

Indice

Capitolo 1

Introduzione.....	3
1.1 L’NMR e le proteine disordinate.....	3
1.2 Studio della dinamica di un <i>linker</i> di una proteina umana coinvolta nel processo di trascrizione.....	4
1.3 Scopo della tesi.....	5

Capitolo 2

Background teorico.....	6
2.1 Principi di spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare.....	6
2.2 Processi di rilassamento.....	8
2.3 Processi di rilassamento del ^{15}N	11
2.3.1 Chemical Shift Anisotropy (CSA).....	11
2.3.2 Interazione dipolare.....	13
2.4 Come mai studiamo i processi di rilassamento di ^{15}N per ottenere informazioni sulla dinamica del <i>backbone</i> delle proteine?.....	14
2.4.1 Funzione di autocorrelazione.....	14
2.5 Interpretazione.....	17

Capitolo 3

Materiali e metodi.....	18
3.1 Campione utilizzato.....	18
3.2 Strumenti.....	18
3.2.1 Parametri di acquisizione e di processing degli spettri per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.....	19
3.3 Parametri sperimentali.....	20
3.3.1 Misura di $R_1(^{15}\text{N})$	20
3.3.2 Misura di $R_2(^{15}\text{N})$	21
3.3.3 Misura del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.....	22
3.4 Programmi usati.....	23

Capitolo 4

Sequenze di impulsi.....	24
4.1 Introduzione.....	24
4.2 Sequenze.....	26
4.2.1 Sequenza di base.....	26

4.2.2	Sequenze $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$	30
4.2.2.1	Sequenza per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$	31
4.2.2.2	Sequenza per la determinazione di $R_2(^{15}\text{N})$	32
4.2.3	Sequenza per il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE	34
Capitolo 5		
Discussione dei risultati		35
5.1	Spettro $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ HSQC	35
5.2	Determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.....	36
5.3	Plot $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE in funzione del residuo	37
5.4	Interpretazione dei risultati	40
5.4.1	La sequenza primaria per avere informazioni sulla struttura tridimensionale (Intrinsically Unstructured Proteins predictor - IUPred)	41
5.4.2	L'influenza dell'ingombro della catena laterale (<i>bulkiness</i>)	42
5.4.3	I chemical shift per avere informazioni sulla tendenza ad assumere una struttura secondaria (Secondary Structural Propensity - SSP)	44
Capitolo 6		
Conclusioni.....		48
Bibliografia		49

Introduzione

1.1 L’NMR e le proteine disordinate

Le ‘proteine intrinsecamente disordinate’ (IDP) costituiscono una classe di proteine caratterizzate dall’assenza di una struttura tridimensionale stabile.

L’interesse per le proprietà strutturali, dinamiche e funzionali delle IDP è cresciuto negli ultimi anni ^[1;2], poiché è stato osservato che in natura sono presenti molte proteine caratterizzate da assenza di globularità e di elementi di struttura secondaria regolari. Molte IDP sono associate a malattie umane come quelle cardiovascolari, neurodegenerative, il diabete e il cancro ^[3].

Uno dei concetti alla base della biologia, rappresentato dal paradigma struttura-funzione, è fondato sul presupposto che una proteina, per esercitare una funzione, debba possedere un’organizzazione strutturale compatta e ben definita. Anche se da tempo è ampiamente riconosciuta l’influenza esercitata dalle regioni flessibili e dinamiche sul ruolo che hanno le proteine all’interno del nostro organismo, solo studi recenti hanno messo in discussione questo paradigma, dimostrando che l’assenza di una struttura tridimensionale stabile e la presenza di molti conformeri ad alta flessibilità accessibili a temperatura ambiente, sia determinante per lo svolgimento delle attività proteiche, in una grande varietà di differenti condizioni fisiologiche. Anzi, l’alta flessibilità e il disordine conformazionale conferiscono alle IDP vantaggi funzionali complementari a quelli delle proteine strutturate ^[4-7].

Tali proprietà non possono essere rilevate nello stato cristallino, quindi la cristallografia a raggi X non è adatta alla loro caratterizzazione.

La tecnica principale per lo studio delle IDP, pertanto, è la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), che permette di ottenere informazioni a risoluzione atomica. L’NMR può essere sfruttato sia per lo studio delle proteine ordinate, che per quelle disordinate e permette di ricavare informazioni non solo sulla loro struttura, ma anche sulle loro proprietà dinamiche.

I progressi degli ultimi anni hanno consentito di realizzare esperimenti NMR sempre più informativi e rapidi. L’introduzione della tecnologia criogenica nella realizzazione dei *probehead*, ha consentito una diminuzione del rumore termico strumentale, a beneficio della

qualità degli spettri. Inoltre, grazie all'uso di campi magnetici sempre più elevati e di nuovi dispositivi necessari all'amplificazione del segnale, oggi è possibile studiare proteine costituite anche da qualche centinaio di amminoacidi.

1.2 Studio della dinamica di un *linker* di una proteina umana coinvolta nel processo di trascrizione

All'interno delle proteine complesse è possibile individuare regioni globulari, in cui le catene polipeptidiche sono ripiegate in strutture compatte, dette domini, e filamenti flessibili, detti *linker*, che collegano tra loro i vari domini.

Nel progetto di tesi è stata analizzata, tramite l'NMR, la dinamica di un *linker* della Cyclic-AMP-Response-Element-Binding protein (CREB)-Binding Protein (CBP).

La CBP è una proteina umana che svolge un ruolo fondamentale all'intero delle cellule, quindi il suo studio è di grande interesse anche per il settore biomedico.

È costituita da 2.442 amminoacidi ed è un co-attivatore della trascrizione ^[8]. È in grado di modificare la cromatina ed i fattori della trascrizione attraverso l'attività acetil-transferasica. Inoltre funziona da scaffold per la costruzione della struttura biologica responsabile della trascrizione. Più del 50% degli amminoacidi che costituiscono la CBP sono contenuti nelle regioni intrinsecamente disordinate che collegano i vari domini strutturati.

Nella figura sottostante sono mostrati i domini e i *linker* della CBP. I domini sono rappresentati dalle sfere colorate, mentre i *linker* dai segmenti blu.

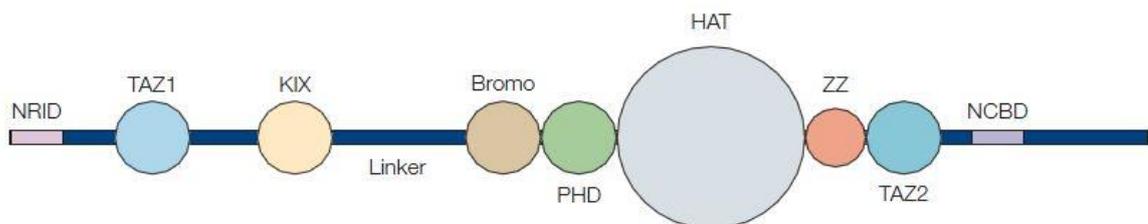


Figura 1.1 Domini e *linker* della CBP ^[8].

Il terzo *linker* dall'estremità N-terminale della proteina prende il nome di Intrinsically Disordered region 3 (ID3) e la sua caratterizzazione è oggetto di un progetto di ricerca svolto in collaborazione tra il CERM e il VIB di Bruxelles, Belgio. La sua sequenza amminoacidica è mostrata di seguito, dove il colore rosso indica i residui che sono stati assegnati, mentre il colore nero quelli che ancora non sono stati assegnati.

**HKQGILGNQPALPAPGAQPPVIPQAQPVRPPNGPLSLPVNRMQVSQGMNSFNPMS
LGNVQLPQAPMGPRAAASPMNHSVQMNSMGSVPGMAISPSRMPQPPNMMGAHTN
NMMAQAPAQSQFLPQNQFPSSSGAMSVMGQPPAQTGVSQGQVPGAALPNPLNM
LGPQASQLPCPPVTQSPLHPTPPPASTAAGMPSLQHTTPPGMTTPPQAAAPTQPSTP
VSSSGQTPTPTPGSVPSATQTQSTPTVQAAAQAQVTPQPQTPVQPPSVATPQSSQQ
QPTPVHAQPPGTPLSQAAASIDNRVPTPSSVASAETNSQQPGPDVPVLEMKTETQA
EDTEPDPGESKGEPRSEMMEEDLQGASQVKEETDIAEQKSEPMEVDEKKPEVKVE
VKEEESSSNGTASQSTSPSQ**

L'ID3 ha un peso molecolare pari a 41,83 kDa; il P.I teorico è pari a 4,77. All'interno della sequenza si possono individuare gli amminoacidi più abbondanti, che sono: Prolina (18,2%), Glutamina (12,1%), Serina (11,6%), Alanina (9,4%), Treonina (7,4%), Glicina (6,7%) e Valina (6,7%).

1.3 Scopo della tesi

Le regioni più strutturate della proteina sono già state oggetto di studio ^[8]. Solo recentemente è stata accettata l'idea che anche i *linker* possano avere un ruolo biologico importante e proprio per questo motivo lo scopo del progetto è stato quello di studiare la dinamica dell'ID3, un *linker* costituito da 406 amminoacidi, tramite le proprietà di rilassamento dei ¹⁵N del *backbone* della proteina.

Dall'analisi dei risultati è stato possibile constatare che il *linker* è molto flessibile e di conseguenza è privo di una rigida struttura secondaria e terziaria.

La caratterizzazione della dinamica dell'ID3 è un tassello importante per lo studio della CBP e per comprendere come il suo comportamento influenzi la funzione biologica della proteina all'interno del nostro organismo.

Background teorico

2.1 Principi di spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare

I nuclei con momento magnetico di spin diverso da zero (e rapporto giromagnetico $\gamma > 0$), in presenza di un campo magnetico statico esterno \mathbf{B}_0 , sono caratterizzati da due livelli energetici: il livello fondamentale α , ad energia minore e quello β , ad energia maggiore.

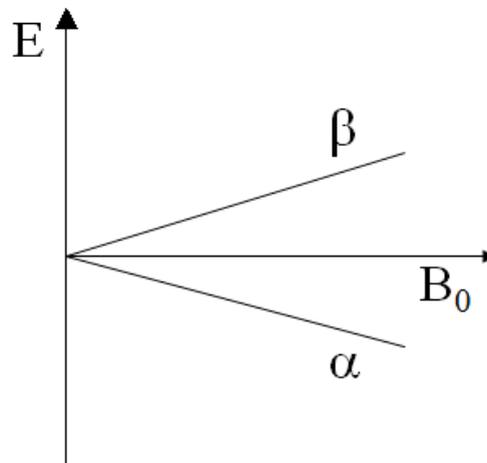


Figura 2.1 Livelli energetici assunti dal momento magnetico di spin in presenza di un campo magnetico statico esterno \mathbf{B}_0 .

All'equilibrio, gli spin che si trovano al livello fondamentale sono leggermente in eccesso rispetto a quelli che si trovano al livello energetico superiore ($n_\alpha > n_\beta$, dove n_α e n_β indicano le popolazioni dei livelli α e β).

Gli stati α e β sono caratterizzati, rispettivamente, dalle proiezioni $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ degli spin rispetto all'asse z, preso per convenzione lungo la direzione del campo magnetico statico \mathbf{B}_0 .

Viceversa, non è possibile conoscere per i singoli spin le proiezioni sugli assi x e y. In altre parole, all'equilibrio possiamo immaginare che l'orientazione degli spin rispetto agli assi x e y sia casuale, cioè non si ha coerenza di fase.

Per descrivere gli esperimenti NMR è importante introdurre il vettore magnetizzazione \mathbf{M} , che è dato dalla somma dei momenti magnetici dei singoli spin.

Il vettore magnetizzazione \mathbf{M} può essere suddiviso in due componenti: quella longitudinale, M_z , che si trova lungo l'asse z e quella trasversale M_{xy} , che si trova sul piano xy.

All'equilibrio, \mathbf{M} si trova lungo l'asse z, perciò la componente trasversale è nulla.

L'eccitazione del sistema mediante un impulso a radiofrequenze (RF), con frequenza corrispondente a quella della transizione $\alpha \rightarrow \beta$, è in grado di ruotare il vettore \mathbf{M} di 90° . Provoca il passaggio degli spin dal livello fondamentale α a quello β ($n_\alpha = n_\beta$) ed impone la coerenza di fase tra tutti gli spin, cioè la medesima orientazione rispetto agli assi x e y.

Il vettore \mathbf{M} si posiziona così sul piano xy, perciò la componente longitudinale è nulla.

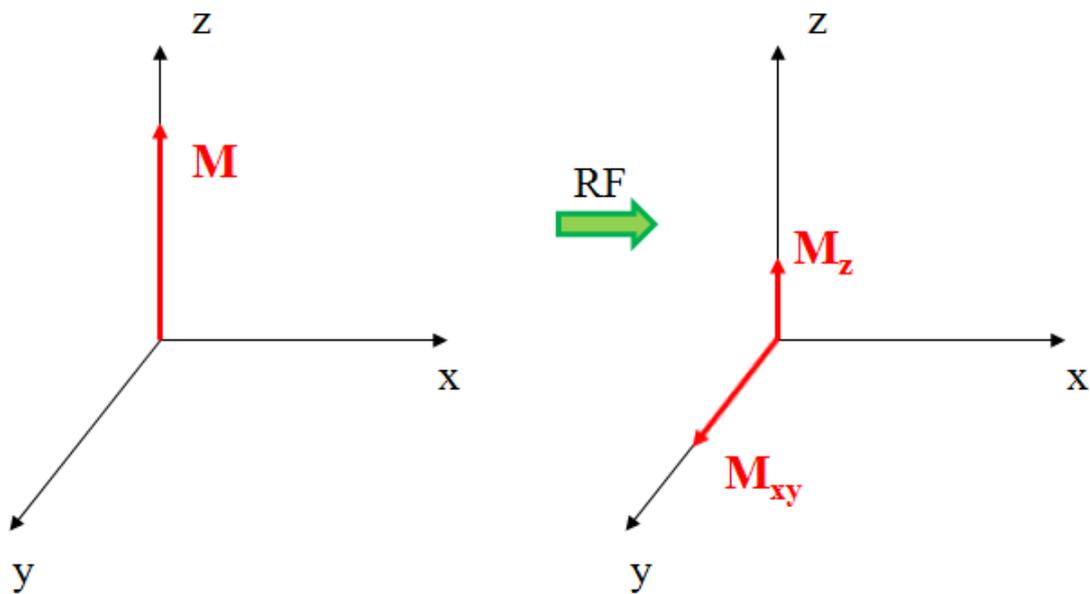


Figura 2.2 Il vettore magnetizzazione \mathbf{M} , all'equilibrio, si trova lungo l'asse z. In seguito all'applicazione dell'impulso RF a 90° lungo x, la componente longitudinale M_z sparisce progressivamente dall'asse z, mentre compare quella trasversale M_{xy} sul piano xy.

