

## ***SEZIONE SPERIMENTALE***



## **CAPITOLO 9. MATERIALI E METODOLOGIE.**

### **9.1 Preparazione della resina utilizzata nella purificazione della TcAChE tramite cromatografia di affinità'.**

La resina utilizzata per la colonna dell'FPLC è la EAH Sepharose 4B, che contiene gruppi amminici liberi ad un'estremità di uno *spacer* a dieci atomi di carbonio (1,6-diamminoesano). Questi gruppi sono indicati per accoppiare ligandi contenenti gruppi carbossilici con il metodo dell'accoppiamento via carbodiimmide (vedi Fig. 9.1).

Prima di preparare la resina è stato necessario sintetizzare il ligando di affinità, l'*m*-carbossifeniltrimetilammonio bromuro, adatto ad immobilizzare la TcAChE durante la purificazione.

Per l'accoppiamento è stata usata la N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDAC).

### **9.2 Sintesi del ligando di affinità'.**

#### ***Quaternizzazione dell'acido m-dimetilamminobenzoico.*** (Fig. 9.2)

5 g di acido *m*-dimetilamminobenzoico vengono sciolti in 60 ml di metanolo. Dopo aggiunta di 20 ml di ioduro di metile, si bolle a ricadere per quattro ore.

La miscela di reazione viene evaporata ed il residuo viene risospeso in etere e tritato. La sospensione viene filtrata sotto vuoto ed il residuo solido viene seccato e purificato per cristallizzazione da etanolo. Si ottengono 7 g di *m*-carbossifeniltrimetilammonio ioduro con una resa del 76,6 %.

#### ***Reazione di scambio ioduro-bromuro.*** (Fig. 9.2)

I 7 g di *m*-carbossifeniltrimetilammonio ioduro vengono sciolti in 41 ml di acido acetico glaciale. Dopo aggiunta di 50 ml di HBr al 33 % in acido

acetico glaciale, la soluzione viene lasciata sotto agitazione tutta la notte a temperatura ambiente.

Il prodotto viene poi precipitato per aggiunta di 300 ml di etere, viene filtrato sotto vuoto e lavato abbondantemente con etere, ed infine purificato per cristallizzazione da etanolo.

Si ottengono 4 g di m-carbossifeniltrimetilammonio bromuro con una resa del 68 %.

Lo spettro NMR riportato conferma la presenza del gruppo ammonico quaternario desiderato con un singoletto da nove atomi di idrogeno a 8,86  $\delta$  (Fig. 9.3).

### **9.3 Derivatizzazione della fase stazionaria.**

La reazione di derivatizzazione, riportata in Fig.9.4, è stata condotta secondo la seguente procedura:

50 ml di EAH Sepharose 4B, contenenti tra 350 e 550  $\mu$ mol di gruppi amminici liberi (7-11  $\mu$ mol per ml di resina), e conservati in etanolo al 20%, vengono lavati in vari passaggi con 3 l di NaCl 0,5 M, e con 1 l di acqua distillata. La resina viene poi risospesa in una soluzione contenente 1,3 g di m-carbossifeniltrimetilammonio bromuro (pm 260,5 millimoli) e 2 g di N-(3-dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimmide cloridrato (EDAC) in 100 ml di acqua distillata. Il pH viene portato a 5 per aggiunta di NaOH, e la sospensione viene lasciata sotto agitazione (delicata, non con agitatore magnetico) per 16 ore a temperatura ambiente, controllando il pH nelle prime ore di reazione e riportandolo tra 4,5 e 6 in caso di abbassamento, sempre per aggiunta di NaOH.

Conclusa la reazione, la resina viene portata a secco e quindi risospesa in 50 ml di una soluzione acquosa di acido acetico/acetato di sodio 1 M a pH 4,75 contenente 1 g di EDAC e lasciata 4 ore sotto agitazione a temperatura ambiente, per acetilare i gruppi amminici che non hanno reagito.

La resina viene poi lavata in 3 passaggi ciascuno da 250 ml di acetato di sodio 0,1 M NaCl 0,5 M a pH 4, e da 250 ml di Tris 0,1 M NaCl 0,5 M a pH 8,3, allo scopo di eliminare gli eccessi dei reagenti ed i prodotti collaterali di reazione.

Dopo un ultimo, estensivo lavaggio con acqua distillata, la resina viene conservata a 4°C in attesa dell'utilizzazione.

La resa della derivatizzazione viene determinata per via spettrofotometrica, confrontando l'assorbanza totale della soluzione

utilizzata per la reazione prima e dopo la reazione stessa. La soluzione di ligando e di EDAC ha un massimo di assorbanza a 194 nm; il rapporto molare ligando/gruppi amminici liberi utilizzato è circa 10:1 (non è definita esattamente la concentrazione dei gruppi amminici della resina). La riduzione dell'assorbanza totale a 194 nm del 10 % circa dimostra che la reazione è avvenuta con resa pressochè quantitativa.

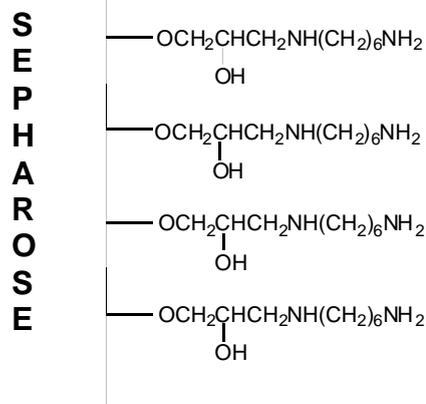
#### **9.4 Purificazione della TcAChE.** [Sussman *et al.* 1988]

Il materiale organico di partenza è costituito dagli organi elettrici congelati della *Torpedo Californica* (*Aquatic Research Consultants*, San Pedro, California, U.S.A.); se ne sezionano 500 g in cubetti e si omogeneizzano a 0 °C, in 5 *step* da un minuto ognuno, intervallati da una pausa di un minuto, in 300 ml di un tampone costituito da Tris 10 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 40 mM a pH 8,0 (tampone I, BI), utilizzando un omogeneizzatore *Sorvall Omnimixer* alla massima velocità.

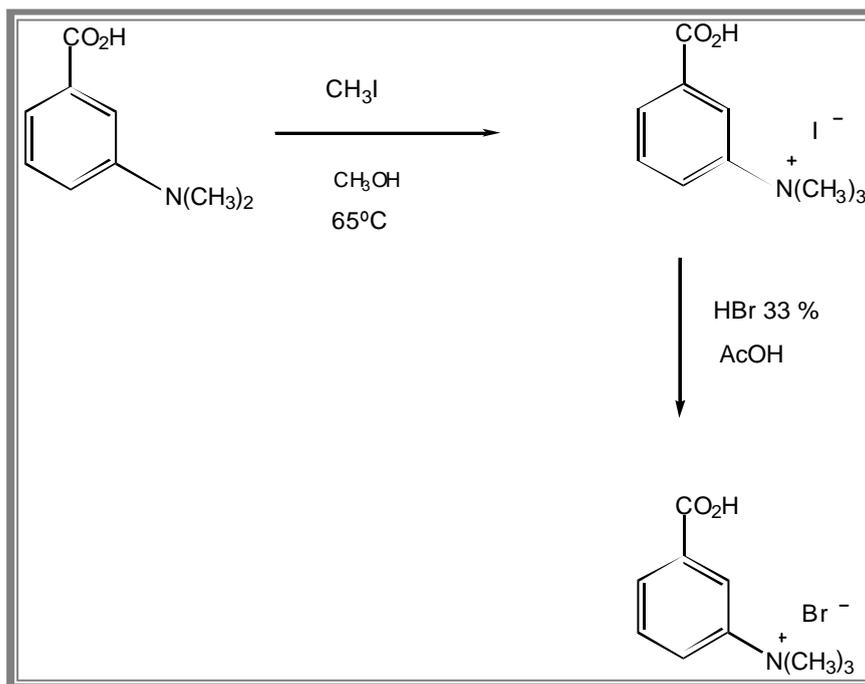
L'omogenato viene quindi centrifugato per 1 ora a 4 °C alla velocità di 18000 rpm (Rotor SS 34, tubi da 50 ml); si scarta dunque il supernatante, ed il pellet viene risospeso in 200 ml di BI ed omogeneizzato per 1 minuto a 0 °C. Dopo aver aggiunto 25 µl (pari a 5U) di una soluzione di fosfolipasi C fosfatidil-inositolo specifica (PIPLC, *Glyko*, U.S.A.) 200 U/ml, si lascia l'omogenato per 18 ore a temperatura ambiente. In questo modo il dimero di TcAChE viene scisso dall'ancora di membrana e viene portato in soluzione.

Al termine dell'incubazione si centrifuga per 1 ora a 78000 g ed a 4 °C; a questo punto si scarta il pellet, ed il supernatante viene caricato, sempre a 4 °C, sulla colonna di affinità (EAH Sepharose 4B, funzionalizzata con *m*-carbossifeniltrimetilammonio bromuro), precedentemente impaccata (volume del letto 10-15 ml); si equilibra con il BI, preventivamente filtrato su filtro da 0,2 µm, mandando il flusso a ~ 0,2 ml/min. Si lava poi la colonna con BI fino a stabilizzazione della linea di base (circa 200 ml), a flusso di 1 ml/min. L'Acetilcolinesterasi così purificata viene infine eluita con il tampone BI contenente decametonio 5mM (BII) allo stesso flusso, raccogliendo frazioni da 6 ml. La colonna viene poi lavata estensivamente con circa 100 ml di NaCl 1 M in BI (BIII), ad un flusso di 1 ml/min e riequilibrata con BI. Il cromatogramma è riportato in Fig. 9.5.

