

Approcci Structure Based per la razionalizzazione delle interazioni proteina inibitore applicate all'enzima TACE



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Facoltà di Farmacia e Medicina
Corso di Laurea in Farmacia
Tesi Sperimentale in Chimica Farmaceutica
a.a. 2013/2014

Laureanda : Juliana Bundo
Matricola:

Relatore: prof. Rino Ragno



TACE O ADAM17

- TACE è un enzima di membrana di 70kD che fa parte della famiglia delle ADAMs (“A Disintegrin And a Metalloprotease”).

1. INTRODUZIONE

- Struttura dell'enzima
- Inibitori

- TACE è enzima di conversione del TNF α

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Secondo la classificazione EC, il TACE viene classificata:

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3.4.24.86

3. RISULTATI

Idrolase

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

Protease

TACE o ADAM17
Metalloendopeptidase

4. CONCLUSIONI



TNF- α

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α**
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

• **Fattore di necrosi tumorale α**

• **Citochina pleotropica pro-infiammatoria**

• **Sintetizzato come una proteina precursore di trans membrana di tipo II**





TNF- α

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

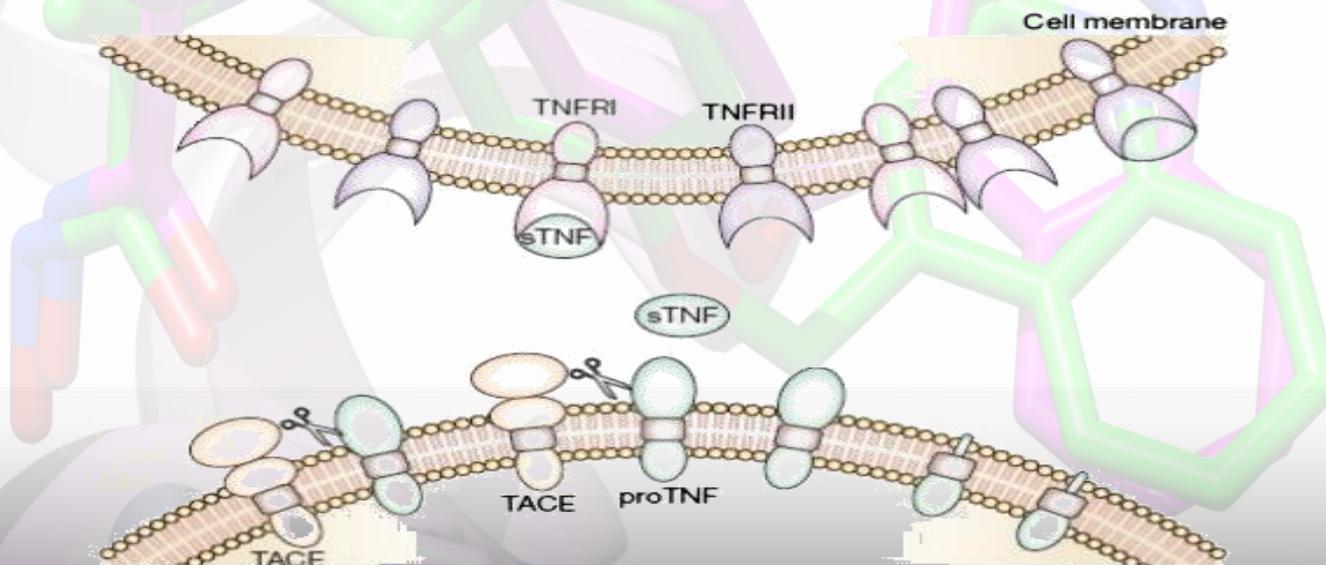
- Pro TNF- α
- 233 aa
- 26 kD
- Rilasciato nello spazio extracellulare

TACE



Ala 76-----Val 77

- TNF- α solubile
- 146aa
- 17kD
- Rilasciato nello spazio extracellulare





TNF- α

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

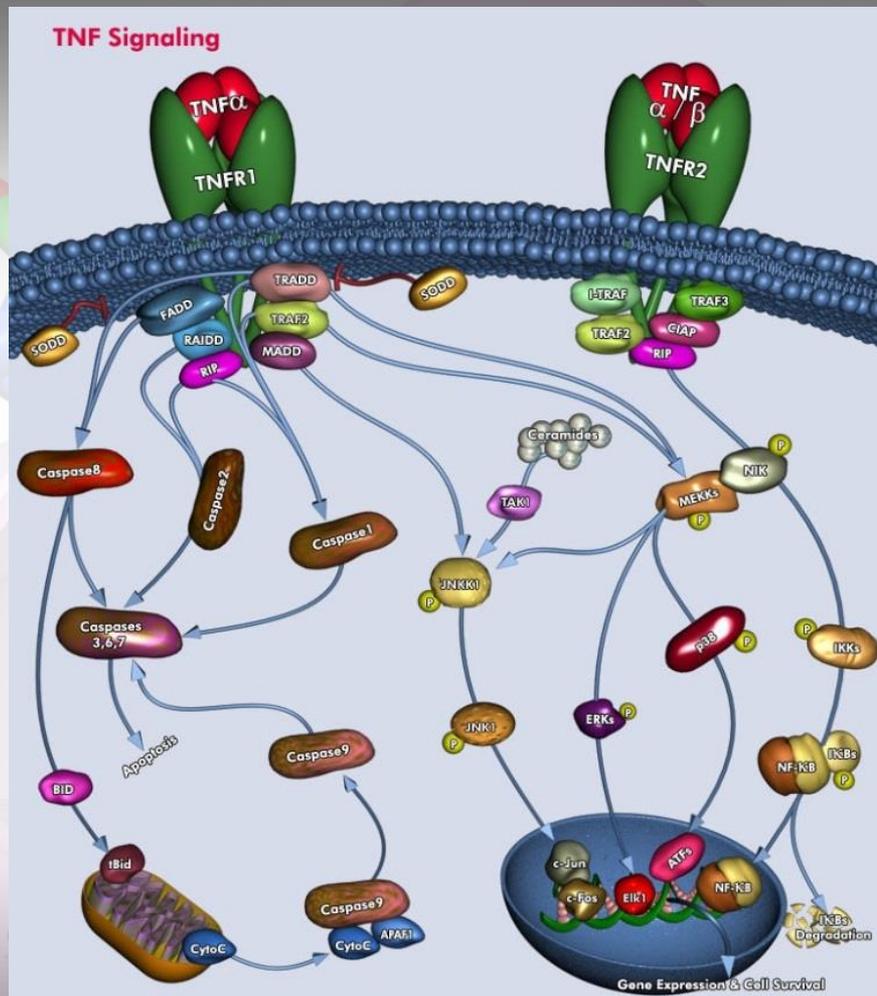
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





TNF- α

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

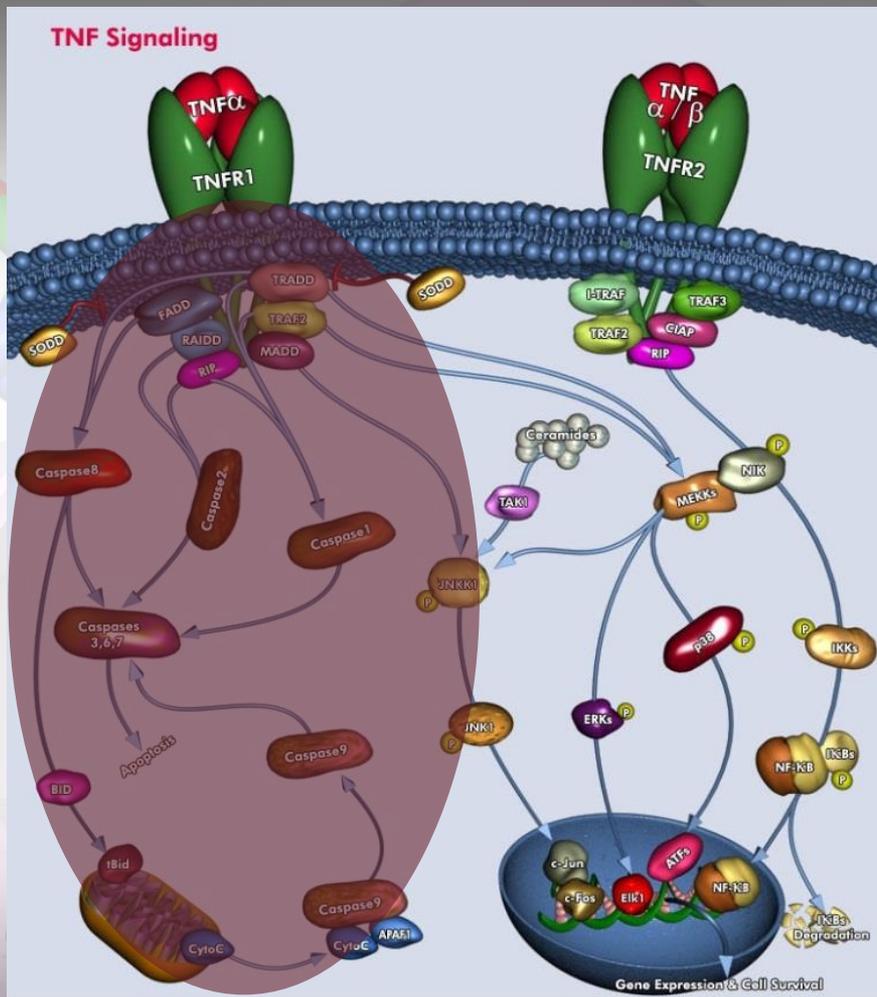
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





TNF- α

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

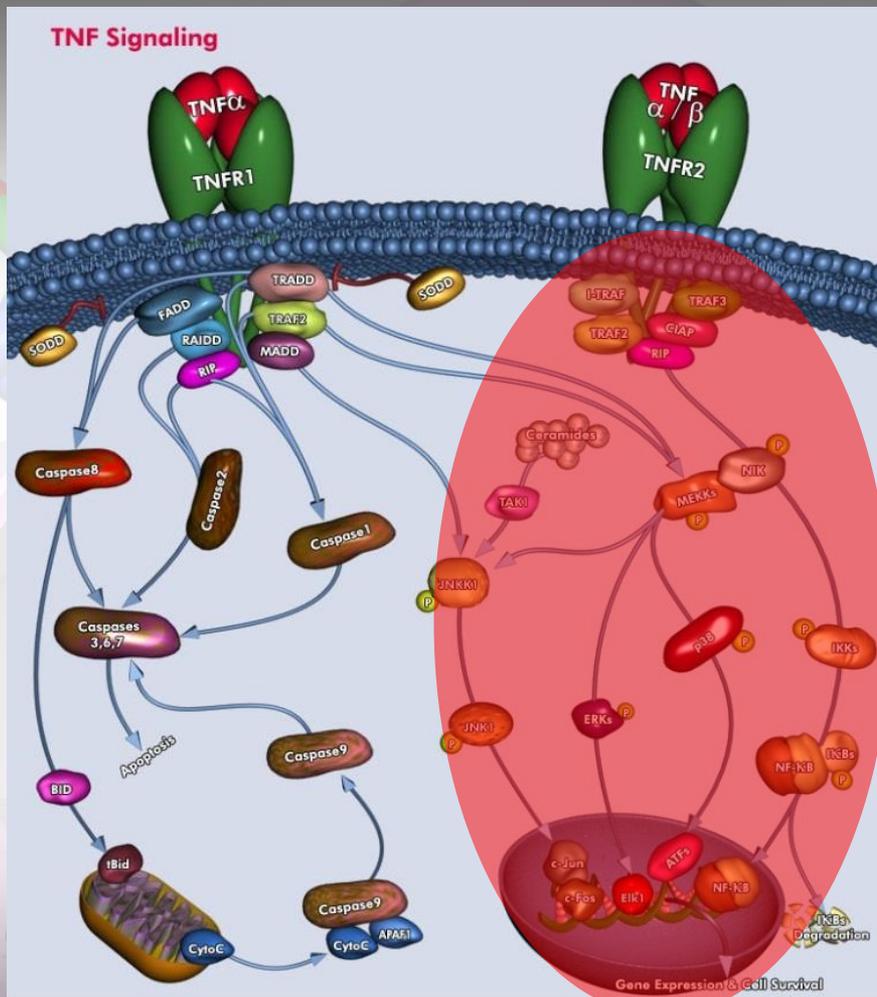
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

