

SIMULAZIONE MOLECOLARE DELLE INTERAZIONI RECETTORE/SUBSTRATO: IL CASO DELL'ALFA-CHIMOTRIPSINA E I BETA-CARBOETOSSI-GAMMA-LATTAMI

Sabrina Pricl¹, Fulvia Felluga²

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

²Dipartimento di Scienze Chimiche, Università degli Studi di Trieste, Via Giorgeri 1, 34127 Trieste

INTRODUZIONE

Il nucleo gamma-lattamico (o 2-pirrolidinonico) si trova in molti composti che presentano importanti attività biologiche e farmacologiche. Gamma-lattami diversamente sostituiti sono utilizzati, infatti, come agenti psicotropici, antagonisti dell'acido muscarinico, e anti-ipertensivi (1,2). Di particolare interesse è la funzionalizzazione in posizione beta con un gruppo carbossilico, poiché i corrispondenti derivati lattamici, a potenziale attività biologica, sono poco caratterizzati in letteratura, particolarmente nelle loro forma otticamente attiva.

Esteri alchilici di questi derivati, sostituiti all'azoto con diversi raggruppamenti, sono stati sottoposti a risoluzione cinetica con enzimi idrolitici quali esterasi, lipasi e proteasi. L'alfa-chimotripsina (alfa-CT), in particolare, è in grado di idrolizzare con elevata enantioselettività, e in maniera enantiocomplementare, i derivati **1** (metil 1-benzil-5-oxo-3-pirrolidincarbossilato), **2** (metil 1-(2-idrossietil)-5-oxo-3-pirrolidincarbossilato) e **3** (metil 1-isopropil-5-oxo-3-pirrolidincarbossilato), consentendo l'ottenimento dell'enantiomero (3S)-(-)-**1** con 95% ee, (3R)-(+)-**2** con 99% ee, e (3R)-(+)-**3** con 96% ee, rispettivamente. Lo stesso enzima, al contrario, non ha rivelato alcuna enantioselettività nei confronti del composto **4** (metil 5-oxo-3-pirrolidincarbossilato), che è stato recuperato dall'idrolisi in forma racema. La Figura 1 riporta i modelli molecolari dei quattro gamma-lattami derivati appena descritti.

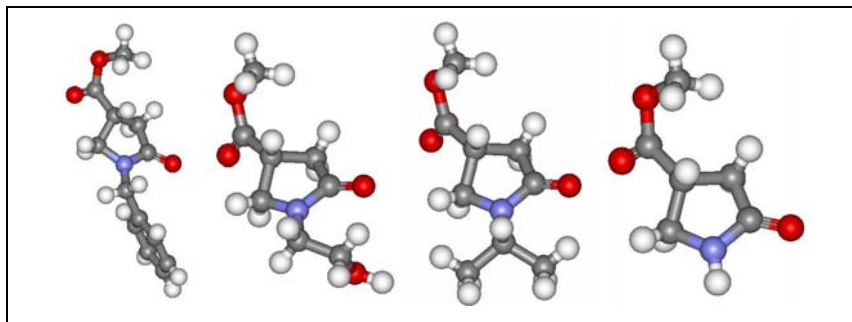


Figura 1: Modelli molecolari dei quattro gamma lattami sostituiti considerati in questo lavoro. Partendo da sinistra: **1**, **2**, **3** e **4**.

Precedenti studi delle relazioni tra struttura e reattività in reazioni di idrolisi di beta-aril-alfa-aminoacidi e loro derivati da parte dell'alfa-CT hanno permesso di ottenere delle informazioni sulle dimensioni del sito attivo, sulle interazioni enzima-substrato che sono in grado di influenzare la reattività e la stereoselettività, nonché sulla orientazione reattiva e la conformazione del substrato all'interno del sito attivo (3,4). Studi di diffrazione ai raggi X, accoppiati alla determinazione della sequenza aminoacidica, hanno portato, sempre nel caso

citato in precedenza, alla dettagliata descrizione delle interazioni enzima-inibitore e enzima-substrato (5,6). Così, il sito di binding coinvolge i frammenti 189-194 e 214-220, mentre il gruppo da idrolizzare viene diretto verso l'essenziale legame idrogeno -O-H-N tra la Ser 195 e l'Hys 57.

In questo lavoro presentiamo i risultati dell'applicazione delle tecniche di simulazione molecolare come mezzo di indagine microscopica delle origini della diversa enantioselettività dei gamma-lattami **1**, **2**, **3** e **4** da parte dell'alfa-chimotripsina.

DETTAGLI COMPUTAZIONALI

Le simulazioni molecolari sono state condotte su una workstation Silicon Graphics Origin 200. Per la predizione dell'interazione estere-proteina è stato usato il Software AutoDock v. 3.0 (7), 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 dell'alfa-chimotripsina è stata ottimizzata partendo dalle relative coordinate cristallografiche con un approccio meccanico-molecolare (MM) usando il force field COMPASS (8) 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. In ogni caso, una costante dielettrica effettiva $\epsilon = 4$ è stata usata per tener conto della schermatura dielettrica.

