

CAPITOLO 4. STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DELLA TcAChE.

4.1 Struttura cristallografica generale.

La cristallografia a raggi X ha consentito di determinare la struttura tridimensionale della forma dimerica della TcAChE nativa [Sussman *et al.* 1991] (Fig.4.1). Le coordinate relative a questa struttura sono state depositate sul *Protein Data Bank* [Berman *et al.* 2000] con *entry code*: 2ACE. Per questa e per le successive strutture cristallografiche citate si può consultare il sito Web: www.rcsb.org.

La proteina cristallizza nel gruppo spaziale P3₁21 con un monomero per unità asimmetrica. La molecola ha forma ellissoidale con dimensioni 45X60x65 Å, appartiene alla classe delle proteine α/β e consiste di 12 foglietti β centrali circondati da 14 α eliche. La prima e l'ultima coppia di nastri formano β-loops a tornante che sono legati solo da legami idrogeno agli otto nastri centrali che formano supereliche (Fig.4.2).

Visti lungo il loro asse, gli sheet curvano di circa 180°, invece, visti perpendicolarmente al loro asse, il primo e l'ultimo sheet si incrociano a circa 90°.

Nel cristallo l'asse che correla i due monomeri nel dimero coincide con un asse cristallografico binario. Le due unità monomeriche sono tenute insieme da un fascio di quattro eliche: due eliche per ogni monomero, inclusa l'elica C-terminale. La maggior parte delle interazioni che tengono insieme le quattro eliche sono di natura idrofobica.

La densità elettronica nella parte C-terminale non è ben definita. L'apparente disordine in questa regione è in contrasto con il fatto che la cisteina C-terminale, Cys537, si suppone formi un ponte disolfuro con la stessa cisteina dell'altro monomero nel dimero biologico, limitando la mobilità della catena terminale. Inoltre il punto in cui il dimero di TcAChE è tagliato dalla membrana si trova a qualche residuo di distanza dalla Cys 537, motivo per cui non è chiaro perché i residui C-terminali non siano localizzabili [Raves *et al.* 1997].

