Titolo di Tesi: Studio di modellistica molecolare del complesso SpyTag-SpyCatcher

Laureanda: Irene Borghesi **Matricola**: 323885

Relatore: Prof. Matteo Tegoni

Correlatrice: Prof.ssa Antonella Di Pizio

Laboratorio: Molecular Modeling presso Leibniz Istitute for Food Systems Biology at Technical University of Munich

Riassunto

In questo lavoro di tesi ho condotto un'analisi di dinamica molecolare del costrutto Spy, una proteina artificiale ridisegnata sulla base del dominio CnaB2 di Streptococcus pyogenes (da cui l'acronimo Spy). CnaB2 è un dominio facente parte della FBAB (Fibronectin-binding-protein) del batterio Streptococcus pyogenes. Questo dominio è un dominio ß-sandwich costituito da 9 strand, nel quale è presente un legame isopeptidico tra K31 (strand 1) e D117 (strand 9). Il costrutto Spy è una proteina artificiale ottenuta separando idealmente lo strand 9 dal resto del dominio. Howarth e collaboratori hanno dimostrato che se questi due componenti proteina (SpyCatcher) e un peptide (SpyTag) vengno incubati a temperatura ambiente e pH fisiologico, il legame isopeptidico si forma spontaneamente ed in pochi minuti.

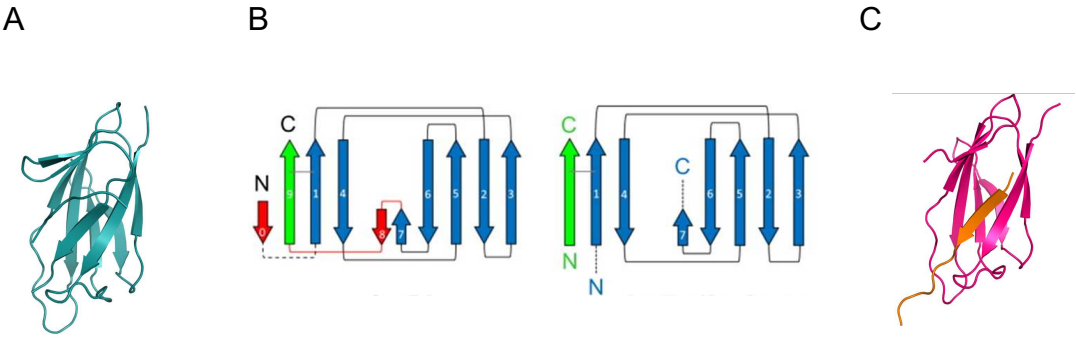

Figura 1 (A) Rappresentazione cristallografica del dominio CnaB2, (B) Diagramma della struttura secondaria di CnaB2 e Spy. Il filamento β (contrassegnato con zero) rappresentato in rosso non è visualizzabile nella struttura cristallografica di Spy, ed è stato modellizzato. In blu viene raffigurato SpyCacther e in verde viene raffigurato SpyTag. (C) rappresentazione cristallografica del complesso Spy in cui SpyCatcher è rappresentato in magenta e SpyTag in arancione.

In questo progetto di tesi ho analizzato Spy utilizzando un approccio computazionale nella prospettiva di potere utilizzare questo costrutto per la realizzazione di metalloproteine artificiali. Per studiare questo costrutto ed ottenere informazioni aggiuntive rispetto a quelle ottenibili dalle banche dati cristallografiche, ho fatto un'analisi di modellizzazione strutturale e di dinamica molecolare.

Un dato rilevante è che una parte della sequenza del dominio CnaB2 è non localizzato nella struttura cristallografica come evidenziato nello ***Schema 2***.

GAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDIDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQVKDFYLM
PGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGDAHIVMVDA

Schema 2. *Sequenza corrispondete al dominio CnaB2. I residui rappresentati in rosso rappresentano gli amminoacidi con densità elettronica non localizzata nella struttura cristallografica.*

Utilizzando un approccio di protein modeling (homology modeling e artificial intelligence) ho confermato una struttura β a livello dell'N-terminale del CnaB2 osservata nella struttura cristallografica. Contemporaneamente, ho predetto che la sequenza non localizzata nella struttura sia parte di un loop. La modellizzazione dell'addotto Spy, rivalutata alla luce di questi risultati, ha permesso di prevedere una struttura a filamento β anche per la sequenza di SpyCatcher, come rappresentato in ***figura 2***.

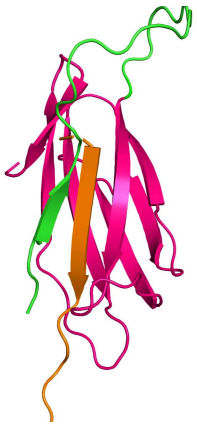

Figura 2 *Rappresentazione del modello strutturale del sistema Spy. Spycatcher colorato in magenta, SpyTag colorato in arancione e filamento predetto in conformazione beta in verde.*

Il sistema modellizzato e soggetto a indagine di dinamica molecolare è stato analizzato dal punto di vista strutturale valutando interazioni sidechain – sidechain e backbone – backbone, iniziando da quelle presenti nelle strutture cristallografiche di Spy e del dominio CnaB2. Di queste interazioni ho verificato o meno il mantenimento durante le traiettorie delle indagini di dinamica molecolare, cercando di focalizzarmi sulle interazioni che coinvolgono i residui chiave del Tag (IVMVD) e del Catcher (I27, F29, S30, K31, L39, M44 and F75). Inoltre, è stato valutato il mantenimento della struttura β all'N-terminale predetta durante la dinamica molecolare.

Come risultato finale è stato confermato il mantenimento delle interazioni backbone – backbone in dinamica per tutti i residui chiave del Tag e del Catcher. Inoltre, la localizzazione del filamento β predetto all'N-terminale mantenuto in posizione durante le traiettorie di dinamica molecolare dello Spy permette di avere a disposizione un modello

strutturale piu’ raffinato di quello cristallografico, che sarà interessante utilizzare per il design razionale di nuovo metalloenzimi basati su questo costrutto.