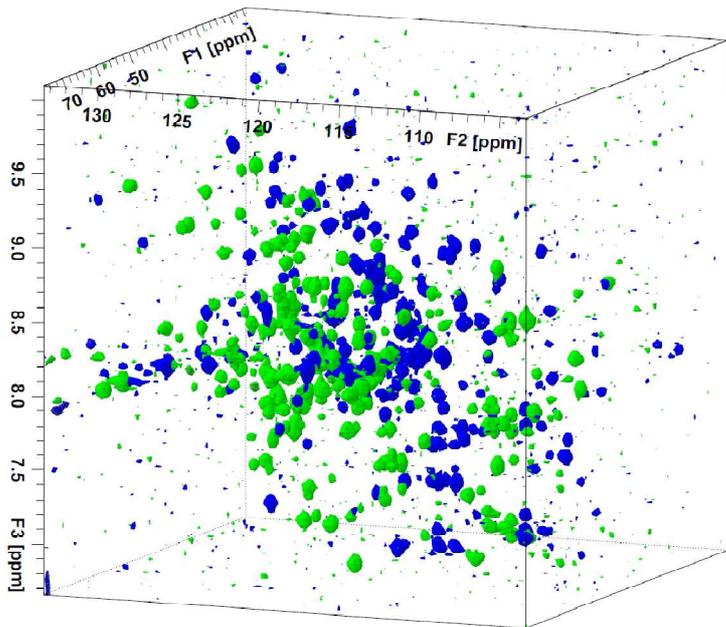


Figura 3.3-9: Rappresentazione tridimensionale dello spettro $^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -HNCACB. Le dimensioni dello spettro sono: $^{13}\text{C}_{\alpha/\beta, i-1}$ (F1), $^{15}\text{N}_i$ (F2), $^1\text{H}_{\text{N}_i}$ (F3).

Figura 3.3-9: Rappresentazione tridimensionale dello spettro $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -3D NOESY. Le dimensioni dello spettro sono: ^1H (F1), ^{15}N (F2), $^1\text{H}_\text{N}$ (F3).

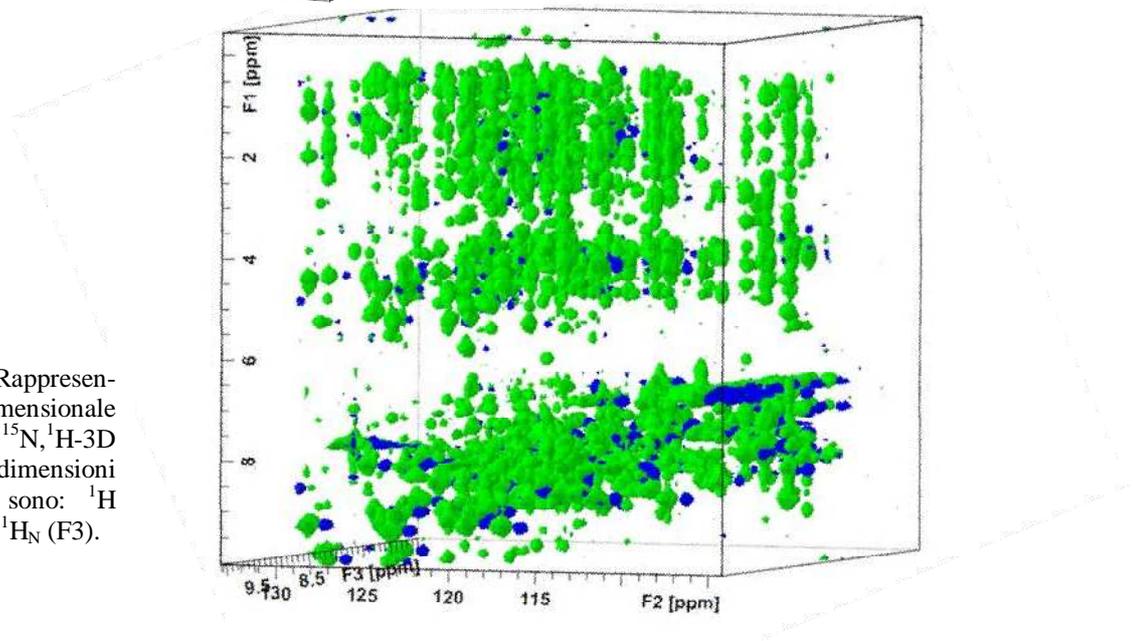
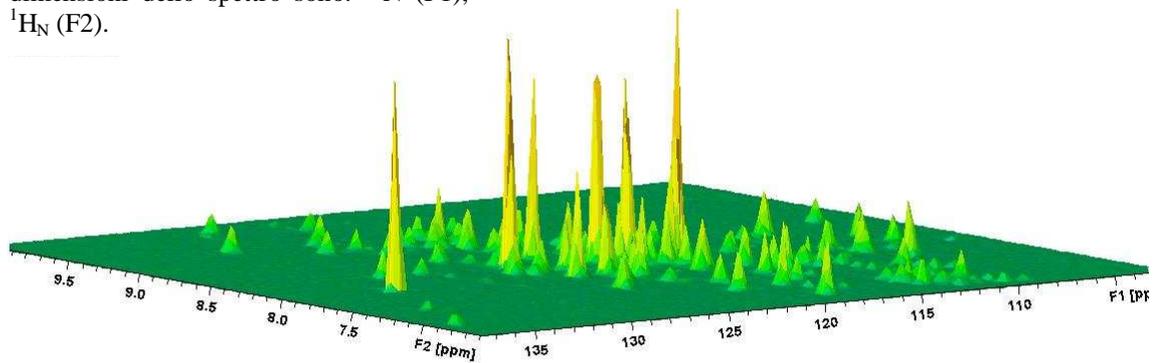


Figura 3.3-10: Rappresentazione tridimensionale dello spettro $^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY. Le dimensioni dello spettro sono: ^{15}N (F1), $^1\text{H}_\text{N}$ (F2).



Per gestire gli esperimenti tridimensionali e poterli assegnare, è necessario visualizzarli come proiezioni bidimensionali. Generalmente, negli esperimenti che

sfruttano le risonanze del gruppo ammidico, la proiezione principale è quella che individua il piano $H_N - N$ (corrispondente al $^{15}N, ^1H$ -TROSY), sulla cui verticale sono individuati i picchi che permettono di individuare le connessioni con altri atomi del *backbone* o delle catene laterali. Negli esperimenti che sfruttano i gruppi C-H, la proiezione principale è quella corrispondente ad un $^{13}C, ^1H$ -TROSY.

Se si considera il cilindro a base ellittica che ha per base la proiezione dei picchi sul piano principale, la sua altezza individua la terza dimensione. Dalla proiezione di questo cilindro (che ospita tutti i picchi tra loro correlati) risultano due strisce (*strip*) le cui coordinate sono rappresentate da ciascuna delle dimensioni del piano principale e dall'altezza del cilindro.

A titolo esemplificativo, nelle pagine seguenti sarà mostrata l'assegnazione, completa di tutti gli spettri, del segmento Ile 131 – His 132 – Asp 133 del dominio STAS di Prestina. Tutte le immagini delle proiezioni sono ottenute con l'ausilio del software CARA, che è anche stato utilizzato per l'assegnazione.

Figura 3.3-11: Un picco di un esperimento tridimensionale e la sua proiezione sul piano HSQC.

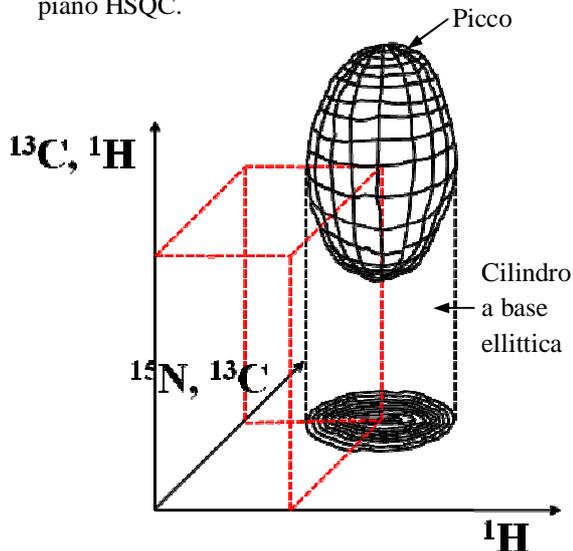
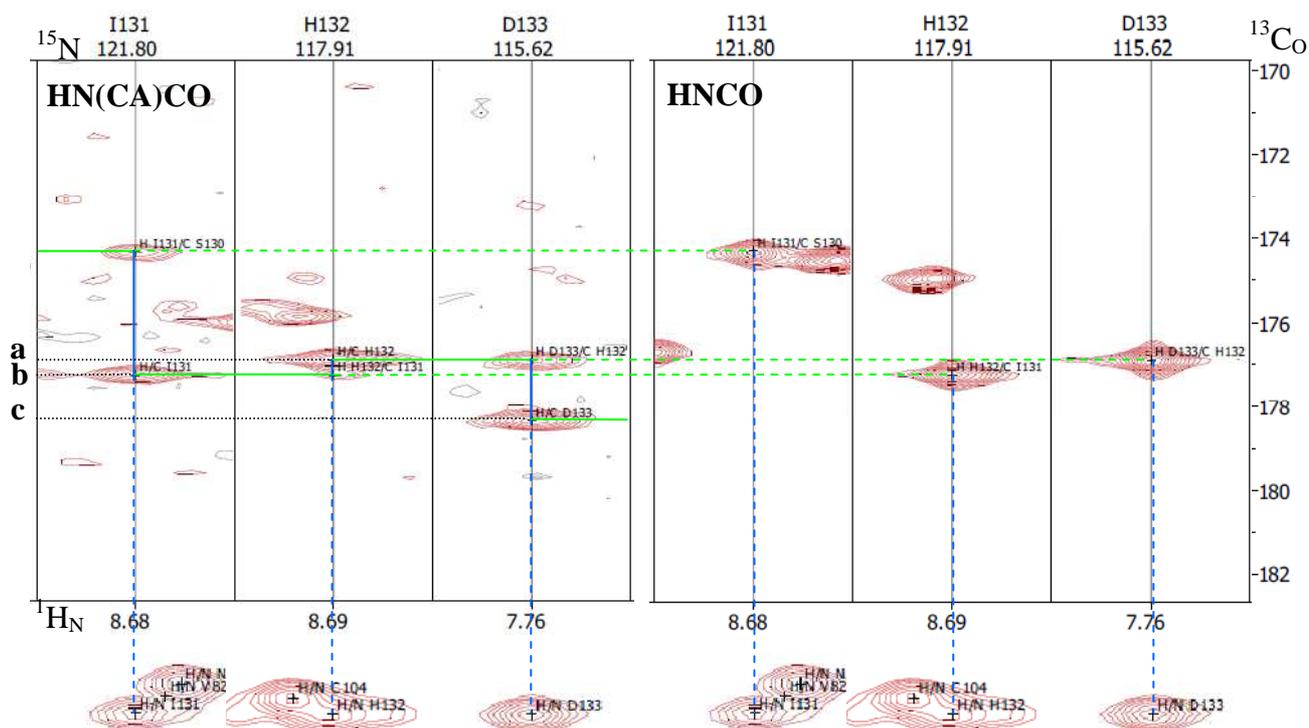


Figura 3.3-12: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - C_O$, tratte dagli spettri HN(CA)CO e HNC(O). Le proiezioni dei *cross*-picchi sul piano $^{15}N, ^1H$ -TROSY sono presentate al di sotto delle rispettive *strip*. **a**, **b** e **c** indicano dei piani perpendicolari alla pagina, situati all'altezza dei *cross*-picchi.



Per ragioni di spazio verranno in seguito mostrati soltanto gli allineamenti tra *strip*, ma ciascuno degli spettri analizzati deve essere inteso come una serie di piani sovrapposti che ospitano i cross-picchi corrispondenti ad una certa coordinata nella terza dimensione (l'altezza del cilindro), in analogia con quanto mostrato per lo spettro HN(CA)CO.

Figura 3.3-14: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - C_{\alpha,\beta}$, tratte dagli spettri HN(CO)CACB e HNCACB.

● C_α , ● C_β

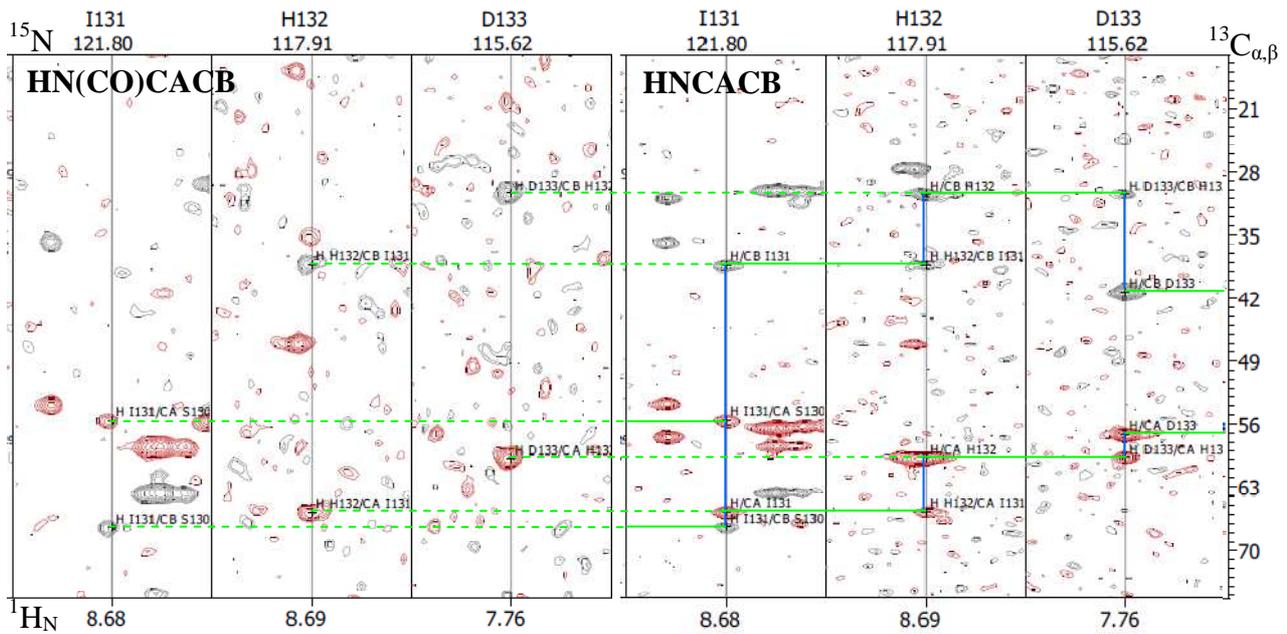


Figura 3.3-15: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - C_\alpha$, tratte dallo spettro HNCA.

A destra è invece riportata la proiezione dello spettro *C-detected* HCACO sul piano $1H_\alpha - 13C_\alpha$.

