

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biologia

Corso di Laurea Magistrale in  
**BIOTECNOLOGIE INDUSTRIALI**



Tesi di Laurea Magistrale

**$^{19}\text{F}$ -NMR as a powerful tool for drug discovery, using  
cyclophilin D as pharmacological target**

**La spettroscopia  $^{19}\text{F}$ -NMR come strumento per la ricerca di  
potenziali nuovi farmaci, utilizzando la ciclofilina D come  
bersaglio farmacologico**

**Relatore: Dott. Massimo Bellanda**

*Dipartimento di Scienze Chimiche*

**Correlatore: Dott.sa Sylvie Gehanne**

*Aptuit (Verona) Srl, an Evotec company*

**Controrelatore: Dott. Daniele Mazzarella**

*Dipartimento di Scienze Chimiche*

***Laureando: Sernesi Francesco***

*Anno accademico 2022-2023*



# 1 SOMMARIO

---

Indice delle figure.....	5
1 Introduzione .....	7
1.1 Mitocondrio .....	7
1.2 ATP Sintasi .....	8
1.3 mPTP e Cyp-D: Funzione cellulare.....	9
1.4 Ciclofilina D e mPTP.....	11
1.5 <i>Fragment – Based Drug Discovery</i> (FBDD).....	16
2 Scopo della tesi: .....	18
3 Tecniche e metodologie utilizzate.....	19
3.1 Risonanza magnetica nucleare:.....	19
3.2 Trasformata di Fourier .....	23
3.3 Sequenze NMR .....	25
3.3.1 Sequenza zg .....	25
3.3.2 Sequenza T <sub>2</sub> _SCREEN_19F .....	28
3.4 <sup>19</sup> F-NMR .....	30
3.5 NMR: Esperimenti bidimensionali .....	31
3.5.1 <sup>1</sup> H- <sup>15</sup> N - HMQC.....	32
3.6 Tecniche cromatografiche – FPLC .....	33
3.7 Purificazione per affinità (IMAC) .....	34
3.8 <i>Desalting</i> .....	36
3.9 Scambio cationico.....	37
3.10 Separazione per esclusione dimensionale.....	38
4 Materiali e metodi .....	
4.1 Protocollo di crescita .....	39
4.1.1 Trasformazione.....	39
4.1.2 Crescita CypD .....	40
4.1.3 Induzione espressione proteica.....	41
4.2 Protocollo di purificazione.....	41
4.2.1 Tamponi utilizzati:.....	42
4.2.2 IMAC CypD .....	42
4.2.3 <i>Desalting</i> CypD .....	44
4.2.4 Scambio Cationico CypD.....	45
4.2.5 SEC - CypD.....	46

4.3	Costruzione delle miscele per FBDD .....	47
4.3.1	Spettri di riferimento: $^{19}\text{F}$ -NMR 1D .....	47
4.3.2	Spettri frammenti e proteina (CypD).....	52
4.3.3	<i>Processing template</i> – Mscreen.....	53
4.3.4	Analisi dati CPMG – Impostazioni MScreen.....	55
	.....	55
	.....	
5	Risultati sperimentali e discussione .....	56
5.1	Analisi dei frammenti “ <i>specific-hit</i> ” .....	57
6	Appendice A – Spettri di riferimento .....	69
7	Bibliografia.....	88

## INDICE DELLE FIGURE

---

Figura 1 - Mitocondrio e la sua struttura - <a href="http://testdimecicina.altervista.org">testdimecicina.altervista.org</a> -	
Figura 2 - Complesso V Catena respiratoria (Gao et al., 2005) .....	8
Figura 3 - Catena di trasporto degli elettroni - <a href="http://projectinvictus.it/catena-di-trasporto-degli-elettroni/">projectinvictus.it/catena-di-trasporto-degli-elettroni/</a> - .....	9
Figura 6 - Membrana mitocondriale e <i>PTP complex</i> .....	9
Figura 9 - Ciclofilina D Struttura tridimensionale PDB.....	
Figura 10 - Componenti, inibitori e induttori PTP .....	12
Figura 11 - <i>Pipeline</i> FBDD .....	16
Figura 12 - Distribuzione di Boltzmann.....	19
Figura 13 - Variazioni dei livelli energetici in base alla forza del magnete.....	20
Figura 14 - Momento magnetico ed eccitazione .....	21
Figura 15 - Magnetizzazione netta prima e dopo l'introduzione di RF .....	22
Figura 16 - FID (free induction decay).....	24
Figura 17 - Descrizione impulso zg30.....	25
Figura 18 - <i>Pulse program</i> "zg30" .....	26
Figura 19 - T2_SCREEN <i>pulse program</i> .....	28
Figura 20 - Rappresentazione echi di spin.....	29
Figura 21 - Differenza del rilassamento trasversale con interazione proteica.....	30
Figura 22 - Schema generale esperimenti NMR-2D .....	31
Figura 23 - Sequenza HMQC .....	33
Figura 24 - Limite componenti utilizzabili.....	36
Figura 25 - Caratteristiche colonna HisTrap HP .....	36
Figura 26 - pET SUMO 6xHis tag .....	40
Figura 27 - Cromatogramma IMAC CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità .....	43
Figura 28 - Cromatogramma <i>Desalting</i> , in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità .....	44
Figura 29 - Cromatogramma Scambio Cationico CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità .....	45
Figura 30 - Cromatogramma SEC CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in marrone osserviamo la conducibilità e in rosso le frazioni raccolte con il numero identificativo della posizione nel frazionatore .....	46
Figura 31 - Spettro di riferimento P2_C10.....	48
Figura 32 - <i>pool 2</i> di riferimento (stacked).....	49
Figura 33 - <i>pool 2</i> di riferimento ( <i>superimposed</i> ) .....	50
Figura 34 - CPMG Tempo corto riferimento.....	51
Figura 35 - CPMG Tempo lungo riferimento.....	51
Figura 36 - Esempio riduzione di intensità del segnale nel tempo lungo.....	52
Figura 37 - <i>Processing template</i> usato .....	54
Figura 38 - Impostazioni MScreen <i>Dataset</i> .....	55

Figura 39 - CPMG parametri di processamento.....	56
Figura 40 - Risultati <i>Mnova Screening</i> $^{19}\text{F}$ .....	57
Figura 41 - Normalizzazione ed allineamento STD int. (-74.59 ppm).....	55
Figura 42 - Differenza tra spettri acquisiti a tempo lungo e corto (riferimento e proteina), non si notano interazioni. In blu ed in azzurro vediamo i tempi lunghi rispettivamente di proteina e riferimento ed in verde e celeste i tempi corti di proteina e riferimento. ....	58
Figura 43 - Spettro Mix004 (P3_G2 e P3_B4 segnati in rosso a destra), si nota che i picchi a 119 ppm e 121 ppm (nello spettro 2004 - Blank CPMG 2) si riducono di intensità in seguito all'interazione con la proteina nello spettro in alto (4004 - protein CPMG 4). Al centro viene rappresentato un ingrandimento dei due picchi interessati. ....	59
Figura 44 - Riduzione del segnale in seguito all'interazione.....	59
Figura 45 - Recupero segnale con aggiunta CsA .....	60
Figura 46 - SOFAST-HMQC CypD.....	61
Figura 47 - Spettro NMR SOFAST-HMBC, al centro si denota una zona di degradazione a 8.4 / 122 ppm in quanto sono picchi stretti ed intensi non presenti nell'assegnazione NMR della proteina.....	62
Figura 48 - Confronto HMQC del riferimento (in blu) e dei frammenti G2 (in arancio) e B4 (in verde) si notano <i>shift</i> nei picchi a 10, 689 (K31); 10,813 (H92). ....	63
Figura 49 - Struttura CypD: in verde ed in rosso sono descritte i foglietti e le eliche rispettivamente; in giallo i residui altamente conservati (R55 e W121); in arancione la tasca S2 ed in blu la tasca S1.....	63
Figura 50 - Modello CypD: evidenziati in rosa i residui K31 e H92, si nota che sono localizzati molto distanti dalle tasche S1 (in blu) e S2 (in arancione), in giallo sono evidenziati i residui altamente conservati W121 e R55. ....	64
Figura 51 - Spettro ESI CypD $^{19}\text{F}$ .....	65
Figura 52 - Spettro CypD $^{19}\text{F}$ ; si utilizza P1: 90°, D1: 2 s, TD: 1K.....	66
Figura 53 - Spettro CypD $^{19}\text{F}$ con correzione angolo di Ernst (P1: 56.8°).....	66

# 1 INTRODUZIONE

Il lavoro svolto durante questa tesi è suddiviso in due parti distinte: una parte strettamente affine alla biologia, riguardante la preparazione e purificazione della ciclofilina D ed una parte riguardante lo screening di tale proteina con una libreria di composti fluorurati per la ricerca di ligandi. Qui sotto vengono riportati alcuni concetti necessari per l'introduzione a questo lavoro.

## 1.1 MITOCONDRIO

I mitocondri sono organelli della cellula eucariote, hanno una lunghezza di circa 1-2  $\mu\text{m}$  ed un diametro di 0.5  $\mu\text{m}$ ; sono formati da una doppia membrana: una interna che si ripiega a formare delle creste (IMM) ed una esterna (OMM).

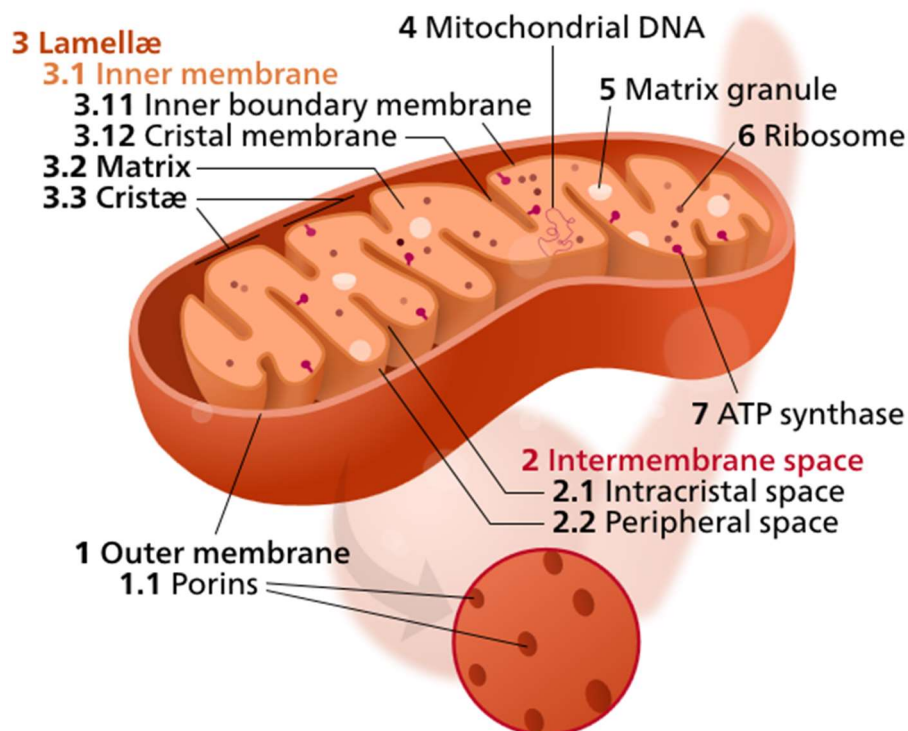


Figura 1 - Mitocondrio e la sua struttura - [testdimedicina.altervista.org](http://testdimedicina.altervista.org)-

Sono dotati di un sistema genetico indipendente, completo dell'apparato necessario per la sua espressione<sup>1</sup>. Il DNA mitocondriale (mtDNA) umano è circolare ed è costituito da 16 569 pb contenenti 37 geni di cui: 13 codificano per proteine del sistema OXPhos (fosforilazione ossidativa), 22 per i tRNA e 2 per rRNA. I mitocondri, tra le varie funzioni, sono responsabili del:

signaling intracellulare, apoptosi, metabolismo intermedio e metabolismo di aminoacidi, lipidi, colesterolo e nucleotidi. La funzione principale di metabolismo energetico include la  $\beta$ -ossidazione, il ciclo dell'urea e, la più comune, la catena di respirazione (o fosforilazione ossidativa)<sup>2</sup>. Le 13 proteine codificate dal mtDNA entrano nella costituzione di 3 dei 4 complessi respiratori e dell'ATP sintasi, la restante parte delle proteine necessarie al sistema OXPhos sono codificate da geni nucleari.

## 1.2 ATP SINTASI

La catena respiratoria è localizzata nella membrana interna del mitocondrio, è formata da 5 complessi proteici ed ha la principale funzione di ossidare

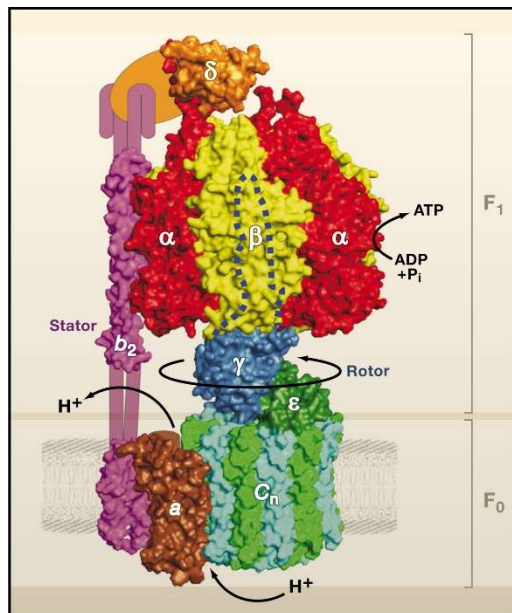


Figura 2 - Complesso V Catena respiratoria (Gao et al., 2005)

NADH ( $+H^+$ ) e  $FADH_2$  e ridurre ossigeno molecolare ( $O_2$ ) ad acqua per produrre un trasferimento elettronico in grado di generare un gradiente protonico. Questo permette la sintesi di ATP a partire da ADP e Pi catalizzata dall'ATP sintasi (V complesso della catena respiratoria<sup>3</sup>).

L'ATP sintasi è formata da un dominio  $F_0$  transmembrana e da un dominio  $F_1$  esterno. La sintesi avviene nel dominio  $F_1$  composto

da tre sub-unità  $\alpha$  e tre sub-unità  $\beta$  organizzate sotto forma di dimeri ( $\alpha\beta$ ). I due domini sono collegati da una sub-unità  $\gamma$  (in blu). La catalisi è di tipo rotazionale: ogni dimero ha tre conformazioni (*open*, *tight* e *loose*) che ruotano con il passaggio dei protoni nel dominio intracellulare che trasmette la rotazione attraverso la sub-unità  $\gamma$  che funge da rotore. La subunità *a* del dominio  $F_0$  contiene due canali idrofilici, uno aperto verso lo spazio intermembrana ed uno verso la matrice; inoltre, possiede un residuo di arginina (Arg) in grado di interagire con i residui di acido aspartico (Asp)



della sub-unità C. Quando un protone attraversa il canale intermembrana indebolisce l'interazione tra i due residui amminoacidici permettendo la rotazione alla sub-unità C successiva, dove è già presente Asp protonato. Per ripristinare l'interazione (favorevole), il protone viene rilasciato nella matrice mitocondriale attraverso lo specifico canale. Questa rotazione viene trasmessa dal rotore al dominio F<sub>1</sub> permettendo la catalisi.

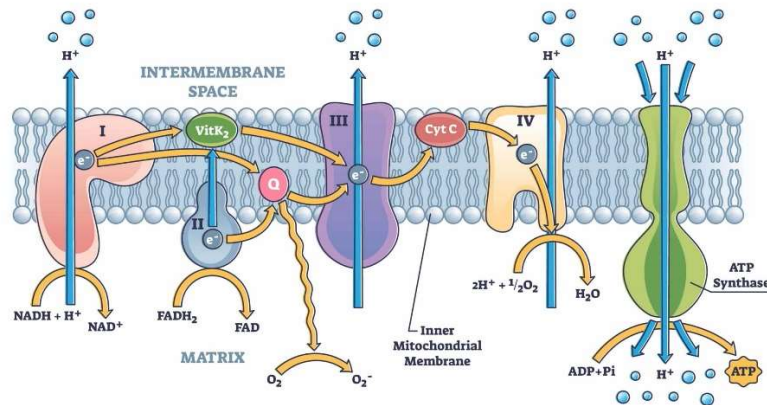


Figura 3 - Catena di trasporto degli elettroni - [projectinviectus.it/catena-di-trasporto-degli-elettroni/](http://projectinviectus.it/catena-di-trasporto-degli-elettroni/)

### 1.3 MPTP E CYP-D: FUNZIONE CELLULARE

La ciclofilina D (CyP-D) è una proteina appartenente alla famiglia delle ciclofiline che agisce come una peptidili-prolil isomerasi (PPI). La funzione principale è la sua interazione con la membrana mitocondriale interna: si associa alla proteina di trasporto dell'adenina (ANT) e permette l'apertura di un complesso denominato poro di transizione di permeabilità (PTP)<sup>6</sup>.

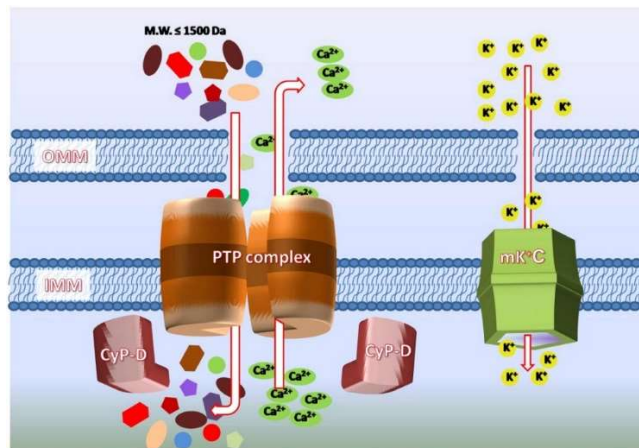


Figura 4 - Membrana mitocondriale e PTP complex (Vianello et al., 2012)

La membrana interna è estremamente impermeabile e sono quindi necessari trasportatori specifici. Recenti studi hanno dimostrato il coinvolgimento del complesso V della catena di trasporto nella formazione di PTP mitocondriali, ovvero di trasportatori non selettivi che permettono il passaggio di ioni e composti a peso molecolare inferiore ai 1500 Da. Questi possono avvenire in due configurazioni: “*low conductance*” e “*high conductance*”.

L’apertura del poro “*low conductance*” permette il rilascio di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  dalla matrice mitocondriale all’esterno come semplice canale di depolarizzazione della membrana, infatti, viene spesso proposto il meccanismo nel quale sia proprio il pH a guidare l’apertura di questo canale a conducibilità ridotta (circa 500 pS). Il calcio entra inizialmente nell’organello per via del potenziale negativo interno: attraverso la catena respiratoria si ha un aumento del pH della matrice mitocondriale che spinge l’apertura del poro e ristabilisce il potenziale iniziale; a questo punto il ciclo si ripete nuovamente. L’apertura del poro ad alta conducibilità (1200 pS) rende invece non selettiva la membrana mitocondriale che permette il passaggio di ioni e soluti con massa molecolare inferiore ai 1.5 kDa; il poro rimane poi aperto fino alla perdita del potenziale di membrana e alla rottura della membrana mitocondriale. Quest’ultima porta al passaggio dei componenti solubili della matrice nello spazio esterno. Citocromo C e AIF (*apoptosis inducing factor*) sono due di questi: il citocromo C è una piccola proteina contenente il gruppo  $-\text{eme}$ , normalmente adsorbita nella superficie della IMM, che, quando viene rilasciata, attiva la caspasi III e IV provocando la morte cellulare. AIF è una proteina di 50 kDa, presumibilmente localizzata nello spazio intermembrana, una volta che viene rilasciata attiva la caspasi II e le endonucleasi. Tutto questo, dunque, suggerisce che l’attivazione del PTP comporti poi apoptosi; tuttavia, questo meccanismo risulta semplicistico in quanto si può avere apoptosi anche senza l’attivazione del PTP.

## 1.4 CICLOFILINA D E MPTP

La ciclofilina D regola il PTP ed è noto che questo è implicato in malattie neurodegenerative, distrofia muscolare, ischemia e danno da ri-perfusione in vari organi; per questo motivo la proteina è oggetto di ricerche come target farmaceutico.



Figura 5 - Cyclofilina D Struttura tridimensionale PDB (Chimera)

Viene codificata dal gene *Ppif* e contiene una sequenza bersaglio mitocondriale (MLALRCGSRWLGLLSVPRSVPLRLPAARA) che viene eliminata quando la proteina entra nella matrice mitocondriale, riducendo la sua dimensione da 22 a ~18 kDa. Esistono 24 membri della famiglia delle ciclofiline, tutte agiscono come chaperoni accelerando la maturazione ed il *folding* proteico, oltre che giocare un ruolo fondamentale nella trasduzione del segnale (per quanto riguarda la concentrazione di calcio nella matrice mitocondriale) e nella risposta immunitaria. Nonostante non siano ben noti i ruoli fisiologici della proteina, è dimostrato che regola l'apertura del poro di transizione della permeabilità mitocondriale<sup>24</sup>. Sebbene siano state suggerite numerose componenti molecolari come necessarie per la formazione del mPTP, solo CypD ha resistito all'analisi genetica (studio della delezione del gene *Ppif*). Fino a tempi relativamente recenti, il modello del poro includeva l'ANT nella membrana interna mitocondriale (IMM) e il VDAC nella membrana esterna mitocondriale (OMM), che insieme formavano un canale continuo attraverso lo spazio intermembrana (IMS) sotto il controllo di CypD (questo è talvolta definito come l'ipotesi del "sito

di contatto” ed è in gran parte attribuito al lavoro di Le Quoc, Crompton e Halestrap<sup>25</sup>). Tuttavia, rimangono prove consistenti che numerose componenti, sebbene non siano necessarie per la formazione del poro, siano coinvolte nella modulazione della permeabilità.

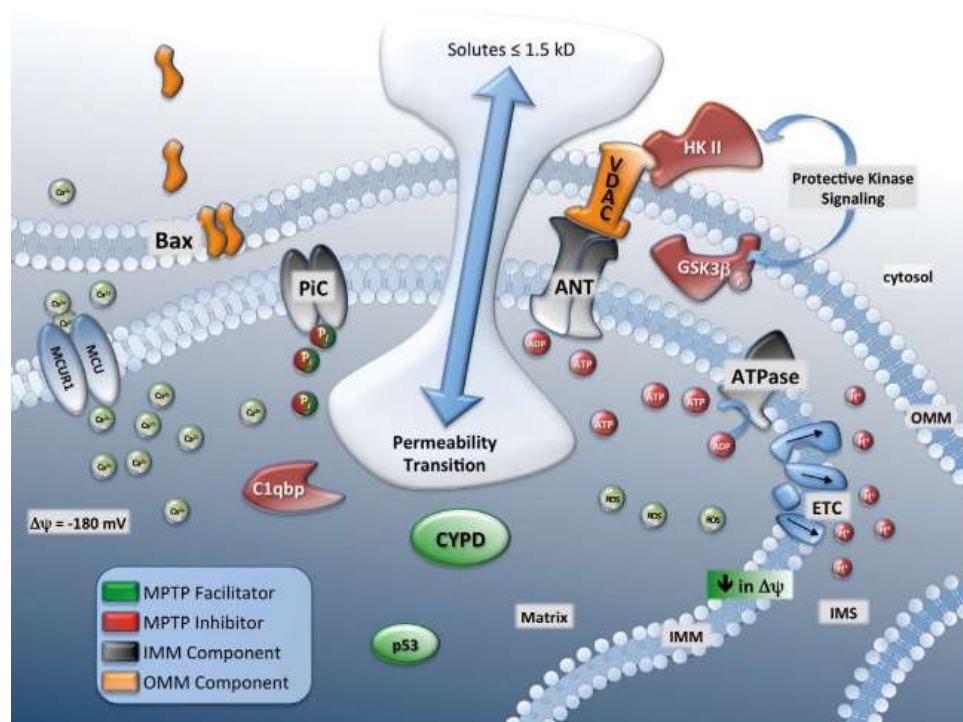


Figura 6 - Componenti, inibitori e induttori PTP (Elrod et al., 2013)

La scoperta che l'acido bongkreico, un inibitore dell'ANT che lo blocca nella conformazione "m", fosse in grado di ritardare la transizione di permeabilità, mentre un diverso inibitore dell'ANT che lo blocca nella conformazione "c" (atrattilaside) potesse sensibilizzare l'apertura in risposta al  $\text{Ca}^{2+}$ , ha suggerito che l'ANT potesse essere una componente strutturale del PTP. Halestrap<sup>26</sup> et al. hanno ulteriormente sviluppato questa ipotesi, suggerendo che gli effetti sia di CsA che dell'azione inibitoria dell'ADP sull'apertura del poro potessero essere attribuiti a una legatura diretta tra l'ANT e la CypD. Utilizzando una colonna di affinità per la CypD, sia il gruppo di Halestrap che Crompton<sup>27</sup> et al. hanno mostrato in modo indipendente un'interazione molecolare con l'ANT. Studi di ricostituzione condotti dai gruppi di Kroemer<sup>28</sup> e Crompton hanno dimostrato che gli isolati purificati di ANT, CypD e VDAC (anche proteine Bcl2) potevano

formare un poro sensibile al  $\text{Ca}^{2+}$  e sensibile a CsA in proteoliposomi e il lavoro del gruppo ha suggerito che l'ANT stesso potesse formare una struttura simile a un poro, simile al PTP. La somma di questi studi ha fornito evidenze significative che indicavano che l'ANT fosse il componente più probabile della membrana interna del poro. Questa teoria è rimasta valida fino a quando sono stati creati topi privi di Ant1 e Ant2 (Ant1/2-/-) e i mitocondri isolati da epatociti doppiamente carenti hanno dimostrato di subire comunque una transizione di permeabilità (sensibile a CsA) e rimanere suscettibili alla morte cellulare innescata da vari agenti. Questa scoperta singolare suggeriva che l'ANT non fosse una componente strutturale del PTP, anche se va notato che i mitocondri Ant1/2-/- richiedevano una concentrazione più elevata di  $\text{Ca}^{2+}$  per indurre l'apertura e che i ligandi dell'ANT (come l'ADP) perdevano la capacità inibitoria sulla probabilità di apertura del poro. Queste osservazioni successive suggeriscono che l'ANT probabilmente fa parte di un complesso di pori più ampio nella membrana interna mitocondriale che può influenzare direttamente le proprietà del PTP. La prima evidenza che il VDAC (noto come porina nella letteratura più datata) potesse essere un componente del mPTP localizzato nella OMM venne nel 1985 quando i Le Quoc caratterizzarono un evento di rigonfiamento mitocondriale che sembrava richiedere la membrana esterna. Scoprirono che i mitoplasti non rispondevano alla classica prova di rigonfiamento e sospettavano che il VDAC fosse coinvolto, forse migrando nella membrana interna per consentire la transizione di permeabilità. Crompton et al suggerirono ulteriormente il coinvolgimento del VDAC utilizzando una colonna di affinità CypD-GST, che mostrava un'interazione con il VDAC e l'ANT, nonché che questi costituenti purificati potevano formare un poro funzionale in proteoliposomi. Altre review hanno supportato l'ipotesi del VDAC attraverso il blocco con anticorpi anti-VDAC della transizione di permeabilità e l'inibizione del PTP mediante fosforilazione del VDAC. Tuttavia, come con l'ANT, un approccio genetico nel topo ha alla fine dissipato l'idea che il VDAC fosse una componente necessaria del poro di permeabilità. Ad esempio, Baines et al<sup>29</sup> hanno dimostrato che

l'eliminazione o la soppressione dei 3 geni Vdac (Vdac1, 2, 3) non ha interrotto la funzione del PTP e inoltre non ha alterato la morte cellulare necrotica o apoptotica. In effetti, l'eliminazione di Vdac2 ha aumentato la propensione alla morte cellulare. Fin dalla prima caratterizzazione del PTP, la ATP sintasi è stata postulata come possibile componente del poro stesso, anche se gran parte di questa congettura può probabilmente essere attribuita a cambiamenti indiretti nei fattori energetici che alterano la probabilità di apertura (adenina, fosfato,  $Ca^{2+}$ , ecc). Giorgio et al.<sup>30</sup> hanno dimostrato che la CypD si lega direttamente allo stelo laterale (subunità d e b) dell'ATP sintasi e ne modifica l'attività. Uno studio recente, che utilizza la soppressione mediata da siRNA, ha trovato che la subunità F0 è necessaria per la transizione di permeabilità e gli autori hanno ipotizzato che sia un componente principale di un complesso supramolecolare del PTP<sup>31</sup>. Questi risultati sono stati confermati da altri che mostrano che l'interazione di CypD riduce i tassi di sintesi e idrolisi dell'ATP per modulare sia la produzione di energia che la morte cellulare necrotica. Il meccanismo esatto con cui CypD può interagire e modulare il complesso V è complicato dalle interazioni precedentemente menzionate di CypD con ANT. Ad esempio, Chinopoulos et al.<sup>32</sup> hanno suggerito che il cambiamento nel tasso di scambio di ATP-ADP associato al legame con la ATP sintasi potrebbe essere parzialmente attribuito a un cambiamento nei tassi di flusso di ANT. Il PiC (gene SLC25A3) è il principale trasportatore di fosfato inorganico (Pi) nella matrice mitocondriale mediante co-trasporto con protoni o in scambio con ioni idrossile. Storicamente, il Pi è un potente modulatore dell'apertura del poro con innumerevoli studi che suggeriscono una relazione definitiva tra il contenuto di Pi nella matrice e l'attivazione del PTP. Tuttavia, la regolazione del poro mediante il Pi è stata recentemente rivalutata, poiché è stato suggerito che l'azione regolatoria dell'intera CypD e quindi di CsA possa dipendere dal Pi. Tuttavia, questa ipotesi è in netto contrasto con un recente studio condotto da McGee et al.<sup>33</sup>, in cui il Pi non ha assolutamente alcun effetto sull'apertura del poro in assenza di Ppif o inibizione da parte di CsA. Nonostante il potenziale effetto del Pi, il PiC stesso è stato suggerito come effettore del PTP o addirittura come

componente strutturale. Tuttavia, una prova definitiva dell'implicazione del PiC nel PTP dovrà essere confermata con analisi genetica nei topi o nelle cellule prive del gene Slc25a3.

## 1.5 FRAGMENT – BASED DRUG DISCOVERY (FBDD)

FBDD o “Fragment-based drug discovery” è un approccio complementare allo *high throughput screening* (HTS) per l’identificazione di molecole per campagne di ricerca *hit to lead*, in cui è fondamentale l’ottimizzazione delle proprietà e della potenza dello *screening*. Il metodo è diventato largamente utilizzato in aziende farmaceutiche, biotecnologiche e in realtà accademiche con 20 pubblicazioni nel 2019 e 21 nel 2020<sup>34</sup>.

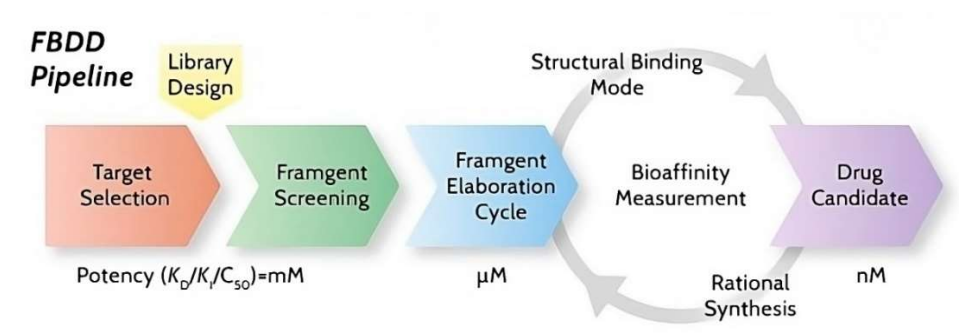


Figura 7 - Pipeline FBDD (Jubilantbiosys)

A differenza di un metodo classico HTS si utilizzano librerie di composti semplici ed a basso peso molecolare per studiare la loro interazione con una proteina di interesse. Pur avendo una bassa affinità ( $\mu M$ - $mM$ ) per la proteina la tecnica permette di ottenere degli ottimi punti di partenza con molecole semplici e facilmente modificabili in vari punti, portando quindi alla scoperta di *hit* molto adatti come punti di partenza per ottimizzazioni sequenziali, risultando particolarmente utile per *target* difficili da trovare (“*hard to drug targets*”). Quest’approccio ha avuto successo con il Venetoclax: medicinale chiave nel trattamento di alcuni tipi di leucemia ed uno dei primi farmaci in grado di targettare un’interazione proteina-proteina che era stata considerata *undruggable*. Altro vantaggio dell’utilizzo di piccoli frammenti sta nel fatto che è possibile, attraverso un ottimo *design* della libreria, avere grande copertura nello “spazio chimico” rispetto all’utilizzo di composti più grandi. Trovare *hit* di qualità ed interesse farmaceutico/biochimico è sempre il risultato di un buon *design* della libreria: è sempre essenziale assicurarsi un’ampia diversità per quanto riguarda gruppi funzionali e farmacofori. Cosa definisce un frammento? La definizione più accreditata definisce il frammento come una piccola molecola organica, generalmente con un numero inferiore a 20 atomi



pesanti, che segue la “regola del tre” (Ro3) definite anche regole di Lipinski: deve avere un peso molecolare inferiore di 300 Da, HBD (donatore di legame ad idrogeno) inferiore o uguale a 3, HBA (accettore di legame ad idrogeno) inferiore o uguale a 3 e un rapporto tra logaritmo di partizione e distribuzione  $c\text{LogP}/c\text{LogD} \leq 3$ . La bassa affinità con il bersaglio implica l'utilizzo di tecniche biofisiche molto accurate come: NMR, SPR, cristallografia a raggi X; sono in genere necessari almeno due metodi ortogonali per poi validare ogni hit.

## 2 SCOPO DELLA TESI:

---

La ciclofilina-D (CypD) è una proteina coinvolta nella regolazione del poro di transizione di permeabilità mitocondriale (mPTP), questa rappresenta un promettente bersaglio farmaceutico nelle patologie associate a danni cellulari, inclusi gli eventi ischemici, le complicanze post-infarto miocardico e le malattie neurodegenerative. La disfunzione mitocondriale, associata all'apertura incontrollata del mPTP, è correlata a danni cellulari e morte cellulare, evento che si verifica in tutte le patologie sopracitate. L'inibizione mirata di CypD potrebbe preservare l'integrità mitocondriale, ridurre i danni ossidativi e prevenire la morte cellulare, promuovendo così la sopravvivenza cellulare in condizioni patologiche. Il progetto prevede di ricercare attraverso tecnica *fragment-based drug discovery* (FBDD) <sup>19</sup>F-NMR, ligandi per il sito attivo, in modo da poter essere poi utilizzate come molecole *hit* per lo sviluppo di farmaci in grado di contrastare malattie patologiche croniche neurodegenerative. L'approccio FBDD verrà eseguito sia utilizzando la CypD non marcata contro la libreria di composti fluorurati, fornita da Evotec; sia utilizzando la proteina marcata al fluoro sul trp del sito attivo. In caso di frammenti ritenuti di interesse verranno prese in considerazione analisi aggiuntive per verificare l'entità e la posizione dell'interazione con la proteina.

