

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CHIMICHE
DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA IN CHIMICA INDUSTRIALE

TESI DI LAUREA

**CARATTERIZZAZIONE DEL MECCANISMO D'AZIONE
DI DERIVATI BIFENILICI AD ATTIVITÀ ANTITUMORALE TRAMITE
METODI COMPUTAZIONALI**

RELATORE: PROF. STEFANO MORO

LAUREANDA: ZERBATO ASYA

MATRICOLA: 1225358

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	pag 3
1. Capitolo 1: INTRODUZIONE	pag 4
1.1 Il tumore: definizione.....	pag 4
1.2 Chinasi: generalità.....	pag 4
1.3 Ligando: GV39.....	pag 5
2. Capitolo 2: TARGET	pag 6
2.1 Generalità e patologie legate ai target attivi.....	pag 6
2.2 Riassumendo.....	pag 9
2.3 Razionalizzazione dell'alta attività dei target tramite docking	pag 9
3. Capitolo 3: CONFRONTO ISOFORME DI UNA STESSA FAMIGLIA	pag13
3.1 famiglia JNK.....	pag 13
3.2 famiglia GRK.....	pag 15
3.3 famiglia TAOK.....	pag 21
4. Materiali e metodi	pag 23
4.1 Preparazione delle proteine	pag 23
4.2 Preparazione del ligando.....	pag 23
4.3 Alphafold.....	pag 24
4.4 Ligand Based Homology Modelling.....	pag 24
4.5 Docking.....	pag 25
5. Bibliografia	pag 27

Abstract

Il lavoro di tesi svolto nasce dalla collaborazione tra tre gruppi di ricerca: il laboratorio Molecular Modeling Section (MMS) dell'Università di Padova, diretto dal professor Stefano Moro, il laboratorio di sintesi organica del professor Giampiero Spalluto presso il Dipartimento di Scienze Chimiche dell'Università di Trieste e il laboratorio di oncoematologia del professor Giampietro Viola presso il Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino dell'Università di Padova.

La collaborazione scientifica tra questi tre laboratori nasce nell'ottica di riposizionare alcuni composti inizialmente ideati come inibitori di chinasi coinvolte in patologie neurodegenerative quali CK1 δ e GSK3 β come antitumorali. In particolar modo, nel corso di una serie di saggi su diverse linee di cellule tumorali effettuati presso il laboratorio di oncoematologia del professor Viola, è emerso come un composto noto come GV39 sia dotato di una potente attività antitumorale ad ampio spettro.

Al fine di caratterizzare il meccanismo d'azione di questo composto, è stato effettuato dalla ditta DiscoverX un panel chinamico (KINOMEscanTM) in cui è stata valutata l'attività inibitoria alla concentrazione fissa di 1 μ M di GV39 contro 468 diverse chinasi. Dall'analisi del panel chinamico è emerso come GV39 abbia una forte attività inibitoria (attività residua a concentrazione fissa < 5%) nei confronti di sei differenti chinasi, come riportato nella Tabella 1.

target	GV39
Gene	%Ctrl 1000 nM
CAMK1B	0
GRK2	0.8
GRK4	4.6
JNK1	2.2
PAK3	1.4
TAOK2	0

Tabella 1: percentuale residua di attività enzimatica per le sei chinasi maggiormente inibite dal composto GV39, come determinato dal panel chinamico KINOMEscanTM effettuato dalla ditta DiscoverX.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è quello di razionalizzare il meccanismo molecolare per cui le chinasi riportate in Tabella 1 sono fortemente inibite dal ligando GV39, valutando la loro modalità di interazione con il target tramite l'utilizzo di metodi computazionali, valutando al contempo la selettività del composto nei confronti di specifiche isoforme enzimatiche. Il lavoro di questa tesi si configura pertanto come un lavoro di razionalizzazione strutturale dell'attività del ligando GV39 nei confronti di una serie di target appartenenti alla famiglia delle chinasi atto a spiegare la sua potente attività antitumorale ad ampio spettro rilevata nei saggi cellulari effettuati presso il laboratorio di oncoematologia del prof. Viola. I dati raccolti nel corso di questo lavoro di tesi serviranno a supportare il design razionale di nuovi candidati inibitori di chinasi ad attività antitumorale, nell'ambito della collaborazione scientifica già in atto tra i tre laboratori precedentemente nominati.

1. CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Il tumore: definizioneⁱ

Il cancro non può essere definito come una singola malattia in quanto comprende oltre 200 patologie tutte caratterizzate dalla proliferazione incontrollata delle cellule. In un corpo sano, le cellule crescono e si dividono in modo controllato e ordinato per sostituire quelle che sono invecchiate o sono state danneggiate e muoiono per apoptosi (morte programmata). Il cancro insorge nel momento in cui questi processi naturali vengono alterati da parte di alcune cellule maligne che ignorano il segnale del corpo di fermare la loro crescita a causa del danneggiamento del materiale genetico di una cellula, il DNA, da cui possono svilupparsi mutazioni che interrompono il normale ciclo di vita cellulare. Un accumulo di mutazioni può trasformare le cellule normali in cellule precancerose, che a volte si moltiplicano ed evolvono in cellule tumorali. Il cancro è

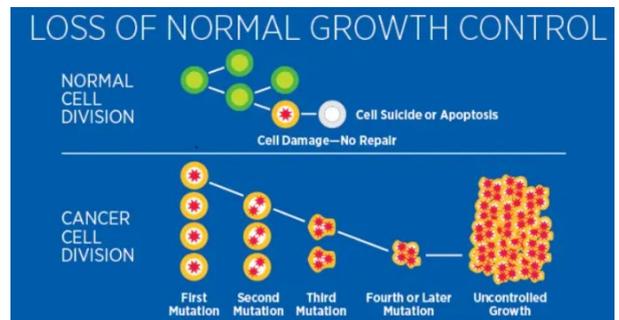


Figura 1: Rappresentazione della duplicazione cellulare in condizioni normali e dopo mutazioneⁱ

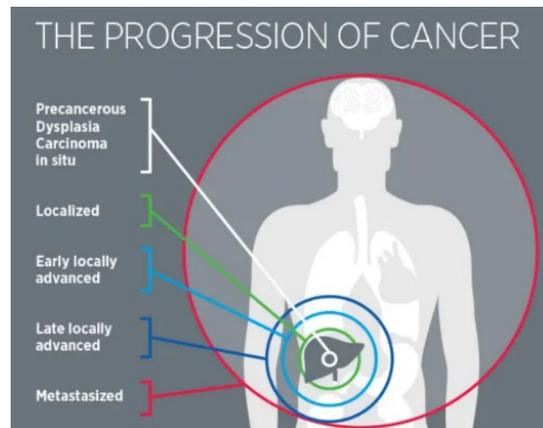


Figura 2: rappresentazione della progressione del cancro nei tessuti del corpo umano rispetto al centro di proliferazioneⁱ

il risultato dell'accumulo di queste cellule. Il cancro non è un evento, ma un processo che richiede tempo, spesso anni, per svilupparsi. La durata del tempo varia ampiamente e dipende dall'identità, dall'ordine e dalla velocità con cui si accumulano le mutazioni. I tumori possono avere inizio in qualsiasi tessuto dell'organismo e, a seconda del loro comportamento biologico, vengono divisi in due categorie:

- Tumore maligno o cancro: in grado di dare metastasi e molto invasivo;
- Tumore benigno: incapace di diffondersi e danneggiare i tessuti circostanti all'origine della mutazione.

1.2 Chinasi: generalità

Le protein-chinasi sono enzimi che regolano l'attività biologica delle proteine mediante la fosforilazione di amminoacidi specifici con ATP come fonte di fosfato, inducendo così un cambiamento conformazionale da una forma inattiva (apo) a una forma attiva della proteina (holo). Le chinasi rappresentano il gruppo più grande di enzimi presenti in natura: si tratta molto spesso di molecole con alta specificità di substrato ma strutturalmente molto simili per la presenza di un dominio a β -sheet e uno ad α -elica separati dalla regione cerniera (hinge) in corrispondenza della quale si ha interazione con il ligando. Si stima che il genoma umano sia in grado di codificare per circa 550 chinasi le quali presentano diverse isoforme.

La fosforilazione è un mezzo principale di trasduzione del segnale che si basa su due principi fondamentali. Il primo è la modifica post-traduzionale di proteine preesistenti tramite la fosforilazione, modifica proteica più comune in quanto usa ATP che è molto abbondante e perché reversibile. Il secondo è la produzione di nuove proteine o secondi messaggeri.ⁱⁱ

Gli organismi eucarioti possiedono due classi generali di protein-chinasi, quelle che trasferiscono il fosfato ai residui di serina e treonina e quelle che trasferiscono il fosfato ai residui di tirosina.

Dei 20 amminoacidi, solo serina, treonina e tirosina contengono il gruppo funzionale appropriato (frazione idrossile, OH) per accogliere la fosforilazione.

La fosforilazione da parte delle protein-chinasi è riconosciuta come un meccanismo critico mediante il quale viene regolata praticamente ogni attività delle cellule eucariotiche, inclusa la proliferazione, l'espressione genica, il metabolismo, la motilità, il trasporto di membrana e l'apoptosi.ⁱⁱⁱ

Un'alterata attività delle chinasi è stata riscontrata in diversi tipi di tumori, per questo motivo, esse sono importanti target per lo sviluppo di farmaci antitumorali.

1.3 Ligando GV39

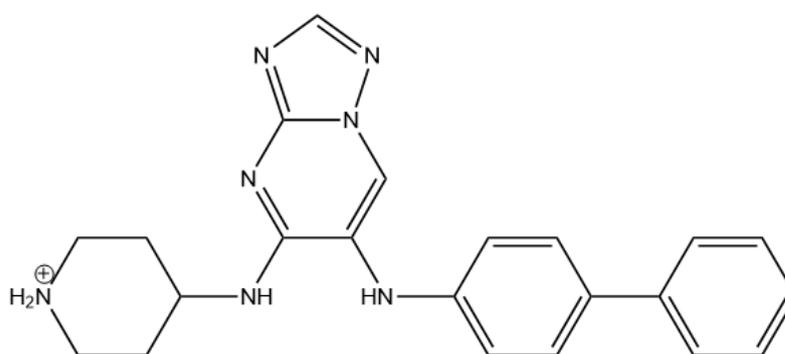


Figura 3: rappresentazione bidimensionale della struttura del ligando GV39 ottenuta utilizzando Chemdraw.

GV39 è l'inibitore di chinasi oggetto di questo lavoro di tesi. Esso è caratterizzato dalla presenza di un gruppo bifenile che rende tale parte di molecola apolare e dalla presenza di una zona polare grazie ai numerosi atomi di azoto presenti che possono fungere da donatori o accettori di legami a idrogeno. Questo ligando, inizialmente ideato assieme a una serie di analoghi strutturali come inibitore di chinasi coinvolte in patologie neurodegenerative tra cui CK1 δ e GSK3 β , presenta dei motivi strutturali simili a quelli di diversi inibitori di chinasi, ovvero un nucleo pseudo-adeninico in grado di occupare la regione più interna della tasca di legame, in corrispondenza della hinge region, dove è in grado di formare legami a idrogeno con il backbone degli amminoacidi che costituiscono la regione hinge oltre a interazioni idrofobiche con le porzioni alchiliche delle catene laterali presenti nel binding pocket. Caratteristica peculiare di GV39 è la presenza di un gruppo bifenile, che risulta essere presente anche nei composti a esso analoghi aventi attività antitumorale nei saggi cellulari effettuati su varie linee di cellule tumorali.

Capitolo 2: TARGET

2.1 Generalità e patologie legate ai target attivi

CAMK1 β (calcium-calmodulin-dependent protein kinase type 1B, uniprot: Q6P2M8):

Le CAMK sono delle serina/treonina chinasi, le quali vengono attivate con l'aumento della concentrazione intracellulare di calcio e sono in grado di mediarne la successiva attività cellulare.

