

## نقش پروتئین فعال کننده INCENP در مهار انتخابی آرورا کیناز B توسط هسپرادین

نوید مقرب\*، طیبه سیدی، لیلا نوابور

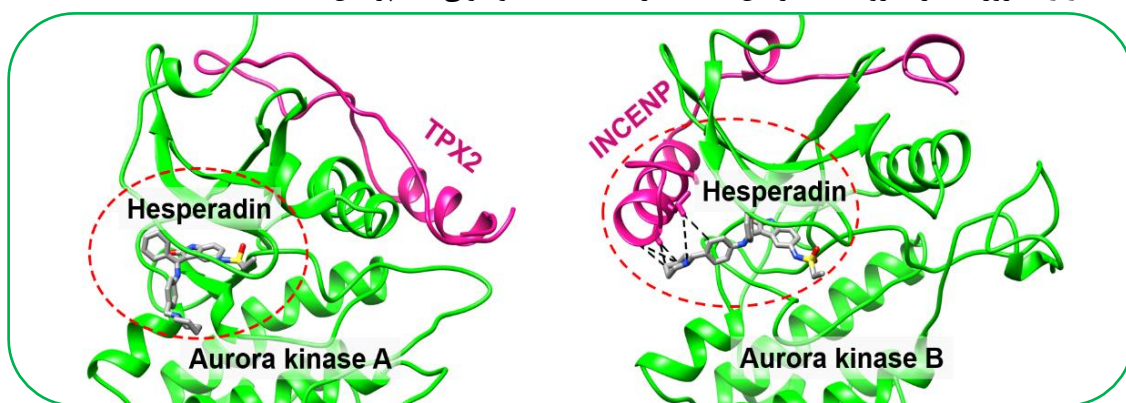
آزمایشگاه بیوفیزیک و زیست‌شناسی محاسباتی، بخش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ اسفند، ۱۴۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۱ تیر، ۱۴۰۳

**چکیده:** در سال‌های اخیر آرورا کینازهای A و B به‌عنوان اهداف درمانی جدید برای انواع مختلف سرطان‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. با این حال، شباهت زیاد در توالی و ساختار جایگاه فعال آن‌ها، طراحی مهارکننده‌های انتخابی را با چالش مواجه کرده است. هسپرادین یک مهارکننده رقابتی با ATP است که انتخاب‌پذیری آن برای آرورا کیناز B در مقایسه با آرورا کیناز A حدود چهار برابر بیشتر است. در این پژوهش، ساز و کار ساختاری مهار انتخابی هسپرادین برای آرورا کیناز B انسانی نسبت به آرورا کیناز A با استفاده از مدل‌سازی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی گرفت. نتایج شبیه‌سازی نشان داد که هسپرادین با گلوتامات ۱۵۵ و آلانین ۱۵۷ از ناحیه لولا در آرورا کیناز B پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند. علاوه بر این، با گلیسین ۸۴۸، لوسین ۸۵۱ و سرین ۸۵۲ از پروتئین INCENP (پروتئین فعال کننده آرورا کیناز B) برهم‌کنش‌های وان‌دروالسی می‌دهد. در مقابل، برهم‌کنش‌های بین هسپرادین و ناحیه لولا در آرورا کیناز A از بین رفته و جایگزین شده‌اند و مهارکننده هیچ برهم‌کنش مستقیمی با پروتئین فعال کننده (TPX2) ندارد. به‌نظر می‌رسد برهم‌کنش‌هایی که بین پروتئین INCENP و هسپرادین شکل می‌گیرد، در جای‌گیری صحیح مهارکننده در جایگاه فعال و حفظ برهم‌کنش‌های اختصاصی بین هسپرادین و آرورا کیناز B نقش مهمی دارند و در نهایت منجر به انتخاب‌پذیری بیشتر هسپرادین برای آرورا کیناز B در مقایسه با آرورا کیناز A می‌شود. از این رو، پیشنهاد می‌شود در طراحی مهارکننده‌های اختصاصی آرورا کیناز B به نقش پروتئین فعال کننده توجه ویژه‌ای معطوف گردد.

**کلید واژه:** آرورا کیناز، داروی ضدسرطان، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، هسپرادین، INCENP



B تقریباً در تمام سلول‌های بدن یافت می‌شوند در حالی که بیان آرورا کیناز C به سلول‌های زایا (germ cells) محدود می‌شود [۲].

آرورا کیناز A از طریق کنترل شروع فعال‌سازی وابسته به سانتروزم Cyclin B1/Cdk1 در ورود سلول‌ها به مرحله میتوز نقش دارد. از دیگر وظایف این آرورا کیناز تنظیم تجمع دقیق

### ۱- مقدمه

آرورا کینازها خانواده‌ای از سرین/ترئونین کینازها هستند که از تنظیم‌کنندگان مهم چرخه سلولی به‌شمار می‌روند [۱]. ژنوم پستانداران سه عضو از خانواده آرورا کینازها را کد می‌کند که شامل آرورا کینازهای A، B و C می‌باشد. آرورا کینازهای A و

کینازها شباهت زیادی دارد، به همین دلیل مهارکننده‌های رقابتی با ATP اغلب انتخاب‌پذیری کمی برای پروتئین هدف خود دارند. از این رو، طراحی یک مهارکننده اختصاصی برای هر یک از آن‌ها که کمترین عوارض جانبی را بر روی سلول‌های سالم داشته باشد از اهمیت زیادی برخوردار است. مهارکننده‌های آرورا کینازها بر اساس انتخاب‌پذیری به سه دسته تقسیم می‌شوند؛ ۱) مهارکننده‌های اختصاصی آرورا کیناز A مانند MLN8054 [۸]، ۲) مهارکننده‌های اختصاصی آرورا کیناز B مانند باراسرتیپ (AZD1152) [۹]، ۳) مهارکننده‌های غیراختصاصی که هر دو نوع را تحت تاثیر قرار می‌دهند مانند VX680 [۱۰].

