

**PREDIKSI 3D-MOLEKULAR AKTIVITAS TURUNAN SENYAWA POLIHIDROKSI
ZERUMBON TERHADAP GLIKOGEN SINTASE KINASE-3 BETA (GSK-3 β)
MENGUNAKAN DOCK6**

Broto Santoso¹, Dedi Hanwar², Andi Suhendi³

¹Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
email: Broto.Santoso@ums.ac.id

²Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
email: Dedi.Hanwar@ums.ac.id

³Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta
email: Andi.Suhendi@ums.ac.id

Abstract

Insulin resistance causes 90% of type 2 diabetes mellitus (DM) cases and this is due to an increase in the activity of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3). Dephosphorylation and activation of glycogen synthase prevent type 2 diabetes by inhibiting the work of GSK-3 beta isoform primarily. The study was done in unix (mac and linux) operating system with the sequence of steps were optimization of geometry of ligand, ligand and protein preparation, validation of docking methods, molecular docking and analysis, and 3D modeling of ligand-protein interactions. Optimization of target ligand geometry using Gaussian showed that molecular docking score increased 62.5% compared with geometry optimization using MarvinSpace. Polyhydroxy compound zerumbon derivats: ZER04, ZER05 and ZER06 potential to be tested further in the laboratory as an anti- type 2 diabetes both in vitro and in vivo. This is based on the ability of the compounds in term of molecular interactions that better than the native ligand of target protein 4PTE, 4AFJ, 3ZRK, 3GB2, 3DU8 and 1Q3W (60% of the total protein targets tested) as an inhibitor of glycogen synthase kinase- 3 types of beta (GSK-3b).

Keywords: polyhydroxyzerumbone, glycogen synthase kinase-3 beta, docking molecular, DOCK6

1. PENDAHULUAN

Penyakit diabetes merupakan penyakit yang umum ditemui pada masyarakat kota bahkan mulai merambah di pedesaan dengan ciri pola hidup mereka yang tidak sehat. Mereka semakin banyak dihadapkan pada produk instan yang mengandung bahan-bahan pemicu penyakit diabetes. Penderita diabetes memerlukan obatnya sepanjang hidupnya yang mengakibatkan efek samping yang terakumulasi terus-menerus. Tipe diabetes yang masih dapat diobati secara mandiri melalui obat modern adalah tipe 2.

Diabetes mellitus tipe 2 dapat diobati dengan menghambat proses kerja enzim glikogen sintase kinase-3 (GSK-3) melalui mekanisme sensitasi insulin, *uptake* glukosa dan sintesis glikogen. Insulin berfungsi utama sebagai stimulator proses *uptake*, metabolisme dan penyimpanan glukosa di dalam adiposit, miosit dan hepatosit. Kegagalan sekresi insulin menyebabkan penyakit diabetes tipe 1.

Sebaliknya, resistensi terhadap insulin menjadi penyebab 90% kasus diabetes tipe 2 diakibatkan terjadinya peningkatan aktivitas GSK-3. Ekspresi enzim GSK-3 dilaporkan meningkat pada kasus diabetik otot (Meijer, Flajolet and Greengard, 2004; Cohen and Goedert, 2004).

Enzim glikogen sintase mengalami fosforilasi dan inaktivasi dikarenakan kerja dari salah satu protein kinase, yaitu glikogen sintase kinase-3 (GSK-3) terutama bentuk isoform betanya. Hal ini berakibat tidak berfungsinya enzim glikogen sintase. Residu Ser9 pada GSK-3 β adalah asam amino yang bertanggung jawab terhadap peristiwa fosforilasi ketika aktivasi enzim tersebut. Aktivitas lainnya adalah insulin dapat menstimulasi penghambatan GSK-3 yang mendorong defosforilasi enzim GSK-3 β dan aktivasi glikogen sintase. Suatu molekul dapat menjadi inhibitor selektif terhadap enzim GSK-3 β diduga juga akan memiliki

kemampuan terapeutik terhadap penyakit diabetes tipe II (Bertrand *et al.*, 2003).

Obat-obatan anti-diabetes, seperti metformin, masih efektif dalam pengaturan konsentrasi glukosa dalam darah, namun diketahui tidak cukup poten dan memberikan efek samping yang tidak menyenangkan. Efek metformin pun tidak mendorong terjadinya aktivasi sinyal jalur insulin sehingga pengaruhnya tidak dapat meringankan semua efek jangka panjang dari diabetes. Kadar gula darah umumnya ditentukan dari kecepatan konversi menjadi glikogen dan kecepatan produksi glukosa oleh hati (Cohen and Goedert, 2004).

