

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



پایان نامه کارشناسی ارشد شیمی فیزیک

عنوان:

بررسی اتصال مشتقات جدید سنتز شده برای مهار آنزیم Pim-1

نگارنده:

میلاد بابادی حیدری

استاد راهنمای اول:

دکتر محسن سرگلزایی

استاد راهنمای دوم:

دکتر عبدالخالق بردبار

اردیبهشت ۱۳۹۸

شماره: ۱۹۲۹
تاریخ: ۹۸/۲/۱۵

باسمه تعالی



مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم / آقای میلاد بابادی حیدری با شماره دانشجویی ۹۵۳۳۸۸۴ رشته شیمی گرایش شیمی فیزیک تحت عنوان بررسی اتصال مشتقات جدید سنتز شده برای مهار آنزیم Pim-1 که در تاریخ ۱۳۹۸/۲/۲ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: بیانی) ☐ مردود ☐			
نوع تحقیق: نظری ☒ عملی ☐			
عضو هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر محسن سرگلزایی	استادیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر عبدالخالق بردبار	استاد	
۳- استاد مشاور			
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد باخرد	استاد	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر حسین نیکوفرد	دانشیار	
۶- استاد ممتحن دوم	دکتر زهرا کلانتر کهدمی	استادیار	



نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: مهدی میرزایی

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

۹۸/۲/۱۵

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم بہ

ای پدر از تو ہرچہ می گویم باز ہم کم می آورم

خورشیدی شدی و از روشنائی ات جان گرفتیم و در ناامیدی ماندم را

کشیدی و لبریزم کردی از شوق

اکنون حاصل دستان خستہ ات رمز موفقتیم شد

بہ خودم تبریک می گویم کہ تو را دارم و دنیا با ہمہ بزرگیش مثل تو را

ندارد.....

و تو ای مادر، ای شوق زیبائی نفس کشیدن

ای روح مہربان هستی ام

تو رنگ شادی ہایم شدی و نقطہ ہا را با تمام وجود از من دور کردی و

عمری گشتی ہا را بہ جان خریدی تا اکنون توانستی طعم خوش

پیروزی را بہ من بخشانی

تشکر و قدردانی

ای پینای داور و ای توانی بی‌یاور، سپاس و ستایش می‌کران تو را که توش و توان و، همتم فرمودی تا قدم در این راه گذارم و در هر لحظه یار می‌گرم بودی. به حرمت آن نامی که تو آنی و آن صفاتی که تو چنانی، یاریمان کن تا بر بی‌ثمری عمری که بر ما می‌گذرد حسرت نبریم.

در طول دوران تحصیلی و تهیه این پایان‌نامه از راهنمایی‌ها و مساعدت‌های اساتید و دوستای عزیز بی‌بهره برده‌ام که در این جالازم است از همه ایشان مراتب سپاس قلبی و تشکر خالصانه خود را داشته باشم.

خصوصاً از استاد راهنمای ارجمندم جناب آقای دکتر محسن سرگلزایی به خاطر زحمات بی‌دریغ، تلاش‌های بی‌وقفه و حمایت‌های ایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم. همچنین از جناب آقای دکتر عبدالحق بردبار که زحمت مشاوره این پایان‌نامه را به عهده داشته‌اند و نیز از کلیه اساتید بزرگوار که همواره از حضورشان بهره گرفته‌ام بی‌نهایت سپاسگزارم.

به رسم ادب از دوست عزیزم جناب آقای مهندس بهنام ابراهیم زاده و سرکار خانم مینا ثابت قدم، گل‌ی کریمی، فاطمه کردنژاد، سیلا عیون‌چراغی و همچنین کارشناسان گروه شبی آقایان خدا بخشیان، یزدانی و آقای مؤمنی که به نحوی محبت‌هایشان شامل حال من شده است، تقدیر و تشکر می‌کنم و برای این عزیزان آرزوی موفقیت و شادکامی را دارم.

تعهد نامه

اینجانب میلاد بابادی حیدری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته شیمی فیزیک دانشکده شیمی دانشگاه

صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه بررسی اتصال مشتقات جدید سنتز شده برای مهار آنزیم Pim-1

تحت راهنمایی دکتر محسن سرگلزایی متعهد می شوم:

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ: ۱۳۹۸/۲/۲

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

آنزیم پیم یک کیناز (Pim-1 kinase)، نقش مهمی در چرخه‌ی سلولی، آپوپتوز و متابولیسم بدن داشته و با توسعه‌ی سرطان، متاستاز و مقاومت دارویی ارتباط دارد. به همین دلیل پیم یک کیناز به عنوان یک هدف خاص در بررسی سرطان به‌شمار می‌رود. درک برهمکنش آنزیم پیم یک کیناز با مهارکننده‌هایش برای ایجاد و توسعه نسل‌های آینده عوامل دارویی ضروری است. مکانیزم اتصال مهارکننده‌ها در جایگاه اختصاصی پروتئین از طریق آزمایش‌های تجربی مشخص نمی‌گردد، بنابراین شبیه‌سازی رایانه‌ای برای این برهمکنش‌ها می‌تواند مورد استفاده قرار بگیرند. در بخش اول این پایان‌نامه، برهمکنش پروتئین 5C1Q با شانزده مشتق پیریدوتیونیوتریازولوپیریمیدین (PTZL) به عنوان مهارکننده‌های آن با روش داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این مشتقات با انرژی‌های اتصال مطلوب و قدرت مهارکنندگی بالایی به پروتئین 5C1Q متصل می‌شوند. مقایسه‌ی انرژی‌های آزاد اتصال، نتایج مهمی را در مورد رابطه‌ی بین ساختار و عملکرد آنها در اختیار قرار داد. در مجموع مشخص گردید که داروی ۸- برومو-۲- (۴- بروموفنیل) -۹،۷- دی متیل -۳،۲- دی هیدروپیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین-۴(H۱)- یک، به دلیل منفی‌ترین میزان انرژی آزاد و بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی، قدرت اتصال بیشتری را با جایگاه فعال پروتئین 5C1Q برقرار می‌کند و می‌تواند برای بررسی‌های دقیق‌تر مطالعات نظری و همچنین مطالعات تجربی به کار گرفته شود. در بخش دوم پایان‌نامه، ۲۰۵۴ مشتق PTZL با استفاده از روش غربالگری مجازی مورد بررسی قرار گرفت و سه دارو که از نظر انرژی اتصال در رتبه بالاتری قرار داشتند به عنوان کاندیدهای دارویی مناسب برای مهار پروتئین 5C1Q، به روش دینامیک مولکولی مورد شبیه‌سازی قرار گرفتند. نتایج نشان می‌دهد که پیوند هیدروژنی بین اسیدآمینه ILE153 مربوط به داروی (۴S)-۲- (سیکلوهگز-۴،۲- دی ان) -۱- ایل-۴- (۲R)- -۹،۷- دی متیل -۴- اکسودود کاهیدروپیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین -۲- ایل-۵- (اتوکسی کربونیل) پیرازولیدین-۱- اید و جایگاه فعال پروتئین در مقایسه با داروی (۲S)-۲- (۴)-

متوکسی-۳-((۴-متوکسی سیکلوهگز-۵،۲-دی ان-۱-ایل)اکسی) متیل) سیکلوهگز-۱-اید-
 ۱-۱-یل)-۴-اکسو-۹-(تتراهیدروتیوفن-۲-یل)-۷-(تری فلوئورومتیل) اکتاهیدرو-۷-HV-پیریدو
 [۵،۴:۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین -۹،۶-a(Ha۵) دی اید و (۲R) -۹- سیکلوهگز-۷-یل -۷- (دی
 فلوئورومتیل) - ۲- ((۱R) -۴- متوکسی - ۳- ((۲،۲،۲- تری فلوئورواتوکسی) متیل)
 سیکلوهگز-۷-یل) دکا هیدروپیریدو [۵،۴:۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین - ۴ (H۱) - اون تشکیل
 می گردد. انرژی های آزاد اتصال سه داروی منتخب با استفاده از روش MMGBSA مورد محاسبه
 قرار گرفت. نتایج نشان داد که سهم انرژی حلالیت قطبی (ΔG_{GB}) بسیار کمتر از انرژی واندروالسی
 (ΔE_{vdw}) بوده، لذا نیروهای آب گریز نقش اصلی را در تشکیل کمپلکس ایفا می نمایند.

واژه های کلیدی: آنزیم پیم یک کیناز، غربالگری مجازی، دینامیک مولکولی

نتایج حاصل از این پایان نامه در یک مقاله تحت عنوان

Investigation of the binding of new derivatives synthesized for inhibit the enzyme Pim-1

در شانزدهمین کنگره ملی مهندسی شیمی ملی ایران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، در دیماه ۹۷ ارائه گردید.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مبانی نظری	۱
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- آنزیم‌ها	۴
۱-۳- ساختار و عملکرد آنزیم‌ها	۵
۱-۴- طبقه‌بندی آنزیم‌ها	۶
۱-۴-۱- اکسید و ردوکتازها	۷
۱-۴-۲- ترانسفرازها	۷
۱-۴-۳- هیدرولازها	۷
۱-۴-۴- لیپازها	۷
۱-۴-۵- ایزومرازها	۷
۱-۴-۶- لیگازها	۷
۱-۵- واکنش آنزیم‌ها و منشأ آنها	۸
۱-۶- سینتیک واکنش‌های آنزیمی	۱۰
۱-۷- بررسی مهارکننده‌ها	۱۲
۱-۸- کوفاکتورها	۱۲
۱-۹- انواع مهارکننده‌ها	۱۴
۱-۹-۱- مهارکننده برگشت‌ناپذیر	۱۴
۱-۹-۲- مهارکننده برگشت‌پذیر	۱۴
۱-۹-۳- پارامتر IC_{50}	۱۵
۱-۹-۴- ضریب هیل	۱۶
۱-۱۰- پروتئین کینازها	۱۶
۱-۱۱- آنزیم پیم یک کیناز	۱۸
۱-۱۲- انواع پیم یک	۲۰
۱-۱۳- تاریخچه‌ی شبیه‌سازی	۲۰
۱-۱۴- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در پروتئین‌ها	۲۱

۲۳	۱-۱۵- شبیه‌سازی رایانه‌ای
۲۳	۱-۱۵-۱- شبیه‌سازی، نظریه یا تجربه
۲۷	۱-۱۵-۲- روش‌های نظری در مقابل تجربه
۲۷	۱-۱۵-۳- ارتباط شبیه‌سازی با تجربه
۲۹	۱-۱۶- کمیت‌های مهم در شبیه‌سازی
۲۹	۱-۱۶-۱- انرژی
۳۰	۱-۱۶-۲- دما
۳۰	۱-۱۶-۳- فشار
۳۲	۱-۱۷- داروها
۳۲	۱-۱۸- روش‌های طراحی دارو به کمک کامپیوتر
۳۲	۱-۱۸-۱- روش بر گیرنده
۳۳	۱-۱۸-۲- روش مبتنی بر لیگاند
۳۴	۱-۱۸-۳- روش طراحی دی‌نوو
۳۵	۱-۱۹- قانون پنج‌تایی لیپینسکی
۳۵	۱-۲۰- ویژگی‌های داروها
۳۵	۱-۲۰-۱- پیکربندی صحیح
۳۶	۱-۲۰-۲- ایجاد پیوندهای شیمیایی قوی با گیرنده‌ی زیستی
۳۷	۱-۲۰-۳- گزینش‌پذیری زیاد
۳۷	۱-۲۰-۴- قطبیت مناسب
۳۹	فصل دوم: روش کار
۴۰	۲-۱- انجام داکینگ
۴۰	۲-۱-۱- ترسیم و بهینه‌سازی ساختار مهارکننده‌ها
۴۶	۲-۱-۲- آماده‌سازی مهارکننده‌ها برای داکینگ
۴۶	۲-۱-۳- آماده‌سازی فایل مختصات آنزیم 5C1Q
۴۷	۲-۲- انجام داکینگ مولکولی
۴۷	۲-۲-۱- آماده‌سازی ساختار شروع کمپلکس آنزیم 5C1Q برای انجام داکینگ
۴۸	۲-۳- انرژی آزاد برهمکنش
۴۸	۲-۴- معرفی پارامترها و روش کار با نرم‌افزار Molgero به منظور شبیه‌سازی داکینگ مولکولی
۴۹	
۴۹	۲-۴-۱- روش کار با نرم‌افزار Molgero

۵۲	۵-۲- غربالگری مجازی مجموعه‌ای از مشتقات PTZL
۶۲	۵-۲-۱- انحراف از جذر میانگین مربعات
۶۳	۵-۲-۲- پیوند هیدروژنی
۶۳	۵-۲-۳- محاسبه انرژی آزاد پیوندی به روش مکانیک مولکولی مساحت سطح تعمیم‌یافته‌ی بورن
۶۴	۶-۲- معرفی نرم‌افزار امبر و پارامترهای آن
۶۵	۶-۲-۱- میدان‌های نیرو
۶۵	۶-۲-۲- ابزارهای آماده‌سازی
۶۶	۶-۲-۲-۱- Leap
۶۶	۶-۲-۲-۲- Antechamber
۶۶	۶-۲-۳- ابزارهای شبیه‌سازی
۶۶	۶-۲-۴- ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج با نرم‌افزار امبر
۶۷	۶-۲-۴-۱- PTRAJ
۶۷	۶-۲-۴-۲- CPPTRAJ
۶۷	۶-۲-۴-۳- PBSA
۶۷	۶-۲-۴-۴- MMGBSA
۶۸	۷-۲- پارامترهای مورد استفاده در شبیه‌سازی
۶۹	فصل سوم: بحث و نتیجه‌گیری
۷۰	۳-۱- نتایج تجزیه و تحلیل برهمکنش تعدادی از مشتقات PTZL به عنوان مهارکننده با آنزیم 5C1Q
۷۰	۳-۱-۱- مطالعه برهمکنش PTZL و شانزده مشتق آن به روش داکینگ مولکولی
۷۰	۳-۱-۲- مقایسه ثابت مهارکنندگی (IC_{50}) با انرژی اتصال بدست آمده
۸۲	۳-۲- تجزیه و تحلیل مطالعه برهمکنش مجموعه‌ای از مشتقات PTZL با آنزیم 5C1Q به روش غربالگری مجازی
۸۳	۳-۲-۱- تست به تعادل رسیدن شبیه‌سازی
۸۳	۳-۲-۲- پارامترهای حاصل از بررسی خواص ترمودینامیکی در طول فرآیند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی
۹۱	۳-۳- بررسی پیوندهای هیدروژنی
۹۱	۳-۳-۱- آنالیز لیگاندها و پروتئین به وسیله‌ی پیوندهای هیدروژنی
۹۲	۳-۳-۲- مقایسه پیوند هیدرونی و اسیدهای آمینه داروها
۹۳	۳-۴- آنالیز لیگاندها و پروتئین به وسیله نمودار RMSF

- ۳-۵- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پیوندشده داروهای ۱، ۲ و ۳ با پروتئین توسط RMSD ۹۶
- ۳-۵-۱- همگرایی جذر میانگین مجذور انحرافات (RMSD) ۹۶
- ۳-۵-۲- تعیین محدوده آنالیز ۹۸
- ۳-۶- نتایج محاسبات انرژی آزاد پیوندی به روش MMGBSA ۱۰۳
- ۳-۷- نتیجه گیری ۱۰۵
- ۳-۸- آینده نگری ۱۰۷
- ۳-۹- منابع ۱۰۸

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱: ساختار پروتئینی آنزیم‌ها برای سرعت بخشیدن به فرآیندهای شیمیایی ۳
- شکل ۲-۱: نمایشی از مدل امیل فیشر برای جایگیری سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم ۶
- شکل ۳-۱: نحوه‌ی عملکرد آنزیم‌ها برای تشکیل کمپلکس آنزیم - سوبسترا ۹
- شکل ۴-۱: نمایشی از فعالیت آپوآنزیم‌ها - کوآنزیم همراه با انواعی از کوفاکتورها ۱۳
- شکل ۵-۱: اتصال سوبسترا به آنزیم از طریق جایگاه فعال آنزیم ۱۴
- شکل ۶-۱: شمای تعادلی واکنش آنزیمی در حضور و عدم حضور مهارکننده ۱۵
- شکل ۷-۱: نحوه وارد کردن ورودی‌ها و خروجی‌ها برای انجام شبیه‌سازی ۲۶
- شکل ۸-۱: نقش دوگانه شبیه‌سازی‌ها به عنوان یک پل بین مدل‌ها و پیش‌بینی‌های نظری از یک سمت و بین نتایج مدل‌ها ۲۹
- شکل ۹-۱: نمایش نظریه‌ی قفل و کلید برای قرارگیری دارو در جایگاه اتصال گیرنده زیستی [۹۱] ۳۶
- شکل ۱۰-۱: یک مثال از طرز قرار گرفتن یک دارو در جایگاه اتصال پروتئین برای ایجاد پیوندهای مناسب با اسید آمینه‌های آن ۳۶
- شکل ۱-۲: نمایش دو بعدی ساختار مشتقات PTZL توسط نرم‌افزار Chemdraw ۴۴
- شکل ۲-۲: تصویری از سایت بانک داده‌ها ۴۷
- شکل ۳-۲: ساختار کریستالوگرافی آنزیم پیم یک کیناز با کد 5C1Q با داروی هدف ۴۸
- شکل ۴-۲: شمایی از نحوه برهمکنش پروتئین و داروی هدف با نرم‌افزار Molgero ۵۳
- شکل ۵-۲: وارد کردن لیگاند و پروتئین در نرم افزار Molgero ۵۴
- شکل ۶-۲: برچسب‌زدن پروتئین و لیگاند ۵۵
- شکل ۷-۲: حذف لیبل‌بندی لیگاند و پروتئین ۵۶
- شکل ۸-۲: بررسی و نشان دادن سطح مولکول مورد نظر ۵۷
- شکل ۹-۲: محل برهمکنش لیگاند و پروتئین ۵۸
- شکل ۱۰-۲: وارد کردن نتایج حاصل از برهمکنش درون نرم افزار Molgero ۵۹
- شکل ۱۱-۲: نتایج حاصل از داکینگ و برهمکنش آنها به صورت دو بعدی ۶۰
- شکل ۱۲-۲: نمایش سطح انرژی و باندهای هیدروژنی بدست آمده از فرآیند داکینگ ۶۱

- شکل ۳-۱: ساختار پروتئین 5C1Q همراه با داروی مورد نظر در جایگاه اختصاصی توسط نرم افزار Molgero ۷۱
- شکل ۳-۲: برهمکنش داروها با پروتئین و نحوه نمایش گروه‌های عاملی و پیوندهای هیدروژنی آنها ۸۰
- شکل ۳-۳: ساختارهای شیمیایی الف) دارو ۱) ب) دارو ۲) ج) دارو ۳ برای مرحله‌ی غربالگری و انتخاب داروی برتر توسط نرم افزار Amber ۸۳
- شکل ۳-۴: نمودار چگالی (g/cm^3) دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۴
- شکل ۳-۵: نمودار چگالی (g/cm^3) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۴
- شکل ۳-۷: نمودار چگالی (g/cm^3) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۵
- شکل ۳-۸: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۵
- شکل ۳-۹: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۵
- شکل ۳-۱۰: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) لیگاند ۳ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۶
- شکل ۳-۱۱: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۶
- شکل ۳-۱۲: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۶
- شکل ۳-۱۳: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۶
- شکل ۳-۱۴: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۳ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۷
- شکل ۳-۱۵: نمودار انرژی کل (kcal/mol) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۷
- شکل ۳-۱۶: نمودار فشار (bar) دارو ۱ مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۷
- شکل ۳-۱۷: نمودار فشار (bar) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۷
- شکل ۳-۱۸: نمودار فشار (bar) دارو ۳ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۸
- شکل ۳-۱۹: نمودار فشار (bar) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۸
- شکل ۳-۲۰: نمودار دما (K) دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۸
- شکل ۳-۲۱: نمودار دما (K) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی ۸۸
- شکل ۳-۲۲: نمودار دما (K) دارو ۳ مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۹
- شکل ۳-۲۳: نمودار دما (K) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی ۸۹
- شکل ۳-۲۴: مقایسه پیوندهای هیدروژنی ما بین آمینواسیدها و داروها ۹۳

- شکل ۳-۲۵: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی..... ۹۴
- شکل ۳-۲۶: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل دارو ۱ در طول زمان شبیه‌سازی..... ۹۴
- شکل (۳-۲۷): نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل لیگاند ۲ در طول زمان شبیه‌سازی..... ۹۴
- شکل ۳-۲۸: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل دارو ۳ در طول زمان شبیه‌سازی..... ۹۴
- شکل ۳-۲۹: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل داروها و پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی..... ۹۵
- شکل ۳-۳۰: مقادیر RMSD اسکلت پروتئین در حالت آزاد در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی..... ۹۶
- شکل ۳-۳۱: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۱ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی..... ۹۷
- شکل ۳-۳۲: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۲ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی..... ۹۷
- شکل ۳-۳۳: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۳ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی..... ۹۷
- شکل ۳-۳۴: مقادیر RMSD اسکلت داروها و پروتئین در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی..... ۹۷
- شکل ۳-۳۵: تغییرات ساختاری پروتئین طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی..... ۱۰۰
- شکل ۳-۳۶: تغییرات ساختاری پروتئین طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی..... ۱۰۰
- شکل ۳-۳۷: تغییرات ساختاری داروی ۱ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی..... ۱۰۰
- شکل ۳-۳۸: تغییرات ساختاری داروی ۱ طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی..... ۱۰۰
- شکل ۳-۳۹: تغییرات ساختاری داروی ۲ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی..... ۱۰۱
- شکل ۳-۴۰: تغییرات ساختاری داروی ۲ طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی..... ۱۰۱
- شکل ۳-۴۱: تغییرات ساختاری داروی ۳ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی..... ۱۰۱
- شکل ۳-۴۲: تغییرات ساختاری داروی ۳ طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی..... ۱۰۱
- شکل ۳-۴۳: تغییرات ساختاری کمپلکس طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی..... ۱۰۲
- شکل ۳-۴۴: تغییرات ساختاری کمپلکس طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی..... ۱۰۲

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۲: نام IUPAC مشتقات PTZL	۴۴
جدول ۱-۳: مقایسه انرژی‌های اتصال و ثابتهای مهارکنندگی داروها با پروتئین 5C1Q [۹۵]	۷۰
جدول ۲-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱)	۷۲
جدول ۳-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۲)	۷۲
جدول ۴-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۳)	۷۲
جدول ۵-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۴)	۷۲
جدول ۶-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۵)	۷۲
جدول ۷-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۶)	۷۲
جدول ۸-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۷)	۷۳
جدول ۹-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۸)	۷۳
جدول ۱۰-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۹)	۷۳
جدول ۱۱-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۰)	۷۳
جدول ۱۲-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۱)	۷۳
جدول ۱۳-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۲)	۷۳
جدول ۱۴-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۳)	۷۳
جدول ۱۵-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۴)	۷۴
جدول ۱۶-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۵)	۷۴
جدول ۱۷-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۶)	۷۴
جدول ۱۸-۳: مقایسه سهم انرژی اتصال اتمی باقیمانده مربوط به هر دارو	۸۱
جدول ۱۹-۳: مقایسه میانگین پارامترها برای داروها و پروتئین	۸۹
جدول ۲۰-۳: مقایسه تغییرات حرکات ساختاری اسیدهای آمینه داروها در جایگاه فعال پروتئین در طی ۱۰۰ نانوثانیه	۹۵
جدول ۲۱-۳: مقایسه تغییرات ساختاری داروها با پروتئین در طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی	۹۹

جدول ۳-۲۲: بررسی میانگین مجذور انحرافات داروها با پروتئین طی ۲۲ نانوثانیه ابتدایی و انتهایی
۹۹.....

جدول ۳-۲۳: مقایسه میانگین انرژی گازی و انرژی حلال داروها با پروتئین (kcal/mol) ۱۰۳

جدول ۳-۲۴: نتایج محاسبه انرژی آزاد پیوندی بدست آمده از روش MMGBSA برحسب kcal/mol
۱۰۴.....

فصل اول

مبانی نظری

آنزیم‌ها، پروتئین‌های اختصاصی هستند که واکنش‌های بیولوژیکی را کاتالیز کرده و همین امر باعث می‌شود هر واکنش و تغییر و تحولی که بخواهد درون سلول روی دهد به وسیله آنزیم‌ها انجام شود. زیرا بعضی از واکنش‌هایی که به صورت ویژه و منحصر به فردی بخواهد روی دهد در شرایط فیزیکی که در درون سلول وجود دارد ایجاد نمی‌شود. آنزیم‌ها همچنین، سرعت واکنش‌هایی که از شرایط ویژه‌ای برخوردار باشند را افزایش می‌دهند [۱]. بنابراین، برای اینکه بفهمیم چگونه آنزیم‌ها فعالیت خود را انجام می‌دهند، باید نقش و جایگاه آنها را به صورت بنیادی بر روی سطح مولکول‌ها بررسی کرد تا اطلاعات جامع‌تری از آنها بدست آید. علاوه بر نقش‌های بیولوژیکی آنها، علاقه‌ی زیادی به درک و نحوه استفاده از آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورهای مصنوعی برای طیف وسیعی از فرآیندها که می‌توانند وظیفه‌ی سنتز شیمیایی تا تولید سوخت‌های زیستی جدید را بر عهده بگیرند وجود دارد. اولین پژوهشی که در زمینه‌ی آنزیم‌شناسی صورت گرفت، مربوط به اواسط سال‌های ۱۸۰۰ تا اواخر آن بود که با مطالعه در زمینه‌ی تخمیر آغاز گردید (در حقیقت، کلمه آنزیم به معنای واقعی کلمه "مخمر" است). به دنبال آن، نظریه‌ی قفل و کلید امیل فیشر که مربوط به اتصال آنزیم- لیگاند بود در سال ۱۸۹۴ ارائه شد [۲-۴]. با این حال، در نبود داده‌هایی که از ساختارها بدست می‌آیند، به سختی می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم‌های مولکولی به چه نوعی وجود دارند، به جز اینکه فقط می‌توان در مورد نقش و فعالیت آنها اطلاعاتی را بدست آورد. نقطه عطف عمده در علم آنزیم‌شناسی، در سال ۱۹۶۵ با مطالعه و انتشار ساختار کریستالی لیزوزیم سفیده تخم مرغ انجام گرفت که توسط فیلیپس و همکاران بدست آمد [۵]. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) بر روی سیستم بیولوژیکی نشان می‌دهد که پروتئین‌ها در واقع ساختارهای استاتیک نیستند، بلکه ساختارهای پویا هستند که با گذشت زمان تغییر می‌کنند. این پیشرفت‌های تجربی و نظری یک تغییر بزرگ و دائمی در این زمینه ایجاد کرد و آغازگر علم آنزیم‌شناسی در حال حاضر شد [۶]. از ابتدا، آنزیم‌شناسی محاسباتی به یک ابزار مهم و ارزشمند برای مطالعه فعالیت آنزیم تبدیل شده بود. با این حال، علی‌رغم پیشرفت‌های

زیادی که در این زمینه و پیشرفت‌های مربوط به آزمایشگاه انجام شده، ولی دیدگاه ما با مرور کلی و محاسباتی که از نحوه عملکرد آنزیم‌ها حاصل می‌شود بیان می‌گردد. با این وجود، هنوز درک کامل از اینکه آنزیم‌ها چگونه عمل می‌کنند وجود ندارد [۷-۱۰]. آنزیم‌شناسی، با تأکید بر کاری که مبنای آن را کارپوس، لویت و ورشل انجام دادند صورت گرفت که جوایز نوبل شیمی در سال ۲۰۱۳ به آنها اهدا گردید [۱۱-۱۳]. آنزیم‌ها در صورتی می‌توانند سرعت واکنش‌های شیمیایی را افزایش دهند که سطح انرژی فعالسازی^۱ را در طول واکنش کاهش دهند. در شکل (۱-۱)، ساختار پروتئینی آنزیم‌ها ترسیم شده است. آنزیم‌ها به شکل‌های مختلفی وجود دارند که هر کدام وظیفه‌ی کاتالیز کردن یک واکنش شیمیایی را برعهده دارند. در مسیری که واکنش‌دهنده‌ها به محصولات تبدیل می‌شوند، انرژی فعالسازی با بزرگی سد تبدیل سوپسترا به محصول ارتباط دارد. زمانی که آنزیم با سوپسترا واکنش می‌دهد منجر به آزادسازی انرژی فعالسازی شده و سوپسترا را در حالتی پایدار می‌کند که باعث تشکیل محصول شود که به این حالت، حالت گذار (انتقال) گفته می‌شود. هرچه قدر حالت گذار پایدارتر باشد، انرژی کمتری برای تبدیل شدن سوپسترا به محصول مصرف شده و واکنش سریعتر انجام می‌گیرد [۱].

شکل ۱-۱: ساختار پروتئینی آنزیم‌ها برای سرعت بخشیدن به فرآیندهای شیمیایی

¹- energy of activation

این نتیجه رسید که این تخمیر توسط ماده‌ی تخمیر موجود در مخمر کاتالیز می‌شود که به نظر می‌رسید فقط در حضور موجودات زنده فعالیت می‌کنند. اگرچه در سال ۱۸۹۷ هانس و ادوارد بوخنر^۱ از عصاره‌ی مخمر علی‌رغم نبود سلول‌های مخمر زنده برای تخمیر شکر استفاده کردند، ولی آنها علاقمند به ساخت عصاره‌ی سلول‌های مخمر برای اهداف پزشکی بودند. آنها برای ماندگاری، مقادیر زیادی از ساکارز^۲ را به عصاره اضافه کردند و دریافتند که شکر به این شیوه تخمیر می‌گردد، هرچند هیچ سلول مخمر زنده‌ای در ترکیب وجود ندارد. اصطلاح آنزیم برای توصیف ماده‌ها در عصاره‌ی مخمر مورد استفاده قرار گرفت که باعث تخمیر ساکارز شد. تا سال ۱۹۲۶ اولین آنزیم در شکل خالص بدست آمد.

اولین اطلاعاتی که به کار گرفته شد تا بتوانند بفهمند از آنزیم‌ها چگونه استفاده کنند به ۲۰۰۰ سال پیش بر می‌گردد. همین امر باعث شد که پژوهشگران از اواخر قرن ۱۷ میلادی به بعد هنگامی که بخواهند از آنزیم‌ها استفاده کنند آنها را به صورت علمی بدست آورده و مورد استفاده قرار دهند. همین امر باعث شد که آنزیم‌ها را با توجه به عملکردشان شناخته و مورد استفاده قرار دهند. بیشتر اطلاعات در مورد عملکرد آنزیم‌ها به اواخر قرن ۱۹ و اوایل قرن ۲۰ بر می‌گردد. مطالعاتی که بر روی فرآیند هضم مواد غذایی در معده صورت گرفت، یکی از اولین مطالعاتی بود که از آن به عنوان آنزیم‌شناسی اولیه نام می‌برند [۱۴].

۱-۲- آنزیم‌ها

برخی نوکلئیک اسیدها به نام ریبوزوم‌ها هم قادر به انجام فعالیت کاتالیزی به‌شمار می‌روند. به همین دلیل این ترکیبات به عنوان کاتالیزورهای زیستی یا کاتالیزورهای یاخته‌ای نیز معروف هستند که سرعت واکنش را حدود ۱۰^۶ تا ۱۰^{۱۲} برابر افزایش می‌دهند. آنزیم‌ها تحت تأثیر عوامل مختلفی شامل pH محیط، قدرت یونی محیط، طبیعت شیمیایی بافر، غلظت سوبسترا و ... فعالیت و عمل می‌کنند. فرآیندهای شیمیایی در یک سلول زنده به‌وسیله آنزیم‌ها انجام می‌شود. دو ویژگی اصلی کاتالیزوری

^۱- Hans and Eduard Buchner

^۲- sucrose

آنزیم‌ها که آن را از کاتالیزورهای صنعتی و آزمایشگاهی متمایز می‌کند، گزینش‌پذیری بالا و سرعت بخشیدن به فرآیندها می‌باشد [۱۵].

۱-۳- ساختار و عملکرد آنزیم‌ها

تمام واکنش‌های شیمیایی که در سلول‌ها انجام می‌شود را آنزیم‌ها برعهده دارند. به همین دلیل، خواص کاتالیستی آنزیم‌ها قبل از شناخت ساختار آنها مورد توجه قرار می‌گیرد. در حیطه شیمی آلی، آنزیم‌ها کاتالیست‌های قدرتمندی برای انجام واکنش‌های فضا گزین^۱ و مکان‌گزین^۲ هستند. آنزیم‌ها همانند هر کاتالیست دیگری در علم شیمی عمل می‌کنند، یعنی تغییری در انرژی آزاد ایجاد نمی‌کنند بلکه مانند سایر کاتالیست‌های شیمی یا منجر به تغییر مکانیسم انجام واکنش شده و یا غلظت مؤثر ماده اولیه را از طریق پیش‌تغلیظ آن بر مکان‌های فعال خود افزایش می‌دهند، یعنی انرژی فعال‌سازی کل واکنش را کم می‌کنند. علاوه بر افزایش سرعت واکنش، آنزیم‌ها برای پیش‌ماده‌ی خود ویژگی خاصی^۳ را دارند که این ویژگی بستگی به طراحی ظریف مولکولی در جایگاه فعال آنزیم دارد. جایگاه فعال آنزیم دارای یک ساختار سه‌بعدی^۴ بوده که مکان کوچکی را نسبت به فضای کل آنزیم در برمی‌گیرد. از آنجا که تغییر در ساختار آنزیم‌ها باعث بروز بسیاری از بیماری‌ها می‌شود، بسیاری از داروها با مهار کردن فعالیت آنزیم‌ها باعث مهار آنها می‌شوند. از این رو مطالعه بر روی مهارکننده‌های آنزیمی به عنوان یکی از کاربردهای مهم آنزیم شناسی در تهیه انواع داروها به‌شمار می‌رود [۱۶]. یکی دیگر از موضوعات مهم در فعالیت آنزیم، معادله‌سازی جهت محاسبه‌ی سرعت واکنش آنزیم‌ها می‌باشد که توسط هنری در سال ۱۹۰۳ و میکائیلیس و منتن در سال ۱۹۱۳ بیان شد و منجر به ایجاد معادله میکائیلیس^۵- منتن^۶ شد. بیشتر اتصالات لیگاند به ماکرومولکول به خصوص در کاتالیزگر آنزیم از نوع اتصالات غیرکووالانسی می‌باشد. این بدان معنی است که

1- Streoselective

2- Regioselective

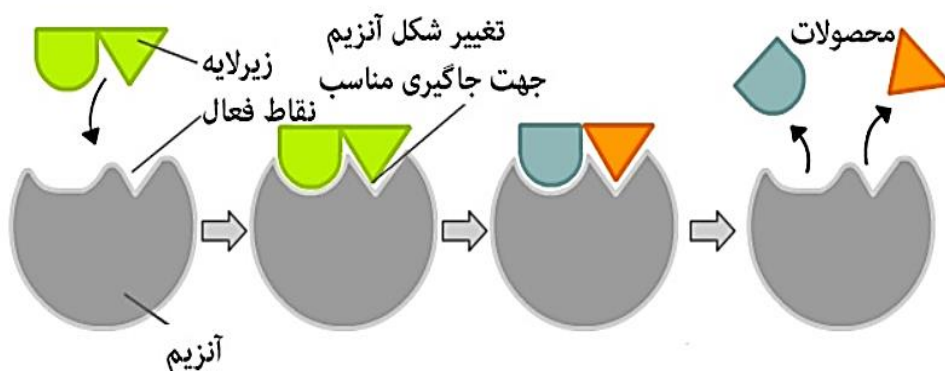
3- Specificity

4- Three dimensional

5- Michaelis

6- Menten

اتصالات برگشت‌پذیر بوده و فعالیت آنزیم به غلظت سوبسترا بستگی دارد [۱۷]. آنزیم‌ها برای انجام فعالیت کاتالیزوری خود دارای یک یا چند محل نفوذ سطحی به نام جایگاه فعال هستند. جایگاه فعال که فقط بخش بسیار کوچکی از مولکول آنزیم را اشغال می‌کند در یک محل خاص خود پذیرای مولکول سوبسترا بوده و واکنش آنزیمی در آنجا انجام می‌شود. این ترکیب، مجموعه آنزیم / سوبسترا نامیده می‌شود. هر آنزیم بر سوبسترای خاص خود اثر کرده و فرآورده‌ی جدیدی را تولید می‌کند. محل فعال، ناحیه‌ای با شکلی خاص در آنزیم است که با سوبسترا متناسب است. همچنین، هر آنزیم دارای ساختار سه‌بعدی بوده که برای انجام فعالیت کاتالپتیکی مناسب می‌باشد [۱۸-۱۹]. در مورد محل اتصال آنزیم به سوبسترا مدل‌هایی ارائه شده که یکی از این مدل‌ها، مدل قالب سخت یا مدل قفل و کلید می‌باشد که در سال ۱۸۹۴ توسط امیل فیشر ارائه شد. مدلی از نظریه‌ی امیل فیشر در شکل (۱-۲) ترسیم شده است. با توجه به نوع واکنش و قابلیت آنزیم مانند اکسید و احیا و هیدرولیز، واکنش در زمان مشخصی انجام شده و واکنشگر از سطح آنزیم جدا می‌گردد. همچنین این مدل بیان می‌کند که آنزیم‌ها با توجه به اندازه، شکل و طبیعت شیمیایی مولکول سوبسترا وارد عمل می‌شوند [۲۰].



شکل ۱-۲: نمایشی از مدل امیل فیشر برای جاگیری سوبسترا در جایگاه فعال آنزیم

۴-۱- طبقه‌بندی آنزیم‌ها

بسیاری از آنزیم‌ها توسط مسیرهایی که به صورت قاعده‌ی ژنومی بیان شده شناسایی می‌شوند. طبق تعریف، قاعده‌ی ژنومی مجموعه‌ی کامل از دستورالعمل‌های ژنتیکی هر موجود زنده می‌باشد که هر

ژنوم حاوی تمام اطلاعات لازم برای ساخته شدن، رشد و گسترش یافتن موجود زنده می‌باشد. همچنین، تمام آنزیم‌ها در واکنش‌های مختلفی که باعث افزایش سرعت آنها می‌شوند تعریف و طبقه‌بندی می‌شوند. آنزیم‌ها از نظر فعالیت کاتالیزوری که انجام می‌دهند به شش گروه اصلی طبقه‌بندی می‌شوند که عبارتند از:

۱-۴-۱- اکسید و ردوکتازها

واکنش‌های اکسید و احیا (اکسایش - کاهش) را کاتالیز می‌کند (دهیدروژناز).

