



Debby Saputera <debbysaputera@gmail.com>

EDIT (4) Debby Saputera

1 pesan

Debby Saputera (via Google Dokumen) <debbysaputera@gmail.com>

21 September 2020 pukul 10.34

Balas Ke: Debby Saputera <debbysaputera@gmail.com>

Kepada: debbysaputera@gmail.com

Cc: d.saputera@gmail.com

debbysaputera@gmail.com telah melampirkan dokumen berikut:

 **EDIT (4) Debby Saputera**

Salinan email ini disediakan hanya sebagai catatan Anda. Email ini tidak sama dengan yang diterima oleh kolaborator Anda. Click [here](#) to learn more.

**EDIT (4) Debby Saputera.docx**

736K

LAPORAN

EFEK ELLAGIC ACID DAN CALCIUM PHOSPHATE TERHADAP PROTEIN INFLAMASI TLR2 DAN TLR4

1. Pathway analysis

Untuk mengetahui korelasi antara kejadian trauma dan inflamasi, dilakukan studi literatur melalui jurnal. Selain itu eksplorasi pathway TLR (*toll like receptor*) yang mungkin terjadi di visualisasikan melalui database KEGG (map04620) <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.

Hasil:

Menurut Hua Shen et al., (2013), protein inflamasi yang berperan dalam kondisi steril inflamasi (kondisi trauma) ataupun disebabkan bakteri, diperankan oleh TLR2 dan TLR4.

Hal ini didukung oleh data KEGG Pathway yang menunjukkan bahwa TLR2 dan TLR4 memiliki interaksi secara langsung dengan Lipoprotein bakteri, dan lokasi protein berada di membrane sel (Gambar 1, kotak merah). Sehingga TLR2 dan TLR4 menjadi target protein untuk pengujian efektivitas ellagic acid dan calcium phosphate.

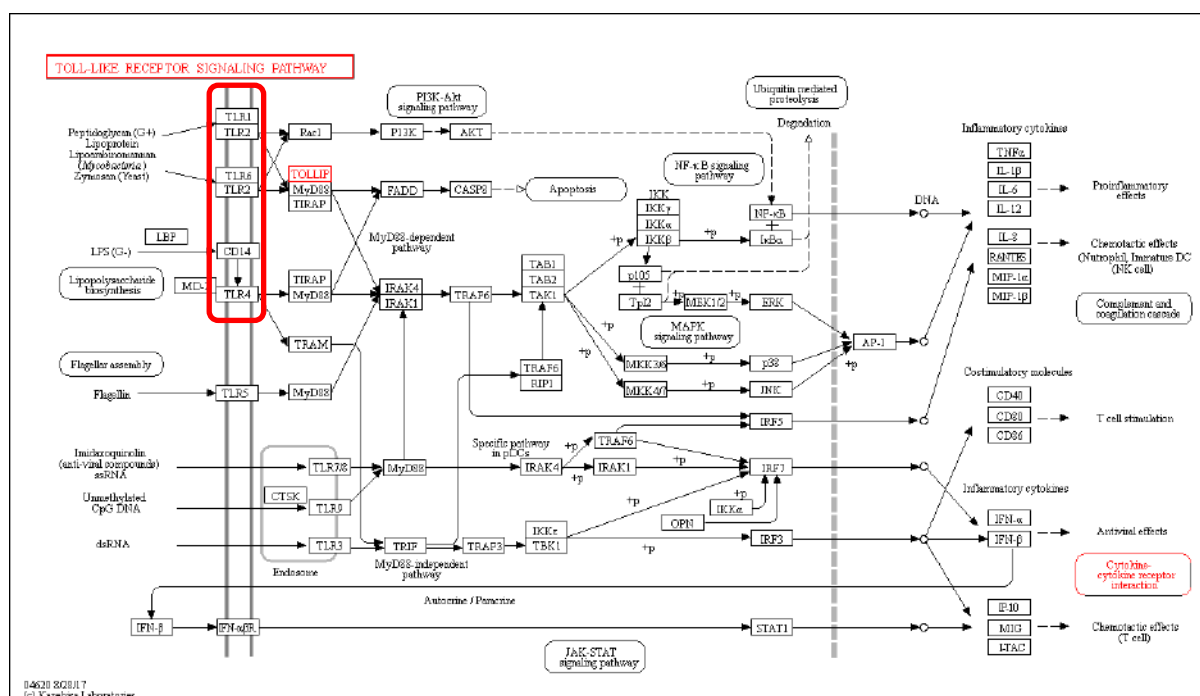


Figure 1 Toll like receptor signaling pathway

2. Uji Potensi ellagic acid dan Calcium Phosphate

Untuk menguji potensi allelgic acid dan calcium phosphate sebagai agen antiinflamasi, dilakukan uji biological activity menggunakan PASS Server (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>).

