

# Università degli Studi di Napoli Federico II

DIPARTIMENTO DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XXVI CICLO

**INVESTIGAZIONE DELLE BASI MOLECOLARI DELLA  
FARMACO-RESISTENZA NEI TUMORI VOLTA ALLA  
PROGETTAZIONE DI NUOVI POTENZIALI AGENTI  
TERAPEUTICI.**

**Coordinatore**

Ch.mo Prof. Maria Valeria D'Auria

**Candidato**

Dott. Nausicaa Orteca

**Tutor**

Ch.mo Prof. Caterina Fattorusso

---

# SOMMARIO

<b>LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI .....</b>	<b>4</b>
<b>PREFAZIONE .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>7</b>
1.1a Sviluppo e cause dei tumori .....	7
1.1b Ciclo cellulare .....	10
1.1c Morte cellulare programmata (Apoptosi) .....	13
1.1d Basi molecolari dell'insorgenza della resistenza ai farmaci antitumorali .....	16
1.1e Importanza delle interazioni proteina-proteina nei processi biologici .....	21
1.1f Farmaci che interferiscono con le interazioni proteina-proteina .....	23
<b>2. PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI ANTITUMORALI IN GRADO DI MIMARE MOTIVI DI RICONOSCIMENTO PROTEICO.....</b>	<b>28</b>
2.1 INTRODUZIONE.....	28
2.1a Motivi proteici altamente conservati coinvolti nella comunicazione cellulare .....	29
2.2 SCOPO DEL LAVORO .....	36
2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE .....	38
2.3a Analisi dell'attività biologica del nuovo set di ligandi identificato .....	38
2.3b Studi NMR sui nuovi derivati 8g-i .....	43
2.3c Studi computazionali sui nuovi derivati 8g-i .....	45
2.3.1 Analisi delle proprietà conformazionali ed elettroniche del nuovo set di molecole e relativi studi SARs. ....	46
2.3.2 Comparazione strutturale con i motivi LxxLL-like .....	57
2.3.3 Generazione di un farmacofoforo tridimensionale e ricerca in banche dati molecolari .....	61
2.4 CONCLUSIONI .....	65
2.5 PARTE SPERIMENTALE .....	67
2.5a Analisi conformazionale dei ligandi .....	67
2.5b Analisi bioinformatica e strutturale .....	68
2.5c Generazione di modelli farmacoforici e ricerca in banche dati molecolari.....	69
<b>3. IDENTIFICAZIONE DEL PRIMO INIBITORE DELL'INTERAZIONE GBP1/PIMI: IMPLICAZIONI PER LO SVILUPPO DI UNA NUOVA CLASSE DI AGENTI ANTITUMORALI ATTIVI IN CELLULE TUMORALI RESISTENTI AL PACLITAXEL .....</b>	<b>71</b>
3.1 INTRODUZIONE.....	72
3.1a Meccanismi alla base della farmaco-resistenza al paclitaxel nella cellule tumorali .....	72
3.1b Caratteristiche generali e funzionali della proteina legante il guanilato (GBP1) .....	74

---

3.1c	Caratteristiche strutturali di GBP1	77
3.1d	Caratteristiche generali e funzionali della serin-treonin chinasi PIM1	79
3.1e	Caratteristiche strutturali della serin-treonin chinasi PIM1	81
3.1f	Tubulina come unità base dei microtubuli: struttura e funzioni	84
3.2	SCOPO DEL LAVORO	87
3.3	RISULTATI E DISCUSSIONE	90
3.3a	Analisi bioinformatica di GBP1, PIM1 e Tubulina	90
3.3b	Studi di docking sul complesso GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ / $\beta$ III	93
3.3c	Analisi dell'attività biologica del nuovo set di ligandi identificato	119
3.3d	Identificazione di un possibile sito di legame per il derivato azapodofillotossinico NSC756093 su GBP1 attraverso studi di modellistica molecolare	123
3.3e	Studi di docking sul complesso NSC756093/GBP1	126
3.3f	Investigazione delle relazioni struttura-attività (SARs) dei nuovi derivati azapodofillotossinici	131
3.3g	Studi di mutagenesi	134
3.4	CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE	137
3.5	PARTE SPERIMENTALE	138
3.5a	Analisi conformazionale di nuovi derivati azapodofillotossinici	138
3.5b	Analisi bioinformatica delle strutture cristallografiche di GBP1, PIM1, Tubulina e Topoisomerasi II $\beta$	139
3.5c	Costruzione dei modelli molecolari di GBP1, PIM1 e Tubulina $\alpha$ / $\beta$ III	141
3.5.1	Costruzione del modello di GBP1	141
3.5.2	Costruzione del modello di PIM1	142
3.5.3	Costruzione del modello della $\beta$ III-tubulina	142
3.5.4	Costruzione del modello della $\alpha$ I-tubulina	143
3.5d	Costruzione del modello del complesso trimetrico GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ / $\beta$ III	144
3.5e	Studi di docking sul complesso GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ / $\beta$ III	145
3.5f	Studi di docking sul complesso NSC756093/GBP1	147
<b>4.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>149</b>

---

---

## ***LEGENDA DELLE ABBREVIAZIONI***

Cdk: chinasi ciclina dipendenti

ER: reticolo endoplasmatico

P-gP: glicoproteina P

MDR: resistenza multi-farmaco

PP: poliprolinica

wt: wild-type

SARs: relazioni struttura-attività

Cmp: composti

NCOA5: coattivatore 5 del recettore nucleare

aa: amminoacidi

NMR: risonanza magnetica nucleare

MTAs: agenti che agiscono sui microtubuli

MAPs: proteine associate ai microtubuli

SCRs: regioni strutturalmente conservate

SA: simulated annealing

SPR: Surface Plasmon Resonance

DMSO: Dimetilsolfossido

---

## ***PREFAZIONE***

La base della prevenzione e della cura di patologie tumorali, che risulta ad oggi tra le sfide più importanti per la società, risiede essenzialmente nell'identificazione dei meccanismi a livello molecolare responsabili dei processi biologici e nell'individuazione degli strumenti necessari per combattere l'insorgenza di tale patologie. Sebbene negli ultimi decenni, le scoperte fatte nell'ambito di questa linea di ricerca abbiano consentito di sviluppare nuovi approcci per prevenire, diagnosticare e combattere il cancro, il costante sviluppo della resistenza ai farmaci antitumorali rappresenta ancora uno dei problemi più rilevanti in clinica muovendo la ricerca verso una conoscenza più approfondita dei processi attivi all'interno delle cellule tumorali al fine di individuare nuovi bersagli molecolari per lo sviluppo di terapie mirate.

I *network* di interazioni proteina-proteina rappresentano un'interessante strategia terapeutica dal momento che risultano essere coinvolti in tutti i processi biologici che si verificano nelle cellule. Alterazioni delle interazioni proteina-proteina conducono, infatti, sia allo sviluppo dei tumori che all'insorgenza della farmaco-resistenza per cui la scoperta di molecole aventi la capacità di inibire o modulare specifiche interazioni proteiche è oggetto di grande interesse.

In quest'ambito, l'attività di ricerca descritta nella presente tesi di dottorato, è stata focalizzata proprio allo sviluppo di nuovi potenziali agenti terapeutici in grado di interferire con le interazioni proteina-proteina coinvolte nei processi tumorali e responsabili dell'insorgenza della farmaco-resistenza. In particolare, è stato condotto un primo progetto di ricerca (capitolo 2) che ha portato allo sviluppo di un modello farmacoforico per la progettazione di nuovi agenti antitumorali in grado di mimare motivi di riconoscimento proteico del tipo LxxLL, presenti principalmente nei regolatori trascrizionali, ed un secondo progetto di ricerca (capitolo 3) che ha avuto come oggetto l'investigazione delle basi molecolari del meccanismo di azione di nuove azapodofillotossine, risultate attive in cellule resistenti al paclitaxel, andando ad investigare, in particolare, la loro capacità nell'inibire il complesso GBP1/PIM1, responsabile del fenomeno della farmaco-resistenza al paclitaxel in cellule di carcinoma ovarico.

Gli studi computazionali e di bioinformatica eseguiti nell'ambito di questi due progetti di ricerca hanno i) fornito importanti informazioni sul meccanismo di azione, a livello molecolare, dei nuovi derivati identificati, ii) consentito la razionalizzazione delle relazioni struttura-attività (SARs) osservate, iii) consentito l'individuazione di nuovi bersagli molecolari coinvolti nei meccanismi di farmaco-resistenza e iv) posto le basi per la

---

progettazione di modifiche strutturali volte a migliorare il profilo di attività biologica dei composti guida identificati.

---

# ***1. INTRODUZIONE***

## ***1.1a Sviluppo e cause dei tumori***

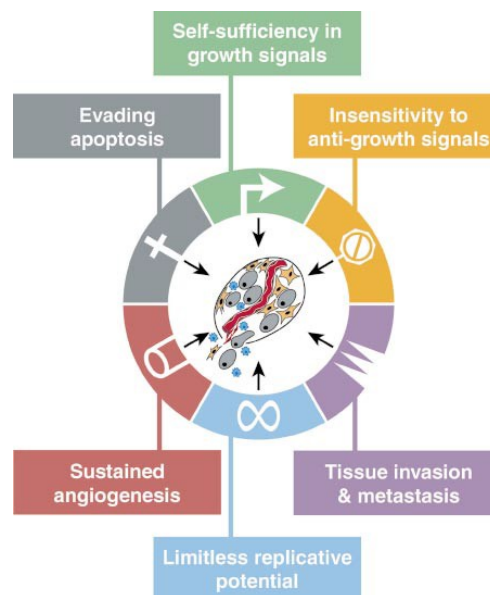
Numerose evidenze indicano che la tumorigenesi negli umani è un processo multistep che guida la progressiva trasformazione delle cellule normali in cellule tumorali.<sup>1</sup> In realtà non esiste una definizione valida per tutti i tipi di tumore. In generale possiamo definire cancro l'insieme di una popolazione di cellule somatiche che ha preso origine quasi sempre da una sola cellula dell'organismo che ha subito, nel corso di molti anni, una serie sequenziale di peculiari danni genomici trasmissibili alla progenie con conseguente proliferazione autonoma al di fuori dei normali meccanismi di controllo che limitano la crescita dei tessuti nelle dimensioni e nei siti corretti. Molti tipi di cancro, infatti, sono diagnosticati nella popolazione umana con un'incidenza dipendente dall'età, coinvolgendo da quattro a sette eventi stocastici.<sup>2</sup>

Sulla base delle caratteristiche morfologiche, dell'attività proliferativa e soprattutto del comportamento biologico nei confronti dei tessuti limitrofi e dell'intero organismo, si conoscono in letteratura i tumori benigni e tumori maligni. I primi sono costituiti da cellule che mantengono pressochè inalterate le loro caratteristiche morfologiche e funzionali in confronto a quelle normali pur esibendo autonomia moltiplicativa in quanto: a) non rispondono ai meccanismi regolatori della proliferazione cellulare e b) sfuggono ai meccanismi omeostatici che regolano la secrezione dei loro prodotti. Queste, infatti, sono caratterizzate da uno sviluppo di tipo espansivo assumendo con i tessuti limitrofi rapporti di contiguità, nel senso che le cellule neoplastiche non invadano e non infiltrano i tessuti vicini ma si limitano ad esercitare una compressione sulle cellule adiacenti con conseguente danneggiamento. Questo spiega perché, una volta rimossi totalmente, non recidivano, quindi è puramente una neoformazione localizzata. I tumori maligni, invece, sono costituiti da cellule che si presentano diverse dalle corrispondenti cellule normali sotto tutti gli aspetti, da quello morfologico a quello funzionale. L'atipia morfologica, che è tanto più spiccata quanto più indifferenziato è il tumore, si manifesta con mancanza di uniformità nella forma e dimensioni delle cellule (polimorfismo) e degli organuli cellulari, in particolare del nucleo che è frequentemente ipercromico e in fase mitotica; un tumore di questo tipo è anaplastico non essendo individuato il citotipo da cui ha preso origine. Le cellule invadono dapprima i tessuti sani limitrofi superando le capsule e altre barriere anatomiche (perdita dell'inibizione da contatto) e poi li distruggono, con la conseguenza che il tessuto neoplastico proliferante

---

finisce col sostituirsi ad essi. Infine, hanno l'abilità di penetrare nel sistema circolatorio e linfatico, invadere organi distanti ed in essi proliferare (processo metastatico).

Per un'adeguata comprensione della malattia tumorale e del suo trattamento è, comunque, opportuno considerare che il cancro non è una singola malattia ma almeno 100 malattie differenti, ognuna con le sue caratteristiche e la sua storia naturale. Tutti i vari citotipi presenti nell'organismo possono andare incontro a trasformazione neoplastica quando hanno accumulato nel proprio genoma un certo numero di mutazioni a carico di determinati geni (es. geni che governano la proliferazione e la morte cellulare). Hanahan e Weinberg<sup>2</sup> hanno riassunto schematicamente le sei essenziali alterazioni che si verificano nella fisiologia della cellula con conseguente crescita tumorale: a) capacità di proliferare indipendentemente dalla presenza dei fattori di crescita (attivazione di oncogeni), b) insensibilità ai segnali antiproliferativi (inattivazione di anti-oncogeni o dei geni soppressori del tumore), c) capacità di sfuggire ai segnali apoptotici, d) capacità di divisioni cellulari illimitate, e) neoangiogenesi e f) potenzialità metastatica (Figura 1). Così le cellule tumorali prendono il sopravvento sulle cellule normali, competono con esse per lo spazio e le sostanze nutritive e determinano la loro morte così come, alla fine, quella dell'intero organismo.



**Figura 1.** Le 6 proprietà caratteristiche delle cellule tumorali (Hanahan e Weinberg, 2000, Cell).<sup>2</sup>

L'acquisizione di queste caratteristiche, ciascuna capace di conferire alla cellula un "vantaggio" selettivo di crescita, procede sia attraverso vie meccanicistiche diverse (lo stesso tratto fenotipico come risultato di varie alterazioni genetiche e funzionali) sia secondo



---

sequenze cronologiche alternative e ciò non solo nei diversi tipi di neoplasie, ma anche all'interno dello stesso tipo tumorale.

È pur vero che la trasformazione neoplastica è nel complesso un processo inefficiente, in quanto contrastata costantemente da numerosi meccanismi molecolari che garantiscono il mantenimento dell'integrità del genoma e dell'omeostasi tissutale attraverso il controllo della scelta cellulare a proliferare, differenziare, cessare di crescere o morire. Ciclo cellulare ed apoptosi rappresentano, infatti, i due meccanismi chiave durante la vita di una cellula, strettamente complementari tra loro in quanto la regolazione dell'apoptosi coinvolge alcune delle proteine che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare.<sup>3</sup> Molecole chiave agiscono come “guardiani del genoma” in momenti specifici del ciclo cellulare ed, attraverso la “certificazione” della qualità dei diversi processi, determinano la progressione o meno della replicazione e della divisione cellulare. La perdita di questi sistemi di controllo e, quindi, dell'integrità genomica (prototipo la proteina p53), provoca instabilità genomica, la quale rappresenta la condizione permissiva fondamentale per la trasformazione cellulare in quanto favorisce l'acquisizione progressiva da parte delle cellule pre-neoplastiche di nuove mutazioni.<sup>4</sup>

Lo studio dell'interattoma, la rete composta da tutte le possibili interazioni fisiche proteina - proteina che avvengono naturalmente in una cellula o in un organismo,<sup>5</sup> degli esseri viventi, ha fornito numerose conoscenze in merito all'eziologia e alla regolazione del cancro e ha portato all'identificazione di oncogeni, oncosoppressori, geni alterati che codificano per proteine implicate nella riparazione del DNA, nella regolazione del ciclo cellulare, nel differenziamento e nella morte cellulare, tutti coinvolti nello sviluppo del cancro umano. Una varietà di fattori ambientali (agenti fisici, chimici, ecc), epigenetici (modificazioni degli istoni, metilazione del DNA) e genetici (es. mutazioni geniche, traslocazioni, amplificazioni, delezioni ed inserzioni virali) possono alterare le proteine tradotte e, quindi, interrompere le vie di trasduzione del segnale e le interazioni proteina-proteina che sono essenziali per importanti processi cellulari come l'apoptosi ed i segnali di sopravvivenza cellulare portando allo sviluppo incontrollato delle cellule ed infine al cancro.<sup>1</sup>

---

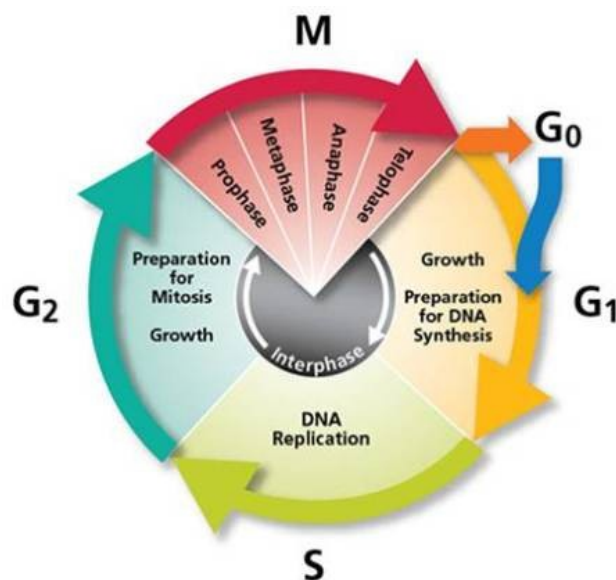
## ***1.1b Ciclo cellulare***

Il ciclo cellulare è l'insieme di eventi ordinati che regolano la crescita e la divisione di una cellula in relazione a stimoli esterni. La sua durata varia col variare della specie, del tipo di cellula e delle condizioni di crescita, ma in media dura dalle 16-24 ore. Negli organismi pluricellulari, non tutte le cellule si riproducono. Possiamo infatti distinguere alcuni tipi cellulari, altamente differenziati, che non entrano mai in mitosi, si pensi ai neuroni, o agli eritrociti. Vi sono poi popolazioni cellulari che si replicano solo in alcune specifiche situazioni, per esempio gli epatociti, o alcune cellule del sistema immunitario. Infine, esistono cellule che si replicano continuamente, come le cellule staminali, presenti in molti tessuti fra cui il midollo osseo, che ospita i precursori delle cellule del sangue. Le cellule eucariotiche hanno evoluto un complesso sistema di regolazione che governa il passaggio da una fase all'altra del ciclo cellulare. Quest'ultimo, infatti, ha il compito di assicurare che il DNA sia fedelmente replicato una sola volta e che copie identiche cromosomali siano egualmente distribuite nelle due cellule figlie. Il macchinario deputato alla replicazione del DNA e alla segregazione cromosomica è regolato da specifici segnali extracellulari; alterazioni (mutazioni, delezioni, amplificazioni geniche) dei componenti che prendono parte al ciclo cellulare potrebbero essere altamente debilitanti, se non fatali per la cellula e possono portare allo sviluppo del tumore.<sup>6</sup> Infatti, il ciclo cellulare è un processo geneticamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule. Gli eventi molecolari che controllano il ciclo cellulare sono ordinati e direzionali: ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente ed è la causa di quello successivo. Affinchè possa verificarsi, sono necessari degli eventi biochimici che inducano la cellula ad entrare nel ciclo, quali sintesi di fattori di crescita, comunicazione tra cellule, trasduzione del segnale.

Il ciclo cellulare di una cellula eucariotica consiste nell'alternanza fra interfase e mitosi. L'interfase comprende una fase nota G1 (dalla lettera iniziale della parola lingua inglese gap che significa riposo in quanto si ritenne erroneamente che l'intervallo tra due mitosi fosse un periodo di riposo cellulare) in cui la cellula sintetizza molti enzimi, si ingrandisce e si prepara a raddoppiare il proprio DNA. Questa è la più lunga fase dell'intero ciclo dato che per percorrerla la cellula può impiegare diverse ore, giorni, settimane o mesi, a seconda della sua differenziazione. E' per l'appunto la durata della fase G1 che condiziona la durata dell'intero ciclo in quanto ciascuna delle fasi successive ha una durata pressoché costante. Segue una fase nota come S (sintesi), durante la quale si verifica la duplicazione del DNA in modo tale che il numero dei cromosomi risulti il doppio di quello normale (assetto tetraploide). Durante

---

la fase successiva, nota G2, la cellula mantiene il suo patrimonio cromosomico tetraploide, provvede alla sintesi di ulteriori proteine ed alla duplicazione degli organuli citoplasmatici e dispone i cromosomi in assetto metafisico. È una fase principalmente di controllo su ciò che è avvenuto prima e di preparazione per la successiva divisione. Nella quarta fase, detta M (Mitosi), che a sua volta si suddivide in profase, metafase, anafase e telofase, la cellula compie la divisione mitotica e forma due cellule ognuna delle quali ha un corredo cromosomico diploide con dapprima la divisione del nucleo e poi quella del citoplasma (citodieresi), precedute dalla condensazione e segregazione dei cromosomi. I segnali che spingono la cellula a proseguire nel ciclo o ad arrestarsi sono forniti da molecole sintetizzate da essa stessa o da altre cellule figlie le quali, una volta secrete, interagiscono con specifici recettori di membrana. Questi segnali extracellulari esercitano una duplice e contrastante azione in quanto alcuni (prevalentemente innescati dai fattori di crescita, dalle citochine e da alcuni ormoni) la spingono a progredire nella fase successiva mentre altri la bloccano e la fanno uscire dal ciclo convogliandola in una fase definita G0 dove la cellula, pur essendo metabolicamente attiva, è in uno stato non proliferante, di quiescenza, che può essere reversibile o meno a seconda dei casi e, quindi, può o non rientrare in fase G1 o G2 e proseguire nel ciclo (Figura 2).



**Figura 2.** Raffigurazione grafica delle varie fasi del ciclo cellulare.

Da quanto detto si comprende come il processo di replicazione del DNA, divisione cellulare, risposta ai segnali extracellulari quali nutrienti e fattori di crescita, siano eventi estremamente importanti nella regolazione del ciclo cellulare. Esistono importanti meccanismi di controllo

---

che coordinano i passaggi durante le varie fasi del ciclo cellulare, il primo è rappresentato da un sistema di *checkpoints* che prevengono l'entrata nella fase successiva del ciclo fino a quando gli eventi della fase precedente non sono stati completati.<sup>7</sup> Essi agiscono a livello delle principali transizioni del ciclo cellulare, in particolare a livello della transizione fra la fase G2 e la fase M (checkpoint G2/M) e la fase G1 e la fase S (checkpoint G1/S). Il primo previene l'entrata in mitosi fin quando la replicazione del DNA in fase S non è del tutto completa; inoltre, tale *checkpoint*, interviene in risposta ad un danno al DNA. Tale arresto permette alla cellula di avere il tempo per riparare il danno piuttosto di trasmetterlo alle cellule figlie. Il danno al DNA non solo arresta il ciclo cellulare in G2, ma rallenta la progressione delle cellule attraverso la fase S e arresta la progressione del ciclo anche al *checkpoint* G1 permettendo il riparo del danno prima che la cellula entri in fase S. La proteina che media tale azione è conosciuta come p53, che è rapidamente prodotta in risposta al danno; è interessante notare che il gene che codifica per la proteina p53 è frequentemente mutato nei tumori umani e la perdita della funzione di p53 risulta in una mancata correzione del danno al DNA che viene replicato e trasmesso alle cellule figlie. Tale trasmissione di eredità porta ad un'aumentata frequenza di mutazioni e generalmente ad instabilità del genoma cellulare, che contribuisce allo sviluppo del tumore.<sup>8</sup> Il secondo *checkpoint*, quello di fase G1, localizzato al termine di tale fase, è il punto in cui la cellula prende la decisione chiave se dividersi o entrare nello stato di quiescenza G0. Lo stato di questo *checkpoint* dipende dalle condizioni nutrizionali in cui si trova la cellula e da particolari messaggeri chimici. È presente, inoltre, un terzo *checkpoint* che presiede all'integrità del genoma, alla fine della fase M; questo monitora il corretto allineamento dei cromosomi sul fuso mitotico e assicura la corretta distribuzione dei cromosomi alle cellule figlie.

Un secondo importante meccanismo di controllo, che presiede al passaggio delle varie fasi del ciclo cellulare è rappresentato da un'insieme di protein-chinasi, chiamate *chinasi ciclina-dipendenti (Cdk)*, e da numerose proteine, dette *ciclina*, che unendosi alle precedenti le attivano rendendole capaci di fosforilare determinati substrati che vengono, a loro volta e a seconda dei casi, attivate o inattivate. I complessi ciclina-Cdk hanno vita breve in quanto le prime vengono inattivate da altre proteine. Ciascun passaggio da una fase all'altra del ciclo, così come l'avanzamento nella stessa fase, è operato da specifiche Cdk associate a determinate ciclina che attivano cascate enzimatiche<sup>9</sup> che culminano con la liberazione di fattori di trascrizione che raggiungono il nucleo e stimolano la codificazione di molecole che favoriscono l'avanzamento nella fase e/o la transizione da una fase all'altra ovvero bloccano proteine inibitrici (prodotte da geni oncosoppressori) (Figura 3).

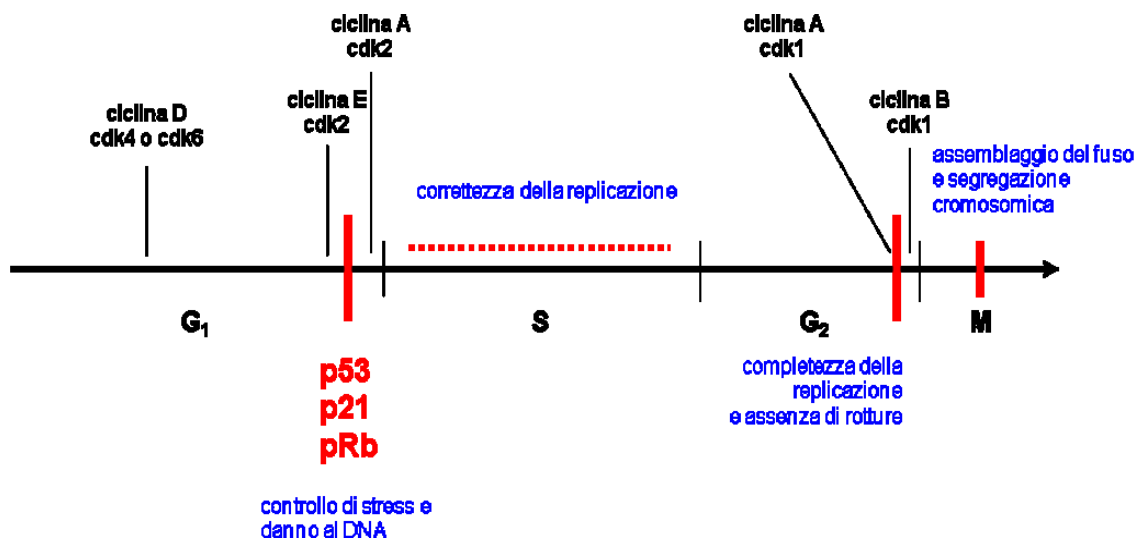


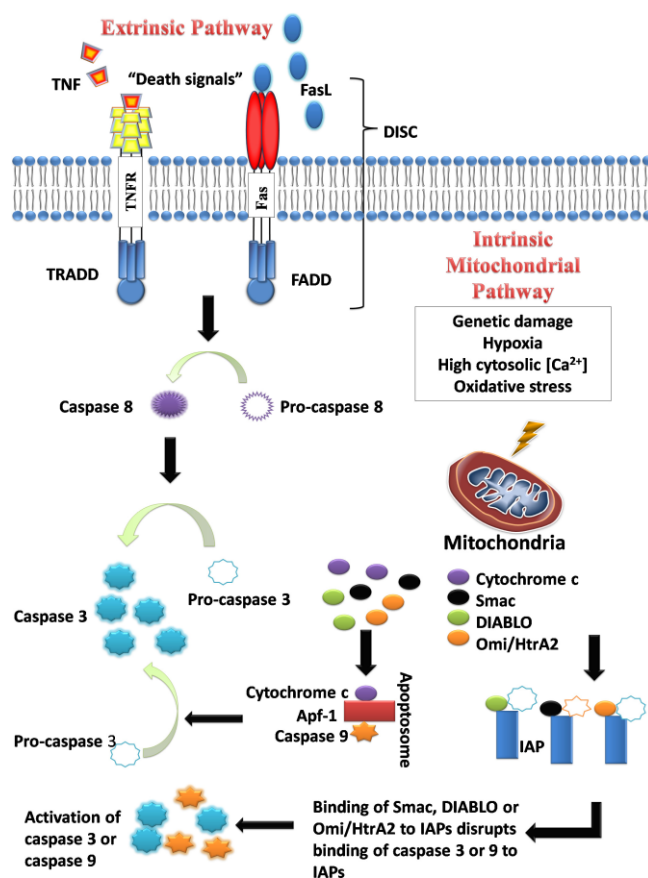
Figura 3. Rappresentazione schematica dei *checkpoints* del ciclo cellulare.

### 1.1c Morte cellulare programmata (Apoptosi)

La morte cellulare programmata (definita apoptosi) è un processo fisiologico complementare alla proliferazione cellulare che garantisce l'omeostasi in tutti i tessuti cellulari. Viene attuata dalla cellula in condizioni fisiologiche proprio per bilanciare gli effetti dell'eccessiva proliferazione portando al graduale smantellamento della cellula attraverso la degradazione del citoscheletro, dell'involucro nucleare, dei compartimenti intracellulari ed infine alla formazione di residui cellulari sottoforma di corpi apoptotici che vengono riconosciuti e fagocitati dai macrofagi che ne ricicleranno i costituenti.<sup>10</sup> Il mantenimento delle normali funzioni cellulari e dell'omeostasi tissutale dipende, infatti, proprio dalla regolazione di molteplici segnali che controllano la scelta cellulare di proliferare, differenziare, cessare di crescere o morire.

Per molto tempo l'oncogenesi è stata vista come il risultato di una proliferazione illimitata ma, forti evidenze hanno dimostrato che anche l'apoptosi gioca un ruolo ugualmente importante. Infatti, il tumore si sviluppa quando le cellule evitano la morte cellulare programmata e proliferano in modo improprio senza un'apoptosi compensatoria.<sup>11</sup> Quindi lo studio dei regolatori della proliferazione e della morte cellulare è fondamentale per comprendere la trasformazione cellulare in vitro e per trovare nuovi approcci alla terapia del cancro.

Gli iniziatori ed esecutori del processo apoptotico sono le caspasi, una famiglia di cistein proteasi specificamente attivate nelle cellule apoptotiche tramite auto clivaggio e responsabili, a loro volta, del clivaggio di proteine a valle, strategiche per la cellula.<sup>12</sup> Ci sono tre diverse vie attraverso le quali le caspasi possono essere attivate: le prime due sono quelle comunemente note, ossia la via estrinseca o innescata dai recettori di morte (TNR e Fas) e la via intrinseca o mitocondriale (via regolata dai fattori pro-apoptotici (Bad, Bik, Bid, Bak, Bx) ed anti-apoptotici (Bcl-2, e Bcl-X<sub>L</sub>)) (Figura 4). La terza, meno conosciuta, è la via intrinseca del reticolo endoplasmatico (ER).<sup>11</sup>



**Figura 4.** Via estrinseca ed intrinseca dell'apoptosi.

La proteina a monte della via intrinseca è la caspasi 9 mentre la caspasi 8 è quella che regola l'inizio del processo apoptotico attraverso la via estrinseca. Entrambi le vie convergono nell'attivazione della caspasi 3. Quest'ultima è responsabile dell'attivazione, a valle, di altre caspasi che inducono il clivaggio di protein-chinasi, proteine del citoscheletro, proteine che riparano il DNA e delle subunità inibitorie della famiglia delle endonucleasi.

---

La terza via, meno conosciuta, è quella della via intrinseca del ER. Si pensa sia dipendente dall'attivazione della caspasi 12 che darà inizio ad una cascata di eventi che porteranno all'attivazione dei segnali apoptotici.

Il breve excursus fatto sulle vie apoptotiche ci fa comprendere come anche lo studio sui regolatori della morte cellulare sia fondamentale per un'analisi della trasformazione cellulare in vitro e per trovare nuovi approcci alla terapia dei tumori. Infatti, una ridotta apoptosi e/o la sua resistenza giocano un ruolo vitale nella carcinogenesi. I meccanismi attraverso cui ciò si verifica possono essere vari e divisi in: a) distruzione dell'equilibrio tra proteine pro e anti apoptotiche, b) ridotta espressione delle caspasi, c) difetti/mutazioni nella proteina p53 (coinvolta non solo nell'induzione dell'apoptosi, ma anche nella regolazione del ciclo cellulare, nello sviluppo, nella differenziazione, nell'amplificazione genica, nella ricombinazione del DNA, nella segregazione cromosomica, nella senescenza cellulare), d) ridotta espressione dei segnali o dei recettori di morte.<sup>11</sup>

La resistenza ai farmaci antitumorali, da parte delle cellule neoplastiche nel corso di un trattamento chemioterapico, è all'origine dell'insuccesso terapeutico nella maggior parte dei casi e dipende spesso dal fatto che l'attività un gran numero di farmaci è legata alla capacità di indurre la morte cellulare programmata delle cellule bersaglio. Se ciò non avviene, in conseguenza delle alterazioni dei geni che presiedono a questo fenomeno, e quindi, delle proteine tradotte, la cellula neoplastica sopravvive e continua a moltiplicarsi indefinitivamente. Ogni difetto o anomalità lungo le vie apoptotiche rappresenta un interessante bersaglio per potenziali strategie terapeutiche contro il cancro che possano ripristinare i segnali apoptotici verso la normalità eliminando le cellule difettose.

---

## ***1.1d Basi molecolari dell'insorgenza della resistenza ai farmaci antitumorali***

Nonostante la complessità della natura biologica, la chemioterapia antineoplastica ha ottenuto numerosi successi quando applicata a molte malignità ematologiche e alcuni tumori solidi, specialmente delle cellule germinali e di alcune malignità infantili.<sup>13</sup> Questi successi scaturiscono principalmente da una comprensione più razionale dei diversi meccanismi molecolari che governano lo sviluppo del tumore e diverse terapie antitumorali sono concepite con l'intento di bersagliare specifici meccanismi che si verificano nelle cellule tumorali e che, generalmente, sono assenti nelle cellule normali.<sup>14</sup> Molti farmaci antitumorali sono attualmente usati in terapia clinica ed hanno un impatto positivo sulla sopravvivenza del paziente.

Purtroppo, nello scenario della maggior parte dei tumori killer come quello al polmone, al pancreas, al colon, alla mammella e alla prostata, i successi sono stati limitati;<sup>15</sup> uno dei maggiori impedimenti è rappresentato dallo sviluppo della resistenza al farmaco (*farmaco-resistenza*) e dagli effetti collaterali sui normali tessuti e cellule. Infatti, molti tumori sono intrinsecamente resistenti a molti dei più potenti agenti citotossici usati in terapia (resistenza primaria) mentre altri tumori, invece, inizialmente sensibili, acquisiscono resistenza dopo una terapia iniziale e risultano essere resistenti non solo ai primi agenti terapeutici, ma anche ad altri farmaci non utilizzati nel trattamento (resistenza acquisita).

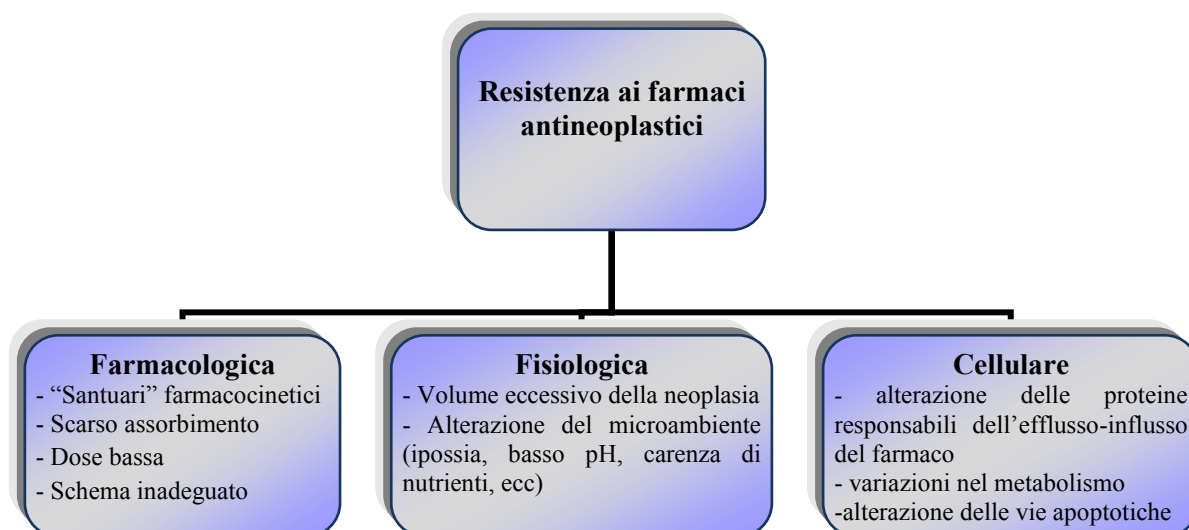
Perché una terapia antitumorale sia efficace, deve soddisfare alcuni requisiti. Il farmaco deve raggiungere le cellule tumorali, una quantità sufficiente di farmaco (o dei suoi metaboliti) deve entrare e persistere all'interno della cellula per un tempo adeguato, la cellula tumorale deve essere sensibile all'azione del farmaco, e tutto questo deve avvenire prima che insorga resistenza al farmaco. Inoltre, il paziente deve essere in grado di sopportare gli effetti collaterali della terapia. Purtroppo, lo sviluppo di resistenza da parte della cellula neoplastica ai farmaci antitumorali è uno degli ostacoli maggiori all'efficacia della chemioterapia.

Per parafrasare Tolstoy nelle linee di apertura del suo celebre romanzo Anna Karenina, “*le cellule normali si assomigliano nella loro risposta ai farmaci mentre ogni cellula tumorale risponde a modo suo*”. Ciò significa che ogni cellula tumorale di un determinato paziente presenta un differente assetto genetico che dipende non solo dal tessuto di origine ma anche dal *pattern* di attivazione di oncogeni ed inattivazione di oncosoppressori, così come dalle variazioni casuali nell'espressione genica risultante da un fenotipo mutato nella maggior parte dei tumori.<sup>14</sup> Come risultato, ogni tumore esprime una differente varietà di geni resistenti ai



---

farmaci e le sue cellule, anche se derivate clonalmente, esibiscono un'elevata eterogeneità rispetto alla farmaco-resistenza. Pertanto, è necessario approfondire le conoscenze in merito ai meccanismi attraverso cui le cellule tumorali eludono i trattamenti al fine di sviluppare farmaci antitumorali pienamente efficaci in terapia. Ad oggi, sono stati evidenziate diverse cause per cui le cellule tumorali in crescita nei tessuti possono diventare resistenti ai farmaci antitumorali (Figura 5).



**Figura 5.** Schema dei meccanismi di resistenza ai farmaci antitumorali.

Una prima causa può essere legata a fattori anatomo-fisiologici, ad esempio nel caso in cui un determinato farmaco non sia in grado di raggiungere concentrazioni citotossiche per un periodo adeguato di tempo. Questa situazione si verifica quando le cellule neoplastiche sono confinate in organi difficilmente accessibili dai farmaci, i cosiddetti *santuari* (ad esempio il sistema nervoso centrale, per la presenza della barriera emato-encefalica, e il testicolo, a causa della barriera emato-testicolare). A questo meccanismo possono aggiungersi errori nello schema terapeutico, che prevedono una dose troppo bassa o che si mantiene su livelli adeguati solo per un periodo limitato di tempo.

La farmaco-resistenza può essere indotta anche da cause relative alla fisiologia peculiare della massa tumorale: ad esempio un eccessivo volume della neoplasia determina, nell'ambito della stessa, la formazione di estese aree ischemiche, che rendono difficile sia il trasporto del farmaco, sia quello dell'ossigeno nelle vicinanze delle cellule tumorali. Alcuni antineoplastici provocano la morte cellulare tramite la formazione di reattivi dell'ossigeno: si comprende

---

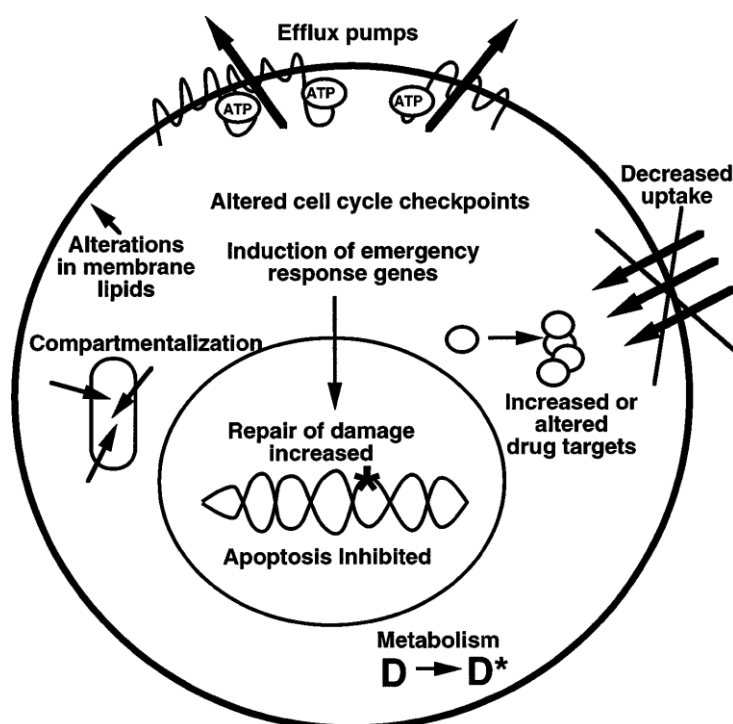
quindi come la mancanza dell'ossigeno comporti necessariamente una riduzione dell'attività. In realtà, deprivazione di glucosio, basso pH, ipossia, carenza di nutrienti sono tutte condizioni microambientali frequentemente presenti nelle cellule tumorali e sono alla base dell'inadeguata vascolarizzazione dei tumori, soprattutto quelli solidi, nonostante la loro origine e localizzazione. Inoltre, la presenza di una estesa area ischemica, unita alle condizioni di stress microambientale, determina anche la selezione di cellule che hanno ridotto la loro funzione apoptotica attraverso alterazioni genetiche come mutazioni di p53 ed, essendo incapaci di iniziare l'apoptosi, sono anche resistenti a molti farmaci. È pur vero che le condizioni di stress possono indurre farmaco- resistenza anche senza alterazioni genetiche nelle cellule tumorali.<sup>14</sup>

Vi sono poi ulteriori fattori (Figura 6), propri della cellula neoplastica, che si oppongono all'azione dei farmaci antineoplastici come:

- ridotta o completa perdita dell'espressione dei recettori di superficie cellulare o dei trasportatori con conseguente diminuzione del trasporto intracellulare del farmaco dal momento che ne risulta alterato il legame. Questo meccanismo porta, per esempio, ad una diminuzione dell'uptake di ciclopamine e farmaci nucleosidici, come la citarabina e il metotrexato (in quest'ultimo caso la resistenza scaturisce da una mutazione a carico della proteina legante i folati);
- aumento dell'espressione di specifiche proteine responsabili dell'incremento del trasporto extracellulare del farmaco. Tale meccanismo è stato descritto per molti farmaci come gli alcaloidi della vinca, epipodofillotossine, antracicline, vinblastina, doxorubicina e paclitaxel. L'aumentato efflusso è dovuto all'aumento dell'espressione di proteine specifiche, come la glicoproteina P (P-gP), la proteina associata alla resistenza multifarmaco (MRP-1) e la proteina associata alla resistenza al mitoxantrone (MXR; anche conosciuta come proteina resistente al tumore al seno (BCRP) o proteina ABC della placenta (ABC-P)), che hanno la funzione di estrarre i farmaci dall'interno della cellula. Questo meccanismo è alla base del fenomeno della *multidrug resistance* (MDR), cioè della contemporanea resistenza verso farmaci antineoplastici con diversa struttura e diversa modalità d'azione;
- attivazione del metabolismo del farmaco o alterazione, per mutazione, di uno specifico bersaglio del farmaco; in entrambi i casi si verifica o una diminuzione della sua attivazione o un aumento della sua inattivazione. Nel primo caso sono interessati, per esempio, farmaci quali la citosina arabinoside (ARA-C) che per il loro funzionamento richiedono un'attivazione enzimatica. Le cellule sono resistenti ad ARA-C perché

povere in chinasi e fosforibosil-transferasi (enzimi necessari per l'attivazione intracellulare del farmaco). Per il secondo meccanismo, invece, possiamo includere la coniugazione di farmaci contenenti platino come oxaliplatino e cisplatino al GSH, un potente anti-ossidante che protegge le cellule dagli effetti dannosi delle specie reattive dell'ossigeno. Tale coniugazione fornisce il substrato a trasportatori come ABC che aumentano l'effluso del farmaco;

- evasione delle vie apoptotiche per mezzo dell'acquisizione sia di mutazioni inattivanti geni che codificano per proteine pro-apoptotiche, come la p53, sia di mutazioni attivanti geni che codificano per proteine anti-apoptotiche, come Bcl-2.



**Figura 6.** Schema riassuntivo di alcuni fattori attraverso cui le cellule tumorali diventano resistenti all'azione di farmaci antitumorali citotossici.

Tutti questi fattori portano ad un accumulo limitato del farmaco nelle cellule con conseguente blocco i) della morte cellulare programmata (apoptosi), che è attivata dalla maggior parte dei farmaci antitumorali, ii) dell'attivazione dei meccanismi di risposta generale che detossificano i farmaci e riparano i danni del DNA, iii) delle alterazioni nel ciclo cellulare e nei *checkpoints*, rendendo le cellule relativamente resistenti agli effetti citotossici dei farmaci sulle cellule tumorali; inoltre tali fattori sono responsabili sia della resistenza "intrinseca" o

---

primaria, (un esempio tipico di questo è la MDR), che della resistenza “acquisita” o secondaria.

L'efficacia limitata di molti farmaci antitumorali, progettati con l'intento di colpire specifiche alterazioni molecolari, è risultata essere una conseguenza della complessa funzione aberrante di molte biomolecole che prendono parte alla trasformazione neoplastica. È quindi diventato imperativo ideare e sviluppare nuove strategie per aumentare e migliorare le terapie. Recentemente, le conoscenze rivolte verso la comprensione del sistema biologico del cancro hanno portato a considerare i *network* di interazione proteina-proteina come appropriati bersagli terapeutici, dal momento che risultano essere responsabili delle alterazioni dei segnali di morte/sopravvivenza caratteristici delle cellule tumorali; dai primi studi sono emersi risultati positivi che hanno fornito evidenze incoraggianti sulle interruzioni selettive ed efficienti delle interazioni proteina-proteina nel cancro, aprendo nuove strade per lo sviluppo di farmaci antitumorali.<sup>15</sup>

---

## ***1.1e Importanza delle interazioni proteina-proteina nei processi biologici***

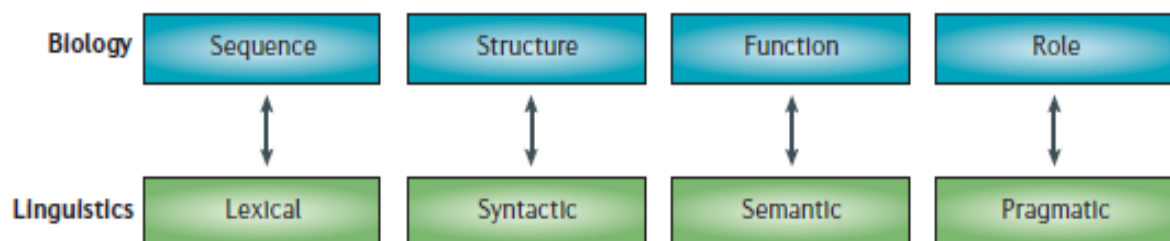
La mappatura dell'interattoma ha permesso di avvalorare la conoscenza che tutti i processi biologici che si verificano nelle cellule viventi sono largamente controllati da proteine, che interagiscono con una moltitudine di partners funzionali, dando vita ad un complesso *network* di segnali.

L'organizzazione citoscheletrica della cellula dipende dall'assemblaggio di diverse proteine, la trasduzione dei segnali dai recettori presenti sulla membrana plasmatica a specifici siti intracellulari è trasmessa da precise associazioni proteina-proteina; il riconoscimento cellula-cellula è mediato da specifici recettori localizzati sulla superficie delle cellule bersaglio a cui si legano specifiche proteine presenti su cellule diverse; la risposta immunitaria si basa in gran parte sul riconoscimento di proteine e peptidi da parte di opportuni anticorpi; la trascrizione è regolata da una moltitudine di fattori, attivatori e soppressori di essa, la cui unione è di difficile comprensione ma chiaramente essenziale;<sup>16</sup> la progressione del ciclo cellulare dipende da una fine interazione di cicline e Cdk;<sup>17</sup> la stessa apoptosi, traffico proteico, espressione genica e molti altri processi sono regolati da proteine che formano spesso un complesso insieme di *network* in cui esse stesse regolano e sostengono altre ancora per mezzo di specifiche interazioni. Per comprendere la complessità di tali riconoscimenti basti pensare ai *network* neuronali caratteristici del sistema nervoso, che sono alla base del trasferimento delle informazioni, o anche alla complessa rete computazionale che permette di decifrare articolati codici.