2.2 Processi di rilassamento

Il sistema eccitato torna all'equilibrio grazie ai processi di rilassamento, che sono causati da piccoli campi magnetici fluttuanti in modo random, generati dal movimento casuale degli spin nel sistema ^[9-11].

Esistono due diversi tipi di rilassamento:

- rilassamento longitudinale o *spin-lattice*, in cui gli spin interagiscono con i campi magnetici oscillanti lungo gli assi x e y alla frequenza di Larmor e decadono dal livello β a quello α , cedendo energia all'ambiente. In questo modo viene ripristinata la situazione iniziale di equilibrio, in cui lo stato α è più popolato dello stato β ($n_\alpha > n_\beta$).

Il passaggio degli spin dallo stato eccitato β a quello fondamentale α provoca il ripristino della componente longitudinale della magnetizzazione M_z lungo l'asse z.

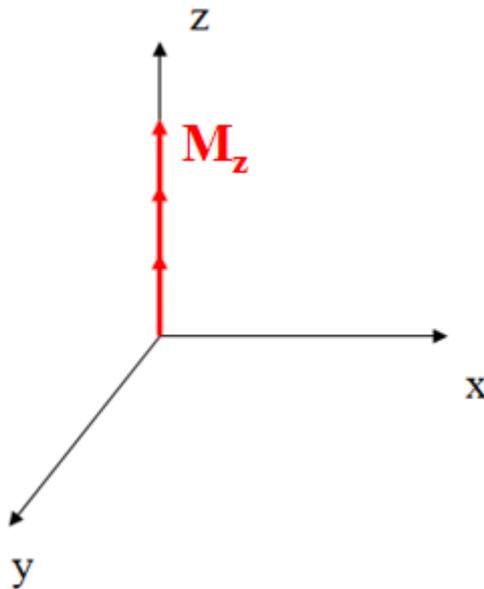


Figura 2.3 Rilassamento longitudinale. Si ha il ripristino della componente longitudinale del vettore magnetizzazione lungo l'asse z.

L'equazione che descrive questo fenomeno in funzione del tempo t è:

$$M_z = M_z^0 (1 - e^{-t/T_1})$$

in cui compare la costante di tempo $T_1^{-1} = R_1$.

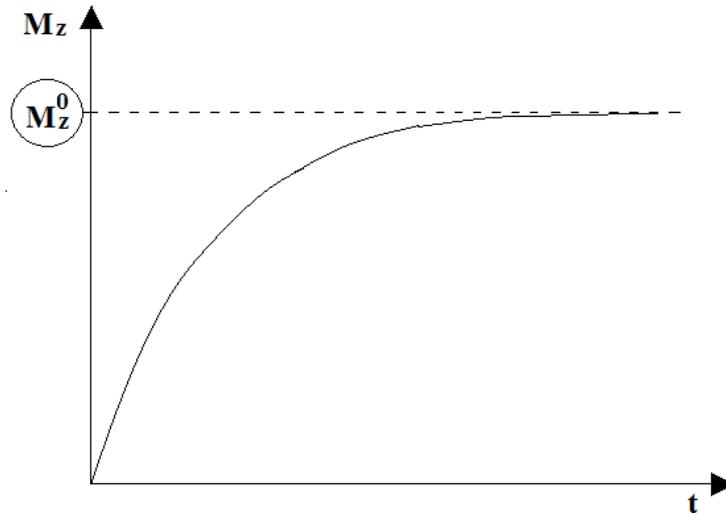


Figura 2.4 Funzione che descrive il processo del rilassamento longitudinale.

- rilassamento trasversale o spin-spin, che è dovuto all'interazione degli spin con i campi magnetici oscillanti lungo gli assi x, y e z.

I campi magnetici oscillanti lungo gli assi x e y alla frequenza di Larmor causano il decadimento dello spin dallo stato eccitato β a quello fondamentale α . In genere la fase dello spin che passa da $\beta \rightarrow \alpha$ è casuale. Questo significa che nel tempo la coerenza di fase viene perduta e di conseguenza si ha la scomparsa della componente trasversale della magnetizzazione M_{xy} dal piano xy.

I campi magnetici oscillanti lungo l'asse z non inducono transizioni tra i livelli energetici, ma causano la perdita della coerenza di fase degli spin. Tali campi, infatti, alterano il campo magnetico statico \mathbf{B}_0 di cui ogni spin risente. Dato che la frequenza angolare con cui ciascuno spin risuona dipende dal campo magnetico statico \mathbf{B}_0 , piccole variazioni del campo \mathbf{B}_0 causano piccole variazioni della frequenza di risonanza e di conseguenza la perdita della coerenza di fase. Si ha così la scomparsa della componente trasversale della magnetizzazione M_{xy} dal piano xy.

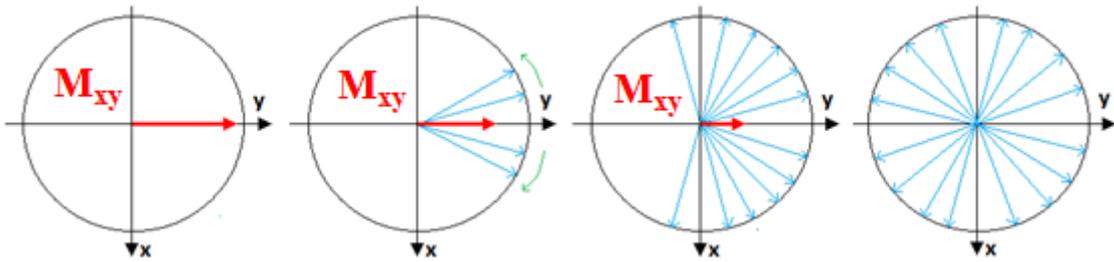


Figura 2.5 Rilassamento trasversale. Si ha la scomparsa della componente trasversale del vettore magnetizzazione dal piano xy.

L'equazione che descrive il rilassamento trasversale in funzione del tempo t è:

$$M_{xy} = M_{xy}^0 e^{-t/T_2}$$

in cui compare la costante di tempo $T_2^{-1} = R_2$.

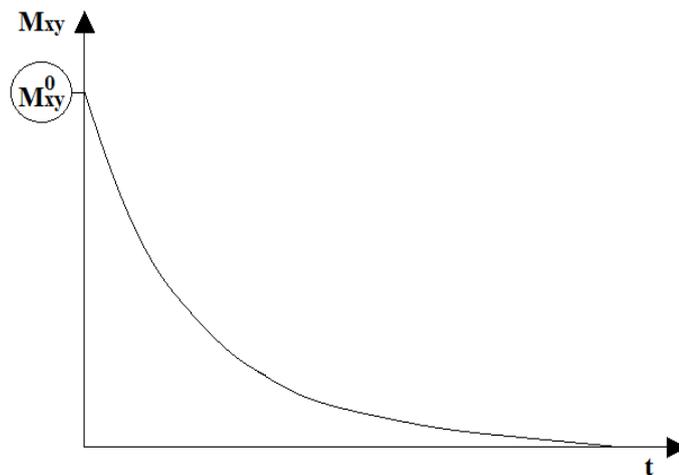


Figura 2.6 Funzione che descrive il processo del rilassamento trasversale.

Dato che il rilassamento trasversale risente di un maggior numero di contributi rispetto al rilassamento longitudinale, $R_2 \geq R_1$.

Pertanto la magnetizzazione sparisce dal piano xy prima che si sia completamente ripristinata lungo l'asse z.

2.3 Processi di rilassamento del ^{15}N

Per studiare la dinamica dell'ID3 sono stati analizzati i processi di rilassamento longitudinale e trasversale dei nuclei ^{15}N appartenenti al *backbone* della proteina e l'effetto nucleare Overhauser (NOE) $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ [12].

Come è stato detto precedentemente, i processi di rilassamento sono causati dai campi magnetici locali oscillanti in modo casuale lungo gli assi x,y e z.

I contributi prevalenti alla formazione di questi campi magnetici locali sono dati da:

- ^{15}N Chemical Shift Anisotropy (CSA);
- interazione dipolare tra $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$.

2.3.1 Chemical Shift Anisotropy (CSA)

Lo spin nucleare ^{15}N non risente solo del campo magnetico esterno statico \mathbf{B}_0 , ma anche di un campo locale generato dai suoi elettroni, che schermano il nucleo stesso dal campo esterno.

$\mathbf{B}_{\text{eff}} = (1-\sigma) \mathbf{B}_0$, dove σ rappresenta la costante di schermo elettronico, che è una grandezza tensoriale.

La distribuzione elettronica è anisotropa, quindi anche la costante di schermo elettronico (σ) è anisotropa.

La rotazione della molecola in soluzione (*tumbling*) fa variare continuamente la sua orientazione rispetto al campo \mathbf{B}_0 . Pertanto, sia l'intensità che la direzione del campo magnetico locale sono soggetti a continui cambiamenti, che causano la fluttuazione casuale nel tempo del campo stesso.

Tale campo magnetico oscillante è alla base dei processi di rilassamento.

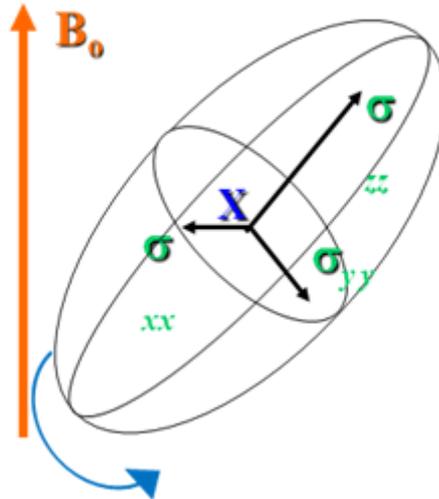


Figura 2.7 Rappresentazione schematica del tensore di schermo elettronico associato ad uno spin ^{15}N .

In soluzione le molecole ruotano rapidamente, per cui la costante di schermo elettronico σ è un valore medio che dipende dalle diverse orientazioni che le molecole possono assumere.

La traccia del tensore σ , riportata di seguito, rappresenta la componente isotropa del tensore; influenza la posizione delle righe, ma non contribuisce ai processi di rilassamento.

$$\sigma_{\text{tr}} = (\sigma_{xx} + \sigma_{yy} + \sigma_{zz})/3$$

La componente anisotropa del tensore σ è responsabile dei fenomeni di rilassamento.

Supponendo una simmetria assiale:

$$\sigma_{\parallel} = \sigma_{zz} ; \sigma_{\perp} = (\sigma_{xx} + \sigma_{yy})/2 ; \Delta\sigma = \sigma_{\parallel} - \sigma_{\perp}$$

Il contributo dell'anisotropia del chemical shift ai processi di rilassamento è direttamente proporzionale al parametro c , definito come ^[9]:

$$c = \omega_{\text{N}} \Delta\sigma / \sqrt{3}$$

2.3.2 Interazione dipolare

Ciascuno spin nucleare ^{15}N del *backbone* della proteina risente del campo magnetico generato dal nucleo vicino (in questo caso $^1\text{H}^{\text{N}}$), tramite l'interazione dipolare tra due momenti magnetici. Si tratta di un'interazione anisotropa perché dipende dall'orientazione della molecola nel campo magnetico \mathbf{B}_0 . Pertanto, sia l'intensità che la direzione del campo magnetico generato da $^1\text{H}^{\text{N}}$ variano a seconda dei movimenti della molecola in soluzione.

Tale campo oscilla perciò in modo casuale ed è responsabile dei processi di rilassamento.

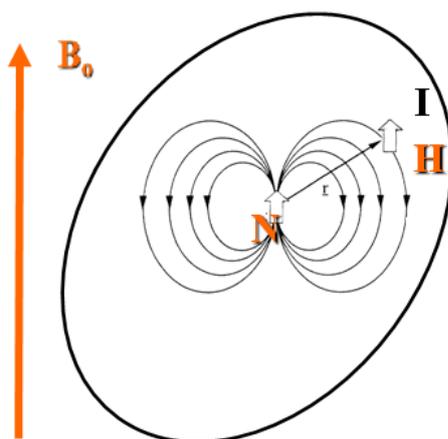


Figura 2.8 Rappresentazione schematica dell'interazione dipolare fra i momenti magnetici di spin associati a ^{15}N e $^1\text{H}^{\text{N}}$.

Il contributo dell'interazione dipolare ai processi di rilassamento è direttamente proporzionale al parametro d , definito come ^[9]:

$$d = \frac{\mu_0 \hbar \gamma_N \gamma_H}{8\pi^2} \langle r_{\text{N-H}}^{-3} \rangle$$

2.4 Come mai studiamo i processi di rilassamento di ^{15}N per ottenere informazioni sulla dinamica del *backbone* delle proteine?

Per analizzare la dinamica di una proteina in soluzione vengono studiate le proprietà di rilassamento del ^{15}N , piuttosto che quelle del ^1H , proprio per superare alcuni problemi relativi alle caratteristiche del protone ^[12].

Innanzitutto non è possibile isolare un'unica interazione dipolare ^1H - ^1H , cioè un unico vettore ^1H - ^1H , perché ciascun protone risente della presenza di tutti gli altri protoni circostanti.

Inoltre le distanze ^1H - ^1H non sono note perché variano a seconda della struttura 3D. Infine risulta difficile separare i contributi che influenzano le proprietà di rilassamento del ^1H .

Proprio per questi motivi è stato sfruttato l'accoppiamento $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N , in cui il ^{15}N è l'azoto ammidico e il protone è quello a lui direttamente legato. Mentre la distanza tra il ^{15}N e gli altri protoni della proteina è superiore a 2,5 Å, quella tra $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N è di circa 1 Å. Dato che l'interazione dipolare è inversamente proporzionale al cubo della distanza tra gli spin, l'interazione dipolo-dipolo tra ^{15}N e $^1\text{H}^{\text{N}}$ è più forte rispetto a quella tra il ^{15}N e gli altri protoni e perciò si può considerare preponderante rispetto alle altre.

In questo modo è possibile considerare i parametri strutturali costanti ed interpretare il rilassamento del ^{15}N per ottenere informazioni dinamiche sulla fluttuazione del vettore $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N .

Come discusso nel paragrafo precedente, oltre all'interazione dipolare $^1\text{H}^{\text{N}}$ - ^{15}N , dobbiamo considerare anche la CSA del ^{15}N . Anche in questo caso, con buona approssimazione, possiamo considerarla costante per gli N ammidici del *backbone* della proteina.

2.4.1 Funzione di autocorrelazione

Dato che i campi magnetici fluttuanti derivano dai moti random del sistema, occorre introdurre la funzione di autocorrelazione, che ci permette di quantificare l'entità di questi moti casuali.

La funzione di autocorrelazione, per i moti random, presenta l'andamento del decadimento esponenziale, perciò può anche essere scritta come:

$$C(t) \propto e^{-\left(\frac{t}{\tau_c}\right)}$$

Compare il termine τ_c , che prende il nome di tempo di correlazione. Maggiore è il valore di τ_c , più lenti saranno i movimenti della molecola in soluzione; minore è il valore di τ_c , più la molecola si muoverà velocemente.

