

**Luigi De Colibus, PhD MBiol**

OMass Therapeutics | Building 4000, Chancellor Court, John Smith Dr, ARC, Oxford OX4 2GX, United Kingdom

### **Metodologie conosciute**

**Negative staining- e Cryo-EM | Cristallografia a raggi X di Proteine | Molecular Dynamics | Structure-Based drug design | Molecular Modelling |** Clonaggio | DNA editing | Espressione di proteine ricombinanti in cellule batteriche e di mammifero | Trasduzione basata su sistemi lentivirali per la produzione di proteine | Ingegneria proteica | Purificazione di proteine solubili e di membrana | Sviluppo di saggi enzimatici | Caratterizzazione biofisica e biochimica di proteine | Manipolazione di lipidi e detergenti

### **Competenze tecniche**

**Vitrobot | Manipolazione di cristalli e soaking | Cromatografia di proteine** in modalità **FPLC e HPLC** (IEX, HIC, SEC, IMAC) su sistemi di purificazione **ÄKTA** | Saggi spettrofotometrici per proteine e DNA (UV/VIS/CD) | Metodi elettroforetici (SDS-PAGE, BN-PAGE and 2D PAGE, Western blotting) |

### **Competenze computazionali**

Unix shell scripting | **CCP4 suite** | EMAN | **Relion** | **Rosetta Scripts** | **Phenix suite** | **Scipion suite** | **HKL2000** | **XDS** | **AMBER** | **SCHRÖDINGER suite** | Microsoft Office and Illustrator from Adobe Suite

### **Lingue conosciute**

Italiano (madre lingua), Inglese (fluente)

### **Ruoli ricoperti**

Coordinatore di progetti scientifici  
Corresponding author di articoli scientifici  
Responsabile del corso di cryo microscopia elettronica per gli studenti di dottorato del Wellcome Trust Science Program presso l'università di Oxford  
Speaker a conferenze internazionali  
Supervisore di studenti di dottorato e di master

### **Istruzione, borse di studio e premi in ordine cronologico**

Marie Curie Individual Fellowship, Amsterdam, Olanda (2019).  
Talos Basic Course, FEI Nano Part /Thermo Fisher Scientific, Eindhoven, Olanda (2017).  
Fellowship presso università di Roma "La Sapienza" (2007).  
Protein Mass Spectrometry and Proteomics a cura del Prof. Mark Lively, Wake Forest University North Carolina (2004).  
Dottorato di ricerca in Biomolecular Sciences all' Università di Pavia, sotto la supervisione del Prof. Andrea Mattevi (2003-2006).  
Abilitato alla professione di Biologo (2003).

Laurea in Scienze Biologiche presso la Seconda Università di studi di Napoli con votazione 110/110 con lode e menzione accademica (2003).

Premio di profitto per studenti che si sono distinti nell'anno accademico 1999/2000.

Premio di profitto per studenti che si sono distinti nell'anno 1998/1999.

## Occupazione

**Posizione Attuale:** Senior Scientist livello II, presso la biotech OMass Therapeutics.

**Settembre 2019- Luglio 2020:** Research Scientist, finanziato da una Marie Curie Fellowship, presso il Dipartimento di Immunologia Sperimentale dell'Università di Amsterdam (con il Prof. Theo Geijtenbeek).

**Luglio 2011- Settembre 2019:** Research fellow finanziato dalla fondazione Bill e Melinda Gates presso la divisione di biologia strutturale dell'Università di Oxford (con il Prof. David Stuart).

**Luglio 2007- Maggio 2011:** Research fellow finanziato da BBSRC presso la divisione di biologia strutturale dell'Università di Oxford (con il Prof. Robert Gilbert).

## Esperienze di ricerca

### Progetti post-dottorato

Nel corso della mia carriera accademica ho lavorato su una varietà di target molecolari di primaria rilevanza nell'ambito dell'immunologia e infettivologia, tra cui picornavirus, halovirus, tossine eucariotiche responsabili della formazione di pori nella membrana cellulare degli ospiti, enzimi che modificano l'mRNA e recettori di neurotrasmettitori.

