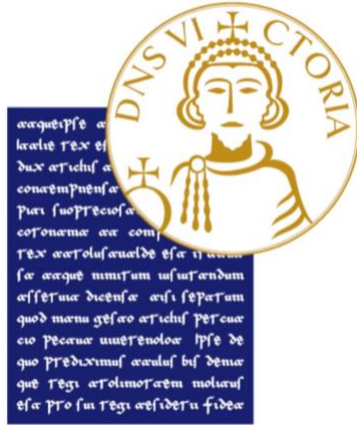




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL SANNIO

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Corso di Laurea in Biotecnologie

Tesi di Laurea in

Bioinformatica

ANALISI STRUTTURALE DELLE INTERAZIONI TRA PROTEINE VIRALI HPV, P53 E PEP11 MEDIANTE STRUMENTI DI SIMULAZIONE E INTELLIGENZA ARTIFICIALE

Relatore:

Ch.mo Prof.
Francesco Napolitano

Candidato:

Mario Loiola
Matr.171005926

A.A. 2025/2026

INDICE

INTRODUZIONE.....pag. 3

CAPITOLO I – HPV e meccanismi oncogenicipag. 5

- * 1.1 Papillomavirus umano (HPV)
- * 1.2 Genotipi
- * 1.3 HPV e cancro cervicale
- * 1.4 Meccanismi di degradazione di p53
- * 1.5 L'oncoproteina E6 come bersaglio terapeutico

CAPITOLO II – Funzione e Applicazione di Pep11pag. 9

- * 2.1 Origine e identificazione del peptide Pep11
- * 2.2 Peptidi di penetrazione cellulare (CPP)
- * 2.3 Sviluppo del CPP-Pep11
- * 2.4 Studi sperimentali
- * 2.5 Razionale del presente studio

**CAPITOLO III – Metodi computazionali
e strumenti di simulazione e intelligenza artificialepag. 14**

- * 3.1 AlphaFold 3 (predizione strutturale)
- * 3.2 AutoDock Vina (docking molecolare)
- * 3.3 ChimeraX (visualizzazione strutturale)
- * 3.4 AutoDock Tools (preparazione sistemi)
- * 3.5 Workflow completo

CAPITOLO IV – Risultati e discussione.....pag. 24

- * 4.1 Predizione strutturale e complessi ottenuti mediante Alphafold 3
- * 4.2 Docking molecolare, complessi ottenuti mediante Autodock Vina e visualizzati in ChimeraX
- * 4.3 Analisi dei complessi visualizzati in ChimeraX
- * 4.4 Analisi delle interazioni molecolari

CONCLUSIONI.....pag. 41

BIBLIOGRAFIA.....pag. 43

INTRODUZIONE

Il carcinoma della cervice uterina rappresenta una delle neoplasie più diffuse nella popolazione femminile a livello mondiale.

Numerose evidenze scientifiche hanno dimostrato che l'infezione persistente da Human Papillomavirus, in particolare dai ceppi ad alto rischio oncogeno, costituisce il principale fattore eziologico associato allo sviluppo di questa patologia.

Tra le proteine virali coinvolte nel processo di trasformazione cellulare, la proteina E6 svolge un ruolo fondamentale, poiché è in grado di interferire con importanti meccanismi di regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi, favorendo la proliferazione incontrollata delle cellule infettate. Negli ultimi anni, la ricerca scientifica ha rivolto crescente attenzione all'identificazione di molecole in grado di inibire l'attività della proteina E6, con l'obiettivo di sviluppare nuove strategie terapeutiche mirate. In questo contesto, i peptidi rappresentano una promettente classe di composti biologicamente attivi grazie alla loro elevata specificità di legame verso bersagli proteici.

Tra questi, il peptide Pep11 ha mostrato la capacità di interagire con la proteina E6, suggerendo un potenziale impiego come inibitore dell'attività oncogenica mediata dal virus.

Parallelamente ai progressi della biologia molecolare, lo sviluppo di metodologie computazionali ha rivoluzionato lo studio delle biomolecole.

Tecniche di modellazione strutturale e simulazione consentono, infatti, di analizzare le interazioni molecolari in modo rapido ed efficiente, riducendo tempi e costi rispetto alle tradizionali procedure sperimentali.

In particolare, gli strumenti basati sull'intelligenza artificiale hanno raggiunto livelli di accuratezza senza precedenti nella predizione delle strutture proteiche e dei complessi biomolecolari.

Tra le tecnologie più innovative in questo ambito vi è AlphaFold 3, un sistema di intelligenza artificiale sviluppato per prevedere con elevata precisione la struttura tridimensionale di proteine e complessi molecolari. Per lo studio delle modalità di interazione tra biomolecole è inoltre

ampiamente utilizzato AutoDock Vina, software che permette di simulare il legame tra un recettore e un ligando, fornendo una stima dell'affinità di legame e delle possibili conformazioni del complesso.

L'analisi e la visualizzazione delle strutture ottenute possono infine essere effettuate mediante UCSF ChimeraX, uno strumento avanzato per l'esplorazione e la rappresentazione grafica di macromolecole biologiche.

L'obiettivo del presente lavoro è analizzare l'interazione tra la proteina E6 e il peptide Pep11 mediante un approccio computazionale integrato. In particolare, verranno utilizzati AlphaFold 3 per la predizione strutturale del complesso, AutoDock Vina per lo studio delle modalità di legame e ChimeraX per l'analisi delle interazioni intermolecolari e la visualizzazione dei residui coinvolti nel riconoscimento molecolare.

Attraverso tali strumenti sarà possibile ottenere informazioni utili alla comprensione dei meccanismi di interazione tra E6 e Pep11 e valutare il potenziale del peptide come candidato inibitore dell'attività oncogenica della proteina virale.

CAPITOLO I

HPV E MECCANISMI ONCOGENI

1.1 Il papillomavirus umano (HPV) è un virus a DNA appartenente alla famiglia Papillomaviridae, caratterizzato da un tropismo specifico per le cellule epiteliali squamose della cute e delle mucose [1].

Si tratta di piccoli virus non enveloped con un capsido icosaedrico e un genoma a DNA circolare a doppio filamento di circa 8 kb [1].

Il genoma dell'HPV è organizzato in tre regioni principali: una regione precoce (E), una regione tardiva (L) e una regione regolatoria non codificante, nota come long control region (LCR).

I geni precoci (E1–E7) sono coinvolti nella replicazione virale e nella modulazione del ciclo cellulare dell'ospite, mentre i geni tardivi (L1 e L2) codificano per le proteine strutturali del capsido virale [1,2].

L1 e L2 giocano un ruolo fondamentale nella formazione del capsido virale e nei processi di infezione iniziale, mediando il riconoscimento e l'ingresso nelle cellule epiteliali basali.

In particolare, L1 costituisce la principale componente del capsido, mentre L2 facilita il trasporto del genoma virale all'interno del nucleo cellulare.

Il ciclo vitale dell'HPV è strettamente dipendente dalla differenziazione delle cellule epiteliali. L'infezione avviene attraverso microlesioni dell'epitelio, che permettono al virus di raggiungere lo strato basale, dove stabilisce un'infezione persistente.

La replicazione virale è strettamente regolata dalla differenziazione cellulare, consentendo la produzione di virioni maturi negli strati più superficiali dell'epitelio senza causare immediata lisi cellulare [2].

Una caratteristica fondamentale dell'HPV è la sua capacità di instaurare infezioni persistenti, condizione necessaria per lo sviluppo delle lesioni precancerose e del carcinoma invasivo [3].

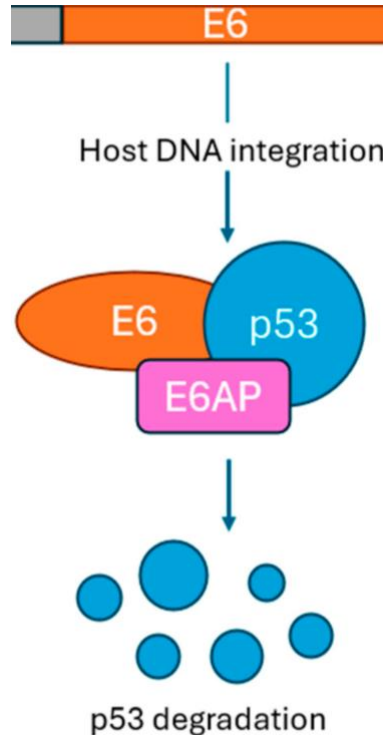
1.2 I papillomavirus umani sono classificati in base al potenziale oncogeno in genotipi a basso e ad alto rischio. I tipi a basso rischio, come HPV6 e HPV11, sono associati principalmente a lesioni benigne quali verruche genitali e papillomi laringei [4]. I tipi ad alto rischio sono invece

strettamente correlati allo sviluppo di tumori maligni, in particolare al carcinoma della cervice uterina [4].

Tra i genotipi ad alto rischio, HPV16 e HPV18 rappresentano i più rilevanti a livello globale, essendo responsabili della maggior parte dei casi di carcinoma cervicale [5]. Altri genotipi oncogeni includono HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV52 e HPV58, che contribuiscono in modo significativo all'incidenza complessiva della malattia [5].

La classificazione oncogenica è basata sulla capacità dei diversi genotipi di integrare il proprio DNA nel genoma dell'ospite e di interferire con il controllo del ciclo cellulare. I genotipi ad alto rischio sono caratterizzati da una maggiore probabilità di persistenza dell'infezione e da una più efficiente espressione delle oncoproteine virali E6 ed E7, che inattivano i principali soppressori tumorali cellulari [3,5].

Oltre alla classificazione oncogenica, i papillomavirus possono essere ulteriormente suddivisi in generi filogenetici, tra cui Alphapapillomavirus, che include i principali ceppi associati a infezioni mucosali e carcinogenesi, e Betapapillomavirus, più frequentemente associati a infezioni cutanee asintomatiche.



1.3 Il cancro cervicale continua a rappresentare una delle principali sfide per la salute globale, classificandosi come la quarta malignità più comune tra le donne in tutto il mondo sia per incidenza che per mortalità, con una stima di 660.000 nuovi casi e 350.000 decessi segnalati nel 2022 [6].

L'infezione persistente con papillomavirus umani (HPV) è la causa eziologica ben consolidata del cancro cervicale [7]. Il potenziale oncogenico dell'HPV varia a seconda del genotipo, con HPV16, HPV18 e HPV45 che conferiscono un rischio particolarmente elevato di progressione delle lesioni intraepiteliali al cancro cervicale invasivo [8].

In tutto il mondo, la distribuzione dei genotipi cancerogeni più prevalenti, comprendenti HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV45, HPV52, HPV58, è generalmente coerente in diverse regioni geografiche [9].

Collettivamente, questi genotipi rappresentano circa il 91% dei casi di cancro cervicale a livello globale, con HPV16 e HPV18 da soli responsabili di circa il 71% dei casi [10].

La progressione verso il carcinoma cervicale non è immediata, ma avviene attraverso stadi precancerosi definiti neoplasie intraepiteliali cervicali (CIN), classificabili in base al grado di displasia cellulare.

