

Pengaruh Volume *Gridbox* pada *Docking* Senyawa dalam *Stelechocarpus burahol* terhadap Protein Homolog antiinflamasi TRPV1

Broto Santoso^{1*}

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta

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

Abstrak

Keywords:

Docking molekular;
idock; gridbox;
kepel; TRPV1

Penentuan pusat massa dan volume gridbox docking yang tepat mendekati hasil prediksi dengan aktivitas biologis sesungguhnya. Hal ini menjadi mudah untuk protein yang telah tersedia dalam database. Teknik homologi dapat digunakan untuk menyelesaikan permasalahan ketiadaan protein target. Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui pengaruh perubahan volume gridbox terhadap hasil docking dan mendapatkan senyawa dengan nilai binding affinity terbaik terhadap protein homolog antiinflamasi jalur transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1). Urutan FASTA protein TRPV1 pada manusia digunakan untuk skrining protein homolognya termasuk ligan yang direkomendasikan (native-like) oleh COACH. Protein homolog TRPV1 diperoleh dari i-TASSER server. Penapisan binding site pocket protein telah dilakukan menggunakan DoGSiteScorer. Protein dan ligan dilakukan preparasi agar dapat digunakan dengan idock. Pusat massa ligan native-like digunakan sebagai pusat dari gridbox untuk proses docking dengan variasi volume 14-30kÅ. Analisis hasil docking dilakukan terhadap nilai dari idock-Score, RF-Score (keduanya mewakili afinitas ikatan ligan-protein), konformasi 3D ligan hasil docking, dan interaksi ligan-protein). Konformasi ligan hasil docking dipengaruhi oleh fleksibilitas struktur kimia ligan dan volume gridbox perhitungan. Senyawa 4 dan 14 dari total 15 ligan memiliki nilai idock- dan RF-Score terbaik dibandingkan native-like, senyawa 6o8. Terdapat 8 ligan dengan idock-Score lebih rendah dari native-like yang sama. Hal terbalik didapatkan bahwa tidak ada satu pun ligan yang mempunyai kedua nilai Score lebih baik dibandingkan senyawa 6ue. Senyawa native-like atau ligan dengan tingkat fleksibilitas tinggi memiliki kemampuan berinteraksi dengan binding site pocket lebih besar dengan variasi konformasi interaksi lebih banyak. Nilai afinitas ikatannya pun ditentukan oleh volume gridbox yang digunakan dalam docking.

1. PENDAHULUAN

Teknik *docking* molekular umumnya menggunakan protein target yang telah tersedia dalam *database* protein, salah satunya adalah www.rcsb.org [1].

Beberapa ketentuan protein yang bisa digunakan adalah diutamakan berupa protein hasil pengukuran kristalografi X-ray dengan resolusi setidaknya kurang dari 2,5Å. Organisme asal protein sesuai

dengan organisme target untuk penggunaannya nanti, misal berasal dari manusia (*homo sapien*). Protein hasil kristalografi yang dipilih pun harus disertai ligan *native*, atau senyawa aktif yang diduga menjadi antagonis atau agonis terhadap mekanisme aksi protein atau senyawa alam umum lainnya seperti ADP. Ligan *native* ini berguna sebagai referensi bagi ligan yang akan diujikan sebagai pembanding untuk konformasi 3D dan jenis interaksi ligan-protein yang terjadi serta memudahkan dalam menguji kesesuaian parameter *docking* yang digunakan dengan kenyataan sesungguhnya, seperti pusat massa dan volume *gridbox*. Hal terakhir disebut juga sebagai validasi metode *docking* molekular.

Protein *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1) merupakan salah satu protein yang belum terdapat *database* protein yang telah ada. Protein ini dikenal pula sebagai reseptor capsaicin atau reseptor vanilloid 1 [2]. Protein ini merupakan salah satu reseptor yang turut berperan dalam nyeri sehingga ligan antagonis dapat menjadi alternatif senyawa analgetik [3]. Prediksi affinitas ikatan ligan terhadap protein ini membuka peluang pengembangan obat anti nyeri lainnya. Ketiadaan protein target TRPV1 untuk manusia dapat diatasi dengan teknik homologi protein.

