بررسی نقش HMGB1 در بیماری Cerebral Ischemia و مقایسه داروهای طراحی شده برای مسیر سیگنالی آن

الناز امان‌زاده، حسن محبت کار*

اصفهان، دانشگاه صفهان، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، گروه بیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۳/۶/۱۴

چکیده

سربرال ایشمیا یکی از بیماریهای کشنده مربوط به سلولهای مغزی می‌باشد که در اثر کاهش جریان خون به مغز به صورت جزئی یا کلی اتفاق می‌افتد. این عارضه در اثر ضربه مغزی پیدا شده و موجب خونریزی و انسداد عروق مغزی و بروز التهاب در مغز می شود. پیشرفت این التهابها کشنده خواهد بود. پروتئین HMGB1 به عنوان یک مولکول سیگنال خارج سلولی در مسیر وقوع این بیماری از سلولهای مبتلا به کمبود اکسیژن و سلولهای ایمنی آزاد می‌گردد و به عنوان فاکتور تشدید التهاب، مسیر ترشح سیتوکین‌ها را به راه می‌اندازد. تاکنون تلاشهای متعددی به منظور مهار اثر HMGB1 که در واقع مهم ترین عامل تشدید التهاب و مرگ و میر در اثر بروز سربرال ایشمیا به شمار می‌آید، انجام شده است. سه داروی مهم که برای مهار اثر این پروتئین در مسیر فیزیولوژیک بیماری مورد بررسی قرار گرفته‌اند، Tricin 7-Glucoside ، Tanshinone A و Rosamirinic Aci می‌باشند. فایلهای سه بعدی ساختارهای شیمیایی این سه دارو استخراج شد و برهمکنش آنها با پروتئین HMGB1 و دو پروتئین TLR2 و TLR4 که گیرنده‌ها و انتقال دهنده‌های سیگنال در جریان بیماری می‌باشند، بررسی شدند. مطالعات با استفاده از نرم‌افزار بررسی برهمکنش پروتئین/لیگاند Molegro Virtual Docker و نرم‌افزار تخصصی طراحی مدلهای دارویی LigandScout مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که داروی Tricin 7-Glucoside بهترین برهمکنش را با دو پروتئین HMGB1 و TLR2 داشت. و داروی Tanshinone A بهترین برهمکنش را با پروتئین TLR4 برقرار کرده بود.

واژه های کلیدی: سربرال ایشمیا، HMGB1، Molegro Virtual Docker، LigandScout

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۱۴۴۲ ، پست الکترونیکی: h.mohabatkar@ast.ui.ac.ir

مقدمه

سربرال ایشمیا یکی از عوامل مهم مرگ و میر در سراسر جهان می‌باشد (۱۹). خونریزی مغزی منجر به آسیبهای مغزی در قالب تعدادی از رویدادهای التهابی می‌گردد، که منتج به مرگ مغزی و آسیبهای جدی به اعصاب می‌شود (۲۲). طی مراحل اولیه خونریزی مغزی، وجود التهاب ممکن است منجر به جریان یافتن تعدادی از مولکولهای التهابی به محل آسیب دیده، شده و موجب نکروز و آپوپتوز سلولهای مغزی گردد. این بیماری به دو صورت عمده سراسری و موضعی قابل مشاهده است. از دیدگاه فیزیولوژیکی، این عارضه در اثر کاهش جریان خون به سیستم خون رسانی مغز به دلایل مختلف از جمله کاهش عملکرد ماهیچه قلبی، انسداد سیستم خون رسانی مغز و انسداد رگهای مغذی خارج مغزی و یا در اثر افت متوالی فشار در چند مرحله رخ می‌دهد (۴). این وقایع، باعث کمبود میزان اکسیژن و قند رسانی به سلولهای مغزی شده، میزان تولید ترکیبات سمی را نیز افزایش می‌دهد (۷و ۱۳). عارضه ایشمیا که به دو نوع مغزی و قلبی می‌باشد، از نظر آناتومیکی در نواحی از بدن انسان که دچار کمبود

اکسیژن‌رسانی و خون رسانی شده‌اند، اتفاق می افتد و باعث علائمی از جمله نابینایی یکی از چشمها، ضعف در یکی از بازوها یا پاها، و یا ضعف عمومی در یک سمت از بدن می‌شود. علاوه بر اینها ضعف در تکلم، از دست دادن توانایی تمرکز و غیره نیز قابل مشاهده است. علائم مشاهده شده وابسته به میزان رگهای خونی قطع شده، ضعیف تا قوی می‌باشند (۳۹). بیماری سربرال ایشمیا یا کم خونی موضعی مغزی، با توجه به دلیل بروز آن ممکن است در تمامی رده‌های سنی مشاهده شود. با این وجود، بروز آن در سنین بالای ۶۰ که افراد دچار فشار خون بالا یا نارسایی قلبی هستند، بیشتر است. تحقیقات همچنین ثابت کرده‌اند که میزان بروز این بیماری در زنان به مراتب بیشتر از مردان است.

High Mobility Group Box-1 (**HMGB-1**) پروتئینی ۲۵ کیلودالتونی و حاوی دو دومین HMG Box می‌باشد. ساختار این دو دومین کاملاً مشابه هستند و پروتئین مورد نظر به وسیله آنها به کروماتین متصل شده، رونویسی از ژنها را تسهیل و یا آغاز می‌نماید. با توجه به ساختار اختصاصی دومین HMG، این پروتئین در هنگام اتصال به DNA تغییراتی را در ساختار آن ایجاد نموده و ساختار کرماتینی DNA را برای اتصال تعدادی از فاکتورهای رونویسی مهیا می‌نماید (۲۸). نتایج تحقیقات متعدد به اثبات رسانده‌اند که این پروتئین در فرآیندهای التهابی یک تشدید کننده التهاب خارج سلولی بسیار مهم نیز می‌باشد. HMGB-1 پس از آسیب به سرعت از سلولهای آسیب دیده، منوسیتها و ماکروفاژها به فضای خارج سلولی آزاد می‌گردد و به عنوان یکی از عوامل خانواده پروتئینهای هشدار دهنده التهاب فعالیت می‌نماید. از این رو در خانواده سیتوکین‌های نوین هشدار دهنده جای گرفته است(۲۳). با توجه به این ویژگی و نیز توانایی اتصال به DNA، HMGB1 نقش مهمی در بسیاری از بیماریها از جمله آلزایمر (۲۱)، آرتریت (۲۶) منتژیت (۳۲)، سپسیس (۱۲ و ۱۸)، سرطان تخمدان (۹)، ایشمیا و غیره دارد. غالباً HMGB-1 پس از خروج از سلول، به گروهی از گیرنده‌های سلولی به نام Toll Like Receptor (TLR) متصل شده، آنها را فعال می‌نماید (۶). TLRها گروهی از گیرنده‌های سلولی هستند که نقش مهمی را در سیستم ایمنی مادرزادی ایفاء می‌نمایند (۱۶). این پروتئینها، در غشای سلولهای ماکروفاژ و سلولهای دندریتیک حاضر بوده، غالباً در شناسایی مولکولهای مشتق شده از میکروبها مؤثر می‌باشند (۲۹). نام این پروتئینها از ژن بیان کننده آنها که برای اولین بار در دروزوفیلا ملانوگاستر شناسایی شد، بر گرفته شده است (۱۴). تعدادی از مولکولهای درونی نیز به عنوان لیگاندهای این گیرنده‌ها در تعدادی از فرآیندهای ایمنی محسوب می‌شوند. از آن جمله می‌توان به فیبرینوژن، پروتئینهای شوک گرمایی و HMGB-1 اشاره کرد (۱۷). نکته قابل توجه در مورد این پروتئینها این است که ترکیبات دیمری گوناگون متشکل از اعضای این خانواده، برای لیگاندهای متفاوت دارای عمل اختصاصی هستند (۱۰). پس از فعال شدن گیرنده‌های خانواده TLR، پروتئینهای آداپتور و کینازها مسیر سیگنالی مربوط را در داخل سلول از جمله MyD88، Tirap، Trif و Tram مستقر در سیتوپلاسم را به راه می‌اندازند (۸). انتقال سیگنالها در درون سلول به واسطه دو مسیر عمده وابسته به MyD-88 و مسیر وابسته به TRIF می‌گردد. مسیر MyD-88 به وسیله فعال سازی عامل رونویسی NF-κB موجب افزایش بیان سیتوکین‌های التهابی شده، مسیر وابسته به Trif از طریق عامل رونویسی IR3 موجب القای بیان اینترفرونها می‌شود. در نهایت مسیرهای وابسته به این فاکتورها موجب ارائه آنتی‌ژنهای این سلولها به CD4+ شده و سیستم ایمنی را به منظور بروز پاسخ تحریک می‌نماید. به علاوه در موارد حاد ممکن است سلولهای ملتهب سنتز پروتئین را در سلول متوقف نموده، وارد فرآیند خودکشی سلول یا آپوپتوز شوند (۵).

