## طراحی یک پپتید چهار اسیدآمینهای نوین برای مهار دومین BIR3 پروتئین XIAP بهوسیلهٔ شبیهسازی دینامیک مولکولی

فاطمه میراحمدی باباحیدری<sup>۱</sup> و کریم مهنام ۱<sup>۰۴\*</sup> دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۹۴/ ویرایش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۸ /انتشار: ۱۳۹۷/۶/۱۹

> <sup>ا</sup>گروه زیستشناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران <sup>۲</sup> مرکز پژوهشی فناوری نانو، دانشگاه شهر کرد، شهر کرد، ایران \*مسئول مکاتبات: mahnam.karim@sci.sku.ac.ir

چکیده. پروتئین XIAP یکی از اعضای پروتئینهای مهارکننده آپوپتوز یا مرگ برنامهریزی شده یاخته (خانواده IAP) است. پروتئین XIAP یکی از اعضای پروتئینهای مهارکننده آپوپتوز یا مرگ برنامهریزی شده یاخته (خانواده IBR) است. پروتئین XIAP یخی BIR3 به طور مستقیم به پایانه N پروتئین آپوپتوز بازی می کند و دربر گیرندهٔ سه دومین BIR3 (Baculoviral IAP Repeat) است. دومین سوم این پروتئین یعنی BIR3 به طور مستقیم به پایانه N پروتئین کاسپاز ۹ متصل می شود و آپوپتوز را مهار می کند. نشان داده شده است که چهار اسید آمینه پایانه N پروتئین SMAC یعنی AVPI می توانند به BIR3 متصل شوند و آن را مهار کنند و بنابراین، آپوپتوز را مه راهاندازند. در این پژوهش ۱۵ پپتید به دومین BIR3 داک شده اند و سپس ۱۰ نانو ثانیه شیه سازی دینامیک مولکولی روی هر کمپلکس به دست آمده از داکینگ انجام شد. سپس از روش مکانیک مولکولی پوازی بولتز من سطح در دسترس حلال (MM/PBSA) برای بر آورد انرژی اتصال آزاد پیتیدها به دومین BIR3 استفاده شد. نتایج روش مکاه MM/PBSA هماهنگی نصبی با روش داکینگ وهماهنگی خوبی با نتایج تجربی موجود داشتند. نتایج نشان داد که پیتیدها به دومین BIR3 استفاده شد. نتایج روش مکانیک مولکولی پوازی بولتز من سطح در دسترس حلال (MM/PBSA) برای بر آورد انرژی اتصال آزاد پیتیدها با کمترین انرژی آزاد اتصال عبارت اند از ATPF و MAPA و ARPF. همچنین بررسی پیوندهای میان این پیتیدها و دومین BIR3 در ساختار نهایی کمپلکس ها آشکار کرد که لوسین ۳۰۷ و تر نونین ۸۰۰ و گلو تامات ۹۲۴ و تیروزین ۳۲۴ دومین BIR3 برای اتصال پیتیدها ضروری هستند. نتایج تفکیک انرژی آزاد و تعیین سهم باقی مانده می شکاف دومین BIR3 در اتصال به این پیتیدها در طول شیه سازی نیز هماهنگ با نتایج پیشین بود و نقش همان باقی مانده از از این این می داد. همچنین گرایش بالای این پیتیدها نسبت به پیتید طبیعی (AVP) و مقایسه آنها با سایر پیتیدها آشکار می کند که وجود بار مثبت در جایگاه دوم پیتید و وجود می داد. همچنین گرایش بالای این پیتیدها نمان قدرت اتصال پیتید هماهنگ با نتایج پیشین بود و نقش همان باقی ماده ان بان

**واژههای کلیدی**. آپوپتوز، پروتئین، داکینگ، روش مکانیک مولکولی و پوازی بولتزمن- سطح در دسترس حلال، سرطان

# Designing a new tetrapeptide to inhibit the BIR3 domain of the XIAP protein via molecular dynamics simulations

Fateme Mirahmadi-Babahaidary & Karim Mahnam<sup>1,2\*</sup> Received 13.7.2017/ Revised 17.02.2018/ Accepted 28.02.2018/ Published 20.09.2018

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran <sup>2</sup>Nanotechnology Research Center, Shahrekord University, Shahrekord, Iran \*Correspondent author: mahnam.karim@sci.sku.ac.ir

**Abstract.** The XIAP protein is a member of apoptosis proteins family. The XIAP protein plays a central role in the inhibition of apoptosis and consists of three Baculoviral IAP Repeat domains. The BIR3 domain binds directly to the N-terminal of caspase-9 and therefore it inhibits apoptosis. N-terminal tetrapeptide region of SMAC protein can bind to BIR3, inhibit it and subsequently induce apoptosis. In this study, fifteen tetrapeptides were docked into the BIR3 domain and then 10 ns molecular dynamics simulations were performed on each of the BIR3-peptide complex obtained from docking. MM/PBSA method was subsequently used to calculate the binding free energy of peptides to BIR3. The results of MM/PBSA method were in good coordination with docking and existing experimental results. The results showed the most potent peptides with the lowest binding free energy for binding to BIR3 included ATPF, AKPW and ARPF peptides. Also, investigation of bonds between these peptides and BIR3 domain in the final structure of complexes showed that Leu 307, Thr 308, Glu 314 and Tyr 324 of the BIR3 domain during MD simulation was inconsistent with previous results and approved the roles of the same residues. The higher affinity of these peptides relative to native peptide (AVPI) and comparing them with other peptides revealed that the existence of positive charge in the second position and the existence of the aromatic group in the fourth position led to more binding affinity.

Keywords. apoptosis, cancer, docking, MM/PBSA method,

168/181

#### مقدمه

آپوپتوز یا مرگ برنامهریزیشده فرایندی یاختهای است که برای فرگشت رویان و حفظ پایداری بافتهای سالم و حذف پاختههای ناقص در بدن و مهار سرطان ضروری است (Seiter, 2014). دو مسير پيامرسان آپويتوز را القا مي کنند که عبارتند از مسير خارجي که بهوسیلهٔ گیرندههای مرگ مانند Fas (آنتیژن آپوپتوز ۱ (APO-1 or APT)) و مسير داخلي كه با آزادشدن سيتوكروم C از ميتوكندري آغاز مي شود (Bagheri et al., 2012). اين مسيرها به فعال شدن يک خانواده از يروتئازها به نام كاسيازها منجر مي شوند. كاسپازها يك كلاس ويژه از پروتئازها دربرگيرنده آسپارتات-سیستئین هستند و از یک سیستئن دربر گیرنده گروه تیول در جایگاه فعال خود استفاده مي كنند كه باعث آبكافت ييوند ييتيدي در يايانه پروتئین می شوند. کاسپازها در حالت عادی به صورت غیرفعال C ویرو کاسیاز در یاختههای هدف وجود دارند (زیموژن). شکست در دو ييش دومين يايانهٔ N و چهار جايگاه دومين يروتئازها مي تواند زيموژن را به آنزيم فعال تبديل كند. در اين حالت فعاليت اتوفاژي كاسپازها به هضم محتويات سلول منجر مي شود. فعال شدن كاسپاز به برش شماری از پروتئینهای سلول و مرگ یاخته منجر می شو د (Wu et al., 2014; Mcllwain et al., 2015). فعاليت كاسپازها با يک کلاس از يروتئين ها که IAP ( يروتئين ها که Inhibitor of Apoptosis Proteins) نامیدہ می شوند کنترل می شود. اعضای خانوادہ IAP با مهار کاسپازها باعث جلوگیری از آپوپتوز میشوند زیرا بهطور مستقیم به کاسپازها متصل میشوند و در مسیر پیامرسانی آپوپتوز و مرگ سلولى تداخل ايجاد مىكنند (Huang, 2002). پروتئين XIAP) یکی از اعضای (X-Linked Inhibitor of Apoptosis) این خانواده IAP است. یروتئین XIAP یکی از نیرومندترین مهارکنندههای کاسیازها است و ثابت مهارکنندگی آن در حد نانومولار است (Carter et al., 2003). پروتئين XIAP وزن مولکولی ۵۷ کیلو دالتون و سه دومین BIR دارد ( Baculoviral BIR1) (IAP Repeat و BIR3). دومين BIR2 و BIR3 پروتئین XIAP بهترتیب به کاسپاز ۳ یا ۷ و ۹ متصل و آنها را مهار میکنند و مانع مرگ سلولی می شوند ( Cossu et al., 2008). دومین BIR3 دربر گیرنده ۷۰ اسیدآمینه و یک یون روی و یک بخش ضروری برای اتصال به کاسپاز است. این دومین دو جایگاه اتصال برای مهار کاسپاز ۹ دارد که شامل یک بخش

ضروری برای دیمرشدن BIR3 و یک موتیف اتصال (IBM) (IAP-binding motif) است. این موتیف دربر گیرنده یک شکاف سطحی حفاظتشده روی دومین BIR3 است. ییتید ATPF (Ala-Thr-Pro-Phe) در یایانه N زیر واحد کوچکترکاسیاز ۹ مى تواند به موتيف IBM متصل شود. فعاليت مهار كنندگى پروتئين XIAP بهوسیلهٔ یک پروتئین میتوکندیایی به نام SMAC تنظیم می شود. این پروتئین از غشا خارجی میتو کندری به داخل سیتو پلاسم رها و به دومین BIR3 متصل می شود و آن را مهار می کند. پیتید Ala-Val-Pro-Ile)AVPI) از يروتئين SMAC مى تواند به دومین BIR3 متصل شود و فعالیت مهار کنندگی آن را از بین ببرد. بنابراین، یک رقابت میان SMAC و کاسپاز ۹ برای اتصال به دومین BIR3 وجود دارد (Kashkar, 2010; Cai et al., 2011). جایگاه اتصال دومین BIR3 برای پروتئین SMAC و کاسپاز ۹ دربر گیرنده ۳۳ باقیمانده (لوسین ۲۹۲ تا تیروزین ۳۲۴) با این ترادف است: -LGEGDKVKCFHCGGGLTDWKPS Yang et al., 2009) EDPWEQHAKWY). نقص در تنظیم برنامه مرگ یاخته یکی از دلایل بنیادی در گسترش یاختههای سرطانی است. برخلاف یاختههای طبیعی این یاختهها تحت فشارند و برای زندهماندنشان بهشدت وابسته به از کارافتادن مسیر پیامرسانی آپویتوز هستند؛ بنابراین، داروهایی که دوباره مسیر آپویتوز را در یاختههای سرطانی به راه میاندازند، در درمان سرطان کار آمدند. مولکولهای کوچک که بتوانند کارکرد یروتئین SMAC را تقلید کنند می توانند باعث مهار عمل کرد پروتئین XIAP بر کاسپاز و سرانجام باعث درمان سرطان شوند (Flygare, 2012). بنابراین، می توان با جلوگیری از فعالیت پاد آپوپتوزی پروتئین XIAP بهوسیلهٔ پیتیدهای کوچک متصل شونده به دومین BIR3 یاختههای سرطانی به داروهای شیمیدرمانی حساس کرد. به این پپتیدها مولکولهای کوچک تقلیدکننده SMAC گفته می شود و ترادف آنها مانند جایگاه اتصال پایانه N پروتئین SMAC که به پروتئین XIAP متصل می شود، است. بیشتر تقلید کننده های SMAC فعالیت بالایی دارند ولی به علت ویژگی پیتیدی که دارند کموبیش ناپايدارند و نمي توانند به طور کار آمد وارد ياخته ها شوند ( Fulda et al., 2002). روش دیگر طراحی مولکول های غیر پپتیدی كوچك بر پايه پپتيد AVPI مهاركنندهٔ طبيعي (SMAC) است. گروه Wang شماری از مولکولهای مقلد SMAC غیر پپتیدی

