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

فاطمه میراحمدی باباحیدری[۱] و کریم مهنام[۱،۲*]

دریافت: ۱۳۹۶/۳/۲۳/ ویرایش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۸ /پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۹/ انتشار: ۱۳۹۷/۶/۲۹

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
[۲] مرکز پژوهشی فناوری نانو، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران
*مسئول مکاتبات: mahnam.karim@sci.sku.ac.ir

چکیده. پروتئین XIAP یکی از اعضای پروتئین‌های مهارکننده آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده یاخته (خانواده IAP) است. پروتئین XIAP نقش باارزشی در مهار آپوپتوز بازی می‌کند و دربرگیرندهٔ سه دومین BIR (Baculoviral IAP Repeat) است. دومین سوم این پروتئین یعنی BIR3 به‌طور مستقیم به پایانه N پروتئین کاسپاز ۹ متصل می‌شود و آپوپتوز را مهار می‌کند. نشان داده‌شده است که چهار اسیدآمینه پایانهٔ N پروتئین SMAC یعنی AVPI می‌توانند به BIR3 متصل شوند و آن را مهار کنند و بنابراین، آپوپتوز را به راه‌اندازند. در این پژوهش ۱۵ پپتید به دومین BIR3 داک شده‌اند و سپس ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روی هر کمپلکس به‌دست‌آمده از داکینگ انجام شد. سپس از روش مکانیک مولکولی پوازی بولتزمن سطح در دسترس حلال (MM/PBSA) برای برآورد انرژی اتصال آزاد پپتیدها به دومین BIR3 استفاده شد. نتایج روش MM/PBSA هماهنگی نسبی با روش داکینگ وهماهنگی خوبی با نتایج تجربی موجود داشتند. نتایج نشان داد که بهترین پپتیدها با کمترین انرژی آزاد اتصال عبارت‌اند از ATPF و AKPW و ARPF. همچنین بررسی پیوندهای میان این پپتیدها و دومین BIR3 در ساختار نهایی کمپلکس‌ها آشکار کرد که لوسین ۳۰۷ و ترئونین ۳۰۸ و گلوتامات ۳۱۴ و تیروزین ۳۲۴ دومین BIR3 برای اتصال پپتیدها ضروری هستند. نتایج تفکیک انرژی آزاد و تعیین سهم باقی‌مانده‌های شکاف دومین BIR3 در اتصال به این پپتیدها در طول شبیه‌سازی نیز هماهنگ با نتایج پیشین بود و نقش همان باقی‌مانده‌ها را در اتصال نشان می‌داد. همچنین گرایش بالای این پپتیدها نسبت به پپتید طبیعی (AVPI) و مقایسه آنها با سایر پپتیدها آشکار می‌کند که وجود بار مثبت در جایگاه دوم پپتید و وجود گروه هیدروفوب آروماتیک در جایگاه چهارم پپتید باعث افزایش قدرت اتصال پپتید می‌شود.

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[1,2*]

Received 13.7.2017/ Revised 17.02.2018/ Accepted 28.02.2018/ Published 20.09.2018

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, Iran
[2]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 expermental 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 were essential for binding of peptides. Energy decomposition results for binding these peptides to 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,

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

مقدمه

آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی‌شده فرایندی یاخته‌ای است که برای فرگشت رویان و حفظ پایداری بافت‌های سالم و حذف یاخته‌های ناقص در بدن و مهار سرطان ضروری است (Seiter, 2014). دو مسیر پیام‌رسان آپوپتوز را القا می‌کنند که عبارتند از مسیر خارجی که به‌وسیلۀ گیرنده‌های مرگ مانند Fas (آنتی‌ژن آپوپتوز ۱ (APO-1 or APT)) و مسیر داخلی که با آزادشدن سیتوکروم C از میتوکندری آغاز می‌شود (Bagheri *et al.*, 2012). این مسیرها به فعال شدن یک خانواده از پروتئازها به نام کاسپازها منجر می‌شوند. کاسپازها یک کلاس ویژه از پروتئازها دربرگیرنده آسپارتات–سیستئین هستند و از یک سیستئن دربرگیرنده گروه تیول در جایگاه فعال خود استفاده می‌کنند که باعث آبکافت پیوند پپتیدی در پایانۀ C پروتئین می‌شوند. کاسپازها در حالت عادی به‌صورت غیرفعال وپروکاسپاز در یاخته‌های هدف وجود دارند (زیموژن). شکست در دو پیش دومین پایانۀ N و چهار جایگاه دومین پروتئازها می‌تواند زیموژن را به آنزیم فعال تبدیل کند. در این حالت فعالیت اتوفاژی کاسپازها به هضم محتویات سلول منجر می‌شود. فعال شدن کاسپاز به برش شماری از پروتئین‌های سلول و مرگ یاخته منجر می‌شود (Wu *et al.*, 2014; Mcllwain *et al.*, 2015). فعالیت کاسپازها با یک کلاس از پروتئین‌ها که IAP (Inhibitor of Apoptosis Proteins) نامیده می‌شوند کنترل می‌شود. اعضای خانواده IAP با مهار کاسپازها باعث جلوگیری از آپوپتوز می‌شوند زیرا به‌طور مستقیم به کاسپازها متصل می‌شوند و در مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز و مرگ سلولی تداخل ایجاد می‌کنند (Huang, 2002). پروتئین XIAP (X-Linked Inhibitor of Apoptosis) یکی از اعضای این خانواده IAP است. پروتئین XIAP یکی از نیرومندترین مهارکننده‌های کاسپازها است و ثابت مهارکنندگی آن در حد نانومولار است (Carter *et al.*, 2003). پروتئین XIAP وزن مولکولی ۵۷ کیلو دالتون و سه دومین BIR دارد (Baculoviral IAP Repeat) (BIR1 و BIR2 و BIR3). دومین BIR2 و BIR3 پروتئین XIAP به‌ترتیب به کاسپاز ۳ یا ۷ و ۹ متصل و آنها را مهار می‌کنند و مانع مرگ سلولی می‌شوند (Cossu *et al.*, 2008). دومین BIR3 دربرگیرنده 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 دربرگیرنده یک شکاف سطحی حفاظت‌شده روی دومین BIR3 است. پپتید ATPF (Ala-Thr-Pro-Phe) در پایانه N زیر واحد کوچکترکاسپاز ۹ می‌تواند به موتیف IBM متصل شود. فعالیت مهارکنندگی پروتئین XIAP به‌وسیلۀ یک پروتئین میتوکندیایی به نام SMAC تنظیم می‌شود. این پروتئین از غشا خارجی میتوکندری به داخل سیتوپلاسم رها و به دومین BIR3 متصل می‌شود و آن را مهار می‌کند. پپتید AVPI(Ala-Val-Pro-Ile) از پروتئین SMAC می‌تواند به دومین BIR3 متصل شود و فعالیت مهارکنندگی 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 دربرگیرنده ۳۳ باقی‌مانده (لوسین ۲۹۲ تا تیروزین ۳۲۴) با این ترادف است: LGEGDKVKCFHCGGGLTDWKPS-EDPWEQHAKWY (Yang *et al.*, 2009). 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 ازکارافتادن مسیر پیام‌رسانی آپوپتوز هستند؛ بنابراین، داروهایی که دوباره مسیر آپوپتوز را در یاخته‌های سرطانی به راه می‌اندازند، در درمان سرطان کارآمدند. مولکول‌های کوچک که بتوانند کارکرد پروتئین SMAC را تقلید کنند می‌توانند باعث مهار عمل‌کرد پروتئین XIAP بر کاسپاز و سرانجام باعث درمان سرطان شوند (Flygare, 2012). بنابراین، می‌توان با جلوگیری از فعالیت پاد آپوپتوزی پروتئین XIAP به‌وسیلۀ پپتیدهای کوچک متصل شونده به دومین BIR3 یاخته‌های سرطانی به داروهای شیمی‌درمانی حساس کرد. به این پپتیدها مولکول‌های کوچک تقلیدکننده SMAC گفته می‌شود و ترادف آنها مانند جایگاه اتصال پایانه N پروتئین SMAC که به پروتئین XIAP متصل می‌شود، است. بیشتر تقلیدکننده‌های SMAC فعالیت بالایی دارند ولی به علت ویژگی پپتیدی که دارند کم‌وبیش ناپایدارند و نمی‌توانند به‌طور کارآمد وارد یاخته‌ها شوند (Fulda *et al.*, 2002). روش دیگر طراحی مولکول‌های غیر پپتیدی کوچک بر پایه پپتید AVPI مهارکنندۀ طبیعی (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). Oost و همکاران کشف کردند که گروه‌های آمین آزاد متیله شده باعث افزایش فعالیت پپتیدهای مقلد می‌شود (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 می‌توان انرژی آزاد اتصال مقلدهای SMAC را با BIR3-XIAP به دست آورد. از سوی دیگر می‌توان تغییرات ساختاری مقلدهای SMAC و دومین BIR3 را دراثر اتصال به هم (که تابه‌حال 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 به‌دست‌آوردن 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 طراحی دارو و علوم مرتبط می‌شود (Morris *et al.*, 2009). روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هم ابزاری مهم و پرکاربرد نظری است که به پژوهشگران شیمی، فیزیک و زیست‌شناسی امکان مدل‌سازی رفتار دینامیکی میکروسکوپی سامانه‌های گوناگون مانند گازها، مایعات، جامدات، سطوح و مولکول‌های زیستی و غیره را می‌دهد. 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 تشکیل‌دهندهٔ سامانه می‌گشاید. روش‌های محاسبه انرژی آزاد اتصال لیگاندها به پروتئین‌ها 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 مولکول‌های 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 سامانه‌ها با موفقیت امتحان شده است (Genheden & Ryde 2015).