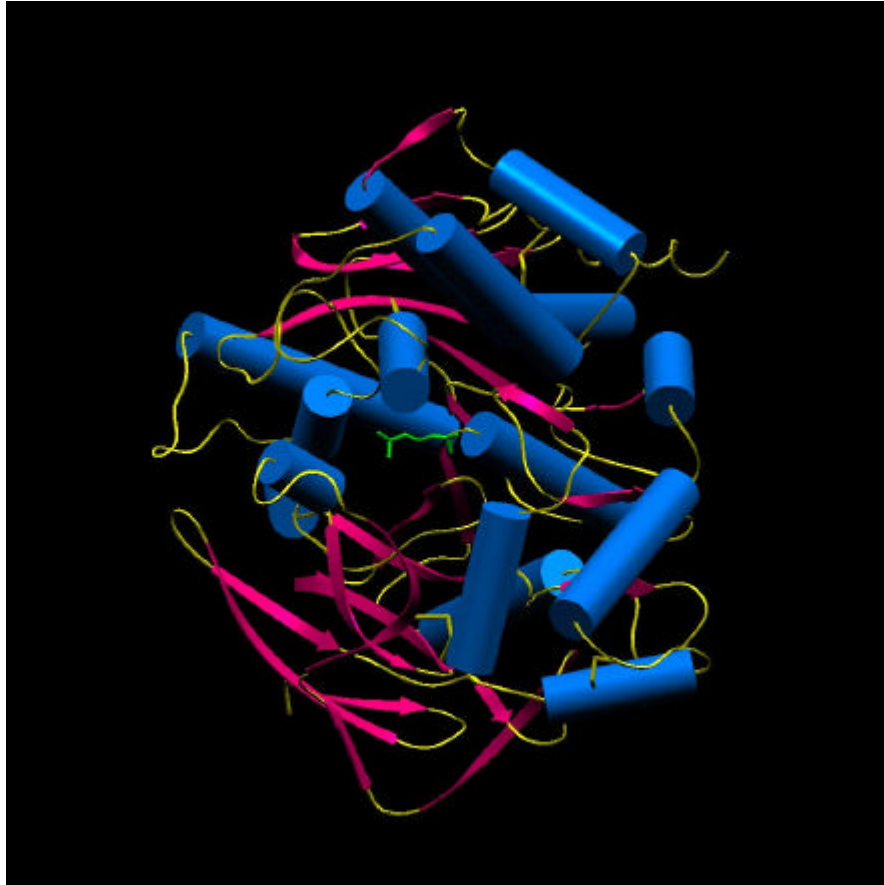


Fig.4.1 Struttura cristallografica della *TcAChE* nativa. Le α eliche sono disegnate in blu, i β *sheet* in fucsia ed i *loop* in giallo. Al centro dell'enzima è rappresentato il substrato acetilcolina in verde.



a



b

Fig.4.2 Dimero di *TcAChE*.

- a. inquadratura lungo l'asse di simmetria binario
- b. inquadratura lungo l'asse di simmetria binario ruotata di 90° rispetto al piano del foglio.

4.2 Sito attivo e meccanismo catalitico.

La triade catalitica è formata dai residui Ser200, His440 e Glu327 (La numerazione si riferisce sempre alla struttura della proteina nativa; [PDB entry code: 2ACE; Sussman *et al.* 1991]).

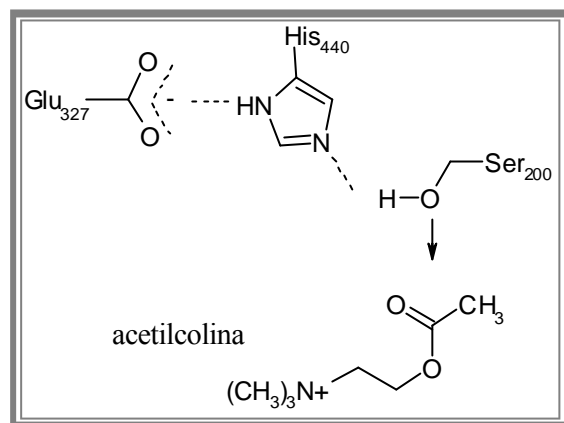
Il meccanismo d'azione dell'AChE (Fig.4.3) è analogo a quello della maggior parte delle serina proteasi. Ci sono però due importanti differenze: la prima è che l'AChE rappresenta il primo caso conosciuto in cui vi è un Glu al posto di un Asp nella triade; la seconda è dovuta ad una disposizione a tipologia inversa rispetto alle altre proteasi, infatti, mantenendo inalterata la posizione dell'O γ della Ser200, la posizione dell'anello imidazolico dell'His440 ed il gruppo carbossilico del Glu327, la proteina appare ruotata intorno alla "linea immaginaria" che unisce il C β della Ser con il C γ dell'His.

La triade è strutturata in modo tale che le catene laterali dei tre amminoacidi agiscano in modo sinergico per attivare la nucleofilicità dell'O γ della serina.

Il carbonile estereo dell'acetilcolina viene orientato correttamente in corrispondenza della triade catalitica grazie all'interazione del gruppo ammonico con il Trp84 (Fig.4.4). L'attacco nucleofilo dell'O γ serinico sul carbonile dell'ACh porta alla formazione di un addotto tetraedrico, stabilizzato dai legami idrogeno che si formano tra l'ossigeno carbonilico, ora carico negativamente, e gli NH ammidici della catena principale appartenenti ai tre residui della buca ossianionica (Gly118, Gly119 e Ala201). L'intermedio poi si dissocia formando l'enzima acetilato e rilasciando la colina; la rapida deacilazione idrolitica rigenera infine l'enzima attivo.

La questione di come avvenga il processo di attivazione nella triade è stata lungamente dibattuta. Evidenze sperimentali indicano che il trasferimento del protone ossidrilico dalla serina all'istidina sia simultaneo all'attacco nucleofilo sul carbonile dell'ACh e che sia favorito dalla stabilizzazione dell'istidina protonata da parte del glutammato. Nella struttura cristallografica della proteina nativa [PDB entry code: 2ACE; Sussman *et al.* 1991] la His440, infatti, è posizionata al centro in modo tale che la distanza tra l'N ϵ 2 e l'O γ della Ser200 sia di 2,89 Å e quella tra l'N δ 1 e l'O ϵ 1 del Glu327 sia di 2,39 Å.