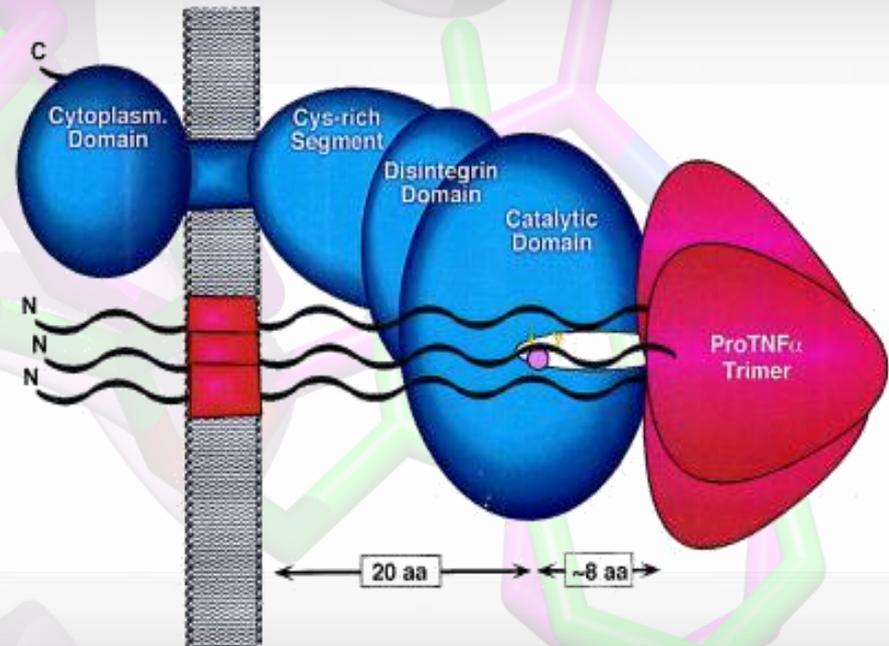




Struttura dell'enzima

• TACE: proteina transmembrana di tipo I, è sintetizzata come zimogeno ed è composto da:

- **Multidominio Extracellulare**
- **Elica transmembrana**
- **Coda intracellulare**

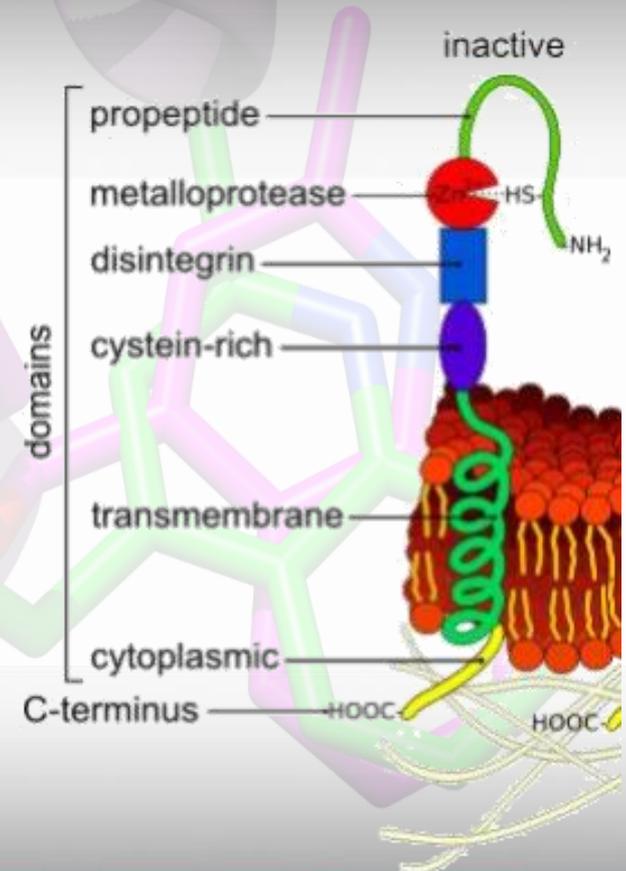


1. INTRODUZIONE
 - TACE
 - TNF- α
 - Struttura dell'enzima**
 - Inibitori
2. DOCKING MOLECOLARE
 - Docking Assessment
 - Preparazione
 - Esecuzione
3. RISULTATI
 - Re-Docking
 - Cross-Docking
 - Validazione Metodo
4. CONCLUSIONI



Multidominio extracellulare

- Un pro-dominio N-terminale
- Un dominio catalitico
- Una disintegrina
- Una regione ricca di cisteina



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima**
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Struttura dell'enzima

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima**
- Inibitori

2. DOCKING

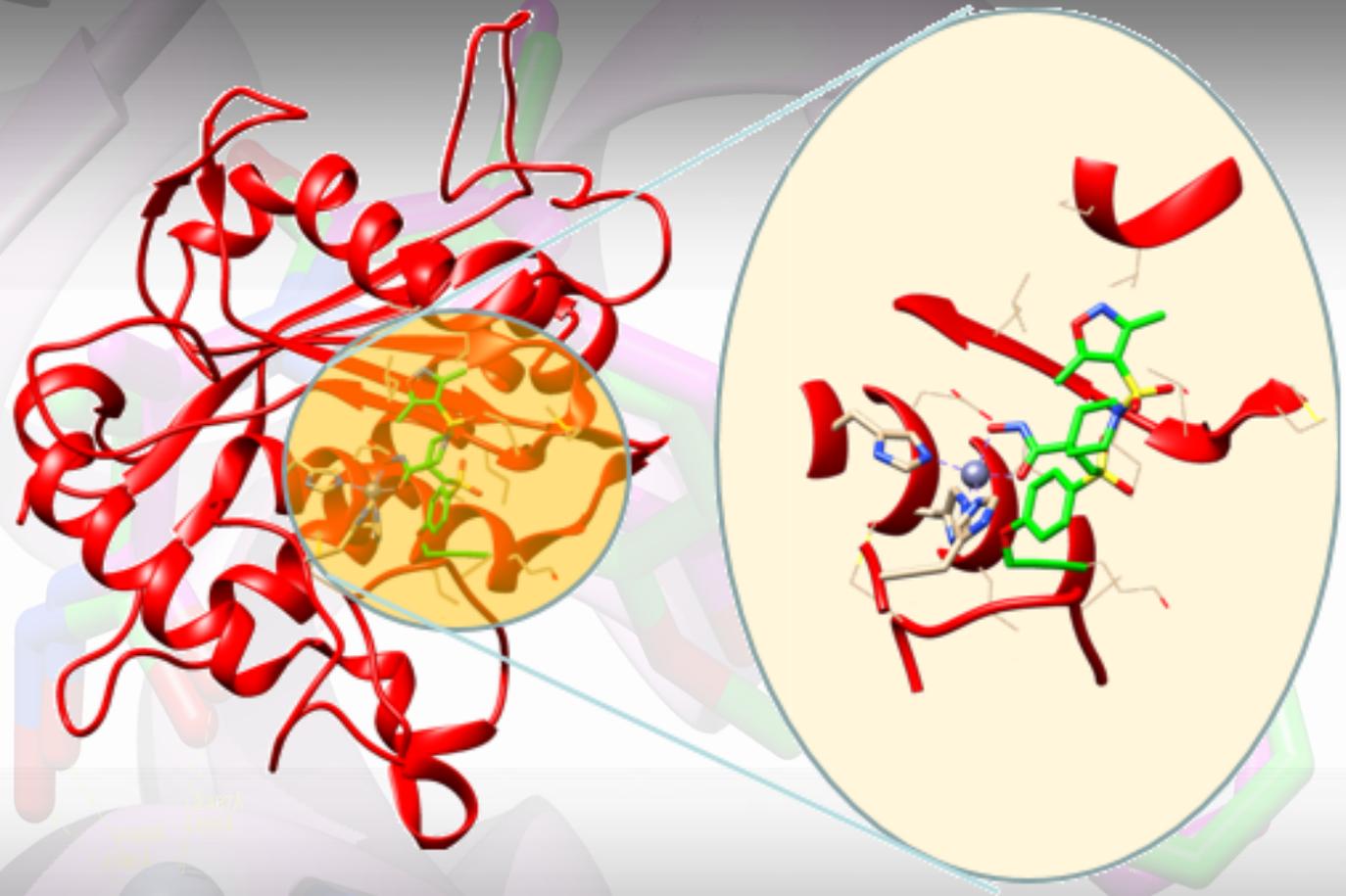
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





Struttura dell'enzima

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima**
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

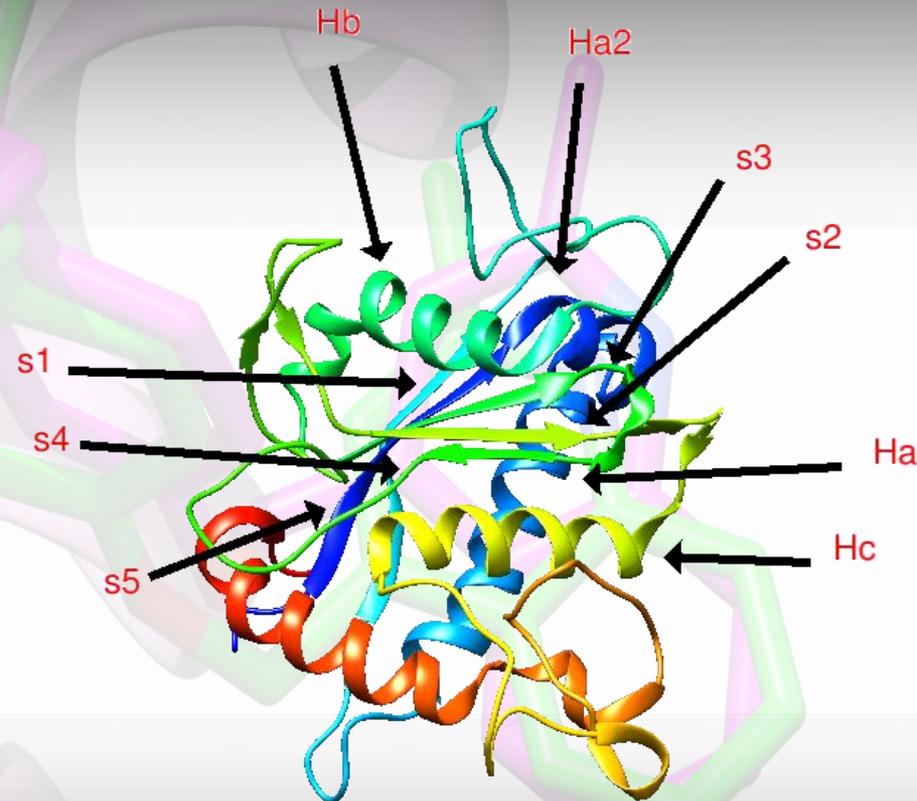
- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