La CAMK in esame è una delle forme isomeriche possibili, la sua funzione è quella di rispondere agli ormoni e ai neurotrasmettitori e di regolarne l'attività cellulare per fosforilazione. Tale chinasi risulta inoltre coinvolta in molteplici funzioni cellulari, tra cui la formazione del legame con ATP, la trasduzione del segnale, lo sviluppo e la differenziazione cellulare.^{iv} Si è vista un'ulteriore implicazione delle CAMKs nel LTP (fenomeno di plasticità sinaptica) che consiste in un aumento a lungo termine della trasmissione del segnale tra due neuroni, ottenuto stimolandoli in modo sincrono, che migliora la capacità di uno stimolo di produrre l'attivazione cellulare.^v

La presenza della CAMK β può essere rilevata immunistochemicalmente, tecnica analitica che viene eseguita sui tessuti per valutare l'espressione delle cellule che li compongono mediante l'utilizzo di anticorpi specifici che le vanno a legare. Tale pratica viene utilizzata spesso in oncologia in quanto utile alla determinazione di tessuti neoplastici cioè caratterizzati da una proliferazione incontrollata e con mutazioni del DNA. È stata confermata l'immunoreattività citoplasmatica da parte di CAMK1 β in molti tessuti colpiti da cancro al pancreas dove vi erano valori elevati della sua espressione; infatti, essa è in grado di regolare la crescita cellulare e la sua funzione può variare nei tumori maligni.^{vi}

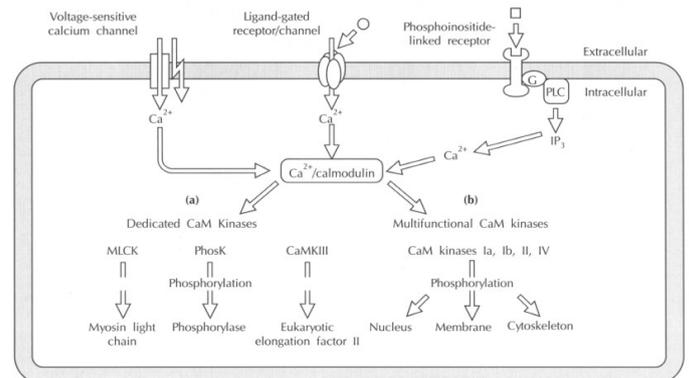


Figura 4: CAMKs mediano molti segnali di trasduzione. (b) CAMK1 β viene attivata da tali segnali e risponde fosforilando molti substrati a livello del nucleo, del citoscheletro, delle membrane e del citosol.

GRK2 (β -adrenergic receptor kinase 1, uniprot: P25098): è un enzima che ha un ruolo chiave nella regolazione della funzione di recettori accoppiati alla proteina G (GPCR). I GPCR in risposta ad uno stimolo attivano le proteine G e per disattivare tale risposta i recettori attivi devono essere desensibilizzati. Tale processo può essere eseguito per fosforilazione della forma occupata dagli agonisti dei recettori β -adrenergici da parte di GRK, la quale induce una loro desensibilizzazione e prepara il recettore attivato per il legame con l'arrestina (GPCR- β -arrestina), gruppo di proteine che regolano la trasduzione del segnale ai recettori accoppiati alla proteina G, inibendo ulteriori interazioni con le proteine G. GRK2 risulta essere distribuita in modo omogeneo in tutti i tessuti così come GRK3,5 e 6. Ciò che permette una loro distinzione è la porzione carbossi-terminale che è estremamente variabile.^{vii}

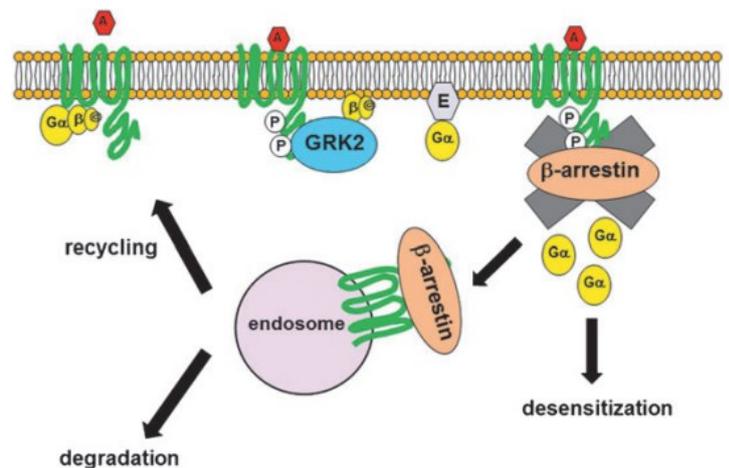


Figura 5: dopo la fosforilazione di GRK, la β -arrestina si lega al recettore ostacolando stericamente il legame tra il recettore e la proteina G conseguentemente desensibilizzando l'attivazione del GPCR.

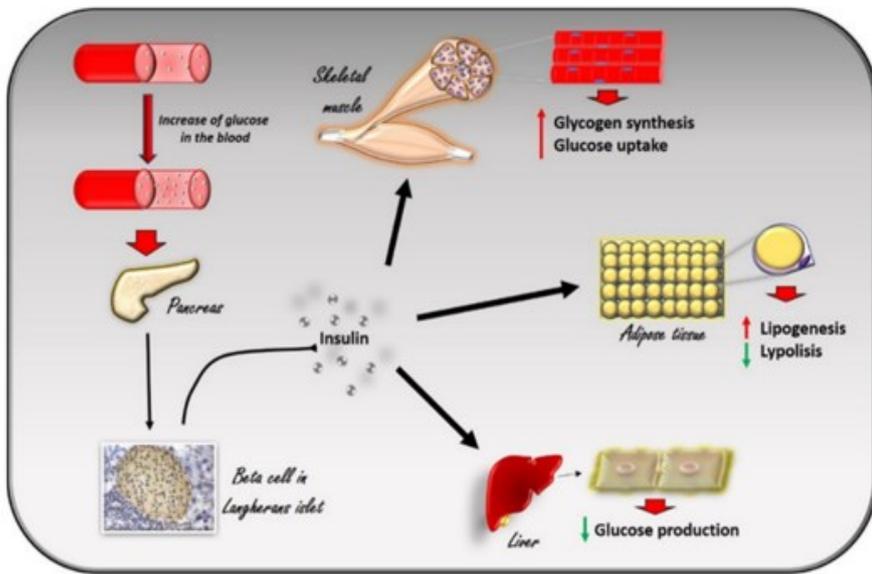


Figura 6: la risposta dell'insulina all'aumento della concentrazione di glucosio nel sangue. L'aumento di glucosio nel sangue stimola le cellule β nel pancreas per la produzione di insulina. La circolazione di insulina induce diversi effetti in diversi tessuti: nei muscoli scheletrici promuove il trasporto del glucosio e la sintesi del glicogeno. Nel tessuto adipocita promuove la deposizione dei TAG, inibisce la lipolisi e promuove l'assorbimento di glucosio e di acidi grassi. Nel fegato l'insulina promuove la sintesi di glicogeno e inibisce la gluconeogenesi.

Livelli di GRK2 elevati sono stati segnalati in molte situazioni patologiche rilevanti quali insufficienza cardiaca, ipertrofia cardiaca, scompenso cardiaco, steatosi epatica non alcolica e obesità.^{viii} Quest'ultima viene associata alla resistenza insulinica, situazione in cui vi è una riduzione di risposta nei confronti dell'insulina da parte di diversi tessuti e può evolvere in due tipi di diabete aumentando il rischio di malattie cardiovascolari che presentano funzionalità di GRK2 alterate.^{ix} Oltre che nelle malattie legate al funzionamento del sistema cardiovascolare modifiche di tale chinasi sono state registrate in pazienti con alcuni tipi di cancro in cui il dosaggio o l'attività anomala di GRK2 sembra contribuire alla progressione della malattia.^x

Come è possibile notare, GRK2 è implicata in diverse patologie e per questo vi sono molti studi per lo sviluppo di inibitori di tale chinasi, da utilizzare poi in potenziali strategie terapeutiche.

GRK4 (G protein-coupled receptor kinase 4, uniprot: P32298): è una chinasi altamente espressa nei testicoli e a livello minore nel cervello e nei reni. Si è notato un suo coinvolgimento nello sviluppo di ipertensione in quanto essa agisce attraverso i recettori della dopamina renale regolandone l'escrezione di sodio. L'ipertensione aumenta la possibilità nelle donne dell'insorgere del cancro al seno, infatti, l'espressione di GRK4 nel rene è regolata trascrizionalmente da un oncogene cMyc, gene che indirizza la cellula verso un fenotipo neoplastico, che viene amplificato nel cancro al seno. Una potenziale terapia potrebbe essere quella di silenziare tale oncogene il che abbatterebbe la formazione delle cellule tumorali ma l'espressione di GRK4 porterebbe a delle modificazioni cellulari per cui essa indurrebbe una proliferazione naturale di tessuti maligni. In sintesi, inibire in modo mirato GRK4 potrebbe essere una potenziale terapia sia per l'ipertensione che per il carcinoma mammario^{xi}.

Un'ulteriore conferma del suo coinvolgimento nel carcinoma mammario è evidenziata dalla scoperta del fatto che GRK4 è espressa nelle cellule coinvolte nel cancro mentre in quelle epiteliali mammarie benigne no.

JNK1 (mitogen-activated protein kinase 8, uniprot: P45983): è una delle isoforme possibili di JNK presente in tutte le cellule e nei tessuti. Essa viene attivata da segnali infiammatori, cambiamenti nei livelli di ossigeno, radiazioni ultraviolette, dalla presenza di inibitori della sintesi proteica e una varietà di stimoli di stress. JNK1 è in grado di regolare diverse importanti funzioni cellulari, tra cui la loro crescita, differenziazione, sopravvivenza e l'apoptosi (morte programmata). Un'alterazione di tale chinasi può portare a neurodegenerazione, proliferazione cellulare incontrollata, condizioni infiammatorie e, inoltre, può esercitare una funzione di sopravvivenza delle cellule tumorali evitandone l'apoptosi. Essa ha anche un effetto sull'autofagia cioè è in grado di riciclare componenti citoplasmatici danneggiati svolgendo un ruolo di protezione che è correlato alla resistenza chemioterapica, interessante per la ricerca in quanto il farmaco antitumorale andrà a colpire un certo tipo di chinasi e la maggior parte di esse verrà "uccisa" una volta colpita ma una piccola percentuale cercherà dei percorsi alternativi per resistere e procedere con la proliferazione e per questo è importante la ricerca di farmaci che siano in grado di inibire il più alto numero di chinasi possibili.^{xii}

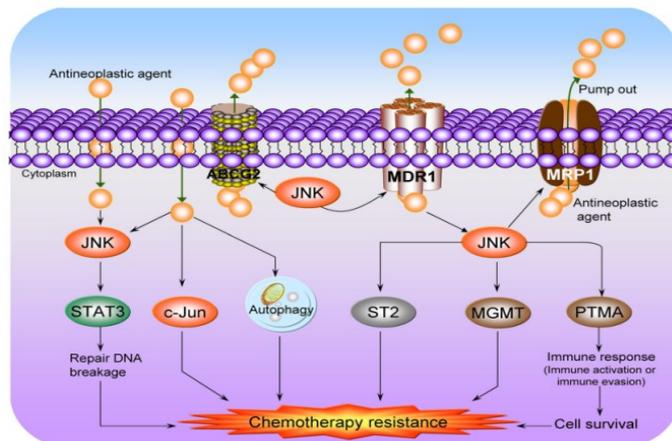


Figura 7: Meccanismo proposto della resistenza indotta da JNK alla chemioterapia. Agenti antineoplastici inducono l'attivazione di JNK e STAT3 nelle cellule tumorali per riparare il danno al DNA indotto dalla chemioterapia. L'attivazione mediata da JNK di ST2 e l'autofagia pro-survival facilitano la resistenza delle cellule tumorali alla chemioterapia. O6-Metilguanina DNA metiltransferasi (MGMT) e protimosina-alfa (PTMA) possono essere attivati da JNK per innescare risposte immunitarie e proteggere le cellule del cancro dalla morte cellulare indotta da agenti antineoplastici. JNK attiva le pompe di efflusso multifarmaco che legano l'ATP a ABCG2, MDR1 e MRP1 che sono proteine di resistenza multifarmaco per pompare i farmaci fuori dalle cellule e indurre resistenza alla chemioterapia.

PAK3 (p21-activated kinase 2, uniprot: O75914): è uno dei membri della famiglia PAK del gruppo di serina/treonina chinasi. PAK3 è espressa preferenzialmente nelle cellule neuronali ed è coinvolta nella formazione delle sinapsi, nel ritardo mentale e, essendo confinata nelle cellule oligodendritiche è un potenziale responsabile di tumore cerebrale.^{xiii} PAK3 regola, inoltre, l'espressione di transizione epiteliale mesenchimale (EMT) che gioca un ruolo importante nella migrazione e nella metastasi in quanto le cellule devono acquisire un carattere specifico per allontanarsi dalla massa tumorale e migrare grazie alla circolazione sanguigna in altri distretti corporei. Essa colpendo EMT è coinvolta nella proliferazione, nella metastasi e nell'invasione dell'HCC (carcinoma epatocellulare) e in quest'ultimo la concentrazione di PAK3 risulta essere direttamente correlabile allo stadio e al grado della malattia.^{xiv} Degli studi hanno notato una sua sovra-espressione nei tumori neuroendocrini/carcinoidi, nello sviluppo del tumore al fegato, del cancro gastrico e del pancreas anche se tali ricerche non sono state approfondite per evidenziare il ruolo di tale chinasi nell'evolversi di tali patologie.

TAOK2 (serine/threonine-protein kinase, uniprot: Q9UL54): è una chinasi serina/treonina proteica coinvolta in molti processi, tra cui nel rigonfiamento di membrana, nella formazione di corpi apoptotici in risposta ai danni del DNA e alla sintesi di MAPK attivata dallo stress, infatti, essa è in grado di interagire con MAPK14/p38, coinvolta nella proliferazione cellulare, tramite fosforilazione.