تکظرفیتی و دو ظرفیتی را پیدا کردند. آنها مشاهده کردند که مقلدهای هسته SMAC با دو حلقه قدرت مهار کنندگی زیادی دارند در این مولکولها یک حلقه هفت اتمی با حلقوی شدن گروه ایزوپروپیل والین ۲ و یک حلقه پنج اتمی (پرولین ۳) وجود داشت (Ling et al., 2010) و همكاران كشف كردند كه گروه-های آمین آزاد متیله شده باعث افزایش فعالیت پپتیدهای مقلد می شود ( Liu et al., 2000). در حال حاضر هدف بیشتر پژوهشها ساخت مقلدهای نوین است و شمار خیلی کمی از پژوهشها به جنبه نظری این مسئله توجه کردهاند. در پژوهشها نظری می توان انرژی آزاد اتصال مقلدهای SMAC را با -BIR3 XIAP به دست آورد. از سوی دیگر می توان تغییرات ساختاری مقلدهای SMAC و دومین BIR3 را دراثر اتصال به هم (که تابه حال بررسی نشده است) را تعیین کرد. در این پژوهش از روش داکینگ و شبیهسازی دینامیک مولکولی (MDS) بهمنزلهٔ روشی نظری برای بررسی فعالیت مهارکنندگی مقلدهای SMAC استفادهشده است. روش داکینگ یک روش باارزش برای بهدست-آوردن یک گمان اولیه و خام از محل اتصال یک لیگاند یا دارو به یک پروتئین است و از این روش استفاده زیادی در داروسازی و طراحي دارو و علوم مرتبط مي شود (Morris et al., 2009). روش شبیه سازی دینامیک مولکولی هم ابزاری مهم و پر کاربرد نظری است که به پژوهشگران شیمی، فیزیک و زیستشناسی امکان مدلسازی رفتار دینامیکی میکروسکوپی سامانههای گوناگون مانند گازها، مايعات، جامدات، سطوح و مولكولهاي زيستي و غيره را ميدهد. در یک شبیهسازی دینامیک مولکولی معادله کلاسیک حرکت برای هسته اتمهای یک مولکول حل میشود. بنابراین، روش شبیهسازی دینامیک مولکولی پنجرهای رو به رفتاردینامیکی اتمهای تشکیل دهندهٔ سامانه می گشاید. روش های محاسبه انرژی آزاد اتصال لیگاندها به پروتئین ها شامل روش مکانیک مولکولی پوازی بولتزمن سطح در دسترس حلال (MM/PBSA) و روش انرژی میانکنش خطی (LIE) و روشهای اختلالی وغیره هستند. روش MM/PBSA روش فراگیری در محاسبه انرژی اتصال مولکول های کوچک به مولکولهای زیستی است که یک حد واسطی میان روشهای تجربی و روشهای پرهزینه مانند روش اختلالی ازنظر دقت و هزینه محاسباتی است. این روش در شمار زیادی از سامانه ها با موفقيت امتحان شده است (Genheden & Ryde 2015).

Nova Biologica Reperta 5 (2): 168-182 (2018)

هدف از انجام این بررسی طراحی یک پپتید کوچک به منظور مهار دومین BIR3 پروتئین XIAP با استفاده از روش دینامیک مولکولی و داکینگ است. همچنین از روش MM/PBSA برای محاسبهٔ دقیق انرژی آزاد اتصال و میزان مشارکت باقی مانده های دومین BIR3 در اتصال به پپتید استفاده شده است. علت گزینش این دومین این است که در اتصال پروتئین XIAP به کاسپاز ۹ تنها این دومین نقش دارد و حضور دیگر دومین ها اثری در نتایج ندارد بنابراین در نظر گرفتن این دومین به تنهایی کافی است (Sun *et al.*, 2000).

#### مواد و روشها

ساختار سهبعدی دومین BIR3 از بانک ساختار سهبعدی پروتئینها (کدPDB : PDB) گرفته شد. در ابتدا ۱۰ نانوثانیه شبیهسازی دینامیک مولکولی بهمنظور بهدست آوردن ساختار پایدارتر و بهتر برای دومین آزاد BIR3 روی آن انجام شد. سپس از روش داکینگ و شبیهسازی دینامیک مولکولی برای بررسی تمایل اتصال پیتید به دومین BIR3 استفاده شد.

#### روش داکینگ

در ابتدا ۱۵ پپتید چهار اسیدآمینهای طراحی شد (جدول ۱) و بهوسیلهٔ نرمافزار هایپر کم ۸ (Hyperchem8) ساختار سهبعدی آنها رسم و بهینه شدند (http://www.hyper.com). برای بهینهسازی از روش مکانیک مولکولی با الگوریتم کاهش پرشیب و میدان نیروی امبر استفاده شد. محاسبات داکینگ با نرمافزار اتوداک ۴/۲ (Autodock4) انجام شد (Morris et al., 1998 & 2009). در داکینگ برای جستجوی فضای صورتبندی پیتید در اطراف دومین BIR3 از الگوریتم ژنتیک لامار کی (LGA) و برای محاسبه انرژی اتصال از یک تابع انرژی نیم تجربی استفاده شد. مرکز جعبهٔ گرید در محل باقیمانده ترئونین ۳۰۸ قرار داده شد. این باقیمانده در وسط جایگاه اتصال دومین BIR3 به پروتئین SMAC است. اندازهٔ جعبهٔ گرید ۶۰ در ۶۰ در ۶۰ نقطه و فاصله میان نقاط گرید ۳۷۵٪. انگستروم درنظر گرفته شد. این ابعاد بهاندازهٔ کافی برای چرخش آزاد پپتید در حین انجام داکینگ بزرگ هستند. از سنجه (پارامتر)های پیش فرض در مراحل داکینگ استفاده شد بهجز این که اندازه های tstep و dstep و qstep به تر تیب ۰/۲ انگستروم و ۵ درجه و ۵ درجه در نظر گرفته شدند ( Mahnam & Hoghoughi, ا 2014). پروندههای ورودی برای برنامه اتوداک توسط برنامه اتوداک تولز ۴/۲ آماده شدند. در این برنامه هیدروژنهای غیرقطبی

ِ آنھا	شماری از	تفکيک (K <sub>D</sub> )	سىشدە و ثابت	، پپتیدهای بررس	م و ترادف	<b>جدول ۱</b> - نام
--------	----------	-------------------------	--------------	-----------------	-----------	---------------------

Table 1. The name and sequence of the studied peptides and their experimental dissociation constant (K<sub>D</sub>).

KD (μM)†	ترادف تكحرفي	تر ادف سەحر فى	ئىمار ە پېتىد
48/.	AVPI	Ala-Val-Pro-Ile	1
*NR	Methyl-AVPI	N-methyl-Ala-Val-Pro-Ile	2
NR	Ethyl-phenyl-AVPI	N-ethyl-phenyl-Ala-Val-Pro-Ile	3
11/.	AVPW	Ala-Val-Pro-Trp	4
NR	AKPF	Ala-Lys-Pro-Phe	5
NR	AKPW	Ala-Lys-Pro-Trp	6
NR	AKPY	Ala-Lys-Pro-Tyr	7
02/.	ARPF	Ala-Arg-Pro-Phe	8
NR	ATPF	Ala-Thr-Pro-Phe	9
NR	AVFI	Ala-Val-Phe-Ile	10
04/.	AVPF	Ala-Val-Pro- Phe	11
NR	ARPW	Ala-Arg-Pro-Trp	12
NR	ARPY	Ala-Arg-Pro-Tyr	13
NR	ATPW	Ala-Thr-Pro-Trp	14
NR	ARPI	Ala-Arg-Pro-Ile	15

† نتایج تجربی از منبع kipp (2002) kipp) گرفته شده است. \*NR: گزارش نشده.

