

Phân tích quỹ đạo mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết cho cấu trúc phân tử nhỏ có hoạt tính ức chế BACE1

Trần Thị Thúy Nga¹, Hoàng Tùng², Nguyễn Kim Hưng², Lâm Mạnh Hoàng¹, Đặng Thị Mỹ Huệ¹, Phạm Thu Hương¹, Trần Quế Hương^{1*} ¹ Khoa Dược, Trường Đại học Kỹ thuật Y-Dược Đà Nẵng ² Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh *Tác giả liên hệ: tqhuong@dhktyduocdn.edu.vn (Ngày gửi đăng: 09/3/2022 – Ngày duyệt đăng: 30/5/2022)

SUMMARY

Beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) is a crucial aspartic protease that cleaves the amyloid precursor protein to generate the amyloid peptide that plays a vital role in Alzheimer's disease (AD) pathophysiologic, and as thus, it appears as a promising therapeutic target for AD treatment. However, increase in recent AD cases and occurrence of various side effects of existing drugs leads to a dire need of discovering or identifying chemical compounds that can cease AD development. In continuance of the previous study that identified 14 potential small-molecule compounds inhibiting BACE1 by screening through 3D pharmacophore modeling, molecular docking, and protein-ligand interaction fingerprinting analysis, these substances were subjected molecular dynamics (MD) simulation to determine the protein-ligand complex stability in 20 ns duration. Based on the RMSD, RMSF values, and high hydrogen bonds frequency of each ligand with the key residues of BACE1, four candidates were chosen to perform further investigation of the stability and binding potency through 50 ns MD simulation. In addition, the calculation of free binding energies using the MM-PB/SA method revealed the energetic results of these four substances were < 1000 kJ/mol. The final data confirmed that these four newly obtained compounds hit HTS0170, DB07007, DB07618, and MBX527804, and thereby may serve as the best binding affinity compounds as well as potential inhibitors for BACE1 in the treatment of Alzheimer's disease.

Từ khóa: Alzheimer, BACE1, mô phỏng động học phân tử, năng lượng tự do gắn kết.

Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer (Alzheimer disease –AD) là một bệnh lý về não, chiếm 60 % đến 80 % trong những bệnh suy giảm trí nhớ và ước tính khoảng 50 triệu người trên thế giới mắc nhóm bệnh lý này [7]. Tại Việt Nam, số người đang sống cùng căn bệnh Alzheimer cũng gần 1,2- 1,3 triệu. Bệnh được biểu hiện bởi sự có mặt của các mảng bám β amyloid (hay Aβ), làm suy giảm chức năng của các tế bào thần kinh và gây chết tế bào. Trong đo, γ secretase và đặc biệt là β secretase (hay con gọi BACE1) là hai enzym chịu trách nhiệm quan trọng trong việc hình thành β amyloid [4]. Như vậy, để giảm sự tích tụ các mảng Aβ bằng cách ức chế BACE1 là một trong các chiến lược để ngăn chặn căn bệnh này. Nghiên cứu trước của chúng tôi đã xác định được 14 cấu trúc phân tử nhỏ có tiềm năng ức chế BACE1 bằng sàng lọc qua mô hình pharmacophore, docking phân tử và phân tích dấu vân tay tương tác protein-phối tử [1]. Nối tiếp kết quả đó, chúng tôi tiến hành thực hiện mô phỏng động lực học phân tử và tính toán năng lượng tự do gắn kết cho các cấu trúc tiềm năng này với mục đích khảo sát độ ổn định của phức hợp proteinphối tử trong thời gian 20 ns, từ đó dự đoán khả năng trở thành thuốc ức chế BACE1 trong điều trị bệnh Alzheimer.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu Cơ sở dữ liệu

Đối tượng thử nghiệm của đề tài gồm 14 cấu trúc tiềm năng đã được đánh giá qua mô hình docking phân tử ở nghiên cứu trước của chúng tôi [1] và cấu trúc tinh thể của BACE1 trong phức hợp với OM99-2 có mã pdb 2ZHR (2,5 Å).