هسپرادین یک مولکول کوچک دارای حلقه‌ی ایندولینون است. این مهارکننده با ایجاد خلل در نقاط بازرسی چرخه سلولی در هنگام گذر از متافاز به آنافاز باعث شکست سیتوکینز و ایجاد پلی‌پلوئیدی در سلول می‌شود. هم‌چنین هسپرادین فسفردار کردن سرین ۱۰ هیستون H3 که توسط آرورا کیناز B کنترل می‌شود را مهار می‌کند [۱۱]. گزارش شده است که این مهارکننده هر دو آرورا کیناز A و B را مهار می‌کند، اما قدرت مهارکنندگی آن برای آرورا کیناز B ( $IC_{50} = 3 \text{ nM}$ ) حدود چهار برابر بیشتر از آرورا کیناز A ( $IC_{50} = 11 \text{ nM}$ ) است [۱۲، ۱۳].

در بین مهارکننده‌های اختصاصی آرورا کیناز B، اخیراً مکانسیم مهار انتخابی مهارکننده باراسرتیپ توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفته است و برهم‌کنش‌های لیگاند-گیرنده بین این مهارکننده و آرورا کینازهای A و B مقایسه و گزارش شده است [۱۴]. با این حال، ساز و کار انتخاب‌پذیری هسپرادین برای آرورا کیناز B تا کنون مشخص نشده است. بر این اساس، پژوهش حاضر به هدف روشن ساختن ساز و کار ساختاری مهار انتخابی هسپرادین برای آرورا کیناز B انسانی نسبت به آرورا کیناز A با استفاده از مدل‌سازی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام گرفت.

## ۲- روش‌های محاسباتی

### ۲-۱- مدل‌سازی

مدل‌سازی با استفاده از نرم‌افزار Modeller نسخه ۹/۹ [۱۵] انجام شد و بهترین مدل براساس DOPE score انتخاب گردید. برای تهیه کمپلکس آرورا کیناز A-TPX2 انسانی از

دوک تقسیم میتوزی، دخالت در بلوغ و تفکیک صحیح سانتروزوم‌ها می‌باشد [۳]. آرورا کیناز B عضو کاتالیستی کمپلکس رونده کروموزومی است که همراه با پروتئین‌های غیرکاتالیستی این کمپلکس، جداسازی دقیق کروماتیدها در حین تقسیم میتوز، اصلاحات هیستون‌ها و سیتوکینز را کنترل می‌کند [۴]. آرورا کیناز C عضو کاتالیستی کمپلکس رونده کروموزومی میوزی است که نقطه بازرسی مونتاژ دوک، سیتوکینز و اتصالات کینه توکور-میکروتوبول را تنظیم می‌کند. هم‌چنین با قرارگیری در مراکز سازمان‌دهی میکروتوبول در سلول‌های میوزی به حفظ یکپارچگی دوک دوقطبی کمک می‌کند [۲]. همانند سایر کینازها، عملکردهای آرورا کینازها از لحاظ مکانی و زمانی توسط فعال‌کننده‌های خاص کینازی تنظیم می‌شود. چندین فعال‌کننده برای آرورا کیناز A شناخته شده است که معروف‌ترین آن‌ها پروتئین TPX2 (Targeting Protein for Xklp2) می‌باشد. اتصال این پروتئین به آرورا کیناز A موجب تسهیل (فسفردار کردن خودی) اتوفسفریلاسیون بر روی ترئونین ۲۸۸ می‌شود و یک سپر حفاظتی در برابر فسفر زدایی این باقیمانده توسط پروتئین فسفاتاز ۱ ایجاد می‌کند [۵]. آرورا کینازهای B و C نیز که بخش کاتالیستی کمپلکس‌های رونده کروموزومی هستند توسط INCENP (INNER CENtrome Protein) فعال می‌شوند. با توجه به نقش مهمی که آرورا کینازها در کنترل مراحل مختلف تقسیم سلولی در پستانداران ایفا می‌کنند، اختلال در عملکرد آن‌ها می‌تواند باعث نقص در عملکرد سانتروزوم، مونتاژ دوک، جفت شدن صحیح کروموزوم‌ها و سیتوکینز شده و به بی‌ثباتی ژنتیکی و تومورزایی منجر شود. بیان آرورا کیناز C و دخالت آن در بروز سرطان کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است ولی افزایش سطح بیان و فعالیت آرورا کینازهای A و B در بسیاری از سرطان‌های انسانی گزارش شده است. همین مسئله، توجه شرکت‌های داروسازی را به ساخت داروهای مهارکننده برای آرورا کینازها جلب کرده است [۴ و ۶].

مهارکننده‌های آرورا کینازی که تا کنون گزارش شده‌اند به دسته مهارکننده‌های رقابتی با ATP مانند کوئینازولین‌ها، پیریمیدین‌ها، پیرازول‌ها یا ایندولینون‌ها تعلق دارند [۷]. این مهارکننده‌ها جایگاه اتصال ATP را اشغال کرده و با ناحیه لولا که بین دو لوب آرورا کینازی قرار دارد برهم‌کنش می‌دهند. توالی آمینواسیدی و ساختار جایگاه اتصال ATP در آرورا