†Expermental K<sub>D</sub> were obtained from kipp ( kipp et al., 2002) paper , \*NR: not report

در اتم کربن متصل به آنها ادغام می شوند و از الگوریتم Gasteiger برای محاسبه بارهای جزیی اتمهای پیتیدها استفاده شد. تعداد ۲۰۰ اجرای اتوداک برای هر پیتید انجام شد. همچنین آستانه ۲ انگستروم برای خوشهبندی نتایج داکینگ در نظر گرفته شد.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

شبیهسازی دینامیک مولکولی بهوسیلهٔ نرمافزار گرومکس ۴ (Gromacs 4) بهوسیلهٔ میدان نیروی امبر ۹۹ انجام شد Van Der Spoel et al., 2005; Hess et al., 2008;) Berendsen et al., 1995). پرونده توپولوژی پېتيدهای غيرطبيعي (پیتید ۲ و ۳) بهوسیلهٔ نرمافزار Acpype/Antechamber بر پایه میدان نیروی امبر عمومی (GAFF) ساخته شد ( ,) میدان نیروی امبر عمومی 2012). بارهای جزیی اتمهای پپتید با یک روش دقیق کوانتومی به نام برازش پتانسیل Merz-Kollman در نرمافزارگاوسین ۹۸ به روش هارترى- فاك (HF) و مجموعه يايه \*6-31G محاسبه (Frisch et al., 1998) و به توپولوژی گرومکس وارد شدند (Cornell et al., 1993). این بارهای جزیی اتمی پپتید هماهنگ با بارهای اتمی جزیی اتمهای BIR3 هستند که در میدان نیروی امبر استفاده می شوند. پرونده تو پولوژی دیگر پیتیدهای طبیعی با استفاده از فرمان pdb2gmx در برنامه گرومکس ساخته شد. کمیلکس های بهدست آمده با بهترین موقعیت پیتیدها در دومین BIR3 درروش داکینگ برای شبیهسازی گزینش و در یک جعبه آب شامل حدود ۸۲۰۰ مولکول آب با مدل TIP4P قرار داده شدند. همچنین ۲۱ یون سدیم و ۲۱ (یا ۲۲ در پیتیدهایی که بار کل مثبت

یک داشتند) یون کلر به طور تصادفی جایگزین مولکول های آب شدند. ابتدا کل سامانه با الگوریتم کاهش پرشیب و شیب مزدوج بهینه شدند (minimization). در مرحله بعد به منظور به تعادل رساندن سامانه به مدت ۵۰۰ پیکو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NVT (دما و حجم و تعداد مولکول های ثابت) و سپس ۱۰۰۰ پیکو ثانیه در هنگرد NPT (دما و فشار و تعداد مولکول های ثابت) با ثابت در نظر گرفتن مکان اتم های پروتئین ( position ثابت) با ثابت در نظر گرفتن مکان اتم های پروتئین ( restraint مولکولی در شرایط NPT و در دمای ۳۰۰ کلوین و گام زمانی ۲ فمتو ثانیه بدون این که مکان اتم های پروتئین ثابت در نظر گرفته شود، انجام شد. جزئیات بیشتر در مقالات مشابه ذکر شده است ( یا 2005; Mahnam & Hoghoughi, 2014; Lindhal *et al.*, 2002).

#### محاسبات MM/PBSA

درروش MM/PBSA انرژی آزاد اتصال با فرمول زیر محاسبه میشود: AG<sub>bind</sub>=G<sub>complex</sub>-G<sub>protein</sub>-G<sub>ligand</sub>

در این فرمول عبارات بالا بهترتیب انرژی آزاد اتصال پپتید به پروتئین، انرژی آزاد کمپلکس، انرژی آزاد پروتئین BIR3 بهتنهایی و انرژی آزاد پپتید بهتنهایی هستند. این انرژی ها مانند کارهای پیشین محاسبه شدند (Baker *et al.*, 2001). برای این کار از فرمان محاسبه شدند (trajectory). برای این کار از قرمان کمپلکس استفاده می کند کمک گرفته شد. همچنین از قسمت آنتروپی هم در محاسبات همچشم پوشی شد، زیرا کاهش آنتروپی Nova Biologica Reperta 5 (2): 168-182 (2018)

برای همه پیتیدها یکسان است و تأثیری در مقایسه نسبی انرژی آزاد اتصال ييتيدها ندارد ( Kollman et al., ) اتصال ييتيدها ندارد .(2000

### نتايج و بحث

## نتايج داكينك

نتايج داكينگ نشان داد كه همه پپتيدها توانايي اتصال اوليه به شکاف IBM دومین BIR3 را دارند. جدول ۲ سهم انرژی الكتروستاتيك و واندروالسي (به علاوه ييوند هيدروژني و جدا شدن آب) در اتصال هرکدام از پپتیدها را نشان میدهد. در این جدول همچنین کمترین انرژی اتصال پرجمعیت ترین خوشه (بهدست آمده از دستهبندی نتایج داکینگ پپتیدها به دومین BIR3) ذکر شده است. پیتید ۶ و ۸ و ۹و ۱۱ دارای کمترین انرژی اتصال اند؛ بنابراین، این پپتیدها را می توان به عنوان پپتیدهای مهم در اتصال به دومین BIR3 در نظر گرفت. همه میانکنش های الکتروستاتیک، واندروالسي و هيدروژني دراتصال نقش دارند ولي يک بررسي کلي این انرژیها نشان میدهد که کموبیش در همه پپتیدها در کل سهم انرژی واندروالسی (وپیوند هیدروژنی و جدا شدن آب) بیشتر از سهم انرژی الکتروستاتیک است. البته نتایج داکینگ خام وغیردقیقاند زیرا بار جزیی اتمهای پپتیدها با روش Gasteiger-Marsili محاسبه شدهاند که این روش خیلی دقیق نیست. این روش از حالت پروتونه پپتید چشمپوشی میکند و بار کل پپتید را صفر در نظر می گیرد درحالی که شماری از پپتیدها بارکل مثبت دارند. همچنین در ساخت فایل های ورودی برنامه اتوداک هیدروژن های غیرقطبی حذف مي شوند. بنابراين، با روش داكينگ نمي توان قضاوت دقيقي درمورد اهميت بيشترميانكنش الكتروستاتيك ويا واندروالسي (هیدروفوبیک) کرد. ازنتایج داکینگ دراینجا تنها برای مقایسه انرژی اتصال پیتیدهاو بهدست آوردن یک موقعیت شروع برای شبیه-سازی دینامیک مولکولی استفادهشده است. در این بررسی از روش های دقیق تری مانند شبیهسازی دینامیک مولکولی برای محاسبه انرژی اتصال استفاده شد.

#### نتايج شبيهسازی دومين آزاد BIR3

جذرمیانگین مربع انحرافات (RMSD) بیانگر میزان جابجایی همه اتمهای پروتئین درطی زمان شبیهسازی نسبت به ساختار شروع (در اين جا ساختار كريستالو گرافي) است. نمودار جذر ميانگين انحرافات (RMSD) اسكلت اصلى دومين BIR3 نسبت به لحظه شروع در

یافته های نوین در علوم زیستی، جلد ۵، شمارهٔ ۲: ۱۸۲–۱۶۸

شکل ۱ نشان داده شده است که صاف شدن این نمودار وتغییرات

ناچیز آن (۰/۰۷ نانومتر) در چهار نانوثانیه آخر حاکی از به تعادل-

رسيدن اسكلت اصلي يروتئين است. تغيير نكر دن قابل توجه RMSD

در طول زمان شبیهسازی به معنی رسیدن پروتئین به ساختار پایدار و

تعادلی است و تغییر RMSD به معنی تغییرساختار پروتئین نسبت به

ساختار اولیه است. با میانگین گرفتن از RMSD درکل زمان

شبيهسازي مي توان ميزان جابجايي همهٔ اتم ها در كل زمان شبيهسازي

را نسبت به ساختار شروع بهدست آورد. اغلب مواقع این میانگین

زمانی از RMSD را از زمانی میگیریم که RMSD کموبیش

ثابت شده است و پروتئین دیگر تغییر ساختار نمی دهد. در این مطالعه

از آنجا که نمودار RMSD در ۴ نانو ثانیه آخر شبیهسازی صاف شده

بود، میانگین پارامترهای مهم در ۴ نانوثانیه پایانی یعنی از زمان ۶ تا

۱۰ نانوثانیه گرفتهشد. درجدول ۴ (ردیف نخستین) میانگین زمانی

جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی پروتئین

(Backbone) وهمچنین میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی میان

آب و پروتئین و میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی در داخل دومین

BIR3 در طول ۴ نانو ثانیه پایانی شبیهسازی ذکر شده است. همچنین

نمودار شعاع چرخش دومین BIR3 درحالت بدون پپتید در طول

شبیهسازی در شکل ۲ نشان داده شده است. تغییرات ناچیز (۰/۰۲

نانومتر) شعاع چرخش پروتئین در چهار نانوثانیه آخر شبیهسازی

نشاندهندهٔ رسیدن به ساختار پایدار است. از آنجا که ساختار شروع

ساختار کریستالو گرافی بوده است، ثابت ماندن شعاع چرخش نشان-

دهندهٔ بازنشدن ساختار پروتئین درطول شبیهسازی نیز است. میانگین

انرژی کل، انرژی پتانسیل و دما برای سامانه حاوی دومین BIR3

آزاد درچهارنانو ثانیه پایان شبیهسازی و نسبت هرز (drift) انرژی کل

به میانگین انرژی کل در جدول ۳ (ردیف نخست) ذکرشدهاند.

مقدار بسیار کم این نسبت (۰/۰۰۰۱) در طول شبیه سازی نشان می دهد

سامانه به حالت تعادل رسیده است وزمان شبیهسازی (۱۰ نانوثانیه)

کافی بوده است و قانون بقای انرژی کل در سامانه رعایت شده است.

منظور از به تعادل رسیدن این است که این پارامترها در ادامه زمان

شبیهسازی دیگر تغییر نکر دهاند و ثابت ماندهاند. مقدار کم نوسان دما

(۱/۹ کلوین) نشان میدهد که سامانه به تعادل دمایی رسیده است.

بهعلاوه تغییرات کم در میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی میان

دومین BIR3 و آب و درداخل پروتئین (جدول ۴) به این معنی است

که دومین BIR3 به ساختار پایداردر طول شبیهسازی رسیده است.

**جدول ۲**- انرژی الکتروستاتیک و مجموع انرژی واندروالسی و پیوند هیدروژنی و جداشدن آب و کمترین انرژی آزاد اتصال (کیلوژول برمول) پرجمعیت ترین خوشه پیتید به دومین BIR3 و جمعیت خوشهها در آن اجرا در داکینگ.

**Table 2.** Electrostatic energy and Van der Waals +hydrogen bond+ desolvation and the lowest binding energies (kJ/mol) of most populated tetrapeptides to BIR3 domain and population of clusters in that docking run.