**Forma di un elisse
schiacciata su 5 foglietti β
(SI-SV)**

**Eliche α (hB,hB2) sul lato
convesso**

**Eliche α (hA, hC)
sul lato concavo**





Sovra-espressione patologica del TNF α :

- **Artrite reumatoide**
- **Colite ulcerosa**
- **Morbo di Crohn**
- **Diabete**
- **Morbo di Alzaihmer**

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Inibitori

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- **Inibitori**

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

CPLX	IC ₅₀ */KI (nM)	CPLX	IC ₅₀ */KI (nM)
1ZXC	8*	3EWJ	143
2A8H	67*	3G42	140*
2DDF	41*	3KMC	400
2FV5	0,56* ---- 0,03	3KME	96
2FV9	65*	3LOT	-
2I47	2,2*	3LOV	23
2O10	28	3LE9	6
3B92	10*	3LEA	0,77
3E8R	0,18*	3LGP	2
3EDZ	8	3O64	720*-----0,4



Inibitori

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- **Inibitori**

2. DOCKING

MOLECOLARE

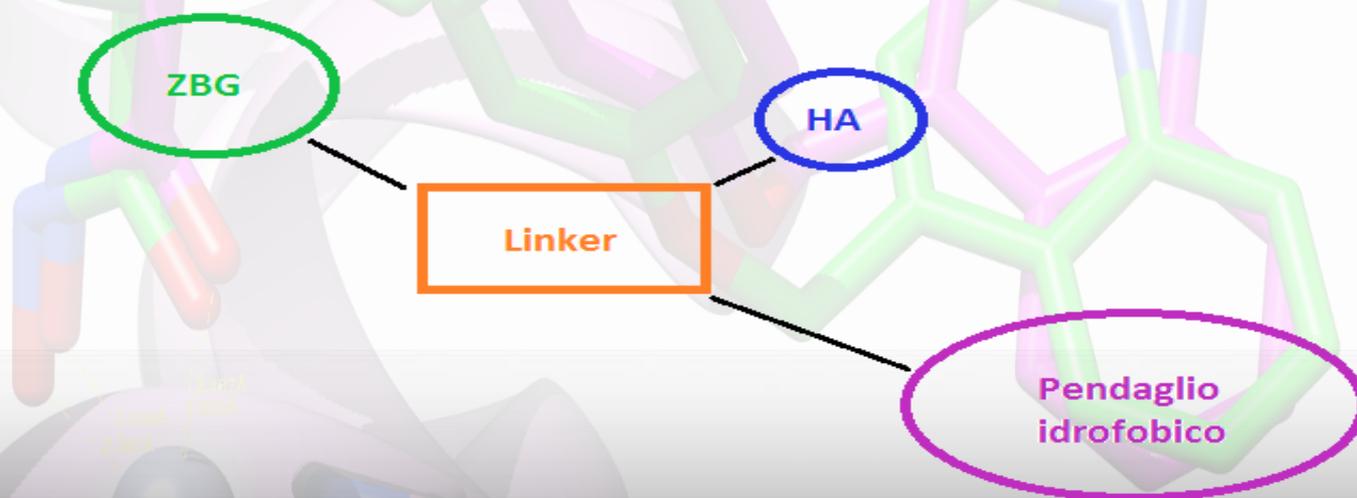
- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

- Gruppo legante lo zinco detto ZBG;
- Accettore di legami idrogeno (legame ammidico, o legame sulfonamidici) detto HA che forma legami di idrogeno con i residui GLY 349 e LEU348;
- Pendaglio idrofobico.





Inibitori

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- **Inibitori**

2. DOCKING

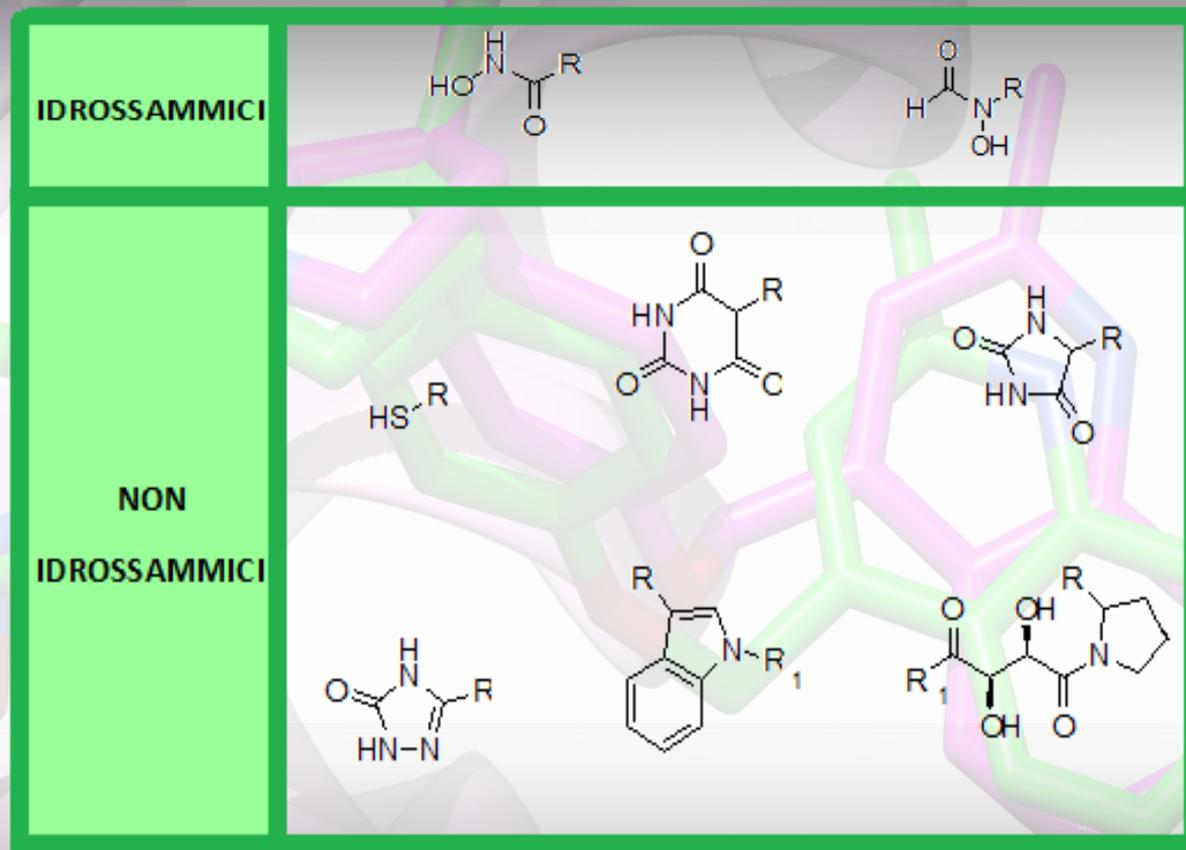
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





Docking Molecolare

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

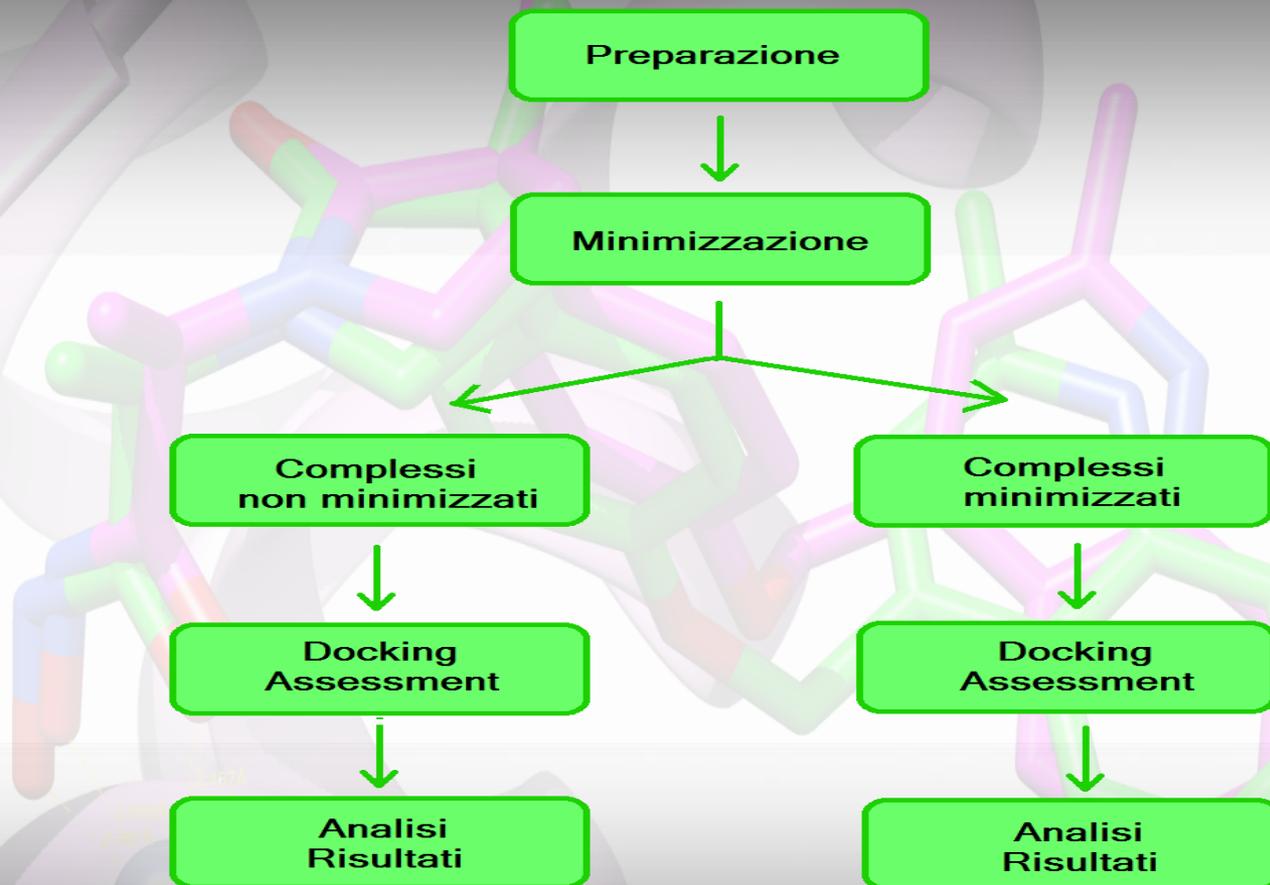
2. DOCKING MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

