

STUDIO DELL'INTERAZIONE DI POTENZIALI INIBITORI CON IL PRIONE PrP^C (90-231) DELLA BSE TRAMITE TECNICHE DI SIMULAZIONE MOLECOLARE

Sabrina Pricl¹, Maurizio Fermeglia¹, Maurizio Fratta¹, Gianluigi Forloni², Pasqualina D'Ursi²

¹Dipartimento di Ingegneria Chimica, dell'Ambiente e delle Materie Prime, Università degli Studi di Trieste, Piazzale Europa 1, 34127 Trieste e ICS UNIDO, Area di Ricerca di Trieste, Padriciano 99, 34100 Trieste
²Dipartimento di Biochimica e Farmacologia Molecolare e Dipartimento di Neurologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Via Eritrea 62, 20157 Milano

INTRODUZIONE

La proteina prione PrP^C è un componente glicosilato della superficie extracellulare dei neuroni che, allo stato attuale, sembra avere un ruolo attivo nella trasduzione dei segnali. La sua variante conformazionale, PrP^{Sc}, è una proteina che possiede diversi domini a conformazione beta-sheet, resistente alle proteasi, che è causa di malattie neurodegenerative ad esito fatale nei mammiferi e negli esseri umani (encefalite spongiforme bovina (BSE), sindrome di Creutzfeldt-Jakob (CJD), insonnia familiare fatale, etc.) e che può esibire manifestazioni sporadiche, ereditarie o infettive (1). A dispetto delle notevoli differenze nelle espressioni fenotipiche, questi disordini cerebrali sono accumulati da un meccanismo patogenico simile: una modificazione post-traslazionale del prione dalla isoforma cellulare normale PrP^C alle specie tipiche delle forme patologiche PrP^{Sc}. La transizione PrP^C → PrP^{Sc} coinvolge un profondo cambiamento conformazionale, con una diminuzione della struttura secondaria in alfa-elica (dal 40% al 30% circa) e un conseguente aumento del contenuto di beta-sheet (da ~ 3% a 40%). Questa transizione, a sua volta, è accompagnata dalla manifestazione di proprietà chimico-fisiche abnormi, che includono la non-solubilità nei tipici detergenti non-denaturanti e la parziale resistenza alla digestione da parte della proteinase K (2).

L'urgenza di identificare e sviluppare composti ad uso terapeutico è aumentata notevolmente in tempi recenti a causa delle note epidemie di BSE e la comparsa di una nuova variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob. A tale proposito, una varietà di composti è stata testata sia *in vitro* che *in vivo*, ed è stato, di fatto, verificato che tali sostanze sono in grado di ridurre l'accumulo di PrP^{Sc} in cellule infette, di ritardare i sintomi clinici della malattia e di prolungare il tempo di sopravvivenza in animali di laboratorio. Tale gruppo di farmaci è strutturalmente eterogeneo, ed il meccanismo di azione rimane a tutt'oggi sconosciuto; tuttavia, alcune di queste molecole sono accomunate dalla presenza un esteso *core* aromatico idrofobico recante un elevato numero di sostituenti idrofilici (i.e., tetraciclina, doxorubicina, amfotericina B, tetrapirrol e rosso Congo). Poiché la conversione PrP^C → PrP^{Sc} ha come conseguenza un aumento dell'idrofobicità dovuta all'esposizione di residui lipofili al solvente acquoso e la formazione di aggregati insolubili, è ragionevole supporre che l'attività anti-prione dei composti farmaceutici sia collegata al loro carattere idrofobico che permette l'instaurarsi di una forte interazione tra proteina e substrato (3).

