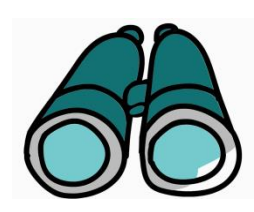


## YIA2018-Modellistica Computazionale

# Studio in silico dei meccanismi molecolari alla base della plasticità funzionale nelle proteine

Silvia Rinaldi - Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, Milano

### 1) Understanding complex mechanisms of enzyme reactivity: The case of Limonene-1,2-epoxide hydrolases – ACS Catalysis (2018)



Qual è il significato funzionale dei cambiamenti conformazionali nella catalisi?

Caso studio: Limonene-1,2-epossido idrolasi (LEH), un enzima che pur presentando un'elevata regio- ed enantio-selettività verso il suo substrato naturale, mostra una attività catalitica nei confronti di substrati non naturali estremamente ridotta.

Per comprendere i meccanismi molecolari alla base della diversa selettività di LEH è stato applicato un approccio combinato:

Meccanismo di reazione  
(QM/MM Free Energy Perturbations)

Relazione struttura/affinità  
(Binding Affinity Calculations)

Dinamica Interna: misura della perturbazione conformazionale indotta dai diversi ligandi  
(MD-derived methods)

Lo studio ha dimostrato la complessità del processo catalitico della LEH, dove la specificità e selettività dell'enzima sono governate da una concomitanza di fattori:

- | SUBSTRATO NATURALE                                | SUBSTRATO NON NATURALE                          |
|---|---|
| • Corretta pre-organizzazione del sito catalitico | • Errata pre-organizzazione del sito catalitico |
| • Alta affinità per il substrato                  | • Bassa affinità per il substrato               |
| • Bassa Energia di Attivazione                    | • Bassa Energia di Attivazione                  |

Le interazioni specifiche proteina-ligando stabilizzano determinate conformazioni del sito attivo che a loro volta mediano differenti cammini enzimatici; traducendosi in una differente efficienza catalitica e in una diversa regio/stereo-selettività.

La stabilizzazione ligando-specifica di determinate conformazioni spiega anche la diversa affinità per substrati differenti, suggerendo che la perturbazione di un specifico set di interazioni proteina/ligando possa aprire alla possibilità di modulare e ottimizzare le proprietà catalitiche della LEH.

I risultati prodotti contribuiscono a sostenere la tesi per cui una corretta trattazione delle proprietà enzimatiche non può prescindere dal considerare queste macromolecole biologiche delle complesse entità dinamiche.

### 2) Unraveling Energy and Dynamics Determinants to Interpret Protein Functional Plasticity: The Limonene-1,2-epoxide-hydrolase Case Study – JCI (2017)