Mô phỏng động lực học và đánh giá tính ổn định, linh động của phức hợp

Nghiên cứu tiến hành mô phỏng động lực học các chất có kết quả docking tiềm năng trong thời gian là 20 ns và 50 ns bằng phần mềm GROMACS 2020.4, trường lực CHARMM27. Các tệp đầu vào gồm toạ độ và topology cho protein là "protein_processed.gro" và "topol.top", đối với phối tử là "ligand.gro" và "ligand.itp", tương ứng "complex.gro" là topology của phức hợp. Phức hợp tạo thành được mô phỏng động lực hoc trong môi trường nước tường minh TIP3P được dựng sẵn với khoảng cách từ phức hợp đến cạnh của hộp sẽ là 1,0 nm, thêm ion và trung hoà điện tích cho hộp bằng dung dịch NaCl 0,15 M. Trước khi tiến hành mô phỏng cần tiến hành cân bằng với các bước tối thiểu hóa năng lượng và ổn định nhiệt độ hệ 300 K cũng như áp suất 0,987 atm (1 bar), thời gian thiết lập là 100 ps. Mô phỏng đông lực học sau đó được thực hiện trong 20 ns, với 2000 khung hình (frame) cho giá trị RMSD đánh giá mức độ ổn định của các nguyên tử trong điều kiện mô phỏng. RMSD < 0,3 nm cho thấy cấu trúc ổn định và có ý nghĩa [10]. Công thức tính RMSD:

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

Bên cạnh đó, RMSF được dùng đế khảo sát sự linh động của các acid amin trong protein, RMSF > 0,2 nm cho thấy phối tử linh động [4]. Giá trị RMSF được tính toán bằng biểu thức:

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

Tỷ lệ liên kết hydro: liên kết hydro sẽ được tính dựa trên kết quả động học bằng phần mềm VMD 1.9.4 thông qua giá trị các thông số như md.tpr, md.fit.xtc và index từ kết quả động học. Chọn khoảng cách giữa nguyên tử cho và nhận hydro < 3.5Å và góc tạo thành giữa 2 liên kết này > 120°. Nhưng phối tử cho tỷ lệ liên kết hydro > 70% với protein được xem là liên kết mạnh tại khoang gắn kết [6], [9].

Năng lượng tự do gắn kết: Tính toán năng lượng tự do của liên kết protein-phối tử được thực hiện dựa trên kết quả mô phỏng động học, sử dụng phần mềm g_mmpbsa 5.1.2. theo công thức [11].

Phần mềm g_mmpbsa sẽ thực hiện 3 bước tính năng lượng thành phần, lần lượt là thế năng cơ học phân tử (E_{MM} = E_{vdw}+E_{elec}), năng lượng solvat hoá phân cực (G(phân cực)) và năng lượng solvat hoá không phân cực (G_{(không} phân cực)) [5].

Kết quả và bàn luận

Để đánh giá sơ bộ ái lực gắn kết giữa protein và phối tử, nghiên cứu tiến hành mô phỏng động lực học phân tử và tính toán tỷ lệ liên kết hydro của các phức hợp với thời gian 20 ns. Kết quả được mô tả ở bảng 1 và bảng 2.

Mô phỏng động lực học phân tử (20 ns)

Nhìn vào bảng 1 có thể thấy rằng, phần lớn các phức hợp giữa BACE1 và phối tử có giá trị RMSD_protein và RMSD_phối tử đều nhỏ hơn



Phức hợp	RMSD_protein (nm)	RMSD_phối tử (nm)	RMSF_Cα (nm) 0.07 ± 0.03	
Apoprotein-BACE1	0.11 ± 0.01			
BACE1- DB07813	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.04	
BACE1-HTS03305	0.14 ± 0.06	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.04	
BACE1- HTS01701	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.03	
BACE1- DB07007	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.03	
BACE1- DB05590	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.03	
BACE1- DB07618	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.07 ± 0.03	
BACE1- MHC02286	0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03	
BACE1-MBX527804	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.03	
BACE1- MHC03281	0.12 ± 0.01	0.19 ± 0.04	0.07 ± 0.04	
BACE1- MHC09505	0.16 ± 0.02	0.12 ± 0.05	0.07 ± 0.03	
BACE1-DB08026	0.12 ± 0.01	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.04	
BACE1- DB00243	0.12 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.07 ± 0.03	
BACE1- DB01255	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.07 ± 0.03	
BACE1-RH01508	0.12 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.03	

Bảng 1. Giá trị RMSD_protein, RMSD_phối tử được tính toán từ dữ liệu của quá trình mô phỏng động lực học phân tử 20 ns ở dạng apoprotein và dạng phức hợp

0,2 nm trong suốt thời gian 20 ns của quá trình mô phỏng. Tuy nhiên, khi tiến hành so sánh với giá trị RMSD của apoprotein-BACE1 (apo), chỉ có 4 phức chất BACE1-HTS01701, BACE1-DB07007, BACE1-DB07618 và BACE1-MBX527804 cho giá trị tương đương. Với các phức hợp cho giá trị RMSD lớn hơn apoprotein được dự đoán sẽ tạo những biến động trên cấu trúc của protein trong quá trình tương tác. Giá trị RMSF_Cα của tất cả các phức hợp đều nhỏ hơn 0,1 nm và có giá trị tương đương RMSF của apo.

