



Laura Scalvini
Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco
Università degli Studi di Parma
laura.scalvini@unipr.it

STUDI COMPUTAZIONALI SULLA NAAA

La ricerca, che ha ottenuto il riconoscimento Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2022, ha riguardato l'applicazione di metodi computazionali allo studio a livello atomistico del meccanismo di idrolisi del mediatore lipidico palmitoiletanolammide (PEA) catalizzato dall'enzima NAAA (N-acyl ethanolamine acid amidase).

L'attività di ricerca per la quale ho ricevuto il "Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2022" riguarda lo studio del meccanismo di enzimi coinvolti nella degradazione di mediatori lipidici e la progettazione di composti in grado di modularne l'attività. Grazie alla collaborazione del mio gruppo di chimica farmaceutica presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco dell'Università di Parma con il Prof. Piomelli della University of California, Irvine, ho avuto modo di chiarire il meccanismo dell'enzima NAAA (N-acyl ethanolamine acid amidase), responsabile dell'idrolisi di mediatori lipidici in grado di modulare la risposta infiammatoria.

Come è noto le fasi iniziali del processo infiammatorio sono innescate dall'attività di segnali chimici di natura lipidica rilasciati da cellule del sistema immunitario (SI). Macrofagi e neutrofili, ad esempio, rilasciano metaboliti dell'acido arachidonico in grado di provocare vasodilatazione e sensibilizzazione dei nocicettori, due fondamentali sintomi dell'infiammazione acuta. Le cellule del SI sono altresì

responsabili della produzione di mediatori in grado di contrastare il processo infiammatorio, favorendo sia la risoluzione dell'infiammazione e la guarigione, sia l'aumentata capacità dei tessuti di opporsi agli insulti. Tali mediatori lipidici comprendono non solo lipossine e resolvine, ma anche derivati ammidici di acidi grassi, come la palmitoiletanolammide (PEA). La PEA è sintetizzata in modo costitutivo da parte di vari tipi di cellule del SI ed esplica la propria attività biologica attivando i recettori PPAR- α , contribuendo così ad attenuare lo stimolo doloroso e a ridurre la produzione di citochine ed eicosanoidi [1].

L'attività della PEA è regolata dall'idrolisi catalizzata dall'enzima NAAA. Identificata per la prima volta da Ueda e Yamamoto nel 1999 [2], la NAAA è stata oggetto di numerosi studi da parte di gruppi di ricerca accademici interessati alla progettazione di nuovi composti attivi per il trattamento di patologie infiammatorie a livello periferico e centrale. Tra le classi di inibitori più rilevanti si ricordano gli inibitori irreversibili della classe dei β -lattoni e β -lattami,

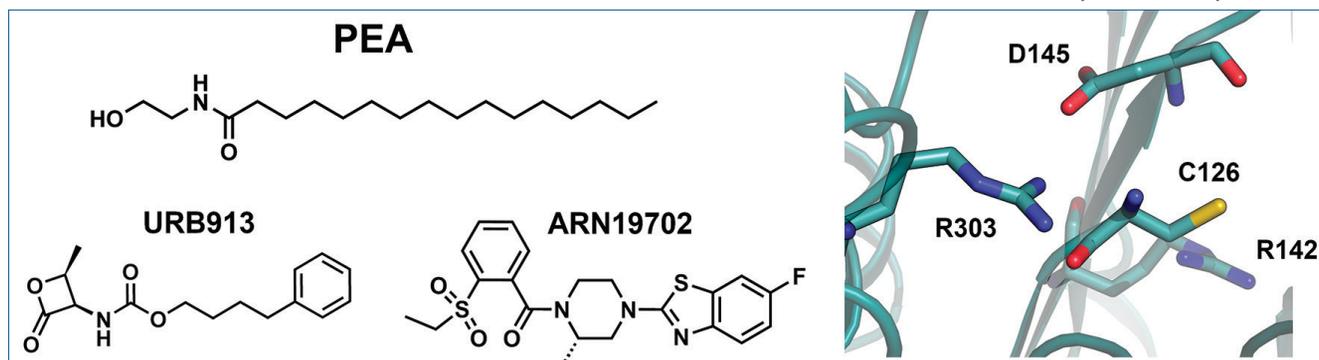


Fig. 1 - Strutture di PEA e inibitori di riferimento; rappresentazione del sito catalitico della NAAA