انرژى الكتروستاتيك	انرژی واندروالسی+هیدروژنی+جداشدن آب (کیلوژول بر مول)	كمترين انرژي پرجمعيت ترين خوشه	جمعيت خوشه	شمارهٔ
(کیلوژول بر مول)		(کیلوژول بر مول)		پپتيد
-۴/۵۶	_٣·/۴۶	-۲۲/۵	۴۳	۱
-¥/A	_٣۶/۴λ	-۲۳/۰۵	٣٧	۲
$-\Lambda/\Lambda \Upsilon$	-¥1/9V	-۳۳/۰۱	۲۶	٣
- <del>\$</del> /AY	_44/24	-۲۸/۹۵	۳۶	۴
-1٣/1	-٣٤/١٨	-۲٩/٧٩	10	۵
-1·/·A	-47/09	-۳۵/۱۴	۲.	۶
- <b>٩</b> /٨٧	-٣•/٥	-11/84	۴۸	۷
-14/30	- <b>FF</b> /1A	-47/4	۲۳	٨
-1·/·A	-٣٨/١٢	-٣۴/۴٣	1	٩
-۴/۴λ	-٣۴/٨١	-۲۳/۰۵	١٣	۱۰
- <b>A</b> / <del>\$</del> \$	- <b>*</b> 9/17	-۳۵/۱۴	74	11
-1•/٩۶	- <b>\`</b> \$/\`\	-۳۱	١٣	۱۲
-٨/۴۵	- <del>Y</del> A/V	-Y9/V	١٢	۱۳
-٩/٧٩	-***/01	-۲۹/۵۳	74	۱۴
-11/VY	-***/V9	-۲٩/۲٨	٣٠	10



شکل ۱- نمودار جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی BIR3. در طول ۱۰ نانو ثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی. Fig. 1. Root mean square deviation (RMSD) of BIR3 backbone during 10 ns MD simulation.





با دومین BIR3 باشد. جذر میانگین مربع نوسانات ( BIR3 RMSF) (Square Fluctuations) یک باقی مانده نشان دهندهٔ ميزان جابجايي آن باقىمانده در طول شبيهسازي نسبت به مكان اوليه خودش است. بنابراین، RMSF هر باقیمانده نشانده انعطاف پذیری وجنبش آن باقیمانده در طول زمان شبیهسازی است. برای نمونه نواحی لوپ و انعطاف پذیر در پروتئین RMSF زیادتری نسبت به دیگر بخشهای انعطافناپذیر پروتئین دارند. مساحت زیر نمودار RMSF همهٔ باقیماندههای پروتئین نشاندهندهٔ انعطاف پذیری کلی پروتئین درطول شبیه سازی است. مقایسهٔ مساحت زیر نمودار RMSF دومین آزاد BIR3 ودومین BIR3 در کمپلکس با پیتیدها در جدول ۵ نشان میدهد که انعطاف پذیری کلی دومین BIR3 در اثرحضور پپتیدها کم میشود. این مسئله احتمالاً به این خاطر است که میان پیتیدها و دومین BIR3 میان کنش و پیوند برقرار میشود. مقایسهٔ میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی میان آب ودومین BIR3 و میانگین تعداد پیوند هیدروژنی داخل مولکولی دومین BIR3 در همهٔ شبیهسازیها (جدول ۴) و سطح دردسترس حلال BIR3 و شعاع چرخش آن در کمپلکس ها (جدول ۵) بیانگر این است که هیچ تغییر قابل توجهی در ساختار سوم دومین BIR3 و در شکاف اتصال آن در اثر حضور پیتیدهای مختلف رخ نمیدهد. پیتید ۱ بیشترین فاصله مرکز جرم را با پروتئین و بیشترین تغییرات در فاصله (۴/۰ نانومتر) را نسبت به سایر پیتیدها در طول ۴ نانوثانيه آخر شبيهسازي دارد (جدول ۵). بنابراين اين پيتيد موقعيت خود را بیش از سایر پپتیدها در طول شبیهسازی تغییر میدهد. این نتیجه می تواند به معنی عدم پیوند پیتید ۱ با دومین BIR3 باشد وهماهنگ با تعداد کم پیوند هیدروژنی میان این پپتید و دومین BIR3 (جدول ۴) و همچنین هماهنگ با ثابت تفکیک تجربی بیشتر آن (در مقایسه با سایر ییتیدها) نیز است (جدول ۱).

## نتایج محاسبات انرژی اتصال با روش MM/PBSA و تفکیک انرژی

بهمنظور مقایسهٔ انرژی آزاد پیتیدها به دومین BIR3 و انجام بررسی دقیق تری از مشارکت تک تک باقی مانده های دومین BIR3 در میانکنش با پیتیدها و همچنین تعیین میزان مشارکت تک تک باقی مانده های پیتیدها از روش MM/PBSA استفاده شد. جدول ۶ مشارکت الکتروستاتیک و واندروالسی و همچنین سهم انرژی حلالیت قطبی و غیر قطبی را در انرژی میان کنش با پیتیدها نشان همچنین میانگین شعاع چرخش (Rg) دومین BIR3، میانگین RMSD اتم روی (Zn) و اتمهای متصل به آن و میانگین سطح در دسترس حلال پروتئین در ۴ نانوثانیه آخر شبیه سازی در جدول ۵ (ردیف اول) ذکر شده اند. از آنجا که روی (Zn) در این پروتئین نقش ساختاری دارد، تغییرات کوچک در RMSD یون روی و اتمهای متصل به آن آشکار می کند که ساختار دومین BIR3 در طول شبیه سازی تغییر نکرده است. تغییرات کوچک در شعاع چرخش دومین BIR3 وهمچنین سطح در دسترس حلال حاکی از رسیدن به یک ساختار سوم پایدار برای دومین BIR3 در ۴ نانوثانیه آخر شبیه سازی است. ساختار پایانی دومین BIR3 در ۴ نانوثانیه آخر شبیه سازی برای داکینگ و شبیه سازی در حضور پپتیدهای مختلف استفاده شد. نتایچ شبیه سازی دومین BIR3 در کمپلکس با پیتیدها

نمودار جذر ميانگين مربعات انحرافات اسكلت اصلى پروتئين BIR3 درحضور پیتیدها همگی حاکی از به تعادل رسیدن اسکلت اصلی پروتئین BIR3 درطول چهار نانوثانیه آخر شبیهسازی بود که به علت تعداد زیاد آنها از ذکر آنها صرفنظر شد و در این مقاله تنها به ذکر میانگین آنها در چهار نانوثانیه آخر بسنده شد. اطلاعات ذکرشده در جداول ۳ و ۴ و ۵ نتایج شبیهسازی کمپلکس دومین BIR3 با پپتیدها را نشان میدهد و می تواند برای مقایسهٔ اثر پپتیدهای مختلف روی ساختار دومین BIR3 استفاده شود. نتایج جدول ۳ دوباره رسیدن به ساختار متعادل برای دومین BIR3 در کمپلکس با پپتیدها درچهار نانوثانیه آخر همهٔ شبیهسازیها را نشان میدهد. نتایج جدول ۴ میانگین RMSD پپتیدها و تعداد پیوند هیدروژنی میان پپتید ودومین BIR3 را درچهارنانوثانیه پایانی شبیهسازی نشان میدهد. تغييرات RMSD پپتيدها نسبت به ساختار موقعيت شروع كوچك بوده است که این نشان میدهد موقعیت بهدست آمده توسط داکینگ موقعیت کموبیش خوبی بوده است (جدول ۴). قرار گرفتن پپتیدها در شکاف IBM پروتئین BIR3 به کاهش تعداد پیوند هیدروژنی داخل مولكول BIR3 (نسبت به حالت بدون پپتيد) منجر مي شود كه این مسئله احتمالاً به علت ایجاد پیوند هیدروژنی میان دومین BIR3 و پیتیدها بوده است. همچنین بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی میان پروتئین و پپتید نشان میدهد که پپتید ۸ به طور میانگین بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی (۲/۳ ± ۴) و پپتید ۱ کمترین تعداد پیوند هیدروژنی (صفر) را با دومین BIR3 در طول ۴ نانو ثانیه پایانی شبیه سازی برقرار مي كنند (جدول ۴) كه اين مي تواند حاكي از اتصال محكم پيتيد ٨

## **جدول ۳**- میانگین انرژی کل، انرژی پتانسیل و نسبت هرز انرژی کل تقسیم بر میانگین انرژی کل (کیلوژول برمول) و دما (کلوین) در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیهسازی دینامیک مولکولی در دومین BIR3 آزاد و در کمپلکسها.

**Table 3.** The average of total, potential and drift of total energy divided to average of total energy and temperature of all systems during the last 4 ns of MD simulations in free BIR3 domain and complexes.

شماره پپتيد	دما (كلوين)	هرز انرژی	انرژی پتانسیل (کیلوژول بر مول )	انرژی کل (کیلوژول بر مول)
دومين BIR3 آزاد	199/9±1/9	•/•••1	- MITE1.± SWV	-2002957 VLd
١	۳۰۰/۱±۲/۱	•/•••١	-374 ± 529	- <b>*··</b> V9V±VV9
۲	¥٩٩/λ±¥	٠/٠٠٠٩	- <b>TV</b> •• <b>T</b> F±99F	- <b>*• *9</b> \9± <b>\</b> *\$
٣	299/9±7/٣	•/••••9	-489184 ± 881	_*•1•••±1•**
۴	۳۰۰±۲/۳	•/•••٣	-471.VF1 ± 149	- <b>*</b> • <b>*</b> • <b>t</b> • <b>±</b> 1• <b>t</b> A
۵	۳۰۰±۲/۴	•/••••٢	- <b>TV • T</b> \$0±9 <b>T9</b>	_٣•٣٣•۶±٩•۴
۶	Y99/A±Y	•/•••١	- <b>TV</b> •TT1±9TV	_٣•٣٣١٧±٨٢٨
v	۳۰۰±۲/۱	•/•••١	- <b>*</b> V•1V\$±V•Y	_~*•***A±9*1
٨	299/9±7/1	•/••••	- <b>*</b> V•9V*±V19	_~*•*9v#±9#Y
٩	۳۰۰±۲/۳	•/••••9	-47V·AIV ±219	_٣•٣۶٩٩±٧٧٩
١٠	۳۰۰±۲/۳	۰/۰۰۰۰۸	- <b>*</b> V•991±9V9	-*•*\$•9±1\$2
11	۳۰۰±۲	•/•••١	-471. but to the	_~*•*\$• <b>٩±</b> \\$*
17	*••/Y±Y/Y	•/•••1	-471·194 ±191	-*•*V0F±911
١٣	۳۰۰±۲/۱	•/•••1	- TV1.FD±919	_~*• *• * 1 ± 9**
14	*••/1±*	•/•••¥	- <b>*</b> V•V\$1±VY9	- <b>٣٠٣</b> ۶٧۶±٨٨۶
۱۵	۳۰۰/۱±۱/۹	•/••••٣	- <b>TV1T</b> DA±V1V	- <b>*</b> • <b>F</b> Y9۵±AVF
				l l

**جدول ٤**- میانگین زمانی جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی دومین BIR3 و پپتیدها و میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی میان پپتیدها و دومین BIR3 و میانگین شمار پیوند هیدروژنی داخل مولکولی BIR3 و میانگین تعداد پیوند هیدروژنی میان دومین BIR3 و آب در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیهسازی دینامیک مولکولی در دومین BIR3 آزاد و در کمپلکس ها.