۱-۴-۲- ترانسفرازها

انتقال عوامل ویژه‌ای مانند آمین، فسفات و غیره را از مولکولی به مولکول دیگر به عهده دارند. مانند آمینوترانسفرازها که در انتقال گروه آمین فعال هستند.

۱-۴-۳- هیدرولازها

واکنش‌های آبکافتی را کاتالیز می‌کنند. مانند پپتیدازها که موجب شکسته‌شدن پیوند پپتیدی می‌شوند.

۱-۴-۴- لیپازها

موجب برداشت گروه ویژه‌ای از مولکول می‌شوند. مانند دکربوکسیلازها که برداشت دی‌اکسید کربن را برعهده دارند.

۱-۴-۵- ایزومرازها

واکنش‌های تشکیل ایزومری را کاتالیز می‌کنند. مانند راسه‌ماز که از آل-آلانین، ترکیب ایزومری دی-آلانین را می‌سازد.

۱-۴-۶- لیگازها

آنزیم‌هایی هستند که باعث اتصال دو مولکول به یکدیگر و ایجاد پیوند کووالانسی بین آنها می‌شوند. مانند استیل کوآنزیم A سنتتاز که موجب سنتز استیل کوآنزیم A می‌گردد. برای شناسایی هر آنزیم

یک سیستم ساده‌ی عددی مرکب از چهار عدد برای هر آنزیم توسط اتحادیه‌ی بیوشیمی و بیولوژی مولکولی^۱ معرفی شده است. عدد اول نوع واکنش کاتالیز شونده را نشان می‌دهد و با اعدادی که جزئیات واکنش را معرفی می‌نمایند ادامه می‌یابد. نام‌های سیستماتیک شامل سوبسترا و نوع واکنش می‌شوند [۲۱].

۱-۵- واکنش آنزیم‌ها و منشأ آنها

آنزیم‌ها با استفاده از مکان‌های فعال خود که می‌تواند منبع^۲ اصلی آنها برای جایگیری باشد توسط پیوندهای غیرکوالانسی^۳ به ماده اولیه متصل می‌شوند. این نوع اتصال از طریق پیوندهای هیدروژنی برهمکنش‌های دوقطبی-دوقطبی، نیروهای واندروالسی، برهم‌کنش پای (π)، اثرات هیدروفوبیک و برهمکنش‌های الکتروستاتیک انجام می‌گیرد. این جایگاه قالب یعنی طرحی از پیش ساخته، ثابت و غیرقابل تغییر در ساختار آنزیم برای قرارگیری منبع اصلی که توسط فیشر (۱۸۹۴) ارائه شد توجیه خوبی برای نحوه عملکرد آنزیم‌ها نمی‌باشند، از این رو نظریه‌ی کو شلاند (۱۹۵۸) مناسب‌تر است. یکی از خصوصیات بارز این نظریه، قابلیت انعطاف‌پذیری جایگاه کاتالیزور می‌باشد. به این ترتیب که سوبسترا^۴ سبب القاء یک تغییر شکل مولکولی در ساختمان پروتئینی آنزیم می‌گردد و با این عمل آنزیم، اسیدهای آمینه و گروه‌های دیگر را در جهت مناسبی قرار می‌دهد تا اتصال و یا کاتالیز (یا هردو) به بهترین شکل انجام گیرد. مکان فعال به موقعیت خاص درون آنزیم که ماده اولیه در آن قرار گرفته و عمل کاتالیز شدن در آنجا انجام می‌شود اطلاق می‌شود. مکان فعال آنزیم مانند یک شکاف عمل می‌نماید. این مکان، ماده اولیه خاص و مورد نظر خود را شناسایی کرده و به صورت گزینشی واکنش مربوط به آن گروه از مواد را کاتالیز می‌کند. براساس این نظریه، مولکول‌های آنزیم از آنجایی که دارای جایگاه ویژه‌ای می‌باشند برای پذیرش مولکول منبع کنار جایگاه اتصال آنزیم قرار می‌گیرند. هنگامی که مولکول منبع با آنزیم واکنش می‌دهد، موجب بروز تغییر در ساختار و

¹- TUBMB

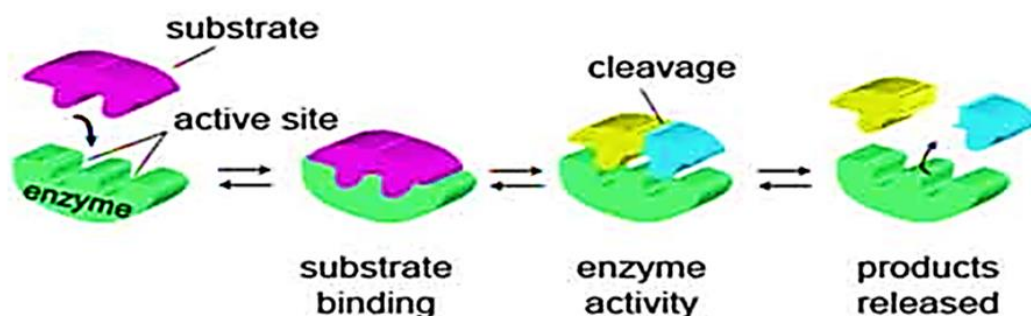
²- Source

³-Noncovalent

⁴-Substrate

آرایش فضایی آن می‌گردد و جایگاه فعال آنزیم برای عمل کاتالیز شدن مهیا می‌گردد. این نظریه به قالب القا شده توسط مولکول منبع معروف است.

ماهیت نیروهای غیر کووالانسی مشابه نیروهایی بوده که ساختار سه‌بعدی پروتئین را می‌توانند تغییر دهند که این نیرو می‌تواند مولکول منبع و سایر مولکول‌ها را به هم متصل کند. به طور کلی، محل اتصال مولکول منبع به صورت حفره یا شیاری در سطح مولکول آنزیم مشخص شده و مکمل شکل هندسی مولکول منبع می‌باشند و فقط بخش کوچکی از ساختار کل آنزیم را شامل می‌شود. جایگاه فعال، جایگاهی می‌باشد که سوبسترا یعنی ماده‌ای که آنزیم بر آن اثر می‌کند به این نواحی متصل می‌شود. تحت تاثیر آنزیم‌ها، سوبسترا تغییر می‌کند و به یک یا تعدادی محصول تبدیل می‌شود. هنگامی که آنزیم روی سوبسترا اعمال می‌شود، واکنش‌دهنده‌ها را ایجاد می‌کند که در نهایت در اثر اعمال این تغییرات باعث به وجود آمدن محصولات می‌شوند. در کل، ناحیه‌ای که دارای جایگاه اتصال است اصطلاحاً جایگاه فعال یا مرکز فعال آنزیم محسوب می‌گردد. جایگاه فعال آنزیم اغلب شامل هر دو نوع اسید آمینه قطبی و غیرقطبی بوده که موجب پدید آمدن آرایش ویژه از نواحی آب‌گریز و آب‌دوست می‌شوند. وقتی یک سوبسترا با جایگاه مناسب یک آنزیم برخورد می‌کند، کمپلکس آنزیم - سوبسترا تشکیل می‌شود. به محض آنکه کمپلکس تشکیل شد پیوندهای شیمیایی در سوبسترا تضعیف می‌شوند که در شکل (۱-۳)، نحوه‌ی عملکرد آنزیم‌ها بیان شده است.



شکل ۱-۳: نحوه‌ی عملکرد آنزیم‌ها برای تشکیل کمپلکس آنزیم - سوبسترا

در طی این فرآیند دو حالت رخ می‌دهد:

حالت اول: سوبسترا ممکن است به مولکول‌های ساده‌تر تبدیل شود که به این روند، کاتابولیسم گفته می‌شود.

با توجه به شکل (۱-۳)، در طی کاتابولیسم یک مولکول بزرگ، سوبسترا مطابق شکل به آنزیم متصل می‌شود و در مرحله‌ی بعد پس از تشکیل کمپلکس آنزیم سوبسترا، آنزیم، سوبسترا را تخریب می‌کند و نهایتاً این فرآیند منجر به تولید مولکول‌های کوچک‌تر و آزادسازی انرژی می‌شود. حالت دوم: سوبسترا به مولکول‌های پیچیده‌تر تبدیل می‌شود که به این روند، آنابولیسم گفته می‌شود. در طی آنابولیسم سوبستراهای کوچک به آنزیم متصل شده و پس از تشکیل کمپلکس مشخص، این دو ماده به یک ماده‌ی جدید تبدیل می‌شود. مشابه این فرآیند در سنتزهای سلولی انجام می‌گیرد.

۱-۶- سینتیک واکنش‌های آنزیمی

سینتیک آنزیمی، بخشی از علم بیوشیمی محسوب شده که به اندازه‌گیری کمی سرعت واکنش‌های کاتالیزشونده با آنزیم و مطالعه سیستماتیک عوامل مؤثر بر این سرعت‌ها می‌پردازد. فهم سینتیک آنزیمی برای درک چگونگی اثر استرس‌های فیزیولوژیک مانند آنوکسی، آکالوز، اسیدوز متابولیک، سموم و عوامل دارویی بسیار مهم بوده که تحلیل سینتیکی، تعداد و ترتیب مراحل که طی آن آنزیم‌ها، سوبستراها را به محصولات واکنش تبدیل می‌کنند را آشکار می‌سازد. در این میان، از جمله عواملی که بر سرعت واکنش‌های شیمیایی تاثیر می‌گذارند عبارتند از: ۱-دما: دمایی که آنزیم بیشترین فعالیت و بالاترین سرعت را دارد (دمای بهینه) نامیده شده که در موجودات مختلف متفاوت است. ۲-pH: با تغییر شرایط یونیزاسیون محلول یا تغییر غلظت یونی محلول، سرعت کاهش می‌یابد. ۳- غلظت آنزیم: هرچه غلظت آنزیم بیشتر باشد، سرعت واکنش‌های آنزیمی بیشتر است. ۴- غلظت سوبسترا: هرچه غلظت سوبسترا افزایش یابد، سرعت واکنش‌های آنزیمی نیز افزایش می‌یابد اما این مقدار محدود است زیرا تعداد آنزیم‌ها محدود می‌باشد. ۵- غلظت کوفاکتورها و کوآنزیم‌ها: بعضی از آنزیم‌ها برای انجام فعالیت خود به کوفاکتور یا کوآنزیم‌ها نیاز دارند. ۶- غلظت یون‌ها و نمک‌ها.

هر آنزیم در یک اسیدیتة معینی که آن را اسیدیتة بهینه می نامند دارای بیشترین فعالیت می باشد. سرعت واکنش به غلظت آنزیم و مولکول فعال بستگی دارد و غلظت مولکول فعال، متناسب با مدت زمان انجام واکنش مرتباً رو به کاهش است. به عبارت دیگر سرعت یک واکنش آنزیمی تا زمانی که مولکول فعال به مقدار کافی در محلول موجود باشد متناسب با غلظت آنزیم می باشد ولی در صورتی که غلظت آنزیم افزایش پیدا کند زمانی می رسد که دیگر سرعت واکنش به علت کمبود مقدار مولکول فعال افزایش نمی یابد. اگر غلظت مولکول فعال را افزایش دهیم سرعت واکنش هایی که توسط آنزیم ها انجام می شود به یک حداکثر (V_{max}) می رسد و در این مرحله تمام مولکول های آنزیم توسط مولکول های فعال به حالت سیر شده می رسند. نظریه ی میکائیلیس - منتن (۱۹۱۳) مربوط به تشکیل کمپلکس آنزیم - مولکول فعال می باشد که آنها این مدل را رابطه ای بین سرعت آنزیم و غلظت مولکول فعال می دانند که کار آنها بعداً توسط جورج ادوارد بریگس (G. E. Briggs) و جان برتون ساندرسون هالدین (J. B. S. Haldane) گسترش یافت. شخصی که معادلات سینتیکی زیادی را توسعه داده و امروزه به طور گسترده مورد استفاده قرار می گیرد. در هر حال، حداکثر سرعت تنها یک پارامتر سینتیکی است که زیست شیمی دان ها^۱ را علاقمند می کند. آنها همچنین می خواهند به محاسبه ی مقدار زیرلایه ی مورد نیاز برای دستیابی به یک سرعت مشخصی از واکنش دسترسی داشته باشند. این مقدار می تواند توسط ضریب میکائیلیس - منتن (K_m) بیان شود که این ضریب، غلظتی از مولکول فعال بوده که در آن سرعت آنزیمی نصف حداکثر سرعت خود باشد و نشان دهنده ی تمایل آنزیم به مولکول فعال است، یعنی هر چه قدر مقدار آن کم تر باشد تمایل آنزیم به مولکول فعال بیشتر خواهد بود. هر آنزیم یک ضریب K_m مشخص برای یک زیرلایه داده شده دارد. دانستن K_m آنزیم برای سنجش فعالیت آن دارای اهمیت است. به صورت نظری، V_{max} در غلظت نامحدود مولکول فعال بدست می آید، بنابراین یافتن مقدار واقعی آن توسط نمودار میکائیلیس - منتن غیر ممکن نبود و لاین ویور - برک (۱۹۳۴) با معکوس کردن معادله میکائیلیس - منتن راه آسان تری را برای یافتن

¹- biochemists

V_{max} و K_m ارائه دادند و به این نتیجه رسیدند که تغییرات نسبت عکس سرعت واکنش و نسبت عکس غلظت مولکول فعال به صورت یک خط مستقیم خواهد بود. از این رو در معادله لاین ویور-برک، $1/V$ (معکوس سرعت اولیه) در برابر $1/[S]$ (معکوس غلظت مولکول فعال) رسم می‌گردد. معادله لاین ویور-بلاک عبارت است از:

$$1/V = K_m/V_{max} \times 1/[S] + 1/V_{max} \quad (1-1)$$

$1/V_{max}$ در معادله (1-1)، نقطه برخورد خط به محور عرض‌ها برابر $1/V_{max}$ و نقطه برخورد خط به محور طول‌ها برابر $1/K_m$ محاسبه می‌شود [۲۲].

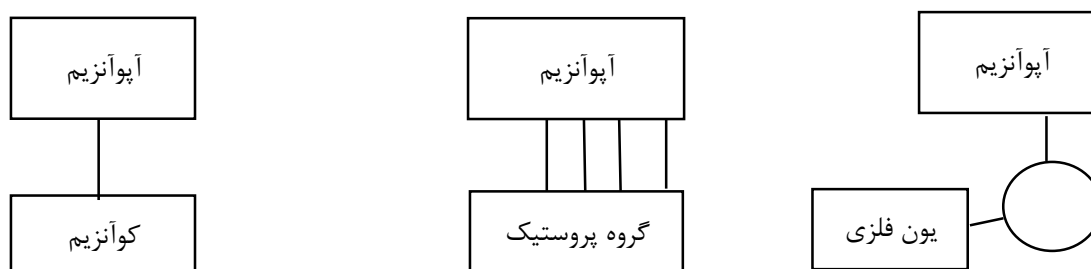
۷-۱- بررسی مهارکننده‌ها

مهارکننده‌ها از جمله مهمترین عوامل فارماکولوژیک شناخته شده هستند که برخی از فرآیندهای آنزیمی را کند و یا متوقف می‌کنند. مهارکننده‌های آنزیمی، عوامل مولکولی هستند که واکنش‌های آنزیمی را از طریق مداخله در انجام واکنش آهسته و متوقف می‌کنند. همچنین، این ترکیبات شیمیایی قادرند با عوامل شیمیایی موجود در جایگاه فعال آنزیم و یا جایگاه غیرفعال آنزیم و یا همچنین با کوآنزیم و یا با کوفاکتورهای آنزیم ترکیب شوند و در مقابل فعالیت آنزیم قرار بگیرند که به این ترکیبات، مهارکننده گفته می‌شود (مثل داروها و حشره‌کش‌ها). برای مثال آسپیرین (استیل سالیسیلات)، آنزیم کنترل‌کننده‌ی اولین مرحله سنتز پروستاگلاندین‌ها را مهار می‌نماید که در بسیاری از فرآیندها از جمله ایجاد درد مؤثر است. دوا گروه بزرگی از مهارکننده‌ها، مهارکننده برگشت‌پذیر و برگشت ناپذیر بوده که مهارکننده‌های برگشت‌پذیر می‌توانند به صورت رقابتی و غیررقابتی باشند.

۸-۱- کوفاکتورها

بسیاری از آنزیم‌هایی که واکنش‌های دیگر را کاتالیز می‌کنند علاوه بر سوبسترای خود به مولکول آلی دیگر یا یون فلزی دیگر موسوم به کوآنزیم یا کوفاکتور نیاز دارند و بدون آن غیرفعال می‌شوند. فعالیت بعضی از آنزیم‌ها فقط بستگی به ساختمان پروتئینی آنها دارد. در صورتی که بعضی دیگر

برای فعال شدن به یک یا چند ترکیب غیر پروتئینی که کوفاکتور نامیده می‌شوند احتیاج دارند. کوآنزیم‌ها، مجموعه توانایی‌های کاتالیستی یک آنزیم را به صورت قابل توجهی کم می‌کنند که صرفاً مربوط به گروه‌های عملکردی اسیدهای آمینه تشکیل دهنده کل آنزیم می‌باشد. کوآنزیم‌هایی که از طریق پیوند کووالانسی یا نیروهای غیر کووالانسی ارتباط محکمی با آنزیم برقرار می‌کنند، غالباً گروه پروستیک نامیده می‌شوند. کوآنزیم‌ها را می‌توان به عنوان سوبسترای دوم در نظر گرفت. در شکل (۴-۱)، نمایشی از آپوآنزیم-کوآنزیم همراه با انواعی از کوفاکتورها آورده شده است.



شکل ۴-۱: نمایشی از فعالیت آپوآنزیم‌ها - کوآنزیم همراه با انواعی از کوفاکتورها

پس از جداسازی کوفاکتور، پروتئینی که باقی می‌ماند و غیرفعال است آپوآنزیم نامیده می‌شود.

درچنین آنزیم‌هایی یون فلزی می‌تواند نقش‌های زیر را داشته باشد:

۱- مرکز کاتالیتیکی باشد.

۲- با ایجاد یک مجموعه کوئوردینانسی باعث برقراری پلی بین آنزیم و سوبسترا باشد.

۳- عامل ثابت نگه داشتن شکل فعال ساختمان فضایی پروتئین آنزیمی باشد.

آنزیم‌هایی که برای فعال بودن خود به یون فلزی احتیاج دارند در بعضی مواقع متالوآنزیم نامیده

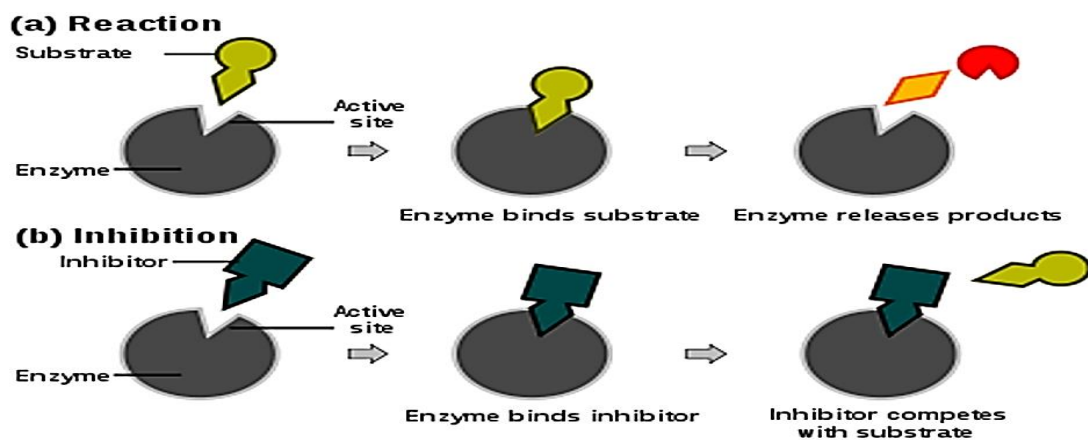
می‌شوند. در تعدادی از متالوآنزیم‌ها یون فلز خود به تنهایی دارای یک فعالیت کاتالیستی اولیه است

که با اضافه شدن پروتئین آنزیمی این فعالیت چند برابر می‌شود [۲۱].

۹-۱- انواع مهارکننده‌ها

مهارکننده‌ها از جمله لیگاندها به‌شمار می‌روند و هنگامی که به آنزیم متصل می‌شوند درون جایگاه اختصاصی آن قرار گرفته و سبب غیرفعال کردن فعالیت آن می‌شوند. مطالعات در مورد مهار آنزیم‌ها می‌تواند

در زمینه‌های دارویی، آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد نگهدارنده، سموم و آفات گیاهی به‌کار برده شود. در شکل (۱-۵)، اتصال مهارکننده در جایگاه فعال آنزیم نشان داده شده است.



شکل ۱-۵: اتصال سوبسترا به آنزیم از طریق جایگاه فعال آنزیم

علاوه بر این، مهارکننده‌های برگشت‌پذیر و برگشت‌ناپذیر دو گروه بزرگ از مهارکننده‌های آنزیمی به‌شمار می‌روند که به اختصار به آنها پرداخته می‌شود:

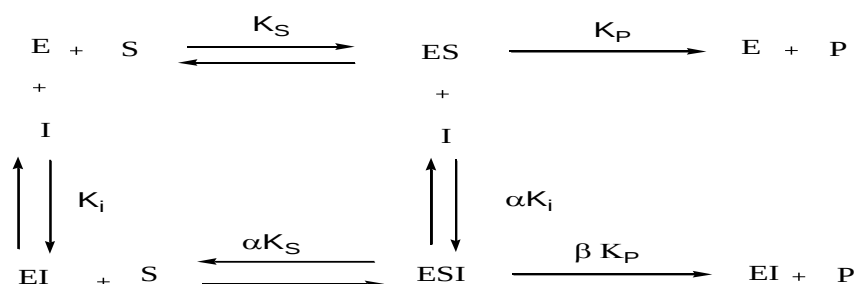
۹-۱-۱- مهارکننده برگشت‌ناپذیر

مهارکننده‌های برگشت‌ناپذیر، مولکول‌های مهمی هستند که به صورت برگشت‌ناپذیر و مستحکم به مولکول آنزیم متصل می‌شوند. این اتصال به صورت دائم و از نوع اتصالات کووالانسی می‌باشد.

۹-۱-۲- مهارکننده برگشت‌پذیر

ترکیباتی هستند که از نظر ساختمانی شبیه به سوبسترا بوده و این شباهت باعث می‌شود که آنزیم، آنها را در جایگاه فعال خود به جای مولکول سوبسترا جای دهد. مهارکننده با سوبسترا برای ترکیب

با جایگاه فعال آنزیم رقابت می‌کند و محصولی تشکیل نمی‌شود. با افزایش غلظت سوبسترا، آنزیم از مهارشدن آزاد می‌شود. در شکل (۶-۱)، نحوه‌ی تعادل واکنش آنزیم در حضور و عدم حضور مهارکننده نشان داده شده است. اغلب داروهایی که در پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند توسط این گروه از مهارکننده‌ها بدست می‌آیند [۲۳].



شکل ۶-۱: شمای تعادلی واکنش آنزیمی در حضور و عدم حضور مهارکننده

براساس شکل بالا، مهارکننده‌ها به شیوه‌های گوناگونی بر روی آنزیم‌ها تاثیر می‌گذارند. ضریب بتا در مهارکننده‌های برگشت پذیر صفر بوده که این بدین معنا می‌باشد که با تشکیل کمپلکس ESI محصولی تولید نمی‌شود، به عبارتی ثابت سرعت صفر می‌باشد. در غلظت‌های بالا این مهارکننده‌ها نمی‌توانند فعالیت‌های آنزیم را کم کرده و به صفر برسانند در صورتی که انواع دیگری از مهارکننده‌های برگشت‌پذیر در غلظت‌های بالا می‌توانند فعالیت آنزیم را به صفر برسانند [۲۴]. در ادامه به دو پارامتر که مشخصه‌ی مهارکننده‌ها را توضیح می‌دهد اشاره می‌گردد که عبارتند از: پارامتر IC_{50} و ضریب هیل.

۱-۹-۳- پارامتر IC_{50}

هرچقدر میزان آن کم‌تر باشد عملکرد بازدارنده مؤثرتر است. از این کمیت برای سنجش میزان تأثیر مهارکننده و تعیین غلظت آن برای کاهش فعالیت آنزیم استفاده می‌گردد.

¹- Inhibitor Concentration Giving 50% Inhibition

۱-۹-۴- ضریب هیل^۱

مقدار ضریب هیل اگر بزرگتر از یک باشد بیانگر این است که اتصال لیگاند به آنزیم جدا از هم می‌باشند. همچنین، مشخص می‌کند که اتصال لیگاند به آنزیم روی میزان تمایل لیگاندهای بعدی برای اتصال به آنزیم هیچ‌گونه اثری ندارد. همچنین، امکان دارد هنگامی که مهارکننده بخواهد به یک مکان فعال آنزیم متصل شود جایگاه‌های فعال دیگر آنزیم فعال شده و باعث شود که لیگاندهای دیگر به آن جایگاه‌ها متصل شوند که این فرآیند، مشارکت نامیده می‌شود. اگر اتصال لیگاند به یک مکان دیگر آنزیم انجام شود مشارکت مثبت نامیده می‌شود. در موارد دیگر اتصال لیگاند موجب کاهش تمایل مکان فعال به اتصال لیگاند بعدی می‌شود که این فرآیند، مشارکت منفی نامیده می‌شود [۲۵].

۱-۱۰- پروتئین کینازها

پروتئین کینازها یک گروه مهم از آنزیم‌های کیناز به‌شمار می‌روند که پروتئین‌ها را با افزودن گروه فسفات فسفوردار می‌کنند. همچنین یکی از بزرگترین خانواده‌های پروتئینی بوده که نقش بسیار حیاتی را در مراحل زندگی سلول‌ها بر عهده دارند. پروتئین کینازها آنزیم‌های مهمی هستند و بیش از پانصد ژن در انسان (۲٪ کل ژنوم) تولید پروتئین کینازها را کدگذاری می‌کنند و بیش از سی درصد پروتئین‌های بدن تحت تاثیر این آنزیم‌ها فسفوریله می‌شوند. از اولین پروتئین کینازهایی که ساختار آن تعیین شده و به عنوان پروتئین هدف در مطالعات مورد استفاده قرار گرفت، پروتئین کیناز A می‌باشد. پروتئین کیناز A جزو اولین و ساده‌ترین پروتئین کینازهایی است که ساختار آن تعیین شده و به همین دلیل به عنوان پروتئین مرجع در بسیاری از تحقیقات انتخاب شده است. همچنین براساس ساختار برهمکنش پروتئین‌ها با لیگاندهای مختلف داروهای جدیدی طراحی شده که در درمان بیشتر سرطان‌ها کاربرد دارد. پژوهشگران بر پایه‌ی دانش بیوانفورماتیک برهمکنش پروتئین - لیگاند را با استفاده از کامپیوتر مورد مطالعه قرار می‌دهند و قبل از اینکه بخواهند آنها را

^۱- Hill Coefficient

در آزمایشگاه طراحی کنند برهمکنش ترکیبات شیمیایی (داروها) را با پروتئین جستجو نموده و پس از انتخاب ترکیباتی که با احتمال بیشتری به پروتئین هدف متصل می‌شوند آنها را در آزمایشگاه مورد بررسی قرار می‌دهند [۲۶]. آنزیم کیناز به عنوان کلید کنترلی برای انجام بسیاری از فعالیت‌های سلولی از زمان رشد تا هنگام مرگ عمل می‌کند. در هر لحظه در هر سلول بیش از ۵۰۰ کیناز مختلف در حال فعالیت هستند. کینازها تقریباً در تمام جنبه‌های فیزیولوژی دخالت دارند. از جمله کینازهای بدن، آنزیم مبدل آنژیوتانسین می‌باشد. برای کنترل فعالیت پروتئین از فسفریلاسیون پروتئین استفاده می‌شود. کینازها را براساس اسیدآمینه‌هایی که فسفریله می‌کنند به چهار گروه: سرین/ترئونین کینازها، تیروزین کینازها، هیستیدین کینازها و کینازهای تخصصی دوگانه^۱ طبقه‌بندی می‌کنند. عملکرد کینازها به این صورت است که در طی فرآیند فسفریلاسیون، پروتئین کیناز به ATP و سوبسترای پروتئینی‌اش متصل شده و گروه فسفات گامای ATP را به گروه‌های هیدروکسیل آزاد اسیدآمینه‌های سرین، ترئونین یا تیروزین سوبسترا منتقل می‌کند [۲۷]. بیشتر پروتئین کینازها جزء خانواده پروتئین کیناز یوکاریوتی می‌باشند که مسئولیت فسفریلاسیون باقی‌مانده‌های سرین، ترئونین و تیروزین در همه‌ی ارگانیسم‌های یوکاریوتی را بر عهده دارند. پروتئین کیناز اختصاصی سرین/ترئونین یک آنزیم کیناز است که گروه OH در اسید آمینه‌های سرین و ترئونین را فسفریله می‌کند. این آنزیم‌ها متعلق به گروه ترانسفرازها می‌باشند. پروتئین کینازها تنظیم‌کنندگان اصلی مسیرهای پیام‌رسانی در اکثر فرآیندهای سلولی از جمله رشد سلولی، تکثیر، تمایز، متابولیسم، رونویسی ژن، آپاپتوز^۲ و هموستازی^۳ هستند [۲۸]. همچنین، فرآیند فسفریلاسیون پروتئین‌های سوبسترا را با تغییر در فعالیت آنزیمی، جایگیری سلولی، برهمکنش‌های پروتئین - پروتئین و پایداریشان تنظیم می‌کند و بنابراین طیف گسترده‌ای از تغییرات را در فرآیندهای سلولی سبب می‌شوند [۲۹]. بین مسیرهای مختلف و در حقیقت بین کل سیستم‌های کنترل‌کننده سلول ارتباط دو طرفه وجود دارد.

¹- Dual Specificity Kinases

²- Apoptosis

³- Homeostasis

بنابراین، عملکرد مناسب فعالیت کینازها برای سلول مورد نیاز و حیاتی است. جهش‌ها و تنظیم نابجایی که در پروتئین کینازها اتفاق می‌افتد با بسیاری از بیماری‌ها همانند سرطان مرتبط است [۳۰]. برخی از پروتئین‌های درون سلولی توسط چندین پروتئین کیناز متفاوت، فسفریله و فعال می‌شوند و بنابراین اطلاعات ارسالی از منابع مختلف توسط این پروتئین‌ها همگرا شده و به یک پیام تبدیل می‌شود. با این وجود، همه‌ی این پروتئین کینازها در یک نقطه متمرکز نمی‌شوند که از این میان، ۱۶۴ تا از آنها در نقاطی که باعث بروز سرطان می‌شود گسترش یافته و ۸۰ تا از آنها در نقاطی که بیماری‌های مختلف ظهور پیدا می‌کنند گسترش می‌یابند [۳۱]. بیشتر مهارکنندگان پروتئین کینازها به گونه‌ای طراحی شده‌اند که با جایگاه اتصالی ATP برهمکنش می‌کنند. به عبارت بهتر این مولکول‌ها فسفریلاسیون پروتئین‌ها توسط کینازها را مهار کرده و بنابراین فرآیندهای پیام رسانی^۱ را مسدود می‌کنند [۳۲]. مقایسه توالی‌های پروتئین کینازی نشان می‌دهد که کینازها تشابه^۲ توالی نسبتاً پائینی دارند به طوری که متوسط همسانی^۳ در دومین کیناز حدود ۲۰ درصد و در خارج از دومین کیناز تشابه از این هم کمتر است [۳۳]. با توجه به مطالب بیان شده در اهمیت پروتئین کینازها از آنها به عنوان اهداف دارویی در درمان بسیاری از بیماری‌ها استفاده می‌کنند. همچنین در حال حاضر از چندین مهارکننده‌ی پروتئین کینازی به عنوان دارو در درمان سرطان‌ها استفاده می‌کنند و البته تعداد بسیار زیادی نیز تحت مطالعات بالینی قرار دارند [۳۴].

۱-۱۱- آنزیم پیم یک کیناز

آنزیم پیم یک کیناز^۴ نقش مهمی در چرخه سلولی، آپوپتوز و متابولیسم بدن داشته و با توسعه سرطان، متاستاز و مقاومت دارویی ارتباط دارد. به همین دلیل پیم یک کیناز به عنوان یک هدف خاص در بررسی سرطان به شمار می‌رود. پیم یک کینازها جزء خانواده‌ی پروتئین‌های پیم یک به شمار می‌روند که منجر به هدف جالب برای کشف داروها و مهار سرطان‌ها می‌باشند [۳۵-۳۶]. این

^۲- Signaling

^۳- Similarity

^۴- Identity

^۱- Pim-1 kinase

آنزیم به صورت خودکار فعال شده که این ویژگی باعث می شود پیم یک کینازها اهداف ساختاری و بیولوژیکی منحصر به فردی را داشته باشند. [۳۷-۳۸]. پیوند پروتئین پیم یک، ۶۱ درصد مشابه پیم دو و ۷۱ درصد مشابه پیم سه است. همه اعضای خانواده پیم دارای سطح بالایی از حفاظت در جایگاه اتصال ATP هستند [۳۹-۴۰].

گسترش و فعالیت بیش از حد آنزیم پیم یک در سلول‌ها، آنها را از سازوکارهای عادی تقسیم و رشد سلولی جدا کرده و باعث ایجاد سلول‌های سرطانی و مقاومت به داروهای تولید شده می گردد. پیم یک کینازها به طور گزینشی هرکدام در سرطان‌های خاصی بیان می شوند درحالی که با تغییر سلول‌های طبیعی بدن به صورتی بیان می شوند که ظاهراً نقشی در آنها نداشته‌اند [۴۱]. تحقیقات زیادی در این زمینه برای مهار آنزیم پیم یک با هدف طراحی داروهای ویژه ایجاد شده اما با درک محدودی که از فعالیت آنها در بروز بیماری‌ها وجود دارد می توان با استفاده از غربالگری، یکسری از ترکیبات اختصاصی این کار را انجام داد. گسترش بیش از حد پیم یک منجر به تبدیل سلول‌های خوش خیم به سلول‌های بدخیم در بدن شده و باعث بروز سرطان می شود. این آنزیم‌ها باعث افزایش سلول‌های سرطانی در بدن شده و منجر به صدمه دیدن بدن می شود. تعدادی از مهارکننده‌های مولکولی مورد نظر با متصل شدن در جایگاه اختصاصی ATP پروتئین آنزیم مورد نظر ایفای نقش کرده و باعث مهار آن می شوند. تعدادی از مهارکننده‌های پیم یک^۱ برای بررسی بالینی در بیماران مبتلا به سرطان به کار رفته‌اند. پیشرفت‌های حاصل شده از ساختار و جایگاه تخصصی آنزیم‌ها بدست آمده و داروهای مورد نظر متناسب با جایگیری مناسب مهارکننده‌ها بر روی آنها مشخص می شوند. بینش ما در مورد ساختار مهارکننده‌ها می تواند برای کشف نسل جدید عوامل ضد سرطان مفید باشد [۳۹].

²- Pim-1

۱-۱۲- انواع پیم یک

آنزیم پیم یک دارای دو ایزومر ساختاری پیم یک ال^۱ و پیم یک اس^۲ می‌باشد که نحوه جایگیری آنها در بدن متفاوت بوده که پیم یک ال در هسته سلول و پیم یک اس در غشای پلاسمای سلول قرار می‌گیرد تا در مقابل داروها مقاومت نشان داده و عملکرد بهتری داشته باشند. پیم یک به عنوان یک آنزیم، به‌خصوص در ایجاد سرطان پروستات نقش دارد. آنزیم پیم یک، علاوه بر اینکه باعث ایجاد تغییر در وضعیت سلول‌های بدن می‌شود با مشتقات جدیدی که از آنها یافت می‌شود می‌تواند در جلوگیری از پیری زودرس و متاستاز بدن نقش‌آفرینی کند [۴۲-۴۳]. بیان بیش از حد آن در بدن که توسط سیتوکین‌ها انجام می‌شود منجر به مقاومت آنها در برابر شیمی‌درمانی و داروها می‌گردد. آنزیم پیم یک باعث مهار فعالیت رونویسی فاکس سه‌گردیده که باعث سرطانی‌شدن سلول‌ها می‌شود. مهارکننده‌هایی که مسئولیت کاهش فعالیت آنزیم پیم یک را بر عهده دارند با هدف قراردادن پیم یک در ایمن‌سازی و درمان سلول‌های سرطانی و تشخیص سرطان‌ها در نسل‌های بعدی پزشکی به کار گرفته می‌شوند [۴۴-۴۵].

