

## طراحی مجازی و مدلسازی مولکولی ترکیبات پپتیدی پایدار کننده ساختار چهارتایی

## گوانین

سید احمد عبادی<sup>۱\*</sup>، مریم خزایی<sup>۱</sup> و دارا دستان<sup>۲</sup><sup>۱</sup> ایران، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده داروسازی، گروه شیمی دارویی<sup>۲</sup> ایران، همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکونوزی و بیوتکنولوژی دارویی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

## چکیده

مدلسازی مولکولی نقش بسیار مهمی در کشف و توسعه داروهای جدید دارد. روش‌های مجازی در کشف داروهای جدید هزینه تولید را بسیار کاهش می‌دهند. مدلسازی مولکولی در توسعه داروهای ضدسرطان جایگاه خاصی دارد. ساختار چهارتایی گوانین یک ساختار ثانویه یکتا است که در برخی از توالی‌های غنی از گوانین تشکیل می‌گردد. ساختار چهارتایی گوانین در فعال‌کننده آنکوژن‌ها تشکیل شده و مانع بیان آنها می‌شود. بنابراین ترکیبات پایدار کننده چهارتایی گوانین به عنوان هدف درمانی در سرطان شناخته می‌شوند. در این مطالعه به بررسی برهم‌کنش پپتید DSM و همچنین طراحی و مدلسازی پپتیدهای پایدار کننده ساختار چهارتایی گوانین پرداخته شده است. براساس نتایج بدست آمده، مهمترین پارامتر در اتصال به ساختار چهارتایی گوانین وجود دو گروه بازی در زنجیره پپتیدی است. در بهترین زنجیره‌های بدست آمده (KGREIGYAK و KGREIGMYAK) آمینو اسیدهای لیزین و آرژینین در فاصله مناسب از یکدیگر قرار گرفته‌اند و پتانسیل بالایی برای اتصال به چهارتایی گوانین دارند. این آمینو اسیدهای بازی با گروه‌های فسفات زنجیره DNA پیوندهای یونی تشکیل می‌دهند. آمینو اسید تایروزین با حلقه گوانین برهم‌کنش‌های  $\pi-\pi$  دارد.

واژه‌های کلیدی: مدلسازی مولکولی، سرطان، چهارتایی گوانین، طراحی دارو، پپتید

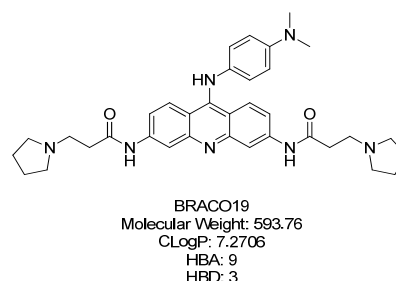
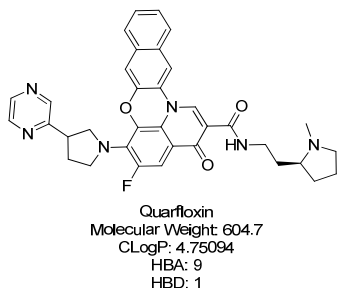
\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱ ۳۸۳۸ ۱۶۷۵، پست الکترونیکی: [a.ebadi@umsha.ac.ir](mailto:a.ebadi@umsha.ac.ir)

## مقدمه

شده، در ایجاد بسیاری از سرطان‌ها نقش دارد. پروتئین c-Myc در کنترل ۱۵-۱۰ درصد تمام ژن‌های سلول از جمله تنظیم چرخه سلولی (cell cycle regulation)، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (apoptosis)، متابولیسم (metabolism)، تمایز سلولی (cellular differentiation) و چسبندگی سلول (cell adhesion) نقش دارد (۶). بیان بیش از حد c-myc در بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان‌های سینه، کولون، دهانه رحم و لوکمی گزارش شده است (۷). ساختار چهارتایی گوانین در فعال‌کننده c-myc به عنوان سرکوب کننده رونویسی عمل می‌کند. بنابراین پایدار کردن ساختار

توالی‌های غنی از گوانین زنجیره DNA تمایل زیادی برای خود تجمعی در قالب یک ساختار مسطح با چهار حلقه گوانین دارند. این ساختارهای ویژه چهارتایی گوانین (G-quadplex) نامیده می‌شوند. تعدد و نقش تنظیم‌کننده این نواحی غنی از گوانین در زنجیره DNA حاکی از نقش مهم آنها در برخی از فرآیندهای بیولوژیک است. ساختارهای چهارتایی گوانین ممکن است در فعال‌کننده (Promoter) هزاران ژن از جمله آنکوژن‌ها وجود داشته باشند و بنابراین بیان ژن و به تبع آن فرآیندهای بیولوژیک را تحت تاثیر قرار دهند (۳). c-myc، یکی از اولین آنکوژن‌های شناخته

طراحی و معرفی لیگاندهای متصل شونده به چهارتایی گوانین انجام شده است (۹، ۱۵، ۱۹) (شکل ۱). دو داروی Quarfloxin و BRACO19 (شکل ۱) به ساختار چهارتایی گوانین متصل می‌شوند. نکته قابل توجه در ساختار این دو دارو وجود گروه‌های بازی (آمینی) در ساختار آنها می‌باشد. این ترکیبات برای اتصال قوی به زنجیره DNA باید ساختارهای بزرگی داشته باشند.



