

## UJI *IN SILICO* SENYAWA COUMESTROL SEBAGAI LIGAN RESEPTOR ESTROGEN ALFA

Felicia<sup>\*</sup>, Enade Perdana Istyastono

Fakultas Farmasi, Universitas Sanata Dharma, Yogyakarta

**Abstract:** Breast cancer is a cancer caused by uncontrolled cell growth at breast tissue. One of the most common triggers of breast cancer is overexpression of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ). This research's goal is to test the ability of coumestrol as the ligand of ER $\alpha$  with *in silico* method and to discover coumestrol's binding pose inside the ER $\alpha$ 's binding pocket.

Coumestrol's ability as ER $\alpha$ 's ligand was tested using structure-based virtual screening (SBVS) method by Setiawati *et al.* (2014) that had been modified by Istyastono (2015). Results analysis was done using decision tree generated from recursive partition and regression tree method (RPART). If coumestrol is a ligand based on decision tree, it is concluded that coumestrol is active as ligand of ER $\alpha$ . At the end of analysis, coumestrol's pose inside ER $\alpha$ 's binding pocket was visualized using MacPyMol.

From the test acknowledged that the smallest ChemPLP value of coumestrol's pose was -83.1487. Coumestrol interacts with GLY420, ARG394, and GLU353 using hydrogen bonds. However, coumestrol were perceived as decoy according to decision tree. Hence, coumestrol could not be recognized as ER $\alpha$ 's ligand by the protocol. Therefore, development of proper protocol to indentify ligand for ER $\alpha$  is required.

**Keywords:** Coumestrol, breast cancer, SBVS, estrogen receptor alpha, *in silico*

### 1. Pendahuluan

Kanker payudara adalah kanker yang terjadi akibat pertumbuhan sel payudara yang tidak terkendali (National Cancer Institute, 2014). Berdasar data statistik World Health Organization (WHO), kanker payudara merupakan kanker yang paling sering terjadi pada wanita di 140 dari 184 negara di seluruh dunia. WHO mencatat 522.000 kematian wanita akibat kanker payudara pada tahun 2012 (International Agency for Research on Cancer WHO, 2013).

Menurut Liao *et al.* (2014), ekspresi reseptor estrogen alfa (RE $\alpha$ ) yang tinggi berkorelasi dekat dengan proliferasi sel kanker payudara. Kedekatan korelasi ini menjadikan RE $\alpha$  target yang potensial untuk terapi kanker payudara. Oleh karena itu, perlu dikembangkan suatu senyawa alam yang berpotensi menghambat aktivitas RE $\alpha$ .

Coumestrol termasuk senyawa organik alami golongan *coumestan* yang banyak terdapat pada semanggi merah, kala chana dan kedelai (Bhagwat, Haytowitz dan Holden, 2008). Berdasarkan uji *in vitro* dan *in vivo* oleh Hopert *et al.* (1998), coumestrol terbukti dapat berikatan dengan RE $\alpha$ . Coumestrol juga menunjukkan aktivitas anti-estrogenik di otak dan kelenjar pituitari yang

dimediasi oleh RE $\alpha$  berdasar uji *in vivo* pada *estrogen receptor alpha knockout mice (ERalphaKO)* (Jacob, Temple, Patisaul, Young, dan Rissman, 2001), namun uji *in silico* aktivitas senyawa coumestrol pada RE $\alpha$  belum pernah dilakukan.

Uji *in silico* mengenai aktivitas coumestrol pada RE $\alpha$  didasarkan pada metode penambatan Penapisan Virtual Berbasis Struktur (PVBS). Dalam penelitian ini, pose coumestrol dalam kantung ikatan RE $\alpha$  diseleksi menggunakan protokol penambatan virtual molekuler Setiawati, Riswanto, Yuliani, dan Istyastono (2014) yang dimodifikasi pada bagian *post-docking analysis* oleh Istyastono pada tahun 2015; perangkat lunak PLANTS 1.2 digunakan untuk melakukan simulasi penambatan virtual molekuler yang dilanjutkan dengan *post-docking analysis* menggunakan perangkat lunak statistik komputasional R.

