

CAPITOLO 7. STRUTTURA CRISTALLOGRAFICA DEL COMPLESSO TRA LA TcAChE E LA N¹,N⁸- BISNORCIMSERINA: UNA QUESTIONE APERTA.

7.1 Introduzione.

L'N¹,N⁸-bisnorcimserina (Fig.7.1.) è un inibitore dell'Acetilcolinesterasi che appartiene alla classe degli inibitori carbammici (par.5.2), il cui meccanismo di azione è caratterizzato da una rapida carbamoilazione della serina catalitica seguita da una lenta rigenerazione dell'enzima. Il meccanismo di reazione è schematizzato in Fig 5.3.

L'alcaloide fisostigmina (Fig.7.1) è stato il primo inibitore carbammico dell'AChE utilizzato nel trattamento di disordini colinergici quali il morbo di Alzheimer; questa molecola è stata soggetta a numerose modificazioni chimiche.

Uno dei derivati sintetici più interessanti è il fenil carbammato fenserina [Greig *et al.* 1995] (Fig.7.1), che mostra una spiccata selettività verso l'AChE, ed una minima inibizione della BChE. Questo composto ha superato la fase clinica I ed è attualmente in fase clinica II per il trattamento dell'AD. L'inibitore ha una durata di azione sufficientemente lunga tanto da richiedere una sola somministrazione giornaliera, viene assorbito preferenzialmente dai tessuti cerebrali ed è meno tossico e più a lunga durata della fisostigmina. Inoltre, da studi *in vitro* ed *in vivo*, mostra di ridurre la sintesi e la secrezione della proteina precursore del β -amiloide, fonte del peptide β -amiloide neurotossico [Greig *et al.* 1996; Haroutunian *et al.* 1997].

Sulla base di queste evidenze sperimentali, sono stati sintetizzati numerosi derivati della Fenserina [Yu *et al.* 1997], con lo scopo di individuare inibitori più attivi e selettivi verso l'AChE; sono stati sintetizzati anche metaboliti della stessa [Yu *et al.* 1998], con l'obiettivo di analizzarne le proprietà anticolinesterasiche.

Poiché la funzione della BChE nel cervello è ancora sconosciuta, non è stato posto molto interesse nella progettazione di inibitori selettivi della BChE.

Recenti studi hanno però proposto l'implicazione della BChE nell'aumento del rischio e/o della progressione dell'AD [Guillozet *et al.* 1997; Barber *et al.* 1996; Lehman *et al.* 1997]. Questa evidenza ha suggerito la sintesi di inibitori selettivi della BChE, che però non presentino effetti collaterali quali nausea, vomito ed epatotossicità.

Presso i laboratori del Dr.N.Greig del *National Institute of Health*, U.S.A., sono stati disegnati e sintetizzati nuovi inibitori carbammici reversibili a partire dalla cimserina (Fig.7.1). Questa molecola è 15 volte più selettiva verso la BChE rispetto all'AChE. Tra le molecole ottenute, la N¹,N⁸-bisnorcimserina (Fig.7.1), si è rivelata ben 50 volte più potente della cimserina e 110 volte più selettiva verso la BChE; inoltre è ben tollerata in vivo, oltrepassa la barriera ematoencefalica e, saggiata sui roditori, ha mostrato di aumentare le risposte cognitive [Yu *et al.* 1999].

Questa molecola è stata dunque presa in considerazione per studiarne la struttura cristallografica in complesso con la TcAChE. L'obiettivo era di verificare se, dato l'ingombro sterico del gruppo paraisopropilfenilcarbammico, la N¹,N⁸-bisnorcimserina avrebbe provocato una modifica sull'orientamento o sulla posizione del Trp84, fornendo una evidenza sperimentale dell'esistenza della "porta di servizio" dell'enzima. Una via possibile per generare questo canale di uscita secondario potrebbe infatti essere il movimento *shutter like* del Trp84, della Val129 e della Gly441 (vedi discussione par.4.6).

7.2 Struttura cristallografica della TcAChE in complesso con la nor-eserolina.

Risultati.

La struttura ai raggi X del complesso in esame è stata determinata a 2.26 Å di risoluzione e l'affinamento della struttura ha raggiunto a convergenza un valore di R e di R_{free} rispettivamente di 21.0% e di 25.1%. In Tabella 7.I sono riportati alcuni dati statistici relativi alla raccolta dati e all'affinamento della struttura.