Hasil:

Hasil eksplorasi database 3D struktur dari pubchem dan data SMILE ditunjukkan oleh gambar 2. menunjukkan bahwa ellagic acid memiliki Pa (probability of activity) sebagai antiinflamasi sebesar 0,749. Skor diatas 0,7 menunjukkan keakuratan prediksi server.


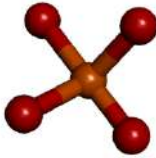
Ellagic acid (ID 5281855)	Calcium phosphate (ID 24456)
SMILE: <chem>C1=C2C3=C(C(=C1O)O)OC(=O)C4=CC(=C(C(=C43)OC2=O)O)O</chem>	SMILE: <chem>[O-]P(=O)([O-])[O-].[O-]P(=O)([O-])[O-].[Ca+2].[Ca+2].[Ca+2]</chem>
	

Figure 2 Struktur 3D dan SMILE ellagic acid dan calcium phosphate

3. Uji molecular docking

A. Docking per ligan ke reseptor

Untuk mengetahui interaksi antara ellagic acid dan calcium phosphate dengan TLR2 dan TLR4, dilakukan analisis molecular docking secara spesifik menggunakan software PyRx v.0.9.5. Kompleks TLR4-MD2 (PDB ID 3VQ1) dan TLR2/TLR6 (PDB ID 3A79) sebagai reseptor didapatkan dari PDB database (<http://www.rcsb.org/>). Informasi struktur 3D dan SMILE dari ellagic acid (ID 5281855) dan calcium phosphate (ID 24456) didapatkan dari database PubChem NCBI (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Molekular docking dilakukan dengan metode docking spesifik, yakni diarahkan pada sisi aktif kontrol menggunakan Patchdock (<https://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/>).

Hasil:

Signaling melalui TLR2 akan terjadi jika ia membentuk kompleks heterodimer dengan TLR1 ataupun TLR6 (Jin et al., 2007). Menurut Katja F. et al., (2008), kompleks TLR2/TLR1 ataupun TLR2/TLR6 tidak menunjukkan perbedaan jalur signaling. Sehingga beberapa kompleks TLR2 yang telah dimodelkan selalu membentuk heterodimer dengan TLR1 ataupun TLR6.

Molekular docking analisis menunjukkan bahwa TLR4 memiliki ikatan terkuat dengan LP5 sebagai kontrol, diikuti dengan ellagic acid dan calcium phosphate dengan skor berturut-turut -47.07; -35.82 dan -23.99 kcal/mol. Hasil yang sama juga ditunjukkan pada interaksi TLR2/TLR6 dengan PSX sebagai kontrol dengan binding affinity tertinggi -84.55 kcal/mol. Selanjutnya ellagic acid dan calcium phosphate dengan skor -50.12 dan -21.27 kcal/mol. Ellagic acid dan calcium phosphate melekat pada site yang sama dengan kontrol, di visualisasikan dengan Gambar 3 dan Gambar 4.

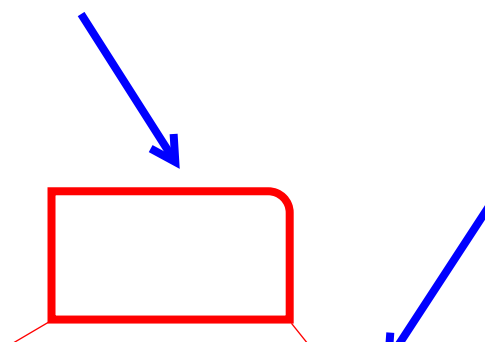
Data tersebut menunjukkan bahwa **Ellagic acid dan Calcium phosphate cenderung berikatan dengan kuat ke TLR2 dibandingkan TLR4, ditunjukkan dengan hasil binding affinity yang lebih kuat.** Hal ini mungkin terjadi karena saat small molekul berikatan dengan TLR4, maka ia harus berikatan terlebih dahulu dengan pocket khusus yang disebut dengan MD2 (Gambar 3). Sedangkan jika dilihat dari ikatan antara TLR2 dengan small molekul adalah ikatan yang langsung ke TLR4 (tanpa perantara) (Gambar 4).

Berdasarkan literatur, TLR4 mampu menginduksi pembentukan Th1-inducing cytokine IL12, p70 dan kemokin interferon gamma inducible protein IP-10. sedangkan stimulasi TLR2 tidak mampu menginduksi IL12 P70 dan interferon gamma IP10, namun menghasilkan IL12 inhibitor p40 homodimer yang membuat Th2 berkembang baik (Fabio dan Jack, 2001).

Selain itu, potensi ellagic acid dan calcium phosphate untuk menginduksi TLR2 atau TLR4 tidak sebaik kontrol LPS (PSX ataupun LP5). Sehingga terdapat potensi bahwa ellagic acid dan calcium phosphate tidak menginduksi inflamasi secara massif.