شکل ۱- ساختار شیمیایی لیگاندهای پایدارکننده ساختار چهارتایی گوانین، مشتقات آکریدین (BRACO19) و فلوروکینولین (Quarfloxin)

چهارتایی گوانین را ندارند، این پپتید ۲۰ اسیدآمینه‌ای ( $^{73}SMHPGHLKGREIGMWYAKKQ^{54}$ ) با برقراری برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و واندرالس به صورت کاملاً انتخابی عمل می‌کند (۵، ۱۳). در این مقاله با استفاده از روش‌های مدل‌سازی مولکولی به بررسی برهم‌کنش‌های کلیدی در کمپلکس DSM و چهارتایی گوانین پرداخته و براساس داده‌های بدست آمده زنجیره‌های پپتیدی کوچکتری طراحی می‌گردد.

### مواد و روشها

**شبیه‌سازی دینامیک مولکولی:** شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار گرومکس ۵-۶-۴ انجام گرفت (۱۲). پارامترهای اتمی براساس میدان نیروی امبر (AMBER) تعیین گردید (۱۴). ساختار سه بعدی DNA-DSM از سرور rcsb با شناسه 2n21 استخراج گردید (۱۰). شماره‌گذاری زنجیره پپتیدی DSM در این مقاله از یک (معادل سرین ۵۴) تا بیست (معادل گلوتامین ۷۳) انجام گرفت. جهت بررسی دینامیک سیستم‌های تحت مطالعه، ابتدا کمپلکس DNA-پپتید در مرکز یک جعبه دوازده

چهارتایی گوانین با استفاده از ترکیبات دارویی می‌تواند فعالیت رونویسی c-myc را سرکوب کند (۱۸). با توجه نقش ساختار چهارتایی گوانین در کنترل فعالیت بسیاری از ژن‌ها از جمله c-kit، bcl-2 و VEGF و نقش این ژن‌ها در ایجاد سرطان‌های مختلف، این ساختارهای ویژه در زنجیره DNA به عنوان هدف درمانی در کشف و توسعه داروهای جدید مورد توجه قرار گرفته‌اند. تلاش‌های زیادی برای

نکته منفی در مورد لیگاندهای پایدارکننده ساختار چهارتایی گوانین، نداشتن داروهمانندی است (۱۶). شرط اتصال قوی به سطح تماس گسترده DNA، افزایش اندازه ملکول است که منجر به کاهش پارامترهای داروهمانندی می‌شود. پپتیدهای دارویی با داشتن وزن مولکولی بالا معایب مولکول‌های کوچک را ندارند. ترکیبات پپتیدی دارای مشکلاتی از قبیل عدم وجود فرم خوراکی، ناپایداری متابولیکی و نیمه عمر کوتاه هستند که با فرمولاسیون‌های جدید قابل برطرف شدن هستند. از این رو تمایل به طراحی و سنتز ترکیبات پپتیدی مهارکننده برهم‌کنش پروتئین-پروتئین و DNA-پروتئین افزایش چشمگیری داشته است (۱۳).

پروتئین RAHU، جزء خانواده هلیکازها، با تمایل بسیار زیادی به زنجیره‌های DNA و به ویژه ساختار چهارتایی گوانین متصل می‌شود. در اتصال RAHU به ساختار چهارتایی گوانین، ۲۰ اسیدآمینه انتهای N-پروتئین (به نام بخش DSM) نقش کلیدی دارند. بر خلاف مولکول‌های کوچک آلی که امکان اتصال انتخابی به ساختارهای

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام گرفت. بررسی تغییرات دما و انرژی در طول ۵۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی حاکی از پایداری سیستم و حفظ قانون بقای انرژی بود. میانگین دما و انرژی در طول شبیه‌سازی به ترتیب (RSD: ۰/۶٪) ۱/۸ ± ۳۰۰/۰ کلوین و (RSD: ۰/۲٪) ۱۷۷/۹ ± ۷۳۳۲۲/۹- کیلو کالری بر مول بدست آمد. بنابراین سیستم در طول شبیه‌سازی پایداری لازم را داشت.

پایداری ساختار کمپلکس DSM-DNA با تغییرات شعاع ژیراسیون ارزیابی گردید. شعاع ژیراسیون نشانگر تغییرات شعاع کوچکترین کره‌ای است که کمپلکس مورد بررسی در آن قرار می‌گیرد. عدم افزایش شعاع ژیراسیون نشان دهنده پایداری ساختار سه بعدی مورد بررسی است. همانطور که در شکل ۲A نشان داده شده است، شعاع ژیراسیون بعد از تغییرات محدودی (کمتر از ۰/۰۸ نانومتر) تا ۳۰ نانو ثانیه شروع به کاهش می‌کند و سپس در ۲۰ نانو ثانیه پایانی پایدار می‌ماند. کاهش ۰/۱ نانومتری شعاع ژیراسیون نسبت به ساختار اولیه نشان از برهم‌کنش قوی بین زنجیره DNA و پپتید DSM دارد که این دو ساختار را به سمت یکدیگر جذب کرده است.

