

## مطالعه تغییرات ساختاری و دینامیکی پروتئین GSK3 $\beta$ در حضور لیگاند CHIR99021 با استفاده از شبیه‌سازی و داکینگ مولکولی

جواد کاظمی<sup>۱</sup>، حسین شاهسوارانی<sup>۲،۳\*</sup>، پرویز پاکزاد<sup>۱</sup> و محمد علی شکرگزار<sup>۳،۴\*</sup>

<sup>۱</sup> ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

<sup>۲</sup> ایران، تهران، دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی

<sup>۳</sup> ایران، تهران، انستیتو پاستور ایران، آزمایشگاه طب بازساختی و نوآوری های پزشکی

<sup>۴</sup> 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 پیام‌رسانی WNT در عملکرد های مختلف سلول های بنیادی پرتوان (PSCs) شامل؛ خودنوزایی، بقا و تمایز ایفای نقش می‌کند. از آنجایی که مهار GSK3 $\beta$  سبب تمایز PSCs می‌شود استفاده از مهارکننده های مناسبی که در غلظت کمتر باعث مهار GSK3 $\beta$  شود می‌تواند به لحاظ اقتصادی مقرون بصره باشد. CHIR99021 یکی از مهمترین مهارکننده 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 2-2015 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 می‌شود و اثر مهارکنندگی خود را ایجاد می‌کند و در نتیجه سبب ناپایداری ساختار GSK3 $\beta$  می‌شود. همچنین نتایج داکینگ و شبیه سازی دینامیکی روشن ساخت این ترکیب به نحو موثرتری می‌تواند 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

\* نویسندگان مسئول، پست الکترونیکی: [hosein.shahsavarani@gmail.com](mailto:hosein.shahsavarani@gmail.com) و [mashokrgozar@pasteur.ac.ir](mailto:mashokrgozar@pasteur.ac.ir)

### مقدمه

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

گلیکوژن سنتاز کیناز ۳ بتا (GSK3 $\beta$ )، یک کیناز پروتئین چندعملکردی است که بعنوان تنظیم کننده اصلی خودنوزایی و تمایز سلول های بنیادی پرتوان (PSCs) عمل می‌کند. به علاوه، این پروتئین با چندین بیماری شایع از جمله

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) مولکول‌های زیستی اغلب در حوزه‌ی شیمی محاسباتی طبقه‌بندی می‌شود اما ریشه علمی این تکنیک به شیمی پلیمر و زیست‌شناسی ساختار در دهه ۱۹۷۰ برمی‌گردد جایی که برای مطالعه فیزیک، خواص مکانی مولکولی شامل؛ انعطاف پذیری، واپیچش (distortion)، پایداری و شل شدن ساختارها، ساختارهای اولیه اشعه ایکس پروتئین‌ها در مقیاس‌های کوتاه مدت استفاده می‌شد [۱۱]. بطور کلی شبیه‌سازی مولکولی پیشتر در فیزیک پیشگام بود [۱۲]. حوزه شبیه‌سازی مولکولی از آن زمان تا کنون بسیار پیشرفت کرده است و در حال حاضر شبیه‌سازی‌ها به طور مکرر در مقیاس چند میلی ثانیه انجام می‌شود که در این زمان کوتاه می‌توان چندین بار پروتئین را تا کرد [۱۳]، برهمکنش بین گیرنده‌ها [۱۴] و ویژگی‌های عملکردی گیرنده‌ها را پیش‌بینی کرد و حتی حالت‌های انتقالی حدواسط پروتئین‌هایی مانند پروتئین‌های غشایی، را ثبت کرد [۱۵]. این نوع شبیه‌سازی کلاسیک طولانی مدت همچنان حائز اهمیت است زیرا روش‌هایی برای مشاهده مستقیم فرآیند‌های مولکولی که به راحتی از طریق سایر ابزارها قابل مشاهده نیست، ارائه می‌دهد. با این حال بسیاری از مطالعات کنونی بطور فزاینده‌ای به مجموعه‌های بزرگ شبیه‌سازی تکیه می‌کنند که تا حدی با افزایش روزافزون مدل‌های ساختاری امکان پذیر شده است که با توالی‌یابی و ژنومیک ساختاری و همچنین تکنیک‌های جدید برای برآورد خواص پیچیده مولکولی با استفاده از هزاران شبیه‌سازی کوتاه‌تر امکان پذیر کرده است [۱۶]. مطالعات جهش‌های ژنی از این پس می‌توانند به آسانی مدل‌سازی شوند و شبیه‌سازی‌های کوتاه برای صدها ژن جهش یافته انجام شود. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی کلاسیک بر اساس مدل‌های تجربی نقش مهمی ایفا می‌کنند زیرا بیشتر ویژگی‌های مورد نظر توسط انرژی آزاد تعریف می‌شود که معمولاً به نمونه برداری گسترده‌ای نیاز دارد و روش‌های شیمی کوانتومی سنتی نمی‌توانند

فعالیت خودنوزایی سلول‌های بنیادی را القاء می‌کند و سلول‌های بنیادی را به سمت خاموش شدن سوق می‌دهد، مهار این مسیر پیام‌رسانی سبب آغاز تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های تمایز یافته می‌شود [۳]. مسیر پیام‌رسانی WNT یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی در تمایز PSCs به انواع مختلف سلول است. تنظیم این مسیر پیام‌رسانی با کمک ریزمولکول‌ها (Small Molecules) نقش مهمی در تمایز *in vitro* سلول‌های بنیادی ایفا می‌کند. ریزمولکول‌ها، ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم (>۹۰۰ دالتون) می‌باشند که در تنظیم فرآیندهای بیولوژیکی، با اندازه‌ای در حدود ۱ نانومتر نقش دارند. ریزمولکول‌ها مزایای عمده‌ای نسبت به پروتئین‌های اصلی تنظیم‌کننده‌ی مسیر پیام‌رسانی WNT مثل DKK1 و Noggin دارند. ریزمولکول‌ها می‌توانند از طریق انتشار ساده از عرض غشاء سلول عبور کنند و به بخش‌های مختلف سلول برسند و نسبت به پروتئین‌های نوترکیب مقرون به صرفه‌تر هستند [4]. با این حال گزارش شده است، یک سری از ریزمولکول‌ها مهارکننده‌ی  $GSK3\beta$  وجود دارند که در صنعت پزشکی بازساختی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

فعال‌سازی مسیر پیام‌رسانی WNT از طریق ریزمولکول‌های CHIR99021 منجر به تمایز PSCs به رده‌های مزودرمی می‌شوند [۵، ۶]. CHIR99021 فعالیت مسیر پیام‌رسانی WNT را از طریق مهار  $GSK3\beta$ ، تحت تأثیر قرار می‌دهد. در نتیجه PSCs را به سمت رده‌های مزودرمی سوق می‌دهد [۷، ۸]. فاکتور مؤثر اصلی در پیام‌رسانی WNT،  $\beta$ -کاتنین است. غیرفعال‌سازی مسیر WNT سبب تخریب  $\beta$ -کاتنین می‌شود و منجر به کاهش سطح  $\beta$ -کاتنین در سیتوزول می‌شود. به محض فعال‌شدن مسیر پیام‌رسانی WNT،  $\beta$ -کاتنین در سیتوزول تجمع می‌یابد و به هسته منتقل می‌شوند و با فاکتورهای رونویسی خاص برهمکنش می‌کنند [۹، ۱۰].

