



HAL
open science

**Relations structure/activité dans les systèmes
protéiques : Chémokines et Méthionine Sulfoxyde
Réductases**

Pasquale Palladino

► **To cite this version:**

Pasquale Palladino. Relations structure/activité dans les systèmes protéiques : Chémokines et Méthionine Sulfoxyde Réductases. Autre. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2004. Français. NNT : 2004NAN10127. tel-01748114

HAL Id: tel-01748114

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748114v1>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



FACULTE DES SCIENCES & TECHNIQUES

S.C.D. - U.H.P. NANCY 1
BIBLIOTHÈQUE DES SCIENCES
Rue du Jardin Botanique
54600 VILLERS-LES-NANCY



Università degli studi di Napoli Federico II

U.F.R. STMP

Ecole Doctorale : Synthèse, Expériences, Simulations,
Applications : de la molécule aux édifices supramoléculaires (SESAMES)
Département de Formation Doctorale :
Chimie et physico-chimie moléculaires.

Thèse en co-tutelle France-Italie
Tesi in co-tutella Italia-Francia

présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
Discipline : Sciences Chimiques


per ottenere il titolo di
Dottore di ricerca dell' Università degli studi di Napoli Federico II
Disciplina : Chimica dei processi biologici

par
Pasquale Palladino

**Relazioni struttura/attività in sistemi proteici:
Chemochine e Metionine Solfossido Reduttasi**

**Relations structure/activité dans les systèmes protéiques:
Chémokines et Méthionine Sulfoxyde Réductases**

Soutenance publique le 26 Janvier 2004

Président du jury	M. Ettore Benedetti	Professeur, Università Federico II, Naples
Membres du jury		
Rapporteurs :	M. Michel Marraud	Directeur de Recherches CNRS, ENSIC, INPL, Nancy
	M. Evaristo Peggion	Professeur, Università degli studi di Padova
Examineurs :	BIBLIOTHEQUE SCIENCES NANCY 1	Directeur de recherche CNRS, UHP Nancy I, Directeur de thèse
		Maître de conférences, UHP Nancy I
	D 095 167005 5	rofesseur, Università Federico II, Naples

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II
FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ, NANCY 1
FACULTE DE SCIENCES & TECHNIQUES

Dottorato di Ricerca in
Chimica dei Processi Biologici XVI Ciclo (2000-2003)

Tesi in cotutela Italia-Francia

Relazioni struttura/attività in sistemi proteici:
Chemochine e Metionine Solfossido Reduttasi

Relations structure/activité dans les systèmes protéiques:
Chémokines et Méthionine Sulfoxyde Réductases

Tutore: prof. F. Rossi

Candidato: dott. P. Palladino

Relatore: prof. C. Pedone

Coordinatore: prof. E. Benedetti

Commissione internazionale:

prof. A. Aubry

prof. E. Benedetti

dott. F. Favier

prof. F. Rossi

A.A. 2002-2003

INDICE	
Abbreviazioni	pag. 1
Premessa	pag. 3
Introduzione I	
1.0 Le Chemochine	pag. 4
1.1 Il recettore CXCR4	pag. 5
1.2 SDF-1: struttura e funzione	pag. 10
1.3 Modello di interazione CXCR4/SDF-1	pag. 11
1.4 Agonisti ed antagonisti del recettore CXCR4	pag. 13
a. Analoghi del recettore delle chemochine Domini transmembrana	pag. 14
b. Analoghi delle chemochine SDF-1 VMIP-II	pag. 16 pag. 16
c. Analoghi di peptidi naturali T22 T140	pag. 17 pag. 17
d. Molecole organiche AMD3100	pag. 18
Scopo del lavoro di Tesi	pag. 20
Parte sperimentale I	
Sintesi dei peptidi analoghi dalla chemochina SDF-1 e del recettore CXCR4	pag. 20
Spettri CD in soluzione acquosa dei peptidi sintetizzati	pag. 20
Titolazione fluorimetrica del peptide sintetico CXCR4{29-39} con i detergenti SDS e DPC	pag. 24
Titolazione fluorimetrica del peptide sintetico SDF-1{1-17} con i detergenti SDS e DPC	pag. 25
Determinazione spettrofluorimetrica dell'interazione tra i peptidi lineari CXCR4{29-39} e SDF-1{1-17} in soluzione acquosa	pag. 26
Analisi conformazionale in soluzione acquosa mediante NMR dell'analogo peptidico SDF-1{H-H} della proteina SDF-1	pag. 26
Saggi di attività biologica dei peptidi sintetizzati	pag. 33
Conclusioni e Discussione I	pag. 33
Materiali e Metodi I	
Sintesi peptidica, purificazione e caratterizzazione	pag. 35
Dicroismo circolare	pag. 35
Titolazioni fluorimetriche	pag. 36
Spettrometria ¹ H NMR	pag. 36
Saggi di attività biologica	pag. 36
Cristallizzazione dei peptidi	pag. 37
Bibliografia I	pag. 38
Introduzione II	
Stress ossidativo	pag. 42
Peptide-Metionina Solfossido Reduttasi (PMSR)	pag. 42
Perossiredossine (Prx)	pag. 43
Parte sperimentale II	
Cristallizzazione MsrA e Prx BCP	pag. 45
Raccolta dati MsrA	pag. 46
Sostituzione molecolare MsrA	pag. 47
Ricostruzione e raffinamento della struttura MsrA	pag. 49
Studi di mutagenesi e meccanismo catalitico MsrA	pag. 49
Analisi strutturale MsrA	pag. 50
Modellizzazione del ponte disolfurico CysA-CysB	pag. 55
Conclusioni e Discussione II	pag. 56
Materiali e Metodi II	pag. 56
Bibliografia II	pag. 58
Résumé en français	pag. 60
Appendice I Metodologie di indagine strutturale ed analisi conformazionale	pag. 62
Diffrazione dei raggi X	pag. 62
Spettrometria di risonanza magnetica nucleare	pag. 71
Spettroscopia di fluorescenza	pag. 71
Spettroscopia di dicroismo circolare	pag. 74
Bibliografia III	pag. 82
Appendice II Elenco dei lavori pubblicati	pag. 85

Abbreviazioni

Apo	Apoplasti
APX	Ascorbato perossidasi
<i>Arath</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>Brana</i>	<i>Brassica napus</i>
BRET	<i>Bioluminescence resonance energy transfer</i>
CAT	Catalasi
CC₅₀	50% della concentrazione citotossica
CD	<i>Circular dichroism</i>
CD4	<i>Cluster</i> di differenziazione 4
Cit	Citosol
Cl	Cloroplasti
CMC	Concentrazione micellare critica
cMsrA	<i>Cytosolic MsrA</i>
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DAG	Diacilglicerolo
DPC	Dodecilfosfocolina
DQF-COSY	<i>Double quantum filtering-COSY</i>
DTNB	<i>Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
DTT	Ditiotreitolo
EC30	30% della concentrazione effettiva
ECL	<i>Extracellular loop</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fmoc	N-(9-Fluorenil)-metossicarbonile
<i>Fraan</i>	<i>Fragaria ananassa</i>
Fs	Fotosistema
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GAG	Glicosoamminoglicano
GDP	Guanosina difosfato
gp120	Glicoproteina dell'HIV di 120KDa
gp41	Glicoproteina dell'HIV di 41KDa
GTP	Guanosina trifosfato
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulphonic acid
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i>
HIV-2	<i>Human immunodeficiency virus type 2</i>
HOBt	N-Idrossibenzotriazolo
HSQC	<i>Hetero nuclear single quantum coherence</i>
IC₅₀	50% della concentrazione inibitoria
ICL	<i>Intracellular loop</i>
IP3	Inositolo-(1,4,5)-trifosfato
<i>Lacsa</i>	<i>Lactuca sativa</i>
L-MetSO	L-metionina solfossido
<i>Lyces</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Mab	Monoclonal antibody
MAD/SAD	Dispersione molecolare anomala
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight</i>
MAP	Microtubules associated protein
mCXCR4	<i>Mutant CXCR4</i>
MF	<i>Mean fluorescence</i>
Mit	Mitocondri
Mp	Membrana plasmatica
MSNT	<i>1-(Mesitylene-2-sulfonyl)-3-nitro-1,2,4-triazole</i>
MsrA	Metionina solfossido reduttasi A
MsrB	Metionina solfossido reduttasi B
NADPH	Nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Enhancement</i>
NOESY	<i>NOE Spectroscopy</i>
ORD	<i>Optical Rotary Dispersion</i>
Pc	Parete cellulare
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>

PEG	Polietilenglicole
Per	Periossoma
Prx	Perossiredossina
PLS	<i>Photo-Stimulated Luminescence</i>
PI3K γ	Fosfatidilinositolo-3-OH chinasi γ
PKB	<i>Protein kinase B</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLC β_2	<i>Phospholipase C β_2</i>
PLC β_3	<i>Phospholipase C β_3</i>
PMSR	<i>Peptide-methionine sulfoxidereductase</i>
pMsrA	<i>Plastidial MsrA</i>
Proteina G	Proteina che lega GTP
PyBOP	<i>Benzotriazol-1-yloxytris hexafluorophosphate(pyrrolidino)phosphonium</i>
RET	<i>Resonance energy transfer</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RNI	<i>Reactive nitrogen intermediate</i>
ROESY	<i>Rotating frame Overhauser effect spectroscopy</i>
ROI	Reactive oxygen intermediate
RP-HPLC	<i>Reverse phase high performance liquid chromatography</i>
SPPS	<i>Solid phase peptide synthesis</i>
Sc	<i>Scramble</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
SDS	Sodio dodecil solfato
SI	<i>Selectivity index</i>
SIR/MIR	Sostituzione molecolare isomorfa
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
SOD	superossido dismutasi
TBTU	<i>O-(1H-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate</i>
Te	Trasferimento elettronico
tf	<i>Target function</i>
TFA	Acido trifluoroacetico
TFE	Trifluoroetano
TIS	Triisopropilsilano
tm	<i>Mixing time</i>
TM	<i>Transmembrane domain</i>
TNB	<i>Thio(2-nitrobenzoic acid)</i>
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
TRIS	<i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
Trx	Tioredossina
TrxR	tioredossina reduttasi
UV	<i>Ultra violet</i>
Vac	Vacuoli
VM	Volume molare
vMIP-II	<i>Viral macrophage inflammatory protein II</i>

Premessa

In questo lavoro di tesi di dottorato, in cotutela con l'università francese, sono state studiate le relazioni struttura-attività responsabili della funzione svolta da due differenti sistemi proteici. L'indagine effettuata presso i laboratori del Centro Interuniversitario sui Peptidi Bioattivi (CIRPeB) della Università Federico II di Napoli è stata indirizzata alla classe di molecole note come chemochine ed in particolare la nostra attenzione si è focalizzata sullo studio strutturale dell'interazione del recettore CXCR4 con la chemochina SDF-1, per la specificità e biunivocità di tale interazione. Gli studi di interazione e di *binding* tra macromolecole di interesse biologico sono fortemente correlati alla possibilità di ottenere molecole sintetiche, utili per impieghi diagnostici e/o terapeutici. Nel caso del recettore CXCR4, coinvolto in patologie quali il cancro, l'HIV, e le allergie, è richiesta l'identificazione delle regioni proteiche responsabili dell'efficace e selettiva interazione tra la chemochina SDF-1 ed il recettore CXCR4. Ad oggi, va sottolineata la totale assenza di dati strutturali per il recettore CXCR4, sia in soluzione che allo stato solido, contrariamente alla chemochina SDF-1 che è stata caratterizzata sia in soluzione con tecniche di NMR che allo stato cristallino. Sulla base dei numerosi dati di letteratura e soprattutto dai risultati ottenuti mediante metodi di mutagenesi abbiamo deciso di studiare il sistema recettore/ligando attraverso la sintesi di analoghi peptidici della regione N-terminale del recettore CXCR4 e della chemochina SDF-1 opportunamente scelti. Ci siamo serviti, per il nostro scopo, di un modello semplificato del sistema proteico da studiare che ha fornito comunque risultati interessanti. I peptidi sintetizzati sono stati impiegati in saggi di attività biologica e per studi spettroscopici di CD, fluorescenza, e di spettrometria di NMR, per comprendere le basi strutturali dell'interazione specifica tra le regioni N-terminali di entrambe le proteine. Parallelamente sono state condotte prove di cristallizzazione dei peptidi analoghi della chemochina SDF-1 in presenza in presenza dei peptidi derivati dal recettore CXCR4.

Il lavoro di ricerca nell'ambito di questa tesi di dottorato, svolta nella Facoltà delle Scienze dell'Università Henri Poincaré, Nancy 1 (Francia) ha previsto, invece, lo studio cristallografico di proteine di origine vegetale coinvolte nella difesa delle cellule dal cosiddetto *stress* ossidativo generato dalla presenza intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) e dell'azoto (RNI). In particolare, è stata determinata la struttura molecolare della proteina cloroplastica MsrA appartenente ad una classe di enzimi noti come Peptide-Metionina Solfossido Reduttasi (PMSR) che catalizzano la riduzione delle metionine solfossido, presenti in altre proteine, a metionine. I dati strutturali ottenuti da MsrA da pioppo rappresentano ad oggi la prima ed unica struttura cristallografica ottenuta per una proteina di origine vegetale di questa classe. La definizione del meccanismo catalitico per tale proteina è stata possibile mediante l'analisi strutturale e, soprattutto, attraverso studi di mutagenesi effettuati dal prof. Jean P. Jacquot che ha espresso e purificato tale proteina. Prove di cristallizzazione di un'altra proteina vegetale e di suoi mutanti, la Perossiredossina cloroplastica da pioppo (PrxQ) che catalizza la riduzione di numerosi perossidi hanno fornito cristalli singoli che non adatti alla diffrazione dei raggi X.

Le due tematiche di ricerca affrontate nei laboratori in Italia e in Francia sono molto diverse fra loro per l'approccio metodologico e per la tipologia di informazioni strutturali che l'impiego di tecniche di indagine così diversificate consente di ottenere. L'approccio più efficace per comprendere le basi strutturali del meccanismo catalitico di una proteina o del riconoscimento nel legame ligando/recettore è sicuramente la determinazione della struttura della singola proteina o di un suo complesso attraverso entrambe le tecniche di NMR o di diffrazione dei raggi X, ma ciò non è sempre possibile, come nel presente lavoro. Infatti, il sistema CXCR4/SDF-1 è stato caratterizzato solo con metodologie spettroscopiche in soluzione, mentre i dati strutturali della proteina MsrA sono stati invece ottenuti esclusivamente con diffrazione dei raggi X.

Introduzione

1.0 Le Chemochine

Le chemochine costituiscono un'ampia famiglia di mediatori delle infiammazioni e del sistema immunitario ed in analogia alle citochine sono proteine di secrezione prodotte dai leucociti e dalle cellule dei tessuti. Il termine *chemokine* fu coniato in seguito alla scoperta dell'Interleuchina 8 (IL-8) anche se la prima molecola riconosciuta come citochina chemotattica è stata la CXCL4 [1, 2]. Le chemochine sono costituite da circa 70-130 amminoacidi con quattro cisteine conservate; sono più piccole in dimensione delle citochine ed inducono riarrangiamenti citoscheletrici, adesione alle cellule endoteliali e migrazioni direzionali [3-8], mediante l'interazione con i recettori a sette eliche accoppiati con le proteine G (7TM GPCR) di tipo G_i [9]. Le chemochine sono anche coinvolte nella crescita delle cellule tumorali, nell'angiogenesi e nella risposta immunitaria contro le cellule maligne [10]. Sebbene numerose molecole siano coinvolte nelle metastasi, molta importanza rivestono i meccanismi che determinano la migrazione direzionale e l'invasione delle cellule tumorali in specifici organi [11]. In particolare le cellule tumorali utilizzano meccanismi chemochine-dipendenti come la regolazione del traffico dei leucociti durante il processo della metastasi. Ciò avviene attraverso l'espressione da parte delle cellule tumorali di un particolare insieme di recettori di chemochine funzionalmente attivi che mediano la polimerizzazione dell'actina e la formazione di pseudopodi nelle cellule del cancro al seno [12]. Infine, le chemochine evidenziano un'attività antivirale dipendente dalla competizione con la glicoproteina gp120 dell'HIV nel legare i recettori delle chemochine che oltre al recettore CD4 sono necessari per una efficace infezione delle cellule umane. È stato riportato che la semplice occupazione, senza l'attivazione, dei corecettori dell'HIV è sufficiente ad inibire l'infezione virale [13]. Inoltre, le chemochine possono inibire ingresso del virus anche diminuendo l'espressione dei loro recettori attraverso l'endocitosi successiva all'interazione tra ligando e recettore [14].

Nomenclatura delle chemochine

Le chemochine sono distinte in base alla posizione delle cisteine conservate [1]. Le due principali sottofamiglie sono:

- CXC, o α -chemochine, in cui i primi due residui di cisteina sono separati da un solo amminoacido
- CC, o β -chemochine, in cui i primi due residui di cisteina sono adiacenti

Le cisteine formano due ponti disolfurici (Cys1→Cys3 e Cys2→Cys4), che conferiscono alle chemochine la loro caratteristica struttura tridimensionale. Esistono due eccezioni a tale classificazione. La linfotattina che possiede solo 2

cisteine (XC) [15], e la frattalkina, o neurotactina, che è legata alla membrana e presenta un dominio N-terminale simile alle chemochine con tre amminoacidi tra le prime due cisteine (CX₃C)[16, 17]. Le chemochine sono identificate dalle abbreviazioni CXC, CC, XC, e CX₃C seguite da L (ligando) e dal numero del loro gene, mentre i recettori sono riportati facendo seguire alla classe della chemochina la lettera R ed un numero progressivo (Tabella 1 e Figura 1).

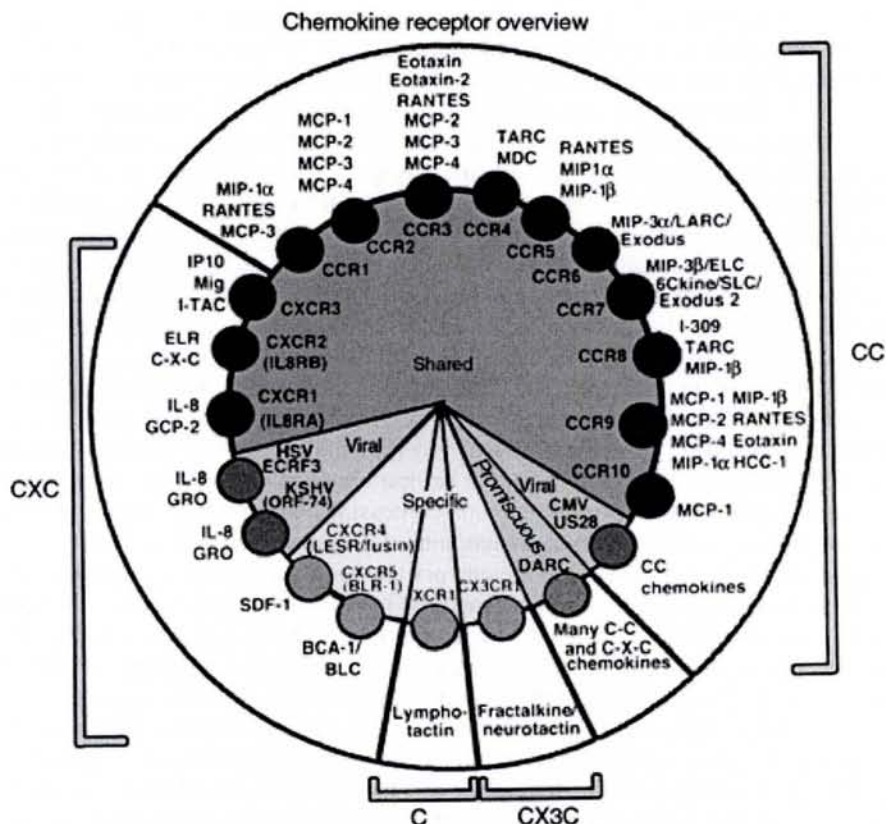


Figura 1. Rappresentazione schematica delle chemochine e dei loro recettori.

Agonista		Recettore
Nome sistematico	Nome originale	
<i>Sottogruppo CXC</i>		
CXCL1	GRO α	CXCR2
CXCL2	GRO β	CXCR2
CXCL3	GRO γ	CXCR2
CXCL4	PF4	Sconosciuto
CXCL5	ENA-78	CXCR2
CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2
CXCL7	NAP-2	CXCR2
CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2
CXCL9	Mig	CXCR3
CXCL10	IP-10	CXCR3
CXCL11	I-TAC	CXCR3
CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4
CXCL13	BCA-1	CXCR5
CXCL14	BRAK	Sconosciuto
CXCL15	Lungkine	Sconosciuto
CXCL16		CXCR6
<i>Sottogruppo CC</i>		
CCL1	I-309	CCR8
CCL2	MCP-1	CCR2
CCL3	MIP-1 α , LD78	CCR1, CCR5
CCL3L1	LD78 β	CCR1, CCR5
CCL4	MIP-1 β	CCR5
CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5
CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3

CCL8	MCP-2	CCR3
CCL11	Eotaxin-1	CCR3
CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3
CCL14	HCC-1	CCR1
CCL15	HCC-2, Lkn-1, MIP-1δ	CCR1, CCR3
CCL16	HCC-4, LEC	CCR1
CCL17:	TARC	CCR4
CCL18	PARC, DC-CK1, AMAC1	Sconosciuto
CCL19	ELC, MIP-3β, exodus-3	CCR7
CCL20	LARC, MIP-3α, exodus-1	CCR6
CCL21	SLC, 6Ckine, exodus-2	CCR7
CCL22	MDC, STCP-1	CCR4
CCL23	MPIF-1, CKβ8	CCR1
CCL24	Eotaxin-2, MFIB-2	CCR3
CCL25	TECK	CCR9
CCL26	Eotaxin-3	CCR3
CCL27	CTACK, ILC	CCR10
CCL28	MEC	CCR3, CCR10
<i>Sottogruppo C</i>		
XCL1,2	Lymphotactin	XCR1
<i>Sottogruppo CX₃C</i>		
CX ₃ CL1	Fracktalkine	CX ₃ CR1

Tabella 1. Nomenclatura delle chemochine dei sottogruppi CXC, CC, C e CX₃C.

1.1 Il recettore CXCR4

Il recettore CXCR4. Il modello bidimensionale del recettore (Figura 2) mostra la presenza di 7 eliche transmembrana (TM), 3 *loop* intracellulari (ICL) e 3 *loop* extracellulari (ECL). Inoltre il recettore presenta un braccio C-terminale intracellulare, ed un braccio N-terminale extracellulare. Nelle 4 regioni extracellulari sono presenti 4 residui di cisteina, e nel ICL2 è presente una regione conservata nei GPCR, necessaria per l'attività del recettore, definita *DRY box* dal nome dei residui amminoacidici presenti.

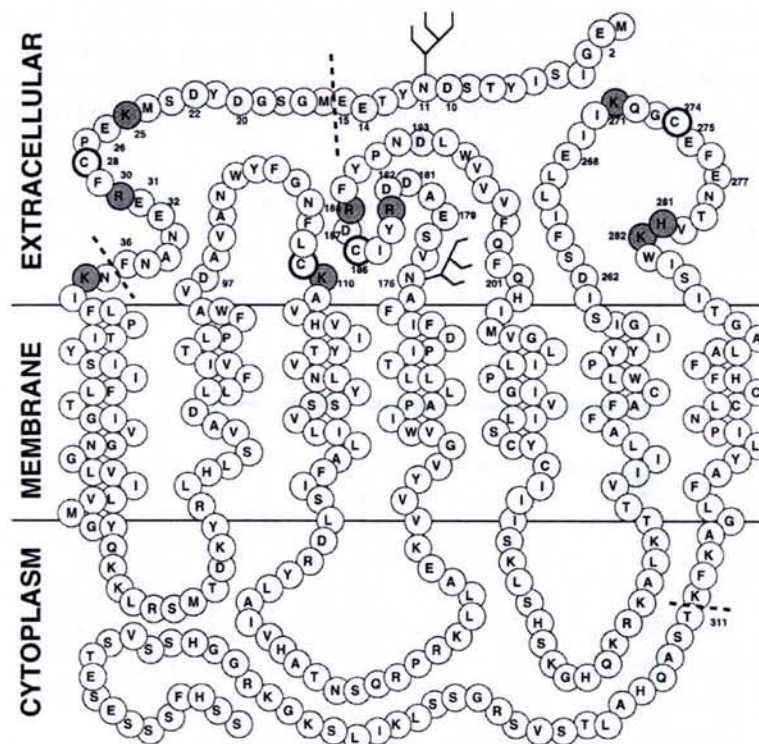


Figura 2. Sequenza e modello bidimensionale del recettore CXCR4. Sono evidenziati i residui basici ed i residui di cisteina dei domini extracellulari.

Il recettore CXCR4, in analogia con gli altri recettori delle chemochine e della rodopsina [18, 19], è accoppiato a proteine di tipo G_i che legano il GTP [20]. Le proteine eterotrimeriche di tipo G sono attivate dallo scambio GDP/GTP, e si dissociano nella subunità α , a cui è legato il GTP, e nella subunità $\beta\gamma$ (Figura 3). La subunità α attiva delle tirosina-chinasi attraverso cui avverrebbe la trasduzione del segnale [8]. La subunità $\beta\gamma$ attiva due enzimi di trasduzione del segnale, una fosfolipasi C ($PLC\beta_2$ e $PLC\beta_3$) la quale è specifica per il fosfatidilinositolo, ed una fosfatidilinositolo-3-OH chinasi ($PI3K\gamma$). La $PLC\beta$ genera dal fosfatidilinositolo-(4,5)-bifosfato due secondi messaggeri, l'inositolo-(1,4,5)-trifosfato (IP_3) ed il diacilglicerolo (DAG). IP_3 induce il rilascio di Ca^{2+} dalle vescicole intracellulari, e il DAG attiva diverse isoforme della proteina chinasi C (PKC). La $PI3K\gamma$ genera il fosfatidilinositolo-(3,4,5)-trifosfato ed inizia l'attivazione di un'altra chinasi, la PKB. Inoltre la subunità $\beta\gamma$ attiva altri enzimi come la serina/treonina-chinasi MAP, detta anche Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK).

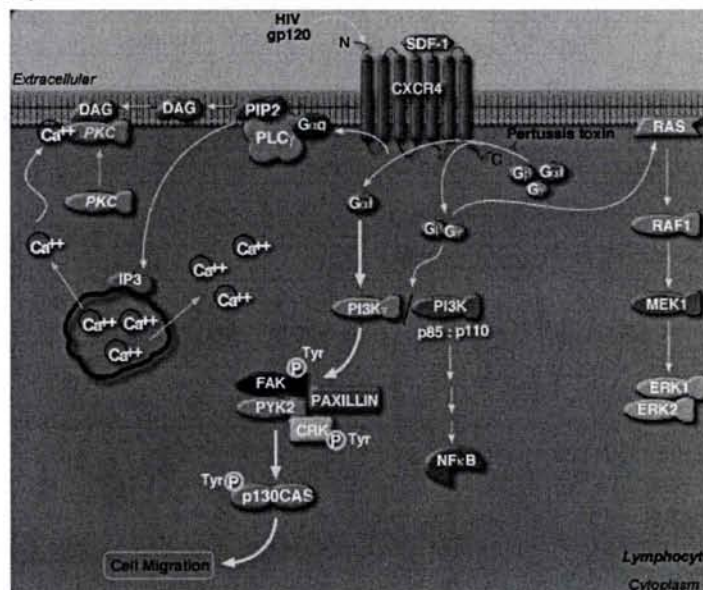
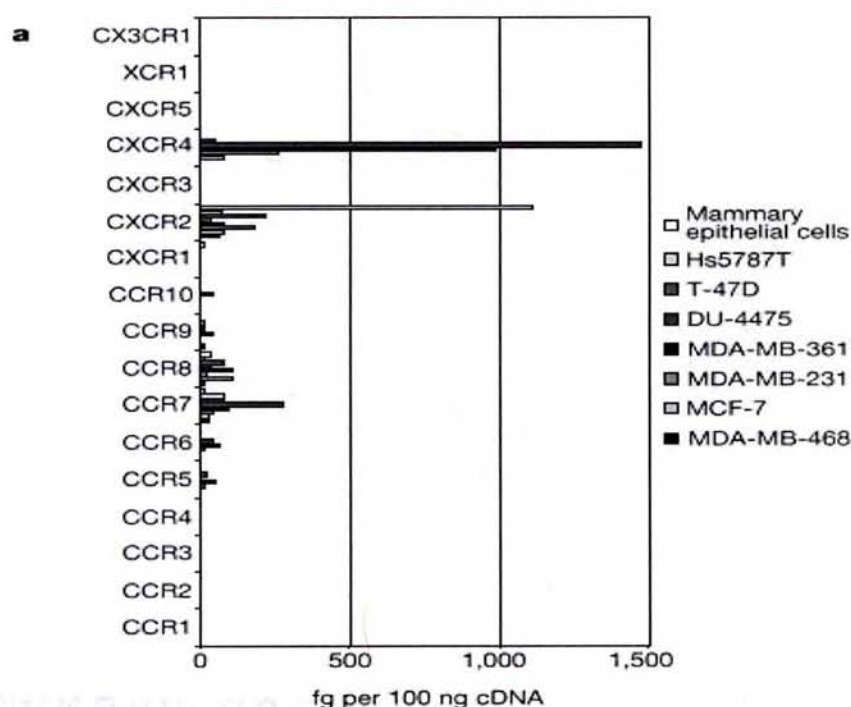


Figura 3. Attivazione proteina G_i attraverso l'interazione del recettore con il ligando

Sovraespressione del recettore CXCR4 nelle cellule tumorali

La migrazione delle cellule tumorali e la loro metastasi mostra molte similitudini con il traffico dei leucociti, il quale è regolato dalle chemochine e dai loro recettori. In particolare il recettore CXCR4 è sovraespresso nelle cellule del cancro al seno [12] (Figura 4 e 5) ed il ligando SDF-1 esibisce livelli elevati di espressione negli organi che rappresentano la principale destinazione delle metastasi. Infatti, l'interazione del ligando con il recettore induce una risposta invasiva e la neutralizzazione *in vivo* dell'interazione SDF-1/CXCR4 inibisce significativamente la metastasi del cancro al seno verso i linfonodi e polmoni.

Figura 4. Espressione dei recettori di chemochine in cellule tumorali umane. Analisi quantitativa in sette linee cellulari del cancro al seno confrontate con cellule epiteliali normali.



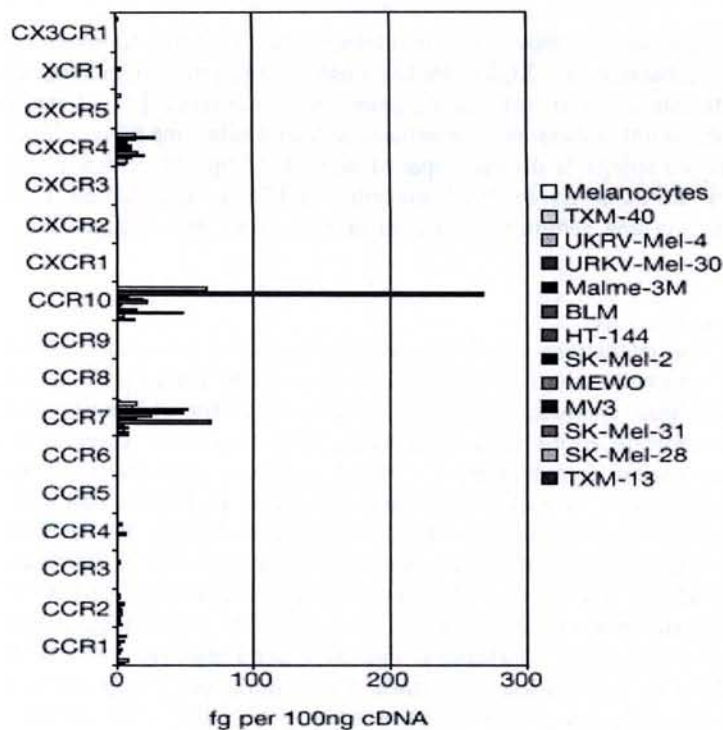


Figura 5. Espressione dei recettori di chemochine in cellule tumorali umane. Analisi quantitativa in 12 linee cellulari di melanoma umano maligno confrontate con melanociti normali

Alti livelli di espressione del recettore CXCR4 sono presenti anche nelle cellule umane di melanoma maligno, di mieloma [21], di carcinoma del colon [22], di neuroblastoma [23] e di neuroepitelioma [24, 25]. Inoltre è stato descritto il sistema di trasduzione del segnale attivato dalla chemochina SDF-1 nelle cellule CHP100 in cui il recettore CXCR4 è accoppiato alla fosforilazione della chinasi ERK1/2 (Extracellular signal-Related Kinase) e Akt [25].

CXCR4 e HIV

Il recettore CXCR4 è stato identificato come corecettore per la fusione e l'infezione dell'HIV-1 e dell'HIV-2 com'è riportato nel modello schematico in Figura 6 relativo all'interazione delle glicoproteine gp120e gp41 dell'HIV con il recettore CD4 e con i corecettori CXCR4 e CCR5.

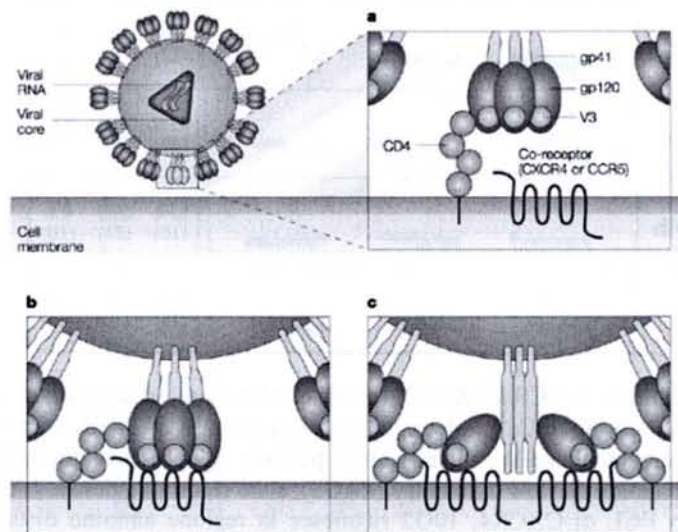


Figura 6. Modello di interazione delle glicoproteine gp120 e gp41 dell'HIV con il recettore CD4 ed i corecettori CXCR4 e CCR5.

È stato inoltre dimostrato che il recettore CXCR4 dimerizza in lisati cellulari contenenti detersivi che preservano la conformazione nativa del recettore [26]. Ciò è risultato essere indipendente dai livelli di espressione di CXCR4 che non interagisce con CCR5 quando le due proteine sono coesprese. Usando tecniche di bioluminescenza (BRET), è risultato evidente che multimeri di CXCR4 sono presenti naturalmente nelle membrane cellulari integre, sia in presenza che in assenza di ligando. Per alcune GPCR dimeriche, le eliche transmembrana 5 e 6 giocherebbero un ruolo importante nel favorire il contatto interproteico [27]. La presenza nella quinta elica transmembrana di CXCR4 di una cisteina aggiuntiva,

non presente negli altri recettori di chemochine, sebbene essa non formi ponti disolfurici tra monomeri adiacenti, potrebbe contribuire in altro modo alla dimerizzazione di CXCR4. Inoltre l'uso di anticorpi monoclonali (Mab) per CXCR4 ha mostrato che tale recettore presenta una considerevole eterogeneità conformazionale [28]. I fattori responsabili di tali alterazioni conformazionali sono sconosciuti, ma essi non riguardano né la glicosilazione né la solfonazione del dominio N-terminale di CXCR4. Tale eterogeneità spiega la diversa capacità secondo il tipo di cellula di bloccare la chemotassi, dipendente da SDF-1, e la diversa attitudine ad inibire l'infezione da HIV-1. L'anticorpo 12G5 usato per studiare l'espressione di CXCR4, riconosce solo una sottopopolazione di tale recettore, ne consegue che la concentrazione di CXCR4 è stata finora sottostimata.

Studi di mutagenesi e di *modeling* molecolare

Le regioni del CXCR4 responsabili dell'interazione con il ligando naturale SDF-1 non sono definite precisamente poiché ad oggi non vi sono stati studi di caratterizzazione strutturale allo stato solido (raggi X) o in soluzione (NMR) sulla struttura del recettore, o di sue parti. Studi di mutagenesi hanno tuttavia consentito di identificare le regioni di CXCR4 responsabili della sua funzionalità come recettore della chemochina SDF-1, e come corecettore dell'HIV-1 [29]. In particolare, residui in tutte le quattro regioni extracellulari di CXCR4 sembrano contribuire alla funzione di corecettore anche se i primi due *loop* extracellulari (ECL1 ed ECL2) sono i più importanti. La fusione dell'HIV-1 richiede regioni di CXCR4 che si sovrappongono alle regioni di legame ed attivazione usate da SDF-1, ma le funzioni recettoriali sono chiaramente distinte dalla capacità di CXCR4 di funzionare come corecettore [30]. Ciò in analogia con l'altro principale corecettore dell'HIV, il recettore CCR5 [31, 32]. Studi condotti su mutanti e chimere CXCR4-CXCR2 (Figura 7) indicano che mentre la regione ammino terminale distale relativa ai primi 27 residui fino alla cisteina conservata di CXCR4 non sono né necessari né sufficienti per l'attivazione attraverso il ligando e per l'ingresso dell'HIV-1, la regione ammino terminale tra la cisteina conservata e la regione transmembrana è necessaria per l'interazione di SDF-1 e supporta l'infezione virale e l'espressione in superficie del recettore chimera. I residui nel ECL2 e nel secondo *loop* intracellulare di CXCR4 (DRY box) sono necessari all'attivazione del recettore, ed anche il terzo *loop* extracellulare (ECL3) di CXCR4 riveste un ruolo importante nell'attivazione forse attraverso la conservazione della conformazione globale della proteina di membrana (Figura 8). Inoltre, l'eliminazione della regione C-terminale ricca di residui di Ser e di Thr quali potenziali siti di fosforilazione non ha effetti sulle capacità di trasmissione del segnale da parte di CXCR4 come dimostrato da misure della mobilità del Ca^{2+} intracellulare [29].


















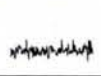

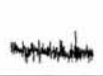

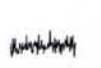


		SDF	IL8	Gro α	FACS % Gated (MF)		
					12G5	10G2	807
	CXCR4				39% (63)	6% (12)	6% (13)
	CXCR2				7% (13)	30% (39)	5% (12)
	4222				6% (12)	5% (10)	5% (13)
	2444				43% (62)	39% (54)	5% (12)
	2444b				13% (16)	26% (24)	4% (10)
	4442				38% (71)	5% (10)	8% (15)

Figura 7. Recettori chimere CXCR4-CXCR2. I nomi e le strutture generali dei recettori sono indicati a sinistra. È riportata l'attività relativa alla mobilità di Ca^{2+} indotta, nelle cellule transfettate, dalla stimolazione da parte delle chemochine SDF-1, IL-8 e Gro α . La percentuale delle cellule risultate positive alla presenza dei recettori (% *Gated*) ed il valore medio della fluorescenza (MF), ottenute da flow cytometry (FACS), sono riportati a destra. L'anticorpo monoclonale 12G5 riconosce il primo ed il secondo ECL di CXCR4, 10G2 riconosce la regione ammino distale di CXCR2, e 807 è un anticorpo di controllo [29].

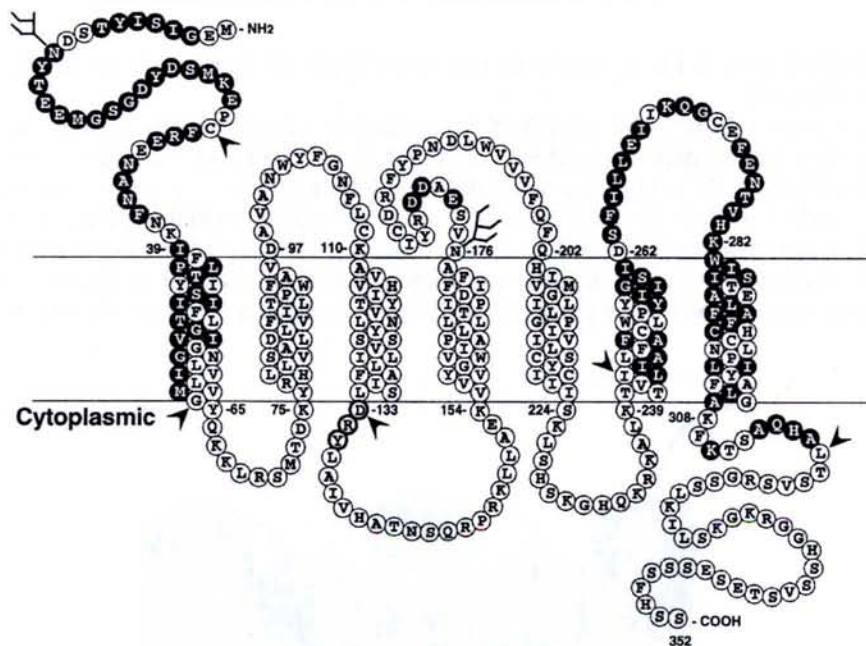


Figura 8. Sequenza del recettore CXCR4. I residui indicati in neretto sono sostituiti nei recettori mutanti e chimere e sono richiesti per l'attivazione della funzione recettoriale e corecettoriale. Le frecce indicano i residui di giunzione a partire dai quali sono stati costruiti i recettori mutanti e le chimere.

Dati recenti di letteratura riportano possibili modelli di CXCR4 ottenuti attraverso simulazioni di *modeling* molecolare [33, 34] e studi di mutagenesi indicano che anche i residui di D²⁰ e di Y²¹ nel dominio N-terminale ed il residuo di E²⁶⁸ nella regione ECL3 sono coinvolti nell'interazione di CXCR4 con la chemochina SDF-1 α [34] (Figura 9).

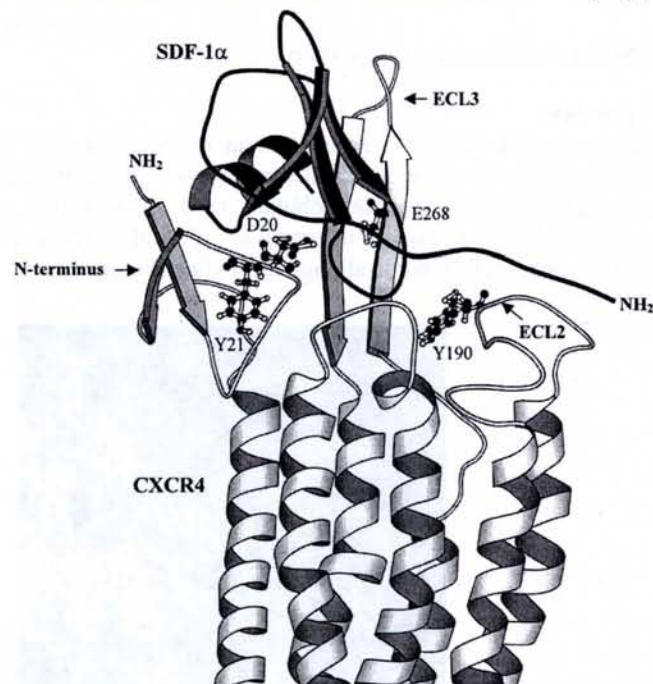


Figura 9. Modeling molecolare del recettore CXCR4 ed interazione con SDF-1[34]

I residui di cisteina presenti nei *loop* extracellulari ECL-1 ed ECL-2 sono altamente conservati tra i recettori accoppiati alle proteine G e si pensa formino tra loro un ponte disolfurico [35] che risulta importante al fine del corretto ripiegamento e dell'espressione sulla superficie cellulare del recettore. Il secondo paio di cisteine extracellulari, una nella regione N-terminale e l'altra nel *loop* ECL-3, è conservato solo nei recettori di chemochine. Da studi di mutagenesi sembrerebbe che anche queste cisteine formino un ponte disolfurico [36]. Quest'ultima evidenza, e la scoperta dell'esistenza del recettore nella forma dimerica [26] rendono meno attendibili i modelli del recettore CXCR4 finora ottenuti.

Modificazioni post-traduzionali e recettori con 5 eliche transmembrana

Come per i recettori di chemochine CCR5 e CCR2b [37-40], il CXCR4 è modificato post-traduzionalmente da solfonazione delle tirosine ammino terminali. Il gruppo solfato sulla Tyr²¹ contribuirebbe sostanzialmente all'interazione di legame con SDF-1, mentre svolgerebbe un ruolo più marginale nell'ingresso dell'HIV-1. Inoltre in alcune linee cellulari e primo caso tra le GPCR, il CXCR4 presenta la Ser¹⁸ modificata con il gruppo condroitin solfato. Tale serina è inserita nella

sequenza (DGSG) in analogia a molti siti di legame di glicosamminoglicani anche se la sua assenza sembrerebbe non alterare l'attività del recettore [41].

Sebbene nessuno dei recettori GPCR finora identificati nei procarioti e negli eucarioti presenti meno di sette domini transmembrana [42], recettori mutanti delle chemochine (mCXCR4 ed mCCR5) sono stati ottenuti per eliminazione delle prime due eliche transmembrana e del primo *loop* intracellulare ed extracellulare. Entrambi i recettori con solo cinque eliche transmembrana secondo il modello bidimensionale [43], e con la regione N terminale integra direttamente connessa alla terza elica (Figura 10), sono stati espressi stabilmente sulla superficie cellulare e funzionano come normali recettori di chemochine [44]. Questo risultato inatteso è spiegabile con l'assunzione di un modello di disposizione delle sette eliche sulla superficie cellulare in senso antiorario che porterebbe le prime due eliche in posizione abbastanza distante dalle altre cinque eliche [45].

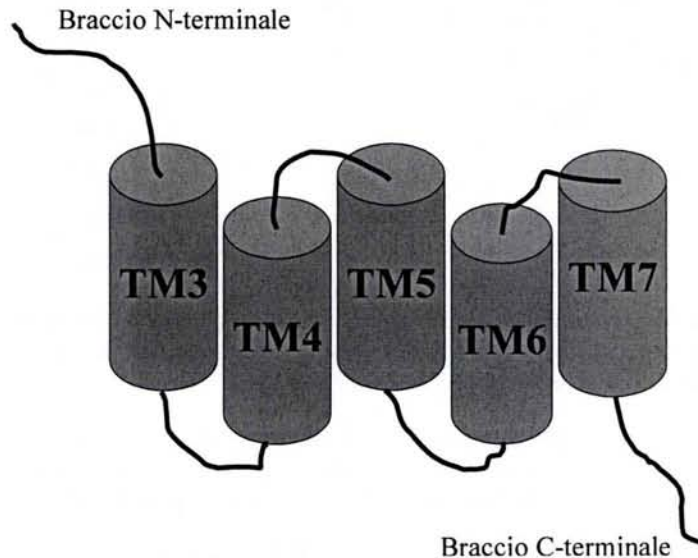


Figura 10. Recettore CXCR4 mutante con 5 eliche transmembrana

1.2 SDF-1: Struttura e funzione

La prima struttura della chemochina SDF-1 è stata ottenuta in soluzione con tecniche di NMR nel 1997 [46] e, solo successivamente, ne è stata risolta la struttura cristallografica [47] che è risultata essere praticamente identica a quella ottenuta in soluzione per quanto riguarda la parte globulare. La proteina, infatti, si presenta ben definita eccetto che per i residui N-terminali, nel tratto 1-8, e C-terminali, nel tratto 66-67. SDF-1 adotta la tipica conformazione delle chemochine che consiste in tre β -*strand* antiparalleli su cui si allunga un' α -elica (Figura 11)



Figura 11. Chemochina SDF-1: (A) struttura in soluzione (NMR); (B) struttura cristallografica

Sebbene comunemente le chemochine si presentino in forma di dimeri, la SDF-1 si trova, in soluzione, come monomero, mentre nelle diverse forme cristalline ottenute si trova sottoforma di dimero il che escluderebbe la possibilità della

formazione di un dimero quale artificio cristallografico [48]. La sintesi di analoghi della chemokina SDF-1 ha permesso inoltre di stabilire che i residui N-terminali ne determinano l'attività anche se i soli frammenti N-terminali costituiti dai residui Lys¹-Arg⁸ e Lys¹-Cys⁹ di SDF-1 non attivano né si legano alle cellule utilizzate probabilmente perché non assumono la conformazione necessaria per una opportuna interazione con il recettore. In particolare i residui di Lys¹ e di Pro² sono necessari per l'attivazione di CXCR4, ma non sono indispensabili per il legame, e inoltre l'aggiunta di una glicina all'N-terminale o la sostituzione del residuo di Val³ con un residuo di Ile porta ad un incremento della attività senza aumentarne l'affinità con il recettore (Tabella 2). L'ottenimento di chimere da SDF-1 e diverse chemokine (IL8, IP10, GRO) ha permesso di identificare ulteriormente il sito di legame nella regione di *loop* che lega il motivo CXC all'elica 3₁₀ (Figura 12) [46].