A Laura Scalvini è stato conferito il Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2022 della SCI.

tra cui il composto URB913, valutato in fase clinica per il trattamento delle lesioni infiammatorie dell'epidermide. Più recentemente, inibitori di tipo competitivo come il derivato benzotiazolico ARN19702, sono stati identificati come potenziali composti per il trattamento di patologie infiammatorie del sistema nervoso centrale come la sclerosi multipla (Fig. 1) [1]. L'elevato interesse riguardo lo sviluppo di agenti antiinfiammatori in grado di regolare l'attività della NAAA ha infine portato, nel 2018, all'identificazione della struttura cristallografica dell'enzima [3].

Membro della famiglia degli enzimi con gruppo nucleofilo *N*-terminale (*Ntn hydrolases*), l'attività della NAAA avviene esclusivamente nell'ambiente lisosomiale a pH 4,5-5 ed è mediata da una cisteina nucleofila, Cys126, in posizione *N*-terminale. L'enzima, sintetizzato come precursore inattivo, risulta cataliticamente competente in seguito ad una reazione auto-catalizzata che porta alla rottura di un legame peptidico e alla formazione di due subunità, α e β , che modellano un sito attivo adatto ad accogliere la catena idrofobica della PEA. Le strutture cristallografiche disponibili hanno, inoltre, consentito di valutare che, in prossimità della cisteina catalitica Cys126, altri residui amminoacidici potrebbero avere un ruolo importante nella reazione di idrolisi catalizzata dalla NAAA. Arg142, Asp145, Glu195 e Arg300 rivestono un ruolo cruciale nel mantenimento dell'architettura del sito catalitico e, al tempo stesso, nel regolare la pK_a della Cys126 (Fig. 1). Inoltre, la presenza di un elevato numero di residui acidi, un tratto del tutto caratteristico di questo enzima, potrebbe avere un ruolo nel garantire la capacità della NAAA di esplicare la propria attività a pH acidi.

Partendo da tali premesse, la mia attività di ricerca si è concentrata sull'applicazione di metodi computazionali allo studio dell'idrolisi della PEA catalizzata dalla NAAA. I risultati sono stati pubblicati sulla rivista *ACS Catalysis* e hanno ottenuto, come riconoscimento, l'opportunità di essere rappresentati graficamente sulla *front cover* della rivista [4]. Nello studio riportato su *Catalysis* ho utilizzato diversi approcci computazionali, dalla dinamica molecolare (*molecular dynamics*, MD) a simulazioni con approccio ibrido QM/MM (quantomeccanica/meccanica molecolare) accoppiate a metodi di *enhanced sampling*, per la caratterizzazione a livello atomistico del meccanismo catalitico della NAAA.