La Trasformata di Fourier di questa funzione definisce la funzione densità spettrale, che mostra come sono distribuiti i moti alle varie frequenze.

$$J(\omega) = \frac{\tau_c}{1 + \omega^2 \tau_c^2}$$

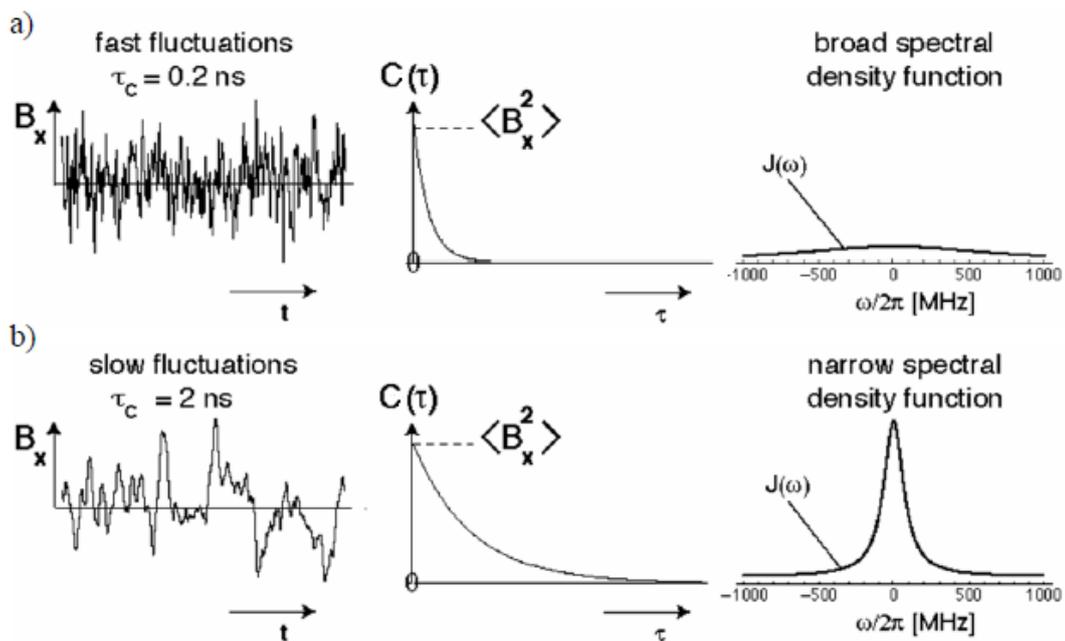


Figura 2.9 Relazione tra campo magnetico fluttuante, funzione di autocorrelazione e densità spettrale ^[9].

- Campo magnetico fluttuante rapidamente, repentino decadimento esponenziale e ampia funzione densità spettrale.
- Campo magnetico fluttuante lentamente, decadimento esponenziale dolce e stretta funzione densità spettrale.

Nella figura sottostante è mostrata la relazione tra le transizioni che interessano il sistema $^1\text{H}^N$ - ^{15}N e le frequenze angolari ad esse associate (ω_N , $\omega_H + \omega_N$, ω_H , $\omega_H - \omega_N$).

Se la frequenza del campo magnetico fluttuante assume uno qualsiasi di questi valori, il campo può causare delle transizioni.

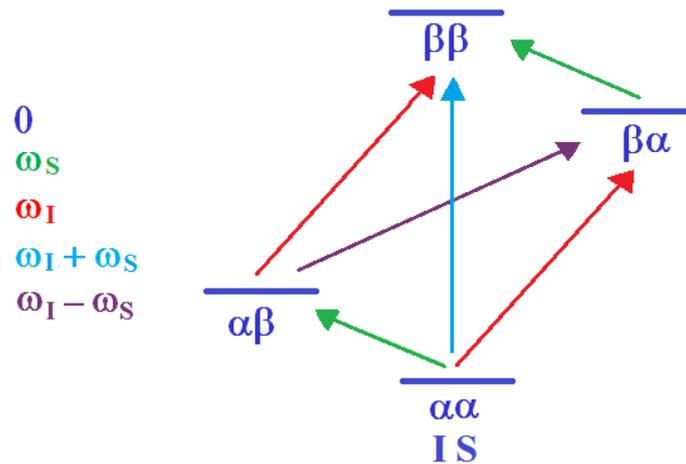


Figura 2.10 Schema dei livelli energetici di due generici spin I ed S accoppiati. Nel nostro caso $I = {}^1\text{H}^N$ e $S = {}^{15}\text{N}$.

Alle frequenze angolari sono associati i corrispondenti valori di densità spettrale $J(\omega_N)$, $J(\omega_H + \omega_N)$, $J(\omega_H)$ e $J(\omega_H - \omega_N)$. Oltre a questi è importante anche il valore della densità spettrale a frequenza 0, $J(0)$, che come abbiamo brevemente descritto in precedenza, fornisce un contributo in più ai processi di rilassamento trasversali. Tali valori delle $J(\omega)$ alle varie frequenze vengono messi in relazione ai parametri di rilassamento trovati sperimentalmente, mediante le espressioni scritte nel paragrafo successivo.

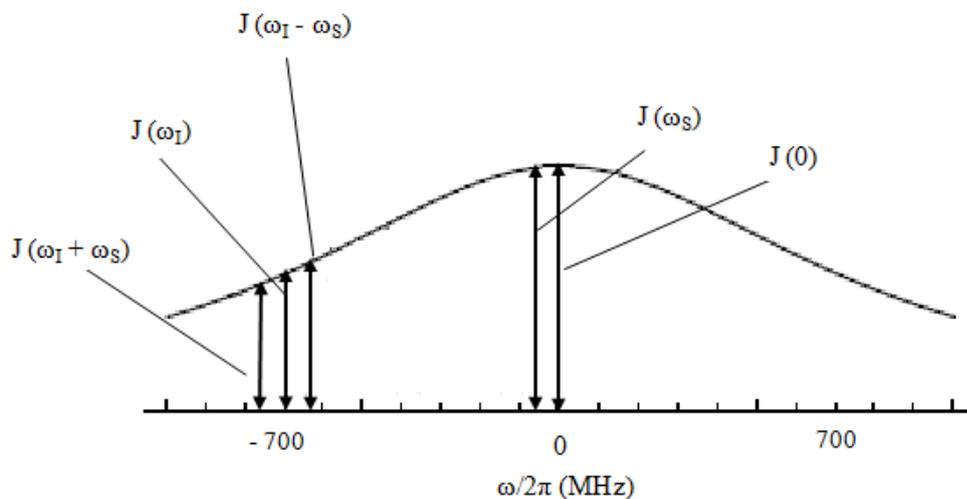


Figura 2.11 Funzione densità spettrale. Nel nostro caso $I = {}^1\text{H}^N$, $S = {}^{15}\text{N}$.

2.5 Interpretazione

I processi di rilassamento dipendono dalla $J(\omega)$ e quindi sono correlati alla dinamica molecolare della proteina ^[12-15]. Pertanto, grazie all'interpretazione del ¹H^N-¹⁵N NOE e dei parametri di rilassamento R_1 ed R_2 relativi al ¹⁵N, determinati sperimentalmente, è possibile ricavare informazioni utili sui movimenti della proteina nello spazio.

Per determinare i valori della funzione densità spettrale $J(0)$, $J(\omega_N)$, $J(\omega_H+\omega_N)$, $J(\omega_H)$ e $J(\omega_H-\omega_N)$, sarebbero necessari cinque dati sperimentali.

Però i parametri di rilassamento di ¹⁵N che si possono ottenere sperimentalmente in modo accurato sono solamente due (R_1 ed R_2).

D'altra parte, i valori delle densità spettrali ad alte frequenze ($\omega_H+\omega_N$, ω_H , $\omega_H-\omega_N$) sono molto simili tra loro, quindi si può ricorrere alla seguente approssimazione:

$$J(\omega_H+\omega_N) \cong J(\omega_H-\omega_N) \cong J(\omega_H)$$

Quest'ultima ci consente di sfruttare i due parametri di rilassamento ($R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$) ed il ¹H^N-¹⁵N NOE per estrarre i valori di densità spettrale, grazie alle espressioni semplificate riportate di seguito:

$$R_1 = \frac{d^2}{4} [3J(\omega_N) + 7J(\omega_H)] + c^2 J(\omega_N)$$

$$R_2 = \frac{d^2}{8} [4J(0) + 3J(\omega_N) + 2J(\omega_H)] + \frac{c^2}{6} [3J(\omega_N) + 4J(0)] + R_{\text{ex}}$$

$$\text{NOE} = 1 + \frac{1}{R_1} \frac{\gamma_H}{\gamma_N} \frac{d^2}{4} [5J(\omega_H)]$$

Il valore del τ_c è direttamente proporzionale al rapporto tra le costanti di tempo R_2 ed R_1 .

$$\tau_c \propto R_2/R_1$$

R_{ex} deriva dai processi di scambio chimico o conformazionale e rappresenta un contributo aggiuntivo al rilassamento trasversale.

La determinazione sperimentale di questo parametro richiede una ulteriore serie di misure (oltre lo scopo di questa tesi).

Proprio per questo motivo, gli esperimenti sono stati effettuati in condizioni tali da rendere minimo il contributo di R_{ex} .

Materiali e metodi

3.1 Campione utilizzato

Le misure NMR sono state effettuate su un campione di ID3 a concentrazione 0,8 mM, arricchito isotopicamente in ^{15}N .

Il campione è stato solubilizzato in un buffer caratterizzato da una concentrazione di fosfato pari a 50 mM e di NaCl pari a 150 mM, a pH = 6,5.

È stata aggiunta il 10% di D_2O per il lock.

3.2 Strumenti

Gli spettri registrati per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$ e per la misura dell'effetto Overhauser nucleare (NOE) $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ sono stati acquisiti con uno spettrometro Bruker Avance operante a 700 MHz, alla temperatura di 297,15 K.

Si riportano di seguito i parametri di acquisizione e di processing comuni a tutti gli esperimenti. Quelli specifici sono invece descritti nei paragrafi successivi.

3.2.1 Parametri di acquisizione e di processing degli spettri per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE

	PARAMETRI DI ACQUISIZIONE				PARAMETRI DI PROCESSING
	Numero di punti acquisiti	Finestra spettrale	Tempo di acquisizione	Carrier	Numero di punti della matrice finale
F2 ($^1\text{H}^{\text{N}}$)	2048	12 ppm	112 ms	4,75 ppm	2048
F1 (^{15}N)	512	23 ppm	156 ms	117,5 ppm	1024

Tabella 3.1 Parametri di acquisizione e di processing.

L'impulso selettivo sui protoni del solvente, che ha l'obiettivo di sopprimere il segnale intenso dell'acqua, ha una forma rettangolare e la durata di 1ms.

Il disaccoppiamento del ^{15}N viene realizzato con la sequenza di disaccoppiamento 'Garp4', che prevede di inviare sul ^{15}N impulsi a 90° di 1 kHz.

Nelle sequenze di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$ l'intervallo di tempo d1 tra ogni scansione è pari a 3 s e sono stati realizzati 8 scan per ciascun incremento e 32 dummy scan.

Nelle sequenze relative al $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE e al riferimento, l'intervallo di tempo tra la fine di un'acquisizione e l'inizio di un nuovo esperimento è pari a 6 s ed è suddiviso in due periodi di uguale durata:

- D3: 3 s, in cui il vettore magnetizzazione si ripristina completamente lungo l'asse z;
- D1: 3 s, in cui il protone viene saturato con un treno di impulsi ad alta potenza.

Sono stati effettuati 56 scan per ciascun incremento e 64 dummy scan.

Per tutte e tre le sequenze è stata impiegata la funzione di pesaggio 'seno quadro'.

Inoltre, per ogni spettro è stata applicata una correzione della linea di base, sia per la dimensione diretta che indiretta, in modo da eliminare le oscillazioni del rumore di fondo.

3.3 Parametri sperimentali

Le sequenze impiegate per la misura di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono descritte in dettaglio nel Capitolo 4. I parametri sperimentali sono riportati nei paragrafi successivi.

3.3.1 Misura di $R_1(^{15}\text{N})$

Nella sequenza relativa ad $R_1(^{15}\text{N})$ è stato inserito il blocco SATN, in cui il vettore magnetizzazione, posto lungo l'asse z, viene lasciato rilassare.

In totale sono stati condotti 10 esperimenti. Il numero di volte che il blocco SATN viene ripetuto, espresso dal valore del COUNTER, aumenta passando dalla prima alla decima acquisizione.

Grazie alla seguente formula è possibile determinare, per ogni esperimento, l'intervallo di tempo totale coperto dalle ripetizioni del blocco SATN.

$$\text{Durata totale ripetizioni SATN} = 14 \text{ ms} * (\text{COUNTER} + 1)$$

14 ms rappresenta la durata di un singolo blocco SATN.

Nella tabella sottostante sono riportati i parametri relativi a ciascun esperimento.

N° esperimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
COUNTER	1	4	7	11	19	31	44	64	84	99
Durata totale ripetizioni SATN (ms)	28	70	112	168	280	448	630	910	1190	1400

Tabella 3.2 Parametri relativi agli esperimenti realizzati per la misura di $R_1(^{15}\text{N})$.

3.3.2 Misura di $R_2(^{15}\text{N})$

Per quanto riguarda la sequenza relativa ad $R_2(^{15}\text{N})$ sono stati inseriti due blocchi:

- il primo, chiamato ‘loop di compensazione’, cui è associato il parametro L5;
- il secondo, chiamato CPMG, cui è associato il parametro L4. In questo blocco la magnetizzazione, che è stata completamente trasferita dal protone al ^{15}N posto sul piano xy, viene lasciata rilassare.

Il numero di volte che il blocco CPMG viene ripetuto è diverso per ciascuno dei 9 esperimenti condotti. Infatti, passando dalla prima alla nona acquisizione, il segnale viene lasciato rilassare sul piano per un intervallo di tempo via via crescente. Per evitare che la temperatura del campione vari da un esperimento all’altro, è stato inserito il blocco iniziale, che ha il compito di compensare le differenze di calore. Quindi, se il CPMG è ripetuto un numero limitato di volte, il campione verrà scaldato poco e di conseguenza il blocco iniziale dovrà essere lungo, mentre nel caso in cui il CPMG sia ripetuto molte volte, il blocco iniziale dovrà essere corto.

La somma dei parametri L4 ed L5, rappresentativi rispettivamente dell’intervallo di tempo coperto dalle ripetizioni del CPMG e del blocco iniziale, è perciò una costante ed è pari a 18.

Nella tabella sottostante sono riportati i parametri relativi a ciascun esperimento.