Molegro Virtual Docker یکی از نرم‌افزارهای پرکاربرد در پیش‌بینی نحوه میانکنش پروتئینها با لیگاندها می‌باشد. این نرم افزار مکانهای اتصال بالقوه را در پروتئین مورد نظر تشخیص می‌دهد و از میان آنها بهترین محل و شیوه اتصال را برای لیگاند در نظر می‌گیرد. امتیاز Docking مهم ترین نکته استخراج شده از این نرم‌افزار می‌باشد (۳). علاوه بر این، نرم‌افزار LigandScout مدلهای مختلف ساخت و پردازش داروها را براساس مدل ۳ بعدی که از مجموعه دارو و پروتئین مورد نظر در دست است، پیش‌بینی می‌نماید (۳۷). ویژگیهای شیمیایی محل اتصال دارو به پروتئین و جستجوی بهترین مکان اتصال دارو در ساختار سوم پروتئین از جمله اطلاعاتی است که نرم افزار LigandScout در اختیار ما قرار می‌دهد (۳۶). در این میان انواع پیوندهایی که ممکن است داروی مورد نظر با پروتئین داشته باشد، نیز مورد پیش بینی قرار می‌گیرند. علاوه بر این LigondScout، اشکال گوناگون توموری دارو در اتصال به پروتئین و بهترین حالت از نظر حداقل انرژی را برای دارو، پروتئین و مجموعه پروتئین-داروی مورد نظر مورد بررسی قرار می‌دهد (۲۰).

در درمان عارضه کم خونی موضعی مغزی به ویژه در افراد سالمند تجویز داروهایی همچون آسپرین، فعال کننده پلاسمینوژن بافتی و داروهای ضد لخته شوندگی خون، مرسوم هستند. با توجه به مطالعات گسترده‌ای که طی سالهای اخیر بر روی علل و عوامل بروز این بیماری انجام شده و آشکار شدن نقش مهم فاکتورهای التهابی در بروز آن، دانشمندان درصدد یافتن راهی برای مقابله با تشدید التهاب برآمدند. بدین منظور غالباً از ترکیبات گیاهی استفاده شد. Rosamirinic acid، ترکیبی استری می‌باشد که در بسیاری از گیاهان یافت می‌شود و اثر ضد میکروبی و ضد التهابی آن به اثبات رسیده است (۳۴). Tanshinon A از ترکیبات موجود در گیاه مریم گلی می‌باشد و خاصیت ضد التهابی و به ویژه ضد انسداد رگی آن به اثبات رسیده است (۳۸). Tricin-7 Glucoside نیز ترکیب فلاوونی استخراج شده از دانه‌های برنج است که از جمله مهم ترین ترکیبات دارای اثر دارویی بر علیه مسیر التهابی HMGB1 و NF-κB به شمار می‌آید (۳۵). هدف از این مطالعه آشکار ساختن بیش از پیش مسیر ارتباطی پروتئین HMGB-1 با پروتئینهای مسیر بیماری سربرال ایشمیا و آزمایش سه ترکیب دارویی ذکر شده برای مقابله با بروز و تشدید التهاب می‌باشد.

مواد و روشها

استفاده از وب سرور Pathway Linker: با توجه به اینکه، تحقیقات آزمایشگاهی در زمینه داروسازی تحت تأثیر فعالیتهای متفاوت پروتئینها و میانکنش آنها با لیگاندهای مختلف قرار دارد، و تغییرات موجود در مسیرهای پروتئینی می‌تواند در مسیرهای سیگنالی اثرگذار باشد، شناسایی اختصاصی تمامی پروتئینهایی که به صورت بالقوه و بالفعل با پروتئین مورد نظر میانکنش می‌دهند، بسیار با اهمیت است. وب گاه Pathway Linker (http://PathwayLinker.org) بر اساس آزمون میانکنش هر پروتئین خاص با پروتئینهای دیگر بدن که در مجموعه داده‌های مورد استفاده این وب گاه می‌باشد، الگویی از ارتباطات پروتئین با دیگر پروتئینها و مسیرهای سیگنالی مورد نظر را ارائه می‌دهد (۱۵). این وب گاه برای به دست آوردن اطلاعات میانکنش پروتئین HMGB1 با پروتئینهای دیگر و یافتن مسیر ارتباط آن با مسیر بیماری سربرال ایشمیا مورد استفاده قرار گرفت.

وب سرور Hex : یکی از ابزارهایی است که برای بررسی بهترین حالت میانکنش لیگاند و پروتئینها و تشکیل ساختار سه بعدی مجموعه پروتئین-لیگاند را انجام می‌دهد و به صورت فایل PDB نشان می‌دهد. علاوه بر وب گاه که از طریق آدرس (http://hexserver.loria.fr/) قابل دسترسی است، نرم افزار Hex نیز موجود می‌باشد که همین فعالیت را انجام می‌دهد. این وب گاه نیز برای بررسی بهترین

حالت میانکنش پروتئینهای HMGB-1، TLR-2 و TLR-4 و داروهای استفاده شده مورد استفاده قرار گرفت.

Molegro Virtual Docking: فایلهای به دست آمده از وب گاه Hex در مرحله بعد در این نرم افزار مورد بررسی قرار گرفت. مکانهای بالقوه میانکنش هر یک از پروتئینهای نامبرده (Cavity)، مورد شناسایی قرار گرفت. سپس محیط میانکنش پروتئین و داروی مورد نظر تنظیم شد. در نهایت میانکنش پروتئین و لیگاند مورد نظر با استفاده از ابزار Docking در نرم افزار حاضر انجام شد. به علاوه این نرم افزار برای به دست آوردن نحوه میانکنش پروتئین و لیگاند مورد نظر و تعداد این پیوندها استفاده شد.

LigandScout: این نرم افزار برای به دست آوردن محل دقیق پیوند لیگاند به پروتئین مورد نظر و ویژگی محل اتصال لیگاند یا دارو به پروتئین مورد بررسی استفاده می‌شود. با استفاده از این لیگاند همچنین بهترین حالت قرار گیری داروها در داخل پروتئین مورد نظر با توجه به داشتن ویژگیهای خاص داروی مورد نظر و محل اتصال آن در داخل پروتئین به دست می‌آید.

