

مطالعه تغییرات ساختاری و دینامیکی پروتئین $GSK3\beta$ در حضور لیگاند CHIR99021 با

استفاده از شبیه سازی و داکینگ مولکولی

جواد کاظمی^۱، حسین شاهسوارانی^{۲،۳}، پرویز پاکزاد^۱ و محمد علی شکرگزار^{۳،۴}^۱ ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی^۲ ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی^۳ ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری های پزشکی^۴ ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، گروه بانک سلولی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۰۸

چکیده

گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا ($GSK3\beta$) یک سرین/ترونین کیناز چند عملکردی است که بعنوان یک پروتئین اصلی در مسیر پیام رسانی WNT در عملکرد های مختلف سلول های بنیادی پرتوان (PSCs) شامل؛ خودنوزایی، بقا و تمایز ایفای نقش می کند. از آنجایی که مهار $GSK3\beta$ سبب تمایز PSCs می شود استفاده از مهار کننده های مناسبی که در غلظت کمتر باعث مهار $GSK3\beta$ شود می تواند به لحاظ اقتصادی مقرون بصرفه باشد. CHIR99021 یکی از مهمترین مهار کننده های $GSK3\beta$ است که با استفاده از سرور Way2drug روند این مهار مورد پیش بینی قرار گرفت تا بتواند جهت بهبود سیستم های کشت و تمایز PSCs مورد استفاده قرار گیرد. در مطالعه حاضر، رویکرد های مختلف شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) مثل ریشه میانگین مجذور انحراف (RMSD)، ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF)، تعداد پیوند هیدروژنی، آنالیز مؤلفه اصلی (PCA)، چشم انداز انرژی آزاد گیبس، شعاع ژیراسیون در حضور و عدم حضور CHIR99021 نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و علاوه بر آن بمنظور بررسی دقیق تر برهمکنش لیگاند-پروتئین با استفاده از داکینگ انعطاف پذیر با سرور سوئیس داک انجام شد و میزان پایداری و تغییرات ساختاری پروتئین $GSK3\beta$ با استفاده از نرم افزار GROMACS 2021.1 شبیه سازی شد. به علاوه، خصوصیات فارماکوکینتیکی این ترکیب با استفاده از نرم افزار افزاز 2015-2-Schrodinger, LLC, New York, NY, Release پیش بینی شد. نتایج این مطالعات نشان داد که CHIR99021 از طریق ایجاد پیوند هیدروژنی و واندروالسی در جایگاه فعال $GSK3\beta$ متصل می شود و اثر مهار کنندگی خود را ایجاد می کند و در نتیجه سبب ناپایداری ساختار $GSK3\beta$ می شود. همچنین نتایج داکینگ و شبیه سازی دینامیکی روشن ساخت این ترکیب به نحو موثرتری می تواند برای القای تمایز سلول های بنیادی پرتوان مورد استفاده قرار گیرد و به لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است.

واژه های کلیدی: سلول های بنیادی پرتوان، CHIR99021، $GSK3\beta$ ، ADMET، دینامیک مولکولی (MD)، داکینگ مولکولی*پست الکترونیکی نویسندگان مسئول: hosein.shahsavarani@gmail.com و mashokrgozar@pasteur.ac.ir

مقدمه

گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا ($GSK3\beta$)، یک کیناز پروتئین چندعملکردی است که بعنوان تنظیم کننده اصلی خود نوزایی و تمایز سلول های بنیادی پرتوان (PSCs) عمل می کند. علاوه، این پروتئین با چندین بیماری شایع از جمله سرطان، دیابت و التهاب ارتباط دارد و در انواع عملکرد های فیزیولوژیکی مثل بیان ژن، تمایز سلول، تکثیر، متابولیسم و بقای سلول نقش دارند [۱، ۲]. در حالیکه فعال سازی مسیر پیام رسانی WNT و در نهایت فعال سازی $GSK3\beta$ ، فعالیت خودنوزایی سلول های

بنیادی را القاء می کند و سلول های بنیادی را به سمت خاموش شدن سوق می دهد، مهار این مسیر پیام رسانی سبب آغاز تمایز سلول های بنیادی به سلول های تمایز یافته می شود [۳]. مسیر پیام رسانی WNT یکی از مهم ترین مسیرهای پیام رسانی در تمایز PSCs به انواع مختلف سلول است. تنظیم این مسیر پیام رسانی با کمک ریز مولکول ها (Small Molecules) نقش مهمی در تمایز *in vitro* سلول های بنیادی ایفا می کند. ریزمولکول ها، ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم (>۹۰۰ دالتون) می باشند که در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی، با اندازه ای در حدود ۱ نانومتر نقش دارند. ریز مولکول ها مزایای عمده ای نسبت به پروتئین های اصلی تنظیم کننده ی مسیر پیام رسانی WNT مثل DKK1 و Noggin دارند. ریز مولکول ها می توانند از طریق انتشار ساده از عرض غشاء سلول عبور کنند و به بخش های مختلف سلول برسند و نسبت به پروتئین های نوترکیب مقرون به صرفه تر هستند [4]. با این حال گزارش شده است، یک سری از ریز مولکول ها مهار کننده ی GSK3 β وجود دارند که در صنعت پزشکی بازساختی مورد استفاده قرار می گیرند.

فعال سازی مسیر پیام رسانی WNT از طریق ریز مولکول های CHIR99021 منجر به تمایز PSCs به رده های مزودرمی می شوند [۵، ۶]. CHIR99021 فعالیت مسیر پیام رسانی WNT را از طریق مهار GSK3 β ، تحت تأثیر قرار می دهد. در نتیجه PSCs را به سمت رده های مزودرمی سوق می دهد [۷، ۸]. فاکتور مؤثر اصلی در پیام رسانی WNT، β -کاتنین است. غیر فعال سازی مسیر WNT سبب تخریب β -کاتنین می شود و منجر به کاهش سطح β -کاتنین در سیتوزول می شود. به محض فعال شدن مسیر پیام رسانی WNT، β -کاتنین در سیتوزول تجمع می یابد و به هسته منتقل می شوند و با فاکتورهای رونویسی خاص برهمکنش می کنند [۹، ۱۰].

شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) مولکول های زیستی اغلب در حوزه ی شیمی محاسباتی طبقه بندی می شود اما ریشه علمی این تکنیک به شیمی پلیمر و زیست شناسی ساختار در دهه ۱۹۷۰ برمی گردد جایی که برای مطالعه فیزیک، خواص مکانی مولکولی شامل؛ انعطاف پذیری، واپیچش (distortion)، پایداری و شل شدن ساختارها، ساختار های اولیه اشعه ایکس پروتئین ها در مقیاس های کوتاه مدت استفاده می شد [۱۱]. بطور کلی شبیه سازی مولکولی پیشتر در فیزیک پیشگام بود [۱۲]. حوزه شبیه سازی مولکولی از آن زمان تا کنون بسیار پیشرفت کرده است و در حال حاضر شبیه سازی ها به طور مکرر در مقیاس چند میلی ثانیه انجام می شود که در این زمان کوتاه می توان چندین بار پروتئین را تا کرد [۱۳]، برهمکنش بین گیرنده ها [۱۴] و ویژگی های عملکردی گیرنده ها را پیش بینی کرد و حتی حالت های انتقالی حدواسط پروتئین هایی مانند پروتئین های غشایی، را ثبت کرد [۱۵]. این نوع شبیه سازی کلاسیک طولانی مدت همچنان حائز اهمیت است زیرا روش هایی برای مشاهده مستقیم فرآیند های مولکولی که به راحتی از طریق سایر ابزار ها قابل مشاهده نیست، ارائه می دهد. با این حال بسیاری از مطالعات کنونی بطور فزاینده ای به مجموعه های بزرگ شبیه سازی تکیه می کنند که تا حدی با افزایش روز افزون مدل های ساختاری امکان پذیر شده است که با توالی یابی و ژنومیک ساختاری و همچنین تکنیک های جدید برای برآورد خواص پیچیده مولکولی با استفاده از هزاران شبیه سازی کوتاه تر امکان پذیر کرده است [۱۶]. مطالعات جهش های ژنی از این پس می توانند به آسانی مدل سازی شوند و شبیه سازی های کوتاه برای صدها ژن جهش یافته انجام شود. شبیه سازی دینامیک مولکولی کلاسیک بر اساس مدل های تجربی نقش مهمی ایفا می کنند زیرا بیشتر ویژگی های مورد نظر توسط انرژی آزاد تعریف می شود که معمولاً به نمونه برداری گسترده ای نیاز دارد و روش های شیمی کوانتومی سنتی نمی توانند برای سیستم های بزرگ کارایی داشته باشند. این پیشرفت ها بدون تلاش تحقیقاتی مهم در الگوریتم های شبیه سازی، بهینه سازی و موازی سازی امکان پذیر نبود. ظهور بسته های نرم افزاری استاندارد مدل سازی

