



Surabaya, 6 Juli 2023

SEMINAR NASIONAL HASIL RISET DAN PENGABDIAN

"Peran Riset, Inovasi dan Pengabdian Kepada Masyarakat Bagi Pembangunan Indonesia Berkelanjutan"



PERHITUNGAN PERUBAHAN ENERGI BEBAS LIGAN RAPAMYCIN DALAM KOMPLEKS MIP-RAPAMYCIN DAN FKBP12-RAPAMYCIN

Elisabeth Catherina Widjakusuma^{1*}, Devi Herlina², Wa Ode Nur Nisa Amalia³

¹Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

Email: ecwidj@ukwms.ac.id, deviherlina0210@gmail.com, waodenuurnisa25@gmail.com

Abstrak

Pada penelitian ini, perhitungan energi bebas dilakukan untuk kompleks MIP-rapamicin dan FKBP12-rapamicin dengan menggunakan metode integrasi termodinamika. Protein MIP (*macrophage infectivity potentiator*) adalah faktor virulensi yang berasal dari bakteri *Legionella pneumophila*. Bakteri ini menyerang makrovag alveolar manusia dan dapat menyebabkan penyakit pneumonia yang beresiko kematian. Struktur dari protein MIP menyerupai struktur dari protein FKBP12 (the 12 kDa FK506 *binding protein*), yang merupakan protein yang dapat mengikat immunosupresan seperti FK506, Rapamicyn dan siklofilin. Akibat interaksi tersebut sistem kekebalan tubuh manusia akan menurun. Rapamicyn digunakan sebagai immunosupresan untuk transplantasi organ. Kemiripan struktur antara MIP dan FKBP12 merupakan tantangan untuk mendapatkan ligan yang selektif untuk melawan bakteri *Legionella pneumophila* tetapi tidak bersifat immunosupresif. Perhitungan energi bebas kedua kompleks tersebut menunjukkan afinitas FKBP12-Rapamicyn lebih tinggi dibandingkan MIP-Rapamicyn.

Kata kunci: perhitungan energi bebas, integrasi termodinamika, MIP, *Legionella pneumophila*, FKBP12

Copyright © (2022) Seminar Hasil Riset dan Pengabdian ke 4

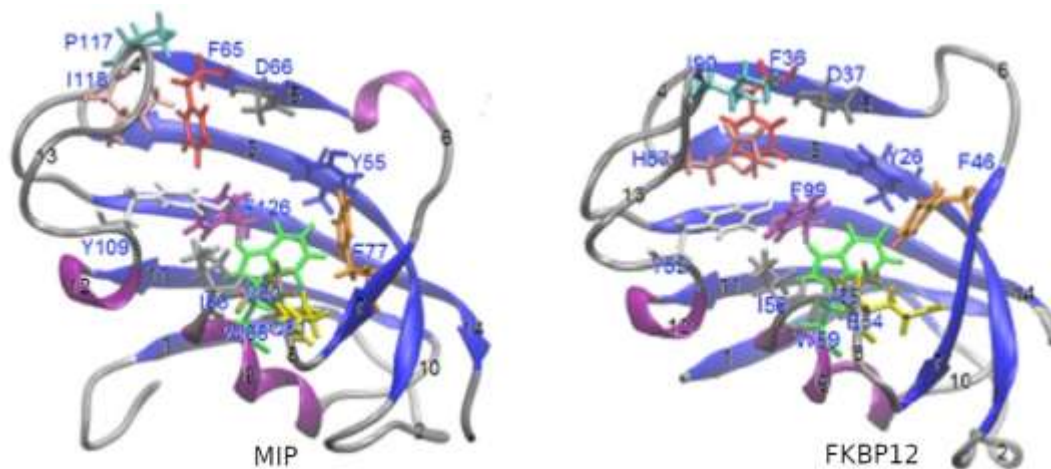
PENDAHULUAN

Antibiotika bekerja dengan cara menghambat pertumbuhan atau membunuh sel bakteri. Target dari antibiotika adalah jalur esensial dari bakteri, misalnya dengan menghambat sintesis dinding sel dari mikroba, menghalangi sintesis protein baru, atau mencegah replikasi DNA. Masalah terpenting yang dapat timbul dari penggunaan antibiotika adalah resistensi yang dapat menyebabkan kematian. Salah satu cara mengatasi resistensi antibiotik adalah dengan menemukan target baru dari sel bakteri.

Salah satu alternatif target baru adalah faktor virulensi pada beberapa bakteri Gram negatif, misalnya faktor virulensi, Oyang mirip dengan protein FKBP12 pada manusia, yang

Odikonal dengan MIP (gambar di bawah) dari bakteri patogen *Trypanosoma cruzi*, *Ooxiella burnetii*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Legionella pneumophila* (Kolos, 2018).

