

FROM STRUCTURE TO FUNCTION TO DRUG DESIGN: USE OF STRUCTURAL RESEARCH IN BIOMEDICAL SCIENCES

SANDRA B. GABELLI, JASON S. MCLELLAN, ANDREA MONTALVETTI, ERIC OLDFIELD, ROBERTO DOCAMPO, SEAN T. PRIGGE, XAVIER SIEBERT, BETTY EIPPER, RICHARD MAINS, MYTHILI NADELLA, MARIO A. BIANCHET, JENNIFER BARRILA, AND L. MARIO AMZEL

X-ray diffraction research has been and continues to be a major contributor to the development of modern molecular biology. From the determination of the structures of major cellular and metabolic components to the detailed mechanism of enzymes, receptors, membrane components, ribozymes, and other molecules, it is not possible to imagine understanding modern biology without the results of x-ray diffraction studies. Three examples from our own work illustrate the kinds of insights provided by this type of study.

Case 1: Bisphosphonates have been shown to target the mevalonate pathway. In particular, they inhibit farnesyl diphosphate synthase (FPPS), the enzyme that catalyzes the condensation of isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP) to form geranyl diphosphate (GPP) and subsequently, farnesyl diphosphate (FPP). FPP and GPP are precursors for the biosynthesis of most of the isoprenoid compound family. Importantly, FPP is the branching point in the mevalonate pathway leading to farnesylated proteins and to the biosynthesis of dolichols and sterols, such as cholesterol and ergosterol.

In bisphosphonates the bridging oxygen atom of the diphosphate moiety is replaced by a carbon atom carrying various substituents. These compounds are potent inhibitors of bone resorption in clinical use for the treatment and prevention of osteoporosis, hypercalcemia and other related diseases. During many years of use, bisphosphonates have demonstrated low toxicity. Recently bisphosphonates have been shown to be active against *T. cruzi*, both *in vitro* and *in vivo*, suggesting their potential as a new family of anti-Chagasic compounds. *TcFPPS*, the farnesyl diphosphate synthase of *T. cruzi*, has been shown to be the most likely target of the nitrogen-containing bisphosphonates. We present the 3-dimensional structure of *TcFPPS*, alone and in two complexes—one with risedronate, DMAPP and Mg^{2+} , the other with alendronate, IPP, and Mg^{2+} —determined by single crystal x-ray diffraction. These structures provide impor-

tant clues to the development of new, more effective anti-Chagasic bisphosphonates.

Case 2: During neural development axons are guided to their targets by a variety of environmental cues. These guidance cues may take the form of long-range signaling by diffusible molecules or short-range interactions by membrane-bound molecules that either attract or repel the axon. One family of effector molecules, the semaphorins, includes secreted and transmembrane proteins that act as repellents in a variety of axon development processes. Repulsive guidance by semaphorins is mediated through their interaction with plexins, a family of transmembrane proteins that function as their receptors. It was shown recently that in *Drosophila*, a large multi-domain cytosolic protein, MICAL, is required for the repulsive axon guidance mediated by interaction of Semaphorin 1a and Plexin A. Here we present the structure of the N-terminal region of MICAL (MICAL_{td}) determined by x-ray diffraction to 2.0 Å resolution. The structure shows that MICAL_{td} is an FAD containing module structurally similar to aromatic hydroxylases and amine oxidases. In addition, we present biochemical data showing that MICAL_{td} is a flavoenzyme that in the presence of NADPH, reduces molecular oxygen to H_2O_2 , a molecule with known signaling properties. We propose that the H_2O_2 produced by this reaction is one of the signaling molecules involved in axon guidance by MICAL.