Tutti gli stimoli esterni e i segnali che vengono percepiti dalle cellule sono successivamente propagati all'interno attraverso interazioni proteiche con una forte gerarchia spaziale e temporale che permette alla cellula stessa di comportarsi e rispondere in maniera adeguata rispetto all'ambiente che la circonda, riscontrando sempre un equilibrio tra ambiente esterno e nucleo. Lo studio della propagazione intracellulare dei segnali è attualmente arrivato a descrivere minuziosamente gli eventi biochimici iniziali, l'attivazione delle chinasi dei recettori, i segnali dovuti a fosforilazioni di serine, treonine e tirosine, la partecipazione di adattatori che riconoscono questi segnali e partecipano addensando proteine nel punto richiesto. Al contrario, i fenomeni che spengono i segnali quali endocitosi, downregulation e degradazione, sono meno definiti. La maggior parte di queste interazioni scaturiscono dal fatto che le proteine sono strutturate in maniera modulare per mezzo di una specifica combinazione di domini funzionali<sup>18</sup> capaci di riconoscere brevi motivi proteici per mezzo di

sequenze altamente conservate. Tipicamente, i domini di interazione proteina-proteina (es. SH3, WW) sono moduli foldati di strutture terziarie altamente conservati, indipendenti dalla proteina stessa, di 35-150 amminoacidi (aa), che possono essere espressi da soli rispetto alle proteine di cui fanno parte ma conservano la loro capacità intrinseca di legare i loro partner fisiologici. I domini di interazione sono spesso utilizzati da numerose proteine differenti per mediare un particolare tipo di riconoscimento molecolare. I motivi proteici, invece, sono siti funzionali presenti nelle proteine identificati da specifiche sequenze consenso e possono essere organizzati in singole o diverse combinazioni di strutture secondarie, aventi ognuna una caratteristica disposizione tridimensionale (es. motivi poliprolinici, motivi LxxLL, coiled – coil, elica – loop – elica, dita di zinco etc.).

Si parla di un vero e proprio “linguaggio delle proteine” per indicare una precisa e chiara comunicazione tra di esse tanto da poter affermare che: *“il linguaggio umano può essere considerato come una trasformazione del linguaggio delle cellule”*;<sup>19</sup> se tale teoria è perseguibile, è esplicito paragonare semantica e sintassi con il rapporto struttura – funzione (Figura 7), così come è interessante che la complessità della linguistica computazionale abbia sviluppato tecniche di calcolo usate non solo per interpretare i dati biologici ma anche per studiare ed investigare la lingua e la grammatica più a fondo. Se le teorie linguistiche possono essere applicate a discipline biologiche come la genetica e la biologia, allora si potrebbero stabilire delle regole grammaticali utili per la comprensione dei *network* proteici e delle funzioni.<sup>20</sup>



**Figura 7.** Rappresentazione schematica e chiarificatrice della notevole somiglianza tra il linguaggio delle proteine (riga superiore) e quello umano (riga inferiore); importanza del valore semantico delle informazioni che sono depositate in una frase o in una proteina in quanto definisce un ruolo biologico o pragmatico in un contesto molto più ampio.

È ben esplicito utilizzare i domini modulari delle proteine come unità base sintattica dal momento che essi possono essere considerati come punto di partenza per la struttura, funzione e sviluppo di queste ed inoltre è possibile considerarli come una biologica Stele di Rosetta che aiuteranno tutti a decifrare i concetti di base nel linguaggio delle proteine.

---

## ***1.1f Farmaci che interferiscono con le interazioni proteina-proteina***

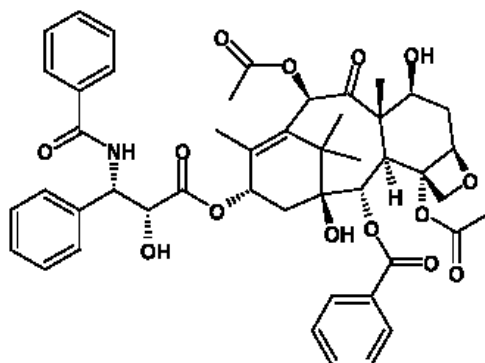
La natura ubiquitaria delle interazioni proteiche e la conoscenza che riconoscimenti inadeguati proteina-proteina possano condurre a patologie ha aperto la possibilità di sviluppare in campo terapeutico piccole molecole, definite *peptidomimetici*, con attività antitumorale, che vanno ad inibire selettivamente l'interazione proteina – proteina. Secondo “l'ipotesi di strutture privilegiate” (*privileged scaffolds*) tutti i template organici, capaci di imitare le superfici dei motivi di riconoscimento delle proteine, rappresentano composti potenzialmente utilizzabili come modulatori dei complessi proteina-proteina.<sup>21</sup> In realtà, i peptidi o le proteine native biologicamente attive potrebbero essere impiegate direttamente come farmaci se non fosse per il fatto che risultano essere facilmente degradabili da parte delle proteasi, rapidamente degradate dal fegato o dai reni, avere un'elevata flessibilità strutturale con conseguenti interazioni indesiderate con diversi recettori, e bassa permeabilità alle membrane biologiche. Da qui nasce l'esigenza di realizzare dei derivati con immutate proprietà biologiche ma aumentata resistenza enzimatica quali i *peptidomimetici*,<sup>16</sup> composti che abbandonano lo scheletro del peptide ma conservano quelle funzionalità chimiche essenziali in un caratteristico *pattern* tridimensionale che lo rende complementare alla superficie della proteina/e bersaglio. I peptidomimetici, generalmente, presentano delle strutture conformazionalmente ristrette da opportuni vincoli strutturali (quali la presenza di cicli e/o di gruppi ingombranti) che minimizzano i legami con altri siti proteici aumentando l'attività per il bersaglio.

In letteratura sono noti numerosi prodotti naturali che agiscono come farmaci peptidomimetici andando ad inibire specifiche interazioni proteina-proteina, grazie alla presenza di caratteristiche strutturali che mimano un messaggio comune, quello cioè di fungere da antitumorali. Tra questi riportiamo il paclitaxel, inibitore sia della tubulina che della proteina antiapoptotica Bcl-2, e gli inibitori del complesso p53-MDM2, quali la nutlina-2 ed i derivati benzodiazepinonici, in quanto essi condividono delle caratteristiche strutturali comuni a motivi di riconoscimento proteina-proteina che giocano un ruolo chiave nella regolazione cellulare (es. motivi poliprolinici, motivi LxxLL, etc.).

Il paclitaxel (Figura 8) è un farmaco antitumorale che interferisce con il normale funzionamento microtubulare aumentando la polimerizzazione dei monomeri di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina (il paclitaxel si lega alla subunità  $\beta$  della tubulina)<sup>22</sup> e determinando, così, la formazione di strutture microtubulari altamente stabili. Ciò influisce negativamente sulla funzionalità cellulare in quanto l'accorciamento e l'allungamento dei microtubuli (definita

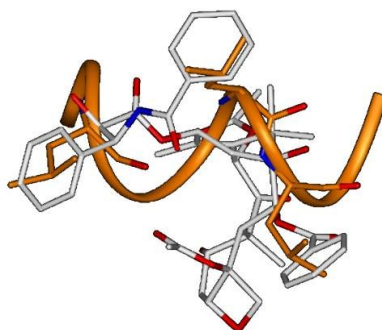
---

“instabilità dinamica”) è indispensabile per la loro funzione. Questo implica un’inibizione della capacità cellulare di utilizzare il proprio citoscheletro in maniera flessibile e, quindi, un’inibizione della mitosi delle cellule.<sup>23</sup>



**Figura 8.** Struttura del paclitaxel.

Oltre la tubulina, è stato identificato come ulteriore bersaglio del paclitaxel la proteina Bcl-2, ipotizzando che esso sia in grado di interagire con una regione del loop flessibile della proteina inibendone la sua funzione antiapoptotica.<sup>24</sup> Partendo da queste informazioni, attraverso studi di *docking* dinamico e analisi bioinformatica è stato dimostrato come tale farmaco sia un peptidomimetico in grado di interferire con le interazioni proteina-proteina alla base del processo apoptotico. In particolare, questi studi hanno evidenziato che il paclitaxel, grazie alla particolare disposizione spaziale dei suoi anelli aromatici, è in grado di riprodurre una struttura ad  $\alpha$ -elica, mimando così il motivo strutturale *LxxLL-like* (Figura 9), e riproduce le interazioni di tali motivi proprio quando si lega ai suoi bersagli proteici.<sup>25</sup>



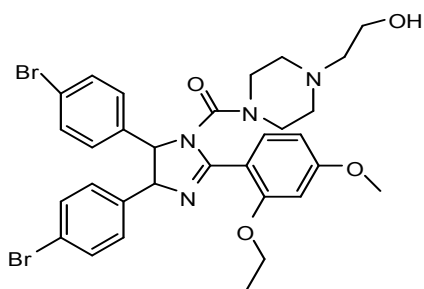
**Figura 9.** Sovrapposizione del paclitaxel (PDB ID: 1JFF; carboni in bianco) con i residui di interazione del motivo LxxLL (PDB ID: 1SB0; carboni in arancione). I residui di interazione sono mostrati in *stick*. Gli eteroatomi sono colorati in base al tipo atomico: C in bianco, O in rosso e N in blu. Gli idrogeni sono stati omessi per rendere la figura più chiara.



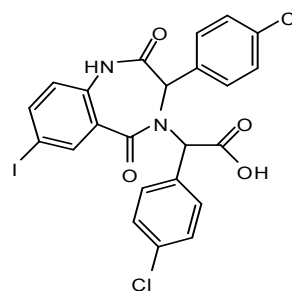
---

Infatti, le sue tre porzioni aromatiche sono impegnate in interazioni idrofobiche con altri residui similmente orientati sia nel sito di legame della Bcl-2 che della  $\beta$ -tubulina. Inoltre, l'anello ossetanico del paclitaxel mima la forma di un residuo prolinico ed è impegnato in interazioni idrofobiche favorevoli sia nella  $\beta$ -tubulina sia nella Bcl-2, che riproducono quelle osservate tra i domini SH3 e i motivi poliprolinici. Questi risultati hanno confermato il ruolo del paclitaxel come peptidomimetico e rivelano che quest'ultimo è una molecola "biadesiva" capace di interferire con le interazioni proteina-proteina che coinvolgono motivi LxxLL-like e poliprolinici.

La Nutlina-2<sup>26</sup> (Figura 10) ed i derivati benzodiazepinonici<sup>27</sup> (es. inibitore benzodiazepinonico 1, Figura 11), invece, sono piccole molecole antagoniste dell'interazione p53-MDM2 che sono risultate essere in grado di bloccare l'azione della proteina MDM2 e ripristinare la funzione della proteina p53 in quei tumori in cui quest'ultima ha conservato la sua relativa struttura e funzione *wild-type* (wt), fungendo così da potenziali agenti antitumorali.



**Figura 10.** Struttura della Nutlina-2



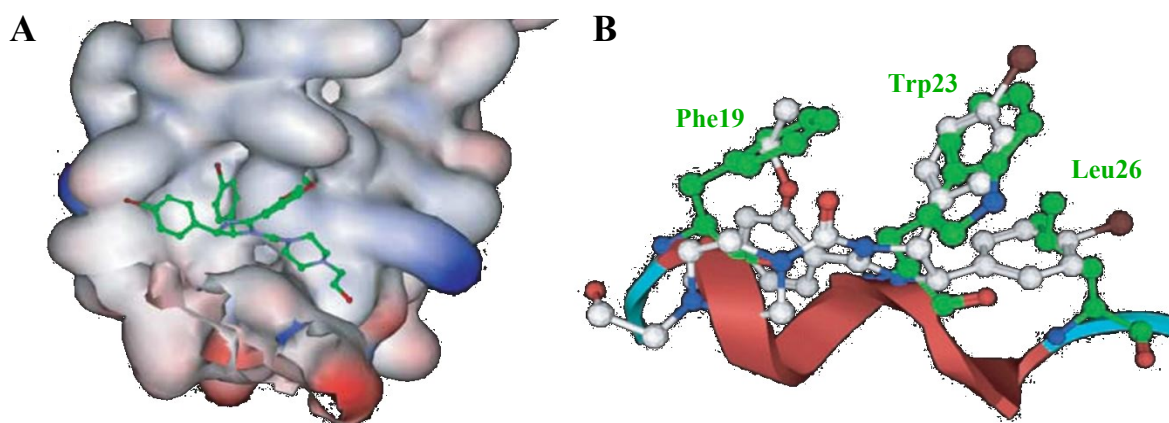
**Figura 11.** Struttura dell'inibitore benzodiazepinonico 1 di HDM2.

La proteina p53 è un fattore trascrizionale essenziale per prevenire la proliferazione inappropriata delle cellule e per mantenere l'integrità del genoma in seguito a diverse forme di stress genotossico. E' implicata nella regolazione di numerosi eventi cellulari quali ciclo cellulare (nella fase G1/S e G2/M), apoptosi, angiogenesi, senescenza<sup>28</sup> e ciò scaturisce dalla sua struttura molto "flessibile" che gli permette di interagire con un elevato numero di partner e di mediare moltissime funzioni. Tale proteina è nota in letteratura come "guardiano del genoma", ed è proprio per il suo ruolo di preservazione della stabilità del genoma attraverso la prevenzione delle mutazioni e l'eliminazione delle cellule danneggiate che i *pathway* di p53 sono i bersagli proteici più frequenti di alterazioni geniche nei tumori. Approssimativamente, circa la metà di tutti i tumori umani esprimono una proteina p53 o incapace di svolgere la sua funzione, a causa di una serie di mutazioni nel suo dominio di legame al DNA, o inattiva come fattore trascrizionale.<sup>29</sup> La funzione della proteina p53 è

---

controllata dal regolatore negativo MDM2 attraverso un meccanismo autoregolatorio di tipo feedback negativo. Quando i livelli nucleari di p53 sono elevati, essa stessa attiva la trascrizione del gene Mdm2, aumentando così i livelli della proteina MDM2. A sua volta MDM2 è in grado di legare p53 nel nucleo, esportarla nel citoplasma ed indirizzarla verso la degradazione nel proteosoma per mezzo del processo di ubiquitinazione.<sup>30</sup> Il motivo della p53, che viene riconosciuto da MDM2, può essere classificato come un motivo ad  $\alpha$ -elica del tipo LxxLL-like ripetuto invertito (i.e. LxxLLxxL) che presenta la sequenza consenso del tipo Fxx $\phi$ xxL (F:fenilalanina; x: qualsiasi amminoacido;  $\phi$ : residuo idrofobico, es. Trp<sup>23</sup>, L: residuo di lisina).

Sia la Nutlina-2 che il derivato benzodiazepinonico sono in grado di mimare la posizione delle catene laterali idrofobiche degli amminoacidi Phe<sup>19</sup>, Trp<sup>23</sup> e Leu<sup>26</sup> presenti sul motivo della p53, legandosi fortemente ad MDM2 nella tasca di legame di p53 e impedendo a quest'ultima di alloggiarvi<sup>26</sup> (Figura 12).



**Figura 12.** (A) Struttura cristallografica del complesso MDM2/Nutlina-2; (B) sovrapposizione della Nutlina-2 (in *ball&stick*, bianco) con il peptide p53 di 9 mer RFMDYWEGL (in *ball&stick*, verde).

In questo modo p53, nelle cellule tumorali, non essendo più complessata con MDM2 risulta attiva e ciò si manifesta con un arresto del ciclo cellulare e l'inizio di una apoptosi caspasi dipendente.

La scoperta di piccole molecole sintetiche che mimino uno o più giri di un' $\alpha$ -elica ha determinato un cambiamento significativo nelle modalità di ricerca di nuovi potenziali agenti terapeutici.

---

Pertanto grazie a tali studi è stato dimostrato che è possibile definire un ligando peptidomimetico anche quando questo non possiede elementi strutturali direttamente riconducibili alla struttura peptidica ma comunque in grado di riprodurre le medesime interazioni di un motivo/dominio proteico funzionale.

---

***2. Progettazione di nuovi agenti antitumorali  
in grado di mimare motivi di riconoscimento  
proteico***

---

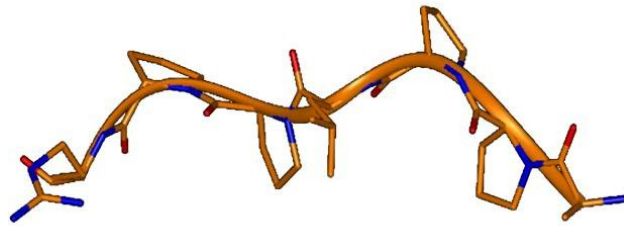
## 2.1 INTRODUZIONE

### ***2.1a Motivi proteici altamente conservati coinvolti nella comunicazione cellulare***

Numerosi studi condotti sulle interazioni proteina-proteina hanno permesso di stabilire che molte proteine coinvolte nella regolazione di diversi eventi cellulari sono costruite in maniera “modulare” ed utilizzano domini altamente conservati per mediare queste interazioni e per formare complessi multiproteici. Inoltre, questi studi hanno suggerito la presenza, in tali domini proteici, di punti cruciali, chiamati *hot spots*,<sup>31</sup> che rappresentano punti focali energetici sulle superfici delle proteine che sono i maggiori determinanti dell’energia libera d’interazione e determinano nelle vicinanze quasi tutte le interazioni chiave. Tali *hot spots* costituiscono regioni di residui amminoacidici la cui natura e disposizione relativa determina l’affinità e la forza dell’interazione. Gli *hot spots* sono altamente complementari fra loro e possiedono un’elevata adattabilità funzionale e strutturale. Molte proteine, infatti, tendono ad utilizzare lo stesso set di *hot spots* per interagire con proteine diverse, set che è in grado di adattarsi di volta in volta per presentare gli stessi residui in contesti strutturali diversi.<sup>32</sup> Per esempio, lo stesso dominio di legame di MDM2 può essere riconosciuto sia da p53 che dalle proteine omologhe p63 e p73 e da molte altre proteine contenenti simili motivi di legame, la cui rilevanza biologica, in alcuni casi, non è ancora ben chiara.<sup>33</sup> Questo suggerisce che gli *hot spots* sono in grado di legare non solo proteine con domini complementari, ma anche peptidi o addirittura piccoli ligandi che vanno in qualche modo a mimare il “ligando naturale”, mediando sia interazioni intra- che inter-molecolari.

Ad oggi sono state identificate differenti famiglie di domini e motivi di interazione proteina-proteina<sup>34</sup> e quelli più frequentemente coinvolti nella comunicazione cellulare e nella formazione di macrocomplessi proteici sono risultati essere sia i) i motivi poliprolinici e, quindi, i loro partner di interazione, tra i quali bisogna annoverare i domini SH3 e WW,<sup>35</sup> sia ii) i motivi LxxLL.<sup>36</sup>

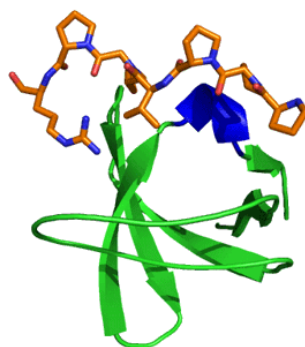
Come è evidente dal nome, i motivi poliprolinici contengono diversi residui prolينici consecutivi necessari sia per le interazioni che per la strutturazione. La presenza di più proline determina una costrizione conformazionale a livello dello scheletro peptidico, che assume una conformazione estesa a forma di elica, chiamata elica poliprolinica (PP)<sup>37-39</sup> (Figura 13).



**Figura 13.** Elica poliprolinica di tipo II ( $\omega=180^\circ$ ;  $\phi=-78^\circ$  e  $\psi=+146^\circ$ ; Codice PDB ID: 1QWE). I carboni sono in arancione, gli azoti in blu e gli ossigeni in rosso.

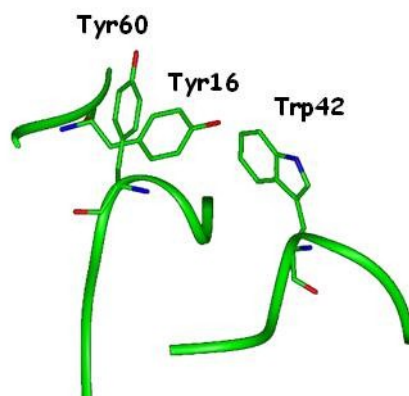
La struttura PP è un motivo di riconoscimento unico caratterizzato dalla presenza di catene laterali proliniche e gruppi carbonilici esposti al solvente ad intervalli regolari. Queste proprietà conformazionali rendono simmetrici questi motivi di riconoscimento, permettendo di avere due possibili orientazioni di interazione e, quindi, riducendo il costo entropico di legame. L'assenza di legami idrogeno intramolecolari permette ai gruppi carbonilici di formare legami idrogeno con i domini di riconoscimento. Inoltre, il gruppo carbonilico delle proline risulta essere un ottimo accettore di legami idrogeno in quanto ha una maggiore densità elettronica rispetto a quella degli altri amminoacidi naturali non essendo coinvolto nella tautomeria con l'azoto ammidico.<sup>40,41</sup> Sebbene i residui prolinici dominino la composizione delle eliche PP, ai fini della selettività delle interazioni con i domini di riconoscimento di tali motivi sono fondamentali anche quei residui amminoacidici carichi o polarizzati, che sono stati trovati essere presenti sia tra le stesse proline che ai limiti di tali motivi.<sup>42</sup> I domini che interagiscono con i motivi poliprolinici sono i domini SH3 e i domini WW.

I domini SH3 sono piccoli moduli proteici di interazione costituiti da circa 60 residui amminoacidici, presenti in un elevato numero di proteine citoplasmatiche e del citoscheletro. Le varie funzioni delle proteine che contengono i domini SH3 includono il controllo della compartimentalizzazione cellulare, la localizzazione delle proteine a livello dei microfilamenti del citoscheletro ed a livello delle membrane, e la regolazione delle attività enzimatiche.<sup>35</sup> La strutturazione di base dei domini SH3 consiste in cinque filamenti  $\beta$  antiparalleli che formano due foglietti  $\beta$  perpendicolari (Figura 14).



**Figura 14.** Struttura cristallografica di un dominio SH3 (verde e blu) in complesso con un motivo poliprolinico (arancione). (Codice PDB ID: 3SEM).

Il sito di legame è costituito da una tasca di residui amminoacidici idrofobici altamente conservati (Figura 15), circondati da due loop variabili e ricchi di aminoacidi carichi. I domini SH3, come già detto precedentemente, riconoscono i motivi poliprolinici contenenti la sequenza consenso PpxP, nella quale p è di solito una prolina, mentre x è un residuo idrofobico (di solito Leu, Val o Pro).<sup>43</sup>



**Figura 15.** Sito di legame di un dominio SH3 (Codice PDB ID: 1QWE). Sono evidenziati i residui conservati Tyr16, Trp42 e Tyr60, coinvolti nel legame proteico. I carboni sono in verde, gli azoti in blu e gli ossigeni in rosso.

I domini SH3 possono anche interagire fra loro e sono spesso accompagnati dalla presenza dei domini SH2. I domini SH2 mediano l'interazione proteina-proteina in una varietà di segnalazioni, alcune delle quali sono rilevanti per i processi mitogeni. Per esempio il dominio SH2 di Grb2, che ha un ruolo chiave nella segnalazione del recettore EGF, è stato bersaglio di numerosi programmi di *drug discovery* in oncologia. In tutte le interazioni del dominio SH2, il bersaglio proteico possiede una tirosina (Tyr) fosforilata.

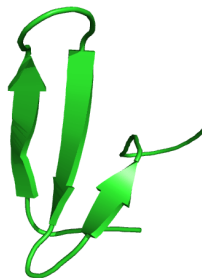
Il sito di legame, quindi, è altamente carico positivamente. Le numerose strutture dei domini SH2 sono state risolte con ligandi ad alta affinità di legame,<sup>44</sup> tipicamente frammenti di peptide della proteina bersaglio che includono residui di fosfotirosina. Si è pensato di

---

utilizzare queste strutture per progettare inibitori dei domini SH2 con pochi legami peptidici e meno polarità, tuttavia è stato difficile e gli unici con un alto grado di affinità (nell'ordine dei nM) non possiedono fosfotirosine, sono abbastanza estesi e presentano gruppi carbossilici, per cui sono molecole inadatte ad essere utilizzate come agenti farmacologici.

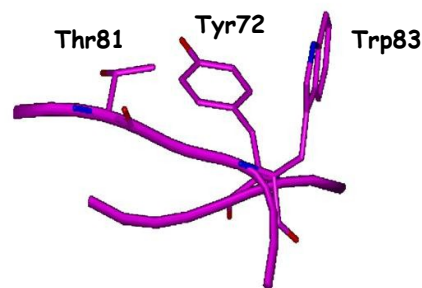
D'altro canto, i domini WW sono un "modulo" proteico costituito da 34-40 aminoacidi e presente in diverse proteine coinvolte nella comunicazione e regolazione cellulare.<sup>45,46</sup> Il loro nome deriva dalla presenza di due residui di triptofano (Trp) altamente conservati, di cui uno è indispensabile per la strutturazione del dominio mentre l'altro per il riconoscimento del motivo poliprolinico.

Questi motivi consistono in un unico foglietto  $\beta$  costituito da tre filamenti  $\beta$  (Figura 16).



**Figura 16.** Struttura cristallografica di un dominio WW (codice PDB ID: 1I6C).

Il sito di legame è costituito da una tasca idrofobica nella quale le catene laterali di un triptofano e di una tirosina formano un angolo di  $90^\circ$  che definisce la cavità di legame delle proline<sup>47,48</sup> (Figura 17).



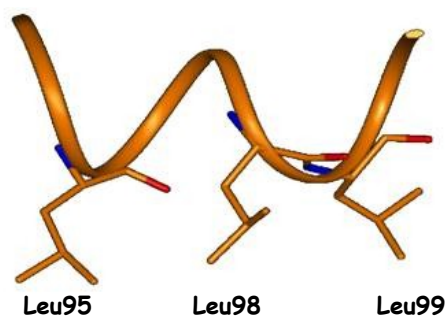
**Figura 17.** Sito di legame di un dominio WW (codice PDB ID: 1EG4). Sono evidenziati i residui conservati Tyr72, Thr81 e Trp83. I carboni sono in magenta, gli azoti in blu e gli ossigeni in rosso.

Anche i motivi LxxLL partecipano in molte interazioni proteina-proteina coinvolte, principalmente, nella regolazione trascrizionale. Infatti, questi motivi sono presenti in molti fattori e cofattori di trascrizione, che mediano le interazioni che possono attivare o reprimere



---

la trascrizione.<sup>36</sup> Il loro nome deriva dalla presenza di tre residui di leucina (Leu) altamente conservati presenti nelle posizioni 1 (residuo  $i$ ), 4 (residuo  $i+3$ ) e 5 (residuo  $i+4$ ) su di un' $\alpha$ -elica (Figura 18).



**Figura 18.** Motivo LxxLL (codice PDB ID: 1SB0). I carboni sono in arancione, gli azoti in blu e gli ossigeni in rosso.

Nonostante i residui di leucina risultino fondamentali per l'interazione con altri domini idrofobici orientati in maniera simile, ai fini della selettività di tali interazioni, sono fondamentali anche quei residui amminoacidici carichi o polarizzati, che sono stati trovati essere presenti ai limiti di tali motivi; tali residui sono fondamentali anche per l'orientazione di legame dei motivi LxxLL.<sup>36</sup> Studi recenti hanno anche dimostrato l'esistenza di motivi simili agli LxxLL (*LxxLL-like*) nei quali i residui di leucina sono sostituiti da diversi amminoacidi idrofobici conservando le stesse proprietà di interazione.<sup>49</sup>

Da un'analisi dettagliata delle interazioni molecolari tra i domini SH3, WW ed LxxLL ed i loro ligandi sono emerse delle importanti caratteristiche strutturali riguardanti i residui coinvolti nelle interazioni.<sup>25</sup> Tali proprietà sono riportate in Tabella 1.

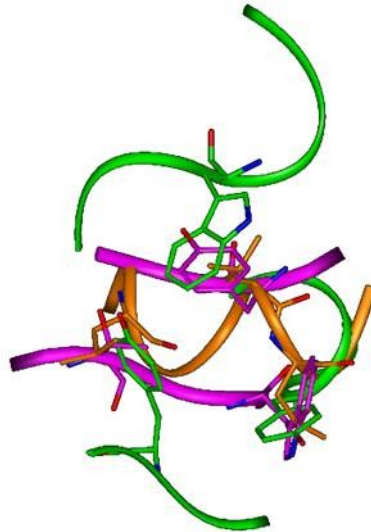
**Tabella 1.** Analisi strutturale dei domini SH3, WW e del motivo LxxLL.

<b>Dominio SH3</b>	
Amminoacidi	Distanza tra i centroidi delle catene laterali
Tyr16 – Trp42	6.19 Å
Tyr60 – Tyr16	6.61 Å
Tyr60 – Trp42	8.38 Å
<b>Motivo LxxLL</b>	
Amminoacidi	Distanza tra i centroidi delle catene laterali
Leu95 – Leu98	7.38 Å
Leu99 – Leu95 <sup>a</sup>	10.08 Å
Leu99 – Leu98	8.18 Å
<b>Dominio WW</b>	
Amminoacidi	Distanza tra i centroidi delle catene laterali
Thr81 – Tyr72	4.51 Å
Trp83 – Thr81 <sup>b</sup>	7.76 Å
Trp83 – Tyr72	6.98 Å

<sup>a</sup> Leu95 e Leu99 sono i residui  $i$  e  $i+4$  su un'  $\alpha$ -elica;

<sup>b</sup> Thr81 e Trp83 sono i residui  $i$  e  $i+2$  in un foglietto  $\beta$ .

In accordo con la loro capacità di riconoscere lo stesso tipo di ligando, come è mostrato in tabella 1, i domini SH3 e WW mostrano simili caratteristiche strutturali; queste caratteristiche strutturali sono risultate essere sorprendentemente anche simili a quelle mostrate dal motivo lineare LxxLL. In particolare, in accordo con un recente studio<sup>25</sup> nel quale è stato dimostrato che la distanza tra i  $C_{\alpha}$  dei residui  $i$  ed  $i+4$  su un'  $\alpha$ -alfa corrisponde alla distanza tra i  $C_{\alpha}$  dei residui  $i$  ed  $i+2$  su un filamento  $\beta$ , il primo e l'ultimo residuo di leucina nel motivo LxxLL (residui  $i$  e  $i+4$  in un'  $\alpha$ -elica), sono strutturati come i residui treonina e triptofano nel dominio WW (residui  $i$  e  $i+2$  in un filamento  $\beta$ ) (Tabella 1; Figura 19).



**Figura 19.** Sovrapposizione dei residui di interazione dei domini WW (carboni in magenta) e SH3 (carboni in verde) e del motivo LxxLL (carboni in arancione). I residui di interazione sono mostrati in *stick*. Gli eteroatomi sono colorati in base al tipo atomico: O in rosso e N in blu. Gli idrogeni sono stati omessi per rendere la figura più chiara.

---

## 2.2 SCOPO DEL LAVORO

È ormai di uso comune parlare di un vero e proprio “linguaggio delle proteine” per indicare una precisa e chiara comunicazione tra di esse tanto da poter affermare che: “il linguaggio umano può essere considerato come una trasformazione del linguaggio delle cellule”. Le interazioni proteina - proteina si verificano, infatti, per mezzo di una specifica combinazione di domini funzionali presenti nelle proteine (SH3, WW, ecc) capaci di riconoscere brevi motivi (poliprolinici, LxxLL, ecc) per mezzo di sequenze altamente conservate. Dal momento che le proteine seguono un preciso codice strutturale, piccole molecole in grado di interferire con il “linguaggio” sono abili a mimare i residui chiave di interazione dei motivi/domini di riconoscimento proteico di un determinato *pathway* molecolare. In quest’ambito, è stato dimostrato dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio dottorato di ricerca che la particolare orientazione spaziale di tre anelli aromatici del paclitaxel, composto di origine naturale con attività antitumorale, è abile a mimare le catene laterali idrofobiche dei residui di interazione dei domini SH3, ciò spiegherebbe la sua attività verso bersagli proteici multipli coinvolti nell’apoptosi.<sup>25</sup> Pertanto, la comprensione delle basi strutturali dell’inibizione da parte di molecole peptidomimetiche rappresenta la chiave per lo sviluppo di nuovi potenziali farmaci più efficaci e selettivi.

Partendo da queste basi, lo scopo del presente lavoro di dottorato è stato l’individuazione di nuovi composti antitumorali, aventi scheletri molecolari facilmente modificabili e sintetizzabili, potenzialmente capaci di interferire nelle interazioni proteina-proteina attraverso la loro capacità di mimare motivi funzionali proteici presenti nei regolatori trascrizionali.

Basandosi sul presupposto che:

- le interazioni proteina-proteina sono alla base di tutti i processi biologici che si verificano nelle cellule;
- il fine equilibrio fra interazioni intra- ed inter-molecolari di domini/motivi peptidici altamente conservati modula la comunicazione fra proteine;
- la presenza di comuni caratteristiche strutturali nei composti con attività antitumorale è altamente frequente in quanto essi sono in grado di riprodurre le interazioni di specifici domini e/o motivi di interazione;

è stato progettato e sintetizzato un piccolo set di derivati pirrolici tetrasostituiti che presentano caratteristiche strutturali comuni a composti antitumorali noti in letteratura ed ipotizzate

---

essere fondamentali per la modulazione di quelle interazioni proteina-proteina che regolano il ciclo vitale della cellula.

In particolare, attraverso un'approfondita analisi farmacologica e computazionale è stato investigato, a livello molecolare, il loro meccanismo d'azione per valutare la loro capacità peptidomimetica di riprodurre i motivi funzionali proteici del tipo *LxxLL-like*, che sono riportati essere uno dei motivi di riconoscimento proteina-proteina più rappresentativi nella regolazione del ciclo cellulare.<sup>36</sup>

Successivamente, per validare l'ipotesi di progettazione, è stato generato un farmacoforo tridimensionale degli analoghi attivi al fine di individuare, in banche dati molecolari, altri composti che non solo rispettino i requisiti strutturali del nostro farmacoforo tridimensionale ma che abbiano anche una simile attività biologica.

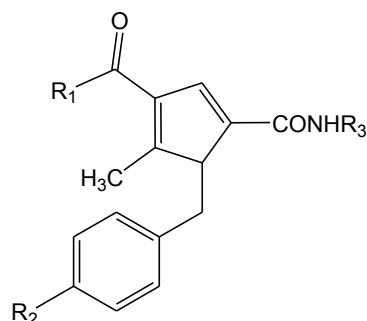
L'attività di ricerca oggetto del presente lavoro di dottorato si è inserita in un ampio progetto multidisciplinare che ha previsto la collaborazione di ricercatori quali: i) Dr. Anna Ramunno (Università degli Studi di Salerno) con competenze nella sintesi chimica; ii) Dr. Silvia Franceschelli (Università degli Studi di Salerno) con competenze biochimiche; iii) Prof. Alfonso Carotenuto (Università di Napoli Federico II) con competenze di chimica farmaceutica.

## 2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE


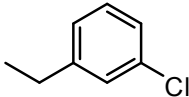

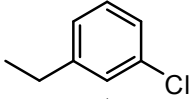

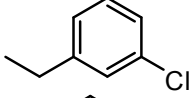

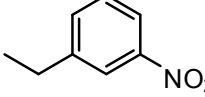

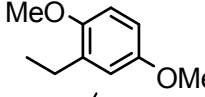

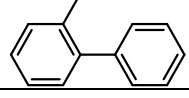
### 2.3a Analisi dell'attività biologica del nuovo set di ligandi identificato

La presenza, nel nuovo set di derivati pirrolici tetra sostituiti, (Tabella 2) di caratteristiche strutturali comuni ad altri composti ad attività antitumorale in grado di riprodurre la disposizione spaziale di motivi/domini proteici (vedere paragrafo 1.1f), ha guidato l'investigazione dell'attività biologica. In Tabella 2 sono riportate le diverse strutture dei composti (Cmp) sintetizzati.

**Tabella 2.** Strutture dei nuovi derivati pirrolici tetrasostituiti **8a-n**.



Cmp	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>8a</b>	CH <sub>3</sub>	H	
<b>8b</b>	CH <sub>3</sub>	H	
<b>8c</b>	CH <sub>3</sub>	H	
<b>8d</b>	CH <sub>3</sub>	H	
<b>8e</b>		H	
<b>8f</b>		H	
<b>8g</b>		H	
<b>8h</b>		H	

<b>8i</b>		CH <sub>3</sub>	
<b>8j</b>		NO <sub>2</sub>	
<b>8k</b>		CF <sub>3</sub>	
<b>8l</b>		H	
<b>8m</b>		H	
<b>8n</b>		H	

In particolare, è stata valutata la loro attività antiproliferativa verso differenti linee cellulari sia tumorali (MCF7, Huh7, M14, Jurkat) che verso linee cellulari di macrofagi monociti murini (Raw) attraverso il saggio colorimetrico dell'MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Come si evince in Tabella 3, solo i composti **8g-i** sono risultati attivi su cellule di melanoma umano M14 (linea cellulare che presenta una mutazione nella proteina p53) con un valore di IC<sub>50</sub> basso micromolare, mentre non è stata riportata alcuna attività sulle altre linee cellulari tumorali, evidenziando così la presenza di un meccanismo di azione selettivo, basato sull'interazione con un *pathway* molecolare alterato in questa linea tumorale, e non legato ad una generica citotossicità. Ciò è stato anche confermato dalla assenza di citotossicità nei confronti delle linee cellulari murine non tumorali (Raw).

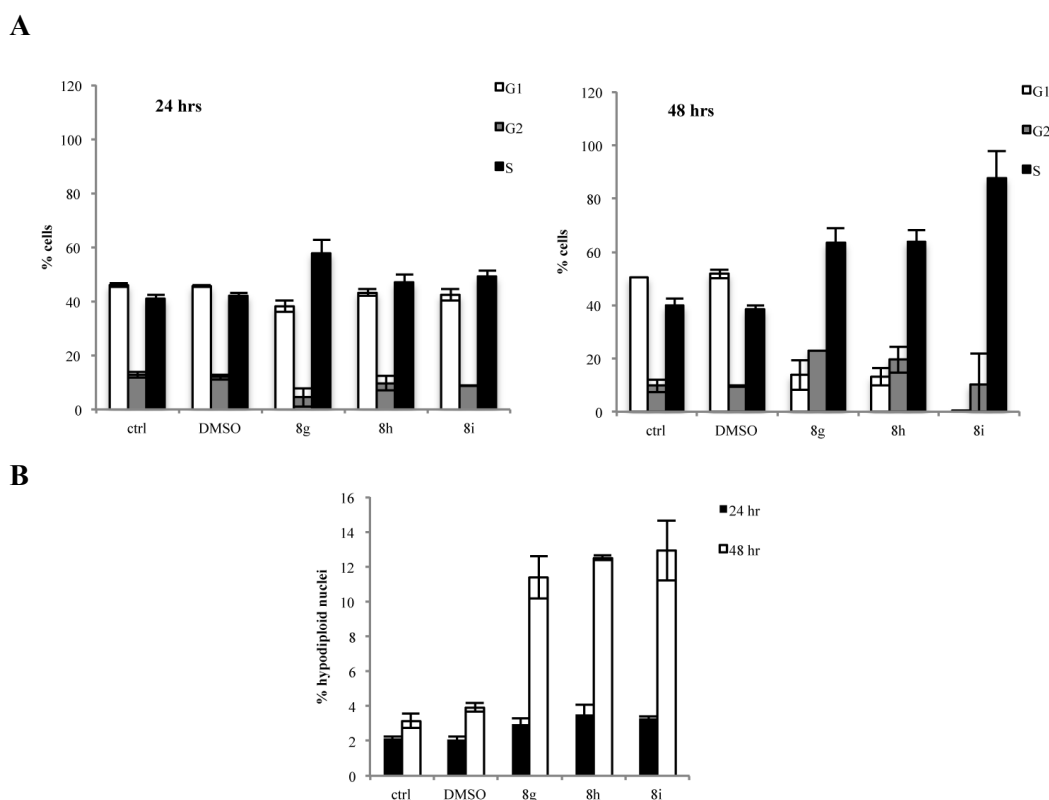
**Tabella 3.** Attività antiproliferativa dei composti **8g-i**: valori di IC<sub>50</sub> calcolati per le linee tumorali (MCF7, Huh7, M14, Jurkat) e normali (Raw) dopo 48 ore di trattamento.

Cmp	IC <sub>50</sub> (μM)				
	M14 <sup>a</sup>	MCF7 <sup>b</sup>	Huh7 <sup>c</sup>	Jurkat <sup>d</sup>	Raw <sup>e</sup>
<b>8g</b>	5.0 ± 0.1	na <sup>f</sup>	na	na	na
<b>8h</b>	7.5 ± 0.1	na	na	na	na
<b>8i</b>	2.5 ± 0.1	na	na	na	na

<sup>a</sup>Linea cellulare di melanoma umano. <sup>b</sup>Linea cellulare umana di tumore alla mammella. <sup>c</sup>Linea cellulare di epatocarcinoma umano. <sup>d</sup>Linea cellulare di linfociti T immortalizzati. <sup>e</sup>Linea cellulare di macrofagi murini. <sup>f</sup>Non attiva (IC<sub>50</sub> > 10 μM).

Sulla base di questi risultati, per investigare ancora più nel dettaglio il meccanismo d'azione dei composti attivi, sono stati eseguiti altri saggi farmacologici per valutare la loro capacità di arrestare il ciclo cellulare.

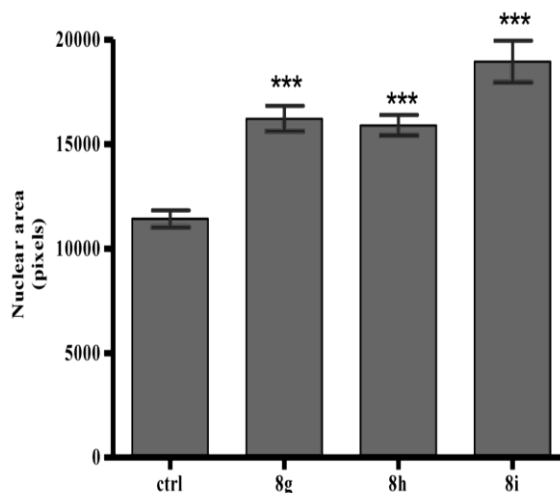
In questi saggi, i composti attivi hanno determinato, dopo 24 ore, il blocco delle cellule in fase S del ciclo cellulare con un conseguente rallentamento delle cellule in fase G0/G1 e G2/M corrispondente ad una netta diminuzione di tali fasi a vantaggio della fase S, mentre dopo 48 ore è stato evidenziato un aumento delle cellule in apoptosi. Dai risultati ottenuti i composti **8g-i** hanno, dunque, mostrato un'attività antitumorale selettiva sulle cellule di melanoma umano M14 attraverso l'arresto della fase S e la successiva induzione dei meccanismi di apoptosi (Figura 20).



**Figura 20.** Profilo del ciclo cellulare (A) e dell'apoptosi (B) sulle cellule di melanoma umano M14 in presenza dei derivati **8g-i** dopo 24 e 48 ore di trattamento.

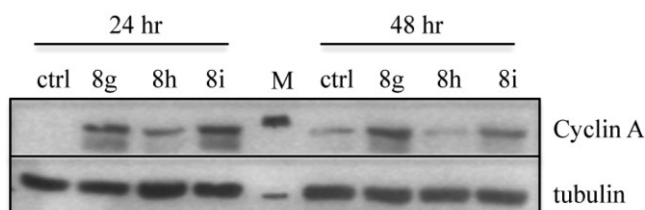


L'arresto in fase S è stato confermato anche dalla colorazione con il reagente DAPI in cui si è osservata una differenza nella grandezza dei nuclei delle cellule trattate, probabilmente a causa di un aumento del contenuto di DNA e d'incapacità delle cellule a dividersi (Figura 21).



**Figura 21.** Aree nucleari delle cellule di melanoma umano M14 trattate per 24 ore con i derivati **8g-i** misurate utilizzando il software *ImageJ* dopo colorazione con il reagente DAPI. I risultati sono espressi come media  $\pm$  SEM (*Standard error of the mean*) di almeno venti misure indipendenti; \*\*\* indicano  $P < 0.001$  rispetto al controllo. La significatività statistica è stata misurata usando l'analisi ANOVA, il test Bonferroni è stato usato per confrontare le differenze tra i gruppi. Tutti i valori misurati sono in accordo con il test statistico ( $P < 0.05$ ).

Per comprendere maggiormente il ruolo dei derivati pirrolici **8g-i** sull'arresto del ciclo cellulare, è stato valutato il loro effetto anche sull'espressione della ciclina A, un marker tumorale associato alla fase G1/S, nota promuovere l'ingresso delle cellule in fase S, attraverso il saggio del *Western Blotting*<sup>50</sup> (Figura 22).



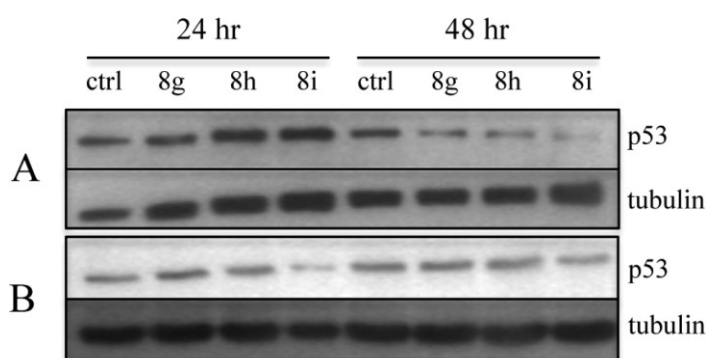
**Figura 22.** *Western Blotting* dell'espressione della ciclina A dopo 24 e 48 ore di trattamento a concentrazione di  $IC_{50}$  con i derivati **8g-i**. La presenza di elevati livelli di ciclina A è importante per l'induzione ed il mantenimento dell'arresto del ciclo cellulare.

Come riportato in Figura 22, i composti attivi **8g-i** hanno determinato nella linea cellulare M14 un aumento dell'espressione della ciclina A dopo 24 ore di trattamento mentre dopo 48

---

ore ciò si è verificato solo per i composti **8g** e **8i** ma non per **8h**, suggerendo la presenza di un meccanismo di azione differente che necessita di maggiore investigazione.

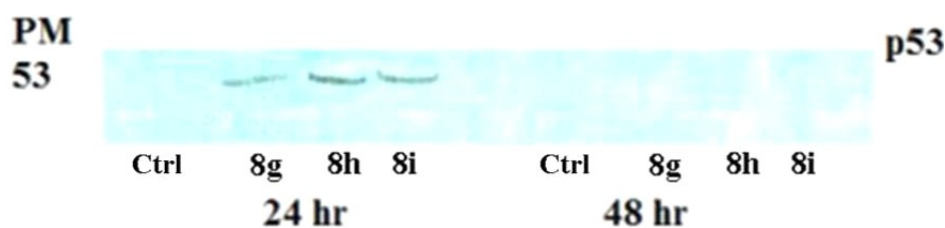
Su queste basi, dal momento che i composti **8g-i** riducono la sopravvivenza cellulare, inducono l'arresto del ciclo e determinano un aumento dell'espressione della ciclina A, è stata indagata anche l'espressione della proteina p53 con saggi di *Western blotting* sulle linee cellulari M14 e Huh7 trattate con 5  $\mu$ M di **8g-i** dopo 24 e 48 ore di trattamento.<sup>51</sup> Le cellule Huh7 sono state utilizzate come controllo dal momento che esse, pur contenendo una mutazione missenso nel gene p53, non sono sensibili ai composti **8g-i** (Figura 23).



**Figura 23.** Espressione della proteina p53 nella linea cellulare M14 (A) ed Huh7 (B) dopo 24 e 48 ore di trattamento con i derivati **8g-i**.

Tali saggi hanno evidenziato che mentre nelle cellule Huh7 trattate con i composti **8g-i** p53 è espressa e si mantiene costante nei due tempi, cioè dopo 24 e 48 ore, nelle cellule M14 trattate la proteina è espressa in maniera differenziale. In particolare, si osserva un aumento dell'espressione della proteina p53 nelle cellule M14 dopo 24 ore di trattamento mentre è chiara la scomparsa dopo 48 ore, marcata rispetto al controllo (Figura 23). La variazione dei livelli di p53, nelle cellule sensibili alle nostre sostanze, ha suggerito che, sebbene mutata, potrebbe avere un ruolo nella regolazione della proliferazione cellulare e, quindi, il *pathway* della p53 potrebbe essere un possibile bersaglio cellulare su cui agiscono le molecole oggetto di studio.

Per confermare tale ipotesi, sono stati eseguiti saggi di *Western blotting* anche sui lisati nucleari per vedere se il trattamento con i derivati **8g-i** modificava la traslocazione nucleare di p53 (Figura 24).



**Figura 24.** Espressione nucleare della proteina p53 nelle cellule M14 dopo 24 e 48 ore di trattamento.

Dai risultati è emerso come p53 sia presente nel nucleo delle cellule trattate per 24 ore con i composti **8g-i**, ma scompare dopo 48 ore di incubazione, in accordo con i risultati relativi all'espressione di p53.

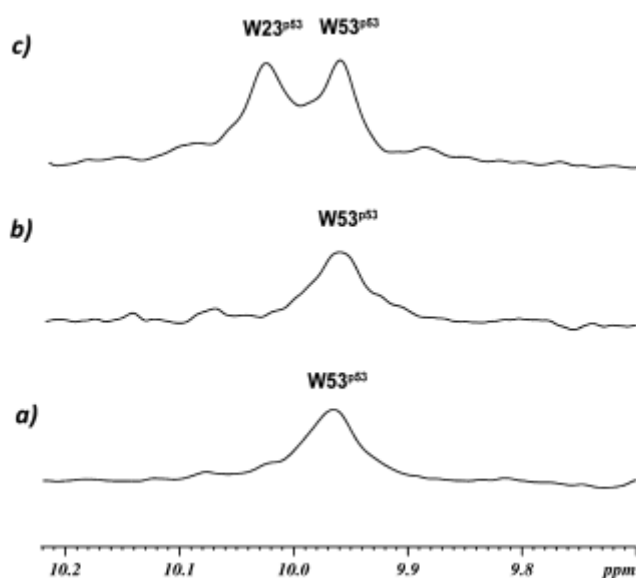
L'attenzione è stata focalizzata principalmente sulla proteina p53 dal momento che il suo ruolo critico come fattore trascrizionale è ben documentato, oltre ad essere una molecola chiave nella regolazione della risposta ai danni al DNA, del ciclo cellulare e dell'apoptosi. La rilevanza biologica di uno specifico *status* di p53 (*wt* o mutato) è stato valutato attentamente nelle diverse linee cellulari. Nel caso specifico è stata riportata una sola mutazione di p53 nella linea cellulare M14 (G266E) e Huh7 (Y220C).<sup>52</sup> Per di più, sulla base di dati NMR, un recente studio su un set di derivati spiro (oxindolo-3,3'-tiazolidino), testati sulla linea cellulare M14, ha messo in evidenza come tali composti siano dei potenti inibitori dell'interazione p53-MDM2.<sup>53</sup> Infine, numerose evidenze supportano il ruolo chiave della proteina p53 e del suo regolatore negativo MDM2/MDM4 nella melanogenesi.