Utilizzando la spettrometria di massa si è riusciti ad identificare diversi bersagli di TAOK2. Essa fosforila direttamente la GTPasi citoscheletrica Septin7 e ne induce la traslocazione alla colonna vertebrale dove si associa e stabilizza una proteina promuovendo la maturazione della colonna dendritica le cui spine permettono un controllo sinaptico preciso.^{xv} Lo scarso livello di TAOK2 porta a protrusioni dendritiche instabili e a una cattiva localizzazione delle proteine postsinaptiche causando la formazione di sinapsi

direttamente sull'albero dendritico e con conseguente perdita di compartimentazione dell'afflusso di calcio, infatti, un'alterazione di tale chinasi porta a malattie coinvolte nello sviluppo neurologico e psichiatrico quali Alzheimer, autismo, schizofrenia e, nelle donne, un malfunzionamento a livello sinaptico potrebbe portare alla sindrome di Rett che è coinvolta nel deficit cognitivo.^{xvi}

2.2 Riassumendo

chinasi	funzione	patologia	chinasi	funzione	patologia
CAMK1B	risponde a ormoni e neurotrasmettitori	cancro al pancreas e plasticità sinaptica	JNK1	regola lo sviluppo, la differenziazione e l'apoptosi cellulare	neurodegenerazione, infiammazioni e sviluppo cellulare
GRK2	regola le funzioni del recettore accoppiato alla proteina G	malattie cardiovascolari e resistenza insulinica	PAK3	regola le transizioni epiteliali mesenchimali	tumore al fegato, gastrico, del pancreas e epatocellulare
GRK4	regola l'escrezione di sodio a livello renale	ipertensione e coinvolgimento nel cancro al seno	TAOK2	rigonfiamento di membrana, formazione di corpi apoptotici, sintesi di MAPK	malattie legate allo sviluppo neurologico e psichiatrico

2.3 Razionalizzazione dell'alta attività dei target tramite docking

CAMK1β

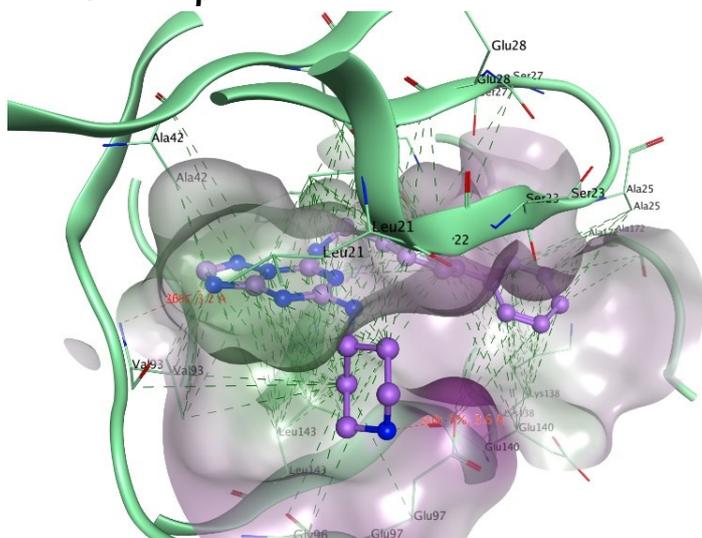


Figura 8: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi CAMK1B.

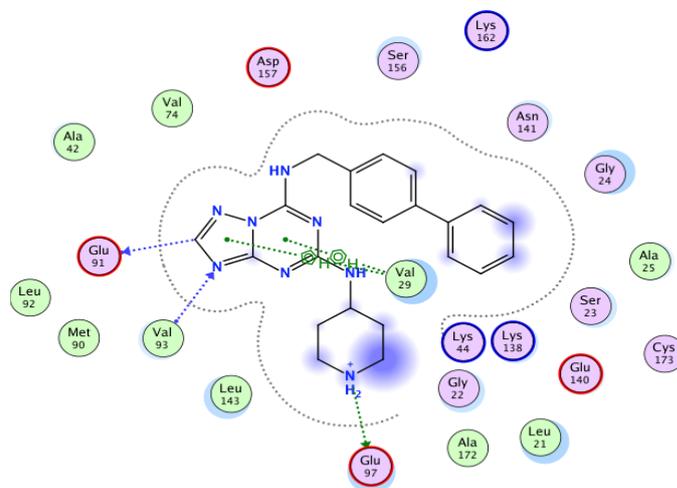


Figura 9: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi CAMK1B.

Per lo studio della “pose” di GV39 in CAMK1β è stato costruito il modello di omologia su CAMK1α che presenta il 95% di identità amminoacidica nel sito attivo e di cui era disponibile una struttura cristallografica (4FG8) contenente un ligando co-cristallizzato all'interno, al contrario della chinasi in esame di cui erano disponibili soltanto modelli di *alphafold* in forma “apo” e di cui si era potuta notare una notevole chiusura della tasca in corrispondenza del sito attivo, per cui il sistema non sarebbe stato rappresentativo per quanto riguarda la modalità di interazione. Come è possibile notare, osservando le immagini soprariportate, GV39 è in grado di interagire con la hinge della chinasi tramite l'azoto che in tal caso funge da accettore di legame a idrogeno con la valina 93 e vi è un'ulteriore interazione con il glutammato 91. Il bifenile occupa la zona che normalmente viene occupata da gruppi fosfato, dal confronto con altre strutture presenti nel PDB con ligandi co-cristallizzati, mentre in altre strutture esso

si sostituisce all'acqua che alle volte può portare ad un guadagno energetico in termini di binding ma dipende fortemente dall'intorno chimico dell'acqua. Un'ulteriore informazione ricavabile dalle immagini è l'esposizione al solvente della piperidina carica positivamente la quale è in grado di mediare legami a idrogeno e stabilizzare ulteriormente il ligando all'interno della tasca, tale stabilizzazione è molto forte grazie anche alle numerose interazioni idrofobiche presenti.

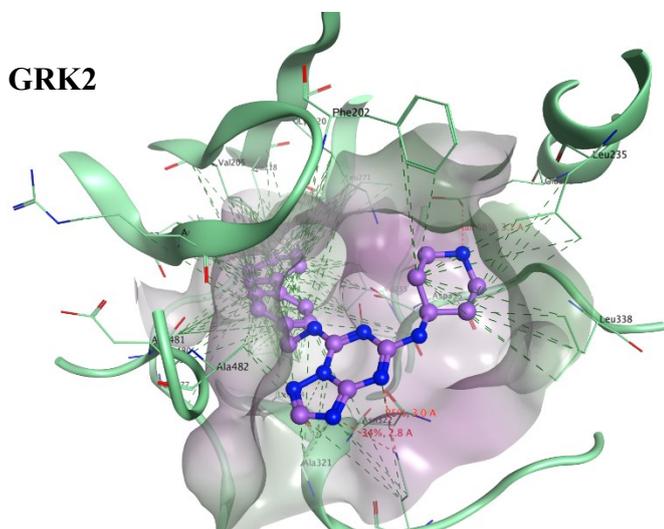


Figura 10: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi **GRK2**.

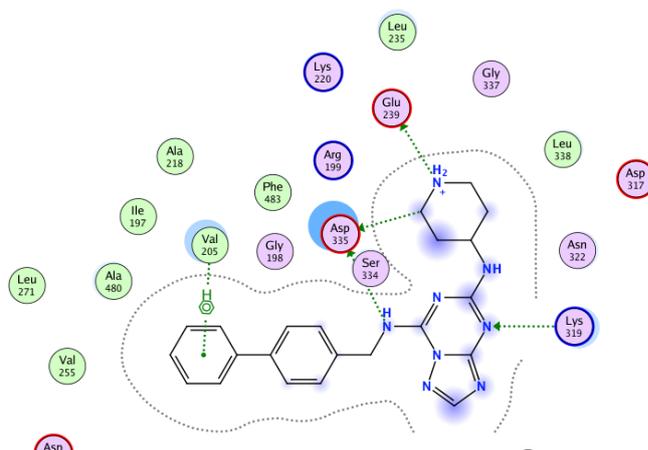


Figura 11: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi **GRK2**.

Di tale chinasi sono disponibili numerose strutture nel PDB per cui è stato possibile utilizzare una struttura (3V5W) con ligando co-cristallizzato per effettuare il docking. Dall'immagine con la "pose" selezionata è possibile notare che verso la hinge della chinasi è presente il bifenile che si estende lungo la tasca, il quale non è in grado di formare legami a idrogeno ma presenta molte interazioni idrofobiche, il che è coerente con l'intorno della tasca che presenta numerosi amminoacidi con catene laterali apolari come valina e leucina. L'anello della piperidina media un'interazione con l'aspartato 335 e con glutammato 239 mentre il nucleo pseudo adeninico, essendo un nucleo aromatico idrofobico, si posiziona nella tasca idrofobica formata dalle catene laterali di valina, fenilalanina e lisina con le quali vi sono interazioni a corto raggio. Dal confronto con la pose del ligando nel PDB non si vede una sovrapposizione perfetta ma migliore rispetto al ligando co-cristallizzato in quanto le interazioni aumentano e il bifenile va a sostituire il benzene per cui la superficie di contatto aumenta.

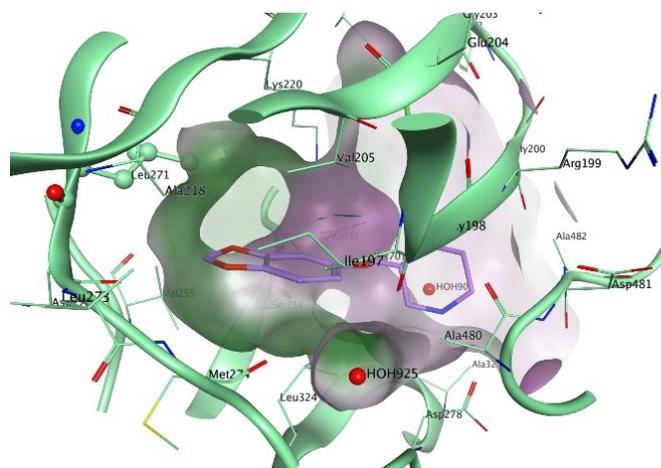


Figura 12: struttura di **GRK2** presa dal PDB 3V5W con paroxetina come ligando co-cristallizzato.

La "pose" in questione è definibile anticonvenzionale perché non vi sono legami a idrogeno con la hinge della chinasi ma ciò è giustificabile in quanto si sono prese tutte le strutture presenti nel PDB con ligando co-cristallizzato e si sono sovrapposte per verificare se esse interagissero o meno con la hinge e, in effetti, tali legami non erano presenti in nessun cristallo. Quest'operazione ha permesso di razionalizzare il fatto che la chinasi è predisposta all'esposizione della hinge verso la zona del ligando aromatica e planare ma non che essa sia necessariamente in grado di formare legami a idrogeno.

GRK4

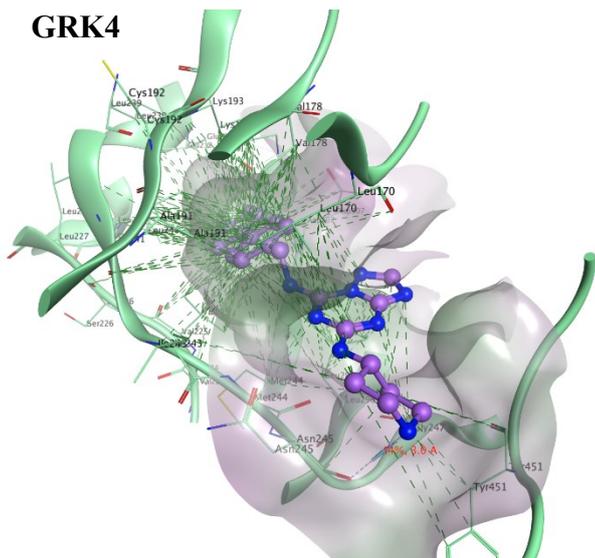


Figura 13: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi GRK4.

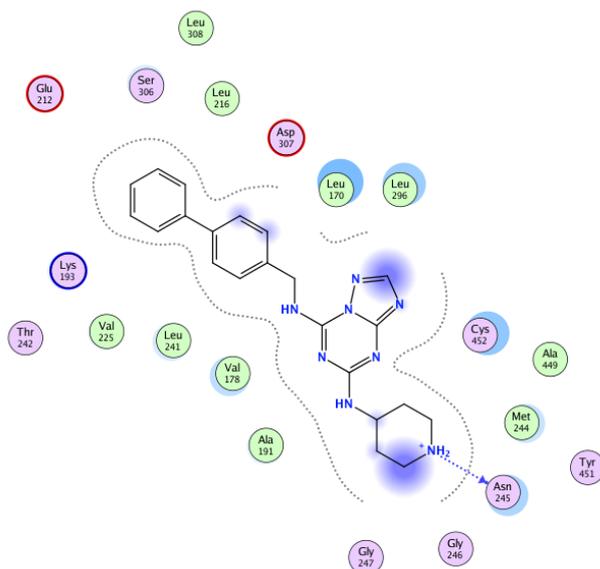


Figura 14: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi GRK4.