## ۲- پارامتریزاسیون مولکول‌های لیگاند

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

## ۳- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

پروتئین تنها و در حالت کمپلکس به عنوان ورودی برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار *GROMACS 2021.1* انجام شد. ساختارهای ورودی با میدان نیروی *ff99SB+ILDN* آماده‌سازی شدند. وضعیت صحیح هیدروژن هیستیدین‌ها برای تمامی هیستیدین‌های پروتئین در ساختار ایجاد و پیوندهای دی‌سولفید (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 ۸ آنگستروم در جعبه مکعبی (cubic) با استفاده از نرم‌افزار *gmx solvate* قرار داده شد [۲۲-۲۴].

کاهش انرژی بر روی ساختارها با ۱۰۰۰ گام با روش *steepest descent* به منظور حذف اندرکنش‌های واندروالس و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولهای آب و کمپلکس صورت گرفت. در مرحله بعد، دمای سیستم به تدریج از ۰ تا ۳۱۰ کلوین به مدت ۲۰۰ پیکوثانیه در حجم ثابت افزایش یافت و پس از آن در فشار ثابت به مدت ۲۰۰ پیکوثانیه سیستم به حالت تعادل رسانده شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در دمای ۲۹۸ کلوین و در مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه به انجام رسید. میانکنش‌های غیرپیوندی با فاصله ۱۰ 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 شبیه‌سازی در فواصل ۸ پیکوثانیه برای انجام آنالیز ذخیره شد.

برای سیستم‌های بزرگ کارایی داشته باشند. این پیشرفت‌ها بدون تلاش تحقیقاتی مهم در الگوریتم‌های شبیه‌سازی، بهینه‌سازی و موازی‌سازی امکان‌پذیر نبود. ظهور بسته‌های نرم‌افزاری استاندارد مدل‌سازی مولکولی مانند *CHARMM* [۱۷]، *GROMOS* [۱۸]، *Amber* [۱۹]، *NAMD* [۲۰]، *GROMACS* [۲۱] مهم بوده است زیرا این نرم‌افزارها به تحقیقات شبیه‌سازی و مدل‌سازی مولکولی کمک شایانی کرده است و تکنیک‌ها را در اختیار محققان علوم زیستی که متخصص شبیه‌سازی نیستند قرار داده است. ابزار *GROMACS* یکی از اهداف اصلی توسعه بلندمدت برای دست‌یابی به بالاترین شبیه‌سازی ممکن در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی است. از سال ۲۰۰۹ تاکنون *GROMACS 4* در حال توسعه است به طوری که تعدادی از ویژگی‌های جدید به آن اضافه شده است که منجر به انتشار نسخه ۴.۵ این نرم‌افزار شده است و عملکرد و کارایی برنامه‌های موازی به طور قابل توجهی بهبود یافته است. هدف اصلی این مطالعه بررسی خصوصیات فیزیکی-شیمیایی *CHIR99021* بعنوان فعال‌کننده‌های مسیر پیام‌رسانی *WNT* از طریق مهار *GSK3β* با استفاده از داکینگ مولکولی جهت انتخاب گزینه مناسب برای تمایز *PSCs* با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) و ارزیابی چندین خصوصیت فارماکودینامیک یا پیش‌بینی پارامترهای *ADMET* بترتیب با کمک نرم‌افزار *GROMACS 2021.1* و ابزار *QikProp* نسخه ۴.۴ از بسته نرم‌افزاری *Maestro* (Schrodinger suite, LLC, New York, NY) (Release 2015-2) انجام شد.

## مواد و روشها

### ۱- ساختارها

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

## ۴- داکینگ مولکولی

برهمکنش بالایی با پیوند های هیدروژنی که با جایگاه فعال این پروتئین ایجاد می‌کند نقش کلیدی در مهار پروتئین  $GSK3\beta$  ایجاد می‌کند و مسیر های پیام‌رسانی WNT نیز در پی آن فعال می‌شوند.

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 می‌دهد که این لیگاند توانایی

Pa	Pi	Activity
0,565	0,014	Protein kinase inhibitor
0,453	0,035	Signal transduction pathways inhibitor
0,406	0,004	TRKB antagonist
0,423	0,046	HMGCS2 expression enhancer
0,377	0,022	Tyrosine kinase inhibitor
0,389	0,059	Autoimmune disorders treatment
0,322	0,034	HIV attachment inhibitor
0,322	0,046	Focal adhesion kinase inhibitor
0,336	0,063	Botulin neurotoxin A light chain inhibitor
0,293	0,020	Janus tyrosine kinase 2 inhibitor

شکل ۱- پیش‌بینی خواص لیگاند CHIR99021 با سرور Way 2 drug

## ۵- آنالیز

## خصوصیات مرتبط با ADMET یا فارماکوکیتیک

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  $\text{mol dm}^{-3}$  است و نشان‌دهنده ی غلظت حل‌شونده در محلول اشباع است). مهار کانال های  $HERG K^+$ :  $\log IC_{50}$ ،  $\log Khsa$  اتصال به پروتئین سرم، قانون Lipinski's rule of five شامل:  $500 <$  وزن مولکولی،  $QPlog Po/w < 5$ ،  $5 \leq$  پیوند هیدروژنی دهنده،  $10 \leq$  پیوند هیدروژنی گیرنده [۲۸]، قانون Jorgensen's rule of three شامل:  $QPlogS > -5$ ،  $7 <$  تعداد متابولیت های اولیه.