Durata totale ripetizioni CPMG (ms)	32	95	127	158	253	317	412	507	570
L4	1	3	4	5	8	10	13	16	18
L5	17	15	14	13	10	8	5	2	0

Tabella 3.3 Parametri relativi agli esperimenti realizzati per la misura di $R_2(^{15}\text{N})$.

3.3.3 Misura del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE

Per la misura dei $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono stati registrati alternativamente due esperimenti.

In un esperimento (NOE) i protoni sono stati saturati per 3 s, utilizzando un treno di impulsi ad alta potenza in grado di ruotare la magnetizzazione del protone di 120° . Ogni impulso è stato seguito da un intervallo di 5 ms. Nell'altro esperimento (riferimento) invece i protoni non sono stati saturati.

Dato che l'effetto nucleare Overhauser è definito come la variazione frazionaria del segnale del ^{15}N in seguito alla saturazione del $^1\text{H}^{\text{N}}$, il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE è stato calcolato per ciascun gruppo $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ come rapporto tra l'altezza del picco quando il protone viene saturato (I) e quella dello stesso picco quando il protone non viene saturato (I_0).

$$\text{NOE} = I/I_0$$

3.4 Programmi usati

1) CARA (Computer Aided Resonance Assignment) ^[16]

L'assegnamento dei residui, ottenuto da precedenti esperimenti in 4D, è stato trasferito sui nuovi spettri. E' stato così possibile associare a ciascun picco l'amminoacido corrispondente e misurarne l'intensità.

2) Origin

Con questo programma sono stati effettuati:

- i grafici relativi al *bulkiness* ed SSP;
- i *fitting* per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$ per ciascun residuo. Per ogni amminoacido, infatti, è stato realizzato un grafico che rappresenta il decadimento esponenziale del segnale in funzione del tempo. In ascissa troviamo la durata degli intervalli di tempo coperti dalle ripetizioni del blocco SATN (nei grafici relativi ad $R_1(^{15}\text{N})$) e del blocco CPMG (nei grafici relativi ad $R_2(^{15}\text{N})$), mentre in ordinata le variazioni di intensità del picco in esame.

L'equazione della funzione impiegata nel *fitting* è:

$$I = Ae^{-Bt}$$

dove I è l'intensità del picco e B è $R_1(^{15}\text{N})$ o $R_2(^{15}\text{N})$.

- i *plot* di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE in funzione del residuo;

3) SSP (Secondary Structure Propensities from chemical shifts)

Elabora i chemical shifts dei differenti nuclei ($^1\text{H}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$) appartenenti ad un certo residuo, per ottenere un valore che rappresenta la frazione di struttura secondaria α o β dell'amminoacido ^[17].

4) Bulkiness

È un programma che valuta, per ciascun amminoacido, l'ingombro sterico dovuto al volume del residuo stesso e dei residui vicini ^[18].

Sequenze di impulsi

4.1 Introduzione

Per la determinazione dei valori di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE di ciascun amminoacido sono state impiegate tre diverse sequenze di impulsi. Ognuna di esse è caratterizzata dalla sequenza di base opportunamente modificata con dei blocchi specifici.

La sequenza di base è l'HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), un esperimento bidimensionale ad alta risoluzione che prevede il trasferimento della magnetizzazione dal protone al ^{15}N , l'evoluzione del chemical shift del ^{15}N ed infine il ritorno della magnetizzazione sul protone, che viene così acquisito.

Si tratta di un esperimento out-and-back perché la magnetizzazione, che si trova inizialmente sul protone, segue un percorso che la porta sull'eteroatomo per poi tornare sul protone, percorrendo un cammino inverso.

Attraverso il formalismo degli operatori prodotto ^[19:20], che è valido nel limite dell'accoppiamento debole ($\Delta\nu \gg J_{\text{H-N}}$), è possibile descrivere il 'pathway' della magnetizzazione lungo l'intera sequenza di impulsi.

Gli impulsi agiscono sul vettore magnetizzazione come un torchio, facendolo ruotare di un certo angolo in base alla loro lunghezza e potenza.

Come mostra la figura sottostante, dato un generico vettore I , posto lungo l'asse z , l'applicazione di un impulso lungo l'asse y , lo fa ruotare di un angolo β . Questo fenomeno viene rappresentato mediante la convenzione della 'mano destra'.

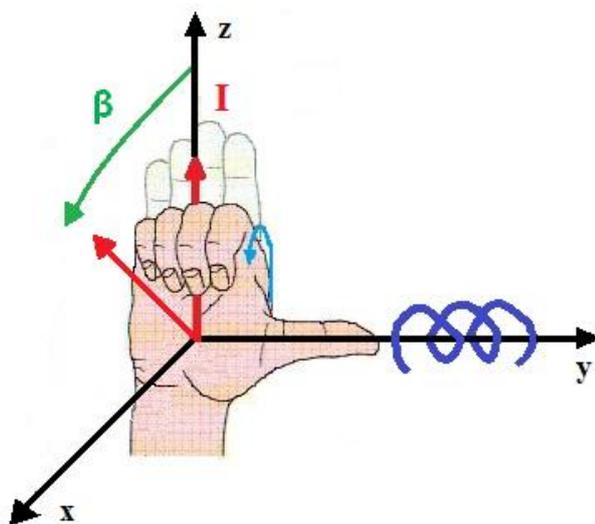


Figura 4.1 Generico vettore I posto lungo l'asse z , su cui agisce un impulso applicato lungo l'asse y , che è in grado di farlo ruotare di un angolo β .

$$I_z \xrightarrow{\beta_y} I_z \cos\beta + I_x \sin\beta$$

Il formalismo degli operatori prodotto si basa su due regole fondamentali:

1) Regola dell'evoluzione del chemical shift

Si consideri un generico spin I che si trova sul piano xy e che evolve nel rotating frame con una velocità angolare Ω_I per un tempo t .

$$I_x \xrightarrow{\Omega_I I_z} I_x \cos(\Omega_I t) + I_y \sin(\Omega_I t)$$

2) Regola dell'evoluzione dell'accoppiamento scalare

Si consideri un generico spin I che si trova sul piano xy , che interagisce per un tempo t , per mezzo dell'accoppiamento scalare, con lo spin S .

$$I_x \xrightarrow{2\pi J_{I-S} I_z S_z} I_x \cos(\pi J_{I-S} t) + 2I_y S_z \sin(\pi J_{I-S} t)$$

$$I_y \xrightarrow{2\pi J_{I-S} I_z S_z} I_y \cos(\pi J_{I-S} t) - 2I_x S_z \sin(\pi J_{I-S} t)$$

$$\begin{aligned}
 & 2\pi J_{I-S} I_z S_z \\
 2I_y S_z & \xrightarrow{\hspace{2cm}} 2I_y S_z \cos(\pi J_{I-S} t) - I_x \sin(\pi J_{I-S} t) \\
 & 2\pi J_{I-S} I_z S_z \\
 2I_x S_z & \xrightarrow{\hspace{2cm}} 2I_x S_z \cos(\pi J_{I-S} t) + I_y \sin(\pi J_{I-S} t)
 \end{aligned}$$

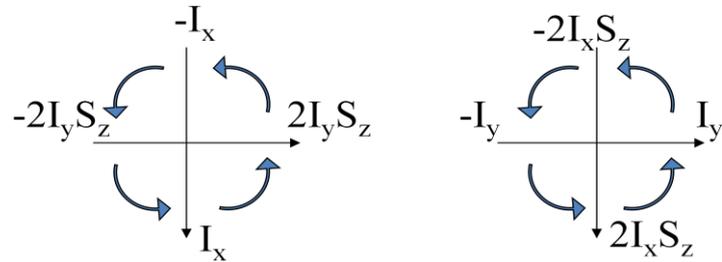


Figura 4.2 Regola dell'evoluzione dell'accoppiamento scalare.

4.2 Sequenze

4.2.1 Sequenza di base

Si consideri un sistema di due spin $^1\text{H}^{\text{N}}$ e ^{15}N con offset Ω_{H} e Ω_{N} e accoppiati scalarmente con $J_{\text{H-N}}$.

Qui di seguito è riportata in dettaglio la sequenza di base ^[15].

Per semplicità sono stati omessi i gradienti di campo magnetico.

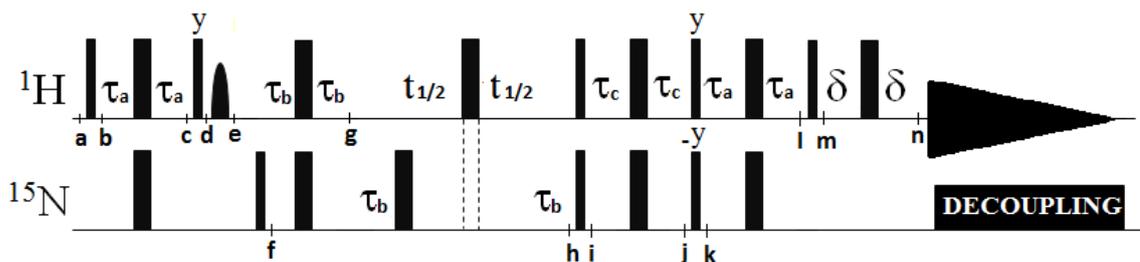


Figura 4.3 Sequenza di base.

a) All'equilibrio il vettore magnetizzazione \mathbf{M} si trova lungo il semiasse positivo z.

$$\mathbf{H}_z$$

b) Dopo un impulso a 90° lungo x su $^1\text{H}^{\text{N}}$

$$-\mathbf{H}_y$$

b \rightarrow c Si inviano due impulsi simultanei a 180° lungo x su $^1\text{H}^{\text{N}}$ e sul ^{15}N ; evolve l'accoppiamento scalare, ma non il chemical shift; cambia il segno di $-\mathbf{H}_y$ in $+\mathbf{H}_y$ ¹.

$$2\pi J_{\text{H-N}} \mathbf{H}_z \mathbf{N}_z$$

$$\mathbf{H}_y \longrightarrow \mathbf{H}_y \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_a) - 2\mathbf{H}_x \mathbf{N}_z \text{sen}(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_a)$$

$$\tau_a = 1/(4J_{\text{H-N}})$$

$$\cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_a) = 0$$

$$\text{sen}(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_a) = 1$$

c) $-2\mathbf{H}_x \mathbf{N}_z$

d) Dopo un impulso a 90° lungo y su $^1\text{H}^{\text{N}}$

$$2\mathbf{H}_z \mathbf{N}_z$$

d \rightarrow e Si manda un impulso 90° lungo x selettivo sui protoni dell'acqua e successivamente un gradiente di campo magnetico. In questo modo il segnale del solvente si sfasa e quindi viene soppresso.

e) $2\mathbf{H}_z \mathbf{N}_z$

f) Dopo un impulso a 90° lungo x sul ^{15}N

$$-2\mathbf{H}_z \mathbf{N}_y$$

f \rightarrow g Si inviano due impulsi contemporanei a 180° lungo x sul $^1\text{H}^{\text{N}}$ e ^{15}N . Evolve solo l'accoppiamento scalare; non evolve il chemical shift del ^{15}N .

$$2\pi J_{\text{H-N}} \mathbf{H}_z \mathbf{N}_z$$

$$2\mathbf{H}_z \mathbf{N}_y \longrightarrow 2\mathbf{H}_z \mathbf{N}_y \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) - \mathbf{N}_x \text{sen}(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b)$$

$$\tau_b = 1/(4J_{\text{H-N}})$$

$$\cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) = 0$$

$$\text{sen}(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) = 1$$

¹ Il segno cambia se la fase dell'impulso a 180° e quella della magnetizzazione sono ortogonali.

g) - N_x

g \rightarrow h Si invia prima un impulso a 180° lungo x sul ^{15}N e poi un impulso a 180° lungo x su $^1\text{H}^N$. Evolvono l'accoppiamento scalare e il chemical shift del ^{15}N , per un tempo rispettivamente pari a $2\tau_b$ e t_1 .

$$- N_x \xrightarrow{\Omega_N N_z} - N_x \cos(\Omega_N t_1) - N_y \sin(\Omega_N t_1)$$

$$- N_x \cos(\Omega_N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{H-N}} H_z N_z} - N_x \cos(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) - 2H_z N_y \cos(\Omega_N t_1) \sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b)$$

$$- N_y \sin(\Omega_N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{H-N}} H_z N_z} - N_y \sin(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) + 2H_z N_x \sin(\Omega_N t_1) \sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b)$$

In totale si ottiene:

$$- N_x \cos(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) - 2H_z N_y \cos(\Omega_N t_1) \sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) - N_y \sin(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) + 2H_z N_x \sin(\Omega_N t_1) \sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b)$$

$$\tau_b = 1/(4J_{\text{H-N}})$$

$$\cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) = 0$$

$$\sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_b) = 1$$

h) - $2H_z N_y \cos(\Omega_N t_1) + 2H_z N_x \sin(\Omega_N t_1)$

i) Si applicano due impulsi contemporanei a 90° lungo x su $^1\text{H}^N$ e ^{15}N . Si genera così un termine di doppio quanto.

$$2H_y N_z \cos(\Omega_N t_1) - 2H_y N_x \sin(\Omega_N t_1)$$

i \rightarrow j Si inviano due impulsi contemporanei a 180° lungo x su $^1\text{H}^N$ e ^{15}N ; evolve l'accoppiamento scalare, ma non i chemical shifts di $^1\text{H}^N$ e ^{15}N .

$$- 2H_y N_z \cos(\Omega_N t_1) + 2H_y N_x \sin(\Omega_N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{\text{H-N}} H_z N_z} - 2H_y N_z \cos(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_c) + H_x \cos(\Omega_N t_1) \sin(2\pi J_{\text{H-N}} \tau_c) + 2H_y N_x \sin(\Omega_N t_1)$$

$$\tau_c = 1/(4J_{H-N})$$

$$\cos(2\pi J_{H-N} \tau_c) = 0$$

$$\text{sen}(2\pi J_{H-N} \tau_c) = 1$$

j) $H_x \cos(\Omega_N t_1) + 2H_y N_x \text{sen}(\Omega_N t_1)$

k) Si inviano due impulsi contemporanei a 90° lungo y su $^1H^N$ e lungo - y sul ^{15}N . Si recupera così il segnale di doppio quanto, che altrimenti sarebbe stato perso.