Tale chinasi ha una sola struttura nel PDB su cui si è effettuato il docking ma la sovrapposizione tra la pose di GRK4 e GRK2 mostra notevoli differenze anche se ci si aspetta una binding mode simile tra le due in quanto appartenenti alla stessa famiglia. La tasca di GRK4 risulta essere più chiusa per la presenza di numerosi residui flessibili che ingombrano la tasca per cui si è eseguito il *ligand based homology modelling* tenendo in considerazione la “pose” selezionata su GRK2 per aumentare il volume della tasca. Ottenuto il modello è stato possibile effettuare nuovamente il docking e selezionare la pose migliore la quale presenta una binding mode simile a GRK2 con il bifenile esteso all’interno della tasca, l’anello della piperidina media un’interazione con l’asparagina 245 mentre il nucleo pseudo adeninico si posiziona nella tasca idrofobica dove vi sono leucina, alanina e valina. Un confronto ulteriore tra le “pose” selezionate tra GRK2 e GRK4 verrà ulteriormente discusso nel capitolo 3 (pagina 16).

JNK1

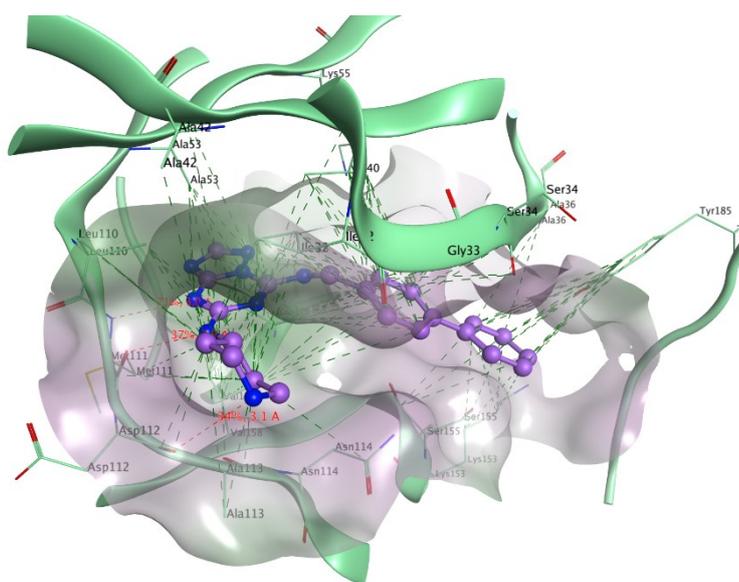


Figura 15: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi JNK1.

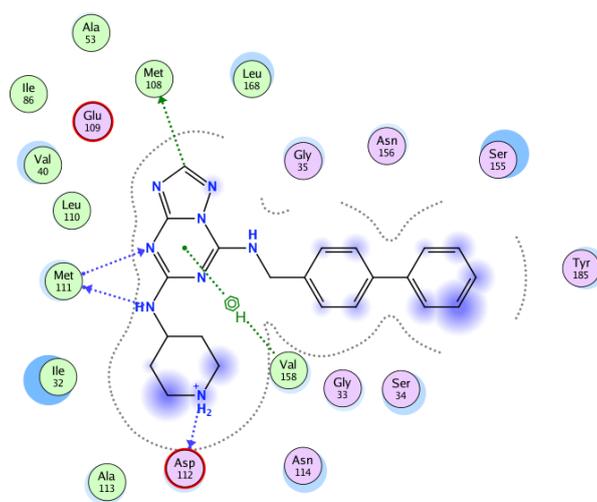


Figura 16: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi JNK1.

TAOK2

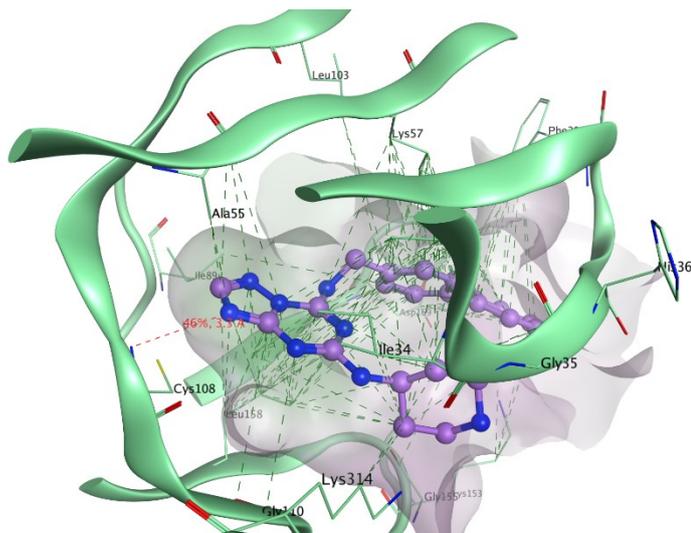


Figura 19: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi TAOK2.

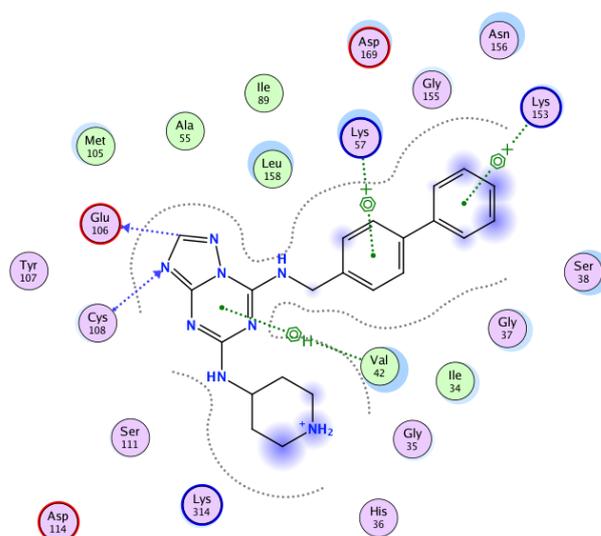


Figura 20: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi TAOK2.

Della chinasi TAOK2 non sono disponibili strutture nel PDB per cui si è fatto un modello utilizzando il cristallo di tale chinasi del ratto di cui erano disponibili sia cristalli in forma “holo” che in forma “apo” ma da un loro confronto non si sono osservate grandi differenze. La struttura scelta (1U5R) per la creazione del modello è quella che presenta il ligando co-cristallizzato, ad essa è stata sovrapposta la sequenza primaria (fasta) di TAOK2 umana e si è constatato che la percentuale di identità è del 96,2% nell'intera catena ma si ha un'identità di sequenza del 100% per quanto riguarda i residui nella tasca per cui eseguire tale operazione è plausibile.

La “pose” migliore selezionata con il docking vede il nucleo pseudo adeninico verso la hinge con la quale vengono mediate interazioni con glutammato 106 e con cisteina 108, il bifenile esteso verso l'interno della tasca che presenta molte interazioni idrofobiche e si nasconde dal solvente, mentre l'anello della piperidina espone l'azoto carico positivamente al solvente migliorando la solubilità del ligando. La binding mode è quella che ci si aspetta da un inibitore di chinasi.

3. Capitolo 3: CONFRONTO ISOFORME DI UNA STESSA FAMIGLIA

Il Professor Viola dell'Università che ha effettuato i saggi cellulari per verificare l'attività antitumorale chiede se vi è la possibilità, confrontando le varie binding mode, di razionalizzare il motivo per cui vi sia un'estrema specificità del composto GV39 per determinate isoforme di chinasi appartenenti alla stessa famiglia. In particolare, la richiesta è quella di confrontare le “pose” che si ottengono per le famiglie delle JNK, GRK e TAOK.

3.1 Famiglia JNK

Le tre isoforme prese in esame sono JNK1, JNK2 e JNK3 di cui vi è a disposizione per tutte più di una struttura nel PDB con ligando co-cristallizzato e l'unica che risulta essere attiva nei confronti dell'attività inibitoria di GV39 è JNK2 discussa precedentemente.

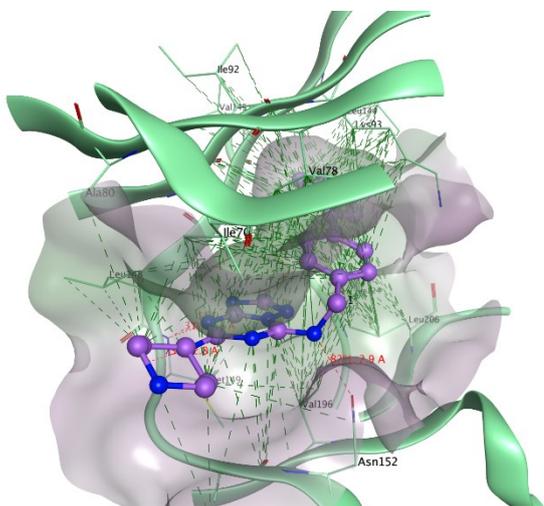


Figura 21: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi JNK1.

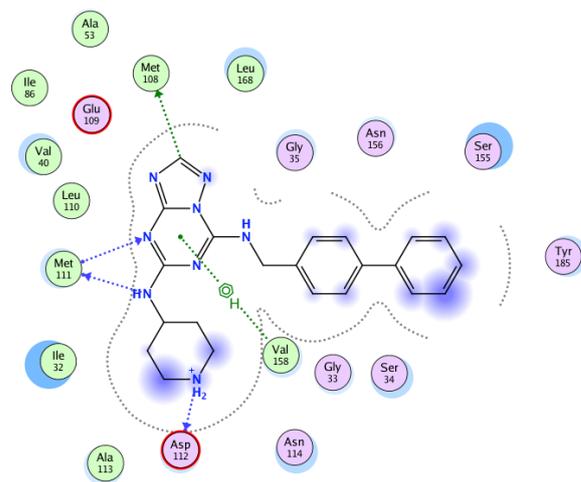


Figura 22: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi JNK1.

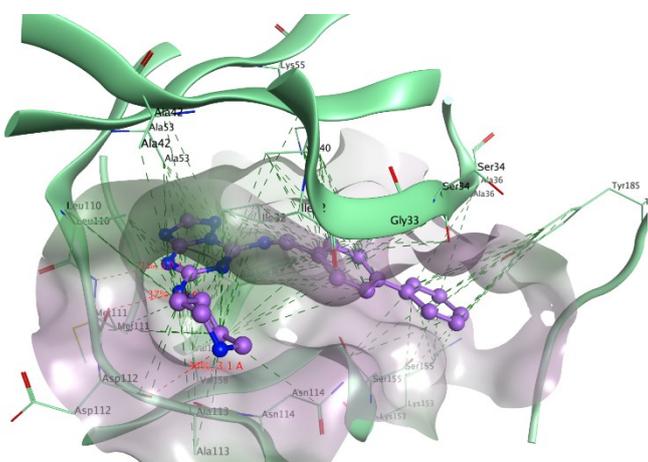


Figura 23: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi JNK3.

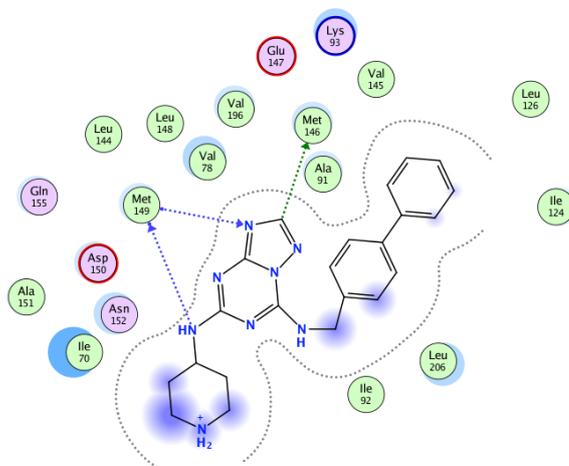


Figura 24: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi JNK3.

Come è possibile notare sia dalle immagini in tre dimensioni sia in quelle bidimensionali la binding mode campionata per JNK1 è simile a quella campionata per JNK2 con il bifenile che si estende verso la destra della tasca, mentre per JNK3 ciò che cambia è proprio l'orientamento del bifenile che si allunga all'interno del pocket. Questa differenza è dovuta principalmente dal fatto che in JNK1 e JNK2 la metionina 108 è in forma chiusa mentre in JNK3 la metionina 146 è in forma aperta per cui è utile svolgere un'analisi prendendo le strutture disponibili di JNK2 e osservare le percentuali in cui la metionina risulta essere aperta, lo stesso processo va eseguito su JNK1.

Dopo aver allineato tutte le strutture disponibili nel PDB con un ligando co-cristallizzato si è potuto notare che per il 50% delle volte il residuo di metionina si trova in conformazione aperta e per il 50% delle volte in forma chiusa da cui se ne deduce la sua flessibilità e la sua funzione di gatekeeper che spesso risulta essere una metionina^{XVII}. Un ulteriore sguardo all'orientazione del ligando co-cristallizzati evidenzia che alcuni di essi assumono una binding mode che prevede l'estensione all'interno della tasca simile a quella assunta e selezionata per GV39 in JNK3.