Table 1 Hasil docking per molekul ke reseptor TLR

Receptor	Ligan	Binding Affinity (kcal/mol)
TLR4-MD2	LP5	-47.07
	Ellagic acid	-35.82
	Calcium Phosphate	-23.99
TLR2/TLR6	PSX	-84.55
	Ellagic acid	-50.12
	Calcium Phosphate	-21.27



MD 2 pocket

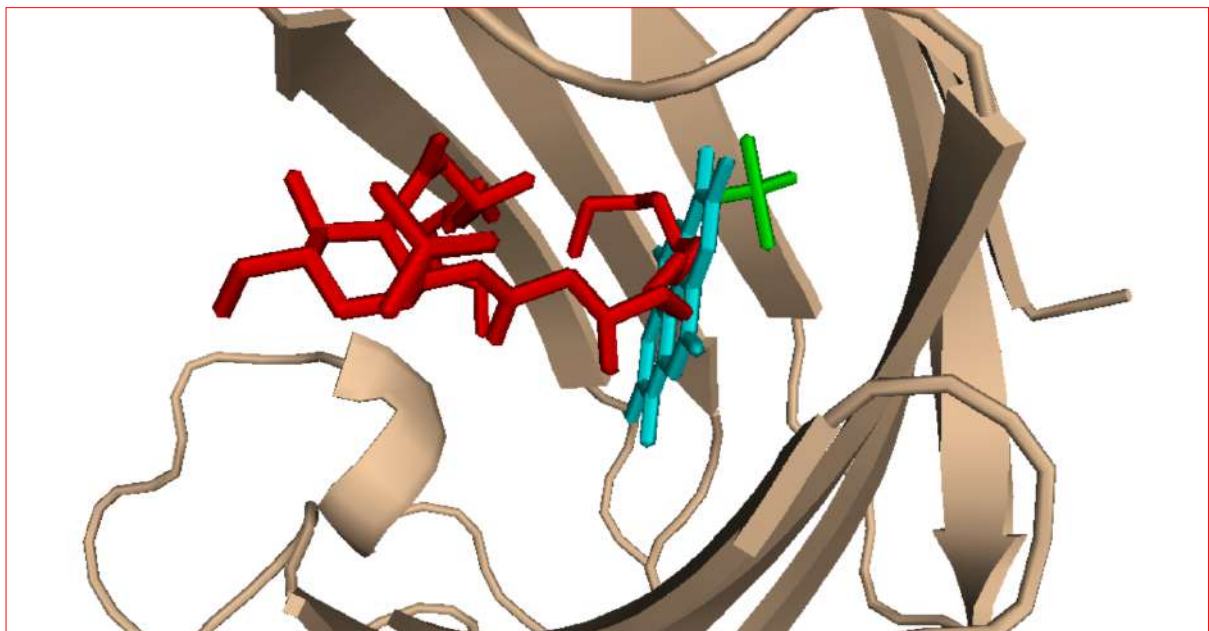
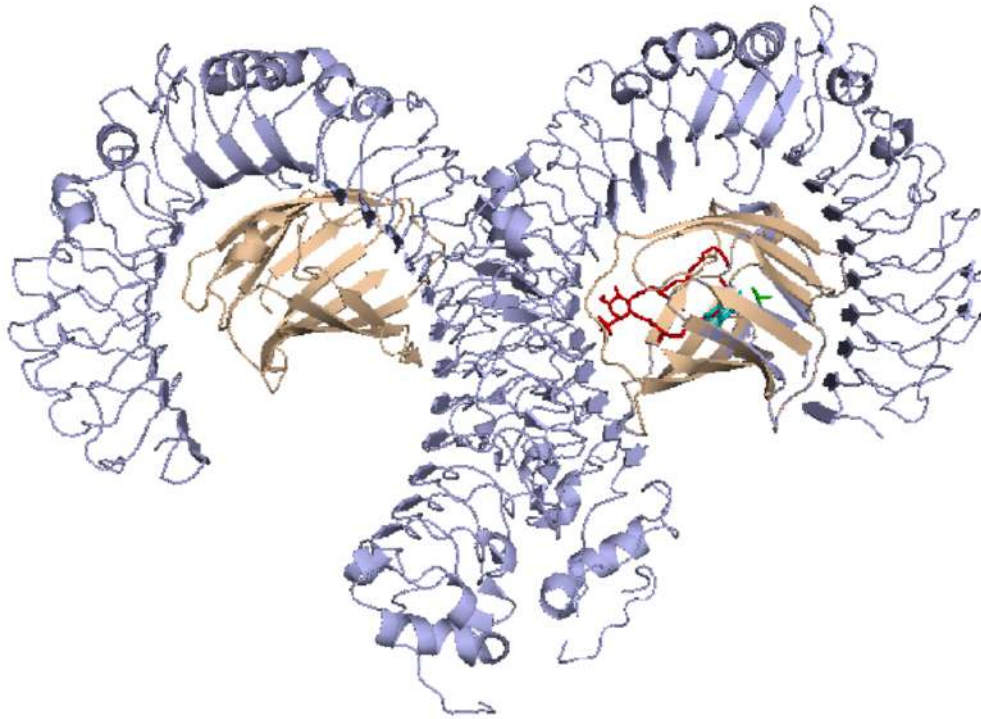