خصوصیات ADMET (جذب، متابولیسم، پراکنش، دفع و سمیت) [۲۵، ۲۶] ترکیب شیمیایی ریز مولکول CHIR99021 با استفاده از پارامترهای قرار دادی پروتوکل *QikProp* نسخه 4.4 از بسته نرم‌افزاری *Maestro* (Schrödinger, LLC, New York, NY, Release 2015-2) [۲۷] آنالیز شد. پارامترهای *in silico* فیزیکی-شیمیایی که از طریق مدول *QikProp* قابل پیش‌بینی 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)،

## نتایج و بحث

## ۱-آنالیز نتایج داکینگ مولکولی

نتایج پیش‌بینی خواص لیگاند با استفاده از سرور Way2drug انجام شد تأثیر این مولکول آلی بر روی تارگت‌های 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 کایمرا (Chimera) پروتئین به حالت طبیعی و خالص خود درآمد و تمام لیگاند‌های غیر مرتبط حذف شدند. در نهایت این پروتئین به همراه فایل لیگاند به سرور سوئیس داک که بر اساس الگوریتم *ab-initio* فعالیت می‌کند 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

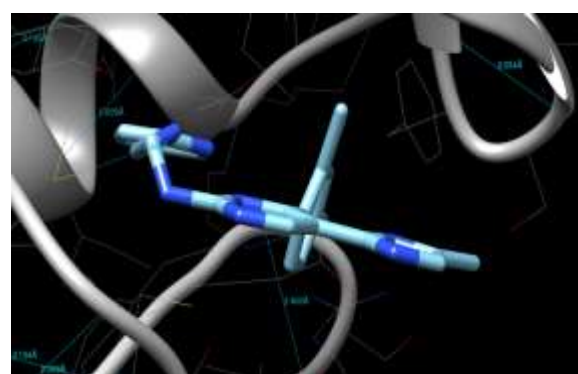
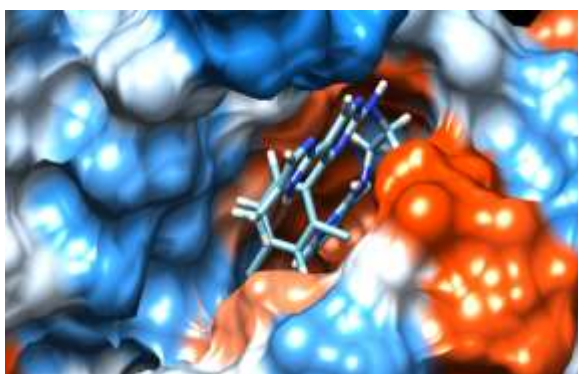
بهترین حالت قرارگیری لیگاند در درون جایگاه فعال پروتئین در حالت اول بررسی گردید و پیوند‌های هیدروژنی آن نیز نمایش داده شد (شکل ۲).

## ۲-آنالیز نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

نتایج شبیه‌سازی 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 ماژول‌های *gmx rms*، *gmx rmsf*، *gmx gyrate* مورد بررسی قرار گرفت. برای آنالیز PCA انرژی آزاد گیبس بترتیب از ماژول‌های *gmx covar*، *gmx anaeig* و *gmx sham* استفاده شد.

Show	Cluster	Element	FullFitness (kcal/mol)	Estimated $\Delta G$ (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

جدول ۱- نتایج اسکور داکینگ



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

محاسبه RMSD بین ساختارهای بدست آمده و یک ساختار

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.

#### 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 های 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

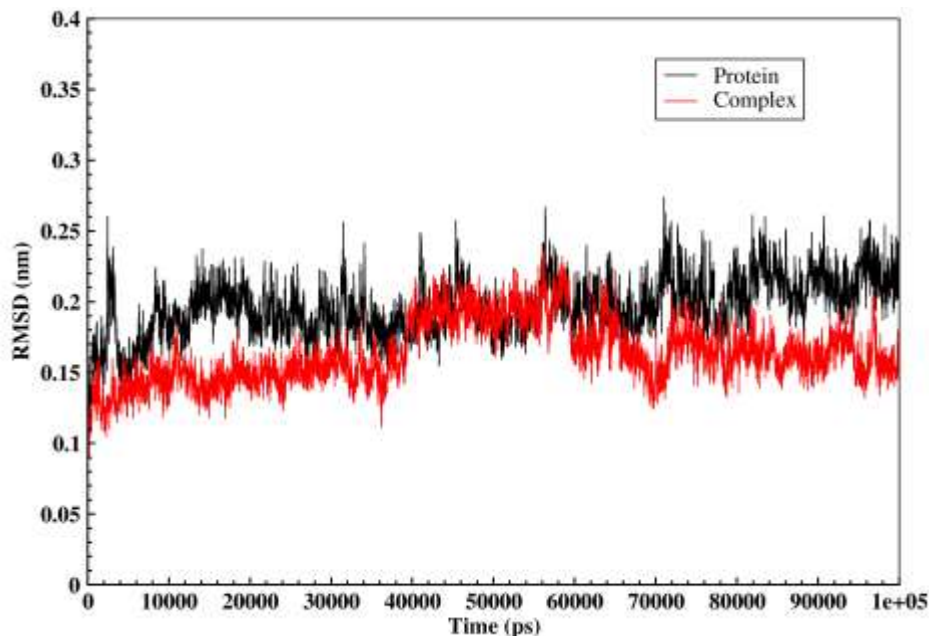
مرجع مهمترین روش برای ارزیابی پایداری شبیه سازی دینامیک مولکولی در طول زمان می باشد. برای مطالعه حرکات اصلی در سیستم، RMSD برای اتم های کربن آلفا بدست آمد. همچنین انعطاف پذیری ساختار بر اساس RMSF اتم های کربن آلفا محاسبه شد. شعاع ژیراسیون نیز که یکی از پارامترهای تعیین کننده در میزان تراکم ساختار می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

