

Xây dựng mô hình docking và mô phỏng động lực học phân tử các dẫn chất chalcon có tiềm năng ức chế enzym glycolat oxidase

Lê Minh Trí^{1,2}, Trương Lê Mỹ Ngọc¹, Huỳnh Nguyễn Bảo Uyên¹
Nguyễn Đắc Nhân¹, Mai Thành Tấn¹, Trần Thị Thuý Nga³, Thái Khắc Minh^{1*}

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Y, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Khoa Dược - Trường Đại học Kỹ thuật Y Dược Đà Nẵng

Summary

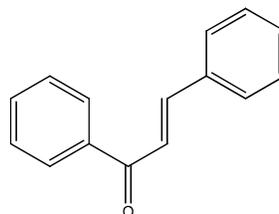
Glycolate oxidase of oxydoreductase enzyme family is a free radical involved in oxidized yields oxalate. High oxalate levels lead to insoluble calcium oxalate stone formation, which causes primary hyperoxaluria, renal parenchyma damage, progressive deterioration of renal function. Chalcone is a simple compound of a large group of flavonoids, which has been reported to have many therapeutic effects in free radical-related diseases. This study built a docking model to evaluate binding ability of chalcone compounds on enzyme glycolate oxidase. The potential chalcones after docking process would be selected to perform molecular dynamics simulation within 20 ns to evaluate the stability of the complex over time. The result showed that most of the compounds were well bound and able to inhibit enzyme glycolate oxidase. This model could be applied to predict the antioxidant activity of other similar derivatives.

Keywords: Glycolate oxidase, chalcone, docking, molecular dynamics simulation.

Đặt vấn đề

Glycolat oxidase là một họ enzym oxidase acid α -hydroxy phụ thuộc FMN (flavin mononucleotid) thể hiện tính đặc hiệu cơ chất rộng và khả năng oxy hóa glycolat thành glyoxylat, glyoxylat thành oxalat. Quá trình tạo oxalat hình thành cặn calci không tan, đặc biệt ở thận^[1]. Các nghiên cứu tìm kiếm cấu trúc ức chế GO để giảm quá trình oxy hóa giúp điều trị tăng oxalat niệu nguyên phát ở người. Hiện nay, trên lâm sàng đã có một số thuốc được sử dụng giúp ức chế enzym glycolat oxidase, trong đó nổi bật là thuốc lumasiran được chỉ định trong điều trị tăng oxalat niệu nguyên phát ở người^[2]. Chalcon gồm những hợp chất đơn giản thuộc nhóm lớn flavonoid, có mặt trong rất nhiều loại thực vật với tác dụng chống oxy hóa^[3]. Chalcon có cấu trúc chuỗi mở, mang hai vòng aryl được kết nối thông qua một đệm ba carbon, liên kết

propenon (hình 1). Đoạn propenon chưa bão hòa α , β không chỉ chịu trách nhiệm về hoạt tính chống oxy hóa mà còn rất quan trọng trong chuyển đổi cấu trúc chalcon thành các dẫn chất khác nhau giúp tăng cường hoạt tính^[4]. Tuy nhiên, hiện nay vẫn chưa có nhiều nghiên cứu sàng lọc trên các hợp chất chống oxy hóa tốt như chalcon có khả năng ức chế tốt enzym glycolat oxidase. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tổng quát là dự đoán khả năng gắn kết của các hợp chất chalcon với enzym glycolat oxidase bằng phương pháp docking và mô phỏng động lực học phân tử. Quá trình docking bằng phần mềm LeadIT sẽ giúp chọn ra các hợp chất tiềm năng nhằm tiến hành mô phỏng động lực học phân tử trong 20 ns bằng phần mềm GROMACS 2020.



