

# Chimica, Nmr e biologia strutturale

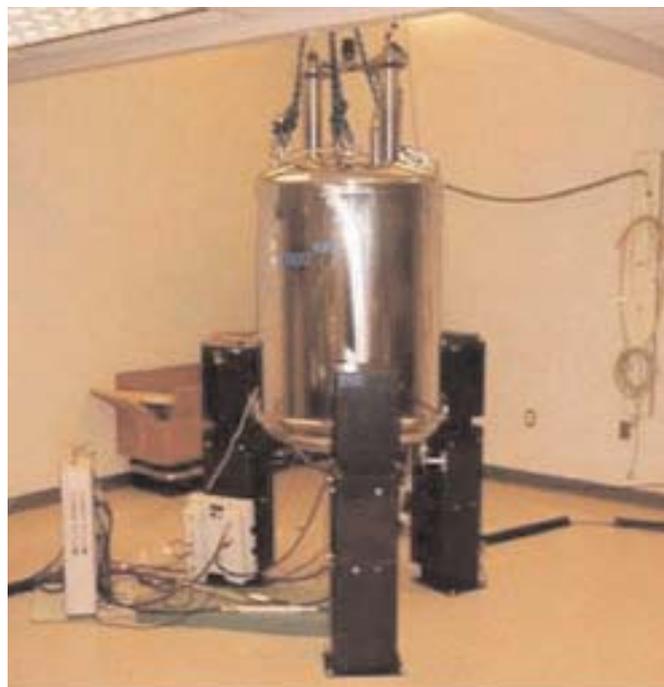
di Gian Maria Bonora, Roberto Fattorusso, Henriette Molinari

La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare rappresenta per i chimici il metodo di elezione per la determinazione delle strutture tridimensionali di proteine ed acidi nucleici. Spesso i complessi o le proteine parzialmente strutturate sono difficili da cristallizzare e l'Nmr è l'unica metodologia disponibile per il loro studio. Affiancando dati su interazioni intermolecolari alla determinazione delle strutture proteiche è possibile immaginare future strategie per la scoperta di nuove funzioni genetiche ancora sconosciute.

**T**ra le conclusioni che è stato possibile trarre sulla base di quanto visto e sentito al recente Congresso della Società Chimica Italiana tenutosi a Torino lo scorso giugno un particolare accenno va rivolto alle tecniche di determinazione strutturale delle molecole di importanza biologica.

Non occorre sottolineare come, per tutti i chimici, l'Nmr rappresenti la tecnica di elezione per poter indagare in ogni dettaglio sia l'andamento di una sintesi, sia la purezza e l'identità dei prodotti ottenuti. In questo senso si può dire che la risonanza magnetica, pur nata dai fisici, sia alla fine stata compiutamente esplorata, sviluppata ed applicata proprio dai chimici. Per quanto riguarda poi i sistemi biologici e il loro studio, il suo impiego è risultato fondamentale nella comprensione e nella determinazione dei meccanismi molecolari che sono alla base di ogni sistema vivente. Durante i lavori della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici è stato pertanto dato ampio risalto all'importanza della spettroscopia di risonanza magnetica nucleare tra i metodi disponibili per la determinazione delle strutture tridimensionali di proteine ed acidi nucleici, in quanto è l'unica che permette lo studio di queste macromolecole in soluzione. Se si pensa che i fluidi del corpo, come ad esempio il sangue, i liquidi gastrici e la saliva, altro non sono che soluzioni proteiche dove queste molecole svolgono la loro funzione biologica, è chiaro che la conoscenza della struttura in soluzione è parecchio importante. Negli esperimenti Nmr, le condizioni della soluzione quali temperatura, pH e forza ionica possono essere variate in modo da simulare un dato fluido biologico. Inoltre le soluzioni possono essere deliberatamente portate in condizioni estreme, non biologiche, per esempio per studiare fenomeni come la denaturazione. Le applicazioni dell'Nmr includono, oltre alla determinazione strutturale, lo studio delle proprietà dinamiche delle molecole in soluzione così come lo studio della termodinamica e della cinetica dell'interazione tra proteine ed altre componenti della soluzione, che possono essere sia macromolecole sia leganti di basso peso molecolare.

