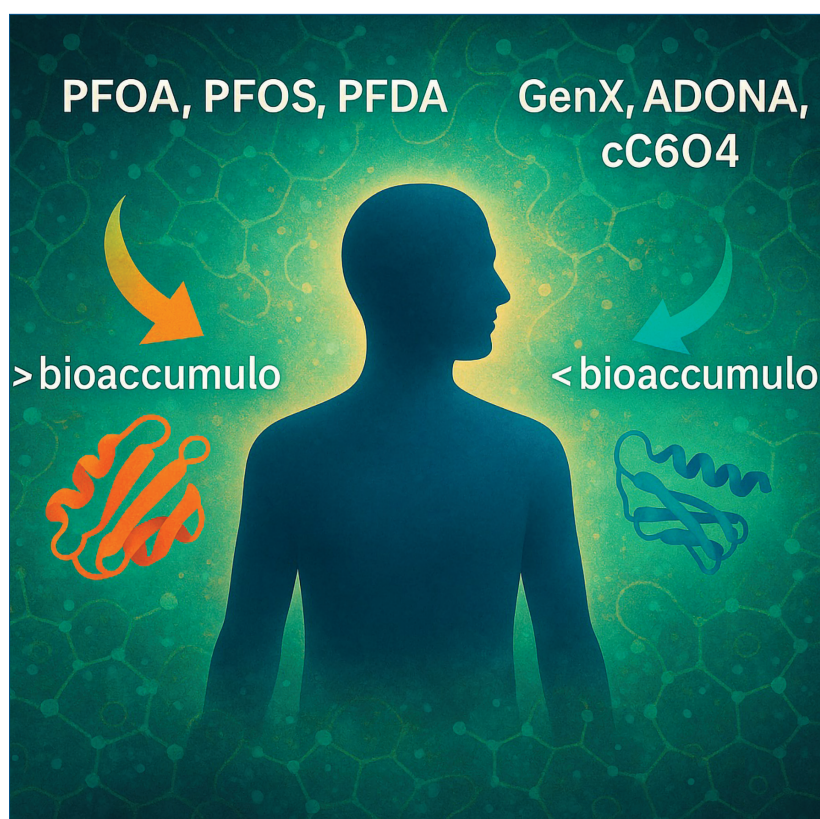




## PFAS E PROTEINE TRASPORTATRICI: UNO STUDIO PREDITTIVO

*Le sostanze per- e polifluoroalchiliche (PFAS) sono composti ampiamente usati nell'industria. Tramite simulazioni in silico abbiamo valutato l'interazione tra PFAS di vecchia e nuova generazione con proteine umane di trasporto (HSA, TTR, TBG, FABP, OAT). PFOA e PFOS mostrano legami più forti, suggerendo un maggiore bioaccumulo rispetto a composti recenti come GenX o cC6O4.*



I composti per- e polifluoroalchilici (PFAS), anche noti come *forever chemicals*, rappresentano una vasta e complessa classe di sostanze chimiche sintetiche, caratterizzate da una straordinaria stabilità termica e chimica [1, 2]. Utilizzate per decenni in applicazioni industriali e di consumo, queste

molecole si trovano oggi diffuse in ogni comparto ambientale, dal suolo all'acqua potabile, e sono state rilevate anche nel sangue umano [3-5]. La loro struttura unica, costituita da una catena carboniosa completamente fluorurata, le rende estremamente resistenti e in grado di accumularsi nell'ambiente e anche nel corpo umano per molti anni, sfruttando l'interazione con proteine specifiche [6-8].

La predizione dell'interazione fra una proteina e una piccola molecola può essere agilmente effettuata utilizzando metodi computazionali basati sulla meccanica molecolare, come il docking molecolare e la dinamica molecolare. In questo studio [9] abbiamo applicato i suddetti metodi per simulare l'interazione di una serie di 26 PFAS, riportati in Tab. 1, con specifici trasportatori umani. I PFAS sono stati selezionati in modo da rappresentare le molecole più note di vecchia generazione, come PFOA (acido perfluoroottanoico) e PFOS (acido perfluoroottansolfonico) ma anche formulazioni più recenti, meno idrofobiche e più ramificate (Fig. 1), come GenX o cC6O4 [10], specificatamente progettate allo scopo di ridurre il bioaccumulo. In particolare, abbiamo conside-



