

NF- κ B: la Proteina che controlla l'espressione dei geni

di Ivano Eberini*, Andrew Emerson, Roberto Gambari**, Silvia Giuliani, Laura Piccagli**, Elda Rossi

*Gruppo di Studio per la Proteomica e la Struttura delle Proteine, Dipartimento di Scienze Farmacologiche, Università degli Studi di Milano

**Dipartimento di Biochimica e Biologia Molecolare, Università di Ferrara

The Rel/NF- κ B proteins belong to one of the most studied transcription factor families. In fact, these proteins are involved in the control of a large number of normal cellular and organism processes, such as immune and inflammatory responses, development, cellular growth and apoptosis. It is known that the activity of NF- κ B is regulated primarily by interaction with inhibitory I κ B proteins through the formation of a stable I κ B/NF- κ B complex. One of the best-characterized and most prevalent members of the NF- κ B family is a heterodimer composed of p50 and p65 subunits and the most studied NF- κ B-I κ B interaction is that with I κ B α . The protein complex simulated consists of the NF- κ B p50/p65 heterodimer in the open conformation and the I κ B α inhibitor. The three dimensional structures of the complexes suggest that the presence of I κ B α allows a marked conformational change of the DNA-bound 'open' conformation of the p50-p65 heterodimer with the adoption in the resting state of a I κ B α -bound 'closed' conformation. The aim of this work was to investigate the dynamic properties and the conformational behaviour of the NF- κ B p50-p65/I κ B α system by molecular dynamic simulation.

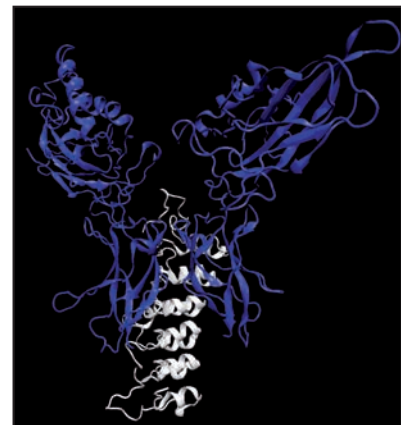
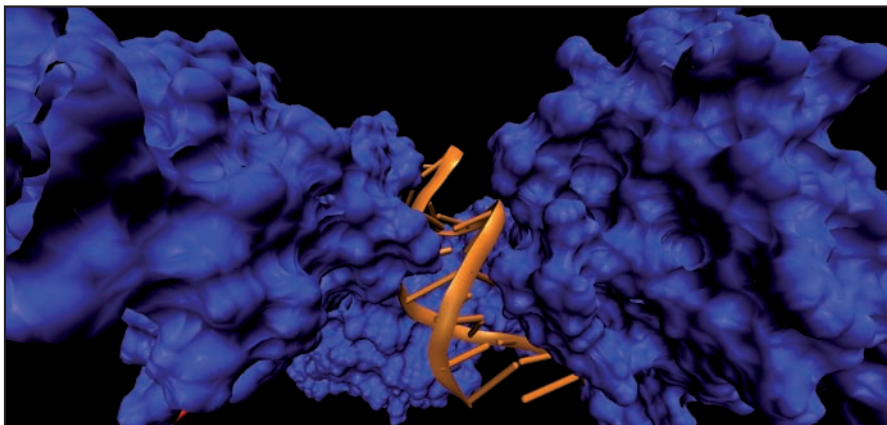
Il patrimonio genetico di ciascuno di noi si esprime in tutto ciò che siamo, determinando non soltanto i nostri tratti somatici, ma anche caratteristiche biologiche non evidenti, come il gruppo sanguigno e caratteristiche comportamentali altamente complesse e multifattoriali. L'espressione di un gene avviene attraverso un processo biologico piuttosto articolato che si conclude con la produzione di proteine da parte delle cellule del nostro organismo. In

condizioni normali non tutti i geni all'interno del nucleo cellulare si esprimono con la stessa intensità; alcuni geni addirittura alcuni non si esprimono proprio e rimangono "silenti". L'espressione genica va considerata pertanto un fenomeno molto complesso; inoltre, esso è altamente modulabile e condizionato anche da fattori esterni. In condizioni particolari di stress cellulare o in presenza di malattie genetiche, la normale espressione di un gene può

