

## PI STACKING PADA N,N-DIETHYLCINNAMAMIDE TERHADAP HDAC INHIBITOR SECARA IN-SILICO

Eddy PB Tjoa

Program Studi Kesehatan Masyarakat Universitas Esa Unggul

Jalan Arjuna Utara Tol Tomang Kebun Jeruk, Jakarta 11510

eddytjoa2001@yahoo.com

### Abstrak

HDAC merupakan penentu dalam peristiwa epigenetic sehingga harus dihambat. Penghambat menggunakan molekul kecil, dengan memperhatikan jarak ikatan dan posisi ikatan. Guna mendapatkan penghambat yang baik maka diharapkan molekul kecil tersebut mampu berikatan dengan membentuk formasi Pi stacking, sehingga energi yang terpakai menjadi kecil. Metoda yang digunakan adalah docking dengan autodok vina dengan grid. Hasil penelitian menunjukkan ikatan pi stacking terbentuk antara molekul *Dietilsinamamid* dengan *Arginin*, *Leisin* dll. Sehingga dapat menjadi kandidat penghambat yang baik. Kesimpulan *Dietilsinamamide* dapat membentuk posisi *pi stacking* dengan HDAC

**Kata Kunci:** Pi stacking, HDAC inhibitor, *in-silico*

### Abstract

HDAC is a determinant in epigenetic events that should be blocked. Using a small molecule inhibitor, with due regard to the bond distances and bond positions. In order to get a good inhibitor it is expected that the small molecule is able to bind to the formation pi stacking, so that the energy that used to be small. The methods used are docking with Davina autodok the grid. The results showed the bond between molecules pi stacking terbentuk *Dietilsinamamid* with *Arginine*, *Leisin* etc. So that can be a good candidate inhibitor. Conclusion *Dietilsinamamide* can form pi stacking position with HDAC

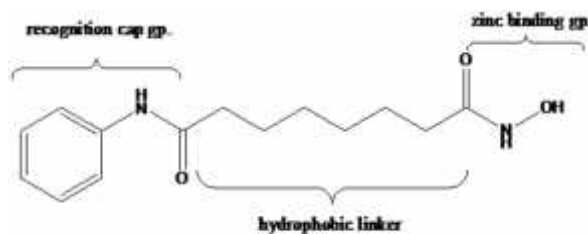
**Keywords:** Pi stacking, HDAC inhibitors, *in-silico*

### Pendahuluan

*Histon Deacetylase* (HDACs) (*Histone Deacetylase*) adalah suatu enzim yang penting dalam pengaturan transkripsi gen (Cheng, 2003). Golongan HDAC (*Histone Deacetylase*) dibedakan menjadi dua yaitu *Zn-dependent* (Class I and Class II) dan *NAD-dependent* (Class III) enzim. *Zn-dependent* menjadi fokus penelitian karena fungsi *asetilasi* dan regulasi dari siklus sel, *cdk inhibitor p21, p53*. (Ruijter, 2003) Karena memiliki efek yang luas dalam pengaturan dan pengendalian sel maka HDAC (*Histone Deacetylase*) sangat penting menjadi target perancangan obat baru kanker (Finnin, 1999). HDAC (*Histone Deacetylase*) enzim membuang *asetil group* dari *histone* dengan caramengubah residu *histidin, aspartat* masing masing dua dan satu residu *tirosin* yang sangat diperlukan untuk ikatan dengan ion  $Zn^{2+}$  (Haberland, 2009).

Kanker servik secara molekular bertalian dengan aktivitas dan ekspresi dari gen *p21WAF1* dan *p27KIP1* pada galur sel, dapat dilihat dari *western blot*. Aktifitas gen *p21WAF1* dan *p27KIP1* menyebabkan aktifitas berlebihan dari *histon* karena mengalami *asetilasi* sehingga tidak dapat mengendalikan sel dengan baik (Gui, 2004).

