
Biomolecole e circuiti elettrici: la sfida Proteotronica

Rosella Cataldo

Dipartimento di Matematica e Fisica "Ennio De Giorgi" - Università del Salento

Negli ultimi vent'anni una fiorente produzione di ricerche in campo biologico e medico ha accelerato il processo di conoscenza di molti sistemi biologici, con notevoli ricadute quali, per esempio, una più precisa discriminazione degli stati sano/malato, una descrizione dettagliata di alcune patologie, della progressione della malattia e della risposta alle terapie. Le metodologie usate in tutti questi studi hanno anche cambiato e indirizzato nuovi paradigmi d'indagine. Un tempo, infatti, il confine tra la biologia molecolare e le discipline affini, come la genetica e la biochimica, era molto chiaro, mentre oggi non è più così ben definito; soprattutto è diventato palese che le sole conoscenze biologiche non sono in grado di fornire una descrizione esaustiva dei fenomeni studiati. Si è delineata chiaramente una rivoluzione nelle modalità attraverso cui viene condotta la ricerca biomedica: all'aumento di conoscenza non possono non contribuire importanti branche della Fisica e della Matematica, che riescono a integrare e a sintetizzare diversi scenari, facendo da propulsore allo sviluppo di molteplici applicazioni.

Questo articolo presenta alcuni casi di sistemi biologici modellizzati secondo la Proteotronica, ossia come reti complesse attraverso le quali l'informazione che interessa ricavare è assimilabile a un segnale elettrico, e quindi opportunamente studiata con le leggi fisiche dell'elettronica.

Le biomolecole sono sostanze esclusive degli esseri viventi che rivestono un ruolo fondamentale nella vita e nello sviluppo dell'organismo. Esse sono composte essenzialmente da carbonio e idrogeno, cui sono spesso associati azoto, ossigeno, fosforo e zolfo che, aggregandosi, formano catene di polimeri, composti da un gran numero di monomeri. Le proteine e gli acidi nucleici (deossiribonucleico o DNA, ribonucleico o RNA) sono tra le biomolecole più studiate.

Le proteine sono una catena lineare di monomeri, detti amminoacidi, che svolgono la maggior parte delle funzioni di routine della cellula. Essi sono componenti di ormoni, enzimi e neurotrasmettitori, e partecipano alle reazioni chimiche che avvengono nel nostro corpo, accelerandole, rallentandole, favorendole oppure ostacolando a seconda delle necessità. Sono pure in grado di catalizzare reazioni biochimiche per la sintesi di nucleotidi e il loro assemblaggio in acidi nucleici, oppure possono avere un ruolo

strutturale di trasporto di sostanze nutritive o di elaborazione di informazioni. Gli acidi nucleici sono in gran parte interessati alla conservazione e alla distribuzione di informazioni genetiche e per questo motivo sono chiamati macromolecole informative.

Accanto a queste biomolecole presenti in natura, negli ultimi vent'anni sono stati sviluppati in laboratorio dei composti organici detti **attameri**, con una strategia di produzione mirata. Il termine *attameri*, dovuto a Ellington e Szostak [1], deriva dall'unione del termine latino *aptus*, che significa adatto, e di quello greco *meros*, che significa parte. La loro funzione, infatti, è quella di adattarsi nella maniera migliore al bersaglio (*target*) biologico per i quale sono stati progettati.

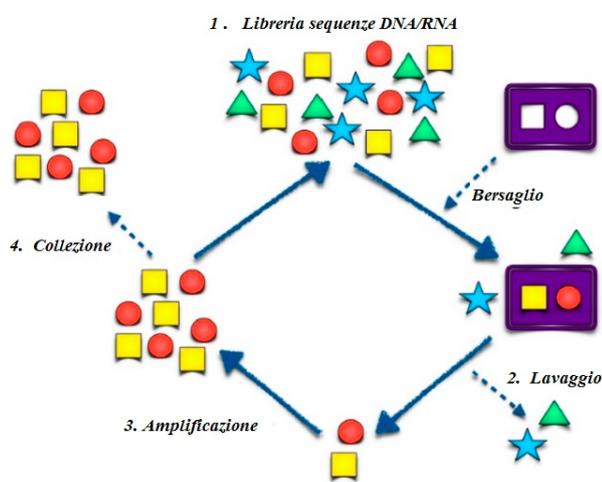


Figura 1: Schema della procedura SELEX.

Essi sono catene corte a filamento singolo di DNA o RNA, scelte usando la tecnica di selezione in vitro detta SELEX [2], mediante la quale si riesce a discriminare quelli che si adattano/legano meglio alla molecola considerata, all'interno di una grande quantità di acidi nucleici aventi sequenze diverse. SELEX è una procedura iterativa schematizzata in Figura 1, che consta di un certo numero di cicli, riassumibili in queste fasi principali:

1. costruzione di una libreria, attraverso la sintesi chimica di 10^{13} - 10^{16} sequenze di RNA o DNA, e quindi incubazione con la proteina bersaglio;
2. lavaggio degli oligonucleotidi non legati alla proteina bersaglio;

3. amplificazione delle specie selezionate fino a questo punto, tramite la reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente in maniera molto rapida la moltiplicazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscono le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali;

4. collezione del materiale genetico ottenuto con le fasi precedenti, tramite trascrizione in vitro o solo denaturazione (DNA). Nella trascrizione, le informazioni contenute nel DNA vengono trasferite enzimaticamente in una molecola complementare di RNA, passando dalla produzione intermedia di un RNA messaggero (mRNA) fino alla sintesi di peptidi o proteine funzionali. Nella denaturazione, l'acido deossiribonucleico a doppio filamento si svolge e si separa in due filamenti singoli, rompendo i legami d'idrogeno tra le basi appaiate.

A questo punto hanno inizio nuovi cicli, solitamente ne servono 5-10, fino ad arrivare alla sequenza che meglio si adatta al particolare bersaglio. Talvolta, il bersaglio è altamente purificato, per limitare effetti dannosi dell'attamero sulla molecola stessa, specialmente nel caso di cancro. SELEX è in costante aggiornamento, una sua evoluzione, nota come cell-SELEX, impiega cellule viventi come bersagli [3], di fatto ampliando il campo di utilizzo degli attameri.