Questo processo può richiedere diversi anni e risulta fortemente influenzato dalla persistenza dell'infezione virale e dalla risposta immunitaria dell'ospite.

1.4 Un evento centrale nella carcinogenesi cervicale è l'integrazione del DNA virale nel genoma ospite, che spesso interrompe il quadro di lettura aperto E1/E2, con conseguente perdita della proteina funzionale E2 [11].

La perdita dell'attività E2 come repressore trascrizionale del promotore precoce consente l'espressione sostenuta delle oncoproteine virali E6 ed E7 nell'epitelio cervicale, che è fondamentale sia per l'inizio che per il mantenimento del fenotipo maligno [12].

Queste oncoproteine guidano la carcinogenesi inattivando i soppressori del tumore p53 e della proteina retinoblastoma (pRb), così come molte altre proteine cellulari, causando proliferazione cellulare incontrollata e instabilità genomica.

Il complesso E6/E6AP funziona come una ubiquitina ligasi di tipo E3, in grado di riconoscere e marcare p53 per la degradazione proteasomica.

Questo processo determina una riduzione dei livelli intracellulari di p53, compromettendo i principali meccanismi di checkpoint del ciclo cellulare [13,14,15].

1.5 La proteina HPV16 E6 è una sequenza di 151 aminoacidi contenente due domini di legame dello zinco che, insieme al motivo LxxLL di E6AP, formano una fessura di legame per il dominio centrale di p53, consentendo la sua degradazione mirata [16].

L'ubiquitinazione mediata da E6/E6AP e la degradazione proteasomica di p53 interrompe la regolazione del ciclo cellulare e l'apoptosi, promuovendo l'instabilità genomica e la progressione della carcinogenesi cervicale [17].

È importante sottolineare che i carcinomi cervicali HPV-positivi e le loro linee cellulari derivate generalmente mantengono il p53 wild type, che è funzionalmente inattivato dall'oncoproteina E6, rendendo l'interruzione di questa interazione una strategia terapeutica promettente [18].

Gli approcci precedenti si sono concentrati sulla prevenzione delle interazioni p53 con i suoi inibitori o sulla riattivazione dell'attività trascrizionale TP53 bloccando la degradazione mediata da MDM2 [19].

Più recentemente, sono stati identificati nuovi inibitori di E6 ed E7 che possono interrompere l'interazione E6-E6AP e prevenire la degradazione di p53 nelle cellule HPV-positive [20,21,19]. Tuttavia, E6 manca di una tasca di legame del ligando definita, rendendolo un bersaglio impegnativo per i tradizionali approcci a piccole molecole a causa della difficoltà di interrompere ampie interfacce proteina-proteina [22,23].

La presenza di domini zinc-finger conferisce alla proteina E6 una struttura altamente compatta e stabilizzata da interazioni con ioni zinco, rendendo difficile l'identificazione di tasche di legame convenzionali per lo sviluppo di piccole molecole inibitrici.

Al contrario, gli inibitori a base di peptidi, in particolare quelli che imitano il motivo LxxLL di E6AP, sono più adatti per colpire tali interazioni. Questi peptidi possono inibire in modo competitivo il legame E6-E6AP e ripristinare i livelli di p53 se introdotti nelle cellule HPV-positive [24,25,26].

Tra questi, il peptide Pep11 si è dimostrato uno dei candidati più promettenti grazie alla sua elevata affinità per HPV16 E6 e alla capacità di ripristinare l'attività di p53. Le caratteristiche strutturali e funzionali di Pep11 saranno approfondite nel capitolo successivo.

CAPITOLO II

PEP11: ORIGINE, CARATTERISTICHE E POTENZIALE TERAPEUTICO

2.1 Poiché l'oncoproteina E6 rappresenta uno dei principali fattori responsabili della trasformazione neoplastica indotta da HPV16, negli ultimi anni sono stati sviluppati numerosi approcci volti a bloccarne l'attività.

Tra questi, particolare interesse ha suscitato l'impiego di peptidi in grado di interferire con l'interazione tra E6 ed E6AP, impedendo la degradazione della proteina oncosoppressore p53. Nel 2009, Dymalla et al. hanno identificato nuovi peptidi in grado di inibire l'attività dell'oncoproteina E6, alcuni dei quali hanno presentato un nuovo motivo di legame (CxChxCh) oltre al motivo canonico LxxLL [27].

Tra questi, nuovo peptide che trasporta solo il motivo CxChxCh, vale a dire un pep11, ha mostrato un legame selettivo a HPV16 E6 con maggiore affinità rispetto al peptide E6AP, sopprimendo così la crescita delle cellule HPV16-positive e ripristinando i livelli di p53.

A differenza del motivo LxxLL, presente in numerose proteine cellulari che interagiscono con E6, il motivo CxChxCh rappresenta una nuova sequenza di riconoscimento ricca di residui di cisteina, capace di conferire al peptide una modalità di legame differente e una maggiore selettività nei confronti dell'oncoproteina HPV16 E6.

Tuttavia, la sintesi chimica di pep11 ha dimostrato di essere limitata dalla sua idrofobicità intrinseca, portando a una scarsa solubilità nei mezzi acquosi e riducendo sostanzialmente la resa sintetica complessiva.

Tali limitazioni hanno portato allo sviluppo di nuove strategie volte a migliorarne la biodisponibilità e la capacità di raggiungere il compartimento intracellulare.

Tra queste, particolare interesse ha assunto la coniugazione di Pep11 con peptidi di penetrazione cellulare (Cell Penetrating Peptides, CPP).

2.2 I peptidi di penetrazione cellulare (CPP) sono peptidi corti in grado di attraversare le membrane cellulari e sono classificati in base alla loro origine in CPP derivati da proteine, chimerici e sintetici [28].

La maggior parte dei CPP sono sequenze lineari a base di L-amminoacidi prodotte attraverso la sintesi chimica e classificate per proprietà fisico-chimiche in tipi anfipatico, idrofobico e cationico [29].

La maggior parte dei CPP cationici deriva dai peptidi naturali Tat e Penetratin e di solito contiene più di cinque aminoacidi caricati positivamente, con sequenze cationiche ricche di arginina e triptofano che mostrano il più alto assorbimento cellulare [30].

I peptidi ricchi di arginina, in particolare, hanno la capacità di indurre una forte distorsione alla struttura del doppio strato fosfolipidico legandosi ai gruppi fosfato, facilitando la traslocazione attraverso la destabilizzazione della membrana e la formazione di pori transitori.

L'ingresso dei CPP nelle cellule può avvenire attraverso differenti meccanismi, tra cui l'endocitosi e la traslocazione diretta attraverso il doppio strato fosfolipidico.

Il meccanismo prevalente dipende dalla sequenza del peptide, dalla concentrazione utilizzata e dal tipo cellulare.

Nel presente studio, l'impiego di un peptide di penetrazione cellulare ricco di residui di arginina è stato fondamentale per migliorare la capacità di Pep11 di attraversare la membrana plasmatica e raggiungere il compartimento intracellulare, rendendolo un candidato più promettente per future applicazioni terapeutiche.

2.3 Il peptide Pep11 è stato successivamente modificato mediante coniugazione con una sequenza di penetrazione cellulare (Cell Penetrating Peptide, CPP) ricca in residui di arginina, ottenendo la variante CPP-Pep11.

Tale modifica è stata introdotta con l'obiettivo di migliorare la capacità del peptide di attraversare la membrana plasmatica e aumentare la sua disponibilità intracellulare, superando una delle principali limitazioni del peptide originale.

La sequenza completa del CPP-Pep11 è la seguente: RRRRRRR-EEGSGCSCIVCIGLI-NH₂. Parallelamente, al fine di valutare la specificità delle interazioni biologiche osservate, è stato

utilizzato un peptide controllo con sequenza scrambled, denominato CPP-SCRpep11, caratterizzato dalla stessa composizione amminoacidica ma con ordine residuale randomizzato: RRRRRRR-CGVSI~~C~~GLSFEICIG-NH₂.

La sintesi dei peptidi è stata effettuata mediante sintesi peptidica in fase solida (Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS), una tecnica ampiamente utilizzata per la produzione di peptidi ad elevata purezza e riproducibilità.

Successivamente, i peptidi sono stati purificati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni in fase inversa (RP-HPLC) e la loro massa molecolare è stata confermata mediante spettrometria di massa (ESI-MS), al fine di verificarne l'identità e la purezza.

L'introduzione della sequenza CPP ricca in residui di arginina ha permesso di incrementare significativamente la capacità del peptide di attraversare la membrana cellulare, rappresentando un passaggio fondamentale per le successive analisi funzionali e strutturali del sistema CPP-Pep11.

2.4 L'attività biologica del peptide CPP-pep11 è stata valutata mediante una serie di saggi funzionali condotti su linee cellulari di carcinoma cervicale HPV-positive, in particolare SiHa (HPV16+) e C4-I (HPV18+), al fine di determinare il suo effetto sulla proliferazione cellulare, sulla capacità clonogenica e sulla regolazione della proteina oncosoppressore p53.

In termini di citotossicità, il trattamento con CPP-pep11 non ha indotto effetti significativi sulla vitalità cellulare alle concentrazioni più elevate, indicando una buona tollerabilità del composto. Al contrario, il peptide controllo CPP-SCRpep11 ha mostrato un effetto citotossico già a concentrazioni di 10 µM dopo 24 ore, riducendo significativamente la vitalità cellulare, con un effetto ancora più marcato a concentrazioni superiori.

Sulla base di questi risultati, le concentrazioni di 10 µM sono state considerate il limite operativo per i successivi esperimenti funzionali. L'analisi della crescita cellulare ha evidenziato che CPP-pep11 riduce la proliferazione in modo dose-dipendente, con un effetto particolarmente evidente dopo 72 ore di trattamento alla concentrazione più elevata, dove circa la metà della popolazione cellulare risultava non vitale.

La capacità clonogenica delle cellule trattate è stata successivamente valutata mediante clonogenic assay. Le cellule sono state trattate con CPP-pep11 a concentrazioni crescenti (5–20 μ M) e con CPP-SCRpep11 come controllo.

I risultati hanno mostrato una riduzione significativa del numero e delle dimensioni delle colonie in modo dose-dipendente. In particolare, rispetto ai controlli (media di circa 735 colonie), il trattamento con CPP-pep11 ha ridotto il numero di colonie fino a circa il 35% del controllo alla concentrazione di 20 μ M, indicando una forte inibizione della capacità proliferativa e clonogenica. Inoltre, le cellule C4-I hanno mostrato una maggiore sensibilità al trattamento rispetto alle SiHa, evidenziando una riduzione della formazione delle colonie già a basse concentrazioni (5 μ M), suggerendo possibili differenze di risposta tra i due modelli cellulari HPV16 e HPV18. Per comprendere il meccanismo molecolare alla base dell'effetto osservato, è stata analizzata l'espressione della proteina p53 mediante western blot.

I risultati hanno mostrato che il trattamento con CPP-pep11 induce un aumento dose- e tempo-dipendente dei livelli di p53, in entrambe le linee cellulari. Tale effetto è risultato particolarmente evidente tra 48 e 72 ore di trattamento, confermando il ripristino della funzione di p53.