Hình 1. Công thức cấu tạo chung của các chalcon nghiên cứu

Chịu trách nhiệm: Thái Khắc Minh
Email: thaikhacminh@ump.edu.vn
Ngày nhận: 24/9/2021
Ngày phân biên: 30/9/2021
Ngày duyệt bài: 24/12/2021

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Cơ sở dữ liệu

Cơ sở dữ liệu gồm 90 hợp chất thuộc khung cấu trúc chalcon, có hoạt tính sinh học được xác định bằng phương pháp đánh bắt gốc tự do DPPH thu được từ các bài báo khoa học với các giá trị IC_{50} từ 9,56 μ M đến 11027,16 μ M. Sau khi loại 10 chất gây nhiễu bằng phần mềm Z – score, cơ sở dữ liệu còn lại gồm 80 hợp chất dùng để xây dựng mô hình mô tả phân tử docking tại khoang gắn kết của enzym glycolat oxidase. Cấu trúc tinh thể phức hợp protein glycolat oxidase với chất ức chế 4-carboxy-5-dodecylsulfanyl-1,2,3-triazol (CDST) tại vị trí hoạt động tương tự phức hợp GO-glycoylat cho tác dụng ức chế mạnh, sẽ được lấy từ ngân hàng dữ liệu Protein Data Bank (mã pdb: 2RDT).

Re-docking

Nhằm chứng minh độ tin cậy của quy trình docking, các ligand đồng kết tinh cần được re-docking vào khoang gắn kết với 3 loại cấu hình gồm phối tử 1 nguyên dạng được lấy từ protein bằng cách xóa các chuỗi acid amin, nước, ion và các phối tử không liên quan khác bằng công cụ *Sequence Edit* của phần mềm MOE 2015.10; phối tử 2 thu được bằng cách tối thiểu hóa năng lượng phối tử 1 hai lần bằng công cụ *Minimize Energy* của phần mềm Sybyl-X 2.0; phối tử 3 được vẽ lại bằng ChemDraw Pro 12.0 và tiến hành chuẩn bị tương tự ligand. Với công cụ FlexX tích hợp trong phần mềm LeadIT 2.1.8, tiến hành docking cấu trúc 3D của protein với lần lượt 3 phối tử. Kết quả redocking bao gồm điểm số docking và giá trị RMSD thể hiện khoảng cách giữa các cấu dạng của phối tử dock với ligand đồng kết tinh của từng phối tử. Mô hình đáng tin cậy khi giá trị RMSD của ba trường hợp redocking không quá 2 Å^[5].

Xây dựng mô hình docking phân tử

Protein đã được chuẩn bị bằng MOE 2015.10 sẽ được tải lên LeadIT 2.1.8 để tiến hành docking. Đầu tiên, các vị trí quan trọng trong khoang gắn kết được lựa chọn bằng công cụ *Define Binding Site*. Sau đó từ vị trí hoạt động của protein mở rộng 6,5 Å xung quanh ligand đồng kết tinh. Quá trình docking được thực hiện bằng công cụ FlexX được tích hợp sẵn trong

phần mềm LeadIT 2.1.8 và lưu kết quả là điểm số docking dưới dạng tệp *.sdf. Điểm số docking (đơn vị kJ/mol) thể hiện ái lực gắn kết phối tử - protein dựa trên mức độ tương thích với vị trí gắn kết tại đích tác động. Điểm số docking càng nhỏ, ái lực gắn kết càng tốt.

Mô phỏng động lực học phân tử

Các chất tiềm năng từ docking được tiến hành mô phỏng động lực học phân tử (MDS) trong thời gian là 20 ns (nano giây) cho mỗi phức hợp bằng phần mềm GROMACS 2020.4 với trường lực CHARMM27. Phức hợp tạo thành sẽ được mô phỏng động lực học trong môi trường nước tương minh TIP3P, hợp nước sau đó sẽ được thêm ion và trung hoà điện tích bằng dung dịch NaCl 0,15 M. Giai đoạn cân bằng trước khi mô phỏng gồm tối thiểu hóa năng lượng, cân bằng NVT trong thời gian 100 ps và nhiệt độ là 300 K, cân bằng NPT trong thời gian 100 ps và áp suất là 0,987 atm (1 bar). Mô phỏng động lực học sau đó được thực hiện trong 20 ns, với 2000 khung hình (frame). Sau quá trình mô phỏng động lực học, giá trị RMSD được sử dụng để đánh giá mức độ ổn định của các nguyên tử trong điều kiện mô phỏng. Cấu trúc được xem là ổn định và có ý nghĩa khi $RMSD < 3,0 \text{ \AA}$ ^[6]. Bên cạnh đó, RMSF được dùng để khảo sát sự linh động của các acid amin trong protein hoặc các nguyên tử nặng của ligand trong hệ. $RMSF > 0,2$ chứng tỏ acid amin (hoặc phối tử) đó linh động^[7].