### 3 TECNICHE E METODOLOGIE UTILIZZATE

#### 3.1 RISONANZA MAGNETICA NUCLEARE:

La risonanza magnetica nucleare (NMR) è una tecnica analitica che rileva l'energia assorbita attraverso cambiamenti negli stati di spin nucleare. Si basa su un fenomeno fisico in cui i nuclei, posti in un forte campo magnetico costante, sono perturbati da una radiofrequenza (RF) generando un segnale elettromagnetico. Questo avviene in prossimità della risonanza, quando la RF impostata corrisponde alla frequenza intrinseca dei nuclei (frequenza di Larmor), la quale dipende dall'intensità del campo magnetico statico ( $B_0$ ), dall'ambiente chimico e dalle proprietà magnetiche dell'isotopo. La tecnica viene utilizzata prevalentemente per determinare la struttura di molecole organiche<sup>35</sup> in soluzione, in questo progetto di tesi è stata utilizzata per la costruzione di pool di composti fluorurati e per il loro test con esperimenti T2-CPMG al  $^{19}\text{F}$  per studi proteina-ligando al fine di ricercare eventuali "binders".

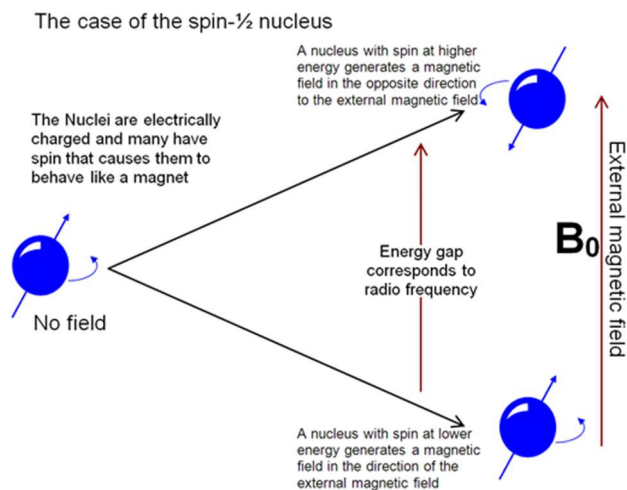


Figura 8 - Distribuzione di Boltzmann

In generale, i nuclei maggiormente usati sono  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  e  $^{31}\text{P}$ , in quanto per poter interagire con il campo magnetico dello spettrometro il nucleo deve avere un momento magnetico nucleare associato a un momento angolare<sup>36</sup>. Questo si verifica quando un

isotopo ha un spin nucleare diverso da zero, ovvero un numero dispari di protoni e/o neutroni. I nuclidi con numero pari di entrambi hanno uno spin totale pari a zero e sono inattivi all'NMR. Nel caso delle proteine o comunque di tutti i nuclei dotati di un numero quantico di spin nucleare  $I =$

1/2, immersi nel campo magnetico  $B_0$  orientato lungo l'asse z, si avrà una separazione dei nuclei in due livelli energetici differenti:  $\alpha$  a più bassa energia e  $\beta$  a più alta energia. La distribuzione delle popolazioni nei due livelli è definita dalla distribuzione di Boltzman [Eq.1], ottenendo che la popolazione ad energia minore è la più rappresentativa rispetto allo stato  $\beta$ .

$$\frac{N_i}{N} = \frac{g_i e^{-E_i/k_B T}}{Z(T)} \quad \text{[Eq.1];}$$

N: numero particelle,  $k_B$ : costante di Boltzman, T: temperatura, Z: funzione di partizione,  $g_i$ : numero di stati aventi energia  $E_i$ ,  $E_i$ : energia dello stato  $i$ ,  $N_i$ : numero di particelle nello stato energetico  $E_i$ .

La differenza di energia ( $\Delta E$ ) tra i due livelli energetici equivale a:

$$\Delta E = \frac{\mu B_x}{I} \quad \text{[Eq.2];}$$

Dove  $\mu$  è il momento magnetico, generato dal nucleo, che ruotando ed avendo una carica produce un campo magnetico.  $B_x$  la forza del campo magnetico e I il numero quantico magnetico.

Maggiore è la forza del campo magnetico più grande è la separazione, in termini di differenza di energia, tra i due livelli di popolazione. Il valore  $\Delta E$  rimane molto piccolo e spesso è definito come una frequenza (MHz), che può variare dai 100 MHz ai 1200 MHz a seconda del tipo di strumento utilizzato.

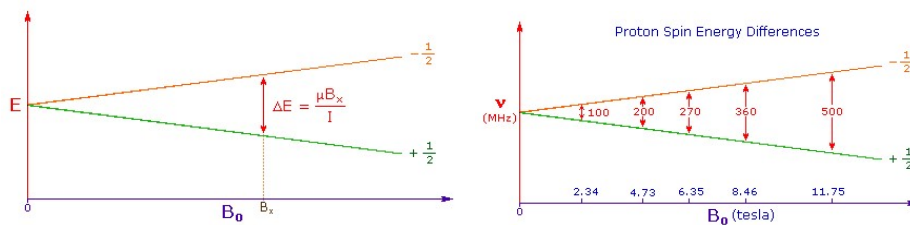


Figura 9 - Variazioni dei livelli energetici in base alla forza del magnete

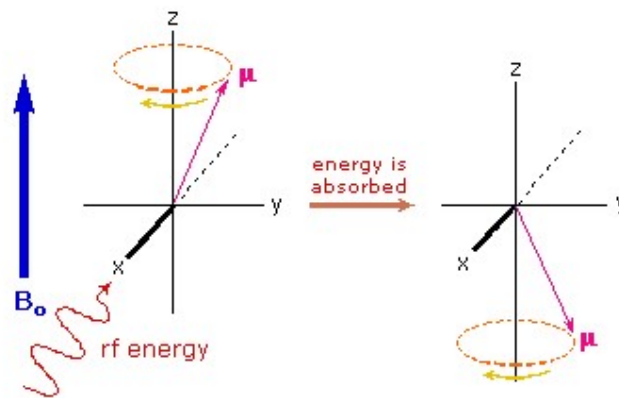


Figura 10- Momento magnetico ed eccitazione

Questo è valido per nuclei con  $I=1/2$ . I valori del momento magnetico dei nuclei più comuni sono:  $\mu=2,7927 \mu_N$   $^1\text{H}$ ,  $\mu=2,6273 \mu_N$   $^{19}\text{F}$ ,  $\mu=1,1305 \mu_N$   $^{31}\text{P}$  e  $\mu=0,7022 \mu_N$   $^{13}\text{C}$ . Riassumendo: il nucleo immerso in un campo magnetico esterno avrà un moto di precessione attorno all'asse z, la frequenza del moto è intrinseca di ogni nuclide e corrisponde a:

$$\omega_0 = \gamma B_0 \quad [\text{Eq.3}];$$

$\omega_0$ , ovvero la frequenza di Larmor ( $\text{rad s}^{-1}$ ). La costante  $\gamma$  è il rapporto giromagnetico (caratteristico di ogni nucleo), proporzionale al momento magnetico e  $B_0$  il campo magnetico. Quando la radiofrequenza applicata corrisponde alla frequenza del moto di precessione del nucleo e possiede un corretto angolo rispetto al campo magnetico esterno (asse x), il nucleo assorbirà energia e il suo momento magnetico subirà un'inversione allo stato  $I=-1/2$  (la frequenza in  $\text{rad/s}$  può essere facilmente convertita in  $\text{Hz}$  dividendo per  $2\pi$ ).

La differenza di energia tra i due stati di spin non è molto grande (circa 6 nuclei per milione sono in eccesso nello stato a più bassa energia  $I=+1/2$ ), nonostante ciò l'eccesso nello stato ad energia minore è sufficiente per misurazioni spettroscopiche.

In NMR, la magnetizzazione si riferisce all'orientamento netto del momento magnetico nucleare di un campione all'interno di un campo magnetico esterno. Quando un campione viene esposto a quest'ultimo, gli spin nucleari all'interno delle molecole si allineano con o contro la direzione del campo.

La componente lungo la direzione del campo magnetico esterno contribuisce alla magnetizzazione del sistema. Durante un esperimento NMR, il sistema di spin viene disturbato da impulsi di radiofrequenza (RF) e poi rilassa gradualmente alla sua condizione di equilibrio. La misurazione della magnetizzazione risultante nel tempo fornisce informazioni sulla struttura e l'ambiente chimico delle molecole nel campione.

Esistono due componenti principali della magnetizzazione in NMR:

1. Magnetizzazione longitudinale ( $M_z$ ): Questa è la componente della magnetizzazione lungo la direzione del campo magnetico esterno. Durante un impulso RF, la magnetizzazione longitudinale può essere ribaltata, ma successivamente rilassa verso l'equilibrio, fornendo informazioni sulla risonanza e sulla dinamica molecolare.

2. Magnetizzazione trasversale ( $M_{xy}$ ): Questa è la componente della magnetizzazione che è trasversale al campo magnetico esterno. Viene generata durante l'impulso RF e produce il segnale NMR che viene rilevato. La rilevazione e l'analisi della magnetizzazione trasversale forniscono informazioni sulla struttura chimica del campione.

La manipolazione della magnetizzazione attraverso impulsi RF e l'analisi della sua rilassamento sono fondamentali per l'acquisizione di dati NMR e la generazione di spettri NMR, che sono utilizzati per determinare la struttura e la dinamica molecolare dei campioni.

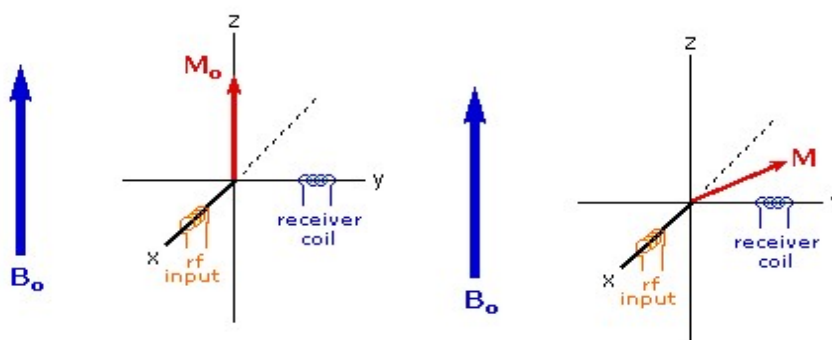


Figura 11 - Magnetizzazione netta prima e dopo l'introduzione di RF

Si nota come varia la magnetizzazione netta  $M_0$  quando viene fornita energia come RF:

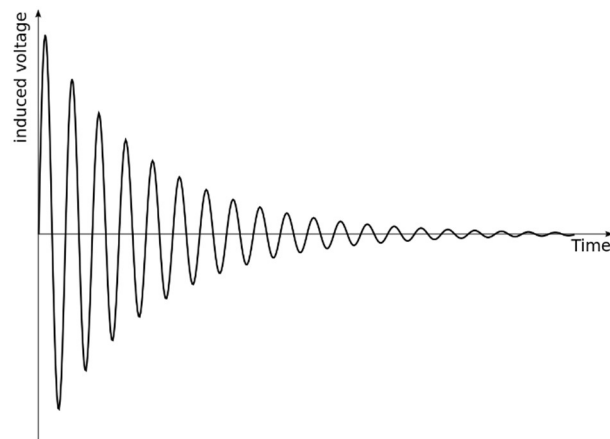
- Prima si ha lo spostamento della magnetizzazione dall'asse z verso l'asse y. Questo avviene perché alcuni dei nuclei con spin  $+1/2$  sono eccitati allo stato  $-1/2$  a più alta energia, il moto di precessione intorno all'asse z diventa coerente (non randomico) e genera una componente y significativa sulla magnetizzazione netta.
- Dopo l'irradiazione si ha un processo definito di rilassamento che porta gli spin eccitati all'equilibrio. L'energia così rilasciata viene rilevata dal ricevitore e si ristabilisce la situazione iniziale di equilibrio.

Inoltre, è molto importante la durata dell'impulso a radiofrequenza, in quanto dalla sua lunghezza dipende l'angolo di rotazione della magnetizzazione  $t_p$  (in genere  $30^\circ/90^\circ/180^\circ$ ):

$$\beta = \omega_0 t_p \quad \text{[Eq.5]}$$

### **3.2 TRASFORMATATA DI FOURIER**

In ogni campione i nuclei non hanno la stessa frequenza di precessione a causa del diverso intorno chimico che sperimentano. Si imposta quindi una frequenza  $\nu_{RF}$  dove viene centrato l'impulso a radiofrequenza, si ottiene la magnetizzazione nel piano  $xy$  e si registra l'interferogramma di decadimento (FID). Si ottiene così una misura della differenza fra la frequenza di Larmor di ogni protone e di quella applicata, si ottiene lo spettro dopo l'applicazione della trasformata di Fourier<sup>37</sup> (FT). Al termine dell'impulso RF il sistema procederà a ristabilire le condizioni iniziali rilassando la magnetizzazione lungo l'asse z, portando all'annullamento di quella presente sul piano trasversale. Quando il FID riduce di intensità come in Fig.12, si ha la perdita di magnetizzazione trasversale:



*Figura 12 - FID (free induction decay)*

Il rilassamento di tipo  $T_2$  corrisponde a questo tipo di perdita di magnetizzazione, il recupero della magnetizzazione iniziale sull'asse  $z$ , invece, corrisponde al rilassamento  $T_1$ . La differenza tra i due tipi di rilassamento è che la perdita di magnetizzazione sul piano  $xy$  provoca una perdita di fase e quindi perdita di intensità e risoluzione del segnale, questo fenomeno si somma alla non perfetta omogeneità del campo magnetico. I tempi di rilassamento longitudinali sono molto più grandi di quelli trasversali per molecole di grandi dimensioni, fenomeno che sarà fondamentale per comprendere gli esperimenti CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill).



### 3.3 SEQUENZE NMR

#### 3.3.1 Sequenza zg

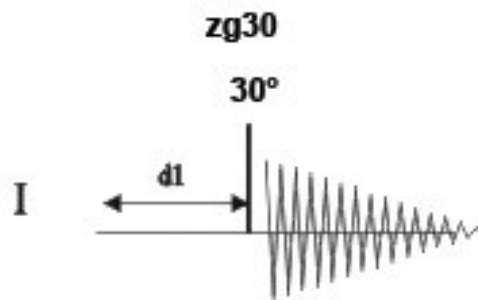


Figura 13 - Descrizione impulso zg30

In un esperimento standard 1-D, si utilizzerebbe un impulso di 90 gradi per eccitare il segnale NMR al fine di massimizzare il segnale emesso. Tuttavia, ciò massimizza anche la durata che deve trascorrere tra impulsi successivi affinché il campione si rilassi. Si può dimostrare che nel caso di eccitazione ripetuta di un campione, un metodo più efficiente è eccitare il campione con un impulso di 30 gradi e ridurre di conseguenza il ritardo di rilassamento. Anche se ogni singolo segnale emesso è più debole, l'accumulo più rapido di dati consentito dall'impulso da 30 gradi porta a un aumento complessivo della sensibilità. I due programmi standard sono "zg" per un impulso di eccitazione di 90 gradi e "zg30" per un impulso di eccitazione di 30 gradi<sup>38</sup>, vedi Fig.13.

Guardiamo adesso il programma dell'impulso nel dettaglio:

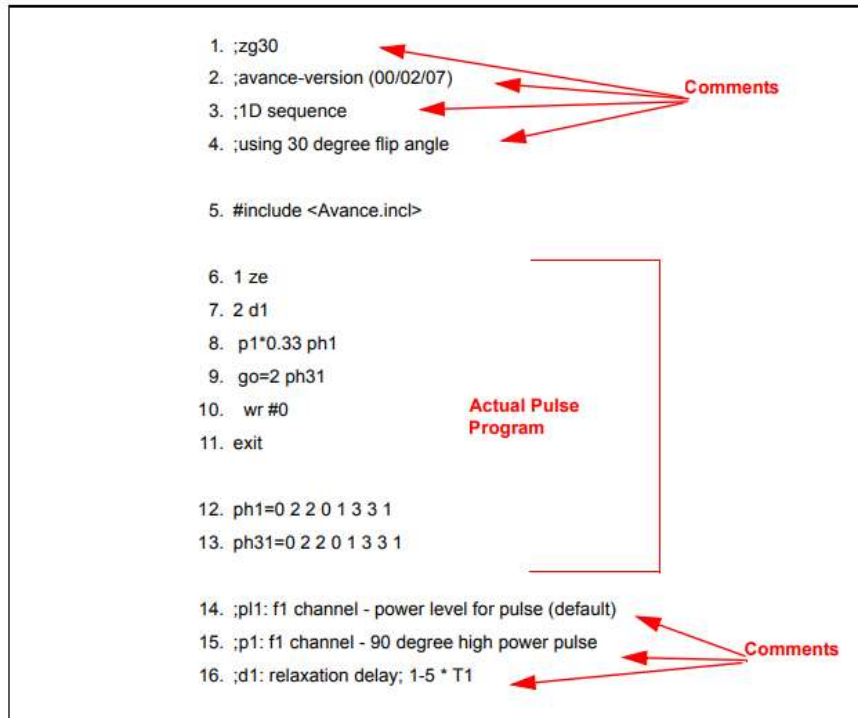


Figura 14 - Pulse program "zg30" (Bruker)

- Linea 6: 1 ze - Questa linea non è preceduta da un punto e virgola ed è effettivamente la prima linea del programma vero e proprio. Qualsiasi linea all'interno di un programma può essere numerata per facilitare i cicli e questa è naturalmente numerata come linea 1. Il comando "ze" (zero) è un comando che fa sì che i dati attualmente in memoria vengano sostituiti dai dati acquisiti durante la prima scansione. I dati acquisiti durante le scansioni successive saranno quindi aggiunti in memoria. Il comando "ze" cancella, o azzerà, la memoria in preparazione ai dati che verranno acquisiti durante un esperimento.
- Linea 7: 2 d1 - Questa linea è un comando di *delay*. Il *delay* si chiama "d1". Questo è semplicemente una pausa durante la quale non vengono trasmessi impulsi. La lunghezza di d1 può essere specificata inserendo un valore adeguato.
- Linea 8: p1\*0.33 ph1 - Il comando p1\*0.33 istruisce lo spettrometro a emettere un impulso con lunghezza p1 moltiplicata per 0,33. Risulta quindi un impulso di eccitazione da 30 gradi, poiché convenzionalmente p1 è l'impulso da 90 gradi. Ogni impulso avrà tre caratteristiche principali: lunghezza, ampiezza e fase. La lunghezza o durata dell'impulso può essere

impostata inserendo un valore adeguato di p1. L'ampiezza dell'impulso è spesso chiamata livello di potenza. In questo caso, non viene specificata alcuna impostazione di potenza, quindi lo spettrometro si basa sul valore assegnato a p1. Il valore di "p1" può essere impostato inserendo un valore adeguato nella tabella dei livelli di potenza del menu "eda". Va anche menzionato che quando non viene specificato alcun canale per un particolare impulso, l'impulso viene inviato automaticamente al canale di osservazione (cioè il canale F1).

- Linea 8 assegna anche la fase all'impulso con il comando "ph1".
- Linea 9: go=2 ph31 - Questo singolo comando avvia una serie di processi, inclusa l'apertura del ricevitore e la digitalizzazione dei segnali NMR. Quando l'acquisizione è stata completata, cioè dopo che sono stati digitalizzati i punti del FID, il programma torna alla linea che inizia con "2", che è la Linea 7. L'intero processo viene ripetuto NS volte (supponendo che DS=0). La Linea 9 imposta anche la fase del ricevitore con il comando ph31.

La necessità del ritardo "d1" nella Linea 7 dovrebbe ora essere più chiara. Eccitare un campione NMR con una serie di impulsi e con un ritardo di rilassamento insufficiente fa sì che il campione diventi saturo. In altre parole, assorbe più energia di quanto ne possa rilasciare. Per dare al campione il tempo di rilasciare più energia, il ritardo "d1" precede ciascun impulso. Serve quindi per concedere al campione il tempo sufficiente per rilassarsi.

- Linea 10: wr #0 - Questo comando istruisce il computer a memorizzare i dati acquisiti sull'hard disk.
- Linea 11: Exit - Questo comando dice al computer che è stato raggiunto la fine del programma.
- Linea 12 e 13: Queste due linee definiscono la sequenza di ciclo di fase sia per il trasmettitore (ph1) che per il ricevitore (ph31).

Il valore preciso assegnato a "p1", "d1" e "pl1" dipenderà dal campione da analizzare e dal tipo di sonda da utilizzare. Il programma di impulsi comune intitolato "zg" è identico a "zg30" tranne che viene trasmesso un impulso di 90 gradi invece di un impulso di 30 gradi.

### 3.3.2 Sequenza $T_2\_SCREEN\_19F$

La sequenza di impulsi utilizzata negli esperimenti CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) consente di misurare il tempo di rilassamento  $T_2$  di un nucleo specifico. Questa sequenza è stata sviluppata per ridurre gli effetti di sfasamento dovuti alla disomogeneità del campo (definita come perdita di coerenza degli spin). Qui in Fig. 15 viene descritto lo schema della sequenza CPMG:

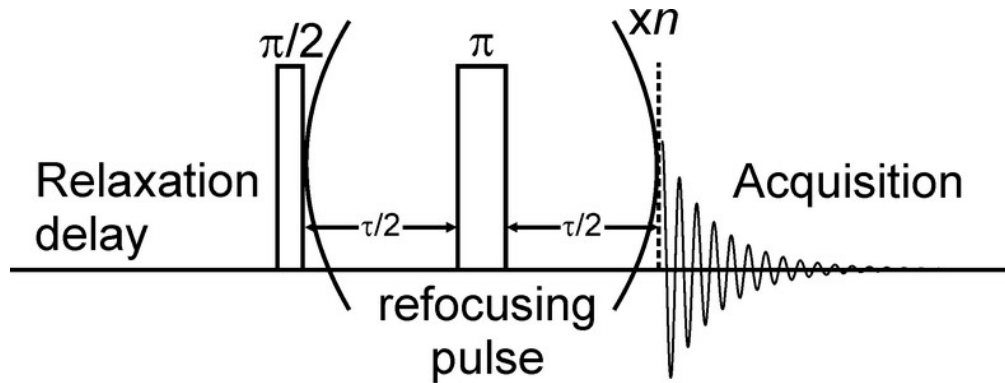


Figura 15 -  $T_2\_SCREEN$  pulse program

- Impulso di 90 gradi ( $\pi/2$ ): la sequenza inizia con un impulso  $90^\circ$ , che direziona gli spin nucleari del campione da uno stato di equilibrio magnetico dall'asse z al piano xy.
- Serie di impulsi di  $180^\circ$  ( $\pi$ ): dopo il primo impulso di  $90^\circ$ , viene applicata una serie di impulsi di  $180^\circ$  ( $\pi$ ). Questi impulsi di inversione di fase sono applicati a intervalli regolari e servono a invertire la fase del segnale NMR, generando echi di spin per ripristinare la coerenza di spin. Durante ciascun eco di spin si rifocalizza lo sfasamento degli spin dovuto alla disomogeneità del campo ma non quello dovuto al rilassamento trasversale come mostrato in Fig.16:

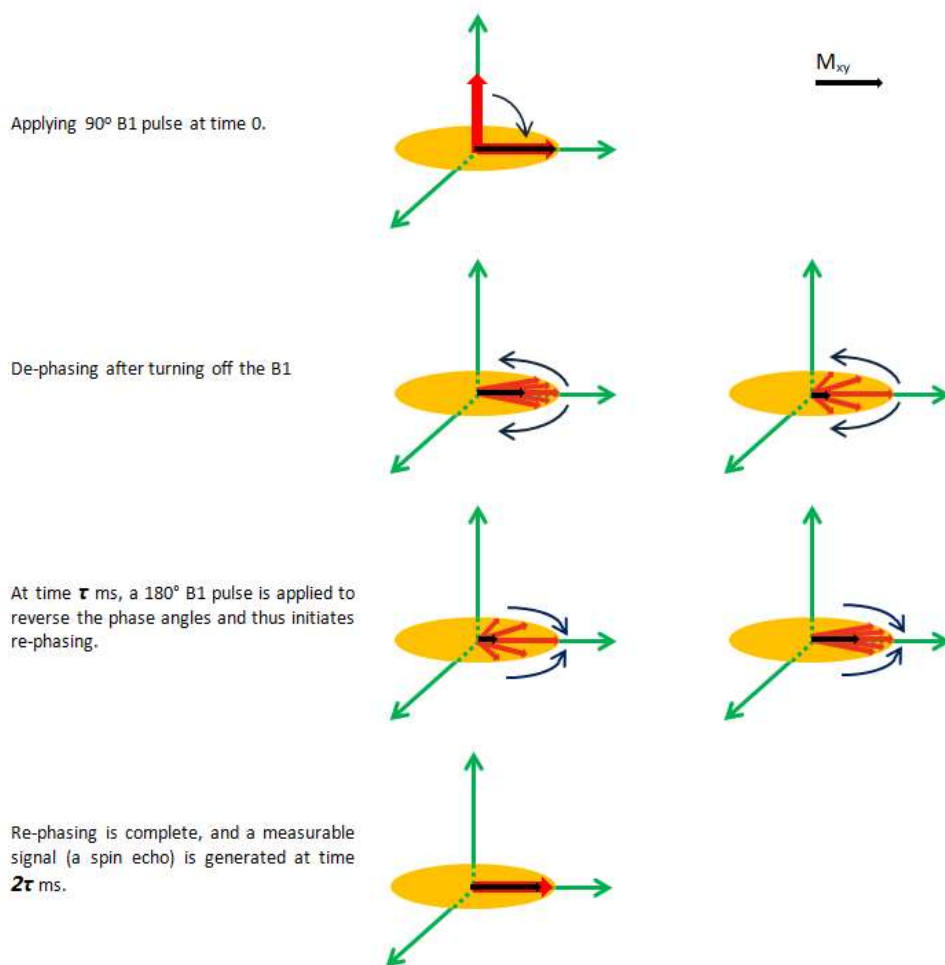


Figura 16 - Rappresentazione echi di spin

- Acquisizione del segnale: dopo la serie di eco di spin, viene acquisito il segnale NMR.

Misurando l'ampiezza del segnale NMR variando il numero di echi di spin e osservando come diminuisce aumentando il tempo complessivo in cui la magnetizzazione trasversale viene lasciata rilassare, è possibile determinare il tempo di rilassamento  $T_2$ . In pratica, questo tipo di sequenza di impulsi permette di ottenere informazioni sulla perdita di coerenza degli spin nucleari nel campione, che è indicativa delle interazioni molecolari e della mobilità degli atomi o dei nuclei nell'ambiente circostante.

L'esperimento CPMG è alla base dello studio di interazione di proteine con frammenti, FBDD (*fragment-based drug discovery*) per la ricerca di ligandi. Il segnale NMR del frammento quando interagisce con la proteina si allarga diminuendo di intensità, questo fenomeno è dovuto alla diminuzione del tempo di rilassamento  $T_2$  come mostrato in Fig. 17:

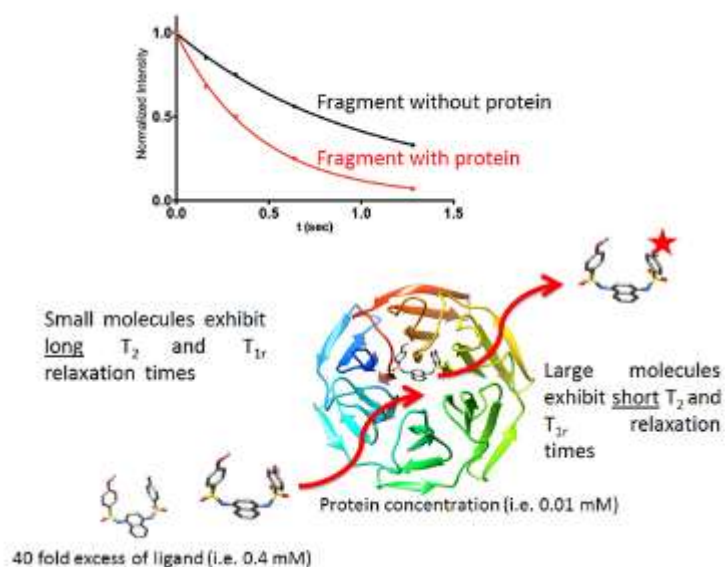


Figura 17 - Differenza del rilassamento trasversale con interazione proteica (Bruker)

### 3.4 $^{19}\text{F}$ -NMR

La spettroscopia NMR al fluoro è uno strumento potente per selezionare piccole molecole contro un bersaglio biologico (proteina), permettendo un rapido ed efficiente *screening* di grandi librerie di composti. La sensibilità intrinseca dell'NMR al fluoro è paragonabile a quella del protone (83% della sensibilità del protone), e l'isotopo attivo, il  $^{19}\text{F}$  con spin 1/2, è presente al 100% in abbondanza naturale. Lo *screening* viene eseguito in una soluzione tampone più appropriata per la stabilità e la solubilità della proteina. Questo è possibile perché i tamponi non contengono fluoro e, quindi, non interferiscono con l'acquisizione degli spettri. La vasta finestra spettrale dei *chemical shift* riduce il problema della sovrapposizione dei segnali, permettendo così la possibilità di creare grandi miscele (*pool*) di frammenti fluorurati.

In generale, diversi parametri possono essere misurati per lo *screening*: (I) rilassamento trasversale, (II) spostamento chimico isotopico, (III) rilassamento della coerenza a doppio quanto (DQ), (IV) “*long lived spin states*” (LLS), (V) rilassamento longitudinale, (VI) trasferimento di saturazione  $^1\text{H} \rightarrow ^{19}\text{F}$  (STD), e (VII) diffusione traslazionale. Il *range* dinamico, definito come il rapporto del parametro osservabile in presenza e in assenza di proteina, per (V) a (VII) è limitata, richiedendo quindi una maggiore quantità di proteina per lo *screening*. Per gli esperimenti si utilizzano basse concentrazioni di frammenti in modo da: (i) evitare

l'interazione tra i frammenti; (ii) evitare la formazione di aggregati, che spesso sono causa di falsi positivi; (iii) testare ampie miscele fluorurate (ad esempio, con più di 30 frammenti fluorurati in ciascuna miscela/*pool*), aumentando così la capacità e riducendo il consumo di proteina. Si è realizzato utilizzando una sequenza di impulsi Carr–Purcell–Meiboom–Gill (CPMG), con un impulso di rifocalizzazione adiabatico a 180° senza distorsione di fase per coprire una vasta larghezza di banda spettrale, spesso necessaria nella selezione di frammenti fluorurati con diversi gruppi funzionali. La sequenza viene di solito eseguita con un intervallo di 40-80 ms tra il treno di impulsi a 180° per beneficiare del contributo dello scambio tra lo stato libero e legato al tasso di rilassamento trasversale osservato.

### 3.5 NMR: ESPERIMENTI BIDIMENSIONALI

Studiando molecole complesse come le proteine, è fondamentale poter studiare accuratamente le risonanze di tutti i nuclei coinvolti. Più una molecola è grande di dimensioni più è probabile che queste diventino degeneri e si sovrappongano nella stessa regione spettrale, per questo motivo risulta spesso necessario utilizzare esperimenti bidimensionali. A differenza degli esperimenti 1D, gli spettri NMR bidimensionali sono descritti da due assi di frequenza ( $f_1$  e  $f_2$ ) e in funzione di essi viene plottata l'intensità del segnale. Ogni picco è quindi caratterizzato da due valori di frequenza. La distinzione delle due frequenze permette di risolvere i picchi sovrapposti in quanto questi vengono dispersi in un piano e non su solo un asse.

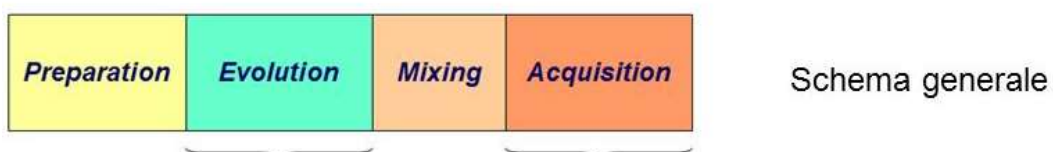


Figura 18 - Schema generale esperimenti NMR-2D

Questo è reso possibile dal fatto che gli esperimenti bidimensionali vengono registrati in funzioni di due variabili temporali ( $t_1$  e  $t_2$ ):

- Durante la fase di “preparazione” si ha il primo impulso o sequenza di impulsi che vengono fatti evolvere per un tempo  $t_1$ ,
- In seguito si ha il periodo di “mescolamento” dove avviene il trasferimento di magnetizzazione tra spin differenti, ma accoppiati scalarmente o per via dipolare,

- Il segnale viene ora registrato dal detector come funzione della seconda variabile temporale  $t_2$  ( $f_2$ ).

### 3.5.1 $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ - HMQC

Il  $^1\text{H}$  $^{15}\text{N}$  HMQC è un esperimento di risonanza magnetica nucleare (NMR) bidimensionale ed etero-correlato ampiamente utilizzato nel campo della biologia strutturale delle proteine. In breve, produce uno spettro bidimensionale in cui ogni segnale identifica una coppia di nuclei correlati ( $^{15}\text{N}$  -  $^1\text{H}$ ), accoppiati scalarmente tra loro ( $^1J_{\text{N-H}}$ ). Nelle proteine, tali segnali si riferiscono essenzialmente al gruppo funzionale N-H ammidico (ad esempio legami peptidici o catena laterale di glutammina e asparagina) e al N-H dell'indolo nella catena laterale del triptofano. Segnali dai gruppi amminici potrebbero essere osservati anche in condizione di pH acido. Ogni residuo proteico, è associato a un legame peptidico specifico e di conseguenza a un segnale NMR unico (ad eccezione del residuo N-terminale o della prolina). Per questo motivo, gli spettri HMQC o HSQC forniscono un'impronta strutturale delle proteine e uno strumento potente per monitorare le proprietà proteiche in soluzione. Valutare la dispersione dei segnali lungo entrambe le dimensioni delle frequenze  $^1\text{H}$  e  $^{15}\text{N}$  è un primo controllo di qualità per la struttura proteica in soluzione: infatti, una proteina foldata produce picchi con valori di *chemical shift* ben dispersi, in entrambe le dimensioni. Le coppie di risonanze correlate relative alle catene laterali di glutammina, asparagina e triptofano sono facilmente rilevabili dagli spettri 2D perché occupano regioni specifiche. Anche le risonanze ammidiche derivanti dai residui di glicina sono generalmente confinate in specifici intervalli di *chemical shift*.

