

**“INTERAZIONE TRA GLUTATIONE ED INSULINA: DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI DI LEGAME ED IDENTIFICAZIONE DEI POSSIBILI SITI DI INTERAZIONE”**

**“THE INTERACTION BETWEEN GLUTATHIONE AND INSULIN: DETERMINATION OF THE BINDING CONSTANTS AND IDENTIFICATION OF POSSIBLE INTERACTION SITES”**

**Relatore: Prof. Paolo Paoli**

*paolo.paoli@unifi.it*

**Correlatore: Prof.ssa Claudia Giorgi**

*claudia.giorgi@unifi.it*

**Candidato: Ruggeri Jacopo**

*jacopo.ruggeri@stud.unifi.it*

**ABSTRACT**

Sebbene sia uno degli ormoni peptidici di più piccole dimensioni, l'insulina svolge un ruolo quanto mai preminente nella regolazione del metabolismo energetico, permettendo l'accumulo a livello epatico e muscolare di glucosio sotto forma di glicogeno, favorendo la sintesi proteica e quella degli acidi grassi. Data l'importanza di questa proteina, risulta di grande interesse la ricerca delle dinamiche molecolari e delle interazioni chimiche implicate nel mantenimento della sua stabilità e biodisponibilità. Nonostante ad oggi non sia stato chiarito alcun meccanismo atto a regolare la funzione dell'ormone, precedenti ricerche hanno dimostrato che alcuni tioli fisiologici, quali omocisteina e N-acetil-cisteina, sono in grado di modulare la funzionalità dell'insulina. Con questo lavoro di tesi, riallacciandoci a tali precedenti studi, abbiamo cercato di far chiarezza sulla natura dell'interazione fra l'ormone ed altri metaboliti tiolici, che all'interno del nostro organismo svolgono un ruolo preminente, quali il glutatone e la cisteina. Abbiamo poi utilizzato due derivati del glutatone, la  $\gamma$ -glutammil-cisteina e la cisteinil-glicina, che rispetto al tripeptide originario mancano rispettivamente del residuo glicinico e di quello glutammico, per scorgerne le possibili differenze. Effettuando dei test di aggregazione a pH fisiologico abbiamo appurato che tutte queste molecole, tranne la cisteinil-glicina, sono in grado di interagire con l'insulina, stabilizzandone la forma esamerica, presente a tale pH, e di inibirne l'aggregazione, e la conseguente disattivazione biologica. Per comprendere invece la stechiometria di legame, con test simili siamo riusciti ad affermare che tre molecole di glutatone interagiscono con una molecola di insulina nella forma esamerica. La calorimetria di titolazione isoterma (ITC) ha confermato tale rapporto stechiometrico di legame con la proteina di 1:3 per tutti i tioli usati. La stessa tecnica ITC ha mostrato delle costanti di dissociazione  $K_d$ , indici della forza di interazione, dell'ordine di 20÷30 micromolare per il glutatone e la  $\gamma$ -glutammil-cisteina, e di un ordine di grandezza superiore per la cisteina. Il meccanismo di binding con la cisteina è risultato essere, inoltre, accompagnato da un processo endotermico, a differenza di glutatone e  $\gamma$ -glutammil-cisteina. L'analisi in silico, effettuata utilizzando il programma di simulazione SwissDock, mostra molteplici modalità di legame tra insulina e glutatone, impedendo una univoca localizzazione del sito di binding. In ogni caso, l'analisi rivela costanti di legame nell'ordine del micromolare, confermando i dati ottenuti mediante ITC. L'ultimo test effettuato su cellule C2C12 di mioblasti murinici ha provato che l'insulina trattata con  $\gamma$ -glutammil-cisteina risulta essere molto più attiva rispetto a quella di controllo o quella incubata con il solo glutatone. Tutte queste analisi, seppur di difficile interpretazione, ci hanno permesso di concludere che piccole modifiche a livello molecolare sui composti tiolici da noi utilizzati possono condurre a modifiche conformazionali dell'ormone tali da cambiarne completamente la stabilità e la conseguente attività.