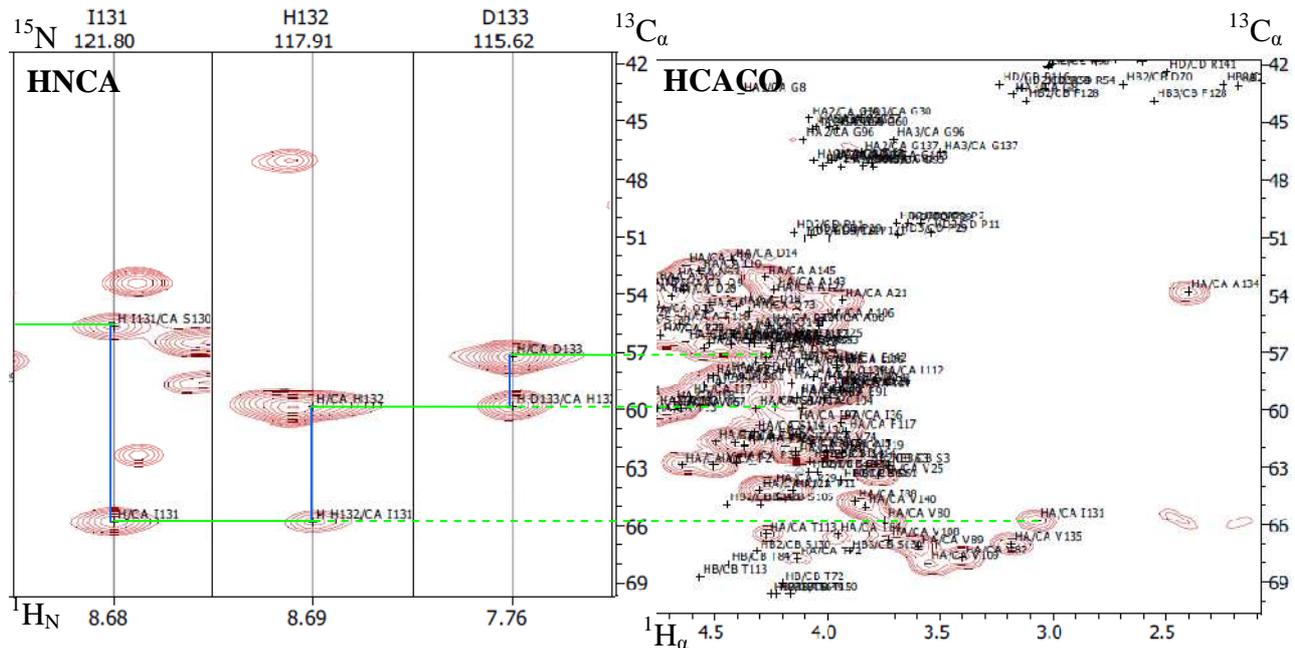


Figura 3.3-16: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - H_\alpha$, tratte dagli spettri HBHA(CBCACO)NH e H(CA)NH.

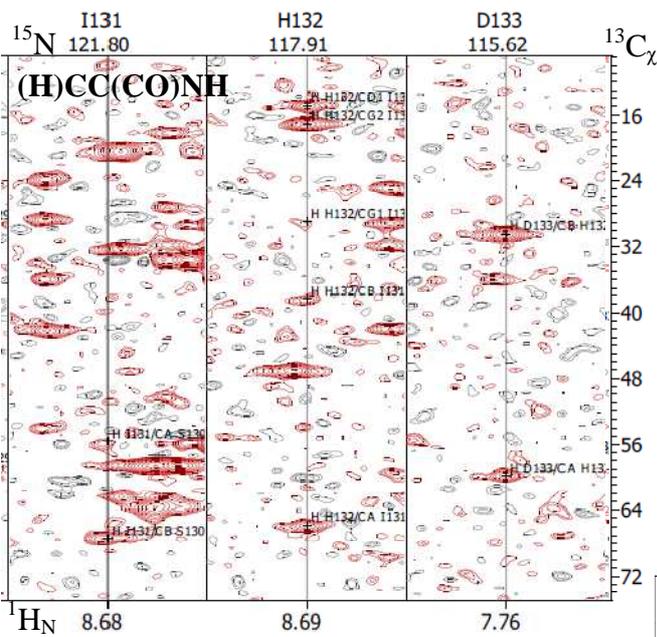
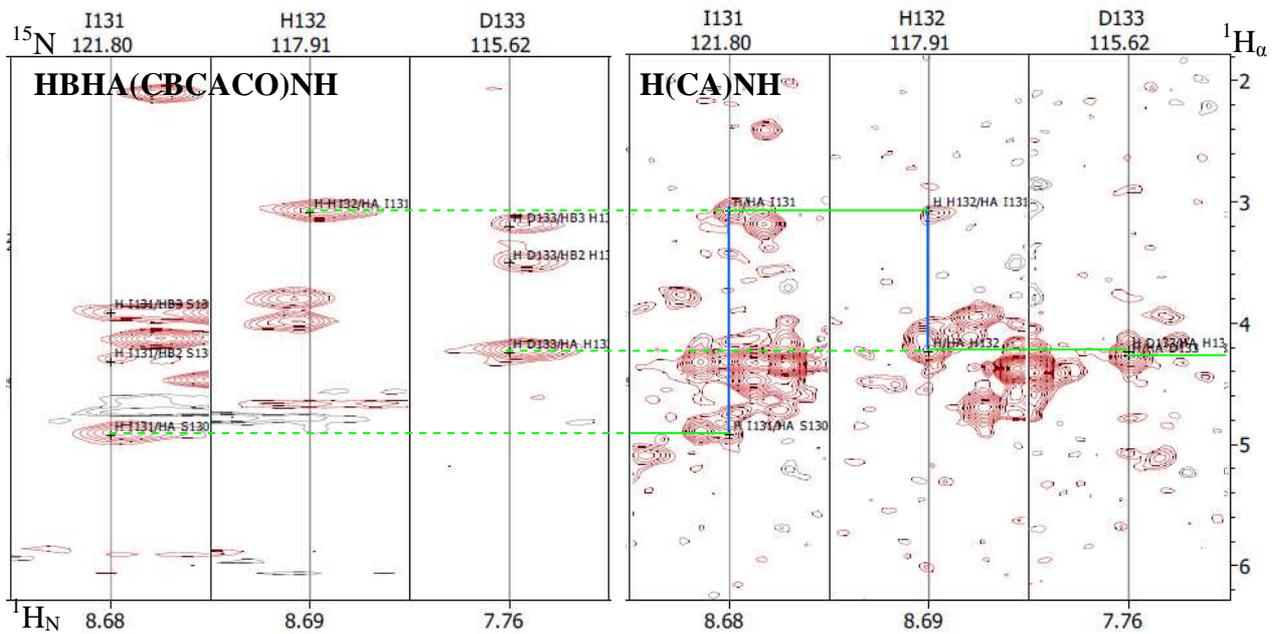


Figura 3.3-17: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - C_\alpha$, tratte dallo spettro (H)CC(CO)NH.

Figura 3.3-18: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni $H_N - H_\gamma$, tratte dallo spettro H(CCCO)NH.

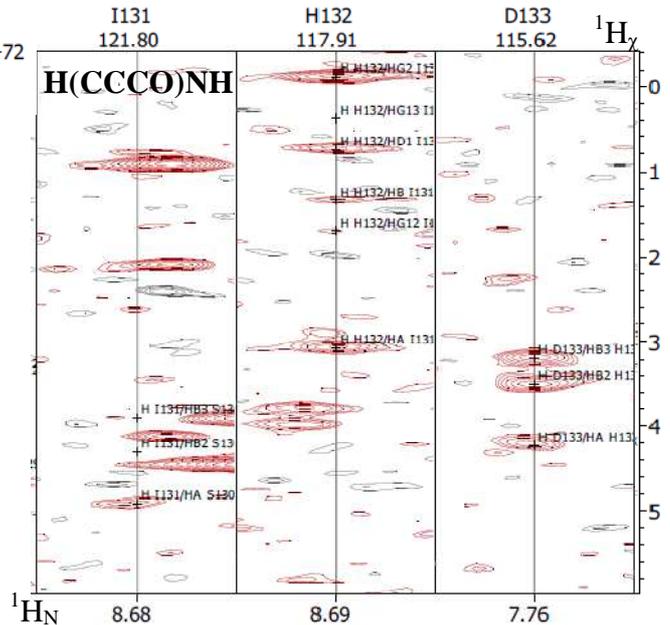


Figura 3.3-18: Catena laterale di I131. Allineamento delle *strip* (corrispondenti ad ogni coppia $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$) del residuo I131 nelle dimensioni $H_\chi - H_\chi$, tratte dallo spettro HC(C)H – TOCSY.

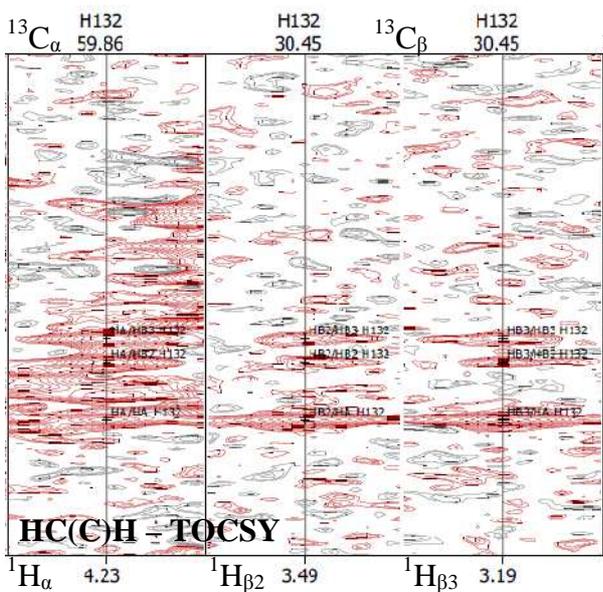
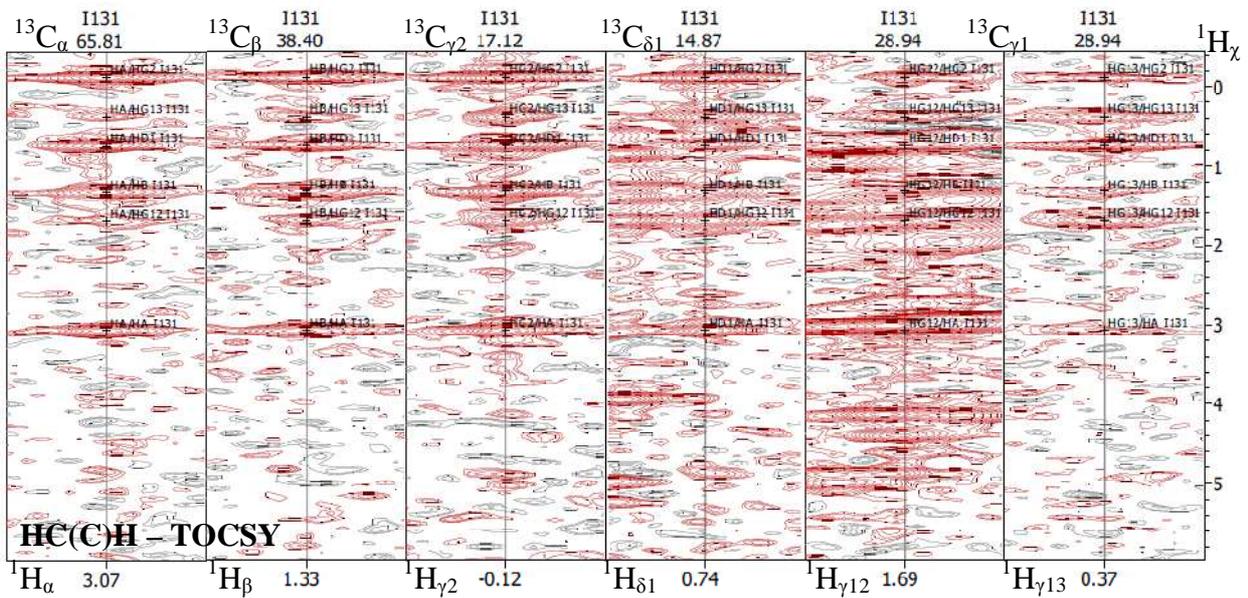
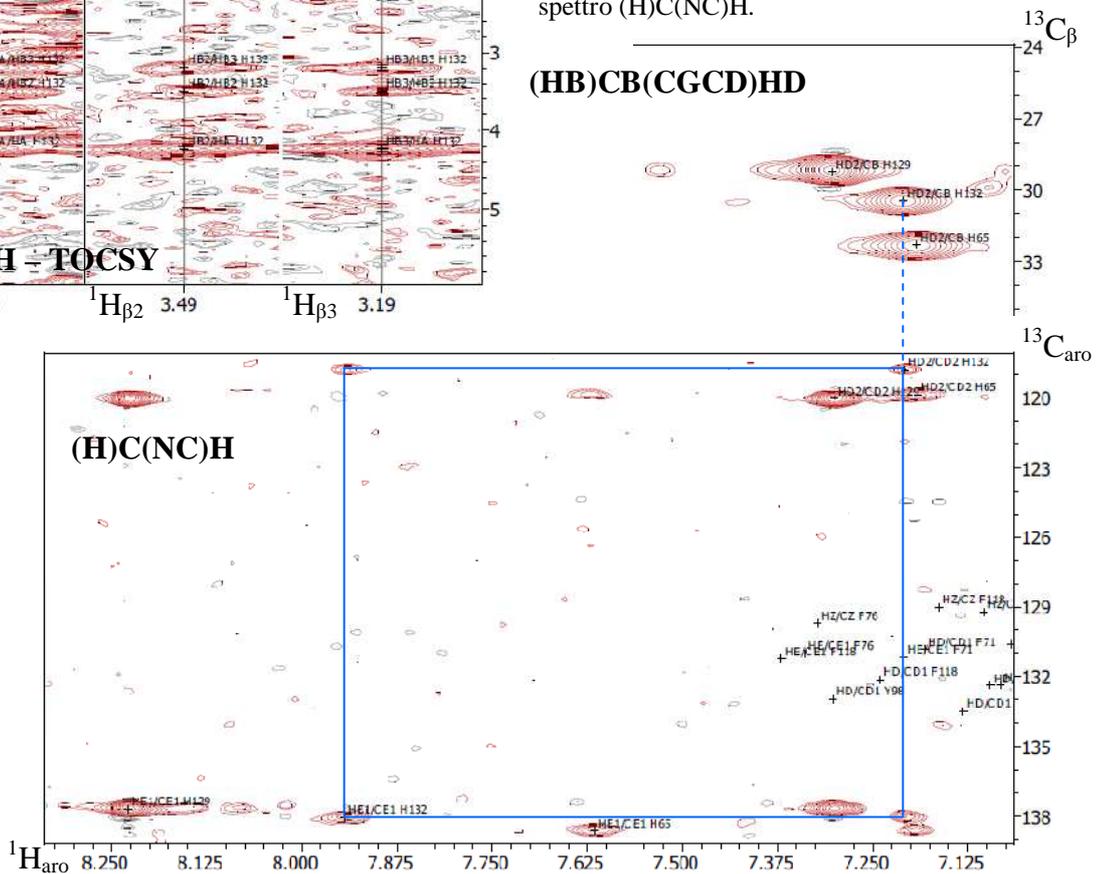


Figura 3.3-19: Catena laterale di H132. Allineamento delle *strip* del residuo H132 nelle dimensioni $H_{\alpha,\beta} - H_{\alpha,\beta}$, tratte dallo spettro HC(C)H – TOCSY. Sotto: correlazione tra $^{13}\text{C}_\beta$ e $^1\text{H}_{\delta_2}$ nello spettro (HB)CB(CGCD)HD, e tra $^1\text{H}_{\delta_2}$ e $^1\text{H}_{e_1}$ nello spettro (H)C(NC)H.