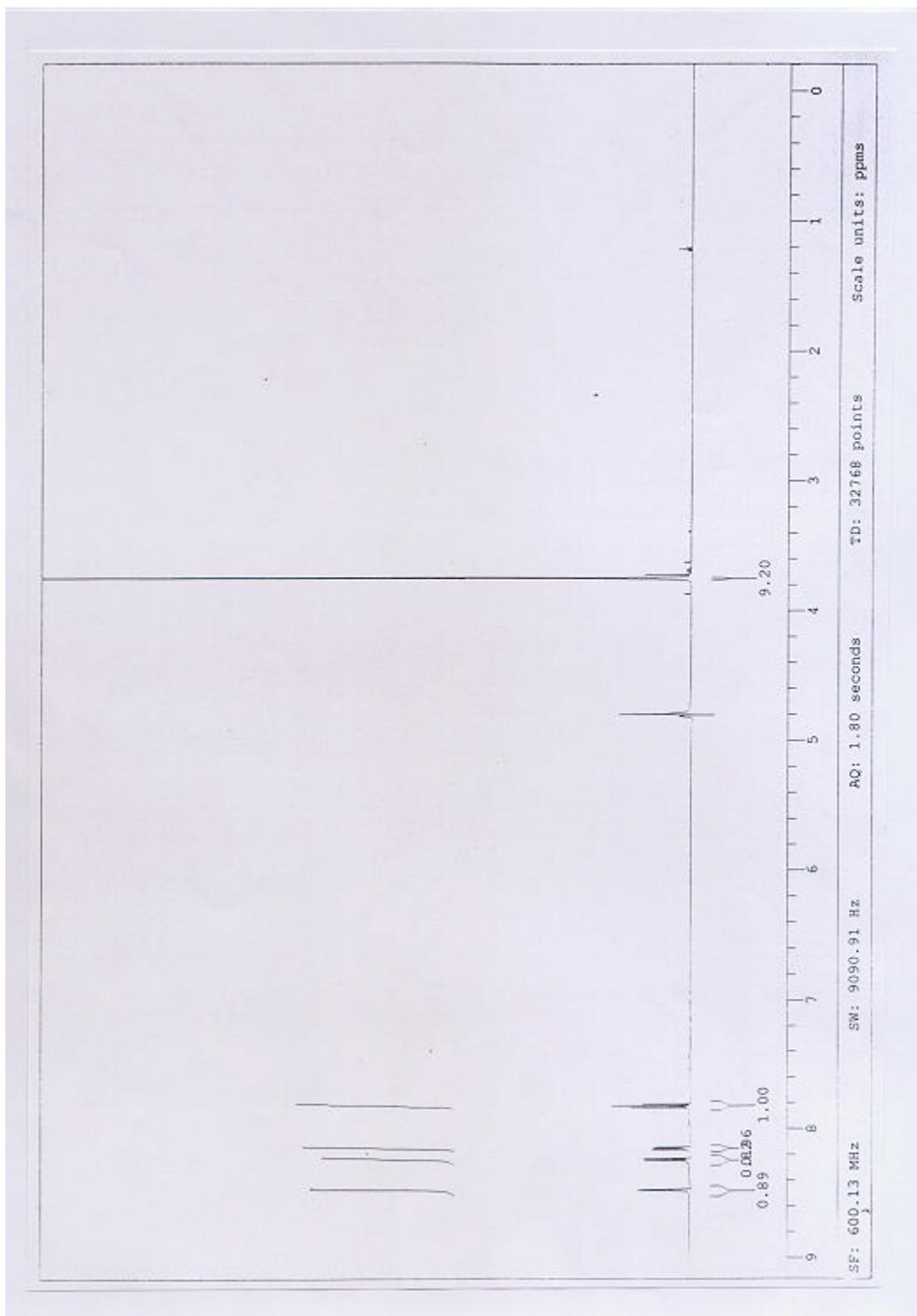
Le frazioni contenenti l'enzima, vengono quindi dializzate per alcuni giorni a 4 °C (membrana da dialisi di cellulosa, con cutoff da ~ 12000), con



**Fig.9.1** EAH Sepharose 4B.



**Fig. 9.2.** Sintesi del ligando di affinità.



**Fig. 9.3** Spettro  $^1\text{H}$  NMR a 600 MHz dell' m-carbossifeniltrimetilammonio bromuro.

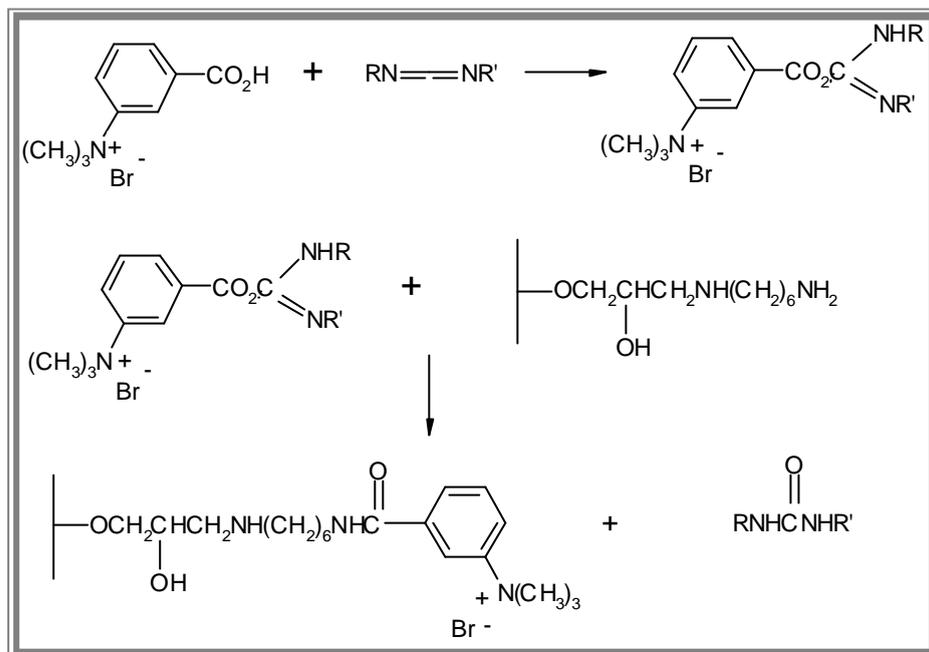
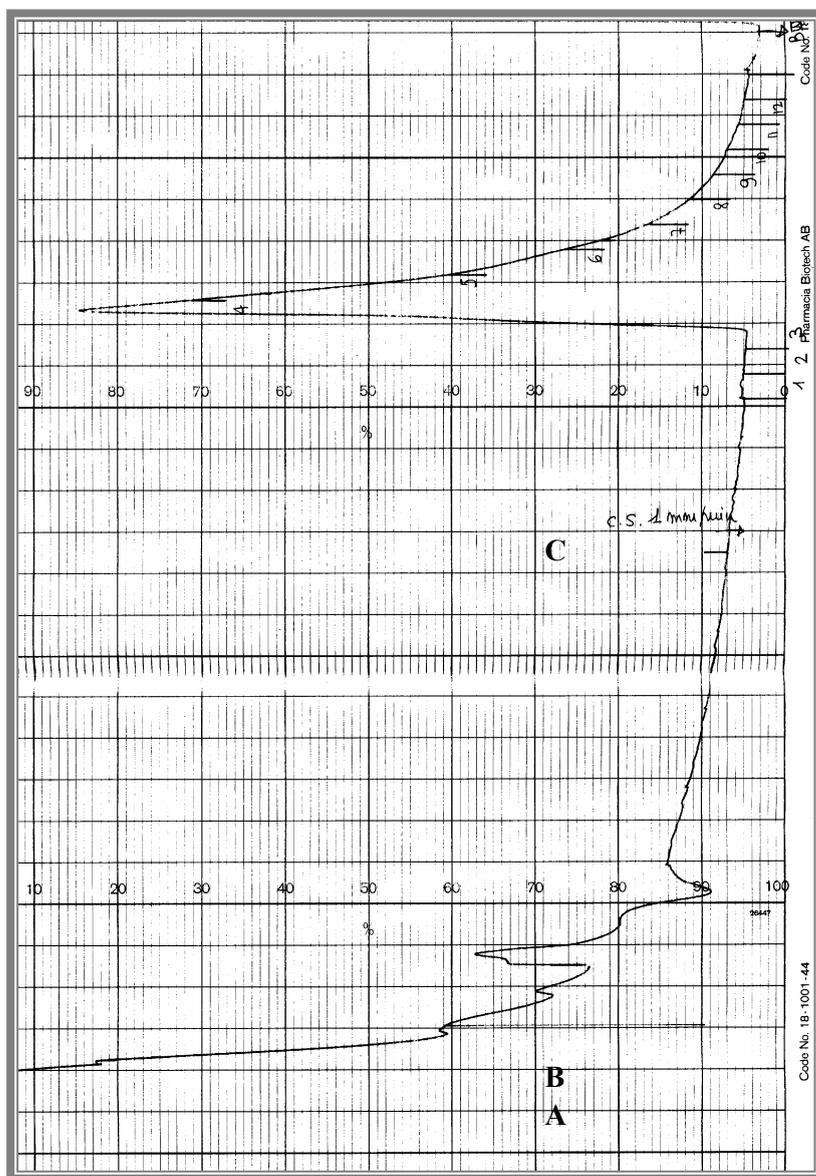


Fig. 9.4 Derivatizzazione della fase stazionaria.



**Fig 9.5** Cromatogramma relativo alla purificazione della *TcAChE*:

**A:** (non riportato) caricamento dell'estratto da Torpedo. **B:** lavaggio con tampone equilibrante. **C:** eluizione. In alto è riportato il picco corrispondente alla *TcAChE*.

ripetuti cambi, contro Mes 1 mM, NaCl 100 mM, NaN<sub>3</sub> 0,01 % a pH 6,5 (BIV) allo scopo di rimuovere il decametonio.

La soluzione viene dunque concentrata su celle da ultrafiltrazione (con membrane YM 10, cutoff 10000), sempre a 4 °C, ed alla pressione massima di 4 atm.; quindi su Microcon (microconcentratore centrifugo), fino ad ottenere una concentrazione finale compresa tra i 7 ed i 10 mg/ml.