- $H_z \cos(\Omega_N t_1) + 2H_y N_z \text{sen}(\Omega_N t_1)$

k \rightarrow 1 si inviano due impulsi contemporanei a 180° lungo x su $^1H^N$ e ^{15}N . Evolve solo l'accoppiamento scalare, ma non i chemical shift.

$$-H_z \cos(\Omega_N t_1) - 2H_y N_z \text{sen}(\Omega_N t_1) \xrightarrow{2\pi J_{H-N} H_z N_z} -H_z \cos(\Omega_N t_1) - 2H_y N_z \text{sen}(\Omega_N t_1) \cos(2\pi J_{H-N} \tau_a) + H_x \text{sen}(\Omega_N t_1) \text{sen}(2\pi J_{H-N} \tau_a)$$

$$\tau_a = 1/(4J_{H-N})$$

$$\cos(2\pi J_{H-N} \tau_a) = 0$$

$$\text{sen}(2\pi J_{H-N} \tau_a) = 1$$

l) $-H_z \cos(\Omega_N t_1) + H_x \text{sen}(\Omega_N t_1)$

m) dopo un impulso a 90° lungo x sul $^1H^N$

$H_y \cos(\Omega_N t_1) + H_x \text{sen}(\Omega_N t_1)$

m \rightarrow n Si invia un impulso a 180° lungo x sul $^1H^N$

n) $-H_y \cos(\Omega_N t_1) + H_x \text{sen}(\Omega_N t_1)$

Si acquisisce il segnale del protone irradiando il ^{15}N per realizzare il disaccoppiamento.

All'interno della sequenza di base è possibile individuare i seguenti *building blocks*:

1) "Refocused INEPT" (a – g)

consente di trasferire completamente la magnetizzazione dal protone al ^{15}N , passando da un termine in fase sul protone (H_x) ad un termine in fase sul ^{15}N ($-N_x$). In questo modo, piccole modifiche alla sequenza di base, permettono di determinare R_1 ed R_2 relativi al rilassamento del ^{15}N e il $^1H^N$ - ^{15}N NOE.

2) Sensitivity improvement (h – l) ^[21]

dopo aver acquisito l'informazione sull'eteronucleo, permette di far tornare la magnetizzazione sul protone, recuperando il termine di doppio quanto.

3) Spin echo (l – n)

Serve, abbinato all'uso dei gradienti di campo magnetico, per implementare la quadratura del chemical shift del ¹⁵N (echo/antiecho).

4.2.2 Sequenze $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$

Le sequenze relative alla determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$ si ottengono inserendo all'interno della sequenza di base (Figura 4.3) dei blocchi specifici.

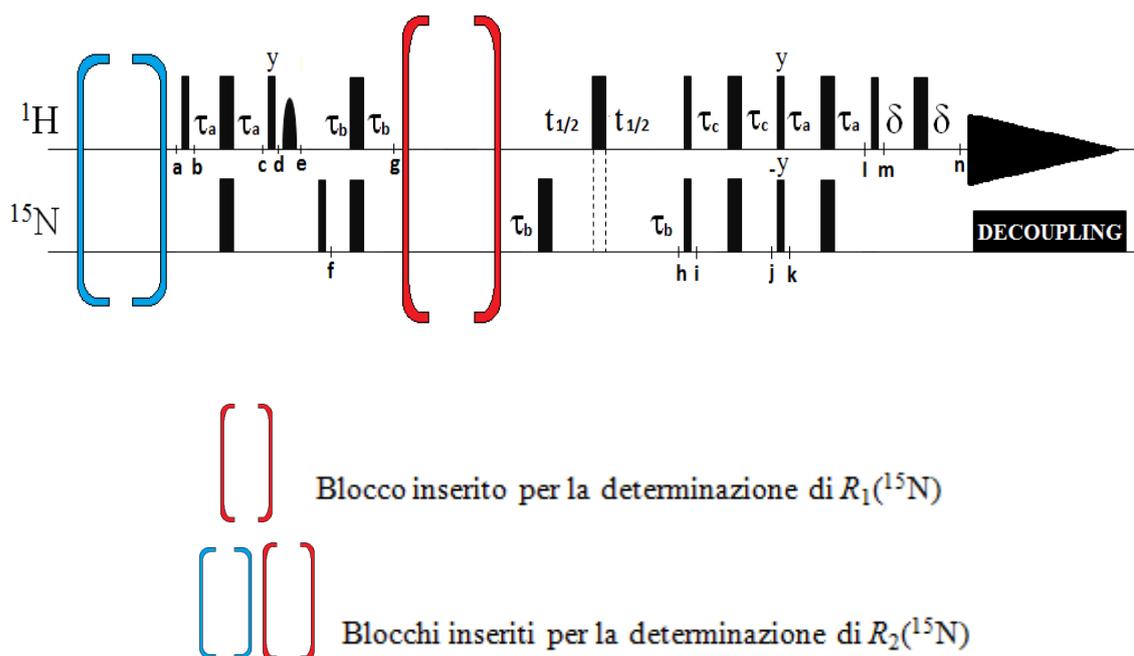


Figura 4.4 Schema generale della sequenza per la determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$.

A cosa serve il blocco SATN

Abbiamo visto che per ogni esperimento il vettore magnetizzazione \mathbf{M} viene completamente trasferito dal protone all'eteronucleo e poi viene posto lungo l'asse z . A questo punto viene applicato il blocco SATN, che viene ripetuto un certo numero di volte. Durante il blocco SATN, l'intensità del vettore magnetizzazione decade con un andamento di tipo esponenziale.

Posto il vettore \mathbf{M} lungo l'asse z , avremmo potuto lasciarlo libero di rilassare, senza inserire il blocco SATN. Così facendo però non avremmo potuto sfruttare l'effetto di questo blocco, che è in grado di eliminare il fenomeno della cross correlazione ^[12] e di conseguenza consentire al processo di rilassamento longitudinale di essere governato solamente da un decadimento esponenziale.

4.2.2.2 Sequenza per la determinazione di $R_2(^{15}\text{N})$

Analizziamo in dettaglio il blocco inserito nella sequenza di base per lo studio del rilassamento trasversale.

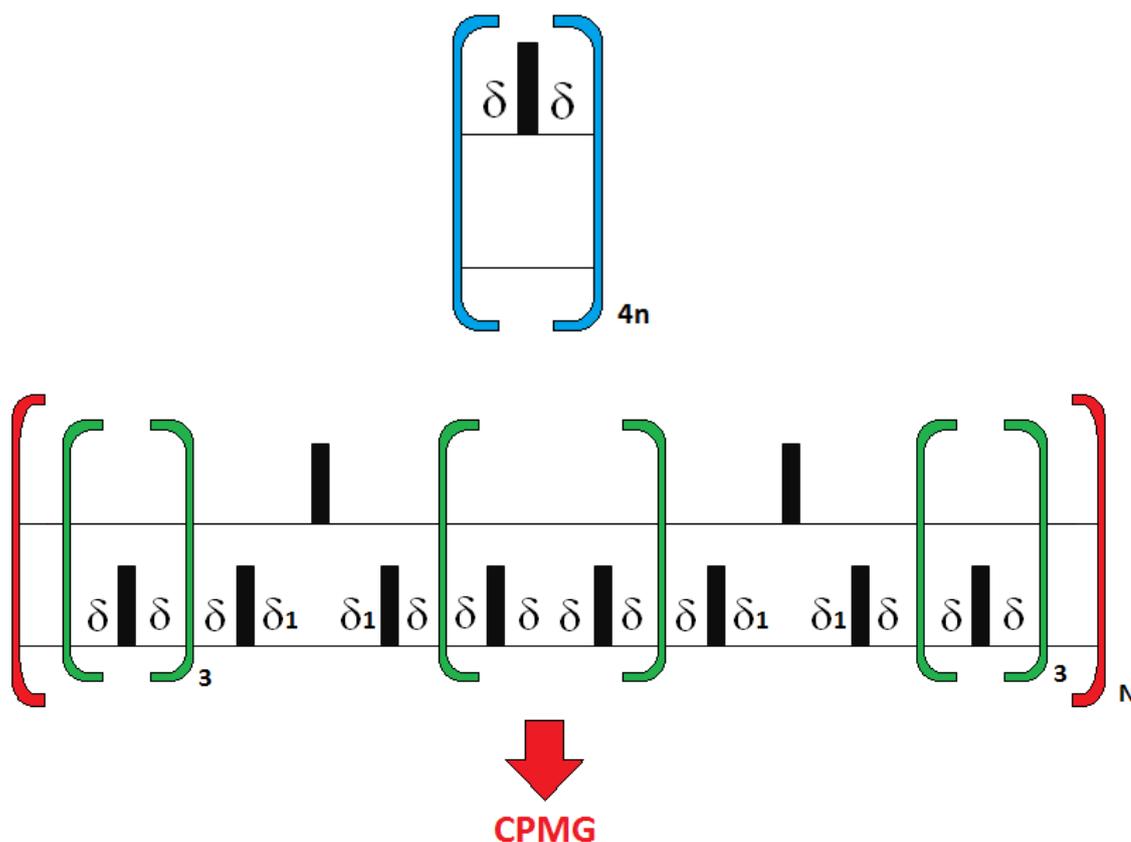


Figura 4.6 Blocchi inseriti nella sequenza di base per la determinazione di $R_2(^{15}\text{N})$.

A cosa serve il blocco CPMG

Il vettore \mathbf{M} , una volta posto sul piano xy , è soggetto sia all'evoluzione del chemical shift, che alla progressiva attenuazione dovuta al processo di rilassamento trasversale.

Come è noto, per rifocalizzare l'evoluzione del chemical shift, sarebbe sufficiente un impulso a 180° in mezzo all'intervallo di tempo.

L'uso di un treno di impulsi a 180° sul ^{15}N , ha lo scopo di minimizzare il contributo dei processi di scambio chimico o conformazionale (R_{ex})^[12].

Un ulteriore effetto che complica l'interpretazione dei dati, consiste nell'evoluzione dei processi di rilassamento derivanti da fenomeni di cross-correlazione della CSA di ^{15}N con l'accoppiamento dipolare $^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$. L'introduzione degli impulsi a 180° sul $^1\text{H}^{\text{N}}$ permette di limitare questo effetto^[12].

Pertanto, il blocco CPMG permette di fittare i decadimenti con un singolo termine esponenziale e di minimizzare il contributo di R_{ex} nell'interpretazione dei risultati.

Quindi, in seguito all'inserimento di tale blocco, abbiamo introdotto una modulazione del segnale che include $N_x e^{-R_2 t_{\text{CPMG}}}$.

4.2.3 Sequenza per il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE

Per quanto riguarda la determinazione del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE, mentre la prima parte della sequenza è differente rispetto alla sequenza di base, la seconda parte è identica.

Infatti, dal punto a al punto g, viene applicato il seguente blocco.

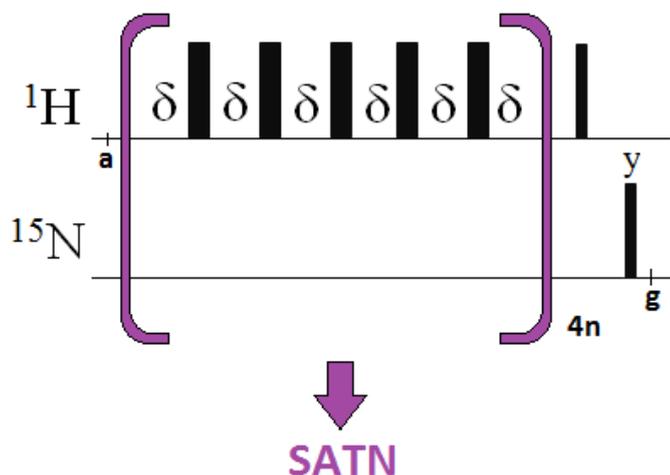


Figura 4.7 Blocco inserito nella sequenza di base per la determinazione del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.

Il protone viene irradiato con un treno di impulsi, con lo scopo di saturarlo, per misurare il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.

Successivamente vengono applicati sul protone un impulso a 90° lungo x ed un gradiente di campo magnetico, che ha lo scopo di far sparire dal piano xy il segnale del protone ed assicurare che la magnetizzazione sia originata dal ^{15}N .

Grazie ad un impulso a 90° lungo y sul ^{15}N , il vettore magnetizzazione viene posto sul piano xy, dove evolve come descritto in precedenza, a partire dal punto g.

Dal punto g fino al punto n la sequenza è identica a quella di base.

Nella sequenza relativa allo spettro di riferimento il blocco SATN è omissa.

Discussione dei risultati

5.1 Spettro ^1H - ^{15}N HSQC

Lo spettro ^1H - ^{15}N HSQC (figura 5.1) mostra che molti picchi sono sovrapposti, poiché sono concentrati in intervalli di pochi ppm. Già da questa prima osservazione si può dedurre che la sequenza amminoacidica è caratterizzata dall'assenza di una rigida struttura secondaria e terziaria [22]. Infatti il chemical shift dipende da più fattori, ma il contributo principale deriva dall'organizzazione in una struttura 3D. Grazie all'analisi dei parametri di rilassamento longitudinale e trasversale del ^{15}N e del ^1H - ^{15}N NOE, si può scoprire se la catena polipeptidica è caratterizzata da proprietà dinamiche che variano con la sequenza primaria.

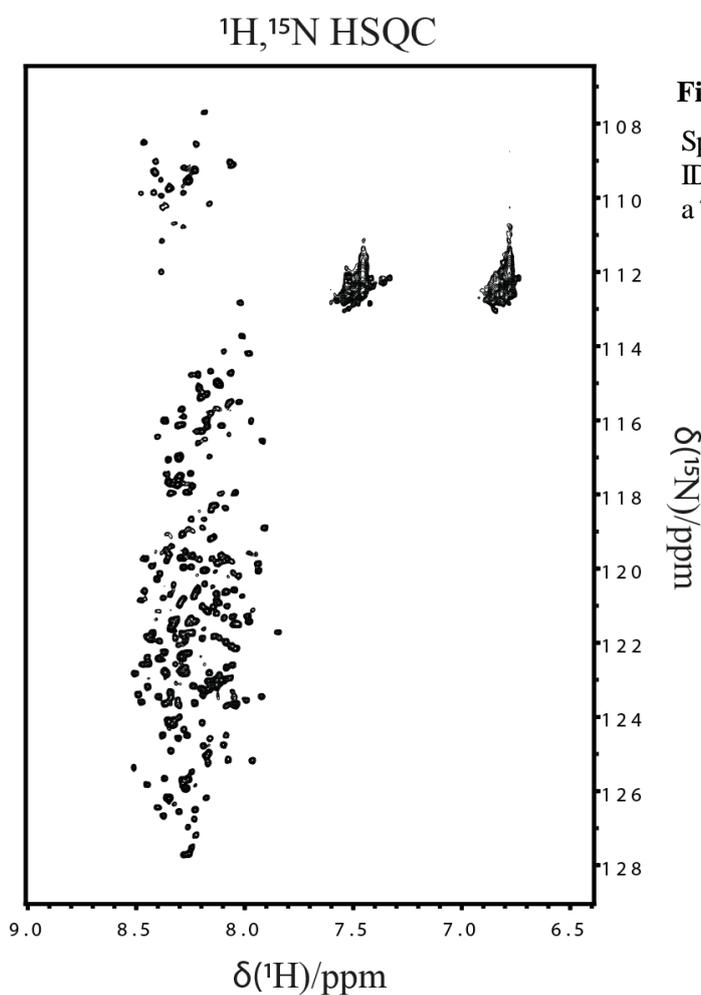


Figura 5.1

Spettro ^1H - ^{15}N HSQC del *linker* ID3 della CBP umana, registrato a 700 MHz, T = 297,15 K.

