

Pengaruh Residu Fleksibel terhadap Nilai Afinitas Ikatan Protein dengan Ligan *Native*-nya menggunakan PyRx-vina

Broto Santoso

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

Email: Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:

Residu fleksibel;
ligan native; PyRx-
vina, binding
affinity, AutoDock

Komputasi dockingsudah menjadi teknik alternatif yang membantu mempercepat proses penemuan obat baru dalam bidang Kimia Medisinal. Hasil kajian sebelumnya menyatakan bahwa penentuan volume gridbox dalam metode in silico menjadi kunci sukses pendekatan komputasi. Penelitian ini ditujukan untuk menilai pengaruh residu fleksibel protein terhadap nilai afinitas ikatan protein-ligan. Sejumlah 32 protein terpilih yang berasal dari Mycobacterium tuberculosis telah diunduh dari www.rcsb.org, dilakukan preparasi, docking molekular dan interaction profiling menggunakan software Chimera, PyRx-vina, PLIP dan PyMOL. Docking residu fleksibel telah berhasil dilakukan terhadap 97% protein karena terdapat satu protein yang tidak selesai proses komputasinya. Residu fleksibel berhasil memberikan peningkatan afinitas ikatan pada 44% protein target sedangkan 17 diantaranya belum menunjukkan adanya perbedaan dibandingkan nilai dasarnya. Hasil ini memperlihatkan bahwa selain penentuan volume gridbox, pemilihan dan pemanfaatan residu aktif menjadi fleksibel selama komputasi akan memperpendek jarak pembeda antara prediksi dan nilai sesungguhnya. Kajian berikutnya yang penting untuk dieksplorasi adalah seberapa besar pengaruh dan hubungan antara pemilihan residu fleksibel dengan deskriptor ligan native atau ligan target.

1. PENDAHULUAN

Jumlah obat baru yang berhasil didapatkan menjadi tidak bernilai apabila dibandingkan dengan waktu dan biaya penelitian yang telah dilakukan. Seiring tahun berjalan, teknik komputasi molekular mulai dan banyak digunakan sebagai jembatan penghubung antara ilmu prediksi secara matematis dengan hasil uji laboratorium. Komputasi *docking* sudah menjadi teknik alternatif yang membantu mempercepat proses penemuan obat baru dalam bidang Kimia Medisinal. Teknik ini memerlukan beberapa parameter kendali yang harus ditentukan di awal proses perhitungannya. Hasil kajian sebelumnya (Santoso, 2017) menyatakan bahwa penentuan volume gridbox dalam metode *in silico* menjadi kunci sukses pendekatan komputasi. Selain itu, validasi proses *docking* menjadi wajib dilakukan sebelum meneliti interaksi senyawa target terhadap protein yang diinginkan. Di alam, protein target suatu penentu terjadinya penyakit memiliki kemampuan untuk berubah bentuk secara dinamis (fleksibel).

Terdapat dua jenis komputasi bagi protein atau pun ligan, yaitu komputasi dinamis dan komputasi rigid (kaku). Elokey and Doerksen (2013) menyatakan bahwa protein atau reseptor bisa dalam 4 tipe, diantaranya adalah reseptor rigid dan reseptor fleksibel. Selama ini, *docking* molekular dikerjakan pada protein target yang dibiarkan rigid, berasal dari hasil pengukuran secara kristalografi X-ray. Teknik molekular dinamik diperlukan untuk memperoleh reseptor yang dinamik dalam kondisi yang diinginkan. Gromacs merupakan salah satu perangkat lunak yang dapat memenuhi tujuan ini, namun kebutuhan akan

spesifikasi perangkat keras komputer yang tinggi dan lamanya proses komputasi yang harus dijalankan membuatnya tidak dapat dan fleksibel untuk digunakan oleh setiap peneliti.

Ada beberapa alternatif dalam melakukan dinamisasi protein secara parsial yang ditawarkan diantaranya melalui skema tertentu seperti BP-Dock (Bolia *et al.*, 2014), VORFFIP-Driven Dock: V-D2OCK (Segura *et al.*, 2015), atau AutoDockFR (Ravindranath *et al.*, 2015). Software PyRx dibantu vina dapat menjadikan protein bersifat fleksibel di beberapa residunya namun tidak untuk seluruhnya. Penelitian ini ditujukan untuk menilai pengaruh residu fleksibel protein terhadap nilai afinitas ikatan protein-ligan menggunakan AutoDock-vina dibantu PyRx sebagai perangkat *graphical user interface* (GUI).

