



Università degli studi Milano – Bicocca

Impatto della mutazione $\Delta F508$ nel primo dominio di legame dei nucleotidi del regolatore di conduttanza transmembrana della fibrosi cistica umana sul ripiegamento e sulla struttura del dominio

Campora Aurora – Colombo Alice – Bravi Elisa
Gracioppo Rossella – Qamar Hakkani

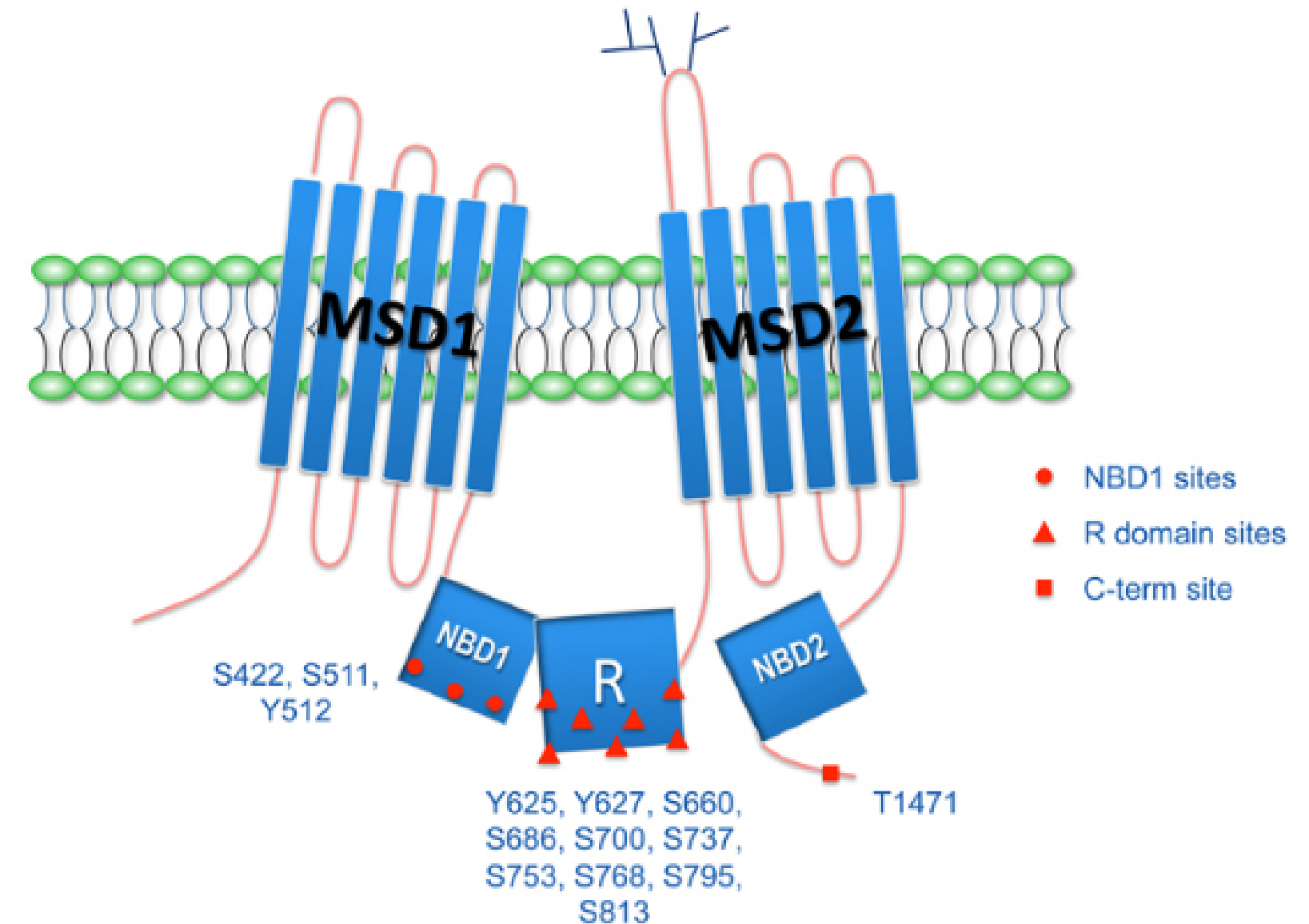
FIBROSI CISTICA E LA PROTEINA CFTR

La **proteina CFTR**: Canale ionico della famiglia dei trasportatori ABC(ATP-Binding Cassette).

Architettura della proteina CFTR a 5 MODULI:

- **MSD1 e MSD2**: Due domini transmembrana → poro del canale;
- **NBD1 e NBD2**: Due domini di legame nucleotidico (gating) → domini leganti ATP;
- **Regione R**: Dominio regolatorio (unico di CFTR).

Funziona come un **canale anionico** regolato dal legame e dall'idrolisi di ATP.



LA MUTAZIONE $\Delta F508$: IL DESTINO DELLA PROTEINA

IL PARADOSSO CLINICO:

Se la proteina mutata raggiungesse la superficie, funzionerebbe in modo quasi normale.



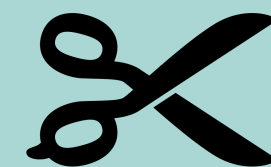
Mutazione:

Delezione della Fenilalanina in posizione 508 ($\Delta F508$) nel dominio NBD1.



Difetto di traffico:

Mancata maturazione nel reticolo endoplasmatico. La proteina viene bloccata e distrutta.



Degradazione:

Proteolisi mirata che riduce drasticamente i canali in membrana.

IL CUORE DELLA SCOPERTA: UN NUOVO PARADIGMA

```
graph TD; Title[IL CUORE DELLA SCOPERTA:  
UN NUOVO PARADIGMA] --> OldHypothesis[VECCHIA IPOTESI (MISFOLDING)]; Title --> NewPerspective[NUOVA PROSPETTIVA (INTERAZIONE)]; NewPerspective --> RealProblem[Il vero problema: L'alterazione della superficie esterna impedisce la "comunicazione" e l'aggancio con i domini di membrana (MSD1).];
```

VECCHIA IPOTESI (MISFOLDING)