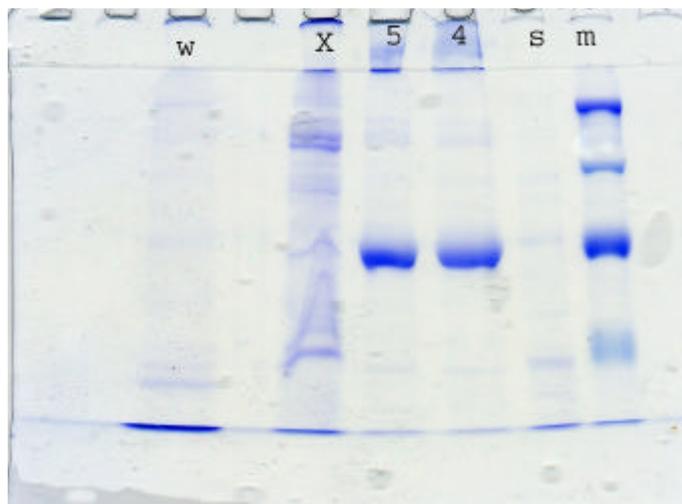
Per misurare la concentrazione proteica è stato utilizzato il metodo di Bradford, utilizzando il *Bio-Rad Protein Assay* [Bradford 1976].

Si esegue dunque una elettroforesi su gel di poliacrilammide (7,5 %) in SDS, per controllare il grado di purezza dell'enzima; la banda dell'Acetilcolinesterasi si trova in corrispondenza di un peso molecolare attorno ai 65 KDa (Fig. 9.6).

### **9.5 Misurazione dell'attività della TcAChE.**

Il test di attività, sfrutta il metodo di Ellman [Ellman *et al.* 1961], e determina la velocità di idrolisi del substrato modificato acetiltiocolina da parte dell'enzima. La concentrazione enzimatica si mantiene costante :  $\sim 5 \times 10^{-2}$  U/ml (1 unità corrisponde alla quantità di enzima in grado di idrolizzare 1  $\mu$ mole di substrato in un minuto a 25 °C e a pH 8,0), valore adatto per avere una giusta variazione di assorbanza. Tenendo conto che, partendo da 500 g di organi elettrici, in  $\sim 200$  ml di supernatante ci sono  $\sim 20000$ - $40000$  unità, quindi  $\sim 200$ - $400$  U/ml, nelle frazioni del picco ci sono 200-1000 U/ml, quindi si diluisce la proteina in modo tale da avere una concentrazione di 4-8 U/ml. Prelevando poi 10  $\mu$ l di tale soluzione da aggiungere ai 990  $\mu$ l della soluzione test, si avrà la concentrazione finale di proteina desiderata cioè  $\sim 0,05$  U/ml.

Ad 880  $\mu$ l di tampone sodio fosfato 0,1 M pH 8,0, si aggiungono 10  $\mu$ l della soluzione proteica (4-8 U/ml). A 25 °C si aggiungono 10  $\mu$ l di una soluzione di DTNB (acido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoico) in tampone fosfato e 100  $\mu$ l di una soluzione di acetiltiocolina 5 mM in tampone fosfato. Dopo aver mescolato si misura rapidamente a 412 nm la variazione dell'assorbanza in funzione del tempo. La tiocolina, che si ottiene dall'idrolisi, scinde il DTNB dando luogo ad un prodotto che assorbe nel visibile. La reazione è immediata, il che consente di assimilare la velocità di formazione dell'indicatore, alla velocità di idrolisi del substrato. Il coefficiente di estinzione dell'indicatore a 412 nm è  $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Fig.9.6** SDS page al 7.5%.

W = controllo della soluzione in uscita dal lavaggio.

X = controllo della soluzione in uscita durante il caricamento del supernatante.

5,4 = frazioni del picco: le bande a~ 65kDa corrispondono alla TcAChE.

s = controllo della soluzione in uscita durante il lavaggio finale (dopo eluizione).

m = marker Biorad, *High range* (dall'alto: 116.250kDa, 97.400kDa, 66.200kDa, 45.000kDa).

L'attività specifica dell'enzima purificato è di circa 3000 U/ml.

## 9.6 Cristallizzazione della TcAChE.

La TcAChE è stata cristallizzata con il metodo dell' "hanging drop" (vedi appendice A) seguendo le condizioni riportate in letteratura [Sussmann *et al.* 1988; Sussmann *et al.* 1991].

Ogni *batch* di purificazione ha comportato però una ottimizzazione delle condizioni di cristallizzazione. E' stato dunque necessario effettuare, mediante un approccio fattoriale, uno *screening* dei parametri che influenzano la cristallizzazione, in particolare: della concentrazione dell'enzima, della concentrazione del precipitante, del valore del pH.

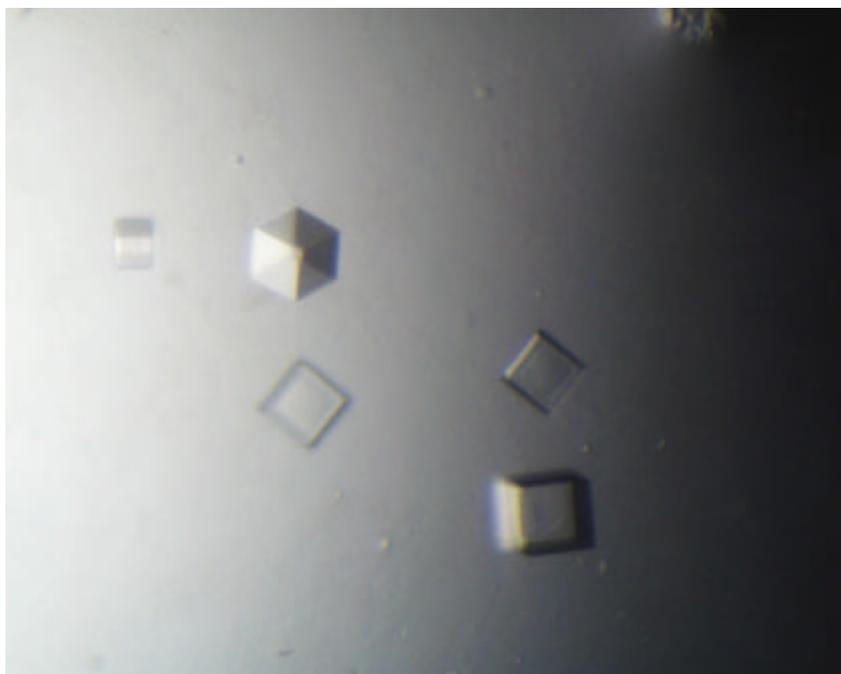
La concentrazione iniziale di TcAChE è stata variata tra i 7 mg/ml e i 10 mg/ml in MES 1mM, NaCl 100mM, NaN<sub>3</sub> 0.01 %, pH 6.5. L'agente precipitante utilizzato è il polietilenglicole (PEG) 200 in MES 0.1M a pH 6.2, la cui percentuale volumetrica è stata variata tra il 38% ed il 42%.

La goccia è stata preparata mescolando la soluzione dell'enzima con la soluzione di precipitante, con un rapporto volumetrico di 2:2, 2.5:2, 3:2. La piastra di cristallizzazione è stata tenuta ad una temperatura costante di 4 °C.

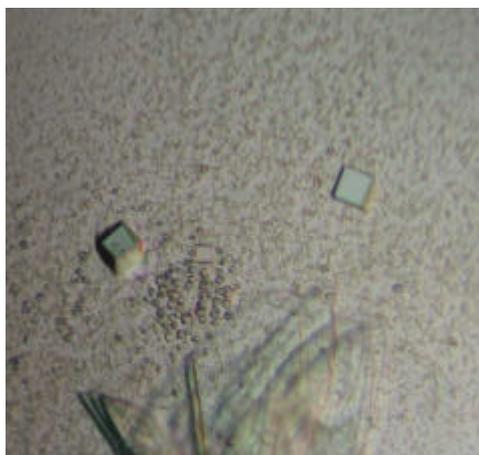
Si sono ottenute due forme cristalline di TcAChE, quasi sempre ubiquitarie. Dopo poche ore si verifica la nucleazione e la crescita di cristalli dalla forma sottile e piatta, ortorombici. Questi cristalli (Fig.9.8) sono inadatti per l'analisi diffrattometrica, in quanto crescono in una sola direzione, spesso sovrapposti, inoltre sono anisotropi e si deteriorano facilmente.

L'inconveniente principale dovuto alla presenza di questi cristalli è che la loro crescita interferisce con quella, molto più lenta, dei cristalli trigonali. Questi cristalli, sui quali è stata effettuata la raccolta ai raggi X, hanno forma cubica od esagonale perfetta (Fig.9.7) ed estinguono la luce polarizzata. La loro nucleazione inizia dopo qualche giorno (anche una settimana) rispetto all'altra forma. All'inizio la loro dimensione è molto ridotta, tanto da essere difficilmente individuabili; la crescita avviene in tre o quattro settimane dalla nucleazione. Le dimensioni massime raggiunte da questi cristalli sono di 0,2 x 0,2 x 0,2 mm<sup>3</sup>.

Lo *screening* delle condizioni di cristallizzazione ha consentito di individuare la condizione in cui viene favorita la nucleazione e la crescita dei cristalli trigonali: i cristalli migliori sono stati ottenuti con una



**Fig.9.7** Cristalli trigonali di *TcAChE*, utilizzati per l'analisi diffrattometrica.



**Fig.9.8** In basso al centro: cristalli di *TcAChE* ortorombici (piatti e sovrapposti). In alto: due cristalli trigonali di *TcAChE*.

concentrazione iniziale di TcAChE pari a 7.5mg/ml, con una percentuale volumetrica di agente precipitante PEG 200 pari al 40%; e con un rapporto volumetrico nella goccia di 3:2 tra la soluzione dell'enzima e l'agente precipitante.

