

Pengaruh Koenzim dan Kofaktor Protein Target Reduktase Aldosa dalam *Docking* Molekular Menggunakan DOCK6

Broto Santoso

Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

*Email: Broto.Santoso@ums.ac.id

Abstrak

Keywords:

Koenzim, Kofaktor, DOCK6, aldosereductase, Grid-Score dan Amber-Score

Kofaktor dan koenzim memiliki peran penting dalam mekanisme aksi obat di dalam tubuh. Molekul air telah terbukti memberikan pengaruh terhadap konformasi akhir ligan dalam uji insilico. Kajian ini ditujukan untuk memotret pengaruh koenzim dan kofaktor terhadap hasil docking molekular dengan studi kasus protein reduktase aldosa. Ketiga protein aldosereductase diunduh dari database bank protein (RCSB PDB). Kelompok senyawa uji dipilih dan diunduh dari database PubChem berdasarkan informasi dari laman bindingdb.org. Software DOCK versi 6.9 digunakan untuk mendapatkan hasil interaksi ligan dan protein setelah dilakukan docking molekular yang dinyatakan dalam Grid-Score dan Amber-Score. Hanya terdapat satu senyawa native dengan konformasi ruang hasil docking mode rigid dan fleksibel menyerupai hasil pengukuran kristalografinya. Kedua protein target lainnya memiliki nilai Hungarian root mean square deviation (RMSDh) kurang dari 5 pada mode rigid saja. Hal yang sama juga didapati pada hasil rescoring native dengan Amber-Score untuk mode fleksibel salah satu protein dan nilai RSD antar perlakuan diperoleh lebih dari 5%, sedangkan nilai Grid-Score ketiga native memperlihatkan hasil yang tidak berbeda antar perlakuan untuk kedua mode. Urutan tiga terbaik senyawa uji hasil docking memperlihatkan hasil yang berbeda termasuk nilai skoring ketiganya pada beda perlakuan kecuali nilai Grid-Score mode fleksibel.

1. PENDAHULUAN

Koenzim merupakan senyawa organik non protein dengan bobot molekul rendah seperti ligan yang tidak didapati pada semua enzim. Suatu kofaktor dapat berupa atom logam, yang bersifat anorganik dengan tingkatan bilangan oksidasi tertentu atau mirip dengan koenzim yaitu senyawa organik non protein lainnya seperti vitamin. Keduanya berada di sisi aktif enzim dan memiliki fungsi membantu biotransformasi katalitik enzim. Integritas struktur tiga dimensi

enzim dibantu oleh keberadaan keduanya [1-2].

Kofaktor dan koenzim berperan penting dalam meningkatkan keberhasilan suatu reaksi enzimatik dalam tubuh. Obat mengalami metabolisme menjadi bentuk aktif dan tidak aktif melalui mekanisme ini. *Thiamine pyrophosphate* (TPP) adalah koenzim aktif dari vitamin B1 yang mengkatalisis reaksi dekarboksilasi dan transketolase [3]. Contoh lainnya, senyawa NADP⁺ merupakan koenzim yang telah terbukti memberikan pengaruh terhadap

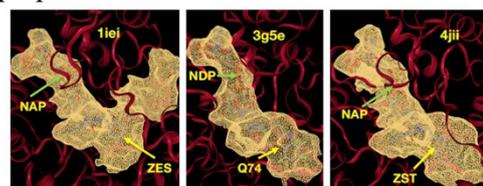
stabilitas enzim bahkan dalam lingkungan yang buruk untuknya. Morales-Luna *et al.* (2020) telah berhasil mengidentifikasinya dengan baik secara uji laboratorium dan *in silico* melalui *moleculardocking* dan *moleculardynamic* [4]. Hal ini menjadi faktor penentu dalam uji *in silico*, seperti halnya pelarut air yang selalu ditemukan dalam setiap protein target.