Kendala dalam *docking* molekular menggunakan protein target hasil homologi adalah ketidaksesuaian karakteristik protein yang dijadikan *template* dan ketiadaan ligan *native*. Pusat massa dan *gridbox docking* dapat menggunakan pusat massa protein dan volume keseluruhan protein target sebagai volume *gridbox*nya. Hal ini akan menaikkan waktu proses *docking* molekular dan menurunkan selektifitas *docking* pada *binding site pocket* target tertentu. Protein homologi pun dapat diperoleh secara *offline* atau *online*. Proses *offline* membutuhkan spesifikasi komputer yang tinggi dan memerlukan perangkat lunak yang cukup mengganggu dalam penggunaannya bagi yang kurang terbiasa. Terdapat server *online* untuk mendapatkan

protein homologi seperti Swiss-Model Server [4] dan i-TASSER [5] yang dapat mengatasi permasalahan tersebut. Beberapa kelebihan yang diperoleh adalah waktu pengerjaannya yang cepat dengan fasilitas pendukung yang melimpah seperti perangkat lunak COACH yang berguna untuk mendapatkan ligan *native-like*. Satu hal penting lainnya adalah tidak diperlukan super-komputer *offline*.

Perangkat lunak idock [6] yang merupakan pengembangan dari vina [7] dengan skoring tambahan, RF-Score telah digunakan untuk *docking* molekular. Program idock kompatibel dengan semua sistem operasi dan masih dikembangkan hingga sekarang sehingga tepat untuk pengguna awal dalam *docking* molekular. Program ini telah digunakan dalam penelitian ini dengan tujuan untuk membantu mengetahui pengaruh perubahan volume *gridbox* terhadap hasil *docking* dan mendapatkan senyawa dengan nilai *binding affinity* terbaik terhadap protein homolog antiinflamasi jalur *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1* (TRPV1).

2. METODE

Semua tahapan penelitian ini telah dilakukan menggunakan bantuan laptop dengan sistem operasi Mac OS X 10.10.5 (Yosemite) dengan beberapa perangkat lunak pendukung berikut: Firefox, Marvin-Sketch [8], Chimera [9], OpenBabel [10], PyRx [11], idock, PyMOL [12] dan PLIP [13].

2.1. Protein Homolog

Urutan FASTA protein TRPV1 pada manusia [14] digunakan untuk skrining protein homolog pada server i-TASSER dengan pengaturan default. Hasil skrining yang telah diunduh, termasuk ligan yang direkomendasikan oleh COACH dipilih yaitu protein Model 1 dengan ligan yang unik berupa senyawa yang tidak alami (6o8). Hasil penapisan *binding site pocket* protein terpilih telah dilakukan dengan DoGSiteScorer [15]. Proses ini dikerjakan untuk mengetahui letak ligan *native-like* terhadap area *binding site pocket* protein homolog.

2.2. Sumber ligan

Ligan *native-like* 6o8 telah diperoleh dari COACH dalam format struktur 3D dan 6ue diunduh dari www.rcsb.org dengan PDB-ID: 5irx dan telah disimpan dalam format 3D. Terdapat 15 ligan uji yang terdiri dari 9 senyawa yang terkandung dalam satu keluarga dengan tanaman kepel (*Stelechocarpus burahol*) dan 6 senyawa yang terdapat dalam kepel itu sendiri. Semua ligan uji telah dihasilkan dan disimpan menggunakan Marvin-Sketch.

2.3. Preparasi Protein Homolog dan Ligan

Kesesuaian format protein homolog dan ligan telah dikonversi menggunakan kombinasi OpenBabel dan PyRx agar dapat digunakan oleh perangkat lunak idock. Hasilnya diletakkan sesuai dengan pengaturan pada program idock. Komponen air jika ada di dalam protein homolog ditiadakan pada preparasi ini.

2.4. Penentuan Pusat Massa dan Variasi Gridbox Docking

Pusat massa *docking* ditentukan dari pusat massa masing-masing ligan *native-like* sehingga diperoleh 2 pusat massa. Volume gridbox untuk proses *docking* menggunakan variasi volume 14-30kÅ. Ligan uji dilakukan telah dilakukan *docking* pada kedua pusat massa.