Peristiwa tersebut mengawali pertumbuhan sel ke arah kanker pada umumnya dan servik pada khususnya. Sel diservik termasuk aktif dalam pembelahan maka erat kaitannya dengan HDAC (*Histone Deacetylase*) (Takai, 2010a). Mekanisme kerja HDCA Inhibitor secara kimia adalah berinteraksi dengan sistem *farmakopor* (Takai, 2010b). Adapun *farmakopor* yang dapat berinteraksi jika memiliki tiga bagian aktif yaitu 1. *Zinc-binding region*, 2. *Regio Hydrophobik*, 3. *Regio Penutup*. (Anton, 2007).



Gambar 1

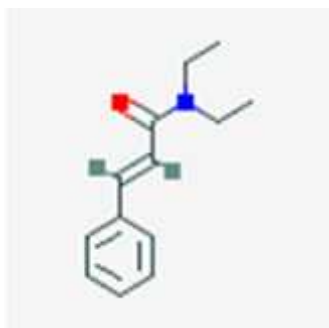
Struktur Penghambat HDAC (*Histone Deacetylase*)

Beberapa bahan alam dapat berikatan dengan HDCA dan menghambat reaksi enzimatis tersebut seperti: *Trikosantin*, *Hydroxamat*, *Varinostat*, *M-Carboxycinnamic acid*, *bishydroxamate*,

*Belinostat*, *Panobinosat* asam sinamathydosamat (Miller,2003). Interaksi terjadi di daerah aktif tempat terjadinya ikatan dengan residu asam amino. Demikian juga interaksi dengan logam Zinc dan daerah penutup mempererat ikatan yang terjadi (Yoshida,1990).

## Bahan dan Metoda

Mengumpulkan Homo sapiens Kelas II urutan HDAC(*Histone Deacetylase*) dan struktur 3D-nya (Zang,1991).Mengumpulkan Kelas Homo sapiens II urutan HDAC(*Histone Deacetylase*) dilakukan dengan men-download dari database protein di situs NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Kelas Homo sapiens II HDAC(*Histone Deacetylase*) 3D struktur kristal yang didownload dari situs database PDB struktural (<http://www.rcsb.org/pdb>). Urutan dianalisis untuk menentukan apakah ada urutan yang baru akurat atau tidak. Urutan konservasi di kelas situs Homo sapiens II HDAC(*Histone Deacetylase*) katalitik CLUSTALW urutan beberapa penyelarasan dari Homo sapiens Kelas II dikumpulkan urutan HDAC(*Histone Deacetylase*) dilakukan. Hasil keselarasan dianalisis dengan BioEdit, dalam rangka untuk mendapatkan situs katalitik yang ada. Informasi kawasan konservasi adalah hasil dari Kelas keselarasan Homo sapiens II HDAC(*Histone Deacetylase*) urutan dengan urutan 3D struktur. Urutan untuk pemodelan akan menjadi salah satu yang mirip dengan struktur kristal dari Homo sapiens Kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*). Penelitian ini merupakan kelanjutan dari penelitian sebelumnya, yang menggunakan Kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) Homo sapiens Jika hasil dari sequence alignment adalah sama dengan yang sebelumnya, Kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) Homo sapiens struktur akan dihasilkan dari itu, tanpa perlu melakukan proses lain pemodelan homologi.Sumber molekul Pubchem.



PubChem CID: 817779

## Rancangan Turunan Metil Sinamat.

Studi awal dari SAR. Struktur LLX (*N*-(2-aminophenyl) benzamide). dan dimodifikasi LLX

(*N*-(2-aminophenyl) benzamide) dirancang dengan menggunakan ChemSketch 12,0 software. Berbagai LLX (*N*-(2-aminophenyl) benzamide).Modifikasi yang digunakan. Output dari ChemSketch 12,0 dalam format mol. Ini berfungsi sebagai masukan untuk docking simulasi dengan kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) dari Homo sapiens, dan untuk menguji farmakologi dan atribut toksisitas. Ligan yang disimpan dalam format Molfile MDL. Kemudian, mereka dikonversi ke format pdb dengan menggunakan OpenBabel 2.2.3 atau perangkat lunak Vegazz. (Zang,1991)

