

# SIMULAZIONI DI DINAMICA MOLECOLARE DEI SISTEMI BIOLOGICI: EVOLUZIONI E PROSPETTIVE

La simulazione di dinamica molecolare classica permette di indagare le proprietà dinamico-strutturali di grossi sistemi biologici, in condizioni molto simili a quelle fisiologiche e per ampie finestre di tempo. Tali caratteristiche stanno portando all'utilizzo diffuso di questo metodo per interpretare i dati sperimentali e per progettare nuovi esperimenti. In questo articolo viene brevemente illustrata l'evoluzione della dinamica molecolare su sistemi biologici e vengono presentati due esempi di studi di sistemi complessi.

**Alessandro Desideri**

desideri@uniroma2.it

Dipartimento di Biologia, Centro di Biostatistica e Bioinformatica, Centro di Nanoscienze, Nanotecnologie e Strumentazione avanzata, Università di Roma Tor Vergata e Istituto Nazionale di Biostrutture e Biosistemi

**Birgitta Knudsen**

brk@mb.au.dk

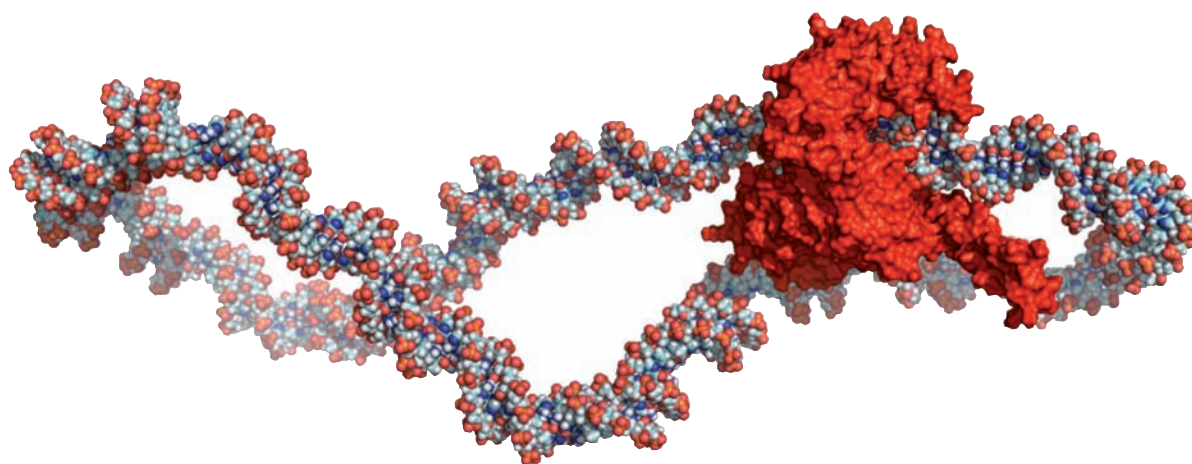
Department of Molecular Biology and Interdisciplinary Nanoscience Center, Aarhus University

La prima simulazione di dinamica molecolare di un liquido in cui sia stato utilizzato un potenziale realistico è stata effettuata sull'Argon liquido nel 1964 da Aneesur Rahman [1] che, dieci anni dopo, produsse anche la prima simulazione dell'acqua [2]. Tre anni dopo apparve la prima simulazione di una proteina [3], l'inibitore bovino pancreatico della tripsina (BPTI), che fu progettata e iniziata nel 1976 in un workshop, tenutosi al CECAM (Centro Europeo di Calcolo Atomico e Molecolare), che vide la partecipazione di tutti i padri fondatori della dinamica molecolare nei sistemi biologici. Questo lavoro, benché effettuato con la proteina nel vuoto, utilizzando un "rozzo" potenziale di meccanica molecolare e per una durata di soli 9.2 ps, servì a cambiare l'opinione corrente che le proteine erano strutture rigide e portò alla concezione di proteine come sistemi dinamici, i cui moti interni hanno un ruolo funzionale.

Un importante aspetto da ricordare è che, fin dall'inizio, i simulatori sentirono il bisogno di comparare i dati ottenuti dalla simulazione con i dati sperimentali. Due anni dopo, con la prima simulazione del BPTI si comprese che i fattori di temperatura B misurati dai cristallografi in esperimenti di diffrazione di raggi X di cristalli di proteina potevano essere utilizzati per avere informazioni sui moti interni delle proteine e furono utilizzati per una comparazione con le fluttuazioni quadratiche medie ottenute dalle simulazioni di dinamica molecolare.