2. METODE PENELITIAN

Kajian 3D Molekular dilakukan menggunakan MacBookPro 2012 (Mac OS X Yosemite) dan Komputer Personal (Linux Ubuntu Trusty 14.0.4) dengan mengikuti tahapan berikut:

Pertama, optimasi struktur 3D senyawa target menggunakan perhitungan Gaussian

Density Functional Theory (DFT): B3LYP dibandingkan dengan hasil 3D yang diperoleh menggunakan MarvinSpace dari ChemAxon. Semua struktur senyawa target, yaitu zerumbon, zerumbol dan berikut 6 turunan lainnya digambar menggunakan MarvinSketch. Bentuk struktur 2D yang diperoleh dikonversi menjadi struktur 3D menggunakan MarvinSpace. Hasil struktur 3D ini dioptimasi menggunakan Gaussian 2009.

Berikutnya, preparasi protein target menggunakan Chimera: untuk mendapatkan 4 molekul yang diperlukan dalam perhitungan menggunakan Dock6, yaitu molekul bermuatan dari protein dan ligan yang terdapat di dalamnya, protein tanpa hidrogen dan *molecular surface* dari protein. Tabel 1 merupakan 10 protein target yang digunakan dalam kajian ini dan diperoleh dari database RCSB (<http://www.rcsb.org>).

Langkah ketiga adalah validasi *docking* molekular menggunakan ligan *native* masing-masing protein target. Langkah ini ditujukan untuk mendapatkan parameter docking yang sesuai dengan ditunjukkan dari nilai RMSD yang tidak lebih dari 5, antara ligan hasil kristalografi dan *docking* molekular. Parameter yang dimaksud adalah koordinat 3D dari pusat massa ligan dan nilai

Tabel 1. Protein target dari enzim Glikogen sintase kinase-3 beta (GSK-3 β) dari PDB database.

Kode Protein	Resolusi (Å)	Nama & kode ligan	Referensi (DOI)
4PTE	2,03	N-[4-(isoquinolin-7-yl)pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (2WF)	10.1016/j.bmcl.2015.03.046
4ACC	2,21	3-amino-6-(4-[[2-(dimethylamino)ethyl]sulfamoyl]phenyl)-n-pyridin-3-ylpyrazine-2-carboxamide (7YG)	10.1021/jm201724m
4AFJ	1,98	5-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-4-ylmethyl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (SJJ)	10.1016/j.bmcl.2012.01.034
3ZRK	2,37	2-(4-pyridinyl)furo[3,2-c]pyridin-4(5h)-one (ZRK)	10.1016/j.bmcl.2011.06.050
3GB2	2,40	2-methyl-5-(3-{4-[(S)-methylsulfinyl]phenyl}-1-benzofuran-5-yl)-1,3,4-oxadiazole (G3B)	10.1021/jm900647e
3DU8	2,20	(7S)-2-(2-aminopyrimidin-4-yl)-7-(2-fluoroethyl)-1,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-4-one (553)	10.1021/jm800977q
1Q5K	1,94	N-(4-methoxybenzyl)-N'-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)urea (TMU)	10.1074/jbc.M306268200
1UV5	2,80	6-bromoindirubin-3'-oxime (BRW)	10.1016/j.chembiol.2003.11.010
1Q3W	2,30	9-nitro-5,12-dihydro-7h-benzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6-one (ATU)	10.1016/j.jmb.2003.08.031
1Q3D	2,20	Staurosporine (STU)	10.2174/1381612043452668

besaran volume *gridbox* dari *binding site pocket* yang digunakan.

Keempat, *docking* molekular terhadap semua senyawa dilakukan menggunakan Dock6 dengan 2 pemodelan, yaitu: 1) tetap mempertahankan konformasi 3D dari senyawa dan 2) menguji berbagai konformasi 3D baru hasil pencarian Dock6 selama proses.

Terakhir, pemodelan 3D dan interaksi ligan-protein divisualisasikan dengan perangkat lunak PyMOL dan PLIP. Data skor *docking* dan interaksi residu-ligan dianalisis peringkat dan kesamaannya terhadap ligan *native* masing-masing protein target.