In questo lavoro presentiamo i risultati ottenuti da uno studio di modellazione e dinamica molecolare dei possibili complessi che l'intero frammento PrP(90-231) forma con i farmaci sopra elencati - sia *in vitro* (i.e. nel vuoto) che in ambiente acquoso - con lo scopo di fornire un contributo alla comprensione, a livello molecolare, dei meccanismi alla base della

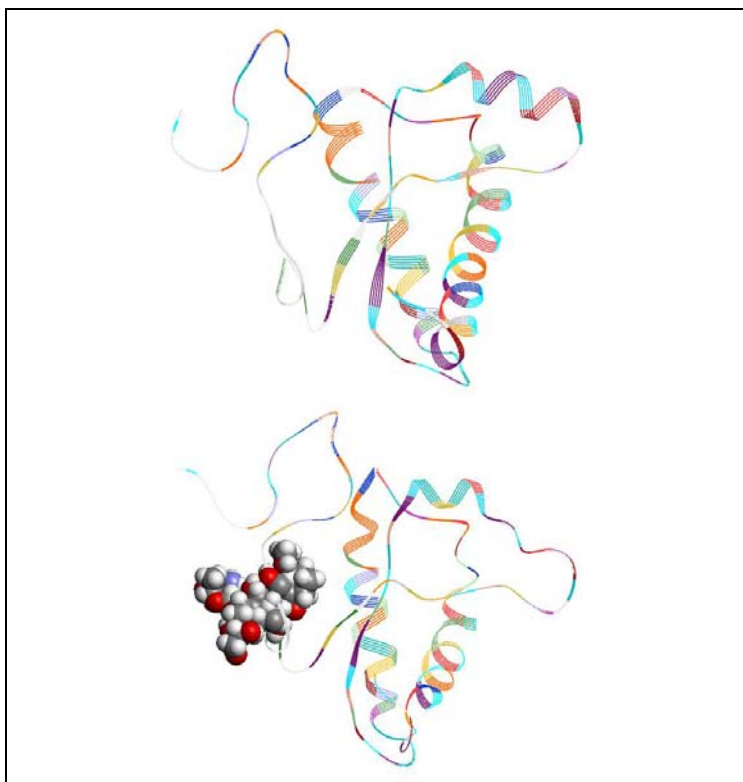
transizione conformazionale $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$ e delle informazioni utili alla progettazione di nuovi inibitori efficaci.

METODI E PROCEDURE DI CALCOLO

Le simulazioni molecolari sono state condotte su una workstation Silicon Graphics Origin 200. Per la predizione dell'interazione farmaco-proteina è stato usato il Software AutoDock v. 3.0 (4), mentre le simulazioni di dinamica molecolare sono state effettuate usando il Software Discover (Molecular Simulations Inc., USA) e varie routines FORTRAN sviluppate *in-house*. La struttura 3-D del PrPC90-231 è stata ottimizzata partendo dalle relative coordinate cristallografiche con un approccio meccanico-molecolare (MM) usando il force field COMPASS (5) e ricorrendo ad un metodo misto di ottimizzazione gradiente coniugato/Newton Raphson. La soglia di convergenza è stata posta uguale a 0.01 Kcal/mole per Å. L'effetto solvente è stato modellato ricorrendo al modello del continuo polarizzabile (PCM) (6). In tale approccio il soluto, rappresentato da un set di cariche puntiformi Q_i derivate dal force field viene collocato in una cavità di forma realistica composta da sfere intersecanti aventi raggi di van der Waals centrate sui singoli atomi. Il solvente è rappresentato da un mezzo dielettrico omogeneo con costante dielettrica ϵ che, nel nostro caso, è stata posta uguale a 80.

RISULTATI E DISCUSSIONE

A titolo di esempio, la Figura 1 riporta il confronto tra il modello molecolare del frammento del prione $\text{PrP}^c(90-231)$ e il risultato della simulazione dinamica molecolare del relativo complesso con la doxorubicina *in vitro*.