La tasca che ospita l'atomo di ossigeno carico negativamente (l'ossigeno carbonilico dell'acetilcolina) nell'intermedio tetraedrico, è stata denominata "buca ossianionica"; questa è costituita dagli atomi della *main chain* di due



Secondo stadio:
formazione dell'intermedio tetraedrico.

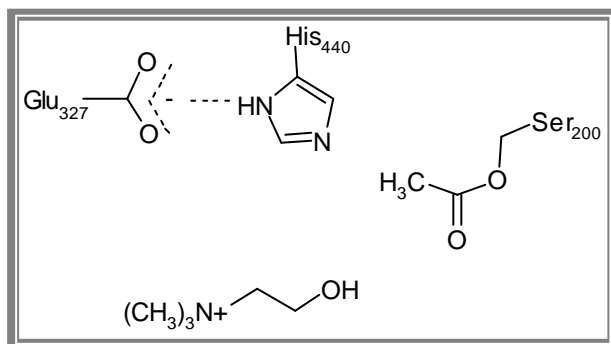
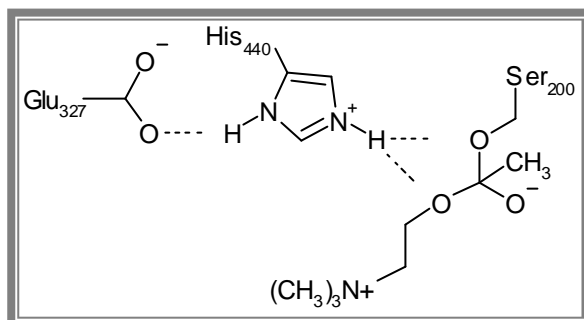


Fig.4.3 Meccanismo catalitico della AChE. I numeri dei residui sono relativi alla struttura della TcAChE nativa (PDB entry code 2ACE). Oltre agli stadi qui rappresentati bisogna ricordare il quarto stadio: la ripristinazione dell'enzima deacetilato ad opera dell'acqua.

glicine consecutive, la Gly118 e la Gly119 e della Ala201. La Gly118 e la Gly119 fanno parte di dieci residui di una sequenza conservata che contiene tre Gly in fila; questo rende la catena abbastanza flessibile tanto da permettere alle Gly menzionate di formare la “buca ossianionica”.

Nella struttura della proteina nativa [PDB entry code: 2ACE; Sussman *et al.* 1991] l'ACh è stata modellata nel sito attivo come intermedio tetraedrico; il suo ossigeno carico negativamente forma legami idrogeno con gli azoti ammidici dei tre residui sopra menzionati.

Un altro importante sito adiacente al sito attivo è deputato al riconoscimento del gruppo ammonico quaternario carico positivamente dell'ACh e degli altri ligandi. Originariamente era stato denominato MAS (*Main Anionic Site*) perché si pensava fosse costituito da residui acidi. In realtà è costituito da una tasca aromatica, formata dal residuo Trp84 e anche dal Phe330. La carica positiva del neurotrasmettitore interagisce con l'anello degli elettroni π del Trp84 (con distanza di Van der Waals di 3,5 Å).

La natura di queste interazioni catione-anello aromatico è stata studiata approfonditamente [Verdonk *et al.* 1993; Dougherty 1996].

4.3 La gola aromatica.

La più importante caratteristica della proteina è la presenza di una gola profonda e stretta, lunga circa 20 Å, che connette il sito attivo con l'esterno (Fig.4.4). Questa gola si estende fino a metà della proteina e si allarga in prossimità della base; a metà altezza i residui Phe330 e Tyr121 (i dati fanno sempre riferimento alla struttura della proteina nativa) puntano verso l'interno della gola formando una strozzatura della dimensione di una molecola di acqua; a circa 4 Å dalla base si trova la Ser200 della triade catalitica.

Lungo le pareti vi sono ben quattordici residui aromatici che formano così il 40 % della superficie totale della gola. Questi residui sono conservati in AChE provenienti da specie anche molto differenti.

Sono presenti anche quattro residui acidi tra cui un Asp ed un Glu all'ingresso, un Asp a metà ed un Glu in prossimità della base della gola.

