

Xây dựng mô hình docking của các chất ức chế bơm ngược ABCC2/MRP2

Phan Thiện Vy

Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành
thienvyphan@gmail.com

Tóm tắt

Bơm ABCC2 (ATP Binding Cassette subfamily C member 2) thuộc họ bơm sử dụng năng lượng ATP để vận chuyển các chất qua màng. Bơm ABCC2 còn được gọi là MRP2 (Multidrug Resistance Protein 2) vì bơm góp phần gây ra tình trạng kháng thuốc ở các tế bào ung thư. Bơm phân bố ở tế bào biểu mô ống mật ở gan, tế bào ống lượn gần, tế bào biểu mô ruột do đó bơm ảnh hưởng đến sự hấp thu và đào thải các chất độc nội sinh và các thuốc sử dụng đường uống. Trong đề tài này, mô hình mô tả phân tử docking được xây dựng nhằm xác định tương tác của các chất ức chế với các acid amin tại khoang trung tâm và dự đoán các chất có khả năng ức chế hoạt tính bơm. Công cụ FlexX tích hợp trong LeadIT được sử dụng để nghiên cứu mô hình mô tả phân tử docking của 204 chất có hoạt tính ức chế bơm. Cấu trúc homology của bơm ABCC2 được xây dựng bằng server tự động I-TASSER. Kết quả docking tại khoang trung tâm trên bơm ABCC2 cho thấy Arg943 là acid amin quan trọng tại khoang gắn kết, Arg943 tạo 2 liên kết hydro và 1 tương tác kỵ nước với đa số các chất ức chế. Đề tài đã xây dựng được mô hình homology của bơm ABCC2 bằng server I-TASSER với chất lượng tốt và độ tin cậy khá cao. Mô hình này tạo cơ sở cho việc docking các chất ức chế vào khoang trung tâm nhằm tìm ra các acid amin và các liên kết quan trọng tại khoang gắn kết.

Nhận	20.12.2017
Được duyệt	15.01.2018
Công bố	01.02.2018
Từ khóa	
ABCC2, MRP2, sàng lọc ảo, docking	

© 2018 Journal of Science and Technology - NTTU

1. Đặt vấn đề

ABCC2 hay còn gọi là bơm ngược MRP2 (Multidrug resistance associated protein 2) là bơm vận chuyển có một vai trò đặc biệt quan trọng trong việc đào thải thuốc và các chất độc nội sinh [2], [4], [5], [6]. Các chất ức chế mạnh ABCC2 là mối quan tâm đáng kể trong nghiên cứu tương tác thuốc. Ngoài ra, việc phát triển các thuốc có thể ức chế sự đào thải của ABCC2 cũng cần được xem xét để cải thiện hiệu quả điều trị.

Hiện nay, chưa có nghiên cứu nào giúp mô hình hóa quá trình gắn kết của các chất ức chế với bơm ABCC2, đề tài sẽ ứng dụng các công cụ máy tính để xây dựng cấu trúc bơm và giải thích khả năng gắn kết của các chất ức chế lên bơm. Cấu trúc bơm ngược hiện tại chưa được xác định bằng cấu trúc tinh thể, do đó, cấu trúc ABCC2/MRP2 sẽ được mô hình hóa bằng kỹ thuật mô tả tính tương đồng (homology). Phần mềm DOCK, MOE docking và có thể FlexX sẽ được sử dụng cho mô hình mô tả

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1 Nguyên liệu

Cơ sở dữ liệu gồm 204 chất có hoạt tính ức chế bơm ABCC2 (IC₅₀, Ki) được thu thập từ 16 bài báo khoa học. Ở mỗi bài báo, giá trị hoạt tính được thử nghiệm trên các cơ chất khác nhau và phương pháp thử cũng khác nhau như trình bày trong 0.

2.2 Xây dựng mô hình homology của bơm ABCC2

Trình tự protein được lấy từ trang web www.uniprot.org. Sau khi loại bỏ bớt các acid amin của xoắn thứ 1 tới xoắn thứ 5 thuộc vùng MSD0, vùng còn lại chứa 1231 acid amin. Các acid amin này được tải lên trang web <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER> để xây dựng mô hình tương đồng. Cấu trúc homology được đánh giá dựa trên các thang điểm C-score, TM-score, RMSD và mật độ đám (Cluster density).