آن، درشت‌مولکول‌های زیستی عمده از جمله پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و قندها را پوشش می‌دهد. تفاوت این نسخه با میدان نیروی GROMOS 43a1 آن است که اشکال فسفریله‌ی سرین، ترئونین و تیروزین را نیز شامل می‌شود [۲۳]. هر یک از کمپلکس‌های آروراکیناز A و B به ترتیب در مرکز جعبه‌های مکعبی به ابعاد  $9/28 \times 9/28 \times 8/77$  و  $9/28 \times 8/77 \times 8/77$  نانومتر قرار داده شدند تا اطمینان حاصل شود که حداقل فاصله سطح پروتئین‌ها از لبه‌های جعبه  $1/1$  نانومتر باشد. سپس مولکول‌های آب به هر یک از جعبه‌ها اضافه گردید به طوری که جعبه حاوی آروراکیناز A با  $25102$  مولکول آب و جعبه حاوی آروراکیناز B با  $20557$  مولکول آب پر شدند. جهت خنثی‌سازی محتویات جعبه‌های شبیه‌سازی، ۵ یون سدیم در سیستم آروراکیناز A و ۶ یون کلر در سیستم آروراکیناز B جایگزین همان تعداد از مولکول‌های آب شدند. در ادامه، برای حصول اطمینان از عدم برخورد‌های فضایی یا هندسه نامناسب، کمینه‌سازی انرژی تا جایی که حداکثر نیروی وارد بر سیستم کمتر از  $500$  کیلوژول بر مول نانومتر باشد، انجام گرفت. قبل از شروع شبیه‌سازی اصلی، مولکول‌های حلال و یون‌های اطراف پروتئین، طی دو مرحله شبیه‌سازی  $200$  پیکوثانیه‌ای با اعمال محدودیت موقعیت (Position Restrain) به تعادل رسانده شدند. پس از به آرامش رسیدن مولکول‌های حلال در اطراف پروتئین، شبیه‌سازی اصلی بر روی هر دو سیستم به مدت  $80$  نانوثانیه بدون اعمال محدودیت موقعیت انجام شد. در تمامی مراحل شبیه‌سازی، برای انتگرال‌گیری از معادلات حرکت از بازه‌های زمانی  $2$  فمتوثانیه‌ای استفاده شد. برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک لنارد-جونز و کوتاه‌برد تا شعاع  $1$  نانومتر محاسبه گردیدند. برای برهم‌کنش‌های دوربرد از الگوریتم Particle Mesh Ewald استفاده شد [۲۴] و طول پیوندها با الگوریتم لینکس محدود گردید [۲۵]. در طول زمان شبیه‌سازی، دما با الگوریتم V-rescale [۲۶] در حدود  $300$  کلوین و فشار با الگوریتم پارینلو-رحمان [۲۷] در حدود یک بار ثابت نگه داشته شد.

### ۳- نتایج و بحث روی نتایج

جایگاه اتصال ATP در پروتئین کینازها یک هدف ایده‌آل برای درمان دارویی است. از بیست و شش باقیمانده‌ای که جایگاه اتصال ATP را پوشش می‌دهند، تنها سه باقیمانده در

مختصات اتمی کد بانک 1OL5 [۱۶] به‌عنوان الگو استفاده شد. این کمپلکس شامل فرم فعال آرورا کیناز A انسانی (باقیمانده‌های ۱۲۳ تا ۳۸۸ که بر روی باقیمانده‌های ترئونین ۲۸۷ و ۲۸۸ فسفریله است) در کمپلکس با پروتئین فعال‌کننده TPX2 انسانی (باقیمانده‌های ۷ تا ۴۳) می‌باشد. نواحی فاقد ساختار در پروتئین TPX2 (باقیمانده‌های ۱ تا ۶ و ۲۳ تا ۲۹) با الگو گرفتن از کدبانک‌های 3HA6 [۱۷] و 3E5A [۱۸] تکمیل شدند.

مختصات اتمی آرورا کیناز B در کمپلکس با INCENP از کد بانک 4AF3 [۱۳] به‌دست آمد. این ساختار متعلق به فرم فعال آرورا کیناز B انسانی (شامل باقیمانده‌های ۷۰ تا ۳۳۸ که بر روی ترئونین ۲۳۲ فسفریله است) در کمپلکس با پروتئین فعال‌کننده INCENP انسانی (شامل باقیمانده‌های ۸۸۲ تا ۸۴۰) و مهارکننده VX-680 است. بخشی از پروتئین آرورا کیناز B در ناحیه قطعه فعال‌کننده (باقیمانده‌های ۲۲۱ تا ۲۳۶) در کد بانک 4AF3 فاقد ساختار بود که برای کامل کردن این ناحیه، از مختصات اتمی آرورا کیناز B زنوپوس در کمپلکس با INCENP در کدبانک 2BFX استفاده شد. هم‌چنین ناحیه G-loop به‌علت حضور مهارکننده VX-680 به سمت پایین کشیده شده بود که جهت تصحیح این وضعیت، از مختصات اتمی G-loop در آرورا کیناز B زنوپوس با کدبانک 2BFX به‌عنوان الگو استفاده شد [۱۹]. لازم به ذکر است که توالی آمینواسیدی دمین‌های کینازی آرورا کیناز B انسانی (UniProt ID: Q96GD4) و زنوپوس (UniProt ID: Q6DE08)،  $80$  درصد هم‌سانی و  $90$  درصد شباهت دارند. پس از مدل‌سازی کمپلکس‌های آرورا کیناز-پروتئین فعال‌کننده اختصاصی، مختصات اتمی مهارکننده هسپرادین از کدبانک 2BFY (کمپلکس آرورا کیناز B زنوپوس با هسپرادین) [۱۹] توسط نرم‌افزار Swiss PDB Viewer [۲۰] به هر یک از کمپلکس‌ها اضافه شد. توپولوژی مهارکننده هسپرادین جهت انجام شبیه‌سازی با استفاده از وب‌سرور PRODRG [۲۱] تهیه شد.