G.M. Bonora, Università di Trieste; Roberto Fattorusso, Seconda Università di Napoli; Henriette Molinari, Università di Verona - Direttivo della Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della Sci. bonora@dsch.univ.trieste.it



Spettrometro Nmr a 750 MHz

## Ruolo strutturale dell'Nmr

Spesso i complessi o le proteine parzialmente strutturate sono difficili da cristallizzare e l'Nmr è l'unica metodologia disponibile per il loro studio. Mentre i protocolli standard per la determinazione strutturale mediante Nmr forniscono un'immagine statica, vi sono tutta una serie di altri esperimenti Nmr che forniscono informazioni sulle frequenze dei moti nella scala di tempi che va dai millisecondi ai nanosecondi. Quando si parla di Nmr in biologia strutturale, va ricordato che il protocollo per la determinazione strutturale comprende la preparazione di una soluzione proteica omogenea, l'acquisizione, l'analisi e l'interpretazione dei dati Nmr ottenuti. Nuovi approcci allo studio strutturale sono stati introdotti grazie ai metodi di produzione di proteine ricombinanti marcate con isotopi stabili, in particolare carbonio-13, azoto-15 e deuterio, aprendo così la strada a nuovi esperimenti eteronucleari tridimensionali in tripla risonanza. Anche le metodologie di calcolo strutturale sono migliorate notevolmente e, tanto per citare un esempio, il tempo richiesto per la determinazione strutturale di una piccola proteina è stato ridotto da 24 ore, nel 1984, a pochi secondi, oggi-giorno. Attualmente si registra un notevole sforzo di ricerca nel campo dell'automazione per l'interpretazione dei dati Nmr.

Tipicamente la rappresentazione statica di una molecola proteica ottenuta con un protocollo Nmr standard mostra una precisione variabile lungo la catena polipeptidica, come manifestato dalla variazione delle coordinate della famiglia di conformeri che rappresenta la struttura Nmr. Un aumentato disordine è spesso osservato, nelle proteine, verso la periferia delle catene laterali superficiali. Questo pronunciato disordine superficiale, che tipicamente coinvolge anche le regioni terminali della catena polipeptidica, è in parecchi casi l'unica differenza osservata

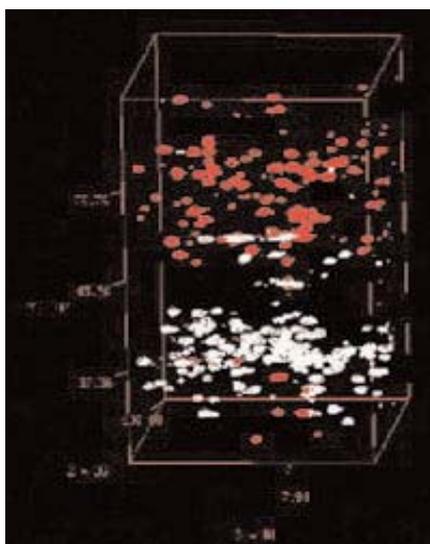
rispetto alle strutture di proteine globulari in cristallo singolo. L'aumentato disordine superficiale è in parte dovuto alla mancanza di vincoli strutturali, rispetto a quelli presenti nel core della proteina, e quindi a una scarsità di effetti Noe, che rappresentano i vincoli sperimentali sulle distanze. Misure di rilassamento permettono di distinguere tra il disordine statico, realisticamente dovuto alla mancanza di sufficienti vincoli, e il disordine dinamico, caratterizzato da moti intramolecolari che avvengono nella scala dei tempi dei nanosecondi o sub-nanosecondi. Globalmente, indipendentemente da considerazioni di carattere dinamico, l'osservazione di molecole parzialmente strutturate in soluzione, è un'informazione importante, complementare ai dati ottenibili tramite cristallografia. Un'importante estensione della caratterizzazione delle

proteine in soluzione è legata agli studi in alta risoluzione dell'idratazione proteica. La localizzazione delle acque di idratazione è determinata dall'osservazione di Noe tra i protoni dell'acqua e gli atomi di idrogeno della catena polipeptidica. A causa della dipendenza del Noe dall'inverso della sesta potenza delle distanze interprotoniche, solo il primo strato di acque di idratazione può essere osservato. Per gli studi di idratazione, la dipendenza dell'intensità dei Noe dalla funzione di correlazione che descrive la modulazione stocastica dell'accoppiamento dipolo-dipolo tra protoni interagenti ha un ruolo chiave. È possibile stabilire che la superficie di idratazione di peptidi e proteine è caratterizzata da tempi di residenza molto brevi delle molecole di acqua nei siti di idratazione, in un intervallo di 20-300 picosecondi a 10 °C. I dati di idratazione, accoppiati a misure di dinamica forniscono un'accurata descrizione della struttura e dei processi dinamici in cui sono coinvolte le proteine.