Acronimo	Nome comune	CAS	Categoria chimica
PFBA	Acido perfluorobutirrico	375-22-4	Acido carbossilico
PFPeA	Acido perfluoropentanoico	2706-90-3	Acido carbossilico
PFHxA	Acido perfluoroesanoico	307-24-4	Acido carbossilico
PFHpA	Acido perfluoroetanoico	375-85-9	Acido carbossilico
PFOA	Acido perfluorottanoico	335-67-1	Acido carbossilico
PFNA	Acido perfluorononanoico	375-95-1	Acido carbossilico
PFDA	Acido perfluorodecanoico	335-76-2	Acido carbossilico
PFUnA	Acido perfluoroundecanoico	2058-94-8	Acido carbossilico
PFDoDA	Acido perfluorododecanoico	307-55-1	Acido carbossilico
PFTrDA	Acido perfluorotridecanoico	72629-94-8	Acido carbossilico
PFTeDA	Acido perfluorotetradecanoico	376-06-7	Acido carbossilico
PFHxDA	Acido perfluoroesadecanoico	67905-19-5	Acido carbossilico
PFODA	Acido perfluorottadecanoico	16517-11-6	Acido carbossilico
PFBS	Acido perfluorobutansolfonico	375-73-5	Acido solfonico
PFPeS	Acido perfluoropentansolfonico	2706-91-4	Acido solfonico
PFHxS	Acido perfluoroesansolfonico	355-46-4	Acido solfonico
PFHpS	Acido perfluoroepansolfonico	375-92-8	Acido solfonico
PFDS	Acido perfluorodecansolfonico	335-77-3	Acido solfonico
PFOS	Acido perfluorottansolfonico	1763-23-1	Acido solfonico
6:2 FTOH	1,1,2,2-Tetraidroperfluoro-1-ottanolo	647-42-7	Fluorotelomero alcolico
8:2 FTOH	1,1,2,2-Tetraidroperfluoro-1-decanolo	678-39-7	Fluorotelomero alcolico
PFOO	Perfluorottano	307-34-6	Alcano perfluorurato
PFTeCO	Perfluorotetracosano	1766-41-2	Alcano perfluorurato
ADONA	ADONA	919005-14-4	Perfluoroetere carbossilato
GenX	GenX	13252-13-6	Perfluoroetere carbossilato
cC6O4	cC6O4	1190931-41-9	Perfluoroetere carbossilato

Tab. 1 - PFAS analizzati

rato l'albumina sierica umana (HSA), la principale proteina plasmatica deputata al trasporto di acidi grassi e molecole idrofobiche dotate di un gruppo carico negativamente nel sangue [11, 12]. La seconda proteina considerata è la transtiretina (TTR), coinvolta nel trasporto dell'ormone tiroideo T4. TBG (thyroxine binding globulin) è un'altra proteina fondamentale nel trasporto degli ormoni tiroidei, con un'affinità molto elevata per T4 e T3 [13]. Sono state inoltre incluse le FABPs (fatty acid binding

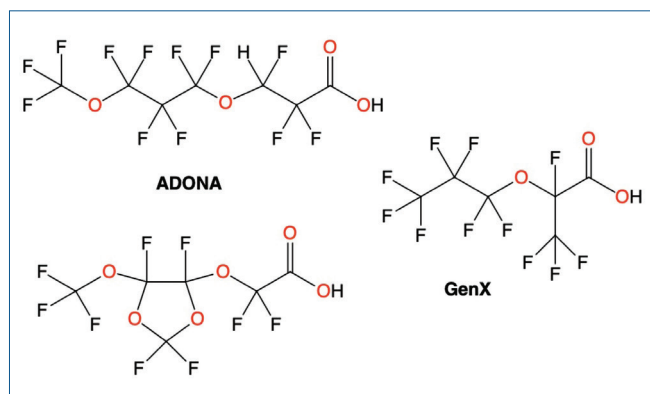


Fig. 1 - Struttura chimica di ADONA, GenX e cC6O4

proteins), una famiglia di proteine presenti in diversi tessuti, responsabili del trasporto intracellulare di acidi grassi. In particolare, abbiamo considerato L-FABP (fegato), I-FABP (intestino), H-FABP (cuore e muscoli), A-FABP (adipociti), PmP2 (proteina della mielina periferica). Infine, sono stati inclusi nello studio i trasportatori anionici organici (OATs), localizzati principalmente a livello renale. Questi ultimi sono responsabili del passaggio di soluti anionici attraverso le membrane cellulari e rivestono un ruolo chiave nell'escrezione dei PFAS [14, 15].