Avere un'impronta digitale delle proprietà proteiche in soluzione consente di monitorare anche tutte le perturbazioni strutturali che influenzano il ripiegamento della macromolecola, come l'aggregazione, i cambiamenti conformazionali e i processi di interazione con altre proteine o molecole.



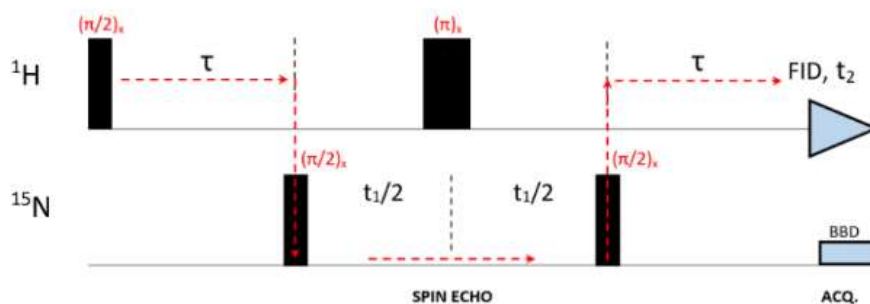


Figura 19 - Sequenza HMQC

Il segnale di risonanza magnetica nucleare (NMR) viene sempre registrato eccitando e rivelando il nucleo con il rapporto giromagnetico  $\gamma$  più elevato, cioè l' $^1\text{H}$ , per migliorare la sensibilità complessiva dei segnali ( $\gamma_{\text{H}^1} = 26.75 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $\gamma_{\text{N}^{15}} = -2.7 \cdot 10^7 \text{ rad T}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Ciò avviene perché, negli esperimenti di risonanza magnetica nucleare bidimensionale, il rapporto segnale-rumore (S/N) dipende dai rapporti giromagnetici dei nuclei eccitati ( $\gamma_{\text{exc}}$ ) e osservati ( $\gamma_{\text{obs}}$ )<sup>3/2</sup>. La dimensione indiretta  $^{15}\text{N}$  viene costruita trasferendo la magnetizzazione protonica eccitata all'eteronucleo attraverso una sequenza di impulsi a radiofrequenza (rf).  $^1\text{H}^{15}\text{N}$  SOFAST-HMQC è stato utilizzato per l'analisi interazione proteina-ligando. La sequenza di impulsi è essenzialmente la stessa di un normale esperimento HMQC, ma consente di ottenere spettri eterocorrelati con un'elevata sensibilità del segnale in tempi molto brevi ( $\approx 5\text{-}20 \text{ min.}$ ) e utilizzando basse concentrazioni di proteina ( $<50 \mu\text{M}$ ). Questo è reso possibile dall'ottimizzazione del tempo di rilassamento longitudinale  $T_1$  per far allineare la magnetizzazione parallelamente a  $B_0$ , riducendo così il ritardo di recupero tra ciascuna scansione. Ogni spettro viene acquisito con:  $n_s = 96$ ,  $d_1 = 200 \text{ ms}$ , la dimensione spettrale è di circa 12-14 ppm per  $^1\text{H}$  e 30-35 ppm per  $^{15}\text{N}$ .

### 3.6 TECNICHE CROMATOGRAFICHE – FPLC

La “Fast Protein Liquid Chromatography” (FPLC) è una forma di cromatografia a media pressione originariamente sviluppata per purificare le proteine con alta risoluzione e riproducibilità. La sua caratteristica distintiva è che la fase stazionaria è composta da microsferi di piccolo diametro (generalmente agarosio reticolato) che sono impacchettate in colonne di vetro o plastica e hanno un'elevata capacità di carico. Le resine per FPLC sono disponibili in un'ampia gamma di dimensioni delle

particelle e superfici dei ligandi, che vengono selezionate in base all'applicazione, da notare la differenza sostanziale con le colonne per i sistemi HPLC che al contrario presentano molte volte fasi solide con metalli e sistemi che necessitano di pressioni troppo elevate incompatibili con le condizioni di stabilità delle proteine o enzimi da purificare.

La purificazione delle proteine è essenziale per gli studi biochimici ed attraverso il sistema FPLC è possibile ottenere una separazione rapida e un monitoraggio in tempo reale delle varie condizioni di eluizione e del sistema (pressione, pH, temperatura, conducibilità). Ad ogni modo, con migliaia di proteine esistenti, di cui la maggior parte mostrano caratteristiche uniche è sempre più importante sviluppare una strategia di purificazione che porti alla giusta resa, purezza e attività richiesta. Tutte queste tecniche richiedono specifici tamponi (fasi mobili) e resine cromatografiche (fase solida), in particolare vedremo nel dettaglio alcuni tipi di separazioni cromatografiche:

- Purificazione per affinità (IMAC),
- Purificazione per scambio cationico (CEC),
- Purificazione per esclusione dimensionale (SEC).

### **3.7 PURIFICAZIONE PER AFFINITÀ (IMAC)**

Esistono numerosi metodi per separare proteine bersaglio dalle altre presenti nel lisato cellulare, il più potente è attraverso la cromatografia per affinità che sfrutta le proprietà di *binding* specifiche del prodotto di interesse sulla fase stazionaria. Il funzionamento si può descrivere in tre fasi: la prima consiste nell'iniezione della miscela in colonna e di attendere il completo passaggio della stessa, nella seconda fase si continua a fluire fase mobile in colonna per lavare via eventuali molecole presenti e si attende fino a che il sistema non ritorna all'equilibrio, l'insieme di pompe e colonna costituisce un sistema di tipo inerziale opponendosi alle modifiche effettuate su di esso che quindi richiedono un certo tempo per essere rivelate attraverso i detector; una volta ritornati in una situazione di equilibrio si procede con l'eluizione del composto di interesse utilizzando un ligando più affine alla fase stazionaria della proteina bersaglio in modo da portarla in soluzione. Esistono diversi esempi di cromatografie di affinità, per quanto riguarda il progetto di tesi è stata utilizzata una IMAC che permette la purificazione di proteine poli-istidiniche

dopo la loro chelazione con uno ione metallico. Si possono utilizzare vari ioni metallici, tra i più comuni possiamo annoverare  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , per la separazione è stata utilizzata una colonna caricata con nichel. Per l'eluizione della proteina legata alla fase stazionaria si utilizza un tampone contenente imidazolo.

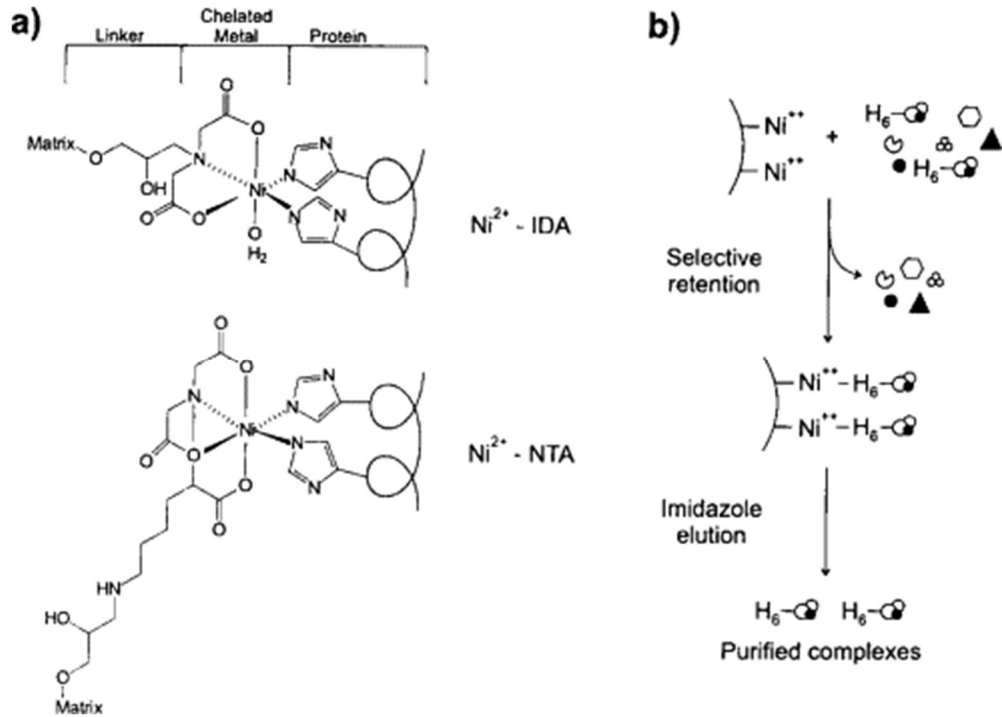


Figura 14 – Descrizione affinità (IMAC) (Cytiva)

La colonna utilizzata è una HisTrap IMAC HP della Cytiva<sup>®</sup>, la quale possiede le seguenti specifiche:

Matrix	Highly cross-linked spherical agarose, 6%
Mean particle size	34 µm
Metal ion capacity	~15 µmol NP <sup>+</sup> /mL medium
Dynamic binding capacity <sup>1</sup>	At least 40 mg (histidine) <sub>6</sub> -tagged protein/mL medium (NP <sup>+</sup> -charged)
Column volumes	1 mL or 5 mL
Column dimensions	i.d. x h: 0.7 x 2.5 cm (1 mL) 1.6 x 2.5 cm (5 mL)
Recommended flow rate <sup>2</sup>	1 and 5 mL/min for 1 and 5 mL column, respectively
Max. flow rates	4 and 20 mL/min for 1 and 5 mL column, respectively
Column hardware pressure limit	5 bar (0.5 MPa, 70 psi)
Compatibility during use	See Tables 3 and 4
Chemical stability (metal-ion-stripped medium)	0.01 M HCl, 0.1 M NaOH. Tested for 1 week at 40°C 1 M NaOH, 70% HAc. Tested for 12 hours 2% SDS. Tested for 1 hour 30% 2-propanol. Tested for 30 min
Avoid in buffers	Chelating agents, e.g., EDTA, EGTA, citrate
pH stability (metal-ion-stripped medium)	
Cleaning <sup>3</sup>	2 to 14
Working <sup>4</sup>	3 to 12
Storage	20% ethanol at +4°C to +30°C

Figura 21 - Caratteristiche colonna HisTrap HP (Cytiva)

5 mM DTE <sup>1</sup>
5 mM DTT <sup>1</sup>
20 mM β-mercaptoethanol <sup>1</sup>
5 mM TCEP <sup>1</sup> (Tris[2-carboxyethyl]phosphine)
10 mM reduced glutathione <sup>1</sup>
8 M urea <sup>2</sup>
6 M guanidine hydrochloride <sup>2</sup>

Figura 20 - Limite componenti utilizzabili (Cytiva)

Il controllo delle specifiche delle colonne è fondamentale per poter fare un *design* dell'esperimento corretto, in quanto determinate fasi stazionarie sono suscettibili alla presenza o ad alte concentrazioni di alcune componenti dei tamponi utilizzati.

### 3.8 DESALTING

Successivamente alla fase di purificazione per affinità occorre un passaggio intermedio di *desalting*. In questo *step* si compie un cambio tampone trasferendo la proteina purificata con IMAC in un tampone dove non è presente imidazolo, dannoso per la proteina e per gli *step* di purificazione successivi. La colonna utilizzata è una Sephadex G-25 HiPrep 26/10. Le resine Sephadex G-25 offrono:

- Rapida desalinizzazione, rimozione di contaminanti e scambio di tamponi in un singolo passaggio.
- Ottimo recupero e riduzione minima del campione

Il principio di separazione si basa sull'esclusione dimensionale: le molecole piccole come sali e altre impurità vengono efficientemente separate dalle molecole ad alto peso molecolare di interesse. In Sephadex, il grado di reticolazione del destrosio determina in che misura le macromolecole possono permeare le sfere. Le molecole grandi vengono escluse, mentre le molecole di dimensioni più piccole entrano nelle sfere in misura variabile in base alle loro diverse dimensioni. Di conseguenza, le molecole grandi escono per prime dalla colonna, passando nel tampone desiderato seguite dalle molecole più piccole.

	<b>HiTrap Desalting</b>	<b>HiPrep 26/10 Desalting</b>
Resin	Sephadex G-25 Superfine	Sephadex G-25 Fine
Matrix	Cross-linked dextran	Cross-linked dextran
Bed volume	5 mL	53 mL
Bed dimension	1.6 × 2.5 cm	2.6 × 10 cm
Void volume	1.5 mL	15 mL
Recommended sample volume	0.1 to 1.5 mL	≤ 15 mL
Sample dilution, syringe operation	1.3 to 4 fold	1.2 to 3 fold
Exclusion limit [M] Globular proteins	$M_r \sim 5000$	$M_r \sim 5000$
Particle size distribution, dry ( $\mu\text{m}$ )	20 to 50*	20 to 80*
Maximum operational flow rate <sup>†</sup>	15 mL/min	40 mL/min
Recommended operational flow rate <sup>†</sup>	1 to 10 mL/min	9 to 31 mL/min
Column hardware pressure limit	5 bar (0.5 MPa, 70 psi)	5 bar (0.5 MPa, 70 psi)
Chemical stability	Stable to commonly used aqueous buffers	Stable to commonly used aqueous buffers
pH stability, operational <sup>‡</sup> :	2 to 13	2 to 13
pH stability, CIP <sup>‡</sup> :	2 to 13	2 to 13
Avoid	Oxidizing agents	Oxidizing agents
Storage	4°C to 30°C, 20% ethanol	4°C to 30°C, 20% ethanol

Figura 17 - Caratteristiche HiPrep 26/10 (Cytiva)

### 3.9 SCAMBIO CATIONICO

La cromatografia a scambio ionico è probabilmente il metodo più frequentemente utilizzato e versatile per frazionare sostanze biologiche, permettendo la separazione anche di proteine e peptidi con piccole differenze di carica. Inoltre, le condizioni di legame ed eluizione sono facili da ottimizzare, garantendo separazioni rapide ad alta risoluzione, che sono riproducibili e convenienti da ampliare in scala. Le molecole cariche si legano alla resina di separazione a bassa forza ionica e vengono poi eluite con un gradiente di sale o pH. Per la separazione è stata utilizzata una colonna HiTrap HP SP da 1mL:

Column dimensions	0.7 × 2.5 cm (1 mL), 1.6 × 2.5 cm (5 mL)
Column volumes	1 mL and 5 mL
Rec. flow rate	1.0 mL/min (1 mL), 5.0 mL/min (5 mL)
Max. flow rate*	4.0 mL/min (1 mL), 20.0 mL/min (5 mL)
Column hardware pressure limit	5 bar (0.5 MPa, 73 psi)
Storage	20% ethanol, 4° to 30°C (Q) 20% ethanol, 0.2 M sodium acetate, 4° to 30°C (SP)

Figura 18 - Caratteristiche HiTrap HP SP 1/5mL (Cytiva)

### 3.10 SEPARAZIONE PER ESCLUSIONE DIMENSIONALE

La fase in SEC permette di controllare lo stato della proteina al termine degli *step* di purificazione permettendo di separarla da eventuali aggregati. Essendo in questo caso l'ultimo passaggio cromatografico previsto permette inoltre, di trasferire la proteina in un tampone adeguato alla sua stabilità ed analisi richieste. Questa tecnica di separazione condivide i principi della fase di *desalting*. Si è utilizzata una colonna Superdex HiLoad 16/600 che possiede le seguenti specifiche:

Matrix	Cross-linked agarose, spherical
Particle size, $d_{50V}^1$	~34 $\mu\text{m}$
Fractionation range [M,]	
Globular proteins	< 10 000 (Superdex 30 prep grade) ~3000 to 70 000 (Superdex 75 prep grade) ~10 000 to 600 000 (Superdex 200 prep grade)
Dextrans	~500 to 30 000 (Superdex 75 prep grade) ~1000 to 100 000 (Superdex 200 prep grade)
pH stability, operational <sup>2</sup>	3 to 12
pH stability, CIP <sup>3</sup>	1 to 14
Chemical stability	Stable to commonly used aqueous buffers 1 M acetic acid 0.01 M NaOH 8 M urea 6 M guanidine hydrochloride 30% isopropanol 30 acetonitrile 24% ethanol 0.001 M hydrochloric acid 1% SDS
Recommended operating flow velocity	10 to 50 cm/h <sup>4</sup>
Avoid	Strong oxidizing agents
Autoclavability	20 min at 121°C, 1 cycle
Storage	
Superdex 30 prep grade	0.2 M sodium acetate in 20% ethanol, 4°C to 30°C
Superdex 75 prep grade	0.2 M sodium acetate in 20% ethanol, 4°C to 30°C
Superdex 200 prep grade	20% ethanol, 4°C to 30°C
Column volume	120 mL (HiLoad 16/600) 320 mL (HiLoad 26/600)
Sample volume	Up to 5 mL (HiLoad 16/600) Up to 13 mL (HiLoad 26/600)
Recommended operating flow rate <sup>5</sup>	0.3 to 1.6 mL/min for HiLoad 16/600 0.9 to 4.4 mL/min for HiLoad 26/600
Theoretical plates	>13 000 m <sup>-1</sup>
Maximum operating pressure	0.3 MPa (3 bar, 42 psi)
HiLoad column hardware pressure limit	0.5 MPa (5 bar, 73 psi)
Column fittings	1/16" (Valco™)

Figura 19 - Specifiche colonna SEC (Cytiva)

## 4 MATERIALI E METODI

---

### 4.1 PROTOCOLLO DI CRESCITA

Per la crescita dei batteri, competenti nell'espressione della proteina ricombinante di interesse (CypD) e selezionati attraverso la resistenza alla Kanamicina, sono stati utilizzati diversi terreni:

- LB (1L): 5 g di estratto di lievito, 10 g di triptone, 10 g di NaCl;
- M9 (5X 1L): 30 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g NH<sub>4</sub>Cl, 2.5 g NaCl;
- M9 (additivi x 500 mL): 1 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>, 1 mL Q solution, 0.5 g NH<sub>4</sub>Cl, 2 g glucosio, 1.5 mL Vitamin Mix

#### 4.1.1 Trasformazione

Il ceppo utilizzato per l'espressione è BL21 (DE3), è stato selezionato in quanto è caratterizzato da una rapida crescita e necessita di substrati economici. Questo viene trasformato con un plasmide di espressione pET15b contenente la sequenza della CypD mutata rispetto alla *wild type*. È stata rimossa la sequenza del MTS, in quanto la proteina matura non la possiede una volta entrata nel mitocondrio, inoltre per favorire la purificazione sono state aggiunte all'N terminale una sequenza suscettibile al taglio di SUMO proteasi e una sequenza codificante il *6xHis Tag* necessario per lo *step* IMAC. A monte della sequenza codificante la proteina di interesse è posta la sequenza per la RNA polimerasi T7, molto più processiva, indispensabile per una maggiore resa di espressione.

#### Protocollo di trasformazione:

- 1) Si trasforma andando a inserire DNA (1.1 µL ovvero 100 ng) nel ceppo batterico BL21 (50 µL), in presenza di CaCl<sub>2</sub>.
- 2) Si mette in ghiaccio per 30 min.,
- 3) Si scalda poi in termoblocco (42°C) per 1.5 min. e di nuovo subito in ghiaccio per 3 min.,
- 4) Si risospende in 500 µL di LB.
- 5) Si mette ad incubare per 1.5 h, sotto agitazione.
- 6) Dopo l'incubazione si piastra (200 µL) su LB-agar dove è già presente antibiotico per la selezione, si lascia *overnight* ad incubare.

- 7) Dalla piastra si prelevano le colonie già selezionate per via della presenza dell'antibiotico e si utilizzano direttamente per la crescita o per la costruzione di *glycerol-stock* da poter conservare a  $-80^{\circ}\text{C}$  per evitare la perdita del plasmide.

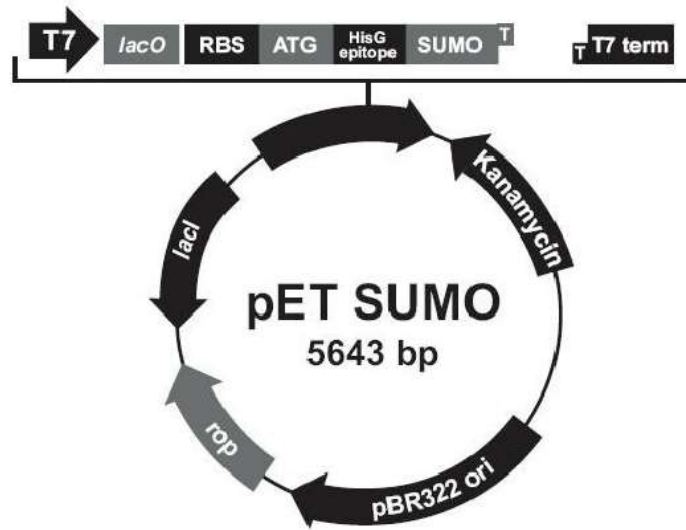


Figura 22 - pET SUMO 6xHis tag (Snapgene)

## 4.1.2 Crescita CypD

### 4.1.2.1 CypD non marcata

Per la costruzione di un metodo di *screening* e lo studio dell'interazione con i frammenti della libreria sono necessarie grandi quantità di proteina pura. La strategia adottata per ottenerla è stata l'espressione per via ricombinante mediante un ceppo mutato di *E.Coli* (BL21-DE3). La crescita viene effettuata in terreno *Lysogeny Broth* (LB), in due fasi:

- Pre-inoculo: si pone in una beuta da 250 mL, 100 mL di terreno sterile (LB), si aggiungono 100  $\mu\text{L}$  di Kanamicina (50 mg/mL) e una certa quantità di batteri trasformati, si attende *overnight* la crescita ponendo la beuta sotto agitazione in termostato a  $37^{\circ}\text{C}$ ;
- Cambio scala e crescita: Si trasferiscono 5 mL di pre-inoculo in 1 L di terreno sterile (LB) con l'aggiunta di 1000  $\mu\text{L}$  di Kanamicina (50 mg/mL), mantenendo in agitazione a  $37^{\circ}\text{C}$  in incubatore;
- Si misura ogni 30 min. circa il valore di densità ottica (OD) della soluzione fino all'ottenimento del valore di OD: 0.80.



#### **4.1.2.2 CypD <sup>19</sup>F**

La crescita viene condotta inizialmente in terreno LB come per la CypD non marcata (vedi paragrafo 5.1.2.1), al momento dell'induzione, però, si procede andando a centrifugare il terreno di crescita a 5000 rpm per 20 min. in modo da fare depositare i batteri e poterli poi risospendere in terreno minimo M9 dopo aver scartato il surnatante. È critico il passaggio di condizionamento del medium M9 a 37°C per almeno 30 min. prima della ri-sospensione batterica. Si addiziona il terreno con gli additivi (previsti nel paragrafo 5.1), si aggiungono 55 mg di 5-fluoroindolo per litro di coltura e si induce con IPTG.

#### **4.1.2.3 CypD <sup>15</sup>N**

La crescita avviene direttamente in terreno M9 addizionato (paragrafo 5.1), ottenuto il valore di densità ottica di 0.8 si induce con IPTG.

### **4.1.3 Induzione espressione proteica**

La trascrizione della proteina di interesse non può avvenire senza un'induzione. Questo è reso possibile dal repressore LacI espresso dal gene regolatore del costrutto. Nella fase di induzione è necessario aggiungere 250 µL di IPTG (*isopropil-beta-D-1-tiogalattopiranoside*) 0.5 mM che lega il repressore, induce una sua variazione conformazionale che permette l'espressione della proteina di interesse precedentemente bloccata. Si lascia la soluzione in agitazione *overnight* a 20°C in incubatore per l'espressione proteica.

## **4.2 PROTOCOLLO DI PURIFICAZIONE**

Una volta espressa la proteina sono necessari degli *step* preliminari alla purificazione: (i) ottenimento del *pellet* e (ii) lisi cellulare. Per la pellettatura si divide la soluzione ottenuta dall'induzione in bottiglie di plastica e, una volta bilanciate, si pongono in centrifuga per 20 min. a 5000 rpm. È importante condizionare precedentemente la centrifuga alla temperatura di 5°C. Una volta completata la centrifugazione, si scarta il surnatante e si pone il *pellet* ottenuto sotto ghiaccio, si solubilizza poi con il *buffer* di lisi (vedi paragrafo 5.2.1) aiutandoci con una bacchetta di vetro pulita. È importante solubilizzare bene tutto il *pellet* senza sfregare troppo le pareti per evitare di surriscaldarlo.

Il passaggio di lisi cellulare serve per rompere le pareti cellulari batteriche per liberare la proteina espressa nel citosol. Questo passaggio si effettua attraverso l'utilizzo di *french press*.

Si procede con un ultimo passaggio in centrifuga per 40 min. a 10.000 rpm per eliminare le componenti cellulari lisate, si filtra il surnatante con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$  e si conserva in frigo fino al passaggio di separazione cromatografica.

#### **4.2.1 Tamponi utilizzati:**

Per la purificazione cromatografica della CypD sono stati utilizzati diversi buffer per ogni step, per ognuno di questo è stato misurato il pH e, in caso, corretto con soluzioni stock di HCl 5 M o NaOH 5 M. Prima dell'utilizzo nel cromatografo il tampone è stato filtrato con filtri da 0.45  $\mu\text{m}$  e successivamente immerso in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti. I molteplici cali di pressione che si verificano nel percorso del flusso liquido attraverso il sistema del cromatografo (valvole di iniezione, colonna di separazione, cella del rilevatore, ecc.) possono innescare la formazione di bolle, specialmente se qualche segmento ha anche una temperatura più elevata rispetto alla bottiglia dell'eluente. Il passaggio in ultrasuoni serve per rimuovere i gas disciolti e ridurre la probabilità di formare bolle che possono inficiare sulla corretta separazione.

I tamponi utilizzati nelle varie fasi cromatografiche sono:

- IMAC A: 50 mM TRIS, 10% V/V glicerolo, 3 mM 2-mercaptoetanolo, pH 8
- IMAC B: IMAC A + 500 mM Imidazolo, pH 8
- *Desalting*: 20 mM fosfato 150 mM NaCl 3mM 2-mercaptoetanolo, pH 7
- Tampone diluizione: tampone fosfato 20 mM, pH 7
- Scambio cationico (CEC A): 50 mM fosfato, pH 7
- Scambio cationico (CEC B): 50 mM fosfato + 1M NaCl, pH 7
- SEC: 50 mM fosfato + 50 mM NaCl, pH 7
- *Buffer* lisi: DNAsi, 15 mL *buffer* IMAC A, inibitore proteasi, 300  $\mu\text{L}$  IMAC B,  $\text{MgCl}_2$

#### **4.2.2 IMAC CypD**

Per il passaggio IMAC si preparano i tamponi richiesti: IMAC A e IMAC B (vedi par. 5.2.1), successivamente si lava il *super loop* da 50 mL necessario per

l'iniezione in colonna. Per il lavaggio si può utilizzare acqua deionizzata. Una volta condizionato il *super loop* si procede inserendo i pescanti delle pompe nelle bottiglie dei tamponi e si compie un lavaggio attraverso la funzione "pump wash" del software, questo permette di condizionare le pompe del sistema. Una volta inserita la colonna si procede al suo lavaggio con acqua deionizzata. Successivamente si impostano i seguenti parametri:

- Flusso: 1 ml/min;
- Allarme di pressione: 0.3 MPa (0.5 MPa se presente il contro-pressore da 0.2 MPa);
- Gradiente: 2% di buffer IMAC B.

Si condiziona la colonna per circa cinque volte il suo volume e fino a che non si stabilizza il segnale UV e se disponibile la conducibilità. Si procede iniettando in colonna il campione, spostando la valvola su "inject" da "load". Si eluisce la proteina di interesse con un gradiente lineare di 2 min. al 50 % di tampone IMAC B.

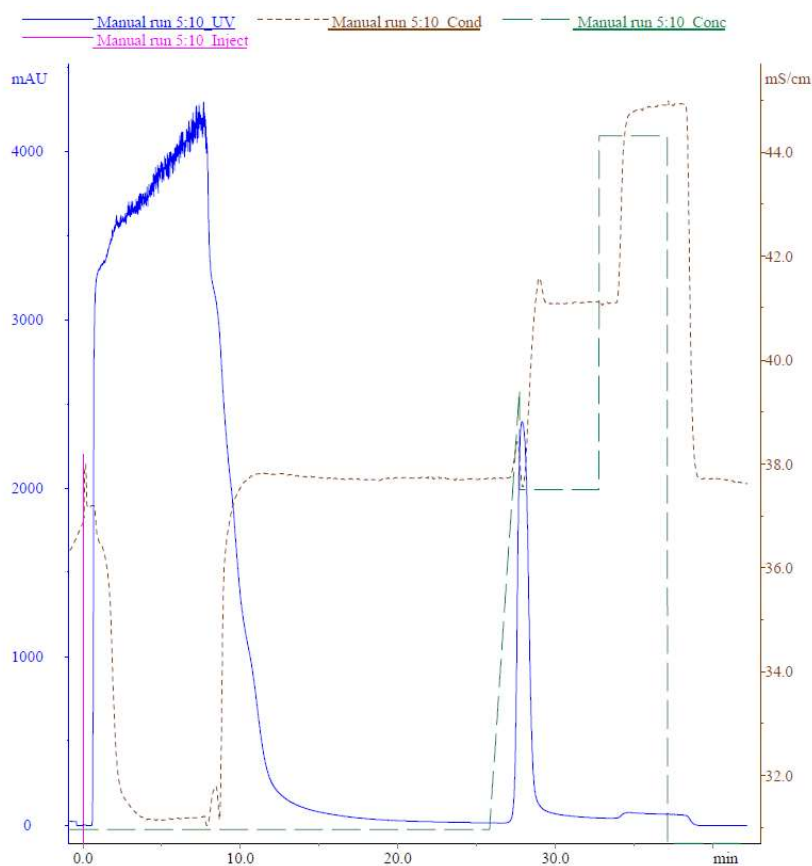


Figura 23 - Cromatogramma IMAC CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità

### 4.2.3 Desalting CypD

Si procede ora al passaggio in *desalting* per rimuovere l'imidazolo. Si condiziona il cromatografo come visto nel paragrafo precedente, utilizzando il *buffer desalting* (Par. 5.1.2), si inserisce al posto del *super loop* un *loop* da 5 mL. Se la soluzione ottenuta dalla separazione IMAC è superiore ai 5 mL è necessario concentrarla, si usano concentratore con *cut-off* di 10.000 Da. Si impostano i seguenti parametri:

- Flusso 3 mL/min;
- Allarme di pressione 0.15 MPa (0.35 MPa con contro-pessore);

Dopo l'iniezione si avrà l'uscita della proteina dopo il volume morto della colonna (circa 8 mL), non si hanno interazione della soluzione con la fase stazionaria si raccoglie il primo picco rivelato dal detector UV (impostato a 280 nm).

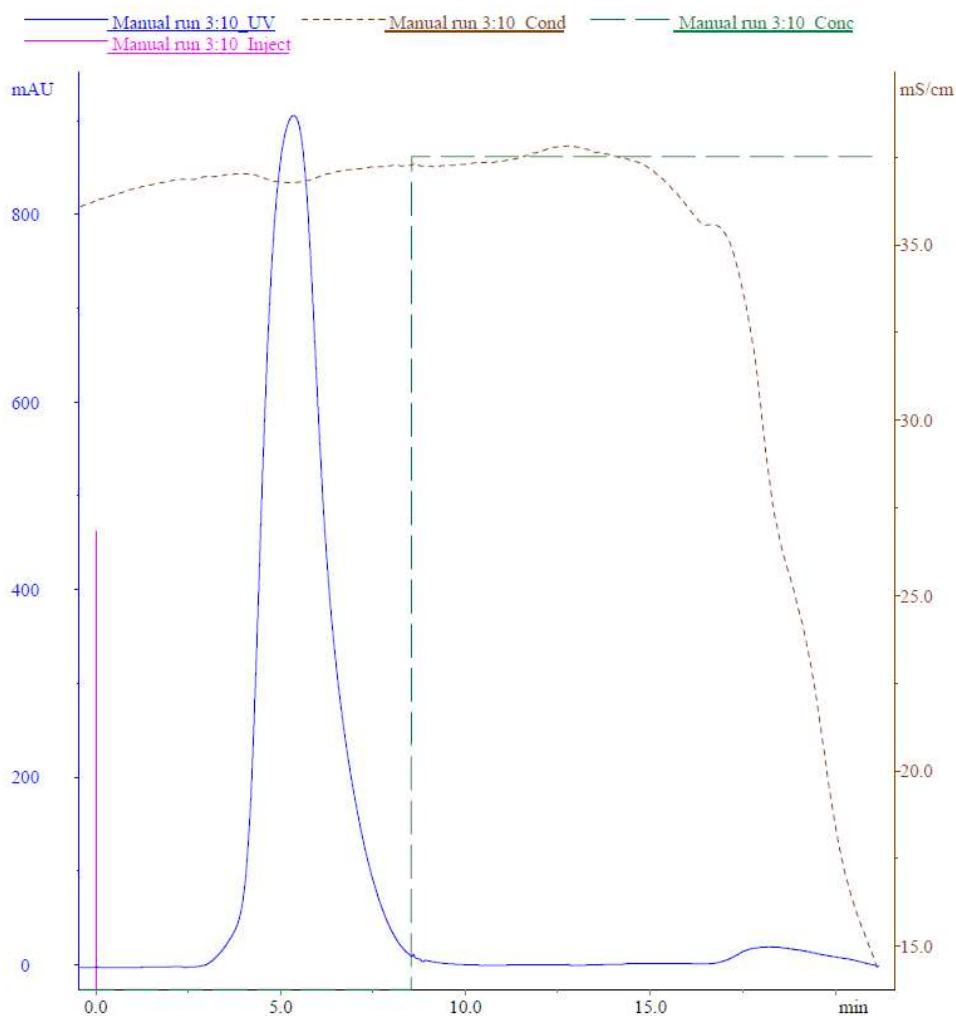


Figura 24 - Cromatogramma Desalting, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità

Al termine del passaggio di cambio buffer si concentra la soluzione fino ad ottenerne 5 mL e si inserisce SUMO proteasi (20  $\mu$ L concentrazione: 0.8 mg/mL), e si lascia a tagliare *overnight* a 5°C. Dopo il taglio si diluisce in rapporto 1:3 con il tampone di diluizione al fine di ridurre la forza ionica per il passaggio successivo di scambio cationico.

#### 4.2.4 Scambio Cationico CypD

Si collega la colonna per lo scambio cationico e si lava prima con tampone CEC A e in seguito con il 100% di CEC B per poi condizionarla con CEC A nuovamente. Una volta stabilizzata la conducibilità al valore di circa 8  $\mu$ S/cm si inizia con l'iniezione, avendo precedentemente diluito saranno necessarie circa 4/5 iniezioni usando un *loop* da 5 mL. In Fig.25 si può vedere un esempio di iniezione (min. 0.0) ed eluizione (min. 15): per l'eluizione è necessario utilizzare un gradiente lineare 50% CEC B in 2 minuti.