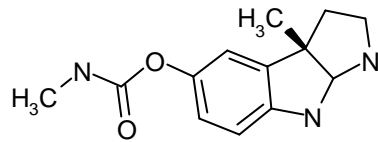
L'analisi delle mappe di densità elettronica, aventi rispettivamente coefficienti (2F_{obs}-F_{calc}) e (F_{obs}-F_{calc}), calcolate al termine dell'affinamento cristallografico a seguito del solo contributo nel calcolo delle fasi derivante dagli atomi appartenenti alla proteina (PDB *entry code*: 1EVE, con esclusione delle acque e dell'inibitore E2020), ha inaspettatamente rivelato la presenza all'interno del sito catalitico di una densità elettronica residua attribuibile alla nor-eserolina (N¹,N⁸-bisnor-eserolina) (Fig.7.2) e non al gruppo paraisopropilfenilcarbammico legato covalentemente alla serina catalitica.

La struttura tridimensionale del complesso ha mostrato che la nor-eserolina si posiziona sul fondo della gola catalitica (Fig.7.3, 7.4) con un orientamento simile a quello osservato per la tacrina nel complesso *TcAChE*-tacrina [PDB *entry code*: 1ACJ; Harel *et al.* 1993] (Fig.7.5).

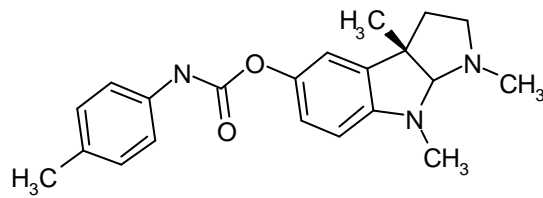
Infatti l'anello contenente l'azoto N¹ della nor-eserolina è rivolto verso il Trp84; la distanza tra i centroidi degli anelli è di circa 3 Å (Fig 7.4); l'ossidrile si posiziona invece a 2.64 Å dall'ossigeno O_γ della Ser200 ed a 2.94 Å dall'azoto Nε2 dell'His440.

Anche in questa struttura si è potuto riscontrare, all'interno della gola catalitica, la presenza di molecole di acqua altamente conservate nella struttura dell'enzima nativo e di alcuni complessi (vedi a titolo d'esempio la W765 riportata in Fig.7.4). Recentemente è stato pubblicato un lavoro interessante nel quale sono state analizzate proprio le acque conservate nelle diverse strutture 3D di complessi *TcAChE*-inibitore [Koellner *et al.* 2000].

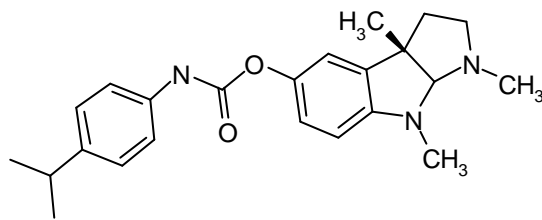
Inoltre, come precedentemente osservato nelle strutture 3D del complesso *TcAChE*-galantamina [PDB *entry code*: 1DX6, 1QTI; Greenblatt *et al.* 1999; Bartolucci *et al.* 2001], e del complesso *TcAChE*-ganstigmina (vedi cap.6), anche nella struttura del complesso *TcAChE*-nor-eserolina è stato trovato un frammento (pentamero) di polietilenglicole (PEG) che occupa la gola enzimatica fino a raggiungere il Trp279, residuo amminoacidico del *Peripheral Anionic Site*.



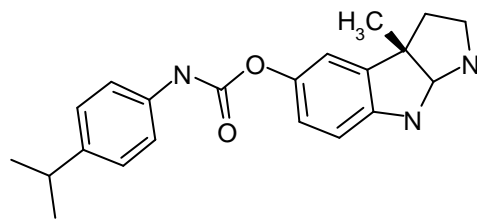
FISOSTIGMINA



FENSERINA



CIMSERINA



N¹,N⁸-BISNORCIMSERINA

Fig.7.1 Fisostigmina e derivati.

Tabella 7.1 Parametri del cristallo, raccolta dati ed affinamento statistico del complesso TcAChE- nor-eserolina.

