

PREPARAZIONE DI IMMAGINI E FILMATI DI STRUTTURE PROTEICHE UTILIZZANDO IL SOFTWARE UCSF CHIMERAX.

Esercizio: Analisi della struttura di una proteina in grado di degradare la plastica

L'obiettivo di questo esercizio è di esplorare in un video la struttura di un'idrolasi (codice PDB: 5XG0, [1]) in grado di idrolizzare il polimero PET nei suoi monomeri. Questa proteina è stata estratta da un batterio che è in grado di vivere in un ambiente dove è presente PET e di utilizzarlo come fonte di carbonio. Questo tipo di enzimi sono molto studiati per la loro possibile applicazione a processi industriali di riciclo della plastica. La capacità dell'enzima di catalizzare l'idrolisi del polimero nei suoi monomeri in condizioni non spinte di temperatura e pH è molto interessante in un'ottica di economia circolare: se la plastica può essere scomposta nei monomeri che la costituiscono, questi possono essere poi utilizzati per produrre nuovi polimeri e/o per altri processi industriali.

Per prima cosa è necessario ottenere da PDB il file con le coordinate del modello e aprirlo. Questo può essere fatto con:

```
> open 5xg0 fromDatabase pdb
```

Nel pannello *Log* sono descritte le principali caratteristiche della struttura cristallografica: sono presenti 3 catene polipeptidiche nell'unità asimmetrica, indicate rispettivamente come A, B e C. Ciascuna catena polipeptidica ha residui da 1 a 261. Per vedere le differenze tra queste catene polipeptidiche:

```
> split #1
> color #1.2 red
> color #1.3 yellow
> matchmaker #1.2 to #1.1
> matchmaker #1.3 to #1.1
```

Da qui osserviamo che ci sono solo piccole differenze per ciascuna catena, probabilmente dovute all'impaccamento cristallino. Per comodità, le catene B e C possono essere nascoste:

```
> hide #1.2|#1.3 cartoon, atoms
```

Per uniformare la rappresentazione (nascondere gli eventuali atomi rappresentati) e selezionare il colore di background:

```
> hide atoms
> set bgColor white
```

Dal punto di vista della catalisi questo enzima è un'idrolasi e, più specificamente, una esterasi. La triade catalitica dell'enzima è costituita dai residui His 208, Ser 131 e Asp 177.

Per comodità di analisi, si selezionano i residui catalitici e si salva la selezione:

```
> name catalytic_residues /A:208|/A:131|/A:177
```

Si visualizzano i residui selezionati come atomi e li si posiziona al centro dello schermo, con uno zoom opportuno:

```
> show catalytic_residues atoms
> view catalytic_residues
```

Con il mouse è ora possibile modificare leggermente l'orientazione per posizionare i residui in modo ottimale. Inoltre, si può aggiustare lo zoom al livello desiderato. Una volta ottimizzata la vista della struttura, si salva la posizione della camera con il comando:

```
> view name catalytic_site
```

I residui catalitici di questa proteina si trovano sulla sua superficie: la proteina è infatti in grado di lavorare all'interfaccia tra la soluzione e un substrato solido come il PET. Questa proprietà è molto interessante per

l'applicazione biotecnologica "green" di questi enzimi all'idrolisi di plastiche, senza una fase iniziale di dissoluzione in solvente che aumenterebbe l'impatto ambientale del processo.

Per visualizzare la posizione del sito catalitico rispetto all'intera proteina:

```
> view
```

Con il mouse modifichiamo leggermente la posizione della proteina, in modo da visualizzare i residui di interesse in alto. A questo punto possiamo salvare la vista ottenuta:

```
> view name whole_protein
```

Torniamo a esaminare il sito catalitico della proteina:

```
> view catalytic_site
```

Da un'esame della struttura, si osserva che il residuo di istidina presente nel sito catalitico è impegnato in un'interazione di legame a idrogeno con uno degli ossigeni del residuo di aspartato. Per conoscere l'esatta identità degli atomi impegnati in queste interazioni è sufficiente fermarsi con il mouse sopra di essi. Possiamo misurare la distanza di legame a idrogeno:

```
> distance /A:177@OD2 /A:208@ND1
```

Otteniamo il valore di 2.684 Å, consistente con un legame a idrogeno piuttosto forte. La distanza viene visualizzata con un tratteggio e con l'etichetta (*label*) che ne riporta il valore. Nel pannello *Models*, è stato creato un altro modello (#2), che contiene solo la distanza misurata.