2.5. Analisis dan Visualisasi Hasil

Analisis hasil docking dilakukan terhadap nilai dari idock-Score, RF-Score [16] (keduanya mewakili afinitas ikatan ligan-protein), konformasi 3D ligan hasil *docking*, dan interaksi ligan-protein). Hasil visualisasi ligan-protein diperoleh dari program PyMOL dan interaksi ligan-protein yang terjadi didapatkan dari hasil penggunaan program PLIP.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Docking molekular dengan program idock mempunyai ciri bahwa selama proses docking, konformasi protein tetap rigid sedangkan ligan yang bergerak fleksibel sehingga diperoleh konformasi terbaik yang memiliki nilai afinitas ikatan terendah. Struktur 3D akhir ligan ini dipengaruhi oleh fleksibilitas struktur kimia ligan itu sendiri dan volume *gridbox* perhitungan yang digunakan. Tabel 1 memperlihatkan bahwa ligan 6ue memiliki tingkat fleksibilitas yang relatif rendah walaupun memiliki jumlah ikatan yang dapat berotasi terbanyak kedua setelah ligan 6o8. Hal ini disebabkan jumlah cincin gabungan yang dimilikinya adalah yang tertinggi. Sebaliknya ligan 6o8 memiliki fleksibilitas gerak terbaik dilihat dari faktor yang sama.

Tabel 1. Analisis topologi fleksibilitas senyawa yang terkandung di dalam *Stelechocarpus burahol* dan *native-like*.

| Flexibility Descriptor | 6ue | 6o8 | comp01 | comp02 | comp03 | comp04 | comp14 | comp15 |
|-------------------------|------|-----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Rotatable bond | 9 | 19 | 2 | 3 | 1 | 4 | 5 | 4 |
| Aromatic ring | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Chiral center | 13 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 9 |
| Fused ring | 5 | 0 | 4 | 4 | 2 | 0 | 4 | 4 |
| 3D-surface [#] | 1048 | 763 | 378 | 426 | 369 | 444 | 753 | 723 |

[#]dalam satuan Å³

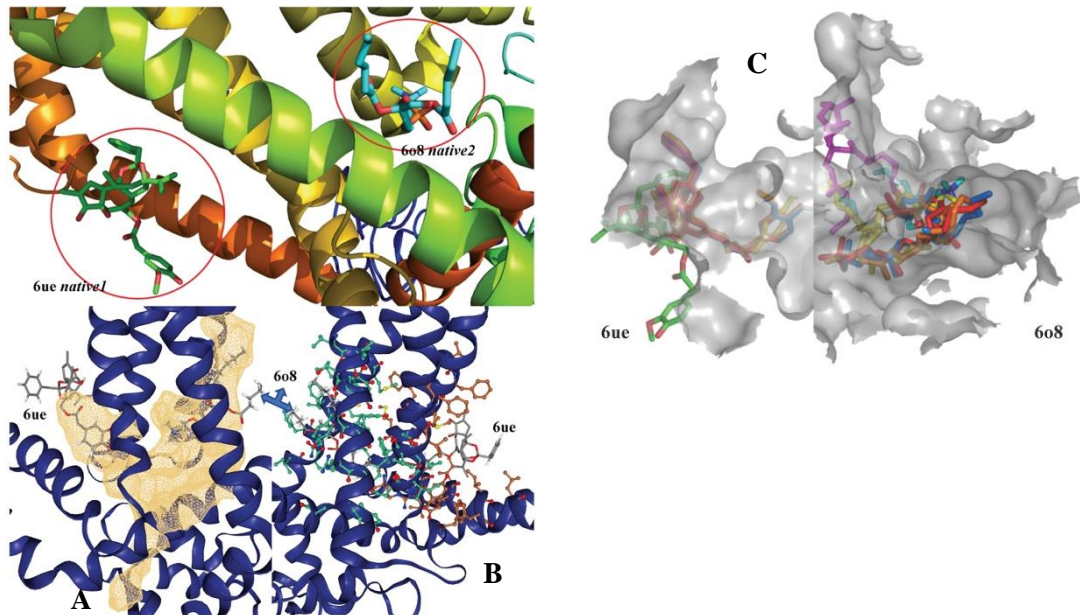
Bentuk molekular akhir *binding site pocket template* asal ditentukan oleh fleksibilitas ligan *native* yang berinteraksi dengan residu dari protein secara alami ketika diukur baik secara kristalografi atau mikroskopi elektron. Volume molekular ligan uji masih lebih rendah dibandingkan dengan ligan *native-like*. Keadaan ini

mendukung terjadinya interaksi yang lebih baik dengan protein target, seperti comp14.