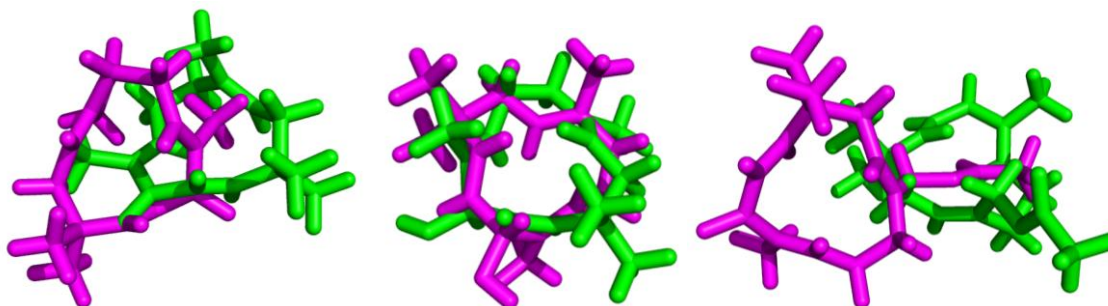
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil penelusuran protein target pada database *pdb.org* yang memiliki mekanisme aksi penghambatan enzim glikogen sintase kinase-3 beta diperoleh 10 protein yang memenuhi persyaratan untuk dijadikan sebagai target *docking* molekular. Beberapa protein

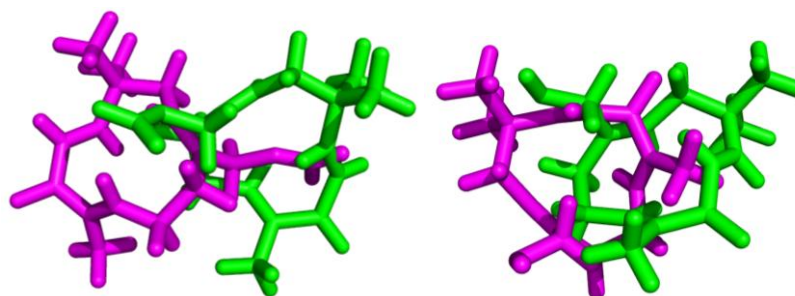
merupakan hasil kristalografi menggunakan X-ray dengan resolusi maksimal 2,5 angstrom, diperoleh dari sumber organisme *Homo sapiens* dan memiliki ligan dalam struktur kompleksnya kecuali 1UV5 yang merupakan protein target penuntun untuk kelompok enzim tersebut. Data lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 1.

Struktur target (yang diujikan) dioptimasi konformasi molekul 3D-nya dengan menggunakan Gaussian DFT (B3LYP) dan dibandingkan dengan struktur target yang diperoleh dari MarvinSpace. Hal ini perlu dilakukan untuk melihat konformasi molekulnya secara 3D pertama kali sebelum dilakukan *docking* molekular. Posisi 3D secara koordinat xyz mempengaruhi hasil akhir dari interaksinya dengan protein target.

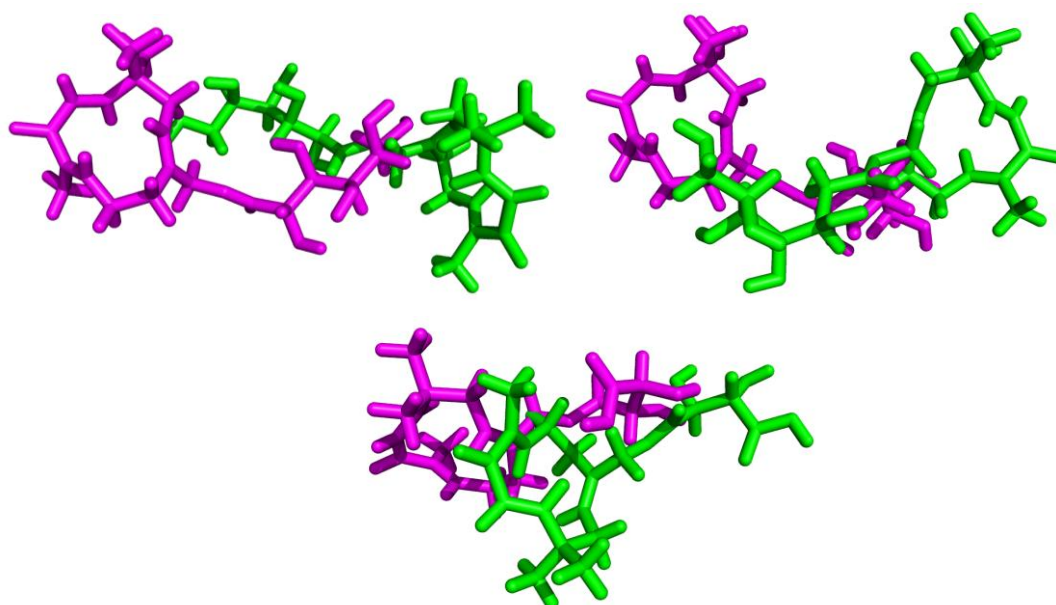
Hasil optimasi menggunakan algoritma DFT-B3LYP memberikan konformasi hasil yang berbeda dengan konformasi 3D hasil pembentukan menggunakan perangkat lunak