2. METODE

Sejumlah 32 protein terpilih yang berasal dari *Mycobacterium tuberculosis* telah diunduh dari www.rcsb.org dengan beberapa kriteria diantaranya adalah organisme sumber protein harus berasal dari *M. Tuberculosis*, menggunakan teknik kristalografi x-ray yang setidaknya memiliki resolusi kurang dari 2,5 Å, dan harus mempunyai ligan *native* sebagai ligan target dalam penelitian. Protein dan ligan telah dilakukan preparasi pendahuluan, *docking* molekular dan *interactionprofiling* menggunakan beberapa software pendukung seperti Chimera, PyRx-vina, OpenBabel, PLIP dan PyMOL (Trott, 2017; Salentin *et al.*, 2015; Dallakyan and Olson, 2015; O'Boyle *et al.*, 2011; Pettersen *et al.*, 2004; Berman *et al.*, 2000).

Data yang diperoleh berupa nilai afinitas ikatan ligan protein, kemudian dilakukan analisis lanjutan terhadap 3 hasil docking terbaik dengan residu fleksibel, sederhananya yang memiliki selisih afinitas ikatan terbesar dengan docking jika menggunakan protein rigidnya masing-masing. Protein beserta ligan *native* yang digunakan dalam penelitian ini disajikan secara lengkap pada Tabel 1 dengan rincian residu yang terlibat.

Tabel 1. Protein target yang digunakan dalam penelitian

No	Kode PDB	Residu yang terlibat interaksi	Native	R (Å)
1	1u6s	ser28, trp32 , ala112, arg151, ser276 , ala306	dcc	2,30
2	2c27	glu36, glu179 , lys224, glu234 , tyr282	ma8	1,80
3	2c92	ser25, trp27 , ala59, glu61, val81 , gln86, thr87, asn114 , arg128 , leu138 , arg128 , asn114 , lys138	tp6	1,60
4	2fp2	arg49 , lys60, asp69, gln76 , glu106, glu109, arg134	tsa	1,64
5	2q3d	lys44, thr71 , ser72 , asn74, thr75, gln144, gly178, thr179, thr182, ser266	pda	2,20
6	2vi5	ile60 , glu61, val81 , ile83, asn114	y19	2,30
7	2vvo	asp11 , his12 , gly70, ser71 , gly74, glu75, arg113, his102 , asn103 , arg137 , arg141	a6p	1,85
8	2vvp	asp11 , his12 , gly70, ser71 , gly74, his102 , asn103 , arg113 , arg137 , arg141	r52	1,65
9	2w0a	his259 , tyr76 , ala256 , leu321	cii	1,60
10	2w09	his259 , tyr76 , ala256 , leu321	cm9	1,57
11	2x22	tyr158 , ala198 , phe149 , tyr158 , val203 , met199 , met161 , ile202	tcu	2,10
12	2y1d	ser152 , ser177 , asn218 , lys219	34f	2,05
13	3c8z	gly44, thr46 , thr83, asn81 , trp227, gly249, asp251 , ile283, met282 , gly54	5ca	1,60

Tabel 2. Protein target yang digunakan dalam penelitian (lanjutan)

No	Kode PDB	Residu yang terlibat interaksi	Native	R (Å)
14	3n76	tyr24, asn75, his81, his101, ile102, ser103, arg112, asn12, glu20, tyr24, arg15	ca2	1,90
15	3st6	lys205, gly270, tyr385, arg405, gly419, lys438	rve	1,75
16	3zei	thr71, ser72, lys215, phe145, phe227	awh	2,00
17	3zhx	ser152, ser177, ser213, asn218, lys219, met267, MN401	fm6	2,00
18	3zhy	ser152, ser177, asn218, lys219, met205, met267, MN401	fm6	2,30
19	3zhz	ser152, glu153, ser177, ser213, asn218, glu222	fm7	2,25
20	3zi0	ser152, ser177, asn209, ser213, asn218, lys219, pro265	fm8	1,90
21	4c6u	cys171, his311, his345	tlg	2,40
22	4c6w	gln333	m7u	1,70
23	4c70	his311, his345, phe237	tlj	1,75
24	4c72	his311, his345	tlg	1,50
25	4kij*	asn75, his81, ile102, ser103, arg112, tyr24, asn12	kij	2,80
26	4km0	ile5, ile14, asp27, phe31, phe39	cp6	1,30
27	4mue	met40, his44, lys160, val187, ser196, ser197, gly46, leu50, gly158, thr186	2dh	2,06
28	4muf	pro38, met40, his44, his47, gly46, leu50, val143, gly158, lys160	2dj	2,50
29	4xt4	asn44, asn67, phe71	44w	1,89
30	5ibd	phe168, ser237, val78, thr229	ggj	1,77
31	5ibe	phe168, ser237, val78, thr229	69m	1,62
32	5mtr	tyr158, gln214, phe149, tyr158, met161, ala198, ile202, val203	xt0	2,00