#### الف- انحراف ریشه میانگین مربعات (RMSD)

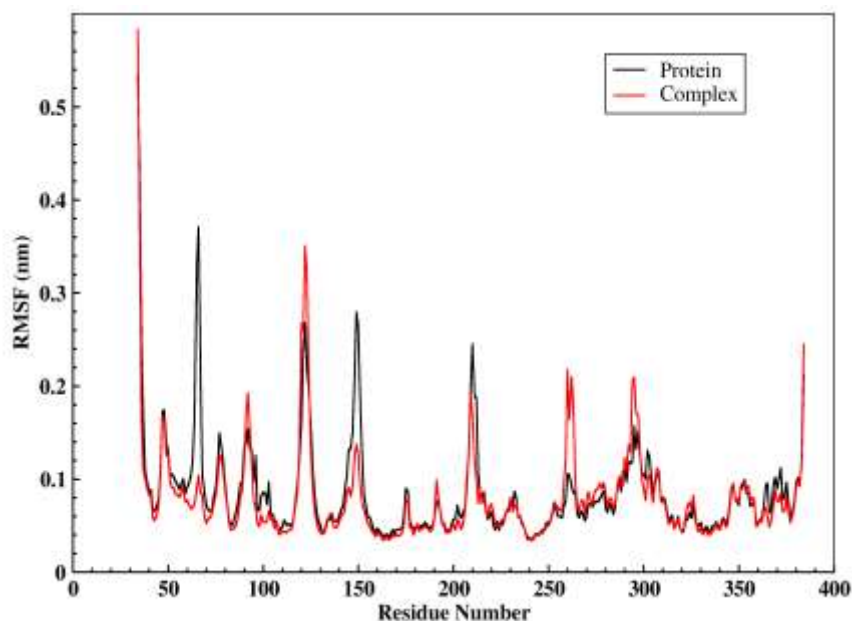
انحراف ریشه میانگین مربعات RMSD بین ساختارهای ایجاد شده در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی در بعد زمان معیاری مناسب و رایج جهت اطمینان از پایداری ساختاری پروتئین های طبیعی و جهش یافته می باشد. بنابراین تغییرات RMSD مربوط به اتم های کربن آلفای پروتئین در هر دو شبیه سازی (در حضور و عدم حضور لیگاند) در طی زمان شبیه سازی (۱۰۰ نانوثانیه) 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 می‌شود 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. در واقع 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

دارای انعطاف پذیری پایین در ناحیه اتصالی لیگاند قرار دارند و در واقع می‌توان چنین گفت که اتصال لیگاند به پروتئین باعث کاهش انعطاف پذیری این نواحی شده است.

۶۰-۷۰ و ۱۵۲-۱۴۲. جهت مطالعه بیشتر دلیل کاهش انعطاف پذیری نواحی مذکور در حالت کمپلکس، این نواحی در ساختار سه بعدی پروتئین (شکل ۵) نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود دو ناحیه



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

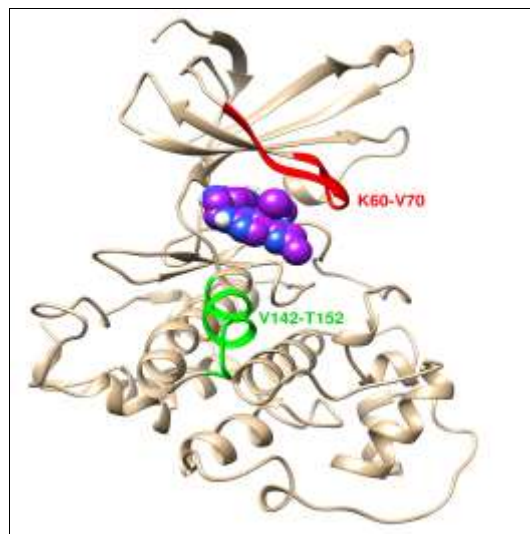


شکل ۴- مقایسه میزان انعطاف پذیری (RMSF) آمینواسیدهای پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند

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 می‌شود 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 می‌دهد که در حضور لیگاند اندازه شعاع ژیراسیون پروتئین تغییر محسوسی را نشان نمی‌دهد.

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

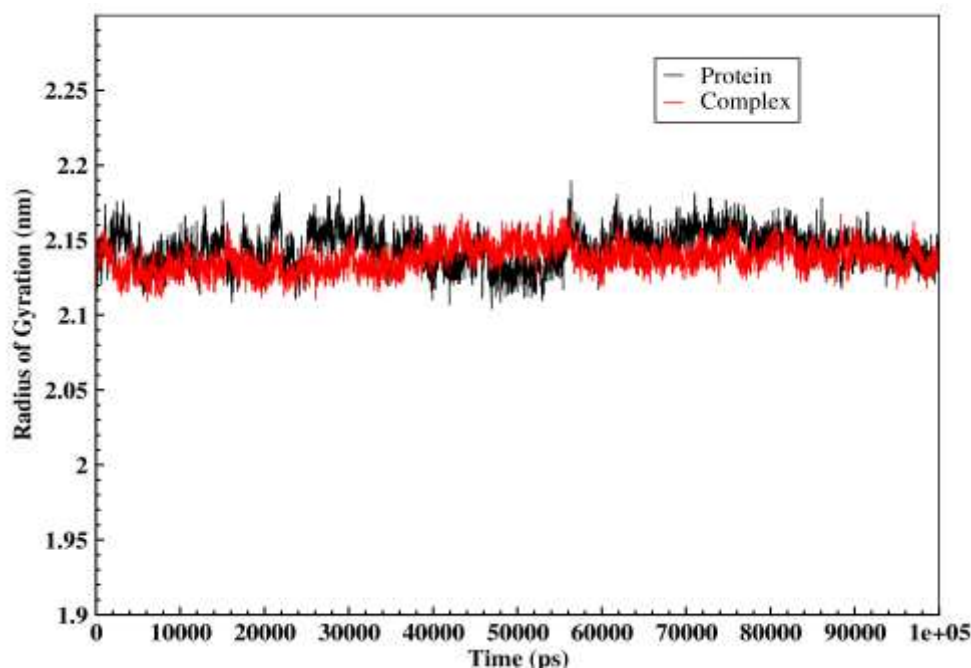
بالا بودن تعداد میانکنش‌های گیرنده با لیگاند نشان دهنده پایداری لیگاند در جایگاه خود روی پروتئین می باشد.



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 فشرده‌گی 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



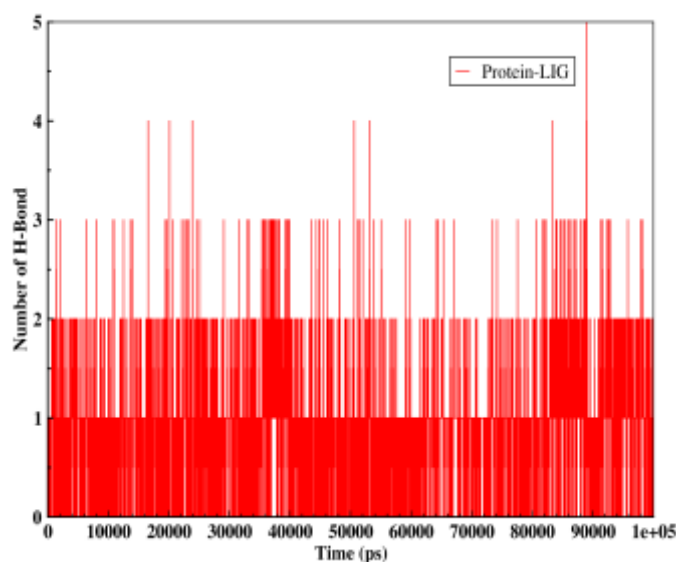
شکل ۶- تغییرات شعاع ژیراسیون پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی

پایدار شبیه سازی دینامیک مولکولی (۲۰۰۰۰ پیکوثانیه انتهای شبیه سازی) تشکیل شده است.

