

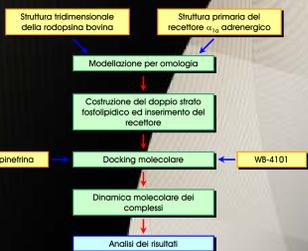
# ANALISI DELLE PROPRIETA' STRUTTURALI E DELLE CAPACITA' INTERATTIVE DEL RECETTORE $\alpha_{1a}$ ADRENERGICO

Istituto di Chimica Farmaceutica e Tossicologica - Università di Milano  
Viale Abruzzi, 42 - I-20131 Milano

Alessandro Pedretti, Luigi Villa, Giulio Vistoli

## INTRODUZIONE

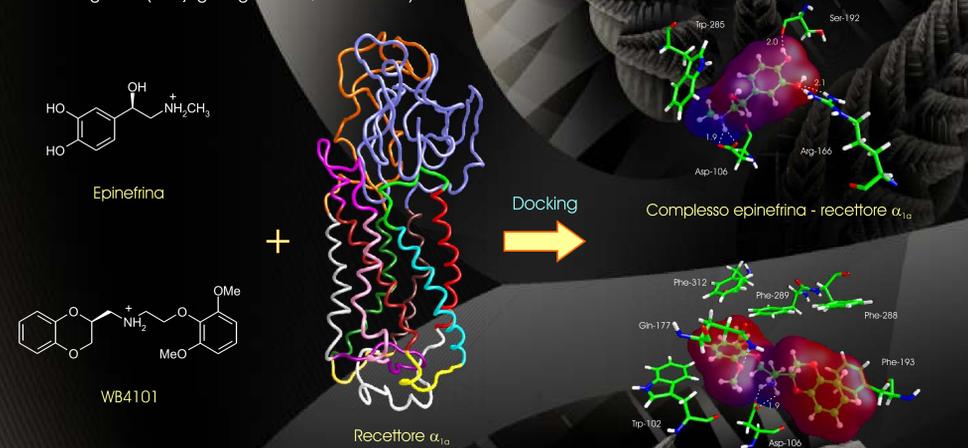
La recente acquisizione della struttura cristallografica della rodopsina bovina [1] ha aperto la strada a studi d'omologia, che hanno come obiettivo lo sviluppo di accurati modelli tridimensionali dei recettori transmembrana accoppiati alle proteine G. Lo sviluppo di tali modelli è ancora difficoltoso, tuttavia la disponibilità di un template risolto sperimentalmente, consente di ottenere risultati ragionevoli che possono essere utilmente impiegati nella progettazione razionale di nuovi ligandi.



Il presente studio ha avuto come obiettivo iniziale lo sviluppo di un modello completo del recettore  $\alpha_{1a}$  adrenergico ( $\alpha_{1a}$ -AR) [2], scelto per il suo ruolo significativo nel trattamento dell'iperplasia prostatica benigna e nelle patologie correlate. Finora di esso erano noti in letteratura solo modelli parziali della porzione transmembrana ottenuti utilizzando la struttura della batteriorodopsina come stampo. In secondo luogo, la ricerca ha avuto come fine quello di individuare un plausibile meccanismo di trasduzione del segnale da parte dell'agonista naturale (epinefrina), e di evidenziare particolari variazioni nella struttura dei domini che possano spiegare il meccanismo di inibizione, sfruttando un potente antagonista selettivo (WB4101) [3].

