



A CURA DI MONICA CIVERA  
DIPARTIMENTO DI CHIMICA  
UNIVERSITÀ DI MILANO  
MONICA.CIVERA@UNIMI.IT

### La dinamica molecolare applicata allo studio di *allosteric pathways*

In questa recente *review* [A.A.S.T. Ribeiro, *Chem. Rev.*, 2016, **116**, 6488], si affronta il complesso fenomeno della regolazione allosterica nelle proteine da un punto di vista computazionale, in particolare considerando i metodi basati sulla dinamica molecolare (MD). Oltre a dare una panoramica sui recenti risultati ottenuti nel settore con approcci più classici, gli autori in questo lavoro propongono un nuovo metodo basato su una comunicazione inter-residuo di natura energetica. Infatti, l'allosteria può essere interpretata come un effetto long-range causato dall'eccesso di energia derivante dall'interazione con il ligando che si converte in riarrangiamenti strutturali/dinamici della biomolecola. Questo tipo di visione del fenomeno è in accordo con entrambi i classici modelli interpretativi della regolazione allosterica nelle proteine: nel modello concertato i diversi domini di una proteina esistono in stati conformazionali il cui equilibrio chimico è modificato dal legame con il substrato, quindi dall'energia di legame; nel meccanismo di tipo *induced-fit* è il legame con il substrato, dunque sempre l'energia di legame, a causare il cambio conformazionale.

Quindi in una visione più energetica della regolazione allosterica, Ribeiro cerca di identificare i residui essenziali per la propagazione del segnale e i cambi strutturali causati dall'eccesso di energia dovuto al legarsi del substrato [*J. Phys. Chem. B*, 2015, **119**, 1835], rappresentando la proteina come un *network*. Ai vertici o nodi di questo *network*, identificato con il nome di PEN (*protein energy network*, vedi figura), ci sono i residui, mentre le connessioni sono rappresentate dalle energie di interazione di non legame calcolate da simulazioni MD e opportunamente pesate. Energie di interazione di coppie di residui legati, legami ad idrogeno e ponti salini hanno pesi maggiori in accordo con l'ipotesi che il segnale allosterico si propaghi attraverso interazioni forti.

I PENs vengono analizzati con algoritmi usati comunemente nell'analisi dei *network* per determinare il percorso del segnale allosterico. Inoltre i nodi critici vengono identificati in base al numero di *shortest pathways* che passano attraverso il nodo. Con questo approccio è stato possibile discriminare e caratterizzare il flusso dell'energia nella proteina CAP (*catabolite activator protein*), in cui la regolazione allosterica avviene senza cambi conformazionali. Nei metodi più classici, il fenomeno della regolazione allosterica nelle proteine viene affrontato analizzando le strutture delle simulazioni MD e cercando di caratterizzare i cambi conformazionali. Vengono considerate sia le fluttuazioni delle coordinate dei residui che le correlazioni dei moti degli atomi.

Nella *normal mode analysis* (NMA) si assume che all'equilibrio tutte le conformazioni di una molecola possano essere rappresentate da fluttuazioni termiche di tipo armonico attorno ad una conformazione centrale, o minimo, e che per le proteine i movimenti descritti nei *low frequency modes* contengano le informazioni utili per descrivere la regolazione allosterica. Per ridurre i costi computazionali, spesso la NMA è usata in accoppiata all'approssimazione *elastic network models* (ENM), in cui la proteina viene semplificata e ridotta ad un insieme di particel-

le centrate sugli atomi C $\alpha$  e connessi tra loro con delle molle aventi tutte la stessa costante di forza e distanza di *cutoff*. Nonostante le approssimazioni necessarie per l'utilizzo di questa tecnica, la NMA rafforzata da dati sperimentali e altri tipi di analisi fornisce preziose informazioni sui cambi conformazionali coinvolti nella regolazione allosterica che spesso è difficile ottenere con classiche simulazioni MD.

Come la NMA, anche l'analisi delle componenti principali (PCA) assume che i moti molecolari rilevanti per la funzione di una proteina siano inclusi nei principali moti collettivi. Basata sulla diagonalizzazione della matrice di varianza-covarianza delle fluttuazioni delle posizioni di atomi, la PCA è applicata ad un insieme di conformazioni sperimentali o ottenute tramite calcoli teorici. In un recente lavoro [Q.R. Johnson, *Biochemistry*, 2015, **54**, 1534] la PCA è combinata alla tecnica di *glycine scanning* in cui i residui del sito di legame del recettore NR (*heterodimeric nuclear receptor*) vengono mutati in glicine e sottoposti a brevi simulazioni MD. Infatti non avendo a disposizione la forma apo della proteina, ovvero quella non legata al substrato, è possibile in questo modo introdurre una perturbazione nel complesso ligando-recettore e studiarne l'evoluzione. La glicina infatti, non avendo una catena laterale, dovrebbe eliminare le interazioni residuo-ligando.

Inoltre in questo lavoro la PCA non viene applicata alle coordinate cartesiane delle strutture campionate, ma ai contatti residuo-residuo, attribuendo il valore di 1 per il contatto che si forma e 0 per quello che non si forma e definendo una distanza di *cutoff* per l'interazione. Per ridurre la dimensione del problema, vengono considerati nell'analisi solo i contatti dinamici, ovvero quelli che si formano con una probabilità compresa tra il 20 e l'80% durante la simulazione. In questo tipo di spazio, i modi dei PC rappresentano le 'vibrazioni' dei contatti residuo-residuo, ovvero i legami che si formano e rompono quando una molecola si lega e quindi importanti per la comunicazione allosterica.

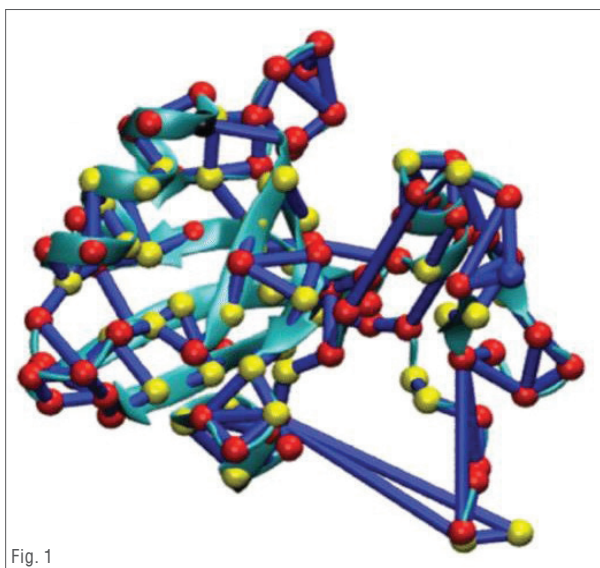


Fig. 1