**Table 4.** The average backbone RMSD values of BIR3 domain and peptides, the number of intramolecular hydrogen bonds of the BIR3 domain and the number of hydrogen bonds between peptides and BIR3 domain and between water and BIR3 domain during the last 4 ns MD simulations in free BIR3 domain and complexes.

ميانگين شمار پيوند هيدروژني	میانگین شمار پیوند هیدروژنی میان	میانگین تعداد پیوند هیدروژنی	میانگین زمانی RMSD	میانگین زمانی RMSD اسکلت	شماره پېتيد
میان پپتید و دومین BIR3	دومین BIR3 و آب	داخل مولكولي BIR3	پپتيد (نانومتر)	اصلى دومين BIR3 (نانومتر)	
-	190±9/0	۶۳±۴/۵	-	$\cdot / \Delta \pm \cdot / \cdot V$	دومين BIR3
					آزاد
۰±۰	<b>۲</b> ۷・±1・	91±4	$\cdot/\Delta \Lambda \pm \cdot/19$	•/YV ± •/•A	١
۰/۹۳ ± ۰/۷۵	۲۶ <del>۴</del> ±۱۰	۶۰±۵	•/YY ± •/•Y	•/YW±•/•Y	۲
Y/Y±1/1	۲۶۲±۹	9Y±F	•/Y& ± •/•Y	۰/۳۵ ± ۰/۰۹	٣
$1/\Lambda Y \pm \cdot/90$	Υ <del></del> γλ±ν	69±4	•/Y\$±•/•Y	・/٣١ ± ・/・۶	۴
•/1F ± •/٣F	۲۷۰±۸	91±F	۰/۳۳ ± ۰/۰۳	$\cdot / \Delta \pm \cdot / \cdot Y$	۵
•/VA ± •/V1	₹₽₽₽±٨	9Y±F	۰/۳۳ ± ۰/۰۷	•/YV ± •/• ١	Ŷ
1/47 ± •/90	19#±1.	9Y±F	•/YY ± •/•F	・/٣۶ ± ・/・٣	۷
۴/•V ± ۱/۲۹	۲۷۳±۷	۵۸±۴	•/YV ± •/•۴	$\cdot$ /th $\pm$ $\cdot$ / $\cdot$ th	٨
۲/VA ± ۱/۰۵	۲۶۸±۱۰	49 <b>±</b> 4	$\cdot$ /90 ± $\cdot$ /1V	۰/۳۴±۰/۰۳	٩
۱/۷۴ ± ۰/۹۶	۲۶۹±۸	9.±4	۰/۴۷ ± ۰/۰۹	•/۲٩±•/•۴	۱.
$1/M \pm \cdot/4V$	τον±λ	94±4	۰/۵۴±۰/۱۱	$\cdot$ /th $\pm$ $\cdot$ / $\cdot$ ۵	11
$t \pm \cdot / \lambda T$	۲V·±۹	09±4	•/۲۴±•/•٣	۰/۲۸ ± ۰/۰۳	١٢
۲/۱۹ ± ۰/۷۳	1907V	۶۰±۵	•/Y9 ± •/•Y	•/YA ± •/•F	١٣
۱/۸۳ ± ۱/۰۷	Υ <del></del> γν±λ	69±4	•/Y1 ± •/•F	۰/۲۸ ± ۰/۰۴	14
۱/۸۴ ± ۰/۰۲	191±1	۶۰±۴	۰/۱۶ ± ۰/۰۳	•/YF±•/•٣	10

**جدول ۵**- میانگین فاصله مرکز جرم دومین BIR3 و پپتیدها و مساحت زیر نمودار RMSF دومین BIR3 و میانگین شعاع چرخش (Rg) دومین BIR3 و میانگین RMSD یون روی و اتمهای متصل به آن و میانگین سطح در دسترس حلال دومین BIR3 در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیهسازی دینامیک مولکولی دومین BIR3 آزاد و در کمپلکسها.

**Table 5.** The distance of the center of mass of BIR3 domain and peptides, the area of below RMSF graph of BIR3, the radius of gyration (Rg) of BIR3 domain, and the average of RMSD of zinc ion and its connected atoms and average of the solvent accessible surface of the BIR3 domain during the last 4 ns of MD simulations in free BIR3 domain and complexes.

میانگین فاصله مرکز جرم	مساحت زیر نمودار RMSF دومین	میانگین شعاع چرخش	میانگین RMSD یون روی و	میانگین سطح در دسترس حلال دومین	شماره پپتيد
دومین BIR3 و پپتید	BIR3	دومين BIR3 (نانومتر)	اتمهای متصل به آن (نانومتر)	BIR3 (نانومتر مربع)	
(نانومتر)					
-	۲۷/۳۴	1/44 Ŧ ·/·1	•/•Y ± •/•1	۲۶/۹ ± ۱/۳	دومين BIR3
					آزاد
۳/۱۲ ± ۰/۴	۱۵/۱۵	۱/۶۲ ± ۰/۵	•/•\# ± •/• 1	VV ± 1/V	١
$\cdot$ /V9 $\pm$ $\cdot$ / $\cdot$ A	18/1	۱/۵ ± ۰/۰۲	•/• <b>*</b> ±•/• <b>*</b>	۷۶ ± ۱/۸	٢
•/9V ± •/•V	11/11	1/09 ± •/•Y	•/•Y ± •/•1	V9 ± 1/Y	٣
$\cdot / Y \pm \cdot / \lambda$	۱۵/۹۷	۱/۵ ± ۰/۰۶	•/•Y ± •/•1	VX ± 1/F	۴
1/75 ± •/14	۱۹/۸۷	۱/۳۸ ± ۰/۰۲	•/•\# ± •/• 1	٧۶ ± ۲/۱	۵
۰/۸۲ ± ۰/۰۳	18/90	۱/۴۹ ± ۰/۰۳	•/•\# ± •/• 1	۷۷ ± ۱/۱	Ŷ
۱/۱۵ ± ۰/۰۹	۱۷/۰۲	1/23 ± •/•1	•/•\# ± •/• 1	۷۶ ± ۱/۳	٧
$\cdot$ /AA $\pm$ $\cdot$ / $\cdot$ V	19	1/2V ± •/•Y	•/•\# ± •/• 1	$V9 \pm 1/\Delta$	٨
$\cdot$ /VA $\pm \cdot$ / $\cdot$ $r$	۱۶/۲۷	۱/۵ ± ۰/۰۲	۰/۰۴ ± ۰/۰۱	۷۸ ± ۱/۳	٩
۱/۰۳ ± ۰/۰۷	14/4	$1/\Delta \Lambda \pm \cdot / 19$	・/・Y ± ・/・1	VA ± 1/1	۱.
۰/۵۲ ± ۰/۰۳	1 <i>9/9</i> V	۱/۴۹ ± ۰/۰۹	·/•Y ± •/•1	VV ± 1/1	11
$\cdot/\Delta \Lambda \pm \cdot/\cdot F$	۱۴/۸۳	1/VY ± •/Y9	•/•Y ± •/•1	VA ± 1/1	١٢
۱/۱۹ ± ۰/۰۶	19/7	1/DV ± •/•9	•/•۵±•/•١	۸۰ ± ۱/۲	١٣
$\cdot / Y \pm \cdot / \lambda$	18/47	۱/۵ ± ۰/۰۶	۰/۰۳±۰/۰۱	VV±1/F	14
1/1± •/19	14/14	۱/۴۸ ± ۰/۰۲	・/・Y ± ・/・1	$V\lambda \pm Y/\hat{P}$	10

اول از نظر انرژی اتصال هستند که این نشان میدهد نتایج کلی این دوروش تا حد زیادی با هم هماهنگی دارند. در کل نتایج شبیه سازی وروش MM/PBSA دقیق تراز نتایج روش داکینگ هستند (به ویژه در مقایسه سهم میانکنش الکتروستاتیک و واندروالسی) و برای ارزیابی نتایج خود آنها را با اطلاعات تجربی مقایسه کردیم. در یک بررسی تجربی انرژی اتصال پپتیدهای ۱ و ۴ و ۸ و ۱۱ به دومین BIR3 گزارش شده بودند (جدول ۱). ضریب همبستگی (R<sup>2</sup>) انرژی اتصال نظری (جدول ۶) باانرژی اتصال تجربی برای این چهار پپتید حدود ۸/۰ است. به علاوه، ترتیب ثابت تفکیک تجربی با انرژی اتصال به دست آمده با روش MM/PBSA یکسان است. این و نشان می دهد که می توان از روش نظری را تأیید می کند تمایل اتصال پپتیدها به پروتئین BIR3 استفاده کرد. (Rip و همکاران (2002) نشان دادند که تغییر باقی مانده ۱ و ۳ از سمت پایانه ۸ پپتید جداشده از پروتئین SMAC (AVPI) بایستی با دقت میدهد. این نتایج نشان میدهد که میان کنش های الکتروستاتیک نقش مهمتری نسبت به میان کنش های واندروالسی (هیدروفوبیک) در اتصال دارد. این نتایج برخلاف نتایج داکینگ است که نقش انرژی های واندروالسی را مهمتر از انرژی الکتروستاتیک نشان میداد. همچنین مقادیر انرژی آزاد اتصال در این روش متفاوت با مقادیر بهدست آمده درروش داکینگ است. این دوگانگی به خاطر تفاوت در محاسبه بارهای جزیی اتمهای پپتید در دو روش و حضور آب در شبیه سازی در مقایسه با روش داکینگ است. درروش داکینگ از مدل آب غیر صریح استفاده می شود و عملاً مولکول آب آب وجود دارد. از طرف دیگر هیدروژن های غیرقطبی در داکینگ در نظر گرفته نشده اند ولی در شبیه سازی در نظر گرفته شده اند (بعلت استفاده از میدان نیروی امبر). علیر غم همه این اختلافات ضریب همبستگی (<sup>R2</sup>) انرژی اتصال به دست آمده از این دو روش به میزان استفاده از میدان نیروی امبر). علیر غم همه این اختلافات ضریب (<sup>R2</sup>) انرژی اتصال به دست آمده از این دو روش به میزان