Penelitian ini menggunakan dua macam kompleks dan membandingkan afinitas Rapamycin terhadap MIP dari *Legionella pneumophila* dan FKBP12 dengan menghitung energi bebas pengikatan ligan Rapamycin pada kedua protein tersebut. Informasi ini dapat memberi manfaat pada design ligan baru yang selektif terhadap MIP. Gambar 1 menunjukkan kemiripan protein MIP (Ceyman, 200) dan FKBP12 (van Duyne, 1991). Penelitian sebelumnya telah memperlihatkan ada perbedaan fleksibilitas antara kedua protein (Widjajakusuma, 2022), dan penelitian ini melanjutkan untuk memprediksi afinitas kedua kompleks ini.



Gambar 1. Protein MIP dan FKBP12. Residu-residu pada sisi pengikatan ditunjukkan dengan warna yang sama sesuai dengan posisi yang sama pada kedua protein

METODE

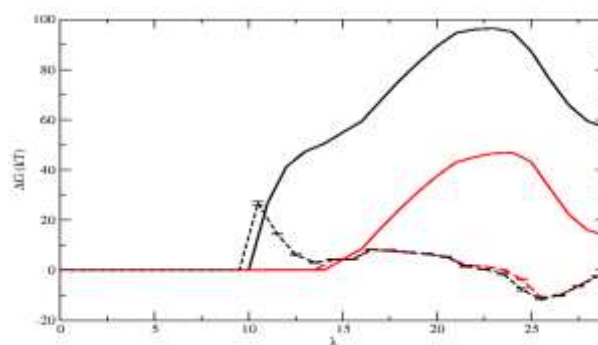
Parameterisasi ligan Rapamycin dengan medan gaya umum menggunakan perangkat lunak *Assisted Model Building with Energy Refinement* (AMBER) dengan metode *Generalized Amber Force Field* (GAFF) (Wang, 2004) dan muatan diturunkan menggunakan metode AM1-BBC (*Atom-Atom Method 1 Bond Charge Correction*) yang diterapkan dalam program Antechamber dari AMBER versi 18 (Abraham, 2018) dan untuk protein ff99SB (Lindorff-Larsen, 2010). Topologi dan koordinat GROMACS (Lemkul, 2019) dihasilkan dari AMBER versi 18 yang menggunakan program acpype (Sousa, 2012). Kompleks 2VCD (Ceyman, 2008) dan 1FKB (van Duyne, 1991) kemudian dinetralkan menggunakan 4 Cl-counterion dan dilarutkan dengan air TIP3P (Jorgensen, 1983) eksplisit dalam kotak dodecahedron periodik yang memanjang 10 Å ke atom kompleks terluar. Kemudian menjalankan minimasi energi. Algoritma Verlet kecepatan dengan timestep 2 fs digunakan untuk mengintegrasikan persamaan gerak kemudian kondisi batas periodik diterapkan. Pendekatan Partikel Mesh Ewald dengan jarak putus ruang 12 Å langsung digunakan untuk interaksi elektrostatik jarak jauh. Suhu sistem dijaga pada 300 K menggunakan

metode V-rescale dan tekanan dipertahankan pada 1 bar menggunakan metode Parrinello-Rahman (Parrinello, 1981).

Panjang ikatan yang melibatkan atom hidrogen dibatasi menggunakan LINCS. Sistem ini kemudian diminimalkan untuk 50.000 langkah minimalisasi penurunan curam, selanjutnya diseimbangkan menggunakan ensemble NVT untuk 50.000 langkah (100 ps) dan ensemble NPT untuk 50.000 langkah (100 ps). Dinamika produksi kemudian dilakukan menggunakan isobarik-isothermal. NPT (jumlah konstan partikel, tekanan, dan suhu) ansambel menggunakan langkah waktu 2 fs dan koordinat disimpan setiap picosecond untuk analisis. Algoritma SHAKE (Miyamoto, 1992) digunakan untuk membatasi gerakan ikatan yang mengandung hidrogen karena dinamika protein ditentukan oleh lanskap energi potensial mereka, penambahan potensi dapat mempercepat proses tersebut.

Sekarang setelah keseimbangan selesai, simulasi dinamika molekul dijalankan. Interaksi elektrostatik dihitung menggunakan metode Particle Mesh Ewald (PME). Menjalankan simulasi dengan kondisi tekanan 1 bar, suhu 300 K, jumlah air 6442 molekul. Sistem kemudian disimulasikan selama 10 ns dilanjutkan dengan conformational flooding selama 10 ns dan diteruskan kembali dengan simulasi klasik selama 5 ns. Perhitungan perubahan energi bebas menggunakan 30 nilai λ (koordinat reaksi) dan total simulasi adalah 300 ns.

HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 2. Perubahan energi bebas ligan dalam kompleks MIP-Rapamycin (garis hitam) dan FKBP-Rapamycin (garis merah). Garis putus-putus adalah perubahan energi bebas untuk λ , sedangkan garis biasa adalah perubahan energi bebas kumulatif

Gambar 2 menunjukkan perubahan energi bebas dari ke-30 λ . Sumbu x merupakan kondisi simulasi λ sebanyak 30 kondisi dan sumbu y merupakan nilai perubahan energi bebas (ΔG) selama simulasi dalam (kT). Pada perhitungan perubahan energi bebas (ΔG) digunakan dalam satuan kJ/mol yang bila dikonversi, nilainya 1 kT adalah 2,49 kJ/mol. Nilai hasil perhitungan energi bebas pada masing-masing parameter pada setiap perubahan kondisi λ memiliki nilai yang berbeda. Nilai λ pada awal semuanya nol yang dimana ada protein tetapi tidak ada ligan atau ligan awalnya dianggap tidak ada. Kemudian interaksi dua atom yang dihubungkan oleh ikatan kovalen

dinaikkan secara bertahap. Pada λ pertama, interaksi kovalen adalah 1% dan kemudian dinaikkan hingga λ ke-10 interaksinya menjadi 100%. Simulasi untuk perhitungan bebas pada λ pertama hingga λ ke-10 mengabaikan adanya interaksi elektrostatik dan hidrofobik yang ditandai dengan λ_{coul} dan λ_{vdw} sama dengan nol. Perubahan energi bebas yang dihitung adalah nol, yang berarti tidak terdapat interaksi kovalen antara protein MIP dan ligan Rapamycin. Pada λ ke-11, λ_{coul} (interaksi elektrostatik) mulai dinaikkan 25% hingga λ ke-14 interaksinya menjadi 100%. Interaksi elektrostatik adalah interaksi antara dua atom yang tidak dihubungkan oleh ikatan kovalen yang terjadi karena adanya muatan (parsial) positif maupun (parsial) negatif pada atom-atom tersebut. Lonjakan perubahan energi bebas terjadi ketika interaksi elektrostatik diberikan sebesar 25%. Kenaikan kontribusi interaksi elektrostatik menyebabkan penurunan perubahan energi bebas meskipun kontribusinya tetap positif terhadap perubahan energi bebas total. Hal ini menunjukkan interaksi elektrostatik memang menstabilkan kompleks protein MIP dengan ligan Rapamycin, tetapi tidak sebesar kontribusi interaksi hidrofobik.

Kontribusi interaksi hidrofobik yang ditunjukkan oleh kenaikan λ interaksi van der Waals menyebabkan kenaikan perubahan energi bebas. Perubahan energi bebas terjadi ketika interaksi van der Waals diberikan sebesar 5%. Hasil yang diperoleh dari perubahan energi bebas pengikatan adalah positif terhadap perubahan energi bebas total.

Perhitungan ΔG akumulasi hasil perhitungan energi bebas, nilai ΔG yang diperoleh pada perhitungan ΔG akumulasi sama dengan hasil perhitungan energi bebas (ΔG) yaitu positif 141,77 kJ/mol. Di lain pihak, perubahan energi bebas kompleks FKBP12-Rapamycin menggunakan metode integrasi termodinamika adalah positif 34,31 kJ/mol, sedangkan penelitian ini menghitung perubahan energi bebas kompleks dengan protein yang berbeda dan ligan yang sama, yaitu MIP-Rapamycin. Hasil perhitungan perubahan energi bebas MIP-Rapamycin yang diperoleh adalah positif 141,77 kJ/mol, yang besarnya tiga kali lebih besar daripada kompleks FKBP12-Rapamycin. Fretz dkk (1992) telah menghitung K_d (konstanta disosiasi) dari protein FKBP12 dengan ligan rapamycin dan mendapatkan nilai sebesar 0,2 nM. Nilai ini menunjukkan perubahan energi bebas kompleks FKBP12-Rapamycin sekitar -49 kJ/mol yang nilainya hampir sama dengan FKBP12-FK506. Di lain pihak, penambahan 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Rapamycin atau FK506 menghambat aktivitas PPIase yang dapat disimpulkan nilai perubahan energi bebasnya juga negatif (Wagner, 2006). Meskipun secara kuantitatif hasilnya tidak sesuai dengan yang diharapkan, yaitu negatif, tetapi secara kualitatif perbedaan perubahan energi bebas MIP-Rapamycin dan FKBP12-Rapamycin menunjukkan bahwa afinitas ligan Rapamycin terhadap protein FKBP12 lebih besar bila dibandingkan dengan protein MIP. Oleh karena itu dapat dimengerti mengapa Rapamycin tidak digunakan sebagai antibiotik untuk bakteri *Legionella pneumophila*.

