

Centro di responsabilità di attività scientifica di primo livello  
- ex Istituto dei Sistemi Complessi (ISC) - CNR  
via Madonna del Piano, 10 - I-50019 Sesto Fiorentino (Firenze)

---

Tel.: +39-055-5226670 - Fax: +39-055-522-6683

---

### **Relazione Scientifica: Ricostruzione del panorama energetico di biomolecole**

L'attività di ricerca ha avuto luogo presso la Sezione di Firenze del nostro istituto, ed ha coinvolto oltre al Prof. Anders Irbäck della Università di Lund (Svezia), i Dott.ri Alessandro Torcini, Massimo Vassalli, e Bruno Tiribilli, ricercatori presso la sezione fiorentina dell'ISC, il Dott. Stefano Luccioli, dottorando dell'Università di Firenze, che svolge la sua tesi presso il nostro istituto, ed il Prof. Alberto Imparato, Aarhus University, Danimarca, venuto appositamente in visita all'ISC durante il periodo di permanenza del Prof. Anders Irbäck.

Quale primo passo sono stati riesaminati criticamente i dati di simulazione ottenuti sia presso il Dipartimento di Fisica Teorica dell'Università di Lund (Svezia) che presso il nostro istituto riguardanti il dominio  $FnIII_{10}$  della Fibronectina. Questa attività è stata propedeutica alla stesura e scrittura di un articolo scientifico che ha riguardato la denaturazione meccanica del dominio  $FnIII_{10}$  [1]. In particolare, ci si è concentrati sulla caratterizzazione dei vari cammini di denaturazione, dallo stato nativo a quello totalmente aperto, e degli stati intermedi, meccanicamente stabili, osservati con vari protocolli di "pulling" sia a forza che a velocità costante. I dati di simulazione Monte-Carlo ottenuti per lo srotolamento della Fibronectina sono stati confrontati con dati sperimentali recentemente ottenuti [2], trovando un buon accordo fra di essi.

Inoltre, applicando la eguaglianza di Jarzynski ai dati fuori equilibrio ottenuti durante il "pulling" della proteina, siamo riusciti a ricostruire anche il panorama di energia libera visitato dalla proteina sottoposta a denaturazione ed abbiamo messo in luce l'esistenza di stati metastabili (minimi dell'energia libera) che possono essere messi in diretta corrispondenza con stati intermedi osservati durante il "pulling" meccanico della proteina in esame.

L'articolo in questione [1] è stato completato ed inviato alla rivista Biophysical Jour-

nal ed attualmente é all'esame dei "referees".

Quale futura attività comune abbiamo poi programmato una serie di nuove misure numeriche e sperimentali sulla Fibronectina per la stima dei tempi necessari alla denaturazione meccanica della proteina, quando questa é sottoposta a forze di intensità crescente. Gli esperimenti numerici (già iniziati) verranno svolti presso l'ISC per ciò che riguarda semplici proteine modello [3,4], mentre simulazioni Monte-Carlo della Fibronectina verranno svolte a Lund. A questo scopo il Dott. S. Luccioli si é attualmente in Svezia e vi resterà sino ad ottobre 2008.

Le corrispondenti analisi sperimentali (in particolare, misure di Force Clamp) verranno effettuate presso la Sezione Fiorentina dell'ISC dal gruppo di microscopia ottica composto dai Dott.ri M. Vassalli e B. Tiribilli, per la realizzazione di queste misure si avvarranno di un microscopio a forza atomica appositamente realizzato presso l'ISC, recentemente usato per lo studio dello "unfolding" della Titina [5], con un apparato di controllo nuovo atto a consentire misure a forza costante.

Questo studio é teso a rivelare i meccanismi che sottindendono alla apertura dei vari domini della proteina ed in particolare dovrebbe mettere in luce in quali regimi di forza si possa descrivere il processo come termicamente attivato, piuttosto che come un processo Markoviano in presenza di un termine di deriva costante.

Nei prossimi anni si prevede di continuare la collaborazione su tematiche relative alla stabilità meccanica di etero-polimeri e fibrille amiloidi fra l'ISC e la Computational Biology and Biological Physics Division della Università di Lund. In particolare, si pensa di usare tecniche sperimentali di spettroscopia di forza AFM per riuscire a comprendere il ruolo giocato dalla presenza di nodi in proteine, osservata recentemente [6] ma di cui non si comprende a tutt'oggi lo scopo funzionale.

## **Bibliografia**

[1] S. Mitternacht, S. Luccioli, A. Torcini, A. Imparato, e A. Irbäck, "Changing the mechanical unfolding pathway of FnIII<sub>10</sub> by tuning the pulling strength", sottomesso a Biophysical Journal per la pubblicazione nel 2008.

[2] L. Li, H.H.-L. Huang, C.L. Badilla, e J.M. Fernandez, "Mechanical unfolding intermediates observed by single-molecule force spectroscopy in a fibronectin type III module" J. Molecular Biology, **345** 817–826 (2005)

[3] A. Imparato, S. Luccioli, e A. Torcini, "Reconstructing the free energy landscape of a mechanically unfolded model protein", Phys. Rev. Lett. **99** (2007) 168101.

[4] S. Luccioli, A. Imparato, e A. Torcini, "Free energy landscape of mechanically un-

folded model proteins: extended Jarzinsky versus inherent structure reconstruction”  
in fase di stampa su Phys. Rev. E (2008).

[5] A. Imparato, F. Sbrana, e M. Vassalli, “Reconstructing the free-energy landscape of a polyprotein by single-molecule experiments”, Europhys. Lett. **82**, 58006 (2008).

[6] W.R. Taylor, “A deeply knotted protein structure and how it might fold”, Nature **406** 916-919 (2000); W.R. Taylor e K. Lin “Protein knots: A tangled problem”, Nature **421** 25 (2003).

Firenze, 10 settembre 2008

Antonio Politi