176/178

دوم به افزایش قدرت اتصال منجر می شود (پپتید ۹ (ATPF)). ازآنجاکه پیتید ۹ بار مثبت در جایگاه دوم ندارد و تنها خاصیت هیدروفوبیک در جایگاه چهارم دارد می توان نتیجه گرفت وجود هردوی بار مثبت و خاصیت هیدروفوبیک برای افزایش قدرت اتصال ضروری نیست. شاید هم بتوان این گونه نتیجه گرفت که وجود ویژگی هیدروفوبیک آروماتیک در جایگاه چهارم مهمتر از وجود بار مثبت در جایگاه دوم است. زیرا هر سه پیتید قوی (۶ و ۸ و ۹) دارای فنیل آلانین یا تریپتوفان در جایگاه چهارم خود هستند. (جدول ۶). همچنین جهش در باقی مانده ۳ در پیتید ۱۰ (AVFI) در مقایسه با پیتید ۱ (AVPI) به کاهش مشارکت باقی مانده ۱ در اتصال منجر می شود (جدول ۷). بنابراین، نتایج ما هماهنگ با نتایج آقای Kipp و همکاران است که خاطرنشان کردند که جهش در باقی مانده ۳ پیتید AVPI اثر منفی روی اتصال دیگر باقیماندهها دارد و به کاهش گرایش اتصال پپتید به دومین BIR3 منجر می شود. نتایج جدول ۷ نیز سهم زیاد باقیمانده هیدروفوب آروماتیک مانند فنیل آلانین یا تریپتوفان در مقایسه با باقیماندههای هیدروفوبیک آلیفاتیک در اتصال به دومین BIR3 را نشان میدهد که با نتایج جدول ۶ هماهنگ است. سه پپتیدی که در میان ۱۵ پپتید کمترین انرژی اتصال را داشتند (۶ و ۸ و ۹) برای بررسی بیشتر میانکنش های هیدروفوبیک و هیدروژنی بهوسیلهٔ نرمافزار LigPlus 4 گزینش شدند (Wallace et al., 1995). شکل ۳ میان کنش های هیدروفوبیک و هیدروژنی میان این پپتیدها و دومین BIR3 را در ساختار پایانی بهدستآمده در شبیهسازی کمپلکس ها را نشان میدهد. پیتید ۶، سه پیوند هیدروژنی با ترئونین ۳۰۸ و گلوتامات ۳۱۴ و میانکنش هیدروفوبیک با سیستئین ۳۰۰ و ۳۰۳، لوسین ۳۰۷، آسپارتات ۳۰۹، تریپتوفان ۳۱۰، گلوتامین ۳۱۹، هیستیدین ۳۲۰، تیروزین ۳۲۴، گلیسین ۳۲۶ و سیستئین ۳۲۷ دومین BIR3 دارد (شکل ۳A). پپتید ۸، سه پیوند هیدروژنی با ترئونین ۳۰۸ و گلوتامات ۳۱۴ و میانکنش های هیدروفوبیک با لوسین ۳۰۷ و تیروزین ۳۲۴ دارد (شکل B۳). پیتید ۹، یک پیوند هیدروژنی با ترئونین ۳۰۸ و گلوتامات ۳۱۴ و میانکنش هیدروفوبیک با سیستئین ۳۰۰ و سیستئین ۳۰۳ و لوسین ۳۰۷ و آسپارتات ۳۰۹ و گلوتامین ۳۱۹ و تیروزین ۳۲۴ و سیستئین ۳۲۷ دارد (شکل ۳C). بنابراین، برای طراحی یک مهارکننده خوب برای BIR3، پپتید باید پیوند هیدروژنی ترئونین ۳۰۸ و گلوتامات ۳۱۴ و میان کنش هیدروفوبیک

انجام گیرد. این چهار باقیمانده در کمپلکس SMAC/DIABLO به شکاف سطحی IBM در BIR3 متصل می شوند. نخستین باقىماندە يعنى آلانين بە ياكت ھيدروفوبيك BIR3 متصل مىشود و ۵ تا پیوند هیدروژنی با باقیماندههای همسایه تشکیل میدهد (Wu et al., 2000). بنابراین وجود آلانین در پایانه N برای اتصال ضروری است و این مسئله در ساختار کریستالوگرافی هم آشکار است. آلانین ۱ در پیتید AVPI (در پروتئین SMAC) سه پیوند هیدروژنی با شکاف سطحی BIR3 میدهد و گروه کربونیل آن دو پیوند هیدروژنی اضافی تشکیل میدهد. همچنین گروه متیل آلانین ۱ بهطور محکم در پاکت هیدروفوبیک جای میگیرد و هر تغییر آلانين بايد بااحتياط انجام شود تا جلوى ممانعت فضايي با اين پاكت یا خراب شدن این پیوندهای هیدروژنی ضروری گرفته شود. اگرچه سه باقیمانده بعدی هم در اتصال مشارکت میکنند، اهمیت آنها بهاندازه آلانین ۱ حیاتی نیست (Liu et al., 2000). ما نیز در پپتیدهایی که طراحی کردیم همواره اولین باقیمانده را آلانین در نظر گرفتیم. Kipp (2002) همچنین نشان داد که وقتی پرولین با دیگر باقیماندهها جایگزین میشود تمایل اتصال کاهش مییابد. آنها همچنین نشان دادند که بهتر است باقیماندههای ۲ بار مثبت و باقیمانده ۴ ویژگی هیدروفوبیک داشته باشند. نتایج ما هم نشان داد ییتید ۶ (AKPW) و ۸ (ARPF) و ۹ (ATPF) انرژی آزاد اتصال کمتری نسبت به سایر پپتیدها دارند که هر سه کموبیش این دو ویژگی را دارند. انرژی اتصال این سه پپتید کمتر از انرژی آزاد اتصال پپتيد SMAC يعنى AVPI است (٥۴– كيلوژول برمول). بنابراین، قدرت مهارکنندگی این پپتیدها بیشتر از پپتید طبیعی SMAC است. مقایسه این سه پپتید با سایر پپتیدها نشان میدهد که گروه هیدروفوب آروماتیک بهتر از گروه هیدروفوبیک آلیفاتیک برای جایگاه چهارم پپتید است. نتایج انرژی آزاد اتصال با تعداد پیوند هیدروژنی پپتید با دومین BIR3 و همچنین فاصله مرکز جرم آنها هماهنگی دارد (جدولهای ۴ و ۵). ما همچنین میزان مشارکت باقیمانده های پیتیدها در اتصال به دومین BIR3 را نیز تعیین کردیم. همانطور که در جدول ۷ نشان داده شده است بررسی سهم هر کدام از باقیماندههای پیتید در اتصال به دومین BIR3 نشان میدهد افزایش بار مثبت باقیمانده دوم پیتید به افزایش قدرت اتصال منجر می شود. (پپتید ۶(AKPW) و ۸(ARPF)). همچنین افزایش خاصیت هیدروفوبیکی باقیمانده چهارم و گروه قطبی در باقیمانده

**جدول ۲**- میانگین انرژی آزاد اتصال MM/PBSA پپتیدها به دومین BIR3 و سهم انرژیهای الکتروستاتیک و واندروالسی و حلالیت قطبی و حلالیت غیر قطبی (کیلوژول برمول) در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیهسازی دینامیک مولکولی.

**Table 6.** The average of MM/PBSA binding free energies and electrostatic, Van der Waals, polar and non-polar solvation contribution energies (kJ/mol) of peptides to BIR3 domain during the last 4 ns of MD simulation.

پپتيد	ترادف پېتيد	انرژی آزاد اتصال	انرژى الكتروستاتيك	انرژى واندروالسي	انرژی حلالیت قطبی	انرژی حلالیت غیر قطبی
١	AVPI	-04/V±11/1	$-11A/V \pm 1A/\Delta$	$-1.10 \pm 1.04$	۸۶/۳±۱۴/۰	-٣/٢ ±•/۴
۲	Methyl-AVPI	-Y•A/&±1•/9	-411/9±11/9	$-VA/A\pm Y/V$	*•*/V±1V/1	-1·/Y±·/Y
٣	Ethyl-phenyl-AVPI	-142/0±11	- <b>~.</b> \/ <b>*</b> ±1 <b>*</b> / <b>*</b>	-V9/9±1/A	10Y/0±9/0	-1·/Y±·/٣
۴	AVPW	-YY • /V±V/9	-41·/4711/4	-9٣/۶±٩/١	۳۷۷±۸/۷	-1Y/9±•/Y
۵	AKPF	-YYY/1±1V	-V•Y/9 ±YY/A	$-VY/\Delta\pm 1/A$	661/17V	-1Y/9±•/1
۶	AKPW	-44V/9±0/V	-1110/T±11/1	-11·/٣±٢/1	۸ <b>۰</b> ۳/۶±۷/۳	-19/۴±•/1
٧	AKPY	-۵۲/۵±۴/۴	-٣1/۵±۵/۵	-V1/V±1/Δ	۶۰/۵±۵/۵	-9/۵±•/۲
^	ARPF	-۴۱۸/۳±۸/۹	-XF•/X±14/Y	-AA/Y±Y/Y	516/47711/k	-14/9±•/Y
٩	ATPF	-449/9±14/9	-999/1±٣1/X	-11V/9±٣/۲	\$91/#±14/F	-19/1±•/٣
۱۰	AVFI	-Y11/1±14/9	-~XV/A±Y1/m	-91/9±1/9	Υ۴λ/λ±λ/λ	-٩/۵± • /٣
11	AVPF	-Y&1±9/A	-014/V±19/0	-VA/Y±Y/9	24. /QTI/Y	-1•/٩±•/٣
۱۲	ARPW	-189/V±14/8	-444/0±11/1	-X%/4±%/٩	۳۵۷/۴±۱۶	-11/1±•/۵
۱۳	ARPY	-YA9/F±1•	-V1Y/9±1Y/A	-9A/V±Y/Y	۵۳۴/۸±۱۰/۹	-\Y/Y±•/Y
14	ATPW	-۲۵۶±۹/λ	- <b>۵</b> •۴/۶±۱۷/۶	-VV/1±Y/۵	848/0±11/A	-11/A±•/Y
۱۵	ARPI	-144/t#	-444/1711/m	-9٣/V±1/A	414/4±9/0	-1·/A±·/Y

**جدول ۲**- میانگین مشار کت انرژی اتصال باقیماندههای پیتیدها در اتصال به دومین BIR3 (کیلوژول برمول) در طول ۴ نانو ثانیه پایانی شبیهسازی.