۱-۱۳- تاریخچه‌ی شبیه‌سازی

روش دینامیک مولکولی ابتدا به‌منظور مطالعه‌ی برهمکنش‌های بین کرات سخت به وسیله آلدرا^۴ و وین رایت^۵ از اواخر دهه‌ی ۱۹۵۰ معرفی شدند [۴۶-۴۷]. در این مطالعه، ایده‌های بسیار مهمی درباره‌ی رفتار مایعات ساده حاصل شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این اجازه را به شخص می‌دهد تا براساس قوانین فیزیک تحول وابسته به زمان، خواص یک سیستم را پیشگویی کند. دینامیک مولکولی یکی از شاخه‌های فیزیک محاسباتی است. در این روش، برهمکنش میان اتم‌ها و مولکول‌ها در بازه‌هایی از زمان براساس قوانین فیزیک، به‌وسیله کامپیوتر شبیه‌سازی می‌شود. در سال ۱۹۶۴،

^۱- Pim-1L

^۲- Pim-1S

^۳- Faxx3

^۴- Alder

^۵- Wain Wright

رحمان^۱ مدل کره نرم را در شبیه‌سازی خود به کار برد که از وی به عنوان پدر دینامیک مولکولی یاد می‌شود [۴۸]. اولین شبیه‌سازی روی یک سامانه‌ی واقعی به وسیله رحمان و استلینگر^۲ در سال ۱۹۷۴ روی آب مایع با چگالی 1g/cm^3 و در چهار دما انجام شد [۴۹]. لی^۳ و همکارانش به وسیله محاسبه‌ی مونت کارلو، ساختار سطحی و کشش سطحی مایعی که مولکول‌های آن از طریق پتانسیل لنارد - جونز برهمکنش داشتند را توصیف نمودند [۵۰]. اولین شبیه‌سازی روی پروتئین به وسیله مک کامن^۴ و همکاران در سال ۱۹۷۷ روی بازدارنده‌های تیپسین در لوزالمعده‌ی گاو صورت گرفت [۵۱]. امروزه می‌توان نمونه‌های زیادی از شبیه‌سازی روی پروتئین‌های حل شده، کمپلکس‌های پروتئین-DNA و سامانه‌های لیپیدی را در مقالات یافت که شامل بررسی ترمودینامیکی پیوند لیگاند و تاخوردگی پروتئین‌های کوچک می‌باشند [۵۲-۵۳]. شبیه‌سازی رایانه‌ای با معرفی روش‌های غیرتعادلی در تعیین خواص انتقالی و در نظر گرفتن اثرات مکانیک کوانتومی توسعه یافته است [۵۵-۵۴]. در حال حاضر، تعداد روش‌های شبیه‌سازی در سطح گسترده‌ای افزایش یافته‌اند به طوری که امروزه برای هر مسئله روش خاصی وجود دارد. این روش‌ها اغلب شامل ترکیب شبیه‌سازی‌های کلاسیکی با مکانیک کوانتومی هستند.

۱-۱۴- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در پروتئین‌ها

روش‌های محاسباتی برای پیش‌بینی برهمکنش بین مولکول‌ها و طراحی ترکیبات جدید به کار گرفته می‌شود. یکی از این موارد داکینگ مولکولی نام دارد که اجازه می‌دهد به بررسی تعاملات ساختاری بین بسیاری از اجزای سلولی و داروها بپردازد. داکینگ مولکولی شامل انواع مختلفی از مطالعات براساس نوع هدف‌های درگیر در مجموعه است. برخی از شناخته شده‌ترین این مجموعه‌ها، کمپلکس پروتئین - لیگاند، کمپلکس پروتئین-پروتئین، کمپلکس نوکلئیک اسید - پروتئین و کمپلکس پروتئین-کربوهیدرات می‌باشد. در زمینه کشف یا طراحی دارو، داکینگ مولکولی بر روی

¹- Aness Rahman

²- Stillinger

³- Lee

⁴- McCammon

کمپلکس‌های پروتئین-لیگاند متمرکز شده است تا بررسی کند که چگونه یک لیگاند شیمیایی به عنوان یک دارو به گیرنده پروتئینی هدف متصل می‌شود. پیش‌بینی چگونگی اتصال لیگاند درون جایگاه فعال پروتئین، یک عامل مهم در برهمکنش و ایجاد ترکیبات جدید برای درمان بیماری‌ها می‌باشد [۵۶-۵۸]. علاوه بر این، غربالگری از نظر مفهوم داکینگ کردن با تعدادی از آزمایشاتی که به صورت تجربی استفاده می‌شود متفاوت می‌باشد. در حال حاضر، چند برنامه کاربردی که برای غربالگری مجازی مورد استفاده قرار می‌گیرند عبارتند از: Dock blaster [۵۹]، Auto dock [۶۰]، Molgero [۶۱]، flexx [۶۲]، Glide htvs [۶۳]، Plants [۶۴]، ICM [۶۵] و Ligmach. پایگاه‌های داده‌ی بسیاری وجود دارد که ساختار سه‌بعدی ترکیبات را در اختیار قرار می‌دهد [۶۶]. از این میان می‌توان به پایگاه داده PDB bind [۶۷-۶۸] و پایگاه داده ZINC [۶۹] اشاره کرد. اگرچه تجزیه و تحلیل داکینگ مولکولی اطلاعاتی در مورد حالت‌های اتصال لیگاند برقرار می‌کند اما انرژی اتصال، باقیمانده پروتئین در محل اتصال به لیگاند و توصیف دقیق ساختار و پویایی پروتئین در حالت محدود را نمی‌تواند توضیح دهد. با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌توانیم ساختار و دینامیک مولکولی را بررسی کرده و پروتئین را در حالت آزاد و با هدف اتصال به لیگاند هدف در طول اتصال مورد استفاده قرار دهیم. امروزه با پیشرفتی که در زمینه‌ی محاسبات انجام گرفته است، شبیه‌سازی را می‌توان روی سیستم‌هایی با تعداد اتم‌های بیشتر و در مقیاس‌های زمانی نانو ثانیه (و حتی میکرو ثانیه برای برخی نرم‌افزارها) انجام داد. همچنین با کمک این روش می‌توان رفتار مولکول‌های زیستی حین انجام واکنش، از دینامیک اتصال مونواکسید کربن به هموگلوبین تا عبور یون‌ها از کانال‌های یونی را بررسی کرد [۷۰].

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نسبت به روش QSAR از مزایایی برخوردار بوده که اطلاعاتی در مورد مکانیزم‌های مولکولی حاکم بر فرآیندهای واکنش در اختیار ما قرار می‌دهد. شبیه‌سازی مولکولی، امکان مطالعه یک سیستم و تعاملات و خواص آنها را در طول زمان و به معنایی دیگر در سطح اتمی انجام می‌دهد. در مقابل مزیت‌ها، یکی از محدودیت‌هایی که از شبیه‌سازی‌ها برای تمام

مولکول‌ها در هنگام برهمکنش وجود دارد، مقیاس زمانی و محدودیت زمانی بوده که اغلب در نظر گرفته نمی‌شود [۷۵-۷۱]. شبیه‌سازی به دلیل اینکه می‌تواند برهمکنش بین ذرات را در سطح اتمی بررسی کند در بسیاری از رشته‌های مختلف از جمله شیمی، داروسازی، فیزیک، مهندسی، علوم فضایی، پزشکی و زیست‌شناسی به کار گرفته می‌شود. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند برهمکنش بین لیگاند و پروتئین و خواص آنها و همچنین جایگیری مناسبی که نسبت به هم دارند را بررسی کرده و از این اطلاعات در طراحی داروها با کیفیت مناسب استفاده کند. در این میان برای استفاده از برنامه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از نرم‌افزارهای گوناگونی استفاده می‌کنند که این نرم‌افزارها باید به سادگی در اختیار قرار بگیرند [۷۸-۷۶].

۱-۱۵- شبیه‌سازی رایانه‌ای

با ورود و رشد چشم‌گیر رایانه‌ها در چهاردهه‌ی گذشته، امروزه دانشمندان از طریق شبیه‌سازی رایانه‌ای امکان آن را یافته‌اند که فرآیندهای مختلف را از جنبه‌های گوناگون با دقت بیشتری مورد مطالعه قرار دهند و پاسخ پرسش‌های خود را آسان‌تر بیابند. به‌رغم کاربردهای ریاضیات در علوم، واقعیت این است که معمولاً بین نظریه و توانایی استخراج اطلاعات کمی مفید برای توصیف یافته‌های تجربی، یک شکاف عمیق وجود دارد. می‌توان با صراحت گفت که یافتن پاسخ‌های دقیق، مواردی کاملاً استثنایی هستند. نظریه‌های علمی براساس تقریب‌های عددی بیان می‌شوند درحالی که تقریب‌ها اغلب غیرقابل کنترل بوده و می‌توانند اعتبار مسأله را زیر سؤال ببرند. بنابراین، می‌توان گفت که شبیه‌سازی رایانه‌ای دارای پایه‌های نظری است. امروزه شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای در حل بعضی از مسائل مکانیک آماری نقش ارزشمندی را ایفا می‌کنند که قبلاً و در نبود شبیه‌سازی‌ها یا با استفاده از روش‌های تقریبی حل می‌شدند و یا اصلاً قابل حل نبودند.

۱-۱۵-۱- شبیه‌سازی، نظریه یا تجربه

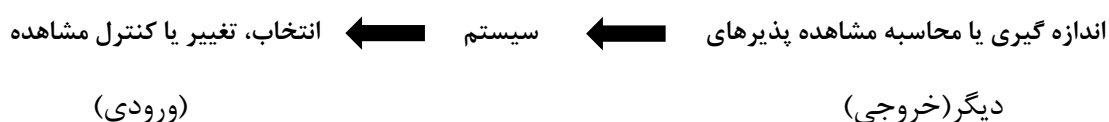
علم به مشاهده و درک کردن نیاز دارد و بدون مشاهده، حقیقتی برای درک واقعیت‌ها وجود ندارد. بدون درک کردن، علم فقط ایجاد کردن اسناد و مدارک است. لازمه‌ی درک، نظریه و زبان علوم‌نظری،

ریاضی است. هر نظریه براساس یک حدس و گمان صورت می‌گیرد. فرضیه، یک حدس هوشمندانه است که برای توصیف و بیان علت مشاهده‌های موجود به کار گرفته می‌شود. پس از امتحان کردن فرضیه‌ها و اثبات درستی آنها نظریه‌ها و مدل‌های علمی ایجاد می‌شوند و برای پیش‌گویی پدیده‌های جدید مورد استفاده قرار می‌گیرند. برخورد انسان با طبیعت همواره از طریق مطالعه نظری و تجربی می‌باشد. بخشی از دنیای فیزیکی که توجه خود را به آن جلب می‌کنیم، سیستم یا سامانه نامیده می‌شود. یک سیستم زیرمجموعه‌ای از جهان است. سیستم می‌تواند از تعدادی اجزای مشابه یا متفاوت تشکیل شده باشد و ویژگی‌های این اجزا این است که حالت سیستم را بیان می‌کند. برای ساماندهی، توصیف و شاید حتی پیش‌بینی مشاهده‌پذیرها، نظریه‌ها ایجاد می‌شوند. نظریه‌ها ممکن است در جهت‌های مختلفی ایجاد شوند. در ساده‌ترین حالت، یک نظریه فقط رابطه‌ای بین مشاهده‌پذیرها برقرار می‌کند. قانون گازهای کامل ($PV=NKT$) که از سازماندهی نتایج حاصل از اندازه‌گیری فشار، حجم و دمای گازهای حقیقی با چگالی کم بدست آمده نمونه‌ای از یک نظریه علمی در این راستا می‌باشد. در سطح بعدی پیچیدگی، نظریه‌هایی قرار دارند که مشاهده‌پذیرها را با حالت مورد نظر سیستم مربوط می‌کنند. نمونه‌ای از این مورد، نظریه جنبشی گازهاست که با افزایش دما تعداد برخوردها بین ذرات زیاد شده و سرعت مولکول‌ها افزایش یافته و از این طریق می‌توان مشاهده‌پذیر دما را به حالت سیستم و به دما مرتبط کرد. نظریه‌های این سطح، تفسیر یا توضیحی برای مشاهده‌پذیرها برقرار می‌کند اما اگر حالت سیستم، خود یک مشاهده پذیر نباشد این نظریه‌ها را نمی‌توان برای محاسبه‌ی مقادیر مشاهده‌پذیرها به کار گرفت. برای حل این مشکل محاسباتی، دو روش وجود دارد: (۱) ساختن نظریه‌هایی در سطح بالاتر یا (۲) انجام شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای. نظریه‌های پیشرفته‌تر در راستای حل مشکلات محاسباتی تلاش می‌کنند تا اطلاعات کامل‌تری را که در ارتباط با سیستم و برای محاسبه‌ی مقادیر مشاهده‌پذیرها مورد نیاز است از اول سازماندهی و خلاصه کنند. مکانیک آماری هم همین هدف را دنبال می‌کند. در مکانیک آماری آنچه به مشاهده‌پذیرها مرتبط می‌شود حالت مورد نظر سیستم نیست، بلکه احتمال وجود سیستم در یک حالت خاص می‌

باشد. روش دوم، استفاده از شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای است. در یک شبیه‌سازی رایانه‌ای (همانند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی) به حالت‌های سیستم مقادیر عددی نسبت داده می‌شود. بنابراین، این حالت‌ها تبدیل به مشاهده‌پذیر می‌شوند. پس از آنکه به حالت‌ها مقادیر عددی داده می‌شود می‌توان با استفاده از رابطه‌های نظری نظریه‌ی جنبشی، مقدار مشاهده‌پذیرهایی که در تجربه موجود می‌باشند را محاسبه کرد.

شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای نقش ارزشمندی را در حل بعضی از مسائل مکانیک‌آماري ایفا می‌کنند، مسائلی که بدون وجود شبیه‌سازی فقط با استفاده از روش‌های تقریبی قبل اجرا هستند و گاهی نیز اساساً روش دیگری برای حل آنها وجود ندارد. شبیه‌سازی‌ها از یک طرف وسیله‌ای برای امتحان کردن نظریه‌ها ایجاد می‌کنند و از یک سمت می‌توان نتایج حاصل از شبیه‌سازی‌ها را به طور مستقیم با نتایج تجربی مقایسه کرد. شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای ویژگی‌های میکروسکوپی یک سیستم (جرم اتم‌ها، برهمکنش‌های آنها، ساختار هندسی مولکولی و ...) را به خواص ماکروسکوپی آن (معادله حالت، ضرایب انتقال، پارامترهای ترتیب ساختاری...) مرتبط می‌کند، خواصی که از دیدگاه تجربی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار هستند. شبیه‌سازی را گاهی به عنوان نظریه و گاهی به عنوان تجربه در نظر می‌گیرند. از یک سو در شبیه‌سازی به جای واقعیت با مدل‌ها سروکار داریم که باعث می‌شود بی‌تردید شبیه‌سازی را در گروه روش‌های نظری قرار دهیم. این دیدگاه تأکید می‌کند که شبیه‌سازی مشخصاً یک آزمایش نیست زیرا اندازه‌گیری روی سامانه‌های واقعی انجام نمی‌شود و فقط با محاسبات صرف سروکار دارد. از طرف دیگر، روندی که برای تحقیق درباره‌ی صحت یک مدل به وسیله شبیه‌سازی رایانه‌ای طی می‌شود بسیار شبیه یک آزمایش است که برنامه اجرا می‌شود و نتایج تجزیه و تحلیل می‌شوند. این دیدگاه تجربی بیان می‌کند که نتایج شبیه‌سازی، مشابه آزمایش‌ها، در معرض مسائلی چون تکرارپذیری، خطاهای تکرارپذیری و خطاهای آماری قرار دارند. حال این پرسش مطرح می‌شود که واقعاً شبیه‌سازی را باید در کدام گروه قرار داد؟ پاسخ این است که جواب مشخصی برای این سؤال وجود ندارد و هر دو دیدگاه نظری و تجربی منطقی به نظر می‌رسند. صرف نظر از اینکه

برای مطالعه سیستم از روش نظری یا تجربی استفاده شود، روند کلی کار یکسان می‌باشد. در هر یک از این روش‌ها مشاهده‌پذیرها (ورودی‌ها)ی معینی انتخاب و مقدار آنها تغییر داده شده یا کنترل می‌شود. سیستم به این تغییرها پاسخ می‌دهد و پاسخ آن در قالب مشاهده‌پذیرها (خروجی‌های) دیگری مشاهده می‌شود که قابل اندازه‌گیری یا محاسبه هستند. در شکل (۷-۱)، روند کار نشان داده شده است. از آنجایی که امروزه بررسی‌های نظری معمولاً با استفاده از مدل‌سازی، شبیه‌سازی، یا هر دو انجام می‌شود، شناخت تفاوت بین روش مدل‌سازی و شبیه‌سازی بسیار سودمند خواهد بود.



شکل ۷-۱: نحوه وارد کردن ورودی‌ها و خروجی‌ها برای انجام شبیه‌سازی

هدف یک کار نظری، ایجاد ارتباط بین مشاهده‌پذیرهای خروجی و ورودی‌های کنترل شده می‌باشد. بخشی از یک مسأله نظری، تعریف حالت است. این حالت باید به گونه‌ای بیان شود که برهمکنش‌های پیچیده‌ی بین متغیرهای حالت، تفکیک یا حتی تضعیف شود و بتوان مشاهده‌پذیرهای خروجی را محاسبه کرد. در یک مدل تلاش می‌شود تا برهمکنش‌هایی که اثر کمتری بر مشاهده‌پذیرهای مورد مطالعه دارند یا بر آنها بی‌اثرند، تفکیک یا حذف شوند. در نتیجه یک مدل، ساده‌تر از سیستمی است که از آن الگو گرفته می‌شود. یک مدل یک زیر مجموعه یا زیر سیستم از سیستم اصلی است. خروجی‌های یک مدل فقط برای مجموعه محدودی از ورودی‌ها با خروجی‌های سیستم اصلی سازگاری خواهند داشت. برخلاف مدل‌سازی، یک شبیه‌سازی پیچیده‌تر از سیستم مورد مطالعه است. یک شبیه‌سازی عموماً می‌تواند به تعداد حالت‌های بسیار بیشتری نسبت به سیستم اصلی دست یابد. بنابراین، در شبیه‌سازی‌ها محدودیت‌هایی اعمال می‌شود تا خروجی شبیه‌سازی شده، دست‌کم برای مجموعه‌ی معدودی از ورودی‌ها با خروجی سیستم اصلی سازگار باشد.

۱-۱۵-۲- روش‌های نظری در مقابل تجربه

در یک کنفرانس علمی در دهه‌ی ۱۹۷۰، موضوع مهمی مطرح شد که بیان می‌کرد که آیا شبیه‌سازی رایانه‌ای جزو روش‌های نظری بوده یا تجربی می‌باشد. معتقدان روش نظری، معتقد بودند که شبیه‌سازی مطمئناً تجربی نبوده زیرا هیچ‌گونه اندازه‌گیری روی مدل واقعی انجام نمی‌شود. منتقدان به روش تجربی نیز با آنها مخالفت می‌کردند و بیان می‌کردند که کاربرد نتایج شبیه‌سازی همانند آزمایش‌های تجربی می‌باشد یعنی از آنها برای امتحان کردن نظریه‌ها استفاده می‌کنند. همچنین این افراد اشاره می‌کردند که نتایج شبیه‌سازی مانند تجربه، مستعد مشکلات تکرارپذیری و خطاهای آماری است، در نتیجه در بیشتر منابع از شبیه‌سازی‌های مولکولی با نام آزمایش‌های رایانه‌ای یاد می‌کنند. به عنوان مثال، برای انجام یک اندازه‌گیری در آزمایشگاه، مشاهده‌گر باید با سیستم برهمکنش داشته باشد. به عبارت دیگر بایستی نوعی ردیاب (نمونه‌بردار) از مرز میان سیستم و محیط عبور کند. به این دلیل سیستم‌های منزوی را نمی‌توان به صورت تجربی مطالعه کرد زیرا وقتی ردیاب از مرز سیستم عبور کند، سیستم دیگر منزوی نخواهد بود. با این حال، می‌توان بر این سیستم‌های منزوی محاسبات نظری مانند شبیه‌سازی انجام داد و نتایج معنی‌داری هم بدست آورد. طرز تفکر ما درباره شبیه‌سازی نیز مهم و در واقع حیاتی است. اگر ما بپذیریم که شبیه‌سازی‌ها تجربی بوده ممکن است این‌گونه برداشت شود که مدل‌های شبیه‌سازی شده واقعی هستند. با این نگرش و با توجه به سهولت انجام شبیه‌سازی در عمل، ممکن است تحریک شویم که تجربیات آزمایشگاهی را کاملاً کنار بگذاریم. خطر این کار، دور شدن شبیه‌سازی از واقعیت می‌باشد.

۱-۱۵-۳- ارتباط شبیه‌سازی با تجربه

برخی مسائل در مکانیک آماری کاملاً قابل حل هستند. هدف این است که توصیف کاملی از خواص ماکروسکوپی سیستم (از قبیل هامیلتونی یک مدل ایده آل شده، مانند گاز کامل یا بلور انیشتین) که به‌طور مستقیم و به راحتی منجر به مجموعه‌ای از نتایج جالب یا خواص ماکروسکوپی (از قبیل یک معادله‌ی حالت مانند $PV=NKT$) می‌شود. فقط تعداد کمی از مسائل در مکانیک مولکولی به

راحتی قابل حل هستند. مدل ایزینگ دوبعدی، نمونه معروفی از اینگونه مسائل قابل حل است. برخی مسائل در مکانیک آماری ممکن است به طور دقیق قابل حل نباشند، اما می‌توان آنها را بر مبنای یک الگوی تقریبی بررسی کرد. در این مورد، رایانه‌ها نقش بسیار مهمی دارند. به عنوان نمونه، در ارزیابی انتگرال‌های خوشه‌ای در بسط ویریال برای گازهای رقیق ناکامل، از رایانه‌ها می‌توان استفاده کرد. شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای نقش بسیار با ارزشی در فراهم کردن نتایج دقیق برای مسائل موجود در مکانیک آماری ایجاد می‌کنند که ممکن است با روش‌های دیگر قابل حل نباشد یا فقط بتوان آنها را با روش‌های تقریبی حل کرد. در این صورت شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای به نوعی امتحان کردن نظریه‌ها است و از نظر تاریخی روش‌های شبیه‌سازی چندان موفقیت آمیز نیستند، مانند نظریه‌ی قدیمی سلولی مایع‌ها تمایز قایل می‌شود. در قدم اول، این خود آزمونی از مدل مورد استفاده در یک شبیه سازی رایانه‌ای است. در نهایت اگر مدل ارائه شده خوب باشد کسی که شبیه‌سازی می‌کند امیدوار است که به آزمایشگرها دیدگاه‌های تازه‌ای پیشنهاد کند و به توصیف نتایج جدید کمک کند. این نقش دوگانه شبیه سازی‌ها به عنوان یک پل بین مدل‌ها و پیش بینی‌های نظری از یک سمت و بین نتایج مدل‌ها از سوی دیگر در شکل (۱-۸) نشان داده شده است. شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای راه مستقیمی از ویژگی‌های میکروسکوپی یک سیستم (جرم اتم‌ها، برهمکنش‌های بین آنها، ساختار مولکولی و ...) به خواص ماکروسکوپی و تجربی موردنظر (معادله حالت، ضرایب انتقال، پارامترهای ترتیب ساختاری و...) در اختیار قرار می‌دهند. این نوع اطلاعات هم از نظر تحقیقاتی و هم از نظر صنعتی مفید می‌باشند. اجرای برخی آزمایش‌ها در شرایط دما و فشار بسیار بالا مشکل یا غیرممکن می‌باشد درحالی‌که یک شبیه‌سازی رایانه‌ای از این مواد به عنوان مثال در یک موج کوبشی، یک پلاسمای با دمای بالا، یک راکتور هسته‌ای یا هسته‌ی یک سیاره، به طور کامل قابل اجرا می‌باشد. همچنین تعداد بسیار زیادی از پدیده‌های فیزیکی و شیمیایی از مقیاس مولکولی تا کهکشانی را می‌توان با استفاده از شبیه‌سازی‌های رایانه‌ای انجام داد [۷۹].

دارای افت وخیز باشد. در بعضی مجموعه‌ها مثل (مجموعه میکروکانونیکال)، انرژی کل ثابت است و محاسبه‌ی هرگام زمانی کمک می‌کند تا درستی شبیه‌سازی را بررسی کنیم.

۱-۱۶-۲- دما

با استفاده از قضیه‌ی همبخشی انرژی می‌توان دمای لحظه‌ای $T(t)$ را به صورت زیر تعریف کرد:

$$T(t) = \frac{2}{3Nk_B} K(t) \quad (3-1)$$

سمت راست عبارت فوق همان انرژی جنبشی لحظه‌ای کل دستگاه در لحظه‌ی t است. K_B ثابت بولتزمن و $3N$ تعداد درجات آزادی دستگاه است. باگذشت زمان، دمای لحظه‌ای افت وخیز می‌کند و دمای ماکروسکوپی T از میانگین‌گیری زمانی دمای لحظه‌ای بدست می‌آید:

$$T = \frac{1}{3Nk_B} \langle \sum_{i=1}^N V_i^2(t) \rangle \quad (4-1)$$

معادله‌ی فوق، مثالی از رابطه‌ی یک کمیت ماکروسکوپی (مانند دما) با میانگین‌گیری زمانی یک کمیت میکروسکوپی مثل (انرژی جنبشی) است.

۱-۱۶-۳- فشار

طبق تعریف، فشار، اندازه‌ی نیروی عمودی وارد بر هر سطح فرضی در دستگاه است و همان‌طور که گفته

شد در دینامیک مولکولی برای تعریف آن از تابع ویريال کلاسیوس، استفاده می‌کنیم.

$$W(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N) = \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \vec{F}_i^{tot} \quad (5-1)$$

که در آن F_i^{tot} کل نیرویی است که به ذره‌ی i ام وارد می‌شود. متوسط آماری تابع ویريال، $\langle W \rangle$ ، مطابق رابطه (۱-۶)، با میانگین‌گیری روی مسیرها بدست می‌آید:

$$\langle W \rangle = \lim_t \frac{1}{t} \int_0^t d\tau \sum_{i=1}^N \vec{r}_i(\tau) \cdot m_i \vec{r}_i(\tau) \quad (6-1)$$

با انتگرالگیری جزء به جزء بدست می‌آید:

$$\langle W \rangle = \lim_t \frac{1}{t} \int_0^t d\tau \sum_{i=1}^N \vec{r}_i(\tau) \cdot m_i |\vec{r}_i(\tau)|^2 \quad (7-1)$$

این مقدار دو برابر متوسط انرژی جنبشی است و درنتیجه با استفاده از قانون همبخشی انرژی بدست می‌آید:

$$\langle W \rangle = -dNk_B T \quad (۸-۱)$$

که در آن d بعد فضا (۲ یا ۳) ، N تعداد ذرات و k_B ثابت بولتزمن است. می توان نیروی کل وارد بر هر ذره را به دو قسمت تقسیم کرد:

$$\vec{F}_{i}^{tot} = \vec{F}_i + \vec{F}_i^{ext} \quad (۹-۱)$$

که $\vec{F}_i$ نیروی داخلی ناشی از برهمکنش بقیه ذره ها با ذره ی موردنظر است و $\vec{F}_i^{ext}$ نیروی خارجی ناشی از دیواره های ظرف است. اگر فرض کنیم ذرات در مکعبی به ابعاد L_x ، L_y و L_z با حجم $V = L_x L_y L_z$ محبوس باشند و مبدأ را در یکی از گوشه های مکعب در نظر بگیریم سهم $\langle W_{ext} \rangle$ ناشی از ظرف را می توان با استفاده از تعریف (۱ - ۵) بدست آورد:

$$\langle W \rangle = L_x (-PL_y L_z) + L_y (-PL_x L_z) + L_z (-PL_x L_y) = -3PV \quad (۱۰-۱)$$

که در آن P فشار و $-PL_y L_z$ نیروی خارجی اعمال شده به وسیله ی دیوار yz در امتداد جهت x بر ذره ای است که در مکان $x = L_x$ قرار دارد. در نتیجه رابطه ی (۱ - ۸) را می توان به صورت زیر نوشت:

$$\langle \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \vec{F}_i \rangle - dPV = -dNk_B T \quad (۱۱-۱)$$

یا

$$PV = Nk_B T + \frac{1}{d} \langle \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \vec{F}_i \rangle = Nk_B T + \langle W_{int} \rangle \quad (۱۲-۱)$$

این نتیجه ی مهم، معادله ی ویريال نام دارد. جمله ی اول در طرف راست رابطه ی (۱ - ۱۲) فشار گرمایی و جمله ی دوم فشار برهمکنشی نام دارد. فشار گرمایی، همان فشار ملموسی است که ناشی از برخورد ذره ها با یکدیگر و با جداره ظرف است اما فشار برهمکنشی، صرفاً ناشی از وجود یک پتانسیل بین ذرات دستگاه است بدون تماس مستقیم ذرات با یکدیگر ایجاد می شود. جمله ی دوم سمت راست رابطه ی (۱۲-۱) معمولاً ویريال داخلی نامیده می شود و آن را با W_{int} نشان می دهیم:

$$W_{int} = \frac{1}{d} \sum_{i=1}^N \vec{r}_i \cdot \vec{F}_i \quad (۱۳-۱)$$

برای برهمکنشی که شامل نیروهای دو یا سه ذره ای باشد، ویريال از رابطه ی زیر بدست می آید:

$$W_{\text{int}} = -\frac{1}{d} \sum_{j>i} \vec{r}_{ij} \cdot \frac{\partial U_{ij}}{\partial \vec{r}_{ij}} - \frac{1}{d} \sum_i \sum_{j>i} (\vec{r}_{ij} \cdot \frac{\partial U_{ijk}}{\partial \vec{r}_{ij}} + \vec{r}_{ik} \cdot \frac{\partial U_{ijk}}{\partial \vec{r}_{ik}} + \vec{r}_{jk} \cdot \frac{\partial U_{ijk}}{\partial \vec{r}_{jk}}) \quad (14-1)$$

که در این رابطه U_{ij} ، پتانسیل دو ذره‌ای بین ذره‌ی i و j است و U_{ijk} ، پتانسیل سه‌ذره‌ای مربوط به سه ذره‌ی i ، j و k است. چون در معادله‌ی ویرال همه‌ی کمیت‌ها به جز فشار معلوم هستند می‌توان از آن برای محاسبه‌ی P استفاده کرد. اگر ذرات دستگاه برهمکنشی با هم نداشته باشند مثل گاز کامل این معادله به معادله‌ی شناخته شده گاز کامل تبدیل می‌شود [۸۰].

۱۷-۱- داروها

داروها معمولاً مولکول‌های آلی کوچکی هستند که بسیاری از آنها در بدن انسان از طریق اتصال به یک گیرنده‌ی ویژه که باعث بروز بیماری می‌شوند فعالیت خود را آغاز می‌کنند [۸۱].

۱۸-۱- روش‌های طراحی دارو به کمک کامپیوتر

روش‌های طراحی داروها را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم‌بندی کرد که همه‌ی آنها با دردست داشتن اطلاعات در مورد ساختار لیگاندها و پروتئین بدست می‌آیند. در ادامه در مورد آنها توضیح داده می‌شود.

۱-۱۸-۱- روش بر گیرنده^۱

هنگامی که ساختار سه‌بعدی مولکول‌های لیگاند و گیرنده معلوم باشد، روش مبتنی برگیرنده کاندید خوبی برای شناسایی و یا بهینه کردن داروها به شمار می‌رود. به خاطر حضور ساختارهای سه‌بعدی ترکیبات و گیرنده، می‌توان هم ماهیت برهمکنش بین لیگاند و گیرنده و هم نوع ساختاری که لیگاند می‌تواند داشته باشد تا برهمکنش بین آنها در شرایط مطلوبی قرار بگیرد را با استفاده از این روش تشخیص داد. برای تعیین نوع لیگاندهایی که می‌توانند به جایگاه گیرنده داک^۲ شوند، باید هم مطابقت داشتن از نظر شکل و هم مکمل بودن قسمت‌های آب‌گریز، آب‌دوست و باردار در هر دو گونه‌ی لیگاند و گیرنده باید در نظر گرفته شوند. در این روش، ترکیب بر روی جایگاه فعال داک

^۱- Dock Receptor Based Approach

^۲- Dock

شده (در اصطلاح به معنی لنگراندازی است) و برهمکنش لیگاند با پروتئین به وسیله مکانیک مولکولی و دینامیک مولکولی شبیه سازی می شود. همچنین، بر اثر داک شدن لیگاند در جایگاه فعال، لیگاند از لحاظ کنفورماسیونی مطابق با جایگاه فعال پروتئین تغییر شکل می دهد و با آن واکنش می دهد. برای طراحی دارو بر اساس ساختار گیرنده از نرم افزارهای مختلفی مانند Glide-AUTODOCK-LUDI و Ligand fit استفاده می شود [۸۲].

۱-۱۸-۲- روش مبتنی بر لیگاند^۱

هنگامی که ساختارهای سه بعدی گیرنده مشخص نیست و در عوض ساختار لیگاندها معلوم است از این روش استفاده می گردد که از روش های مرسوم به حساب می آید. در این روش به طور غیرمستقیم با مطالعه ترکیباتی که با مولکول های زیستی واکنش نشان می دهند به دنبال طراحی ترکیباتی هستند که از لحاظ فارماکولوژیکی فعال باشند. همچنین در این روش، به جای مطالعه بر روی هر دو با مطالعه ویژه بر روی ساختار لیگاند به دنبال شناخت ویژگی های ساختاری و فیزیکوشیمیایی ترکیبات بوده تا بتوان ترکیب مورد نظر را براساس داده هایی که از مطالعه ترکیبات قبلی استخراج می شود طراحی نمود. در این روش، طراحی دارو بر اساس فارماکوفور^۲ صورت می گیرد. مفهوم فارماکوفور اولین بار در سال ۱۹۰۹ توسط Ehrlich معرفی گردید. فارماکوفر یک چهارچوب مولکولی است که ویژگی های ضروری مسئول ایجاد فعالیت های زیستی یک دارو را حمل می کند. همچنین فارماکوفور قسمتی از ساختار دارو بوده که اثر دارو وابسته به آن است و به وسیله مطالعه روابط کمی ساختار - فعالیت^۳ آنها می توان داروها را به وسیله این روش طراحی نمود [۸۳].

³-Ligand Based Approach

¹- pharmacophore

²- Relationship Quantitative Structure Activity

۱-۱۸-۳- روش طراحی دی نوو^۱

هنگامی که ساختار لیگاند مشخص نیست اما ساختار گیرنده معلوم باشد از این روش استفاده می‌شود. در این روش اطلاعاتی از ساختارهای گیرنده یا شبیه‌گیرنده‌ها وجود دارد اما ساختار ترکیب اصلی که بتواند با جایگاه فعال گیرنده برهمکنش داشته باشد وجود ندارد. طراحی منطقی پروتئین به اواسط دهه ۱۹۷۰ بازمی‌گردد، هرچند روش‌های اولیه طراحی پروتئین بیشتر بر پایه ترکیب توالی انجام می‌گرفتند و برهمکنش‌های اختصاصی بین زنجیره‌های جانبی در سطح اتمی به حساب نمی‌آمد، اخیراً پیشرفت در میدان نیروی مولکولی، الگوریتم‌های طراحی پروتئین و بیوانفورماتیک ساختاری^۲ مانند کتابخانه‌هایی از کانفورماسیون‌های اسیدآمینه، توسعه ابزارهای محاسباتی پیشرفته طراحی پروتئین را امکان‌پذیر کرده است. این ابزار محاسباتی می‌تواند محاسبات پیچیده‌ای را در مورد انرژی و انعطاف‌پذیری پروتئین انجام دهد و جستجوها را در فضاها پیکربندی وسیعی انجام دهد که انجام آن به صورت دستی غیرممکن است. با توجه به پیشرفت برنامه‌های محاسباتی طراحی پروتئین و موفقیت‌های مهم در این زمینه، طراحی منطقی پروتئین به یکی از مهم‌ترین ابزارهای مهندسی پروتئین تبدیل شده است. یکی از عملکردهای طراحی دارو بر پایه این روش، پیشنهاد و ارائه ترکیب اصلی است که با جایگاه فعال مکمل باشد. اساس این روش به این صورت است که از پایگاه داده‌ی ساختارهای سه‌بعدی موجود برای پیدا کردن مولکول‌های کوچکی که بتوانند با جایگاه فعال گیرنده از لحاظ اندازه، ژئومتری و گروه‌های عاملی برهمکنش مناسبی داشته باشند استفاده گردد. نرم‌افزارهایی مثل GROW و LEGEND برای طراحی دارو به وسیله این روش به کار می‌روند [۸۴].

^۳- De Novo Design Based Approach

^۴- structural bioinformatics

۱۹-۱- قانون پنجتایی لیپینسکی

این قوانین در سال ۱۹۹۷ توسط کریستوفر لیپینسکی بیان شد که ویژگی‌های ساختاری یک دارو که در جذب، توزیع، متابولیسم و دفع آن دارو از بدن اهمیت دارند را بیان می‌کند [۸۵-۸۶]. این قانون همچنین بیان می‌کند که خواص مولکولی برای داروها در بدن انسان مانند جذب، پخش، متابولیسم و دفع دارو مهم است [۸۷-۸۸]. براساس این قانون، مولکول‌هایی دارای خواص دارویی هستند که شامل مشخصات زیر باشند:

- ۱- تعداد گروه‌هایی که در مولکول می‌توانند در پیوند هیدروژنی دهنده اتم هیدروژن باشند بیشتر از ۵ نباشند (تعداد گروه‌های هیدروکسیل و آمین)
- ۲- تعداد گروه‌هایی که می‌توانند در پیوند هیدروژنی گیرنده اتم هیدروژن باشند بیشتر از ۱۵ نباشد. (تعداد اتم‌های نیتروژن و اکسیژن)
- ۳- وزن مولکولی آن بیشتر از ۹۵۵ دالتون نباشد.
- ۴- (لگاریتم ضریب تقسیم بین آب و ۱- اکتانول)^۱ مولکول بیشتر از ۵ نباشد.
- ۵- شکست مولی^۲ بین ۳۰ تا ۱۴۰ باشد [۸۹].

