

## توالی RGD اتصال پپتیدهای مشتق از کلاژن IV به اینتگرین‌ها را بهبود می‌بخشد: یک مطالعه *in silico*

ریحانه چمنی<sup>۱\*</sup>، محسن نم‌نبات<sup>۱</sup>، محمد حسین طالقانی<sup>۱</sup> و آیلار ایمان‌پور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ایران، یزد، دانشگاه یزد، گروه زیست‌شناسی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، شبکه جهانی آموزش و پژوهش علمی (USERN)، گروه پزشکی بازساختی (REMED)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

### چکیده

این‌تگرین‌های متصل شونده به RGD گیرنده‌هایی هستند که در تومورهای مختلف بیش از حد بیان شده و نقش مهمی در رشد، رگرایی و متاستاز آنها دارند. از این رو، طراحی بازدارنده‌های حاوی RGD برای مهار این‌تگرین‌ها و درمان سرطان بسیار مورد توجه بوده است. آرستین، کانستاتین و تومستاتین، مهارکننده‌های رگرایی مشتق از کلاژن IV، از طریق اتصال به این‌تگرین‌ها و مهار پیام‌رسانی آنها عمل می‌کنند. در مطالعه‌ای نشان داده شد که پپتیدهای مشتق از آرستین (A)، کانستاتین (C) و تومستاتین (T) قادر به مهار رگرایی و رشد تومور بوده و پپتید C فعالتر از دو پپتید دیگر می‌باشد. در مطالعه حاضر، توالی RGD به انتهای پپتیدهای مذکور اضافه شد و ساختار آنها بکمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و برهمکنش آنها با این‌تگرین‌های  $\alpha\beta3$ ،  $\alpha\beta6$ ،  $\alpha\beta8$ ،  $\alpha5\beta1$  و  $\alpha6\beta1$  با استفاده از نرم‌افزار اتوداک ۴ بررسی شد. نتایج نشان دادند که افزودن RGD موجب تغییر ساختارهای دوم و کاهش نوسانات ساختاری در پپتیدها می‌شود. همچنین، پپتیدهای دارای RGD با انرژی اتصال منفی تری به تمام این‌تگرین‌ها متصل شده و انرژی اتصال پپتید CRGD منفی‌تر از سایرین بود. بنابراین می‌توان پپتیدهای حاوی RGD را برای انجام بررسی‌های آزمایشگاهی بیشتر پیشنهاد نمود. در مجموع، نتایج این مطالعه می‌تواند برای طراحی مهارکننده‌های این‌تگرین در جهت مهار رگرایی و رشد تومورها سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: داکینگ مولکولی، دینامیک مولکولی، مهارکننده رگرایی، اتوداک ۴

\* نویسنده مسئول: chamani@yazd.ac.ir

### مقدمه

سلول قرار گرفته‌اند (۳۱). این‌تگرین‌ها می‌توانند به لیگاندهای خارج سلولی و یا درون سلولی متصل شده و در نتیجه قادر به پیام‌رسانی دوطرفه هستند. در پیام‌رسانی "خارج به داخل"، لیگاندهای خارج سلولی به این‌تگرین متصل شده، تغییرات ساختاری خاصی را در آن القاء کرده و این‌تگرین را فعال می‌کنند که منجر به تنظیم فرآیندهای مختلفی مانند تکثیر سلولی، مهاجرت، بقا، رگرایی، بهبود زخم، تمایز سلولی و تهاجم می‌شود. در پیام‌رسانی "داخل به خارج"، تعامل پروتئین‌های داخل سلولی با دم

این‌تگرین‌ها خانواده‌ای از گیرنده‌های گلیکوپروتئینی هستند که در اتصال سلول‌ها به ماتریکس خارج سلولی و سایر سلول‌ها نقش دارند. آنها پروتئین‌های هتروداایمری متشکل از یک زیرواحد  $\alpha$  و یک زیرواحد  $\beta$  هستند. حداقل ۱۸ زیرواحد  $\alpha$  و هشت زیرواحد  $\beta$  مختلف شناخته شده است که ۲۴ این‌تگرین مختلف در انسان را بوجود می‌آورند (۳۱). تمام این‌تگرین‌ها دارای یک دامین خارج سلولی، یک دامین گذرنده از غشا و یک دم سیتوپلاسمی کوتاه هستند. زیرواحدهای  $\alpha$  و  $\beta$  بشکل یک سر کروی با دو پا در سطح

اعمال می‌کند (۳). کانستاتین با اینتگرین‌های حاوی  $\beta 1$  (بعنوان مثال  $\alpha 1\beta 1$  و  $\alpha 3\beta 1$ ) و اینتگرین  $\alpha v\beta 5$  روی سلول اندوتلیال تعامل دارد (۳۲). علاوه بر این، القاء آپوپتوز توسط کانستاتین در هر دو نوع سلول اندوتلیال و توموری از طریق اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  و  $\alpha v\beta 5$  انجام می‌شود (۲۴). تومستاتین به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  به روشی مستقل و/یا وابسته به RGD متصل می‌شود. علاوه بر این، بنظر می‌رسد که اینتگرین  $\alpha 3\beta 1$ ،  $\alpha 1\beta 1$  و  $\alpha v\beta 5$  گیرنده‌های سطح سلول‌های اندوتلیال برای تومستاتین هستند (۱۱ و ۱۵). با این حال، اتصال این پروتئین‌ها به سایر اینتگرین‌ها هنوز مورد بررسی قرار نگرفته و اسیدآمینوهای مسئول اتصال در این پروتئین‌ها شناسایی نشده است. با توجه به مزایای پپتیدها نسبت به مولکول‌های کوچک، پروتئین‌های نوترکیب و آنتی‌بادی‌ها، محققان در حال توسعه پپتیدهای ضد‌رگزیایی و ضدسرطان هستند. در همین راستا، چندین مطالعه برای شناسایی نواحی فعال در پروتئین تومستاتین انجام شد و نتایج نشان دادند که دو پپتید همپوشان بنام‌های T3 (اسید-آمینوهای ۸۸-۶۹) و T7 (اسیدآمینوهای ۹۸-۷۴) موثرتر از سایر قطعات تومستاتین هستند (۲۳). جهش‌زایی هدفمند مشخص کرد که اسیدآمینوهای لوسین ۷۸، والین ۸۲ و آسپاراتات ۸۴ برای فعالیت ضد‌رگزیایی تومستاتین با واسطه اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  ضروری هستند (۱۱). از طرفی، گرافتون و همکاران نشان دادند که یک پپتید کوتاه‌تر حاوی تنها ۱۵ اسیدآمینو همپوشان از T7 و T3 زنده‌مانی سلول‌های اندوتلیال و رگزیایی را در شرایط آزمایشگاهی کاهش می‌دهد (۱۳). بنابراین ما در مطالعات قبلی ساختار و فعالیت پپتید ۹ اسیدآمینوای از همین قطعه حاوی لوسین ۷۸، والین ۸۲ و آسپاراتات ۸۴ را با قطعات متناظر از ارستن و کانستاتین مقایسه نمودیم. نتایج نشان دادند که این پپتیدها می‌توانند زنده‌مانی، مهاجرت و تشکیل لوله را در سلول‌های اندوتلیال و همچنین رشد تومور را در موش کاهش دهند (۶). همچنین ساختار پپتیدها با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و اتصال آنها به اینتگرین

سیتوپلاسمی، اینتگرین را فعال نموده و چسبندگی سلول به ماتریکس خارج سلولی را تنظیم می‌کند. بطور کلی، تغییر ساختاری در اینتگرین منجر به تغییر از یک ساختار خمیده و غیرفعال به یک ساختار غیرخمیده و فعال می‌گردد (۴). اینتگرین‌ها بر اساس نوع لیگاند متصل شونده، به چهار زیرخانواده شامل اینتگرین‌های الف) متصل شونده به کلاژن، ب) متصل شونده به لامینین، ج) متصل شونده به RGD و د) اختصاصی لکوسیت‌ها دسته‌بندی می‌شوند. هر هشت اینتگرین متصل شونده به RGD یعنی اینتگرین‌های  $\alpha 1\beta 1$ ،  $\alpha v\beta 1$ ،  $\alpha v\beta 3$ ،  $\alpha v\beta 5$ ،  $\alpha v\beta 6$ ،  $\alpha v\beta 8$ ،  $\alpha 5\beta 1$ ،  $\alpha 8\beta 1$  و  $\alpha IIb\beta 3$  موتیف Arg-Gly-Asp (RGD) را در لیگاندهای خود شناسایی می‌کنند (۲۵). اغلب اعضای این دسته از اینتگرین‌ها در سلول‌های توموری مختلف بیش از حد بیان می‌شوند و در رشد تومور، رگزیایی و متاستاز نقش دارند. علاوه بر این، در سایر بیماری‌ها مانند اختلالات عصبی، سپسیس، فیروز، بیماری‌های قلبی عروقی و عفونت‌های ویروسی نقش ایفا می‌کنند (۳۷). از این رو، در سال‌های اخیر مطالعات پیش‌بالینی و بالینی متعددی بر روی مهارکننده‌های اینتگرین از جمله آنتاگونیست‌های دارای موتیف RGD برای اهداف درمانی و تشخیصی انجام شده است (۲۱). کلاژن نوع IV، فراوان‌ترین جزء غشاء پایه، از یک ساختار مارپیچ هتروتریمر متشکل از زنجیره‌های  $\alpha$  مختلف ( $\alpha 1 - \alpha 6$ ) ساخته شده است. هر زنجیره  $\alpha$  از سه دامین تشکیل شده است: یک دامین کوتاه VS در انتهای آمین، یک دامین مارپیچی مرکزی و یک دامین کروی غیرکلاژنی (NC1) در انتهای کربوکسیل (۳۴). پروتئین‌هایی که بطور آنزیمی از دامین NC1 زنجیره‌های  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$ ،  $\alpha 3$  جدا می‌شوند بترتیب آرستین، کانستاتین و تومستاتین نامیده می‌شوند و مشخص شده است که اثرات ضد‌رگزیایی و ضدتوموری قوی‌ای دارند (۱۵، ۲۹، ۳۰). این پروتئین‌ها با برخی از اینتگرین‌ها تعامل دارند و مسیرهای پیام‌رسانی آنها را مهار می‌کنند. بعنوان مثال، آرستین اثرات ضد‌رگزیایی و ضدتوموری خود را از طریق تعامل با اینتگرین  $\alpha 1\beta 1$

NPT (تعداد ذرات، فشار و دمای ثابت) متعادل شدند. در نهایت، مرحله تولید در دمای ۳۰۰ درجه کلوین برای ۵۰ نانوثانیه انجام شد. داده‌ها در فواصل زمانی نیم پیکوثانیه از شبیه‌سازی‌ها استخراج شدند و مقادیر RMSF، RMSD، شعاع ژیراسیون (Rg) و DSSP بدست آمدند.