<i>Parametri del Cristallo</i>	
Gruppo spaziale	P3121
Costanti di cella	a=b= 111.01 Å , c=137.38 Å $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma= 120^\circ$
Mosaicità, °	0.83
<i>Raccolta Dati</i>	
Sorgente di raggi X	XRD1, ELETTRA, Trieste (Italy)
Lunghezza d'onda, Å	1.00
Temperatura, K	100.0
Intervallo di RISOLUZIONE, Å	29.21 – 2.26 (2.29 – 2.26) [§]
Misure	356758
Riflessi unici I=0s(I)	45813 (1303) [§]
Completezza, %	99.0 (30.2) [§]
Molteplicità	7.8 (2.1) [§]
R _{sym} [†] , %	11.2 (38.6) [§]
Media I/s(I) dei dati merged	5.9 (1.1) [§]
<i>Statistica di Affinamento</i>	
Resolution used, Å	29.21 – 2.26
Reflection used F=0s (F _o)	45736
R _{cryst} , R _{free} [‡] , %	21.0 – 25.1
R.m.s.d. on bond lengths, * Å	0.011
R.m.s.d. on bond angles, * °	1.644
<i>Numero di atomi</i>	
Protein	4263
Water	309
Carbohydrates	42
Inhibitor	14
Ligand (PEG)	16
All atoms	4645
<i>Fattori di temperatura medi, Å</i>	
Protein	45.7
Water	51.4
Carbohydrates	71.9
Inhibitors	42.4
Ligand (PEG)	72.8
R.m.s.d. ΔB , # Å ²	4.23

[§] I numeri in parentesi di riferiscono all' intervallo contenente i dati a più alta risoluzione.

[†] $R_{sym}(I) = \sum_{hkl} S_i |I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle| / \sum_{hkl} S_i |I_{hkl,i}|$ con $\langle I_{hkl} \rangle$ Intensità media delle osservazioni multiple delle $I_{hkl,i}$ dei riflessi correlati per simmetria.

[‡] $R_{cryst} = \sum_{hkl} |F_{obs} - F_{calc}| / \sum_{hkl} F_{obs}$ dove F_{obs} and F_{calc} sono le ampiezze e i fattori di struttura rispettivamente per i riflessi hkl. L' R_{free} è stato calcolato omettendo il 5% dei riflessi osservati dai dati.

* I criteri stereo chimici sono quelli di Engh and Huber (*Acta Crystallogr.* (1991) A47, 392-400).

R.m.s.d ΔB è lo scarto quadratico medio dei fattori di temperatura B (modello isotropo) tra gli atomi covalentemente legati.

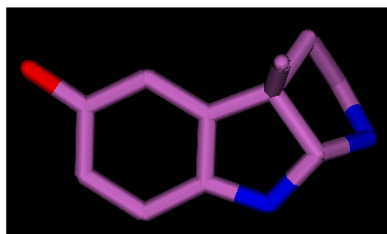


Fig.7.2 Nor-eserolina.

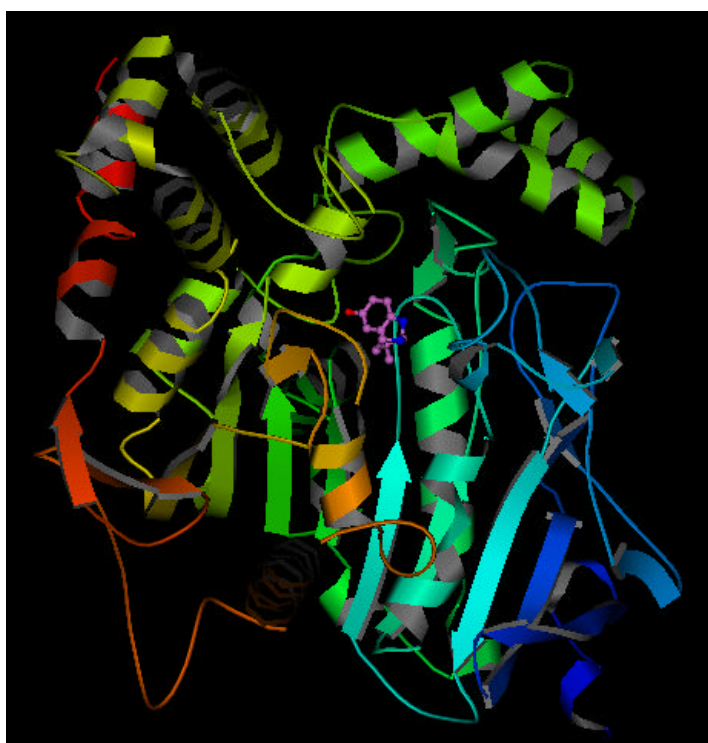


Fig.7.3 Struttura cristallografica del complesso tra la *TcAChE* e la nor-eserolina.