## DOCKING DEI LIGANDI

Epinefrina e WB4101 sono stati costruiti col modulo ChemNote di QuantalCHARMM [8] e successivamente ottimizzati con MOPAC 6.0 [9] al fine di sbarcare i conformeri ad alta energia e di attribuire le cariche atomiche parziali. Per l'epinefrina, considerata nel suo stato protonato, è stata selezionata manualmente la conformazione anti, nota per essere quella implicata nell'interazione col recettore [10]. Il complesso recettore-epinefrina è stato generato utilizzando il programma BioDock [11]. A differenza dell'agonista naturale, il WB4101 è una molecola particolarmente flessibile e pertanto è stato sottoposto ad un *conformational search* basato sul metodo Monte Carlo. In particolare, ruotando casualmente le torsioni flessibili, sono stati generati 1.000 conformeri i quali sono stati minimizzati (steepest descent, 5.000 iterazioni, RMS = 1.0) e sono stati classificati sulla base della loro similarità. Più in dettaglio, sono stati considerati ridondanti i conformeri le cui torsioni differiscono meno di 60 gradi. Il docking è stato eseguito sempre con BioDock, tuttavia in questo caso tutti i conformeri sono stati collocati in modo automatico nel recettore al fine di individuare quello che avesse il fitting ottimale. Il miglior complesso è stato selezionato sulla base dell'energia d'interazione, dell'energia conformazionale e dei dati relativi alla mutagenesi. I complessi ottenuti hanno subito due distinte minimizzazioni: nella prima è stato mantenuto il backbone fisso (steepest descent, RMS = 1), mentre nella seconda sono stati fissati gli atomi di fuori di una sfera di 15 Å attorno al ligando (conjugate gradients, RMS = 0.01).



## DINAMICHE MOLECOLARI DEI COMPLESSI

Entrambi i complessi recettoriali sono stati sottoposti al medesimo protocollo di dinamica molecolare. Con VEGA ZZ [12] sono state assegnate le cariche atomiche (metodo Gasteiger-Marsilli), sono stati attribuiti i tipi atomici (CHARMM 22 per i lipidi) ed è stata generata la matrice topologica richiesta da NAMD [13], programma di dinamica utilizzato nel presente studio. Le simulazioni sono state condotte utilizzando i seguenti parametri: T=300 K, costante dielettrica 1.0, equazione di Newton integrata col metodo R-RESPA ogni 4 fs per le forze elettrostatiche a lungo raggio, ogni 2 fs per le interazioni di non legame a corto raggio, e ogni 1 fs per le forze di legame. La durata totale della simulazione è stata di 2,5 ns. Non essendo possibile simulare una membrana cellulare nella sua interezza, è stato necessario introdurre dei vincoli che riproducano l'effetto delle forze di coesione intermolecolari presenti in un doppio strato reale. Per fare questo sono state utilizzate delle *cylindrical harmonic boundary conditions*, in cui il cilindro virtuale (altezza 62 Å, raggio 42 Å, costante di forza = 2.0) è stato orientato lungo l'asse longitudinale della membrana.

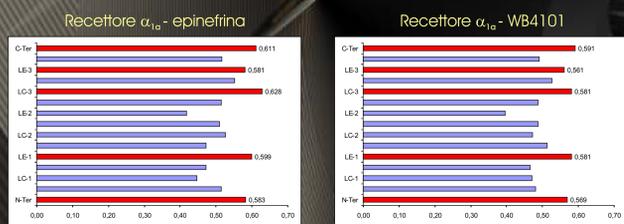


Figura 1: Istogrammi dei valori di RMSD dei loop citoplasmatici (LC), extracellulari (LE) e del dominio N-terminale (N-Ter), C-terminale (C-Ter). In rosso sono riportati i domini che compiono maggiori spostamenti.

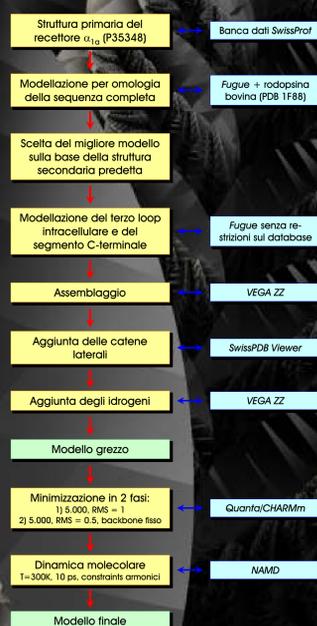
Dominio	Epinefrina	WB4101	Diff. (Å)
N-Ter	0.583	0.569	0.014
TM-1	0.515	0.481	0.034
LC-1	0.447	0.470	-0.023
TM-2	0.472	0.465	0.007
LE-1	0.599	0.581	0.018
TM-3	0.472	0.512	-0.040
LC-2	0.527	0.473	0.054
TM-4	0.510	0.488	0.022
LE-2	0.418	0.395	0.023
TM-5	0.515	0.488	0.027
LC-3	0.628	0.581	0.047
TM-6	0.563	0.527	0.026
LE-3	0.581	0.561	0.019
TM-7	0.517	0.491	0.025
C-Ter	0.611	0.591	0.020