NF- κ B: the protein that controls gene expression

Figura 1, a sinistra – Il fattore di trascrizione NF- κ B (blu) con il DNA (arancione)

Figura 2, a destra – Il fattore di trascrizione NF- κ B (blu) con l'inibitore I κ B α (bianco)



essere alterata e dunque i normali processi che esso controlla possono degenerare, dando luogo ad importanti patologie.

Un aspetto cruciale di questo fenomeno biologico così sfaccettato è costituito dai meccanismi di controllo che le cellule mettono in atto per modulare l'attività di espressione genica a livello trascrizionale, ovvero nella produzione degli RNA messaggeri (mRNA), dalla cui traduzione saranno prodotte le proteine. Uno dei livelli di regolazione dell'espressione genica coinvolge i cosiddetti fattori di trascrizione, proteine in grado di legarsi a specifiche porzioni del DNA, così da attivare o disattivare, all'occorrenza, la trascrizione. Indagare in modo approfondito il loro comportamento significa dunque comprendere sempre meglio le cause ed i meccanismi alla base di molte malattie.

In questo lavoro abbiamo esplorato un particolare fattore di trascrizione, NF-kB (Nuclear Factor Kappa B), in grado di legare nel nucleo cellulare specifiche sequenze di DNA presenti in geni da esso regolati. Si tratta di una proteina con caratteristiche di funzionamento molto interessanti, ma ancora poco definite, e che offre dunque vari spunti di studio sotto molteplici punti di vista. Cerchiamo innanzitutto di descrivere la sua vita ordinaria all'interno del nostro organismo. Normalmente la proteina NF-kB si trova nel citoplasma di svariate tipi di cellule legata ad un'ulteriore proteina (un inibitore), che la rende inattiva, cioè incapace di formare interazioni con il DNA. Sotto stimoli esterni di varia natura, come agenti batterici e virali, NF-kB si libera e rie-

sce a migrare nel nucleo, dove può assolvere alla sua funzione regolatrice.

Le ricerche pubblicate su questa proteina evidenziano che essa può assumere una diversa conformazione a seconda che si trovi nel citoplasma, legata all'inibitore (forma non attiva), oppure nel nucleo, insieme al DNA (forma attiva). A subire tale variazione di forma è la porzione della proteina che ospita il DNA: "le ali" superiori sono aperte quando vi è inserita la doppia elica (Fig. 1), mentre sono chiuse quando le "ali" inferiori interagiscono con l'inibitore (Fig. 2).