Molekul air secara eksplisit dapat meningkatkan kemampuan prediksi seperti Rosetta untuk membedakan konformasi ruang ligan yang benar dan salah [5]. Pemilihan molekul air yang diikuti sertakan dalam *docking* harus dilakukan secara hati-hati. Penurunan performa kinerja *software* dan hasil yang salah menjadi masalah baru ketika molekul air yang disertakan tidak tepat walaupun kemampuan prediksi terhadap konformasi ikatan terjadi peningkatan. Hal ini disebabkan oleh sistem protein, golongan kimia ligan, metode *docking* dan skoring yang digunakan [6]. Molekul air telah terbukti mempunyai pengaruh yang signifikan terhadap prediksi konformasi akhir ligan dalam protein target menggunakan uji *in silico*. Penelitian pada protein target hERG menyimpulkan bahwa pengaruh molekul air terhadap konformasi ligan adalah kecil [7] sehingga dapat diabaikan. Kajian ini ditujukan untuk mendapatkan informasi ilmiah sekaligus memotret pengaruh koenzim dan kofaktor terhadap hasil *docking* molekuler ligan yang telah terbukti sebagai inhibitor dari protein reduktase aldosa.

2. METODE

Ketiga protein reduktase aldosa telah diunduh dari bank data protein (RCSB PDB). Kode protein dari ketiganya adalah 1iei, 3g5e, dan 4jii yang secara berurutan memiliki resolusi pengukuran kristalografi X-ray adalah 2,5; 1,8; dan 2,2 Å [8-10]. Tiga kelompok senyawa uji telah dipilih dan diunduh dari bank data senyawa kimia PubChem berdasarkan data hasil penelitian yang diperoleh dari laman bindingdb.org [11-13]. *Bindingsitepocket* setiap protein dapat dilihat pada Gambar

1 yang merupakan hasil dari aplikasi *onlineDoGSiteScorer* [14]. Protein dan ligan dipreparasi menggunakan Chimera versi 1.13. Terdapat 3 perlakuan yang diberikan ketika preparasi yaitu koenzim dan kofaktor dipertahankan tetap berada dalam protein dan dihilangkan langsung dari hasil preparasi pertama atau dari awal preparasi.



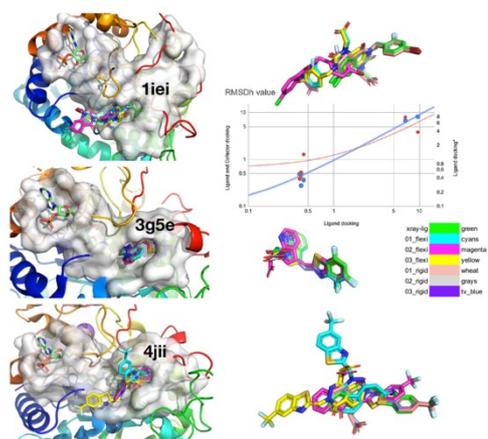
Deskriptor Binding Pocket	1iei	3g5e	4jii
Volume (Å ³)	1398,27	1040,45	1191,17
Luas Permukaan (Å ²)	1526,05	1068,08	1207,72
Donor Ikatan Hidrogen	54	32	36
Akseptor Ikatan Hidrogen	80	60	68
Rasio Hidrofobitas	0,34	0,40	0,35
Logam	0	0	0

Gambar 1. *Bindingsitepocket* dari protein target berikut letak dari ligan native (ZES, Q74, dan ZST) dan koenzim (NAP dan NDP). Atom Na (kofaktor) tidak berada pada *bindingsitepocket* terbesar sehingga tidak ditampilkan dalam gambar.

Docking molekuler telah berhasil dilakukan pada sistem operasi Ubuntu 14.04 menggunakan software DOCK versi 6.9 dan mendapatkan hasil berupa nilai RMSDh, Grid-Score (kkal/mol) dan Amber-Score (kkal/mol). Visualisasi interaksi ligan protein menggunakan PyMOL dan PoseView [15-16]. Data yang diperoleh dilakukan analisis berdasarkan nilai RSD sebaran Grid-Score dan Amber-Score. Korelasi nilai RMSDh native dari protein target ditunjukkan dengan grafik Kartesius (Gambar 2).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