La successiva analisi mediante immunofluorescenza ha confermato l'efficace internalizzazione del peptide nelle cellule trattate, con localizzazione prevalentemente citoplasmatica e perinucleare. Parallelamente è stata osservata una maggiore accumulazione nucleare di p53 nelle cellule trattate rispetto ai controlli, suggerendo che CPP-pep11 interferisca con il meccanismo di degradazione mediato da E6, favorendo la stabilizzazione della proteina.

Nel complesso, questi risultati dimostrano che CPPpep11 esercita un effetto antitumorale significativo nelle cellule HPV-positive, agendo sia sulla riduzione della proliferazione cellulare sia sul ripristino della funzione di p53, confermando il suo potenziale interesse come molecola bioattiva nel contesto dell'inibizione dell'interazione E6–p53.

2.5 Il presente studio si inserisce nel contesto della ricerca di strategie innovative per l'inibizione dell'interazione tra l'oncoproteina HPV16 E6 e la proteina oncosoppressore p53, un asse molecolare centrale nella carcinogenesi cervicale.

La degradazione di p53 mediata dal complesso E6–E6AP rappresenta infatti uno dei principali meccanismi attraverso cui il virus induce trasformazione cellulare e progressione tumorale.

In questo scenario, il peptide Pep11 è stato identificato come un potenziale inibitore dell'interazione E6–E6AP grazie alla sua capacità di legarsi selettivamente all'oncoproteina virale. Tuttavia, la sua applicazione è limitata da una ridotta solubilità e da una scarsa capacità di attraversamento della membrana cellulare, che ne riducono l'efficacia in sistemi biologici complessi.

Per superare tali limiti, Pep11 è stato ingegnerizzato mediante estensione N-terminale con una sequenza poli-argininica (R6), generando la variante CPP-Pep11. Questa modifica strutturale è stata introdotta per incrementare la cationicità del peptide e migliorarne le proprietà di traslocazione attraverso la membrana cellulare.

I dati sperimentali riportati nella letteratura indicano che tale modifica consente un efficace ingresso intracellulare e un conseguente aumento dei livelli di p53, suggerendo un potenziale ripristino della sua funzione oncosoppressiva.

Alla luce di queste premesse, diventa fondamentale comprendere nel dettaglio le basi strutturali e molecolari dell'interazione tra CPP-Pep11 e HPV16 E6, al fine di chiarire i determinanti del legame e il possibile meccanismo di inibizione. Per questo motivo, nel capitolo successivo verranno descritti gli strumenti computazionali e di modellazione strutturale utilizzati nel presente lavoro, tra cui AlphaFold 3 per la predizione delle strutture proteina–peptide, AutoDock Vina per lo studio delle interazioni di docking e ChimeraX per la visualizzazione e l'analisi strutturale dei complessi ottenuti.

CAPITOLO III

Metodi computazionali e strumenti di simulazione e intelligenza artificiale

3.1 Come descritto nel capitolo precedente, il peptide CPP-Pep11 rappresenta un promettente candidato per l'inibizione dell'oncoproteina HPV16 E6.

Per comprendere le basi strutturali di tale interazione e caratterizzare il possibile meccanismo di legame, nel presente lavoro sono stati impiegati strumenti computazionali basati sull'intelligenza artificiale e sul docking molecolare.

Il primo di questi è AlphaFold 3, utilizzato per la predizione della struttura tridimensionale del complesso biomolecolare oggetto di studio [31].

L'identificazione della struttura tridimensionale delle proteine rappresenta uno degli aspetti fondamentali della biologia strutturale, poiché la conformazione spaziale di una biomolecola determina in larga misura la sua funzione biologica, la capacità di interagire con altre macromolecole e il suo coinvolgimento nei processi fisiologici e patologici.

Tradizionalmente, la determinazione sperimentale delle strutture proteiche si è basata su tecniche quali la cristallografia a raggi X, la risonanza magnetica nucleare (NMR) e, più recentemente, la microscopia crioelettronica (cryo-EM). Sebbene queste metodiche forniscano risultati di elevata accuratezza, esse richiedono tempi lunghi, costi elevati e, in molti casi, presentano difficoltà nell'analisi di complessi biomolecolari particolarmente dinamici o di grandi dimensioni.

L'impiego dell'intelligenza artificiale ha rivoluzionato questo settore grazie allo sviluppo di AlphaFold, un sistema di deep learning sviluppato da Google DeepMind per la predizione della struttura tridimensionale delle proteine a partire dalla sola sequenza amminoacidica.

Dopo il successo di AlphaFold 2, che nel 2021 ha raggiunto accuratèzze comparabili a quelle sperimentali nella maggior parte dei target valutati durante la competizione internazionale CASP14, è stata sviluppata una nuova versione del modello, denominata AlphaFold 3, pubblicata nel 2024 [31]. Tale versione rappresenta un'evoluzione sostanziale rispetto ai modelli

precedenti, estendendo la capacità predittiva non soltanto alle proteine, ma anche ai complessi biomolecolari costituiti da proteine, peptidi, acidi nucleici (DNA e RNA), piccoli ligandi, ioni e residui modificati, consentendo quindi una rappresentazione molto più realistica delle interazioni molecolari che avvengono all'interno della cellula.

Dal punto di vista architetturale, AlphaFold 3 introduce un cambiamento significativo rispetto ad AlphaFold 2 [32].

Mentre quest'ultimo era basato principalmente sull'architettura Evoformer e sulla successiva generazione delle coordinate atomiche, AlphaFold 3 adotta un modello generativo basato su diffusion model, una tecnologia già ampiamente utilizzata nella generazione di immagini mediante intelligenza artificiale.

Durante il processo di inferenza il modello parte da una disposizione casuale degli atomi e, attraverso una sequenza iterativa di passaggi di denoising, ricostruisce progressivamente la configurazione tridimensionale più probabile del complesso biomolecolare.

Questo approccio consente una rappresentazione diretta delle coordinate atomiche e migliora la capacità del sistema di descrivere superfici di interazione particolarmente complesse. Un'altra innovazione fondamentale è rappresentata dall'introduzione del modulo Pairformer, che sostituisce il precedente Evoformer come nucleo principale dell'elaborazione strutturale.

Il Pairformer integra simultaneamente le informazioni relative ai singoli residui e alle relazioni spaziali tra tutte le coppie di atomi o residui, permettendo al modello di apprendere con maggiore efficacia le interazioni che stabilizzano i complessi biomolecolari.

Grazie a questa architettura, AlphaFold 3 risulta particolarmente efficace nello studio delle interazioni proteina-proteina e proteina-peptide, come nel caso del complesso costituito dall'oncoproteina HPV16 E6 e dal peptide CPP-Pep11 analizzato nel presente lavoro.

Le prestazioni di AlphaFold 3 risultano superiori rispetto a numerosi approcci computazionali precedentemente utilizzati per la modellazione strutturale. Gli autori hanno infatti dimostrato un marcato incremento dell'accuratezza nella predizione delle interazioni proteina-ligando, proteina-DNA, proteina-RNA e anticorpo-antigene, superando in diversi benchmark gli algoritmi specialistici tradizionalmente impiegati per tali categorie di complessi.

Questa capacità rende AlphaFold 3 uno strumento particolarmente promettente sia per la ricerca di base sia per lo sviluppo di nuove strategie di drug discovery.

Per valutare l'affidabilità delle strutture predette, AlphaFold 3 fornisce diversi indicatori quantitativi. Tra questi, il parametro Predicted Local Distance Difference Test (pLDDT) esprime il grado di confidenza della previsione per ciascun residuo, assumendo valori compresi tra 0 e 100; valori superiori a 90 indicano generalmente una predizione altamente affidabile.

Un ulteriore indice è rappresentato dalla Predicted Aligned Error (PAE), che descrive l'errore atteso nella posizione relativa tra differenti regioni della struttura e consente di valutare l'affidabilità delle interazioni tra domini o tra molecole differenti.

Nei complessi multimerici vengono inoltre utilizzati parametri globali, quali il predicted Template Modeling score (pTM) e l'interface predicted TM-score (ipTM), utili per stimare rispettivamente la qualità complessiva della struttura e l'affidabilità dell'interfaccia tra le molecole coinvolte.

Nel presente studio AlphaFold 3 è stato utilizzato come primo passo del workflow computazionale per ottenere il modello tridimensionale del complesso costituito dall'oncoproteina HPV16 E6 e dal peptide CPP-Pep11.

La struttura tridimensionale di CPP-Pep11 ottenuta mediante AlphaFold 3 è stata successivamente preparata per le simulazioni di docking molecolare attraverso AutoDock Tools e utilizzate in AutoDock Vina per lo studio dell'interazione tra HPV16 E6 e CPP-Pep11 [33].

Le modalità di funzionamento di tali strumenti sono descritte nei paragrafi successivi. Un ulteriore elemento di innovazione introdotto da AlphaFold 3 riguarda la possibilità di prevedere non soltanto la struttura tridimensionale di singole proteine, ma anche le interazioni tra differenti biomolecole, come proteine, peptidi, acidi nucleici e piccoli ligandi.

Questa caratteristica amplia significativamente il campo di applicazione del modello, consentendo di analizzare sistemi biologici complessi con un livello di accuratezza precedentemente difficilmente raggiungibile mediante approcci esclusivamente computazionali. Nel contesto del presente studio, tale capacità ha rappresentato un importante supporto per la costruzione del modello tridimensionale del complesso tra CPP-Pep11 e le oncoproteine E6, fornendo una base strutturale affidabile per le successive simulazioni di docking molecolare.

3.2 Dopo la predizione e la preparazione delle strutture tridimensionali, lo studio delle interazioni tra biomolecole richiede strumenti in grado di simulare il riconoscimento molecolare e stimare la stabilità dei complessi formati.

A tale scopo, nel presente lavoro è stato impiegato AutoDock Vina, uno dei software più diffusi per il docking molecolare, grazie all'elevata accuratezza delle predizioni, alla rapidità di calcolo e alla semplicità di utilizzo [33].

Il docking molecolare è una metodologia computazionale che consente di prevedere la modalità con cui due molecole interagiscono nello spazio tridimensionale. L'obiettivo principale consiste nell'identificare l'orientamento e la conformazione più favorevoli dal punto di vista energetico tra un recettore, generalmente una proteina, e un ligando, che può essere rappresentato da una piccola molecola, un peptide o un'altra proteina.

Tale approccio permette di simulare le interazioni che avvengono in condizioni fisiologiche, fornendo informazioni utili sul possibile meccanismo di riconoscimento molecolare. AutoDock Vina rappresenta un'evoluzione del precedente AutoDock 4 e utilizza un algoritmo di ricerca globale associato a una funzione di scoring empirica in grado di stimare l'energia libera di legame (binding affinity) [34].

Durante la simulazione vengono generate numerose possibili conformazioni del complesso biomolecolare; ciascuna di esse viene valutata energeticamente e classificata in funzione della stabilità prevista.