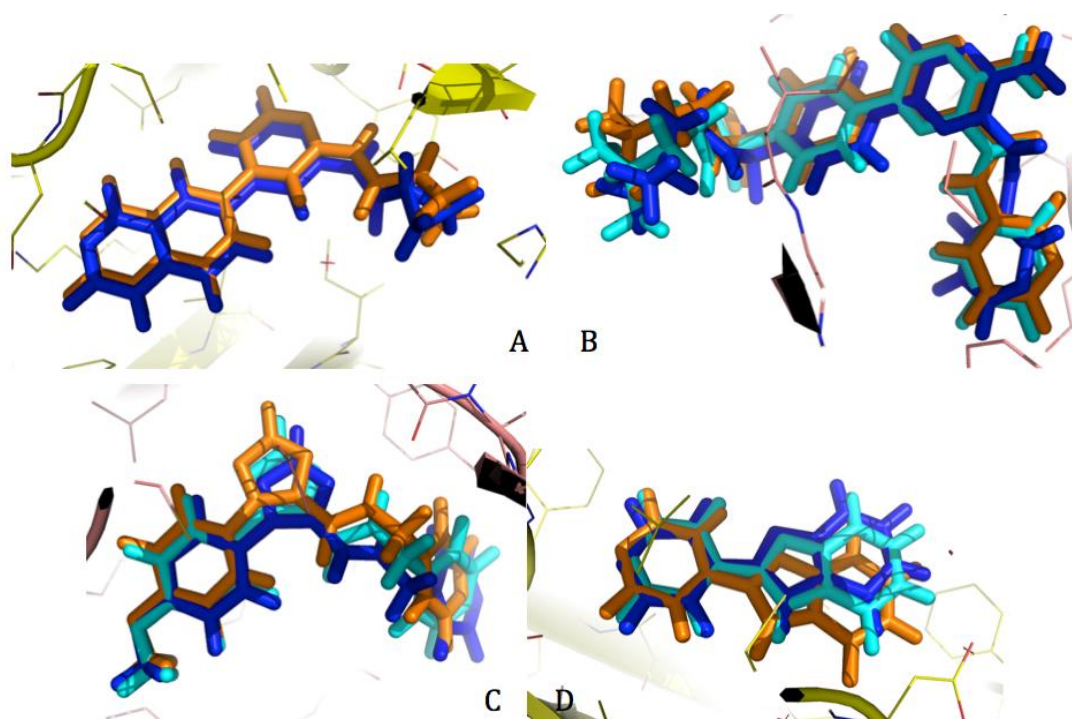
Gambar 1. Konformasi 3D zerumbon (A), zerumbol (B) dan ZER01 (C) yang dihasilkan oleh perhitungan optimasi Gaussian DFT-B3LYP (hijau) dan MarvinSpace (magenta).



