



RELAZIONE SCIENTIFICA SULL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA DALLA DOTT.SSA LUCIANA ESPOSITO presso il Dipartimento di Chimica dell'Università di Cambridge (periodo di ricerca: 3/05/2010 – 30/05/2010) NELL'AMBITO DEL PROGRAMMA STM:

Analisi dei fattori strutturali coinvolti nella formazione di fibre amiloidi mediante l'uso di tecniche computazionali di dinamica molecolare

In linea con il progetto di ricerca presentato e continuando la fruttuosa collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università di Cambridge⁽¹⁻⁴⁾ durante il periodo di ricerca all'estero sono stati condotti studi computazionali delle proprietà dinamiche di nuovi modelli strutturali di fibre amiloidi.

L'attività ha seguito due principali filoni:

1) E' stato studiato un peptide amiloidogenico la cui struttura cristallina è stata recentemente determinata e che mostra polimorfismo strutturale⁽⁵⁾. Tale polimorfismo è stato correlato alla presenza di diversi strain patologici, causati dallo stesso peptide o proteina cui appartiene, e comunemente osservati nelle malattie prioniche.

In particolare, ci si è concentrati sullo studio dinamico di un segmento di sei amminoacidi (SSTNVG) derivante dal Polipeptide Amiloide Insulare (IAPP), proteina di 37 amminoacidi il cui *misfolding* porta alla formazione di aggregati amiloidi tra le cellule β del pancreas di pazienti affetti da diabete di tipo II. In uno dei polimorfi, la regione centrale è occupata da due residui di Serina, mentre nell'altro tale regione è occupata da due residui di Asparagina.

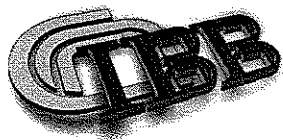
Precedentemente, presso il nostro Istituto IBB-CNR di Napoli, erano stati condotti studi di dinamica molecolare classica (MD) su aggregati di coppie di β -sheets (formati ciascuno da 10 strands) di tali polimorfi al fine di valutarne la stabilità strutturale in un contesto non cristallino. Una volta accertata la stabilità strutturale, presso l'Università di Cambridge sono stati intrapresi studi di metadinamica allo scopo di valutare le barriere energetiche per l'interconversione dei polimorfi.

La metadinamica è una metodologia di recente applicazione basata su un potente algoritmo che può essere utilizzato sia per la ricostruzione del profilo di *free energy*, sia per accelerare eventi rari in un sistema. Lo scopo è quindi quello di permettere al sistema molecolare indagato di superare i minimi locali nei quali potrebbe essere intrappolato ed esplorare dunque un maggiore spazio energetico accessibile. Ciò è realizzato identificando un set di variabili collettive in grado di descrivere il processo di interesse, e fornendo periodicamente un "surplus" di energia a tali variabili mediante una funzione gaussiana di opportuna altezza ed ampiezza.

Durante il periodo di ricerca all'estero sono state individuate tali variabili e definite le condizioni nelle quali applicare tale metodologia al nostro sistema peptidico. Le simulazioni in ambiente acquoso, giunte a tempi di 100 ns, sono ancora in corso perché il sistema non ha ancora raggiunto la convergenza, necessaria per il calcolo dei profili di *free energy*. Tuttavia, un'analisi preliminare di simulazioni metadinamiche, avviate per valutare la scelta delle variabili collettive, mostra risultati promettenti indicando la capacità dei modelli strutturali polimorfi di interconvertirsi e di rappresentare un minimo energetico.

2) Estendendo il lavoro svolto nel nostro laboratorio sulla proteina prionica umana, durante il periodo di visita a Cambridge è stato affrontato lo studio della stabilità di una piccola regione della proteina prionica coinvolta nel processo di dimerizzazione.⁽⁶⁻⁷⁾

In particolare sono stati analizzati diversi stati di aggregazione dei peptidi 125-136 (denominato A) e 158-169 (denominato B) della proteina prionica. Questi tratti formano un β -sheet antiparallelo di



Consiglio Nazionale delle Ricerche

Istituto di Biostrutture e Bioimmagini

due strands (AB) nel singolo monomero e sono poi associati nella struttura a formare un dimero (ABB'A').