#### **1. Caratterizzazione biofisica e biochimica del complesso MAVS-DDX3X | laboratorio Prof. Geijtenbeek | Amsterdam**

- Clonaggio di entrambi i geni delle proteine DDX3 e MAVS in vettori di espressione di lentivirus contenenti tags fluorescenti per eseguire esperimenti FRET, FLIM, con l'obiettivo di rilevare la formazione del complesso a livello cellulare.
- Generazione di linee cellulari stabili in grado di esprimere i target sopra riportati. Queste linee cellulari sono attualmente utilizzate per eseguire saggi FRET al fine di documentare la dinamica di formazione del complesso.
- Visualizzazione di cellule che contengono le cassette di espressione sopra citate con microscopio a fluorescenza per valutare il livello di espressione delle proteine in studio e loro localizzazione.
- Purificazione di entrambi i target proteici attraverso tecniche cromatografiche di affinità e di gel filtrazione.
- Visualizzazione di entrambe le proteine tramite microscopio elettronico T12, operante a 120eV, tramite la tecnica del Negative staining.

#### **2. Strutture cryo-EM di Haloviruses e Microviridae | laboratorio Prof. Stuart | Oxford**

- Risoluzione della struttura cryo-EM a 4.0Å di un batteriofago denominato FLiP (*Flavobacterium* infecting, lipid-containing Phage), solo recentemente scoperto e geneticamente caratterizzato.
- Sviluppo di un protocollo semiautomatico per la modificazione della densità cryo-EM, costruzione di modelli atomici e raffinamento delle coordinate atomiche in mappe cryo-EM in un intervallo di risoluzione 4.3-3.8 Å, per colmare il divario tra la cristallografia di proteine e la microscopia elettronica.
- Costruzione di un modello atomico della proteina del capsido virale, che rappresenta la prima struttura depositata per questa classe di virus.

- Risoluzione della struttura cryo-EM a 3.8 Å di un virus che infetta gli Archea, denominato SH1. Con il suo peso molecolare di ~82MDa, SH1 rappresenta un dei virus più grandi mai risolti tramite la microscopia elettronica. La risoluzione di questa struttura ha richiesto lo sviluppo di uno speciale protocollo in collaborazione con l'Istituto di Biofisica dell'accademia Delle Scienze Cinesi, per correggere gli effetti della sfera di Ewald che limitano la risoluzione di oggetti di grandi dimensioni, come nel caso studiato.
- Costruzione dei modelli atomici delle proteine virali che formano il capsido di SH1 e quelle interne di membrana (integrali e associate) con una metodologia simile a quella sviluppata per il virus FLiP di cui sopra.
- Risoluzione della struttura cryo-EM della proteina spike ad una risoluzione di 6.3 Å attraverso un metodo denominato Localized Reconstruction, sviluppato presso la divisione di Biologia Strutturale dell'università di Oxford, per migliorare la risoluzione di complessi macromolecolari flessibili.

### **3. Virologia strutturale, disegno di antivirali, vaccinologia strutturale | laboratorio Prof. Stuart | Oxford**

- Risoluzione di strutture cristallografiche di Enterovirus 71 (EV71) e Coxsackie virus A16 (CVA16) in complesso con molecole antivirali attraverso la tecnica del Molecular Replacement. Questa ricerca è stata effettuata in collaborazione con l'Istituto di Biofisica dell'accademia Delle Scienze Cinesi.
- Disegno di antivirali efficaci contro un ampio spettro di picornavirus attraverso la tecnica della Structure-Based drug design tramite Quantum Mechanics Ligand Docking.
- Titolare della richiesta di brevetto (GB 1402169.5), per le molecole antivirali sviluppate con l'approccio di cui sopra.
- Queste molecole sono nella prima fase di trials clinici in Cina.