Cùng với phân tích kết quả RMSD, RMSF, tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin quan trọng cũng là một tiêu chí góp phần đánh giá chính xác độ ổn định của phức hợp protein-ligand trong quá trình mô phỏng động lực học phân tử. Liên kết hydro sẽ được tính toán dựa trên kết quả động học kết hợp bằng phần mềm VMD 1.9.4. Kết quả tính toán tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin quan trọng của 14 chất được trình bày trong bảng 2.

Mô phỏng động lực học phân tử (50 ns)

Dựa vào phân tích mô phỏng động lực học phân tử và tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin quan trọng, nghiên cứu tiến hành chọn lọc những chất tốt nhất (có khả năng gắn kết ổn định nhất và tương tác tốt tại khoang gắn kết trong quá trình mô phỏng 20 ns) để tiến hành mô phỏng động lực học phân tử với thời gian dài hơn (50 ns) nhằm đánh giá sâu hơn ái lực liên kết của các phối tử này trên BACE1. Đó chính 4 phối tử có giá trị RMSD_protein, RMSF_Ca có giá trị tương đương apo với tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin guan trong > 100%, bao gồm HTS01701, DB07007, DB07618 và MBX527804. Từ hình 1 có thể thấy giá trị RMSD_protein và RMSD_phối tử của 4 phức hợp đều nhỏ hơn 0,2 nm với biên

Phối tử	Chất cho hydro	Chất nhận hydro	Tỷ lệ liên kết (%)
DB07813	LIG386-Main	ASP228-Side	637,91
	LIG386-Main	ASP32-Side	692,96
HTS03305	LIG386-Side	ASP228-Side	75,77
	LIG386-Side	ASP32-Side	53,65
HTS01701	LIG386-Side	ASP228-Side	240,61
	LIG386-Side	ASP32-Side	167,23
DB07007	LIG386-Main	ASP228-Side	412,49
	LIG386-Main	ASP32-Side	303,80
DB05590	LIG386-Main	ASP228-Side	282,92
	LIG386-Main	ASP32-Side	235,21
DB07618	LIG386-Main	ASP228-Side	282,92
	LIG386-Main	ASP32-Side	649,10
MHC02286	LIG386-Side	ASP228-Side	255,39
	LIG386-Main	ASP32-Side	137,91
MBX527804	LIG386-Side	ASP228-Side	593,41
	LIG386-Side	ASP32-Side	642,91
MHC03281	LIG386-Side	ASP228-Side	134,17
	LIG386-Side	ASP32-Side	195,55
MHC09505	LIG386-Side	ASP32-Side	10,75
	LIG386-Main	ASP32-Side	105,74
DB08026	LIG386-Side	ASP32-Side	39,61
	LIG386-Side	THR72-Side	37,81
DB00243	LIG386-Side	ASP228-Side	114,99
	LIG386-Side	ASP32-Side	102,90
DB01255	LIG386-Side	ASP228-Side	161,99
	LIG386-Side	ASP32-Side	211,19
RH01508	LIG386-Side	ASP32-Side	0,05
	LIG386-Side	TYR71-Side	1,25

Bảng 2. Tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin quan trọng

độ giao động < 0,1 nm. Đặc biệt, càng về cuối quá trình mô phỏng, các phức hợp này càng ít giao động. Điều đó chứng minh rằng, 4 phối tử HTS01701, DB07007, DB07618 và MBX527804 có xu hướng tương tác với protein ngày càng ổn định tại khoang gắn kết.