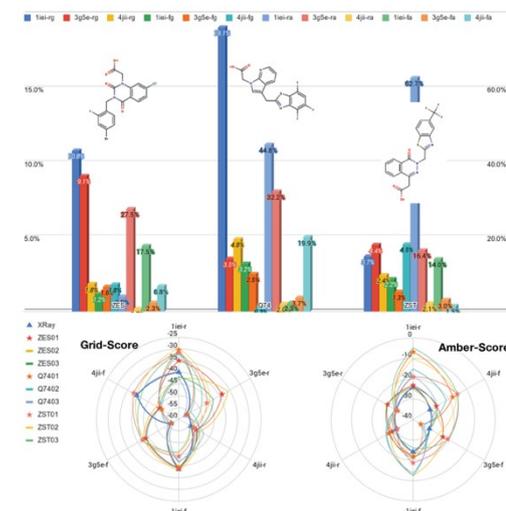
Hasil validasi konformasi ruang *native* setelah dilakukan *docking* molekuler ditam-



Gambar 2. Konformasi *native* pada setiap protein target dan grafik korelasi RMSDh. Hanya satu protein target (3g5e) memperlihatkan kedekatan konformasi ruang *native* dari ketiga perlakuan baik pengukuran secara rigid atau fleksibel dengan konformasi ruang *native* hasil pengukuran kristalografi X-ray. Nilai RMSDh dari semua konformasi *native* pun menunjukkan hal yang mendukung, yaitu kurang dari 5,0.

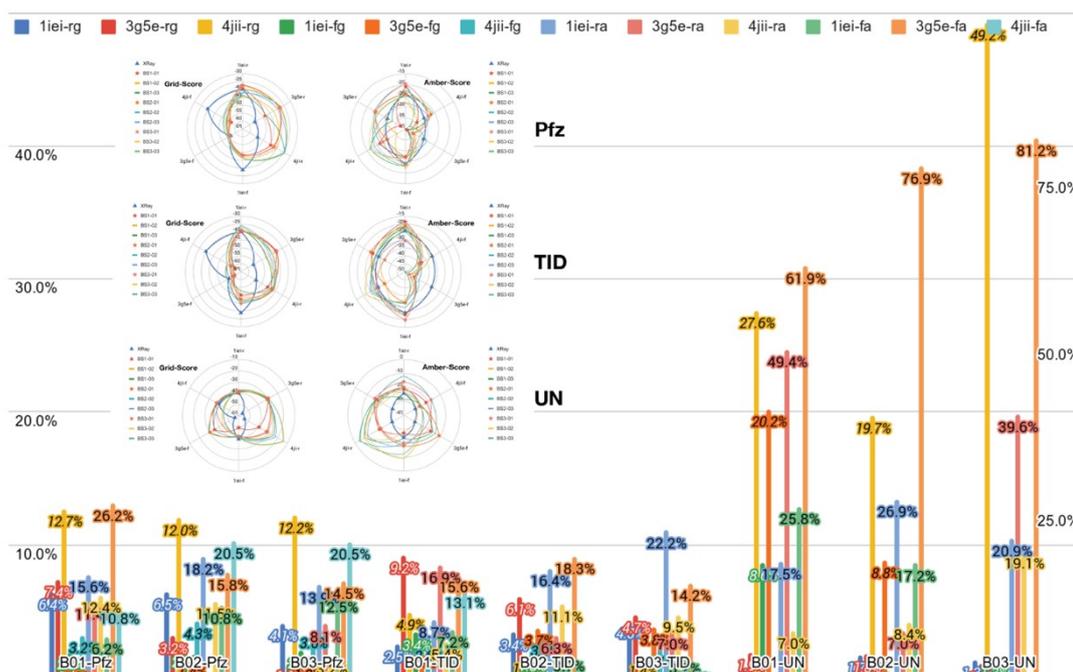
Senyawa *native* 1iei memperlihatkan hasil *docking* dengan konformasi ruang yang berbeda untuk perhitungan secara fleksibel dikarenakan luas permukaan molekul *native* adalah terkecil ($77,9 \text{ \AA}^2$) di antara kedua *native* lainnya dengan volume *bindingsitepocket* protein paling besar ($1398,27 \text{ \AA}^3$) sehingga konformer dengan interaksi ligan protein terbaik yang diperoleh memiliki konformasi ruang yang tidak sama dengan *native* kristalografi [17].

