

COMPITI E SUDDIVISIONE FONDI TRA LE UNITÀ DI RICERCA  
prot. 2005027330

<b>Coordinatore Scientifico</b>	Amos MARITAN
<b>Ateneo</b>	Università degli Studi di PADOVA
<b>Titolo della Ricerca</b>	APPROCCIO TEORICO-SPERIMENTALE AGLI STATI NON-NATIVI DELLE PROTEINE: FORMAZIONE DI FIBRILLE AMILOIDI, PROTEINE DISORDINATE E DENATURATE
<b>Finanziamento assegnato</b>	Euro 160.000
<b>Durata</b>	24 Mesi

### Obiettivo della Ricerca

*L'argomento di ricerca comune di questo gruppo di ricerca e' il problema del ripiegamento delle proteine. I risultati di questi studi potrebbero avere applicazioni in molti campi della biochimica, della medicina e della biotecnologia.*

*Negli ultimi anni, grazie ai grandi sviluppi della biotecnologia, c'e' stato un incredibile aumento nel numero delle sequenze proteiche determinate e rese disponibili alla comunità scientifica. Queste informazioni, tuttavia, non sono sufficienti per capire il ruolo di queste molecole all'interno della cellula, poiché è noto che la funzione della proteina è strettamente legata alla sua struttura tridimensionale. Attualmente, solo l'un per cento delle strutture corrispondenti a sequenze note e' stato risolto ed il numero di sequenze note cresce ad una velocità superiore rispetto a quello delle strutture.*

*La conoscenza del processo di folding darebbe anche utili informazioni su come trattare alcune malattie, quali l'Alzheimer, la fibrosi cistica, il morbo di Creutzfeld-Jacob. In tutti questi casi, la cellula viene danneggiata dalla formazione di aggregati non solubili chiamati fibrille amiloidi, che nascono dalla aggregazione di proteine mal ripiegate. L'impatto sociale di queste malattie è enorme: sintomatico il caso dell'Alzheimer che colpisce l'un per cento della popolazione sopra i sessantacinque anni e la metà della popolazione sopra gli ottantacinque.*

*Negli ultimi anni si è cominciato a pensare che lo studio di queste situazioni patologiche che portano al non corretto ripiegamento delle proteine e alla loro aggregazione possa essere una strategia alternativa per capire almeno alcuni aspetti del folding. Analogamente si pensa che informazioni interessanti si possano ottenere dallo studio dello stato denaturato (nel quale è già stato visto sperimentalmente che esiste una grande concentrazione di strutture secondarie) e delle proteine non strutturate, che sono soggette ad una ripiegamento solo quando in contatto con un substrato.*

*Inoltre, è sempre più chiaro che ulteriori progressi in questo campo possono avvenire solamente combinando strettamente esperimenti, modelli teorici e calcoli computazionali.*

*Questo infatti lo scopo del nostro progetto: unire due gruppi sperimentali e tre teorici per sviluppare un insieme di tecniche per affrontare diversi problemi biologici.*

*L'esperienza di tutti i gruppi coinvolti, sia teorici che sperimentali, e' assolutamente necessaria per affrontare queste tematiche (ulteriori collaborazioni esterne sono segnalate nelle varie sezioni).*

*Gli obiettivi che vogliamo raggiungere sono principalmente i seguenti:*

- 1. Studi teorici e sperimentali di misfolding e aggregazione di proteine;*
- 2. Studi teorici e sperimentali dei primi eventi durante il folding e caratterizzazione dello stato denaturato.*
- 3. Studi teorici e sperimentali di stati di transizione ed intermedi;*
- 4. Proteine intrinsecamente destrutturate;*
- 5. Studio del disegno e del folding delle proteine da un punto di vista fondamentale;*
- 6. Studio del profilo di energia libera in vicinanza dello stato nativo e sviluppo di modelli a grana grossa;*
- 7. Fasi di tipo cristalli liquidi e proteine;*
- 8. Studio di sistemi mecano-chimici;*
- 9. Traslocazione di polimeri e proteine attraverso stretti canali proteici;*
- 10. Studio di filamenti citoschetrici: microtubuli ed actina;*
- 11. Sfere rigide adesive anisotrope e aggregazione di particelle.*