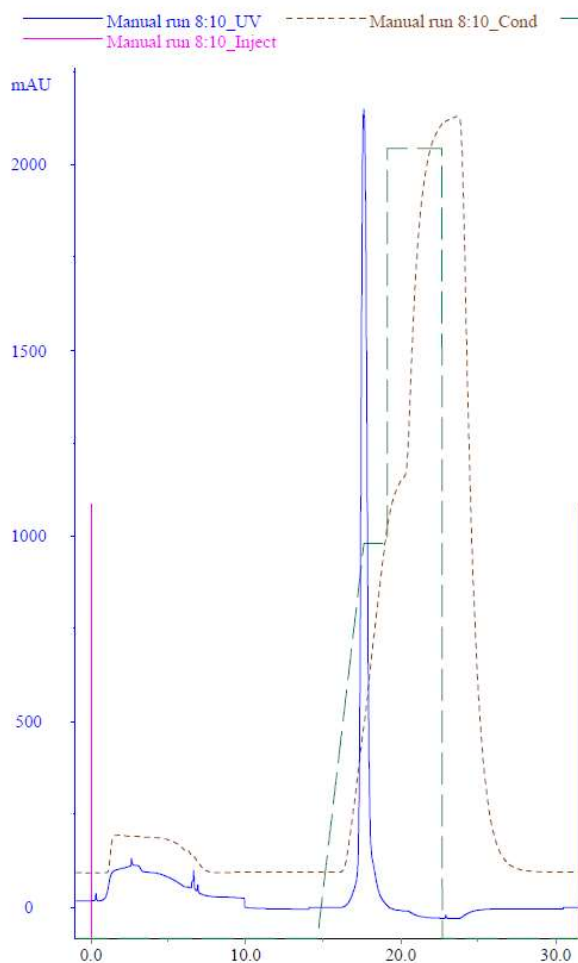


Figura 25 - Cromatogramma Scambio Cationico CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in verde e in marrone rispettivamente osserviamo il gradiente di concentrazione e la conducibilità

Le varie frazioni ottenute vengono raccolte in falcon e concentrate fino a 5 mL con concentratore con cut-off da 5.000 Da.

#### 4.2.5 SEC - CypD

Si collega e si condiziona lo strumento (“*pump wash*”) e la colonna per 120 min. con tampone SEC con i seguenti parametri:

- Flusso di 1 mL/min.
- Allarme di pressione di 0.3 MPa

Una volta condizionata si prepara il frazionatore per raccogliere la proteina caricandolo con *Eppendorf* da 1.5 mL e programmandolo per iniziare a prelevare 1 mL/ min. dopo 70 min. di corsa cromatografica fino a 100 min. come mostrato in Fig. 26:

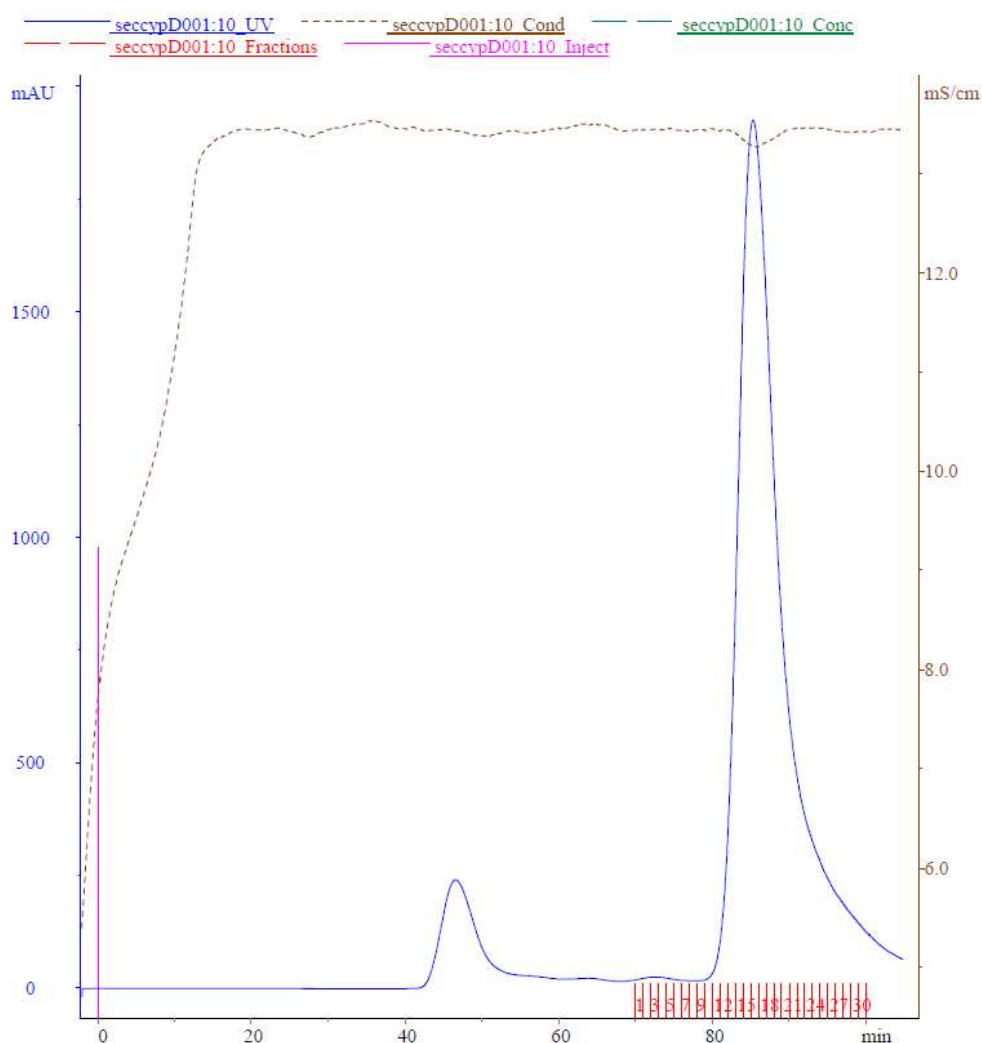


Figura 26 - Cromatogramma SEC CypD, in blu viene rappresentato l'assorbimento UV (280nm), in marrone osserviamo la conducibilità e in rosso le frazioni raccolte con il numero identificativo della posizione nel frazionatore

Si nota un picco tra 40 e 60 min. che descrive la presenza di DNA batterico o aggregati proteici in quanto corrisponde al volume morto della colonna utilizzata e quindi di componenti maggiori di 70 KDa che non riescono ad essere escluse dimensionalmente.

### **4.3 COSTRUZIONE DEI POOL PER FBDD**

Parallelamente alla purificazione della proteina si è costruito il modello di *pool* per lo *screening* utilizzando la tecnica basata sul  $^{19}\text{F}$ -NMR. Per le acquisizioni è stato utilizzato un Bruker 400 MHz. Sono stati utilizzati 175 composti fluorurati di proprietà di Evotec<sup>®</sup> per comporre le miscele per lo *screening*. Questi erano già stati selezionati per le loro caratteristiche positive (alta solubilità, purezza, tendenza a non aggregare e stabilità) durante la fase del controllo qualità.

#### **4.3.1 Spettri di riferimento: $^{19}\text{F}$ -NMR 1D**

Per la costruzione delle miscele sono state necessarie due fasi preliminari:

- Selezione standard interno di riferimento;
- Acquisizione degli spettri di riferimento.

Le informazioni ottenute dagli spettri sono necessarie per evitare di inserire frammenti con *chemical shift* sovrapponibili nello stesso *pool*. Lo standard scelto è l'esafluoroisopropanolo (-74.59 ppm), è stato calibrato utilizzando il freon-11 che ha per convenzione il valore di 0 ppm, come descritto in farmacopea.

Prima dell'acquisizione dei riferimenti si registrano gli spettri dei bianchi: tampone e tampone con standard interno per verificare l'assenza di segnale interferenti.

I frammenti, divisi in piastre da 96 pozzetti, erano presenti nel volume di 4  $\mu\text{L}$  (DMSO\_d6) alla concentrazione di 200 mM per ogni composto. Si è operato manualmente per diluire i composti utilizzando un tampone fosfato costituito da: 50 mM fosfato (fosfato dibasico di sodio eptaidrato + fosfato monobasico di sodio monoidrato) a pH 7.4, si pone nel tampone lo standard interno per ottenere una concentrazione finale di 50  $\mu\text{M}$ , per la successiva normalizzazione, e 10% di  $\text{D}_2\text{O}$  (per il *lock* strumentale).

Si ottiene una soluzione finale per ogni frammento costituita da:

- 4  $\mu\text{L}$  200  $\mu\text{M}$  di composto fluorurato,
- 90/10 V/V  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ,

- 596  $\mu$ L tampone fosfato pH 7.4,
- 50  $\mu$ M esafluoroisopropanolo,
- 0.67% DMSO\_d6.

Si pone l'intera soluzione per ogni frammento in tubo NMR da 5 mm con l'ausilio di Pasteur in vetro.

Si pongono i tubi in auto-campionatore e si analizzano con sequenza zg30 disaccoppiando il fluoro con i seguenti parametri di acquisizione: DW: 1.5 sec., NS: 512; 4 *dummy scan*; 5 min condizionamento/spin; T: 273 K, finestra spettrale 160 ppm.

Si ottengono i singoli riferimenti come nell'esempio in Fig. 27:

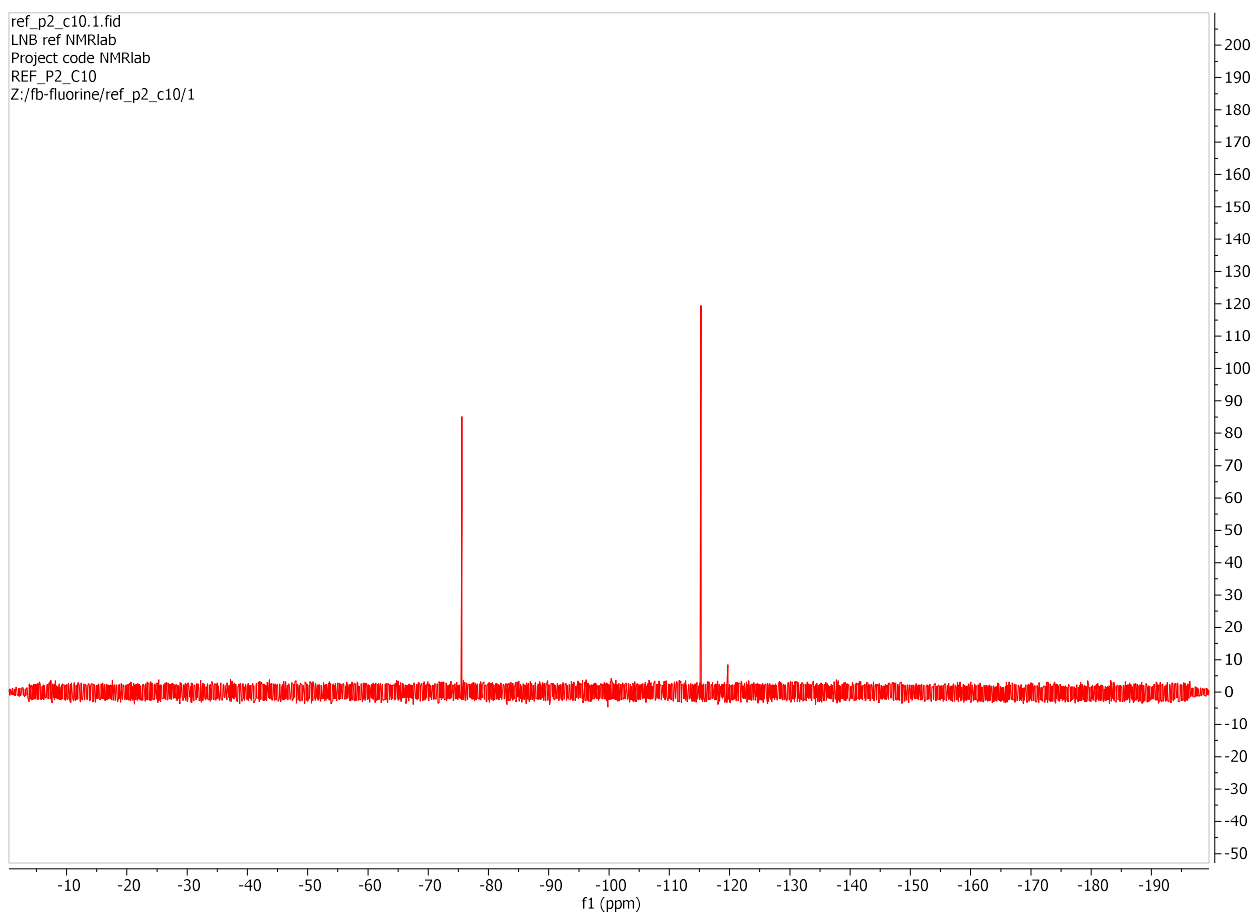


Figura 27 - Spettro di riferimento P2\_C10 (Evotec)

Per la successiva analisi in automazione (MScreen) è di fondamentale importanza archiviare le varie acquisizioni secondo il seguente schema:

- REF\_P?\_X??

Ponendo il numero della piastra, ad esempio P2; e la posizione del pozzetto da cui viene prelevato il frammento, ad esempio C10, ottenendo:



- REF\_P2\_C10

Questo permetterà successivamente al software di riconoscere i riferimenti ed associarli per l'analisi dei dati in automazione.

Acquisiti tutti i 175 spettri della libreria, questi, sono stati divisi in 18 pool contenenti ciascuno 10 frammenti (a parte il mix 18 che ne contiene 5) come in

Fig.28-29:

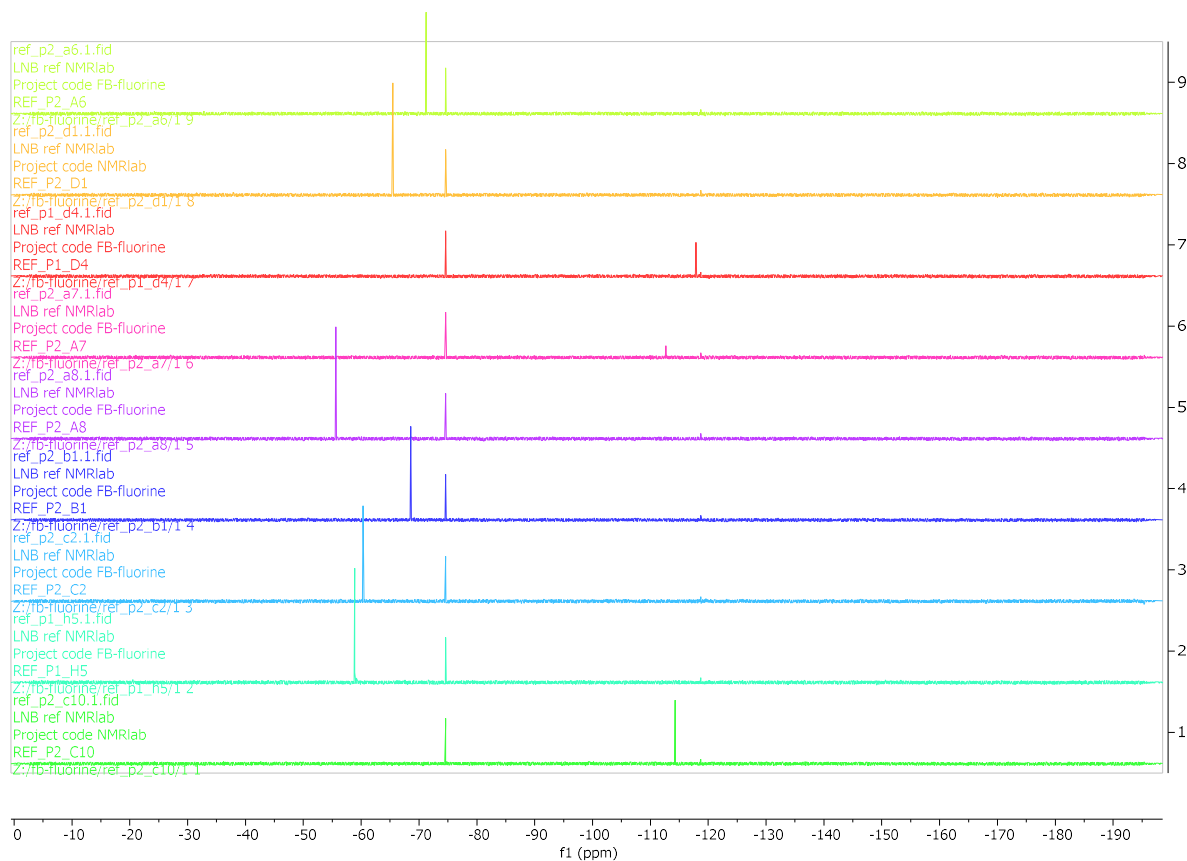


Figura 28 - pool 2 di riferimento "stacked" (Evotec)

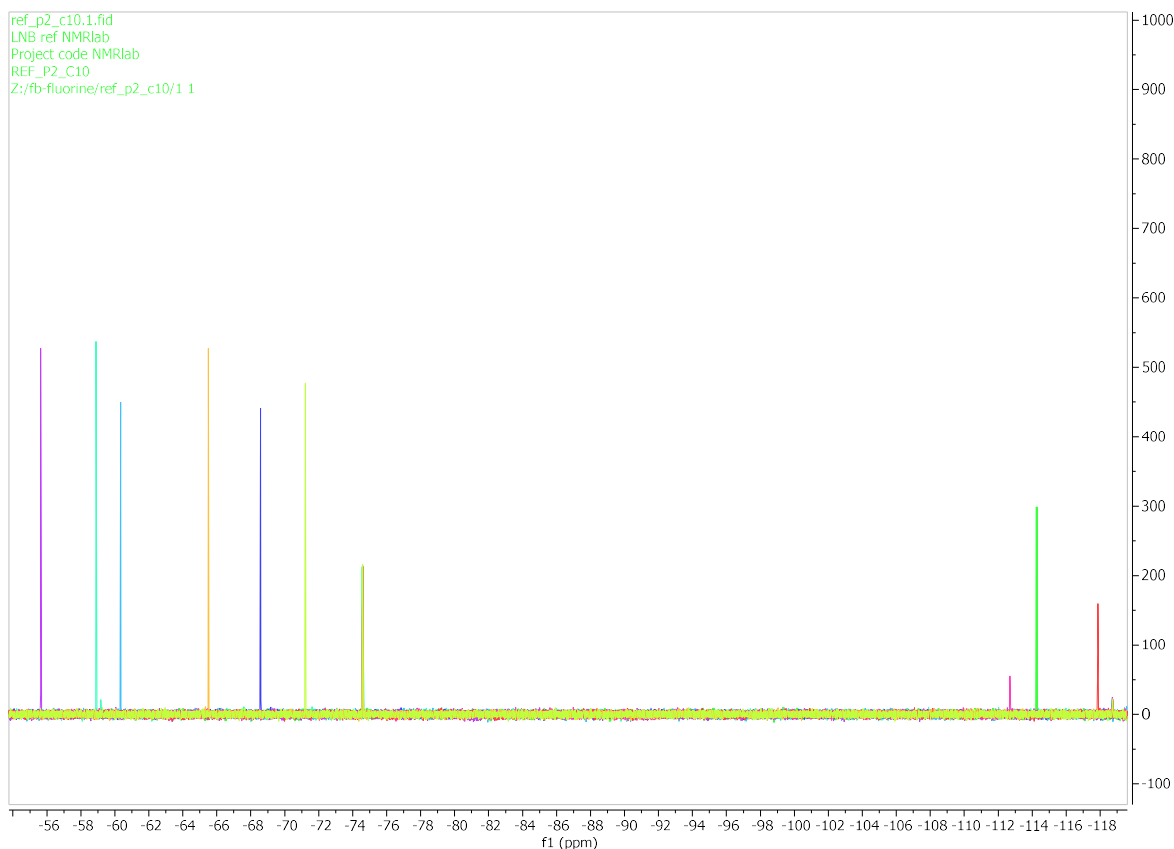


Figura 29 - pool 2 di riferimento "superimposed" (Evotec)

Gli spettri dei pool di riferimento sono disponibili nell'Appendice A dell'elaborato. I *pool* così ottenuti sono indispensabili per poter costruire miscele di frammenti che non interferiscono tra di loro, queste sono state ordinate presso il fornitore aziendale e sono stati forniti in piastre da 96 pozzetti in 3 copie, in ogni pozzetto sono presenti 6  $\mu\text{L}$  di *pool* di composti alla concentrazione di 100 mM in DMSO<sub>d6</sub>. La prima piastra è stata utilizzata per acquisire spettri di riferimento dei *pool* attraverso la sequenza CPMG impostando i seguenti parametri: DS: 1.5 s, NS: 1024, 4 *dummy scan*, finestra spettrale 160 ppm. Per la preparazione dei tubi NMR si è proceduto nel seguente modo:

- 6  $\mu\text{L}$  di composti 200  $\mu\text{M}$ ,
- 594  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato 50mM, NaCl 50 mM, pH 7.4,
- STD interno 50  $\mu\text{M}$ ,
- 90/10 V/V H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O,
- 1% DMSO<sub>d6</sub>.

L'acquisizione è necessaria per valutare la risposta dei frammenti al tempo di rilassamento  $T_2$  in modo da escludere possibili falsi positivi. Si ottengono due spettri per ogni pool:

- Tempo corto (0 ms) Fig.30:

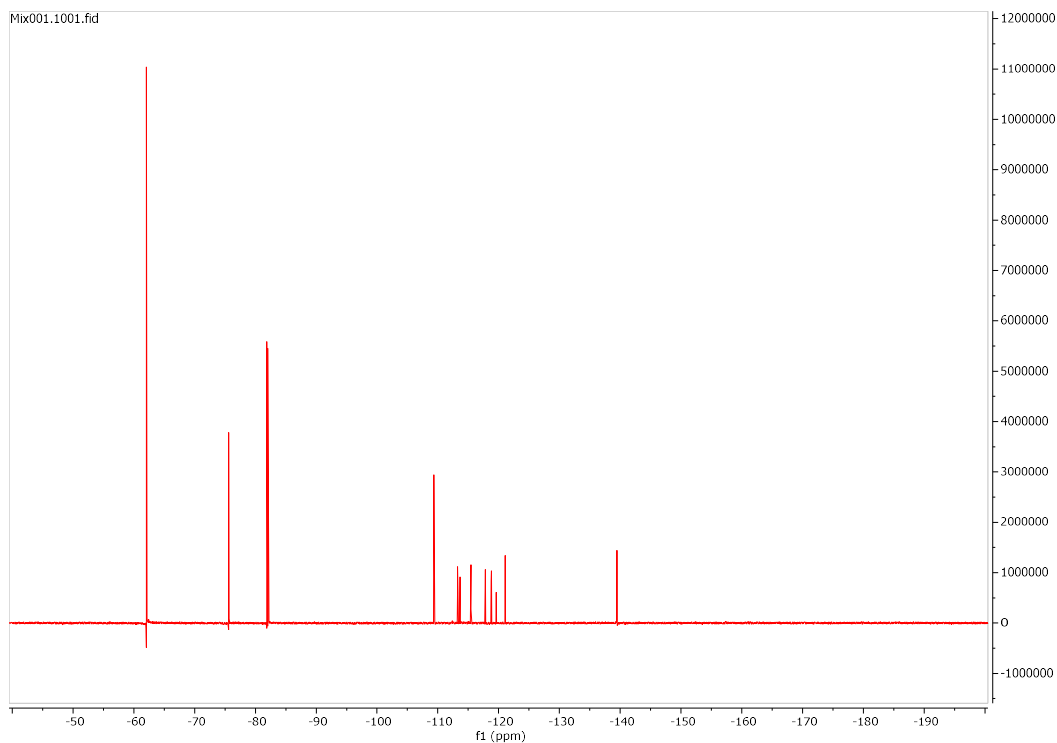


Figura 30 - CPMG Tempo corto riferimento (Evotec)

- Tempo lungo (200ms) Fig.31:

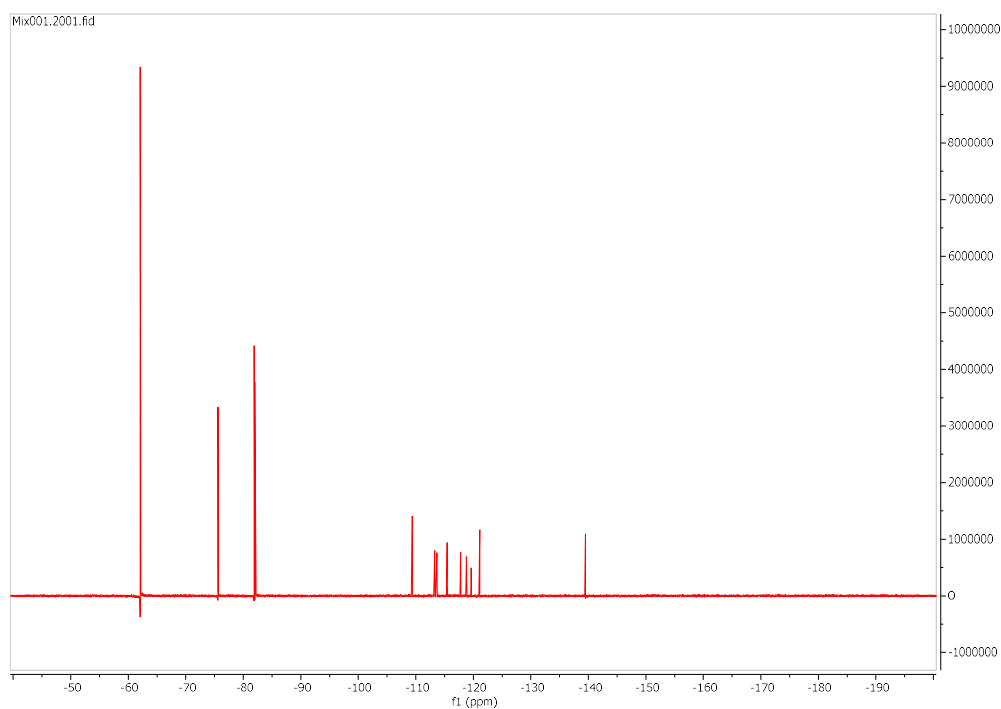


Figura 31 - CPMG Tempo lungo riferimento (Evotec)

È necessaria l'acquisizione dei riferimenti per osservare le differenze, in intensità e larghezza dei segnali durante le due acquisizioni, in modo tale da non attribuirle erroneamente all'interazione con la proteina. È fondamentale una preparazione meticolosa dei tubi NMR in quanto, la minima variazione nel volume, concentrazione di DMSO, tampone o pool può inficiare sui corretti risultati portando a falsi positivi e/o negativi; a tale scopo per la preparazione è stato utilizzato un *liquid handler* Gilson.

Vediamo in Fig. 32 la riduzione del segnale NMR durante l'acquisizione nel tempo lungo a causa del maggior rilassamento trasversale.

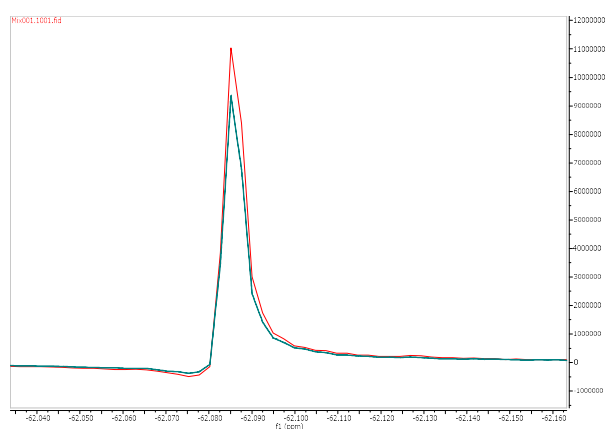


Figura 32 - Esempio riduzione di intensità del segnale nel tempo lungo (Evotec)

Risulta importante, come precedentemente illustrato per i riferimenti singoli, le modalità di archiviazione dei dati ed occorre seguire il seguente schema:

- Il primo spettro del primo MIX al tempo corto deve essere salvato con la dicitura "1001", al posto di "001" bisogna inserire il numero del MIX, ad esempio per il tempo corto del riferimento del MIX002 è necessario salvare il file come 1002.
- Il secondo spettro al tempo lungo deve essere salvato con la dicitura "2001" e allo stesso modo sostituire "001" con il numero del Mix acquisito.

Allo stesso modo, questo, risulta importante per la fase di analisi dei dati attraverso MScreen che verrà illustrata in seguito.

### 4.3.2 Spettri frammenti e proteina (CypD)

Acquisiti i riferimenti si procede con lo screening vero e proprio della proteina con i frammenti suddivisi nelle miscele. Si preparano i tubi NMR attraverso l'utilizzo del *liquid handler* con il seguente protocollo:

- 6  $\mu$ L di frammenti 200  $\mu$ M,

- 579  $\mu\text{L}$  di tampone fosfato 50 mM e NaCl 50 mM, pH 7.4,
- STD interno 50  $\mu\text{M}$ ,
- 15  $\mu\text{L}$  di CypD 5  $\mu\text{M}$ ,
- 90/10 V/V  $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ ,
- 1% DMSO- $d_6$ .

Risulta fondamentale mantenere le stesse condizioni di solvente e pH dei riferimenti precedentemente acquisiti per non creare artefatti che possono portare ad errori di valutazione. Si caricano i tubi nell'auto-campionatore si analizzano in automazione attraverso la sequenza CPMG precedentemente utilizzata.

Le modalità di archiviazione dei dati in questo caso seguono il seguente schema:

- Il primo spettro del primo MIX al tempo corto deve essere salvato con la dicitura "3001", seguendo lo stesso schema illustrato in precedenza.
- Il secondo spettro al tempo lungo deve essere salvato con la dicitura "4001" e allo stesso modo sostituire "001" con il numero del Mix acquisito, come ad esempio 4002 per il Mix002.