Figura 2: Differenza fra le medie degli RMSD. Valori positivi (giallo) indicano che il dominio del complesso con l'epinefrina si muove maggiormente, mentre valori negativi (azzurro) indicano che il dominio del complesso del WB4101 si sposta maggiormente.

L'analisi dei risultati è stata condotta al fine di individuare lo spostamento dei domini extramembrana durante la simulazione mediante la misura dell'RMSD (Root Mean Square Deviation). Nella Figura 1 sono riportati in grafico i valori di RMSD calcolati per i due complessi in esame. Per entrambi i complessi, gli spostamenti più grandi sono riscontrabili per i domini N-Ter, C-Ter, LC-3, LE-1 e LE-3. In particolare, N-Ter e C-Ter sono particolarmente mobili perché non vincolati né dai domini adiacenti, né dal mezzo in cui si trovano (acqua). LE-1 e LE-3 compiono ampi spostamenti perché sono i domini più piccoli come numero di residui (rispettivamente 11 e 8) e pertanto risentono meno degli attriti col solvente e con i domini adiacenti. LC-3 è quello che presenta RMSD in assoluto più elevato.

Confrontando le differenze di RMSD fra i domini dei due complessi (Figura 2), in accordo ai dati riportati in letteratura in cui si ipotizza la trasduzione del segnale per opera di LC-2 e LC-3, si può evincere che sono proprio questi due loop a spostarsi maggiormente nel complesso con l'epinefrina rispetto a quello col WB4101. È noto che la trasduzione del segnale nel GPCR sia mediata dalla sequenza D(E)RY(W) [14] che nel recettore  $\alpha_{1a}$  è collocata all'inizio di LC-2 (segmento 123-125) nella forma DRY. Per tutta la durata della dinamica dell'agonista tale segmento non subisce particolari variazioni di posizione rispetto a LC-3 col quale instaura una forte interazione coulombiana. Con molta probabilità, non è possibile evidenziare il processo di disaccoppiamento sia perché la durata della simulazione è troppo breve in confronto alla complessità del sistema, sia per via dell'assenza della proteina G con cui la sequenza DRY dovrebbe interagire.