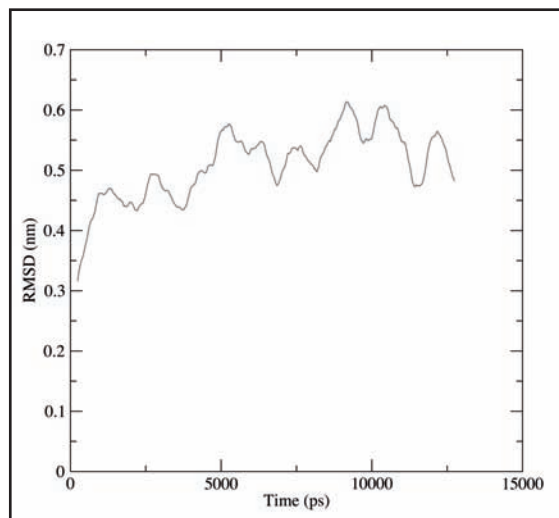
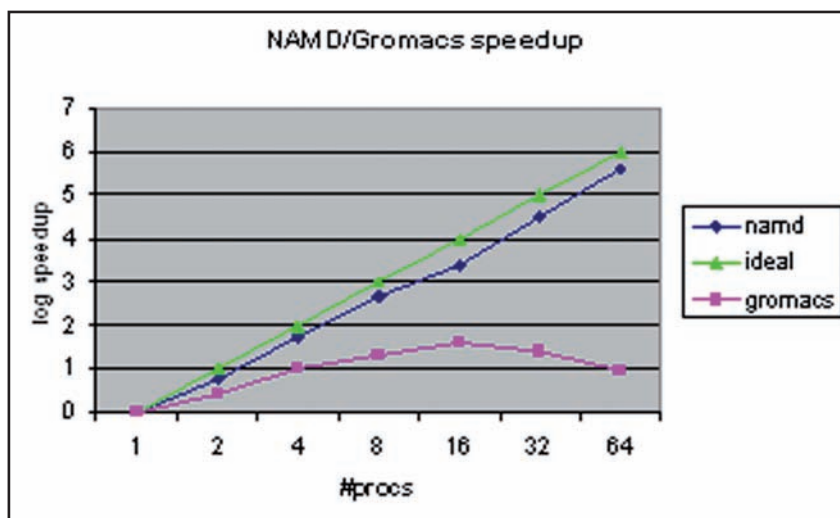
Gli studi scientifici fin qui svolti non sono stati in grado di fare ancora chiarezza sulle cause di un simile riarrangiamento strutturale né sui meccanismi molecolari con cui esso si verifica. È la presenza dell'inibitore a determinare la chiusura di NF-kB nel citoplasma o è semplicemente l'assenza del DNA in questo compartimento cellulare? Se le tre entità, NF-kB, DNA ed inibitore potessero coesistere nello stesso spazio cellulare cosa succederebbe? Nell'interazione con NF-kB prevarrebbe l'inibitore o il DNA? Eventualmente potrebbe formarsi un complesso a tre molecole? Abbiamo tentato di rispondere a tali interrogativi, o almeno di approfondire la problematica, attraverso un'attività di ricerca computazionale, che ha richiesto adeguate competenze scientifiche e risorse di calcolo.

Attività di dinamica molecolare

Al fine di rispondere a tali interrogativi abbiamo iniziato a simulare il comportamento in soluzione di svariate strutture biomolecolari.

Figura 3, a sinistra – Speedup di NAMD e GROMACS nella simulazione di un complesso proteico con solvente di circa 30.000 atomi. Si osserva che all'aumentare del numero dei processori le performance di NAMD, misurate in ps di simulazione al giorno (ps/day) sono migliori

Figura 4, a destra - RMSD calcolata su 13 ns di traiettoria per i C α della sola proteina NF-kB



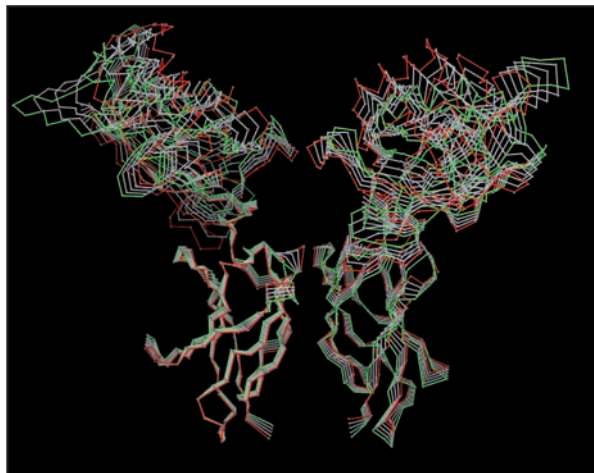
Il nostro primo sforzo si è concentrato sulla scelta del software di dinamica molecolare più adeguato alla tipologia del complesso proteico da simulare e dell'ambiente computazionale da impiegare, un cluster linux IBM installato al CINECA. La scelta è ricaduta su due dei più diffusi software di dinamica molecolare, GROMACS e NAMD.