#### - شبیه‌سازی اتصال پپتیدها به اینتگرین‌ها با برنامه اتوداک ۴,۲

اتصال پپتیدها به اینتگرین‌های  $\alpha v\beta 3$  (PDB ID: 4G1M)،  $\alpha 5\beta 1$ ،  $\alpha v\beta 8$  (PDB ID: 6OM1)،  $\alpha v\beta 6$  (PDB ID: 4UM8) (PDB ID: 7NXD) و  $\alpha 6\beta 1$  (PDB ID: 7CBE) با استفاده از برنامه AutoDock 4 شبیه‌سازی شد. ساختار کریستالی گیرنده‌ها با PDB ID ذکر شده از سایت (<https://www.rcsb.org>) RCSB PDB بارگیری شدند. در این مطالعه، پپتیدهای بدون RGD مشتق از آرستین، کانستاتین و تومستاتین بترتیب با عنوان A، C و T نامگذاری شدند که از ساختار پپتیدهای حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شده در مطالعه قبل (۶) و از ساختار پپتیدهای ARGD، CRGD و TRGD حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مطالعه حاضر برای داکینگ با اینتگرین‌ها استفاده شد. توالی پپتیدها در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱: توالی اسیدآمینه‌ای پپتیدها

نام پپتید	توالی اسیدآمینه‌ای
A	LFCNINNVVC
C	LYCNP GDVC
T	LFCNVNDVC
ARGD	LFCNINNVCRGD
CRGD	LYCNP GDVCRGD
TRGD	LFCNVNDVCRGD

افزودن اتم‌های هیدروژن قطبی با جهت مناسب به گیرنده‌ها و لیگاندها و ادغام هیدروژن‌های غیرقطبی قبل از آغاز

$\alpha v\beta 3$  از طریق شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بررسی شد. بطور کلی، نتایج نشان دادند که پپتید مشتق از کانستاتین فعالتر از دو پپتید دیگر بوده و با انرژی اتصال منفی تری به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  متصل می‌شود (۶). در مطالعه حاضر، با توجه به اهمیت اینتگرین‌های متصل شونده به RGD در رگ‌زایی، رشد و تهاجم تومور، توالی RGD به انتهای پپتیدهای مشتق از آرستین، کانستاتین و تومستاتین افزوده شد و ساختار آنها بکمک شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و همینطور برهمکنش آنها با اینتگرین‌های  $\alpha v\beta 3$ ،  $\alpha v\beta 6$ ،  $\alpha 5\beta 1$  و  $\alpha 6\beta 1$  بکمک شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بررسی شد و با پپتیدهای فاقد RGD مقایسه گردید. هدف از این مطالعه پاسخ به این سوال بود که آیا افزودن RGD به توالی پپتیدها منجر به افزایش اتصال آنها به اینتگرین‌ها خواهد شد یا خیر.

#### مواد و روشها

##### - شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدها

پپتیدهای دارای RGD مشتق از آرستین، کانستاتین و تومستاتین بترتیب با عنوان ARGD، CRGD و TRGD نامگذاری شدند. ساختار اولیه این پپتیدها با استفاده از برنامه MODELLER ساخته شد و برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. شبیه‌سازی‌ها با استفاده از بسته GROMACS 4.5.5 و میدان نیروی CHARMM انجام شدند. پپتیدها در یک جعبه مکعبی حاوی آب شارژ نقطه‌ای ساده برای حلالیت قرار داده شدند. سیستم با افزودن یون‌های  $Na^+$  و  $Cl^-$  خنثی شد. در تمام شبیه‌سازی‌ها، فشار و دما با استفاده از الگوریتم Berendsen بترتیب نزدیک به مقادیر یک بار و ۳۶۰ درجه کلوین حفظ شد. سرعت اولیه اتم‌ها بطور تصادفی از توزیع ماکسول-بولتزمن در دمای اولیه بدست آمد. قبل از شروع شبیه‌سازی، کمینه‌سازی انرژی با استفاده از الگوریتم شیب‌دارترین نزول انجام شد. سپس، سیستم‌ها بمدت ۱۰۰ پیکوثانیه تحت شرایط NVT (تعداد ذرات، حجم و دمای ثابت) و ۱۰۰۰ پیکوثانیه تحت شرایط

نوسانات ریشه میانگین مربعات (RMSF) کربن‌های آلفا نشان دهنده میزان نوسانات هر اسیدآمینو در طول شبیه‌سازی است. شکل ۱ ب نشان می‌دهد که نوسانات کلی پپتید ARGD کمتر از سایرین است و اسیدآمینوهای ابتدا و انتها بیشتر از سایر اسیدآمینوها در پپتیدهای CRGD و TRGD نوسان دارند. میانگین مقادیر RMSF در طی زمان شبیه‌سازی برای ARGD، CRGD و TRGD به ترتیب ۰/۰۸، ۰/۱۷ و ۰/۲۹ آنگستروم محاسبه شد.

برای بررسی نوع ساختارهای دوم در پپتیدهای دارای RGD، میزان DSSP (ساختار دوم تعریف شده پروتئین) از شبیه‌سازی‌ها بدست آمد و درصد هر ساختار محاسبه شد. شکل ۱ ج و جدول ۲ نشان می‌دهد که ARGD بیشتر شامل پیچچه تصادفی، صفحات بتا و پیچ است، در حالی که CRGD عمدتاً از پیچچه تصادفی و پیچ تشکیل شده است. TRGD فاقد صفحات بتا و پل بتا است و بیشتر دارای پیچچه تصادفی و خمش بتا است.

مقدار شعاع ژیراسیون (Rg)، فشردگی ساختاری مولکول را نشان می‌دهد. ساختار کمتر فشرده مقدار Rg بالاتری دارد (۲۰). مقادیر میانگین Rg در طول زمان شبیه‌سازی برای ARGD، CRGD و TRGD به ترتیب ۰/۶۱، ۰/۶۲ و ۰/۸۳ نانومتر بود (شکل ۱د). مقدار Rg بالاتر برای TRGD کانفورماسیون با فشردگی کمتر را نشان می‌دهد که این مورد با نتایج RMSF و DSSP برای TRGD مطابقت دارد. این پپتید ساختار پیچچه تصادفی و نوسانات بالاتری داشته، بنابراین فشردگی کمتری دارد. مقادیر مربوط به RMSF، ساختارهای دوم و شعاع ژیراسیون در مطالعه قبلی برای پپتیدهای فاقد RGD محاسبه شده بود (۶) و در جدول ۲ جهت مقایسه با نتایج حاضر آورده شده‌اند.

#### - شبیه‌سازی داکینگ مولکولی پپتیدها با اینتگرین‌ها

از برنامه اتوداک ۴ برای بررسی و مقایسه اتصال پپتیدهای فاقد و دارای RGD به اینتگرین‌های  $\alpha\beta3$ ،  $\alpha\beta6$ ،  $\alpha\beta8$  و  $\alpha5\beta1$  استفاده شد.

داکینگ انجام شد. سپس، بارهای گاستایگر و کولمن محاسبه و اضافه شدند. فایل‌های PDB با فرمت PDBQT ذخیره شدند. در داکینگ انجام شده، پپتیدها انعطاف‌پذیر و گیرنده‌ها بدون انعطاف در نظر گرفته شدند. برای اکثر پارامترها از تنظیمات پیش فرض برنامه استفاده شد. الگوریتم بکار برده شده، ژنتیک لامارکی و تعداد اجراها ۵۰ مورد بود. از آنجایی که هیچ اطلاعاتی درباره ناحیه اتصال پپتیدها روی گیرنده‌ها وجود ندارد، برای مشخص کردن جعبه گرید، ناحیه به اصطلاح "سر" اینتگرین‌ها به چند بخش تقسیم شد و چندین داکینگ مختلف انجام شد. در نهایت، انرژی‌های اتصال کمپلکس‌های خروجی بررسی شد و کمپلکس با منفی‌ترین انرژی اتصال به عنوان بهترین مدل انتخاب شد و اسیدهای آمینو درگیر در اتصال در بهترین مدل‌ها توسط برنامه Biovia Discovery Studio 2021 تعیین شدند.