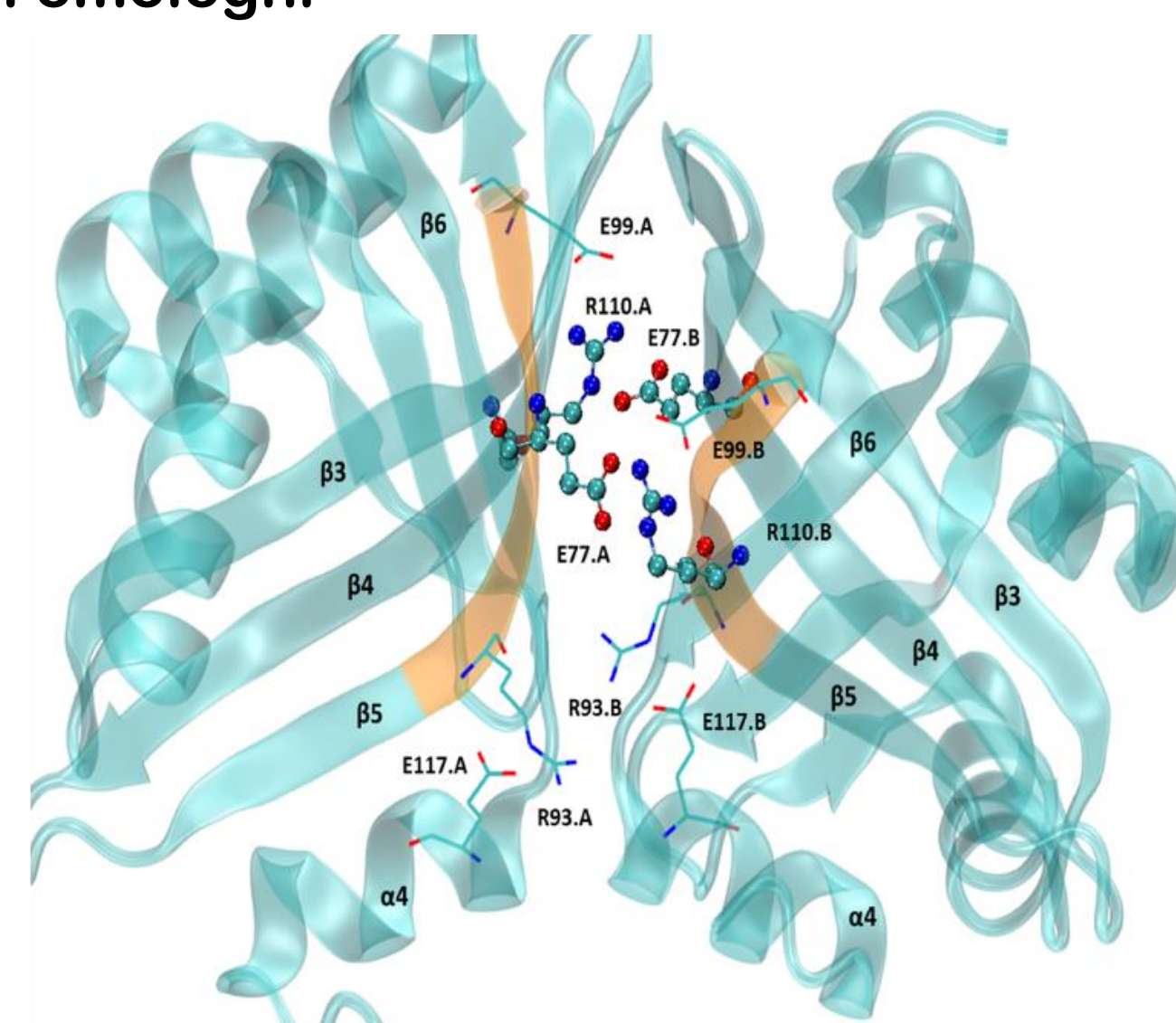
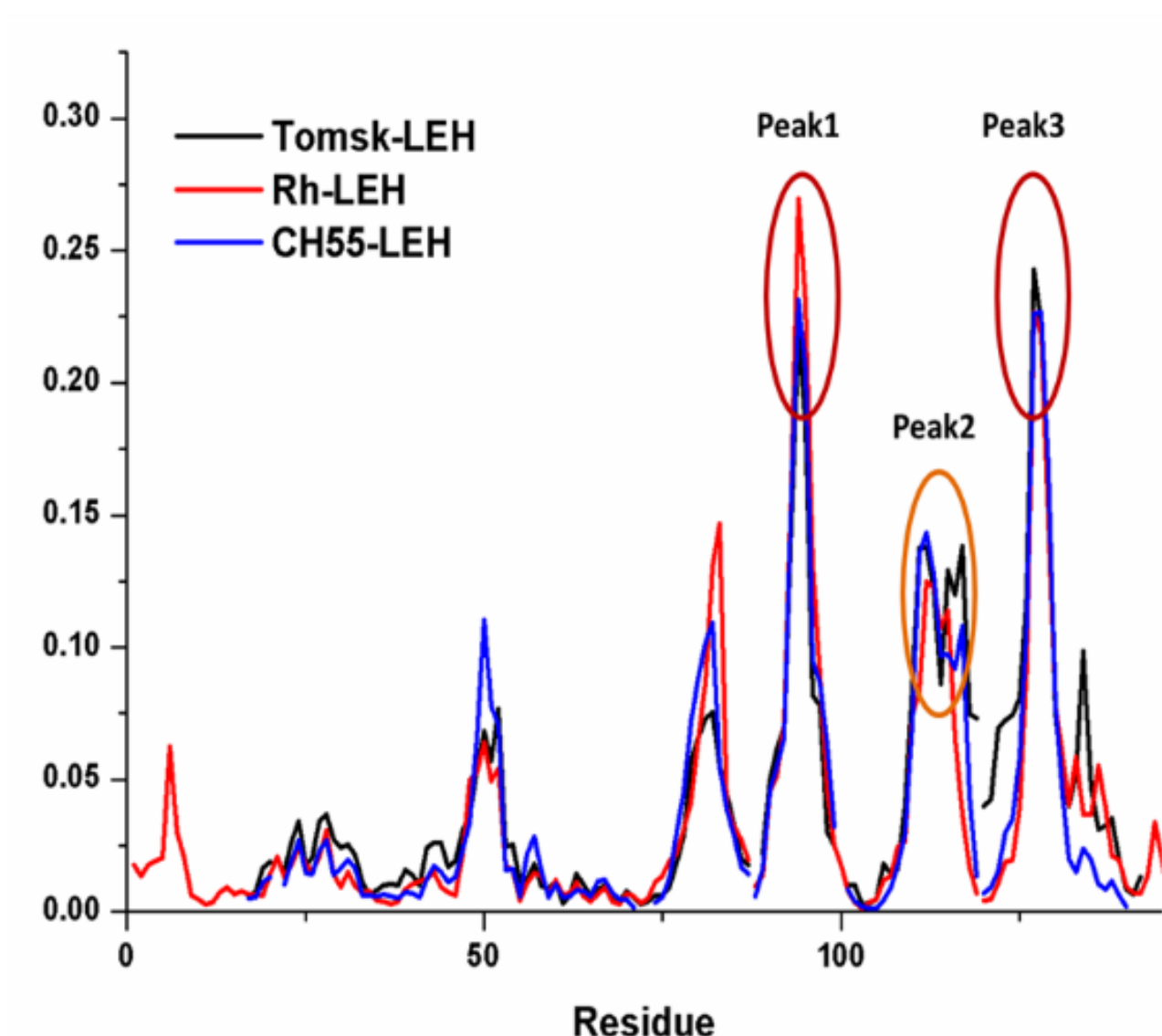