### **2.3b Studi NMR sui nuovi derivati 8g-i**

Sulla base dei risultati ottenuti dai dati biologici e delle conoscenze riportate in letteratura in merito all'inibizione del complesso p53-MDM2 da parte di un set di derivati spiro in cellule di melanoma M14,<sup>53</sup> è stata valutata la capacità, da parte del derivato attivo **8i**, di bloccare l'interazione p53-MDM2 anche attraverso la tecnica della Risonanza Magnetica Nucleare (NMR).

Holak et al. hanno descritto un esperimento <sup>15</sup>N-HSQC bidimensionale utilizzato in spettroscopia NMR per determinare gli effetti degli antagonisti su specifiche interazioni proteina-proteina.<sup>54,55</sup> Il metodo, chiamato AIDA (*Antagonism induced dissociation assay*), permette di stabilire se un antagonista di un'interazione proteina-proteina è "abbastanza forte"

da dissociare il complesso e se, il suo meccanismo di azione ha come conseguenza la denaturazione, la precipitazione o il rilascio della proteina in una conformazione foldata. Questo metodo richiede una proteina abbastanza grande (più di 30 kDa) che sia, a sua volta, in grado di legare proteine più piccole (meno di 20 kDa). Grazie alla natura altamente flessibile del dominio N-terminale della proteina p53, il complesso p53-MDM2 è risultato essere adatto per tale tipologia di studio. In particolare, quando la proteina p53 è in una conformazione libera, i gruppi  $^1\text{H}^\epsilon$  delle catene laterali degli aminoacidi Trp23 e Trp53 determinano nello spettro protonico 1D NMR dei segnali netti. Quando si forma il complesso con la proteina MDM2, il segnale del Trp23 scompare in quanto tale aa, insieme con i residui aa17-26 della p53, si trova all'interno del sito di legame della proteina MDM2. Dopo il legame, questi residui sono ancora coinvolti nel complesso p53-MDM2, a differenza del Trp53 della p53 che non partecipa a nessun tipo di legame con la proteina MDM2, e ciò si evince dallo spettro NMR in quanto si osserva solo il suo segnale<sup>54,55</sup> (Figura 25, a).



**Figura 13.** Spettro protonico monodimensionale delle catene laterali dei triptofani (W) nel complesso p53-MDM2 (a), dopo l'aggiunta del composto **8i** (b) e della nutlina-3 (c).

In merito a ciò, al fine di valutare la capacità del derivato attivo **8i** di inibire la formazione del complesso p53-MDM2, nella soluzione contenente tale complesso (0.1 mM) è stato aggiunto il composto **8i** ma lo spettro completo 1D  $^1\text{H}$  NMR rilevato non è cambiato se comparato con quello acquisito prima dell'aggiunta di **8i**, in quanto **8i** è precipitato dopo essere stato introdotto in soluzione. In particolare, non si è osservato alcun picco per il Trp23 (Figura 25, b), e ciò indica che il complesso p53-MDM2 è ancora presente in soluzione. È stato aggiunto, come controllo positivo, il composto Nutlina-3 (Figura 25, c) ed è emerso, invece, che esso ha

---

determinato un completo rilascio della proteina p53.<sup>54,55</sup> A causa della precipitazione osservata per il derivato **8i**, è stata misurata la sua solubilità nella stessa soluzione *buffer* utilizzata per gli esperimenti NMR.<sup>56</sup> È emerso che la solubilità del composto **8i** è  $\leq 3.1 \mu\text{g/mL}$  ( $\leq 6.8 \mu\text{M}$ ) e, purtroppo, l'alta affinità del complesso p53-MDM2 ( $K_D \approx 0.7 \mu\text{M}$ ), insieme con l'alta concentrazione delle due proteine richiesta per i saggi NMR ( $100 \mu\text{M}$ ), permette la rilevazione solo di inibitori molto solubili, e ciò non è il caso del composto **8i**. Per cui, a causa delle condizioni sperimentali necessarie per l'esecuzione del saggio NMR, il derivato **8i** potrebbe non essere abile a spiazzare la proteina p53 anche se esso presenta affinità di legame elevata per la proteina MDM2.

### ***2.3c Studi computazionali sui nuovi derivati 8g-i***

Sulla base dell'ipotesi di progettazione e del supporto ottenuto dai dati biologici, il nostro set di molecole è stato sottoposto a dettagliati studi computazionali (per i dettagli vedere parte sperimentale) al fine di: i) razionalizzare le relazioni struttura-attività (SARs) ottenute, ii) investigare il meccanismo di azione a livello molecolare e iii) guidare ulteriori modifiche strutturali che portino all'ottimizzazione del profilo farmacologico desiderato.

Gli studi computazionali sono proceduti nel seguente modo. Prima di tutto è stata eseguita una dettagliata analisi delle proprietà conformazionali ed elettroniche del nuovo set di molecole riportate in Tabella 2 e i risultati ottenuti sono serviti per razionalizzare le SARs. Successivamente, al fine di valutare la peptidomimetività dei nuovi composti è stata effettuata una comparazione strutturale dei conformeri ottenuti con motivi *LxxLL-like* coinvolti nelle interazioni proteina-proteina, come quelli presenti i) nella proteina p53 in complesso con MDM2 e ii) nel coattivatore 5 del recettore nucleare (NCOA5) in complesso con il recettore beta degli estrogeni. Infine, per validare i risultati ottenuti è stato generato un farmacoforo tridimensionale che consentisse di comparare la struttura dei nostri composti attivi con quella di altre molecole aventi simile attività biologica.

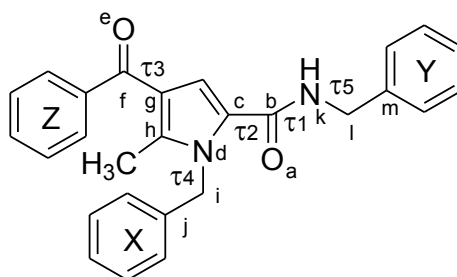
---

### **2.3.1 *Analisi delle proprietà conformazionali ed elettroniche del nuovo set di molecole e relativi studi SARs.***

L'analisi conformazionale ed elettronica del nuovo set di molecole è stata eseguita utilizzando un protocollo di calcoli di dinamica e meccanica molecolare, seguito da una piena ottimizzazione geometrica attraverso calcoli quantomeccanici (PM6) (vedi parte sperimentale, paragrafo 3.5a).

Inizialmente, i conformeri ottenuti all'interno delle 5 kcal/mol dal minimo globale di energia ( $\Delta E_{GM} \leq 5$ ) sono stati classificati in cinque diverse famiglie conformazionali quali TCC, CCC, TCT, TTC e CCT sulla base della conformazione *sin-periplanare* e *anti-periplanare* degli angoli torsionali  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  e  $\tau_3$ . Inoltre, ciascuna famiglia conformazionale è stata ulteriormente suddivisa in sottofamiglie sulla base degli angoli torsionali  $\tau_4$  e  $\tau_5$ . Infine, per ciascuna sottofamiglia sono stati calcolati i valori di  $\Delta E$  dal minimo globale di energia e la percentuale con la quale essa è presente nello spazio conformazionale campionato (Tabelle 4-10).

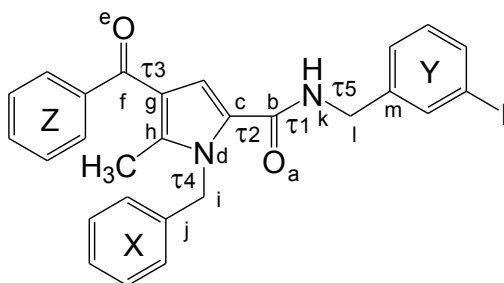
**Tabella 4.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8e** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I	0.05-0.12	~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	30.0
	II	0.00-0.81	~180	~0.00	~0.00	~90	~90	13.0
CCC	I	1.68-2.05	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	9.00
	II	2.18-2.38	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	8.00
	III	2.92	~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	1.00
	IV	2.39	~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	1.00
TCT	I	2.26-2.38	~180	~0.00	~180	~90	~-90	14.5
	II	2.16-3.17	~180	~0.00	~180	~105	~90	12.5
TTC	I	-	-	-	-	-	-	-
	II	3.54	~180	~180	~0.00	~90	~90	1.00
CCT	I	3.90-4.34	~0.00	~0.00	~180	~85	~100	3.00
	II	4.09-4.97	~0.00	~0.00	~180	~105	~-80	7.00

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

**Tabella 5.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8g** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.

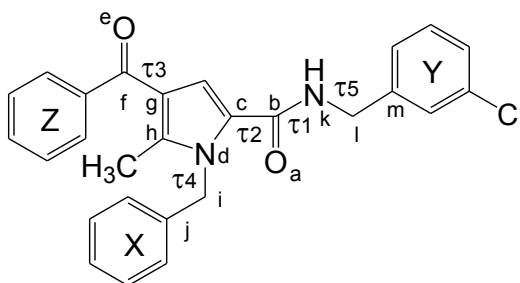


Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I		~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	20.0
	II		~180	~0.00	~0.00	~90	~90	12.0
CCC	I		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	8.00
	II		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	5.00
	III		~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	2.00
	IV		~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	1.00
TCT	I		~180	~0.00	~180	~90	~-90	20.0
	II		~180	~0.00	~180	~105	~90	9.00
TTC	I		~180	~180	~0.00	~85	~-100	12.0
	II		~180	~180	~0.00	~90	~90	1.00
CCT	I		~0.00	~0.00	~180	~85	~100	6.00
	II		~0.00	~0.00	~180	~105	~-80	4.00

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.



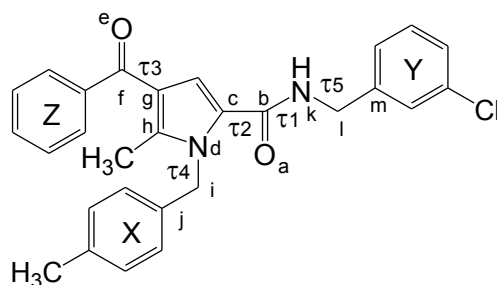
**Tabella 6.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8h** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I		~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	19.0
	II		~180	~0.00	~0.00	~90	~90	15.0
CCC	I		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	8.00
	II		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	7.00
	III		~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	1.00
	IV		~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	5.00
TCT	I		~180	~0.00	~180	~90	~-90	12.0
	II		~180	~0.00	~180	~105	~90	12.0
TTC	I		~180	~180	~0.00	~85	~-100	13.0
	II		~180	~180	~0.00	~90	~90	2.50
CCT	I		~0.00	~0.00	~180	~85	~100	3.00
	II		~0.00	~0.00	~180	~105	~-80	2.50

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

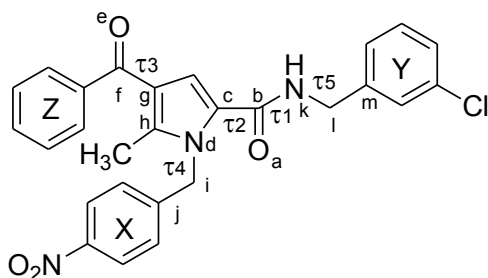
**Tabella 7.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8i** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I		~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	20.0
	II		~180	~0.00	~0.00	~90	~90	15.0
CCC	I		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	10.0
	II		~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	6.00
	III		~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	1.00
	IV		~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	2.00
TCT	I		~180	~0.00	~180	~90	~-90	12.5
	II		~180	~0.00	~180	~105	~90	12.5
TTC	I		~180	~180	~0.00	~85	~-100	14.0
	II		~180	~180	~0.00	~90	~90	1.00
CCT	I		~0.00	~0.00	~180	~85	~100	5.00
	II		~0.00	~0.00	~180	~105	~-80	1.00

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

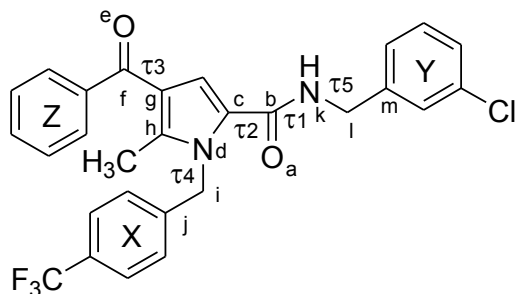
**Tabella 8.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8j** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I	0.00-1.14	~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	26.0
	II	0.94-1.32	~180	~0.00	~0.00	~90	~90	16.0
CCC	I	2.04-3.11	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	11.0
	II	3.05-3.33	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	3.50
	III	2.83-3.72	~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	4.00
	IV	3.37-3.39	~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	3.50
TCT	I	2.25-3.54	~180	~0.00	~180	~90	~-90	15.0
	II	3.14-3.51	~180	~0.00	~180	~105	~90	20.0
TTC	I	-	-	-	-	-	-	-
	II	-	-	-	-	-	-	-
CCT	I	4.49-4.57	~0.00	~0.00	~180	~85	~100	1.00
	II	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

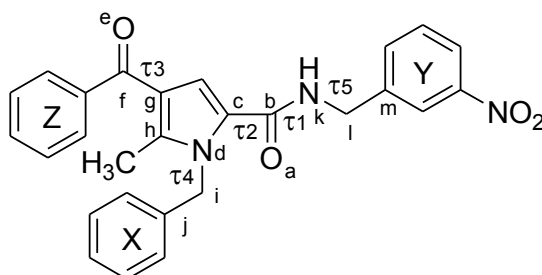
**Tabella 9.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **8k** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I	0.00-0.71	~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	13.0
	II	0.34-0.78	~180	~0.00	~0.00	~90	~90	26.0
CCC	I	0.60-2.61	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	5.00
	II	2.39-2.54	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~-95	1.50
	III	1.09-2.63	~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	3.00
	IV	2.79-3.43	~0.00	~0.00	~0.00	~105	~-70	1.00
TCT	I	1.15-2.91	~180	~0.00	~180	~90	~-90	13.5
	II	2.51-3.04	~180	~0.00	~180	~105	~90	20.0
TTC	I	3.41-3.77	~180	~180	~0.00	~85	~-100	11.0
	II	-	-	-	-	-	-	-
CCT	I	2.80-4.32	~0.00	~0.00	~180	~85	~100	3.00
	II	4.58-4.99	~0.00	~0.00	~180	~105	~-80	3.00

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

**Tabella 10.** Valori di  $\Delta E_{GM}$  (kcal/mol), angoli torsionali e percentuali di presenza nello spazio conformazionale campionato per ogni sottofamiglia conformazionale di **81** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.

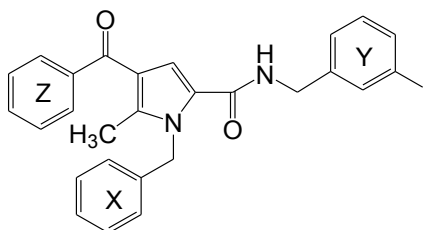


Famiglia	Sotto famiglia	$\Delta E_{GM}^a$ (kcal/mol)	Angoli torsionali <sup>b</sup> (°)					Percentuale (%)
			$\tau 1^c$	$\tau 2^d$	$\tau 3^e$	$\tau 4^f$	$\tau 5^g$	
TCC	I	0.00-0.74	~180	~0.00	~0.00	~90	~-100	17.0
	II	0.44-1.41	~180	~0.00	~0.00	~90	~90	20.0
CCC	I	2.55-2.88	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~100	9.00
	II	2.51-3.35	~0.00	~0.00	~0.00	~85	~95	4.00
	III	2.89	~0.00	~0.00	~0.00	~80	~60	1.00
	IV	3.33-4.38	~0.00	~0.00	~0.00	~105	~70	3.00
TCT	I	1.99-4.05	~180	~0.00	~180	~90	~90	11.0
	II	2.67-3.28	~180	~0.00	~180	~105	~90	18.0
TTC	I	2.42-4.29	~180	~180	~0.00	~85	~-100	11.0
	II	3.61	~180	~180	~0.00	~90	~90	1.00
CCT	I	3.91-4.67	~0.00	~0.00	~180	~85	~100	2.50
	II	3.76-3.77	~0.00	~0.00	~180	~105	~80	2.50

<sup>a</sup>I valori riportati si riferiscono ai conformeri a più alta e più bassa energia della sottofamiglia. <sup>b</sup> Enantiomeri conformazionali aventi, in valore assoluto, lo stesso valore degli angoli torsionali, con  $\tau 4$  e  $\tau 5$  di segno apposto. <sup>c</sup> $\tau 1$ : angolo torsionale calcolato considerando gli atomi del legame ammidico. <sup>d</sup> $\tau 2$ : atomi a, b, c, d. <sup>e</sup> $\tau 3$ : atomi e, f, g, h. <sup>f</sup> $\tau 4$ : c, d, i, and j atoms. <sup>g</sup> $\tau 5$ : atomi b, k, l, m.

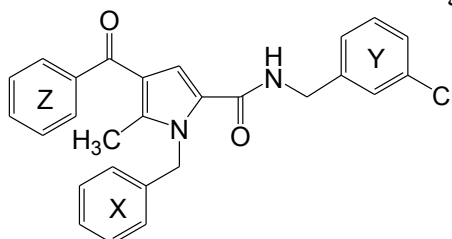
Dal momento che la presenza dei tre sostituenti aromatici sull'anello pirrolico è risultata necessaria per l'attività biologica (Tabella 3), questi sono stati considerati come gruppi farmacoforici e, per le tre molecole attive, sono state calcolate le relative distanze in tutti i conformeri a più bassa energia (Tabelle 11-13). Da questa analisi è emerso che ciascuna sottofamiglia conformazionale è caratterizzata da più di un set di distanze farmacoforiche, in accordo con i valori degli angoli torsionali  $\tau 4$  e  $\tau 5$ . (Tabelle 4-10; Figura 26).

**Tabella 11.** Distanze intramolecolari (Å), delle sottofamiglie conformazionali di **8g** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



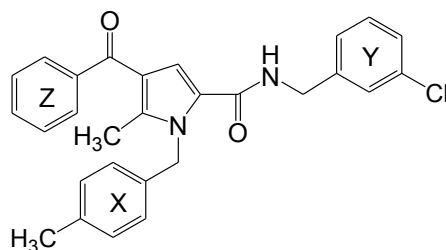
Famiglia	Sotto famiglia	Distanza (Å)		
		d1 (X-Y)	d2 (X-Z)	d3 (Y-Z)
TCC	I	6.0	8.9	9.4
	II	8.7	9.0	8.0
CCC	I	5.8	9.0	8.5
	II	8.5	8.8	4.5
	III	4.8	8.6	5.8
	IV	7.3	8.7	8.5
TCT	I	6.1	8.1	11.3
	II	8.8	7.0	11.1
TTC	I	4.8	9.2	10.6
	II	6.4	9.2	8.9
CCT	I	5.8	8.3	10.7
	II	7.3	7.0	9.1

**Tabella 12.** Distanze intramolecolari (Å), delle sottofamiglie conformazionali di **8h** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.

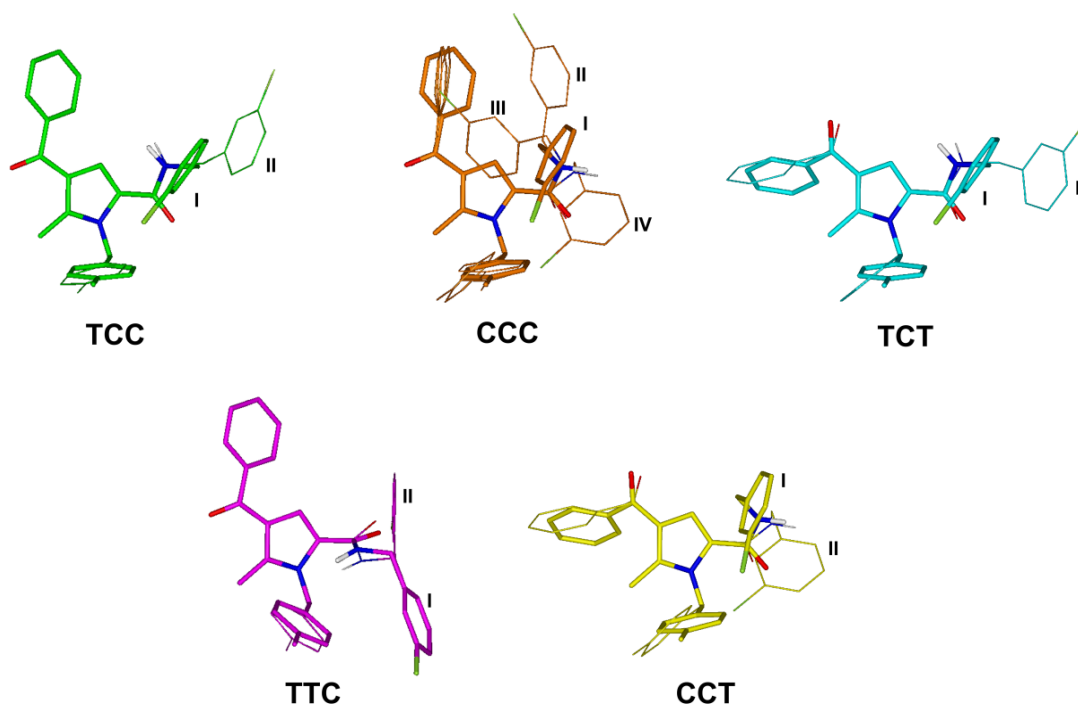


Famiglia	Sotto famiglia	Distanza (Å)		
		d1 (X-Y)	d2 (X-Z)	d3 (Y-Z)
TCC	I	6.1	9.0	9.2
	II	8.8	9.0	8.0
CCC	I	5.4	9.0	8.6
	II	8.4	8.9	4.6
	III	4.8	8.6	5.6
	IV	7.9	8.7	8.4
TCT	I	6.1	8.1	11.2
	II	8.8	7.0	11.1
TTC	I	4.6	9.2	10.6
	II	6.4	9.2	8.9
CCT	I	5.7	8.3	10.6
	II	7.9	6.9	9.4

**Tabella 13.** Distanze intramolecolari (Å) delle sottofamiglie conformazionali di **8i** considerando i conformeri PM6 entro le 5 kcal/mol dal minimo globale.



Famiglia	Sotto famiglia	Distanza (Å)		
		d1 (X-Y)	d2 (X-Z)	d3 (Y-Z)
TCC	I	5.7	9.0	9.1
	II	8.8	9.0	8.0
CCC	I	5.6	9.0	8.6
	II	8.4	8.9	4.6
	III	4.8	8.5	5.6
	IV	7.9	8.7	8.4
TCT	I	6.1	8.1	11.2
	II	8.8	7.0	11.1
TTC	I	4.6	9.2	10.7
	II	6.3	9.2	8.9
CCT	I	5.7	8.3	10.6
	II	7.9	6.9	9.4



**Figura 26.** Modelli molecolari delle famiglie conformazionali **8i** classificati come in Tabella 7. Il conformero a più bassa energia di ciascuna famiglia è visualizzato in *sticks* mentre i conformeri appartenenti alle altre famiglie conformazionali sono stati sovrapposti agli atomi dell'anello pirrolico e visualizzati come linee. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, S in giallo e Cl in verde chiaro. Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza con l'eccezione di quelli legati all'azoto ammidico.

---

Inoltre, i composti attivi hanno mostrato un simile comportamento conformazionale; quindi, dal momento che le distanze intramolecolari sono univocamente associate con una sottofamiglia conformazionale, essi hanno anche mostrato la stessa orientazione degli anelli aromatici X, Y e Z (Tabelle 11-13).

Di conseguenza, la differente “potenza” mostrata dai composti **8g-i** (in un range di attività nell’ordine **8i>8g>8h**, Tabella 3) è causata da specifiche interazioni molecolari con i bersagli molecolari determinate sia dal sostituente in para dell’anello X ( $R_2$ ; **8i** vs **8g** e **8h**, Tabella 2) che dal sostituente in meta dell’anello Y ( $R_3$ ; **8i** e **8h** vs **8g**, Tabella 2). A conferma di ciò, le SAR hanno indicato come requisiti fondamentali la sostituzione degli anelli aromatici X ed Y. Infatti, la presenza di un sostituente alogeno in meta all’anello Y ( $R_3$ ) è risultato cruciale per l’attività biologica (**8e** vs **8g** e **8h**, Tabella 2-3) e la sua sostituzione con un gruppo nitro ha portato ad un composto inattivo (**8l**). D’altra parte, la sostituzione in para all’anello X ha determinato sia un miglioramento che una perdita di attività biologica, dipendente dalla natura del sostituente su  $R_3$  (**8i**, **8j** e **8k** vs **8h**, Tabella 2-3). Per investigare ulteriormente le SAR, le caratteristiche conformazionali degli analoghi attivi **8g-i** sono state comparate con quelle degli analoghi inattivi **8e** (Tabella 4) e **8j-l** (Tabella 8-10). Per tutti i ligandi è emerso che le tre famiglie conformazionali più popolate sono risultate essere TCC, CCC e TCT con il seguente ordine: TCC>TCT>CCC. Differenze significative nel comportamento conformazionale dei composti attivi, rispetto a quelli inattivi, possono essere trovate solo nella percentuale dei conformeri TTC, sebbene non in tutti i casi. In particolare, l’analogo non sostituito **8e** ha mostrato una diminuzione dei conformeri TTC (1%) ed un aumento dei conformeri TCC (43%) rispetto ai composti attivi **8g-i**, mentre la sostituzione di un atomo di cloro su  $R_3$  (**8i**) con un gruppo nitro (**8l**) non ha alterato la preferenza conformazionale delle strutture risultanti (Tabella 7 vs Tabella 10). Di conseguenza, è probabile che l’inattività del composto **8l** sia causata da un’interazione sterica sfavorevole con il bersaglio proteico causata dalla grandezza del gruppo nitro rispetto all’atomo di cloro dell’**8i**. Anche il composto **8k**, che presenta un sostituente trifluoro metile in posizione  $R_2$  invece del gruppo metile nel composto **8i** (Tabella 2), ha mostrato un comportamento conformazionale comparabile all’**8i**, con un piccolo aumento della famiglia conformazionale TCC e una leggera diminuzione della famiglia CCC (Tabella 7 vs Tabella 9). Per cui, dal momento che il trifluorometile nell’**8k** ed il gruppo metile nell’**8i** hanno parametri sterici simili, allora la forte elettronegatività del sostituente trifluoro metile è responsabile della perdita di attività dell’**8k**. Di conseguenza, l’inattività del composto **8j** dipende dalla presenza di un gruppo elettron-attrattore sull’anello  $R_2$  (Tabella 2), tuttavia, nel caso specifico, si è osservato anche un aumento della famiglia conformazionale



TCT (35% Tabella 8) e l'assenza di conformeri in TTC. Infine, gli analoghi inattivi **8m** e **8n**, caratterizzati dalla presenza di sostituenti ingombranti in posizione orto sull'anello Y (Tabella 2), hanno mostrato differenti caratteristiche elettroniche, steriche e conformazionali rispetto ai composti attivi **8g-i**.

### 2.3.2 Comparazione strutturale con i motivi LxxLL-like

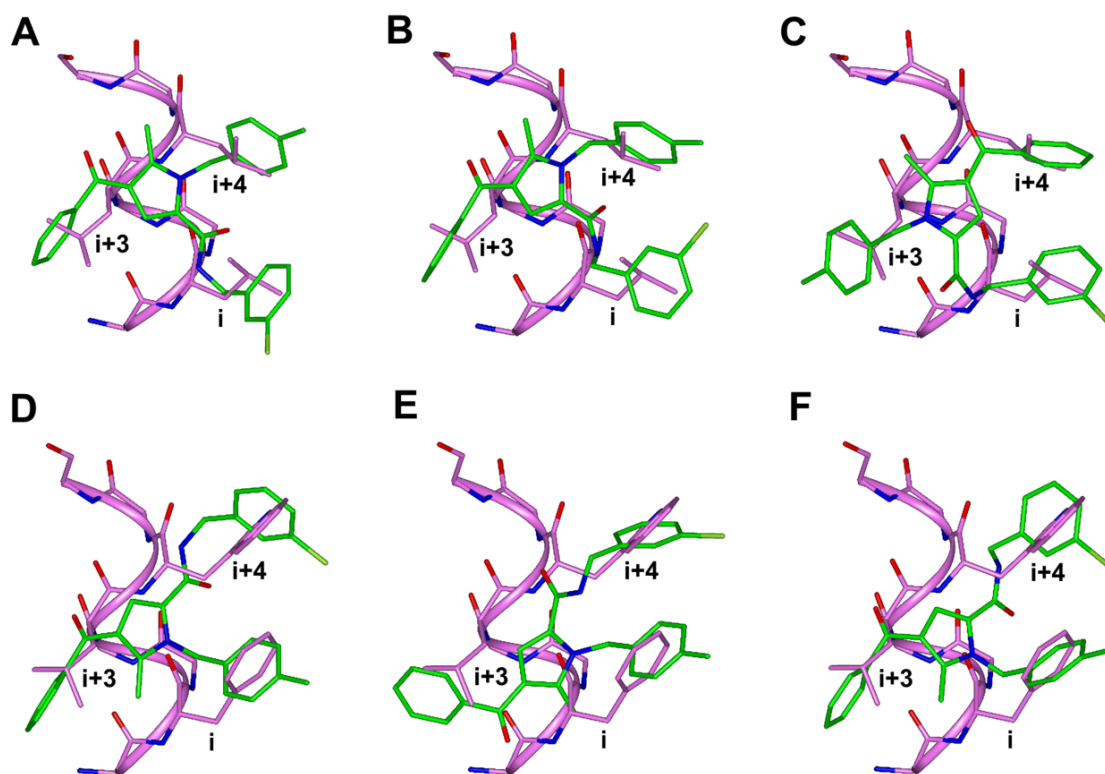
Al fine di valutare l'abilità peptidomimetica dei nostri analoghi attivi **8g-i**, è stata effettuata un'analisi strutturale e di bioinformatica (vedi parte sperimentale, paragrafo 3.5b) delle strutture a raggi X di motivi LxxLL-like coinvolti nelle interazioni proteina-proteina e presenti: i) nella proteina p53 in complesso con HDM2 (PDB ID: 1YCR) e ii) nel coattivatore 5 del recettore nucleare (NCOA5) in complesso con il recettore beta degli estrogeni (PDB ID: 2J7X). Sono stati così identificati i residui responsabili delle interazioni proteina-proteina nei motivi menzionati e, in seguito, sono state calcolate le distanze tra i centroidi delle catene laterali degli amminoacidi interagenti (Tabella 14).

**Tabella 14.** distanze tra i centroidi delle catene laterali degli amminoacidi interagenti presenti nei motivi LxxLL-like.

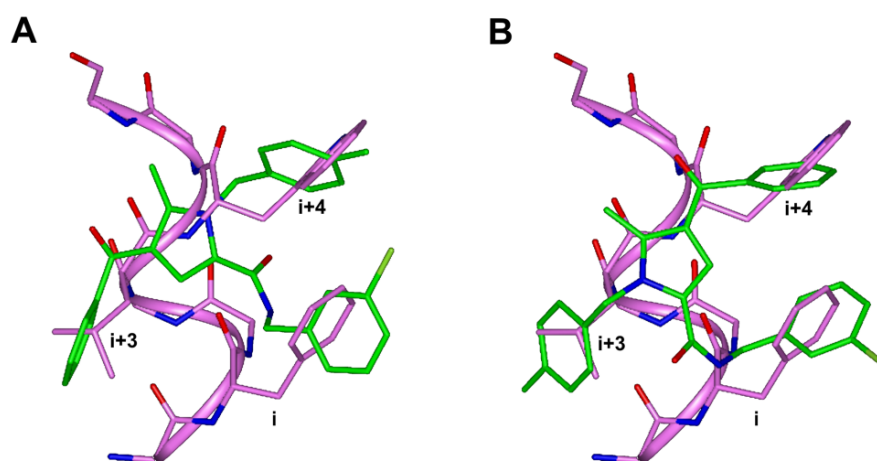
Motivi	PDB ID	Distanze (Å)					
		<i>i,i+3</i>	<i>i,i+4</i>	<i>i,i+7</i>	<i>i+3,i+4</i>	<i>i+3,i+7</i>	<i>i+4,i+7</i>
<sup>345</sup> LxxLL <sup>349</sup> <sup>a</sup>	2J7X	7.9	5.0	-	8.6		
<sup>19</sup> FxxLWxxL <sup>26</sup> <sup>b</sup>	1YCR	7.8	5.3	8.2	10.2	9.7	4.3

<sup>a</sup> coattivatore 5 del recettore nucleare. <sup>b</sup> p53.

Le distanze intramolecolari riportate in Tabella 14 sono state incrociate con quelle di ciascuna sottofamiglia conformazionale delle molecole attive **8g-i** (Tabelle 11-13) e, sulla base di specifici criteri di similarità, sono stati sovrapposti i centroidi degli anelli aromatici X, Y e Z dei conformeri PM6 a più bassa energia sui centroidi delle catene laterali dei residui corrispondenti nei motivi <sup>345</sup>LxxLL<sup>349</sup> e/o <sup>19</sup>FxxLWxxL<sup>26</sup> presenti in NCOA5 e p53. Questa analisi ha evidenziato che alcune sottofamiglie conformazionali dei derivati **8g-i** sono in grado di riprodurre l'orientazione dei residui *i*, *i+3*, *i+4* dei motivi LxxLL-like come quelli presenti in p53 (es. CCC I-II, TCT I, TTC I, CCT I) e in NCOA5 (TCC I, CCC I-II) (Figura 27 e 28).

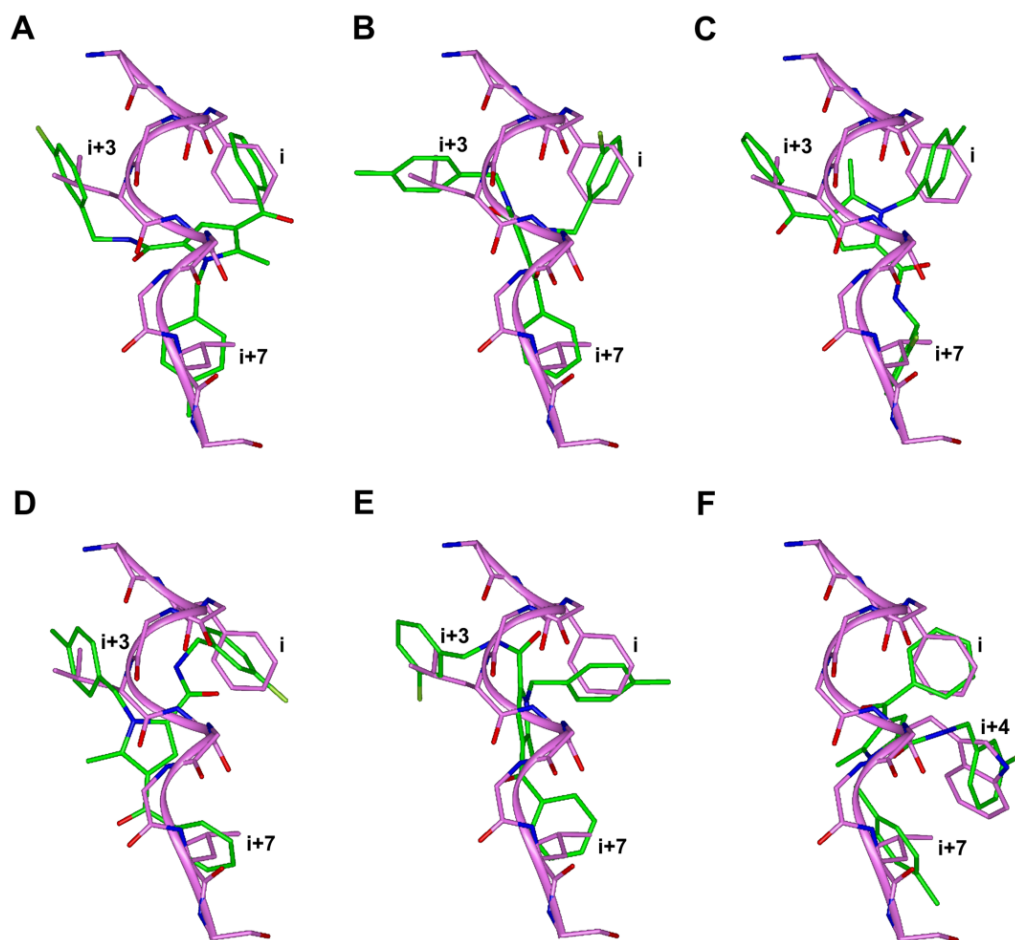


**Figura 27.** Sovrapposizione dei conformeri a più bassa energia del composto **8i** (carboni in verde) di TCC I (A), CCC I (B), CCC II (C), TCT I (D), TTC I (E), and CCT I (F) sui residui *i*, *i*+3, *i*+4 sia del motivo  $^{345}\text{LxxLL}^{349}$  (A, B, C) presente nella struttura 2J7X (carboni in rosa) che del motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  (D, E, F) nella struttura 1YCR (carboni in rosa); è indicata la posizione degli aa. Lo scheletro peptidico del motivo e gli aa d'interazione sono visualizzati in sticks. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, e Cl in verde chiaro. Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza.



**Figura 28.** Sovrapposizione dei conformeri a più bassa energia del composto **8i** (carboni in verde) di A) CCC I and B) CCC II sul motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  presente nella struttura 1YCR (carboni in rosa); è indicata la posizione degli aa. Lo scheletro peptidico del motivo e gli aa d'interazione sono visualizzati in sticks. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, e Cl in verde chiaro. Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza.

Dall'altro lato, le sottofamiglie conformazionali TCC II, CCC IV, TCT II, TTC II e CCT II sono risultate essere abili a riprodurre i residui  $i$ ,  $i+3$ ,  $i+7$  del motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  presente in p53 (Figura 29 A-E).



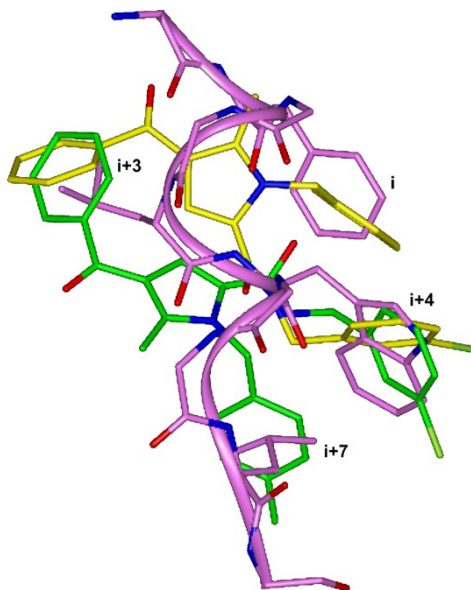
**Figura 29.** Sovrapposizione dei conformeri a più bassa energia del composto **8i** (carboni in verde) di TCC II (A), CCC IV (B), TCT II (C), TTC II (D), and CCT II (E) sui residui  $i$ ,  $i+3$ ,  $i+7$  del motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  presente nella struttura 1YCR (carboni in rosa); è indicata la posizione degli aa. Lo scheletro peptidico del motivo e gli aa d'interazione sono visualizzati in *sticks*. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, e Cl in verde chiaro. Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza.

Inoltre, per mezzo della rotazione degli anelli X ed Y, i.e. attraverso la variazione di  $\tau_4$  e  $\tau_5$  (Tabelle 5-7), i composti **8g-i** sono anche in grado di mimare sia i residui  $i$ ,  $i+3$ ,  $i+4$  che i residui  $i$ ,  $i+3$ ,  $i+7$  dei motivi *LxxLL-like*.

Tuttavia, solo i conformeri della sottofamiglia conformazionale CCC III sono in grado di riprodurre l'orientazione delle catene laterali idrofobiche dei residui  $i$ ,  $i+4$ ,  $i+7$  presenti nel motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  in p53 (Figura 29 F), che rappresentano i residui di interazione chiave nel suo legame con la proteina MDM2.

---

È interessante sottolineare che, oltre alla sovrapposizione dei gruppi idrofobici, i nostri analoghi attivi sono in grado di riprodurre anche la forma e la posizione degli eteroatomi (inclusa la direzione di alcune funzioni carboniliche) dei residui di interazione dei motivi. Dall'analisi è risultato anche che, a causa della pseudosimmetria del motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$ , alcuni enantiomeri conformazionali dei derivati **8g-i** sono in grado di riprodurre il motivo funzionale sopra citato attraverso una sovrapposizione speculare dei residui di interazione (Figura 30).



**Figura 30.** Enantiomeri conformazionali del composto **8i** (sottofamiglia conformazionale TTC I, carboni in giallo e verde) sovrapposti al motivo  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  presente nella struttura 1YCR (carboni in rosa). E' indicata la posizione degli aa. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu e Cl in verde chiaro. Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza.

Questa analisi ha evidenziato la capacità di tali composti di mimare, attraverso la peculiare orientazione tridimensionale dei sostituenti idrofobici sull'anello pirrolico, motivi/domini funzionali proteici presenti, per esempio, nei regolatori trascrizionali come p53.

### 2.3.3 Generazione di un farmacoforo tridimensionale e ricerca in banche dati molecolari

Per investigare ulteriormente il meccanismo molecolare d'azione dei nuovi derivati ed individuare altri composti che presentino caratteristiche strutturali comuni ai nostri, sono stati costruiti dei modelli farmacoforici con il software *Catalyst* per ogni sottofamiglia conformazionale dei composti attivi **8g-i** (Tabella 15) ed è stata effettuata una ricerca 3D in diverse banche dati molecolari (vedi parte sperimentale, paragrafo 2.5c). Oltre alle tre porzioni aromatiche, è stato inserito come ulteriore punto farmacoforico l'atomo di alogeno sull'anello Y, in quanto, dalle SARs è emerso che la sua presenza è risultata essere fondamentale per l'attività biologica dei nostri composti.

**Tabella 15.** Distanze relative alle sottofamiglie conformazionali dei composti **8g-i** utilizzate per la generazione dei modelli farmacoforici.

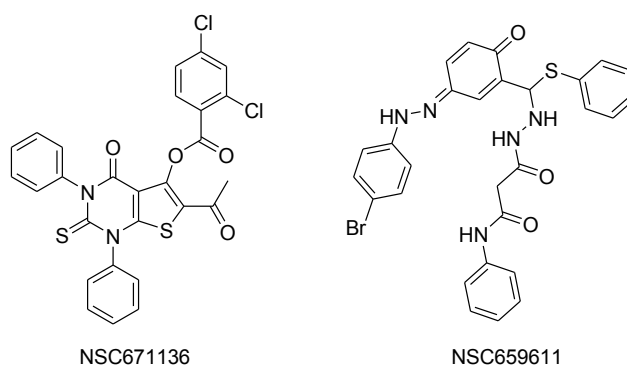
Famiglia	Sottofamiglia	Distanze farmacoforiche (Å) <sup>a</sup>		
		d1 (X-Y)	d2 (X-Z)	d3 (Y-Z)
TCC	I	5.96	8.97	9.23
	II	8.77	8.97	7.98
CCC	I	5.58	8.99	8.56
	II	8.44	8.84	4.56
	III	4.78	8.57	5.66
	IV	7.69	8.69	8.44
TCT	I	6.12	8.14	11.25
	II	8.81	7.00	11.15
TTC	I	4.71	9.16	10.63
	II	6.38	9.21	8.87
CCT	I	5.74	8.32	10.65
	II	7.71	6.91	9.31

La ricerca 3D nelle diverse banche dati molecolari ha prodotto 1529 risultati (*hits*) i quali, una volta analizzati, sono stati filtrati sulla base della compatibilità tra il loro profilo di attività biologico e quello dei nostri analoghi attivi (Enhanced NCI Database Browser 2.1,<sup>57</sup>

---

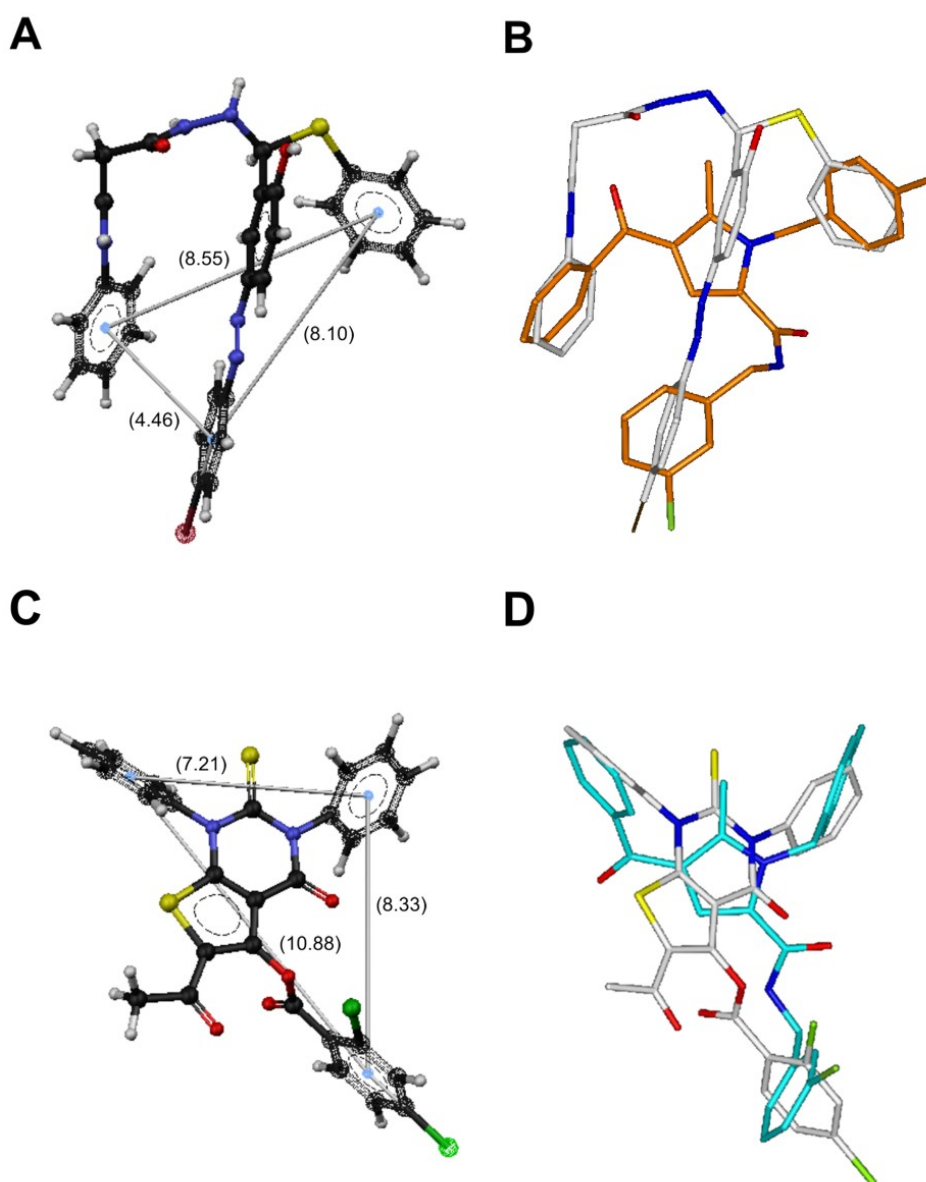
(PubChem BioAssay database;<sup>58</sup> [www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pcassay)). In una prima fase, sono stati analizzati e presi in considerazione solo i composti che hanno mostrato un'attività biologica sulle linee cellulari tumorali M14, riducendo il numero di *hits* a 189. Tra questi, solo 19 sono risultati essere attivi in un range micromolare (<10  $\mu\text{M}$ ) comparabile al nostro. Infine, tra quest'ultimi, solo due, l' NSC671136 (CID: 383092) e l' NSC659611 (CID: 6712209) hanno mostrato lo stesso profilo farmacologico dei nostri derivati, ossia sono risultati essere attivi sulle linee cellulari M14 e non sulle linee cellulari MCF7 (chart 1).