## MODELLAZIONE DEL RECETTORE

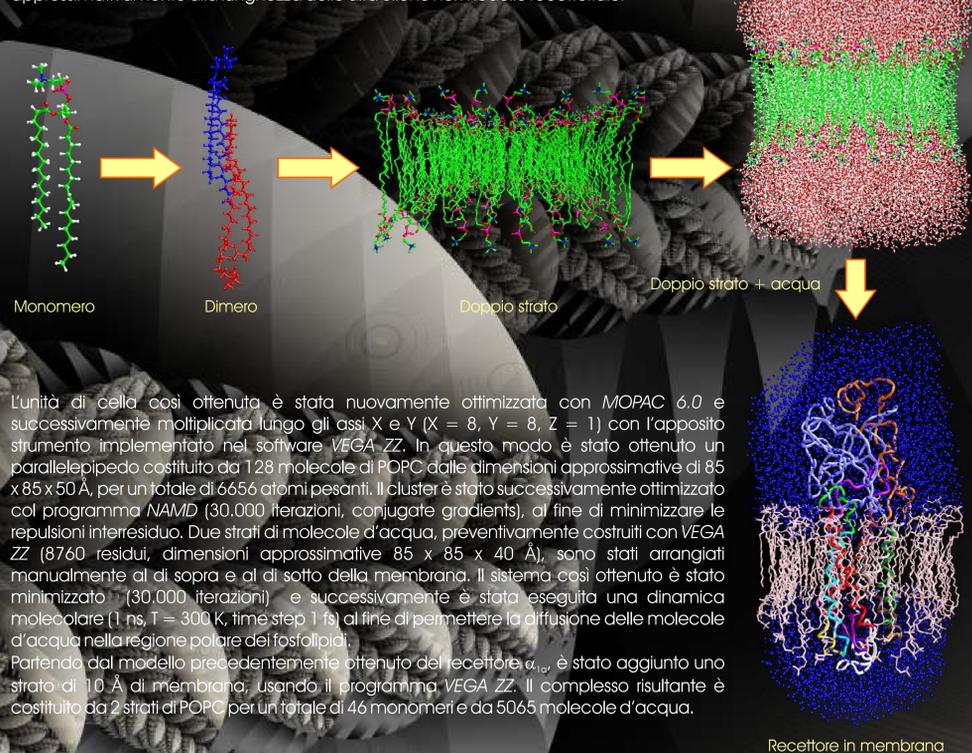


La struttura primaria del recettore  $\alpha_{1a}$  è stata ottenuta consultando la banca dati SwissProt [4]. La sequenza è stata utilizzata come input per Fugue [5], sistema di predizione della struttura terziaria di proteine accessibile gratuitamente via Web [6]. In un primo momento è stata sottomessa a Fugue l'intera sequenza utilizzando esplicitamente la struttura 3D della rodopsina bovina. Il servizio è stato in grado di riportare numerosi plausibili modelli e pertanto si è dovuto procedere alla scelta del più probabile sulla base della struttura secondaria precedentemente predetta, del ponte disolfuro fra le cisteine 99 e 176 e dell'impaccamento delle sette eliche transmembrana che sono caratterizzate da una leggera incurvatura dell'asse dovuto alla presenza di residui di prolina e glicina. Fugue non è stato capace di predire la struttura 3D del terzo loop citoplasmatico (LC3) e del dominio C-terminale (CT). Per ovviare a questo problema, si è proceduto alla frammentazione della sequenza in modo da poter sottoporre separatamente due segmenti: uno composto dai domini transmembrana 5-citoplasmatico 3-transmembrana 6 (TM5-LC3-TM6) e uno dai domini transmembrana 7-C-terminale (TM7-CT). In questo modo si è potuto aumentare la sensibilità del sistema che ha predetto dei segmenti plausibili che sono stati assemblati al resto del recettore.

Successivamente si è proceduto all'aggiunta delle catene laterali e degli idrogeni, tenendo conto del pH fisiologico e quindi protonando i residui di arginina e di lisina. Il modello così completato è stato ottimizzato utilizzando due fasi di minimizzazione successive: la prima con l'algoritmo *steepest descent* (5.000 iterazioni, RMS = 1) e la seconda con l'algoritmo *conjugate gradients* (5.000 iterazioni, RMS = 0.05) mantenendo il backbone fisso. Per ottenere un certo rilassamento della struttura è stata eseguita una simulazione di dinamica molecolare nel vuoto composta da tre fasi distinte: riscaldamento da 0 a 300 K (3 ps), equilibrazione (2.500 ps) con backbone fisso, dinamica (7500 ps) con constraints armonici. In tutte le fasi di calcolo di meccanica molecolare è stato utilizzato il campo di forze CHARMM 22 [7].

## COSTRUZIONE DELLA MEMBRANA

Al fine di simulare un ambiente più simile possibile a quello biologico, si è proceduto alla costruzione di un doppio strato fosfolipidico nel quale includere il recettore. La membrana cellulare risulta essere allo stato fluido per via della presenza del colesterolo e pertanto si è deciso di costruirne un modello partendo da un monomero di 1-palmitoil-2-oleil-sn-glicerolo-3-fosfoacolina (POPC). Più in dettaglio, il POPC è stato costruito nella sua conformazione favorita e cioè quella in cui lo scheletro carbonioso degli acidi grassi è disposto a zig-zag. Il monomero è stato ottimizzato con MOPAC 6.0 attribuendo anche le cariche atomiche parziali. Due molecole di POPC sono state orientate in modo da sovrapporre per circa 12 Å le catene alifatiche massimizzando le interazioni idrofobiche. In questo modo si ottiene una lunghezza del dimero di circa 50 Å che corrisponde approssimativamente alla lunghezza delle alfa eliche nel modello recettoriale.