### 2. Metode Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah protokol penambatan virtual molekuler Setiawati, Riswanto, Yuliani, dan Istyastono (2014) (protokol penambatan) dan *post-docking analysis* oleh Istyastono (2015) (protokol analisis hasil),

\*Email korespondensi: clarafelicia0911@gmail.com

struktur tiga dimensi coumestrol dalam bentuk .mol2 (didapat dari zinc.docking.org, kode: ZINC00001219), perangkat lunak penambatan PLANTS1.2 (Korb *et al.*, 2009) untuk menilai pose penambatan coumestrol, SPORES (Brink dan Exner, 2008) untuk memastikan format .mol2 dapat digunakan oleh perangkat lunak PLANTS1.2, MacPyMOL1.2r1 (Lill dan Danielson, 2010) untuk menghasilkan gambar molekuler, serta R versi 3.1.1 (R Development Core Team, 2013) untuk analisis statistik. Peralatan yang digunakan adalah server dengan alamat IP 103.247.10.66, Apple Macbook 5,1 dengan spesifikasi: prosesor Intel Core 2 Duo @2GHz, RAM 2GB 1067 MHz DDR3, dengan sistem operasi Mac OS X versi 10.6.8.

### 2.1. Preparasi coumestrol

Struktur coumestrol dalam bentuk .mol2 (coumestrol.mol2) diunduh dari ZINC (zinc.docking.org) dengan kode ZINC00001219. Struktur .mol2 coumestrol dipreparasi (modul *settypes*) menggunakan aplikasi SPORES agar dapat ditambatkan pada penambatan molekuler menggunakan PLANTS1.2.

### 2.2. Penambatan coumestrol

Luaran dari SPORES ditambatkan menggunakan PLANTS1.2 sesuai protokol. Iterasi penambatan molekuler dilakukan tiga kali. Lalu,

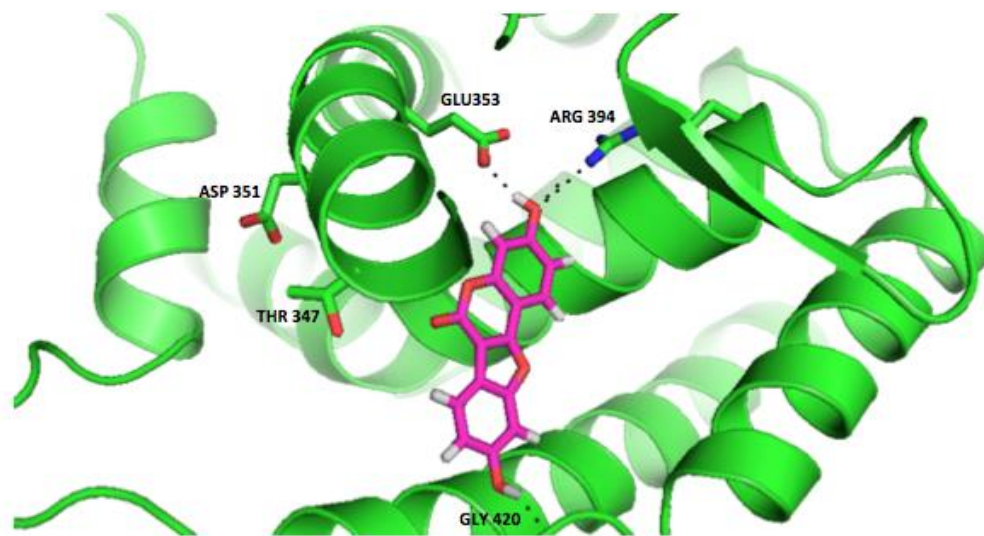
luaran berupa 3 x 50 pose berupa skor ChemPLP dipilih satu dengan skor terbaik (terendah). Prosedur penambatan coumestrol direplikasi 1000 kali, sehingga diperoleh 1000 pose terbaik masing-masing replikasi.