### ***9.7 Formazione dei complessi tra la TcAChE ed i quattro inibitori.***

Per formare i complessi tra la TcAChE ed i quattro inibitori, è stata utilizzata la procedura del “soaking” [Ducroix *et al.* 1992], che consiste nell'incubare i cristalli dell'enzima con una soluzione in cui è disciolto l'inibitore. La diffusione del composto nell'enzima è facilitata dall'alto contenuto di solvente presente nel reticolo cristallino (può arrivare fino al 95%).

Per ottenere i quattro complessi si è proceduto nel seguente modo: alle gocce contenenti i cristalli sono state aggiunte le soluzioni costituite dagli inibitori ad una concentrazione pari a 10 mM, e da PEG 200 in percentuale volumetrica del 44 % in MES 0.1M a pH 6.2.

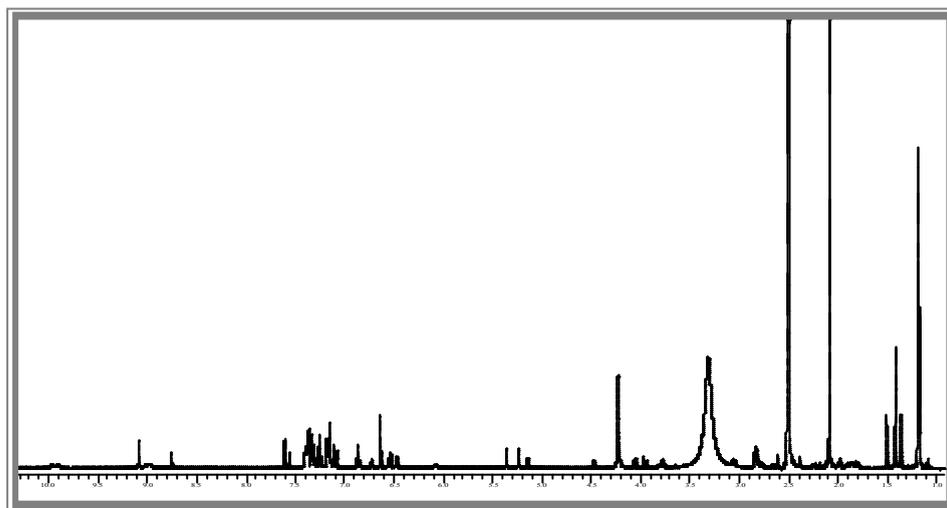
L'N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bisnorcimserina ha presentato un'alta insolubilità in acqua ed è stata disciolta in DMSO. Una volta miscelata la soluzione dell'inibitore con il tampone contenente il PEG200 al 44%, si è formato del precipitato. E' stata comunque utilizzata questa soluzione per diffondere l'N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bisnorcimserina nei cristalli.

E' stato stabilito un rapporto volumetrico di 1:1 tra le gocce contenenti i cristalli e le soluzioni degli inibitori; in questo modo si è ottenuta una concentrazione finale di inibitore nella goccia pari a 5mM, quantità sufficiente per garantire la diffusione del composto nell'enzima.

Le gocce così ottenute, mantenute sempre a 4°C, sono state trasferite su un pozzetto (*reservoir*) contenente PEG 200 al 42 % in MES 0.1M a pH 6.2; in questo modo, sia nelle gocce che nei pozzetti, la concentrazione finale di agente precipitante era leggermente superiore a quella di cristallizzazione (PEG 200 al 40%).

I tempi di incubazione degli inibitori sono stati i seguenti:

- 24 ore per la ganstigmina;
- 26 ore per l' N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bisnorcimserina;
- 48 ore per l'SPH-1371;
- 63 ore per l'SPH-1373.



**Fig.9.9** Spettro  $^1\text{H}$  NMR, 600 MHz della  $\text{N}^1, \text{N}^8$ -bisnorcimserina.

## **9.8 Spettro NMR del composto $N^1, N^8$ -bisnorcimserina.**

La  $N^1, N^8$ -bisnorcimserina è stata sottoposta ad indagine spettroscopica NMR, per analizzarne la purezza. Lo spettro  $^1H$  NMR, 600 MHz (Fig.9.9) ha rivelato la presenza di alcuni prodotti di degradazione tra i quali la nor-eserolina.

## **9.9 Raccolta dati.**

### ***Luce di Sincrotrone.***

Gli spettri di diffrazione di raggi X relativi ai cristalli dei quattro complessi *TcAChE*-inibitori studiati, sono stati raccolti utilizzando, come sorgente di raggi X, la linea XRD1 presso il Laboratorio Nazionale di Luce di Sincrotrone, *ELETTRA*, Trieste (Fig 9.10).

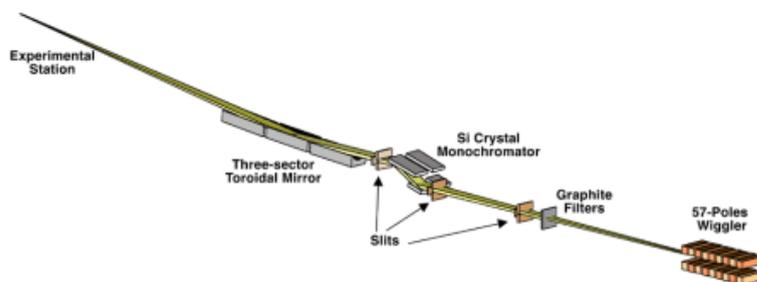
Qualora la traiettoria di elettroni o positroni ad alta energia (2-3 GeV) venga deviata da forti campi magnetici curvanti, essi emettono delle onde elettromagnetiche tangenziali comunemente chiamate radiazioni di sincrotrone. Le particelle cariche sono all'inizio accelerate ad una velocità vicina a quella della luce utilizzando un acceleratore lineare (LINAC); successivamente sono iniettate direttamente nell'anello di accumulazione (*storage ring*).

La luce prodotta nell'anello è non solo estremamente intensa ma anche modulabile; tra le sue principali e più importanti caratteristiche citiamo: l'elevata brillantezza, l'ampio intervallo spettrale (dalle microonde ai raggi X duri), l'elevata collimazione angolare, la piccola dimensione del fascio di luce e l'elevato grado di polarizzazione.

La principale caratteristica delle sorgenti di luce di terza generazione, delle quali fa parte *ELETTRA*, è la produzione di un fascio di elettroni che ha un'emittanza molto piccola, è stabile e riproducibile ed ha un tempo di vita lungo (24-36 ore). Nell'anello, dove gli elettroni accelerati sono deviati da magneti curvanti, nei tratti rettilinei subiscono ulteriori modificazioni, passando attraverso i cosiddetti *insertion devices* (ondulatori o wiggler) con il risultato di un notevole aumento della brillantezza della luce di sincrotrone



**Fig.9.10** Fotografia aerea di *ELETTRA*, Trieste, Italia.



**Fig.9.11** Rappresentazione schematica della linea di diffrazione XRD1, *ELETTRA*, Trieste, Italia.

prodotta che, successivamente, viene focalizzata nelle direzioni verticali ed orizzontali da un complesso sistema ottico costituito da specchi.

*ELETTRA* emette una luce ad alta brillantezza, con energie di fotoni comprese tra i 10 eV ed i 30 KeV, e con brillantezza spettrale fino a  $10^{19}$  fotoni/s/ mm<sup>2</sup>/mrad<sup>2</sup>/0.1%bw. L'energia nello *storage ring* può essere variata tra 2 e 3 GeV, ma in genere l'anello in condizioni normali opera a 2.0 o 2.4 GeV.

La linea XRD1 è caratterizzata da una sorgente luminosa (*wiggler*) che ha un range compreso tra i 4 ed i 25 keV, da un monocromatore a doppio cristallo di silicio e da uno specchio (tre sezioni) toroidale focalizzante (Fig.9.11).

***Temperature criogeniche e crioprotezione.*** [Garman *et al.* 1997]

Per evitare che i cristalli vengano danneggiati durante l'esposizione ai raggi X, aventi elevata brillantezza, quali sono quelli prodotti da una sorgente di luce di sincrotrone, la raccolta dei dati di diffrazione viene effettuata a temperature criogeniche (alla temperatura dell'azoto liquido, 100 °K).

Esistono infatti due generi di danni indotti dalla radiazione X. Uno è diretto, e non può essere evitato, perché è dovuto alla ionizzazione indotta dai raggi X. L'altro, invece, è indiretto e tempo-dipendente in quanto è causato dalla formazione e dalla rapida diffusione di radicali liberi nel reticolo cristallino [Von Sonntag *et al.* 1994; Sliz *et al.* 2003]. Recentemente, cristalli di TcAChE e di lisozima sono stati oggetto di esperimenti progettati *ad hoc* per evidenziare l'occorrenza di danni chimici e strutturali causati dall'esposizione alla radiazione di sincrotrone. Sono stati infatti evidenziati: la rottura dei ponti disolfuro, l'alterazione di gruppi carbossilici (decarbossilazioni) e reazioni di deaminazioni [Weik *et al.* 2000].

In condizioni criogeniche la velocità di diffusione dei radicali liberi aventi elevata reattività può essere drasticamente ridotta.

Per questo motivo i cristalli congelati in genere non mostrano il decadimento nella qualità dello spettro di diffrazione, che invece si riscontra nei cristalli la cui raccolta dati è stata effettuata a temperatura ambiente.

Inoltre in condizioni criogeniche i cristalli hanno un tempo di vita medio molto lungo e questo rende possibile la raccolta di un *set* completo di dati utilizzando un solo cristallo.

Per evitare che, nel corso del processo di congelamento (100 °K) dei cristalli proteici si possano formare cristalli di ghiaccio e che questi possano distruggere o perturbare il reticolo cristallino, prima del loro rapido congelamento, i cristalli vengono trasferiti in soluzioni contenenti le loro acque madri alle quali viene addizionato un opportuno agente crioprotettore. Il rapido congelamento dei cristalli così trattati non permette all'acqua di congelare dando luogo ad una delle sue possibili fasi cristalline ma piuttosto consente che essa si converta nella fase vetrosa ed amorfa [Hope1988; Riboldi-Tunnicliffe 1999].