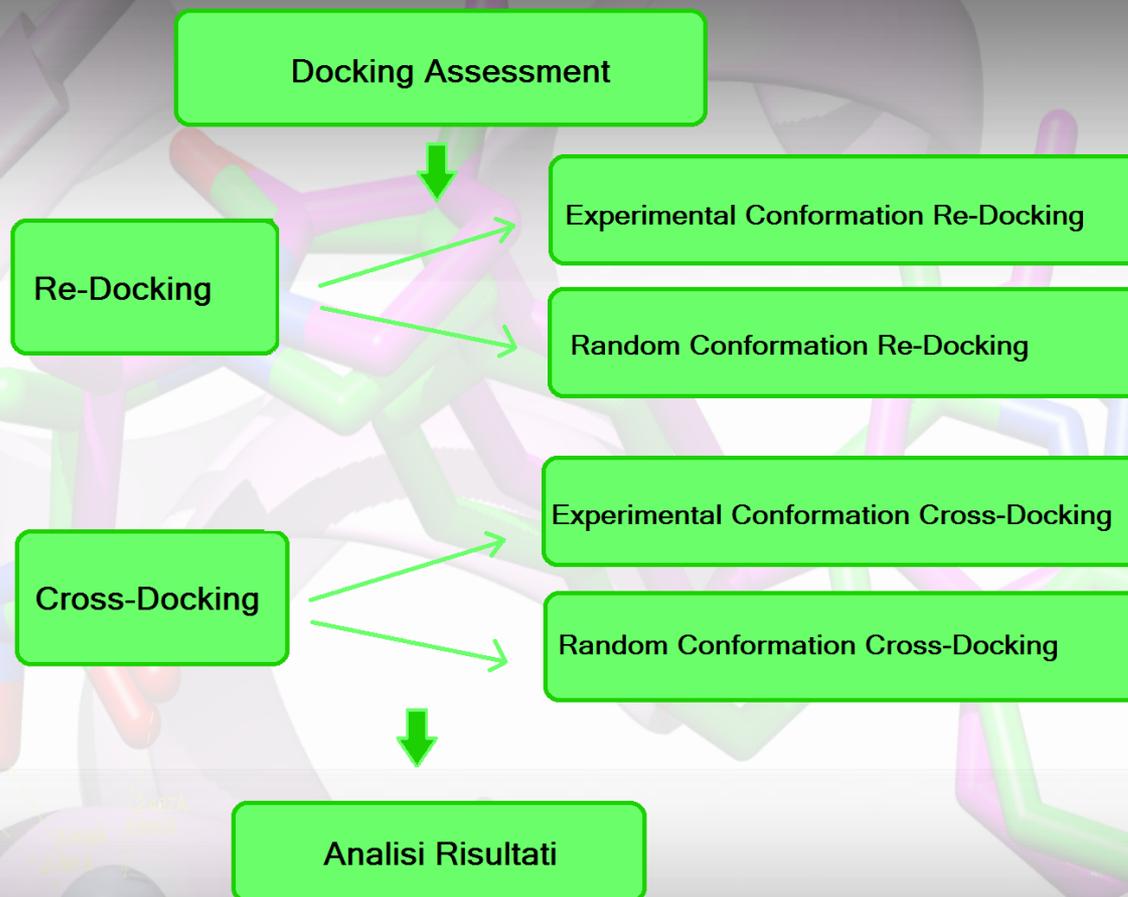
4. CONCLUSIONI





Docking Assessment

1. INTRODUZIONE
 - TACE
 - TNF- α
 - Struttura dell'enzima
 - Inibitori
2. DOCKING MOLECOLARE
 - **Docking Assessment**
 - Preparazione
 - Esecuzione
3. RISULTATI
 - Re-Docking
 - Cross-Docking
 - Validazione Metodo
4. CONCLUSIONI





Docking Assessment

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

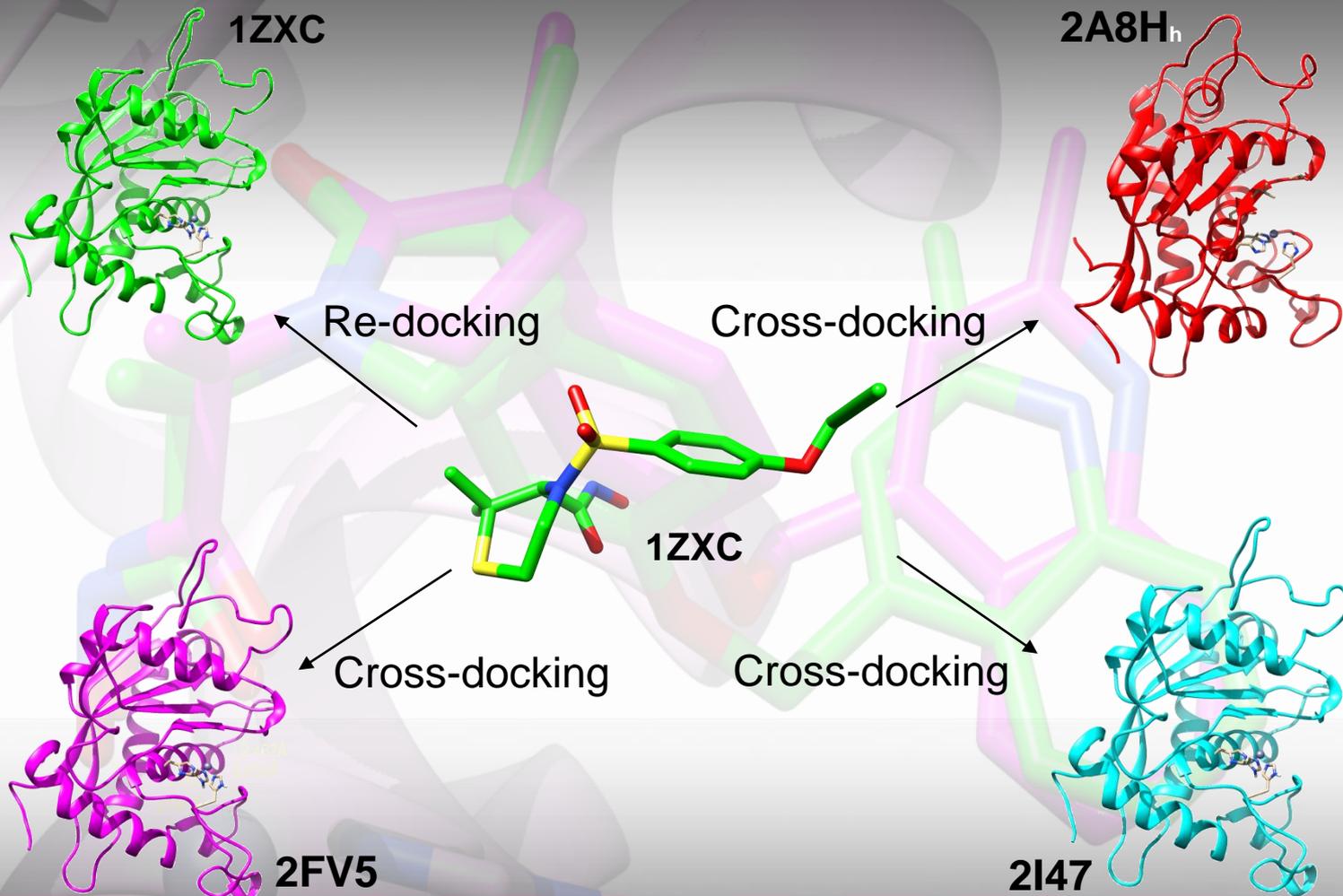
2. DOCKING MOLECOLARE

- **Docking Assessment**
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





Docking Assessment

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

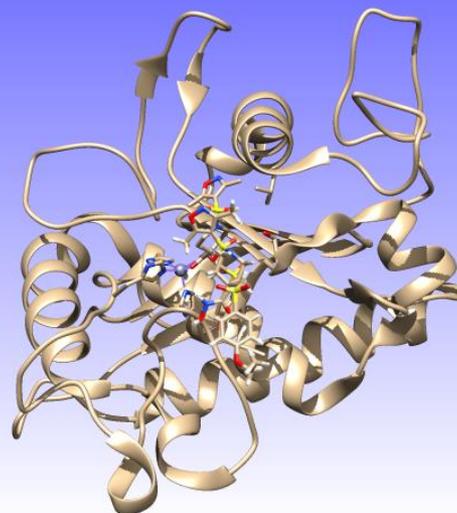
MOLECOLARE

- **Docking Assessment**
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

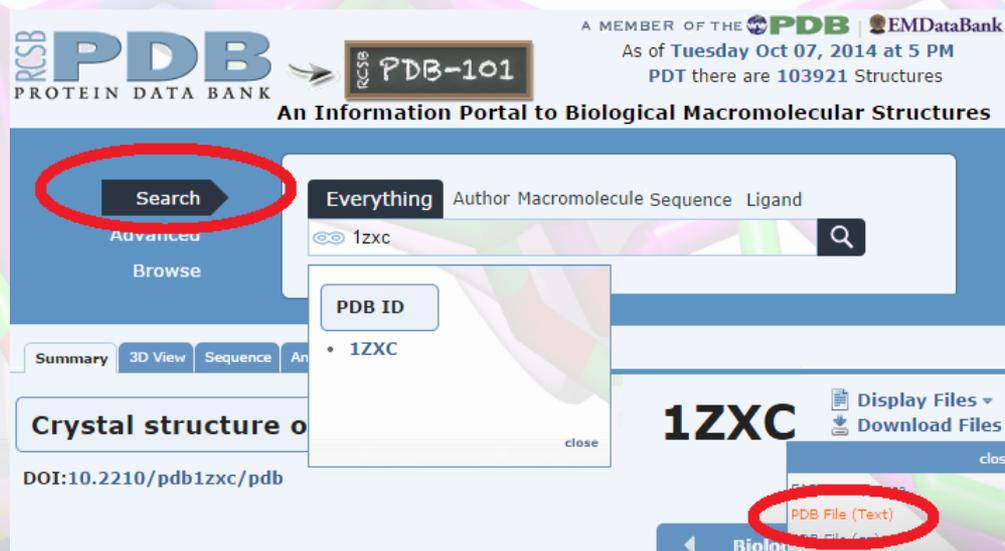




Preparazione

I 20 cplx sono stati ottenuti con Diffrazione dei raggi X con risoluzione da 1,70 a 2,28 Å
I cplx cristallizzati sono stati scaricati da PDB

1. INTRODUZIONE
 - TACE
 - TNF- α
 - Struttura dell'enzima
 - Inibitori
2. DOCKING MOLECOLARE
 - Docking Assessment
 - **Preparazione**
 - Esecuzione
3. RISULTATI
 - Re-Docking
 - Cross-Docking
 - Validazione Metodo
4. CONCLUSIONI



A MEMBER OF THE **PDB** | **EMDataBank**
As of Tuesday Oct 07, 2014 at 5 PM
PDT there are 103921 Structures

RCSB PDB **PDB-101**
PROTEIN DATA BANK

An Information Portal to Biological Macromolecular Structures

Search (circled in red) | Everything | Author | Macromolecule | Sequence | Ligand

1zxc

PDB ID
• 1ZXC

Crystal structure of ...