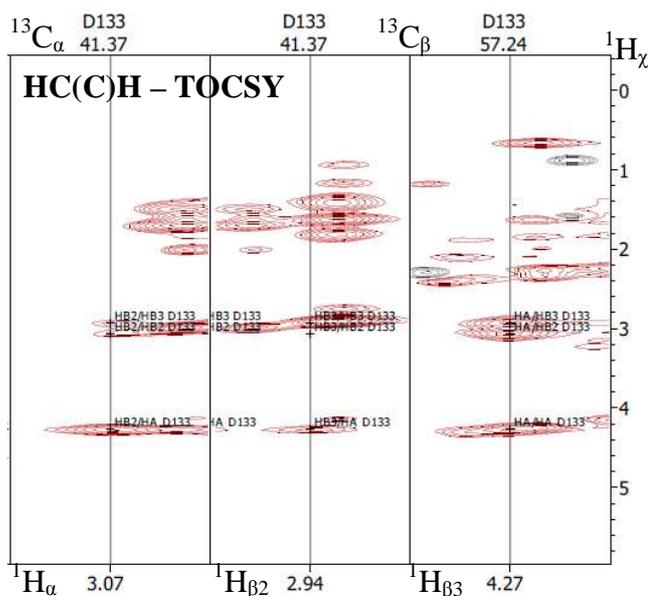


Figura 3.3-20: Catena laterale di D133. Allineamento delle *strip* del residuo D133 nelle dimensioni $H_{\alpha,\beta} - H_{\alpha,\beta}$, tratte dallo spettro HC(C)H - TOCSY.

Tabella 3.2-5: Esperimenti acquisiti per l'assegnazione del dominio STAS di Prestina e principali parametri di acquisizione: numero di campionamenti (TD), numero di scansioni (NS), finestre spettrali (SW).

Esperimento (mod. TROSY)	Numero di campionamenti		Numero di scansioni	Finestra spettrale	Campo B_0
	$^{13}\text{C}_O$	^{15}N			
HNCO	$^{13}\text{C}_O$	66	2	12 ppm	21.14 T
	^{15}N	216		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	1024		11 ppm	900.09 MHz
HN(CA)CO	$^{13}\text{C}_O$	128	8	13 ppm	21.14 T
	^{15}N	216		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	1024		11 ppm	900.09 MHz
^{13}C - det. HCACO	$^1\text{H}_\alpha$	48	8	4 ppm	14.09 T
	$^{13}\text{C}_\alpha$	76		29 ppm	
	$^{13}\text{C}_O$	512		18 ppm	150.90 MHz
HNCA	$^{13}\text{C}_\alpha$	88	24	28.4 ppm	16.44 T
	^{15}N	128		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	832		10.5 ppm	700.17 MHz
HN(CO)CACB	$^{13}\text{C}_{\alpha\beta}$	80	4	60.5 ppm	21.14 T
	^{15}N	216		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	1024		11 ppm	900.09 MHz
HNCACB	$^{13}\text{C}_{\alpha\beta}$	176	4	60.5 ppm	21.14 T
	^{15}N	216		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	1024		11 ppm	900.09 MHz
H(CA)NH	$^1\text{H}_\alpha$	96	48	4 ppm	11.74 T
	^{15}N	80		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	384		6 ppm	499.80 MHz
HBHA(CBCACO)NH	$^1\text{H}_\alpha$	152	8	5.8 ppm	16.44 T
	^{15}N	156		30 ppm	
	$^1\text{H}_N$	832		10.6 ppm	700.17 MHz

(H)CC(CO)NH	$^{13}\text{C}_\chi$	152		66.3 ppm	14.09 T
	^{15}N	160		30 ppm	
	$^1\text{H}_\text{N}$	768	8	11 ppm	599.88 MHz
H(CCCO)NH	$^1\text{H}_\chi$	172		6.4 ppm	14.09 T
	^{15}N	160		30 ppm	
	$^1\text{H}_\text{N}$	768	8	11 ppm	599.88 MHz
HC(C)H – TOCSY	$^1\text{H}_\chi$	192		6.4 ppm	18.79 T
	$^{13}\text{C}_\chi$	256		65.4 ppm	
	$^1\text{H}_\chi$	1024	8	11 ppm	800.13 MHz
(HB)CB(CGCD)HD	$^{13}\text{C}_\beta$	88		29.3 ppm	16.44 T
	$^1\text{H}_\delta$	768	384	8.5 ppm	700.17 MHz
(HB)CB(CGCD)H – TOCSY (Phe/Tyr)	$^{13}\text{C}_\beta$	100		29.2 ppm	18.79 T
	$^1\text{H}_\chi$	1024	768	8.5 ppm	800.13 MHz
(H)C(NC)H (His)	$^{13}\text{C}_{\varepsilon 1, \delta 2}$	160		27.9 ppm	18.79 T
	$^1\text{H}_{\delta 2, \varepsilon 1}$	1024	192	8.5 ppm	800.13 MHz
$^{15}\text{N}, ^1\text{H}$ -TROSY	^{15}N	216		30 ppm	21.14 T
	$^1\text{H}_\text{N}$	2048	2	15 ppm	900.09 MHz
$^{13}\text{C}, ^1\text{H}$ -TROSY (aromatici)	$^{13}\text{C}_\chi$	400		80.2 ppm	18.79 T
	$^1\text{H}_\chi$	1024	4	11 ppm	800.13 MHz

L'assegnazione della catena principale e delle catene laterali è stata completata per l'86% degli amminoacidi.

Tabella 3.2-6: Chemical shifts della catena principale e delle catene laterali degli amminoacidi del dominio STAS di Prestina. A sinistra è indicata la sequenza amminoacidica. I (...) indicano risonanze non individuate, o non univocamente assegnabili.

residuo	^{15}N	$^1\text{H}_\text{N}$	$^{13}\text{C}_\text{O}$	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^1\text{H}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\chi$	$^1\text{H}_\chi$
P2			177.158	62.910	4.504	β	31.793 2.206, 1.797
						γ	27.107 1.926
						δ	50.286 3.694, 3.586
S3	116.743	8.685	174.374	59.924	4.315	β	62.942 3.824, 3.731
...							
T5	118.065	8.872	173.070	61.669	4.493	β	72.021 3.940
						$\gamma 2$	21.664 1.252
V6	130.573	9.322	174.956	62.903	4.642	β	31.559 2.100
						$\gamma 1$	22.047 1.190
						$\gamma 2$	21.546 0.953
L7	124.419	8.313	176.354	52.360	5.049	β	44.226 1.509, 1.328
						γ	26.487 1.494
						$\delta 1$	25.977 0.783
						$\delta 2$	21.787 0.573
G8	105.036	8.701	170.616	43.528	4.384, 3.179		
Q9	119.264	8.845	177.127	53.724	4.638	β	33.122 2.098, 1.696
						γ	33.122 2.084, 1.948
L10	130.330	8.290	175.124	52.716	4.565	β	40.808 1.400, 1.633
						γ	26.689 1.398
						$\delta 1$	24.482 0.737
						$\delta 2$	24.414 0.737

P11			176.143	64.218	4.155	β	31.848	2.258, 1.830
						γ	27.734	2.147, 1.982
						δ	50.773	4.150, 3.542
D12	115.654	8.771	174.885	55.546	4.259	β	39.377	2.898, 2.840
T13	108.375	7.588	172.856	60.312	4.774	β	72.623	4.163
						γ_2	20.388	1.033
D14	118.191	8.061	174.632	52.157	4.420	β	39.289	2.448, 2.009
V15	119.945	7.914	173.941	62.140	4.005	β	32.678	2.015
						γ_1	21.454	0.827
						γ_2	21.118	0.827
Y16	125.017	8.089	175.786	56.329	5.391	β	39.956	2.696, 2.592
						δ	133.187	6.780
						ϵ	117.209	6.574
I17	119.831	8.695	173.208	59.346	4.608	β	43.452	1.757
						γ_1	26.390	1.411, 1.015
						γ_2	17.666	0.872
						δ_1	13.894	0.746
D18	122.670	8.052	177.206	54.600	4.406	β	41.724	2.720, 2.625
I19	125.457	8.564	175.388	62.277	3.934	β	38.668	1.682
						γ_1	26.934	1.393, 1.279
						γ_2	18.000	0.874
						δ_1	14.994	0.831
D20	118.145	8.408	177.560	54.070	4.692	β	41.053	2.723, 2.542
A21	122.555	8.063	177.224	54.260	3.934	β	19.982	1.315
Y22	110.547	6.922	175.896	56.080	4.740	β	41.114	3.321, 2.632
						δ	133.470	7.131
						ϵ	117.888	6.796
E23	122.950	8.938	177.319	58.564	4.158	β	29.641	2.028
						γ	36.053	2.307
E24	114.731	8.533	176.296	57.503	4.120	β	29.306	2.055, 1.848
						γ	36.519	2.239
V25	118.026	7.150	175.121	63.430	3.774	β	31.318	2.078
						γ_1	22.816	0.978
						γ_2	22.268	0.777
K26	123.932	8.053	176.738	53.984	4.888	β	35.881	1.913, 1.798
						γ	23.849	1.529
						δ	28.684	1.774, 1.713
						ϵ	42.024	3.015
E27	121.975	8.834	175.793	57.498	4.316	β	30.930	2.411, 1.885
						γ	39.575	2.386, 2.116
I28	127.728	9.863	174.362	58.315	4.375	β	38.913	1.791
						γ_1	27.534	1.624, 1.274
						γ_2	17.225	0.955
						δ_1	14.240	1.014
P29			177.314	63.967	4.242	β	31.666	2.317, 1.929
						γ	27.656	2.159, 1.994
						δ	50.908	4.069, 3.689
G30	111.630	8.763	172.262	44.800	4.082, 3.854			
I31	120.332	7.995	175.565	59.367	5.009	β	41.339	1.528
						γ_1	27.670	1.430, 0.666
						γ_2	17.216	0.594
						δ_1	14.596	0.864
K32	128.205	8.306	173.572	52.434	4.627	β	34.325	1.411, 1.339
						γ	24.230	1.177, 0.942
						δ	27.501	1.649, 1.594
						ϵ	41.382	2.906, 2.745
I33	125.521	9.034	174.521	59.921	4.758	β	38.670	1.787
						γ_1	27.503	1.595, 0.440

						γ_2	18.492	0.586
						δ_1	13.863	0.563
F34	123.398	9.055	174.543	54.262	5.486	β	41.839	2.811, 2.605
						δ	131.300	6.867
						ϵ	130.635	7.067
						ζ	129.226	7.103
Q35	124.093	9.896	174.453	55.078	4.795	β	32.359	2.280, 1.903
						γ	34.919	2.400, 1.935
I36	126.995	7.763	175.855	60.641	3.940	β	35.949	1.530
						γ_1	26.617	0.980, 0.853
						γ_2	18.048	0.675
						δ_1	10.670	0.317
...								
P39			176.720	62.741	4.405	β	31.806	2.274, 1.893
						γ	27.136	2.020, 2.002
						δ	50.305	3.643
I40	121.670	8.536	176.310	56.272	4.471	β	38.400	1.705
						γ_1	26.504	1.419
						γ_2	17.317	0.780
						δ_1	13.412	0.617
...								
K53	176.663	56.728	4.145	β	32.457	1.820
						γ	24.561	1.450, 1.394
						δ	28.899	1.627
						ϵ	41.667	2.912
R54	56.763	4.168	β	30.156	1.721, 1.673
						γ	27.107	1.559
						δ	43.202	3.143, 3.034
K55	8.431	...	176.747	56.050	4.414	β	32.882	1.902, 1.818
						γ	24.650	1.510, 1.460
						δ	28.769	1.702
						ϵ	42.083	3.026
T56	113.665	8.127	175.011	61.839	4.367	β	69.623	4.251
						γ_2	21.367	1.178
G57	110.804	8.414	174.543	45.247	4.051, 3.990			
V58	118.824	8.049	176.301	62.422	4.138	β	32.327	2.118
						γ_1	20.865	0.944
						γ_2	20.170	0.921
N59	121.432	8.652	175.705	53.377	4.760	β	38.589	2.905, 2.804
G60	109.632	8.434	174.554	45.348	4.065, 3.957			
S61	115.635	8.244	174.541	58.592	4.478	β	63.685	3.941, 3.900
E62	121.910	8.556	176.013	56.499	4.321	β	29.955	2.065, 1.945
						γ	36.145	2.273
N63	119.404	8.503	174.360	53.127	4.676	β	38.393	2.840, 2.757
I64	121.188	7.944	174.879	59.050	3.905	β	38.434	1.788
						γ_1	26.418	1.271, 1.229
						γ_2	17.937	0.615
						δ_1	11.537	0.606
H65	121.661	9.151	176.090	55.123	5.083	β	32.303	3.234, 3.058
						δ_2	119.873	7.191
						ϵ_1	138.629	7.615
T66	119.638	7.382	171.334	62.051	5.152	β	73.397	3.714
						γ_2	21.051	0.635
V67	127.495	9.068	173.849	59.954	4.652	β	34.045	1.484
						γ_1	21.068	0.418
						γ_2	20.770	0.677
I68	126.447	9.289	173.927	59.605	4.681	β	39.793	1.537
						γ_1	28.318	1.509

						γ_2	16.992	0.593
						δ_1	15.135	0.585
L69	125.913	9.085	174.790	52.172	5.285	β	43.088	2.180, 1.119
						γ	26.617	1.718
						δ_1	24.667	0.839
						δ_2	25.621	0.785
D70	122.860	9.202	177.286	53.393	5.259	β	43.027	2.689, 2.244
F71	128.513	9.769	177.302	58.233	4.508	β	40.256	3.506, 2.947
						δ	130.852	7.182
						ϵ	131.159	7.209
						ζ	127.992	6.853
T72	120.210	8.885	176.489	67.799	4.133	β	69.067	4.200
						γ_2	21.995	1.456
Q73	117.558	9.764	175.421	54.878	4.346	β	27.869	2.360, 1.938
						γ	33.461	2.355, 2.259
...								
V80	7.649	122.997	179.600	65.788	3.747	β	31.322	2.108
						γ_1	22.396	1.074
						γ_2	20.978	0.944
G81	113.145	8.619	174.504	47.273	4.021, 3.842			
V82	121.583	8.662	177.095	67.734	3.403	β	31.031	2.063
						γ_1	22.529	1.080
						γ_2	22.987	0.995
K83	120.334	7.995	180.396	59.433	4.134	β	32.002	2.015
						γ	24.889	1.612, 1.510
						δ	29.108	1.716, 1.621
						ϵ	41.970	3.002
T84	118.110	8.468	176.884	66.503	3.955	β	68.077	4.437
						γ_2	20.483	1.223
L85	124.450	8.480	177.941	57.784	4.113	β	41.623	2.043, 1.396
						γ	26.662	1.645
						δ_1	22.493	0.902
						δ_2	26.474	0.513
A86	121.245	9.029	180.826	55.539	4.036	β	17.607	1.584
G87	106.035	8.015	175.898	47.004	4.060, 3.977			
I88	124.545	8.009	177.723	64.806	3.877	β	38.301	2.167
						γ_1	28.687	1.817, 1.139
						γ_2	16.560	0.926
						δ_1	13.498	0.759
V89	118.762	8.449	179.291	67.161	3.597	β	31.561	2.258
						γ_1	22.070	1.164
						γ_2	21.098	1.013
K90	120.811	7.919	177.760	59.294	4.131	β	32.523	2.046, 1.931
						γ	24.699	1.493, 1.418
						δ	28.733	1.711, 1.648
						ϵ	42.143	3.021
E91	119.641	8.453	180.268	59.433	4.015	β	29.216	2.060, 1.945
						γ	36.334	2.307, 2.157
Y92	8.107	116.975	178.824	61.937	4.187	β	36.226	2.938, 2.773
						δ	132.392	7.095
						ϵ	117.252	6.653
G93	110.179	8.414	178.140	47.339	3.940, 3.796			
D94	122.442	8.524	178.069	56.545	4.522	β	40.214	2.871, 2.694
V95	110.213	7.381	176.007	59.992	4.677	β	30.781	2.576
						γ_1	18.994	1.046
						γ_2	21.253	0.924
G96	109.085	7.824	173.941	45.892	4.107, 3.706			
I97	122.132	8.081	175.177	60.632	4.142	β	39.207	1.648

