

PENAMBATAN MOLEKUL DAN PREDIKSI UJI TOKSISITAS PADA SENYAWA TURUNAN INHIBITOR GATA-2 SEBAGAI PENINGKAT TRANSKRIPSI ERITROPOIESIS

Dona Suzana*¹, Ashfar Kurnia², Dina Melia Oktavilantika³, Lathvi Masyithah⁴

1,2,3,4. Program Studi Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan dan Farmasi, Universitas Gunadarma, Indonesia

*Corresponding author email: dona.suzana12@gmail.com

Keywords

Anemia, GATA-2, Proliferation, Erythrosite, Pyrrothiogatain Derivative.

Abstract

Anemia is a condition in which the number of red blood cells or the amount of hemoglobin, a protein responsible for transporting oxygen throughout the body, is below normal. The condition of chronic kidney disease causes a decrease in hemoglobin levels in the body so that it affects the proliferation of red blood cells. The search for compounds to stimulate the process of red blood cell proliferation without involving erythropoietin was carried out. Pyrrothiogatain compounds are believed to increase the proliferation of red blood cells, but are reported to have serious toxicity. Then modification of the molecule is carried out to find the effectiveness which has lower toxicity. Several pyritiogartain derivatives have been produced which are effective with molecular tethering and determination of the productive toxicity.

Kata kunci

Anemia, GATA-2, Proliferasi, Eritrosit, Turunan Pyrrothiogatain.

Abstrak

Anemia adalah suatu kondisi dimana jumlah sel darah merah atau jumlah hemoglobin, suatu protein yang bertanggung jawab dalam mengangkut oksigen keseluruh tubuh, berada dibawah normal. Kondisi penyakit ginjal kronis menyebabkan menurunnya kadar hemoglobin dalam tubuh sehingga berpengaruh terhadap proliferasi sel darah merah. Dilakukan pencarian senyawa untuk merangsang proses proliferasi sel darah merah tanpa melibatkan eritropoietin. Senyawa pyrrothiogatain dipercaya dapat meningkatkan proliferasi sel darah merah, tetapi dilaporkan memiliki toksisitas yang cukupo serius. Kemudian dilakukan modifikasi molekul untuk mencari efektifitas yang memiliki toksisitas yang lebih rendah dihasilkan beberapa turunan piritiogartain yang efektif dengan penambatan mokul dan penentuan toksisitas prodiktif.

PENDAHULUAN

Anemia adalah suatu kondisi dimana jumlah sel eritrosit atau jumlah massa hemoglobin, suatu protein yang bertanggung jawab dalam mengangkut oksigen keseluruh tubuh, berada dibawah normal. Selain kadar eritrosit kondisi hematokrit juga meningkatkan keparahan. Kondisi penyakit ginjal kronis pada seseorang diyakini merupakan hal utama dalam menurunnya kadar hemoglobin dalam tubuh, pada kondisi ini kadar eritropoietin akan menurun sehingga berpengaruh terhadap jumlah proliferasi sel dalarah merah. (Bakta, IM., 2006).

Hormon eritropoietin (Epo) sangat penting dalam proliferasi dan diferensiasi sel progenitor eritrosit di sum-sum tulang belakang dan bertanggung jawab dalam jumlah pasokan sel darah merah tubuh. Epo diproduksi terutama di dalam ginjal dan hati. Sintesis hormon ini meningkat seiring dengan kondisi hipoksia jaringan, kondisi keganasan lainnya seperti autoimun, dan berkurang apabila terjadi kondisi patologis pada ginjal seseorang. (La ferla, K., et al., 2002).

Dalam perkembangan sel eritroid, ekspresi reseptor eritropoiesis meningkat dengan adanya protein GATA-1, suatu efektor penting dalam transkripsinya. Protein GATA-1 biasanya lemah diekspresikan dalam limfosit tetapi dapat meningkat seiring dengan diaktifasinya keluarga protein GATA lainnya. GATA-1 berperan dalam mengatur eritropoiesis, GATA-2 berperan dalam mengatur proliferasi, sedangkan GATA-3 berperan dalam hematopoiesis. Kondisi tumpang tindih dapat terjadi pada pengikatan antara GATA-1 kepada GATA-2 terhadap faktor transkripsi. (Suzuki, M., et al. 2011).

Pengikatan GATA-2 dengan senyawa pyrrothiogatain (Nomura, S., et al. 2019) dapat meningkatkan proses proliferasi karena menghindari terjadinya ikatan silang antara GATA-1 dan GATA-2 yang akan menyebabkan tumpangtindihnya proses transkripsi. (Gaine, M.E., et al. 2017).