مولکولی مانند *CHARMM* [۱۷]، *GROMOS* [۱۸]، *Amber* [۱۹]، *NAMD* [۲۰]، *GROMACS* [۲۱] مهم بوده است زیرا این نرم افزار ها به تحقیقات شبیه سازی و مدل سازی مولکولی کمک شایانی کرده است و تکنیک ها را در اختیار محققان علوم زیستی که متخصص شبیه سازی نیستند قرار داده است. ابزار *GROMACS* یکی از اهداف اصلی توسعه بلند مدت برای دست یابی به بالاترین شبیه سازی ممکن در آزمایشگاه های تحقیقاتی است. از سال ۲۰۰۹ تاکنون *GROMACS 4* در حال توسعه است به طوری که تعدادی از ویژگی های جدید به آن اضافه شده است که منجر به انتشار نسخه 4.5 این نرم افزار شده است و عملکرد و کارایی برنامه های موازی به طور قابل توجهی بهبود یافته است. هدف اصلی این مطالعه بررسی خصوصیات فیزیکی- شیمیایی *CHIR99021* بعنوان فعال کننده های مسیر پیام رسانی WNT از طریق مهار *GSK3β* با استفاده از داکینگ مولکولی جهت انتخاب گزینه مناسب برای تمایز *PSCs* با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) و ارزیابی چندین خصوصیت فارماکودینامیک یا پیش بینی پارامترهای ADMET بترتیب با کمک نرم افزار *GROMACS 2021.1* و ابزار *QikProp* نسخه 4.4 از بسته نرم افزاری *Maestro* (*schrödinger suite*)، انجام شد. (LLC, New York, NY, Release 2015-2)

مواد و روش

۱- ساختارها

ساختار کریستال پروتئین در حالت کمپلکس با لیگاند با کد 5HLN از بانک اطلاعاتی پروتئین (PDB) بدست آمد (www.rcsb.org). مطالعات ساختار با استفاده از نرم افزارهای *Swiss-PDB viewer 4.10* و *Chimera* انجام شد.

۲- پارامتریزاسیون مولکول های لیگاند

برای پارامتریزاسیون مولکول لیگاند از نرم افزار *Antechamber* موجود در بسته نرم افزار *AmberTools* استفاده گردید و در نهایت پارامترهای ایجاد شده با استفاده از اسکریپت *ACPYE* به فرمت *GROMACS* تبدیل شدند.

۳- شبیه سازی دینامیک مولکولی

پروتئین تنها و در حالت کمپلکس به عنوان ورودی برای شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار *GROMACS 2021.1* انجام شد. ساختارهای ورودی با میدان نیروی ff99SB+ILDN آماده سازی شدند. وضعیت صحیح هیدروژن هیستیدین ها برای تمامی هیستیدین های پروتئین در ساختار ایجاد و پیوندهای دی سولفید (در صورت وجود) برای آنزیم تعریف شد. سپس بار سطحی ساختار با افزودن چند یون سدیم و کلر خنثی گردید. پروتئین در لایه ای از مولکولهای آب *TIP3P* به ضخامت 8 آنگستروم در جعبه مکعبی (cubic) با استفاده از نرم افزار *gmX solvate* قرار داده شد [۲۲-۲۴].

کاهش انرژی بر روی ساختارها با 1000 گام با روش *steepest descent* به منظور حذف اندرکنش های واندروالس و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولهای آب و کمپلکس صورت گرفت. در مرحله بعد، دمای سیستم به تدریج از 0 تا 310 کلون به مدت 200 پیکوثانیه در حجم ثابت افزایش یافت و پس از آن در فشار ثابت به مدت ۲۰۰ پیکوثانیه سیستم به

☒ All ☐ Pa>Pi ☐ Pa>0,3 ☐ Pa>0,7 ok			حالت
Pa	Pi	Activity	تعداد
0,565	0,014	Protein kinase inhibitor	رسانده
0,453	0,035	Signal transduction pathways inhibitor	شد.
0,406	0,004	TRKB antagonist	شبیه
0,423	0,046	HMGCS2 expression enhancer	سازی
0,377	0,022	Tyrosine kinase inhibitor	دینامیک
0,389	0,059	Autoimmune disorders treatment	مولکولی
0,322	0,034	HIV attachment inhibitor	در دمای
0,322	0,046	Focal adhesion kinase inhibitor	۲۹۸
0,336	0,063	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor	کلون و
0,293	0,020	Janus tyrosine kinase 2 inhibitor	در مدت

زمان 100 نانوثانیه به انجام رسید. میانکنش های غیریونی با فاصله 10 آنگستروم به روش PME محاسبه گردید. برای افزایش سرعت محاسبات از الگوریتم SHAKE برای محدود کردن پیوندهای درگیر در اتم هیدروژن استفاده گردید. در نهایت اطلاعات شبیه سازی در فواصل ۸ پیکوثانیه برای انجام آنالیز ذخیره شد.

۴-داکینگ مولکولی

با استفاده از سرور سوئیس داک فرآیند داکینگ مولکولی انجام شد و نتایج آن ثابت کرد که لیگاند CHIR99021 توانایی مهار پروتئین $GSK3\beta$ را دارد. نتایج اسکور های داکینگ (جدول ۱) نشان می دهد که این لیگاند توانایی برهمکنش بالایی با پیوند های هیدروژنی که با جایگاه فعال این پروتئین ایجاد می کند نقش کلیدی در مهار پروتئین $GSK3\beta$ ایجاد می کند و مسیر های پیام رسانی WNT نیز در پی آن فعال می شوند.

شکل ۱- پیش بینی خواص لیگاند CHIR99021 با سرور Way 2 drug

۵-آنالیز خصوصیات مرتبط با ADMET یا فارماکوکیتیک

خصوصیات ADMET (جذب، متابولیسم، پراکنش، دفع و سمیت) [۲۵، ۲۶] ترکیب شیمیایی ریز مولکول CHIR99021 با استفاده از پارامترهای قرار دادی پروتوکول *QikProp* نسخه 4.4 از بسته نرم افزاری *Maestro* (Schrödinger, LLC, New York, NY, Release 2015-2) [۲۷] آنالیز شد. پارامترهای *in silico* فیزیکی-شیمیایی که از طریق مدول *QikProp* قابل پیش بینی هستند عبارتند از: وزن مولکولی (MV)، تعداد پیوندهای هیدروژنی دهنده، تعداد پیوند هیدروژنی گیرنده، تعداد پیوند های قابل چرخش (Rot)، مساحت کل سطح قابل دسترس حلال (SASA)، حجم مولکولی (بر حسب آنگستروم مکعب)، مساحت سطح قطب پیوند و اندروالسی (PSA)، میزان کرویت (globularity)، درصد جذب ریز مولکول از دهان انسان (%HOA)، حلالیت در آب ($\log s$): که S برحسب mol dm^{-3} است و نشان دهنده ی غلظت حل شونده در محلول اشباع است). مهار کانال های HERG K^+ : $\log \text{IC}_{50}$ ، $\log \text{Khsa}$ ، اتصال به پروتئین سرم، قانون Lipinski's rule of five شامل: ۵۰۰ دالتون < وزن مولکولی، $\text{QLog Po/w} < 5$ ، $\text{QLog S} > -10$ پیوند هیدروژنی دهنده، قانون Jorgensen's rule of three شامل: $\text{QLog S} > -10$ ، $\text{QLog PCaco} > 22 \text{ nm/s}$ و < 7 تعداد متابولیت های اولیه.

نتایج و بحث

۱-آنالیز نتایج داکینگ مولکولی

نتایج پیش بینی خواص لیگاند با استفاده از سرور Way2drug انجام شد تأثیر این مولکول آلی بر روی تارگت های مختلف نیز بدست آمد، که در این بین توانایی مهار پروتئین کیناز با احتمال ۵۶ درصد بهترین تارگت برای مولکول آلی مورد نظر است (شکل ۱).

الف-انتخاب پروتئین هدف

پروتئین هدف با شماره دسترسی HLN5 بر اساس رزولوشن مناسب و همچنین کمترین میزان رزیدو گم شده انتخاب شد و سپس با استفاده از نرم افزار کایمر (Chimera) پروتئین به حالت طبیعی و خالص خود درآمد و تمام لیگاند های غیر مرتبط حذف شدند. در نهایت این پروتئین به همراه فایل لیگاند به سرور سوئیس داک که بر اساس الگوریتم *ab-initio* فعالیت می کند قرار گرفت و فرآیند داکینگ انجام شد. نتایج حاصل از اسکور داکینگ در جدول ۱ نشان داده شده است.

ب-بررسی برهمکنش لیگاند و پروتئین

بهترین حالت قرار گیری لیگاند در درون جایگاه فعال پروتئین در حالت اول بررسی گردید و پیوند های هیدروژنی آن نیز

Show	Cluster	Element	FullFitness (kcal/mol)	Estimated ΔG (kcal/mol)
☒	0	0	-1944.21	-9.35
☐	0	1	-1936.89	-9.23
☐	0	2	-1931.18	-8.56
☐	0	3	-1930.78	-8.48
☐	0	4	-1929.74	-8.68
☐	0	5	-1928.67	-8.34
☐	1	0	-1943.39	-9.30
☐	1	1	-1943.38	-9.30
☐	1	2	-1935.65	-9.02
☐	1	3	-1934.94	-9.02
☐	1	4	-1932.70	-8.74
☐	1	5	-1932.67	-8.75
☐	1	6	-1929.93	-8.59
☐	1	7	-1929.64	-8.58
☐	2	0	-1939.82	-9.00

نمایش داده شد (شکل ۲).