KESIMPULAN

Hasil perhitungan perubahan energi bebas untuk ligan Rapamycin yang berinteraksi dengan protein masing-masing dalam kompleks MIP-Rapamycin dan FKBP12-Rapamycin adalah 141,77 kJ/mol dan 34,31 kJ/mol.

DAFTAR PUSTAKA

- Abraham, M.J., van der Spoel, D., Lindahl, E., dan Hess, B. (2018) GROMACS User Manual version 2018.2, www.gromacs.org.
- Case, D., Ben-Shalom, I., Brozell, S., Cerutti, D., Cheatham, T. I., Cruzeiro, V., Darden, T., Duke, R., Ghoreishi, D., Gilson, M. K., Gohlke, H., Goetz, A. W., Greene, D., Harris, R., Homeyer, N., Huang, Y., Izadi, S., Kovalenko, A., Kurtzman, T., Lee, T. S., LeGrand, S., Li, P., Lin, C., Liu, J., Luchko, T., Luo, R., Mermelstein, D. J., Merz, K. M., Miao, Y., Monard, G., Nguyen, C., Nguyen, H., Omelyan, I., Onufriev, A., Pan, F., Qi, R., Roe, D. R., Roitberg, A., Sagui, C., Schott-Verdugo, S., Shen, J., Simmerling, C. L., Smith, J., Salomon-Ferrer, R., Swails, J., Walker, R.C., Wang, J., Wei, H., Wolf, R. M., Wu, X., Xiao, L., York, D.M., dan Kollman, P.A. (2018) Amber 2018, *AMBER 2018 Reference Manual (Covers Amber18 and AmberTools18)*, University of California, San Francisco.
- Ceyman, A., Horstmann, M., Ehses, P., Schweimer, K., Paschke, A.K., Steinert, M., and Faber, C. (2008) Solution structure of the Legionella pneumophila mip-rapamycin complex, *BMC Structural Biology*, 8(1), 1-12.
- Fretz, H., Albers, M. W., Galat, A., Standaert, R. F., Lane, W. S., Burakoff, S. J., & Schreiber, S. L. (1991) Rapamycin and FK506 binding proteins (immunophilins), *Journal of the American Chemical Society*, 113(4), 1409-1411.
- Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein, M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *Journal of Chemical Physics*, 79, 926-935.
- Kolos, J. M., Voll, A. M., Bauder, M., dan Hausch, F. (2018) FKBP Ligands—Where We Are and Where to Go?, *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1425.
- Lemkul, J.A. (2019) From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0], *Living J. Comp. Mol. Sci.* 2019, 1(1), 5068, <https://doi.org/10.33011/livecoms.1.1.5068>
- Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O., dan Shaw, D. E. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field, *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 78, 1950-1958.

- Miyamoto, S, dan Kollman, P.A. (1992) SETTLE: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models, *Journal of Computational Chemistry*, 8(13), 952-962.
- Parrinello, M., & Rahman, A. (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. *Physical review letters*, 45(14), 1196.
- Sousa da Silva, A.W. and Vranken, W.F. (2012) ACPYPE—AnteChamber PYthon Parser interfacE. *BMC Research Notes*, 5, 367. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-367>
- van Duyne, G. D., F.Standaert, R., Karplus, P. A., Schreiber, S. L. & Cardy, J. 1991. Atomic Structures of the Human Immunophilin FKBP-12 Complexes with FK506 and Rapamycin. *Journal of Molecular Biology*, 229, 105-124.
- Wagner, C., Khan, A. S., Kamphausen, T., Schmausser, B., Ünal, C., Lorenz, U., ... & Steinert, M. (2007). Collagen binding protein Mip enables Legionella pneumophila to transmigrate through a barrier of NCI-H292 lung epithelial cells and extracellular matrix. *Cellular microbiology*, 9(2), 450-462.
- Wang, J., Wolf, R.M., Caldwell, J.W., Kollman, P.A. and Case, D.A. 2004, Development and Testing of a General Amber Force Field, *Journal of Computational Chemistry*, **25(9)**: 1158-1171.
- Widjajakusuma, E. C., Frederica, M., Kaweono, K., Shea, A., Jawa, G. D. S. L., Kelan, Y. A., ... & Setiyoningsih, D. V. (2022). Studi Perbandingan Sifat Struktur dan Dinamika Bentuk Apo dan Holo dari FKBP12 dan Mip dengan Menggunakan Simulasi Dinamika Molekul. *Jurnal Farmasi Sains dan Terapan*, 9(1), 24-29.