هدف از انجام این بررسی طراحی یک پپتید کوچک به‌منظور 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 باقی‌مانده‌های 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 دومین‌ها اثری در نتایج ندارد بنابراین در نظر گرفتن این دومین به‌تنهایی کافی است (Sun *et al.*, 2000).

مواد و روش‌ها

ساختار سه‌بعدی دومین BIR3 از بانک ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها (کدPDB : 2OPY) گرفته شد. در ابتدا ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به‌منظور به‌دست‌آوردن ساختار پایدارتر و بهتر برای دومین آزاد BIR3 روی آن انجام شد. سپس از روش داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بررسی تمایل اتصال پپتید به دومین BIR3 استفاده شد.

روش داکینگ

در ابتدا ۱۵ پپتید چهار اسیدآمینه‌ای طراحی شد (جدول ۱) و به‌وسیلهٔ نرم‌افزار هایپرکم 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 پپتید در اطراف دومین BIR3 از الگوریتم ژنتیک لامارکی (LGA) و برای محاسبه انرژی اتصال از یک تابع انرژی نیم‌تجربی 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 ۰/۳۷۵ انگستروم درنظر گرفته شد. این ابعاد به‌اندازهٔ کافی برای چرخش آزاد پپتید در حین انجام داکینگ بزرگ هستند. از سنجه (پارامتر)های پیش‌فرض در مراحل داکینگ استفاده شد به‌جز این‌که اندازه‌های tstep وdstep و qstep به‌ترتیب ۰/۲ انگستروم و۵ درجه و ۵ درجه در نظر گرفته شدند (Mahnam & Hoghoughi, 2014). پرونده‌های ورودی برای برنامه اتوداک توسط برنامه اتوداک تولز ۴/۲ آماده شدند. در این برنامه هیدروژن‌های غیرقطبی

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

جدول ۱- نام و ترادف پپتیدهای بررسی‌شده و ثابت تفکیک (K_D) شماری از آنها.

Table 1. The name and sequence of the studied peptides and their experimental dissociation constant (K_D).

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

† نتایج تجربی از منبع kipp (kipp, 2002) گرفته‌شده است. *NR: گزارش نشده.

†Expermental K_D were obtained from kipp (kipp *et al.*, 2002) paper , *NR: not report

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

شبیه‌سازی 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 پپتیدهای غیرطبیعی (پپتید ۲ و ۳) به‌وسیلهٔ نرم‌افزار Acpype/Antechamber بر پایه میدان نیروی امبر عمومی (GAFF) ساخته شد (Sousa *et al.*, 2012). بارهای جزیی اتم‌های پپتید با یک روش دقیق کوانتومی به نام برازش پتانسیل Merz-Kollman در نرم‌افزار گاوسین ۹۸ به روش هارتری– فاک (HF) و مجموعه پایه 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 می‌شوند. پرونده توپولوژی دیگر پپتیدهای طبیعی با استفاده از فرمان pdb2gmx در برنامه گرومکس ساخته شد. کمپلکس‌های به‌دست‌آمده با بهترین موقعیت پپتیدها 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 پپتیدهایی که بار کل مثبت یک داشتند) یون کلر به‌طور تصادفی جایگزین مولکول‌های آب شدند. ابتدا کل سامانه با الگوریتم کاهش پرشیب و شیب مزدوج بهینه شدند (minimization). در مرحله بعد به‌منظور به تعادل رساندن سامانه به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NVT (دما و حجم و تعداد مولکول‌های ثابت) و سپس ۱۰۰۰ پیکوثانیه در هنگرد NPT (دما و فشار و تعداد مولکول‌های ثابت) با ثابت در نظر گرفتن مکان اتم‌های پروتئین (position restraint) انجام شد. در پایان ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در شرایط NPT و در دمای ۳۰۰ کلوین و گام زمانی ۲ فمتوثانیه بدون این که مکان اتم‌های پروتئین ثابت در نظر گرفته شود، انجام شد. جزئیات بیشتر در مقالات مشابه ذکرشده است (Li, 2005; Mahnam & Hoghoughi, 2014; Lindhal *et al.*, 2002).

محاسبات MM/PBSA

درروش MM/PBSA انرژی آزاد اتصال با فرمول زیر محاسبه می‌شود: $\Delta G_{bind}=G_{complex}-G_{protein}-G_{ligand}$

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 انرژی‌ها مانند کارهای پیشین محاسبه شدند (Baker *et al.*, 2001). برای این کار از فرمان g_mmpbsa که از پرونده مسیر (trajectory) شبیه‌سازی کمپلکس استفاده می‌کند کمک گرفته شد. همچنین از قسمت آنتروپی هم در محاسبات هم‌چشم پوشی شد، زیرا کاهش آنتروپی

برای همه پپتیدها یکسان است و تأثیری در مقایسه نسبی انرژی آزاد اتصال پپتیدها ندارد (Kumari *et al.*, 2014; Kollman *et al.*, 2000).