L'AChE, a pH fisiologici, ha un forte momento di dipolo (505 debye) allineato più o meno con l'asse della gola (Fig.4.5). Il campo elettrico intorno all'enzima può spingere l'ACh verso l'ingresso della gola e poi giù fino al sito attivo [Ripoll *et al.* 1993].

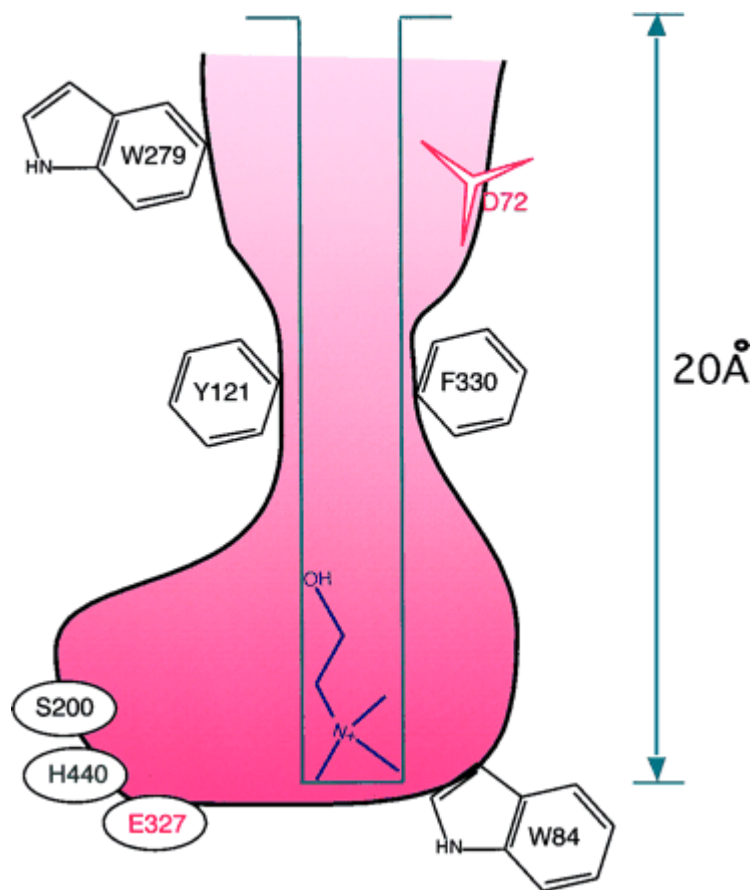


Fig.4.4 Rappresentazione bidimensionale della gola aromatica della *TcAChE* nativa (fucsia). La triade catalitica è rappresentata in basso a sinistra. In basso a destra c'è il Trp84 deputato al riconoscimento del gruppo ammonico, in alto a sinistra è rappresentato il Trp279 (*Peripheral Anionic Site*). Lungo le pareti della gola sono stati rappresentati due dei quattordici residui aromatici che la costituiscono; notare la strozzatura che è presente a circa metà altezza. In rosso sono evidenziati i residui acidi. Sul fondo della gola, in blu, è rappresentato il prodotto della reazione enzimatica, la colina.