SDF nos	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
SDF-1β	KPVLSYSR	CPC	RFFESH	VARANVKHLKILN	TPNCALQIVARLK	NNNRQVCIDPKLKIQEYLEKALNKRFPK									
SDF-1	KPVLSYSR	CPC	RFFESH	VARANVKHLKILN	TPNCALQIVARLK	NNNRQVCIDPKLKIQEYLEKALN									
SDF-Gly	G
SDF K1R	R
SDF K1Orn	O
SDF P2G	.G
SDF V3I	.I
SDF AQA	..AQA
SDF Y7HH
SDF Y7AA
SDF R8KK
IP10H1	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	ISISNQFVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEIIATMCKKGEKACLNPEKAIKNLLKAVSKEMSKRSP												
IP10H2	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	<u>RFFESH</u>	VNPRSLKLEIIPASQFCPRVEIIATMCKKGEKACLNPEKAIKNLLKAVSKEMSKRSP											
IP10	VPLSRTVR	CTC	ISISNQFVNPRSLKLEIIPASQFCPRVEIIATMCKKGEKACLNPEKAIKNLLKAVSKEMSKRSP												
GROH1	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	LQTLQG	IHPKNIQHLKILN	TPNCAQTEVIATLKN	GRKACLNPAKPIVKKIIEKMLNSDKSN									
GROH2	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	<u>RFFESH</u>	IHPKNIQHLKILN	TPNCAQTEVIATLKN	GRKACLNPAKPIVKKIIEKMLNSDKSN									
GRO	ASVATELR	CQC	LQTLQG	IHPKNIQSVNVKSPGPHCAQTEVIATLKN	GRKACLNPAKPIVKKIIEKMLNSDKSN										
IL8H1	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	IKTYSK	FHPKFIKELRVIE	TPNCANTEIIVKLS	GRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS									
IL8H2	<u>KPVLSYSR</u>	CPC	<u>RFFESH</u>	FHPKFIKELRVIE	TPNCANTEIIVKLS	GRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS									
IL-8	SAKELR	CQC	IKTYSK	FHPKFIKELRVIE	SGPHCANTEIIVKLS	GRELCLDPKENWVQRVVEKFLKRAENS									

Figura 12. Allineamento di sequenza di analoghi di SDF-1. Le chimere sono indicate con il nome della chemochina utilizzata seguito da H1 e H2. Per le chimere le parti di sequenza corrispondenti a SDF-1 sono sottolineate [40].

Analoghi ^a	[Ca ²⁺] _i	Binding	HIV
	EC30 (nM) ^b	K _d (nM) ^c	IC ₅₀ (nM) ^d
SDF-1	1.1	3.6 ± 1.6	79
SDF-1β	1.0	2.2 ± 1	40
SDF-1{2-67}	>10000	20 ± 9	N.R.
SDF-1{3-67}	N.R.	46 ± 11	N.R.
SDF-1{4-67}	N.R.	340 ± 112	N.R.
SDF-1{5-67}	N.R.	390 ± 210	N.R.
SDF-1{6-67}	N.R.	410 ± 134	N.R.
SDF-1{7-67}	N.R.	470 ± 6	N.R.
SDF-1{8-67}	N.R.	490 ± 269	N.R.
SDF-1{9-67}	N.R.	N.R.	N.R.

Tabella 2. Sommario dati struttura-attività degli analoghi di SDF-1.

^aLe sequenze degli analoghi indicati sono mostrate in Figura 12.

^bLa concentrazione effettiva per il 30% di massima velocità di induzione del calcio libero intracellulare (EC30) è stata determinata da curve dose-risposta.

^cLe costanti di dissociazione apparente (K_d±SD) sono ricavate dalla media di tre differenti esperimenti di competizione di legame.

^dGli analoghi sono stati testati per l'inibizione (IC₅₀) dell'infezione da HIV.

N.R. Non Rivelabile.

1.3 Modello di interazione CXCR4/SDF-1

L'insieme dei dati di mutagenesi, di attività, di caratterizzazione strutturale e di *modeling* molecolare ha reso possibile la costruzione di un modello di interazione chemochina recettore che descrive due siti di legame contenuti nella sequenza KPVLSYSR-CPC-RFFESH. Il primo sito, riferito alla sequenza: RFFESH, in analogia con altri sistemi chemochina-recettore, risulta importante per un legame ottimale. È stato ipotizzato che questo passaggio serva come punto di ancoraggio di SDF-1 con la regione N-terminale di CXCR4 [29], ma non è sufficiente per l'attivazione del recettore [46], mentre il secondo sito, costituito dai residui N-terminali: KPVLSYSR, è necessario per l'attivazione di CXCR4 (Figura 13) attraverso l'accesso ad un sito più nascosto del recettore stesso. I due siti sono separati dal motivo CPC coinvolto nella proteina nativa nella formazione di due ponti disolfurici intramolecolari.

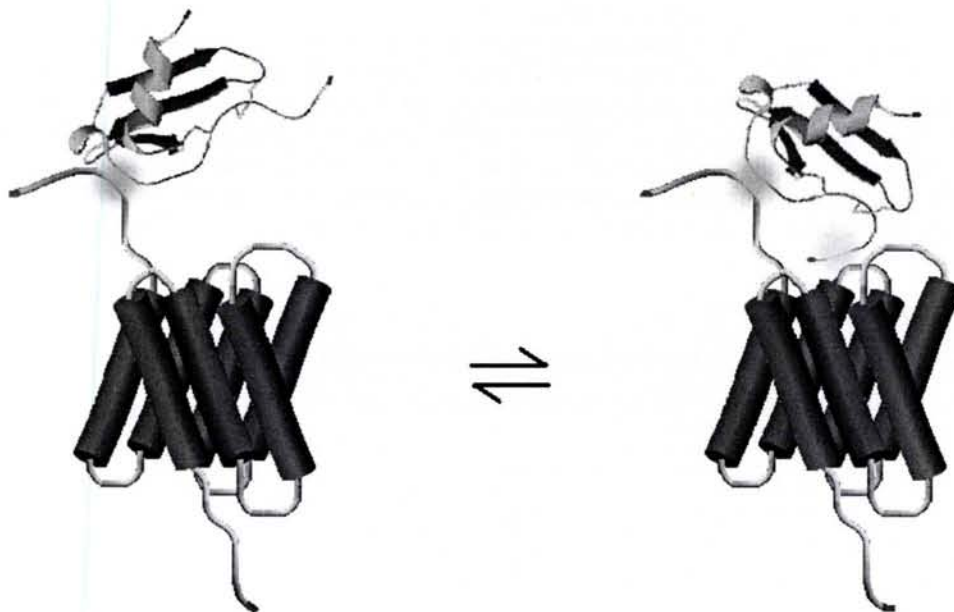


Figura 13. Modello dell'interazione tra il recettore CXCR4 e la chemokina SDF-1

Motivi di riconoscimento strutturale

Ulteriori studi condotti con tecniche NMR, a bassa temperatura, hanno permesso di determinare la struttura di tre peptidi N-terminali che legano il recettore CXCR4. Il primo peptide costituito dai residui 1-9 della chemochina naturale SDF-1 [49, 50] funzionerebbe come agonista, ciò in contrasto con i dati di attività ottenuti per lo stesso peptide e per lo stesso tipo di cellule in un precedente studio [46]. Il secondo peptide costituito dai residui 1-10 della chemochina virale vMIP-II [51], ed il terzo peptide costituito dai residui 1-8 della chemochina I-TAC [52] (Tabella 3) funzionano, invece, da antagonisti del recettore CXCR4. Lo scopo principale di questi studi è stato quello di identificare un motivo strutturale comune ai tre peptidi che definisse la conformazione assunta da queste molecole per legare il recettore CXCR4 in modo competitivo rispetto all'intera chemochina SDF-1.

Nome Proteina	Sequenza N-terminale	Attività rispetto CXCR4
I-TAC	FPMFKRGRCLC	Antagonista
SDF-1	KPVSLSYRCPC	Agonista
vMIP-II	LGASWHRPCC	Antagonista

Tabella 3. Sequenza N-terminale delle chemochine SDF-1, I-TAC e vMIP-II ed attività biologica rispetto al recettore CXCR4. Gli amminoacidi sottolineati rappresentano i motivi strutturali conservati.

I tre peptidi riportati in Tabella 3 hanno mostrato un elevato grado di flessibilità, ma è comunque identificata una regione strutturalmente ben definita dove il *backbone* peptidico è ripiegato in una conformazione semicompatta che mimerebbe la struttura dei peptidi nel complesso con il recettore (Figura 14).

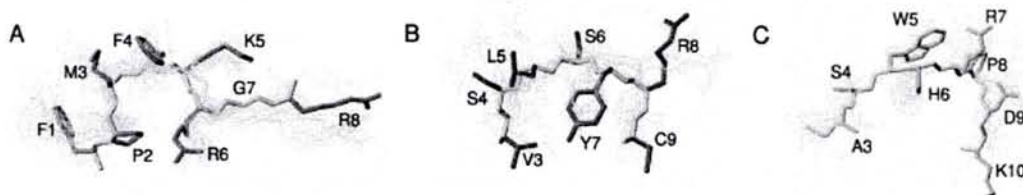
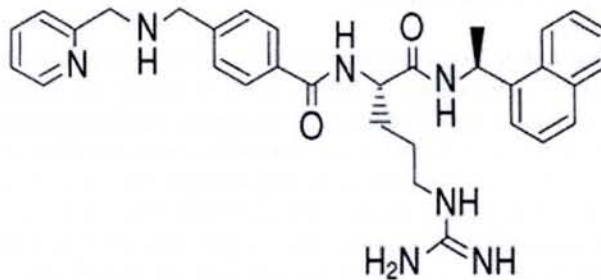
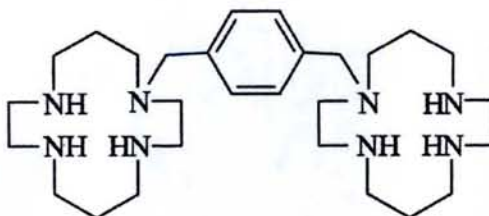


Figura 14. Struttura NMR N-terminale di I-TAC (A), SDF-1 (B), vMIP-II(C).

L'allineamento delle sequenze peptidiche mostra una stretta similitudine nella posizione di tre catene laterali: Met³, Phe⁴ e Lys⁵ per I-TAC; Leu⁵, Tyr⁷ e Arg⁸ per SDF-1; e Ser⁴, His⁶ ed Arg⁷ per vMIP-II. Infatti in due dei tre peptidi, il primo residuo amminoacidico di questo motivo strutturale è di natura idrofobica, in tutti i peptidi il secondo residuo amminoacidico contiene un anello aromatico ed il terzo residuo possiede una catena laterale basica. Anche la molecola AMD3100 (Figura 15), antagonista del recettore CXCR4, presenta una struttura che attraverso il gruppo fenilico ed il gruppo azamacrociclico, riproduce il motivo strutturale esibito dai peptidi [53]. Inoltre, recentemente è stato identificato un altro antagonista del recettore CXCR4 con una potente e selettiva attività anti HIV-1. Anche in questo caso la sequenza di tale molecola chiamata KRH-1636 presenta un residuo aromatico e uno di natura basica [54] (Figura 15).



KHR-1636 (A)



AMD3100 (B)

Figura 15. Struttura chimica degli antagonisti del recettore CXCR4: KHR-1636 (A) e di AMD3100 (B).

1.4 Agonisti ed Antagonisti del recettore CXCR4

L'interesse all'ottenimento di molecole in grado di interagire con il recettore delle chemochine CXCR4 ha svolto un ruolo cruciale nella sperimentazione di numerosi agenti classificabili secondo lo schema:

- a. **Analoghi del recettore delle chemochine**
 Domini extracellulari
 Domini transmembrana
- b. **Analoghi di chemochine**
 Analoghi di SDF-1 α
 Analoghi di vMIP-II
 Analoghi di I-TAC
- c. **Analoghi di peptidi naturali**
 Analoghi della polifemusina (T22, T140)
- d. **Molecole organiche**
 AMD3100
 KHR-1636
- e. **Anticorpi monoclonali**
 12G5 (IgG_{2a})
 4D10
 44716.111(IgG_{2b})
 44717.111(IgG_{2b})

1.4a Analoghi del recettore delle chemochine

Domini di transmembrana

Analoghi strutturali di singoli domini transmembrana dei recettori accoppiati alle proteine G possono essere utilizzati come potenti e specifici antagonisti dello stesso recettore di cui, in Figura 13, si riporta il possibile meccanismo di azione. In particolare la sintesi e l'impiego di peptidi derivati dalle regioni transmembrana dei recettori CXCR4 e CCR5 ha permesso di identificare antagonisti in grado di inibire *in vitro* la replicazione del virus dell'HIV-1. In Tabella 4 è riportata l'attività di inibizione indotta da SDF-1 in termini di rilascio intracellulare del calcio. L'uso del peptide corrispondente alla seconda elica transmembrana risulta inibire in maniera più efficace il rilascio del Ca^{2+} . La presenza di cariche negative alle estremità extracellulari dei peptidi antagonisti sembra importante per una corretta e spontanea inserzione di tali molecole nella membrana cellulare. Risultati simili sono stati ottenuti per il recettore delle colicistochinine di tipo A (CCKAR) [55].

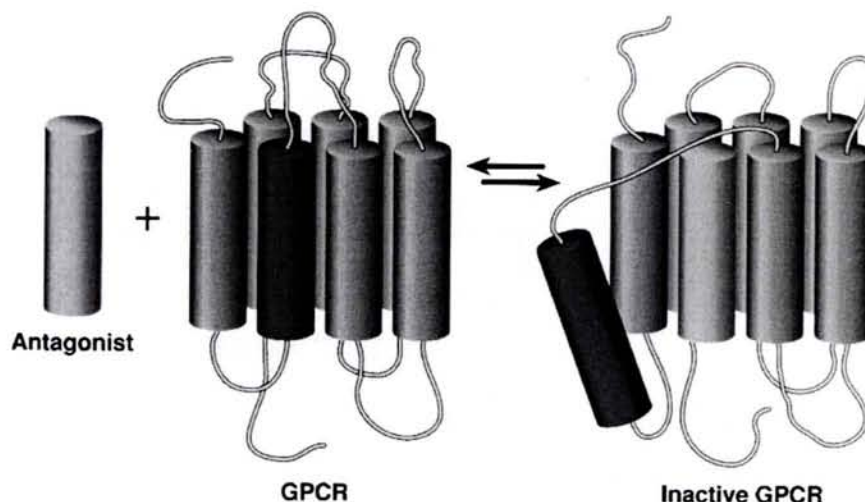


Figura 13. Meccanismo proposto per l'azione antagonista di un peptide corrispondente ad un'elica transmembrana di un recettore accoppiato ad una proteina G (GPCR)

Peptide	$[Ca^{2+}]$
CXCR4-1: DDIFLPTIYSIIFLTGIV-NH ₂	>30 μ M
CXCR4-2: LLFVITLPFWAVDAVANWYFGN-OH	5 \pm 1 μ M
CXCR4-3: KAVHVIYTVNLYSSVLILAFISL-NH ₂	>50 μ M
CXCR4-4: KVVYGVWIPALLLTIPDFIF-OH	>50 μ M
CXCR4-5: HIMVGLILPGIVILSCYCIII-NH ₂	>50 μ M
CXCR4-6: VILILAFFACWLPYYIGISID-OH	10 \pm 1 μ M
CXCR4-7: ALAFFHCLNPILYAFLGAK-NH ₂	>100 μ M

Tabella 4. Attività di peptidi sintetici, corrispondenti ai 7 domini transmembrana di CXCR4, nell'inibizione del rilascio intracellulare del calcio indotta da SDF-1

1.4b Analoghi di chemochine

Analoghi di SDF-1

Frammento N- e C-terminale della chemochina SDF-1

Naturalmente la ricerca di molecole capaci di interagire con il recettore CXCR4 è partita dallo studio della chemochina SDF-1 identificata come unico agonista naturale. I primi studi di mutagenesi e l'ottenimento di chemochine chimera hanno portato alla distinzione tra la capacità di legare il recettore e la possibilità di attivarlo. E contemporaneamente hanno permesso l'identificazione della regione N-terminale quale fondamentale per l'interazione chemochina-recettore, riportando l'inefficacia dell'interazione ed attivazione del recettore da parte della chemochina privata dei primi nove amminoacidi [56]. Tali studi hanno determinato i presupposti per avviare sintesi mirate di peptidi analoghi della chemochina SDF-1. Una prima analisi [49] ha valutato l'attività chemotattica di peptidi costituiti dai frammenti 1-8, 1-9 ed 1-17 di SDF-1 (Tabella 5 e 6). Essi esibiscono un'attività agonistica circa mille volte inferiore a SDF-1, mentre l'analogo dimerico del peptide corrispondente al frammento 1-9[P2G] si presenta, seppure con affinità inferiore all'SDF-1{1-17}, come antagonista dell'attività chemotattica.

Peptide	Sequenza amminoacidica
SDF-1	KPVLSYRCPCRFFESHVARAN VKHLKILNTPNCALQIVARLKN NNRQVCIDPKLKWIQEYLEKAL
SDF-1{1-8}	KPVLSYR
SDF-1{1-9}	KPVLSYRC
SDF-1{1-9[Aba]}	KPVLSYR ^{Aba}
SDF-1{1-9 dimero}	(KPVLSYRC) ₂

SDF-1{1-9[P2G] dimero}	(KGVLSYRC) ₂
SDF-1{1-17}	KPVLSYRCPCRFFESH

Tabella 5. Sequenza di peptidi analoghi SDF-1 [49]. In neretto è evidenziata la regione N-terminale della chemokina SDF-1 in comune con i peptidi sintetici.

Peptide	K_d (nM)	EC_{50} (nM)
SDF-1	9 ± 3	5 ± 1
SDF-1{1-8}		37500 ± 10600
SDF-1 {1-9}	13900 ± 5500	5200 ± 3800
SDF-1{1-9[Aba] }		17800
SDF-1{1-9 dimero}	730 ± 90	500
SDF-1{1-9[P2G] dimero}	2,580	
SDF-1{1-17}	850 ± 26	2200 ± 490

Tabella 6. Attività relativa dei peptidi derivati da SDF-1 [49] (EC_{50} : concentrazione effettiva per il 50% di massima attività chemotattica; K_d : costante di dissociazione apparente)

Gli studi successivi si sono focalizzati sulla sintesi di un peptide in cui fosse presente sia la regione N-terminale, corrispondente ai residui 1-17, che la regione C-terminale, relativa ai residui 55-67 della chemochina SDF-1 (Figura 17) [56, 57].

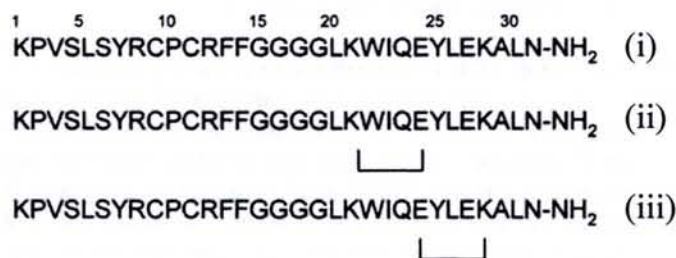


Figura 17. Sequenza peptidi analoghi SDF-1 formati dalle regioni C- ed N-terminale (i), e ciclizzati attraverso la formazione di un lattame tra Lys⁵⁶ e Glu⁶⁰ (ii), e tra Glu⁶⁰ e Lys⁶⁴ (iii).

È stato così possibile evidenziare che unendo direttamente la regione C-terminale elicoidale, che di per se non possiede alcuna affinità con il recettore, alla regione N-terminale, si verifica un elevato aumento della attività recettoriale rispetto al solo frammento 1-17 senza per altro incrementare l'affinità tra peptide e recettore. Tale incremento risulta ancora più evidente se l'elica C-terminale è stabilizzata attraverso la ciclizzazione delle catene laterali dei residui di glutammico 60 e lisina 56 o lisina 64 (Figura 17). Inoltre, sulla base di studi che mostrano un'elevata affinità di SDF-1 con l'eparina [58, 59], è stato osservato che l'aggiunta di questo glicosamminoglicano (GAG), elimina completamente il flusso del Ca²⁺ intracellulare attivato dal peptide formato dalle regioni N,C-terminale. Questa evidenza ha suggerito l'ipotesi che quando il frammento C-terminale interagisce con glicosamminoglicani ciò possa modulare l'attività biologica di SDF-1. La successiva caratterizzazione strutturale del complesso tra SDF-1/eparina attraverso esperimenti di mutagenesi e di SPR (surface plasmon resonance) ha permesso di identificare i residui basici di lisina ed arginina (Lys¹, Lys²⁴, Lys²⁷ e Arg⁴¹) quali principali responsabili del legame con il polisaccaride modello utilizzato [60] (Figura 18a e 18b).

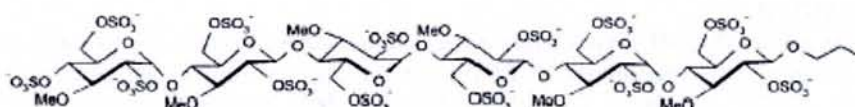


Figura 18a. Struttura eparina



Figura 18b. Modello complesso dimero SDF-1/eparina

Frammento N-terminale di SDF-1 e distribuzione di carica positiva

La notevole distribuzione di carica positiva è una caratteristica comune sia alla regione a foglietto β della chemochina SDF-1, sia al peptide antagonista ALX40-4C [61] costituito da nove residui di D-Arg. Per verificare l'importanza di tale cariche nell'interazione con il recettore CXCR4 sono stati effettuati studi con peptidi sintetici [62] costituiti dagli amminoacidi della regione N-terminale legati agli amminoacidi della regione a foglietto β di SDF-1. Tali peptidi presentano una migliore capacità sia di legare il recettore CXCR4 che di inibire l'ingresso dell'HIV-1. Un ulteriore studio condotto su un peptide, costituito dalla regione N-terminale di SDF-1 legata a nove residui D-Arg, ha evidenziato la produzione di un flusso del Ca^{2+} intracellulare distinto da quello indotto dal peptide N-terminale della chemochina. Inoltre tale segnale è inibito da ALX40-4C che avrebbe un sito di legame in CXCR4 sovrapposto parzialmente al sito di legame di SDF-1.

Antagonisti allosterici analoghi di SDF-1

L'uso di agonisti allosterici potrebbe prevenire tutte le complicazioni legate all'uso di antagonisti del recettore CXCR4. A tale fine sono stati costruiti oligonucleotidi, codificanti per peptidi contenenti di 17 residui amminoacidici, nei quali i primi 4 codoni erano variabili mentre i codoni da 5 a 17 corrispondevano alla sequenza N-terminale di SDF-1. Dei 160000 peptidi così ottenuti solo 2 hanno mostrato attività agonistica. In particolare i due agonisti individuati presentano le sequenze RSVMLSYRCPFRFFESH, e ASLWLSYRCPFRFFESH. Il primo peptide definito, come RSVM, funziona come agonista parziale ed ha un'attività indifferente sia alla presenza di molecole antagoniste di CXCR4 quali AMD3100 e T140, sia agli anticorpi monoclonali 12G5 e 44717.111 che invece inibiscono l'attività della proteina mutante [RSVM]SDF-1. Il secondo peptide, descritto come ASLW, è un super agonista con un indice chemotattico più grande di SDF-1 α , non induce internalizzazione del recettore ed è anch'esso indifferente sia alla presenza degli anticorpi che delle molecole antagoniste di CXCR4. La proteina mutante corrispondente [ASLW]SDF-1 è addirittura inattiva. L'insieme di questi dati suggerisce la presenza di siti alternativi di legame per i peptidi agonisti sul recettore CXCR4 [63]. L'agonismo allosterico è relativamente poco comune nella letteratura dei recettori accoppiati alle proteine G. Infatti, solitamente i ligandi allosterici agiscono da antagonisti o da modulatori dell'attività dei ligandi naturali senza avere una intrinseca attività agonista. È stato ipotizzato che la mancata individuazione di agonisti allosterici per le GPCR sia dovuta all'uso di saggi non ottimali [64].

Analoghi di vMIP-II

La chemochina virale vMIP-II (*viral macrophage inflammatory protein II*), di cui è stato recentemente riportato un modello di interazione con il recettore CXCR4 (Figura 19 [34]), ha la particolare proprietà di interagire sia con recettori di tipo CCR che CXCR. La sintesi di analoghi peptidici della regione N-terminale di tale proteina ha portato alla individuazione di un antagonista specifico per il recettore CXCR4 con affinità maggiore dei peptidi analoghi di SDF-1. Inoltre tale peptide costituito dai primi 21 amminoacidi di vMIP-II, di sequenza LGASWHRPDKCCLGYQKRPLP, inibisce selettivamente l'ingresso dell'HIV dipendente da CXCR4 [51].

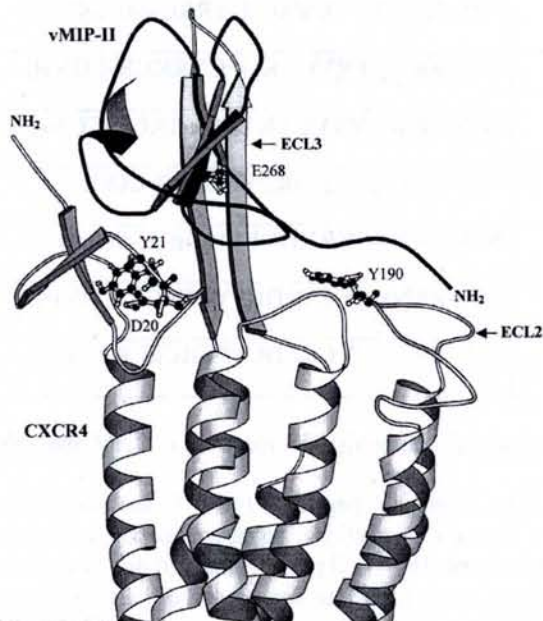


Figura 19. Modello interazione vMIP-II/CXCR4 [34]

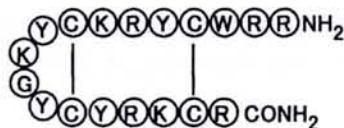
La sintesi di analoghi peptidici sia di SDF-1 che di vMIP-II costituiti da tutti enantiomeri di tipo D ha portato alla individuazione di antagonisti del recettore CXCR4, più stabili dei corrispondenti peptidi costituiti da L-amminoacidi, evidenziando la notevole ed inusuale flessibilità stereochimica dell'interfaccia CXCR4-Ligando. La principale differenza di questi peptidi rispetto al già noto antagonista costituito esclusivamente da residui D-Arg, consiste nel fatto che ALX40-4C, come altre molecole con elevata carica positiva (T22, AMD3100), agisce probabilmente attraverso interazioni di tipo elettrostatico (carica-carica) e quindi in modo meno selettivo [65].

1.4c Analoghi di peptidi naturali

Analogo della polifemusina: T22

T22 ([Tyr^{5,12}, Lys⁷]-polifemusina II) è un peptide sintetico di 18 residui analogo della polifemusina II con elevata attività anti HIV-1 [66]. Inoltre T22 funziona come antagonista specifico del recettore CXCR4 anche se non è escluso che possa interagire con la regione V3 dell'involucro dell'HIV-1 [67-69] (Figura 20).

T22



4Ala-T-I



Figura 20. Sequenza peptide T22 [67]

Dato che T22 inibisce la mobilità del calcio intracellulare indotta dalla chemochina SDF-1, è probabile che la sua struttura a foglietto β antiparallelo, stabilizzata da due ponti disolfurici, mimi la regione della chemochina coinvolta nell'attivazione del recettore.

Analogo della polifemusina: T140

Basandosi sulla struttura di T22 sono stati ideati e sperimentati altri peptidi analoghi dai quali si è ottenuto un antagonista del recettore CXCR4 costituito da 14 residui, più potente e specifico del T22, designato come T140 [70-72] che presenta la sostituzione di un'Arg con un residuo di citrullina e la sostituzione del Trp con un residuo di naftilalanina (Tabella 7). Ulteriori studi di relazione tra struttura ed attività hanno rilevato l'importanza critica del residuo di L-3-(2-naftil)alanina in posizione 3 del T140 [73]. L'indice di selettività e di attività di T140 è comparabile con l'AZT ed è notevolmente maggiore degli altri inibitori di CXCR4 quali AMD3100 e ALX40-4C; inoltre la capacità di inibire il legame del recettore CXCR4 con l'anticorpo 12G5 è maggiore anche dello stesso ligando SDF-1.

Nome peptide	Sequenza amminoacidica
--------------	------------------------

Tachiplesina	NH ₂ -KWCFRVCYRGICYRRRCR-CONH ₂
Polifemusina	NH ₂ -RRWCFRVCYKGFYRKRKR-CONH ₂
T22	NH ₂ -RRWCYRVCYKGFYRKRKR-CONH ₂
T134	NH ₂ -RRWCYRKDKPYRCitCR-COOH
T140	NH ₂ -RRNaICYRKDKPYRCitCR-COOH
TN14003	NH ₂ -RRNaICYCikDKPYRCitCR-CONH ₂
TC14012	NH ₂ -RRNaICYCikDKPYRCitCR-CONH ₂

Tabella 7. Sequenze di peptidi antagonisti del recettore CXCR4 analoghi del T22.

È stato dimostrato che un limite del peptide T140 è la sua instabilità quando è presente nel siero felino. Infatti in tali condizioni il peptide è digerito da peptidasi ed in particolare si osserva il distacco del residuo di Arg C-terminale che è indispensabile per l'attività anti HIV-1. Il peptide analogo del T140 ammidato alla posizione C-terminale, risulta più stabile dell'analogo libero, ma ad esso è associata una perdita di parte della sua capacità inibitoria oltre che una forte citotossicità probabilmente legata all'incremento della carica netta del peptide [71]. Sulla base di queste evidenze sono stati individuati, attraverso la introduzione sistematica di due residui di citrullina, e l'ammidazione del residuo C-terminale, due nuovi peptidi stabili nel siero e con maggiore indice di selettività (SI) denominati TN14003 e TC14012. (Tabella 8). Inoltre molecole cicliche, di sequenza c-(Nal-Gly-DTyr-Arg-Arg), correlabili al peptide T140 hanno mostrato un'affinità comparabile con quest'ultimo [72].

Nome peptide	EC ₅₀ (nM)	CC ₅₀ (μM)	SI	IC ₅₀ (nM)
T22	290	20	67	48
T134	74	20	290	4.1
T140	12	54	4400	2.5
TN14003	0.6	410	680000	12
TC14012	0.4	800	2 x 10 ⁶	19
SDF-1	730	11	16	110
AMD3100	280	250	1000	13000
ALX40-4C	1300	140	110	3200
AZT	5.9	27	4500	-

Tabella 8. Attività dei peptidi analoghi del T22 ed altri antagonisti di CXCR4 (EC₅₀: 50% di concentrazione effettiva di attività anti HIV-1; CC₅₀: 50% della concentrazione citotossica; SI: Indice di selettività espresso come CC₅₀/EC₅₀; IC₅₀: 50% inibizione *binding* 12G5)

1.4d Molecole organiche

AMD3100

La scoperta della relativa efficacia *in vivo* dell'uso di un poliossometallato HPA-23 [(NH₄)₁₇Na(NaSb₉W₂₁O₈₆)•14H₂O] (SI ≥ 500) [53] contro l'HIV ha portato allo studio di un gran numero di composti simili. Naturalmente, pensando all'importanza del metallo, gli studi successivi hanno impiegato metallo complessi di tipo organico del tipo delle metalloporfirine senza però ottenere risultati soddisfacenti da punto di vista della selettività e della potenza [74]. Quindi l'attenzione si è spostata su un semplice macrociclo chiamato ciclame (1,4,8,11-tetra-azociclotetradecano) che attraverso quattro atomi di azoto può coordinare ioni metallici. Prima di sintetizzare complessi con il metallo sono stati testati campioni di ciclame evidenziando per esso attività anti HIV-1 che si è scoperto essere dovuta ad impurezza del campione, che poi è stata in seguito isolata e caratterizzata. Tale sostanza chiamata JM1657 (Johnson Matthey Company) non è altro che un biciclame. Non riuscendo a sintetizzare tale composto sono stati progettati degli analoghi da cui si è ottenuto uno dei più potenti agenti anti HIV-1 (SI ≥ 100000) chiamato JM3100 o anche AMD3100 (AnorMED Company). Tale composto è riconosciuto come candidato per il trattamento clinico dell'infezione da HIV-1 (Figura 21) così come anche il più recente analogo AMD070 somministrabile anche oralmente [75, 76].

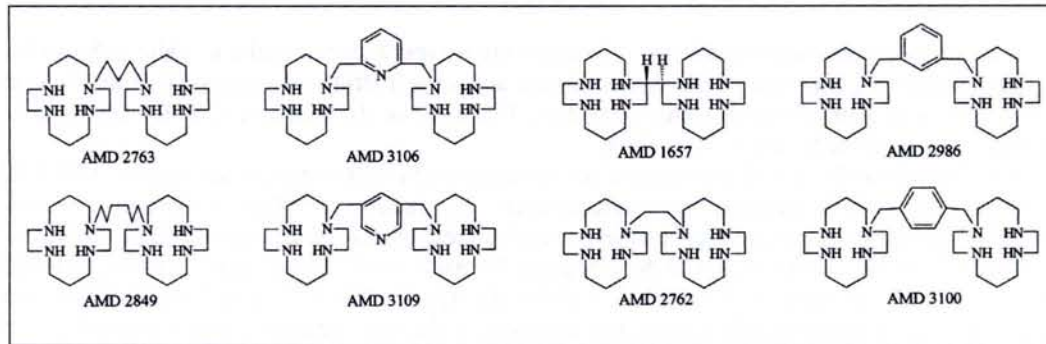


Figura 21. Struttura di AMD3100 e di alcuni analoghi.

Il composto AMD3100 è un antagonista del recettore CXCR4 estremamente specifico ed efficace grazie alle interazioni elettrostatiche tra gli atomi di azoto del ciclame ed i residui di acido aspartico in posizione 171, 182, 193, e 262 del recettore (Figura 22).

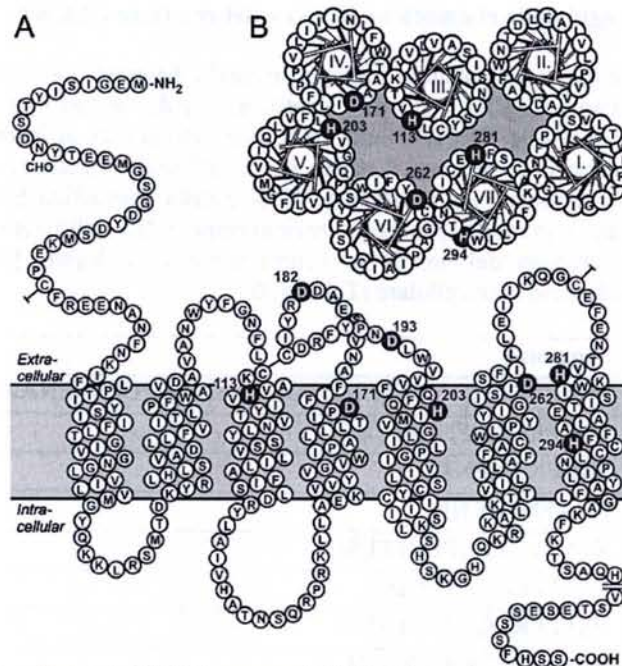


Figura 22. Rappresentazione dei residui del CXCR4 responsabili dell'interazione con AMD3100.

in particolare sono fondamentali per tale interazione (CXCR4/AMD3100) i residui D¹⁷¹ e D²⁶², posti tra le regioni transmembrana ed i *loop* extracellulari [77, 78]; inoltre l'affinità di AMD3100 per il recettore CXCR4 è incrementata dalla presenza di ioni metallici Cu (II), Zn (II), e Ni (II)[79, 80] (Figura 23).

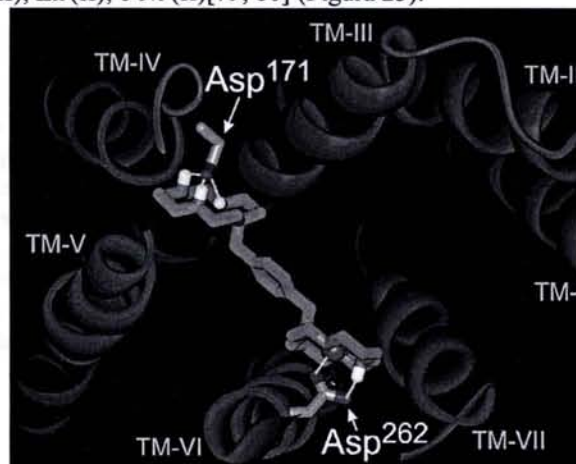


Figura 23. Modello di interazione AMD3100/CXCR4 via Asp¹⁷¹ e Asp²⁶² [73].

Scopo del lavoro di Tesi

In questo ampio contesto bibliografico si inserisce il lavoro sperimentale svolto in Italia nell'ambito della tesi di Dottorato, che vuole portare un contributo nella comprensione dei dettagli strutturali, responsabili dell'interazione tra chemochine e recettori. In particolare abbiamo scelto di studiare l'interazione del recettore CXCR4 con la chemochina SDF-1, per la specificità e la biunivocità di tale interazione.

La razionalizzazione dei dati di letteratura circa le relazioni struttura-proprietà del sistema SDF-1/CXCR4 ci ha suggerito la sintesi di diversi peptidi, per caratterizzare in modo specifico l'ipotetico meccanismo di interazione chemochina/recettore. In particolare, la sintesi di analoghi del braccio N-terminale di CXCR4 (CXCR4{1-39}, CXCR4{28-39}, CXCR4{29-39}, CXCR4{Sc}), e della regione N-terminale di SDF-1 (SDF-1{1-17}, SDF-1{H-H}, SDF-1{HG₃H}, SDF-1{Y₄}, SDF-1{Loop}, SDF-1{RFF₄}, e SDF-1{Beta}) riportati in Tabella 9, nasce soprattutto dall'analisi dei dati di mutagenesi che descrivono tali regioni del recettore e del suo ligando come necessarie sia per il legame che per l'attivazione, senza però caratterizzarle in modo specifico.

Punto fondamentale della caratterizzazione relativa all'interazione specifica CXCR4/SDF-1 è la completa assenza ad oggi di studi strutturali per il recettore, sia in soluzione che allo stato solido. Pertanto si è cercato di costruire un utile, rappresentativo, e relativamente semplice sistema modello, da studiare mediante metodologie in soluzione quali la spettroscopia di fluorescenza, la risonanza magnetica nucleare e con *test* di attività biologica *in vitro*.

Sintesi dei peptidi analoghi della chemochina SDF-1 e del recettore CXCR4

La possibilità di ottenere molecole sintetiche, utili per impieghi diagnostici e/o terapeutici nei diversi campi delle patologie in cui è coinvolto il recettore CXCR4, richiede l'identificazione dei requisiti per una efficace e selettiva interazione tra la chemochina SDF-1 ed il recettore CXCR4. Sulla base di numerosi dati di letteratura, soprattutto dall'analisi dei dati di mutagenesi, abbiamo deciso di indirizzare il nostro studio del sistema recettore/ligando attraverso la sintesi di analoghi peptidici della regione N-terminale del recettore CXCR4 e della chemochina SDF-1. In particolare, volendo ottenere dei composti in grado di mimare in modo specifico le regioni responsabili dell'interazioni di legame, sono stati sintetizzati per la chemochina dei peptidi analoghi del loop definito come primo sito di legame [46], e per il recettore sono stati sintetizzati peptidi corrispondenti al braccio extracellulare (Tabella 9).

Nome peptide	Sequenza
CXCR4{1-39}	MEGISIYTS DNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKI
CXCR4{28-39}	CFREENANFNKI
CXCR4{29-39}	FREENANFNKI
CXCR4{Sc}	ENAFNFRKNEI
SDF-1{1-17}	KPVLSYRCP RFFESH
SDF-1{H-H}	HSEFFRCPC RFFESH
SDF-1{HG ₃ H}	HSEFFRGGGRFFESH
SDF-1{Y ₄ }	HSEYYRCPC RYYESH
SDF-1{Loop}	GRFFESH
SDF-1{RFF ₄ }	RFFRFFRFFRFFH
SDF-1{Beta}	βAβARFFβAβAH

Tabella 9. Sequenze peptidiche sintetiche del recettore CXCR4 e della chemochina SDF-1

Spettri CD in soluzione acquosa dei peptidi sintetizzati

Per studiare la conformazione assunta dagli analoghi della chemochina SDF-1 e del suo recettore in soluzione, è stata condotta un'indagine preliminare con metodiche di dicroismo circolare. Tutti i peptidi analizzati presentano spettri dicroici caratteristici di disposizione prevalentemente *random* come atteso per peptidi lineari analoghi di regioni proteiche estese. I dettagli relativi agli spettri dei peptidi sono riportati nella sezione **Materiali e Metodi I**. In Figura 24 è riportato lo spettro in ellitticità molare per residuo del peptide CXCR4[1-39] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.3. Esso ha un aspetto molto simile all'andamento ottenuto per il peptide CXCR4[29-39] tra 190 e 250 nm riportato in Figura 25. La titolazione del peptide CXCR4[29-39] con il detergente dodecilsolfocolina (DPC) che è un agente strutturante, non ha evidenziato significative variazioni dello spettro che resta rappresentativo di una disposizione disorganizzata (Figura 26).

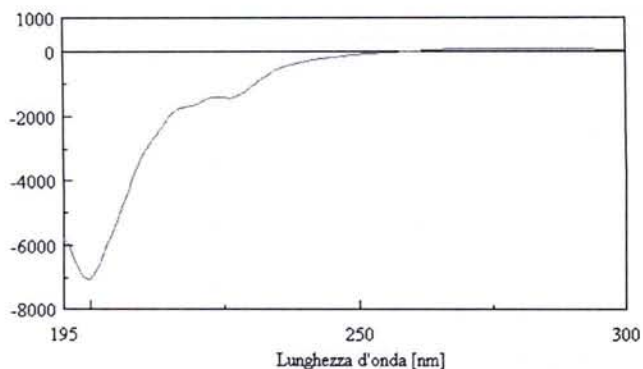


Figura 24. Spettro di dicroismo circolare riportato come ellitticità molare per residuo (θ) in funzione di λ per il peptide CXCR4[1-39] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.3.

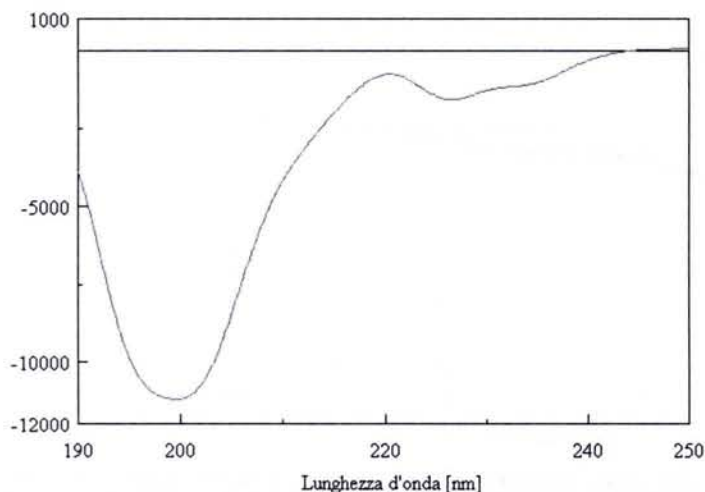


Figura 25. Spettro di dicroismo circolare riportato come ellitticità molare per residuo (θ) in funzione di λ per il peptide CXCR4[29-39] in tampone fosfato 10 mM a pH7.3.

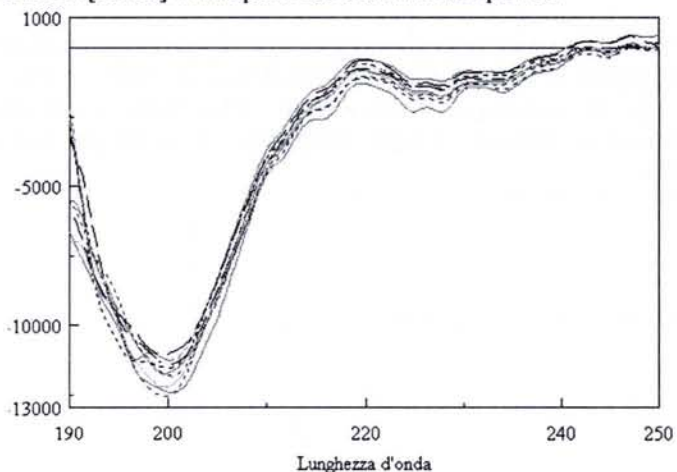


Figura 26. Sovrapposizione degli spettri di dicroismo circolare riportato come ellitticità molare per residuo (θ) in funzione di λ per il peptide CXCR4[29-39] in tampone fosfato 10 mM a pH7.3, titolato con dodecilsolfocolina.

Anche lo spettro del peptide SDF-1[1-17], riportato in Figura 27, e la sovrapposizione degli spettri ottenuti per titolazione dello stesso analogo della chemochina SDF-1 con il detergente dodecilsolfocolina (DPC) presenta lo stesso andamento osservato per il recettore anche se è evidente uno spostamento del minimo a lunghezze d'onda maggiori.

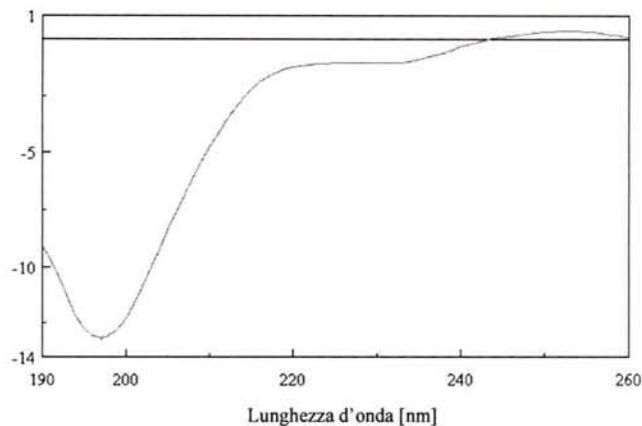


Figura 24. Spettro CD riportato come ellitticità in funzione di λ per il peptide SDF-1[1-17] in tampone fosfato 10 mM a pH7.1.

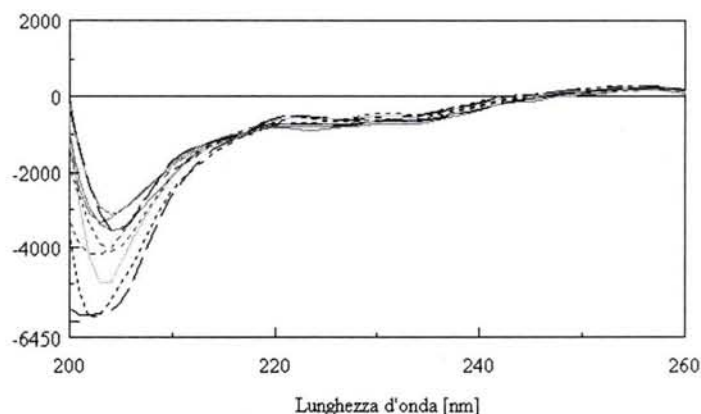


Figura 28. Sovrapposizione degli spettri di dicroismo circolare riportato come ellitticità molare per residuo (θ) in funzione di λ per il peptide SDF-1[1-17] in tampone fosfato 10 mM a pH7.3, titolato con dodecilsolfocolina. È evidente uno spostamento del minimo da una lunghezza d'onda di 200 nm (nero) a circa 205 nm (rosa).

Per i peptidi SDF-1[H-H], SDF-1[HG₃H] e SDF-1[RFF₄], analoghi della chemochina SDF-1, è evidente una banda positiva ad una lunghezza d'onda di circa 220 nm. Per tali peptidi le titolazioni con sodiododecilsolfato (SDS) e trifluoroetanolo (TFE) evidenziano spettri differenti da *random coil*, ma comunque di non semplice interpretazione. In particolare, il peptide SDF-1[H-H] presenta uno *shift* verso il rosso del minimo il cui segno sembrerebbe diventare positivo al crescere della concentrazione di SDS e di TFE (Figura 29-32).

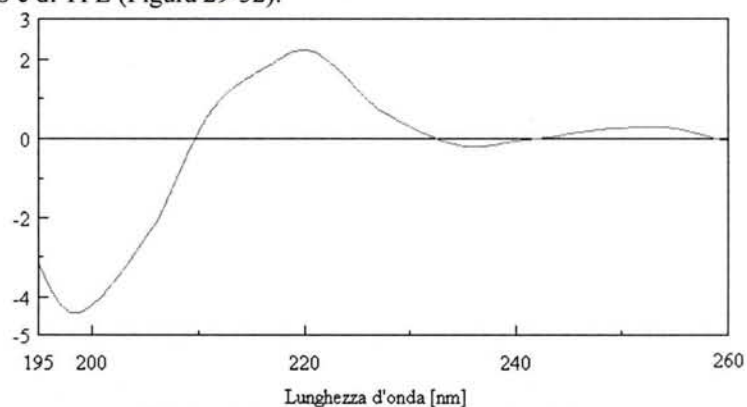


Figura 29. Spettro CD riportato come ellitticità in funzione di λ per il peptide SDF-1[H-H] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.2.