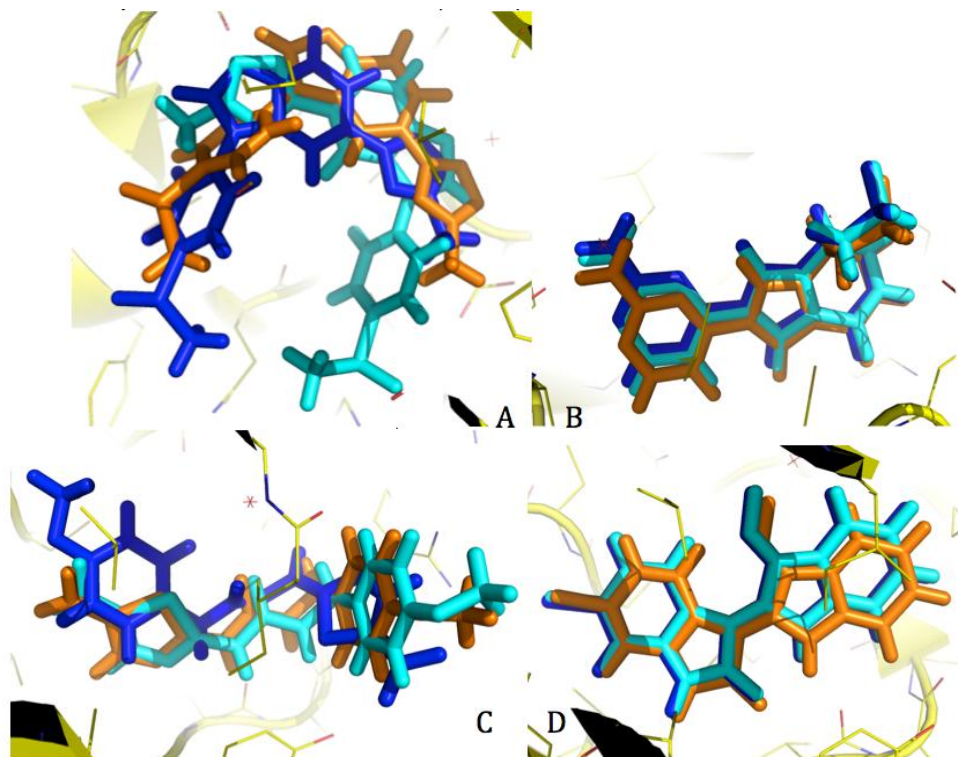
Gambar 2. Konformasi 3D ZER02 (A) dan ZER03 (B) yang dihasilkan oleh perhitungan optimasi Gaussian DFT-B3LYP (hijau) dan MarvinSpace (magenta).



Gambar 3. Konformasi 3D ZER04 (A), ZER05 (B) dan ZER06 (C) yang dihasilkan oleh perhitungan optimasi Gaussian DFT-B3LYP (hijau) dan MarvinSpace (magenta).



Gambar 4. Konformasi 3D molekular ligan *native* (orange), struktur rigid (biru) dan fleksibel (cyan) hasil *docking* dari N-[4-(isoquinolin-7-yl)pyridin-2-yl]cyclopropanecarboxamide (2WF, RMSD=0,6495) pada protein 4PTE (A), 3-amino-6-(4-{[2-(dimethylamino)ethyl]sulfamoyl}phenyl)-n-pyridin-3-ylpyrazine-2-carboxamide (7YG, RMSD=0,7016) dalam protein 4ACC (B), 5-(4-methoxyphenyl)-N-(pyridin-4-ylmethyl)-1,3-oxazole-4-carboxamide (SJJ, RMSD=0,5967) pada protein 4AFJ (C) dan 2-(4-pyridinyl)furo[3,2-c]pyridin-4(5h)-one (ZRK, RMSD=0,8097) dalam protein 3ZRK (D).



Gambar 5. Konformasi 3D molekular ligan *native* (orange), struktur rigid (biru) dan fleksibel (cyan) hasil *docking* dari 2-methyl-5-(3-{4-[(S)-methylsulfinyl] phenyl}-1-benzofuran-5-yl)-1,3,4-oxadiazole (G3B, RMSD=5,1056) pada protein 3GB2 (A) dan (7S)-2-(2-aminopyrimidin-4-yl)-7-(2-fluoroethyl)-1,5,6,7-tetrahydro-4H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-4-one (553, RMSD=0,4501) dalam protein 3DU8 (B), N-(4-methoxybenzyl)-N'-(5-nitro-1,3-thiazol-2-yl)urea (TMU, RMSD=1,0546) pada protein 1Q5K (C) dan 6-bromoindirubin-3'-oxime (BRW, RMSD=0,5629) dalam protein 1UV5 (D).