5.2 Determinazione di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N}$ NOE

Per la determinazione dei valori di $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$, sono stati realizzati rispettivamente 10 e 9 esperimenti.

Il tempo in cui il vettore \mathbf{M} , posto lungo l'asse z per studiare il rilassamento longitudinale e sul piano xy per studiare il rilassamento trasversale, ha a disposizione per tornare alla condizione di equilibrio, aumenta passando dal primo all'ultimo esperimento.

Per ogni spettro sono state misurate le intensità dei picchi, espresse sotto forma di altezza, mediante il programma CARA. Attraverso il *fitting* dei dati di 'Intensità' in funzione del 'tempo' con una funzione esponenziale, per ciascun residuo sono stati determinati i valori delle costanti $R_1(^{15}\text{N})$ ed $R_2(^{15}\text{N})$ (ed i relativi errori).

Come esempio della qualità dei dati, sono riportati i risultati ottenuti per la Serina 221. Come si può vedere dalle figure 5.2 e 5.3, la funzione che descrive l'andamento delle intensità (I) dei picchi funzione del tempo si può approssimare ad un decadimento esponenziale.

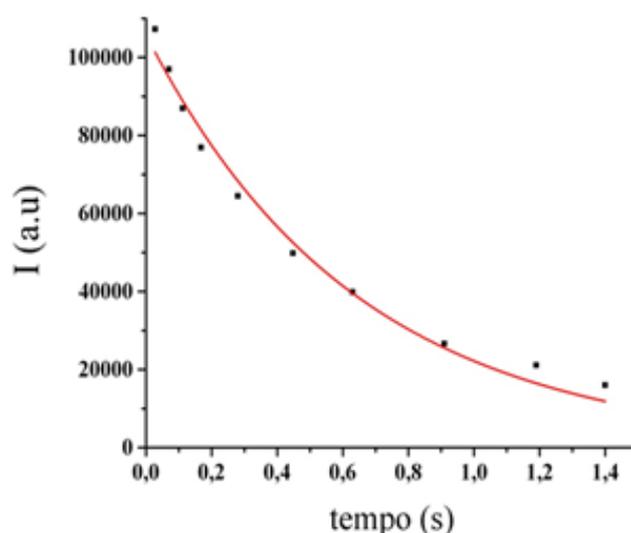


Figura 5.2 *Fitting* dei dati di 'Intensità' in funzione del 'tempo' relativo al rilassamento longitudinale. Si noti che la scala dell'asse delle ascisse è diversa da quella della figura 5.3.

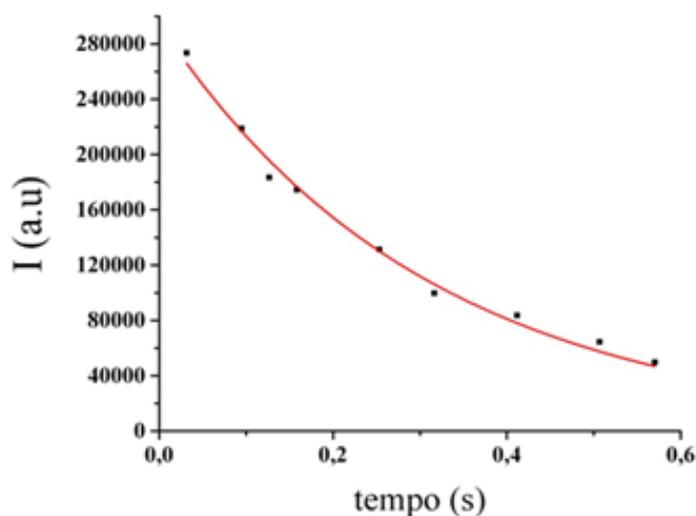


Figura 5.3 *Fitting* dei dati di 'Intensità' in funzione del 'tempo' relativo al rilassamento trasversale. Si noti che la scala dell'asse delle ascisse è diversa da quella della figura 5.2.

Il rilassamento trasversale è più rapido del rilassamento longitudinale, perché l'intensità decade più velocemente. Questo è dovuto al fatto che, mentre il rilassamento longitudinale è causato solo dai campi magnetici oscillanti alla frequenza di Larmor lungo gli assi x e y, il rilassamento trasversale è influenzato anche dal contributo dei campi lungo l'asse z.

Per la determinazione dell'effetto nucleare Overhauser (NOE) $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ sono stati registrati sia uno spettro in cui il protone è saturato con un treno di impulsi ad alta potenza, che uno spettro di riferimento, in cui invece il protone non è stato alterato.

Il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE è stato calcolato come rapporto tra le intensità dei picchi nello spettro NOE e quelle nello spettro di riferimento.

5.3 Plot $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e $^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE in funzione del residuo

I dati ottenuti per $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 , con i relativi errori, e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE, sono stati riportati in funzione del numero del residuo nelle figure 5.4-5.7, mostrate qui di seguito.

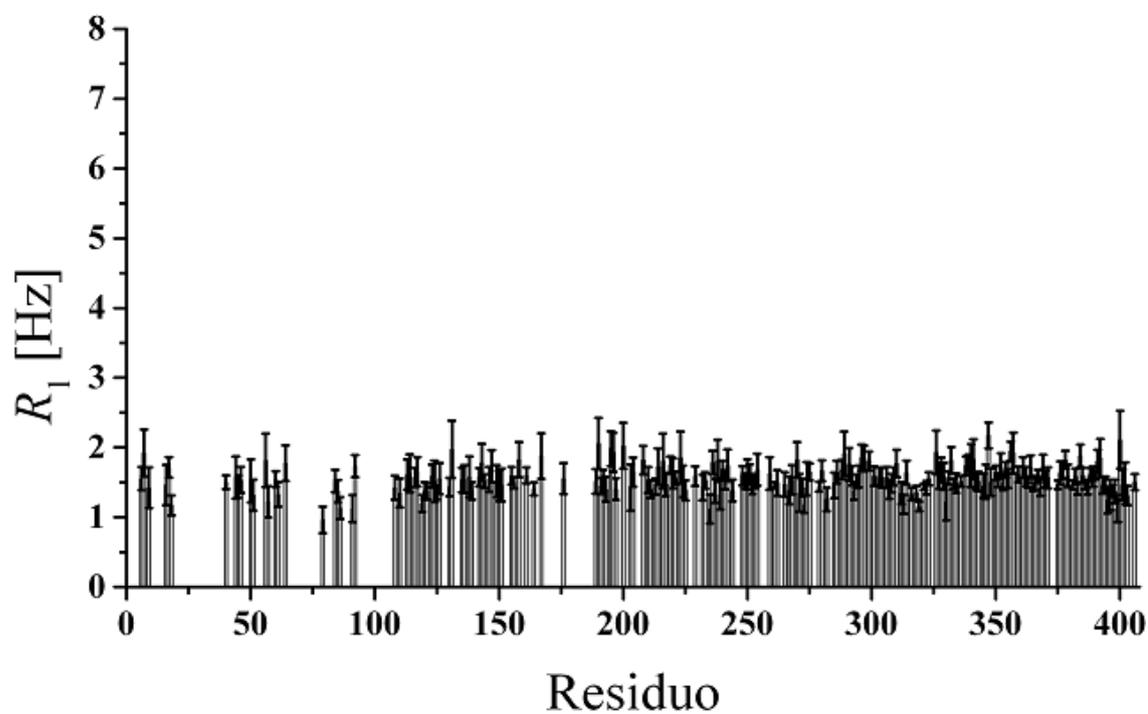


Figura 5.4 Plot degli ' $R_1(^{15}\text{N})$ ' in funzione del 'Residuo'.

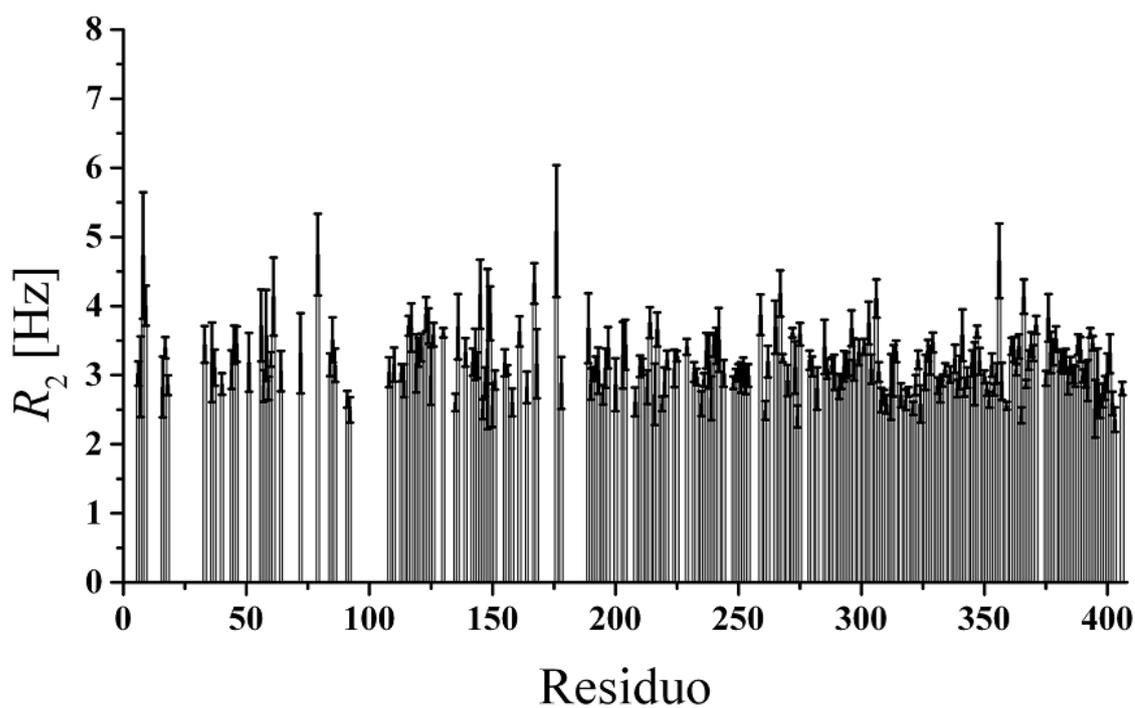


Figura 5.5 Plot degli ' $R_2(^{15}\text{N})$ ' in funzione del 'Residuo'.

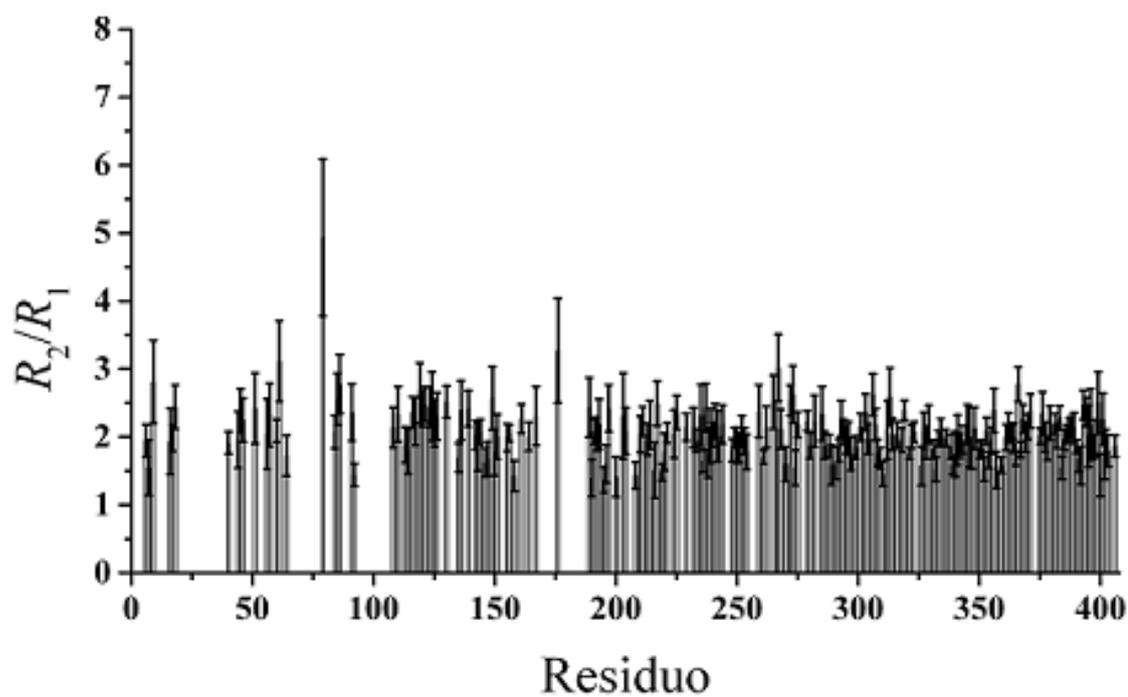


Figura 5.6 Plot del rapporto ' R_2/R_1 ' in funzione del 'Residuo'.

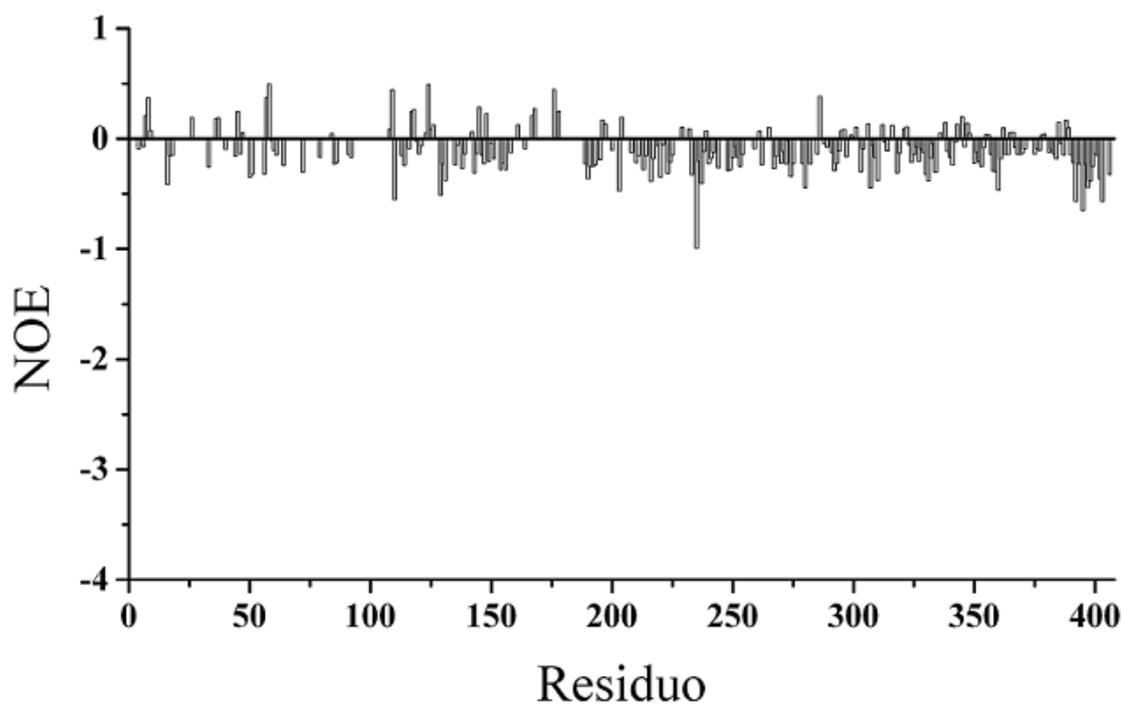


Figura 5.7 Plot del ' $\text{NOE} (^1\text{H}^{\text{N}}-^{15}\text{N})$ ' in funzione del 'Residuo'.