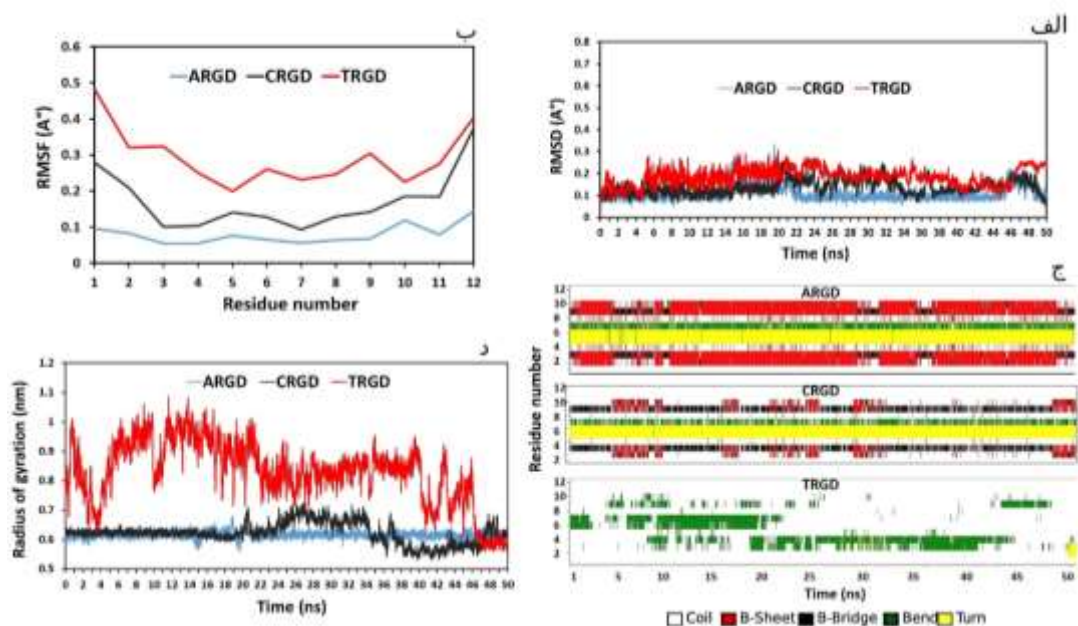
## نتایج

### - شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدهای دارای RGD

برای پاسخ به این سوال که اضافه کردن RGD چه تاثیری بر ساختار پپتیدهای مشتق از ارستن، کانستاتین و تومستاتین دارد، از روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. ابتدا پپتیدها بمدت ۵۰ نانوثانیه تحت شبیه‌سازی قرار گرفتند و در پایان پارامترهای RMSD، RMSF، DSSP، شعاع ژیراسیون (Rg) به دست آمدند. انحراف ریشه میانگین مربعات (RMSD) کربن‌های آلفای توالی پپتیدی در طول شبیه‌سازی، پایداری ساختاری مولکول را نشان می‌دهد. نتایج برای سه پپتید دارای RGD نشان دادند که شبیه‌سازی‌ها پایدار بوده و مقادیر RMSD دارای انحرافات قابل تحمل بودند. میانگین مقادیر RMSD در طول زمان شبیه‌سازی برای ARGD، CRGD و TRGD به ترتیب ۰/۱۱، ۰/۱۳ و ۰/۱۸ آنگستروم بود (شکل ۱ الف).

جدول ۲: داده‌های حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای پپتیدهای دارای RGD در مقایسه با پپتیدهای فاقد RGD

شعاع ژیراسیون (nm)	پیچ (%)	خمش بتا (%)	پل بتا (%)	صفحه بتا (%)	پیچه تصادفی (%)	RMSF (Å)	
۰/۵۸	۳۶	۹	۰	۰	۵۵	۰/۲۳	A
۰/۶۱	۱۸	۶	۵	۲۱	۵۰	۰/۰۸	ARGD
۰/۶۲	۲۱	۹	۱	۰	۶۹	۰/۲۴	C
۰/۶۲	۱۷	۶	۴	۴	۶۹	۰/۱۷	CRGD
۰/۵۷	۲۳	۱۴	۰	۰	۶۲	۰/۲۲	T
۰/۸۳	۲	۲۱	۰	۰	۷۶	۰/۲۹	TRGD



شکل ۱: شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدهای دارای RGD (الف) انحراف ریشه میانگین مربعات یا RMSD کربن‌های آلفای توالی پپتیدها در طی ۵۰ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی (ب) نوسانات ریشه میانگین مربعات یا RMSF اسیدهای آمینه پپتیدها در طی شبیه‌سازی (ج) ساختارهای دوم پپتیدها حاصل از DSSP (د) شعاع ژیراسیون یا Rg در طی شبیه‌سازی

اینتگرین‌هایی انتخاب شدند که ساختار کریستالی آنها در پایگاه RCSB PDB موجود بود و بدلیل در دسترس نبودن ساختار کریستالی سایر اینتگرین‌های زیرخانواده متصل شونده به RGD، انجام داکینگ برای آنها ممکن نبود. برای هر پپتید و گیرنده منفی‌ترین انرژی اتصال بر حسب کیلو کالری بر مول در جدول ۳ آورده شده است. با نگاهی به اعداد بدست آمده مشخص شد که از میان پپتیدهای طبیعی، پپتید مشتق از کانستاتین (پپتید C) و در بین پپتیدهای دارای RGD نیز پپتید CRGD منفی‌ترین انرژی

اتصال به تمام اینتگرین‌ها را دارد. همچنین مقایسه انرژی اتصال بین پپتیدهای فاقد و دارای RGD نشان داد که افزودن این موتیف سه اسیدآمینه‌ای به پپتیدها قدرت اتصال آنها به اینتگرین‌ها را افزایش داد. آرژینین و آسپاراتات از موتیف RGD در اتصال پپتیدها به اینتگرین‌ها بویژه  $\alpha\beta 6$  و  $\alpha\beta 8$  نقش داشتند (جدول تکمیلی ۱ تا ۵). منفی‌ترین انرژی اتصال برای هر سه پپتید دارای RGD مربوط به اتصال به اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  است و در رتبه‌های بعدی  $\alpha\beta 8$  و  $\alpha 6\beta 1$  قرار دارند.

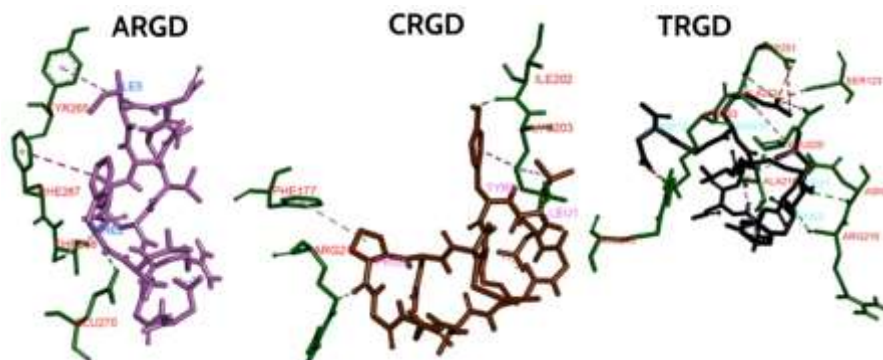
جدول ۳: انرژی اتصال پپتیدها به اینتگرین‌ها (کیلوکالری بر مول) حاصل از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با برنامه اتوداک ۴

گیرنده / پپتید	$\alpha\beta3$	$\alpha\beta6$	$\alpha\nu\beta8$	$\alpha5\beta1$	$\alpha6\beta1$
A	-۹	-۸/۷۶	-۴/۳۴	-۶/۳۵	-۷/۰۸
C	-۹/۷	-۱۰/۷۶	-۸/۶۷	-۷/۴۲	-۸/۴۸
T	-۹/۵	-۸/۲۸	-۵/۱۱	-۷/۱۳	-۷/۷۵
ARGD	-۱۱/۹۸	-۱۱/۹۳	-۱۲/۷۵	-۱۳	-۱۲/۲۴
CRGD	-۱۲/۱۶	-۱۲/۵۶	-۱۳/۱۵	-۱۳/۴۳	-۱۳/۰۶
TRGD	-۱۰/۷۰	-۱۰/۳۰	-۱۱/۸۳	-۱۱/۹۳	-۱۱/۴۴

اسیدآمینه‌های درگیر در اتصال در بهترین کمپلکس‌ها (دارای منفی‌ترین انرژی اتصال) با استفاده از برنامه دایسکاوری استودیو ۲۰۲۱ تعیین شدند که در جدول‌های تکمیلی ۱ تا ۵ و شکل‌های ۲ تا ۶ نشان داده شده‌اند.

جدول ۴: بررسی اتصال پپتیدها به اینتگرین  $\alpha5\beta1$  با اتوداک ۴ و نرم‌افزار دایسکاوری استودیو

پپتید	انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	اسیدآمینه‌های درگیر در اتصال (بترتیب از چپ به راست، اسیدآمینه در اینتگرین: اسیدآمینه در پپتید)
A	-6.35	LYS 424 : CYC 9    GLU 435 : ASN 7    LYS 424 : ASN 7 LYS 368 : CYS 3    ASN 366 : LEU1    GLU 308 : PHE 2
C	-7.42	GLN 405 : LEU 1    TYR 380 : TYR 2    GLU 403 : TYR 2 VAL 404 : TYR 2    LYS 382 : ASN 4    GLY 401 : GLY 6    ARG 78 : ASP 7    LYS 116 : ASP7    GLU 403 : GLY 6
T	-7.13	PRO 314 : PHE 2    GLY 389 : CYS 9    TYR 377 : CYS 9 ILE 375 : LEU 1    THR 411 : ASN 4    LEU 369 : LEU 1    GLU 390 : PHE 2    THR 374 : CYS 3
ARGD	-13	GLU 347 : ASN 6    GLU 347 : ASN 7    LYS 368 : ASN 7 LYS 368 : ILE 5    ARG 317 : ASN 7    LYS 368 : CYS 3
CRGD	-13.43	ASP 68 : LEU 1    LYS 67 : LEU 1    GLN 405 : PRO 5 ILE 69 : LEU 1    LYS 67 : TYR 2    LYS 114 : ASP 7
TRGD	-11.93	LYS 67 : ASP 12    THR 112 : ASP 12    THR 112 : ASP 12    GLN 405 : CYS 3    ASN 77 : ASP 7    LYS 114 : CYS 3 ASN 72 : CYS 9    LYS 67 : GLY 11    THR 112 : CYS 3



شکل ۲: بررسی اتصال پپتیدهای دارای RGD به اینتگرین  $\alpha\nu\beta3$  با استفاده از داکینگ مولکولی. رزیدوهای درگیر در اتصال در اینتگرین با رنگ سبز و شماره رزیدوهای آن با رنگ قرمز نمایش داده شده است. پپتیدها با سایر رنگ‌ها نشان داده شده‌اند. برای تهیه تصاویر از برنامه دایسکاوری استودیو استفاده شد.