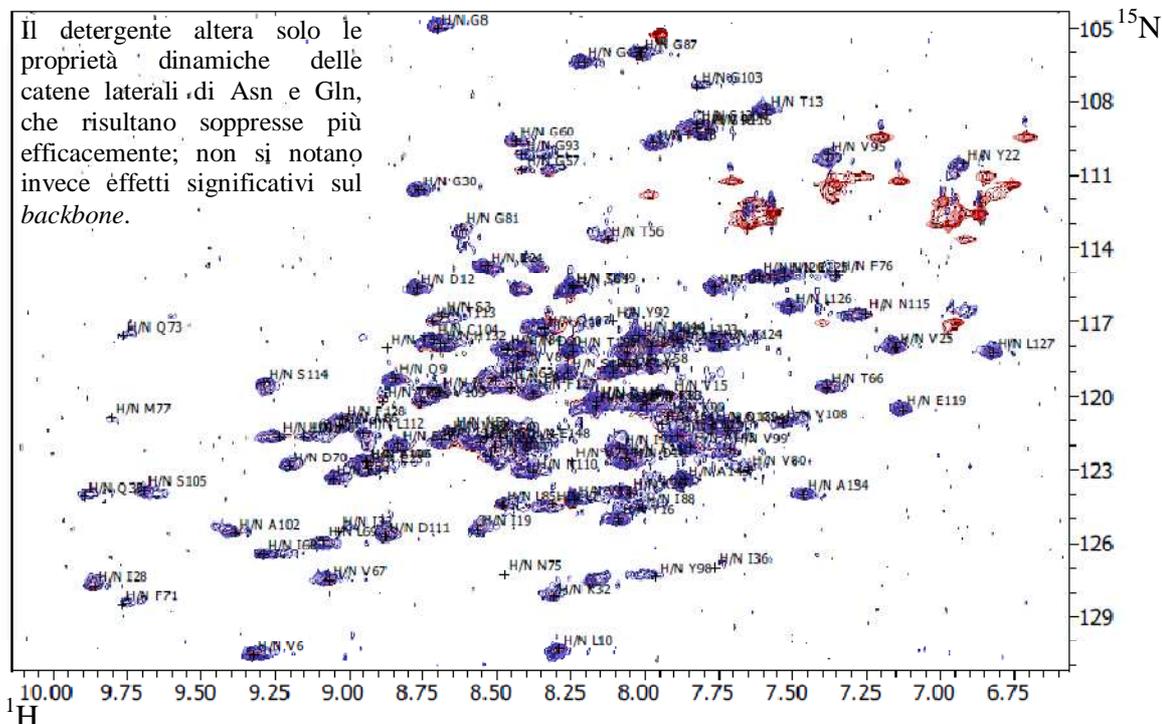
						γ_1	27.845	1.571, 1.033
						γ_2	16.952	0.531
						δ_1	13.631	0.846
Y98	127.373	7.963	173.754	58.974	3.986	β	39.723	2.674, 2.438
						δ	132.988	7.302
						ε	118.049	6.879
V99	122.109	7.711	173.860	60.121	5.073	β	33.042	1.974
						γ_1	20.948	0.802
						γ_2	22.454	0.785
Y100	122.699	8.942	174.937	51.880	5.809	β	40.630	3.180, 2.751
						δ	132.448	6.686
						ε	118.130	7.023
L101	121.650	9.238	175.081	53.421	5.247	β	42.435	1.857, 1.116
						γ	28.076	1.732
						δ_1	24.806	0.712
						δ_2	24.611	0.647
A102	125.583	9.385	177.054	49.172	5.439	β	21.185	0.988
G103	107.400	7.822	...	47.084	3.994, 3.807			
C104	117.714	8.714	175.912	59.914	4.113	β	27.674	2.683, 2.432
S105	123.833	9.695	173.964	56.607	4.427	β	64.987	4.444, 4.298
A106	122.715	8.940	180.468	55.302	4.020	β	17.449	1.462
Q107	117.277	8.342	177.466	58.589	4.012	β	28.170	2.291, 2.102
						γ	33.559	2.675, 2.508
V108	121.091	7.534	178.202	66.783	3.731	β	31.161	2.090
						γ_1	25.282	0.893
						γ_2	21.601	0.739
V109	120.227	8.757	179.829	68.037	3.554	β	30.891	2.108
						γ_1	23.578	0.901
						γ_2	21.245	0.929
N110	123.137	8.378	177.624	56.758	4.545	β	37.621	3.067, 3.021
D111	125.728	8.878	179.863	58.134	4.440	β	40.623	2.880
L112	121.493	8.949	178.979	58.314	3.783	β	41.696	2.070, 0.783
						γ	25.895	1.644
						δ_1	25.211	0.342
						δ_2	22.579	-0.137
T113	116.977	8.717	179.296	66.504	4.269	β	68.765	4.565
						γ_2	20.854	1.379
S114	119.456	9.285	174.508	61.160	4.323	β	62.708	4.075, 4.022
N115	116.648	7.254	172.646	53.701	4.978	β	39.433	3.081, 2.672
R116	109.111	7.786	176.656	57.859	4.201	β	25.886	2.144, 2.102
						γ	27.419	1.574
						δ	43.023	3.236
F117	119.871	8.376	175.701	61.113	3.917	β	41.205	2.721, 1.761
						δ	132.269	6.120
						ε	129.794	6.848
						ζ	128.455	6.916
F118	109.711	7.971	175.140	55.495	4.654	β	37.377	3.408, 2.868
						δ	132.140	7.241
						ε	131.252	7.370
						ζ	129.022	7.163
E119	120.537	7.127	177.739	58.974	3.941	β	29.211	2.072, 2.028
						γ	36.214	2.314, 2.280
N120	115.136	7.613	174.888	49.346	5.099	β	38.012	3.036, 2.790
P121			178.694	64.211	4.300	β	31.677	2.414, 2.056
						γ	26.794	2.082
						δ	51.056	4.105, 3.988
A122	121.610	7.888	180.250	54.012	4.238	β	17.957	1.432
L123	117.694	7.889	178.645	56.775	4.249	β	40.213	1.846, 1.629

						γ	28.193	1.640
						δ_1	22.788	0.682
						δ_2	24.611	0.655
K124	117.865	7.749	178.448	58.840	3.949	β	31.911	1.730
						γ	25.354	1.302, 0.897
						δ	28.739	1.464, 1.391
						ϵ	41.483	2.677
E125	115.127	7.527	176.310	56.412	4.155	β	28.635	2.270, 1.988
						γ	35.950	2.346, 2.282
L126	116.405	7.504	175.467	54.768	4.542	β	40.642	2.534, 2.178
						γ	27.146	2.093
						δ_1	25.413	1.309
						δ_2	21.450	1.279
L127	118.229	6.820	176.351	55.249	4.997	β	42.464	1.536
						γ	28.736	1.763
						δ_1	25.418	1.004
						δ_2	25.510	0.911
F128	120.973	9.023	176.941	56.439	4.628	β	43.863	3.121, 2.554
						δ	131.673	7.011
						ϵ	131.346	6.540
						ζ	129.000	6.693
H129	174.937	58.709	4.549	β	29.240	3.422, 3.354
						δ_2	120.055	7.300
						ϵ_1	137.708	8.228
S130	108.934	7.824	174.364	55.651	4.919	β	67.402	4.311, 3.904
I131	121.799	8.684	177.313	65.813	3.070	β	38.397	1.329
						γ_1	28.940	1.693, 0.375
						γ_2	17.124	-0.119
						δ_1	14.873	0.743
H132	117.909	8.688	176.943	59.856	4.232	β	30.450	3.494, 3.190
						δ_2	118.775	7.208
						ϵ_1	138.044	7.944
D133	115.622	7.762	178.408	57.237	4.272	β	41.371	3.073, 2.938
A134	123.995	7.462	178.312	53.802	2.401	β	18.200	1.036
V135	122.084	8.507	179.332	67.006	3.186	β	31.380	2.046
						γ_1	22.849	0.741
						γ_2	20.251	0.780
L136	120.405	8.164	180.139	57.789	3.960	β	40.698	1.627, 1.448
						γ	26.439	1.359
						δ_1	24.578	0.751
						δ_2	22.563	0.751
G137	106.408	8.207	176.620	46.580	3.850, 3.497			
138	119.040	8.259	175.196	61.425	4.233	β	63.222	4.082, 4.044
Q139	121.185	7.772	179.535	58.277	4.063	β	27.901	2.304, 2.031
						γ	34.069	2.648, 2.393
V140	120.219	8.162	177.630	65.079	3.832	β	31.714	2.155
						γ_1	21.901	1.054
						γ_2	20.840	0.964
R141	121.279	7.718	179.028	58.661	3.936	β	29.594	1.825, 1.789
						γ	26.610	1.617
						δ	42.355	2.498
E142	117.980	7.975	177.790	57.640	3.959	β	29.577	1.970, 1.787
						γ	35.341	1.939, 1.754
A143	122.061	7.845	179.295	53.706	4.234	β	18.234	1.465
M144	117.574	8.020	177.010	56.296	4.340	β	32.296	2.117
						γ	31.901	2.738, 2.614
A145	123.426	7.866	178.386	53.065	4.278	β	18.749	1.454
E146	119.035	8.109	176.873	56.670	4.244	β	29.829	2.093, 2.004

Si è provato, sfortunatamente senza successo, ad alterare la dinamica di tale scambio con le strategie presentate qui di seguito.

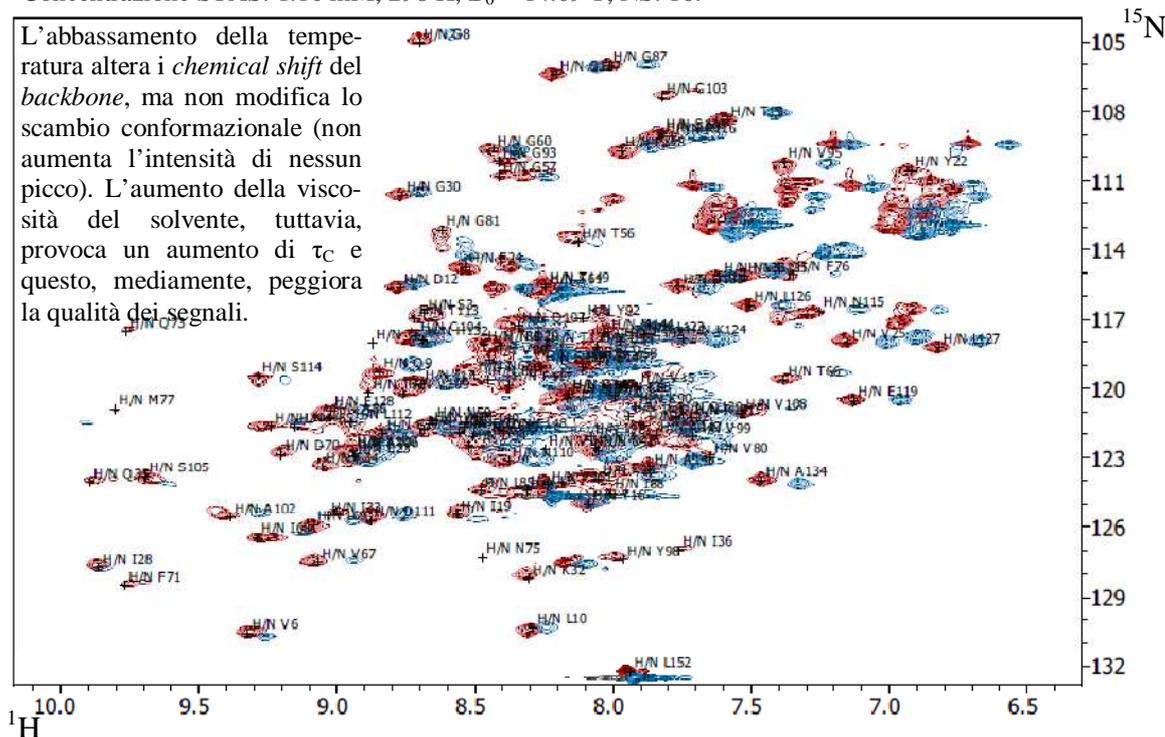
1) Aggiunta del detergente non ionico β -D-octil glucopiranoside (comunemente utilizzato per la solubilizzazione di proteine di membrana) a concentrazione sub-micellare.

Figura 3.3-21: Ingrandimento della regione N- H_N dello spettro $^{15}N, ^1H$ -TROSY in assenza (●) e in presenza di β -D-octil glucopiranoside (●). Concentrazione STAS: 1.10 mM, 298 K, $B_0 = 14.09$ T, NS: 8.



2) Abbassamento della temperatura a 283 K, per rallentare lo scambio conformazionale.

Figura 3.3-22: Ingrandimento della regione N- H_N dello spettro $^{15}N, ^1H$ -TROSY a 298 K (●) e a 283 K (●). Concentrazione STAS: 1.10 mM, 298 K, $B_0 = 14.09$ T, NS: 16.



Le informazioni relative ai *chemical shift* sono un requisito fondamentale per l'identificazione delle distanze *inter-protoniche* ${}^1\text{H}_i - {}^1\text{H}_j$ ($r_{\text{H}_i\text{H}_j}$) determinate tramite gli esperimenti NOESY (il volume dei *cross-picchi* NOESY $V_{\text{NOE}} \propto 1/(r_{\text{H}_i\text{H}_j})^6$).

Tabella 3.2-7: Esperimenti 3D NOESY – TROSY acquisiti per la determinazione delle distanze *inter-protoniche* del dominio STAS di Prestina (TD: numero di campionamenti, NS: numero di scansioni, SW: finestra spettrale).

Esperimento	TD		NS	SW	B ₀
	¹ H				
¹ H, ¹⁵ N-3D NOESY – TROSY	¹ H	352	4	10.5 ppm	21.14 T
	¹⁵ N	256		29 ppm	
	¹ H _N	1024		10.5 ppm	900.09 MHz
¹ H, ¹³ C-3D NOESY – TROSY (ALIFATICO)	¹ H	300	4	10.5 ppm	22.31 T
	¹³ C _{ALI.}	256		65.4 ppm	
	¹ H _{C ALI.}	1280		10.2 ppm	950.05 MHz
¹ H, ¹³ C-3D NOESY – TROSY (AROMATICO)	¹ H	238	8	11 ppm	18.79 T
	¹³ C _{ARO.}	144		23.7 ppm	
	¹ H _{C ARO.}	768		7.6 ppm	800.13 MHz

finestra spettrale).