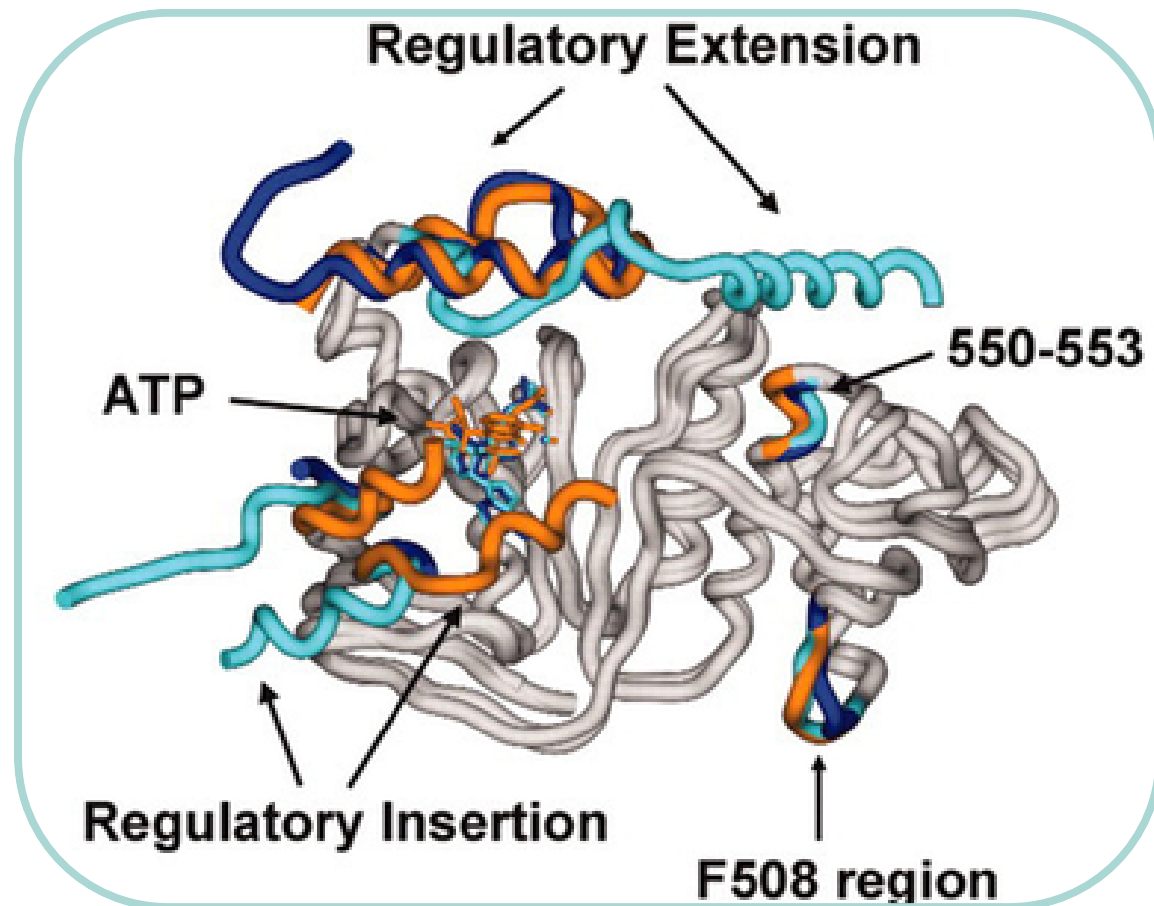
Studi su frammenti incompleti suggerivano che $\Delta F508$ causasse un **ripiegamento aberrante** del dominio NBD1.

NUOVA PROSPETTIVA (INTERAZIONE)

Domini NBD1 completi mostrano stabilità normale. Il problema risiede nell'**interruzione delle interazioni interdominio**.

Il vero problema: L'alterazione della superficie esterna impedisce la "comunicazione" e l'aggancio con i domini di membrana (MSD1).

L'ARCHITETTURA MICROSCOPICA DI NBD1



Struttura del dominio ABC canonico diviso in 3 sottodomini:

- **Core tipo F1-ATPasi:** Porzione centrale per il legame dell'ATP.
- **Sottodominio ABC β :** Costituito da foglietti β antiparalleli.
- **Sottodominio ABC α :** Costituito da eliche α ; contiene la firma genetica LSGGQ.

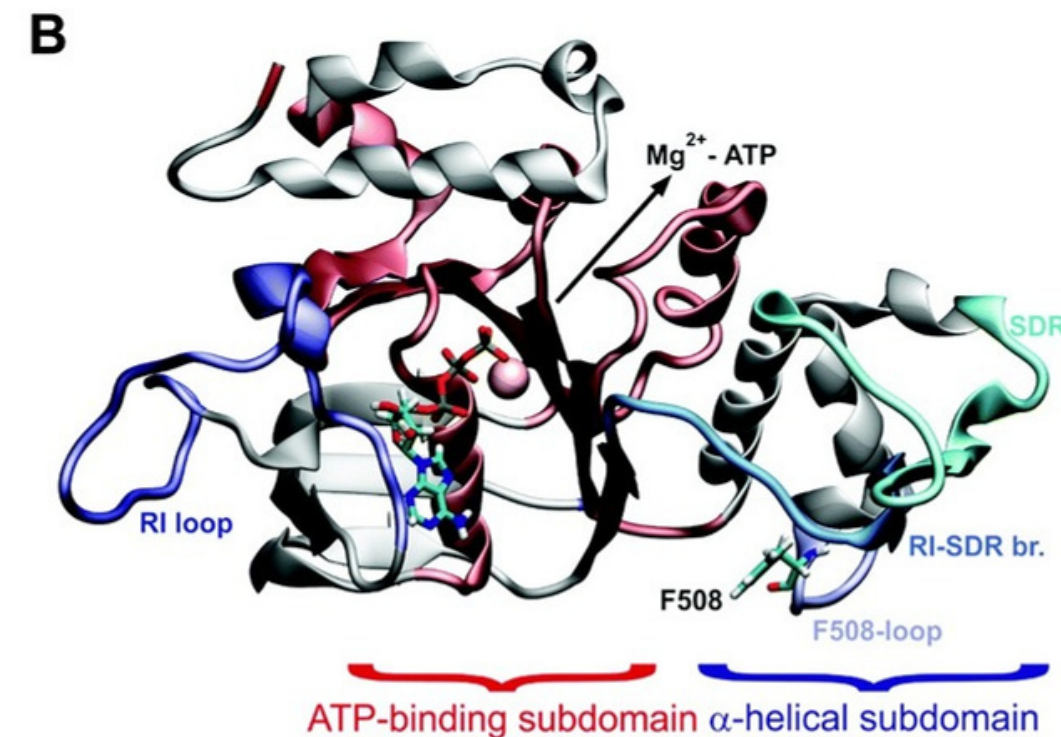
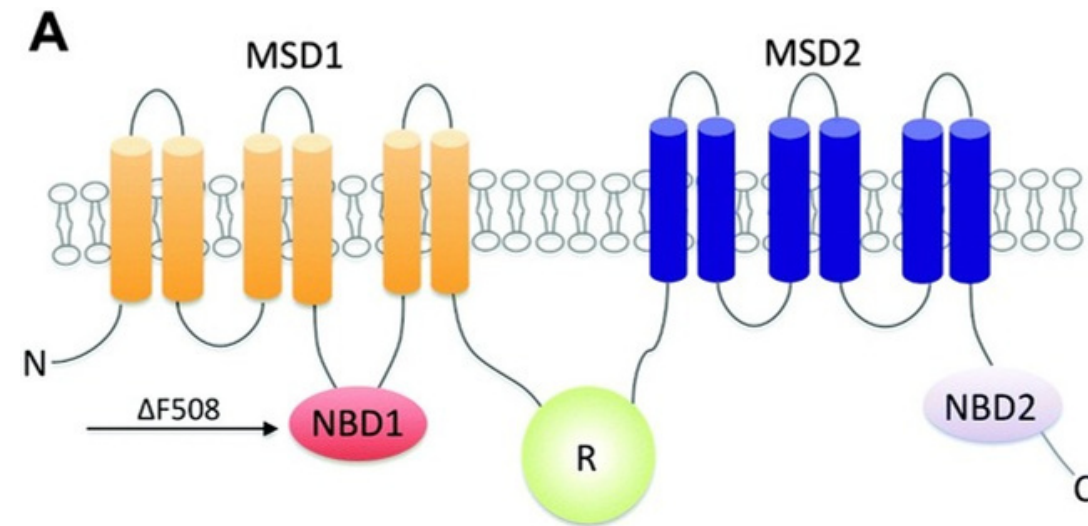
Asimmetria funzionale:

- ***Faccia universale:*** Altamente conservata tra gli organismi.
- ***Faccia variabile:*** Superficie di aggancio con le eliche transmembrana (MSD).