نتایج و بحث

نتایج داکینگ

نتایج داکینگ نشان داد که همه پپتیدها توانایی اتصال اولیه به شکاف IBM دومین BIR3 را دارند. جدول ۲ سهم انرژی الکتروستاتیک و واندروالسی (به علاوه پیوند هیدروژنی و جدا شدن آب) در اتصال هرکدام از پپتیدها را نشان می‌دهد. در این جدول همچنین کمترین انرژی اتصال پرجمعیت ترین خوشه (به‌دست‌آمده از دسته‌بندی نتایج داکینگ پپتیدها به دومین BIR3) ذکر شده است. پپتید ۶ و ۸ و ۹و ۱۱ دارای کمترین انرژی اتصال اند؛ بنابراین، این پپتیدها را می‌توان به‌عنوان پپتیدهای مهم در اتصال به دومین BIR3 در نظر گرفت. همه میانکنش‌های الکتروستاتیک، واندروالسی و هیدروژنی دراتصال نقش دارند ولی یک بررسی کلی 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 می‌گیرد درحالی‌که شماری از پپتیدها بارکل مثبت دارند. همچنین در ساخت فایل‌های ورودی برنامه اتوداک هیدروژن های غیرقطبی حذف می شوند. بنابراین، با روش داکینگ نمی‌توان قضاوت دقیقی درمورد اهمیت بیشترمیانکنش الکتروستاتیک ویا واندروالسی (هیدروفوبیک) کرد. ازنتایج داکینگ دراینجا تنها برای مقایسه انرژی اتصال پپتیدهاو به‌دست آوردن یک موقعیت شروع برای شبیه-سازی دینامیک مولکولی استفاده‌شده است. در این بررسی از روش‌های دقیق‌تری مانند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای محاسبه انرژی اتصال استفاده شد.

نتایج شبیه‌سازی دومین آزاد BIR3

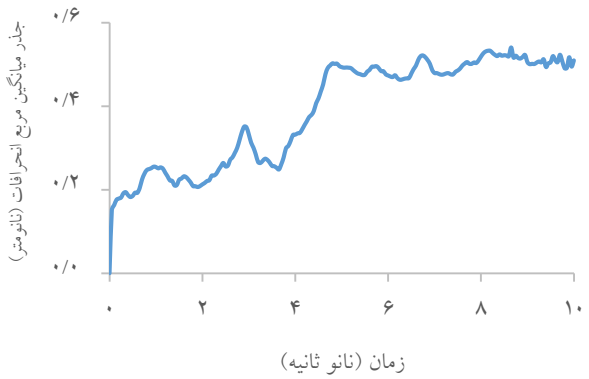
جذرمیانگین مربع انحرافات (RMSD) بیانگر میزان جابجایی همه اتم‌های پروتئین درطی زمان شبیه‌سازی نسبت به ساختار شروع (در این جا ساختارکریستالوگرافی) است. نمودار جذر میانگین انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی دومین BIR3 نسبت به لحظه شروع در شکل ۱ نشان داده شده است که صاف شدن این نمودار وتغییرات ناچیز آن (۰/۰۷ نانومتر) در چهار نانوثانیه آخر حاکی از به‌تعادل-رسیدن اسکلت اصلی پروتئین است. تغییرنکردن قابل‌توجه 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 میانگین‌گرفتن از RMSD درکل زمان شبیه‌سازی می‌توان میزان جابجایی همهٔ اتم‌ها درکل زمان شبیه‌سازی را نسبت به ساختار شروع به‌دست آورد. اغلب مواقع این میانگین زمانی از RMSD را از زمانی می‌گیریم که RMSD کم‌وبیش ثابت‌شده است و پروتئین دیگر تغییر ساختار نمی‌دهد. در این مطالعه از آنجا که نمودار RMSD در ۴ نانوثانیه 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 نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی ذکرشده 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 کریستالوگرافی 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 درچهارنانوثانیه پایان شبیه‌سازی و نسبت هرز (drift) انرژی کل به میانگین انرژی کل در جدول ۳ (ردیف نخست) ذکرشده‌اند. مقدار بسیارکم این نسبت (۰/۰۰۰۱) در طول شبیه‌سازی نشان می‌دهد 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 به‌تعادل‌رسیدن این است که این پارامترها در ادامه زمان شبیه‌سازی دیگر تغییر نکرده‌اند 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 وآب و درداخل پروتئین (جدول ۴) به این معنی است که دومین BIR3 به ساختار پایداردر طول شبیه‌سازی رسیده است.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

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

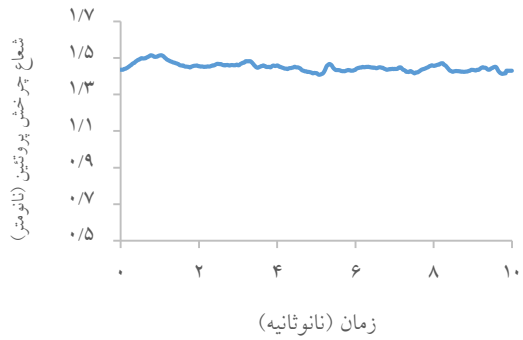
Table 2. Electrostatic energy and Van der Waals +hydrogen bond+ desolvation and the lowest binding energies (kJ/mol) of most populated tetrapeptides to BIR3 domain and population of clusters in that docking run.

شمارهٔ پپتید	جمعیت خوشه	کمترین انرژی پرجمعیت‌ترین خوشه (کیلوژول بر مول)	انرژی واندروالسی+هیدروژنی+جداشدن آب (کیلوژول بر مول)	انرژی الکتروستاتیک (کیلوژول بر مول)
۱	۴۳	-۲۲/۵	-۳۰/۴۶	-۴/۵۶
۲	۳۷	-۲۳/۰۵	-۳۶/۴۸	-۲/۸
۳	۲۶	-۳۳/۰۱	-۴۱/۶۷	-۸/۸۳
۴	۳۶	-۲۸/۹۵	-۳۴/۶۴	-۶/۸۲
۵	۱۵	-۲۹/۷۹	-۳۴/۱۸	-۱۳/۱
۶	۲۰	-۳۵/۱۴	-۴۲/۵۹	-۱۰/۰۸
۷	۴۸	-۲۱/۶۳	-۳۰/۵	-۹/۸۷
۸	۲۳	-۴۲/۳	-۴۴/۱۸	-۱۴/۳۵
۹	۱۰۰	-۳۴/۴۳	-۳۸/۱۲	-۱۰/۰۸
۱۰	۱۳	-۲۳/۰۵	-۳۴/۸۱	-۴/۴۸
۱۱	۲۴	-۳۵/۱۴	-۳۹/۱۲	-۸/۶۶
۱۲	۱۳	-۳۱	-۳۶/۲۸	-۱۰/۹۶
۱۳	۱۲	-۲۹/۷	-۳۸/۷	-۸/۴۵
۱۴	۲۴	-۲۹/۵۳	-۳۳/۵۱	-۹/۷۹
۱۵	۳۰	-۲۹/۲۸	-۳۳/۷۶	-۱۱/۷۲



شکل ۱- نمودار جذر میانگین مربع انحرافات (RMSD) اسکلت اصلی BIR3. در طول ۱۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.

Fig. 1. Root mean square deviation (RMSD) of BIR3 backbone during 10 ns MD simulation.



شکل ۲- شعاع چرخش دومین BIR3 در طی ۱۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی.

Fig. 2. Radius of gyration (Rg) of BIR3 domain during 10 ns MD simulation.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

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 شبیه‌سازی در جدول ۵ (ردیف اول) ذکرشده‌اند. ازآنجا که روی (Zn) در این پروتئین نقش ساختاری دارد، تغییرات کوچک درRMSD یون روی و اتم‌های متصل به آن آشکار می‌کند که ساختاردومین 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 در۴ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی است. ساختار پایانی دومین BIR3 که از این شبیه‌سازی به‌دست آمد برای داکینگ و شبیه‌سازی در حضور پپتیدهای مختلف استفاده شد.