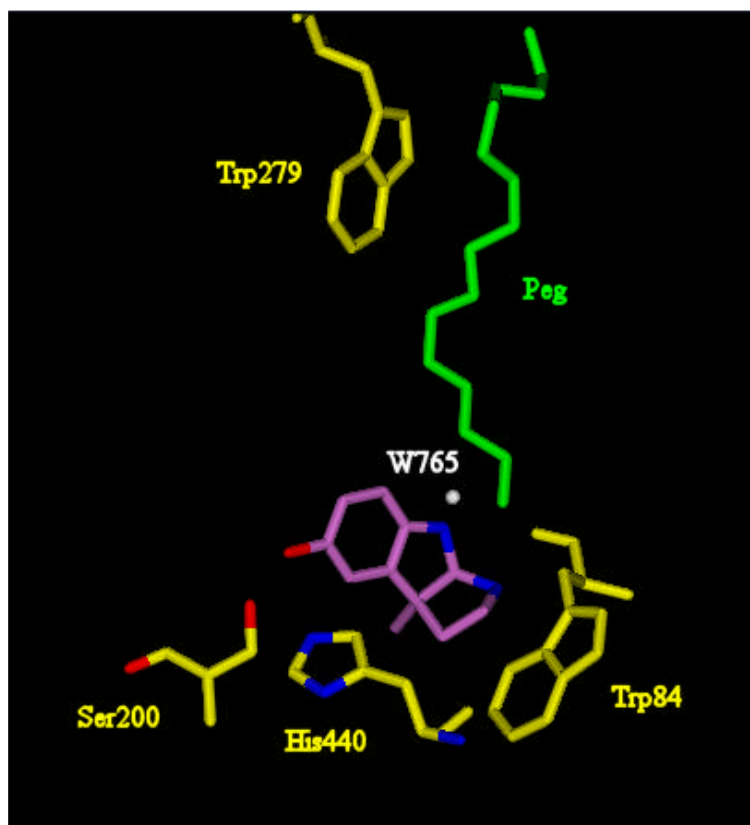


Fig. 7.4 Struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-nor-eserolina. Visione ravvicinata delle interazioni tra la nor-eserolina, in viola, ed i residui della gola catalitica della *TcAChE*, in giallo. In verde è rappresentat o il pentamero di Peg200. In bianco una molecola di acqua (W765).

