



STRATEGIE NMR PER PROTEINE MULTIDOMINIO

Le proteine multidominio, caratterizzate dall'alternanza di regioni globulari e intrinsecamente disordinate, pongono notevoli sfide alla loro caratterizzazione strutturale. Lo sviluppo di approcci NMR innovativi, applicati al costrutto TAZ4 della proteina CBP, ha permesso di discriminare i suoi due domini, fornendo una descrizione accurata delle loro proprietà strutturali e dinamiche.

La CREB Binding Protein (CBP) è un co-regolatore trascrizionale che svolge un ruolo fondamentale in numerosi processi cellulari, tra cui la differenziazione e lo sviluppo cellulare [1]. È costituita da sette domini globulari alternati a lunghe regioni intrinsecamente disordinate. I domini globulari sono stati ampiamente caratterizzati strutturalmente mediante cristallografia a raggi X e spettroscopia NMR. Studi più recenti hanno esteso le conoscenze anche di tre delle cinque regioni disordinate, ciascuna delle quali mostra proprietà particolari oltre al noto ruolo di *linkers*. L'approccio più comune nello studio di grandi proteine multidominio

consiste nel concentrarsi su singole regioni proteiche, semplificando così il sistema. Tuttavia, l'analisi di costrutti più ampi, se pur più impegnativa a causa delle differenze intrinseche tra domini globulari e disordinati, rappresenta un passo necessario alla comprensione dei meccanismi di azione di tali sistemi.

Il lavoro di tesi si è focalizzato sullo studio tramite spettroscopia NMR del costrutto multidominio TAZ4, una porzione di CBP costituita dal dominio globulare TAZ2 e dal linker flessibile ID4 (Fig. 1). La spettroscopia NMR, capace di indagare sia regioni strutturate sia intrinsecamente disordinate, è uno strumento ideale per questo tipo di sistemi, sebbene l'eterogeneità strutturale e dinamica renda particolarmente impegnativa la sua applicazione. Gli spettri NMR di domini intrinsecamente disordinati sono caratterizzati da segnali intensi e poco dispersi, mentre quelli di domini globulari presentano segnali più deboli e dispersi. Nei costrutti multidominio, i segnali intensi del dominio disordinato tendono a mascherare quelli più deboli del dominio globulare, complicando notevolmente l'analisi. Per superare questo ostacolo è stato sfruttato l'effetto di *Longitudinal relaxation enhancement* (LRE), ossia la misura dei processi di rilassamento longitudinale a seguito dell'inversione selettiva di un sottoinsieme di spin [4].

Il punto di partenza è stato lo studio delle proprietà di rilassamento longitudinale dei nuclei di TAZ4. Esperimenti 1D con inversione selettiva dei protoni ammidici hanno evidenziato una notevole differenza delle velocità di rilassamento longitudinali tra i nuclei degli amminoacidi presenti nei due domini.

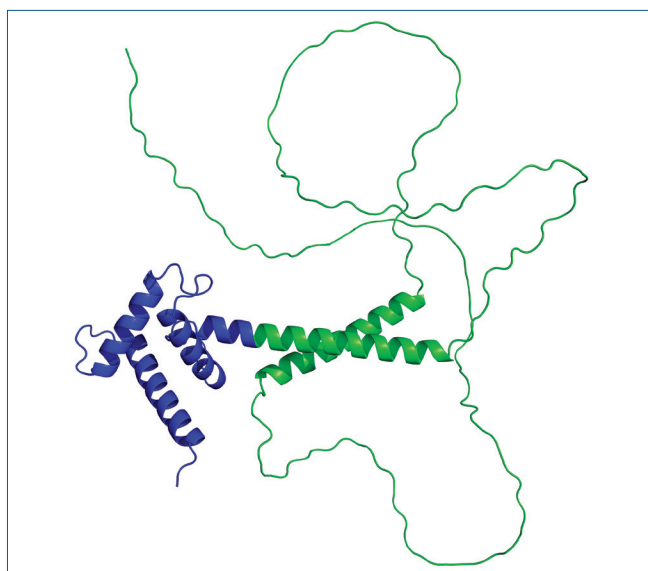


Fig. 1 - Una delle possibili conformazioni del costrutto CBP-TAZ4, generata usando il programma di intelligenza artificiale AlphaFold [2, 3]. In blu il dominio TAZ2 (globulare, 88 amminoacidi) e in verde il dominio ID4 (intrinsecamente disordinato, 207 amminoacidi)

A Silvia Oliveti è stato conferito il “Premio Angelini miglior tesi di laurea” 2025 dalla Divisione di Chimica dei Sistemi Biologici della SCI.