DOI:10.2210/pdb1zxc/pdb

1ZXC

Display Files | Download Files

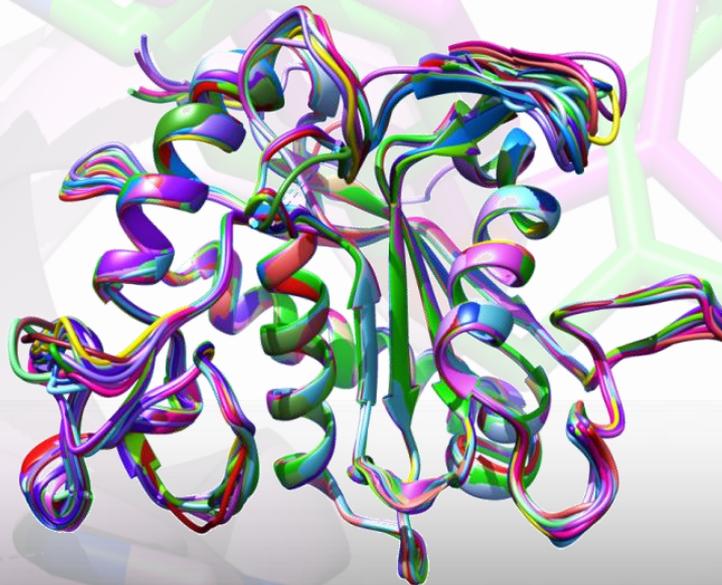
PDB File (Text) (circled in red)



Preparazione

I complessi sono stati processati:

- Eliminazione solvente
- Separati le catene
- Allineamento
- Protonazione
- Aggiunta delle cariche



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- **Preparazione**
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Preparazione

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- **Preparazione**
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

ID PROTEINA	CATENA	INIBITORE	PRIMO RESIDUO	ULTIMO RESIDUO
1ZXC	A	IH6	ASP 217	ASN 475
	B	IH6	PRO 218	ASN 475
2I47	A	INN	PRO 220	SER 474
	B	INN	MET 221	SER 474
	C	KGY	MET 221	SER 474
	D	KGY	PRO 220	SER 474

Composizione originaria dei complessi: 2 casi rappresentativi



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- **Preparazione**
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

Minimizzazione:

- **Gromacs 4.5.5**
- **Forcefield: Amber99sb-ildn**
- **Modello dell'acqua: tip4p**
- **Box: cubica**
- **Nsteps: 1000**



Preparazione

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

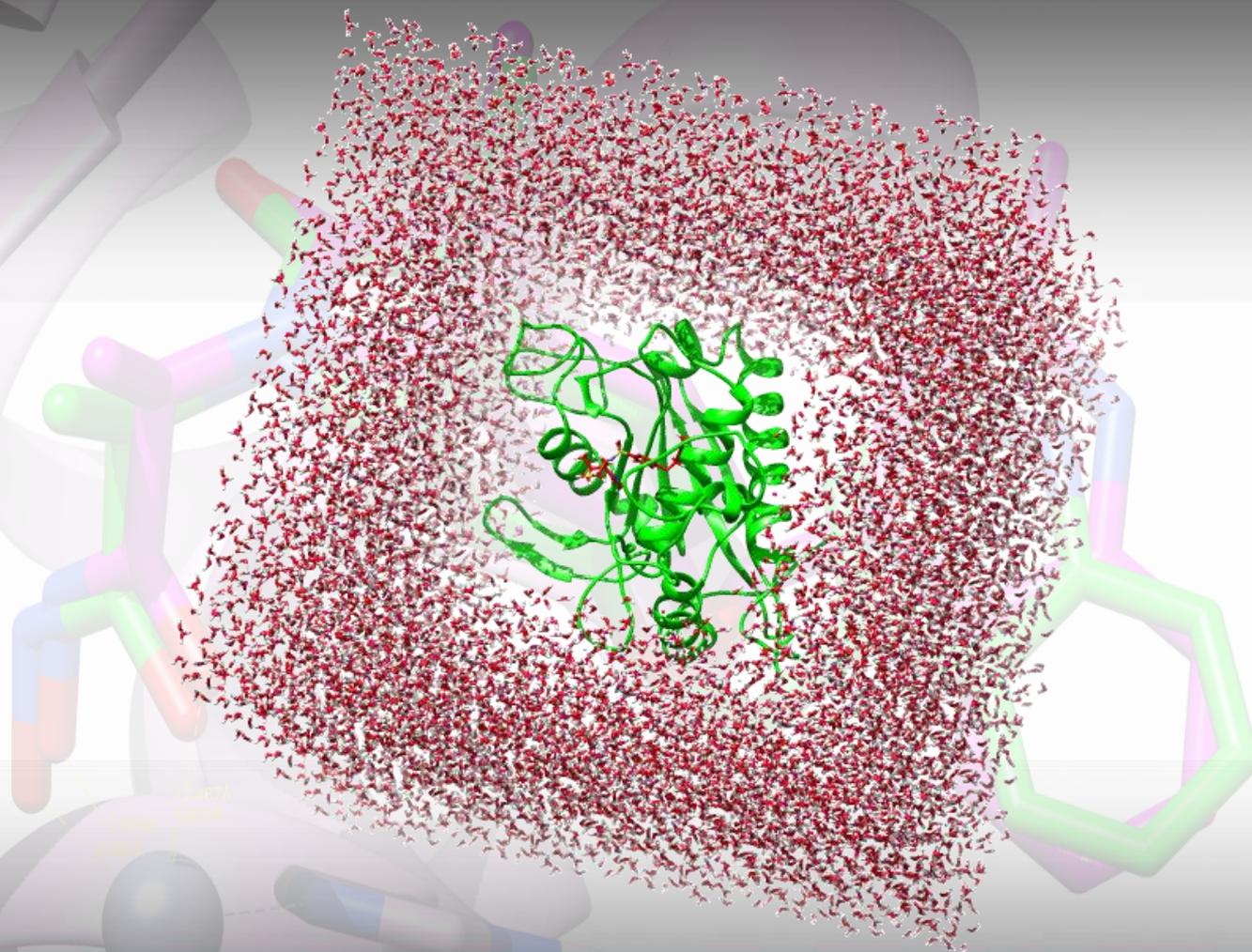
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- **Preparazione**
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





Preparazione

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

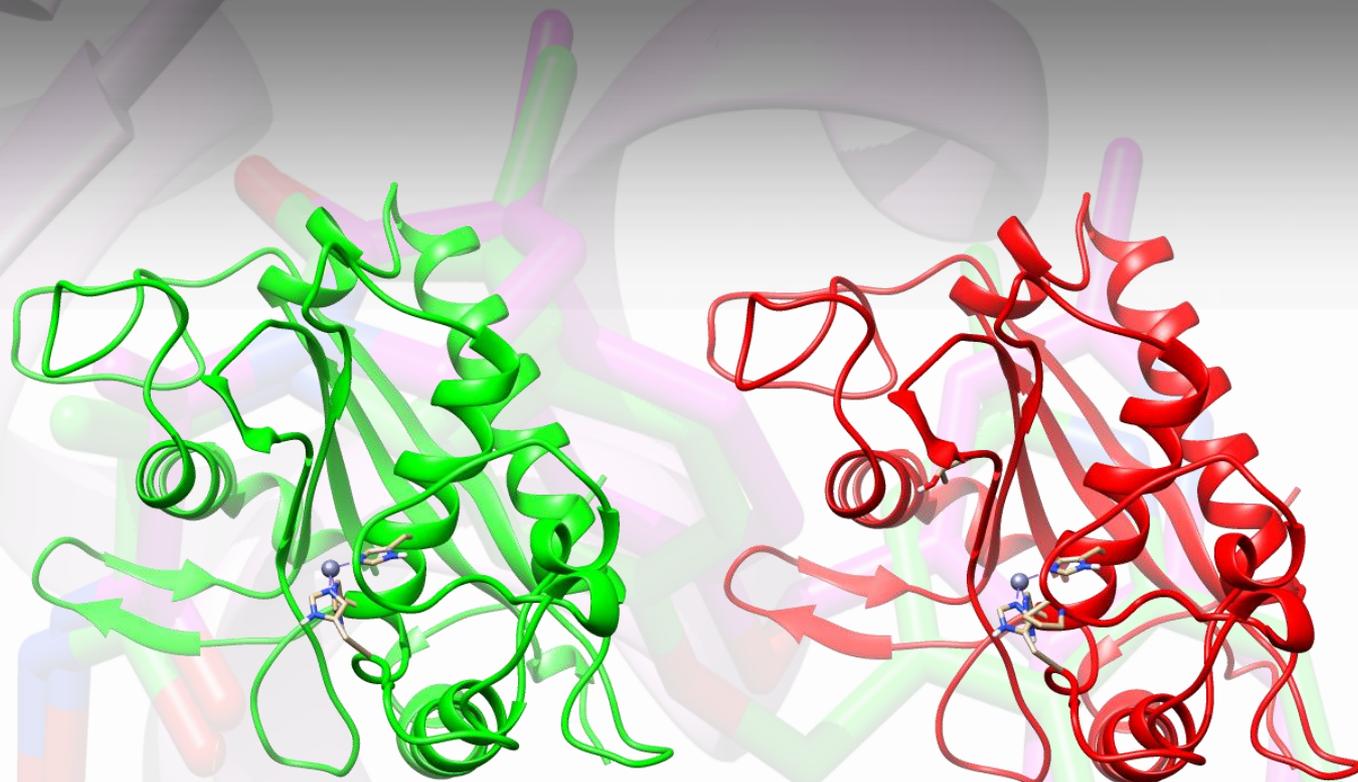
MOLECOLARE

- Docking Assessment
- **Preparazione**
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI





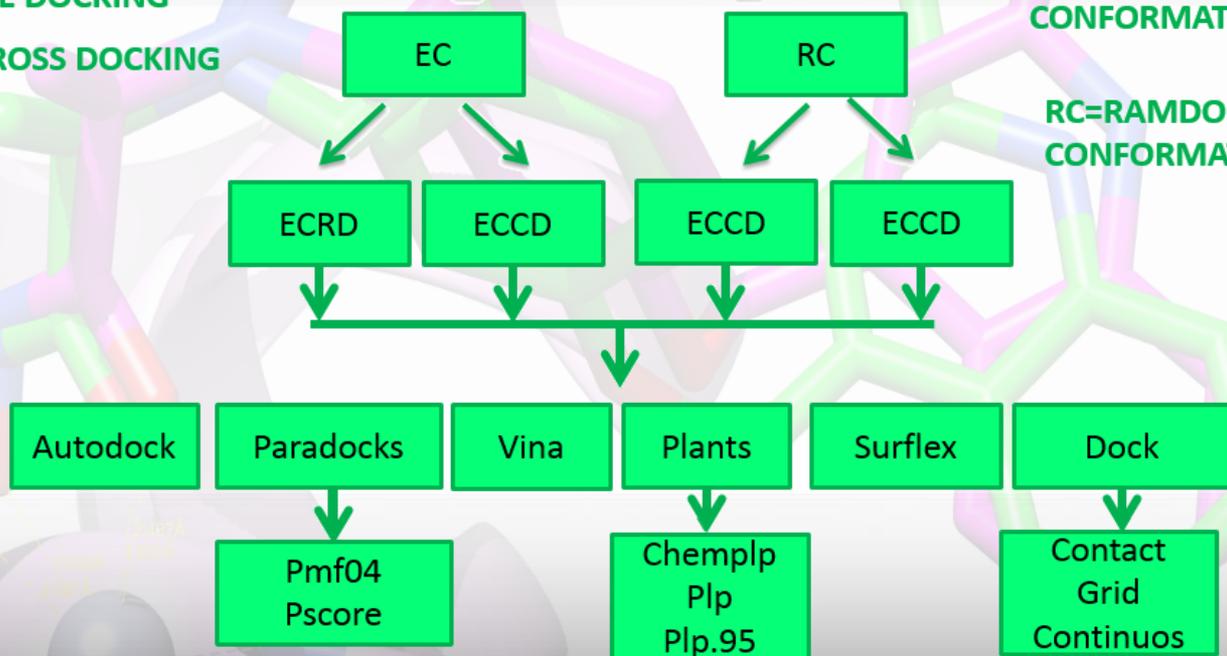
Esecuzione

DOCKING MOLECOLARE: Minimizzate e NonMinimizzate

RC=RE DOCKING
CD=CROSS DOCKING

EC=EXPERIMENTAL
CONFORMATION

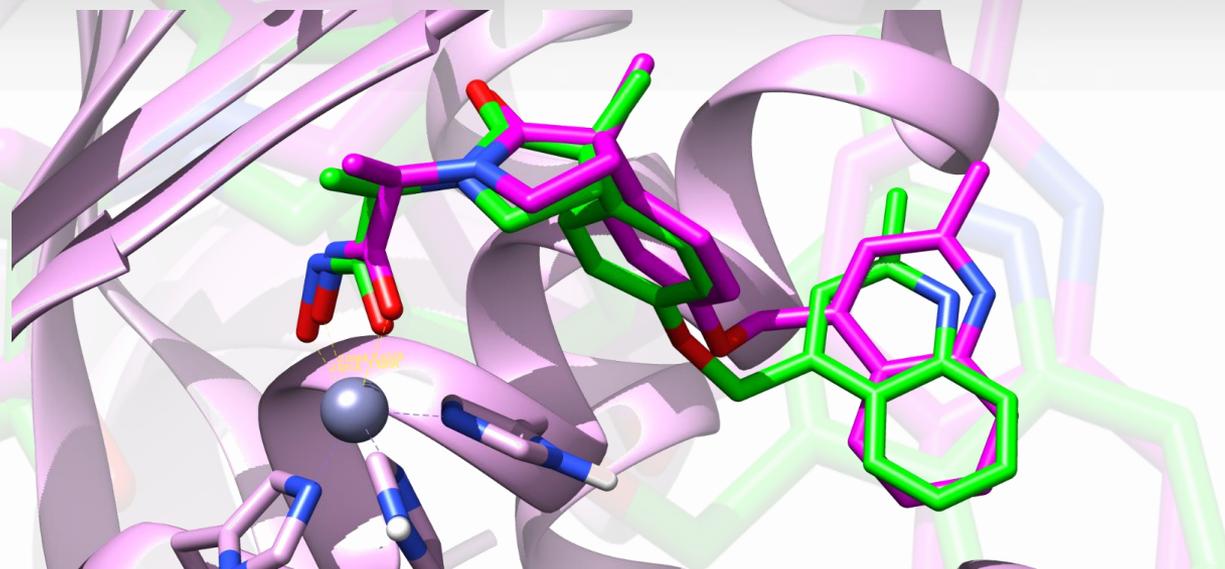
RC=RAMDOM
CONFORMATION



1. INTRODUZIONE
 - TACE
 - TNF- α
 - Struttura dell'enzima
 - Inibitori
2. DOCKING MOLECOLARE
 - Docking Assessment
 - Preparazione
 - **Esecuzione**
3. RISULTATI
 - Re-Docking
 - Cross-Docking
 - Validazione Metodo
4. CONCLUSIONI



RMSD



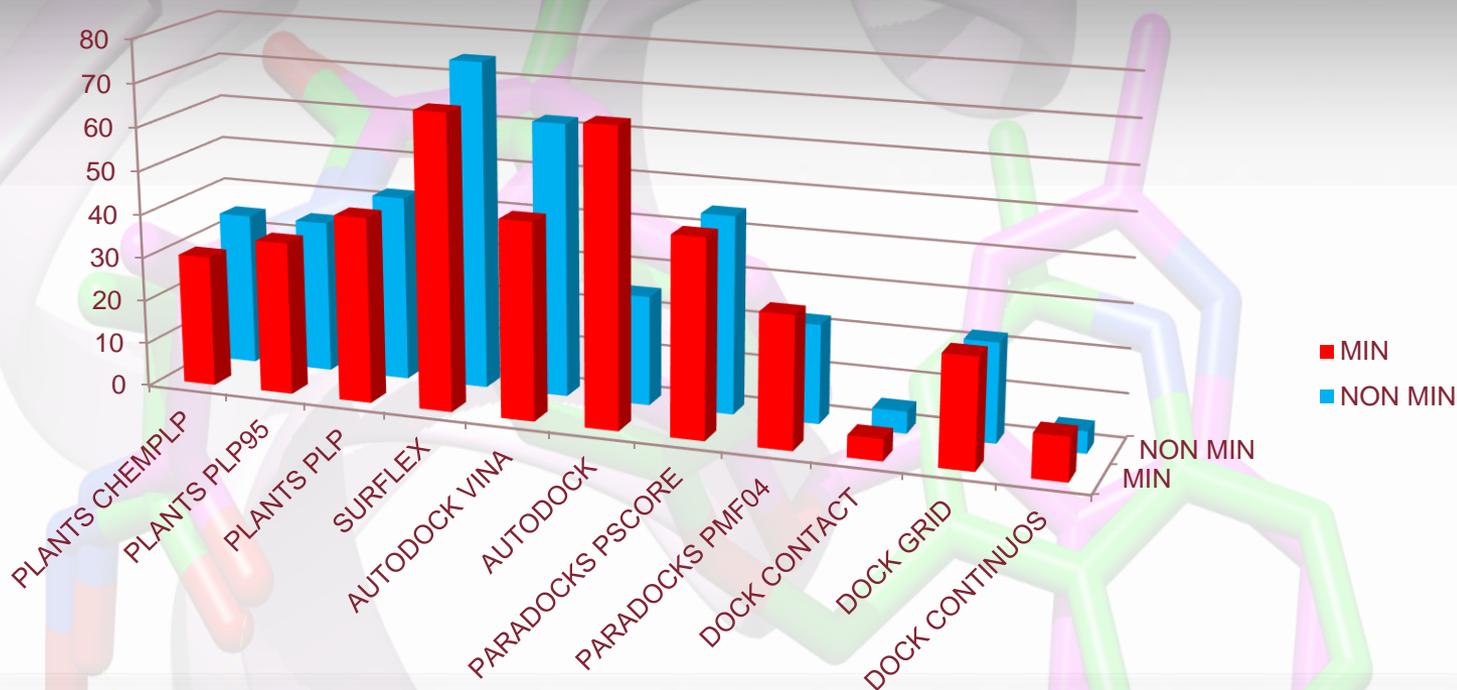
Docking accuracy DA%

1. INTRODUZIONE
 - TACE
 - TNF- α
 - Struttura dell'enzima
 - Inibitori
2. DOCKING MOLECOLARE
 - Docking Assessment
 - Preparazione
 - Esecuzione
3. **RISULTATI**
 - Re-Docking
 - Cross-Docking
 - Validazione Metodo
4. CONCLUSIONI



Risultati

ECRD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

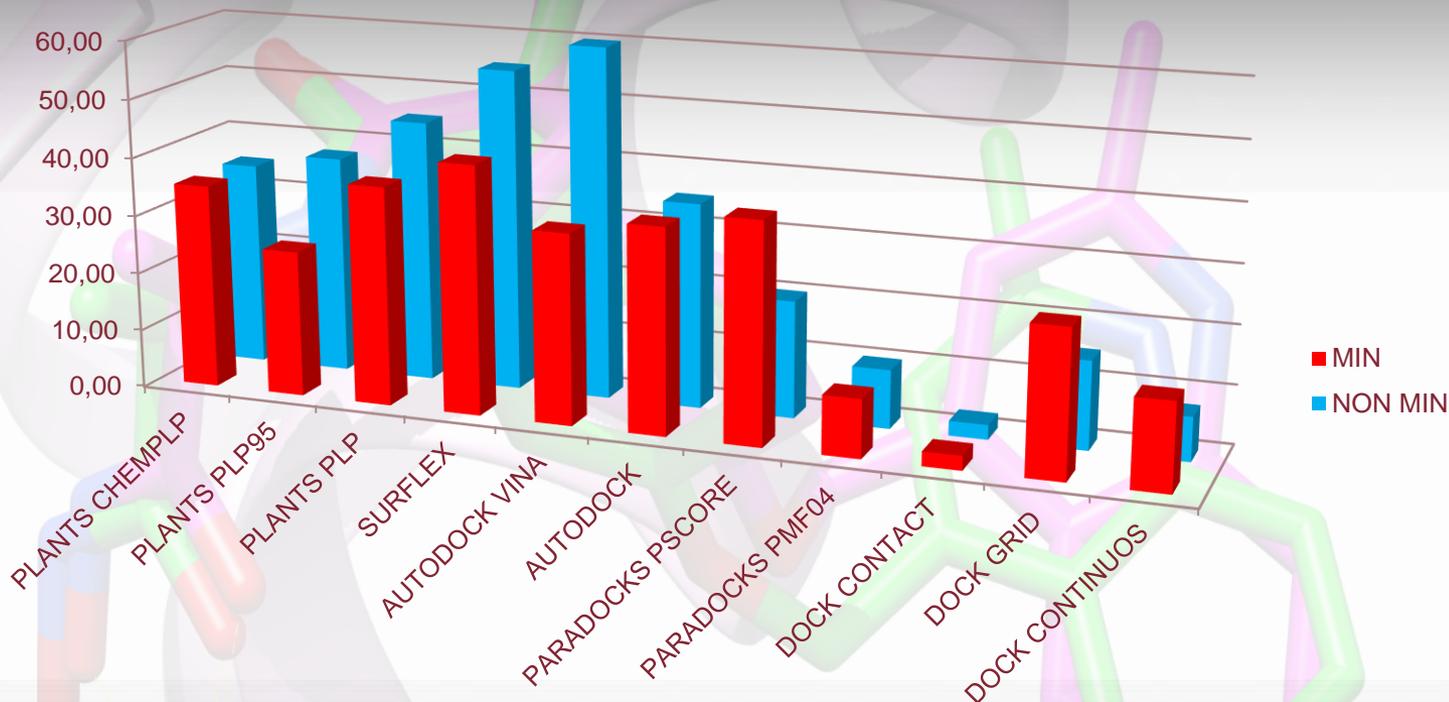
- **Re-Docking**
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Risultati