In generale, valori di energia di legame più negativi indicano una maggiore affinità tra le molecole e una più elevata probabilità che il complesso risulti stabile. Uno dei principali vantaggi di AutoDock Vina è la capacità di esplorare in maniera efficiente un ampio numero di conformazioni, ottimizzando contemporaneamente la posizione, l'orientamento e le rotazioni interne del ligando all'interno del sito di interazione.

Tale procedura consente di individuare la configurazione energeticamente più favorevole tra tutte quelle analizzate, riducendo significativamente i tempi di calcolo rispetto alle versioni precedenti del software.

Nel presente studio AutoDock Vina è stato utilizzato per simulare l'interazione tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6, al fine di confrontarne le modalità di legame e stimarne l'affinità mediante i valori di binding affinity [33].

I complessi ottenuti sono stati successivamente analizzati attraverso UCSF ChimeraX, che ha consentito di identificare i principali residui coinvolti nelle interazioni e di caratterizzare i legami molecolari responsabili della stabilità dei complessi.

L'impiego di AutoDock Vina ha quindi rappresentato un passaggio fondamentale del workflow computazionale, permettendo di integrare la predizione strutturale ottenuta mediante AlphaFold 3 con una valutazione quantitativa delle possibili interazioni tra peptide e oncoproteine virali.

I risultati ottenuti costituiscono la base dell'analisi comparativa riportata nel Capitolo IV, nella quale verranno confrontati i complessi HPV16 E6 E6AP p53–CPP-Pep11 e HPV18 E6–CPP-Pep11 dal punto di vista strutturale ed energetico.

Oltre a individuare la migliore orientazione del ligando all'interno del sito di legame, AutoDock Vina restituisce un valore di binding affinity espresso in kcal/mol, che rappresenta una stima dell'energia libera di legame tra le due molecole.

Valori maggiormente negativi indicano interazioni teoricamente più stabili e favorevoli dal punto di vista energetico. Sebbene tali valori non sostituiscano la validazione sperimentale, essi costituiscono un utile parametro per confrontare differenti complessi molecolari e orientare l'interpretazione dei risultati ottenuti mediante simulazioni di docking.

3.3 Dopo l'esecuzione delle simulazioni di docking molecolare, è fondamentale disporre di strumenti che consentano di analizzare e visualizzare in maniera dettagliata i complessi tridimensionali ottenuti.

A questo scopo, nel presente lavoro è stato impiegato UCSF ChimeraX, un software di visualizzazione molecolare sviluppato dall'Università della California di San Francisco (UCSF), progettato per l'analisi strutturale di proteine, acidi nucleici, peptidi e complessi biomolecolari. Grazie alla sua interfaccia moderna e all'elevata qualità grafica, ChimeraX rappresenta uno degli strumenti più utilizzati nell'ambito della biologia strutturale, della bioinformatica e della progettazione razionale di farmaci [35].

ChimeraX costituisce l'evoluzione del precedente software UCSF Chimera, introducendo numerosi miglioramenti in termini di prestazioni, qualità del rendering tridimensionale, gestione di strutture di grandi dimensioni e compatibilità con i più recenti database strutturali e algoritmi di predizione.

Il programma permette infatti di importare strutture provenienti dalla Protein Data Bank (PDB) o generate mediante strumenti di intelligenza artificiale, come AlphaFold 3, consentendo la visualizzazione dettagliata delle macromolecole e delle loro interazioni [35,36].

Dal punto di vista strutturale, ChimeraX offre numerose modalità di rappresentazione delle biomolecole, tra cui modelli cartoon, ribbon, surface, stick e ball-and-stick, permettendo di evidenziare specifiche regioni funzionali, domini proteici, residui amminoacidici o siti di legame.

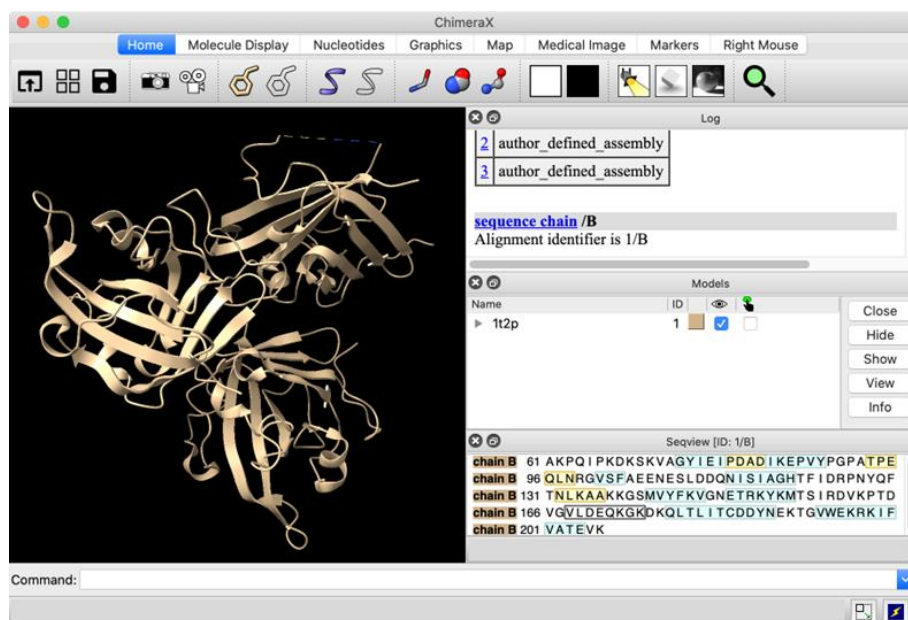
Il software consente inoltre, di modificare colori, trasparenze, orientamento della struttura e livelli di ingrandimento, producendo immagini ad alta risoluzione adatte sia all'analisi scientifica sia alla pubblicazione dei risultati [35].

Un aspetto particolarmente rilevante di ChimeraX riguarda la possibilità di analizzare quantitativamente le interazioni intermolecolari presenti nei complessi ottenuti mediante docking. Il programma permette infatti di identificare legami a idrogeno, interazioni idrofobiche, contatti di van der Waals, ponti salini e distanze intermolecolari tra specifici residui amminoacidici. Tali informazioni risultano fondamentali per comprendere i meccanismi di riconoscimento molecolare e valutare la stabilità dei complessi proteina-peptide [36].

Nel presente studio, UCSF ChimeraX è stato impiegato per analizzare i complessi tridimensionali ottenuti tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6 in seguito alle simulazioni di docking eseguite con AutoDock Vina. Attraverso il software è stato possibile visualizzare il posizionamento del peptide all'interno del sito di interazione delle due oncoproteine, identificare i principali residui coinvolti nel legame e produrre le immagini tridimensionali utilizzate nel Capitolo IV per il confronto tra i due complessi.

L'impiego di ChimeraX ha inoltre consentito di rappresentare graficamente le interazioni molecolari osservate, facilitandone l'interpretazione biologica e il confronto con i dati riportati in letteratura.

Le funzionalità di visualizzazione e analisi offerte da ChimeraX hanno rappresentato uno strumento fondamentale per l'interpretazione dei risultati ottenuti mediante docking molecolare. Le immagini e le analisi strutturali prodotte con questo software saranno presentate e discusse nel Capitolo IV, dove verranno confrontati i complessi CPP-Pep11-HPV16 E6 e CPP-Pep11-HPV18 E6.



3.4 L'accuratezza di una simulazione di docking molecolare dipende non soltanto dall'algoritmo utilizzato per la ricerca delle pose di legame, ma anche dalla corretta preparazione delle strutture tridimensionali impiegate come recettore e ligando.

A tale scopo, nel presente studio è stato utilizzato AutoDock Tools (ADT), l'interfaccia grafica ufficiale sviluppata per la preparazione delle simulazioni eseguite con la suite AutoDock e AutoDock Vina [37].

AutoDock Tools rappresenta un ambiente software progettato per convertire le strutture tridimensionali delle biomolecole in un formato compatibile con il motore di docking. Il programma consente infatti di importare strutture proteiche e peptidiche ottenute dalla Protein Data Bank (PDB) o generate mediante strumenti di predizione strutturale, effettuando tutte le operazioni preliminari necessarie prima dell'esecuzione della simulazione [37].

Tra le principali funzionalità del software rientrano l'aggiunta degli atomi di idrogeno polari, l'assegnazione delle cariche atomiche di Gasteiger, la definizione dei legami rotabili del ligando, l'eliminazione di molecole d'acqua o altri componenti non coinvolti nell'interazione e la conversione dei file nel formato PDBQT, richiesto da AutoDock Vina.

Quest'ultimo contiene, oltre alle coordinate atomiche, informazioni sulle cariche parziali e sulla flessibilità conformazionale della molecola, elementi indispensabili per l'esecuzione del docking [38].

Un'altra funzione fondamentale di AutoDock Tools consiste nella definizione della griglia di ricerca (Grid Box), ovvero il volume tridimensionale all'interno del quale AutoDock Vina esplora le possibili modalità di legame tra recettore e ligando.

La scelta delle dimensioni e della posizione della Grid Box rappresenta un passaggio cruciale, poiché delimita l'area nella quale verranno ricercate le conformazioni energeticamente più favorevoli.

Una corretta definizione della griglia permette di concentrare la ricerca sul sito d'interazione biologicamente rilevante, migliorando sia l'efficienza computazionale sia l'affidabilità dei risultati ottenuti [37,38].

Nel presente lavoro, le strutture tridimensionali delle oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6, ottenute dalla Protein Data Bank, e quella del peptide CPP-Pep11, predetta mediante AlphaFold 3, sono state preparate utilizzando AutoDock Tools.

Per ciascuna struttura sono stati aggiunti gli idrogeni polari, assegnate le cariche di Gasteiger e generati i corrispondenti file PDBQT. Successivamente è stata definita la Grid Box per delimitare il sito di docking, consentendo l'esecuzione delle simulazioni con AutoDock Vina in condizioni standardizzate e confrontabili.

L'impiego di AutoDock Tools è quindi una fase essenziale dell'intero workflow computazionale, garantendo che tutte le strutture utilizzate nelle simulazioni fossero preparate secondo criteri uniformi e compatibili con il software di docking.

Tale procedura ha contribuito a migliorare l'affidabilità delle predizioni ottenute e ha costituito il passaggio intermedio tra la predizione strutturale mediante AlphaFold 3 e l'analisi delle interazioni effettuata con AutoDock Vina e UCSF ChimeraX.

3.5 Il workflow sviluppato nel presente studio è stato progettato per analizzare, mediante strumenti di modellistica molecolare e docking computazionale, l'interazione tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6.

L'obiettivo è stato quello di confrontare il comportamento del peptide nei confronti dei due principali genotipi ad alto rischio di HPV, verificando se i risultati ottenuti mediante simulazioni computazionali fossero coerenti con le evidenze sperimentali riportate in letteratura.

La prima fase del lavoro ha riguardato lo studio del funzionamento e dell'architettura di AlphaFold 3, approfondendone le principali caratteristiche e le innovazioni introdotte nella predizione delle strutture biomolecolari [32].