نتایج

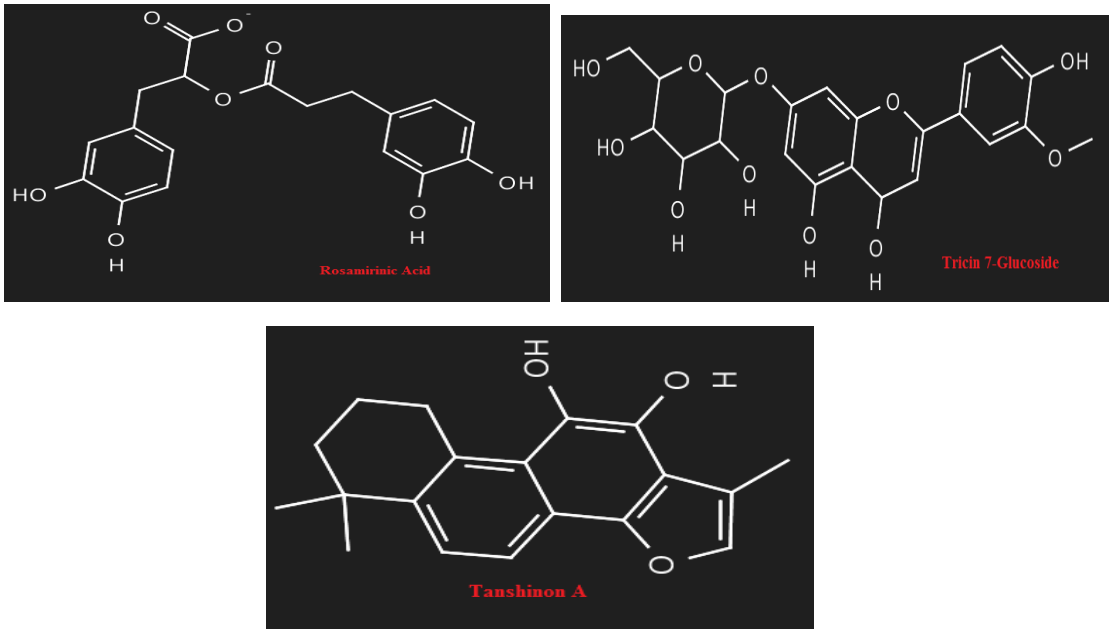
با استفاده از وب سرور Patway Linker تمامی پروتئینهای موجود در بدن که با پروتئین HMGB1 میانکنش دارند یا با توجه به مجموعه داده‌های در دسترس و بررسی شباهتهای ساختاری در میانکنشهای پروتئین-پروتئین، پروتئینهایی که امکان میانکنش با پروتئین مورد بررسی دارند نیز به دست آمد (شکل ۱).

شکل۱- شبکه پروتئینی به دست آمده برای پروتئین HMGB1. دایره قرمز این پروتئین را نشان می‌دهد. دایره‌های با رنگ خاکستری تیره نشان دهنده پروتئینهایی هستند که مسیرهای سیگنال آنها شناسایی شده‌اند و در پایگاه داده KEGG به ثبت رسیده‌اند. دایره‌های خاکستری روشن: پروتئینهایی که در مسیرهای سیگنالی شناسایی نشده‌اند. خطوط: میانکنشها.

این وب گاه مجموعه‌ای از مسیرهای سیگنالی مرتبط با پروتئینهای موجود در شبکه را نیز ارائه می‌دهد، که با استفاده از آن می‌توان مسیرهای سیگنالی دخالت پروتئین مورد نظر را با مسیر بیماری در یافت.

با توجه به یافته‌های حاصل از تحقیقات مختلف، مسیر مورد نظر مسیر میانکنش HMGB1 با TLR-4 و TLR-2 در نظر گرفته شد. با توجه به تحقیقات انجام شده، HMGB1 با تعداد زیادی از پروتئینهای اعضای خانواده TLR میانکنش می‌دهد و عمدتاً مسیر مربوط به NF-κB به راه افتاده موجب بیان و ترشح سیتوکارین‌های التهابی به محل التهاب می‌گردد (۲۷). این مسیر در پایگاه داده KEGG مشاهده شد. با توجه به نکات ذکر شده و بیان این نکته که طی تحقیقات مختلف در بررسی اثر سه داروی Rosamirinic Acid (RA)، Tanoshinon A ، و Tricin-7-Glucoside (شکل ۲) بر روی مسیر اثر گذاری پروتئین HMGB1 در بیماری سربرال ایشمیا که محل اثر گذاری دقیق این داروها هنوز مشخص نشده بود و در طی مراحل تحقیقاتی که تمرکز خود را برروی مطالعه چگونگی توقف اثر HMGB-1 و چگونگی توقف بیان ژن این پروتئین، معطوف نموده‌اند، تصمیم گرفته شد تا در این تحقیق با استفاده از نرم افزارهای نامبرده شده، محل مهار مسیر بیماری توسط این داروها پیدا گردد.

با توجه به اینکه نحوه قرارگیری پروتئین در داخل لیگاند و محل اتصال لیگاند به پروتئین مورد نظر در میانکنش صحیح بین آن دو بسیار با اهمیت است، از وب گاه hex Docking استفاده گردید. این وب گاه غالباً تا ۲۰ مورد از بهترین حالتهای میانکنش را در نمایه‌های PDB ارائه می‌دهد که از این میان یکی از نتایج، بهترین نتیجه است. برای این تحقیق میانکنش بین داروی نامبرده شده با سه پروتئین HMGB1، TLR-2 و TLR-4 مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه این داروها برای توقف اثر پروتئین HMGB1 بر روی سیر بیماری و کاهش تولید سیتوکین‌های التهابی بررسی شده است و دو پروتئین مورد نظر با توجه به نتایج وب گاه Pathway Linker محتمل‌ترین گیرنده‌ها برای این پروتئین می‌باشند، این سه پروتئین برای مطالعه انتخاب شدند. فایل به دست آمده از وب گاه Hex در این مرحله وارد نرم افزار Molegeo Virtual Docker شد. در ابتدا برای هریک از مولکولهای مورد نظر شکل و ویژگیهای مورد نظر به دست آمد که در شکل ۲ آمده است.



شکل ۲- ساختار داروهای بررسی شده بر روی مسیر بیماری.

در این نرم افزار با توجه به اینکه نمایه وارد شده حاوی مجموعه پروتئین و لیگاند در بهترین حالت اتصال بود، در ابتدا حفرات اتصالی به لیگاندها در ساختار پروتئین مورد شناسایی قرار گرفت. سپس با توجه به اینکه در تمامی ۹ مورد لیگاند در محل حفره اتصالی شناسایی شده قرار گرفته بود، محوطه‌ایی برای انجام بررسی docking در نظر گرفته شد. در تمامی بررسیها، تعداد تکرارها ۱۰ در نظر گرفته شد. نتایج به دست آمده برای امتیاز Docking که با Mol Dock Score بیان می‌گردد، در جدول ۱ آورده شده است.

جدول۱- در این جدول مقادیر Mol dock Score برای میانکنش سه پروتئین انتخاب شده با داروهای مورد بررسی آمده است.

	Rosamirinic Acid	Tanoshinon A	Tricin Glucoside
HMGB1	-۹۹,۶	-۱۰۸,۲۹	-۱۲۹,۴۴
TLR-2	-۶۲,۶۴	-۱۱۰,۱۶	-۱۱۲,۶۵
TLR-4	-۱۱۱,۴۳	-۱۲۷,۶۱	-۱۲۶,۳۴

جدول ۲- تعداد پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده در جایگاه پیوندی برای سه پروتئین مورد نظر در تقابل با ۳ داروی استفاده شده.