نتایج شبیه‌سازی دومین BIR3 در کمپلکس با پپتیدها

نمودار جذر میانگین مربعات انحرافات اسکلت اصلی پروتئین BIR3 درحضور پپتیدها همگی حاکی از به‌تعادل‌رسیدن 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 می‌تواند 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 وتعداد پیوند هیدروژنی میان پپتید ودومین BIR3 را درچهارنانوثانیه پایانی شبیه‌سازی نشان می‌دهد. تغییرات RMSD پپتیدها نسبت به ساختار موقعیت شروع کوچک بوده است که این نشان می‌دهد موقعیت به‌دست‌آمده توسط داکینگ موقعیت کم‌وبیش خوبی بوده است (جدول ۴). قرار گرفتن پپتیدها در شکاف IBM پروتئین BIR3 به کاهش تعداد پیوند هیدروژنی داخل مولکول BIR3 (نسبت به حالت بدون پپتید) منجر می‌شود که این مسئله احتمالاً به‌علت ایجاد پیوند هیدروژنی میان دومین BIR3 و پپتیدها بوده است. همچنین بررسی تعداد پیوندهای هیدروژنی میان پروتئین و پپتید نشان می‌دهد که پپتید ۸ به‌طور میانگین بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی (۱/۳ ± ۴) و پپتید ۱ کمترین تعداد پیوند هیدروژنی (صفر) را با دومین BIR3 در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی برقرار می‌کنند (جدول ۴) که این می‌تواند حاکی از اتصال محکم پپتید ۸ با دومین BIR3 باشد. جذر میانگین مربع نوسانات (Root Mean Square Fluctuations) (RMSF) یک باقی‌مانده نشان‌دهندهٔ میزان جابجایی آن باقی‌مانده در طول شبیه‌سازی نسبت به مکان اولیه خودش است. بنابراین، RMSF هر باقی‌مانده نشانده انعطاف‌پذیری وجنبش آن باقی‌مانده در طول زمان شبیه‌سازی است. برای نمونه نواحی لوپ و انعطاف‌پذیر در پروتئین RMSF زیادتری نسبت به دیگر بخش‌های انعطاف‌ناپذیر پروتئین دارند. مساحت زیر نمودارRMSF همهٔ باقی‌مانده‌های پروتئین نشان‌دهندهٔ انعطاف‌پذیری کلی پروتئین درطول شبیه‌سازی است. مقایسهٔ مساحت زیر نمودار RMSF دومین آزاد BIR3 ودومین BIR3 درکمپلکس با پپتیدها در جدول ۵ نشان می‌دهد که انعطاف‌پذیری کلی دومین BIR3 در اثرحضور پپتیدها کم می‌شود. این مسئله احتمالاً به این خاطر است که میان پپتیدها و دومین BIR3 میان‌کنش 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 کمپلکس‌ها (جدول ۵) بیانگر این است که هیچ تغییر قابل توجهی در ساختار سوم دومین BIR3 و در شکاف اتصال آن در اثر حضور پپتیدهای مختلف رخ نمی‌دهد. پپتید ۱ بیشترین فاصله مرکز جرم را با پروتئین و بیشترین تغییرات در فاصله (۰/۴ نانومتر) را نسبت به سایر پپتیدها در طول ۴ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی دارد (جدول ۵). بنابراین این پپتید موقعیت خود را بیش از سایر پپتیدها در طول شبیه‌سازی تغییر می‌دهد. این نتیجه می‌تواند به معنی عدم پیوند پپتید 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 پپتیدها) نیز است (جدول ۱).

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

به‌منظور مقایسهٔ انرژی آزاد پپتیدها به دومین BIR3 و انجام بررسی دقیق‌تری از مشارکت تک‌تک باقی‌مانده‌های دومین BIR3 در میانکنش با پپتیدها وهمچنین تعیین میزان مشارکت تک‌تک باقی‌مانده‌های پپتیدها از روش MM/PBSA استفاده شد. جدول ۶ مشارکت الکتروستاتیک و واندروالسی و همچنین سهم انرژی حلالیت قطبی و غیرقطبی را در انرژی میان‌کنش با پپتیدها نشان

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

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 درکمپلکس‌ها.

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 پپتید	دما (کلوین)	هرز انرژی	انرژی پتانسیل (کیلوژول بر مول)	انرژی کل (کیلوژول بر مول)
دومین BIR3 آزاد	۲۹۹/۹±۱/۹	۰/۰۰۰۱	- ۳۱۲۴۹۰± ۶۳۷	-۲۵۵۳۹۶± ۸۲۹
۱	۳۰۰/۱±۲/۱	۰/۰۰۰۱	-۳۷۰۸۶۱ ± ۶۲۹	-۳۰۰۷۶۷±۷۷۶
۲	۲۹۹/۸±۲	۰/۰۰۰۰۹	-۳۷۰۰۳۴ ± ۶۶۴	- ۳۰۲۹۷۶±۸۳۶
۳	۲۹۹/۹±۲/۳	۰/۰۰۰۰۶	-۳۶۹۷۶۴ ± ۶۶۱	-۳۰۱۰۰۰±۱۰۲۲
۴	۳۰۰±۲/۳	۰/۰۰۰۳	-۳۷۰۷۴۱ ± ۷۲۶	-۳۰۴۰۲۰±۱۰۲۸
۵	۳۰۰±۲/۴	۰/۰۰۰۰۲	-۳۷۰۳۶۵±۶۳۹	-۳۰۳۳۰۶±۹۰۴
۶	۲۹۹/۸±۲	۰/۰۰۰۱	-۳۷۰۳۲۱±۶۳۷	-۳۰۳۳۱۷±۸۲۸
۷	۳۰۰±۲/۱	۰/۰۰۰۱	-۳۷۰۱۷۴±۷۰۲	-۳۰۳۳۲۸±۹۳۱
۸	۲۹۹/۹±۲/۱	۰/۰۰۰۲	-۳۷۰۹۷۳±۷۱۹	-۳۰۳۹۷۳±۹۳۲
۹	۳۰۰±۲/۳	۰/۰۰۰۰۶	-۳۷۰۸۱۷ ±۵۷۶	-۳۰۳۶۹۹±۷۷۹
۱۰	۳۰۰±۲/۳	۰/۰۰۰۰۸	-۳۷۰۶۶۱± ۶۷۶	-۳۰۳۶۰۹±۸۶۵
۱۱	۳۰۰±۲	۰/۰۰۰۱	-۳۷۰۶۸۳ ±۶۲۷	-۳۰۳۶۰۹±۸۶۳
۱۲	۳۰۰/۲±۲/۲	۰/۰۰۰۱	-۳۷۰۸۶۴ ±۷۶۲	-۳۰۳۷۵۴±۹۲۸
۱۳	۳۰۰±۲/۱	۰/۰۰۰۱	- ۳۷۱۰۴۵±۶۸۶	-۳۰۴۰۲۱±۹۳۴
۱۴	۳۰۰/۱±۲	۰/۰۰۰۲	-۳۷۰۷۴۱±۷۲۶	-۳۰۳۶۷۶±۸۸۶
۱۵	۳۰۰/۱±۱/۹	۰/۰۰۰۰۳	-۳۷۱۳۵۸±۷۱۷	-۳۰۴۲۶۵±۸۷۴

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 کمپلکس‌ها.

