

## Abstract

La proteomica chimica accoppiata alla spettrometria di massa è attualmente considerato un potente strumento nell'identificazione dei target biologici di piccole molecole, come ad esempio farmaci o più in generale molecole naturali bioattive<sup>[1]</sup>. La completa caratterizzazione degli effetti biofarmacologici e dell'esatto meccanismo d'azione non può prescindere dalla completa caratterizzazione delle interazioni che una molecola bioattiva è in grado di instaurare con il complesso *network* proteico cellulare<sup>[1, 2]</sup>.

Nonostante i notevoli sviluppi nello studio del meccanismo d'azione della gran parte di farmaci attualmente in commercio, l'esatto meccanismo d'azione a livello molecolare, in molti casi, rimane non conosciuto<sup>[3,4]</sup>. Pertanto, l'identificazione dei target proteici di molecole dotate di un interessante profilo farmacologico è, attualmente, uno degli obiettivi principali nel campo della ricerca farmaceutica. La completa caratterizzazione del meccanismo d'azione di un metabolita bioattivo può essere ottenuta accoppiando opportunamente esperimenti di proteomica chimica con esperimenti di proteomica chimica quantitativa<sup>[5]</sup>. In tal modo, sarà possibile ottenere informazioni sull'attivazione o l'inibizione dell'espressione genica indotta dal trattamento farmacologico con il metabolita bioattivo in fase di studio.

Oggetto di questa tesi è l'applicazione di metodiche di proteomica chimica allo studio dell'interattoma di tre metaboliti marini bioattivi, tutti caratterizzati da un interessante profilo anti-infiammatorio. Inoltre, oggetto di questa tesi è l'applicazione di metodiche di proteomica chimica quantitativa allo studio del meccanismo di attivazione piastrinica ad opera del collagene.

Nel dettaglio, le metodiche di proteomica chimica sono state applicate alla caratterizzazione dell'interattome del Petrosaspongiolide M (PM)<sup>[6-8]</sup>, del

Bolinaquinone (BLQ)<sup>[9-11]</sup> e della Perthamide C (PRT). Tali molecole sono state immobilizzate su un supporto solido a base di agarosio mediante l'utilizzo di un braccio spaziatore  $\alpha,\omega$ -diamino. I supporti solidi, modificati con i metaboliti in fase di studio, sono stati poi utilizzati per isolare i *partners* proteici specifici da un lisato proteico di cellule macrofagiche.

L'applicazione di tale metodica ci ha consentito di identificare il 20S proteasoma, la clatrina e l'endoplasmia come partner di PM, BLQ e PRT rispettivamente. Successivi saggi di fluorescenza, *in vitro* ed in cellula, ci hanno permesso di misurare la potenza inibitoria del sesterterpene marino PM a livello dei differenti siti proteolitici del proteasoma.

L'attività del BLQ di modulare i processi di endocitosi clatrina mediata è stata dimostrata mediante analisi citofluorimetrica e miscoscopica, suggerendo per il BLQ una nuova applicazione come *tools* biotecnologico nello studio dei *pathway* endocitotici.

Esperimenti di Risonanza Plasmonica di Superficie (SPR) sono stati, infine, sviluppati per valutare l'affinità della Perthamide nei confronti di GRP94 e di Hsp90 aprendo la strada a successivi studi del meccanismo di modulazione delle *heat shock* da parte del metabolita marino PRT.

Infine, è riportata l'applicazione di metodiche di proteomica chimica quantitativa allo studio del meccanismo di attivazione piastrinica ad opera del collagene. Visto il ruolo chiave dei metaboliti cAMP/cGMP nel meccanismo di attivazione piastrinica<sup>[12]</sup>, la metodica di proteomica chimica quantitativa è stata accoppiata allo specifico arricchimento del pathway delle protein chinasi A e G mediante supporti solidi opportunamente modificati con cAMP e cGMP<sup>[13]</sup>. L'applicazione di tale metodica ci ha consentito di verificare come il pathway delle proteoin chinasi A e G viene modulato in seguito allo stimolo con collagene.

Bibliografia

- [1] U. Rix, G. Superti-Furga. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5(9), 616-624.
- [2] M. Bantscheff, A. Scholten, A. J. Heck. *Drug Discov. Today* **2009**, 14(21-22), 1021-1029.
- [3] U. Rix, O. Hantschel, G. Durnberger, L. L. Remsing Rix, M. Planyavsky, N. V. Fernbach, I. Kaupe, K. L. Bennett, P. Valent, J. Colinge, T. Kocher, G. Superti-Furga. *Blood* **2007**, 110(12), 4055-4063.
- [4] D. A. Jeffery, M. Bogyo. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, 14(1), 87-95.
- [5] J. L. Hsu, S. Y. Huang, N. H. Chow, S. H. Chen. *Anal. Chem.* **2003**, 75(24), 6843-6852.
- [6] J. Busserolles, M. Paya, M. V. D'Auria, L. Gomez-Paloma, M. J. Alcaraz. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69(10), 1433-1440.
- [7] I. Posadas, M. C. Terencio, A. Randazzo, L. Gomez-Paloma, M. Paya, M. J. Alcaraz. *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 65(5), 887-895.
- [8] M. C. Monti, A. Casapullo, C. N. Cavasotto, A. Tosco, P. F. Dal, A. Ziemys, L. Margarucci, R. Riccio. *Chemistry* **2009**, 15(5), 1155-1163.
- [9] R. Lucas, C. Giannini, M. V. D'Auria, M. Paya. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, 304(3), 1172-1180.
- [10] J. Busserolles, M. Paya, M. V. D'Auria, L. Gomez-Paloma, M. J. Alcaraz. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, 69(10), 1433-1440.
- [11] M. C. Monti, M. G. Chini, L. Margarucci, A. Tosco, R. Riccio, G. Bifulco, A. Casapullo. *J. Mol. Recognit.* **2009**, 22(6), 530-537.