Nel caso dei cristalli dei complessi *TcAChE*-inibitore, non è stato necessario aggiungere alcun agente crioprotettore, dal momento che l'agente precipitante presente nelle acque madri, il PEG 200, si è mostrato adatto ad assolvere questa funzione.

Per effettuare la raccolta dati, i cristalli dei complessi sono stati prelevati con un *loop* di nylon di opportuna dimensione (Fig.9.12) e rapidamente congelati sotto il getto di azoto gassoso a 100 °K (*Criocooler* della *Oxford Cryosystem*).

E' stato utilizzato un rivelatore *MarResearch CCD (Charge Coupled Device)* in dotazione sulla linea XRD1.

Per tutti e quattro i complessi, i dati sono stati raccolti con il metodo oscillante (1° di oscillazione per un totale di 180°).

## **9.10 Processamento dei dati.**

L'indicizzazione dei riflessi e l'integrazione delle intensità associate a ciascun riflesso sono state ottenute utilizzando il programma DENZO. Le intensità sono state quindi riportate su scala comune utilizzando il programma SCALEPACK. Entrambi i programmi appartengono al pacchetto HKL [Otwinowsky *et al.* 1997].

L'analisi dei quattro complessi *TcAChE*-inibitore è stata eseguita con una procedura standard che consiste in sei *step* principali:

- *Analisi dello spettro (immagine) di diffrazione* (esempio in Fig.9.13). Sono state valutate la massima risoluzione, la lunghezza d'onda ottimale, la distanza cristallo-rivelatore ottimale (minima sovrapposizione delle *spot* di diffrazione), la presenza di un cristallo singolo.

- *Indicizzazione dell'immagine di diffrazione*, assegnando i corretti indici  $hkl$  a ciascuna *spot* dell'immagine. Da un sottogruppo di *spot* aventi intensità superiore ad un valore soglia predefinito, sono stati stimati di una immagine di diffrazione sono stati stimati i parametri reticolari del cristallo (dimensioni) e l'appartenenza ad uno dei quattordici possibili reticoli di Bravais. I cristalli dei complessi TcAChE-inibitore appartengono alla classe primitiva trigonale.
- *Affinamento dei parametri del cristallo e del rivelatore*. Sono stati affinati numerosi parametri sperimentali tra i quali l'orientamento del cristallo, del rivelatore rispetto ad un sistema di riferimento predefinito, le coordinate del punto di intersezione tra i raggi X ed il rivelatore (centro del rivelatore) e la distanza cristallo-rivelatore. La procedura di affinamento è stata ripetuta per tutte le immagini della raccolta in modo da tener conto delle possibili variazioni sperimentali, quali ad esempio lo *slippage* del cristallo, la sua mosaicità e la sua forma .
- *Integrazione dei massimi di diffrazione*. Per calcolare le intensità di diffrazione di ciascun riflesso, le intensità associate a ciascuno dei *pixel* che definiscono la *spot* di diffrazione assegnabile ad un determinato riflesso, sono state integrate utilizzando il metodo dell'*average profile fitting* applicato, successivamente, a tutte le immagini raccolte.
- *Scalatura e merging dei dati integrati*. Poiché un riflesso con indici  $hkl$  a causa, ad esempio, dell'oscillazione scelta per effettuare la raccolta dei dati o della mosaicità del cristallo, potrebbe non essere stato completamente registrato su una stessa immagine, ma solo parzialmente, si rende necessaria una ricostruzione dell'intensità totale ad esso associata. I relativi fattori di scala *intra-* ed *inter-*immagine sono stati derivati, affinati ed applicati usando il programma SCALEPACK. Le intensità di quei riflessi i cui indici obbediscono alla simmetria del reticolo scelta, includendo anche le coppie di Friedel  $I(h,k,l)$  e  $I(-h, -k, -l)$  (l'operazione di diffrazione è centrosimmetrica e si trascura il contributo derivante dalla diffusione anomala), sono stati mediate fino ad ottenere una lista di riflessi indipendenti, con i valori delle intensità  $I$  e dei  $\sigma(I)$  ad essi associati. La lista di questi valori costituisce il dato sperimentale di partenza per la determinazione della struttura mediante metodi di calcolo tipici della biocristallografia.

Sono stati dunque utilizzati dei parametri statistici e di affidabilità per valutare la qualità dei dati di diffrazione. Tra questi i più importanti sono la completezza dei dati, il rapporto  $I/\sigma(I)$  e il parametro  $R_{sym}$ :

$$R_{sym} = \frac{\sum \left| \langle I_h \rangle - I_{i, h} \right|}{\sum I_{i, h}}$$

dove  $i$  è l'*i-esima* misura dell'intensità dei riflessi  $h = (h, k, l)$ .

Tutti i parametri relativi alla raccolta ed al processamento dei dati cristallografici per i quattro complessi TcAChE-inibitore sono stati riportati nelle tabelle 6.I, 7.I, 8.I ed 8.II.

A partire dalle intensità sono state derivate le ampiezze dei fattori di struttura, utilizzando il programma TRUNCATE del pacchetto CCP4 [Collaborative Computational Project N° 4, 1994]. I fattori di struttura rappresentano infatti le grandezze che sono comunemente utilizzate per la soluzione del problema della fase.



**Fig.9.12** Cristallo montato in un *loop* di nylon.



**Fig.9.13** Immagine di diffrazione ottenuta dal cristallo trigonale di *TcAChE*.

## 9.11 Determinazione delle strutture.

### *Sostituzione molecolare.*

Come verrà discusso nell'appendice B, dagli esperimenti di diffrazione è possibile ottenere i valori delle ampiezze dei fattori di struttura ma non il valore delle fasi ad essi associati; la conoscenza del valore della fase associata a ciascun riflesso è un requisito *sine qua non* per il calcolo della funzione di densità elettronica.

Per risolvere il problema della fase e per poter determinare la struttura dei complessi tra la *TcAChE* e gli inibitori, sebbene la struttura 3D della proteina nativa fosse stata precedentemente determinata [Sussman *et al.* 1991], è stato necessario utilizzare la procedura della sostituzione molecolare [Rossmann *et al.* 1962].

I cristalli di *TcAChE* da noi ottenuti appartengono al sistema trigonale ma l'assegnazione del gruppo spaziale non è univoca: i gruppi spaziali  $P3_121$  e  $P3_221$  entrambi soddisfano le simmetrie dello spettro di diffrazione. Il gruppo spaziale  $P3_121$  non può essere distinto dal  $P3_221$ : essi differiscono solo per la diversa scelta dell'origine (le simmetrie  $3_1$  e  $3_2$  originano eliche destrorse e levogire rispettivamente). Inoltre per entrambi i gruppi spaziali esiste una relazione che associa univocamente il *set* degli indici  $hkl$  al *set* coordinate  $xyz$  del modello: ad un *set* di indici corrisponde uno ed un solo *set* di coordinate. Essendo l'unità asimmetrica nello spazio reciproco dei dati di diffrazione da noi raccolti (il *set* di indici  $hkl$ ) non necessariamente corrispondente a quello associato alle coordinate del modello depositato, è stato necessario ricorrere al metodo della sostituzione molecolare per risolvere il problema della fase. La procedura completa della sostituzione molecolare (orientazione: tre gradi di libertà rotazionali e posizione: tre gradi di libertà traslazionale) è stata eseguita utilizzando il programma AMoRe [Navaza 1994].

Nel caso del complesso *TcAChE*-ganstigmina è stato utilizzato come modello il *set* di coordinate della *TcAChE* nativa [PDB entry code: 2ACE; Sussman *et al.* 1991], al quale sono state rimosse le coordinate relative alle molecole d'acqua; per gli altri tre complessi *TcAChE*-inibitore è stato invece utilizzato come modello il *set* di coordinate della struttura del complesso della *TcAChE* con l'E2020 [PDB entry code: 1EVE; Kryger *et al.* 1999], al quale sono state rimosse le coordinate relative all'inibitore ed alle molecole d'acqua.

Il metodo della sostituzione molecolare implica:

- una rotazione del modello perché possa assumere un'orientazione ottimale rispetto a quella della proteina in esame;
- una sua traslazione che porti alla sovrapposizione ottimale.

Il programma dapprima calcola, utilizzando un sistema di coordinate Euleriane, la funzione di correlazione rotazionale tra la funzione Patterson osservata e quella calcolata a partire dal modello (per la descrizione della funzione di Patterson vedi Appendice B). In tutti i complessi *TcAChE*-inibitore studiati, la migliore terna rotazionale del modello nella cella *target* presentava, in media, un valore del coefficiente di correlazione pari al 12%. Successivamente il calcolo dei coefficienti di correlazione relativi alla funzione traslazionale ha evidenziato che la corretta posizione del modello nella cella *target* presentava, in media, un valore pari al 69.5%.

Infine, una volta applicato al modello la matrice rotazionale ed il vettore traslazionale corrispondenti alle migliori soluzioni della funzione rotazionale e traslazionale, con l'intento di ottimizzare l'orientamento e la posizione del modello nella cella unitaria *target* è stato eseguito un affinamento a corpo rigido (*rigid body refinement*).

### ***Fitting ed affinamento delle strutture.***

Il *fitting* e l'affinamento di una struttura proteica sono processi con i quali si aumenta la correlazione tra il modello ed i dati di diffrazione. I fattori di struttura del modello,  $F_{\text{calc}}$  e quelli calcolati con gli esperimenti di diffrazione,  $F_{\text{obs}}$ , spesso non sono in accordo tra di loro.

A questo scopo viene applicata la trasformata di Fourier (vedi appendice B) per calcolare le mappe di densità elettronica dai dati sperimentali ottenendo una mappa  $2F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ , in cui si osservano le caratteristiche del modello (ex. i residui amminoacidici) ed una  $F_{\text{obs}}-F_{\text{calc}}$ , detta anche densità elettronica residua, che mostra le discrepanze tra i dati sperimentali ed il modello.