2.3 Docking

Chuẩn bị protein bằng công cụ LigX

Xác định vị trí gắn kết bằng Site Finder trong MOE 2008.10

Chuẩn bị ligand gắn kết bằng Sybyl

Dock ligand vào vị trí gắn kết bằng Lead IT 2.0.2

2.4 Đánh giá kết quả

Điểm số docking (KJ/mol) được đánh giá dựa trên các liên kết tạo thành giữa ligand và protein bao gồm liên kết ion, liên kết hydro, liên kết *van der Waals*, liên kết π - π , ... Kết quả docking cho biết ái lực gắn kết của ligand với protein và tương tác giữa ligand với các acid amin xung quanh. Kết quả docking này được sử dụng để hỗ trợ việc tìm kiếm khoang gắn kết phù hợp nhất

Bảng 2.1 Phương pháp thử hoạt tính ức chế bơm ABCC2 của các bài báo thu thập được

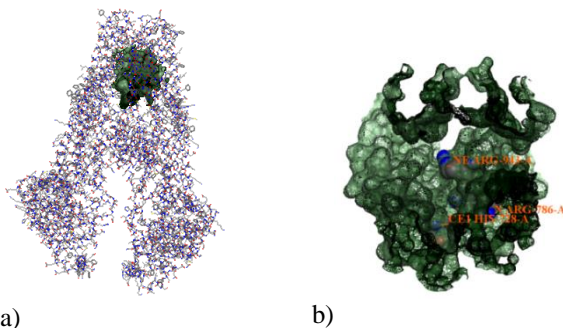
STT	Bài báo	Cơ chất	Phương pháp thử
1	BMCL_2008_18_4761	Calcein AM	Phương pháp hấp thu
2	BP_2005_69_699	Calcein AM	Phương pháp hấp thu
3	CRT_2003_16_1651	Calcein AM	Phương pháp hấp thu
4	DMD_2005_33_537	Calcein AM	Phương pháp hấp thu
5	DMD_2007_35_937	Calcein AM	Phương pháp hấp thu
6	EJPB_2008_69_396	CMFDA	Phương pháp hấp thu
7	IJP_2011_420_26	Erythromycin	Phương pháp hấp thu
8	JPET_2007_320_299	MTX	Phương pháp hấp thu
9	PR_2001_18_579	DNPG	Phương pháp hấp thu
10	BJ_1997_327_305	LTC4	Vận chuyển bằng màng túi
11	BMC_2015_04_029	EG, CDCF	Vận chuyển bằng màng túi
12	DMD_2008_552_60	EG	Vận chuyển bằng màng túi
13	DMD_2013_41_1231	EG	Vận chuyển bằng màng túi
14	EJPS_2012_46_100	EG, CDCF, LTC4	Vận chuyển bằng màng túi
15	JBS_2008_13_295	CDCF, LTC4	Vận chuyển bằng màng túi
16	JMC_2008_51_3275	EG	Vận chuyển bằng màng túi

Chú thích

Ký hiệu bài báo: Tên bài báo viết tắt_năm_số_trang bắt đầu

DNPG: [₃H]-S-(2,4-dinitrophenyl)glutathione; MTX: Methotrexat; EG: β -estradiol 17- β -d-glucuronide

CDCF: 5(6)-carboxy-2,'7'-dichlorofluorescein; LTC4: Leukotrien C4; CMFDA: chloromethylfluorescein-diacetat



Hình 3.1 (a) Minh họa vị trí gắn kết của chất ức chế trên bơm ngược ABCC2.