۲۰-۱- ویژگی‌های داروها

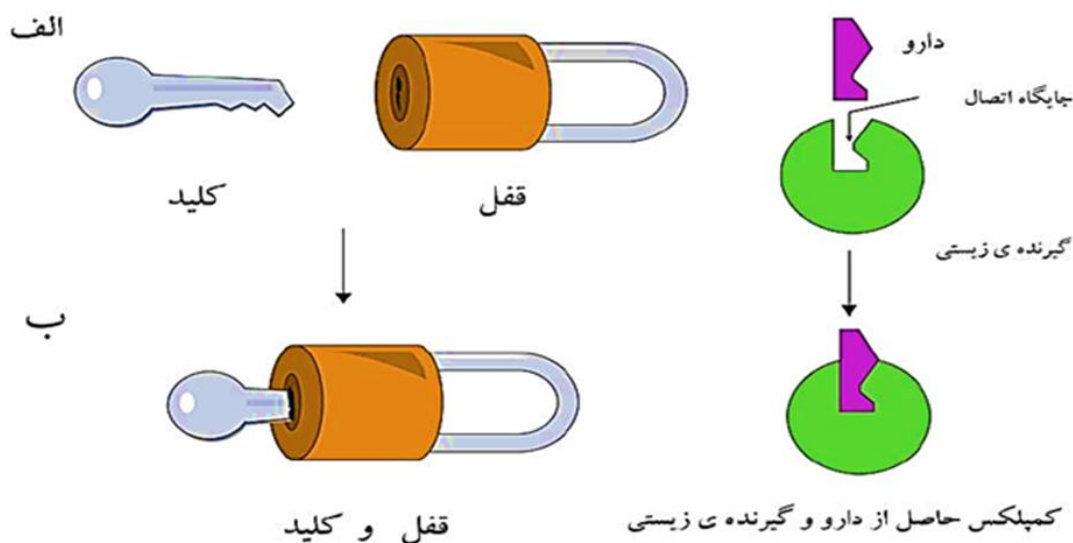
ترکیباتی که به عنوان دارو برای یک بیماری خاص پیشنهاد می‌شوند باید دارای تعدادی ویژگی ساختاری باشند که در ادامه هر یک از این ویژگی‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند [۹۰].

۱-۲۰-۱- پیکربندی صحیح

یک دارو برای اینکه به گیرنده هدف خود متصل شود باید جهت‌گیری مناسب و برهمکنش مناسبی را با مولکول هدف خود داشته باشد. مثلاً اگر هدف آن یک پروتئین باشد باید مطابق شکل (۱-۹)، پیکربندی مناسب را مطابق با ساختار سه‌بعدی که از پروتئین حاصل می‌شود را در آن جایگاه برقرار کند تا بتواند در آن جایگاه برهمکنش مناسبی را از خود نشان دهد [۹۱]. (نظریه قفل و کلید).

^۱- cLogP

^۲- Molar refractivity

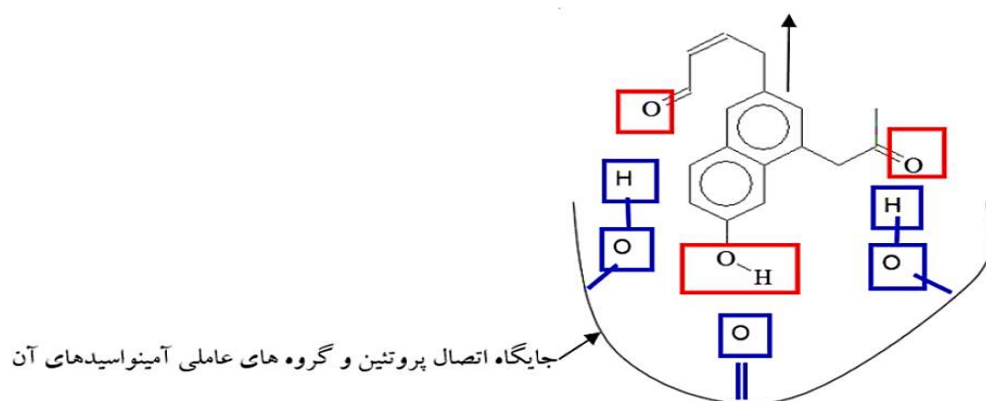


شکل ۹-۱: نمایش نظریه‌ی قفل و کلید برای قرارگیری دارو در جایگاه اتصال گیرنده زیستی [۹۱]

۱-۲۰-۲- ایجاد پیوندهای شیمیایی قوی با گیرنده‌ی زیستی

یک دارو باید توانایی این را داشته باشد که با مولکول هدف خود پیوندهای شیمیایی یا فیزیکی برقرار کند. همچنین یک دارو باید با گروه‌های عاملی خودش برای برقراری پیوند با اسید آمینه‌های پروتئین آماده و از نظر جایگیری مناسب باشد [۹۲]. شکل (۱-۱۰)

ساختار شیمیایی دارو و گروه‌های عاملی مهم آن



شکل ۱-۱۰: یک مثال از طرز قرار گرفتن یک دارو در جایگاه اتصال پروتئین برای ایجاد پیوندهای مناسب با اسید آمینه‌های آن

۱-۲۰-۳-گزینش پذیری زیاد

گزینش پذیر بودن یک دارو کمیت مهمی است که نباید به گیرنده‌ی پروتئینی که با گیرنده‌ی خودش ساختار مشابهی داشته باشد برهمکنش و متصل شود زیرا در این صورت باعث ایجاد اثرات جانبی و همچنین اثرات مخرب در بدن می‌گردد.

۱-۲۰-۴-قطبیت مناسب

از بین روش‌هایی که در مصرف دارو به کار برده می‌شود، مصرف خوراکی آن از استقبال زیادی برخوردار است. در این روش، میزان قطبیت و یا چربی دوستی ترکیب حائز اهمیت است. به‌صورتی که یک دارو باید از نظر میزان قطبیت و چربی دوستی از میزان بالایی برخوردار باشد. انحلال پذیری یا توانایی حل‌شونده برای حل شدن در حلال تا حد زیادی به قطبیت آن بستگی دارد. قطبیت به توزیع یا همترازی الکترون‌ها در مولکول بستگی دارد. حل‌شونده قطبی به آسانی در حلال قطبی و حل‌شونده غیرقطبی در حلال غیرقطبی حل خواهد شد. عوامل دیگری مانند حجم حلال و حل‌شونده و دما نیز انحلال پذیری ماده را تحت تأثیر قرار می‌دهند. مثلاً اگر ترکیب قطبیت بالایی داشته باشد، باعث انسداد رگ‌های خونی می‌گردد. همچنین اگر چربی دوستی بالایی داشته باشد توسط آنزیم‌های کبد از رگ‌های خونی دفع می‌شود [۹۳].

فصل دوم

روش کار

۲-۱- انجام داکینگ

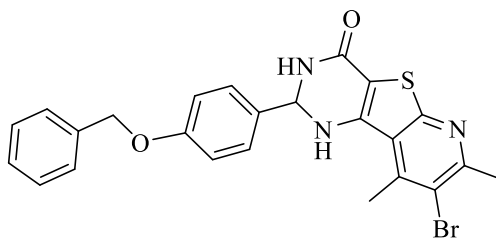
۲-۱-۱- ترسیم و بهینه‌سازی ساختار مهارکننده‌ها

قبل از ترسیم و بهینه‌سازی، ساختار مهارکننده‌ها براساس مراجع [Hala B. El-Nassan, Bassem H. Naguib & Engy A. Beshay 2018] انتخاب گردید. اغلب برای محاسبه ویژگی‌های مولکول، نیازمند ایجاد یک ساختار مناسب از مولکول هستیم. بنابراین قبل از اینکه فرآیند داکینگ انجام شود باید ساختار تمام مهارکننده‌های موجود در سری داده رسم و بهینه شوند و پایدارترین حالت آنها با حداقل انرژی مشخص گردد. بدین منظور، ساختار سه‌بعدی مهارکننده‌ها توسط نرم‌افزار کم‌دراوا^۱ رسم گردید و سپس ساختار مهارکننده‌ها بهینه شد تا به حالت کمینه انرژی برسند. این کار با نرم‌افزار گوسین و با روش DFT انجام گرفت. به طور دقیق‌تر، از روش B3LYP و مجموعه‌ی پایه‌ی ۶-۳۱ G** استفاده گردید. روش B3LYP شامل تابعیت تبدیلی از HF، DFT و تابعیت همبستگی لی یانگ پارآهمراه با سه پارامتر تجربی می‌باشد که در این روش جزء روش‌های معمول در محاسبات به کار گرفته شده بود استفاده گردید. همچنین این روش به پایداری داروها می‌پردازد. پس از آن مهارکننده‌های بهینه‌شده به عنوان ساختار اولیه مناسب برای انجام فرآیند داکینگ مورد استفاده قرار می‌گیرند. شکل (۲-۱)، ساختار دوبعدی مهارکننده‌های مورد استفاده در فرآیند داکینگ را نشان می‌دهد. همچنین نام این مهارکننده‌ها که از پیریدوتیونیوتریازولوپیریمیدین (PTZL) اشتقاق یافته‌اند در جدول (۲-۱) نشان داده شده است.

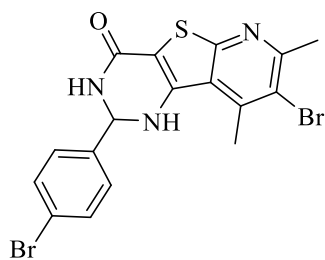
^۱-Chem Draw

^۲-Lee-Yang-Parr

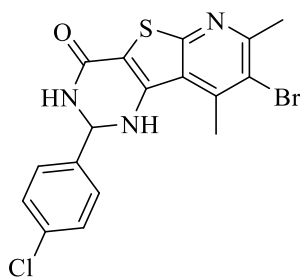
^۳-Pyridothienotriazolopyrimidin



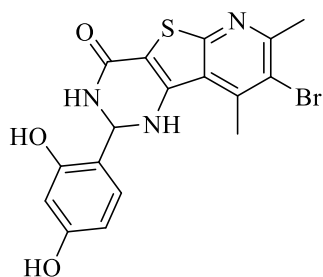
2-(4-(benzyloxy)phenyl)-8-bromo-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
دارو (۱)



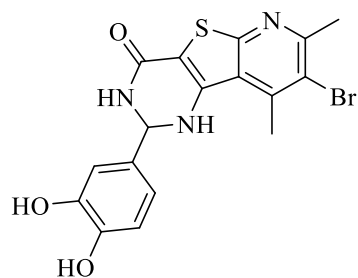
8-bromo-2-(4-bromophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
دارو (۲)



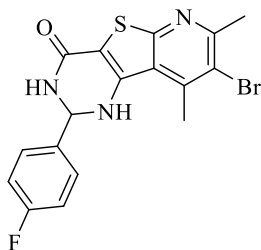
8-bromo-2-(4-chlorophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
دارو (۳)



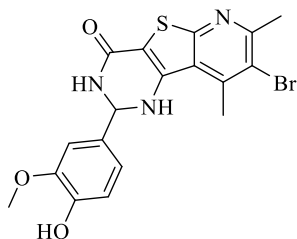
8-bromo-2-(2,4-dihydroxyphenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
دارو (۴)



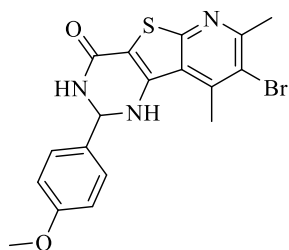
8-bromo-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
 دارو (٥)



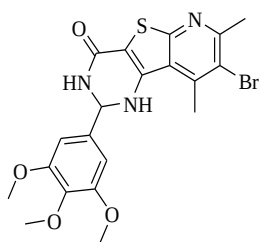
8-bromo-2-(4-fluorophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
 دارو (٦)



8-bromo-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
 دارو (٧)

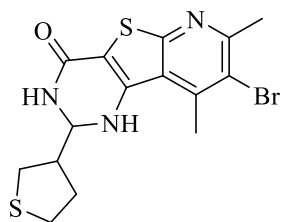


8-bromo-2-(4-methoxyphenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one
 دارو (٨)



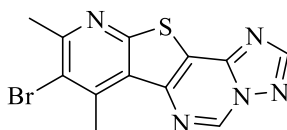
8-bromo-9-methyl-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one

دارو (٩)



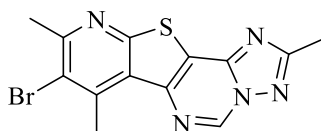
8-bromo-7,9-dimethyl-2-(tetrahydrothiophen-3-yl)-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(1*H*)-one

دارو (١٠)



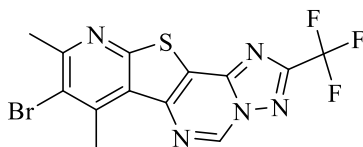
8-bromo-7,9-dimethylpyrido[3',2':4,5]thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidine

دارو (١١)



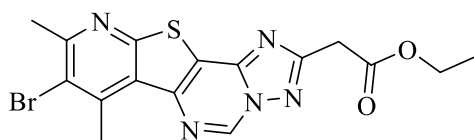
8-bromo-2,7,9-trimethylpyrido[3',2':4,5]thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidine

دارو (١٢)

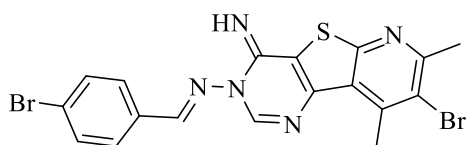


8-bromo-7,9-dimethyl-2-(trifluoromethyl)pyrido[3',2':4,5]thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidine

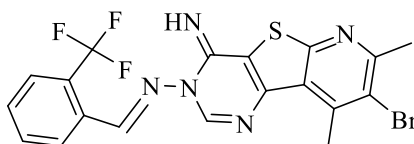
دارو (١٣)



ethyl 2-(8-bromo-7,9-dimethylpyrido[3',2':4,5]thieno[2,3-*e*][1,2,4]triazolo[1,5-*c*]pyrimidin-2-yl)acetate
دارو (۱۴)



(*E*)-8-bromo-3-((4-bromobenzylidene)amino)-7,9-dimethylpyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-imine
دارو (۱۵)



(*E*)-8-bromo-7,9-dimethyl-3-((2-(trifluoromethyl)benzylidene)amino)pyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-*d*]pyrimidin-4(3*H*)-imine
دارو (۱۶)

شکل ۲-۱: نمایش دو بعدی ساختار مشتقات PTZL توسط نرم افزار Chemdraw

جدول ۲-۱: نام IUPAC مشتقات PTZL

شماره ترکیبات	نام ترکیبات مورد مطالعه
۱	۲-(۴-(بنزیلوکس-یل)-۸-برومو-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدروپیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [۲،۳- <i>d</i>] پیریمیدین-۴(H۱)-یک
۲	۸-برومو-۲-(۴-بروموفنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدروپیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [۲،۳- <i>d</i>] پیریمیدین-۴(H۱)-یک
۳	۸-برومو-۲-(۴-کلروفنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدروپیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [۲،۳- <i>d</i>] پیریمیدین-۴(H۱)-یک

۴	۸-برومو-۲-(۴،۲-دی هیدروکسی فنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] [پیریمیدین-۴(H۱)]-یک
۵	۸-برومو-۲-(۴،۳-دی هیدروکسی فنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] [پیریمیدین-۴(H۱)]-یک
۶	۸-برومو-۲-(۴-فلوئوروفنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین- ۴(H۱)-یک
۷	۸-برومو-۲-(۴-هیدروکسی-۳-متوکسی فنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] [پیریمیدین-۴(H۱)]-یک
۸	۸-برومو-۲-(۴-متوکسی فنیل)-۹،۷-دی متیل-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین- ۴(H۱)-یک
۹	۸-برومو-۲-(۵،۴،۳-تری متوکسی فنیل)-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین-۴(H۱)-یک
۱۰	۸-برومو-۲-(تیوفن-۳-ایل)-۳،۲-دی هیدرو پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین-۴(H۱)- یک
۱۱	۸-برومو-۹،۷-دی متیل پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [e-۳،۲] [۴،۲،۱] تری آزولو [c-۵،۱] پیریمیدین
۱۲	۸-برومو-۹،۷،۲-تری متیل پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [e-۳،۲] تری آزولو [c-۵،۱] پیریمیدین
۱۳	۸-برومو-۹،۷-دی متیل-۲-(تری فلوئورومتیل) پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [e-۳،۲] [۴،۲،۱] تری آزولو [c-۵،۱] پیریمیدین
۱۴	۲-اتیل-۸-برومو-۹،۷-دی متیل پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [e-۳،۲] [۴،۲،۱] تری آزولو [c-۵،۱] پیریمیدین-۲-ایل) استات
۱۵	۸-برومو-N-(۴-بروموبنزیلیدین)-۴-ایمینو-۹،۷-دی متیل پیریدو [۵:۴،۲،۳] تینو [d-۲،۳] پیریمیدین-۳-۴) H-آمین

۱۶	۸-برومو-۴-آمینو-۹،۷-دی‌متیل-N-(۲-تری‌فلوئورومتیل)بنزیلیدین-پیریدو[۵:۴،۲،۳]تینو[d-۲،۳] پیریمیدین-۳-(H۴)-آمین
----	--

۲-۱-۲- آماده‌سازی مهارکننده‌ها برای داکینگ

فایل ورودی مهارکننده‌ها برای فرآیند داکینگ باید از نوع PDB mol2 و یا SDF باشند. ابتدا هیدروژن‌های قطبی به ساختار تمامی مهارکننده‌ها اضافه شد و بارهای اتمی جزئی گاستیگر^۱ برای آنها تعیین گردید. سپس میزان حرکت چرخش‌های فعال برای پیوندهای تمامی مهارکننده‌ها، به میزان بیشترین پیوندهای قابل چرخش تنظیم گردید و بارهای گاستیگر و پیوندهای قابل چرخش در یک فایل مختصات با فرمت pdb ذخیره گردید تا این فایل در زمان انجام فرآیند داکینگ مهارکننده‌ها مورد استفاده قرار بگیرد. برای تهیه‌ی فایل ساختاری لیگاندها، ساختار سه‌بعدی آنها با استفاده از نرم‌افزار گوس و یو‌ترسیم شد.

۲-۱-۳- آماده‌سازی فایل مختصات آنزیم 5C1Q

فایل ورودی پروتئین آنزیم از بانک اطلاعاتی RCSB استخراج گردید. PDB پروتئین مورد مطالعه ما 5C1Q بود که با دانلود فایل پروتئین از سایت مذکور می‌توان به ساختار و تمام مشخصات 5C1Q دسترسی پیدا کرد. نوع فایل پروتئین برای داک‌شدن باید mol2 و PDB باشد تا برای نرم‌افزار قابل خوانش بوده و عملیات داکینگ بر روی آن انجام گیرد. شکل (۲-۲)، تصویری از سایت مورد نظر را نشان می‌دهد.

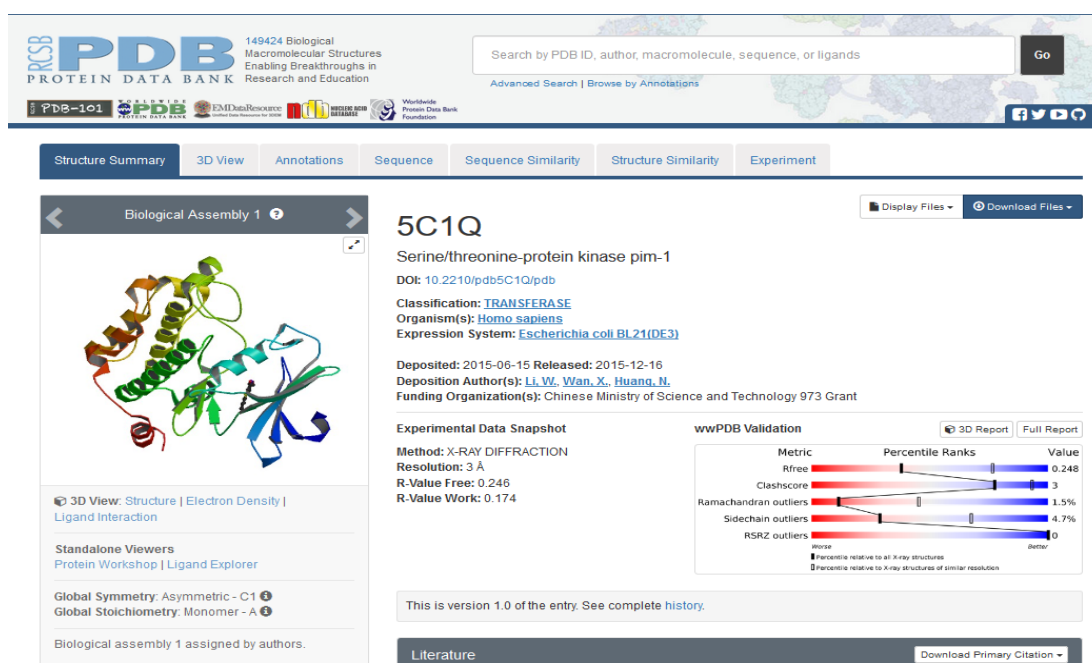
برای اینکه فرایند داکینگ با استفاده از نرم‌افزار مولگرو در طی فرآیند داکینگ انجام گیرد، باید یکسری تنظیمات روی متغیرها صورت بگیرد. صحت نتایج داکینگ به کیفیت و ساختار کریستالی پروتئین بستگی دارد. از آنجایی که حتی بهترین ساختارهایی که ذخیره می‌شوند قدرت تفکیک یک آنگستروم یا بیشتر را دارند، لذا اتم‌های هیدروژن در آنها دیده نمی‌شود و باید هیدروژن‌هایی را که

¹- Gasteiger

²- Gauss view05

معمولاً در ساختار کریستالوگرافی دیده نمی‌شوند به ساختار اضافه کرد. همچنین باید مولکول‌های آب همراه مولکول را حذف نمود و وضعیت تمام حلقه‌ها، زنجیره‌های جانبی و آمینواسیدها و میزان پروتونه‌بودن ساختار پروتئین مورد بررسی قرار بگیرد.

بعد از مشخص کردن بارهای جزئی پروتئین، جعبه شبکه‌ای با ابعاد $80 \times 80 \times 80 \text{ \AA}^3$ نقطه در جهات X، Y و Z تعریف گردید و مرکز جعبه در جایگاه فعال پروتئین قرار گرفت. فاصله بین نقاط این شبکه به میزان ۰/۲۷۵ آنگستروم در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات داکینگ، مهارکننده‌ها به صورت انعطاف‌پذیر و پروتئین به صورت یک مولکول سخت و بدون انعطاف در نظر گرفته شدند.



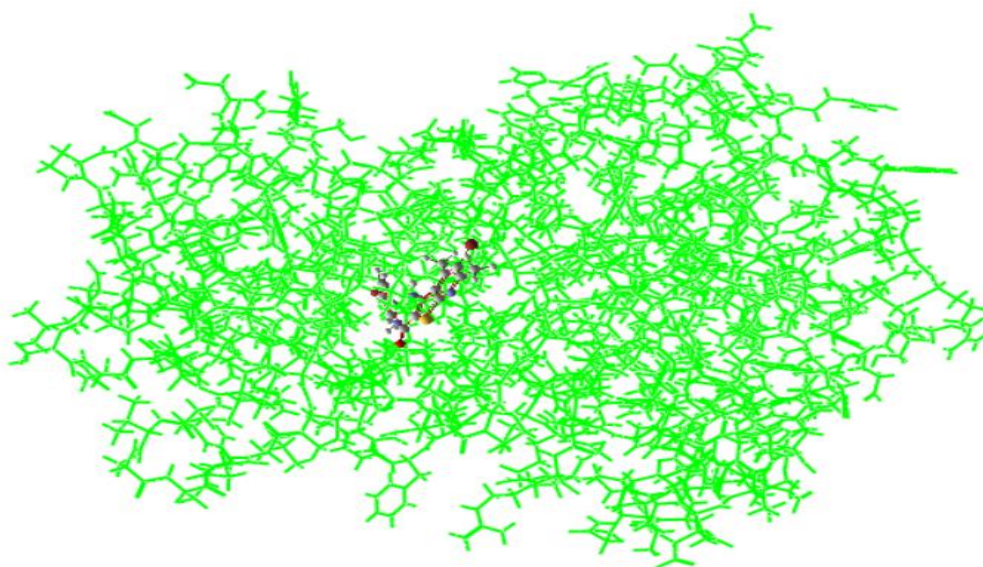
شکل ۲-۲: تصویری از سایت بانک داده‌ها

۲-۲- انجام داکینگ مولکولی

۲-۲-۱- آماده‌سازی ساختار شروع کمپلکس آنزیم 5C1Q برای انجام داکینگ

ساختار کریستالوگرافی پروتئین آنزیم 5C1Q برای انجام داکینگ مولکولی مشخص گردید که در این بررسی بعد از مشخص شدن ساختار پروتئین، جهت‌گیری صورت‌بندی مهارکننده در جایگاه اتصال، توسط داکینگ و با کمک نرم‌افزار مولگرو تعیین گردید. ساختار لیگاند-پروتئین اصلی (کریستالوگرافی) را با ساختار لیگاند - پروتئین داک شده مقایسه کرده و اگر RMSD ساختار اصلی

کم تر از ۰/۲ بود، روش داکینگ برای مراحل بعدی تأیید می‌شود و می‌توان لیگاند مورد نظر را با پروتئین داک کرد. ساختار کریستالوگرافی آنزیم 5C1Q مورد استفاده در شکل (۲-۳) نشان داده شده است. در این بررسی جهت‌گیری صورت‌بندی مهارکننده در جایگاه اتصال توسط تکنیک داکینگ و با کمک نرم‌افزار مولگرو مشخص گردید به‌طوری که از بهترین صورت‌بندی‌های داک شده مهارکننده‌ها به ساختار کریستالوگرافی آنزیم 5C1Q، به‌منظور شبیه‌سازی کمپلکس - مهارکننده استفاده گردید.



شکل ۲-۳: ساختار کریستالوگرافی آنزیم پیم یک کیناز با کد 5C1Q با داروی هدف

۲-۳- انرژی آزاد برهمکنش

پس از انجام محاسبات داکینگ، بایستی صحت الگوریتم‌های داکینگ که توسط نرم‌افزار بدست می‌آید را از نظر مشابهت با شرایط واقعی، برای لیگاند و پروتئین هدف مورد آزمون قرار داد. از آنجایی که در پروسه طراحی دارو، انرژی‌های نمره‌دهی برای انتخاب ترکیب مورد نظر به‌کار گرفته می‌شود، می‌بایست از کافی بودن صحت انرژی تابع نمره‌دهی اطمینان حاصل کرد. رتبه‌دهی‌ها در واقع، معیاری از اندازه‌گیری انرژی اتصال، انرژی آزاد یا یک معیار کیفی عددی می‌باشد که در انتها، این عدد برای ما بهترین ترکیبات را مشخص می‌کند. بهترین راه برای ارزیابی نتایج داکینگ، مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج تجربی است و برای این منظور، انرژی آزاد و ثابت مهارکنندگی معیاری برای این بوده

که تا چه میزان مطالعات داکینگ صحیح بوده است. در حالت ایده‌ال نتایج داکینگ، انرژی اتصال خواهد بود. این مقدار برای تعیین بهترین ترکیب مهارکننده بین ترکیبات مختلف مقایسه می‌شود.

۴-۲- معرفی پارامترها و روش کار با نرم‌افزار Molgero به منظور شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

ساختارهای شبیه‌سازی شده پروتئین و مهارکننده‌های بهینه شده به وسیله نرم‌افزار مولگرو داک شده و بدین ترتیب جایگاه های اتصال و آمینواسیدهای درگیر در برهمکنش شناسایی می‌گردد. بدین ترتیب برهمکنش مهارکننده‌ها با پروتئین 5C1Q و نوع برهمکنش‌ها تعیین خواهد شد. همچنین، اتم‌هایی از پروتئین و لیگاند که در برهمکنش با یکدیگر نقش داشته باشند نیز مشخص می‌شود. قبل از اینکه فرآیند داکینگ انجام شود باید ورودی‌های پروتئین و لیگاند در اختیار باشد که در ابتدای محاسبات این ورودی‌ها مشخص شد. بعد از مشخص کردن ساختار ورودی‌ها، آنها را وارد نرم‌افزار کرده و در نهایت نرم‌افزار کمپلکس داک شده را می‌دهد و ترکیبات بهتر و موقعیت‌های بهتر را مشخص می‌کند. شکل (۴-۲)، تصویری از نحوه برهمکنش پروتئین با لیگاند مورد نظر را توسط نرم‌افزار نشان می‌دهد.

۴-۲-۱- روش کار با نرم‌افزار Molgero

نرم‌افزار مولگرو همانند هر نرم‌افزاری از قسمت‌های مختلفی برای داکینگ کردن تشکیل شده است که به آنها اشاره می‌گردد.

گام اول

نرم‌افزار را باز کرده و صفحه‌ای مشکی رنگ برای ما باز می‌گردد و محلی است که می‌خواهیم مولکول های مختلف را باهم داک کنیم. در پنجره‌ی قسمت چپ نرم‌افزار، گزینه‌ی Work space Explor قرار دارد و همه‌ی گزینه‌هایی که در آنجا وجود دارد را در طی مرحله‌ی داکینگ لیست می‌کند که می‌تواند پروتئین، لیگاند یا ساختارهای مختلف پروتئین را نمایش داده و یا مولکولی را حذف، اضافه و همچنین یک مولکول را با مولکول دیگر جابجا و ذخیره کند. پنجره‌ی دیگر در زیر همان پنجره

properties قرار دارد که همان اطلاعات مربوط به عملیاتی که در Work space Explor روی می‌دهد را گزارش و نمایش می‌دهد. پنجره‌ی دیگر، Console بوده که تمام عملیات‌ها را به نمایش می‌گذارد و همچنین در آن، Description و time قرار دارد که مشخص می‌کند چه عملیاتی را انجام داده و اگر خطایی در طی عملیات وجود داشته باشد را با رنگ زرد مشخص می‌کند. بعد از معرفی بعضی از آیتم‌ها نوبت به مرحله‌ی داکینگ می‌رسد که در گام دوم توضیح داده می‌شود.

گام دوم

ابتدا مولکول مورد نظر که از سایت داندلود و ذخیره شده است را از سربرگ File و گزینه‌ی import Molecule وارد نرم‌افزار کرده و گزینه‌ی import را فعال می‌کنیم. در ادامه، لیگاند مورد نظر که سطح انرژی منفی‌تری از بین لیگاندهای مذکور دارد را انتخاب کرده و وارد نرم‌افزار می‌کنیم و ۱- open را می‌زنیم. در قسمت نوار، گزینه‌ی Hydrogens قرار دارد که با انتخاب آن می‌توان هیدروژن‌های قطبی را اضافه کرد شکل (۲-۵).

گام سوم

قبل از اینکه فرآیند داکینگ انجام شود باید یکسری آماده‌سازی بر روی پروتئین و لیگاند انجام گرفته تا فرآیند داکینگ با خطا مواجه نشود، به همین دلیل در داخل نرم‌افزار امکاناتی تعبیه شده است که از آنها می‌توان استفاده کرد. به عنوان مثال، در داخل Tools اولین گزینه Label Type قرار دارد که می‌توان آن را در حالت باقیمانده قرار داد. همچنین، می‌توان Template را در حالت Residue name and index گذاشت تا باقی‌مانده‌های آمینواسیدها را برای ما مشخص کند شکل (۲-۶). در ادامه به برچسب‌ها نیازی نیست و با کلیک راست بر روی آن و انتخاب گزینه‌ی Remove all می‌توان آن را حذف کرد شکل (۲-۷).

همچنین گزینه دیگری که در داخل Tools تعبیه شده است Surface بوده که سطح مولکول را براساس شعاع واندوالسی مشخص می‌کند که مطابق شکل (۲-۸) در می‌آید. همچنین RMSD.

نحوه‌ی تشابه ساختار سه‌بعدی دو پروتئین مختلف را براساس میزان شباهتی که باهم دارند نمایش می‌دهد.

برای نمایش مولکول‌ها می‌توان وارد زبانه‌ی Rendering شده که معمولاً بهترین مدل ball and stick می‌باشد. برای لیگاند، بهترین شکل Spacefill است. در ادامه برای آماده‌سازی پروتئین و لیگاند وارد زبانه‌ی Preparation شده و آنها را در حالت if missing قرار می‌دهیم و دوباره تیک Detect Cavities را فعال کرده که محل برهمکنش و حفره‌های بین لیگاند و پروتئین را مشخص می‌کند که ۵ مرحله را برای فرآیند داکینگ انتخاب کرده و Ok می‌کنیم. از بین حفره‌ها، حفره‌ای که جایگیری آن دقیقاً در محل برهمکنش با لیگاند باشد را انتخاب کرده و بقیه را حذف می‌کنیم شکل (۲-۹).

گام چهارم

در این مرحله زمانی که آماده‌سازی لیگاند و پروتئین انجام گرفت وارد مرحله‌ی داکینگ می‌شویم. برای شروع ابتدا وارد زبانه‌ی Docking شده و تیک مربوط به Docking wizard را زده و صفحه‌ای برای ما مشخص می‌گردد و مراحل عملیات داکینگ را زده تا داکینگ شروع شود و پنجره‌ی مربوط به داکینگ باز شده و موقعیت‌های مربوط به زمانی که داکینگ انجام می‌شود را برای ما نمایش می‌دهد شکل (۲-۱۰).

گام پنجم

در این مرحله بار دیگر نرم‌افزار را باز کرده و پروتئین را وارد نموده و زمانی که نتایج حاصل از داکینگ به اتمام رسید در آن اعمال می‌کنیم. در ادامه صفحه‌ای باز شده که هر تعداد لیگاندی که داشته باشیم و هر تعداد موقعیتی که بخواهیم از لیگاندها انتخاب کنیم را وارد نموده که در اینجا ما ۵ موقعیت داریم و تیک آنها را فعال نموده تا وارد نرم‌افزار گردد شکل (۲-۱۱).

برای اینکه برهمکنش بین لیگاند و پروتئین‌ها را به صورت دوبعدی ببینیم از گزینه‌ی Ligand map استفاده می‌کنیم. در ادامه، یک پنجره برای ما باز شده که گزینه‌ی show interaction را فعال

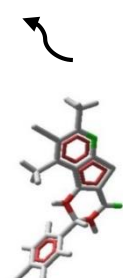
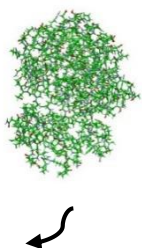
می‌کنیم، گزینه‌ی اول آن باندهای هیدروژنی را برای ما نمایش می‌دهد شکل (۲-۱۲). با استفاده از این نرم‌افزار می‌توانیم کلیه‌ی اطلاعات لازم از برهمکنش بین لیگاند و پروتئین را بدست آوریم.

۲-۵- غربالگری مجازی مجموعه‌ای از مشتقات PTZL

غربالگری مجازی با توان بالا، یک روش محاسباتی کارآمد برای محاسبه تمایل پیوندی مجموعه‌ی عظیمی از ترکیبات شیمیایی با یک هدف پروتئینی خاص و سپس مرتب کردن آنها بر حسب انرژی اتصال است. از آنجایی که در این روش با یک بار محاسبه کل نتایج لازم حاصل می‌شود، بنابراین صرفه‌جویی زیادی در وقت صورت می‌گیرد. با در نظر گرفتن محدودیت‌های روش‌های داکینگ مولکولی که در آن شیوه‌های اتصال مختلف می‌توانند امتیاز یکسانی از توابع امتیازدهی کسب کنند و دانستن این حقیقت که دقت روش‌های داکینگ مولکولی، دقت شیوه‌های اتصال پیش‌بینی را به دنبال خواهد داشت، استفاده از روش‌هایی که دقت داکینگ مولکولی را بالا ببرد از اهمیت خاصی برخوردار است. یکی از مؤثرترین راهکارهای پیشنهاد شده برای افزایش دقت پیش‌بینی شیوه اتصال، بهره‌گیری از روش داکینگ توافقی است که در این روش بیشتر از یک نرم‌افزار داکینگ مولکولی بهره گرفته می‌شود.

در این رساله، ۲۰۵۴ مشتق PTZL که از نظر تجاری در دسترس و قابل خریداری می‌باشد از پایگاه داده‌ی Zinc انتخاب گردیدند و در یک غربالگری اولیه توسط خود پایگاه داده‌ی Zinc، ۱۰۰ ترکیب که مطابق با قانون لیپینسکی بودند، جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. در ادامه با استفاده از نرم‌افزار Molgero، شیوه اتصال این لیگاندها درون جایگاه اتصال آنزیم 5C1Q بررسی شدند و براساس انرژی اتصال پیش‌بینی‌شده توسط این نرم‌افزار، ترکیبات مرتب شده و سه ترکیب با پائین‌ترین مقدار RMSD و بالاترین میزان انرژی اتصال انتخاب گردیدند تا با استفاده از نرم‌افزار Amber مورد بررسی‌های بیشتر قرار بگیرند. قبل از معرفی نرم‌افزار امبر، در ادامه به معرفی پارامترهای نرم‌افزار Amber می‌پردازیم.