Il punto critico: la mutazione

Il residuo Phe-508 si trova vicino al terminale C della prima elica ABC α , esattamente sulla superficie di contatto.

L'INTERFACCIA NBD1-MSD1 E L'EFFETTO $\Delta F508$



Conservazione strutturale: L'NBD1 umano ha una struttura globale analoga a quella del topo (mNBD1) e agli NBD canonici dei trasportatori ABC.

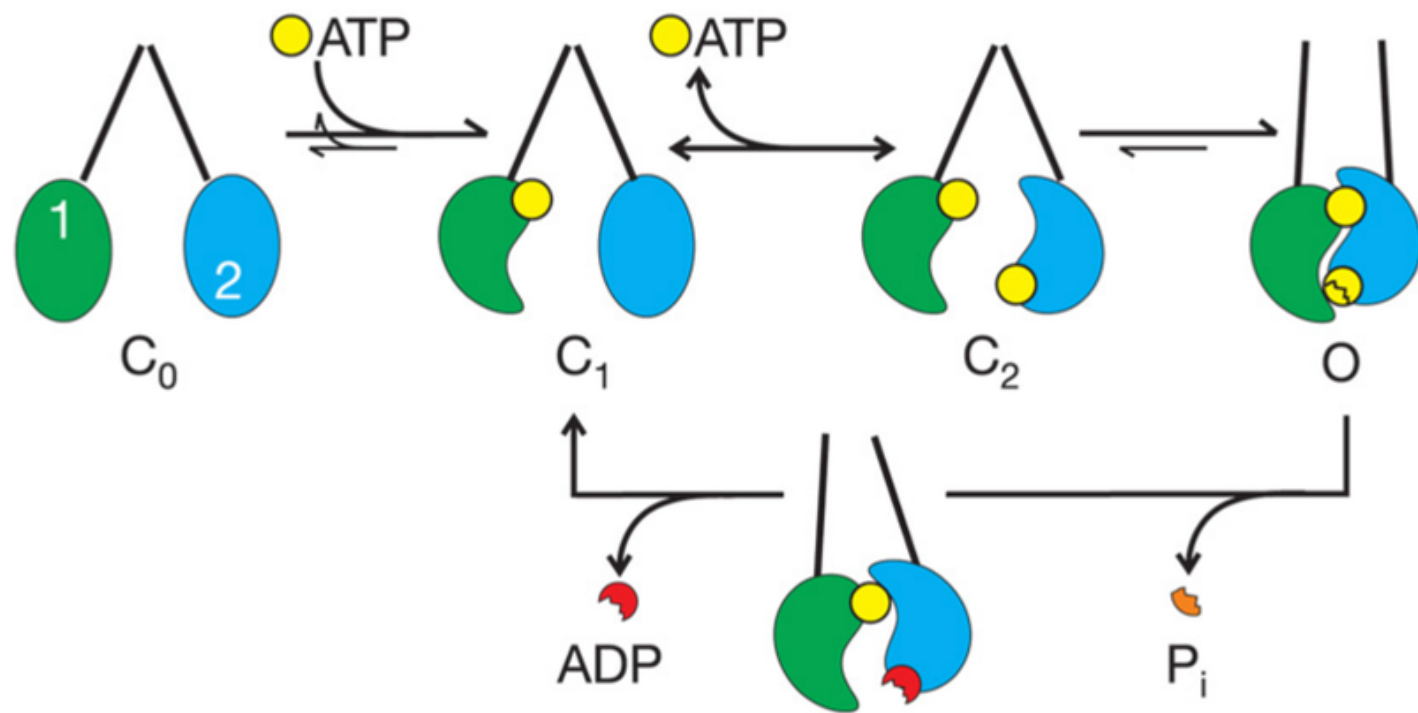
Topografia locale vs Struttura globale:

- La mutazione $\Delta F508$ **non** altera il ripiegamento (folding) complessivo del dominio.
- **Altera drasticamente la topografia della superficie locale.**

Il vero meccanismo patogenetico:

- L'errore colpisce il sito di contatto chiave con le eliche transmembrana di **MSD1**.
- *Risultato:* Instabilità dell'intero complesso proteico (canale CFTR) e non del singolo dominio isolato.

DINAMICA MOLECOLARE E IMPLICAZIONE TERAPEUTICHE



Segmenti strutturali dinamici:

- RI (Inserzione Regulatoria, ~30 residui)
- RE (Estensione Regulatoria, ~20 residui).

MECCANISMO DI GATING:

- RI e RE devono muoversi per permettere la **chiusura a "sandwich" di NBD1/NBD2 mediata da ATP.**
- **Fosforilazione:** Modula l'interferenza sterica per attivare/disattivare il canale.

NUOVO TARGET FARMACOLOGICO:



Serve un farmaco chaperone che "raddrizzi" o ripieghi l'NBD1 interno.



Serve un correttore che funga da "colla" strutturale per stabilizzare l'interfaccia NBD1-MSD1 (membrana).

OBIETTIVO DELLA RICERCA



La sfida metodologica: Superare i limiti dei vecchi studi basati solo su frammenti incompleti o proteine murine.



Traguardo dello studio: Produrre ed esaminare domini **hNBD1** umani solubili (sia wild-type che mutati).



Risoluzione del quesito biologico: Chiarire in modo definitivo se la mutazione $\Delta F508$ causi il misfolding del singolo dominio o se distrugga le **interazioni interdominio funzionali**.

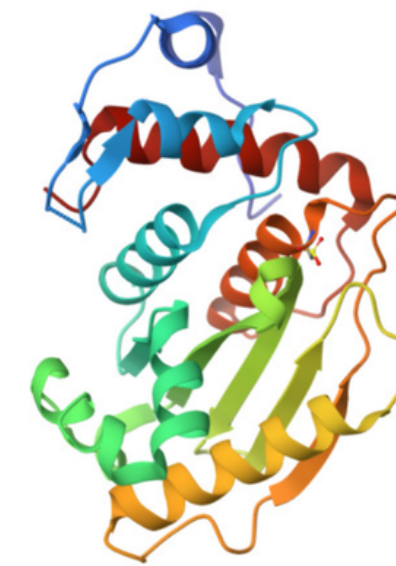
MATERIALI E METODI:

Clonaggio, espressione e purificazione della proteina



Il frammento NBD1 della CFTR è stato prodotto in batteri *Escherichia Coli* come **proteina di fusione con un tag His6-Smt3** per facilitarne la purificazione.