### 2.3. Tata cara analisis hasil

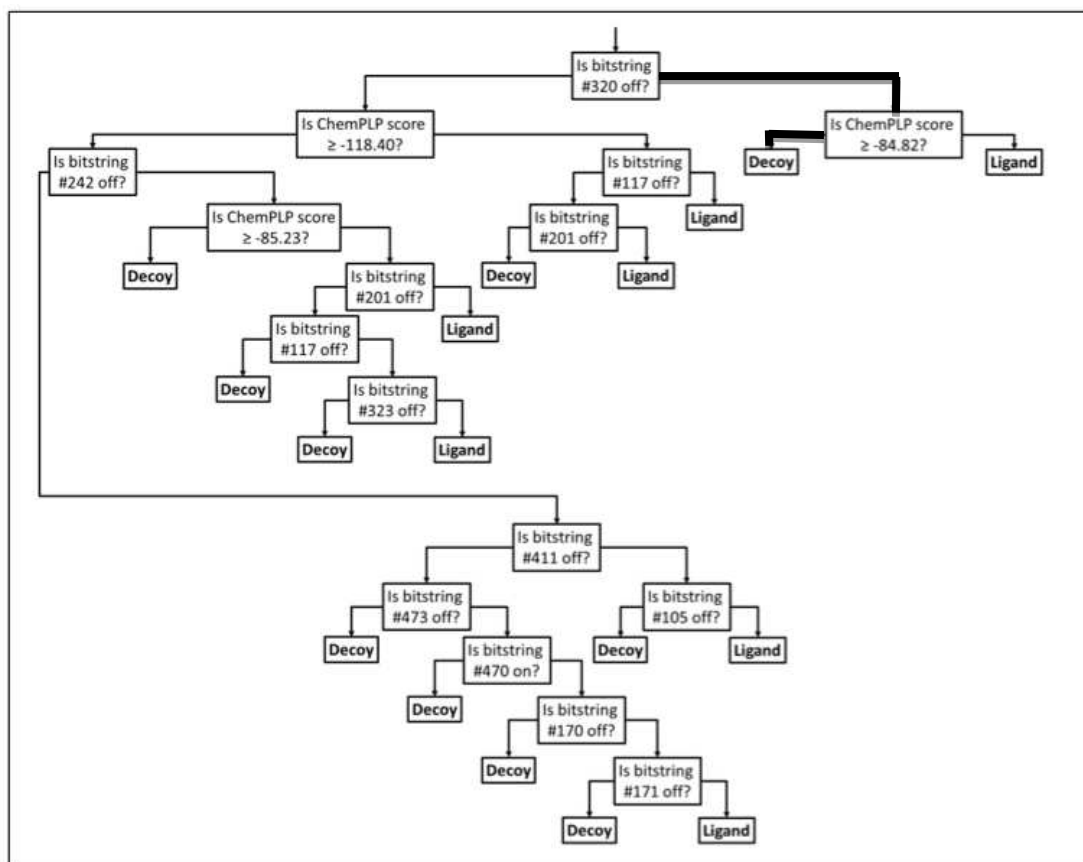
Dilakukan analisis hasil menggunakan protokol analisis hasil. Jika berdasar *decision tree* coumestrol merupakan *ligand*, maka coumestrol dinyatakan aktif sebagai ligan pada RE $\alpha$ . Setelah analisis hasil, dilakukan visualisasi pose coumestrol dalam kantung ikatan RE $\alpha$ . Pose coumestrol yang divisualisasikan adalah: (1) Pose yang memiliki *bitstring* 320 aktif dengan skor ChemPLP terendah, (2) Pose dengan skor ChemPLP terendah, (3) Jika pose pada poin (2) memiliki skor ChemPLP yang lebih rendah dari pose pada poin (1), maka kedua pose divisualisasikan.