	Rosamirinic Acid	Tanoshinon A	Tricin Glucoside
HMGB1	۱	۳	۲
TLR-2	۶	۱	۶
TLR-4	۳	۳	۳

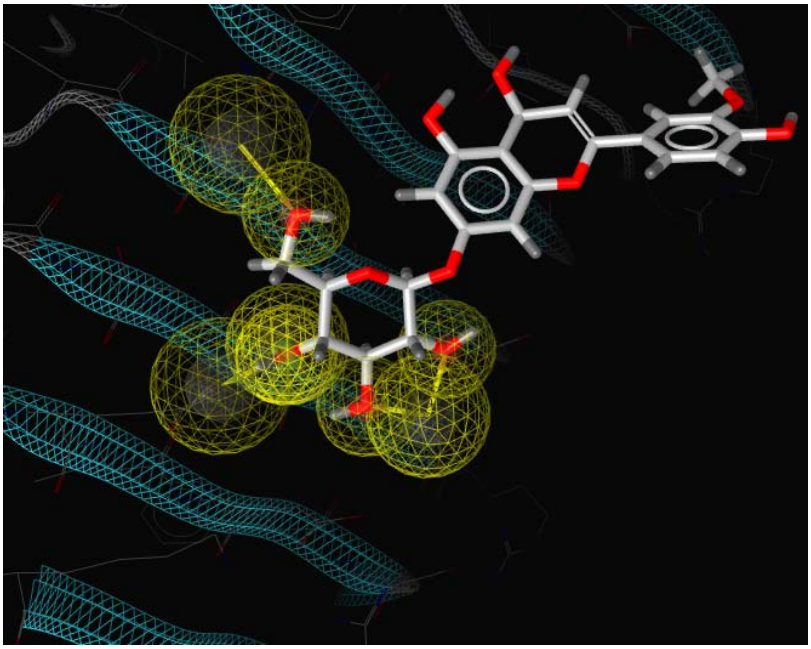
همان طور که در جدول ۱ مشاهده شد، داروی Tricin Glucoside بر روی HMGB1 و TLR-2 و دو داروی Tanoshinon A و Tricin Glucoside بیشترین میزان امتیاز منفی را در میانکنش با TLR-4 دریافت کردند. سپس ویژگیهای اتصال لیگاند به پروتئین مورد نظر، و جایگاه اتصال آن با پروتئین بسیار با اهمیت است. بدین منظور ابتدا تعداد پیوندهای هیدروژنی در اتصال هر لیگاند به پروتئین بررسی گردید. نتایج در جدول ۲ و شکل ۳ آمده است.

براساس نتایج به دست آمده، در میانکنش بین TLR-2 و داروی Tricin Glucoside بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی در جایگاه پیوندی تشکیل می‌گردد. در بررسی ویژگیهای مولکولی این دارو باید در نظر داشت که تعدادی حلقه‌های بنزنی در آن به ۳ عدد می‌رسد و به همین دلیل تعداد پیوندهای هیدروژنی برقرار شده زیاد می‌باشد. علاوه بر این باید توجه داشت که تعداد پیوندهای هیدروژنی بین همین پروتئین با داروی RA نیز به ۴ عدد می‌رسد، درحالی که تعداد این نوع از پیوند در این پروتئین با داروی TAnshinon A صفر می‌باشد. بدین ترتیب در این تحقیق به بررسی آمینواسیدهای جایگاه اتصالی برای هر یک از داروها پرداخته شد. نتایج مطابق جدول ۳ به دست آمد:

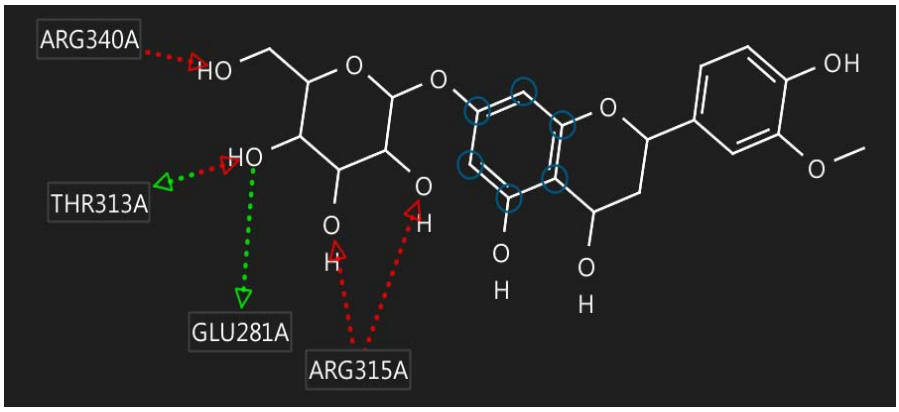
جدول ۳- آمینواسیدهای جایگاه برهمکنش پروتئین TLR2 با سه داروی مورد بررسی.

	TLR-2 – Tricin-7- Glucoside	TLR-2–TanshinonA	TLR-2 – RA
Arg	۲ (۳۱۵ و ۳۴۰)		۱ (۳۴۶)
Asp	۳ (۳۶۶ و ۴۱۹ و ۴۴۲)		۲ (۳۶۶ و ۴۱۹)
Glu	۱ (۲۸۱)		۳ (۲۸۱)
Leu	۴ (۳۶۵ و ۳۶۷ و ۳۹۲ و ۳۹۴)	۲ (۳۳۵ و ۳۵۰)	۵ (۳۶۵ و ۳۶۷ و ۳۹۲ و ۳۹۴ و ۴۱۸)
Tyr			
Phe		۳ (۳۲۲ و ۳۴۹ و ۳۵۵)	۲ (۳۶۴ و ۴۴۰)
Val		۳ (۳۴۳ و ۳۴۸)	
Thr	۱ (۱۳۴)		۱ (۳۱۳)
Ile		۳ (۳۱۴ و ۳۱۹ و ۳۴۱)	

شکل ۳ (الف).



شکل ۳ (ب):



شکل ۳- (الف) محل میانکنش پروتئین و دارو و برهمکنش‌ها در ساختار سه بعدی. (ب) شیوه برهمکنش گروههای موجود در مولکول دارویی.

نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار LigandScout حاکی از آن است که آمینواسیدهای حاضر در جایگاه اتصالی مربوط به Tricin-7- Glucoside شامل ۴ آمینواسید کلیدی (۳۵۱ و ۳۴۰) آرژنین، گلوتامات و ترئونین می‌باشد که در تشکیل ۶ پیوند هیدروژنی با ۳ گروه OH انتهای مولکول دارویی نقش مهمی داشته‌اند. با توجه به اینکه هر سه گروه OH در یک انتهای مولکول قرار گرفته و در حال برهمکنش هستند، و یکی از این گروهها در تشکیل سه پیوند هیدروژنی به صورت همزمان شرکت دارد، موجب کاهش امتیاز Docking شده و این ترکیب را پایدارتر می‌نماید، به این ترتیب ترکیب مورد نظر، برای استفاده دارویی اتصال بهتری دارد (شکل ۳).