(b) Ba acid amin Arg943, Arg786 và His728 tại khoang gắn kết

3. Kết quả nghiên cứu mô hình mô tả phân tử docking

3.1 Xây dựng mô hình homology của bơm ABCC2

Sau khi xây dựng mô hình homology, server I-TASSER đưa ra 5 cấu trúc mô hình ABCC2 tương đồng tốt nhất. Mô hình đầu tiên có giá trị TM-score lớn hơn 0,5 chứng tỏ mô hình này có dạng hình học giống với dạng của protein mẫu. C-score của mô hình đầu bằng -0,92 lớn hơn bốn mô hình

còn lại nên có độ tin cậy cao nhất và mật độ đám của mô hình cũng tốt nhất. Mô hình đầu tiên sẽ được sử dụng để thực hiện docking.

3.2 Xác định vị trí gắn kết tại khoang trung tâm

Sau khi kết hợp giữa công cụ tìm kiếm Site Finder và docking bằng Lead IT, vị trí gắn kết trong khoang trung tâm của các chất ức chế được xác định

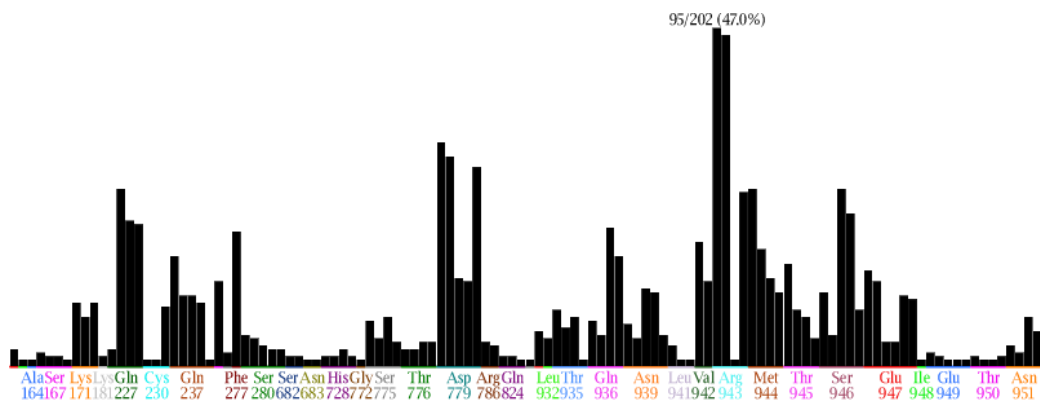
Trong số các chất ức chế mạnh có những chất vừa là cơ chất, vừa là chất ức chế bơm ABCC2. Do đó, vị trí gắn kết cơ chất ở khoang trung tâm cũng có thể là nơi gắn kết các chất ức chế. Với những luận cứ trên, vị trí gắn kết được xác định là phù hợp với nghiên cứu của Ryu và cộng sự. Ryu và cộng sự đã chứng minh rằng acid amin **Arg943** tương ứng với Arg1257 đối với protein chưa cắt bỏ phần MSD0, **Arg786** tương ứng Arg1100 và **His728** tương ứng His1042 là thành phần của khoang gắn kết cơ chất [3]. thể hiện 3 acid amin Arg943, Arg786 và His728 tại vị trí gắn kết.

3.3 Kết quả docking vào khoang trung tâm

Phân tích kết quả docking của 204 chất có hoạt tính ức chế vào khoang trung tâm. Kết quả cho thấy có 2 chất ức chế không dock vào khoang trung tâm, 4 chất ức chế có điểm số docking dương, còn lại tất cả các chất đều dock được vào vị trí gắn kết và có điểm số docking âm, với điểm số docking

thay đổi từ -35,41 KJ/mol đến -0,25 KJ/mol). Sử dụng công cụ PLIF trong MOE 2008.10 để phân tích kết quả docking của 202 chất có hoạt tính ức chế được dock thành công vào khoang trung tâm. Kết quả cho thấy acid amin **Arg943** tạo liên kết với 95/202 ligand (47%). Trong đó, Arg943 đóng vai trò là chất nhận hydro với 95/202 ligand, liên kết ion

