

IDENTIFICAZIONE *IN SILICO* DI COMPOSTI IN GRADO DI PROMUOVERE L'INTERAZIONE TRA TNFR2 e TNF- α : UN NUOVO APPROCCIO CONTRO LE MALATTIE DEMIELINIZZANTI



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI MILANO

Saporiti S¹, Parravicini C¹, Palazzolo L¹, Brambilla R², Eberini I¹

¹Laboratorio di Biochimica e Biofisica Computazionale, Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari, Università degli Studi di Milano, Milan, Italy.

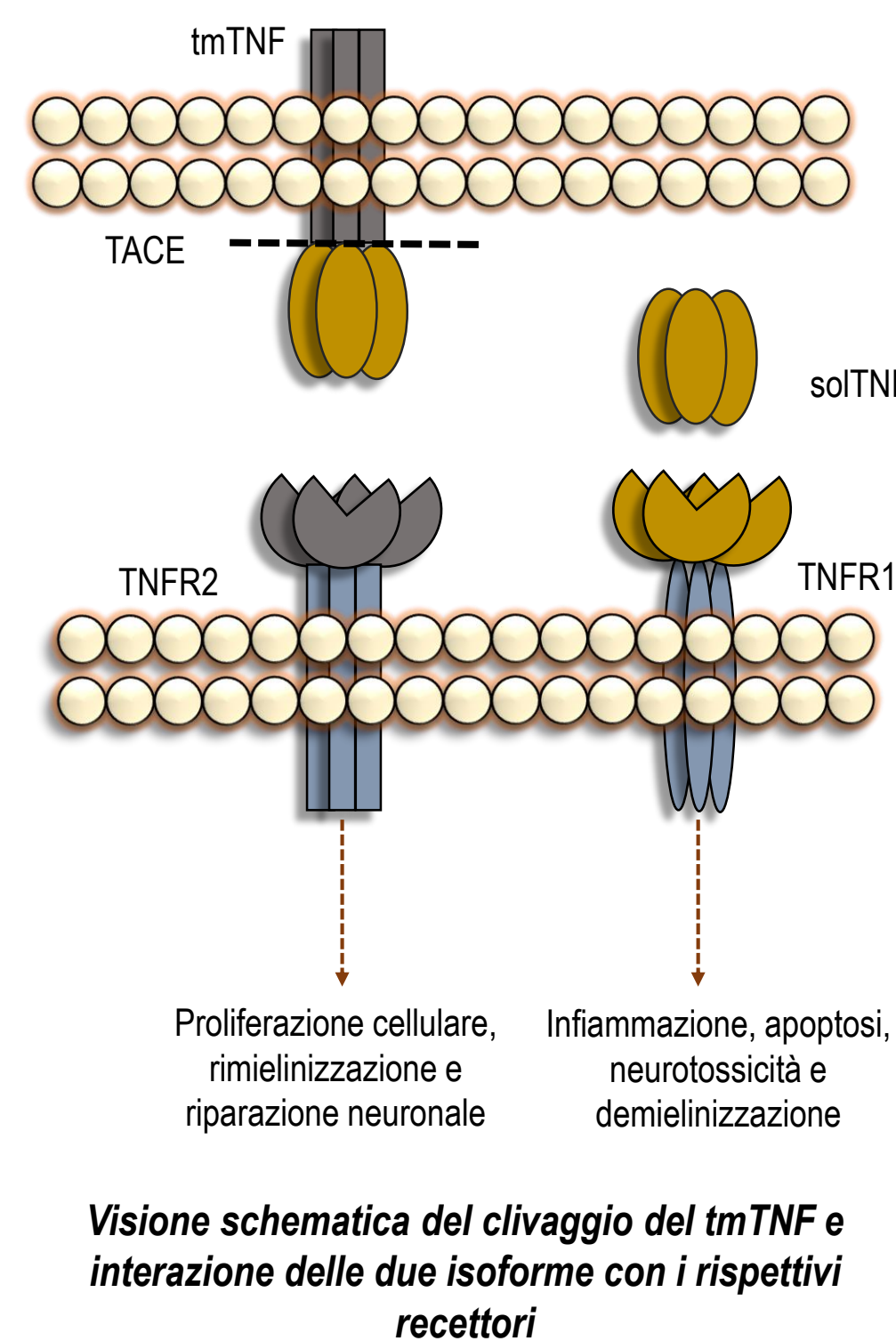
²The Miami Project To Cure Paralysis, University of Miami Miller School of Medicine, Miami, Florida 33136