Hình 2 là kết quả xếp chồng các giá trị RMSF của các acid amin trong 4 phức hợp protein-phối tử, các giá trị này chồng lấp và khá tương đồng nhau. Đặc biệt, ở các acid amin quan trọng như Asp32, Tyr71, Thr72, Phe108 và Asp228, giá trị RMSF < 0,2 nm. Điều này chứng tỏ các acid amin ở vùng này không di chuyển nhiều và khá ổn định trong suốt quá trình mô phỏng. Các phối tử tương tác với protein với số liên kết hydro trung bình < 12 (Hình 3) được dự đoán sẽ cho sinh khả dụng đường uống tốt [2].

Khi xếp chồng cấu trúc 3D của phức hợp BACE1 với 4 phối tử HTS01701, DB07007, DB07618 và MBX527804 tại thời điểm 0, 20 và 50 ns trong quá trình mô phỏng động học (Hình 4), có thể quan sát thấy vị trí và cấu trúc của phối tử này không thay đổi đáng kể. Cùng với kết quả phân tích giá trị RMSD, RMSF và số liên kết hydro có thể thấy rằng đây là 4 cấu trúc phân tử nhỏ đường uống tiềm năng có hoạt tính ức chế BACE1.

Năng lượng tự do gắn kết

Kết quả tính toán năng lượng cơ học phân



Hình 1. RMSD của 4 phức hợp trong mô phỏng động lực học phân tử 50 ns



Hình 2. RMSF của 4 phức hợp trong mô phỏng động lực học phân tử 50 ns

tử ($\Delta E_{vdw} + \Delta E_{elec}$), năng lượng solvat hoá phân cực ($\Delta G_{phân cực}$), năng lượng solvat hoá không phân cực (ΔG không phân cực) và năng lượng gắn kết tự do (ΔG gắn kết) của 4 phức hợp được mô tả ở bảng 3.

Với kết quả trên, có thể thấy rằng 4 phối tử đều cho năng lượng tự do liên kết âm rất sâu (< -1000 kJ/mol), chứng tỏ các phối tử này có khả năng liên kết rất tốt với khoang gắn kết. Trong đó, phối tử HTS01701 có năng lượng liên kết tự do âm nhất -1641,27 kJ/mol) và



Hình 3. Số liên kết hydro trung bình của 4 phức hợp trong mô phỏng động lực học phân tử 50 ns

được xem là có tiềm năng ức chế BACE1 mạnh nhất so với các phối tử còn lại.

Trong các công bố liên quan đến việc thiết kế cấu trúc phân tử nhỏ ức chế hoạt tính BACE1, nghiên cứu *in silico* của Dhanabalan và cộng sự đã tiến hành sàng lọc trên cơ sở dữ liệu ZINC [3]. Kết quả, nghiên cứu này tìm được 2 chất tiềm năng nhất với tỷ lệ liên kết hydro tại các acid amin quan trọng như Asp32, Tyr71 và Asp228 đạt khoảng 60 % và năng lượng tự do gắn kết trung bình lớn hơn



Hình 4. Cấu trúc của phức BACE1 với 4 phối tử quan sát ở 0 ns (hồng), 20ns (đỏ) và 50ns (xanh lá cây).

Phối tử	E _{vdw} (kJ/mol)	E _{elec} (kJ/mol)	G _{polar} (kJ/mol)	G _{SASA} (kJ/mol)	ΔG _{bind} (kJ/mol)
HTS01701	-151,13 ± 0,26	-2031,53 ± 1,16	566,15 ± 0,50	-24,76 ± 0,14	-1641,27 ± 0,78
DB07007	-150,99 ± 0,25	- 1382,26 ± 1,09	172,69 ± 0,55	-19,78 ± 0,02	-1380,23 ± 0,74
DB07618	-114,65 ± 0,45	- 1360,40 ± 0,98	269,09 ± 0,75	-17,51 ± 0,02	-1492,56 ± 0,89
MBX527804	-158,71 ± 0,24	-2010,77 ± 1,02	558,45 ± 0,47	-19,59 ± 0,02	-1630,57 ± 0.64