La procedura impiegata per affinare i complessi *TcAChE*-inibitori è stata condotta in due *step* che sono alternati in un processo iterativo:

- *fitting* manuale del modello nelle mappe di densità elettronica usando il programma di grafica interattiva O [Jones *et al.* 1991], che permette di visualizzare (in 3D) e di manipolare le strutture proteiche;

- protocollo di affinamento automatico per minimizzare il disaccordo tra  $F_{obs}$  ed  $F_{calc}$ . Il programma utilizzato è stato CNS [Brünger *et al.* 1998].

Il *fitting* nel caso dei complessi TcAChE-inibitore è stato relativamente semplice, in quanto il modello presenta la stessa sequenza amminoacidica e struttura dell'enzima in esame. Sono stati controllati la corretta orientazione delle catene laterali dei residui amminoacidici e la conformazione dei *loop* maggiormente esposti al solvente.

Nel protocollo di affinamento automatico il programma CNS ha eseguito un affinamento dei parametri posizionali (x,y,z) e dei fattori di temperatura B (il fattore termico o di Debye-Waller B esprime la vibrazione atomica), per ciascun atomo nella struttura.

Un approccio di dinamica molecolare, il *simulated annealing*, ha consentito che la proteina potesse esplorare uno spazio conformazionale molto ampio (è stato eseguito un riscaldamento fittizio della macromolecola ad una temperatura di 3000 °K); un lento raffreddamento del sistema, ha permesso alla proteina di evitare di cadere in un falso minimo di energia.

Nel caso dell'affinamento di strutture di proteine esiste il problema della sottodeterminazione: il numero di riflessi misurati in un esperimento non è sufficiente per garantire un adeguato rapporto tra le osservazioni (le intensità dei riflessi) ed i parametri da affinare; per diminuire il numero dei parametri da affinare, vengono introdotte informazioni vincoli energetici ed in particolare informazioni addizionali basate sulla conoscenza *a priori* della stereochimica delle proteine, quali lunghezze di legame, angoli di legame, angoli torsionali ed interazioni di Van der Waals [Engh and Huber 1991].

Man mano che l'affinamento procede le informazioni di fase calcolate dal modello gradualmente diventano più accurate e le mappe di densità elettronica risultano più interpretabili.

Per monitorare questo progresso durante l'affinamento e la qualità del modello finale, viene misurato il valore del fattore R:

$$R = \frac{\sum |F_{obs} - F_{calc}|}{\sum F_{obs}}$$

Il problema dell'*overfitting* può essere valutato con la procedura della *cross-validation* [Brünger 1992]. La maggior parte dei dati (*working set*) sono utilizzati per affinare il modello e per calcolare il fattore R, mentre il rimanenti dati (*test set*) non sono affinati e sono utilizzati per calcolare l' $R_{\text{free}}$  (calcolato come l'R ma solo sul 5/10% dei dati totali). Se l'R e l' $R_{\text{free}}$  diminuiscono in modo consistente e parallelo ad ogni stadio dell'affinamento, allora l'affinamento sta procedendo in maniera corretta senza un *overfitting*.

Dopo aver eseguito l'affinamento dell'enzima, è stato eseguito il *fitting* degli inibitori. In tutti i complessi esaminati è stata riscontrata una densità elettronica residua ben evidente nella cavità catalitica, indicando senza ambiguità la presenza degli inibitori.

Per ognuno dei quattro inibitori è stato costruito un modello utilizzando il programma di modellistica molecolare SYBYL [TRIPOS]. Ciascun modello è stato inserito nella densità elettronica residua ed è stato affinato con il programma CNS. Per ogni inibitore è stato necessario fornire al programma un file contenente la tabella di connettività degli atomi che costituivano l'inibitore, ed un file con le costanti geometriche (campo di forze) utilizzate nel calcolo del termine energetico.

Nei quattro complessi, le molecole di acqua (in un numero compreso tra 280 e 400) sono state individuate utilizzando il protocollo *WATERPICK*, del programma CNS, sono state controllate singolarmente nelle mappe di densità elettronica e sono state affinate con CNS.

Sono state individuate e posizionate anche due molecole di N-acetilglucosammina (NAG) legate a residui di Asparagina (Asn59 ed Asn416), e, nel caso dei complessi con la N<sup>1</sup>, N<sup>8</sup>-bisorcimserina, con l'SPH-1371 e l'SPH-1373, anche una terza molecola di NAG legata con legame  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) alla molecola di NAG in posizione 416, formando una ramificazione tipicamente presente sulla superficie delle molecole proteiche.

L'affinamento è stato condotto fino a convergenza dei valori di R e di  $R_{\text{free}}$ . I dati relativi all'affinamento sono riportati nelle tabelle 6.I, 7.I, 8.I ed 8.II.

### ***Validazione.***

La validazione è il processo con il quale, al termine dell'affinamento o nel corso dei vari stadi della determinazione della struttura, è possibile

valutare la qualità della struttura della proteina facendo riferimento ad esempio alla geometria molecolare, all'andamento dei fattori termici degli atomi, all'orientamento dei legami peptidici (cis-trans), ai rotameri preferiti (catene laterali), etc. Particolare attenzione è rivolta ai parametri stereochimici tipici di una struttura proteica quali sono: le distanze di legame, gli angoli di valenza, gli angoli di torsione, sia delle catena principale (distribuzione dei valori  $\phi$  e  $\psi$ : *Ramachandran plot*) che delle catene laterali dei residui amminoacidici, la planarità del legame peptidico, la planarità degli anelli aromatici (triptofano, tiroxina, fenilalanina, etc.) e soprattutto le deviazioni dei valori osservati rispetto a quelli tabulati in un *database* derivato sulla base di strutture di piccole molecole (*Cambridge Crystallographic database*) o di proteine determinate a risoluzione atomica [Engh and Huber, 1991]. Il programma utilizzato è stato PROCHECK [Laskowski *et al.* 1993].

## ***APPENDICE A.***

### ***Cristallizzazione di proteine.*** [Ducroix *et al.* 1992]

La difficoltà nell'ottenere i cristalli di proteine è dovuta essenzialmente alla loro flessibilità conformazionale ed alla loro versatilità chimica; queste caratteristiche rendono le molecole proteiche non adatte, idealmente, ad essere costrette in un reticolo periodico cristallino. Infatti i cristalli proteici contengono in media il 50% (ma anche fino al 95%) di solvente, presente per lo più nei larghi canali esistenti tra le molecole impacchettate nel cristallo. Inoltre, le interazioni che tengono unite le molecole sono generalmente deboli: legami idrogeno, ponti salini ed interazioni idrofobiche. Come conseguenza i cristalli proteici sono abbastanza piccoli (le facce hanno in genere dimensioni sono al di sotto di 1 mm), molto fragili, delicati e sensibili ad ogni variazione dell'intorno biochimico.

La biocristallizzazione coinvolge un grande numero di parametri dovuti alle peculiari proprietà chimico fisiche delle macromolecole biologiche (tabella A.I) ed è un processo multiequilibrio costituito da tre stadi: nucleazione, crescita, e cessazione della crescita.

La nucleazione è il processo tramite il quale le molecole, presenti nelle soluzioni sovrasature, si associano in tre dimensioni per creare un aggregato termodinamicamente stabile.

La nucleazione coinvolge (Fig.A.1) una serie di associazioni molecolari reversibili che portano alla formazione di un nucleo critico; questo primo nucleo fornisce una superficie adatta per la crescita dei cristalli. In ciascuno stadio della nucleazione e della crescita la *driving force* termodinamica è ottenuta portando il sistema in uno stato di non equilibrio o stato di supersaturazione, in cui la concentrazione del soluto è superiore alla solubilità dello stesso. L'equilibrio può essere ottenuto nuovamente riducendo la concentrazione del soluto attraverso la precipitazione o la formazione di nuclei e la conseguente crescita dei cristalli. Le condizioni di supersaturazione richieste per la nucleazione e per la crescita cristallina sono differenti, come mostrato nel diagramma in Fig.A.2. La nucleazione spontanea può avvenire solo nella regione labile ad alto grado di supersaturazione (a causa dell'alta probabilità di collisione delle molecole che diffondono e dunque dell'aumento della probabilità della formazione di

nuclei stabili), piuttosto che nella regione metastabile dove può avvenire solamente la crescita cristallina. Infatti la crescita dei cristalli in genere inizia a concentrazioni di soluto sufficienti perché avvenga la nucleazione, e continua a concentrazioni al di sotto della soglia di nucleazione.

La crescita cristallina cessa quando la soluzione è sufficientemente priva di molecole, oppure quando le impurezze inquinano le facce del cristallo in crescita o quando il reticolo è destabilizzato da forze indotte dalla deformazione.

La sovrasaturazione è una funzione della concentrazione delle macromolecole e di altri parametri che influenzano la solubilità delle macromolecole stesse, quali il pH e la temperatura, la presenza di ioni, la purezza e l'omogeneità del campione.

La condizione di sovrasaturazione può essere ottenuta aggiungendo un agente precipitante alla soluzione proteica e/o modificando alcuni parametri interni della soluzione stessa. Gli agenti precipitanti più frequentemente usati possono essere divisi nelle seguenti categorie: sali, solventi organici e polimeri di polietilenglicole (PEG).

La cristallizzazione di macromolecole può essere ottenuta utilizzando differenti tecniche, tra le quali le più utilizzate sono: la cristallizzazione in *batch* e *microbatch*, i metodi di diffusione liquido-liquido, la cristallizzazione mediante dialisi e la tecnica della diffusione di vapore.

In particolare il metodo della diffusione di vapore è il più impiegato e consiste nel deidratare una goccia contenente la soluzione proteica, per raggiungere la sovrasaturazione. La velocità con cui viene raggiunta la sovrasaturazione delle macromolecole dipende dalla velocità con cui l'acqua si allontana dalla goccia. La cinetica di equilibrio dell'acqua dipende, a sua volta, da una serie di fattori quali la temperatura, la concentrazione e la natura dei soluti presenti nella goccia, la soluzione precipitante impiegata e la forma e la dimensione della goccia.