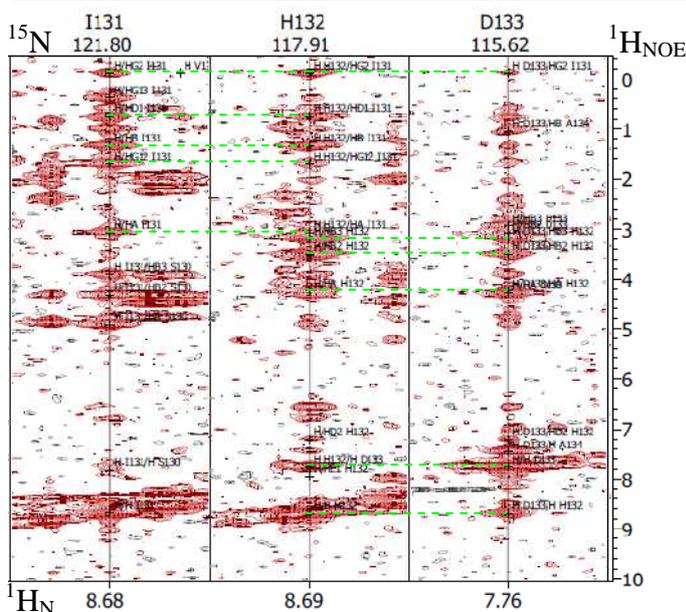


Figura 3.3-27: Allineamento delle *strip* del frammento I131 - H132 - D133 nelle dimensioni H_N – H_{NOE}, tratte dallo spettro ¹H, ¹⁵N-3D NOESY.

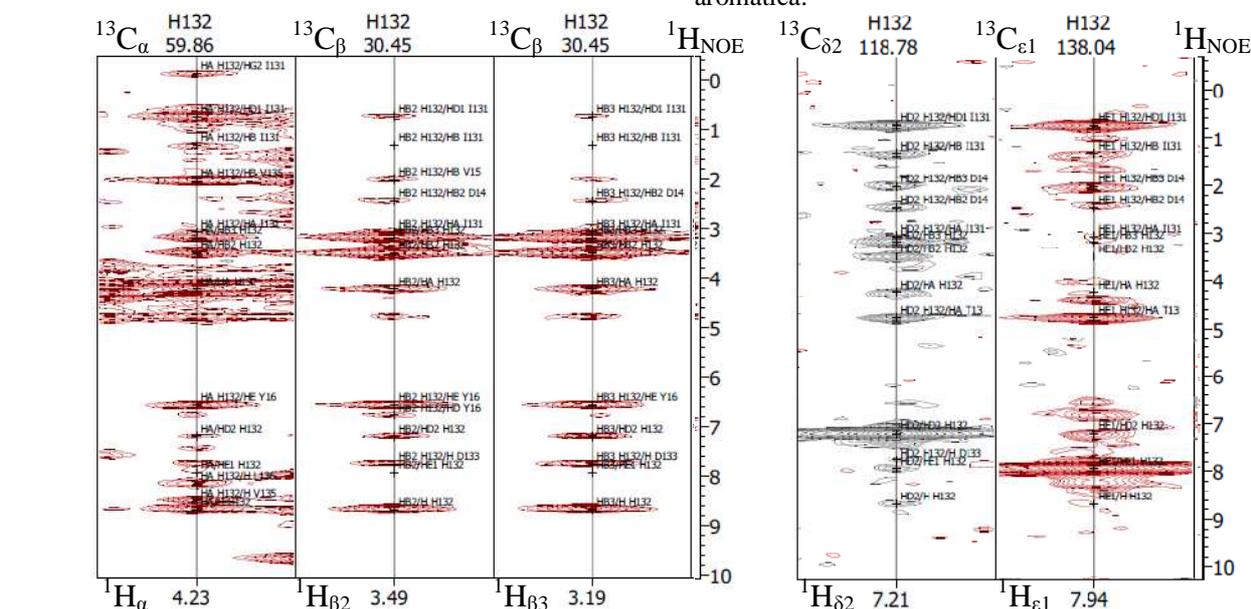


Figura 3.3-28: Sotto: allineamento delle *strip* del residuo H132 nelle dimensioni H_C – H_{NOE}, tratte dallo spettro ¹H, ¹³C-3D NOESY nella regione alifatica e in quella aromatica.

3.3.5 INFORMAZIONI STRUTTURALI DAI *CHEMICAL SHIFT*

I *chemical shifts* degli atomi di una molecola sono sonde della struttura molecolare sensibili all'intorno chimico e consentono di risolvere segnali distinti originati da gruppi funzionali identici quando situati in differenti ambienti locali (si veda la nota [28]). In una molecola proteica, la particolare combinazione di angoli ϕ e ψ può modificare l'effetto delle correnti elettroniche indotte e la prossimità spaziale di atomi elettrone-attrattori o elettrone-donatori. Inoltre, tali angoli determinano la possibilità di formare legami a idrogeno in strutture ripetitive. Ne consegue che, nelle proteine, i *chemical shift* degli amminoacidi sono intimamente legati anche alla struttura secondaria locale.

Sono stati sviluppati diversi software che, sfruttando *database* di amminoacidi a struttura secondaria e *chemical shift* (^{15}N , $^{13}\text{C}_\text{O}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^1\text{H}_\alpha$, $^1\text{H}_\text{N}$) noti, effettuano predizioni degli angoli torsionali ϕ e ψ , identificando approssimativamente la regione della mappa di Ramachandran in cui un particolare residuo (di cui siano noti i *chemical shift* sperimentali) si dovrebbe trovare.

I *chemical shift*, pertanto, possono essere utilizzati a fini strutturali e rappresentano informazioni già disponibili al termine dell'assegnazione. Utilizzando il software TALOS+ (*Torsion Angle Likelihood Obtained from Shift and Sequence Similarity*)^{15§} è stato possibile ricavare informazioni sulla struttura secondaria degli amminoacidi del dominio STAS.

^{15§} TALOS+ (Y. Shen et al., 2009) legge i *chemical shift* sperimentali, li converte in *chemical shift* secondari e li confronta con un *data-set* di *chemical shift* di 200 proteine, di cui sono note in modo completo sia le risonanze ^{15}N , $^{13}\text{C}_\text{O}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^1\text{H}_\alpha$ e $^1\text{H}_\text{N}$, sia le strutture secondarie (angoli ϕ e ψ) determinate tramite diffrazione ai raggi X.

A questo scopo, vengono considerate delle triplette di amminoacidi adiacenti ($i - 1, i, i + 1$) e vengono ricercati frammenti ($j - 1, j, j + 1$) con sequenza e *chemical shift* simili all'interno del database.

Le 10 triplette più simili vengono isolate e, se gli angoli ϕ_j e ψ_j di tutti questi frammenti si distribuiscono nelle stesse regioni della mappa di Ramachandran, il loro valore medio è usato come predizione per gli angoli ϕ_j e ψ_j .

Per la tripla a struttura ignota viene valutata la similarità con le triplette del database, secondo la funzione: $S(i, j) = \sum_{n=-1,0,+1} [k_n^0 \Delta_{ResType}^2 + \sum_X k_n^X (\Delta\delta_{X_{i+1}} - \Delta\delta_{X_{j+1}})^2 + k_n^S \Delta(\phi, \psi)_{i+n, j+n}^S]$

dove $\Delta_{ResType}$ valuta la similarità tra i residui i e j , $\Delta\delta_i - \Delta\delta_j$ le differenze tra i *chemical shift* secondari (ovvero la differenza rispetto al *chemical shift* del *random coil*) sperimentali e del database, per i nuclei $X = ^{15}\text{N}$, $^{13}\text{C}_\text{O}$, $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^1\text{H}_\alpha$ e $^1\text{H}_\text{N}$; i $\Delta(\phi, \psi)_{i,j}^S$ tengono conto della differenza tra i *chemical shift* predetti per i e quelli osservati per j nel database. k_n^0 è un coefficiente che serve a ponderare l'importanza relativa dei diversi tipi di residuo, i valori delle costanti k_n^X sono una misura di quanto utile sia un certo tipo di *chemical shift* secondario a dare informazioni sugli angoli diedri del residuo i :

$$k_n^X = \frac{1}{q} \sum_{qResType} \frac{\sqrt{\sum_t (\Delta\delta_{j+n}^X)_t^2} / t}{\sqrt{\sum_t (\Delta\delta_{j+n}^X - \Delta\delta_{j+n}^X)_t^2} / (t-1)}, \text{ dove } t \text{ sono le triplette il cui residuo centrale } (j) \text{ ha angoli}$$

diedri $\phi_j, \psi_j = \phi_i, \psi_i \pm 7.5^\circ$ (G. Cornilescu et al., 1999).

Tali coefficienti sono indipendenti dal tipo di residuo j (o i) e ciò è ottenuto mediandone il valore con triplette aventi j di diverso tipo. $k_n^S = 0.2, 1, 0.2$, per $n = -1, 0, +1$.

Le predizioni di struttura secondaria sono consistenti nell'88% dei casi, con un errore sugli angoli ϕ e ψ di $\pm 13^\circ$.

TALOS+ fornisce inoltre informazioni sulla mobilità dei singoli residui, stimando il parametro d'ordine S^2 a partire dai *chemical shift* secondari¹⁶⁸.

Figura 3.3-29: Strutture secondarie predette da TALOS+ sulla base dei valori di *chemical shift* sperimentali. In azzurro sono evidenziati i residui con *chemical shift* compatibili con gli angoli ϕ e ψ propri della struttura β ; in rosso sono evidenziati i residui strutturati ad α -elica.

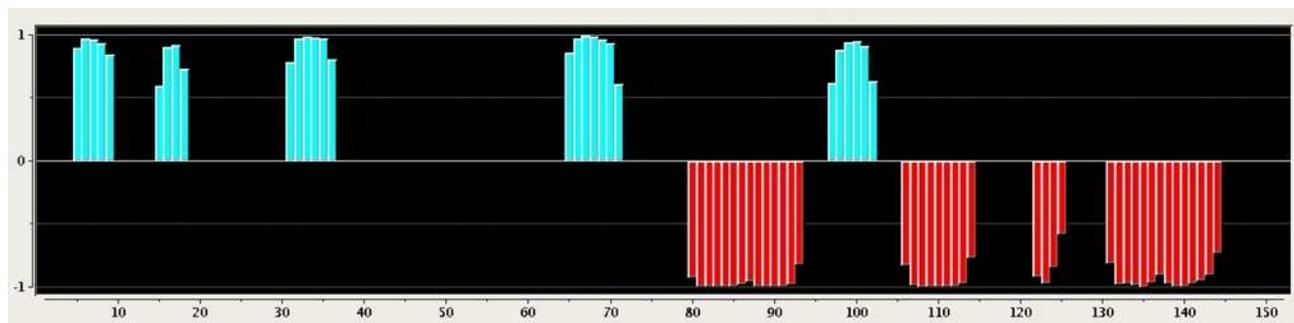
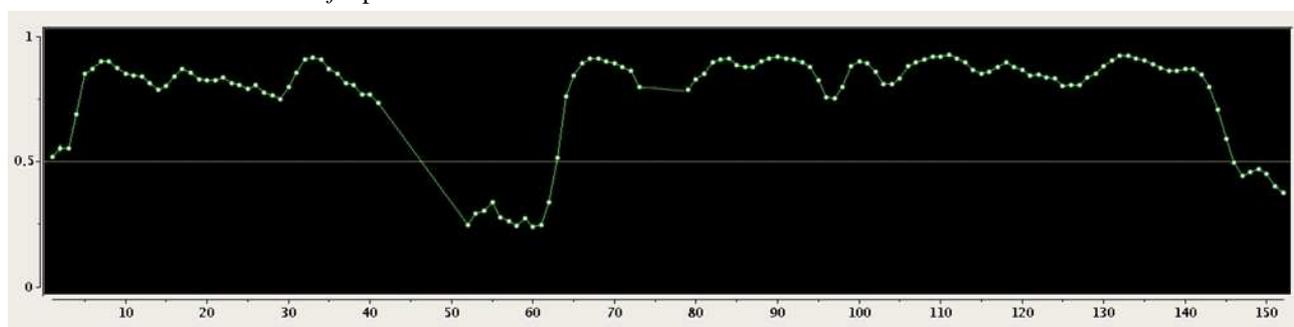


Figura 3.3-30: Stima del parametro d'ordine S^2 predetto da TALOS+ per ciascun residuo della sequenza, sfruttando i *chemical shift* sperimentali.



In corrispondenza delle strutture secondarie evidenziate da TALOS+ il parametro d'ordine S^2 risulta particolarmente elevato (vicino a 1); in tali regioni gli amminoacidi hanno pertanto una scarsa mobilità intrinseca.

¹⁶⁸ Poiché la conformazione *random coil* è in genere caratteristica delle regioni molto flessibili, e presenta dei valori di *chemical shift* caratteristici mediamente diversi da quelli delle strutture secondarie ripetitive, è stata proposta (M. V. Berjanskii & D. S. Wishart, 2008) una formula empirica basata su *data-set* di *chemical shift* sperimentali e di analisi della mobilità ottenute tramite simulazioni di dinamica molecolare. Il parametro che è stato ricavato, noto come RCI (*Random Coil Index*) è in sostanza un indice di mobilità:

$$RCI = \frac{1}{4.80|\Delta\delta_{C\alpha}| + 4.80|\Delta\delta_{CO}| + |\Delta\delta_{C\beta}| + 3.93|\Delta\delta_N| + 5.69|\Delta\delta_{H\alpha}|}$$

I $\Delta\delta$ indicano i *chemical shift* secondari, ovvero le differenze tra i valori di *chemical shift* sperimentali e i corrispondenti valori di riferimento caratteristici della conformazione *random coil*.

Questo indice può essere utilizzato per stimare il parametro d'ordine S^2 , solitamente determinato mediante studi di rilassamento sui gruppi ammidici del *backbone*: $S^2 = 1 - 0.4 \ln(1 + 17.7 RCI)$.

Quando l'RCI è molto piccolo (come nel caso di un amminoacido coinvolto in una struttura secondaria), $S^2 \rightarrow 1$ e, pertanto, la mobilità intrinseca del residuo è ridotta (il suo moto coincide in sostanza con il moto globale della proteina).

Quando l'RCI è grande (i *chemical shift* del residuo sono molto simili a quelli tipici del *random coil*), $S^2 \rightarrow 0$ e risultano prevalenti i moti interni, più rapidi del moto globale. Questa situazione è tipica delle regioni flessibili.

Si evidenziano inoltre due regioni estremamente flessibili: la prima si trova immediatamente a valle della principale lacuna nell'assegnazione. La seconda è rappresentata dalla coda C-terminale.

Tabella 3.2-8: Parametri d'ordine (S^2) e strutture secondarie (S. Sec.) assegnati da TALOS+ agli amminoacidi della sequenza del dominio STAS di Prestina. L: *Loop*, E: filamento β , H: α -elica.