Công thức tính RMSD:

$$RMSD(t_1, t_2) = \sqrt{\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N m_i \|r_i(t_1) - r_i(t_2)\|^2}$$

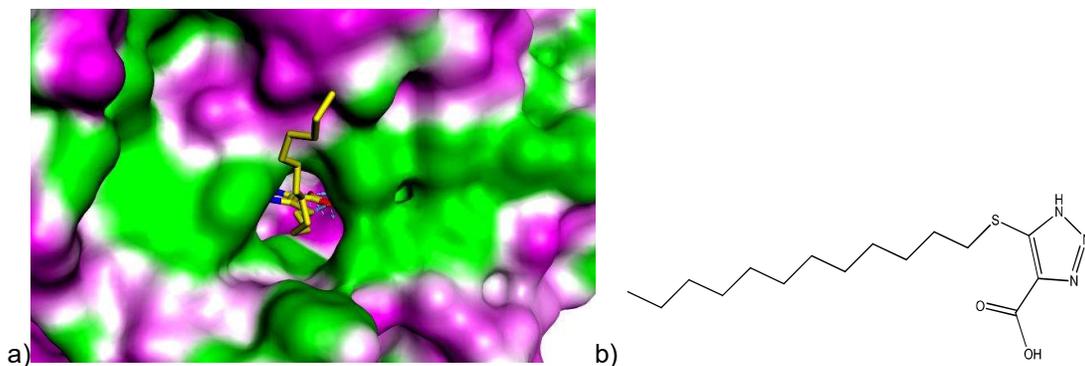
Công thức tính RMSF:

$$RMSF_i = \sqrt{\frac{1}{T} \sum_{t_j=1}^T |r_i(t_j) - r_i^{ref}|^2}$$

Kết quả và bàn luận

Kết quả re-docking

Hình 2 là cấu trúc tinh thể của glycolat oxidase trong phức hợp với chất ức chế 4-carboxy-5-dodecylsulfanyl-1,2,3-triazol (CDST) được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X với độ phân giải 1,95 Å^[8].



Hình 2. a) Cấu trúc tinh thể phức hợp glycolat oxidase – CDST và b) cấu trúc hóa học chất ức chế CDST

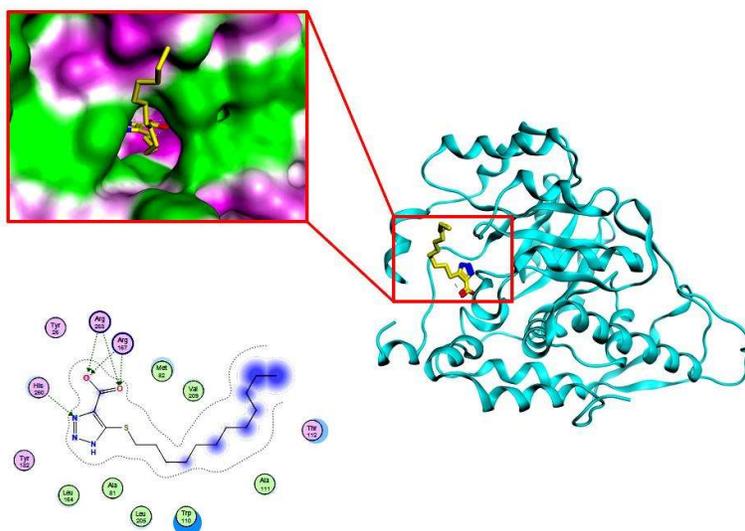
Bảng 1 trình bày kết quả redocking rất tốt với - 47,19 kJ/mol đến - 45,66 kJ/mol, cho thấy mô hình docking có độ tin cậy phù hợp để dùng điểm số docking nằm trong khoảng từ trong các nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 1. Kết quả phân tích mô hình redocking của 2RDT