Successivamente, il software è stato impiegato per predire la struttura tridimensionale del peptide CPP-Pep11, ottenuto mediante l'aggiunta di una sequenza N-terminale ricca di residui di arginina al peptide Pep11, con l'obiettivo di migliorarne la capacità di penetrazione cellulare. Attraverso AlphaFold 3 sono stati inoltre generati i modelli tridimensionali dei complessi HPV16 E6–CPP-Pep11 e HPV18 E6–CPP-Pep11, consentendo una prima valutazione qualitativa delle modalità di interazione tra il peptide e le due oncoproteine.

Parallelamente, sono state recuperate dalla Protein Data Bank (PDB) le strutture tridimensionali sperimentali delle oncoproteine HPV16 E6 in complesso con E6AP e p53, nonché della proteina HPV18 E6, che sono state successivamente utilizzate come recettori nelle simulazioni di docking.

Prima dell'esecuzione del docking, tutte le strutture sono state preparate mediante AutoDock Tools [38]. In questa fase sono stati aggiunti gli atomi di idrogeno polari, assegnate le cariche di Gasteiger e convertiti i file dal formato PDB al formato PDBQT, necessario per l'utilizzo di AutoDock Vina. È stata inoltre definita la Grid Box, posizionandola in corrispondenza della regione di interesse della proteina, così da delimitare il volume tridimensionale entro il quale il software avrebbe ricercato le possibili modalità di legame tra recettore e ligando.

Le simulazioni di docking molecolare sono state successivamente eseguite mediante AutoDock Vina [34], avviando il programma attraverso il prompt dei comandi. Per ciascun sistema è stata utilizzata come ligando la struttura tridimensionale del peptide CPP-Pep11, mentre come recettori sono state impiegate le strutture delle oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6.

Al termine di ogni simulazione, il software ha generato nove differenti pose di legame, ordinate in funzione della relativa energia di binding. Per ciascun complesso è stata selezionata la conformazione caratterizzata dal valore energetico più favorevole, successivamente impiegata nelle analisi strutturali. Infine, tutti i complessi ottenuti mediante docking sono stati importati in UCSF ChimeraX [36], dove sono stati visualizzati e analizzati nel dettaglio.

Attraverso questo software è stato possibile osservare l'orientamento del peptide nei confronti delle oncoproteine virali, esaminare le principali interazioni molecolari e realizzare le immagini tridimensionali utilizzate nel Capitolo IV.

Il confronto tra i modelli predetti mediante AlphaFold 3 e quelli ottenuti attraverso il docking molecolare con AutoDock Vina ha inoltre consentito di valutare la coerenza tra i diversi approcci computazionali adottati e i dati sperimentali disponibili.

I risultati quantitativi delle simulazioni, insieme all'analisi delle interazioni molecolari e al confronto tra i complessi HPV16 E6–CPP-Pep11 e HPV18 E6–CPP-Pep11, saranno presentati e discussi nel Capitolo IV.

CAPITOLO IV

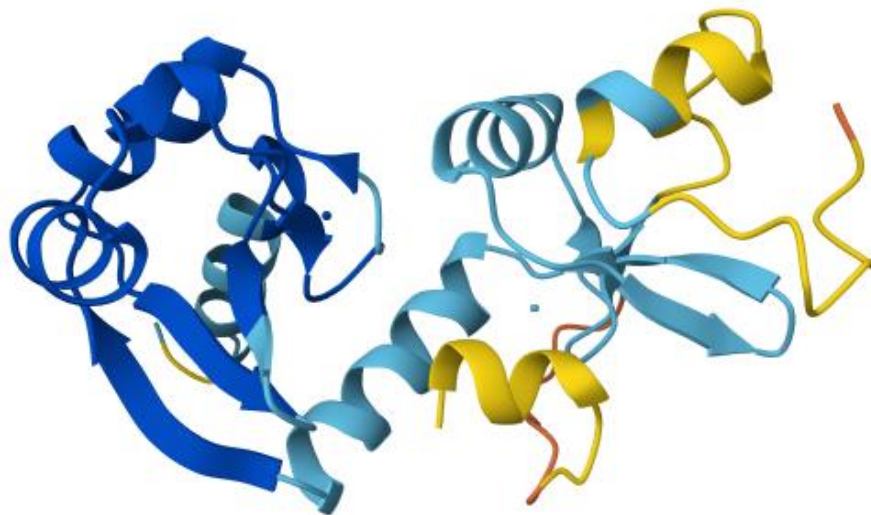
RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Dopo aver descritto gli strumenti computazionali impiegati nel Capitolo III, sono stati analizzati i risultati ottenuti mediante AlphaFold 3 e AutoDock Vina.

In una prima fase è stata predetta la struttura tridimensionale del peptide CPP-Pep11 e sono stati generati i complessi con le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6 mediante AlphaFold 3. Successivamente, le stesse strutture sono state sottoposte a docking molecolare mediante AutoDock Vina, al fine di valutare l'affinità di legame del peptide nei confronti delle due oncoproteine e confrontare i risultati con le evidenze sperimentali disponibili.

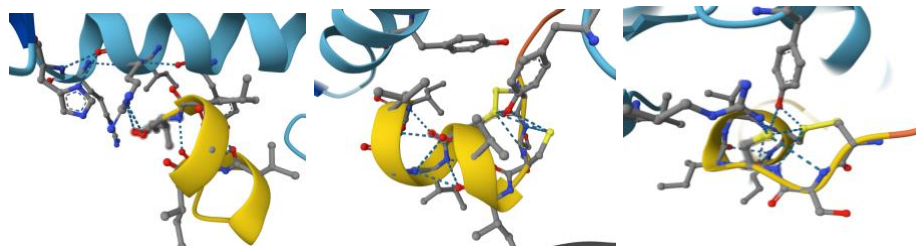


Struttura tridimensionale del peptide CPP-Pep11 predetta mediante AlphaFold 3.



Complesso HPV16 E6-CPP-Pep11 ottenuto con Alphafold 3.

Grazie a questa immagine possiamo visualizzare come il peptide (in giallo) riesca ad inserirsi nella tasca di HPV16E6, zona centrale che possiamo riconoscere grazie alla presenza degli ioni zinco.



ILE 21—ARG 74

TYR 32—CYS 17

CYS 14—ARG 55



Complesso HPV18 E6-CPP-Pep11 ottenuto con AlphaFold 3.

In questa immagine si osserva come il peptide non riesca a legarsi in modo efficace alla tasca molecolare, a causa del ridotto numero di interazioni stabilizzanti tra il complesso e il peptide stesso.

Tali interazioni saranno analizzate più nel dettaglio nella struttura ottenuta mediante AutoDock Vina.

Sebbene AlphaFold 3 abbia permesso di generare modelli tridimensionali plausibili per entrambi i complessi, la sola analisi strutturale non è sufficiente per determinare quale interazione risulti energeticamente più favorevole.

Per questo motivo, le strutture sono state successivamente sottoposte a docking molecolare tramite AutoDock Vina, al fine di valutare e confrontare in modo più accurato l'affinità di legame.

4.2



Migliore posa di docking del complesso HPV16 E6 E6AP
p53–CPP-Pep11 ottenuta mediante AutoDock Vina.

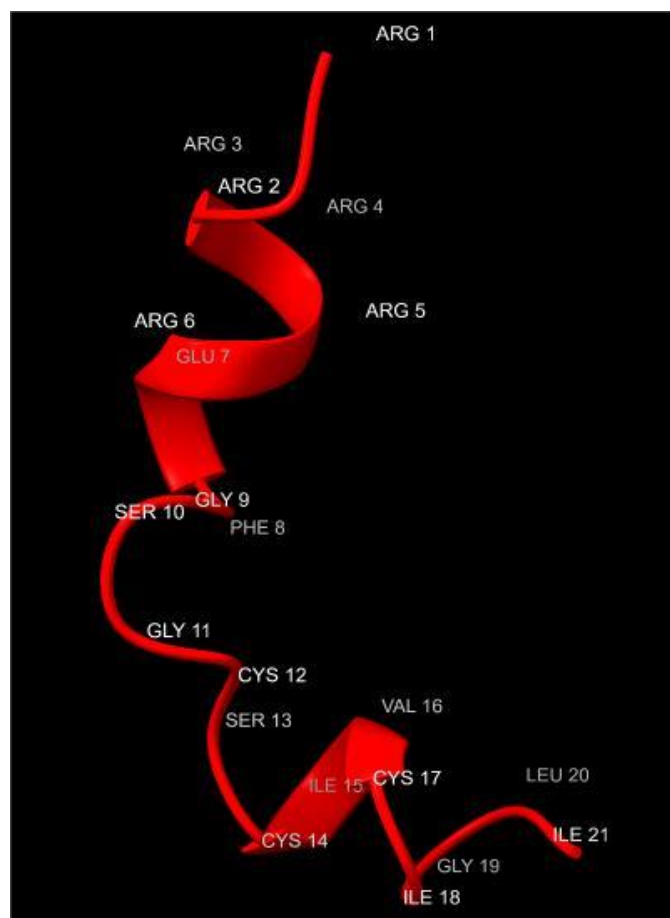
AutoDock Vina ha generato nove differenti pose di legame, selezionando come migliore quella caratterizzata da una binding affinity pari a $-8,797$ kcal/mol.



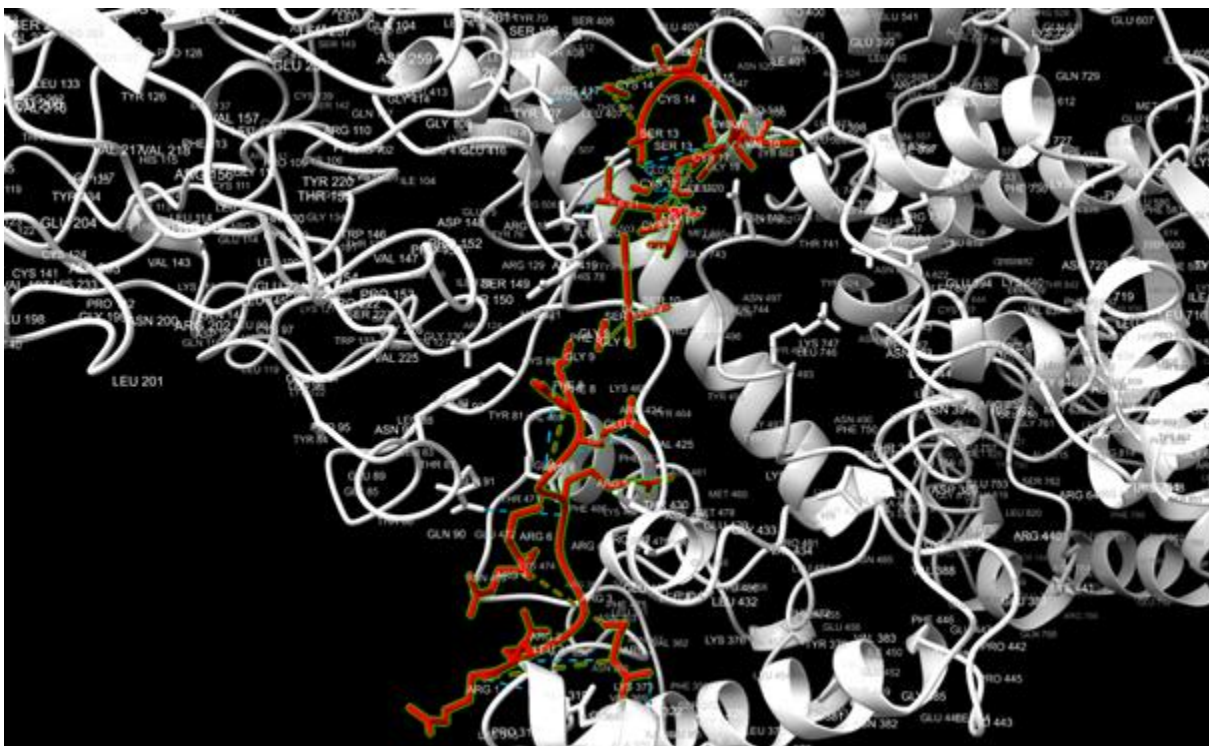
Migliore posa di docking del complesso HPV18 E6–CPP-Pep11
ottenuta mediante AutoDock Vina.