Figure 3 Interaksi molekular docking antara TLR4-MD2 (wheat; cartoon) dengan LP5 (kontrol) (merah;line), calcium phosphate (green; line) dan ellagic acid (cyan; line)

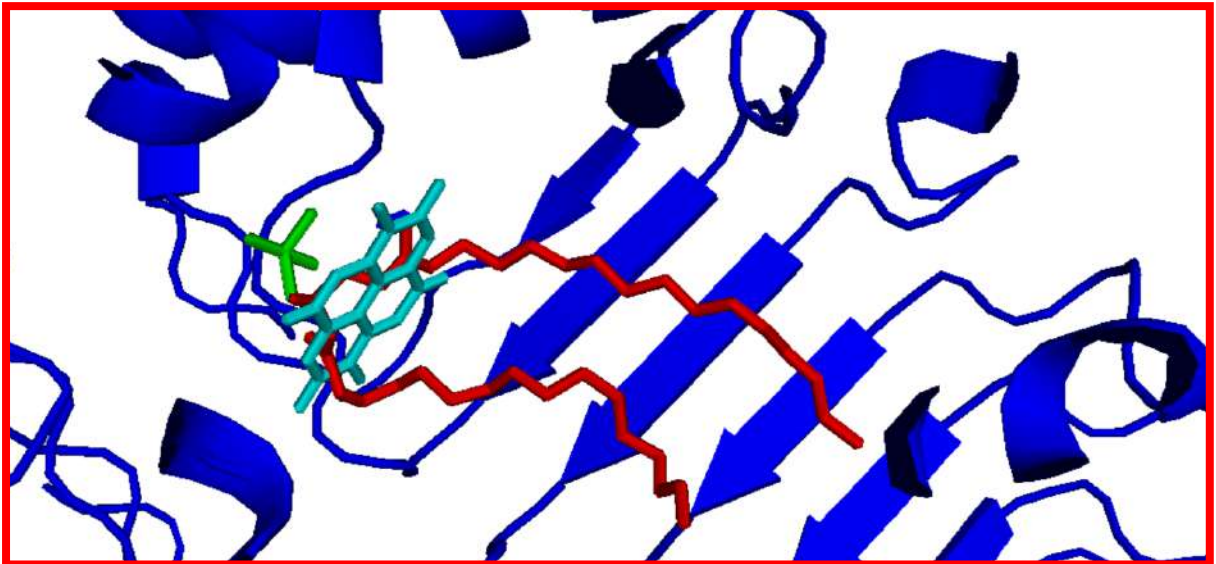
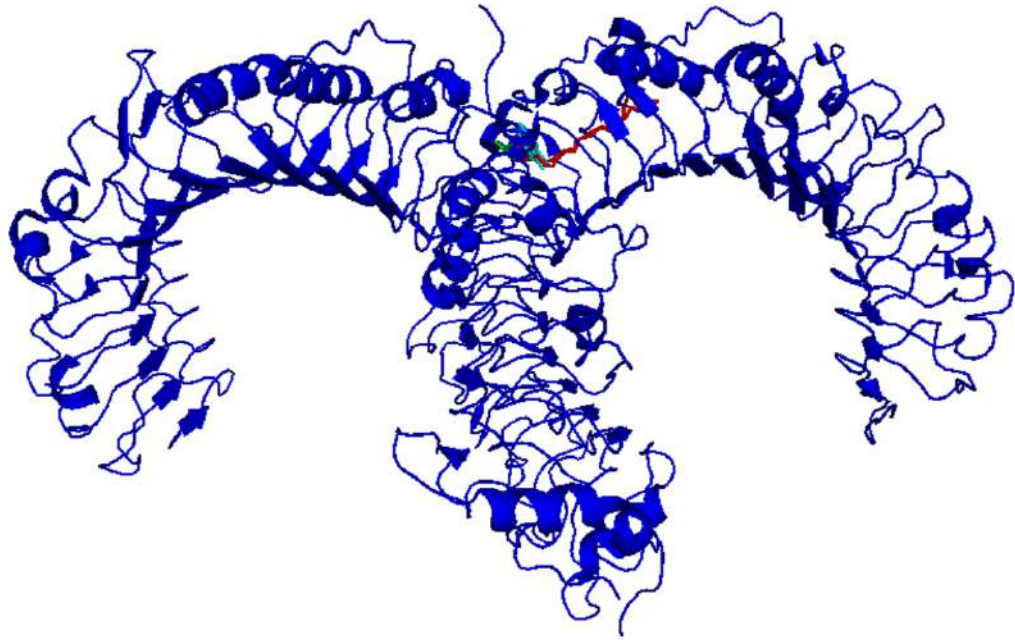