تغییرات انرژی برهم‌کنش بین زنجیره DNA و پپتید DSM در شکل ۲B نشان داده شده است. انرژی برهم‌کنش و اندروالس (شکل ۲B - خط نارنجی) بین زنجیره DNA و پپتید DSM در طول شبیه‌سازی تغییرات محدودی دارد (میانگین انرژی و اندروالس در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: ۶/۱ ± ۷۲/۱-، RSD: ۸/۵٪). این برهم‌کنش‌ها به واسطه حضور آمینواسیدهای هیدروفوب متیونین، لئوسین، ایزولئوسین، تریپتوفان، تایروزین و آلانین ایجاد می‌گردند. برخلاف برهم‌کنش‌های واندروالس، برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک (شکل ۲B - خط آبی) تغییرات زیادی در طول ۵۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارد (میانگین انرژی الکتروستاتیک در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی: ۱۸/۳ ± ۵۹/۵-،

وجهی قرار داده شد. جعبه با مولکول‌های آب و تعداد یون‌های لازم برای خنثی‌کردن بار الکتریکی کمپلکس DNA-پروتئین پر شد. برهم‌کنش‌های هر اتم در فاصله ۱/۲ نانومتری محاسبه گردید. طول پیوندهای شیمیایی در طول شبیه‌سازی ثابت فرض شد (۱۱). در تمام شبیه‌سازی‌های انجام شده، ابتدا برای حذف برهم‌کنش‌های نامناسب ۵۰۰۰ مرحله بهینه‌سازی انرژی انجام گرفت. سپس در حالی که اتم‌های DNA و پروتئین در سه بعد ثابت شده بودند، دمای سیستم تا ۳۰۰ کلوین افزایش یافت. در حجم ثابت و دمای ۳۰۰ کلوین به مدت ۳۰۰ پیکو ثانیه سرعت اولیه اتم‌ها محاسبه گردید (۴). در مرحله بعد با اعمال فشار ۱ اتمسفر دانسیته سیستم به تعادل رسید (۱۷). و در نهایت با حذف تمام محدودیت‌ها سیستم به مدت ۵۰ نانوثانیه تحت مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی قرار گرفت. بررسی داده‌ها با استفاده از بسته‌های نرم‌افزاری موجود در گرومکس انجام گرفت.

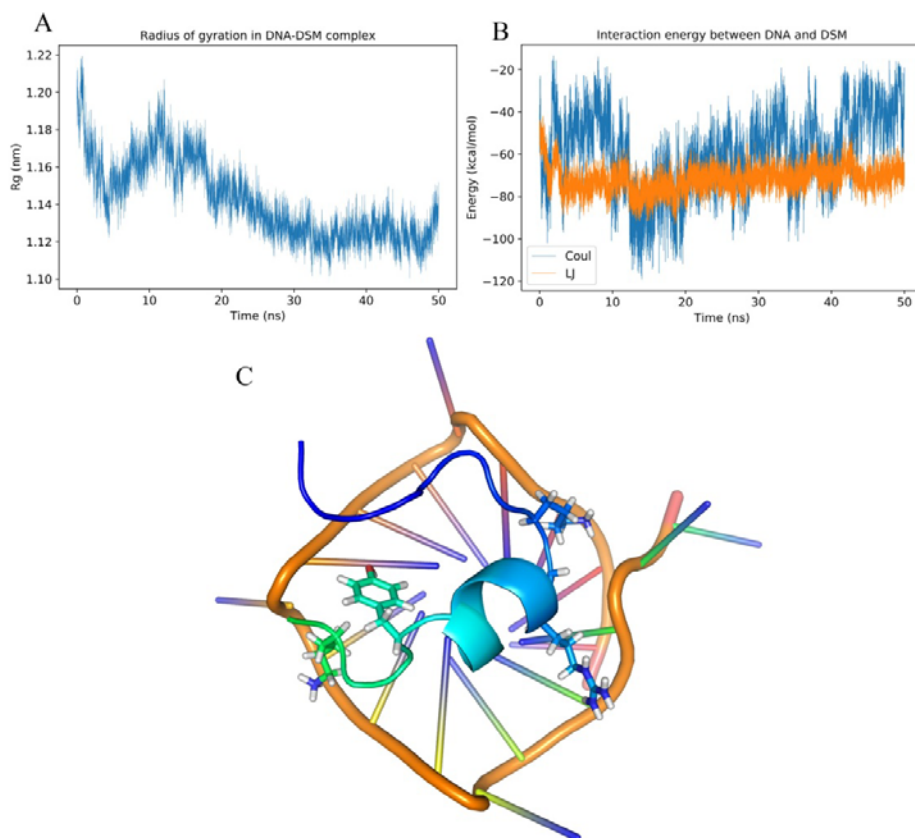
**داکینگ DNA-پپتید:** جهت پیش‌بینی کمپلکس بین DNA و زنجیره‌های پپتیدی طراحی شده از نرم‌افزار تحت وب HADDOCK استفاده گردید (۸). با ارائه سطح تماس بین DNA و زنجیره‌های پپتیدی، نرم‌افزار دقت بالایی در پیش‌بینی کمپلکس بین این دو ماکرومولکول دارد. به منظور در نظر گرفتن تمام احتمالات در برهم‌کنش بین زنجیره‌های پپتید و DNA، تمام آمینواسیدهای زنجیره پپتیدی به عنوان سطح تماس معرفی شدند. این درحالی است که در ساختار DNA، فقط چهار گوانین که صفحه بالایی ساختار چهارتایی گوانین را تشکیل می‌دهند به عنوان سطح تماس معرفی شدند.