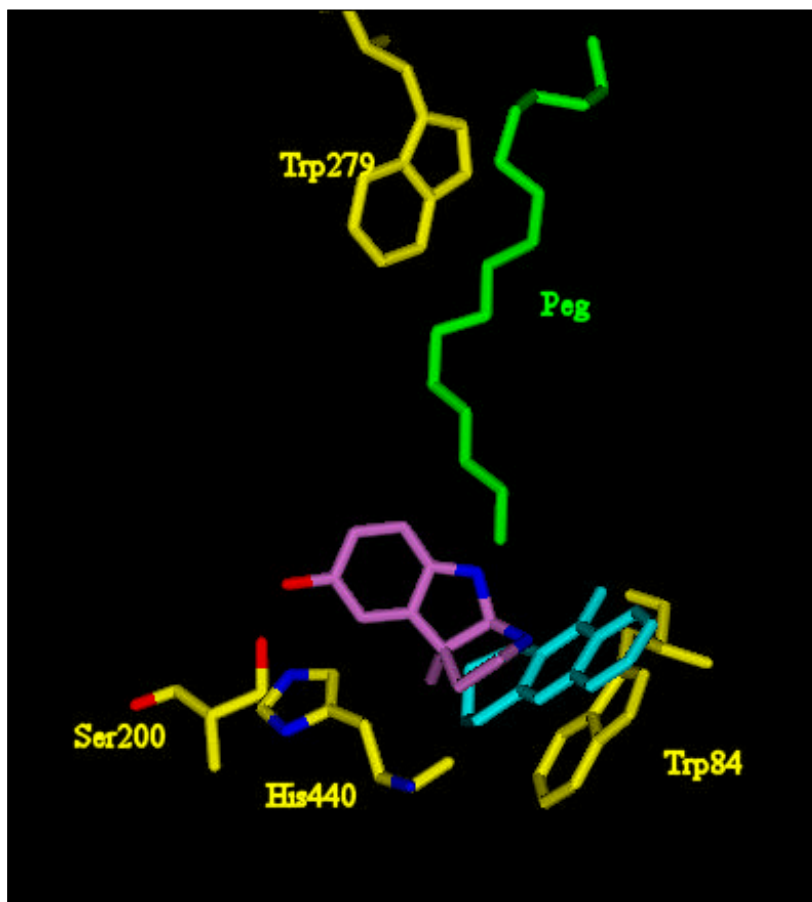


Fig. 7.5 Sovrapposizione delle strutture cristallografiche dei complessi *TcAChE*-nor- eserolina (viola) e *TcAChE*-tacrina (celeste). Visione ravvicinata della gola catalitica enzimatica; in giallo sono rappresentati i residui enzimatici, in verde il pentamero di Peg200.

Discussione.

Come nel caso dei derivati della fisostigmina precedentemente studiati [Bartolucci *et al.* 1999; Perola *et al.* 1997] e come nel caso della ganstigmina (vedi cap.6), ci si aspettava di trovare nel sito catalitico una densità elettronica residua attribuibile al gruppo paraisopropilfenilcarbammico legato covalentemente all'ossigeno ossidrilico della Serina catalitica 200 (Fig.7.6).

La nor-eserolina rappresenta il prodotto di eliminazione della reazione di acilazione della N¹,N⁸-bisorcimserina, quella parte cioè di molecola che non ci si aspettava di trovare all'interno della cavità enzimatica. Gli studi cristallografici effettuati sul derivato della fisostigmina, MF268 [Bartolucci *et al.* 1999] e sul derivato della geneserina, ganstigmina (vedi cap.6) evidenziavano proprio l'assenza nella cavità catalitica dell'eserolina (Fig.7.8) e della geneserolina (Fig.6.2), rispettivamente.

Questo risultato del tutto inatteso potrebbe essere attribuito ad una impurità del composto di sintesi fornitoci, nel quale potrebbero essere state presenti tracce di nor-eserolina. La N¹,N⁸-bisorcimserina utilizzata era molto poco solubile in acqua (vedi par.9.7) mentre la nor-eserolina è solubile in acqua; non è da escludere che la differente solubilità delle due molecole abbia favorito la diffusione nei cristalli proteici della nor-eserolina piuttosto che della N¹,N⁸-bisorcimserina.

Per evidenziare eventuali impurezze la N¹,N⁸-bisorcimserina è stata sottoposta ad indagine spettroscopica NMR. Lo spettro ¹H NMR, 600 MHz (vedi par.9.8) ha rivelato effettivamente la presenza di alcuni prodotti di degradazione tra i quali la nor-eserolina.

E' noto che l'eserolina, metabolita primario della fisostigmina, mostra una forte e selettiva attività inibitoria verso l'AChE [Galli *et al.* 1982; Golcnik *et al.* 2002] ed, essendo la nor-eserolina strutturalmente identica con l'esclusione dei due metili (Fig.7.7 e 7.8), non è sorprendente una sua analoga attività inibitoria verso la TcAChE. Le interazioni osservate nella struttura cristallografica tra la nor-eserolina ed i residui amminoacidici dell'enzima, evidenziano le modalità strutturali con cui avviene l'inibizione. In particolare i legami idrogeno che l'ossidrilico della nor-eserolina forma con l'Oγ della Ser200 e con l'Nε2 dell'His440, bloccano la molecola nel sito catalitico e rallentano la riattivazione enzimatica impedendo la funzionalità della serina e dell'istidina catalitiche (vedi anche discussione par.6.2).

Il risultato ottenuto potrebbe anche esser dovuto alla idrolisi della N¹,N⁸-bisorcimserina nel tampone di crescita dei cristalli della TcAChE (PEG 200

al 40% v/v, MES 0.1 M pH 6.2). Come conseguenza potrebbe essere diffusa all'interno della cavità enzimatica soltanto la nor-eserolina, attiva verso l'enzima, e non il gruppo para-isopropilfenilcarbammico, di cui ancora non è stato dimostrato il potere inibitorio.

Pur non essendo riusciti a perseguire l'obiettivo iniziale che prevedeva la determinazione della struttura cristallografica della *TcAChE* in complesso con la N¹,N⁸-bisnorcimserina come acil-enzima, l'inattesa caratterizzazione del complesso *TcAChE*-nor-eserolina si è rivelata di estremo interesse in quanto per la prima volta è stata determinata la struttura tridimensionale della *TcAChE* complessata con il gruppo uscente eserolinico di un inibitore carbammico derivato della fisostigmina.

