

## RIASSUNTO

La galattosemia classica è un disturbo metabolico genetico raro causato da mutazioni che compromettono l'attività e la stabilità dell'enzima dimerico galattosio-1-fosfato uridiltransferasi (GALT), che catalizza la terza fase del metabolismo del galattosio. Tra le oltre 300 mutazioni note, p.Gln188Arg, una mutazione missenso situata nel sito attivo e all'interfaccia del dimero, è la più frequentemente riscontrata per l'enzima GALT. Essa causa l'inattivazione quasi totale dell'enzima e ne compromette la stabilità, determinando il fenotipo più grave della malattia. In passato, e più recentemente, gli effetti strutturali di questa mutazione sono stati dedotti dalla struttura statica dell'enzima umano wild-type; tuttavia, abbiamo ritenuto che una visione dinamica della proteina fosse necessaria per comprenderne a fondo il comportamento e ottenere suggerimenti per possibili interventi terapeutici. Abbiamo, perciò, eseguito simulazioni di dinamica molecolare della proteina GALT wild-type e del mutante p.Gln188Arg, in assenza o in presenza dei substrati, in diverse condizioni di temperatura. I nostri risultati suggeriscono l'importanza delle interazioni intersubunitarie per una corretta attività di questo enzima e possono essere utilizzati come punto di partenza per la ricerca di farmaci in grado di ripristinare l'attività di questo enzima nei pazienti galattosemici.

Poiché l'attuale trattamento della malattia (l'eliminazione del galattosio dalla dieta) non è adeguato a risolvere la disabilità fisica e cognitiva dei pazienti galattosemici, che può durare tutta la vita, alcuni gruppi di ricerca hanno iniziato a cercare farmacochaperoni per GALT. I farmacochaperoni sono piccole molecole, in grado di legare specifiche proteine bersaglio, che possono stabilizzare la loro conformazione nativa o addirittura correggere il misfolding di proteine affette da mutazioni, ripristinando così la loro funzione originale. In particolare, si è scoperto che l'arginina era in grado di ripristinare l'attività di diversi enzimi mutanti di GALT, tra cui p.Gln188Arg, in un modello batterico della malattia. Tuttavia, recentemente, testando l'arginina direttamente su quattro pazienti galattosemici affetti dalla mutazione p.Gln188Arg, questo ripristino

funzionale non è stato confermato. Dato che non sono state effettuate caratterizzazioni molecolari dei possibili effetti dell'arginina nei confronti di GALT e dato che il numero di pazienti trattati con arginina è estremamente limitato per trarre conclusioni definitive a livello clinico, abbiamo effettuato simulazioni computazionali per prevedere le interazioni (se esistono) tra questo aminoacido e l'enzima. I nostri risultati non supportano la possibilità che l'arginina possa funzionare come farmacochaperone per GALT, ma le informazioni ottenute da questo studio potrebbero essere utili per identificare, in futuro, possibili farmacochaperoni per questo enzima.

Allo stesso tempo, ci siamo chiesti se potesse esistere un sito allosterico nell'enzima GALT e se potesse essere usato come bersaglio per sviluppare nuovi farmacochaperoni per questo enzima. Attraverso un predittore computazionale e considerando i nostri precedenti risultati, abbiamo identificato un potenziale sito allosterico corrispondente anche alla porzione di interazione dell'enzima con l'arginina. Questo potenziale sito allosterico può essere un bersaglio per nuovi farmacochaperoni, che abbiamo identificato come candidati per l'enzima GALT umano.

Mediante docking molecolare, è stata simulata una possibile interazione tra i nuovi farmacochaperoni e le proteine GALT wild type e p.Gln188Arg. Partendo dalla migliore conformazione del docking, il passo successivo è stato quello di procedere con la ricerca di farmacofori, utilizzando un metodo chiamato "receptor-based". Ciò ha portato all'identificazione di cinque nuovi ligandi, che sono stati selezionati per un ulteriore docking sul sito allosterico. Una prima analisi rivela che tutti i ligandi selezionati hanno dato risultati promettenti. Questi risultati sono stati utilizzati per impostare ulteriori studi di dinamica molecolare, che sono attualmente in corso. Inoltre, risultati preliminari eseguiti su fibroblasti di pazienti galattosemici hanno suggerito che questi composti siano in grado di migliorare l'attività dell'enzima.

Test preliminari di questi ligandi su fibroblasti di pazienti galattosemici hanno mostrato la capacità di tutti di abbassare la concentrazione di galattosio-1-fosfato quando i fibroblasti sono stressati dal galattosio. Questi dati preliminari devono ovviamente

essere confermati, ma sono dati promettenti per lo sviluppo di una terapia basata su farmacochaperoni per la galattosemia.