- Le cellule sono state rotte tramite sonicazione con ghiaccio;
- La proteina è stata purificata con cromatografia di affinità al nichel;
- Il tag è stato rimosso tramite la proteasi Ulp1;
- Eliminazione di impurità residue.



La proteina finale è stata concentrata in un **tampone contenente ATP, MgCl₂, agenti riducenti e stabilizzanti.**

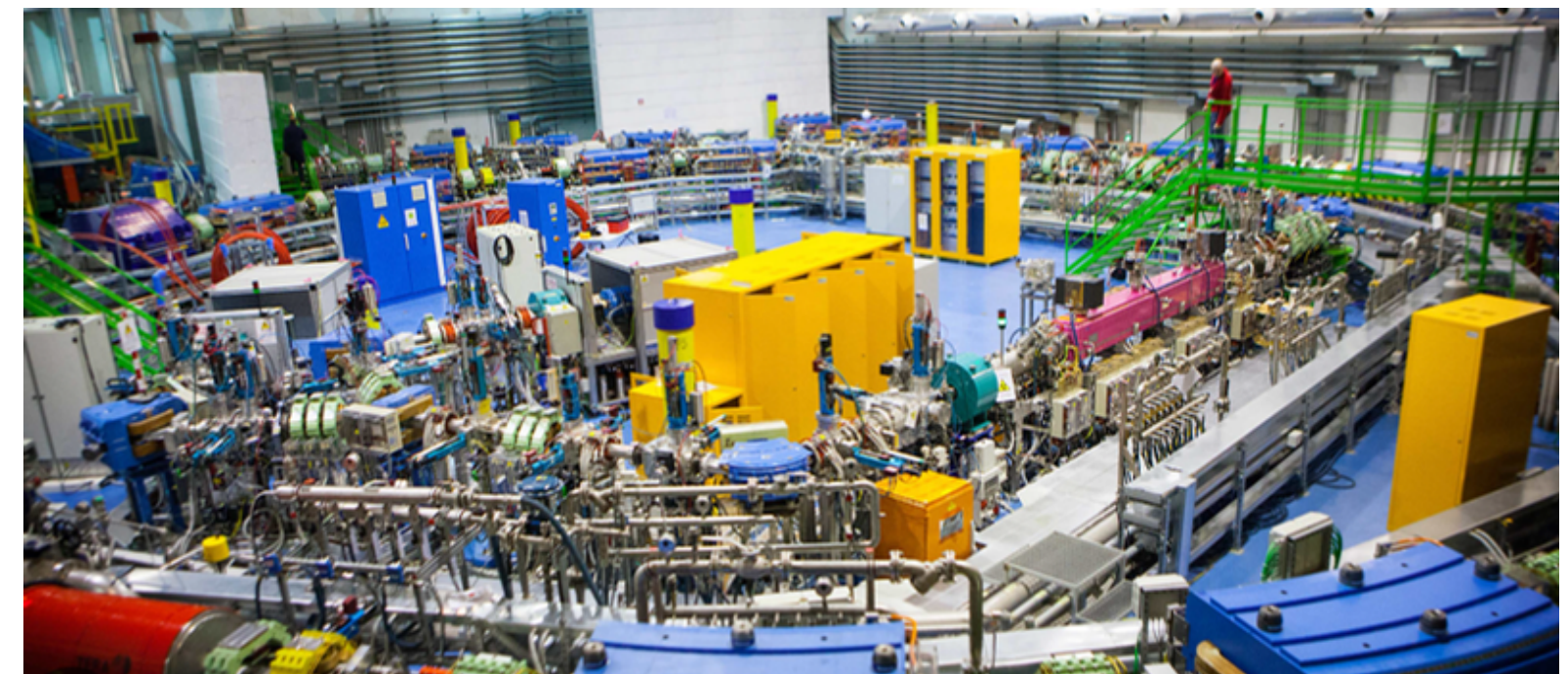
L'attività ATPasica del dominio NBD1 è risultata praticamente assente.



MATERIALI E METODI:

Cristallizzazione e raccolta dati

- Proteine purificate cristallizzate usando diffusione del vapore e tecniche di microseeding per ottenere cristalli adatti alla diffrazione.
- Cristalli congelati in azoto liquido e analizzati mediante diffrazione a raggi X presso il sincrotrone Advanced Photon Source.
- Determinazione della struttura tridimensionale della proteina attraverso software specifici.

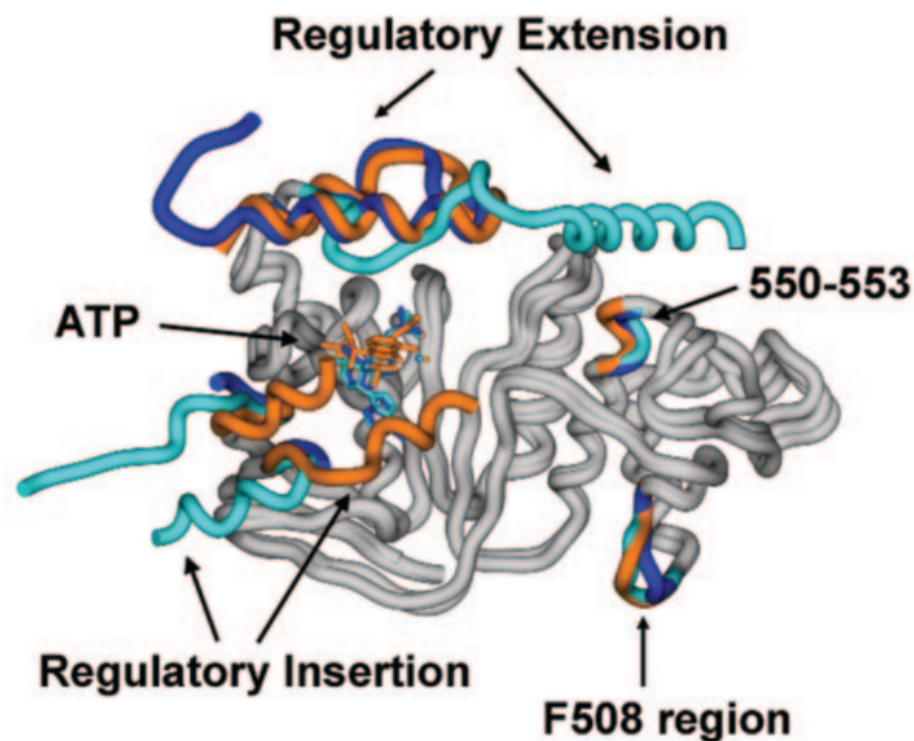


DETERMINAZIONE STRUTTURALE

Le strutture atomiche sono state risolte tramite molecular replacement e raffinate con diversi programmi di modellazione strutturale.

I modelli finali includevano:

- Residui proteici ben definiti;
- Molecole di ATP legat;
- Numerose molecole d'acqua.