Partendo dalle coordinate cristallografiche dell'enzima umano in complesso con l'inibitore ARN19702, è stato condotto uno studio di MD per valutare quale sia lo stato di protonazione dei gruppi funzionali direttamente coinvolti nella costituzione del sito catalitico, ovvero della catena laterale e del gruppo ammino-terminale della Cys126 e della catena laterale del residuo Asp145, e dei residui acidi che, situati in prossimità del sito attivo, ne influenzano la stabilità attraverso la formazione di legami di natura polare. Questo studio si è rivelato fondamentale per comprendere che la corretta attribuzione dello stato di protonazione di tali gruppi è necessaria a garantire la stabilità dinamica dell'enzima. Un'ulteriore informazione critica emersa dalle simulazioni MD riguarda la distribuzione delle cariche nella diade catalitica Cys126-Asp145. In presenza dell'inibitore non covalente, infatti, la struttura del sito catalitico risulta maggiormente stabilizzata da una configurazione in cui la catena laterale dell'Asp145 si trova nella sua forma neutra, mentre il gruppo ammino-terminale e la catena laterale della Cys126 si trovano, rispettivamente, nella loro forma neutra e carica negativamente. Se da un lato questa configurazione protonica risulta inaspettata per un enzima la cui attività ottimale richiede che il pH sia acido, è importante sottolineare che il gruppo ammino-terminale della cisteina catalitica si trova ad una distanza ridotta dal gruppo guanidinico della Arg300 che ne modula la pK_a e che, come sottolineato da studi di mutagenesi su enzimi appartenenti alla famiglia delle *Ntn hydrolases*, ha un ruolo fondamentale nel regolare l'attività enzimatica.

Partendo da questo risultato, è stato effettuato uno studio in cui si sono combinate tecniche di *enhanced sampling*, e, in particolare, simulazioni *umbrella sampling* (US), con l'approccio ibrido QM/MM. Questo approccio consente l'investigazione a livello atomistico degli eventi coinvolti nei fenomeni di trasferimento protonico e rottura e formazione dei legami interatomici che si verificano durante una reazione chimica e, grazie all'uso di coordinate di reazione adeguate, di effettuare una stima del profilo di energia libera associato ad un determinato processo. Sono state effettuate delle simulazioni US per valutare quale sia la configurazione protonica della diade catalitica Cys126-Asp145 dell'enzima in complesso con il substrato. Partendo da un modello PEA-NAAA