## نتایج و بحث

مطالعه برهم‌کنش DSM-DNA به منظور طراحی زنجیره‌های پپتیدی جدید با قابلیت اتصال انتخابی به چهارتایی گوانین انجام گرفت (۱). در همین راستا به منظور بررسی فضای کانفورمیری کمپلکس DSM-DNA، ۵۰ نانو ثانیه

برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک تشکیل دادند. آمینواسیدهای لیزین و آرژنین به دلیل داشتن زنجیره جانبی به ترتیب ۴ و ۳ کربنه انعطاف‌پذیری بالایی دارند و همین مساله موجب افزایش آنتروپی درونی این آمینواسیدها می‌گردد.

تغییرات ایجاد شده در برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک به واسطه انعطاف‌پذیر بودن آمینواسیدهای درگیر در این برهم‌کنش است. آمینواسیدهای بازی لیزین ۸، آرژنین ۱۰ و لیزین ۱۸ و ۱۹ با داشتن بار مثبت در زنجیره جانبی با گروه‌های فسفات زنجیره DNA با بار منفی

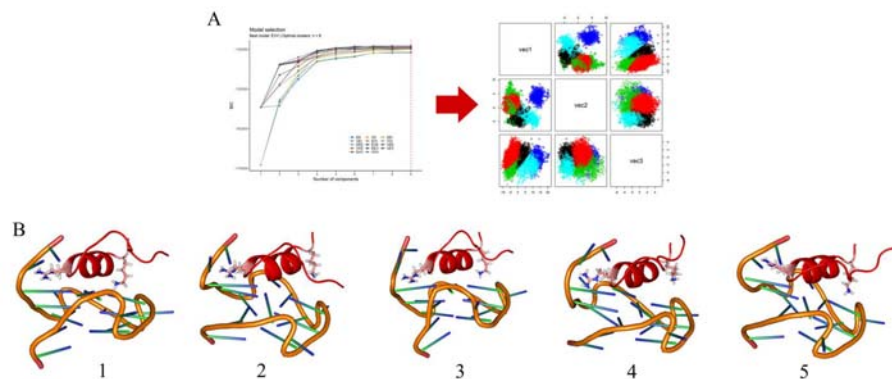


شکل ۲- تغییرات شعاع ژیراسیون (A) و تغییرات انرژی برهم‌کنش واندروالس (نارنجی) و الکتروستاتیک (آبی) (B) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، کمپلکس DSM با چهارتایی گوانین (C)

برهم‌کنش‌ها و همچنین طراحی زنجیره‌های جدید مورد ارزیابی قرار گرفت. در ۲۰ نانو ثانیه آخر ۲۰۰۰۰ کانفورمر ایجاد شد که به منظور کاهش بعد داده‌ها از تحلیل مولفه-های اصلی (PCA) استفاده گردید. سه مولفه اصلی با بیشترین سهم در توصیف داده‌ها (۸۸٪) برای بررسی تغییرات ساختار کمپلکس DSM-DNA انتخاب گردید. فضای ایجاد شده از سه مولفه اصلی در ۵ خوشه دسته-بندی گردید. از هر خوشه یک کانفورمر جهت ارزیابی برهم‌کنش‌ها استخراج گردید (شکل ۳).

انعطاف‌پذیری بالای مولکولی تعداد کانفورمرهای آنرا افزایش می‌دهد و همین تعدد کانفورمر موجب ایجاد تغییرات گسترده در انرژی برهم‌کنش الکتروستاتیک می‌گردد. همانطور که در شکل ۲C نشان داده شده است، آمینواسیدهای لیزین ۸، گلیسین ۹، آرژنین ۱۰، تیروزین ۱۶ و لیزین ۱۸ پیوندهای هیدروژنی با زنجیره DNA برقرار کرده‌اند.

سیستم پس از گذشت ۳۰ نانوثانیه به تعادل رسید و کانفورمرهای تولید شده در ۲۰ نانو ثانیه آخر برای بررسی



شکل ۳- خوشه‌بندی براساس معیار اطلاع بیسی (Bayesian Information Criterion) منجر به تولید ۵ خوشه مجزا شد که در شکل با ۵ رنگ مختلف نشان داده شده است (A). کانفورم‌های کمپلکس DSM-DNA براساس خوشه‌بندی انجام شده به صورت کارتونی نمایش داده شده اند (B1-5). زنجیره جانبی آمینواسیدهای آرژنین ۱۰ و لیزین ۱۹ در شکل نشان داده شده است.