Studio dell'equilibrio tra stabilità strutturale e plasticità funzionale alla base del processo di adattamento evolutivo delle proteine

Caso studio: Set di 5 omologhi strutturali appartenenti alla famiglia della limonene-1,2-epossido- idrolasi (LEH). Questi enzimi, a dispetto di una comune funzionalità e di una elevata similarità strutturale, hanno una bassa omologia di sequenza (dal 25 al 48%), che si rispecchia in differenze significative sia nella stabilità termica che nell'efficienza catalitica.

Contributo (valore assoluto) all'energia di stabilizzazione del fold proteico per residuo

Determinanti di stabilizzazione primari (rappresentazione CPK) e secondari (rappresentazione lineare) comuni al set di omologhi



Combinando lo studio della dinamica interna e del pattern energetico delle proteine alla validazione sperimentale (disegno e caratterizzazioni di mutanti), i nostri risultati hanno dimostrato che nonostante la variabilità nella sequenza primaria, i diversi enzimi sfruttano poche e conservate regioni (determinanti di stabilità) per assicurare la stabilità strutturale della proteina. Questi hotspot definiscono una comune e caratteristica impronta energetica e dinamica che è associabile e riconducibile ad uno specifico fold tridimensionale. A seconda del grado di conservazione della loro sequenza, questi determinanti vengono definiti primari, altamente conservati ed essenziali al mantenimento del fold proteico, o secondari, dove la maggiore variabilità di sequenza ne permette un ruolo accessorio. Parallelamente, lo studio ha permesso di individuare specifiche regioni variabili delle LEH che agiscono potenzialmente da modulatori, contribuendo alla plasticità funzionale degli enzimi.

Se da un lato la pressione evolutiva ha conservato determinanti strutturali comuni a proteine che adottano una simile organizzazione tridimensionale (e ne assicurano la stabilità), dall'altro ha selezionato elementi regolatori variabili, la cui modulazione si rispecchia in una differente funzionalità biologica.