Sequenza	S^2	S. Sec.	Sequenza	S^2	S. Sec.	Sequenza	S^2	S. Sec.
...			58 V	0.242	L	108 V	0.908	H
2 P	0.553	L	59 N	0.273	L	109 V	0.918	H
3 S	0.553	L	60 G	0.24	L	110 N	0.918	H
...			61 S	0.247	L	111 D	0.925	H
T5	0.85	E	62 E	0.336	L	112 L	0.911	H
6 V	0.868	E	63 N	0.516	L	113 T	0.897	H
7 L	0.9	E	64 I	0.761	L	114 S	0.865	H
8 G	0.899	E	65 H	0.843	E	115 N	0.852	L
9 Q	0.875	E	66 T	0.892	E	116 R	0.858	L
10 L	0.852	L	67 V	0.91	E	117 F	0.877	L
11 P	0.844	L	68 I	0.913	E	118 F	0.895	L
12 D	0.839	L	69 L	0.901	E	119 E	0.878	L
13 T	0.814	L	70 D	0.892	E	120 N	0.866	L
14 D	0.787	L	71 F	0.877	E	121 P	0.842	L
15 V	0.801	E	72 T	0.862	L	122 A	0.847	H
16 Y	0.839	E	73 Q	0.799	L	123 L	0.834	H
17 I	0.87	E	...			124 K	0.831	H
18 D	0.855	E	80 V	0.83	H	125 E	0.803	H
19 I	0.828	L	81 G	0.85	H	126 L	0.805	L
20 D	0.825	L	82 V	0.898	H	127 L	0.806	L
21 A	0.823	L	83 K	0.909	H	128 F	0.834	L
22 Y	0.836	L	84 T	0.911	H	129 H	0.85	L
23 E	0.812	L	85 L	0.885	H	130 S	0.881	L
24 E	0.806	L	86 A	0.876	H	131 I	0.905	H
25 V	0.789	L	87 G	0.876	H	132 H	0.922	H
26 K	0.804	L	88 I	0.899	H	133 D	0.922	H
27 E	0.777	L	89 V	0.912	H	134 A	0.911	H
28 I	0.764	L	90 K	0.917	H	135 V	0.905	H
29 P	0.749	L	91 E	0.913	H	136 L	0.889	H
30 G	0.798	L	92 Y	0.908	H	137 G	0.874	H
31 I	0.853	E	93 G	0.898	H	138 S	0.862	H
32 K	0.907	E	94 D	0.879	L	139 Q	0.864	H
33 I	0.914	E	95 V	0.823	L	140 V	0.869	H
34 F	0.906	E	96 G	0.756	L	141 R	0.869	H
35 Q	0.868	E	97 I	0.754	E	142 E	0.846	H
36 I	0.85	E	98 Y	0.797	E	143 A	0.798	H
...			99 V	0.88	E	144 M	0.706	H
39 P	0.768	L	100 Y	0.901	E	145 A	0.591	L
40 I	0.768	L	101 L	0.891	E	146 E	0.496	L
...			102 A	0.857	E	147 Q	0.444	L
53 K	0.291		103 G	0.81	L	148 E	0.458	L
54 R	0.305	L	104 C	0.81	L	149 T	0.468	L
55 K	0.336	L	105 S	0.832	L	150 T	0.451	L
56 T	0.277	L	106 A	0.881	H	151 V	0.401	L
57 G	0.263	L	107 Q	0.898	H	152 L	0.376	L

Per verificare in modo rapido l'attendibilità di questo parametro, è stato utilizzato un esperimento NMR che, misurando l'effetto NOE eteronucleare, fornisce informazioni sulla mobilità individuale dei singoli vettori internucleari $^{15}\text{N} - ^1\text{H}_N$ ^{17§}.

L'esperimento misura una variazione nelle popolazioni $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$ di un eteronucleo (ad esempio ^{15}N) allo stato stazionario, quando le frequenze dei protoni vicini ($^1\text{H}_N$) siano irradiate in modo continuo, tale da saturarne la differenza di popolazione tra gli stati $|\alpha\rangle$ e $|\beta\rangle$.

In condizioni di stato stazionario ($t \rightarrow \infty$, irradiazione prolungata su uno spin S, tale da azzerarne la magnetizzazione longitudinale S_z) la relazione $\frac{d(I_z - I_z^0)}{dt} = -R_1(I_z - I_z^0) - \sigma_{IS}(0 - S_z^0) = 0$ e $I_{z,ss} = I_z^0 + \frac{\sigma_{IS}}{R_1}(S_z^0)$. Poiché il rapporto tra le magnetizzazioni all'equilibrio è uguale al rapporto tra i rapporti giromagnetici, risulta: $I_{z,ss} = I_z^0 + \frac{\sigma_{IS} \gamma_I}{R_1 \gamma_S}(I_z^0)$. Dal rapporto tra i segnali $I_{z,ss}$ (magnetizzazione di I in presenza di saturazione di S) e I_z^0 (magnetizzazione di I all'equilibrio, in assenza di saturazione di S) si ricava il NOE eteronucleare.

Oltre all'accoppiamento dipolare tra I ed S, può esserne sfruttato anche l'accoppiamento scalare, al fine di ottenere un esperimento eteronucleare bidimensionale simile, per aspetto, ad un normale HSQC. Nel caso del gruppo ammidico, il nucleo saturato (S) è $^1\text{H}_N$, mentre ^{15}N subisce il trasferimento di

^{17§} L'orientazione di un vettore $^{15}\text{N} - ^1\text{H}$ cambia nel tempo a causa del riorientamento molecolare causato dai moti Browniani. La correlazione tra l'orientazione del vettore in due istanti successivi (t e $t + \delta t$) è descritta dalla funzione di correlazione: $C(t) = \frac{1}{5} e^{-t/\tau_c}$

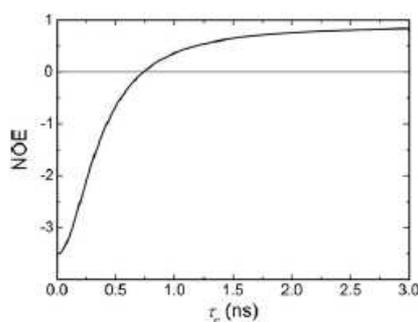
La trasformata di Fourier di tale funzione genera la funzione di densità spettrale: $J(\omega) = \frac{2}{5} \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$.

Le molecole di piccole dimensioni (*extreme narrowing limit*) si riorientano rapidamente in soluzione e pertanto hanno un τ_c piccolo, e $\omega \tau_c \ll 1$; presentano dei $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE intensi e negativi. Al contrario, le macromolecole (*spin diffusion limit*) si riorientano lentamente in soluzione e pertanto hanno τ_c grande, e $\omega \tau_c \gg 1$. I loro $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE si avvicinano a 1 (in un campo di 14 T, per τ_c di 13-14 ns (150-170 residui), hanno in media un valore di 0.76).

$$\frac{N_{z,ss}}{N_z^0} = \text{NOE} = 1 + \frac{\gamma_H R_N(H_z \rightarrow N_z)}{\gamma_N R_N(N_z)}$$

$$R_N(H_z \rightarrow N_z) = \frac{\gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2}{4r_{NH}^6} \{6J(\omega_H + \omega_N) - J(\omega_H - \omega_N)\}$$

$$R_N(N_z) = \frac{\gamma_H^2 \gamma_N^2 \hbar^2}{4r_{NH}^6} \{J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)\} + \frac{\Delta^2 \omega_N^2}{3} J(\omega_N)$$



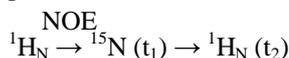
Le differenze di comportamento tra le molecole di piccole e di grandi dimensioni dipendono dal fatto che esse presentano diversi meccanismi di rilassamento dipolare; le prime privilegiano meccanismi di rilassamento dipendenti da moti molecolari ad alta frequenza, le seconde privilegiano transizioni dipendenti da moti a bassa frequenza.

In presenza di moti sia individuali che globali, la funzione di correlazione può essere descritta come:

$C(t) = \frac{1}{5} e^{-t/\tau_c} [S^2 + (1 - S^2)e^{-t/\tau_i}]$, dove τ_i è il tempo di correlazione dei moti interni, e S^2 è il parametro d'ordine. Quando $S^2 \rightarrow 1$ il rilassamento è dominato dal moto globale, quando $S^2 \rightarrow 0$ prevalgono invece i moti interni.

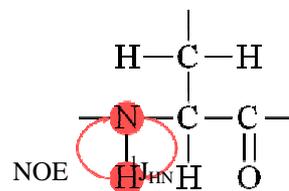
magnetizzazione per interazione dipolare. Sfruttando l'evoluzione della magnetizzazione sotto l'effetto del *chemical shift* di ^{15}N , il trasferimento della magnetizzazione ad $^1\text{H}_\text{N}$ (via $^1J_{\text{HN}}$) e l'evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di $^1\text{H}_\text{N}$, è possibile ottenere uno spettro in cui l'intensità dei segnali è modulata sia dalle frequenze di risonanza dei due tipi di nucleo, sia dall'effetto NOE eteronucleare.

Figura 3.3-31: Rappresentazione degli atomi della catena principale coinvolti nel trasferimento di polarizzazione durante l'esperimento $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE:



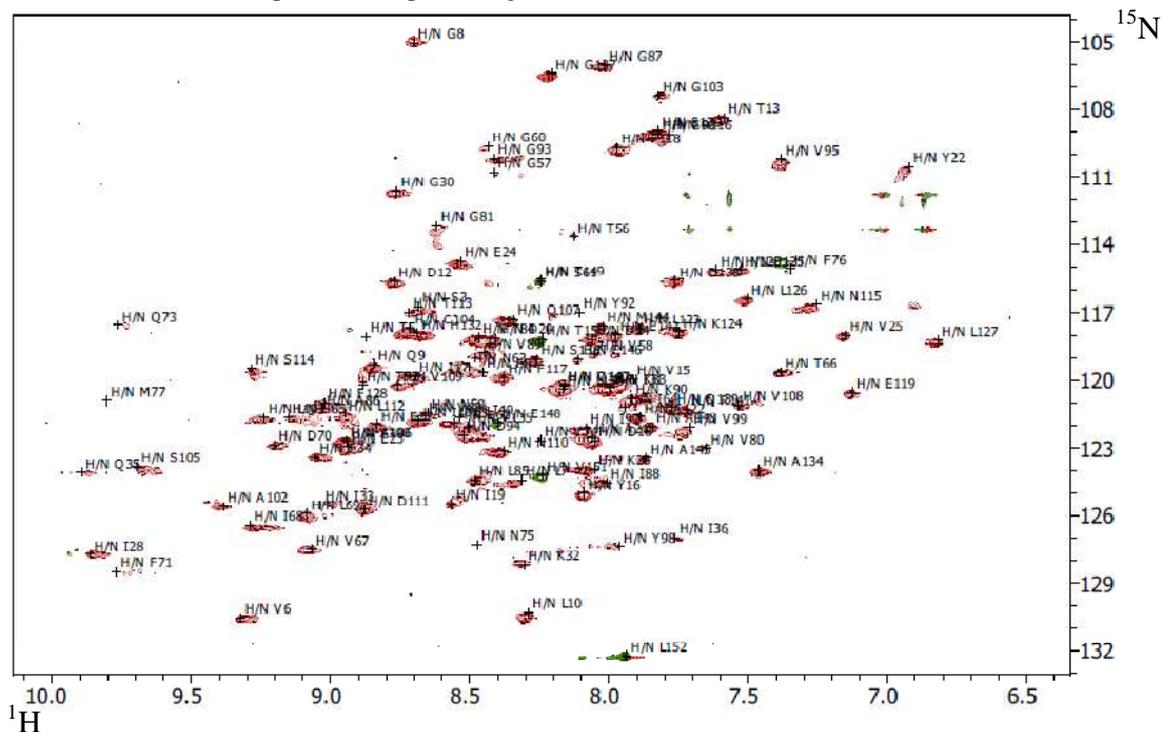
L'esperimento si compone delle seguenti parti:

- saturazione delle frequenze protoniche $^1\text{H}_\text{N}$ tramite radiofrequenza (3-4 s)
- trasferimento della polarizzazione da ^1H a ^{15}N per effetto NOE
- eccitazione della magnetizzazione di N, ed evoluzione sotto l'effetto del *chemical shift* di N
- trasferimento inverso della polarizzazione
- acquisizione del FID delle magnetizzazioni in evoluzione sotto l'effetto dei *chemical shift* protonici



L'intensità dei $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE è informativa sulla dinamica dei gruppi ammidici; quando il valore è prossimo a 1 significa che il backbone locale è essenzialmente solidale con la proteina nel suo complesso, e ne condivide la dinamica lenta, tipica delle macromolecole. Quando il segno si avvicina a 0, o diventa negativo, il backbone locale presenta una dinamica interna più rapida rispetto a quella globale della proteina, ed è simile a quella di una piccola molecola che si riorienta rapidamente in soluzione. Questo comportamento è tipico delle regioni flessibili.

Figura 3.3-32: Ingrandimento della regione N- H_N dello spettro $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE -TROSY. Concentrazione STAS: 1.10 mM (in presenza di β -D-octil glucopiranoside in concentrazione sub-micellare), 298 K, $B_0 = 14.09$ T, NS: 64. Picchi positivi (●), picchi negativi (●).

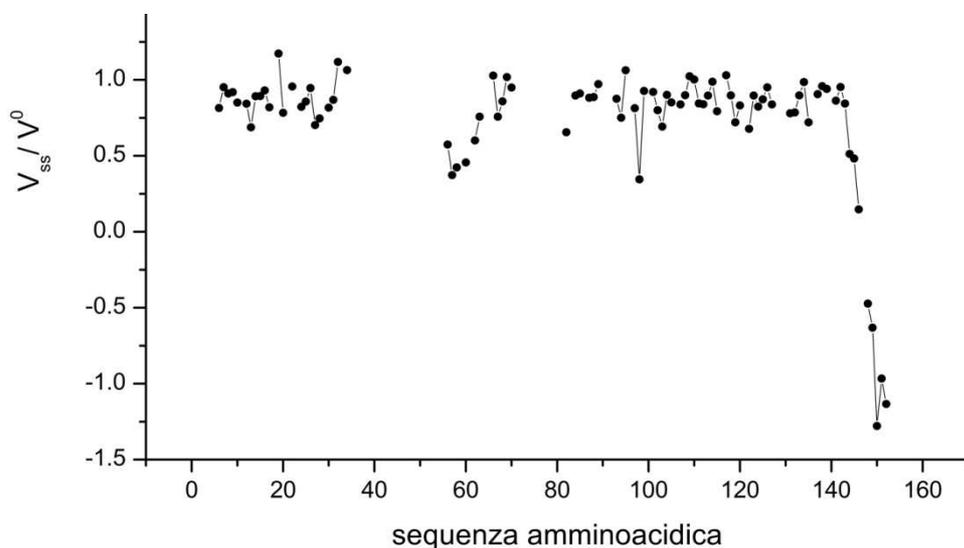


Dallo spettro risulta nettamente evidente il diverso comportamento della coda C-terminale (residui E148, T149, T150, V151, L152), rispetto al resto della proteina.

Tabella 3.2-9: Rapporti tra i volumi dei picchi dello spettro $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}\text{NOE-TROSY}$ in presenza e in assenza di saturazione di $^1\text{H}_\text{N}$, V_{ss}/V^0 .

Sequenza	V_{ss}/V^0	Sequenza	V_{ss}/V^0	Sequenza	V_{ss}/V^0	Sequenza	V_{ss}/V^0
...		35 Q	...	86 A	...	120 N	0.8315
2 P		36 I	...	87 G	0.8819	121 P	
3 S		88 I	0.8860	122 A	0.6778
...		39 P		89 V	0.9720	123 L	0.8967
T5	...	40 I	...	90 K	...	124 K	0.8236
6 V	0.8144	...		91 E	...	125 E	0.8720
7 L	0.9517	53 K	...	92 Y	...	126 L	0.9502
8 G	0.9105	54 R	...	93 G	0.8757	127 L	0.8387
9 Q	0.9194	55 K	...	94 D	0.7506	128 F	...
10 L	0.8505	56 T	0.5741	95 V	1.0634	129 H	...
11 P		57 G	0.3725	96 G	...	130 S	...
12 D	0.8432	58 V	0.4239	97 I	0.8133	131 I	0.7800
13 T	0.6881	59 N	...	98 Y	0.3447	132 H	0.7850
14 D	0.8917	60 G	0.4558	99 V	0.9272	133 D	0.8982
15 V	0.8929	61 S	...	100 Y	...	134 A	0.9852
16 Y	0.9308	62 E	0.6011	101 L	0.9200	135 V	0.7205
17 I	0.8187	63 N	0.7568	102 A	0.7999	136 L	...
18 D	...	64 I	...	103 G	0.6919	137 G	0.9053
19 I	1.1734	65 H	...	104 C	0.9006	138 S	0.9581
20 D	0.7833	66 T	1.0278	105 S	0.8520	139 Q	0.9409
21 A	...	67 V	0.7573	106 A	...	140 V	...
22 Y	0.9562	68 I	0.8586	107 Q	0.8386	141 R	0.8628
23 E	...	69 L	1.0179	108 V	0.8994	142 E	0.9532
24 E	0.8226	70 D	0.9500	109 V	1.0234	143 A	0.8434
25 V	0.8571	71 F	...	110 N	1.0019	144 M	0.5120
26 K	0.946	72 T	...	111 D	0.8452	145 A	0.4817
27 E	0.7018	73 Q	...	112 L	0.8398	146 E	0.1473
28 I	0.7459	...		113 T	0.8965	147 Q	...
29 P		80 V	...	114 S	0.9872	148 E	-0.4728
30 G	0.8172	81 G	...	115 N	0.7932	149 T	-0.6316
31 I	0.8685	82 V	0.6552	116 R	...	150 T	-1.2791
32 K	1.1177	83 K	...	117 F	1.0300	151 V	-0.9667
33 I	...	84 T	0.8964	118 F	0.8974	152 L	-1.1337
34 F	1.0643	85 L	0.9103	119 E	0.7199		

Figura 3.3-33: Rappresentazione grafica dei rapporti V_{ss}/V^0 in funzione della sequenza amminoacidica.



