



A CURA DI PIERFAUSTO SENECI
 DIPARTIMENTO DI CHIMICA
 UNIVERSITÀ DI MILANO
 PIERFAUSTO.SENECI@UNIMI.IT

Cosa può fare la chimica per te, se sei un ricercatore farmaceutico? Questa è la domanda a cui rispondo in maniera entusiastica attraverso alcuni esempi (che inizierò a descrivere oggi, per finire nel prossimo appuntamento).

Parliamo di proteine e di zuccheri. Una modificazione post-traslazionale (PTM) di serine e treonine le glicosila con una β -N-acetilglucosammina (O-GlcNAc, Fig. 1, **1**) che modifica conformazione e caratteristiche chimico-fisiche di epitopi, o addirittura intere proteine per modificarne lo stato (attivo od inattivo), la locazione cellulare, la stabilità alla degradazione e così via. La *O-GlcNAcylation* ha simile rilevanza rispetto alla fosforilazione in termini di influenza su processi cellulari, anche se a fronte di centinaia di chinasi (+ fosfato) e decine di fosfatasi (- fosfato) vi sono una sola O-GlcNAc transferasi (OGT) e idrolasi (OGA); a tutt'oggi sono stati caratterizzati più di 3.000 siti/epitopi O-GlcNAcificabili su molte proteine, e alterazioni dello stato di O-GlcNAcificazione fisiologica sono riconducibili a varie patologie. Nel campo della fosforilazione, metodi bioanalitici sensibili permettono di monitorare *in situ* l'evoluzione dinamica dello stato di fosforilazione di ogni epitopo di una proteina; ciò è possibile perché gli esteri fosforici sono stabili alle procedure di isolamento e di quantificazione (per lo più proteomica e spettrometria di massa). Non è così per il legame glicosidico fra Ser o Thr e GlcNAc: solo tecniche e protocolli molto sofisticati (che in pratica li limitano a pochissimi laboratori) sono in grado di generare GlcNAc *glycosylation patterns* affidabili. I chimici hanno trovato una soluzione parzialmente adeguata, che si fonda sulla ben nota *click chemistry*: in un primo *step* - effettuato *in cellulo*, o addirittura *in vivo* - una galattosiltransferasi modificata introduce un amminozucchero azidato sulla GlcNAc (composto **2**); infine, una *click reaction* con una biotina connessa via *linker* ad un alchino (composto **3**) produce il probe **4** (Fig. 1), che può essere purificato e quantificato.

Questo cosiddetto *click kit* risolve molti, ma non tutti i problemi. Infatti, ogni *O-GlcNAc protein* in un campione biologico viene "cliccata": se sono interessato a quantificare e monitorare la O-GlcNAcificazione di una specifica proteina, dovrò isolarla e purificarla dalle altre - processo lungo, e spesso pericoloso per la stabilità del legame glicosilico O-GlcNAc. Se poi la proteina è poco abbondante, la sensibilità dei metodi di rivelazione potrebbe essere insufficiente.

Il gruppo di Carolyn Bertozzi a Berkeley ha introdotto Glyco-Seek [P.V. Robinson *et al.*, *JACS*, 2016, **138**, 10722], basato sulla nota *polymerase chain reaction* (PCR) - capacità del DNA di venire amplificato in maniera esponenziale utilizzando enzimi polimerasici - per risolvere questi problemi. Un cosiddetto *amplicone* (sequenza di circa 50 *base pairs*), in grado di essere amplificato per PCR, è scisso in due parti, ognuna delle quali è coniugata a due anticorpi monoclonali (mAbs): uno è specifico per la proteina che mi interessa, l'altro per il gruppo O-GlcNAc. Dopo incubazione dei due mAbs (nell'esempio l' α -cristallina/ semplice da monitorare, abbondante; oppure il fattore di trascrizione c-Rel/problematico, poco abbondante), la preparazione biologica è

trattata con un oligoDNA "ponte" e con DNA ligasi. Quando i due mAbs siano complessati con la stessa proteina O-GlcNAcificata, la ligasi li unisce, e rende la sequenza nucleotidica risultante dell'amplicone appunto amplificabile via PCR. Nel caso di entrambe le proteine nel lavoro, gli autori determinano la concentrazione delle proteine O-GlcNAcificate di interesse senza interferenze; quantificano la quantità totale delle stesse, determinando quindi quanta (in maniera dinamica) è glicosilata e quanta no, e su quali epitopi ed ottengono un rapporto segnale-rumore di fondo accettabile anche in caso di bassissime concentrazioni (fino a 2 attomoli di proteina, usando solo 2 microlitri di campione biologico!). Potrete saperne di più, e davvero divertirvi, leggendo l'articolo.

Finisco brevemente citando un lavoro [A.M. Watkins *et al.*, *JACS*, 2016, **138**, 10386] che riporta sorprendenti risultati computazionali - e risvolti applicativi/sintetici - riguardo agli *hot spot* proteici, cioè alle "zone calde" attraverso cui le proteine interagiscono con altre proteine, e formano o sciolgono complessi biologicamente rilevanti (*protein-protein interactions*, PPIs). Gli autori determinano che sono sempre gli stessi residui (Trp, Leu, Tyr, Arg fra gli altri) ad essere più spesso presenti in *hot spots*; e

che, stranamente, queste percentuali restano simili in eliche, foglietti, od in altre strutture proteiche secondarie. Andando oltre, in un esempio specifico di *hot spot* L-x-x-L-L tipico di recettori nucleari, mostrano che sequenze simili interagiscono con *partner proteins* anche ben diverse attraverso conformazioni diverse assunte da una o più leucine nell'*hot spot*; e che certe PPIs avvengono attraverso conformazioni energeticamente sfavorite per una o più leucine, pagando una *penalty* energetica più che compensata dalla PPI che si instaura. Risvolti applicativi? Certi peptidomimetici, o meglio amminoacidi esotici e conformazionalmente "costretti" contenenti ciclopropili, ciclobutili ed altri gruppi che mimano le conformazioni "costrette" e ricorrenti di residui proteici dovrebbero essere privilegiati in *drug discovery*. Anche in questo caso, buona lettura.

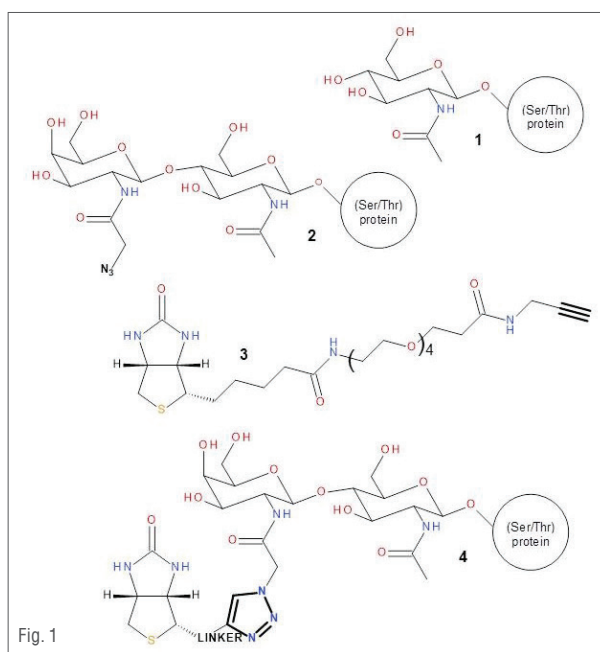


Fig. 1