### **4.3.3 Processing template – Mscreen**

I dati così acquisiti devono essere processati per la loro analisi. Si procede quindi a costruire un *template di processing* in modo da processare tutti i dati allo stesso modo, riducendo così la probabilità di inserire artefatti durante questa fase. I *template* di processamento degli spettri di riferimento e degli spettri della proteina sono differenti in quanto è necessario ottimizzarli per le singole condizioni. Si inserisce la fasatura, la correzione della linea di base, *line broadening*, la normalizzazione sullo standard e la sua correzione nel *chemical shift*, come riportato in Fig.33:

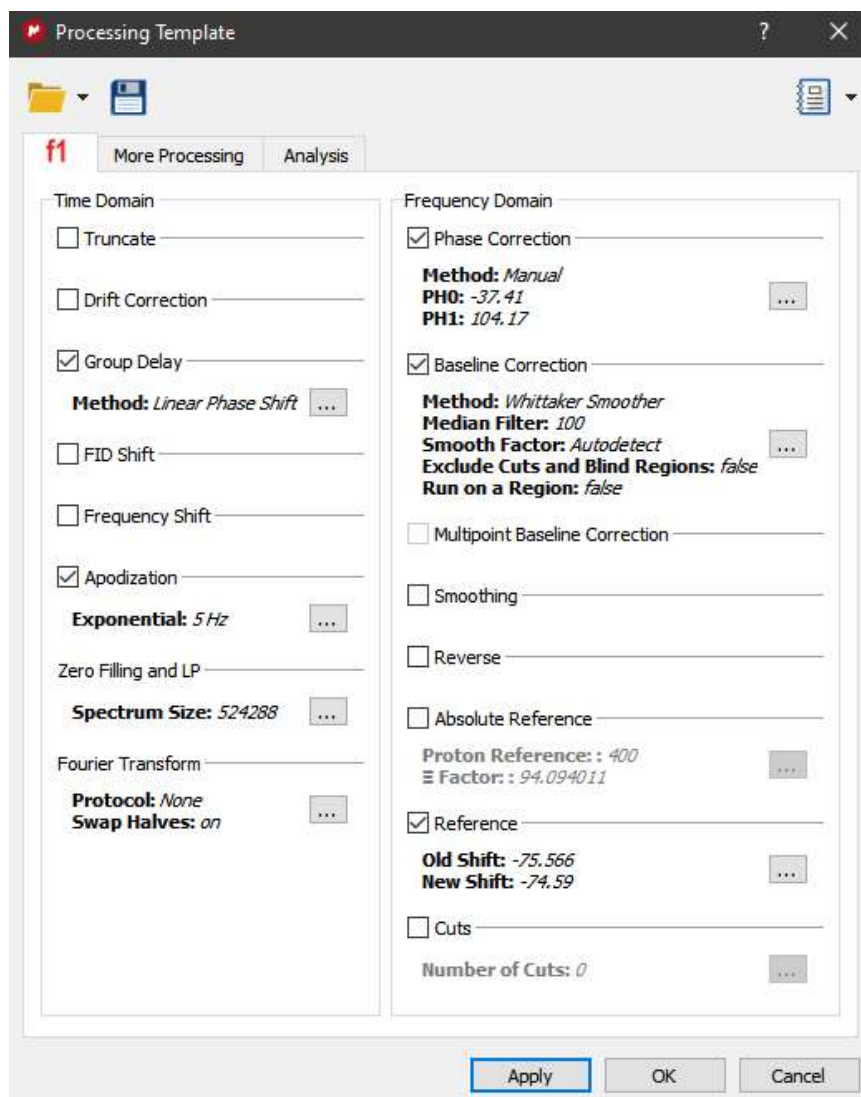


Figura 33 - Processing template usato (MestReNova)

È importante controllare il corretto allineamento e normalizzazione dei risultati basandosi sul segnale dello standard interno (esafluoroisopropanolo 50  $\mu\text{M}$ ) come mostrato in Fig. 34:

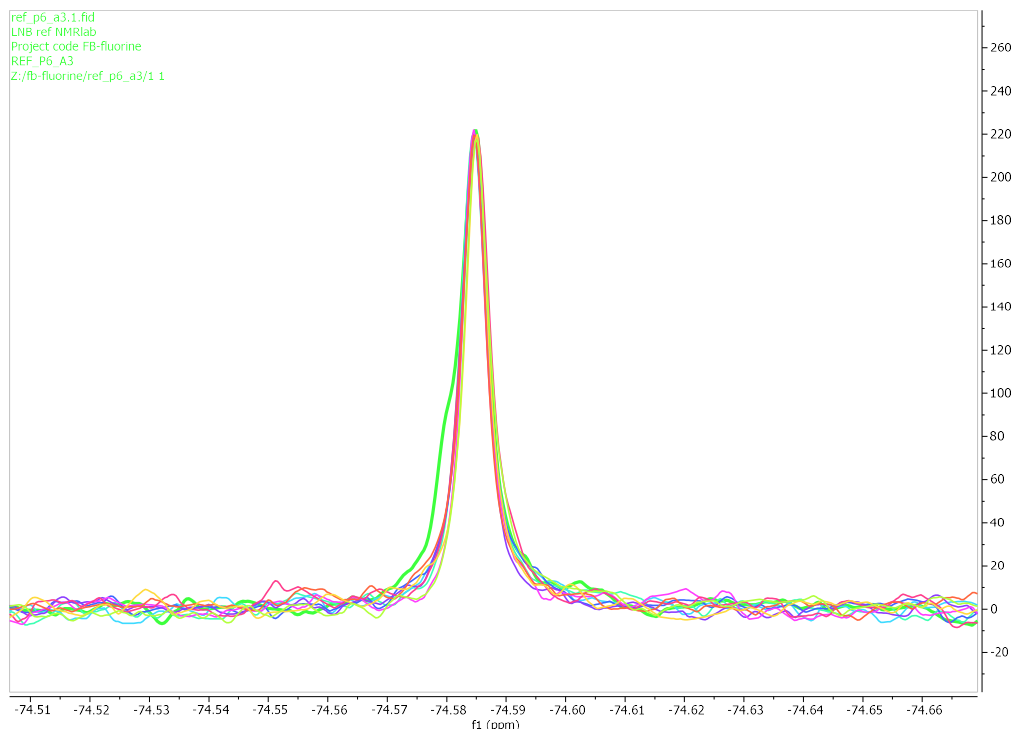


Figura 34 - Normalizzazione ed allineamento STD int. (-74.59 ppm) (Evotec)

### 4.3.4 Analisi dati CPMG – Impostazioni MScreen

In seguito, sono riportati i *data set* di processamento di MestreNova® Fig.35-36:

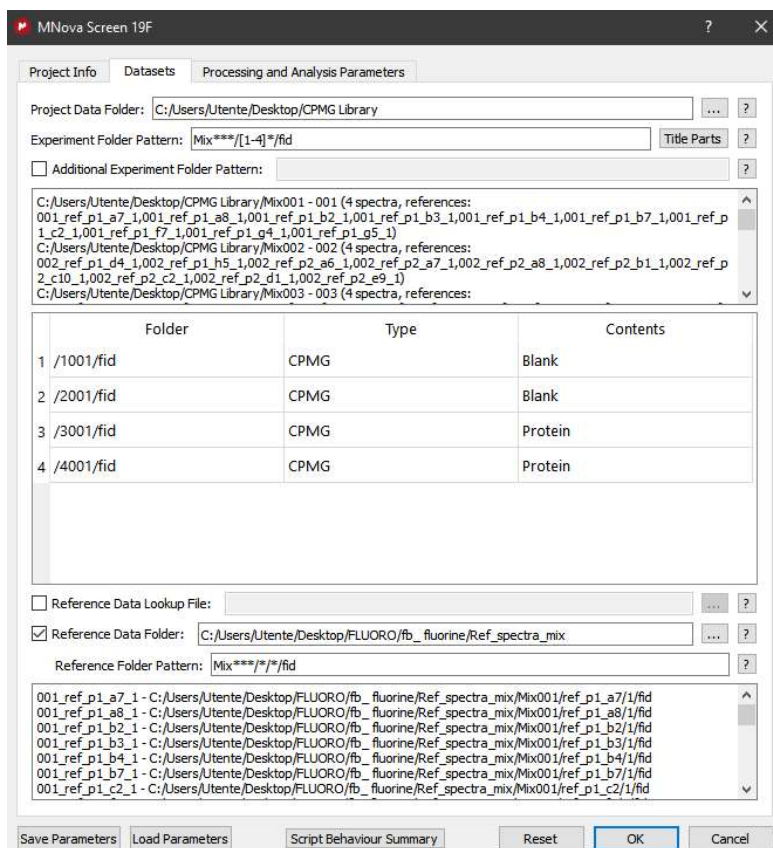


Figura 35 - Impostazioni MScreen Dataset (MestreNova)

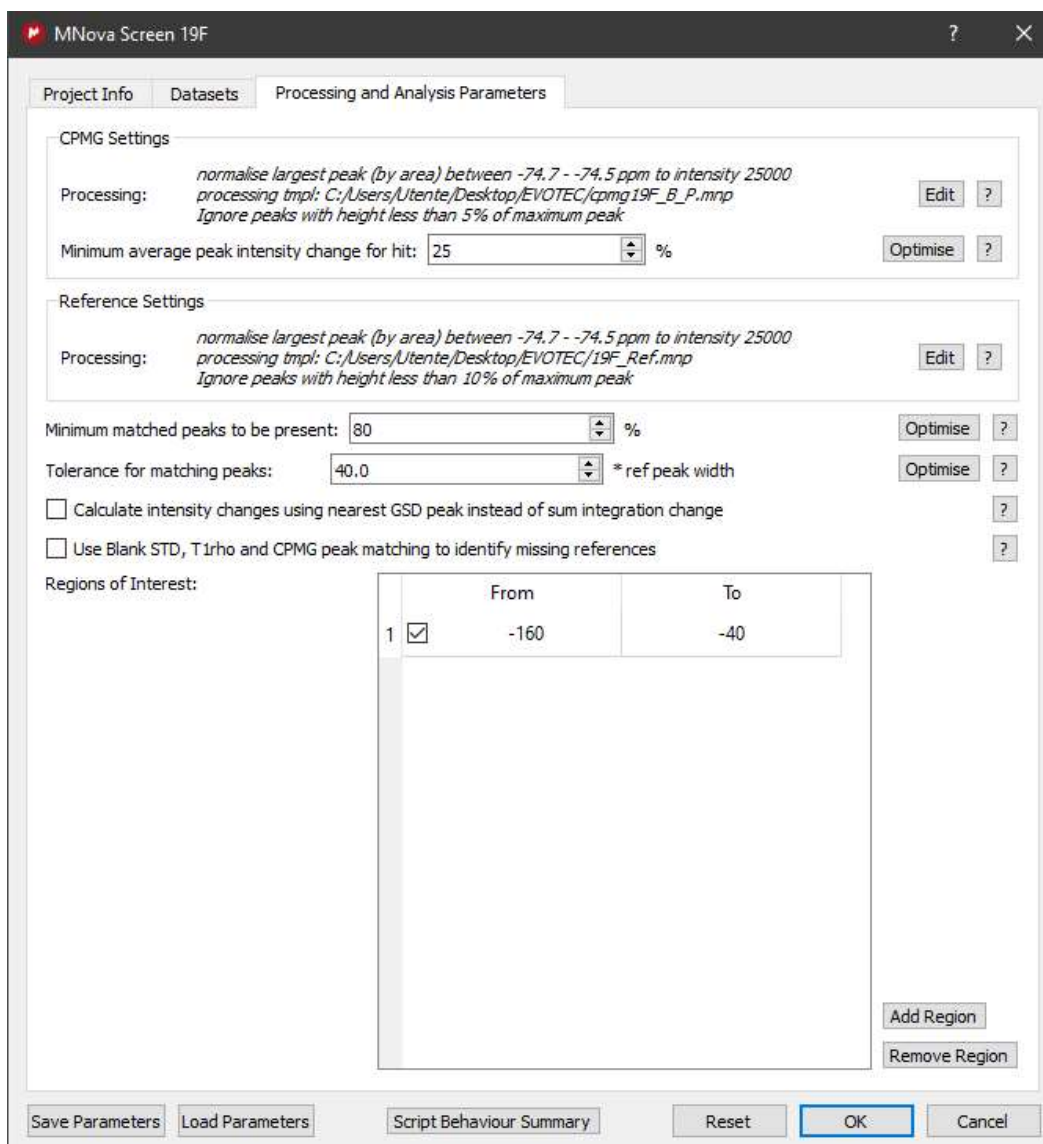


Figura 34 - CPMG parametri di procesamiento (MestreNova)

## 5 RISULTATI SPERIMENTALI E DISCUSSIONE

Gli spettri processati sono stati analizzati attraverso il software MestreNova<sup>®</sup> utilizzando la funzione MScreen. La funzione fornisce la sovrapposizione degli spettri dei tempi lunghi e corti in assenza di proteina, come riferimento, ed in presenza di proteina; questo riconosce autonomamente a quale frammento corrisponde ogni picco utilizzando le informazioni degli spettri di riferimento dei frammenti singoli. In seguito, viene riportata la tabella dei risultati, vedi Fig.37:



Experiment	Fragment 1	Fragment 2	Fragment 3	Fragment 4	Fragment 5	Fragment 6	Fragment 7	Fragment 8	Fragment 9	Fragment 10	Result	Comments
<input type="checkbox"/> 001	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 002	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 003	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 004	present	present	specific hit	present	present	specific hit	present	present	present	present	BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 005	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 006	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 007	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 008	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 009	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 010	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 011	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 012	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 013	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 014	present	present	present	present	present	present	present	present	present	-	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 015	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 016	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 017	present	present	present	present	present	present	present	present	present	present	NOT BINDING	Ref ...
<input type="checkbox"/> 018	present	present	present	present	present	-	-	-	-	-	NOT BINDING	Ref ...

Figura 357 - Risultati Mnova Screening <sup>19</sup>F (Evotec)

L'analisi permette di discriminare, in completa automazione, quale dei segnali ha un allargamento/diminuzione in presenza di CypD, andando a definire con la dicitura “*specific-hit*” il frammento che interagisce con la proteina. Analisi dei frammenti “*specific-hit*”

Vengono definiti “*specific-hit*” in quanto si riferisce all'interazione del frammento con la proteina, tuttavia non abbiamo informazione sulla posizione dell'interazione, ma solo di una diminuzione del tempo di rilassamento trasversale (T<sub>2</sub>) in seguito al *binding*. Osserviamo, come previsto, che la maggior parte dei segnali non porta ad una sostanziale differenza tra l'intensità in presenza e in assenza di CypD; tuttavia, notiamo che si verifica spesso una variazione di intensità tra l'acquisizione a 0 ms (tempo corto) e 200 ms (tempo lungo), come mostrato in Fig.38:

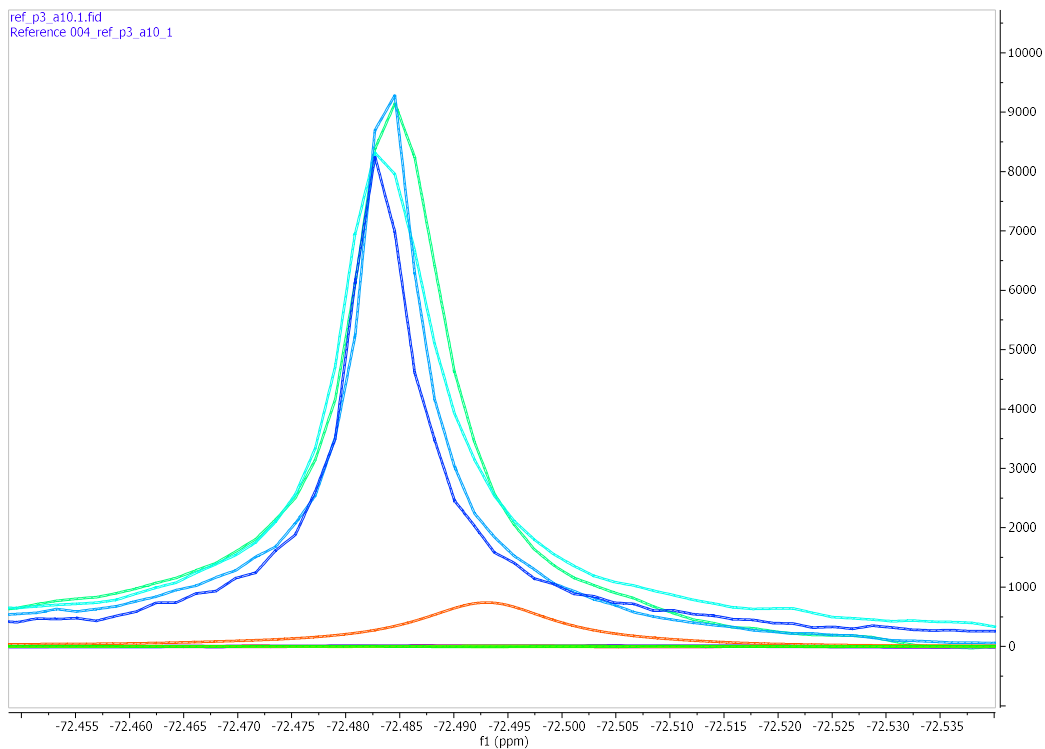


Figura 36 - Differenza tra spettri acquisiti a tempo lungo e corto (riferimento e proteina), non si notano interazioni. In blu ed in azzurro vediamo i tempi lunghi rispettivamente di proteina e riferimento ed in verde e celeste i tempi corti di proteina e riferimento. (Evotec)

Si nota che ai tempi lunghi si ha un'intensità di segnale leggermente minore.

Per evitare falsi positivi risulta adesso più chiaro che sia necessario acquisire spettri di riferimento nei due tempi per comprendere il comportamento del frammento durante l'esperimento NMR.

Il software è stato impostato in modo tale che i picchi nei due esperimenti CPMG, che corrispondono ai riferimenti inseriti, vengano comparati durante il processamento. Se le intensità dei loro picchi differiscono più del 25%, rispetto alla differenza di intensità dei picchi di controllo, il riferimento viene considerato un "possibile hit".

Andiamo ad analizzare adesso i frammenti P3\_B4 e P3\_G2 risultati come positivi, Fig.39:

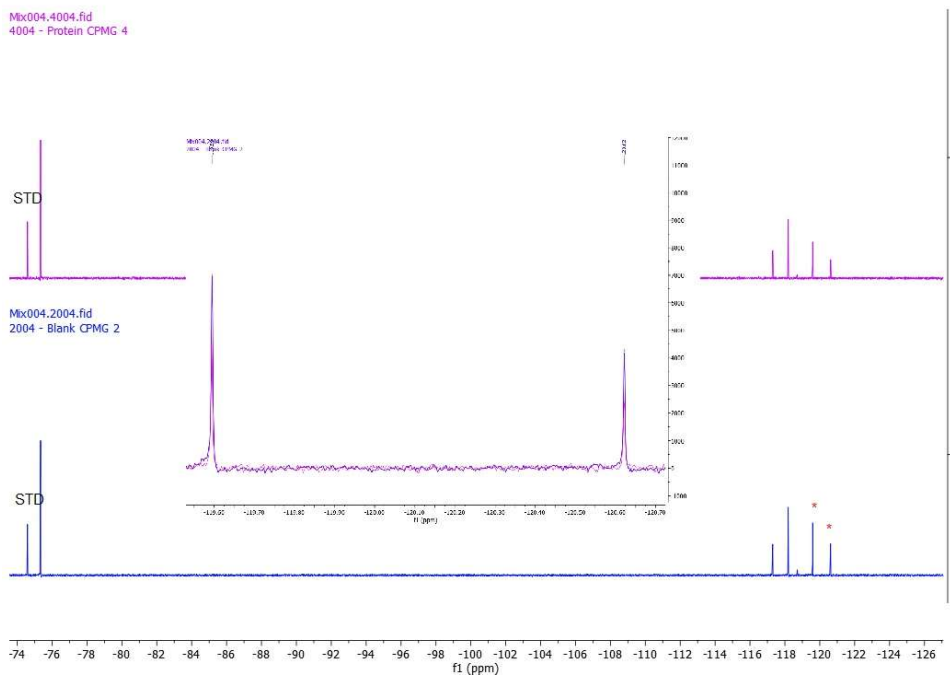


Figura 37 - Spettro Mix004 (P3\_G2 e P3\_B4 segnati in rosso a destra), si nota che i picchi a 119 ppm e 121 ppm (nello spettro 2004 - Blank CPMG 2) si riducono di intensità in seguito all'interazione con la proteina nello spettro in alto (4004 - protein CPMG 4). Al centro viene rappresentato un ingrandimento dei due picchi interessati. (Evotec)

Si può notare la riduzione dei segnali (spettro in alto) a 119.59 ppm e 121 ppm rispetto al tempo lungo del riferimento (spettro in basso). Guardando nel dettaglio osserviamo in Fig.40:

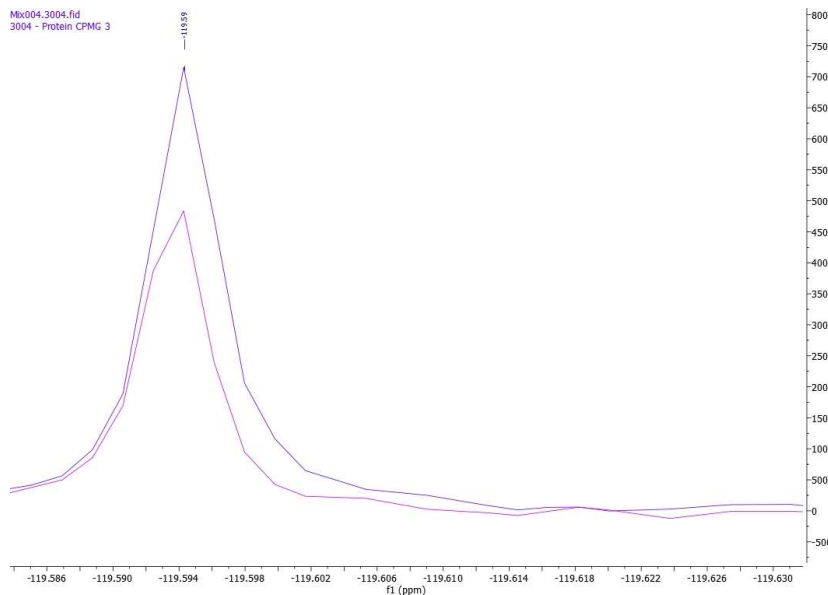


Figura 38 - Riduzione del segnale in seguito all'interazione. (Evotec)

Utilizzando frammenti molto piccoli e una proteina dal basso peso molecolare (18 kDa) non si otterranno mai grandi riduzioni di intensità, il che rende difficile avere

la conferma di una interazione solo attraverso questo risultato. È pratica comune utilizzare un forte inibitore noto della proteina studiata in grado di potersi legare ad essa, in modo che, ripetendo l'acquisizione, non si ottenga più la riduzione di intensità del segnale del frammento, in quanto, non riesce a competere con l'interazione dell'inibitore.

Per questo scopo è stata utilizzata ciclosporina A (CsA), un noto forte inibitore di CypD.

Per ogni frammento è stato preparato un tubo NMR per l'analisi con CsA, a tale scopo risulta importante utilizzare concentrazioni maggiori di proteina e frammento; la problematica principale risulta la scarsissima solubilità di CsA in acqua (praticamente insolubile), a tal proposito si è utilizzato DMSO-d<sub>6</sub> come solvente per ottenere una soluzione 12 mM di CsA. Si sono preparati i seguenti tubi:

- 1) Tubo NMR con frammento G2 e proteina (50 μM) con CsA 1:1 (50 μM);
- 2) Tubo NMR con frammento B4 e proteina (50 μM) con CsA 1:1 (50 μM).

Acquisendo gli spettri CPMG con la stessa sequenza precedentemente descritta otteniamo un recupero dell'intensità del segnale nello spettro NMR come previsto, vedi Fig.41:

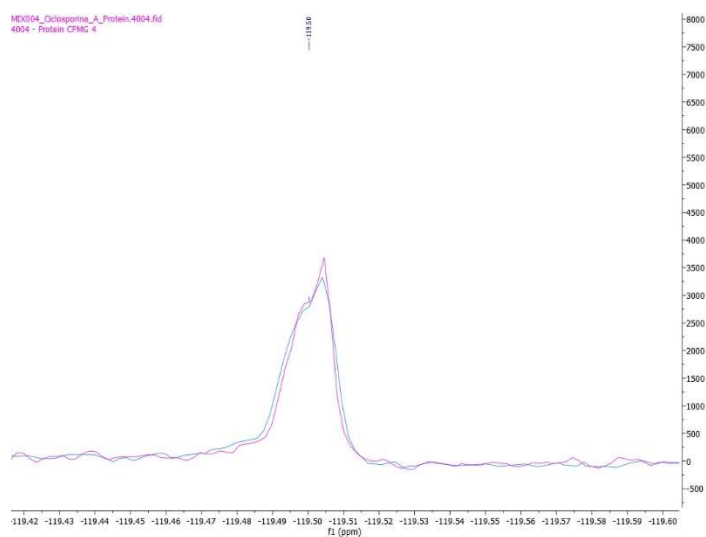


Figura 39 - Recupero segnale con aggiunta CsA. (Evotec)

Questo può corrispondere alla differente forza di interazione tra frammento (molto debole) e dell'inibitore specifico (molto forte) con la proteina, impedendo

l'interazione del frammento fluorurato e quindi ristabilendo omogeneità di intensità tra i due tempi di acquisizione dei *loop* CPMG.

Nonostante la conferma attraverso quest'ultimo esperimento, è necessario comprendere il tipo di possibile interazione che avviene sfruttando un esperimento NMR bidimensionale: SOFAST-HMQC. Questo esperimento, vedi Fig.42, avvalendosi di CypD marcata all' $^{15}\text{N}$  permette di comprendere, attraverso l'osservazione dei cambiamenti nei *chemical shift*, su quali aminoacidi della proteina il frammento lega.

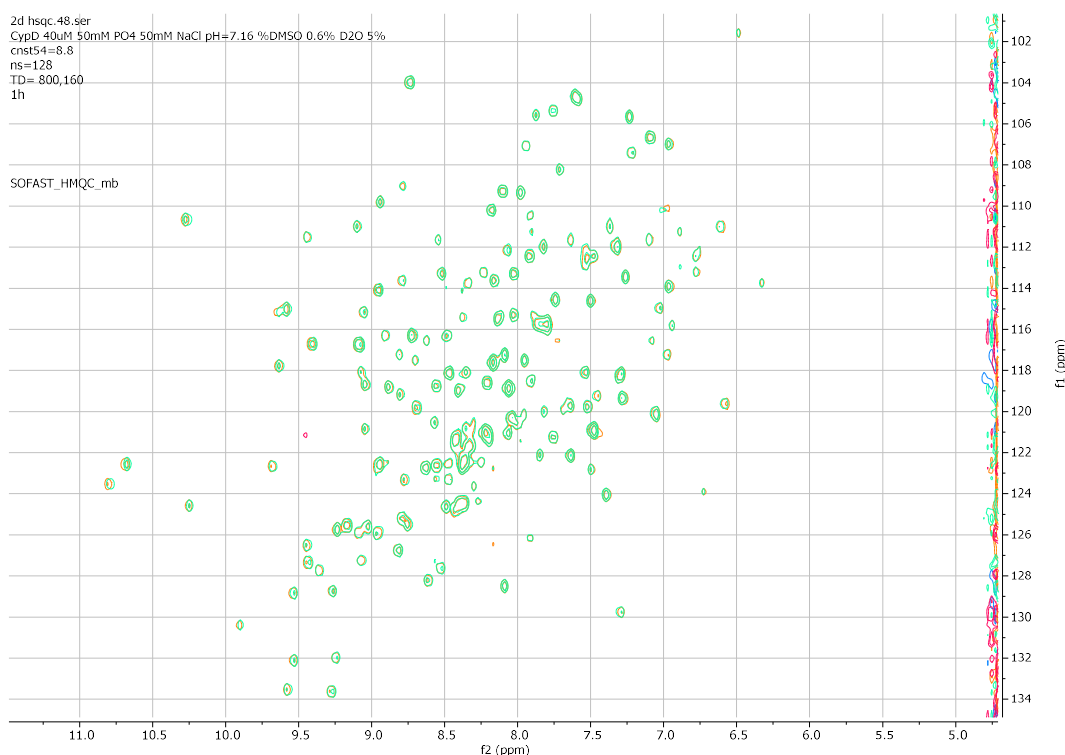


Figura 40 - SOFAST-HMQC CypD (DiSC)

Si sono preparati i tubi per testare ogni frammento risultato positivo dallo screening preliminare; questi sono stati preparati in tubi Shigemi senza l'utilizzo del pistone che permettono di ridurre il volume di soluzione necessaria per la misura:

- 1) Tubo di riferimento: Volume totale 300  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  2,4  $\mu\text{L}$  DMSO<sub>d6</sub>; 15  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O; 2,6  $\mu\text{L}$  CypD 40  $\mu\text{M}$ .
- 2) Tubi B4 e G2: Volume totale 300  $\mu\text{L}$   $\rightarrow$  2,4  $\mu\text{L}$  frammento (G2 o B4); 15  $\mu\text{L}$  D<sub>2</sub>O; 2,6  $\mu\text{L}$  CypD 40  $\mu\text{M}$ .

Fondamentale per questo tipo di esperimenti è mantenere il più possibile omogeneità tra i tubi preparati, in quanto, anche le più piccole differenze come volume totale del tubo e soprattutto come concentrazione di DMSO<sub>d6</sub> presente ed

il pH, provocano variazioni importanti di *chemical shift*, andando ad inficiare sulla corretta analisi dei risultati ottenuti.

Si nota subito che nella parte bassa e centrale dello spettro (8.4 ppm) si trova una regione di leggera degradazione, la quale però non influenza questo tipo di osservazione sperimentale.

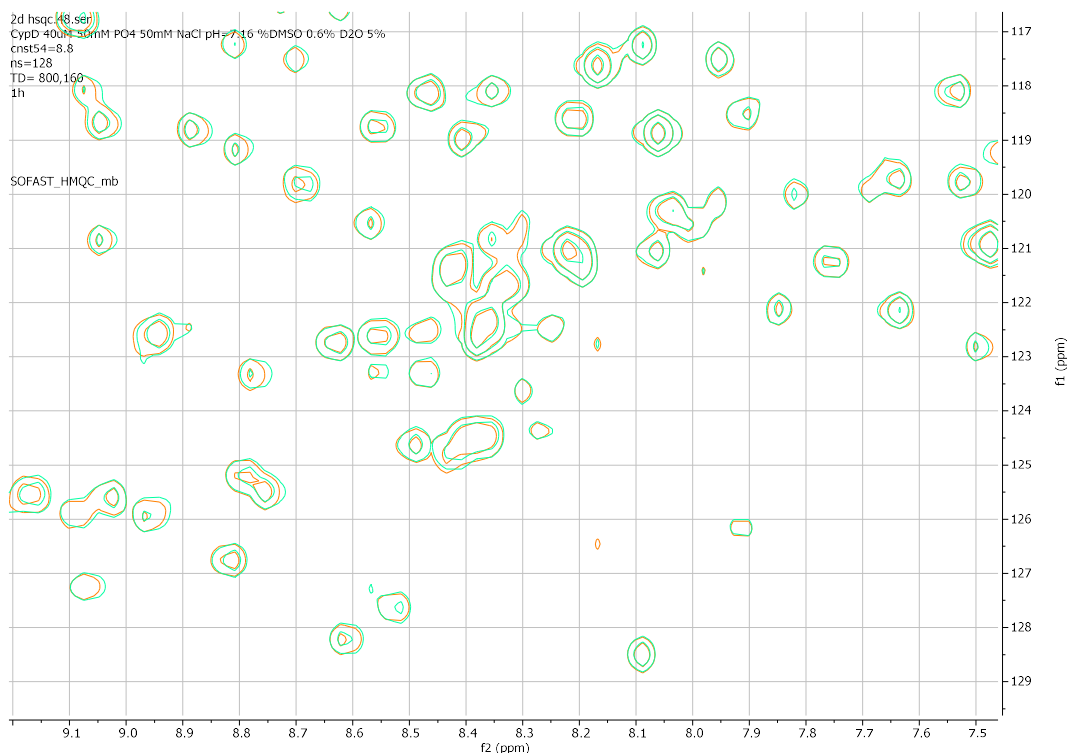


Figura 41 - Spettro NMR SOFAST-HMBC, al centro si denota una zona di degradazione a 8.4 / 122 ppm in quanto sono picchi stretti ed intensi non presenti nell'assegnazione NMR della proteina. (DiSC)

Mediante il riferimento si processano i risultati attraverso MestreNova e si centrano i picchi che sicuramente non hanno interazioni con frammenti, come ad esempio residui della proteina presenti nel *core*. Dunque, si osservano variazioni significative in alcune zone dello spettro, come deboli *shift*, non si aspettano grosse variazioni in quanto il frammento è un ligando molto debole della proteina.

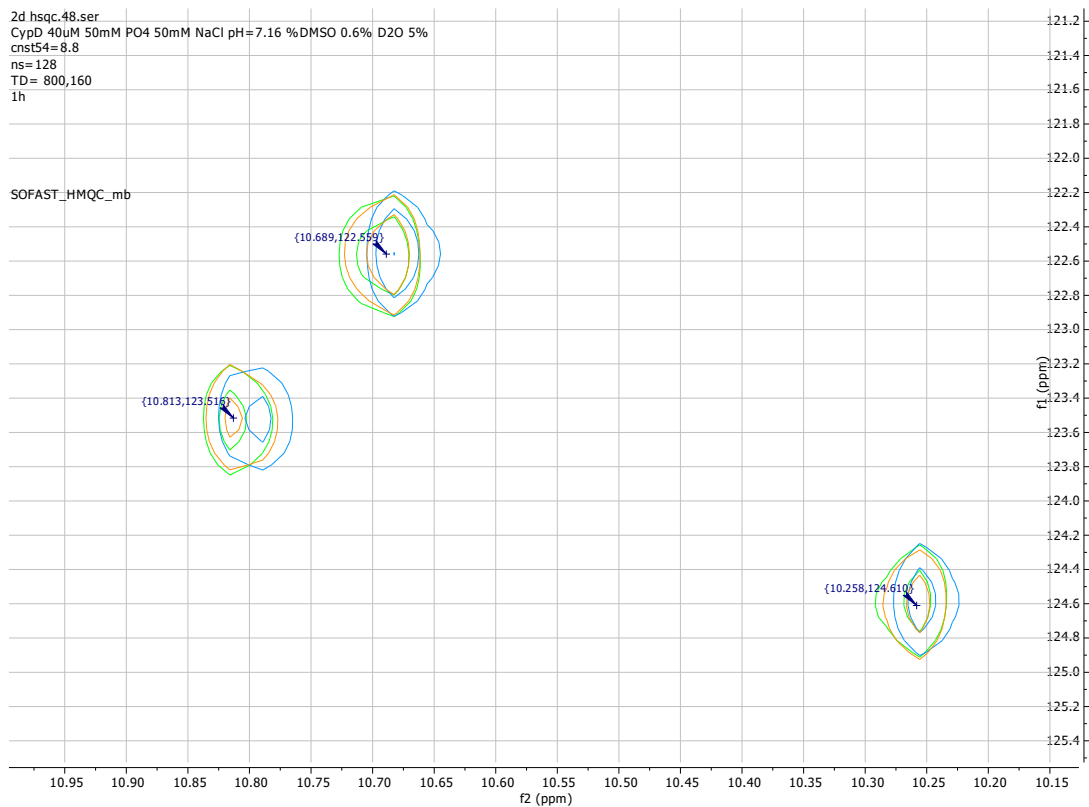


Figura 42 - Confronto HMQC della proteina libera (in blu) e con la proteina in presenza dei frammenti G2 (in arancio) e B4 (in verde) si notano shift nei picchi a 10, 689 (K31); 10,813 (H92). (DiSC)

L'assegnazione dei picchi dell'esperimento  $^{15}\text{N}$ -HMQC della CypD era stata ottenuta in precedenza mediante esperimenti NMR 3D a tripla risonanza.

In questo modo è stato possibile determinare a quali residui corrispondono i picchi

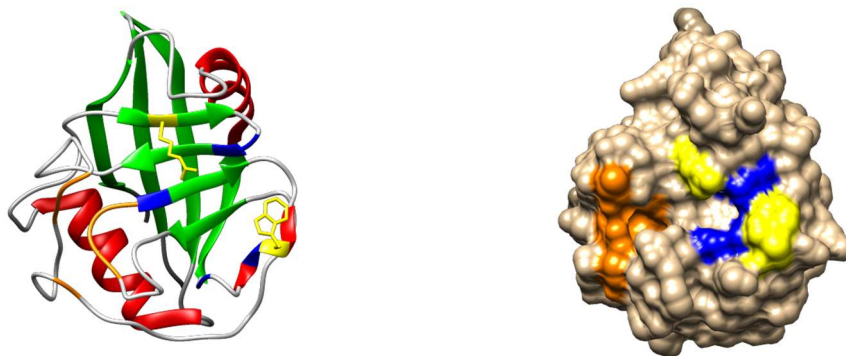


Figura 43 - Struttura CypD: in verde ed in rosso sono descritte i foglietti e le eliche rispettivamente; in giallo i residui altamente conservati (R55 e W121); in arancione la tasca S2 ed in blu la tasca S1. (Chimera)

che hanno subito un piccolo spostamento e mapparli quindi sul modello 3D della CypD, mediante il programma Chimera:

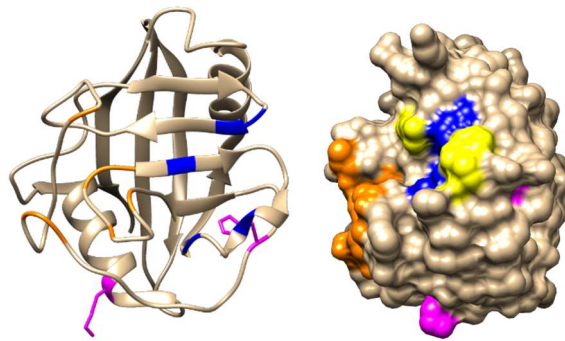


Figura 44 - Modello CypD: evidenziati in rosa i residui K31 e H92, si nota che sono localizzati molto distanti dalle tasche S1 (in blu) e S2 (in arancione), in giallo sono evidenziati i residui altamente conservati W121 e R55. (Chimera)

Essendo note i principali siti di interazione di CypD (evidenziati in arancione ed in blu) si nota che i segnali che subiscono un piccolo spostamento in presenza dei frammenti sono molto distanti da essi e quindi con buona probabilità si può determinare che le molecole analizzate interagiscono al di fuori della tasca del sito attivo attraverso un legame aspecifico con la superficie proteica. Il possibile effetto di *shift* ottenuto potrebbe essere determinato anche da variazioni di pH e DMSO\_d6 nei tubi, ma, attraverso precedenti studi volti a determinare la suscettibilità dei vari segnali dello spettro NMR a piccole variazioni di pH e concentrazioni di solvente, i picchi in oggetto sono risultati come segnali molto stabili a quelle variazioni eliminando questa opzione.