Table 7. The average of binding energy contribution of peptide residues in binding to BIR3 domain (kJ/mol).

باقىماندە ۱(پايانە N)	باقىماندە ٢	باقىماندە ۳	باقىماندە ۴ (پايانە C)	شماره پېتيد
А	V	Р	Ι	١
-99/VY	-**/٩٧	-41/4	-%1/۲۹	
			- <b>۶</b> ۳۸/۸۲	٢
			-09V/TV	٣
А	V	Р	W	۴
-Y•٣/AF	- 134/8	-94/88	-111/99	
А	K	Р	F	۵
-AŶ/\Ŷ	-V•/AF	-94/99	- <b>*</b> \\/• <b>*</b>	
А	K	Р	W	۶
-9٣/٢٣	- <b>t •</b> ۵/۳۷	-94/•Y	-4.1/22	
А	K	Р	Y	v
-9•/۶۶	-1.1/90	-۳۵/۱۸	-189/29	
А	R	Р	F	٨
-141/04	-14./11	-۵1/Y۵	-412/40	
А	Т	Р	F	٩
-VV/٣۴	- <i>99</i> /Y	-٣٧/٩۶	-164/60	
А	V	F	Ι	۱.
-1/FA	- <b>٣</b> ٣/٢٢	-Y0/Y	- 1VA/•Y	
А	V	Р	F	
-49/1	-79/9	- <b>TT</b> /V <b>T</b>	-19V/9A	
А	R	Р	W	١٢
-171/14	-14./49	-¥•/VY	-71./20	
А	R	Р	Y	١٣
-414/44	-187/04	-91/1	-۳۳۷/۲۵	
A	Т	Р	W	14
-111/VY	-99/77	-٣٩/٩۶	-110/4	
A	R	Р	I	10
-191/89	-10V/99	-01/98	-۲۱۲/۸۸	





**شکل ۳**- نمودار شماتیک میانکنش دومین BIR3 با پپتیدهایA: ۶ و B: ۸ و C: ۹ در ساختار پایانی ۱۰ نانوثانیه شبیهسازی دینامیک مولکولی. پیوندهای هیدروژنی بهوسیلهٔ خطوط نقطهچین میان اتمهای درگیر نمایش دادهشده است. تماسهای هیدروفوبیک بهوسیلهٔ نیمدایره خطدار نشان دادهشده است. اتمهای کربن بارنگ مشکی و اکسیژنها بارنگ قرمز و نیتروژنها بارنگ آبی نشان دادهشدهاند.

**Fig. 3.** Schematic diagram of the interaction of BIR3 domain with **A:** tetrapeptide 6, **B:** 8 and **C:** 9 in the final structure of 10 ns MD simulation. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes radiating towards the ligand atoms they contact. The contacted atoms are shown with spokes radiating back. Carbon atoms are shown in black, oxygen and nitrogen atoms in red and blue, respectively.

همان باقیمانده های مهم پیشین که برای اتصال ضروری بودند، به-دست آمد و نتایج شکل ۳ تأیید شد. روی همرفته بر پایه شکل ۳ و ۴ و نتایج تجربی می توان نتیجه گرفت که پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ به همان باقیمانده هایی از شکاف BIR3 متصل می شوند که برای اتصال و مهارکنندگی ضروری هستند.

#### نتيجه گيري

به منظور طراحی یک مهارکننده پپتیدی برای مهار دومین BIR3 پروتئین XIAP، ۱۵ پپتید طراحی شد. روش داکینگ برای بررسی اولیهٔ میزان تمایل اتصال این پپتیدها به دومین BIR3 استفاده شد. نتایج داکینگ آشکار کرد که کموبیش همه پپتیدها می توانند با انرژی اتصال متفاوت به دومین BIR3 متصل شوند و پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ و ۱۱ انرژی اتصال کمتری نسبت به دیگر پپتیدها داشتند. سپس شبیه سازی دینامیک مولکولی روی کمپلکس های به دست آمده از روش داکینگ انجام شد و بررسی نتایج آن نشان داد که کمپلکس با لوسین ۳۰۷ و تیروزین ۳۲۴ داشته باشد. زیرا این باقیمانده ها در میان این سه پپتید قوی مشترک هستند. بر پایه نتایج تجربی باقیمانده هایی از BIR3 که در گیر در میان کنش با پپتید AVPI هستند عبارت اند از گلیسین ۳۰۶ و لوسین ۳۰۷ و ترئونین ۳۰۸ و آسپارتات ۳۰۹ و تریپتوفان ۳۱۰ و لیزین ۲۹۷ و لیزین ۳۹۲ و گلوتامات ۳۱۴ و گلوتامات ۳۱۹ و تریپتوفان ۳۲۳ و تیروزین ۳۲۴ مانده هایی که پپتید طبیعی متصل می شود، پیوند می دهد و پیوندهای مانده هایی که پپتید طبیعی متصل می شود، پیوند می دهد و پیوندهای اضافی پپتیدهای ما باعث اتصال قوی تر آن نسبت به پپتید طبیعی نهایی در شبیه سازی) است، به منظور بررسی سهم انرژی آزاد باقیمانده های شکاف دومین BIR3 در اتصال به پپتیدهای ۶ و ۸ و نهایی از شبه سازی، نمو دار این انرژی ها در طول ۴ نانو ثانیه آخر شبیه سازی به دست آورده شد (شکل ۴). در این نمو دار نیز کم وبیش



**شکل ٤**- میزان مشارکت انرژی آزاد اتصال باقیماندههای شکاف دومین BIR3 در اتصال به پپتیدهای ۶ (A) و ۸ (B) و ۹ (C) در طول چهار نانوثانیه پایانی شبیهسازی

**Fig. 4.** The binding energy contribution of BIR3 domain clef residues in binding to peptide 6 (A), peptide 8 (B) and peptide 9 (C) during the last 4 ns.

روش داکینگ است. همچنین انرژیهای اتصال بهدستآمده در داکینگ فقط مربوط به یک صورتبندی است (در این جا بهترین صورتبندي پر جمعیت ترین خوشه) ولي انرژي هاي بهدست آمده از روش MM/PBSA میانگین انرژی اتصال چندین صورتبندی است که در طول شبیه سازی بهدست آمدهاند. باوجود همهٔ این اختلافات در مجموع نتایج بهدست آمده از روش داکینگ با نتایج  $(R^2 = \cdot/9t)$  ممبستگی مناسبی دارند ( $R^2 = -1/9t$ ). بنابراين، نتايج داكينگ تنها يك كمان اوليه وخام از موقعيت اتصال هستند و برای اطمینان و دقت بیشتر باید روشهای دقیقتر و پرهزینه تری مانند روش MM/PBSA را به کاربرد. همچنین نتایج تجربي موجود ۴ تا از اين پېتيدها با نتايج روش MM/PBSA همبستگی خوبی داشت(//۹ R<sup>2</sup>). نتایج جداسازی سهم انرژی آزاد باقی مانده های دومین BIR3 در اتصال به این پیتیدها در طول شبيهسازي كموبيش نقش همان باقىماندهها مهم ازنظر پيوند هیدروژنی و واندروالسی که از ساختارتجربی کمپلکس حاوی پپتید طبيعي بهدستآمده بود را آشکار میکند (یعنی باقیماندههای لوسین ۳۰۷، ترئونین ۳۰۸، گلوتامات ۳۱۴ و تیروزین ۳۲۴). این باقیماندهها ویژگی هیدروفوب و بارمنفی دارند و قابلیت اتصال به گروههای هیدروفوب و بارمثبت در پپتید رادارند و این مسئله با نتایج دیگران هماهنگی دارد (Kipp, 2002). بهعبارتدیگر تمایل زیادتر این پیتیدها در مقایسه با پیتید مهارکننده طبیعی (AVPI) که متعلق

دومین BIR3 با هرکدام از پپتیدها در ۴ نانوثانیه پایانی شبیهسازی در همه سامانهها به تعادل میرسد و خواص ساختاری آنها ثابت میماند. همچنین تقریباً همه پیتیدها موقعیت پایداری در جایگاه اتصال خود (در طول ۴ نانو ثانیه یایانی شبیه سازی) دارند زیرا تغییرات فاصله ميان مركز جرم پيتيدها تا دومين BIR3 وتغييرات RMSD در اکثریپتیدها ناچیز بود واین مسئله با وجود پیوند هیدروژنی قابل توجه میان اکثر پپتیدها و دومین BIR3 در طول شبیهسازی هماهنگ بود. سپس محاسبات انرژی آزاد اتصال با روش پوازی بولتزمن سطح در دسترس حلال انجام شد و سه پپتيد از اين محاسبات گزينش شد. این پیتیدها عبارتاند از پیتید ۶ (AKPW) و ۸ (ARPF) و ۹ (ATPF). این پیتیدها انرژی اتصال منفی تری نسبت به دیگر پیتیدها دارند. نتایج بررسی پیوندهای هیدروژنی میان این پیتیدها با دومین BIR3 در ساختار نهایی کمپلکس بهدست آمده از شبیهسازی نشان داد که این پیتیدها به همان باقیمانده هایی که پیتید طبیعی پیوند می-دهد، میانکنش میدهند. اگرچه با دیگر باقیماندههای دومین BIR3 ييوندهاي اضافهتري مي دهند كه باعث افزايش قدرت اتصال آنها نسبت به پیتید طبیعی (AVPI) می شود. در محاسبات با روش MM/PBSA سهم انرژی الکتروستاتیک در اتصال پررنگ تر از سهم انرژی واندروالسی بود که با نتایج بهدست آمده از روش داکینگ ناهماهنگ است که علت آن در نظر نگرفتن صریح مولکولهای آب و دقت پایین روش محاسبه بارهای جزیی اتمها در

180/18.