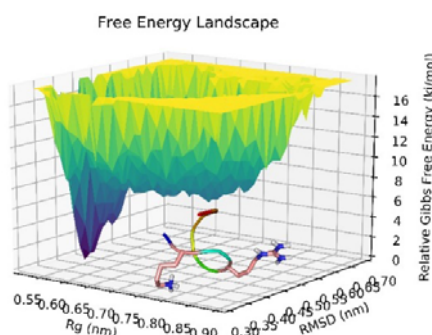
گلايسين ۱۳ با انرژی برهم‌کنش  $6/8$ - کیلوکالری بر مول بعد از تایروژین ۱۶ دارای بیشترین سهم برهم‌کنش و اندروالس هستند. بیشترین سهم برهم‌کنش مربوط به بخش هلیکسی زنجیره پپتیدی DSM است (آمینواسیدهای ۱۳-۹). سهم انتهای N در برهم‌کنش با زنجیره DNA کمتر از انتهای C- است و همین مساله تغییرات کانفورم‌ری در این بخش را افزایش می‌دهد (شکل ۳). دو آمینواسیدی که در برهم‌کنش با زنجیره DNA نقش کلیدی دارند (آرژنین ۱۰ و لیزین ۱۹) به ترتیب در ابتدا و انتهای بخش هلیکسی DSM قرار گرفته‌اند. برهم‌کنش یونی بین این دو آمینواسید و گروه‌های فسفات به عنوان بخش کلیدی در طراحی مهارکننده‌های جدید مورد توجه است (۱۶). غالباً این برهم‌کنش در مدل‌های فارماکوفوری به صورت دو گروه بازی که تقریباً در فاصله ۱۵ آنگسترومی از یکدیگر قرار گرفته‌اند مشخص می‌شود.

همانطور که از ارزیابی برهم‌کنش آمینواسیدهای زنجیره DSM مشخص شد، تمامی این آمینواسیدها در برهم‌کنش با زنجیره DNA نقش ندارند (۲). بنابراین امکان کاهش اندازه و افزایش کارایی آمینواسیدهای زنجیره پپتیدی وجود دارد. چالش اصلی در این بین حفظ جهت‌گیری مناسب زنجیره جانبی آمینواسیدها در کمپلکس نهایی است. به همین منظور آمینواسیدهای کلیدی در برهم‌کنش

همانطور که در شکل ۳ نشان داده شده است عمده تغییرات ایجاد شده در ساختار DSM-DNA به دو بخش انتهایی کربوکسیل و آمینی پپتید مربوط می‌شود. بخش مرکزی پپتید که با ساختار هلیکس در شکل مشخص است در طول شبیه‌سازی پایدار است. این بخش در جهت‌گیری دو آمینواسید آرژنین ۱۰ و لیزین ۱۹ و همچنین برهم‌کنش آنها با DNA نقش مهمی ایفا می‌کند.

براساس بررسی‌های انجام شده، آمینواسید آرژنین ۱۰ بیشترین سهم را در برهم‌کنش با زنجیره DNA داشت (انرژی الکتروستاتیک:  $17/0$ - و انرژی واندوالس:  $16/6$ - کیلوکالری بر مول). سپس تایروژین ۱۶ با انرژی برهم‌کنش  $13/1$ - کیلوکالری بر مول بیشترین برهم‌کنش و اندوالس در بین آمینواسیدهای زنجیره DSM را داشت. جهت‌گیری حلقه فنول تایروژین ۱۶ نسبت به حلقه گوانین زنجیره DNA منجر به برهم‌کنش‌های واندوالس قوی می‌شود. گلوتامیک اسید ۱۱ با برقراری پیوند هیدروژنی با ریبوز تیمین سهم بالایی در برهم‌کنش با زنجیره DNA دارد (انرژی الکتروستاتیک:  $7/5$ - و انرژی واندوالس:  $4/6$ - کیلوکالری بر مول). لیزین ۱۹ با انرژی برهم‌کنش  $7/3$ - کیلوکالری بر مول سهم قابل توجهی در برقراری پیوند یونی با گروه‌های فسفات دارد. ایزولئوسین ۱۲ با انرژی برهم‌کنش  $7/6$ -، گلايسين ۹ با انرژی برهم‌کنش  $7/0$ - و

می‌دهد. عمیق‌ترین چاهک نشان‌دهنده پایداری بیشتر رنجیره پپتیدی نسبت به سایر نقاط چشم‌انداز است.



شکل ۴- چشم‌انداز انرژی آزاد رنجیره پپتیدی ۳ و ساختار پایدارترین کانفورمر مربوط به چاهک انرژی. رنجیره جانبی آمینواسیدهای بازی آرژنین و لیزین در شکل نشان داده شده است.

پس از دستیابی به پایدارترین ساختار ۸ رنجیره پپتیدی، داکینگ مولکولی با استفاده از سرور HADDOCK انجام گرفت. تابع امتیازدهی HADDOCK براساس جمع‌وزنی انرژی الکتروستاتیک (ضریب وزنی: ۰/۲)، انرژی واندروالس (ضریب وزنی: ۱/۰)، انرژی حلال‌زدایی (ضریب وزنی: ۱/۰) و انرژی نقض محدودیت ساختاری (ضریب وزنی: ۰/۱) محاسبه می‌گردد. جدول ۱ امتیاز محاسبه شده برای ۸ رنجیره پپتیدی را نشان می‌دهد.