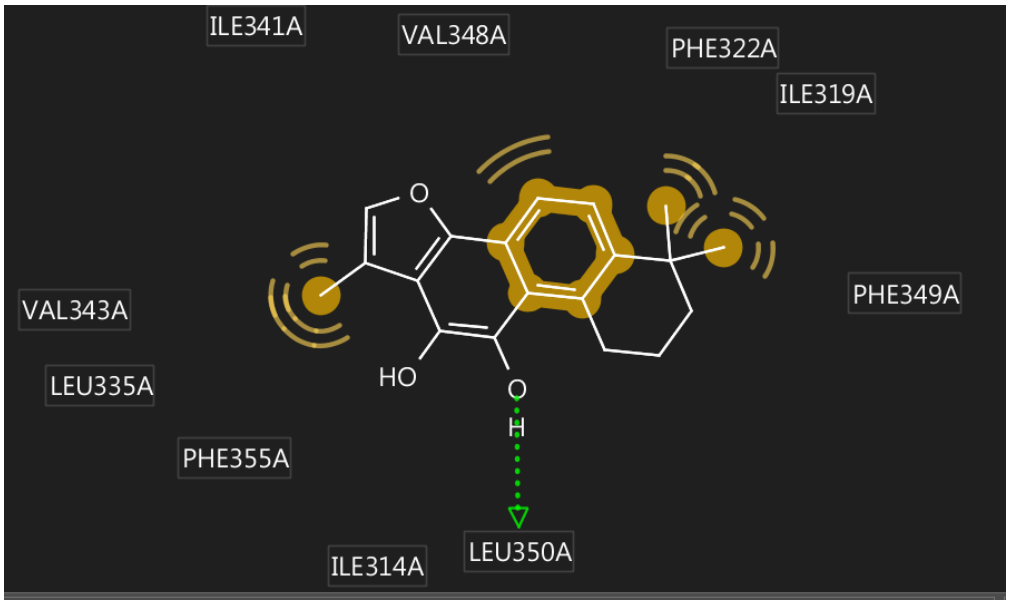
در بررسیها مشاهده شد که RA با تشکیل ۶ پیوند هیدروژنی مشابه داروی پیشین با پروتئین مورد نظر برهمکنش دارد. جایگاه برهمکنش نیز در هر دو مولکول کاملاً مشابه بودند. اما انرژی اتصال RA از دو داروی دیگر

برای این پروتئین بیشتر است. بنابراین نمی‌تواند گزینه مناسبی برای مهار فعالیت این پروتئین باشد. با تحلیل نتایج و بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی و تحلیل آب گریزی ناحیه برهمکنش آن با نرم‌افزار Molegro نشان داد که، علی رغم بالا بودن تعداد پیوند هیدروژنی بین RA و TLR2، برهمکنش آب گریز بین TanshinonA و همین پروتئین قوی تر بوده، ترکیب پایدارتری را می‌سازد. به علاوه در تحلیل برهمکنش این دو، مشخص شد که در ۴ نقطه دارای برهمکنشهای هیدروفوبی با آمینواسیدهای دارای خاصیت آب گریزی می‌باشد و در یک نقطه با تنها گروه OH خود، پیوند هیدروژنی را برقرار می‌نماید. با توجه به اینکه تعداد برهمکنشهای حاضر در این برهمکنش کمتر از تعداد برهمکنشهای RA با TLR2 است، مناسب بودن ساختار فضایی این مولکول برای ایجاد برهمکنش پایدار با مولکول گیرنده و بنابراین، مهار فعالیت این پروتئین با اهمیت به نظر می‌رسد (شکل ۴).

پروتئین بعدی HMGB1 است که نتایج بررسی آمینواسیدهای جایگاه اتصال آن در جدول ۴ آمده است :

جدول ۴- آمینواسیدهای حاضر در جایگاه میانکنش سه داروی مورد بررسی با HMGB1.

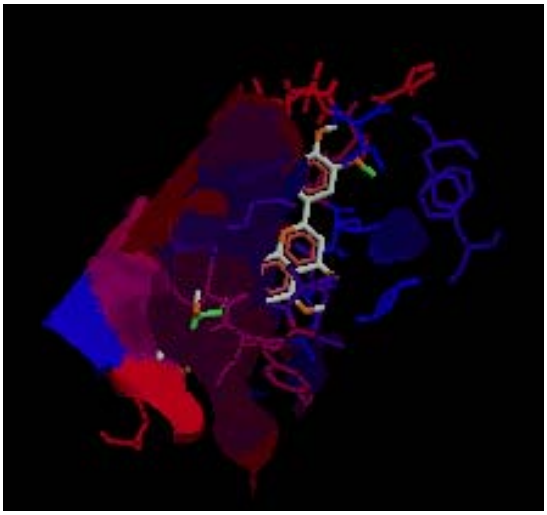
	HMGB1–Tricin 7- Glucoside	HMGB1- TanshinonA	HMGB1 – RA
Ser	۲ (۱۳ و ۱۴و ۴۵)	۳ (۳۳ و ۱۴ ۴۵)	۱ (۱۳)
Leu	۲ (۳۵ و ۴۳)	۱ (۳۵)	
Pro	-		۱ (۸)
Asp	۳ (۴۲ و ۴۸ و ۴۹)		
Phe	۲ (۱۷ و ۳۷)		
Lys		۲ (۴۹ و ۵۶)	۲ (۷ و ۱۱)
Tyr		۱ (۱۵)	۲ (۱۵ و ۷۰)
Val		۱ (۳۱)	



شکل ۴- جایگاه برهمکنش پروتئین TLR2 و داروی Tanshinone A. جایگاه کاملاً آب گریز تشکیل شده از آمینواسیدهای ذکر شده در جدول ۳ که نشان دهنده برهمکنش قوی میان آنها است.

مطابق نتایجی که در جدول ۴ آمده است، تعداد آمینداسیدهایی که در میانکنش پروتئین با لیگاند مورد نظر آن شرکت دارند، در مورد داروی Tricin 7-Glucoside بیشتر می‌باشد. به علاوه با توجه به ساختار این دارو و توانایی بالا در میانکنش با آمینواسیدها ترکیب آمینواسیدی موجود در HMGB1 برای میانکنش با آن منطقی به نظر می‌رسد. در بررسی ویژگی میانکنش با آب در جایگاه میانکنش (شکل ۵)، ساختار پروتئینی در قسمتی که

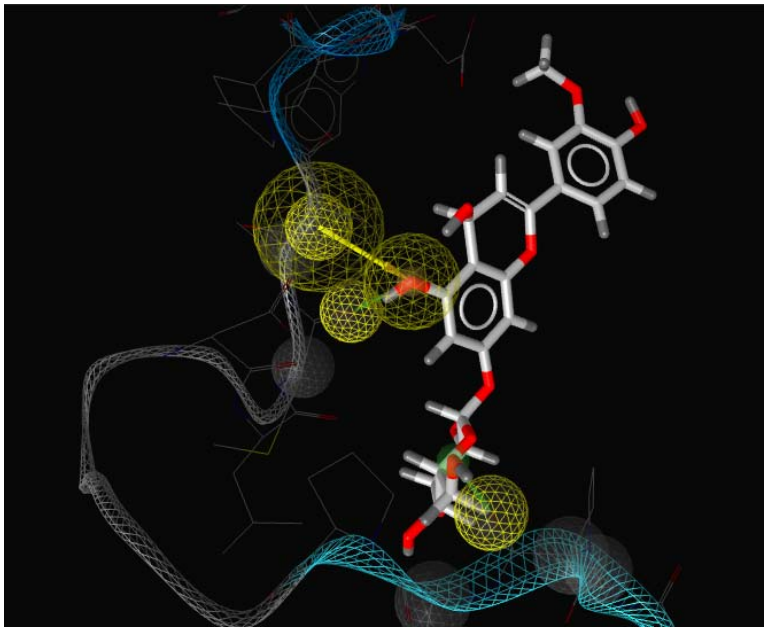
پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌گردند، به رنگ قرمز می‌باشد که نشان دهنده قطبیت بالای این ناحیه و مستعد بودن آن برای تشکیل پیوند هیدروژنی است. در مورد دو داروی دیگر با بررسی جایگاههای اتصال می توان دریافت که هر یک از داروها در ناحیه متفاوتی از ساختار سوم این پروتئین با آن میانکنش می‌دهند.



شکل ۵- بررسی محتوای هیدروپاتی در برهمکنش HMGB1 و Tricin 7-Glucoside که بهترین حالت انرژی را در مقایسه با دو داروی دیگر نشان می‌دهد.