Catatan. * memiliki resolusi X-ray lebih dari 2,5Å. Residu memiliki ikatan hidrogen dengan ligan (hitam atau ungu/atau digarisbawahi (residu yang terpilih untuk digunakan)), berinteraksi secara hidrofobik (hijau) dan berada pada rantai protein berbeda dalam protein target yang sama (hitam ditebalkan).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 3 memperlihatkan hasil preparasi awal terhadap protein, penentuan pusat massa dan volume *gridbox* sistem yang telah digunakan dalam *docking* molekular pada penelitian ini. Setiap ligan *native* yang terdapat dalam protein menunjukkan perbedaan nilai antara volume molar molekular dengan area polar pada permukaan senyawanya.

Tabel 3. Nilai pusat massa dan volume *gridbox* (Å³) 32 protein target yang diteliti

masscenter			No Urut PDB	gridboxsize (Å)			PolSurf Area ¹	Molar Vol ²
X	Y	Z		X	Y	Z		
14,293	-22,164	-2,238	1	35	40	30	418	585,4
3,851	3,707	17,788	2	30	25	40	274	259,4
-23,025	1,032	5,258	3	25	25	25	239	267,9
-5,207	5,575	30,683	4	25	25	30	104	141,3
36,126	12,907	44,575	5	35	40	30	159	208,8
11,296	6,106	-15,339	6	25	20	20	181	196,3
34,34	10,806	-10,157	7	20	20	30	167	132,0

27,292	-9,847	14,925	8	35	40	30	154	127,6
-16,768	-1,766	69,124	9	35	25	25	71	267,5
-17,336	-1,728	69,286	10	40	35	20	96	301,1
-16,19	-35,898	15,695	11	40	40	30	29	273,6
42,87	9,539	22,936	12	40	25	25	108	201,2
33,106	14,363	-34,701	13	45	30	35	265	213,2
-38,917	-60,904	-48,23	14	25	30	40	107	230,6
1,74	-37,756	16,291	15	25	25	35	104	146,9
-21,455	10,089	-5,56	16	40	40	35	142	290,9
20,342	21,987	-17,382	17	40	35	30	108	263,2

Tabel 4. Nilai pusat massa dan volume *gridbox* (\AA^3) 32 protein target yang diteliti (lanjutan)

masscenter			No Urut PDB	gridboxsize (\AA)			PolSurf Area ¹	Molar Vol ²
X	Y	Z		X	Y	Z		
25,849	9,688	27,355	18	40	55	45	108	263,2
20,284	23,416	-16,470	19	45	35	35	120	362,8
42,237	22,406	23,676	20	35	25	25	139	309,1
-18,597	34,614	-31,203	21	25	35	30	80	184,4
19,821	28,676	30,026	22	30	35	30	129	689,0
-6,542	-21,959	7,462	23	30	35	25	63	207,3
-6,469	-21,682	7,435	24	30	35	20	80	184,4
-29,363	-16,567	56,054	25	20	30	20	133	181,3
1,828	-4,671	1,146	26	30	30	35	78	190,5
14,883	10,142	1,179	27	30	30	35	123	300,0
15,522	10,273	1,553	28	30	35	30	123	337,0
21,489	26,864	20,247	29	25	40	45	92	100,2
-8,728	18,327	3,431	30	35	35	30	90	285,4
-8,525	18,216	3,440	31	35	35	25	101	259,8
24,221	-3,366	39,115	32	30	40	30	84	277,2

Satuan *polar surface area*(1): \AA^2 dan *molar volume* (2): cm^3 yang bersumber dari www.chemspider.com

Perbedaan ini mempengaruhi jumlah ikatan hidrogen yang terlibat dan interaksi hidrofobik yang dimiliki ligan *native* terhadap *binding site pocket* dari protein target. Perhitungan afinitas ikatan sangat dipengaruhi oleh jumlah interaksi ligan-protein yang terjadi. Nilai koordinat pusat massa sistem didasarkan pada pusat massa ligan *native* sebagai pusat dari *gridbox* komputasi. Besaran angka penentu volume *gridbox* diperoleh dengan mempertimbangkan bahwa ligan *native* telah dipastikan berada di dalam *gridbox* dan dapat memenuhi semua bagian dari *binding site pocket* yang diperoleh dari hasil pencarian menggunakan *DogSiteScorer* secara online (Volkamer *et al.*, 2012).