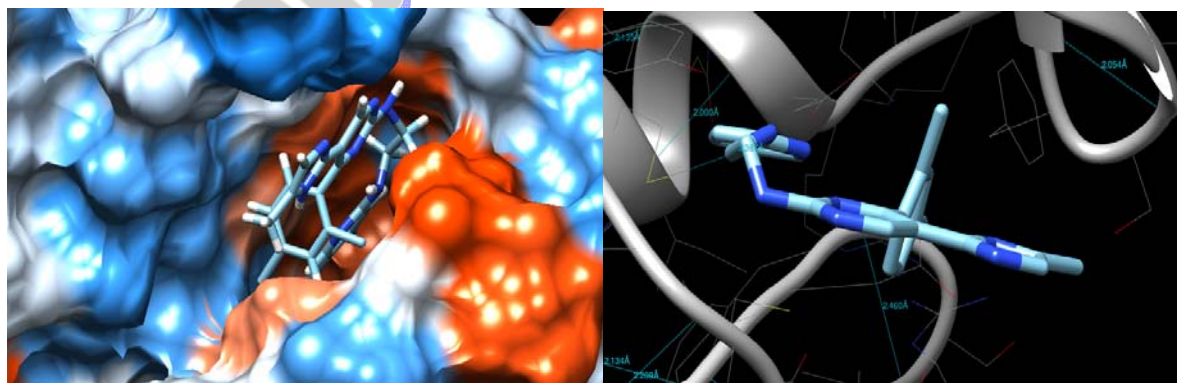
جدول ۱- نتایج اسکور داکینگ

شکل ۲- بررسی نتایج برهمکنش لیگاند و پروتئین با نرم افزار کایمرا

۲-آنالیز نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی

نتایج شبیه سازی حاصل از نرم افزار *GROMACS* به صورت ریشه میانگین مجذور انحراف ها (RMSD)، ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF)، شعاع ژیراسیون و ساختار دوم با استفاده از ماژول های *gmx rmsf*، *gmx rms*، *gmx gyrate* مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز PCA و انرژی آزاد گیبس بترتیب از ماژول های *gmx covar*، *gmx anaeig* و *gmx sham* استفاده شد.

محاسبه RMSD بین ساختارهای بدست آمده و یک ساختار مرجع مهمترین روش برای ارزیابی پایداری شبیه سازی دینامیک مولکولی در طول زمان می باشد. برای مطالعه حرکات اصلی در سیستم، RMSD برای اتم های کربن آلفا بدست آمد. همچنین انعطاف پذیری ساختار بر اساس RMSF اتم های کربن آلفا محاسبه شد. شعاع ژیراسیون نیز که یکی از پارامترهای تعیین کننده در میزان تراکم ساختار می باشد، در طول مدت شبیه سازی بدست آمد.

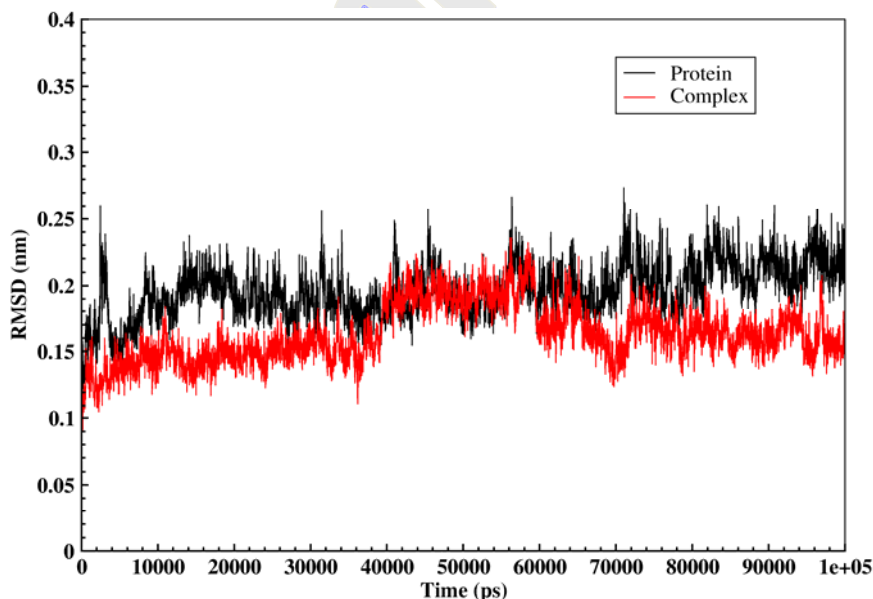


الف- انحراف ریشه میانگین مربعات

(RMSD)

انحراف ریشه میانگین مربعات RMSD بین ساختارهای ایجاد شده در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی در بعد زمان معیاری مناسب و رایج جهت اطمینان از پایداری ساختاری پروتئین های طبیعی و جهش یافته می باشد. بنابراین تغییرات RMSD مربوط به اتم های کربن آلفای پروتئین در هر دو شبیه سازی (در حضور و عدم حضور لیگاند) در طی زمان شبیه سازی (۱۰۰ نانو ثانیه) نسبت به ساختار اولیه محاسبه و استخراج شد. نتایج این محاسبه برای تمام شبیه سازی ها در شکل ۳ نمایش داده شده است. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود در ابتدای شبیه سازی هر دو نمودار روند صعودی را نشان

داده‌اند. طبق این شکل نمودار RMSD مربوط به پروتئین در عدم حضور لیگاند (Protein)، بعد از زمان حدود ۱۵۰۰۰ پیکوثانیه به مقدار ۰/۲ نانومتر رسیده است و بعد از این زمان مقدار آن مجدداً کاهش یافته و در زمان ۳۹۰۰۰ پیکوثانیه به مقدار ۰/۱۸ نانومتر رسیده است. در ادامه مقدار RMSD مربوط به این نمودار مجدد افزایش نسبی را نشان می‌دهد و در انتهای شبیه سازی مجدداً به مقدار ۰/۲ نانومتر رسیده است. درواقع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که از زمان ۱۵۰۰۰ پیکوثانیه تا انتهای شبیه سازی نمودار حول مقدار ۰/۲ نانومتر نوسان بسیار مختصری را نشان می‌دهد. در نمودار مربوط به پروتئین در حالت اتصال به لیگاند (Complex)، در زمان ۱۰۰۰۰ پیکوثانیه مقدار RMSD به حدود ۰/۱۵ نانومتر رسیده است و تا زمان ۳۸۰۰۰ پیکوثانیه روی این مقدار ثابت نسبی را نشان می‌دهد. بعد از این زمان مقدار RMSD افزایش ناگهانی داشته و در زمان ۴۲۰۰۰ پیکوثانیه به مقدار ۰/۱۹ نانومتر رسیده است و تا زمان ۵۹۰۰۰ پیکوثانیه روی این مقدار باقی می‌ماند و بعد از این زمان شروع به کاهش مجدد می‌کند و در زمان ۸۰۰۰۰ پیکوثانیه مجدداً به مقدار ۰/۱۵ نانومتر می‌رسد و تا انتهای شبیه سازی روی این مقدار ثابت باقی می‌ماند. از این دو نمودار می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که در هر دو شبیه سازی بعد از زمان ۸۰۰۰۰ پیکوثانیه پروتئین به تعادل رسیده است.

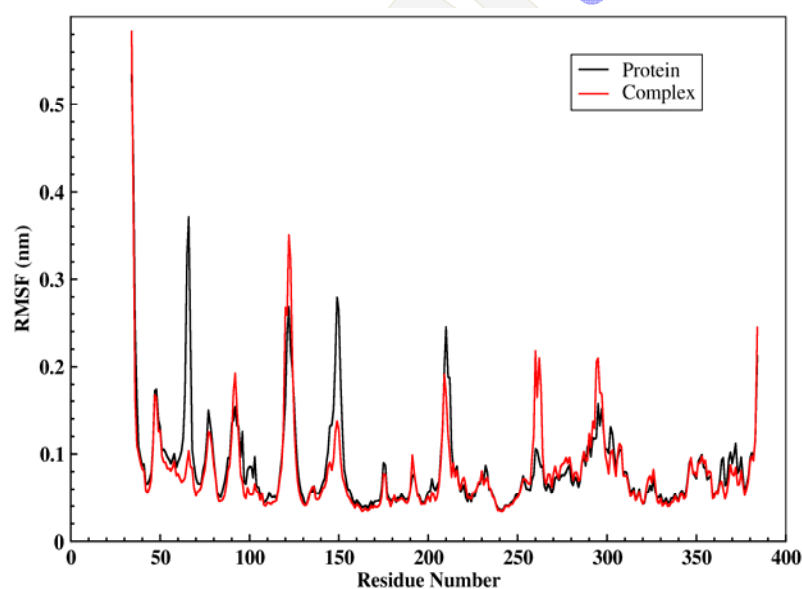


شکل ۳- تغییرات RMSD پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی

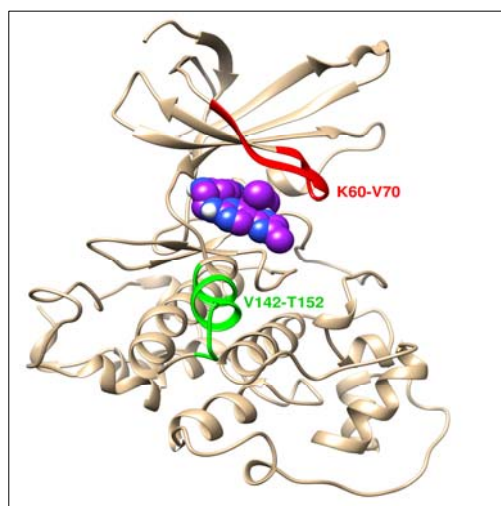
ب- انعطاف پذیری ساختار (RMSF)