با رنجیره DNA انتخاب و پس از بررسی برهم‌کنش و جهت‌گیری احتمالی آنها در کمپلکس با DNA رنجیره‌های پپتیدی جدیدی طراحی شدند. براساس نتایج دست‌آمده به ترتیب رنجیره‌های پپتیدی ۱ تا ۸ با توالی KGREIGYAK، KGREIGMYK، HKGREIGYA، KGREIGHYA، HKGREIGYAK، KGREIGHYA و LKGREIGM مشخص شدند. مشخصه اصلی رنجیره‌های پپتیدی طراحی شده حضور حداقل دو آمینواسید بازی آرژنین و لیزین در تمامی رنجیره‌ها می‌باشد. همانطور که اشاره شد، آنچه در این بین اهمیت زیادی دارد فاصله و نحوه جهت‌گیری آمینواسیدهای بازی در رنجیره پپتیدی است. به منظور بررسی نحوه برهم‌کنش رنجیره‌های پپتیدی و رنجیره DNA از روش داکینگ مولکولی استفاده گردید. نکته اصلی در انجام یک داکینگ معتبر بهره‌مندی از نقطه شروع مناسب است. در همین راستا جهت دستیابی به پایدارترین ساختار هر رنجیره پپتیدی، در سه مرحله مجزا ۶۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام گرفت. بر اساس داده‌های بدست آمده، چشم‌انداز انرژی آزاد (Free Energy Landscape) مورد ارزیابی قرار گرفت. چشم‌انداز انرژی آزاد میزان پایداری رنجیره پپتیدی در فضای کانفورمری پیموده شده را نشان

جدول ۱. پارامترهای امتیازدهی HADDOCK. واحد انرژی کیلوکالری بر مول است.

زنجیره پپتیدی	توالی زنجیره پپتد	امتیاز HADDOCK	امتیاز Z	انرژی واندروالس	انرژی الکتروستاتیک	انرژی حلال-زدایی	برهم‌کنش یونی
۱	KGREIGYAK	-۷۰/۹ ± ۹/۲	-۱/۱	-۳۸/۱ ± ۷/۸	-۲۱۰/۱ ± ۴۷/۷	۹/۰ ± ۲/۳	دارد
۲	KGREIGMYK	-۷۳/۳ ± ۴/۵	-۱/۲	-۳۸/۳ ± ۴/۷	۱۹۲/۵ ± ۴۳/۵	۱/۴ ± ۳/۰	دارد
۳	HKGREIGYA	-۴۷/۳ ± ۲/۰	-۱/۱	-۳۷/۹ ± ۱/۹	-۷۲/۱ ± ۱۰/۱	۱۹/۴ ± ۱۳/۸	دارد
۴	KGREIGHYA	-۶۰/۳ ± ۲/۳	-۱/۷	-۳۸/۸ ± ۱/۶	-۸۹/۹ ± ۲۰/۲	-۵/۳ ± ۱/۱	دارد
۵	HKGREIGYAK	-۷۴/۲ ± ۵/۴	-۱/۷	-۳۳/۳ ± ۲/۴	-۲۲۱/۵ ± ۳۲/۰	۱/۲ ± ۲/۴	دارد
۶	KGREIGHYAK	-۶۶/۵ ± ۵/۰	-۲/۴	-۲۷/۲ ± ۳/۹	-۲۳۱/۳ ± ۳۳/۵	۴/۶ ± ۱/۵	ندارد
۷	LKGREIGM	-۵۴/۰ ± ۱/۶	-۱/۵	-۴۱/۶ ± ۲/۱	-۶۶/۷ ± ۱۷/۳	۰/۵ ± ۰/۹	ندارد
۸	KGREIGMYAK	-۷۶/۰ ± ۳/۷	-۱/۸	-۳۲/۵ ± ۳/۴	-۲۵۰/۵ ± ۳۷/۳	۳/۶ ± ۴/۶	دارد

و ۷ پیوند یونی بین آمینواسیدهای بازی و گروه‌های فسفات DNA را ندارند. با در نظر گرفتن دو پارامتر انرژی برهم‌کنش و پیوند یونی کلیدی زنجیره‌های ۱، ۲، ۵ و ۸ به عنوان پپتیدهای برتر انتخاب شدند. در مرحله بعدی و به منظور بررسی تاثیر دینامیک بر زنجیره‌های برتر ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام گرفت. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در جدول ۲ گزارش شده است.

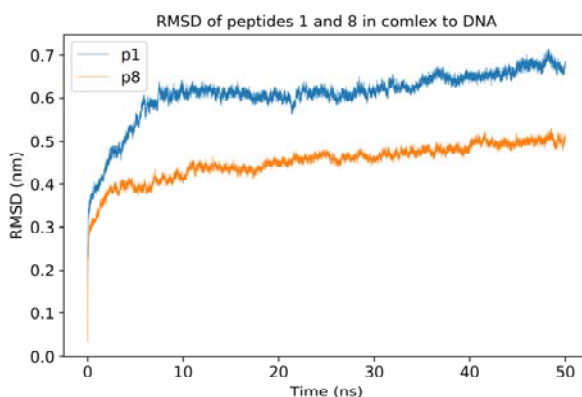
هرچه میزان امتیاز HADDOCK و Z منفی‌تر باشد نتایج بدست آمده قابل اعتمادتر هستند. براساس نتایج بدست آمده زنجیره‌های پپتیدی ۱، ۲، ۵ و ۸ بیشترین انرژی برهم‌کنش با زنجیره DNA را داشتند. علاوه بر انرژی مطلوب برهم‌کنش با چهارتایی گوانین، برهم‌کنش آمینواسیدهای بازی با گروه‌های فسفات که در فارماکوفور پایدارکننده‌های G4 نیز ذکر شد ملاک مقایسه و انتخاب بهترین زنجیره قرار گرفت. براساس بررسی نحوه برهم‌کنش تنها دو زنجیره ۶

جدول ۲- پارامترهای دینامیک مولکولی زنجیره‌های برتر بعد از ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. انرژی بر حسب کیلوکالری بر مول و RMSD بر حسب نانومتر گزارش شده است.

