

DENDRIMERI BIOTECNOLOGICI A NUCLEO PROTOPORFIRINICO: STUDIO DI DINAMICA MOLECOLARE

Sabrina Pricl, Maurizio Fermeglia, Marco Ferrone

Dipartimento di Ingegneria Chimica, dell'Ambiente e delle Materie Prime, Università degli Studi di Trieste,
Piazzale Europa 1, 34127 Trieste

INTRODUZIONE

I dendrimeri sono polimeri caratterizzati da un elevato numero di ramificazioni che emanano da un nucleo centrale (core), possiedono un numero definito di generazioni e di gruppi funzionali terminali, e vengono sintetizzati in processi di tipo step-wise attraverso una sequenza di reazioni ripetute. Questa peculiare topologia molecolare si riflette in una serie di proprietà chimiche e fisiche uniche nel loro genere e che, a loro volta, possono essere sfruttate in numerose applicazioni: dalla catalisi su nanoscala alle applicazioni in campo medico diagnostico, dai sensori chimici fino alle antenne molecolari tanto per citare solo alcuni esempi.

Nel tentativo di imitare le funzioni biologiche delle proteine ematiche, uno degli obiettivi più stimolanti è quello di realizzare un'attività di adsorbimento reversibile dell'ossigeno molecolare assolutamente analogo a quello che si verifica nell'emoglobina e/o nella mioglobina. A tale proposito, è stata sintetizzata una varietà di complessi porfirina-Fe²⁺ variamente sostituiti (1-4), alcune delle quali si è effettivamente dimostrata in grado di legare stabilmente l'ossigeno ma esclusivamente in condizioni anidre. Solo recentemente, Jin et al. hanno sintetizzato una serie di dendrimeri aril-eteri caratterizzati dalla presenza di un core a funzionalità porfirinica (5). La loro caratterizzazione sperimentale ha dimostrato che l'anello porfirinico è praticamente completamente incapsulato all'interno del dendrimero quando il numero di strati aromatici nel framework dendrimerico è maggiore o uguale a 4. Grazie alla protezione stereochimica e idrofobica del sito attivo protoporfirinico, tali dendrimeri ad elevata generazione hanno dimostrato di possedere una capacità di legare l'ossigeno molecolare molto simile a quella che caratterizza la mioglobina. (6).

In questo studio riportiamo i risultati ottenuti da una serie estensiva di simulazioni molecolari eseguite su 5 generazioni successive di tali dendrimeri a nucleo protoporfirinico, con l'intento di verificare la stabilità di questi modelli monomolecolari di proteine ematiche trasportatrici di ossigeno in ambiente acquoso.

DETTAGLI COMPUTAZIONALI

Tutte le simulazioni sono state eseguite su una Silicon Graphics Origin 200 usando il software *Cerius²* (v.4.2) e *Materials Studio*, entrambi della Molecular Simulations Inc. (San Diego, USA). La generazione di modelli molecolari accurati della serie dendrimerica è stata ottenuta con la seguente procedura. Per ciascun dendrimero, la molecola è stata costruita e la sua geometria è stata ottimizzata in accordo con i principi della meccanica molecolare usando il *force field* COMPASS (7). La carica totale sulle molecole è stata posta uguale a zero, e la distribuzione delle cariche parziali all'interno di ciascuna molecola è stata determinata con il metodo di Rappé e Goddard (8). L'energia è stata minimizzata ricorrendo al metodo di Newton-Raphson; seguendo tale procedura, le derivate atomiche quadratiche medie nelle regioni a bassa energia erano inferiori a 0.05 kcal/mole Å. Le interazioni di non-legame a lungo raggio sono state trattate applicando opportune distanze di cut-off e, per evitare

discontinuità indotte dalla presenza dei cut-off, è stato usato il metodo delle spline cubiche. I parametri delle distanze e delle energie di van der Waals per le interazioni di non legame tra atomi eteronucleari sono stati calcolati con la regola di combinazione di tipo 6th-power proposta da Walman e Hagler (9).