Una precedente esperienza di simulazione di un complesso proteico di circa 30.000 atomi in soluzione aveva già evidenziato per NAMD un migliore speedup all'aumentare del numero dei processori (Fig. 3). Di qui la scelta di utilizzare NAMD per condurre le nostre simulazioni sul cluster del CINECA.

Il primo complesso simulato è composto dalla proteina NF- κ B in conformazione aperta e dall'inibitore I κ B α per un totale di circa 150.000 atomi. Per 13 nanosecondi di dinamica sono state impiegate circa 800 ore CPU per ogni ns. utilizzando 16 processori. La traiettoria così ottenuta è stata analizzata con GROMACS, disponendo questo pacchetto di una più vasta libreria di programmi per l'analisi. Il plot della RMSD (Root Mean Square Deviation) calcolata da 0 a 13 ns per gli atomi C α della sola proteina NF- κ B mostra un incremento fino a 5 ns di simulazione per poi raggiungere una regione di plateau che perdura fino ai 13 ns (Fig. 4).

Si è dunque proceduto a caratterizzare un movimento essenziale di rotazione presente nei primi 7 ns di simulazione, attraverso un approccio di dinamica essenziale. La Fig. 5 evidenzia un movimento di rotazione concertato a livello del dominio superiore N-terminale della proteina, dall'inizio della simulazione (in verde), fino al termine (in rosso).

Inoltre l'analisi della RMSF (Root Mean Square Fluctuation) individua zone della proteina ad alta fluttuazione, probabilmente coinvolte nel movimento di rotazione. Ulteriori conferme della rotazione provengono dall'analisi degli aminoacidi in struttura secondaria, arricchendosi questa di circa 10 aminoacidi nell'intervallo di tempo che va dai 2.5 ai 6 ns. Dai risultati ottenuti da questa prima simulazione abbiamo dunque potuto constatare che la conformazione aperta del dominio N-terminale della proteina NF- κ B in presenza di inibitore ed in assenza di DNA ruota verso una conformazione chiusa. Stiamo ora indagando



se il cambiamento conformazionale osservato sia dovuto alla rimozione del DNA o alla presenza dell'inibitore I κ B α . A tal fine sono state avviate simulazioni della proteina complessata con il DNA e non complessata.

Conclusioni e ringraziamenti

Dai dati di letteratura è noto che il fattore di trascrizione NF- κ B è inattivo in condizioni fisiologiche ed invece si attiva sotto l'impulso di stimoli esterni alla cellula, come batteri, virus, fattori infiammatori ed alterazioni genetiche. È stata dimostrata un'attività di questa proteina nei tessuti tumorali, nei quali favorisce la proliferazione delle cellule danneggiate e ne sfavorisce il processo di eliminazione. Comprendere le proprietà dinamiche di questo fattore di trascrizione in condizioni fisiologiche e patologiche potrebbe contribuire alla scoperta di nuovi farmaci capaci di interferire, rallentando o arrestando, la progressione della malattia neoplastica e il processo di infiammazione. Questa ricerca è stata l'oggetto della tesi di dottorato di Silvia Giuliani, svolta in collaborazione tra CINECA e Università di Ferrara, e coordinata dal prof. Roberto Gambari

Figura 5 – Dinamica essenziale dei primi 7 ns di simulazione. Si osserva un movimento di rotazione concertato a livello del dominio superiore N-terminale della proteina. Posizione di partenza verde, posizione di arrivo rossa

Per ulteriori informazioni:
info.bio@cineca.it

NAMD:
<http://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/>
GROMACS:
<http://www.gromacs.org/>

doi:10.1388/notizie-61-01