### Innovazione rispetto allo stato dell'arte nel campo

*Capire il processo con il quale le proteine si ripiegano nel loro stato nativo e' l'essenza stessa della moderna biologia cellulare e molecolare.*

*Come fa una catena non strutturata di ammino-acidi, priva di ogni attività biologica, a ripiegarsi in una ben definita struttura tridimensionale (lo stato nativo) perfettamente funzionante? Capire il protein folding implica decifrare la seconda metà del codice genetico ovvero i complessi meccanismi che sono necessari per la conversione di una sequenza unidimensionale di amino acidi in*

una attività biologica.

La presenza di svariate catene proteiche può indurre un folding non corretto (misfolding) che porta alla formazione di aggregati non solubili, le fibrille amiloidi, che sono coinvolte in molte terribili malattie. I meccanismi di aggregazione e la struttura stessa degli amiloidi sono molto poco conosciute e qualsiasi nuova scoperta in questo campo può portare a cruciali aiuti nello sviluppare nuove strategie mediche e farmaceutiche. Altri aspetti non nativi delle proteine, come la struttura degli stati denaturati e le proteine intrinsecamente non strutturate possono nascondere importanti informazioni per svelare il problema del folding.

I più recenti sviluppi dei mezzi di calcolo hanno permesso di ipotizzare una analisi numerica realistica di situazioni nelle quali tutti i gradi di libertà di piccole proteine e del solvente vengano tenuti in considerazione per tempi sufficientemente lunghi. Tuttavia, anche l'ancor remota possibilità di simulare (in silico) la dinamica del folding non necessariamente implica la capacità di comprendere i fattori chiave che guidano folding/unfolding, misfolding e aggregazione.

Un aspetto che sembra emergere in maniera preponderante e' quello di utilizzare modelli meccanico statistici integrati da informazioni sperimentali per individuare questi aspetti chiave che soggiacciono ad un fenomeno così complesso. Per questa ragione crediamo che i prossimi sviluppi in questo campo verranno solamente se esperimenti, modelli teorici e simulazioni al computer verranno orchestrati simultaneamente.

Questo e' proprio lo scopo di questo programma di ricerca: combinare due gruppi sperimentali e tre teorici per sviluppare un set completo di tecniche atte ad affrontare svariati problemi biologici con particolare attenzione ad alcuni aspetti non nativi del folding quali appunto il misfolding, l'aggregazione, gli stati non strutturati e quello denaturato con lo scopo di raggiungere una più profonda comprensione dell'intero problema.

## **Criteri di verificabilità**

Trattandosi di ricerca prevalentemente fondamentale, sia teorica che sperimentale, si ritiene che il criterio principale di valutazione del progetto

possano essere le pubblicazioni scientifiche su riviste internazionali con referees e con alto impact factor e gli inviti a presentare i risultati ottenuti in conferenze internazionali.

## **Elenco delle Unità di Ricerca**

<b>Sede dell'Unità</b>	Università degli Studi di PADOVA
<b>Responsabile Scientifico</b>	Amos MARITAN
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 46.565

## **Compito dell'Unità**

1) Ripiegamento errato e aggregazione di proteine.

Il gruppo studierà i processi che portano al ripiegamento errato e aggregazione delle proteine con varie metodologie. Si cercherà di chiarire il ruolo della specificità della sequenza di aminoacidi introducendo dei potenziali efficaci tra residui che permettano di predire le regioni che promuovono l'aggregazione. La collaborazione con il gruppo di Firenze sarà fondamentale.

2) Proprietà conformazionali delle proteine nello stato denaturato.

Le proprietà dello stato denaturato delle proteine sarà studiato in collaborazione con il gruppo associato di Roma. Si cercherà di comprendere il ruolo delle interazioni locali lungo la catena polipeptidica sia per la struttura dello stato denaturato che per il processo di ripiegamento.

3) Proteine intrinsecamente non strutturate.