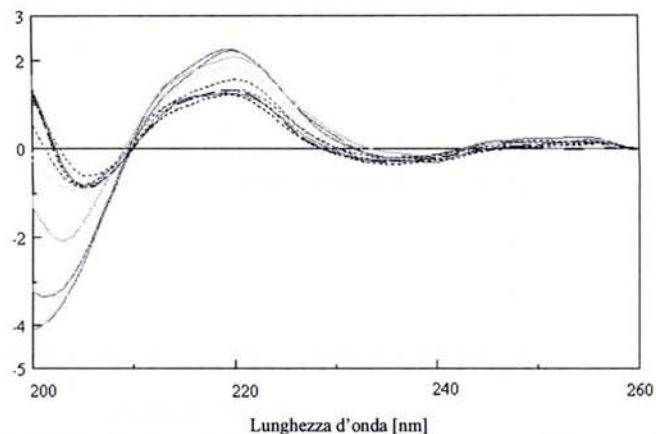


Figura 30. Spettro CD riportato come ellitticità in funzione di λ per il peptide SDF-1[H-H] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.2, titolato con sodiododecilsolfato.

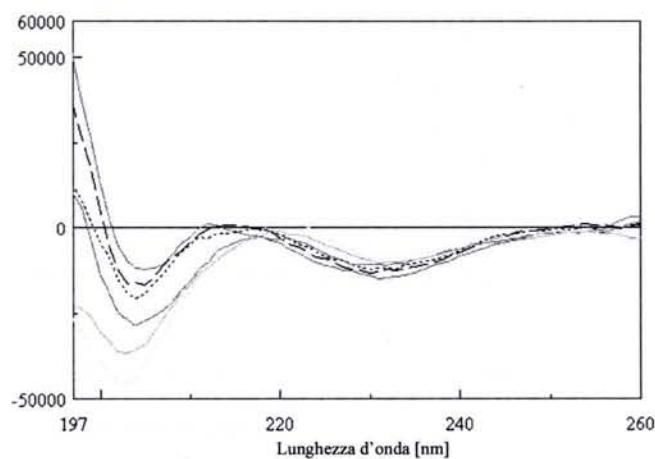


Figura 31. Spettro di θ in funzione di λ per il peptide SDF-1[H-H] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.2, in presenza di trifluoroetanolo (giallo 0% viola 50%).

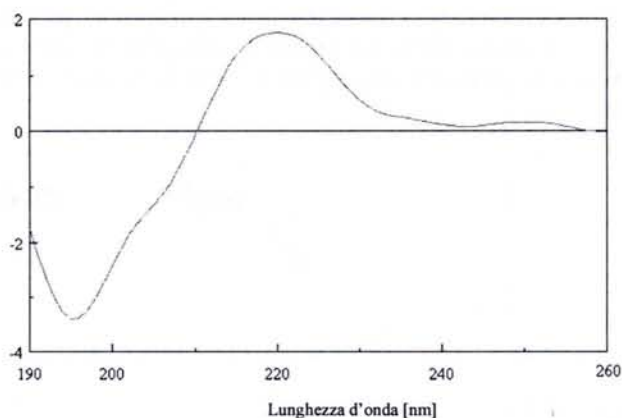


Figura 32. Spettro CD riportato come ellitticità in funzione di λ per il peptide SDF-1[HG₃H] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.2.

Particolare è il comportamento del peptide SDF-1[RFF₄], che presenta inizialmente un aspetto *random*, come riportato in Figura 33. Questo peptide titolato con trifluoroetanolo evidenzia uno spettro, riportato in Figura 34, che ricorda l'andamento dell' α -elica

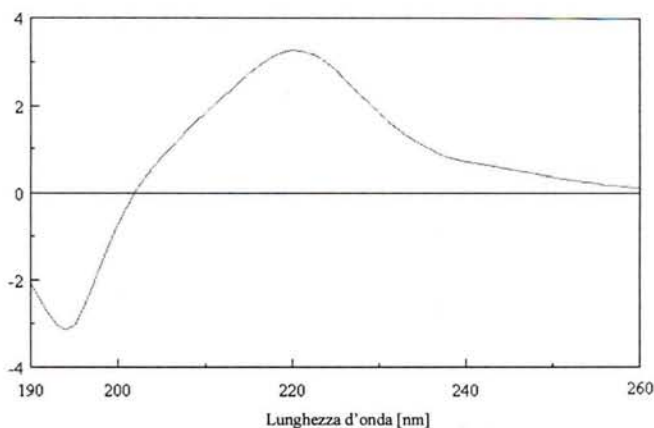


Figura 33. Spettro CD riportato come ellitticità in funzione di λ per il peptide SDF-1[RFF₄] in tampone fosfato 10 mM a pH7.2.

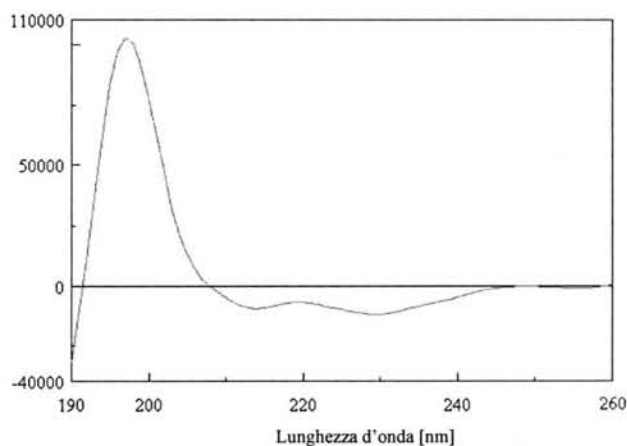


Figura 34. Spettro di dicroismo circolare riportato come ellitticità molare per residuo (θ) in funzione di λ per il peptide SDF-1[RFF₄] in tampone fosfato 10 mM a pH 7.2, in presenza di trifluoroetanolo.

Titolazione fluorimetrica del peptide sintetico CXCR4 {29-39} con i detergenti SDS e DPC

Per seguire il legame dei surfactanti, sia carico (sodio dodecilsolfato, SDS) che neutro (dodecil fosfocolina, DPC), con il peptide CXCR4{29-39} è stata adottata la stessa procedura sperimentale descritta per un altro recettore [81]. In particolare è stata sfruttata la presenza di residui di Phe nel peptide CXCR4{29-39} come sonda fluorescente dell'interazione con SDS e DPC. La Figura 35 mostra lo spettro UV del peptide in cui si evidenzia l'assorbimento strutturato dovuto ai due residui di Phe presenti in sequenza.

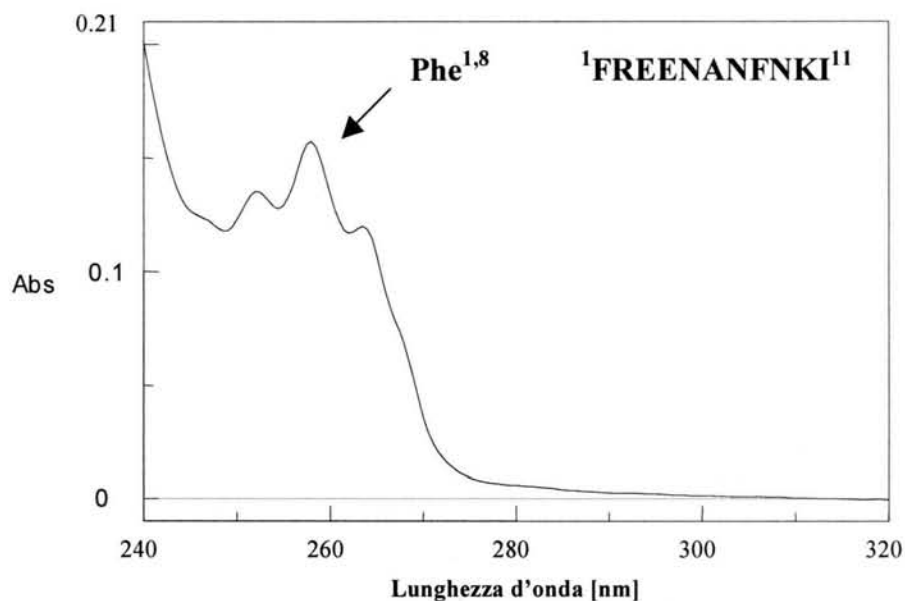


Figura 35. Spettro di assorbimento del peptide CXCR4{29-39} di sequenza FREENANFNKI

La Figura 36 mostra che la posizione delle curve di legame lungo l'asse della concentrazione dipende dal tipo di detergente. Questa evidenza apparentemente ovvia permette di comprendere se il legame avviene con le forme monomeriche o

micellari dei surfactanti presenti in equilibrio. A questo scopo, risulta utile considerare che la costante dielettrica della parte interna delle micelle è radicalmente differente da quella esterna che è circondata da acqua, e che la fluorescenza è molto sensibile ai cambiamenti delle proprietà dielettriche del microambiente in cui è immerso il fluoroforo.

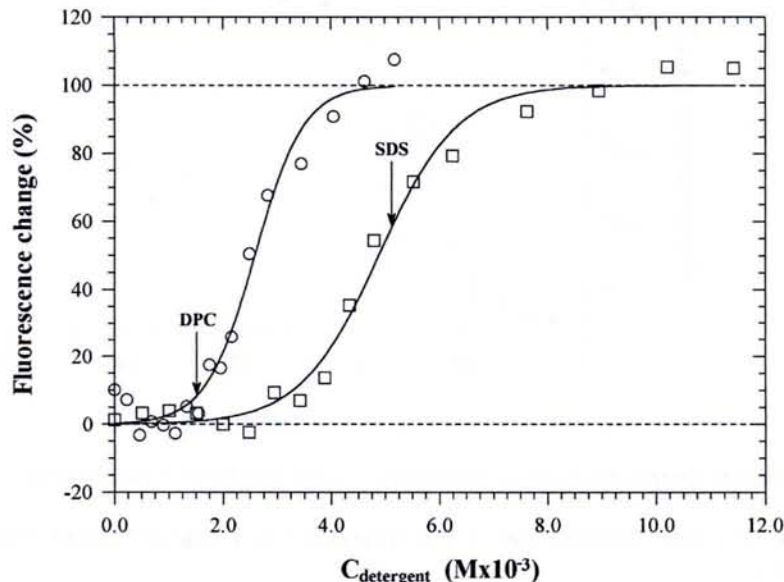


Figura 36. Titolazione fluorimetrica del peptide CXCR4{29-39} con SDS e DPC in tampone fosfato 10 mM, pH 7.15

Inoltre, la formazione delle micelle avviene in maniera cooperativa vicino ad una particolare concentrazione di detergente, anche nota come concentrazione micellare critica (CMC), la quale è costante e rappresenta la concentrazione del detergente monomero in equilibrio con gli aggregati micellari. Quindi, la CMC può essere considerata come la concentrazione di detergente alla quale la costante dielettrica del solvente che la circonda cambia bruscamente. Di conseguenza la variazione della fluorescenza nell'intervallo di concentrazione di detergente intorno alla CMC è indicativa dell'interazione del peptide con una pseudofase micellare. Come si osserva dalla Figura 36, le CMC di DPC e di SDS (~1.5 e ~5.1 mM [82, 83], rispettivamente) cadono entrambe sulle rispettive curve di legame. Ciò può essere interpretato come una prova che CXCR4{29-39} è adatto ad interagire con un sistema simil membrana, indipendentemente se questo sia mimato da SDS o DPC, e conferma la validità della semplificazione strutturale fatta nella sintesi di un idoneo modello del recettore.

Titolazione fluorimetrica del peptide sintetico SDF-1{1-17} con i detergenti SDS e DPC

Per verificare l'interazione degli stessi surfactanti anche con il peptide SDF-1{1-17} di sequenza KPVLSYRCP RFFESH è stata adottata la stessa procedura utilizzata per il frammento del recettore CXCR4. In questo caso è stata sfruttata la presenza di un residuo di Tyr come sonda fluorescente dell'interazione con SDS e DPC. La Figura 37 mostra lo spettro UV del peptide in cui si evidenziano l'assorbimento strutturato dovuto ai due residui di Phe presenti in sequenza, e l'assorbimento a maggiore lunghezza d'onda dovuto al residuo di Tyr.

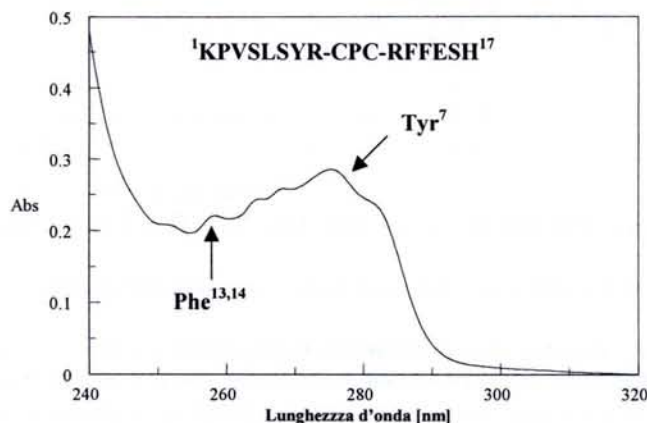


Figura 37. Spettro di assorbimento del peptide SDF-1{1-17}.

La Figura 38 mostra anche in questo caso che per la titolazione con la DPC si ottiene una curva la cui forma e posizione è tipica di un legame peptide-micella. Nel caso dell' SDS, invece, l'interazione non sembrerebbe dipendere dalla formazione delle micelle.

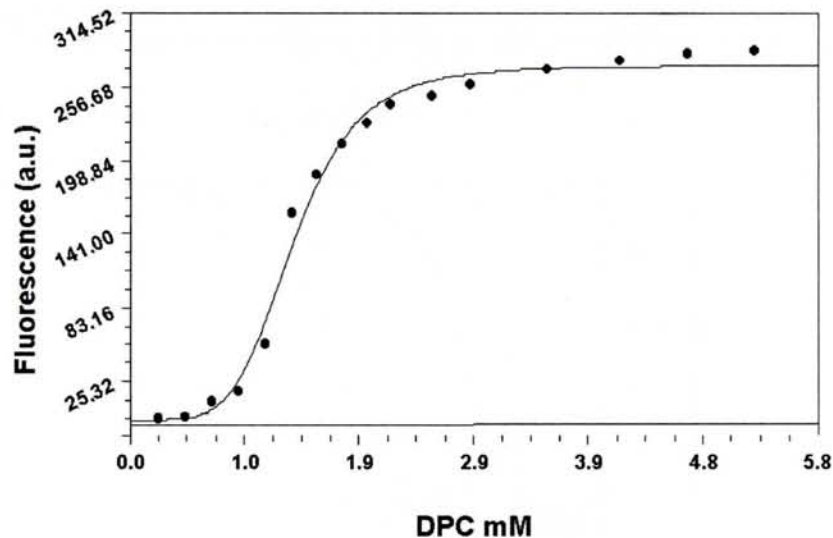


Figura 38. Titolazione fluorimetrica del peptide SDF-1{1-17} con DPC in tampone fosfato 10 mM, pH 7.15

Determinazione spettrofluorimetrica dell'interazione tra i peptidi lineari CXCR4 {29-39} e SDF-1{1-17} in soluzione acquosa

La spettroscopia di fluorescenza è una delle metodologie più utili e versatili per la valutazione delle costanti di dissociazione. La titolazione di CXCR4{29-39} con SDF-1{1-17}, è stata condotta sfruttando la presenza dei fluorofori aromatici in entrambi i peptidi. Come mostrato in Figura 39, il tipico andamento iperbolico della curva di titolazione suggerisce la saturazione di CXCR4{29-39} per aggiunta del peptide SDF-1{1-17}, permettendo di calcolare una K_d' pari a $2.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$ [84]. Studi di letteratura riportano valori di K_d' per il legame con il recettore CXCR4 di circa lo stesso ordine di grandezza sia per il peptide SDF-1{1-17} sia per suoi analoghi [46, 49]. È evidente una affinità di poco più bassa di SDF-1{1-17} per il frammento del recettore rispetto all'intero recettore, anche se tale risultato può essere considerato soddisfacente alla luce delle semplificazioni strutturali da noi fatte per ottenere un efficace sistema modello.

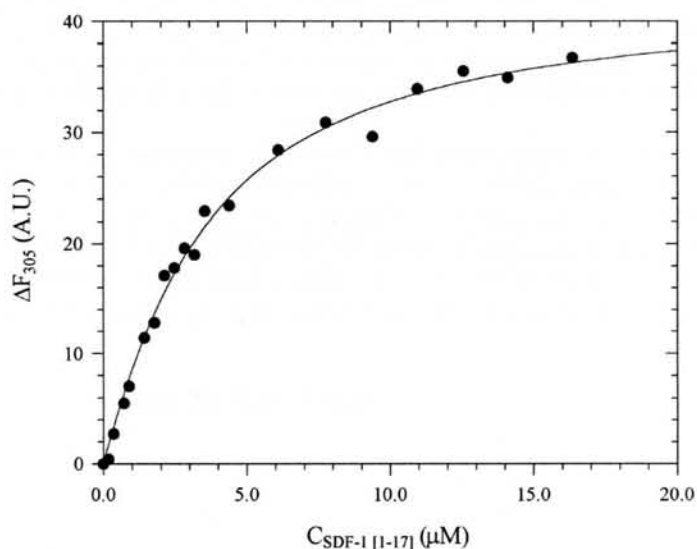


Figura 39. Titolazione di CXCR4{29-39} con SDF-1{1-17} in DPC 2.5 mM e tampone fosfato 10 mM, pH 7.2

Analisi conformazionale in soluzione acquosa mediante NMR dell'analogo peptidico SDF-1{H-H} della proteina SDF-1

Il peptide SDF-1{H-H} non è studiabile attraverso la fluorescenza così come è stato possibile fare per peptide SDF-1{1-17}, ma è stata effettuata una caratterizzazione in soluzione con tecniche di risonanza magnetica nucleare. La struttura in soluzione di SDF-1{H-H} è stata determinata mediante NMR omò ed eteronucleare a pH~5 e alla temperatura di 8 °C (questa condizione di temperatura spesso consente di isolare un'unica conformazione ben definita o un unico set di conformazioni [53]). Il campione è stato preparato dissolvendo il peptide in H₂O (10% D₂O; 700 μL) in modo da ottenere una concentrazione finale di peptide circa 2 mM. L'identificazione dei sistemi di spin e l'assegnazione delle risonanze individuali di SDF-1{H-H} in H₂O/D₂O sono state ottenute usando una combinazione di esperimenti bidimensionali TOCSY e DQF-COSY [85, 86]. L'assegnazione specifica per la sequenza è stata ottenuta da esperimenti bidimensionali NOESY [87], secondo le procedure *standard* [88]. I *chemical shift* protonici per tutte le risonanze a 281K sono riportati in Tabella 10. Lo spettro TOCSY 2D in H₂O/D₂O mostra risonanze ben risolte (Figura 40). Comunque, sono state osservate

alcune sovrapposizioni nella regione dei protoni ammidici dello spettro che presenta *chemical shift* dei protoni NH quasi identici per i residui delle Phe⁵, Phe¹¹ e Phe¹².

La configurazione del legame ammidico tra i residui Cys⁷-Pro⁸ è stata attribuita alla forma *trans* grazie anche ad una analisi dello spettro bidimensionale eteronucleare (¹H-¹³C) HSQC. Infatti la differenza tra i valori dei ppm del C_β e del C_γ della Pro⁸ è circa 5 ppm, valore tipico della forma *trans* [89].

Le costanti di accoppiamento ³J(NH,αCH) estratte dallo spettro DQF-COSY presentano tutte dei valori maggiori di 6.5 Hz significativi di una struttura sostanzialmente estesa con valori di φ compresi tra -160°-60° [90].

AA	NH	αCH	βCH	γCH	δCH	altro
His ¹	-	4.106	3.153	-		4H 7.147 2H 8.364
Ser ²	8.708	4.244	3.590	-		
Glu ³	8.565	4.059	1.583/1.656	1.930 2.003		
Phe ⁴	8.156	4.355	2.693/2.804	-		2,6H 6.9
Phe ⁵	7.9	4.2	2.7	-		2,6H 6.9
Arg ⁶	8.019	3.954	1.399/1.479	1.271	2.906	εNH 6.982
Cys ⁷	8.210	4.387	2.631/2.631	-		
Pro ⁸	-	4.161	1.666/2.040	1.781 1.781	3.535 3.547	
Cys ⁹	8.255	4.145	2.610/2.610	-		
Arg ¹⁰	8.244	3.993	1.391/1.391	1.184 1.184	2.870	εNH 6.920
Phe ¹¹	7.987	4.2	2.7	-		2,6H 6.9
Phe ¹²	7.9	4.290	2.7	-		2,6H 6.9
Glu ¹³	8.015	4.047	1.648/1.773	2.08 2.08		
Ser ¹⁴	8.151	4.114	3.590	-		
His ¹⁵	7.985	4.269	2.873/3.018	-		4H 6.991 2H 8.282

Tabella 10. *Chemical shift* ¹H per il peptide SDF-1 {H-H} in H₂O/D₂O (90/10 v/v) a 281K

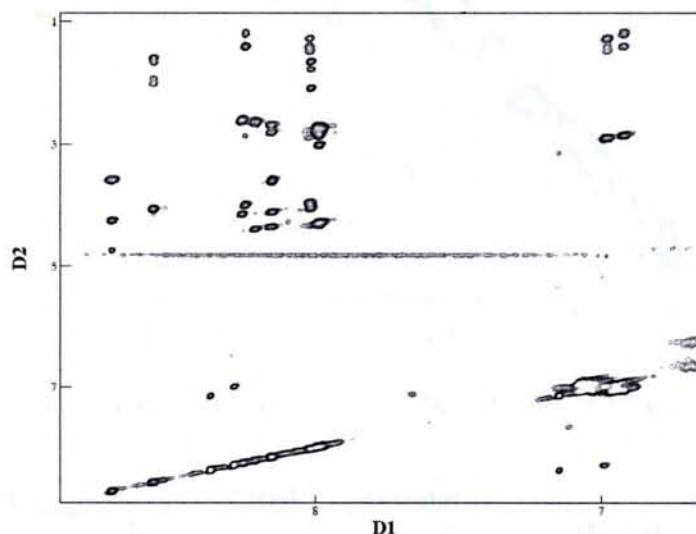


Figura 40. Regione ammidica dello spettro TOCSY in H₂O/D₂O del peptide SDF-1 {H-H}

Da una prima analisi delle correlazioni spaziali relative all'esperimento NOESY (Figura 41) si evince la presenza di forti effetti di tipo sequenziale (inter-residuo) H_α,HN(i,i+1) e di deboli effetti di tipo sequenziale HN,HN(i,i+1) dello scheletro peptidico (Figura 42). Tali effetti non solo hanno permesso la corretta attribuzione dei sistemi di *spin* relativi ad ogni amminoacido della sequenza, ma sono anche indicativi di una struttura secondaria che presenta sia regioni estese che regioni ripiegate (o un *set* di conformazioni mediamente in equilibrio tra di loro). Infatti, la presenza di effetti deboli nella regione ammidica di tipo HN,HN(i,i+1) potrebbe indicare la presenza di una certa percentuale di popolazioni di strutture che presentano una forma ripiegata. Nella Tabella 11 sono riassunti gli effetti NOE più significativi utilizzati come vincoli strutturali per la determinazione di un possibile modello molecolare.

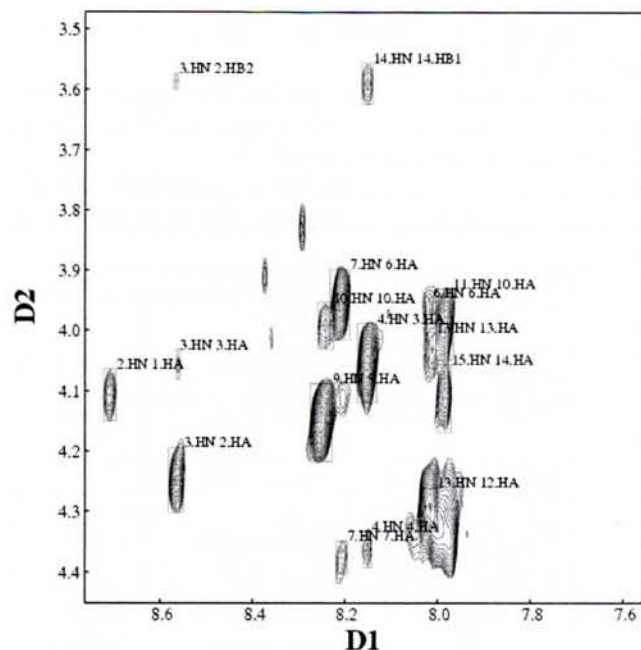


Figura 41. Spettro NOESY parziale della regione HN-H α in cui sono evidenziati alcuni effetti sequenziali del tipo H α ,HN(i,i+1) del peptide SDF-1 {H-H}.

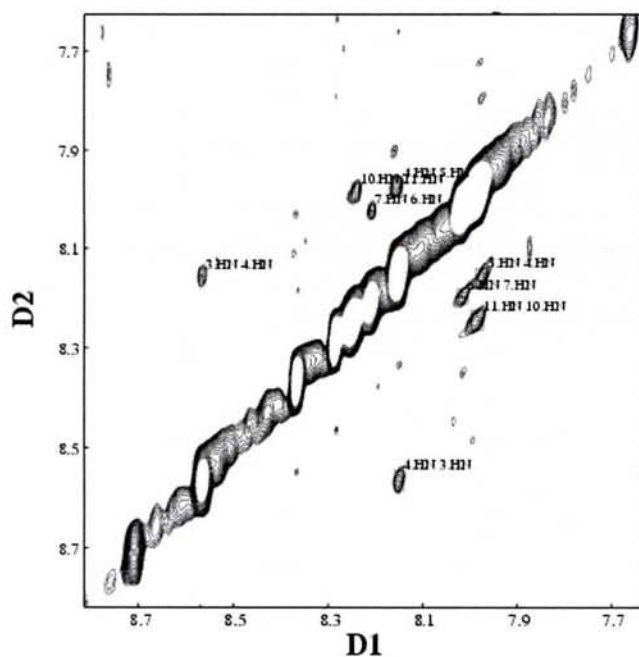


Figura 42. Regione ammidica dello spettro NOESY in cui sono evidenziati gli effetti HN, HN(i,i+1) del peptide SDF-1 {H-H}.

NOE ^a	Intensità	NOE ^a	Intensità
H α ¹ -NH ²	m	H* β ⁶ -NH ⁷	w
H α ² -NH ³	m	NH ⁶ -NH ⁷	w
H α ³ -H* β ³	w	NH ⁶ -H* β ⁶	s
H α ³ -NH ⁴	s	NH ⁶ -H* β ⁷	m
NH ³ -NH ⁴	w	NH ⁶ -H* β ⁸	m
NH ⁴ -H β ⁴	m	NH ⁷ -H* β ⁷	m
NH ⁴ -H β ⁴	m	H* β ⁸ -NH ⁹	w
NH ⁴ -H* β ⁴	m	H* β ⁸ -NH ¹⁰	m
NH ⁴ -NH ⁵	w	NH ⁹ -H α ⁹	w
H α ⁶ -NH ⁷	s	NH ⁹ -H* β ⁹	w
H* β ⁶ -NH ⁷	w	H α ¹⁰ -H* β ¹⁰	m
NH ⁶ -NH ⁷	w	NH ¹⁰ -H* β ¹⁰	w

$\text{NH}^6\text{-H}^*_\beta{}^6$	w	$\text{NH}^{10}\text{-H}^*_\gamma{}^{10}$	m
$\text{NH}^6\text{-H}^*_\gamma{}^6$	w	$\text{H}^{10}_\alpha\text{-NH}^{11}$	w
$\text{NH}^6\text{-H}^*_\epsilon{}^6$	w	$\text{H}^*_\beta{}^{10}\text{-NH}^{11}$	m
$\text{NH}^7\text{-H}^*_\beta{}^7$	m	$\text{H}^{10}_\epsilon\text{-NH}^{11}$	w

Tabella 11. Sommario degli effetti Noe del peptide SDF-1{H-H}

^aGli effetti NOE corrispondenti a distanze inferiori o uguali a 2.5 Å sono classificati come forti (*strong s*); Gli effetti NOE corrispondenti a distanze comprese tra 2.5 e 3.5 Å sono classificati come medi (*medium m*); Gli effetti NOE corrispondenti a distanze comprese tra 3.5 e 4.5 Å sono classificati come deboli (*weak w*).

La Figura 43 riassume graficamente le connettività NOE di tipo sequenziale e di medio *range* osservate dagli esperimenti NOESY (le connettività dovute alla sovrapposizione di più effetti non sono state prese in considerazione). Il *pattern* di effetti NOE osservati di tipo HN,HN(i,i+1) sono analoghi a quelli ritrovati in un lavoro simile fatto per il peptide SDF-1{1-17} [59] i quali suggeriscono la presenza di un β -turn compreso tra i residui Leu⁵, Ser⁶, Tyr⁷ e Arg⁸. Per analogia con quei risultati si può ipotizzare, per il peptide SDF-1{H-H}, lo stesso tipo di ripiegamento compreso tra i residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶ oppure tra i residui Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵.

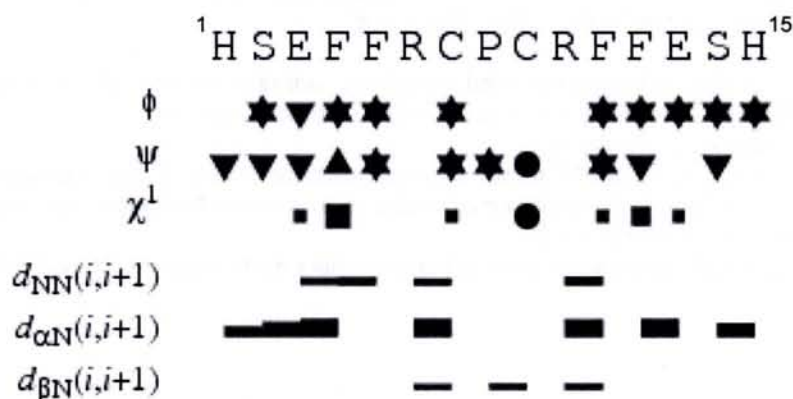


Figura 43. Connettività NOE di tipo sequenziale e di medio *range* osservate dagli esperimenti NOESY per il peptide SDF-1{H-H}.

L'insieme dei dati ottenuti sperimentalmente sono stati utilizzati come vincoli strutturali di partenza per il calcolo di una possibile struttura preferenziale mediante il protocollo DYANA [91].

La Figura 44 mostra una vista della sovrapposizione dello scheletro (N, C α , C'), centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, delle migliori 20 strutture su 80 calcolate da DYANA (tali strutture presentano una *t.f.* dell'ordine di 10⁻²).

La sovrapposizione di tale regione dello scheletro amminoacidico delle 20 migliori strutture calcolate porta a valori di deviazione *standard* quadratica media (RMSD) molto bassi (0.62 +/- 0.27 Å) evidenziando la presenza, in questa regione, di un ripiegamento della molecola, motivo ricorrente in tutte le strutture.

Figura 44. Sovrapposizione dello scheletro (N, Ca, C') delle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶.

Lo stesso procedimento effettuato senza i vincoli di distanza ricavati sperimentalmente ha prodotto un *set* di strutture che presentano essenzialmente strutture estese.

A questo punto, una analisi più approfondita degli angoli diedri delle strutture ottenute con i vincoli ha messo in evidenza la presenza di più sottofamiglie conformazionali che sono in seguito state identificate come 6 *cluster* così suddivisi (Tabella 13):

<i>cluster</i>	molecole
1	1, 8, 9, 11, 14, 16
2	2, 5, 6, 7, 10, 13, 18
3	3, 4, 20
4	12, 15
5	17
6	19

Tabella 13. *Cluster* di famiglie conformazionali ottenute dalle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶.

La sovrapposizione dello scheletro dei primi due *cluster*, centrato sempre sugli stessi residui presenta un valore di RMSD di 0,36 +/- 0.14 Å per cui queste due sottofamiglie di strutture sono state considerate entrambe come rappresentative di un'unica conformazione preferenziale.

La Figura 45, analoga alla Figura 44, mostra la sovrapposizione di tutti i 6 *cluster* differenziati per colore.

Nella Figura 46 è evidenziata la struttura media della regione ammino terminale relativa ai residui da Ser² a Cys⁷ ottenuta dalla sovrapposizione dei *cluster* 1 e 2.

La Tabella 13 riporta gli angoli diedri ottenuti per la struttura media relativa alla Figura 46.



Figura 45. Sovrapposizione di tutti i 6 *cluster* riportati in Tabella 12 differenziati per colore dello scheletro (N, Ca, C') delle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶.

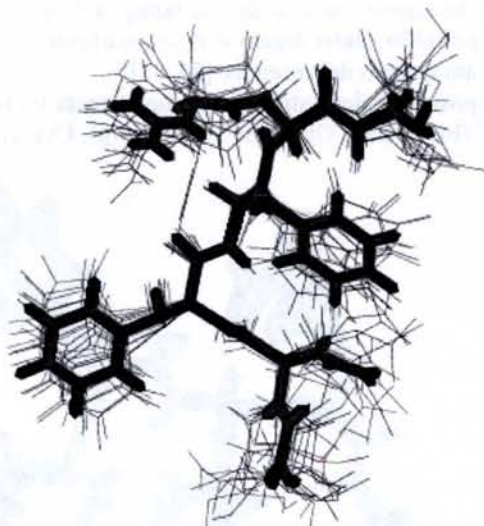


Figura 46. Sovrapposizione dei *cluster* 1 e 2 riportati in Tabella 12 dello scheletro (N, Ca, C') delle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶.

Residuo	ω	ϕ	ψ	χ_1/χ_2	χ_3/χ_4
Ser ²			-135.595	144.644	-133.499
Glu ³	179.984	-166.803	92.896	-39.755/39.755	45.323
Phe ⁴	-179.993	-93.812	-3.045	-121.876/84.395	
Phe ⁵	179.986	-102.206	174.698	57.710/83.433	
Arg ⁶	180.000	-126.217	84.897	-32.203/94.481	-72.797/-176.110
Cys ⁷	179.994	-79.604		-140.210	112.460

Tabella 13. Angoli di legame della struttura media ottenuta dai *cluster* 1 e 2 riportati in Tabella 15 dello scheletro (N, Ca, C') delle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶.

Con la stessa procedura di calcolo è stata effettuata la sovrapposizione delle migliori 20 strutture centrate questa volta sui residui Ser²-Cys⁷.

Anche per queste 20 strutture si evince la presenza di un ripiegamento analogo a quello ritrovato precedentemente.

Da un'analisi degli angoli sono state evidenziate 7 sottofamiglie di strutture di cui una sola significativamente popolata.

La Figura 47 riporta la sovrapposizione del suddetto *cluster* e della sua media calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Ser²-Cys⁷.

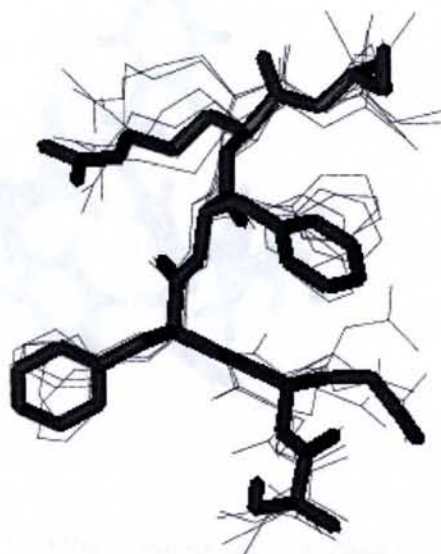


Figura 47. Struttura media ottenuta dal *cluster* che presenta il numero di strutture più significativo delle migliori 20 strutture calcolate da DYANA per il peptide SDF-1 {H-H} centrato sui residui Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷.

Dal confronto degli angoli diedri calcolati per le due strutture medie ottenute dalle due diverse sovrapposizioni delle migliori 20 strutture si ottiene un valore di RMSD di circa 0.40 Å per il *backbone* e di circa 0.70 Å per le catene laterali.

La presenza di tale ripiegamento rappresentativo di una famiglia di strutture nella regione N-terminale tra i residui Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷ potrebbe essere legato al riconoscimento tra il ligando SDF-1 ed il recettore CXCR4 come è stato riportato per altri peptidi antagonisti del recettore [50, 52].

La Figura 48 mostra la sovrapposizione delle strutture medie ottenute da DYANA per il peptide SDF-1{H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶ (blu) e Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷ (rosso).

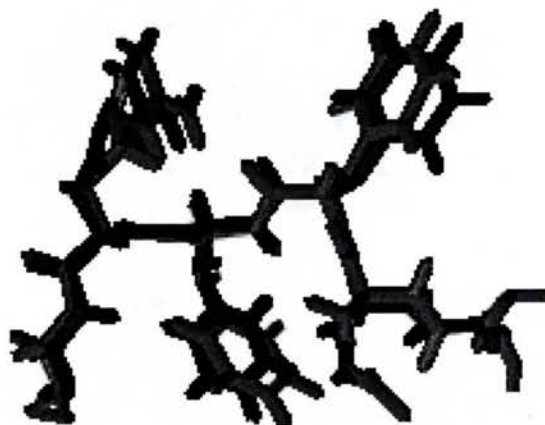


Figura 48. Sovrapposizione delle strutture medie ottenute da DYANA per il peptide SDF-1{H-H} centrato sui residui Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶ (blu) e Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷ (rosso).

La presenza di questo ripiegamento è stata ritrovata anche nella struttura cristallografica dell'intera proteina SDF-1 [47] mentre nella struttura in soluzione mediante NMR l'intera regione N-terminale non è stata risolta [46].

Il tentativo di sovrapposizione dei tratti strutturali delle regioni omologhe tra il peptide SDF-1{H-H} e la chemochina SDF-1, sottolineate nelle sequenze mostrate di seguito, ha evidenziato un basso valore di RMSD per il *backbone* indicando un buon accordo tra i dati strutturali ottenuti in soluzione e quelli cristallografici

SDF-1	KPVLSYRCPC
SDF-1{H-H}	HSEFFRCPC

In Figura 49 è riportata la sovrapposizione della struttura media ottenuta da DYANA per il peptide SDF-1{H-H} centrato sui residui Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷ (blu) e la struttura ottenuta cristallografica della proteina SDF-1 relativa ai residui Ser⁴, Leu⁵, Ser⁶, Tyr⁷, Arg⁸, Cys⁹ (nero)

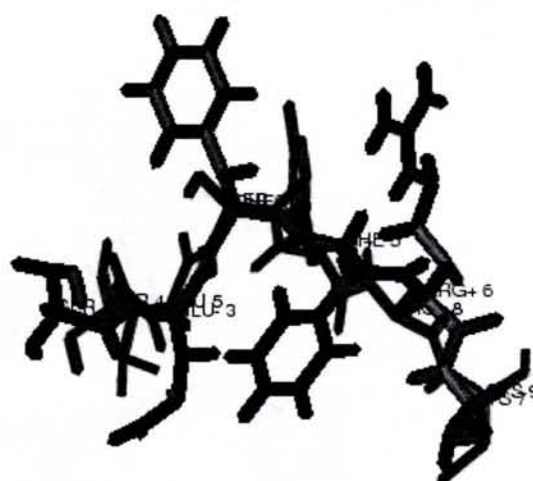


Figura 49. Sovrapposizione della struttura media ottenute da DYANA per il peptide SDF-1{H-H} centrato sui residui Ser², Glu³, Phe⁴, Phe⁵ e Arg⁶, Cys⁷ (blu) e la struttura ottenuta da diffrazione dei raggi X della proteina SDF-1 relativa ai residui Ser⁴, Leu⁵, Ser⁶, Tyr⁷, Arg⁸, Cys⁹ (nero).

Allo luce di tali risultati sarà interessante verificare il possibile ruolo stabilizzante del ripiegamento ritrovato da parte degli amminoacidi del motivo CPC presente nel peptide SDF-1{H-H}, agonista del recettore CXCR4. infatti, tale motivo invece è

assente nel peptide SDF-1[³H] risultato essere inattivo rispetto allo stesso recettore e nelle stesse condizioni sperimentali, come riportato nella sezione sperimentale dei saggi di attività biologica.

Saggi di attività biologica dei peptidi sintetizzati

Analoghi di SDF-1 e stimolazione delle cellule di neuroblastoma

Per verificare l'attività biologica dei peptidi sintetizzati, sono stati analizzati gli effetti della stimolazione delle cellule di neuroblastoma umano con i nostri analoghi della chemochina SDF-1. L'indagine è stata svolta presso i laboratori del Dipartimento di Fisiologia Umana e Farmacologica dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". L'obiettivo principale di tale esperimenti è stato quello di verificare le capacità agoniste o antagoniste rispetto all'attivazione di cellule di neuroepitelioma umano ed in particolare per determinare se i peptidi contenenti esclusivamente la sequenza RFFESH o sue parti, ritenuta primo sito di legame tra ligando/recettore, fossero in grado di interagire con il recettore CXCR4. La Figura 44 mostra che quando le cellule CHP100 sono stimolate con la chemochina SDF-1 si osserva un incremento della fosforilazione della chinasi ERK1/2 (442% ± 26% rispetto al valore di controllo dopo 30 minuti), in accordo con i dati di letteratura [25]. Quando le cellule di neuroepitelioma CHP100 sono stimolate per lo stesso tempo con i peptidi riportati in Tabella 14, la fosforilazione della chinasi ERK1/2 è attivata solo dai peptidi SDF-1{1-17} e SDF-1{H-H} (Figura 50). Tale attivazione risulta essere dose dipendente, raggiungendo il valore massimo ad una concentrazione 250 nM per entrambi i composti (rispettivamente, 190% ± 23% e 140% ± 13%; media di tre esperimenti ± SE rispetto al valore di controllo per uguale quantità di proteina). Inoltre, differenti test condotti sul peptide CXCR4{1-39} provrebbero una funzione da antagonista del recettore CXCR4 (dati non riportati) per la capacità di questa molecola di funzionare da esca (*decoy receptor*) per il ligando SDF-1.



Figura 50. Analisi *Western blot* della fosforilazione ERK1/2 per la proteina SDF-1 e suoi analoghi peptidici. (*upper panel*: anti fosfo-ERK1/2; *lower panel*: anti ERK2)

Nome peptide	Sequenza	Antagonista	Agonista
CXCR4{29-39}	FREENANFNKI	-	-
CXCR4{Sc}	ENAFNFRKNEI	-	-
SDF-1{1-17}	KPVLSYRCPFRFFESH	-	+
SDF-1{H-H}	HSEFFRCPCRFFESH	-	+
SDF-1{HG ₃ H}	HSEFFRGGGRFFESH	-	-
SDF-1{Loop}	GRFFESH	-	-
SDF-1{RFF ₄ }	RFFRFFRFFRFFH	-	-

Tabella 14. Sequenze dei peptidi utilizzati per stimolare le cellule CHP100

Conclusioni e Discussione I

Definizione di un modello dettagliato di interazione recettore/ligando

I peptidi analoghi del recettore CXCR4 corrispondono alla sequenza del braccio extracellulare che presenta, come unico vincolo strutturale, un ponte disolfurico con il terzo *loop* extracellulare, e che per la sua funzione da esca per il ligando, richiede grande flessibilità. Per questo motivo l'assenza di strutture secondarie ben definite, quali α -eliche o β -*strand*, che noi abbiamo verificato per i peptidi sintetizzati nell'ambito di questo lavoro di tesi era ciò che ci attendavamo. D'altra parte, la titolazione di CXCR4{29-39} con detergenti (SDS e DPC) ha mostrato in modo netto l'interazione di questo peptide con l'ambiente simil-membrana creato dalle micelle. I peptidi relativi a SDF-1 si comportano analogamente e in particolare SDF-1{1-17}, malgrado la elevata flessibilità, mostra una interazione con le micelle che *in vivo* è sostituita dalla interazione con la membrana cellulare probabilmente al fine di assumere la conformazione più idonea all'interazione con il recettore. La definizione dell'interazione tra una specifica regione del braccio N-terminale di CXCR4, definita dal frammento 29-39 del recettore, e quello N-terminale della chemochina SDF-1, definito dai residui amminoacidici 1-17 è un

importante risultato ottenuto in questa parte del lavoro sperimentale svolto. Infatti, la costante di dissociazione apparente ricavata per il sistema SDF-1{1-17}/CXCR4{29-39} (K_d pari a $2.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$) [84] è di poco più alta di quella riportata in letteratura per SDF-1{1-17} con l'intero recettore [46, 49]. Pertanto il dato può essere considerato ampiamente soddisfacente alla luce delle semplificazioni strutturali da noi fatte per ottenere un efficace sistema modello. È quindi possibile affermare il ruolo essenziale degli amminoacidi tra il primo dominio transmembrana e la prima cisteina extracellulare di CXCR4, nell'interazione di legame con il frammento N-terminale della chemochina SDF-1, ed è quindi possibile descrivere un modello più dettagliato dell'interazione recettore/ligando (Figura 50).

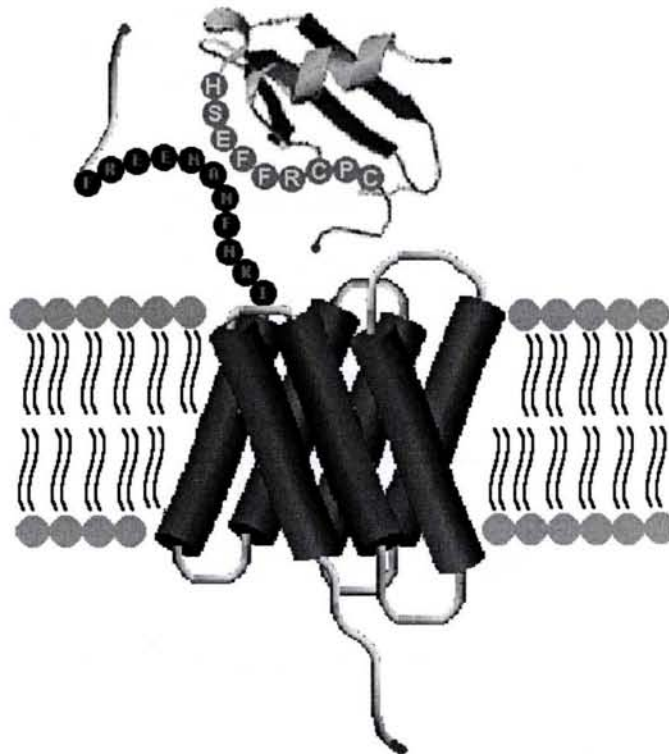


Figura 50. Modello di interazione tra il recettore CXCR4 ed il ligando SDF-1 attraverso i residui amminoacidici 29-39 del recettore e 1-17 del ligando.

Per una migliore descrizione di tale modello di interazione, appaiono fondamentali i saggi di attività biologica da noi effettuati il cui esito era prevedibile soprattutto per ciò che riguarda il peptide SDF-1{1-17}. È risultato, invece, sorprendente la funzione agonista manifestata dall'analogo peptidico SDF-1{H-H}. Infatti, due dati in particolare sono interessanti per le implicazioni coinvolte. In primo luogo la sequenza di SDF-1{H-H}: HSEFFRCPCRFFESH, non presenta quei residui di lisina e prolina ritenuti indispensabili per l'attivazione del recettore CXCR4 [46] e che sono presenti invece nel peptide SDF-1{1-17}, KPVLSYRCPCRFFESH. Il secondo motivo è che tutti gli altri peptidi testati nelle stesse condizioni risultano inattivi alle concentrazioni utilizzate. Anche se c'era da aspettarsi un'interazione peptide/recettore per alcuni dei peptidi sintetizzati, questa avrebbe dovuto riflettersi con una attività di tipo antagonista a meno della presenza nel recettore CXCR4 di siti alternativi di induzione del segnale. L'attività del peptide SDF-1{H-H} potrebbe essere correlata al fenomeno dell'agonismo allosterico oppure i residui descritti come necessari per l'attivazione recettoriale [46] sono coinvolti in modo diverso da quello finora proposto. Infatti, il peptide SDF-1{H-H} utilizza per interagire con il recettore la stessa sequenza sia per legarsi che per attivarlo. D'altra parte se questi residui del *loop* della chemochina RFFESH fossero sufficienti all'interazione con il recettore CXCR4 gli altri analoghi peptidici da noi saggati SDF-1{Loop}, di sequenza GRFFESH, e SDF-1{HG₃H}, di sequenza HSEFFRGGGRFFESH, avrebbero dovuto mostrare un'attività comparabile a SDF-1{H-H} o almeno funzionare da antagonisti. È quindi importante la funzione svolta dal motivo strutturale CPC che, nella proteina nativa, permette la formazione di ponti disolfurici strutturalmente stabilizzanti e che nei peptidi liberi, e prevalentemente non strutturati [50], potrebbe favorire alcune conformazioni peptidiche attive. Inoltre le cisteine libere presenti potrebbero avere anche un ruolo diretto nel legame e/o nell'attivazione del recettore.

La determinazione della struttura in soluzione acquosa, mediante NMR, del peptide SDF-1{H-H} ci ha permesso di comprendere meglio la rilevanza del risultato biologico. Infatti, è evidente una conformazione preferenziale assunta da SDF-1{H-H} analoga della struttura assunta dai residui Ser⁴, Leu⁵, Ser⁶, Tyr⁷, Arg⁸, Cys⁹ ottenuta mediante diffrazione dei raggi X della proteina SDF-1. Inoltre, un motivo strutturale simile, sia per il *backbone* che per le catene laterali, è riportato da dati di letteratura per il peptide agonista SDF-1{1-17}, e per i peptidi antagonisti derivati dalle chemochine I-TAC e vMIP-II e viene descritto come possibile sistema di interazione specifica ligando/recettore.