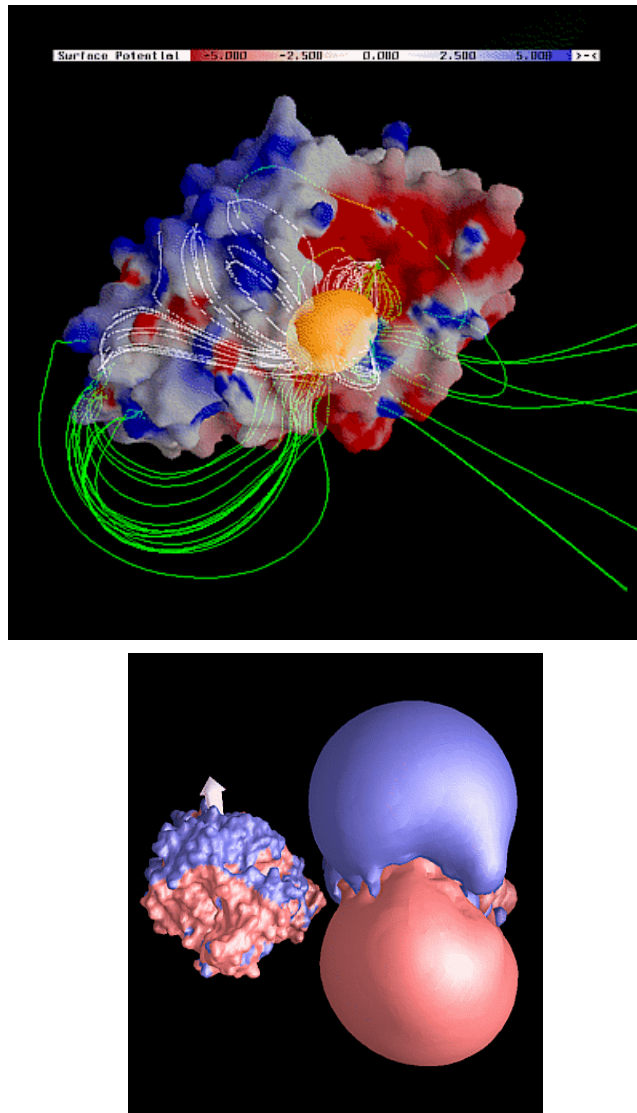


Fig.4.5 Rappresentazione del momento di dipolo dell'AChE. Figura in alto: in verde sono riportate le linee di forza del campo elettrico. Figura in basso: la freccia verso l'alto indica la direzione del momento di dipolo. In rosso sono indicati i residui carichi negativamente, in blu quelli carichi positivamente.

Sono stati mutati i quattro amminoacidi acidi della gola, carichi negativamente, con residui neutri; come risultato si è osservata solo una piccola riduzione del momento di dipolo, a dimostrazione del fatto che questo è dato dalla distribuzione della carica in tutta la proteina [Shafferman *et al.* 1994].

La maggior parte dei residui acidi si trovano a distanza di 5 Å dalla gola; dunque i residui aromatici contribuiscono ad una sequenziale interazione con il substrato cationico, schermandolo da una interazione diretta con le cariche negative, le quali potrebbero attrarlo troppo “avidamente”, impedendone la discesa verso la triade catalitica.

La presenza combinata di questo forte momento di dipolo e dei residui aromatici presenti nella gola permette un’entrata al sito attivo selettiva ed efficiente.

4.4 Sito periferico.

E’ stato dimostrato con vari metodi che l’AChE ha un altro importante sito di legame per i ligandi, il cosiddetto PAS (*Peripheral Anionic Site*) (Fig.4.4). Il legame con questo sito causa inattivazione dell’enzima, sebbene non sia ancora chiaro come questo avvenga [Quinn 1987].

Alcuni composti, come il propidio, si legano specificatamente solo al PAS e agiscono come inibitori non-competitivi [Taylor *et al.* 1975]. E’ stato suggerito che anche l’ACh interagisca con il PAS [Radic *et al.* 1991].

L’azione enzimatica dell’AChE è inibita ad alte concentrazioni di substrato, un fenomeno chiamato “inibizione da substrato” [Hucho *et al.* 1991], osservato in tutti i tipi di enzimi [Kühl 1994]. L’inibizione da substrato nel caso dell’AChE si suppone sia il risultato di un legame improprio dell’ACh nel sito attivo o del legame ad un sito allosterico [Reiner *et al.* 1991], che potrebbe essere il PAS; l’interazione dell’ACh con il PAS provocherebbe una modificazione conformazionale dell’enzima tale da impedire l’ingresso del neurotrasmettitore nella gola. Quando il complesso ACh/PAS si dissocia, l’attività di idrolisi enzimatica dell’ACh torna ai livelli normali [Shaffermann *et al.* 1992]. Studi di mutazione sito specifica, e la struttura cristallografica stessa, suggeriscono che il PAS sia posizionato vicino all’entrata della gola aromatica. Il residuo chiave di questo sito è il Trp279 con cui interagiscono diversi inibitori enzimatici studiati. Anche la Tyr70 e l’Asp72 sono coinvolti nel legame con il propidio ed altri ligandi del sito periferico [Shafferman *et al.* 1994; Eichler *et al.* 1994].