Phối tử	Điểm số redocking (kJ/mol)	RMSD
Phối tử 1 (nguyên thủy)	- 47,19	0,9507
Phối tử 2 (phối tử nguyên thủy được tối thiểu hóa năng lượng)	- 46,02	0,9853
Phối tử 3 (tự xây dựng)	- 45,66	0,9096

Vị trí hoạt động của glycolat oxidase gồm các acid amin quan trọng như Tyr26, Trp110, Tyr132, Arg167, Lys236, His260 và Arg263. Tại khoang gắn kết ở hình 3 CDST tạo các liên kết

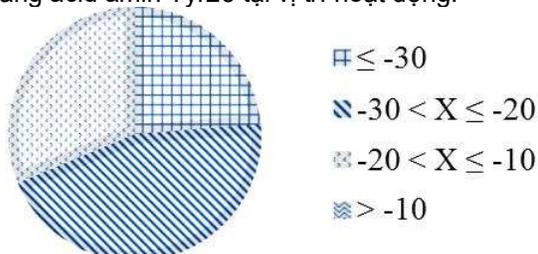
hydro chặt chẽ với Arg263, Arg167, His260. Quan trọng hơn là vòng indol sáu cạnh của Trp110 hướng về đuôi hydrocacbon của CDST.



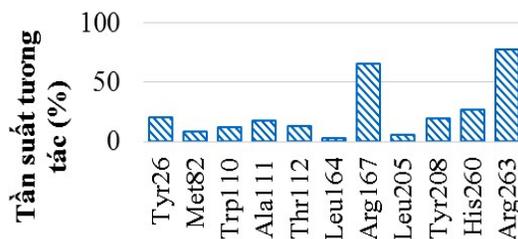
Hình 3. Khoang gắn kết của glycolat oxidase và tương tác giữa các acid amin với chất ức chế CDST

Kết quả docking phân tử

Kết quả phân tích cho thấy cả 80 chất đều docking thành công vào khoang gắn kết với 800 cấu dạng được ghi nhận. Điểm số docking của 80 hợp chất dao động trong khoảng từ -52,44 kJ/mol tới -10,37 kJ/mol. Trong đó có 19 chất có điểm số thấp hơn -30 kJ/mol, chiếm tỉ lệ 24% trong số các phối tử được khảo sát (hình 4). Hình 5 cho thấy các hợp chất nghiên cứu đều tương tác với tất cả các acid amin quan trọng nằm trong vị trí hoạt động tại khoang gắn kết. Ba acid amin quan trọng tạo liên kết hydro với chất ức chế 4-carboxy-5-dodecylsulfanyl-1,2,3-triazol (CDST) có tần suất tương tác cao nhất Arg263, Arg167 và His260. Tuy nhiên His260 có tần suất tạo liên kết hydro không cao bằng acid amin Tyr26 tại vị trí hoạt động.

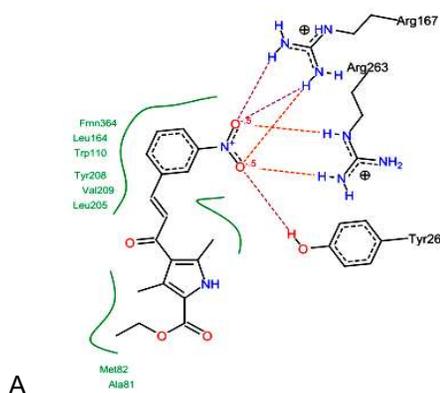


Hình 4. Biểu đồ phân bố điểm số docking của glycolat oxidase



Hình 5. Tần suất tương tác với các acid amin tại khoang gắn kết của glycolat oxidase