L'analisi dei $^{15}\text{N}\{^1\text{H}\}$ NOE conferma sostanzialmente quanto predetto da TALOS+ sulla base dei *chemical shift* secondari. Il *backbone* degli ultimi 9 amminoacidi (coda C-terminale) si conferma estremamente flessibile. Gli ultimi 5 amminoacidi presentano addirittura dei NOE negativi e sono pertanto soggetti ad un riorientamento molto più rapido rispetto al resto della proteina. Avendo un rilassamento più lento rispetto agli altri amminoacidi della proteina, presentano dei picchi molto più intensi della media, come accennato nel commento alla Figura 3.3-5. Un'altra regione flessibile è localizzata intorno e a monte del residuo 60. A causa della sovrapposizione dei segnali non è tuttavia possibile confermare in modo completo le previsioni di TALOS+. La maggior parte della sequenza presenta invece dei NOE compresi tra 0.7 e 0.9, coerentemente con quanto atteso per dei residui sostanzialmente rigidi, e pertanto soggetti ad una dinamica globale più lenta.

3.3.6 OSSERVAZIONI CONCLUSIVE

Recentemente, nel laboratorio di cristallografia biomolecolare del Prof. R. Battistutta (con cui collaboriamo in questo progetto), è stata risolta la struttura ai raggi X di un costrutto di STAS di Prestina più corto rispetto al nostro di 9 amminoacidi (E. Pasqualetto, R. Aiello). In entrambi i costrutti, la regione corrispondente al *loop* variabile è stata rimossa e sostituita dal dipeptide Gly – Ser, riunendo l'elica α_1 e il filamento β_3 in modo analogo a quanto avviene negli ASA batterici.

Il costrutto contenente la coda C-terminale (da noi studiato) si è dimostrato inadatto alla cristallizzazione, e, in effetti, questo dato sembra coerente con l'osservazione che gli amminoacidi terminali sono estremamente mobili ($\text{NOE} \leq 0.5$, $S^2 \leq 0.5$). Tale mobilità costituisce probabilmente un ostacolo per un impaccamento ottimale nella struttura cristallina.

La struttura del dominio, in accordo con quanto previsto dal modello basato sulla struttura di ASA batterico, presenta un *core* costituito da un foglietto β . Questo foglietto, oltre ai filamenti β_1 , β_2 , β_3 e β_4 , presenta un β_0 N-terminale aggiuntivo e un β_5 al C-terminale. I quattro β terminali sono circondati da cinque α -eliche (α_1 , α_2 , α_3 , α_4 , α_5). La struttura è stabilizzata da interazioni di tipo idrofobico che coinvolgono ciascun lato del foglietto β e le eliche circostanti.

Le strutture secondarie assegnate con TALOS+ sulla base dei *chemical shift* secondari si dimostrano in ottimo accordo con le strutture secondarie ottenute per via cristallografica. Lo *scaffold* complessivo della proteina è pertanto conservato sia in soluzione, sia nell'ambiente cristallino.

Dal confronto con il modello ottenuto per omologia con la struttura degli ASA batterici, si evidenzia un buon accordo tra le strutture secondarie previste e quelle sperimentali. La differenza più significativa riguarda l'N-terminale, che, nel dominio STAS di Prestina, presenta due *loop* che connettono il filamento β_1 ad un filamento β_0 aggiuntivo, assente negli ASA batterici, e β_0 a β_2 . A valle di β_0 , la struttura RX evidenzia inoltre un giro d'elica (α_0), che tuttavia non è nettamente evidenziato in soluzione. Pertanto, la struttura dello STAS di Prestina si differenzia da quella degli ASA per l'inserzione di 19 amminoacidi tra β_1 e β_2 . L'importanza della regione N-terminale è testimoniata dal fatto che dei costrutti che presentano delezioni

dell'estensione N-terminale (iniziando, in modo simile agli ASA, dal residuo 522 o 529, anziché dal residuo 505) hanno un'elevata propensione all'aggregazione. La regione a monte del dominio STAS propriamente detto (residui 505-525 di Prestina) non costituisce pertanto una semplice regione *linker*, come affermato in letteratura, ma appartiene a pieno titolo alla struttura del dominio.

Ne consegue che lo STAS si viene a trovare in stretto contatto con la superficie interna della membrana plasmatica. Tale contatto potrebbe essere mediato da un'interfaccia idrofobica delineata dalle catene laterali di alcuni residui, tra cui P39(543), Y41(545), Y42(546), F76(651), V80(655). È interessante osservare che questi amminoacidi si trovano a livello delle sequenze non assegnabili mediante NMR in soluzione, verosimilmente a causa dello scambio conformazionale. Non è escluso che tali regioni necessitino del contatto con la membrana per essere stabilizzate.

Figura 3.3-34: Sequenza del costrutto chimerico studiato e del dominio C-terminale della proteina originale, con le rispettive numerazioni. Nelle tre righe inferiori sono evidenziate le strutture secondarie: (MOD) dedotte dal modello computazionale basato sull'omologia con gli ASA batterici, (NMR) dedotte dai *chemical shift* secondari mediante TALOS+, (CRX) ottenute dai dati di cristallografia ai raggi X.

H: α -elica, **H**: giro d'elica (α_0), **E**: β -strand, (L): altro.

I caratteri in grassetto **X** contraddistinguono i residui allineabili con la struttura degli ASA batterici, **X** i residui non allineabili. In **X** sono identificati alcuni possibili contatti con la membrana.

1	SPSYTVLGQL	PDTDVYIDID	AYEEVKEIPG	IKIFQINAPI	YYANSDLYSS
505	SPSYTVLGQL	PDTDVYIDID	AYEEVKEIPG	IKIFQINAPI	YYANSDLYSS
MOD	-----	-----	---LEEELL	EEEELEEEEE	LHHHHHHHHH
NMR	-LL-EEEEEL	LLLLEEEELL	LLLLLLLLLL	EEEEEE--LL	-----
CRX	LLLEEEEEEL	LLLLLEEHH	HLLLLLLLLL	EEEEELLH	HHHHHHHHHH
	β_1	β_0 (α_0)	(β_1 MOD)	β_2	α_1
51	ALKRKTGVN-	---G---	-----	---S---	-----
555	ALKRKTGVNP	AIIMGARRKA	MRKYAKEVGN	ANIANATVVK	VDAEVDGENA
MOD	HHHHLLLLL-	---L---	-----	---L---	-----
NMR	---LLLLL-	---L---	-----	---L---	-----
CRX	L-----	-----	-----	-----	-----
62	-----	-----	-----	--ENIHTVIL	DFTQVNFMD
605	TKPEEEDDEV	KFPPIVIKTT	FPEELQRFLP	QGENIHTVIL	DFTQVNFMD
MOD	-----	-----	-----	--LLLLEEEE	ELLEEEEEELH
NMR	-----	-----	-----	--LLLLEEEE	EELL-----
CRX	-----	-----	-----	---EEEE	ELLLLLLLLH
				β_3	
80	VGVKTLAGIV	KEYGDVGIYV	YLAGCSAQVV	NDLTSNRFFE	NPALKELLFH
655	VGVKTLAGIV	KEYGDVGIYV	YLAGCSAQVV	NDLTSNRFFE	NPALKELLFH
MOD	HHHHHHHHHH	HHHHHLLLE	EEELLHHHH	HHHHHLLL	LLLLLLEEEL
NMR	HHHHHHHHHH	HHHLLLEEE	EEELLHHHH	HHHHHLLL	LLHHHLLL
CRX	HHHHHHHHHH	HHHHHLLLE	EEELLHHHH	HHHHHLLL	LHHHHHEEL
	α_2	β_4	α_3	α_4	β_5
130	SIHDAVLGSQ	VREAMAEQET	TVL	152	costrutto chimerico
705	SIHDAVLGSQ	VREAMAEQET	TVL	727	proteina originale
MOD	LHHHHL---	-----	---	MOD	
NMR	LHHHHHHHHH	HHHHHLLL	LLL	NMR	
CRX	LHHHHHHHHL	LLLL-----	---	CRX	
	α_5				

Figura 3.3-35: Modello della struttura del dominio STAS di Prestina dedotto per allineamento strutturale sulla base della similarità di sequenza con gli ASA batterici come proposto da L. Aravind & E. V. Koonin, 2000). Il dominio STAS previsto si dovrebbe estendere da A21(525) a S138(713), con il *loop* variabile compreso tra P(564) e E62(637). Di conseguenza, il modello teorico prevede che il β_1 sia localizzato intorno al residuo K26(530), in posizione immediatamente precedente al β_2 . Le eliche sono colorate in rosso, le strutture β in azzurro. Le immagini sono state ottenute con il software UCSF CHIMERA, E. F. Pettersen et al., 2004).

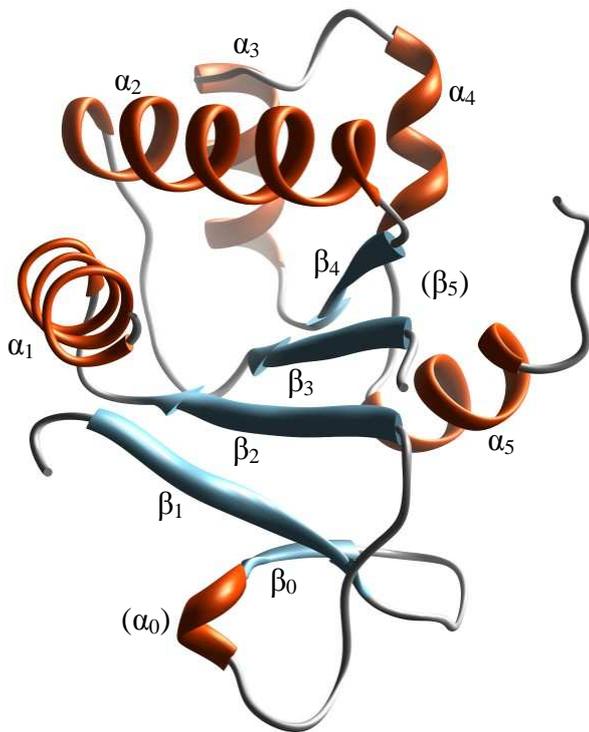
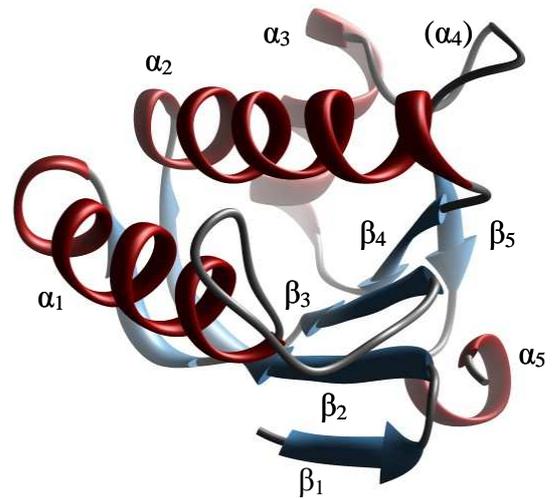


Figura 3.3-36: Struttura cristallografica del dominio STAS di Prestina, E. Pasqualetto, R. Aiello, R. Battistutta. La struttura devia significativamente dal modello nella regione N-terminale (residui 505-525). Tale sequenza, in precedenza considerata un semplice *linker* tra l'ultimo dominio *trans*-membrana del trasportatore e il suo dominio STAS, si è dimostrata, in realtà, parte integrante dello STAS stesso.

Figura 3.3-37: Allineamento tra la struttura cristallografica e il modello del dominio STAS di Prestina. Si nota la significativa deviazione della regione N-terminale della struttura dal modello.

Tra i residui L52(556) e H65(640), ovvero a livello della sequenza deleta, la struttura cristallografica presenta una lacuna. In questa regione le informazioni fornite dall'NMR risultano perfettamente complementari ai dati cristallografici e, coerentemente con essi, suggeriscono che si tratti di un *loop* flessibile (S^2 molto bassi).

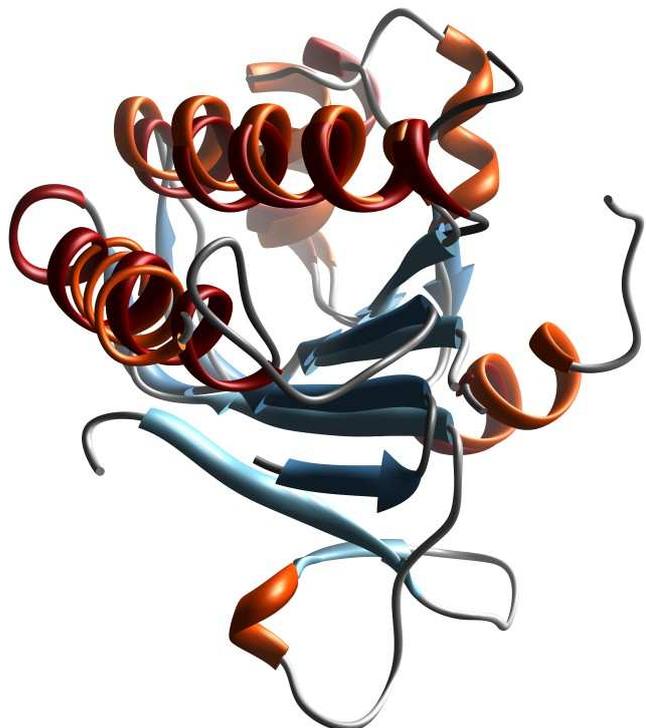


Figura 3.3-38: Struttura cristallografica del dominio STAS di Prestina con strutture secondarie e catene laterali. I residui verosimilmente coinvolti nell'interazione con la membrana plasmatica sono evidenziati in giallo . Le due immagini differiscono per una rotazione verso destra di circa 90°.