جدول ۵: بررسی اتصال پپتیدها به اینتگرین  $\alpha 6\beta 1$  با اوتوداک ۴ و نرم‌افزار دیسکاوری استودیو

پپتید	انرژی اتصال (کیلوکالری بر مول)	اسیدآمینه‌های درگیر در اتصال (به ترتیب از چپ به راست، اسیدآمینه در اینتگرین: اسیدآمینه در پپتید)
A	-7.08	ARG 102 : CYS 3 PRO 63 : ILE 5 CYS 442 : PHE 2 LYS 418 : PHE 2 ARG 102 : ASN 4 CYS 415 : PHE 2 ARG 102 : ASN 7 ASP 419 : LEU1
C	-8.48	ASP 68 : LEU1 LYS 70 : TYR 2 ASN 72 : CYS 3 THR 112 : ASN 4 PRO 96 : PRO 5 LYS 114 : PRO 5 ILE 69 : LEU 1
T	-7.75	ARG 426: CYS 9 LYS 424 : CYS 9 GLN 304 : LEU 1 LYS 368 : CYS 3 LYS 368 : VAL 5 SER 422 : VAL 8 LYS 417 : ASP 7 LYS 417 : ASN 6
ARGD	-12.24	GLU 308 : LEU 1 TYR 378 : PHE 2 TYR 378 : ARG 10 ASP 380 : CYS 9 ASP 380 : VAL 8 LYS 368 : ASP 12
CRGD	-13.06	SER 420 : CYS 3 SER 422 : CYS 3 LYS 417 : CYS 3 LYS 417 : PRO 5 LYS 368 : PRO 5 SER 370 : PRO 5
TRGD	-11.44	SER 422 : CYS 3 LYS 424 : ASP 12 ASP 419 : ASP 7 LYS 417 : ASN 4 LYS 417 : ASP 7

### بحث

این‌تگرین‌ها گیرنده‌هایی هستند که در تنظیم فرآیندهای حیاتی مانند تکثیر، مهاجرت، بقا، رگزایی، بهبود زخم، تمایز، تهاجم و چسبندگی در سلول‌ها دخالت دارند (۳۷).

در دو دهه اخیر، مطالعات پیش‌بالینی و بالینی متعددی بر روی مهارکننده‌های این‌تگرین‌ها برای بیماری‌های مختلف انجام شده است (۲۱) و شش مهارکننده که این‌تگرین‌های  $\alpha 6\beta 1$ ،  $\alpha 4\beta 7$ ،  $\alpha 5\beta 1$ ،  $\alpha L\beta 2$  را هدف قرار می‌دهند برای بیماری خشکی چشم، کولیت اولسراتیو، مولتیپل اسکلروزیس و سندرم حاد کرونری تأیید شده‌اند (۳۷).

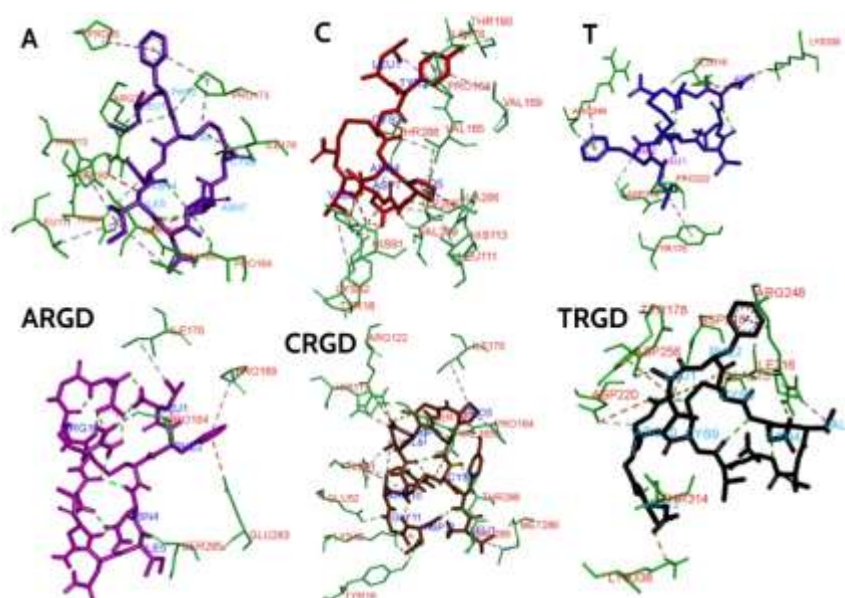
این‌تگرین‌های  $\alpha 6\beta 1$ ،  $\alpha 5\beta 1$ ،  $\alpha 5\beta 3$ ،  $\alpha 5\beta 5$ ،  $\alpha 5\beta 6$ ،  $\alpha 5\beta 8$ ،  $\alpha 8\beta 1$  و  $\alpha IIb\beta 3$  جزو دسته این‌تگرین‌های متصل شونده به RGD بوده که میزان بیان اغلب اعضای این زیرخانواده در سلول‌های توموری بشدت بالا بوده و در رشد تومور، رگزایی و متاستاز نقش دارند (۲۵).

بیشترین پژوهش‌ها روی این‌تگرین  $\alpha 5\beta 3$  انجام شده است. این گیرنده در طول رگزایی تومور، بر روی سلول‌های اندوتلیال در حال رگزایی بمقدار زیادی بیان می‌شود و واسطه تعامل سلول‌های اندوتلیال فعال با ماتریکس خارج سلولی است. همچنین این گیرنده در روند پیشرفت تومور باعث تشکیل لاملی و فیلوپودیا شده، مهاجرت و تهاجم

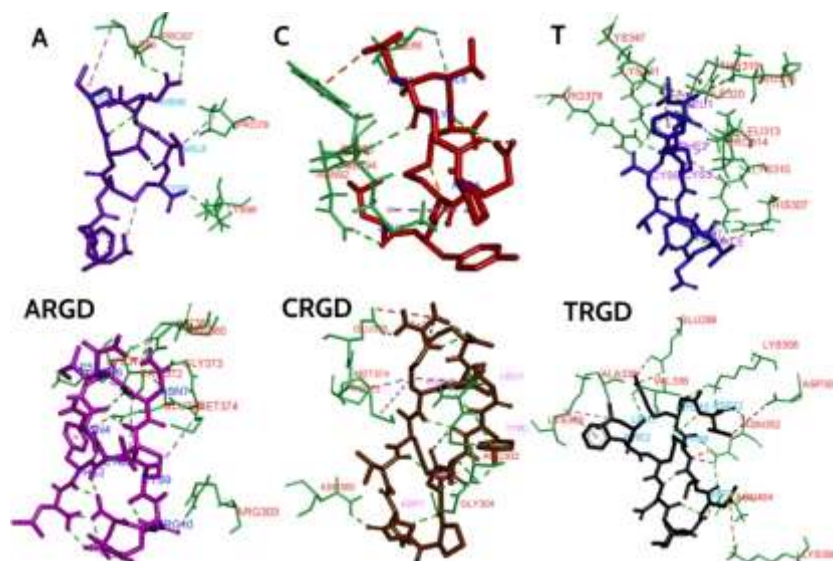
بکمک این برنامه پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و آبگریز شامل پیوندهای کربن-کربن، الکیل-الکیل، پای-پای و پای-اکیل بین اسیدهای آمینه در لیگاند و گیرنده مشخص شدند. بطور کلی می‌توان گفت که محل اتصال پپتیدها روی این‌تگرین‌ها نزدیک بهم هستند اما کاملاً یکسان نبوده و تا حدودی با هم تفاوت دارند. بعنوان مثال، پپتید C به اسیدآمینه‌های شماره ۱۸، ۴۲، ۹۱، ۱۱۱، ۱۱۳، ۱۶۴، ۱۶۵، ۱۷۶، ۱۹۰، ۲۶۶، ۲۶۸، ۲۶۹ و ۲۸۸ در این‌تگرین  $\alpha 6\beta 6$  متصل شد و پپتید CRGD به اسیدآمینه‌های شماره ۱۸، ۴۲، ۵۲، ۹۱، ۱۱۳، ۱۲۲، ۱۶۴، ۱۶۵، ۱۶۶، ۱۷۶، ۲۸۶، ۲۸۸ و ۲۸۹ متصل گردید که هشت اسیدآمینه در این بین یکسان و بقیه متفاوت بودند (شکل ۳). همچنین، به اسیدآمینه‌های شماره ۱۶۴، ۱۷۶، ۱۸۹، ۲۸۳ و ۲۸۵ متصل شد و TRGD به اسیدآمینه‌های شماره ۱۷۸، ۲۱۵، ۲۱۶، ۲۱۸، ۲۲۰، ۲۴۸ و ۲۵۶ در این‌تگرین اتصال یافت که اسیدآمینه‌های ۱۶۴ و ۱۷۶ بین CRGD و ARGD مشترک هستند اما با TRGD اسیدآمینه مشترکی ندارند، هرچند، نواحی اتصال بسیار نزدیک هستند. برای سایر پپتیدها و این‌تگرین‌ها نیز همین روند وجود داشت که برای مشاهده اسیدهای آمینه درگیر در اتصال در سایر گیرنده‌ها به جدول‌های تکمیلی ۱ تا ۵ مراجعه شود (پیوست).

این‌تگرین  $\alpha v\beta 6$  منحصراً در سلول‌های اپیتلیال و در سرطان‌هایی مانند سرطان سلول سنگفرشی دهان، پستان، روده بزرگ، کبد، تخمدان و پانکراس بیش از حد بیان می‌شود و در تهاجم تومور نقش دارد. این گیرنده با بقای ضعیف بیمار و همچنین مقاومت به شیمی‌درمانی و پرتودرمانی مرتبط است (۲۸).