Dipartimento di Scienze Farmacologiche e Biomolecolari

BACKGROUND

Il *Tumor Necrosis Factor-alpha* (TNF- α) è una potente citochina coinvolta nelle risposte immunitarie e pro-infiammatorie, che promuove la proliferazione e il differenziamento cellulare. TNF- α esiste come omotrimerico funzionale in due differenti isoforme: tmTNF, transmembrana, e soITNF, solubile. tmTNF ha un dominio transmembrana e uno extracellulare, che viene tagliato dall'enzima TACE (TNF- α converting enzyme), generando la forma solubile [1,2]. Entrambe le isoforme interagiscono con due recettori, TNFR1 e TNFR2, attraverso la porzione solubile. I due recettori inducono risposte cellulari diverse [3]: TNFR1 è costitutivamente espresso in molti tessuti ed è riconosciuto come mediatore principale dell'attività infiammatoria tipica del TNF- α ; TNFR2 è altamente regolato nelle cellule del sistema immunitario ed è principalmente coinvolto nelle risposte immunitarie e riparatorie [4]. soITNF agisce preferenzialmente attraverso il TNFR1, stimolando l'infiammazione, l'apoptosi, la neurotossicità e la demielinizzazione [5], mentre tmTNF interagisce maggiormente con TNFR2 inducendo delle risposte opposte a quelle indotte dal TNFR1, come proliferazione cellulare, rimielinizzazione e rigenerazione neuronale [6,7]. Diversi studi hanno evidenziato alti livelli di soITNF in pazienti affetti da sclerosi multipla (SM), suggerendo un ruolo di TNF- α nella fisiopatologia della malattia [8,9]. Inoltre, studi *in vivo* su un modello animale di SM (encefalomielite autoimmune sperimentale, EAE), hanno mostrato un ruolo duale del recettore TNFR2: nei precursori degli oligodendrociti (OPCs), negli oligodendrociti maturi e nella microglia, che sono coinvolti nei meccanismi di riparazione neuronale e rimielinizzazione, TNFR2 ha un ruolo neuroprotettivo, mentre in monociti e macrofagi, coinvolti nelle risposte pro-infiammatorie, TNFR2 supporta il *signalling* di TNFR1 inducendo risposte degenerative e dannose per i tessuti [10,11]. Inoltre, l'ablazione di TNFR2 monocitico/macrofagico riduce l'infiltrazione di cellule immunitarie nel sistema nervoso centrale (SNC) e sopprime la EAE, mentre l'ablazione del TNFR2 microgliale induce un microambiente pro-infiammatorio e accelera la progressione della malattia [12].



Visione schematica del clivaggio del tmTNF e interazione delle due isoforme con i rispettivi recettori

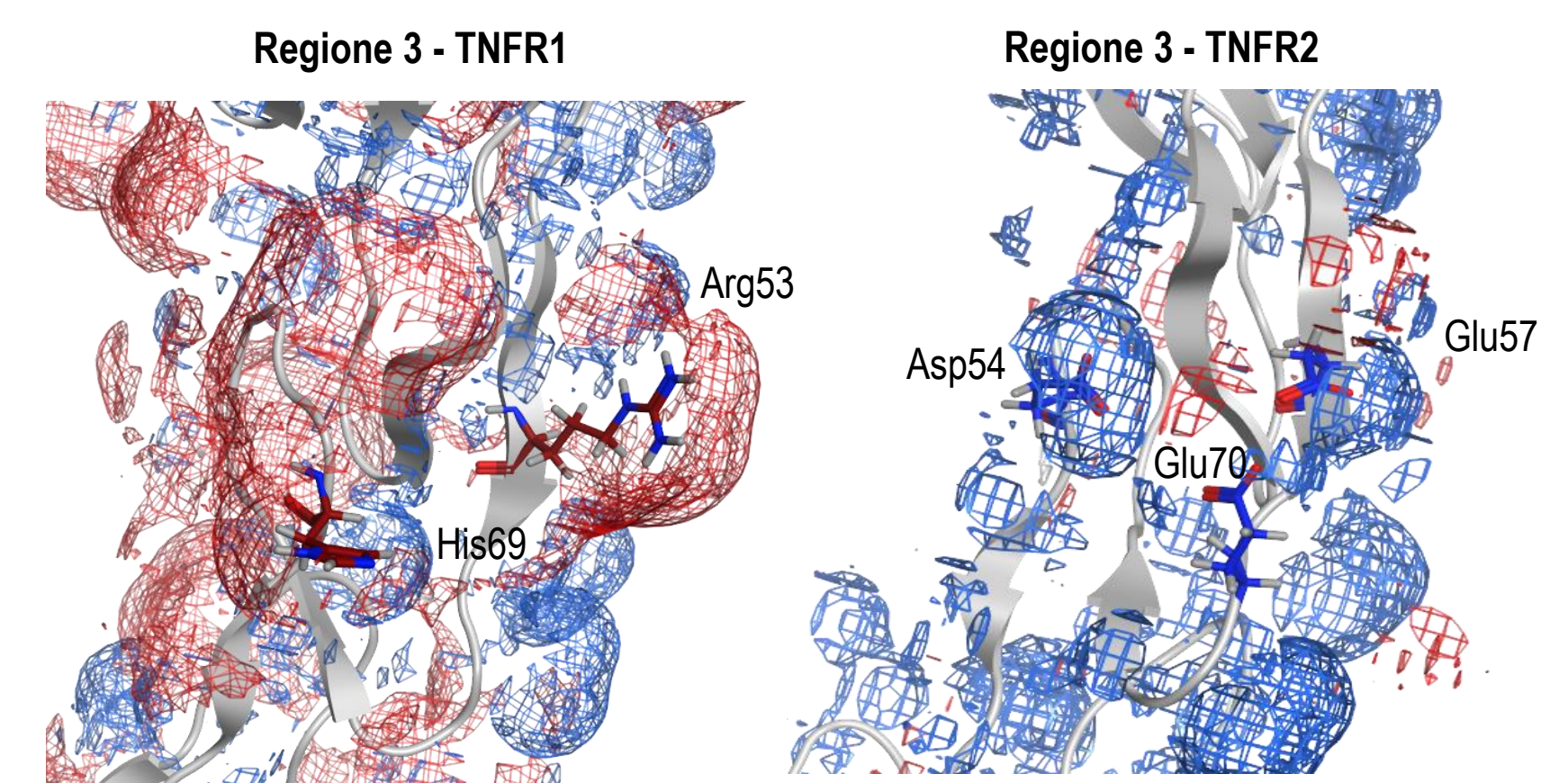
SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo di questo studio è stato quello di identificare composti in grado di migliorare e rafforzare selettivamente l'interazione tra tmTNF e TNFR2, per promuovere gli effetti riparativi nelle malattie demielinizzanti. Per raggiungere questo scopo è stato necessario:

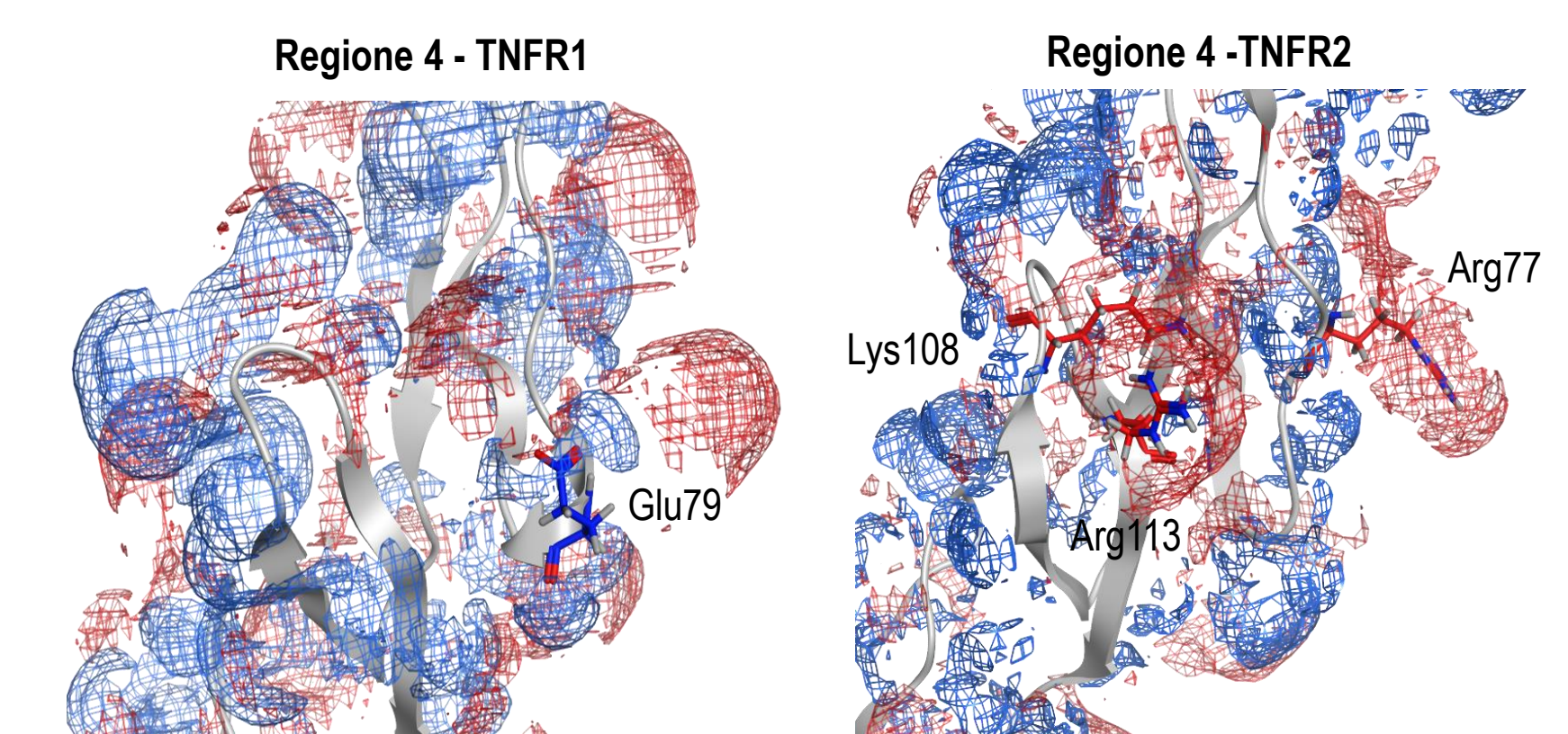
- studiare *in silico* la struttura di soITNF, tmTNF, TNFR1, TNFR2 e dei rispettivi complessi, sulla base dei dati sperimentali cristallografici disponibili [13];
- confrontare le strutture dei recettori TNFR1 e TNFR2, per identificare analogie e differenze alla base del riconoscimento di soITNF e tmTNF, utili per isolare composti selettivi per il complesso tmTNF::TNFR2;
- identificare con un *virtual high-throughput screening* (vHTS) composti in grado di rafforzare l'interazione TNFR2::TNF- α in un database di molecole disponibili commercialmente.