¹-Root mean squared deviation



Molero Virtual Docker

File Edit View Rendering Preparation Docking Tools Window Help

Workspace Explorer Options

Workspace: Unnamed

☒ Ligands [1]

☒ Proteins [1]

Properties

Property Value

Time Description

16:43:16.203 Prepare working space using program: prepare a workspace for docking

16:43:17.456 Preparing SCIO [8] from file: F:\formation\Scio.pdb

16:44:47.866 PDB Parser converted molecule(UNX_011 [27 atoms]) from ATOM to HETATM

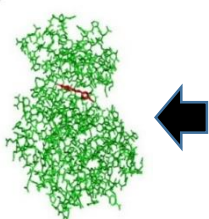
16:44:47.992 Space search203 found 6 empty ligand Proteins as expected the working space

16:44:49.112 Preparing UNX_0 from file: F:\formation\data\ligand\scio.gif.pdb

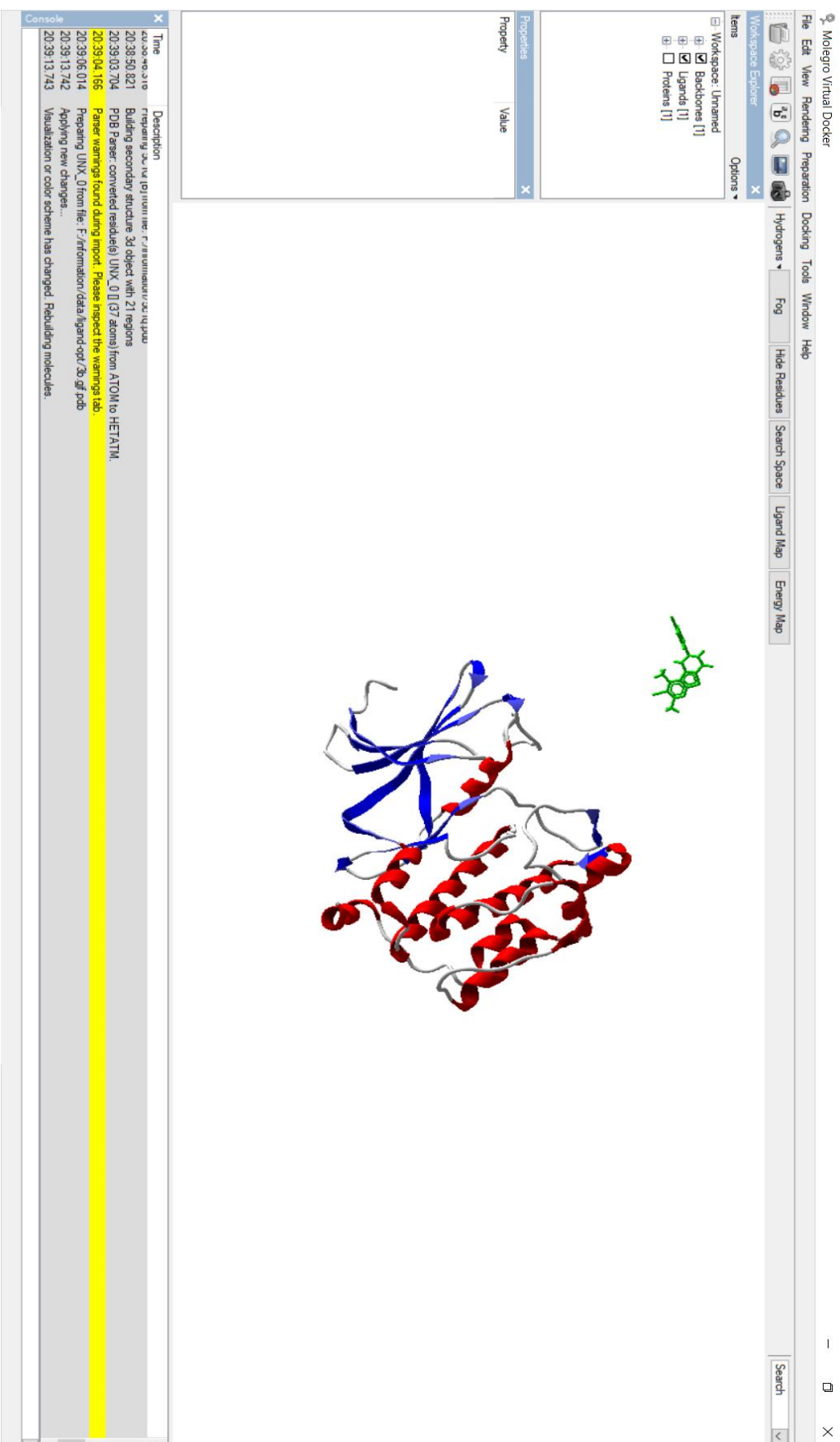
16:47:37.293 Applying new changes...

16:47:37.295 Visualization or color scheme has changed: Redrawing molecules.

Search



شکل ۲-۴: شمایی از نحوه برهمکنش پروتئین و داروی هدف با نرم افزار Molero



شکل ۲-۵: وارد کردن لیگاند و پروتئین در نرم افزار Molero

Molegro Virtual Docker

File Edit View Rendering Preparation Docking Tools Window Help

Workspace Explorer Options

Workspace: Unnamed

Backbones [1]

Labels [1]

Ligands [1]

Proteins [1]

Hydrogens

Fog

Hide Residues

Search Space

Ligand Map

Energy Map

Search

Properties

Property Value

Console

Time	Description
13:10:19.005	Ensuring secondary structure 3D output with 4.1 requires
13:16:19.985	PDB Parser converted residue(s) UNIX_0 [1 (37 atoms)] from ATOM to HETATM.
13:16:20.102	Parser warnings found during input. Please inspect the warnings tab.
13:16:21.933	Preparing UNIX_0 from file: F:\information\information\ligand-opt\3b.glt.pdb
13:16:36.281	Applying new changes...
13:16:36.282	Visualization or color scheme has changed. Rebuilding molecules.
15:42:21.143	273 residue label(s) added for molecule: SC1Q [8]

شکل ۲-۶: برچسب‌زدن پروتئین و لیگاند

Molegro Virtual Docker

File Edit View Rendering Preparation Docking Tools Window Help

Workspace Explorer Options

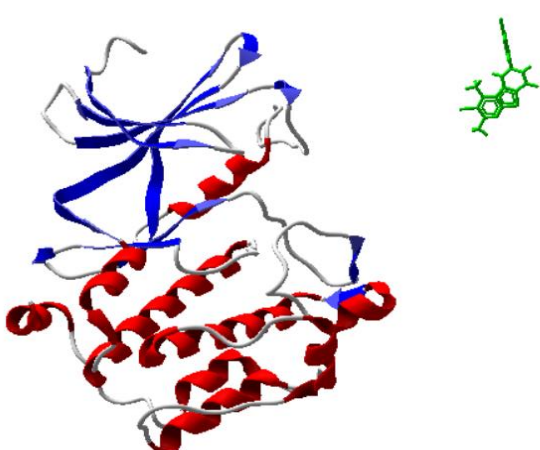
- Workspace: Unnamed
- ☒ Backbones [1]
- ☒ Labels [1]
- ☒ Ligands [1]
- ☐ Proteins [1]

Properties

Property	Value

Hydrogens Fog Hide Residues Search Space Ligand Map Energy Map

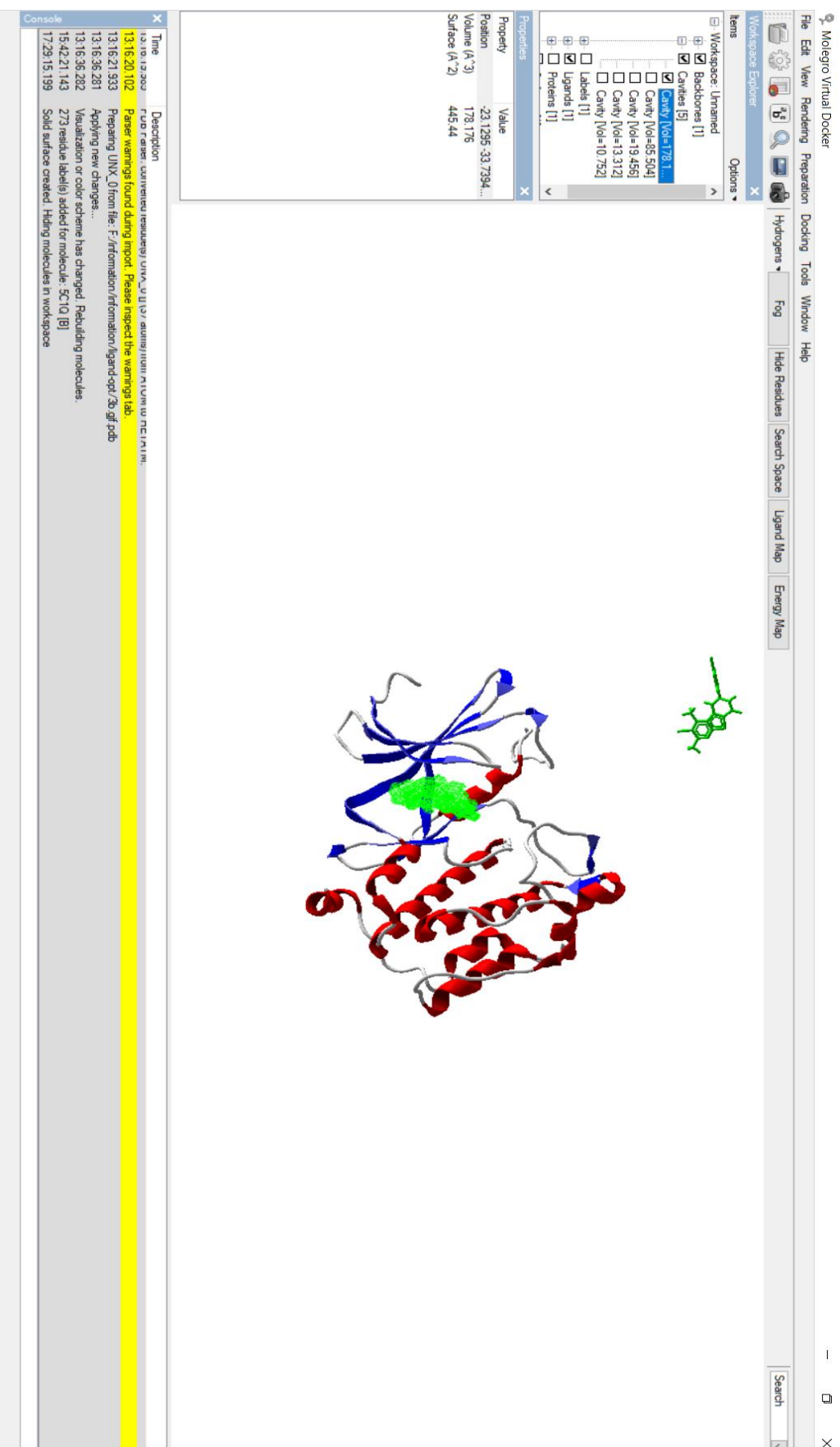
Search



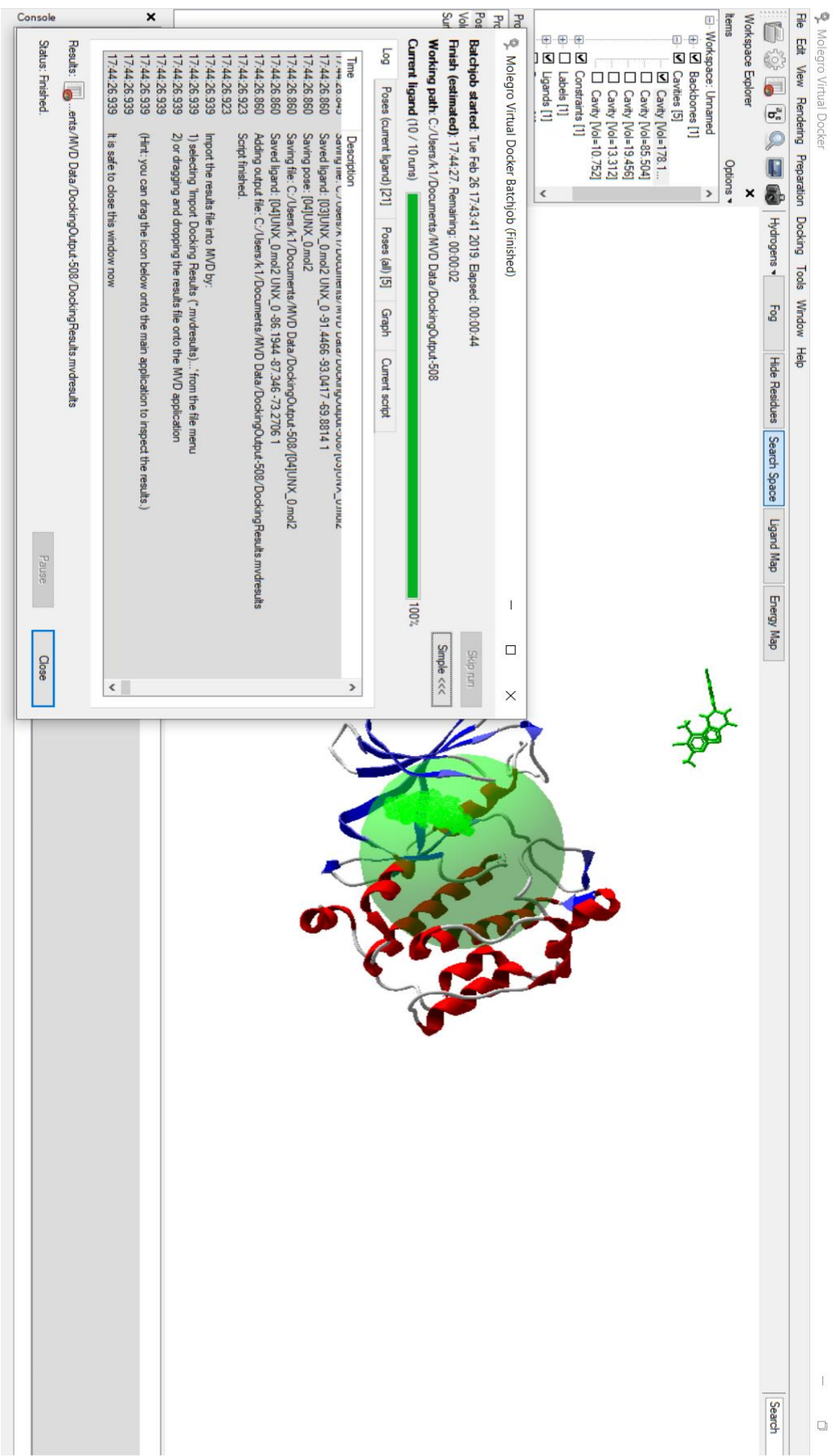
Console

Time	Description
13:16:19.000	Building secondary structure: 3d ucpa, min 4.1 requires
13:16:19.985	PDB Parser: converted residue(s) UNX_0 [7 atoms] from ATOM to HETATM.
13:16:20.102	Parser warnings found during import. Please inspect the warnings tab.
13:16:21.933	Preparing UNX_0 from file: F:\Information\Information\ligand-opt\3b.gff.pdb
13:16:36.281	Applying new changes...
13:16:36.282	Visualization or color scheme has changed. Rebuilding molecules.
15:42:21.143	273 residue label(s) added for molecule: SC10 [8]

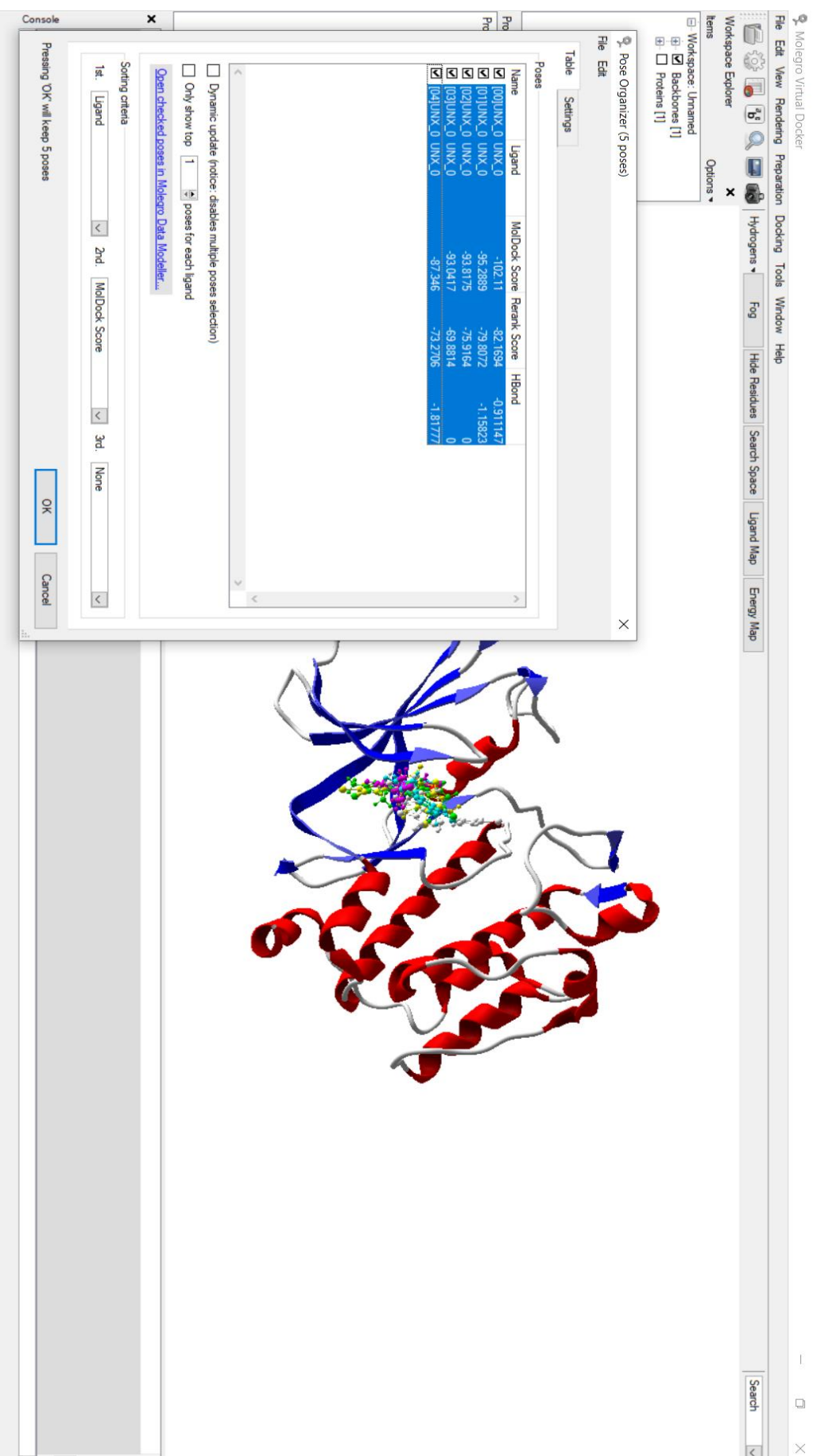
شکل ۷-۲: حذف لیبل‌بندی لیگاند و پروتئین



شکل ۹-۲: محل برهمکنش لیگاند و پروتئین



شکل ۱۰-۲: وارد کردن نتایج حاصل از برهمکنش درون نرم افزار MolScribe



شکل ۱-۲: نتایج حاصل از داکینگ و برهمکنش آنها به صورت دو بعدی



شکل ۲-۱: نمایش سطح انرژی و باندهای هیدروژنی بدست آمده از فرآیند داکینگ

۲-۵-۱- انحراف از جذر میانگین مربعات

انحراف از جذر میانگین مربعات یا RMSD، کمیتی است که معمولاً برای مقایسه‌ی دو پیکربندی به کار گرفته می‌شود. این کمیت برای همه‌ی اتم‌های یک مولکول در یک زمان خاص نسبت به یک حالت مرجع (که معمولاً ساختار اولیه است) از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{RMSD} = \left[\frac{1}{M} \sum_{i=1}^N |r_i(t) - r_i^{\text{ref}}|^2 \right]^{1/2} \quad (1-2)$$

در این معادله M ، m_i و r_i به ترتیب بیانگر جرم هر اتم، مجموع جرم همه‌ی اتم‌های مولکول و موقعیت مکانی هر اتم می‌باشد. هرچقدر مقدار RMSD کمتر باشد پیکربندی پروتئین شباهت بیشتری به پیکربندی مرجع دارد. RMSD برای همه‌ی اتم‌های پروتئین و یا برای بدنه‌ی اصلی آن (شامل کربن آلفا، نیتروژن و کربنی که زنجیر اصلی پروتئین را تشکیل می‌دهند) محاسبه می‌شود که مسلماً اگر برای همه‌ی اتم‌ها محاسبه گردد مقدار بزرگتری حاصل می‌گردد. تجزیه و تحلیل RMSD پروتئین، اطلاعات مفیدی در زمینه‌ی تغییرات پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی در اختیار قرار می‌دهد. برای مثال با استفاده از نمودارهای RMSD و مشاهده‌ی میزان افت و خیزهای اتم‌ها در طول زمان، هرگونه تغییر در ساختارهای مختلف پروتئین قابل شناسایی خواهد بود. برای این منظور ابتدا نمودار RMSD پروتئین تنها (بدون حضور لیگاندها) و سپس RMSD پروتئین در حضور این لیگاندها به عنوان تابعی از زمان رسم شدند. ریشه‌ی متوسط مجذور افت و خیزها^۱ متوسط‌گیری زمانی بر روی موقعیت‌های مکانی یک ذره می‌باشد. این کمیت با استفاده از معادله‌ی زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{RMSF} = \left[\frac{1}{T} \sum_{j=1}^t |r_i(t_j) - r_i^{\text{ref}}|^2 \right]^{1/2} \quad (2-2)$$

در این معادله t محدوده‌ی زمانی است که متوسط‌گیری در آن محدوده صورت می‌گیرد. r_i^{ref} نیز موقعیت مکانی مرجع ذره‌ی مورد نظر است. تفاوت RMSD و RMSF در این است که RMSF متوسط

¹ - Root Mean Square Fluctuations

گیری بر روی کل زمان و برای هر اتم انجام می‌شود ولی در RMSD متوسط‌گیری روی همه‌ی اتم‌ها و در هر لحظه صورت می‌گیرد.

۲-۵-۲- پیوند هیدروژنی

پیوند هیدروژنی، یکی از نیروهای اصلی است که باعث برقراری اتصال بین دو ترکیب می‌شود. بنابراین از مسائل مورد توجه در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، محاسبه‌ی پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و لیگاند است.

۲-۵-۳- محاسبه انرژی آزاد پیوندی به روش مکانیک مولکولی مساحت سطح

تعمیم یافته‌ی بورن^۱

روش‌های محاسباتی که بیشترین استفاده را در طراحی دارو دارند، داکینگ و امتیازدهی می‌باشند. در این روش، شیوه‌ی اتصال دارو و انرژی پیوندی پیش‌بینی می‌شود. این روش اگرچه کارآمد بوده ولی دقت آن به اندازه کافی زیاد نیست. بنابراین بهتر است برای محاسبه‌ی انرژی پیوندی از روش‌های دیگری نیز استفاده گردد. در این رساله، انرژی‌های آزاد پیوندی با استفاده از روش مکانیک مولکولی مساحت سطح تعمیم یافته‌ی بورن (MMGBSA) محاسبه گردید. در این روش، انرژی آزاد اتصال لیگاند با در نظر گرفتن انرژی‌های حلال‌پوشی مولکول‌های برهمکنش‌کننده همراه با انرژی‌های مکانیک مولکولی محاسبه می‌شود. همچنین، این روش برای روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و برپایه‌ی برهمکنش لیگاند و پروتئین به کار گرفته می‌شود. به طور کلی انرژی‌های آزاد پیوندی در فاز متراکم توسط روابط زیر محاسبه می‌گردند:

$$\Delta G_{\text{bind}} = G_{\text{Complex}} - (G_{\text{Protein}} + G_{\text{Ligand}}) \quad (۳-۲)$$

$$\Delta G_{\text{bind}} = \Delta G_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{SOLV}} - T\Delta S \quad (۴-۲)$$

$$\Delta G_{\text{gas}} = \Delta G_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{Vdw}} \quad (۵-۲)$$

$$\Delta G_{\text{nonpolar sol}} = \gamma \text{SASA} + b \quad (۶-۲)$$

^۱- MMGBSA

ΔG_{bind} به عنوان اختلاف در انرژی آزاد بین حالت های پیوندی و غیرپیوندی سیستم تعریف می شود. ΔG_{gas} ، مجموع انرژی های آزاد مکانیک مولکولی، به دو بخش پتانسیل الکتروستاتیکی (ΔG_{ele}) و پتانسیل واندروالسی ΔG_{vdw} طبقه بندی می شود. ΔG_{ele} با استفاده از قانون کولن و بارهای اتمی بدست آمده از میدان نیروی مکانیک مولکولی محاسبه می شود. انرژی آزاد حلال پوشی (ΔG_{solv}) هم خود شامل بخش های انرژی آزاد حلال پوشی قطبی ($\Delta G_{ele,sol}$) و انرژی آزاد حلال پوشی غیرقطبی ($\Delta G_{nonpolar,sol}$) است. جمله ی مربوط به انرژی آزاد حلال پوشی قطبی که در حقیقت انرژی الکتروستاتیک بین حلال و حل شونده را نشان می دهد. $\Delta G_{nonpolar,sol}$ از معادله (۲-۶) محاسبه می گردد که در آن SASA، سطح در دسترس حلال بر حسب آنگستروم است که در این تحقیق با استفاده از برنامه Molsurf محاسبه گردید. مقادیر ثابت های تجربی γ و b به ترتیب برابر با $^{-1}$ و 0.0072 kcal/mol و $92 \text{ kcal/mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ قرار داده شد. ایراد اصلی که به روش MMGBSA وارد می شود این است که سهم آنتروپی را در محاسبه انرژی آزاد پیوندی در نظر نمی گیرند و برای محاسبه این سهم باید از روش های دیگری بهره جست. در این رساله تجزیه و تحلیل مد نرمال با استفاده از مدول^۱ nabnmode در نرم افزار امبر ۱۶ به کار گرفته شد تا سهم آنتروپی پیکربندی را، که ناشی از تغییر درجات آزادی انتقالی، چرخشی و ارتعاشی است در انرژی آزاد پیوندی کل محاسبه کند. در نهایت جملات مختلف انرژی پیوندی علاوه بر انرژی آزاد پیوندی کل برای هر اجرای شبیه سازی با استفاده از فایل مسیر حرکت محاسبه شدند.

۲-۶- معرفی نرم افزار امبر و پارامترهای آن

از آنجایی که روش های داکینگ مولکولی اطلاعاتی در مورد شیوه های اتصال، انرژی های آزاد اتصال و خواص جایگاه پیوندی پروتئین در اختیار قرار نمی دهد، بنابراین از روش های دینامیک مولکولی استفاده می گردد. همچنین با استفاده از روش دینامیک مولکولی، سیستم به تعادل می رسد. با به کارگیری این محاسبات، علاوه بر اینکه اطلاعات ارزشمندی در مورد دینامیک ساختاری آنزیم

¹- Module

5C1Q و جایگاه پیوندی آن در اثر اتصال لیگاند در طول یک زمان مشخص بدست آمد، اعتبار شیوه‌های اتصال لیگاندها را که از محاسبات داکینگ مولکولی بدست آمدند نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این پژوهش، تمام محاسبات شبیه‌سازی با استفاده از نرم‌افزار Amber16 انجام گرفت. Amber تنها یک بسته نرم‌افزاری دینامیک مولکولی نیست بلکه شامل مجموعه‌ای از نرم‌افزارهای متعددی است که با یکدیگر فعالیت می‌کنند تا محاسبات شبیه‌سازی از آماده‌سازی فایل‌های ورودی لازم تا تحلیل نتایج، به درستی انجام گیرد. بسته نرم‌افزاری Amber در طول زمان دچار تغییرات فراوانی گشته که منجر به بهبود کارایی بخش‌های مختلف آن شده است. یک تغییر مهم در ساختار آن، جداسازی این بسته به دو مجموعه Amber و Ambetools است. بسته نرم‌افزاری Amber شامل سه موتور مختلف شبیه‌سازی دینامیک مولکولی sander، pmed و pmed cuda است که رایگان نمی‌باشند. مجموعه Ambetools به طور کلی شامل: میدان‌های نیرو، ابزارهای آماده‌سازی، ابزارهای شبیه‌سازی و ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج بوده که هرکدام به اختصار توضیح داده می‌شوند.

۲-۶-۱- میدان‌های نیرو

میدان‌های نیروی Amber به عنوان بخشی از Ambetools در سال‌های اخیر بسیار توسعه یافته‌اند. امبر در حال حاضر، گستره وسیعی از میدان‌های نیرو را شامل می‌شود که از میان آنها می‌توان به میدان نیروهای ff10، ff99SB، ff12S، charm، Lipid11، GAFF، Amoeba و ZAFF اشاره کرد.

۲-۶-۲- ابزارهای آماده‌سازی

Amber tools شامل گستره‌ای از ابزارهای آماده‌سازی است که برای همکاری با یکدیگر طراحی شده‌اند. از کلیدی‌ترین این ابزارها می‌توان به Leap و Antechamber اشاره کرد که در ادامه به آنها اشاره می‌شود.

Leap - ۱-۲-۶-۲

به واحدی از برنامه‌ها گفته می‌شود که می‌تواند برای تولید فایل‌های ورودی با بسته نرم‌افزاری Amber استفاده گردد.

در حال حاضر دارای نسخه خط فرمانی^۱ tleap و نسخه خط فرمانی - ویرایشی^۲ xleap می‌باشد. این دو نسخه کاملاً با هم برابر و دارای کدهای یکسانی هستند و تنها از نظر نحوه استفاده با هم متفاوتند.

Antechamber - ۲-۲-۶-۲

به مجموعه‌ای از ابزارها برای تولید فایل‌های مقدماتی مولکول‌های آلی گفته می‌شود. این مجموعه برای استفاده با میدان نیروی GAFF طراحی شده است و به طور خودکار نوع اتم‌ها را تعیین کرده و تلاش می‌کند که پارامترهای مفقود شده را تولید کند. گستره وسیعی از فرمت‌های فایل‌های ورودی را می‌شناسد و برای پروتئین‌هایی که دارای لیگاندهای آلی هستند فایل‌های خروجی آن را به گونه‌ای تغییر داده که توسط Leap قابل خواندن باشد.

۳-۶-۲- ابزارهای شبیه‌سازی

از جمله این ابزارها، می‌توان به NAB^۳ که برای ایجاد تغییرات در ماکرومولکول‌ها و اجزای آنها طراحی شده است اشاره کرد. همچنین برخی محاسبات میدان نیرو مانند دینامیک مولکولی، کمینه‌سازی و تجزیه و تحلیل مد نرمال^۴ نیز توسط NAB می‌تواند صورت بگیرد.

۴-۶-۲- ابزارهای تجزیه و تحلیل نتایج با نرم‌افزار امبر

گستره‌ای از ابزارهای جانبی بوده که تجزیه و تحلیل نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی را انجام داده و قسمتی از Amber tools را تشکیل می‌دهند که شامل:

^۱- Command Line Program Termed

^۲- Command Line Editor Termed

^۳- Nucleic Acid Builder

^۴- Normal Mode Analysis

PTRAJ - ۱-۴-۶-۲

ابزار اصلی تجزیه و تحلیل تراژکتوری در Amber بوده که قادر است انواع زیادی از تجزیه و تحلیل‌ها را انجام دهد.

نسخه موازی‌سازی شده این ابزار تحت عنوان ptraj.MPI نیز در دسترس می‌باشد.

CPPTRAJ - ۲-۴-۶-۲

به زبان برنامه‌نویسی C++ نوشته شده است. cpptraj نیز می‌تواند به صورت موازی اجرا شود. اما در مجموع کارایی آن از ptraj بالاتر است.

PBSA - ۳-۴-۶-۲

بسته‌ای شامل ابزارهای گوناگون برای حل عددی معادلات خطی و غیر خطی و در کاربردهای گوناگون به کار گرفته می‌شود. نسخه موازی آن نیز با عنوان pbsa.MPI در دسترس است.

MMGBSA - ۴-۴-۶-۲

روشی برای محاسبه انرژی آزاد پیوندی می‌باشد. در حال حاضر Amber دارای دو اسکریپت برای اجرای آنها می‌باشد: mmpbsa.P1 که با زبان برنامه‌نویسی Perl و mmpbsa.py و با زبان برنامه‌نویسی Python نوشته شده است.

بعد از معرفی برنامه‌ها و نرم‌افزارهای امبر که اشاره شد بایستی بتوان به کمک این ویژگی‌ها و خصوصیتی که از نرم‌افزار حاصل می‌گردد، داروهای مرحله‌ی قبل که توسط نرم‌افزار مولکرو بدست آمدند را شبیه‌سازی کرد و به کمک نرم‌افزار محاسبات را انجام داد. این نرم‌افزار برای ساخت مدل‌هایی برای جداسازی سطح انرژی و همچنین یک مجموعه چند برنامه‌ای برای شبیه‌سازی‌های ماکرومولکولی می‌باشد. تحقیقات ما به این صورت است که با Amber16 و آخرین به‌روزرسانی از AmberTools16 که شامل برنامه‌هایی مانند xleap می‌باشد به راه‌اندازی شبیه‌سازی خود کمک کنیم. هندسه لیگاند که از نتایج داکینگ و به کمک نرم‌افزار امبر بدست آمد، به عنوان کانفورماسیون آغازین در شبیه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت و انرژی اتصال با روش MMGBSA بدست آمد. از

جمله مزایای روش MMGBSA این است که اختلاف انرژی بین حالت‌های موجود بین پروتئین - لیگاند را بررسی می‌کند و همچنین به اعتبارسنجی و منطقی کردن تجربیات آزمایشگاهی و برای بهبود نتایج انرژی داکینگ، آماده‌سازی پروتئین - لیگاند مورد استفاده قرار بگیرد. در نهایت دارویی با بیشترین انرژی اتصال از محاسباتی که توسط نرم‌افزار امبر صورت می‌گیرد مشخص و برای درمان سرطان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲-۷- پارامترهای مورد استفاده در شبیه‌سازی

در این رساله، تمام محاسبات شبیه‌سازی با استفاده از بسته‌ی نرم‌افزاری AMBER16 انجام گرفت. ساختار کریستالوگرافی پروتئین با کد 5C1Q از بانک داده‌های پروتئین گرفته شد. هندسه لیگاند که از نتایج داکینگ بدست آمد، به عنوان کانفورماسیون آغازی در شبیه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت. بارهای جزئی مولیکن اتم‌های لیگاند به روش (HF) محاسبه و سپس با روش پتانسیل الکتریکی محدود شده در نرم‌افزار جانبی آنتی‌چمبر و در سطح محاسباتی B3LYP/6-31G(d) انجام گرفت. برای دیگر پارامترهای میدان نیروی لیگاند (پیوندی و غیرپیوندی) از پارامترهای پیشنهادی آنتی‌چمبر و GAFF استفاده شد. از میدان‌های نیرو Amber ff99SB برای فراهم کردن پارامترهای پروتئین استفاده شد. با استفاده از AMBER16، اتم‌های هیدروژن به سیستم اضافه گردید. سیستم در یک جعبه مکعبی به ابعاد ۱۰ آنگستروم که حاوی مولکول‌های آب با مدل TIP3P است حل شد. سامانه‌های حاصل توسط موتور شبیه‌سازی PMEMD در AMBER16 شبیه‌سازی شدند. تمام محاسبات ما در مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه انجام گرفت [۹۴].

فصل سوم

بحث و نتیجه گیری

۳-۱- نتایج تجزیه و تحلیل برهمکنش تعدادی از مشتقات PTZL به عنوان مهارکننده با آنزیم 5C1Q

۳-۱-۱- مطالعه برهمکنش PTZL و شانزده مشتق آن به روش داکینگ مولکولی

در بخش اول این پایان نامه، برهمکنش ۱۶ داروی مهارکننده با پروتئین آنزیم 5C1Q به روش داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. این مشتقات، شناسایی و سنتز شده و فعالیت مهارکنندگی آنها بر روی آنزیم 5C1Q، به صورت تجربی بدست آمده است، لذا تجزیه و تحلیل برهمکنش این مشتقات با آنزیم 5C1Q به منظور یافتن ارتباط بین ساختار و فعالیت آنها می تواند منجر به طراحی ترکیبات جدید با کارایی و عملکرد بالاتر گردد. علاوه بر آن، شیوه های اتصال، انرژی های پیوندی، تعداد پیوندهای هیدروژنی و گروه های عاملی ضروری شرکت کننده در برهمکنش نیز گزارش شده اند.

۳-۱-۲- مقایسه ثابت مهارکنندگی (IC_{50}) با انرژی اتصال بدست آمده

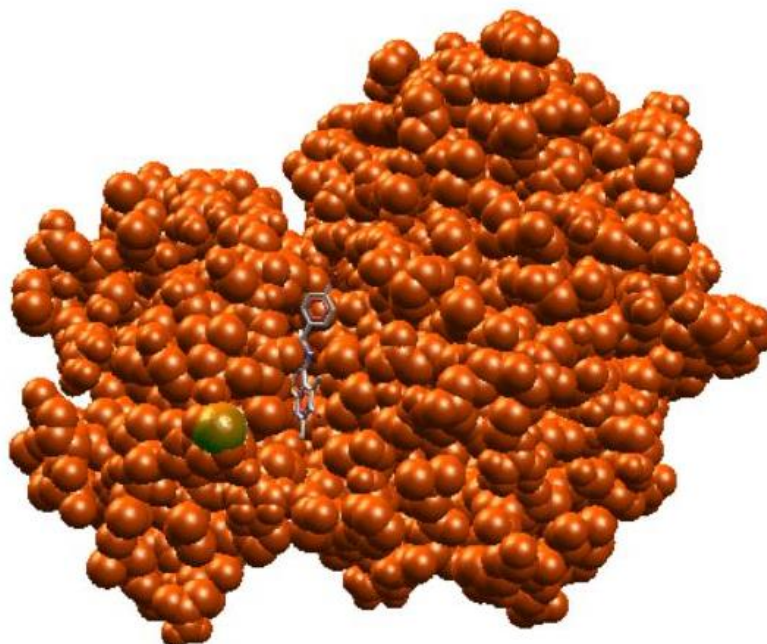
جدول (۳-۱) نام و ساختار شیمیایی مشتقات از پیش سنتز شده PTZL را نشان می دهد که انرژی اتصال و ثابت مهارکنندگی آنها برای مهار آنزیم 5C1Q در جدول (۳-۱) نشان داده و با هم مقایسه شده اند.

جدول ۳-۱: مقایسه انرژی های اتصال و ثابتهای مهارکنندگی داروها با پروتئین 5C1Q [۹۵]

داروها	(kcal/mol) انرژی اتصال	(IC_{50}) ثابت مهارکنندگی تجربی
۱	-۸۳	۰/۹۶
۲	-۹۶	۰/۰۶
۳	-۹۲	۰/۱۴
۴	-۸۱	۱/۳۴
۵	-۹۳	۰/۰۶
۶	-۸۹	۱/۰۰
۷	-۹۲	۰/۰۸
۸	-۸۴	۱/۱۷

۹	-۸۱	۰/۹۳
۱۰	-۹۵	۰/۱۰
۱۱	-۸۱	۱/۰۸
۱۲	-۷۶	۱/۷۶
۱۳	-۹۳	۰/۰۸
۱۴	-۹۵	۰/۱۰
۱۵	-۸۸	۰/۵۲
۱۶	-۸۹	۰/۲۲

طبق محاسباتی که بر روی انرژی اتصال داروها توسط روش داکینگ و نرم‌افزار Molgero انجام گرفت، مشخص گردید که داروی (۲) هم از لحاظ تجربی و نظری به عنوان قوی ترین دارو به شمار می رود. لذا این دارو به عنوان مرجع جهت شناسایی ترکیبات مشابه مورد بررسی بیشتر قرار گرفت. در شکل (۳-۱)، نحوه‌ی جایگیری داروی ۲ با پروتئین 5C1Q را نشان می‌دهد.