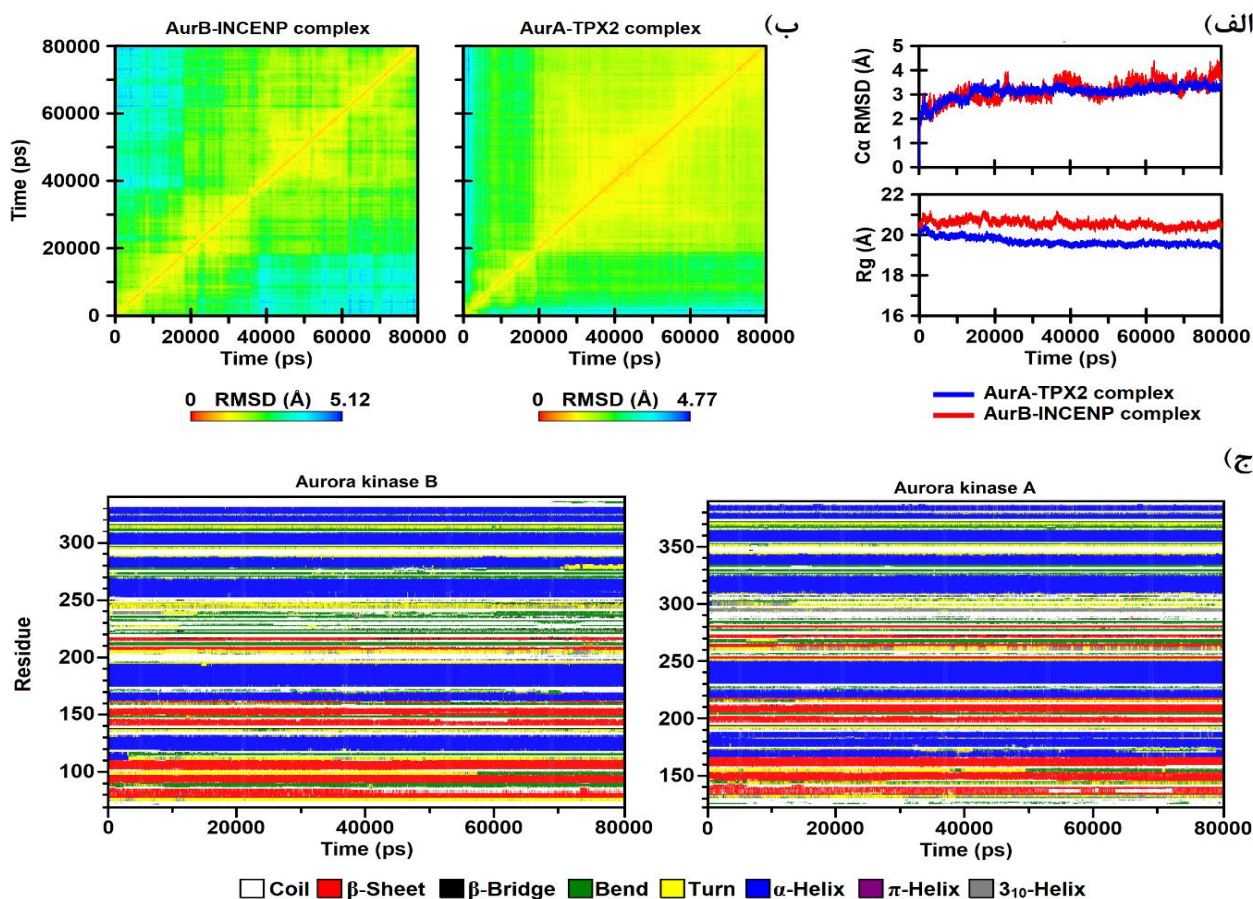
### ۲-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی با استفاده از بسته نرم‌افزاری گرومکس [۲۲] با میدان نیروی GROMOS 43a1p انجام شد. این میدان نیرو یک نسخه از میدان نیروی GROMOS96 است که همانند

بیشتر از آرورا کیناز A است، از این رو اختصاصی آروراکیناز B محسوب می‌شود. [۱۲ و ۱۳]. در این پژوهش، ساز و کار این مهار انتخابی با استفاده از مدل‌سازی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

در این مطالعه، ساختار دو کمپلکس آرورا کینازی مدل‌سازی، شبیه‌سازی و مورد مقایسه قرار گرفتند. ساختار اول، شامل فرم فعال آرورا کیناز A انسانی در کمپلکس با پروتئین فعال‌کننده TPX2 و مهارکننده هسپرادین است. در ساختار دوم، فرم فعال آرورا کیناز B انسانی، در کمپلکس با پروتئین فعال‌کننده INCENP و مهارکننده هسپرادین می‌باشد.

بین آرورا کینازهای انسانی متفاوت است. باقیمانده‌های لوسین ۲۱۵، ترئونین ۲۱۷ و آرژینین ۲۲۰ اختصاصی آرورا کیناز A هستند که به ترتیب با باقیمانده‌های آرژینین ۱۵۹، گلوتامات ۱۶۱ و لیزین ۱۶۴ در آرورا کیناز B جایگزین شده‌اند [۱]. از این رو، تشابه بالای جایگاه فعال در آرورا کینازها یک چالش اساسی در طراحی مهارکننده اختصاصی به‌شمار می‌رود. هسپرادین یک مهارکننده رقابتی است که به جایگاه اتصال ATP در فرم فعال پروتئین کیناز متصل می‌گردد [۱۹]. مطالعات پیشین نشان داده است که این مهارکننده بر روی هر دو نوع آرورا کینازهای A و B اثر دارد اما گزارش شده است که قدرت مهارکنندگی آن بر روی آرورا کیناز B حدود چهار برابر