Pencarian turunan pyrrothiogatain dilakukan dengan menggunakan modifikasi molekul, metode Toplis merupakan cara terbaik untuk mencari beberapa kemungkinan turunan senyawa yang diharapkan, kemudian membandingkan nilai toksisitasnya terhadap senyawa pemanding untuk mencari senyawa yang efektif dan lebih aman.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah laptop dengan prosesor AMD E1, RAM 8GB, Windows XP, Sistem Operasi 64-bit. Perangkat lunak yang digunakan adalah ChemDraw 3D versi 17.1, Molegro Virtual Docker versi 6, dilengkapi PLANTS.

Bahan

Senyawa kontrol postif pyrrothiogatain berdasarkan hasil penelitian Nomura, S. et al., (2019), serta senyawa turunan dari pyrrothiogatain dengan menggunakan

metode Toplis et al., (1972), Struktur kristal dari makromolekul GATA-2 dengan kode PDB: 5O9B.

Jalannya Penelitian

1. Persiapan makromolekul

Dilakukan pengunduhan struktur protein yang akan dilakukan pen- targetan dengan suatu ligan, makro- molekul tersebut adalah GATA-2 pada manusia. Data makromolekul diunduh dari Bank Data Protein pada alamat www.rcsb.org. Pemilihan makromolekul didasarkan pada kesesuaian protein yang akan di- gunakan. Struktur kristal yang dipilih memiliki berat molekul 7,77 kDa dengan memiliki 68 residu asam amino.

2. Persiapan ligan

Disiapkan suatu senyawa ligan yang bekerja menghambat ikatan antara keluarga protein GATA dengan DNA yaitu pyrrothiogatain (Nomura, S. Et al., 2019). Dibuat pula turunan pyrrothiogatain untuk mencari potensi pengembangan senyawa baru dengan menggunakan pendekatan Toplis. Senyawa pyrrothiogatain dan turunannya dibuat dengan menggunakan perangkat lunak ChemDraw 3D versi 17.1, dan dilakukan minimisasi energi untuk melenturkan ikatan antar molekul sehingga diperoleh medan sterik yang sesuai, kemudian senyawa tersebut disimpan dalam format *.mol2.

3. Validasi penambatan

Protokol validasi penambatan menggunakan validasi internal yaitu perhitungan nilai the *Root Mean Square Deviation* (RMSD) antara kontrol positif dengan konformasi senyawa turunannya. Penambatan dapat diterima apabila hasil validasi berkisar kurang dari 2,5 Amstrong. Penentuan validasi ini menggunakan konfigurasi PLANTS pada Molegro.

4. Penambatan molekul

Dilakukan penambatan kristal protein 5O9B dengan ligan yang telah dipersiapkan dengan perangkat lunak Molegro Virtual Docker versi 6. Makromolekul terlebih dahulu dipreparasikan dengan mencari situs aktifnya (*cavities*) dengan melakukan penambatan buta (*blind docking*) pada seluruh bagian protein, karena pada saat pengunduhan makro- molekul, senyawa ligan tidak ikut termasuk kedalam struktur kristalnya.

5. Skrining toksisitas

Skrining toksisitas dilakukan dengan menggunakan prediksi farmako- kinetik *pkCSM web server*, uji ini menggunakan tipe data SMILES untuk menjalankannya, selanjutnya diinput kedalam mesin pencari pada web tersebut maka akan muncul nilai toksisitas dengan satuan LD₅₀ mol/Kg unit.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dilakukan penambatan buta kepada seluruh permukaan protein untuk mencari situs pengikatan terbaik. Setelah dilakukan pencarian situs pengikatan

terbaik, diperoleh koordinat X; Y; Z adalah 4,45; -10,31; 4,25 dengan radius 15 poin sebagai rujukan untuk melakukan penambatan. reaksi penambatan dilakukan sebanyak 10 kali pengulangan untuk memperoleh energi minimum dan optimalisasi ikatan. Dilakukan pula penetapan validasi pada senyawa kontrol positif dan diperoleh nilai RMSD sebesar 2,3622. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa kontrol positif memiliki presisi yang dapat cukup baik. Dapat dilihat pada tabel 1.

Senyawa turunan menggunakan pendekatan metode Toplis namun terlebih dahulu dilakukan modifikasi cincin piran menjadi benzena (gambar 2). Hal ini dilakukan karena cincin ini tidak berikatan langsung dengan residu pada protein (**gambar 1**). Ikatan rantai samping dipengaruhi oleh ikatan Van der Waals serta kesesuaian molekul.

