

Titolo della tesi

Progettazione di un Fragment Based Drug Discovery per inibire la proteina Bcl-X_L, una delle armi con cui la cellula tumorale evade dal suicidio programmato

Autore

Simone Fabbian

simone.fabbian@phd.unipd.it

Dipartimento di Scienze Chimiche

Università degli studi di Padova

via Marzolo 1

Relatore

Dott. Massimo Bellanda

massimo.bellanda@unipd.it

Dipartimento di Scienze Chimiche

Università degli studi di Padova

via Marzolo 1

Il *Drug Discovery* finalizzato ad una lotta efficace contro il cancro rappresenta uno degli ambiti di ricerca di maggior interesse del nuovo millennio ed è stato il motivo che ha ispirato il presente progetto di tesi. Più precisamente, ci si è focalizzati sulla resistenza all'apoptosi, una delle possibili manifestazioni fenotipiche della cellula cancerosa conseguente al suo pregresso danneggiamento genomico.

Una cellula cancerogena apoptosi-resistente acquista la capacità di sopravvivere in maniera anomala rispetto ad una cellula sana e diventa pericolosamente insensibile nei confronti dei danneggiamenti provocati da chemioterapia o radioterapia. La rottura dell'equilibrio nel complesso macchinario apoptotico può interessare sia la via estrinseca di apoptosi che quella intrinseca o mitocondriale, quest'ultima regolata da una specifica famiglia di proteine denominate Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*). In una cellula sana, i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2 interagiscono con quelli pro-apoptotici, grazie ad una tasca di legame idrofobica presente nei primi che funge da *binding site* nei confronti del cosiddetto dominio *BH3* dei secondi. In seguito a tale legame, le proteine pro-apoptotiche non possono più attivare la via intrinseca di apoptosi mediante la permeabilizzazione della membrana mitocondriale esterna. Se, come può accadere in una cellula tumorale, vi è un'eccessiva concentrazione di Bcl-2 anti-apoptotiche in seguito a loro sovraespressione, gli eventi di *binding* con i membri pro-apoptotici diventano troppo frequenti e si assiste all'insorgere dell'apoptosi-resistenza. Ne segue quindi che inibire l'azione dei membri anti-apoptotici della famiglia può rappresentare una possibile strategia terapeutica per la regressione delle patologie tumorali caratterizzate da cellule apoptosi-resistenti con alti livelli di Bcl-2 anti-apoptotiche. Per inibire le Bcl-2 anti-apoptotiche è necessario progettare dei farmaci antagonisti che possano competere con il dominio *BH3* delle Bcl-2 pro-apoptotiche, andando a legarsi con maggiore affinità a livello della tasca di legame idrofobica. Simili agenti xenobiotici sono chiamati "*BH3-mimetics*".

Con il presente elaborato di tesi, si sono messe a punto le prime fasi sperimentali in vista della progettazione di un possibile *BH3-mimetic* contro la proteina anti-apoptotica umana Bcl-X_L (*B-cell lymphoma-extra large*). Per fare questo si è adottato un approccio altamente interdisciplinare che ha richiesto l'utilizzo sia di tecniche biofisiche per l'analisi strutturale che di procedure impiegate nella biologia molecolare per l'espressione di proteine ricombinanti.

La proteina umana Bcl-X_L è stata ottenuta nel nostro laboratorio esprimendola all'interno di cellule competenti di *E. coli* BL21 (DE3) precedentemente trasformate con il plasmide pET15b contenente la sequenza di nucleobasi codificanti per un costrutto di Bcl-X_L privo della porzione C-terminale, un' α elica idrofobica di 24 residui utilizzata nelle cellule per ancorare la proteina alla membrana mitocondriale. Tale elica non svolge alcun ruolo nel *binding* con il dominio *BH3* ma causa invece

fenomeni di aggregazione in fase di purificazione della proteina e per questo è stata rimossa. Il plasmide pET15b contiene inoltre una sequenza di basi anteposta alla regione codificante per Bcl-X_L necessaria ad esprimere la proteina con sei residui di Istidina aggiuntivi (*His-tag*) in corrispondenza della porzione N-terminale: tale *tag* è necessario per il primo *step* di purificazione con cromatografia IMAC (*Imobilized Metal Ion Affinity Chromatography*). Nella fattispecie, si sono utilizzate colonne di affinità funzionalizzate con ioni Ni²⁺ che possono fungere da centro di coordinazione per gli azoti elettrondonatori degli anelli imidazolici presenti nelle catene laterali delle Istidine. La seconda tecnica cromatografica utilizzata per la purificazione di Bcl-X_L è stata la SEC (*Size Exclusion Chromatography*), un processo di gel-filtrazione che ha permesso di separare aggregati aspecifici di Bcl-X_L dalla sua forma monomerica. La caratterizzazione biofisica più importante è avvenuta con l'impiego di una tecnica NMR bidimensionale di eterocorrelazione ¹H-¹⁵N, possibile grazie alla marcatura di Bcl-X_L, in fase di espressione, con l'isotopo NMR attivo ¹⁵N. Tale tecnica, denominata HMQC (*Heteronuclear Single Quantum Coherence*), sfrutta una sequenza di impulsi che permette di ottenere una *finger-print* della proteina dal momento che ad ogni residuo amminoacidico e in particolare ad ogni coppia di nuclei amidici ¹H-¹⁵N (accoppiati scalarmente) viene associato uno specifico e unico segnale NMR caratterizzato dalla coppia di frequenze di risonanza associate ai due isotopi. La variante dell'HMQC utilizzata durante il progetto di tesi prende il nome di SOFAST-HMQC (*band Selective Optimized Angle Short Transient-Heteronuclear Single Quantum Coherence*): in pratica la sequenza originale dell'esperimento HMQC viene modificata in modo da ottenere spettri NMR in un tempo minore e con un buon rapporto S/N pur utilizzando basse concentrazioni di proteina (decine di μM).