Bảng 3. Kết quả tính toán năng lượng gắn kết tự do

-80 kJ/mol. Như vậy, nghiên cứu của chúng tôi ghi nhận một số ưu điểm so với nhóm tác giả Dhanabalan đó là xây dựng mô hình pharmacophore trực tiếp trên protein tại các acid amin quyết định hoạt tính của BACE1, dẫn đến việc sàng lọc dựa trên mô hình này có thể tìm được các chất với tiềm năng gắn kết chọn lọc tại đích tác dụng hơn. Cụ thể các cấu trúc phẩn tử nhỏ mà nghiên cứu chọn được là những chất cho liên kết hydro mạnh với tỷ lệ > 200 % và năng lượng gắn kết tự do giữa protein và phối tử đạt giá trị nhỏ hơn -1000 kJ/mol. Cũng với các bước tiến hành sàng lọc ảo tương tự, nhóm tác giả Manoharan đã thực hiện trên 50,000 phân mảnh cấu trúc BROOD [8] và xây dựng mô



hình pharmacophore dựa trên cấu trúc tại vi trí Asp32, Asp228 và Gly230. Trong khi đó, nghiên cứu chúng tôi sàng lọc trên tập cơ sở dữ liệu lớn hơn với 147.331 cấu trúc từ các thư viện hợp chất khác nhau, đồng thời, đặc tính của các điểm pharmacophore trong mô hình xây dựng dựa trên nhiều acid amin quan trọng, đặc biệt Tyr71 là acid amin đã được chứng minh đột biến nên mô hình pharmacophore cho thấy tính chọn lọc hơn. Sau cùng, các giá trị về tỷ lệ liên kết hydro tại những acid amin quan trọng và năng lượng tự do của phối tử cũng thể hiện tiềm năng gắn kết với đích tác động BACE1 tốt hơn.

Kết luận

Từ việc thực hiện mô phỏng động lực học phân với thời gian 20ns trên 14 cấu trúc tiềm

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- 1. Trần Quế Hương, Lâm Mạnh Hoàng, Trần Thị Thúy Nga và cộng sự (2021), "Sàng lọc in silico các cấu trúc phân tử nhỏ có tiềm năng ức chế hoạt tính BACE1", Nghiên cứu được và thông tin thuốc, 12 (6): 103-108.
- 2. Daina A, Michielin O, Zoete V. "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules". *Scientific Reports*. 2017;7:42717-30.
- 3. Dhanabalan AK, Kesherwani M, et al. (2017), "Identification of new BACE1 inhibitors using Pharmacophore and Molecular dynamics simulations approach", *J Mol Graph Model*. 76: 56-69.
- 4. Duthey Béatrice (2004), "Background Paper 6.11 Alzheimer Disease and Other Dementias", *World Health Organization Geneva, Switzerland*.
- 5. Homeyer N and Gohlke H (2012), "Free Energy Calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area Method", *Mol Inform.* 31(2): 114-22.
- 6. Humphrey, W, Dalke A and Schulten K (1996), "VMD: Visual molecular dynamics", *Journal of Molecular Graphics*. 14(1): 33-38.
- 7. Lalut J, Payan H, Davis A, et al (2020), "Rational design of novel benzisoxazole derivatives with acetylcholinesterase inhibitory and serotoninergic 5–HT4 receptors activities for the treatment of Alzheimer's disease", *Sci. Rep*, 10: 3014.
- 8. Manoharan P and Ghoshal N (2018), "Fragment-based virtual screening approach and molecular dynamics simulation studies for identification of BACE1 inhibitor leads", *J Biomol Struct Dyn*. 36(7): 1878-1892.
- 9. Nguyen PT, Yu, H, and Keller PA (2014), "Discovery of in silico hits targeting the nsP3 macro domain of chikungunya virus", *J Mol Model*. 20(5): 2216.
- 10.Reva BA., Finkelstein AV., and Skolnick J (1998), "What is the probability of a chance prediction of a protein structure with a rmsd of 6 Å?", *Folding and Design*. 3(2): 141-147.
- 11.Sundar S, 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: 100210.

năng trên để phân tích các giá tri RMSD, RMSF kết hợp tính toán tỷ lê liên kết hydro và năng lương tư do gắn kết của các phối tử, nghiên cứu đã tìm được 4 phối tử để tiến hành mô phỏng động lực học với thời gian 50 ns nhằm đánh giá sâu hơn khả năng gắn kết của các phối tử này vào khoang gắn kết của BACE1. Kết quả, cả 4 phối tử HTS0170, DB07007, DB07618 và MBX527804 đều có xu hướng gắn kết ngày càng ổn định và bền vững với mục tiêu phân tử. Vì thế, trong các nghiên cứu tiếp theo, có thể thực hiện mô phỏng động học phân tử trong khoảng thời gian dài hơn (100 ns), đồng thời tiến hành các thử nghiêm in vitro và in vivo để khẳng định hoạt tính ức chế enzym BACE1.