شکل ۳-۱: ساختار پروتئین 5C1Q همراه با داروی مورد نظر در جایگاه اختصاصی توسط نرم‌افزار Molgero

در جداول (۲-۳) تا (۱۷-۳)، انرژی و موقعیت اسیدآمینه‌های فعال مربوط به هر دارو که در نزدیک‌ترین فاصله به جایگاه فعال پروتئین قرار دارند گزارش شده‌اند.

جدول ۲-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۴/۰۰
5C1Q[B]	Glu	۱۷۱	-۱۰/۶۸
5C1Q[B]	Lys	۱۶۹	-۹/۲۰
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۸/۴۲

جدول ۳-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۲)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۲۱/۹۰
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۶/۸۸
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۵/۶۰

جدول ۴-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۳)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۶/۹۶
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۱۵/۵۵
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۴/۸۰

۵-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۴)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۱۵/۶۰
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۷/۰

۶-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۵)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۶/۷۴

۷-۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۶)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۷/۱۷
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۱۵/۳۸
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۶/۴۴

جدول ۳-۸: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۷)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۱۴/۷۸
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۶/۵۳
5C1Q[B]	Glu	۱۷۱	-۴/۶۵

جدول ۳-۹: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۸)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۲۱/۷۷
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۱/۱۱
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۱/۵۴

جدول ۳-۱۰: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۹)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۳/۰۴
5C1Q[B]	Lys	۱۷۱	-۶/۲۲
5C1Q[B]	Ile	۱۰۴	-۵/۳۸

جدول ۳-۱۱: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۰)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Ile	۱۸۵	-۲۱/۴۴۰

جدول ۳-۱۲: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۱)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۰/۵۰
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۷/۳۴
5C1Q[B]	Ile	۱۰۴	-۶/۵۷
5C1Q[B]	Glu	۸۹	-۲/۱۴

جدول ۳-۱۳: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۲)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۵/۵۰
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۶/۱۷

جدول ۳-۱۴: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۳)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	انرژی اتصال باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۱۰/۲۸
5C1Q[B]	Leu	۱۲۰	-۷/۱۸
5C1Q[B]	Val	۵۲	-۴/۶۰

5C1Q[B]	Phe	۱۸۷	-۱/۳۶
5C1Q[B]	Ile	۱۰۴	-۰/۳۳

جدول ۳-۱۵: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۴)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	(kcal/mol) انرژی اتصال باقیمانده
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۵/۰۵
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۱۰/۷۰
5C1Q[B]	Leu	۱۲۰	-۱۰/۰۷
5C1Q[B]	Ile	۱۰۴	-۴/۹۰
5C1Q[B]	Val	۵۲	-۳/۰۳
5C1Q[B]	Phe	۱۸۷	-۱/۷۵

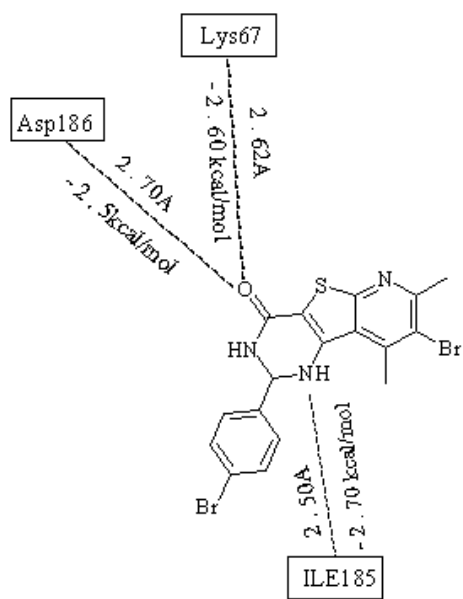
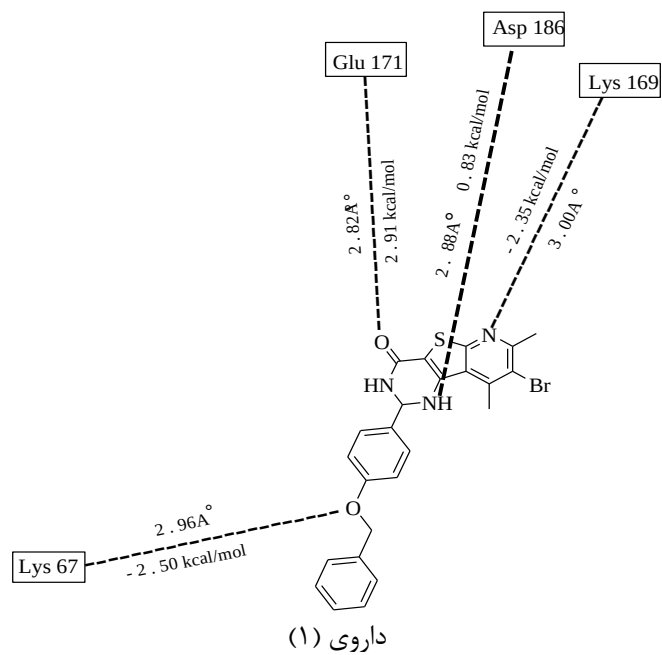
جدول ۳-۱۶: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۵)

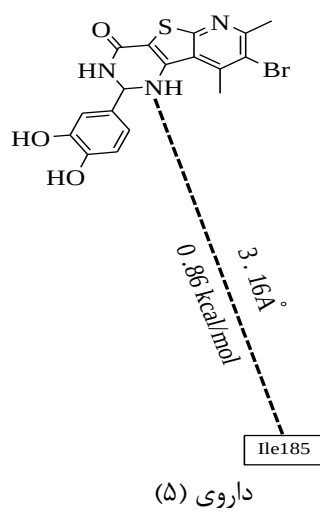
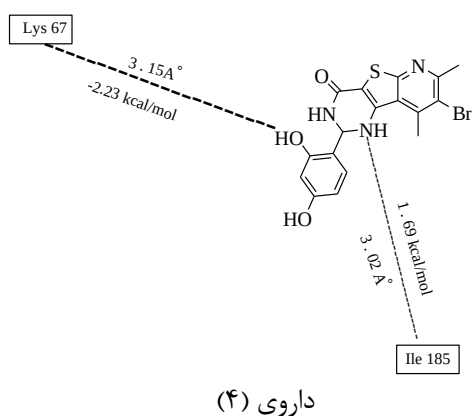
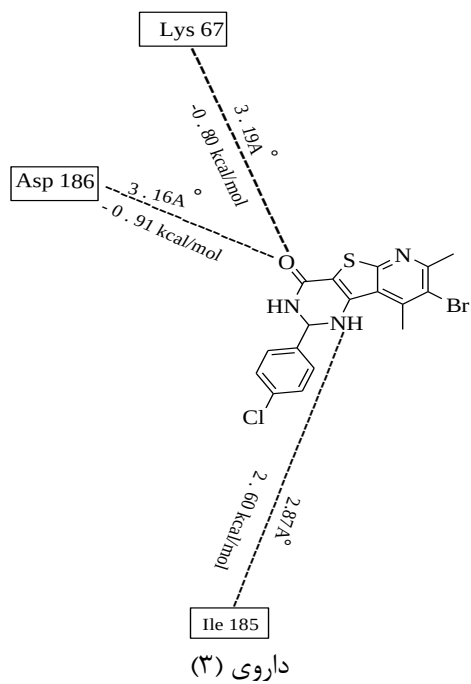
مولکول	موقعیت	باقیمانده	(kcal/mol) انرژی اتصال باقیمانده
5C1Q[B]	Asp	۱۸۶	-۱۳/۲۴

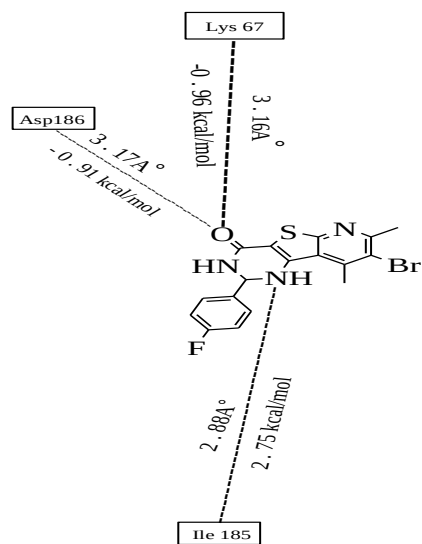
جدول ۳-۱۷: مقادیر انرژی اسیدهای آمینه مربوط به دارو شماره (۱۶)

مولکول	موقعیت	باقیمانده	(kcal/mol) انرژی اتصال باقیمانده
5C1Q[B]	Val	۵۲	-۴/۸۳
5C1Q[B]	Lys	۶۷	-۳/۵۲

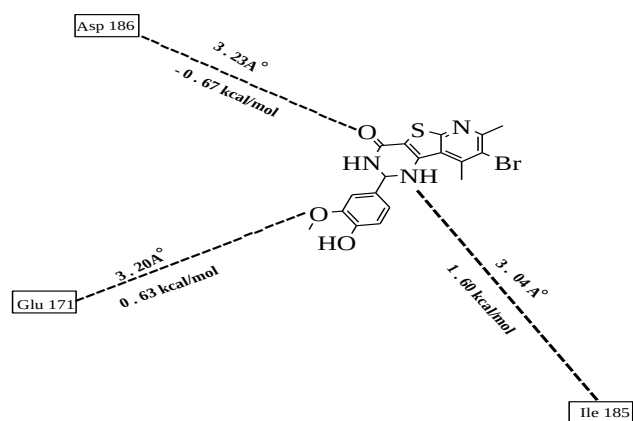
مکان فعال آنزیم با داروهای مختلف آنالیز شد و نتایج حاصل از جداول (۲-۳) تا (۱۷-۳) نشان می‌دهد که داروی ۲ با اسیدآمینه Ile185 سهم اتصال قوی‌تر و برهم‌کنش بهتری را در جایگاه فعال پروتئین برقرار می‌کند ولی اسیدآمینه Lys67 آن از اتصال ضعیف‌تری برخوردار است. همچنین، داروهای ذکر شده از نظر گروههای عاملی و پیوندهای هیدروژنی مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص گردید که هرچقدر تعداد پیوندهای هیدروژنی بیشتر و طول پیوند کوتاهتر باشد، پیوند قوی‌تر و به عنوان ترکیب برتر در برهم‌کنش با پروتئین مشارکت می‌کند شکل (۲-۳).



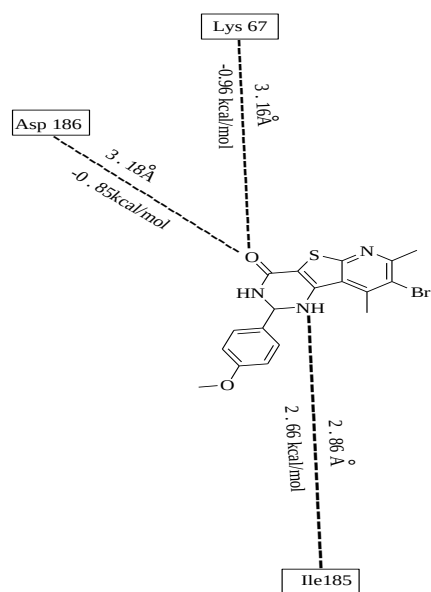




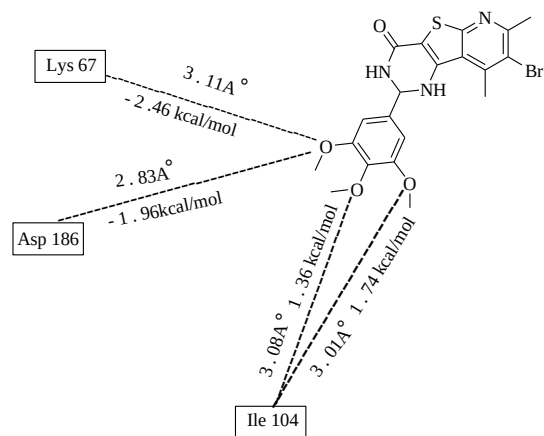
داروی (۶)



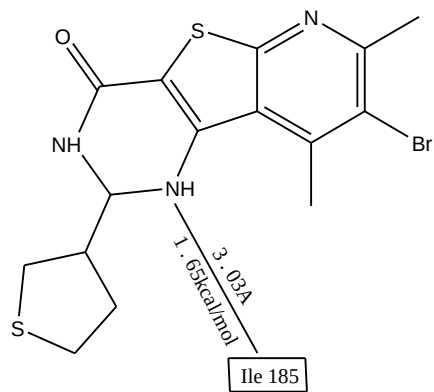
داروی (۷)



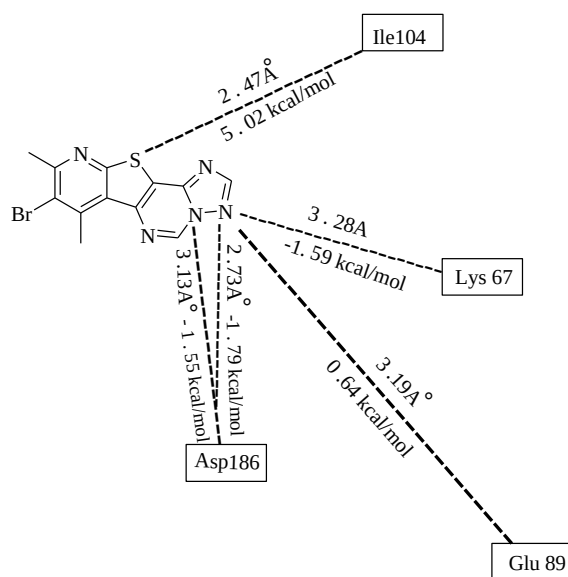
داروی (۸)



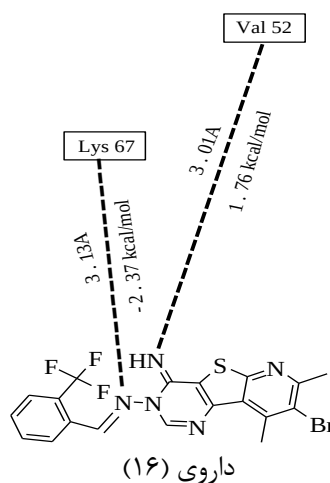
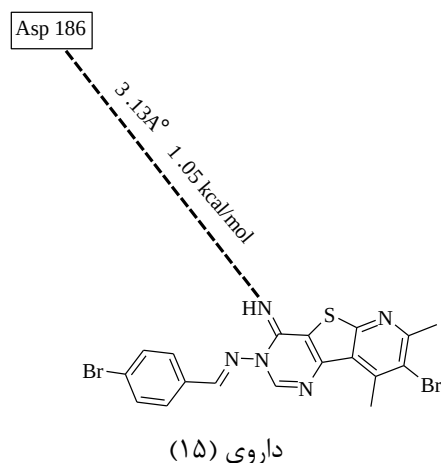
داروی (۹)



داروی (۱۰)



داروی (۱۱)



شکل ۲-۳: برهمکنش داروها با پروتئین و نحوه نمایش گروه‌های عاملی و پیوندهای هیدروژنی آنها

با توجه به نتایجی که از شکل‌های (۲-۳) مربوط به داروها بدست آمد، مشخص گردید که داروی ۲ به دلیل ایجاد پیوند هیدروژنی با Lys67، Asp186 و Ile185 طول پیوند هیدروژنی کوتا‌تر (آنگستروم) و قدرت پیوند بالایی (کیلوکالری بر مول) را نسبت به مقادیر مربوط به اسیدهای آمینه داروها در جایگاه فعال پروتئین برقرار می‌کند که با توجه به این ویژگی‌ها از بین داروها انتخاب و پیوندهای هیدروژنی آن با داروها مقایسه گردید که در شکل (۲-۳) به وضوح مشخص است.

در جدول (۳-۱۸)، بالاترین میزان سهم انرژی اتصال اتمی مربوط به هر باقیمانده در اطراف داروها نشان داده شده و با داروی ۲ مقایسه شده‌اند.

جدول ۳-۱۸: مقایسه سهم انرژی اتصال اتمی باقیمانده مربوط به هر دارو

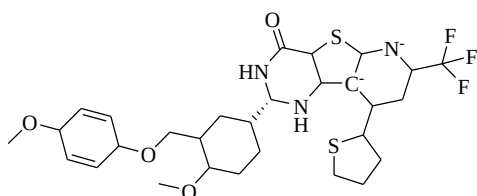
پروتئین	داروها	باقیمانده	شماره باقیمانده	اتم	انرژی باقیمانده (kcal/mol)
5C1Q[B]	۱	Leu	۱۶۹	N	-۵/۰۸۹۳
5C1Q[B]	۲	Ile	۱۸۵	C	-۵/۱۷۳۰۶
5C1Q[B]	۳	Ile	۱۸۵	C	-۴/۵۶۷۲۴
5C1Q[B]	۴	Ile	۱۸۵	C	-۴/۳۵۸۶۶
5C1Q[B]	۵	Glu	۸۹	O	-۳/۵۹۸۲۵
5C1Q[B]	۶	Ile	۱۸۵	C	-۴/۵۵۰۶۳
5C1Q[B]	۷	Leu	۱۷۴	C	-۵/۰۲۹۴۱
5C1Q[B]	۸	Asp	۱۸۶	C	-۲/۴۳۳۱۸
5C1Q[B]	۹	Ile	۱۸۵	C	-۴/۹۶۵۲۸
5C1Q[B]	۱۰	Ile	۱۸۵	C	-۴/۸۸۳۴۷
5C1Q[B]	۱۱	Lys	۶۷	N	-۵/۱۳۱۳۳
5C1Q[B]	۱۲	Asp	۱۸۶	N	-۵/۱۷۱۰۲
5C1Q[B]	۱۳	Lys	۶۷	C	-۵/۰۵۱۹۹
5C1Q[B]	۱۴	Lys	۶۷	N	-۴/۶۵۰۲۹
5C1Q[B]	۱۵	Phe	۴۹	C	-۵/۰۸۱۴۸
5C1Q[B]	۱۶	Phe	۴۹	C	-۵/۰۴۳۷۹

نتایجی که بر روی اسیدآمین‌های داروها صورت گرفت، حاکی از این بود که آمینواسید Ile185 داروی ۲، دو پیوند هیدروژنی با اتم‌های اکسیژن و کربن پروتئین برقرار کرده و از سطح انرژی بالایی برخوردار است. همچنین در مقایسه با سایر آمینواسیدها، برهمکنش مناسب‌تری را با جایگاه فعال پروتئین برقرار می‌کند.

۳-۲- تجزیه و تحلیل مطالعه برهمکنش مجموعه‌ای از مشتقات PTZL با آنزیم 5C1Q به روش غربالگری مجازی

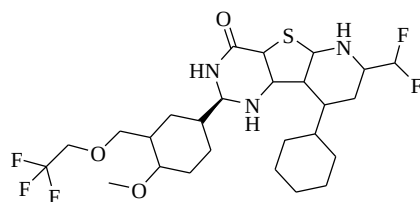
مشتقات PTZL برای مهار آنزیم 5C1Q از پایگاه داده‌ی Zinc استخراج گردید و در یک غربالگری اولیه توسط خود پایگاه داده‌ی Zinc، ۲۰۵۴ مشتق که با قانون پنج‌تایی لیپینسکی مطابقت داشتند، جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. ابتدا، شیوه اتصال این داروها با استفاده از نرم‌افزار مولگرو درون جایگاه اتصال پروتئین 5C1Q بررسی و براساس انرژی‌های اتصال پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار، ترکیبات مرتب شدند. سه ترکیب که جایگیری و سطح انرژی بهتری را نسبت به بقیه ترکیبات داشتند انتخاب و برای غربالگری بیشتر توسط نرم‌افزار امبر مورد استفاده قرار گرفتند. ساختار شیمیایی این سه دارو در شکل (۳-۳) نشان داده شده است. در این شکل، ترکیب (الف)، داروی ۱، ترکیب (ب)، داروی ۲ و ترکیب (ج) نیز داروی ۳ را نشان می‌دهد.

(الف)



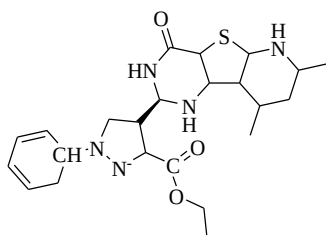
(۲s)-۲-(۴-متوکسی-۳-((۴-متوکسی سیکلوهگزا-۵,۲-دی ان-۱-ایل)اکسی) متیل) سیکلوهگزان-۱-اید-۱-
 ایل)-(۴-اکسو-۹-(تتراهیدروتیوفن-۲-ایل)-۷-(تری فلوئورومتیل) اکتاهیدرو-۷H-پیریدو[۵,۴:۲,۳] تینو [d-۲,۳]
 پیریمیدین-۶,۹a(Ha۵) دی اید

(ب)



(2R) - ۹- سیکلو هگزیل - ۷- (دی فلوئورومتیل) - ۲- ((۱R)) - ۴- متوکسی - ۳- ((۲,۲,۲- تری فلوئورواتوکسی) متیل (سیکلو هگزیل) دکا هیدرو پیریدو [۵,۴:۲,۳] تینو [d-۲,۳] پیریمیدین - ۴ (H۱) - اون

(ج)



(4S) - ۲- (سیکلو هگزا - ۴,۲- دی ان) - ۱- ایل - ۴- ((2R)) - ۹,۷- دی متیل - ۴- اکسود دکا هیدرو پیریدو [۵,۴:۲,۳] تینو [d-۲,۳] پیریمیدین - ۲- ایل - ۵- (اتوکسی کربونیل) پیرازولیدین - ۱- اید

شکل ۳-۳: ساختارهای شیمیایی الف) دارو ۱ (ب) دارو ۲ (ج) دارو ۳ برای مرحله‌ی غربالگری و انتخاب داروی برتر

توسط نرم افزار Amber

۳-۲-۱- تست به تعادل رسیدن شبیه سازی

پس از اتمام شبیه سازی دینامیک مولکولی، ابتدا با توجه به برخی استانداردها اطمینان از صحت شبیه سازی از لحاظ فیزیکی و کیفی ضروری است. یکی از راهها برای بررسی کیفیت شبیه سازی، بررسی همگرایی پارامترهای ترمودینامیکی مثل چگالی، انرژی پتانسیل کل، انرژی کل، فشار و دما می باشد که در ادامه مورد بررسی قرار می گیرند.

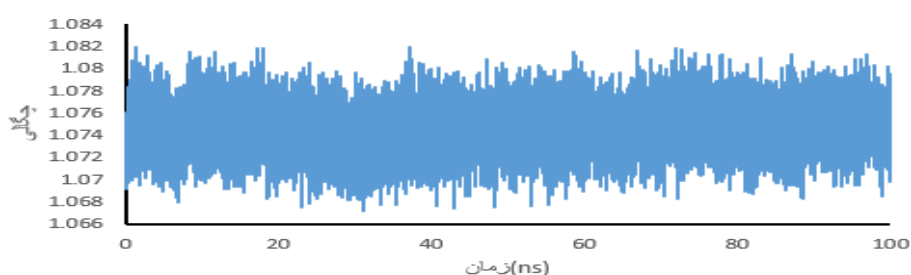
۳-۲-۲- پارامترهای حاصل از بررسی خواص ترمودینامیکی در طول فرآیند

شبیه سازی دینامیک مولکولی

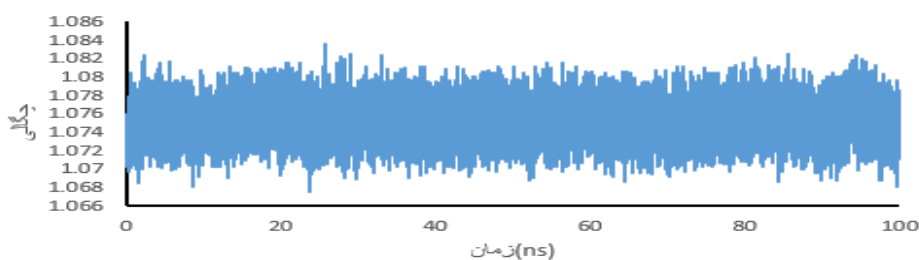
این پارامترها براساس ویژگی هایی که در طول فرآیند شبیه سازی کسب می کنند بررسی می شوند.

شکل‌های ۴-۳ تا ۷-۳ نمودارهای مربوط به چگالی، شکل‌های ۸-۳ تا ۱۱-۳ مربوط به انرژی پتانسیل کل، شکل‌های ۱۲-۳ تا ۱۵-۳ مربوط به انرژی کل، شکل‌های ۱۶-۳ تا ۱۹-۳ مربوط به فشار و همچنین شکل‌های ۲۰-۳ تا ۲۳-۳ مربوط به دما بوده که همه‌ی این پارامترها برحسب زمان (نانوثانیه) برای کمپلکس‌های دارو - پروتئین ترسیم شدند. قابل ذکر است که در این شبیه سازی تعداد فریم‌های بدست آمده ۵۰۰۰۰ عدد بود.

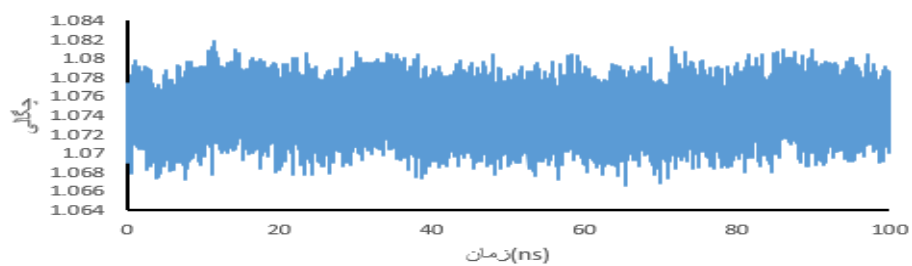
الف) نمودارهای مربوط به چگالی



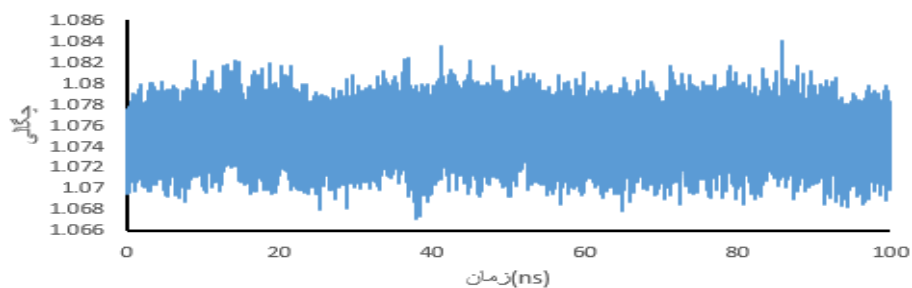
شکل ۳-۴: نمودار چگالی (g/cm^3) دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۵: نمودار چگالی (g/cm^3) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی

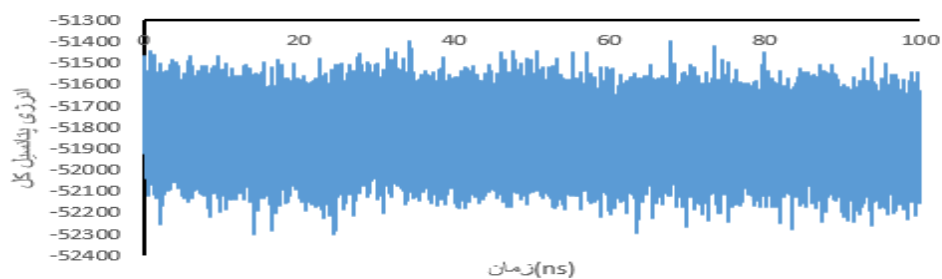


شکل ۳-۶: نمودار چگالی (g/cm^3) دارو ۳ در طی زمان شبیه‌سازی

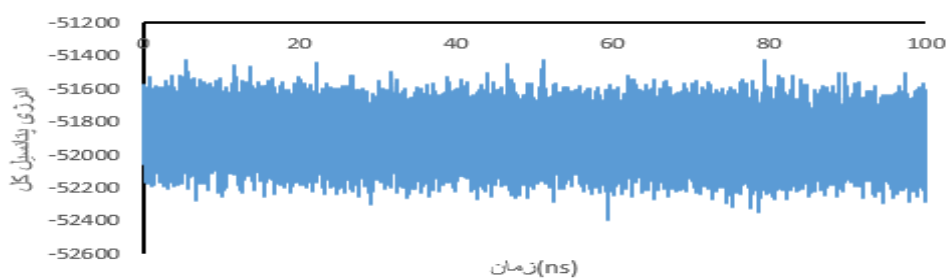


شکل ۳-۷: نمودار چگالی (g/cm^3) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی

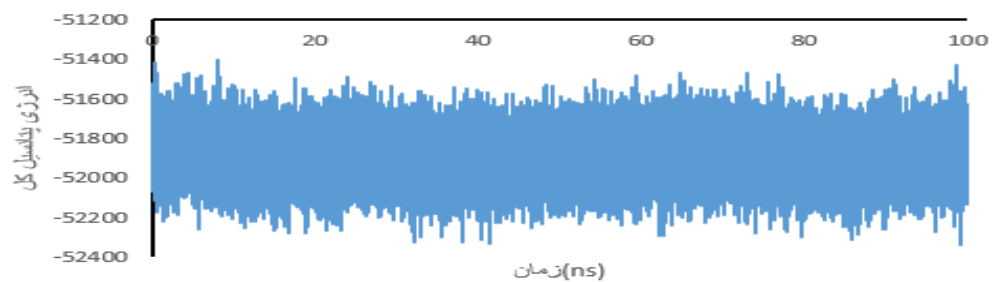
ب) نمودارهای مربوط به انرژی پتانسیل کل



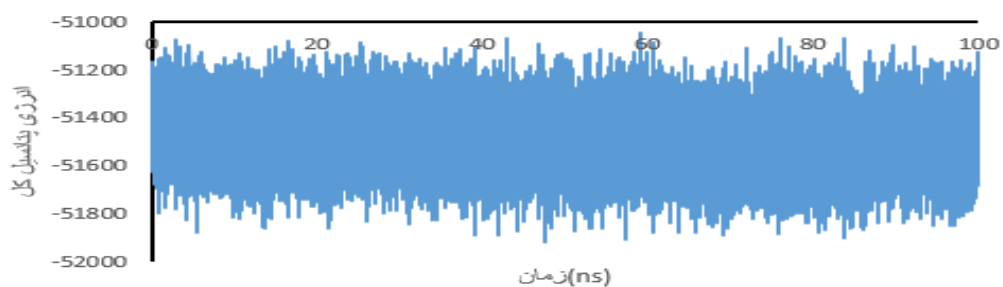
شکل ۳-۸: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۹: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی

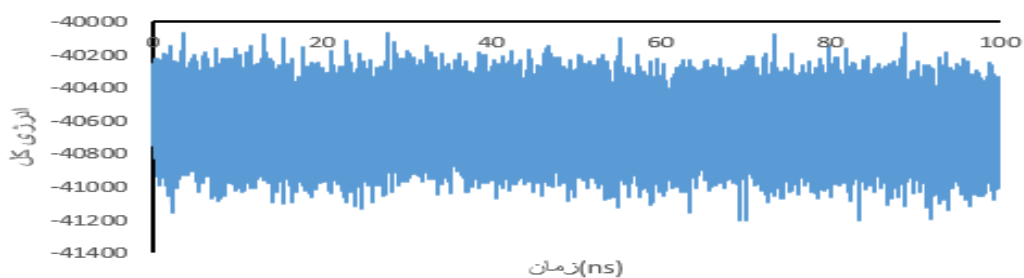


شکل (۳-۱۰): نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) لیگاند ۳ در طی زمان شبیه سازی

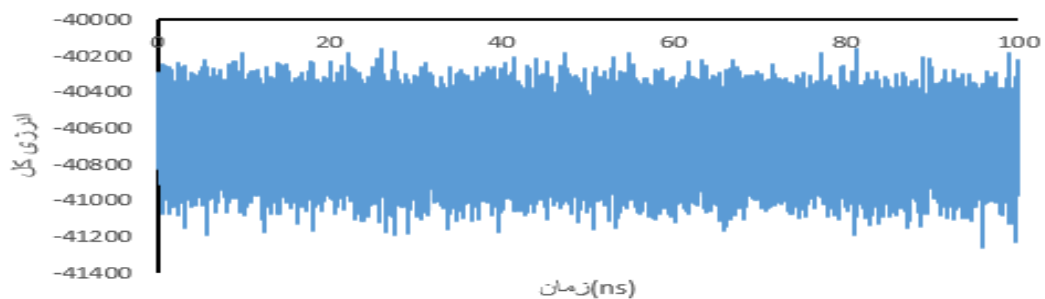


شکل ۳-۱۱: نمودار انرژی پتانسیل کل (kcal/mol) کل پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه سازی

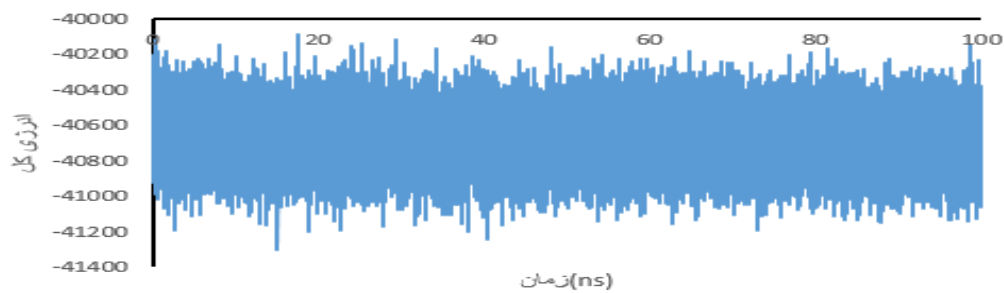
(ج) نمودارهای مربوط به انرژی کل (پیوندی + الکتریکی + جنبشی)



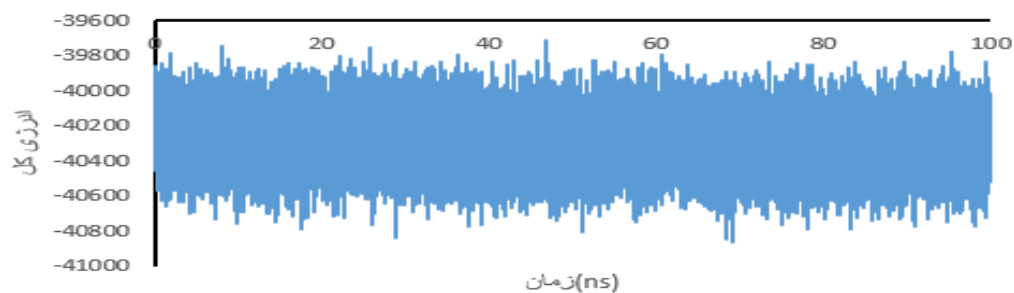
شکل ۳-۱۲: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۱ در طی زمان شبیه سازی



شکل ۳-۱۳: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۲ در طی زمان شبیه سازی

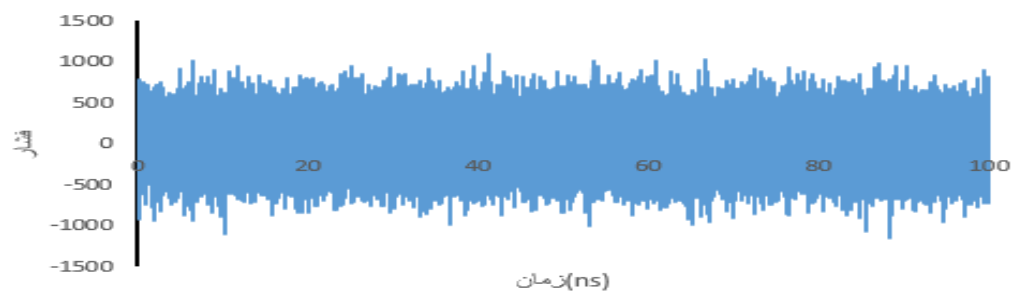


شکل ۳-۱۴: نمودار انرژی کل (kcal/mol) دارو ۳ در طی زمان شبیه‌سازی

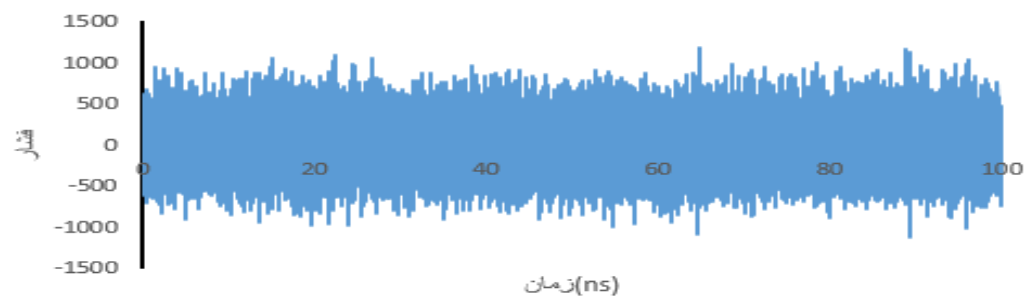


شکل ۳-۱۵: نمودار انرژی کل (kcal/mol) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی

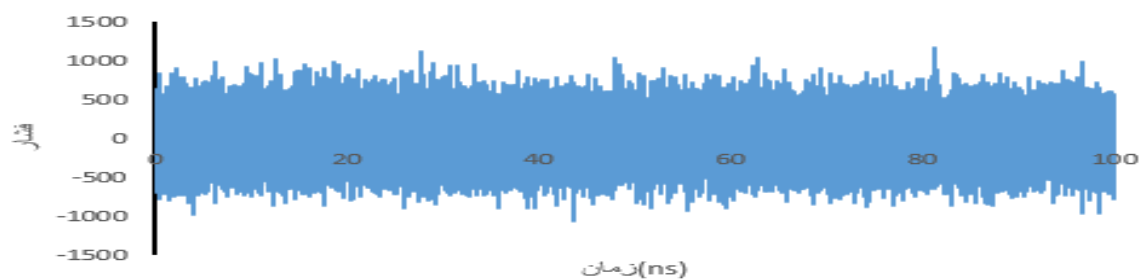
د) نمودارهای مربوط به فشار



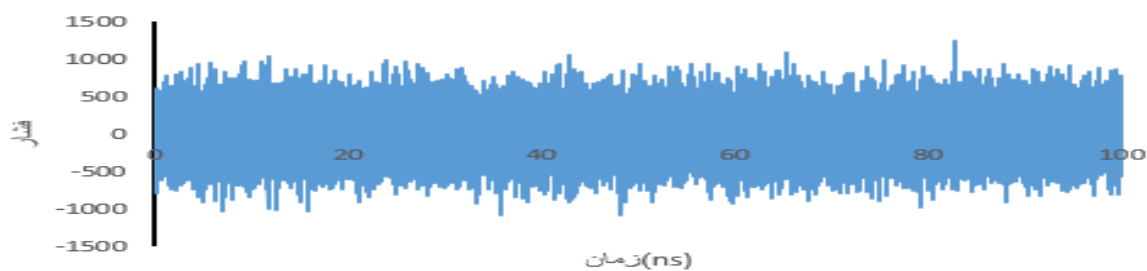
شکل ۳-۱۶: نمودار فشار (bar) دارو ۱ مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۱۷: نمودار فشار (bar) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی

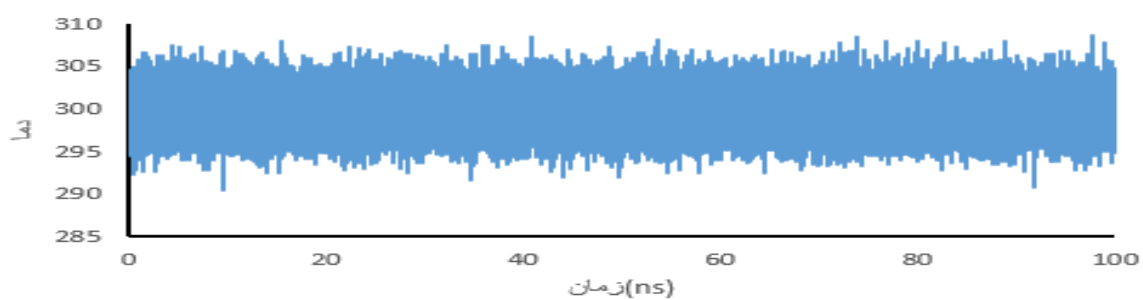


شکل ۳-۱۸: نمودار فشار (bar) دارو ۳ در طی زمان شبیه‌سازی

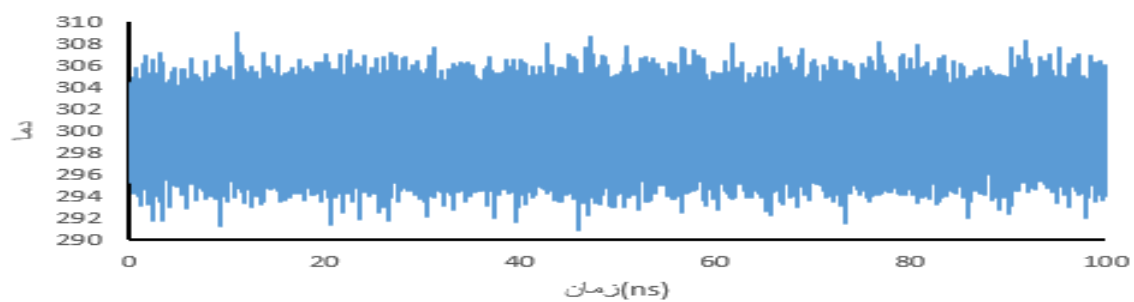


شکل ۳-۱۹: نمودار فشار (bar) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی

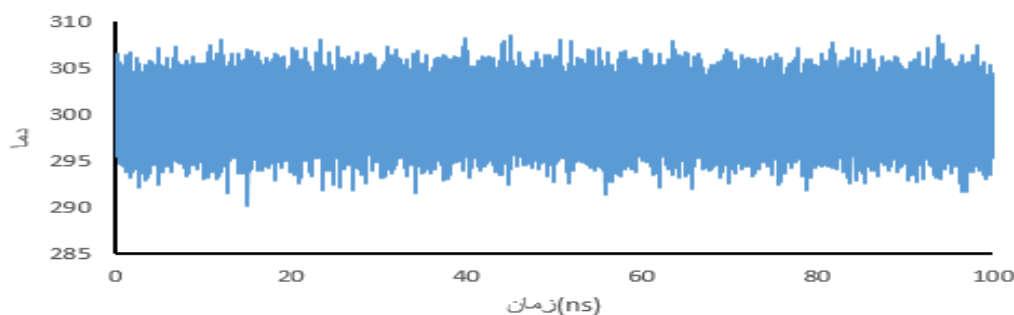
ه) نمودارهای مربوط به دما



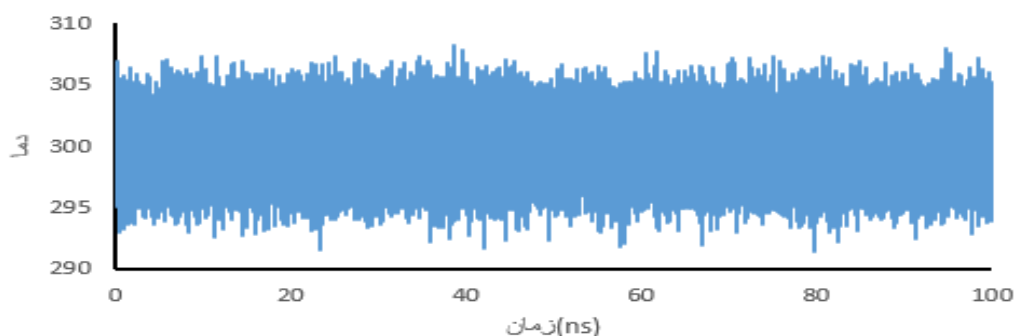
شکل ۳-۲۰: نمودار دما (K) دارو ۱ در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۱: نمودار دما (K) دارو ۲ در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۲: نمودار دما (K) دارو ۳ مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۳: نمودار دما (K) پروتئین مورد نظر در طی زمان شبیه‌سازی

با بررسی نمودارهای ۴-۳ تا ۲۳-۳ و همچنین جدول (۳-۱۹) مشخص گردید که انرژی پتانسیل کل، انرژی کل، دما و همچنین فشار در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای کمپلکس‌های مهارکننده PTZL ثابت بوده پس از ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه سازی بر روی کمپلکس‌ها تمامی نمودارها هیچ تغییری را در فشار، انرژی پتانسیل کل، انرژی کل، فشار و دما نشان ندادند. بنابراین کمپلکس‌ها به تعادل رسیده و از فایل خروجی می‌توان نمونه‌برداری کرد.

جدول ۳-۱۹: مقایسه میانگین پارامترها برای داروها و پروتئین

ترکیبات	چگالی (g/cm^3)	انرژی پتانسیل کل (kcal/mol)	انرژی کل (kcal/mol)	فشار (bar)	دما (K)
پروتئین	۱/۰۷۵۰	-۵۱۴۸۱/۲۸۵۶	-۴۰۲۸۶/۰۷۰۱	-۰/۵	۲۹۹/۹۸
داروی ۱	۱/۰۷۴۶	-۵۱۸۴۵/۵۴۲۷	-۴۰۶۲۵/۷۱۳۲	۰/۷	۲۹۹/۹۸
داروی ۲	۱/۰۷۵۳	-۵۱۸۹۶/۰۳۷۰	-۴۰۶۷۴/۸۴۹۲	۱/۲	۲۹۹/۹۸
داروی ۳	۱/۰۷۴۳	-۵۱۸۹۴/۷۰۷۹	-۴۰۶۷۶/۰۷۷۶	۱/۳	۲۹۹/۹۹

با بررسی‌های انجام شده بر روی نمودارهای ۳-۴ تا ۳-۷ مشخص گردید که مقادیر چگالی در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم طی ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارای نوسانات اندکی در محدوده ۱/۰۸۲ تا ۱/۰۶۸ گرم بر سانتیمتر مکعب است ولی با این وجود اکثر نقاط بین محدوده ۱/۰۷-۱/۰۸ گرم بر سانتیمتر مکعب ثابت شده‌اند که تأییدکننده به تعادل رسیدن چگالی در طی فرآیند شبیه‌سازی است. با توجه به نمودارهای ۳-۸ تا ۳-۱۱ مشخص گردید که مقادیر انرژی پتانسیل کل در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارای نوسانات اندکی در محدوده ۵۱۵۵۰- تا ۵۲۲۰۰- کیلوکالری بر مول است ولی با این وجود اکثر نقاط بین محدوده ۵۱۵۰۰- تا ۵۲۱۰۰- کیلوکالری بر مول ثابت شده‌اند که تأییدکننده به تعادل رسیدن انرژی جنبشی در طی فرآیند شبیه‌سازی است. با بررسی نمودارهای ۳-۱۲ تا ۳-۱۵ مشخص گردید که انرژی کل در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارای نوسانات اندکی در محدوده ۴۰۲۰۰- تا ۴۱۲۰۰- کیلوکالری بر مول است، ولی با توجه به نمودارها اکثر نقاط، بین محدوده ۴۰۲۰۰- تا ۴۱۰۰۰- کیلوکالری بر مول ثابت شده‌اند که تأییدکننده به تعادل رسیدن انرژی کل در طی فرآیند شبیه‌سازی است. با بررسی‌های انجام شده بر روی نمودارهای ۳-۱۶ تا ۳-۱۹ مشخص گردید که فشار در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارای نوسانات اندکی در محدوده ۷۵۰- تا ۷۵۰ بار می‌باشد، ولی با توجه به نمودارها اکثر نقاط بین ۵۰۰- تا ۵۰۰ بار ثابت شده‌اند که تأییدکننده به تعادل رسیدن فشار در طی فرآیند شبیه‌سازی است. در نهایت با بررسی نمودارهای ۳-۲۰ تا ۳-۲۳ مشخص گردید که منحنی دما در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارای نوسانات اندکی در محدوده ۲۹۲ تا ۳۰۶ کلوین بوده، ولی با توجه به نمودارها اکثر نقاط بین ۲۹۵ تا ۳۰۵ کلوین ثابت شده‌اند که تأییدکننده به تعادل رسیدن دما در طی فرآیند شبیه‌سازی است. همان‌طور که در نمودارها به وضوح

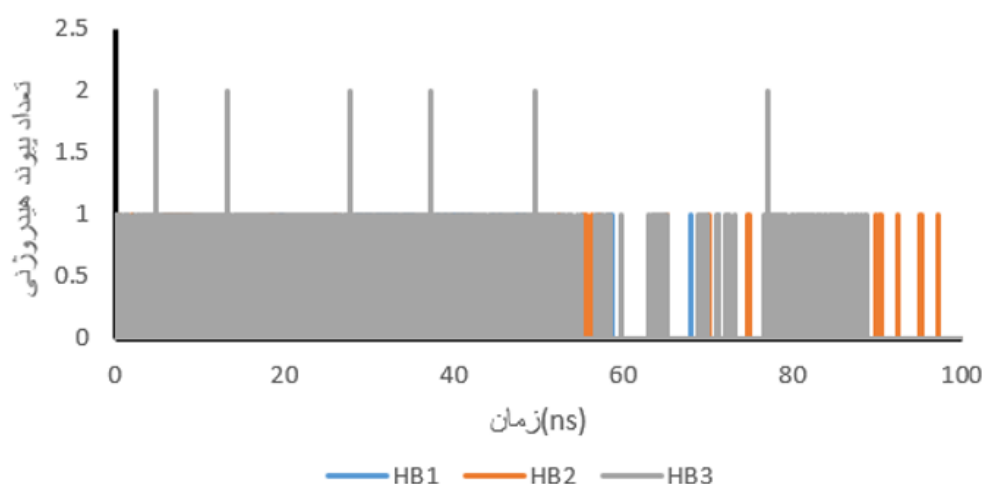
Val71 و Ser14، Pro91، Phe155، Lys35، Leu142، Ile153، His36، Gly70، Glu57 هستند.

همچنین، طبق یافته‌هایی که توسط نرم‌افزار امبر صورت گرفت مشخص شد که از داروی ۱، اسیدهای آمینه (Tyr175, Arg173, Asn146, Asp135, Thr102, Ser19)، از داروی ۲، اسیدهای آمینه (Ser176, Tyr175, Gly158, Phe155, Asp152, Glu139, Asn128, Asp152, Gln118) و از داروی ۳، اسیدهای آمینه (Ala268, Gln225, Asp170, Val71, Gly70, His36, Ser14) با پروتئین 5C1Q پیوند هیدروژنی برقرار نمی‌کنند. این داروها یکبار نقش پذیرنده (acc) و یکبار نقش دهنده (don) را با پروتئین ایفا می‌کنند. همه‌ی اسیدهای آمینه متعلق به اسیدهای آمینه پروتئینی و رایج‌ترین اسیدهای آمینه موجود در پروتئین‌ها بوده که در حین ترجمه به پروتئین در حال ساخت اضافه می‌شوند. در شکل (۳-۲۴) به مقایسه پیوندهای هیدروژنی که بین اسیدهای آمینه مربوط به داروها در جایگاه فعال پروتئین برقرار شده پرداخته شده است.

۳-۳-۲- مقایسه پیوند هیدرونی و اسیدهای آمینه داروها

نمودار (۳-۲۴) که پیوند هیدروژنی داروها را نشان می‌دهد، بیان می‌کند که از میان اسیدهای آمینه مربوط به دارو ۳، اسید آمینه Ile153 که جزء اسیدهای آمینه آب‌گریز بوده و به طور معمول درون هسته‌ی پروتئین قرار دارد انتخاب شده که این اسید آمینه به دلیل توانایی در تشکیل پیوند هیدروژنی ترجیح می‌دهد سطح مولکول را بپوشاند و در تماس با حلال قرار بگیرد. همچنین به دلیل اینکه پیوند هیدروژنی قوی‌تر و تعداد پیوند هیدروژنی بیشتری را با جایگاه فعال پروتئین در طی مدت زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برقرار می‌کند در مقایسه با اسیدهای آمینه مربوط به داروی ۱ و ۲ که پیوند ضعیفی را با جایگاه فعال پروتئین برقرار می‌کنند انتخاب شده که از اسیدهای آمینه مربوط به داروی ۱ و ۲ می‌توان به Glu139، Arg90 اشاره کرد که متعلق به اسیدهای آمینه باردار بوده که با زنجیره‌های جانبی غالباً پل‌های نمکی تشکیل می‌دهند. اسید آمینه مربوط به داروی ۳، علاوه بر اینکه بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی را در بازه‌ی زمانی ۱۰۰ نانوثانیه در طول شبیه‌سازی

دینامیک مولکولی در محدوده ۱ برقرار می‌کند در محدوده ۲ هم دارای تعداد پیوند هیدروژنی می‌باشد و نشان‌دهنده‌ی این است که با جایگاه فعال پروتئین پیوند هیدروژنی قوی‌تری را برقرار می‌کند ولی اسیدهای آمینه مربوط به داروی ۱ و ۲ در بازه‌ی زمانی ۱۰۰ نانوثانیه در محدوده ۱ پیوند هیدروژنی ضعیفی را تشکیل می‌دهند و رفته‌رفته با پیشرفت واکنش در محدوده‌های بالاتر هیچ پیوند هیدروژنی مشاهده نمی‌گردد. می‌توان این مسأله را اینگونه توجیه کرد که احتمالاً در حالت‌گذار، هنگامی که داروی ۱ و ۲ از کنار پروتئین عبور می‌کردند بین آنها پیوند هیدروژنی تشکیل گردیده و رفته‌رفته با پیشرفت واکنش و نزدیک شدن به حالت تعادل این پیوندها از بین رفته و در حالت تعادل هیچ پیوند هیدروژنی وجود ندارد.

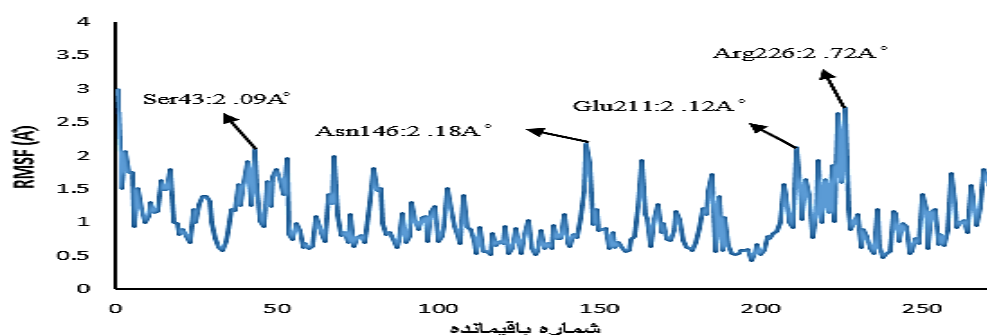


شکل ۳-۲۴: مقایسه پیوندهای هیدروژنی ما بین آمینواسیدها و داروها

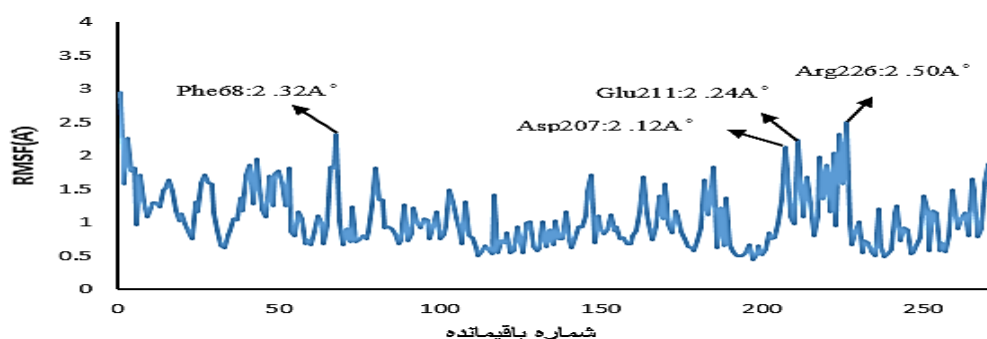
۳-۴- آنالیز لیگاندها و پروتئین به وسیله نمودار RMSF

به منظور ارزیابی تحرک اسیدهای آمینه در جایگاه اتصال پروتئین 5C1Q، متوسط مربع نوسانات (RMSF) مربوط به ۴ اسید آمینه در جایگاه اتصال پروتئین (Ser43، Asn146، Glu211 و Arg226) در غیاب و در حضور داروها محاسبه شد. همان‌طور که در شکل‌های (۳-۲۵) تا (۳-۲۹) دیده می‌شود این اسیدهای آمینه در شرایطی که داروها حضور دارند انعطاف‌پذیری کمتری را در مقایسه با شرایطی که پروتئین با دارویی برهمکنش ندارد و به حالت آزاد قرار دارد از خود نشان می‌دهد.

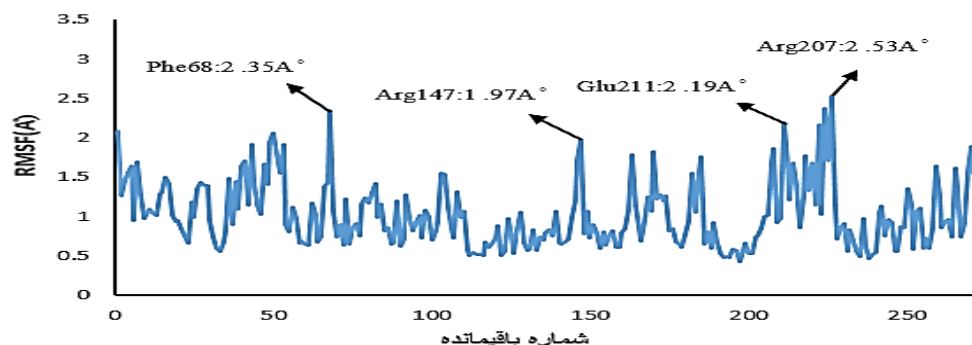
کاهش کلی در مقدار RMSF، محدودیت حرکتی اسیدهای آمینه را به دلیل برهمکنش با داروها، آشکار می‌سازد.



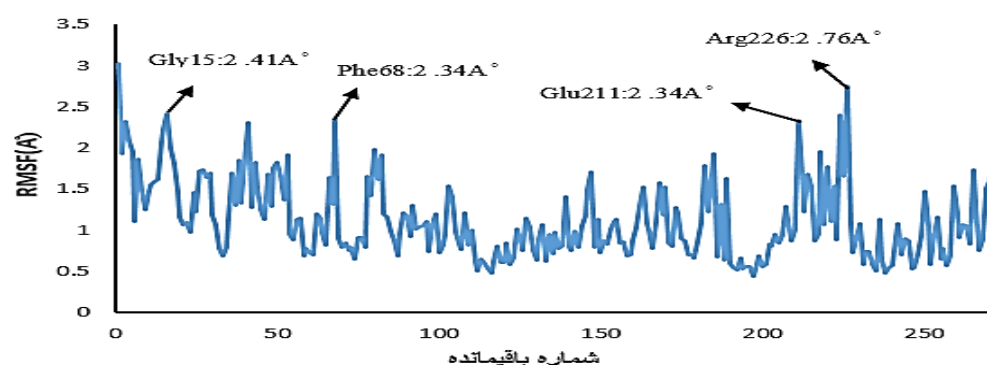
شکل ۳-۲۵: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی



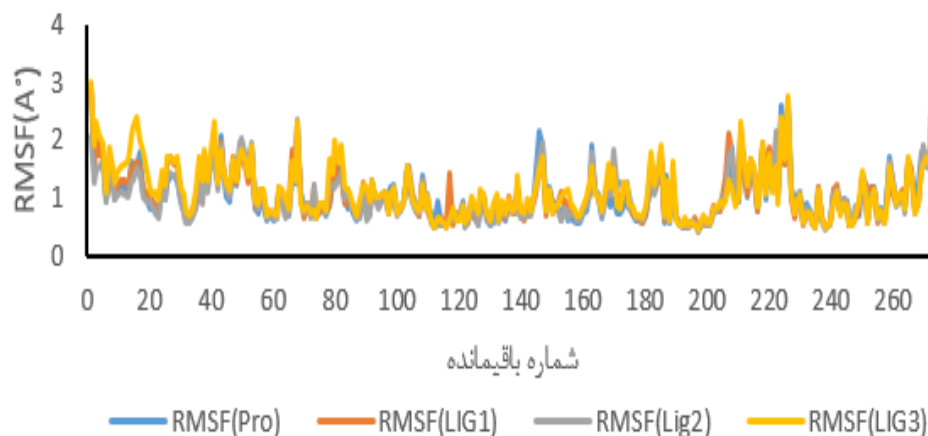
شکل ۳-۲۶: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل دارو ۱ در طول زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۷: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل لیگاند ۲ در طول زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۸: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل دارو ۳ در طول زمان شبیه‌سازی



شکل ۳-۲۹: نمودار مربوط به تحرکات ساختاری کل داروها و پروتئین در طول زمان شبیه سازی

مطابق با شکل‌های (۳-۲۵) تا (۳-۲۹)، و مقایسه‌ای که بین میزان انعطاف‌پذیری هر دارو در جایگاه فعال پروتئین بر حسب آنگستروم و میزان تغییرات ساختاری اسیدهای آمینه داروها با پروتئین در جدول (۳-۲۰) صورت گرفت، نشان می‌دهد که میزان انعطاف‌پذیری و تحرکات ساختاری اسیدهای آمینه دارو ۳ در مقایسه با داروی ۱ و ۲ بالاتر و جایگیری بهتری را با اسیدهای آمینه پروتئین برقرار می‌کند که این عمل باعث می‌گردد که داروی شماره ۳ جایگیری بهتری جهت استقرار در پروتئین داشته باشد.

جدول ۳-۲۰: مقایسه تغییرات تحرکات ساختاری اسیدهای آمینه داروها در جایگاه فعال پروتئین در طی ۱۰۰ نانوثانیه

ترکیبات	میانگین تحرکات ساختاری اسیدهای آمینه داروها با پروتئین (آنگستروم)
پروتئین	$1.0 \pm 0.4/45$
داروی ۱	$1.0 \pm 0.7/46$
داروی ۲	$1.0 \pm 0.3/43$
داروی ۳	$1.0 \pm 1.2/48$

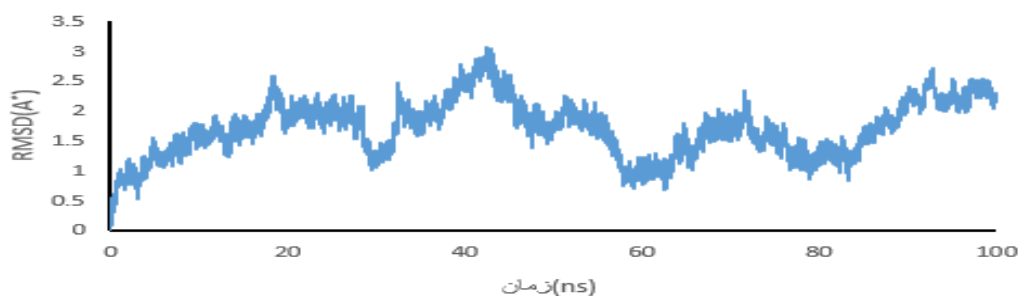
۳-۵- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پیوندشدن داروهای ۱، ۲ و ۳ با پروتئین توسط RMSD

RMSD، که به معنی جذر میانگین مربع انحرافات بوده به فاصله‌ی دکارتی از یک ساختار اولیه تعریف می‌گردد. از طریق این پارامتر می‌توان، میزان انعطاف‌پذیری پروتئین و به تعادل رسیدن آن را در طول زمان شبیه‌سازی بررسی نمود. مقدار RMSD برای اتم‌های بدنه اصلی پروتئین 5C1Q نسبت به ساختار اولیه توسط مدول CPPTRAJ نرم‌افزار AMBER محاسبه گردید و پایداری تمام ساختارها در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به صورت تابعی از زمان بررسی شد. منحنی‌های RMSD مربوط به سامانه‌های مختلف در شکل‌های (۳-۳۰) تا (۳-۳۴) نشان داده شده است. همانطور که در نمودار مربوط به برهمکنش داروها با پروتئین مشخص شده، با افزوده‌شدن داروها میزان نوسانات افزایش یافته است ولی در مورد باقی‌مانده‌های مختلف میزان این افزایش متفاوت است.

۳-۵-۱- همگرایی جذر میانگین مجذور انحرافات (RMSD)

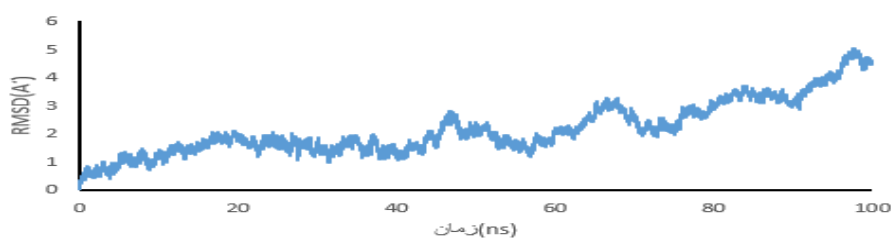
جذر میانگین مربع انحرافات برای بررسی همگرایی ساختار در حالت تعادل مورد استفاده قرار می‌گیرد. در نمودارهای زیر جذر میانگین مجذور انحرافات مربوط به پروتئین خالص و کمپلکس‌های پروتئین - دارو نشان داده شده است.

الف) نمودار تغییرات RMSD مربوط به پروتئین خالص

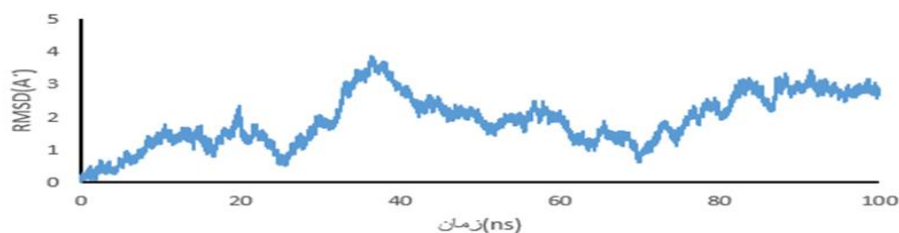


شکل ۳-۳۰: مقادیر RMSD اسکلت پروتئین در حالت آزاد در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

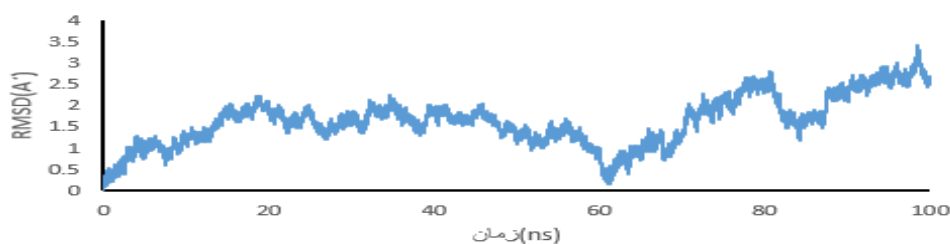
ب) نمودار تغییرات RMSD داروها و برهمکنش با پروتئین



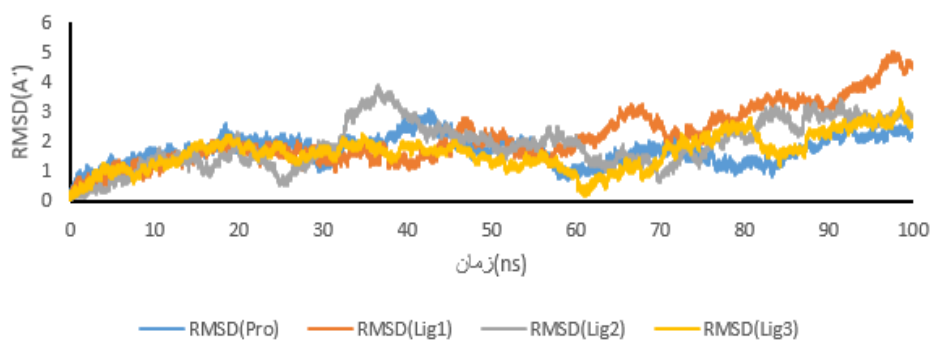
شکل ۳-۳۱: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۱ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی



شکل ۳-۳۲: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۲ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی



شکل ۳-۳۳: مقادیر RMSD اسکلت داروی ۳ در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی



شکل ۳-۳۴: مقادیر RMSD اسکلت داروها و پروتئین در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

با استفاده از نمودارهای جذر میانگین مربع انحرافات می‌توان همگرایی سیستم به حالت تعادل را مورد بررسی قرار داد. در تمامی نمودارهای مورد مطالعه، مقدار RMSD ابتدا افزایش یافته و به تدریج به سمت پایداری همگرا شده و تا آخر شبیه‌سازی حول یک مقدار میانگین نوسان می‌کند. از طرف دیگر، مقدار میانگین RMSD برای پروتئین تنها بیشتر از نمودارهای در حالت کمپلکس است

و این امر کاهش حرکت‌های پروتئین را در اثر اتصال به دارو نشان می‌دهد. به عبارتی، پروتئین در فرایند کمپلکس‌شدن پایدارتر از حالت آزاد خود است. همچنین برای پایداری کمپلکس داروها با پروتئین، میزان RMSD از نقطه‌ای مورد بررسی قرار می‌گیرد که ساختار کمپلکس داروها - پروتئین به تعادل رسیده باشد.

با توجه به نمودارهای ترسیم شده، میزان RMSD از نقطه‌ای قابل محاسبه بوده که ساختار کمپلکس در طول فرآیند شبیه‌سازی ثابت باشد (در اینجا ما بازه‌ی زمانی که به تعادل می‌رسند را در نظر می‌گیریم). شیب نمودار RMSD، بیان‌کننده‌ی پایداری بودن مدل در طول مدت زمان شبیه‌سازی (۱۰۰ نانوثانیه) می‌باشد. هرچه قدر این شیب به صفر نزدیکتر باشد، مدل شبیه‌سازی شده ما پایدارتر و هرچه این شیب به تدریج افزایش یابد و یا نوسان بیشتری داشته باشد مدل ناپایدارتر است. بررسی نمودارهای جذر میانگین مربع انحرافات و مقایسه‌ی این نمودارها در دو حالت پروتئین آزاد و همچنین برهمکنش پروتئین با داروها یکی از راههایی است که برای تشخیص کیفیت شبیه‌سازی و کنترل کیفی آن به کار می‌رود. از نمودارهای بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که شبیه‌سازی ما صحیح بوده است.

۳-۵-۲- تعیین محدوده آنالیز

با توجه به مقادیر RMSD داروها با پروتئین که در طول فرآیند شبیه‌سازی در نمودار (۳-۳۴) نشان داده شد، می‌توان مشاهده کرد که سیستم بعد از گذشت زمان ۸۰ نانوثانیه به تعادل رسیده و در اطراف مقدار میانگین نوسان می‌کند. میزان حرکات ساختاری پروتئین و داروها در طی ۱۰۰ نانوثانیه در جدول (۳-۲۱) گزارش و با هم مقایسه شده‌اند.

جدول ۳-۲۱: مقایسه تغییرات ساختاری داروها با پروتئین در طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

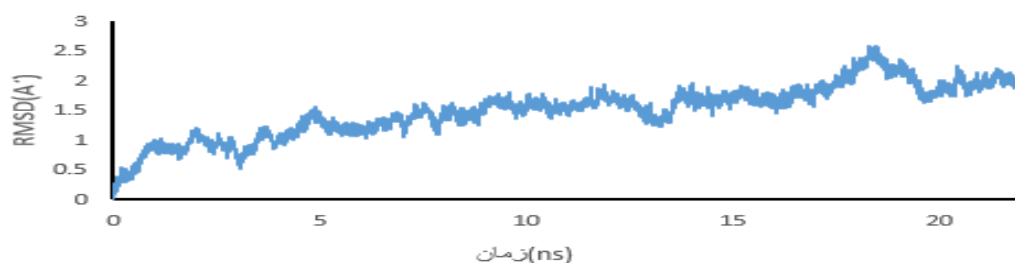
ترکیبات	میانگین تغییرات ساختاری داروها و پروتئین (آنگستروم)
پروتئین	$1/0 \pm 71/47$
داروی ۱	$2/0 \pm 16/96$
داروی ۲	$1/0 \pm 91/90$
داروی ۳	$1/0 \pm 64/58$

با توجه به نتایج، تغییرات ساختاری داروی ۱ نسبت به سایر ترکیبات بیشتر می‌باشد. همچنین این دارو در میزان ناپایداری پروتئین تأثیر به‌سزایی دارد و به عنوان دارویی که بیشترین تأثیر را در ناپایداری پروتئین دارد انتخاب می‌گردد. داروی ۳، به‌دلیل اینکه میزان تغییرات ساختاری RMSD آن اختلاف کم‌تری را با RMSD ساختار پروتئین در طول مدت زمان شبیه‌سازی دارد، انتخاب شده که کمترین تأثیر را در ناپایداری پروتئین داشته و در پایداری آن تأثیر به‌سزایی دارد. همچنین، جهت بررسی بیشتر برهمکنش داروها با پروتئین، میزان تغییرات ساختاری آنها به طور جداگانه طی ۲۲ نانوثانیه ابتدایی و انتهایی محاسبه و با هم مقایسه گردید. در جدول (۳-۲۲) مقادیر مربوط به آنها نشان داده شده است.

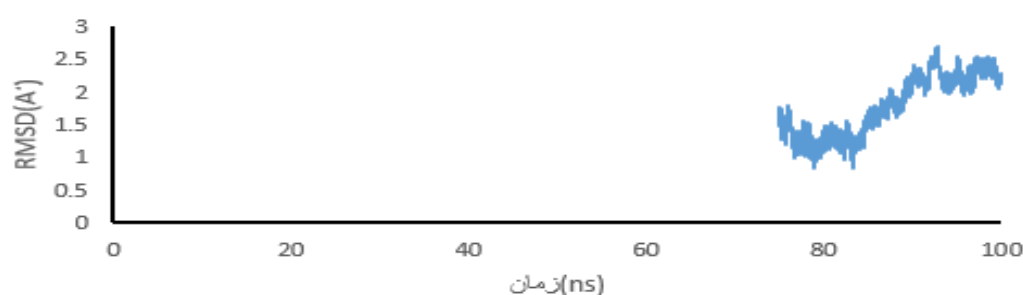
جدول ۳-۲۲: بررسی میانگین مجذور انحرافات داروها با پروتئین طی ۲۲ نانوثانیه ابتدایی و انتهایی

داروها و پروتئین	مدت زمان شبیه‌سازی (۰-۲۲) نانوثانیه	مدت زمان شبیه‌سازی (۷۸-۱۰۰) نانوثانیه
پروتئین	$1/0 \pm 55/43$	$1/0 \pm 78/47$
داروی ۱	$1/0 \pm 31/44$	$3/0 \pm 48/64$
داروی ۲	$1/0 \pm 09/47$	$2/0 \pm 65/38$
داروی ۳	$1/0 \pm 35/49$	$2/0 \pm 31/40$

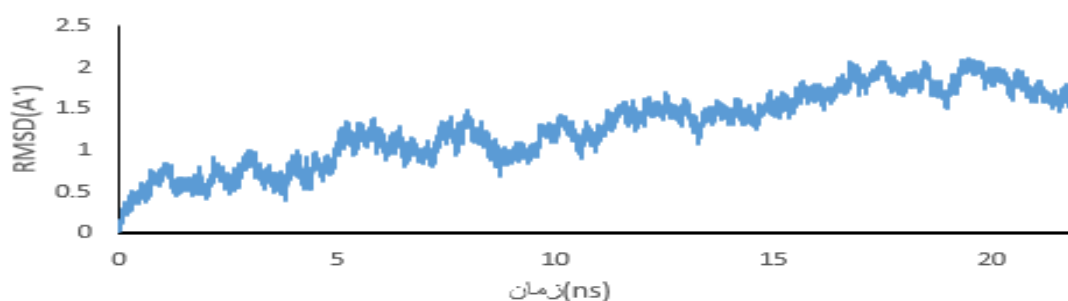
علاوه بر این، جهت بررسی تغییرات ساختاری داروها با پروتئین در طول فرآیند شبیه‌سازی، ساختار هر کدام از آنها علاوه بر میانگین تغییرات ساختاری به‌طور جداگانه در مدت زمان ۲۲ نانوثانیه ابتدا و انتهای شبیه‌سازی با هم مقایسه و در شکل‌های (۳-۳۵) تا (۳-۴۴) نشان داده شد.