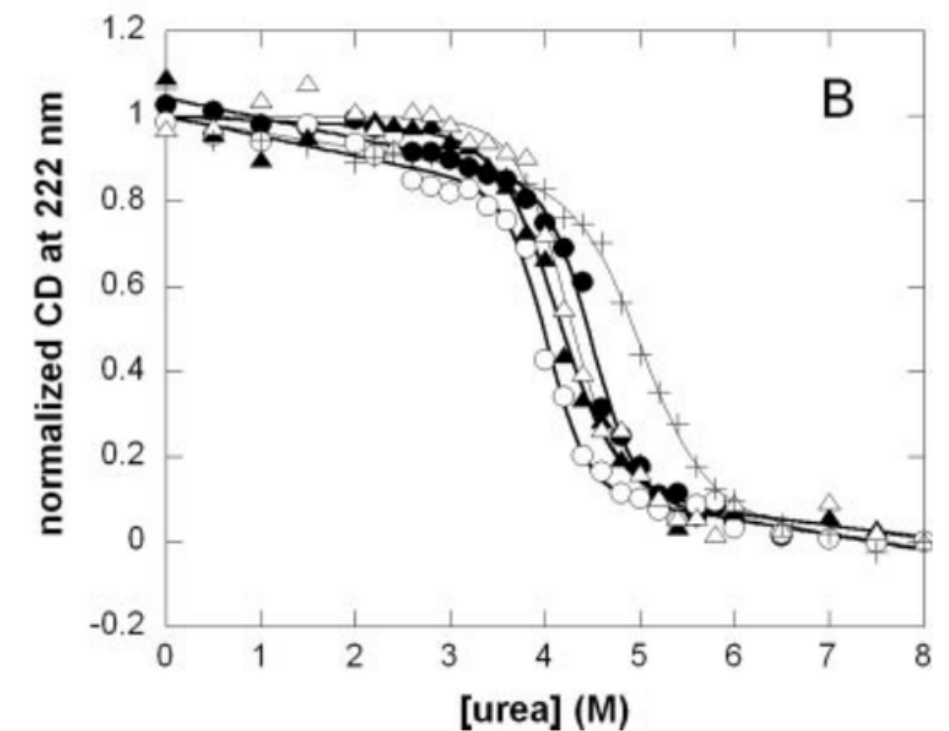
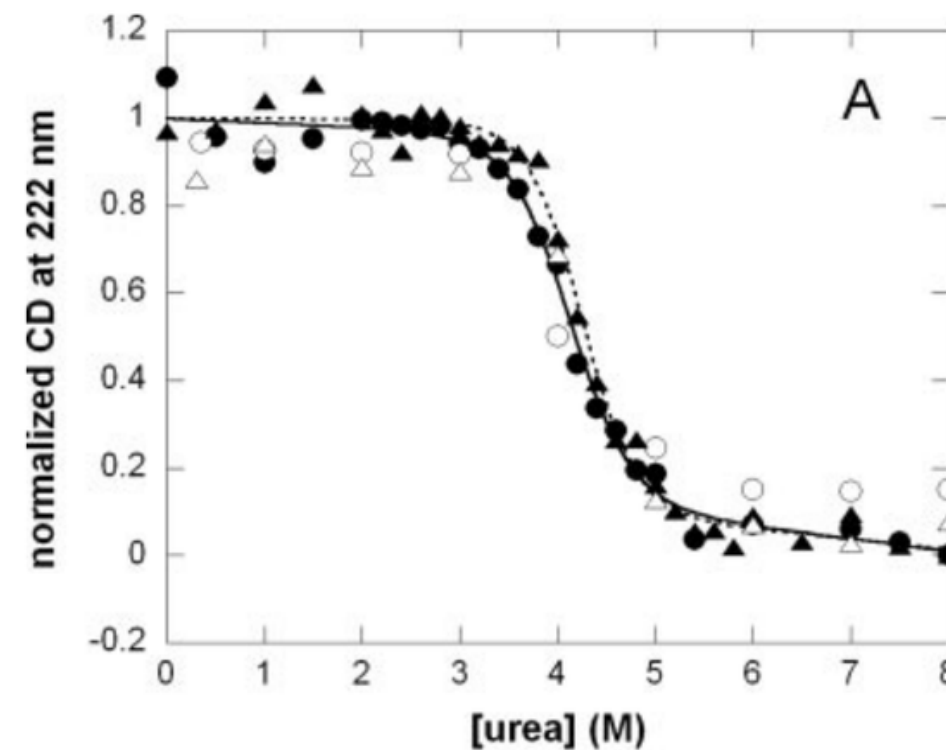


DENATURAZIONE ALL'EQUILIBRIO

I dati sono stati analizzati assumendo un meccanismo a due stati:

- Proteina ripiegata;
- Proteina denaturata.

Per valutare la stabilità della proteina, i campioni sono stati denaturati con urea e monitorati tramite dicroismo circolare (CD) a 222 nm.



MATERIALI E METODI:

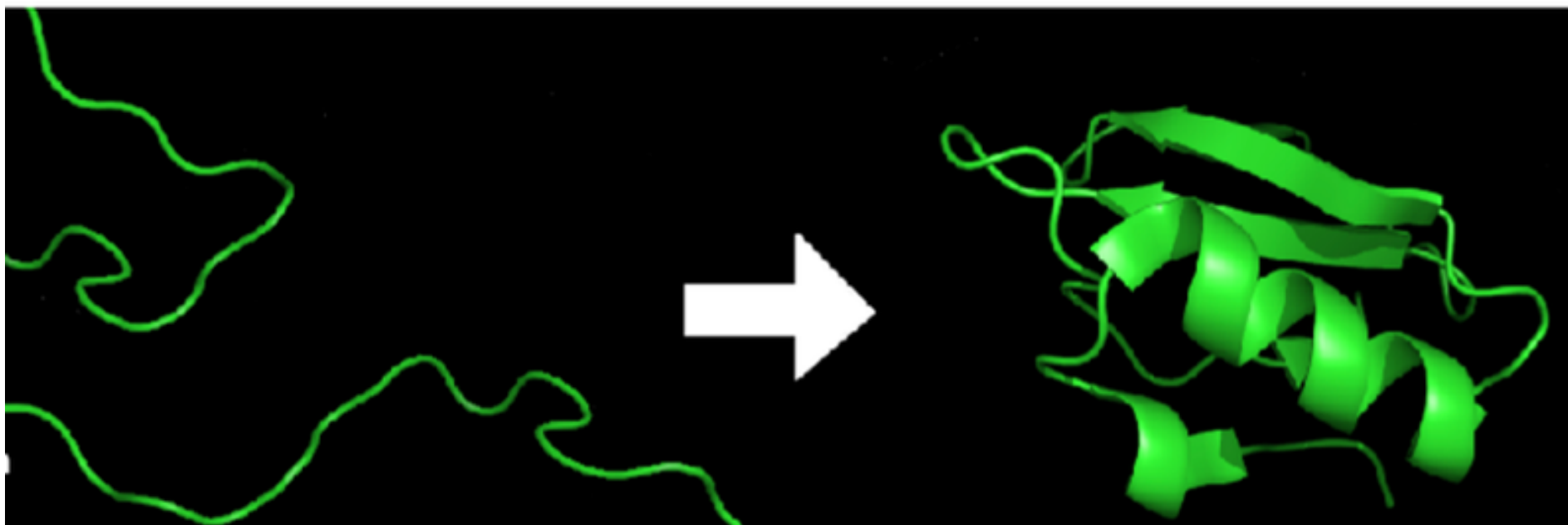
Fluorescenza del triptofano e cinetiche di refolding

Studio delle conformazioni durante il ripiegamento della proteina attraverso la fluorescenza intrinseca del triptofano utilizzando uno spettrofluorimetro a scansione Cary Eclipse.