Hasil *docking* molekuler memperlihatkan bahwa terdapat 17 protein atau 53 % dari total protein yang tidak terpengaruh dengan adanya intervensi residu fleksibel. Hal ini ditunjukkan dengan nilai afinitas ikatannya yang masih lebih baik dibandingkan dengan afinitas ikatan pada protein dengan residu fleksibel. Perbedaan afinitas ikatan ligan-protein untuk kedua perlakuan berada pada rentang 0,1-1,5 kkal/mol (Tabel 3).

Hanya 44 % (14 protein) yang menunjukkan adanya peningkatan nilai afinitas ikatan menjadi lebih baik ketika diberikan perlakuan residu fleksibel pada protein targetnya. Perlakuan residu fleksibel menghasilkan jenis dan jumlah interaksi ligan-protein yang berbeda (Gambar 1). Terdapat satu protein target (PDB-ID: 4c6w) dimana ligan *native* protein tersebut tidak memberikan nilai afinitas ikatan setelah diberikan perlakuan residu

fleksibel baik terhadap residu yang terlibat secara ikatan hidrogen atau berinteraksi secara hidrofobik. Adanya hasil yang demikian dikarenakan pengaruh dari ligan yang lebih membawa sifat hidrofobik dibandingkan dengan sifat polarnya.

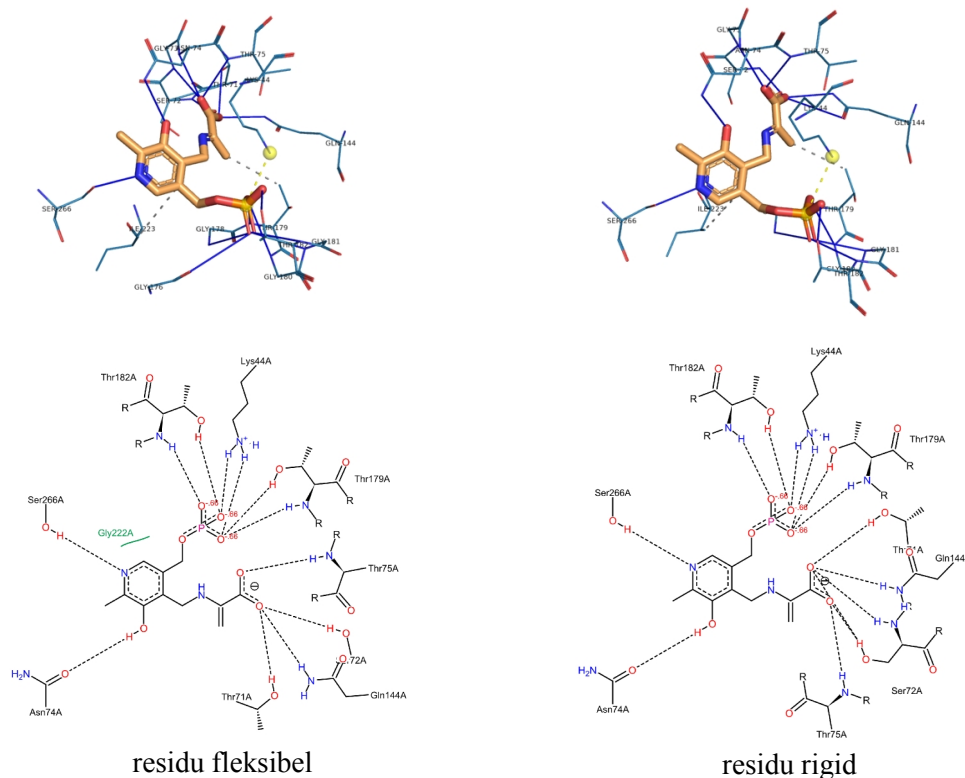
Tabel 5. Afinitas ikatan (kkal/mol) ligan *native* masing-masing 32 protein target dengan atau tanpa perlakuan fleksibel residu selama proses *docking* molekular