La simulazione del BPTI aprì la strada alla simulazione di dinamica molecolare classica di molecole proteiche; da allora infatti sono apparsi numerosi articoli tra i quali va almeno ricordato il primo lavoro in cui una proteina è stata immersa in un box, nel quale le molecole di acqua erano considerate in maniera esplicita [4]. La possibilità di simulare una molecola proteica in acqua esplicita rese più concreta l'opportunità di comparare dati simulati e dati sperimentali in particolare con dati spettroscopici quali la depolarizzazione di fluorescenza, i parametri di ordine misurati per NMR, l'effetto del solvente e della temperatura nel modulare la struttura e la dinamica delle proteine. Lentamente ma decisamente, l'approccio simulativo si estese ad altri sistemi biologici. Nella seconda metà degli anni ottanta si effettuarono le prime simulazioni di DNA e successivamente di RNA, mentre nella seconda metà degli anni novanta fu eseguita la simulazione delle prime proteine di membrana immerse in un doppio strato lipidico. Il rapido sviluppo tecnologico dei calcolatori e le ottimizzazioni dei codici di calcolo stanno rendendo possibile lo studio, in tempo reale, di importanti fenomeni biologici. In dettaglio le attuali risorse di calcolo permettono, da una parte, di analizzare sistemi biologici estremamente complessi, contenenti centinaia di migliaia di atomi; dall'altra, di allungare i tempi su scale del microsecondo e quindi comparabili a quelle degli eventi reali.

Un esempio di sistema complesso recentemente studiato, grazie alla potenza computazionale del CASPUR nonché all'esperienza dei suoi ricercatori, è rappresentato dal sistema binario costituito dalla topoisomerasi in complesso con un'elica di DNA [5-9] che ha permesso, in congiunzione con dati sperimentali funzionali, di cominciare a fornire un modello per il meccanismo di funzionamento di questo enzima essenziale, deputato al mantenimento dell'integrità genomica tramite la rimozione del superavvolgimento nel DNA. Questo enzima è un bersaglio di farmaci utilizzati in numerose terapie antitumorali e l'uso combinato di simulazioni e dati sperimentali ha permesso di comprendere i dettagli dell'interazione del complesso enzima-DNA con il farmaco, nonché il meccanismo di resistenza al farmaco mostrato da alcuni singoli mutanti enzimatici. Il proseguimento di tali studi riguarda la simulazione di questo enzima in presenza del suo substrato naturale, ovvero il DNA superavvolto (Figura 1). La simulazione di questo complesso, costituito da 755.000 atomi, è attualmente in corso e ha lo scopo di fornire i dettagli atomici e molecolari tramite i quali il DNA riesce a rimuovere il suo superavvolgimento senza bisogno di energia esterna.



**Fig. 1** *Complesso della topoisomerasi (superficie molecolare in rosso) con un plasmide di DNA superavvolto (rappresentazione a sfere piene colorate per tipologia di atomo).*

Un altro affascinante esempio di sistema complesso analizzato è rappresentato da una nanostruttura di DNA che è stata sperimentalmente costruita utilizzando appropriati segmenti di DNA, i quali, avendo una diversa temperatura di annealing e appropriati enzimi, come le ligasi, permettono di legare covalentemente i diversi segmenti fino a ottenere una reale struttura tridimensionale nanometrica costituita da 12 doppie eliche di DNA connesse da 24 segmenti di timidina di lunghezza variabile (Figura 2). La struttura è stata caratterizzata attraverso spettroscopia di scattering di raggi X a piccolo angolo (SAXS) e può avere interessanti applicazioni biotecnologiche, quali la veicolazione mirata di proteine o farmaci, essendo le sue dimensioni tali da poterne contenere al suo interno. La simulazione della nanostruttura di DNA è stata una notevole sfida sia nel processo di ricostruzione del modello tridimensionale, sia da un punto di vista computazionale nella produzione della traiettoria. Il modello finale immerso in un box di acqua esplicita contiene circa 400.000 atomi e la sua simulazione ha permesso, da un lato, di contraddistinguere sia le sue caratteristiche strutturali che ben riproducono i dati SAXS sperimentali, sia quelle dinamiche; dall'altro, di individuare gli elementi essenziali per la sua stabilità [10-12]. Questi dati hanno consentito di progettare una nuova nanostruttura di DNA, attualmente in fase di caratterizzazione sperimentale e computazionale, in grado di variare la sua conformazione in funzione della temperatura.