Gambar 1 menggambarkan pengaruh ligan *native* asal dari protein *template* pada volume *pocket* jika dibandingkan dengan hasil penapisan *binding site pocket* menggunakan DoGSiteScorer. Terdapat perbedaan area ikatan di antara keduanya.

Kedua ligan *native-like* tidak sepenuhnya di dalam *binding site pocket* (Gambar 1-

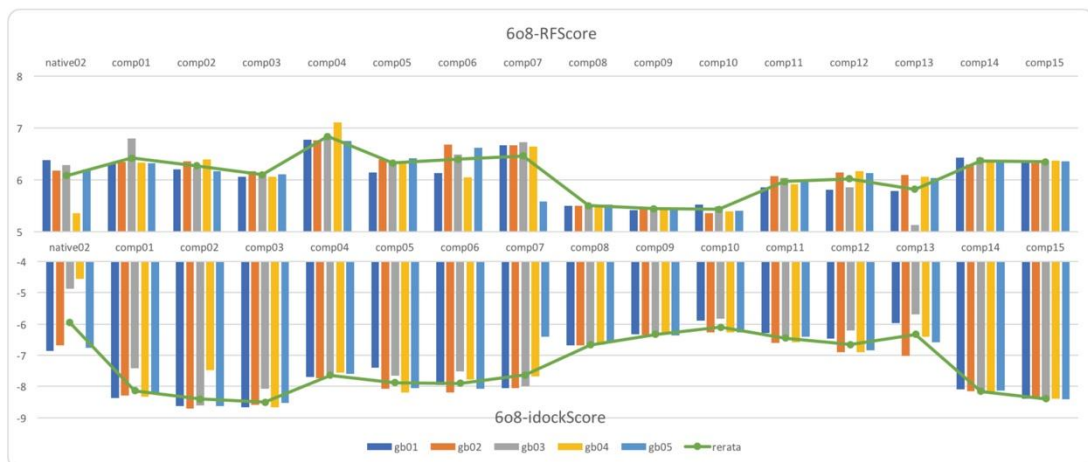
A).



Gambar 1. Posisi molekular dan interaksi ligan 6ue dan 6o8 (grey) dengan protein target TRPV1 dibandingkan antara residu hasil identifikasi *pocket* (B) dari ligan 6ue (cyan) dan 6o8 (jingga) dengan hasil skrining *binding site pocket* (A) serta hasil *docking* kedua ligan *native-like* (C) pada variasi 5 volume *gridbox*.

Hasil *docking* untuk ligan 6ue dalam berbagai variasi volume *gridbox* ditemukan konformasi ikatan yang sama (Gambar 1-C) namun berbeda jauh dengan posisi ligan 6ue. Kejadian ini diakibatkan adanya perbedaan *pocket* ligan asal dan

binding site pocket pengukuran walaupun volumenya telah dibuat berlainan. Berbeda halnya untuk ligan 6o8, adanya variasi *gridbox* memberikan perbedaan konformasi hasil.



Gambar 2. Afinitas ikatan ligan uji (idock- dan RF-Score) terhadap pocket ligan 6o8.

Faktor lainnya yang mempengaruhi perbedaan ini adalah letak binding site pocket pada protein yang tidak sama.

Pocket ligan 6ue hampir separuhnya berada di luar permukaan protein target,

sebaliknya *pocket* ligan 6o8 berada di dalam protein.