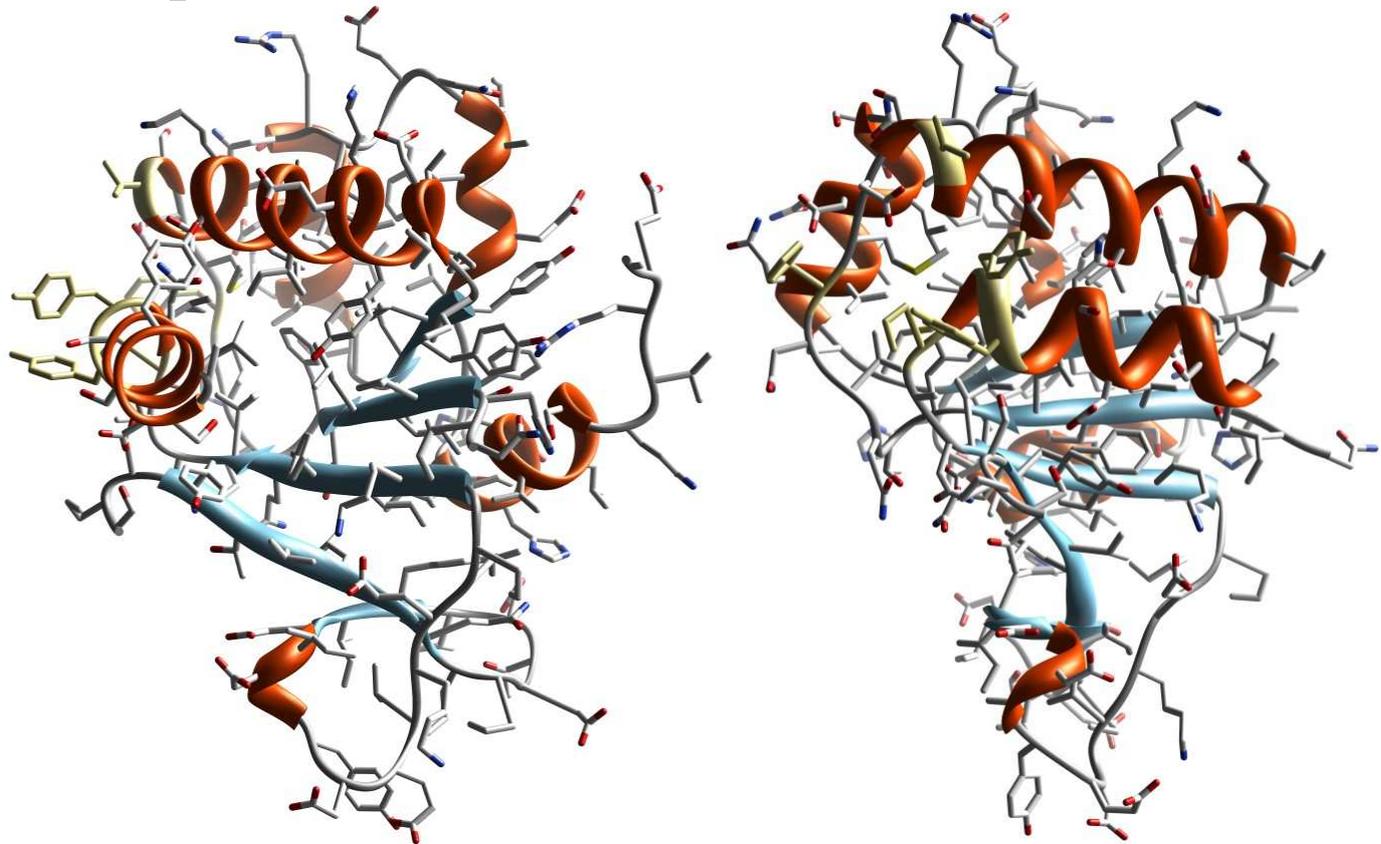
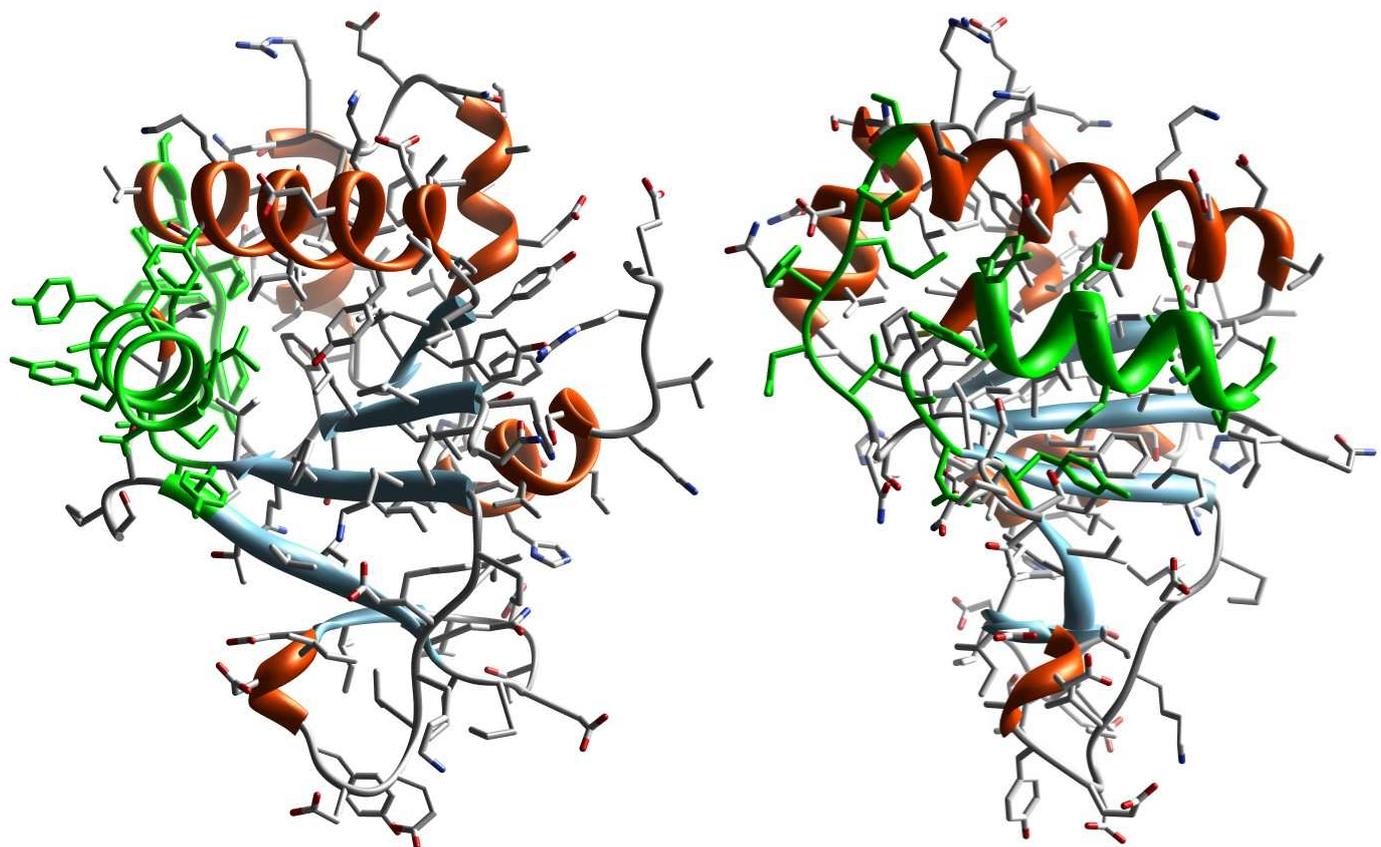


Figura 3.3-38: Struttura cristallografica del dominio STAS di Prestina con strutture secondarie e catene laterali. I residui il cui *backbone* non è risultato assegnabile all'NMR sono evidenziati in verde .



L'interazione tra le due estremità sembra essere stabilizzata da un ponte idrogeno tra le catene laterali di Y16(520) e H132(707) e da un *core* idrofobico costituito dai residui L7(511), Y16(520) e I28(532) N-terminali, e da I131(706) e V135(710) al C-terminale.

La porzione C-terminale del dominio STAS di Prestina è molto simile alla struttura degli ASA (*Anti-Sigma factor Antagonist*) batterici; pertanto, l'assimilazione di queste proteine batteriche e delle regioni C-terminali dei SulP ad un unico tipo di dominio, lo STAS (*Sulfate Transporter and Anti-Sigma factor antagonist*) risulta pienamente giustificabile da un punto di vista strutturale, malgrado le sensibili differenze.

BIBLIOGRAFIA

- L. Aravind, E. V. Koonin (2000) The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current Biology* Vol. 10: R53-R55
- J. M. R. Baker, R. P. Hudson, V. Kanelis, W. Y. Choy, P. H. Thibodeau, P. J. Thomas, J. D. Forman-Kay (2007) CFTR regulatory region interacts with NBD1 predominantly via multiple transient helices. *Nature Structural & Molecular Biology* Vol. 14 n° 8: 738-745
- M. V. Berjanskii & D. S. Wishart (2005) A Simple Method To Predict Protein Flexibility Using Secondary Chemical Shifts. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 127: 14970-14971
- P. Buchner, H. Takahashi, M. J. Hawkesford (2004) Plant sulphate transporters: co-ordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, n° 404: 1765-1773
- M. H. Chang, C. Plata, A. Sindić, W. K. Ranatunga, A. P. Chen, K. Zandi-Nejad, K. W. Chan, J. Thompson, D. B. Mount, M. F. Romero (2009) Slc26a9 is inhibited by the R-region of CFTR via the STAS domain. *The Journal of Biological Chemistry*
- G. Cornilescu, F. Delaglio, A. Bax (1999) Protein backbone angle restraints from searching a database for chemical shift and sequence homology. *Journal of Biomolecular NMR*, Vol. 13: 289-302
- P.A. Dawson & D. Markovich (2005) Pathogenetics of the human SLC26 transporters. *Current Medicinal Chemistry* Vol. 12: 385-396
- A. L. Decatur & R. Losick (1996) Three sites of contact between the *Bacillus subtilis* transcription factor σ^F and its antisigma factor SpoIIAB. *Genes & Development* Vol. 10: 2348-2358
- M. R. Dorwart, N. Shcheynikov, J. M. R. Baker, J. D. Forman-Kay, S. Muallem, P. J. Thomas (2008) Congenital Chloride-losing Diarrhea Causing Mutations in the STAS Domain Result in Misfolding and Mistrafficking of SLC26A3. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 283, n° 13:8711-8722
- M. R. Dorwart, N. Shcheynikov, D. Yang, S. Muallem (2008) The Solute Carrier 26 Family of Proteins in Epithelial Ion Transport. *Physiology* Vol. 23: 104-114
- G. Fiermonte, V. Dolce, R. Arrigoni, M. J. Runswick, J. E. Walker, F. Palmieri (1999) Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier : evolution of the carrier family. *Biochem. J.* Vol. 344, 953-960
- M. J. Hawkesford & L. J. De Kok (2006) Managing sulphur metabolism in plants. *Plant, Cell and Environment* Vol. 29: 382-395
- R. Hell (1997) Molecular physiology of plant sulfur metabolism. *Planta* Vol. 202: 138-148
- R. Iwanicka-Nowicka, A. Zielak, A. M. Cook, M. S. Thomas and M. M. Hryniewicz (2007) Regulation of sulfur assimilation pathways in *Burkholderia*

cenocepacia: identification of transcription factors CysB and SsuR and their role in control of target genes. *Journal of Bacteriology* Vol. 189, n° 5: 1675-1688

- T. Kataoka, N. Hayashi, T. Yamaya, H. Takahashi (2004) Root-to-shoot transport of sulfate in *Arabidopsis*. Evidence for the role of SULTR3;5 as a component of low-affinity sulfate transport system in the root vasculature. *Plant Physiology* Vol. 136, pp. 4198-4204
- R. Keller PhD: Optimizing the process of Nuclear Magnetic Resonance Spectrum Analysis and Computer Aided Resonance Assignment
- M. A. Kertesz (2001) Bacterial transporters for sulfate and organosulfur compounds. *Res. Microbiol.* Vol.152: 279-290
- T. Kobayashi, T. Sugimoto, K. Saijoh, M. Fukase, K. Chihara (1997) Cloning of mouse diastrophic dysplasia sulfate transporter gene induced during osteoblast differentiation by bone morphogenetic protein-2. *Gene* Vol. 198: 341-349
- H. Lohi, M. Kujala, S. Mäkelä, E. Lehtonen, M. Kestilä, U. Saarialho-Kere, D. Markovich, J. Kere (2002) Functional Characterization of Three Novel Tissue-specific Anion Exchangers SLC26A7, A8, and A9. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, n° 16: 14246-14254
- H. Lohi, G. Lamprecht, D. Markovich, A. Heil, M. Kujala, U. Seidler, J. Kere (2003) Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* Vol. 284: 769-779
- D. Markovich & H. Murer (2004) The SLC13 gene family of sodium sulphate/carboxylate cotransporters. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* Vol. 447: 594-602
- K. Mio, Y. Kubo, T. Ogura, T. Yamamoto, F. Arisaka, C. Sato (2008) The motor protein Prestin is a bullet-shaped molecule with inner cavities. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 283, n° 2: 1137-1145
- D. B. Mount, M. F. Romero (2004) The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch-Eur J Physiol* Vol. 447:710-721
- E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, T. E. Ferrin (2004) UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* Vol. 25(13): 1605-12
- S. Piłsyk & A.Paszewski (2009) Sulfate permeases – phylogenetic diversity of sulfate transport. *Acta Biocimica Polonica* Vol. 56, n° 3: 375-384
- V. Rybalchenko & J. Santos-Sacchi (2008) Anion Control of Voltage Sensing by the Motor Protein Prestin in Outer Hair Cells. *Biophysical Journal* Vol. 95: 4439-4447
- M. H. Saier, (2000) A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* Vol. 64, n° 2: 354-411
- H. Satoh, M. Susaki, C. Shukunami, K. Iyama, T. Negoro, Y. Hiraki (1998) Functional analysis of diastrophic dysplasia sulfate transporter. Its involvement in growth regulation of chondrocytes mediated by sulfated proteoglycans. *J. Biol. Chem.* Vol. 273: 12307-12315

- M. W. Schelle & C. R. Bertozzi (2006) Sulfate metabolism in Mycobacteria. *ChemBioChem*. Vol. 7: 1516 – 1524
- N. B. Schwartz, S. Lyle, J. D. Ozeran, H. Li, A. Deyrup, K. Ng, J. Westley (1998) Sulfate activation and transport in mammals: system components and mechanisms. *Chemico-Biological Interactions* Vol. 109: 143-151
- A. K. Sharma, L. Ye, A. S. Zolotarev, S. L. Alper, A. C. Rigby (2009) NMR assignment and secondary structure of the STAS domain of Rv1739c, a putative sulfate transporter of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biomol. NMR Assign.*
- Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu, A. Bax (2009) TALOS+: a hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts. *J. Biomol. NMR* Vol. 44: 213-223
- N. Shibagaki & A. R. Grossman (2006) The role of the STAS domain in the function and biogenesis of a sulfate transporter as probed by random mutagenesis. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 281, n° 32: 22964-22973
- N. Yoshimoto, H. Takahashi, F. W. Smith, T. Yamaya, K. Saito (2002) Two distinct high-affinity sulfate transporters with different inducibilities mediate the uptake of sulfate in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* Vol. 29, n° 4: 465-473
- J. Zheng, W. Shen, D. Z. Z. He, K. B. Long, L. D. Madison, P. Dallos (2000) Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells. *Nature* Vol. 405: 149-155
- A. S. Zolotarev, M. Unnikrishnan, B. E. Shmukler, J. S. Clark, D. H. Vandorpe, N. Grigorieff, E. J. Rubin, S. L. Alper (2008) Increased sulfate uptake by *E. coli* overexpressing the SLC26-related SulP protein Rv1739c from *Mycobacterium tuberculosis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 149: 255-266