Anche per HPV18 E6 sono state generate nove pose differenti. La conformazione con la migliore energia di legame ha mostrato una binding affinity pari a $-4,958$ kcal/mol. L'analisi dettagliata delle interazioni molecolari responsabili di tale differenza sarà approfondita nei paragrafi successivi.

4.3 Per comprendere le differenze osservate nei valori di binding affinity ottenuti mediante AutoDock Vina, è stata effettuata un'analisi dettagliata dei complessi molecolari utilizzando UCSF ChimeraX. L'analisi ha permesso di identificare i principali residui coinvolti nel riconoscimento tra CPP-Pep11 e le oncoproteine virali.



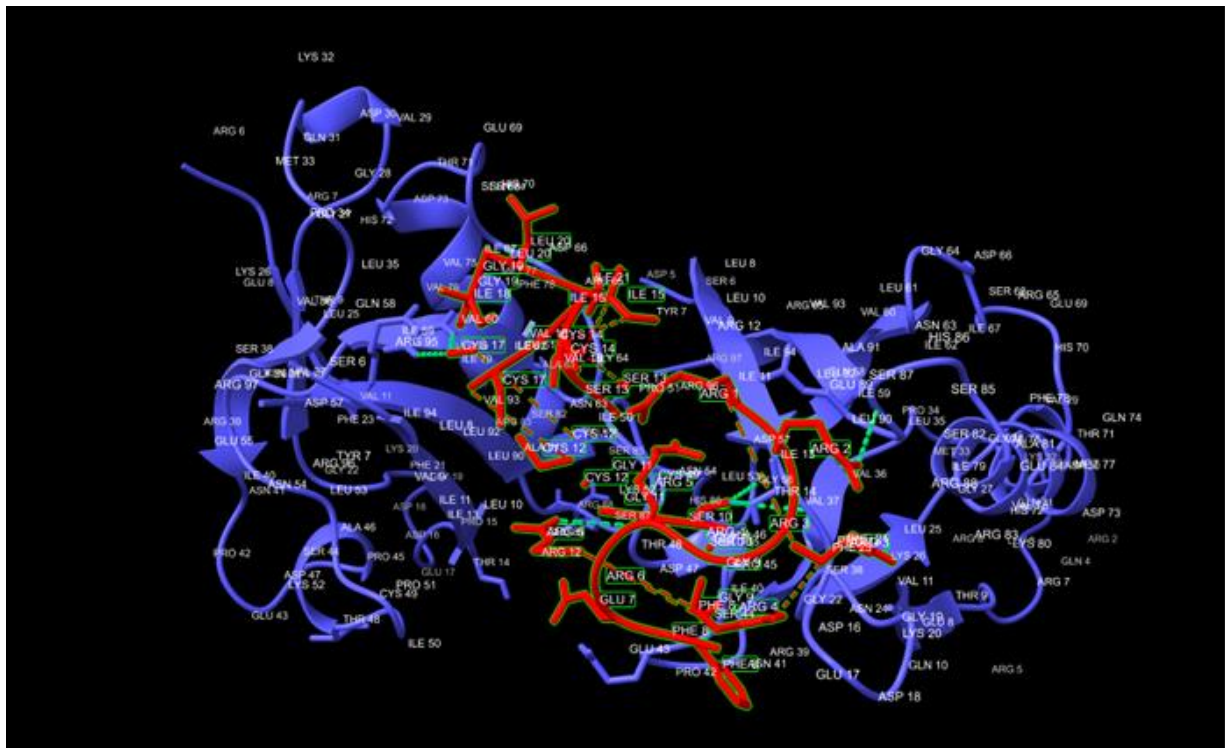
Struttura tridimensionale di CPP-Pep11 visualizzata in ChimeraX



Nel complesso HPV16 E6 E6AP P53–CPP-Pep11 sono state osservate numerose interazioni distribuite lungo il sito di legame della proteina.

La presenza di diversi contatti ravvicinati tra il peptide e i residui della proteina suggerisce una buona complementarità strutturale, favorendo la formazione di un complesso stabile.

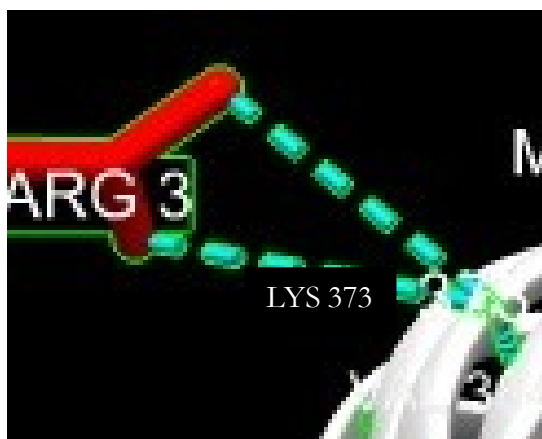
Tale osservazione risulta coerente con il valore di binding affinity ottenuto mediante AutoDock Vina.



Nel complesso HPV18 E6–CPP-Pep11 il peptide instaura comunque interazioni con la proteina bersaglio; tuttavia, la distribuzione spaziale dei contatti appare differente e la superficie di interazione risulta meno estesa rispetto a quella osservata per HPV16 E6. Questa diversa organizzazione del complesso potrebbe contribuire alla minore stabilità del legame evidenziata dalle simulazioni di docking.

4.4 L'analisi delle interazioni molecolari è stata effettuata sui complessi ottenuti mediante AutoDock Vina e successivamente visualizzati con UCSF ChimeraX, al fine di identificare i principali contatti responsabili della stabilità del legame tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6. In particolare, sono stati analizzati i legami a idrogeno instaurati dal peptide con i residui amminoacidici presenti nel sito di legame delle due proteine, poiché tali interazioni rappresentano uno dei principali fattori che contribuiscono alla stabilizzazione del complesso proteina-peptide.

Legami a idrogeno osservati tra CPP-Pep11 e HPV16 E6 E6AP
p53 nel complesso ottenuto mediante AutoDock Vina e
visualizzato in UCSF ChimeraX:



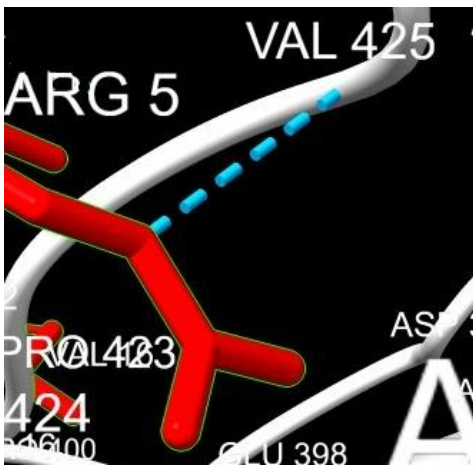
ARG 3 -- LYS 373
3.469Å



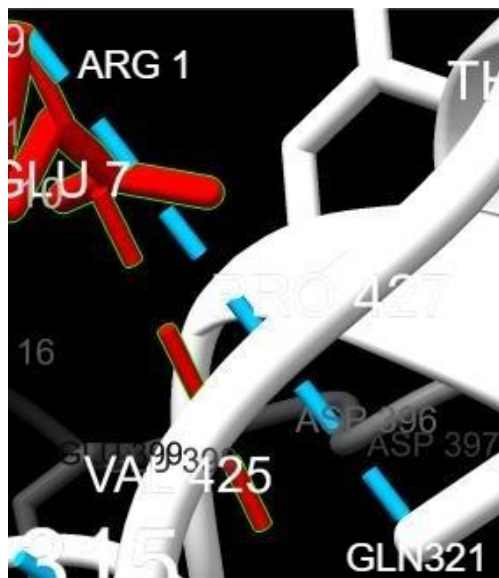
ARG 5 — GLN 91
2.747Å



GLU 7 – VAL 425
2.273Å



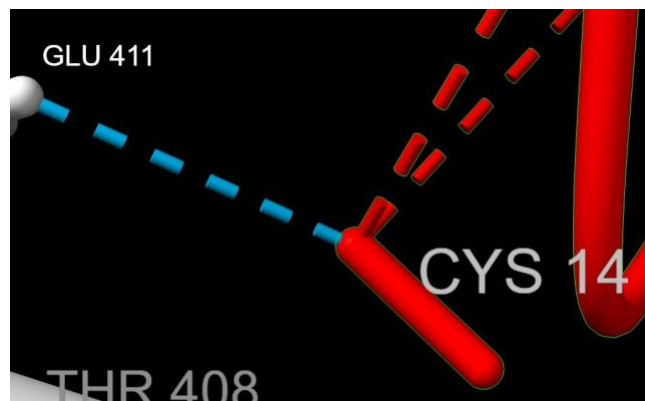
ARG 5 – VAL 425
3.170Å



ARG 1 — GLN 321
2.411Å



ILE 21 — LYS 420
2.250Å



CYS 14 — GLU 411
3.645Å

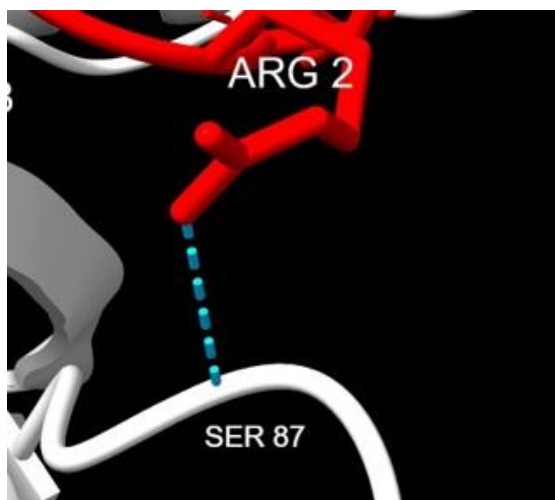
L'analisi del complesso HPV16 E6 E6AP p53-CPP-Pep11 ha evidenziato la presenza di otto legami a idrogeno distribuiti lungo l'interfaccia di contatto tra il peptide e l'oncoproteina.