Successivamente si è eseguito il confronto sulla qualità delle interazioni che il composto fa con la hinge su JNK2 e JNK3 con uno script di MOE e il risultato porta a definire migliore la "pose" campionata su JNK3 rispetto a quella di JNK2. Entrambe le "pose" mediano tre legami a idrogeno con la hinge ma in JNK3 si trovano su una porzione rigida della chinasi mentre per JNK2 si trovano su una porzione più flessibile e, inoltre, un'altra ragione per cui è preferibile la binding mode di JNK3 è il fatto che il bifenile

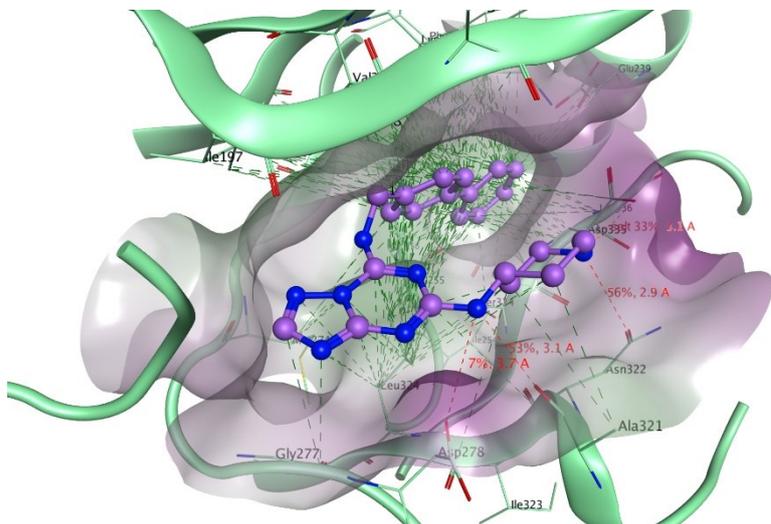


Figura 28: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi **GRK3**, con bifenile esteso all'interno per avere una buona complementarità con la tasca e l'esposizione della piperidina.

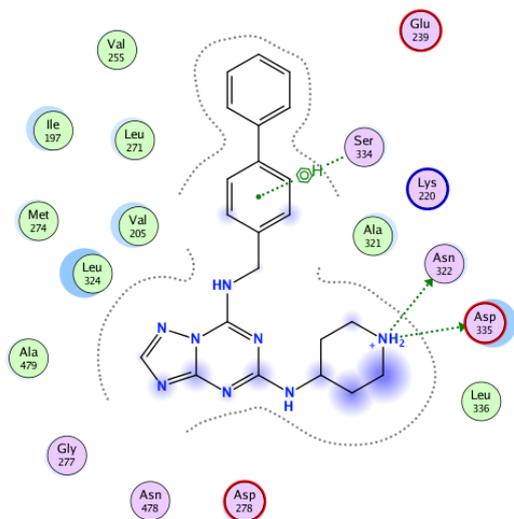


Figura 29: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi **GRK3**.

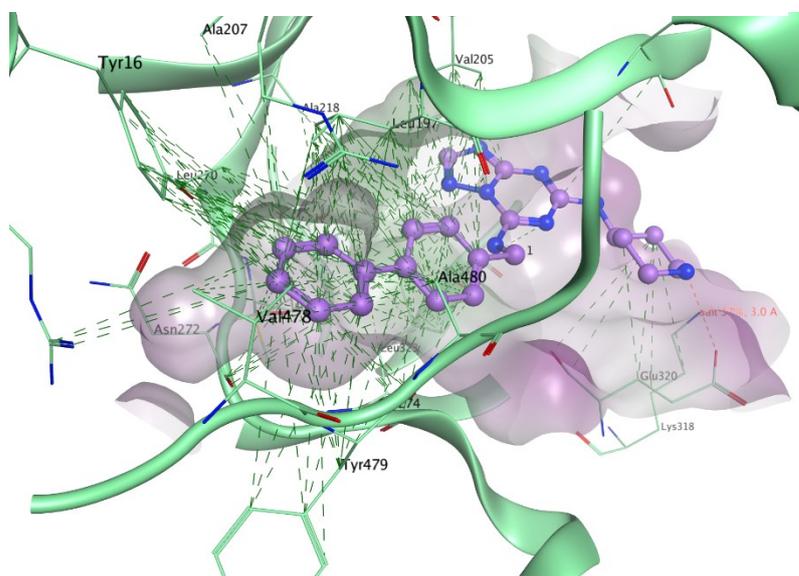


Figura 30: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi **GRK7** con bifenile verso la hinge in quanto l'interno della tasca risulta chiusa dalle catene laterali degli aminoacidi che puntano verso l'interno e l'esposizione della piperidina al solvente.

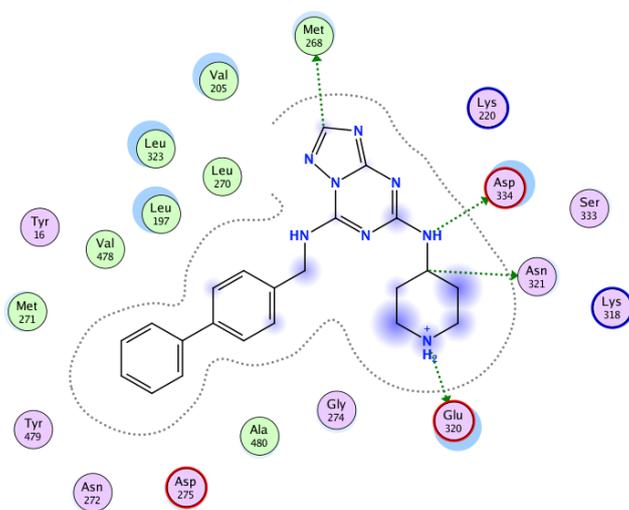


Figura 31: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi **GRK7**.

Sovrapposizione GRK2 e GRK4

Le strutture di GRK2 e GRK4 vengono sovrapposte e allineate in modo da mettere in risalto le possibili differenze per quanto riguarda il sito attivo.

La maggior parte delle catene laterali dei residui aminoacidici presenti e le loro orientazioni sono conservate tra i due complessi. È quindi plausibile affermare che entrambe le “pose” selezionate siano entrambe valide per il fatto che la binding mode selezionata per GRK2, che non interagisce con la hinge, è coerente con la modalità di interazione di altri inibitori co-cristallizzati come detto in precedenza.

La “pose” campionata per GRK4, invece, ha una modalità di interazione classica delle chinasi con il bifenile esteso all'interno della tasca nel pocket idrofobico con la porzione che sostituisce l'adenina dell'ATP che interagisce con la hinge formando legami a idrogeno.

Dopo tali considerazioni è possibile notare che la forma della tasca viene regolata dalla posizione del loop che si trova in prossimità dell'ingresso del sito atpasico ed essendo il docking una metodologia di indagine di tipo statico, per cui fortemente influenzata dalla struttura di input, non è possibile valutare quale delle "pose" è quella che permette un miglior riconoscimento del ligando. Un'indagine più profonda andrebbe eseguita con la dinamica che tiene conto della flessibilità della proteina e aiuterebbe a comprendere l'influenza del loop sulla struttura della tasca e sul riconoscimento di essa da parte del ligando.

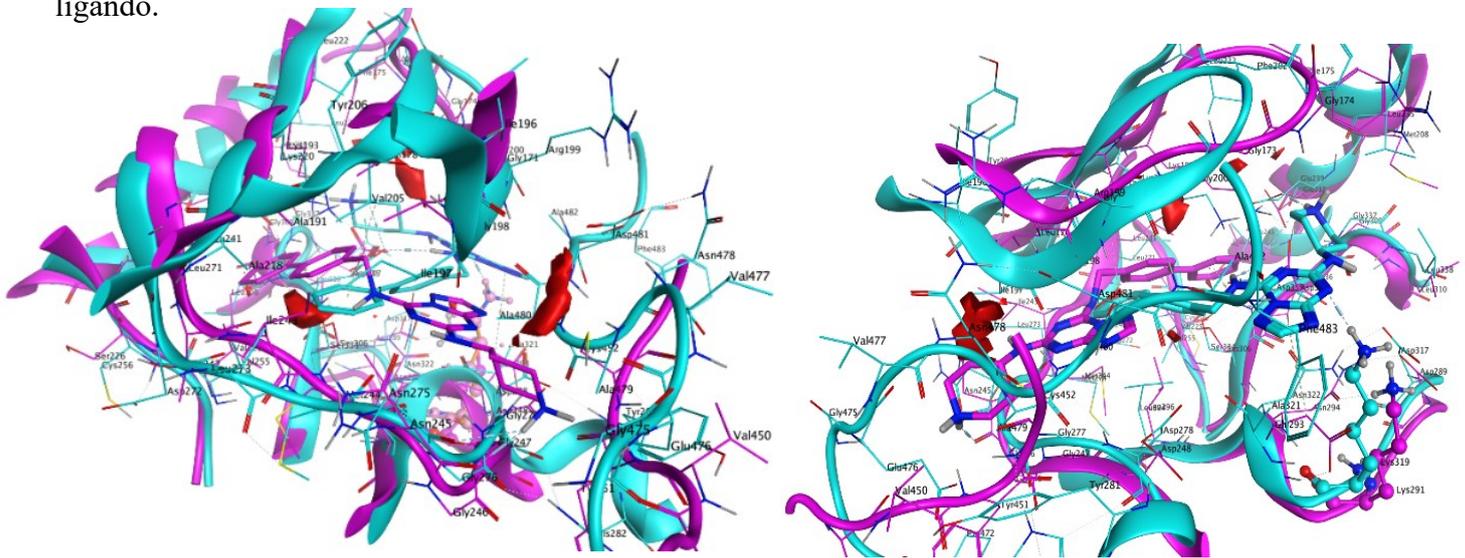


Figura 32,33: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" campionate per GRK2(azzurra) e GRK4 (fuxia) con evidenziate in rosso le differenze di volume della tasca.

Confronto GRK1 (modello alphafold) e GRK2

Tra le due isoforme cambia il residuo gatekeeper che per GRK1 è metionina 267 mentre per GRK2 è leucina 272 che potrebbero avere una propensità diversa ad aprire la tasca al ligando. Ulteriori differenze riguardano un amminoacido nel sito attivo che risulta essere arginina 276 per GRK1 mentre per GRK2 è un'istidina 280, entrambi con catene laterali cariche positivamente ma l'arginina più ingombrante in termini di volume, tale differenza potrebbe incidere sull'equilibrio del loop rilevante per quanto riguarda la conformazione della tasca e non tanto per l'interazione diretta con il ligando.

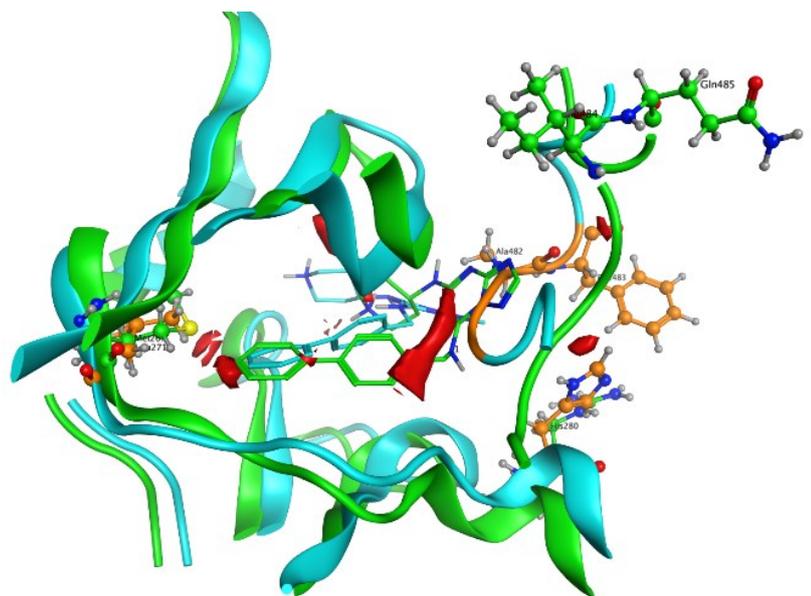


Figura 34: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" di GRK1 (verde) e GRK2 (azzurra) dove sono messe in evidenza le principali differenze in arancione.

Va evidenziata anche la differenza presente nel loop di regolazione (le differenze appena citate vengono riassunte nella tabella sottostante).

GRK1	GRK2
Gatekeeper: metionina 267	leucina 272
Residuo: arginina 276	istidina 280
Loop: ile,gln,asp,val,gly,ala,phe,ser	ala,phe,asp,ile,gly,ser,phe,asp

La maggior parte delle differenze è presente nella regione esterna della tasca, quella che è la bocca della chinasi che il ligando deve superare per entrare, è diversa e potrebbe essere che in un caso sia più accessibile e nell'altro meno. Tale regione è sufficientemente diversa da indurre al pensiero che sia diverso anche il profilo di riconoscimento del ligando.