5.4 Interpretazione dei risultati

Dall'analisi dei grafici si possono ricavare informazioni sulla dinamica e sulla flessibilità della sequenza amminoacidica in esame.

Innanzitutto, si possono confrontare i valori medi di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e l'andamento del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE con quelli previsti per una proteina globulare delle stesse dimensioni (406 amminoacidi), con $\tau_c = 20$ ns.

	$R_1(^{15}\text{N})$	$R_2(^{15}\text{N})$	R_2/R_1	$^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE
Proteina globulare	0,55 Hz	28 Hz	52	$\cong 1$
ID3 (dati sperimentali)	1,56 Hz	3,17 Hz	2	$\ll 1$

Tabella 5.1 Confronto dei valori medi di $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e dell'andamento del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE relativi all'ID3 con quelli previsti per una proteina globulare di 406 amminoacidi, con $\tau_c = 20$ ns.

Per quanto riguarda l'ID3, si nota che il valore medio di $R_1(^{15}\text{N})$ è più grande del doppio di quello della proteina globulare, mentre il valore medio di $R_2(^{15}\text{N})$ è più piccolo di un ordine di grandezza. Di conseguenza il rapporto R_2/R_1 , che è direttamente proporzionale al τ_c , è nettamente inferiore. Il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE è molto più piccolo di 1.

Tutti questi fattori suggeriscono che la catena polipeptidica in esame sia caratterizzata da una grande flessibilità.

Osservando i grafici riportati nelle figure 5.4-5.7 si nota che:

- i valori di $R_1(^{15}\text{N})$ subiscono solo piccole variazioni attorno al valore medio. In particolare nella prima parte della catena polipeptidica (residui 1-110) tendono ad assumere valori più piccoli rispetto alla seconda parte (residui 111-406).
- I valori di $R_2(^{15}\text{N})$ mostrano una certa variabilità. Infatti, alcuni tratti della catena sono caratterizzati da valori di $R_2(^{15}\text{N})$ superiori alla media, mentre altri da valori di $R_2(^{15}\text{N})$ inferiori alla media. Anche in questo caso però, la prima parte della catena

polipeptidica (residui 1-110) si differenzia dalla seconda (residui 111-406), perché è caratterizzata da valori di $R_2(^{15}\text{N})$ maggiori.

- I valori relativi al $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE lungo l'intera catena polipeptidica sono molto vicini a 0 e prevalentemente negativi, soprattutto nella seconda parte della catena.

Da questa prima analisi possiamo affermare che nel suo complesso l'ID3 è molto flessibile; la prima regione però è caratterizzata da una minore flessibilità rispetto al resto della catena.

Osservando in dettaglio i grafici relativi ad $R_2(^{15}\text{N})$ e $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE, si possono comunque individuare, all'interno della seconda parte della catena, dei tratti meno flessibili. Sfruttando le informazioni che si ricavano dalla sequenza primaria e dai chemical shifts si può constatare che questi tratti hanno la tendenza ad assumere una struttura secondaria più organizzata, come è spiegato in dettaglio nei paragrafi successivi.

5.4.1 La sequenza primaria per avere informazioni sulla struttura tridimensionale (Intrinsically Unstructured Proteins predictor - IUPred)

IUPred è un programma bio-informatico che, sulla base della sequenza primaria di una catena polipeptidica, assegna ad ogni amminoacido un valore numerico, compreso tra 0 e 1. Le regioni della catena caratterizzate dalla presenza di residui cui sono attribuiti valori prossimi a 0, hanno la tendenza ad assumere una struttura tridimensionale organizzata. Le zone in cui prevalgono residui cui sono associati valori vicini a 1, tendono invece ad essere completamente disordinate^[23].

Il grafico seguente riporta i risultati ottenuti inserendo nel programma IUPred la sequenza amminoacidica dell'ID3.

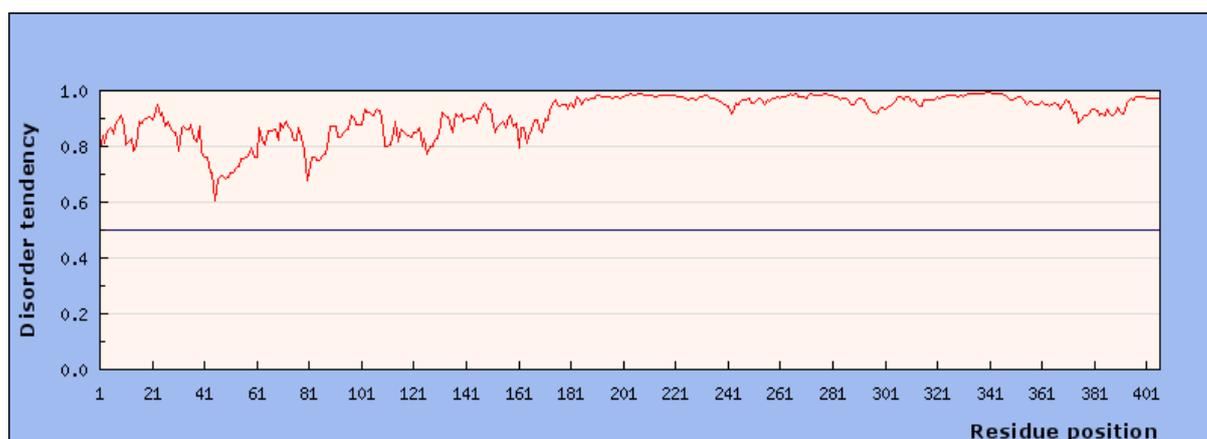


Figura 5.8 Grafico che mostra la tendenza dell'ID3 ad essere disordinato.

È interessante osservare che la prima parte della catena polipeptidica (residui 1 - 170) è caratterizzata da valori più bassi, mentre la seconda parte (residui 171 - 406), da valori molto vicini ad 1. Perciò, sulla base della sola sequenza primaria, è possibile attribuire alla prima regione della catena una debole tendenza ad assumere conformazioni parzialmente strutturate, mentre alla seconda regione la tendenza ad essere più disordinata.

Questo risulta compatibile con le informazioni ricavate precedentemente dall'analisi dei parametri di rilassamento $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$, R_2/R_1 e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE, ottenuti sperimentalmente.

Infatti la prima parte della catena appariva meno flessibile rispetto alla seconda, indicando una maggiore propensione ad assumere una conformazione strutturata.

5.4.2 L'influenza dell'ingombro della catena laterale (*bulkiness*)

L'ingombro maggiore o minore di una catena laterale può avere influenza sulle proprietà dinamiche del vettore $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ di un amminoacido e quindi vale la pena confrontare i nostri dati sperimentali con il parametro *bulkiness*. Nota la sequenza primaria della catena polipeptidica, è possibile valutare per ogni amminoacido l'ingombro sterico dovuto al volume occupato dalla catena laterale del residuo stesso e dei residui circostanti, detto appunto *bulkiness*.

Dal confronto dei grafici relativi ad $R_2(^{15}\text{N})$ e al $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE con quello del *bulkiness* (figure 5.9 e 5.10), emerge che in gran parte le variazioni osservate tramite la misura delle velocità di rilassamento di ^{15}N correlano con l'ingombro sterico dell'amminoacido stesso e di quelli vicini, come è ragionevole immaginare. Tale fatto si riscontra soprattutto nella seconda parte della catena polipeptica (residui 111-406), mentre nella prima parte (residui 1-110) è meno evidente.

Questo permette di valutare meglio ulteriori contributi, che possono derivare dalla tendenza di alcune regioni ad assumere conformazioni strutturate. Ad esempio, la prima parte della catena presenta alti valori di $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE, che si discostano considerevolmente da quelli del *bulkiness*, perciò questa regione ha una tendenza più alta del resto della catena ad assumere conformazioni strutturate. Nella seconda parte, infatti, gli andamenti di $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono descritti con buona approssimazione dal *bulkiness*.

All'interno di questa regione si possono individuare delle zone caratteristiche, evidenziate con colori diversi, per le quali i valori di $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono in accordo con quelli del *bulkiness*. Pertanto, la dinamica di tali zone è influenzata principalmente dall'ingombro sterico delle catene laterali dei residui che ne fanno parte.

Il significato dei diversi colori e delle lettere è spiegato in dettaglio nel paragrafo successivo.

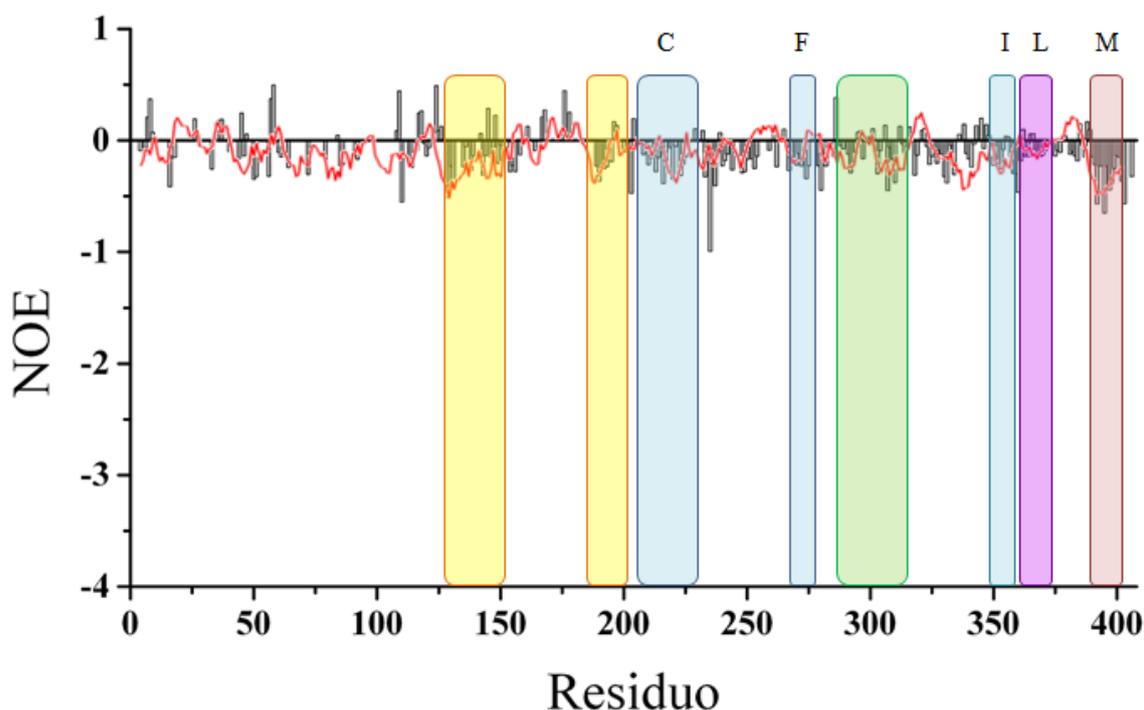


Figura 5.9 Confronto tra $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE e *bulkiness*. Il *bulkiness* è stato riscaldato per renderlo paragonabile al $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE.

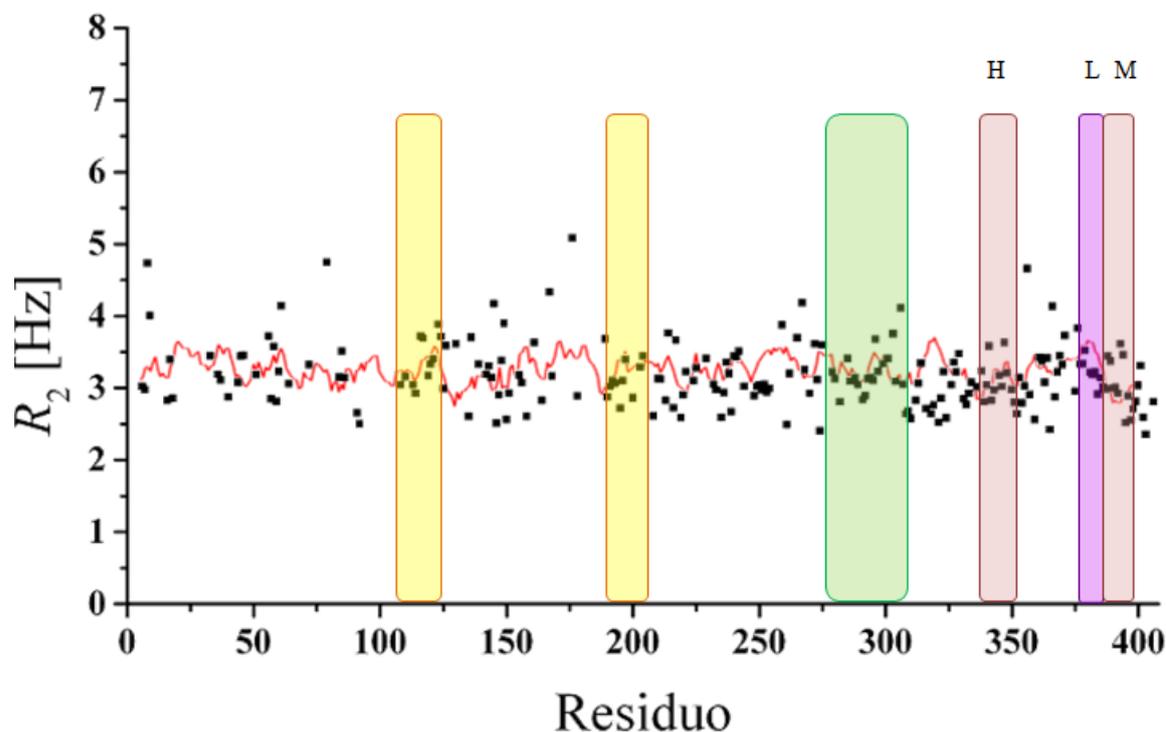


Figura 5.10 Confronto tra R_2 e *bulkiness*. Il *bulkiness* è stato riscalo per renderlo paragonabile ad $R_2(^{15}\text{N})$.