### 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.

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



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

متفاوتی را نشان می‌دهد. طبق این شکل، پروتئین در عدم حضور لیگاند در محور PC1 در دو کلاستر بزرگ مشاهده می‌شود و در PC2 تنها در یک کلاستر بزرگ پخش شده‌اند. همچنین طبق این شکل میزان پخش شدگی کنفورمسیون‌های مختلف پروتئین در دو PC بسیار بالا می‌باشد و این در حالی است که در حضور لیگاند در PC1 در دو کلاستر و در PC2 در سه کلاستر نزدیک به هم مشاهده می‌شود. در واقع در حضور لیگاند کلاسترها بسیار متمرکز می‌باشند و میزان پخش شدگی بسیار پایین می‌باشد.

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 می‌شود در عدم حضور لیگاند، دمن کوچک پروتئین (با دایره نشان داده شده است) دامنه حرکتی بسیار بالایی را نشان می‌دهد، این در حالی است که حضور لیگاند در این دمن تنها در دو ناحیه ۱۲۷-۱۱۷ و ۹۶-۸۷ دامنه حرکتی بالا می‌باشد و در بقیه نواحی این دمن دامنه حرکتی آمینواسیدها بسیار پایین‌تر است. مقایسه دمن 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 ۳۰۴-۲۱۰ دامنه حرکتی بسیار بالا می‌باشد و در سایر نواحی دامنه حرکتی بسیار پایین‌تر است. در واقع 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 در واقع همین عوامل باعث شده‌اند که در عدم حضور لیگاند کنفورمسیون‌های مختلف پروتئین در فضای فاز بسیار پخش‌شده 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 ۸ نمودار مقادیر ویژه (eigenvalue) بدست آمده از مورب سازی (diagonalization) ماتریکس کوواریانس نوسان‌های اتم‌های 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 می‌شود مقادیر eigenvalue مربوط به حرکات هماهنگ و بزرگ بوده که به سرعت دامنه آن کاهش یافته و در بردارهای ویژه بعدی نشان دهنده حرکات محدود و محلی کوچک در پروتئین می‌باشد. همانطور که در بالا ذکر شده است به هر کدام از مقادیر eigenvalue به ازای هر بردار ویژه یک PC گفته می‌شود. همانطور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود در دو PC اول که PC1 و PC2 گفته می‌شود بیشترین دامنه حرکات ممکن مشاهده می‌شود. 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 می‌باشد 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 می‌باشد. در واقع از نمودار می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که دامنه حرکات در PC1 در عدم حضور لیگاند بسیار بالا می‌باشد.

در ادامه جهت بررسی بهتر دامنه و گستردگی حرکتی پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در فضای فاز (phase space)، تراژکتوری‌های 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 می‌شود که در آن تمام حالت‌های ممکن برای یک سیستم (پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند) نشان داده می‌شود. در شکل ۹ الف (ستون سمت چپ) نیز تمام حالت‌های 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 می‌شود پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند رفتار نسبتاً

پخش شده اند. در واقع از این نمودار می‌توان چنین نتیجه گرفت که اتصال مولکول لیگاند باعث کاهش انعطاف پذیری (شکل ۱۰) و افزایش پایداری پروتئین شده است.

### خ- بررسی ساختار دوم

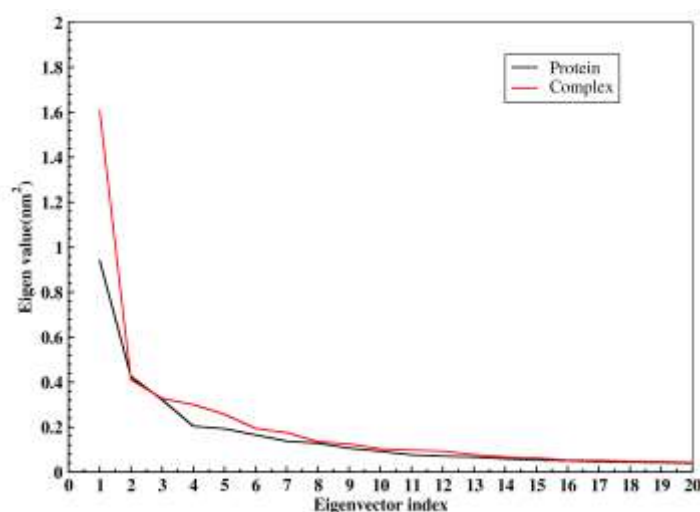
بررسی و مطالعه تغییرات ساختار دوم پروتئین یکی از فاکتورهای مهم در آنالیز تاثیرپذیری در حضور عوامل مختلف می باشد. هر چقدر میزان تغییر ساختار دوم پروتئین ها کمتر باشد نشان دهنده پایداری پروتئین است. ساختارهای دوم به دو نوع منظم و نامنظم تقسیم می شوند که ساختار دوم منظم شامل مارپیچ آلفا، صفحه بتا، مارپیچ 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  $\alpha 10$ ، Turn، coil و beta-bridge، bend.

در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود در عدم حضور لیگاند آمینواسیدهای ۱۱۵-۳۵ انعطاف پذیری بسیار بالایی را نشان می‌دهند. همچنین آمینواسیدهای شماره ۱۵۰-۱۳۵، ۱۸۰-۲۱۰ و ۲۹۵-۲۷۵ مقدار انعطاف پذیری نسبتا 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.