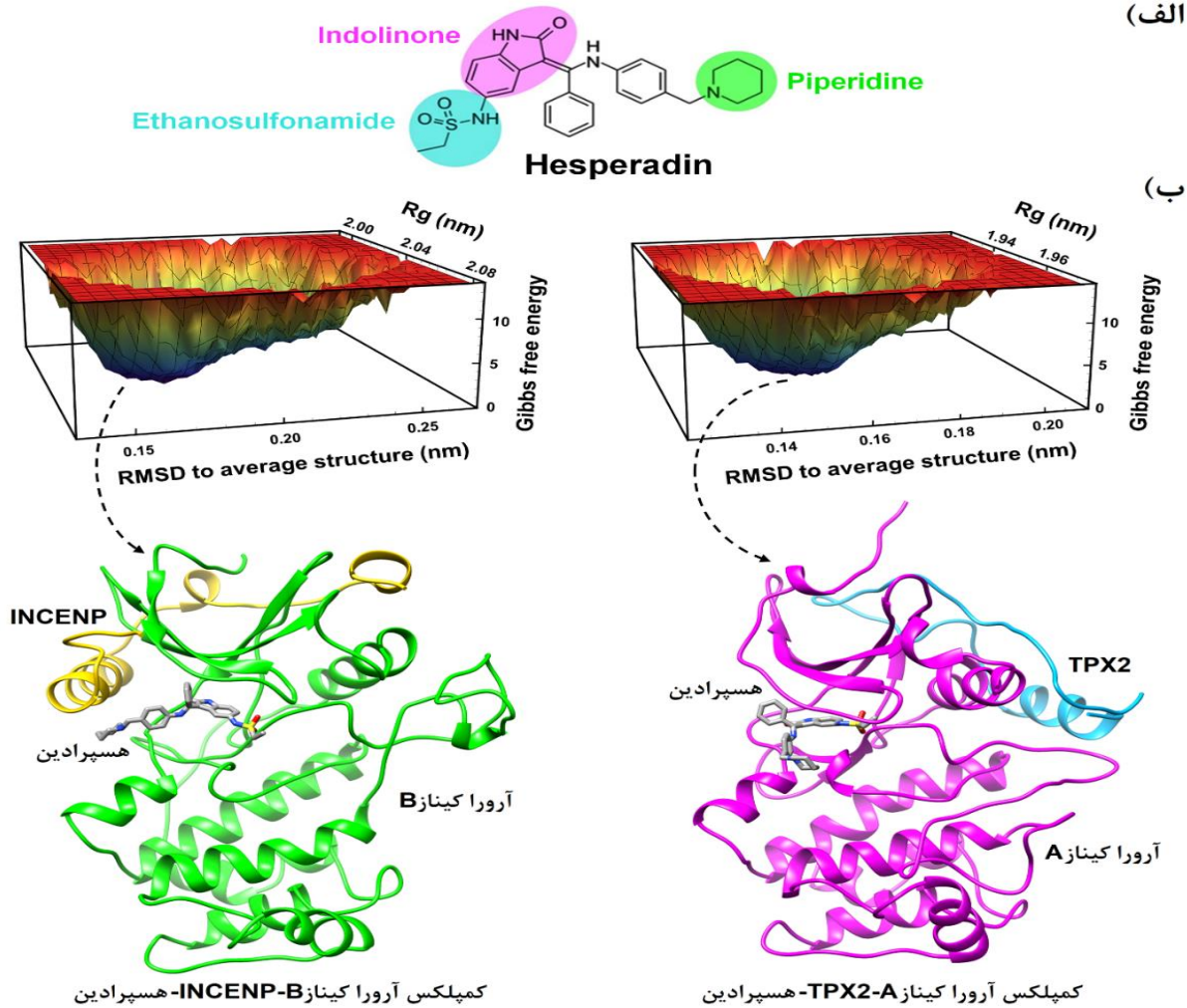
شکل ۱: (الف) نمودارهای RMSD اتم‌های کربن آلفا و شعاع ژیراسیون (Rg) پروتئین در کمپلکس‌های آرورا کیناز TPX2-A (رنگ آبی) و آرورا کیناز INCENP-B (رنگ قرمز)، (ب) نمودارهای RMSD دوبعدی کمپلکس‌ها در طول زمان شبیه‌سازی و (ج) نمودارهای ساختارهای دوم در آرورا کینازهای A و B

یک بعدی و دو بعدی نشان می‌دهند طی زمان‌های اولیه شبیه‌سازی میزان نوسان در هر دو کمپلکس پروتئینی زیاد است ولی بعد از سپری شدن حدود ۴۰ نانوثانیه تا انتهای زمان

جذر میانگین مجذور انحرافات (RMSD) اتم‌های کربن آلفا و شعاع ژیراسیون پروتئین در هر یک از کمپلکس‌ها به‌عنوان تابعی از زمان در شکل ۱ آورده شده است. نمودارهای RMSD

ساختار شیمیایی هسپرادین و ساختار هر یک از کمپلکس‌ها با حداقل انرژی آزاد به عنوان ساختار نماینده که با آنالیز چشم‌انداز انرژی آزاد (Free energy landscape) از ۴۰ نانوثانیه پایانی هر شبیه‌سازی استخراج شده است در شکل ۲ نمایش داده شده است.

شبیه‌سازی رفتار تقریباً یکنواختی مشاهده می‌شود (شکل ۱، قسمت الف و ب). تغییرات وابسته به زمان ساختارهای دوم نیز پایداری هسته پروتئین‌ها در حضور مهارکننده را تایید می‌کنند (شکل ۱، قسمت ج). از این رو، ۴۰ نانوثانیه پایانی شبیه‌سازی مبنای مقایسه آنالیزهای بعدی قرار گرفت.