Le distanze osservate risultano compatibili con la formazione di interazioni stabili, suggerendo un'elevata complementarità tra le superfici molecolari coinvolte.

La presenza simultanea di numerosi legami a idrogeno contribuisce ad aumentare la stabilità conformazionale del complesso e risulta coerente con l'elevata binding affinity ottenuta mediante docking molecolare.

I legami ottenuti mediante Autodock Vina non sono i medesimi ottenuti con Alphafold 3 poiché in Autodock Vina abbiamo visualizzato il complesso HPV 16 E6 E6AP p53 CPP-Pep11 mentre in Alphafold 3 il complesso HPV16 E6 CPP-Pep11.

Legami a idrogeno osservati tra CPP-Pep11 e HPV18 E6 nel complesso ottenuto mediante AutoDock Vina e visualizzato in UCSF ChimeraX.



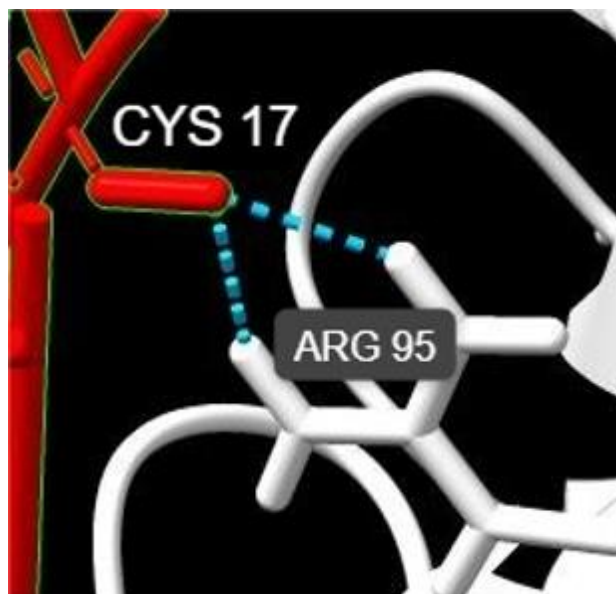
ARG 2 – SER 87
3.403Å



ARG 6 – THR48
3.394Å



SER 10 – THR 14
3.211Å e 3.273Å



CYS 17 — ARG95
2.150Å è 2.213Å

Nel complesso HPV18 E6–CPP-Pep11 sono stati identificati 6 legami a idrogeno tra il peptide e la proteina bersaglio; tuttavia, il numero e la distribuzione di tali interazioni risultano differenti rispetto a quanto osservato nel complesso con HPV16 E6.

Le differenze nella disposizione spaziale dei contatti suggeriscono una minore stabilizzazione del complesso, in accordo con il valore di binding affinity ottenuto mediante AutoDock Vina. L'analisi delle interazioni molecolari ha permesso di caratterizzare nel dettaglio i principali contatti responsabili della formazione dei complessi proteina-peptide.

L'identificazione dei legami a idrogeno e dei residui coinvolti fornisce una base strutturale utile per comprendere il diverso comportamento del peptide CPP-Pep11 nei confronti delle oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6.

Nel complesso, l'analisi delle interazioni molecolari ha evidenziato come la stabilità del complesso non dipenda esclusivamente dal numero di legami a idrogeno osservati, ma anche dalla loro distribuzione spaziale e dalla complementarità conformazionale tra il peptide e la proteina bersaglio.

Una disposizione favorevole delle superfici di contatto consente infatti la formazione di interazioni più stabili, contribuendo a ridurre l'energia complessiva del sistema e ad aumentare l'affinità di legame.

I risultati ottenuti mediante AutoDock Vina risultano coerenti con le osservazioni effettuate attraverso AlphaFold 3 e con la successiva visualizzazione in UCSF ChimeraX. L'integrazione di questi strumenti ha consentito di descrivere in maniera dettagliata il comportamento del peptide CPP-Pep11 nei confronti delle oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6, evidenziando differenze strutturali che potrebbero contribuire a spiegare la diversa efficacia biologica osservata nei dati sperimentali disponibili.

Sebbene il docking molecolare rappresenti una simulazione teorica, la concordanza tra i risultati computazionali e quelli sperimentali conferisce maggiore solidità alle ipotesi formulate nel presente lavoro.

Metodologia

1. Raccolta dei dati

* Download delle strutture di HPV16 E6, HPV18 E6, E6AP e p53 dal Protein Data Bank (PDB).

* Inserimento della sequenza amminoacidica di Pep11 in AlphaFold 3 in modo da ricavarne la struttura tridimensionale



2. Predizione strutturale (AlphaFold 3)

* Generazione della struttura tridimensionale di Pep11.

* Predizione dei complessi HPV16 E6–Pep11 e HPV18 E6–Pep11.

Tempo medio: 10–15 minuti per ciascun complesso.



3. Docking molecolare (AutoDock Vina)

* Preparazione delle strutture con AutoDock Tools.

* Simulazione del docking molecolare.

Tempo medio: circa 1 ora per simulazione.



4. Analisi strutturale (UCSF ChimeraX)

* Visualizzazione dei complessi.

* Analisi delle interazioni intermolecolari.



5. Interpretazione dei risultati

* Valutazione delle differenze di interazione tra i complessi HPV16 E6–Pep11 e HPV18 E6–Pep11 eseguite in AlphaFold 3 e i medesimi complessi generati in Autodock Vina e visualizzati con ChimeraX

CONCLUSIONI

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di analizzare, mediante strumenti di simulazione molecolare e intelligenza artificiale, l'interazione tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine HPV16 E6 e HPV18 E6, con particolare attenzione alle differenze strutturali e funzionali che caratterizzano i due complessi.

A tal fine sono stati impiegati AlphaFold 3 per la predizione strutturale, AutoDock Vina per il docking molecolare, AutoDock Tools per la preparazione delle simulazioni e UCSF ChimeraX per la visualizzazione e l'analisi delle interazioni molecolari.

Il confronto tra i risultati ottenuti mediante AlphaFold 3 e AutoDock Vina evidenzia come il peptide CPP-Pep11 presenti una maggiore affinità nei confronti dell'oncoproteina HPV16 E6 rispetto a HPV18 E6.

Tale osservazione risulta in accordo con i dati sperimentali ottenuti in laboratorio, nei quali il peptide ha mostrato una maggiore capacità di legarsi all'oncoproteina E6 del ceppo HPV16 rispetto all'oncoproteina E6 del ceppo HPV18.

Nel complesso, i risultati ottenuti suggeriscono che gli approcci computazionali impiegati siano in grado di riprodurre in maniera coerente il diverso comportamento biologico del peptide nei confronti dei due genotipi virali.

COMPLESSO	BINDING AFFINITY
HPV16E6- E6AP-p53- CPP-Pep11	-8,797 kcal/mol
HPV16E6- CPP-Pep11	-4,958 kcal/mol

L'integrazione tra strumenti di intelligenza artificiale, modellistica molecolare e docking rappresenta oggi una delle principali innovazioni nel campo della biologia strutturale. Tecnologie come AlphaFold 3 consentono infatti di accelerare significativamente la comprensione delle interazioni biomolecolari, riducendo tempi e costi rispetto ai tradizionali approcci sperimentali.

In quest'ottica, l'utilizzo combinato di AlphaFold 3, AutoDock Vina, AutoDock Tools e UCSF ChimeraX ha permesso di realizzare un workflow completo, dimostrando come tali strumenti possano supportare efficacemente la ricerca preclinica nello sviluppo di nuove strategie terapeutiche.

L'impiego combinato di AlphaFold 3, AutoDock Vina, AutoDock Tools e UCSF ChimeraX ha consentito di realizzare un workflow completo di modellazione e analisi strutturale, permettendo di integrare strumenti di intelligenza artificiale e simulazione molecolare nello studio delle interazioni tra il peptide CPP-Pep11 e le oncoproteine di HPV.

I risultati ottenuti dimostrano come tali approcci possano costituire un valido supporto alla ricerca sperimentale, consentendo di formulare ipotesi strutturali da verificare successivamente mediante tecniche di laboratorio.

Sebbene il presente studio sia stato condotto nell'ambito di una ricerca preclinica, integrando strumenti di modellistica molecolare, docking molecolare e intelligenza artificiale con dati sperimentali già disponibili, i risultati ottenuti rappresentano un importante punto di partenza per futuri approfondimenti.

In particolare, sarà possibile estendere l'analisi ad altri genotipi di HPV ad alto rischio, valutare eventuali modifiche strutturali del peptide CPP-Pep11 finalizzate a migliorarne l'affinità e la specificità e integrare strumenti di intelligenza artificiale sempre più avanzati per la progettazione razionale di nuovi peptidi terapeutici diretti contro le oncoproteine virali coinvolte nella carcinogenesi associata all'HPV.

In conclusione, il presente lavoro evidenzia come l'integrazione tra modellazione strutturale, docking molecolare e analisi tridimensionale rappresenti un approccio efficace per approfondire i meccanismi di riconoscimento tra proteine e peptidi, contribuendo allo sviluppo di nuove strategie terapeutiche mirate contro le infezioni da HPV ad alto rischio.

Bibliografia

- [1] Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Rev Med Virol.* 2015;25(S1):2–23.
doi:10.1002/rmv.1822
PMID: 25752814. PMCID: PMC5024016 DOI: 10.1002/rmv.1822
- [2] Doorbar J.
The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol.* 2005;32(Suppl 1): S7–S15.
doi: 10.1016/j.jcv.2004.12.006
PMID: 15753007 DOI: 10.1016/j.jcv.2004.12.006
- [3] McBride AA.
Oncogenic human papillomaviruses. *Viruses.* 2017;9(5):112.
doi: 10.1098/rstb.2016.0273
PMID: 28893940 PMCID: PMC5597740 DOI:
10.1098/rstb.2016.0273
- [4] Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al.
Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451–11460.
PMID: 15479788 PMCID: PMC523272 DOI:
10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004

[5] Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM.

The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129–1136.

PMID: 2175676 DOI: 10.1016/0092-8674(90)90409-8

[6]. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, et al.

Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016; 2:16086.

doi: 10.1038/nrdp.2016.86

PMID: 27905473 DOI: 10.1038/nrdp.2016.86

[7] IARC Working Group.

Human papillomaviruses. *IARC Monographs*. Vol 90. Lyon: IARC; 2007.

PMID: 18354839 PMCID: PMC4781057

[8] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al.

Global cancer statistics 2022. *CA Cancer J Clin*. 2024.

doi: 10.3322/caac.21834

PMID: 38572751

DOI:10.3322/caac.21834

[9] Bray F, et al.

Global cancer statistics updates. *CA Cancer J Clin*. 2024.

PMID: 38572751 DOI: 10.3322/caac.21834

[10] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah KV.

The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002;55(4):244–265.

doi:10.1136/jcp.55.4.244. PMID:11919208.

[11] Munoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic

classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(6):518–527.

doi:10.1056/NEJMoa021641. PMID: 12571259.

[12] de Sanjosé S, Quint WG, Alemany L, et al. Human

papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol*.

2010;11(11):1048–1056. PMID: 20952254.