## Persiapan docking kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) Homo sapiens.

Kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) Homo sapiens struktur file disiapkan dalam format pdb. Kemudian, variasinya: HDAC 2, yang dimuat dengan Alat AutoDock, dan hidrogen kutub ditambahkan ke masing-masing HDAC(*Histone Deacetylase*) tersebut. Selain ini berguna untuk memberikan biaya parsial / biaya *Gasteiger* kepada enzim. Kemudian, disimpan dalam format pdbqt. Kemudian, anka Zn kelas Homo sapiens HDAC(*Histone Deacetylase*) II dikonversi 0-2 dengan menggunakan script *python*. Kemudian, molekul telah disesuaikan sebagai makromolekul untuk proses *docking*. (Zang,1991)Molekul yang akan di dockingkan adalah DES [*N,N*Dietl sinamamida].

## Persiapan file kelas HDAC(*Histone Deacetylase*) inhibitor II Homo sapiens.

Penghambat atau ligan dalam format pdb yang dimuat dengan perangkat lunak Alat . Kemudian, torsi ligan tersebut disesuaikan berdasarkan jumlah total obligasi dibalik. Ligan yang disimpan dalam format pdbqt. (Zang,1991)

## Grid kotak persiapan.

Langkah-langkah persiapan yang dimulai oleh menggunakan file pdb dari Homo sapiens Kelas II HDAC(*Histone Deacetylase*) sebagai reseptor, dan LLX (*N*-(2-aminophenyl) benzamide).dengan modifikasi berbagai ligan. Kotak Grid adalah penentuan wilayah koordinat untuk proses docking. Hal ini dikonfigurasi dalam Alat AutoDock. Kotak kotak ukuran untuk docking HDAC 2..Hasil docking model terbaik kemudian diambil. Kotak grid disimpan dalam kotak parameter format file (GPF). (Zang,1991).

## Docking simulasi.

Proses ini dilakukan dengan menggunakan AutoGrid 4.2 dan 4.2 AutoDock. Data berikut ini diperlukan untuk melakukan docking: enzim file

dalam format pdbqt, ligan dalam format pdbqt, file GPF, file DPF. Algoritma yang digunakan adalah Algoritma Genetika Lamarck (LGA) dengan ukuran populasi 150, energi evaluasi  $2,5 \times 10^6$  dan pencarian berjalan dari 100 kali dalam rmsd dari 1,5. (Zang,1991)

### Analisis dan visualisasi hasil simulasi docking

Hasil docking AutoDock 4.2 dalam format file log docking (dlg). Kemudian, dengan menggunakan script *python*, hasil docking dikonversi ke format pdb. Dari 100-model hasil, satu model terbaik dijemput, berdasarkan data energi ikatan bebas, untuk menganalisa interaksi (Zang,1991).

### Hasil dan Pembahasan

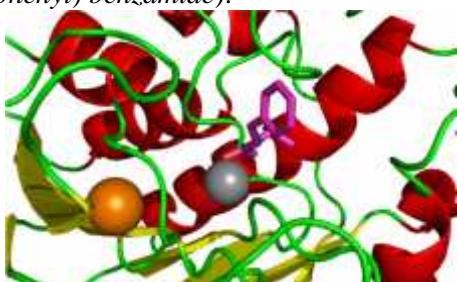
#### Hasil Virtual Docking [penambatan molekul]

Sampel : N.N dietilsinamamida [DES]

Metoda : *Molecular Docking*

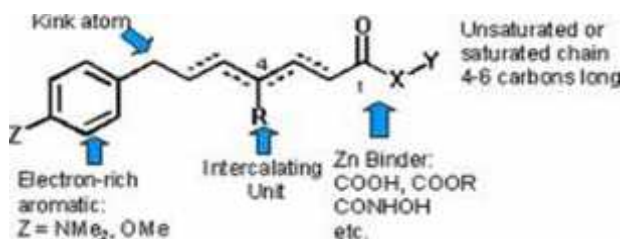
[Penambatan Molekul]

\Target : *Histon Deasetilase* tipe 2 [HDAC2] (*Histone Deacetylase*), struktur diperoleh dari Protein Data Bank [pdbID 3MAX], resolusi 2.05 Angstrom Ligan : LLX (N-(2-aminophenyl) benzamide).