**Chart 1.** *Hits* selezionati dalla ricerca 3D in banche dati molecolari.

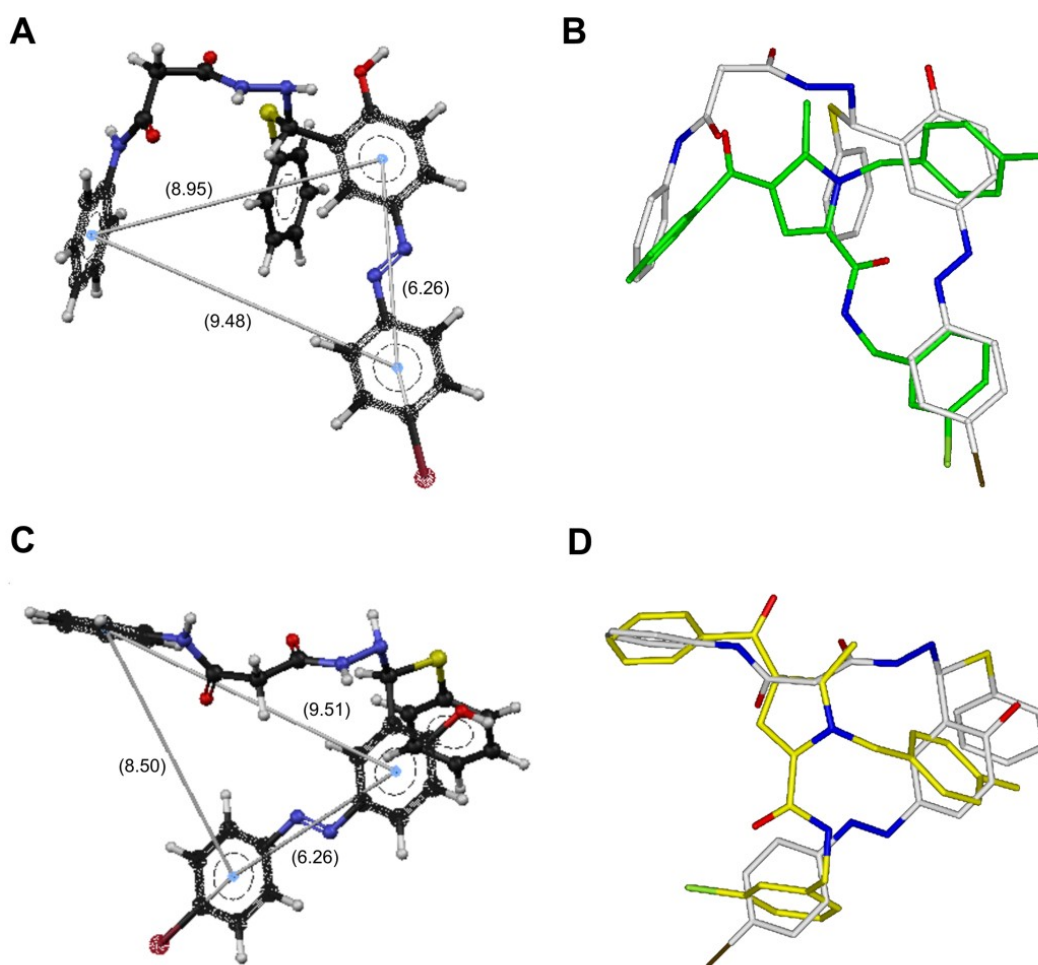


Mentre per il composto NSC659611 sono riportati solo saggi di inibizione della proliferazione cellulare (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?cid=6712209>), per l'NSC671136 sono menzionati anche numerosi bersagli molecolari dal momento che è stata esplorata a livello molecolare la sua attività biologica utilizzando diversi saggi cellulari ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?cid=383092](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/assay/assay.cgi?cid=383092)). È importante sottolineare che tutti i possibili bersagli proteici riportati per l'NSC671136 sono coinvolti nelle interazioni proteina-proteina che regolano la trascrizione del DNA. Oltretutto è stata dimostrata l'abilità dell' NSC671136 ad inibire la formazione dell'eterodimero MDM2-MDM4. L'ubiquitinazione e la degradazione del complesso MDM2-MDM4 ligasi è più efficiente se si considera come bersaglio molecolare la p53 e l'inibizione dell'interazione MDM4-p53 ripristina la funzione di p53 nelle cellule di melanoma.<sup>59</sup> Quest'affascinante ipotesi sul meccanismo di azione dei nostri derivati necessita di un'approfondita investigazione per essere confermata.

Infine, è interessante notare come i punti farmacofori dei due *hits* individuati si sovrappongono ai modelli farmacoforici dei conformeri CCC II, TCC I e TTC II dei derivati **8g-i** (Figura 31-32).



**Figura 31.** A) conformero NSC659611 a più bassa energia ottenuto dalla ricerca farmacoforica in banche dati molecolari; sono indicate le distanze corrispondenti. B) sovrapposizione del conformero **8i** a più bassa energia (carboni in arancione) appartenente alla sottofamiglia CCC II su NSC659611 (carboni in bianco). C) conformero NSC671136 a più bassa energia ottenuto dalla ricerca farmacoforica in banche dati molecolari; sono indicate le distanze corrispondenti. D) sovrapposizione del conformero **8i** a più bassa energia (carboni in ciano) appartenente alla sottofamiglia TCT II su NSC671136 (carboni in bianco). Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, S in giallo, Cl in verde chiaro.



**Figura 32.** (A, C) conformero NSC659611 a più bassa energia ottenuto dalla ricerca farmacoforica in banche dati molecolari; sono indicate le distanze corrispondenti. Sovrapposizione dei conformeri **8i** a più bassa energia (carboni in arancione) appartenenti alla sottofamiglia (B) TCC I (carboni in verde) e (D) TTC II (carboni in giallo) su NSC659611 (carboni in bianco). Gli idrogeni sono omessi per maggiore chiarezza. Gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico: O in rosso, N in blu, S in giallo, Cl in verde chiaro.



---

## 2.4 CONCLUSIONI

Lo studio effettuato nel presente lavoro di dottorato ha permesso di definire le basi molecolari dell'attività biologica di un nuovo set di composti predetti avere attività antitumorale sulla base della loro capacità di mimare motivi/domini funzionali presenti nei fattori di trascrizione. In accordo con i risultati ottenuti dai saggi biologici, i nostri derivati **8g-i** interferiscono con la replicazione del DNA e sono selettivamente attivi verso le linee cellulari di Melanoma M14. Tale tossicità selettiva sembra essere collegata ad una particolare mutazione della p53, presente in questa linea cellulare, che la rende resistente ad alcuni agenti chemioterapici. D'altro canto, i risultati ottenuti dalle SAR e gli studi di modellistica molecolare supportano fortemente l'ipotesi che i nostri derivati siano abili a mimare i motivi di riconoscimento proteici *LxxLL-like* presenti nei fattori trascrizionali (i.e. p53 e NCOA5) e coinvolti nelle interazioni proteina-proteina e che ciò sia responsabile della loro attività antitumorale. La nostra ipotesi è stata ulteriormente validata dalla ricerca farmacoforica in banche dati molecolari dalla quale è emerso che i derivati attivi **8g-i** mostrano caratteristiche farmacoforiche ed un profilo farmacologico sovrapponibile a quello di un composto antitumorale riportato inibire la formazione del complesso MDM2-MDM4, supportando l'abilità peptidomimetica da noi ipotizzata.

Dal momento che le proteine seguono un preciso codice strutturale, la comprensione delle basi strutturali di questo linguaggio rappresenta la chiave per lo sviluppo di potenziali farmaci più selettivi ed efficaci. Sebbene siano necessarie ulteriori evidenze, la citotossicità selettiva dei derivati **8g-i** verso la linea cellulare M14 suggerisce un meccanismo di azione basato sull'interazione con proteine che sono coinvolte in uno specifico *pathway* del segnale cellulare, e ciò rappresenta un potenziale beneficio nella ricerca di nuovi composti guida per la terapia dei tumori. Pertanto, i nostri derivati **8g-i** possono essere usati come composti guida per lo sviluppo di analoghi ottimizzati.

Sulla base delle informazioni ottenute e grazie alla facilità, dal punto di vista sintetico, di esplorare la diversità chimica intorno al core pirrolico dei nostri composti guida, sarà possibile la futura ottimizzazione dell'affinità e specificità di legame e/o delle proprietà farmacocinetiche, così come l'introduzione di gruppi più solubili che bilanceranno quelli lipofili dei sostituenti idrofobici chiave, al fine di indirizzare e potenziare l'attività biologica. Inoltre, ciò consentirà l'indagine del meccanismo d'azione a livello molecolare anche attraverso tecniche NMR, cosa attualmente non possibile a causa della scarsissima solubilità in acqua dei composti risultati attivi.

---

Questi studi sono stati oggetto di una pubblicazione su rivista internazionale e di una comunicazione poster di seguito riportate:

1) Persico M, Ramunno A, Maglio V, Franceschelli S, Esposito C, Carotenuto A, Brancaccio D, De Pasquale V, Pavone LM, Varra M, Orteca N, Novellino E, Fattorusso C. ***New anticancer agents mimicking protein recognition motifs. J. Med. Chem. 2013, 56, 6666-80;***

2) Persico M, Ramunno A, Maglio V, Franceschelli S, Carotenuto A, Brancaccio D, Orteca N, Pavone LM, Novellino E, Fattorusso C. ***Pyrrole-based mimics of LxxLL-like binding motif with antiproliferative activity. Chemical Biology: Methods, Progress, Perspectives. February 11-12, 2013, Vienna, Austria.***

---

## 2.5 PARTE SPERIMENTALE

### 2.5a Analisi conformazionale dei ligandi

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti sui calcolatori SGI Origin 200 8XR12000 e E4 Server Twin 2 x Dual Xeon 5520, dotati di due nodi. Ciascun nodo è composto da 2 x Intel Xeon QuadCore E5520, 2.26 GHz, 36 GB RAM. I grafici di modellistica molecolare sono stati eseguiti su due postazioni SGI Octane 2.

I valori apparenti di pKa e di solubilità dei nuovi derivati pirrolici progettati **8a-n** sono stati calcolati utilizzando i software ACD/pKa DB e ACD/Solubility DB versione 12.00 (ACD/Labs, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Tutti i composti sono stati considerati neutri nei calcoli eseguiti, come conseguenza della stima delle percentuali delle forme neutre/protonate considerando il valore di pH citoplasmatico (7.4) usando l'equazione di Henderson-Hasselbach.

I nuovi derivati pirrolici progettati sono stati costruiti tenendo conto della forma ionica prevalente al valore di pH considerato utilizzando il modulo Builder di Insight 2005 (Accelrys Software Inc., San Diego). I potenziali atomici e le cariche parziali sono state assegnate utilizzando il campo di forza CFF91.<sup>60</sup> Lo spazio conformazionale dei composti è stato campionato attraverso 200 cicli di *simulated annealing* ( $\epsilon=1$ ) seguendo il protocollo di seguito riportato. Una temperatura iniziale di 1000 K è stata applicata al sistema per 2000 fs (time step= 3.0 fs) al fine di superare tutte le barriere torsionali; successivamente la temperatura è stata ridotta a 300 K in 1000 fs (time step= 1.0 fs) con un decremento di 0.5 K/fs. Le conformazioni risultanti sono state sottoposte a minimizzazione energetica con calcoli di Meccanica Molecolare (MM) utilizzando il modulo Discover\_3 di Insight 2005 ( $\epsilon=1$ ). La minimizzazione energetica è stata eseguita usando come algoritmo di minimizzazione *Conjugate Gradient*,<sup>61</sup> il criterio di convergenza è stato stabilito in modo che il massimo valore di RMS sulla derivata prima sia inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati secondo i valori di energia conformazionale, angoli torsionali e distanze interatomiche facendo uso di una macro in linguaggio bcl ideata dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio lavoro di dottorato.

Al fine di analizzare in maniera dettagliata le proprietà elettroniche, tutti i conformeri, ottenuti dai calcoli di meccanica e dinamica molecolare, sono stati sottoposti ad una piena ottimizzazione geometrica (*full geometry optimization*) attraverso calcoli semiempirici, usando il metodo quanto-meccanico PM6<sup>62</sup> di Mopac 2009.<sup>63</sup> Al fine di raggiungere un

---

gradiente geometrico (GNorm) fissato al valore di 0.01 è stato utilizzato l'algoritmo di minimizzazione EF<sup>64</sup> (*Eigenvector Following routine*). Per ottenere una completa ottimizzazione della geometria di partenza abbiamo aumentato i criteri per la terminazione di tutte le ottimizzazioni di un fattore di 100, usando la keyword PRECISE.

I conformeri ottenuti all'interno delle 5 kcal/mol dal minimo globale ( $\Delta E_{GM} \leq 5 \text{ kcal/mol}$ ) sono stati analizzati e raggruppati in famiglie conformazionali sulla base della conformazione *syn-periplanare* (C) e *anti-periplanare* (T) del: a) legame ammidico ( $\tau_1$ ), b) dell'ossigeno del legame ammidico rispetto all'azoto dell'anello pirrolico ( $\tau_2$ ) e c) dell'ossigeno del carbonile a cui è legato R<sub>1</sub> rispetto al metile sull'anello pirrolico ( $\tau_3$ ). Sono stati costruiti i centroidi degli anelli aromatici X, Y e Z (Comando: Pseudo\_Atom Define; Modulo: Biopolymer; Insight2005) e sono state calcolate le relative distanze. Le famiglie conformazionali sono state classificate in sottofamiglie sulla base del set di distanze farmacoforiche ottenuto, in accordo ai valori degli angoli torsionali  $\tau_4$  e  $\tau_5$ , relativi alla rotazione degli anelli X ed Y. Per ciascuna sottofamiglia conformazionale sono stati calcolati i valori dei range di  $\Delta E$  dal minimo globale e la percentuale con la quale essa è presente nello spazio conformazionale.

### **2.5b Analisi bioinformatica e strutturale**

È stata eseguita un'analisi strutturale sulle strutture a raggi X contenenti i motivi *LxxLL-like*. In particolare, le strutture determinate sperimentalmente: i) della proteina HDM2 in complesso con p53 (PDB ID: 1YCR) e ii) del recettore beta degli estrogeni in complesso con il coattivatore 5 del recettore nucleare (NCOA5; PDB ID: 2J7X) sono state scaricate dalla Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti ad esse considerando un valore di pH di 7.2 (Modulo Biopolymer, Insight 2005). Tutte le strutture cristallografiche sono state analizzate utilizzando i moduli Biopolymer e Homology di Insight2005 (Accelrys, San Diego). Sono stati costruiti i centroidi dei residui d'interazione dei motivi *LxxLL-like* (*i, i+3, i+4*) ed *LxxLLxxL* (*i, i+3, i+4, i+7*) considerati (Comando: Pseudo\_Atom Define; Modulo: Biopolymer; Insight2005) e sono state calcolate le relative distanze. I valori ottenuti sono stati incrociati con i valori medi delle distanze farmacoforiche dei composti **8g-i**. In particolare, sono state selezionate le sottofamiglie conformazionali di **8g-i** che hanno mostrato avere un set di distanze farmacoforiche con almeno: i) due valori più piccoli di 1 Å e ii) un valore più piccolo di 1,5 Å

---

rispetto ai valori delle distanze inter-atomiche dei motivi LxxLL-like (i, i+3, i+4) e/o LxxLLxxL-like (i, i+3, i+4, i+7). Sono stati sovrapposti i centroidi degli anelli aromatici (X, Y e Z) dei conformeri del PM6 a più bassa energia ( $\Delta E_{GM} \leq 5 \text{ kcal/mol}$ ) di **8g-i** ai centroidi delle catene laterali dei residui corrispondenti nei motivi  $^{345}\text{LxxLL}^{349}$  e  $^{19}\text{FxxLWxxL}^{26}$  rispettivamente di NCOA5 e p53.

### ***2.5c Generazione di modelli farmacoforici e ricerca in banche dati molecolari***

Dai risultati ottenuti dall'analisi delle proprietà conformazionali ed elettroniche delle molecole progettate, sono stati costruiti dei modelli farmacoforici ed è stata effettuata una ricerca in banche dati molecolari utilizzando il software CATALYST 4.6 (Accelrys, San Diego, CA).

I farmacofori sono stati generati prendendo in considerazione tutti i conformeri delle molecole attive **8g-i** ottenute dai calcoli quanto-meccanici appartenenti alle cinque famiglie conformazionali ottenute entro le 5 kcal/mol dal minimo globale. Come punti farmacoforici sono stati considerati i tre anelli aromatici fenilici X, Y, Z presenti sull'anello pirrolico e l'atomo di alogeno presente sull'anello Y e sono stati costruiti con il comando *Feature Dictionary*. È stato generato un modello farmacoforico per ogni sottofamiglia conformazionale. Di conseguenza, sono stati calcolati i valori medi delle distanze farmacoforiche tra i tre anelli fenilici X, Y e Z in ciascuna sottofamiglia conformazionale dei derivati **8g-i** e tali valori sono stati assegnati con il comando *Set constraint tolerance* applicando ad esse una tolleranza di  $\pm 0.5 \text{ \AA}$  (*View Hypothesis Workbench, Catalyst*). Inoltre, con lo scopo di assegnare un range di distanza tra l'atomo di alogeno ed il centroide dell'anello fenilico Y, sono stati calcolati i valori di distanza minima e massima tra un qualsiasi atomo di alogeno legato ad un anello fenilico (i.e.: F, Cl, Br, e I) ed il centroide di quest'ultimo, utilizzando il metodo quanto-meccanico PM6. Sono stati utilizzati tutti i parametri di default eccetto per gli *Hydrogen Count* con il comando *Set Atom Specification* in cui per specificare che i carboni degli anelli fenilici potessero legare tutti gli atomi, si è utilizzato il simbolo asterisco (\*). I modelli farmacoforici generati con Catalyst sono stati utilizzati come *query* per la ricerca in banche dati molecolari e gli *hits* identificati sono stati analizzati e classificati per la loro attività biologica (MiniBioByte, Maybrdige99, Maybridge01, Sample, NCI2000, Enhanced NCI Database Browser 2.1,<sup>57</sup> Pubchem<sup>58</sup>). Al fine

---

di ottenere risultati più accurati e aumentare il numero di *hits*, è stato utilizzato il metodo *BEST Flexible Search Database/Spreadsheets* che permette di modificare le conformazioni delle molecole durante la ricerca. Sono stati selezionati gli *hits* che presentavano lo stesso profilo farmacologico dei nostri derivati **8g-i** e sono stati salvati utilizzando il comando Tool/Compare/Fit presente nella *View Compound Workbench* (Fast Fit methods; Find Best Conf e Max. ometted features:-1). Infine, sono stati sovrapposti i conformeri PM6 a più bassa energia delle molecole attive **8g-i** sugli *hits* selezionati attraverso una sovrapposizione dei gruppi farmacoforici corrispondenti (i.e. i centroidi dei tre anelli fenilici e l'atomo di alogeno; Trasform/Superimpose, Viewer, Insight 2005).

---

***3. Identificazione del primo inibitore  
dell'interazione GBP1/PIM1: implicazioni  
per lo sviluppo di una nuova classe di agenti  
antitumorali attivi in cellule tumorali  
resistenti al paclitaxel***

---

## 3.1 INTRODUZIONE

### ***3.1a Meccanismi alla base della farmaco-resistenza al paclitaxel nella cellule tumorali***

La resistenza ai farmaci antitumorali è un problema clinico molto rilevante nel trattamento dei tumori solidi in quanto rappresenta una delle cause principali del fallimento delle terapie antitumorali; in molti casi, dopo una risposta iniziale al trattamento, le cellule tumorali sviluppano un fenotipo resistente che è il principale responsabile della progressione della malattia. Negli ultimi due decenni, vi è stato un notevole interesse nello sviluppo di terapie capaci di inibire specifici *network* di interazioni proteina-proteina responsabili delle alterazioni dei segnali di morte/sopravvivenza caratteristici delle cellule tumorali. Sebbene lo sviluppo di piccole molecole, in grado di interporci all'interfaccia proteina-proteina, sia stato impegnativo, sono noti in letteratura molti esempi di ligandi naturali e loro derivati in grado di alterare tali interazioni con una efficacia ragionevole. Uno dei primi esempi di farmaci antitumorali sono state le podofillotossine (originariamente ottenute da *Podophyllum peltatum* L. e specie correlate)<sup>65,66</sup> ed i loro derivati semi-sintetici come l'etoposide, l'etoposide fosfato e il teniposide, che sono attualmente utilizzati in terapia per il trattamento di una varietà di tumori, seppur presentano effetti collaterali associati all'uso di questi agenti in clinica (come mielosoppressione, neutropenia e nausea).<sup>67</sup> Un altro esempio sono gli agenti che agiscono sui microtubuli (MTAs) come gli alcaloidi della vinca (vinblastina e vincristina), che sono stati introdotti per il trattamento di neoplasie ematopoietiche, ed i tassani (es. paclitaxel) che sono senza dubbio gli agenti clinicamente più efficaci e di successo dell'ultimo decennio. I tassani interferiscono con la dinamicità dei microtubuli accelerando la polimerizzazione dei monomeri di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina e stabilizzando i microtubuli, mentre gli alcaloidi della vinca, la colchicina e la combretastatina agiscono in maniera opposta, ossia inibiscono la polimerizzazione della tubulina.

Tra gli MTAs, il paclitaxel è uno dei chemioterapici più comunemente utilizzato nella clinica dei tumori solidi soprattutto per il cancro alle ovaie,<sup>68</sup> al seno, al polmone, alla prostata<sup>69</sup> e al pancreas.<sup>70</sup>

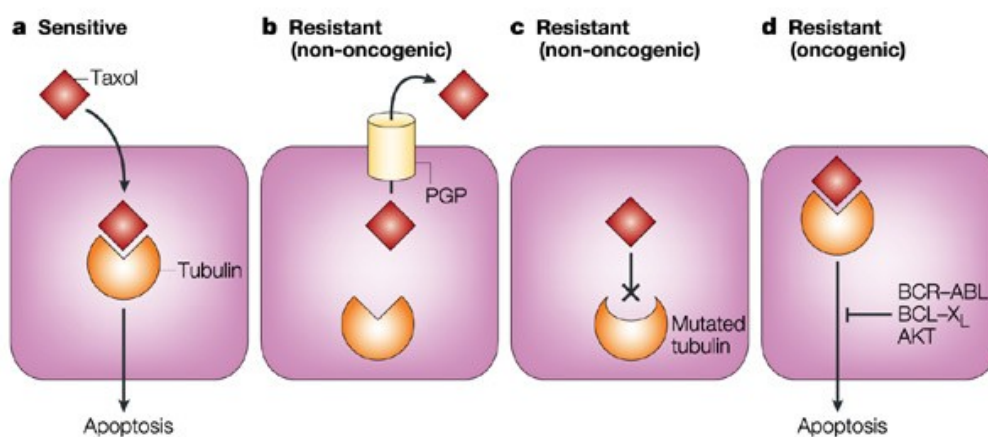
Anche se la terapia con il paclitaxel ha ottenuto numerosi successi portando ad un concreto miglioramento della gestione clinica dei tumori solidi, questo farmaco, purtroppo, non ha risolto uno dei problemi più importanti in clinica rappresentato dal fenomeno della farmaco-



---

resistenza. Sono stati riportati in letteratura<sup>71</sup> diversi meccanismi di resistenza al paclitaxel (Figura 33), tra questi possiamo annoverare:

- incremento del trasporto extracellulare del farmaco causato dall'overespressione della pompa di efflusso P-gP, e ciò si verifica in quanto il paclitaxel risulta essere uno dei substrati della P-gP;
- mutazione puntiforme della  $\beta$ -tubulina all'interno o in prossimità del sito di legame al paclitaxel;
- espressione di isotipi di  $\beta$ -tubulina che risultano essere meno sensibili all'inibizione del paclitaxel;
- attivazione di fattori antiapoptotici (esempio AKT, BCL-XL etc.).



**Figura 33.** Rappresentazione di alcuni meccanismi di resistenza al paclitaxel: (a) Paclitaxel si lega ai microtubuli e le cellule si arrestano in mitosi, provocando apoptosi. (b) Espressione di PGP, che pompa al di fuori il paclitaxel, impedendo l'interazione del farmaco con il suo substrato (resistenza non-oncogena). (c) Mutazioni al livello della  $\beta$ -tubulina che evitano l'interazione con il farmaco (resistenza non-oncogena). (d) Soppressione di apoptosi mediante l'attivazione di oncogeni (per esempio, dalla formazione della proteina di fusione BCR-ABL, oppure over-espressione di AKT o BCL-XL). Anche se il paclitaxel si lega ai microtubuli e provoca l'arresto mitotico, l'apoptosi non si verifica (resistenza oncogena).

A tal proposito, Kavallaris et al.<sup>72</sup> hanno messo in evidenza alcuni punti molto importanti riguardanti la farmaco-resistenza indotta dal paclitaxel, osservando che le cellule di carcinoma ovarico e degli altri tumori solidi resistenti a tale farmaco presentano un'aumentata espressione, a livello proteico, dell'isoforma  $\beta$ III della tubulina ( $\beta$ III-tubulina),<sup>73</sup> un promettente biomarker predittivo di farmaco resistenza.<sup>74</sup> In particolare è stato osservato che l'overespressione della  $\beta$ III-tubulina può avere effetti sulla stabilità dei microtubuli, compromettendo gli effetti stabilizzanti del paclitaxel e prevenendo così i suoi effetti antitumorali.<sup>75</sup>

---

A conferma di ciò, Ferlini et al.<sup>76,77</sup> in un recente lavoro, hanno messo in evidenza come tale isoforma della tubulina, attraverso l'interazione con specifiche proteine, conferisca alle cellule tumorali una notevole resistenza al paclitaxel soprattutto in condizioni di stress microambientali dovute a carenza di ossigeno (ipossia). In particolare, la funzione della  $\beta$ III-tubulina è risultata essere regolata dall'interazione con due GTPasi: la proteina che lega il guanilato (GBP1), attivante la sua funzione, e la proteina che lega il nucleotide guaninico (GNAI) che invece la inibisce.

A partire da questi risultati, sono stati svolti numerosi studi per cercare di individuare le proteine in grado di modulare l'attività di queste GTPasi e, di conseguenza, della  $\beta$ III-tubulina. Un notevole interesse è stato rivolto alla serin/treonin chinasi PIM1, un partner di GBP1 che viene stimolata in condizioni di ipossia ed è sovra-espressa nei tumori più aggressivi presenti in vari tessuti<sup>78</sup> mostrando, in tal modo, un'attività associata a quella della  $\beta$ III-tubulina. In accordo con ciò, è stato dimostrato che la funzionalità di GBP1 e GNAI1 (rispettivamente in maniera positiva e negativa) è direttamente associata a quella di PIM1.<sup>79</sup> In particolare, in condizioni di stress microambientali, come condizioni di ipossia, PIM1 e GBP1 sono reclutate all'interno del citoscheletro in seguito all'over-espressione della  $\beta$ III-tubulina e tale complesso multi-proteico è in grado di innescare una cascata di segnali che porta all'aumento della capacità di pro-sopravvivenza delle cellule, determinando nelle cellule tumorali una farmaco-resistenza. Tali segnali di sopravvivenza sono essenziali nel mantenere la longevità delle cellule lungo l'intera durata di vita e nel resistere a danni indotti da stimoli micro ambientali nocivi. Per cui la  $\beta$ III-tubulina non agisce come un singolo "guidatore" del fenotipo resistente, ma è parte integrante di un complesso multi-molecolare in grado di attivare un *gateway* citoscheletrico per l'incorporazione nei microtubuli di chinasi di pro-sopravvivenza come PIM1. Quindi, inibire la formazione di tale complesso multi-proteico attraverso la distruzione delle interazioni sopra descritte premetterà di rendere più efficace la terapia contro le cellule tumorali resistenti al paclitaxel, (es. cellule di carcinoma ovarico).

---

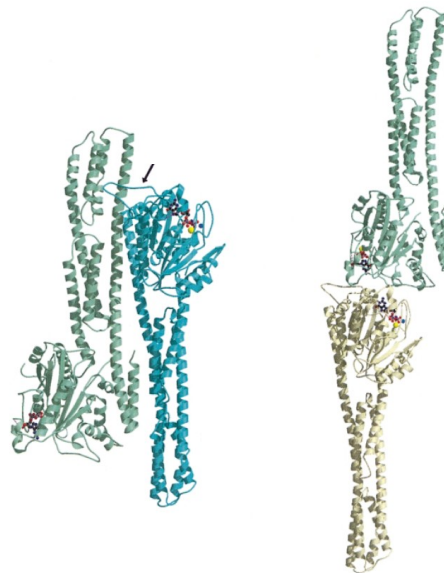
### ***3.1b Caratteristiche generali e funzionali della proteina legante il guanilato (GBP1)***

Le proteine umane leganti il guanilato (GBPs), come GBP1, appartengono alla famiglia delle GTPasi e vengono sintetizzate maggiormente dopo il trattamento di diversi tipi cellulari (cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, cellule-B, cellule-T e cellule mononucleari del sangue) con interferone  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), una sostanza immunomodulatoria che induce l'espressione di un gran numero di geni che regolano la risposta cellulare alle citochine,<sup>80</sup> mostrando un importante ruolo nella resistenza verso gli agenti citotossici intracellulari. La localizzazione della proteina GBP1 è principalmente citosolica e la sua distribuzione è granulare anche se è stata descritta una sua associazione a livello della membrana plasmatica. Tale proteina regola molti processi cellulari come trasduzione del segnale, sintesi proteica, trasporto proteico intracellulare, trasporto vescicolare e citodieresi.<sup>81</sup>

La famiglia delle GTPasi, oltre alle hGBPs, è composta da altri tre gruppi di proteine, quali la dinamina, le proteine Mx e le atlastine, le quali sono comunemente classificate come *large GTPases* per differenziarle dalle *small GTPases* di cui fanno parte Ras, la sub-unità  $\alpha$  delle proteine G eterodimeriche e i fattori trascrizionali nella biosintesi proteica. Le proprietà biochimiche della proteina GBP1 sono chiaramente differenti da queste ultime in quanto, come membro della super famiglia della dinamina, evidenzia alcuni aspetti caratteristici appartenenti a questa classe, come la capacità di interagire con le membrane lipidiche e l'attività GTPasica dipendente dall'oligomerizzazione. GBP1 è in grado di legare i tre nucleotidi guaninici, GMP, GDP e GTP con affinità simile,<sup>82</sup> avendo non solo la capacità di idrolizzare il GTP, in maniera concentrazione-dipendente a GDP, ma anche a GMP attraverso dei passaggi consequenziali.<sup>83-85</sup> Quest'ultima funzione di GBP1 rappresenta un'abilità unica di questa classe di proteine rispetto alle altre GTPasi e per di più GBP1 risulta essere stabile anche in assenza di nucleotide a differenza di Ras e delle proteine G $\alpha$  leganti il GTP; inoltre, mentre l'attività GTPasica di Ras è controllata dalla proteina GAP (proteina attivante il guanilato) che permette il rilascio di pirofosfato da GTP a GDP, e dalla proteina GEF (fattore di scambio dei nucleotidi guaninici) che permette il distacco del GDP ed il legame di GTP, quella di GBP1 è controllata dalla sua stessa oligomerizzazione promuovendo la reazione di idrolisi.<sup>86</sup> Tale oligomerizzazione coinvolge importanti regioni e alcuni residui aminoacidici chiave come l'Arg48 e la Ser73, i quali sono soggetti a cambiamenti osservabili nella disposizione delle catene laterali per favorire la reazione di catalisi.<sup>87</sup> Inoltre, l'abilità ad oligomerizzare in relazione al tipo di nucleotide legato e la successiva idrolisi del GTP

---

dipendente dalla concentrazione hanno permesso di osservare che la hGBP1 in assenza di nucleotide ed in complesso con GDP/GMP risulta essere monomero, è un dimero in presenza di GppNHp (analogo del GTP non idrolizzabile) e GTP, mentre risulta un tetramero quando mima lo stato di transizione GDP-AlFx.<sup>86b</sup> Sono state avanzate due diverse ipotesi di interazione per la formazione del dimero di GBP1: un'interazione di tipo “testa-testa” ed una di tipo “testa-coda” (Figura 34). Quest'ultima è risultata essere poco favorita a causa del potenziale elettrostatico fortemente negativo che tende a creare delle forze di repulsione nell'interazione al contrario dell'interazione testa-testa che, invece, è più facilitata per la distribuzione di carica. Ciò nonostante, però, nessuno dei due modelli è stato validato, giungendo alla conclusione che sono necessari più studi strutturali e biochimici dettagliati per comprendere l'esatto processo di oligomerizzazione.<sup>86b</sup>



**Figura 34.** Rappresentazione delle due possibili interazioni in GBP1, interazione “testa-coda” (a sinistra), interazione “testa-testa” (a destra).

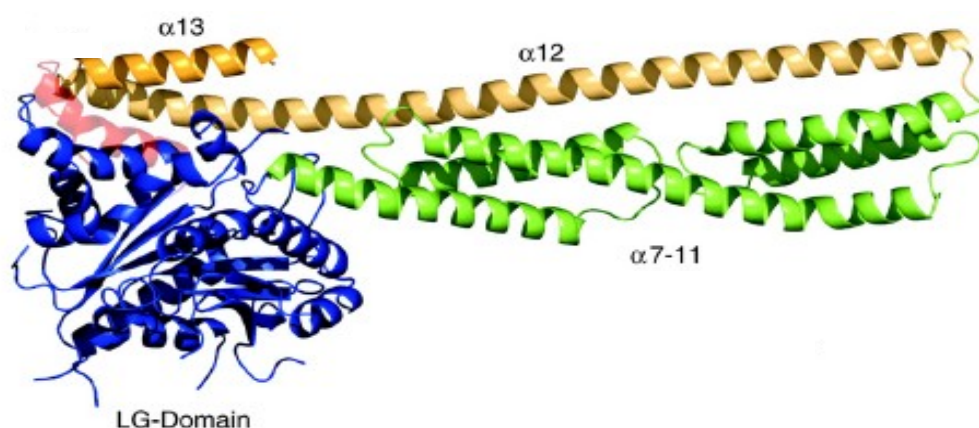
---

### 3.1c Caratteristiche strutturali di GBP1

Da un punto di vista strutturale hGBP1 presenta un peso molecolare approssimativo di 67kDa e le strutture cristallografiche note in letteratura hanno rilevato la presenza di un dominio  $\alpha/\beta$ -globulare a livello dell'N-terminale chiamato comunemente dominio "LG" (large GTPase) che guida l'attività GTPasica, e un esteso dominio C-terminale ad  $\alpha$ -eliche denominato "dominio ad elica" e sottoclassificato in un "dominio centrale", composto esclusivamente dalle  $\alpha$ -eliche sette-undici e un dominio chiamato "GED" (*GTPase effector domain*), composto dalle  $\alpha$ -eliche 12 e 13 (Figura 35). In un lavoro è stato ipotizzato che è proprio il dominio ad elica ad agire come una proteina interna attivante la GTPasi (GAP) attraverso l'interazione con specifici residui coinvolti nella catalisi e presenti nel dominio GTPasico dell'LG.<sup>88</sup>

I domini N e C-terminale sono connessi da una piccola regione intermedia costituita da una  $\alpha$ -elica e due piccoli foglietti  $\beta$  (regione di connessione) che non rappresenta un dominio indipendente ma va ad impacchettarsi verso la prima  $\alpha$ -elica ed il primo foglietto  $\beta$  del dominio LG, in corrispondenza dell'ipotetico sito di legame del nucleotide.

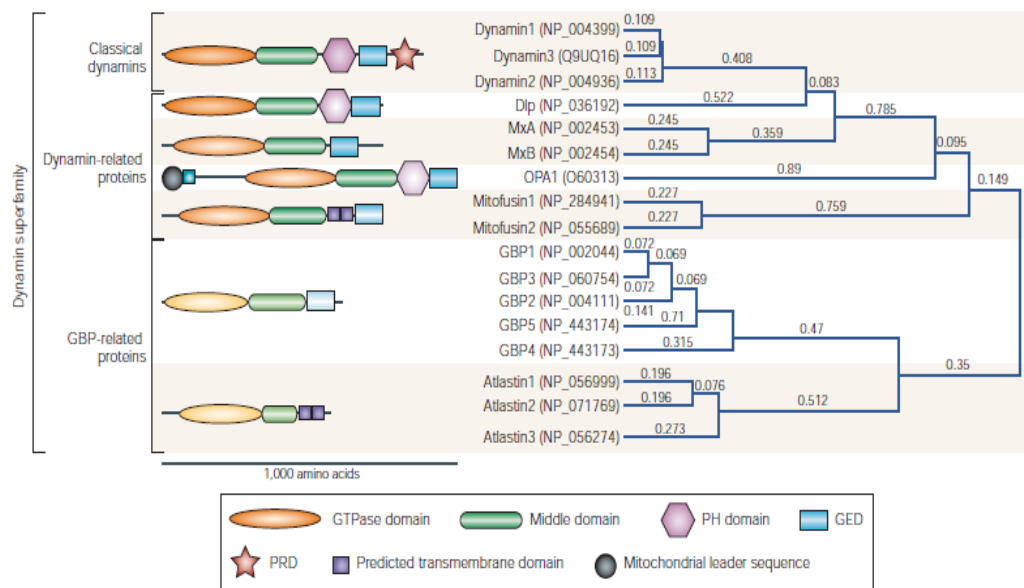
Il C-terminale presenta anche il motivo CAAX (dove A costituisce un aminoacido alifatico e X un qualsiasi aminoacido) di isoprenilazione importante sia per l'ancoraggio della proteina alla membrana ma anche necessario per l'attività antiproliferativa delle citochine infiammatorie sulla proliferazione della cellula endoteliale.<sup>88</sup>



**Figura 35.** Rappresentazione strutturale della proteina GBP1 (PDB ID: 1DG3) in cui è mostrato il dominio LG in blu, la regione di connessione in rosso, il dominio centrale in verde, l' $\alpha 12$  e l' $\alpha 13$  in arancione chiaro e scuro.

E' da sottolineare che le caratteristiche strutturali minime, comuni a tutte le proteine appartenenti alla famiglia della dinamina, sono rappresentate proprio dal dominio GTPasico

(circa 300 residui), dal dominio centrale (circa 150-200 residui) e dal dominio GED (circa 100 residui), coinvolti nell'oligomerizzazione e nella regolazione dell'attività GTPasica (Figura 36). Molti altri membri della superfamiglia, oltre a questi domini, ne presentano altri aggiuntivi come: il dominio PH (*Pleckstrin-homology*) necessario per l'interazione con le membrane lipidiche, il dominio transmembranario o una sequenza per l'attacco lipidico, il dominio ricco di proline (PRDs) che lega i domini SH3 e le sequenze che indirizzano le proteine verso specifici organelli, come i mitocondri o i cloroplasti.<sup>89</sup>



**Figura 36.** Rappresentazione schematica dei domini della superfamiglia della dinamina umana in cui è presente anche GBP1.

Il dominio GTPasico di GBP1 contiene dei motivi leganti il GTP (G1-G4) che sono necessari per il legame del nucleotide guaninico e per l'idrolisi. In particolare, il motivo G1 (<sup>45</sup>GXXXXGKS<sup>52</sup>) comunemente chiamato *P-loop* coordina il fosfato del nucleotide mentre i motivi G2 (T) - G3 (<sup>97</sup>DXXG<sup>100</sup>), chiamati *switchI* e *switchII* sono coinvolti rispettivamente nel meccanismo di catalisi e nel formare un legame ad H con il  $\gamma$ -fosfato del GTP; sono quindi coinvolti nel processo di dimerizzazione fino a quando l'idrolisi del GTP in GMP non è completa. Questi motivi risultano essere assolutamente conservati nella superfamiglia della dinamina eccetto il motivo G4 (<sup>181</sup>TLRD<sup>184</sup>), coinvolto nel coordinare la base e il ribosio del nucleotide che, in un primo momento sembrava essere assente in GBP1 ma in realtà la sequenza consenso di G4 NKxDT in GBP1 risulta sostituita dal motivo <sup>181</sup>TLRD<sup>184</sup> (Figura 37).<sup>89</sup>

	G1 (P-loop)	G2 and switch 1	G3 and switch 2	G4
Dynamin1	I A V V G G Q S A G K S S V L E N F V G	S G I V T R R P L V	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
DLP1	I V V V G T Q S S G K S S V L E S L V G	T G I V T R R P L I	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
MxA	I A V I G D Q S S G K S S V L E A L S G	S G I V T R C P L V	L I D L P G I T R V	I L T K P D L
OPA1	V V V V G D Q S A G K T S V L E M I A Q	G E M M T R S P V K	L V D L P G V I N T	V L T K V D L
Mitofusin1	V A F F G R T S S G K S S V I N A M L W	I G H I T N C F L S	L V D S P G T D V T	L N N R W D A
GBP1	V A I V G L Y R T G K S Y L M N K L A G	V Q S H T K G I W M	L L D T E G L G D V	V W T L R D F
Atlastin1	V S V A G A F R K G K S F L M D F M L R	N E P L T G F S W R	L M D T Q G T F D S	I F L V R D W
IIGP1	V A V T G E T G S G K S S F I N T L R G	G A A K T G V V E V	F W D L P G I G S T	V R T K V D S
p21 Ras	L V V V G A G V G K S A L T I Q L I Q	E Y D P T I E D S Y	I L D T A G Q E E Y	V G N K C D L
EF1α	I V V I G H V D S G K S T T T G H L I Y	E R G I T I D I S L	I I D A P G H R D F	G V N K M D S
Consensus	GxxxxGKS T	T	DxxG	NKxD T

Figura 37. Motivi leganti il GTP nella superfamiglia della dinamina.

### 3.1d Caratteristiche generali e funzionali della serin-treonin chinasi PIM1

La serin/treonin chinasi PIM1 è una proteina appartenente alla famiglia delle calmoduline  $Ca^{2+}$  dipendenti insieme a PIM2 e PIM3 e, rispetto ad altre chinasi che sono regolate da fosforilazione o legate alla membrana plasmatica, la sua attività è regolata principalmente durante la sua trascrizione, traduzione o degradazione a livello del proteo soma.<sup>90</sup> E' espressa in maniera ubiquitaria con alti livelli nel timo, milza, midollo osseo ed in un gran numero di tumori di origine non ematopoietica (tumore dell'epitelio orale, del pancreas, dei polmoni, della prostata e del colon),<sup>91</sup> nelle cellule HeLa (cellule della cervice uterina), LNCaP e PC3 (cellule del cancro prostatico umano). Sono presenti molti meccanismi che controllano finemente la sua espressione. Tale chinasi può, infatti, essere indotta dall'azione di molte citochine (IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12, IL-15), fattori di crescita e mitogeni come LIF, GM-CSF, G-CSF, EGF, INF- $\alpha$  (interferone- $\alpha$ ), PRL, Epo, PMA. Perciò differenti sono gli stimoli che possono attivare l'espressione del gene PIM1 nei diversi tipi cellulari. La principale via di trasduzione responsabile dell'attivazione trascrizionale di PIM1 è quella che coinvolge la chinasi JAK (*Janus kinases*) e il fattore di trascrizione STAT. Dopo la stimolazione dei recettori tirosin chinasi con il ligando si ha l'attivazione di JAK che fosforila STAT (STAT1-3-5) su residui di tirosina. STAT fosforilato dimerizza e trasloca nel nucleo, si lega all'elemento GAS-ISFR presente nel promotore di PIM1 e ne attiva la trascrizione.<sup>92</sup> PIM1 stesso può regolare negativamente questa via fosforilando, e quindi attivando, un gruppo di regolatori negativi dell'attività di STAT, chiamate proteine SOCS.<sup>93</sup> Il messaggero di PIM1 codifica per due isoforme di peso molecolare di 34kDa e 44kDa

---

rispettivamente, espresse nella maggior parte delle linee cellulari di cancro umano, le quali esibiscono una attività chinasi comparabile *in vitro*. La localizzazione sub-cellulare di PIM1 umana di 44kDa è primariamente sulla membrana plasmatica ed essa contiene all'estremità N-terminale un motivo poliprolinico che interagisce direttamente con il dominio SH3 del recettore tirosin/chinasi Etk attraverso il motivo PXXP.<sup>94</sup> Tale interazione compete con il soppressore del tumore p53 per il sito di legame ad Etk promuovendone l'attività chinasi. La sovra-espressione di PIM1 di 44kDa nelle cellule tumorali prostatiche conferisce resistenza ai farmaci chemioterapici.<sup>95</sup> L'isoforma di 33kDa, invece, è presente sia nel citosol e sia nel nucleo cellulare ed è implicata nella regolazione del ciclo cellulare e nella trascrizione attraverso la fosforilazione di un gran numero di substrati come cdc25A, HP1 e p100;<sup>96-98</sup> inoltre, è capace di incrementare la velocità di comparsa del linfoma indotto c-Myc ed agisce bloccando l'apoptosi indotta da stress genotossico.<sup>99</sup> Entrambe mostrano un'attività chinasi simile, con differenza solo nella loro emivita in quanto l'isoforma di 44kDa risulta più stabile. Quest'ultima, non è altro che un'estensione N-terminale dell'isoforma di 33kDa, ottenuta attraverso un diverso meccanismo di *splicing* alternativo. La chinasi PIM1, una volta sintetizzata, si autofosforila e ciò determina un aumento di stabilità; infatti, la sua defosforilazione da parte della fosfatasi PP2A,<sup>100</sup> causa un drastico calo della sua espressione con successiva ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma 26S.

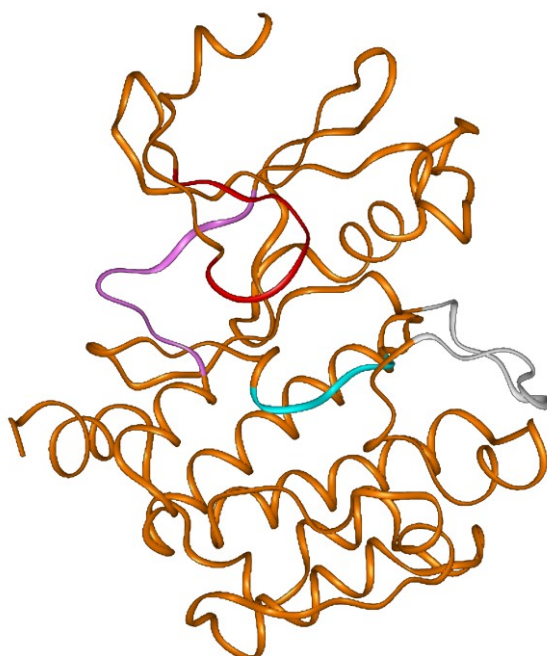
In letteratura sono stati identificati diversi substrati di PIM1 coinvolti nella sintesi proteica (S6K1, 4EBP1), nell'apoptosi (BAD), nella regolazione della crescita e del ciclo cellulare (p21, p27, cdc25a, cdc25c). Questo rende PIM1 un regolatore importante dello sviluppo e dell'omeostasi cellulare in quanto fosforila numerose proteine coinvolte direttamente nella sopravvivenza e crescita della cellula. Proprio per le sue molteplici funzioni molti studi hanno dimostrato il ruolo rilevante della chinasi PIM1 in numerose forme di cancro umano; purtroppo, l'esatto meccanismo con cui essa partecipa alla trasformazione cellulare non è ancora del tutto chiaro e, per poter avere un'efficace azione terapeutica, potrebbe essere necessario agire sui complessi proteici attraverso i quali PIM1 svolge la sua eclettica funzione nella tumorigenesi e non semplicemente inibire la sua attività chinasi.



---

### 3.1e Caratteristiche strutturali della serin-treonin chinasi PIM1

A differenza delle altre chinasi che necessitano di essere fosforilate per essere attive, PIM1 nella sua forma libera è stata trovata essere una chinasi costitutivamente attiva in quanto la sua fosforilazione non è necessaria per l'attività chinasica ma contribuisce solo ad una maggiore stabilità.<sup>101</sup> La chinasi PIM1 adotta un tipico *fold* chinasico a due lobi, ossia il lobo N-terminale (in verde, Figura 38) che comprende principalmente dei foglietti  $\beta$  antiparalleli mentre il lobo C-terminale (in arancione, Figura 38) costituito principalmente da  $\alpha$ -eliche. I due domini sono in comunicazione tra loro attraverso una "regione di connessione" (in rosa, Figura 38) che presenta la sequenza consenso caratteristica ERPXPX (residui 121-126) presente solo nella famiglia delle chinasi PIM1.<sup>102</sup>



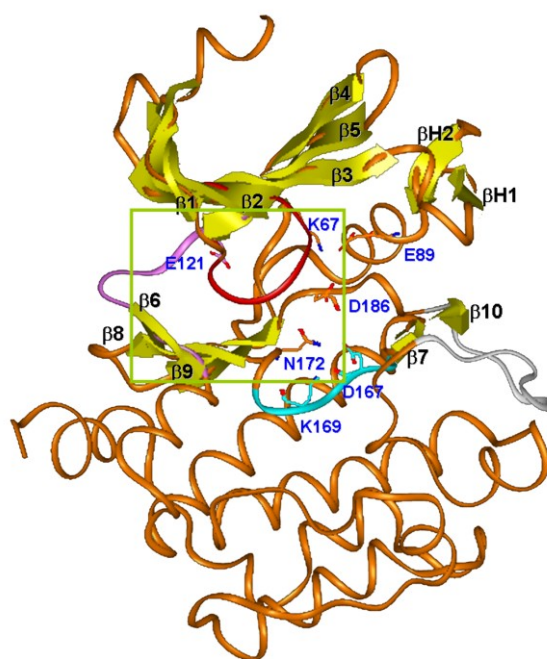
**Figura 38.** Rappresentazione strutturale della proteina PIM1 in cui sono ben schematizzati il dominio N-terminale (verde), costituito principalmente da foglietti  $\beta$ , il dominio C-terminale (in arancione), caratterizzato in gran parte da  $\alpha$ -eliche, la regione di connessione dei due domini (in rosa), il G-loop (in rosso), il C-loop (in ciano) e l'A-loop (in bianco), questi ultimi necessari per la stabilità e il mantenimento della conformazione attiva di PIM1.

Non sono presenti interazioni ioniche tra i due lobi anche se si osserva, nella maggior parte delle chinasi, una coppia ionica comprendente un residuo di lisina nel lobo N-terminale e un residuo acido o fosforilato nel lobo C-terminale che sono critici nel mantenere una certa stabilità strutturale nell'attività chinasica. Prima della regione di connessione è presente un G-loop (in rosso, Figura 38), così chiamato per la presenza di numerosi residui di glicina, che non instaura alcun tipo di interazioni con il resto della proteina come, invece, avviene nelle

---

altre chinasi. Tuttavia, in questa regione è stato identificato un aminoacido critico per l'interazione con gli inibitori, quale la Phe49.<sup>103</sup> Al G-loop segue un loop catalitico, C-loop, (in ciano) e un loop di attivazione, A-loop, (in bianco) che, diversamente dalle altre chinasi, non bloccano la tasca di legame dell'ATP. L'A-loop e il C-loop sono coinvolti in un intenso *network* di interazioni per il mantenimento della conformazione attiva e della stabilità di PIM1.<sup>104</sup> L'ATP normalmente instaura due legami ad idrogeno con la regione di connessione delle chinasi utilizzando l'adenina mentre il gruppo fosfato interagisce con due residui di lisina e due ioni magnesio ( $Mg^{2+}$ ) legati all'ATP. In PIM1, invece, la presenza di due residui di prolina nella regione di connessione (sequenza presente solo in PIM1) porta ad una variazione nel modo tradizionale di legare l'ATP.

Sebbene PIM1 adotti il tipico *fold* delle chinasi, la struttura del suo dominio contiene una coppia in più di foglietti  $\beta$  antiparalleli ( $\beta H1$  e  $\beta H2$ ) che connettono il foglietto  $\beta 3$  e la successiva elica (Figura 39).



**Figura 39.** Struttura cristallografica di PIM1 (PDB ID: 1XR1) in cui sono evidenziati, oltre ai foglietti  $\beta$  nel lobo N-terminale e le  $\alpha$ -eliche nel lobo C-terminale, i foglietti  $\beta H1$  e  $\beta H2$ . L'area evidenziata in giallo rappresenta la tasca di legame dell'ATP con i residui chiave del sito attivo.