TNFR1 vs TNFR2

Confrontando le strutture di TNFR1 e TNFR2 emerge che, in entrambi i recettori, i domini principalmente coinvolti nell'interazione con TNF- α sono CRD2 e CRD3. Il sito di *binding* è organizzato in 4 regioni, di cui le regioni 3 e 4 sono quelle maggiormente coinvolte nell'interazione. In queste due regioni è possibile identificare le differenze da usare per aumentare l'affinità dei ligandi.



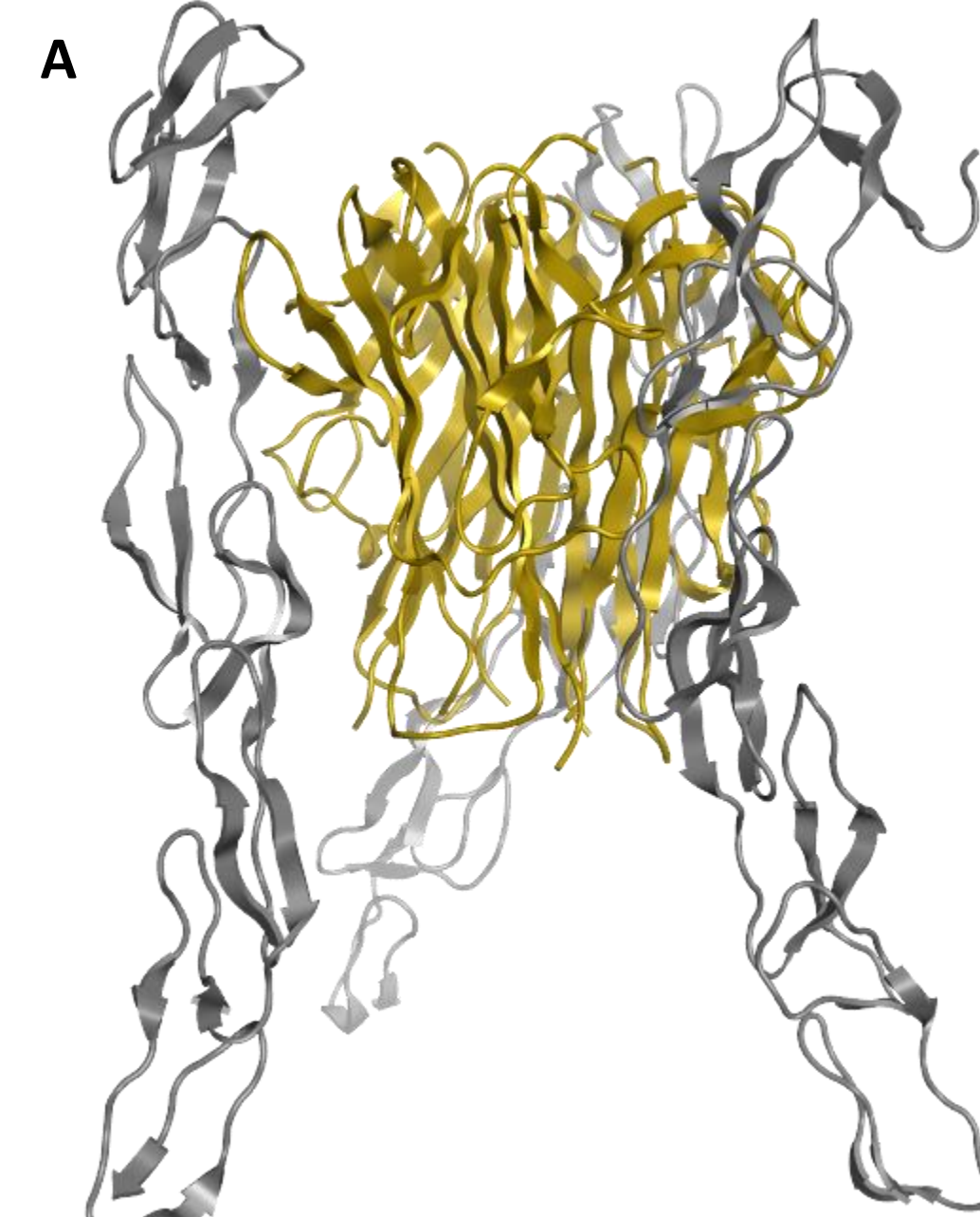
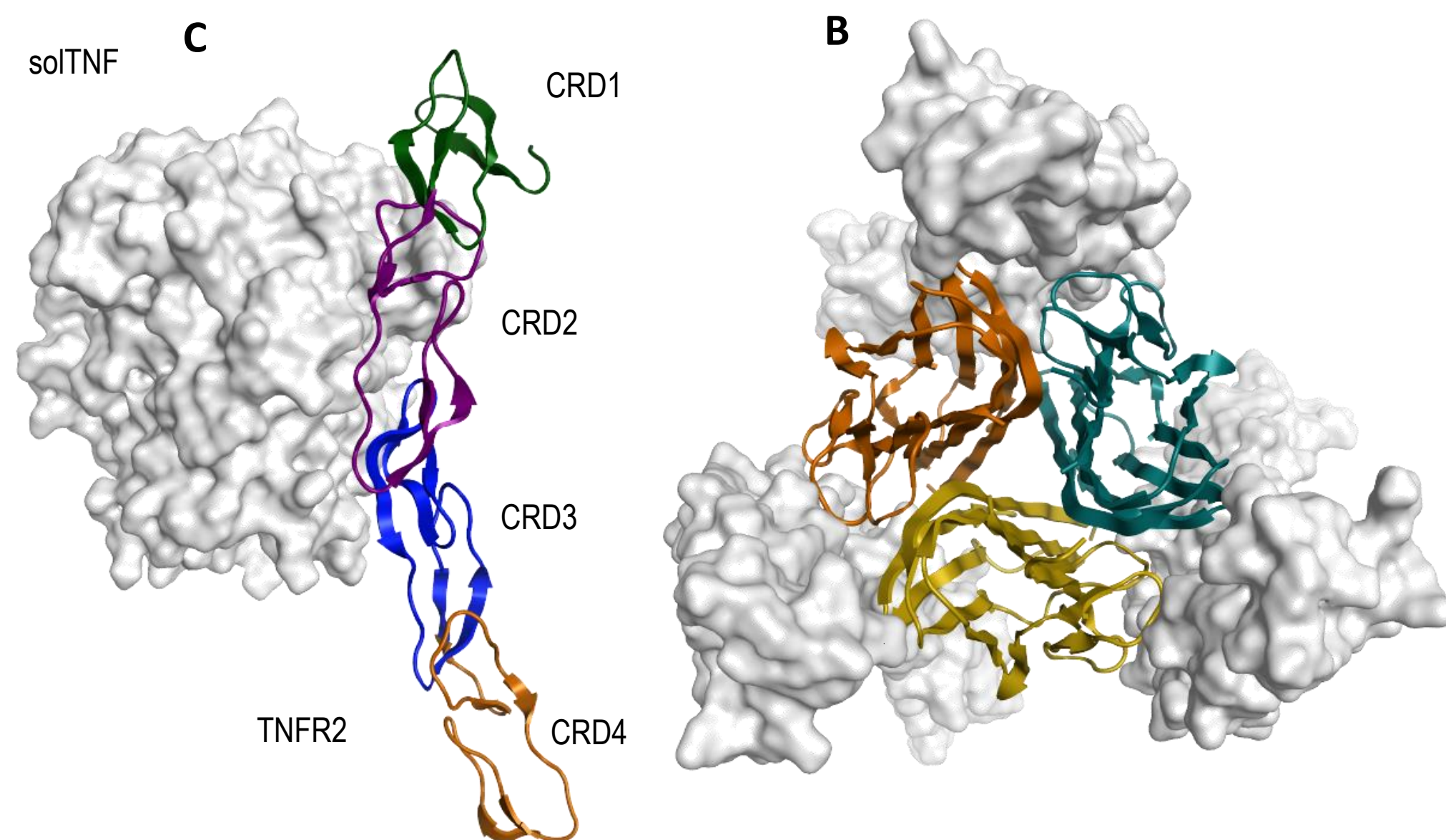
Il potenziale elettrostatico della superficie della regione 3 del TNFR1, grazie alla presenza di residui accettori come Arg53 e His69, è caratterizzato da una carica positiva maggiore (in rosso) rispetto alla corrispondente regione in TNFR2, in cui la presenza dei residui donatori Asp54, Glu57 e Glu70 conferisce un potenziale elettrostatico più negativo (in blu).