RCRD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

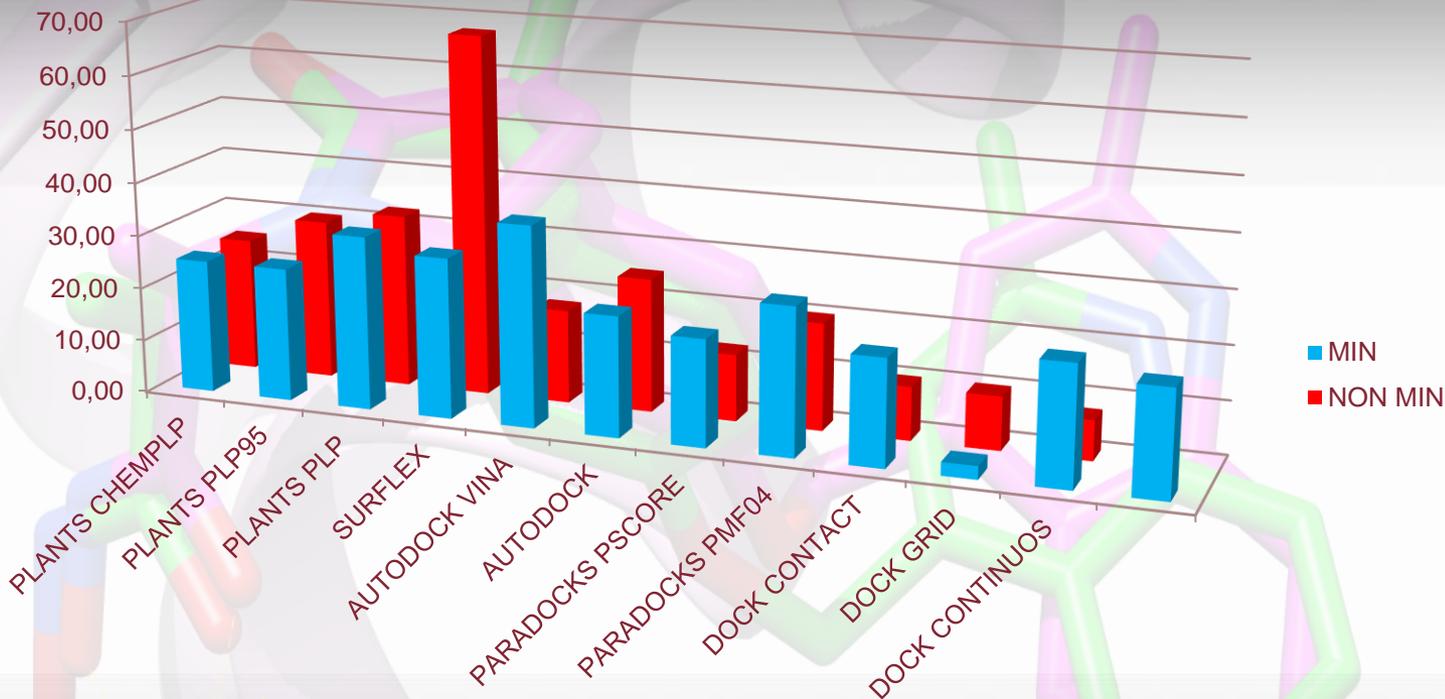
- **Re-Docking**
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Risultati

ECCD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

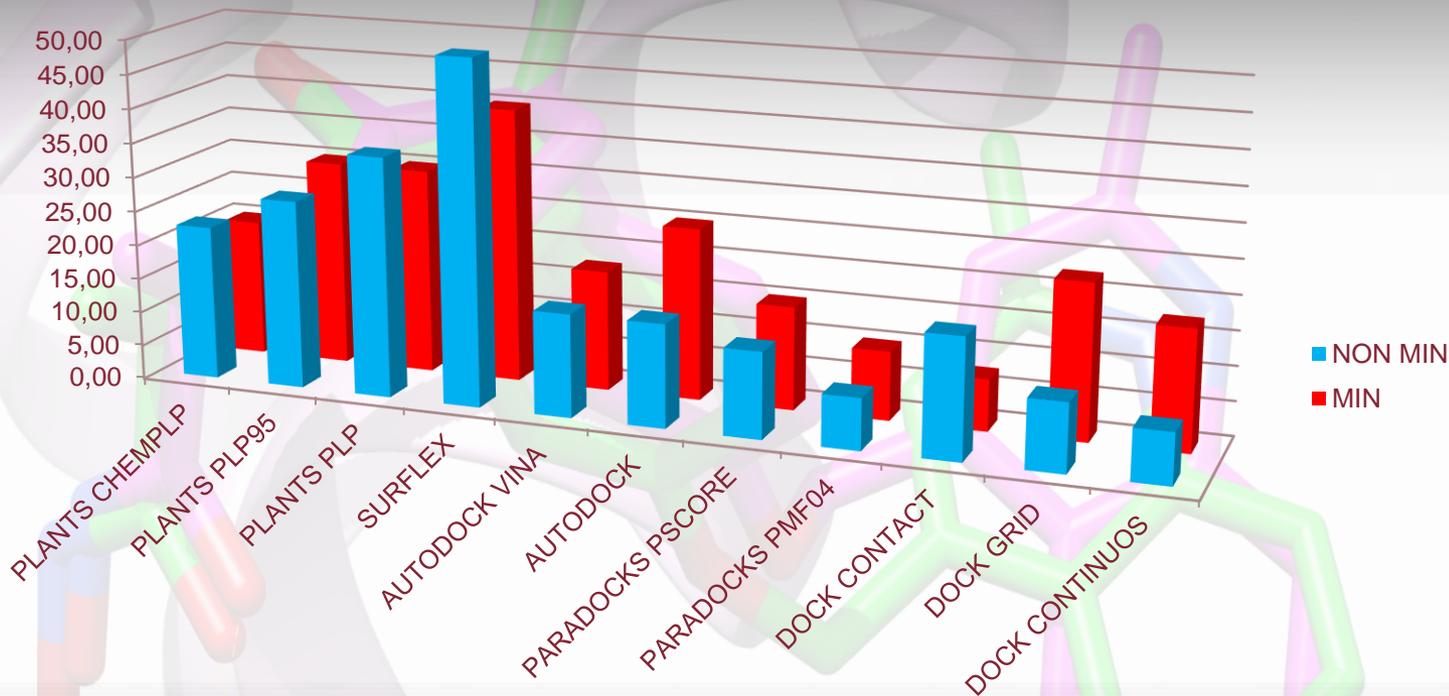
- Re-Docking
- **Cross-Docking**
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Risultati

RCCD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

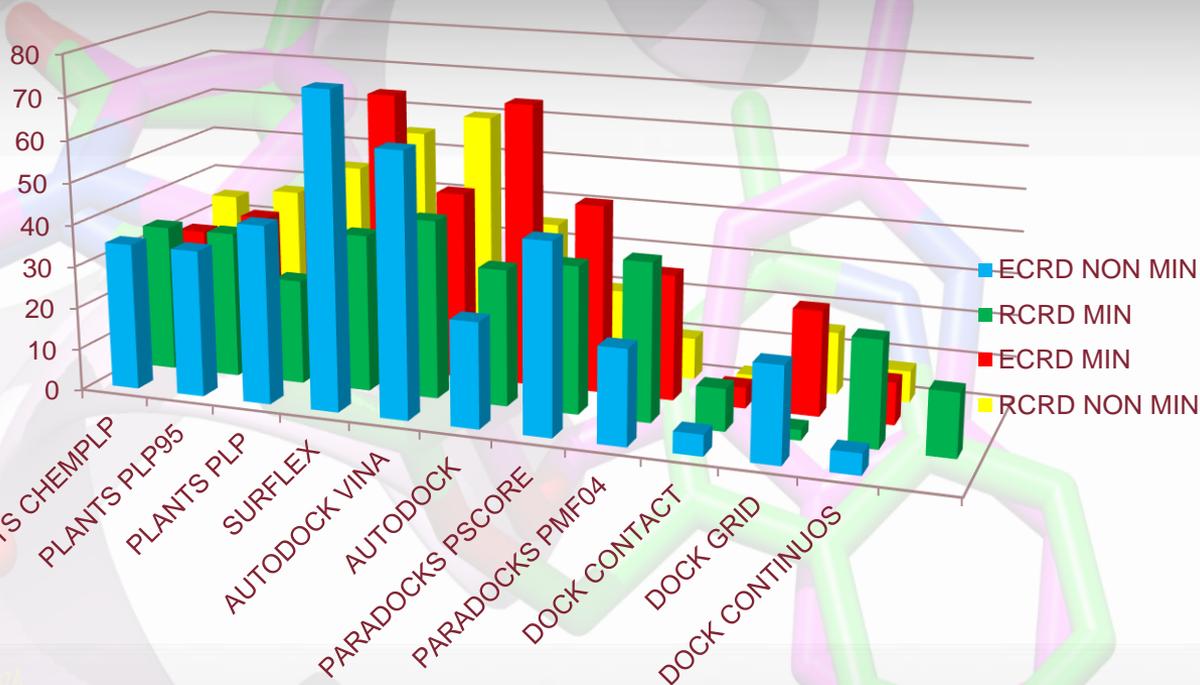
- Re-Docking
- **Cross-Docking**
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Risultati