L'obiettivo è di comprendere l'effetto dell'interazione tra una proteina intrinsecamente non strutturata e la sua proteina bersaglio nel paesaggio energetico della prima modificato dalla presenza del bersaglio stesso. L'esistenza di un paesaggio energetico pre-scolpito è ideale per dimostrare il ruolo delle geometrie delle proteine interagenti.

4) Ripiegamento e disegno di proteine da un punto di vista fondamentale.

Lo scopo è di studiare il disegno, il ripiegamento e altri importanti aspetti di proteine globulari relativamente piccole da un punto di vista fondamentale utilizzando lo scenario unitario del paesaggio di energia libera pre-scolpito proposto recentemente.

5) Paesaggio di energia libera nelle vicinanze dello stato nativo

Il gruppo intende sviluppare un approccio ibrido per lo studio del processo di riconoscimento molecolare che permetta di trattare la regione coinvolta nel riconoscimento con tutti i dettagli atomici necessari mentre il resto della proteina viene trattato meno dettagliatamente usando modelli già ben collaudati.

6) Fasi di cristalli liquidi e proteine

Si studieranno le geometrie degli stati nativi di proteine in termini di parametri d'ordine utilizzati per lo studio delle fasi di cristalli liquidi con lo scopo di comprendere se le proteine possono essere considerate delle nano gocce di cristallo liquido in termini del loro responso a perturbazioni. Con il gruppo associato di Venezia si studierà il diagramma di fase di semplici modelli di proteine.

<b>Sede dell'Unità</b>	Università degli Studi di BARI
<b>Responsabile Scientifico</b>	Gianluca LATTANZI
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 24.850

### **Compito dell'Unità**

L'unità di ricerca di Bari intende contribuire alla definizione, allo sviluppo ed alla applicazione di modelli teorici per lo studio delle proprietà strutturali e funzionali di proteine ed aggregati di proteine. Il progetto è suddiviso in tre obiettivi principali, la cui realizzazione dipende fortemente dall'interazione con le altre unità di ricerca.

A) *Modelli meccanochimici.*

Intendiamo estendere le nostre precedenti ricerche sulla descrizione teorica del rapporto tra le coordinate meccaniche e chimiche, un problema di rilevante importanza nel campo della fisica statistica di non-equilibrio. Il nostro studio non sarà limitato alla formulazione teorica di rigorosi modelli meccanochimici, ma si propone come obiettivo principale l'applicazione di tali modelli a problemi di rilevanza biologica e al confronto delle predizioni teoriche con i dati sperimentali attualmente disponibili. Questa parte del progetto sarà condotta in stretta collaborazione con l'unità di ricerca di Padova.

B) *Filamenti e fibre biologici.*

Intendiamo proseguire i nostri studi, a carattere teorico e sperimentale, delle proprietà meccaniche dei filamenti citoscheletrici, in particolare dell'actina e dei microtubuli, in collaborazione con altri gruppi di ricerca presso l'EMBL di Heidelberg e a Monaco di Baviera. Vorremmo inoltre estendere le nostre analisi alla comprensione della relazione tra le strutture interne delle sottounità proteiche e i filamenti ottenuti per aggregazione delle suddette sottounità, fornendo quindi un interessante banco di prova per il quadro teorico proposto dall'unità di ricerca di Padova. Allo stesso tempo, vorremmo contribuire agli studi teorici e sperimentali volti a comprendere le proprietà meccaniche delle fibrille amiloidi, che costituiscono il principale obiettivo dell'unità di ricerca di Firenze. Questa parte del progetto sarà realizzata in stretta collaborazione con le unità di ricerca di Padova e Firenze.