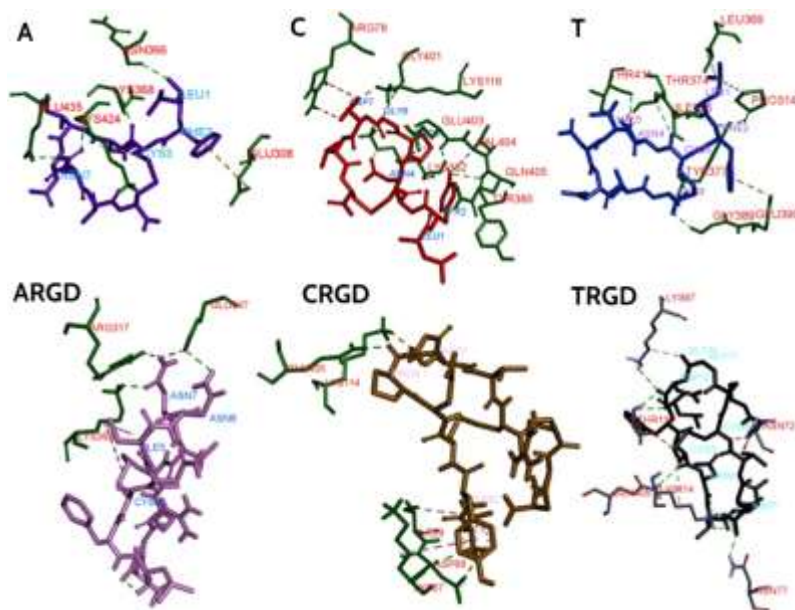
سلول‌های سرطانی و انقباض سلولی را تنظیم می‌کند. این‌تگرین  $\alpha v\beta 3$  در سرطان‌های پستان، معده، گلیوما، متاستازهای مغزی، ریه، پروستات، پانکراس، کارسینوم سلول سنگفرشی دهان، تخمدان با پیشرفت تومور ارتباط دارد (۴۱).



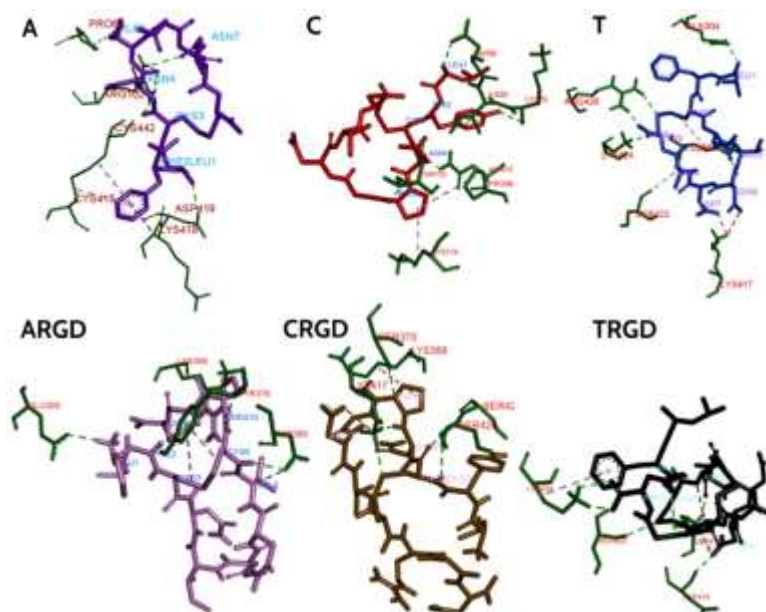
شکل ۳: مطالعه برهمکنش پپتیدهای فاقد و دارای RGD با این‌تگرین  $\alpha v\beta 6$  بوسیله برنامه اتوداک ۴. رزیدوهای درگیر در اتصال این‌تگرین با رنگ سبز و شماره رزیدوها با رنگ قرمز نمایش داده شده است. پپتیدها با سایر رنگ‌ها نشان داده شده‌اند.



شکل ۴: شبیه‌سازی برهمکنش پپتیدها با این‌تگرین  $\alpha v\beta 8$  با استفاده از داکینگ مولکولی. (راهنمای رنگها همانند شکل‌های قبل است). برای تهیه تصاویر از برنامه دیسکآوری استودیو استفاده شد.



شکل ۵: شبیه‌سازی داکینگ مولکولی پپتیدها با اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$ . (راهنمای رنگها همانند شکل‌های قبل است).



شکل ۶: مطالعه برهمکنش پپتیدها با اینتگرین  $\alpha 6\beta 1$  بوسیله داکینگ مولکولی. (راهنمای رنگها همانند شکل‌های قبل است).

تهاجم، اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  افزایش تولید نیروهای چسبندگی، تشکیل فیبر تنش و نیروهای انقباضی را تسهیل می‌کند. این گیرنده بر روی سلول‌های تومور مانند کارسینوم سلول سنگفرشی دهان و سلول‌های سرطانی تخمدان بیان می‌شود (۲۶). اینتگرین  $\alpha 6\beta 1$  برای چسبندگی پلاکت‌ها به لامینین-

اینتگرین  $\alpha v\beta 8$  در سرطان‌های سر و گردن، ریه سلول غیرکوچک و پروستات شناسایی شده و در رگ‌زایی نقش دارد (۱۷). یکی دیگر از نشانگرهای مهم رگ‌زایی در سلول‌های اندوتلیال، اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  است که با بدخیمی تومور، تهاجم و متاستاز ارتباط دارد. در طول فرآیندهای

ها حیاتی است. لامینین‌ها فراوان‌ترین اجزای غشای پایه اطراف سلول‌های عضله صاف اندوتلیال و میانی هستند و از طریق تنظیم چسبندگی سلولی، تکثیر، تمایز، مهاجرت و آپوپتوز نقش مهمی در رگ‌زایی و حفظ معماری عروق دارند. اینتگرین  $\alpha 6\beta 1$  پس از اتصال به لامینین، پلاکت‌ها را با شروع سیگنال‌هایی که سازمان‌دهی مجدد اسکلت سلولی و انتشار فیلوپودیا را ترویج می‌کنند، فعال می‌کند (۳۸).

با توجه به اهمیت اینتگرین‌ها در پیشرفت سرطان‌ها، در دهه‌های اخیر مطالعات پیش‌بالینی و بالینی متعددی بر روی مهارکننده‌های اینتگرین‌ها برای اهداف درمانی و تشخیصی انجام شده است. توالی RGD در حال حاضر پایه اصلی برای طراحی انواع مولکول‌های دارای اتصال انتخابی به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  و سایر اینتگرین‌ها است (۳۷).

آنتاگونیست‌های  $\alpha v\beta 3$  فرصتی را برای رساندن داروهای شیمی‌درمانی و پرتودرمانی به اندوتلیوم تومور فراهم می‌کنند. می‌توان در سطح نانوحامل‌هایی مانند لیپوزوم‌ها، نانوذرات، میسل‌ها و غیره، توالی دارای RGD قرار داد تا بطور خاص داروها را به سلول‌های اندوتلیال رگ‌زا و/یا سلول‌های سرطانی که اینتگرین‌ها را بیان می‌کنند تحویل دهند و به این ترتیب امکان هدف‌گیری فعال تومورها را فراهم می‌کنند (۲۱).

بطور سنتی، برای ارزیابی پاسخ بیمار به شیمی‌درمانی از روش‌های تصویربرداری مانند توموگرافی گسیل پوزیترون (PET) و تصویربرداری رزونانس مغناطیسی (MRI) استفاده می‌شود. اخیراً، علاقه زیادی برای شناسایی و توسعه نشانگرهای مولکولی پاسخ تومور به درمان پدید آمده است. یکی از امیدوارکننده‌ترین و بهترین اهداف مورد مطالعه، استفاده از نشانگرهای مولکولی حاوی RGD برای اتصال به اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  در سطح تومور است که می‌توان آنها را با تکنیک‌های تصویربرداری تشخیص داد (۹).

علی‌رغم مطالعات گسترده در دهه‌های گذشته، تنها چند آنتاگونیست از نوع مولکول‌های شیمیایی کوچک وارد

آزمایشات بالینی شده‌اند. یکی از اشکالات عمده آنتاگونیست‌های اینتگرین  $\alpha v\beta 3$ ، فارماکولوژی پیچیده وابسته به غلظت آنها است. سیلنژیتید (Cilengitide) که یک پپتید پنج اسیدآمینه‌ای حلقوی دارای RGD برای هر دو اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  و  $\alpha v\beta 5$  است، برای درمان گلیوبلاستوما طراحی شد اما عملکرد آن به اثرات ضد رگ‌زایی مورد انتظار منجر نشد. استفاده از سیلنژیتید با غلظت‌های کمتر از مقدار  $IC_{50}$  اثرات آگونیستی (تحریکی) نشان داد در حالی که در غلظت‌های بالاتر از  $IC_{50}$  اثرات متضاد و آنتاگونیستی (مهارتی) رخ داد. از این نظر، بویژه بدلیل فارماکوکینتیک سریع، یعنی نیمه عمر ۴ ساعته سیلنژیتید در گردش خون انسان، حتی دوزهای سیستمیک بالا نیز احتمالاً چند ساعت پس از مصرف دارو منجر به دوزهای پایین در تومور و اثرات آگونیستی می‌شوند. همچنین، فقدان فراهمی زیستی خوراکی مهارکننده‌های اینتگرین یک محدودیت عمده برای استفاده بالینی آنها است (۲۱ و ۳۵). بنابراین، هنوز توسعه داروهای سرطان که اینتگرین‌های متصل شونده به RGD را هدف قرار می‌دهند، با چالش‌های مهمی روبرو است. بیشتر این مهارکننده‌های اینتگرین، آنتی‌بادی و مولکول‌های کوچک شیمیایی هستند. استفاده از پپتیدها بجای آنتی‌بادی‌ها و مولکول‌های کوچک می‌تواند مزایایی مانند ایمنی‌زایی کم، سمیت کم و تولید ساده‌تر و مقرون به صرفه‌تر داشته باشد (۴۰).

