

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA
prot. 2005027011

Coordinatore Scientifico	Lorenzo CORDONE
Ateneo	Università degli Studi di PALERMO
Titolo della Ricerca	PROPRIETÀ DINAMICHE STRUTTURALI E FUNZIONALI DI PROTEINE IN SISTEMI NON-LIQUIDI CONTENENTI ACQUA RESIDUA: ACCOPPIAMENTO CON LA MATRICE ESTERNA
Finanziamento assegnato	Euro 180.000
Durata	24 Mesi

Obiettivo della Ricerca

Il cofinanziamento assegnato è inferiore a quello richiesto. Ciononostante, in generale, gli obiettivi rimangono immutati e saranno perseguiti al meglio, compatibilmente con le disponibilità finanziarie.

Obiettivo del progetto di ricerca è la caratterizzazione della funzione, struttura e dinamica di macromolecole biologiche inglobate in matrici non-liquide contenenti acqua. Questi sistemi approssimano, in vitro, la condizione di non idealità dei sistemi reali, in cui l'affollamento ed il confinamento macromolecolare giocano un ruolo rilevante nei processi biochimici.

Obiettivo dello studio di sistemi soluto-acqua, in assenza di macromolecole, in funzione della composizione e della temperatura, è l'identificazione dei parametri che caratterizzano le proprietà del mezzo di sospensione delle macromolecole biologiche, in assenza delle medesime. Lo studio, effettuato tramite tecniche spettroscopiche e simulazioni ab initio Density Functional, costituisce il primo passo per la comprensione del comportamento delle macromolecole biologiche, in soluzioni non ideali. Particolare attenzione sarà rivolta alla cosiddetta banda d'associazione dell'acqua, marker importante del sistema soluto-solvente per lo studio dell'accoppiamento proteina-matrice, che sarà studiata in sistemi zucchero-acqua e sali cosmotropi o caotropi, mediante spettroscopia FTIR, NIR e simulazioni ab initio al livello Density Functional. Ciò permetterà di ricavare informazioni sulle sottobande della banda d'associazione in relazione ai differenti microambienti dell'acqua, e sulla relazione con le altre bande vibrazionali dell'acqua.

Studi sulla MbCO inglobata in matrici di zuccheri hanno rivelato come il panorama energetico della proteina sia regolato dal tipo di zucchero presente. Studi analoghi sono stati condotti sulla cinetica del trasferimento elettronico nel Centro di Reazione (CR) inglobata in matrici di trealosio. Al fine di caratterizzare meglio le proprietà strutturali/dinamiche del Centro di Reazione gli studi su questa proteina saranno estesi a matrici di saccarosio e maltosio, in funzione del rapporto proteina/zucchero e al variare della temperatura nell'intervallo 270-310K. La dipendenza dalla temperatura delle cinetiche, a varie idratazioni della matrice, permetterà di ottenere una stima delle barriere energetiche che separano le conformazioni adattate al buio ed alla luce. Gli spettri differenziali (luce meno buio) nel NIR di CR inglobate in matrici di trealosio o di PVA, al variare del contenuto d'acqua residua, forniranno informazioni sugli effetti che la matrice esterna ha sulla struttura interna del CR.

Sarà inoltre studiata l'evoluzione termica della struttura della proteina in soluzioni di trealosio attraverso spettroscopia NIR e dicroismo circolare, con l'obiettivo di comprendere gli effetti dello zucchero sulla denaturazione termica del CR e sui cambiamenti conformazionali di piccola scala correlati alle cinetiche di reazione.

Sarà studiata la cinetica di ricombinazione di carica nel CR in mutanti purificati ed in proteine in cui è stata effettuata una proteolisi parziale. Obiettivo di questo studio è di ottenere informazioni sui differenti sottostati conformazionali della proteina e di correlare le differenze strutturali con la reattività.

Sarà studiato il comportamento del CR all'interno di doppi strati lipidici (cromatofori) intatti, inglobati in matrici di trealosio.

Obiettivo della ricerca è di ottenere informazioni su come il doppio strato lipidico moduli i vincoli imposti dalla matrice sulla dinamica interna. Ciò sarà realizzato confrontando i risultati con i dati ottenuti su CR purificati.

Misure di spettroscopia di assorbimento dei raggi X saranno condotte su MbCO, sul citocromo c e sul CR di Rhodospirillum rubrum con l'obiettivo di studiare la struttura locale intorno all'atomo di Fe.

Obiettivo dello studio del comportamento della MbCO e del CR in sistemi proteina-saccaridi-acqua in funzione del rapporto di concentrazione proteina/saccaride, a vari contenuti d'acqua residua, è avere informazioni sugli effetti dell'affollamento e del confinamento sulla dinamica-struttura-funzione di proteine in un ambiente affollato che si avvicini a quello cellulare. Lo studio sarà esteso a complessi contenenti MbCO-zucchero-collagene, al fine di approssimare la matrice extracellulare.