Un metodo aggiuntivo per la conferma che è stato proposto è attraverso l'analisi dell'interazione tra il frammento e la CypD marcata al fluoro 19. La CypD presenta un solo residuo di triptofano (Trp) in tutta la sequenza e questo è presente nel sito attivo (W121). Attraverso l'introduzione di un precursore fluorurato del triptofano, il 5-fluoroindolo, nel terreno minimo (M9) di crescita batterico è possibile permettere l'incorporazione, attraverso biosintesi, di un residuo di fluoro triptofano. Questo può essere monitorato con NMR monodimensionale al fine di verificare l'interazione di un frammento con la tasca del sito attivo di interesse. È stata verificata l'incorporazione dell'aminoacido non naturale attraverso analisi ESI-MS:



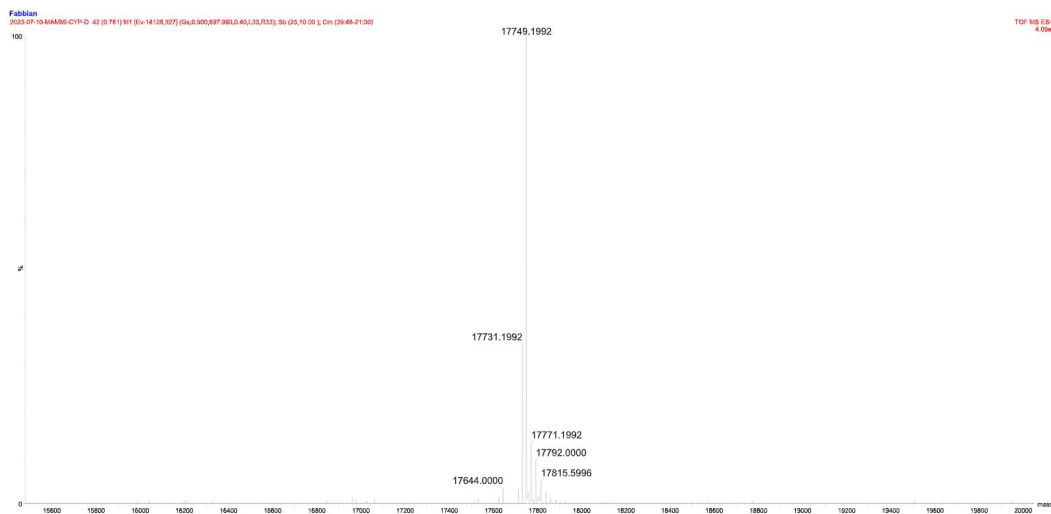


Figura 45 - Spettro ESI CypD  $^{19}\text{F}$  (DiSC)

Dalle differenti crescite condotte è stato ottenuto un risultato medio di incorporazione del 70% di Trp fluorurato. Si può notare che attraverso brevi esperimenti NMR (Bruker 600Mhz) con sequenza zg, con correzione con angolo di Ernst ( $56,8^\circ$ ) e disaccoppiato dal protone si ottiene un segnale nella zona dei fluori aromatici (circa -120 ppm) permettendo l'opzione di non limitare lo screening alla sola libreria di composti fluorurati, ma anche di estenderla a frammenti che non presentano l'alogeno, mantenendo tuttavia la velocità e sensibilità eccellenti delle tecniche al fluoro.

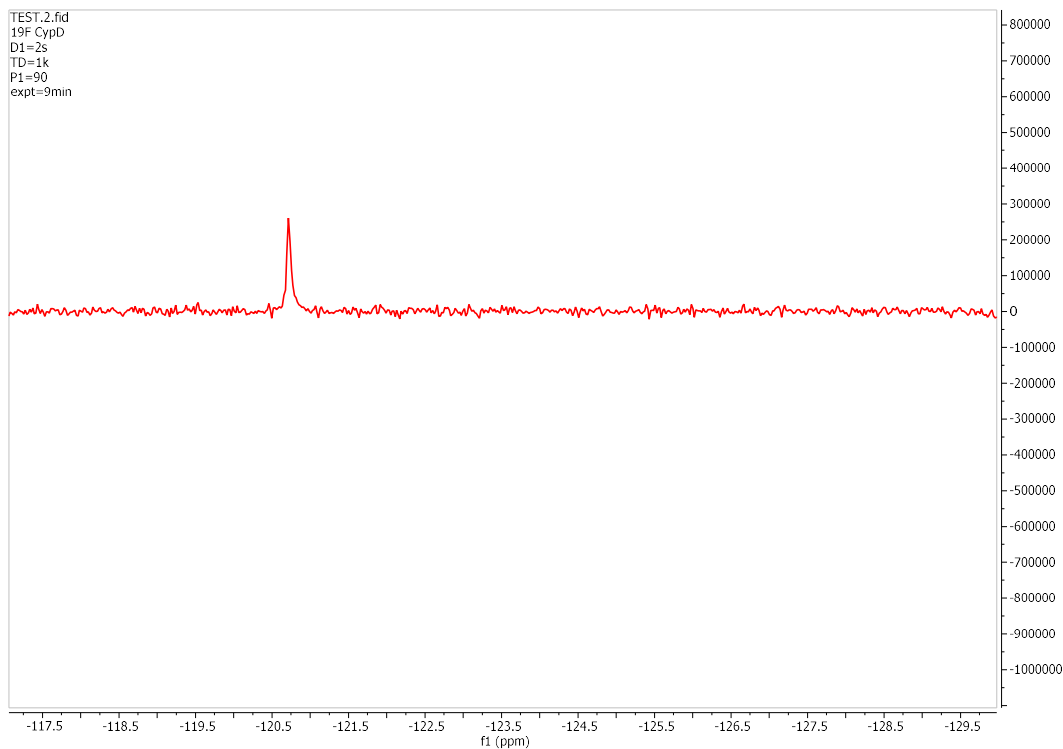


Figura 46 - Spettro CypD  $^{19}\text{F}$ ; si utilizza  $P1: 90^\circ$ ,  $D1: 2\text{ s}$ ,  $TD: 1\text{K}$  (DiSC)

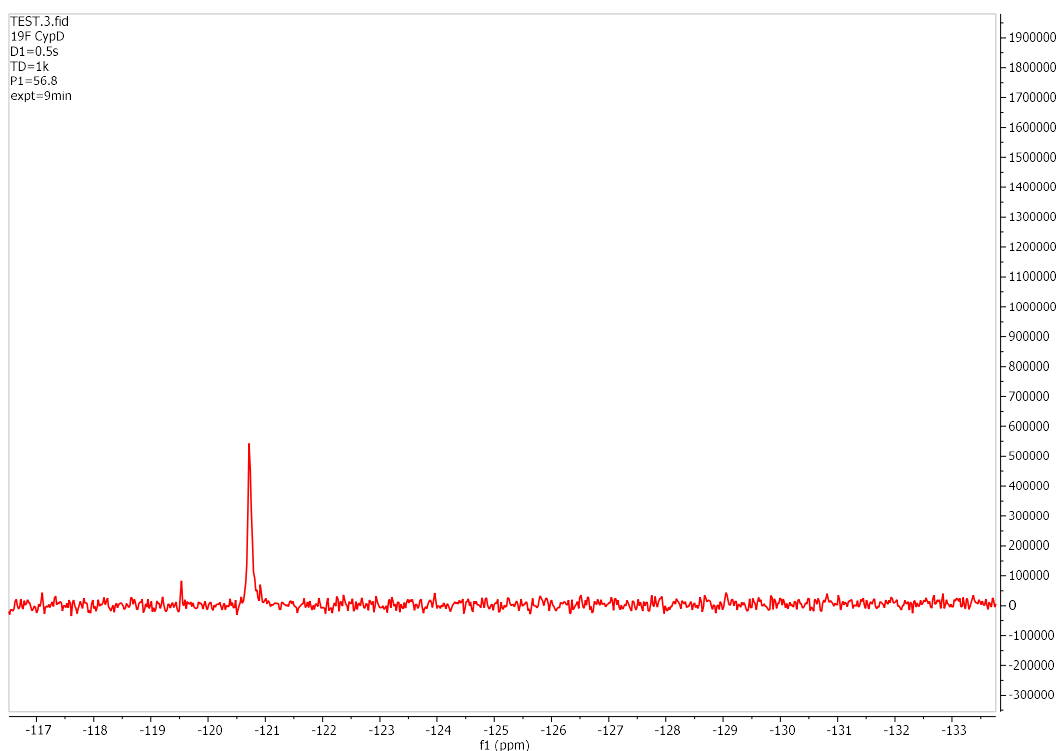


Figura 47 - Spettro CypD  $^{19}\text{F}$  con correzione angolo di Ernst ( $P1: 56.8^\circ$ ). (DiSC)

La tecnica permette quindi di osservare spostamenti del segnale del residuo fluorurato (W121) evidenziando, attraverso variazioni di *chemical shift*, l'interazione del frammento con la proteina. Per la nostra proteina, non essendo stati

trovati frammenti che interagiscono direttamente nel sito attivo non sono stati condotti esperimenti successivi in presenza di frammenti e proteina marcata al  $^{19}\text{F}$ . Questa può, ad ogni modo, rappresentare un'applicazione universalmente valida anche per la ricerca di ligandi di altre proteine di interesse farmacologico.

## 6 CONCLUSIONI

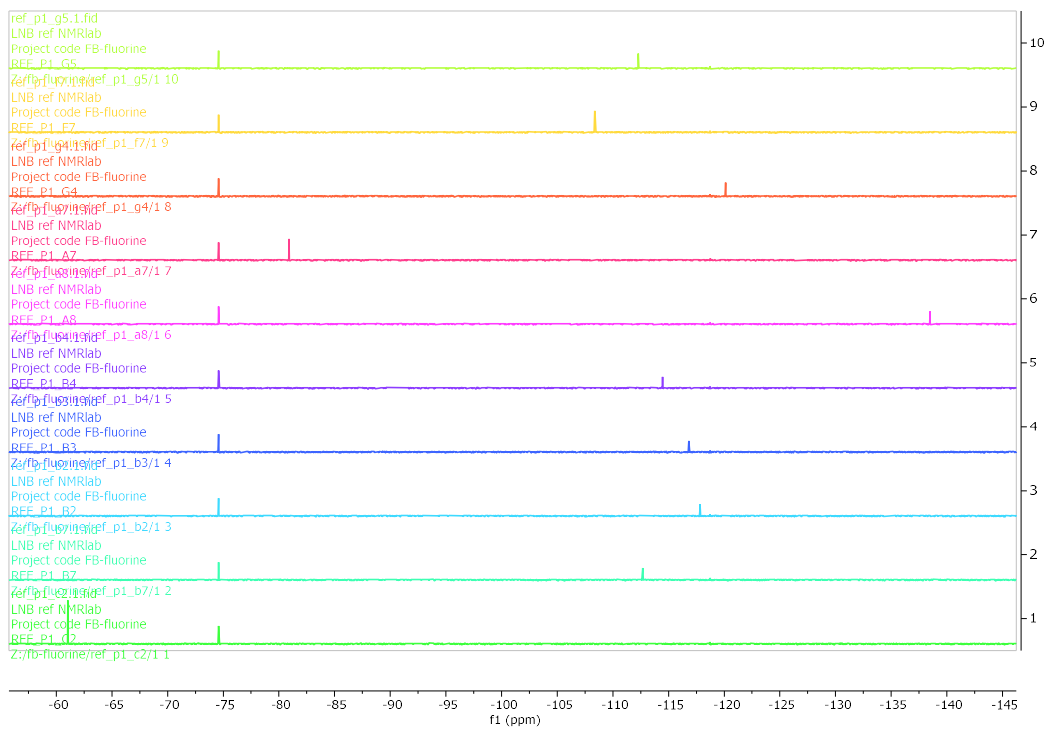
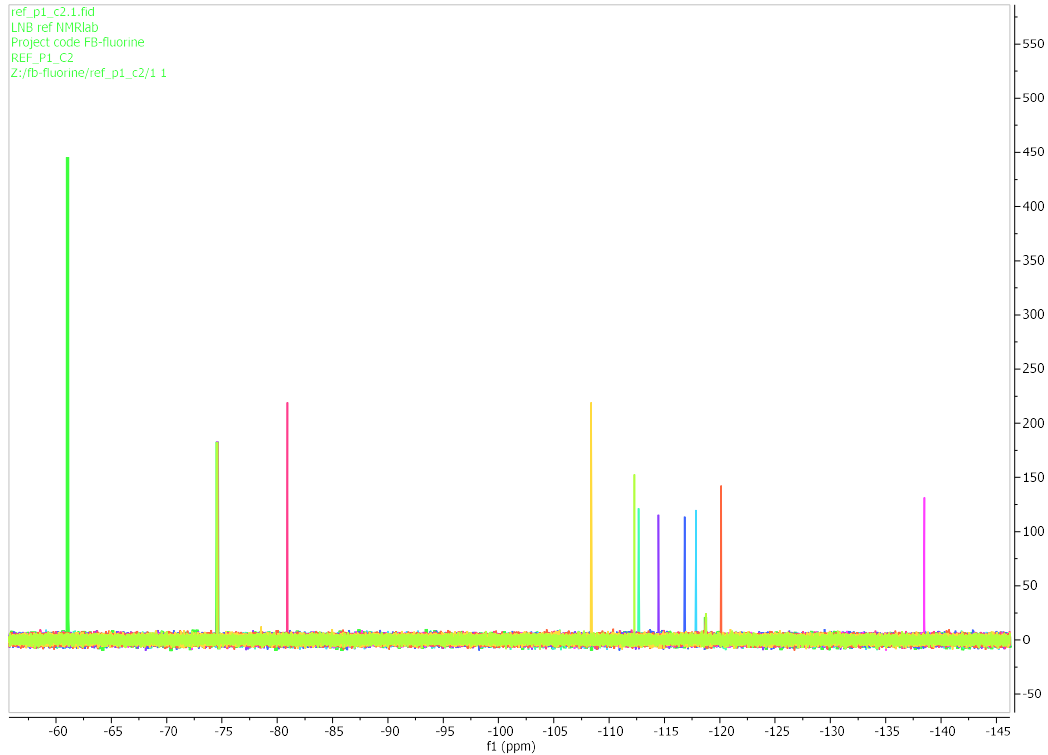
---

Il metodo proposto permette uno screening rapido di numerosi frammenti contro un *target* proteico, inoltre, in seguito alla creazione dei *pool* questi possono essere utilizzati anche per altri *target*. Le difficoltà che possono essere riscontrate sono prevalentemente per la natura proteica, la sua stabilità in soluzione e la debole interazione con i frammenti spesso rende difficile l'interpretazione dei risultati ottenuti. Inoltre, è una tecnica che può presentare falsi positivi e/o negativi e non fornisce una diretta informazione della posizione dell'interazione tra frammento e proteina. Risulta quindi importante, per avere successo, avere a disposizione grandi librerie di composti. Per quanto riguarda CypD i frammenti trovati come possibili positivi, pur non interagendo direttamente con il sito attivo, rispondono in modo positivo all'esperimento CPMG ed entrambi rispondono all'azione dell'inibitore specifico CsA confermando la robustezza del metodo. Il lavoro di tesi ha messo le basi per l'ottimizzazione dell'espressione e purificazione di proteine marcate al  $^{19}\text{F}$  in modo da poter estendere, in futuro, lo screening di *target* anche con librerie di frammenti non fluorurati e per studiare direttamente l'interazione con il sito attivo fluorurato di interesse.

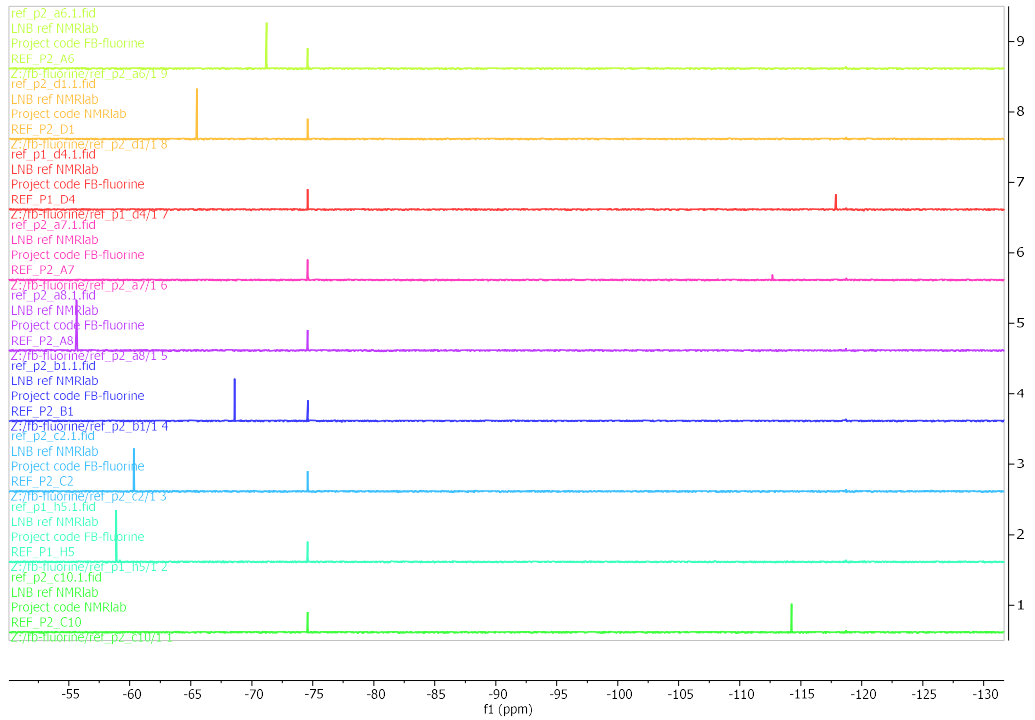
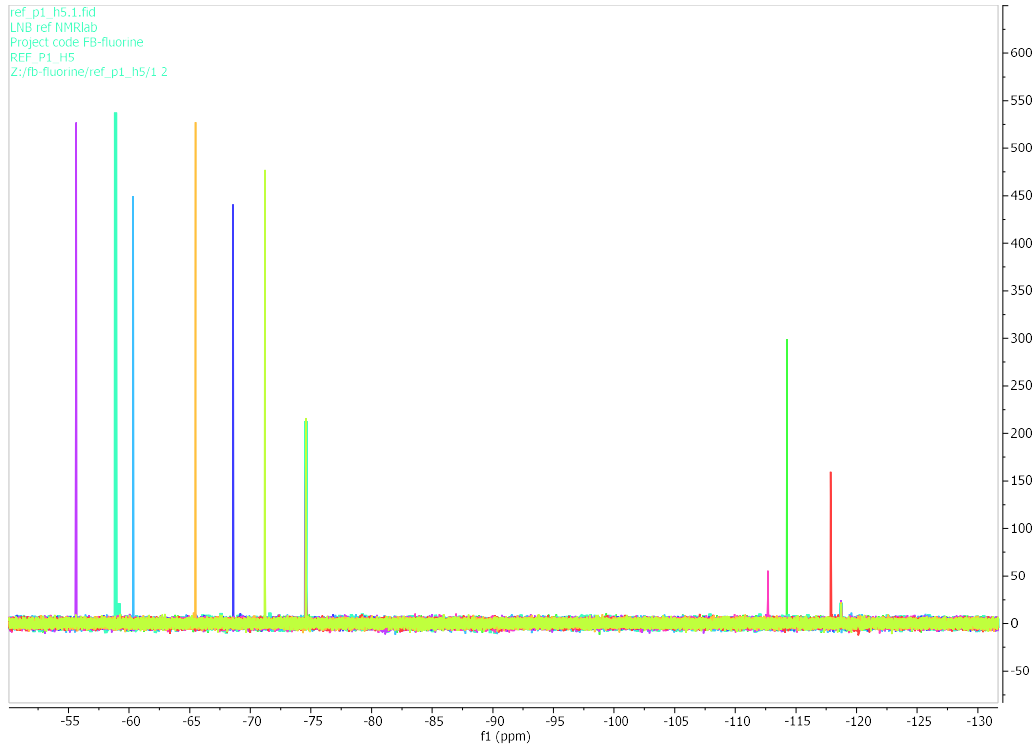


## 7 APPENDICE A – SPETTRI DI RIFERIMENTO

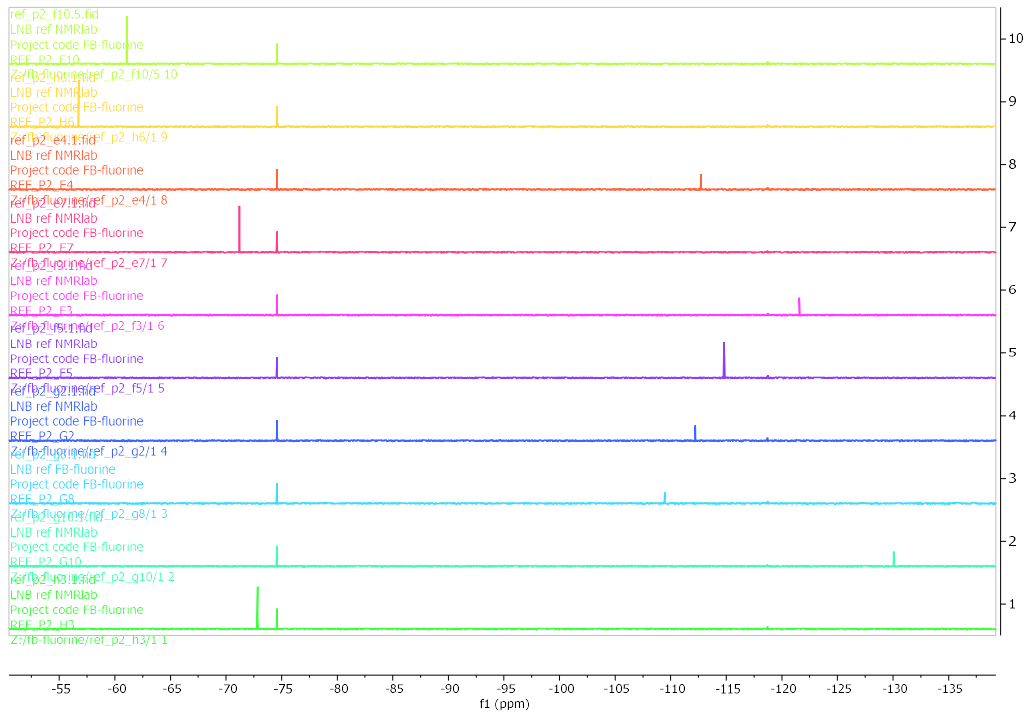
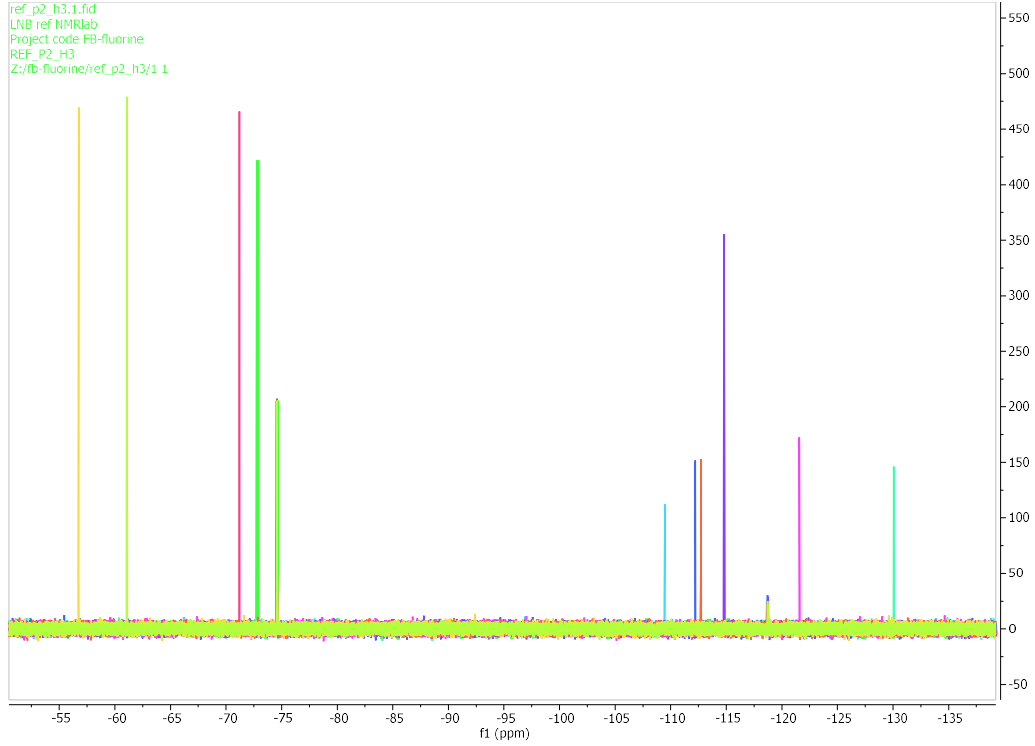
### Riferimento Mix001:



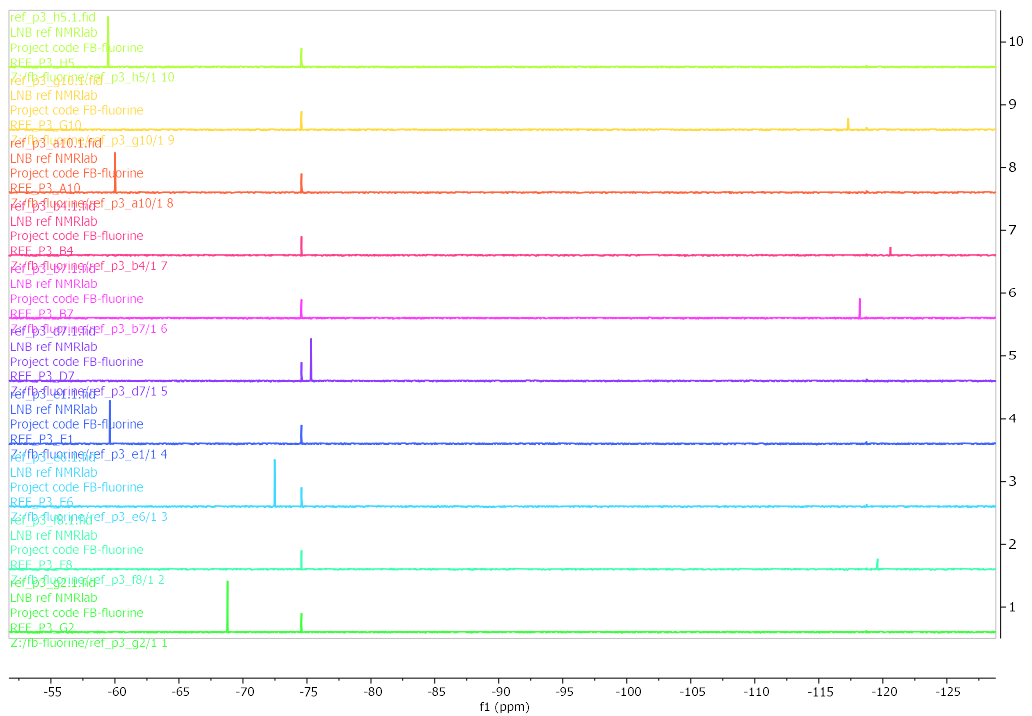
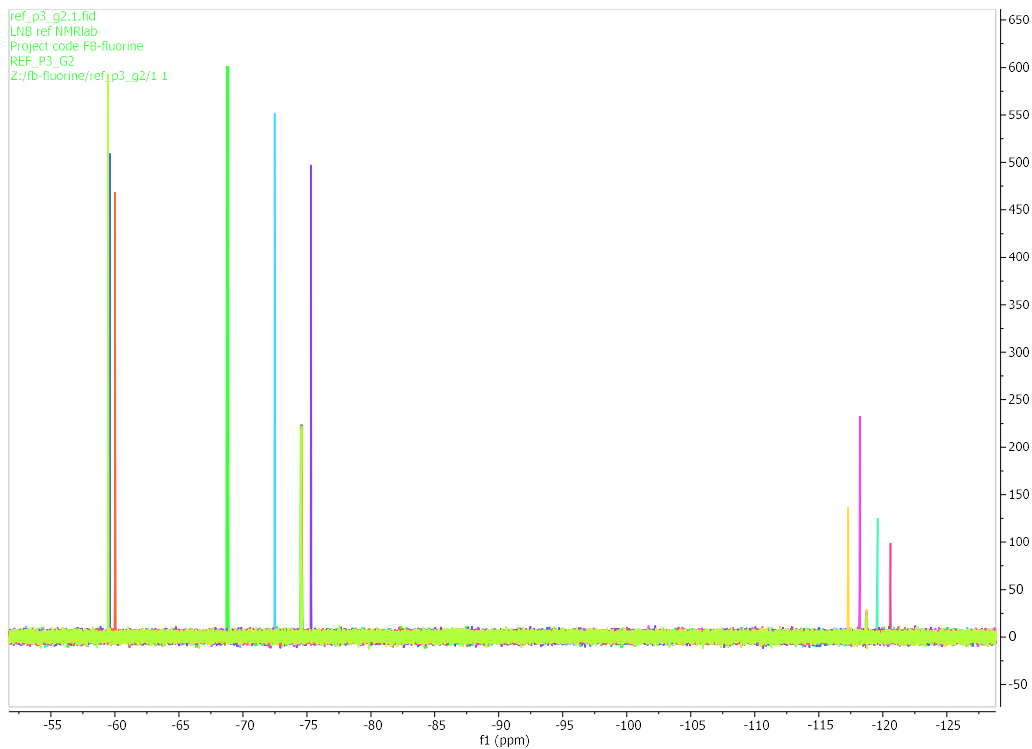
# Riferimento Mix002:



# Riferimento Mix003:

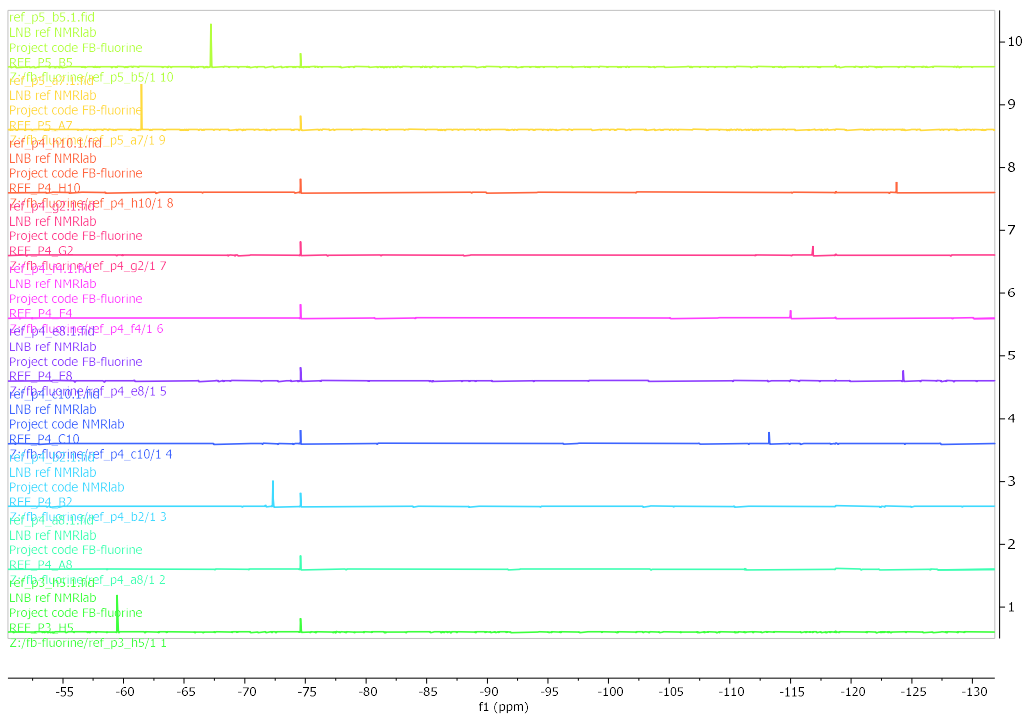
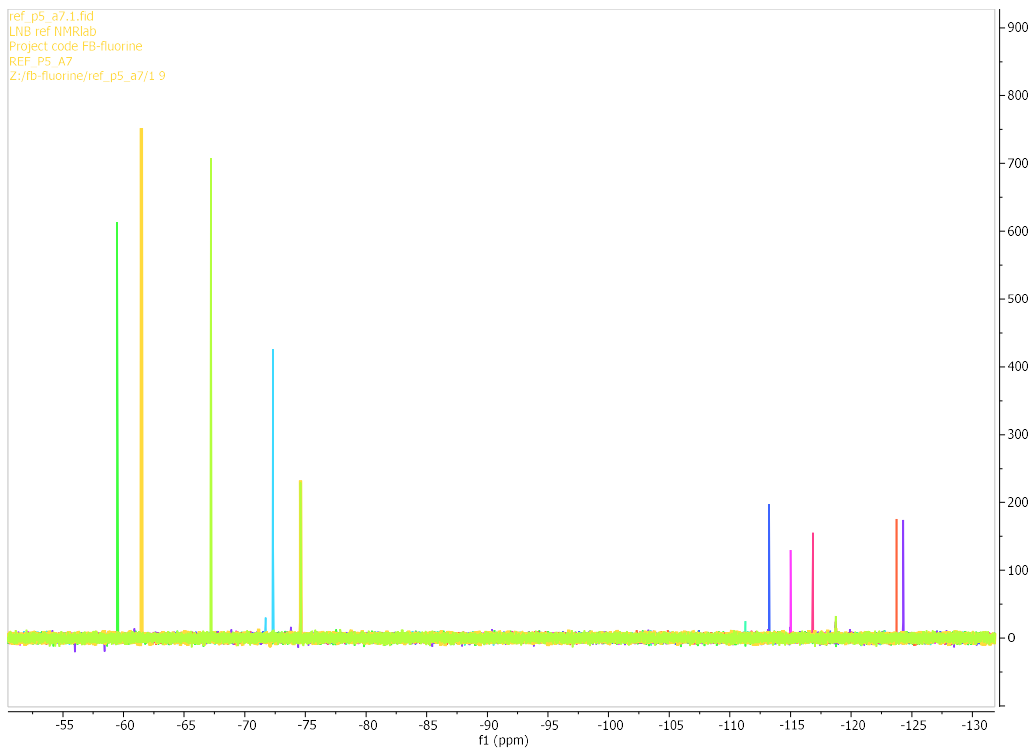