### **4. Tossine eucariotiche che formano pori nelle membrane cellulari dell'ospite ed enzimi che modificano l'RNA | laboratorio Prof. Gilbert | Oxford**

- Risoluzione delle strutture cristallografiche della tossina Lysenin, nella sua forma apo ed in complesso con ligandi tramite la tecnica MIRAS.
- Risoluzione della struttura cristallografica dell'enzima Nhm1 nella sua forma apo ed in complesso con ligandi tramite la tecnica MAD. Questo enzima è coinvolto nel processamento dell'mRNA durante la trascrizione.
- Risoluzione della struttura cristallografica dell'enzima CID1, una poly(U)polimerasi (PUP), tramite la tecnica del Molecular Replacement, con conseguente miglioramento delle fasi tramite la procedura della Density Modification.

### **5. Struttura cryo-EM del recettore GABA<sub>A</sub> e modulazione della sua attività tramite Structure-Based drug design | in collaborazione con il gruppo del Prof. Aricescu | LMB-Cambridge**

- Costruzione del modello atomico del recettore Type-A  $\gamma$ -Aminobutyric Acid (GABA<sub>A</sub>) in complesso con nanobodies in una mappa cryo-EM alla risoluzione 5.1 Å, tramite un approccio basato sull'utilizzo di Homology Modelling per la costruzione di modelli atomici in mappe cryo-EM a bassa risoluzione.
- Utilizzo di Quantum Mechanics Ligand Docking per studiare le interazioni di ligandi nel sito di legame del recettore GABA<sub>A</sub>.

- Designo di nuove molecole con affinità più alta per il GABA<sub>A</sub>, basate sui risultati di docking di ligandi.
- Le molecole di cui sopra sono attualmente testate in collaborazione con il dipartimento di Farmacologia dell'Università di Harvard, U.S.A.

### **Dottorato**

La mia tesi di dottorato ha riguardato la risoluzione della struttura cristallografica di proteine virali e di membrana. In particolare, ho determinato la struttura atomica dell'enzima monoamino ossidasi di tipo A (MAOA), una proteina di membrana mitocondriale. Sono stato anche coinvolto nel progetto Vizier, un progetto europeo di genomica strutturale focalizzato su proteine virali. All'interno di esso ho determinato la struttura cristallografica dell'elicasi del virus Kokobera.

### **Laurea**

Ho discusso la tesi di laurea sullo sviluppo di un saggio non radioattivo per monitorare l'attività enzimatica della ribonucleasi H del virus dell'epatite di tipo B (HBV).

### **Brevetti**

Inibitori virali contro picornaviruses. Richiesta di brevetto numero GB 1402169.5

### **Collaborazioni con industria farmaceutica**

Collaborazione con Sealife Pharma GmbH (<http://www.sealifepharma.com>) per lo sviluppo di una nuova generazione di antivirali.

### **Attività ed interessi**

Sono un appassionato di libri sulla storia della scienza e nel tempo libero mi piace ascoltare musica rock ed elettronica. Adoro viaggiare, conoscere nuovi posti e culture ma per me è altrettanto importante trascorrere del tempo con la mia famiglia ed i miei amici.

### **Conferenze, esperienze lavorative all'estero e simposi internazionali**

- Max Planck-Institut für Biochemie, Martinsried (Germany), to test the “free-mounting system” for the MaoA protein crystals.
- Two months at Emory University, Atlanta (USA) in Dale Edmonson's lab of Flavin chemistry and flavoenzyme catalysis, Dept. of Biochemistry, for the expression, purification and activity assay of human MaoA, December 2004.
- One week in APS, Chicago (USA), to collect diffraction data on MaoA crystals.
- International Workshop on Discovery of Antiviral Compounds, 26-29 April 2006, Lübeck, Germany.
- International School of Protein Crystallography, 21-25 May 2006, Como, Italy.
- 5th International Workshop on Structural Characterisation of Proteins by NMR and X Ray Diffraction and Computational Methods, 16-18 June 2006, San Vito di Cadore, Italy.
- New Developments in Quantitative Molecular Bioscience, 10-17 September 2008, Spetses, Greece.