La razionalizzazione dei dati ottenuti in questo lavoro di tesi di dottorato e dei dati riportati recentemente in letteratura ci permettono di descrivere un possibile modello ancor più dettagliato anche se non completamente definito dell'interazione CXCR4/SDF-1 in analogia con il modello descritto per la chemochina IL-8 ed il recettore CXCR1 [93]. Il modello prevede un'interazione tra la chemochina SDF-1, in forma dimerica quando in complesso con l'eparina ($K_d = 38 \text{ nM}$) [48, 59, 60], ed

il recettore CXCR4 nella forma dimerica (Figura 51)[26]. In particolare la chemochina SDF-1, ad esempio attraverso le cellule endoteliali, lega in forma dimerica un glicosaminoglicano con i residui Lys¹, Lys²⁴, Lys²⁷ e Arg⁴¹ e del β -sheet (Figura 18), portando alla stabilizzazione di una conformazione del suo braccio N-terminale. Inoltre il legame con il dimero del recettore è rafforzato dall'interazione del residuo di tirosina solfatata Tyr²¹ del braccio extracellulare di ognuno dei monomeri di CXCR4. Quindi il *loop* N-terminale di SDF-1 definito dai residui ¹²RFFESH¹⁷ interagisce il frammento del braccio N-terminale del recettore definito dai residui ²⁹FREENANFNKI³⁹ (Figura 50), ed il braccio N-terminale del ligando definito dai residui ¹KPVLSYSYR⁸ interagisce con il secondo *loop* extracellulare di CXCR4, ed in particolare con i residui Glu¹⁷⁹, Asp¹⁸¹, Asp¹⁸², attivando il recettore.

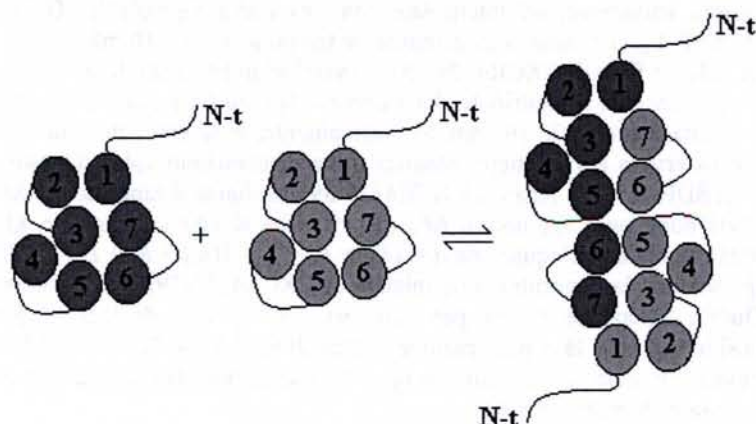


Figura 51. Formazione del recettore dimerico attraverso lo *swapping* dei domini transmembrana 6 e 7 di entrambi i monomeri di CXCR4.

Materiali e Metodi I

Sintesi peptidica, purificazione e caratterizzazione

Gli analoghi del braccio N-terminale di CXCR4, relativamente alle regioni 1-39; 28-39; 29-39; e 29-39{Sc} (sequenza *scramble*), e gli analoghi del braccio N-terminale di SDF-1, corrispondenti ai peptidi descritti come SDF-1{1-17}; SDF-1{H-H}; SDF-1{HG₃H}; SDF-1{Y₄}; SDF-1{Loop}; SDF-1{RFF₄}; e SDF-1{Beta}, le cui sequenze in dettaglio sono riportate in Tabella 9, sono stati ottenuti attraverso sintesi in fase solida (SPSS) con le funzioni ammino- e carbossi-terminali libere, utilizzando protocolli *standard* di condensazione con chimica Fmoc. I peptidi relativi al recettore sono stati ottenuti su resina TGA, legando il primo amminoacido attraverso l'attivante MSNT. I peptidi relativi al ligando sono stati ottenuti su resina tritilica già sostituita con un residuo di istidina. Per tutte le sintesi durante gli accoppiamenti sono stati impiegati come agenti attivanti il PyBOP, l'HOBt e il TBTU. Per la deprotezione ed il distacco, le resine con i peptidi protetti sono state trattate con una soluzione di TFA, TIS, H₂O (95: 2.5: 2.5 v/v/v) per tempi diversi in dipendenza del numero e del tipo di gruppi protettori presenti. I peptidi grezzi sono stati precipitati a 0°C in etere etilico, liofilizzati e successivamente purificati da RP-HPLC usando un gradiente lineare di CH₃CN (0.1% TFA) in H₂O (0.1% TFA). Gli spettri di massa ottenuti da MALDI-TOF hanno confermato l'identità e purezza dei prodotti.

Dicroismo circolare

Tutte le misure di dicroismo circolare sono state effettuate in celle da 0.1 cm e 1.0 cm a 278 K e 293 K utilizzando lo spettropolarimetro Jasco 715, con una finestra spettrale di 2.0 nm e velocità di scansione a 20 nm/min. Gli spettri dei peptidi riportati in Tabella 15 sono stati generati per sottrazione del bianco, costituito da una soluzione tampone fosfato 10 mM con pH compreso tra 7.1 e 7.3, o dalla stessa soluzione tampone contenente gli agenti strutturanti (SDS, DPC e TFE) utilizzati nelle diverse titolazioni. Inoltre è stata applicata agli spettri una funzione di *smoothing* presente nel *software* dello strumento. Le concentrazioni dei peptidi sono state determinate da misure di assorbimento UV utilizzando come coefficienti di estinzione molare il valore di 195 M⁻¹cm⁻¹ a $\lambda = 257$ nm per ogni residuo di fenilalanina, ed il valore di 1405 M⁻¹cm⁻¹ a $\lambda = 275.7$ nm per ogni residuo di tirosina contenuto nei peptidi analizzati. Le titolazioni con i detergenti sono state effettuate fino a superare il valore della concentrazione micellare critica, mentre le titolazioni con trifluoroetanolo sono state seguite fino al 60% in volume di TFE. Gli spettri del peptide CXCR4[1-39] sono stati acquisiti a lunghezze d'onda comprese tra 190 nm e 300 nm. Gli spettri degli altri peptidi derivati dal recettore CXCR4 e dalla chemochina SDF-1 sono stati acquisiti a lunghezze d'onda comprese tra 190 nm e 260 nm.

Nome peptide	Sequenza
CXCR4{1-39}	MEGISIYTSNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREENANFNKI
CXCR4{29-39}	FREENANFNKI
SDF-1{1-17}	KPVLSYSYRCPFRFFESH
SDF-1{H-H}	HSEFFRCPCRFFESH
SDF-1{HG ₃ H}	HSEFFRGGGRFFESH
SDF-1{RFF ₄ }	RFFRFFRFFRFFH

Tabella 15. Peptidi sintetici di sono stati riportati gli spettri di dicroismo circolare.

Titolazioni fluorimetriche

Tutte le titolazioni fluorimetriche sono state effettuate a temperatura ambiente utilizzando uno spettrofotometro per la fluorescenza Varian Cary Eclipse eccitando i fluorofori di Phe a $\lambda=250$ nm, con uguale finestra sia per l'eccitazione che per l'emissione. Negli esperimenti di legame con i detergenti, diverse piccole aliquote da soluzioni concentrate sia di DPC che di SDS (31.0 e 68.6 mM, rispettivamente) sono state aggiunte ad un volume fisso di CXCR4{29-39} 1.25×10^{-5} M, eccitando poi a 250 nm, e SDF-1{1-17} 1.01×10^{-5} M eccitando a $\lambda=280$ nm in tampone fosfato 10 mM, pH 7.15. Le intensità di fluorescenza di Phe sono state registrate a $\lambda=285$ nm, espresse come percentuali di massima variazione, ed interpolate con una curva sigmoideale. Le intensità di fluorescenza di Tyr sono state registrate a $\lambda=307$ nm, espresse come percentuali di massima variazione, ed interpolate con una curva sigmoideale. Gli esperimenti di legame dei peptidi CXCR4{29-39} con SDF-1{1-17} sono stati effettuati in tampone fosfato 10 mM pH7.2, aggiungendo quantità crescenti di SDF-1{1-17} ad un volume fisso di CXCR4{29-39} 1.7×10^{-6} M in presenza di DPC 2.5 mM. La variazione di fluorescenza originata dalla Tyr⁷, che include il contributo della energia di risonanza dello stato eccitato trasferita dalle Phe, donatori, alla Tyr, accettore, è stata rilevata a $\lambda=305$ nm. Successivamente, le diverse intensità delle due specie interagenti sono state sottratte dal segnale osservato per ottenere intensità prive di contributi spuri. Queste intensità sono state usate poi per valutare la frazione di SDF-1{1-17} legata a CXCR4{29-39} mediante il rapporto $\alpha = \Delta F / \Delta F_{\max}$, dove ΔF è la variazione di fluorescenza osservata dopo ogni aggiunta e ΔF_{\max} si riferisce al 100% di legame. Quindi, la costante di dissociazione apparente (K_d') è stata calcolata dall'equazione $\alpha = \{K_d' + R_0 + L_0 - [(K_d' + R_0 + L_0)^2 - 4R_0L_0]^{1/2}\} / 2R_0$. Dove, R_0 e L_0 rappresentano la concentrazione iniziale di CXCR4{29-39} e la concentrazione aggiunta di SDF-1{1-17}, rispettivamente. Questa equazione valida per equilibri con un sito di legame può essere facilmente derivata da $\alpha = [L] / (K_d' + [L])$ considerando che la concentrazione molare di SDF-1{1-17} libero, $[L]$, è uguale a $L_0 - \alpha R_0$, tutti i dati ottenuti sono stati trattati con opportune equazioni nel programma Scientist per Windows versione 2.0 dalla MicroMath Software (San Diego, CA).

Spettrometria ¹H NMR

Una soluzione di peptide SDF-1{H-H} circa 2 mM è stata preparata per gli studi NMR dissolvendo il campione in H₂O (10% D₂O; 700 μ L). Il solvente deuterato è stato acquistato da Isotec inc. Milwaukee, WI, USA. Gli esperimenti NMR omonucleari sono stati effettuati con uno spettrometro Varian Inova operante ad una frequenza di 600 MHz, (situato presso l'Istituto di Biostrutture e Bioimmagini, CNR, Napoli), l'esperimento eteronucleare è stato acquisito con uno spettrometro Bruker di 500 MHz (Istituto di chimica Biomolecolare del CNR). Tutti gli spettri 2D sono stati registrati con il metodo States-Haberhorn; la soppressione dell'acqua è stata ottenuta presaturando la linea del solvente attraverso la tecnica WATERGATE PFG.

Gli esperimenti 2D-TOCSY sono stati registrati a 281 K utilizzando uno schema MLEV17 di 30 e 70 ms (ampiezza spettrale 7000 Hz lungo f_1 ed f_2 , 4096 X 256 *data points* in t_2 e t_1 , rispettivamente, 32 scansioni per ogni t_1). Gli spettri 2D-NOESY usati per determinare le costrizioni spaziali sono stati misurati a 281 K con la sequenza di impulso standard con *mixing time* di 100, 200, 350, 500 ms (ampiezza spettrale 7000 Hz lungo f_1 ed f_2 , 4096 X 256 *data points* in t_2 e t_1 , rispettivamente, 64 scansioni per ogni t_1). Gli spettri 2D-ROESY sono stati registrati a 281 K con un *mixing time* di 250 ms (ampiezza spettrale 7000 Hz lungo f_1 ed f_2 , 4096 X 256 *data points* in t_2 e t_1 , rispettivamente, 64 scansioni per ogni t_1) e gli esperimenti 2D DQF-COSY sono stati ottenuti saturando il segnale dell'acqua durante il periodo di rilassamento (ampiezza spettrale 7000 Hz lungo f_1 ed f_2 , 4096 X 256 *data points* in t_2 e t_1 , rispettivamente, 256 scansioni per ogni t_1).

I dati sono stati apodizzati con una funzione di pesatura del tipo gaussiana ed è stato eseguito uno zero filling di 1 K in f_1 prima della trasformata di Fourier. I *chemical shift* sono stati riferiti al segnale dell'H₂O fissato a $\delta = 4.76$ ppm. I dati sono stati acquisiti con programmi standard della Varian e della Bruker e poi processati con i programmi nmrPipe [90] e NMRView [92].

Dettagli computazionali

I vincoli di distanza sperimentali per il calcoli di struttura sono stati ottenuti dalle intensità dei cross-peak negli spettri NOESY (350 ms) registrati in H₂O. I *cross-peak* ricavati dagli spettri NOESY sono stati integrati usando il programma NMRView e convertiti in vincoli di distanza utilizzando il modulo CALIBA inserito nel protocollo del programma DYANA [91]. I vincoli di distanza sono stati poi usati dal modulo GRIDSEARCH (protocollo DYANA) per generare un insieme di angoli diedri accessibili. I calcoli di struttura sono stati eseguiti con l'applicazione della macro *Annealing* usando le *torsion angle dynamics*.

Saggi di attività biologica

Materiali proteine e cellule

Le cellule CHP100 sono state gentilmente fornite dal dott. Gerry Merlino (Università degli Studi "La Sapienza" di Roma), e accresciute normalmente in RPMI contenente 10% di siero fetale bovino. Gli anticorpi monoclonali (mAb): Anti-fosfo Akt (Ser 473), anti Akt, e anti-fosfo-p44/p42 MAP chinasi (Thr202/Tyr204), sono prodotti dalla New England Biolabs Inc. (Hertfordshire, UK); Anti ERK2 è prodotto dalla Santa Cruz Biotechnology (CA, USA). La proteina umana SDF-1 α è prodotta dalla Peprotech Inc (NJ, USA); il saggio proteico BCA è prodotto dalla Pierce (IL, USA); la nitrocellulosa e l'ECL sono prodotti dalla Amersham Pharmacia (Italia); tutti gli altri materiali sono prodotti dalla Sigma-Aldrich (Italia).

Analisi Western blot

Cellule di neuroepitelioma umano *semi-confluent* CHP100 sono state lasciate in siero per 16-24 h, incubate per 1 h nel tampone di Locke e stimolate in esso con la proteina SDF-1 α e con gli analoghi peptidici, riportati in Tabella 14. Dopo stimolazione, le cellule sono state lisate con un campione di SDS in tampone caldo, bollite per 5 min e sonicate per 10 s in

ghiaccio, poi sono state centrifugate per 15 min a 15000 x g. Il contenuto di proteina è stato determinato con l'opportuno saggio proteico BCA, e la stessa quantità di proteina da ogni campione è stata analizzata su un gel di poliacrilammide al 8.75% di SDS e trasferita su foglio di nitrocellulosa a 4°C per 2 h. Quindi ogni campione di proteina è stato incubato per 1 h con il 3% di albumina di siero bovino per bloccare i siti di legame non specifico e quindi incubati con anticorpi specifici. L'immunoreattività è stata rilevata con un substrato chemiluminescente (ECL). L'intensità relativa delle bande è stata misurata via densitometrica (Scan Jet 4c HP) ed opportunamente analizzata (Jandel Sigma Gel).

Cristallizzazione dei peptidi

Per l'ottenimento di cristalli singoli adatti per un'indagine cristoallografica è stato impiegato in un primo momento il metodo della lenta evaporazione del solvente per una soluzione contenente i peptidi riportati come CXCR4{29-39} e SDF-1{1-17} in rapporto 1:1. In particolare l'impiego di soluzioni di CH₃CN/H₂O (3:7) a 20 °C ha fornito, in modo riproducibile, cristalli di dimensioni troppo ridotte per una utile raccolta dati. Contemporaneamente l'impiego di una diversa strategia di cristallizzazione, attraverso il metodo della diffusione in fase vapore, noto come *hanging drop*, ha fornito condizioni riproducibili ed in corso di perfezionamento per l'ottenimento di cristalli di dimensioni idonee all'indagine diffrattometrica.

Bibliografia I

- [1] Murphy P.M., Baggiolini M., Charo I.F., Hebert C.A., Horuk R., Matsushima K., Miller L.H., Oppenheim J.J., and Power C.A. International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors. *Pharmacol. Rev.* 2000, **52**:145-76
- [2] Baggiolini M., Dewald B., and Moser B. Human Chemokines: An Update. *Annu. Rev. Immunol.* 1997, **15**:675-705
- [3] Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998, **392**:565-8
- [4] Luther S.A., and Cyster J.G. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nature Immunol.* 2001, **2**:102-107
- [5] Gerard C., and Rollins B.J. Chemokines and disease. *Nature Immunol.* 2001, **2**:108-115
- [6] Murphy P.M. viral exploitation and subversion of the immune system through chemokine mimicry. *Nature Immunol.* 2001, **2**:116-122
- [7] Moser B., and Loetscher O. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunol.* 2001, **2**:123-128
- [8] Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nature Immunol.* 2001, **2**:129-134
- [9] Baggiolini M. Chemokine in pathology and medicine. *J.Internal. Med.* 2001, **250**:91-104
- [10] Vicari A.P., and Caux C. Chemokines in cancer *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002, **13**:143-154
- [11] Wang J.M., Deng X., Gong W., and Su S. Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *J. Immunol. Methods* 1998, **220**:1-17
- [12] Muller A., Homey B., Soto H., Ge N., Catron D., Buchanan M., McClanahan T., Murphy E., Yuan W., Wagner S.N., Barrera J.L., Mohar A., Verastegui E., and Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001, **410**:50-56
- [13] Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Rousset D., Clark-Lewis I., Loetscher P., Moser B., and Baggiolini M. HIV blocked by chemokine antagonist. *Nature* 1996, **383**:400
- [14] Amara A., Le Gall S., Schwartz O., Salamero J., Montes M., Loetscher P., Baggiolini M., Virelizier J.L., and Arenzana-Seisdedos F. HIV Coreceptor Downregulation as Antiviral Principle: SDF-1 α -dependent Internalization of the Chemokine Receptor CXCR4 Contributes to Inhibition of HIV Replication. *J. Exp.Med.* 1997, **186**:139-146
- [15] Kennedy J., Kelner G.S., Kleyensteuber S., Schall T.J., Weiss M.C., Yssel H., Schneider P.V., Cocks B.G., Bacon K.B., Zlotnik A. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *J. Immunol.* 1995, **155**:203-209
- [16] Bazan J.F., Bacon K.B., Hardiman G., Wang W., Soo K., Rossi D., Greaves D.R., Zlotnik A., and Schall T.J. A new class of membrane-bound chemokine with a CX₃C motif. *Nature* 1997, **385**:640-644
- [17] Pan Y., Lloyd C., Zhou H., Dolich S., Deeds J., Gonzalo J.A., Vath J., Gosselin M., Ma J., Dussault B., Woolf E., Alperin G., Culpepper J., Gutierrez-Ramos J.C., and Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature* 1997, **387**:611-617
- [18] Palczewski K., Kumaska T., Hori T., Behnke C.A., Motoshima H., Fox B.A., Le Trong I., Teller D.C., Okada T., Stenkamp R.E., Yamamoto M., Miyano M. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor. *Science* 2000, **289**:730-734
- [19] Teller D.C., Okada T., Behnke C.A., Palczewski K., and Stenkamp R.E. Advances in Determination of High-Resolution Three-Dimensional Structure of Rhodopsin, a Model of G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs). *Biochemistry* 2001, **26**:7761-7772
- [20] Thelen M., Peveri P., Kerner P., von Tscharner V., Walz A., Baggiolini M. Mechanism of neutrophil activation by NAF, a novel monocyte- derived peptide agonist. *FASEB J.* 1988, **2**:2702-2706
- [21] Möller C., Stromberg T., Juremalm M., Nilsson K., and Nilsson G. Expression and function of chemokine receptors in human multiple myeloma. *Leukemia* 2003, **17**:203-210
- [22] Zeelenberg I.S., Ruuls-Van Stalle L., and Roos Ed. The Chemokine Receptor CXCR4 Is Required for Outgrowth of Colon Carcinoma Micrometastases. *Cancer Reserch* 2003, **63**, 13:3833-3839
- [23] Catani M.V., Corasaniti M.T., Navarra M., Nisticò G., Finazzi-Agrò A., and Merlino G. gp120 Induces Cell Death in Human Neuroblastoma Cells Through the CXCR4 and CCR5 Chemokine Receptors. *J. Neurochem.* 2000, **74**:2373-2379
- [24] Banisadr G., Dicou E., Berbar T., Rostene W., Lombet A., Haour F. Characterization and visualization of [¹²⁵I] stromal cell-derived factor-1 α binding to CXCR4 receptors in rat brain. *Journal of Neuroimmunology* 2000, **100**:151-160
- [25] Floridi F., Trettel F., Di Bartolomeo S., Ciotti M.T., and Limatolo C. Signalling pathways involved in the chemotactic activity of CXCL12 in cultured rat cerebellar neurons and CHP100 neuroepithelioma cells. *Journal of Neuroimmunology* 2003, **135**: 38-46
- [26] Babcock G.J., Farzan M., and Sodroski J. Ligand-independent Dimerization of CXCR4, a Principal HIV-1 Coreceptor. *J.B.C.* 2003, **278**, 5 :3378-3385
- [27] Dean M.K., Higgs C., Smith R.E., Bywater R.P., Snell C.R., Scott P.D., Upton G.J.G., Howe T.J., Reynolds C.A. Dimerization of G-Protein-Coupled Receptors. *J. Med. Chem.* 2001, **44**:4595-4614
- [28] Baribaud F., Edwards T.G., Sharron M., Brelot A., Heveker N., Price K., Mortari F., Alizon M., Tsang M., and Doms R.W. Antigenically Distinct Conformations of CXCR4. *Journal of Virology* 2001, **75**, 19:8957-8967
- [29] Doranz B.D., Orsini M.J., Turner J.D., Hoffman T.L., Berson J.F., Hoxie J.A., Peiper S.C., Brass L.F., and Doms R.W. Identification of CXCR4 Domains That Support Coreceptor and Chemokine Receptor Functions. *Journal of Virology* 1999, **73**, 4:2752-2761

- [30] Brelot A.N., Heveker N., Pleskoff O., Sol N., and Alison M. Role of the First and Third Extracellular Domains of CXCR-4 in Human Immunodeficiency Virus Coreceptor Activity. *Journal of Virology* 1997, **71**:4744-4751
- [31] Lu Z., Berson J.F., Chen Y.H., Turner J.D., Zhang T.Y., Sharrin M., Jenks M.H., Wang M.H., Wang Z.X., Kim J., Rucker J., Hoxie J.A., Peiper S.C., and Doms R.W. Evolution of HIV-1 coreceptor usage through interactions with distinct CCR5 and CXCR4 domains. *P.N.A.S.* 1997, **94**:6426-6431
- [32] Picard L., Wilkinson D.A., McKnight A., Gray P.W., Hoxie J.A., Clapham P.R., and Weiss R.A. Role of the Amino-Terminal Extracellular Domain of CXCR-4 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Entry. *Virology* 1997, **231**: 105-111
- [33] Huang X., Shen J., Cui M., Shen L., Luo X., Ling K., Pei G., Jiang H., and Chen K. Molecular Dynamics Simulations on SDF-1 α : Binding with CXCR4 Receptor. *Biophysical Journal* 2003, **84**:171-184
- [34] Zhou N., Luo Z., Luo J., Liu D., Hall J.W., Pomeranz R.J., and Huang Z. Structural and Functional Characterization of Human CXCR4 as a Chemokine Receptor and HIV-1 Co-receptor by Mutagenesis and Molecular Modeling Studies. *J.B.C.* 2001, **276**, 46; 16:42826-42833
- [35] Strader C.D., Fong T.M., Tota M.R., Underwood D., and Dixon R.A.F. Structure and Function of G Protein-Coupled Receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, **63**:101-132
- [36] Chabot D.J., Zhang P.F., Quinnan G.V., and Broder C.C. Mutagenesis of CXCR4 Identifies Important Domains for Human Immunodeficiency Virus Type 1 X4 Isolate Envelope-Mediated Membrane Fusion and Virus Entry and Reveals Cryptic Coreceptor Activity for R5 Isolates. *Journal of Virology* 1999, **8**:6598-6609
- [37] Farzan M., Mirzabekov T., Kolchinsky P., Wyatt R., Cayabyab M., Gerard N.P., Gerard C., Sodroski J., and Choe H. Tyrosine Sulfation of the Amino Terminus of CCR5 Facilitates HIV-1 Entry. *Cell* 1999, **96**:667-676
- [38] Bannert N., Craig S., Farzan M., Sogah D., Santo N.V., Choe H., and Sodroski J. Sialated O-Glycans and Sulfated Tyrosines in the NH₂-Terminal Domain of CC Chemokine Receptor 5 Contribute to High Affinity Binding of Chemokines. *J.Exp.Med.* 2001, **194**:1661-1673
- [39] Farzan M., Schnitzler C.E., Vasileva N., Leung D., Kuhn J., Gerard C., Gerard N.P., and Choe H. Sulfated Tyrosines Contribute to Formation of the C5a Docking Site of the Human C5a Anaphylatoxin Receptor. *J.Exp.Med.* 2001, **193**:1059-1066
- [40] Preobrazhensky A.A., Dragan S., Kavano T., Gavrilin M.A., Gulina I.V., Chakravarty L., and Kolattukudy P.E. Monocyte Chemotactic Protein-1 Receptor CCR2B Is a Glycoprotein That Has Tyrosine Sulfation in a Conserved Extracellular N-Terminal Region. *J.Immunol.* 2000, **165**:5295-5303
- [41] Farzan M., Babcock G.J., Vasileva N., Wright P.L., Kiprilov E., Mirzabekov T., and Choe H. The Role of Post-translational Modifications of the CXCR4 Amino Terminus in Stromal-derived Factor 1 α Association and HIV-1 Entry. *J.B.C.* 2002, **277**, 33:29484-29489
- [42] Ji T., Wang P., Zhao J., Wu Y.L., Cheng Z.J., Wu G.W., Hu W., Ma L., and Pei G. Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: Functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *J.B.C.* 1998, **273**:17299-17302
- [43] Horn F., Weare J., Beukers M.W., Hörsch S., Bairoch A., Chen W., Edvardsen Ø., Campagne F., and Vriend G. GPCRDB: an information system for G protein-coupled receptors. *Nucleic Acids Res.* 1998, **26**:275-279
- [44] Ling K., Wang P., Zhao J., Wu Y.L., Cheng Z.L., Wu G.X., Hu W., Ma L., and Pei G. Five-transmembrane domains appear sufficient for a G protein-coupled receptor: Functional five-transmembrane domain chemokine receptors. *PNAS* 1999, **96**:7922-7927
- [45] Baldwin J.M. The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* 1993, **12**:1693-1703
- [46] Crump M.P., Gong J.H., Loetscher P., Rajarathnam K., Amara A., Arenzana-Seisdedos F., Virelizier J.L., Baggiolini M., Sykes B.D., and Clark-Lewis I. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO Journal* 1997, **16**, 23:6996-7007
- [47] Dealwis C., Fernandez E.J., Thompson D.A., Simon R.J., Siani M.A., and Lolis E. Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1 α , a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998, **95**:6941-6946
- [48] Holmes W.D., Consler T.G., Dallas W.S., Rocque W.J., and Willard D.H., Solution Studies of Recombinant Human Stromal-Cell-Derived Factor-1. *Protein Expr. Purif* 2001, **21**:367-377
- [49] Loetscher P., Gong J.H., Dewald B., Baggiolini M., and Clark-Lewis I. N-terminal Peptides of Stromal Cell-derived Factor-1 with CXC Chemokine Receptor 4 Agonist and Antagonist Activities. *J.B.C.* 1998, **273**, 35:22279-22283
- [50] Elisseeva E.L., Slupsky C.M., Crump M.P., Clark-Lewis I., and Sykes B.D. NMR Studies of Active N-terminal Peptides of Stromal Cell-derived Factor-1. *J.B.C.* 2000, **275**, 35:26799-26805
- [51] Zhou N., Luo Z., Luo J., Hall J.W., and Huang Z. A Novel Peptide Antagonist of CXCR4 Derived from the N-Terminus of Viral Chemokine vMIP-II. *Biochemistry* 2000, **39**:3782-3787
- [52] Booth V., Slupsky C.M., Clark-Lewis I., and Sykes B.D. Unmasking Ligand Binding Motifs: Identification of a Chemokine Receptor Motif by NMR Studies of Antagonist Peptides. *J.Mol.Biol.* 2003, **327**:329-334
- [53] De Clerq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nature reviews* 2003, **2**:581-587
- [54] Ichiyama K., Yokoyama-Kumakura S., Tanaka R., Hirose K., Bannai K., Edamatsu T., Yanaka M., Niitani Y., Miyano-Kurosaki N., Takaku H., Koyanagi Y., and Yamamoto N. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KHR-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, **100**, 7:4185-4190

- [55] Tarasova N.I., Rice W.G., and Michejda C.J. Inhibition of G-protein-coupled Receptor Function by Disruption of Transmembrane Domain Interactions. *J.B.C.* 1999, **274**; 49:34911-34915
- [56] Luo J., Luo Z., Zhou N., Hall J.W., and Huang Z. Attachment of C-Terminus of SDF-1 Enhances the Biological Activity of Its N-Terminal Peptide. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1999, **264**:42-47
- [57] Tudan C., Willick G.E., Chahal S., Arab L., Law P., Salari H., and Merzouk A. C-Terminal Cyclization of an SDF-1 Small Peptide Analogue Dramatically Increase Receptor Affinity and Activation of the CXCR4 Receptor. *J.Med.Chem.* 2002, **45**:2024-2031
- [58] Bleu C.C., Fuhlbrigge R.C., Casanovas J.M., Aiuti A., and Springer T.A. A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant, Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1). *J. Exp. Med.* 1996, **184**; 3:1101-1109
- [59] Amara A., Lorthioir O., Valenzuela A., Magerus A., Thelen M., Montes M., Virelizier J.L., Delepiepierre M., Baleux F., Lortat-Jacob H., and Arenzana-Seisdedos F. Stromal Cell-derived Factor-1 α Associates with Heparan Sulfates through the First β -Strand of the Chemokine. *J.B.C.* 1999, **274**, 34:23916-23925
- [60] Sadir R., Baleux F., Grosdidier A., Imberty A., and Lortat-Jacob H. Characterization of the Stromal Cell-derived Factor-1 α -Heparin Complex. *J.B.C.* 2001, **276**; 11:8288-8296
- [61] Doranz B.J., Grovit-Ferbas K., Sharron M.P., Mao S.H., Goetz M.B., Daar E.S., Doms R.W., and O'Brien A.W., A Small-molecule Inhibitor Direct against the Chemokine Receptor CXCR4 Prevents its Use as an HIV-1 Coreceptor. *J. Exp. Med.* 1997, **186**; 8:1395-1400
- [62] Luo Z., Zhou N., Luo J., Hall J.W., and Huang Z. The role of Positively Charged Residues in CXCR4 Recognition Probed with Synthetic Peptides. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1999, **263**:691-695
- [63] Sachpatzidis A., Benton B.K., Manfredi J.P., Wang H., Hamilton A., Dohlmans H.G., and Lolis E. Identification of Allosteric Peptide Agonists of CXCR4. *J.B.C.* 2003, **278**; 2:896-90
- [64] Christopoulos A. and Kenakin T., G Protein-Coupled Receptor Allosterism and Complexing. *Pharmacology Rev.* 2002, **54**:323-374
- [65] Zhou N., Luo Z., Luo J., Fan X., Cayabyab M., Hiraka M., Liu D., Han X., Pesavento J., Dong C.Z., Wang Y., An J., Kaji H., Sodroski J.G., and Huang Z. Exploring the Stereochemistry of CXCR4-Peptide Recognition and Inhibiting HIV-1 Entry with D-Peptides Derived from Chemokines. *J.B.C.* 2002, **277**; 20:17476-17485
- [66] Nakashima, H., Masuda M., Murakami T., Koyanagi Y., Matsumoto A., Fujii N., and Yamamoto N. Anti-human immunodeficiency virus activity of a novel synthetic peptide, T22 ([Tyr-5,12, Lys-7] polyphemusin II): a possible inhibitor of virus-cell fusion. *Antimicrob. Agent Chemother.* 1992, **36**:1249-1255
- [67] Murakami T., Nakajima T., Koyanagi Y., Tachibana K., Fuji N., Tamamura H., Yoshida N., Waki M., Matsumoto A., Yoshie O., Kishimoto T., Yamamoto N., and Nagasawa T. A Small Molecule CXCR4 Inhibitor that Blocks T Cell Line-tropic HIV-1 Infection. *J.Exp.Med.* 1997, **186**; 8:1389-1393
- [68] Lusso P. Picking the Lock with a Hairpin: Did HIV-1 Learn the Art from Chemokines?. *Structure*, 2003, **11**:129-132
- [69] Sharon M., Kessler N., Levy R., Zolla-Pazner S., Görlach M., and Anglister J. Alternative Conformations of HIV-1 V3 Loops Mimic β Hairpins in Chemokines, Suggesting a Mechanism for Coreceptor Selectivity. *Structure*, 2003, **11**:225-236
- [70] Tamamura H., Xu Y., Hattori T., Zhang X., Arakaki R., Kanbara K., Omagari A., Otaka A., Ibuka T., Yamamoto N., Nakashima H., and Fuji N. A Low-Molecular-Weight Inhibitor against the Chemokine Receptor CXCR4: A Strong Anti-HIV Peptide T140. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1998, **235**:877-882
- [71] Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Gotoh K., Kanamoto T., Xu Y., Kodama E., Matsuoka M., Hattori T., Yamamoto N., Nakashima H., Otaka A., and Fuji N. Development of Specific CXCR4 Inhibitors Possessing High Selectivity Indexes as Well as Complete Stability in Serum Based on an Anti-HIV-1 Peptide T140. *Bioorg. & Med. Chemistry Letters* 2001, **11**:1897-1902
- [72] Tamamura H., Omagari A., Hiramatsu K., Oishi S., Habashita H., Kanamoto T., Gotoh K., Yamamoto N., Nakashima H., Otaka A., and Fuji N. Certification of the Critical Importance of L-3-(2-Naphthyl)alanine at Position 3 of a Specific CXCR4 Inhibitor, T140, Leads to an Exploratory Performance of Its Downsizing Study. *Bioorg. & Med. Chemistry Letters* 2002, **10**:1417-1426
- [73] Fujii N., Oishi S., Hiramatsu K., Araki T., Ueda S., Tamamura H., Otaka A., Kusano S., Terakubo S., Nakashima H., Broanch J.A., Trent J.O., Wang Z.X., and Peiper S.C. Molecular-Size Reduction of a Potent CXCR4-Chemokine Antagonist Using Orthogonal Combination of Conformation- and Sequence-Based Libraries. *Angewante Chemie* 2003, **42**:3251-3253
- [74] Song R., Witvrouuv M., Schols D., Robert A., Balzarini J., De Clercq E., Bernadou J., Meunier B. Anti-HIV activity of anionic metalloporphyrins and related compounds. *Antivir. Chem. Chemother.* 1997, **8**:85-97
- [75] Schols D., Claes S., Hatse S., Princen K., Vermeire K., De Clercq E., Skerlj R., Bridger G., calandra G. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. *The 10th Conf. on Retrov. and Opport. Infect.*, Boston 2003
- [76] Schols D., Claes S., Hatse S., Princen K., Vermeire K., De Clercq E., Skerlj R., Bridger G., calandra G. Anti-HIV activity profile of AMD070, an orally bioavailable CXCR4 antagonist. *The 16th Int. Conf. on Antiviral Res.*, Georgia 2003. **57**, A39
- [77] Hatse S., Princen K., Gerlach L.O., Bridger G., Henson G., De Clercq E., Schwartz T.W., and Schols D. Mutation of Asp¹⁷¹ and Asp²⁶² of the Chemokine Receptor CXCR4 Impairs Its Coreceptor Function for Human Immunodeficiency Virus-1 Entry and Abrogates the Antagonistic Activity of AMD3100. *Mol. Pharmacol.* 2001, **60**:164-173

- [78] Gerlach L.O., Skerlj R.L., Brider G.J., and Schwartz T.W. Molecular Interactions of Cyclam and Bicyclam Non-peptide Antagonists with the CXCR4 Chemokine Receptor. *J.B.C.* 2001, **276**:14153-14160
- [79] Gerlach L.O., Jakobsen J.S., Jensen K.P., Rosenkilde M.R., Skerlj R.T., Ryde U., Bridge G.J., and Schwartz T.W. Metal Ion Enhanced Binding of AMD3100 to Asp²⁶² in the CXCR4 Receptor. *Biochemistry* 2003, **42**:710-717
- [80] Gupta S.K., Pillarisetti K., Thomas R.A., Aiyar N. Pharmacological evidence for complex and multiple site interaction of CXCR4 with SDF-1 α : implications for development of selective CXCR4 antagonists. *Immunology Letters* 2001, **78**:29-34
- [81] Ragone R., De Luca S., Tesauro D., Pedone C., and Morelli G. Fluorescence Studies on the Binding Between 1-47 Fragment of Cholecystokinin receptor CCK_A-R(1-47) and Nonsulfated Cholecystokinin Octapeptide CCK8. *Biopolymers* 2001, **59**:47-53
- [82] le Marie M., Champeil P., and Møller J.V., Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000, **1508**:86-111
- [83] Esposito C., Colicchio P., Facchiano A., and Ragone R. Effect of a Weak Electrolyte on the Critical Micellar Concentration of Sodium Dodecyl Sulfate. *J. Colloid Interface Sci.* 1998, **200**:310-312
- [84] Palladino P., Pedone C., Ragone R., Rossi F., Saviano M., and Benedetti E. A Simplified Model of the Binding Interaction Between Stromal Cell-Derived Factor-1 Chemokine and CXC Chemokine Receptor 4. *Protein and Peptide Letters* 2003, **10**, 2:133-138
- [85] Griesinger C., Otting G, Wuthrich K., Ernst R.R. Clean TOCSY for ¹H Spin System Identification in Macromolecules. *J.Am. Chem. Soc.*, 1988, **110**:7870-7872
- [86] Rance M., Sorensen O.W., Bodenhausen G., Wagner G., Ernst R.R., Wuthrich K. Improved spectral resolution in cosy 1H NMR spectra of proteins via double quantum filtering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983, **117**: 479-485
- [87] Kumar A., Ernst R.R., Wuthrich K. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, **95**:1-6
- [88] Wuthrich K., *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York 1986
- [89] Dorman D.E., and Bovey F.A. Carbon-13 magnetic resonance spectroscopy. Spectrum of proline in oligopeptides. *J.OrganicChem.* 1973, **38**, 13:2379-2383
- [90] Delaglio F., Grzesiek S., Vuister G., Zhu G., Pfeifer J., Bax A. NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J. Biomol. NMR* 1995, **6**:277-293
- [91] Günter P., Mumenthaler C., Wuthrich K. Torsion angle dynamics for NMR structure calculation with the new program D_{YANA}. *J. Mol. Biol.* 1997, **273**:283-298
- [92] Johnson B.A., Blevins R.A. NMRView: A computer program for the visualization and analysis of NMR data *J. Biomol. NMR* 1994, **4**:603-614
- [93] Skelton N.J., Quan C., Reilly D., and Lowman H. Structure of a CXC chemokine-receptor fragment in complex with interleukin-8. *Structure* 1999, **7**, 2: 157-168

Introduzione II

Stress ossidativo

Gli intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI) sono forme parzialmente ridotte dell'ossigeno atmosferico. Essi si formano per eccitazione di O_2 allo stato di singoletto o per trasferimento di elettroni all' O_2 formando radicali superossido (O_2^-), perossido d'idrogeno (H_2O_2), o radicali ossidrilici (HO^\cdot). Differentemente dall'ossigeno atmosferico, le ROI sono in grado di portare alla distruzione ossidativa delle cellule [1-3]. Mentre nelle normali condizioni di crescita la produzione di ROI nelle cellule è bassa ($240 \mu M s^{-1}$ per O_2^- , e $0.5 \mu M$ per H_2O_2 nei cloroplasti) [4], in caso di *stress* la produzione di ROI è elevata ($240-720 \mu M s^{-1}$ per O_2^- , e $5-15 \mu M$ per H_2O_2) [4]. Queste elevate quantità hanno diverse cause tra cui la siccità, la elevata salinità, gli *shock* termici, la presenza di metalli pesanti, le radiazioni UV, gli inquinanti atmosferici come l'ozono o l' SO_2 , gli *stress* meccanici, la perdita di sostanze nutrienti, e gli attacchi patogeni [5, 6]. Tali agenti ossidanti funzionano anche da segnali per l'attivazione di meccanismi di difesa [7]. La morte cellulare indotta dai ROI è il risultato di processi quali la perossidazione dei lipidi di membrana, l'ossidazione delle proteine, l'inibizione di enzimi ed il danneggiamento del DNA ed RNA oltre che dalla attivazione della morte cellulare programmata (PCD).

Le cellule delle piante richiedono un meccanismo capace di modulare i bassi livelli di ROI usati come segnali cellulari, ed un altro meccanismo che permetta la detossificazione dall'eccesso degli stessi agenti ossidanti attraverso degli *scavenger*. I principali meccanismi di eliminazione delle specie ossidanti nelle piante includono la superossido dismutasi (SOD), l'ascorbato perossidasi (APX), la catalasi (CAT), Tioredossina perossidasi (Trx) e la Glutazione perossidasi [1, 8, 9] (Tabella 1).

Meccanismo	Localizzazione ^a	ROI primari	Rif.
Produzione			
Fotosintesi (Te e Ps)	Cl	O_2^-	[1, 3]
Respirazione (Te)	Mit	O_2^-	[2, 25]
Glicolato ossidasi	Per	H_2O_2	[31]
Clorofilla eccitata	Cl	O_2^1	[1]
NADPH ossidasi	Mp	O_2^-	[4, 5]
β -ossidazione degli acidi grassi	Per	H_2O_2	[31]
Ossalato ossidasi	Apo	H_2O_2	[2]
Xantina ossidasi	Per	O_2^-	[31]
Perossidasi, Mn^{2+} e NADH	PC	O_2^- , H_2O_2	[4, 5]
Ammina ossidasi	Apo	H_2O_2	[46]
Scavenging			
Superossido dismutasi	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	O_2^-	[7]
Ascorbato perossidasi	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	H_2O_2	[1, 3]
Catalasi	Per	H_2O_2 , ROOH	[16]
Glutazione perossidasi	Cit	H_2O_2	[47]
Perossidasi	PC, Cit, Vac	H_2O_2	[1]
Tioredossina perossidasi	Cl, Cit, Mit	H_2O_2 , O_2^-	[48]
Acido ascorbico	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	H_2O_2	[3, 8]
Glutazione	Cl, Cit, Mit, Per, Apo	H_2O_2 , O_2^1	[3, 8]
α -Tocoferolo	Membrane	ROOH, O_2^1	[1]
Carotenoidi	Cl	O_2^1	[1]
Inibizione			
Adattamento anatomico	Struttura della foglia, epiderma	O_2^- , H_2O_2 , O_2^1	[44, 49]
Metabolismo C4 o CAM	Cl, Cit, Vac	O_2^- , H_2O_2	[49]
Movimento dei Cl	Cit	O_2^- , H_2O_2 , O_2^1	[44]
Soppressione della fotosintesi	Cl	O_2^- , H_2O_2	[49]
Modulazione di PS e antenna	Cl	O_2^- , O_2^1	[44]
Ossidasi alternative	Cl, Mit	O_2^-	[25,50]

Tabella 1. Produzione, *scavenging* ed inibizione degli intermedi reattivi dell'ossigeno nelle piante.

^aAbbreviazioni: Apo, apoplasti; Cl, cloroplasti; Cit, citosol; Fs, fotosistema; Mit, mitocondri; Mp, membrana plasmatica; Pc, parete cellulare, Per, periossoma; Te, trasferimento elettronico; Vac, vacuoli.

Peptide-Metionina Solfossi Reduttasi (PMSR)

Catalisi della riduzione delle Metionine solfossido e ruolo biologico

Gli enzimi chiamati Peptide Metionina Solfossi Reduttasi (PMSR) catalizzano la riduzione delle metionine solfossido, Met-O, a metionine, Met. [10, 11]. Le proteine che possiedono residui di Met esposti in superficie possono aver contatto accidentale con intermedi reattivi dell'ossigeno (ROI), o dell'azoto (RNI), generando Met-O. In questo caso la riduzione da parte delle PMSR permette la preservazione dall'invecchiamento dell'organismo. Inoltre, certi enzimi possiedono una o più metionine nel sito attivo la cui ossidazione può variarne la funzionalità. Per esempio, la velocità di chiusura del canale per

K^+ è modulata dalla ossidazione di un residuo di metionina [12, 13]. In maniera simile, l'ossidazione di una metionina determina la capacità della calmodulina di legare il calcio [14].

I due stereoisomeri della metionina ossidata, Metionina-(S)-solfossido (Met-S-O) e Metionina-(R)-solfossido (Met-R-O) sono ridotte due differenti sottoclassi di PMSR., la MsrA riduce la Met-S-O [15, 16] e la MsrB riduce la Met-R-O [17]. Inoltre, esistono proteine in cui i domini MsrA e MsrB sono coniugati. Dati biochimici suggeriscono un meccanismo catalitico che richiede l'impiego di due o più cisteine per MsrA ed MsrB. Il primo stadio prevede la formazione di un acido sulfenico come intermedio di reazione a cui segue la formazione di un ponte disolfuro la cui riduzione, attraverso la tioredossina, rigenera il sito attivo. [15, 18, 19, 20] come mostrato in Figura 1. Inoltre, sono note delle proteine di tipo MsrB con una sola cisteina o con 4 residui di cisteina aggiuntivi che coordinano un atomo di Zn (II) la cui funzione è ancora sconosciuta.

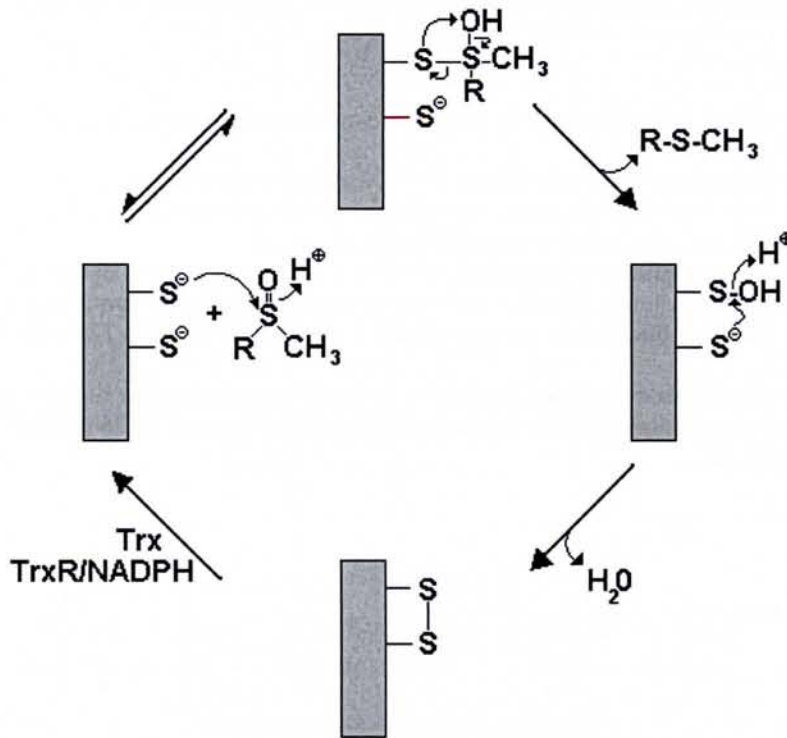


Figura 1. Meccanismo generale di azione della Metionina Solfossi Reduttasi. Il primo stadio prevede l'attacco nucleofilo ad una metionina ossidata a cui segue la formazione dell'acido sulfenico, quindi si ha la formazione di un ponte disolfurico intramolecolare ridotto poi dalla tioredossina (Trx) che è rigenerata dal sistema tioredossina reduttasi (TrxR)/NADPH.

Perossiredossine (Prx)

Localizzazione e funzione biologica

Le perossiredossine (Prx) costituiscono una nuova famiglia di proteine antiossidanti chiamate anche tioredossina perossidasi o alchil-idroperossido reduttasi. Queste perossidasi non-eme catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno e di numerosi altri perossidi in presenza di donatore di protoni ed elettroni. Questi enzimi sono ubiquitari e sono stati ritrovati ad esempio nelle piante, le cellule animali, nei parassiti e nei batteri. Maggiormente localizzati nel citosol, si trovano anche nei mitocondri, nei cloroplasti ed associati alla membrana. Queste proteine sono generalmente sovraespresse quando le cellule sono sottoposte a stress ossidativo, ossia quando il perossido d'idrogeno è prodotto in grande quantità [21]. Queste proteine hanno tra l'altro un ruolo nell'apoptosi, nella regolazione di alcuni fattori di trascrizione [22, 23] e ricoprono in parte la funzione della glutatione perossidasi e della catalasi [24].