Saranno studiati gli effetti del confinamento sulle relazioni struttura-dinamica-funzione delle emoproteine. La correlazione tra le proprietà dinamiche della mioglobina incapsulata in gel di silice e la stabilità termica della stessa proteina verrà investigata attraverso esperimenti di scattering elastico e quasi elastico di neutroni, spettroscopia ottica, calorimetria differenziale a scansione.

Gli esperimenti saranno estesi a idrogel contenenti soluzioni acqua/glicerolo e anche miscele acqua/trealosio. Saranno studiate le proprietà funzionali e dinamiche di emoglobina incapsulata in differenti strutture quaternarie e le cinetiche della transizione di struttura quaternaria sia in idrogel di silice sia in matrici di trealosio, attraverso spettroscopia ottica risolta spettralmente e temporalmente. Le misure di ricombinazione del CO dopo flash fotolisi, nei campioni di mioglobina ed emoglobina inglobati in idrogel di silice, saranno estese all'intervallo temporale 5ns - 200ms, usando un sistema di flash-fotolisi risolto spettralmente.

Obiettivo degli studi brevemente riassunti in quest'ultimo paragrafo è di approfondire le conoscenze sulle proprietà funzionali (cinetiche di legame del CO) e la loro dipendenza dalla rigidità della matrice e dal solvente incapsulato nei pori e di caratterizzare, tramite la misura degli shift spettrali, i vari rilassamenti della proteina incapsulata, nell'intervallo di temperatura 100-300K.

Lo studio di sistemi ternari sarà condotto anche utilizzando liposomi e proteine quali lisozima monomero, il trimero dUTPase,

l'enzima di restrizione EcoR124I pentaeterodimerico, macromolecole modello come il polietilenossido tramite misure di scattering Raman, FTIR, e diffrazione di neutroni. Obiettivo di questa ricerca è caratterizzare la conformazione e i dettagli strutturali di sistemi modello e di proteine in matrici nanoscopiche soluto/H₂O, in funzione dell'affollamento dovuto all'aumento di concentrazione di proteine e di soluto. Lo studio sarà esteso a proteine confinate in gel dove la proteina può raggiungere concentrazioni circa del 50% (v/v), valori compatibili con quelli presenti in compartimenti cellulari. Saranno effettuate misure di scattering di luce e IR per verificare possibili effetti di stabilizzazione strutturale indotti dall'affollamento. Le variazioni morfologiche strutturali subite dai sistemi investigati saranno studiate anche tramite microscopia SNOM.

Misure di scattering quasi-elastico ed inelastico di luce, di neutroni e luce di sincrotrone consentiranno di indagare i contributi connessi ai processi vibrazionali e rilassamentali nella regione di temperatura interessata dalla transizione vetrosa del solvente. La rigidità della struttura sarà confrontata con la fragilità esibita dal sistema binario in un identico rapporto molare.

Nell'ambito del presente progetto si conta anche di condurre simulazioni di sistemi modello multi-proteina in soluzione acquosa e/o contenente zuccheri. L'obiettivo è indagare, a livello molecolare, i) sulla struttura, dinamica e funzione di proteine globulari di media taglia in sistemi multicomponente, al variare del rapporto di concentrazione acqua-cosolvente, a differenti temperature; ii) sulle proprietà del solvente all'interfaccia proteina-proteina, e sul suo accoppiamento con la proteina.

Si conta di calcolare le differenze di energia libera di solvatazione della proteina in presenza di diversi zuccheri, con l'obiettivo di identificare i solventi con cui la proteina solubilizza in modo ottimale e di associare ad essi i meccanismi microscopici di stabilizzazione proteica.

Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

Il risultato più generale dell'attività di ricerca proposta sarà dato dall'ampliamento delle conoscenze sulle interazioni, e sulle trasformazioni strutturali, di biomolecole inglobate in sistemi non liquidi contenenti acqua residua. L'utilità di questi studi è duplice: da un canto riguardano il campo della bioprotezione, in relazione alla morfologia nanostrutturale di sistemi interagenti con "strutture biomolecolari complesse", dall'altro il campo della integrità e della funzionalità in sistemi molecolari affollati, che simulino l'ambiente cellulare. Considerato il grande interesse di laboratori specialistici e di ricerca industriale interessati allo sviluppo produttivo dei processi di bioprotezione, si deve includere tra i risultati attesi la possibilità di valorizzazione, con le nuove conoscenze acquisite, la proprietà intellettuale in ambito universitario.