Diluizione rapida della proteina in tampone privo di denaturante per avviare il refolding.

Il recupero della struttura nativa è stato monitorato nel tempo tramite:

- Dicroismo circolare;
- Fluorescenza del triptofano.



RISULTATO 1

Paradosso sperimentale:

NBD1 wt, se rimosso dal resto della proteina, non è solubile e precipita → impossibilità di eseguire i test

Risoluzione:

Produzione di proteine hNBD1 ingegnerizzate con una solubilità migliorata, introducendo mutazioni nei residui superficiali per renderli più idrofili.

- Cambiamento di sequenza da umana a murina;
- Cambiamento di sequenza da umana a pesce;
- Mutazioni soppressorie.

RISULTATO 1

ANALISI DELLA RESA PROTEICA:

- hNBD1 (senza modifiche);
- hNBD1-2f (con due mutazioni: Q637R/F494N);
- hNBD1-7a (con 7 mutazioni).

Dal confronto dei ΔG emerge che:

- La rimozione dell'aa 508 NON destabilizza l'architettura interna di NBD1.
- Resa inferiore del mutante $\Delta F508$ attribuibile a una riduzione intrinseca della solubilità della sua superficie → proteina più prona all'aggregazione.

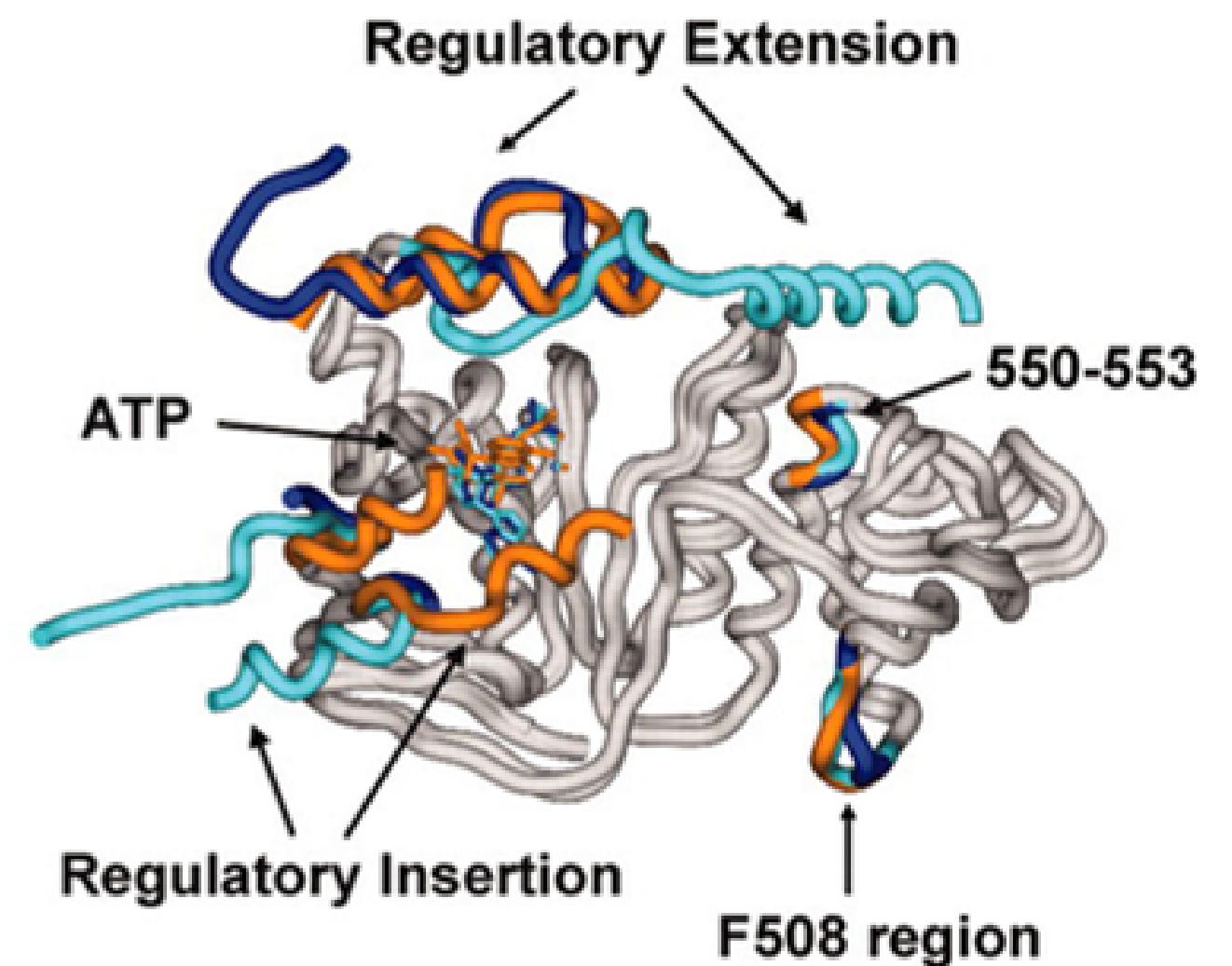
		F508	F508A	$\Delta F508$
Base Name	Base Mutations ^a	Relative Yield ^b	Relative Yield ^b	Relative Yield ^b
hNBD1	No additional	None	Medium	None
hNBD1-1	F429S	Medium	High	None
hNBD1-2a	F409L/F433L	Low	Low	NC ^c
hNBD1-2b	F429S/H667R	Low	High**	None
hNBD1-2c	F429S/Q637R	NC	NC	None
hNBD1-2d	F429S/F494N	NC	NC	None
hNBD1-2e	F429S/R555K	NC	NC	Low
hNBD1-2f	Q637R/F494N	High $\Delta G^{\circ} = -8.90 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$ $m = 2.10 \pm 0.2 \text{ kcal/mol M}$ $C_m = 4.20 \text{ M}$	NC	Low $\Delta G^{\circ} = -8.05 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$ $m = 1.95 \pm 0.2 \text{ kcal/mol M}$ $C_m = 4.15 \text{ M}$
hNBD1-3	F429S/Q637R/F494N	High	NC	Medium
hNBD1-4	F433L/F409L/F429S/H667R	Medium $\Delta G^{\circ} = -8.70 \pm 0.9 \text{ kcal/mol}$ $m = 1.70 \pm 0.2 \text{ kcal/mol M}$ $C_m = 5.00 \text{ M}$	High	None
hNBD1-5a	F433L/F409L/F429S/H667R/V393E	NC	NC	None
hNBD1-5b	F433L/F409L/F429S/H667R/F494N	NC	NC	Low
hNBD1-5c	F433L/F409L/F429S/H667R/R553Q	NC	NC	None
hNBD1-5d	F433L/F409L/F429S/H667R/G550E	NC	NC	Low
hNBD1-5e	F433L/F409L/F429S/H667R/R555K	NC	NC	Medium
hNBD1-6a	F433L/F409L/F429S/H667R/F400S/L436H	Medium	NC	None
hNBD1-6b	F433L/F409L/F429S/H667R/F494N/V393E	NC	NC	Low
hNBD1-7a	F433L/F409L/F429S/H667R/G550E/R553Q/R555K	High $\Delta G^{\circ} = -11.30 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$ $m = 2.50 \pm 0.2 \text{ kcal/mol M}$ $C_m = 4.40 \text{ M}$	NC	Medium** $\Delta G^{\circ} = -11.25 \pm 0.5 \text{ kcal/mol}$ $m = 2.80 \pm 0.2 \text{ kcal/mol M}$ $C_m = 4.15 \text{ M}$
hNBD1-7b	F433L/F409L/F429S/H667R/Q637R/V393E/F494N	High	NC	High