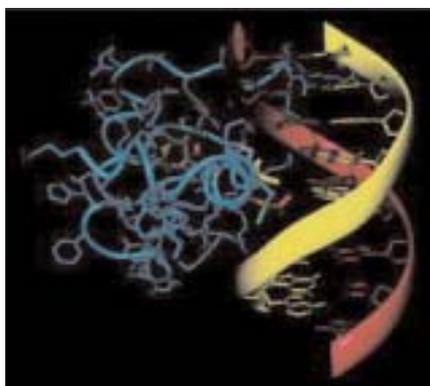
## Sviluppi recenti e futuri

Con la disponibilità di un crescente numero di genomi completamente sequenziati, i metodi utilizzati per la determinazione strutturale possono essere utilizzati per nuovi rilevanti scopi scientifici. Da un lato, infatti, gli studi di genomica strutturale svolti in numerosi centri di ricerca avanzata si focalizzano sullo sviluppo di una tecnologia per un'efficiente determinazione strutturale, allo scopo di costruire un completo atlante di fold proteici che possa essere utilizzato poi per determinare la struttura di un gran numero di proteine attraverso metodi di predizione. D'altro canto, oggi abbiamo la possibilità di utilizzare nuove strutture di proteine per predirne la funzione, mentre nella classica biologia strutturale ci si trova più tipicamente a dover razionalizzare una funzione nota sulla base di una struttura tridimen-

Per un'esauriente bibliografia: K. Wüthrich, Nmr Studies of Structure and Function of Biological Macromolecules (Nobel Lecture), *Journal of Biomolecular Nmr*, 2003, **27**, 13.



Esempio di spettro Nmr tridimensionale



Struttura Nmr di un complesso Dna-proteina

sionale. Tale percorso cognitivo è non privo di sostanziali difficoltà. Ma sulla base di recenti sviluppi scientifici, è oggi possibile immaginare future strategie per la scoperta di nuove funzioni fisiologiche utilizzando dati di strutture molecolari. È infatti largamente riconosciuto che affiancando dati su interazioni intermolecolari alla determinazione di nuovi fold proteici si possono ottenere importanti informazioni per l'identificazione delle funzioni ancora sconosciute di un gene. Purtroppo, un uso efficiente della spettroscopia Nmr convenzionale in soluzione è stato a lungo limitato a proteine con un peso molecolare non superiore a 30.000 Da, e pertanto non è stato possibile indagare le strutture supramolecolari risultanti dall'interazione tra due o più proteine e aventi pertanto più alti pesi molecolari. Per esempio, tale limite ha fortemente ristretto l'intervallo di potenziali sistemi

recettoriali accessibili agli studi Nmr di "drug discovery", ridotto gli studi di complessi proteine-acidi nucleici a piccoli sistemi di modeste dimensioni ed impedito l'uso di tecniche di Nmr in soluzione per studi di proteine di membrana, dal momento che esse dovevano essere ricostituite e solubilizzate in micelle miste di detergenti o di lipidi. Recentemente, tale limitazione è stata superata e l'intervallo di applicazione dell'Nmr è stato significativamente esteso attraverso l'utilizzo della spettroscopia Trosy. Tale principio, che riduce gli effetti dei moti browniani sul

rilassamento del segnale, aumenta notevolmente la sensibilità di molti esperimenti normalmente utilizzati nella determinazione strutturale e permette di applicare l'Nmr allo studio di sistemi molto più grandi, quali proteine di membrana e sistemi proteici di 870.000 Da (per esempio il complesso costituito dalla co-chaperonina GroEs legata alla chaperonina GroEL). Le potenzialità di questa nuova tipologia di esperimenti Nmr sono notevoli e permetteranno di analizzare sistemi biologici supramolecolari e quindi di comprendere funzioni biologiche rilevanti sulla base di dati strutturali e di interazioni molecolari.

Da quanto emerso una naturale domanda riguarda i limiti futuri delle possibilità

investigative. In particolare viene spontaneo chiedersi se il costante sviluppo tecnologico sia nel campo dell'elaborazione e del calcolo computerizzato sia nell'ottenimento di campi magnetici sempre più potenti possa far prevedere un ulteriore incremento delle dimensioni dei sistemi molecolari studiabili con successo. Sarà possibile un giorno riuscire a "vedere" tramite l'Nmr non solo le parti macroscopiche dei sistemi viventi, ma anche le singole molecole e sistemi multimolecolari operanti "in diretta" all'interno dei vari organismi?

Potrà l'Nmr non solo servire come sostituto diagnostico delle tradizionali indagini radiologiche, come ormai comunemente diffuso, ma anche come sistema di indagine e rilevamento delle singole disfunzioni molecolari all'origine delle patologie operanti negli organismi viventi? Forse i limiti sono rimasti ormai solo nella nostra capacità immaginativa.