Sebaliknya, kondisi yang berbeda didapati pada 4jii, dengan volume *bindingsitepocket* kedua terbesar ($1191,17 \text{ \AA}^3$) dan luas permukaan molekul *native* terbesar (111 \AA^2) menunjukkan hasil konformasi ruang yang tidak sama dengan *native* kristalografinya pada perhitungan fleksibel



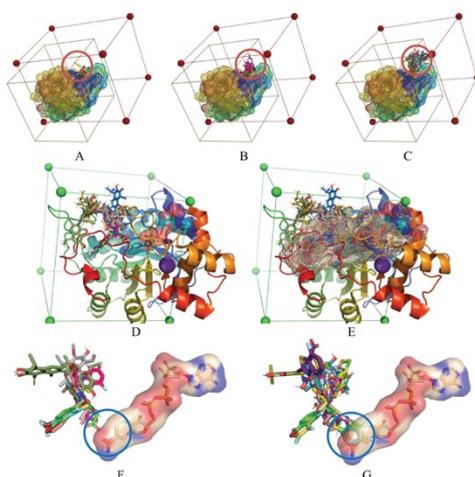
Gambar 3. Nilai Grid- dan Amber-Score (grafik radar) dan nilai RSD (grafik batang) dari senyawa *native*.

[18]. Konformer molekul yang dihasilkan tidak mampu memenuhi ruang dari *bindingsitepocket* protein sehingga menaikkan nilai RMSDh. Hal berbeda ditampakan pada 3g5e. Ketiga *native* memiliki nilai RMSDh yang memenuhi kriteria ketika *docking* molekuler dilakukan dengan perhitungan rigid.



Gambar 4. Nilai Grid- dan Amber-Score (grafik radar) dan nilai RSD (grafik batang) dari ketiga kelompok senyawa uji (Pfz, TID, dan UN).

Grafik model radar pada Gambar 3 dan 4 memberikan pola distribusi skoring dan skoring ulang hasil *docking* molekuler *native* dan senyawa uji. Garis tebal biru merupakan nilai Grid- dan Amber-Score dari *native* kristalografi. Apabila titik warna lainnya berada di dalam garis ini menandakan bahwa Grid- dan Amber-Score senyawa tersebut memiliki nilai lebih baik dibandingkan dengan *native*. Fungsi skoring ulang Amber dilakukan untuk memastikan bahwa interaksi ligan protein bernilai terbaik di kedua model skoring [19].



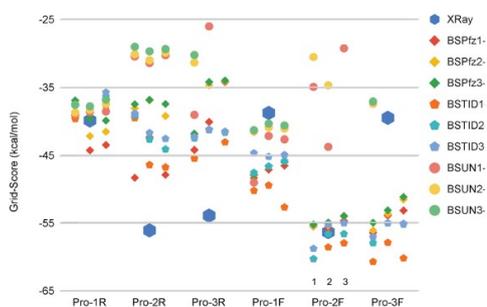
Gambar 5. Irisan area *gridboxdocking* (kotak dengan bulatan) dan area *bindingsitepocket* (kotak tanpa bulatan) untuk 1iei (A), 3g5e (B), dan 4jii (C). Konformasi ruang ligan uji hasil *docking* tanpa (D) dan dengan (E) area *bindingsitepocket* pada 4jii. Konformasi 3D dari ligan uji dan koenzim dengan menyertakan koenzim (F) dan tanpa melibatkannya (G) dalam *docking* molekuler.

Sebagian besarnative hasil *docking* lintas protein dan kelompok senyawa uji tidak memiliki nilai Grid- dan Amber-Score yang lebih baik dibandingkan dengan nilai dari *native* masing-masing protein target. Deviasi skor *native* menunjukkan nilai yang kecil pada mode fleksibel, selainnya selisih antar data satu dengan lainnya sangat besar (Gambar 3). Hal yang sama ditemukan pula pada kelompok senyawa uji Pfz dan TID, bahkan kelompok senyawa uji UN tidak didapatkan nilai skor untuk mode fleksibel dikarenakan ketidakmampuan *software* mencari konformer yang sesuai untuk diukur berdasarkan input nilai volume *gridbox* yang digunakan dengan pusat massa pengukuran adalah pusat massa dari

native (Gambar 4) [20]. Sebab lainnya dikarenakan adanya molekul koenzim atau volume *bindingsitepocket* yang hanya digunakan sebagian tergantung pusat massa ligan *native*.