رفتار دینامیکی اتم های کربن آلفا در ساختار، حاوی اطلاعات کافی جهت بررسی حرکت های مهم در پروتئین ها بوده و منعکس کننده حرکت های کلی ساختار است. بنابراین ریشه میانگین مربعات نوسان (Root Mean Square Fluctuation) اتم های کربن آلفا جهت بررسی حرکت ها و انعطاف پذیری ساختاری در نظر گرفته شد. در این قسمت یک مقایسه انعطاف پذیری ساختاری بین دو حالت پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند صورت گرفت (شکل ۴). لازم به ذکر است که Protein نشان دهنده پروتئین در عدم حضور لیگاند و Complex مربوط به نمودار پروتئین در حالت

کمپلکس می باشد. در هر دو شبیه سازی مقدار RMSF از ناحیه پایدار (۲۰ نانوثانیه انتهایی شبیه سازی) محاسبه شد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود در حضور لیگاند مقدار انعطاف پذیری در برخی نواحی از پروتئین به شکل چشمگیری کاهش یافته است و تنها در ناحیه آمینواسیدهای شماره ۲۴۸-۲۵۵ مقدار انعطاف پذیری پروتئین در حضور لیگاند نسبت به پروتئین تنها افزایش یافته است. نواحی از پروتئین که در حضور لیگاند میزان انعطاف پذیری آنها نسبت به پروتئین آزاد کاهش یافته است عبارتند از: آمینواسیدهای شماره ۶۰-۷۰ و ۱۴۲-۱۵۲. جهت مطالعه بیشتر دلیل کاهش انعطاف پذیری نواحی مذکور در حالت کمپلکس، این نواحی در ساختار سه بعدی پروتئین (شکل ۵) نشان داده شده اند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می شود دو ناحیه دارای انعطاف پذیری پایین در ناحیه اتصال لیگاند قرار دارند و درواقع می توان چنین گفت که اتصال لیگاند به پروتئین باعث کاهش انعطاف پذیری این نواحی شده است.



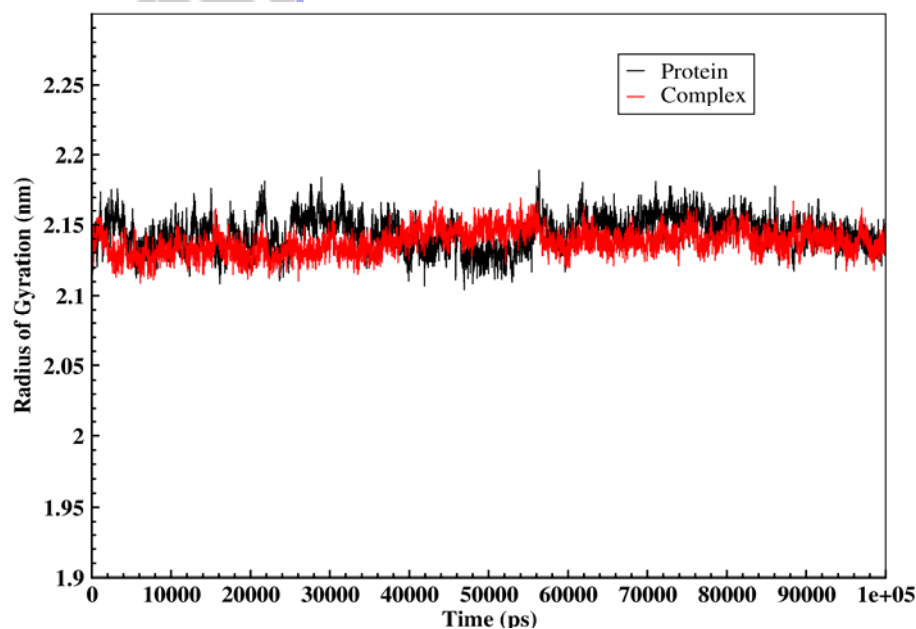
شکل ۴- مقایسه میزان انعطاف پذیری (RMSF) آمینواسیدهای پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند



شکل ۵- نواحی دارای انعطاف پذیری پروتئین در حالت کمپلکس نسبت به حالت آزاد

ج- شعاع ژیراسیون (Radius of Gyration)

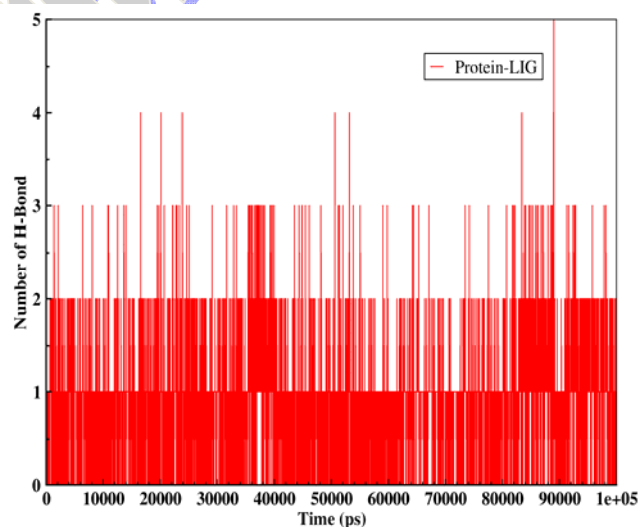
شعاع ژیراسیون یکی از پارامترهای های مهم در بررسی و مطالعه تغییرات فشردگی پروتئین در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی می باشد. هر قدر که در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی میزان شعاع ژیراسیون کاهش پیدا کند نشان دهنده فشرده تر شدن پروتئین می باشد و بالعکس با افزایش میزان شعاع ژیراسیون اندازه پروتئین نیز بیشتر شده و به تعبیری پروتئین بازتر می باشد. در شکل ۶ تغییرات اندازه پروتئین در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی برای پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۶ مشاهده می شود شعاع ژیراسیون پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند تغییر چشمگیری را نداشته و بعد از زمان حدود ۸۰۰۰۰ پیکوثانیه دو نمودار کاملاً روی هم منطبق شده اند. همچنین اندازه متوسط پروتئین در هر دو شبیه سازی در حالت تنها و کمپلکس بترتیب برابر با ۲/۱۴۴ و ۲/۱۴۰ نانومتر می باشد. در واقع مقایسه اندازه میانگین شعاع ژیراسیون نشان می دهد که در حضور لیگاند اندازه شعاع ژیراسیون پروتئین تغییر محسوسی را نشان نمی دهد.



شکل ۶- تغییرات شعاع ژیراسیون پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی

د-تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند در طول شبیه سازی

بالا بودن تعداد میانکنش های گیرنده با لیگاند نشان دهنده پایداری لیگاند در جایگاه خود روی پروتئین می باشد. به همین دلیل یکی از فاکتورهای مهم در پایداری لیگاند در جایگاه اتصال روی پروتئین، بررسی تعداد میانکنش های هیدروژنی می باشد. میانکنش هیدروژنی در واقع بین یک گروه عاملی دهنده هیدروژن و یک گروه گیرنده هیدروژن تشکیل می شود. در اتصال لیگاند به پروتئین در ابتدای شبیه سازی دینامیک مولکولی، لیگاند تا زمانی تغییر جایگاه می دهد که بتواند بیشترین میانکنش را با پروتئین برقرار کند. این میانکنش ها شامل میانکنش واندروالس، الکترواستاتیک و هیدروژنی می باشد. در شکل ۷ تغییرات تعداد میانکنش های هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می شود تعداد میانکنش های هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند در اکثر مواقع شبیه سازی بین ۱ و ۲ عدد میانکنش نوسان را نشان می دهد. همچنین طبق این نمودار در برخی از زمان تعداد میانکنش ها به ۳ و در مواقع کم نیز به ۴ و ۵ میانکنش رسیده است و به طور میانگین ۱/۱۲ میانکنش در زمان پایدار شبیه سازی دینامیک مولکولی (۲۰۰۰۰ پیکوثانیه انتهای شبیه سازی) تشکیل شده است.