# Riferimento Mix004:

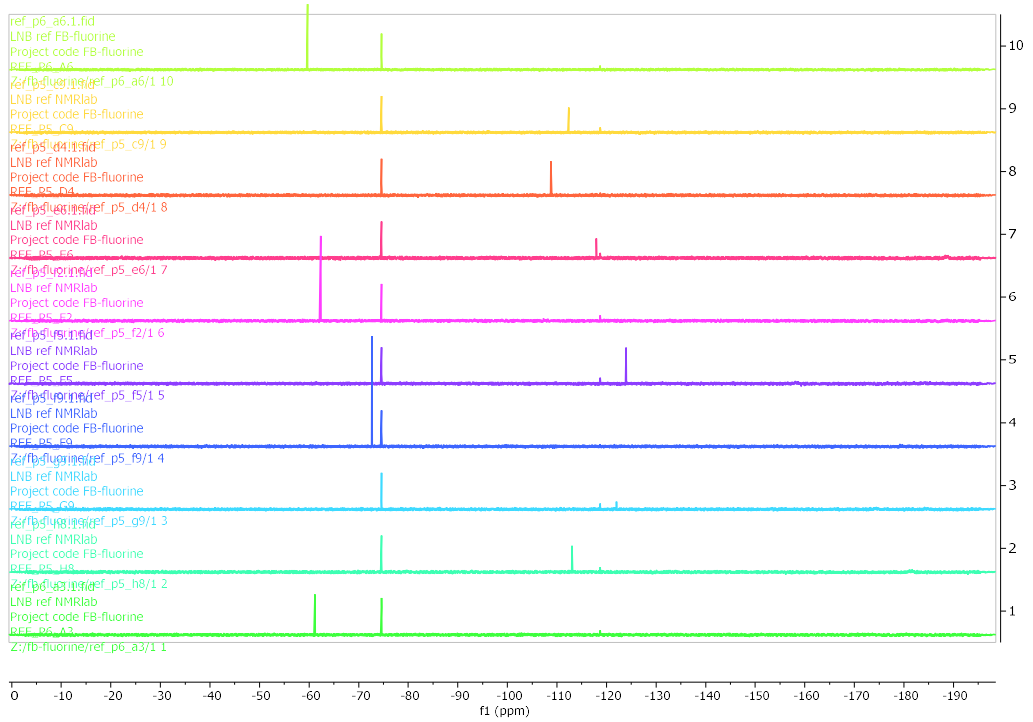
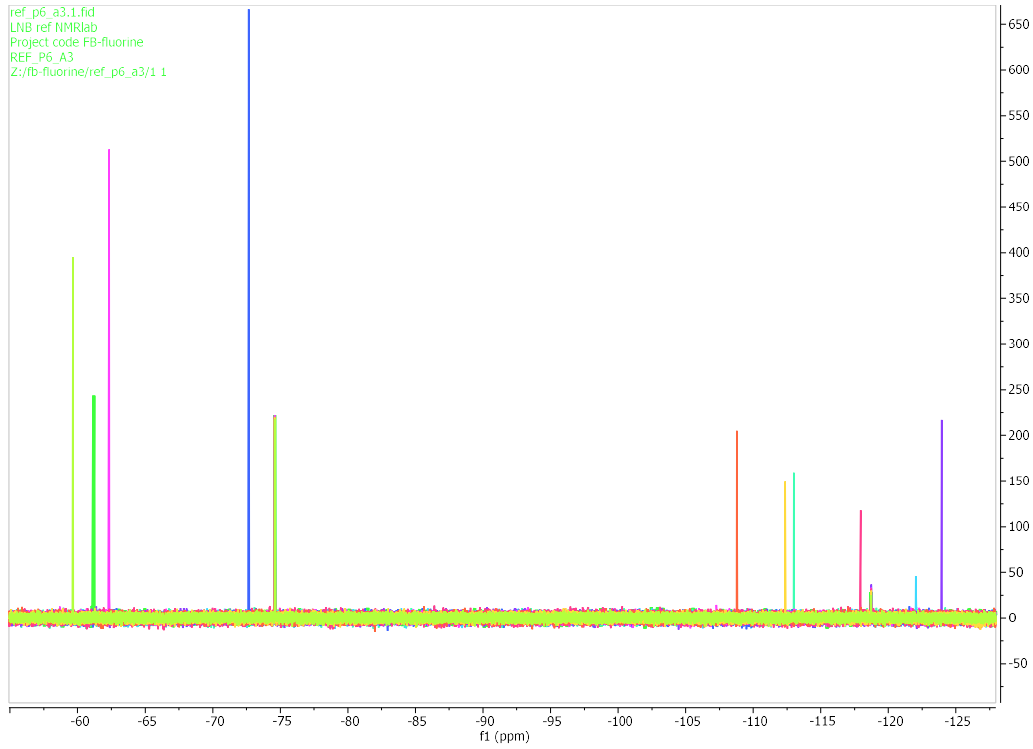




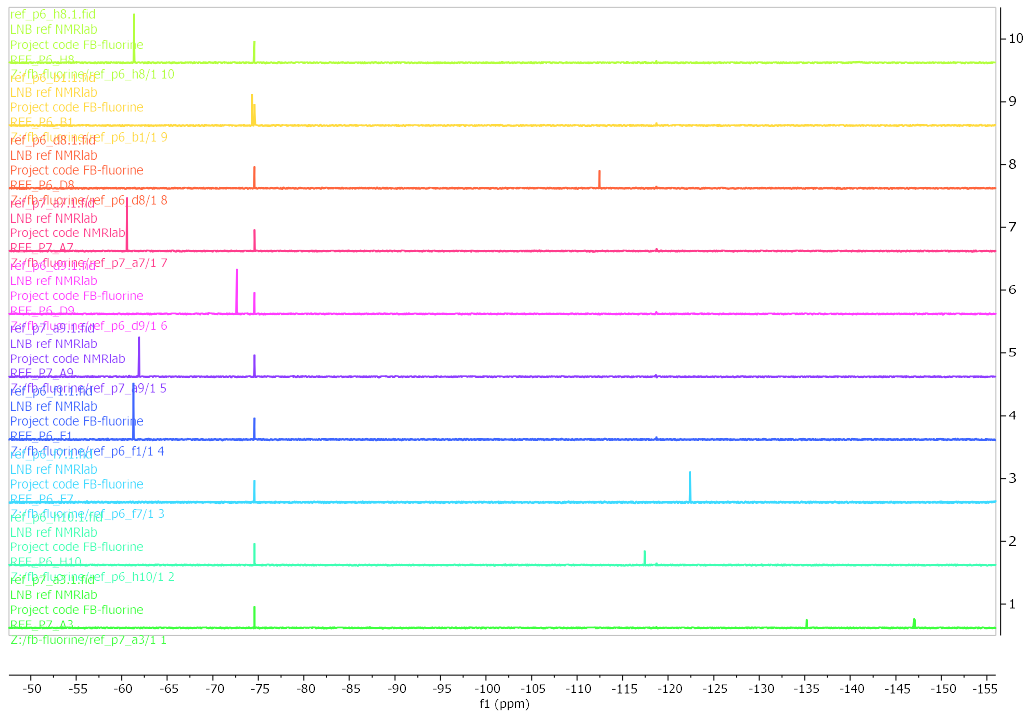
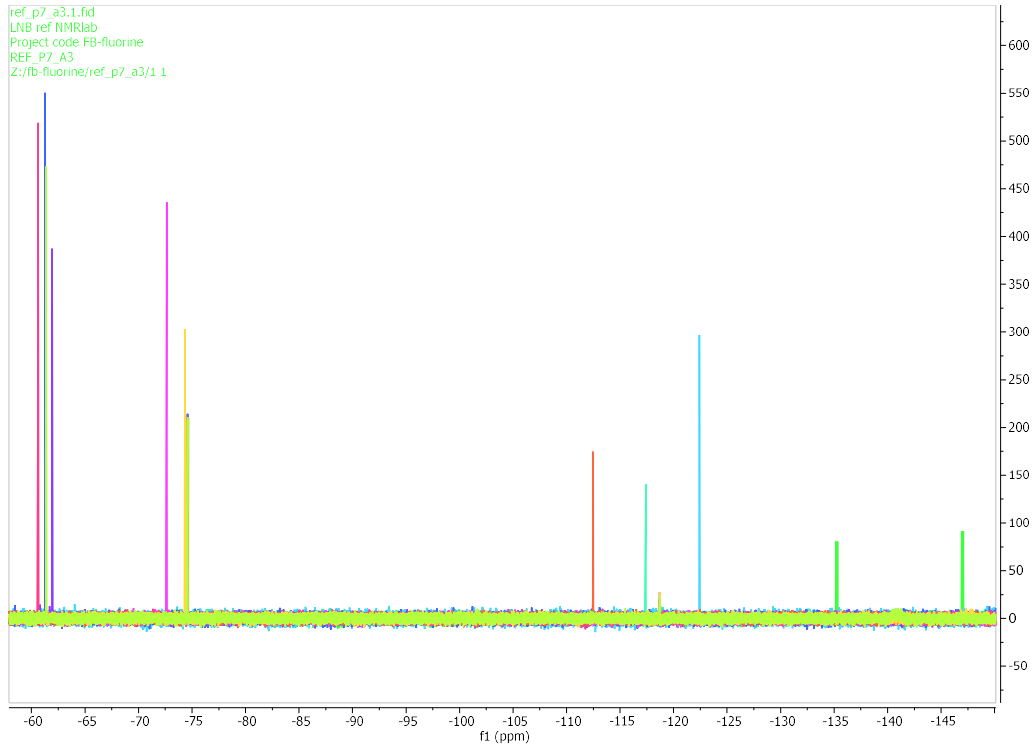
# Riferimento Mix005:



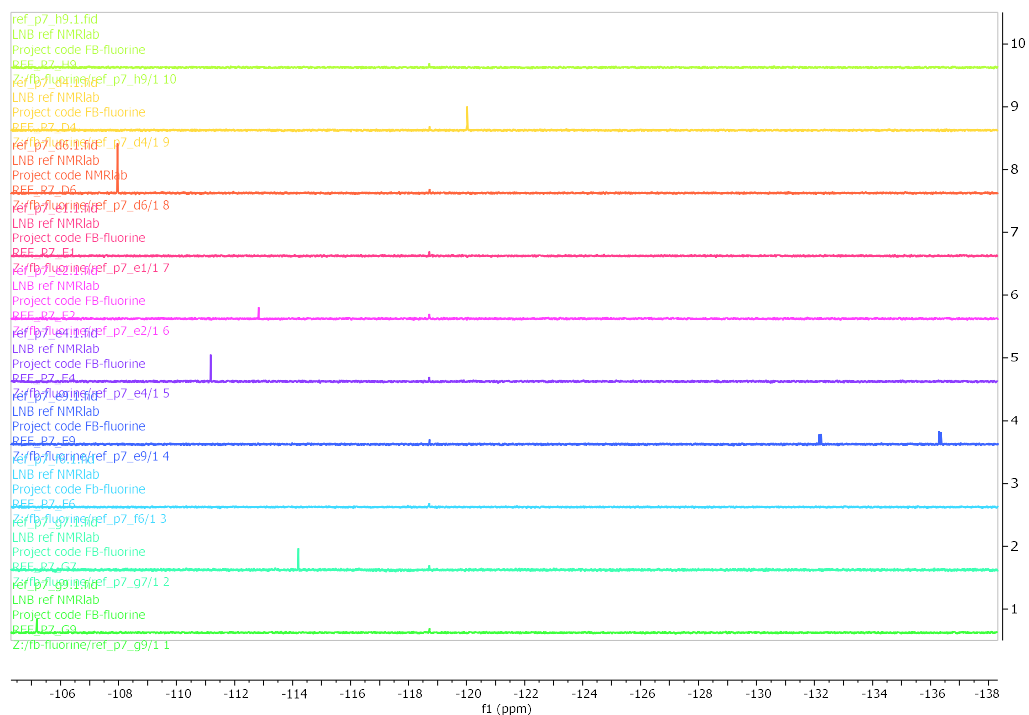
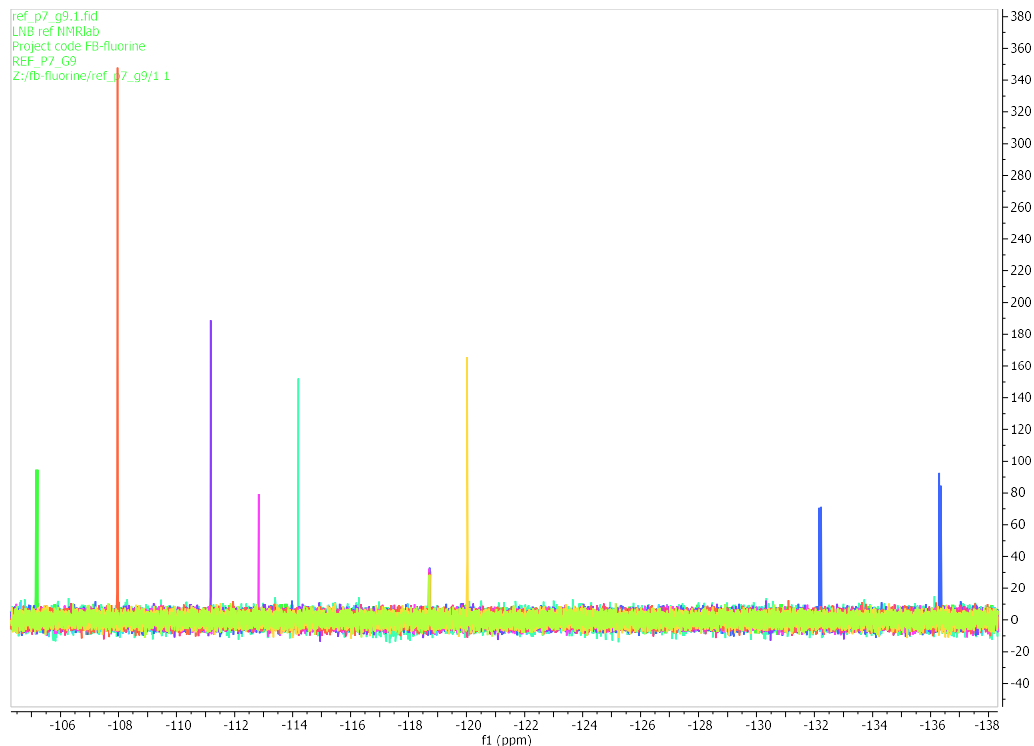
# Riferimento Mix006:



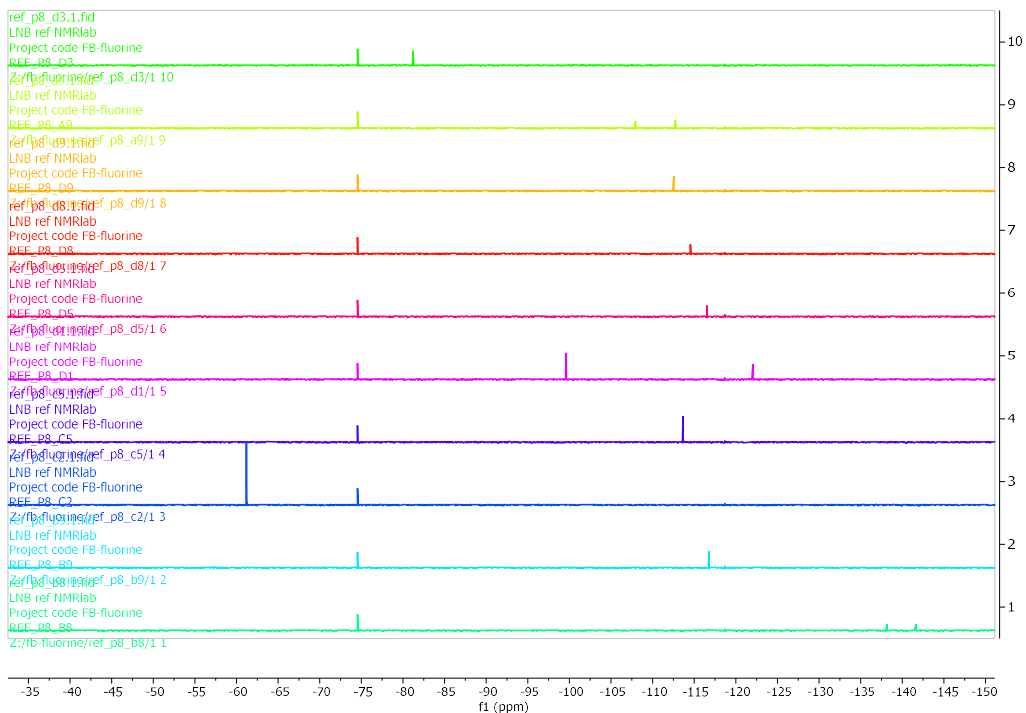
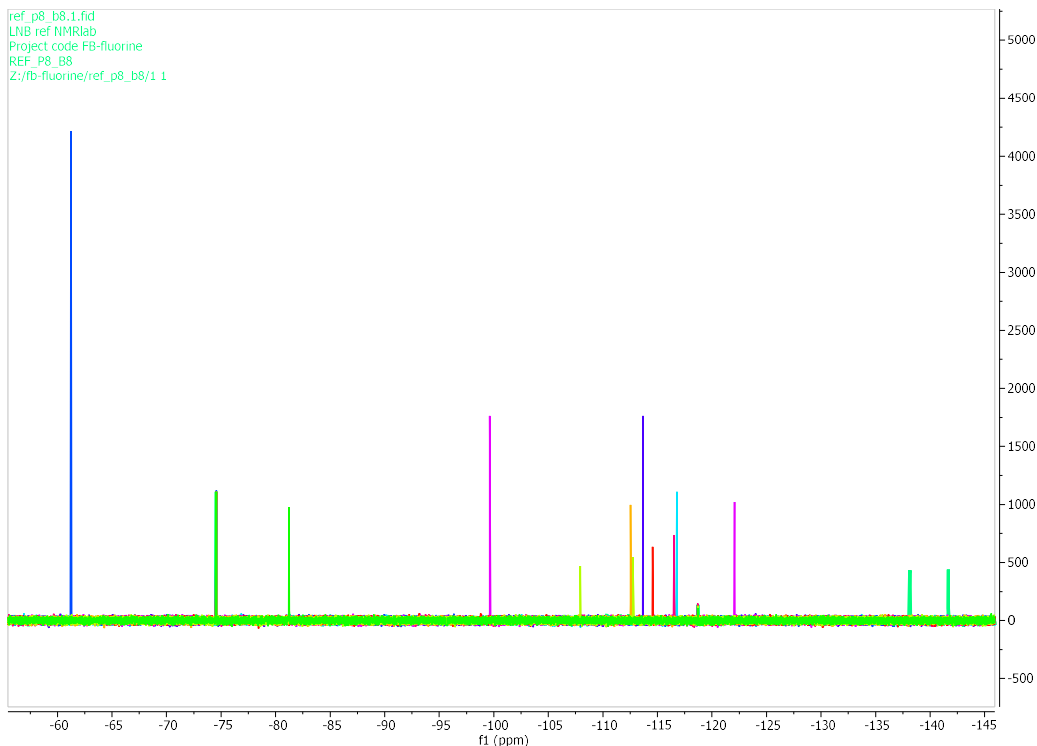
# Riferimento Mix007:



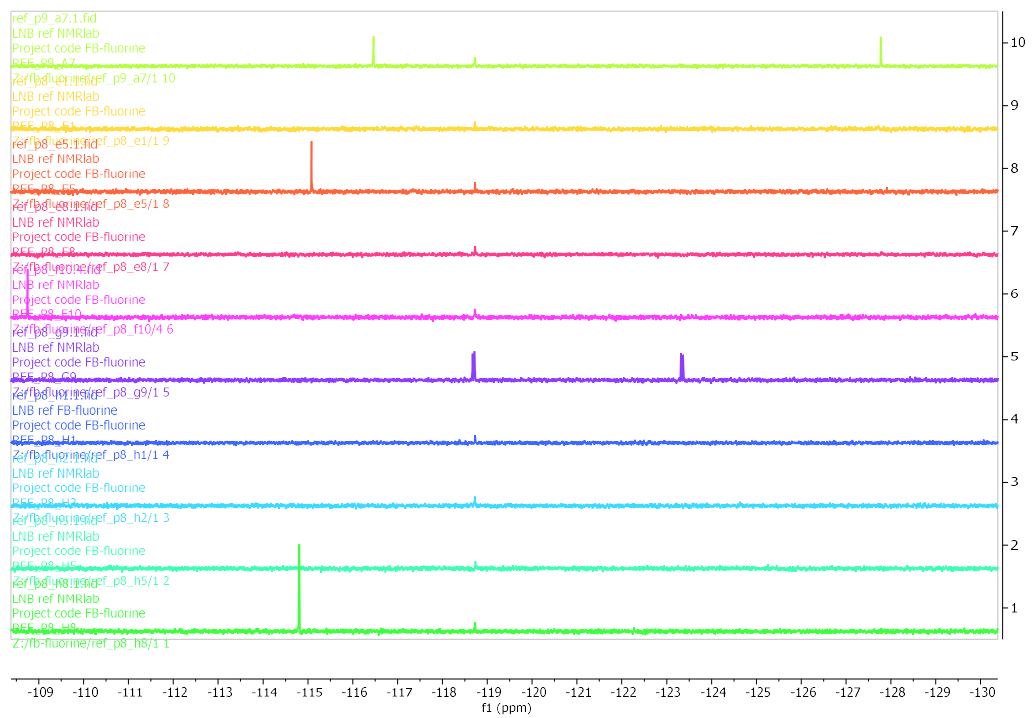
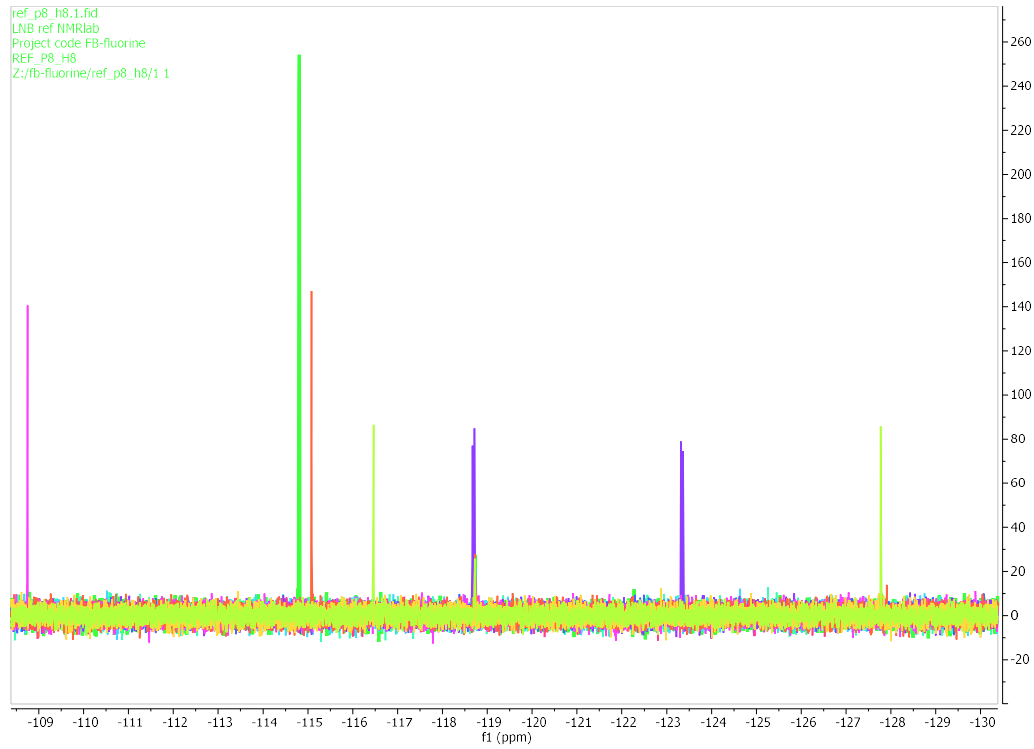
# Riferimenti Mix008:



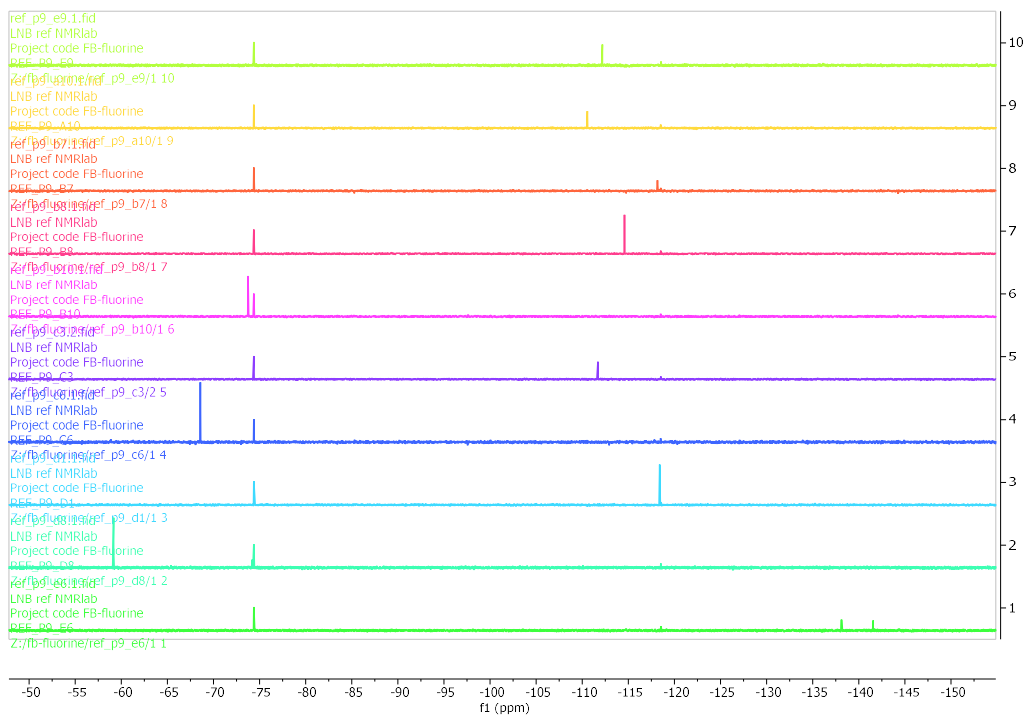
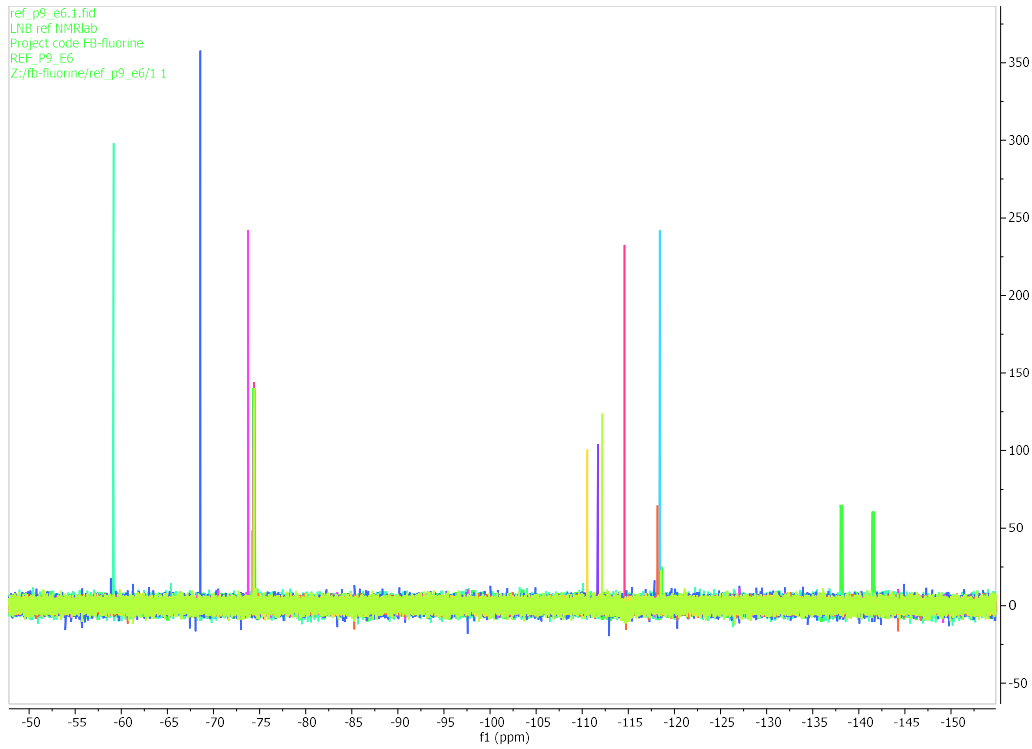
# Riferimenti Mix009:



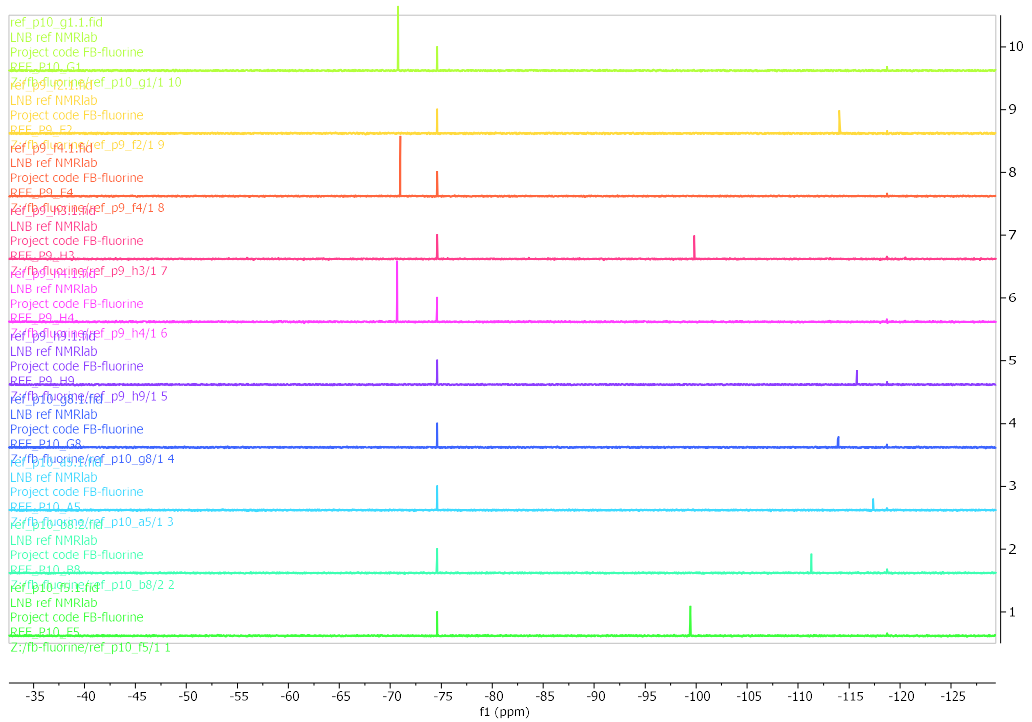
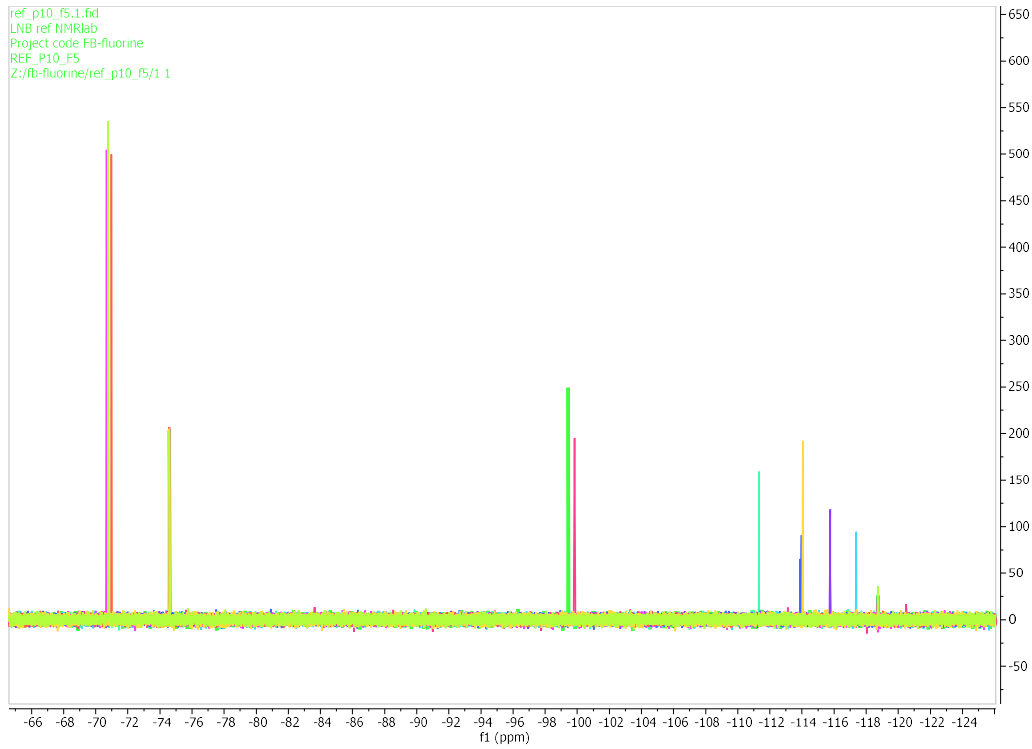
# Riferimento Mix010:



## Riferimento Mix011:

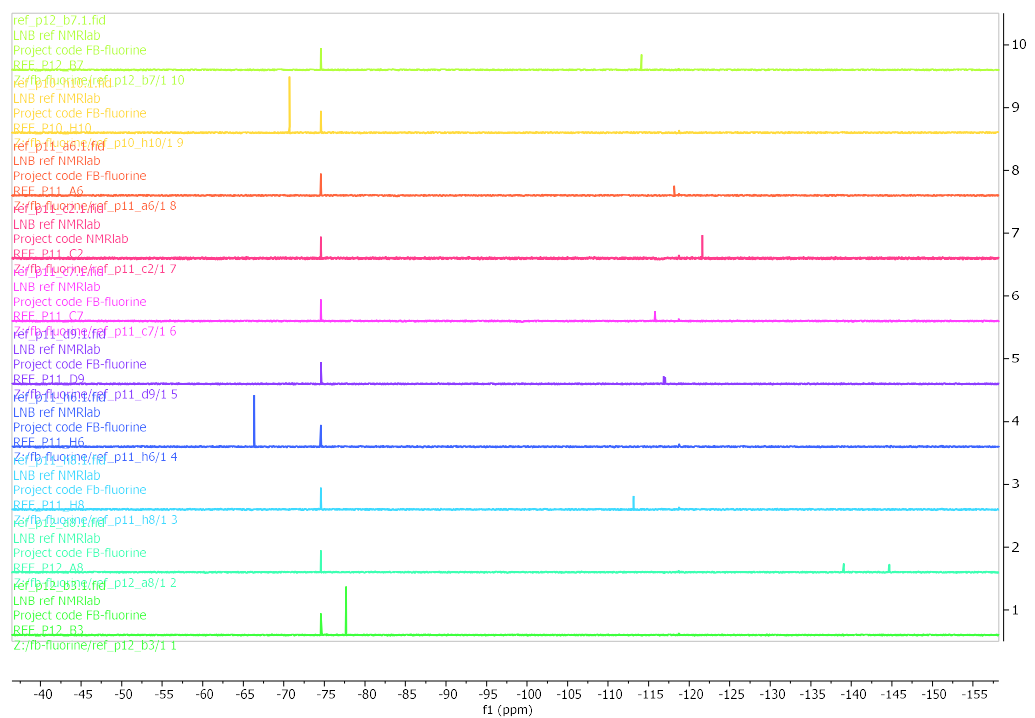
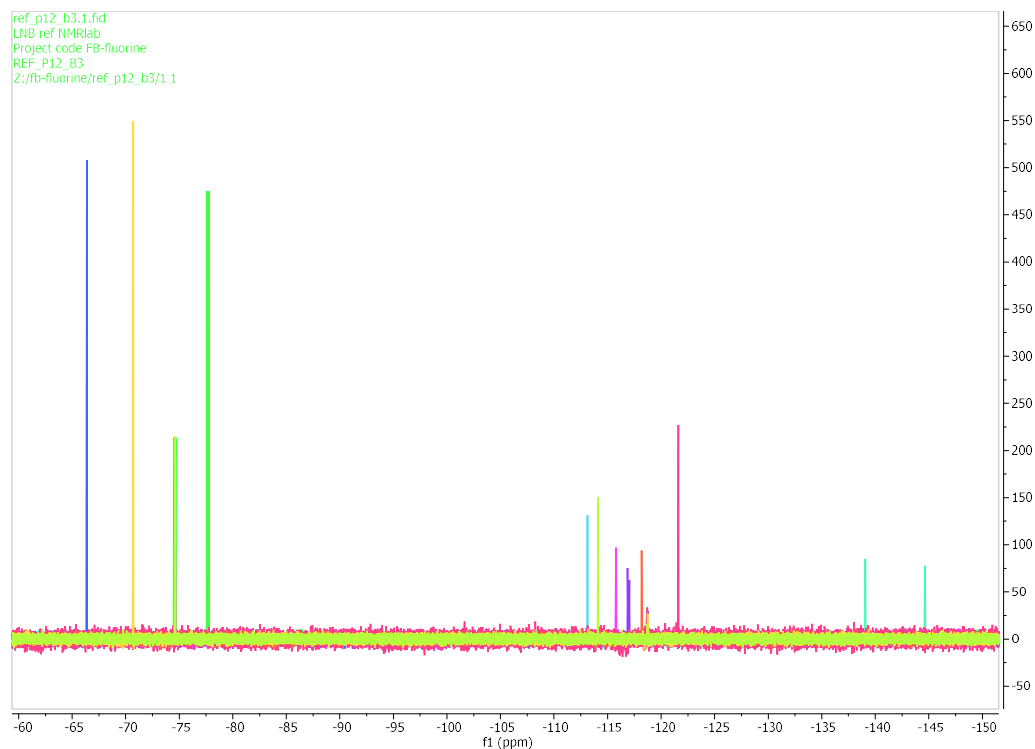


## Riferimento Mix012:

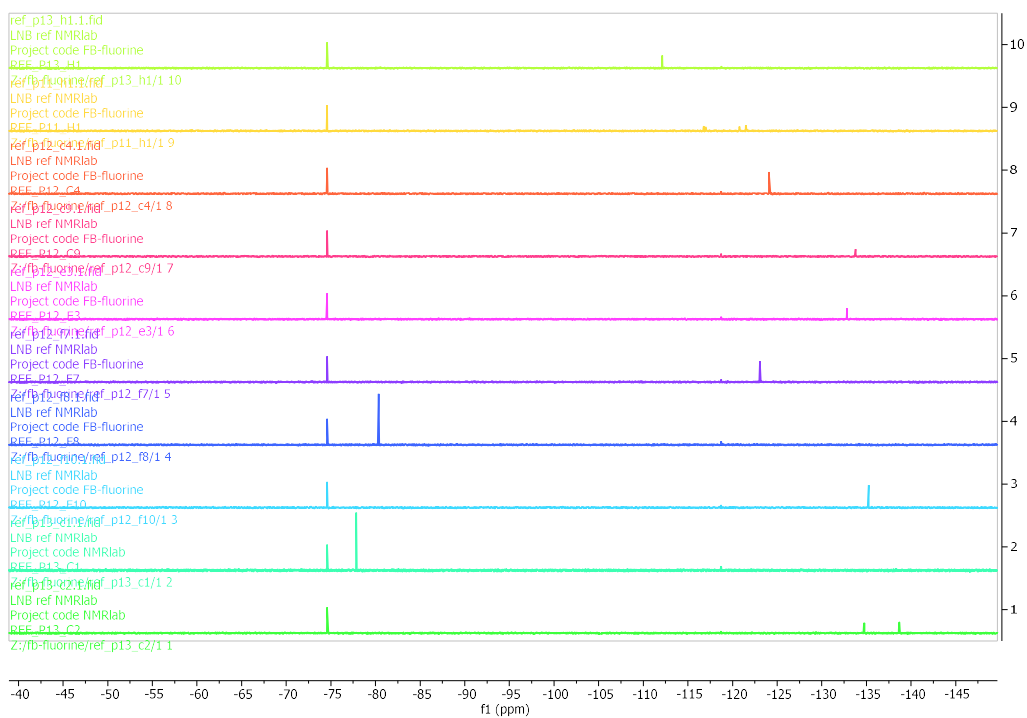
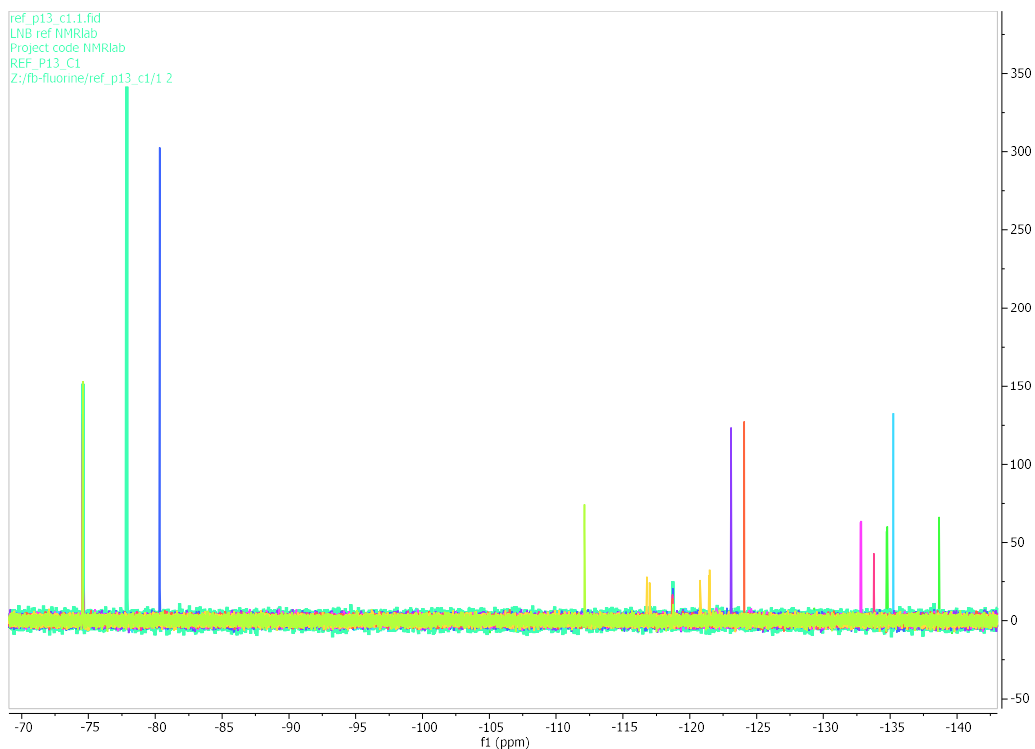




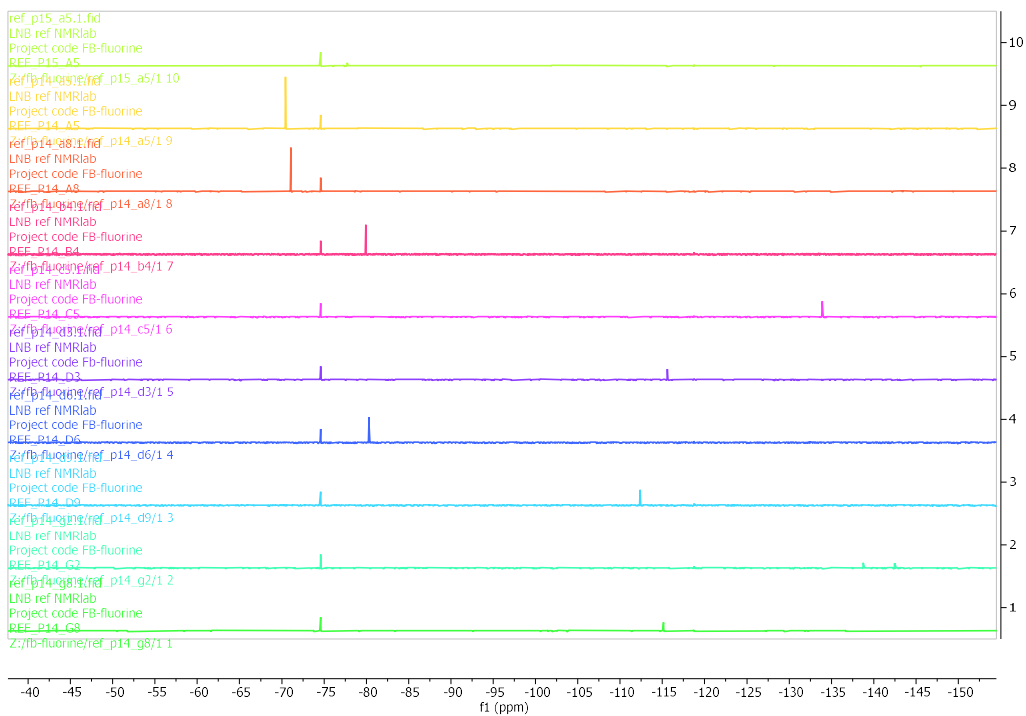
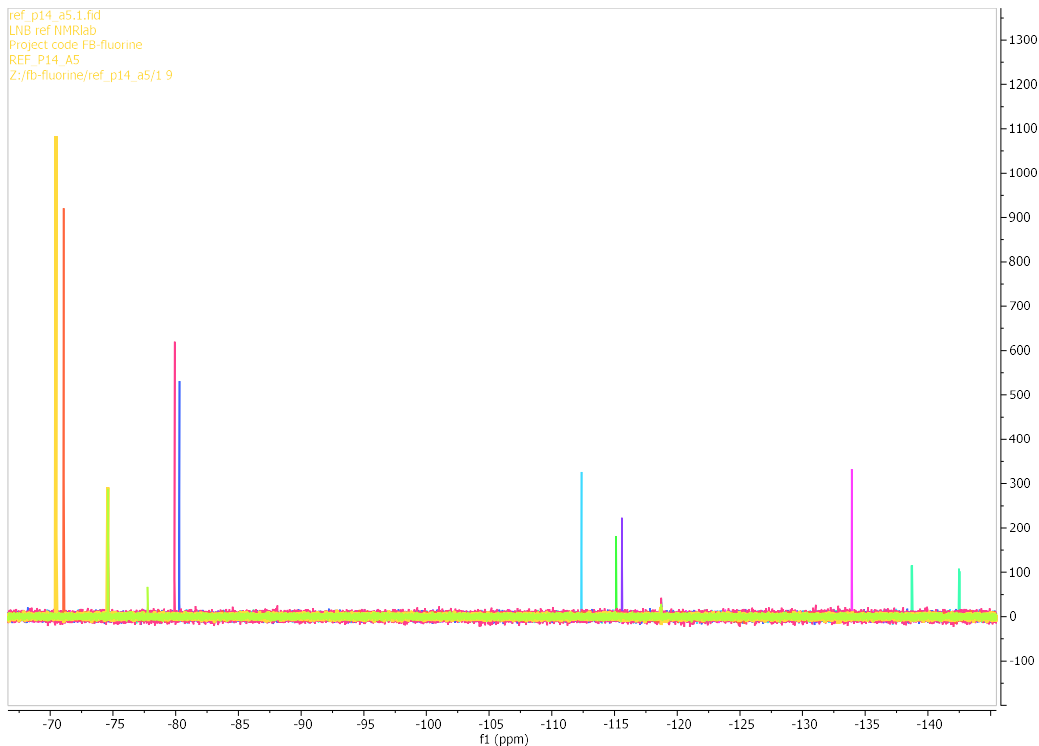
## Riferimento Mix013:



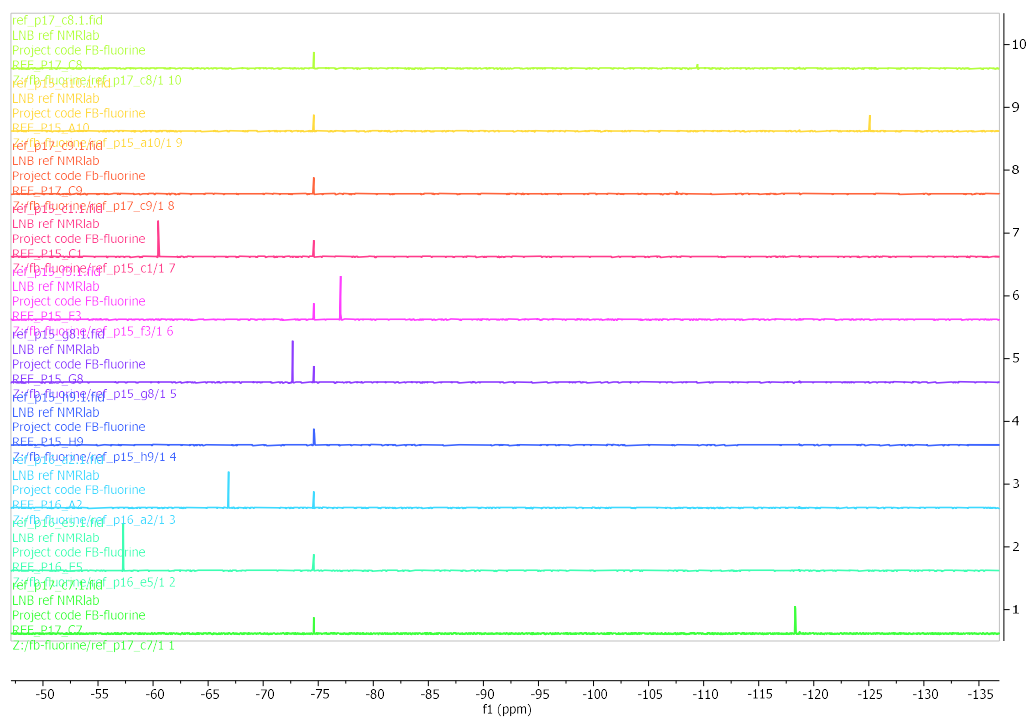
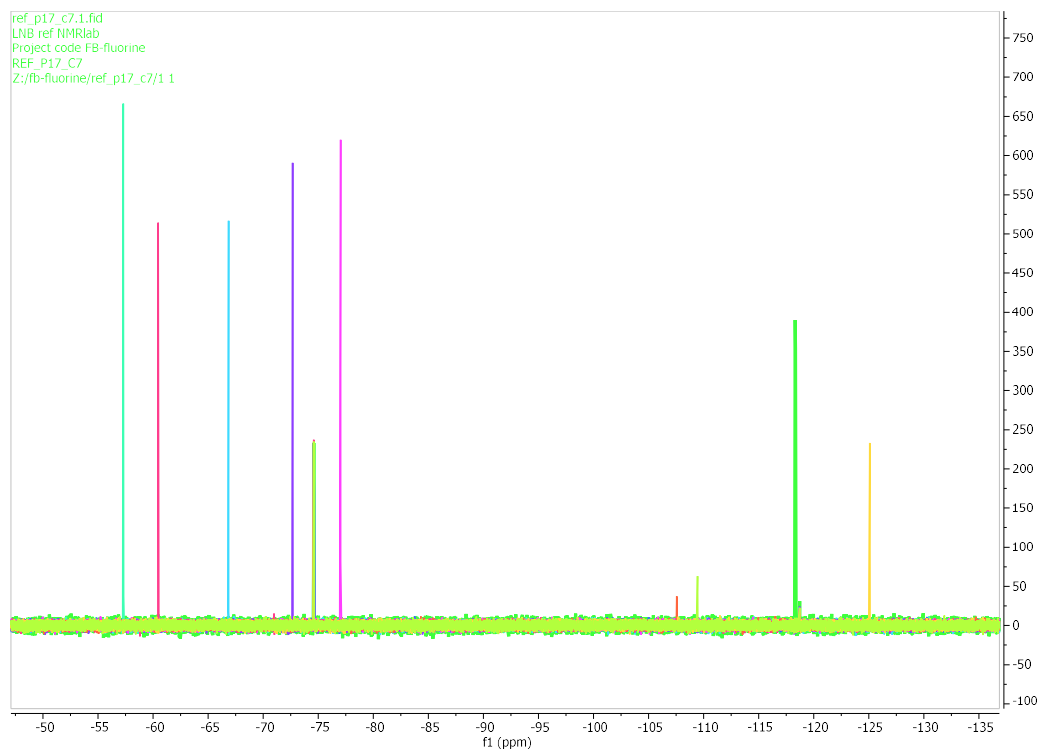
# Riferimento Mix014:



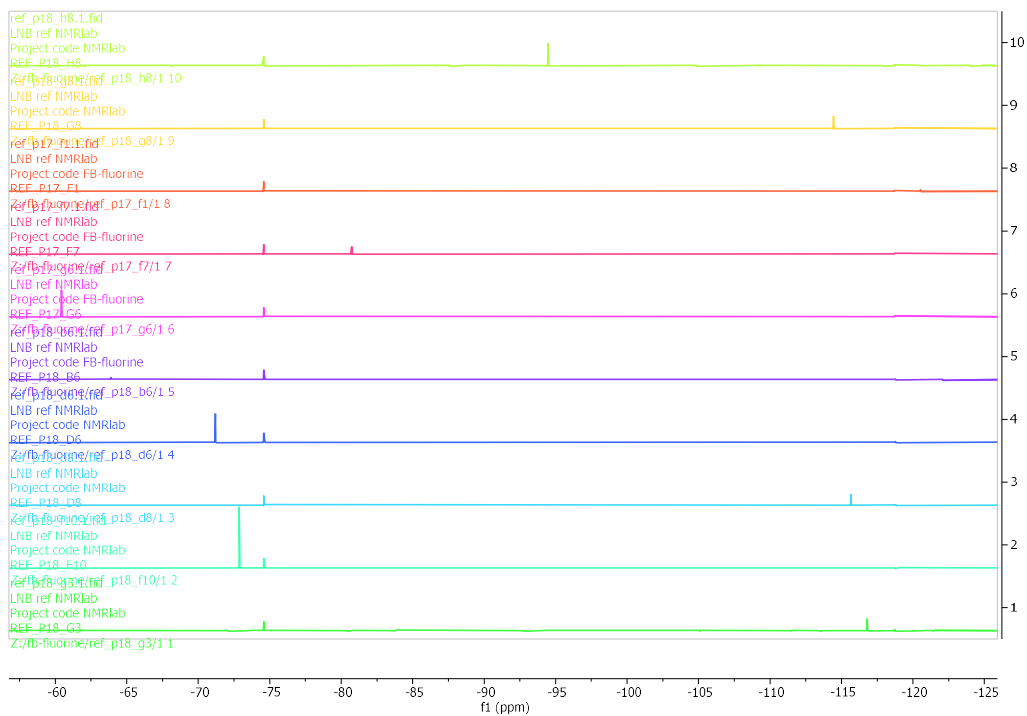
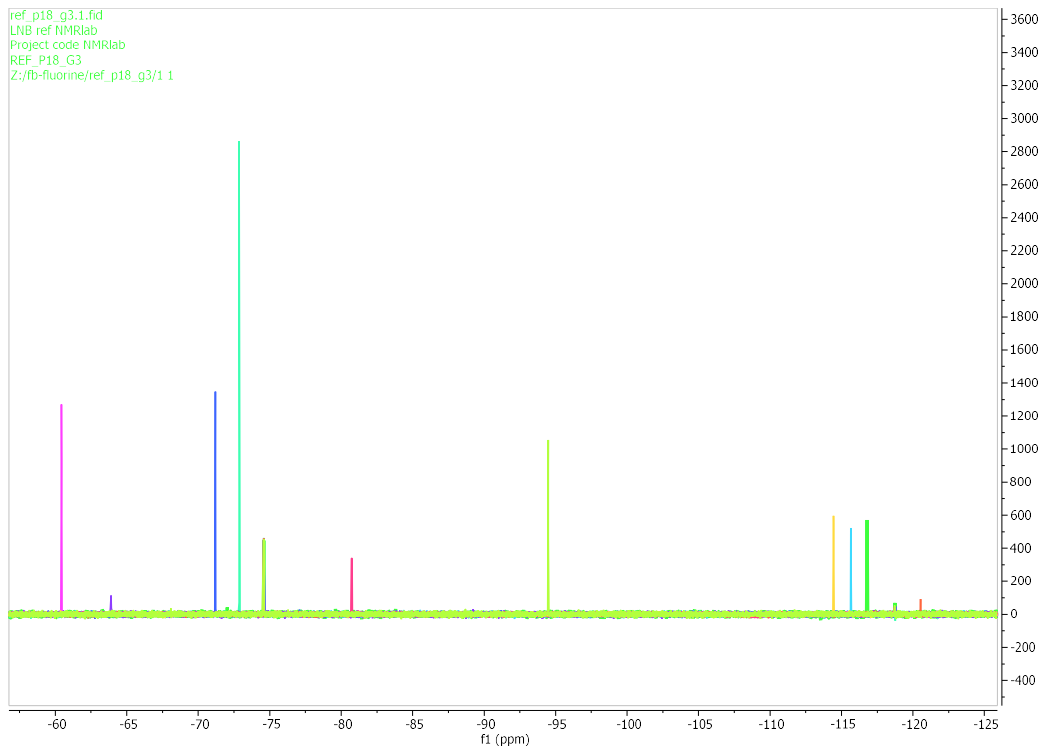
# Riferimento Mix015:



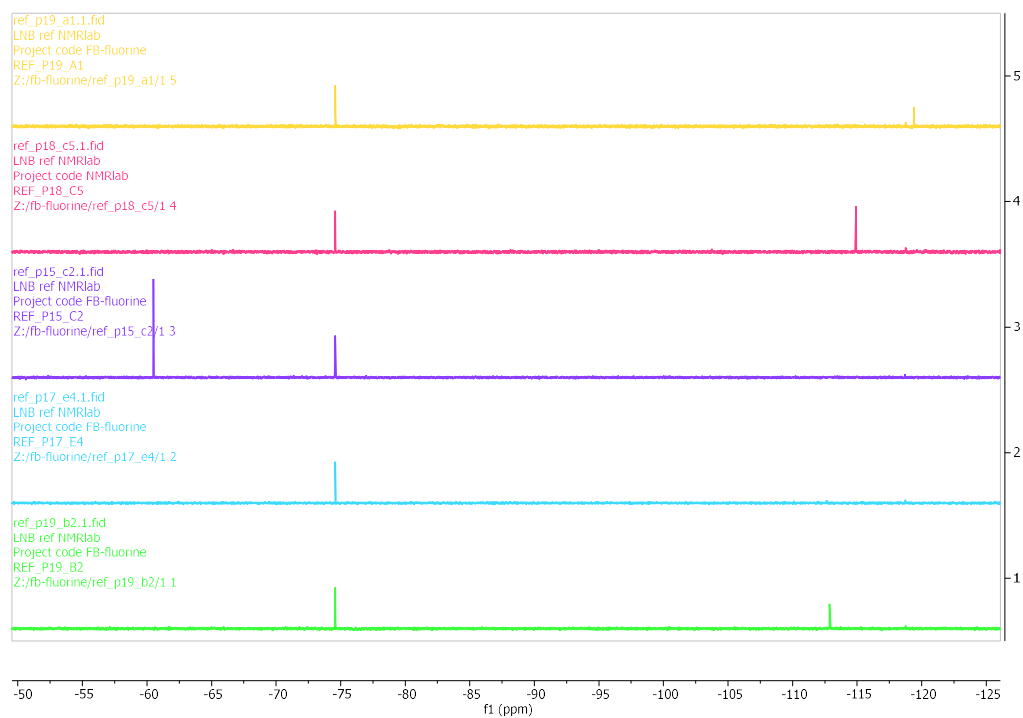
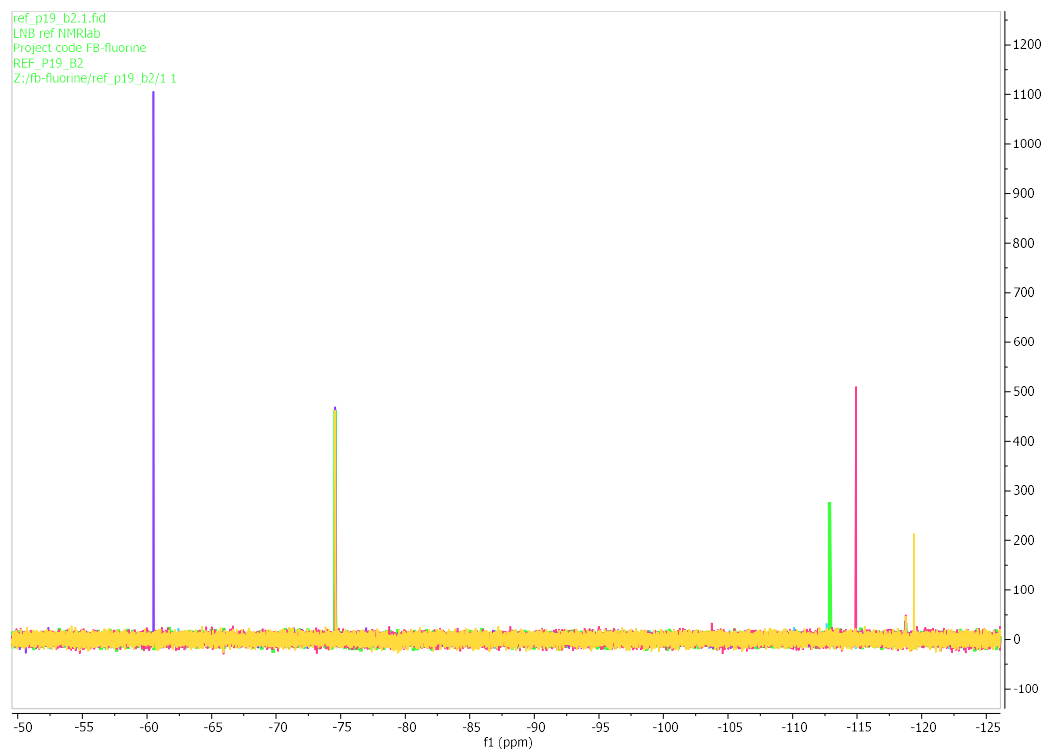
## Riferimento Mix016:



# Riferimento Mix017:



## Riferimento Mix018:





## 8 BIBLIOGRAFIA

- (1) *Amaldi, F. (2014). Biologia Molecolare. Casa Editrice Ambrosiana.*
- (2) P.F. CHinnery, E. A. (2003). Mitochondria.
- (3) Whitehouse, D. G. (2019). Respiratory Chain and ATP Synthase. Reference Module in Biomedical Sciences, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.95732-5>.
- (4) Dittrich M, Hayashi S, Schulten K. On the Mechanism of ATP Hydrolysis in F1-ATPase. *Biophys J.* 2003 Oct;85(4):2253-66. Doi: 10.1016/S0006-3495(03)74650-5. PMID: 14507690; PMCID: PMC1303451.
- (5) Masamitsu Futai, Mayumi Nakanishi-Matsui, Haruko Okamoto, Mizuki Sekiya, Robert K. Nakamoto, Rotational Catalysis in Proton Pumping ATPases: From E. Coli F-ATPase to Mammalian V-ATPase, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.*
- (6) Angelo Vianello, V. C. (2012). The Mitochondrial Permeability Transition Pore (PTP) — An Example of Multiple Molecular Exaptation? Elsevier, 15.
- (7) S. Desagher, J. M. (2000). Mitochondria as the Central Control Point of Apoptosis. *Trends Cell Biology*, 369-377.
- (8) Skulachev, V. P. (2006). Bioenergetic Aspects of Apoptosis, Necrosis and Mitoptosis. *Apoptosis*, 473-485.
- (9) J.L. Vayssie@re, P.X. Petit, Y. Risler, B. Mignotte, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 11752^11756.
- (10) P.X. Petit, H. LecEur, E. Zorn, C. Dauguet, B. Mignotte, M.L. Gougeon, *J. Cell Biol.* 130 (1995) 157^167.
- (11) N. Zamzami, P. Marchetti, M. Castedo, C. Zanin, J.L. Vayssie@re, P.X. Petit, G. Kroemer, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1661^1672.
- (12) S.A. Thayer, G.J. Wang, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 22 (1995) 303^304.
- (13) R.J. Miller, *Trends Neurosci.* 21 (1998) 95^96.
- (14) R.J. White, I.J. Reynolds, *J. Neurosci.* 16 (1996) 5688^5697.
- (15) A.F. Schinder, E.C. Olson, N.C. Spitzer, M. Montal, *J. Neurosci.* 16 (1996) 6125^6133.
- (16) M. Ankarcona, J.M. Dypbukt, S. Orrenius, P. Nicotera, *FEBS Lett.* 394 (1996) 321^324.
- (17) A.L. Nieminen, T.G. Petrie, J.J. Lemasters, W.R. Selman, *Neuroscience* 75 (1996) 993^997.
- (18) D.M. Hockenberry, Z.N. Oltvai, X.-M. Yin, C.L. Milliman, S.J. Korsmeyer, *Cell* 75 (1993) 241^251.
- (19) D.M. Hockenberry, G. Nunez, C.L. Milliman, R.D. Schreiber, S.J. Korsmeyer, *Nature* 348 (1990) 334^338.
- (20) A. Moodie, R.C. Murphy, R. Song, P. Fox, M.L. Campo, D. Lawrence, E. Schneider, K.W. Kinnally, (1998) Lecture at the 42nd Biophysical Meeting, Kansas City, KS, Feb. 1998.
- (21) Y. Wang, W. Jia, M. Cynader, *Neuroreport* 8 (1997) 3323^3326.
- (22) G. Bajy, T. Miyashita, J.R. Williamson, J.C. Reed, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6511^6519.



- (23) J.H. Prehn, V.P. Bindokas, J. Jordan, M.F. Galindo, G.D. Ghadge, R.P. Roos, L.H. Boise, C.B. Thompson, S. Krajewski, J.C. Reed, R.J. Miller, *Mol. Pharmacol.* 49 (1996) 319-328.
- (24) Amanakis G, Murphy E. Cyclophilin D: An Integrator of Mitochondrial Function. *Front Physiol.* 2020 Jun 17;11:595. Doi: 10.3389/Fphys.2020.00595. PMID: 32625108; PMCID: PMC7311779.
- (25) Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP Translocator Is Not Essential for the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *Nature.* 2004 Jan 29;427(6973):461-5. Doi: 10.1038/Nature02229. PMID: 14749836; PMCID: PMC3049806.
- (26) Woodfield K, Rück A, Brdiczka D, Halestrap AP. Direct Demonstration of a Specific Interaction between Cyclophilin-D and the Adenine Nucleotide Translocase Confirms Their Role in the Mitochondrial Permeability Transition. *Biochem J.* 1998 Dec 1;336 ( Pt 2)(Pt 2):287-90. Doi: 10.1042/Bj3360287. PMID: 9820802; PMCID: PMC1219869.
- (27) Crompton M, Virji S, Ward JM. Cyclophilin-D Binds Strongly to Complexes of the Voltage-Dependent Anion Channel and the Adenine Nucleotide Translocase to Form the Permeability Transition Pore. *Eur J Biochem.* 1998 Dec 1;258(2):729-35. Doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2580729.x. PMID: 9874241.
- (28) Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163. Doi: 10.1152/Physrev.00013.2006. PMID: 17237344.
- (29) Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ, Molkenin JD. Voltage-Dependent Anion Channels Are Dispensable for Mitochondrial-Dependent Cell Death. *Nat Cell Biol.* 2007 May;9(5):550-5. Doi: 10.1038/Ncb1575. Epub 2007 Apr 8. PMID: 17417626; PMCID: PMC2680246.
- (30) Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G. Cyclophilin D Modulates Mitochondrial F0F1-ATP Synthase by Interacting with the Lateral Stalk of the Complex. *J Biol Chem.* 2009 Dec 4;284(49):33982-8. Doi: 10.1074/Jbc.M109.020115. Epub 2009 Sep 29. PMID: 19801635; PMCID: PMC2797168.
- (31) Bonora M, Bononi A, De Marchi E, Giorgi C, Lebedzinska M, Marchi S, Patergnani S, Rimessi A, Suski JM, Wojtala A, Wieckowski MR, Kroemer G, Galluzzi L, Pinton P. Role of the c Subunit of the FO ATP Synthase in Mitochondrial Permeability Transition. *Cell Cycle.* 2013 Feb 15;12(4):674-83. Doi: 10.4161/Cc.23599. Epub 2013 Jan 23. PMID: 23343770; PMCID: PMC3594268.
- (32) Chinopoulos C, Konrad C, Kiss G, Metelkin E, Töröcsik B, Zhang SF, Starkov AA. Modulation of F0F1-ATP Synthase Activity by Cyclophilin D Regulates Matrix Adenine Nucleotide Levels. *FEBS J.* 2011 Apr;278(7):1112-25. Doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08026.x. Epub 2011 Feb 23. PMID: 21281446; PMCID: PMC3062657.
- (33) McGee AM, Baines CP. Phosphate Is Not an Absolute Requirement for the Inhibitory Effects of Cyclosporin A or Cyclophilin D Deletion on Mitochondrial Permeability Transition. *Biochem J.* 2012 Apr 1;443(1):185-91. Doi: 10.1042/BJ20111881. PMID: 22236255; PMCID: PMC3508683.

- (34) Bon M, Bilsland A, Bower J, McAulay K. Fragment-Based Drug Discovery-the Importance of High-Quality Molecule Libraries. *Mol Oncol.* 2022 Nov;16(21):3761-3777. Doi: 10.1002/1878-0261.13277. Epub 2022 Jul 10. PMID: 35749608; PMCID: PMC9627785.
- (35) Roya Koshani, Seid Mahdi Jafari, Theo G.M. van de Ven, Going Deep inside Bioactive-Loaded Nanocarriers through Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 101, 2020, **2020**.
- (36) Kopfermann H. (1958) Chapter IV—Nuclear Moments and Nuclear Models. In: *Pure and Applied Physics*, Vol. 2, Elsevier, Pp. 380 458.
- (37) Robert M. Silverstein; Francis X. Webster; David J. Kiemle. *Silverstein - Spectrometric Identification of Organic Compounds 7th Ed.*
- (38) Butler, E. *AVANCE AV Beginners Guide Version.*