Il residuo di istidina forma anche un'altra interazione di legame a idrogeno con il residuo di serina 131:

```
> distance /A:208@NE2 /A:131@OG
```

In questo caso la distanza è di 2.911 Å, più lunga della precedente, e con una geometria non ideale, come si vede misurando l'angolo $C_8N_8 \cdots O_7$, che ha un valore di 173°:

```
> angle /A:208@CD2 /A:208@NE2 /A:131@OG
```

Per il momento, è possibile nascondere le distanze (sia i tratteggi che le etichette) con il comando:

```
> hide #2.
```

Per capire il legame dell'enzima al substrato, è stato creato un mutante della proteina con un residuo di alanina al posto di quello di serina nel sito catalitico. In questo modo, la catalisi non procede. Il mutante S131A è stato cristallizzato (codice PDB: 5XFY) e possiamo visualizzarlo con:

```
> open 5xfy fromDatabase pdb
```

Dal pannello *Log* vediamo che la struttura in questo caso ha una sola catena polipeptidica per unità asimmetrica, ma sono presenti anche una molecola di glicerolo (GOL) e uno ione solfato (SO4). Per visualizzare questa proteina (che è stata caricata dal software come modello #3):

```
> view #3
```

```
> hide #3 atoms
```

```
> show #3&catalytic_residues atoms
```

A questo punto paragoniamo la struttura della proteina *wild-type* con quella di questo mutante e concentriamo la nostra attenzione sul sito catalitico:

```
> matchmaker #3 to #1.1
```

```
> view catalytic_site
```

Osserviamo una sovrapposizione quasi perfetta tra i residui catalitici delle due proteine: la struttura complessiva non è significativamente alterata dalla presenza di una mutazione puntiforme del residuo di serina catalitico.

I tentativi di cristallizzazione della struttura del mutante S131A con il substrato (acido 2-idrossietil tereftalico) non hanno dato buoni risultati. Ancora una volta l'analisi della struttura, e nello specifico del packing cristallino suggerisce la ragione: nell'impaccamento cristallino, la catena laterale dell'arginina 103 di un'altra catena polipeptidica si avvicina al sito catalitico e ne impedisce l'accesso ad una molecola di substrato. Possiamo osservare questa interazione tra le due catene polipeptidiche:

```
> hide #1 cartoon, atoms
```

```
> crystalcontacts #3
```

```
> view
```

Il comando `crystalcontacts` genera diverse catene polipeptidiche simmetriche rispetto al modello 3, che vengono salvate dal programma come modello 4 (#4). Tra queste, cerchiamo quella il cui residuo di arginina 103 si trova vicino al sito catalitico della proteina #3:

```
> view catalytic_site
```

```
> show #4:103 atoms
```

La catena in questione è quella con codice #4.2 (è facile confrontare il colore della catena polipeptidica con il colore che si vede nel pannello *Models*):

```
> hide #4 cartoon, atoms
```

```
> show #4.2 cartoon
```

```
> show #4.2:103 atoms
```

Dopo aver posizionato opportunamente il sito catalitico utilizzando il mouse, possiamo salvare la vista:

```
> view name crystal_contact_R103
```

Per ottenere la struttura cristallografica della proteina con il proprio substrato è stato ottenuto un altro mutante, con una doppia mutazione puntiforme: R103G/S131A. Oltre alla serina catalitica, è stato mutato anche il residuo di arginina che nell'impaccamento cristallino è a contatto con il sito catalitico. Questa proteina è stata cristallizzata in assenza (codice PDB: 5XFZ) e in presenza del metil estere dell'acido 2-idrossietil tereftalico (codice PDB: 5XH3). Prima di tutto analizziamo la struttura del mutante *apo*, cioè senza ligando:

```
> hide #3-4 cartoon, atoms
```

```
> open 5xfz fromDatabase pdb
```

In questa struttura, è presente una sola catena polipeptidica con residui da 1 a 261. Sono anche presenti una molecola di glicerolo (GOL) e uno ione solfato (SO4).

Per confrontare questa struttura con quella della proteina *wild-type*:

```
> show #1.1,5 cartoon
```

```
> matchmaker #5 to #1.1
```

```
> hide #5 atoms
```

```
> view
```

Anche in questo caso la sovrapposizione con la proteina *wild-type* è soddisfacente, sia nella struttura complessiva, che nel sito catalitico:

```
> show #5&catalytic_residues atoms
```

```
> show #1&catalytic_residues atoms
```

```
> view catalytic_site
```

Analizziamo la struttura di questo doppio mutante con il substrato, il metil estere dell'acido 2-idrossietil tereftalico:

```
> hide #1-5 cartoon, atoms
```

```
> open 5xh3 fromDatabase pdb
```

```
> show #1.1,6 cartoon
```

```
> hide #6 atoms
```

```
> matchmaker #6 to #1.1
```

```
> view
```