Dengan berubahnya cincin B pada Pyrrothiogatain akan menyebabkan berkurangnya ikatan dengan protein terlihat bahwa ikatan awal pada Pyrrothiogatain adalah -553,405 sedangkan turunan pertama memiliki energi ikatan yang lebih rendah yaitu - 324,335 (gambar 2).

Namun setelah dilakukan substitusi pada cincin benzena maka energi ikatan menjadi relatif lebih besar. Ikatan yang terjadi pada Pyrrothiogatain antara lain gugus karbonil pada karboksilat berikatan hidrogen dengan residu Thr-140 sedangkan hidroksi pada karboksilatnya berikatan hidrogen dengan His-120, Thr-140 dan Thr-160, sedangkan gugus sampingnya berikatan Van der Waals dengan Arg-10. Pada turunan pertama ikatan yang sama juga terjadi pada gugus karboksilatnya namun agak sedikit ada perubahan sterik molekul disebabkan karena bergantinya cincin piran menjadi benzen, hal ini terlihat bahwa gaya tarik Van der Waals banyak terjadi pada cincin benzen yaitu berikatan pada residu Arg-10, Ala-30, Thr-130, Thr-160.

Hal menarik diperlihatkan oleh senyawa turunan B-4, akibat perubahan konformasi sedemikian rupa pada cincin benzena yang berikatan dengan residu Thr-140 dan His-120 sehingga menyebabkan cincin yang mengikat gugus karbonil agak menekan yang pada akhirnya menyebabkan gugus sulfur berikatan dengan residu Gly-40, sehingga nilai ikatan menjadi melonjak drastis. Pada penelitian ini diperoleh bahwa 60% turunan senyawa ini memiliki nilai ikatanyang relatif lebih besar dari senyawa kontrol positif.

Prediksi toksisitas menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan secara signifikan pada nilai LC50. Sehingga memiliki dampak yang sama yang berarti memiliki konsentrasi dosis yang relatif sama. Namun apabila dibandingkan dengan senyawa kontrol positif nilai toksisitas turunan senyawa ini relatif lebih rendah.

KESIMPULAN

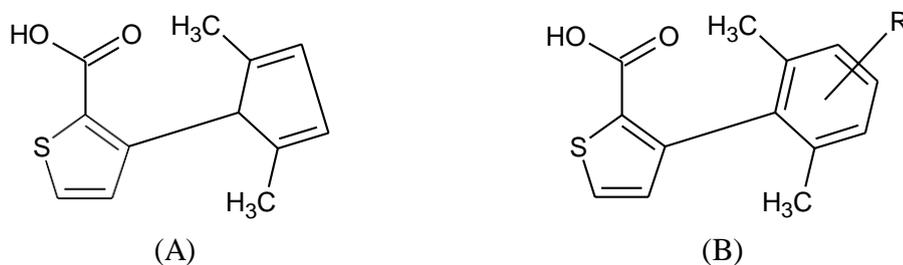
Diperoleh 27 modifikasi senyawa yang memiliki efektivitas untuk berikatan dengan GATA-2 secara penambatan molekul. Nilai pengikatan relatif lebih baik dengan rata-rata (-612,908) dibandingkan dengan kontrol (-553,405) dengan prediksi toksisitas yang tidak ada perbedaan bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