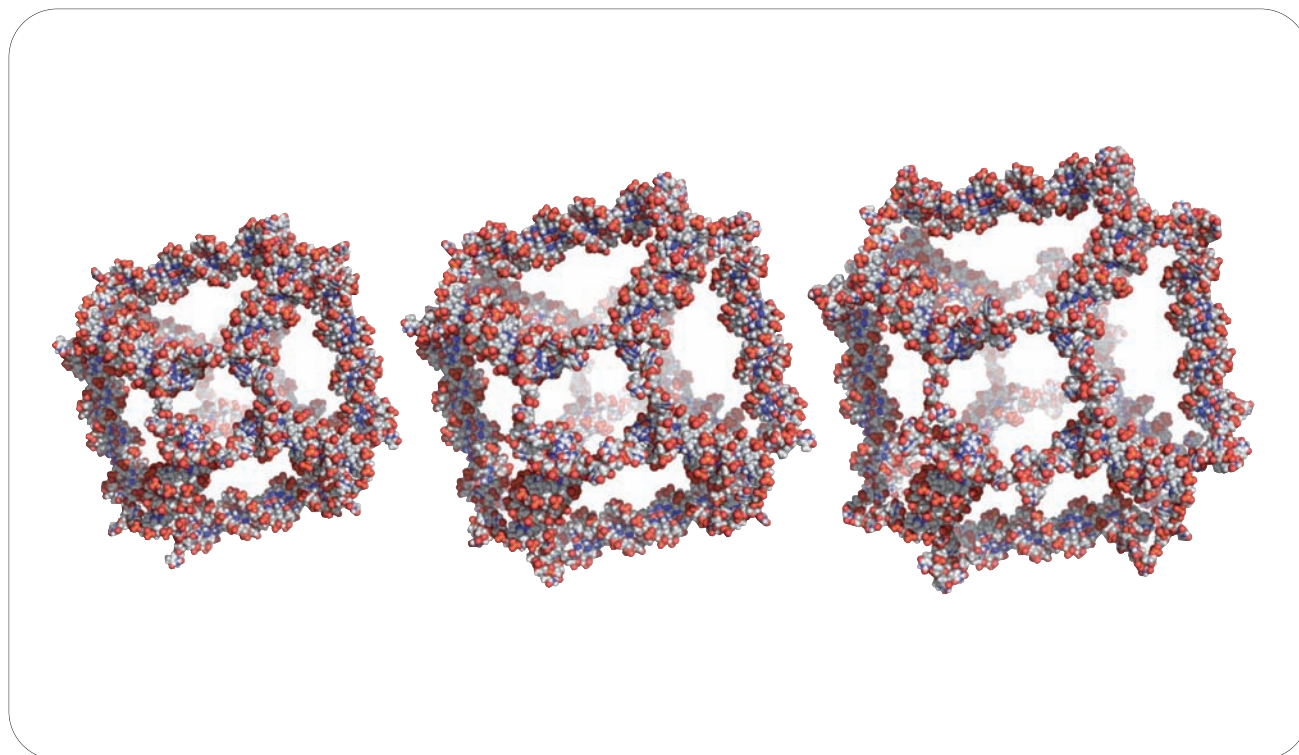


Fig. 2 Nanostrutture di DNA a dimensione variabile (rappresentazione a sfere piene colorate per tipologia di atomo).

Questi esempi mostrano la raffinatezza con cui possono essere trattate molecole biologiche estremamente complesse, ma queste, a mio parere, non rappresentano ancora il limite dei sistemi che possono essere investigati. I prossimi anni porteranno la simulazione di sistemi biologici a livello cellulare, cosa che permetterà di indagare processi di formazione e destrutturazione di organelli cellulari, affrontare problemi su come la membrana nucleare si destruttura e riprodurre i processi di divisione e replicazione cellulare. Un punto certo è che la simulazione di dinamica molecolare classica è ormai un metodo di indagine affidabile che può e deve essere utilizzato da ogni ricercatore sperimentale sia per meglio interpretare i propri dati, sia per progettare nuovi esperimenti, ribadendo la necessità e l'utilità di un comune procedere dei metodi simulativi e sperimentali nel processo di conoscenza dei meccanismi biologici.

#### BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- [1] Rahman, A. (1964). *Phys. Rev.* **A136**, 405.
- [2] Stillinger, F.H. and Rahman, A. (1974). *J. Chem. Phys.* **60**, 1545.
- [3] McCammon, J.A., Gelin, B.R., and Karplus, M. (1977). *Nature* **267**, 585.
- [4] Levitt, M., Sharon, R. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7557.
- [5] Fiorani, P., et al. (2003). *J Biol Chem* **278**, 43268.
- [6] Chillemi, G., et al. (2004). *Biophys J.* **87**, 4087.
- [7] Chillemi, G., et al. (2007). *Nucleic Acids Research* **35**, 3032.
- [8] Chillemi, G., et al. (2008). *Nucleic Acids Research* **36**, 5645.
- [9] Mancini, G., et al. (2010). *PLoS ONE* **5**, e10934.
- [10] Falconi, M., et al. (2009). *Acs Nano.* **7**, 1813.
- [11] Oliveira, C.L., et al. (2010). *Acs Nano.* **4**, 1367.
- [12] Oteri, F., et al. (2011). *J Phys Chem C.* **115**, 16819.