

SVILUPPO E VALIDAZIONE DI UNA PIPELINE INTEGRATA IN SILICO PER LA DETERMINAZIONE DI AFFINITÀ E ATTIVITÀ INTRINSECA DI XENOBIOTICI SUL RECETTORE ALFA DEGLI ESTROGENI

Palazzolo L.¹ Moretto A.² Cotterill .JV.³ Eberini I.¹

¹ *Disfeb, Università degli studi di milano - la statale, Milano, Italia*

² *Disbc – L. Sacco, Università degli studi di Milano - La Statale, Milano, Italia*

³ *Fera science Ltd, Sand Hutton, Uk*

La capacità di alcuni xenobiotici, caratterizzati da attività endocrina (Endocrine Active Substance, EAS), di legarsi al ligand binding domain (LBD) del recettore alfa degli estrogeni (ER α) è uno degli *endpoint* considerati nel progetto H2020 Euromix, finanziato dall'Unione Europea. In questo progetto, le previsioni *in silico* vengono utilizzate per classificare una vasta gamma di composti in gruppi di valutazione cumulativi (CAG). A questo scopo, è stata sviluppata una *pipeline* integrata di metodi *in silico*, che combini diversi modelli di (Q)SAR, con simulazioni di *docking* e di dinamica molecolare *low-mode*, in grado di raggiungere l'obiettivo attraverso un consenso di punteggi derivanti dai modelli.

Per mettere a punto e calibrare questa *pipeline* sono stati utilizzati 52 composti di *training*, derivanti da un dataset specifico per un approccio (Q)SAR su ER α , a cui sono stati associati valori sperimentali d'affinità (RBA) e attività relativa (RA) rispetto al 17 β -estradiolo, ormone naturale assunto quale composto di riferimento.

Poiché sono stati utilizzati differenti modelli di (Q)SAR specifici per ER α , è stato impostato un punteggio di consenso interno alla metodologia. Questa predizione, caratterizzata da un buon bilanciamento tra sensibilità e specificità, ha mostrato un'elevata accuratezza. Tra i 52 composti di *training*, caratterizzati da valori di RBA sperimentali attivi, soltanto 12 venivano classificati come negativi per ER α , attraverso il punteggio consenso del (Q)SAR. Tra questi, 10 risultavano caratterizzati da valori negativi di RA in saggi specifici, configurandosi come antagonisti. Questi risultati suggeriscono che i modelli di (Q)SAR utilizzati siano poco efficaci nel classificare ligandi di ER α , dotate di attività intrinseca nulla.

Il *docking* molecolare ha permesso di calcolare l'energia libera di legame (ΔG) di ciascun ligando rispetto ad ER α , basandosi sulla struttura tridimensionale della proteina e degli xenobiotici. La statistica di Cooper, calcolata scegliendo diversi valori di ΔG come *cut-off* per la classificazione, ha mostrato un valore massimo di accuratezza comparabile a quello del (Q)SAR. Il *docking* molecolare ha permesso anche di ottenere informazioni preziose sulla stabilità di legame dei complessi simulati, sulla base del valore di ΔG . Unendo i risultati di consenso del (Q)SAR con quelli *docking* molecolare, è stato possibile definire un punteggio di consenso globale tra i due approcci.

Al fine di validare un metodo di predizione dell'attività intrinseca, sono stati analizzati 10 composti predetti come buoni ligandi, di cui 5 con valori di RA positivo (probabili agonisti) e 5 con valori di RA negativo (probabili antagonisti). Utilizzando simulazioni di dinamica molecolare *low-mode* è stata studiata la capacità di esplorazione dello spazio conformazionale dell'elica 12, che resta in conformazione chiusa per gli agonisti, mentre invece si dispone in conformazione aperta per gli antagonisti. Questa metodologia è stata validata su due composti di riferimento per il recettore degli estrogeni: il 17 β -estradiolo (agonista naturale) ed il 4-idrossitamoxifene (antagonista).

I nostri risultati mostrano che il punteggio di consenso globale dei modelli (Q)SAR e del *docking* molecolare è un buon metodo per predire se un composto è in grado di legare ER α , anche se non fornisce informazioni sull'attività intrinseca. Questo primo *screening in silico* ha il vantaggio di essere semplice e rapido, essendo basato da un lato su modelli (Q)SAR già disponibili e dall'altro

sull'uso di (modelli di) struttura tridimensionale dei bersagli molecolari e dei composti. Con l'integrazione delle simulazioni di dinamica molecolare *low-mode*, si ha infine la possibilità di indagare approfonditamente, per un sottogruppo di composti, l'attività intrinseca al fine di aumentare il livello informativo di questa *pipeline in silico*, utile a classificare i composti all'interno dei CAG.