Per predire l'interazione dei PFAS selezionati con le proteine indicate sono state effettuate simulazioni di docking molecolare, utilizzando il software Glide (suite Schrödinger 2022-04), che consente di stimare sia la posizione migliore del ligando nel sito della proteina che l'energia associata all'interazione. In particolare, è stata utilizzata la tecnica del docking Induced Fit, che permette di adattare sia la conformazione della proteina che quella del ligando durante la formazione del complesso, ottenendo simulazioni più realistiche, soprattutto per molecole molto diverse tra loro. Una volta predette le modalità di legame, i complessi proteina-PFAS più interessanti sono stati ulteriormente analizzati tramite dinamica molecolare, utilizzando il software GROMACS [16]. Alcuni sistemi, come il complesso HSA-PFOA, sono stati simulati fino a 500 nanosecondi, un tempo che consente di osservare cambiamenti strutturali anche lenti e di verificare la reale stabilità dell'interazione. Grazie a queste simulazioni è stato possibile distinguere tra PFAS che si legano in modo stabile alle proteine analizzate e PFAS che, invece, tendono a staccarsi facilmente, suggerendo un comportamento diverso in termini di bioaccumulo nell'organismo umano.

Nel complesso, lo studio ha dimostrato che la propensione all'interazione dei PFAS con i trasportatori umani, e conseguentemente al bioaccumulo, è strettamente legata alle loro caratteristiche strutturali. Le molecole più lineari e idrofobiche si associano più stabilmente con le proteine plasmatiche e i trasportatori, mentre quelle più corte, ramificate e idrofile, come cC6O4, tendono a mostrare affinità minori, interazioni più fugaci e un profilo cinetico più favorevole all'escrezione. Questo si traduce, in ultima analisi, in un potenziale tossicologico inferiore.

## PFAS:HSA

Nel caso dell'albumina sierica umana, i risultati ottenuti tramite docking molecolare indicano che PFOA si lega preferenzialmente al sito FA4 (fatty acid 4) con un'energia di legame calcolata intorno a -13,4 kcal/mol, un valore significativamente più favorevole rispetto a quelli ottenuti per PFAS a catena più corta o per i nuovi PFAS, come GenX e cC6O4. Tali risultati sono stati confermati da simulazioni di dinamica molecolare della durata di 500 ns. Le simulazioni hanno mostrato che, complessivamente, la struttura della proteina rimane stabile in entrambi i casi. Analizzando nel dettaglio i singoli siti di legame, è emerso che sia PFOA sia cC6O4 mantengono una buona stabilità nel sito FA4, con interazioni forti e persistenti. Tuttavia, in altri siti come FA7 e soprattutto FA6, le differenze diventano più evidenti: mentre PFOA rimane ben ancorato, cC6O4 tende a perdere contatto con i residui chiave della proteina e a spostarsi lungo la sua superficie, indicando una minore stabilità del legame. Un comportamento simile è stato osservato nella tasca detta "cleft", molto esposta al solvente, dove entrambi i composti risultano instabili, suggerendo che questa zona venga occupata solo ad alte concentrazioni. Questi risultati suggeriscono che il PFOA si lega in modo più saldo e duraturo all'albumina rispetto al cC6O4, e che la differenza non dipende tanto dalla forza dei legami chimici, quanto piuttosto dalla maggiore libertà di movimento consentita dalla struttura più corta e ramificata di cC6O4. Per confermare queste osservazioni, sono stati eseguiti esperimenti di legame su albumina bovina: il PFOA ha mostrato una percentuale di legame dell'82%, contro il 62% del cC6O4, rafforzando l'idea che i nuovi PFAS abbiano una minore tendenza ad accumularsi attraverso il legame all'albumina rispetto a quelli tradizionali.