Nella regione 4 di TNFR1, invece, si riscontra un potenziale elettrostatico più negativo (in blu) a causa del residuo donatore Glu79, mentre nel TNFR2 il potenziale tende al positivo (in rosso) a causa della presenza dei residui accettori Arg77, Lys108 e Arg113.

IL COMPLESSO soITNF::TNFR2

Analizzando la struttura cristallografica del complesso soITNF::TNFR2 (PDB ID: 3ALQ) [14] emerge che il complesso è costituito dall'omotrimerico di soITNF legato a tre molecole di recettore con una stechiometria di 2:1. Da un punto di vista strutturale, la porzione extracellulare del TNFR2 è organizzata in 4 domini ripetuti e conservati denominati CRD (*Cysteine Rich Domain*). Ogni CRD (CRD1-4) è organizzato in moduli definiti da ponti disolfuro, 3 per ogni dominio. Diversi studi hanno suggerito che la presenza di questi ponti disolfuro sia essenziale per mantenimento del *folding* e per l'interazione con il *target*, e la stessa architettura è condivisa con TNFR1 e altre proteine della stessa superfamiglia.



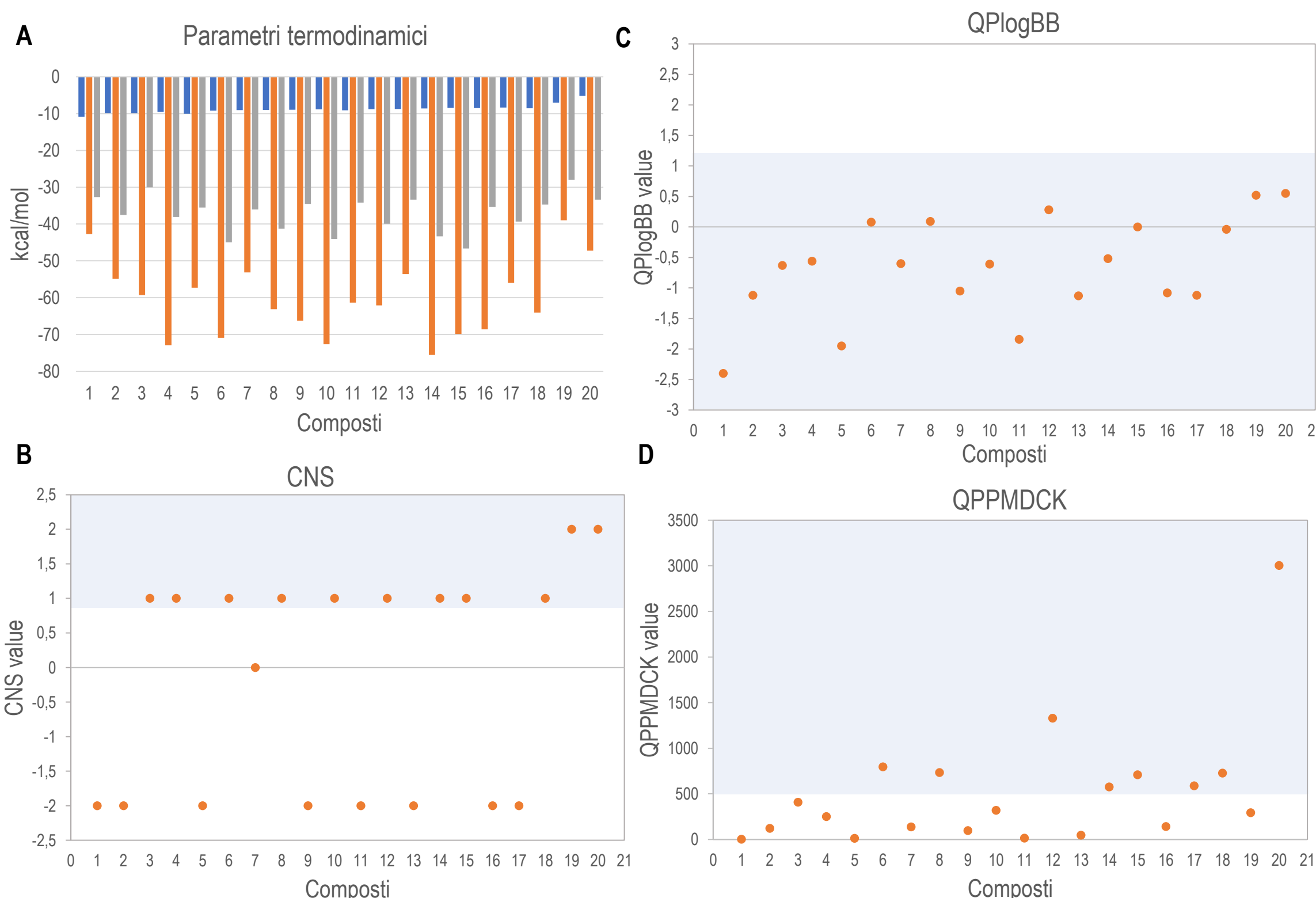
(A) Struttura 3D del complesso soITNF::TNFR2, in oro e grigio, rispettivamente. (B) Visione dall'alto del complesso, dove in verde, oro e arancio sono rappresentati i monomeri di soITNF, mentre in grigio le superfici dei recettori. Ciascuna molecola di recettore interagisce con due monomeri di soITNF. (C) Architettura strutturale di TNFR2: CRD1 (verde), CRD2 (viola), CRD3 (blu) e CRD4 (arancio). In grigio la superficie molecolare del soITNF, che evidenzia l'interazione con i domini CRD2 e CRD3 del recettore.

