

Abstract

My PhD project was focused on the study of protein-ligands interactions using different NMR techniques. NMR has a long history in drug discovery and hit-to-lead optimization. Compared to many other biophysical techniques, NMR has the advantage of combining structural and functional parameters to characterize protein inhibitor interactions. NMR experiments for protein-ligands interactions can be divided into two main categories: protein observed and ligand-observed experiments. Using protein-observed NMR experiments, such as *Chemical Shift Mapping*, I studied the Gp36-MPER/C8 interaction. The Gp36-MPER plays an important role in the Feline Immunodeficiency Virus (FIV) membrane fusion process. FIV is a naturally occurring lentivirus that is studied as a model system for anti-HIV vaccines and anti-HIV drug development. We have previously demonstrated that a 8 residues fragment (C8) included in the Membrane proximal external region MPER of Gp36, is endowed with antiviral activity by inhibiting the in cell virus entrance.

The study of NMR structure of Gp36-MPER was aimed at understanding the role of C8 peptide for antiviral action, in particular at discerning if it is related to the C8 specific sequence or to the specific structural context within the GP36-MPER structure. Consistently I determined the 3D NMR structure of the full Gp36-MPER by acquiring 3D heteronuclear NMR spectra on a ^{13}C and ^{15}N double labeled protein sample. NMR structure of Gp36-MPER was calculated on the basis of NOE data evidencing the presence of α -helical and β -turn conformations. Interaction of Gp36-MPER with C8 peptide was demonstrated on the basis of the chemical shift perturbation in ^{15}N -NHQC spectra. Using ligand-observed NMR experiments, interaction studies were focused on Farnesyl diphosphate synthase (FPPS) and Protein Kinase A (PKA) proteins.

FPPS is a key enzyme in the mevalonate, isoprenoid biosynthesis pathway. It is known to be the target of bisphosphonates, but it is also involved in microbial infections, cancer, and hypertension. N6-Isopentenyladenosine (i6A) is a modified nucleoside exhibiting anti-tumor effects on human and murine cells. During my PhD, I demonstrated the structural interaction of i6A with FDPS by recording saturation transfer difference (STD) and WaterLOGSY NMR experiments. i6A was demonstrated to occupy FPPS enzymatic pocket with a calculated K_D of $\sim 1\text{mM}$. Based on the i6A-FPPS interaction data, new ligands, analogs of i6A, were screened. STD NMR data demonstrate that a modification that the introduction in the 6-position of adenosine ring of a benzyl moiety induce a significant increasing in the interaction with FPPS target.

PKA is an enzyme involved in several functions in the cell, including regulation of glycogen, sugar and lipid metabolism. At the EMBL laboratory of Heidelberg, Germany, under the supervision of prof. Teresa Carlomagno, I analyzed set of PKA binding ligands provided by Sanofi

Aventis, using INPHARMA method. The INPHARMA method, developed by Prof.ssa Carlomagno, is based on the observation of interligand, spin-diffusion mediated, transferred-NOEs (nuclear Overhauser effects), between two ligands L1 and L2 binding competitively and weakly to a receptor T. In particular, my contribution to the INPHARMA project was to develop and test protocols in which the INPHARMA data are used to select the correct relative orientation of ligand pairs in a pool of complex and numerous structures generated by molecular docking calculation.

This new approach, called INPHARMA-STRING, allows to improve the degree of selection of molecular docking data, leading INPHARMA to be a solid tool applicable to an even large amount of targets and ligands.

Abstract

Il mio progetto di dottorato si è focalizzato su studi d'interazione proteina-ligando utilizzando tecniche NMR differenti. L'NMR è una tecnica ampiamente utilizzata nel drug discovery e nell'ottimizzazione di lead-compounds. Rispetto ad altre tecniche biofisiche, l'NMR presenta il grosso vantaggio di combinare parametri strutturali e funzionali per caratterizzare l'interazione proteina-ligando. Gli esperimenti NMR per gli studi d'interazione proteina-ligando possono essere divisi in due grandi categorie: quelli basati sull'osservazione della proteina e quelli basati sull'osservazione dei ligandi.