Questa rappresenta una caratteristica strutturale unica in quanto in altre chinasi questa regione generalmente adotta una struttura ad  $\alpha$ -elica. Nel lobo C-terminale, tra l'A-loop e il C-loop, sono presenti una coppia di piccoli foglietti  $\beta$  ( $\beta 7$  e  $\beta 10$ ). Questa caratteristica strutturale è simile per la chinasi CHK-1 ma non per le altre chinasi.

---

Sulla base dell'omologia di sequenza con le altre chinasi è possibile evidenziare la Lys67, il Glu89, la Lys169, l'Asn172 e l'Asp186 come residui di PIM1 che potrebbero legare l'ATP mentre l'Asp167 che potrebbe catalizzare il trasferimento del gruppo fosfato. Questi residui sono evidenziati in Figura 39 e rappresentano la tasca in cui alloggia l'ATP. Questa regione è riportata nelle strutture cristallografiche di PIM1 essere sottoposta ad un cambiamento conformazionale che dà luogo ad una conformazione "aperta" (PIM1 libera) o "chiusa" (PIM1 legata all'ATP). Tuttavia la tasca di legame per l'ATP è aperta anche in PIM1 legata all'AMP-PNP, suggerendo che il sito catalitico potrebbe essere mantenuto in una conformazione attiva.<sup>105</sup>

Come conseguenza dell'identificazione dei numerosi substrati su cui agisce PIM1, è stato possibile identificare una sequenza consenso responsabile del loro riconoscimento da parte di PIM1, rappresentata da una Lys/Arg – Lys/Arg – Arg – Lys/Arg – Leu – Ser/Thr – Xaa, dove Xaa indica un aminoacido con una piccola catena laterale.

### 3.1f Tubulina come unità base dei microtubuli: struttura e funzioni

I microtubuli costituiscono uno dei componenti dinamici fondamentali del citoscheletro e presentano un diametro di 25 nm ed una lunghezza variabile dai 200 nm ai 25  $\mu\text{m}$ .; essi fungono da componenti strutturali all'interno delle cellule e sono coinvolti in numerosi processi cellulari che includono la mitosi, la citochinesi, il trasporto vescicolare e l'apoptosi. Sono infatti critici per l'allineamento dei cromosomi al cinetocore, per il loro movimento durante la metafase e la segregazione in anafase e telofase.

La parete dei microtubuli è composta da una serie di unità sferoidali ordinate rigidamente, rappresentate da  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina che formano eterodimeri. Nei mammiferi esistono sette  $\alpha$ -tubuline, designate come  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$ ,  $\alpha 7$  e  $\alpha 8$  e otto differenti isotipi di  $\beta$ -tubulina designati come  $\beta \text{I}$ ,  $\beta \text{II}$ ,  $\beta \text{III}$ ,  $\beta \text{IVa}$ ,  $\beta \text{IVb}$ ,  $\beta \text{V}$ ,  $\beta \text{VI}$ ,  $\beta \text{VII}$ ;<sup>106</sup> le varie isoforme della tubulina mostrano una diversa localizzazione e sono differenzialmente espresse in molti tessuti e tipi cellulari.<sup>107</sup>

I dimeri di tubulina polimerizzano a formare lunghe catene chiamate protofilamenti, che nella cellula sono assemblati in gruppi di tredici, formando il microtubulo. I protofilamenti si avvolgono a spirale di passo sinistrorso e decorrono paralleli tra di loro attorno all'asse del microtubulo (Figura 40).

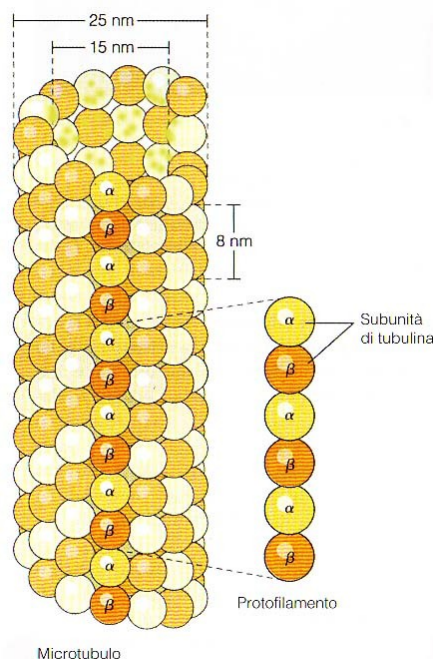


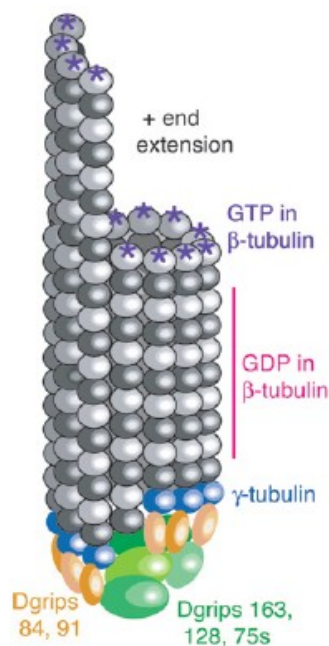
Figura 40. Struttura dei microtubuli.

---

Nel citoplasma i microtubuli sono in equilibrio dinamico con una certa quantità di dimeri di tubulina depolimerizzata in forma solubile; per equilibrio dinamico si intende un processo continuo di polimerizzazione e depolimerizzazione con conseguente assemblaggio e disassemblaggio dei microtubuli.<sup>108,109</sup> Un'importante caratteristica della struttura microtubulare è la polarità: la tubulina, infatti, polimerizza *end to end* tramite la sub-unità  $\alpha$  di un dimero di tubulina che prende contatto con la sub-unità  $\beta$  del successivo. Di conseguenza, in un protofilamento, un terminale avrà la sub-unità  $\alpha$  esposta mentre l'altro terminale esporrà la sub-unità  $\beta$ , determinando quindi una diversità strutturale e chimica tra le due estremità. Questi terminali sono indicati rispettivamente con (-) e (+).<sup>110</sup>

La polimerizzazione dei microtubuli avviene in aree denominate “centri organizzatori dei microtubuli” (MTOCs,) quali centrosomi e corpi basali.<sup>111</sup> All'interno degli MTOCs è presente un ulteriore tipo di tubulina, la tubulina  $\gamma$ , la quale si combina con numerose altre proteine a formare una struttura circolare nota come  $\gamma$  - *tubulin ring complex*, che agisce come scheletro per i dimeri di  $\alpha/\beta$  tubulina per dare inizio alla polimerizzazione.<sup>112</sup> Questo complesso agisce come un “tappo” all'estremità (-) mentre la crescita dei microtubuli continua allontanandosi dal MTOC in direzione del terminale (+). Durante la polimerizzazione sia la sub-unità  $\alpha$  che la  $\beta$  dei dimeri di tubulina sono legate a molecole di guanosina trifosfato (GTP). Mentre il GTP legato alla sub-unità  $\alpha$  risulta stabile, quello legato alla  $\beta$ -tubulina è velocemente idrolizzato a guanosina difosfato (GDP) in seguito all'assemblaggio. Le cinetiche della tubulina/GDP sono differenti da quelle della tubulina/GTP, infatti la tubulina/GDP è predisposta alla depolimerizzazione.<sup>113</sup>

Dato che la tubulina è addizionata al terminale del microtubulo solo nello stato legato al GTP, è presente generalmente una superficie di tubulina legata a GTP al terminale (+) del microtubulo con la funzione di proteggerlo dal disassemblaggio<sup>114</sup> (Figura 41).



**Figura 41.** Allungamento di un microtubulo al terminale (+). Il terminale (-) è mostrato protetto e stabilizzato dalla  $\gamma$ -tubulin ring complex. La  $\gamma$  tubulina è mostrata in blu.

Quando si verifica l'idrolisi al terminale del microtubulo, esso va incontro ad una rapida depolimerizzazione ed accorciamento; tale cambiamento strutturale è noto come “catastrofe del microtubulo”.<sup>109</sup> Per contro la GTP-tubulina può essere nuovamente addizionata al terminale provvedendo alla formazione di un nuovo “tappo”, proteggendo il microtubulo dall'accorciamento. Questo evento è conosciuto come “recupero del microtubulo”.<sup>115</sup> Il grado di assemblaggio, disassemblaggio e catastrofe dipendono anche dalla presenza di proteine associate ai microtubuli (MAPs) quali ad esempio MAP2, MAP4 e TAU che sembrano stabilizzare i microtubuli tramite un legame alla superficie esterna dei proto filamenti.<sup>116</sup>

---

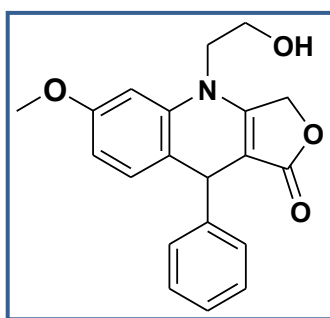
## 3.2 SCOPO DEL LAVORO

Il costante sviluppo della resistenza ai farmaci antitumorali muove la ricerca verso una più dettagliata comprensione dei meccanismi molecolari responsabili del processo di tumorigenesi al fine di individuare le basi dell'insorgenza dei fenomeni di resistenza. È stato ampiamente dimostrato che un'alterazione dei normali *network* di interazione proteina-proteina comporta una variazione degli eventi biochimici e morfologici che regolano l'equilibrio vita e/o morte della cellula con conseguente insorgenza della neoplasia e sviluppo di farmaco-resistenza. Sempre più numerosi sono i gruppi di ricerca impegnati ad indagare, tramite approcci di tipo biologico e chimico, il ruolo chiave che svolgono le interazioni proteina-proteina nella regolazione dei processi biologici. In letteratura sono stati individuati diversi complessi proteici che hanno mostrato un'interessante capacità di modulare le funzioni cellulari permettendo di generare composti con effetti farmacologici di grande interesse.

Come già descritto nell'introduzione (vedere paragrafo 3.1.a) il gruppo di ricerca del Dr. Ferlini da anni indaga i meccanismi di farmaco-resistenza che le cellule di carcinoma ovarico ed altri tumori solidi sviluppano nei confronti del chemioterapico paclitaxel; in tali cellule, l'over-espressione della  $\beta$ III-tubulina riveste un'attenzione particolare in quanto rappresenta un promettente biomarker predittivo di farmaco-resistenza permettendo l'incorporazione all'interno dei microtubuli della GTPasi GBP1, che si lega alla chinasi PIM1, innescando una cascata di segnali che portano all'aumento della capacità di pro-sopravvivenza delle cellule.<sup>79</sup> Alla luce di queste conoscenze, il presente lavoro di ricerca è stato dedicato, in una prima fase, allo sviluppo di un possibile modello molecolare di interazione del complesso trimetrico GBP1/PIM1/ $\beta$ III-tubulina sulla base di un'approfondita analisi strutturale e bioinformatica di tutte le strutture note sperimentalmente in letteratura delle proteine oggetto di studio. Dal momento che non esistono dati strutturali disponibili sulla formazione di tale complesso sono stati considerati diversi complessi proteici comprendenti chinasi e GTPasi, determinati sperimentalmente a livello molecolare. Ciò ha permesso di ricavare delle omologie strutturali con le nostre proteine riuscendo a costruire un ipotetico modello di interazione dei partner di legame individuando le possibili zone di contatto nel macrocomplesso stesso. Contestualmente allo sviluppo del modello molecolare del complesso trimetrico GBP1/PIM1/ $\beta$ III-Tubulina, al fine di sviluppare molecole farmacologicamente attive in grado di inibire la formazione di tale complesso a livello del citoscheletro e, quindi, interferire nei meccanismi di resistenza fin'ora individuati, sono state sintetizzate dai gruppi di ricerca del Dr. Sanjay Malhotra e dei Dr. Kumar e Alegria 47 nuove 2-azapodofillotossine (2-APT) e

---

testate su un pannello di 60 linee cellulari tumorali presso il National Cancer Institute (NCI). Purtroppo le isoforme  $\alpha$  e  $\beta$  della tubulina, non sono utilizzabili per saggi *in vitro* in quanto la loro conformazione attiva richiede modifiche post-trascrizionali non ottenibili con l'attuale tecnologia ricombinante, per cui gli studi biochimici sono proceduti considerando solo le proteine GBP1 e PIM1 che possono essere espresse *in vitro*. I risultati ottenuti dai saggi cellulari hanno dimostrato che alcuni di questi ligandi sono attivi su cellule resistenti al paclitaxel con uno spettro di citotossicità simile a quello di diversi composti antitumorali, tutti capaci di interferire a livello del citoscheletro; in particolare, è stato identificato un solo composto guida, il derivato NSC756093 (Figura 42) come possibile inibitore *in vitro* dell'interazione GBP1/PIM1 e la sua attività è stata dimostrata anche in cellule di carcinoma ovarico.



**Figura 42.** Struttura di NSC756093.

Quindi, sulla base dei risultati ottenuti, anche gli studi computazionali si sono incentrati sul complesso dimerico GBP1/PIM1 andando ad investigare le basi molecolari del meccanismo d'azione dei nuovi derivati APTs, al fine di identificare un possibile sito di legame di NSC756093 su GBP1 e/o PIM1 che ci permettesse di spiegare l'abilità da parte del ligando di inibire la formazione del dimero, seguita dalla razionalizzazione delle relazioni struttura-attività (SARs) osservate. In particolare, è stata effettuata:

- i) un'approfondita analisi strutturale e bioinformatica delle strutture cristallografiche di podofillotossina/tubulina e etoposide/topoisomerasiII $\beta$ /DNA dal momento che i due ligandi presentano uno scheletro strutturale comune al composto attivo NSC756093 identificato;
- ii) un'approfondita analisi strutturale e bioinformatica delle strutture cristallografiche dei due bersagli proteici presi in considerazione (GBP1 e PIM1);
- iii) studi di *docking* dinamico per definire dei possibili modelli di interazione ligando/proteine.



---

L'attività di ricerca oggetto del presente lavoro di dottorato si è inserita in un ampio progetto multidisciplinare che ha previsto la collaborazione di ricercatori internazionali quali: i) Dr. Cristiano Ferlini (Biomedical Research Center of Danbury Hospital Institute, USA), con competenze biochimiche; ii) Dr. Sanjay V. Malhotra (National Cancer Institute (NCI), USA), iii) Dr. Ajay Kumar (School of Environmental Affairs, Universidad Metropolitana, San Juan, Puerto Rico, USA), e iv) Dr. Antonio E. Alegria (Department of Chemistry, University of Puerto Rico at Humacao, USA) con competenze nella sintesi chimica.

---

## 3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 3.3a Analisi bioinformatica di GBP1, PIM1 e Tubulina

Al fine di investigare, a livello molecolare, il possibile modello di interazione della protein-chinasi PIM1 con la GTPasi GBP1 e la  $\beta$ III-tubulina, che è stato evidenziato dal gruppo di ricerca del Dr.Ferlini essere fondamentale per il processo di sopravvivenza delle cellule tumorali<sup>79</sup> sono stati eseguiti dettagliati studi di modellistica molecolare su tale complesso trimerico.

Per generare la struttura di partenza di tale modello molecolare, è stata eseguita inizialmente una dettagliata analisi bioinformatica di tutte le strutture cristallografiche delle proteine oggetto di studio, andando ad individuare dei motivi/domini proteici. Dal momento che le strutture cristallografiche di tutte le proteine esaminate sono risultate essere caratterizzate dall'assenza di alcune regioni, è stato costruito per ognuna di essa un modello di omologia strutturale (per i dettagli vedere da paragrafo 3.5.1-3.5.4).

Per quanto riguarda la proteina GBP1, a partire dalla struttura cristallografica dell'apoenzima (codice PDB ID:1DG3) sono state inserite le seguenti regioni mancanti: quattro *loop* flessibili (63-73; 157-166; 190-193 e 244-256) e le regioni N-terminale (1-5) e C-terminale (584-592).

Per quanto riguarda la serin-treonin chinasi PIM1, la struttura cristallografica presa come riferimento per la costruzione del modello è stata l'apoenzima (codice PDB ID:1XQZ). Ad esso sono state aggiunte sia la porzione N-terminale (1-122) che quella C-terminale (400-404).

Infine, per quanto riguarda la costruzione del modello del dimero della tubulina umana è stata presa come riferimento la struttura cristallografica del dimero di Bos Taurus (i.e. di toro, codice PDB ID: 1JFF), dal momento che non è stata ancora determinata una struttura della tubulina dell'organismo Homo Sapiens, ad eccezione della  $\gamma$ -tubulina. Infatti, confrontando attentamente i risultati di predizione di struttura secondaria delle tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  umane con le tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  bovine, è emerso che sono strutturalmente quasi identiche ma differiscono solo per alcuni aminoacidi. In particolare, per l'isoforma  $\beta$ III sono state aggiunte solo le porzioni N-terminale (1) e C-terminale (428-446); invece per l'isoforma  $\alpha$ I oltre all'N-terminale (1) e C-terminale (440-451) è stato aggiunto anche una regione di *loop* flessibile (35-60).

La validità dei modelli generati è stata verificata utilizzando il server Procheck (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/><sup>117</sup> e and Hopp (<http://hoppscore.lbl.gov/>).<sup>118</sup>

---

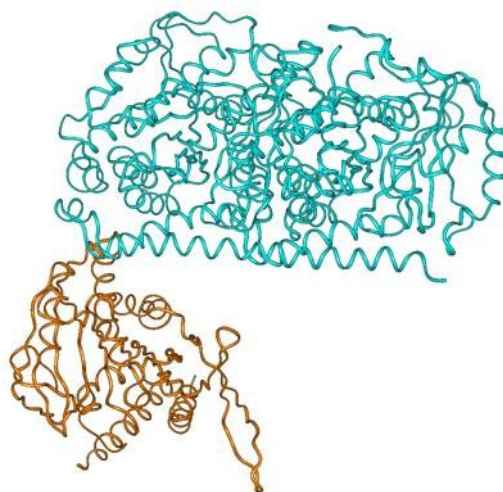
Tutti i modelli molecolari sviluppati sono stati utilizzati per generare la struttura di partenza del complesso trimerico da sottoporre agli studi di *docking* dinamico. Dal momento che non è stato ancora cristallizzato un complesso trimerico coinvolgente una protein-chinasi, una GTPasi e la tubulina, sono stati analizzati tutti i possibili complessi chinasi-GTPasi e GTPasi-tubulina. Da questa dettagliata analisi sono stati selezionati i seguenti complessi:

- 1) p110 $\gamma$  in complesso con RAS (PDB ID: 1HE8) (Figura 43);



**Figura 43.** Struttura a raggi X del complesso p110gamma (in viola) e RAS (in giallo)

- 2) chinesina in complesso con il dimero  $\alpha/\beta$  tubulina (PDB ID: 3EDL) (Figura 44).

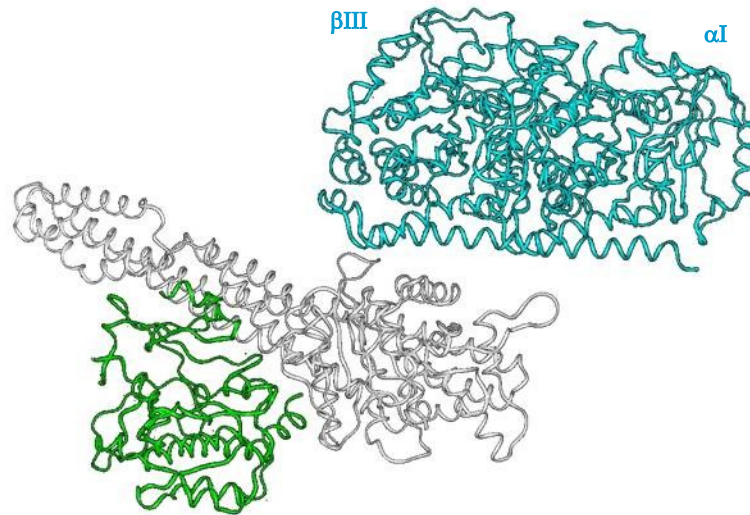


**Figura 44.** Struttura a raggi X del complesso  $\alpha/\beta$  tubulina (in celeste) e chinesina (in arancione).

In particolare, è stato preso di riferimento il complesso p110 $\gamma$  con RAS ed è stato effettuato l'allineamento del dominio chinasi della p110  $\gamma$  con PIM1; tale allineamento strutturale ha conseguentemente consentito l'allineamento di RAS con GBP1, entrambi facenti parte della famiglia delle GTPasi. Contemporaneamente, prendendo in considerazione il complesso

---

chinesina (GTPasi appartenente alla famiglia delle dinamine, come GBP1) – tubulina, è stata effettuata la sovrapposizione strutturale di GBP1 con la chinesina e del modello ottenuto del dimero di Tubulina  $\alpha I/\beta III$  con il dimero di Tubulina della struttura cristallografica. La combinazione dei risultati ottenuti ci ha consentito di formulare un modello di partenza del complesso trimerico PIM1/GBP1/Tubulina (per quest'ultima considerando il dimero  $\alpha I/\beta III$ ) (Figura 45).



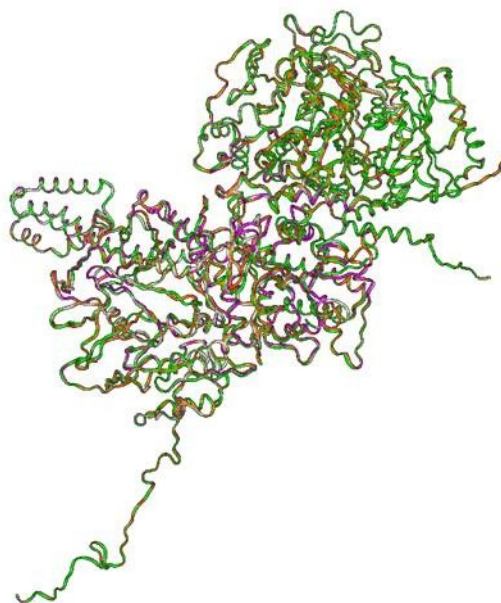
**Figura 45.** Modello di partenza del complesso trimerico ipotizzato tra PIM1 (in verde), GBP1 (in bianco) ed il dimero di tubulina  $\alpha I/\beta III$  (in celeste).

---

### 3.3b Studi di docking sul complesso GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ 1/ $\beta$ III

La struttura del complesso trimerico GBP1/PIM1/Tubulina  $\alpha$ 1/ $\beta$ III risultante dall'analisi descritta in precedenza, è stata sottoposta a studi di *docking* dinamico. Tutti gli amminoacidi del complesso sono stati lasciati liberi di muoversi durante l'intero corso del calcolo di *docking*, eccetto quelli presenti nelle regioni strutturalmente conservate (SCRs:  $\alpha$ -elica e foglietti  $\beta$ ) i quali sono stati vincolati conformazionalmente. Tali SCR sono state ricavate utilizzando il server che calcola la predizione di struttura secondaria (<http://www.predictprotein.org/>) (per i dettagli vedere paragrafo 3.5c).

Poichè tale protocollo di *docking* prevede una ricerca conformazionale con il metodo Monte Carlo di un "ligando" rispetto ad una "proteina", si è deciso di eseguire due serie di *docking*: nella prima si è considerato GBP1 "proteina" ed il complesso PIM1/Tubulina  $\alpha$ 1/ $\beta$ III "ligando" e viceversa nella seconda. Inoltre, al fine di mimare l'ambiente citoplasmatico, entrambi i calcoli di *docking* sono stati eseguiti considerando le molecole di acqua presenti nelle strutture cristallografiche, ad eccezione di quelle localizzate all'interfaccia fra le proteine. In particolare, per valutare nel dettaglio il ruolo giocato dalle molecole d'acqua presenti nei siti catalitici, sono stati eseguiti su ciascuna serie due tipologie di *docking*: una dove quest'ultime sono state lasciate libere di muoversi l'altra dove sono state vincolate con una forza (vedere parte sperimentale). Tutti i risultati ottenuti sono convergenti verso lo stesso complesso trimerico (Figura 46).



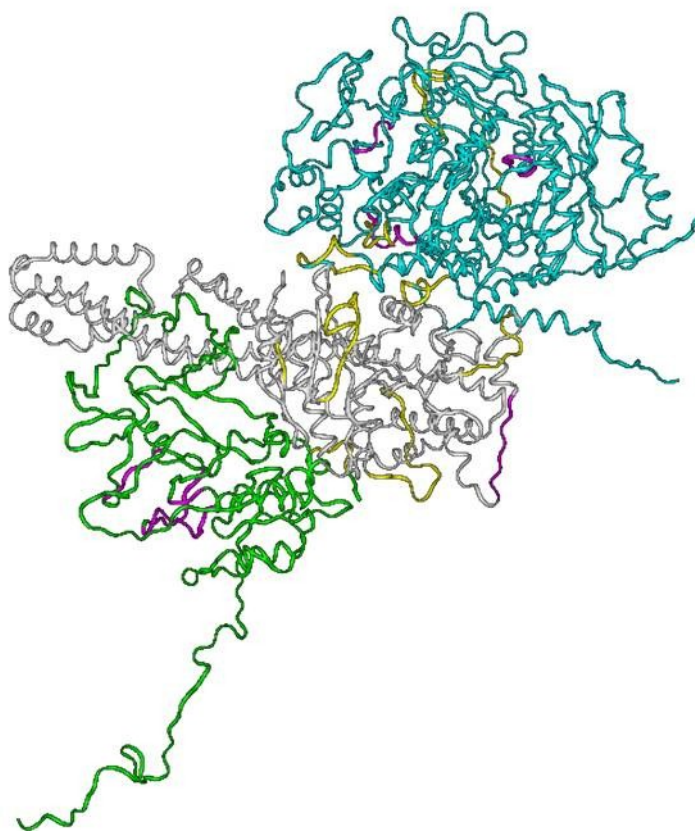
**Figura 46.** Sovrapposizione di tutti i complessi trimerici ottenuti dagli studi di *docking* colorati ciascuno in modo differente. Le proteine di ciascun complesso sono visualizzate in *ribbons* e colorati in maniera diversa (verde, arancione, magenta e bianco).

---

Questi risultati, in accordo con i dati biochimici ottenuti dal gruppo di ricerca del Dr. Ferlini, indicano una forte tendenza di queste proteine a complessare con la GTPasi GBP1 capace di formare un ponte di legame tra la protein-chinasi PIM1 e la  $\beta$ III-tubulina.

Il modello trimerico generato è stato sottoposto ad un'attenta analisi bioinformatica e strutturale in modo da analizzarne in dettaglio i cambiamenti conformazionali. In particolare, l'analisi delle strutture secondarie delle proteine prese in esame è stata effettuata utilizzando sia il modulo Homology di Insight2005 (*Prostat; Secondary Classify*) sia il server *Structural Analysis and Verification* ([http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES\\_3/](http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES_3/)). I risultati ottenuti sono stati verificati attraverso un'analisi strutturale manuale che ha permesso di identificare anche le  $\alpha$ -eliche di tipo  $3_{10}$  e  $\pi$  e tutti i dati acquisiti durante le analisi sono stati confrontati con il modello iniziale (Tabelle 16, 17 e 18).

Questa analisi ha evidenziato che le tre proteine, nel momento in cui formano questo macrocomplesso, tendono a stabilizzarsi in determinate conformazioni caratterizzate da evidenti cambiamenti strutturali sia a livello dei loro siti catalitici che a livello delle zone di interazione (Tabelle 16-18 e Figura 47).



**Figura 47.** Complesso trimerico ottenuto dagli studi di *docking*: GBP1 (in bianco), PIM1 (in verde) e Tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III (in celeste). I cambiamenti conformazionali relativi alle zone di interazione tra le proteine sono evidenziati in giallo mentre quelli relativi ai siti catalitici in magenta.

**Tabella 16.** Parametri strutturali della proteina GBP1 nel complesso trimerico iniziale (punto di partenza), ottenuto dal *docking* e dopo il *simulated annealing* (SA).

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:METN_1				:GLN_36		foglietto β	foglietto β	:VAL_71		foglietto β	foglietto β
:ALA_2	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PRO_37		foglietto β	foglietto β	:GLN_72		foglietto β	foglietto β
:SER_3	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:MET_38	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_73		foglietto β	foglietto β
:GLU_4	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_39	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:HIS_74		foglietto β	foglietto β
:ILE_5				:VAL_40	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:THR_75			
:HIS_6				:VAL_41	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:LYS+_76			
:MET_7				:ALA_42	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_77			
:THR_8				:ILE_43	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_78	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLY_9				:VAL_44	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:TRP_79	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_10				:GLY_45		foglietto β	foglietto β	:MET_80	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:MET_11				:LEU_46		foglietto β	foglietto β	:TRP_81	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:CYSH_12	foglietto β		foglietto β	:TYR_47				:CYSH_82	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:LEU_13				:ARG+_48				:VAL_83	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ILE_14	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:THR_49				:PRO_84	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLU_15	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_50				:HIS_85	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ASN_16	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:LYS+_51	α-elica	α-elica	α-elica	:PRO_86			
:THR_17				:SER_52	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_87			
:ASN_18				:TYR_53	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_88			
:GLY_19				:LEU_54	α-elica	α-elica	α-elica	:PRO_89	Turn	Turn	Turn
:ARG+_20		foglietto β	foglietto β	:MET_55	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_90	Turn	Turn	Turn
:LEU_21	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ASN_56	α-elica	α-elica	α-elica	:HIS_91		foglietto β	foglietto β
:MET_22	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:LYS+_57	α-elica			:ILE_92	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ALA_23	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:LEU_58	α-elica			:LEU_93	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ASN_24	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ALA_59	α-elica			:VAL_94	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_25	α-elica	Turn		:GLY_60	α-elica			:LEU_95	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLU_26	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_61	foglietto β			:LEU_96	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ALA_27	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_62	foglietto β			:ASP_97	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:LEU_28	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_63				:THR_98	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:LYS+_29	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_64	Turn			:GLU_99	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ILE_30	α-elica	α-elica	α-elica	:PHE_65	Turn			:GLY_100			
:LEU_31	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_66	Turn			:LEU_101	Turn		
:SER_32	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_67	Turn			:GLY_102	Turn		
:ALA_33				:GLY_68		foglietto β	foglietto β	:ASP_103	Turn		
:ILE_34		foglietto β	foglietto β	:SER_69	Turn	foglietto β	foglietto β	:VAL_104			
:THR_35		foglietto β	foglietto β	:THR_70	Turn	foglietto β	foglietto β	:GLU_105			

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:LYS+_106				:GLN_141	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:PRO_176	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_107				:LEU_142	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:ASP-_177	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP_108				:TYR_143	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:PHE_178	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_109				:TYR_144	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:VAL_179	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_110				:VAL_145	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:TRP_180	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_111				:THR_146	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:THR_181	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_112	$\alpha$ -elica			:GLU-_147	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:LEU_182	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_113	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_148	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:ARG+_183	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:TRP_114	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_149	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:ASP-_184			
:ILE_115	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_150	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:PHE_185	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PHE_116	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_151	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:SER_186	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_117	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_152	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_187	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_118	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_153	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP-_188	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_119	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_154				:LEU_189			
:VAL_120	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_155				:GLU-_190			
:LEU_121	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_156				:ALA_191			
:LEU_122	$\alpha$ -elica			:SER_157				:ASP-_192			
:SER_123				:PRO_158			Turn	:GLY_193			
:SER_124				:ASP-_159			Turn	:GLN_194			
:THR_125	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_160			Turn	:PRO_195			
:PHE_126	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_161				:LEU_196			
:VAL_127	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_162				:THR_197	$\alpha$ -elica		
:TYR_128	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_163				:PRO_198	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASN_129	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_164				:ASP-_199	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_130	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_165				:GLU-_200	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_131	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_166				:TYR_201	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_132		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP-_167	$\alpha$ -elica			:LEU_202	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_133		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_168	$\alpha$ -elica			:THR_203	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_134		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_169	$\alpha$ -elica			:TYR_204	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASN_135				:ASP-_170	$\alpha$ -elica			:SER_205	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_136	$\alpha$ -elica			:PHE_171	$\alpha$ -elica			:LEU_206	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_137	$\alpha$ -elica			:VAL_172	$\alpha$ -elica			:LYS+_207	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_138	$\alpha$ -elica	Turn		:SER_173	$\alpha$ -elica			:LEU_208		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:MET_139	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:PHE_174	$\alpha$ -elica		foglietto $\beta$	:LYS+_209		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_140	$\alpha$ -elica	elica 3 <sub>10</sub>	elica 3 <sub>10</sub>	:PHE_175	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_210		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$



Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:GLY_211		foglietto β	foglietto β	:LYS+_246				:THR_281	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:THR_212		foglietto β	foglietto β	:LEU_247				:LEU_282	foglietto β		
:SER_213		foglietto β	foglietto β	:ALA_248				:SER_283	Turn		
:GLN_214		Turn	Turn	:GLN_249				:GLY_284	Turn	foglietto β	foglietto β
:LYS+_215	α-elica	Turn	Turn	:LEU_250				:GLY_285	Turn	foglietto β	foglietto β
:ASP-_216	α-elica			:GLU-_251				:ILE_286	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLU-_217	α-elica			:LYS+_252				:GLN_287	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:THR_218	α-elica			:LEU_253				:VAL_288	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PHE_219	α-elica			:GLN_254				:ASN_289	α-elica		
:ASN_220	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP-_255				:GLY_290	α-elica		elica 3 <sub>10</sub>
:LEU_221	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU-_256				:PRO_291	α-elica		elica 3 <sub>10</sub>
:PRO_222	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU-_257				:ARG+_292	α-elica	α-elica	elica 3 <sub>10</sub>
:ARG+_223	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_258				:LEU_293	α-elica	α-elica	elica 3 <sub>10</sub>
:LEU_224	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP-_259	α-elica			:GLU-_294	α-elica	α-elica	α-elica
:CYSH_225	α-elica	α-elica	α-elica	:PRO_260	α-elica	α-elica		:SER_295	α-elica	α-elica	α-elica
:ILE_226	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU-_261	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_296	α-elica	α-elica	α-elica
:ARG+_227	α-elica	α-elica	α-elica	:PHE_262	α-elica	α-elica	α-elica	:VAL_297	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_228	α-elica	Turn	Turn	:VAL_263	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_298	α-elica	α-elica	α-elica
:PHE_229	α-elica	Turn	Turn	:GLN_264	α-elica	α-elica	α-elica	:THR_299	α-elica	α-elica	α-elica
:PHE_230				:GLN_265	α-elica	α-elica	α-elica	:TYR_300	α-elica	α-elica	α-elica
:PRO_231				:VAL_266	α-elica	α-elica	α-elica	:VAL_301	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_232	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ALA_267	α-elica	α-elica	α-elica	:ASN_302	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_233	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ASP-_268	α-elica	α-elica	α-elica	:ALA_303	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_234	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PHE_269	α-elica	α-elica	α-elica	:ILE_304	α-elica	α-elica	α-elica
:CYSH_235	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:CYSH_270	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_305	α-elica	α-elica	α-elica
:PHE_236	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_271	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_306	α-elica	α-elica	α-elica
:VAL_237	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:TYR_272	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_307	α-elica		
:PHE_238	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_273	α-elica			:ASP-_308			
:ASP-_239		foglietto β	foglietto β	:PHE_274	α-elica	Turn		:LEU_309	foglietto β	foglietto β	
:ARG+_240				:SER_275	α-elica	Turn		:PRO_310	foglietto β	foglietto β	
:PRO_241				:ASN_276	α-elica	Turn		:CYSH_311	foglietto β	foglietto β	
:VAL_242				:SER_277		foglietto β	foglietto β	:MET_312	α-elica		
:HIS_243				:LYS+_278		foglietto β	foglietto β	:GLU-_313	α-elica		
:ARG+_244	Turn			:THR_279		foglietto β	foglietto β	:ASN_314	α-elica		
:ARG+_245	Turn			:LYS+_280	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ALA_315	α-elica	α-elica	α-elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:VAL_316	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_351	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_386	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_317	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_352	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_387	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_318	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_353	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_388	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_319	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_354	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_389	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_320	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_355	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_390	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_321	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_356	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_391	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_322	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_357	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_392	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU_323	$\alpha$ -elica			:ARG+_358	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_393	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASN_324	$\alpha$ -elica			:ASP_359	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_394	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_325	$\alpha$ -elica			:SER_360	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_395	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_326	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_361	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:CYSH_396	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_327	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_362	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_397	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_328	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_363	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_398	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_329	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_364	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_399	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+_330	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_365	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_400	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_331	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_366	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_401	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_332	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_367	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_402	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_333	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_368	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_403	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:HIS_334	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_369	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_404	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_335	$\alpha$ -elica	Turn	Turn	:ARG+_370	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_405	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU_336	$\alpha$ -elica			:SER_371			foglietto $\beta$	:ARG+_406	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_337	$\alpha$ -elica			:SER_372			foglietto $\beta$	:CYSH_407	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_338	$\alpha$ -elica			:PHE_373			foglietto $\beta$	:SER_408	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:MET_339	$\alpha$ -elica			:LYS+_374				:GLY_409	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_340	$\alpha$ -elica			:ASP_375	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$		:LEU_410	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_341	$\alpha$ -elica			:VAL_376	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	Turn (i+3)	:LEU_411	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+_342	$\alpha$ -elica			:ASP_377		Turn	Turn (i+3)	:GLN_412	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_343	$\alpha$ -elica			:HIS_378		$\alpha$ -elica	Turn (i+3)	:VAL_413	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_344				:LEU_379	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_414	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_345				:PHE_380	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_415	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PRO_346				:GLN_381	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_416	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_347				:LYS+_382	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_417	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU_348				:GLU_383	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_418	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_349				:LEU_384	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_419	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_350	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_385	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_420	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:GLU_421	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_456	$\alpha$ -elica			:VAL_491	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_422	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_457	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_492	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+423	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_458	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+493	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ALA_424	$\alpha$ -elica	Turn		:GLU_459	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_494	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_425	$\alpha$ -elica	Turn		:ILE_460	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+495	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_426				:LEU_461	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_496	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_427				:GLN_462	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_497	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_428			foglietto $\beta$	:THR_463	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_498	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+429			foglietto $\beta$	:TYR_464	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_499	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PRO_430			foglietto $\beta$	:LEU_465	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_500	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_431				:LYS+466	$\alpha$ -elica		$\alpha$ -elica	:ALA_501	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_432	$\alpha$ -elica			:SER_467	$\alpha$ -elica		$\alpha$ -elica	:SER_502	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_433	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+468	$\alpha$ -elica			:ALA_503	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ARG+434	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_469	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+504	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_435	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_470	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_505	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PHE_436	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_471	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_506	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_437	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_472	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_507	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_438	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_473	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_508	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+439	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_474	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_509	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_440	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_475	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_510	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_441	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_476	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+511	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASP_442	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_477	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+512	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_443	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_478	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_513	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+444	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_479	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_514	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+445	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_480				:GLN_515	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+446	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_481				:MET_516	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_447	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_482				:MET_517	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_448	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_483	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_518	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU_449	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_484	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_519	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU_450	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+485	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+520	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PRO_451				:GLU_486	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_521	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ARG+452				:LYS+487	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+522	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LYS+453				:GLU_488	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_523	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_454				:ILE_489	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:TYR_524	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_455	Turn			:GLU_490	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_525	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:GLU_526	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_561	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:HIS_527	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_562	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LEU_528	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_563	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LYS+_529	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_564	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLN_530	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_565							
:LEU_531	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_566	Turn						
:THR_532	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_567	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLU_533	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_568	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LYS+_534	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_569	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:MET_535	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_570	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLU_536	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_571	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ASN_537	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_572	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ASP_538	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_573	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ARG+_539	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_574	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:VAL_540	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_575	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLN_541	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_576	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LEU_542	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_577	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LEU_543	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_578	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LYS+_544	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_579	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLU_545	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_580	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLN_546	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_581	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:GLU_547	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_582	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ARG+_548	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_583	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:THR_549	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_584	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LEU_550	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_585	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ALA_551	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_586							
:LEU_552	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_587							
:LYS+_553	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_588							
:LEU_554	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:CYSH_589	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLN_555	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_590	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLU_556	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_591	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLN_557	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_592							
:GLU_558	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:GLN_559	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:LEU_560	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								

<sup>a</sup>Sono evidenziati gli aa del *P-loop* (in giallo); *switch I* (in magenta); *switch II* (in verde) e regione di connessione (in arancione).

**Tabella 17.** Parametri strutturali della proteina PIM1 nel complesso trimerico iniziale (punto di partenza), ottenuto dal *docking* e dopo il *simulated annealing* (SA).

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:METN_1				:SER_36	foglietto $\beta$		foglietto $\beta$	:GLY_71			
:PRO_2				:ASP_37				:SER_72			
:HIS_3				:SER_38				:GLY_73			
:GLU_4				:PRO_39				:SER_74			
:PRO_5				:SER_40	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_75			
:HIS_6				:ALA_41	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_76			
:GLU_7				:PHE_42	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_77			
:PRO_8				:ARG+_43	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_78			
:LEU_9				:ALA_44	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_79			
:THR_10				:SER_45	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_80	foglietto $\beta$		
:PRO_11				:ARG+_46	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_81	foglietto $\beta$		
:PRO_12				:SER_47	foglietto $\beta$			:ARG+_82	foglietto $\beta$		
:PHE_13				:HIS_48	foglietto $\beta$			:PRO_83			
:SER_14	Turn			:SER_49				:CYSH_84		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_15	Turn			:ARG+_50	foglietto $\beta$			:ALA_85		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_16				:ASN_51	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_86		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PRO_17				:ALA_52	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_87			
:ASP_18				:THR_53	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_88			
:PRO_19				:ARG+_54	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU_89			
:ALA_20				:SER_55	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_90			
:GLY_21				:HIS_56	foglietto $\beta$			:GLY_91			
:ALA_22				:SER_57				:MET_92			
:PRO_23				:HIS_58	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_93		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_24	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_59	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_94		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_25	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_60	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_95		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_26	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_61	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_96			
:GLN_27	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_62				:ILE_97		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_28	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_63	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_98		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_29	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_64	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_99			
:GLN_30		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_65	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_100	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_31		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_66	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_101	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PRO_32				:ARG+_67	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_102	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_33	foglietto $\beta$			:HIS_68	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_103	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_34	foglietto $\beta$			:SER_69	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_104	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_35	foglietto $\beta$		foglietto $\beta$	:PRO_70	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_105			

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:ALA_106				:GLY_141				:ARG+_176	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_107		foglietto β	foglietto β	:SER_142	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_177	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:CYSH_108		foglietto β	foglietto β	:VAL_143	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PRO_178	α-elica	α-elica	α-elica
:ASN_109		foglietto β	foglietto β	:TYR_144	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:MET_179	α-elica	α-elica	α-elica
:ASP_110	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_145	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLU-_180	α-elica	α-elica	α-elica
:LEU_111	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_146	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_181	α-elica	α-elica	α-elica
:HIS_112	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_147	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_182	α-elica	α-elica	α-elica
:ALA_113	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ARG+_148	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:LEU_183	α-elica	α-elica	α-elica
:THR_114	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_149	Turn	foglietto β	foglietto β	:LEU_184	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_115	Turn			:SER_150	Turn			:LYS+_185	α-elica	α-elica	α-elica
:LEU_116	Turn			:ASP_151	Turn			:LYS+_186	α-elica	α-elica	α-elica
:ALA_117			foglietto β	:ASN_152				:VAL_187	α-elica	foglietto β	foglietto β
:PRO_118	foglietto β		foglietto β	:LEU_153	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_188		foglietto β	foglietto β
:GLY_119	foglietto β		foglietto β	:PRO_154	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_189		foglietto β	foglietto β
:LYS+_120			foglietto β	:VAL_155	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_190			
:GLU-_121				:ALA_156	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PHE_191			
:LYS+_122				:ILE_157	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_192			
:GLU-_123				:LYS+_158	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_193			
:PRO_124				:HIS_159	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_194			
:LEU_125				:VAL_160	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_195	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLU-_126				:GLU-_161		foglietto β	foglietto β	:ARG+_196	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:SER_127				:LYS+_162	Turn			:LEU_197	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLN_128				:ASP_163	Turn			:LEU_198			
:TYR_129	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ARG+_164				:ASP_199	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLN_130	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_165				:TRP_200	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:VAL_131	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_166				:PHE_201	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLY_132	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ASP_167			foglietto β	:GLU-_202	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_133				:TRP_168	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ARG+_203	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:LEU_134				:GLY_169	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PRO_204			
:LEU_135				:GLU-_170	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ASP_205			
:GLY_136				:LEU_171		foglietto β	foglietto β	:SER_206	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:SER_137				:PRO_172				:PHE_207	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLY_138				:ASN_173				:VAL_208	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLY_139	Turn			:GLY_174				:LEU_209	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PHE_140	Turn			:THR_175	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ILE_210	foglietto β	foglietto β	foglietto β

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:LEU_211	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_246	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_281			foglietto β
:GLU_212	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ARG+_247	α-elica	α-elica	α-elica	:ALA_282	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:ARG+_213	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:HIS_248	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_283	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_214	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:CYSH_249	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_284	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:GLU_215			foglietto β	:HIS_250	α-elica			LYS+_285	foglietto β	foglietto β	foglietto β
:PRO_216	foglietto β	foglietto β		:ASN_251	α-elica			:ASP_286	foglietto β		foglietto β
:VAL_217	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:CYSH_252	α-elica			:THR_287			
:GLN_218	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_253			foglietto β	:VAL_288		foglietto β	foglietto β
:ASP_219	foglietto β	foglietto β		:VAL_254	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:TYR_289		foglietto β	foglietto β
:LEU_220	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_255	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:THR_290		foglietto β	foglietto β
:PHE_221	α-elica	α-elica	α-elica	:HIS_256				:ASP_291		foglietto β	foglietto β
:ASP_222	α-elica	α-elica	α-elica	:ARG+_257				:PHE_292		foglietto β	foglietto β
:PHE_223	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP_258		foglietto β	foglietto β	:ASP_293		foglietto β	foglietto β
:ILE_224	α-elica	α-elica	α-elica	:ILE_259		foglietto β	foglietto β	:GLY_294			
:THR_225	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_260		foglietto β	foglietto β	THR_295			
:GLU_226	α-elica			:ASP_261		foglietto β	foglietto β	ARG+_296			
:ARG+_227	α-elica			:GLU_262				:VAL_297			
:GLY_228				:ASN_263		foglietto β	foglietto β	:TYR_298		foglietto β	foglietto β
:ALA_229				:ILE_264	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_299		foglietto β	foglietto β
:LEU_230				:LEU_265	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PRO_300		foglietto β	foglietto β
:GLN_231				:ILE_266	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PRO_301	α-elica		
:GLU_232	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP_267	foglietto β	foglietto β	foglietto β	GLU_302	α-elica		
:GLU_233	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_268				:TRP_303	α-elica		
:LEU_234	α-elica	α-elica	α-elica	:ASN_269				:ILE_304	α-elica		
:ALA_235	α-elica	α-elica	α-elica	:ARG+_270				ARG+_305	Turn		
:ARG+_236	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_271				:TYR_306	Turn		
:SER_237	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU_272		foglietto β	foglietto β	:HIS_307			
:PHE_238	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_273		foglietto β	foglietto β	ARG+_308		foglietto β	foglietto β
:PHE_239	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_274	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:TYR_309		foglietto β	foglietto β
:TRP_240	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_275	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:HIS_310	α-elica	foglietto β	foglietto β
:GLN_241	α-elica	α-elica	α-elica	:ILE_276	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_311	α-elica	foglietto β	foglietto β
:VAL_242	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP_277		foglietto β	foglietto β	ARG+_312	α-elica		
:LEU_243	α-elica	α-elica	α-elica	:PHE_278		foglietto β	foglietto β	:SER_313	α-elica		
:GLU_244	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_279				:ALA_314	α-elica		
:ALA_245	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_280				:ALA_315	α-elica		

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:VAL_316	$\alpha$ -elica			:SER_351				:LEU_386		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:TRP_317	$\alpha$ -elica			:SER_352	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_387	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_318	$\alpha$ -elica			:GLU-_353	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_388	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_319	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:CYSH_354	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_389	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_320	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_355	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_390	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_321	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_356	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_391	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	Turn
:LEU_322	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_357	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_392	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	Turn
:LEU_323	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_358	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_393	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_324	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_359	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_394	Turn		$\alpha$ -elica
:ASP-_325	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:TRP_360	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_395	Turn		$\alpha$ -elica
:MET_326	elica $3_{10}$	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:CYSH_361	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_396		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:VAL_327	elica $3_{10}$	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_362	$\alpha$ -elica			:SER_397		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:CYSH_328	elica $3_{10}$	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_363				:LEU_398			
:GLY_329			Turn	:LEU_364				:SER_399		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_330			Turn	:ARG+_365				:PRO_400		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ILE_331			Turn	:PRO_366	Turn			:GLY_401			
:PRO_332				:SER_367	Turn			:PRO_402			
:PHE_333				:ASP-_368	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_403			
:GLU-_334				:ARG+_369		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_404			
:HIS_335	$\alpha$ -elica			:PRO_370		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:ASP-_336	$\alpha$ -elica			:THR_371	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLU-_337	$\alpha$ -elica			:PHE_372	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLU-_338	$\alpha$ -elica			:GLU-_373	$\alpha$ -elica						
:ILE_339	$\alpha$ -elica			:GLU-_374	$\alpha$ -elica						
:ILE_340	$\alpha$ -elica			:ILE_375	elica $3_{10}$						
:ARG+_341	$\alpha$ -elica			:GLN_376	elica $3_{10}$						
:GLY_342	$\alpha$ -elica			:ASN_377	elica $3_{10}$						
:GLN_343	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_378							
:VAL_344	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_379	Turn						
:PHE_345	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TRP_380	Turn						
:PHE_346	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:MET_381	Turn						
:ARG+_347				:GLN_382							
:GLN_348				:ASP-_383							
:ARG+_349				:VAL_384		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:VAL_350				:LEU_385		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				

<sup>a</sup>Sono evidenziati gli aa del G-loop (in giallo); la regione di connessione (in celeste); il C-loop (in magenta); e l'A-loop (in verde).



**Tabella 18.** Parametri strutturali del dimero di tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III nel complesso trimetrico iniziale (punto di partenza), ottenuto dal *docking* e dopo il *simulated annealing* (SA).