Confronto GRK3 (modello di alphafold) e GRK2

GRK2 e GRK3, messe a confronto valutando le percentuali di identità, risultano diverse per quanto riguarda il loop di regolazione che induce la formazione di diverse conformazioni nel loop esteso nei pressi della tasca deformandola in modi diversi nei due casi e questo potrebbe spiegare la diversa binding mode ma andrebbero fatte ulteriori indagini di dinamica molecolare in quanto la tasca catalitica appare identica in termini di composizione amminoacidica.

In particolare, la sequenza interessata per la differenziazione nel loop di regolazione è:

GRK2	GRK3
glu,his,ser,phe,lys,gly,val	glu,ser,pro,phe,arg,ser,leu

Entrambe presentano come residuo gatekeeper leucina 271 e sono identiche a livello della composizione amminoacidica del sito attivo.



Figura 35: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" di GRK3 (verde) e GRK2 (azzurra) dove sono messe in evidenza le principali differenze in arancione.

Confronto GRK7 (modello di alphafold) e GRK2

Tra le due isoforme prese in considerazione **varia il residuo gatekeeper** che risulta essere una metionina 268 per GRK7 mentre leucina 271 per GRK2.

In tal caso vi sono delle differenze anche per quanto riguarda dei residui amminoacidici. Le principali differenze vengono riassunte sulla tabella sottostante:

GRK2	GRK7
Metionina 268, serina 269	Leucina 271, asparagina 272
Istidina 280, tirosina 281 in basso a destra	Lisina 277, fenilalanina 278 in basso a destra
Alanina 321	Glutammato 320
Loop di regolazione: asn,ala,ala,asp,ala,phe,asp	Loop di regolazione: tyr,ala,lys,asp,ile,ala,glu

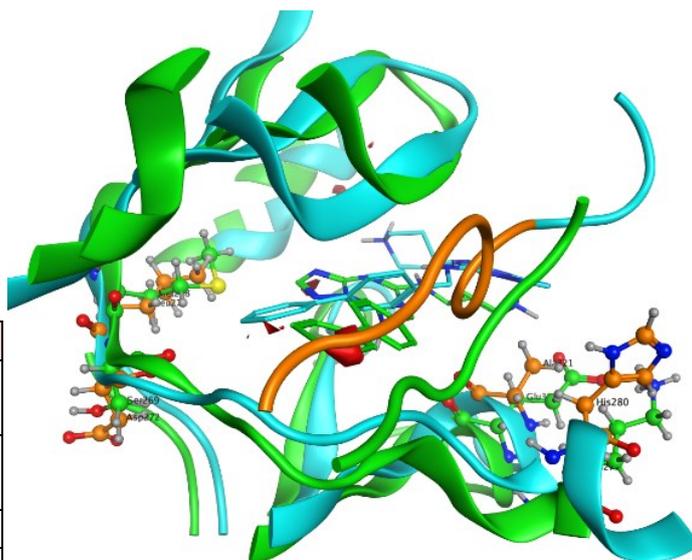


Figura 36: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" di GRK7 (verde) e GRK2 (azzurra) dove sono messe in evidenza le principali differenze in arancione.

È possibile notare che il residuo gatekeeper è mutato, come accade in GRK1 e lo stesso accade per i residui amminoacidici in basso a destra, prendendo come riferimento il sito attivo, per cui anche in questo caso va considerata valida, come giustificazione per la diversa selettività nei confronti del ligando, l'accessibilità al sito attivo che non è la stessa. A livello di sequenza la GRK7 è molto diversa da GRK2 anche se i residui appartenenti al sito catalitico non lo sono del tutto.

Confronto GRK1 e GRK7 con GRK4

Sovrapponendo le tre isoforme in esame le principali differenze presenti riguardano:

GRK1	GRK7	GRK4
Residuo gatekeeper: metionina 267	Metionina 268	Leucina 241
Loop di regolazione: thr,ala	Val,ala	Ala,cis

Il residuo gatekeeper è mutato sia per GRK1 che per GRK7 rispetto GRK4 per cui l'accessibilità alla tasca è diversa in quanto forma di resistenza tipica delle chinasi. Osservando la composizione del binding site nel *sequence editor* si trovano anche differenze nelle catene laterali dei residui amminoacidici verso destra nella tasca.

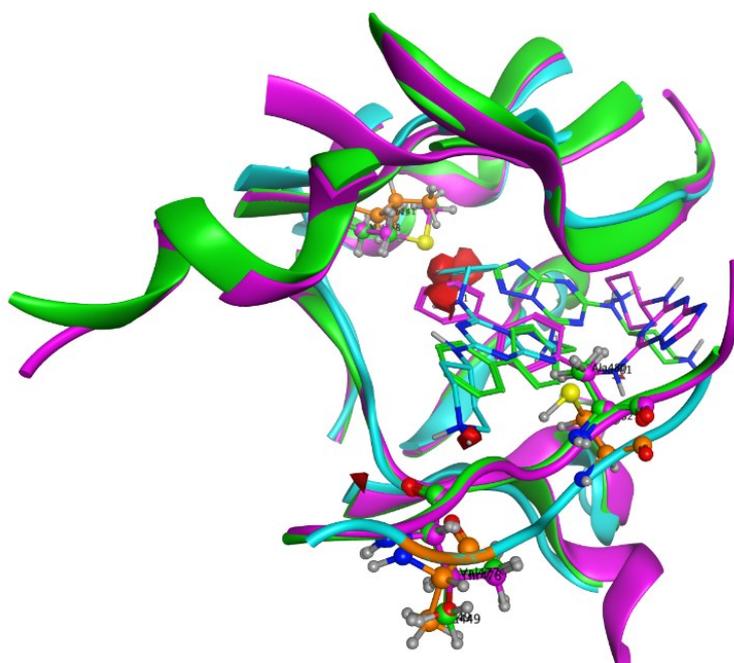


Figura 37: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" di GRK7 (verde), GRK1 (fuxia) e GRK4 (azzurra) dove sono messe in evidenza le principali differenze in arancione.

Confronto GRK3 e GRK4

Le due isoforme poste a confronto presentano svariate differenze riassunte in tabella ma il residuo che funge da gatekeeper rimane invariato, per GRK3 leucina 271 mentre per GRK4 242.

GRK3	GRK4
Loop sopra alla tasca: ile-gly-arg	Leu-gly-lys
Sequenza due residui in alto: tyr 206-met 219	Cis 179-cis 192
Loop regolazione: ile-val-cis	Val-val-ser
Dietro la tasca: phe 269	Leu 239
In basso a destra della tasca: ala 321	Glu 293
Loop di regolazione: glu-val-asn-ala	Ala-val-tyr-cis

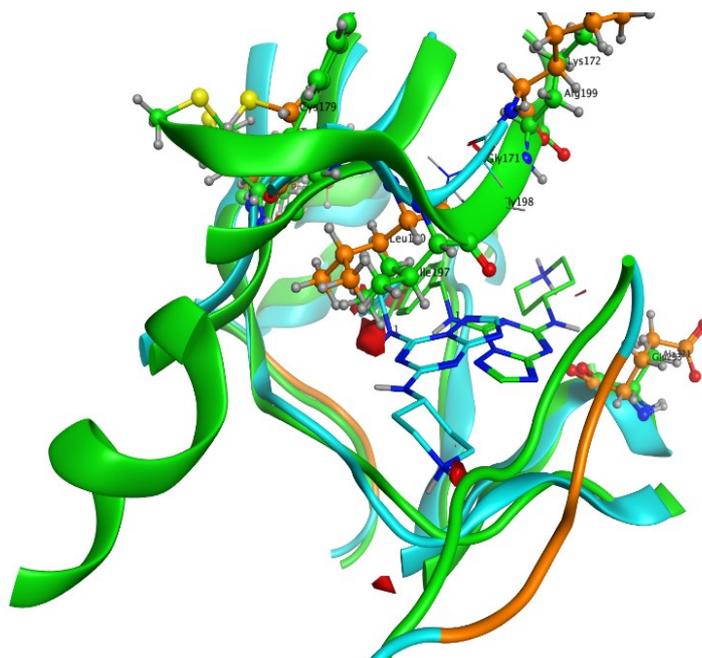


Figura 38: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" di GRK2 (verde,) e GRK4 (azzurra) dove sono messe in evidenza le principali differenze in arancione.

Ci sono variazioni sia nella bocca della chinasi che nella porzione alta del sito attivo e questa potrebbe essere la causa della diversa selettività.

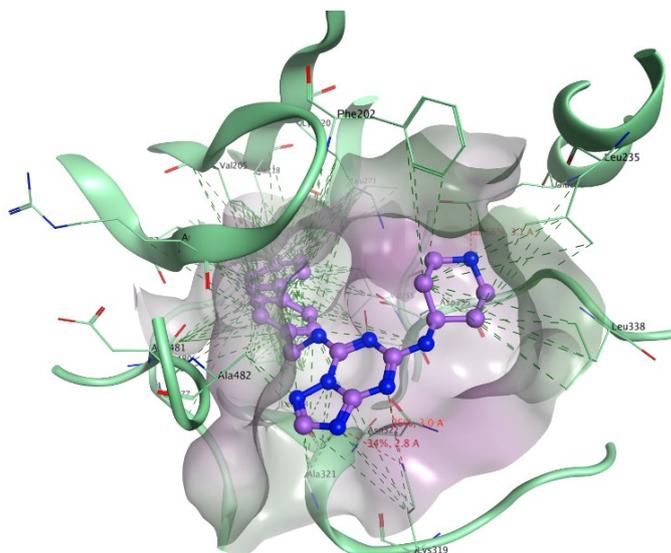
Conclusioni:

Dopo un'attenta indagine per evidenziare le varie differenze che influiscono sul diverso riconoscimento della tasca da parte del ligando di diverse isoforme di GRK, si notano che le principali differenze riguardano soprattutto la sequenza presente a livello del loop di regolazione. Tale ambiguità si era riscontrata in precedenza dal confronto delle "pose" campionate per GRK2 e GRK4 e anche in questo caso sarebbe utile un'analisi di tipo dinamico per capire quanto la sequenza presente nel loop influenzi la conformazione della tasca. È utile tenere in considerazione che le strutture utilizzate per GRK1, GRK3 e GRK7 sono modelli presenti su *alphafold* e non cristalli ma è anche vero che questa è un'ambiguità che si presenta in ogni caso per cui è ragionevole pensare che il loop interessi la conformazione dello stato finale.

Una seconda discrepanza, anche se non presente tra tutte le isoforme attive e inattive, è rappresentata dalla mutazione del residuo gatekeeper che sia per GRK2 che per GRK4 è rappresentato dalla leucina mentre per GRK1 e GRK7 risulta essere una metionina. È noto che^{xvii} una mutazione di tale residuo, che regola l'entrata del ligando lungo la tasca, sia associato alla resistenza antitumorale e giustifica il diverso riconoscimento di GV39 nei confronti delle GRK. È plausibile concludere che dove vi è come gatekeeper la leucina, il sito catalitico possa essere in una conformazione tale per cui il pocket sia meno accessibile in quanto la metionina presenta catena lineare mentre la leucina ramificata per cui maggiormente ingombrante e non permette al bifenile di allungarsi lungo la tasca ma, anzi, esso trova una binding mode diversa più attiva come quella assunta in GRK2.

Questo, senza l'utilizzo della dinamica, ci induce a pensare che la "pose" assunta in GRK2 sia quella maggiormente attiva la quale presenta un pocket idrofobico dietro alla regione hinge meno accessibile ma comunque il fatto andrebbe confermato con indagini più approfondite.

Figura 39: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi GRK2.



3.3 Famiglia TAOK

Le tre isoforme prese in esame sono TAOK1, TAOK2 e TAOK3 di cui solo per quest'ultima vi è a disposizione una struttura nel PDB, mentre per TAOK1 si è utilizzato il modello di *alphafold* e per TAOK2, l'unica chinasi attiva, si è creato il modello da un cristallo presente nel PDB di tale chinasi ma del ratto come spiegato precedentemente (pagina 13).

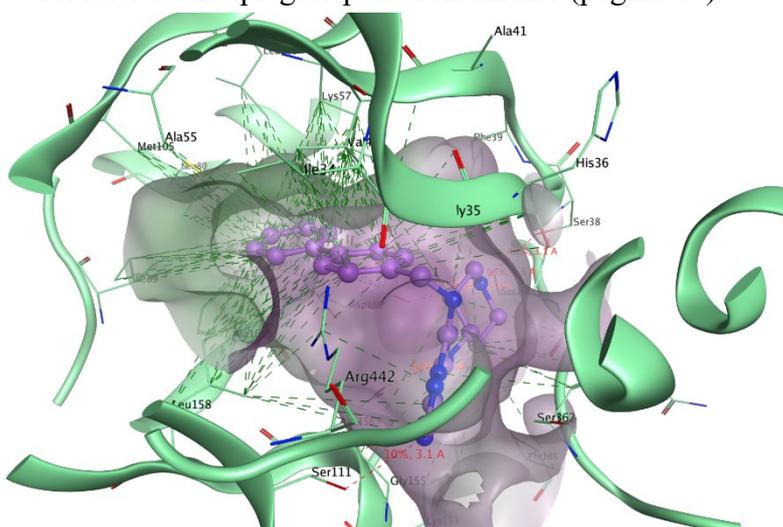


Figura 40: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi TAOK1 con il bifenile verso la hinge che media numerose interazioni idrofobiche e stabilizza il ligando all'interno della tasca e sia il nucleo pseudo adeninico, che la piperidina mediano un'interazione con l'aspartato utilizzando l'azoto.