Classificazione e meccanismo

Le Perossiredossine sono state divise inizialmente in due classi in base al numero di cisteine implicate nel meccanismo catalitico. I dati biologici e strutturali tuttavia permettono di suddividere la classe delle 2-Cys Prx : le 2-Cys Prx dette "tipiche" e le 2-Cys Prx dette "atipiche". Il meccanismo d'azione della proteina è costituito da due tappe essenziali. La prima tappa, comune alle tre classi di Prx, consiste nell'attacco nucleofilo della cisteina catalitica, e per questo detta perossidasi, sul substrato e la sua ossidazione ad acido sulfenico (Cys-SOH) (Figura 2). Ad oggi, tutte le Prx di struttura nota posseggono una arginina nel sito attivo con il probabile ruolo di abbassare il pKa della cisteina perossidasi e stabilizzarne la forma tiolato. La seconda tappa della reazione consiste nella reazione da parte dell'acido sulfenico ed è ciò che distingue le tre classi di Prx:

- Le 2-Cys Prx tipiche funzionano come dimeri orientati testa-coda e possiedono una seconda cisteina conservata che attacca l'acido sulfenico dell'altro monomero. Il che comporta la formazione di un ponte disolfurico intermolecolare che viene ridotto da una disolfuro-ossidoreduttasi della cellula come la tioredossina. Le Prx di questa classe possono anche

formare decameri e questa oligomerizzazione potrebbe essere implicata nel controllo dell'attività enzimatica e dei segnali cellulari [25].

- Le 2-Cys Prx atipiche hanno lo stesso tipo di meccanismo ma funzionano come monomeri, ed il secondo stadio della reazione passa attraverso la formazione di un ponte disolfurico intramolecolare ridotto in seguito dalla tioredossina [26].
- Le Prx di tipo 1-Cys non possiedono la seconda cisteina attiva, e l'acido sulfenico è rigenerato da un donatore di elettrone che potrebbe essere il glutatione, l'acido lipoico o la ciclofillina.

Delle strutture oggi risolte di Prx (Figura 3) tre sono di origine umana: 1PRX [27]; 1HD2 o 1H40 [28]; 1QMV [29]. Le altre Prx sono di ratto 1QQ2 [30], di *Crithidia fasciculata* 1E2Y [31], di *Mycobacterium tuberculosis* 1KNC [32], e di *Salmonella thyphimurium* 1KYG [25]. Inoltre è stata determinata la struttura di una proteina ibrida, contenente un dominio di Prx ed un dominio glutaredossina (Grx) INM3 [33]. Tutte queste proteine hanno una struttura simile alla tioredossina con qualche elemento di struttura secondaria addizionale. Tutte Le Prx possiedono siti attivi molto simili. In particolare la cisteina perossidasica è localizzata all'inizio di un'elica ed è circondata da tre residui conservati di arginina, treonina, e prolina.

Le Prx di origine vegetale

Le numerose sequenze disponibili di Prx permettono di identificare quattro gruppi distinti con un'identità di sequenza che varia dal 75% al 90% [34, 35, 36].

- La classe 1-Cys PRX è costituita da proteine costituite da 216-222 residui amminoacidici [37].
- La classe principale 2-Cys PRX raggruppa gli enzimi cloroplastici di tipo dimerici (Figura 2, 3) la cui caratterizzazione biochimica a permesso di stabilire che sono tioredossina-dipendenti [38, 39, 40].
- La classe di Prx identificata nei cloroplasti e chiamata Prx Q (o Prx a 2-Cys monomerica di tipo I). La sequenza di questa proteina, tioredossina dipendente, nella forma matura è più corta di quella delle Prx di tipo 2-Cys dimeriche (150 residui contro i 200-215) e le loro cisteine catalitiche sono separate da soli 4 residui contro i circa 120 residui per le Prx di tipo 2-Cys dimeriche. [41].
- L'ultima classe, detta Prx a 2-Cys monomerica di tipo II, a cui appartengono proteine di 162 residui. Queste proteine sono probabilmente localizzate nei citoplasmici [42] e possiedono due cisteine separate da 25 residui, di cui solo la prima è indispensabile all'atto catalitico [37].

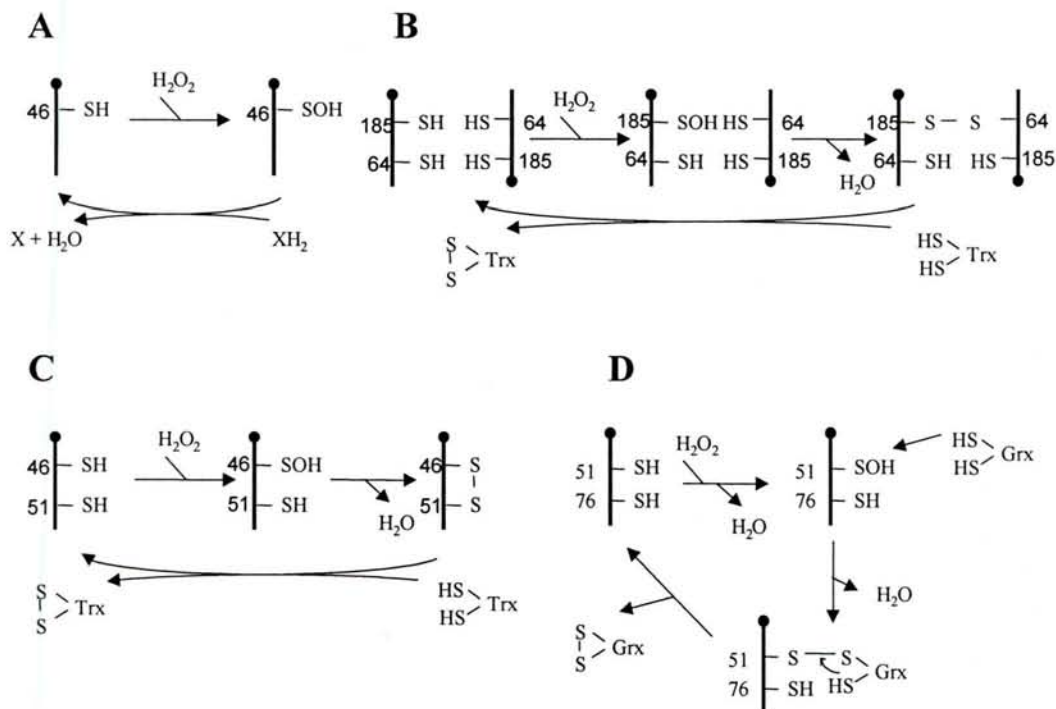


Figura 2. Meccanismo catalitico delle 4 sottoclassi di perossiredossine

- (A): 1-Cys Prx
- (B): 2-Cys Prx
- (C): 2-Cys Prx monomerica di tipo I (Prx Q)
- (D): 2-Cys Prx monomerica di tipo II.

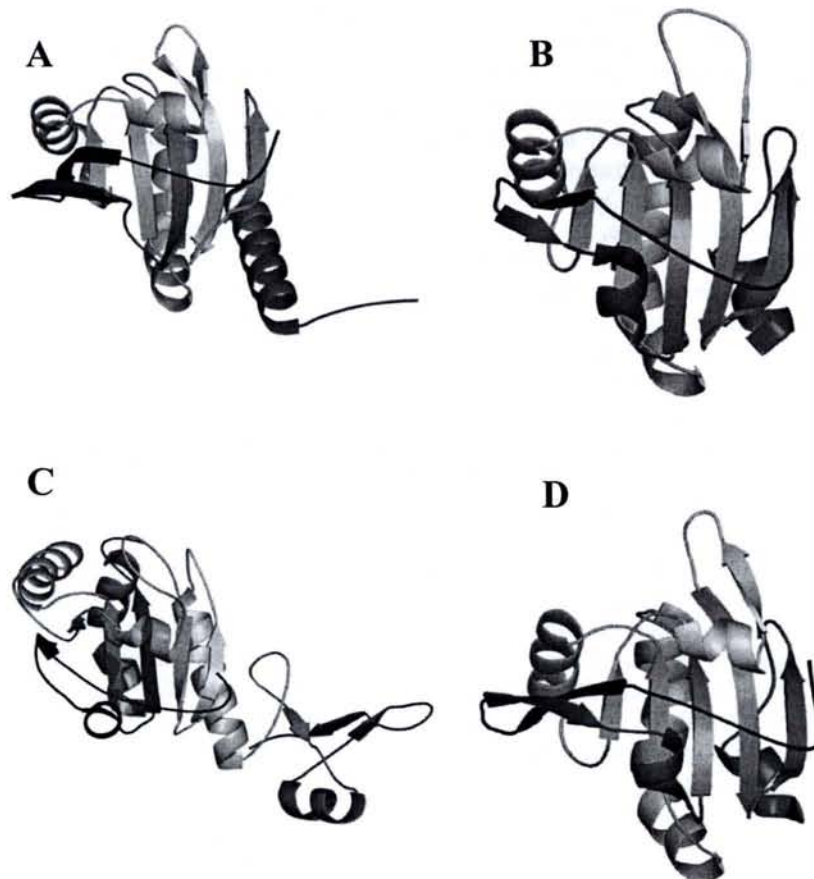


Figura 3. Rappresentazione di un monomero di Perossiredossina per ognuna delle 4 differenti classi

A : 2-Cys Prx monomerica di tipo I, umana (codice pdb 1HD2)

B : 2-Cys Prx, *S. thyphimurium* (codice pdb 1KYG)

C : 1-Cys Prx, umana (codice pdb 1PRX)

D : Prx monomerica di tipo II, pioppo.

Parte sperimentale II

Cristallizzazione

MsrA cloroplastica da pioppo

La proteina MsrA da pioppo, sia cloroplastica che citosolica, è stata fornita dai laboratori diretti dal prof. Jean-Pierre Jacquot della *Faculté des Sciences UMR 1136 UHP-INRA* (Vandoeuvre-Cedex Francia). La soluzione madre della proteina cloroplastica era costituita da 40 mg/mL di MsrA e da una soluzione tampone a pH 7.01 contenente TRIS 30 mM, EDTA 1 mM, e β mercaptoetanolo 14 mM. Per la ricerca della condizione di cristallizzazione, attraverso la tecnica della diffusione di vapore, sono stati utilizzate le soluzioni *Crystal Screen*TM, *Crystal Screen 2*TM, e *PEG/Ion Screen*TM della *Hampton Research*. La variazione della concentrazione della proteina e della temperatura ha portato all'individuazione della condizione che ha fornito buoni cristalli della proteina MsrA cloroplastica a 277 K, 10 mg/mL in PEG 6000 al 10% e NaCl 2.0 M, come riportato nella Foto 1.

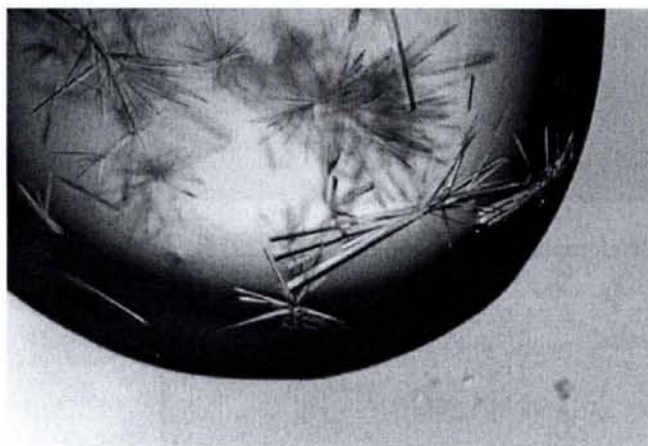


Foto 1. Cristalli di MsrA cloroplastica da pioppo ottenuti a 277 K in PEG 6000 al 10% e NaCl 2.0 M.

Prx cloroplastica da pioppo (Prx BCP)

Anche la proteina cloroplastica da pioppo Prx BCP, appartenente alla classe delle PrxQ, è stata fornita dal prof. Jean-Pierre Jacquot della *Faculté des Sciences* UMR 1136 UHP-INRA (Vandoeuvre-Cedex Francia); La soluzione madre era costituita da 40mg/mL di Prx BCP in tampone acetato 50mM a pH 5.54. Per trovare le condizioni di cristallizzazione, attraverso la tecnica della diffusione di vapore, sono stati utilizzate le soluzioni *Crystal Screen*TM, *Crystal Screen 2*TM, della *Hampton Research* e le soluzioni *Clear Strategy Screen 1*TM della Molecular Dimension Ltd. La strategia di cristallizzazione ha quindi previsto utilizzo iniziale di una concentrazione, di proteina pari a 10 mg/mL in camera termostata a 20°C, utilizzando le 96 differenti condizioni fornite da *Crystal Screen 1* e *2*TM. Inoltre le stesse soluzioni e temperatura sono state utilizzate per la proteina ad uguale concentrazione, ma con l'aggiunta di un agente riducente, il ditione 1 mM (DTT), allo scopo di prevenire ossidazioni intra ed intermolecolari della proteina nativa Prx. Poiché la quasi totalità delle gocce preparate, sia in presenza di DTT che in assenza, dopo una settimana presentavano un precipitato amorfo, sono state ripetute le condizioni di cristallizzazione diluendo le soluzioni della *Hampton Research* al 20% ed al 30% con H₂O. Inoltre altra proteina dalla soluzione madre, diluita a 20 mg/mL, e tal quale a 40 mg/mL è stata utilizzata per ripetere, anche con DTT 1 mM, le differenti soluzioni che dopo circa tre settimane presentavano gocce limpide. Ancora, la proteina a 10 mg/mL è stata utilizzata per applicare la *Clear Strategy Screen 1*TM della MDL che prevede l'impiego di soluzioni diverse per tre intervalli di pH: 4.5, 7.0, e 8.5. L'impiego di queste metodiche sistematiche per la cristallizzazione della Perossiredossina cloroplastica da pioppo ha portato dopo mesi di tentativi, e più di mille differenti condizioni provate, all'ottenimento di cristalli della proteina in una soluzione ricca di solfato d'ammonio della Hampton: 2% PEG 400, 0.1 M HEPES pH 7.5, 2.0 M (NH₄)₂SO₄.

Per poter effettuare la raccolta dati utilizzando radiazione da luce di sincrotrone, sotto flusso di azoto a 100 K, è stato aggiunto alla soluzione madre del glicole etilenico per impedire il congelamento della suddetta soluzione. Tale procedura ha generato la formazione di cristalli di solfato d'ammonio che hanno impedito di raccogliere i piccoli cristalli proteici presenti. Inoltre, anche il cristallo di dimensioni maggiori, riportato nella Foto 2, è stato danneggiato dalla variazione di soluzione ed ha fornito una diffrazione non adatta alla raccolta dati. Successivamente gli sforzi sono stati concentrati sulla cristallizzazione di un mutante della Prx BCP, avente la sostituzione C51S sempre allo scopo di limitare, con l'assenza della cisteina catalitica in posizione 51, ossidazioni e formazioni di dimeri. Anche in questo con una soluzione *Crystal Screen 2*TM: 0.1 M sodio citrato pH 5.6, 0.2 M potassio e sodio tartrato e 2.0 M (NH₄)₂SO₄ hanno fornito cristalli di proteina con uno spettro di diffrazione con valori di risoluzione superiori ai 15 Å e pertanto non si è proceduto oltre nella raccolta dati. Di conseguenza la prospettiva comune sia per la proteina naturale che per il mutante sarà quella di trovare migliori condizioni di crescita dei cristalli che li renda adatti alla raccolta dati.

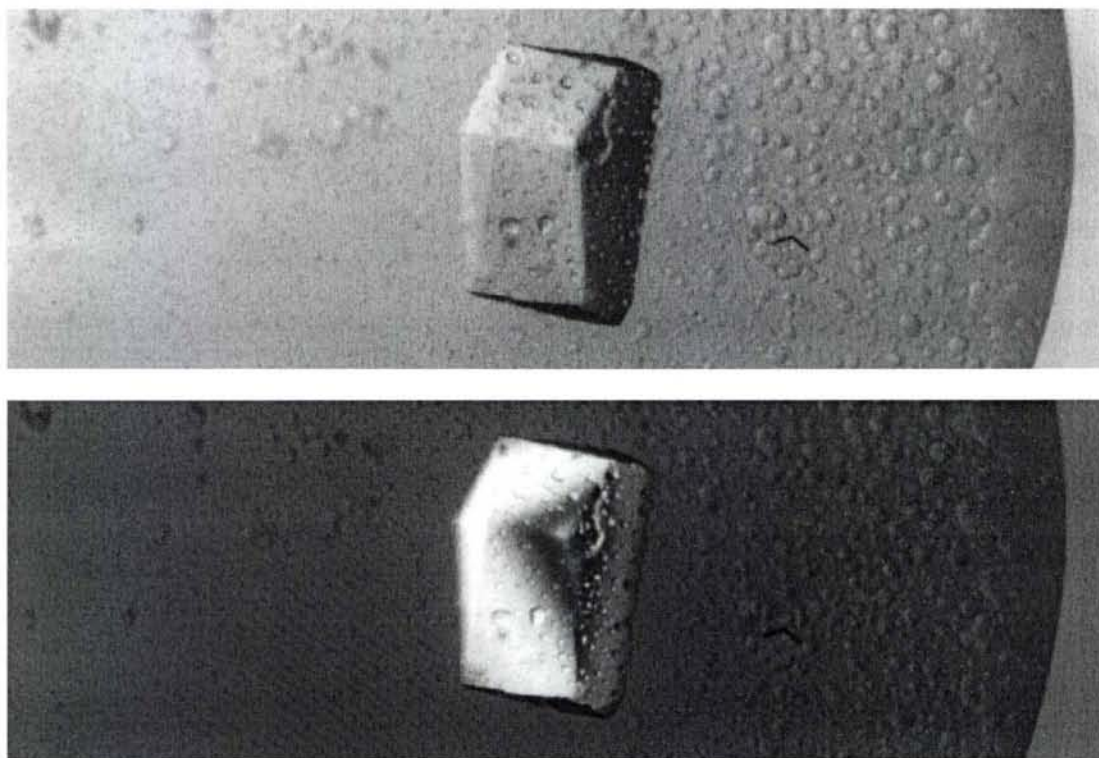


Foto 2. Cristalli di Prx BCP cloroplastica da pioppo ottenuti a 293 K in una soluzione di PEG 400 al 2%, HEPES 0.1 M pH 7.5, (NH₄)₂SO₄. 2.0 M.



Foto 3. Cristalli del mutante C51S della Prx BCP cloroplastica da pioppo ottenuti a 293 K in una soluzione di 0.1 M sodio citrato pH 5.6, potassio e sodio tartrato 0.2 M e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0 M.

Raccolta dati MsrA

La raccolta dati è avvenuta tramite luce di sincrotrone utilizzando la linea BM30A (FIP) del ESRF di Grenoble. I cristalli trigonali di MsrA cloroplastica da pioppo sono stati posti in una soluzione crioprotettiva (soluzione precipitante con il 10% v/v di metilpentandiolo) e quindi posti sotto flusso di azoto a 100 K durante tutto l'esperimento di diffrazione dei raggi X. La risoluzione dei raggi diffratti è stata di 1.70Å come riportato in Tabella 2. L'insieme dei dati è stato trattato con il programma DENZO [43] da cui sono state ottenute statistiche di buona qualità riportate in Tabella 3.

Simmetria	Trigonale ($\alpha=\beta=90^\circ$; $\gamma=120^\circ$)
Dimensioni cella unitaria	$a=b=68.6 \text{ \AA}$; $c=40.7 \text{ \AA}$
Gruppo spaziale	$P3_1$
Molecole/unità asimmetrica	1
Solvente	45%
Limite di diffrazione	1.70Å

Tabella 2. Assegnazione costanti di cella per i cristalli di MsrA cloroplastica da pioppo.

ESRF beam line	BM 30 A
λ (Å)	1.0093
Risoluzione (Å)	25 – 1.70 (1.74-1.70)
N° di riflessioni osservate	114471
N° di riflessioni uniche	23121
Completezza (%)	98.2 (83.4)
R_{sym} (%)	4.8 (21.9)
$I/\sigma(I)$	8.6 (2.5)

Tabella 3. Statistiche della raccolta dati effettuata sui cristalli di MsrA cloroplastica da pioppo (I valori tra parentesi si riferiscono all'ultimo shell di risoluzione).

Sostituzione Molecolare

Modello di partenza

Sono state isolate due isoforme di *Populus* MsrA, una isoforma cloroplastica pMsrA (*plastidial* MsrA) ed un'isoforma citosolica cMsrA (*cytosolic* MsrA). L'identità di sequenza tra le isoforme pMsrA e cMsrA di pioppo riportate in Figura 4 è del 62%.

Tale percentuale di omologia varia dal 58 all'82% per le sequenze di piante mentre è di circa il 40% rispetto agli enzimi di *Escherichia coli* e *Bos taurus* riportate in Figura 5. La scelta del modello di partenza per la sostituzione molecolare è ricaduta sull'MsrA da *Escherichia coli* [44], la cui struttura è riportata in Figura 6, per il maggior valore dell'omologia di sequenza rispetto alle altre due strutture di MsrA note: l'MsrA bovina [45] e l'MsrA da *Mycobacterium Tuberculosis* [46].

Poptrp	-----MANILSKLGFGRSPDPSTMDPTI PQGDDDLPA	34
Poptrc	-----MATSTTNPALDPDLDPDN-----	19
	46 81	
Poptrp	PGQOFAQFGAGFWGVELAFQRVPGVTKTEVGYTQGLLHNPTYEDVVTGTTNHNEVVRVQ	94
Poptrc	ENHEFAQFGAGFWGVELAFQRLEGVVKEVGYSQGHVPDPTYKLVVTNTTNHVEVVRVQ	79
	100	
Poptrp	YDPKEFSFDTLIDVLWARHDPTTLNRQNDVGTQYRSGIYYYTPEQEKAAKESLE----R	150
Poptrc	FDPEVPYTNLLSLFWSRHDPTTLNRQGGDVTQYRSGIYYYNEAQAKLAHESKE----A	135
	196 202	
Poptrp	QOKLLN-RKIVTEILPAKKFYRAEYHQYLAQGGRFGFMQSAEKGNDPIRYG	204
Poptrc	KQLELKDNKVVTEILPAKR FYRAEYHQYLEKGGGRGVKQSAEKGNDPIRYG	190

Figura 4. Allineamento di sequenza tra le isoforme di *Populus* MsrA cloroplastica pMsrA (*plastidial* MsrA) e citosolica cMsrA (*cytosolic* MsrA).

Poptrp	-----MANILSKLGFGRSPDPSTMDPTI PQGDDDLPA	34
Poptrc	-----MATSTTNPALDPDLDPDN-----	19
E.coli	-----SLFDKHLVSPADALPGRNTPMPVATLHAVNG-HSMTNVP	39
Bovin	MLSVTRRALQLFHSFPVPRMGDSAAKIVSPQALPGRKEPLVVAAKHHVNGNRTVEFPF	60
	46 81	
Poptrp	PGQOFAQFGAGFWGVELAFQRVPGVTKTEVGYTQGLLHNPTYEDVVTGTTNHNEVVRVQ	94
Poptrc	ENHEFAQFGAGFWGVELAFQRLEGVVKEVGYSQGHVPDPTYKLVVTNTTNHVEVVRVQ	79
E.coli	DGMEIAIFAMGFWGVERLEFWQLPGVYSTAAGYTGGYTVPNTYREVSGDTGHAEAVRIV	99
Bovin	EGTQMAVFGMGFWGAERKEFWTLKGVYSTQVGFAGGYTPNPTYKEVSGKTGHAEVVRVQ	120
	51 86	
	100	
Poptrp	YDPKEFSFDTLIDVLWARHDPTTLNRQNDVGTQYRSGIYYYTPEQEKAAKESLE----R	150
Poptrc	FDPEVPYTNLLSLFWSRHDPTTLNRQGGDVTQYRSGIYYYNEAQAKLAHESKE----A	135
E.coli	YDPSVISYEQLLQVFWENHDPAQGMROGNDHGTQYRSAIYPLTPEQDAAARASLERFQAA	159
Bovin	FQPEHISFEELEKVFENHDPTQGMROGNDHGSQYRSAIYPTSAEHVGAALKSKEDYQKV	180
	196 202	
Poptrp	QOKLLN-RKIVTEILPAKKFYRAEYHQYLAQGGRFGFMQSAEKGNDPIRYG	204
Poptrc	KQLELKDNKVVTEILPAKR FYRAEYHQYLEKGGGRGVKQSAEKGNDPIRYG	190
E.coli	MLAADDHRITTEIANATPFYYAEDDHHQYLHKNP-YGYGIGGIGVLPPEA--	211
Bovin	LSEHGFG-LITTDIREGQTFYYAEDYHQYLSKDP-DGYGLGGTGVSPGIIKK	233
	198 206	

Figura 5. Allineamento di sequenza tra le isoforme di *Populus* MsrA cloroplastica pMsrA, citosolica e MsrA da *Escherichia coli* e da *Bos taurus*.



Figura 6. Struttura di MsrA da Escherichia Coli

Ricostruzione e affinamento della struttura

Data la caratteristica strutturale e funzionale della proteina MsrA di possedere una struttura terziaria ben definita su tutta la macromolecola tranne che alle estremità N-terminale e C-terminale, tali parti flessibili, e quindi soggette ad una maggiore variabilità strutturale, sono state eliminate dal modello di partenza. Quindi si è proceduto con la sostituzione molecolare utilizzando il modello secondo le seguenti 3 strategie:

1. Macromolecola con le catene laterali originali
2. Macromolecola costituita da tutte catene laterali di Alanina (poliAla)
3. Macromolecola con catene laterali conservate tra le due proteine più polialanina

Tra i tre metodi il terzo ha fornito le migliori statistiche di accordo riportate in Tabella 5. La struttura è stata risolta usando il metodo della sostituzione molecolare utilizzato da Molrep [47] di CCP4. Il modello iniziale utilizzato in Molrep è consistito nel corpo centrale (⁴¹Gly-Pro¹⁹⁴) della struttura dell' MsrA di *E. coli*. La soluzione della sostituzione molecolare è stata utilizzata nel programma di ricostruzione automatica e affinamento Arp/wArp5.1 [48]. Esso ha prodotto un modello contenente 4 catene polipeptidiche per un totale di 164 amminoacidi, con valori dei fattori R e R_{free} di 20.6 e 25.8 %, rispettivamente. Correzioni automatiche (in particolare, la costruzione dei residui mancanti) e affinamento automatico tramite CNS [49] del modello sono state effettuate in una procedura iterativa, fino al raggiungimento di un modello soddisfacente. La struttura finale corrisponde a 183 amminoacidi (residui ²²Pro-Gly²⁰⁴), e 183 molecole d'acqua, con R = 19.5 % ed R_{free} = 20.1% (Tabella 6).

Intervallo di risoluzione[†] (Å)	25.0 – 1.7 (1.74 – 1.70)
No. di riflessi usati per il calcolo di R[†]	21710 (1812)
No. di riflessi usati per il calcolo di R_{free}[†]	1103 (84)
Data cutoff F/σ(F)	0.0
Valore di R[†] (%)	19.5 (23.4)
Valore di R_{free}[†] (%)	20.1 (23.4)
No. di atomi di proteina non-idrogeno	1478
No. di molecole d'acqua	183
Grafico di Ramachandran	
Residui nelle regioni più favorite (%)	92.7
Residui nelle regioni addizionalmente favorite (%)	7.3
Residui nelle regioni generosamente permesse (%)	0
Residui nelle regioni non permesse (%)	0
Deviazione Rms dalla geometria ideale	
Lunghezza di legame (Å)	0.006
Angolo di legame (°)	1.31
Deviazione Rms per <i>restraint</i> del fattore termale isotropico (Å²)	
Legame della catena principale	0.98
Angolo della catena principale	1.53
Legame della catena laterale	1.82
Angolo della catena laterale	2.65

Tabella 6. Statistiche del modello di MsrA e del affinamento

[†](I valori tra parentesi si riferiscono allo *shell* a più alta risoluzione)

Studi di mutagenesi e meccanismo catalitico per MsrA da pioppo

I 5 residui di cisteina della cMsrA ed i residui di cisteina ritenuti essenziali per pMsrA sono stati mutati in residui di serina. Gli enzimi nella forma nativa e gli enzimi ricombinanti mutanti sono in grado di ridurre della metionina solfossido aggiunta (MetSO), in presenza di ditiotritolo (DTT) come riducente, eccezion fatta per i mutanti cMsrA C31S e pMsrA C46S indicando che questi due residui amminoacidici sono le cisteine catalitiche, indicate come CysA in Figura 7. Inoltre, viene inibita la rigenerazione dipendente dalla tioredossina (Trx) per i mutanti C182S e C188S per cMsrA, mentre resta inalterata la rigenerazione per le proteine mutanti C66S e C85S per cMsrA. Questi dati suggeriscono che i residui di cisteina Cys⁶⁶ e Cys⁸⁵, non partecipano alla catalisi enzimatica mentre le due cisteine C-terminali sono coinvolte nella riduzione dell'acido sulfenico (-SOH) della cisteina Cys³¹. La stechiometria della reazione è stata verificata per ogni proteina ricombinante. Il risultato conferma le osservazioni precedenti ma non permette ancora di accertare definitivamente il coinvolgimento dei residui Cys¹⁸² e Cys¹⁸⁸ nella riduzione Trx-dipendente. La partecipazione di queste due cisteine nella formazione di due ponti disolfurici, come per gli enzimi di *E. coli* e bovino [50], è stato confermato anche dalla misura della diminuzione del numero di gruppi tiolici liberi di ogni proteina ricombinante dopo il trattamento con MetSO. I dati ottenuti da questo esperimento confermano senza dubbio che il residuo Cys³¹ per cMsrA ed il residuo Cys⁴⁶ per pMsrA sono le cisteine catalitiche indicate come CysA (Figura 7) la quale è trasformata nell'intermedio acido sulfenico che poi è ridotto per l'attacco da parte della cisteina indicata come CysB che corrisponde al residuo di Cys¹⁸², per cMsrA, e Cys¹⁹⁶, per pMsrA, formando il primo ponte disolfurico CysA-CysB. Questo ponte disolfurico è successivamente attaccato dalla cisteina descritta come CysC che corrisponde ai residui Cys¹⁸⁸ e C²⁰², appartenenti rispettivamente alle proteine cMsrA e pMsrA, formando un secondo ponte disolfurico CysB-CysC tra Cys¹⁸² e C¹⁸⁸, e tra C¹⁹⁶ e C²⁰², il quale è ridotto da tioredossina ma non è ridotto da glutaredossina (Grx). La ragione per cui Grx non è in grado di ridurre questo ponte disolfurico non è ancora chiara, e potrebbe essere dovuta al basso valore di potenziale di riduzione del ponte disolfurico rispetto a Grx oppure l'interazione tra le proteine è inibita dall'ingombro sterico o da una superficie di riconoscimento non adatta. Comunque due osservazioni indipendenti sono in favore dell'ipotesi della rigenerazione dell'MsrA da parte di Grx in altri organismi. Il primo motivo consiste nel fatto che la crescita di un sottotipo di *E. coli*, che utilizza la metionina e che non esprime la Trx (A⁻), è inibita in presenza di MetSO, ma è rigenerata dalla sovraespressione di Grx [51]. Il secondo motivo è la presenza nelle alghe rosse, *Gracilaria gracilis*, di una sequenza codificante per un enzima costituito dalla fusione di due unità di Grx con un'unità di MsrA. Questa unità di MsrA è molto simile a quella presente nelle piante eccetto per l'assenza del residuo indicato come CysB, che corrisponde alla Cys¹⁸² della cMsrA di pioppo. Non è ancora noto se tale enzima usi un differente meccanismo catalitico e se sia poi ridotto dall'unità di Grx in presenza di glutatione.

Per ottenere maggiori informazioni circa l'interazione tra Trx e MsrA, è necessario risolvere la struttura 3D sia delle singole proteine che del loro complesso. Attualmente sono in fase di sperimentazione tentativi di espressione delle due proteine legate covalentemente. Alcuni eterodimeri sono stati osservati su SDS-PAGE non riducente dopo aver unito MsrA e Trx, ma la quantità è troppo bassa per isolare il complesso (dati non riportati).

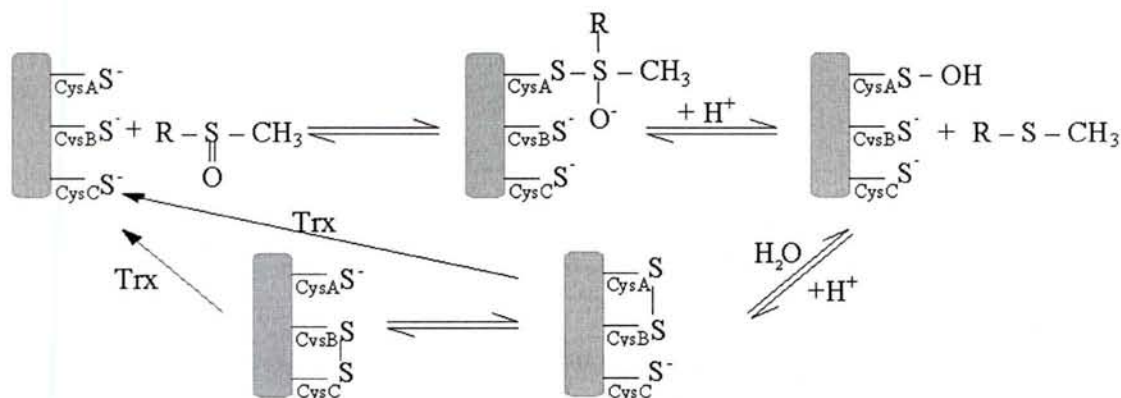


Figura 7. Meccanismo catalitico dimostrato per MsrA da pioppo. La cisteina indicata come CysA corrisponde a Cys³¹ per cMsrA ed il residuo Cys⁴⁶ per pMsrA. Dopo l'attacco alla MetSO e la formazione dell'acido sulfenico (-SOH) si ha la formazione dei ponti disolfurici CysA-CysB e poi CysB-CysC ridotto dalla Trx.

Analisi strutturale dell'MsrA da pioppo

Dal momento che il ruolo dei residui di cisteina è riconosciuto essere critico per il funzionamento dell'MsrA, è interessante commentare la loro posizione nelle sequenze di origine vegetale riportate in Figura 8 e nella struttura riportata in Figura 9. Nella proteina cloroplastica da pioppo 4 delle 5 cisteine (Cys⁴⁶, Cys⁸¹, Cys¹⁹⁶ e Cys²⁰²) si trovano in posizioni strettamente conservate rispetto alle altre sequenze di pianta, mentre la cisteina in posizione 100 è rimpiazzata da una valina nella pMsrA Brassica. Interessantemente, questo residuo non ha equivalenti in MsrA di *E. coli* o di *Bos taurus* che contengono altre quattro cisteine in posizioni conservate [45, 50-52]. Le cinque cisteine di cMsrA (Cys³¹, Cys⁶⁶, Cys¹⁸², Cys¹⁸⁸) ritrovano nelle stesse posizioni occupate in pMsrA.

1	-----	0
2	-----	0
Popl	-----MANILS	6
4	MFLLRTTTATTTASLPLPLLSISSHLSSKPSFPVTSKPLFLTRHSSSTPKIMSWLG	60
5	-----MSWLG	5
6	-MQVLVVSPLIAAASLSKPLNSLSKAALSFSRAKPICFPPQTSRRPISVYKSPMNNL FN	59
7	-MLSIVASPPVISAVSLSKPLQSLAKAALSLSKRAKPTSPFPKTARSISVYKSPMNNL FT	59
1	-----MEGNSSSKSTNPALDPLDSDPQGLEFAQFAAG FVGVELAFQFVGGVVKT	54
2	-----MASSTNNPALDLDSDTPENPGHELAQFASG FVGSELRFRVVGVIKT	49
Popl	KLGFQ-TRSPDPSTMDP-TIPQGPDDDL P-APGQQAQFGAG FVGVELAFQFVPGVTKT	63
4	RLGXG-TRTPADASMDQSSIAQGPDDIP-APGQQAQFGAG FVGVELAFQFVPGVSKT	118
5	KLGLGGLGGSPRASAASAALAQGPDED RP-AAGNEFAQFGAG FVGVELAFQFVPGVTRT	64
6	RLGFQ-SRPQAQADPSSAAIAQGPDDV P-SSGQQAQFGAG FVGVELAYQFVPGVTKT	117
7	RLGFQ-SRPQDP- AASSAIAQGPDDV P-SPGQQAQFGAG FVGAELAYQFVPGVTKT	116
1	EVGYSQGNVHDPNYKLI SGTTEHAEAIRIQFDPNV PYSNLLSLFWSRHDPTTLNRQGN	114
2	EVGYSQGHVHDPNYRLV SGTTNHSEVVRVQFDQV PYSDLLSVFWSRHDPTTLNCCGG	109
Popl	EVGYTQGLLHNPYEDV TGTTNHNEVVRVQYDPKE SFDTLIDVLFWARHDPTTLNRQGN	123
4	EVGYTQGFLLHNPYNDI SGTTNHSEVVRVQYDPKA SFDLLDCFWERHDPTTLNRQGN	178
5	EVGYSQGNLHDPYEDV TGTATYHNEVVRVHYDVSA KFDLLDVFWARHDPTTLNRQGN	124
6	EVGYSHGIVHNPSYEDV TGTTHNEVVRVQYDPKE SFESLLDVFWNRHDPTTLNRQGN	177
7	EVGYSHGFVDNPTYEDV SETTGHNEIVRVQYDPKEVSFESLLDVFWKRHDPTTLNRQGN	176
1	DVGKQYRSGIYYYNDAQAQLARESLEAKQKE----FMDKKIVTEILPAKRFYRAEYHQQ	170
2	DVGTQYRSGIYYYNEDCLAKKSKEAKQKE----FKDKRVVTEILPAKRFYRAEYHQQ	165
Popl	DVGTQYRSGIYYTPEQEKAAKESLERQK-----LLNRKIVTEILPAKRFYRAEYHQQ	178
4	DVGTQYRSGIYFYTPEQEKAIEAKERHQK-----KLNRTVVTEILPAKRFYRAEYHQQ	233
5	DVGTQYRSGIYYTPEQEKAARESLEKQK-----LLNRTIVTEILPAKRFYRAEYHQQ	179
6	DVGTQYRSGIYYTDEQERIAAREAVEKQK-----ILNKKIVTEILPATKFYRAENYHQQ	232
7	DVGTRYRSGIYFYTDEQEKLAREAMEKQK-----ILNRKIVTEILPATKFYRAENYHQQ	231
1	YLEKGGGRGCKQSAAKGNDPIRYG	196
2	YLEKGGGNGNKQSAQKGNNDPIKRYG	191
Popl	YLAAGGRFGFMQSAEKGNDPIRYG	204
4	YLAAGGRFGFRQSTKGNNDPIRYG	259
5	YLAAGGRFGFRQSAEKGNDPIRYG	205
6	YLAAGGRMGLRQSAEKGNDPIRYG	258
7	YLAAGGRMGLSQSAEKGNDPIRYG	257

Figura 8. Allineamento di sequenza tra MsrA cloroplastica da pioppo (Popl) con altre pMsrA di origine vegetale. 1: *Lyces*; 2: *Fraan*; 4: *Lacsa*; 5: *Orisa*; 6: *Arath*; 7: *Brana*.



Figura 9. Struttura di MsrA cloroplastica da pioppo. Sono evidenziati i residui amminoacidici corrispondente alle cinque cisteine presenti. Il dominio C-terminale ripiegato è evidenziato in rosso
Comparazione globale delle strutture di MsrA

Regione N-terminale di pMsrA di pioppo

Il lungo tratto N-terminale dell'MsrA di *E. coli* (residui 1 a 41) e dell'MsrA bovina (residui 28 a 62) gira intorno al dominio centrale della proteina. Nella struttura dell'pMsrA, la posizione dei residui N-terminali osservati nella densità elettronica dell'MsrA di pioppo (Pro²² - Gly³⁶) differisce fortemente dagli altri enzimi, sebbene essi formino ancora un lungo tratto non strutturato, come mostrato in Figura 10. Tali differenze sembrano dovute alla sequenza del *loop* all'inizio del primo β -strand, che contiene due residui di prolina (Pro³³-Ala-Pro-Gly³⁶) nell'enzima di pioppo, al posto di una sola prolina nella sequenza della MsrA bovina (Phe⁵⁹-Pro-Glu-Gly⁶²) e di *E. coli* (Val³⁸-Pro-Asp-Gly⁴¹). Nella struttura di pMsrA di pioppo, il *coil* N-terminale è stabilizzato sul resto della proteina da diversi legami idrogeno tra: la catena laterale della Gln²⁶ e la catena principale della Gly⁷⁰; la catena principale della Gly²⁷ e della Lys¹⁶⁸; le catene laterali della Asp²⁹, Asp³¹ e Arg⁹²; ed infine la catena principale della Ala³⁴ e la catena laterale della Gln⁹⁴. Inoltre, la Pro³⁵ e l'anello aromatico della Phe³⁹ sono ravvicinati da interazioni idrofobiche. La diversa posizione del tratto terminale osservato per pMsrA di pioppo non può essere proposto come comune a tutte le MsrA di pianta. Infatti, la *Lycopersicon esculentum*, *Fragaria ananassa*, e l'MsrA citosolica da pioppo posseggono sequenze N-terminali più corte. Inoltre sia le due proline osservate in pMsrA sia gli amminoacidi coinvolti nella stabilizzazione tramite legami idrogeno non sono conservati in tutte le sequenze di piante.

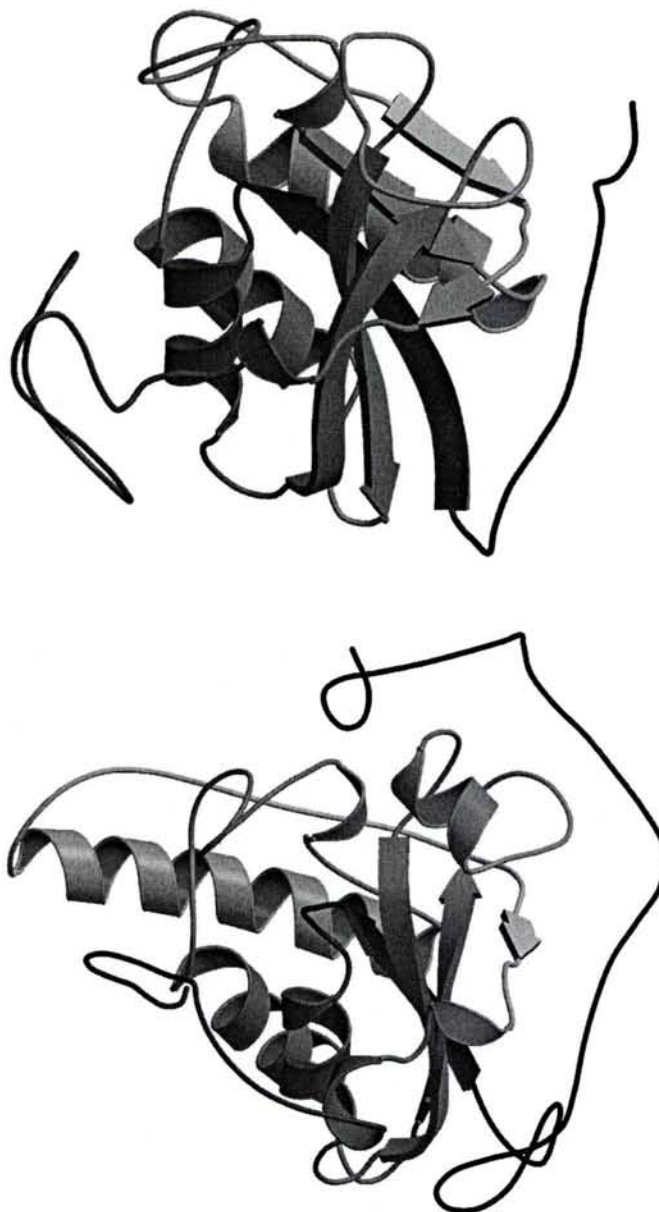


Figura 10. Comparazione delle strutture di MsrA cloroplastica da pioppo (in alto), e da *E. coli*. (in basso). È evidenziata in blu la regione amminoacidica corrispondente alla regione N-terminale.

Regione C-terminale di pMsrA di pioppo

Nelle strutture note di MsrA il tratto C-terminale appare come un braccio esteso senza organizzazione terziaria. La regione terminale Asn¹⁹³-Ala²¹¹ dell'MsrA di *E. coli* è stata osservata in uno solo dei tre monomeri dell'unità asimmetrica, portando a concludere che questo fosse conseguenza della sua flessibilità. Nonostante la presenza di un ponte disolfurico intermolecolare tra le Cys²⁰⁶ (CysC) che potrebbe aver forzato il tratto C-terminale ad adottare una particolare conformazione, è sorprendente osservare una posizione simile per il corrispondente tratto Asp²¹³-Pro²²⁸ della struttura di MsrA bovina. Al contrario, nel modello di pMsrA di pioppo, la regione C-terminale Lys¹⁸²-Gly²⁰⁴ consiste in un braccio

che corre prima parallelo all' α -elica H1 e poi, dopo un *turn*, corre antiparallelo ad essa, come evidenziato in Figura 9 e in Figura 11. Numerosi legami a idrogeno sono stati osservati all'interno di questo tratto della proteina, e tra esso e la restante parte dell'enzima. Tre residui amminoacidici, fortemente conservati nelle sequenze di MsrA di pianta, sembrano giocare un ruolo chiave nell'architettura globale di quello che chiamiamo adesso dominio C-terminale:

- Il residuo di Arg⁵⁶ si trova alla fine dell' α -elica H1. La sua catena laterale distesa è legata mediante N^c attraverso legami a idrogeno con le catene principali dei residui di Ser¹⁹¹ e Asp¹⁹⁸, mentre il suo gruppo carbonile interagisce attraverso legame a idrogeno con il gruppo NH della catena principale della Gly¹⁹⁵ (Figura 11).
- Il residuo di Lys¹⁹⁴ è legata via legame a idrogeno con i gruppi carbonili della Gln⁵⁵, Val⁵⁷ e Val⁶⁰ grazie al suo Ne (Figura 12).
- Il residuo di Gln¹⁹⁰ contribuisce a stabilizzare il dominio attraverso una interazione intra-catena tra la sua catena laterale estesa e la catena principale dell'Arg²⁰¹ (Figura 13).

Inoltre, una molecola d'acqua che interagisce con Gln¹⁹⁰, Asp¹⁹⁸, Pro¹⁹⁹ e Arg⁵⁶ fissa la coesione del dominio.

Anche se le strutture note delle MsrA sono per lo più sovrapponibili, le catene principali di questi enzimi divergono a partire da una posizione che puo essere considerata come una regione cerniera. Essa consinte nella sequenza Lys¹⁸²-Gly-Gly¹⁸⁴ nell'MsrA di pioppo, mentre è Lys¹⁹²-Asn-Pro¹⁹⁴ nell'MsrA *E. coli*, Lys²¹²-Asp-Pro²¹⁴ nella sequenza di MsrA *B. Taurus* e Arg¹⁴⁷-Tyr-Pro¹⁴⁹ per l'MsrA di *Meningitidis tuberculosis*. La perdita della prolina e la presenza di due glicine in pMsrA di pioppo modifica fortemente la flessibilità di questo *loop*.

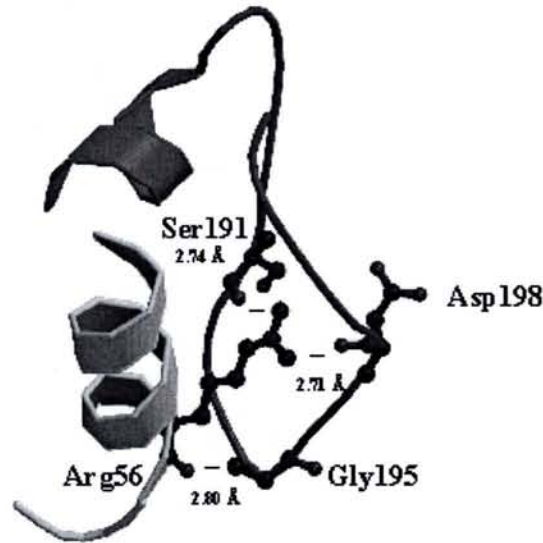


Figura 11. Struttura del dominio C-terminale della pMsrA di pioppo stabilizzata dai residui amminoacidici Arg⁵⁶, Ser¹⁹¹, Gly¹⁹⁵, e Asp¹⁹⁸.

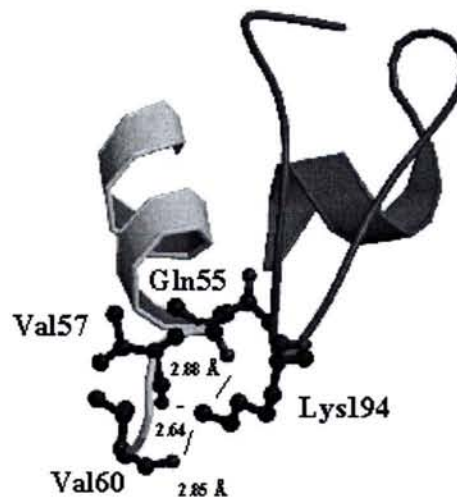


Figura 12. Struttura del dominio C-terminale della pMsrA di pioppo stabilizzata dai residui amminoacidici Lys¹⁹⁴, Gln⁵⁵, Val⁵⁷, e Val⁶⁰.