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:METN_1				:TYR_36		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_71	elica 3 <sub>10</sub>		
:ARG+_2				:VAL_37		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_72	elica 3 <sub>10</sub>		
:GLU-_3	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_38				:MET_73	elica 3 <sub>10</sub>		
:ILE_4	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP-_39				:ASP-_74	elica 3 <sub>10</sub>		
:VAL_5	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_40		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_75	elica 3 <sub>10</sub>		
:HIS_6	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_41		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_76	elica 3 <sub>10</sub>		
:ILE_7	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_42	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_77	$\alpha$ -elica		
:GLN_8	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_43	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_78	$\alpha$ -elica		
:ALA_9	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_44	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_79	elica 3 <sub>10</sub>		
:GLY_10	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_45	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_80			
:GLN_11	$\alpha$ -elica			:ARG+_46	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_81	elica 3 <sub>10</sub>		
:CYSH_12	$\alpha$ -elica			:ILE_47				:GLY_82	elica 3 <sub>10</sub>		
:GLY_13	$\alpha$ -elica			:ASN_48				:GLN_83	elica 3 <sub>10</sub>		
:ASN_14	$\alpha$ -elica			:VAL_49				:LEU_84	elica 3 <sub>10</sub>	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_15	$\alpha$ -elica			:TYR_50				:PHE_85		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ILE_16	$\alpha$ -elica			:TYR_51	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_86		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_17	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_52	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_87	elica 3 <sub>10</sub>		
:THR_18	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_53	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP-_88	elica 3 <sub>10</sub>		
:LYS+_19	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_54				:ASN_89	elica 3 <sub>10</sub>		
:PHE_20	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_55				:PHE_90	elica 3 <sub>10</sub>	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:TRP_21	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_56				:ILE_91	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU-_22	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_57				:PHE_92	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:VAL_23	$\alpha$ -elica			:LYS+_58	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_93	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ILE_24	$\alpha$ -elica			:TYR_59	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_94	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_25	$\alpha$ -elica			:VAL_60	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_95			
:ASP-_26	$\alpha$ -elica			:PRO_61	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_96			
:GLU-_27	$\alpha$ -elica			:ARG+_62		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_97			
:HIS_28	$\alpha$ -elica			:ALA_63	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_98			
:GLY_29				:ALA_64	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_99			
:ILE_30		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_65	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_100	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	
:ASP-_31		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_66	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TRP_101	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	
:PRO_32				:ASP-_67	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_102	$\alpha$ -elica		
:ALA_33				:LEU_68				:LYS+_103	$\alpha$ -elica		
:GLY_34				:GLU-_69				:GLY_104	$\alpha$ -elica		
:GLY_35				:PRO_70	Turn			:HIS_105	$\alpha$ -elica		

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:TYR_106	$\alpha$ -elica			:GLY_141				:SER_176		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:THR_107				:GLY_142				:ASP_-177		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU-_108				:THR_143	Turn			:THR_178		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_109				:GLY_144	Turn			:VAL_179			
:ALA_110				:SER_145	$\alpha$ -elica			:VAL_180			
:GLU-_111				:GLY_146	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_181	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:LEU_112				:MET_147	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_182	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:VAL_113	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_148	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:TYR_183	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:ASP_-114	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_149	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_184	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:ALA_115	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_150	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_185	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:VAL_116	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_151	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_186	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:LEU_117	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_152	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_187	$\alpha$ -elica		elica $\pi$
:ASP_-118	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_153	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_188	$\alpha$ -elica		
:VAL_119	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_154	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_189	$\alpha$ -elica		
:VAL_120	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_155	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_190	$\alpha$ -elica		
:ARG+_121	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_156	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_191	$\alpha$ -elica		
:LYS+_122	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_157	$\alpha$ -elica			:LEU_192	$\alpha$ -elica		
:GLU-_123	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_158	$\alpha$ -elica			:VAL_193	$\alpha$ -elica		
:CYSH_124	Turn			:PHE_159	$\alpha$ -elica			:GLU-_194	Turn		
:GLU-_125	Turn			:PRO_160	Turn			:ASN_195	Turn		
:HIS_126	Turn			:ASP_-161	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_196			foglietto $\beta$
:CYSH_127				:ARG+_162	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_-197		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP_-128				:ILE_163	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_198	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:CYSH_129		foglietto $\beta$		:MET_164	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_199	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_130	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$		:ASN_165	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TYR_200	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_131	foglietto $\beta$			:THR_166	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_201	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_132	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PHE_167	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_202	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PHE_133	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_168	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_-203	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_134	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_169	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_204	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_135	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:MET_170	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_205	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_136	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_171			foglietto $\beta$	:ALA_206	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:HIS_137	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_172			foglietto $\beta$	:LEU_207	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_138	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_173			foglietto $\beta$	:TYR_208	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_139		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_174			foglietto $\beta$	:ASP_-209	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_140				:VAL_175			foglietto $\beta$	:ILE_210	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:CYSH_211	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_246	Turn		foglietto $\beta$	:TYR_281			Turn
:PHE_212	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_247			foglietto $\beta$	:ARG+_282			Turn
:ARG+_213	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_248			foglietto $\beta$	:ALA_283		foglietto $\beta$	Turn
:THR_214	$\alpha$ -elica	Turn	$\alpha$ -elica	:ASP_-249	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica		:LEU_284		foglietto $\beta$	
:LEU_215		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_250	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_285		foglietto $\beta$	
:LYS+_216		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_251	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_286	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_217		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_252	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_287	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_218				:LEU_253	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_-288	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_219		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_254	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_289	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PRO_220		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_255	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_290	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_221	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_256	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_291	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_222	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:MET_257	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_292	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_223	$\alpha$ -elica			:VAL_258	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_293			
:ASP_-224	$\alpha$ -elica			:PRO_259				:PHE_294			
:LEU_225	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_260			foglietto $\beta$	:ASP_-295		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_226	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_261			foglietto $\beta$	:ALA_296		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:HIS_227	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_262			foglietto $\beta$	:ARG+_297		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_228	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_263				:ASN_298			
:VAL_229	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_264			foglietto $\beta$	:MET_299		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_230	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_265	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:MET_300		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_231	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_266	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_301		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:THR_232	$\alpha$ -elica			:MET_267	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_302			
:MET_233	$\alpha$ -elica			:PRO_268	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_303			
:SER_234	$\alpha$ -elica			:GLY_269	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_-304			
:GLY_235	$\alpha$ -elica			:PHE_270	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_305	Turn		
:VAL_236	$\alpha$ -elica			:ALA_271				:ARG+_306	Turn		
:THR_237	$\alpha$ -elica			:PRO_272		foglietto $\beta$		:HIS_307	Turn		
:THR_238	$\alpha$ -elica			:LEU_273		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_308			
:SER_239	$\alpha$ -elica			:THR_274		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_309			
:LEU_240	$\alpha$ -elica			:SER_275		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TYR_310	foglietto $\beta$		
:ARG+_241	$\alpha$ -elica			:ARG+_276	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_311	foglietto $\beta$		
:PHE_242				:GLY_277	Turn			:THR_312	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PRO_243				:SER_278				:VAL_313	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_244				:GLN_279		foglietto $\beta$		:ALA_314	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLN_245	Turn			:GLN_280		foglietto $\beta$		:THR_315	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:VAL_316	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_351	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:SER_386	α-elica	α-elica	α-elica
:PHE_317	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ALA_352	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ALA_387	α-elica	α-elica	α-elica
:ARG+_318	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:VAL_353	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:MET_388	α-elica	α-elica	α-elica
:GLY_319				:CYSH_354	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PHE_389	α-elica	α-elica	α-elica
:PRO_320				:ASP_355		foglietto β	foglietto β	:ARG+_390	α-elica	α-elica	α-elica
:MET_321				:ILE_356		foglietto β	foglietto β	:ARG+_391	Turn	α-elica	α-elica
:SER_322	α-elica			:PRO_357		foglietto β	foglietto β	:LYS+_392			
:MET_323	α-elica	α-elica	α-elica	:PRO_358	Turn	foglietto β		:ALA_393			
:LYS+_324	α-elica	α-elica	α-elica	:ARG+_359	Turn			:PHE_394			
:GLU-_325	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_360				:LEU_395	α-elica		
:VAL_326	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_361				:HIS_396	α-elica		
:ASP_327	α-elica	α-elica	α-elica	:LYS+_362				:TRP_397	α-elica		
:GLU-_328	α-elica	α-elica	α-elica	:MET_363	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PHE_398	α-elica		
:GLN_329	α-elica	α-elica	α-elica	:ALA_364	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:THR_399	α-elica		
:MET_330	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_365	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_400	α-elica		
:LEU_331	α-elica	α-elica	α-elica	:THR_366	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLU-_401	α-elica		
:ALA_332	α-elica	α-elica	α-elica	:PHE_367	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLY_402	Turn		
:ILE_333	α-elica	α-elica	α-elica	:ILE_368	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:MET_403			
:GLN_334	α-elica	α-elica	α-elica	:GLY_369	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:ASP_404			
:SER_335	α-elica	α-elica	α-elica	:ASN_370	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:GLU-_405	Turn		
:LYS+_336	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_371	Turn	foglietto β	foglietto β	:MET_406	elica 3 <sub>10</sub>		
:ASN_337	α-elica			:THR_372	Turn	foglietto β	foglietto β	:GLU-_407	elica 3 <sub>10</sub>		
:SER_338	Turn			:ALA_373	Turn		foglietto β	:PHE_408	elica 3 <sub>10</sub>		
:SER_339	Turn			:ILE_374	α-elica	α-elica	α-elica	:THR_409	elica 3 <sub>10</sub>		
:TYR_340	Turn		foglietto β	:GLN_375	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU-_410	α-elica	α-elica	α-elica
:PHE_341			foglietto β	:GLU-_376	α-elica	α-elica	α-elica	:ALA_411	α-elica	α-elica	α-elica
:VAL_342			foglietto β	:LEU_377	α-elica	α-elica	α-elica	:GLU-_412	α-elica	α-elica	α-elica
:GLU-_343	Turn			:PHE_378	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_413	α-elica	α-elica	α-elica
:TRP_344	Turn			:LYS+_379	α-elica	α-elica	α-elica	:ASN_414	α-elica	α-elica	α-elica
:ILE_345				:ARG+_380	α-elica	α-elica	α-elica	:MET_415	α-elica	α-elica	α-elica
:PRO_346				:ILE_381	α-elica	α-elica	α-elica	:ASN_416	α-elica	α-elica	α-elica
:ASN_347				:SER_382	α-elica	α-elica	α-elica	:ASP_417	α-elica	α-elica	α-elica
:ASN_348				:GLU-_383	α-elica	α-elica	α-elica	:LEU_418	α-elica	α-elica	α-elica
:VAL_349		foglietto β	foglietto β	:GLN_384	α-elica	α-elica	α-elica	:VAL_419	α-elica	α-elica	α-elica
:LYS+_350	foglietto β	foglietto β	foglietto β	:PHE_385	α-elica	α-elica	α-elica	:SER_420	α-elica	α-elica	α-elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:GLU_421	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_456				:GLY_491			
:TYR_422	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLN_457	$\alpha$ -elica			:ASP_492			
:GLN_423	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_458	$\alpha$ -elica	Turn	$\alpha$ -elica	:ASP_493			
:GLN_424	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_459	$\alpha$ -elica	Turn	$\alpha$ -elica	:SER_494			
:TYR_425				:VAL_460	$\alpha$ -elica	Turn	$\alpha$ -elica	:PHE_495			
:GLN_426				:GLN_461	$\alpha$ -elica		$\alpha$ -elica	:ASN_496			
:ASP_428	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_462	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_497			
:ALA_429	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_463	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_498	foglietto $\beta$		
:THR_430	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASN_464	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_499	foglietto $\beta$		
:ALA_431	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_465	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_500	foglietto $\beta$		
:ASN_432	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_466	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_501			
:ASP_433		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TRP_467	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_502			
:GLY_434			foglietto $\beta$	:GLU_468	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_503			
:GLU_435		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_469	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_504			
:GLU_436		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TYR_470	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_505			
:ALA_437		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_471	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_506			Turn
:PHE_438		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_472	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_507			Turn
:GLU_439	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU_473	$\alpha$ -elica			:VAL_508			Turn
:ASP_440	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_474	$\alpha$ -elica			:PRO_509			
:GLU_441	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_475				:ARG+_510			
:GLU_442	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_476				:ALA_511	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU_443	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_477				:VAL_512	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU_443	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_478				:PHE_513	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ILE_444	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_479				:VAL_514	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP_445				:GLY_480				:ASP_515	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_446				:GLN_481				:LEU_516			
:METN_447				:MET_482				:GLU_517			
:ARG+_448				:PRO_483				:PRO_518			
:GLU_449	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_484				:THR_519			
:CYSH_450	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_485				:VAL_520	$\alpha$ -elica		
:ILE_451	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_486				:ILE_521	$\alpha$ -elica		
:SER_452	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_487				:ASP_522	$\alpha$ -elica		
:ILE_453	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_488				:GLU_523	$\alpha$ -elica		
:HIS_454	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_489				:VAL_524	$\alpha$ -elica		
:VAL_455	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_490				:ARG+_525	$\alpha$ -elica		

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:THR_526	Turn			:ILE_561	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:THR_596	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_527	Turn			:ASP_562	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_597	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:THR_528	Turn			:LEU_563	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_598	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_529	Turn			:VAL_564	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_599	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ARG+_530	Turn			:LEU_565	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:MET_600	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_531	Turn			:ASP_566	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_601	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_532				:ARG+_567	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_602	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PHE_533				:ILE_568	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_603	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:HIS_534				:ARG+_569	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_604	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:PRO_535	Turn			:LYS+_570	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_605	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLU-_536	Turn			:LEU_571	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP-_606	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLN_537		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_572	$\alpha$ -elica			:TYR_607	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_538	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ASP_573	$\alpha$ -elica			:GLY_608			
:ILE_539	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_574	$\alpha$ -elica			:LYS+_609			foglietto $\beta$
:THR_540	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:CYSH_575	$\alpha$ -elica			:LYS+_610			foglietto $\beta$
:GLY_541		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_576	Turn			:SER_611			foglietto $\beta$
:LYS+_542				:GLY_577				:LYS+_612	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU-_543				:LEU_578	foglietto $\beta$			:LEU_613	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_544				:GLN_579	foglietto $\beta$			:GLU-_614	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_545				:GLY_580	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$		:PHE_615	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_546				:PHE_581	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_616	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_547				:LEU_582	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_617	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_548				:VAL_583	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TYR_618	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:TYR_549	$\alpha$ -elica			:PHE_584	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_619		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_550	$\alpha$ -elica			:HIS_585	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_620		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_551	$\alpha$ -elica			:SER_586	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PRO_621			
:GLY_552	$\alpha$ -elica		Turn	:PHE_587	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_622			
:HIS_553	$\alpha$ -elica		Turn	:GLY_588	Turn			:VAL_623			
:TYR_554	elica $\pi$		Turn	:GLY_589				:SER_624			
:THR_555	elica $\pi$		Turn	:GLY_590				:THR_625			
:ILE_556	elica $\pi$			:THR_591	$\alpha$ -elica			:ALA_626			
:GLY_557	elica 3 <sub>10</sub>			:GLY_592	$\alpha$ -elica			:VAL_627			
:LYS+_558	elica 3 <sub>10</sub>		$\alpha$ -elica	:SER_593	$\alpha$ -elica			:VAL_628			
:GLU-_559	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_594	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU-_629	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	
:ILE_560	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_595	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_630	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	Turn

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:TYR_631	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	Turn	:GLU-_666				:PHE_701	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASN_632	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	Turn	:ARG+_667				:GLN_702	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:SER_633	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica		:PRO_668				:THR_703	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:ILE_634	$\alpha$ -elica			:THR_669				:ASN_704	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	elica $\pi$
:LEU_635	$\alpha$ -elica			:TYR_670	$\alpha$ -elica			:LEU_705	$\alpha$ -elica		elica $\pi$
:THR_636	$\alpha$ -elica			:THR_671	$\alpha$ -elica			:VAL_706			
:THR_637	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_672	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_707			
:HIS_638	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_673	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:TYR_708			foglietto $\beta$
:THR_639	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_674	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_709			foglietto $\beta$
:THR_640	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_675	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_710		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LEU_641	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_676	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ILE_711		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU-_642	Turn			:ILE_677	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:HIS_712		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:HIS_643	Turn			:SER_678	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_713		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:SER_644				:GLN_679	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_714		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_645				:ILE_680	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_715	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:CYSH_646	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_681	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_716	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_647	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_682	$\alpha$ -elica			:THR_717	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PHE_648	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_683	$\alpha$ -elica			:TYR_718	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:MET_649	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_684	$\alpha$ -elica			:ALA_719			
:VAL_650	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_685	$\alpha$ -elica			:PRO_720			foglietto $\beta$
:ASP-_651	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_686	$\pi$ -elica			:VAL_721		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_652	$\alpha$ -elica	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:SER_687	$\pi$ -elica			:ILE_722		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLU-_653	$\alpha$ -elica			:LEU_688	$\pi$ -elica			:SER_723		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_654	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ARG+_689	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_724	Turn	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ILE_655	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PHE_690		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_725	Turn		
:TYR_656	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP-_691		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_726			
:ASP-_657	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_692				:ALA_727		foglietto $\beta$	
:ILE_658	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_693				:TYR_728		foglietto $\beta$	
:CYSH_659	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_694		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:HIS_729			Turn
:ARG+_660	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_695		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_730			Turn
:ARG+_661	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_696		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLN_731			Turn
:ASN_662	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP-_697		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_732			
:LEU_663		Turn	elica $\pi$	:LEU_698	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:SER_733			
:ASP-_664			elica $\pi$	:THR_699	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_734	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ILE_665				:GLU-_700	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_735	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica

Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:GLU-_736	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_771	$\alpha$ -elica			:PRO_806			foglietto $\beta$
:ILE_737	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_772	elica 3 <sub>10</sub>			:THR_807		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:THR_738	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP-_773	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_808		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASN_739	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_774	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_809		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_740	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASN_775	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:PRO_810			
:CYSH_741	elica 3 <sub>10</sub>			:ALA_776	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_811			
:PHE_742				:ALA_777	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLY_812			
:GLU-_743				:ILE_778	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP-_813			foglietto $\beta$
:PRO_744	Turn			:ALA_779	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LEU_814			foglietto $\beta$
:ALA_745	Turn			:THR_780	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ALA_815			foglietto $\beta$
:ASN_746	Turn			:ILE_781	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	elica $\pi$	:LYS+_816			foglietto $\beta$
:GLN_747				:LYS+_782	$\alpha$ -elica	elica $\pi$	elica $\pi$	:VAL_817			foglietto $\beta$
:MET_748				:THR_783	$\alpha$ -elica			:GLN_818			
:VAL_749			foglietto $\beta$	:LYS+_784	Turn			:ARG+_819	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LYS+_750			foglietto $\beta$	:ARG+_785				:ALA_820	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:CYSH_751			foglietto $\beta$	:SER_786	Turn			:VAL_821	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ASP-_752			foglietto $\beta$	:ILE_787	Turn			:CYSH_822	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:PRO_753			foglietto $\beta$	:GLN_788	Turn			:MET_823	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ARG+_754				:PHE_789				:LEU_824	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:HIS_755			foglietto $\beta$	:VAL_790				:SER_825	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:GLY_756			foglietto $\beta$	:ASP-_791				:ASN_826	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:LYS+_757			foglietto $\beta$	:TRP_792				:THR_827	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:TYR_758			foglietto $\beta$	:CYSH_793				:THR_828	elica 3 <sub>10</sub>	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:MET_759				:PRO_794	Turn			:ALA_829	elica 3 <sub>10</sub>	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$
:ALA_760	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:THR_795	Turn	foglietto $\beta$		:ILE_830	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:CYSH_761	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_796	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$		:ALA_831	elica 3 <sub>10</sub>	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:CYSH_762	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:PHE_797	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU-_832	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_763	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LYS+_798	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_833	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:LEU_764	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:VAL_799	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:TRP_834	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:TYR_765	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_800	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ALA_835	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ARG+_766	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ILE_801	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:ARG+_836	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:GLY_767	foglietto $\beta$			:ASN_802	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:LEU_837	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:ASP-_768				:TYR_803				:ASP-_838	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_769				:GLN_804			foglietto $\beta$	:HIS_839	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica
:VAL_770				:PRO_805			foglietto $\beta$	:LYS+_840	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica



Sequenza <sup>a</sup>	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA	Sequenza	Punto di partenza	Docking	SA
:PHE_841	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:LYS+_876	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ASP_842	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:ASP_-877	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:LEU_843	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:TYR_878	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:MET_844	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_-879	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:TYR_845	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:GLU_-880	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica				
:ALA_846	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	:VAL_881		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:LYS+_847		$\alpha$ -elica	Turn	:GLY_882		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:ARG+_848			Turn	:VAL_883		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:ALA_849			Turn	:ASP_-884		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:PHE_850	$\alpha$ -elica		Turn	:SER_885							
:VAL_851	$\alpha$ -elica			:VAL_886							
:HIS_852	$\alpha$ -elica			:GLU_-887			foglietto $\beta$				
:TRP_853	$\alpha$ -elica			:GLY_888			foglietto $\beta$				
:TYR_854	$\alpha$ -elica			:GLU_-889			foglietto $\beta$				
:VAL_855	$\alpha$ -elica			:GLY_890			foglietto $\beta$				
:GLY_856	$\alpha$ -elica			:GLU_-891		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLU_-857	$\alpha$ -elica			:GLU_-892		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLY_858	Turn			:GLU_-893		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:MET_859		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLY_894			foglietto $\beta$				
:GLU_-860		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU_-896		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLU_-861		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$	:GLU_-896		foglietto $\beta$	foglietto $\beta$				
:GLY_862				:TYR-897							
:GLU_-863		foglietto $\beta$									
:PHE_864	Turn	foglietto $\beta$									
:SER_865	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:GLU_-866	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:ALA_867	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:ARG+_868	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:GLU_-869	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:ASP_-870	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:MET_871	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:ALA_872	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:ALA_873	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:LEU_874	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								
:GLU_-875	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica	$\alpha$ -elica								

<sup>a</sup> Sono evidenziati in giallo gli aa appartenenti all' $\alpha$ I-tubulina.

---

In particolare, per quanto riguarda la proteina GBP1 i maggiori cambiamenti conformazionali hanno riguardato sia il sito catalitico che il dominio ad elica (Tabella 16). Infatti, il modello ottenuto ha evidenziato i seguenti cambiamenti conformazionali:

- la regione aa57 – aa74 (*Switch I*) per effetto dell'interazione con la  $\beta$ III-tubulina in parte rimane destrutturata ed in parte si struttura a foglietto  $\beta$ ;
- la regione aa167 – aa174 si destruttura per effetto dell'interazione del loop (aa157 – aa166) con la protein-chinasi PIM1; tale loop, inoltre, contiene un motivo di riconoscimento del dominio WW\_4;
- la regione aa185 – aa188 si struttura a foglietto  $\beta$  per effetto dell'interazione del loop (aa190 – aa193) con la  $\beta$ III-tubulina;
- la regione aa206 – aa213 si struttura a foglietto  $\beta$ ; non è coinvolta in alcuna interazione ma è molto importante durante la fase di oligomerizzazione della proteina;
- la regione aa323 – aa325 si destruttura per effetto dell'interazione con PIM1;

Per quanto riguarda la proteina PIM1 i maggiori cambiamenti conformazionali hanno riguardato principalmente sia il sito catalitico (C-loop; tabella 2: magenta) che il sito di attivazione (A-loop; tabella 2: verde) atti a mantenere l'attività e la stabilità della proteina (Figura 17). I cambiamenti conformazionali risultanti sono i seguenti:

- le regioni aa84 – aa86 e aa93 – aa98 si strutturano a foglietti  $\beta$ ;
- la regione aa250 – aa252 appartenente al C-loop si destruttura da  $\alpha$ -elica;
- la regione aa258 – aa261 si struttura a foglietto  $\beta$ ;
- la regione aa288 – aa293 appartenente al A-loop si struttura a foglietto  $\beta$ ; inoltre tale regione contiene il motivo di riconoscimento del dominio SH2 STAT5;
- la regione aa298 – aa306 appartenente all'A-loop si struttura a foglietto  $\beta$  fino all'amminoacido 300 poi si destruttura completamente; tale regione contiene un motivo di riconoscimento del dominio 14-3-3\_3, del dominio WW\_4 e del dominio PDZ\_3;
- la regione aa308 – aa318 appartenente all'A-loop si struttura a foglietto  $\beta$  fino all'amminoacido 311 per poi destrutturarsi;
- la regione aa335 – aa342 ad  $\alpha$ -elica si destruttura;
- la regione aa368 – aa372 si struttura a foglietto  $\beta$ ;

- 
- la regione aa396 – aa400 si struttura a foglietto  $\beta$  per effetto dell'interazione con il loop (aa157 – aa166) della GBP1; tale regione contiene un motivo di riconoscimento sia del dominio 14-3-3\_3 sia del dominio WW\_4;

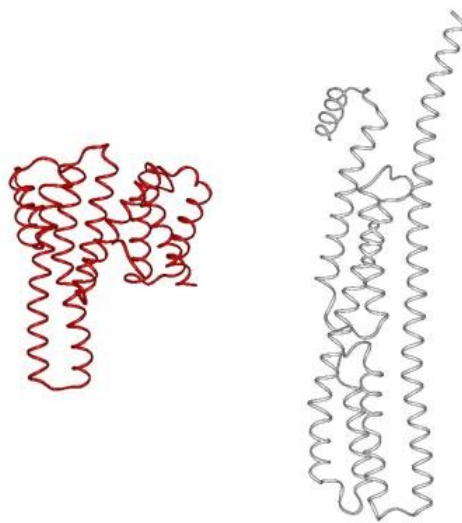
Per quanto riguarda, infine, il dimero  $\alpha$ I/ $\beta$ III della Tubulina i maggiori cambiamenti conformazionali hanno riguardato le tasche ospitanti il GTP o GDP; le zone all'interfaccia tra il monomero  $\alpha$  e  $\beta$  e quelle di interazione con GBP1 (Tabella 18). I cambiamenti conformazionali risultanti sono i seguenti:

- la regione aa11 – aa16 appartenente alla tasca del GTP si destruttura da  $\alpha$ -elica;
- la regione aa23 – aa28 ad  $\alpha$ -elica si destruttura;
- la regione aa70 – aa90 si destruttura e gli aa84 – aa86 si strutturano a foglietti  $\beta$ ;
- la regione aa100 – aa106 ad  $\alpha$ -elica si destruttura;
- la regione aa187 – aa195 ad  $\alpha$ -elica si destruttura per effetto dell'interazione con GBP1;
- la regione aa215 – aa220 si struttura a foglietto  $\beta$ ;
- la regione aa232 – aa241 ad  $\alpha$ -elica si destruttura;
- le regioni aa273 – aa276, aa283 – aa285 e aa295 – aa301 si strutturano a foglietti  $\beta$ ;
- la regione aa349 – aa357 all'interfaccia tra il monomero  $\alpha$  e  $\beta$  si struttura a foglietto  $\beta$ ;
- le regioni aa395 – aa402 e aa405 – aa409 ad  $\alpha$ -elica si destrutturano per effetto dell'interazione con GBP1;
- la regione aa520 – aa531 ad  $\alpha$ -elica all'interfaccia tra il monomero  $\alpha$  e  $\beta$  si ;
- la regione aa549 – aa558 ad  $\alpha$ -elica appartenente alla tasca del GTP si destruttura;
- la regione aa629 – aa636 ad  $\alpha$ -elica si destruttura;
- la regione aa682 – aa688 ad  $\alpha$ -elica appartenente alla tasca del GTP si destruttura;
- le regioni aa689 – aa697, aa710 – aa714 e aa721 – aa724 si strutturano a foglietti  $\beta$ ;
- la regione aa773 – aa781 cambia conformazione ad elica passando da elica 3\_10 ad  $\alpha$ -elica;
- la regione aa807 – aa809 si struttura a foglietto  $\beta$ ;
- la regione aa850 – aa858 ad  $\alpha$ -elica si destruttura per effetto dell'interazione con GBP1;
- le regioni aa881 – aa884 e aa891 – aa896 si strutturano a foglietti  $\beta$ .

---

I cambiamenti conformazionali individuati a livello del macrocomplesso fanno ipotizzare che le tre proteine, nel momento in cui si complessano, assumono uno stadio conformazionale non corrispondente a quello attivo dal punto di vista catalitico.

Inoltre, tali studi hanno anche evidenziato che il dominio ad elica di GBP1 (312-592; Tabella 16) potrebbe andare incontro ad un possibile ripiegamento in quanto diverse zone strutturate ad  $\alpha$ -elica, nel momento in cui si forma il complesso trimerico, tendono a strutturarsi come *turn* (335; 376-378 e 424-425) o a destrutturarsi (323-325; 336-343; 466-468) (Tabella 16). Pertanto è possibile ipotizzare un cambiamento conformazionale in GBP1 che tenda a far ripiegare su se stesse le eliche in esame in una conformazione più impacchettata. A conferma di ciò, l'analisi bioinformatica eseguita ha evidenziato su GBP1 un ipotetico dominio 14-3-3<sub>3</sub> in corrispondenza della regione che va dall'amminoacido 292 all'amminoacido 583. In particolare, è stata individuata un'omologia nella successione di struttura secondaria tra il dominio 14-3-3<sub>3</sub> di interazione proteina-proteina e l'analoga struttura secondaria identificata all'interno di GBP1, ma il *folding* risulta essere differente. In particolare, la strutturazione delle nove  $\alpha$ -eliche in GBP1 appare più distesa e meno compatta di quelle caratteristiche del dominio 14-3-3 (Figura 48).



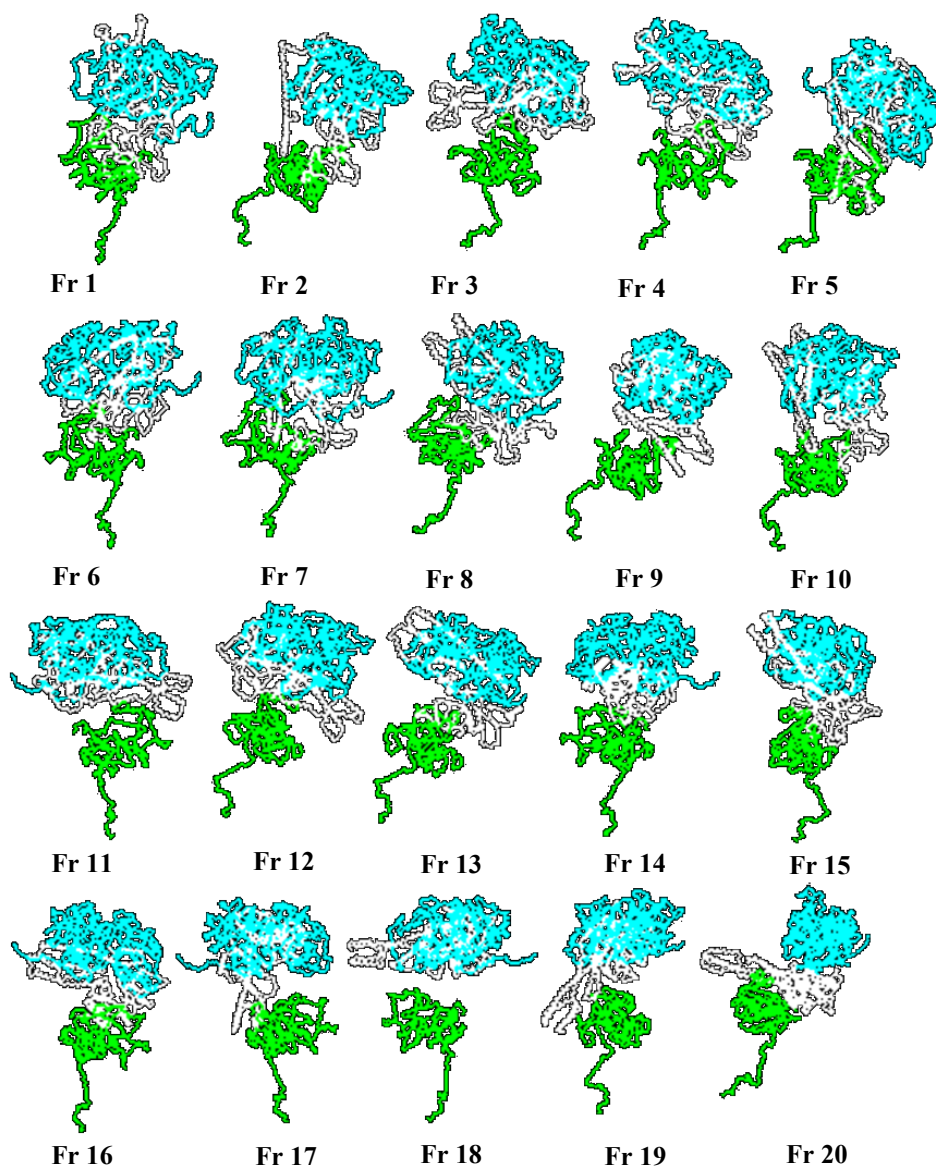
**Figura 48.** Confronto tra le nove  $\alpha$ -eliche del dominio 14-3-3 (in rosso, PDB ID: 2B05) con le nove  $\alpha$ -eliche del dominio ad elica di GBP1 (in bianco, PDB ID: 1F5N).

Infine, l'analisi bioinformatica sul complesso trimerico ottenuto ha evidenziato anche la presenza di diverse regioni che tendono a passare per una strutturazione secondaria ad elica  $3_{10}$  e  $\pi$  o a cambiare tale tipologia di strutturazione in  $\alpha$ -elica (GBP1: 139-151 e 290-293; PIM1: 326-328;  $\alpha$ I-tubulina: 557-561; 773-775; 778-781 e 830-831 Tabelle 16-18).

Tali risultati fanno ipotizzare che anche queste regioni sono alla base dei cambiamenti conformazionali indotti dalla formazione del trimero.

---

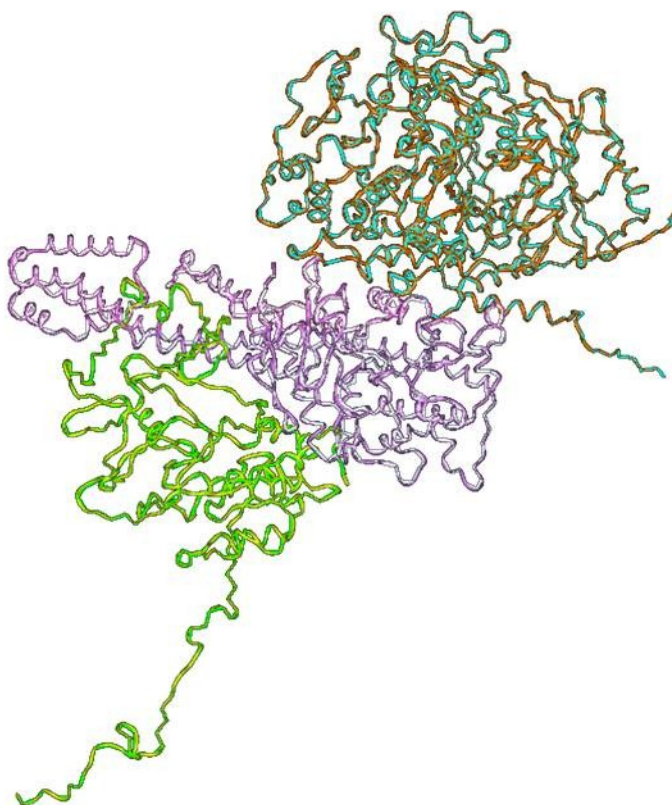
Al fine di testare la stabilità termodinamica del macrocomplesso ottenuto dagli studi di *docking*, su tutti i complessi ottenuti dalla procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione è stata eseguita una procedura di *simulated annealing* (SA, vedere parte sperimentale). I venti cicli di tale procedura hanno generato altrettanto differenti complessi trimerici (Figura 49).



**Figura 49.** Venti complessi trimerici ottenuti dal *simulated annealing*. Le proteine sono mostrate in *ribbons* e colorate rispettivamente in verde (PIM1), in bianco (GBP1) e in celeste (tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III).

---

Quest'ultimi sono tutti caratterizzati da compenetrazioni e forti destrutturazioni, ad eccezione del ventesimo (Fr20; Figura 49) che è risultato essere capace di riprodurre sia il modello di interazione ottenuto dagli studi di *docking* (Figura 50) che la struttura secondaria di quest'ultimo (Tabelle 16-18), confermando la stabilità termodinamica del modello ottenuto.

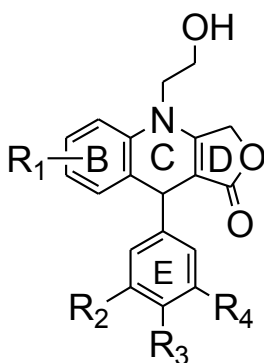


**Figura 50.** Sovrapposizione del complesso trimerico ottenuto dagli studi di *docking* (tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III in celeste, GBP1 in bianco e PIM1 in verde) con il Fr20 ottenuto dal *simulated annealing* (tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III in arancione, GBP1 in magenta e PIM1 in giallo).

### 3.3c Analisi dell'attività biologica del nuovo set di ligandi identificato

Al fine di investigare molecole farmacologicamente attive in grado di inibire la formazione del complesso GBP1/PIM1/ $\beta$ III-tubulina, è stato sintetizzato un set di 47 2-azapodofillotossine (2-APT), la cui struttura è riportata in Tabella 19. Questi composti sono stati prima testati presso il National Cancer Institute (NCI) su di un pannello di 60 linee cellulari tumorali e poi, sottoposti alla metodica della COMPARE Analysis.<sup>119</sup>

**Tabella 19.** Strutture delle 2-azapodofillotossine (2-APT).

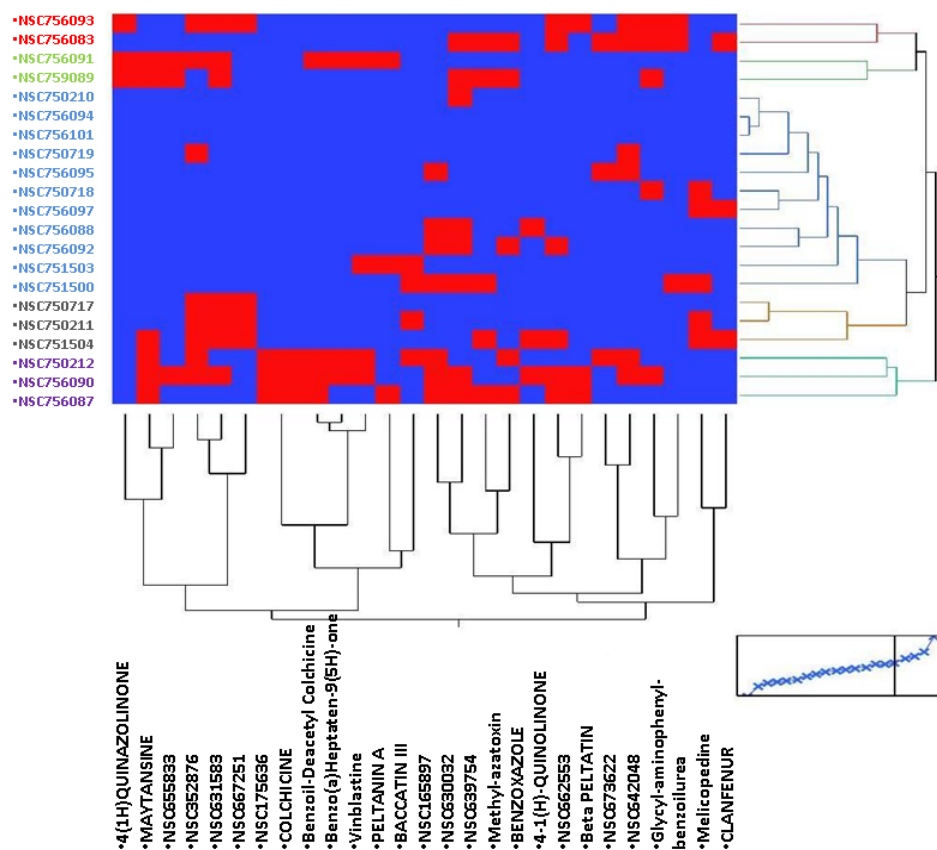


Cmp	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
NSC750210	6,7-OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC750716	6,7-OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC750717	6,7-OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	H	H
NSC750211	6,7-OCH <sub>2</sub> O	H	H	H
NSC750718	6,7-OCH <sub>2</sub> O	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
NSC750499	6,7-OCH <sub>2</sub> O	H	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756083	6,7-OCH <sub>2</sub> O	Cl	H	H
NSC750212	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC751500	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC750719	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
NSC750213	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	H	H	H
NSC751501	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
NSC751502	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756084	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	Br	H	H
NSC756085	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	Cl	H	H
NSC756086	6,7-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	Cl	Cl	H

NSC750720	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC750721	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC750722	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	OCH <sub>3</sub>	H	H
NSC750723	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	H	H	H
NSC751503	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
NSC751504	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	H	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756087	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	Br	H	H
NSC756088	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	Cl	H	H
NSC759089	6,7-O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> °	Cl	Cl	H
NSC756090	6-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC756091	6-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756092	6-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
NSC756093	6-OCH <sub>3</sub>	H	H	H
NSC756094	6-OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756095	6-OCH <sub>3</sub>	Br	H	H
NSC756096	6-OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H
NSC756097	6,7-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC756098	6,7-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756099	6,7-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	H
NSC759100	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	H	H
NSC756101	6,7-OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
NSC756102	6,7-OCH <sub>3</sub>	H	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756103	6,7-OCH <sub>3</sub>	Br	H	H
NSC756104	6,7-OCH <sub>3</sub>	Cl	H	H
NSC756105	6,7-OCH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H
NSC756106	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
NSC750107	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H
NSC756108	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	H	H	H
NSC756110	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Br	H	H
NSC756111	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	H	H
NSC756112	6-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl	Cl	H

Da questi studi è emerso che 21 APTs sono attive in cellule resistenti al paclitaxel con uno spettro di citotossicità simile a quello di diversi farmaci antitumorali, tutti capaci di interferire a livello del citoscheletro. In particolare, è stato possibile identificare 5 cluster con omologie strutturali differenti (Figura 51).

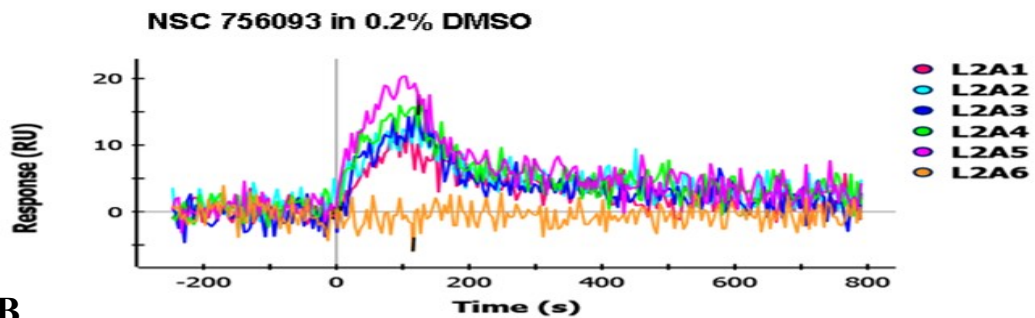




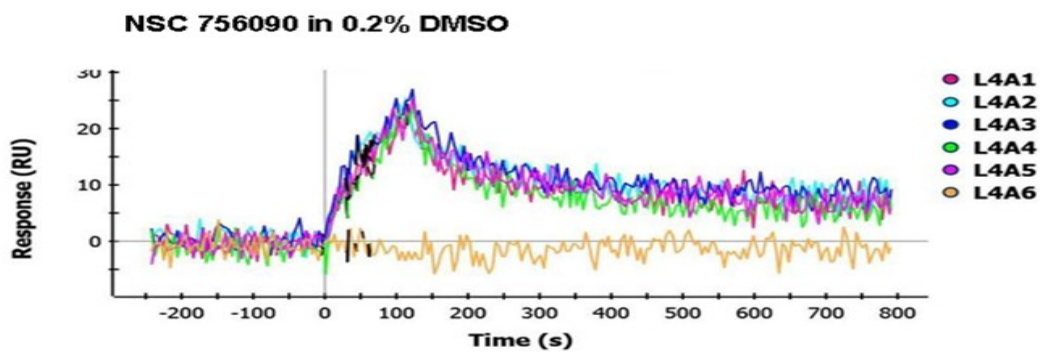
**Figura 51.** Schema mostrante le 21 APTs più attive ottenute dalla COMPARE Analysis. Sull'asse delle ascisse sono rappresentati, con colori differenti, i 5 diversi cluster delle 2-APT con omologie strutturali differenti.

Partendo da questi risultati e al fine di valutare la capacità di questi composti di interferire con il complesso multi-proteico GBP1/PIM1/ $\beta$ III-tubulina alla base della resistenza al paclitaxel, le 21 APTs risultate essere più attive sono state sottoposte alla tecnologia della *Surface Plasmon Resonance* (SPR). Dal momento che le isoforme della tubulina ( $\alpha$  e  $\beta$ ), non sono utilizzabili per saggi *in vitro* in quanto la loro conformazione attiva richiede modifiche post-trascrizionali non ottenibili con l'attuale tecnologia ricombinante, questi studi sono stati eseguiti considerando solo GBP1 e PIM1, proteine che possono essere espresse *in vitro*. Questi studi hanno evidenziato che i) il segnale generato dall'interazione GBP1/PIM1 è dose-dipendente in un range di 8,25-140 nM con una  $K_D$  di  $38 \pm 14$  nM e ii) solo il composto NSC756093 è capace di inibire l'interazione GBP1/PIM1 al 65%, con una correlazione tra concentrazione e percentuale di inibizione (Figura 52).

A

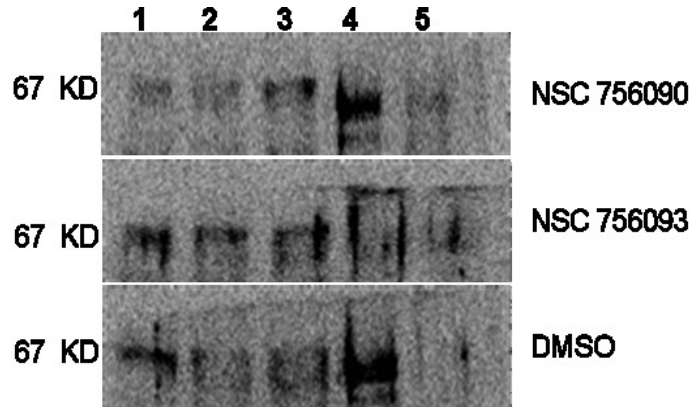


B



**Figura 52.** (A) PIM1 50 ug/ml e GBP1 280 nM interazione con il composto NSC756093 in 0,2% DMSO; (B) PIM1 50 ug/ml e GBP1 280 nM interazione con il composto NSC756090 (inattivo) in 0,2% DMSO. I differenti colori presenti nel grafico rappresentano la diversa concentrazione di composto NSC: linea rossa 100 nM, blu chiaro a 10 nM, 1nM blu scuro, verde 0,1 nM, rosa indica l'assenza del composto, controllo positivo di interazione. In tutti gli esperimenti CA (anidrasi carbonica) è stato utilizzato come controllo negativo (linea arancione).

Per confermare ulteriormente la capacità di NSC756093 di inibire l'interazione GBP1/PIM1 sono stati effettuati anche saggi di co-immunoprecipitazione in cellule SKOV3 di carcinoma ovarico resistenti al paclitaxel. Le cellule sono state trattate per 3 ore con 100 nM sia del composto risultato attivo (NSC756093) che di un composto inattivo (NSC756090). I risultati hanno dimostrato che il trattamento con NSC756093 inibisce l'interazione GBP1/PIM1 anche *in vitro*, mentre il trattamento con Dimetilsolfossido (DMSO) o con il composto inattivo (NSC756090) non determina alcuna modulazione dell'interazione GBP1/PIM1 (Figura 53).



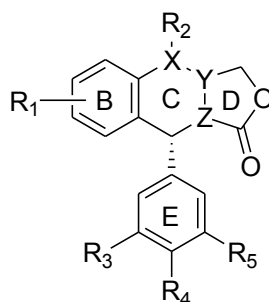
**Figura 53.** Co-immunoprecipitazione (IP) di GBP1/PIM1 nella linea cellulare SKOV3 trattate per 3 ore con NSC756093 (composto attivo) ed NSC756093 (composto inattivo) utilizzando una concentrazione di 100 nM. Il segnale è stato rivelato con anticorpi anti-GBP1 e visualizzato come una specifica banda di 67kD. *Corsia 1:* lisato di SKOV3. *Corsia 2:* flusso attraverso co-IP. *Corsia 3:* flusso attraverso il controllo. *Corsia 4:* co-IP di GBP1/PIM1 (utilizzando un anticorpo anti-PIM1). *Corsia 5:* co-IP. Del controllo negativo (utilizzando un anticorpo anti-IgG). La presenza della banda di 67kD in *corsia 4* indica nessuna interferenza nel legame GBP1/PIM1 sia in presenza di DMSO che del composto inattivo NSC756090; l'assenza della banda di 67kD rilevabile in presenza di NSC756093 indica che il composto è in grado di inibire l'interazione GBP1/PIM1. Questo esperimento è stato ripetuto due volte con risultati simili.