شکل ۷- تغییرات تعداد میانکنش های هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند در طول زمان شبیه سازی دینامیک مولکولی

ه-آنالیز حرکت های اصلی درون مولکولی (Principal Component Analysis)

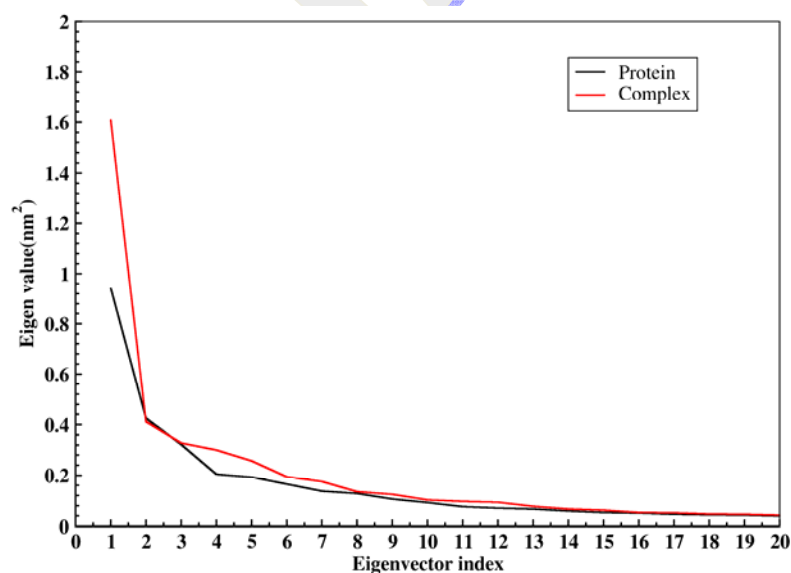
شبیه سازی دینامیک مولکولی به ما این امکان را می دهد که بتوانیم رابطه بین دینامیک و عملکرد پروتئین ها را مورد ارزیابی و مطالعه قرار دهیم. عوامل مختلف مانند تغییرات دمایی، جهش زایی و سایر فاکتورها می توانند روی حرکات قسمت های مختلف پروتئین تأثیر گذار باشند. برای بررسی حرکات اصلی و ضروری درون مولکولی، آنالیز تجزیه به مؤلفه های اصلی (PCA) یکی از قویترین و مهمترین تکنیک های موجود می باشد. در ادامه برای آنالیز دقیق تر شبیه سازی پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند، و همچنین پیش بینی حرکات هماهنگ بزرگ (large-scale collective motions) روش PCA مورد استفاده قرار گرفت. مؤلفه های اصلی (PC) پروتئین به وسیله ماتریکس کوواریانس بردارهای ویژه و تغییر در طول تراژکتوری حاصل از شبیه سازی تعریف می شود. در شکل ۸ نمودار مقادیر ویژه (eigenvalue) بدست آمده از مورب سازی (diagonalization) ماتریکس کوواریانس نوسان های اتم های بدنه (back bone) در پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند برای هر بردار ویژه (eigenvector) نشان داده شده است.

همانطور که در شکل ۸ مشاهده می شود مقادیر eigenvalue مربوط به حرکات هماهنگ و بزرگ بوده که به سرعت دامنه آن کاهش یافته و در بردار های ویژه بعدی نشان دهنده حرکات محدود و محلی کوچک در پروتئین می باشد. همانطور که در بالا ذکر شده است به هر کدام از مقادیر eigenvalue به ازای هر بردار ویژه یک PC گفته می شود. همانطور که در شکل ۸ مشاهده می شود در دو PC اول که PC1 و PC2 گفته می شود بیشترین دامنه حرکات ممکن مشاهده می شود. طبق این شکل دامنه حرکات در PC1 برای پروتئین در دو شبیه سازی در حالت آزاد و کمپلکس بترتیب برابر با ۱/۶۱ و ۰/۹۴۲ نانومتر مربع می باشد و این در حالی است که در PC2 در هر دو شبیه سازی مقدار دامنه حرکات تقریباً یکسان بوده و بترتیب برابر با ۰/۴۱۲ و ۰/۴۲۵ نانومتر مربع می باشد. درواقع از نمودار می توان چنین نتیجه گیری کرد که دامنه حرکات در PC1 در عدم حضور لیگاند بسیار بالا می باشد.

در ادامه جهت بررسی بهتر دامنه و گستردگی حرکتی پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در فضای فاز (phase space)، تراژکتوری های بدست آمده از دو PC اول (PC1 و PC2) به صورت نمودار دو بعدی و تصاویر سه بعدی در شکل ۹ نشان داده شده است. فضای فاز به فضایی گفته می شود که در آن تمام حالت های ممکن برای یک سیستم (پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند) نشان داده می شود. در شکل ۹ الف (ستون سمت چپ) نیز تمام حالت های ممکن برای پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در دو حالت PC1 و PC2 نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می شود پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند رفتار نسبتاً متفاوتی را نشان می دهد. طبق این شکل، پروتئین در عدم حضور لیگاند در محور PC1 در دو کلاستر بزرگ مشاهده می شود و در PC2 تنها در یک کلاستر بزرگ پخش شده اند. همچنین طبق این شکل میزان پخش شدگی کنفورماسیون های مختلف پروتئین در دو PC بسیار بالا می باشد و این در حالی است که در حضور لیگاند در PC1 در دو کلاستر و در PC2 در سه کلاستر نزدیک به هم مشاهده می شود. درواقع در حضور لیگاند کلاسترها بسیار متمرکز می باشند و میزان پخش شدگی بسیار پایین می باشد.

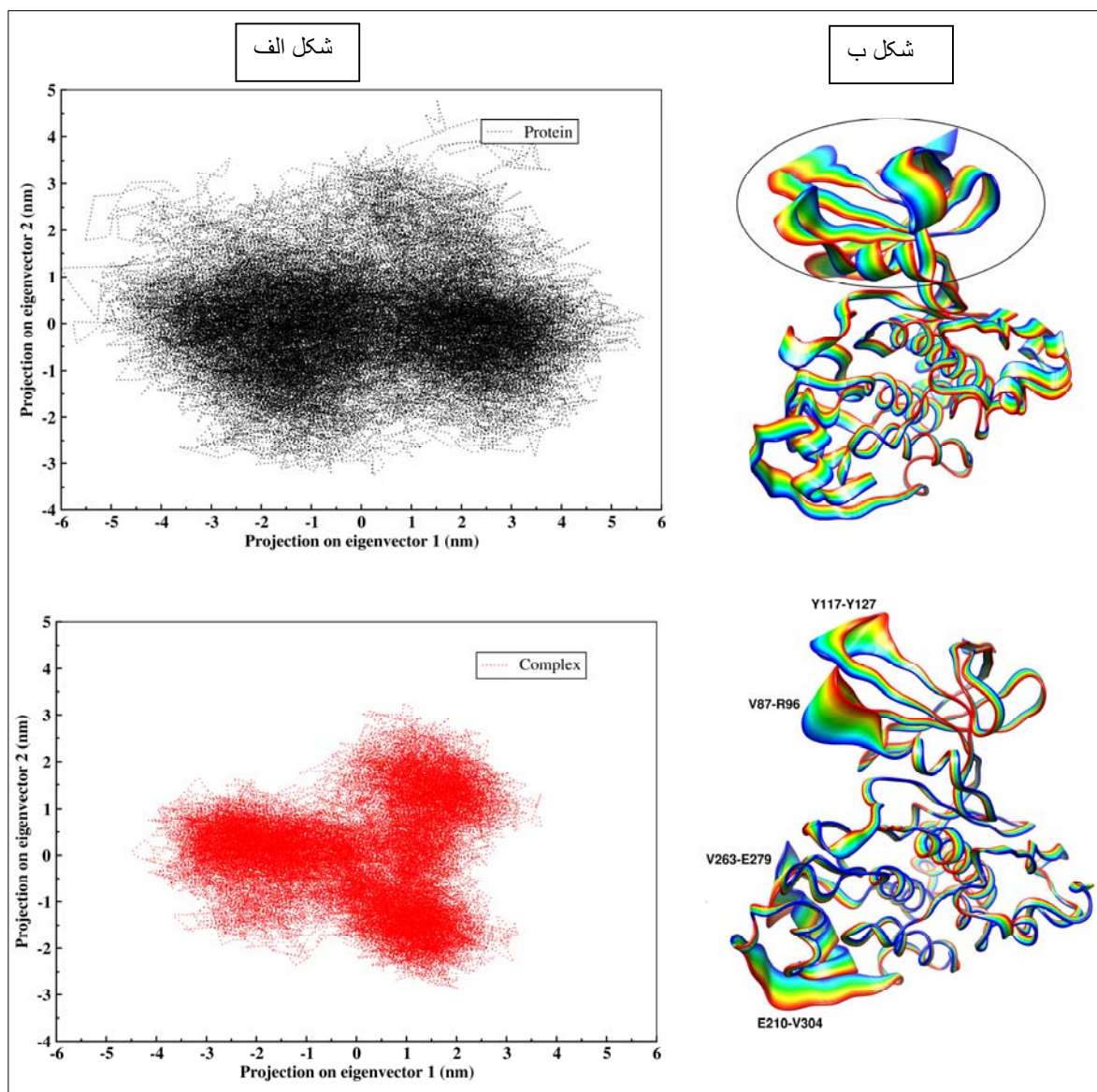
در شکل ۹ ب (ستون سمت راست) نواحی دارای دامنه حرکتی بالا در ساختار سه بعدی پروتئین نشان داده شده است. همانطور که در این شکل مشاهده می شود در عدم حضور لیگاند، دمین کوچک پروتئین (با دایره نشان داده شده است) دامنه حرکتی بسیار بالایی را نشان می دهد، این در حالی است که حضور لیگاند در این دمین تنها در دو ناحیه ۱۲۷-۱۱۷ و ۹۶-۸۷ دامنه حرکتی بالا می باشد و در بقیه نواحی این دمین دامنه حرکتی آمینواسیدها بسیار پایین هست. مقایسه دمین بزرگ