Questo risultato costituisce una solida base di partenza per studiare il meccanismo di inibizione degli inibitori carbammici mediante metodiche tipiche della dinamica molecolare. Infatti, oltre alla presente struttura della *TcAChE*-nor-eserolina, ci si può avvalere della struttura del complesso *TcAChE*-MF268 [PDB entry code: 1OCE; Bartolucci *et al.* 1999] (vedi anche par.5.2).

La figura 7.9 mostra una sovrapposizione tra i residui principali della gola enzimatica nei due complessi sovracitati; osservando le posizioni occupate dal gruppo uscente (Fig.7.9B) e dal gruppo carbammico legato covalentemente alla Ser200 (Fig.7.9A), si può proporre un modello del *pathway* con il quale un inibitore carbammico, derivato della fisostigmina (Fig.7.11), entri nella gola e interagisca con la triade catalitica.

L'inibitore entra nella gola enzimatica ed interagisce con il Trp84 tramite il gruppo nor-eserolinico; in questo modo il gruppo carbammico viene ad essere orientato correttamente nel sito attivo per la reazione di acilazione enzimatica (Fig.7.10).

La posizione dell'ossigeno ossidrilico della nor-eserolina rispetto alla Ser200 (2.64 Å) mostra che un gruppo carbammico legato a questo ossigeno, si troverebbe nella condizione produttiva per l'attacco nucleofilo della Ser200 al carbonile.

La reazione di acilazione implica che il gruppo carbammico si leghi covalentemente alla serina catalitica e che il gruppo nor-eserolinico venga eliminato.

Nelle strutture cristallografiche del MF268 e della ganstigmina, si trova il gruppo carbammico legato covalentemente alla Ser200.

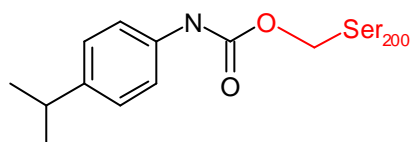
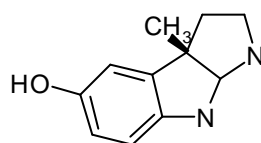
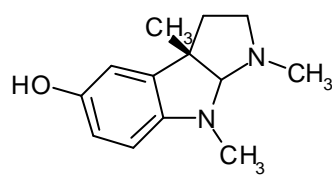


Fig.7.6 Previsione del comportamento dell' N¹,N⁸-bisnorcimserina all'interno della cavità catalitica: in rosso è riportata la serina catalitica della *TcAChE* acilata con il gruppo para-isopropilfenilcarbammico.



nor-eserolina

Fig.7.7 Molecola riscontrata nella cavità catalitica enzimatica: gruppo uscente della N¹,N⁸-bisnorcimserina.



eserolina

Fig.7.8 Gruppo uscente del derivato della Fisostigmina MF268.

Il meccanismo con cui viene eliminato il gruppo uscente non è ancora chiaro; nelle strutture cristallografiche, come già descritto, i gruppi uscenti (eserolina nel caso del MF268, geneserolina nel caso della ganstigmina) non sono stati riscontrati nell'enzima. E' stata suggerita la possibilità di una via di uscita alternativa alla via di entrata, la cosiddetta "back door"(vedi discussione nel par.4.6), ma non ci sono ancora evidenze sperimentali dirette sufficienti ad avvalorare questa ipotesi.

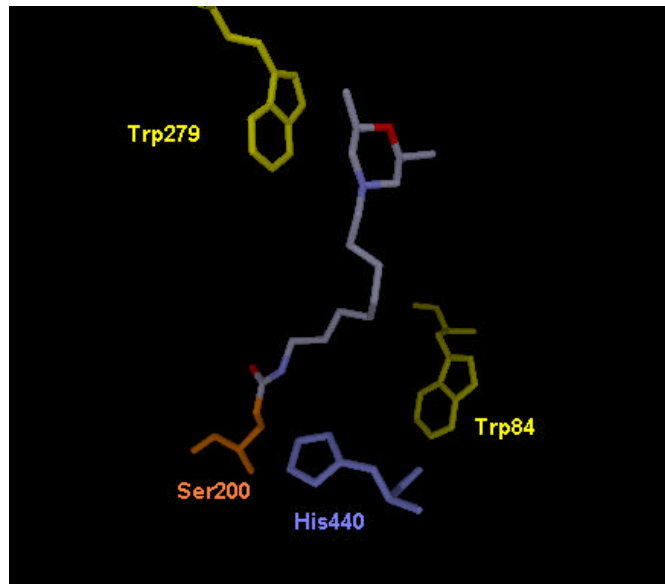
Il *pathway* appena suggerito avrebbe bisogno di essere confermato ed approfondito con studi di dinamica molecolare, anche per verificare la conformazione che potrebbe assumere l'inibitore quando il gruppo eserolinico è sul fondo della gola e quando ancora non è avvenuta l'acilazione enzimatica.