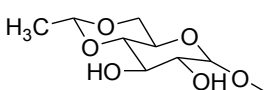
### ***3.3d Identificazione di un possibile sito di legame per il derivato azapodofillotossinico NSC756093 su GBP1 attraverso studi di modellistica molecolare***

Al fine di identificare un possibile sito di legame per l'NSC756093 su GBP1 e/o PIM1, è stata effettuata una dettagliata analisi strutturale e bioinformatica (per i dettagli vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5b) non solo sulle strutture a raggi X dei due bersagli proteici presi in considerazione, cioè GBP1 e PIM1 ma, dal momento che i composti Podofillotossina (**1**), Etoposide (**2**) ed NSC756093 condividono uno scheletro strutturale comune, composto dal sistema policiclico B-D e dall'anello fenilico E, pur presentando sostituenti differenti (Tabella 20), anche sulle strutture a raggi X di :

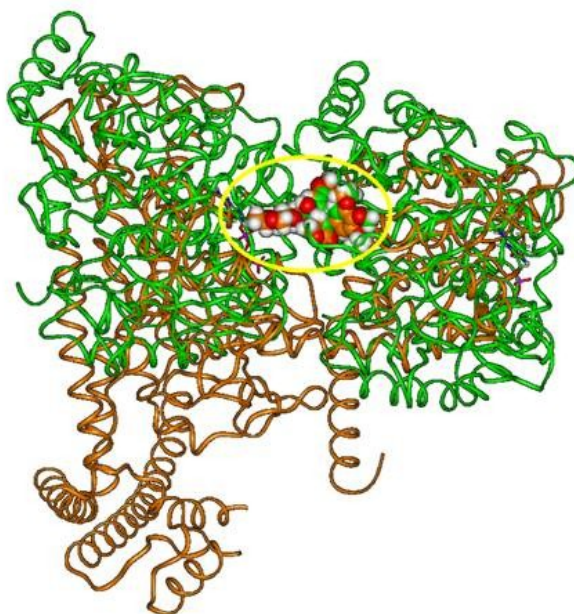
1. Etoposide in complesso con topoisomerasi II $\beta$  (topoII $\beta$ ) e DNA (PDB ID: 3QX3);
2. Podofillotossina in complesso con la tubulina (PDB ID: 1SA1).

**Tabella 20.** Strutture di Podofillotossina (**1**), Etoposide (**2**), e NSC756093.



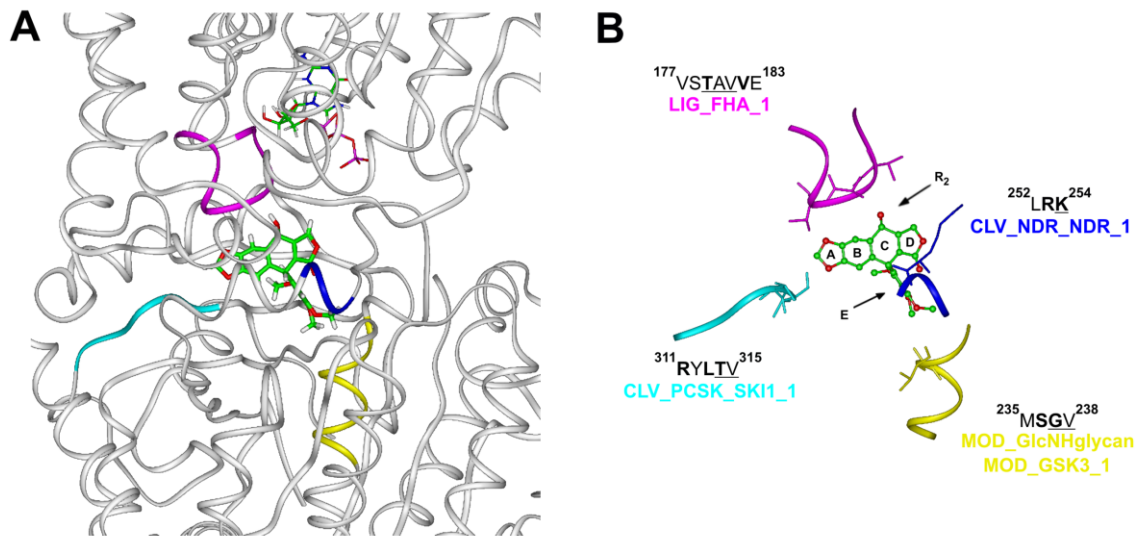
Composto	X	Y-Z	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
<b>1</b>	CH	CH-CH	6,7-OCH <sub>2</sub> O	-OH	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<b>2</b>	CH	CH-CH	6,7-OCH <sub>2</sub> O		OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>NSC756093</b>	N	C=C	6-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	H	H	H

L'analisi eseguita su quest'ultimi complessi ha messo in evidenza che, sebbene **1** e **2** abbiano bersagli molecolari differenti, sovrapponendo i ligandi per il sistema policiclico B-D comune, entrambi mediano interazioni molecolari all'interfaccia tra due domini proteici differenti, quali: i) monomeri di  $\alpha$  e  $\beta$  tubulina per **1** e ii) *winged helix domain* (WHD) e *topoisomerase-primase domain* (TOPRIM) per **2** (in questo caso è coinvolto anche il DNA) (Figura 54).

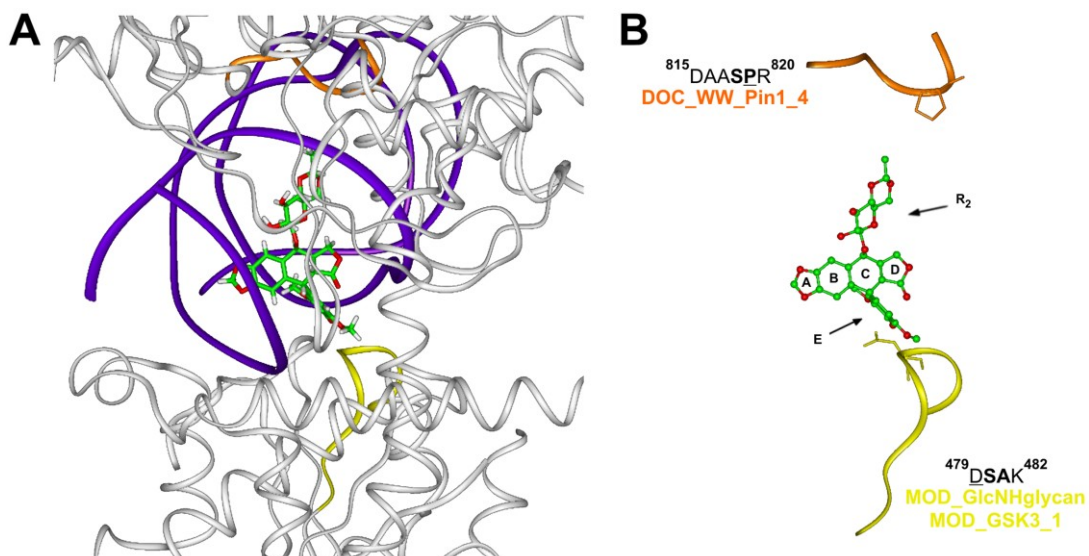


**Figura 54.** Sovrapposizione tra le strutture a raggi X di etoposide/topoII $\beta$  (*ribbons* in arancione, PDB ID: 3QX3) e podofillotossina/tubulina (*ribbons* in verde, PDB ID: 1SA1) sulla base di un *fitting* degli anelli B-D dei due ligandi. Il cerchio giallo evidenzia la posizione dei ligandi sovrapposti e visualizzati in CPK.

D'altra parte, i risultati ottenuti dal server *ELM* (Eukaryotic Linear Motifs resource)<sup>120</sup> hanno messo in evidenza che i siti di legame dei due ligandi sono caratterizzati da diverse sequenze consenso contenute nei motivi funzionali proteici (Figura 55 e 56); si osserva che a substrutture del ligando simili (es. anello fenilico E) corrispondono sequenze consenso simili mentre a substrutture del ligando differenti (es. sostituente R<sub>2</sub>) corrispondono sequenze consenso differenti (Figura 55B e 56B).



**Figura 55.** (A) Sito di legame della podofillotossina in  $\alpha/\beta$ -tubulina (*ribbons* in bianco, PDB ID: 1SA1). La podofillotossina e il nucleotide GTP dell'  $\alpha$ -tubulina sono visualizzati in *stick* e colorati per tipo di atomo (C = verde, O = rosso, N = blu, P = magenta, H = bianco). (B) Motivi proteici della tubulina coinvolti nel sito di legame della podofillotossina. I residui chiave d'interazione sono mostrati e sottolineati nella sequenza mentre i residui chiave della sequenza consenso sono in grassetto. La podofillotossina è mostrata in *ball e stick* e colorata per tipo di atomo.

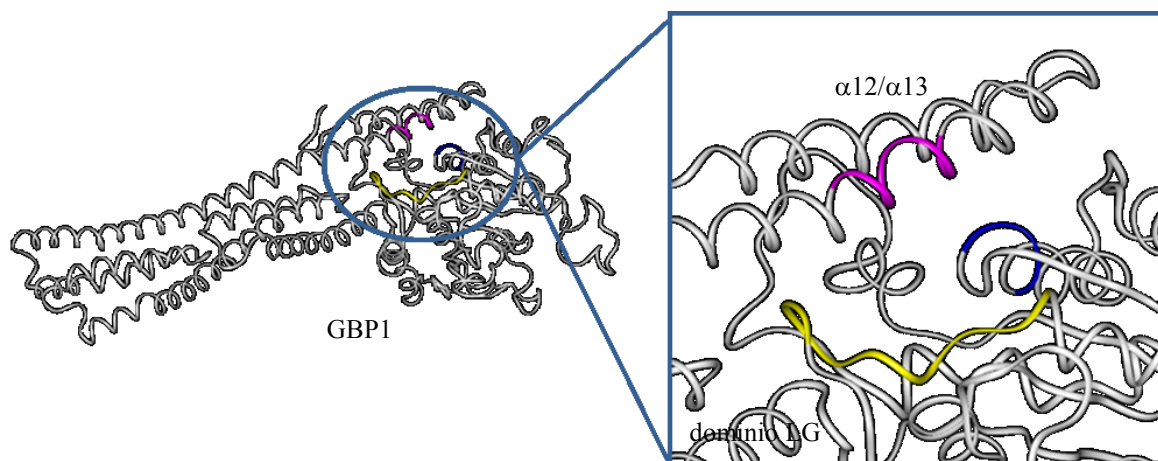


**Figura 56.** (A) Sito di legame dell'etoposide nella topoisomerase II $\beta$ /DNA (PDB ID: 3QX3). La topoisomerase II $\beta$  (bianco) e il DNA (viola) sono visualizzati come *ribbons*. L'etoposide è visualizzato in *stick* e colorato per tipo di atomo (C = verde, O = rosso, H = bianco). (B) Motivi proteici della topoisomerase II $\beta$  coinvolti nel sito di legame dell'etoposide. I

---

residui chiave d'interazione sono mostrati e sottolineati nella sequenza mentre i residui chiave della sequenza consenso sono in grassetto. L'etoposide è mostrato in *ball e stick* e colorata per tipo di atomo.

La stessa analisi strutturale e bioinformatica effettuata sulla topoII $\beta$  e tubulina, è stata successivamente eseguita anche sulle strutture a raggi X di PIM1 e GBP1. Anche in queste due proteine sono state individuate le sequenze consenso di numerosi motivi funzionali proteici, ma solo in GBP1 è stata identificata una combinazione tridimensionale di motivi proteici simile a quella presente nei siti attivi di **1** e **2** (Figura 57).



**Figura 57.** Combinazione tridimensionale di motivi proteici individuata nella struttura a raggi X di GBP1 (PDB ID: 1DG3).

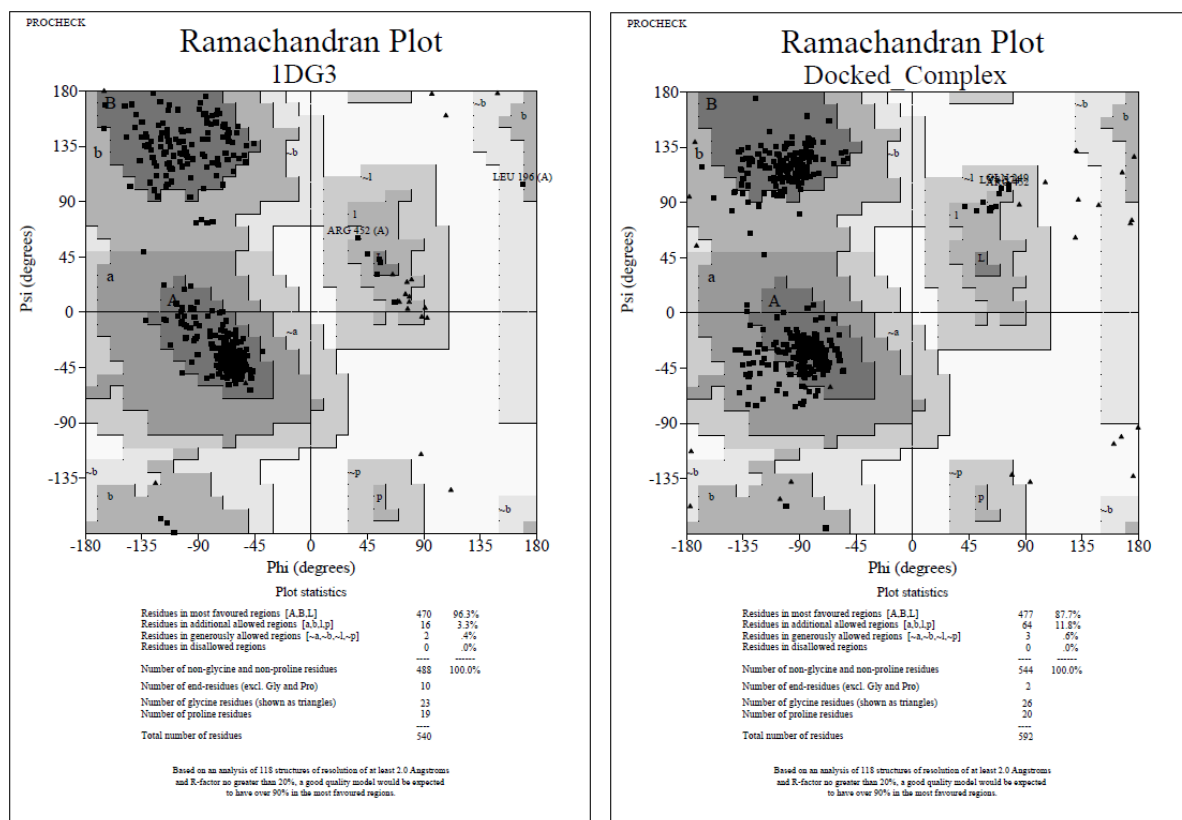
Inoltre, è importante sottolineare che le sequenze identificate sono situate anche in questo caso all'interfaccia di due domini strutturali della proteina GBP1 noti in letteratura con il nome di dominio LG ed dominio ad elica. Pertanto, questi studi hanno permesso di ipotizzare una possibile interazione tra il nuovo derivato azapodofillotossinico NSC756093 e GBP1.

### ***3.3e Studi di docking sul complesso NSC756093/GBP1***

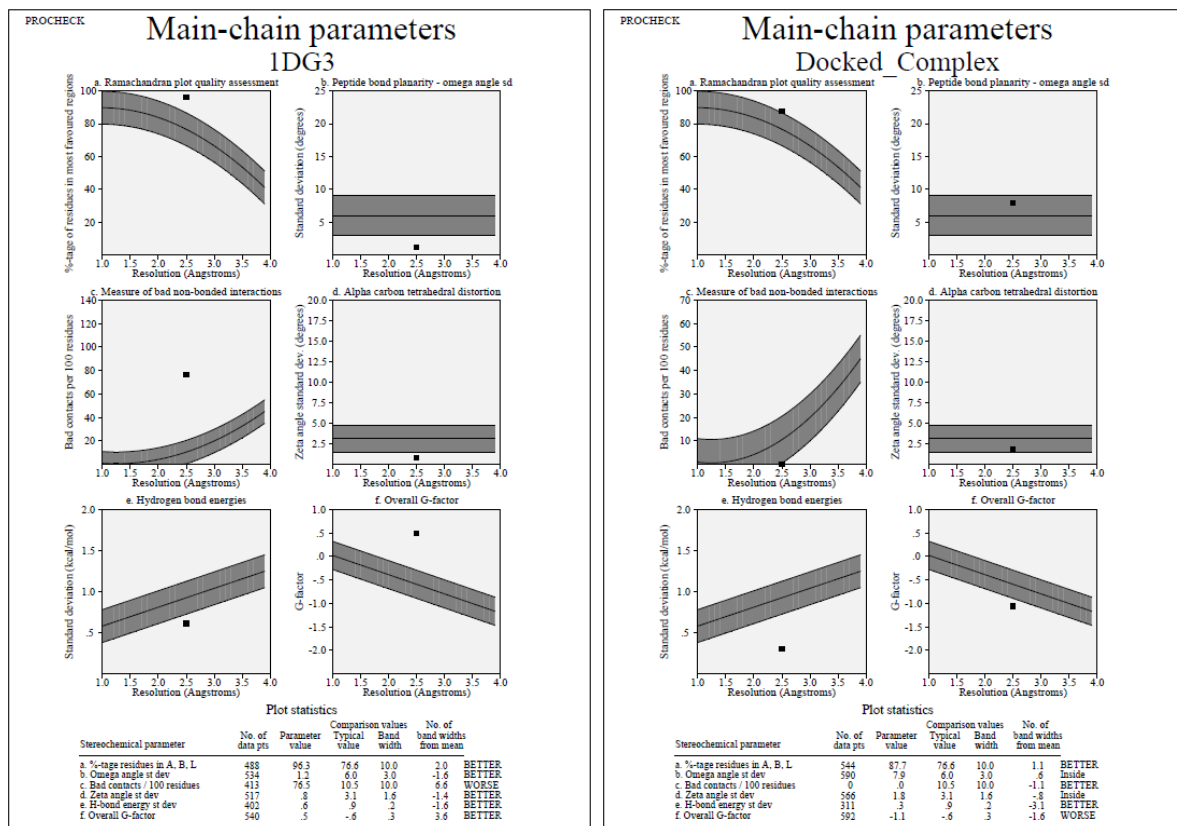
Al fine di validare l'ipotesi di interazione NSC756093/GBP1, sul nuovo ipotetico complesso generato sono stati eseguiti studi di *docking* dinamico. Il complesso NSC756093/GBP1 di partenza generato è stato lasciato libero di muoversi durante l'intero corso dei calcoli di *docking*, eccetto gli amminoacidi della proteina GBP1 presenti nelle SCRs ( $\alpha$ -elica e foglietto  $\beta$ ) sui quali sono stati applicati gli stessi vincoli conformazionali utilizzati durante i calcoli di *docking* per la proteina GBP1 del complesso trimerico (per i dettagli vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5f). Inoltre, al fine di mimare l'ambiente citoplasmatico, i calcoli di *docking* sono stati eseguiti considerando tutte le molecole di acqua presenti nella struttura

cristallografica di riferimento di GBP1 (PDB ID: 1DG3) e per valutare nel dettaglio il ruolo giocato dalle molecole d'acqua presenti nel sito catalitico, anche in questo caso sono stati eseguiti due tipologie di *docking*: una dove quest'ultime sono state lasciate libere di muoversi l'altra dove le molecole d'acqua all'interno del sito di legame del nucleotide di GBP1 sono state vincolate attraverso l'applicazione di una costante di forza (vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5f). I complessi risultanti sono stati poi classificati in base ai loro valori di energia conformazionale e il complesso ad energia più basso è stato scelto come quello più rappresentativo. Infine, allo scopo di testarne la stabilità termodinamica, il complesso ottenuto dagli studi di *docking* è stato sottoposto ad un protocollo di dinamica molecolare di *simulated annealing* (vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5f).

La qualità del modello molecolare generato dai calcoli di *docking* è stata valutata utilizzando il server Procheck (<http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/software/PROCHECK/>),<sup>117</sup> ed i risultati ottenuti hanno mostrato dei parametri simili a quelli della struttura cristallografica di partenza di GBP1 (PDB ID: 1DG3) sia per quanto riguarda lo scheletro peptidico degli amminoacidi (Ramachandran Plot, Figura 58) che per le catene laterali (Main-chain parameters, Figura 59).



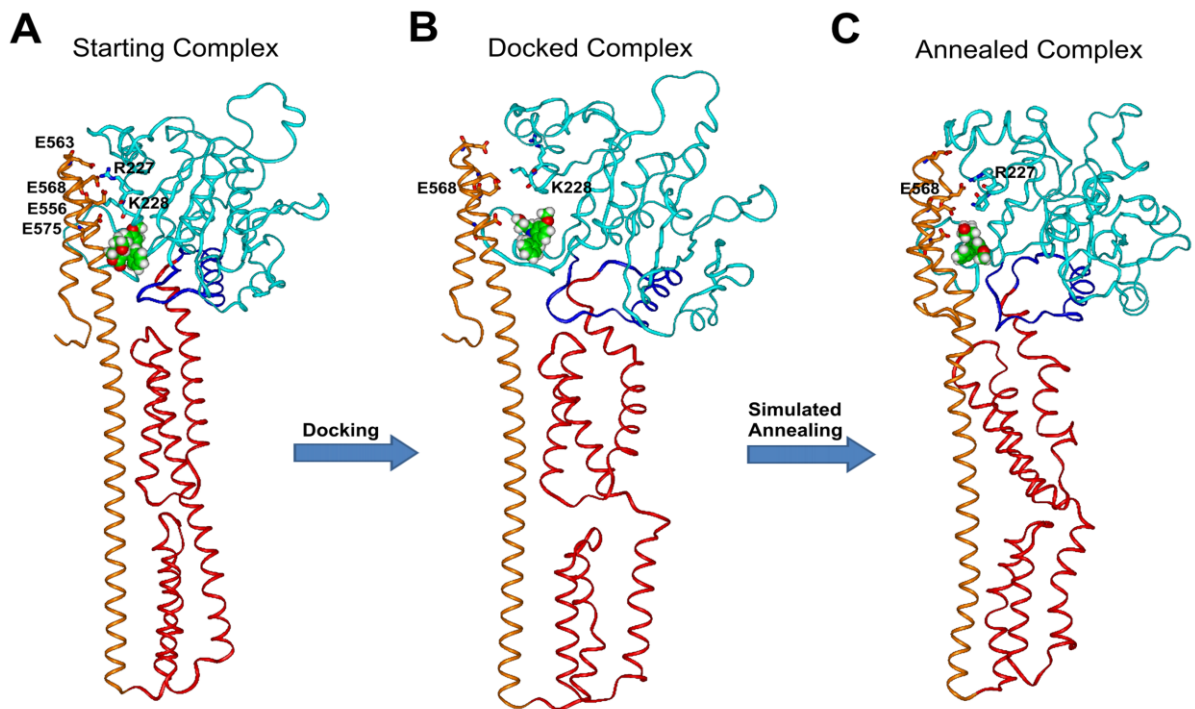
**Figura 58.** Parametri del Ramachandran Plot relativi alla struttura cristallografica di partenza di GBP1 (PDB ID: 1DG3, sinistra) e al modello molecolare NSC756093/GBP1 generato dai calcoli di *docking* (destra).



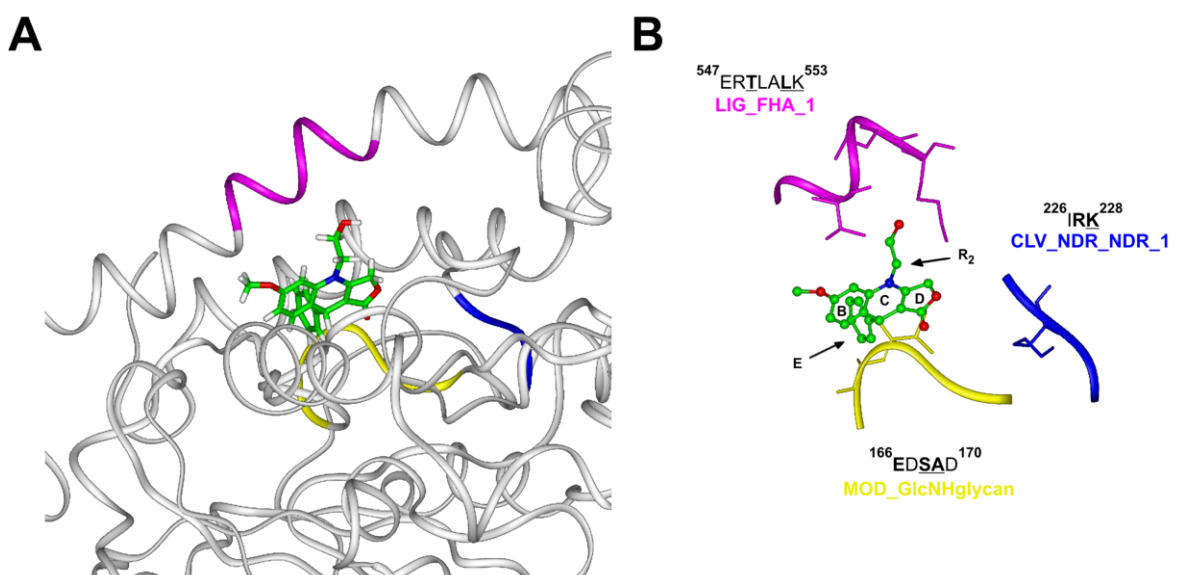
**Figure 59.** Parametri delle catene laterali relativi alla struttura cristallografica di partenza di GBP1 (PDB ID: 1DG3, sinistra) e al modello molecolare NSC756093/GBP1 generato dai calcoli di *docking* (destra).

I risultati ottenuti hanno confermato l'ipotesi iniziale, ossia i) l'NSC756093 resta legato all'interfaccia tra il dominio LG e il dominio ad elica anche se nel complesso finale dopo il *simulated annealing*, il ligando ruota di  $\sim 180^\circ$  rispetto alla sua posizione iniziale (Figura 60), e ii) il sito di legame individuato contiene tre sequenze consenso appartenenti a motivi funzionali proteici individuati anche nel sito di legame di **1** e **2** (Figura 61).





**Figura 60.** Complesso di partenza (A), complesso ottenuto dagli studi di *docking* (B) e complesso ottenuto dal *simulated annealing* (C) dell'NSC756093/GBP1. I residui chiave d'interazione tra il dominio LG ed il dominio ad elica sono evidenziati in *stick* e colorati per tipo di atomo. La struttura di GBP1, visualizzata in *ribbons*, è colorata nel seguente modo: il dominio LG è in ciano, la regione di connessione in blu, il dominio ad elica in rosso con  $\alpha 12/\alpha 13$  in arancione. NSC756093 è visualizzato come *CPK* e colorata per tipo di atomo (C = verde, O = rosso, N = blu, H = bianco).



**Figura 61.** (A) Sito di legame di NSC756093 in GBP1 (*ribbons* in bianco) nel complesso finale del *docking*. L'NSC756093 è visualizzato in *stick* e colorato per tipo di atomo (C = verde, O = rosso, N = blu, H = bianco). (B) Motivi proteici di GBP1 coinvolti nel sito di legame dell'NSC756093. I residui chiave di interazione sono

mostrati e sottolineati nella sequenza mentre i residui chiave della sequenza consenso sono in grassetto. L'NSC756093 è mostrato come *ball e stick* e colorato per tipo di atomo.

Il confronto dei risultati ottenuti dagli studi di *docking* con i risultati ottenuti dall'analisi bioinformatica e strutturale eseguita sui complessi etoposide/topoisomerasiII $\beta$  e Podofilottossina/tubulina hanno evidenziato altri interessanti risultati riguardanti le interazioni che si verificano tra le sequenze consenso individuate nei tre siti di legame (GBP1, tubulina e topoII $\beta$ ) e le rispettive substrutture dei ligandi considerati (Tabella 21).

**Tabella 21.** Sequenze consenso conservate dei motivi presenti nel sito di legame di **1**, **2** ed NSC756093.

Substrutture Ligando	Sequenze Consenso <sup>a</sup>	Proteina Target
Ring D	<sup>252</sup> LRK <sup>254</sup>	Tubulina
	<sup>226</sup> IRK <sup>228</sup>	GBP1
Ring E	<sup>235</sup> MSGV <sup>238</sup>	Tubulina
	<sup>479</sup> DSAK <sup>482</sup>	TopoII $\beta$
	<sup>166</sup> EDSAD <sup>170</sup>	GBP1
R <sub>2</sub>	<sup>177</sup> VSTAVVE <sup>183</sup>	Tubulina
	<sup>547</sup> ERTLALK <sup>553</sup>	GBP1

<sup>a</sup>Gli amminoacidi d'interazione del motivo sono in grassetto.

In particolare, l'anello fenilico E dei tre ligandi interagisce con un motivo proteico avente una sequenza consenso conservata in tutti i siti di legame e colorato in giallo in Figura 28, 29 e 34. Il sistema policiclico di **2** nella topoisomerasi stabilisce delle interazioni  $\pi$ - $\pi$  e legami ad idrogeno con i nucleotidi circostanti (Figura 56) similmente a quanto avviene per il sistema policiclico di **1** nella tubulina e il sistema policiclico di NSC756093 in GBP1 (i nucleotidi sono rimpiazzati da amminoacidi aromatici). In particolare, l'anello D conservato in **1** e NSC756093, in entrambi i siti di legame, risulta essere orientato verso la stessa sequenza consenso colorata in blu in Figura 55 e 61, (Tabella 21). In aggiunta, anche i gruppi più piccoli e abbastanza simili come R<sub>2</sub> di **1** e di NSC756093 (Tabella 20), sono orientati verso una sequenza consenso appartenente ad un motivo lineare presente in entrambi i siti di legame e colorati in magenta nella Figura 55 e 61. In questo modo, a simili substrutture del ligando

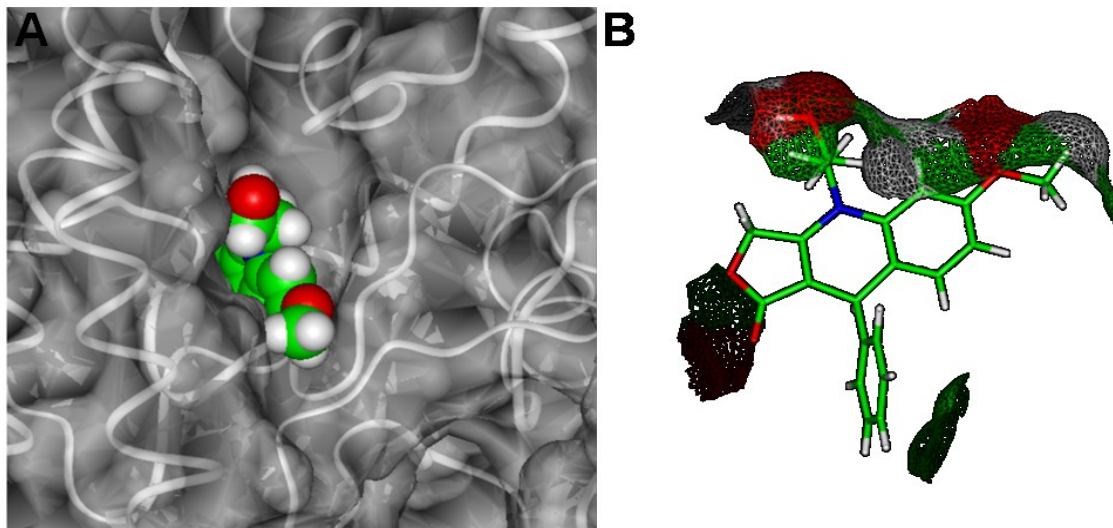
---

corrispondono motivi proteici contenenti sequenze consenso comuni; al contrario, specifiche substrutture del ligando come il sostituito  $R_2$  presente in **2** (Tabella 20), rappresentato da un residuo glicosidico ingombrante, oppure come l'anello A di **1**, sostituito con un gruppo 6-OCH<sub>3</sub> in NSC756093, sono orientati verso motivi proteici che non presentano delle sequenze consenso simili a quelle individuate negli altri due complessi.

Tutti questi risultati indicano che lo scheletro molecolare, composto dagli anelli fusi B-D e dall'anello fenilico pendente E, è in grado di interporre all'interfaccia di due differenti domini proteici. Tale interfaccia è caratterizzata dalla presenza di diverse sequenze consenso contenute in motivi funzionali proteici e la diversa selettività per uno specifico ligando varia a seconda dei sostituenti introdotti sullo scheletro comune. Per contro, anche piccole modifiche nella struttura del ligando possono guidare il legame di quest'ultimo verso una diversa combinazione di motivi proteici, per esempio verso bersagli proteici differenti, così come dimostrato dai risultati ottenuti dagli studi biologici. Infine, lo stesso ligando potrebbe riconoscere un simile *pattern* di motivi proteici su differenti bersagli proteici. In considerazione di ciò, è da notare che l'etoposide è in grado di inibire la topoII $\beta$  anche legandosi al dominio ATPasico della proteina.<sup>121</sup>

### ***3.3f Investigazione delle relazioni struttura-attività (SARs) dei nuovi derivati azapodofillotossinici***

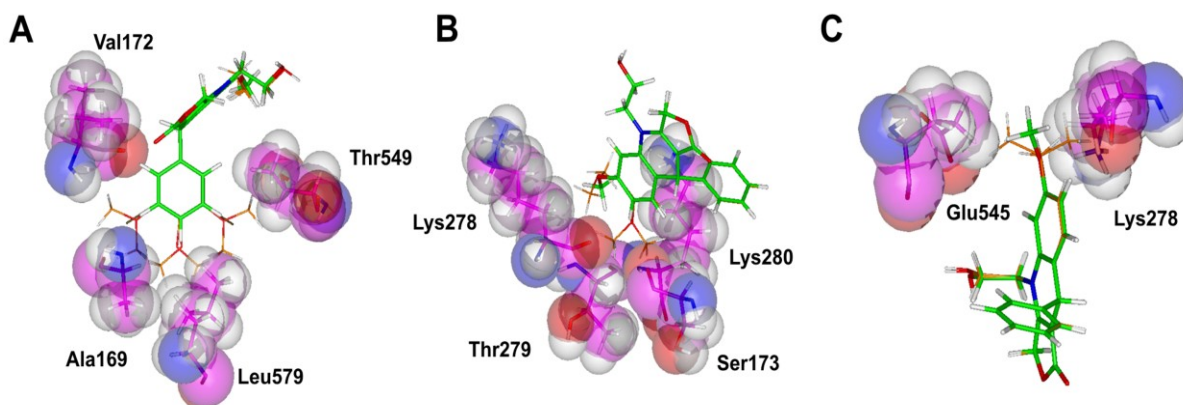
Nel complesso NSC756093/GBP1 ottenuto dai calcoli di *docking* si osserva che NSC756093 risulta quasi completamente “incastrato” nella tasca di legame di GBP1, con solo l'anello D e la sua parte superiore, compreso il sostituito  $R_2$  (Tabella 20, Figura 62A), parzialmente esposto al solvente (Figura 62).



**Figura 62.** (A) NSC756093 legato alle GBP1. Il legando viene visualizzato come CPK e colorato per tipologia di atomo (C = verde, rosso = O, N = blu, H = bianco); la superficie accessibile al solvente della proteina viene visualizzato come solido (trasparenza = 50%) e colorata in bianco; lo scheletro proteico viene visualizzato in *ribbons* bianco. (B) superficie accessibile al solvente di NSC756093 in complesso con GBP1.

Ciò giustifica il fatto che l'NSC756093 risulta essere il solo composto testato in grado di inibire l'interazione GBP1/PIM1, nonché il composto meno ingombrante della serie. Infatti, gli altri derivati presentano tutti dei sostituenti più ingombranti sull'anello B ed E rispetto all'NSC756093 (Tabella 19). Per ben razionalizzare l'inattività di tutte le 2-APTs testate e, allo stesso tempo, validare il nostro modello di interazione NSC756093/GBP1, i composti NSC756092, NSC756094, NSC756095, NSC759100, e NSC756108 sono stati sottoposti ad una approfondita analisi conformazionale che ha incluso calcoli di dinamica e meccanica molecolare seguiti da calcoli di quanto-meccanica (per i dettagli vedere parte sperimentale, paragrafo 3.5a). Come riportato in Tabella 19, questi composti mostrano tutti un extra-volume minimo in corrispondenza dei vari sostituenti rispetto all'NSC756093. I conformeri entro le 5 kcal/mol dal minimo globale di energia sono stati sovrapposti, attraverso lo scheletro strutturale comune B-D, sull'NSC756093 legato a GBP1. Sono state prese in considerazione tutte le possibili orientazioni dei loro sostituenti e sono stati analizzati tutti i possibili impedimenti sterici con la proteina. E' risultato che la sostituzione dell'anello E in posizione *meta*, sia con un gruppo metossile (NSC756092) che con un atomo di bromo (NSC756095), non è tollerata a causa di un ingombro sterico con le catene laterali di Thr549 e Leu579, e con lo scheletro peptidico dell'Ala169 e Val172. La catena laterale della Leu579 e lo scheletro peptidico dell'Ala169 sono coinvolti in contatti sterici anche con il sostituito metossile presente in posizione *para* dell'anello E nel composto NSC756094. Dall'altro lato, la

sostituzione sull'anello B con un ulteriore gruppo metossile in posizione 7, come nel composto NSC759100, causa impedimenti sterici con lo scheletro peptidico della Ser173, Thr279, Lys278 e Lys280; infine, sostituendo il gruppo metossile sul C6 con una catena etilica, come nel composto NSC756108, si osservano delle compenetrazioni steriche con le catene laterali della Lys278 e del Glu545 (Figura 63).



**Figura 63.** Sovrapposizione dei conformeri PM7 di (A) NSC756092, NSC756095, NSC756094, (B) NSC759100 (C) NSC756108 (carboni in arancione) sulla conformazione bioattiva di NSC756093 (carboni in verde). La conformazione bioattiva di NSC756093 viene visualizzata in *stick*, mentre i conformeri sono visualizzate come *lines*. Gli aminoacidi di GBP1 (carboni in magenta) coinvolti in impedimenti sterici sono specificati e visualizzati come *CPK* (trasparenza = 50%). Gli eteroatomi sono colorati per tipo di atomo (O = rosso, N = blu, H = bianco).

Anche se a prima vista, la catena etilica e il gruppo metossile potrebbero occupare un volume molecolare simile, tuttavia, essi sono orientati diversamente rispetto al piano del sistema policiclico. Il gruppo metossile, a causa della coniugazione dell'ossigeno con l'anello aromatico, si pone sullo stesso piano del sistema policiclico (geometria  $sp^2$ ); al contrario, la catena etilica sporge al di fuori del piano dell'anello (geometria  $sp^3$ ). In accordo con gli impedimenti sterici osservati, la minimizzazione energetica di tutti i possibili complessi di GBP1 con i conformeri di NSC756092, NSC756094, NSC756095, NSC759100 e NSC756108 non ha fornito alcuna soluzione accettabile in quanto, tutti i ligandi in tali complessi hanno mostrato un  $\Delta E$  dal minimo globale di energia maggiore alle 10 kcal/mol.

### 3.3g Studi di mutagenesi

In accordo con i risultati ottenuti dai calcoli di *docking*, l'NSC756093 si lega all'interfaccia tra il dominio LG e il dominio ad elica di GBP1, a livello delle interazioni chiave dei due domini proteici per la regolazione della funzione di GBP1. Infatti, l'equilibrio conformazionale che c'è tra l'LG e il dominio ad elica regola l'attività catalitica di GBP1 e la sua abilità ad oligomerizzare.<sup>86</sup> In altre GTPasi (ad esempio, Ras, Rho) questa regolazione è svolta da altri *partner* proteici (ad esempio, GAP e GEF).<sup>122</sup> Analizzando tutti i cambiamenti conformazionali derivanti dai calcoli di *docking* dinamico di GBP1, si osserva un movimento significativo dell'elica  $\alpha 4$  (dominio LG) rispetto all' $\alpha 12/\alpha 13$  (dominio ad elica). Quindi, influenzando le interazioni tra l'LG ed il dominio ad elica di GBP1, il ligando NSC756093 potrebbe indurre GBP1 ad adottare delle conformazioni non compatibili con il legame alla proteina PIM1.

Per validare i risultati ottenuti dagli studi di modellistica molecolare, sono stati progettati una serie di mutanti di GBP1 (delezioni singole e doppie nella sua sequenza umana) con l'intento di mutare residui presenti nel dominio LG che giocano un ruolo chiave nella regolazione della funzione di GBP1; inoltre, al fine di valutare anche l'impatto che tali mutazioni hanno sulla sua oligomerizzazione e, quindi, sulla formazione del complesso con PIM1, sono stati eseguiti gli esperimenti sia in presenza di GDP che dell'analogo non idrolizzabile del GTP, GppNHp (1  $\mu$ M in PBST) (Tabella 22).

**Tabella 22.** Analisi cinetica di un gruppo di mutanti GBP1 per l'interazione GBP1/PIM1 valutata con la tecnologia SPR.

Proteina/Mutanti	K <sub>D</sub> (nM) in PBST (1 $\mu$ M GppNHp*)	K <sub>D</sub> (nM) in PBST (1 $\mu$ M GDP)
GBP1	67 $\pm$ 20	30 $\pm$ 10
R227E/K228E	>10,000	>10,000
R48A	29 $\pm$ 2.1	21 $\pm$ 0.1
K51A	50 $\pm$ 10	26 $\pm$ 11
D184A	80 $\pm$ 5	77 $\pm$ 3
Q72A	62 $\pm$ 2	161 $\pm$ 17
D103N	21 $\pm$ 1	15 $\pm$ 0.1
R227A/R228A	137 $\pm$ 14	61 $\pm$ 4
1-481 (delezione C-terminale)	52 $\pm$ 4	68 $\pm$ 8

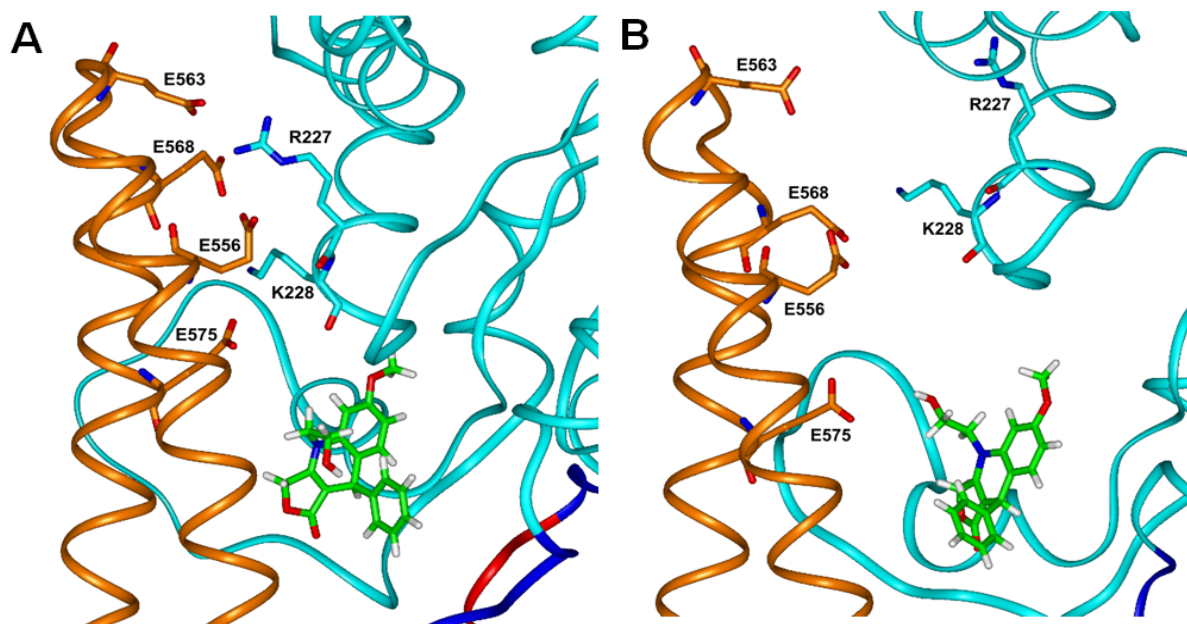
\* Guanosina 5'-[ $\beta,\gamma$ -imido]trifosfato trisodio sale idrato, analogo non idrolizzabile di GTP.

---

Infatti dalla letteratura risulta che GBP1 *wild type* (wt) è un monomero sia nella sua forma libera che quando lega il GDP, diviene un dimero quando lega sia il GTP che il suo analogo non idrolizzabile GppNHp mentre risulta tetramero quando mimica lo stato di transizione del GTP e GDP (GDP-AlF<sub>3</sub> e GMP-AlF<sub>4</sub>).<sup>86b</sup> I doppi mutanti R227E/K228E ed R227A/K228A, presenti all'interfaccia tra l'LG ed il dominio ad elica, inducono in GBP1 una diversa oligomerizzazione in quanto GBP1 wt risulta un dimero nella sua forma libera mentre diviene un tetramero quando lega l'analogo non idrolizzabile GppNHp; purtroppo non si hanno informazioni quando GBP1 è legato al GDP.<sup>88,123</sup> Gli altri mutanti, invece, riducono la capacità di oligomerizzare di GBP1 e quindi influenzano la sua attività catalitica essendo localizzati in prossimità del sito catalitico (R48A, K51A, D184A) o delle regioni di switch (Q72A e D103A).<sup>87,88,123,124</sup>

Gli studi di mutagenesi hanno evidenziato che solo il doppio mutante R227E/K228E è in grado di determinare un completo disaccoppiamento del complesso GBP1/PIM1 sia in presenza di GDP che GppNHp, giungendo alla conclusione che i residui R227 e K228 presenti all'interfaccia tra LG ed il dominio ad elica giocano un ruolo cruciale nella attività catalitica, nell'abilità di omo-oligomerizzazione di GBP1<sup>123</sup> e, quindi, nella capacità di interagire con PIM1. Infatti, le cariche positive presenti sulle catene laterali di R227 e K228 (elica  $\alpha$ 4, dominio LG) sono accoppiate a quattro cariche negative presenti sulle catene laterali dei residui di glutammato E556, E557, E563 e E568 ( $\alpha$ 12/ $\alpha$ 13 del dominio ad elica); di conseguenza, nel mutante R227E/K228E, la sostituzione di R227 e K228 con due residui di glutammato carichi negativamente determina un allontanamento del dominio LG dal dominio ad elica a causa della perdita delle interazioni iniziali. In accordo con ciò, il doppio mutante R227A/K228A, dove i residui R227 e K228 sono sostituiti con un residuo idrofobico di Ala, invece, non è in grado di determinare lo stesso effetto disaccoppiante sulla interazione proteina-proteina.

I risultati ottenuti dagli studi di mutagenesi sono in accordo con i risultati ottenuti dai calcoli di *docking* poiché anche l'NSC756093 induce un simile cambiamento delle interazioni tra l'elica  $\alpha$ 4 del dominio LG e l' $\alpha$ 12/ $\alpha$ 13 del dominio ad elica (Figura 64). Infatti la presenza di NSC756093 determina la rottura proprio delle interazioni tra R227 e K228 con i glutammati presenti sull' $\alpha$ 12 analogamente a quanto si osserva per il mutante R227E/K228E che inibisce la formazione del complesso GBP1/PIM1.



**Figura 64.** Sito di legame dell'NSC756093 in GBP1 nel complesso di partenza (A) e nel complesso ottenuto dagli studi di *docking*. La struttura di GBP1, visualizzata in ribbons, è colorata nel seguente modo: il dominio LG è in ciano, la regione di connessione in blu, il dominio ad elica in rosso con  $\alpha 12/\alpha 13$  in arancione. I residui chiave d'interazione tra LG e il dominio ad elica sono evidenziati in stick e colorati per tipo di atomo. NSC756093 è visualizzato come *stick* e colorato per tipo di atomo (C = verde, O = rosso, N = blu, H = bianco).

I risultati ottenuti supportano l'ipotesi che la tasca dove le 2-APTs si legano sia un sito allosterico in grado di controllare la conformazione attiva di GBP1 e la sua capacità di interagire con un partner come PIM1. I derivati 2-APTs rappresentano, quindi, un ottimo punto di partenza per la progettazione di nuovi inibitori dell'interazione GBP1/PIM1 attraverso modifiche strutturali in grado di ottimizzare il profilo farmacologico.



---

### 3.4 CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

Gli studi di modellistica molecolare eseguiti durante il mio lavoro di dottorato hanno permesso di:

i) sviluppare un primo modello molecolare del complesso trimero PIM1/GBP1/tubulina  $\alpha$ 1/ $\beta$ III il cui coinvolgimento, nello sviluppo della resistenza ai farmaci antitumorali (es. paclitaxel) in cellule di carcinoma ovarico che presentano un'overespressione dell'isoforma  $\beta$ III della tubulina, è oggetto di intensi studi,

ii) definire le basi molecolari del meccanismo d'azione di un nuovo set di derivati 2-azapodofillotossinici (2-APT) che sono risultati essere attivi su cellule resistenti al paclitaxel con uno spettro di citotossicità simile a quello di diversi farmaci antitumorali, tutti capaci di interferire a livello del citoscheletro.

In particolare, è stato investigato il meccanismo d'azione a livello molecolare del composto NSC756093 che è risultato essere il primo inibitore dell'interazione GBP1/PIM1, aprendo la strada per lo sviluppo di una nuova classe di agenti antitumorali attivi in cellule tumorali resistenti al paclitaxel.

L'analisi strutturale e bioinformatica ha permesso di individuare un possibile sito di legame in GBP1 e gli studi di *docking* dinamico eseguiti sul complesso NSC756093/GBP1 con la conseguente razionalizzazione delle relazioni struttura-attività del set di derivati 2-APT hanno confermato l'ipotesi di partenza. I risultati ottenuti dagli studi computazionali sono stati confermati ulteriormente anche da studi di mutagenesi, avvalorando l'ipotesi che la tasca dove le 2-APT si legano sia un sito allosterico in grado di controllare la conformazione attiva di GBP1 e la sua capacità di interagire con un *partner* come PIM1.

Sulla base dei risultati ottenuti nel presente lavoro di dottorato, i derivati APTs rappresentano un ottimo punto di partenza per la progettazione di nuovi inibitori dell'interazione GBP1/PIM1 apportando delle opportune modifiche strutturali in grado di ottimizzare il profilo farmacologico (potenza, selettività, farmacocinetica).