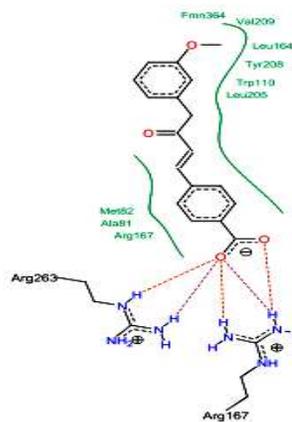
Hợp chất SoAaAA_2021_3f (hình 6A) có điểm số docking tốt là -52,44 kJ/mol (thấp hơn -50 kJ/mol). Trong đó vòng B với sự hiện diện nhóm thế -NO₂ tương tác ba acid amin quan trọng Arg263, Arg167, Tyr26 và nhóm thế -COOH cũng cho tương tác tại khoang khá tốt. Hình 6B là chất N123TC_2018_5f cho điểm số docking -44,39 kJ/mol với vị trí *para* trên vòng B cũng chứa nhóm thế -COOH cho kết quả tương đối tốt. Ngoài ra, các chất có khung cấu trúc tương tự thay nhóm thế -COOH bằng -OCH₃ cho kết quả docking không tốt bằng.



A

SoAaAA_2021_3f

Điểm số docking = -52,44 kJ/mol



B

N123TC_2018_5f

Điểm số docking = -44,39 kJ/mol

Hình 6. Các phối tử tiềm năng liên kết với các acid amin tại khoang glycolat oxidase

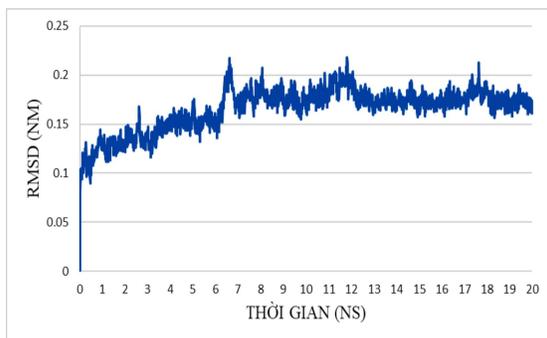
Kết quả mô phỏng động lực học phân tử

Sau quá trình docking, hai phối tử tiềm năng là SoAaAA_2021_3f và N123TC_2018_5f được lựa chọn để tiến hành mô phỏng động lực phân tử ở 20 ns. Hình 7A là kết quả RMSD của phức

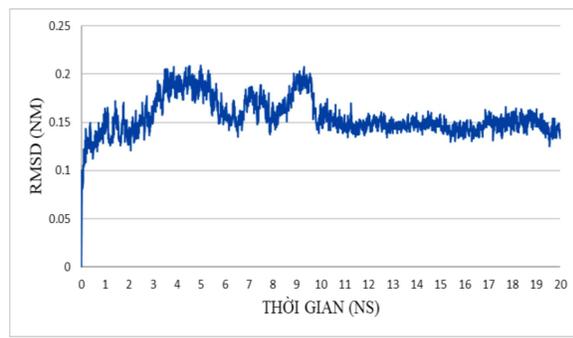
hợp SoAaAA_2021_3f. Trong 7 ns đầu tiên, phức hợp có cấu trúc tương đối bất ổn định với giá trị RMSD dao động từ 1 Å đến 1,5 Å. Từ 8 ns trở về sau, phức hợp protein-ligand dần ổn định với giá trị RMSD dao động trong khoảng

1,75 Å. Hình 7B là kết quả RMSD của phức hợp N123TC_2018_5f, giá trị RMSD dao động ổn định ở mức 1,5 Å trong khoảng thời gian 2,5 ns đầu. Trong khoảng thời gian từ 2,5 ns đến 10 ns, phức hợp chưa ổn định với biên độ dao động lớn, tuy nhiên giá trị RMSD vẫn nhỏ hơn 3 Å. Trong 10 ns cuối, phức hợp N123TC_2018_5f đã ổn định và dao động trong

khoảng 1,5 Å. Nhìn chung, cả phức hợp N123TC_2018_5f và SoAaAA_2021_3f đều có độ ổn định chấp nhận trong khoảng thời gian mô phỏng động lực học (20 ns), tuy nhiên với kết quả RMSD thu được cho thấy phức hợp SoAaAA_2021_3f tương đối ổn định hơn trong quá trình MD.