## Interazione PFAS:TTR

La transtiretina presenta due siti di legame simmetrici, dove il T4 viene stabilizzato da interazioni idrofobiche e da legami ionici con due residui chiave (Lys15 e Lys15'). Lo stesso sito d'interazione è noto essere occupato da PFOA in modo simile (PDB ID 5JID [17]). Dal docking, il PFOA ha mostrato un buon adattamento e un'energia di legame di circa -7 kcal/mol, una delle più basse

tra i composti studiati. Anche altri PFAS a catena media (6-10 atomi di carbonio) hanno mostrato una discreta affinità, mentre molecole più piccole o più grandi (come PFBA o cC6O4) hanno registrato energie di legame meno favorevoli. Anche in questo caso, sono state effettuate simulazioni di dinamica molecolare sui complessi più interessanti (PFOA-TTR e cC6O4-TTR). Durante queste simulazioni, la struttura generale della proteina è rimasta stabile. Tuttavia, mentre il PFOA è riuscito a mantenere la sua posizione e le interazioni chiave, cC6O4 ha mostrato maggiori fluttuazioni, uscendo in alcuni casi dal sito di legame. Questa instabilità sembra dipendere dalla struttura più corta e ciclica di cC6O4, in grado di formare meno contatti idrofobici rispetto a PFOA. Infine, per confrontare ulteriormente i due composti, sono state effettuate simulazioni di "unbinding", in grado di stimare quanto tempo ciascun PFAS è in grado di rimanere nel sito di legame [18]. Mentre PFOA ha mostrato un tempo medio di residenza di circa 10,8 nanosecondi, cC6O4 tende a lasciare il sito di legame in circa 8,5 nanosecondi. Questo conferma come PFOA abbia un'affinità maggiore per TTR rispetto a cC6O4.

## PFAS:TBG

La proteina thyroxine-binding globulin possiede un unico ampio sito di legame, caratterizzato dalla presenza di due residui di arginina (Arg378 e Arg381), essenziali per l'interazione con i substrati naturali. Nonostante non ci siano dati cristallografici riportanti l'interazione fra PFAS e TBG, esperimenti precedenti avevano mostrato che mutazioni di questi residui riducono fortemente l'affinità di legame [19]. Per questo motivo, il docking è stato impostato cercando interazioni tra i gruppi polari dei PFAS e almeno una delle due arginine. I risultati di docking hanno mostrato che i PFAS, in generale, si legano con affinità piuttosto modeste. Molecole di media lunghezza come ADONA e PFUnA hanno ottenuto i migliori punteggi, mentre composti più recenti come GenX e cC6O4 hanno mostrato affinità più basse e meno pose di legame. Le simulazioni di dinamica molecolare hanno confermato che sia PFOA che cC6O4 interagiscono principalmente con Arg381 e stabiliscono legami aggiuntivi con residui vicini. Tuttavia, il cC6O4 ha mostrato





una maggiore variabilità nella posizione, a causa della sua struttura più compatta, che non è in grado di riempire completamente il sito di legame.

### PFAS:FABPs

Le simulazioni hanno evidenziato come i PFAS siano generalmente buoni ligandi per le proteine che legano gli acidi grassi (FABPs), grazie alla loro somiglianza strutturale. Nei siti di legame delle FABPs, infatti, i PFAS instaurano sia interazioni idrofobiche con i residui lipofili, sia interazioni elettrostatiche con residui di arginina conservati. Un fattore importante che influenza il legame è la dimensione della tasca delle diverse FABPs. Ad esempio, tra le proteine analizzate (L-FABP, I-FABP, H-FABP, A-FABP, PmP2), L-FABP ha la tasca più grande e può ospitare facilmente PFAS a lunga catena, come confermato dalle simulazioni: in particolare, il PFDoDA ha mostrato il valore di legame più favorevole (-13,0 kcal/mol) in L-FABP. Risultati simili sono stati osservati anche per I-FABP, dove nuovamente PFDoDA ha ottenuto il miglior punteggio (-13,6 kcal/mol), mentre molecole più corte come PFOA si sono adattate bene grazie alla tasca più piccola. Anche i PFAS nuovi come ADONA e GenX hanno mostrato buone affinità, sebbene con valori leggermente meno favorevoli rispetto ai PFAS più lineari. cC6O4 ha invece mostrato affinità inferiori e meno pose di legame. Non sono stati trovati invece legami significativi per i PFAS completamente perfluorurati senza gruppi funzionali (PFOO e PFTeCO), probabilmente per la loro incapacità di interagire efficacemente con i residui polari del sito. Simulazioni di dinamica molecolare hanno evidenziato nuovamente come il legame con cC6O4 risulta più instabile rispetto a quello con PFOA.