RISULTATO 2

Confronto tra le strutture tridimensionali di hNBD1 e mNBD1:

- Struttura globale del nucleo e dei sottodomini di hNBD1 conservata
- L'inserzione regolatoria (RI) e l'estensione regolatoria (RE) compiono una rotazione macroscopica di 180°.

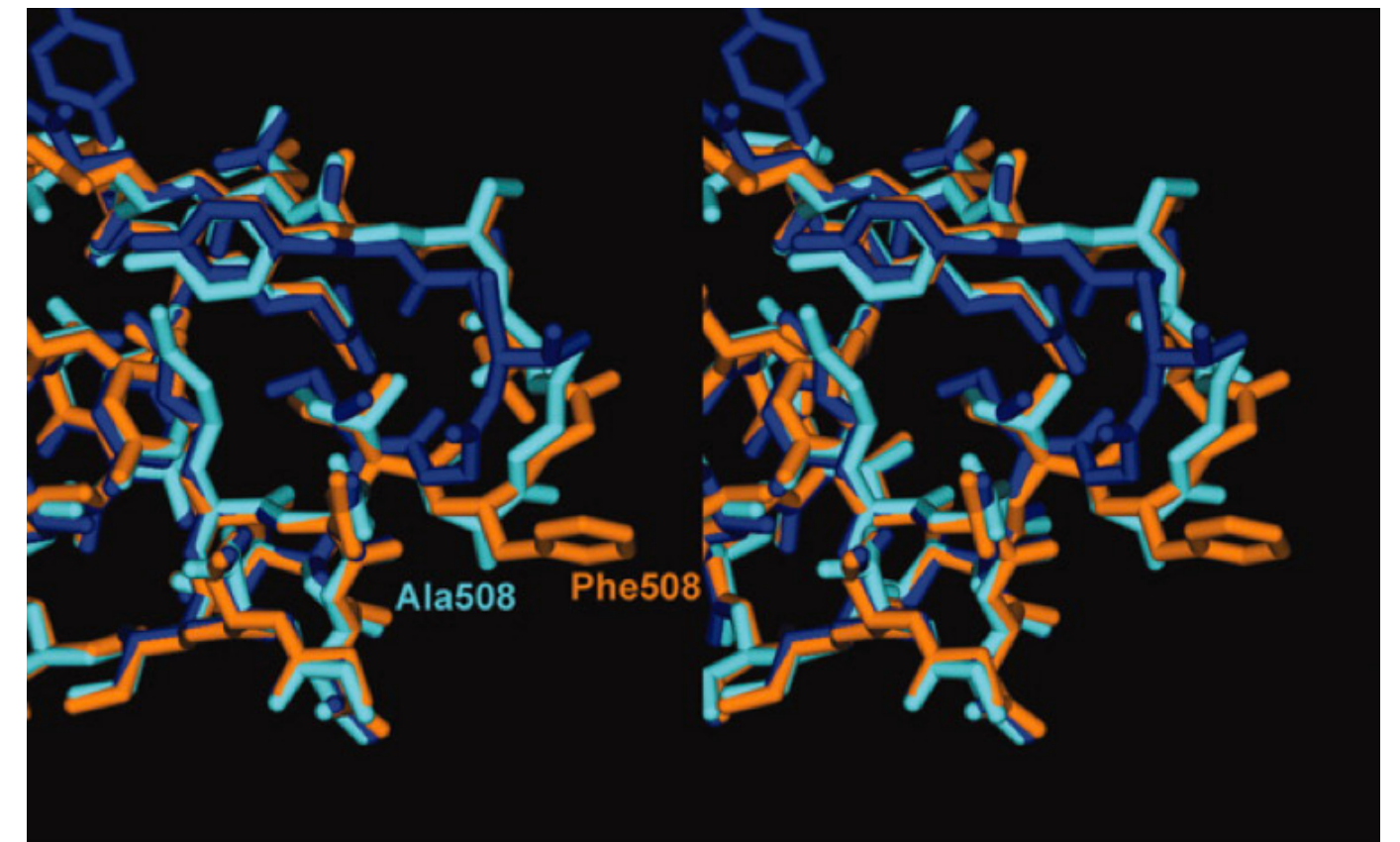
→ Interazione tra Trp 401 e ATP (base stacking)
→ L'interazione NBD1-NBD2 è permessa?
Sì, ruolo regolatorio cruciale di PKA.



RISULTATO 3

La mutazione $\Delta F508$ altera la superficie (topografica) e non la struttura interna del dominio:

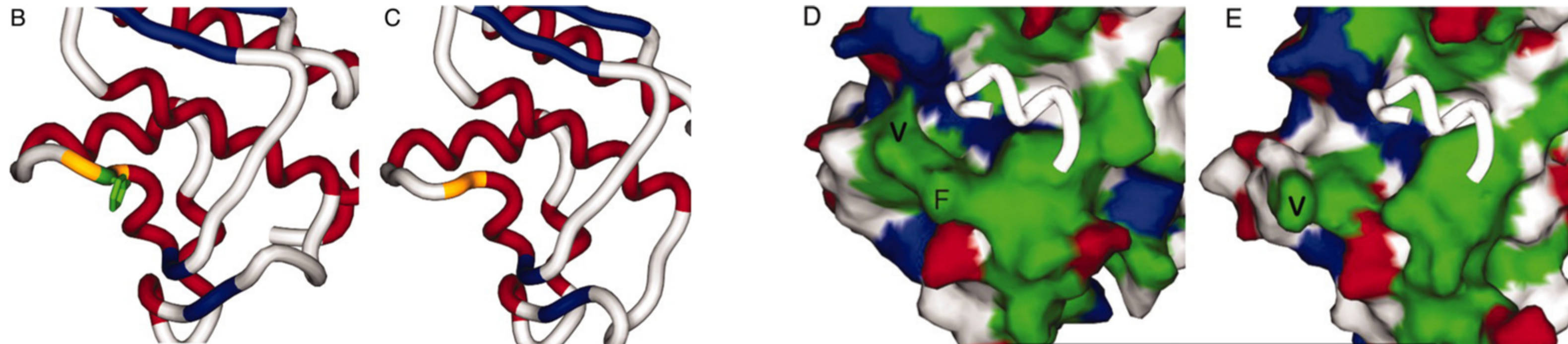
- Cosa mostra il dato: Confrontando la struttura cristallina ad alta risoluzione del dominio NBD1 normale con quella del dominio con mutazione $\Delta F508$.
- Il vero effetto della mutazione.
- Perché è importante (implicazione biologica)?



https://ars.els-cdn.com/content/image/1-s2.0-S0021925820765087-gr2_lrg.jpg

RISULTATO 3

- La rimozione dell'amminoacido Phe-508 altera drasticamente la topografia locale della superficie esterna.
- Questa specifica area superficiale è la zona deputata all'interazione tra il dominio NBD1 e il primo dominio transmembrana (MSD1) della proteina CFTR.