Case 3: Many peptidic signaling molecules such as peptide hormones and neuropeptides are amidated at their carboxy termini. The enzyme peptidyl γ -amidating monooxygenase (PAM) catalyzes the oxygen-dependent, ascorbate-dependent oxidation of the terminal residue of the glycine-extended peptides to give the amidated peptide and glyoxylate. In the first step of this reaction, peptidyl γ -hydroxylating monooxygenase (PHM), a two-Cu, ascorbate dependent enzyme catalyzes the hydroxylation of the C γ of the glycine. We have determined the structure PHM alone and in several complexes in-

cluding the ternary complex of reduced PHM with molecular oxygen and a D-amino acid-containing peptide designed to trap the precatalytic complex. This last structure shows the positions of enzyme and substrate atoms immediately preceding catalysis and provides insight into the PHM mechanism. Strikingly, the copper-bound oxy-

gen molecule displays an end-on geometry never observed before in protein or small molecule crystal structures. This structure and those of several PHM mutants place strong constraints on the possible mechanisms of electron transfer and hydrogen abstraction during the PHM catalytic cycle.

CONFERENCIA LANARI

DE MIS 30 AÑOS EN EL LANARI: DE LA NEUROBIOLOGÍA A LA GENÉTICA DEL SINDROME METABÓLICO

CARLOS J. PIROLA

*Cardiología Molecular, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari,
Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.*

Hace aproximadamente 30 años luego de haber sido invitado a renunciar como docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por las autoridades bajo la dictadura militar, ingresaba invitado por Marcelo Crisculo a la Sección de Sustancias Vasoactivas, creada por el Dr Nahmod, del Instituto de Investigaciones Médicas que por aquel entonces no se llamaba A Lanari porque todavía se lo podía encontrar al Dr Lanari en su laboratorio. Hacía poco que los Dres Nahmod y Finkelman habían descrito la existencia del sistema renina angiotensina en tejidos extrarrenales, lo que condujo en los últimos años a una explosión en el conocimiento de la participación de la angiotensina en procesos fisiopatológicos tan diversos como la memoria, la inmunomodulación y por supuesto, la función cardiovascular y renal ya sea a nivel periférico y central. Tal vez por eso siempre guardé cierto prurito para trabajar en esa línea. Sin embargo rápidamente me integré al estudio de la modulación que ejercían los neuropeptidos sobre los sistemas de neurotransmisión clásicos y describimos como la angiotensina regula positivamente la síntesis y liberación de serotonina¹ y la bradicinina a su vez modifica la neurotransmisión muscarínica colinérgica². Demostramos también que la thyroliberina (TRH) o piroglu-his-Pro-NH₂ modula la transmisión colinérgica³ que a la sazón parecía ser importante en el desarrollo de la hipertensión genética de la rata⁴. Como parte de una hipótesis interesante postulamos que la TRH podría ser formada a partir de la degradación de la angiotensina I, propuesta que resultó ser, por supuesto, totalmente descabellada por que luego se conoció en detalle que se forma a partir del procesado de un precursor que contiene múltiples copias y que es el producto de un solo gen en especies diversas que van desde los anfibios a los humanos. Sin embargo esta molécula despertó un interés creciente en

el grupo marcando los próximos años de producción del laboratorio.

La TRH localizada en núcleos cerebrales que controlan la presión arterial (PA) produce un efecto presor cuando se la infunde icv³. Así, sugerimos que la TRH podría participar en la elevación de la PA de la rata espontáneamente hipertensa (SHR), demostrando que las SHR poseen un sistema hiperactivado tanto pre como postsinápticamente⁵. Coherentemente, sólo en las SHR, la infusión icv de un oligonucleótido fosforotioato antisentido (AS) contra el sitio de iniciación de la traducción del preTRH indujo una caída de la PA de más de 72 hs de duración⁶. Estos resultados indicaban que la hipertensión genética de la rata parecía depender de la expresión de TRH. Como este modelo está caracterizado por múltiples anomalías bioquímicas, exploramos si la sobreexpresión de TRH era capaz de inducir hipertensión arterial en el animal normal. La inyección icv con un plásmido de expresión eucariota que contenía el cDNA del preTRH bajo el promotor del CMV y la señal de poliadenilación de la bGH elevó el contenido del mRNA, la TRH y la PA a las 24 y 48 hs en forma dosis dependiente, efectos revertidos por el AS⁷. Estos resultados mostraron que la sola elevación de TRH es suficiente para inducir hipertensión arterial en el animal normal y nos condujeron a analizar el papel de componentes del sistema en la hipertensión humana. Describimos que un SNP (G-221C) localizado en el promotor del gen del receptor de la TRH está asociado a hipertensión arterial en adultos y adolescentes (OR: 1.80 por dosis de alelo C) independientemente del sexo, edad y el índice de masa corporal⁸.