Gli attameri costituiscono una valida alternativa agli anticorpi, tanto che spesso vengono definiti anticorpi artificiali, con il vantaggio che non è necessario conoscere la quantità o il tipo di proteina sulla superficie cellulare con la quale devono interagire, semplificando così il processo di selezione e riducendo costi e tempi, soprattutto rispetto ai loro diretti concorrenti.

Data l'alta affinità e specificità con cui possono legarsi al bersaglio, il fatto di non essere nocivi e di poter essere facilmente eliminati da reni e sangue, gli attameri sono utilizzati in un'ampia varietà di applicazioni biologiche [4], che spazia dalla progettazione di biomarcatori indicativi dell'attività di un tumore [5], al supporto alla diagnosi precoce di patologie, fino alla produzione di agenti per la diagnostica per immagini e farmaci per la terapia del cancro.

Per comprendere meglio come proteine/attameri possano essere impiegati in varie applicazioni della biologia e della medicina, bisogna partire dal fatto che le loro funzioni dipendono strettamente dalla loro struttura, che è suscettibile a stimoli esterni come variazioni di campo elettromagnetico, radiazione a microonde, temperatura, pressione e pH, aggancio a un recettore. Per questo motivo, le proteine e in generale le biomolecole trovano un valido impiego nella progettazione di dispositivi detti biosensori (aptasensori nel caso di attameri) in grado di rilevare la presenza di uno specifico **analita**, ossia della specie che deve essere determinata durante l'analisi chimica, utilizzando un elemento biologico sensibile (recettore). Il rilevamento è il risultato dell'interazione tra l'elemento sensibile e la molecola bersaglio, riprodotta da un trasduttore in un segnale fisico misurabile come: impedenza, oppure conduttanza, luce, energia termica, ecc., che può essere opportunamente elaborato (Figura 2).

L'elemento chiave di un biosensore è, quindi, l'elemento sensibile, che deve avere un'elevata capacità di legarsi al bersaglio (affinità), caratteristica che rientra nelle tipicità degli attameri cosicché gli aptasensori sembrano essere particolarmente promettenti rispetto al rilevamento rapido e senza reagenti in condizioni realisticamente complesse. In particolare, i biosensori che utilizzano trasduttori elettrici si dimostrano rapidi, convenienti e sostenibili, risultando soluzioni efficaci in molte applicazioni, principalmente per l'individuazione di malattie *point-of-care*, ossia eseguendo il test nel modo più comodo e immediato per il paziente [6].

Nel caso di biosensori elettrici, sono previste due diverse tipologie di misure: a intensità di polarizzazione fissa con frequenza variabile, ovvero una misurazione di spettroscopia di impedenza elettrochimica standard (EIS) rappresentata da spettri di impedenza [7, 8, 9], oppure a frequenza fissa e intensità di polarizzazione variabile, rappresentata dai grafici corrente (resistenza)-tensione [9]. In entrambi i casi, la variazione di impedenza o corrente serve a rilevare, con elevata specificità e selettività, la presenza di un determinato bersaglio, come pure l'intensità della variazione è anche correlata alla concentrazione del bersaglio [8].

Nei biosensori ottici, invece, si impiegano come recettori le proteine transmembrana dette **opsine**, nelle quali il cambiamento conformazionale successivo all'aggancio della biomolecola con il bersaglio è l'unico cambiamento strutturale che si può osservare. In questo caso, il bersaglio è il fotone, in grado di attivarle quando il retinale, antagonista chimico legato all'opsina e derivato dalla vitamina A, è colpito dalla luce [7, 8, 9].

Modellizzazione delle proprietà elettriche delle biomolecole

La modellizzazione del trasporto di carica nelle biomolecole è un argomento molto intrigante, dal momento che la teoria classica deve essere adattata a sistemi che, pur mostrando un alto grado di organizzazione, non hanno una struttura cristallina. In particolare, in tali sistemi di dimensioni intrinsecamente ridotte, un approccio di campo medio non è significativo, cosicché la descrizione in termini di onde di Bloch (stati estesi, ES) è parzialmente, o totalmente, sostituita introducendo onde a corto raggio (stati localizzati, LS), per riuscire a tener conto dell'organizzazione spaziale del materiale. La transizione tra due stati localizzati avviene con costo energetico mediante meccanismi di *tunneling* o *hopping*. In tal modo, a bassa polarizzazione e temperatura, il meccanismo di trasporto dominante viene eseguito da ES, mentre, aumentando il *bias* e/o la temperatura, il meccanismo di *tunneling* diventa dominante.

All'inizio degli anni '90, questo tipo di descrizione locale è stata superata da una nuova proposta [10] che introduceva il concetto di trasferimento di elettroni per vie multiple, inserendo nella visione del trasporto elettronico aspetti abbastanza macroscopici, come i motivi della struttura secondaria della proteina e l'interazione interna fra gli amminoacidi costituenti. In questa logica si inserisce un approccio innovativo, detto **Proteotronica**, ossia l'elettronica delle proteine, che riesce a descrivere la struttura 3D di una qualunque biomolecola e le interazioni tra i suoi componenti in termini di rete complessa [11].

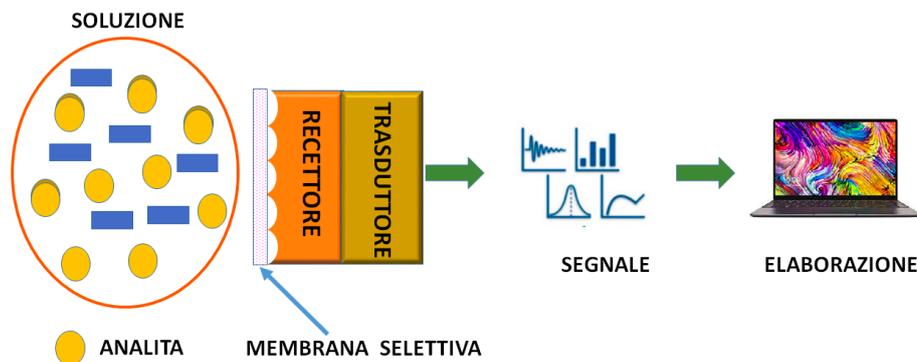


Figura 2: Schema di un biosensore.