MarvinSpace. Hal ini memberikan titik awal interaksi yang berbeda pula terhadap protein target nantinya. Gambaran 3D masing-masing konformasi ligan uji dapat dilihat pada Gambar 1-3. Posisi 3D awal suatu konformasi molekul ligan turut memberikan kontribusi terhadap algoritma perhitungan *docking* molekularnya. Dock6 menggunakan 2 metode interaksi ligan-protein, yaitu konformasi rigid (perpindahan posisi 3D dilakukan secara keseluruhan molekul) dari ligan-protein dan konformasi fleksibel dari ligan terhadap protein yang rigid.

Validasi konformasi hasil *docking* molekular ligan *native* memperlihatkan hasil yang baik, nilai RMSD masing-masing mendekati 5, baik untuk hasil yang menggunakan metode rigid dan fleksibel, kecuali untuk protein target 4PTE. Pengujian ini perlu dilakukan untuk mengetahui apakah

sistem *docking* molekular memenuhi hasil yang mendekati konformasi ligan sebenarnya atau dari hasil kristalografi. Hal ini juga dimaksudkan untuk menguji kedekatan interaksi ligan-protein dibandingkan dengan antara ligan yang diuji dengan ligan *native*. Visualisasi dari interaksi ligan uji yang lebih baik dibandingkan dengan ligan *native* dapat dilihat pada suplemen data artikel.

Hasil *docking* molekular didapatkan hasil yang tidak lebih baik terhadap ligan *native* empat (4) protein target (4ACC, 3DU8, 1UV5 dan 1Q3D) dari 10 target protein yang diujikan. ZER04, ZER05 dan ZER06 merupakan ligan uji yang memiliki nilai atau skor *docking* yang lebih baik (menggunakan perangkat lunak Dock6) berdasarkan data pada suplemen data artikel. Optimasi 3D molekular terhadap ligan uji telah dilakukan menggunakan perangkat lunak Gaussian

dengan algoritma DFT:B3LYP. Optimasi ini perlu dilakukan untuk mendapatkan konformasi 3D dari ligan yang memiliki energi terendah sesuai dengan kondisi lingkungan yang diberikan, dalam hal ini digunakan kondisi vakum. Optimasi Gaussian memberikan hasil skor *docking* 62,5% meningkat dibandingkan dengan hasil MarvinSpace.

Residu Ile62, Phe67, Val70 dan Thr138 memiliki kontribusi utama dalam hasil akhir skor *docking* untuk interaksi hidrofobik antara ligan dan protein. Ikatan hidrogen yang terjadi dipengaruhi oleh residu Val135 dan Asp200. Keberadaan air dalam protein membentuk jembatan ikatan antara residu Gln185, Asp200 dengan H₂O protein. Kedelapan residu tersebut memberikan penanda awal bahwa dalam pengembangan lanjutan turunan zerumbon sebaiknya mengandung gugus fungsional yang dapat berinteraksi dengan residu-residu tersebut.

4. SIMPULAN

Metode *docking* molekular yang dilakukan sudah memenuhi parameter validasi. Hal ini diperlihatkan dari nilai RMSD yang diperoleh tidak melebihi 5, berarti konformasi ligan native hasil docking mendekati konformasi sesungguhnya, hasil kristalografi protein target masing-masing. Senyawa turunan zerumbon: ZER04, ZER05 dan ZER06 memberikan potensi untuk diujikan lebih lanjut di laboratorium sebagai anti-diabetes tipe 2 baik secara *in vitro* dan *in vivo*. Hal ini didasari atas kemampuan interaksi molekular ketiganya yang lebih baik dibandingkan dengan ligan *native* dari protein target 4PTE, 4AFJ, 3ZRK, 3GB2, 3DU8 dan 1Q3W (60% dari total protein target yang diujikan) sebagai inhibitor glikogen sintase kinase-3 tipe beta (GSK-3 β).

5. REFERENSI

Berg, S., Bergh, M., Hellberg, S., Högdin, K., Lo-Alfredsson, Y., Söderman, P., von Berg, S., Weigelt, T., Ormö, M., Xue, Y., Tucker, J., Neelissen, J.,

Jerning, E., Nilsson, Y. and Bhat, R. (2012) 'Discovery of Novel Potent and Highly Selective Glycogen Synthase Kinase-3 β (GSK3 β) Inhibitors for Alzheimer's Disease: Design, Synthesis, and Characterization of Pyrazines', *Journal of Medicinal Chemistry*, 55(21), pp. 9107-9119.