Como la TRH participa del gasto energético, recientemente, postulamos que la TRH podría mediar el efecto presor de la leptina, demostrando que el AS contra TRH bloquea el efecto presor de leptina icv en la rata⁹. Por lo

tanto, hipotetizamos que en modelos con ganancia de peso, la elevación de leptina aumenta la descarga simpática a través de la inducción de TRH diencefálica. Así, mostramos que el AS (48 hs) y la interferencia con RNA (4 semanas) contra TRH normalizan la PA en un modelo de obesidad en ratas alimentadas con dieta rica en grasa¹⁰. Actualmente nos encontramos abocados a analizar el papel de TRH en la regulación de la PA en modelos de obesidad como los ratones Agouti y *ob/ob* y en ratones transgénicos que sobreexpresan el precursor de TRH y que presentan una elevación de la presión arterial.

En este proceso, hemos aprendido que la asociación hipertensión-obesidad es simplemente un componente más del llamado síndrome metabólico o de insulino resistencia caracterizado formalmente por aumento del perímetro de la cadera, elevación de la presión arterial, aumento de colesterol, triglicéridos y/o disminución de HDL colesterol, diabetes o intolerancia a la glucosa, hiperuricemia, ovario poliquístico en la mujer y esteatosis hepática. Con este tema como interés hemos estudiado diversas poblaciones. Una en particular, 934 adolescentes de la ciudad de Chacabuco ha mostrado ser particularmente representativa del fenómeno que aqueja al mundo. El 13% de esos chicos de edad promedio de 15 años poseían, ya por el año 2000 sobrepeso y el 5% eran hipertensos¹¹. Estos rasgos presentan relación con parámetros bioquímicos como la homocisteinemia¹² y la leptina. En esta población hemos observado que la hipertensión arterial está asociada a polimorfismos de los genes que codifican para los componentes del sistema renina angiotensina aldosterona¹³, y como ya fue mencionado al gen del receptor de la TRH⁸. Más recientemente hemos demostrado que también el gen del coactivador del receptor activado por el proliferador de peroxisoma α (PGC-1 α) esta asociado a hipertensión arterial¹⁴, así como el factor de necrosis tumoral α (TNF α)¹⁵, hallazgo que fue confirmado en un meta-análisis posterior de 31 estudios (Obesity Research, en prensa). Interesantemente, variables relacionadas a la ganancia de peso como el índice de masa corporal, la relación cintura cadera, etc también se asociaron a otras variantes de genes como el PPAR γ ¹⁴ y el receptor β_3 -adrenérgico¹¹. Queda claro de estos hallazgos, que variantes ciertamente frecuentes de estos genes confieren un riesgo relativo moderado de entre 1.2 a 4. Probablemente entonces se requiera de una combinación particular (ciertos haplotipos, combinaciones de polimorfismos que en general son de nucleótido único o SNPs) para que el individuo posea cierta susceptibilidad genética que frente un medio ambiente particular conlleve a este tipo de enfermedades que por esta razón se llaman complejas.