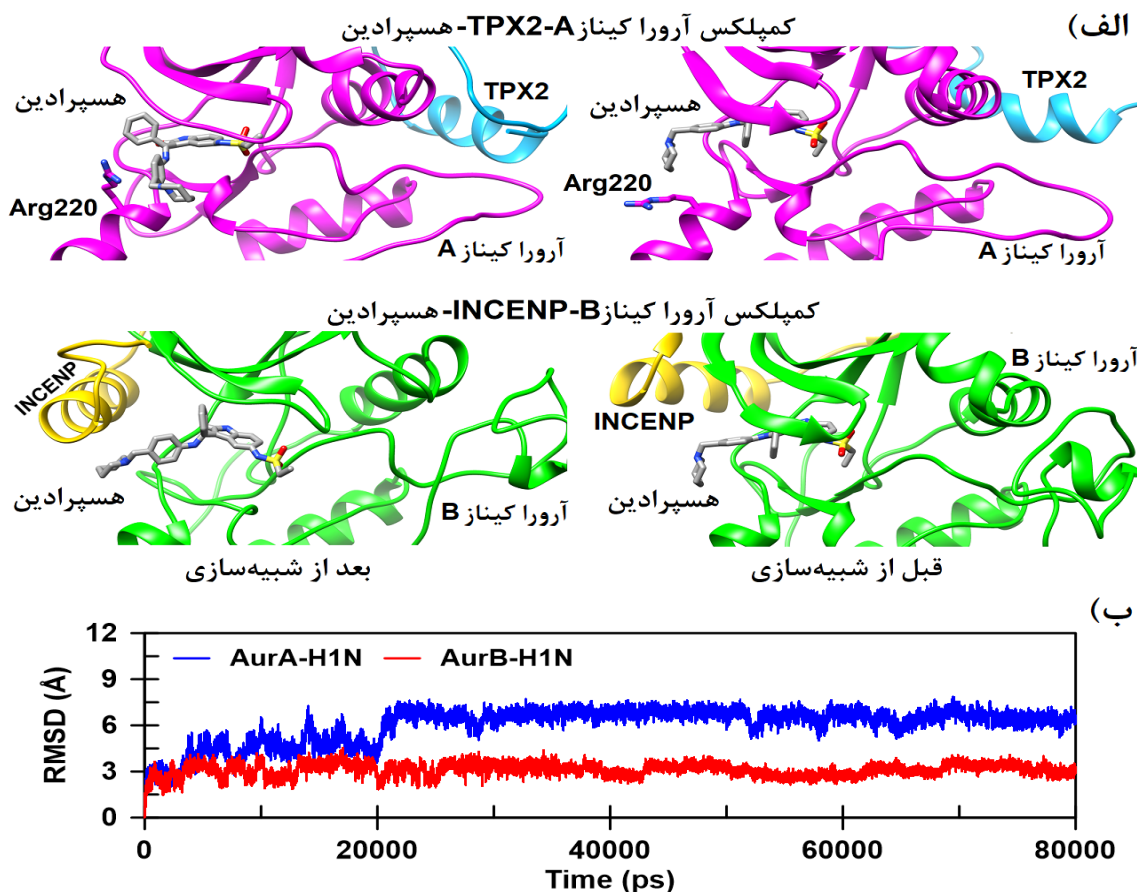
شکل ۲: الف) ساختار شیمیایی مهارکننده هسپرادین. ب) نمودارهای سه بعدی چشم‌انداز انرژی آزاد (Free Energy Landscape) به عنوان تابعی از شعاع ژیراسیون پروتئین و RMSD سیستم نسبت به ساختار میانگین (بالا) و نمایش سه‌بعدی ساختاری با حداقل انرژی آزاد به عنوان ساختار نماینده (پایین) برای کمپلکس‌های آرورا کیناز TPX2-A-هسپرادین (سمت راست)، و آرورا کیناز INCENP-B-هسپرادین (سمت چپ).

فنیل‌آمین از موقعیت اولیه خود خارج شد. بررسی برهم‌کنش‌های این ناحیه از مهارکننده نشان داد که تشکیل برهم‌کنش کاتیون-پای بین حلقه‌های فنیل مرکزی و فنیل‌آمین هسپرادین با گروه گوانیدینیوم آرژینین ۲۲۰ (به ترتیب با میانگین فاصله  $0.193 \pm 0.05$  و  $0.090 \pm 0.04$ )، مهارکننده را در این وضعیت تثبیت کرده است. محاسبه RMSD مهارکننده

نمای نزدیک از ناحیه اتصال هسپرادین در ساختارهای نماینده نشان می‌دهد که قبل از شبیه‌سازی، مهارکننده هسپرادین در آرورا کینازهای A و B جایگاه مشابهی را اشغال کرده است (شکل ۳، قسمت الف). در طی شبیه‌سازی، موقعیت اولیه هسپرادین در آرورا کیناز B تا حدود زیادی حفظ شد، اما در آرورا کیناز A، حلقه پی‌پیدین هسپرادین به همراه حلقه

کونفورماسیون تا پایان شبیه‌سازی حفظ می‌گردد (شکل ۳، قسمت ب).

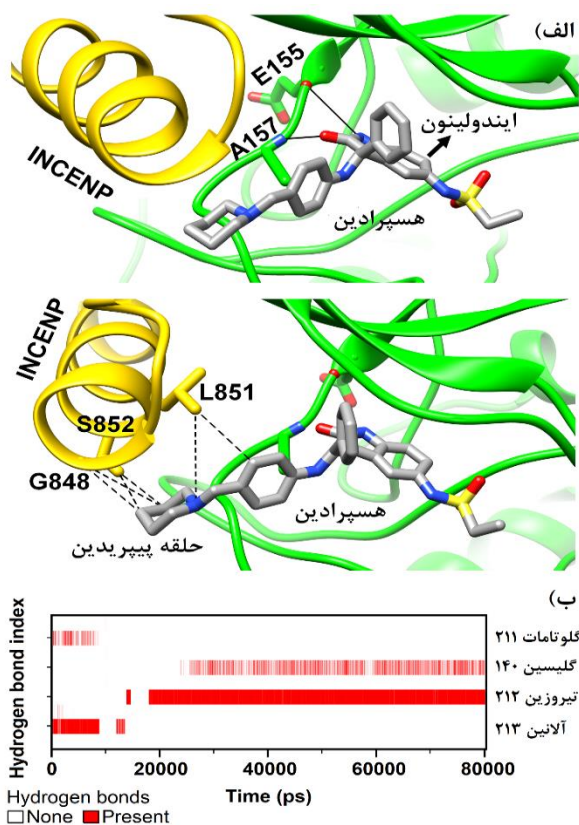
نیز تایید کرد که پس از سپری شدن حدود ۲۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی، یک تغییر کونفورماسیون در مهارکننده اتفاق می‌افتد که به صورت افزایش در RMSD بروز پیدا کرده و این



شکل ۳: (الف) مقایسه موقعیت و نحوه جای‌گیری هسپرادین در کمپلکس با آرورا کیناز TPX2-A و آرورا کیناز INCENP-B در ساختار اولیه (قبل از شبیه‌سازی) و ساختار نماینده (بعد از شبیه‌سازی) و (ب) نمودار تغییرات ساختاری هسپرادین در کمپلکس با آرورا کینازهای A (رنگ آبی) و B (رنگ قرمز) در طول زمان شبیه‌سازی