Costruzione della rete complessa

Una biomolecola è un oggetto tridimensionale definito formalmente dalle coordinate spaziali dei suoi atomi. Questo arrangiamento spaziale è stato studiato per un gran numero di strutture proteiche attraverso metodi di cristallografia a raggi X e Risonanza Magnetica Nucleare, e depositato in una banca dati, nota come Protein Data Bank [12]. L'elenco delle strutture risolte sperimentalmente è in continuo aggiornamento, consentendo di far luce sui numerosi dubbi relativi alla stretta relazione tra struttura e funzione proteica. Sul Protein Data Bank (PDB) sono ospitate anche le strutture terziarie di un centinaio di attameri complessati con la proteina di riferimento.

Partendo dalle strutture tridimensionali delle biomolecole, è possibile ottenere la rete (grafo) nella quale le posizioni spaziali di tutti gli atomi appartenenti alla catena vengono ricostruite scegliendo come punto di riferimento quella del Carbonio- α (C_α) per la proteina, e del Carbonio-1 (C_1) per l'attamero. A questo punto, la topologia spaziale può essere ulteriormente ridotta a una topologia di contatto, che rappresenta la rete d'interazione tra i residui. Si calcolano quindi tutte le distanze euclidee tra le coppie di C_α/C_1 , creando una matrice di distanza $\Delta = \{\delta_{ij}\}$ in cui l'elemento generico δ_{ij} è la distanza euclidea nello spazio 3D tra il residuo i -esimo e il j -esimo (mantenendo l'ordine della sequenza). La topologia di contatto è pertanto calcolata come: $\delta_{i,j} = 1$ se esiste un collegamento, cioè se la distanza tra i nodi i e j è inferiore alla distanza d'interazione assegnata D ;

$\delta_{i,j} = 0$ se non esiste alcun collegamento, cioè se la distanza tra i nodi i e j è maggiore del valore assegnato. D è un parametro libero, che dipende dal grado di connessione del sistema che si vuole studiare. Al crescere della distanza d'interazione (D) cresce il numero di legami considerati e quindi la connessione del sistema, sebbene la natura del grafo, ovvero le sue proprietà topologiche, sia preservata [13]. Si suppone, inoltre, che non esistano auto-cicli (quindi $\delta_{i,i} = 0$) e nessun collegamento sovrapposto, cioè non ci possa essere più di un collegamento tra i e j e che la matrice sia simmetrica.

L'approccio Proteotronico

Il grafo topologico della biomolecola, derivato come spiegato sopra, diventa una rete di interazione, se si assume che i collegamenti siano i percorsi fisici attraverso i quali i nodi comunicano. Una coppia di contatti ideali viene utilizzata per collegare la rete a una batteria esterna, lavorando in corrente continua e in regime lineare. È quindi possibile descrivere il comportamento del complesso assimilandolo a un circuito elettrico analogico, noto come cella di Randles, in cui la cattura del bersaglio viene rilevata da una variazione di impedenza del tipo:

$$Z_{ij} = f_{ij} \frac{\rho_{ij}}{1 + i\omega\epsilon_0\epsilon_{ij}\rho_{ij}}$$

in cui f_{ij} è un fattore di forma, ω la frequenza della polarizzazione applicata, ϵ_0 la costante dielettrica nel vuoto, ϵ_{ij} e ρ_{ij} sono la resistività e le costanti dielettriche della coppia di nodi ij .

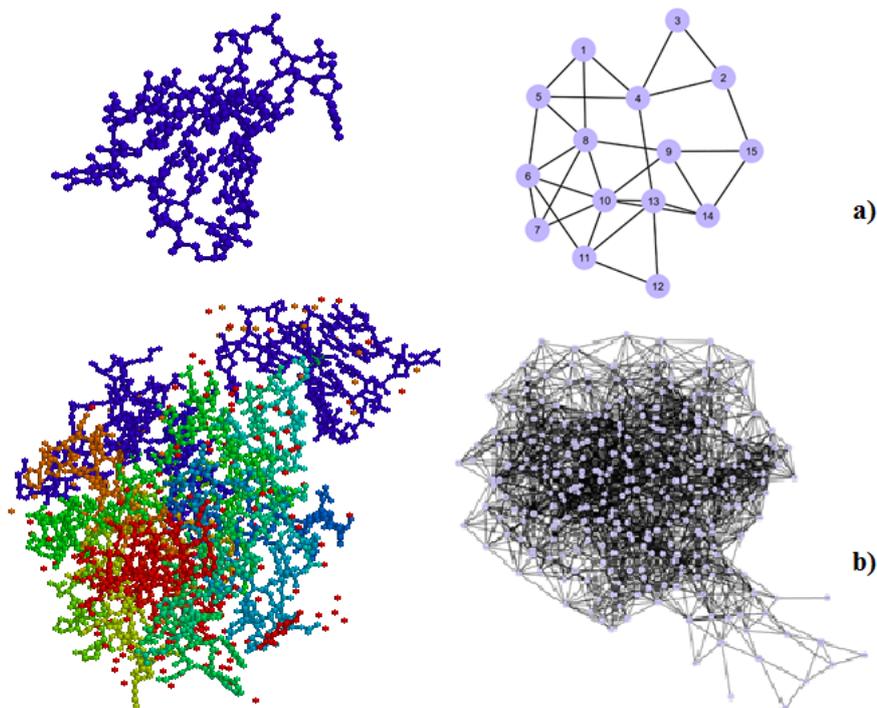


Figura 3: (a) La struttura 3D del TBA allo stato nativo (file PDB 148D) a sinistra e la rete corrispondente a destra, (b) la struttura 3D del complesso TBA+trombina (file PDB 4DII) a sinistra, e la rete corrispondente a destra. In tutti e due i casi $D=10.1 \text{ \AA}$.