In questa struttura sono presenti una catena polipeptidica nell'unità asimmetrica, una molecola di glicerolo (GOL), uno ione solfato (SO4) e il metil estere dell'acido 2-idrossietil tereftalico (residuo denominato 856). Si osserva che, ancora una volta, la sovrapposizione dell'intera struttura è buona, così come quella nel sito catalitico. Nel sito catalitico visualizziamo anche il ligando:

```
> show #6&catalytic_residues atoms
```

```
> show #1&catalytic_residues atoms
```

```
> view catalytic_site
```

```
> show #6:856 atoms
```

Si può notare che la posizione del ligando non è, comunque, compatibile con la presenza del residuo di serina 131 della proteina *wild-type*. La distanza, infatti, non consente il posizionamento del gruppo idrossido nella

serina accanto al ligando. Nel doppio mutante R103G/S131A, il ligando forma un legame a idrogeno con l'azoto ϵ dell'istidina catalitica, che a sua volta forma con l'atomo di azoto δ il legame a idrogeno già visto con il residuo di aspartato del sito catalitico:

```
> hide #1 cartoon, atoms
> distance #6/A:208@NE2 #6/A:856@O11
> distance #6/A:208@ND1 #6/A:177@OD2
```

A questo punto siamo pronti per registrare un piccolo filmato che mostra l'analisi che abbiamo condotto sulle strutture della proteina e dei suoi mutanti. Prima di tutto la "sceneggiatura":

- 1) all'inizio il filmato mostrerà la proteina *wild-type* nella sua struttura complessiva;
- 2) poi, sempre della proteina *wild-type* faremo vedere il particolare del sito catalitico, con la formazione di 2 legami a idrogeno tra i residui catalitici;
- 3) a questo punto introduciamo il mutante S131A, in cui vediamo la sostituzione della serina con l'alanina all'interno del sito catalitico;
- 4) in questa struttura cristallografica, però, c'è un contatto dovuto all'impaccamento cristallografico che impedisce l'accesso del substrato nel sito catalitico: si tratta del residuo di arginina 103;
- 5) per evitare questo contatto e permettere la cristallizzazione della proteina assieme al suo substrato, è stato prodotto un doppio mutante, R103G/S131A; anche in questo caso la sovrapposizione è soddisfacente, sia per quanto riguarda la struttura complessiva che per il sito attivo;
- 6) e' stata infine ottenuta un'ulteriore struttura cristallografica del mutante R103G/S131A con il substrato acido 2-idrossietil tereftalico, che forma un legame a idrogeno con il residuo di istidina presente nel sito catalitico.

Per prima cosa, prima di iniziare la registrazione del filmato, salviamo la sessione di ChimeraX (file cxs), con il comando:

```
> save C:\[path]\PETasi.cxs
```

Comandi per la preparazione del filmato:

```
> hide #6 cartoon, atoms
> show #1.1 cartoon
> view whole_protein
> close #2 (questo serve per chiudere l'oggetto distanza, altrimenti è più difficile far comparire di volta in volta solo le distanze di interesse)
> movie record
> roll y 2 180
> fly whole_protein 60 catalytic_site
> crossfade 30; show #1.1&catalytic_residues atoms
> crossfade 10; distance #1.1/A:177@OD2 #1.1/A:208@ND1; distance #1.1/A:208@NE2 #1.1/A:131@OG
> wait 30
> crossfade 10; hide #2
> crossfade 10; show #3 cartoon; show #3&catalytic_residues atoms
> wait 30
> fly catalytic_site 60 whole_protein
> roll y 2 180
> crossfade 10; hide #1.1 cartoon, atoms
> fly whole_protein 60 crystal_contact_R103
> crossfade 30; show #4.2 cartoon; show #4.2:103 atoms; color #4.2:103@N* blue
> wait 30
> crossfade 10; hide #4.2 atoms
> crossfade 10; hide #4.2 cartoon; show #3:103 atoms
> fly crystal_contact_R103 60 whole_protein
```

```
> crossfade 30; show #5 cartoon; show #5:103,131,177,208 atoms
> roll y 2 180
> fly whole_protein 60 catalytic_site
> crossfade 20; hide #3 atoms, cartoon
> crossfade 20; hide #5 atoms, cartoon; show #6 cartoon; show
#6:131,177,208 atoms; show #6:856 atoms
> wait 30
> crossfade 10; distance #6/A:208@NE2 #6/A:856@O11; distance
#6/A:208@ND1 #6/A:177@OD2
> wait 30
> crossfade 20; show #1.1 cartoon; show #1.1&catalytic_residues atoms
> wait 30
> fly catalytic_site 60 whole_protein; hide #6,2 cartoon, atoms
> wait 20
> movie encode
```

Riferimenti.

[1] Han X, Liu W, Huang JW, Ma J, Zheng Y, Ko TP, Xu L, Cheng YS, Chen CC, Guo RT. "Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase". *Nat Commun.* 2017. 8(1): 2106. doi: 10.1038/s41467-017-02255-z.