انرژی در واحد آمینواسید	انرژی الکتروستاتیک	انرژی واندروالس	تعداد پیوند هیدروژنی	RMSD پپتید	RMSD تمام اتم‌ها	توالی زنجیره پپتید	زنجیره پپتیدی
-۱۹/۱	-۱۲۴/۴±۲۷/۱	-۴۸/۰±۵/۳	۵/۸±۱/۵	۰/۶۰±۰/۰۲	۲/۳±۰/۰۶	KGREIGYAK	۱
-۱۲/۲	-۵۹/۸±۲۲/۲	-۵۰/۱±۶/۰	۲/۸±۱/۲	۰/۲۹±۰/۰۲	۱/۸±۰/۰۶	KGREIGMYK	۲
-۱۴/۲	-۸۹/۹±۲۶/۹	-۵۱/۸±۵/۲	۳/۱±۱/۶	۰/۵۸±۰/۰۵	۲/۲±۰/۱۴	HKGREIGYAK	۵
-۱۵/۳	-۱۰۶/۷±۲۳/۱	-۴۶/۵±۵/۹	۳/۶±۱/۳	۰/۴۵±۰/۰۶	۱/۷±۰/۰۲۲	KGREIGMYK	۸

ساختار کریستالوگرافی است (شکل ۵). تغییرات مقدار RMSD زنجیره‌ای پپتیدی نیز کم (کمتر از ۱ نانومتر) و در طول شبیه‌سازی ثابت است.

پایداری سیستم‌های تحت مطالعه با روند تغییرات RMSD ارزیابی گردید. تغییرات RMSD تمام اتم‌ها در طول شبیه‌سازی برای چهار زنجیره پپتیدی ثابت است. افزایش در RMSD (تا رسیدن به حالت پایا) به دلیل رهاشدن از فشار



شکل ۵- نمودار تغییرات RMSD زنجیره‌های پپتیدی ۱ و ۸ در کمپلکس با زنجیره DNA

بدست آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با نتایج بدست آمده از سرور HADDOCK هم‌خوانی دارد. برهم‌کنش

تغییرات کم RMSD نشان‌دهنده پایداری کمپلکس تشکیل شده بین زنجیره‌های پپتیدی و DNA می‌باشد. روند نتایج



مسیرهای درمانی جدید در کنترل این بیماری ضروری است. یکی از راهکارهای مهم در درمان سرطان کنترل بیان آنکوژن‌هایی همچون C-myc است. تشکیل ساختار چهارتایی گوانین در بخش فعال‌کننده آنکوژن‌ها مانع بیان آنها می‌شود. ترکیبات پایدارکننده ساختار چهارتایی گوانین به عنوان اهداف درمانی جدید در سرطان مطرح شده‌اند. در این پژوهش زنجیره‌های پپتیدی جدید با اثر پایدار کنندگی G4 طراحی شدند. بر اساس نتایج بدست آمده زنجیره‌های KGREIGYAK و KGREIGMYAK به عنوان بهترین کاندید انتخاب شدند. پارامتر کلیدی در برهم‌کنش این دو زنجیره با DNA قرار گرفتن دو آمینواسید بازی لیزین و آرژنین به ترتیب در فاصله ۵ و ۶ آمینواسیدی از یکدیگر است که بهترین فاصله و جهت-گیری را حاصل می‌کند. قرارگرفتن آمینواسیدهای بازی در این دو پپتید احتمال نفوذ به درون سلول را افزایش می‌دهد. نتایج بدست آمده از این مطالعه با مدل‌های فارماکوفوری همخوانی دارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی همدان به خاطر حمایت مالی این مطالعه در قالب طرح شماره ۹۷۰۵۱۶۲۹۸۵ تشکر و قدردانی می‌نمایند.

الکتروستاتیک به عنوان برهم‌کنش اصلی در اتصال زنجیره‌های پپتیدی به DNA نقش دارد. در این بین زنجیره ۱ (KGREIGYAK) بیشترین انرژی برهم‌کنش (۱۷۲/۴- کیلوکالری بر مول) را داشت. با توجه به جهت‌دار بودن پیوندهای هیدروژنی، تعداد پیوندهای هیدروژنی نقش بسیار مهمی در نحوه اتصال پپتید به زنجیره DNA دارد. زنجیره ۱ با متوسط ۵/۸ پیوند هیدروژنی در هر نانو ثانیه بهترین اولویت را دارد. زنجیره ۸ (KGREIGMYAK) با انرژی برهم‌کنش ۱۵۳/۲- کیلوکالری بر مول و متوسط ۳/۶ پیوند هیدروژنی در هر نانو ثانیه در رتبه بعدی قرار دارد. پارامتر مهم دیگری که باید مورد توجه قرار گیرد انرژی برهم‌کنش زنجیره‌های پپتیدی به ازاء هر آمینواسید است. با افزایش تعداد آمینواسیدها و به تبع آن بزرگتر شدن زنجیره پپتیدی انرژی برهم‌کنش افزایش می‌یابد. اما نکته مهم کارایی هر آمینواسید در ایجاد برهم‌کنش است. بر اساس نتایج بدست آمده زنجیره ۱ با انرژی ۱۹/۱- کیلوکالری بر مول به ازا هر آمینواسید بیشترین کارایی را دارد. اختلاف بالای این پارامتر در زنجیره ۱ با سایر زنجیره‌ها نشان از برهم‌کنش قوی و کارآمد آمینواسیدهای این زنجیره است.