- Structure and Function from Macromolecular Crystallography: organisation in space and time. 42<sup>nd</sup> Crystallographic Course at Ettore Majorana centre, 3-13 June 2010, Erice, Italy.
- International Union of Crystallography Twenty-Second General Assembly and International Congress of Crystallography, 22-30 August 2011, Madrid, Spain.
- EUROPIC 2014, 18<sup>th</sup> international Picornavirus meeting, 9-14 March 2014, Blankenberge, Belgium. **(Invited Speaker)**
- Structural basis of Pharmacology. The 47<sup>th</sup> crystallographic course at Ettore Majorana Centre, 30 May - 8 June 2014 Erice, Italy. **(Invited Speaker)**
- Hands-On Workshop on Cryo-EM Modeling Based on X-ray Crystallography, 15-19 August, 2016, Jülich, Germany.
- 6<sup>th</sup> European Congress of Virology, 19-22 October 2016, Hamburg, Germany.
- The 6<sup>th</sup> International caesar Conference. Overcoming Barriers — atomic-resolution and beyond: advances in molecular electron microscopy. 12 - 15 September 2017, Bonn, Germany.
- Workshop on Advanced Topics in EM Structure Determination. 29 October - 3 November 2017, The National Resource for Automated Molecular Microscopy, New York, USA. **(Selected attendant)**
- Protein Structure Determination Industry Meeting. 23-25 October 2022, Eindhoven, Netherlands.

**Pubblicazioni** (first- or corresponding authorships sono indicate con un asterisco rosso)

1. **\*De Colibus L**, Stunnenberg M, Geijtenbeek TBH. *DDX3X structural analysis: Implications in the pharmacology and innate immunity*. **Curr Res Immunol**. 2022 May 24;3:100-109.b (corresponding author)
2. AFM Gavriilidou, K Sokratous, HY Yen, **L De Colibus\***. *High-throughput Native Mass Spectrometry screening in drug discovery*, **Front Mol Biosci**. 2022 Apr 14;9:837901 (corresponding author)
3. **\*De Colibus L**, Roin E, Walter TS, Ilca SL, Wang X, WangN, Roseman AM, Huiskonen JT, Bamford D & DI Stuart. *Assembly of complex viruses exemplified by a halophilic euryarchaeal virus*. **Nat Commun**. 2019 Mar 29; 10(1):1456. The structure described in this paper has been recently highlighted in **Nature** (<https://www.nature.com/articles/d41586-020-00114-4>)
4. Miller PS, Masiulis S, Malinauskas T, Kotecha A, Rao S, Chavali S, **De Colibus L**, Pardon E, Hannan S, Scott S, Sun Z, Frenz B, Klesse G, Li S, Diprose J, Siebert A, Esnouf R, DiMaio F, Tucker S, Smart T, Steyaert J, Babu M, Sansom M, Huiskonen J, Aricescu R. *Heteromeric GABA<sub>A</sub> receptor structures in positively-modulated active states*. <https://www.biorxiv.org/content/early/2018/06/05/338343>
5. **\*De Colibus L** and Stuart DI. *Building the 3.9 Å cryo-EM atomic model of a boreal lake virus of unknown fold*. **J Struct Biol**. 2018 Apr ;202(1):94-99 (corresponding author)
6. **\*De Colibus L**, Laanto E, Mäntynen S, Marjakangas J, Gillum A, Ravantti JJ, Huiskonen JT and Sundberg LR. *A new virus type found from a boreal lake links ssDNA and dsDNA viruses*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2017 Aug 1;114(31):8378-8383.
7. Miller PS, Scott S, Masiulis SS, **De Colibus L**, Pardon E, Steyaert J, Aricescu RA. *Structural basis for GABA<sub>A</sub> receptor potentiation by neurosteroids*. **Nat Struct Mol Biol**. 2017 Oct 9.
8. Vasiliauskaitė-Brooks I, Sounier R, Rochaix P, Bellot G, Fortier M, Hoh F, **De Colibus L**, Bechara C, Saied EM, Arenz C, Leyrat C and Granier S. *Structural basis for the ceramidase activity of adiponectin receptors*. **Nature**. 2017 Apr 6;544(7648):120-123.
9. **\*De Colibus L**, Wang X, Tijsma A, Neyts J, Spyrou JA, Ren J, Grimes JM, Puerstinger G, Leyssen P, Fry EE, Rao Z, Stuart DI. *Structure elucidation of Coxsackievirus A16 in complex with GPP3 informs a systematic review of highly potent capsid binders to enteroviruses*. **PloS Pathogens**. 2015 Oct 20.