### ع- چشم انداز

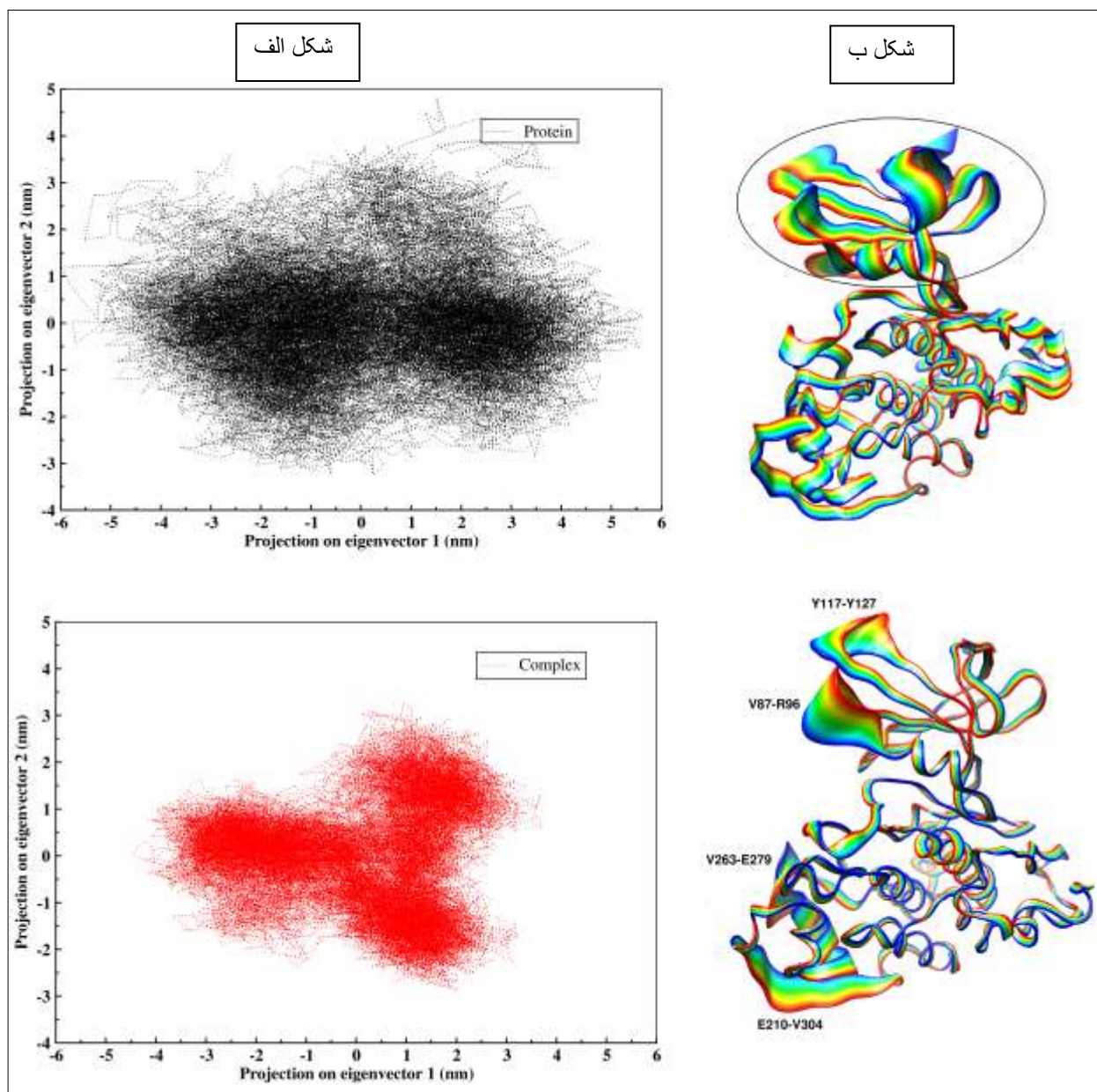
#### انرژی آزاد گیبس (Gibbs Free Energy Landscape)

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 می‌شود در پروتئین آزاد کنفورماسیون های پایدار (رنگ آبی) در دو کلاستر به صورت پخش شده می‌باشند 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



شکل ۸- نمودار مقادیر ویژه در برابر شاخص بردار ویژه مربوطه که از ماتریکس کوواریانس نوسان اتم های بدنه در طول شبیه سازی بدست آمده

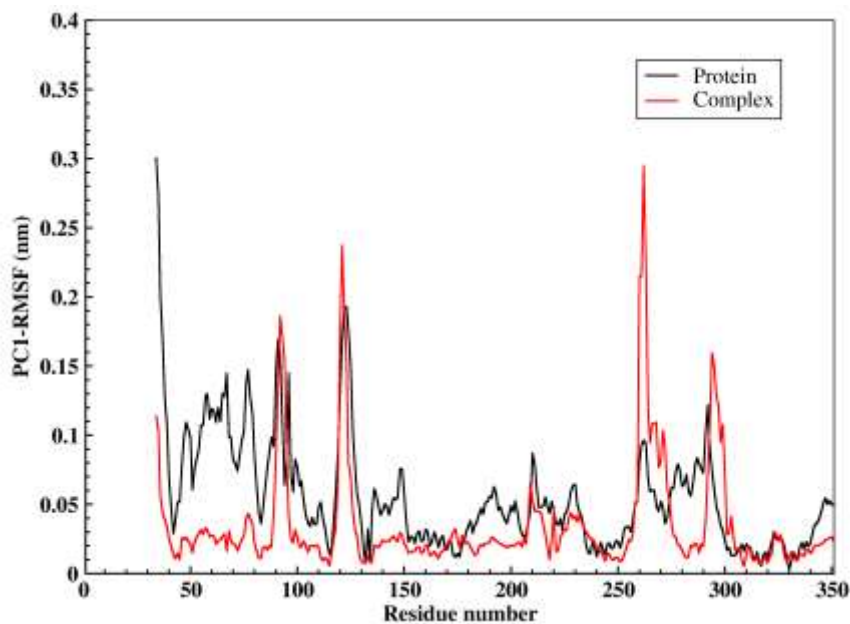
است



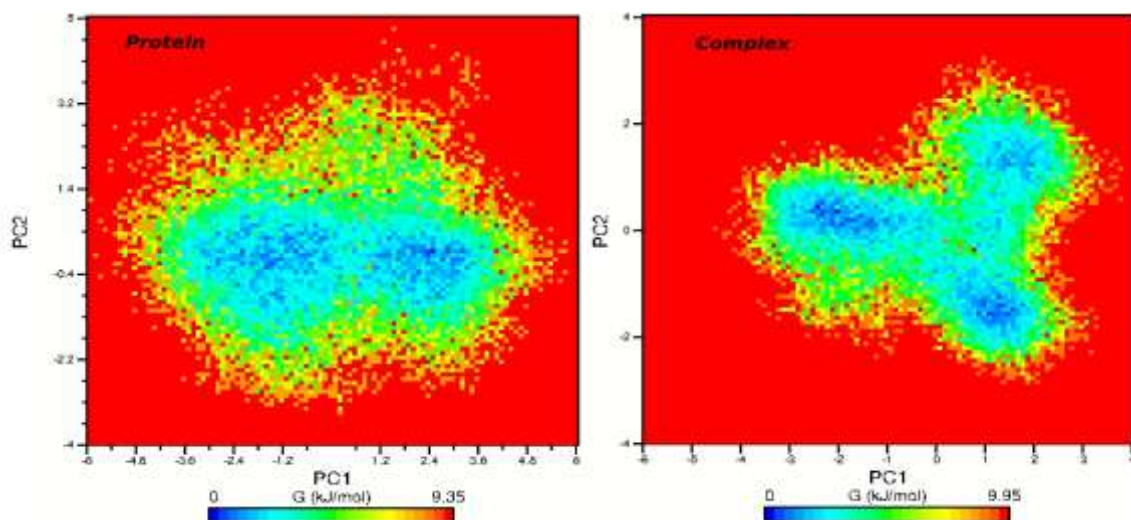
شکل ۹- نمودار PCA مربوط به فضای فاز پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند در PC1 و PC2