Le Unità di ricerca si avvarranno delle conoscenze fisiche, chimiche e biochimiche sviluppate nel tempo nelle specifiche aree di competenza, sfruttando, all'occorrenza, anche consulenze con ricercatori afferenti ad altri Dipartimenti e/o ad altre Università Italiane o Estere. Saranno impiegate sia metodologie di indagine sperimentale disponibili presso i propri laboratori sia di tecniche di spettroscopia neutronica e di luce di sincrotrone fruibili presso grandi facilities europee. Un importante contributo all'innovazione, rispetto allo stato dell'arte nel campo, verrà dalla fertilizzazione incrociata dovuta al confluire di differenti esperienze scientifiche. Tale fertilizzazione incrociata ha già nel passato dato notevoli contributi, come dimostrato dalle numerose pubblicazioni, in collaborazione fra alcune delle Unità presenti nel progetto, apparse nel recente passato.

Un particolare, innovativo, molto rilevante, consiste nel fatto che le misure di carattere prettamente sperimentale, saranno interpretate anche alla luce di risultati di simulazioni. Queste ultime offrono la possibilità di osservare i processi nanoscopici all'interfaccia proteina-solvente, che danno luogo alla stabilizzazione di aggregati e/o alla separazione dei sistemi macromolecolari interagenti. Tali processi non sono stati trattati, fino ad ora, in modo sufficientemente accurato, dal punto di vista della simulazione dalla comunità specializzata, a causa della difficoltà di trattamento, con tecniche di simulazione convenzionali, dei panorami conformazionali complessi che abbiano tempi di rilassamento superiore al nanosecondo. Solamente negli ultimi anni sono state sviluppate adeguate strategie di simulazione per gli eventi rari generici. In questo campo l'Unità di Roma ha sviluppato strategie di simulazione che non dipendono dal grado di complessità del panorama di energia sottostante e che possono anche fare a meno della definizione di un parametro d'ordine o coordinata di reazione. Questo insieme di metodi applicati a sistemi biologici affollati rappresenta un importante contributo metodologico e può dimostrare la flessibilità dell'apparato teorico-algoritmico applicato a generici sistemi complessi.

I risultati delle simulazioni, ottenuti, come già avvenuto in passato, in collaborazioni fra alcune delle Unità partecipanti al progetto, forniranno la base naturale per una approfondita elaborazione e comprensione dei risultati sperimentali.

Da considerare il fatto che, la produzione di ulteriori moduli di software per il calcolo di percorsi di reazione e di energie libere e la distribuzione libera di tali moduli, rappresenta un importante contributo alla comunità scientifica e accademica internazionale. I moduli saranno progettati per essere fruiti come moduli esterni del software DLPROTEIN.

I servizi resi alla comunità, in termini di conoscenze acquisite, saranno molteplici anche in vista delle numerose competenze complementari richieste per la loro realizzazione. Dall'analisi della letteratura scientifica risulta che diverse proposte tentano già di rispondere alle specifiche necessità del progetto, anche se fino ad ora le soluzioni fornite si sono rivelate carenti: spesso non tengono conto di tutti i requisiti, oppure non li considerano in un'ottica coerente con l'utilizzo finale; molto spesso non si tiene conto delle prospettive di sviluppo delle tecnologie; alcune volte le soluzioni proposte sono basate su tecnologie ormai obsolete; quasi sempre si procede per raggruppamenti disciplinari senza reali interazioni tra ricercatori che si occupano di problemi affini. Per esempio, nel campo della bioprotezione, vi è un insieme di requisiti che costituiscono delle grandi sfide, tra cui si segnala principalmente la qualità del prodotto.

Proprio in vista della frammentarietà delle soluzioni sino ad ora proposte, un contributo scientificamente rilevante di questo progetto sarà di tentare di unificare diversi approcci ed arrivare ad una visione d'insieme coerente. Per fornire un esempio specifico lo studio riguardante l'accoppiamento strutturale e dinamico soluto-solvente-proteina, grazie alle competenze sviluppate dalle Unità di Ricerca coinvolte, sarà sviluppato sistematicamente su sistemi diversi, a livello crescente di complessità (da piccole proteine idrosolubili a complessi multiproteici di membrana). La visione d'insieme del problema sarà ugualmente favorita dall'integrazione dei diversi approcci spettroscopici simultaneamente impiegati allo studio di uno stesso sistema, in grado di fornire informazioni fortemente complementari in termini di risoluzione temporale e spaziale. La possibilità di sperimentare soluzioni comuni e il coinvolgimento di un numero significativo di Unità di Ricerca di rilevante massa critica e con competenze complementari rendono senz'altro possibile il conseguimento di risultati veramente innovativi.