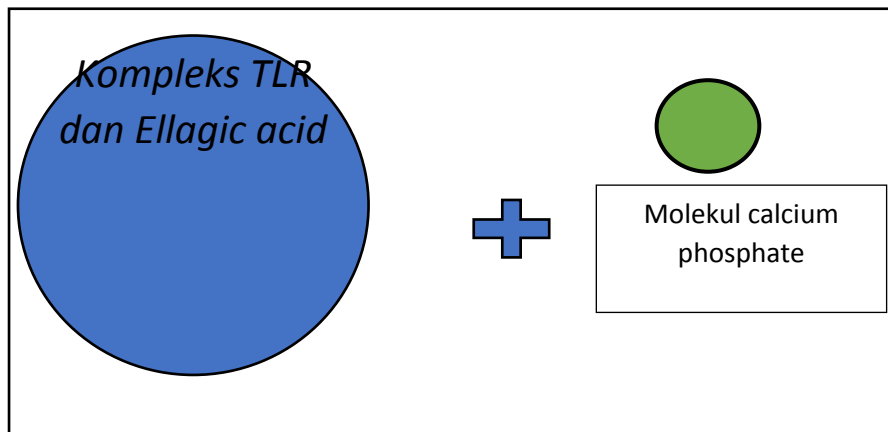
Figure 4 Interaksi molekular docking antara TLR2/TLR6 (blue; cartoon) dengan PXS (kontrol) (merah;line), calcium phosphate (green; line) dan ellagic acid (cyan; line)

B. Kombinasi docking Ellagic acid dan Calcium phosphate ke reseptor

Table 2 Hasil docking kombinasi ellagic acid dan calcium phosphate ke reseptor TLR

Receptor	Ligan	Binding Affinity (kcal/mol)
TLR4-MD2	Ellagic acid dan Calcium Phosphate	-21.28
TLR2/TLR6	Ellagic acid dan Calcium Phosphate	-22.04

Metode docking kombinasi:



Hasil menunjukkan bahwa kombinasi antara ellagic acid dan calcium phosphate ke reseptor TLR menunjukkan binding affinity yang menurun dibandingkan dengan docking per molekul (Table 1 dan Tabel 2). **Hal ini memperkuat dugaan bahwa kedua komponen tsb akan tetap melekat ke TLR namun tidak memiliki potensi induksi inflamasi yang kuat.** Selain itu, tempat pelekatan antara ellagic acid dan calcium phosphate berbeda, jika dibandingkan antara docking individual dan kombinasi (Gambar 3, 4 vs Gambar 5, 6).

Selaras dengan hasil awal, jika dibandingkan pelekatannya, kombinasi ellagic acid dan ca phosphate cenderung berikatan dengan TLR4 daripada TLR2, ditunjukkan dengan skor binding affinity yang lebih kuat.