10. Kelly TJ, **De Colibus L**, Elliott L, Fry EE, Stuart DI, Rowlands DJ, Stonehouse NJ. *Potent antiviral agents fail to elicit genetically-stable resistance mutations in either enterovirus 71 or Coxsackievirus A16*. **Antiviral Research**. 2015 Oct 29.
11. **\*De Colibus L**, Wang X, Spyrou JA, Kelly J, Ren J, Grimes J, Puerstinger G, Stonehouse N, Walter TS, Hu Z, Wang J, Li X, Peng W Rowlands DJ, Fry EE, Rao Z, Stuart DI. *More-powerful virus inhibitors from structure-based analysis of HEV71 capsid-binding molecules*. **Nat Struct Mol Biol**. 2014 Mar;21(3):282-8 (This publication has been recently cited in the book: **Quantum mechanics in Drug Discovery**).
12. **\*De Colibus L**, Sonnen AF, Morris KJ, Siebert CA, Abrusci P, Plitzko J, Hodnik V, Leippe M, Volpi E, Anderluh G, Gilbert RJ. *Structures of lysenin reveal a shared evolutionary origin for pore-forming proteins and its mode of sphingomyelin recognition*. **Structure**. 2012 Sep 5;20(9):1498-507.
13. Yates LA, Fleurdépine S, Rissland OS, **De Colibus L**, Harlos K, Norbury CJ, Gilbert RJ. *Structural basis for the activity of a cytoplasmic RNA terminal uridylyl transferase*. **Nat Struct Mol Biol**. 2012 Aug;19(8):782-7.
14. Yates LA, Lumb CN, Brahme NN, Zalyte R, Bird LE, **De Colibus L**, Owens RJ, Calderwood DA, Sansom MS, Gilbert RJ. Structural and functional characterization of the kindlin-1 pleckstrin homology domain. **J Biol Chem**. 2012 Dec 21;287(52):43246-61
15. Edmondson DE, De Colibus L, Binda C, Li M,Mattevi A. *New insights into the structures and functions of human monoamine oxidases A and B*. **J Neural Transm**. 2007 Mar 29
16. **\*De Colibus L**, Speroni S, Coutard B, Canard B, Forrester NL, Gould E, and Mattevi A. *Purification and Crystallization of Kokobera Virus Helicase*. **Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun**. 2007 Mar 1; 63:193-5
17. Speroni S, **De Colibus L**, Mastrangelo E, Gould E, Coutard B, Forrester NL, Blanc S, Canard B, Mattevi A. *Structure and biochemical analysis of Kokobera virus helicase*. **Proteins**. 2008 Feb 15;70(3):1120-3.
18. **\*De Colibus L** and Mattevi A. *New frontiers in structural flavoenzymology*. **Current Opinion in Structural Biology**. 2006, 16:722–728
19. **\*De Colibus L**, Li M, Binda C, Lustig A, Edmondson DE, Mattevi A. *Three-dimensional structure of human monoamine oxidase A (MAO A): relation to the structures of rat MAO A and human MAO B*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2005 Sep 6 102(36):12684-9
20. A Mattevi, L **De Colibus**, C Binda, D Edmondson. *Structural insights into the inhibitor specificity and catalytic mechanism of monoamine oxidase*. **Italian Journal of Biochemistry**. 2005; 54.
21. Potenza N, **De Colibus L**, Russo A. *Gel-based assay for ribonuclease H activity toward unlabeled poly(A)-poly(dT)*. **Anal Biochem**. 2005 Feb 1;337(1):167-9

**Data**

11/04/23