Sono state risolte strutture cristallografiche di Acetilcolinesterasi da *Mus musculus* con inibitori, quali il Decidio, il Propidio e la Gallamina che interagiscono solo con il PAS [PDB *entry code*: rispettivamente, 1J07, 1N5R, 1N5M; Bourne *et al.* 2003].

Una tossina del veleno di alcuni serpenti, la fascicolina, interagisce proprio con il PAS [Harel *et al.* 1995; Giles *et al.* 1997].

4.5 Cisteina libera.

La TcAChE contiene otto residui di cisteina; sei di questi formano ponti disolfuro all'interno delle subunità (67-94, 254-265, 402-521). La Cys537 forma un ponte disolfuro con lo stesso residuo dell'altro monomero, per formare il dimero. L'ottava cisteina, la Cys231, che non è conservata, può essere modificata con un agente alchilante in assenza di agenti riducenti, formando così un gruppo sulfidrilico libero [Dolginova *et al.* 1992].

Gruppi sulfidrilici liberi si trovano raramente nelle proteine secrete e rimane ancora da chiarire se questa cisteina abbia una funzione particolare [MacPhee-Quigley *et al.* 1986].

La cisteina libera è rara tra le differenti forme di AChE di differenti specie: solo quella di *Torpedo* e di alcuni insetti presenta questa funzionalità [Salih *et al.* 1993].

Un certo numero di agenti sulfidrilici, inclusi gli agenti alchilanti, i disolfuri e gli organomercuriali, reagiscono con la TcAChE inibendone la sua attività enzimatica completamente [Dolginova *et al.* 1992; Kreimer *et al.* 1994].

4.6 Un enzima “dinamico”.

Come già sottolineato l'AChE è un enzima estremamente efficiente che agisce al limite della velocità di diffusione. Dal momento che la condizione limite nell'idrolisi dell'ACh è la presenza del substrato nel sito attivo, può sembrare strano che la reazione avvenga sul fondo di una gola stretta e lunga. Infatti, nella struttura cristallina, il diametro della gola nel punto più stretto è di circa 3Å, largo appena per consentire l'ingresso di una molecola d'acqua, ma troppo piccolo per permettere il passaggio dell'ACh, considerando che la dimensione del gruppo tetrametilammonico è pari a 6.4Å.

Inoltre, nei cristalli trigonali di *TcAChE* (per una descrizione della forma cristallina vedi par.9.6), l'ingresso della gola è bloccato dalla molecola enzimatica simmetrica [Axelsen *et al.* 1994]. Nei cristalli ortorombici l'impacchettamento invece è tale da lasciare un maggiore spazio davanti all'ingresso della gola. E' molto recente la pubblicazione su Web di un lavoro in cui sono riportate le strutture cristallografiche di complessi tra la *TcAChE* e derivati bivalenti della galantamina; uno di questi complessi è stato ottenuto dalla diffusione dell'inibitore in cristalli di *TcAChE* ortorombici, dal momento che l'analoga diffusione in cristalli trigonali portava al deterioramento immediato degli stessi [Greenblatt *et al.* *Web release date*:4/Nov/2004].

E' stato comunque possibile far diffondere diversi inibitori nei cristalli trigonali di *TcAChE* nativa, come verrà descritto nel prossimo capitolo. Evidentemente l'enzima deve andare incontro ad alcune modifiche conformazionali; probabilmente il "respiro" della proteina è dato da movimenti di ampi domini o da rotazioni di diverse catene laterali. Persino molecole piccole quali l'ACh e la colina impongono all'enzima movimenti di diversi residui per allargare il collo di bottiglia della gola [Raves *et al.* 1998].

Un'altra questione irrisolta riguarda la modalità con cui i prodotti di reazione possano lasciare il sito attivo. Infatti, dopo l'idrolisi, il prodotto di reazione, la colina, è ancora carico positivamente; dunque sembra poco probabile che percorra la gola opponendosi al campo elettrico.

Per questo motivo è stata avanzata l'ipotesi dell'esistenza di una via alternativa per l'uscita dei prodotti di reazione dal sito attivo, soprannominata "*back door*", porta di servizio. Questa ulteriore ingresso potrebbe consentire anche l'ingresso di molecole [Ripoll *et al.* 1993].