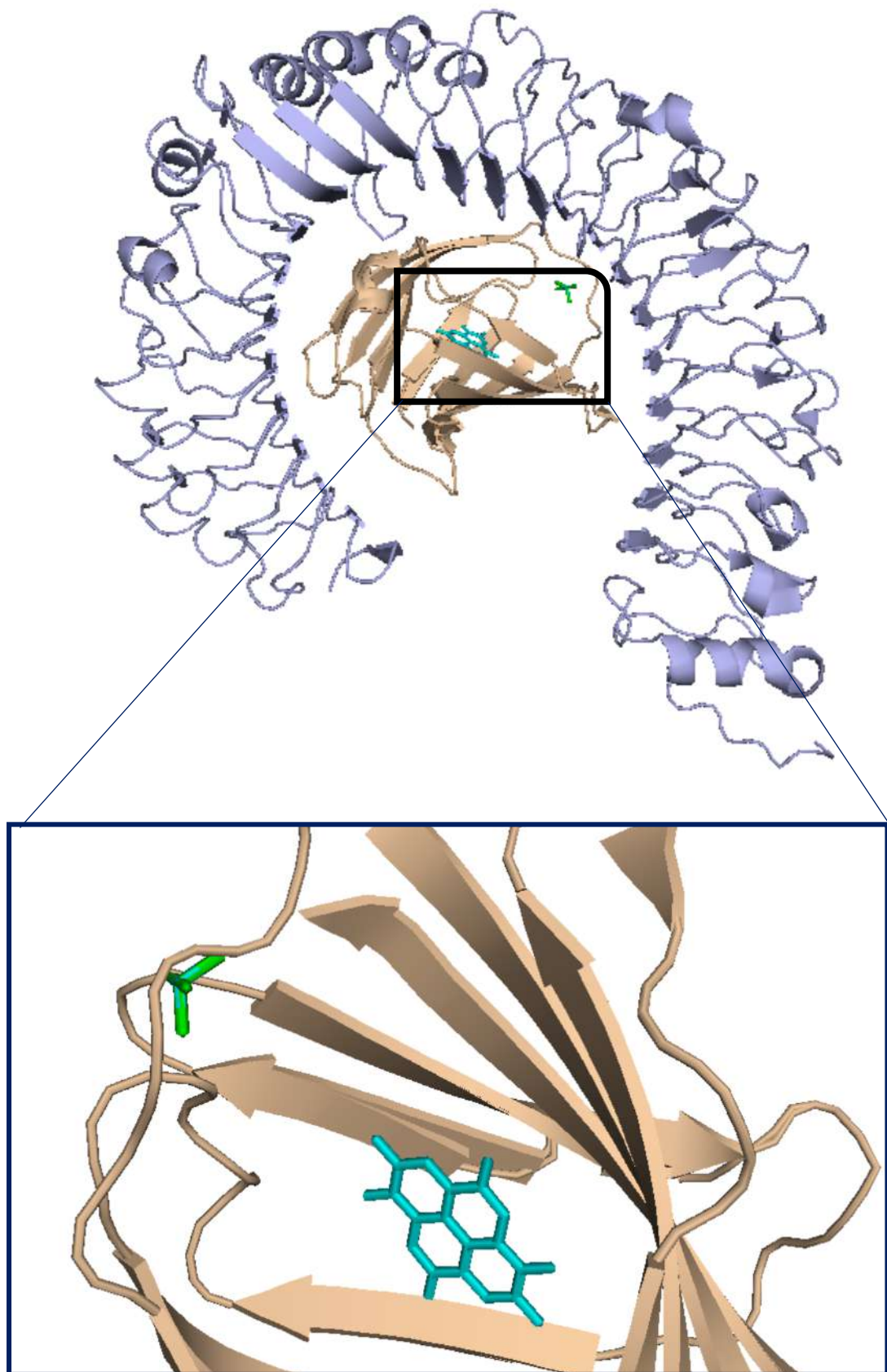


Figure 5 Interaksi molekular docking antara TLR4-MD2 (wheat; cartoon) dengan kombinasi calcium phosphate (green; line) dan ellagic acid (cyan; line)