در کمپلکس آرورا کیناز A-هسپرادین، شبکه برهم‌کنشی متفاوتی شکل گرفته است. پیوندهای هیدروژنی بین حلقه ایندولینون هسپرادین با آلانین ۲۱۳ و گلوتامات ۲۱۱ آرورا کیناز A (معادل باقیمانده‌های آلانین ۱۵۷ و گلوتامات ۱۵۵ در آرورا کیناز B) بعد از سپری شدن حدود ۹ نانوثانیه از آغاز شبیه‌سازی شکسته شد و حدود ۹ نانوثانیه بعد، یک پیوند هیدروژنی بین تیروزین ۲۱۲ و حلقه ایندولینون هسپرادین تشکیل گردید. یک پیوند هیدروژنی دیگر نیز بین گروه سولفونامید هسپرادین و گلیسین ۱۴۰ مشاهده شد که اگرچه به اندازه پیوند قبلی قوی نیست ولی در طول بازه آنالیز حفظ شده است (شکل ۴). یک شبکه برهم‌کنشی وان‌دروالس نیز بین

آنالیز شبکه برهم‌کنشی هسپرادین با آرورا کیناز B نشان داد که حلقه ایندولینون مهارکننده، دو پیوند هیدروژنی با نیتروژن آمید آلانین ۱۵۷ و اکسیژن کربونیل گلوتامات ۱۵۵ آرورا کیناز B تشکیل داده است که اولی بسیار قوی است (درصد حضور ۹۳/۹۶) و دومی علیرغم این‌که چندان قوی نیست (درصد حضور ۲۵/۶۹) در طول بازه آنالیز حفظ شده است (شکل ۴). افزون بر این، باقیمانده‌های آرژینین ۸۱، لوسین ۸۳، والین ۹۱، تیروزین ۹۲، لوسین ۹۳، لوسین ۱۳۸، لوسین ۱۵۴، تیروزین ۱۵۶، گلوتامات ۱۶۱، گلوتامات ۲۰۴، آلانین ۲۱۷ و اسپاراتات ۲۱۸ نیز در برهم‌کنش‌های وان‌دروالس با هسپرادین نقش دارند.



شکل ۴: (الف) پیوندهای هیدروژنی حلقه ایندولینون هسپرادین با آلانین ۱۵۷ (A157) و گلوتامات ۱۵۵ (E155) از ناحیه لولای آرورا کیناز B. خطوط ممتد مشکی نشان‌دهنده پیوندهای هیدروژنی است. (ب) برهم‌کنش‌های وان‌دروالس حلقه پیپیریدین هسپرادین با باقیمانده‌های گلیسین ۸۴۸ (G848)، لوسین ۸۵۱ (L851) و سرین ۸۵۲ (S852) از INCENP. برهم‌کنش‌های وان‌دروالس به صورت خط‌چین‌های مشکی مشخص شده‌اند. (ج) نقشه پیوند هیدروژنی بین هسپرادین و آرورا کیناز A در طول شبیه‌سازی. خطوط قرمز نشان‌دهنده وجود پیوند هیدروژنی بین هسپرادین و باقیمانده‌های مشخص شده از آرورا کیناز A در زمان‌های مختلف است.

اخیراً، یک مطالعه محاسباتی مشابه به منظور بررسی ساز و کار انتخاب‌پذیری باراستیب برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شده است. این مهارکننده به عنوان یک عامل ضد سرطان توسعه یافته است و حداقل ده کارآزمایی بالینی برای درمان تومورهای جامد، لوسمی میلوئیدی و لنفوم داشته است. انتخاب‌پذیری باراستیب برای آرورا کیناز B بیش از ۱۰۰۰ برابر بیشتر از آرورا کیناز A است، در حالی که مطالعه مزبور، انرژی آزاد اتصال به ترتیب ۲/۱۴- و ۹/۷۵- کیلوکالری بر مول برای مدل‌های فعال

هسپرادین و باقیمانده‌های آرژینین ۱۳۷، لوسین ۱۳۹، گلیسین ۱۴۵، والین ۱۴۷، لوسین ۱۴۹، لیزین ۱۶۲، ترئونین ۲۱۷، تیروزین ۲۱۹، گلوتامات ۲۶۰، آسپارژین ۲۶۱، لوسین ۲۶۳، آلانین ۲۷۳ و آسپاراتات ۲۷۴ از آرورا کیناز A به اتصال هسپرادین کمک می‌کند.

به نظر می‌رسد تشکیل پیوند هیدروژنی با باقیمانده‌های آلانین و گلوتامات متعلق به ناحیه لولا در پایداری اتصال مهارکننده به آرورا کیناز نقش مهمی برعهده دارند. آنالیز ساختار سه‌بعدی تعدادی از کمپلکس‌های آرورا کیناز-مهارکننده در داده پایگاه پروتئین نیز نشان داد که مهارکننده‌های آرورا کینازی با زنجیره اصلی باقیمانده آلانین در ناحیه لولا پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند. در تعدادی از این ساختارها، پیوند هیدروژنی با زنجیره اصلی باقیمانده گلوتامات ناحیه لولا نیز مشاهده شد [۱۳، ۱۹، ۲۸-۳۲]. به عنوان مثال، در آرورا کیناز B زئوپوس (کدبانک 2BFY)، حلقه ایندولینون هسپرادین در شکاف کاتالیتیکی به گونه‌ای قرار گرفته است که اتم‌های نیتروژن و اکسیژن آن به ترتیب با زنجیره اصلی آلانین ۱۷۳ و گلوتامات ۱۷۱ از ناحیه لولا پیوند هیدروژنی دارند [۱۹].