### PFAS:OATs

Dato che l'escrezione urinaria rappresenta la principale via di eliminazione dei PFAS [5, 7, 20], ci siamo infine concentrati sull'interazione di questi composti con i trasportatori renali, in particolare gli OAT, che utilizzano l'acido urico come principale substrato fisiologico. OAT1 e OAT3 mediano l'escrezione dal sangue all'urina, mentre OAT4 e URAT1 facilitano il riassorbimento dall'urina al circolo sanguigno. Questi *antiporter* funzionano attraverso diversi stati conformazionali - "outward-fa-

cing" (aperti verso l'esterno) e "inward-facing" (aperti verso il citoplasma) - che possono facilitare l'escrezione o il riassorbimento a seconda del tipo e della localizzazione del trasportatore. OAT1, nella conformazione outward-facing, mostra forte affinità per gli acidi carbossilici come PFDA (-13,2 kcal/mol), mentre i PFAS di nuova generazione, come ADONA e cC6O4, presentano affinità più basse. Nello stato inward-facing, i PFAS mostrano affinità generalmente più basse e uniformi (-4,2 kcal/mol per cC6O4 RS). OAT3 è meno compatibile con PFAS di grandi dimensioni nello stato outward-facing, ma mostra buone affinità per composti più piccoli come PFPeA (-10,2 kcal/mol). La conformazione inward-facing, invece, mostra affinità più elevate per vari PFAS nuovi, in particolare ADONA R (-10,7 kcal/mol), GenX R e cC6O4. OAT4 segue un andamento simile, con affinità inferiori nello stato outward-facing (-11,3 kcal/mol per PFOA; -7,6 kcal/mol per cC6O4 RS) e migliori nello stato inward-facing (-12,0 kcal/mol per PFOA; -10,2 kcal/mol per GenX S). URAT1, nella conformazione outward-facing, mostra pochi risultati rilevanti (-10,9 kcal/mol per PFDA) e affinità generalmente scarse per i PFAS di nuova generazione. Nello stato inward-facing, si osservano affinità inferiori per i PFAS più recenti. Questi risultati sono coerenti con

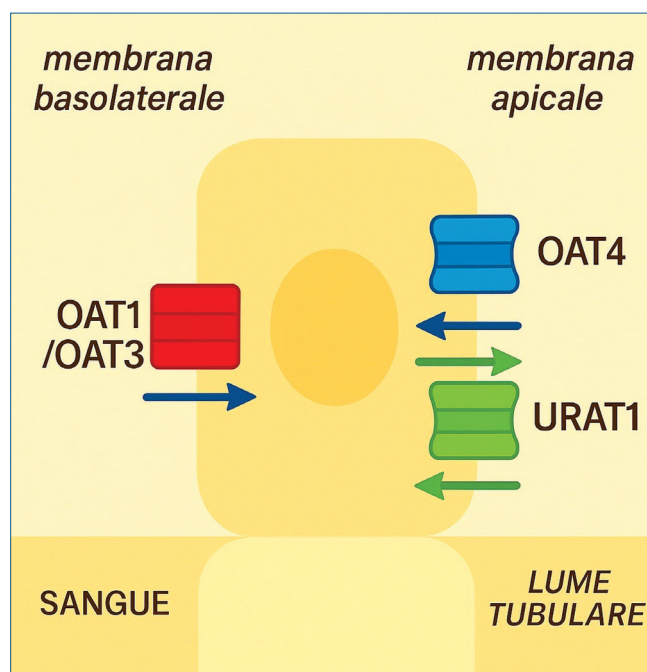


Fig. 2 - Localizzazione cellulare dei trasportatori anionici

quanto riportato da Bruno *et al.* [10], secondo cui si ha una scarsa interazione tra cC6O4 e gli OAT, il che potrebbe spiegare la sua escrezione più rapida rispetto ai composti di vecchia generazione come PFOA e PFOS, noti per il forte legame con questi trasportatori e la loro lunga permanenza nell'organismo. La bassa affinità dei PFAS di nuova generazione, più voluminosi e a catena corta, suggerisce una minore probabilità di riassorbimento (Fig. 2).