I dettagli strutturali delle molecole isolate, così come quelli dei complessi proteina-estere, sono stati ottenuti da simulazioni di dinamica molecolare (MD) nell'insieme canonico (NVT) a 25C. 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 (9), con costante di accoppiamento $\tau_T=0.01$ ps. Le equazioni Newtoniane del moto sono state integrate usando l'algoritmo di leapfrog Verlet (10), usando un intervallo di integrazione pari a 1 fs. Il tempo totale di simulazione era pari a 20 ps. Le energie di complessazione sono state calcolate a partire dalle componenti dell'energia ottenute dalla simulazione dinamica per il complesso, la proteina ed i vari enantiomeri dei gamma-lattami usando la seguente relazione: $E_{\text{compl}} = E_{\text{complesso}}^{\text{nonleg}} - E_{\text{alfa-CT}}^{\text{nonleg}} - E_{\text{estere}}^{\text{nonleg}}$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Come primo caso sono stati presi in considerazione i complessi alfa-CT con i due enantiomeri del gamma-lattame **4**, i cui risultati sperimentali dell'idrolisi enzimatica hanno rivelato la non-enantioselettività della alfa-CT nei confronti di tale composto. La Figura 2 mostra i risultati del processo di docking dei due enantiomeri. L'analisi del sito di binding ha rivelato che effettivamente, anche nel caso dei gamma-lattami ciclici, tale sito risiede proprio nella tasca compresa tra i frammenti 189-194 e 214-220. I due enantiomeri assumono due orientazioni diverse all'interno del sito di binding, in modo da accomodare il gruppo estereo all'interno della tasca proteica; tuttavia, in entrambi i casi, il gruppo COOMe è rivolto verso i residui Ser 195 e Hys 57, come nel caso degli analoghi aciclici o dei beta-lattami.

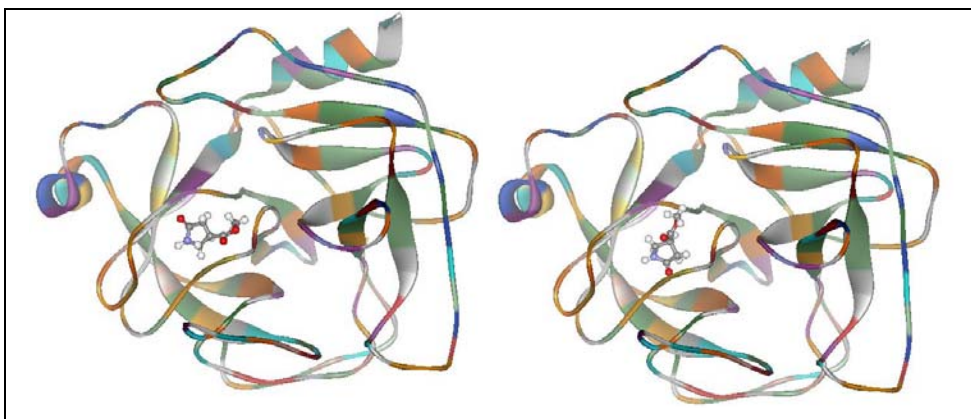


Figura 2: Confronto tra il modello molecolare risultante dal processo di docking dell'enantiomero R del composto **4** (a sinistra) e dell'enantiomero S del composto **4** (a destra).

La struttura di equilibrio del complesso alfa-CT/enantiomero R del metil 5-oxo-3-pirrolidincarbossilato (composto **4**) è caratterizzata da un pattern di legami idrogeno intermolecolari che interessa, rispettivamente, l'ossigeno del gruppo OCH₃ dell'estere e l'NH del legame peptidico tra la Ser 195 e l'ASP194, l'ossigeno del gruppo CO dell'estere e l'NH del legame peptidico tra la Gly 193 e la Met 192, e infine l'ossigeno del gruppo CO dell'anello lattamico e l'NH del legame peptidico tra la Gly 126 e il Trp 125. La corrispondente struttura di equilibrio del complesso alfa-CT/enantiomero S del metil 5-oxo-3-pirrolidincarbossilato è anch'essa caratterizzata da un pattern di legami H simile, che coinvolgono tuttavia l'ossigeno del gruppo OCH₃ e l'H del gruppo OH della Ser 195, l'idrogeno dell'NH dell'anello lattamico e l'ossigeno del legame peptidico tra la Ser 190 e la Cys 191 e, infine, l'ossigeno del gruppo CO dell'anello lattamico e l'NH del legame peptidico tra Cys 191 e Ser 190. Da un punto di vista energetico, l'analisi dell'energia di binding dell'alfa-CT con i due enantiomeri del composto **4** ha rivelato che i due complessi sono caratterizzati da valori molto simili, essendo pari a -6.5 kcal/mole per l'enantiomero R e -6.2 kcal/mole per l'enantiomero S. Tali evidenze sono decisamente consistenti con l'evidenza sperimentale della non enantioselettività dell'alfa-CT nei confronti del composto **4**.