Creemos firmemente que otros componentes genéticos influyen en rasgos de personalidad, hábitos personales y dietarios y en la adaptación a situaciones

estresantes que influyen en el desarrollo de este síndrome. Aunque presenta desafíos éticos y logísticos importantes nuestra intención es lograr la obtención de una base de datos asociada a una seroteca y genoteca que permita encarar estudios de asociación entre rasgos genéticos y fenotípicos en esta enfermedad compleja. En ese camino estamos logrando algunos avances

Referencias

1. Nahmod VE, Finkielman S, Benarroch EE, and Pirola CJ. Angiotensin regulates release and synthesis of serotonin in brain. *Science* 1978; 202: 1091-3.
2. Pirola CJ, Balda MS, Alvarez AL, Finkielman S, and Nahmod VE. Interaction between acetylcholine and bradykinin in the lateral septal area of the rat brain: involvement of muscarinic receptors in cardiovascular responses. *Neuropharmacology* 1986; 25: 1387-93.
3. Pirola CJ, Balda MS, Finkielman S, and Nahmod VE. Thyrotropin-releasing hormone increases the number of muscarinic receptors in the lateral septal area of the rat brain. *Brain Res* 1983; 273: 387-91.
4. Scheucher A, Pirola CJ, Balda MS, Dabsys SM, Alvarez AL, Finkielman S, and Nahmod VE. Muscarinic M1 receptors in the lateral septal area mediate cardiovascular responses to cholinergic agonists and bradykinin: supersensitivity induced by chronic treatment with atropine. *Neuropharmacology* 1987; 26: 181-5.
5. Garcia SI, Dabsys SM, Martinez VN, Delorenzi A, Santajuliana D, Nahmod VE, Finkielman S, and Pirola CJ. Thyrotropin-releasing hormone hyperactivity in the preoptic area of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1995; 26: 1105-10.
6. Garcia SI, Alvarez AL, Porto PI, Garfunkel VM, Finkielman S, and Pirola CJ. Antisense inhibition of thyrotropin-releasing hormone reduces arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 2001; 37: 365-70.
7. Garcia SI, Porto PI, Alvarez AL, Martinez VN, Shaurli D, Finkielman S, and Pirola CJ. Central overexpression of the TRH precursor gene induces hypertension in rats: antisense reversal. *Hypertension* 1997; 30: 759-66.
8. Garcia SI, Porto PI, Dieuzeide G, Landa MS, Kirsznert T, Plotquin Y, Gonzalez C, and Pirola CJ. Thyrotropin-releasing hormone receptor (TRHR) gene is associated with essential hypertension. *Hypertension* 2001; 38: 683-7.
9. Garcia SI, Landa MS, Porto PI, Alvarez AL, Schuman M, Finkielman S, and Pirola CJ. Thyrotropin-releasing hormone decreases leptin and mediates the leptin-induced pressor effect. *Hypertension* 2002; 39: 491-5.
10. Garcia SI and Pirola CJ. Thyrotropin-releasing hormone in cardiovascular pathophysiology. *Regul Pept* 2005; 128: 239-46.
11. Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Gonzalez C, Landa MS, and Pirola CJ. Clinical features of the metabolic syndrome in adolescents: minor role of the Trp64Arg beta3-adrenergic receptor gene variant. *Pediatr Res* 2004; 55: 836-41.
12. Garfunkel VA, Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Kirsznert T, Plotquin Y, Spataro RJ, Gonzalez C, and Pirola CJ. Hyperhomocysteinemia but not MTHFR genotype is associated with young-onset essential hypertension. *J Hum Hypertens* 2003; 17: 361-4.

13. Porto PI, Garcia SI, Dieuzeide G, Gonzalez C, and Pirola CJ. Renin-angiotensin-aldosterone system loci and multilocus interactions in young-onset essential hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2003; 25: 117-30.
14. Sookoian S, Garcia SI, Porto PI, Dieuzeide G, Gonzalez CD, and Pirola CJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and its coactivator-1 alpha may be associated with features of the metabolic syndrome in adolescents. *J Mol Endocrinol* 2005; 35: 373-80.
15. Sookoian S, Garcia SI, Gianotti TF, Dieuzeide G, Gonzalez CD, and Pirola CJ. The G-308A Promoter Variant of the Tumor Necrosis Factor-alpha Gene Is Associated With Hypertension in Adolescents Harboring the Metabolic Syndrome. *Am J Hypertens* 2005; 18: 1271-5.