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.

شماره پپتید	میانگین زمانی RMSD اسکلت اصلی دومین BIR3 (نانومتر)	میانگین زمانی RMSD پپتید (نانومتر)	میانگین تعداد پیوند هیدروژنی داخل مولکولی BIR3	میانگین شمار پیوند هیدروژنی میان دومین BIR3 و آب	میانگین شمار پیوند هیدروژنی میان پپتید و دومین BIR3
دومین BIR3 آزاد	۰/۵ ± ۰/۰۷	-	۶۳±۴/۵	۲۶۵±۹/۵	-
۱	۰/۲۷ ± ۰/۰۸	۰/۵۸ ± ۰/۱۶	۶۱±۴	۲۷۰±۱۰	۰±۰
۲	۰/۲۳ ± ۰/۰۲	۰/۲۳ ± ۰/۰۲	۶۰±۵	۲۶۴±۱۰	۰/۹۳ ± ۰/۷۵
۳	۰/۳۵ ± ۰/۰۹	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۶۲±۴	۲۶۲±۹	۲/۲±۱/۱
۴	۰/۳۱ ± ۰/۰۶	۰/۲۴ ± ۰/۰۲	۵۹±۴	۲۶۸±۷	۱/۸۲ ± ۰/۹۵
۵	۰/۵ ± ۰/۰۲	۰/۳۳ ± ۰/۰۳	۶۱±۴	۲۷۰±۸	۰/۱۴ ± ۰/۳۴
۶	۰/۲۷ ± ۰/۰۱	۰/۳۳ ± ۰/۰۷	۶۲±۴	۲۶۴±۸	۰/۷۸ ± ۰/۷۱
۷	۰/۳۶ ± ۰/۰۳	۰/۲۲ ± ۰/۰۴	۶۲±۴	۲۶۳±۱۰	۱/۴۳ ± ۰/۶۵
۸	۰/۳۸ ± ۰/۰۳	۰/۲۷ ± ۰/۰۴	۵۸±۴	۲۷۳±۷	۴/۰۷ ± ۱/۲۹
۹	۰/۳۴ ± ۰/۰۳	۰/۶۵ ± ۰/۱۷	۴۹±۴	۲۶۸±۱۰	۲/۷۸ ± ۱/۰۵
۱۰	۰/۲۹ ± ۰/۰۴	۰/۴۷ ± ۰/۰۹	۶۰±۴	۲۶۹±۸	۱/۷۴ ± ۰/۹۶
۱۱	۰/۳۸ ± ۰/۰۵	۰/۵۴ ± ۰/۱۱	۶۴±۴	۲۵۷±۸	۱/۸۸ ± ۰/۹۷
۱۲	۰/۲۸ ± ۰/۰۳	۰/۲۴ ± ۰/۰۳	۵۹±۴	۲۷۰±۹	۲ ± ۰/۸۳
۱۳	۰/۲۸ ± ۰/۰۴	۰/۲۹ ± ۰/۰۲	۶۰±۵	۲۶۵±۸	۲/۱۹ ± ۰/۷۳
۱۴	۰/۲۸ ± ۰/۰۴	۰/۲۱ ± ۰/۰۴	۵۹±۴	۲۶۷±۸	۱/۸۳ ± ۱/۰۷
۱۵	۰/۲۴ ± ۰/۰۳	۰/۱۶ ± ۰/۰۳	۶۰±۴	۲۶۲±۸	۱/۸۴ ± ۰/۰۲

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

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.

شماره پپتید	میانگین سطح در دسترس حلال دومین BIR3 (نانومتر مربع)	میانگین RMSD یون روی و اتم‌های متصل به آن (نانومتر)	میانگین شعاع چرخش دومین BIR3 (نانومتر)	مساحت زیر نمودار RMSF دومین BIR3	میانگین فاصله مرکز جرم دومین BIR3 و پپتید (نانومتر)
دومین BIR3 آزاد	۷۶/۹ ± ۱/۳	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۴۴ ± ۰/۰۲	۲۷/۳۴	-
۱	۷۷ ± ۱/۷	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۶۲ ± ۰/۵	۱۵/۱۵	۳/۱۲ ± ۰/۴
۲	۷۶ ± ۱/۸	۰/۰۴±۰/۰۲	۱/۵ ± ۰/۰۲	۱۶/۲	۰/۷۶ ± ۰/۰۸
۳	۷۹ ± ۱/۲	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۵۶ ± ۰/۰۲	۱۷/۷۷	۰/۶۷ ± ۰/۰۷
۴	۷۸ ± ۱/۴	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۵ ± ۰/۰۶	۱۵/۹۷	۰/۷ ± ۰/۱۸
۵	۷۶ ± ۲/۱	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۳۸ ± ۰/۰۲	۱۹/۸۷	۱/۲۵ ± ۰/۱۴
۶	۷۷ ± ۱/۱	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۴۹ ± ۰/۰۳	۱۶/۹۵	۰/۸۲ ± ۰/۰۳
۷	۷۶ ± ۱/۳	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۵۳ ± ۰/۰۱	۱۷/۰۲	۱/۱۵ ± ۰/۰۹
۸	۷۹ ± ۱/۵	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۵۷ ± ۰/۰۲	۱۶	۰/۸۸ ± ۰/۰۷
۹	۷۸ ± ۱/۳	۰/۰۴ ± ۰/۰۱	۱/۵ ± ۰/۰۲	۱۶/۲۷	۰/۷۸ ± ۰/۰۳
۱۰	۷۸ ± ۱/۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۵۸ ± ۰/۱۶	۱۴/۲	۱/۰۳ ± ۰/۰۷
۱۱	۷۷ ± ۱/۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۴۹ ± ۰/۰۹	۱۶/۶۷	۰/۵۲ ± ۰/۰۳
۱۲	۷۸ ± ۱/۱	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۷۲ ± ۰/۲۹	۱۴/۸۳	۰/۵۸ ± ۰/۰۴
۱۳	۸۰ ± ۱/۲	۰/۰۵ ± ۰/۰۱	۱/۵۷ ± ۰/۰۹	۱۹/۲	۱/۱۹ ± ۰/۰۶
۱۴	۷۷ ± ۱/۴	۰/۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۵ ± ۰/۰۶	۱۶/۳۷	۰/۷ ± ۰/۱۸
۱۵	۷۸ ± ۲/۶	۰/۰۲ ± ۰/۰۱	۱/۴۸ ± ۰/۰۲	۱۴/۲۷	۱/۱ ± ۰/۱۶