## 3. Hasil dan Pembahasan

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui mengetahui kemampuan senyawa coumestrol sebagai ligan pada RE $\alpha$  melalui protokol penambatan dan protokol analisis hasil, menguji kemampuan protokol penambatan dan protokol analisis hasil dalam mengenali coumestrol sebagai ligan pada RE $\alpha$  dan mengetahui pose coumestrol pada tingkat atomik dalam kantung ikatan RE $\alpha$



Gambar 1. Pose coumestrol dalam kantung ikatan RE $\alpha$



**Gambar 2.** Hasil *post docking analysis* menggunakan *decision tree*. Garis tebal menunjukkan rute analisis yang terjadi pada coumestrol.

**Tabel I.** Data Aktivitas PLIF *Bitstring* Penting Coumestrol

No. <i>bitstring</i>	Residu	Aktivitas
320	GLY420	Aktif
242	ARG394	Aktif
117	GLU353	Aktif
411	GLY521	Tidak aktif
473	CYS530	Tidak aktif
105	ASP351	Tidak aktif
201	LEU387	Tidak aktif
470	CYS530	Tidak aktif
170	TRP383	Tidak aktif
171	TRP383	Tidak aktif
323	MET421	Tidak aktif

berdasar protokol penambatan dan protokol analisis hasil.

Pose yang divisualisasikan (Gambar 1) merupakan pose coumestrol ke-159 dari 1000 replikasi yang dilakukan dan memiliki skor ChemPLP terendah sebesar -83,1487. Berdasar

hasil visualisasi dari MacPyMol (Gambar 1) dan data aktivitas PLIF *bitstring* penting coumestrol (Tabel I), terlihat coumestrol berinteraksi dengan beberapa residu asam amino pada RE $\alpha$ . Coumestrol berinteraksi dengan residu GLY420 (*bitstring* no. 320), ARG394 (*bitstring* no. 242), dan GLU353 (*bitstring* no. 117). Interaksi yang terjadi berupa ikatan hidrogen dengan protein sebagai akseptor pada residu GLY420 dan GLU353 dan ikatan hidrogen dengan protein sebagai donor pada residu ARG394.

Dari *post docking analysis* menggunakan *decision tree* didapat hasil yang menyatakan coumestrol sebagai *decoy* (Gambar 2), sehingga disimpulkan coumestrol tidak bertindak sebagai ligan pada RE $\alpha$  berdasar protokol penambatan dan protokol analisis hasil. Hasil ini bertentangan dengan hipotesis yang diajukan di awal penelitian. Mysinger *et al.* (2012) mendefinisikan ligan sebagai senyawa dengan afinitas  $\leq 1 \mu\text{M}$  terhadap protein target; senyawa dengan afinitas  $\geq 1 \mu\text{M}$  dan  $\leq 30 \mu\text{M}$  sebagai ligan marginal; dan senyawa dengan

afinitas  $\geq 30 \mu\text{M}$  sebagai pengecoh.  $\text{IC}_{50}$  coumestrol pada  $\text{RE}\alpha$  adalah 75,7 nM (Zhao dan Brinton, 2004), yang berarti coumestrol termasuk ligan bagi  $\text{RE}\alpha$ .

*Decision tree* terbaik hasil metode RPART oleh Istyastono (2015) yang digunakan dalam protokol analisis hasil hanya mengidentifikasi 52,742% ligan dalam DUD-E sebagai ligan (202 dari total 383 ligan). Ketidaksesuaian hasil dengan hipotesis dapat terjadi karena coumestrol termasuk dalam 47,258% ligan yang tidak terdeteksi sebagai ligan oleh protokol analisis hasil. Perbedaan hasil dengan hipotesis menunjukkan protokol penambatan dan protokol analisis hasil masih belum mampu mendeteksi coumestrol sebagai ligan  $\text{RE}\alpha$ , sehingga masih perlu dilakukan pengembangan protokol agar mampu mengidentifikasi ligan  $\text{RE}\alpha$ .