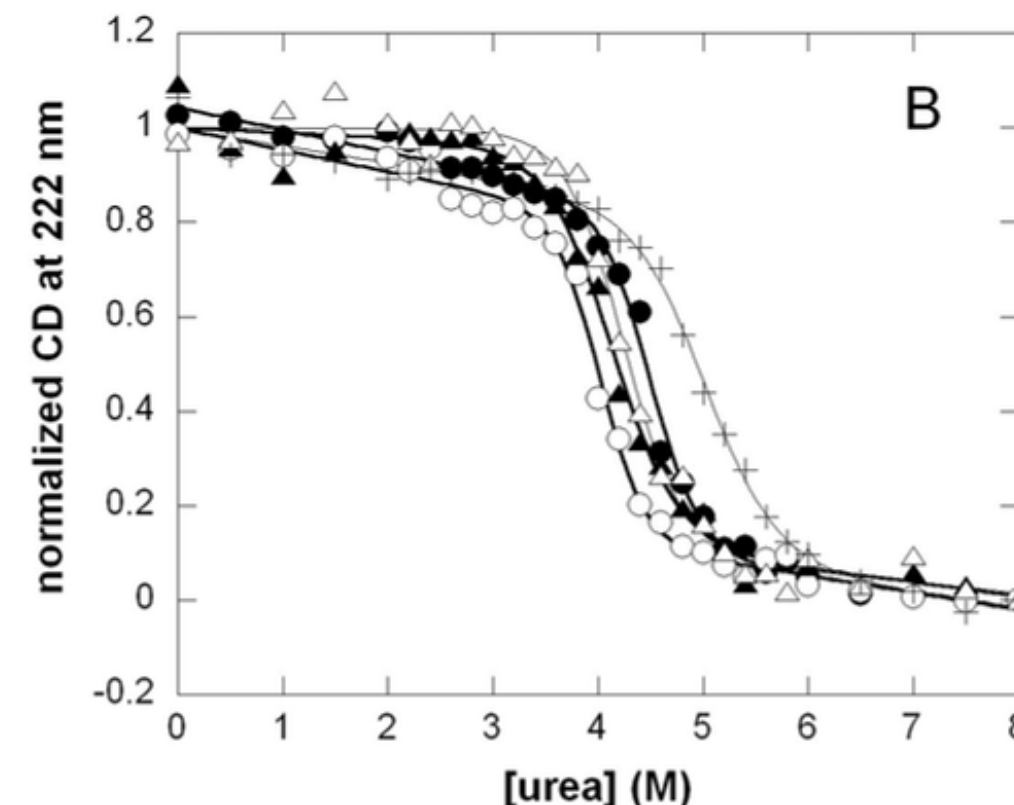
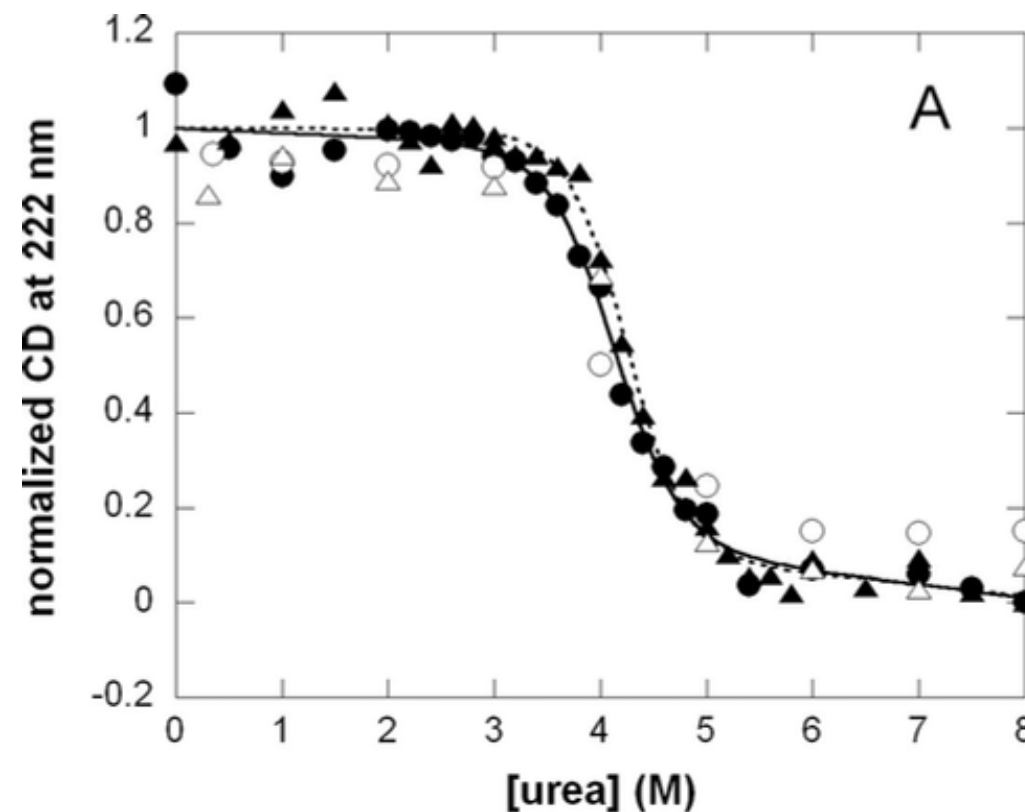


Il problema principale di Δ F508 non è che la proteina si ripiega male (misfolding) a livello isolato, ma che la mutazione distrugge le corrette interazioni e la comunicazione tra i diversi domini (interdomain interactions) all'interno dell'intera proteina CFTR.

RISULTATO 4

L'effetto delle "**Mutazioni Soppressatrici**" di seconda interfaccia:

- Cosa succede nei test biofisici: Quando queste mutazioni soppressatrici vengono inserite nei costrutti di NBD1, si osserva un incremento netto della stabilità intrinseca del dominio.
- Meccanismo d'azione: Anche se la mutazione $\Delta F508$ danneggia l'interfaccia tra i domini, i mutanti soppressori agiscono indirettamente fungendo da "stabilizzatori energetici". Rendono il dominio NBD1 intrinsecamente più stabile ed efficiente nel ripiegarsi, compensando il difetto strutturale causato dalla fibrosi cistica.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

CAMPORA AURORA – COLOMBO ALICE – BRAVI ELISA
GRACIOPPO ROSSELLA – QAMAR HAKKANI



Università degli studi Milano – Bicocca