Analizzando questa struttura cristallografica è possibile anche ricavare delle informazioni interessanti per successivi studi di *drug design*. Osservando la reciproca posizione della nor-eserolina e del pentamero di Peg (Fig.7.4), si può pensare di sintetizzare un composto con una catena alchilica derivatizzata sull'azoto N⁸ della nor-eserolina. L'obiettivo sarebbe quello di creare una molecola che interagisca anche con il *Peripheral Anionic Site*; la catena alchilica, a sei atomi di carbonio (vedi discussione riguardo alla lunghezza della catena par.8.3, *discussione*) dovrebbe terminare con un gruppo in grado di formare un'interazione π - π con il Trp279.

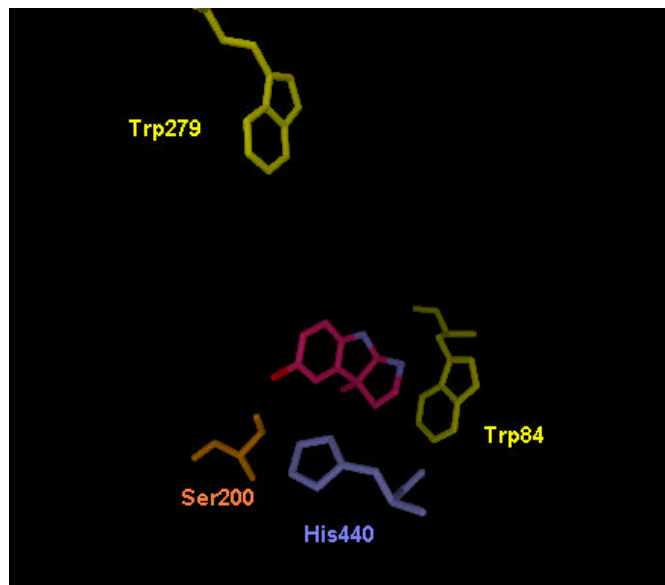
Confrontando inoltre questa struttura cristallografica con le strutture dei complessi tra la TcAChE e, rispettivamente, la tacrina (PDB entry code: 1ACJ) e l'huprinaX (1E66), si ricavano altre utili informazioni.

Come già visto (vedi Fig.7.5) la nor-eserolina e la tacrina hanno una differente interazione con il Trp84. Tutti gli anelli della tacrina formano uno stacking π - π con il Trp84 (interazione *sandwich*); la nor-eserolina interagisce con il Trp84 soltanto con l'anello contenente l'N¹, mentre la parte restante della molecola è posta quasi a 90° (Fig.7.4, 7.5).

L'huprinaX è una chimera costituita dai farmacofori della tacrina e della (-)-huperzina (vedi par.5.3). Dalla sovrapposizione della struttura cristallografica di questo inibitore con la nor-eserolina (Fig.7.12), si nota una orientazione simile tra il gruppo "huperzine like" della huprinaX e la nor-eserolina. Derivatizzando l'huprinaX in modo da inserire un ossidrilico che abbia la stessa orientazione mostrata nella nor-eserolina, si potrebbe ottenere una molecola che presenti un'interazione aggiuntiva con il sito catalitico.



A



B

Fig.7.9 Visione ravvicinata delle strutture cristallografiche dei complessi: *TcAChE*-MF268 (A) e *TcAChE*-nor-escerolina (B).