Le competenze complementari e le facilities a disposizione dei gruppi di ricerca, coinvolti nel progetto, incoraggeranno e faciliteranno lo scambio e la cooperazione in seno ad un comune programma. I contenuti innovativi delle conoscenze acquisite

troveranno riscontro in settori interdisciplinari di Fisica, Biologia e Chimica. Gli obiettivi si identificano, infatti, con quelli tipici di una ricerca di grande interesse di Fisica Applicata.

Criteri di verificabilità

La gestione e il controllo periodico del progetto sarà svolta dal responsabile scientifico, il quale sorveglierà le diverse attività di ricerca, che ogni partecipante è tenuto a svolgere, e verificherà che i risultati ottenuti contribuiscano al raggiungimento degli obiettivi prefissati.

A livello locale il progetto sarà gestito dai responsabili dei gruppi di ricerca coinvolti. Essi saranno responsabili della gestione quotidiana del progetto e svolgeranno un appropriato controllo delle varie fasi della programmazione, dell'esecuzione, della coordinazione, del monitoraggio e della disseminazione dei risultati, assicurando un efficace scambio di informazioni tra i partecipanti al progetto per il raggiungimento degli obiettivi prefissati.

Per la verifica dei risultati, i responsabili delle unità sottometteranno al coordinatore dei brevi reports semestrali relativi ai risultati conseguiti e le eventuali pubblicazioni.

All'inizio del progetto sarà organizzato un meeting finalizzato a tracciare un dettagliato percorso per i primi mesi del progetto. Saranno organizzati, ove necessario, degli incontri finalizzati a monitorare lo stato di avanzamento del progetto e confermare il programma di lavoro per il periodo successivo. In base ai risultati ottenuti al momento di ogni meeting, i responsabili si riserveranno di apporre i necessari cambiamenti al programma totale del progetto.

Al termine del progetto sarà organizzato un meeting finale per stilare un rapporto finale.

La mobilità dei ricercatori afferenti ai gruppi di ricerca coinvolti promossa dal presente progetto consentirà frequenti scambi e contatti, facilitando il progresso delle idee e dei risultati e l'integrazione delle specifiche competenze, superando i confini delle discipline scientifiche particolari.

Il progetto intende apportare al contesto scientifico nazionale ed internazionale diversi contributi. La qualità delle pubblicazioni in contesti nazionali e soprattutto internazionali costituisce il principale elemento per la valutazione dei risultati scientifici. Un ulteriore elemento è rappresentato dalla messa a disposizione di metodologie e tecniche innovative, sia sperimentali sia simulate per la soluzione di problemi che dovrebbero trovare applicazione anche in contesti scientifici esterni.

Vi sono inoltre delle collaborazioni di ricerca già ben collaudate tra alcune delle UR e tra singole UR e centri di ricerca. Tuttavia, si ritiene che la proposta di progetto mirata su tematiche in cui si riscontrano competenze affini, consentirà di sviluppare le sinergie a beneficio di tutte le UR coinvolte. Si potrà, quindi, valutare la rete di ricerca in campo nazionale ed internazionale, considerando il livello numerico e qualitativo delle attività di cooperazione, dello scambio di ricercatori e dell'attivazione di workshops. Questa rete potrà rafforzare la competitività dell'Italia a livello di progetti europei, e potrà costituire parametro di riferimento obiettivo per la valutazione.

Le ricadute a livello della didattica di alta formazione saranno immediatamente valutabili a livello di corsi di dottorato di ricerca e a livello di scuole internazionali.

In sintesi, al fine di oggettivare e disseminare il più ampiamente possibile i progressi raggiunti, i partecipanti:

- pubblicheranno lavori su riviste internazionali di alto profilo;
- pubblicheranno articoli su riviste a carattere divulgativo
- presenteranno contributi a eventi scientifici internazionali
- effettueranno seminari di presentazione o di divulgazione dei risultati.
- Renderanno disponibili moduli di codice di calcolo utili alla comunità scientifica at large
- I risultati ottenuti saranno oggetto di confronto con esperti del settore in occasione di un workshop programmato alla fine del progetto.

Elenco delle Unità di Ricerca

Sede dell'Unità	Università degli Studi di PALERMO
Responsabile Scientifico	Lorenzo CORDONE
Finanziamento assegnato	Euro 42.121

Compito dell'Unità

Il progetto di ricerca dell'Unità di Palermo si articolerà sulle seguenti linee:

A) Accoppiamento dei gradi di libertà interni di proteine a quelli della matrice esterna.