### نتیجه‌گیری

سرطان به عنوان دومین عامل مرگ و میر در جهان شناخته می‌شود. درمان سرطان بسیار دشوار و پیچیده است. یافتن

### منابع

۲- نجاری، ش.، محمدزاده، ر.، برادران، ب. (۱۳۹۹) بررسی نقش miR-34a بر میزان بیان ژن‌های PTEN، BACH1 و SIRT1 در رده سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell (jurkat). پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۳۲ (۴)، ۲۲۹-۲۳۹

۱- رضوان نژاد، ا.، لطفی، ص.، بوستان، آ. (۱۳۹۸) مدل‌سازی پروتئین استرس گرمایی ۷۰ ( ) زنبور عسل به روش همولوژی مدلینگ و شبیه‌سازی مولکولی و اتصال آن به HSP40. پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۳۲ (۴)، ۴۹۱-۴۸۲

3- Ambrus A, Chen D, Dai J, Bialis T, Jones RA, Yang D. 2006. Human telomeric sequence forms a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic acids research*. 34(9):2723-35.

4- Bussi G, Donadio D, Parrinello M. 2007. Canonical sampling through velocity rescaling. *The Journal of chemical physics*. 126(1):014101.

5- Chen MC, Tippiana R, Demeshkina NA, Murat P, Balasubramanian S, Myong S, et al. 2018. Structural basis of G-quadruplex unfolding by



- the DEAH/RHA helicase DHX36. *Nature*. 558(7710):465.
- 6- Dang CV, O'Donnell KA, Zeller KI, Nguyen T, Osthus RC, Li F, editors. 2006. The c-Myc target gene network. *Seminars in cancer biology*; Elsevier.
- 7- Dang CV, Resar LM, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, et al. 1999. Function of the c-Myc oncogenic transcription factor. *Experimental cell research*. 253(1):63-77.
- 8- Dominguez C, Boelens R, Bonvin AM. 2003. HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*. 125(7):1731-7.
- 9- Han H, Hurley LH. 2000. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in pharmacological sciences*. 21(4):136-42.
- 10- Heddi B, Cheong VV, Martadinata H, Phan AT. 2015. Insights into G-quadruplex specific recognition by the DEAH-box helicase RHAU: Solution structure of a peptide-quadruplex complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 112(31):9608-13.
- 11- Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG. 1997. LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*. 18(12):1463-72.
- 12- Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. 2008. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*. 4(3):435-47.
- 13- Lau JL, Dunn MK. 2018. Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 26(10):2700-7.
- 14- Lindorff-Larsen K, Piana S, Palmo K, Maragakis P, Klepeis JL, Dror RO, et al. 2010. Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 78(8):1950-8.
- 15- Murat P, Singh Y, Defrancq E. 2011. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chemical Society Reviews*. 40(11):5293-307.
- 16- Ou Tm, Lu Yj, Tan Jh, Huang Zs, Wong KY, Gu Lq. 2008. G-quadruplexes: targets in anticancer drug design. *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery*. 3(5):690-713.
- 17- Parrinello M, Rahman A. 1981. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*. 52(12):7182-90.
- 18- Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. 2002. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99(18):11593-8.
- 19- Yang D, Okamoto K. 2010. Structural insights into G-quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future medicinal chemistry*. 2(4):619-46.

# In silico design and molecular modeling of peptidic stabilizer of G-quadruplex

Ebadi S.A.<sup>1\*</sup>, Khazaei M.<sup>1</sup> and Dastan D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Dept. of Pharmacognosy and Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, I.R. of Iran

## Abstract

Molecular modeling has a key role in drug discovery and development projects. Virtual screening methods reduce the cost of drug discovery. The roles of molecular modeling methods are undeniable in development of anticancer drugs. G-quadruplexes are distinct secondary structures adopted in some guanine-rich DNA sequences. G-quadruplex forms in the promoter of oncogenes and suppresses transcriptional activity. So G-quadruplex stabilizing agents are one of the most potential anticancer agents. In the present contribution, we evaluate the interaction of DSM peptide with G-quadruplex and also design and molecular modeling of new G-quadruplex peptidic stabilizers. According to obtained results, two basic groups are the main parameter in binding to G-quadruplex. In two best designed chains, KGREIGYAK and KGREIGMYAK, lysine and arginine residues place in optimum distance and showed high affinity to G-quadruplex. These basic residues formed ionic bond with phosphate groups of DNA. Tyrosine residue formed  $\pi$ - $\pi$  interaction with guanine ring of G4.

**Keywords:** Molecular modeling, Cancer, G-quadruples, Drug design, Peptide