Bertrand, J. A., Thieffine, S., Vulpetti, A., Cristiani, C., Valsasina, B., Knapp, S., Kalisz, H. M. and Flocco, M. (2003) 'Structural Characterization of the GSK-3 β Active Site Using Selective and Non-selective ATP-mimetic Inhibitors', *Journal of Molecular Biology*, 333(2), pp. 393-407.

Bhat, R., Xue, Y., Berg, S., Hellberg, S., Ormö, M., Nilsson, Y., Radesäter, A.-C., Jerning, E., Markgren, P.-O., Borgegård, T., Nylöf, M., Giménez-Cassina, A., Hernández, F., Lucas, J. J., Díaz-Nido, J. and Avila, J. (2003) 'Structural Insights and Biological Effects of Glycogen Synthase Kinase 3-specific Inhibitor AR-A014418', *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), pp. 45937-45945.

Cohen, P. and Goedert, M. (2004) 'GSK3 inhibitors: development and therapeutic potential', *Nat Rev Drug Discov*, 3(6), pp. 479-487.

Gentile, G., Bernasconi, G., Pozzan, A., Merlo, G., Marzorati, P., Bamborough, P., Bax, B., Bridges, A., Brough, C., Carter, P., Cutler, G., Neu, M. and Takada, M. (2011) 'Identification of 2-(4-pyridyl)thienopyridinones as GSK-3 β inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21(16), pp. 4823-4827.

Gentile, G., Merlo, G., Pozzan, A., Bernasconi, G., Bax, B., Bamborough, P., Bridges, A., Carter, P., Neu, M., Yao, G., Brough, C., Cutler, G., Coffin, A. and

- Belyanskaya, S. (2012) '5-Aryl-4-carboxamide-1,3-oxazoles: Potent and selective GSK-3 inhibitors', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22(5), pp. 1989-1994.
- Meijer, L., Flajolet, M. and Greengard, P. (2004) 'Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3', *Trends in pharmacological sciences*, 25(9), pp. 471-480.
- Meijer, L., Skaltsounis, A.-L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., Crovace, C., Tarricone, C., Musacchio, A., Roe, S. M., Pearl, L. and Greengard, P. (2003) 'GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins', *Chemistry & Biology*, 10(12), pp. 1255-1266.
- Menichincheri, M., Bargiotti, A., Berthelsen, J., Bertrand, J. A., Bossi, R., Ciavoletta, A., Cirila, A., Cristiani, C., Croci, V., D'Alessio, R., Fasolini, M., Fiorentini, F., Forte, B., Isacchi, A., Martina, K., Molinari, A., Montagnoli, A., Orsini, P., Orzi, F., Pesenti, E., Pezzetta, D., Pillan, A., Poggesi, I., Roletto, F., Scolaro, A., Tatò, M., Tibolla, M., Valsasina, B., Varasi, M., Volpi, D., Santocanale, C. and Vanotti, E. (2009) 'First Cdc7 Kinase Inhibitors: Pyrrolopyridinones as Potent and Orally Active Antitumor Agents. 2. Lead Discovery', *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(2), pp. 293-307.
- Saitoh, M., Kunitomo, J., Kimura, E., Iwashita, H., Uno, Y., Onishi, T., Uchiyama, N., Kawamoto, T., Tanaka, T., Mol, C. D., Dougan, D. R., Textor, G. P., Snell, G. P., Takizawa, M., Itoh, F. and Kori, M. (2009) '2-{3-[4-(Alkylsulfinyl)phenyl]-1-benzofuran-5-yl}-5-methyl-1,3,4-oxadiazole Derivatives as Novel Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3 β with Good Brain Permeability', *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(20), pp. 6270-6286.
- Salentin, S., Schreiber, S., Haupt, V. J., Adasme, M. F. and Schroeder, M. (2015) 'PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler', *Nucleic Acids Research*, 43(W1), pp. W443-W447.
- Sivaprakasam, P., Han, X., Civiello, R. L., Jacutin-Porte, S., Kish, K., Pokross, M., Lewis, H. A., Ahmed, N., Szapitel, N., Newitt, J. A., Baldwin, E. T., Xiao, H., Krause, C. M., Park, H., Nophsker, M., Lippy, J. S., Burton, C. R., Langley, D. R., Macor, J. E. and Dubowchik, G. M. (2015) 'Discovery of new acylaminopyridines as GSK-3 inhibitors by a structure guided in-depth exploration of chemical space around a pyrrolopyridinone core', *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25(9), pp. 1856-1863.