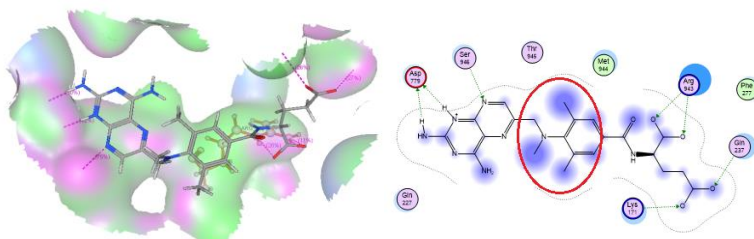
với 2/202 ligand và tạo các liên kết bề mặt khác với 49/202 ligand. Bên cạnh đó, theo **Error! Reference source not found.** các acid amin như Asp779 (63/202), Gln227 (50/202), Ser946 (50/202) và Met944 (50/202) cũng là các acid amin quan trọng tại khoang gắn kết



Hình 3.2. Tần suất tạo tương tác của các acid amin tại khoang gắn kết với các chất có hoạt tính ức chế

Trong 10 chất có điểm số docking thấp nhất có methotrexat và 5 chất thuộc nhóm các dẫn xuất của methotrexat. PR_2001_18_579_9 thuộc nhóm dẫn xuất nhóm thế alkyl trên acid aminobenzoic, PR_2001_18_579_19, PR_2001_18_579_20, PR_2001_18_579_21 thuộc nhóm

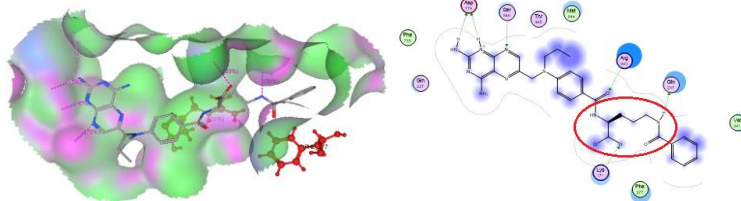
dẫn xuất benzoyl orthinin, PR_2001_18_579_22 thuộc nhóm dẫn xuất mono carboxyl. Khi so sánh tương quan giữa giá trị hoạt tính sinh học K_i của các dẫn chất methotrexat và điểm số docking, kết quả cho thấy không có mối tương quan tuyến tính giữa hai giá trị này ($R^2 = 0,09$).



Hình 3.3. Vị trí docking tại khoang trung tâm và túi gắn kết của PR_2001_18_579_9

Dẫn xuất nhóm thế alkyl trên acid aminobenzoic và dẫn xuất benzoyl orthinin có điểm số docking tốt nhất. Theo Han và cộng sự, sự gia tăng số lượng nguyên tử carbon tại trung tâm phân tử sẽ góp phần tăng sự tương tác kỵ nước

với bơm ABCC2 tại trung tâm phân tử [1]. Kết quả docking phù hợp với giả thuyết trên, liên kết kỵ nước được hình thành do sự tương tác của trung tâm phân tử PR_2001_18_579_9 và acid amin Arg943 xem Hình 3.3



Hình 3.4. Vị trí docking tại khoang trung tâm và túi gắn kết của PR_2001_18_579_21

Trong số các dẫn chất của methotrexat, các chất có nhóm ornithin tận cùng là những chất có hoạt tính ức chế cao hơn các dẫn chất còn lại. Han và cộng sự cho rằng sở dĩ có hiện tượng này là do nhóm ornithin làm tăng thể tích gắn kết

đồng thời góp phần hình thành tương tác kỵ nước π - π hoặc liên kết *van der Waals* với các acid amin. [1] Kết quả docking phù hợp với giả thuyết trên và theo kết quả docking, liên kết kỵ nước được hình thành là do sự tương

tác của nhóm ornithin với acid amin Phe277 và Arg943, xem Hình 3.4

4. Bàn luận

Cấu trúc homology của bơm ABCC2 được xây dựng từ 1231 acid amin trong vùng MSD1, MSD2 và NBD1, NBD2 dựa vào mô hình mô tả tính tương đồng bằng sever tự động I-TASSER. Xác định được vị trí gắn kết gồm 3 acid amin tham gia gắn kết phù hợp với nghiên cứu của Ryu và cộng sự là **Arg943**, **Arg786** và **His728**. Mô hình bơm vừa được xây dựng được áp dụng để tiến hành docking với các chất có hoạt tính ức chế. Kết quả docking cho thấy các chất này có ái lực gắn kết cao với khoang trung tâm (89% các chất có điểm số docking < -10 KJ/mol) và **Arg943**, **Phe277**, **Asp779**, **Gln227**, **Ser946**, **Met944** là những acid amin