A1) Inizialmente si conta di studiare la banda di associazione dell'acqua in sistemi zucchero-acqua in presenza di sali cosmotropi e caotropi, mediante spettroscopia FTIR, NIR (che consente il confronto con altre bande dell'acqua) e simulazioni quanto-meccaniche. L'obiettivo è di avere informazioni: i) sulle sottobande della banda di associazione, anche in dipendenza dei microambienti in cui le molecole d'acqua si trovano; ii) sulla relazione fra la banda di associazione e altre bande dell'acqua. Si conta di estendere lo studio a sistemi contenenti anche betaina, MbCO o collagene.

A2) Si conta di studiare, in seguito, le proprietà strutturali e dinamiche della proteina e della matrice, a vari rapporti saccaride/proteina, effettuando, per ogni valore del rapporto, misure a diversi contenuti d'acqua. Variare il rapporto proteina-zucchero consentirà di studiare tali proprietà in un ambiente affollato, in cui le interazioni fra macromolecole sono rilevanti nella regolazione dei processi. Tali studi saranno effettuati in sistemi MbCO-saccaridi-acqua, a varie concentrazioni di

proteina. Ci si propone di estendere in seguito lo studio a sistemi complessi contenenti MbCO-zucchero-collagene ed acqua residua.

B) Per determinare come l'affollamento macromolecolare influenzi il decadimento da stati eccitati e la funzione della MbCO, saranno effettuati esperimenti di flash fotolisi in sistemi analoghi a quelli descritti sopra (vedi punti A2 e D2).

C) Stabilità strutturale, cambiamenti conformazionali e proprietà funzionali e dinamiche di mioglobina ed emoglobina incapsulate in idrogel di silice.

C1) Inizialmente si studierà la correlazione tra la dinamica e la stabilità termica della mioglobina incapsulata in gel di silice. La dinamica sarà caratterizzata sia tramite gli spostamenti quadratici medi degli idrogeni non scambiabili (misurati con scattering elastico e quasi elastico di neutroni) sia tramite i moti del ferro relativi al piano dell'eme (misurati con spettroscopia ottica a temperature criogeniche); la stabilità termica sarà caratterizzata tramite calorimetria differenziale a scansione. Gli esperimenti saranno estesi a idrogel contenenti cosolventi (acqua/glicerolo o acqua/zucchero) in stretta connessione con gli studi descritti nella sezione A2.

C2) Saranno studiate le cinetiche della transizione di struttura quaternaria di emoglobina sia in idrogel di silice sia in matrici di trealosio. Questo studio avverrà tramite spettroscopia ottica risolta sia spettralmente sia temporalmente. Recenti esperimenti hanno mostrato che è possibile identificare i contributi della struttura quaternaria su marker spettroscopici per la transizione T-R dell'emoglobina; inoltre, nella proteina incapsulata in idrogel di silice, le cinetiche sono rallentate dalle centinaia di secondi fino ad alcune settimane. In collaborazione con il prof. Joel Friedman (Albert Einstein College of Medicine, New York) si conta di estendere le misure all'intervallo temporale 5ns-200ms usando un sistema di flash-fotolisi spettralmente risolto.

D) Studio delle proprietà strutturali-dinamiche di sistemi multiproteina mediante simulazioni di Dinamica Molecolare classica. Si prevede lo studio sistematico di sistemi modello multi-proteina in soluzione acquosa ed in presenza di zuccheri tramite Dinamica Molecolare classica. Questo studio sarà condotto in collaborazione con l'Unità di Roma. Saranno studiate i) la relazione tra struttura, dinamica e funzione di proteine globulari di media taglia in sistemi multicomponente, al variare del rapporto di concentrazione acqua-cosolvente, a differenti temperature; ii) la struttura e la dinamica del solvente all'interfaccia proteina-proteina ed il suo accoppiamento con la proteina.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di ROMA "La Sapienza"
Responsabile Scientifico	Giovanni CICCOTTI
Finanziamento assegnato	Euro 32.442

Compito dell'Unità

Il gruppo di Roma è specializzato nella caratterizzazione biofisica di sistemi proteici impiegando simulazioni di Dinamica Molecolare (MD) e sviluppando tecniche numeriche non convenzionali applicabili a tematiche in questo settore. Ciò nasce dalle capacità allo sviluppo e alla validazione di tecniche meccanico-statistiche per trattare sistemi con molti gradi di libertà ed in presenza di una forte diversità di scale spaziali e temporali. L'approccio metodologico di riferimento è duplice: da un lato si riduce la diversità temporale del sistema (restrizione di moti interni, compressione di spettro, e tecniche similari), da un altro si inducono artificialmente i processi di interesse (eventi rari) al fine di indagare e quantificare la loro evoluzione spontanea.