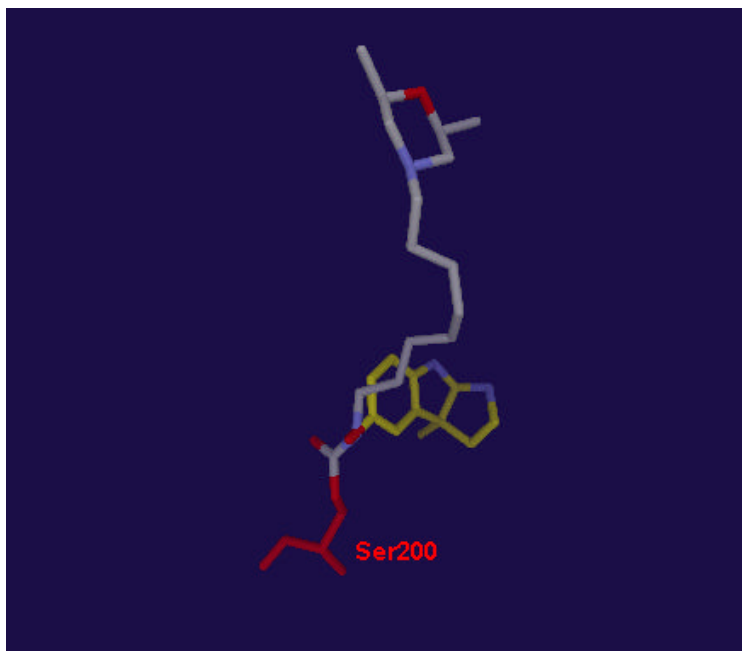


Fig.7.10 Sovrapposizione delle strutture cristallografiche del MF268 (in grigio) e della nor-eserolina (in giallo). Visione ravvicinata dell'interazione con la Ser200 della *TcAChE* (in rosso).

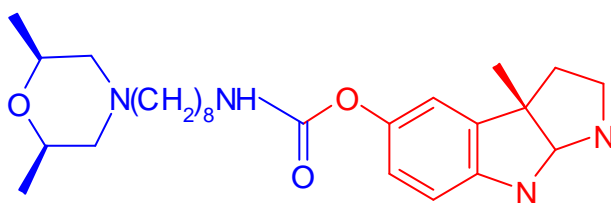


Fig.7.11 Inibitore carbammico, derivato della Fisostigmina: in blu è disegnata la parte di molecola identica a quella riscontrata nella struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-MF268, in rosso la parte di molecola trovata nella struttura cristallografica del complesso *TcAChE*-nor-eserolina . Confrontando questa figura con la Figura 5.2 si può osservare come questa molecola sia pressoché identica al MF268 a meno dei due metili sugli azoti eserolinici.

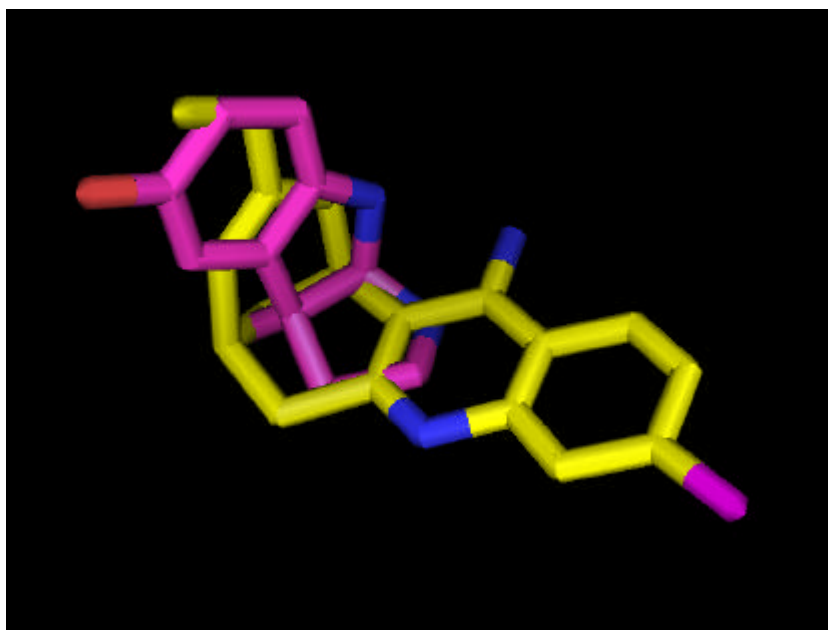


Fig.7.12 Sovrapposizione delle strutture cristallografiche della TcAChE in complesso con la nor-eserolina, in viola e con la huprinaX, in giallo. Notare l'orientazione simile della nor-eserolina con il gruppo "huperzine-like" dell'huprinaX. In azzurro sono rappresentati gli atomi di azoto, in rosso l'ossigeno (gruppo ossidrilico della nor-eserolina) in viola chiaro l'atomo di cloro della huprinaX.