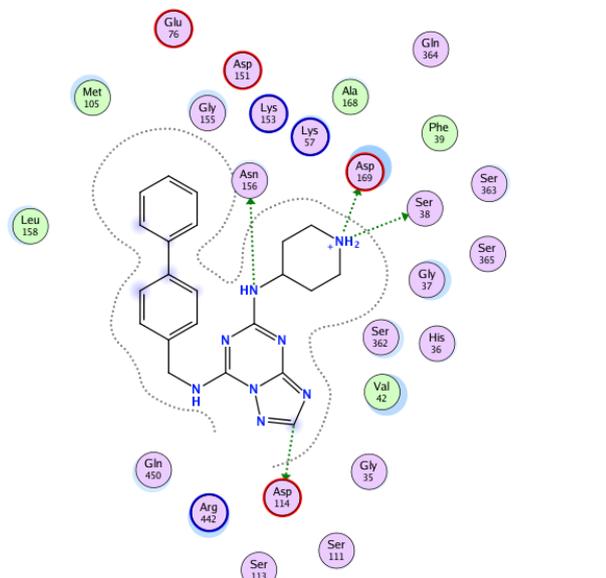


Figura 41: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi TAOK1.

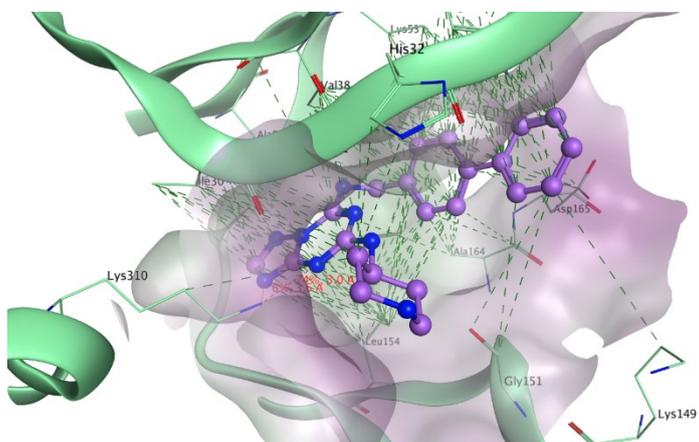


Figura 42: rappresentazione tridimensionale della miglior pose di GV39 in target chinasi TAOK3, con il nucleo pseudo adeninico verso la hinge, la piperidina verso il solvente e il bifenile lungo la tasca.

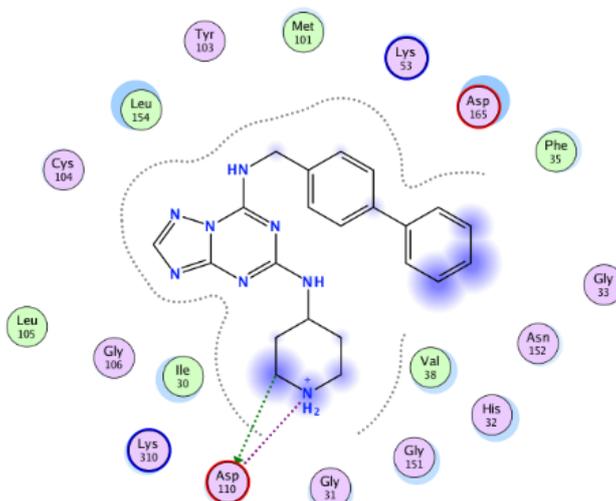


Figura 43: rappresentazione bidimensionale delle interazioni tra GV39 e il target chinasi TAOK3.

Confronto:

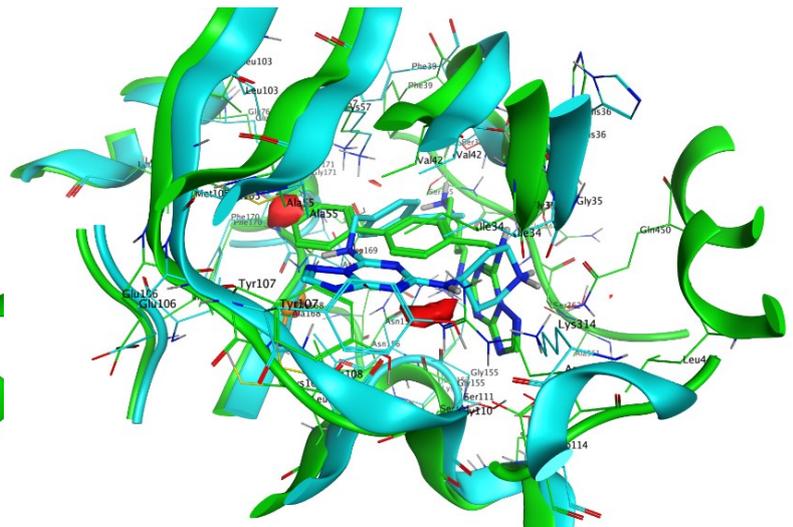
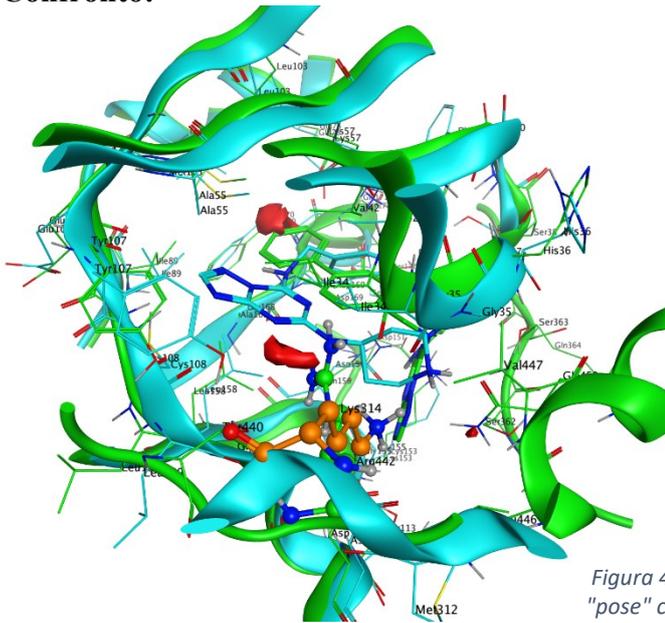


Figura 44 e 45: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" campionate per TAOK2 (azzurro) e TAOK1 (verde) con le differenze evidenziate in arancione e in rosso la variazione di volume della tasca.

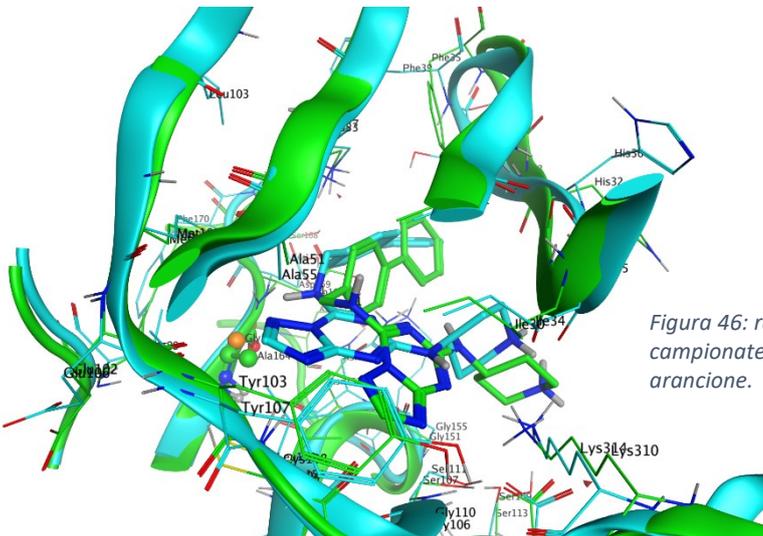


Figura 46: rappresentazione tridimensionale della sovrapposizione delle "pose" campionate per TAOK2 (azzurro) e TAOK3 (verde) con le differenze evidenziate in arancione.

Come è possibile notare dalle immagini non vi sono particolari differenze tra TAOK2 e TAOK3 se non un leggero slittamento della posizione del ligando ma va tenuto in considerazione che si è utilizzato un modello per TAOK3 mentre per TAOK2 è stata creata la struttura sulla base di un cristallo per cui vi è la possibilità che esse non abbiano una sovrapposizione perfetta. Un ulteriore sguardo nel *sequence editor* dei residui che compongono la tasca ha evidenziato la sostituzione della glicina 168 di TAOK2 con un'alanina 164 per TAOK3 ma, essendo due amminoacidi con catene laterali simili, tale cambiamento non può essere considerato come la causa dell'attività di una delle due chinasi a discapito dell'altra in quanto la binding mode risulta abbastanza simile al netto di piccole differenze. Non vanno fatte troppe considerazioni sul posizionamento delle catene laterali perché è dovuto al fatto che una chinasi è una struttura cristallografica mentre l'altra un modello di *alphafold*, per cui hanno necessariamente qualche differenza a livello del posizionamento delle catene laterali. Dopo tali considerazioni si è arrivati alla conclusione che anche in questo caso con il docking non è possibile fornire una motivazione ragionevole sul motivo per cui una sia attiva e l'altra no.

Maggiori discrepanze tra le strutture sono presenti, invece, osservando la sovrapposizione tra TAOK2 e TAOK1, la principale è la sostituzione della lisina 314 in TAOK2 con arginina 442 in TAOK1 che è

molto più ingombrante in termini di catena laterale e per questo motivo il volume della tasca in tale zona è molto inferiore per TAOK1 e questa è considerabile una possibile causa dell'inattività di tale chinasi nei confronti dell'attività inibitoria del ligando GV39. Dal *sequence editor* come ulteriore differenza è emersa la sostituzione della valina 152 per TAOK2 con un'isoleucina 152 per TAOK1 ma non dovrebbe influire molto nella conformazione della tasca in quanto amminoacidi simili. Per il resto a livello del sito ATPasico risultano abbastanza identiche.

4. Materiali e metodi

4.1 Preparazione delle proteine

Il primo step per l'analisi computazionale consiste nella preparazione della proteina, si preferiscono le strutture derivanti dalla cristallografia ai raggi X dei complessi proteina ligando (strutture "holo") scaricabili dal *Protein Data Bank* (PDB) che è un database online open-source di strutture molecolari che viene aggiornato di continuo. Se le strutture a disposizione sono numerose la scelta viene presa escludendo i cristalli che non presentano ligandi legati e sulla base della risoluzione, più essa ha un valore basso minore è l'incertezza sulla posizione atomica per cui tale valore è correlato all'affidabilità della struttura.

Una volta che si ha a disposizione la struttura tridimensionale della proteina di interesse essa può essere caricata nell'interfaccia di MOE (*Molecular Operating Environment*) e va preparata (nella sezione *structure preparation* di MOE) prima di essere utilizzata per l'analisi. La preparazione della proteina consiste nella ricostruzione di porzioni di struttura eventualmente mancanti per insufficiente risoluzione cristallografica, nell'aggiunta dei protoni (*protonate 3D*) poiché non risolti dalla cristallografia e nell'adattare lo stato di protonazione della proteina al pH fisiologico (pH=7.4). Gli idrogeni aggiunti vanno poi minimizzati energeticamente per quanto riguarda le loro coordinate in modo tale da ottenere una conformazione proteica energeticamente stabile. Dal cristallo è possibile ottenere le coordinate del ligando co-cristallizzato che verranno utilizzate come punto di riferimento per il docking del ligando in esame (GV39).

4.2 Preparazione del ligando

Il ligando viene preparato per il docking utilizzando il tool Wash integrato nel programma MOE. Questo tool fornisce le coordinate atomiche più probabili a partire dallo *SMILE*, rispettando le giuste lunghezze di legame e le informazioni riguardanti la chiralità. Vengono inoltre attribuiti lo stato tautomerico e protomerico più probabile a pH = 7.00, mentre le cariche parziali vengono attribuite secondo il campo di forze MMFF94, ottimizzato per la parametrizzazione di piccole molecole organiche come GV39. Come ultimo passaggio, viene infine eseguita una minimizzazione energetica delle coordinate atomiche della molecola secondo lo stesso campo di forze utilizzato per l'attribuzione delle cariche parziali.

