

Approcci bioinformatici per la valutazione della sicurezza di (nuove) proteine ad uso alimentare

Ivano Eberini*, Antonio Fernandez Dumont**, Anna Lanzoni**, Luca Palazzolo*

*Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari "Rodolfo Paoletti",
Università degli Studi di Milano

**European Food Safety Authority (EFSA), Parma

Le proteine presenti nel cibo possono determinare effetti avversi nel consumatore, quali reazioni mediate dal sistema immunitario (allergie, celiachia) e tossicità. In Europa, la sicurezza delle proteine dal punto di vista alimentare viene valutata prima dell'autorizzazione all'immissione in commercio. Esempi rilevanti riguardano organismi geneticamente modificati (OGM), enzimi ad uso alimentare e mangimistico, *novel food*, ecc. L'Agenzia europea per la sicurezza alimentare (EFSA) è l'organo preposto a tale valutazione, svolta seguendo le indicazioni del *Codex Alimentarius* e dettagliata in regolamenti settoriali e linee guida europee. L'Agenzia intraprende inoltre iniziative per mettere a punto o validare nuovi approcci nella valutazione della sicurezza alimentare delle proteine, allo scopo di modernizzarla e irrobustirla, possibilmente con nuove tecniche alternative (ad esempio, *in silico* e *in vitro*) e riducendo gli studi su modelli animali. Questo è di particolare rilevanza anche alla luce delle iniziative *Farm to Fork*, nel contesto

del *Green Deal* Europeo, che promuovono l'uso di proteine nuove e alternative a quelle tradizionali di origine animale. La valutazione della sicurezza delle proteine ad uso alimentare sarà centrale nel prossimo futuro, poiché verranno introdotte nuove fonti proteiche alternative a quelle tradizionali di origine animale. Gli strumenti a disposizione per la valutazione delle proteine sono stati definiti sulla base della valutazione della sicurezza delle sostanze chimiche e necessitano di evolversi e irrobustirsi, alla luce delle nuove conoscenze scientifiche e tecniche. Per questo, il dialogo tra i vari partecipanti alla valutazione della sicurezza delle proteine sarà fondamentale (ad esempio, EFSA, gli stati membri, l'accademia e l'industria) in un'ottica sia europea, sia mondiale. Nell'area delle reazioni avverse dovute al consumo di nuove proteine mediate dal sistema immunitario, attualmente EFSA sta lavorando sia per migliorare la predizione di reazioni avverse, sia per ridurre l'incertezza nell'analisi del rischio.

I progetti principali riguardano la celiachia (reazione non mediata da IgE) e le reazioni allergiche (mediate da IgE). Per quanto riguarda la celiachia, EFSA ha sviluppato un approccio *stepwise* e un software per la predizione di un passaggio chiave nella patogenesi, cioè il legame di peptidi alle molecole HLA-DQ2 e HLA-DQ8 nelle cellule presentanti l'antigene. Nell'area delle reazioni mediate da IgE, EFSA sta sviluppando un metodo di *ranking* dove gli allergeni sono categorizzati in relazione al rischio e alla severità dei sintomi. Per migliorare il peso delle evidenze utilizzate nella valutazione, EFSA propone quindi lo sviluppo di una base dei dati mirata all'uso dell'analisi dei rischi.

EFSA sta lavorando anche nell'area della predizione di effetti tossici avversi associati alle proteine. Le tossine proteiche sono prodotte da piante, animali e batteri quali strumenti di difesa in ambienti ostili e sono associate a vari meccanismi biochimici che possono portare ad effetti avversi in esseri umani e animali. In una prima collaborazione tra EFSA e l'Università degli Studi di Milano è stata messa a punto una *pipeline in silico* per eseguire una ricerca, quanto più completa e integrata possibile, di proteine con potenziali effetti tossici. In questa procedura si sono definiti database di riferimento e procedure basate su chiavi di ricerca accurate e si è deciso di prendere in considerazione soltanto proteine sottoposte a revisione da parte di curatori esperti.

La scelta della stringa "*toxin activity*" si basa su un progetto embrionale già esistente, a cura degli stessi curatori di UniProt, che hanno selezionato le proteine basandosi sui campi di *Gene Ontology* relativi alla funzione molecolare associata ai veleni animali.

Durante la catalogazione delle proteine tossiche, sono state recuperate anche le strutture tridimensionali risolte sperimentalmente, e generati modelli tridimensionali attraverso modellazione per omologia per quelle mancanti. Inoltre, sono state ottenute

informazioni dettagliate sulle famiglie, i domini, i motivi e le firme molecolari delle proteine da specifici database. Tra i principali risultati, oltre ovviamente alla generazione di un database quanto più completo possibile di tossine, vi è la strategia di ricerca basata su database pubblicamente accessibili e curati, che si stanno rivelando fondamentali per la valutazione del rischio di biopolimeri.

Le informazioni sono state utilizzate come base per esplorare nuove strategie di valutazione del rischio per le proteine, basate su metodi predittivi *in silico*. In una nuova collaborazione tra EFSA e l'Università degli Studi di Milano sono in fase di esplorazione le migliori e più accurate strategie di predizione della funzione proteica (con particolare attenzione alla predizione di tossicità), con l'obiettivo principale di identificare una strategia di predizione *in silico* di tossicità. Si guarda con particolare interesse all'eventuale futuro impiego di modelli di intelligenza artificiale utili a gestire tutte le informazioni di sequenza, strutturali e funzionali sulle proteine di interesse, al fine di ottenere un miglioramento dell'accuratezza degli approcci *in silico* per la predizione di attività tossica di proteine.

Si è partiti quindi dagli strumenti che sono stati prodotti e resi disponibili nell'ultimo decennio. Questi strumenti, disponibili su web server o in archivi pubblici, sono basati sia su classici paradigmi della biochimica e bioinformatica, come l'omologia, valutata attraverso la ricerca di similarità di sequenza, sia su modelli iterativi *position-based*, su modelli di Markov nascosti o su concetti di matematica più complessa, come la teoria dei grafi. Sono già disponibili strumenti in grado di predire la tossicità di proteine, ma anche strumenti specifici per alcune famiglie di proteine, come ad esempio le knottine, o ancora strumenti specializzati nella predizione della tossicità di proteine contenute nei veleni animali. Ovviamente, l'accuratezza di questi strumenti dipende sia dal meto-

do utilizzato, sia anche dal campo operativo della predizione. Attualmente la valutazione di questi strumenti è ancora in corso, ma già emerge la necessità, come per la predizione di proteine allergeniche, di avere uno strumento di predizione pubblico e mantenuto nel tempo dalla Commissione europea e dalle agenzie preposte, nell'intento di una valutazione trasparente della sicurezza delle sostanze. Tale strumento di predizione deve inoltre basarsi su database pubblici e curati, al fine di avere sempre a disposizione dati aggiornati e sicuri. Infatti, tra tutti i vari strumenti analizzati, diversi risultano ormai non più aggiornati o non più accessibili, rendendone impossibile un'applicazione continua e omogenea e generando quindi dati, predizioni e valutazioni irriproducibili.