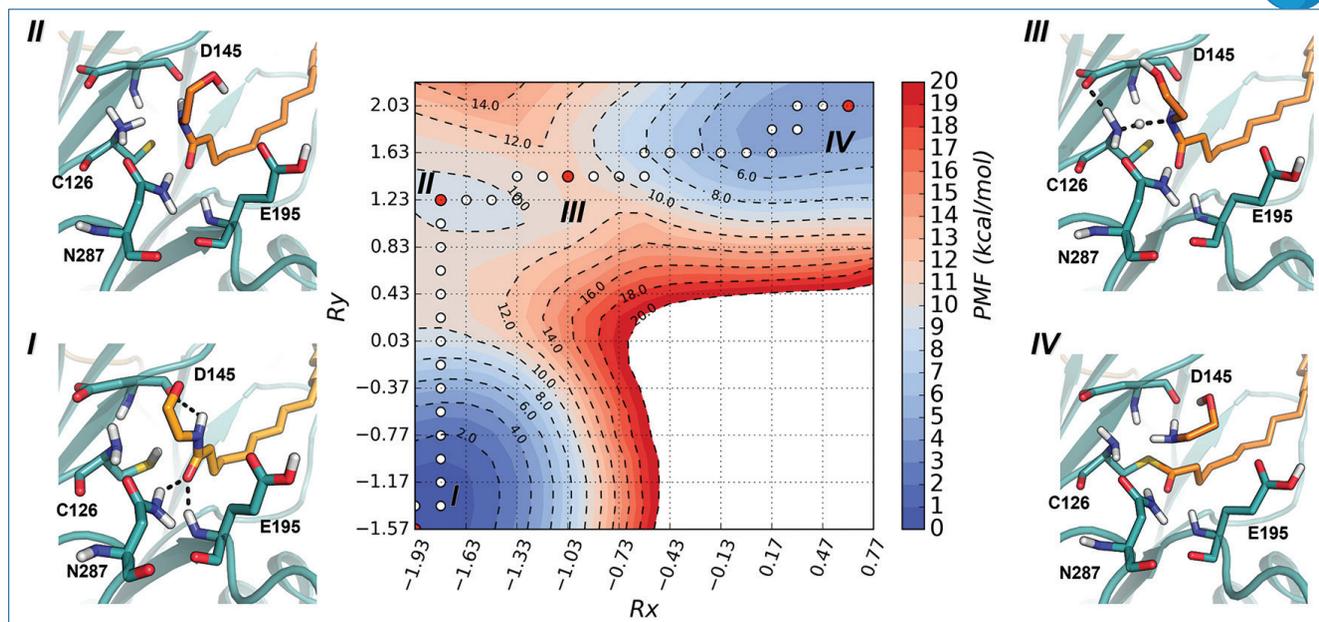


Fig. 2 - Profilo di energia libera associato alla fase di acilazione e stati caratterizzanti la reazione di idrolisi della PEA (atomi di carbonio in arancio)

nella forma dinamicamente stabile identificata dagli studi MD, è stato investigato il processo di trasferimento di un protone dalla catena laterale dell'Asp145 al gruppo ammino-terminale e al tiolato della Cys126 utilizzando una coordinata di reazione rappresentata da combinazioni di distanze tra gli atomi coinvolti nel processo. Il risultato di questo primo studio di QM/MM ha consentito di stabilire che, nel complesso NAAA-PEA, la configurazione in cui la diade catalitica è costituita da Asp145 in forma carica negativamente e Cys 126 con gruppo ammino-terminale e catena laterale in forma neutra è favorita da un punto di vista energetico rispetto ad altre configurazioni.

Questa configurazione è stata selezionata per procedere allo studio della fase di acilazione dell'idrolisi della PEA. Seguendo lo stesso schema di lavoro, ma usando in questo caso due coordinate di reazione che rendessero conto 1) dell'evento di attacco nucleofilo dello zolfo della Cys126 al gruppo ammidico e della PEA e conseguente espulsione dell'etanolanmina come gruppo uscente, e 2) dei processi di trasferimento protonico correlati, è stato calcolato il profilo di energia libera associato alla reazione di acilazione, che, con una barriera energetica di circa 11 kcal/mol, è risultato essere il passaggio limitante dell'intera reazione. Come illustrato in Fig. 2, il meccanismo emerso indica che, in seguito al trasferimento del protone dal tiolo al gruppo ammino-terminale della Cys126 (II, Fig. 2), l'atomo di zolfo carico negativamente attacca il gruppo ammidico della PEA, dando luogo ad uno stato di transizione

(III, Fig. 2) da cui origina, infine, il prodotto della fase di acilazione che vede la formazione del legame tioestereo tra Cys126 e acido palmitico e l'espulsione dell'etanolanmina (IV, Fig. 2).

Un analogo approccio è stato applicato allo studio della fase di deacilazione nella reazione di idrolisi [4]. In conclusione, lo studio qui descritto ci ha consentito, grazie all'uso di metodi computazionali, di chiarire i processi chiave nella reazione di idrolisi della PEA catalizzata dall'enzima NAAA e di raccogliere elementi utili per la progettazione di futuri nuovi composti con attività antiinfiammatoria.

BIBLIOGRAFIA

- [1] D. Piomelli, L. Scalvini *et al.*, *J. Med. Chem.*, 2020, **63**, 7475.
- [2] N. Ueda, K. Yamanaka *et al.*, *FEBS Lett.*, 1999, **454**, 267.
- [3] A. Gorelik, A. Gebai *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2018, **115**, E10032.
- [4] L. Scalvini, A. Ghidini *et al.*, *ACS Catalysis*, 2021, **10**, 11797.

Molecular Modelling Studies on NAAA

The research activity, which has been awarded with the "Premio Divisione Chimica Farmaceutica 2022", is related to the application of computational approaches to investigation at atomistic level of the mechanism of hydrolysis of palmitoylethanolamide catalyzed by NAAA (N-acyl-ethanolamine acid amidase).