I dettagli strutturali delle molecole isolate sono stati ottenuti da simulazioni di dinamica molecolare (MD) nell'insieme canonico (NVT) a 298K. Per il calcolo delle energie in ambiente acquoso, un numero opportuno di molecole di acqua sono state con finite, assieme a una molecola di dendrimero, in una cella cubica alla quale sono state applicate le condizioni periodiche al contorno (PBC). Come modello rappresentativo dell'acqua è stato preso il modello *simple 3-point charge* (SPC), che si è dimostrato particolarmente valido nel descrivere le proprietà di bulk dell'acqua a temperature ordinarie (10). Per minimizzare l'artificialità della periodicità, la distanza di cut-off è stata posta uguale a metà della lunghezza della cella. Le strutture risultanti sono state rilassate ancora con l'uso del COMPASS; in questo caso, per il calcolo delle interazioni di non legame è stata impiegata la tecnica di Ewald L'applicazione diretta di tale schema di meccanica molecolare può risultare nell'intrappolamento del sistema in un minimo locale metastabile. Per prevenire questa possibilità, le strutture, una volta rilassate, sono state sottoposte ad una procedura di *annealing* (5 cicli ripetuti da 298K a 1000K e ritorno) usando condizioni di simulazione dinamica di tipo NVT. Alla fine di ogni ciclo di annealing, le strutture sono state ulteriormente rilassate via FF, usando i seguenti criteri di convergenza: rms per la forza < 0.1 kcal/mole Å per la molecola e 0.1 kcal/mole Å³ per gli sforzi sulla cella. Entrambi i criteri di convergenza La cella di simulazione è stata fatta variare in dimensioni e forma durante il processo di minimizzazione dell'energia, in modo da trovare la densità di equilibrio per i vari sistemi. Ogni simulazione MD è stata iniziata assegnando un set di velocità atomiche iniziali in accordo con una distribuzione di tipo Maxwell-Boltzmann a 2xT, essendo T la temperatura della simulazione. La temperatura è stata controllata con un accoppiamento debole ad un bagno (11), con costante di accoppiamento $\tau_T=0.01$ ps. Le equazioni Newtoniane del moto sono state integrate usando l'algoritmo di *leapfrog Verlet* (12), usando un intervallo di integrazione pari a 1 fs. Poiché le cariche parziali assegnate con il metodo di Rappé e Goddard dipendono dalla geometria molecolare, esse sono state regolarmente aggiornate ogni 100 passi di simulazione per l'intero corso della simulazione stessa. Ogni simulazione di MD è consistita in una fase di equilibrizzazione, durante la quale il processo di equilibrizzazione è stato seguito monitorando il comportamento dell'energia potenziale e cinetica, ed una fase successiva di raccolta dati. In quasi tutti i casi, le componenti dell'energia hanno iniziato ad oscillare attorno a valori stazionari attorno a 30 ps. Pertanto, fasi di equilibrizzazione pari a 100 ps e fasi di acquisizione dati pari a 300 ps sono state giudicate sufficienti per garantire l'ottenimento di risultati accurati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La Figura 1 mostra i modelli molecolari ottimizzati, rispettivamente, della generazione 1 e della generazione 5 dei dendrimeri a base protoporfirinica, così come ottenuti dalla simulazione molecolare in condizioni NVT a temperatura ambiente. L'analisi dei rapporti degli assi d'inerzia per tali dendrimeri ha rivelato che la transizione da una struttura amorfa ad una pressoché sferica si verifica, per questa serie di molecole, tra la terza e la quarta generazione (i.e., $I_i/I_j \rightarrow 1$), così come la generazione critica G_c ottenuta, seguendo la procedura proposta da de Gennes, diagrammando il rapporto tra l'area del dendrimero e il numero di gruppi terminali corrispondenti a ciascuna generazione in funzione del numero di generazioni, risulta essere proprio la quarta.