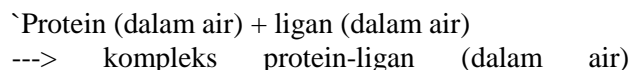
Gambar 2

Gambar menunjukkan DES warna ungu berikatan dengan molekul Zn pengikatan oleh Amide memberikan posisi yang mirip dengan LLX dekat dengan atom Zn.



Sebagai pembanding dapat dilihat gambar molekul yang memiliki bagian yang aktif pada HDAC(*Histone Deacetylase*) inhibitor. Hasil docking *dietilsinamamida* [DES] pada HDAC2(*Histone Deacetylase*) memberikan energi ikatan sebesar -7,66 kkal/mol. Nilai ikatan harus

berada pada nilai yang rendah untuk menjadikan struktur lebih stabil.  $G = -RT \ln K$ . Binding energi ikatan bebas merujuk pada perubahan energi bebas untuk reaksi berikut:

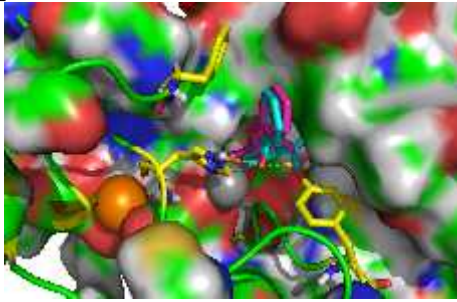


Salah satu faktor yang sangat mempengaruhi prediksi ikatan energi bebas adalah ionisasi keadaan kelompok fungsional pada ligan dan pada tempat pengikatan di mana perhitungan dilakukan. Sehingga molekul DES yang terbentuk diperkirakan akan stabil berikatan dengan HDAC (*Histone Deacetylase*) sebagai inhibitor. Kantong hidrofobik terbentuk dari beberapa residu asam amino *Histidin* 183, *Phenilalanin* 210, *Phenilalanin* 155, *Histidin* 146. Logaritma dari rasio konsentrasi zat terlarut tidak-terionisasi dalam pelarut disebut log P. Hidrofobisitas diwakili oleh Log P. Koefisien partisi adalah rasio konsentrasi senyawa dalam dua fase dari dua campuran yang tidak bercampur dengan pelarut pada koefisien equilibrium.

Artition berguna dalam memperkirakan distribusi obat dalam tubuh. Obat yang bersifat hidrofobik dengan partisi koefisien tinggi secara kusus didistribusikan kekompartemen hidrofobik seperti lapisan lemak sel. Sementara obat *hidrofilik* (koefisien partisi rendah) secara khusus adalah ditemukan dalam kompartemen *hidrofilik* seperti serum darah. Pembentukan kantunf *hidofobik* memungkinkan DES dapat berikatan dengan komponen lemak dan dapat menembus lapisan lemak sehingga menuju enzyme HDAC(*Histone Deacetylase*) yang ada didalam sel, guna menghambat kerja HDAC(*Histone Deacetylase*) sehingga proses epigenetic dapat dihambat Interaksi cincin aromatik pada LLX maupun DES, dengan Phenilalanin 155 membentuk *pi-pi* stacking [*Tersusun*] pipi Stacking mengacu pada gaya pengikatan, interaksi antara noncovalent cincin aromatik (Kumar,2005).