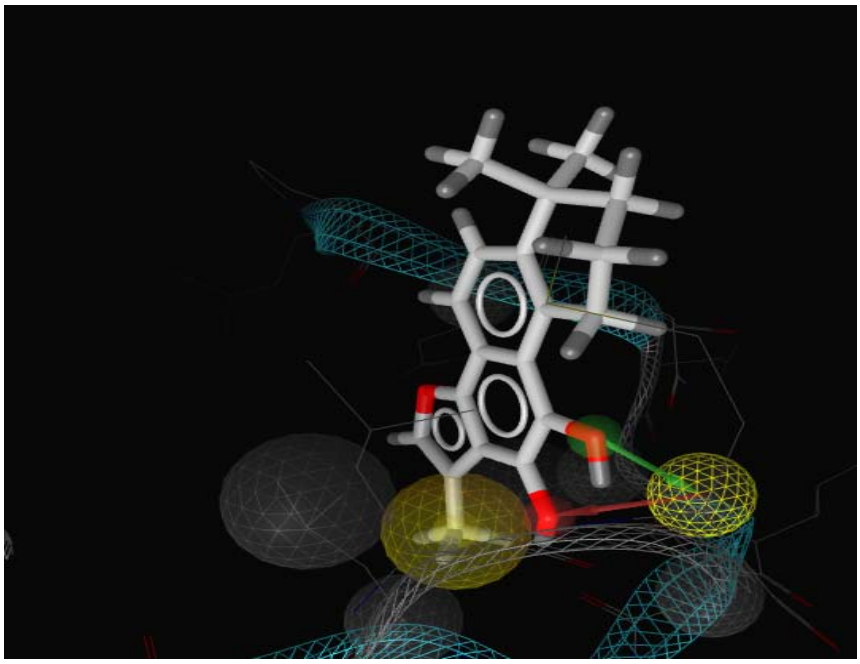
نتایج استفاده از نرم‌افزار LigandScout در بررسی این برهمکنش نشان داد که داروی مورد نظر به وسیله دو پیوند هیدروژنی که از طریق OH حلقه بنزنی سوم در Tricin 7-Glucoside با سرین شماره ۴۵ و متیونین ۴۴ به ترتیب پیوند هیدروژنی و برهمکنش لحظه‌ای ایجاد می‌نماید. به علاوه به وسیله OH انتهای مولکول، نیز برهمکنش قطبی با آمینداسیدهای جایگاه برهمکنش برقرار می‌نماید (شکل ۶).

نتایج استفاده از نرم‌افزار LigandScout برای برهمکنش بین HMGB1 و RA، پس از وارد کردن فایل به دست آمده از سرور Hex بهترین حالت فضایی را که مطابق با حداقل میزان انرژی در حالت مجموعه پروتئین- دارو بود، به دست آورده شد. سپس تشخیص برهمکنش دارویی نشان داد که در سه نقطه پیوندهای هیدروژنی و برهمکنشهای آب گریزی تشکیل می‌شوند. با توجه به اینکه میزان انرژی برهمکنش این دو، نسبت به بقیه داروها انرژی منفی کمتری دارند، ولی تغییرات ساختاری ایجاد شده و عدم هر برهمکنش دیگری میان پروتئین و دارو، با بالاتر بودن انرژی برهمکنشی ارتباط دارد.



شکل۶ – جایگاه برهمکنش و پیوندها و انرژیهای دخیل.

در بررسی برهمکنش بین Tanshinone A و این پروتئین در نرم‌افزار LigandScout مشاهده شد که در جایگاه پیوندی، نتایج مطابق جدول ۴ می‌باشد. در این برهمکنش، نقش کلیدی را سرین شماره ۳۳ ایفاء می‌نماید که همزمان به عنوان گیرنده و دهنده پیوند هیدروژنی عمل می‌نماید. علاوه بر این سر غیر قطبی مولکول دارو دارای برهمکنش آب گریزی با دو آمینواسید والین و لوسین می‌باشد. به علاوه در شکل کرههای سفید رنگ مناطق ایجاد کننده ممانعت فضایی را در این برهمکنش نشان می‌دهد (شکل ۷).



شکل ۷- برهمکنش HMGB1- Tanshinone A که در آن دایره‌های زرد رنگ مکانهای برهمکنش و دایره‌های طوسی رنگ مناطق ایجاد کننده ممانعت فضایی را نشان می‌دهد.

در بررسی میانکنشها میان پروتئین گیرنده TLR4 و سه داروی انتخاب شده، در جدول یک، مشخص شد که انرژی اتصال بین این پروتئین و داروی Tanshinone A در مقایسه با بقیه داروها کمتر است. TLR4 پروتئینی گیرنده است که در داخل غشاء قرار می‌گیرد و از نظر ساختاری تشابه بالایی را با TLR2 دیگر عضو این خانواده دارد. در بررسی برهمکنش بین این پروتئین و داروهای مورد بررسی مطابق جدول ۵ آمینواسیدهای دخیل در برهمکنش به دست آمد.

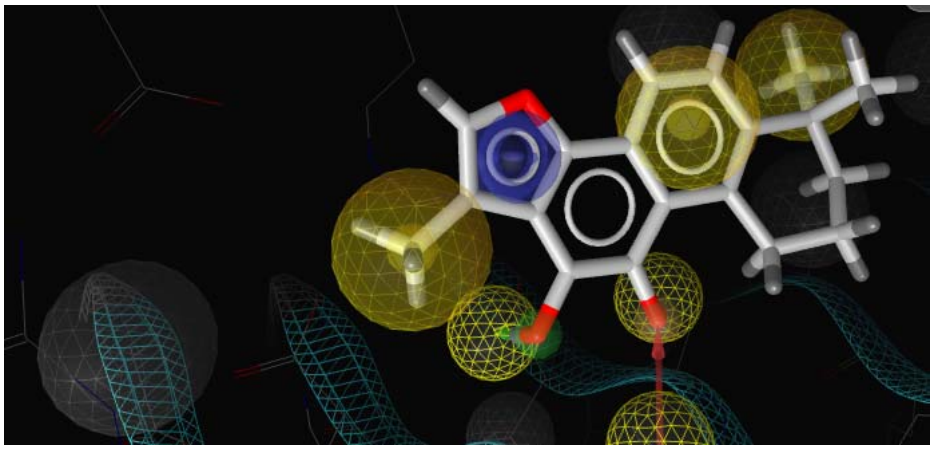
بر این اساس، در بر همکنش TLR-2 –TanshinonA ، که حداقل میزان انرژی را داراست، در مولکول دارویی مورد نظر، ۶ مکان برهمکنش با ۷ آمینواسید در پروتئین برقرار شده است. براساس شکل به دست آمده از نرم‌افزار LigandScout بعد از حداقل نمودن انرژی برهمکنش از نظر فضایی، به بررسی این نقاط پرداخته شد.

جدول ۵- آمینواسیدهای جایگاه برهمکنش TLR-4 با داروهای مورد بررسی.

	TLR-4 – Tricin-7- Glucoside	TLR4-TanshinonA	TLR-4 – RA
Leu	۲ (۷۸ و ۸۷)	۲ (۷۸ و ۸۷)	
Arg	۱ (۹۰)	۱ (۹۰)	
Tyr	۱ (۷۹)	۱ (۷۹)	
Asn	۲ (۷۷ و ۸۶)	۲ (۷۷ و ۸۶)	
Pro	۱ (۸۸)	۱ (۸۸)	

مطابق شکل ۸ حلقه بنزنی در مولکول TanshinonA نقطه‌ای مهم برای ایجاد برهمکنشهای لحظه‌ای با آمینواسیدهای جایگاه برهمکنش در پروتئین است. گروه هیدروژن انتهای مولکول نیز برای ایجاد برهمکنشهای

لحظه‌ای با آمینواسیدهای لوسین نقطه برهمکنش مناسبی می‌باشد. علاوه بر این، دو گروه OH در حلقه سوم از مولکول، با آمینواسید آسپارژین و دو آرژنین موجود، تشکیل سه پیوند هیدروژنی را داده‌اند. گروه هیدروژن متصل به حلقه پنج کربنی نیز با Tyr موجود در جایگاه برهمکنش دارای برهمکنشهای لحظه‌ای می‌باشد.