C) *Modelli semplificati di proteine.*

In collaborazione con l'unità di ricerca di Padova, intendiamo contribuire allo sviluppo di modelli semplificati per l'analisi di strutture proteiche, concentrando la nostra attenzione, in particolare, sul rapporto struttura/funzione. I modelli verranno confrontati con i dati di simulazioni dettagliate in Dinamica Molecolare e potranno usufruire delle indicazioni sperimentali provenienti dai nostri collaboratori dell'unità di ricerca di Roma. In particolare, la nostra ricerca sarà dedicata all'applicazione dei modelli semplificati proposti a proteine e complessi proteici, le cui dimensioni impediscono studi estesi al dettaglio atomico. Le applicazioni da noi proposte includono il citocromo c ossidasi mitocondriale, una proteina che svolge un ruolo essenziale nella respirazione aerobica cellulare, i sistemi dell'acto-miosina e della tubulina-chinesina, implicati, rispettivamente, nella contrazione muscolare e nel trasporto di materiale nelle cellule. Questa parte del progetto verrà condotta in stretta collaborazione con l'unità di ricerca di Padova e trarrà indiscutibili vantaggi dall'interazione con le unità di ricerca di Roma e Venezia.

---

<b>Sede dell'Unità</b>	Università degli Studi di FIRENZE
<b>Responsabile Scientifico</b>	Niccolo' TADDEI
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 45.640

### **Compito dell'Unità**

Il gruppo identificherà il ruolo svolto dalla sequenza amminoacidica e da fattori strutturali nel processo di aggregazione proteica attraverso lo studio di proteine appartenenti alla stessa superfamiglia (acilfosfatasi). A tale scopo saranno prodotte numerose varianti mutazionali delle proteine oggetto di studio il cui processo di aggregazione sarà studiato con una serie di tecniche diverse: light scattering dinamico, esperimenti di cross-linking foto-indotto, dicroismo circolare, spettroscopia FT-IR, saggi colorimetrici specifici per gli aggregati e analisi morfologica con microscopia elettronica in trasmissione e microscopia a forza atomica.

Il gruppo farà misurazioni delle velocità delle varie fasi dell'aggregazione proteica utilizzando proteine della stessa superfamiglia (acilfosfatasi) che aggregano seguendo meccanismi diversi. Le cinetiche di aggregazione saranno monitorate mediante saggi fluorimetrici specifici condotti sulle diverse specie proteiche.

I dati sperimentali raccolti saranno messi a disposizione del gruppo associato di Padova che si occupa degli aspetti teorici sia per aiutare la corretta interpretazione dei dati sia per fornire informazioni utili per la formulazione di modelli teorici adeguati.

---

<b>Sede dell'Unità</b>	Università "Ca' Foscari" di VENEZIA
<b>Responsabile Scientifico</b>	Achille GIACOMETTI
<b>Finanziamento assegnato</b>	<b>Euro</b> 26.635

## **Compito dell'Unità**

### *1. Sfere rigide adesive anisotrope e aggregazione di proteine*

*L'unità di Venezia si propone di studiare la soluzione del modello di Baxter per sfere rigide adesive con interazioni anisotrope. A tal fine si cercherà di adattare un formalismo proposto da Wertheim, Blum e altri, per incorporare la possibilità avere attrazione solo tra particolari zone della superficie della sfera rigida. Ci si aspetta che questo modello simuli, in modo schematico, il processo di aggregazione che avviene in una particolare classe di proteine globulari. In alcuni di questi progetti ci si sarà la collaborazione di gruppi dell'Università di Londra e dell'Università di Cambridge. Un terzo possibile modello di aggregazione proteina-proteina, e' un'estensione di un lavoro precedente del gruppo di Venezia sul modello DLVO-Yukawa. Si estenderanno i risultati ottenuti in precedenza su questo problema al caso di simmetria non sferica in collaborazione con un gruppo dell'Università di Trieste.*

### *2. Fasi di cristalli liquidi nei biopolimeri*

*Le unità di Venezia e di Padova propongono uno studio dettagliato del diagramma di fase per semplici modelli meccanico-statistici, di proteine. Lo scopo è di chiarire se le strutture spaziali degli stati nativi delle proteine sono descrivibili in modo simile ai cristalli liquidi. Si utilizzeranno semplici teorie di campo medio simili alla teoria di Maier-Saupe ben nota nei cristalli liquidi. L'Unità di Venezia collaborerà con quella di Padova su questo problema, essendo le competenze delle due unità perfettamente adatte a questo compito. Una attenzione particolare verrà dedicata alla possibilità di fare questa analisi su reticolo, sulla falsariga delle recenti proposte dell'unità di Padova di un modello su reticolo che simuli un comportamento di tipo "tubolare" per le proteine.*