Populus FYRAEEYHQQYLAKGGRFQFMQSAEKGCNDPIRCYG
Lacsa (83% identity) FYRAEEYHQQYLAKGGRFQFRQSAEKGCNDPIRCYG
Lyces (65% identity) FYRAEEYHQQYLEKGGRRGCKQSAAKGCNDPIRCYG

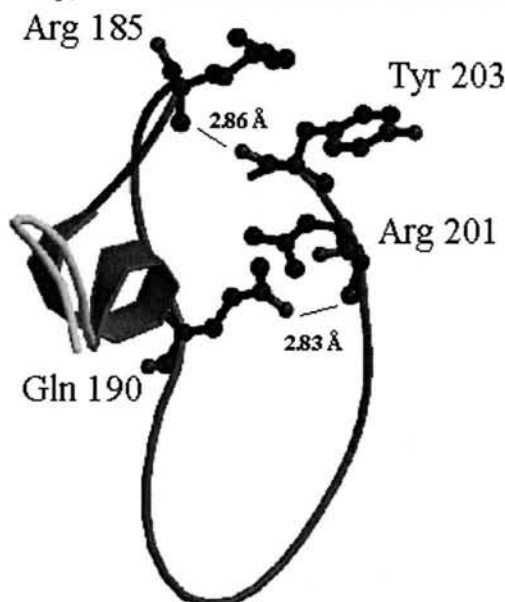


Figura 13. Allineamento delle sequenze di MsrA di diversi organismi vegetali. Struttura del dominio C-terminale della pMsrA di pioppo stabilizzata dai residui amminoacidici Arg¹⁸⁵, Gln¹⁹⁰, Arg²⁰¹, e Tyr²⁰³.

Sito attivo MsrA cloroplastica di pioppo

Il sito attivo della pMsrA di pioppo si presenta come un'ampia cavità carica negativamente che conferisce grande accessibilità alla cisteina catalitica Cys⁴⁶ (CysA) (Figura 14), inclusa nel motivo conservato GCFWG. Le catene laterali del sito catalitico sono perfettamente sovrapponibili a quelle delle altre di MsrA. Allineamenti di sequenza e studi biochimici condotti sulle MsrA di pioppo conducono ad un meccanismo catalitico che coinvolge tre residui di cisteina, nominalmente Cys⁴⁶ (CysA), Cys¹⁹⁶ (CysB) e Cys²⁰² (CysC). Durante la catalisi si formerebbero due successivi ponti disolfurici intramolecolari per la rigenerazione del residuo di Cys⁴⁶. La Cys¹⁹⁶ attaccherebbe la forma intermedia di acido sulfenico della Cys⁴⁶, mentre la Cys²⁰² formerebbe il successivo ponte con la Cys¹⁹⁶. Anche se la regione C-terminale è più compatta e strutturata, appare chiaro che nella struttura di pMsrA di pioppo né la Cys¹⁹⁶ né la Cys²⁰² presentano distanze dalla Cys⁴⁶ compatibili con la formazione di un ponte disolfurico se non avvengono cambiamenti conformazionali. Le distanze tra gli atomi Sy delle cinque cisteine presenti nella sequenza della pMsrA sono riportate in Tabella 7. la minore distanza (7.2 Å) è misurata tra la Cys⁴⁶ e la Cys²⁰² mentre la Cys¹⁹⁶ è lontana 18 Å dal residuo catalitico. Nonostante le modificazioni chimiche osservate per i residui Cys⁴⁶, Cys⁸¹, Cys¹⁹⁶ e Cys²⁰² riportate in Figura15, le distanze sono state misurate considerando che le posizioni degli atomi Sy sarebbero immutate in una ipotetica struttura con cinque residui di cisteina in forma ridotta.

	Cys46	Cys81	Cys100	Cys196	Cys202
Cys46		10.0 Å	22.1 Å	18.0 Å	7.2 Å
Cys81			22.1 Å	27.5 Å	16.0 Å
Cys100				16.4 Å	22.8 Å
Cys196					15.8 Å
Cys202					

Tabella 7. Distanze misurate tra gli atomi Sy delle cinque cisteine presenti nella struttura della pMsrA di pioppo.



Figura 14. Struttura di MsrA cloroplastica da pioppo. È evidenziata la regione tra l' α -elica ed il β -strand (in blu) in cui è presente la cisteina catalitica Cys⁴⁶ nel motivo conservato Gly⁴⁵-Cys-Phe-Trp⁴⁸.

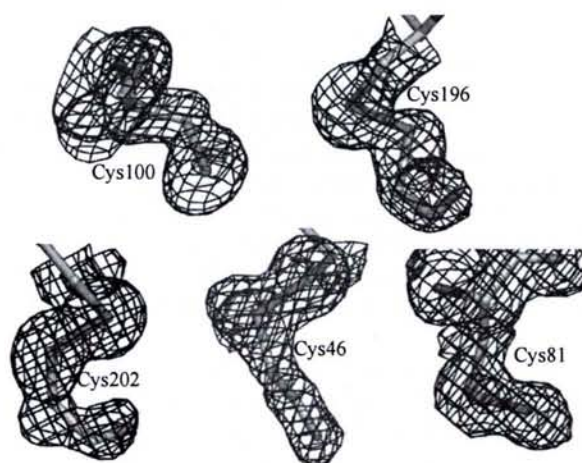


Figura 15. Mappe di densità elettronica 3Fo-2Fc per le regioni Cys⁴⁶, Cys⁸¹, Cys¹⁰⁰, Cys¹⁹⁶ e Cys²⁰². I residui di Cys⁴⁶, Cys¹⁹⁶ e Cys²⁰² sono legate a molecole di β -mercaptoetanolo molecole via ponte disolfurico. La Cys⁸¹ è osservata come acido sulfenico, mentre la Cys¹⁰⁰ è nella forma ridotta.

Modellizzazione del ponte disolfurico CysA-CysB

Una prima indagine è consistita nell'immaginare una rotazione globale di tutto il dominio C-terminale per formare il ponte disolfuro tra la Cys⁴⁶ e la Cys¹⁹⁶. Il fallimento di tale approccio ci ha indotti ad usare metodiche di dinamica molecolare per simulare le potenziali strutture con ponti disolfuro prima tra la Cys⁴⁶ e la Cys¹⁹⁶ e poi tra la Cys¹⁹⁶ e la Cys²⁰². Naturalmente la questione era se fosse possibile formare i ponti disolfurici senza la completa destrutturazione del dominio C-terminale. Appare chiaro che le due strutture modellizzate conservano lo stesso ripiegamento globale per il dominio C-terminale. Infatti la maggior parte delle interazioni stabilizzanti sono conservate. Due sono i residui amminoacidici che potrebbero giocare un ruolo chiave nella necessaria flessibilità del dominio C-terminale. L'Ala¹⁹², posta alla fine del braccio parallelo all' α -elica H1, e la Gly¹⁹⁵ fanno sì che la Cys¹⁹⁶ abbia un ampio spettro di angoli di torsione per posizionare la catena principale nella conformazione più favorevole per la formazione di un ponte disolfurico. Questi due residui sono fortemente conservati nelle sequenze di MsrA di pianta.

La seconda nuova ipotesi che potremmo formulare da questa simulazione di dinamica molecolare concerne la potenziale flessibilità del *loop* conservato in cui è presente la cisteina catalitica Cys⁴⁶. Infatti, la Gly⁴⁵ e la Gly⁴⁹ del motivo GCFWG permetterebbe un cambiamento conformazionale del *loop* tale da rendere la Cys⁴⁶ più vicina a due cisteine per la rigenerazione. In un modello di minimizzazione è stato simulato il movimento del primo ponte della Cys⁴⁶ dalla sua posizione iniziale di 8 Å e questo cambiamento conformazionale è accompagnato da un piccolo spostamento dell' α -elica H1. La dinamica molecolare posiziona la Cys⁴⁶ in una regione proibita della mappa di Ramachandran ($\phi=57^\circ$; $\psi=-96^\circ$). Comunque, è interessante notare che questi angoli diedri sfavorevoli sono già stati descritti per un residuo di cisteina nella struttura cristallina della carbamoil fosfato sintetasi (Cys²⁶⁹ $\phi=59^\circ$; $\psi=-96^\circ$) [53]. Tale cisteina si trova come la Cys⁴⁶ nel cosiddetto *nucleophile elbow*. Più in generale, la propensione dei residui di cisteina ad essere in regioni non permesse è noto essere più alta degli altri residui eccetto che per la serina [54]. Inoltre, residui di cisteina in regioni non permesse si trovano statisticamente vicini a residui aromatici, come nel caso del motivo GCFWG [54].

L'obiettivo di questo *molecular modelling* non era trovare un meccanismo universale di rigenerazione delle cisteine catalitiche nelle MsrA di pianta. Esso dimostra solo che i ponti disolfurici possono essere formati senza la destrutturazione

dell'intero dominio C-terminale descritto in questa struttura di pMsrA di pioppo ed apre una nuova porta nella discussione circa la rigenerazione della cisteina catalitica attraverso potenziali cambiamenti conformazionali nella struttura dell'enzima. Per verificare che la struttura di MsrA di pioppo ottenuta non sia un artificio cristallografico dovuto all'impacchettamento è necessario ottenere altre forme cristalline della stessa proteina, senza le modificazioni osservate per i residui di cisteina. Inoltre, per verificare quali cisteine possano formare dei ponti disolfurici, sarebbe utile ottenere la struttura della stessa proteina nella forma ossidata e/o in complesso con la tioredossina.

Conclusioni e Discussione II

Oltre alla struttura della pMsrA di pioppo, in letteratura sono riportate tre strutture di MsrA da *E. coli*, *B. taurus* e *Mycobacterium Tuberculosis* [45, 46, 47]. Le sequenze amminoacidiche dei primi due enzimi hanno una omologia del 57%, come conseguenza le loro strutture cristallografiche tridimensionali presentano ampie omologie. Comunque, in entrambe le strutture ma in modo più evidente nella struttura di *E. coli*, il residuo di cisteina CysB è troppo lontano dalla cisteina catalitica CysA per permettere la formazione del primo ponte disolfuro. Dati strutturali recenti ottenuti da esperimenti di NMR sull'MsrA da *Erwinia chrysanthemi* forniscono una immagine più dinamica della proteina confermando che le catene laterali delle cisteine non sono posizionate in maniera ottimale per la formazione del ponte disolfurico [55]. Come conseguenza, per questi enzimi è stato postulato che siano necessari importanti riarrangiamenti conformazionali per la rigenerazione mediata dalla tioredossina. Mentre nel caso dell'MsrA di *Mycobacterium Tuberculosis* la rotazione delle catene laterali delle cisteine permetterebbe di avvicinarle abbastanza da formare un ponte disolfurico. Per questi motivi l'ottenimento della ulteriore struttura di MsrA di pioppo è interessante per la comprensione del meccanismo. La struttura dell'MsrA cloroplastica da pioppo presentata qui è piuttosto simile a quelle descritte per gli enzimi di batterio e di mammifero. Tutte le proteine mostrano gli stessi motivi strutturali e la cisteina catalitica del sito attivo ha lo stesso intorno chimico. D'altra parte, la regione C-terminale dell'MsrA di pioppo, che contiene due cisteine addizionali coinvolte nel processo di rigenerazione, ha una orientazione completamente differente rispetto all'MsrA di *E. coli* e *B. taurus*. Infatti, la distanza tra le due cisteine nella regione C-terminale è di 5 residui per l'MsrA da pioppo contro i 7 o 8 residui amminoacidici per gli enzimi di mammifero e di batterio rispettivamente. Inoltre, nella proteina da pioppo non è presente l'alto contenuto in glicine tra queste due cisteine. Il tratto C-terminale della pMsrA di pioppo, poco strutturato negli altri modelli noti, è altamente organizzato in un piccolo dominio con molti legami idrogeno non solo tra le due parti del dominio ma anche tra questo dominio e la restante parte della proteina.

Comunque, come per le altre MsrA, le cisteine sono in posizioni che non permettono la formazione di un ponte disolfurico. Infatti, Anche nel caso di pMsrA di pioppo, sebbene la posizione delle cisteine catalitiche sia differente, è ancora una volta difficile spiegare il meccanismo di azione suggerito dagli studi di mutagenesi dell'enzima. Fermo restano il ruolo della Cys⁴⁶ quale sito di attacco ad una metionina ossidata (CysA) restano da spiegare le seguenti contraddizioni apparenti rispetto al meccanismo proposto:

- La Cys¹⁹⁶ (CysB) è distante dalla Cys⁴⁶ (CysA) (18.0 Å)
- La Cys²⁰² (CysC) è più vicina alla Cys⁴⁶ (CysA) che alla Cys¹⁹⁶ (CysB)
- La Cys⁸¹ inattiva è modificata ad acido sulfenico (Tabella 7 e Figura 15)

Senza dati biochimici, l'analisi della struttura, potrebbe essere interpretata considerando la Cys²⁰² (distante 7.2 Å dalla Cys⁴⁶) come prima cisteina di rigenerazione. Le possibili ipotesi circa la relazione tra tali evidenze e l'attività enzimatica sono diverse. Infatti, a causa della posizione della regione C-terminale tra due monomeri legati per simmetria è possibile che la conformazione di tale dominio sia influenzata dall'impacchettamento delle molecole nel cristallo. Tale ipotesi però è contrastata dall'evidenza che la regione C-terminale, in cui è presente il sito attivo, è solo debolmente implicata nei contatti tra le unità asimmetriche del reticolo cristallino. Inoltre, la stessa regione è invece fortemente stabilizzata da interazioni intramolecolari. Quindi è probabile che la struttura sia corretta, ma che durante la catalisi si verificano cambiamenti strutturali. La questione della rigenerazione della cisteina catalitica è ancora aperta anche con questa nuova struttura. Dal nostro punto di vista la struttura di MsrA da pioppo descritta potrebbe corrispondere all'organizzazione terziaria più favorevole all'attacco nucleofilo da parte della cisteina catalitica verso una metionina solfossido di un'altra proteina.

Materiali e Metodi II

Clonaggio e mutagenesi

Le sequenze nucleotidiche codificanti per cMsrA e pMsrA sono state clonate da PCR nel plasmide di espressione pET-3d usando come *template* rispettivamente una libreria di cDNA di radici e foglie di pioppo. Diverse mutazioni monocisteiniche sono state introdotte nell'MsrA citosolico (cMsrA C31S, C66S, C85S, C182S, C188S) e nell'MsrA plastidico (pMsrA C46S, C196S, C202S) usando due *primer* mutagenici complementari per mutazione. L'introduzione della mutazione nella sequenza di cDNA sequence è stata verificata da sequenziamento.

Espressione e purificazione delle proteine ricombinanti

Culture cellulari di 5 L di *kanamycin* (50 µg/mL) e *ampicillin* (50 µg/mL) sono state incubate a 37 °C. I batteri sono stati raccolti per mezzo di centrifugazione, risospesi nel tampone A (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 200 mM NaCl) contenente 20 mM DTT e lisati tramite sonicazione. Le frazioni solubili ed insolubili sono state separate tramite centrifugazione. Per la pMsrA nativa, la proteina ricombinante era nella frazione solubile ed è precipitata tra lo 0 ed il 50% di solfato d'ammonio. Tutte le altre proteine ricombinanti sono state prodotte essenzialmente come corpi di inclusione. L'estratto è stato centrifugato e la frazione solubile è stata dializzata contro 1 L di tampone A per 5 ore a 5 °C e centrifugata. La frazione solubile risultante è stata purificata tramite cromatografia ad esclusione su una colonna ACA 44 equilibrata in tampone A. Le frazioni di interesse sono state dializzate per rimuovere i sali. La purezza delle proteine è stata verificata usando SDS-PAGE al 15%. Le proteine sono state conservate a -30 °C in tampone A in presenza di β-mercaptoetanolio 14 mM o di DTT 30 mM.

Cristallizzazione, raccolta dati, determinazione strutturale e raffinamento

La cristallizzazione di pMsrA è stata ottenuta con il metodo della diffusione di vapore *hanging-drop* a 277 K. La soluzione madre della proteina cloroplastica era costituita da 40 mg/mL di MsrA e da una soluzione tampone a pH 7.01 contenente TRIS 30 mM, EDTA 1 mM, e β mercaptoetanolo 14 mM. Sono stati utilizzate le soluzioni *Crystal Screen*TM, *Crystal Screen 2*TM, e *PEG/Ion Screen*TM della *Hampton Research*. I cristalli sono cresciuti da gocce di 4 μ l costituite da uguale volume di soluzione proteica 10 mg/mL e soluzione precipitante (PEG 6000 al 10% e NaCl 2.0 M). Dopo 6 settimane sono apparsi lunghi aghi (1 mm) con una sottile sezione triangolare (0.03 mm). I cristalli sono stati posti per breve tempo in una soluzione crioprotettiva (10 % v/v metilpentandiolo e soluzione precipitante) e congelati per immersione in flusso di azoto a 100 K, mantenuto durante gli esperimenti di diffrazione dei raggi X effettuati sulla linea BM30A (FIP) dell'ESRF.

I cristalli appartengono al gruppo spaziale P3₁ con parametri cella unitaria $a = b = 68.6 \text{ \AA}$, $c = 40.7 \text{ \AA}$ e contenenti un solo monomero per unità asimmetrica. Usando una lunghezza d'onda di 1.009 Å, è stato ottenuto un *set* di dati fino a 1.7 Å di risoluzione, e processati usando DENZO.

La struttura è stata risolta usando il metodo della sostituzione molecolare sviluppata dal programma Molrep di CCP4. Il modello iniziale usato in Molrep era formato dagli amminoacidi ⁴¹Gly-Pro¹⁹⁴ della struttura di MsrA di *E. coli*. La soluzione della sostituzione molecolare è stata poi utilizzata dal programma di ricostruzione automatica e raffinamento *warpNtrace* di *Arp/wArp5.1*. Esso ha prodotto un modello contenente 4 catene polipeptidiche costituite da 164 amminoacidi con i fattori R e R_{free} pari rispettivamente al 20.6 e al 25.8 %. Quindi sono state effettuate delle correzioni manuali (in particolare, la costruzione dei residui mancanti) a cui è seguito il raffinamento automatico tramite CNS. Il procedimento è stato iterato fino al raggiungimento di un modello soddisfacente. La struttura finale corrisponde a 183 amminoacidi su 204 (residui ²²Pro-Gly²⁰⁴), e 183 molecole d'acqua, con R = 19.5 % ed R_{free} = 20.1%.

Titolazione del contenuto di tioli

250 μ g di proteine ricombinanti sono state trattate con DTT 50 mM o con L-MetSO 50 mM per 1 ora a temperatura ambiente. Le proteine sono state poi precipitate per aggiunta di un acido tricloroacetico al 20% (TCA) per 30 minuti. Le proteine sono state centrifugate e lavate con una soluzione al 2% di TCA, e sono state risospese in Tris-HCl 30 mM pH 8.0, EDTA 1 mM e SDS al 2%. La concentrazione delle proteine è stata determinata tramite assorbimento UV e successivamente è stato aggiunto DTNB alla concentrazione finale di 100 μ M e l'assorbanza è stata letta dopo 1 ora a 412 nm. Il contenuto di tioli è stato determinato usando come coefficiente di estinzione molare per TNB 13600 M⁻¹ cm⁻¹.

Saggi enzimatici

Misura dell'attività MsrA in presenza di DTT

La miscela di reazione di 1 mL conteneva DTT 10 mM o diverse quantità di Trx, pMsrA 5 μ M e L-MetSO 100 mM in tampone. Dopo 1, 2, 3 o 4 minuti, 2.5 μ L di acido trifluoroacetico (TFA) sono stati aggiunti a 250 μ L di miscela di reazione e la quantità di metionina formata è stata misurata tramite RP-HPLC su una colonna Sephasil C 18.

Attività della metionina solfossi reduttasi tirosina-dipendente

L'attività di cMsrA e pMsrA in presenza di Trx è stata misurata seguendo l'ossidazione del NADPH a 340 nm in una soluzione di 500 μ L costituita da Tris-HCl pH 8.0 30 mM, EDTA 1 mM, NADPH 200 μ M, *Arabidopsis thaliana* NADPH thioredoxin reductase 2 μ M, diverse concentrazioni di tioredossina citosolica e L-MetSO 10 mM. Dopo 1 minuto di incubazione, MsrA è stata aggiunta alla miscela di reazione che è stata effettuata a 30° C e monitorata con uno spettrofotometro Cary 50

Stechiometria della formazione della metionina in assenza di riducenti

Le differenti proteine sono state ridotte da DTT 50 mM e dializzate due volte contro 1 L di tampone costituito da Tris-HCl pH 8.0 30 mM, ed EDTA 1 mM. 200 μ L di miscela di reazione, contenente proteina 100 a 400 μ M e L MetSO 100 mM in tampone costituito da Tris-HCl pH 8.0 30 mM, ed EDTA 1 mM, è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Successivamente 100 μ L sono stati iniettati in su una colonna Sephasil C18 per quantificare la concentrazione di metionina formatasi.

Determinazione dell'attività via NMR

L'attività di reduttasi della MsrA è stata determinata monitorando la riduzione della MetSO a Met ad opera di MsrA usando DTT come agente riducente. Le condizioni sperimentali hanno previsto l'utilizzo di un tampone fosfato 100 mM a pH 8.5, DTT 50 mM, e L-MetR,S-SO 20 mM in H₂O/D₂O 9:1. L-Alanina (10 mM) è stata usata per calibrazione interna della concentrazione. L'enzima è stato aggiunto direttamente nella cella per NMR. Gli spettri NMR spectra sono stati registrati con 8 scansioni a 27 °C ogni 79 secondi su un spettrometro Varian Inova 400 MHz. I dati sono stati processati usando il programma FELIX 97 (Accelrys).

Bibliografia II

- [1] Asada K., and Takanashi M. Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. *Photoinhibition* 1987:227-287
- [2] Asada K., the water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999, **50**:601-639
- [3] Hammond-Kosack K.E., and Jones J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 1996, **8**:1773-1791
- [4] Polle A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate peroxidase-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. *Plant Physiol.* 2001, **126**:445-462
- [5] Noctor G., and Foyer C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1998, **49**:249-279
- [6] Allen R. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.* 1995, **107**: 1049-1054
- [7] Knight H., and Knight M.R. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 2001, **6**:262-267
- [8] Baier M., and Dietz K.J. Primary structure and expression of plant homologues of animal and fungal thioredoxin-dependent peroxide reductase and bacterial alkyl hydroperoxide reductase. *Plant Mol. Biol.* 1996, **31**:553-564
- [9] Mittler R. Oxidative stress, antioxidant and stress tolerance *Trends Plant Sci.* 2002, **7**:405-410
- [10] Moskovitz J., Rahman M.A., Strassman J., Yancey S.O., Kushner S.R., Brot N. and Weissbach H. Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage *J. Bacteriol.* 1995, **177**:502-507
- [11] Moskovitz J., Berlett B.S., Poston J.M. and Stadtman E.R. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, **94**:9585-9589
- [12] Ciorba M.A., Heinemann S.H., Weissbach H., Brot N. and Hoshi T. Modulation of potassium channel function by methionine oxidation and reduction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, **94**:9932-9937
- [13] Ciorba M.A., Heinemann S.H., Weissbach H., Brot N. and Hoshi T. Regulation of voltage-dependent K⁺ channels by methionine oxidation: effect of nitric oxide and vitamin C. *FEBS Letters.* 1999, **442**:48-52
- [14] Yao Y., Yin D., Jas G.S., Kuczer K., Williams T.D., Schoneich C., and Squier T.C. Oxidative modification of a carboxyl-terminal vicinal methionine in calmodulin by hydrogen peroxide inhibits calmodulin-dependent activation of the plasma membrane Ca-ATPase. *Biochemistry* 1996, **35**:2767-2787.
- [15] Moskovitz J., Poston J.M., Berlett B.S., Nosworthy N.J., Szczepanowski R., and Stadtman E.R. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**: 14167-14172
- [16] Sharov V.S., Ferrington D.A., Squier T.C., and Schoneich C. Diastereoselective reduction of protein-bound methionine sulfoxide by methionine sulfoxide reductase. *FEBS Lett.* 1999, **455**:247-250
- [17] Kumar R.A., Koc A., Cerny R.L., and Gladyshev V.N. Reaction Mechanism, Evolutionary Analysis, and Role of Zinc in *Drosophila* Methionine-R-sulfoxide Reductase. *J.B.C.* 2002, **277**:37527-37535
- [18] Boschi-Muller S., Azza S. and Branlant G. E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci.* 2000, **10**:2272-2279.
- [19] Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Van Dorsselear A. and Branlant G. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**:35908-35913.
- [20] Lowther W.T., Brot N., Weissbach H., Honek J.F., and Matthews B.W. Thiol-disulfide exchange is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase. *PNAS* 2000, **97**:6463-6468
- [21] Kang S.W., Baines I.C. and Rhee S.G. Characterization of a mammalian Peroxiredoxin That contains One Conserved Cysteine. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**:6303-6311.
- [22] Zhang P., Liu B., Kang S.W., Seo M.S., Rhee S.G., and Obeid L.M. Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J. Biol. Chem.* 1997, **272**:30615-30618.
- [23] Zhou Y., Kok K.H., Chun A.C., Wong C.M., Wu H.W., Lin M.C., Fung P.C., Kung H., and Jin D.Y. Mouse peroxiredoxin V is a thioredoxin peroxidase that inhibits p53-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, **268**:921-927.
- [24] Seaver L.C., and Imlay J.A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001, **183**:7173-81.
- [25] Wood Z.A., Poole L.B., Hantgan R.R. and Karplus P.A. Dimers to Donuts: Redox-Sensitive Oligomerization of 2-Cysteine Peroxiredoxins. *Biochemistry* 2002, **41**:5493-5500.
- [26] Seo M.S., Kang S.W., Kim K., Baines I.C., Lee T.H. and Rhee S.G. Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**:20346-54.
- [27] Choi H.J., Kang S.W., Yang C.H., Rhee S.G., and Ryu S.E. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 1998, **5**:400-406.
- [28] Declercq J.P., Evrard C., Clippe A., Stricht D.V., Bernard A., and Knoops B. Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 2001, **311**:751-9.
- [29] Schröder E., Littlechild J.A., Lebedev A.A., Errington N., Vagin A.A., and Isupov M.N. Crystal structure of dodecameric 2-cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1,7 Å resolution. *Structure* 2000, **8**:605-615.

- [30] Hirotsu S., Abe Y., Okada K., Nagahara N., Hori H., Nishino T., and Hakoshima T. Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23kDa/proliferation-associated gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999, **96**:12333-12338.
- [31] Alphey M.S., Bond C.S., Tetaud E., Fairlamb A.H., and Hunter W.N. The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins. *J. Mol. Biol.* 2000, **300**:903-916.
- [32] Bryk R., Lima C.D., Erdjument-Bromage H., Tempst P., and Nathan C. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science* 2002, **295**:1073-1077.
- [33] Kim S.J., Woo J.R., Hwang Y.S., Jeong D.G., Shin D.H., Kim K., and Ryu S.R. The tetrameric structure of Haemophilus influenzae hybrid Prx5 reveals interactions between electron donor and acceptor proteins. *J. Biol. Chem.* 2003, **278**:10790-10798.
- [34] Rouhier N., Gelhaye E., and Jacquot J.P. Redox control by dithio-disulfide exchange in plants. II. The cytosolic and mitochondrial systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2002, **973**:520-528.
- [35] Rouhier N., Gelhaye E., and Jacquot J.P. Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett.* 2002, **511**:145-149.
- [36] Rouhier N., Gelhaye E., and Jacquot J.P. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar: protein-protein interaction and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**:13609-14.
- [37] Stacy R.A., Nordeng T.W., Cullanez-Macia F.A., and Aalen R.B. The dormancy-related peroxiredoxin antioxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *Plant J.* 1999, **19**:1-8.
- [38] Cheong N.E., Choi Y.O., Lee K.O., Kim W.Y., Jung B.G., Chi Y.H., Jeong J.S., Kim K., Cho M.J., and Lee S.Y. Molecular cloning, expression and functional characterization of a 2-Cys peroxiredoxin in chinese cabbage. *Plant Mol. Biol.* 1999, **40**:825-834.
- [39] Goyer A., Haslekas C., Miginiac-Malow M., Klein U., Le Marechal P., Jacquot, J.P., and Decottignies P. Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from Chlamydomonas reinhardtii. *Eur. J. Biochem.* 2002, **269**: 272-292.
- [40] König J., Baier M., Horling F., Kahmann U., Harris G., Schurmann P., and Dietz K.J. The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci.* 2002, **99**:5738-5743.
- [41] Motohashi K., Kondosh A., Stumpp M.T., and Hisabori T. Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001, **98**:11224-29.
- [42] Rouhier N., Gelhaye E., Sautiere P.E., Brun A., Laurent P. Tagu D., Gerard J., de Fay E., Meyer T., and Jacquot J.P. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol.* 2001, **127**:1299-1309.
- [43] Otwinowski Z., and Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 1997, **276**:307-326.
- [44] Tete-Favier F., Cobessi D., Boschi-Muller S., Azza S., Branlant G. and Aubry A. Crystal structure of the Escherichia coli peptide methionine sulfoxide reductase at 1.9 Å resolution. *Structure Fold Des.*, 2000, **8**:1167-1178.
- [45] Lowther W.T., Brot N., Weissbach H. and Matthews B.W. Structure and mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase, an "anti-oxidation" enzyme. *Biochemistry*, 2000, **39**:13307-13312.
- [46] Taylor A.B., Benglis D.M., Dhandayuthapani S., and Hart J.P. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* Methionine Sulfoxide Reductase A in Complex with Protein-Bound Methionine. *J. of Bacteriology* 2003, **185**:4119-4126
- [47] Vagin A., and Teplyakov A. MOLREP: an automated program for molecular replacement., *J. Appl. Cryst* 1997, **30**:1022-1025
- [48] Perrakis A., Morris J.R., and Lamzin V.S. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat. Struct. Biol.* 1999, **6**:458-463
- [49] Brünger A. T., Adams P. D., Clore G. M., DeLano W. L., Gros P., Grosse-Kunstleve R. W., Jiang J. S., Kuszewski J., Nilges M., Pannu N. S., Read R. J., Rice L. M., Simonson T. and Warren G. L. Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 1998, **54**:905-921
- [50] Stewart E.J., Aslund F., and Beckwith J. Disulfide bond formation in the Escherichia coli cytoplasm: an in vivo role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 1998, **17**:5543-5550.
- [51] Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Van Dorsselaar A. and Branlant G. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* 2000, **275**:35908-35913.
- [52] Boschi-Muller S., Azza S. and Branlant G. E. coli methionine sulfoxide reductase with a truncated N terminus or C terminus, or both, retains the ability to reduce methionine sulfoxide. *Protein Sci.* 2000, **10**:2272-2279.
- [53] Thoden J.B., Huang X., Raushel F.M., Holden H.M. Crystal Structure of Carbamoyl Phosphate Synthetase: Snapshots Along the Reaction Pathway. *Biochemistry* 1999, **38**(49):16158-66.
- [54] Debnath P., Chakrabarti P., On Residues in the disallowed Region of the Ramachandran Map. *Biopolymers* 2002, **63**:195-206
- [55] Beraud S., Bersch B., Brutscher B., Gans P., Barras F. and Blackledge M. Direct structure determination using residual dipolar couplings: reaction-site conformation of methionine sulfoxide reductase in solution. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, **124**:13709-13715.

Appendice I Metodologie di indagine strutturale ed analisi conformazionale

Diffrazione dei raggi X

Una radiazione elettromagnetica presenta un campo elettrico ed uno magnetico fluttanti secondo la legge: $E = E_0 \cos[2\pi(t/T - x/\lambda)] + \phi = E_0 \cos[\alpha(t)]$. Quando una radiazione X collide con la materia interagisce con le particelle cariche come gli elettroni che fluttano ed emettono una radiazione della stessa lunghezza d'onda. La diffusione dei Raggi X avviene principalmente grazie agli elettroni che rispetto alle altre particelle subatomiche hanno il maggior rapporto carica-raggio. Di conseguenza l'immagine di una macromolecola ottenibile dai raggi X è quella della densità elettronica della molecola stessa.

Natura e Sorgenti di raggi X

I cristalli vengono sottoposti ai raggi X provenienti da una sorgente sufficientemente brillante per minimizzare i tempi di esposizione e soprattutto per ottenere delle misure ad alta risoluzione. I raggi X di lunghezza d'onda utile per la cristallografia sono radiazioni elettromagnetiche di lunghezza d'onda compresa tra 0.5 e 3.5 Å. tali radiazioni possono essere prodotte da due fenomeni fisici: l'emissione di un metallo irradiato con elettroni o l'emissione da parte di particelle accelerate. Nel primo caso un elettrone ad alta energia emesso da un catodo, riscaldato per effetto Joule ed accelerato dalla differenza di potenziale tra i due elettrodi di circa 50 kV, colpisce un anodo metallico, comunemente costituito da rame o molibdeno, sottraendo un elettrone da un orbitale interno. Questo elettrone viene sostituito da un altro elettrone di un orbitale esterno il quale emette l'eccesso di energia sottoforma di raggi X.

L'elemento metallico di cui è costituito l'anodo ha uno spettro di emissione corrispondente alla separazione dei livelli energetici. Tali linee di emissione hanno lunghezza d'onda tanto maggiore quanto più basso è il numero atomico dell'elemento. Per esempio, la transizione degli elettroni del del rame ($Z = 29$) da guscio L al guscio K ($L \rightarrow K$) produce raggi X con $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ (K_α). La transizione $M \rightarrow K$ produce raggi X con $\lambda = 1.39 \text{ \AA}$ (K_β). Per il molibdeno ($Z = 42$), $\lambda(K_\alpha) = 0.71 \text{ \AA}$ e (K_β) = 0.63 Å. (Figura 1)

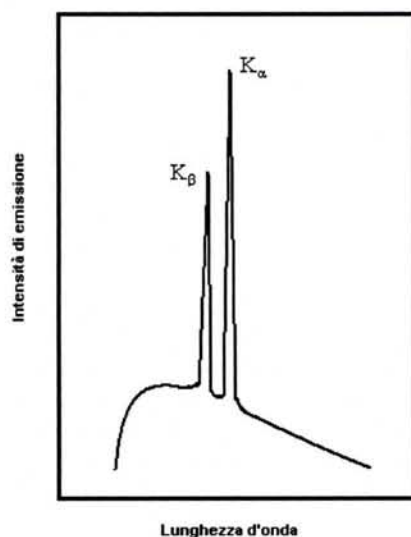


Figura 1. Emissione di raggi X da parte di un anodo di Cu. Sono riportate le transizioni elettroniche K_α con $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, e K_β con $\lambda = 1.39 \text{ \AA}$.

L'emissione di raggi X da tubi è limitata dal riscaldamento dell'anodo. Maggiori emissioni sono possibili attraverso il raffreddamento della suferficie anodica con liquido refrigerante o attraverso la rapida rotazione dell'anodo. La sorgente ad anodo rotante è circa 10 volte più potente di un tubo ad anodo fisso. (Figura 2)

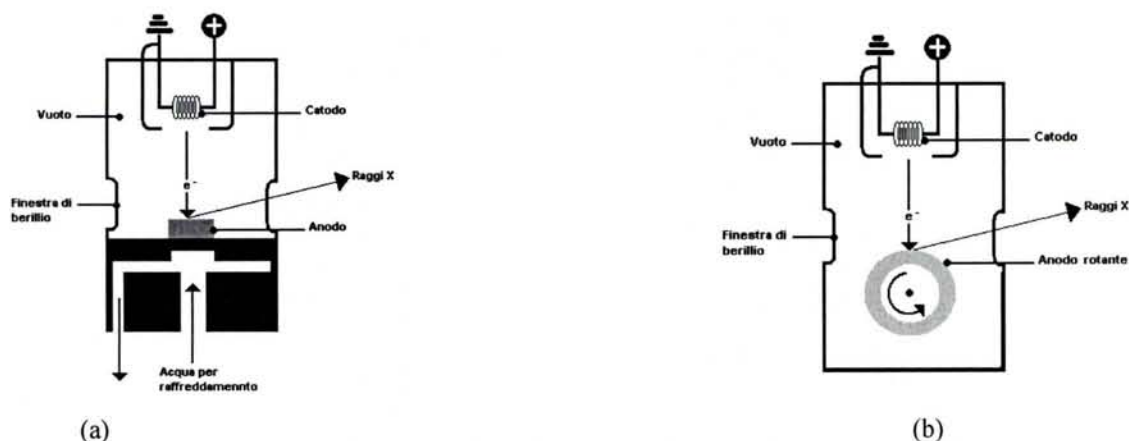
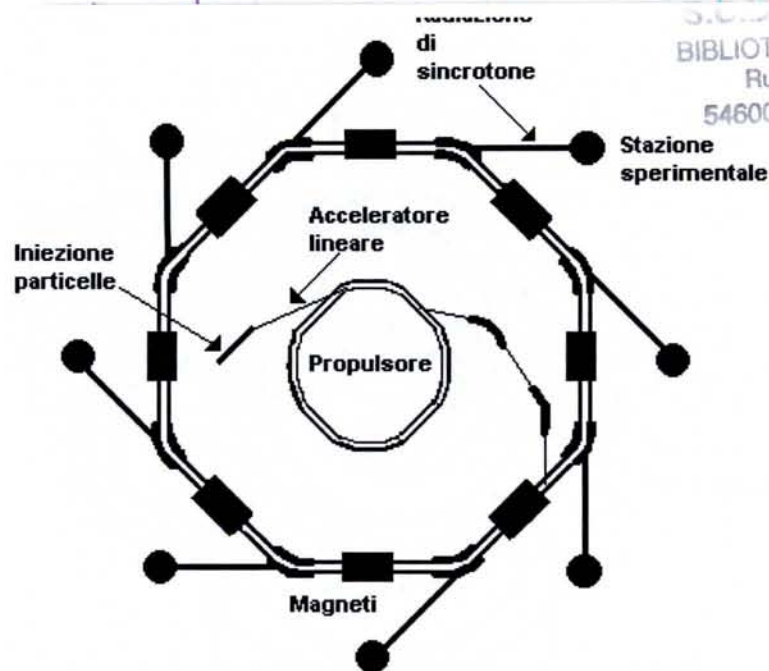


Figura 2. rappresentazione schematica di sorgenti di raggi X. Anodo fisso (a) ed Anodo rotante (b)



Gli acceleratori di particelle (Figura 3), che sono usati dai fisici per studiare le particelle subatomiche, sono le più potenti sorgenti di raggi X. In questi anelli molto estesi, particelle subatomiche circolano a velocità prossime a quella della luce ed il loro fascio è curvato da potenti magneti in modo da assumere un moto circolare.

Figura 3. Rappresentazione schematica di un acceleratore di particelle.

Tale moto comporta l'emissione di raggi X da parte di particelle come l'elettrone (radiazione di sincrotrone). I principali vantaggi di un acceleratore di particelle rispetto alle sorgenti tradizionali sono la più alta risoluzione, i minori tempi di esposizione del cristallo e la possibilità di selezionare la lunghezza d'onda dei raggi X, il che può essere utile per risolvere il problema della fase.

Monocromatori

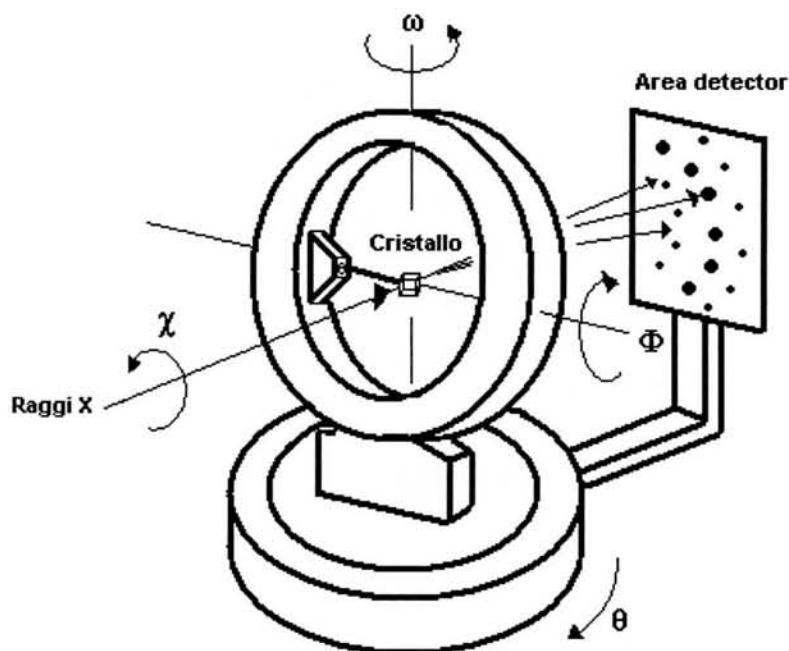
Una sorgente di raggi X monocromatica è necessaria per la cristallografia poiché il diametro della sfera di riflessione è pari a $1/\lambda$, e se una sorgente non fosse monocromatica produrrebbe un insieme di riflessioni per ogni lunghezza d'onda emessa il che renderebbe difficoltoso o impossibile l'indicizzazione dei riflessi a causa della sovrapposizione degli stessi. Per tale motivo vengono utilizzati dei monocromatori per sorgenti di raggi X che possono essere classificati in tre categorie:

- Un filtro metallico che assorbe la radiazione K_{β} , che nel caso della radiazione del rame, è costituito da nichel.
- Un monocromatore costituito da materiale cristallino, come la grafite, il silicio o il germanio, che, secondo la legge di Bragg, permette di eliminare selettivamente la radiazione K_{β} .
- Un sistema in cui la luce viene resa monocromatica da due specchi piani perpendicolari. Il fascio di raggi X viene riflesso successivamente da due specchi con un angolo, detto angolo critico, che permette un riflessione totale. Questo sistema di doppi specchi produce un fascio di raggi intenso avente un angolo di divergenza molto stretto e, per le sue caratteristiche, si adatta bene alla cristallografia su macromolecole biologiche [1].

Rivelatori

In biocristallografia viene utilizzata come tecnica di acquisizione dei dati il metodo dell'oscillazione [2] che abbassa il numero dei riflessi da misurare e quindi i tempi di esposizione rispetto alla misura di intensità diffratta attraverso un diffrattometro automatico il che permette di preservare l'integrità dei cristalli.

Ciò è possibile perché il valore elevato delle costanti di cella di un cristallo proteico fa sì che un piccolo movimento del cristallo intorno all'asse di rotazione ϕ porti in riflessione molti punti del reticolo reciproco, le cui intensità diffratte vengono misurate da rivelatori ad area (area *detector*), ossia rivelatori piatti perpendicolari al fascio della radiazione incidente (Figura 4).



Goniometro a 4 cerchi

Figura 4. Rappresentazione schematica del rivelatore Area detector.

Evoluzione tecnologica dell'area detector è l'*imaging plate* che sfrutta il fenomeno della luminescenza fotostimolata (*Photo-Stimulated Luminescence*, PLS). L'*imaging plate* è costituito da un disco ricoperto da cristalli di BaFBr:Eu^{2+} che colpiti da raggi X si ionizzano ad Eu^{3+} trasferendo elettroni agli atomi di bromo. L'esposizione successiva della superficie alla luce di un laser He-Ne permette di liberare gli elettroni catturati dagli atomi di bromo che riducono l' Eu^{3+} ad Eu^{2+} il quale emette una radiazione visibile (390 nm) in modo proporzionale al numero di fotoni X assorbiti da ogni pixel del disco. L'informazione viene poi trasformata da un lettore in segnale elettrico, ed il disco viene rigenerato attraverso l'esposizione a luce bianca che ne cancella i riflessi presenti. Questo sistema consente l'acquisizione ad alta risoluzione ed è impiegato nella raccolta dati con luce di sincrotrone [3]. (Figura 5)

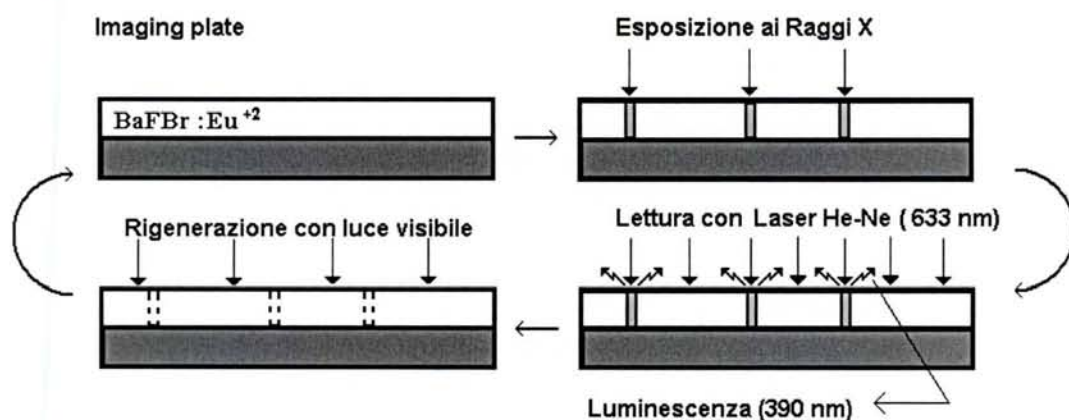


Figura 5. Rappresentazione schematica del rivelatore *imaging plate*.

Cristallizzazione

Natura dei cristalli

Un cristallo è caratterizzato da un periodico arrangiamento tridimensionale delle molecole che lo costituiscono. A partire dalla più piccolo motivo ripetitivo, l'unità asimmetrica, ed utilizzando gli operatori di simmetria, è possibile generare la cella elementare. La traslazione della cella elementare nelle tre dimensioni genera il cristallo 3-D. (Figura 6) L'impacchettamento regolare delle molecole permette di raggiungere lo stato ad energia libera più bassa. Un cristallo di una molecola a basso peso molecolare presenta, generalmente, un impacchettamento molto compatto cui corrispondono alti valori di energia reticolare. Nei cristalli proteici, invece, sono, presenti interstizi reticolari di considerevoli dimensioni aperti al solvente che circonda le molecole. Di conseguenza, una macromolecola disposta in un reticolo cristallino entra in contatto con le altre attraverso un limitato numero di interazioni deboli, quali legami idrogeno o contatti di van der Waals, che coinvolgono i residui amminocidici esposti sulla superficie della proteina mentre gli altri residui rimangono esposti al solvente. La presenza di canali di solvente mantiene le macromolecole cristallizzate in condizioni ambientali non molto

lontane da quelle fisiologiche di una proteina in soluzione. Come conseguenza, a tali cristalli competono energie reticolari particolarmente basse da cui le difficoltà nell'ottenimento di cristalli proteici e la loro estrema fragilità.

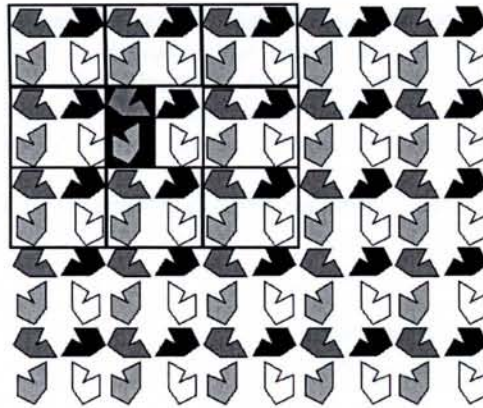


Figura 6. Rappresentazione schematica di un cristallo generato per traslazione della cella elementare.

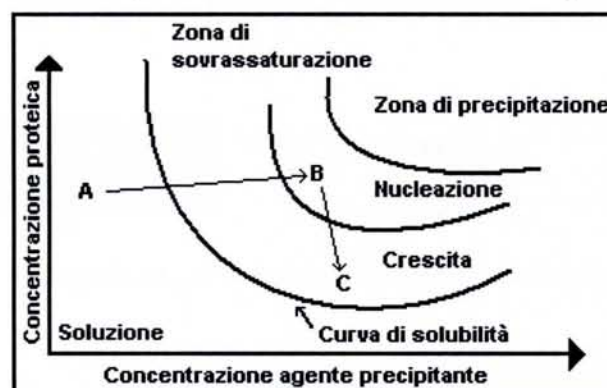
Nel riferirsi al contenuto di solvente di un cristallo proteico si considera spesso il rapporto tra il volume della cella elementare e la massa di proteina in essa contenuta, espressa in Dalton. Il parametro VM che esprime tale rapporto ha dimensioni $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ($1 \text{ Dalton} = 1/6.022 \cdot 10^{23} = 1.66 \cdot 10^{-24} \text{g}$), ed è caratteristico di ciascuna modificazione cristallina: $VM = V_{\text{cella unitaria}} / Z \times \text{P.M.}$. Se si indica con v_p il volume specifico parziale della proteina, risulta che la frazione di volume del cristallo occupata dalla proteina V'_p sarà: $V'_p = 1.66 v_p / VM$. Per la maggior parte delle proteine v_p è circa pari a $0.74 \text{ cm}^3/\text{g}$ cosicché V'_p può essere approssimata a $V'_p = 1.23 / VM$. Di conseguenza la frazione di cristallo occupata dal solvente sarà data dalla differenza $V'_{\text{sol}} = 1 - V'_p = 1 - 1.23 / VM$. V'_{sol} viene spesso riferito come contenuto percentuale di solvente in volume e riguarda il solvente in toto. In realtà si deve distinguere tra due classi di molecole di solvente presenti nei cristalli proteici: l'una, quantitativamente preponderante e descritta sopra, caratterizzata dal disordine tipico dei liquidi ed in equilibrio dinamico con l'ambiente circostante il cristallo, l'altra strettamente legata alla superficie polare delle molecole proteiche presenti. Per molti cristalli di proteina il valore di VM è compreso tra 1.7 e $3.5 \text{ \AA}^3/\text{Da}$ [4]. Il calcolo di VM, note le costanti cristallografiche ed il peso molecolare approssimativo della proteina, offre al cristallografo un semplice mezzo per valutare lo stato di aggregazione della proteina nella cella elementare, cioè quante molecole sono contenute nell'unità simmetrica, in quanto tra i valori ottenuti solo uno, probabilmente, cadrà nell'intervallo di valori permesso sopra descritto. Nel caso in cui il calcolo fornisca più di un valore di VM accettabile, può risultare corretto riferirsi alla distribuzione di VM per proteine di pari peso molecolare [4].