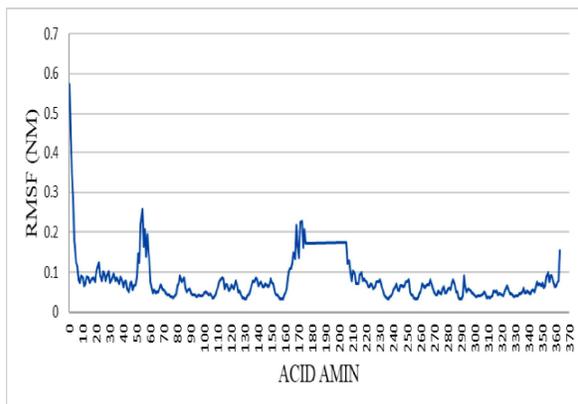


A

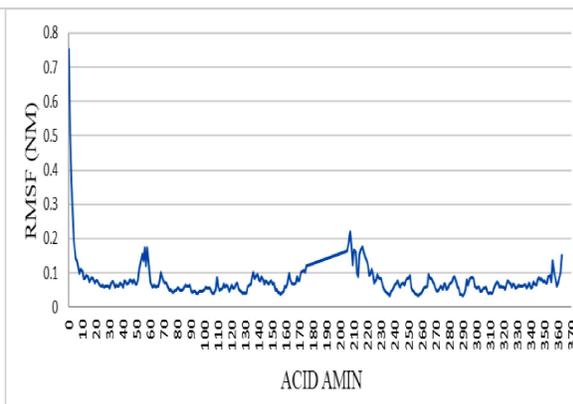


B

Hình 7. Giá trị RMSD của phức hợp SoAaAA_2021_3f (A) và phức hợp N123TC_2018_5f (B)



A



B

Hình 8. Giá trị RMSF của phức hợp SoAaAA_2021_3f (A) và phức hợp N123TC_2018_5f (B)

RMSF là một thông số để đánh giá tính linh động của các acid amin trong protein. Các giá trị RMSF trong hình 8 đều nhỏ hơn 2 Å, cho thấy hầu hết các acid amin khá ổn định trong suốt thời gian mô phỏng động lực học. Tuy nhiên, hai phức hợp đều có sự dao động lớn ở hai vùng acid amin, phức hợp SoAaAA_2021_3f dao động ở vùng acid amin thứ 50 – 60 với đỉnh là acid amin thứ 54 và vùng acid amin số 160 – 210, đỉnh là acid amin số 172. Ngược lại, ở

phức hợp N123TC_2018_5f, hai vùng acid amin biến động có khác biệt hơn là vùng acid amin thứ 50 – 60, đỉnh là acid amin thứ 58 và vùng acid amin thứ 170 – 220 và giá trị RMSF lớn nhất tại acid amin thứ 207. Các acid amin quan trọng Arg263, Arg167, His260 ở cả 2 phức hợp đều ổn định và khá tương đồng nhau ở cả hai phức hợp trong suốt quá trình mô phỏng. Giá trị RMSF của ba acid amin quan trọng Arg263, Arg167, His260 trong phức hợp

SoAaAA_2021_3f lần lượt là 0,603; 1,337; 0,51 Å, còn ở phức hợp N123TC_2018_5f lần lượt là 0,581; 0,721; 0,423 Å. Từ kết quả cho thấy các acid amin ở phức hợp SoAaAA_2021_3f và N123TC_2018_5f đều khá ổn định và ít di chuyển, trong đó các acid amin của phức hợp N123TC_2018_5f cho các giá trị RMSF ổn định hơn.