Per quanto riguarda i valori di resistività e della costante dielettrica, essi descrivono la resistività media e la costante dielettrica della coppia di nodi che possono essere costituiti da soli amminoacidi, solo basi azotate, oppure un amminoacido e una base azotata (nella regione di legame). Una volta che, formalmente, la rete è collegata alla polarizzazione, l'insieme delle equazioni lineari corrispondenti può essere risolto applicando le leggi di Kirckhoff, cosicché l'impedenza totale si riduce a una semplice resistenza ρ_{ij} quando $\omega = 0$ [11, 14].

Vedremo ora alcuni casi nei quali l'approccio Proteotronico si è rivelato di successo per comprendere alcune proprietà delle biomolecole prese in considerazione, utili soprattutto nel caso di progettazione di biosensori per l'analisi di patologie legate a quelle biomolecole.

L'attamero per la trombina

La trombina è un enzima catalitico che svolge un ruolo chiave durante la coagulazione del sangue, sintetizzando la fibrina dal fibrinogeno, e che ha una vasta gamma di effetti sulla salute nel corpo

umano, preservandolo per esempio dal rischio di trombotosi.

Uno degli oligonucleotidi sintetici più studiati [15] è l'attamero legante la trombina (TBA), un DNA a singolo filamento con sequenza GGTTGGTGTGGTTGG. Essendo una sequenza ricca di guanina (G), si formano quartetti che, impilandosi tra di loro, danno origine a strutture secondarie stabili, dette G-tetraedro. Tali strutture, generate attraverso legami di idrogeno tra quattro guanine, sono stabilizzate dalla presenza di un catione monovalente (solitamente il potassio) che si dispone al centro della tetraide stessa. La loro principale funzione è, probabilmente, quella di attivare o disattivare alcuni processi fisiologici attraverso la regolazione della trascrizione.

Oltre al sito attivo, la trombina è caratterizzata da altri due siti di legame, esosito I ed esosito II. L'esosito I è noto come sito di riconoscimento del fibrinogeno e l'esosito II come sito di legame con l'eparina. L'attività enzimatica della trombina è inibita quando legata al TBA, a causa del blocco del fibrinogeno, facilitando il suo potenziale ruolo di anticoagulante [16]. In Figura 3 è riportato lo schizzo del TBA da solo (a) e coniugato con la trombina (b) e la

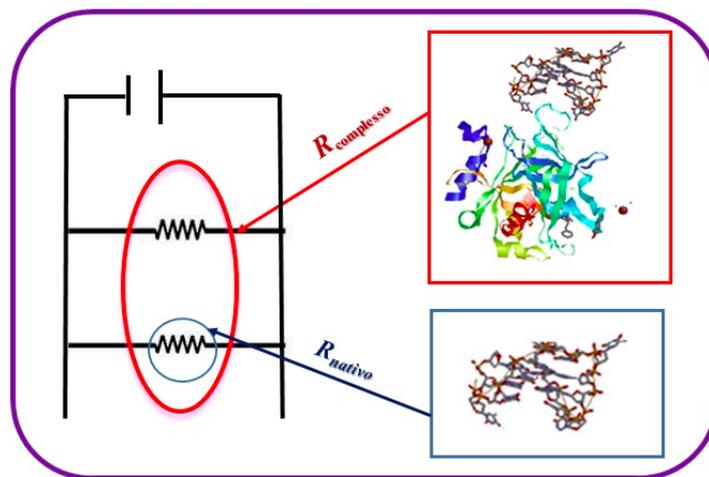


Figura 4: Circuito equivalente per il TBA e la trombina (spiegazione nel testo).

rete corrispondente per ciascuno di essi.

Una volta costruita la rete, è possibile definire il relativo circuito elettrico a scala equivalente, schematizzato in Figura 4, nella quale il ligando può essere descritto come una scala di resistenze collegata ad un'estremità alla batteria esterna; aumentando D , ossia aggiungendo nuovi rami all'estremità opposta, la resistenza totale diminuisce. Se poi si aggiunge il recettore (R_{nativo}), è come inserire un'altra scala di resistenza in parallelo alla prima, quindi la resistenza del complesso ($R_{\text{complesso}}$) è sempre minore di quella del ligando.

R_{nativo} rappresenta sia collegamenti interni che esterni al recettore e dipende dalla dimensione del recettore stesso per cui, aumentando D , il numero di collegamenti interni aumenta e la resistenza diminuisce. Allo stesso tempo, cresce anche il numero di collegamenti esterni, abbassando ulteriormente la resistenza di R_{nativo} . Infine, un recettore di grandi dimensioni può mostrare una resistenza minore rispetto a un recettore di dimensioni inferiori, cioè il suo valore asintotico di $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$ (per grandi valori di D) può essere molto inferiore a 1. D'altra parte, i collegamenti esterni hanno un forte effetto su $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$, perché riducono ulteriormente la resistenza totale. Queste considerazioni sono del tutto generali, quindi vere per tutte le reti complesse, indipendentemente dalla biomolecola studiata.

Studiando le conformazioni fondamentali del TBA in presenza di cationi di potassio e sodio

(K^+ , Na^+), entrambi capaci di rafforzare la stabilità della struttura degli attameri, ma con risultati diversi per quanto riguarda l'affinità, si è osservato che la stabilità del complesso è potenziata da cationi di potassio [15].

Questo risultato è confermato dalla risoluzione della rete di impedenza, tramite la quale è possibile calcolare lo spettro di resistenza per ogni struttura. La Figura 5a mostra il rapporto tra la resistenza del complesso e l'attamero nativo, $R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}}$, a valori crescenti di D . La regione in cui la risposta è in accordo con gli esperimenti ($R_{\text{complesso}}/R_{\text{nativo}} > 1$) è ben definita, tra 8-12 Å, e al suo interno la risposta del complesso risolto in presenza di sodio è sicuramente la minore.