#### REFERENCES

- **Bagheri, S., Davoodi, J., Saboury, A.A. and Salmanian, A.H.** 2012. A mechanistic Insight into Caspase-7 inhibitor by BIR1-2 domain of XIAP and CIAP1. – J. Iran. Chem. Soc. 9: 615-623.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. and McCammon, J.A. 2001. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. – PNAS 98: 10037-10041.
- Berendsen, H.J.C., Van Der Spoel, D. and Van Drunen, R. 1995. GROMACS: A message passing parallel molecular dynamic Implementation. – Comput. Phys. Commun. 91: 43-56.
- Cai, Q., Sun, H., Peng, Y., Lu, J., Nikolovska-Coleska, Z., Mceachern, D., Liu, L., Qiu, S., Yang, C.Y. and Miller, R. 2011. A potent and orally active antagonist (SM-406/AT-406) of multiple inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) in clinical development for cancer treatment. – J. Med. Chem. 54: 2714-2726.
- Carter, B.Z., Milella, M., Tsao, T., Mcqueen, T., Schober, W.D., Hu, W., Dean, N.M., Steelman, L., Mccubrey, J.A. and Andreeff, M. 2003. Regulation and targeting of antiapoptotic XIAP in acute myeloid leukemia. – Leukemia 17: 2081-2089.
- **Cornell, W.D., Cieplak, P., Bayly, C.I. and Kollmann, P.A.** 1993. Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. – J. Am. Chem. Soc. 115: 9620-9631.
- Cossu, F., Mastrangelo, E., Milani, M., Sorrentino, G., Lecis, D., Delia, D., Manzoni, L., Seneci, P., Scolastico, C. and Bolognesi, M. 2008. Designing Smacmimetics as antagonist of XIAP CIAP1 and CIAP2. – Biochem. Biophys. Res. Commun. 378: 162-167.
- Flygare, J.A., Beresini, M., Budha, N., Chan, H., Chan, I., Cheeti, S., Cohen, F., Deshayes, K., Doerner, K. and Eckhardt, G. 2012. Discovery of a potent small molecule antagonist of inhibitor of apoptosis (IAP) proteins and clinical Candidate for the treatment of cancer (GDC-0152). – J. Med. Chem. 55: 4101-4113.
- Frisch, M.J., Trucks, G.W., Schlegel, H.B., Scuseria, G.E., Robb, M.A., Cheeseman, J.R., Zakrzewski, V.G., Montgomery, J.A. and Pople, J.A. 1998. – Gaussian 98 Gaussian, Inc., Pittsburgh, PA.
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M. and Debatin, K.M. 2002. Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. – Nat. Med. 8: 808-815.
- Genheden, S. and Ryde, U. 2015. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities. Expert. Opin. Drug Discov. 10: 449-461.
- Hess, B., Kutzner, C., Van Der Spoel, D. and Lindahl, E. 2008. GROMACS 4: Algoritms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. J. Chem. Theory. Comput. 4: 435-447.
- Huang, Z. 2002. The chemical biology of apoptosis: Exploring protein-protein interactions and the life and death of cells with small molecules. – Chem. Biol. 9: 1059-1072.

به يرو تئين SMAC است نشان مي دهد كه بار مثبت در جايگاه دوم و باقیمانده هیدروفوب درجایگاه چهارم گرایش پیتید به دومین BIR3 را افزایش میدهد. همچنین به نظر میرسد برای جایگاه چهارم گروه آروماتیک بهتر از گروه آلبفاتیک باشند زیرا هر سه ييتيد قوى بەدستآمدە داراي گروه هيدروفوب آروماتيک بودند. در این پژوهش بهمنظور افزایش پایداری پیتیدها در هنگام ورود به بدن و یاخته، به تغییر پیتیدها و غیر طبیعی کردن آنها نیز توجه شد و گروههای متبل و اتبل فنبل به آلانین ۱ پیتید طبیعی AVPI به صورت کووالانسی متصل شد (به ترتیب پیتبدهای ۲ و ۳) و انرژی آنها با سار ییتبدهای طبیعی مقایسه شد. اگرچه این دو پپتید جزو بهترین يبتيدها نيودند ولي انرژي داكينگ و انرژي MM/PBSA آنها بهتر از ييتيد طبيعي (AVPI) بود وازنظر يايداري بيشتر درسلول و هضم نشدن توسط يروتئازهاي باخته نسبت به ساير پيتېدها برتري دارند. ییشنهاد می شود که پیتیدهای ۶ و ۸ و ۹ به صورت تجربی ساخته شوند و تمایل اتصال آنها به دومین BIR3 عملاً بررسی شود. همچنین با اتصال گروههای هیدروفوب آروماتیک به باقی مانده چهارم ييتيد طبيعي، ييتيدهاي جديد ديگري براي مهار دومين BIR3 طراحی و اثر مهارکنندگی آنها بهصورت نظری و تجربی بررسی شود. همچنین می توان اثر پیتیدهای کوچکتر را روی مهار یروتئین BIR3 بررسی کرد. ما امیدواریم که این کار روزنهای برای طراحی بهتر مهار کننده برای دومین BIR3 یروتئین XIAP و درمان سرطان ىاز كند.

#### سپاسگزاری

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد و شرکت رایان زیستفناوری هرمس برای حمایت و پشتیبانی از این مطالعه قدردانی می نمایند.

- Kashkar, H. 2010. X-linked inhibitor of apoptosis: A chemoresistance factor or a hollow promise. Clin. Cancer Res. 16: 4496-4502.
- Kipp, R.A., Case, M.A., Wist, A.D., Cresson, C.M., Carrell, M., Griner, E., Wiita, A., Albiniak, P.A., Chai, J., Shi, Y., Semmelhack, M.F. and McLendon, G.L. 2002. Molecular Targeting of Inhibitor of Apoptosis Proteins Based on Small Molecule Mimics of Natural Binding Partners. – Biochem. 41: 7344-7349.
- Kollman, P.A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., Lee, M., Lee, T., Duan, Y., Wang, W., Donini, O., Cieplak, P., Srinivasan, J., Case, D.A. and Cheatham, T.E. 2000. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. – Accounts. Chem. Res. 33: 889-897.
- Kumari, R., Kumari, R., Anusandhan, B. and Lynn, A. 2014. G-mmpbsa - A GROMACS tool for highthroughput MM-PBSA calculations. – J. Chem. Inf. Model. 54: 1951-1962.
- Li, J. 2005. Handbook of materials modelling. Springer Netherlands. pp: 565-588.
- Lindahl, E., Hess, B., Van Buuren, A.R., Apol, E., Meulenhoff, P.J., Tieleman, D.P., Sijbers, A., Feenstra, K.A., Van Drunan, R. and Berendsen, H.J.C. 2002. Gromacs user manual, version 3.2. University of Groningen: Groningen, Netherlands. pp: 15-27.
- Ling, B., Zhang, R., Wang, Z., Liu, Y. and Liu, C. 2010. Study on the interactions of smacmimetics with XIAP-BIR3 domain by docking and molecular dynamics simulations. – J. Theor. Comput. Chem. 9: 797-812.
- Liu, Z., Sun, C., Olejniczak, E.T., Meadows, R.P., Betz, S.F., Oost, T., Herrmann, J., Wu, J.C. and Fesik, S.W. 2000. Structural basis for binding of Smac/DIABLO to the XIAP BIR3 domain. – Nature 408: 1004-1008.
- Mahnam, K. and Hoghoughi, A. 2014. In silico studies on fingolimod and cladribine binding to p53 gene and its implication in prediction of their carcinogenicity potential. Mol. Biochem. Diag. J. 1: 105-122.
- Mannhold, R., Fulda, S. and Carosati, E. 2010. IAP antagonists: promising candidates for cancer therapy. Drug Discov. Today 15: 210-219.
- Mcllwain, D.R., Berger, T. and Mak, T.W. 2015. Caspase functions in cell death and disease. – Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 7: a026716.
- Morris, GM., goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. and Olson, A. 1998. Automated docking using a lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. – J. Comput. Chem. 19: 1639-1662.
- Morris, G.M., Huey, R., Lindstrom, W., Sanner, M., Belew, R., Goodsel, D. and Olson, A. 2009. Autodock4 and autodocktools4: automated docking with selective receptor flexibility. – J. Comput. Chem. 30: 2785-2791.
- Seiter, M.A., Salcher, S., Rupp, M., Hagenbachner, J., Kiechl-Kohlendorfer, U., Mortier, J., Wolber, G., Rolling, J.M., Opexer, P. and Ausserlechner, M.J. 2014. Discovery of sanggenon G as a small-molecular weight inhibitor of X-linked inhibitor of apoptosis protein XIAP. – FEBS Open. Bio. 4: 659-671.

- Sousa da silva, A.W. and Vranken, W.F. 2012. ACPYPEantechamber python parser interface. – BMC. Res. Notes. 5: 367-374.
- Sun, C., Cai, M., Meadows, R.P., Xu, N., Gunasekera, A.H., Herrmann, J., Wu, J.C. and Fesik, S.W. 2000. NMR structure and mutagenesis of the third bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP. – J. Biol. Chem. 275: 33777-33781.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. and Berendsen, H.J.C. 2005. GROMACS: fast, flexible, and free. – J. Comput. Chem. 26: 1701-1718.
- Wallace, A.C., Laskowski, R.A. and Thornton, J.M. 1995. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. – Protein Eng. 8: 127-134.
- Wu, G., Chai, J., Suber, T.L., Wu, J.W., Du, C., Wang, X. and Shi, Y. 2000. Structural basis of IAP recognition by Smac/DIABLO. – Nature 408: 1008-12.
- Wu, H., Che, X., Zheng, Q., Wu, A., Pan, K., Shao, A., Wu, Q., Zhang, J. and Hong, Y. 2014. Caspases: a molecular switch node in the crosstalk between autophagy and apoptosis. – Int. J. Biol. Sci. 10: 1072-1083.
- Yang, C.Y., Sun, H., Chen, J., Nikolovska-Coleska, Z. and Wang, S. 2009. Importance of ligand reorganization free energy in protein-ligand binding-affinity prediction. – J. Am. Chem. Soc. 131: 13709-13721.

\*\*\*\*\*

How to cite this article:

Mirahmadi-Babahaidary, F. and Mahnam, K. 2018. Designing a new tetrapeptide to inhibit the BIR3 domain of the XIAP protein via molecular dynamics simulations. – Nova Biologica Rep. 2018: 168-182.

م**یراحمدی باباحیدری، ف. و مهنام، ک**. ۱۳۹۷. طراحی یک پپتید چهار

اسید آمینهای نوین برای مهار دومین BIR3 پروتئین XIAP به وسیلهٔ شبیه سازی دینامیک مولکولی. – یافته های نوین در علوم زیستی ۱۳۹۷: ۱۶۸–۱۸۲.

182/177

[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]