Senyawa 4 dan 14 dari total 15 ligan memiliki nilai idock- dan RF-Score terbaik dibandingkan *native-like*, senyawa 6o8 (Gambar 3). Terdapat 8 ligan dengan idock-Score lebih rendah dari *native-like* yang sama tetapi lebih dari 50% ligan uji

tidak direkomendasikan untuk lanjut tahapan uji berikutnya. Senyawa 14 termasuk golongan senyawa steroid. Kajian prediksi ini membuktikan aksi “dewa” dari golongan senyawa ini terhadap berbagai jenis penyakit termasuk sebagai *painkiller*.



Gambar 3. Afinitas ikatan ligan uji (idock- dan RF-Score) terhadap pocket ligan 6ue.

Hal terbalik didapatkan pada ligan *native-like* lainnya, 6ue. Gambar 3 memperlihatkan bahwa tidak ada satu pun ligan uji yang mempunyai kedua nilai Score lebih baik dibandingkan senyawa 6ue. Hal ini sesuai dengan pilihan dari COACH bahwa *docking* molekular untuk TRPV1 homolog pada protein sebaiknya

dilakukan pada *binding site pocket* dari 6o8. Perlakuan berbeda jika protein target yang digunakan telah ada di dalam database protein. Pengaturan volume *gridbox* opsi 1 dan 5 menjadi pilihan yang terbaik untuk *docking* molekular senyawa uji yang lain.

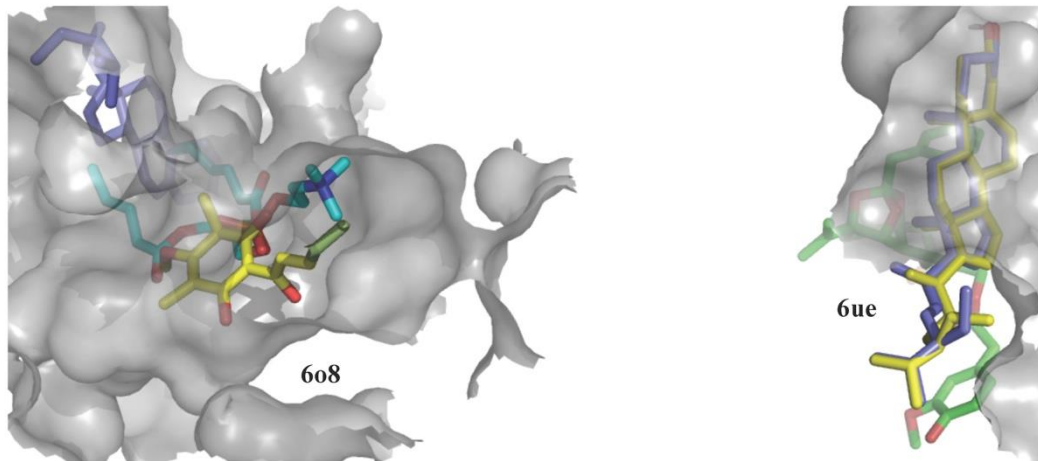
Tabel 2. Daftar residu yang terlibat dalam interaksi ligan-protein untuk *binding site pocket* 6ue (comp05 dan comp14) dan 6o8 (comp04 dan comp14).

| Interaction Type | 6ue | 6o8 | comp04 | comp05 | comp14 |
|-----------------------------|--|--|---------------------------|--|--|
| <i>bsp^A: 6ue</i> | | | | | |
| Hydrophobic interaction | phe639 , thr642 , ile643, | nd [∞] | nd [∞] | ile569, ile573, phe580, tyr584, ile585, phe639 , thr642 , leu675, leu682 | ile569, ile573, leu577, ile585, phe639 , thr642 , leu675, leu679, leu682 |
| <i>bsp^A: 6o8</i> | | | | | |
| Hydrophobic interaction | nd [∞] | val441 , tyr445 , tyr487 | asn438, arg491, lys715 | nd [∞] | val441 , tyr445 , leu483, tyr487 , phe490 |
| Hydrogen bonding | nd [∞] | <u>tyr555</u> | <u>tyr487</u> | nd [∞] | - |
| Phi-cation interaction | nd [∞] | phe516 | - | nd [∞] | - |

^A*bsp*: binding site pocket; [∞]nd: not done (tidak dikerjakan)