---

**Sede dell'Unità** Università degli Studi di ROMA "La Sapienza"

**Responsabile Scientifico** Carlo TRAVAGLINI ALLOCATELLI

**Finanziamento assegnato** Euro 16.310

## **Compito dell'Unità**

### *Eventi precoci del folding e proprietà conformazionali dello stato denaturato.*

*Alcune osservazioni sperimentali hanno dimostrato per alcune proteine modello la formazione, in condizioni fisiologiche, di una specie denaturata (Dphys) con proprietà strutturali diverse da quelle dello stato completamente denaturato U. Questa stessa conclusione è stata recentemente suggerita dal gruppo di Padova sulla base di modelli teorici. La transizione strutturale tra lo stato U e la specie Dphys è oggetto di dibattito e i pochi dati sperimentali disponibili non hanno chiarito le proprietà conformazionali della specie Dphys. A tale proposito questo sottoprogetto è focalizzato allo studio, con metodiche di cinetica super-rapida, delle proprietà strutturali e meccanicistiche dello stato Dphys.*

*Lo scopo è quello di identificare, tramite "phi-value analysis", eventuali interazioni terziarie chiave nella stabilizzazione della specie Dphys nel caso della famiglia dei citocromi di tipo c. La collaborazione con il gruppo di Padova su questo aspetto è particolarmente importante: i) il confronto dei risultati sperimentali con i dati di simulazione di dinamica molecolare permetterà di verificare l'ipotesi che lo stato denaturato Dphys presenti proprietà conformazionali di tipo nativo, ii) verificheremo sperimentalmente la possibilità che lo stato denaturato in condizioni fisiologiche presenti proprietà topologiche proprie dello stato nativo a causa dei vincoli conformazionali locali dovuti alle proprietà chimico-fisiche della sequenza primaria.*

*Poiché gli strumenti di mescolamento rapido a flusso interrotto che sono commercialmente disponibili sono limitati ad una finestra temporale non sufficiente ad esplorare gli eventi precoci del processo di folding (come la formazione della specie Dphys), obiettivo imprescindibile del presente sottoprogetto è la costruzione e lo sviluppo di uno strumento di mescolamento a flusso continuo con risoluzione temporale nella scala dei microsecondi.*

### *Struttura degli stati transienti e selezione del meccanismo di folding.*

*Nel caso del dominio PDZ-2 da PTP-BL, il gruppo si propone di delineare la struttura dei due stati di transizione già identificati nel nostro laboratorio grazie alla costruzione di due varianti (pseudo-wt) contenenti residui di Trp, tramite phi-value analysis. Questo risultato permetterà di definire il meccanismo di folding utilizzato ed eventualmente di studiare a quale stadio del processo viene selezionato il meccanismo prescelto. I dati sperimentali ottenuti saranno confrontati con le simulazioni di dinamica molecolare (U.O. Padova).*

*Ci proponiamo inoltre di studiare la cinetica della reazione di legame del dominio PDZ a peptidi con sequenza di riconoscimento consenso. L'ipotesi interessante che si vuole verificare riguarda la possibilità che residui amminoacidici importanti per il folding siano anche rilevanti per il meccanismo di legame e quindi per la dinamica e la funzione del dominio PDZ nella cellula.*

*Nel caso dei citocromi c si vuole verificare l'ipotesi, suggerita dal gruppo stesso, circa l'esistenza di un meccanismo di folding comune ai diversi membri di questa famiglia proteica. Questo obiettivo verrà raggiunto tramite la caratterizzazione cinetica di opportuni mutanti, suggeriti anche dagli esperimenti di dinamica molecolare condotti dal gruppo di Padova. Strettamente collegato al raggiungimento di questo obiettivo è lo studio della possibilità di alterare il meccanismo di folding su basi razionali (de)stabilizzando lo stato intermedio e/o gli stati di transizione.*