Nel complesso, i risultati ottenuti tramite questo approccio integrato convergono nel delineare un quadro differenziato tra PFAS di vecchia e nuova generazione: i primi sono caratterizzati da elevata affinità per le proteine plasmatiche e i trasportatori renali, lunga permanenza nel corpo e rischio di bioaccumulo sistemico; i secondi, invece, presentano affinità inferiori e profili cinetici più compatibili con l'eliminazione. Dal punto di vista tossicologico, ciò implica che nuove molecole possano avere un minore potenziale di bioaccumulo e, quindi, un profilo di rischio apparentemente più favorevole. Tuttavia, ciò non esclude effetti tossici di altra natura, come interazioni con bersagli non convenzionali, metaboliti reattivi o effetti sistemici di tipo endocrino o immunologico. Pertanto, sebbene la minore affinità per i vettori biologici tradizionali sia un indicatore positivo, non può essere considerato un parametro esaustivo.

Emerge chiaramente la necessità di rafforzare gli studi predittivi e sperimentali sui PFAS alternativi, valutandoli non solo in termini di persistenza, ma anche in base al loro comportamento nei sistemi biologici complessi. Un'approfondita comprensione delle interazioni molecolari, combinata con modelli farmacocinetici in grado di prevedere l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione dei PFAS nella popolazione, rappresenta uno strumento fondamentale per la progettazione di molecole fluorurate più sicure.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] C.D. Vecitis, H. Park *et al.*, *Front. Environ. Sci. Eng. China*, 2009, **3**, 129.
- [2] S.C.E. Leung, D. Wanninayake *et al.*, *Sci. Total Environ.*, 2023, **905**, 166764.
- [3] A. Meneguzzi, C. Fava *et al.*, *Front. Endocrinol.*, 2021, **12**.
- [4] K. Gao, T. Zhuang *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**, 6529.
- [5] B. Göckener, T. Weber *et al.*, *Environ. Int.*, 2020, **145**, 106123.
- [6] N. Sheng, R. Cui *et al.* *Arch. Toxicol.*, 2018, **92**, 359.
- [7] S.E. Fenton, A. Ducatman *et al.*, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2021, **40**, 606.
- [8] Y. Xu, T. Fletcher *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 2020, **128**, 077004.
- [9] G.A. Tiburtini, L. Bertarini *et al.*, *Arch. Toxicol.*, 2024, **98**, 3035.
- [10] S. Bruno, M. Bersani *et al.*, *Toxicology*, 2022, **476**, 153257.
- [11] A.M. Crisalli, A. Cai, B.P. Cho, *Chem. Res. Toxicol.*, 2023, **36**, 703.
- [12] M. Forsthuber, A.M. Kaiser *et al.*, *Environ. Int.*, 2020, **137**, 105324.
- [13] S. Refetoff, Thyroid hormone serum transport proteins, in Endotext [Internet], K.R. Feingold, B. Anawalt *et al.* (Eds.), South Dartmouth (MA), MDText.com, Inc., 2000-, PMID: 25905421.
- [14] L. Zhao, M. Teng *et al.*, *Environ. Int.*, 2023, **175**, 107951.
- [15] A. Janaszkiwicz, Á. Tóth *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 2023, **160**, 114342.
- [16] M.J. Abraham, T. Murtola *et al.*, *SoftwareX*, 2015, **1-2**, 19.
- [17] J. Zhang, A. Begum *et al.*, *Environ. Sci. Technol.*, 2016, **50**, 11984.
- [18] S. Decherchi, G. Bottegoni *et al.*, *J. Chem. Inf. Model.*, 2018, **58**, 219.
- [19] X.-M. Ren, W.-P. Qin *et al.*, *Toxicology*, 2016, **366-367**, 32.
- [20] C.A. Ng, K. Hungerbuehler, *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49**, 12306.

### PFAS and Carrier Proteins: a Predictive Study

Per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are widespread industrial chemicals. We performed *in silico* simulations to assess how legacy and novel PFAS interact with human transport proteins (HSA, TTR, TBG, FABPs, OATs). Legacy PFAS like PFOA and PFOS showed stronger binding, suggesting greater potential for bioaccumulation than newer PFAS as GenX or cC6O4.