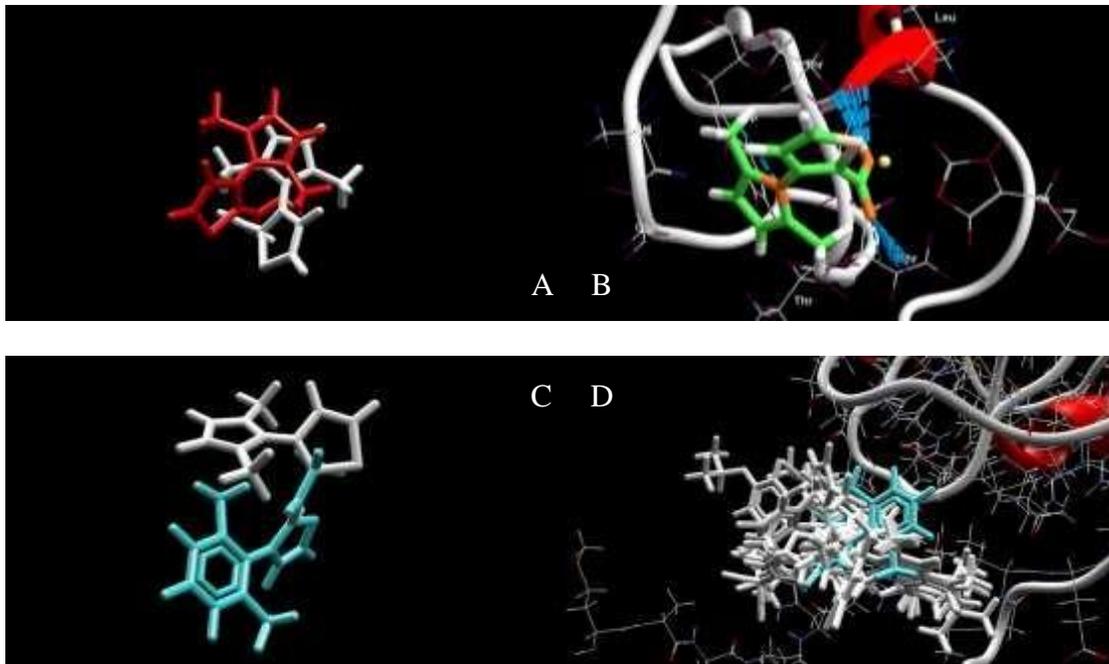
- Bakta, I Made. 2006. Hematologi Klinik Ringkas. Penerbit Kedokteran EGC.
- Gaine, M.E., et al. 2017. GATA2 regulates the erythropoietin receptor in t(12;21) ALL. *Oncotarget*, 8(39):66061-66074.
- Kim, S.I., & Bresnick, E.H. 2007. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. *Oncogene*, 26:6777-6794.
- La Ferla, K., et al. 2002. Inhibition of erythropoietin gene expression signaling involves the transcription factors GATA-2 and NF- κ B.
- Moriguchi, T. & Yamamoto, M. 2014. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchesrates erythroid lineage differentiation. *Int. J. Hematol*, 100:417-424.
- Nomura, S., et al. 2019. Pyrrothiogatain acts as inhibitor of GATA family proteins and inhibits Th2 cell differentiation in vitro. *Scintific Reports*, 9:17335.
- Suzuki, M., et al. 2011. Transcriptional regulation by GATA1 and GATA2 during erythropoiesis. *Int. J, Hematol*, 93:150-155.
- Topliss, John G. 1972. Utilization of operational schemes for analog synthesis in drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15(10):1006-1010.

Tabel 1. Nilai penambatan molekular senyawa turunan pyrrothiogatain dengan GATA-2 serta nilai prediksi toksisitas.

NAMA	SUBSTITUEN (-R)	NILAI PENAMBATAN	PREDIKSI TOKSISITAS
Pyrrothiogatain		-553,405	2,323
B		-324,335	2,360
B-1	4-Cl	-542,591	2,469
B-2	4-OCH ₃	-515,827	2,445
B-3	3-Cl, 4-OCH ₃	-686,532	2,646
B-4	4-N(CH ₃) ₂	-852,287	2,564
B-5	4-NH ₃	-537,587	2,426
B-6	4-OH	-758,016	2,026
B-7	3-CH ₃ , 4-OCH ₃	-670,494	2,550
B-8	4-OCH(CH ₃) ₂	-608,645	2,535
B-9	3-CH ₃ , 4-N(CH ₃) ₂	-435,603	2,533
B-10	4-CH ₃	-496,860	2,376
B-11	3-Cl, 4-CH ₃	-801,801	2,577
B-12	3-N(CH ₃) ₂	-749,636	2,565
B-13	4-F	-540,848	2,396
B-14	2-OCH ₃	-581,868	2,651
B-15	3-CH ₃	-666,750	2,464
B-16	3-CF ₃ , 4-CH ₃	-714,367	2,528
B-17	3-Cl, 5-Cl	-487,952	2,126
B-18	3-NO ₂	-731,520	2,340
B-19	3-Cl, 4-Cl	-691,229	2,453
B-20	4-CF ₃	-838,394	2,532
B-21	4-CBr ₃	-445,626	2,373
B-22	4-CI ₃	-287,554	2,561
B-23	4-NO ₂	-715,787	2,565
B-24	3-CF ₃ , 4-Cl	-854,874	2,392
B-25	3-CF ₃ , 4-CF ₃	-187,727	2,375
B-26	3-CF ₃ , 4-NO ₂	-823,806	2,366



Gambar 1. Senyawa Pyrrothiogatain (A) yang digunakan sebagai kontrol positif dan senyawa turunannya yang digunakan sebagai derivat utama (B)



Gambar 2. Hasil validasi senyawa kontrol positif (A); Penambatan senyawa kontrol positif dengan protein terjadi pada residu threonin (ikatan biru) yang berikatan dengan gugus karboksilat (jingga) (B); Penjajaran molekul turunan (biru) dengan kontrol positif (putih) (C); Hasil penambatan pada seluruh senyawa turunan (putih) setelah seluruhnya dilakukan penjajaran molekul dengan turunan utama (biru) (D).