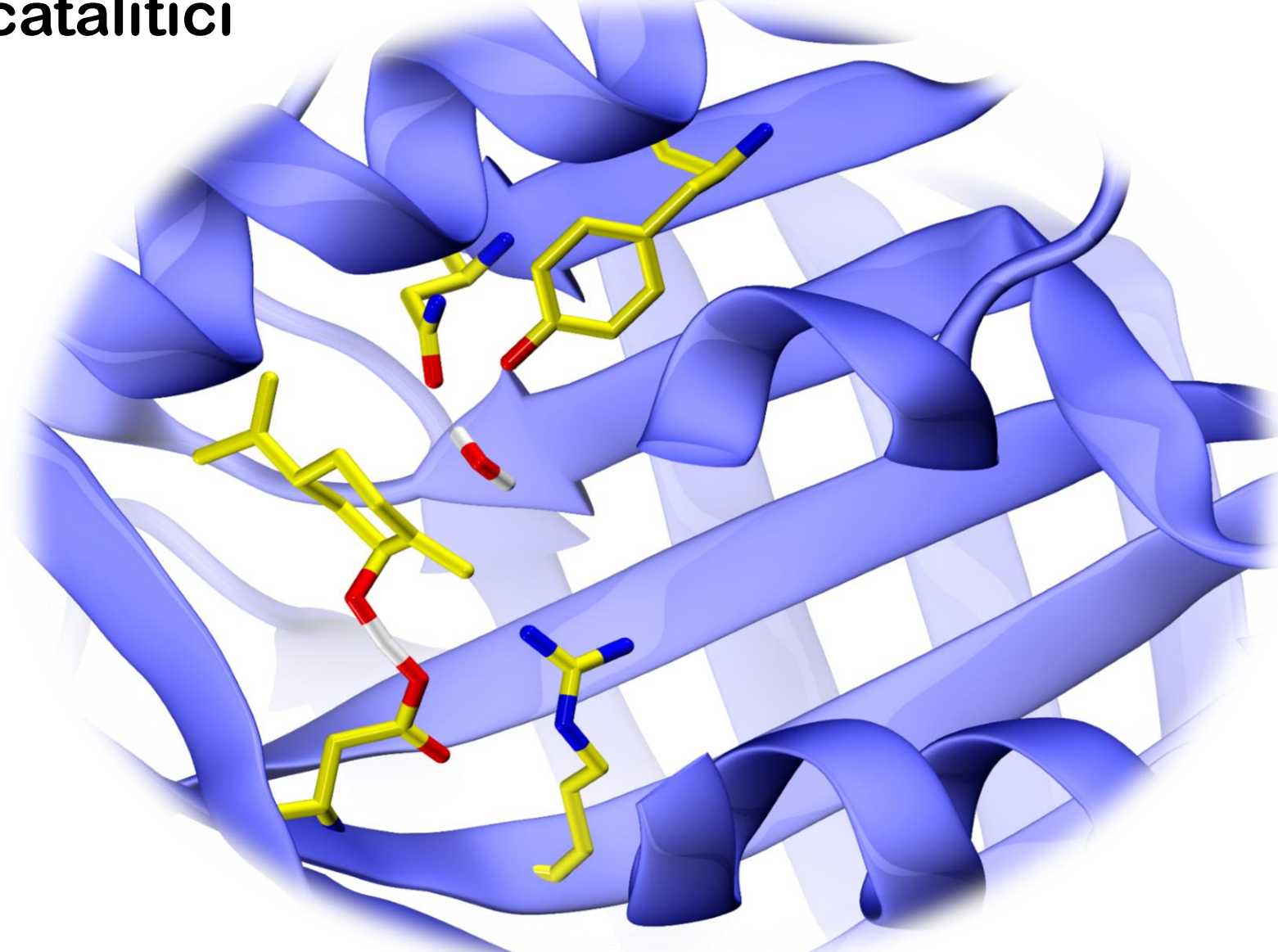
### 3) Protein design: from computer models to artificial intelligence- WIREs Computational Molecular Science (2017)



Design di nuove proteine che presentano nuove funzionalità: stato dell'arte e possibili sviluppi

Il lavoro si articola attorno a tre tematiche principali: il disegno/ottimizzazione di nuovi scaffold, la modulazione delle interazioni proteina-proteina e la modulazione/progettazione della funzionalità proteica. Le tre tematiche vengono affrontate a vari livelli, partendo dall'ottimizzazione di strutture già presenti alla progettazione de novo di nuovi fold e nuovi siti catalitici (teozimi).

Teozima: acquisire nuove funzionalità tramite il disegno e l'ottimizzazione di nuovi siti catalitici



Il design di nuove proteine che presentino nuove funzionalità è un tema centrale del dibattito scientifico, e anche se numerosi passi avanti sono stati fatti in questi anni, il raggiungimento di questo ambizioso obiettivo è ancora un processo lungo. Recentemente un significativo avanzamento in questa direzione è stato possibile grazie all'introduzione di nuovi metodi computazionali che vanno dalla semplice ottimizzazione di proteine esistenti, alla progettazione ex novo di nuovi scaffold. L'obiettivo di questo lavoro è quello di esplorare le differenti tecniche disponibili al momento, mettendone in evidenza vantaggi e svantaggi. Un importante spazio è dato anche all'approccio congiunto computazionale-sperimentale, guardando soprattutto agli interessanti risultati ottenuti dagli studi di evoluzione diretta. Tra le varie tecniche proposte, il lavoro illustra anche la metodologia messa a punto nel nostro laboratorio nell'ambito della structural vaccinology, per la predizione di epitopi che possano efficacemente attivare una risposta immunitaria da utilizzare sia per saggi di diagnosi molecolare che per lo sviluppo di nuovi e più efficienti vaccini.

E' nell'utilizzo combinato di tecniche computazionali, metodi di evoluzione diretta e nuovi approcci derivanti dall'uso di algoritmi di machine learning, che si può individuare una promettente strada da seguire per il design della funzionalità proteica.