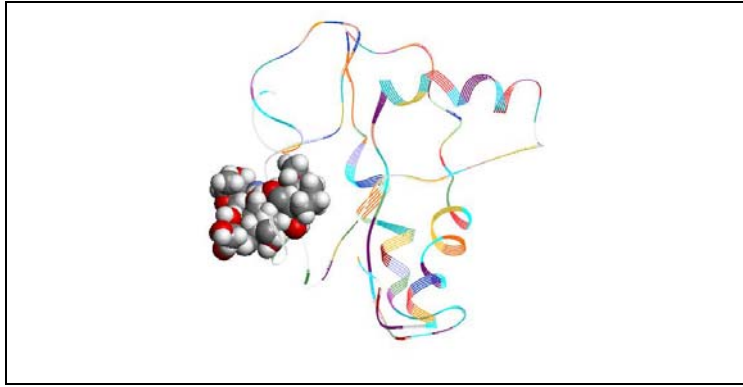


Figura 1: Confronto tra il modello molecolare del prione PrP^c(90-231) (in alto), il modello risultante dal processo di docking con la doxorubicina (al centro) e il modello dopo 10 ps di simulazione molecolare (in basso).

Come si può osservare dalla Figura 1, il risultato di tale analisi indica come sito preferenziale di binding per la doxorubicina la sequenza Gly114–Gly124. Ricordiamo che la regione 90-125 del prione corrisponde alla parte N-terminale del nucleo resistente alla digestione con la proteasi K del PrP^{Sc}; tale resistenza ha portato Prusiner e collaboratori (7) ad ipotizzare che tale sequenza aminoacidica deve subire un riarrangiamento sostanziale e, come tale, svolgere quindi un ruolo fondamentale, nella conversione PrP^c → PrP^{Sc}. Allo stesso tempo, mutanti PrP mancanti di parti di questa sequenza, (i.e., residui 95-107, 108-121 o 114-121) non sono convertiti in forme proteasi-resistenti in cellule infette e, in particolare, l'espressione del mutante PrP Δ 114-121 inibisce in maniera sostanziale l'accumulo del PrP^{Sc} endogeno in tali cellule. Infine, evidenze di spettroscopia NMR hanno rivelato che l'interazione della tetraciclina con il peptide Pr106-126 coinvolge i residui che appartengono alla regione idrofobica di tale peptide (Ala115-118, Val121-122 e Leu125) (3). Dall'analisi della Figura 1 risulta come, in tali condizioni, le fluttuazioni attorno alla struttura secondaria siano molto piccole, e l'unica variazione notevole sia costituita dalla parte N-terminale (residui 90-126) e dal loop tra l'elica B e l'elica C. La bassa, e normale, mobilità della parte strutturata della molecola è in accordo con evidenze sperimentali quali, ad esempio, rilassamento NMR (8).

L'analisi della sequenza degli aminoacidi e la relativa struttura secondaria del complesso PrP^c-doxorubicina può essere confrontata, ad esempio, con quella relativa al complesso PrP^c(90-231)-doxiciclina, riportata in Figura 2. La doxiciclina è un derivato della tetraciclina che presenta una attività farmacologia del tutto analoga alla tetraciclina di base ma, al contrario di quest'ultima, possiede il requisito fondamentale di poter superare la barriera sangue/cervello (BBB) in maniera molto più efficiente. Passando al confronto tra i due farmaci, possiamo subito osservare che, anche nel caso della doxiciclina, il sito preferenziale di binding si trova nella zona N-terminale flessibile 90-126. Inoltre, sempre in analogia con la doxorubicina, gli aminoacidi coinvolti nell'interazione farmaco-proteina appartengono al dominio idrofobico del segmento 90-126, e precisamente si tratta della sequenza Met112-Leu125. È interessante osservare anche come la complessazione di entrambi i farmaci con tale zona del prione porti, già dopo un tempo molto breve, alla scomparsa, *in vitro*, delle zone in conformazione beta-sheet. Sebbene le zone S1 e S2 costituiscano una sequenza in beta-sheet piuttosto corta nella struttura di partenza del prione, recentissimi studi condotti a basso pH hanno rivelato che entrambe zone tendono ad aumentare nel tempo; inoltre, i residui vicinali non strutturati (dapprima i residui 120-124, e successivamente i residui 110-113) assumono una conformazione beta via interazioni idrofobiche tra catene laterali. I residui 121-124 sono particolarmente interessanti in quanto