tham gia gắn kết với chất ức chế tại khoang gắn kết. Trong số đó, Arg943 tạo liên kết nhận hydro đồng thời tạo liên kết kỵ nước với đa số các ligand, kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Zhang và cộng sự, mô hình pharmacophore của Zhang gồm một trung tâm kỵ nước và hai trung tâm nhận hydro [6].

5. Kết luận và kiến nghị

Mô hình mô tả phân tử xây dựng được phù hợp với các nghiên cứu trước đây và có khả năng gắn kết tốt với các chất có hoạt tính ức chế. Mô hình này cần tiếp tục phân tích khả năng gắn kết với các chất có hoạt tính cảm ứng và không có hoạt tính để làm rõ hơn các acid amin và các liên kết thực sự cần thiết để ligand có khả năng ức chế bơm ABCC2.

Tài liệu tham khảo

- Han, Y. Physicochemical Parameters Responsible for the Affinity of Methotrexate Analogs for Rat Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT/MRP2). *Pharm Res*, **2001**, Vol 18 (5), 579.
- Jedlitschky, G.; Hoffmann, U., Kroemer, H.K. Structure and function of the MRP2 (ABCC2) protein and its role in drug disposition. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **2006**, Vol 2 (3), 351-366.
- Ryu, S.; Kawabe, T.; Nada, S., Yamaguchi, A. Identification of Basic Residues Involved in Drug Export Function of Human Multidrug Resistance-associated Protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, **2000**, Vol 275 (50), 39617-39624.
- Wissel, G.; Kudryavtsev, P.; Ghemtio, L.; Tammela, P.; Wipf, P.; Yliperttula, M.; Finel, M.; Urtti, A.; Kidron, H., Xhaard, H. Exploring the structure-activity relationships of ABCC2 modulators using a screening approach. *Bioorg Med Chem*, **2015**, Vol 23 (13), 3513-3525.
- Xing, L.; Hu, Y., Lai, Y. Advancement of Structure-Activity Relationship of Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Interactions. *AAPS J*, **2009**, Vol 11 (3), 406-413.
- Zhang, H.; Xiang, M.L.; Zhao, Y.L.; Wei, Y.Q., Yang, S.Y. Support vector machine and pharmacophore-based prediction models of multidrug-resistance protein 2 (MRP2) inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, Vol 36 (4-5), 451-457.

Molecular docking of human ABCC2/MRP2 efflux pump inhibitors

Phan Thiện Vy

Faculty of Pharmacy, Nguyen Tat Thanh University

Abstract ABCC2/MRP2 is a member of ATP-binding cassette family of transporters. This efflux transporter is found in the apical membranes of polarized cells and is expressed mainly in the liver, kidney and intestine. ABCC2 involves in absorption, distribution and excretion of drugs and xenobiotics. Overexpression of this pump also contributes to the drug resistance of cancer cells. In this thesis, molecular docking on ABCC2 inhibitors have been developed. These models are aimed to identify the residues making contact with ABCC2 inhibitors and to establish a computational prediction model on ABCC2 inhibitors. FlexX tool integrated in Lead IT was used for molecular docking studies of 204 ABCC2 inhibitors. 3D structure of ABCC2 pump has been predicted by I-Tasser online server. For molecular docking, amino acid played an important roles in central cavity was Arg943, Arg943 was identified to bind with majority of ligands by 2 hydrogen bonds and 1 hydrophobic interaction. ABCC2 homology was successfully developed with good quality and high confidence by I-Tasser server. This 3D-structure homology was used to built molecular docking model at central cavity in order to find out important residues and bonds.

Keywords ABCC2, MRP2, docking, in silico, inhibitor