آرستِن، کانستاتین و تومستاتین که بترتیب از دامین انتهایی کربوکسیل زنجیره‌های  $\alpha 1$ ،  $\alpha 2$  و  $\alpha 3$  کلاژن IV جدا می‌شوند اثرات ضد رگ‌زایی و ضد توموری قوی‌ای دارند (۳۴). این پروتئین‌ها اثرات خود را از طریق اتصال به برخی از اینتگرین‌ها و مهار مسیر پیام‌رسانی آنها اعمال می‌کنند (۳). اخیراً، ما در مطالعه‌ای فعالیت پپتیدهای ۹ اسیدآمینه‌ای مشتق از آرستِن، کانستاتین و تومستاتین را با یکدیگر مقایسه کردیم و نشان دادیم که پپتید مشتق از کانستاتین (با نام پپتید C) بیشتر از دو پپتید دیگر، زنده‌مانی، مهاجرت و تشکیل توبول را در سلول‌های اندوتلیال HUVEC و رشد

اصلاح شده نتایج ضدتوموری قابل توجهی را در مدل‌های حیوانی نشان داد و موجب کاهش رگزایی در تومورها گردید (۴۴). همچنین Li و همکاران توالی RGDGRGD را به انتهای اسیدآمینه‌های شماره ۱-۲۵ اندواستاتین افزودند و نشان دادند که این پپتید اصلاح شده بسیار موثرتر از پپتید بدون RGD تکثیر، متاستاز، رگزایی و تهاجم رده سلولی HepG2 را سرکوب می‌کند (۱۹). حمدان و همکاران توالی RGD را به پپتید FAKLF متصل کردند و نشان دادند که این ساختار فیوژن شده در مهار تکثیر سلول‌های اندوتلیال و القاء آپوپتوز قوی‌تر از پپتیدهای مجزای RGD و FAKLF عمل می‌نماید (۱۶). در مطالعه دیگری توالی RGD به یک پروتئین مهارکننده رگزایی بنام VEGI-192 افزوده شد. نتایج نشان دادند که این پروتئین نوترکیب انسانی بشدت رشد سلول‌های اندوتلیال را در شرایط آزمایشگاهی مهار کرد و رگزایی را در مدل غشای کوریوآلانتویئیک مرغ بمیزان بالاتری نسبت به پروتئین بدون RGD سرکوب نمود. همچنین، این پروتئین اصلاح شده توانست بطور قابل توجهی رشد سلول‌های MDA-MB-435 را در شرایط آزمایشگاهی مهار کند و باعث آپوپتوز در آنها شود در حالی که پروتئین بدون RGD چنین اثری را نشان نداد (۴۲). از این رو در مطالعه حاضر، توالی RGD به انتهای توالی پپتیدهای مشتق از آرستین، کانستاتین و تومستاتین اضافه شد که بترتیب بنام پپتیدهای ARGD، CRGD و TRGD نامگذاری شدند. ساختار این پپتیدها با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و نحوه اتصال آنها به اینتگرین‌های  $\alpha\beta3$ ،  $\alpha\beta6$ ،  $\alpha\beta8$ ،  $\alpha5\beta1$  و  $\alpha6\beta1$  توسط شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با نرم‌افزار اتوداک ۴ بررسی و با پپتیدهای فاقد RGD مقایسه شد.

داکینگ مولکولی یک روش طراحی داروی مبتنی بر ساختار است که تعامل‌های مولکولی را شبیه‌سازی می‌کند و حالت اتصال و میل ترکیبی بین گیرنده و لیگاند را پیش‌بینی می‌نماید (۲). در سال‌های اخیر، این روش بطور گسترده‌ای در زمینه تحقیقات مربوط به طراحی داروها و

تومور را در موش‌های دارای سرطان کولون مهار می‌کند. همچنین ساختار پپتیدها با استفاده از طیف‌سنجی CD و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و اتصال پپتیدها به اینتگرین  $\alpha\beta3$  بکمک برنامه اتوداک ۴ بررسی شد. نتایج نشان دادند که پپتید C با انرژی اتصال منفی‌تری به این گیرنده اتصال می‌یابد و پیشنهاد داده شد که تفاوت برخی از اسیدهای آمینه در توالی این پپتیدها مسئول تفاوت ساختاری، تفاوت در اتصال به اینتگرین و در نتیجه عملکرد آنها است (۶). در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که پپتید C قادر به القاء آپوپتوز در سلول‌های HUVEC و سلول‌های تومور می‌باشد (۷). مطالعات مختلف نشان داده است که افزودن موتیف RGD به پپتیدهای متصل شونده به اینتگرین یکی از استراتژی‌های مهم برای افزایش قدرت اتصال و کارایی آنها است. البته این سوال ممکن است مطرح شود که افزودن یک توالی سه اسیدآمینه‌ای ممکن است بر ساختار و در نتیجه فعالیت آن پپتید یا پروتئین اثرگذار باشد و این استراتژی فعالیت ضد رگزایی و ضدسرطانی آنها را بهبود میبخشد یا خیر. در چندین مطالعه این مسئله بشکل تجربی بررسی شده است. یکی از مهارکننده‌های مهم رگزایی، اندواستاتین است که بر روی پپتیدهای مختلفی از این پروتئین مطالعه شده است. سپس، در چند مطالعه اثر افزودن توالی RGD بر فعالیت پپتیدهای مشتق از اندواستاتین بررسی شده است. بعنوان مثال Pu و همکاران نشان دادند که اضافه کردن RGD به توالی ۴۸-۶ انتهای آمین اندواستاتین موجب مهار بیشتر مهاجرت و رگزایی - سلول‌های اندوتلیال و منجر به فعالیت ضدتوموری قوی آن می‌گردد. بررسی‌ها نشان داد که هدف این پپتید اصلاح شده (با نام EDSM) روی سلول‌های اندوتلیال، اینتگرین  $\alpha\beta3$  بود (۳۳). همچنین Xu و همکاران دریافتند که پپتید مشتق از اسیدآمینه‌های ۷۰-۶۰ انتهای آمین اندواستاتین (با نام ES-2) مهاجرت و رگزایی سلول‌های اندوتلیال را مهار می‌کند اما هیچ تاثیری بر رشد تومور در موش ندارد. با این حال، هنگامی که RGD به ES-2 افزوده شد، این پپتید

می‌شوند و در این بین انرژی اتصالاتی پپتید CRGD منفی‌تر از سایرین بود. منفی‌ترین انرژی اتصال برای هر سه پپتید دارای RGD مربوط به اتصال به اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  بود. در ساختار کریستالی اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  با یک تری پپتید RGD مشخص شده است که آسپارات‌های ۲۱۸ و ۱۵۰، تیروزین ۱۲۲، آسپاراژین ۲۱۵ و آرژینین‌های ۲۱۴ و ۲۱۶ در اتصال به این پپتید نقش دارند (۴۳). همچنین، ساختار کریستالی اکتودمین اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  با یک هگزاپپتید به توالی GRGDNP نشان داد که آسپاراتات ۲۲۷ و گلوتامین ۲۲۱ در اینتگرین به این پپتید متصل می‌شوند (۲۷). در ساختار کریستالی زیرواحد بتا اینتگرین  $\alpha v\beta 6$  مشخص شد که آلانین ۱۲۶، آسپاراتات ۲۱۸ و ترئونین ۲۲۱ اینتگرین به RGD درون لیگاند TGF- $\beta$  متصل می‌شوند (۱۰). محل اتصال پپتیدهای حاوی RGD در مطالعه حاضر تنها در اتصال TRGD به آرژینین ۲۱۶ اینتگرین  $\alpha v\beta 3$  و به آسپاراتات ۲۱۸ اینتگرین  $\alpha v\beta 6$  با مکان‌های اتصال اشاره شده در ساختارهای کریستالی مطابق است (جدول‌های تکمیلی ۱ تا ۵) و در بقیه موارد همخوانی ندارند که ممکن است بدلیل تفاوت روش مطالعه و همچنین نوع توالی پپتیدها در دو مطالعه باشد. بنابراین نیاز است محل اتصال این پپتیدها به روش تجربی تعیین شوند. از مجموع نتایج دینامیک و داکینگ مولکولی می‌توان پیشنهاد کرد که افزودن RGD به پپتید C منجر به افزایش درصد ساختار دوم، کاهش نوسانات و انعطاف ساختاری و در نتیجه اتصال بهتر به گیرنده شده است که این فرضیه نیاز به بررسی آزمایشگاهی و تجربی دارد.

مطالعه حاضر در راستای چند مطالعه دیگر است که از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی برای غربالگری و بررسی اتصال پپتیدها به اینتگرین‌ها استفاده نمودند. بعنوان مثال، Guzzetti و همکاران (۱۴) و Civera و همکاران (۸) بترتیب برهمکنش هفت پپتیدومیتیک حلقوی DKP-RGD با اینتگرین  $\alpha 5\beta 1$  و اینتگرین  $\alpha v\beta 6$  را با استفاده از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی و همچنین روش تجربی بررسی کردند و

کشف بسیاری از داروهای تایید شده مانند مهارکننده‌های پروتئاز HIV-1 مورد استفاده قرار گرفته است. در حال حاضر روش‌های *in silico* از جمله داکینگ مولکولی بدلیل مزایایی مانند سرعت بالا و هزینه پایین در مقایسه با روش‌های آزمایشگاهی برای شناسایی و غربالگری لیگاندها، اولین قدم در کشف و توسعه داروها هستند (۱). افزایش ظرفیت محاسباتی و در دسترس بودن ساختار کریستالی پروتئین‌ها از عوامل اصلی پیشرفت این روش‌ها بوده است. اگر قبل از بخش آزمایشی هر تحقیقی از روش شبیه‌سازی داکینگ مولکولی استفاده شود می‌تواند بدون صرف هزینه و زمان فراوان امکان‌پذیری انجام هر ایده یا فرضیه‌ای را در زمینه طراحی دارو نشان دهد (۵ و ۱۲).