Il metodo della diffusione di vapore può essere eseguito in due modi: con il metodo dell' "*hanging drop*" e con il metodo della "*sitting drop*".

Nel metodo dell' "*hanging drop*" (utilizzato per la cristallizzazione della TcAChE) la goccia è depositata su un vetrino siliconizzato mescolando da 1 a 5  $\mu\text{l}$  di soluzione proteica con un volume variabile della soluzione precipitante (generalmente il rapporto utilizzato proteina: precipitante è 1:1). Il vetrino viene capovolto e fatto aderire con del silicone sopra un pozzetto (*reservoir*) contenente 500-1000  $\mu\text{l}$  di soluzione precipitante. Si usano scatole di plastica contenenti ventiquattro pozzetti, *VDX crystallization*

*plates* (vedi Fig.A.3). Quando la soluzione proteina/precipitante presente nella goccia è meno concentrata della soluzione del *reservoir*, l'acqua evapora dalla goccia verso il *reservoir*. Ne consegue che la concentrazione sia della proteina che del precipitante nella goccia lentamente aumentano e questo può consentire la formazione di cristalli

I metodi utilizzati per trovare le condizioni iniziali di cristallizzazione spaziano da approcci razionali (*screening* al pI della proteina), ad approcci analitici (approccio fattoriale incompleto, saggi di solubilità, perturbazione), ad approcci randomizzati (*sparse matrix*).

Generalmente i primi tentativi di cristallizzazione consistono nel testare un'ampia gamma di soluzioni (*initial screen*), usando un approccio a matrice sparsa (*sparse matrix*) in cui vengono saggiati un certo numero di parametri che comprendono la natura e la concentrazione dell'agente precipitante, vari tamponi in un ampio intervallo di pH, additivi salini e detergenti.

E' possibile anche utilizzare un approccio *grid screen*, basato essenzialmente su una matrice bidimensionale. Lo *screening* è eseguito con un processo iterativo, variando due parametri (in genere concentrazione del precipitante vs. pH) all'inizio in un ampio *range*, fino a trovare un intervallo ristretto in cui si raggiungono le condizioni migliori di cristallizzazione. La condizione ottenuta può essere dunque ottimizzata testando fattori addizionali, quali temperatura o additivi.

## **Tabella A.I: Parametri che influenzano la cristallizzazione (e/o la solubilità) delle macromolecole**

### **Parametri chimico fisici intrinseci:**

- Sovrasaturazione (concentrazione delle macromolecole e dei precipitanti);
- Temperatura, pH (fluttuazione di questi parametri);
- Tempo (velocità di equilibrizzazione e di crescita);
- Forza ionica e purezza dei reagenti (natura del precipitante, tamponi, additivi);
- Diffusione e convezione (gel, microgravità);
- Particelle solide, pareti ed effetti di interfaccia (nucleazione in fase omogenea rispetto a quella in fase eterogenea);
- Effetti di densità e di viscosità (differenze tra cristalli e acque madri);
- Pressione, campi elettrici e magnetici;
- Vibrazioni e suoni (onde acustiche);
- Sequenza di eventi (ricercatore - robot).

### **Parametri biochimici e biofisici:**

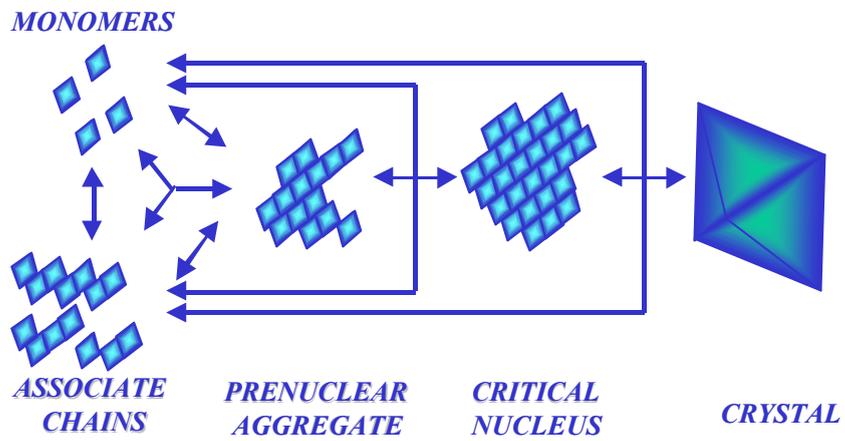
- Sensibilità della conformazione ai parametri fisici (temperatura, pH, forza ionica, solventi,...);
- Legame con ligandi (substrati, cofattori, ioni metallici, altri ioni,...);
- Additivi specifici (agenti riducenti, detergenti non ionici, poliammine,...);
- Relativi a proprietà delle macromolecole (ossidazione, idrofobicità -idrofilicità, natura polielettrolitica degli acidi nucleici,...);
- Invecchiamento dei campioni (effetti red-ox, denaturazione o degradazione).

### **Parametri biologici:**

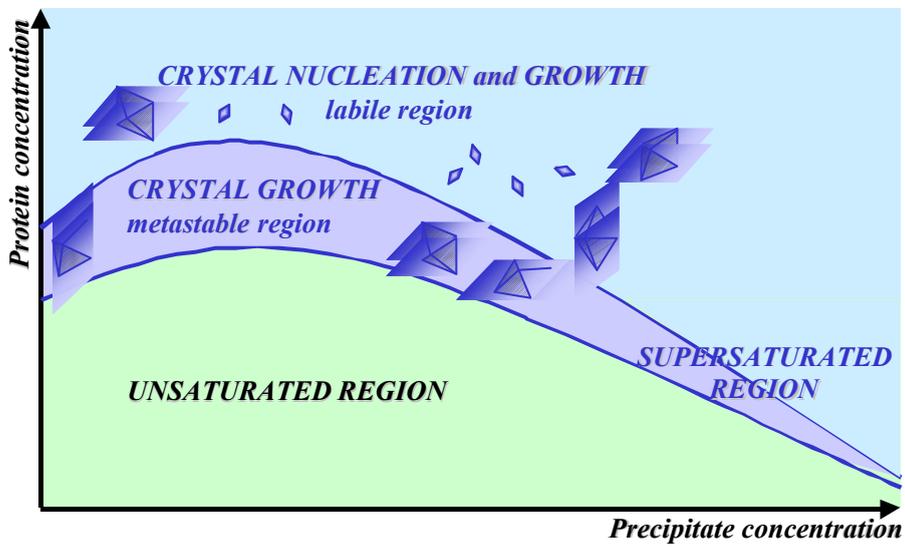
- Rarità della maggior parte delle macromolecole biologiche;
- Fonti biologiche e stato fisiologico di organismi o di cellule (termofili, alofili o mesofili, crescita -fase stazionaria);
- Contaminanti batterici.

### **Purezza delle macromolecole:**

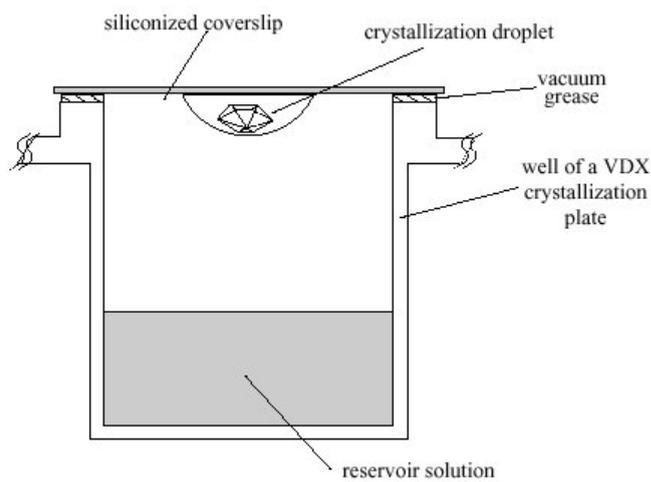
- Contaminanti macromolecolari o presenza di piccole molecole;
- (micro) eterogeneità di sequenza (frammentazione da parte di proteasi o di nucleasi, modificazioni post-traslazionali parziali o eterogenee ...);
- (micro) eterogeneità conformazionali (domini flessibili, oligomeri, ed equilibri di conformeri, aggregazioni, denaturazioni,...);
- effetti della preparazione (due preparazioni non sono identiche!).



**Fig. A.1** Interazioni molecolari reversibili coinvolte nel processo di formazione e crescita di un cristallo.



**Fig.A.2** Diagramma di fase.



**Fig.A.3** Cristallizzazione con il metodo dell' "hanging drop":  
 In alto: dettaglio del pozzetto (*reservoir*)  
 In basso: piastra di cristallizzazione VDX.

## ***APPENDICE B.***

### ***Calcolo della densità elettronica.***

Come evidenziato (equazione B.1) dalla dipendenza dalla massa nell'equazione di scattering di Thomson, (considerando l'interazione tra un'onda ed una particella carica), nel caso di un esperimento di diffrazione ai raggi X i fotoni sono quasi esclusivamente scatterati dagli elettroni degli atomi piuttosto che dai loro nuclei.

$$I_{th} \propto I_0 \frac{e^4}{m^2 \cdot r^2 \cdot c^4} \cdot [1 + \cos^2(2J)] \quad (B.1)$$

In un esperimento di diffrazione da cristallo singolo le onde diffratte interferiranno per produrre raggi secondari di fotoni in direzioni ben definite dello spazio, descrivibili con gli indici di Miller  $h, k, l$ . La conoscenza della direzione dei raggi secondari può fornire diverse informazioni sulla geometria della cella unitaria (reticolo) e sulla simmetria del cristallo, mentre le intensità possono essere correlate con la distribuzione degli elettroni nella cella unitaria del cristallo.

Le misure delle direzioni dei raggi secondari e le intensità possono essere ottenute utilizzando differenti tipi di rivelatori per raggi X.