هیچکدام از حالت‌ها ساختار دوم پروتئین تغییر محسوسی نشان نمی‌دهد. در جدول ۲ میانگین ساختار دوم پروتئین در حضور و عدم حضور لیگاند نشان داده شده است. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود تفاوت محسوسی بین فراوانی ساختار دوم در حضور و عدم حضور لیگاند مشاهده نمی‌شود.

همانطور که در شکل ۱۲ مشاهده می‌شود 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) می‌باشد. طبق شکل ۱۲ در



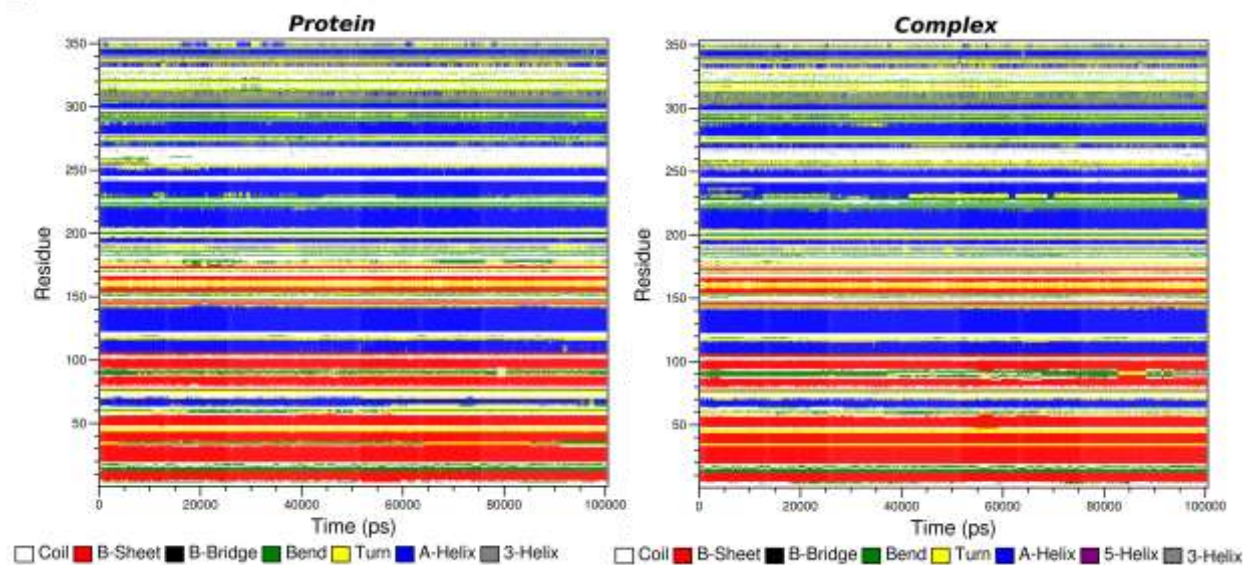
شکل ۱۰- نمودار RMSF پروتئین در PC1 در حضور و عدم حضور لیگاند



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

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

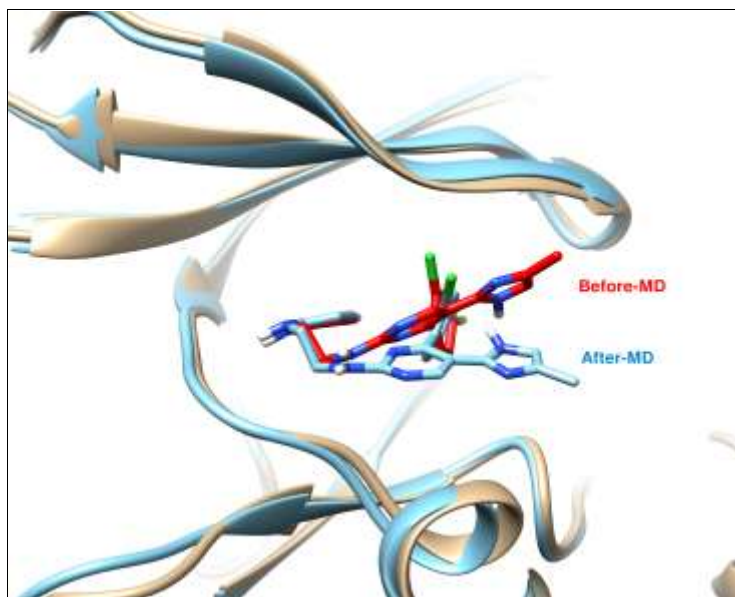
باشد که نشان دهنده نقش مهم این نوع میانکنش در اتصال لیگاند به پروتئین می باشد. همچنین طبق این جدول مقدار انرژی الکترواستاتیک برابر با  $33/710$  کیلوژول بر مول است که در مقایسه با میانکنش های واندروالسی نقش مختصری را در اتصال دارا می باشد. همچنین طبق این جدول مقدار انرژی حلال پوشی قطبی  $119/938$  کیلوژول بر مول می باشد. مقدار انرژی حلال پوشی غیرقطبی نیز برابر با  $20/313$  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 در واقع اندکی به سمت پایین حرکت کرده است.

#### 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  $224/359$  کیلوژول بر مول می

جدول ۳- انرژی آزاد اتصال بین لیگاند و پروتئین

kJ/mol	$\Delta G_{vdw}$	$\Delta G_{elec}$	$\Delta G_{solv-polar}$	$\Delta G_{solv-nonpol}$	$\Delta G_{MMPBSA}$
کمپلکس	$-224/359$	$-33/710$	$119/938$	$-20/313$	$-158/445$



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

ترتیب، ما نشان دادیم که اتصال CHIR99021 به پروتئین GSK3 $\beta$  دارای یک کنفورماسیونی است که از کنفورماسیون ساختار پروتئین در حالت آزاد متفاوت است. تجزیه و تحلیل شبیه‌سازی *in silico* نشان داد که ترکیب CHIR99021 اثرات دارویی خود را از طریق برهمکنش با ریشه‌های اسید آمینه اصلی اعمال می‌کند و ایده‌ای در مورد شبیه‌سازی انرژی آزاد CHIR99021 در محل عملکردی GSK3 $\beta$  ارائه می‌دهد. داده‌های ارائه شده در اینجا نشان می‌دهد 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 می‌شود. علاوه بر این، برهمکنش و اندروالس نقش اصلی را در اتصال CHIR99021 به GSK3 $\beta$  داشت. قانون Jorgensen's Rule of 3 violations (برای پیش‌بینی و بهینه‌سازی فعالیت ترکیب شیمیایی) برای CHIR99021 کمتر از ۱ بود که نشان‌دهنده مناسب بودن آن برای فعالیت‌های بیولوژیکی است.