Ligan	Rig ¹	Flex ²	Ligan	Rig ¹	Flex ²	Ligan	Rig ¹	Flex ²	Ligan	Rig ¹	Flex ²
dcc	-8,0	-7,9	cm9	-7,6	-7,5	fm6	-7,2	-7,3	kij	-9,7	-9,6
ma8	-7,5	-7,7	cii	-8,7	-8,5	fm6	-6,5	-6,9	cp6	-7,1	-6,4
tp6	-10,5	-8,4	tcu	-8,1	-7,1	fm7	-8,8	-9,5	2dh	-9,6	-10,1
tsa	-9,3	-8,6	34f	-6,4	-7,1	fm8	-7,4	-7,6	2dj	-10,1	-9,8
pda	-9,7	-11,2	5ca	-8,8	-9,9	tlg	-7,1	-6,5	44w	-7,0	-6,3
y19	-8,0	-7,6	ca2	-10,3	-10,4	m7u	-6,2	na	ggj	-11,4	-11,6
a6p	-8,0	-7,9	rve	-8,2	-7,5	tlj	-7,7	-8,5	69m	-11,3	-11,2
r52	-7,3	-6,7	awh	-9,1	-10,4	tlg	-8,0	-7,0	xt0	-9,8	-10,0

¹Rig= semua residu dibuat rigid/tetap konformasi, ²Flex= beberapa residu dimana atom-atomnya dibuat fleksibel seperti ligan target, ditebalkan berarti residu fleksibel mempengaruhi afinitas ikatan ligan *native*.

3.1. Nilai afinitas ikatan 3 terbaik ligan *native*

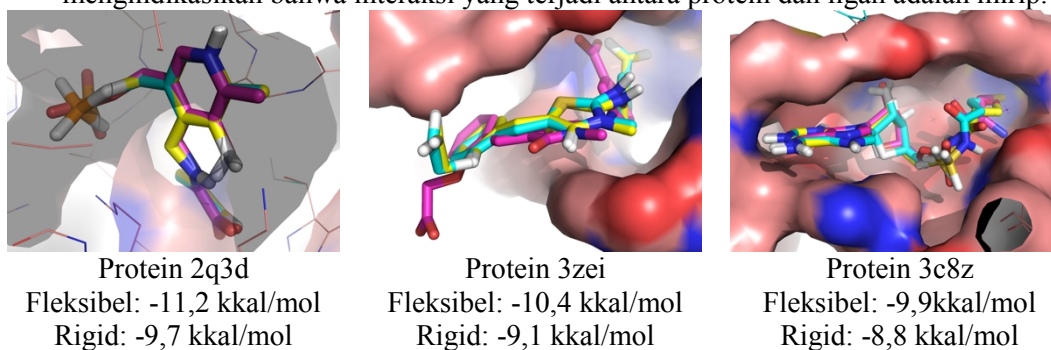
Secara berurutan, protein dengan 2q3d, 3zei, dan 3c8z memiliki selisih afinitas ikatan terbaik dibandingkan dengan 11 protein lainnya yaitu 1,5; 1,3; dan 1,1 kkal/mol (Tabel 3). Hasil penelusuran dengan PLIP secara 3 dimensional, ligan *native* protein 2q3d memiliki interaksi ikatan hidrogen terbanyak dibandingkan dengan 2 lainnya. Secara visual, interaksi yang terjadi antara hasil rigid protein dengan residu fleksibel tidak jauh berbeda tetapi tidak demikian dengan hasil penelusuran oleh PoseView (Gambar 1).



Gambar 1. Interaksi hasil profiling ligan *native* pda (2q3d) dengan PLIP(3D) dan PoseView(2D) (Salentin *et al.*, 2015; Stierand *et al.*, 2006; Frickeret *et al.*, 2004).

3.2. Konformasi 3 terbaik ligan *native*

Konformasi struktur 3D ketiga ligan *native* terbaik untuk protein dengan residu fleksibel dan protein rigid dapat dilihat pada Gambar 2, apabila dibandingkan dengan ligan *native* yang diperoleh secara kristalografi X-ray. Ketiganya memperlihatkan kedekatan konformasi satu sama dengan lainnya. Hal ini mengindikasikan bahwa interaksi yang terjadi antara protein dan ligan adalah mirip.