Diverso è il caso, ad esempio, dei due enantiomeri del derivato **1** (metil 1-benzil-5-oxo-3-pirrolidincarbossilato). Ancora una volta l'analisi di docking ha rivelato che il binding site per entrambi gli enantiomeri è lo stesso descritto in precedenza, e i relativi modelli molecolari sono riportati in Figura 3.

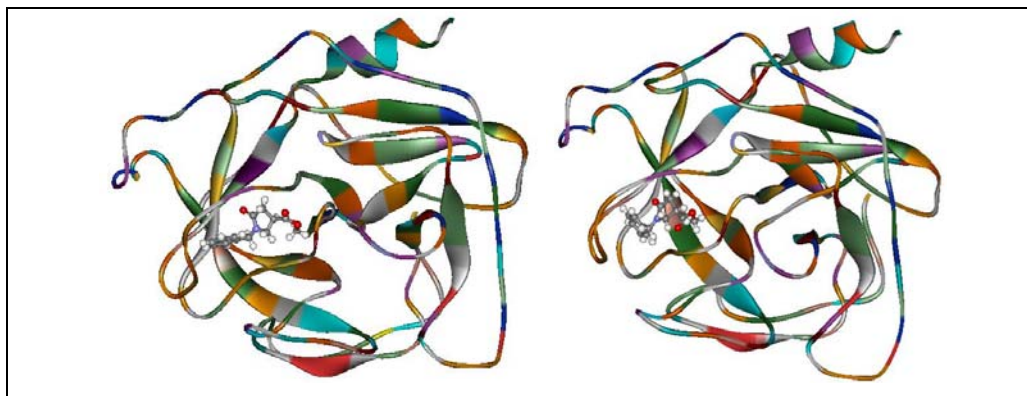


Figura 3: Confronto tra il modello molecolare risultante dal processo di docking dell'enantiomero R del derivato **1** (a sinistra) e dell'enantiomero S del derivato **1** (a destra).

Tuttavia, nel caso dei due enantiomeri del derivato **1**, l'analisi della simulazione di dinamica molecolare ha rivelato che vi è una sostanziale differenza tra il numero di legami idrogeno che si instaurano tra il sito attivo e le molecole ospiti. Infatti, nel caso dell'enantiomero **1-R**, la traiettoria rivela la formazione di legami H solamente tra il gruppo OCH₃ dell'estere e l'NH del legame peptidico tra la Ser 195 e l'Asp194 e ancora tra lo stesso gruppo dell'estere e il gruppo NH del legame peptidico tra la Gly 193 e la Met 192. L'enantiomero **1-S**, viceversa, presenta, oltre allo stesso pattern di legami H coinvolgente il gruppo OCH₃, un ponte H tra il gruppo CO dell'anello lattamico e il gruppo NH del legame peptidico tra la Gly 126 ed il Trp 125. Infine, in quest'ultimo caso, le interazioni idrofobiche tra la tasca formata dai residui 189-194 e 214-220 e l'anello aromatico del gamma-lattone risultano più favorevoli, in virtù della migliore orientazione di quest'ultimo all'interno del sito di binding.

Questo trova riscontro nelle relative energie di binding calcolate, che risultano essere pari a -13.6 kcal/mole per l'isomero **1-S** ed a +6.8 kcal/mole nel caso dell'enantiomero **1-R**. L'elevata affinità dell'alfa-CT per l'enantiomero **1-S** è il risultato di un effetto sinergico tra le componenti dell'energia di binding di natura elettrostatica e/o di dispersione e le interazioni idrofobiche. L'energia di interazione notevolmente minore del complesso alfa-CT/(3S)-(-)- (metil 1-benzil-5-oxo-3-pirrolidincarbossilato) può essere considerata come un'indicazione della formazione di un complesso di inclusione termodinamicamente più favorito, e tale risultato è consistente con le evidenze sperimentali della idrolisi enantioselettiva dell'alfa-CT nei confronti di tale enantiomero.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- (1) Nilsson, B.M., Ringdahl, B., Hacksell, U., *J. Med. Chem.*, 33, 580 (1990).
- (2) Bergmann, R., Gericke, R., *J. Med. Chem.*, 33, 492 (1990).
- (3) Cohen, S.G., *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 31, 705 (1969).
- (4) Silver, M.S., Stoddard, M., Stone, T., Matta, M.S., *J. Amer. Chem. Soc.*, 42, 3151 (1970).
- (5) Steitz, T.A., Henderson, R., Blow, D.M., *J. Mol. Biol.*, 46, 337 (1969).
- (6) Blow, D.M., *Israel J. Chem.* 12, 483 (1974).
- (7) 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).
- (8) Sun, H., *J. Phys. Chem.*, 102, 7338 (1998).
- (9) 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).
- (10) Verlet, L., *Phys. Rev.*, 159, 98 (1967).