### ۳- پارامترهای ADMET ریز مولکول CHIR99021

در ارزیابی‌های ADMET برخی از خصوصیات فارماکوکینتیک ریز مولکول‌های CHIR99021 اعم از میزان انحلال پذیری در آب، میزان جذب از روده، قابلیت نفوذپذیری از پوست (QPlog Kp) پیش‌بینی شده است. سایر خصوصیات فارماکوکینتیک کلیدی ترکیب CHIR99021 در جدول ۴ خلاصه شده است.

### نتیجه‌گیری

ترکیبات شیمیایی ریز مولکول که قادر به مهار فعل و انفعالات بین پروتئین‌های خاص هستند، مدتهاست که به یک رویکرد امیدبخش برای تنظیم سرنوشت سلول‌های بنیادی و تمایز مستقیم برای اهداف بالینی تبدیل شده‌اند. پیش‌بینی برهمکنش این ترکیبات و بررسی خصوصیات فارماکوکینتیک این ریز مولکول‌ها با پروتئین‌های هدفشان از طریق شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) می‌تواند مکانیسم دقیق عملکرد آنها را شناسایی کرده و راه را برای انتخاب مهارکننده‌های قوی و مناسب هموار سازد. بدین

جدول ۴- خصوصیات ADMET یا فارماکوکینتیک ریز مولکول های CHIR99021

خصوصیات ADMET	CHIR99021	خصوصیات ۹۵٪ داروها
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 ( $\text{mol.dm}^{-3}$ )	-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 IC50	-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 Kp for skin permeability (Kp in cm/h)	-2.422	
Jm, max transdermal transport rate ( $\mu\text{g/cm}^2.\text{h}$ )	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	

پروتئین و مهار خواص عملکردی زیستی آن دارد. این یافته یک الگوی جدید برای تأثیر CHIR99021 بر روی ساختار  $\text{GSK3}\beta$  تعیین می کند و امکان طراحی یک ریز مولکول اختصاصی تر برای  $\text{GSK3}\beta$  را فراهم می کند.

براساس قانون ۵ گانه لیپینسکی، CHIR99021 دارای فعالیت زیست شناسی دارویی خاصی است تا در مقایسه با سایر مهارکننده های  $\text{GSK3}\beta$  به یک ترکیب فعال عملکردی تبدیل شود. در مجموع، می توان نتیجه گرفت که اتصال CHIR99021 به  $\text{GSK3}\beta$  اثر قابل توجهی بر میزان سختی

## منابع

1. Krishnankutty, A., et al., *In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  activity in neurons and brains*. Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-15.
2. Racaud-Sultan, C. and N. Vergnolle, *GSK3 $\beta$ , a Master Kinase in the Regulation of Adult Stem Cell Behavior*. Cells, 2021. **10**(2): p. 225.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
- ۱۷ Huang, J., et al., *Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling via GSK3 inhibitors direct differentiation of human adipose stem cells into functional hepatocytes.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-12.
- ۱۸ Wang, H., J. Hao, and C.C. Hong, *Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling.* ACS chemical biology, 2011. **6**(2): p. 192-197.
- ۱۹ Tortelote, G.G., et al., *Complexity of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway: Searching for an activation model.* Cellular Signalling, 2017. **40**: p. 30-43.
- ۲۰ 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.
- ۲۱ 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.
- ۲۲ Bennett, C.H., *Efficient estimation of free energy differences from Monte Carlo data.* Journal of Computational Physics, 1976. **22**(2): p. 245-268.
- ۲۳ Berendsen, H., *Report of CECAM Workshop: models for protein dynamics.* Orsay, May, 1976. **24**.
- ۲۴ Bowers, K., et al., *Proceedings of the ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06).* Tampa, Florida, November, 2006: p. 11-17.
- ۲۵ Bowman, G.R., V.A. Voelz, and V.S. Pande, *Atomistic folding simulations of the five-helix bundle protein  $\lambda$ 6-85.* Journal of the American Chemical Society, 2011. **133**(4): p. 664-667.
- ۲۶ 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.
- ۲۷ Case, D.A., et al., *The Amber biomolecular simulation programs.* Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1668-1688.
- ۲۸ 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.
- ۲۹ Christen, M., et al., *The GROMOS software for biomolecular simulation: GROMOS05.* Journal of computational chemistry, 2005. **26**(16): p. 1719-1751.
- ۳۰ 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.
- ۳۱ Essmann, U., et al., *A smooth particle mesh Ewald method.* The Journal of chemical physics, 1995. **103**(19): p. 8577-8593.
- ۳۲ 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.
- ۳۳ 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.
- ۳۴ 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.-.
- ۳۵ Bocci, G., et al., *ADME-Space: a new tool for medicinal chemists to explore ADME properties.* Scientific reports, 2017. **7**(1): p. 1-13.
- ۳۶ Doogue, M.P. and T.M. Polasek, *The ABCD of clinical pharmacokinetics.* 2013, Sage Publications Sage UK: London, England.
- ۳۷ QikProp, version 4.4, Schrödinger, LLC, New York, NY, Release 2015-2
- ۳۸ 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 $\beta$ protein in the presence of CHIR99021 ligand using molecular simulation and docking

Kazemi K.<sup>1</sup>, Shahsavarani H.<sup>2,3</sup>, Pakzad P.<sup>1</sup> and Shokrgozar M.A.<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup>Department of Cell and Molecular Sciences, Faculty of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup>Laboratory of Regenerative Medicine and Biomedical Innovation, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran

<sup>4</sup>Department of National Cell Bank, Pasteur Institute of Iran, Tehran, I.R. of Iran

## Abstract

Glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) 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 $\beta$  leads to the differentiation of PSCs, the use of appropriate inhibitors that inhibit GSK3 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  through hydrogen bonding and produces its inhibitory effect, thus causing instability of the GSK3 $\beta$  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 $\beta$ ; ADMET; molecular dynamics (MD) simulation; Molecular docking