Lo studio di sistemi proteina-zucchero presenta alcune notevoli sfide per l'approccio simulativo. La prima sfida riguarda la capacità di campionare gli stati conformazionali dei sistemi. Per quanto riguarda la proteina, la ridotta flessibilità interna e il rapido tempo di rilassamento sono fattori che agevolano lo studio numerico sulla scala temporale coperta dalla MD (nanosecondi). Viceversa, la diffusione degli zuccheri deve essere tenuta in conto per una corretta osservazione della fenomenologia del sistema; sulla scala dei nanosecondi tale diffusione è limitata. Pertanto per simulare sistemi proteina-zucchero sarà necessario impiegare sia simulazioni massicce che tecniche di simulazione avanzate che aumentino l'ergodicità del solvente. Due approcci adatti allo studio di soluzioni proteina-zuccheri sono il Blue Moon Ensemble e il metodo di riscaldamento delle masse, entrambi sviluppati dai componenti del gruppo.

La seconda sfida riguarda la possibilità di calcolare l'energia libera di solvatazione delle proteine ed in particolare, le differenze di energia libera in diversi zuccheri. Ciò permetterà di identificare i solventi con cui la proteina solubilizza in modo ottimale e di associare ad essi i meccanismi microscopici di stabilizzazione proteica. Inoltre, sarà possibile distinguere i diversi contributi all'energia di solvatazione di origine entalpica (legata alla rete di legami idrogeno che si formano tra solvente e soluto e alle forze di volume escluso) ed entropica (legata principalmente al numero di stati traslazionali e rotazioni disponibili al solvente in presenza del soluto). Per calcolare le differenze di energia libera di solvatazione si impiegheranno tecniche numeriche avanzate, seguendo l'approccio di Kirkwood, attraverso esperimenti di "alchimia numerica" in cui si trasformano le specie atomiche e la topologia molecolare di un solvente in un altro. Il lavoro reversibile associato a tale trasformazione numerica è quindi calcolabile facendo attenzione che non si abbiano divergenze numeriche nel processo di trasformazione.

Parallelamente, il gruppo di Roma intende condurre un'attività di ricerca di frontiera rispetto alle tecniche convenzionali, non applicabile unicamente ai sistemi sotto studio. Ad esempio, si conta di analizzare alcuni metodi d'indagine legati allo studio di processi in cui non sia definibile analiticamente una coordinata di reazione e in cui, quindi, le tecniche di campionamento per eventi rari non sono utilizzabili. In caso di risultati positivi derivanti da quest'attività, le conoscenze acquisite studiando sistemi modello saranno trasferite a sistemi complessi, quali sistemi proteina-acqua-zucchero.

Il gruppo di Roma ha sviluppato negli ultimi anni un software di simulazione parallelo noto come DLPROTEIN. Il software è usato da diversi ricercatori e laboratori in Europa e USA e permette di preparare, simulare ed analizzare sistemi biologici di complessità arbitraria. Questo software sarà impiegato sia per effettuare simulazioni parallele che per implementare nuove tecniche numeriche che migliorino le prestazioni della simulazione di sistemi complessi.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di BARI
Responsabile Scientifico	Gerardo PALAZZO
Finanziamento assegnato	Euro 32.442

Compito dell'Unità

L'attività di ricerca dell'Unità di Bari si focalizzerà sui seguenti punti:

A) Influenza esercitata dall'affollamento (crowding) molecolare (zuccheri) e macromolecolare (polimeri) sulle variazioni conformazionali di grande e piccola entità del centro di reazione.

Verranno condotti studi sistematici sull'effetto di zuccheri (trealosio, saccarosio, glucosio) e polimeri (polivinilalcol, PVA) sulla stabilità termica della proteina seguendo l'evoluzione al termica dell'assorbimento del centro di reazione nel NIR (dove lo spettro riflette l'intorno dei cofattori). L'influenza di zuccheri e polimeri sulle variazioni conformazionali di minore entità, che non portano a denaturazione o perdita della funzionalità proteica, sarà studiata seguendo le cinetiche di trasferimento elettronico. Le cinetiche di decadimento di P+ saranno analizzate sulla base delle teorie sul trasferimento elettronico, evidenziando le correlazioni tra proprietà delle soluzioni (pressione osmotica, effetti di volume escluso, temperatura) e dinamica proteica. Il confronto con i risultati di uno studio parallelo (condotto dall'U.R. di Bologna) su centri di reazione inclusi in matrici non-liquide (costituite da zuccheri e polimeri disidratati) dovrebbe consentire di discriminare tra interazioni molecolari specifiche, crowding e effetti di viscosità.

B) Analisi delle variazioni conformazionali che avvengono nel centro di reazione mediante strategie combinate di proteolisi parziale e metodologie di spettrometria di massa.