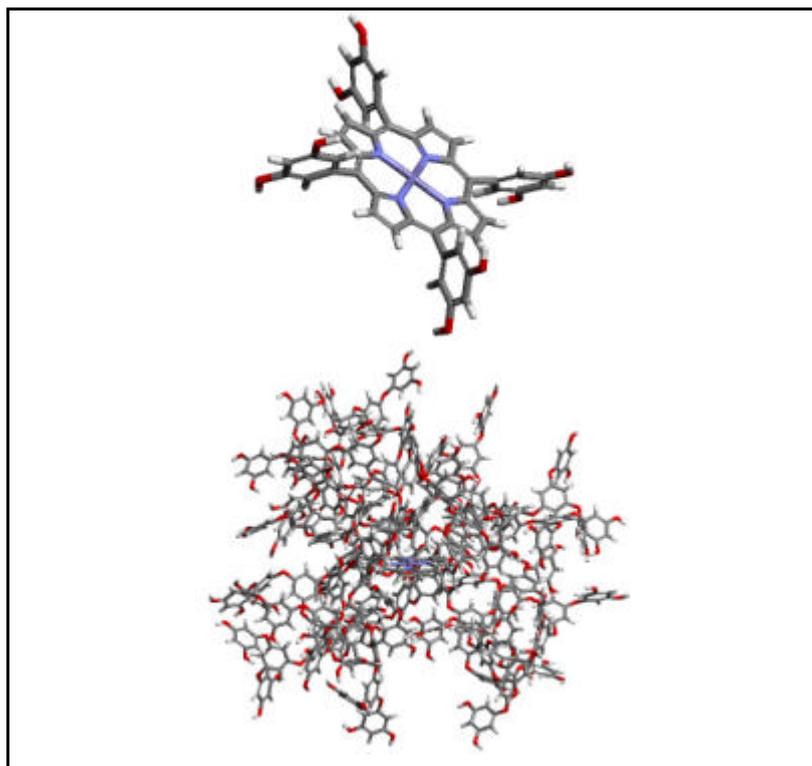


Figura 1: Modelli molecolari della generazione 1 (sopra) e della generazione 5 (sotto) dei dendrimeri a nucleo protoporfirinico considerati.

In accordo con delle evidenze sperimentali di spettroscopia NMR (6), l'analisi delle nostre simulazioni al computer ha rivelato che, nella generazione 5, il nucleo protoporfirinico è ben incapsulato all'interno del guscio dendrimerico, che può così attuare una protezione sia di tipo sterico che idrofobico per l'attività di binding dell'ossigeno. Ciò risulta anche particolarmente evidente dall'analisi dell'andamento dei valori dell'energia potenziale in funzione delle diverse generazioni dendrimeriche ottenuti dalla simulazione molecolare condotta su molecole aventi il nucleo protoporfirinico contenente uno ione Fe^{2+} legato ad una molecola di O_2 al 5 sito di coordinazione e un residuo di istidina al 6 sito di coordinazione (vedi Figura 2).

Il compartimento anomalo esibito dalla generazione 4 è una caratteristica tipica delle molecole di tipo *starburst*, in particolare di quei dendrimeri che presentano una ramificazione di tipo simmetrico (13). Come si può ben vedere in Figura 2, le molecole dendrimeriche legate alla molecola dell'ossigeno sono stabili in acqua; in particolare, la generazione 5, che risulta avere raggio di girazione R_g pari a 15.5 Å e, pertanto, praticamente uguale a quello della mioglobina (15.1 Å), sembra essere caratterizzata dal minor valore dell'energia potenziale di tutta la serie analizzata e, quindi, essere la più efficiente nella coordinazione dell'ossigeno molecolare.

L'ulteriore analisi della relazione tra raggio di girazione e peso molecolare per queste molecole ha rivelato che esiste una relazione lineare tra $\log M_w$ vs. $\log R_g$, il cui esponente, corrispondente alla dimensione frattale della molecola, è risultato essere pari a 2.31, e quindi perfettamente in media con le dimensioni frattali che caratterizzano la maggior parte delle proteine (14).