5.4.3 I chemical shift per avere informazioni sulla tendenza ad assumere una struttura secondaria (Secondary Structural Propensity - SSP)

SSP è un programma che si basa sui dati sperimentali. Infatti, una volta inseriti i valori dei chemical shifts di $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$ e $^1\text{H}^\alpha$, ricavati dagli spettri in 4D, è in grado di assegnare ad ogni amminoacido un parametro, che può essere positivo o negativo e che fornisce informazioni sulla “Secondary Structural Propensity” [17]. Le regioni della catena caratterizzate dalla presenza di residui cui è attribuito un parametro negativo, hanno la tendenza ad assumere una struttura β strand, mentre le zone in cui prevalgono i residui cui sono associati parametri positivi tendono ad assumere una struttura ad α elica.

Dal confronto dei grafici relativi ad $R_2(^{15}\text{N})$ e al $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE con quello dell’SSP, si può capire se la dinamica locale di una regione della catena principale può essere associata alla tendenza della catena stessa ad assumere una particolare struttura secondaria.

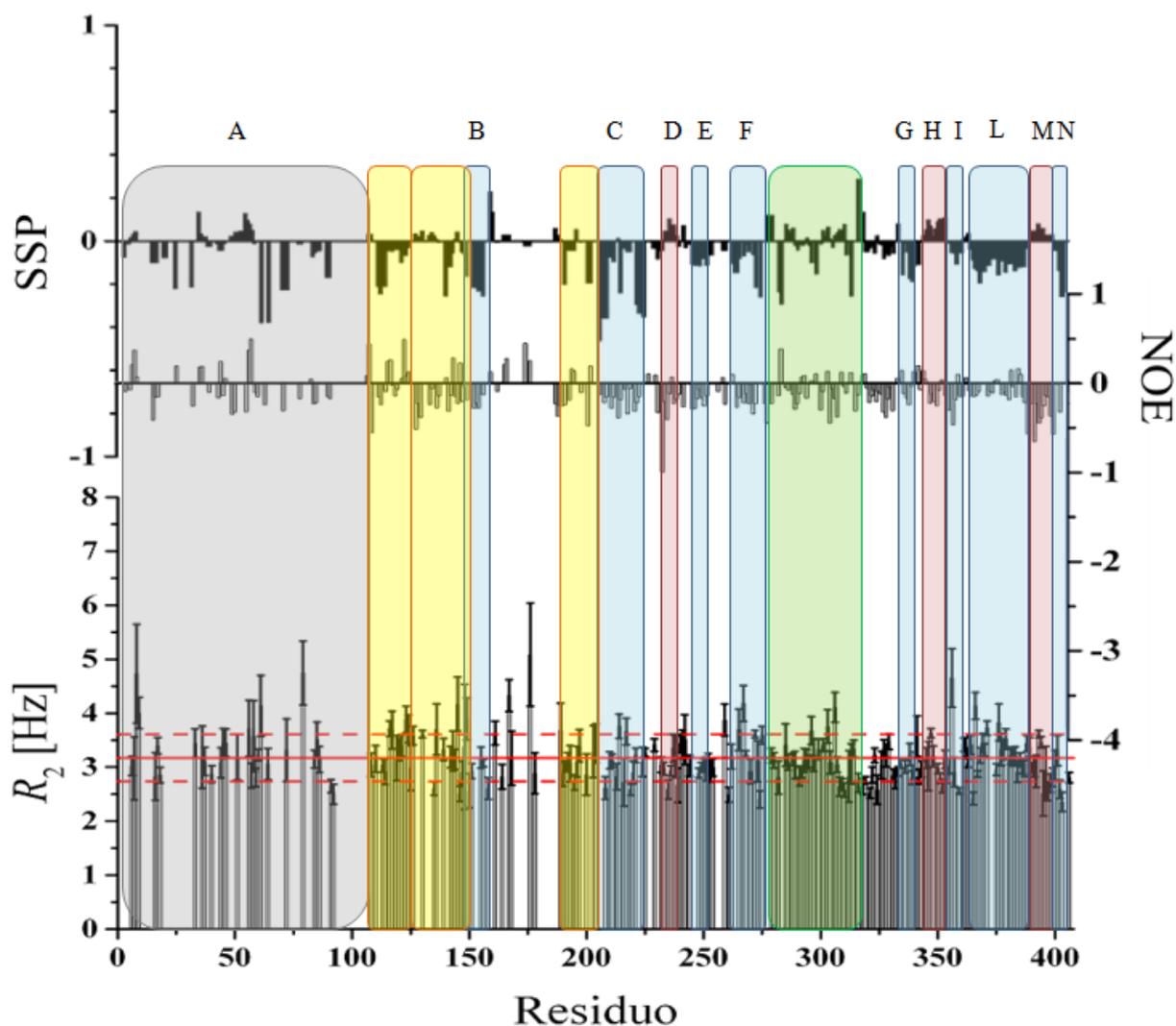


Figura 5.11 Confronto tra $R_2(^{15}\text{N})$, $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE e SSP. In azzurro e in rosa sono evidenziate le regioni che tendono ad assumere, rispettivamente, la conformazione β strand ed α elica. In verde e in giallo sono indicati i tratti della catena per i quali gli andamenti di $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono ben approssimati dal *bulkiness*. Il tratto verde però presenta valori di dell'SSP molto più variabili rispetto a quelli gialli. In grigio è evidenziata la prima parte della catena, per la quale, sebbene i dati disponibili siano pochi, i valori di $R_2(^{15}\text{N})$ leggermente superiori alla media sono indice della tendenza ad assumere una struttura secondaria. Nel grafico relativo ad $R_2(^{15}\text{N})$, la linea rossa continua rappresenta il valore medio, mentre quelle tratteggiate la deviazione standard associata al valore medio.

Confrontando questi tre grafici si possono individuare alcune zone caratteristiche:

- B (residui 147-158); C (residui 208-224); E (residui 248-254); F (residui 267-275) G (residui 338-345); I (residui 357-362) e N (residui 402-406): queste regioni sono caratterizzate da $R_2(^{15}\text{N})$ prossimi al valore medio e $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE negativi o molto vicini a 0, entrambe indicazioni di alta flessibilità. L'SSP risulta negativo, quindi è probabile che tendano ad assumere conformazioni allungate (β).
- L (residui 366-390): si tratta della regione più caratteristica dell'intera catena polipeptidica. Infatti è costituita da 24 amminoacidi, per i quali gli $R_2(^{15}\text{N})$ sono leggermente superiori alla media, i $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE sono negativi, ma più piccoli in valore assoluto rispetto agli altri amminoacidi precedenti e successivi ed in particolare rispetto a quelli adiacenti (regioni I ed M). SSP è negativo. Questi dati indicano che L ha la tendenza ad assumere una conformazione allungata (β) e si trova tra due regioni più flessibili.

Nelle figure 5.9 e 5.10 sono evidenziati in viola, rispettivamente, il primo e il secondo tratto di L, per i quali si riscontra una buona approssimazione con i valori del *bulkiness*. Questo significa che probabilmente la dinamica di tale regione è influenzata anche dall'ingombro sterico degli amminoacidi che la costituiscono e di quelli circostanti.

- D (residui 235-240); H (residui 346-356) e M (residui 392-401): queste regioni hanno valori di $R_2(^{15}\text{N})$ nella media, $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE negativi, ma SSP positivo; perciò sebbene non abbiano una struttura secondaria rigida, è probabile che abbiano la tendenza ad assumere la conformazione α elica.

In particolar modo M è caratterizzata da valori del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE negativi, ma più grandi in valore assoluto rispetto alle altre regioni evidenziate, quindi si tratta di una zona notevolmente flessibile, cosa ragionevole visto che si trova vicino alla fine della catena polipeptidica.

- A (residui 1-110): sebbene i dati disponibili sulla parte iniziale della catena polipeptidica siano pochi, dato che l'assegnamento degli amminoacidi deve essere completato, si può comunque notare che i valori di $R_2(^{15}\text{N})$ sono superiori alla media e il $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE è variabile. In questa regione l'SSP non è informativo ed è probabile che, completando l'assegnamento, vengano identificati diversi tratti con tendenza ad assumere una struttura secondaria.
- le colonne evidenziate in giallo (residui 111-125; 126-150; 189-204): rappresentano quei tratti della catena polipeptidica caratterizzati da valori $R_2(^{15}\text{N})$, $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE ed

SSP abbastanza variabili. Tali valori però sono in accordo con quelli del *bulkiness* (figure 5.9 e 5.10); pertanto la dinamica di queste regioni dipende dal volume dei gruppi sostituenti dei residui stessi e di quelli circostanti.

- la zona compresa tra i residui 275 e 314, che è evidenziata in verde. Dalla figura 5.11 si vede che i valori del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE e dell'SSP sono molto variabili, perciò sembra che questa regione non possieda alcuna tendenza ad assumere una particolare struttura secondaria.

Il *bulkiness* però si adatta bene sia all'andamento degli $R_2(^{15}\text{N})$, che del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE (figure 5.9 e 5.10).

Tale comportamento può essere spiegato dal fatto che la flessibilità di questa zona non dipende dalla tendenza ad organizzarsi in strutture definite, ma piuttosto dall'ingombro sterico delle catene laterali dei residui che ne fanno parte e di quelli vicini.

Dalle informazioni che si ricavano dalla sequenza primaria dell>ID3 (IUPred), si può dedurre che la prima parte della catena polipeptidica è meno flessibile rispetto al resto della catena.

I dati sperimentali determinati sono in accordo con la tendenza ottenuta dall'analisi bioinformatica.

Però è solo grazie ad un'analisi approfondita dei parametri di rilassamento $R_1(^{15}\text{N})$, $R_2(^{15}\text{N})$ e del $^1\text{H}^{\text{N}}\text{-}^{15}\text{N}$ NOE e dal confronto con l'SSP, che è possibile individuare zone caratteristiche, che hanno la tendenza ad assumere una particolare struttura secondaria.

Conclusioni

Nel corso di questo progetto sono state caratterizzate con successo le proprietà dinamiche del *linker* ID3 della proteina umana CBP.

Nel suo complesso l'ID3 risulta molto flessibile, ma presenta anche regioni più rigide, cui è possibile associare la tendenza ad assumere una struttura secondaria allungata o ad α elica.

Lo studio delle proprietà dinamiche dell'ID3 rappresenta un tassello fondamentale per comprenderne il ruolo all'interno della CBP. Inoltre costituisce un contributo importante alla definizione della funzione biologica che hanno gli elementi disordinati nelle proteine complesse. Quest'ultimo aspetto è particolarmente importante perché molte proteine umane, caratterizzate dalla presenza di regioni prive di una rigida struttura secondaria, sono responsabili di malattie cardiovascolari, neurodegenerative, il diabete e il cancro.

Proprio per questi motivi, oggi, lo sviluppo di nuovi metodi NMR che consentono di indagare più in dettaglio la struttura delle proteine disordinate, è alla base della ricerca biomedica. L'introduzione di strumentazioni e di tecniche di analisi sempre più moderne infatti consentiranno di acquisire spettri NMR a maggior risoluzione e quindi studiare più in dettaglio le caratteristiche strutturali e dinamiche delle proteine.

Bibliografia

- [1] P. Tompa, *Trends Biochem.Sci.* **2012**.
- [2] V. N. Uversky, *Protein Sci.* **2013**, 22 693-724.
- [3] V. Uversky, C. J. Oldfield, A. K. Dunker, *Annu.Rev.Biophys.* **2008**, 37 215-246.
- [4] P. Tompa, *Trends Biochem.Sci.* **2002**, 27 527-533.
- [5] T. Mittag, J. Forman-Kay, *Curr.Opin.Struct.Biol.* **2007**, 17 3-14.
- [6] P. E. Wright, H. J. Dyson, *J.Mol.Biol.* **1999**, 293 321-331.
- [7] I. C. Felli, R. Pierattelli, P. Tompa, Eds.: I. Bertini, K. S. McGreevy, G. Parigi), Wiley-Blackwell, **2012**, p. pp. 137-152.
- [8] H. J. Dyson, P. E. Wright, *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* **2005**, 6 197-208.
- [9] M. H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [10] L. Banci, I. Bertini, C. Luchinat, *Nuclear and electron relaxation. The magnetic nucleus-unpaired electron coupling in solution*, VCH, Weinheim **1991**.
- [11] I. Bertini, C. Luchinat, G. Parigi, *Solution NMR of paramagnetic molecules*, Elsevier, Amsterdam **2001**.
- [12] J. W. Peng, G. Wagner, *Methods Enzymol.* **1994**, 239 563-596.
- [13] G. Barbato, M. Ikura, L. E. Kay, R. W. Pastor, A. Bax, *Biochemistry* **1992**, 31 5269-5278.
- [14] L. E. Kay, D. A. Torchia, A. Bax, *Biochemistry* **1989**, 28 8972-8979.
- [15] N. A. Farrow, R. Muhandiram, A. U. Singer, S. M. Pascal, C. M. Kay, G. Gish, S. E. Shoelson, T. Pawson, J. D. Forman-Kay, L. E. Kay, *Biochemistry* **1994**, 33 5984-6003.
- [16] Keller, R. L. J. The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial. [1.3]. 2004. Cantina Verlag.
- [17] J. A. Marsh, V. K. Singh, Z. Jia, J. D. Forman-Kay, *Protein Sci.* **2006**, 15 2795-2804.
- [18] M.-K. Cho, H.-Y. Kim, P. Bernado, C. O. Fernandez, M. Blackledge, M. Zweckstetter, *J.Am.Chem.Soc.* **2007**, 129 3002-3033.
- [19] O. W. Sørensen, G. W. Eich, M. H. Levitt, G. Bodenhausen, R. R. Ernst, *Progr.NMR Spectrosc.* **1983**, 16 163-192.
- [20] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew.Chem.Int.(Ed.Engl.)* **1988**, 490-536.
- [21] J. Cavanagh, A. G. Palmer, III, P. E. Wright, M. Rance, *J.Magn.Reson.* **1991**, 91 429-436.
- [22] M. Kjaergaard, F. M. Poulsen, *Prog.NMR Spectrosc.* **2012**, 60 42-51.
- [23] Z. Dosztanyi, V. Csizmok, P. Tompa, I. Simon, *Bioinformatics* **2005**, 21 3433-3434.

Ringraziamenti

Ringrazio la e Prof.sse Isabella C. Felli e Roberta Pierattelli per avermi introdotto in questo importante progetto e supportato durante la stesura della tesi.

Ringrazio tutti i dottorandi del CERM per avermi aiutato e sostenuto nei mesi di tirocinio ed in particolar modo Alessandro Piai, che mi ha seguito passo passo durante l'intero percorso.

Infine, un ringraziamento speciale va agli amici, ma soprattutto alla mia famiglia, che mi è sempre stata vicina durante questi tre anni.