Tabel 2 menyajikan data interaksi dari 2 ligan uji terbaik pada setiap *pocket* ligan *native-like*. Interaksi hidrofobik didapati lebih dominan pada *pocket* 6ue dibandingkan interaksi lainnya seperti ikatan hidrogen atau interaksi kation-phi. Peningkatan jumlah interaksi ini tidak memberikan kontribusi langsung pada *Score* akhir ikatan afinitas (Gambar 3) namun dalam kasus ini ditemukan

kecenderungan bahwa jumlah tersebut menurunkan afinitas ikatan ligan-protein. Hasil yang kontras diperoleh untuk *pocket* ligan 6o8. Senyawa 4 mempunyai nilai afinitas ikatan lebih baik walau sama sekali tidak memiliki kesamaan residu interaksi dengan ligan 6o8. Selain faktor adanya ikatan hidrogen, konformasi senyawa 4 hasil *docking* berada sepenuhnya di dalam *binding site pocket* target (Gambar 4).



Gambar 4. Konformasi 2 ligan uji terbaik pada masing-masing *pocket*: 6ue (senyawa 5 dan 14) dan 6o8 (senyawa 4 dan 14).

Ketiga residu interaksi dari ligan 6o8 juga ditemukan dalam interaksinya senyawa 14 dengan protein TRPV1 pada *pocket* 6o8. Adanya interaksi hidrofobik tambahan tidak memberikan efek negatif seperti yang terjadi pada *pocket* 6ue.

4. KESIMPULAN

Senyawa *native-like* atau ligan dengan tingkat fleksibilitas tinggi memiliki kemampuan berinteraksi dengan *binding site pocket* lebih besar dengan variasi konformasi interaksi lebih banyak. Nilai afinitas ikatannya pun ditentukan oleh volume *gridbox* yang digunakan dalam *docking*.

REFERENSI

- [1] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, and Bourne PE. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28: 235-242.
- [2] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, and Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*. 1997; 389 (6653): 816–24. PMID: 9349813. DOI:10.1038/39807.
- [3] Brederson JD, Kym PR. and Szallasi A. Review: Targeting TRP channels for pain relief. *European J. Pharmacology*. 2013; 716 (1–3), 61-76. PMID: 23500195. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.03.003.
- [4] Swiss Institute of Bioinformatics Biozentrum, University of Basel – SWISS-MODEL is a fully automated protein structure homology-modelling server, accessible via the ExpASY web server, or from the program DeepView (Swiss Pdb-Viewer). 2014. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: <https://swissmodel.expasy.org/>
- [5] Zhang Lab, University of Michigan – i-TASSER server (Iterative Threading ASSEMBly Refinement) is a hierarchical

- approach to protein structure and function prediction. 2008. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>
- [6] Li H, Leung KS, and Wong MH. idock: A Multithreaded Virtual Screening Tool for Flexible Ligand Docking. In *IEEE Symposium on Computational Intelligence in Bioinformatics and Computational Biology (CIBCB)*, San Diego, United States; 2012 pp.77-84. DOI: 10.1109/CIBCB.2012.6217214
- [7] Trott O. 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>
- [8] Marvin was used for drawing, displaying, characterizing and calculating chemical structures, substructures and reactions, Marvin 16.5.16 2016, ChemAxon (<http://www.chemaxon.com>)
- [9] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004; 25(13): 1605-12.
- [10] O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, and Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminformatics.* 2011; 3: 33. DOI: 10.1186/1758-2946-3-33
- [11] Dallakyan S, and Olson AJ. Small-Molecule Library Screening by Docking with PyRx. *Methods Mol Biol.* 2015; 1263:243-50.
- [12] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8 Schrödinger, LLC.
- [13] Salentin S, Schreiber S, Haupt VJ, Adasme MF, and Schroeder M. PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucl. Acids Res.* 2015; 43 (W1): W443-W447. DOI: 10.1093/nar/gkv315.
- [14] National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine – Protein. 2017. [cited 2017]. Dapat diakses pada laman: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_542437.2
- [15] 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.
- [16] Ballester PJ and Mitchell JBO. A machine learning approach to predicting protein-ligand binding affinity with applications to molecular docking. *Bioinformatics.* 2010; 26: 1169-1175. PMID: 20236947. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq112.