شکل ۸- نقاط مهم در بر همکنش TanshinonA– TLR-4.

بحث

طراحی دارو با کمک روشهای کامپیوتری، شامل طراحی مولکولهایی کوچک است که در فعال یا غیرفعال نمودن مولکولهای زیستی از جمله، پروتئینها نقش دارند. به طور کلی طراحی دارو شامل دو شاخه مهم براساس لیگاند و براساس ساختار است (۱۱). در نوع اول، طراحی دارو وابسته به شناخت از ساختار و خواص اتصالی ماکرومولکول مورد نظر است. بدین منظور باید دست به طراحی مدل دارویی زده شود که طی آن باید از حداقل ویژگیهای ساختاری برای داشتن قابلیت اتصال به مولکول آگاه بود (۳۳). در روش دوم طراحی دارو بر پایه آموخته ها از ساختار سه بعدی پروتئین مورد نظر و مولکول لیگاند آن و شیوه برهمکنش فضایی‌شان می‌باشد. برای این روش نیز تعدادی برنامه کامپیوتری طراحی نوشته شده است. LigandScout یکی از نرم‌افزارهایی است که برای طراحی مدلهای Pharmacophore مجموعه‌های لیگاند/پروتئین مورد استفاده قرار گرفته است. این مدلها می‌توانند، با استفاده از الگوهای اتصال و برهمکنش سایر مولکولها در مجموعه داده موجود خود نرم‌افزار نوع برهمکنشها و تناسب ساختاری را برقرار نماید. این نرم‌افزار قابلیت به کار گیری موفقیت‌آمیز را در طراحی دارو براساس ساختار دارد. نرم افزار Ligand Scout تا کنون در پژوهشهای مختلفی برای استخراج ویژگیهای فیزیکی پروتئینهای شوک گرمایی (۳۰)، طراحی داربستهای پلیمری برای مهارکننده‌های پروتئینهای Pim-1 (۲۵) و غیره استفاده شده است. این پژوهش با هدف بررسی داروهای طراحی شده برای مسیر دخالت پروتئین HMGB1 در بیماری سربرال ایشمیا آغاز شد. فعالیتهای انجام شده تماماً بر اساس ساختار سه بعدی مولکولها و ماکرومولکولها انجام شد. سه داروی Tanshinone A، Rosamirinic Acid و Tricin 7-Glucoside که از منابع و ترکیبات گوناگون گیاهی استخراج می‌گردند، پیش از این به صورت آزمایشگاهی در درمان بیماریهای مختلفی اعم از بیماریهای عصبی و قلبی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تا به امروز دانشمندان اثر این داروها را در مهار بیان پروتئینهای التهابی از جمله HMGB1 و TLR با استفاده از رده‌های سلولی کشت شده متعدد مورد بررسی آزمایشگاهی قرار داده‌اند. نتایج مطالعات نشان دهنده تأثیر چشمگیر ترکیبات به ویژه

Tricin-7 Glucoside در کاهش بیان HMGB1 بوده‌اند. در این مطالعات تأثیرات داروها برروی مسیرهای شروع و تشدید التهاب از جمله مسیر NF-kB و میزان اثرگذاری آنها در مهار بیماری سربرال ایشمیا و کاهش میزان مرگ سلولهای مغزی (۲۴) و (۳۱) مورد بررسی قرار گرفته‌اند. تحقیقات مشابه آزمایشگاهی همچنین در زمینه تأثیر ترکیبات گیاهی مختلف بر دیگر بیماریهای عصبی نیز انجام شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی اثر شیکونین بر آستروسیت‌ها طی التهاب مغزی (۱) و نیز بررسی اثر سم زنبور عسل بر بهبود بیماری مالتیپل اسکروزیس (MS) (۲) اشاره نمود. اما مسئله مهم در مورد ترکیبات مورد نظر این است که تاکنون نقطه دقیق اثرگذاری داروها در مسیر بیماری یافت نشده است. در پژوهش حاضر، امکان اثر گذاری ترکیبات دارویی بر مسیر این بیماری به واسطه واکنش ترکیبات مورد نظر با خود این پروتئینها مورد بررسی قرار گرفت. پس از یافتن مسیر شروع دخالت HMGB1 بر بیماری که اتصال آن به گیرنده‌های خانواده Toll Like Receptor بود، به بررسی برهمکنش داروها با این سه پروتئین با استفاده از دو نرم‌افزار Molegro Virtual Docker و LigandScout پرداخته شد. در استفاده از این نرم‌افزارها عوامل مختلف دخیل در برهمکنش بین این سه پروتئین و سه داروی استفاده شده، از جمله Mol Dock Score، شکل فضایی محل برهمکنش هر دارو در هر پروتئین در حالت حداقل انرژی و بیشترین میزان پایداری و آمینواسیدهای دخیل در این برهمکنشها به دست آمدند. بررسی و تحلیل جزئی این برهمکنشها نتایجی را در مورد اثرگذاری داروها بر مسیر بیماری و مکان دقیق این اثر در اختیار این تحقیق قرار داد. بدین ترتیب، امکان اثر گذاری این پروتئینها بر مسیر بیماری علاوه بر تأثیر بر بیان آنها که تا کنون مورد نظر دانشمندان قرار گرفته بود، نیز به اثبات می‌رسد.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده، داروی Tricin 7-Glucoside در مقایسه با دو داروی دیگر بهترین برهمکنش را با دو پروتئین HMGB1, TLR2 نشان می‌دهد و می‌تواند یکی از بهترین گزینه‌ها در مهار این دو پروتئین و جلوگیری از مسیر شروع التهاب باشد. در این میان داروی Tanshinone A بهترین برهمکنش را با پروتئین TLR4 دارد و کاندیدای مناسب برای مهار اختصاصی این پروتئین می‌باشد. با توجه به اینکه در برهمکنش Rosamirinic Acid با هر سه پروتئین حداقل میزان حداقل انرژی در مقایسه با انرژی اتصال بقیه مولکولها مقداری بیشتر می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که این دارو اتصال ناپایدار به مولکولهای مسیر آغاز بیماری با واسطه HMGB1 دارد و مهارکننده مناسبی برای توقف این فرآیند نمی‌باشد. با توجه به اینکه تاکنون برهمکنش ترکیبات دارویی ذکر شده با پروتئینها التهابی نظیر HMGB1 و گیرنده‌های TLR بررسی نشده بود، نتایج به دست آمده مؤید یافته‌های دانشمندان در مورد اثرگذاری سه ترکیب مورد نظر بودند و امکان وجود مسیر تأثیر گذاری داروها از طریق برهمکنش مستقیم با این پروتئینها را قوت می‌بخشد.

منابع

۱. میررضوی، م.، صابونی، ف.، عباسی، ش، ص.، حق بین، ک.، حاج حسینی، ر.، ناظم، ح. ۱۳۸۹. مقایسه اثر توکسیک شیکونین استاندارد و شیکونین استخراج شده از Arnebia euchroma بر آستروسیتها. مجله زیست شناسی ایران. ۲۵(۳). ص: ۳۵۸-۳۶۵.

۲. آذرنیا، م.، نبیونی، م.، رجبی زلتی.، میرابوالقاسمی، س، غ.، حویزی، الف. ۱۳۸۸. تأثیر سم زنبور عسل بر رمیلینه شدن در رتهای ویستار دمیلینه شده با اتیدیوم بروماید. مجله زیست شناسی ایران. ۲۲(۴). ص: ۵۶۶- ۵۷۳.