Bàn luận

Mô hình mô tả phân tử glycolat oxidase cho kết quả rất tốt với 24 % các chất có điểm số docking dưới -30,00 kJ/mol. Trong đó, chất SoAaAA_2021_3f có gốc -NO₂ tương tác khá tốt với các acid amin ở khoang gắn kết của glycolate oxidase với điểm số docking tốt là -52,44 kJ/mol. Chất N123TC_2018_5f cho điểm số docking - 44,39 kJ/mol với vị trí *para* trên vòng B cũng chứa nhóm thế -COOH cho kết quả tương đối tốt. Hai hợp chất trên được thực hiện quá trình mô phỏng động lực học (20 ns) cho kết quả RMSD và RMSF của phức hợp khá tốt, đều nằm trong khoảng chấp nhận. Phức hợp SoAaAA_2021_3f có giá trị RMSD ổn định hơn phức hợp N123TC_2018_5f, nhưng kết quả RMSF thì ngược lại. Mặc dù phức hợp SoAaAA_2021_3f có giá trị RMSF kém ổn định hơn nhưng các acid amin quan trọng Arg263, Arg167, His260 đều cho giá trị RMSF < 2 Å. Còn ở phức hợp N123TC_2018_5f giá trị RMSF tương đối tốt khi hầu hết các acid amin đều ổn định nhưng phức hợp có giá trị RMSD dao động khá lớn trong 10 ns đầu và chỉ bắt đầu ổn định ở nửa thời gian sau trong quá trình mô phỏng. Dựa vào các kết quả trên, nghiên cứu đã tìm ra được 2 dẫn chất chalcon có tiềm năng ức chế enzym glycolat oxidase là SoAaAA_2021_3f và N123TC_2018_5f. Trong đó, SoAaAA_2021_3f là chất tiềm năng cao hơn cần được thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* nhằm đánh giá khả năng ức chế enzym glycolat oxidase.

Kết luận

Nghiên cứu xây dựng mô hình docking phân tử nhằm đánh giá khả năng gắn kết với enzym glycolat oxidase của các hợp chất chalcon. Kết quả phần lớn các chất nghiên cứu đều có khả năng gắn kết tốt tại khoang gắn kết của enzym glycolat oxidase. Hai chất cho kết quả docking tiềm năng nhất được tiếp tục tiến hành mô phỏng động lực học (20 ns) cũng cho kết quả khá tốt trên các giá trị RMSD, RMSF. Tóm lại chalcon và các dẫn xuất chalcon vẫn có hoạt

tính chống oxy hóa cao và tiềm năng ức chế enzym glycolat oxidase khá tốt. Khả năng gắn kết còn tùy thuộc vào cấu trúc của các chất với những acid amin quan trọng tại vị trí hoạt động của enzym. Vì thế, trong những nghiên cứu tiếp theo, các chất có cấu trúc tương tự cần được tiếp tục được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa nhằm chứng minh độ chính xác của mô hình. Ngoài ra, các dẫn chất tiềm năng trong nghiên cứu này cần được thử nghiệm *in vitro* và *in vivo* trong các nghiên cứu tiếp nối nhằm khẳng định hoạt tính ức chế enzym glycolat oxidase.

Tài liệu tham khảo

1. Bourhis J. M., Vignaud C., Pietrancosta N. et al. (2009), "Structure of human glycolate oxidase in complex with the inhibitor 4-carboxy-5-[(4-chlorophenyl) sulfanyl]-1, 2, 3-thiadiazole", *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 65 (12), pp. 1246-1253.
2. Scott L. J. , Keam S. J. (2021), "Lumasiran: First approval", *Drugs*, 81 (2), pp. 277-282.
3. Zhuang C., Zhang W., Sheng C. et al. (2017), "Chalcone: A privileged structure in medicinal chemistry", *Chem. Rev.*, 117 (12), pp. 7762-7810.
4. Sahu N. K., Balbhadra S. S., Choudhary J. et al. (2012), "Exploring pharmacological significance of chalcone scaffold: A review", *Curr. Med. Chem.*, 19 (2), pp. 209-225.
5. Gohlke H., Hendlich M. , Klebe G. J. J. O. M. B. (2000), "Knowledge - based scoring function to predict protein - ligand interactions", *J. Mol. Biol.*, 295 (2), pp. 337-356.
6. Reva B. A., Finkelstein A. V. , Skolnick J. (1998), "What is the probability of a chance prediction of a protein structure with an rmsd of 6 Å?", *Fold Des.*, 3 (2), pp. 141-147.
7. Sundar S., Thangamani L., Manivel G. et al. (2019), "Molecular docking, molecular dynamics and MM/PBSA studies of FDA approved drugs for protein kinase a of Mycobacterium tuberculosis; application insights of drug repurposing", *Informatics in Medicine Unlocked*, 16, pp. 100210.
8. Murray M. S., Holmes R. P. , Lowther W. T. (2008), "Active site and loop 4 movements within human glycolate oxidase: Implications for substrate specificity and drug design", *Biochemistry*, 47 (8), pp. 2439-2449.