پروتئین در دو حالت (حضور و عدم حضور لیگاند) نشان می‌دهد که در عدم حضور لیگاند اکثر نواحی دامنه حرکتی نسبتاً بالایی را نشان می‌دهند و این در حالی است که در حضور لیگاند تنها در دو ناحیه ۲۶۳-۲۷۹ و ۳۰۴-۳۱۰ دامنه حرکتی بسیار بالا می‌باشد و در سایر نواحی دامنه حرکتی بسیار پایین هست. درواقع از این تصاویر می‌توان چنین استنتاج کرد که در عدم حضور لیگاند اکثر نواحی پروتئین دامنه نوسان بالایی را دارا می‌باشد و در حضور لیگاند نواحی پرحرکت در نواحی مشخصی متمرکز شده است و درواقع همین عوامل باعث شده‌اند که در عدم حضور لیگاند کنفورماسیون‌های مختلف پروتئین در فضای فاز بسیار پخش باشند و در حضور لیگاند در کلاسترهای بسیار متمرکز قرار گیرند (شکل ۹ الف). همچنین در شکل ۱۰ مقدار انعطاف پذیری آمینواسیدها در فضای PC1 نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود در عدم حضور لیگاند آمینواسیدهای ۳۵-۱۱۵ انعطاف پذیری بسیار بالایی را نشان می‌دهند. همچنین آمینواسیدهای شماره ۱۵۰-۱۳۵، ۲۱۰-۱۸۰ و ۲۹۵-۲۷۵ مقدار انعطاف پذیری نسبتاً بالایی را نسبت به حالت کمپلکس نشان می‌دهند. در حالت کمپلکس تنها در ۴ ناحیه (که در شکل ۹ ب نیز اشاره شده است) مقدار انعطاف پذیری پروتئین بسیار بالا می‌باشد.



شکل ۸- نمودار مقادیر ویژه در برابر شاخص بردار ویژه مربوطه که از ماتریکس کوواریانس نوسان اتم‌های بدنه در طول شبیه‌سازی بدست آمده

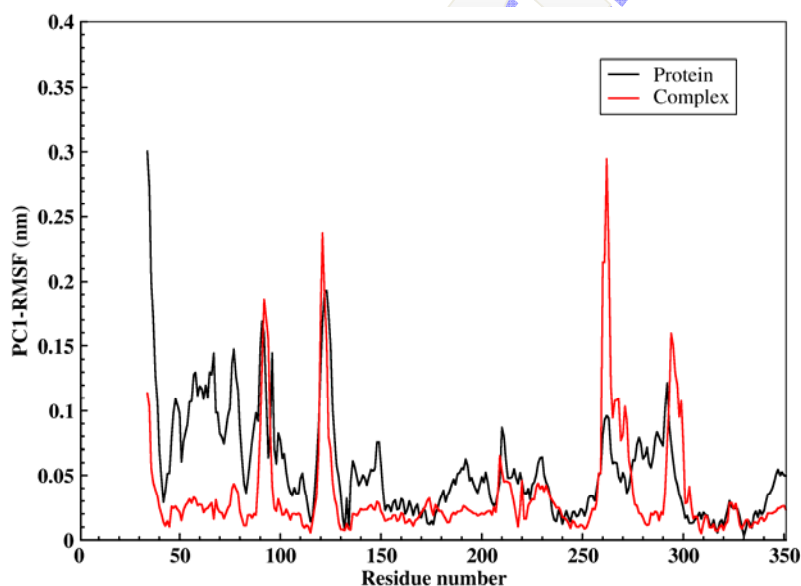
است



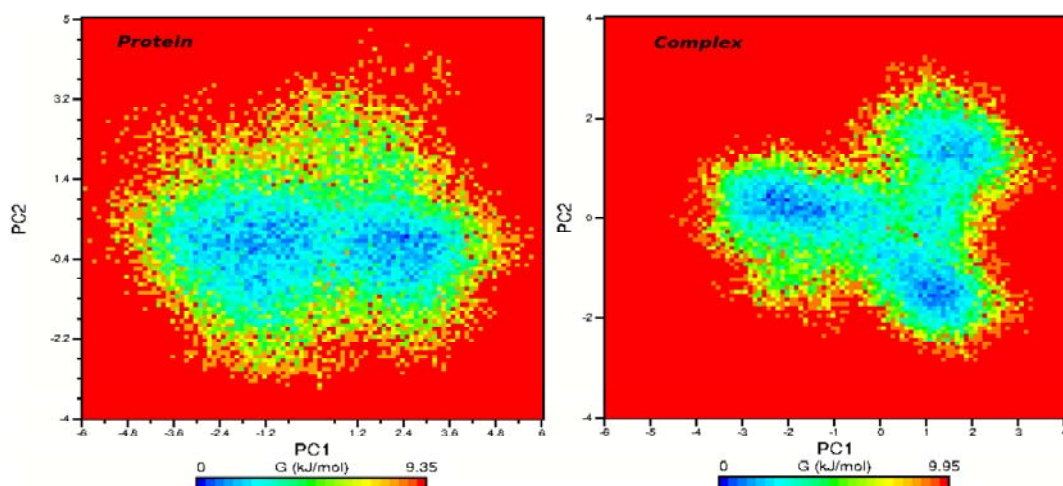
شکل ۹- نمودار PCA مربوط به فضای فاز پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در PC1 و PC2

ع-چشم انداز انرژی آزاد گیبس (Gibbs Free Energy Landscape)

چشم انداز انرژی آزاد گیبس یکی از بهترین فاکتورها برای نشان دادن کنفورماسیون پایدار سیستم های شبیه سازی می باشد. همانطور که در شکل ۱۱ مشاهده می شود نقاط آبی رنگ مربوط به نواحی با کمترین انرژی می باشند و هر چقدر که به سمت قرمز حرکت می کنیم از مقدار پایداری کاسته می شود. همانطور که در این شکل مشاهده می شود در پروتئین آزاد کنفورماسیون های پایدار (رنگ آبی) در دو کلاستر به صورت پخش شده می باشند و این در حالی است که در حالت کمپلکس در سه کلاستر و در نقاط نزدیک هم قرار گرفته اند. همچنین طبق این شکل در حالت آزاد کنفورماسیونهای زیادی در نواحی زرد رنگ پخش شده اند. درواقع از این نمودار می توان چنین نتیجه گرفت که اتصال مولکول لیگاند باعث کاهش انعطاف پذیری (شکل ۱۰) و افزایش پایداری پروتئین شده است.



شکل ۱۰- نمودار RMSF پروتئین در PC1 در حضور و عدم حضور لیگاند



شکل ۱۱- چشم انداز انرژی آزاد گیبس برای دو مولفه اصلی (PC1 و PC2) حاصل از آنالیز PCA در پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند

خ-بررسی ساختار دوم

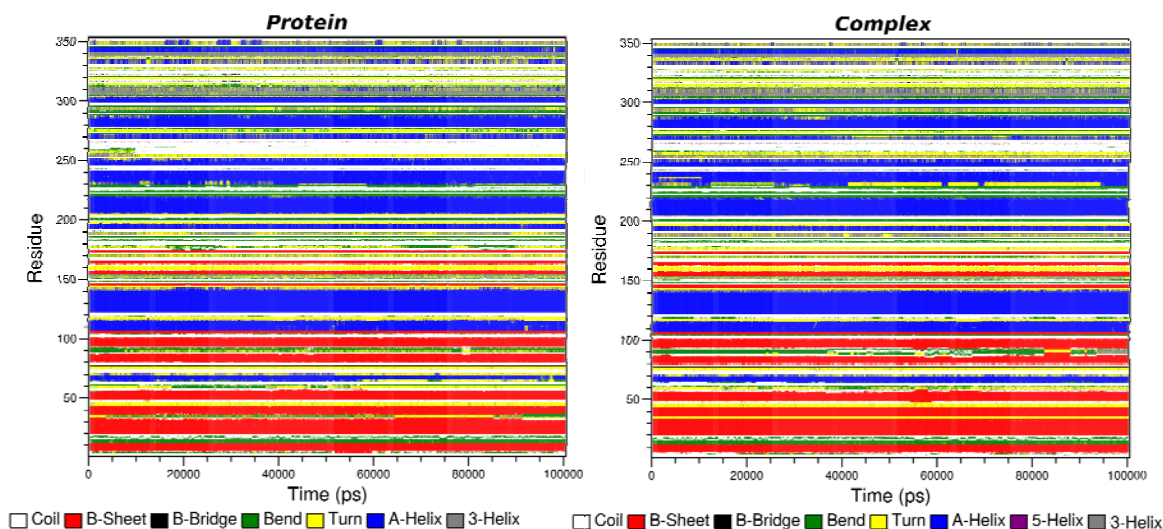
بررسی و مطالعه تغییرات ساختار دوم پروتئین یکی از فاکتورهای مهم در آنالیز تاثیرپذیری در حضور عوامل مختلف می باشد. هر چقدر میزان تغییر ساختار دوم پروتئین ها کمتر باشد نشان دهنده پایداری پروتئین است. ساختارهای دوم به دو نوع منظم و نامنظم تقسیم می شوند که ساختار دوم منظم شامل مارپیچ آلفا، صفحه بتا، مارپیچ پای و غیره می باشد. در حال حاضر یکی از دقیق ترین نرم افزارها در آنالیز ساختار دوم، نرم افزار *DSSP* می باشد. این نرم افزار به ما این امکان را می دهد که بتوانیم تغییرات ساختاری در طول زمان در شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد سنجش قرار دهیم. در این بخش تغییرات ساختار دوم آمینواسیدهای مختلف در ساختار پروتئین در طول زمان مورد آنالیز قرار گرفتند (شکل ۱۲). ساختارهای دومی که در این بخش مورد مطالعه قرار گرفته اند عبارتند از: مارپیچ آلفا، صفحات بتا، مارپیچ پای، مارپیچ ۳۱۰، Turn، bend، beta-bridge و coil.