#### 4. Kesimpulan

Berdasar protokol Setiawati *et al.* (2014) yang telah dimodifikasi dengan RPART sebagai *post docking analysis* oleh Istyastono (2015), coumestrol bukan merupakan ligan bagi  $\text{RE}\alpha$ .

#### Daftar Pustaka

- American Cancer Society, 2014. *Breast Cancer*. American Cancer Society, USA.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B., dan Holden, J.M., 2008. *USDA Database for the Isoflavones Content of Selected Foods*, Release 2.0, U.S. Department of Agriculture, USA, 43-48.
- Brink, T.T., dan Exner, T.E., 2009. Influence of Protonation, Tautomeric, and Stereoisomeric States on Protein-Ligand Docking Results. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 55 (9), 1962-1972.
- Hopert, A.C., Beyer, A., Frank, K., Strunck, E., Wiinsche, W., and Volimer, G., 1998. Characterization of Estrogenicity of Phytoestrogens in an Endometrial-derived Experimental Model. *Environmental Health Perspectives*, 106 (9), 581-586.
- International Agency for Research on Cancer World Health Organization, 2013. *Latest World Cancer Statistics*
- Global Cancer Burden Rises to 14.1 Million New Cases in 2012: Marked Increase in Breast Cancers Must be Addressed*. World Health Organization, France, 1.
- Istyastono, E.P., 2015. Employing Recursive Partition and Regression Tree Method to Increase The Quality of Structure-Based Virtual Screening in The Estrogen Receptor Alpha Ligands Identification. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8 (6), 207-210.
- Jacob, D.A., Temple, J.L., Patisaul, H.B., Young, L.J., dan Rissman, E.F., 2001. Coumestrol Antagonizes Neuroendocrine Actions of Estrogen via The Estrogen Receptor Alpha. *Exp Biol Med (Maywood)*, 226 (4), 301.
- Korb, O., Stutzle, T., dan Exner, T.E., 2007. An Ant Colony Optimization Approach to Flexible Protein-Ligand Docking. *Swarm Intell*, 1, 115-134.
- Korb, O., Stutzle, T., dan Exner, T.E., 2009. Empirical Scoring Function for Advanced Protein-ligand Docking with PLANTS. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49 (1), 84-98.
- Liao, X.H., Lu, D.L., Wang, N., Liu, L.Y., Wang, Y., Li, Y.Q., *et al.*, 2014. Estrogen Receptor  $\alpha$  Mediates Proliferation of Breast Cancer MCF-7 Cells via a p21/PCNA/E2F1-dependent Pathway. *The FEBS Journal*, 281 (2014), 927-942.
- Lill, M.A., dan Danielson, M.L., 2010. Computer-aided Drug Design Platform Using PyMOL. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 25 (1), 13-19.
- Mysinger, M.M., Carchia, M., Irwin, J.J., dan Shoichet, B.K., 2012. Directory of Useful Decoys, Enhanced (DUD-E): Better Ligands and Decoys for Better Benchmarking. *Journal of Medicinal Chemistry*. 55, 6582-6594.
- Setiawati, A., Riswanto, F.D.O., Yuliani, S.H., dan Istyastono, E.P., 2014. Retrospective Validation of A Structure-Based Virtual Screening Protocol to Identify Ligands for Estrogen Receptor Alpha and Its Application to Identify the Alpha-mangostin Binding Pose. *Indones. J.Chem.*, 14 (2), 103-108.
- Zhao, L., dan Brinton, R.D., 2005. Structure-Based Virtual Screening for Plant-Based  $\text{ER}\beta$ -Selective Ligands as Potential Preventative Therapy against Age-Related Neurodegenerative Diseases. *J. Med. Chem.*, 48, 3463-3466.