Gambar 2. konformasi ligan *native* 2q3d, 3c8z, dan 3zei dengan PyMOL. Ligan berwarna cyan berasal dari residu fleksibel, kuning: residu rigid, dan merah muda: kristalografi X-ray.

Adanya perlakuan residu dibuat fleksibel walaupun tidak seluruhnya pada bagian binding site pocket ligan target, memberikan pengaruh berarti terhadap hasil skrining konformasi interaksi ligan-protein melalui *docking*. Hasil penelitian ini membuktikan kembali pentingnya melakukan validasi terhadap sistem *docking* molekular yang akan digunakan sebagai alat uji untuk ligan target lainnya selain ligan *native*, seperti senyawa-senyawa alam, senyawa hasil sintesis, atau senyawa novel yang masih imajiner.

4. KESIMPULAN

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa selain penentuan volume *gridbox*, pemilihan dan pemanfaatan residu aktif menjadi fleksibel selama komputasi akan memperpendek jarak pembeda antara prediksi dan nilai sesungguhnya. Kajian berikutnya yang penting untuk dieksplorasi adalah seberapa besar pengaruh dan hubungan antara pemilihan residu fleksibel dengan deskriptor ligan *native* atau ligan target.

REFERENSI

- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., and Bourne P.E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 28: 235-242.
- Bolia A., Gerek Z.N., and Ozkan S.B. (2014). BP-Dock: A Flexible Docking Scheme for Exploring Protein-Ligand Interactions Based on Unbound Structures, *J. Chemical Information and Modeling*. 54 (3): 913-25. DOI: 10.1021/ci4004927.
- Dallakyan S., and Olson A.J. (2015). Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol. Biol.* 1263:243-50.
- Elokely K.M. and J. Doerksen R.J. (2013). Docking Challenge: Protein Sampling and Molecular Docking Performance, *J. Chemical Information and Modeling*. 53 (8): 1934-45. DOI: 10.1021/ci400040d.
- Fricke P., Gastreich M., and Rarey M. (2004) Automated Generation of Structural Molecular Formulas under Constraints. *J. Chemical Information and Computer Sciences*. 44: 1065-1078.

- O'Boyle N.M., Banck M., James C.A., Morley C., Vandermeersch T., and Hutchison G.R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics*. 3: 33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33
- Pettersen E.F., Goddard T.D., Huang C.C., Couch G.S., Greenblatt D.M., Meng E.C., Ferrin T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 25(13): 1605-12.
- Ravindranath P.A., Forli S., Goodsell D.S., Olson A.J., Sanner M.F. (2015). AutoDockFR: Advances in Protein-Ligand Docking with Explicitly Specified Binding Site Flexibility. *PLOS Computational Biology*. 11(12): e1004586. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004586.
- Salentin S., Schreiber S., Haupt V.J., Adasme M.F., and Schroeder M. (2015). PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res*. 43 (W1): W443-W447. DOI: 10.1093/nar/gkv315.
- Santoso B. (2017). Pengaruh Volume Gridbox pada Docking Senyawa dalam Stelechocarpus Burahol terhadap Protein Homolog Antiinflamasi TRPV1. *Prosiding URECOL VI*, Universitas Muhammadiyah Magelang. p. 321-328. [cited 2018]. Dapat diakses pada laman: <http://journal.ummg.ac.id/index.php/urecol/article/view/1369>.
- Segura J., Marín-López M.A., Jones P.F., Oliva B., Fernandez-Fuentes N. (2015). VORFFIP-Driven Dock: V-D2OCK, a Fast and Accurate Protein Docking Strategy. *PLOS ONE*. 10(3): e0118107. DOI: 10.1371/journal.pone.0118107.
- Stierand K., Maaß P., and Rarey M. (2006) Molecular Complexes at a Glance: Automated Generation of two-dimensional Complex Diagrams. *Bioinformatics*. 22: 1710-1716.
- Volkamer A., Kuhn D., Grombacher T., Rippmann F., M. Rarey M. (2012). Combining global and local measures for structure-based druggability predictions. *J. Chem. Inf. Model*. 52,360-372.
- The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- Trott O. (2017). The Molecular Graphics Lab at The Scripps Research Institute – AutoDock Vina is an open-source program for doing molecular docking. 2010. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: <http://vina.scripps.edu/index.html>.