همانطور که در شکل ۱۲ مشاهده می شود اکثر آمینواسیدها در ساختار پروتئین دارای ساختار دوم منظم مانند مارپیچ آلفا (رنگ آبی) و صفحات بتا (رنگ قرمز) هستند. بر اساس این شکل تنها نقاط محدودی از پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند، دارای ساختاری coil (رنگ سفید) و turn (رنگ زرد) می باشد. طبق شکل ۱۲ در هیچکدام از حالت ها ساختار دوم پروتئین تغییر محسوسی نشان نمی دهد. در جدول ۲ میانگین ساختار دوم پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود تفاوت محسوسی بین فراوانی ساختار دوم در حضور و عدم حضور لیگاند مشاهده نمی شود.

جدول ۲- فراوانی ساختار دوم مختلف پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند

Structure	Coil	B-Sheet	B-Bridge	Bend	Turn	A-Helix	3Helix
-----------	------	---------	----------	------	------	---------	--------

پروتئین	0/59	0/26	0/19	0/00	0/10	0/13	0/28	0/05
کمپلکس	0/59	0/25	0/18	0/01	0/10	0/14	0/27	0/06



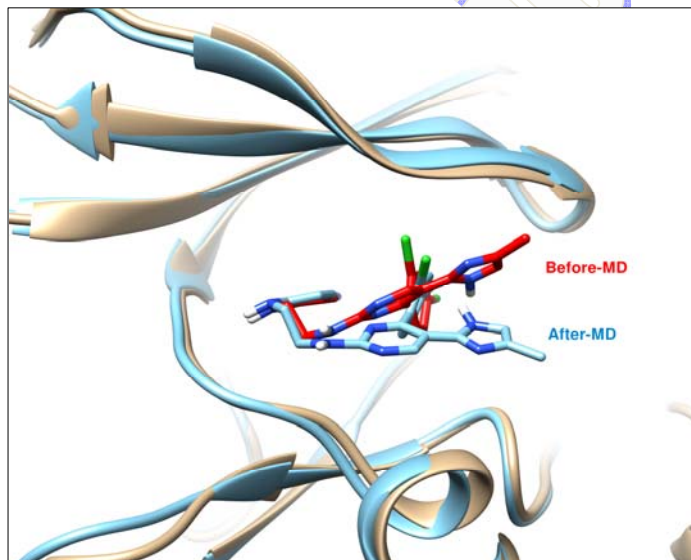
شکل ۱۲- تغییرات ساختار دوم پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در طول زمان شبیه سازی

ل- پارامترهای ترمودینامیکی

انرژی آزاد اتصال بین لیگاند با پروتئین در ناحیه پایدار نمودار RMSD مورد محاسبه قرار گرفت. با توجه به نمودار RMSD (شکل ۳)، بعد از اینکه ساختار به پایداری رسید از مرحله production و طی دوره پایدار، ۴۰۰ ساختار جهت محاسبه انرژی اتصال در نظر گرفته شدند که نتایج آن در جدول ۳ آورده شده است. آنالیز جزئی تر از اجزای انرژی نشان داد که انرژی واندروالس بیشترین سهم را در اتصال لیگاند به پروتئین دارد. در این جدول، اجزای مختلف انرژی اتصال مانند انرژی واندروالس، الکترواستاتیک، حلال پوشی قطبی و غیره نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود مقدار انرژی واندروالس برابر با ۲۲۴/۳۵۹- کیلوژول بر مول می باشد که نشان دهنده نقش مهم این نوع میانکشی در اتصال لیگاند به پروتئین می باشد. همچنین طبق این جدول مقدار انرژی الکترواستاتیک برابر با ۳۳/۷۱۰- کیلوژول بر مول است که در مقایسه با میانکشی های واندروالسی نقش مختصری را در اتصال دارا می باشد. همچنین طبق این جدول مقدار انرژی حلال پوشی قطبی ۱۱۹/۹۳۸ کیلوژول بر مول می باشد. مقدار انرژی حلال پوشی غیرقطبی نیز برابر با ۲۰/۳۱۳- کیلوژول بر مول می باشد. در شکل ۱۳ نیز تغییرات کنفورماسیونی مولکول لیگاند قبل و بعد از شبیه سازی نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱۳ مشاهده می شود در انتهای شبیه سازی مولکول لیگاند تغییر مختصری را نسبت به حالت شروع نشان می دهد و درواقع اندکی به سمت پایین حرکت کرده است.

جدول ۳- انرژی آزاد اتصال بین لیگاند و پروتئین

ΔG_{vdw}	ΔG_{elec}	$\Delta G_{\text{solv-polar}}$	$\Delta G_{\text{solv-nonpol}}$	ΔG_{MMPBSA}	kJ/mol
-۲۲۴/۳۵۹	-۳۳/۷۱۰	۱۱۹/۹۳۸	-۲۰/۳۱۳	-۱۵۸/۴۴۵	کمپلکس



شکل ۱۳- تغییرات کنفورماسیونی لیگاند قبل (قرمز) و بعد (آبی) از شبیه سازی دینامیک مولکولی

۳- پارامترهای ADMET ریز مولکول CHIR99021

در ارزیابی های ADMET برخی از خصوصیات فارماکوکینتیک ریز مولکول های CHIR99021 اعم از میزان انحلال پذیری در آب، میزان جذب از روده، قابلیت نفوذپذیری از پوست (Qplog Kp) پیش بینی شده است. سایر خصوصیات فارماکوکینتیک کلیدی ترکیب CHIR99021 در جدول ۴ خلاصه شده است.

جدول ۴- خصوصیات ADMET یا فارماکوکیتیک ریز مولکول های CHIR99021

خصوصیات ۹۵٪ داروها	CHIR99021	خصوصیات ADMET
Molecular Weight	465.344	130.0- 725.0
Total SASA (Solvent Accessible Surface Area)	673.371	300.0 -1000.0
Hydrophobic SASA	167.492	0.0 - 750.0
Hydrophilic SASA	142.113	7.0 - 330.0
Carbon Pi SASA	269.187	0.0 - 450.0
Weakly Polar SASA (WPSA)	94.580	0.0 -175.0
Molecular Volume ($\text{\AA}^3$)	1282.826	500.0 - 2000.0
vdW Polar SA (PSA)($\text{\AA}^2$)	106.551	7.0 - 200.0
No. of Rotatable Bonds	8.000	0.0 - 15.0
Solute Globularity (Sphere = 1)	0.848	0.75 - 0.95
log P for hexadecane/gas	14.363	4.0 -18.0
log P for octanol/gas	23.281	8.0 -35.0
log P for water/gas	13.695	4.0 - 45.0
log P for octanol/water	3.847	-2.0 - +6.5
log S for aqueous solubility (mol.dm ⁻³)	-6.017	-6.5 - +0.5
log K _{hsa} Serum Protein Binding	0.356	-1.5 - +1.5
log BB for brain/blood barrier	-1.004	-3.0 - +1.2
No. of Primary Metabolites	3	1.0 -8.0
HERG K ⁺ Channel Blockage: log IC ₅₀	-5.277	concern below -5
Apparent Caco-2 Permeability (nm/s)	444	<25 poor, >500 great
Apparent MDCK Permeability (nm/s)	679	<25 poor, >500 great
log K _p for skin permeability (K _p in cm/h)	-2.422	
J _m , max transdermal transport rate (μg/cm ² .h)	0.002	
Lipinski's Rule of 5 Violations	0	maximum is 4
Jorgensen's Rule of 3 Violations	1	maximum is 3
% Human Oral Absorption in gastrointestinal (GI)	97	<25% is poor
Total QPlog Po/w (Lipophilicity)	3.847	
Total -log S	6.017	
Total log P MDCK (Madin-Darby Canine Kidney)	2.832	