Utilizzando esperimenti NMR, basati sull'osservazione della proteina, come il Chemical Shift Mapping, ho studiato l'interazione tra la proteina Gp36-MPER ed il peptide C8. La proteina Gp36-MPER gioca un ruolo importante nel processo di fusione della membrana del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV). Il FIV è un lentivirus ampiamente studiato come un sistema modello per lo sviluppo di vaccini e farmaci contro l'HIV. Studi precedenti, da noi intrapresi, hanno dimostrato che un frammento di 8 residui amminoacidici (peptide C8) della regione MPER (Membrane proximal external region) della gp36, svolge la sua azione antivirale bloccando l'ingresso nella cellula virale. La determinazione della struttura NMR della Gp36-MPER ha lo scopo di comprendere il ruolo del peptide C8 e la sua azione antivirale, in particolare, di comprendere se essa è correlata alla sequenza specifica del peptide C8 o allo specifico contesto strutturale con la Gp36-MPER. Pertanto ho determinato la struttura NMR della Gp36-MPER acquisendo esperimenti 3D NMR etero-correlati su un campione della proteina doppiamente marcata al ^{13}C e al ^{15}N . La struttura NMR della Gp36-MPER è stata calcolata sulla base degli effetti NOEs riscontrati, evidenziando la presenza di conformazioni α -elica e β -turn. L'interazione della Gp36-MPER e il peptide C8 è stata dimostrata sulla base della perturbazione dei chemical shift negli spettri ^{15}N -NHQC.

Usando esperimenti NMR basati sull'osservazione dei ligandi, sono stati intrapresi studi d'interazione sulla proteina Farnesil difosfato sintasi (FPPS) e sulla proteina Chinasi A (PKA).

L'FPPS è un enzima chiave della via biosintetica del mevolonato. È noto come target dei bifosfonati, ma è coinvolto anche nelle infezioni microbiche, cancro e ipertensione. N6-Isopenteniladenosina (i6A) è un nucleotide modificato che ha mostrato effetti anti-tumorali su cellule umane e murine. Durante il mio dottorato, ho dimostrato la diretta interazione dell'i6A con l'FPPS utilizzando le tecniche NMR del saturation transfer difference (STD) e WaterLOGSY. È stato così dimostrato che l'i6A occupa la tasca enzimatica dell'FPPS con una K_D di $\sim 1\text{mM}$. Basandosi sui dati d'interazione i6A-FPPS, sono stati testati nuovi ligandi analoghi dell'i6A. Dati di

STD NMR hanno dimostrato che introducendo un anello benzilico in posizione N-6 dell'adenosina l'interazione con l'FPPS aumenta significativamente.

PKA è un enzima coinvolto in numerose funzioni all'interno della cellula, inclusa la regolazione del glicogeno, metabolismo degli zuccheri e lipidi. Presso l'EMBL di Heidelberg, Germania, sotto la supervisione della Prof.ssa Teresa Carlomagno, ho studiato l'interazione tra la proteina PKA e un set di ligandi forniti dalla Sanofi Aventis, utilizzando la tecnica NMR dell'INPHARMA. La tecnica INPHARMA, sviluppata dalla Prof.ssa Carlomagno, è basata sull'osservazione di effetti interligand NOEs, generati da effetti di spin-diffusion e transferred-NOEs (nuclear Overhauser effects), tra due ligandi L1 e L2 che legano competitivamente e debolmente lo stesso recettore T. In particolare, il mio contributo al progetto INPHARMA è stato lo sviluppo di un protocollo nel quali i dati INPHARMA sono usati per selezionare corrette orientazioni di coppie di ligandi generate mediante calcoli di molecular docking. Questo nuovo approccio, chiamato INPHARMA-STRING, è stato sviluppato per migliorare il grado di selezione dei dati di molecular docking, è rendere quindi la tecnica INPHARMA un valido e solido strumento di selezione applicabile su una larga scala di targets e ligandi.