Pengukuran yang melibatkan koenzim untuk mode rigid memiliki nilai skor yang lebih tinggi dibandingkan dengan skor hasil *docking* yang diperoleh tanpa melibatkan koenzim. Mode fleksibel diperoleh hasil yang bertolak belakang. Hal ini diduga karena jumlah konformer yang digunakan ketika *docking* berbeda dan keberadaan dari koenzim turut mempengaruhi hasil skoring.

Potret tiga dimensi yang divisualisasi melalui aplikasi PyMOL memberikan informasi yang lebih detail seperti yang tampak pada Gambar 5. Area *bindingsitepocket* protein tidak sepenuhnya berada di dalam area *gridboxdocking*. Perbedaan ini terjadi dikarenakan acuan pusat massa dari setiap area berbeda. Area *gridbox* ditentukan pada pusat massa ligan yang dipilih bukan pusat massa protein, sedangkan area *bindingsitepocket* mengacu pada pusat massa dari area dimana suatu ligan dan/atau koenzim berada dalam protein.



Gambar 6. Distribusi nilai Grid-Score dari ketiga terbaik masing-masing kelompok senyawa uji: Pfz (*diamond*), TID (*pentagon*), dan UN (*hexagon*) untuk pelibatan koenzim (1) dan tanpa melibatkannya (2-3).

Kelompok senyawa uji UN tiga terbaik hasil *docking* memperlihatkan konformasi molekul yang tidak seluruhnya berada di dalam *bindingsitepocket* (lingkaran merah pada Gambar 5.C). Hal berbeda didapati pada kelompok senyawa uji Pfz dan TID. Faktor penentunya

adalah luas permukaan molekuler keduanya berada di bawah nilai dari luas permukaan molekuler kelompok senyawa uji UN.

Jumlah dan jenis cincin penyusun senyawa uji menjadi alasan lainnya yang menyebabkan konformasi ruang senyawa hasil *docking* tidak sepenuhnya berada di dalam *bindingsitepocket* (Gambar 5.D dan E). Struktur inti dan gugus fungsional di terminal cincin kelompok senyawa uji menjadi penentu fleksibilitas konformasi memenuhi ruang, selain faktor nilai volume *bindingsitepocket* protein. Pelibatan koenzim atau air dalam pengukuran *in silico* akan meningkatkan lama dan kompleksitas penggunaan aplikasi *docking*.

Terdapat tiga senyawa uji dari semua kelompok (nomor CID) pada ketiga protein Iei, 3g5e, dan 4jii secara berurutan yaitu 15708693, 9890496, dan 9913118 yang memiliki ikatan dan interaksi ligan protein terbaik. Gambar 6 memperlihatkan bahwa pada 3g5e dan 4jii mode rigid, tidak ada senyawa uji yang memiliki Grid-Score lebih baik dibandingkan senyawa *native* kristalografi. Secara angka terlihat perbedaan nilai skor *docking*, namun perlu dilakukan pengujian untuk membuktikan beda hasil tersebut yang dalam kajian tidak dilakukan.

4. KESIMPULAN

Koenzim secara langsung dan kofaktor belum terlihat secara langsung dalam kajian ini terbukti memiliki pengaruh pada nilai RMSDh dan skor *docking* menggunakan DOCK6 pada ketiga protein reduktase aldosa dengan tiga kelompok senyawa inhibitor. Selain itu, pusat massa, ukuran *gridbox*, luas permukaan molekuler ligan dan volume *bindingsitepocket* merupakan faktor lain yang turut menentukan terjadinya perbedaan tersebut.

REFERENSI

- [1] Kirschning A. Coenzymes and their role in the evolution of Life. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2020. DOI:10.1002/anie.201914786.