نتیجه گیری

ترکیبات شیمیایی ریز مولکول که قادر به مهار فعل و انفعالات بین پروتئین های خاص هستند، مدتهاست که به یک رویکرد امیدبخش برای تنظیم سرنوشت سلولهای بنیادی و تمایز مستقیم برای اهداف بالینی تبدیل شده اند. پیش بینی برهمکنش این ترکیبات و بررسی خصوصیات فارماکوکیتیک این ریز مولکول ها با پروتئین های هدفشان از طریق شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) می تواند مکانیسم دقیق عملکرد آنها را شناسایی کرده و راه را برای انتخاب مهارکننده های قوی و مناسب هموار سازد. بدین ترتیب، ما نشان دادیم که اتصال CHIR99021 به پروتئین GSK3 β دارای یک کنفورماسیونی است که از کنفورماسیون ساختار پروتئین در حالت آزاد متفاوت است. تجزیه و تحلیل شبیه سازی *in silico* نشان داد که ترکیب CHIR99021 اثرات دارویی خود را از طریق برهمکنش با ریشه های اسید آمینه اصلی اعمال می کند و ایده ای در مورد شبیه سازی انرژی آزاد CHIR99021 در محل عملکردی GSK3 β ارائه می دهد. داده های ارائه شده در

اینجا نشان می دهد که کمپلکس لیگاند-پروتئین سبب کاهش انعطاف پذیری پروتئین در دو ناحیه اصلی در جایگاه فعال پروتئین $GSK3\beta$ شامل Tyr60-Val70 و Val142-Thr152 و در نتیجه سبب مهار فعالیت بیولوژیکی آن می شود. علاوه بر این، برهمکنش واندروالس نقش اصلی را در اتصال $GSK3\beta$ به CHIR99021 داشت. قانون Jorgensen's Rule of 3 violations (برای پیش بینی و بهینه سازی فعالیت ترکیب شیمیایی) برای CHIR99021 کمتر از ۱ بود که نشان دهنده مناسب بودن آن برای فعالیت های بیولوژیکی است. براساس قانون ۵ گانه لیپینسکی، CHIR99021 دارای فعالیت زیست شناسی دارویی خاصی است تا در مقایسه با سایر مهارکننده های $GSK3\beta$ به یک ترکیب فعال عملکردی تبدیل شود. در مجموع، می توان نتیجه گرفت که اتصال CHIR99021 به $GSK3\beta$ اثر قابل توجهی بر میزان سختی پروتئین و مهار خواص عملکردی زیستی آن دارد. این یافته یک الگوی جدید برای تأثیر CHIR99021 بر روی ساختار $GSK3\beta$ تعیین می کند و امکان طراحی یک ریز مولکول اختصاصی تر برای $GSK3\beta$ را فراهم می کند.

منابع

۱. Krishnankutty, A., et al., *In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-15.
۲. Racaud-Sultan, C. and N. Vergnolle, *GSK3 β , a Master Kinase in the Regulation of Adult Stem Cell Behavior*. Cells, 2021. **10**(2): p. 225.
۳. Patel, P. and J.R. Woodgett, *Glycogen synthase kinase 3: a kinase for all pathways?* Current topics in developmental biology, 2017. **123**: p. 277-302.
۴. Liu, K., et al., *Chemical modulation of cell fate in stem cell therapeutics and regenerative medicine*. Cell chemical biology, 2016. **23**(8): p. 893-916.
۵. Laco, F., et al., *Selection of human induced pluripotent stem cells lines optimization of cardiomyocytes differentiation in an integrated suspension microcarrier bioreactor*. Stem cell research & therapy, 2020. **11**(1): p. 1-16.
۶. Qiu, X.X., et al., *Rapamycin and CHIR 99021 Coordinate Robust Cardiomyocyte Differentiation From Human Pluripotent Stem Cells Via Reducing p53-Dependent Apoptosis*. Journal of the American Heart Association, 2017. **6**(10): p. e005295.
۷. Huang, J., et al., *Activation of Wnt/ β -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-12.
۸. Wang, H., J. Hao, and C.C. Hong, *Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling*. ACS chemical biology, 2011. **6**(2): p. 192-197.
۹. Tortelote, G.G., et al., *Complexity of the Wnt/ β -catenin pathway: Searching for an activation model*. Cellular Signalling, 2017. **40**: p. 30-43.

۱۰. Kadari, A., et al., *Robust generation of cardiomyocytes from human iPS cells requires precise modulation of BMP and WNT signaling*. Stem cell reviews and reports, 2015. **11**(4): p. 560-569.
۱۱. Alder, B.J. and T.E. Wainwright, *Phase transition for a hard sphere system*. The Journal of chemical physics, 1957. **27**(5): p. 1208-1209.
۱۲. Bennett, C.H., *Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data*. Journal of Computational Physics, 1976. **22**(2): p. 245-268.
۱۳. Berendsen, H., *Report of CECAM Workshop: models for protein dynamics*. Orsay, May, 1976. **24**.
۱۴. Bowers, K., et al., *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*. Tampa, Florida, November, 2006: p. 11-17.
۱۵. Bowman, G.R., V.A. Voelz, and V.S. Pande, *Atomistic folding simulations of the five-helix bundle protein λ 6-85*. Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(4): p. 664-667.
۱۶. Boyce, S.E., et al., *Predicting ligand binding affinity with alchemical free energy methods in a polar model binding site*. Journal of molecular biology, 2009. **394**(4): p. 747-763.
۱۷. Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs*. Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
۱۸. Chong, L.T., et al., *Molecular dynamics and free-energy calculations applied to affinity maturation in antibody 48G7*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999. **96**(25): p. 14330-14335.
۱۹. Christen, M., et al., *The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05*. Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1719-1751.
۲۰. Duan, Y. and P.A. Kollman, *Pathways to a protein folding intermediate observed in a 1-microsecond simulation in aqueous solution*. Science, 1998. **282**(5389): p. 740-744.
۲۱. Essmann, U., et al., *A smooth particle mesh Ewald method*. The Journal of chemical physics, 1995. **103**(19): p. 8577-8593.
۲۲. davari, k., et al., *Inhibitor discovery against beta lactamase CTX-M-9 from E.coli by molecular docking, MM/PBSA and molecular dynamics studies*. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 2019. **32**(1): p. 19-31.
۲۳. Abidi, M., *The effect of pH changes on the unfolding force of titin immunoglobulin domain I27 using steered molecular dynamic simulation*. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 2019. **32**(2): p. 219-229.
۲۴. Mehrnejad, F., et al., *Molecular Dynamics Simulation of Acetylcholinesterase in the Presence of Gold Nanoparticles*. Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 2020: p- .
۲۵. Bocci, G., et al., *ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-13.

۲۶. Doogue, M.P. and T.M. Polasek, *The ABCD of clinical pharmacokinetics*. 2013, Sage Publications Sage UK: London, England.
۲۷. QikProp, version 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, Release 2015-2
۲۸. Lipinski, C.A., et al., *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced drug delivery reviews, 1997. **23**(1-3): p. 3-25.

Study of structural and dynamic changes of GSK3 β protein in the presence of CHIR99021 ligand using molecular simulation and docking

Javad Kazemi¹, Hosein Shahsavarani^{2,3*}, Parviz Pakzad¹, Mohammadali Shokrgozar^{2,4*}

¹ Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

³ Laboratory of Regenerative Medicine and Biomedical Innovation, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

⁴ Department of National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

***corresponding author's email:** Dr. Hosein Shahsavarani, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran & Laboratory of Regenerative Medicine and Biomedical Innovations, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran; P.O. Box 48168-194, **Tel:** +98-9194873566; hosein.shahsavarani@gmail.com; Dr._Mohammadali.Shokrgozar@pasteur.ac.ir **Email:** mashokrgozar@pasteur.ac.ir

Abstract

Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β) is a multifunctional serine/threonine kinase that play as a bottleneck protein in the WNT signaling pathway in various functions of pluripotent stem cells (PSCs) such as Self-renewal, survival and differentiation. Since the inhibition of GSK3 β leads to the differentiation of PSCs, the use of appropriate inhibitors that inhibit GSK3 β at lower concentrations can be economically affordable. One of the most important inhibitors is CHIR99021, which can improve the culture and differentiation systems of PSCs. Present study aimed to investigate the molecular dynamics (MD) simulation such as Root Means Square Deviation (RMSD), Root Means Square fluctuation (RMSF), number of hydrogen bonds, principal component analysis (PCA), radius of gyration, Gibbs free energy landscape, in the presence and absence of CHIR99021 were evaluated and the stability and structural changes of GSK3 β protein were simulated using *GROMACS 2021.1* software. In addition, the pharmacokinetic properties of this compound were predicted using *Schrödinger*, LLC, New York, NY, Release 2015-2 software. The results of these studies showed that CHIR99021 binds to the active site of GSK3 β through

hydrogen bonding and produces its inhibitory effect, thus causing instability of the GSK3 β structure. Docking and computational analysis confirmed that this chemical compound can be effectively used for directing cell fate and differentiation of PSCs.

Keywords: pluripotent stem cells (PSCs); CHIR99021; GSK3 β ; ADMET; molecular dynamics (MD) simulation; Molecular docking

Preproof Article