È interessante notare come una discriminazione tra le due strutture in presenza di cationi (K^+ , Na^+) sia confermata anche dallo studio del grafo della rete attamero+proteina con i paradigmi della Teoria dei Grafi, specialmente in termini di gerarchia e assortatività [17]. La gerarchia descrive la struttura di una rete attraverso il raggruppamento gerarchico dei suoi nodi, utile a identificare alcune proprietà comuni delle diverse reti complesse. In linea di principio, l'assortatività è direttamente correlata alla gerarchia della rete in termini di connettività. Un distacco di un nodo di alto grado (hub), o un attaccamento mirato in una rete disassortativa, lascerebbe altri nodi di alto grado connessi ai nodi periferici (resilienza). Ciò ridurrebbe al minimo la possibilità che la rete nel suo complesso si discon-

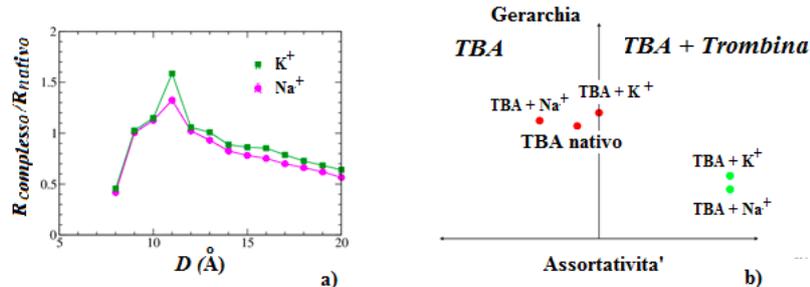


Figura 5: a) Spettri di variazione di resistenza per TBA in presenza di sodio e potassio. Il complesso TBA-proteina ha una resistenza maggiore di quella del solo TBA in un intervallo di valori D vicino a 11 Å. Nell'intero intervallo dei valori di D il rapporto di resistenza del complesso ottenuto in presenza di sodio è maggiore di quelli ottenuti in presenza di potassio. b) Grafico gerarchia-assortatività dell'attamero TBA. A sinistra il solo attamero, allo stato nativo o nella configurazione che assume quando è legato al recettore, in presenza di due diversi cationi. A destra la coppia TBA-trombina, in presenza dei cationi.

netta. In una rete assortiva, gli hub sono collegati tra loro, quindi il distacco di un nodo di alto grado avrebbe un impatto maggiore sulla connettività della rete stessa. Si è osservato che l'analogo di rete dell'attamero cambia la sua assortatività da negativa a positiva aggiungendo la trombina, ciò significa che la rete che descrive l'attamero complessato con la proteina è meno soggetta a influenze esterne, cioè è più stabile di quella che descrive l'attamero da solo.

Studiando l'attamero libero (TBA) e in presenza dei cationi, gerarchia e assortatività sono riassunte nella Figura 5b, che fornisce uno schizzo delle due misure per le reti considerate. Solo le strutture *target-free*, a destra, hanno valori positivi di assortatività, mentre le stesse strutture hanno una gerarchia più alta rispetto al complesso, cioè sono meno stabili [13]. In altri termini, l'attamero in presenza di sodio è più stabile dell'attamero in presenza di potassio, cioè ha una ridotta necessità di legare la proteina per rafforzare la stabilità (bassa affinità di legame). Questi risultati sono in perfetto accordo con quanto riportato in letteratura [15].

Le citochine

Le citochine sono una famiglia di proteine che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione del sistema immunitario e nello sviluppo di diverse malattie, dall'artrite reumatoide al cancro e, recentemente, al COVID-19 [18]. L'interleuchina 6 (IL-6) è una citochina proinfiammatoria che

regola le infiammazioni, la febbre, il sonno, l'ematopoiesi (formazione delle cellule ematiche) e la distruzione ossea [19]. Essa è sintetizzata nella fase iniziale dell'infiammazione e si sposta nel fegato attraverso il flusso sanguigno, seguita dalla rapida induzione di una vasta gamma di proteine di fase acuta come la proteina C-reattiva (CRP), l'amiloide sierica A (SAA), il fibrinogeno, l'aptoglobina e l' α_1 -antichimotripsina [20]. Alti livelli di citochina IL-6 sono stati rilevati in pazienti COVID-19, tanto che in Cina a un gruppo di pazienti affetti da questa patologia sono stati somministrati inibitori specifici di IL-6 e della Janus chinasi (JAK). Il risultato è stato un miglioramento della salute con modesti effetti collaterali, tanto da suggerire l'uso di terapia antagonista di IL-6 non solo contro il COVID-19, ma anche nel trattamento di altri virus letali [18, 21]. Sono presenti, poi, in letteratura varie ricerche che dimostrano come gli agenti antinfiammatori attenuino la crescita del tumore al seno, come pure la relazione tra l'infiammazione e vari tipi di cancro è suffragata da parecchi studi.

Come antagonista di IL-6 e per il trattamento di varie malattie immuno-mediate, una nuova strategia di contrasto ha sviluppato Tocilizumab, un farmaco derivato da anticorpi monoclonali anti-IL-6 R di classe immunoglobuline IgG1. Questo farmaco immunosoppressore era stato studiato soprattutto per il trattamento dell'artrite reumatoide e dall'artrite idiopatica giovanile sistemica, ma durante la pandemia Tocilizumab è stato impiegato con successo nella cura clinica della polmonite grave da

COVID-19. Il meccanismo di inibizione di IL-6 è stato studiato anche tramite l'anticorpo clinico Ollokizumab (OKZ), soprattutto nel caso di artrite reumatoide.

Vedremo allora come la Proteotronica possa svolgere un ruolo importante nella valutazione di quanto bene una biomolecola si adatti al suo bersaglio, dimostrando come molte utili informazioni possano essere dedotte su una vasta gamma di recettori pensati per l'interleuchina 6.