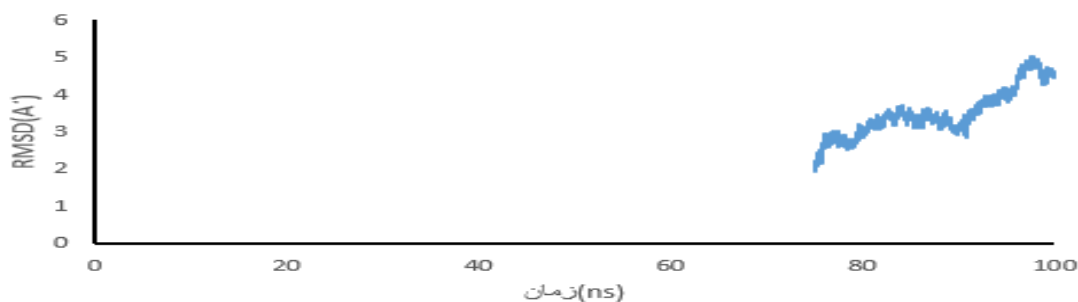
شکل ۳-۳۵: تغییرات ساختاری پروتئین طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی



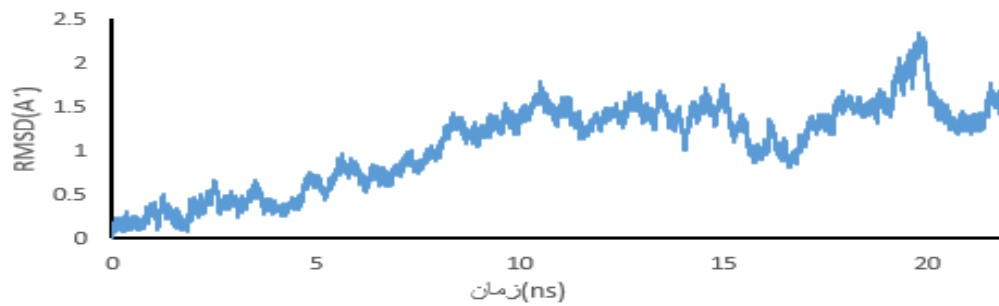
شکل ۳-۳۶: تغییرات ساختاری پروتئین طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی



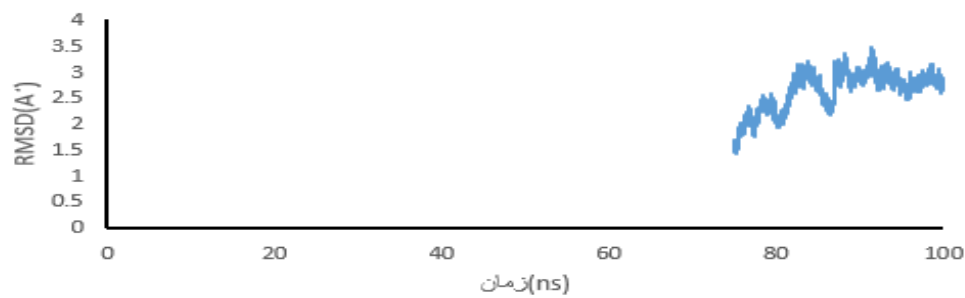
شکل ۳-۳۷: تغییرات ساختاری داروی ۱ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی



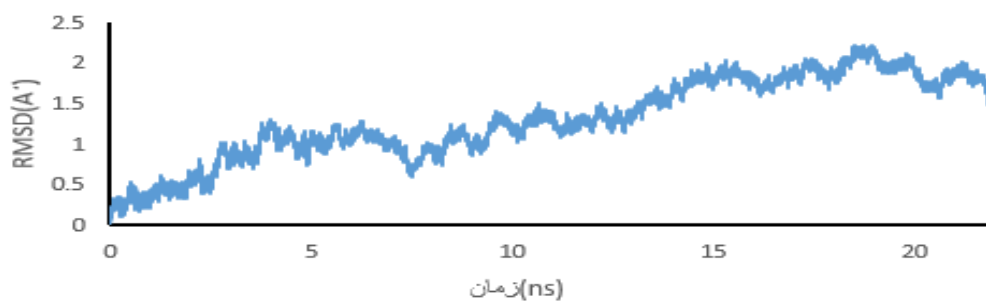
شکل ۳-۳۸: تغییرات ساختاری داروی ۱ طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه‌سازی



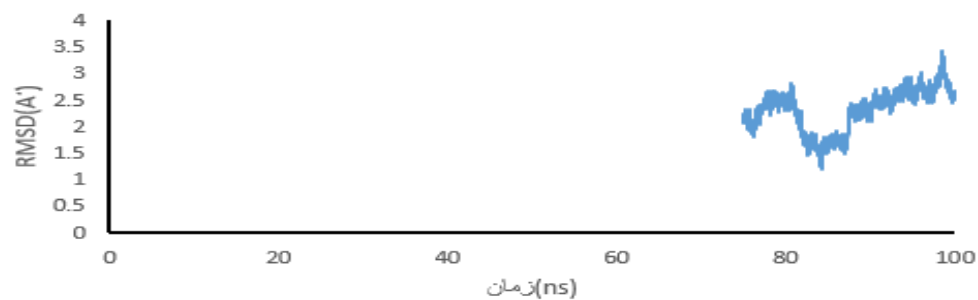
شکل ۳-۳۹: تغییرات ساختاری داروی ۲ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه سازی



شکل ۳-۴۰: تغییرات ساختاری داروی ۲ طی ۲۲ پیکو ثانیه انتهای شبیه سازی

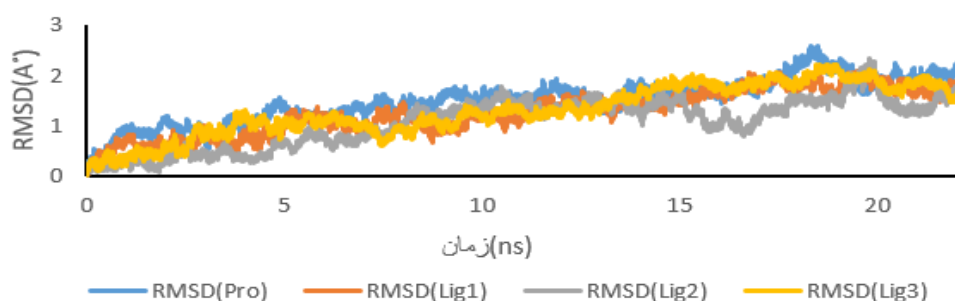


شکل ۳-۴۱: تغییرات ساختاری داروی ۳ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه سازی

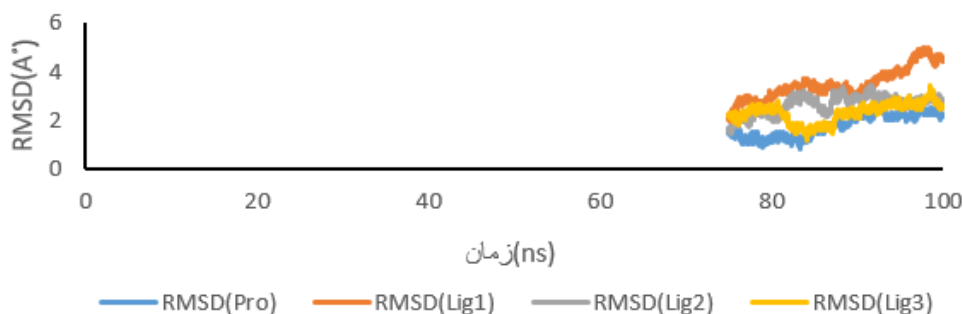


شکل ۳-۴۲: تغییرات ساختاری داروی ۳ طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه سازی

با توجه به نمودارها، در ابتدا و انتهای شبیه‌سازی تغییرات ساختاری داروها و پروتئین، ثابت و بدون تغییر می‌باشد. بدیهی است که در زمان اتصال داروها به پروتئین، هرچقدر دارو ثبات بیشتری داشته باشد و یا به عبارتی دیگر جابجایی‌های کمتری را در طول فرآیند شبیه‌سازی دینامیک مولکولی داشته باشد، برهمکنش بهتری را با پروتئین برقرار کرده و بنابراین بهتر می‌تواند آن را مهار کند. از میانگین برهمکنش داروها در ۲۲ نانوثانیه ابتدا و انتهای داروها، مشخص گردید که میانگین تغییرات ساختاری دارو ۳ به پروتئین نزدیک بوده و باعث برهمکنش بهتر با پروتئین و مهار آن می‌گردد. همچنین با بررسی نمودارهای (۳-۳۵) تا (۳-۴۴) می‌توان فهمید که در تمامی ساختارهای داروها - پروتئین، بیشترین تغییرات و جابجایی طی ۲۲ پیکوثانیه اول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام گرفته است. در نهایت، طبق بررسی که بر روی برهمکنش داروها با پروتئین در ۲۲ نانوثانیه ابتدایی و انتهای انجام گرفت، نشان داد که داروی ۳ در زمان انجام اندرکنش، تأثیر بیشتری را بر روی پروتئین نسبت به سایر داروها اعمال کرده است.



شکل ۳-۴۳: تغییرات ساختاری کمپلکس طی ۲۲ پیکو ثانیه ابتدای شبیه‌سازی



شکل ۳-۴۴: تغییرات ساختاری کمپلکس طی ۲۲ پیکوثانیه انتهای شبیه‌سازی

۳-۶- نتایج محاسبات انرژی آزاد پیوندی به روش MMGBSA

به منظور بررسی بیشتر انرژی آزاد اتصال از روش MMGBSA استفاده گردید. بیشتر روش‌های معرفی شده، حداقل یکی از محدودیت‌های عمده مانند چگونگی رسیدن به اثرات حلال را دارا می‌باشند. با این حال، با استفاده از روش مکانیک مولکولی تعمیم‌یافته سطح MMGBSA می‌توان این مشکل را حل کرد. با وجود تقریب‌های مختلف، روش MMGBSA می‌تواند به اعتبارسنجی و منطقی کردن تجربیاتی که از آزمایش بدست می‌آید کمک کند. در این روش، انرژی اتصال دارو به پروتئین با استفاده از انرژی‌های حلالیت مولکول‌های برهمکنش‌کننده و مکانیک مولکولی محاسبه می‌گردد.

تمام خواص ترموشیمیایی به کمک نرم‌افزار امبر و با استفاده از روش MMGBSA برای مختصات مربوط به فرکانس نمونه‌برداری در زمان ۱۰۰ نانوثانیه انجام گرفت. ترکیباتی که کمترین انرژی اتصال را داشته باشند، از پایداری بیشتری برخوردار هستند. انرژی فاز گازی (ΔG_{gas}) به برهمکنش‌هایی که توسط داروها و پروتئین انجام می‌گیرد، کمک می‌کند، در حالی که انرژی آزاد حلال (G_{solv}) مخالف انرژی گازی می‌باشد. در روش MMGBSA، میانگین انرژی کل گازی و انرژی حلال داروها با پروتئین در جدول (۳-۲۳) مقایسه و نشان داده شده است.

جدول ۳-۲۳: مقایسه میانگین انرژی گازی و انرژی حلال داروها با پروتئین (kcal/mol)

کمپلکس	ΔG_{gas} میانگین انرژی گازی	ΔG_{Solv} میانگین انرژی حلال
پروتئین - دارو ۱	$-54/55 \pm 2/94$	$7/56 \pm 0/89$
پروتئین - دارو ۲	$-47/74 \pm 2/40$	$4/52 \pm 0/62$
پروتئین - دارو ۳	$-58/40 \pm 2/74$	$5/22 \pm 0/67$

با توجه به جدول (۳-۲۳)، میانگین انرژی گازی دارو ۳ در مقایسه با دارو ۱ و ۲ از همه منفی‌تر و برهمکنش بهتری را با پروتئین برقرار می‌کند، ولی میانگین انرژی فاز حلال آن تأثیری بر میزان برهمکنش دارو با پروتئین ندارد و در نظر گرفته نمی‌شود.

انرژی آزاد مجموعه (ΔG_{tot}) حاصل از MMGBSA برای ترکیبات پروتئین - دارو، مقادیر قابل توجهی را در محدوده مورد نظر نشان می‌دهد. ΔG_{tot} برای پروتئین جهش‌یافته، مقدار کم‌تری را برای مجموعه نشان می‌دهد. با استفاده از این روش می‌توان انرژی آزاد اتصال دارو به پروتئین را با در نظر گرفتن انرژی‌های حلالیت مولکول‌های برهمکنش‌کننده محاسبه کرد. همچنین در این روش می‌توان سهم آنتروپی انرژی آزاد کل را به روش مد نرمال محاسبه و در انرژی کل لحاظ کرد.

انرژی‌های آزاد اتصال بدست آمده از سه اجرای شبیه‌سازی هر کمپلکس پروتئین به همراه سهم‌های مختلف آن با استفاده از روش MMGBSA در جدول (۳-۲۴) نشان داده شده است. همچنین، سهم آنتروپی پیکربندی که به طور جداگانه محاسبه شده است را می‌توان با انرژی آزاد بدست آمده جمع نموده تا انرژی تشکیل کل بدست آید. این سری از داده‌ها در جدول (۳-۲۴) نشان داده شده‌اند.

جدول ۳-۲۴: نتایج محاسبه انرژی آزاد پیوندی بدست آمده از روش MMGBSA برحسب kcal/mol

کمپلکس	ΔE_{ele}	ΔE_{vdw}	ΔG_{GB}	ΔG_{MMGBSA}	TΔS	ΔH
پروتئین-داروی ۱	۰/۰۰۰۰	-۵۴/۵۴	۱۴/۵۲	-۴۶/۹۹	-۲۷/۴۵	- ۷۴/۴۴
پروتئین-داروی ۲	۰/۰۰۰۰	-۴۷/۷۳	۱۰/۶۱	-۴۳/۲۱	-۴/۲۵	-۴۷/۴۷
پروتئین-داروی ۳	۰/۰۰۰۰	-۵۸/۴۱	۱۲/۴۰	-۵۳/۱۸	-۲۵/۷۶	-۷۸/۹۴

در روش MMGBSA، بیشترین انرژی اتصال مربوط به داروی ۳ و در رتبه‌های بعدی داروی ۱ و داروی ۲ قرار دارند که این ترتیب، نتایج داکینگ مولکولی را تأیید می‌کند. با توجه به نتایج بدست آمده، مقادیر مثبت سهم انرژی حلالیت قطبی و مقادیر منفی برای سهم‌های انرژی واندوالسی و انرژی آزاد (MMGBSA) در نظر گرفته شده که این مقادیر، بیانگر آن است که سهم انرژی حلالیت قطبی بسیار کمتر از انرژی واندروالسی است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نیروهای آب‌گریز نقش اصلی را در برهمکنش‌های پیوندی بین دارو و پروتئین برقرار می‌کنند. با توجه به این ویژگی‌ها، داروی ۳ در مقایسه با سایر داروها از بالاترین میزان انرژی آزاد برخوردار بوده و برهمکنش هیدروفوبی به‌خوبی توسط آن صورت می‌گیرد.

۷-۳- نتیجه گیری

در بخش اول این پایان نامه، از روش داکینگ مولکولی برای تخمین انرژی آزاد اتصال شانزده مشتق PTZL از پیش سنتز شده و برهمکنش آن با پروتئین 5C1Q استفاده شد. محاسبات داکینگ مولکولی این پژوهش نشان داد که PTZL و مشتقات آن می‌توانند با انرژی اتصال مناسب به پروتئین 5C1Q متصل شوند. آنالیز برهمکنش این مشتقات با پروتئین به منظور یافتن ارتباط بین ساختار و فعالیت آنها می‌تواند منجر به طراحی ترکیبات جدید با کارایی بالاتر گردد.

در بخش دوم این پایان نامه، مجموعه‌ای متشکل از ۲۰۵۴ مشتق PTZL به عنوان مهارکننده‌های بالقوه 5C1Q با استفاده از نرم‌افزار Molgero غربالگری و بررسی شدند تا مشتقاتی با بیشترین تمایل به اتصال با پروتئین انتخاب گردند. همچنین، بعد از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، انرژی‌های آزاد اتصال محاسبه شدند. مؤلفه‌های انرژی آزاد اتصال به صورت جداگانه و تغییرات RMSD نسبت به ساختارهای شروع مورد بررسی قرار گرفتند. طی ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تمامی ویژگی‌های ساختاری و انرژی‌های بدست آمده، همگرایی بسیار خوب را نشان دادند که بیان‌کننده‌ی به تعادل رسیدن شبیه‌سازی و کافی بودن زمان شبیه‌سازی (۱۰۰ نانوثانیه) است. نتایج ما نشان داد که RMSD اسکلت اصلی پروتئین در تمامی کمپلکس‌های مهارکننده - آنزیم زیر ۳ آنگستروم بود و بسیار پایدار هستند. همچنین، قابل ذکر است که مقادیر ناچیز انحراف معیار RMSD برای مهارکننده‌ها حاکی از اتصال مهارکننده‌ها به جایگاه اتصال در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. در تمامی مراحل شبیه‌سازی، بیشترین تطابق مربوط به داروی ۳ است. همچنین، میزان تحرک اسیدهای آمینه مربوط به داروها در جایگاه اتصال پروتئین 5C1Q توسط جذر میانگین مربع نوسانات (RMSF) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسیدهای آمینه مربوط به داروی ۳، انعطاف‌پذیری بالاتر و برهمکنش بهتری را با جایگاه فعال پروتئین برقرار می‌کنند که باعث مهار آن می‌شوند.

برهمکنش پروتئین با مهارکننده‌هایش به صورت انرژی آزاد اتصال توصیف شدند. به طور کلی، تمایل‌های بالای اتصال لیگاند، از برهمکنش‌های قوی‌ترین لیگاند و جایگاه اتصالش ناشی می‌شود. مقایسه انرژی‌های واندوالس با حلالیت قطبی برای این اجزا نشان داد که سهم قابل توجهی از برهمکنش‌ها واندروالسی است. به عبارت دیگر، برهمکنش‌های غیرقطبی بین پروتئین و مهارکننده‌ها، عامل اصلی در ویژگی‌های اتصال است. طی ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، بیشترین تغییرات انرژی واندروالس مربوط به داروی ۱ و ۳ به ترتیب با مقادیر ۵۴/۵۴۳۷- و ۵۸/۴۰۷۰- کیلوکالری بر مول است. این موضوع بیانگر صحت این گفته است که برهمکنش‌های غیرقطبی (آب‌گریز) بین پروتئین و داروها، عامل اصلی در ویژگی‌های اتصال است. علاوه بر این، نتایج محاسبات انرژی داکینگ مولکولی و انرژی آزاد پیوندی به روش MMGBSA نشان می‌دهد که نیروهای آب‌گریز نقش اصلی را در اتصال داروها به پرتئین ایفا می‌کنند. درمجموع می‌توان گفت که داروهای منتخب می‌توانند با قدرت مهارکنندگی بالایی نسبت به سایر مشتقات مورد مطالعه، به جایگاه فعال پروتئین متصل شوند و کاندیدهای مناسبی برای بررسی‌های بیشتر آزمایشگاهی و سلولی باشند.

۳-۸- آینده نگری

- انجام شبیه سازی با زمان بیشتر با داشتن کامپیوترهای پرسرعت تر
- استفاده از میدان های نیرو جدیدتر

- [۱] مهدوی، ر. (۱۳۸۳) " اصول بیوشیمی لنینجر " چاپ سوم، انتشارات آینده، تهران، ص ۲۷۴.
- [۲] Hilvert, D. *Design of protein catalysts*, Annu. Rev. Biochem. **2013**, 84, 447-470.
- [۳] Ahele, W. *Enzymes in industry*, Wiley-VHC, **2007**.
- [۴] Fischer, E. *Einfluss der configuration auf der Wirkung der Enzyme*, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **1894**, 27, 2985-2993.
- [۵] Blake, C. Koenig, D. F, Mair, G. A, North, A.C. Phillips, D. C. Sarma, V. R. *structure of hen egg- white lysozyme. A three- dimensional Fourier synthesis at 2 Angstrom resolution*. **1965**, 206, 757-761.
- [۶] McCammon, J. A. Gelin, B. R., Karplus, M. *Dynamics of folded proteins*. **1977**, 267, 267-585.
- [۷] Bisswanger, H. *Enzyme kinetics: principles and methods*, John Wiley & Sons, **2008**.
- [۸] Kern, D. Eisenmesser, E. Z. Wolf-Watz, M. *Enzyme dynamics during catalysis measured by NMR spectroscopy*, Elsevier, **2005**, 394, 507-524.
- [۹] Ling, M. M. Robinson, B. H. *Approaches to DNA mutagenesis:overview*, Anal. Biochem. **1997**, 254, 157-178.
- [۱۰] Alegre-Cebollada, J. Perez-Jimenez, R. Kosuri, P. Fernandez, *Single molecule force spectroscopy approach to enzyme catalysis*, J. Biol. Chem. **2010**, 285, 18961-18966.
- [۱۱] A. Warshel, <http://www.nobelprize.org/nobel-prizes/chimistry/laureates>: Computer simulations of biological functions:from enzymes to molecular machines, Nobelprize.org. Nobel Media AB, **2013**..
- [۱۲] M. Levitt, <http://www.nobelprize.org/nobel-prizes/chimistry/laureates>: Birth & future of multi-scale modeling of biolog-ical macromolecules, Nobelprize.org. Nobel Media AB, **2013**.
- [۱۳] M. Karplus, <http://www.nobelprize.org/nobel-prizes/chimistry/laureates>: Development of multiscale models for complex chemical systems: From H + H₂to biomolecules, Nobelprize.org. Nobel Media AB, **2013**.
- [۱۴] Copeland, R. A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. Wiley, **2000**, 104.
- [۱۵] صبور، ع.، موسوی موحدی، ع. (۱۳۷۵) " سینتیک آنزیمی " انتشارات دانشگاه تهران.
- [۱۶] Lineweaver, H. Burk, D. *The Determination of Enzyme Dissociation Constant*. J. Am.

Chem. Soc. **1934**, 56, 658-666.

[۱۷] Copeland, R. A. *Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medicinal chemists and pharmacologists*, John Wiley & Sons, **2005**.

[۱۸] محیطی م، (۱۳۸۵)، پایان نامه ارشد: "بررسی پایداری ترمودینامیکی آنزیم لیپاز پانکراس خوک در شرایط مختلف (میدان مغناطیسی)"، دانشکده شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود.

[۱۹] Menendez, R. G. *Three molecular mechanisms to explain some biological effects of electromagnetic fields and hypogravity*. Med. Hypotheses, **1999**, 52, 239-245.

[۲۰] صوری، ع، موسوی موحدی، ع. (۱۳۷۵) "سینتیک آنزیمی" انتشارات دانشگاه تهران.

[۲۱] کریم زاده، ح ر، رفتاری، ع ر، نور محمدیان، م. (۱۳۸۰) "بیوشیمی هاریر" (ترجمه) جلد اول، انتشارات شهراب، تهران، ص ۹۰

[۲۲] آذری، ف، حبیبی رضایی، م، حسینخانی، س، خواجه، خ، گلستانی، ا، میراولیایی، م. و نعمت گرگانی، م.

(۱۳۸۷) آنزیم‌شناسی کاربردی (اصول و مبانی)، جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۳۲.

[۲۳] Saboury, A. *Enzyme inhibition and activation: A general theory*. J. Ir. Chem. Soc. **2009**, 6, 219-229.

[۲۴] Cortés, A. Cascante, M. Cárdenas, M. L. Cornish-Bowden, A. *Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50% inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data*. J. Biochem, **2001**, 357, 263-268.

[۲۵] Biron, K. K. *Distributed automated docking of flexible ligands to proteins*. Mol Des, **2006**, 71, 154-163.

[۲۶] Huang, S. Y. Zou, X. *Advances and Challenges in Protein-Ligand Docking* Int. J. Mol. Sci. **2010**, 11, 3016-3034.

[۲۷] Zuccotto, F. Ardini, E. Casale, E. Angiolini, M. *Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation*. J. med. Chem. **2009**, 53, 2681-2694.

[۲۸] Steussy, C. N. Popov, K. M. Bowker Kinley, M. M. Sloan, R. B. Harris, R. A. Hamilton, J. A. *Structure of pyruvate dehydrogenase kinase. Novel folding pattern for a serine protein kinase*. J. Bio. Chem. **2001**, 276, 37443-37450.

[۲۹] Hunter, T. *Signaling and beyond*. **2000**, 100, 113-127.

[۳۰] Blume-Jensen, P. Hunter, T. *Oncogenic kinase signaling*. **2001**, 411, 355-365.

[۳۱] Manning, G. Whyte, D. B. Martinez, R. Hunter, T. Sudarsanam, S. *The protein kinase complement of the human genome*. **2002**, 298, 1912-1934.

- [٣٢] Negar, B. Hantschel, O. Young, M. A. Scheffzek, K. Veach, D. Bornmann, W. Clarkson, B. Superti Furga, G. Kuriyan, J. *Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase*. **2003**, 112, 859-871.
- [٣٣] Farnum, M. A. Xu, H. Agrafiotis, D. K. *Exploring the nonlinear geometry of protein homology*. *Protein Science*. **2003**, 12, 1604-1612.
- [٣٤] Thurston, D. E. *Chemistry and pharmacology of anticancer drugs*. CRC press. **2007**, 97, 66-78
- [٣٥] Feldman, J. D. Vician, L. Crispino, M. Tocco, G. Baudry, M. H. *Seizure activity induces PIM-1 expression in brain* Seizure activity induces PIM-1 expression in brain. *J. Neurosci. Res*. **1998**, 53, 502-509. .
- [٣٦] Brault, L. Gasser, C. Bracher, F. Huber, K. Knapp, S. Schwaller, J. *PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers*, *Haematologica*. **2010**, 95, 1004–1015.
- [٣٧] Bachmann, M. Moroy, T. *Int. J. Biochem. The serine/threonine kinase Pim-1*. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. **2005**, 37, 726–730
- [٣٨] Narlik-Grassow, M. Blanco-Aparicio, C. Carnero, A. *Med. Res.Rev. The PIM family of serine/threonine kinases in cancer*. *Med. Res. Rev*. **2014**, 34, 136–159.
- [٣٩] Nawijn. M.C, Alendar, A. Berns, A. *Nat. Rev. Cancer For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis*. *Nat. Rev. Cancer*. **2011**, 11, 23–34.
- [٤٠] Bullock, A. N. Debreczeni, J. Amos, A.L. Knapp, S. Turk, B.E . *J. Biol. Chem. Structure and substrate specificity of the Pim-1 kinase*. *J. Biol. Chem*. **2005**, 280, 41675–41682.
- [٤١] Saris. C.J, Domen, J. Berns, A. J. *The pim-1 oncogene encodes two related protein-serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG*. **1991**, 10, 655–664.
- [٤٢] Xie. Y. Xu, K. Dai, B. Guo, Z. Jiang, T. Chen, H and Qiu, Y. *The 44 kDa Pim-1 kinase directly interacts with tyrosine kinase Etk/BMX and protects human prostate cancer cells from apoptosis induced by chemotherapeutic drugs*. *Oncogene*. **2006**, 25, 70-78.
- [٤٣] Saris, C.J.M, Domen, J and Berns, A. *The pim-1 oncogene encodes two related serine/threonine kinases by alternative initiation at AUG and CUG*. **1991**, 10, 665-664.
- [٤٤] Yernar Tursynba, Y. Jinfu Zhang2. ZHI, L.I. *Pim-1 kinase as cancer drug target: An*

- update (Review). *Biomedical Reports*. **2016**, 4, 140-146.
- [୧୫] Wen, Zhao, Rui, Yue. Qiu. Pan, L.i. *PIM1: a promising target in patients with triple-negative breast cancer*, Springer Science , Business Media, **2017**.
- [୧୧] Alder, B. Wainwright, T. *J. Chem. Phys.* **1957**, 27, 1208-1209.
- [୧୧] Alder, B. J. Wainwright, T. E. *J. Chem. Phys.* **1959**, 459-466.
- [୧୧] Tsai, D. *National Bureau of Standards Special Publication*. Rev. A. **1971**, 31, 326, 105-123.
- [୧୧] Stillinger, F. H. Rahman, A. *J. Chem. Phys. JCP*. **1974**, 60, 1545-1557.
- [୧୧] Lee, J. K. Barker, J. Pound, G. *J. Chem. Phys. J. JCP*. **1974**, 60, 1976-1980.
- [୧୧] McCammon, J. A. Gelin, B. R. Karplus, M. **1977**, 267, 585-590.
- [୧୧] Shea, J. E. Brooks III, C. L. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2001**, 52, 499-535.
- [୧୧] Bond, P. J. Faraldo Gómez, J. D. Deol, S. S. Sansom, M. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, 103, 9518-9523.
- [୧୧] Lees, A. Edwards, S. J. *Phys.* **1972**, 5, 1921-1929.
- [୧୧] Corbin, N. Singer, K. *Molecular Physics*. **1982**, 46, 671-677.
- [୧୧] Abagyan, R. Totrov, M. High – throughput docking for lead generation. *Curr. Opin. chem. Bio.* **2001**, 5, 375-382.
- [୧୧] Giganti, D. Guillemain, H. Spadoni, J. L. Nilges, M. Zagury, J.F. Montes.
Comparative evaluation of 3d virtual ligand screening methods: impact of the molecule alignment on enrichment. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 992-1004.
- [୧୧] Klebe, G. *virtual ligand screening methods: strategies, perspective and limitations*, *Drug discov.* **2006**, 11, 580-594.
- [୧୧] Irwin, J. J. Shoichet, B. K. Mysinger, M. Huang, N. Colizzi, F. Wassam, P. Cao, Y. J. *Automated docking screens: a feasibility study. Med. Chem.* **2009**, 52, 5712-5720.
- [୧୧] Zhang, S. Kumar, K. Jiang, X. Wallqvist, A. Reifman. *Dovis: an implementation for high- throughput virtual screening using autodock. J. BMC Bioinform.* **2008**, 9, 126.
- [୧୧] Cosconati, S. Forli, S. Perryman, A. L. Harris, R. Goodsell, D. S. *Olson virtual screening using autodock: theory and practice*, *Expert Opin. Drug Discov.* **2010**, 5, 597-607.
- [୧୧] Rarey, M. Kramer, B. Lengauer, T. Klebe, G. *J. Mol. Biol.* **1996**, 261, 470- 489.
- [୧୧] Friesner, R. A. Murphy, R. B. Repasky, M. P. Frye, L. L. Greenwood, J. R. Halgren,

- T. A. Sanschagrin, P. C. Mainz, D. T. J. Med. Chem. **2006**, 49, 6177-6196.
- [६ॣ] Li, Y. Y. An, J. Jones, S. J. *PLOS Comput. Biol.* **2011**, 7, 145-155.
- [६।] Kinnings, S. L. Jackson, R. M. *J. Chem. Inf. Model.* **2009**, 49, 2056-2066.
- [६॥] Allen, F. H. *The Cambridge structural database: a quarter of a million crystal structures and rising.* Acta Crystallinogr. **2002**, 58, 380-388.
- [६१] Wang, R. Fang, X. Lu, Y. Wang, S. *The pdbind database: collection of binding affinities for protein ligand complexes with known three-dimensional structures.* J. Med. Chem. **2004**, 47, 2977-2980.
- [६१] Wang, R. Fang, X. Lu, Y. Yang, C. Y. Wang, S. *The pdbind database: methodologies and updates.* J. Med. Chem. **2005**, 48, 4111-4119.
- [६१] Irwin, J. J. Shoichet, B. K. *Zinc-a free database of commercially available compounds for virtual screening.* J. Chem. Inf. Model. **2005**, 45, 177- 182.
- [१०] Berendsen, H. J. Postma, J. P. van Gunsteren, W. F. Hermans, J. In *Intermolecular forces* Springer. **1981**, 331-342.
- [१1] Crooks, G. E. *Entropy production fluctuation theorem and the nonequilibrium work relation for free energy differences.* Phys. Rev. **1999**, 60, 2721-2726.
- [१2] Crooks, G. E. *Path-ensemble averages in systems driven far from equilibrium.* Phys. Rev. **2000**, 61, 2361-2366.
- [१3] Park, S. Schulten, K. *Calculating potentials of mean force from steered molecular dynamics simulations.* J. Chem. Phys. **2004**, 120, 5946-5961.
- [१4] Kosztin, I. Barz, B. Janosi, L. *Calculating potentials of mean force and diffusion coefficients from nonequilibrium processes without Jarzynski's equality.* J. Chem. Phys. **2006**, 124, 134-146.
- [१5] Chen, L. *Nonequilibrium fluctuation-dissipation theorem of Brownian dynamics.* J. Chem. Phys. **2008**, 129, 143-166.
- [१6] Lindahl, E. Hess, B. Van Der Spoel, D. *GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis.* J. Mol. Model. **2001**, 7, 306-317.
- [१7] Van Der Spoel, D. Lindahl, E. Hess, B. Groenhof, G. Mark, A. E. Berendsen, H. J. J. *GROMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation.* J. Chem. Theory Comp. **2005**, 26, 1701-1718.
- [१8] Hess, B. Kutzner, C. Van Der Spoel, D. Lindahl, E. J. Chem. Theory Comput. **2008**, 4, 435-447.

- [۷۹] جعفری، س. (۱۳۸۶) " شبیه سازی رایانه ای (دینامیک مولکولی و مونت کارلو)" چاپ اول، انتشارات دانشگاه صنعتی خواجه نصیرالدین طوسی، ص ۱.
- [۸۰] علیزاده بوطاری، ا. (۱۳۹۵) "مدلسازی و شبیه سازی دینامیک مولکولی" انتشارات سنجش و دانش.
- [۸۱] Minor, L. K. *Handbook of assay development in drug discovery*. CRC Press, **2006**, 5, 55-68.
- [۸۲] Gane, P. J. Dean, P. M. *Curr. Opin. chem. Bio.* **2000**, 10, 401-404.
- [۸۳] Hajduk, P. J. J. *Med. Chem.* **2006**, 49, 6972-6976.
- [۸۴] Seddon, G. Lounnas, V. McGuire, R. van den Bergh, T. Bywater, R. P. Oliveira, L. Vriend, G. J. *Comput. Aided mol. des.* **2012**, 26, 137-150.
- [۸۵] Lipinski, C. A. *Drug Discovery Today: Technologies*. **2004**, 1, 337-341.
- [۸۶] Lipinski, C. A. Lombardo, F. Dominy, B. W. Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 46, 3-26.
- [۸۷] Leeson, P. D. Springthorpe, B. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, 6, 90- 881.
- [۸۸] Oprea, T. I. Davis, A. M. Teague, S. J. Leeson, P. D. J. *Chem. Inf. Comput. Sci.* **2001**, 41, 1308-1315.
- [۸۹] Kelder, J. Grootenhuis, P. D. Bayada, D. M. Delbressine, L. P. Ploemen, J. P. *Pharm. Res.* **1999**, 16, 1514-1519.
- [۹۰] Bemis, G. W. Murcko, M. A. *The properties of known drugs. 1. Molecular frameworks*, J. Med. Chem. **1996**, 39, 2887-2893.
- [۹۱] Mannhold, R. Kubinyi, H. Timmerman, H. *Molecular modeling: basic principles and applications*. John Wiley & Sons, **2008**, 37. 245-256.
- [۹۲] Walters, W. P. Murcko, M. A. *Prediction of 'drug-likeness', Advanced drug delivery reviews*. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, 54, 255-266.
- [۹۳] Nogard, T. Weaver, D. F. *Medicinal chemistry: a molecular and biochemical approach* Oxford University Press, **2005**.
- [۹۴] Panda, D. Samuel, J. C. Massie, M. Feinstein, S. C. Wilson, L. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, 100, 9548-9553.
- [۹۵] El-Nassan, H. B, Naguib, B. H, Beshay, E. A. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem* **2018**, 33, 58-66.

Abstract :

The pim-1 kinase enzyme plays an important role in the cell cycles apoptosis and metabolism of the body and is associated with the development of cancer, metastasis, and drug insistance. For this reason, pim-1 kinase is specific goal, in the cancer study. Understanding the interaction of a pim-1 kinase enzyme with inhibitors is essential for the creation and development of future pharmaceutical agents. Mechanism of coupling these inhibitors to the protein is not specified via experimental tests, Therefore computer simulations can be used to demonstrate interactions. In the first part of this thesis, the interaction of 5C1Q protein derivatives with sixteen Pyridotonicotriazolopyrimidine (PTZL) was investigated by molecular docking. The results showed that these derivatives bind to 5C1Q protein with high coupling energy and high inhibitory power. Comparison of free energies yielded important results regarding the relationship between the structure and function. In total, it was specified that drug 8-Bromo-2-(4-bromophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4',5']thieno[3·2-d]pyrimidin-4(1H)-one, due to the more negative free energy and the highest number of hydrogen bonds enhance the more binding strength with the active site of the 5C1Q protein, and can be used for more theoretical experimental studies. In the second part of the thesis, 2054 derivative of PTZL were investigated using virtual screening method and three drugs with highest binding energy were used as the drug candidates for inhibiting of 5C1Q protein, molecular dynamics simulation was used for studing of interaction of these drugs with protein. The results indicates that a hydrogen bond is formed between ILE153 and protein active site for drug 8-Bromo-2-(4-chlorophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4,5]thieno[3,2-]pyrimidin-4(1H)-one in comparison to drug 2-(4-(Benzyloxyl)-8-Bromo-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4',5]thieno[3,2-d]pyrimidin-4(1H)-one and 8-Bromo-2-(4-bromophenyl)-7,9-dimethyl-2,3-dihydropyrido[3',2':4',5']thieno[3·2-d]pyrimidin-4(1H)-one. The free energies of three selected drugs were derived using MMGBSA method. Results shows that contribution of polar solvation energy term is lower than van der waals energy term.

Keywords: pim-1 kinase enzyme, virtual screening , molecular dynamics.



**Shahrood University of
Technology**

Faculty of Chemistry

M.Sc. Thesis in Physical Chemistry

Investigation of the binding of new derivatives synthesized for inhibit the enzyme Pim-1

Milad babadi heydari

Supervisors:

Dr. M. Sargolzaei

Dr. A K. Bordbar

April 2019