HIGH-THROUGHPUT SCREENING IN SILICO

Per identificare composti che favoriscano l'interazione TNF- α ::TNFR2, abbiamo condotto un vHTS [15] di una libreria di piccole molecole commercialmente disponibili (*Protein-Protein Interaction* (PPI) database, <http://www.asinex.com/>) con caratteristiche "drug-like" e capaci di riconoscere interazioni proteina::proteina. Per ridurre il rischio di fenomeni di inibizione competitiva con TNF- α , tra le regioni identificate come potenzialmente interessanti per il *targeting* selettivo, è stata scelta una regione ritenuta non cruciale nell'interazione del recettore con il ligando.

Dalle ~11'000 molecole presenti nel database, abbiamo selezionato i 20 composti più promettenti, cioè quelli che legano il sito di *binding* con i valori migliori di energia libera di *binding* (Extra Precision Glide docking score, XP GScore). Per queste 20 molecole sono stati calcolati i seguenti parametri termodinamici:

- MM-GBSA ΔG_{bind} , che calcola l'affinità dei ligandi per un target considerando il contributo di solvatazione/desolvatazione;
- $\Delta\Delta G$, la differenza tra l'energia di legame del complesso nella sua forma "holo" (TNF::TNFR2+ligando) e quella nella forma "apo" (TNF::TNFR2).



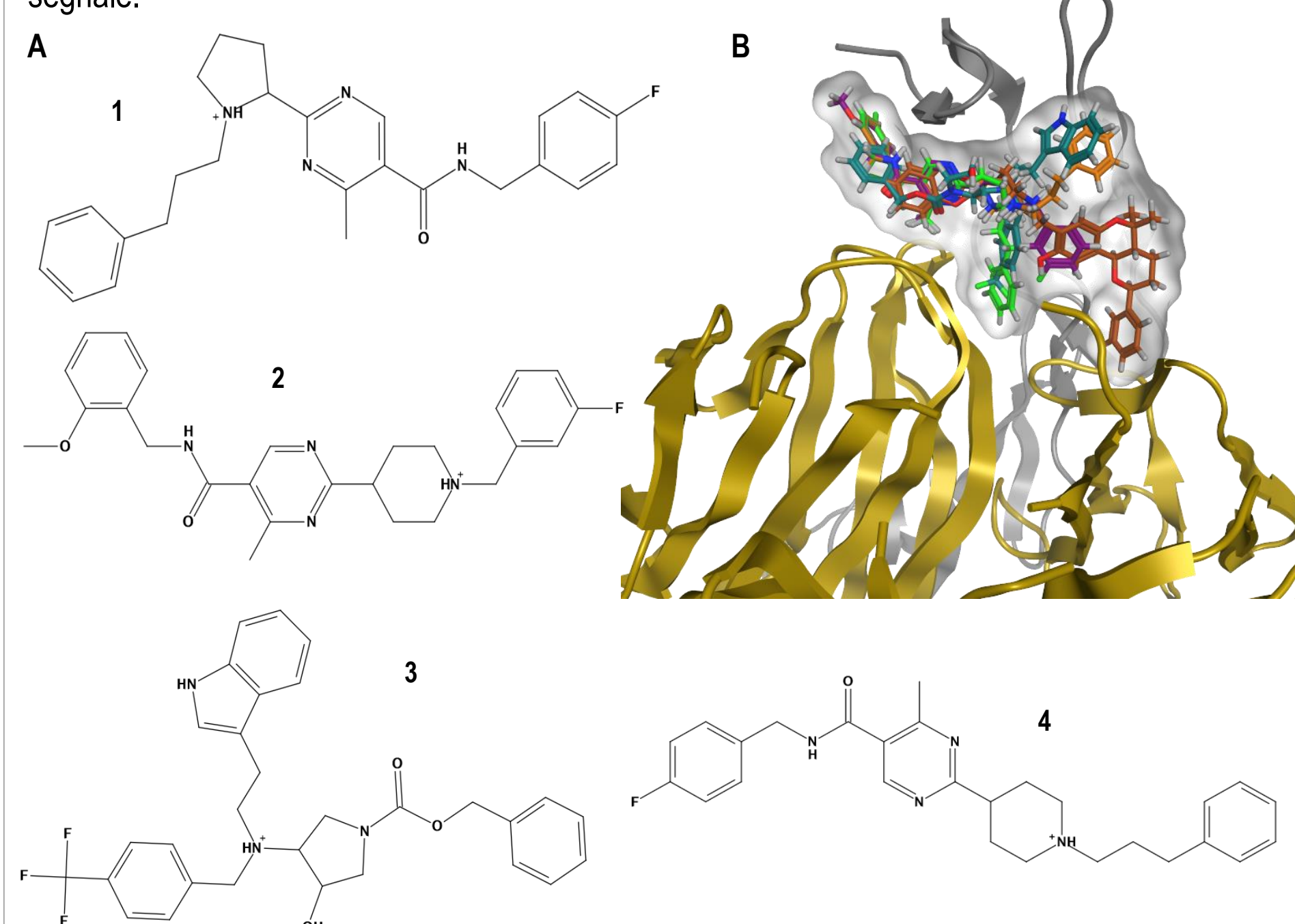
È stata valutata, inoltre, la potenziale attività dei 20 candidati nel sistema nervoso centrale calcolando *in silico* tre descrittori di PK: CNS, QPlogPP e QPPMDCK. Cinque dei venti composti analizzati (6, 8, 14, 15, 18) rientrano nel range di valori ideali per i descrittori QPlogBB e QPPMDCK, e presentano un valore di CNS=+1, sufficiente per l'attività nel SNC.