La conformazione dell'AChE in soluzione è stata dunque analizzata con esperimenti di dinamica molecolare [Gilson *et al.* 1994] ed è stato osservato che la disposizione principale dei residui Trp84, Val129, Gly441, potrebbe aprire, tramite un movimento "*shutter-like in plane*", una cavità larga tanto da consentire l'ingresso di una molecola d'acqua al sito attivo.

Calcolando il campo elettrico della proteina con la "*back door*" aperta, la conformazione mostra che le linee di campo che emergono dall'ingresso della gola diminuiscono in forza, mentre si riscontra un forte campo verso la nuova apertura. La direzione di questa forza potrebbe attrarre ioni carichi positivamente, fornendo dunque un altro accesso al sito attivo per molecole cariche positivamente [Gilson *et al.* 1994].

Un'altra possibilità è il movimento dell'intero Ω loop, dalla Cys67 alla Cys94 [Ripoll *et al.* 1993]. Un loop simile è risaputo adottare sia una conformazione aperta che chiusa nell'enzima strutturalmente simile *Candida Rugosa* lipasi [Grochulski *et al.* 1994].

Studi di *site-directed mutagenesis*, progettati per evidenziare la presenza di questa “back door”, hanno dimostrato soltanto una lieve diminuzione dell'attività enzimatica. Dunque l'importanza del movimento “shutter-like” dei tre residui Trp84, Val129 e Gly441 non può essere confermata [Kronman *et al.* 1994]; l'attività catalitica non sembra neanche essere influenzata dalla restrizione del movimento dell' Ω loop, che è stato ancorato all'enzima tramite un ponte disolfuro [Faerman *et al.* 1996].

Uno studio con anticorpi monoclonali sull'ACHe di *Electrophorus Electricus* ha però mostrato che l'inibizione dell'attività enzimatica da parte di uno dei tre anticorpi progettati, probabilmente è dovuta all'interazione di questo con un sito regolatorio vicino alla “back door” [Simon *et al.* 1999].

A sostegno dell'esistenza di questa porta “di servizio” è stata molto esplicativa la risoluzione della struttura cristallografica della *TcACHe* in complesso con il MF268 [Bartolucci *et al.* 1999] (vedi Fig.5.2 e Fig.5.4). Nella struttura, infatti, è stata riscontrata la presenza della lunga catena alchilica in cui, ad una estremità, il gruppo carbammico si lega covalentemente con l'O γ della Ser200, dando origine ad un'inibizione irreversibile, mentre, all'estremità opposta, il gruppo morfolinico interagisce con il Trp279 del PAS. Non è stato riscontrato una densità elettronica corrispondente al gruppo uscente eserolinico; dato l'ingombro di questo gruppo e dato che la gola è totalmente occupata dalla catena alchilica, è estremamente improbabile che il gruppo eserolinico sia stato eliminato ripercorrendo la gola; questa evidenza depone a favore dell'esistenza di una “back door” dalla quale il gruppo eserolinico potrebbe essere eliminato.

Un'altra conferma deriva dallo studio cinetico e strutturale eseguiti sul complesso tra l'ACHe da *Mus musculus* e la fascicolina. Gli studi cinetici in soluzione [Marchot *et al.* 1993] dimostrano che l'inibitore diisopropilfosforofluoridrato è legato all'enzima, anche in presenza di fascicolina. La struttura cristallografica [PDB entry code: 1KU6] mostra invece chiaramente che la gola è completamente vuota. Dal momento che la fascicolina si lega al PAS, questo risultato evidenzia la possibilità dell'esistenza di un'altra porta dalla quale il diisopropilfosforofluoridrato sia stato eliminato dal sito catalitico.

Come è evidente molti aspetti del meccanismo dell'AChE e dell'ingresso e dell'uscita dei substrati, dei prodotti di reazione e degli inibitori enzimatici sono ancora irrisolti.

Una risposta a queste problematiche potrebbe provenire da studi cristallografici detti "*time-resolved*", in cui, applicando tecniche e condizioni sperimentali appropriate, si possono ottenere strutture del complesso ad intervalli di tempo brevissimi tali da poter osservare gli stadi progressivi della reazione enzimatica. Sono in corso studi di criofotolisi che hanno lo scopo di intrappolare nell'enzima analoghi dell'acetilcolina [Specht *et al.* 2001].