L'idea di fondo è che le regioni all'interfaccia proteina/acqua di diverse conformazioni proteiche sono diversamente accessibili agli enzimi proteolitici. Il confronto tra i frammenti proteolitici di centri di reazione prodotti dall'idrolisi enzimatica (con tripsina, chimotripsina, subtilisina) in diverse condizioni di illuminazione consentirà di evidenziare differenze nella accessibilità ai siti di taglio per gli enzimi proteolitici tra i differenti sottostati. Sarà così possibile mettere in evidenza alcune differenze strutturali tra sottostati la cui esistenza è già stata dedotta dall'analisi della reattività del centro di reazione. Ovviamente questo approccio sonda solo la superficie idrofila della proteina. Studi EXAFS condotti in collaborazione con le Unità di Bologna e Palermo, ci forniranno informazioni complementari sulle regioni interne della proteina.

C) Studio del centro di reazione incluso in matrici solide a basso contenuto di acqua mediante spettri differenziali (luce meno buio) nella regione del NIR

Si dedicherà una particolare attenzione alle bande del donatore elettronico primario P e del radicale cationico P+ (865 e 1200 nm, rispettivamente) ed alla banda di combinazione dell'acqua (intorno a 1930 nm). Il ruolo svolto dalla rete di legami idrogeno nel controllo della dinamica interna delle proteine di membrana all'interno del doppio strato lipidico sarà studiato in membrane fotosintetiche native (cromatofori). L'unità di Bari analizzerà le cinetiche di ricombinazione di P+QA- in funzione del contenuto di acqua in cromatofori bloccati in matrici solide di trealosio e confronterà i risultati ottenuti con quelli di studi analoghi condotti dall'unità di Bologna su centri di reazione purificati. Questo confronto dovrebbe chiarire come il doppio strato lipidico regoli i vincoli imposti dalla matrice zuccherina sulla dinamica proteica.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di MESSINA
Responsabile Scientifico	Salvatore MAGAZU'
Finanziamento assegnato	Euro 40.553

Compito dell'Unità

Per la tipologia di studi prevista dal progetto, che intende perseguire protocolli di carattere marcatamente transdisciplinare, l'unità di ricerca si avvarrà dell'impiego congiunto di metodologie di indagine complementari disponibili presso i laboratori del Dipartimento di Fisica e del Dipartimento di Biochimica.

Inoltre per alcune tecniche, quali la luce di sincrotrone e lo scattering di neutroni, parte della ricerca si avvarrà dei laboratori di facilities europee con cui l'unità ha stabilito, già da molti anni, forti rapporti di collaborazione.

Gli esperimenti verranno effettuati anche su proteine confinate nei diversi gel (sia di silice che di acrilamide), al fine di caratterizzare le proprietà strutturali e conformazionali delle proteine, la loro compattezza, il loro stato d'aggregazione e la loro stabilità termica.

In dettaglio, il progetto della UR-Messina si articolerà sulle seguenti linee principali:

A) Caratterizzazione strutturale e dinamica del sistema "soluto-solvente" in assenza di proteine.

Recenti studi indicano che le proprietà strutturali e dinamiche del sistema "soluto-solvente" siano strettamente connesse a quelle delle proteine in esso immerse. In particolare, il legame idrogeno sembra giocare un ruolo primario nelle interazioni dei soluti con le molecole di acqua e le proteine. Partendo da questi presupposti, ci si propone di caratterizzare il crowding di una ampia classe di soluti attraverso lo studio delle proprietà strutturali e dinamiche del sistema soluto-acqua.

B) Caratterizzazione del crowding e del caging sulle proprietà strutturali, conformazionali, dinamiche e funzionali dei sistemisoluto-solvente-proteina, con specifici riferimenti alla flessibilità e alla rigidità esibite da tali sistemi ternari su scala

nanoscopica.

L'attività dell'UR-Messina prevede lo studio di macromolecole modello in presenza di soluti. Una macromolecola modello è costituita dal PolyethyleneOxide, un polimero lineare la cui semplicità strutturale e solubilità in acqua ne fanno un prezioso sistema modello per lo studio dei meccanismi di interazione con superfici idrofiliche, macromolecole e strutture biologiche permettendo di mimare le strutture gerarchiche primaria, secondaria e terziaria di bpolimeri come il DNA.

Saranno investigati liposomi e proteine con struttura nativa di tipo n-merica ($n=2,3$ e 5): lo studio degli equilibri tra le varie forme a diversa aggregazione dovrebbe permettere di ricavare i diversi contributi che presiedono alla stabilizzazione della struttura quaternaria nelle diverse condizioni sperimentali. Si considereranno, tra le proteine di crescente complessità strutturale, il lisozima monomero, il trimero dUTPase, l'enzima di restrizione EcoR124I penta-eterodimerico.