ECRD E RCRD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

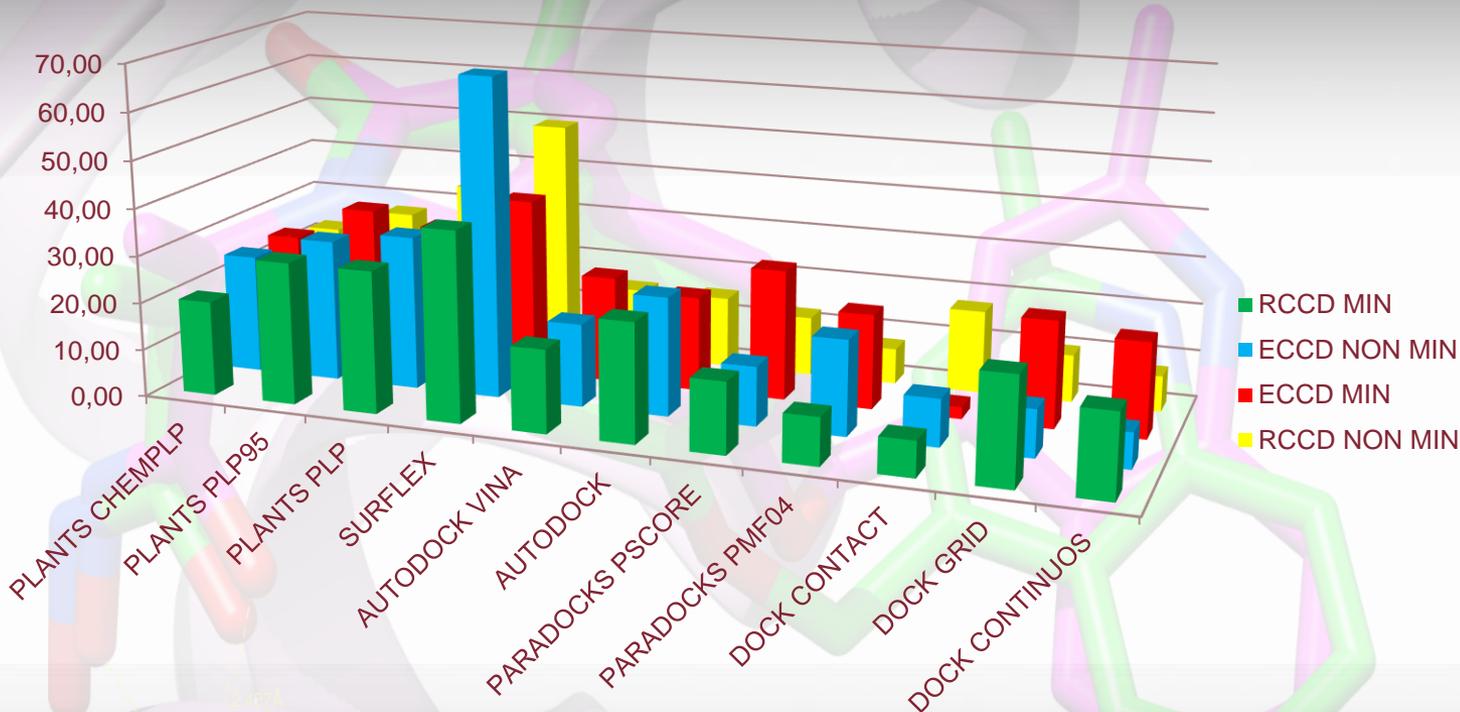
- Re-Docking
- Cross-Docking
- **Validazione Metodo**

4. CONCLUSIONI



Risultati

ECCD E RCCD



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

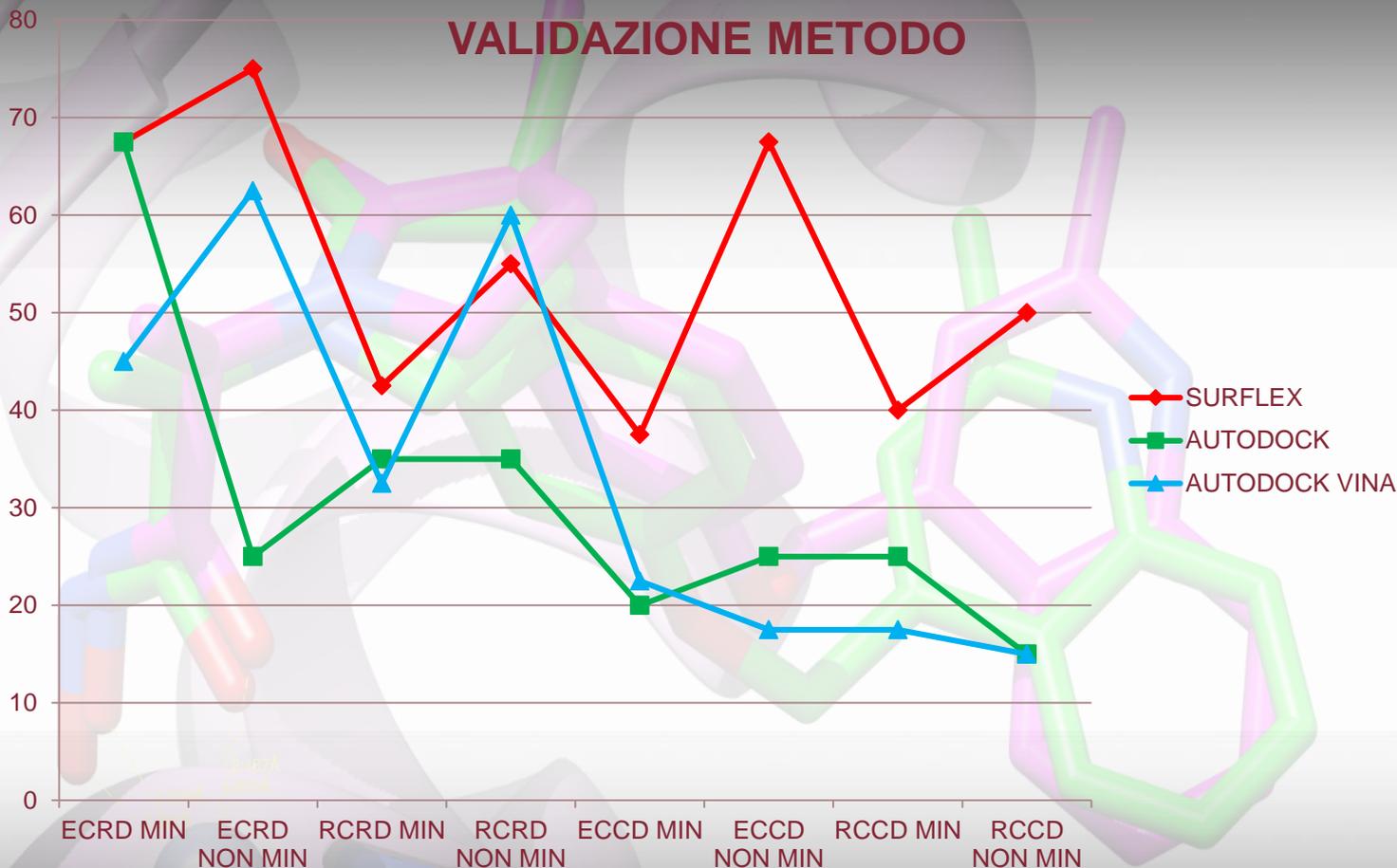
- Re-Docking
- Cross-Docking
- **Validazione Metodo**

4. CONCLUSIONI



Conclusioni

VALIDAZIONE METODO



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

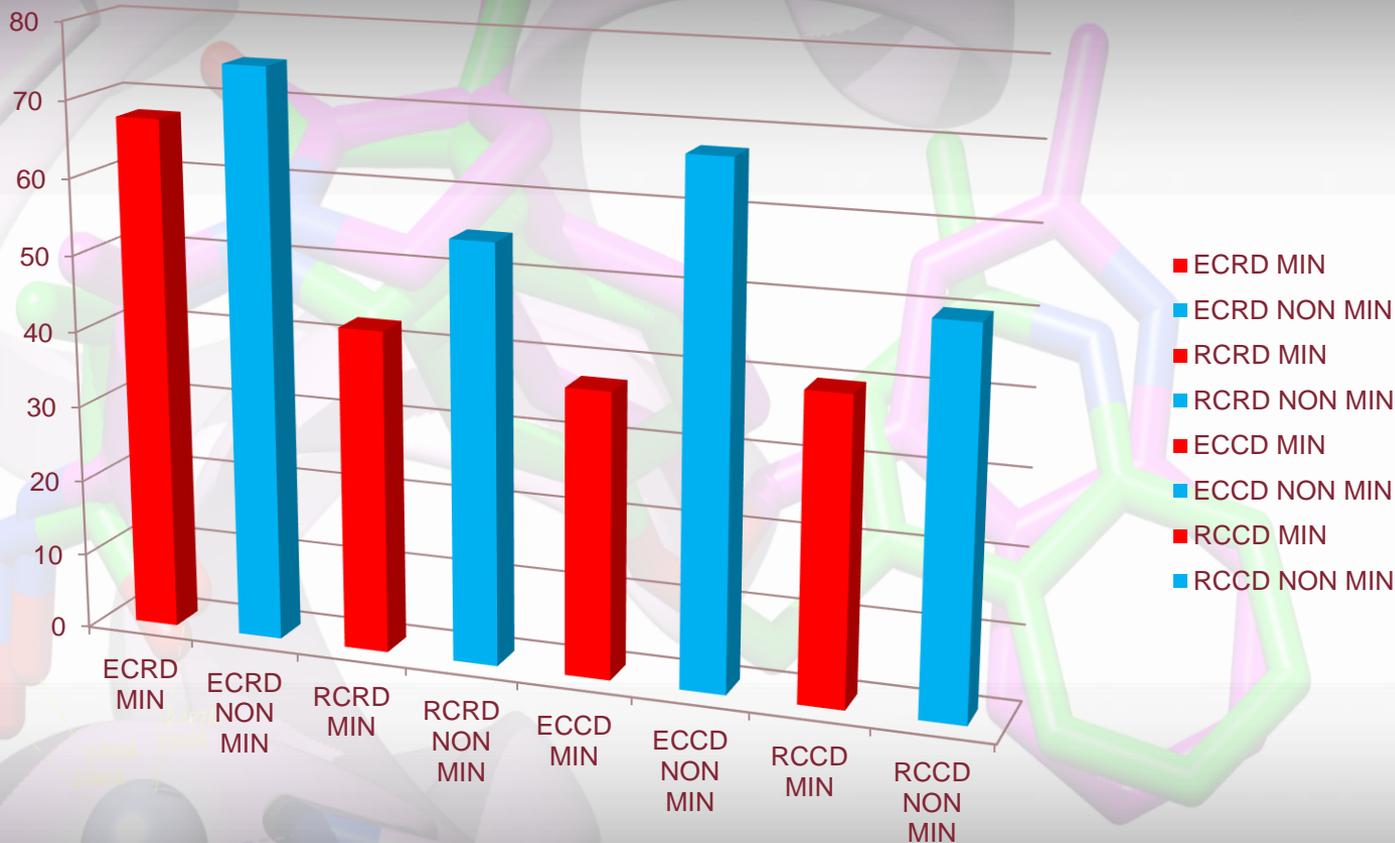
- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Conclusioni

SURFLEX



1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI



Conclusioni

1. INTRODUZIONE

- TACE
- TNF- α
- Struttura dell'enzima
- Inibitori

2. DOCKING

MOLECOLARE

- Docking Assessment
- Preparazione
- Esecuzione

3. RISULTATI

- Re-Docking
- Cross-Docking
- Validazione Metodo

4. CONCLUSIONI

- Validazione della procedura di predizione del binding mode per un ligando capace di legare la TACE
- Il programma SURFLEX è quello che ha dimostrato la migliore performance
- Il confronto diretto tra la procedura di docking su complessi non minimizzati e sottoposti ad ottimizzazione geometrica con GROMACS ha suggerito che si ottengono migliori risultati usando i complessi originali
- La procedura è stata usata per la progettazione di una nuova libreria di ligandi in collaborazione con il centro ricerche C4T (Tor Vergata), ma per motivi di segretezza non è stata inclusa in questo lavoro



FINE

rcmd
www.rcmd.it

Grazie per l'attenzione!