Questo lavoro è stato oggetto di una pubblicazione appena sottomessa su rivista internazionale: Andreoli M, Persico M, Kumar A, Orteca N, Kumar V, Pepe A, Sakkarapalayam M, Alegria AE, Petrella L, Sevcunaite L, Camperchioli A, Mariani M, Novellino E, Scambia G, Malhotra SV, Ferlini C, Fattorusso C. ***Identification of the first inhibitor of the GBP1:PIM1 interaction. Implications for the development of a new class of anticancer agents against paclitaxel resistant cancer cells.*** Submitted to *J. Med. Chem.*

---

## 3.5 PARTE SPERIMENTALE

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti su Silicon Graphics SGI Origin 200 8XR12000 ed E4 Server Twin 2 x Dual Xeon—5520, equipaggiati con due nodi; ogni nodo: 2 x Intel® Xeon® QuadCore E5520—2,26Ghz, 36 GB RAM.

### 3.5a *Analisi conformazionale di nuovi derivati azapodofillotossinici*

I valori apparenti di pKa dei nuovi derivati azapodofillotossinici sono stati calcolati utilizzando il software ACD/pKa DB, versione 12.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). In tutti i calcoli eseguiti, i composti sono stati considerati neutri come conseguenza delle percentuali delle forme neutre/ionizzate determinate considerando il valore di pH citoplasmatico 7,2 usando l'equazione di Handerson-Hasselbalch. I composti progettati sono stati costruiti tenendo conto della forma ionica prevalente al valore di pH considerato utilizzando il modulo *Builder* di Insight 2005 (Accelrys Software Inc., San Diego, CA). I potenziali atomici e le cariche parziali sono stati assegnati utilizzando il campo di forza CVFF.<sup>125</sup> Lo spazio conformazionale di questi composti è stato campionato attraverso 200 cicli di *simulated annealing* ( $\epsilon = 1$ ) seguendo il protocollo di seguito riportato. Una temperatura iniziale di 1000 K è stata applicata per 2000 fs (time step = 3.0 fs) al fine di superare tutte le barriere torsionali; successivamente, la temperatura è stata ridotta a 300 K in 1000 fs (time step = 1.0 fs) con un decremento di 0.5 K/fs. Le strutture risultanti sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover\_3 di Insight 2005 (campo di forza CVFF;  $\epsilon = 1$ ). La minimizzazione energetica è stata eseguita usando come algoritmo di minimizzazione *Conjugate gradient*; il criterio di convergenza è stato stabilito in modo che il massimo valore di RMS sulla derivata prima sia inferiore a 0.001 kcal/Å. I conformeri ottenuti sono stati classificati in famiglie sulla base dei valori di angoli torsionali e di energia potenziale (es.  $\Delta E$  dal minimo globale di energia). Al fine di analizzare in maniera dettagliata le proprietà elettroniche, tutti i conformeri, ottenuti dai calcoli di meccanica e dinamica molecolare, sono stati sottoposti ad una piena ottimizzazione geometrica (*full geometry optimization*) usando il metodo quanto-meccanico PM7 di MOPAC2012.<sup>126</sup> Al fine di raggiungere un gradiente geometrico (GNORM) fissato al valore di 0.01 è stato utilizzato l'algoritmo di minimizzazione EF (*Eigenvector Following routine*)<sup>64</sup> come algoritmo di ottimizzazione geometrica. Per ottenere una completa ottimizzazione della

---

geometria di partenza abbiamo aumentato i criteri per la terminazione di tutte le ottimizzazioni di un fattore di 100, usando la *keyword* PRECISE.

I conformeri ottenuti sono stati quindi classificati in famiglie sulla base dei valori di angoli torsionali e di energia potenziale (es.  $\Delta E$  dal minimo globale di energia).

### ***3.5b Analisi bioinformatica delle strutture cristallografiche di GBP1, PIM1, Tubulina e Topoisomerasi II $\beta$ .***

Le strutture cristallografiche determinate sperimentalmente di:

***GBP1*** (PDB ID: 2B8W, 2B92, 2BC9, 2D4H, 1DG3, 1F5N),

***PIM1*** (PDB ID: 4MBL, 4K0Y, 4K18, 4K1B, 4JX7, 4JX3, 4GW8, 4ENX, 4ENY, 4DTK, 4AS0, 4ALW, 4ALV, 4ALU, 4A7C, 3VC4, 3VBW, 3VBX, 3VBY, 3VBV, 3VBT, 3VBQ, 3UIX, 3UMW, 3UMX, 3T9I, 3R00, 3R01, 3R02, 3R04, 3QF9, 3MA3, 3JXW, 3JY0, 3JYA, 3JPV, 3F2A, 3DCV, 3CXW, 3CY2, 3CY3, 3C4E, 3BWF, 3BGP, 3BGQ, 3BGZ, 3A99, 2XIZ, 2XIY, 2XIX, 2XJ0, 2XJ2, 2XJ1, 2J2I, 2O14, 2O3P, 2O63, 2O64, 2O65, 2OBJ, 2C3I, 2BZH, 2BZI, 2BZK, 2BZJ, 2BIK, 2BIL, 1YWV, 1YXS, 1YXT, 1YXU, 1YXV, 1YXX, 1YHS, 1YI3, 1YI4, 1XWS, 1XQZ, 1XR1),

***Tubulina*** (PDB ID: 3HKB, 3HKC, 3HKD, 3HKE, 3EDL (in complesso con la chinesina), 3E22, 3DU7, 3DCO, 2WBE, 2P4N, 2HXF, 2HXH, 2BTO, 2BTQ, 2CB2, 1Z2B, 1Z5V, 1TVK, 1SA0, 1SA1 (in complesso con la podofilottossina), 1IA0, 1JFF, 1FFX, 1TUB, 1Z5W),

***Topoisomerasi II $\beta$***  (PDB ID: 3QX3 (in complesso con l'etoposide)),

***PI3K subunità alpha*** (PDB ID: 3HHM (mutante H1047R)),

***PI3K subunità gamma*** (PDB ID: 1HE8),

sono state scaricate dalla Protein Data Bank (PDB; <http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti ad esse considerando un valore di pH di 7.2.

Tutte le strutture cristallografiche sono state analizzate utilizzando i moduli *Biopolymer* e *Homology* di Insight2005 (Accelrys, San Diego).

Sono stati effettuati studi di previsione di strutture secondarie su GBP1, PIM1,  $\beta$ -tubulina isoforma I, III,  $\alpha$ -tubulina isoforma I, p110 $\alpha$ , p110 $\gamma$  e p85 utilizzando il server *Structure Prediction and Sequence Analysis (Predict Protein)* (<http://www.predictprotein.org/>) utilizzando le intere sequenze delle proteine umane estratte (Codice Swiss Prot GBP1:

---

P32455; Pim1: P11309;  $\beta$ I-Tubulina: Q9H4B7,  $\beta$ III-Tubulina: Q13509,  $\alpha$ I-Tubulina: P68363; p110 $\alpha$ : P42336, p110 $\gamma$ : P48736, p85: P27986) dal database *UniProtKB/Swiss-Prot* dal server *ExPASy Proteomic Server* (<http://expasy.org/sprot/>). La correttezza delle previsioni è stata poi verificata confrontando i dati della predizione con le strutture a raggi X utilizzando il comando *SecondaryClassify* nel pulldown *ProStat* del modulo *Homology*.

Gli allineamenti di sequenza sono stati effettuati utilizzando numerosi server quali: *BLAST* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast/>), *CLUSTALW2* (*WWW Service at the European Bioinformatics Institute*, <http://www.ebi.ac.uk/clustalw2>), *PROMALS 3D* (<http://prodata.swmed.edu/promals3d/promals3d.php>), *T-COFFEE ed ESPRESSO 3D COFFEE* (<http://www.tcoffee.org/>). Le sequenze analizzate sono state sia quelle estratte da *UniProtKB/Swiss-Prot* di GBP1, PIM1, Tubulina  $\beta$ I e  $\beta$ III e  $\alpha$ I-Tubulina sia tenendo conto di quelle estratte dalle strutture tridimensionali con il comando *Extract* nel pulldown *Sequenze* del modulo *Homology* ed allineate manualmente utilizzando il comando *Multiple\_Sequence* nel pulldown *Alignment* dello stesso modulo.

I motivi funzionali lineari coinvolti nelle interazioni proteina- proteina e presenti nel sito di legame della i) tubulina/podofillosina, ii) etoposide/topoisomerasiII $\beta$ , iii) GBP1 e iv) PIM1 sono stati identificati utilizzando il server *Eukaryotic Linear Motif* (<http://elm.eu.org/>)<sup>120</sup> che consente di identificare piccoli siti funzionali su proteine eucariotiche, così come quelli soggetti a modifiche post-traduzionali o coinvolti in interazioni proteina-proteina. I motivi identificati in GBP1 e PIM1 sono stati logicamente incrociati con i motivi presenti nei siti di legame della tubulina (in complesso con la podofillo tossina) e della topoisomerasiII $\beta$  (in complesso con l'etoposide). Ciò ha permesso di identificare un possibile sito di legame di NSC756093 in GBP1, caratterizzato da tre motivi funzionali lineari presenti anche nei siti di legame della tubulina e/o topoisomerasiII $\beta$ .

---

### 3.5c Costruzione dei modelli molecolari di GBP1, PIM1, e Tubulina $\alpha$ I/ $\beta$ III.

Tutti i calcoli per la costruzione dei vari modelli sono stati eseguiti utilizzando il campo di forza CVFF<sup>125</sup> per parametrizzare i residui amminoacidici delle diverse proteine.

#### 3.5.1 Costruzione del modello di GBP1.

Dal momento che nelle strutture cristallografiche della GBP1 (codice PDB ID: 1DG3) mancavano le regioni di quattro loop flessibili (Tabella 23), questi sono stati modellati utilizzando la procedura standard di costruzione di modelli prevista dal modulo Homology di Insight 2005 (Accelrys, San Diego).

**Tabella 23.** Loop di GBP1 modellati.

<i>LOOP</i>	<i>AMINOACIDI</i>	<i>SEED</i>	<i>INTERNAL- EXTERNAL OVERLAP</i>	<i>LOOP SCELTO</i>
Loop 1	63-73	314982	0.5	Loop5
Loop 2	157-166	1629523	0.5	Loop 10
Loop 3	190-193	293426	0.5	Loop 9
Loop 4	244-256	169665	0.6	Loop 10

Le coordinate degli aminoacidi appartenenti alle SCRs (6 – 62; 74 – 156; 167 – 189; 194 – 243; 257 – 583) sono state assegnate con il comando *Sequence/AssignCoords*. La porzione N-terminale (1-5) è stata aggiunta con il comando *END-REPAIR*. Per il C-terminale (584 – 592), invece, sono state applicate delle costanti di forza al fine di vincolare i residui 584 – 585 nella conformazione ad  $\alpha$ -elica sulla base della predizione del server *Predict Protein*. Di conseguenza il C-terminale del modello è stato aggiunto assegnando le coordinate del C-terminale della struttura cristallografica della GBP1 in complesso con il GTP (codice PDB ID: 1F5N). La carica totale del modello di GBP1 generato è risultata essere -7 (gli aminoacidi carichi positivamente sono 81 mentre gli aminoacidi carichi negativamente 88).

È stata quindi effettuata un'ottimizzazione del modello, lasciando libere di muoversi tutte le porzioni aggiunte e fissando tutto il resto. I parametri utilizzati sono i seguenti: *Step*: 100000000; algoritmo *Steepest descent*: convergenza fino a 10; algoritmo *Conjugate gradient*: fino a convergenza 1.

---

### 3.5.2 Costruzione del modello di PIM1

In accordo con i dati biochimici la struttura cristallografica presa come riferimento per la costruzione del modello di PIM1 è stata l'apoenzima (codice PDB ID: 1XQZ). Le coordinate degli aminoacidi appartenenti alla regione 122-399 sono state assegnate con il comando *Sequence/AssignCoords*. Le porzioni N-terminale (1-122) e quella C-terminale (400-404) sono state aggiunte con il comando *END-REPAIR*. La carica totale del modello di PIM1 generato è risultata essere -5 (gli aminoacidi carichi positivamente sono 45 mentre gli aminoacidi carichi negativamente 50). È stata quindi effettuata un'ottimizzazione del modello, in particolare tenendo ferma tutta la proteina e muovendo le regioni aggiunte, ossia l'N e C-terminale. I parametri utilizzati sono i seguenti: *Step*: 100000000; algoritmo *Steepest descent*: convergenza fino a 10; algoritmo *Conjugate gradient*: fino a convergenza 1.

### 3.5.3 Costruzione del modello della $\beta$ III-tubulina.

La nostra ipotesi di interazione prevede che la chinasi PIM1 e la GTPasi GBP1 formino un complesso trimerico con la  $\beta$ III-tubulina. A tal fine è stata presa come riferimento per la costruzione del modello della  $\beta$ III-tubulina la struttura cristallografica del dimero di Bos Taurus (codice PDB ID: 1JFF), dal momento che non è stata ancora determinata una struttura della tubulina dell'organismo Homo Sapiens, ad eccezione della  $\gamma$ -tubulina. Tuttavia, confrontando attentamente i *Predict Protein* delle tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  umane con le tubuline  $\alpha$  e  $\beta$  bovine, è emerso che sono strutturalmente quasi identiche ma differiscono per la presenza di alcuni aminoacidi.

La sequenza ricavata dalla struttura cristallografica della  $\beta$ I-tubulina di toro (PDB Id: 1JFF) è stata allineata con la sequenza della  $\beta$ III-tubulina utilizzando il comando *Sequence/Alignment*; sono state assegnate le coordinate con il comando *Sequence/AssignCoords* per gli aminoacidi che vanno da: 2 – 427. Le porzioni N-terminale (1) e quella C-terminale (428-446) sono state aggiunte con il comando *END-REPAIR*. La carica totale del modello di  $\beta$ III-tubulina generato è risultata essere -25 (gli aminoacidi carichi positivamente sono 36 mentre gli aminoacidi carichi negativamente 61). È stata quindi effettuata un'ottimizzazione del modello, in particolare tenendo ferma tutta la proteina e muovendo le regioni aggiunte, ossia l'N e C-terminale. I parametri utilizzati sono i seguenti: *Step*: 100000000; algoritmo *Steepest descent*: convergenza fino a 10; algoritmo *Conjugate gradient*: fino a convergenza 1.

---

---

### 3.5.4 Costruzione del modello della $\alpha$ I-tubulina.

Dal momento che non si conosce il tipo di isoforma di  $\alpha$ -tubulina che si associa all'isoforma  $\beta$ III, per la costruzione del modello si è ritenuto opportuno utilizzare la sequenza della  $\alpha$ -tubulina di tipo 1 ubiquitaria umana. In particolare è stata estratta da *Swiss-Prot* la sequenza della tubulina A1B ( TUB A1B→cod. accesso P68363) umana.

Anche in questo caso è stata utilizzata come riferimento per la costruzione del modello la struttura cristallografica del dimero  $\alpha/\beta$ -tubulina di toro (PDB ID: 1JFF). Dal momento che nelle strutture cristallografiche della  $\alpha$ -tubulina mancava la regione di un loop flessibile (tabella 24), questo è stato modellato utilizzando la procedura standard di costruzione di modelli prevista dal modulo Homology di Insight 2005 (Accelrys, San Diego).

**Tabella 24.** Loop dell' $\alpha$ -tubulina modellati.

<i>LOOP</i>	<i>AMINOACIDI</i>	<i>SEED</i>	<i>INTERNAL-EXTERNAL OVERLAP</i>	<i>LOOP SCELTO</i>
Loop 1	35-60	1276032	0.8	Loop5

La struttura cristallografica dell' $\alpha$ -tubulina di Bos Taurus (PDB ID: 1JFF) è stata allineata con la sequenza della tubulina A1B utilizzando il comando *Sequence/Alignment*; le coordinate degli aminoacidi 2–34 e 61–439 sono state assegnate con il comando *Sequence/AssignCoords*. Le porzioni N-terminale (1) e quella C-terminale (440-451) sono state aggiunte con il comando *END-REPAIR*. La carica totale del modello di  $\alpha$ I-tubulina generato è risultata essere -24 (gli aminoacidi carichi positivamente sono 40 mentre gli aminoacidi carichi negativamente 64). È stata quindi effettuata un'ottimizzazione del modello, in particolare tenendo ferma tutta la proteina e muovendo le regioni aggiunte, ossia il loop 35-60, l'N ed il C-terminale. I parametri utilizzati sono i seguenti: *Step*: 100000000; algoritmo *Steepest descent*: convergenza fino a 10; algoritmo *Conjugate gradient*: fino a convergenza 1.

---

### ***3.5d Costruzione del modello del complesso trimerico GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ I/ $\beta$ III***

I modelli molecolari generati sono serviti per la costruzione del complesso trimerico da utilizzare per gli studi di *docking*. I modelli di interazione dai quali sono state estratte informazioni strutturali per la costruzione del complesso PIM1/GBP1/tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III sono stati:

- a) il complesso tra la chinasi p110 $\gamma$  e la GTPasi RAS (codice PDB ID: 1HE8);
- b) il complesso tra il dimero  $\alpha$ / $\beta$ -tubulina e la GTPasi chinesina (codice PDB ID: 3EDL).

In particolare, è stato preso di riferimento il complesso p110 $\gamma$  con RAS ed è stato effettuato l'allineamento del dominio chinasi della p110 $\gamma$  con PIM1. Tale allineamento strutturale ha conseguentemente consentito l'allineamento di RAS con GBP1, entrambi facenti parte della famiglia delle GTPasi. Contemporaneamente, prendendo in considerazione il complesso chinesina (GTPasi appartenente alla famiglia delle dinamine, come GBP1) – tubulina  $\alpha$ / $\beta$  è stata effettuata la sovrapposizione strutturale di GBP1 con la chinesina e del modello della tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III con la tubulina  $\alpha$ / $\beta$ . Tutte gli allineamenti e le sovrapposizioni sopra elencate sono state eseguite utilizzando il comando *Sequence/Alignment* (Modulo Homology; Insight 2005). Il complesso trimerico ottenuto da queste sovrapposizioni è stato utilizzato per gli studi di *docking*.



---

### 3.5e Studi di docking sul complesso GBP1/PIM1/Tubulina $\alpha$ I/ $\beta$ III

Al fine di identificare quale conformazione assumesse il complesso trimerico, sono stati eseguiti studi di *docking* sui complessi GBP1/PIM1/Tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III usando una metodologia di *docking* che considera tutto il sistema flessibile (ligando e proteina) (Affinity, SA\_Docking; Insight 2005, Accelrys San Diego). Le cariche parziali e formali atomiche sono state assegnate usando il campo di forza CVFF.<sup>125</sup> Sebbene nel successivo protocollo di *docking* flessibile l'intero sistema venga comunque perturbato dal metodo Monte Carlo e dal *simulated annealing*, tuttavia la procedura di *docking* dinamico richiede una struttura iniziale ragionevole. Per tale motivo è stato generato un modello di partenza del complesso trimerico (vedere paragrafo precedente).

Poichè tale protocollo di *docking* prevede una ricerca conformazionale con il metodo Monte Carlo di un "ligando" rispetto ad una "proteina", si è deciso di eseguire due serie di *docking*: nella prima si è considerato GBP1 "proteina" ed il complesso PIM1/Tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III "ligando" e viceversa nella seconda. Le strutture di PIM1 e del dimero tubulina  $\alpha$ I/ $\beta$ III sono state complessate con il comando *Modify/Merge* (Modulo Biopolymer; Insight 2005). Inoltre, al fine di mimare l'ambiente citoplasmatico entrambi i calcoli di *docking* sono stati eseguiti considerando le molecole di acqua presenti nelle strutture cristallografiche ad eccezione di quelle localizzate all'interfaccia fra le proteine. In particolare per valutare nel dettaglio il ruolo giocato dalle molecole d'acqua presenti nei siti catalitici sono stati eseguiti su ciascuna serie due tipologie di *docking*: una dove quest'ultime sono state lasciate libere di muoversi l'altra dove sono state vincolate rispetto alla loro posizione iniziale applicando una costante di forza di 10 kcal/mol/Å.

Tutti gli atomi presenti nel complesso sono stati lasciati liberi di muoversi durante l'intero corso del calcolo di *docking*, eccetto quelli presenti nelle SCRs di ogni monomero i quali sono stati vincolati conformazionalmente applicando una costante di forza. Tali SCRs sono state ricavate utilizzando il server *Structure Prediction and Sequence Analysis (Predict Protein)* (<http://www.predictprotein.org/>) ed è stata effettuata un'attenta analisi bioinformatica dei risultati ottenuti.

Per il calcolo delle interazioni di non legame è stato utilizzato il metodo *Quartic\_vdW\_no\_Coul*.

Sono state generate casualmente 20 strutture utilizzando la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione con un criterio di tolleranza energetico di  $10^6$  Kcal/mol per assicurare un'ampia variabilità delle strutture da minimizzare (2500 iterazioni;  $\epsilon=1$ ). Durante questa fase

---

i “ligandi” sono stati mossi attraverso una combinazione casuale di movimenti traslazionali e rotazionali, al fine di campionare sia lo spazio conformazionale del “ligando” che la sua orientazione rispetto alla “proteina” (MxRChange = 3 Å; MxAngChange = 180°). Al fine di evitare forti divergenze nelle energie di Van der Waals (VdW) è stato scalato il termine relativo a tale forza di un fattore pari a 0.1. Dopo la fase di minimizzazione (*Conjugate gradient*; 2500 iterazioni;  $\epsilon=1$ ), sono stati applicati sia un criterio di controllo di similitudine delle strutture (RMS tolerance=0.3 Kcal/Å) che un criterio di energia (Energy test; T=50 K) per selezionare venti soluzioni accettabili. I complessi ottenuti sono stati minimizzati.

Al fine di testare la stabilità delle strutture del complesso trimerico risultanti dai *docking*, tutti i complessi accettati dopo la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione, sono stati sottoposti al protocollo di dinamica molecolare del *simulated annealing*. Per il calcolo delle interazioni di non legame sono stati scelti diversi metodi: *Cell\_Multipole* e *Group Based* e per le SCRs sono stati applicati gli stessi vincoli conformazionali utilizzati durante la procedura combinata Monte Carlo/minimizzazione.

Il protocollo di *simulated annealing* include 5 ps di fasi di dinamica divisi in 20 cicli, ciascuno di 100 fs durante i quali la temperatura del sistema viene diminuita linearmente da 500K a 300K (integratore di velocità Verlet; time step= 1 fs), contemporaneamente le forze di vdW e di Coulomb sono state riportate dal 10% del loro valore al 100%.

Alla fine dei calcoli di dinamica molecolare ciascun complesso ottenuto è stato sottoposto ad una minimizzazione finale di  $10^4$  cicli.

Tutti i complessi ottenuti sono stati sottoposti ad una dettagliata analisi bioinformatica.

---

### 3.5f *Studi di docking sul complesso NSC756093/GBP1*

Al fine di identificare un possibile sito di legame per il derivato azapodofillotossinico NSC756093 in GBP1, sono stati eseguiti studi di *docking* dinamico sul complesso NSC756093/GBP1 utilizzando, anche in questo caso, una metodologia di *docking* che considera tutto il sistema flessibile (ligando e proteina) (modulo Affinity, SA\_Docking; Insight2005, Accelrys, San Diego) (129). Per i successivi calcoli di docking è stato utilizzato il modello molecolare di GBP1 umana *full-length* (hGBP1<sup>FL</sup>) precedentemente costruito (vedi paragrafo 3.5.1). Le cariche parziali e formali atomiche sono state assegnate usando il campo di forza CVFF. Sebbene nel successivo protocollo di *docking* flessibile l'intero sistema venga comunque perturbato dal metodo Monte Carlo e dal *simulated annealing*, tuttavia la procedura di *docking* dinamico richiede una struttura iniziale ragionevole. Per tale motivo, il complesso di partenza NSC756093/GBP1, è stato sottoposto ad una minimizzazione energetica. I parametri utilizzati sono i seguenti: *Step*: 10000000; algoritmo *Steepest descent*, con un valore di  $RMS = 10 \text{ kcal}/\text{\AA}$ ; algoritmo *Conjugate gradient*, con un  $RMS = 1 \text{ kcal}/\text{\AA}$ ;  $\epsilon = 1$ . Durante la minimizzazione energetica tutti gli atomi presenti nel complesso sono stati lasciati liberi di muoversi ad eccezione di quelli presenti nelle SCRs di GBP1 sui quali sono stati applicati gli stessi vincoli conformazionali utilizzati nel modello trimetrico. In particolare, nelle SCRs sono state individuate sedici  $\alpha$ -eliche e quattro foglietti  $\beta$  di seguito riportati:  $\alpha 1$ : aa26-32;  $\alpha 2$  aa113-121;  $\alpha 3$  aa139-151;  $\alpha 4$  aa199-205;  $\alpha 5$  aa221-227;  $\alpha 6$  aa261-272;  $\alpha 7$  aa292-303;  $\alpha 8$  aa315-322;  $\alpha 9$  aa326-334;  $\alpha 10$  aa350-370;  $\alpha 11$  aa376-397;  $\alpha 12$  aa404-423;  $\alpha 13$  aa433-451;  $\alpha 14$  aa457-465;  $\alpha 15$  aa469-563;  $\alpha 16$  aa567-585;  $\beta 1$  aa12-14;  $\beta 2$  aa39-43;  $\beta 3$  aa79-80;  $\beta 4$  aa92-95. Durante i calcoli, le molecole d'acqua presenti nel sito catalitico di GBP1 sono state vincolate applicando una costante di forza di  $100 \text{ kcal}/\text{\AA}^2$ ; in particolare, sono state considerate tutte le molecole di acqua distanti  $6 \text{ \AA}$  da ogni atomo del nucleotide (GppNHp di GBP1, PDB ID: 1F5N).

Anche in questo protocollo di *docking*, che prevede una ricerca conformazionale con il metodo Monte Carlo di NSC756093 all'interno del modello molecolare ottimizzato di GBP1, tutti gli atomi presenti nel complesso sono stati lasciati liberi di muoversi durante i calcoli di *docking*, eccetto quelli presenti nelle SCRs di GBP1 sui quali sono stati applicati gli stessi vincoli conformazionali utilizzati durante la fase di minimizzazione energetica di NSC756093/GBP1. Inoltre, al fine di mimare l'ambiente citoplasmatico, i calcoli di *docking* sono stati eseguiti considerando le molecole di acqua presenti nella struttura cristallografica di GBP1 ad eccezione di quelle che si sovrappongono ad NSC756093. In particolare per valutare

---

nel dettaglio il ruolo giocato dalle molecole d'acqua presenti nei siti catalitici sono stati eseguiti, anche in questo caso, due tipologie di *docking*: una dove quest'ultime sono state lasciate libere di muoversi l'altra dove sono state vincolate applicando una forza di 100 kcal/Å<sup>2</sup>.

Il *docking* è stato eseguito utilizzando tre differenti metodi per il calcolo delle interazioni di non legame: i) *Quartic\_vdW\_no\_Coul* (vdW CUT\_OFF: 5), ii) *Cell\_Multipole*; iii) *Group Based* (vdW and Coul CUT\_OFF: 15). Il protocollo Monte Carlo/*simulated annealing* applicato durante i calcoli di *docking* è stato lo stesso di quello utilizzato durante la procedura di *docking* sul complesso PIM1/GBP1/tubulina αI/βIII (vedi paragrafo 3.5e).

I complessi generati in seguito al protocollo Monte Carlo/*simulated annealing* sono stati classificati secondo i loro valori di energia conformazionale ed è stata eseguita un'analisi strutturale (modulo Homology, Prostat, Insight2005) per verificare la correttezza dei valori degli angoli diedri. Le strutture caratterizzate da una geometria distorta dello scheletro peptidico sono state scartate. Infine è stata eseguita una dettagliata analisi bioinformatica per individuare i motivi funzionali lineari presenti nel sito di legame di NSC756093.

E' stato scelto il complesso NSC756093/GBP1 che presentava l'energia conformazionale più bassa e conteneva nel sito di legame di NSC756093 almeno tre motivi funzionali lineari in comune con i siti di legame della tubulina e/o topoisomeraseIIβ. La struttura è stata ulteriormente sottoposta a minimizzazione (campo di forza CVFF; metodo *Group Based*; CUTOFF: 20) combinando l'algoritmo *Steepest descent* e *Conjugate gradient* (RMS inferiore a 0,1 kcal/Å) per permettere il rilassamento dell'intera proteina, ed è stata sottoposta nuovamente alla stessa analisi strutturale e bioinformatica sopra descritta. La qualità del modello molecolare ottenuto dal calcolo di *docking* è stata, infine, valutata utilizzando il server Procheck.<sup>117</sup>

I conformeri del PM7 ad energia più bassa ( $\leq$  di 5 Kcal/mol dal minimo globale di energia) di ciascuna famiglia conformazionale dei composti NSC756092, NSC756094, NSC756095, NSC759100 e NSC756108 sono stati sovrapposti su NSC756093 in complesso con GBP1 e i complessi risultanti sono stati sottoposti a minimizzazione energetica utilizzando la procedura sopra descritta. Infine, tutti i complessi ligando/enzima sono stati classificati prendendo in considerazione i valori di energia potenziale dei ligandi (es. il valore del  $\Delta E$  dal minimo globale di energia).

---

## 4. BIBLIOGRAFIA

1. Vogelstein, B.; Kinzler, K.W. The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* **1993**, *9*, 138-41.
2. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
3. Alenzi, F.Q.B. Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle. *Br J Biomed Sci.* **2004**, *61*, 99-102.
4. Fukasawa, K.; Wiener, F.; Vande, G.F.; Mai, W. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* **1997**, *15*, 1295-1302.
5. Chu, L.H.; Chen, B.S. Construction of a cancer-perturbed protein-protein interaction network for discovery of apoptosis drug targets". *BMC Syst. Biol.* **2008**, *2*, 56-73.
6. Charles, J.S. Cancer Cell Cycles. *Science* **1996**, *274*, 1672-1677.
7. Molecular Cell Biology. Checkpoints in Cell-Cycle Regulation, 4th edition.
8. Kastan, M.B; Onyekwere, O.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Craig R.W. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA Damage. *Cancer Research* **1991**, *51*, 6304-6311.
9. Nigg, E.A. Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioassays.* **1995**, *17*, 471-80.
10. Scott, W.L.; Athena, W.L. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **2000**, *21*, 485-495.
11. Wong, R.S.Y. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2011**, *30*, 87-99.
12. O'Brien, M.A.; Kirby, R. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and antiapoptotic pathways and dysregulation in disease. *J. Vet. Emerg. Crit. Care* **2008**, *18*, 572-585.
13. Tsuruo, T.; Naito, M.; Tomida, A.; Fujita, N; Mashima, T.; Sakamoto, H.; Haga, N.; Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 15-21.
14. Zahreddine, H.; Borden, K.L. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 28-35.
15. Tzakos, A.G.; Fokas, D.; Johannes, G.; Moussis, V.; Hatzimichael, E.; Briasoulis, E.; Targeting Oncogenic Protein-Protein Interactions by Diversity Oriented Synthesis and Combinatorial Chemistry Approaches. *Molecules* **2011**, *16*, 4408-4427.
16. Che, Y.; Brooks, B.R.; Marshall, GR. Development of small molecules designed to modulate protein–protein interactions. *J Comput Aided Mol Des.* **2006**, *20*, 109–130.

- 
17. Lander, E.S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
  18. Cohen, G.B.; Ren, R.; Baltimore, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell* **1995**, *80*, 237 – 248.
  19. Baker, M.C. The atoms of language. Basic books, **2001**, New York.
  20. Gimona, M. Protein linguistics - a grammar for modular protein assembly? *Nature* **2006**, *7*, 68-73.
  21. Che, Y.; Marshall, G.R. Privileged scaffolds targeting reverse-turn and helix recognition. *Expert Opin Ther Targets*. **2008**, *12*, 101-14.
  22. Schiff, P.B.; Fant, J.; Horwitz, S.B.; Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **1979**, *277*, 665-667.
  23. Amos, L.A; Löwe, J. How Taxol stabilises microtubule structure. *Chemistry & Biology*, **1999**, *6*, R65-69.
  24. Rodi, D.J.; Janes, R.W; Sanganee, H.J.; Holton, R.A.; Wallace, B.A.; Makowski, L. Screening of a library of phage-displayed peptides identifies human bcl-2 as a taxol-binding protein. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 197-203.
  25. Ferlini C. et al. “Paclitaxel Directly Binds to Bcl-2 and Functionally Mimics Activity of Nur77”. *Cancer Research* **2009**, *69*, 6906-6914.
  26. Vassilev, L.T. et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* **2004**, *303*, 844-848.
  27. Grasberger, B.L. et al. Discovery and cocrystal structure of benzodiazepinedione HDM2 antagonists that activate p53 in cells. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 909 – 912.
  28. Klein, C.; Vassilev, L.T. Targeting the p53–MDM2 interaction to treat cancer. *Br J Cancer*. **2004**, *91*, 1415-9.
  29. Efeyan, A.; Serrano, M. p53: Guardian of the Genome and Policeman of the Oncogenes. *Cell Cycle* **2007**, *6*, 1006-1010.
  30. Moll, U.M.; Petrenko, O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res.* **2003**, *1*, 1001-8.
  31. Bogan, A.A.; Thorn, K.S. Anatomy of hot spots in protein interfaces. *J Mol Biol* **1998**, *280*, 1–9.
  32. Scott, J.K.; Huang, .SF.; Gangadhar, B.P.; Samoriski, G.M.; Clapp, P.; Gross, R.A.; Taussig, R.; Smrcka, A.V. Evidence that a protein-protein interaction “hot spot” on heterotrimeric G protein  $\beta\gamma$  subunits is used for recognition of a subclass of effector. *EMBO J* **2001**, *20*,767-76.
-

- 
33. Chi, S.W.; Lee, S.H.; Kim, D.H.; Ahn, M.J.; Kim, J.S.; Woo, J.Y.; Torizawa, T.; Kainosho, M.; Han K.H. Structural Details on mdm2-p53 Interaction. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 38795–38802.
  34. Cohen, G.B.; Ren, R.; Baltimore, D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* **1995**, *80*, 237-248.
  35. Sudol, M. The WW module competes with the SH3 domain? *Trends Biochem Sci.* **1996**, *21*, 161-163.
  36. Plevin, M.J.; Mills, M.M., Ikura, M. The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* **2005**, *30*, 66-69.
  37. Cowan, P.M.; McGavin, S., North, A.C. Structure of Poly-L-Proline. *Nature* **1995**, *176*, 501-503.
  38. Kay, B.K.; Williamson, M.P.; Sudol, M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. *FASEB J.* **2000**, *14*, 231-241.
  39. Williamson, M.P. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *Biochem J.* **1994**, *297*, 249-260.
  40. Hagerman, A.E.; Butler, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *J Biol Chem.* **1981**, *256*, 4494-7.
  41. Veis, A.; Nawrot, C.F. Basicity differences among peptide bonds. *J Am Chem Soc.* **1970**, *92*, 3910-4.
  42. Adzhubei, A.A.; Sternberg, M.J. Left-handed polyproline II helices commonly occur in globular proteins. *J Mol Biol.* **1993**, *229*, 472-93.
  43. Aasland, R. et al. Normalization of nomenclature for peptide motifs as ligands of modular protein domains. *FEBS Lett.* **2002**, *513*, 141-4.
  44. Tong, L.; Warren, T.C.; King, J.; Betageri, R.; Rose, J.; Jakes, S. Crystal structures of the human p56lck SH2 domain in complex with two short phosphotyrosyl peptides at 1.0 Å and 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **1996**, *256*, 601–610.
  45. Bork, P.; Sudol, M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci.* **1994**, *19*, 531-3.
  46. André, B.; Springael, J.Y. WWP, a new amino acid motif present in single or multiple copies in various proteins including dystrophin and the SH3-binding Yes-associated protein YAP65. *Biochem Biophys Res Commun.* **1994**, *205*, 1201-5.
  47. Hofmann, K.; Bucher, P. The rsp5-domain is shared by proteins of diverse functions. *FEBS Lett.* **1995**, *358*, 153-7.
-

- 
48. Macias, M.J. et al. Structure of the WW domain of a kinase-associated protein complexed with a proline-rich peptide. *Nature* **1996**, *382*, 646-9.
  49. He, B.; Kempainen, J. A.; Wilson, E. M. FXXLF and WXXLF Sequences Mediate the NH<sub>2</sub>-terminal interaction with the Ligand Binding Domain of the Androgen Receptor. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 22986–22994.
  50. Woo, A.R.; Poon Y.C.R. Cyclin dependent kinases and S-phase control in mammalian cells. *Cell Cycle* **2004**, 316-324.
  51. Frum, R.; Ramamoorthy, M.; Mohanraj, L.; Deb, S.; Deb, S.P. MDM2 controls the timely expression of cyclin A to regulate the cell cycle. *Mol. Cancer Res.* **2009**, *7*, 1253-1267.
  52. Hsu, I.C.; Tokiwa, T.; Bennett, W.; Metcalf, R.A.; Welsh, J.A.; Sun, T.; Harris, C.C. p53 gene mutation and integrated Hepatitis-B viral DNA sequences in human liver cancer cell lines. *Carcinogenesis* **1993**, *14*, 987-992.
  53. Gomez-Monterrey, I. et al. Identification of the spiro(oxindole-3,3'-thiazolidine)-based derivatives as potential p53 activity modulators. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 8319–8329.
  54. D'Silva, L.; Ozdowy, P.; Krajewski, M.; Rothweiler, U.; Singh, M.; Holak, T. A. Monitoring the effects of antagonists on protein-protein interactions with NMR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13220–13226.
  55. Krajewski, M.; Rothweiler, U.; D'Silva, L.; Sudipta Majumdar, S.; Klein, C.; Holak., T.A. An NMR-based antagonist induced dissociation assay for targeting the ligand-protein and protein-protein interactions in competition binding experiments. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4382–4387.
  56. Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2001**, *46*, 3–26.
  57. Ihlenfeldt, W.D.; Voigt, J.H.; Bienfait, B.; Oellien, F.; Nicklaus, M.C. Enhanced CACTVS browser of the Open NCI Database. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 46–57; <http://cactus.nci.nih.gov/ncidb2.1/>.
  58. (a) Bolton, E.; Wang, Y.; Thiessen, P.A.; Bryant, S.H. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. *Annual Reports in Computational Chemistry*; American Chemical Society, Washington, DC, **2008**; Vol. 4, Chapter 12. (b) Wang, Y. et al. PubChem's BioAssay Database. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D400–D412; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>.
-



- 
59. Gembarska, A. et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 1239–1247.
  60. Maple, J.R.; Hwang, M.J.; Stockfish, T.P.; Dinur, U.; Waldman, M.; Ewig, C.S.; Hagler, A.T. Derivation of Class II force fields. I. Methodology and quantum force field for the alkyl function group and alkane molecules. *J. Comput. Chem.* **1994**, *15*, 162-182.
  61. Fletcher, R. Unconstrained optimization. In *Practical Methods of Optimization*, John Wiley & Sons: New York, **1980**; Vol. 1.
  62. Stewart, J.J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods V: modification of NDDO approximations and application to 70 elements. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 1173-1213.
  63. MOPAC2009, Stewart J.J.P. *Computational Chemistry*, Colorado Springs, CO, USA, **2008**, <http://OpenMOPAC.net>.
  64. Baker, J. An algorithm for the location of transition states. *J. Comput. Chem.* **1986**, *7*, 385-395.
  65. Canel, C.; Moraes, R.M.; Dayan, F.E.; Ferreira, D. Molecules of Interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry* **2000**, *54*, 115–120.
  66. Hartwell, J.L.; Schrecker, A.W. Components of Podophyllin. V. The Constitution of Podophyllotoxin. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 2909–2916.
  67. Bohlin, L.; Rosen, B. Podophyllotoxin derivatives: Drug discovery and development. *Drug Discovery Today* **1996**, *1*, 343-351.
  68. Kavallaris, M. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific h-tubulin isotypes. *J Clin Invest* **1997**, *100*, 1282–93.
  69. Ranganathan, S. Et al. Altered beta-tubulin isotype expression in paclitaxel-resistant human prostate carcinoma cells. *Br J Cancer* **1998**, *77*, 562–6.
  70. Liu, B.; Staren, E.D.; Iwamura, T.; Appert, H.; Howard, J. Mechanisms of taxotere-related drugresistance in pancreatic carcinoma. *J Surg Res* **2001**, *99*, 179–86.
  71. Ojima, I.; Ferlini, C. New Insights into Drug Resistance in Cancer. *Chem Biol.* **2003**, *10*, 583–589.
  72. Verrills, N.M.; Flemming, C.L.; Liu, M.; Ivery, M.T.; Cobon, G.S.; Norris, M.D.; Haber, M.; Kavallaris, M. Microtubule alterations and mutations induced by desoxyepothilone B: implications for drug-target interactions. *Chem. Biol.* **2003**, *10*, 597–607.
  73. Burkhart, C.A. et al. The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochim Biophys Acta* **2001**, *1471*, 1-9.
-

- 
74. Mariani, M.; Shahabi, S.; Sieber, S.; Scambia, G.; Ferlini, C. Class III beta-tubulin (TUBB3): more than a biomarker in solid tumors?. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 726-31.
  75. Derry, W.B.; Wilson, L.; Khan, I.A.; Luduena, R.F.; Jordan, M.A. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes. *Biochemistry* **1997**, *36*, 3554 – 3562.
  76. Ferlini C. et al. Hypoxia induces class III beta-tubulin gene expression by HIF-1alpha binding to its 3' flanking region. *Gene* **2008**, *409*, 100 – 108.
  77. Ferlini C. et al. HuR regulates beta-tubulin isotype expression in ovarian cancer. *Cancer Res* **2010**, *70*, 5891 – 5900.
  78. Chen, J. et al. Hypoxia-mediated up-regulation of PIM1 contributes to solid tumor formation. *Am J Pathol* **2009**, *175*, 400 – 411.
  79. Ferlini, C. et al. Class III beta-tubulin and the cytoskeletal gateway for drug resistance in ovarian cancer. *J Cell Physiol.* **2012**, *227*, 1034-41.
  80. Naschberger, E.; Lubeseder-Martellato, C; Meyer, N.; Gessner, R.; Kremmer, E.; Gessner, A.; Stürzl, M. Human guanylate binding protein-1 is a secreted GTPase present in increased concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *Am J Pathol* **2006**, *169*, 1088–1099.
  81. Weinlander, K.; Naschberger, E. Guanylate binding protein-1 inhibits spreading and migration of endothelial cells through induction of integrin a4 expression. *FASEB J.* **2008**, *22*, 4168–4178.
  82. Kunzelmann, S.; Praefcke G.J.; Herrmann, C. Transient kinetic investigation of GTP hydrolysis catalyzed by interferon-gamma-induced hGBP1 (human guanylate binding protein1). *J Biol Chem* **2006**, *281*, 28627–28635.
  83. Praefcke, G.J.; Geyer, M.; Schwemmle, M.; Kalbitzer, H.R.; Herrmann, C. Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif . *J Mol Biol* **1999**, *292*, 321–332.
  84. Schwemmle, M.; Staeheli, P. The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* **1994**, *269*, 11299–11305.
  85. Cheng, Y.S.; Patterson, C.E.; Staeheli, P. Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* **1991**, *11*, 4717–4725.
  86. (a) Prakash, B.; Praefcke, G.J.; Renault, L.; Wittinghofer, A.; Herrmann, C. Structure of human guanylate-binding protein1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* **2000**, *403*, 567-71. (b) Prakash, B; Renault, L.; Praefcke, G.J.; Herrmann, C.;
-

- 
- Wittinghofer, A. Triphosphate structure of guanylate-binding protein1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *Embo* **2000**, *19*, 4555-4564.
87. Ghosh; A.; Praefcke, G.J.K; Renault L.; Wittinghofer, A.; Herrmann, C. How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP. *Nature* **2006**, *440*, 101-104.
88. Abdullah, N.; Srinivasan, B.; Modiano, N.; Cresswell, P.; Sau, A.K. Role of individual domains and identification of internal Gap in human Guanylate Binding Protein-1 (hGBP1). *J Mol Bio* **2009**, *386*, 690 – 703.
89. Praefcke, G.J.K.; McMahan, H.T. The dynamin superfamily: universal membrane tabulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5*, 133-146.
90. Amaravadi, R.; Thompson, C.B. The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* **2005**, *115*, 2618-24.
91. Muraski J. et al. Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nature Medicine* **2007**, *13*, 1467-1475.
92. Miura, O.; Miura, Y.; Nakamura, N.; Quelle, F.W.; Witthuhn, B.A.; Ihle, J.N.; Aoki, N. Induction of tyrosine phosphorylation of Van and expression of Pim-1 correlated with Jak2-mediated growth signalling from the erythropoietin receptor. *Blood* **1994**, *4*, 4135-4141.
93. Losman, J. et al. IL-4 signaling regulated through the recruitment of phosphatases, kinases, and SOCS protein to the receptor complex. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **1999**, *64*, 405-416.
94. Xie, Y.; Xu, K.; Dai, B.; Guo, Z.; Jiang, T.; Chen, H.; Qiu, Y. The 44 kD Pim1 kinase directly with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **2006**, *25*, 70-78.
95. Saris, C.J.; Domen, J.; Berns, A. The pim-1 oncogene encodes two related protein serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG. *EMBO J.* **1991**, *10*, 655-664.
96. Koike, N.; Maita, H.; Taira, T.; Ariga, H.; Iguchi-Ariga, S.M. Identification of heterochromatin protein 1 (HP1) as a phosphorylation target by Pim-1 kinase and the effect of phosphorylation on the transcriptional repression function of HP1(1). *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 17–21.
97. Mochizuki, T.; Kitanaka, C.; Noguchi, K.; Muramatsu, T.; Asai, A.; Kuchino, Y. Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase.
-

- 
- Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 18659–18666.
98. Xie X. et al. The 44-kDa Pim-1 Kinase Phosphorylates BCRP/ABCG2 and Thereby Promotes Its Multimerization and Drug-resistant Activity in Human Prostate. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 6795–6804.
  99. Ionov Y. et al. Pim1 protein kinase is nuclear in Burkitt's lymphoma :nuclear localization is necessary for its biologic effects. *Anticancer Res* **2003**, *23*, 167-178.
  100. Losman, J.A.; Chen, X.P.; Vuong, B.Q.; Fay, S.; Rothman, P.B. Protein Phosphatase 2A Regulates the Stability of Pim Protein Kinases. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 4800-4805.
  101. Bullock, A.N.; Debreczeni, J.; Amos, A.L.; Knapp, S.; Turk, B.E. Structure and Substrate Specificity of the pIm1 Kinase. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 41675-41682.
  102. Quian KC. et al. Structural basis of constitutive activity and a unique nucleotide binding mode of human Pim1 kinase. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 130-137.
  103. Jacobs, M. et al. Pim1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY2904002. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 13728-13734.
  104. Fox, C.J.; Hammerman, P.S.; Cinalli, R.M.; Master, S.R.; Chodosh, L.A.; Thompson, C.B. The serine/threonine kinase Pim-2 is a transcriptionally regulated apoptotic inhibitor. *Genes Dev* **2003**, *17*, 1841–1854.
  105. Qian, K.C. et al. Expression, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis of human Pim-1 kinase. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **2005**, *61*, 96-9.
  106. Sullivan, K. Structure and utilization of tubulin isotypes. *Annu Rev Cell Biol* **1988**, *4*, 687– 716.
  107. Roach, M.C.; Boucher, V.L.; Walss, C.; Ravdin, P.M.; Ludueña, R.F. Preparation of a monoclonal antibody specific for the class I isotype of h-tubulin: the h isotypes of tubulin differ in their cellular distributions within human tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* **1998**, *39*, 273–85.
  108. Mitchison, T.J.; Kirshner, M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **1984**, *312*, 237-242.
  109. Desai, A. ; Mitchison, T.J. Microtubule polymerization Dynamics. *Ann Rev Cell Dev Biol* **1997**, *13*, 83-117.
  110. Mitchison, T.J. Localization of an exchangeable GTP binding site at the plus end of microtubules. *Science* **1993**, *261*, 1044-1047.
-

- 
111. Doxsey, S. Re-evaluating centrosome function. *Nature Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 688-698.
  112. Vinh, D.B.; Kern, J.W.; Hancock, W.O.; Howard, J.; Davis, T.N. Reconstitution and characterization of budding yeast  $\gamma$ -tubulin complex. *Mol Biol Cell* **2002**, *13*, 1144-1157.
  113. Erickson, H.P.; O'Brien, E.T.; Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* **1992**, *21*, 145-166.
  114. Drechsel, D.N.; Kirshner, M. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol* **1994**, *4*, 1053-61.
  115. Caplow, M.; Shanks, J. Evidence that a single monolayer tubulin-GTP cap is both necessary and sufficient to stabilize microtubules. *Mol Biol Cell* **1996**, *7*, 663-675.
  116. Drewes, G.; Ebnet, A.; Mandelkow, E.M. MAPs, MARKs, and microtubule dynamics. *Trends Biochem Sci* **1998**, *23*, 307-311.
  117. Laskowski, R.A.; Macarthur, M.W.; Moss, D.S.; Thornton, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Cryst* **1993**, *26*, 283-291.
  118. Sims, G.E.; Kim, S.H. A method for evaluating the structural quality of protein models by using higher-order  $\phi$ - $\psi$  pairs scoring. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*, 4428-4432.
  119. Deng, J.Z.; Newman, D.J.; Hecht, S.M. Use of COMPARE analysis to discover functional analogues of bleomycin. *J Nat Prod* **2000**, *63*, 1269-72.
  120. Dinkel, H. et al. The eukaryotic linear motif resource ELM: 10 years and counting. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D259-66.
  121. Leroy, D.; Kajava, A.V.; Frei, C.; Gasser, S.M. Analysis of etoposide binding to subdomains of human DNA topoisomerase II alpha in the absence of DNA. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1624-34.
  122. Vigil, D.; Cherfils, J.; Rossman, K.L.; Der, C.J. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy?. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 842-57.
  123. Vopel, T. et al. Mechanism of GTPase-activity-induced self-assembly of human guanylate binding protein 1. *J Mol Biol* **2010**, *400*, 63-70.
  124. Praefcke, G.J.K. et al. Identification of residue in the human guanylate-binding protein 1 critical for nucleotide binding and cooperative GTP hydrolysis. *J Mol Bio* **2004**, *344*, 257-269.
  125. Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V.A.; Osguthorpe, D.J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A.T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: e coli dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* **1998**, *4*, 31-47.
-

---

126. Stewart, J.J.P. MOPAC2012, Computational Chemistry, Colorado Springs, CO, **2012**, USA, <http://OpenMOPAC.net>.