molte evidenze supportano l'ipotesi di un loro coinvolgimento come punto di origine di beta-sheet e di una successiva fusione della S1 in tale regione (9). Di conseguenza, l'abilità dei due farmaci qui considerati di interagire con il dominio idrofobico del PrP può essere considerata una promettente caratteristica da analizzare in maggior dettaglio e, eventualmente, da sfruttare nell'inibizione del processo di conversione $\text{PrP}^c \rightarrow \text{PrP}^{\text{Sc}}$.

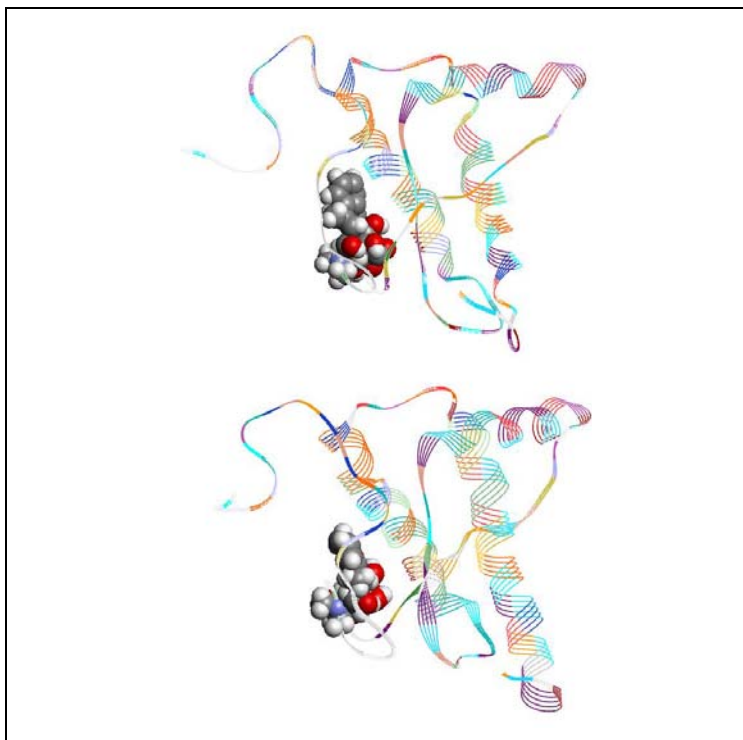


Figura 2: Confronto tra il modello molecolare risultante dal processo di docking con la doxiciclina dopo 1 ps di simulazione molecolare (in alto) e il modello dopo 10 ps (in basso).

RIFERIMENTI

- (1) Prusiner, S.B., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 13363 (1998).
- (2) Prusiner, S. B., Cohen, F.E., Annu. Rev. Biochem., 67, 793 (1998).
- (3) Tagliavini, F., Forloni, G., Colombo, L., Rossi, G., Girola, L., Canciani, B., Angeretti, N., Giampaolo, L., Peressini, E., Awan, T., De Gioia, L., Ragg, E., Bugiani, O., Salmona, M., J. Mol. Biol., 300, 1309 (2000).
- (4) Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J., J. Comp. Chem., 19, 1639 (1998).
- (5) Sun, H., J. Phys. Chem., 102, 7338 (1998).
- (6) Miertus, S., Scrocco, E., Tomasi, J., Chem. Phys., 55, 117 (1981).
- (7) Prusiner, S.B., Groth, D.F., Bolton, D.C., Kent, S.B., Hood, L.E., Cell, 38, 127 (1984).
- (8) Donne, D.G., Viles, J.H., Groth, D., Mehlhorn, I., James, J.L., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Wright, P.E., Dyson, H.J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 13452 (1997).
- (9) Alonso, D.O.V., DeArmond, S.J., Cohen, F.E., Daggett, V., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 2985 (2001).