Per quanto riguarda la messa appunto delle fasi preliminari di *Drug Discovery*, si sono utilizzati i principi del cosiddetto *Fragment Based Drug Discovery* (FBDD). Questa tecnica è ampiamente usata sia in accademia che in ambito industriale e si è dimostrata particolarmente promettente per sviluppare nuovi farmaci che interferiscono con le interazioni proteina-proteina. Essa prevede di costruire una libreria di piccole molecole organiche (MM < 300Da), chiamate "frammenti", da testare sul target biologico in questione. Per verificarne l'affinità di legame possono essere impiegate diverse tecniche biofisiche e nel nostro caso è stata sfruttata in maniera estesa la spettroscopia NMR, sia monodimensionale che bidimensionale. Un grosso vantaggio derivante dalle piccole dimensioni dei frammenti è che anche utilizzando nello screening un numero relativamente piccolo di molecole, è possibile sondare una grande variabilità chimica. Inoltre, il legame di un frammento ad un target non è vincolato dal resto della molecola, come avviene nello screening tradizionale di leganti più grandi e ciò consente al frammento di interagire in modo ottimale con la tasca di legame. Si hanno in pratica meno interazioni con il target ma di più elevata qualità. L'FBDD è un metodo promettente per

scoprire ligandi aventi moderata affinità nei confronti di proteine *target* da cui partire per la progettazione di composti via via più grandi e affini che possano infine diventare veri e propri farmaci da utilizzare in terapia. Le tecniche NMR impiegate in questo lavoro, consentono di identificare anche interazioni deboli (fino a millimolare) ed in questo modo è possibile ottenere più facilmente dei punti di partenza per la maturazione del frammento stesso. La libreria di frammenti a nostra disposizione, composta inizialmente da circa 500 frammenti, è stata analizzata con NMR protonico monodimensionale al fine di caratterizzare ogni frammento e verificarne la solubilità in soluzione acquosa. Dopo questa preliminare caratterizzazione NMR, che ha anche comportato la rimozione dei frammenti meno solubili dalla libreria iniziale, si è iniziata la fase di studio dell'interazione fra Bcl-X_L e i frammenti, sempre tramite NMR. Si sono utilizzati due tipologie di esperimenti, i *protein-based* (basati su variazioni di risonanze NMR della proteina) e i *ligand-based* (basati su variazioni di risonanze NMR dei ligandi). Per quanto riguarda l'approccio *protein-based*, si sono monitorati i cambiamenti in termini di *chemical shifts* ¹H-¹⁵N relativi ai residui di Bcl-X_L presenti nella tasca di legame idrofobica o in corrispondenza di essa, in seguito all'aggiunta di frammenti della libreria. La variazione dei segnali NMR della proteina è diagnostica di possibili eventi di *binding* e permette di mappare il sito di legame con il frammento. Per quantificare tali modifiche di *chemical shifts* si sono calcolati i cosiddetti *Chemical Shift Perturbation (CSP)*. Questo tipo di analisi ha interessato 100 frammenti della libreria, suddivisi in miscele di 5 composti ciascuna. Tali suddivisioni sono state progettate in modo da tale da avere un numero minimo di sovrapposizioni fra i segnali NMR protonici dei frammenti di ogni miscela. Questo ha reso possibile l'utilizzo di esperimenti NMR *ligand-based* per individuare, all'interno delle miscele più promettenti, i singoli frammenti che interagivano con Bcl-X_L causando i CSP misurati nella fase *protein-based* dagli spettri SOFAST-HMQC ¹H-¹⁵N. Entrambi gli esperimenti *ligand-based* utilizzati, rispettivamente l'STD (*Saturation-Transfer Difference*) e il Water-LOGSY (*Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy*), si basano sull'effetto NOE (*Nuclear Overhauser Effect*): essi prevedono di monitorare i segnali NMR protonici monodimensionali dei frammenti in seguito alla miscelazione con la proteina così da individuare quali di essi siano dei possibili ligandi. L'impiego di ben due tecniche di analisi *ligand-based* permette di effettuare un doppio controllo sulla bontà dei risultati ottenuti, rilevando eventuali falsi positivi. Nel periodo di internato, si sono potute analizzare completamente le 3 miscele migliori emerse dalla fase *protein-based* e ben 9 frammenti su 15 sono risultati essere dei possibili (e in alcuni casi promettenti) ligandi per la tasca di legame di Bcl-X_L. Alcuni degli *scaffold* su cui sono basati questi ligandi erano già noti per le loro proprietà di legame nei confronti di Bcl-X_L, altri invece sono completamente nuovi. Differenti residui amminoacidici della proteina che sono risultati essere

maggiormente perturbati dopo l'analisi dei CSP corrispondono agli stessi amminoacidi coinvolti nel legame con alcuni tra i più noti *BH3-Mimetics* di Bcl-X_L.