می‌دهد. این نتایج نشان می‌دهد که میان‌کنش‌های الکتروستاتیک نقش مهم‌تری نسبت به میان‌کنش‌های واندروالسی (هیدروفوبیک) در اتصال دارد. این نتایج برخلاف نتایج داکینگ است که نقش انرژی‌های واندروالسی را مهم‌تر از انرژی الکتروستاتیک نشان می‌داد. همچنین مقادیر انرژی آزاد اتصال در این روش متفاوت با مقادیر به‌دست‌آمده درروش داکینگ است. این دوگانگی به خاطر تفاوت در محاسبه بارهای جزیی اتم‌های پپتید در دو روش و حضور آب در شبیه‌سازی در مقایسه با روش داکینگ است. درروش داکینگ از مدل آب غیرصریح استفاده می‌شود و عملاً مولکول آب در محاسبات وجود ندارد اما در شبیه‌سازی به‌طور صریح مولکول آب وجود دارد. از طرف دیگرهیدروژن‌های غیرقطبی در داکینگ در نظر گرفته نشده‌اند ولی در شبیه‌سازی در نظر گرفته شده‌اند (بعلت استفاده از میدان نیروی امبر). علیرغم همه این اختلافات ضریب همبستگی (R^2) انرژی اتصال به‌دست‌آمده ازاین دو روش به میزان ۰/۶۲ است و پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ در هر دو روش جزء چهار پپتید اول از نظر انرژی اتصال هستند که این نشان می‌دهد نتایج کلی این دوروش تا حد زیادی با هم هماهنگی دارند. درکل نتایج شبیه‌سازی 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 گزارش‌شده بودند (جدول ۱). ضریب همبستگی (R^2) انرژی اتصال نظری (جدول ۶) باانرژی اتصال تجربی برای این چهار پپتید حدود ۰/۸ است. به‌علاوه، ترتیب ثابت تفکیک تجربی با انرژی اتصال به‌دست‌آمده با روش MM/PBSA یکسان است. این همبستگی خوب نتایج به‌دست‌آمده از روش نظری را تأیید می‌کند و نشان می‌دهد که می‌توان از روش MM/PBSA برای پیشگویی تمایل اتصال پپتیدها به پروتئین BIR3 استفاده کرد. Kipp و همکاران (2002) نشان دادند که تغییر باقی‌مانده ۱ و ۳ از سمت پایانه N پپتید جداشده از پروتئین SMAC (AVPI) بایستی با دقت

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

انجام گیرد. این چهار باقی‌مانده در کمپلکس SMAC/DIABLO به شکاف سطحی IBM در BIR3 متصل می‌شوند. نخستین باقی‌مانده یعنی آلانین به پاکت هیدروفوبیک BIR3 متصل می‌شود 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 پپتید AVPI (در پروتئین SMAC) سه پیوند هیدروژنی با شکاف سطحی BIR3 می‌دهد وگروه کربونیل آن دو پیوند هیدروژنی اضافی تشکیل می‌دهد. همچنین گروه متیل آلانین ۱ به‌طور محکم در پاکت هیدروفوبیک جای می‌گیرد و هر تغییر آلانین باید بااحتیاط انجام شود تا جلوی ممانعت فضایی با این پاکت 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 پپتید 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 پپتید SMAC یعنی AVPI است (۵۴- کیلوژول 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 باقی‌مانده‌های پپتیدها در اتصال به دومین BIR3 را نیز تعیین کردیم. همان‌طور که در جدول ۷ نشان داده‌شده است بررسی سهم هرکدام از باقی‌مانده‌های پپتید در اتصال به دومین BIR3 نشان می‌دهد افزایش بار مثبت باقی‌مانده دوم پپتید به افزایش قدرت اتصال منجر می‌شود. (پپتید ۶(AKPW) و ۸(ARPF)). همچنین افزایش خاصیت هیدروفوبیکی باقی‌مانده چهارم و گروه قطبی در باقی‌مانده دوم به افزایش قدرت اتصال منجر می‌شود (پپتید ۹ (ATPF)). ازآنجاکه پپتید ۹ بار مثبت در جایگاه دوم ندارد و تنها خاصیت هیدروفوبیک در جایگاه چهارم دارد می‌توان نتیجه گرفت وجود هردوی بار مثبت و خاصیت هیدروفوبیک برای افزایش قدرت اتصال ضروری نیست. شاید هم بتوان این‌گونه نتیجه گرفت که وجود ویژگی هیدروفوبیک آروماتیک در جایگاه چهارم مهم‌تر از وجود بار مثبت در جایگاه دوم است. زیرا هر سه پپتید قوی (۶ و ۸ و ۹) دارای فنیل آلانین یا تریپتوفان در جایگاه چهارم خود هستند. (جدول ۶). همچنین جهش در باقی‌مانده ۳ در پپتید ۱۰ (AVFI) در مقایسه با پپتید ۱ (AVPI) به کاهش مشارکت باقی‌مانده ۱ در اتصال منجر می‌شود (جدول ۷). بنابراین، نتایج ما هماهنگ با نتایج آقای Kipp و همکاران است که خاطرنشان کردند که جهش در باقی‌مانده ۳ پپتید AVPI اثر منفی روی اتصال دیگر باقی‌مانده‌ها دارد و به کاهش گرایش اتصال پپتید به دومین BIR3 منجر می‌شود. 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 میانکنش‌های هیدروفوبیک و هیدروژنی به‌وسیلهٔ نرم‌افزار LigPlus 4 گزینش شدند (Wallace *et al.*, 1995). شکل ۳ میان‌کنش‌های هیدروفوبیک و هیدروژنی میان این پپتیدها و دومین BIR3 را در ساختار پایانی به‌دست‌آمده در شبیه‌سازی کمپلکس‌ها را نشان می‌دهد. پپتید 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 میانکنش‌های هیدروفوبیک با لوسین ۳۰۷ و تیروزین ۳۲۴ دارد (شکل ۳B). پپتید 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 میان‌کنش هیدروفوبیک

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

جدول ٦- 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.