- [2] UniprotConsortium. Cofactor. 2020. [cited 2020 January 6]. Available from <https://www.uniprot.org/help/cofactor>.
- [3] Freeland-Graves J H, and Bavik C. Coenzymes in Caballero B, Trugo L. and Finglas P. M. Editors. The Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, Second Edition. Academic Press; 2003. 1475-81.
- [4] Morales-Luna L, González-Valdez A, Sixto-López Y, Correa-Basurto J, Hernández-Ochoa B, *et al.* Identification of the NADP⁺ Structural Binding Site and Coenzyme Effect on the Fused G6PD::6PGL Protein from *Giardialamblia*. *Biomolecules*. 2020, 10(1), 46; <https://doi.org/10.3390/biom10010046>.
- [5] Lemmon G and Meiler J. Towards Ligand Docking Including Explicit Interface Water Molecules. *PLoS ONE*. 2013, 8(6): e67536.
- [6] Kumar A and Zhang K Y J. Investigation on the Effect of Key Water Molecules on Docking Performance in CSARdock Exercise. *J. Chem. Inf. Model*. 2013, 53, 8, 1880-1892.
- [7] Munawar S, Vandenberg J I, and Jabeen I. Molecular Docking Guided Grid-Independent Descriptor Analysis to Probe the Impact of Water Molecules on Conformational Changes of hERG Inhibitors in Drug Trapping Phenomenon. *Int. J. Mol. Sci*. 2019, 20, 3385; doi:10.3390/ijms20143385.
- [8] PDB ID: 1IEI. Kinoshita T, Miyake H, Fujii T, Takakura S, and Goto T. The Structure of Human Recombinant Aldose Reductase Complexed with the Potent Inhibitor Zenarestat. *Acta Crystallogr. Sect. D*, 2002, 58: 622-626.
- [9] PDB ID: 3G5E. Van Zandt M C, Doan B, Sawicki D R, Sredy J, and Podjarny A D. Discovery of [3-(4,5,7-trifluorobenzothiazol-2-ylmethyl)-pyrrolo[2,3-b]pyridin-1-yl] acetic Acids as Highly Potent and Selective Inhibitors of Aldose Reductase for Treatment of Chronic Diabetic Complications. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 2009, 19: 2006-2008.
- [10] PDB ID: 4JII. Zhang L, Zhang H, Zhao Y, Li Z, Chen S, *et al.* Inhibitor Selectivity between Aldo-Keto Reductase Superfamily Members AKR1B10 and AKR1B1: Role of Trp112 (Trp111). *Febs Lett*. 2013, 587: 3681-3686.
- [11] Mylari B L, Larson E R, Beyer T A, Zembrowski W J, Charles E. Aldinger C E, *et al.* Novel, potent aldose reductase inhibitors: 3,4-dihydro-4-oxo-3-[[5-(trifluoromethyl)-2-benzothiazolyl]methyl]-1-phthalazineacetic acid (zopolrestat) and congeners. *J. Med. Chem*. 1991, 34, 108-122.
- [12] Van Zandt M C, Jones M L, Gunn D E, Geraci L S, J. Howard Jones H J, *et al.* Discovery of 3-[(4,5,7-Trifluorobenzothiazol-2-yl) methyl] indole-N-acetic Acid (Lidorestat) and Congeners as Highly Potent and Selective Inhibitors of Aldose Reductase for Treatment of Chronic Diabetic Complications. *J. Med. Chem*. 2005, 48, 9, 3141-3152.
- [13] Deck L M, Vander Jagt D L, and Royer R E. Gossypol and Derivatives: a New Class of Aldose Reductase Inhibitors. *J. Med. Chem*. 1991, 34, 3301-3305.
- [14] Volkamer A, Kuhn D, Grombacher T, Rippmann F, and Rarey M. Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions. *J. Chem. Inf. Model*. 2012, 52, 360-372.
- [15] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3.2 Schrödinger, LLC.
- [16] Stierand K, Maaß P, Rarey M. Molecular Complexes at a Glance: Automated Generation of two-dimensional Complex Diagrams. *Bioinformatics*. 2006; 22:1710-1716.
- [17] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Zenarestat, CID=5724, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zenarestat> (accessed on Jan. 6, 2020).
- [18] National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Zopolrestat, CID=1613, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Zopolrestat> (accessed on Jan. 6, 2020).

- [19] Santoso B. Re-Scoring Skor Grid Hasil Docking Molekular Ligan Aslidari Protein Target T47D dan WiDr dengan Metode Skor GBSA-Hawkins-Zou dan Amber menggunakan Program DOCK6. In: *Proceeding of the 10th University Research Colloquium 2019, Bidang MIPA dan Kesehatan*. Gombong; 2019, p. 694-703.
- [20] Santoso B. Pengaruh Volume Gridbox pada Docking Senyawa dalam *Stelechocarpus burahol* terhadap Protein Homolog Antiinflamasi TRPV1. In: *Proceeding of the 6th University Research Colloquium 2017, Bidang MIPA dan Kesehatan*. Magelang; 2017, p. 321-328.