4.3 Alphafold

Se la proteina oggetto dello studio non dispone di strutture cristallografiche nel PDB una risorsa alternativa a disposizione è Alphafold ^{xviii}, una piattaforma che mette a disposizione modelli delle strutture tridimensionali della proteina e viene continuamente aggiornato.

All'interno di Alphafold vi sono molte informazioni utili, tra cui il visualizzatore molecolare simile a MOE che permette la visualizzazione della struttura del modello al di sotto della quale sono presenti la sequenza primaria e una matrice che illustra l'errore che il programma prevede di avere sulla posizione di quel determinato amminoacido, cioè l'incertezza che lui ha nella determinazione della struttura di quella determinata proteina, più tale matrice risulta verde più la predizione è esatta.

Vi è un ulteriore mappatura che indica quanto un modello è attendibile la quale illustra, con colori diversi, la percentuale di confidenza che Alphafold ha sulla posizione di un determinato residuo compresa tra zero (arancione), la predizione è errata al 100%, a 100 (blu) se sono al 100% sicuro che la predizione sia esatta. Solitamente le regioni con indice minore del 50% sono prive di struttura secondaria ma zone disordinate flessibili. Da Alphafold è possibile scaricare il PDB del modello della proteina in esame che poi verrà aperto con MOE.

4.4 Ligand Based Homology Modelling

Spesso le proteine implicate nelle analisi non dispongono di strutture cristallografiche e i modelli presenti su alphafold, essendo in forma “apo”, spesso non sono rappresentativi in termini di volume della tasca. Per effettuare un'analisi attendibile per cui si ricorre al modello di omologia (*Ligand Based Homology Modelling*) ^{xix}. La tecnica consiste nella creazione di modelli di omologia di proteine a partire dalla loro sequenza primaria (fasta) utilizzando come template la struttura di una proteina strutturalmente simile in modo tale da tenere in considerazione la presenza del ligando nella struttura finale, per massimizzare la complementarità tra tasca e ligando.

Tale procedura risulta molto utile nel momento in cui va tenuta in considerazione la flessibilità recettoriale che invece il solo docking, essendo statico, trascura. Spesso, infatti, la struttura della proteina target presenta una tasca ostruita o comunque di volume minore rispetto a quando il ligando si lega ad essa.

In breve, la tecnica prevede la selezione di una “pose” del docking e la successiva costruzione di un modello di omologia utilizzando la sequenza primaria della proteina di cui si vuole costruire il modello, come template la struttura della proteina coinvolta nella “pose” e il ligando campionato selezionato come ambiente in modo tale da ottenere un modello che mantenga le caratteristiche strutturali simili a quelle di partenza ma che al contempo massimizzi la complementarità della tasca con il ligando modificando tutte quelle porzioni di proteina flessibili.

Tale procedura può dar luogo a un database di modelli che vanno valutati per selezionare il più opportuno ai fini dell'analisi. Come ultimo passaggio è necessario effettuare un redocking del ligando sul modello.

4.5 Docking

Il Docking è una tecnica computazionale grazie alla quale è possibile generare un certo numero di orientazioni nello spazio del ligando di interesse all'interno del sito attivo, in particolare viene utilizzato nel virtual screening di piccole molecole per dare priorità alle molecole più promettenti in termini di modalità di interazione prevista col target.

Il programma di docking che si è utilizzato è PLANTS^{xx} che è composto da due componenti, l'algoritmo di ricerca (ACO) che si occupa di esplorare i gradi di libertà conformazionale accessibili al ligando generando varie sue orientazioni all'interno di uno spazio di ricerca definito dall'utilizzatore attorno al sito attivo, e da una scoring function che si occupa di assegnare un punteggio a ciascuna conformazione generata dall'algoritmo di ricerca sulla base della qualità e quantità di interazioni che il ligando forma con il binding site^{xxi}.

Tale procedura richiede che le sia fornita una struttura tridimensionale della proteina di partenza e il volume della tasca che, nel caso di strutture “holo”, è stato identificato prendendo come riferimento le coordinate del ligando co-cristallizzato e nel caso delle strutture “apo”, come quelle di *alphafold*, prendendo in considerazione la posizione della hinge, per poi creare un database di “pose” possibili per il ligando all'interno del sito attivo.

L'analisi nell'attribuire le diverse conformazioni del ligando valuta le libertà traslazionali, rotazionali e conformazionali ma al contempo tiene in considerazione anche l'efficacia con la quale il ligando è in grado di riconoscere il recettore.

La scelta della “pose” migliore di quelle trovate con il docking viene presa tenendo in considerazione la complementarità della tasca con il ligando grazie alla visualizzazione della superficie del recettore, la quale può essere colorata sulla base della lipofilità. Altri elementi utili per tale valutazione sono il calcolo del potenziale di Van der Waals e dell'elettrostatica la cui somma deve essere negativa per dare un contributo positivo al legame, cioè per garantire la stabilità del complesso proteina-ligando, e l'utilizzo di uno script (*scoring.svl*) che permette la visualizzazione immediata dei legami a idrogeno tra il ligando e la hinge region e le interazioni idrofobiche.

Come conferma è possibile consultare il *ligand interaction*, il quale sintetizza in modo schematico tutte le interazioni che il ligando media con i residui amminoacidici della catena proteica ed evidenzia in blu le zone del ligando che vengono esposte al solvente.

Limitazione del docking è la staticità in quanto non valuta la flessibilità recettoriale, per cui tale tecnica risulta utile ma i risultati vanno sempre analizzati con una mente critica per capire se nel determinare la “pose” migliore all'interno della tasca del recettore siano necessarie tecniche più approfondite come studi di dinamica molecolare.

Bibliografia

- ⁱ Accesso di rete (12/08/2022): American association for cancer research, «What is cancer research?» <https://www.aacr.org/patients-caregivers/about-cancer/what-is-cancer-research/>
- ⁱⁱ Weber, T.J. «Protein Kinases». In *Comprehensive Toxicology*, 473–93. Elsevier, 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-046884-6.00225-6>.
- ⁱⁱⁱ Enjalbert e Le Pechon-Vallee, «Protein Kinases». In *Encyclopedia of Hormones*, 277–85. Elsevier, 2003. <https://doi.org/10.1016/B0-12-341103-3/00258-8>.
- ^{iv} Schulman. «The Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases». *Current Opinion in Cell Biology* 5, n. 2 (aprile 1993): 247–53. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(93\)90111-3](https://doi.org/10.1016/0955-0674(93)90111-3).
- ^v Tokuda, Masaaki, Bushra Y. Ahmed, Yun-Fei Lu, Hideki Matsui, Osamu Miyamoto, Fuminori Yamaguchi, Ryoji Konishi, e Osamu Hatase. «Involvement of Calmodulin-Dependent Protein Kinases-I and -IV in Long-Term Potentiation». *Brain Research* 755, n. 1 (aprile 1997): 162–66. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(97\)00189-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(97)00189-3).
- ^{vi} Lei, Yangyang, Tianzhu Yu, Changyu Li, Jianke Li, Yicheng Liang, Xinyuan Wang, Yi Chen, e Xiaolin Wang. «Expression of CAMK1 and Its Association with Clinicopathologic Characteristics in Pancreatic Cancer». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25, n. 2 (gennaio 2021): 1198–1206. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16188>.
- ^{vii} Echeverría, Emiliana, Sonia Ripoll, Lucas Fabián, Carina Shayo, Federico Monczor, e Natalia C. Fernández. «Novel Inhibitors of Phosphorylation Independent Activity of GRK2 Modulate CAMP Signaling». *Pharmacology Research & Perspectives* 10, n. 2 (aprile 2022). <https://doi.org/10.1002/prp2.913>.
- ^{viii} Huang, Zheng Maggie, Erhe Gao, J. Kurt Chuprun, e Walter J. Koch. «GRK2 in the Heart: A GPCR Kinase and Beyond ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21, n. 14 (10 novembre 2014): 2032–43. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.5876>.
- ^x Han, Chenchen, Yifan Li, Yang Wang, Dongqian Cui, Tingting Luo, Yuwen Zhang, Yang Ma, e Wei Wei. «Development of Inflammatory Immune Response-Related Drugs Based on G Protein-Coupled Receptor Kinase 2». *Cellular Physiology and Biochemistry* 51, n. 2 (2018): 729–45. <https://doi.org/10.1159/000495329>.
- ^{xi} Yue, Wei, Hanh T. Tran, Ji-ping Wang, Katherine Schiermeyer, John J. Gildea, Peng Xu, e Robin A. Felder. «The Hypertension Related Gene G-Protein Coupled Receptor Kinase 4 Contributes to Breast Cancer Proliferation». *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 15 (gennaio 2021): 117822342110157. <https://doi.org/10.1177/11782234211015753>.

-
- ^{xii} Wu, Qinghua, Wenda Wu, Bishi Fu, Lei Shi, Xu Wang, e Kamil Kuca. «JNK Signaling in Cancer Cell Survival». *Medicinal Research Reviews* 39, n. 6 (novembre 2019): 2082–2104. <https://doi.org/10.1002/med.21574>.
- ^{xiii} Magne, Nathalie, Véronique Rousseau, Kévin Duarte, Sandrine Poëa-Guyon, Vincent Gleize, Alexandre Mutel, Charlotte Schmitt. «PAK3 Is a Key Signature Gene of the Glioma Proneural Subtype and Affects Its Proliferation, Differentiation and Growth». *Cellular Oncology* 44, n. 6 (dicembre 2021): 1257–71. <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00635-8>.
- ^{xiv} Gao, Zhi, Mengya Zhong, Zhijian Ye, Zhengxin Wu, Yubo Xiong, Jinsong Ma, Huiyu Chen. «PAK3 Promotes the Metastasis of Hepatocellular Carcinoma by Regulating EMT Process». *Journal of Cancer* 13, n. 1 (2022): 153–61. <https://doi.org/10.7150/jca.61918>.
- ^{xv} Yadav, Wei, Hanh T. Tran, Ji-ping Wang, Katherine Schiermeyer, John J. Gildea, Peng Xu, e Robin A. Felder. «TAOK2 Kinase Mediates PSD95 Stability and Dendritic Spine Maturation through Septin7 Phosphorylation». *Neuron* 93, n. 2 (gennaio 2017): 379–93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.12.006>.
- ^{xvi} Richter, Melanie, Nadeem Murtaza, Robin Scharrenberg, Sean H. White, Ole Johanns, Susan Walker, Ryan K. C. Yuen. «Altered TAOK2 Activity Causes Autism-Related Neurodevelopmental and Cognitive Abnormalities through RhoA Signaling». *Molecular Psychiatry* 24, n. 9 (settembre 2019): 1329–50. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0025-5>.
- ^{xvii} Estupiñán, H. Yesid, Qing Wang, Anna Berglöf, Gerard C. P. Schaafsma, Yuye Shi, Litao Zhou, Dara K. Mohammad,. «BTK Gatekeeper Residue Variation Combined with Cysteine 481 Substitution Causes Super-Resistance to Irreversible Inhibitors Acalabrutinib, Ibrutinib and Zanubrutinib». *Leukemia* 35, n. 5 (maggio 2021): 1317–29. <https://doi.org/10.1038/s41375-021-01123-6>.
- ^{xviii} Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z. *et al.* Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* **596**, 590–596 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03828-1>
- ^{xix} Moro, S., Deflorian, F., Bacilieri, M. & Spalluto, G. Ligand-Based Homology Modeling as Attractive Tool to Inspect GPCR Structural Plasticity. *Curr. Pharm. Des.* 12, 2175-2185 (2006).
- ^{xx} Korb, O., Stützle, T. & Exner, T. E. PLANTS: Application of Ant Colony Optimization to Structure-Based Drug Design. 247-258 (2006). doi: 10.1007/11839088_22
- ^{xxi} Salmaso, V. & Moro, S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Front. Pharmacol.* 9, 1-16 (2018).

Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Stefano Moro per avermi concesso l'opportunità di svolgere la tesi nel suo laboratorio.

Ringrazio Matteo per la pazienza che ha avuto nel seguirmi e per avermi dato fiducia e disponibilità.

Ringrazio anche Silvia e Mattia che hanno sempre cercato di darmi una mano quando c'erano problemi o avevo dei dubbi.

Ringrazio la mia famiglia che ha sempre creduto in me anche quando per me non c'era speranza, che sono fieri di me qualsiasi sia il risultato e che esultano più di quanto non faccia io quando un esame è superato.

Ringrazio e mie amiche che anche se ci vediamo poco ogni volta che ho bisogno di parlare con loro ci sono.

Un grazie al mio ragazzo che nonostante mi abbia vista piangere e sclerare mi ha sempre rassicurata. Per i pomeriggi passati ad interrogarmi prima di un esame per farmi stare tranquilla e per incoraggiarmi.

Ringrazio anche i miei compagni di avventura, Elisa e Lorenzo, grazie ai quali ho potuto ridere, arrabbiarmi, rispettare le scadenze, passare i pomeriggi a studiare, lamentarmi e esultare per un buon risultato.

Inoltre ringrazio me stessa per avercela fatta e non aver mollato nonostante mi sia passato in testa spesso e per aver seguito la strada più difficile ma più gratificante.