3. Ajay Babu, P., Colluru, V. and Anaparthy, N.2012. In-silico characterization of ECE-1 inhibitors. Computers in Biology and Medicine, 42(4): p. 446-457.

4. Andersson, U. and Harris, H.E.2010. The role of HMGB1 in the pathogenesis of rheumatic disease. Biochimica et Biophysica Acta, 1799: p. 8.5.

5. Arimilli, S. 2007. TLR-4 and -6 agonists reverse apoptosis and promote maturation of simian virus 5-infected human dendritic cells through NFkB-dependent pathways. Virology, 365(1) : p. 13.

6. Asavarut, P. 2013. The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury. Acta Anaesthesiologica Taiwanica, 51(1):p. 28-33.

7. Bramlett, H., Dietrich, M., Dalton, W. 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: Similarities and differences. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. 24(2). P: 133-150.

8. Brodsky, I. and Medzhitov, R.2007. Two modes of ligand recognition by TLRs. Cell, 130(6): p. 979-981.

9. Chen, J.2012. High-mobility group protein B1 (HMGB1) is a novel biomarker for human ovarian cancer. Gynecologic Oncology, 126(1): p. 109-117.

10. Chevrier, N. 2011. Systematic discovery of TLR signaling components delineates viral-sensing circuits. Cell, 147(4): p. 853-867.

11. Cohn, N.G. 1996. Guidebook on molecular modeling in drug design. Academic Press.

12. Del Zoppo, G.J.2009. Expansion of the Time Window for Treatment of Acute Ischemic Stroke With Intravenous Tissue Plasminogen Activator A Science Advisory From the American Heart Association/American Stroke Association. Stroke. 40(8). p. 2945-2948.

13. Del Zoppo, G.J., et al., *Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia.* Stroke, 2007. 38(2): p. 646-651.

14. Emaitre, B. 1996. *The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette spätzle/Toll/cactus Controls the Potent Antifungal Response in Drosophila Adults.* Cell, 86(6): p. 973-983.

15. Farkas, I.J., Á. Szántó-Várnagy, and T. Korcsmáros.2012. *Linking proteins to signaling pathways for experiment design and evaluation.* PloS one, 7(4): p. 36-42.

16. Hansson, G.K. and Edfeldt, K.2005. *Toll to be paid at the gateway to the vessel wall.* Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 25(6): p. 1085-1087.

17. Hoebe, K. 2003. *Identification of Lps2 as a key transducer of MyD88-independent TIR signaling.* Nature, 424(6950): p. 743-748.

18. Huang, W., Tang, Y and Li,L.2010. *HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis.* Cytokine, 51(2): p. 119-126.

19. Kikuchi, K.2009. *Minocycline attenuates both OGD-induced HMGB1 release and HMGB1-induced cell death in ischemic neuronal injury in PC12 cells.* Biochemical and biophysical research communications, 385(2): p. 132-136.

20. Koutsoukas, A., et al., *From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications.* Journal of proteomics, 2011. 74(12): p. 2554-2574.

21. Leclerc, E.2009. *Crosstalk Between Calcium, Amyloid β and the Receptor for Advanced Glycation Endproducts in Alzheimer's Disease.* Reviews in the Neurosciences, 20(2): p. 95-110.

22. Lei, C. 2012. *Effects of High-mobility Group Box1 on cerebral angiogenesis and neurogenesis after intracerebral hemorrhage.* Neuroscience, 45(6). P: 853-859.

23. Li, S. 2013. *Endogenous HMGB1 is required in endotoxin tolerance.* Journal of Surgical Research, 69(2). P: 129-138.

24. Moon, D. 2010. Rosmarinic acid sensitizes cell death through suppression of TNF-a-induced NF-jB activation and ROS generation in human leukemia U937 cells. Cancer Letters, 288: p. 9-14.

25. Olla, S. 2009. *Indolyl-pyrrolone as a new scaffold for Pim1 inhibitors.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19(5): p. 1512-1516.

26. Östberg,2010. T. *Protective targeting of high mobility group box chromosomal protein 1 in a spontaneous arthritis model.* Arthritis & Rheumatism, 62(10): p. 2963-2972.

27. Park, J.S.2006. *High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors.* American Journal of Physiology-Cell Physiology, 290(3): p. C917-C924.

28. Qiu, J.2010. *HMGB1 promotes MMP-9 upregulation through TLR4 after cerebral ischemia.* Cell, 50(27): p. 240-249.

29. Rolls, A.2007. *Toll-like receptors modulate adult hippocampal neurogenesis.* Nature cell biology, 9(9): p. 1081-1088.

30. Sakkiah, S. 2011. *Pharmacophore based virtual screening, molecular docking studies to design*

potent heat shock protein 90 inhibitors. European journal of medicinal chemistry, 46(7): p. 2937-2947.

31. Tang, D.2008. *A pilot study to detect high mobility group box 1 and heat shock protein 72 in cerebrospinal fluid of pediatric patients with meningitis*.* Critical care medicine, 36(1): p. 291-295.

32. Tang, Q.2012. *Neuroprotective effects of tanshinone IIA and/or tetramethylpyrazine in cerebral ischemic injury in vivo and in vitro.* Brain research, 43(2): p. 1654-1660.

33. Tollenaere, J. 1996. *The role of structure-based ligand design and molecular modelling in drug discovery.* Pharmacy World and Science, 18(2) : p. 56-62.

34. Vivel, S., Joydeep, G., Amit, S., Souyma, G., Anirban, B. 2007. Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. Antimicrobial agents and chemotherapy. 51(9). P: 3367-3370.

35. Wang-Lin, J., Yong, X., Shu-Ping, Z., Hai-Bo, Z., Jian, H. 2012. Tricin 7-glucoside protects against experimental cerebral ischemia by reduction of NF-κB and HMGB1 expression. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 45(1). P: 50-57.

36. Wolber, G. 2008. *Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design.* Drug discovery today, 13(1): p. 23-29.

37. Yang, H. 2009.*Structure-based virtual screening for identification of novel 11b-HSD1 inhibitors.* European Journal of Medicinal Chemistry, 44: p. 5-12.

38. Yoosik, Y., Yeon-Ok, K., Won-Keyung, J., Hee-juhn, P., Jyun Jea, S. 1999. Tanshinone IIA isolated from Salvia miltiorrhiza BUNGE induced apoptosis in HL60 human premyelocytic leukemia cell line. Journal of ethnopharmacology. 68(1). P: 121-127.

39. Zhang, Z. 1998. *Cerebral vessels express interleukin 1 β after focal cerebral ischemia.* Brain research, 784(1): p. 210-217.

Study of HMGB1 role in Cerebral Ischemia and the signaling pathway inhibitor drugs

Amanzade E. and Mohabatkar H.

Biotechnology Dept., Faculty of Advanced Sciences and Technologies, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Cerebral Ischemia is a neural disease which causes dying of a number of people every year. The disease usually exposures since stopping the blood pressure and also arresting of heart muscle. HMGB1 is a member of High Mobility Group superfamily proteins which all have a common DNA binding. HMGB1 is released as an extracellular signaling molecule and it binds to Toll like receptors at the cell membrane in the brain cells inflammations. Totally it leads to increase the cytokines and it also intensifies the inflammation. More inflammation can cause the brain cells apoptosis such as neurons and neuroglia cells. Rosamirinic acid, Tanshinone A and Tricin-7 Glucoside which were used for inhibition of HMGB1, they were studied using the Molegro Virtual Docker ans LiganScout softwares in this study. According to the scores, results showed that Tricin-7 Glucoside had better physical and spatial interactions with HMGB1 and TLR2 than others and also Tanshinone A had the best interaction with TLR4.

Key words: Cerebral Ischemia, HMGB1, Molegro Virtual Docker ،LigandScout