تحقیق حاضر نیز با هدف بررسی این فرضیه انجام شد که آیا افزودن توالی RGD در بهبود اتصال به اینتگرین‌ها موثر است یا خیر تا بتوان از نتایج بدست آمده برای بررسی تجربی و آزمایشگاهی این ایده و طراحی یک پپتید ضد‌رگزا و ضد‌تومور موثر بهره برد. مقایسه نتایج حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدهای فاقد و دارای RGD (جدول ۲) مشخص کرد که افزودن RGD به پپتیدهای A و C منجر به کاهش درصد ساختار پیچ و افزایش صفحات بتا و پل بتا شد. این تغییرات منجر به کاهش نوسانات کلی ساختاری گردید که با مقادیر کمتر RMSF مشخص شد. با این حال، برای پپتید T، افزودن RGD منجر به کاهش ساختار پیچ و افزایش ساختارهای خمش بتا و پیچه تصادفی شد که این تغییرات موجب انعطاف‌پذیری بالاتر و فشردگی کمتر در مقایسه با پپتید بدون موتیف RGD گردید. می‌توان پیشنهاد داد که تفاوت بین TRGD و سایر پپتیدهای RGD به تفاوت در توالی اسیدآمینوای آنها مربوط می‌شود. توالی پپتیدها در جدول ۱ آورده شده است. مقایسه اتصال پپتیدهای فاقد و دارای RGD به اینتگرین‌های  $\alpha 5\beta 1$ ،  $\alpha v\beta 8$ ،  $\alpha v\beta 6$ ،  $\alpha 6\beta 1$  با استفاده از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان داد که پپتیدهای دارای RGD با انرژی اتصال منفی‌تری به تمام این اینتگرین‌ها متصل

آنها برای ایجاد یک تغییر ساختاری عمده در گیرنده است که منجر به یک حالت اتصال به لیگاند با میل ترکیبی بالا می‌شود. آنها با استفاده از روش داکینگ، مدهای اتصالی این آنتاگونیست‌ها به ایتگرین را شناسایی کردند که نتایج بدست آمده با نتایج حاصل از کریستالوگرافی لیگاند-گیرنده تایید شدند (۱۸). Yi Ma و همکاران توانستند با استفاده از غربالگری مجازی مبتنی بر فارماکوفور و داکینگ مولکولی با کارایی بالا، دو پپتید خطی کوچک بنام RWr و RWrNM را با میل ترکیبی و ویژگی بالا به ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  شناسایی کنند. آزمایش‌های تجربی میل این پپتیدها به ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  را تأیید کردند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و روش تجربی، میل اتصال و پایداری بالا، بویژه برای RWrNM را نشان دادند (۲۲).

### نتیجه‌گیری

در مجموع، در مطالعه شبیه‌سازی حاضر نشان داده شد که افزودن RGD به پپتیدهای مشتق از آرستین، کانستاتین و تومستاتین اتصال آنها را به ایتگرین‌های  $\alpha v\beta 3$ ،  $\alpha v\beta 6$ ،  $\alpha v\beta 8$ ،  $\alpha 5\beta 1$  و  $\alpha 6\beta 1$  بهبود می‌بخشد و پپتید CRGD (مشتق از کانستاتین) با انرژی اتصال منفی‌تری به ایتگرین‌ها متصل می‌گردد. بنابراین، می‌توان پپتیدهای حاوی RGD را برای بررسی‌های آزمایشگاهی بیشتر پیشنهاد نمود. نتایج این مطالعه می‌تواند برای طراحی مهارکننده‌های ایتگرین در جهت مهار رگزایی و رشد تومورها سودمند باشد. همچنین، می‌تواند به طراحی نشانگرهایی در جهت عکسبرداری از تومورها و انتقال هدفمند داروها به سلول‌های توموری کمک نماید.

### تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

نشان دادند پپتیدی که در داکینگ بهترین برهمکنش را با ایتگرین نشان داد، در غلظت‌های کمتری نیز از اتصال ویترونکتین به گیرنده جلوگیری می‌کند و توانستند با استفاده از شبیه‌سازی داکینگ مولکولی اطلاعات خوبی را درباره نحوه اتصال لیگاندها به ایتگرین‌ها بدست آورند. Silva و همکاران نیز در راستای توسعه یک روش غربالگری مقرون بصره و سریع، مطالعات شبیه‌سازی داکینگ مولکولی را بر روی چندین آکتاپتید حلقوی حاوی RGD (بنام آنالوگ‌های LXW) بعنوان آنتاگونیست‌های ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  انجام دادند و نتایج بدست آمده را با غربالگری آزمایشگاهی مقایسه کردند. بشکل جالبی نتایج هر دو روش با یکدیگر همخوانی داشتند که منجر به بهینه‌سازی و آزمایش مداوم جهش‌یافته‌های LXW از طریق غربالگری داکینگ مولکولی شد. چندین آنالوگ جدید LXW بعنوان آنتاگونیست ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  پیش‌بینی شد که یکی از آنها (LXZ2) با بررسی آزمایشگاهی تایید شد (۳۶). همچنین، Vilaca و همکاران دو پپتید حلقوی دارای RGD را طراحی و سنتز کردند. آنها برهمکنش این ترکیبات را با ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  با استفاده از روش شبیه‌سازی داکینگ مولکولی و نرم افزار اوتوداک بررسی کردند و نتایج بدست آمده را با نتایج داکینگ ایتگرین با سیلنژیتید مقایسه کردند. مشخص شد که دو پپتید RGD حلقوی جدید در مقایسه با سیلنژیتید میل بالاتری به ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  دارند که می‌تواند نشان دهنده دو آنتاگونیست بالقوه ایتگرین  $\alpha v\beta 3$  باشد (۳۹). Li و همکاران بکمک شبیه‌سازی دینامیک و داکینگ مولکولی توانستند از روی یک آنتاگونیست ایتگرین  $\alpha v\beta 3$ ، آنتاگونیست‌های مولکولی کوچکی بنام TDI-4161 و TDI-3761 را طراحی کنند که از چسبندگی سلولی با واسطه  $\alpha v\beta 3$  جلوگیری می‌کنند اما موجب تغییر ساختاری در گیرنده نمی‌شوند. یکی از محدودیت‌های احتمالی آنتاگونیست‌های کنونی، توانایی

## منابع

- ۱- پوی، دنیا، توحیدفر، مسعود، نصراله زاده، مهرداد سادات. ۱۳۹۹. بررسی مهارپذیری متابولیت‌های ثانویه گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی بر روی پروتئاز اصلی Mpro و Spike گلیکوپروتئین ویروس (nCoV-19) SARS-CoV-2 به روش داکینگ مولکولی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۳ (۴)، ۴۹۸-۴۸۴.
- ۲- لطفی، صفا، رضوان نژاد، الهام لنگجیان، حسین. ۱۴۰۰. بررسی میانکنش ترکیبات فلاونوئیدی بره موم با آنزیم استیل کولین استراز انسانی با استفاده از داکینگ مولکولی. پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) ۳۴ (۳)، ۳۳۷-۳۲۲.
- 3- Aikio, M., Alahuhta, I., Nurmenniemi, S., Suojanen, J., Palovuori, R., Teppo, S., Sorsa, T., López-Otín, C., Pihlajaniemi, T., Salo, T., Heljasvaara, R. & Nyberg, P. 2012. Arresten, a Collagen-Derived Angiogenesis Inhibitor, Suppresses Invasion of Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 7(12), e51044.
- 4- Aksorn, N. & Chanvorachote, P. 2019. Integrin as a molecular target for anti-cancer approaches in lung cancer. *Anticancer Research*, 39(2) 541-548.
- 5- Bitencourt-Ferreira, G., Pintro, V. O. & de Azevedo, W. F. 2019. Docking with AutoDock4. *Methods in Molecular Biology*, 2053, 125-148.
- 6- Chamani, R., Taleqani, M. H., Imanpour, A. & Khatami, M. 2022. New insights into short peptides derived from the collagen NC1  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , and  $\alpha 3$  (IV) domains: An experimental and MD simulations study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1870(4), 140769.
- 7- Chamani, R. & Zamani, F. 2022. Novel Anti-angiogenic Peptide Derived from Canstatin Induces Apoptosis In Vitro and In Vivo. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 28(5), 1-10.
- 8- Civera, M., Arosio, D., Bonato, F., Manzoni, L., Pignataro, L., Zanella, S., Gennari, C., Piarulli, U. & Belvisi, L. 2017. Investigating the interaction of cyclic RGD peptidomimetics with  $\alpha V \beta 6$  integrin by biochemical and molecular docking studies. *Cancers*, 9(10), 1-13.
- 9- Debordeaux, F., Chansel-Debordeaux, L., Pinaquy, J. B., Fernandez, P. & Schulz, J. 2018. What about  $\alpha v \beta 3$  integrins in molecular imaging in oncology? *Nuclear Medicine and Biology*, 62-63, 31-46.
- 10- Dong, X., Hudson, N. E., Lu, C. & Springer, T. A. 2014. Structural determinants of integrin  $\beta$ -subunit specificity for latent TGF- $\beta$ . *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(12), 1091-1096.
- 11- Eikesdal, H. P., Sugimoto, H., Birrane, G., Maeshima, Y., Cooke, V. G., Kieran, M. & Kalluri, R. 2008. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(39), 15040-15045.
- 12- Fan, J., Fu, A. & Zhang, L. 2019. Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*, 7(2), 83-89.
- 13- Grafton, K. T., Moir, L. M., Black, J. L., Hansbro, N. G., Hansbro, P. M., Burgess, J. K. & Oliver, B. G. 2014. LF-15 & T7, synthetic peptides derived from tumstatin, attenuate aspects of airway remodelling in a murine model of chronic OVA-induced allergic airway disease. *PLoS ONE*, 9(1), e85655.
- 14- Guzzetti, I., Civera, M., Vasile, F., Arosio, D., Tringali, C., Piarulli, U., Gennari, C., Pignataro, L., Belvisi, L. & Potenza, D. 2017. Insights into the Binding of Cyclic RGD Peptidomimetics to  $\alpha 5 \beta 1$  Integrin by using Live-Cell NMR And Computational Studies. *ChemistryOpen*, 6(1), 128-136.
- 15- Hamano, Y. & Kalluri, R. 2005. Tumstatin, the NC1 domain of  $\alpha 3$  chain of type IV collagen, is an endogenous inhibitor of pathological angiogenesis and suppresses tumor growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 292-298.
- 16- Hamdan, F., Bigdeli, Z., Asghari, S. M., Sadremomtaz, A. & Balalaie, S. 2019. Synthesis of Modified RGD-Based Peptides and Their in vitro Activity. *ChemMedChem*, 14(2), 282-288.
- 17- Khan, Z. & Marshall, J. F. 2016. The role of integrins in TGF $\beta$  activation in the tumour stroma. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 657-673.
- 18- Li, J., Fukase, Y., Shang, Y., Zou, W., Muñoz-Félix, J. M., Buitrago, L., Van Agthoven, J., Zhang, Y., Hara, R., Tanaka, Y., Okamoto, R., Yasui, T., Nakahata, T., Imaeda, T., Aso, K., Zhou, Y., Locuson, C., Nesic, D., Duggan, M., Collier, B. S. 2019. Novel Pure  $\alpha v \beta 3$  Integrin Antagonists That Do Not Induce Receptor Extension, Prime the Receptor, or Enhance Angiogenesis at Low Concentrations. *ACS Pharmacology and Translational Science*, 2(6), 387-401.
- 19- Li, S., Wei, J., Yuan, L., Sun, H., Liu, Y., Zhang, Y., Li, J. & Liu, X. 2011. RGD-Modified Endostatin Peptide 30 Derived from Endostatin Suppresses Invasion and Migration of HepG2 Cells Through the  $\alpha v \beta 3$  Pathway. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 26(5), 529-538.
- 20- Lobanov, M. Y., Bogatyreva, N. S. & Galzitskaya, O. V. 2008. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*, 42(4), 623-628.
- 21- Ludwig, B. S., Kessler, H., Kossatz, S. & Reuning, U. 2021. RGD-Binding Integrins Revisited: How