Spazieremo dal recettore gp130 complessato sia con IL-6 naturale che con una sua subunità (IL-6R) includendo la citochina complessata con alcuni anticorpi del tipo frammenti leganti l'antigene (Fab 68F2, Fab OKZ e Fab 61H7) e un attamero modificato (SOMAmer), progettato con una tecnica nota come Slow-Off-Rate (bassa dissociazione con il ligando), pensata proprio per esaltare l'associazione a ligandi solitamente abbastanza difficili da legare. Sul Protein Data Bank (PDB), sono depositate le strutture 3D di IL-6 allo stato nativo [22], cioè al minimo di energia conformazionale, che complessata anche con diversi recettori [19, 23], dell'attamero SOMAmer SL1025 (ID PDB: 4ni9 [19, 28]), dell'anticorpo umanizzato OKZ (ID PDB: 4cni [27]) e dei due anticorpi derivati dai Camelidi Fabs (ID PDB: 4o9h [29]) e (ID PDB: 4zs7 [26]).

Attraverso la rete equivalente [11] della biomolecola (recettore, ligando o loro complesso) è possibile ricavare lo spettro di resistenza $R(D)$, dove $R = R_{\text{complesso}}/R_{\text{IL-6}}$ è il rapporto tra la resistenza calcolata del complesso IL-6+recettore rispetto alla resistenza di IL-6 da solo, D è la distanza d'interazione tra i nodi del circuito, non tenendo conto delle specifiche proprietà elettroniche di ciascun nodo e assumendo invece per tutti lo stesso valore di resistività (qui $\rho = 10^{14}\Omega \text{ \AA}$) [24].

Entrando nello specifico del circuito (Figura 6e), ponendo i contatti elettrici su IL-6 (di seguito, il ligando), si ottiene una sorgente di corrente elettrica che scorre attraverso il recettore, il ligando, e i collegamenti esterni tra recettore e ligando. Il ligando può essere descritto come una scala di resistenze (L1) collegata ad un'estremità della batteria esterna che lavora in corrente continua e in regime lineare; aumentando D , vengono aggiunti nuovi rami all'estremità opposta e la resistenza totale diminuisce [17], di fatto dipenden-

do dalle dimensioni del recettore. Aggiungere il recettore equivale a inserire un'altra scala di resistenza (L2) che tiene conto dei collegamenti interni al recettore e dei collegamenti esterni. Essa è in parallelo con L1, e quindi la resistenza del complesso è sempre minore di quella del ligando. Infine, un recettore grande può mostrare una resistenza minore di un recettore piccolo, cioè il suo valore asintotico di resistenza (per grandi valori di D) può essere molto inferiore a 1. Questi comportamenti sono meglio evidenziati in Figura 6 (a - d) che illustra i valori dello spettro di resistenze per diverse configurazioni di IL-6 con tutti i recettori studiati, variando sia la distanza D d'interazione tra i nodi che la posizione dei contatti all'interno del ligando.

Diversi circuiti sono presi in considerazione.

- (a) eliche A (ingresso) - D (uscita), vicine all'N-terminale che è l'estremità di una catena di amminoacidi che termina con un gruppo amminico, a partire dalla glucina (GLU10) e chiudendo con la metionina (MET171);
- (b) eliche A (uscita) - D (ingresso), quindi con orientazione contraria ad (a), a partire dalla treonina (THR30) finendo con l'asparagina (ASN142);
- (c) eliche A (ingresso) - C (uscita) a partire dalla treonina (THR30) e finendo con l'alanina (ALA117);
- (d) ingresso/uscita solo sull'elica B, a partire da asparagina (ASN66) e finendo con serina (SER95) [24].

Ovviamente, la scelta di eliche e amminoacidi ha tenuto conto delle caratteristiche chimiche dei composti, come note dalla letteratura. La configurazione (a) rappresenta il sito I, ossia quella piccola parte (epitopo) dell'antigene che lega l'anticorpo specifico. Il sito II, configurazione (b), rappresenta la parte in cui gp130 lega IL-6. Nella configurazione (c), a causa del ruolo primario dell'elica C nel legame naturale di IL-6, una coppia di contatti viene posta anche sulle eliche A e C e, infine nella configurazione (d) si sceglie una posizione intermedia, con entrambi i contatti posti sull'elica B.

Alcuni interessanti comportamenti vengono in luce: pur essendo più piccolo di IL-6R & gp130,