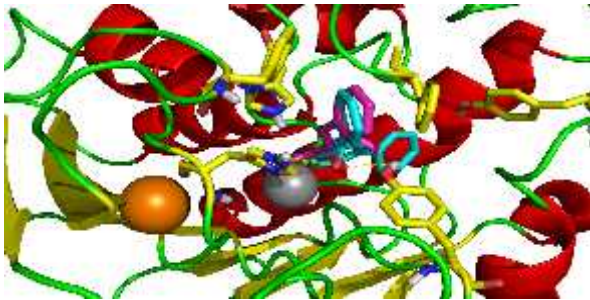
Kegunan *pi-pi Stacking* adalah meningkatkan afinitas pengikatan inhibitor molekul kecil ke sakuenzim yang mengandung residu aromatik. Analisis asam amino aromatik *fenilalanin*, *tirosin*, *histidin*, dan *triptofan* menunjukkan bahwa *dimer* dari rantai samping memiliki banyak interaksi menstabilkan kemungkinan pada jarak yang lebih jauh dari rata-rata jarak radius vander Waals (Wang,2009). Terjadinya *pi-pi stacking* karena bentuk geometri molekul. *Pipi stacking*l azim dalam struktur kristal protein, dan juga berkontribusi terhadap interaksi antara molekul kecil dan protein. Akibatnya, pi-pi dan interaksi kation-pi merupakan faktor penting dalam desain obat rasional (James,1993).

## Kesimpulan



Gambar 3

Hasil Docking 1: DES [ungu],LLX [biru muda],residu asam amino His 183,Phe 210,Phe155, His146 [kuning]



Gambar 4

Hasil Docking 2

Dengan kehadiran molekul N.N dietilsinamamida [DES] pada Histidin 183, Phenilalanin 210, Phenilalanin 155, Histidin 146 diduga efek katalisis *enzyme* HDAC (*Histone Deacetylase*) akan terhambat. Sehingga proses *epigenetic* kemungkinan dapat dicegah.

## Daftar Pustaka

- Cheng, HL; Gu, Y; Mostoslavsky, R; Saito, S *et al.* (2003), "Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice", *Proc Natl Acad Sci*, Vol.100, 10794-10799.
- Ruijter, AJM; Van Gennip, AH; Caron, HN; Kemp, S *et al.* (2003), "Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family", *Biochem J*, Vol. 370, 737-749.
- Finnin, MS; Donigian, JR; Cohen, A; Richon, VM *et al.* (1999), "Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors", *Nature*, Vol.401, 188,3.
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009). "The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy." *Nat Rev Genet*, 10,32-42.
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, et al (2004). "Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1." *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 1241-6.
- Takai N, Narahara H (2010a). "Histone Deacetylase Inhibitor Therapy In Epithelial Ovarian Cancer." *J Oncol*.
- Takai N, Narahara H (2010b). "Preclinical Studies Of Chemotherapy Using Histone Deacetylase Inhibitors In Endometrial Cancer." *Obstet Gynecol Int*
- Anton, VB; Sujith, VW and Mary Kay HP (2007), "Structural requirements of HDAC inhibitors: SAHA analogs functionalized adjacent to the hydroxamic acid", *Bioorganic Chemistry and Organic letters*, Vol.17, 2216-2219.
- Miller, TA; Witter, DJ; Belvedere, S *et al.*(2003), "Histone deacetylase inhibitors", *J MedChem*, Vol.46, 5097 - 5116.
- Yoshida, M; Kijima, M; Akita, M; Beppu, T (1990), "Potent and specific inhibition of Mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A", *J Biol chem*, Vol. 265, 17174 - 17179.
- Kumar, Ranjit. (2005) *Research Methodology-A Step-by-Step Guide for Beginners*, (2nd.ed.). Singapore, Pearson Education.
- Difai Wang (2009). "Computational Studies on the Histone Deacetylases and the Design of Selective Histone Deacetylase Inhibitors." *Curr Top Med Chem*. 2009 ; 9(3): 241-256.
- James Folzman. (1993). "Biostatistics: Experimental Design and Statistical Inference." Oxford University Press, USA; 1<sup>th</sup> edition.