(A) I tre parametri termodinamici calcolati per ciascuno dei 20 composti: XP GScore (in blu), MM-GBSA ΔG_{bind} (in arancio) e $\Delta\Delta G$ (in grigio). (B) I valori, per ciascun composto, del descrittore CNS, indice generale dell'attività nel SNC. (C) I valori del descrittore QPlogBB, che predice il coefficiente di ripartizione tra barriera ematoencefalica (BEE) e sangue. (D) I valori del descrittore QPPMDCK, che predice la capacità dei composti di permeare la BEE, secondo un modello in cellule MDCK, usato per mimare la BEE. In azzurro il range di valori accettabile per ciascun descrittore.

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI COMPOSTI SELETTIVI vs TNFR2

Confrontando i parametri termodinamici di affinità e il profilo ADME delle 20 molecole selezionate *in silico* sono stati identificati 5 composti promettenti, potenzialmente in grado di favorire e stabilizzare il complesso TNF- α ::TNFR2.

Le più recenti terapie farmacologiche sviluppate contro le malattie demielinizzanti prevedono l'uso di prodotti biotecnologici che possono presentare diverse problematiche, tra cui l'ospedalizzazione del paziente, la veicolazione al SNC e gli elevati costi sanitari. Il nostro studio apre quindi la strada allo sviluppo di una terapia per la cura di queste patologie basata sull'utilizzo di piccole molecole farmacologicamente attive, in grado di promuovere l'attività del complesso TNFR2::TNF- α e di stimolare così i meccanismi rigenerativi a valle di questa via di segnale.



(A) Struttura chimica dei 5 ligandi selezionati. (B) Pose del docking e orientamento dei ligandi nel sito di binding. I 5 ligandi si inseriscono tra il TNFR2 (in oro) e il TNF- α (in grigio) promuovendo l'interazione.

Bibliografia

- Luetjig B et al, *J Immunol*, 1989;143:4034-8; 2. Moss ML et al, *Nature*, 1997;385:733-6; 3. Vandenabeele P et al, *Trends Cell Biol*, 1995; 5:392-9; 4. Wajant H et al, *Cell Death Differ*, 2003; 10:45-65; 5. Probert L, *Neuroscience*, 2015 Aug 27; 302:2-22; 6. Arnett HA et al, *Nat Neurosci*, 2001; 4:1116-1122; 7. Marchetti L et al, *J Biol Chem*, 2004; 279:32869-32881; 8. Hofman FM *J Exp Med*, 1989; 170:607-612; 9. Sharief MK *N Engl J Med*, 1991;325:467-472; 10. Brambilla R et al, *Brain*, 2011; 134:2736-2754; 11. Ruspi G et al, *Cell Signal*, 2014; 26:683-690; 12. Gao H et al, *Cell Rep*, 2017; 18(1):198-212; 13. Berman H.M. et al, *Nucleic Acids Research*, 2000; 28:235-242 14. Mukai Y et al, *Sci Signal*, 2010; 16(3):ra83; 15. Friesner, R. A et al, *J Med Chem*, 2006; 49, 6177-6196.