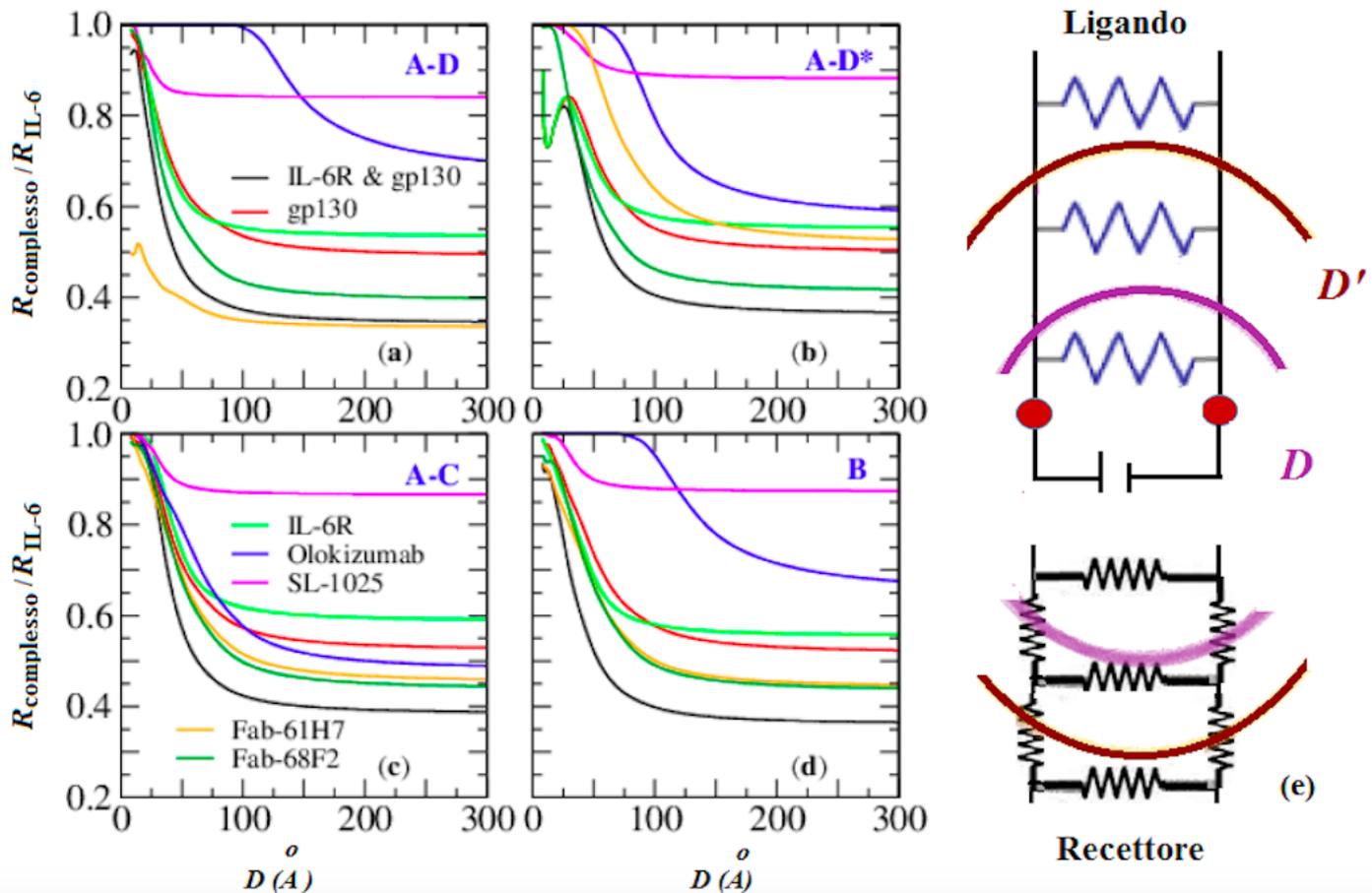


Figura 6: Grafici della resistenza relativa di IL-6 complessato con diversi recettori. I contatti elettrici ideali sono: (a) sulle eliche A – D vicine all’N-terminale, ingresso/uscita GLU10/MET171; (b) sulle eliche A – D al contrario orientamento (A – D*), ingresso/uscita THR30/ASN142; (c) sulle eliche A–C, ingresso/uscita THR30/ALA117; (d) sull’elica B, ingresso/uscita ASN66/SER95; (e) schema del circuito ideale utilizzato per descrivere le proprietà elettriche dei vari complessi (da [24]).

Fab 61H7 a Fab 61H7, di conseguenza ha un valore di R più alto, ma non così alto come potrebbe suggerire l’effetto della dimensione: in questo caso, più collegamenti esterni contribuiscono a ridurre R . Dalle evidenze raccolte, si può concludere che il valore asintotico dello spettro di resistenza è influenzato sia dalla dimensione del recettore che dal collegamento esterno.

Calcolando R per quattro diverse posizioni di contatto, in modo da tenere in conto i diversi modi in cui i recettori legano la proteina, si è osservato come il profilo di $R(D)$ dipenda dalle posizioni di contatto, talvolta con differenze molto drammatiche.

Questo è il caso del Camelide Fab 61H7 e di OKZ: Fab 61H7 lega IL-6 nel Sito I, e quindi i contatti sulla prima posizione (Figura 6a) danno un valore molto basso del massimo di R , una forte diminuzione e un basso valore asintotico

(flusso maggiore all’interno del recettore rispetto al ligando). Al contrario, quando si mettono i contatti nella seconda posizione (Figura 6b), si riscontra un valore maggiore del massimo, una diminuzione più dolce e un maggiore valore asintotico (cioè una corrente minore nel recettore). Si ottiene un risultato speculare per OKZ, che ha il Sito II come sede di legame. Infine, né i contatti sull’elica B (Figura 6d) né su quella C migliorano le risposte date dai contatti posti sulle eliche A e D (Figure 6b e 6c).

Infine, interessanti conclusioni si sono ottenute dal calcolo della superficie equivalente ToCI (Indice Topologico Complementare) del contatto ligando-recettore, definita come l’area di R sotto l’altezza sensibile (cioè la differenza tra il valore di R per ogni D e il suo valore asintotico) e sopra il range sensibile di D (cioè l’intervallo dal valore minimo di D , qui 8 Å, e il valore corri-

spondente al 90% dell'altezza massima sensibile), divisa per il rapporto tra il numero di nodi complesso/proteina. Si è dedotto, infatti, che tre dei quattro recettori: Fab 61H7 (ToCI=1.2), SOMA-mer SL1025 (ToCI=1.6), quando legato al Sito I, e OKZ (ToCI=1.9), quando legato in un sito che costringe alcuni amminoacidi della citochina a forma di spirale a deformarsi in una piccola elica che occlude il sito di legame gp130, sono pressoché equivalenti, per cui potrebbero funzionare molto bene nel rilevamento di IL-6 [24].

Questo risultato non era prevedibile considerando quanto riportato in letteratura, in cui per l'attamero SL1025 alcuni parametri chimici lo caratterizzano con adattabilità per l'interleuchina-6 consistentemente differente rispetto a quella delle altre biomolecole prese in esame.

Conclusioni

Questo articolo ha illustrato come poter studiare le caratteristiche delle biomolecole nel paradigma della Proteotronica, ossia analizzandole in termini di reti complesse assimilabili a circuiti elettrici. È stato dimostrato l'importante potenziale di questo approccio al fine di decifrare informazioni essenziali per trovare bersagli farmacologici e per progettare biosensori, da impiegare nella diagnostica e nella cura di malattie.

Uno dei risultati più sorprendenti è che, sebbene differiscano in gran parte negli elementi di base, questi sistemi condividono dinamiche collettive simili e organizzazioni strutturate che ne rendono robusto l'impianto teorico e interessanti le ricadute.