## CONCLUSIONI

Con questo lavoro è stato possibile dimostrare che la struttura sperimentale della rodopsina bovina consente di elaborare soddisfacenti modelli strutturali per i GPCR e costituisce un importante strumento per il *modelling proteico* e per il *drug design* in generale. Inoltre l'utilizzo di modelli di membrana consente di realizzare simulazioni dinamiche con tali recettori rispettando al meglio le loro condizioni fisiologiche ed esplorando non solo le proprietà strutturali, ma anche il loro profilo dinamico. Il docking di agonisti e antagonisti ha permesso di evidenziare i principali residui coinvolti nell'interazione con i ligandi. Tali risultati hanno in parte confermato i risultati degli esperimenti di mutagenesi sito-diretta, riportati in letteratura, ma hanno anche permesso di evincere nuovi residui, non previsti prima, che giocano un ruolo centrale nella stabilizzazione dei complessi. I risultati delle dinamiche hanno invece consentito di esaminare la differente mobilità dei domini strutturali della proteina quando essa interagisce con l'agonista o con l'antagonista. Infatti il recettore è inizialmente modellato nella sua forma inattiva e tale situazione dovrebbe rimanere stabile con il WB-4101, mentre dovrebbe evolvere verso una situazione di recettore attivato con l'agonista naturale. Le dinamiche realizzate consentono di delineare che i loops intracellulari si muovono maggiormente con l'agonista che non con l'antagonista ed in particolare LC-2 ed LC-3 sono quelli che mostrano le maggiori differenze e ciò è in accordo con il loro presunto ruolo nell'interazione con la proteina G.

## BIBLIOGRAFIA

1. K. Palczewski, T. Kumasaka, D.C. Teller, T. Okada, R.E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano et al., *Science* 282, 739 (2000).
2. A. Pedretti, M.E. Silva, L. Villa, G. Vistoli, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 319, 493 (2004).
3. H. Kaou, D.R. Mottram, P.N. Green, *J. Pharm. & Pharmacol.* 30, 259 (1978).
4. Expert Protein Analysis System (ExPASy), [www.expasy.org](http://www.expasy.org).
5. J. Shi, T.L. Blundell, K. Mizuguchi, *J. Mol. Biol.* 310, 243 (2001).
6. FUGUE, [www-cryst.bio.cam.ac.uk/fugue](http://www-cryst.bio.cam.ac.uk/fugue).
7. A. D. MacKerell, Jr., D. Bashford, M. Bellott, R.L. Dunbrack, Jr., J.D. Evanseck, M.J. Field, S. Fischer, M. Karplus et al., *J. of Phys. Chem.* B 102, 3586 (1998).
8. Quantal/CHARMM, Accelrys Inc., San Diego, CA, USA ([www.accelrys.com](http://www.accelrys.com)).
9. J. P. Stewart, *Quantal Chem. Prog. Exch.* 10, 86 (1990).
10. P. Nagy, G. Alagona, G. Ghio, K. Takacs-Novak, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 2770 (2003).
11. A. Pedretti, A.M. Villa, L. Villa, G. Vistoli, *Il Farmaco* 52, 487 (1997).
12. A. Pedretti, L. Villa, G. Vistoli, *J. Mol. Graph.* 21, 47 (2002).
13. L. Kales, R. Steel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursay, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinzaki, K. Varadarajan, K. Schulten, *J. Comp. Physics* 151, 283 (1999).
14. T.A. Bennett, D.C. Maestas, E.R. Prossnitz, *J. Biol. Chem.* 11, 275(32), 24590 (2000).