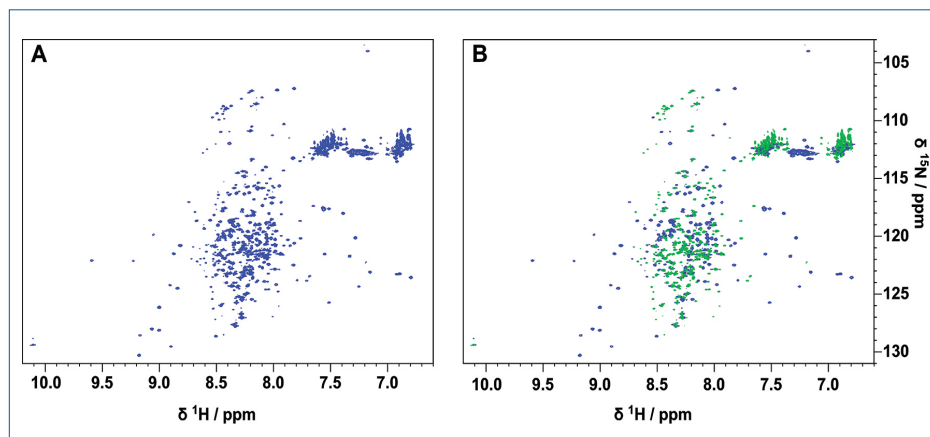


Fig. 2 - Spettro 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC preceduto da inversione selettiva degli H^{N} con (A) un tempo di recupero di 4 s e (B) 150 ms. I contorni blu e verdi rappresentano rispettivamente i segnali con intensità positiva (TAZ2) e negativa (ID4)

Il LRE selettivo sui protoni ammidici è influenzato principalmente da due fattori: le interazioni dipolari con protoni vicini e gli effetti di scambio con il solvente. Per minimizzare quest'ultimo effetto, il costrutto TAZ4 è stato analizzato a pH 5,5, dove lo scambio con il solvente risulta modesto. In queste condizioni, i protoni ammidici del dominio globulare rilassano velocemente grazie alle interazioni dipolari, mentre quelli del dominio disordinato rilassano più lentamente. Questo effetto è stato sfruttato per discriminare i due domini negli esperimenti NMR: ottimizzando i parametri di acquisizione, è stato possibile ottenere spettri con segnali positivi per il dominio globulare (spin completamente rilassati) e negativi per la regione intrinsecamente disordinata (spin non ancora rilassati). La presenza di segnali di segno opposto per i due domini semplifica notevolmente l'analisi degli spettri NMR, consentendo una distinzione chiara tra le componenti del costrutto [5].

L'inversione selettiva dei protoni ammidici è stata implementata anche in esperimenti multidimensionali più complessi, quali 2D $^1\text{H}^{15}\text{N}$ -HSQC (Fig. 2), 3D HNCQ e 3D HNCA. Gli spettri ottenuti hanno consentito di estendere l'assegnamento sequenza-specifico del costrutto TAZ4 ed hanno evidenziato la propensione a formare α -eliche in due zone del dominio intrinsecamente disordinato. Per supportare l'assegnamento sequenza-specifico sono stati acquisiti ulteriori esperimenti, tra cui 3D (H)N(CA)NNH, 3D (H)N(COCA)NNH, 2D CON e 2D CBCACO.

Infine, sono stati acquisiti esperimenti mirati allo studio delle catene laterali dei residui istidina, aminoacidi di particolare rilevanza nel costrutto TAZ4. Tra i sette residui istidina presenti, tre risultano coinvolti nella coordinazione di ioni zinco (II). Gli esperimenti NMR hanno consentito di assegnare le risonanze delle catene laterali e di distinguere tra residui leganti e non leganti, identificando inoltre quale atomo di azoto della catena partecipi al legame con lo ione zinco (II).

I risultati di questo lavoro di tesi hanno ampliato la comprensione delle proprietà strutturali e dinamiche del costrutto TAZ4 e posto le basi per ulteriori studi su proteine multidominio, contribuendo allo sviluppo di approcci NMR sempre più efficaci per sistemi complessi.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K.J. McManus, M.J. Hendzel, *Biochem. Cell. Biol.*, 2001, **79**(3), 253.
- [2] J. Jumper *et al.*, *Nature*, 2021, **596**(7873), 583, DOI: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2)
- [3] M. Varadi *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 2022, **50**(D1), D439, DOI: [10.1093/nar/gkab1061](https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061)
- [4] P. Schanda, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.*, 2009, **55**(3), 238, DOI: [10.1016/j.pnmrs.2009.05.002](https://doi.org/10.1016/j.pnmrs.2009.05.002)
- [5] L. Bracaglia, S. Oliveti *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 2025, **147**(16), 13146, DOI: [10.1021/jacs.4c14959](https://doi.org/10.1021/jacs.4c14959)

NMR Strategies for Multidomain Proteins

Multidomain proteins, characterized by alternating globular and intrinsically disordered regions, pose significant challenges to their structural characterization. The development of novel NMR approaches, applied to the TAZ4 construct of the CBP protein, has made it possible to discriminate between its two domains, providing an accurate description of their structural and dynamic properties.