Infine, anche se non di minore importanza, è stato evidenziato come abbia senso esplorare con queste metodiche derivate dalla Fisica aree della ricerca chimica e biologica con forte impatto sulla salute.



- [1] A. D. Ellington, J. W. Szostak: *In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands*, Nature, 346 (1990) 818.
- [2] C. Tuerk, L. Gold: *Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA*, Science, 249 (1990) 505.
- [3] Y. Lyu *et al.*: *Generating cell targeting aptamers for nanotheranostics using cell-SELEX*, Theranostics, 6 (2016) 1440.
- [4] R. Cataldo, M. Leuzzi, E. Alfinito: *Modelling and development of electrical aptasensors: a short review*, Chemosensors, 6 (2018) 20.
- [5] C. Chen, S. Zhou, Y. Cai, F. Tang: *Nucleic acid aptamer application in diagnosis and therapy of colorectal cancer based on cell-SELEX technology*, NPJ precision oncology, 1 (2017) 1.
- [6] Z. G. Yu, R. Y. Lai: *A reagentless and reusable electrochemical aptamer-based sensor for rapid detection of ampicillin in complex samples*, Talanta, 176 (2018) 619.
- [7] E. Alfinito, L. Reggiani: *Role of topology in electrical properties of bacterio-rhodopsin and rat olfactory receptor 17*, Physical Review E, 81 (2010) 032902.
- [8] E. Alfinito, J. F. Millithaler, L. Reggiani, N. Zine, N. Jaffrezic-Renault: *Human olfactory receptor 17-40 as an active part of a nanobiosensor: a microscopic investigation of its electrical properties*, Rsc Advances, 1 (2011) 123.
- [9] E. Alfinito, J. F. Millithaler, L. Reggiani: *Charge transport in purple membrane monolayers: A sequential tunneling approach*, Physical Review E, 83 (2011) 042902.
- [10] J. J. Regan, S. M. Risser, D. N. Beratan, J. N. Onuchic: *Protein electron transport: Single versus multiple pathways*, The Journal of Physical Chemistry, 97 (1993) 13083.
- [11] E. Alfinito, J. Pousset, L. Reggiani: *Proteotronics: Development of Protein-Based Electronics*, Pan Stanford Publishing, Singapore (2015).
- [12] H. M. Berman *et al.*: *The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics*, Nature structural biology, 7 (2000) 957.
- [13] R. Cataldo, E. Alfinito, L. Reggiani: *Hierarchy and assortativity as new tools for binding-affinity investigation: the case of the TBA aptamer-ligand complex*, IEEE transactions on nanobioscience, 16 (2017) 896.
- [14] E. Alfinito, L. Reggiani, R. Cataldo, G. De Nunzio, L. Giotta, M. R. Guascito: *Modeling the microscopic electrical properties of thrombin binding aptamer (TBA) for label-free biosensors*, Nanotechnology, 28 (2017) 065502.
- [15] I. Russo Krauss *et al.*: *High-resolution structures of two complexes between thrombin and thrombin-binding aptamer shed light on the role of cations in the aptamer inhibitory activity*, Nucleic acids research, 40 (2012) 8119.
- [16] A. Gosai, X. Ma, G. Balasubramanian, P. Shrotriya: *Electrical stimulus controlled binding/unbinding of human thrombin-aptamer complex*, Scientific Reports, 6 (2016) 1.
- [17] R. Albert, A. L. Barabási: *Statistical mechanics of complex networks*, Rev. Mod. Phys., 74 (2002) 47.
- [18] HLH Across Speciality Collaboration, P. Mehta *et al.*: *COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*, Lancet, 395 (2020) 1033.
- [19] A. D. Gelinas *et al.*: *Crystal structure of interleukin-6 in complex with a modified nucleic acid ligand*, Journal of Biological Chemistry, 289 (2014) 8720.

- [20] P. C. Heinrich, J. V. Castell, T. Andus: *Interleukin-6 and the acute phase response*, *Biochemical journal*, 265 (1990) 621.
- [21] J. B. Moore, C.H June: *Cytokine release syndrome in severe COVID-19*, *Science*, 368 (2020) 473.
- [22] E. Somers, M. Stahl, J. S. Seehra: *A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling*, *The EMBO journal*, 16 (1997) 989.
- [23] B. Bonanni *et al.*: *Single molecule recognition between cytochrome C 551 and gold-immobilized azurin by force spectroscopy*, *Biophysical Jour.*, 89 (2005) 2783.
- [24] E. Alfinito, M. Beccaria, M. Ciccarese: *Biosensing cytokine IL-6: A comparative analysis of natural and synthetic receptors*, *Biosensors*, 10 (2020) 106.
- [25] M. Boulanger, D. C. Chow, E. E. Brevnova, K. C. Garcia: *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 α -receptor/gp130 complex*, *Science*, 300 (2003) 2101.
- [26] C. Blanchetot *et al.*: *Structural mimicry of receptor interaction by antagonistic interleukin-6 (IL-6) antibodies*, *Jour. of Biological Chemistry*, 291 (2016) 13846.
- [27] S. Shaw *et al.*: *Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling*, In *Mabs* (Vol. 6, No. 3, pp. 773-781) Taylor & Francis, Milton Park (UK) (2014).
- [28] M. Hirota *et al.*: *Chemically modified interleukin-6 aptamer inhibits development of collagen-induced arthritis in cynomolgus monkeys*, *Nucleic acid therapeutics*, 26 (2016) 10.
- [29] A. Klarenbeek *et al.* : *Combining somatic mutations present in different *in vivo* affinity-matured antibodies isolated from immunized Lama glama yields ultra-potent antibody therapeutics*, *Protein Engineering Design and Selection*, 29 (2016) 123.



Rosella Cataldo: è ricercatrice confermata di Informatica (INF/01), Università del Salento. Collabora con gruppi di ricerca interessati allo studio di metodologie statistico-computazionali per la modellazione della risposta fisica di biomateriali, e nell'utilizzo di metodiche di analisi in immagini biomediche.