In particolare, la teoria che descrive l'interazione tra i raggi X e gli atomi del campione evidenzia che le intensità misurate sono proporzionali al quadrato del fattore di struttura  $F(h, k, l)$ .

$$I = (L)(p)(Abs)(Scal)|F(h, k, l)|^2 \quad (B.2)$$

Dove (L) rappresenta il fattore di correzione di Lorentz, (p) la polarizzazione, (Scal) rappresenta il prodotto di vari fattori che tengono conto di fenomeni che alterano il valore delle intensità del raggio diffratto (assorbimento, estinzione, forma del cristallo), ed, infine, (Abs) è un fattore

costante per uno determinato esperimento di diffrazione (volume del cristallo, volume della cella elementare).

Il Fattore di struttura è una grandezza complessa che descrive il contributo degli atomi all'intensità del raggio secondario, definito come segue:

$$F(h, k, l) = \sum_{j=1}^{atoms} f_j \exp[i\mathbf{a}_j \cdot \mathbf{S}] \quad \text{con} \quad f = \int_V \rho(r) \exp[2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}] dV$$

(B.3, B.4)

dove  $f_j$  è il fattore di scattering dell'atomo  $j$ -esimo, che dipende dalla specie atomica (numero di elettroni) e dal vettore d'onda dei raggi X S. Nella definizione del fattore di struttura  $\mathbf{a}_j$  è definito come  $\mathbf{a}_j = 2\pi (hx_j + ky_j + lz_j)$ , dove  $x_j, y_j$  e  $z_j$  sono le coordinate che identificano la posizione dell'atomo  $j$ -esimo nella cella unitaria.

Poiché il fattore di struttura  $F$  è chiaramente una funzione della distribuzione della densità elettronica  $\rho(x, y, z)$  nella cella unitaria, invece di espletare una sommatoria di tutti i contributi degli atomi separatamente, è possibile effettuare un'integrazione estesa alla densità elettronica nella cella unitaria, ottenendo la seguente espressione per il fattore di struttura  $F$ :

(B.5)

$$F(h, k, l) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(x, y, z) \exp[2\pi i (hx + ky + lz)] dx dy dz$$

dove  $V$  è il volume della cella unitaria. Per le proprietà della trasformata di Fourier, l'espressione B.5 può essere anche scritta come:

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F(h, k, l)| \exp[-2\pi i (hx + ky + lz - \mathbf{a}(h, k, l))]$$

(B.6)

Questa equazione mostra come sia possibile ottenere la distribuzione della densità elettronica (di una qualsiasi molecola o di una proteina) nella cella unitaria partendo dalle posizioni e dalle intensità misurate (eq.B.2).

Nell'equazione B.6, il fattore di struttura  $F(h,k,l)$  è stato diviso nel prodotto del suo modulo per la fase, in modo da sottolineare la dipendenza della densità elettronica dalle fasi dei fattori di struttura, che non possono essere misurate direttamente:

$$F(h, k, l) = |F(h, k, l)| \exp[i\alpha(h, k, l)] \quad (\text{B.7})$$

Ottenere le informazioni di fase costituisce il problema centrale degli esperimenti di diffrazione, noto come "il problema della fase". La conoscenza della distribuzione della densità elettronica permette di costruire il modello della struttura tridimensionale di una proteina con dettagli a livello atomico.

Per superare il problema della fase possono essere impiegati differenti metodi a seconda delle caratteristiche della proteina quali la sua dimensione, la presenza di atomi pesanti (cofattori o introdotti appositamente), o la conoscenza previa della struttura 3D di proteine omologhe.

I metodi comunemente utilizzati sono:

- Metodi diretti [Giacovazzo 1999];
- Sostituzione isomorfa singola o multipla: SIR-MIR [Green *et al.* 1954; Blow *et al.* 1959];
- Diffusione Anomala (singola o multipla): SAD- MAD [Hendrickson 1991];
- Sostituzione molecolare [Rossmann *et al.* 1962].

Per la discussione dei metodi diretti, del MIR e del MAD si rimanda ai testi specifici [Drenth 1994; Glusker *et al.* 1994].

Verrà descritto di seguito il metodo della sostituzione molecolare, che è stato quello utilizzato per la determinazione delle strutture dei quattro complessi TcAChE-inibitori.

Questo metodo può essere utilizzato quando è nota la struttura tridimensionale di una proteina omologa a quella in esame o di parte di essa. Questa procedura è basata sull'osservazione che proteine che presentano un grado di omologia di sequenza amminoacidica superiore al 30% possono presentare un *fold*ing simile della catena polipeptidica simile. Il metodo della sostituzione molecolare comporta la determinazione, nell'unità asimmetrica del cristallo, dell'orientamento e della posizione della proteina la cui struttura è sconosciuta rispetto alla molecola scelta come modello, tramite

tre angoli rotazionali ed un vettore traslazionale. La ricerca dei valori ottimali per queste sei variabili è condotta in due *step* distinti, sfruttando l'informazione contenuta nei fattori di struttura derivati dalle intensità misurate della proteina in esame ed in quelli calcolati a partire dalle coordinate  $xyz$  dal modello omologo scelto.

La conoscenza dell'ampiezza dei fattori di struttura permette la definizione di una mappa di vettori, impiegata in tutti i metodi utilizzati per determinare la fase, e nota con il nome di Funzione di Patterson e definita in questo modo:

$$P(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_{h,k,l} |F(h, k, l)|^2 \cos[2\mathbf{p}(hx + ky + lz)] \quad (\text{B.8.1})$$

Nella sostituzione molecolare il vettore mappa descritto dall'equazione B.8.1 è utilizzato per ottenere le posizioni relative della proteina in esame e del modello durante la determinazione delle funzioni di rotazione e di traslazione.

Dal momento che la funzione di Patterson può essere scritta come l'autoconvoluzione della densità elettronica nella cella unitaria (B.8.2),

$$P(u) = \int_{r_j} \mathbf{r}(r_j) \times \mathbf{r}(r_j + u) du \quad (\text{B.8.2})$$

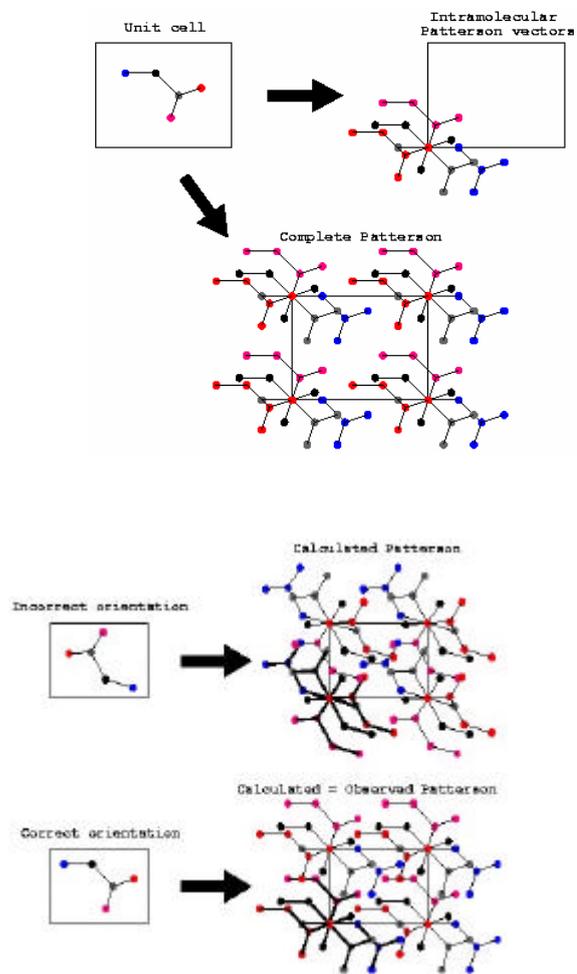
la mappa di Patterson evidenzia la distanza vettoriale esistente tra atomi pesanti o sottostrutture proteiche nella cella unitaria.

In particolare i vettori intramolecolari (quelli che collegano due atomi della stessa molecola) dipendono soltanto dall'orientazione della molecola e non dalla loro posizione nella cella unitaria (sono chiamati vettori *self-Patterson*). Questi vettori possono fornire la relazione rotazionale esistente tra la proteina in esame ed il modello. I vettori intermolecolari (chiamati vettori *cross-Patterson*) dipendono, invece, per un dato orientamento solo dalla posizione della molecola; da questi vettori può essere ricavata l'informazione traslazione richiesta per spostare la molecola nella sua corretta posizione (Fig.B.1).

Le funzioni di Patterson calcolate a partire rispettivamente dai dati sperimentali (fattori di struttura osservati) e dal modello (fattori di struttura calcolati), non mostrerebbero nessuna particolare correlazione fatta eccezione dei casi nei quali i due set di vettori *self-Patterson* abbiano simile orientazione: nella mappa si osserverà la presenza di massimi di correlazione

in corrispondenza di alcuni angoli tra loro connessi dalle simmetrie rotazionali del sistema cristallino. Una volta identificata la corretta orientazione del modello, la sua relativa posizione nella cella unitaria viene trovata usando una funzione di traslazione simile (Fig. B.1).

Una volta ottenuti i parametri rotazionali e traslazionali per sovrapporre propriamente i due *set* di vettori, è possibile calcolare l'iniziale mappa di densità elettronica utilizzando i moduli dei fattori di struttura osservati e le fasi derivate dal modello ovvero le posizioni *xyz* nella cella unitaria *target*, ed i fattori termici *B* degli atomi del modello. Questa densità elettronica costituisce il punto di partenza per la costruzione della struttura tridimensionale della proteina in esame. Uno svantaggio di questo metodo deriva dal fatto che la mappa di densità elettronica così calcolata è dominata dalle fasi calcolate sulla base del modello. Ne consegue il rischio di non poter essere in grado di identificare le reali differenze, non solo in termini di residui amminoacidici (mutazioni) ma anche strutturali (inserzioni, delezioni di parti di struttura), che esistono tra la struttura del modello e quella della proteina oggetto del nostro studio.



**Fig.B.1** Funzione di Patterson.