Principi di cristallizzazione

I cristalli di proteina sono ottenuti mediante la precipitazione lenta e controllata da soluzioni acquose in condizioni che non denaturano la macromolecola. L'ottenimento di cristalli singoli di proteina è uno stadio molto delicato dello studio strutturale, in quanto la qualità della misura dei dati di diffrazione è fortemente legata alla qualità dei cristalli sotto indagine. E' possibile individuare tre stadi nel processo di cristallizzazione comuni a tutti i sistemi (sali, proteine, DNA, RNA, ect.): nucleazione, crescita e cessazione della crescita. La nucleazione è il processo mediante il quale molecole o aggregati non cristallini, che sono liberi in soluzione si uniscono in modo tale da formare un aggregato stabile termodinamicamente. La formazione di aggregati cristallini da soluzioni sovrassature non porta necessariamente alla formazione di cristalli macroscopici. Le tecniche di cristallizzazione tengono conto del diagramma di fase della proteina, indispensabile per comprendere le leggi della cristallizzazione. Questo diagramma mette in evidenza la curva di solubilità che delimita lo stato disciolto da quello sovrassaturo.

Nel caso delle tecniche di cristallizzazione per diffusione di vapore, utilizzate in questo lavoro di tesi, la formazione di un cristallo può essere descritta schematicamente come un processo in due stadi: durante il primo il sistema passa dalla zona di solubilità (A) a quella di nucleazione (B) con formazione del primo germe cristallino, mentre nel secondo stadio il germe cristallino cresce fino a far passare il sistema dalla zona di nucleazione ad un punto (C), dopo il quale la crescita del cristallo si arresta. (Figura 7)

Figura 7. Diagramma di fase valido per le tecniche di diffusione in fase di vapore.



Il notevole numero di parametri (pH, temperatura, pressione, forza ionica, agente precipitante) che possono influenzare il processo di cristallizzazione rende gli esperimenti molto delicati, in quanto non è spesso possibile conoscere il diagramma di solubilità della proteina in funzione di tutti i parametri. La scelta delle condizioni per la cristallizzazione di una proteina va allora fatta in maniera sistematica combinando e facendo variare i parametri che influenzano la cristallizzazione. Poiché questa operazione richiederebbe un numero molto elevato di esperimenti, ci si serve spesso di alcuni insiemi [5] di soluzioni. La composizione di questa matrice di soluzioni è frutto di studi statistici sulle condizioni di cristallizzazione che hanno portato all'ottenimento di cristalli di macromolecole biologiche. L'utilizzo di tali soluzioni, è spesso il punto di partenza per la messa a punto delle condizioni che portano all'ottenimento di cristalli singoli adatti ad un'indagine cristallografica.

Esistono numerose tecniche per la cristallizzazione di proteine alcune delle quali sono di seguito descritte:

- Batch
- Dialisi
- Metodo della diffusione all'interfaccia
- Metodo di diffusione in fase vapore

Batch

Il metodo di cristallizzazione più semplice e tradizionale è sicuramente quello in batch, in cui, in delle provette di vetro chiuse ermeticamente, la soluzione della proteina è mescolata direttamente alla soluzione dell'agente precipitante, portando improvvisamente la soluzione in una condizione di sovrassaturazione. Nei casi fortunati i cristalli crescono dalla soluzione sovrassatura senza ulteriori esperimenti.

Dialisi

Con questa tecnica la soluzione proteica è portata alla sovrassaturazione dializzando la soluzione di proteina con una soluzione esterna concentrata contenente l'agente precipitante, attraverso una membrana di dialisi (membrana semipermeabile) con pori di dimensioni opportune. La dialisi e la microdialisi si differenziano per il recipiente contenente la soluzione proteica: nel primo caso viene usato un tubo di dialisi (>0.1 mL) mentre nel secondo caso può essere usato sia un contenitore di plexiglass con una capacità di 5 ÷ 100 µL (bottone di dialisi) sia un capillare di vetro saldato ad un'estremità con della cera

Metodo della diffusione all'interfaccia

In questo metodo la soluzione proteica e la soluzione dell'agente precipitante sono stratificate l'una sull'altra in un capillare di vetro mediante una siringa. La soluzione sottostante è quella con densità maggiore ed è in genere quella della soluzione precipitante.

Metodo di diffusione in fase vapore

In questo lavoro di tesi la macromolecola oggetto di studio è stata cristallizzata utilizzando il metodo di diffusione in fase di vapore della goccia sospesa o "hanging drop" [6], una delle tecniche più usate in biocristallografia. Una goccia di piccolo volume (2-10 µL) contenente la macromolecola, un tampone e l'agente precipitante viene depositata su una sottile lamella di vetro, che viene capovolta su un serbatoio contenente un volume di circa 1 mL dello stesso tampone e del precipitante ad una concentrazione più alta di quella presente nella goccia (Figura 8).

La differenza di concentrazione in agente precipitante tra la soluzione della goccia e quella del serbatoio dà origine a una diffusione di vapore dalla goccia verso il serbatoio fino al raggiungimento dell'equilibrio. La diminuzione del volume della goccia induce un aumento della concentrazione della proteina che, nei casi favorevoli, permette il passaggio nello stato sovrassaturato con formazione di cristalli. Il procedimento nel suo insieme può presentare delle maggiori difficoltà rispetto alla cristallizzazione di molecole piccole, anche a causa della non facile riproducibilità.

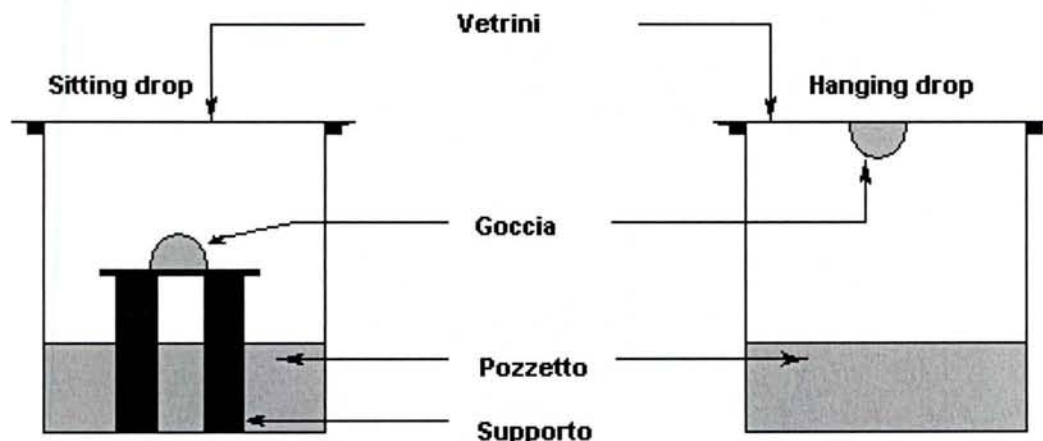


Figura 8. Rappresentazione schematica del metodo sitting drop e della goccia sospesa o hanging drop.

Diffrazione

Legge di Bragg

Tutti i piani con spaziatura regolare che passano per punti del reticolo cristallino possono essere indicati dai cosiddetti indici del reticolo hkl . I tre indici hkl identificano un particolare insieme di piani paralleli equivalenti presenti nella cella unitaria. W.L. Bragg ha mostrato (Figura 9) che quando i raggi X di lunghezza d'onda λ incidono con un angolo θ su dei piani (hkl) con spaziatura interplanare d_{hkl} producono un raggio diffratto se viene rispettata la condizione detta **Legge di Bragg**: $2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$, ossia quando i raggi emergono con una differenza di cammino pari ad un multiplo intero di λ e quindi essendo in fase producendo una interferenza costruttiva.

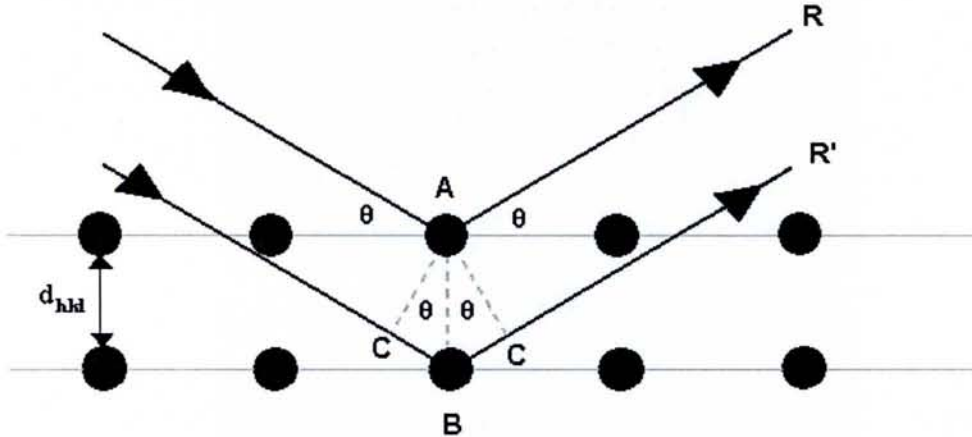


Figura 9. Rappresentazione della legge di Bragg : $2d_{hkl}\sin\theta = n\lambda$

Reticolo reciproco

La direzione ed il numero dei riflessi ottenibile da un cristallo dipendono dalle dimensioni della cella unitaria e non dal suo contenuto. Ciò è evidente se si considera un reticolo reciproco definito dai vettori a^* , b^* e c^* collegati matematicamente ad un reticolo diretto definito dai vettori a , b e c in modo tale che a^* , b^* e c^* hanno per modulo rispettivamente $1/a$, $1/b$, $1/c$, a^* è ortogonale al piano in giacciono i vettori b e c e così via (Figura 10a). Se si costruisce un reticolo reciproco ed in esso una sfera di raggio $1/\lambda$, detta sfera di riflessione o sfera di Ewald, passante per l'origine arbitraria del reticolo e con centro del cristallo sulla direzione della radiazione incidente, ogni volta che la sfera ruotando intorno all'origine tocca un punto del reticolo viene rispettata la legge di Bragg e quindi si ha un riflesso. Il numero dei riflessi misurabili è uguale al numero dei punti del reticolo reciproco che vengono a contatto con la sfera di riflessione, ossia uguale al numero delle celle unitarie del reticolo reciproco contenuti nella sfera limite di raggio $2/\lambda$ (Figura 10b). Quindi il numero dei riflessi N dipende dal volume della cella unitaria V e dalla lunghezza d'onda della radiazione incidente λ secondo l'equazione:

$$N = V_{\text{sfera limite}} / V_{\text{cella reciproca}} = V_{\text{cella diretta}} * (4\pi/3) * (2/\lambda)^3 = V_{\text{cella diretta}} * 33.5 / \lambda^3$$

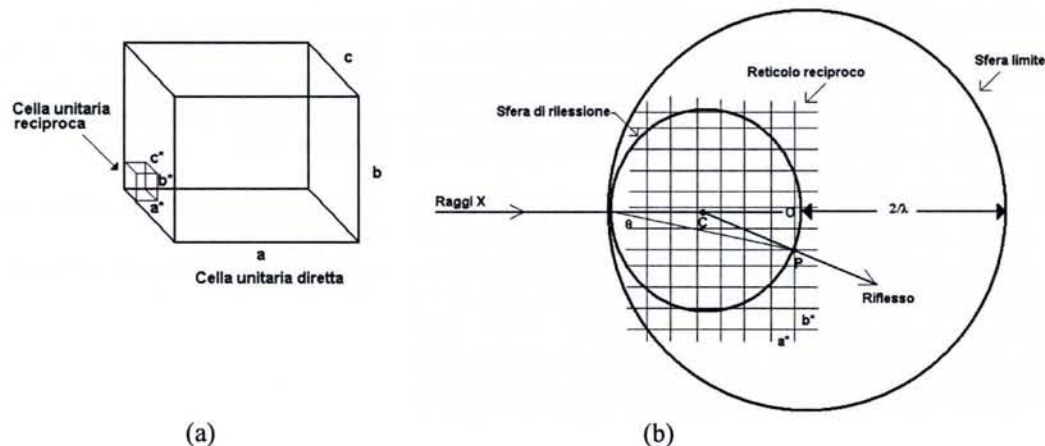


Figura 10. (a) Cella diretta e cella reciproca. (b) Sfera di riflessione e sfera limite.

Fattori di struttura

La figura di diffrazione ottenibile da rivelatore è un insieme di punti ognuno dei quali è il risultato dei riflessi in fase di tutte le famiglie di piani (hkl). (Figura 11) Ogni raggio diffratto è caratterizzato da un vettore detto fattore di struttura F_{hkl} la cui lunghezza rappresenta l'ampiezza e l'orientazione ne rappresenta la fase. F_{hkl} è il risultato della somma delle onde diffuse dagli atomi: $F_{hkl} = f_A + f_B + f_C + \dots = \sum f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$ dove f_j è il fattore di struttura atomico dipendente da $\sin\theta$. Più precisamente l'onda risultante è data dalla sovrapposizione di numerose onde diffuse dagli elettroni contenuti nei diversi

elementi di volume $dV=dx*dy*dz$ della cella, con una densità $\rho(x,y,z)$. Quindi il fattore di struttura può essere così descritto: $F_{hkl} = \iiint_V \rho(x,y,z) e^{2\pi i(hx + ky + lz)} dx dy dz$

Attraverso la trasformata di Fourier è possibile ottenere la densità elettronica in un punto (x,y,z) : $\rho(x,y,z) = (1/V) * \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$

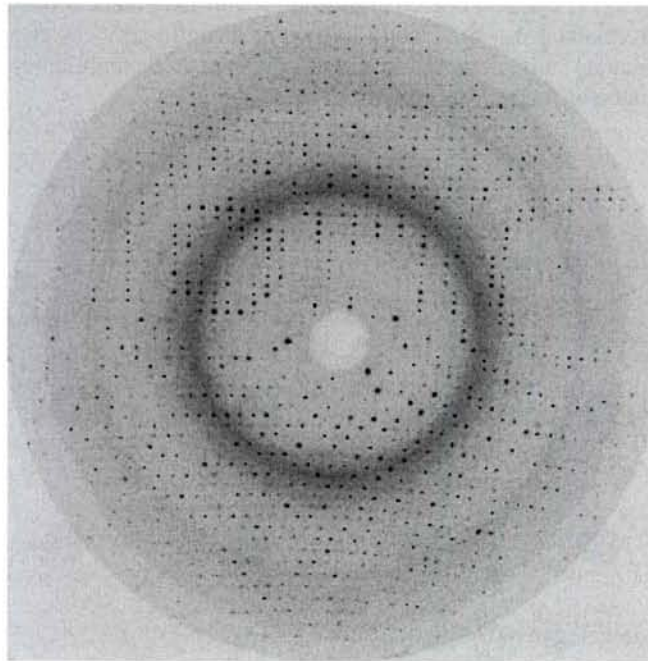


Figura 11. Tipica figura di diffrazione dei raggi X raccolta da Area detector.

Risoluzione del problema della fase

Il cosiddetto problema della fase nasce perchè dal rivelatore non otteniamo la misura delle fasi ma solo la misura dell'intensità delle onde diffratte che è proporzionale al quadrato dell'ampiezza d'onda: $I_{hkl} = k \|F_{hkl}\|^2$ e quindi, non avendo una descrizione completa della radiazione incidente sul rivelatore, non possiamo calcolare la densità elettronica.

- **Sostituzione Isomorfa** (*Isomorphous Replacement - SIR/MIR*)
- **Dispersione Anomala** (*Anomalous Dispersion - MAD/SAD*)
- **Sostituzione molecolare** (*Molecular Replacement*)
- **Metodi diretti** (Richiede un'alta risoluzione e un limitato numero di atomi)

Sostituzione Isomorfa (SIR/MIR)

Il metodo si basa sull'aggiunta di alcuni atomi pesanti alla molecola da studiare tali che si ottenga un cristallo pressochè identico a quella della forma nativa. Gli atomi pesanti possono essere legati covalentemente, per esempio atomi di mercurio su residui di cisteina, o possono essere legati elettrostaticamente in cavità cariche o idrofobiche. I raggi diffratti dal cristallo possono essere descritti dal fattore di struttura F_{HP} (proteina + atomo pesante) = F_P (proteina nativa) + F_H (atomo pesante). La comparazione tra le figure di diffrazione delle due molecole permette di trovare la posizione degli atomi modificati attraverso una serie di Fourier nota come funzione di Patterson $P(u,v,w)$ che non ha fase:

$$P(u,v,w) = (1/V) * \sum_h \sum_k \sum_l \|F_{hkl}\|^2 e^{-2\pi i(hu + kv + lw)}$$

Per ottenere la funzione di Patterson per i soli atomi pesanti basta costruire una funzione differenza nella quale le ampiezze sono $(\Delta F)^2 = (|F_{HP}| - |F_P|)^2$ da cui $\Delta P(u,v,w) = (1/V) * \sum_h \sum_k \sum_l \Delta F_{hkl}^2 e^{-2\pi i(hu + kv + lw)}$

La mappa di Patterson così ottenuta mostra picchi corrispondenti ai vettori interatomici dei soli atomi pesanti. Avendo localizzato gli atomi pesanti nella cella unitaria è possibile calcolare i fattori di struttura F_H dei soli atomi pesanti e quindi ottenerne ampiezza e fase dall'equazione $F_{hkl} = \sum_j f_j e^{2\pi i(hx_j + ky_j + lz_j)}$. I fattori di struttura della molecola nativa F_P e di quella modificata F_{HP} sono noti in modulo e dalla posizione ricavata dell'atomo pesante è possibile ottenere due possibili soluzioni per la fase (Figura 12). Tale ambiguità nel caso ideale di perfetto isomorfismo viene risolta attraverso l'utilizzo di due atomi pesanti che avranno come soluzione comune la fase effettiva. Nel caso reale sono necessari più di due atomi pesanti essendo il calcolo delle posizioni degli stessi affette da errori sperimentali.

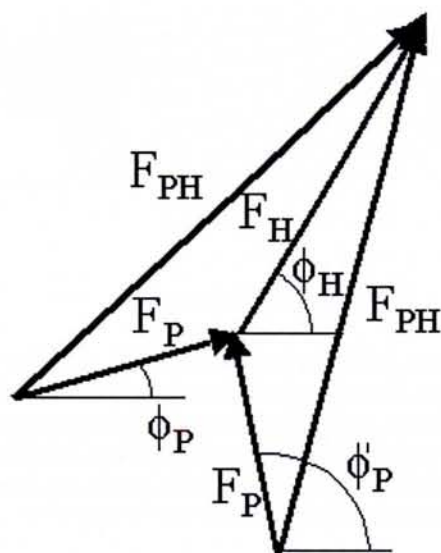


Figura 12. Fattori di struttura F_{HP} (proteina + atomo pesante) = F_P (proteina nativa) + F_H (atomo pesante) ed ambiguità della fase.

Dispersione Anomala (MAD/SAD)

Un altro metodo per ottenere le fasi dei fattori di struttura sfrutta la capacità degli atomi pesanti di assorbire i raggi X di una specifica lunghezza d'onda. come risultato di questo assorbimento non è più valida la legge di Friedel e quindi i riflessi hkl e $-h-k-l$ sono differenti in intensità. Questa disuguaglianza dei riflessi simmetrici è detta dispersione anomala. Il selenio è uno degli atomi più utilizzati per la dispersione anomala e può essere utilizzato come sostituto degli atomi di zolfo nelle proteine. Le posizioni dei diffusori anomali possono essere dedotte sia lavorando con due differenti lunghezze d'onda ed utilizzando la funzione differenza di Patterson ($\|F_{hkl}(\lambda_1)\| - \|F_{hkl}(\lambda_2)\|$)² sia lavorando con un'unica lunghezza d'onda ed utilizzando la funzione differenza di Patterson anomala ($\|F_{hkl}\| - \|F_{-h-k-l}\|$)². Quindi nota la posizione dell'atomo di selenio è possibile ricavare le fasi dei fattori di struttura. Questo metodo ha il vantaggio rispetto alla sostituzione isomorfa di utilizzare un unico cristallo poichè possono essere raccolti dati a diverse lunghezze d'onda. Inoltre essendo rispettato l'isomorfismo le fasi sono definite più precisamente e le mappe di densità elettronica sono migliori.

Sostituzione molecolare (Molecular Replacement)

Il metodo della sostituzione molecolare è applicabile se è nota la struttura di una molecola simile a quella da studiare, ovvero se è nota la struttura de:

- La stessa molecola in un'altra forma cristallina
- Un mutante della molecola da studiare
- La stessa proteina in un altro organismo
- Una proteina avente probabilmente una struttura simile per funzioni simili
- Un sottodominio della proteina studiata

Il successo di tale metodo è legato naturalmente al grado di similitudine tra il modello e la molecola studiata. Tale similitudine è correlata alla percentuale d'identità di sequenza che deve essere almeno del 40% per ottenere una semplice e completa risoluzione della struttura. Del modello sono note le coordinate degli atomi nella cella originaria. Naturalmente ciò che interessa non sono le posizioni assolute degli atomi ma quelle relative. La sostituzione molecolare richiede la creazione di un cristallo virtuale che riproduca il cristallo della molecola da studiare nella cui cella deve essere orientato e posizionato il modello molecolare. Ciò viene fatto ad esempio attraverso la funzione di Patterson utilizzata in programmi quali AmoRe e CNS-solve. In termini più precisi, supposto che le due molecole siano identiche, e che differiscano solo per orientazione e posizione, si tratterà di definire le due operazioni di rotazione e traslazione, che portano i punti equivalenti della molecola nota, e della molecola incognita, in coincidenza. Se si definiscono i punti equivalenti delle due molecole con i vettori posizionali x_2 e x_1 , riferiti ad un sistema di assi ortogonali comune, la corrispondente notazione algebrica sarà: $x_2 = [R]x_1 + t$ dove $[R]$ è una matrice di rotazione e t è il vettore che definisce la traslazione. Le orientazioni relative delle molecole del modello e della proteina in esame vengono determinate per confronto delle rispettive funzioni Patterson. La mappa Patterson del modello sarà costituita da vettori intramolecolari, dipendenti dall'orientazione della molecola nella cella ma non dalla sua posizione, e vettori intermolecolari, più lunghi dei primi e dipendenti dalle posizioni ed orientazioni relative di due molecole nella cella. Quindi i vettori intramolecolari vengono utilizzati per determinare l'orientazione del modello nella cella, mentre i vettori intermolecolari vengono utilizzati per determinare la posizione del modello orientato. Il grado di sovrapposizione (o di accordo) tra le funzioni di Patterson del modello e della molecola studiata segue il criterio introdotto da Rossmann e Blow [7] che prevede il confronto dei valori assunti dalla funzione di rotazione R per le diverse possibili orientazioni della Patterson. La funzione R è così definita: $R = \int_u P_2(x_2) P_1(x_1) dx_1$

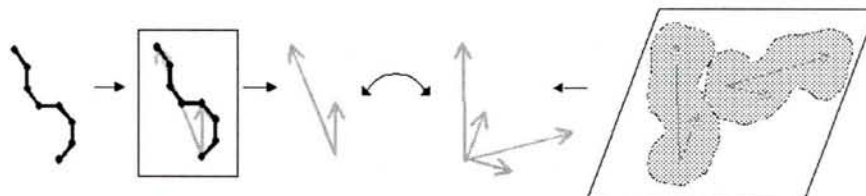


Figura 13. Rappresentazione della funzione di Patterson di rotazione.

Tale funzione, chiaramente, avrà un massimo quando le Patterson 1 e 2, e quindi le rispettive molecole, saranno orientate in maniera equivalente (Figura 13). Una volta determinata l'orientazione della proteina è necessaria posizionarla all'interno della cella elementare. Anche in questo caso si procede per tentativi esplorando tutte le possibili posizioni della molecola, opportunamente orientata, definite dal vettore t . In particolare si definisce la funzione $T(t)$ come: $T(t) = \int_u P(u)P(u,t)du$. Questa funzione avrà valore massimo quando la Patterson calcolata per la corretta orientazione e per un dato vettore $T(t)$ coincide con quella calcolata a partire dai fattori di struttura osservati. (Figura 14)

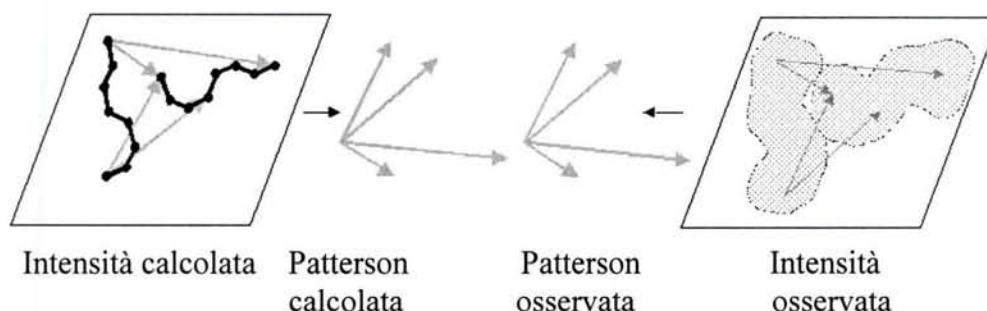


Figura 14. Rappresentazione della funzione di Patterson di traslazione

Una volta trovati l'orientazione e la posizione della proteina a struttura nota nella cella elementare della proteina a struttura incognita, le coordinate della molecola modello vengono trasformate opportunamente in maniera da fornire un insieme approssimato di coordinate di partenza per la proteina in esame. Da queste vengono calcolate le fasi che insieme ai fattori di struttura osservati forniscono una prima mappa di Fourier della densità elettronica per la proteina incognita.

Densità elettronica (Mappe di Fourier) e Costruzione di un modello

Determinate le fasi per il maggior numero possibile di riflessi della proteina nativa, la mappa "best Fourier" della densità elettronica si calcola attraverso la relazione $\rho(x,y,z) = (1/V) * \sum_h \sum_k \sum_l F_{hkl} e^{-2\pi i(hx + ky + lz)}$. La densità elettronica calcolata è, in molti casi, di interpretazione non immediata, in quanto numerosi fattori contribuiscono a rendere le Fourier particolarmente disturbate. Si pensi, per esempio, alla qualità dei dati di diffrazione che non è paragonabile a quella ottenibile per cristalli di composti a basso peso molecolare. Inoltre, l'aspetto di una mappa e la relativa facilità di interpretazione dipendono strettamente dalla risoluzione effettiva dei dati utilizzati per il suo calcolo. Infatti, a causa del disordine intrinseco delle molecole, dovuto a vibrazioni termiche o a disordine statico nel cristallo, al di là di un certo limite risolutivo le intensità diffratte risultano praticamente nulle. In genere in cristallografia delle proteine, per risoluzione di una mappa si intende semplicemente la minima distanza interplanare d relativa ai riflessi che hanno contribuito al calcolo. Il fatto di doversi muovere entro volumi piuttosto estesi di densità elettronica alla ricerca di dettagli strutturali riconoscibili rende preziosa qualsiasi tipo di informazione chimica disponibile per la proteina in esame (come per esempio la sequenza di amminoacidi, la presenza di coenzimi, gruppi prostetici contenenti metalli, etc.) può essere ampiamente sfruttata, ricercando zone di densità elettronica di forma o altezza compatibili con i dettagli ricercati. Nei casi meno fortunati il ricercatore è costretto a definire solo superfici molecolari, distinguendo tra zone di solvente (a bassa densità elettronica) e zone proteina. In seguito, muovendosi all'interno della proteina cercherà elementi di struttura facilmente riconoscibili, quali α -eliche, foglietti beta, ponti disolfuro, che permetteranno di tracciare un percorso per la catena polipeptidica. Una volta riconosciuta la forma globale della molecola, è necessario costruire, residuo per residuo, un modello atomico della macromolecola.

Affinamento del modello

Costruito il modello atomico della proteina (molto spesso questo primo modello non è completo), si è in grado di calcolare un insieme di fasi, che associato ai moduli dei fattori di struttura osservati, fornisce una migliore mappa di Fourier, in quanto si ha un migliore accordo tra i fattori di struttura osservati e quelli calcolati. Ciò avviene attraverso l'affinamento delle coordinate atomiche (e dei fattori di temperatura) delle proteine, nonché del completamento dei loro modelli, includendo in questa fase anche la localizzazione di molecole di solvente ordinato che si lega alla superficie della proteina. Il procedimento è ciclico e le fasi di calcolo si alternano a quelle di ricostruzione manuale. Il problema principale da affrontare nel campo delle proteine, al di là di quelli che possono essere i limiti computazionali, è quello del rapporto tra il

numero dei fattori di struttura osservati (F_o) e il numero di parametri da affinare (alcune migliaia anche per proteine relativamente piccole), rapporto che difficilmente è molto maggiore di 2.

La metodica più utilizzata nell'affinamento delle proteine può essere considerata come schematicamente costituita da tre fasi:

- l'affinamento a corpo rigido
- l'affinamento a gradiente coniugato
- la dinamica molecolare

L'affinamento a corpo rigido permette di riposizionare la molecola nella cella, poiché la sostituzione molecolare non fornisce da solo la migliore orientazione e traslazione della proteina. Tale affinamento, così come le fasi di seguito descritte, è volto a rendere minimo il valore dell'indice di accordo cristallografico R , definito come: $R = \frac{\sum_{h,k,l} ||F_o - F_c||}{\sum_{h,k,l} |F_o|}$.

L'affinamento a gradiente coniugato, messo a punto da Brunger (1992) nel programma X-Plor e utilizzato con la modificazione di alcuni algoritmi in CNS [8], è basato sulla minimizzazione di una pseudo energia potenziale, chiamata E_{tot} , costituita da un termine proveniente dalla meccanica molecolare E_{mol} e da un altro, scalato rispetto al primo, legato alla differenza tra i fattori di struttura osservati e quelli calcolati E_{cris} . Si può allora scrivere: $E_{tot} = E_{mol} + w_a E_{cris}$ dove w_a è il peso da attribuire al termine cristallografico.

Il termine E_{mol} si esprime sotto forma di una somma dei contributi energetici geometrici, elettrostatici e di Van der Waals.

Il termine E_{cris} si esprime: $E_{cris} = \sum w_h [|F_{obs}(h) - k|F_{calc}(h)]^2$ in cui w_h è il peso individuale di ogni singolo riflesso.

La dinamica molecolare è un metodo di calcolo che permette di studiare lo spazio conformazionale di molecole in movimento per integrazione dell'equazione del moto di Newton, servendosi di un campo di forze per la determinazione dell'energia potenziale. Questo metodo, molto utilizzato nella modellistica molecolare, è stato adattato [9] all'affinamento di strutture cristallografiche. Tale metodo permette dei salti energetici non raggiungibili dalle metodiche classiche, come il metodo dei minimi quadrati e il raffinamento a gradiente coniugato [10]. La tecnica consiste, sostanzialmente, nel simulare un aumento di temperatura, che fornisce al sistema un'energia tale da abbattere le barriere energetiche locali, cui segue un raffreddamento che gli permette di raggiungere stati di minima energia. A questi calcoli di dinamica vengono poi fatti seguire dei cicli di affinamento con i metodi classici.

Correttezza del modello

Vi sono due criteri per stabilire se il modello molecolare ottenuto è più o meno corretto. Il primo un criterio cristallografico, basato sull'accordo tra i dati osservati e quelli calcolati. Ed il modello è tanto migliore quanto più piccolo risulta essere sia il valore degli indici di accordo cristallografico R (90-95% dei dati), e R_{free} , calcolati come $R = \frac{\sum_{h,k,l} ||F_o - F_c||}{\sum_{h,k,l} |F_o|}$, sia la loro differenza che non deve superare il 10%. Il secondo è un criterio semplicemente geometrico e prevede che gli angoli di torsione delle catene principali e laterali, le lunghezze di e gli angoli di legame, ed i contatti di van der Waals siano in accordo con quelli contenuti nelle banche dati. Ed inoltre è necessario che l'ambiente in cui si trovano i residui nella struttura sia compatibile con l'intorno chimico preferenziale degli stessi residui.

Spettrometria di risonanza magnetica nucleare (NMR)

La spettrometria di risonanza magnetica nucleare è una tecnica di grandissima potenzialità ai fini di determinazioni strutturali. L'uso della spettrometria NMR permette l'identificazione e la caratterizzazione di molecole delle quali consente lo studio conformazionale e di interazioni intermolecolari. Ovvero, l'NMR permette di definire l'intorno degli atomi nelle molecole. L'importanza dell'NMR risiede, infatti, nella circostanza che nuclei atomici con intorni chimici diversi producono segnali in posizioni diverse nello spettro (*chemical shift*). La spettrometria NMR di uso più frequente è quella 1H NMR in cui i segnali sono dovuti ai nuclei di idrogeno, seguita da quella ^{13}C NMR in cui i segnali sono dovuti ai nuclei dell'isotopo ^{13}C del carbonio.

Teoria dell'NMR

Molte particelle elementari, tra cui gli elettroni, ed i protoni, posseggono un momento angolare intrinseco L cui è associato un momento magnetico $\mu = \gamma L$, dove γ viene detto rapporto giromagnetico. Secondo le leggi dell'elettrodinamica classica, un sistema di questo tipo, sottoposto all'azione di un campo magnetico stazionario H , risulta soggetto ad un momento di forza che lo fa precedere attorno alla direzione del campo stesso con una velocità angolare $\omega_0 = \gamma H$. Il sistema entra in risonanza quando viene investito da un'onda elettromagnetica di frequenza $\nu = \omega_0/2\pi$ polarizzata circolarmente e diretta parallelamente alla direzione del campo. Dato che il momento magnetico di una particella è quantizzato esso può assumere soltanto un numero finito di stati di orientazione, e quindi assumerà un numero discreto di valori diversi di energia di interazione rispetto al campo magnetico esterno. Se il sistema risonante è un nucleo atomico si parla di risonanza magnetica nucleare (NMR).

Analisi conformazionale

Il primo passo nello studio conformazionale di peptidi o proteine in soluzione mediante spettrometria magnetica nucleare 1H NMR consiste nell'assegnazione di tutte le risonanze protoniche. L'impiego di 2D NMR permette di interpretare più facilmente uno spettro monodimensionale complesso. Gli esperimenti COSY (Correlation Spectroscopy) forniscono le correlazioni scalari tra i nuclei della molecola, si osservano infatti gli accoppiamenti tra nuclei vicini nella sequenza atomica (J) il cui effetto si trasferisce mediante i legami chimici. Attraverso i *cross peaks* di un esperimento bidimensionale NOESY (NOE Spectroscopy) si osservano le correlazioni dipolari inter-residuo dNN, dαN, e dβN, cioè si osservano accoppiamenti tra nuclei vicini nello spazio ma non legati direttamente tra loro, il che permette l'assegnazione sequenziale della molecola. Infatti le distanze tra i protoni coinvolti in tali correlazioni dipendono dagli angoli di rotazione ϕ , ψ e χ e da considerazioni geometriche risulta che almeno una di queste distanze deve essere inferiore a 3 Å (Figura 15, 17).

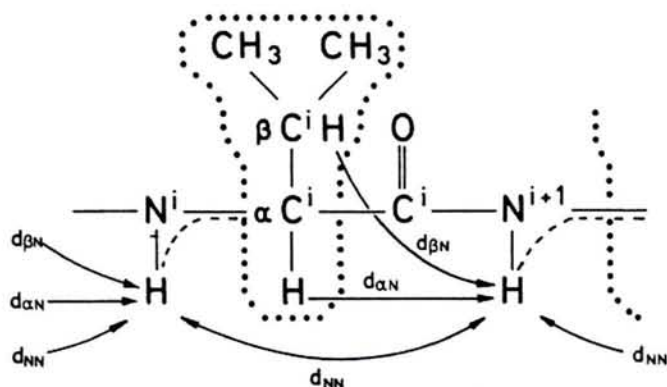


Figura 15. Frammento peptidico con indicazione dei sistemi di spin per i protoni dei singoli residui: α H-NH COSY (linea tratteggiata); NOE (freccia).

I valori dei *chemical shift* per i protoni del *backbone* peptidico e delle catene laterali dei diversi amminoacidi sono influenzati in modo significativo dal tipo di struttura secondaria assunta dalla molecola. Inoltre, il valore della costante di accoppiamento vicinale tra due protoni dipende dalla loro mutua orientazione (Figura 16). In particolare, la costante vicinale $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$ è correlata all'angolo di torsione ϕ mediante l'equazione: $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}} = 6.4 \cos^2 \theta - 1.4 \cos \theta + 1.9$, con $\theta = |\phi - 60^\circ|$

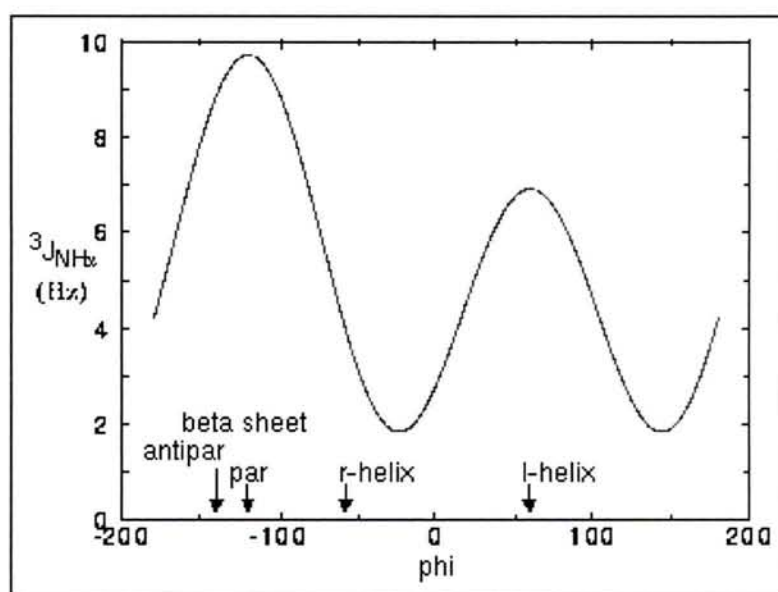


Figura 16. Curva di Karplus: correlazione tra la costante di accoppiamento vicinale $^3J_{\text{NH}-\alpha\text{CH}}$ e l'angolo ϕ .

Ad una determinata costante di accoppiamento possono corrispondere fino a 4 differenti valori per l'angolo ϕ . Tale ambiguità è comunque risolvibile considerando altri parametri del sistema in esame. Le costanti $^3J_{\alpha\text{CH}-\alpha\text{CH}}$ sono invece correlate all'angolo di torsione χ ed insieme alle intensità dei NOE intra-residuo tra i protoni NH, αCH e βCH consentono di assegnare in maniera stereospecifica i protoni β e β' . Ulteriori informazioni strutturali possono essere ricavate seguendo la variazione delle risonanze dei protoni ammidici con la temperatura. Riportando in grafico i valori dei *chemical shift* (δ) in funzione della temperatura T si ottiene una retta la cui pendenza $\Delta\delta/\Delta T$ è detto coefficiente di temperatura e dà un'indicazione dell'esposizione del protone al solvente.

Importante per il riconoscimento di strutture secondarie locali risulta essere l'effetto NOE (*Nuclear Overhauser Enhancement*) il quale consiste nella variazione dell'intensità di risonanza di un nucleo a causa della perturbazione per irradiazione delle transizioni di risonanza di un altro nucleo vicino al primo ($< 4\text{\AA}$). Quindi dall'analisi di questo effetto è possibile stimare le distanze internucleari della molecola in esame (Figura 17, 18, 19).

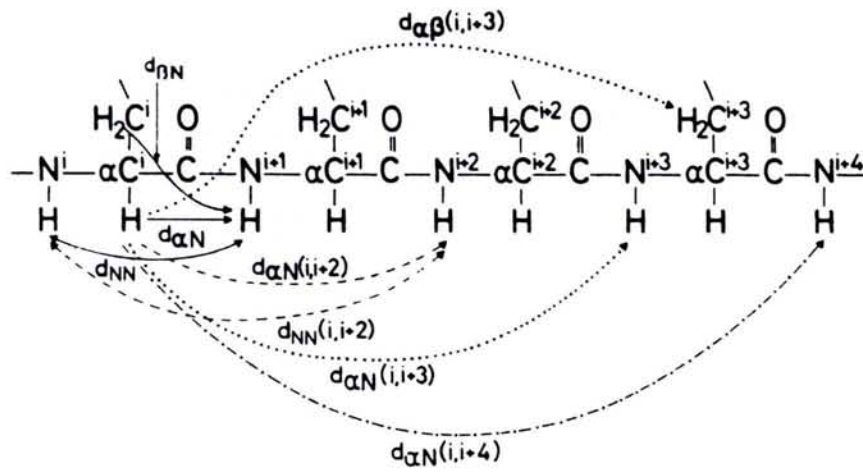


Figura 17. Distanze sequenziali e di media distanza in un polipeptide

	β, β_p	α -Helix	3_0 -Helix	Turn I	Turn II	Turn I'	Turn II'	Half-Turn
$d_{\alpha N(i,i+4)}$		=====	=====					
$d_{\alpha \beta(i,i+3)}$		=====	=====					
$d_{\alpha N(i,i+3)}$		=====	=====	-----		-----	-----	
$d_{NN(i,i+2)}$		=====	=====	-----	-----	-----	-----	
$d_{\alpha N(i,i+2)}$			=====	-----	-----	-----	-----	-----
d_{NN}	-----	=====	=====	-----	-----	-----	-----	-----
$d_{\alpha N}$	=====	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
$^3J_{\text{NH-}\alpha\text{CH}}$ (Hz)	9 9 9 9 9 1 2 3 4 5 6	4 4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6 7	4 4 4 4 4 4 1 2 3 4 5 6	4 9 1 2 3 4	4 5 1 2 3 4	7 5 1 2 3 4	7 9 1 2 3 4	4 9 1 2 3 4

Figura 18. Costanti di accoppiamento vicinale $^3J_{\text{NH-}\alpha\text{CH}}$ ed effetti NOE per le diverse strutture secondarie.

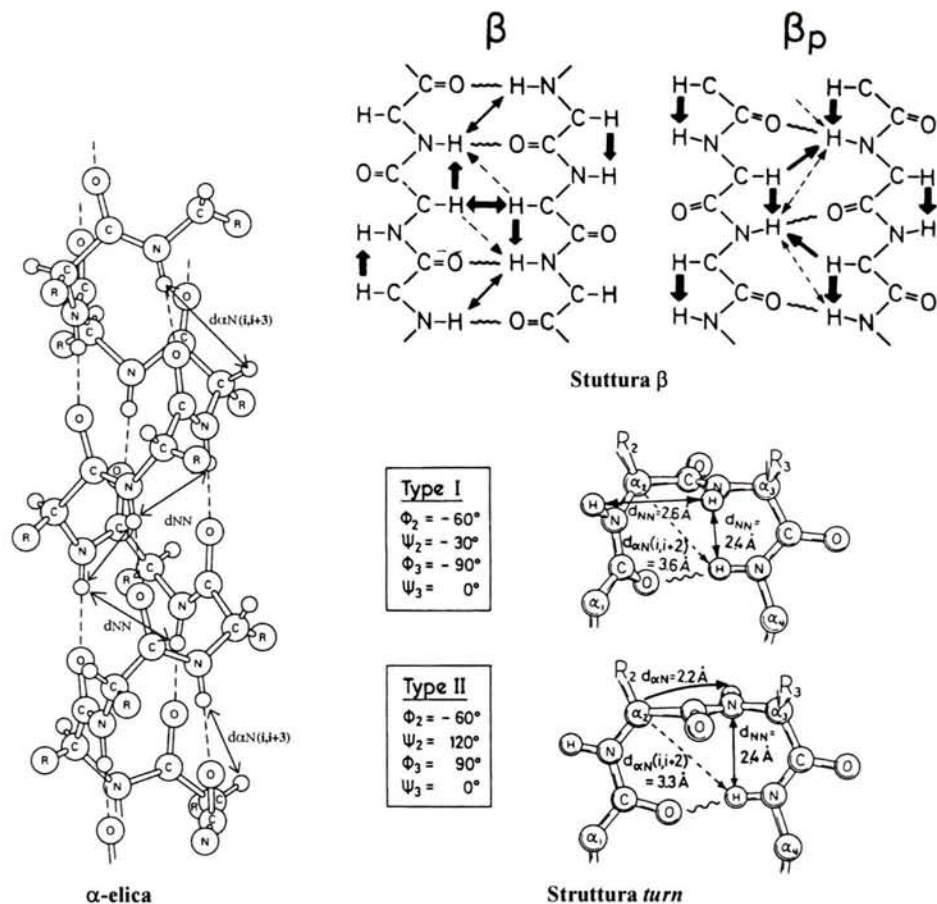


Figura 19. Rappresentazione di strutture secondarie e relative distanze ed angoli di connessione

Per una coppia di protoni i e j che interagiscono dipolarmente le intensità dei *cross peaks* osservabili in uno spettro NOESY variano in funzione del *mixing time* (t_m). Tale variazione descrive una funzione la pendenza iniziale è descritta come σ_{ij} che dipende dalla distanza internucleare r_{ij} secondo l'equazione :

$$\sigma_{ij} = \gamma^4 \hbar^2 / 10 r_{ij}^6 (\tau_{eff} - 6 \tau_{eff} / 1 + 4 \omega^2 \tau_{eff}^2)$$

con τ_{eff} = tempo di correlazione effettivo del vettore interproteico associato al sistema dei due nuclei considerati. Quindi, conoscendo una distanza di riferimento r_{kl} ed assumendo che i tempi di correlazione per i vettori delle coppie di protoni i - j e k - l siano gli stessi, è possibile determinare la distanza incognita r_{ij} in base alla relazione $r_{ij} / r_{kl} = (\sigma_{kl} / \sigma_{ij})^{1/6}$. Le distanze vengono poi utilizzate come vincoli sperimentali per la determinazione delle strutture mediante metodi computazionali.

Spettroscopia di Fluorescenza Il fenomeno della fluorescenza

La spettroscopia di luminescenza è tra le metodologie di ricerca più diffuse in biochimica, biofisica, e nell'analisi genetica. La luminescenza è l'emissione di luce da parte di una sostanza che si trova in uno stato elettronico eccitato. La luminescenza è divisa formalmente in due categorie, fluorescenza e fosforescenza, in dipendenza della natura dello stato eccitato. Negli stati eccitati di singoletto, come nel caso della fluorescenza, l'elettrone nell'orbitale eccitato ha lo spin opposto al secondo elettrone che si trova nell'orbitale dello stato fondamentale. Conseguentemente, il ritorno allo stato fondamentale è permesso ed avviene velocemente con emissione di un fotone (10 ns). Alla base del fenomeno della fosforescenza, invece, vi è l'emissione di luce da parte di un elettrone nello stato eccitato di tripletto, che ha lo stesso spin dell'elettrone dello stato fondamentale. La transizione è proibita e la velocità di emissione è bassa (da ms a s). I processi che avvengono tra l'assorbimento e l'emissione della luce sono normalmente illustrati da un diagramma di Jablonski riportato in Figura 20 dove sono descritti gli stati elettronici di singoletto di un fluoroforo, ed i livelli energetici vibrazionali (rispettivamente S_0 , S_1 , S_2 e 0, 1, 2, ecc.).

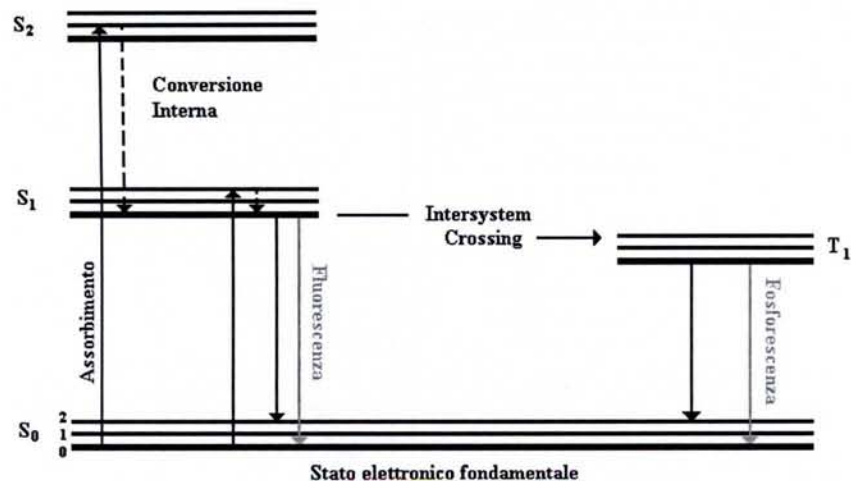


Figura 20. Diagramma delle transizioni elettroniche di Jabłoński. Assorbimento ed emissione di fluorescenza (S_1 - S_0) e fosforescenza (T_1 - S_0).