[13] Li N, Franceschi S, Howell-Jones R, Snijders PJF,

Clifford GM. Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: evaluation of

vaccine types. *Int J Cancer*. 2011;128(4):927–935. PMID: 20473886.

[14] McBride AA. The papillomavirus E2 proteins. *Virology*.

2013;445(1–2):57–79. PMID: 23849793.

[15] The low-risk papillomaviruses

Nagayasu Egawa 1, John Doorbar 2

Affiliations Expand

PMID: 28040475 DOI: 10.1016/j.virusres.2016.12.017.

[16] The human papillomavirus oncoproteins: a review of the host pathways targeted on the road to transformation

James A Scarth 1 2, Molly R Patterson 1 2, Ethan L Morgan 1 2 3, Andrew Macdonald 1 2

Affiliations Expand

PMID: 33427604 PMCID: PMC8148304 DOI: 10.1099/jgv.0.001540

[17] Zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers — a brief historical account. *Virology*. 2009;384(2):260–265. PMID: 19135222.

[18] Zanier K, Charbonnier S, Baltzinger M, et al. Structural basis for hijacking of cellular LxxLL motifs by papillomavirus E6 oncoproteins. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(1):57–64. PMID: 23393263.

[19] The effects of HPV oncoproteins on host communication networks: Therapeutic connotations

Josipa Skelin 1, Ho Yin Luk 2, Dražan Butorac 3, Siaw Shi Boon 2, Vjekoslav Tomać 1

Affiliations Expand

PMID: 38115222 DOI: 10.1002/jmv.29315

[20] Roles of human papillomavirus in cancers: oncogenic mechanisms and clinical use

Yu Zhang 1, Ke Qiu 1 2, Jianjun Ren 3, Yu Zhao 4, Ping Cheng 5

Affiliations Expand

PMID: 39856040 PMCID: PMC11760352 DOI: 10.1038/s41392-024-02083-w

[21] A novel small-molecule inhibitor of the human papillomavirus E6-p53 interaction that reactivates p53 function and blocks cancer cells growth

Marta Celegato 1, Lorenzo Messa 1, Laura Goracci 2, Beatrice Mercorelli 1, Chiara Bertagnin 1, Francesca Spyraakis 3, Irina Suarez 4, Alexandra Cousido-Siah 4, Gilles Travé 4, Lawrence Banks 5, Gabriele Cruciani 6, Giorgio Palù 1, Arianna Loregian 7

Affiliations Expand

PMID: 31693922 DOI: 10.1016/j.canlet.2019.10.046

[22] White EA, Sowa ME, Tan MJ, et al. Systematic identification of interactions between host cell proteins and HPV E6 oncoproteins. Proc Natl Acad Sci USA. 2012. PMID: 22232672. PMCID: PMC3277141 DOI: 10.1073/pnas.1116776109

[23] Novel therapeutic strategies for targeting E6 and E7 oncoproteins in cervical cancer

Vindya Ranasinghe 1, Nigel McMillan 2

Affiliations Expand

PMID: 40216282 DOI: 10.1016/j.critrevonc.2025.104721

[24] The high-risk HPV E6 target scribble (hScrib) is required for HPV E6 expression in cervical tumour-derived cell lines

Christian Kranjec 1, Vjekoslav Tomaić 2, Paola Massimi 3, Lietta Nicolaides 1, John Doorbar 1, Lawrence Banks 3

Affiliations Expand

PMID: 29074188 PMCID: PMC5886876 DOI: 10.1016/j.pvr.2016.04.001.

[25] The E6AP binding pocket of the HPV16 E6 oncoprotein provides a docking site for a small inhibitory peptide unrelated to E6AP, indicating druggability of E6

Katia Zanier 1, Christina Stutz 2, Susanne Kintscher 2, Eileen Reinz 2, Peter Sehr 3, Julia Bulkescher 2, Karin Hoppe-Seyler 2, Gilles Travé 1, Felix Hoppe-Seyler 2

Affiliations Expand

PMID: 25383876 PMCID: PMC4226571 DOI: 10.1371/journal.pone.0112514

[26] A novel peptide motif binding to and blocking the intracellular activity of the human papillomavirus E6 oncoprotein

Susanne Dymalla 1, Martin Scheffner, Elvira Weber, Peter Sehr, Claudia Lohrey, Felix Hoppe-Seyler, Karin Hoppe-Seyler

Affiliations Expand

PMID: 19099279 DOI: 10.1007/s00109-008-0432-1

[27] A novel peptide motif binding to and blocking the intracellular activity of the human papillomavirus E6 oncoprotein

Susanne Dymalla 1, Martin Scheffner, Elvira Weber, Peter Sehr, Claudia Lohrey, Felix Hoppe-Seyler, Karin Hoppe-Seyler

Affiliations Expand

PMID: 19099279 DOI: 10.1007/s00109-008-0432-1

[28]. Guidotti G, Brambilla L, Rossi D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. Trends in Pharmacological Sciences. 2017;38(4):406–424.

PMID: 28209404.

[29]. Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. Drug Discovery Today. 2012;17(15–16):850–860. PMID: 22465171.

[30] Madani F, Lindberg S, Langel Ü, uptake of cell-penetrating peptides. Journal Futaki S, Gräslund A. Mechanisms of cellular of Biophysics. 2011; 2011:414729

PMID: 21687343

[31] 1. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al.

Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3.

Nature. 2024;630(8016):493–500.
doi:10.1038/s41586-024-07487-w. PMID: 38718835. PMCID:
PMC11168924 DOI: 10.1038/s41586-024-07487-w

[32]. Roy R, Al-Hashimi HM.
AlphaFold3 takes a step toward decoding molecular
behavior and biological computation.
Nat Struct Mol Biol. 2024; 31:997–1000. PMID: 38977902
DOI: 10.1038/s41594-024-01350-2

[33] Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed
and accuracy of docking with a new scoring function, efficient
optimization, and multithreading. Journal of Computational
Chemistry. 2010;31(2):455-461. PMID: 19499576. PMCID:
PMC3041641 DOI: 10.1002/jcc.21334

[34] Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S.
AutoDock Vina 1.2.0: New docking methods, expanded force
field, and Python bindings. Journal of Chemical Information
and Modeling. 2021;61(8):3891-3898. PMID: 34278794.
PMCID: PMC10683950 DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00203

[35] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch
GS, Croll TI, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX:
Structure visualization for researchers, educators, and
developers. Protein Science. 2021;30(1):70–82.
doi:10.1002/pro.3943. PMID: 32881101. PMCID:
PMC7737788 DOI: 10.1002/pro.3943

[36] Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Science*. 2018;27(1):14–25. doi:10.1002/pro.3235. PMID: 28710774. PMCID: PMC5734306 DOI: 10.1002/pro.3235

[37] Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson AJ. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*. 2009;30(16):2785–2791. doi:10.1002/jcc.21256. PMID: 19399780. PMCID: PMC2760638 DOI: 10.1002/jcc.21256

[38] Forli S, Huey R, Pique ME, Sanner MF, Goodsell DS, Olson AJ. Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*. 2016;11(5):905–919. doi:10.1038/nprot.2016.051. PMID: 27077332. PMCID: PMC4868550 DOI: 10.1038/nprot.2016.051

RINGRAZIAMENTI

A conclusione di questo percorso di studi, desidero dedicare questo spazio per ringraziare le persone che lo hanno reso possibile.

Innanzitutto, ringrazio sentitamente il mio relatore, il Prof. Francesco Napolitano, per avermi guidato con pazienza, competenza e disponibilità durante l'intero percorso di ricerca e stesura di questo lavoro. I Suoi preziosi consigli e il Suo supporto costante sono stati fondamentali per il raggiungimento di questo traguardo.

Questo lavoro di tesi è il frutto di un percorso di ricerca che mi ha permesso di collaborare con diverse realtà d'eccellenza.

Desidero esprimere la mia gratitudine al BioinfoLab, presso il quale ho avuto l'opportunità di svolgere l'attività di ricerca per questa tesi. Ringrazio l'intero gruppo per l'accoglienza, per avermi messo a disposizione le risorse necessarie e per avermi permesso di lavorare in un ambiente scientifico estremamente stimolante, che ha contribuito in modo determinante alla mia formazione.

Il lavoro di questa tesi è stato svolto anche presso il Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncogenesi Virale, diretto dalla Dott.ssa M. L. Tornesello. In particolare, la sintesi del peptide è stata effettuata presso il CROM di Mercogliano (AV), sezione staccata dell'IRCCS Fondazione G. Pascale di Napoli. Desidero ringraziare profondamente tutto il personale di queste strutture per avermi permesso di utilizzare i dati necessari allo svolgimento del mio lavoro, per l'accoglienza e il supporto tecnico.

Il ringraziamento più grande e sentito va ai miei genitori e a mio fratello, per essere stati il mio punto di riferimento costante. Grazie per avermi sostenuto moralmente e materialmente in ogni momento di questo percorso, per aver creduto in me fin dal primo giorno e per i vostri innumerevoli sacrifici, che mi hanno permesso di arrivare fin qui. Questo traguardo è tanto mio quanto vostro.

Ringrazio immensamente zia Franca e zio Pasquale, i miei terapisti non ufficiali durante l'intera carriera universitaria. Grazie per avermi fornito supporto morale, saggi consigli di sopravvivenza e per aver sempre creduto in me, anche quando io per primo mettevo in discussione le mie scelte di vita davanti a un libro aperto. Siete stati un'ancora di salvezza e una fonte inesauribile di buonumore e amore incondizionato.

Ringrazio di cuore zia Maria Pia, la mia 'guida ufficiale' e il mio angelo custode durante il tirocinio. Grazie per il prezioso supporto logistico e morale, e soprattutto per aver reso il mio inserimento al CROM molto più facile e meno spaventoso di quanto immaginassi. Senza i tuoi consigli, il tuo aiuto (e la tua pazienza), questo traguardo sarebbe stato molto più in salita!

Un ringraziamento speciale va ai miei compagni di viaggio: Vito, Irma e Michela. Aver condiviso con voi l'intero percorso universitario ha reso ogni ostacolo più superabile e ogni traguardo più bello. Grazie per il confronto continuo, per le infinite ore di studio passate insieme e per esserci stati nei momenti di sconforto. Le sfide affrontate fianco a fianco hanno reso questi anni indimenticabili.

Ringrazio vivamente tutti i miei parenti più stretti e a Jaja per esserci sempre stati.

A Clorinda, la parte migliore di me e la più luminosa delle mie giornate, grazie per l'infinito supporto che mi hai dato in questi anni. Questo traguardo è il punto di partenza per tutto ciò che costruiremo insieme, mano nella mano per arrivare fin dove la vita ci porterà. Un ringraziamento sincero e affettuoso lo dedico anche alla tua famiglia, un vero e proprio secondo approdo sicuro, per il calore e la costante fiducia riposta in me.

Infine, ringrazio me stesso, perché non ho mai sottovalutato la mia tenacia, per i miei sacrifici, per le notti passate a studiare e per la passione che ho donato a questa facoltà. Al Mario bambino che sognava questo momento. Non posso che dirmi grazie per non aver mollato mai.

“Inseguite sempre i vostri sogni”

Mario Loiola