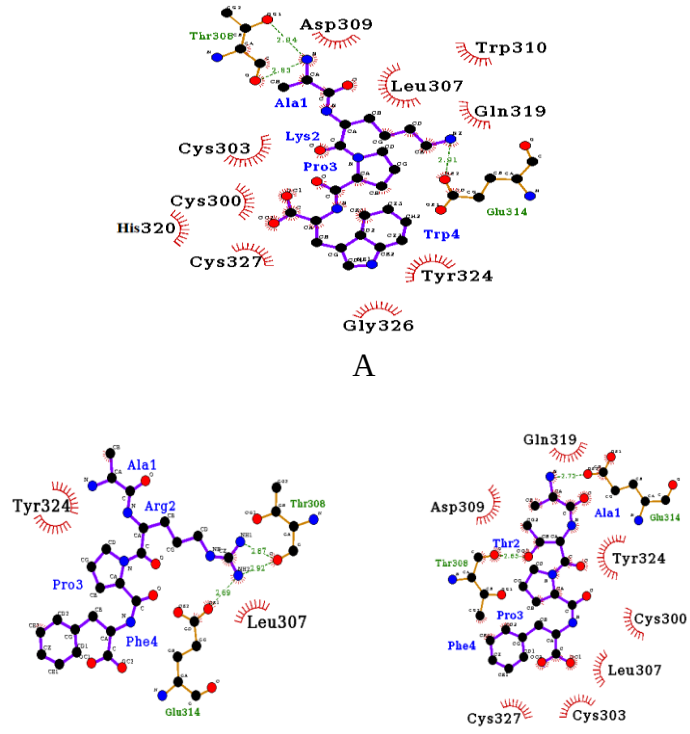
پپتید	ترادف پپتید	انرژی آزاد اتصال	انرژی الکتروستاتیک	انرژی واندروالسی	انرژی حلالیت قطبی	انرژی حلالیت غیر قطبی
۱	AVPI	−۵۴/۷±۱۱/۱	−۱۱۸/۷ ±۱۸/۵	−۲۰/۵ ± ۲/۹	۸۶/۳ ± ۱۴/۰	−۳/۲ ±۰/۴
۲	Methyl-AVPI	−۲۰۸/۵±۱۰/۹	−۴۲۱/۹±۲۱/۹	−۷۸/۸±۲/۷	۳۰۲/۷±۱۷/۱	−۱۰/۲±۰/۲
۳	Ethyl-phenyl-AVPI	−۲۴۳/۵±۱۱	−۳۰۸/۳±۱۴/۳	−۷۶/۶±۲/۸	۱۵۲/۵±۶/۵	−۱۰/۲±۰/۳
۴	AVPW	−۲۲۰/۷±۷/۶	−۴۹۰/۴±۱۱/۴	−۹۳/۶±۹/۱	۳۷۷±۸/۷	−۱۲/۹±۰/۲
۵	AKPF	−۲۲۷/۱±۱۷	−۷۰۲/۹ ±۲۲/۸	−۷۲/۵±۱/۸	۵۶۱/۱±۸/۷	−۱۲/۶±۰/۱
۶	AKPW	−۴۳۷/۶±۵/۷	−۱۱۱۵/۲±۱۲/۱	−۱۱۰/۳±۲/۱	۸۰۳/۶±۷/۳	−۱۶/۴±۰/۱
۷	AKPY	−۵۲/۵±۴/۴	−۳۱/۵±۵/۵	−۷۱/۷±۱/۵	۶۰/۵±۵/۵	−۹/۵±۰/۲
۸	ARPF	−۴۱۸/۳±۸/۹	−۸۴۰/۸±۱۴/۲	−۸۸/۲±۲/۲	۵۲۴/۳±۱۰/۴	−۱۴/۹±۰/۲
۹	ATPF	−۴۳۹/۹±۱۳/۹	−۹۹۹/۱±۳۱/۸	−۱۱۷/۶±۳/۲	۶۹۱/۳±۲۳/۴	−۱۶/۱±۰/۳
۱۰	AVFI	−۲۱۱/۱±۱۴/۶	−۳۸۷/۸±۲۱/۳	−۶۱/۶±۱/۹	۲۴۸/۸±۸/۸	−۹/۵±۰/۳
۱۱	AVPF	−۲۶۱±۹/۸	−۵۱۴/۷±۱۹/۵	−۷۸/۲±۲/۶	۳۴۰/۵±۱۳/۸	−۱۰/۹±۰/۳
۱۲	ARPW	−۱۳۹/۷±۱۴/۶	−۳۹۹/۵±۲۲/۲	−۸۶/۴±۳/۹	۳۵۷/۴±۱۶	−۱۱/۱±۰/۵
۱۳	ARPY	−۲۸۹/۴±۱۰	−۷۱۲/۶±۱۲/۸	−۹۸/۷±۲/۲	۵۳۴/۸±۱۰/۹	−۱۳/۲±۰/۲
۱۴	ATPW	−۲۵۶±۹/۸	−۵۰۴/۶±۱۷/۶	−۷۷/۱±۲/۵	۳۳۶/۵±۱۱/۸	−۱۱/۸±۰/۲
۱۵	ARPI	−۲۴۴/۳±۸/۳	−۴۹۴/۲±۱۲/۳	−۶۳/۷±۱/۸	۳۲۴/۴±۹/۵	−۱۰/۸±۰/۲

جدول ۷- میانگین مشارکت انرژی اتصال باقی‌مانده‌های پپتیدها در اتصال به دومین BIR3 (کیلوژول برمول) در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی.

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

شماره پپتید	باقی‌مانده ۴ (پایانه C)	باقی‌مانده ۳	باقی‌مانده ۲	باقی‌مانده ۱(پایانه N)
۱	I	P	V	A
	−۶۱/۲۹	−۲۱/۴	−۳۲/۹۷	−۶۹/۷۲
۲	−۶۳۸/۸۲			
۳	−۵۶۷/۳۷			
۴	W	P	V	A
	−۲۱۱/۶۶	−۶۴/۳۳	−۱۳۴/۶	−۲۰۳/۸۴
۵	F	P	K	A
	−۳۸۸/۰۳	−۶۴/۶۶	−۷۰/۸۴	−۸۶/۱۶
۶	W	P	K	A
	−۴۰۱/۳۲	−۶۴/۰۲	−۲۰۵/۳۷	−۹۳/۲۳
۷	Y	P	K	A
	−۱۲۹/۳۹	−۳۵/۱۸	−۱۰۱/۶۵	−۹۰/۶۶
۸	F	P	R	A
	−۳۱۲/۳۷	−۵۱/۲۵	−۲۴۰/۲۷	−۱۴۸/۵۴
۹	F	P	T	A
	−۲۴۳/۴۷	−۳۷/۹۶	−۶۶/۲	−۷۷/۳۴
۱۰	I	F	V	A
	−۱۷۸/۰۲	−۲۵/۲	−۳۳/۲۲	−۱/۴۸
۱۱	F	P	V	A
	−۱۶۷/۶۸	−۳۳/۷۳	−۲۹/۹	−۴۹/۷۱
۱۲	W	P	R	A
	−۲۸۰/۵۵	−۴۰/۷۲	−۱۴۰/۴۹	−۱۳۱/۷۴
۱۳	Y	P	R	A
	−۳۳۷/۲۵	−۶۱/۱	−۱۶۲/۵۴	−۲۱۲/۴۷
۱۴	W	P	T	A
	−۲۱۵/۴	−۳۹/۹۶	−۶۹/۲۲	−۱۱۱/۷۲
۱۵	I	P	R	A
	−۲۱۲/۸۸	−۵۱/۶۳	−۱۵۷/۶۶	−۱۹۱/۶۹

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]



شکل ۳- نمودار شماتیک میانکنش دومین BIR3 با پپتیدهای**A**: 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.

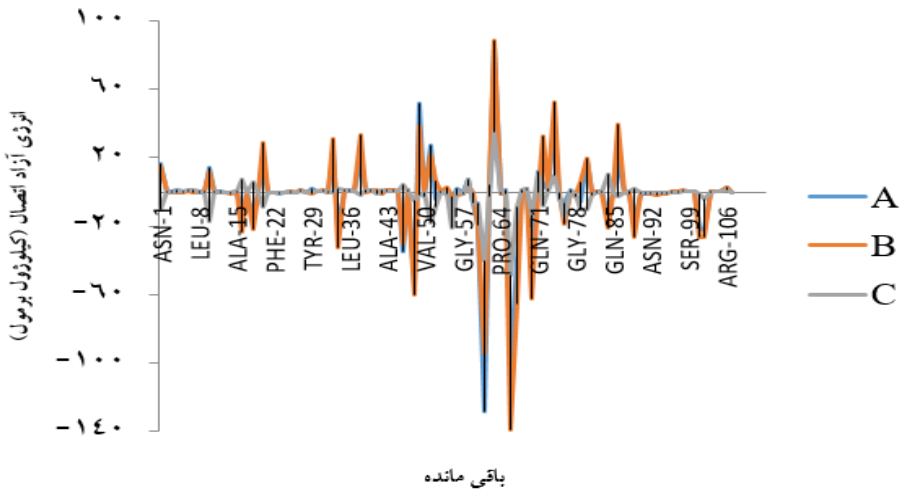
Fig. 3. Schematic diagram of the interaction of BIR3 domain with **A:** tetrapeptide 6, **B:** 8 and **C:** 9 in the final strcture of 10 ns MD simulation. Hydrogen bonds are indicated by dashed lines between the atoms involved, while hydrophobic contacts are represented by an arc with spokes radiating 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.