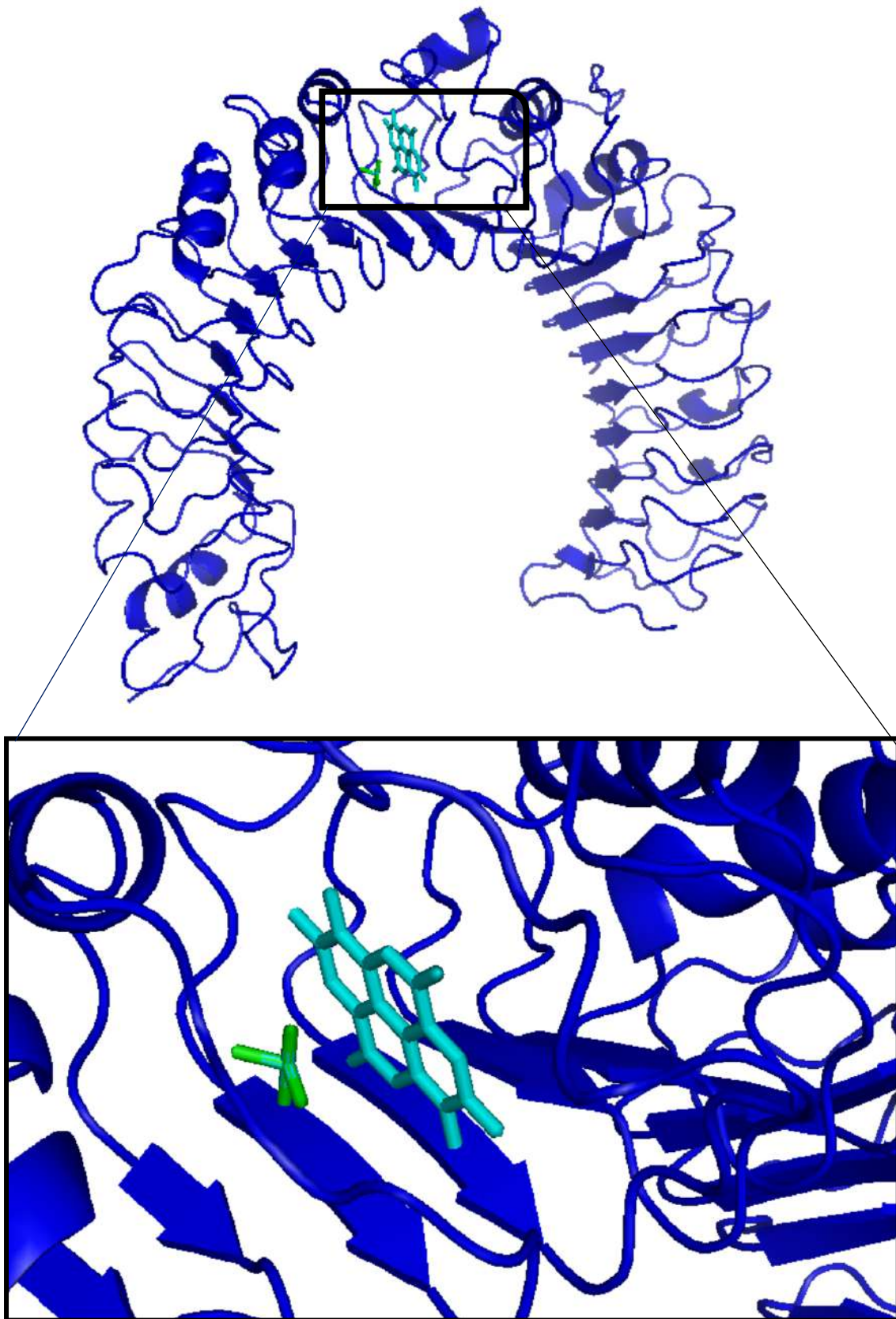


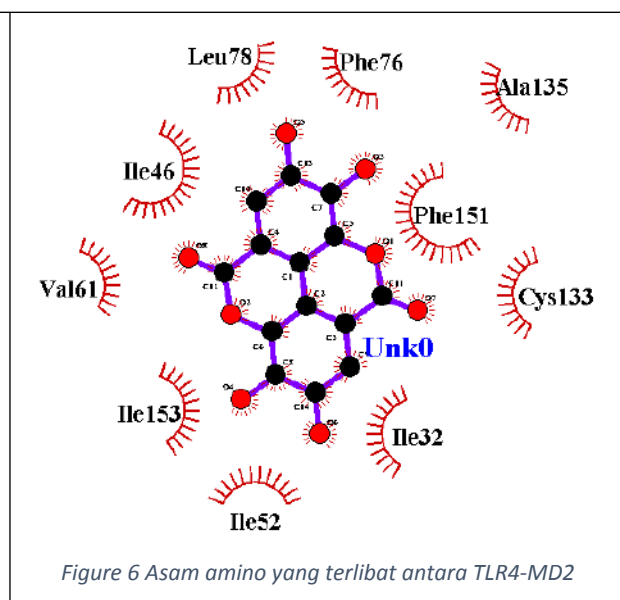
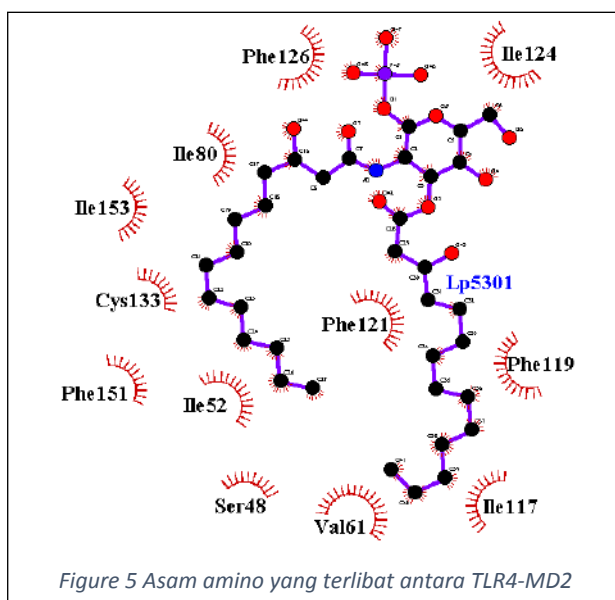
Figure 6 nteraksi molekular docking antara TLR2/TLR6 (blue; cartoon) dengan PXS (kontrol) (merah;line), calcium phosphate (green; line) dan ellagic acid (cyan; line)