Precedentemente presso l'IBB erano state condotte simulazioni classiche di MD sia su sistemi a 4 strands antiparalleli di β sheet (ABB'A'), due provenienti da ogni molecola di proteina prionica umana, sia sui sistemi a 2 strands (AB o BB'), per valutare le caratteristiche e la stabilità prima del dimero e poi dei singoli sheet. Da queste simulazioni è stato osservato che i singoli β -sheets rimangono stabili in un intervallo di tempo di 100 ns e tendono ad estendere la loro conformazione β , conformazione predominante nel *misfolding* della proteina prionica. Alla luce di questi risultati si è deciso di effettuare, presso l'Università di Cambridge, studi più approfonditi sui modelli a 2 e a 4 strands mediante la tecnica del *replica exchange*.

Il metodo del *replica exchange* (REMD) consiste nell'effettuare simulazioni nel tempo di varie repliche del sistema di interesse, condotte in parallelo all'interno di un intervallo di temperature stabilito. Le configurazioni sono scambiate tra le varie repliche a diversa temperatura ad intervalli di tempo costante, permettendo il superamento delle barriere energetiche e un'accurata analisi dello spazio conformazionale. I sistemi ad elevata temperatura sono generalmente in grado di campionare ampi volumi dello spazio delle fasi, mentre sistemi a basse temperature, pur avendo un preciso campionamento in una regione locale di spazio delle fasi, possono rimanere intrappolati in un minimo energetico locale durante il tempo di una tipica simulazione MD. Il *replica exchange* realizza un buon campionamento consentendo ai sistemi, a differenti temperature ma alla stessa energia, uno scambio completo di configurazioni. Questa procedura ci permetterà quindi di valutare il profilo di *free energy* dei sistemi studiati. Simulazioni di REMD sono state avviate su diversi sistemi contenenti sia i peptidi nativi (wt) che quelli con mutazioni puntiformi (in particolare, M129V e G131V, sullo strand B) associate a varie patologie.⁽⁸⁻¹¹⁾ Sono state utilizzate 32 repliche, che coprono un intervallo di temperatura tra 296 K e 435 K, per ognuno dei nove sistemi studiati (aggregati AB, BB' e ABB'A', per tre diversi peptidi, ossia wt e due mutanti). Al momento la maggior parte delle simulazioni ha raggiunto un tempo di 100 ns. L'analisi delle traiettorie è ancora in corso.

Il periodo di lavoro a Cambridge ha affrontato una fase cruciale nell'approccio computazionale: la scelta della metodologia più adatta e dei parametri ad essa associata. E' stato avviato lo studio della stabilità dei modelli amiloidi utilizzando tecniche computazionali estremamente innovative (metadinamica e REMD). I risultati ottenuti finora sono particolarmente incoraggianti e rappresentano un solido punto di partenza per ulteriori sviluppi nell'immediato futuro. Sono state inoltre poste le basi per consolidare la fruttuosa e duratura collaborazione tra le nostre due istituzioni scientifiche.

1. De Simone A., Eposito L., Pedone C. et Vitagliano L., (2008) *Biophys J.* **95**: 1965-73; 2. De Simone A., Pedone C. et Vitagliano L., (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 800-6; 3. Vitagliano L., Pedone C. et De Simone A. (2008) *Biochem Biophys Res Commun* **377**: 1036-41; 4. Vitagliano L., Stanzione F., Pedone C. et De Simone A. (2009) *Biopolymers* **91**: 1161-71; 5. Wilzrus et al. (2009) *Nat Struct Mol Biol.* **16** (9):973-8; 6. Antonyuk S.V., et al. (2009) *PNAS*; **106**(8):2554-2558; 7. Haire L.F., et al. (2004) *J Mol Biol*; **336** :1175-1183 ; 8. Collinge J., et al., (1996) *Lancet*; **348**:56; 9. Hsiao K., et al., (1992) *Nat. Genet.*; **1**:68-71; 10. Collinge J., et al., (1991) *Lancet* **337**:1441-1442; 11. Penegys P.K., et al. (2001) *Arch Neurol*; **58**:1899-1902.

IL PROPONENTE

Dott. Luigi Vitagliano

IL FRUITORE

Dott.ssa Luciana Eposito