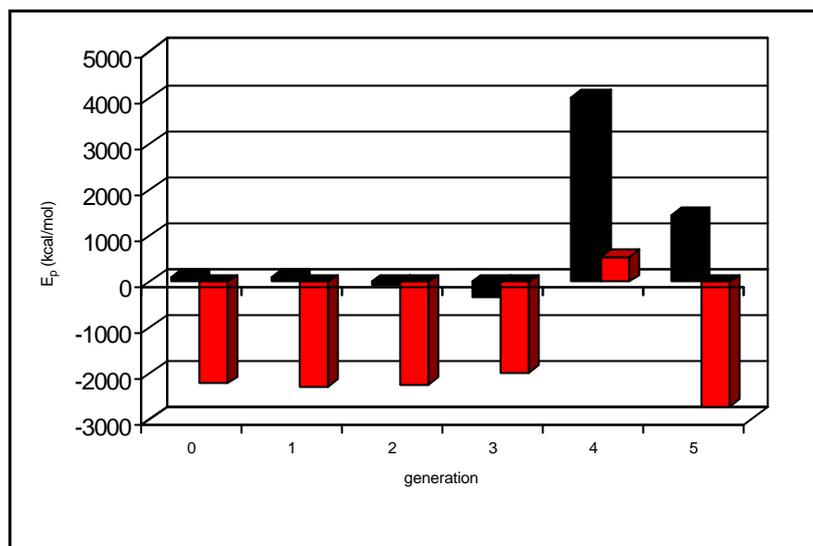


Figura 2: Andamento dell'energia potenziale in funzione della generazione per i dendrimeri in vitro (nero) e in ambiente acquoso (rosso).

Infine, la serie di test condotti con diversi metalli presenti nel nucleo protoporfirinicco ha rivelato, per i metalli biologici, un trend perfettamente in linea con quello naturale, ha dimostrato la possibilità di includere stabilmente ioni per scintigrafia e, non ultimo per importanza, la non assorbibilità degli ioni tossici..

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Almong, J., Baldwin, J.E., Huff, J., J. Am. Chem. Soc., 97, 227 (1975).
- (2) Collman, J.P., Brauman, J.I., Collins, T.J., Iverson, B.L., Lang, G., Pettman, R.B., Sessler, J.L., Walters, M.A., J. Am. Chem. Soc., 105, 3038 (1983).
- (3) Ward, B., Wang, C.-B., Chang, C.K., J. Am. Chem. Soc., 103, 5236 (1981).
- (4) Momenteau, M., Reed, C.A., Chem. Rev., 94, 659 (1994).
- (5) Jin, R.-H, Aida, T. and Inoue, S., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1260 (1993).
- (6) Jiang, D.-L. and Aida, T., J. Chem. Soc., Chem. Commun., 1523 (1996).
- (7) Sun, H., J. Phys. Chem., 102, 7338 (1998).
- (8) Rappé, A. K. and Goddard III, W. A., J. Phys. Chem., 95, 3358 (1991).
- (9) Waldman, M. and Hagler, A. T., J. Comput. Chem., 14, 1077 (1993).
- (10) Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Di Nola, A., van Gunsteren, W.F. and Haak, J.R., J. Chem. Phys., 81, 3684 (1984).
- (11) Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., Di Nola, A., van Gunsteren, W.F. and Hermans, J., in Intermolecular Forces, B. Pullman Ed., Reidel Dordrecht, The Netherlands, pp. 331-342 (1981).
- (12) Verlet, L., Phys. Rev., 159, 98 (1967).
- (13) Blasizza, E., Fermiglia, M., Pricl, S. Molecular Simulation, 24, 167 (2000).
- (14) Birdi, K.S., Fractals in Chemistry, Geochemistry and Biophysics, Plenum Publishing Corporation, New York (1993).