با لوسین ۳۰۷ و تیروزین ۳۲۴ داشته باشد. زیرا این باقی‌مانده‌ها در میان این سه پپتید قوی مشترک هستند. بر پایه نتایج تجربی باقی‌مانده‌هایی از BIR3 که درگیر در میان‌کنش با پپتید AVPI هستند عبارت‌اند از گلیسین ۳۰۶ و لوسین ۳۰۷ و ترئونین ۳۰۸ و آسپارتات ۳۰۹ و تریپتوفان ۳۱۰ و لیزین۲۹۷ و لیزین ۲۹۹ و گلوتامات ۳۱۴ و گلوتامات ۳۱۹ و تریپتوفان ۳۲۳ و تیروزین ۳۲۴ (Mannhold, 2010). بنابراین، پپتیدهای مناسب ما به همان باقی مانده‌هایی که پپتید طبیعی متصل می‌شود، پیوند می‌دهد و پیوندهای اضافی پپتیدهای ما باعث اتصال قوی‌تر آن نسبت به پپتید طبیعی می‌شود. ازآنجاکه نتایج شکل ۳ فقط مربوط به یک ساختار (ساختار نهایی در شبیه‌سازی) است، به‌منظور بررسی سهم انرژی آزاد باقی‌مانده‌های شکاف دومین BIR3 در اتصال به پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ در طول شبیه‌سازی، نمودار این انرژی‌ها در طول ۴ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی به‌دست آورده شد (شکل ۴). در این نمودار نیز کم‌وبیش همان باقی‌مانده‌های مهم پیشین که برای اتصال ضروری بودند، به‌دست آمد و نتایج شکل ۳ تأیید شد. روی‌هم‌رفته بر پایه شکل ۳ و ۴ و نتایج تجربی می‌توان نتیجه گرفت که پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ به همان باقی‌مانده‌هایی از شکاف BIR3 متصل می‌شوند که برای اتصال و مهارکنندگی ضروری هستند.

نتیجه‌گیری

به‌منظور 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 می‌توانند 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 شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روی کمپلکس‌های به‌دست‌آمده از روش داکینگ انجام شد و بررسی نتایج آن نشان داد که کمپلکس

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]



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.

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 پپتیدها موقعیت پایداری در جایگاه اتصال خود (در طول ۴ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی) دارند زیرا تغییرات فاصله میان مرکز جرم پپتیدها تا دومین BIR3 وتغییرات RMSD در اکثرپپتیدها 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 پپتید از این محاسبات گزینش شد. این پپتیدها عبارت‌اند از پپتید ۶ (AKPW) و ۸ (ARPF) و ۹ (ATPF). این پپتیدها انرژی اتصال منفی‌تری نسبت به دیگر پپتیدها دارند. نتایج بررسی پیوندهای هیدروژنی میان این پپتیدها با دومین BIR3 در ساختار نهایی کمپلکس به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی نشان داد که این پپتیدها به همان باقی‌مانده‌هایی که پپتید طبیعی پیوند می‌دهد، میانکنش می‌دهند. اگرچه با دیگر باقی‌مانده‌های دومین BIR3 پیوندهای اضافه‌تری می‌دهند که باعث افزایش قدرت اتصال آنها نسبت به پپتید طبیعی (AVPI) می‌شود. در محاسبات با روش MM/PBSA سهم انرژی الکتروستاتیک در اتصال پررنگ‌تر از سهم انرژی واندروالسی بود که با نتایج به‌دست‌آمده از روش داکینگ ناهماهنگ است که علت آن در نظر نگرفتن صریح مولکول‌های آب و دقت پایین روش محاسبه بارهای جزیی اتم‌ها در روش داکینگ است. همچنین انرژی‌های اتصال به‌دست‌آمده در داکینگ فقط مربوط به یک صورت‌بندی است (در این جا بهترین صورت‌بندی پر جمعیت‌ترین خوشه) ولی انرژی‌های به‌دست‌آمده از روش MM/PBSA میانگین انرژی اتصال چندین صورت‌بندی است که در طول شبیه سازی به‌دست آمده‌اند. باوجود همهٔ این اختلافات در مجموع نتایج به‌دست‌آمده از روش داکینگ با نتایج روش MM/PBSA همبستگی مناسبی دارند (R^2 = ۰/۶۲). بنابراین، نتایج داکینگ تنها یک گمان اولیه وخام از موقعیت اتصال هستند و برای اطمینان و دقت بیشتر باید روش‌های دقیق‌تر و پرهزینه‌تری مانند روش MM/PBSA را به کاربرد. همچنین نتایج تجربی موجود ۴ تا از این پپتیدها با نتایج روش MM/PBSA همبستگی خوبی داشت(R^2 =۰/۸). نتایج جداسازی سهم انرژی آزاد باقی‌مانده‌های دومین BIR3 در اتصال به این پپتیدها در طول شبیه‌سازی کم‌وبیش نقش همان باقی‌مانده‌ها مهم ازنظر پیوند هیدروژنی و واندروالسی که از ساختارتجربی کمپلکس حاوی پپتید طبیعی 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 درپپتید رادارند و این مسئله با نتایج دیگران هماهنگی دارد (Kipp, 2002). به‌عبارت‌دیگر تمایل زیادتر این پپتیدها در مقایسه با پپتید مهارکننده طبیعی (AVPI) که متعلق

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

به پروتئین SMAC است نشان می‌دهد که بار مثبت در جایگاه دوم و باقی‌مانده هیدروفوب درجایگاه چهارم گرایش پپتید به دومین BIR3 را افزایش می‌دهد. همچنین به نظر می‌رسد برای جایگاه چهارم گروه آروماتیک بهتر از گروه آلیفاتیک باشند زیرا هر سه پپتید قوی به‌دست‌آمده دارای گروه هیدروفوب آروماتیک بودند. در این پژوهش به‌منظور افزایش پایداری پپتیدها در هنگام ورود به بدن و یاخته، به تغییر پپتیدها و غیر طبیعی کردن آنها نیز توجه شد و گروه‌های متیل و اتیل فنیل به آلانین ۱ پپتید طبیعی AVPI به‌صورت کووالانسی متصل شد (به ترتیب پپتیدهای ۲ و ۳) و انرژی آنها با سایر پپتیدهای طبیعی مقایسه شد. اگرچه این دو پپتید جزو بهترین پپتیدها نبودند ولی انرژی داکینگ و انرژی MM/PBSA آنها بهتر از پپتید طبیعی (AVPI) بود وازنظر پایداری بیشتر درسلول و هضم نشدن توسط پروتئازهای یاخته نسبت به سایر پپتیدها برتری دارند. پیشنهاد می‌شود که پپتیدهای ۶ و ۸ و ۹ به‌صورت تجربی ساخته شوند و تمایل اتصال آنها به دومین BIR3 عملاً بررسی شود. همچنین با اتصال گروه‌های هیدروفوب آروماتیک به باقی‌مانده چهارم پپتید طبیعی، پپتیدهای جدید دیگری برای مهار دومین BIR3 طراحی و اثر مهارکنندگی آنها به‌صورت نظری و تجربی بررسی شود. همچنین می‌توان اثر پپتیدهای کوچکتر را روی مهار پروتئین BIR3 بررسی کرد. ما امیدواریم که این کار روزنه‌ای برای طراحی بهتر مهارکننده برای دومین BIR3 پروتئین XIAP و درمان سرطان باز کند.

سپاسگزاری

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

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.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

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 high-throughput 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. ACPYPE-antechamber 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.

میراحمدی باباحیدری، ف. و مهنام، ک. ۱۳۹۷. طراحی یک پپتید چهار اسیدآمینه‌ای نوین برای مهار دومین BIR3 پروتئین XIAP به‌وسیلهٔ شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۱۳۹۷: ۱۶۸-۱۸۲.

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]

[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]

[Downloaded from ndea10.khu.ac.ir on 2026-11-10]

[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.2.11.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.2.168]