Gli esperimenti saranno effettuati variando la concentrazione dei co-soluti nel solvente, con particolare attenzione alle condizioni di maggior affollamento molecolare.

Saranno altresì analizzate le proteine modello confinate in gel (di PEO, silice e di acrilamide) dove la proteina può raggiungere concentrazioni circa del 50% (v/v), ovvero valori compatibili con quelli presenti in compartimenti cellulari.

Sede dell'Unità	Università degli Studi di BOLOGNA
Responsabile Scientifico	Giovanni VENTUROLI
Finanziamento assegnato	Euro 32.442

Compito dell'Unità

L'attività dell'unità di ricerca di Bologna si svilupperà lungo le seguenti linee.

A) Studi strutturali e dinamici mediante spettroscopia d'assorbimento dei raggi X (XAFS) del Fe in proteine eminiche ed in centri di reazione (CR) fotosintetici in soluzione ed in matrici non-liquide. Utilizzando la spettroscopia XAFS la struttura locale intorno all'atomo di Fe nella MbCO, nel citocromo c e nel CR sarà confrontata in soluzione, in un mezzo debolmente interagente (film di polivinil alcool (PVA)) ed in una matrice fortemente interagente (matrice di trealosio disidratata). Ci si aspetta che la rete di legami idrogeno (HB) che connette la superficie della proteina alla matrice di trealosio determini distorsioni misurabili nella struttura locale. Gli effetti della matrice sul disordine vibrazionale e conformazionale saranno studiati tramite lo spostamento quadratico medio relativo (MSRD) del Fe calcolato dalla funzione EXAFS. La dipendenza dalla temperatura di MSRD sarà studiata nell'intervallo 40-300 K in MbCO e in CR, in soluzione e nelle matrici. Nel caso della MbCO le misure proposte integreranno le informazioni sulla dinamica della proteina ottenute dall'U. R. di Palermo. Nel caso del CR si avranno per la prima volta informazioni dirette sulla dinamica in matrice e in soluzione. In seguito focalizzeremo l'analisi XAFS sul CR risolvendo la struttura locale del Fe²⁺ in campioni adattati al buio e alla luce, con o senza l'accettore QB, in soluzione ed in matrici disidratate di trealosio. I risultati completeranno l'analisi della dinamica conformazionale del CR condotta dall'U. R. di Bari sulla base della proteolisi controllata combinata con la spettrometria di massa. Gli studi XAFS proposti dovrebbero contribuire a chiarire le basi strutturali del gating conformazionale associato al trasferimento dell'elettrone da QA- a QB.

B) Studi cinetici del trasferimento elettronico in CR nativi e geneticamente modificati, inseriti in matrici saccaridiche amorfe. L'accoppiamento dinamico proteina-matrice sarà studiato in CR esaminando due processi di trasferimento elettronico fotoindotto: la ricombinazione dello stato P+QA- ed il trasferimento elettronico dall'accettore fotoindotto QA- a QB. Le cinetiche delle due reazioni saranno studiate, mediante spettroscopia laser d'assorbimento in CR inglobate in matrici di saccarosio e di maltosio, e saranno confrontate con quelle in matrici di trealosio. Sarà verificata l'esistenza di un accoppiamento proteina-matrice più stretto in trealosio, come suggerito da simulazioni di MbCO, e si otterranno informazioni sul reticolo di HB che si ritiene governi la dinamica della proteina in sistemi saccaridici. Il ruolo del reticolo di HB nel determinare le barriere energetiche che separano i principali stati conformazionali associati all'attività del CR sarà ulteriormente indagato studiando le cinetiche delle reazioni in funzione della temperatura (270-310K) e del rapporto trealosio/CR (10-104). Il confronto con esperimenti paralleli condotti in soluzione dall'U. R. di Bari contribuirà a chiarire i meccanismi di base dell'interazione strutturale e dinamica tra proteina e solvente.

Successivamente sarà esaminata la cinetica di ricombinazione di carica P+QA- in matrici solide di trealosio utilizzando i CR purificati dai 10 mutanti di Rhodobacter sphaeroides caratterizzati da distinti valori del potenziale di ossidoriduzione del donatore P. Questo approccio consentirà di studiare la dipendenza della cinetica dall'energia libera della reazione in matrici deidratate. I dati saranno analizzati sulla base di modelli adiabatici e non adiabatici, valutandone l'adeguatezza e stimando l'energia di riorganizzazione in condizioni di progressiva disidratazione. L'analisi, estesa a CR inglobati in matrici di PVA e CR disidratati in assenza di altre componenti, consentirà di valutare i contributi della proteina, delle matrici e dell'acqua residua all'energia di riorganizzazione associata al trasferimento elettronico.