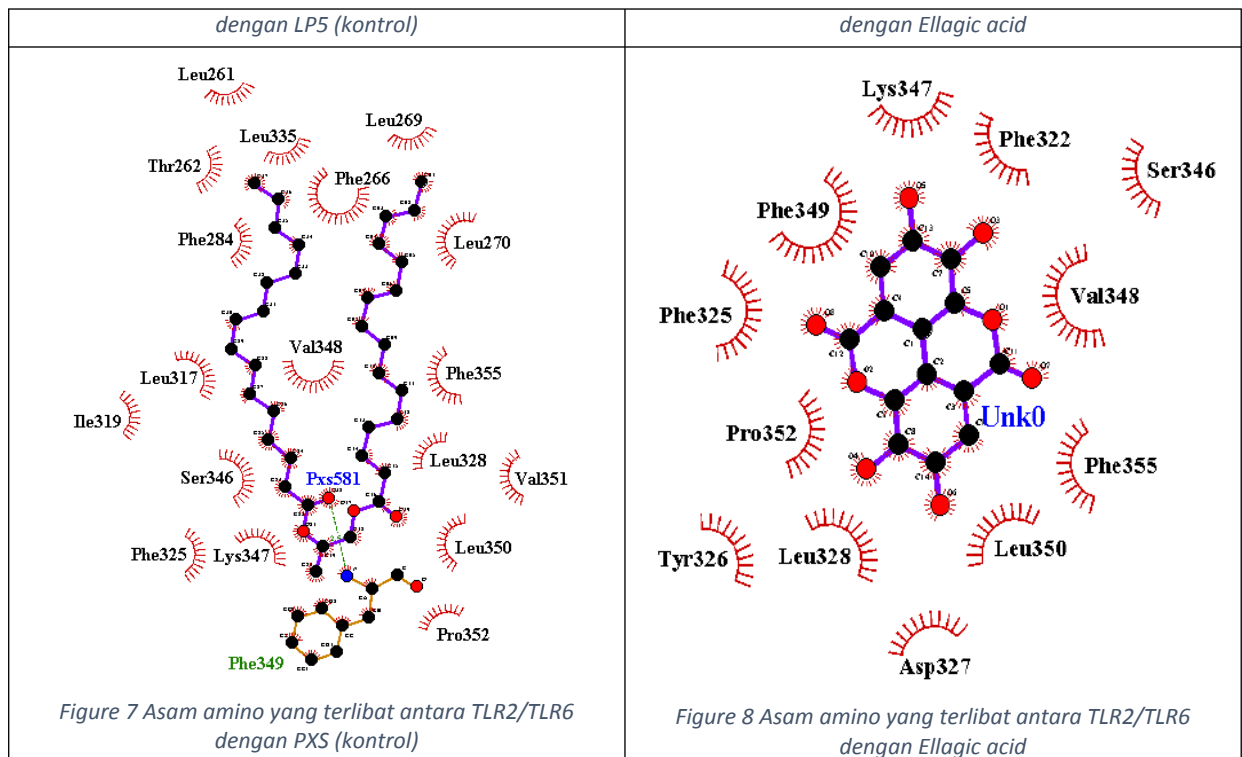
4. Interaksi molekular docking

Hasil menunjukkan bahwa kompleks TLR-ellagic acid memiliki beberapa sisi penempelan yang sama, ditunjukkan dengan asam amino yang ditandai dengan highlight.

Receptor	Ligan	Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofobik
TLR4-MD2 (3VQ1)	LP5	-	Phe126, Ile80, Ile153 , Cys133 , Phe151 , Ile52, Ser48, Val61, Ile117, Phe119, Ile124, Phe121
	Ellagic acid	-	Ile52, Ile153 , Val61, Ile46, Leu78, Phe76, Ala135, Phe151 , Cys133 , Ile32
	Calcium Phosphate	Tidak dapat di analisis ikatannya	
TLR2/TLR6 (3A79)	PSX	Phe349	Phe325 , Lys347 , Ser346 , Ile319, Leu317, Phe284, Thr262, Leu335, Leu261, Phe266, Leu269, Leu270, Phe355, Leu328 , Val351, Leu350 , Pro352
	Ellagic acid	-	Asp327, Leu328 , Tyr326, Pro352 , Phe325 , Phe349, Lys347 , Phe322, Ser346 , Val348, Phe355, Leu350
	Calcium Phosphate	Tidak dapat di analisis ikatannya	

Note: asam amino yang memiliki highlight menunjukkan similaritas asam amino yang berkontribusi pada control dan perlakuan





REFERENCES:

Katja Farhat et al., 2008. Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 83, March 2008

Jin MS, Kim SE, Heo JY, Lee ME, Kim HM, Paik SG, Lee H, Lee JO. Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*. 2007 Sep 21; 130(6):1071-82.

Hua Shen, Daniel Kreisel and Daniel Robert Goldstein. Processes of Sterile Inflammation. <http://www.jimmunol.org/content/191/6/2857>. doi: 10.4049/jimmunol.1301539. *J Immunol* 2013; 191:2857-2863

Fabio Re and Jack L. Strominger. 2001. Toll-like Receptor 2 (TLR2) and TLR4 Differentially Activate Human Dendritic Cells. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 37692-37699. doi: 10.1074/jbc.M105927200