- Recently Discovered Functions and Novel Synthetic Ligands (Re-)Shape an Ever-Evolving Field. *Cancers*, 13(7), 1711.
- 22- Ma, Y., Ai, G., Zhang, C., Zhao, M., Dong, X., Han, Z., Wang, Z., Zhang, M., Liu, Y., Gao, W., Li, S. & Gu, Y. 2017. Novel linear peptides with high affinity to  $\alpha v \beta 3$  integrin for precise tumor identification. *Theranostics*, 7(6), 1511–1523.
- 23- Maeshima, Y., Yerramalla, U. L., Dhanabal, M., Holthaus, K. A., Barbashov, S., Kharbanda, S., Reimer, C., Manfredi, M., Dickerson, W. M. & Kalluri, R. 2001. Extracellular Matrix-derived Peptide Binds to  $\alpha v \beta 3$  Integrin and Inhibits Angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(34), 31959–31968.
- 24- Magnon, C., Galaup, A., Mullan, B., Rouffiac, V., Bidart, J. M., Griscelli, F., Opolon, P. & Perricaudet, M. 2005. Canstatin acts on endothelial and tumor cells via mitochondrial damage initiated through interaction with  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  integrins. *Cancer Research*, 65(10), 4353–4361.
- 25- Mezu-Ndubuisi, O. J. & Maheshwari, A. 2021. The role of integrins in inflammation and angiogenesis. *Pediatric Research*, 89(7), 1619–1626.
- 26- Mierke, C. T., Frey, B., Fellner, M., Herrmann, M. & Fabry, B. 2011. Integrin  $\alpha 5 \beta 1$  facilitates cancer cell invasion through enhanced contractile forces. *Journal of Cell Science*, 124(3), 369–383.
- 27- Nagae, M., Re, S., Mihara, E., Nogi, T., Sugita, Y. & Takagi, J. 2012. Crystal structure of  $\alpha 5 \beta 1$  integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *Journal of Cell Biology*, 197(1), 131–140.
- 28- Niu, J. & Li, Z. 2017. The roles of integrin  $\alpha v \beta 6$  in cancer. *Cancer Letters*, 403, 128–137.
- 29- Nyberg, P., Xie, L., Sugimoto, H., Colorado, P., Sund, M., Holthaus, K., Sudhakar, A., Salo, T. & Kalluri, R. 2008. Characterization of the anti-angiogenic properties of arresten, an  $\alpha 1 \beta 1$  integrin-dependent collagen-derived tumor suppressor. *Experimental Cell Research*, 314(18), 3292–3305.
- 30- Okada, M. & Yamawaki, H. 2019) A current perspective of canstatin, a fragment of type IV collagen alpha 2 chain. *Journal of Pharmacological Sciences*, 139(2), 59–64.
- 31- Pan, L., Zhao, Y., Yuan, Z. & Qin, G. 2016. Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus*, 5(1).
- 32- Petitclerc, E., Boutaud, A., Prestayko, A., Xu, J., Sado, Y., Ninomiya, Y., Sarras, M. P., Hudson, B. G. & Brooks, P. C. 2000. New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 8051–8061.
- 33- Pu, C. Y., Xu, H. M., Hu, J. L., Zheng, H., Huang, X. F., Zhang, C., Yang, Y. J. & Li, Y. B. 2012. RGD-modified endostatin fragments showed an antitumor effect through antiangiogenesis. *Anti-Cancer Drugs*, 23(8), 788–802.
- 34- Sand, J. M. B., Genovese, F., Gudmann, N. S. & Karsdal, M. A. 2019. Chapter 4 - Type IV collagen. In M. A. Karsdal (Ed.), *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin (Second Edition)* (pp. 37–49). Academic Press.
- 35- Scaringi, C., Minniti, G., Caporello, P. & Enrici, R. M. 2012. Integrin inhibitor cilengitide for the treatment of glioblastoma: A brief overview of current clinical results. *Anticancer Research*, 32(10), 4213–4224.
- 36- Silva, A., Xiao, W., Wang, Y., Wang, W., Chang, H. W., Ames, J. B., Lam, K. S. & Zhang, Y. 2020. Structure–activity relationship of RGD-containing cyclic octapeptide and  $\alpha v \beta 3$  integrin allows for rapid identification of a new peptide antagonist. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(9).
- 37- Slack, R. J., Macdonald, S. J. F., Roper, J. A., Jenkins, R. G. & Hatley, R. J. D. 2021. Emerging therapeutic opportunities for integrin inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 21(1), 60–78.
- 38- Sroka, I. C., Anderson, T. A., Mcdaniel, K. M., Nagle, R. B., Gretzer, M. B. & Cress, A. E. 2010. The laminin binding integrin  $\alpha 6 \beta 1$  in prostate cancer perineural invasion. *Journal of Cellular Physiology*, 224(2), 283–288.
- 39- Vilaça, H., Ferreira, P. M. T. & Micaelo, N. M. 2014. New cyclic RGD peptides: Synthesis, characterization, and theoretical activity towards  $\alpha v \beta 3$  integrin. *Tetrahedron*, 70(35), 5420–5427.
- 40- Wang, L., Wang, N., Zhang, W., Cheng, X., Yan, Z., Shao, G., Wang, X., Wang, R. & Fu, C. 2022. Therapeutic peptides: current applications and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1).
- 41- Weis, S. M. & Cheresh, D. A. 2011. Av Integrins in Angiogenesis and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1).
- 42- Wu, J., Jiang, Y., Yang, W., He, Z., Meng, S., Zhang, Q., Lin, M., Zhang, H., Li, W., Yang, Y., Jia, Y., Qian, L., Lu, D., Cai, W., Luo, G., Wang, Y., Zhu, X. & Li, M. 2012. Dual function of RGD-modified VEGI-192 for breast cancer treatment. *Bioconjugate Chemistry*, 23(4), 796–804.
- 43- Xiong, J. P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S. L. & Arnaout, M. A. 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha v \beta 3$  in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 296(5565), 151–155.
- 44- Xu, H., Pan, L., Ren, Y., Yang, Y., Huang, X. & Liu, Z. 2011. RGD-modified angiogenesis inhibitor HM-3 dose: Dual function during cancer treatment. *Bioconjugate Chemistry*, 22(7), 1386–1393.

# The RGD sequence improves the binding of collagen IV-derived peptides to integrins: an *in silico* study

Chamani R.<sup>1</sup>, Namnabat M.<sup>1</sup>, Taleqani M.H.<sup>1</sup> and Imanpour A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Regenerative Medicine Group (REMEDI), Universal Scientific Education and Research Network (USERN), Tehran, I.R. of Iran

## Abstract

RGD-binding integrins are receptors overexpressed in various tumors and play an important role in their growth, angiogenesis, and metastasis. Therefore, the design of inhibitors containing RGD has been of great interest for inhibiting integrins and treating cancer. Arrestan, canstatin, and tumstatin, angiogenesis inhibitors derived from collagen IV, act by binding to integrins and inhibiting their signaling pathway. In a study, it was shown that peptides derived from arrestan (A), canstatin (C), and tumstatin (T) are capable of inhibiting angiogenesis and tumor growth, and peptide C is more active than the other two peptides. In the present study, the RGD sequence was added to the end of the mentioned peptides, and their structure was analyzed using molecular dynamics simulation. The interaction of these peptides with  $\alpha v \beta 3$ ,  $\alpha v \beta 6$ ,  $\alpha v \beta 8$ ,  $\alpha 5 \beta 1$ , and  $\alpha 6 \beta 1$  integrins was then analyzed using AutoDock 4 software. The results showed that the addition of RGD changes the secondary structures and reduces structural fluctuations in peptides. Also, peptides with RGD were bound to all integrins with a more negative binding energy, and the binding energy of the CRGD peptide was more negative than others. Therefore, RGD peptides can be suggested for further laboratory investigations. Overall, the results of this study can be useful for the design of integrin inhibitors to inhibit angiogenesis and tumor growth.

**Keywords:** Molecular docking, Molecular dynamics, Angiogenesis inhibitor, AutoDock