La differenza di energia tra lo stato fondamentale e lo stato eccitato è ampia tanto che il riscaldamento non è sufficiente a popolare lo stato S_1 e questa è la ragione per la quale si usa la luce per indurre il fenomeno della fluorescenza. Stokes notò che la fluorescenza appare a lunghezza d'onda maggiore della radiazione assorbita essendo l'energia di emissione inferiore a quella di assorbimento. Molecole nello stato S_1 possono avere una conversione di spin dallo stato di singoletto S_1 , allo stato di tripletto T_1 (*intersystem crossing*). L'emissione lenta dallo stato T_1 è detta fosforescenza ed avviene a lunghezze d'onda maggiori rispetto alla fluorescenza. Dopo assorbimento della luce normalmente gli elettroni passano dai livelli vibrazionali più alti a quelli più bassi, che essendo equispaziati rispetto ai primi generano uno spettro di emissione speculare a quello di assorbimento come riportato in Figura 21. Il processo di conversione interna avviene in 10^{-12} s e quindi prima che avvenga l'emissione. Ciò comporta, secondo la regola di Kasha [11], che lo spettro di emissione di una sostanza è generalmente indipendente dalla lunghezza d'onda di eccitazione. Inoltre, data la velocità di conversione interna per il principio di Franck-Condon tutte le transizioni elettroniche avvengono senza lo spostamento dei nuclei, e quindi se una particolare probabilità di transizione (fattore di Franck-Condon) tra due livelli vibrazionali di diversi stati elettronici è la più alta in assorbimento, la reciproca transizione è anche la più probabile in emissione (Figura 21 e 22).

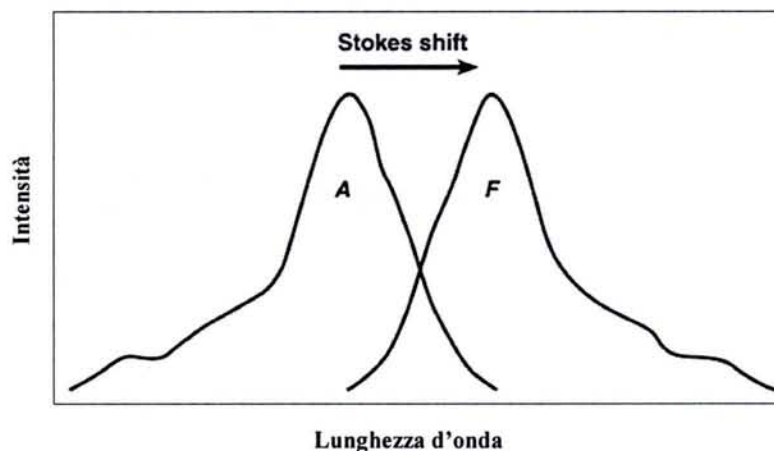


Figura 21. Shift di Stokes (A: spettro di assorbimento, F: spettro di emissione)

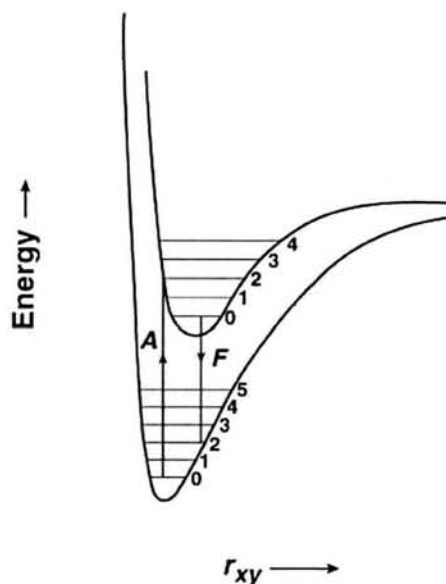


Figura 22. Rappresentazione del principio di Franck-Condon

Il tempo di vita dello stato eccitato e la resa quantica sono tra le caratteristiche più importanti di un fluoroforo. La resa quantica è il numero dei fotoni emessi rispetto al numero dei fotoni assorbiti. La durata dello stato eccitato determina, invece, il tempo a disposizione del fluoroforo per interagire o diffondere nel suo ambiente. Descritta come Γ la velocità di emissione di un fluoroforo, dallo stato eccitato S_1 allo stato fondamentale S_0 , e descritta con k_{nr} la velocità di decadimento senza emissione di radiazione elettromagnetica, la resa quantica Q è definita come $Q = \Gamma / (\Gamma + k_{nr})$ (Figura 23).

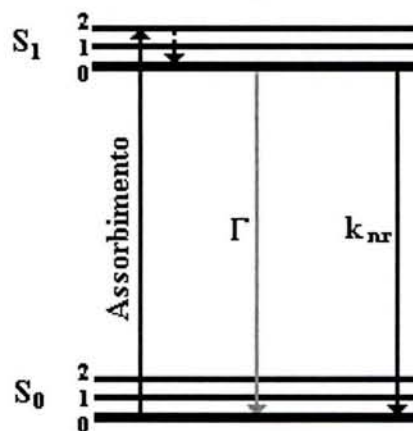


Figura 23. Diagramma di Jablonski semplificato (Γ : decadimento radiativo; k_{nr} : decadimento non radiativo)

Secondo il diagramma descritto in Figura 23 la durata dell'emissione del fluoroforo è $\tau = 1/(\Gamma + k_{nr})$ mentre in assenza di processi non radiativi si ha il cosiddetto tempo di vita intrinseco o naturale $\tau_n = 1/\Gamma$. In linea di principio τ_n può essere calcolato conoscendo il coefficiente di estinzione, lo spettro di assorbimento e di emissione del fluoroforo [12]. Inoltre τ_n può essere calcolato dalla misura di τ e della resa quantica secondo $\tau_n = \tau/Q$

Quenching della fluorescenza

L'intensità di fluorescenza può essere diminuita da un'ampia varietà di processi. Tale diminuzione è chiamata *quenching* ed avviene secondo diversi meccanismi. Il *quenching* collisionale avviene quando lo stato eccitato di un fluoroforo è inattivato dal contatto con un'altra molecola in soluzione ed è quindi dipendente dalla concentrazione del *quencher* (Figura 24) come descritto dall'equazione di

$$\text{Stern-Volmer: } F_0/F = 1 + K[Q] = 1 + k_q\tau_0[Q]$$

In questa equazione K è la costante di *quenching* di Stern-Volmer, k_q è la costante di *quenching* bimolecolare, τ_0 è la durata dello stato eccitato, e $[Q]$ è la concentrazione del *quencher*. Il meccanismo di *quenching* dipende dalla coppia fluoroforo-*quencher*, e comprende trasferimento di elettroni, accoppiamenti spin-orbita ed il passaggio allo stato di tripletto (intercrossing - system).

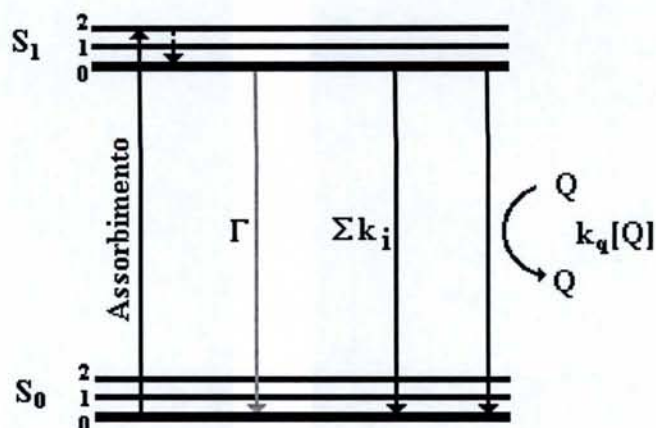


Figura 24. Diagramma di Jablonski (Q: quencher; Σk_i : altro decadimento non radiativo)

Il *quenching* può avvenire anche per formazione tra fluoroforo e *quencher* di un complesso non fluorescente. Questo processo è identificato come *quenching* statico poiché avviene nello stato fondamentale ed è indipendente dalla diffusione o dalla collisione molecolare. Inoltre il *quenching* può avvenire per altri meccanismi non molecolari, come l'attenuazione della luce incidente da parte dello stesso fluoroforo o da altre specie assorbenti.

Resonance energy transfer

Un altro processo importante che avviene nello stato eccitato è il *resonance energy transfer* (RET, o FRET). Questo processo avviene quando lo spettro di emissione di un fluoroforo, chiamato donatore, si sovrappone allo spettro di assorbimento di un'altra molecola, detta accettore (Figura 25) [13]. Non è necessario che l'accettore sia fluorescente. Il processo di RET non comporta l'emissione di luce da parte del donatore; ossia non è il risultato dell'emissione di luce dal donatore assorbita dall'accettore. Il donatore e l'accettore sono accoppiati da un'interazione dipolo-dipolo. Nel caso in cui l'accettore è fluorescente il trasferimento di energia da parte del donatore comporta un aumento della fluorescenza dell'accettore stesso.

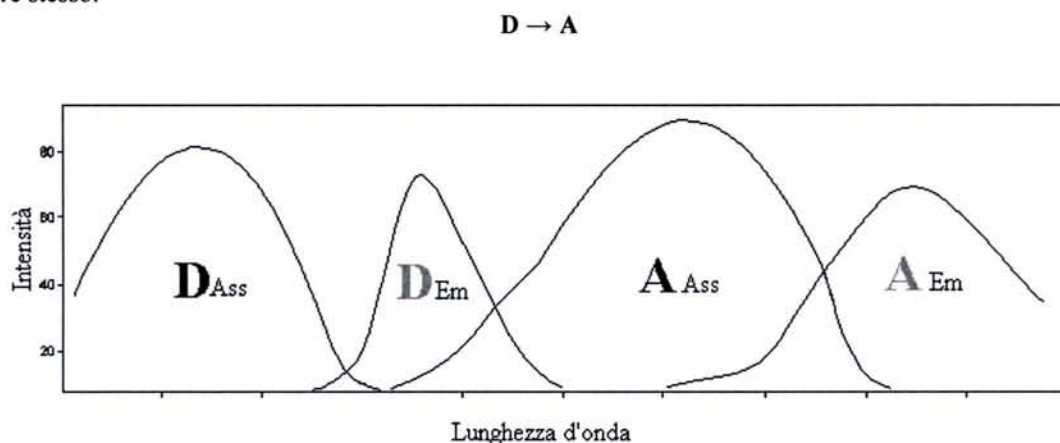
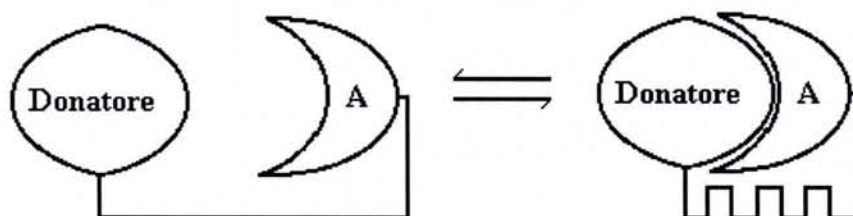


Figura 25. Trasferimento di energia (RET) dal donatore (D) all'accettore (A)

La quantità di energia trasferita dipende dalla distanza (r) tra il donatore (D) e l'accettore (A) e dipende dalla sovrapposizione degli spettri descritta in termini di distanza di Förster (R_0). La velocità di trasferimento di energia $k_T(r)$ è data dalla relazione: $k_T(r) = (R_0/r)^6 \cdot 1/\tau_D$

dove τ_D è la durata dello stato eccitato del donatore in assenza di trasferimento di energia. L'efficienza del trasferimento di energia per una singola coppia accettore-donatore ad una data distanza è descritta dalla relazione: $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$. Per la dipendenza del trasferimento dalla distanza, e dato che la distanza di Förster (R_0) è comparabile in grandezza con le macromolecole biologiche (15-60 Å) il trasferimento di energia può essere usato per misurare la distanza tra diversi siti nelle proteine [14] (Figura 26).



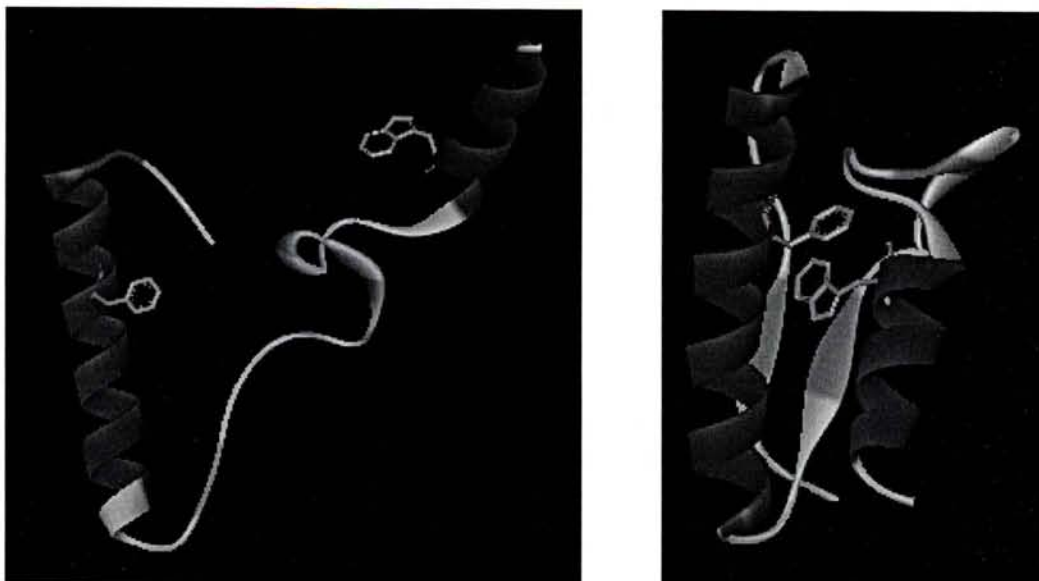


Figura 26. Trasferimento di energia (RET) da un residuo di Phe, donatore (D), al residuo di Trp, accettore (A), presenti in due siti di una macromolecola biologica

Fluorescenza nello stato stazionario e fluorescenza risolta nel tempo

Le misure di fluorescenza possono essere classificate in due tipi, quella relativa allo stato stazionario (*steady-state*) e quella risolta nel tempo (*time-resolved*). Il primo tipo è il più comune e la misura relativa stato stazionario è effettuata con illuminazione e rilevazione costanti e continue. Il secondo tipo di fluorescenza è invece usata per misurare il decadimento dell'intensità o dell'anisotropia del fluoroforo attraverso una luce pulsante con velocità maggiore del tempo di decadimento (ns). La fluorescenza dello stato stazionario è semplicemente una media della fluorescenza risolta nel tempo.

Fluorescenza delle proteine

È ben noto che i lipidi, le membrane, ed i saccaridi sono essenzialmente molecole non fluorescenti, e la fluorescenza intrinseca delle molecole di DNA è troppo debole per essere utilizzata per la caratterizzazione spettroscopica. Tra i biopolimeri, le proteine sono le uniche macromolecole a mostrare un'utile fluorescenza intrinseca. Di conseguenza la fluorescenza di questa classe di molecole ha un ruolo predominante nello studio biochimico in ragione della presenza di amminoacidi aromatici quali fenilalanina, tirosina e triptofano, che sono fluorescenti [15]. Una caratteristica favorevole delle proteine è che questi amminoacidi sono relativamente rari. Il triptofano, che è il maggiore fluoroforo intrinseco, rappresenta generalmente l'1% degli amminoacidi presenti in una proteina, il che facilita l'interpretazione dei dati spettroscopici ottenibili dalla stessa macromolecola. Caratteristica favorevole della fluorescenza del triptofano è la grande sensibilità dell'anello indolico al suo intorno chimico. Si possono quindi osservare cambiamenti nello spettro di emissione come conseguenza di transizioni conformazionali della proteina, associazione di subunità, legame del substrato, o denaturazione. Inoltre il triptofano è l'unico amminoacido sensibile al *quenching* collisionale, probabilmente per la tendenza dell'anello indolico di donare elettroni durante stato eccitato. Anche misure di anisotropia forniscono utili informazioni dato che i residui di tirosina e triptofano mostrano un'alta anisotropia, sensibile alla conformazione proteica, alla diffusione rotazionale della macromolecola biologica, e all'esistenza di movimenti di regioni della proteina durante il tempo di vita dello stato eccitato.

Proprietà spettrali degli amminoacidi aromatici

Gli spettri di assorbimento dei residui amminoacidici che contribuiscono alla fluorescenza nell'ultravioletto delle proteine: fenilalanina (Phe, F), tirosina (Tyr, Y), e triptofano (Trp, W) sono mostrati in Figura 27.

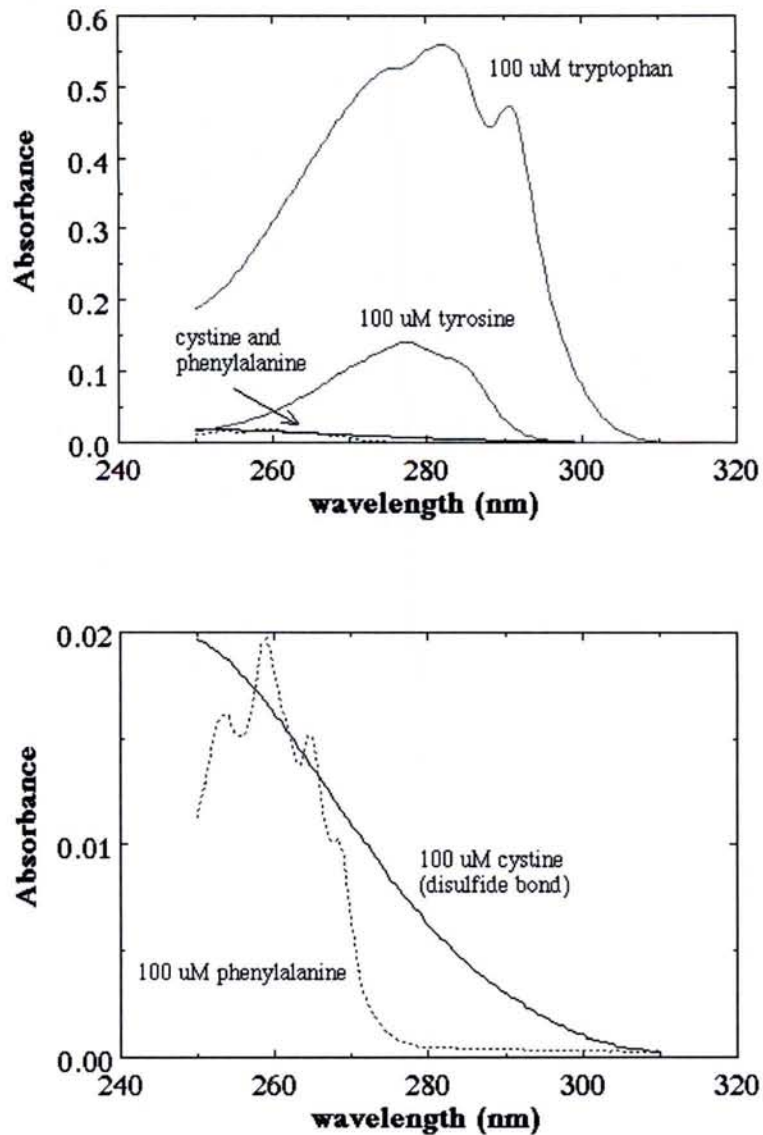
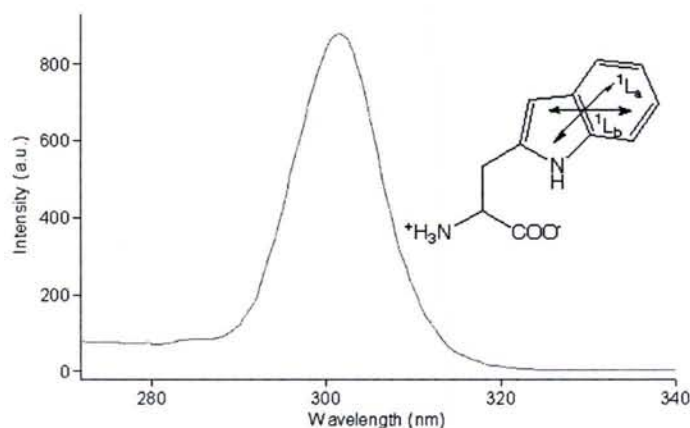


Figura 27. Spettri di assorbimento degli amminoacidi aromatici ed del ponte disolfurico formato dalle cisteine in soluzione acquosa

Triptofano

L'emissione delle proteine è dominata dal triptofano, il quale assorbe alla maggior lunghezza d'onda e mostra il più grande coefficiente di estinzione molare. Inoltre, in seguito all'assorbimento a valori elevati di lunghezza d'onda, l'energia assorbita dai residui di Phe e Tyr è spesso trasferita ai residui di Trp della stessa proteina. L'assorbimento delle proteine intorno a 280 nm è dovuta ai residui di Tyr e Trp le cui rese quantiche in soluzione acquosa neutra a 23 °C sono rispettivamente 0.14 e 0.13 [15, 16]. Il massimo di emissione del Trp in acqua si trova intorno ad una lunghezza d'onda di 350 nm ed è altamente dipendente dalla polarità e/o dall'intono locale e mostra un sostanziale *shift* spettrale quando l'azoto dell'anello indolico forma un legame idrogeno. La fluorescenza del triptofano può essere eccitata selettivamente tra lunghezze d'onda di 295nm e 305 nm (Figura 28).



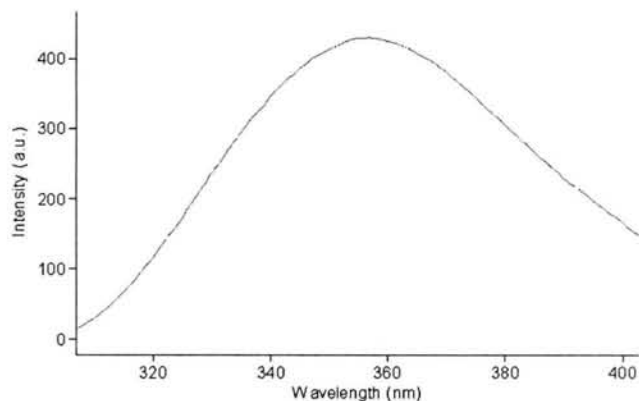


Figura 28. Spettri di assorbimento ed emissione del residuo di Trp in soluzione acquosa a pH 7.0
Fenilalanina

La Phe evidenzia la lunghezza d'onda più piccola sia in assorbimento che in emissione. Essa mostra un assorbimento strutturato con un massimo assoluto centrato a valori di λ di 258 nm, ed una emissione strutturata con un massimo assoluto intorno a valori di λ di 282 nm (Figura 29 e 30). La resa quantica della Phe è bassa, circa 0.03 a 20 °C [15, 16] e diminuisce all'aumentare della temperatura [17]. Cosicché l'emissione dei residui di fenilalanina nelle proteine viene osservata raramente. Come il benzene, la fenilalanina mostra in soluzione acquosa una debole e non strutturata emissione dovuta alla formazione di un eccimero con massimo intorno a λ 320 nm anche se tale emissione non è stata mai osservata per residui di una proteina.

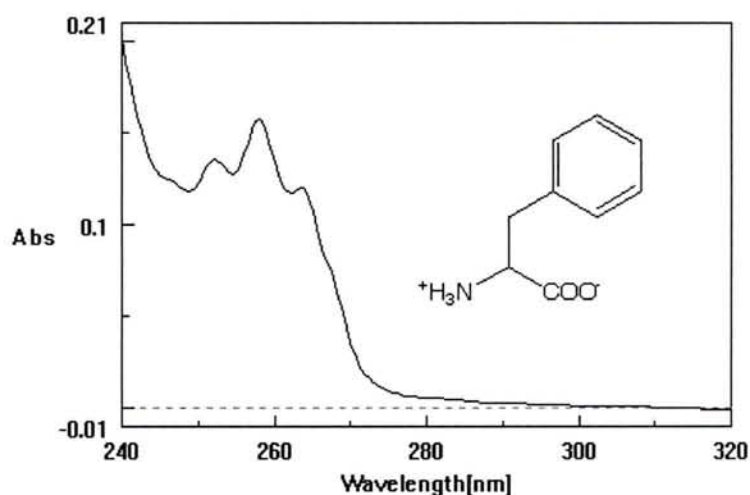


Figura 29. Spettri di assorbimento del residuo di Phe in soluzione acquosa a pH 7.0

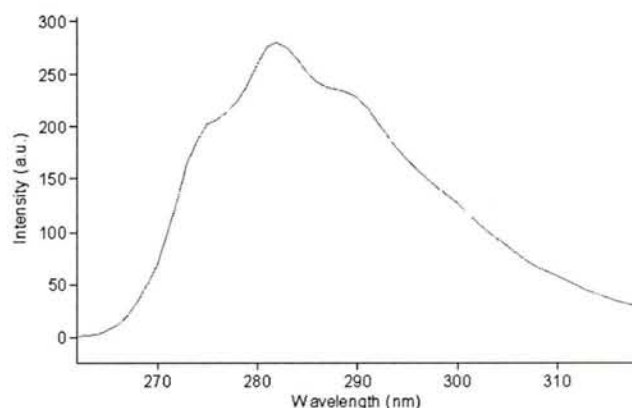


Figura 30. Spettro di emissione del residuo di Phe in soluzione acquosa a pH 7.0
Tirosina

L'emissione della Tyr in acqua avviene a $\lambda = 303$ nm ed è relativamente insensibile alla polarità del solvente (Figura 31). Esso è un fluoroforo piuttosto semplice. Comunque, mostra proprietà spettrali complesse quando si ha la ionizzazione dello stato eccitato per la perdita del protone ossidrilico. Nello stato fondamentale il pK_a dell'ossidrilico della tirosina è circa 10, mentre nello stato eccitato il pK_a si abbassa fino a 4. Conseguentemente, nello stato eccitato il gruppo ossidrilico può dissociarsi portando al *quenching* della fluorescenza dell'amminoacido. La formazione dell'anione tirosinato nello stato

eccitato è favorita dalla generazione di un complesso a pH neutro nello stato fondamentale ad esempio tra la tirosina ed il K_2HPO_4 [18]. Esso è debolmente fluorescente a 350 nm, e la sua emissione osservabile in qualche proteina, può essere erroneamente scambiata per la fluorescenza del Trp (Figura 28). La formazione dell'anione tirosinato può avvenire anche nello stato fondamentale a pH basico, oppure a pH neutro in presenza, per esempio, di un tampone acetato [19].

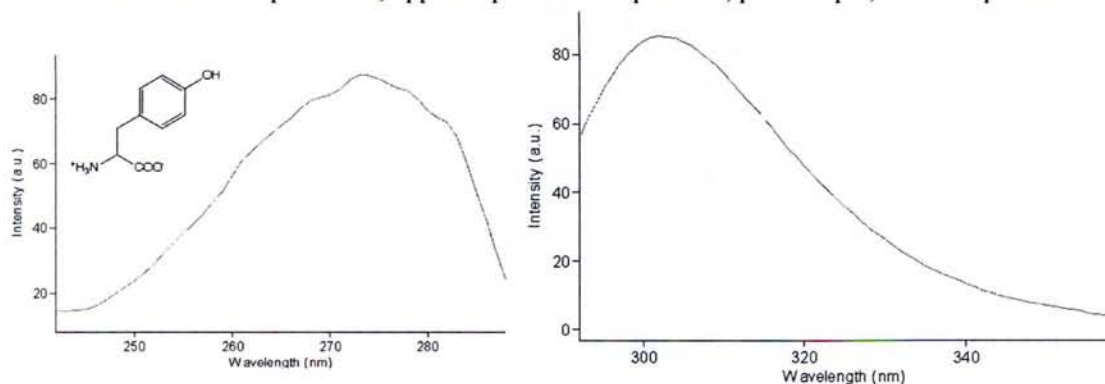


Figura 31. Spettri di assorbimento ed emissione del residuo di Tyr in soluzione acquosa a pH 7.0

Trasferimento di energia nelle proteine

Il trasferimento di energia, definito come RET, tra gli aminoacidi aromatici di una proteina è possibile grazie in seguito alla sovrapposizione degli spettri di emissione ed assorbimento di Phe, Tyr e Trp i cui valori tipici della distanza di Förster (R_0) per il trasferimento di energia sono riportati in Tabella 1. Per ogni coppia donatore-accettore, la distanza R_0 dipenderà dalla resa quantica e dallo spettro di emissione del donatore. Tale valore può cambiare molto per uno stesso residuo in diversi intorni proteici ed è questo il motivo per cui l'omotrasferimento Trp-Trp mostra la maggiore variabilità. Come per il *quenching*, anche il trasferimento di energia può essere utilizzata per verificare l'interazione di un ligando con una proteina [20].

Donatore	Accettore	R_0 (Å)	Riferimenti
Phe	Tyr	11.5-13.5	69-71
Tyr	Tyr	9-16	8, 9, 121
Tyr	Trp	9-18	8, 67, 71-75
Trp	Trp	4-16	8, 64, 76, 154

Tabella 1. Distanze Förster (R_0) per il RET nelle proteine

Trasferimento di energia da Tirosina a Triptofano

Il trasferimento di energia più comunemente osservato nelle proteine è dalla Tyr al Trp. Ciò perché la maggior parte delle proteine contiene entrambi gli aminoacidi, ed entrambi sono eccitati a $\lambda=275$ nm. Un tipico esempio di tale RET è l'interferone- γ umano la cui emissione, ed attività antivirale, dipende dall'autoassociazione in dimeri. Ogni monomero contiene un residuo di Trp e quattro residui di Tyr. Il contributo all'emissione delle Tyr è più alto nella forma monomericamente della proteina che nella forma attiva perché le Tyr si trovano più distanti dagli accettori Trp. Ciò dimostra che il trasferimento di energia Tyr-Trp è dipendente dalla associazione proteica (Figura 32)

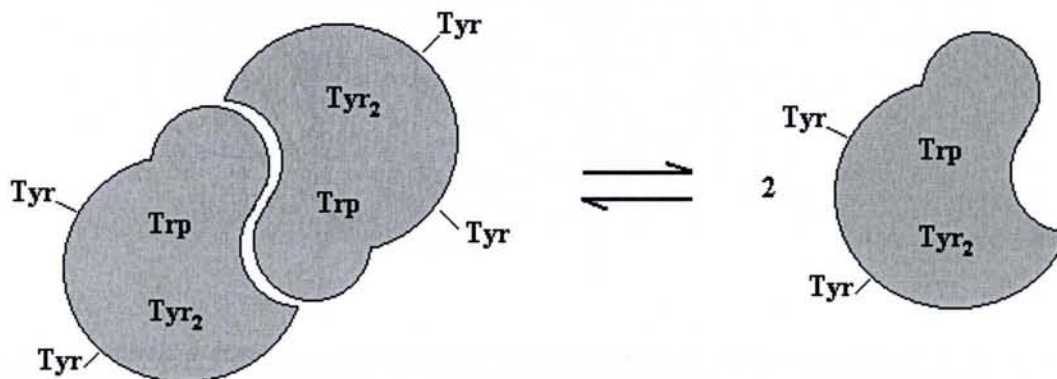


Figura 32. Schema di autoassociazione dei monomeri di interferone- γ e trasferimento di energia, nel monomero e nel dimer, dai residui di Tyr ai residui di Trp.

Trasferimento di energia da Fenilalanina a Tirosina

Il trasferimento di energia da Phe a Tyr è possibile ed è stato osservato, per esempio, in una proteina tetramerica che protegge il DNA dalla degradazione termica, nota come HTa [21] con cinque residui di Phe e uno di Tyr in ogni monomero (Figura 33). Lo spettro di emissione di questa proteina quando eccitata a $\lambda=252$ nm è simile a quello di una Tyr con un massimo intorno a $\lambda=300$ nm la cui intensità, grazie al trasferimento di energia da parte dei residui di Phe, è più alta di una soluzione contenente uguali concentrazioni di amminoacidi.

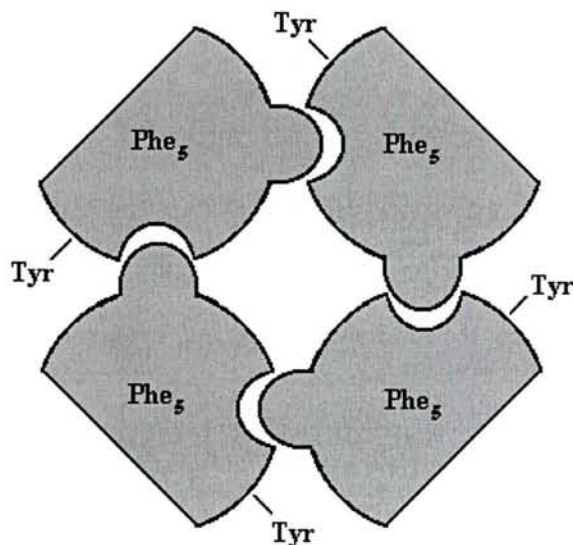


Figura 33. Schema di autoassociazione della proteina tetramerica Hta e trasferimento di energia dai residui di Phe ai residui di Tyr.

Spettroscopia di Dicroismo Circolare

Il fenomeno del dicroismo circolare è molto sensibile alla struttura secondaria dei polipeptidi e proteine. La spettroscopia di dicroismo circolare (CD) è una forma di spettroscopia che misura la differenza in assorbanza della radiazione circolarmente polarizzata a destra e sinistra da parte di una sostanza. Gli spettri compresi in un intervallo di lunghezze d'onda tra 260nm e 180 nm sono utili per analizzare le diverse tipologie di struttura secondaria: α -elica, foglietti β , *turn*, ed altro.

Principi fisici del CD

I cromofori asimmetrici o i cromofori simmetrici in ambienti asimmetrici interagiscono diversamente con le componenti circolarmente polarizzate a destra o a sinistra della radiazione elettromagnetica polarizzata nel piano. La luce piano polarizzata attraversa un mezzo otticamente attivo con diverse velocità nelle sue componenti a causa dei differenti indici di rifrazione rispetto alla radiazione. Quando questi componenti sono ricombinati, essi appaiono come radiazione ellitticamente polarizzata, e l'ellitticità, riportata in Figura 34, è definita come θ .

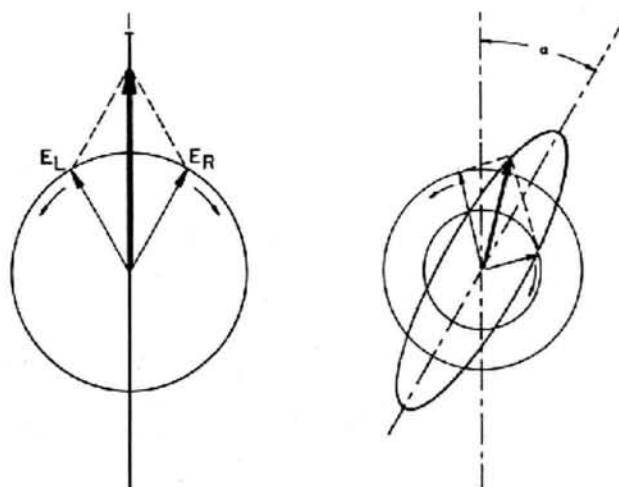


Figura 34. Sovrapposizione delle radiazioni circolarmente polarizzate a destra e sinistra di uguale ampiezza e fase. Il differente assorbimento delle due componenti della radiazione da parte di mezzo chirale genera l'ellitticità descritta come θ .

Optical Rotary Dispersion e Dicroismo Circolare

L'*Optical Rotary Dispersion* (ORD) è l'ellitticità che risulta dall'assorbimento di radiazione linearmente polarizzata da parte di cromofori chirali. La dispersione ottica rotatoria è stata sostituita dalla spettroscopia di dicroismo circolare (CD) che utilizza una radiazione circolarmente polarizzata. Tale radiazione si ottiene facendo attraversare la radiazione piano polarizzata attraverso una superficie birifrangente che la separa in due raggi piano polarizzati oscillanti lungo due differenti assi con diverse lunghezze d'onda. Quando i due raggi sono fuori fase di 90° allora sono uniti, il risultato è l'ottenimento della radiazione circolarmente polarizzata in una direzione. Invertendo i due assi in modo che l'altro raggio sia in ritardo si genera la radiazione circolarmente polarizzata nell'altra direzione. Il risultato dell'addizione delle radiazioni circolarmente polarizzate a destra e a sinistra che attraversano un campione otticamente attivo è una radiazione ellitticamente polarizzata.

CD dei peptidi

Per peptidi e proteine l'assorbimento UV è dovuto essenzialmente ai legami peptidici (cromofori simmetrici) e alle catene laterali. Le transizioni elettroniche osservabili nel lontano UV sono $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$. La transizione $n \rightarrow \pi^*$ coinvolge gli elettroni di non-legame dell'ossigeno del gruppo carbonile, mentre la transizione $\pi \rightarrow \pi^*$ coinvolge gli elettroni π del gruppo carbonile. L'intensità e l'energia di queste transizioni dipende dagli angoli del legame peptidico, come riportato in Figura 35, e quindi dalla struttura secondaria assunta dalla molecola. Le catene laterali aromatiche di Phe, Tyr e Trp, e il ponte disolfurico intrinsecamente asimmetrico, presentano, invece, bande di assorbimento nel vicino UV. Per una struttura essenzialmente non organizzata e definita come *random coil* si osserva una banda negativa intorno ad una lunghezza d'onda di 195 nm ($n \rightarrow \pi^*$) ed una banda positiva a λ pari a 212 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$). Per un'astruttura a foglietto β si osservano una banda di assorbimento negativa a λ pari a circa 218 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) ed una banda positiva intorno a 196 nm ($n \rightarrow \pi^*$). Infine, caratteristiche per un' α -elica sono la banda di assorbimento positivo intorno a 192 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$), e due bande di assorbimento negative a 209 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$) e 222 nm ($n \rightarrow \pi^*$) (Figura 36).

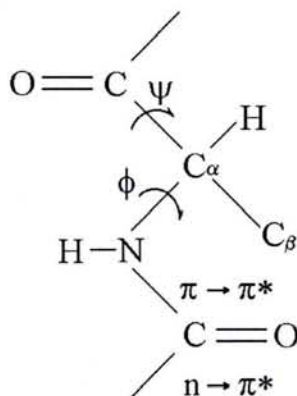


Figura 35. Rappresentazione del legame peptidico. Sono evidenziati gli angoli di rotazione ψ e ϕ rispettivamente tra il gruppo carbonile ed il C α , e tra il C α e l'NH. Inoltre, sono descritte le transizioni elettroniche $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$.

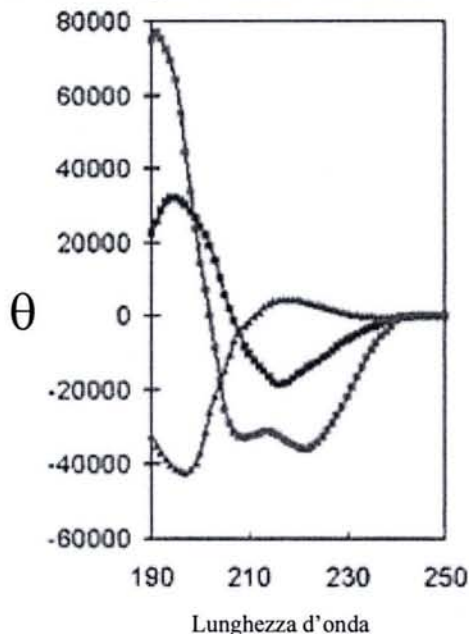


Figura 36. Rappresentazione di tipici spettri di struttura α -elica (rosso), β -sheet (blu), e *random coil* (viola) riportati come ellitticità molare (θ) in funzione della lunghezza d'onda (nm).

Misura dell'ellitticità

L'ellitticità espressa in radianti è descritta dalla seguente equazione in cui compaiono i termini A_L ed A_R che rappresentano l'assorbimento delle due componenti destra (R) e sinistra (L) della radiazione circolarmente polarizzata:

$$\theta_r = 2.303/4 * (A_L - A_R)$$

Equivalentemente l'ellitticità è espressa in gradi dalla seguente equazione:

$$\theta_d = 2.303/4 * (A_L - A_R) * 180/\pi$$

Per poter comparare i valori di ellitticità di diversi esperimenti è necessario convertirli in un valore normalizzato. L'unità più comunemente usata nei lavori sui peptidi e proteine è l'ellitticità molare media per residuo. Tale grandezza tiene conto della lunghezza del cammino ottico l , della concentrazione c , del peso molecolare M , e del numero di residui n_r ed è espressa in gradi*cm²/decimoli*residuo.

$$\theta_{mr} = \theta_d * M/l * c * n_r \equiv \theta_d/10 \text{ [deg*cm}^2\text{/dmol*residuo]}$$

Bibliografia III

- [1] Harrison S.C., A point-focusing camera for single-crystal diffraction *Appl. Crystallog.* 1968, **1**:84-90
- [2] Arndt U.W., The optimum strategy in measuring structure factors *Acta Crystallog.* 1968, **B24**, 1355-1357
- [3] Drenth J., Principles of Protein X-Ray Crystallography 1994 (Cantor C.R., Ed.), ppg 341. Springer-Verlag, N.Y.
- [4] Matthews, B.W. Determination of molecular weight from protein crystals *J. Mol. Biol.* **82**:513-526
- [5] Jancarik J., Rim S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *Appl. Crystall.* 1991, **24**:409-411
- [6] Wlodawer A., Hodgson K.O. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1975, **72**:398
- [7] Rossmann M.G., Blow D.L. The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallog.* 1962, **15**:24-31
- [8] Brunger A.T., Adams P.D., Clore G.M., De Lano W.L., Gros P., Grosse-Kunstleve R.W., Jiang J.S., Kuszewski J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G.L. *Crystallography & NMR System: A New Software Suite for Macromolecular Structure Determination Acta Crystallog.* 1998, **D54**:905-921
- [9] Brunger A.T., Kutiyan J., Kaplus M., *Science* 1987, **299**:458-460
- [10] Brunger A.T., Kaplus M., Petsko G.A. Crystallographic refinement by simulated annealing: application to crambin *Acta Crystallog.* 1989 **A45**:50-61
- [11] Kasha M., Characterization of electronic transitions in complex molecules, *Disc. Faraday Soc.* 1950, **9**:14-19
- [12] Stickler S.L., and Berg R.A. Relationship between absorption intensity and fluorescence lifetime of molecules. *J.Chem.Phys.* 1962, **37**:814-822
- [13] Förster T. Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys. (Leipzig).* 1948, **2**:55-75
- [14] Stryer L., Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler *Annu.Rev. Biochem.* 1978, **47**:819-846
- [15] Permyakov E.A. Luminescent Spectroscopy of Proteins. *CFC Press.* 1993, Inc. Florida, USA
- [16] Chen R.F. Fluorescence quantum yields of tryptophan and tyrosine. *Anal. Lett.* 1967, **1**(1):35-42
- [17] Leroy E., Larmi H., and Laustriat G., Fluorescence lifetime and quantum yield of phenylalanine aqueous solutions. Temperature and concentration effects, *Photochem. Photobiol.* 1971, **13**:411-421
- [18] Shimizu O., and Imakuvo K. New emission band of tyrosine induced by interaction with phosphate ion, *Photochem. Photobiol.* 1977, **26**:541-543
- [19] Rayner D. M., Krajcarski D.T., and Szabo A. G. Excited-state acid-base equilibrium of tyrosine, *Can. J. Chem.* 1978, **56**:1238-1245
- [20] Anderson S. R., and Weber G. Multiplicity of binding by lactate dehydrogenase, *Biochemistry* 1965, **4**:1948-1957
- [21] Searcy D. G., Montenay-Garestier T., and Helene C. Phenylalanine-to-tyrosine singlet energy transfer in the archaeobacterial histo-like protein Hta, *Biochemistry* 1989, **28**:9058-9065

Appendice II

Elenco dei lavori pubblicati

1. Palladino P., Pedone C., Ragone R., Rossi F., Saviano M., Benedetti E. A simplified model of the binding interaction between stromal cell-derived factor-1 chemokine and CXCR4 chemokine receptor 4. *Protein and Peptide Letters* 2003, **10**, 2:133-138
2. Formaggio F., Crisma M., Toniolo C., Broxterman Q.B., Kaptein B., Corbier C., Saviano M., Palladino P., and Benedetti E. C^α-Methyl, C^α-*n*-Propylglycine Homo-oligomers. *Macromolecules* 2003, **36**:8164-8170
3. Rossi F., Zanotti G., Saviano M., Iacovino R., Palladino P., Saviano G., Amodeo P., Tancredi T., Laccetti P., Corbier C., and Benedetti E. New Antitumour Cyclic Astin Analogues: Synthesis, Conformation and Bioactivity. *Journal of Peptide Science* 2003, (in press).
4. Ruvo M., Rossi F., Palladino P., Benedetti E., and Pedone C. Synthesis of "difficult sequences" of highly aggregating peptides. *Peptide* 2002, Edizioni Ziino, Napoli Italy, 270-271
5. Palladino P., Benedetti E., Pedone C., Ragone R., Rossi F., and Saviano M. Conformational and sequence requirements for interaction between the chemokine SDF-1 and the CXCR4 receptor. *Peptide* 2002, Edizioni Ziino, Napoli Italy, 394-395
6. Rossi F., Zanotti G., Saviano M., Iacovino R., Palladino P., Saviano G., Amodeo P., Tancredi T., Spalletti D., Laccetti P., and Benedetti E. *Peptide* 2002, Edizioni Ziino, Napoli Italy, 868-869

Monsieur PALLADINO Pasquale

DOCTORAT de l'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1
en SCIENCES CHIMIQUES

VU, APPROUVÉ ET PERMIS D'IMPRIMER N° 916

Nancy, le 03 mars 2004

Le Président de l'Université



Résumé

Les études que j'ai menées durant mon doctorat, sous la cotutelle des universités française et italienne, traitent des relations structure-activité responsables de la fonction de deux systèmes protéiques distincts. Les recherches effectuées au laboratoire du Centre Interuniversitaire sur les Peptides Bioactifs (CIRPeB) de l'Université ÊFederico II de Naples, sous la direction du Professeur Carlo Pedone, concernent une classe de molécules connue sous le nom de chémokine. Notre attention s'est en particulier focalisée sur l'étude structurale de l'interaction du récepteur avec la chémokine SDF-1, en étudiant la spécificité et la correspondance biunivoque de cette interaction. Dans le cas du récepteur CXCR4 impliqué dans des pathologies telles que le cancer, le sida ou les allergies, il est nécessaire d'identifier les régions protéiques responsables de l'interaction efficace et sélective entre la chémokine SDF-1 et CXCR4. Aujourd'hui, on remarque une absence de données structurales concernant le récepteur CXCR4, en solution ou à l'état solide, contrairement à la chémokine SDF-1 qui a été caractérisée aussi bien en solution que par des techniques de RMN ou à l'état cristallin.

Sur la base des nombreuses données de la littérature et surtout des résultats obtenus à travers des méthodes de mutagenèse dirigée, nous avons décidé d'étudier le système récepteur-ligand à travers des analogues peptidiques synthétiques de la région N-terminale du récepteur CXCR4 et de la chémokine SDF-1 judicieusement choisis.

Dans ce but, nous avons utilisé un modèle simplifié du système protéique à étudier. Malgré cette simplification, des résultats intéressants ont été obtenus.

Les peptides synthétisés ont été testés à travers des mesures d'activité biologique et par des études spectroscopiques de dichroïsme circulaire, de fluorescence et de spectrométrie RMN, pour comprendre les bases structurales de l'interaction spécifique entre les régions N-terminales des deux protéines. Parallèlement, des essais de cristallisation de peptides analogues de la chémokine SDF-1 ont été menés en présence de peptides dérivant du récepteur CXCR4.

Le travail de recherche développé à la Faculté des Sciences de l'Université Henri Poincaré de Nancy 1 (France), dans l'équipe de Biocristallographie dirigée par le Dr. André Aubry au LCM3B concernait l'étude cristallographique de protéines d'origine végétale impliquées dans la défense des cellules contre le stress oxydant produit par la présence d'espèces réactives d'oxygénés (ERO) et nitrées (ERN). Nous avons déterminé la structure moléculaire de la protéine chloroplastique de type MsrA appartenant à une classe d'enzymes connues sous le nom de peptide méthionine sulfoxyde réductases (PMSR) qui catalysent la réduction des résidus méthionine sulfoxydes, en méthionine. Les données structurales obtenues pour la MsrA de peuplier représentent à ce jour la première et unique structure cristallographique déterminée pour une MsrA d'origine végétale. Le mécanisme catalytique de cette protéine a été établi à travers l'analyse structurale et, surtout, à travers des études de mutagenèse dirigée. Des essais de cristallisation d'une seconde protéine végétale et de ses mutants, la peroxydorédoxine chloroplastique de peuplier (PrxQ) qui catalyse la réduction de plusieurs peroxydes, ont fourni des cristaux non adaptés à la diffraction des rayons X.

Mots clés

SDF-1; CXCR4; chémokine; peptides; dichroïsme circulaire; fluorescence; RMN; MsrA; méthionine sulfoxyde; PrxQ; peroxydorédoxine; rayons X