همان‌طور که پیشتر اشاره شد، آرورا کینازها برای انجام عملکردهای خود به فعال‌کننده‌های اختصاصی متصل می‌شوند. پروتئین TPX2 فعال‌کننده آرورا کیناز A است و هیچ برهم‌کنش مستقیمی با مهارکننده هسپرادین ندارد. پروتئین INCENP که فعال‌کننده اختصاصی آرورا کیناز B است مانند یک تاج، لوب آمینی کیناز را در برمی‌گیرد و علیرغم این‌که بخش انتهایی آمینی آن در مجاورت گروه پیپیریدین هسپرادین قرار می‌گیرد، برهم‌کنش مستقیمی بین آن‌ها در ساختار کریستالی اولیه گزارش نشده است [۱۹]. با این حال، در طول زمان شبیه‌سازی مشاهده شد که هسپرادین و INCENP به یکدیگر نزدیک شده و بین گروه پیپیریدین مهارکننده و باقیمانده‌های گلیسین ۸۴۸، لوسین ۸۵۱ و سرین ۸۵۲ از پروتئین INCENP برهم‌کنش‌های وان‌دروالس ایجاد می‌شود (شکل ۴). با در نظر گرفتن این یافته‌ها، به نظر می‌رسد که برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بین هسپرادین و INCENP، مهارکننده را در شکاف جایگاه فعال آرورا کیناز B تثبیت نموده و با کمک به حفظ برهم‌کنش‌های اختصاصی مهارکننده با ناحیه لولای آرورا کیناز B، مانع از چرخش یا خروج مهارکننده از جایگاه فعال می‌شود.

کند. در نتیجه، بخش انتهایی آن که شامل حلقه‌های فنیل‌آمین و پیپریدین می‌شود به‌طور کامل از جایگاه فعال خارج شده است. به‌نظر می‌رسد تشکیل برهم‌کنش کاتیون-پای بین حلقه‌های فنیل مرکزی و فنیل‌آمین با آرژینین ۲۲۰ به همراه پیوند هیدروژنی غیراختصاصی با تیروزین ۲۱۲، هسپرادین را در این موقعیت تثبیت کرده و مانع خروج کامل آن از شکاف جایگاه فعال شده است. در حالی که در آرورا کیناز B، حلقه ایندولینون هسپرادین با باقیمانده‌های آلانین ۱۵۷ و گلوتامات ۱۵۵ از ناحیه لولا پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد و همراه با شبکه برهم‌کنشی وان‌دروالس باعث اتصال هسپرادین به آرورا کیناز B می‌شود. از طرف دیگر، برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بین هسپرادین و پروتئین INCENP سهم قابل توجهی در اتصال هسپرادین و حفظ پیوندهای هیدروژنی بین مهارکننده و ناحیه لولای آرورا کیناز B دارد.

#### ۴- نتیجه‌گیری

این پژوهش با هدف یافتن ساز و کار ساختاری انتخاب‌پذیری بیشتر هسپرادین برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A انجام گرفت. به این منظور دو کمپلکس آرورا کیناز-پروتئین فعال‌کننده-مهارکننده هسپرادین برای آرورا کینازهای A و B مدل‌سازی و پس از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در محیط آبی مورد مقایسه قرار گرفتند. یافته‌های ما نشان داد دو گروه از برهم‌کنش‌ها در حفظ و تثبیت هسپرادین در جایگاه فعال آرورا کیناز B نقش دارند. گروه اول پیوندهای هیدروژنی بین هسپرادین و آرورا کیناز B است که در مدل اولیه (قبل از شبیه‌سازی) وجود داشتند و در طی شبیه‌سازی کمپلکس پروتئینی محلول در آب نیز حفظ شده‌اند. در حالی که در آرورا کیناز A، این برهم‌کنش‌ها طی شبیه‌سازی از بین رفته و برهم‌کنش‌های جدیدی که جایگزین آنها شده‌اند نتوانستند هسپرادین را در موقعیت خود در جایگاه فعال حفظ کنند. گروه دوم، برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بین هسپرادین و پروتئین INCENP (فعال‌کننده اختصاصی آرورا کیناز B) است که در مدل اولیه وجود نداشتند ولی در طی شبیه‌سازی کمپلکس پروتئینی در آب ایجاد شده‌اند. از آنجایی که پروتئین فعال‌کننده TPX2 به جایگاه متفاوتی در آرورا کیناز A متصل می‌شود، برهم‌کنش‌های گروه دوم در این کمپلکس شکل نگرفته‌اند. از این رو می‌توان نتیجه‌گیری نمود که پروتئین فعال

آرورا کیناز A و B در حضور پروتئین‌های فعال‌کننده اختصاصی محاسبه شد. علاوه بر این، نتایج نشان داد که باراسرتیب به آرورا کیناز A از طریق برهم‌کنش با باقیمانده‌های والین ۱۴۷، لوسین ۲۱۰، تیروزین ۲۱۲ و لوسین ۲۶۳ متصل شده است که لوسین ۲۶۳ قوی‌ترین برهم‌کنش (۱/۹۵- کیلوکالری بر مول) را با لیگاند از طریق برهم‌کنش آبگریز تشکیل می‌دهد. در آرورا کیناز B، باقیمانده‌های والین ۹۱، گلوتامات ۱۲۵، گلوتامین ۱۲۹، لوسین ۱۳۸، لوسین ۱۵۴، آرژینین ۱۵۹، گلیسین ۱۶۰، لوسین ۲۰۷، آلانین ۲۱۷ و آسپاراتات ۲۱۸ باقیمانده‌های کلیدی در اتصال به باراسرتیب بودند که از میان آنها آرژینین ۱۵۹ (۳/۲- کیلوکالری بر مول) و آسپاراتات ۲۱۸ (۴/۷۲- کیلوکالری بر مول) قوی‌ترین برهم‌کنش‌ها را با باراسرتیب داشتند. در نهایت، برهم‌کنش‌های هیدروفوب، نیروی محرکه اولیه برای اتصال باراسرتیب به هر دو آرورا کیناز A و B و آرژینین ۱۵۹ به عنوان باقیمانده کلیدی مسئول انتخاب‌پذیری باراسرتیب برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A معرفی شدند [۱۴]. برهم‌کنش‌های وان‌دروالس بین باقیمانده‌های والین ۹۱، لوسین ۱۳۸، لوسین ۱۵۴، آلانین ۲۱۷ و آسپاراتات ۲۱۸ از آرورا کیناز B با هسپرادین در مطالعه حاضر نیز مشاهده شدند ولی هیچ برهم‌کنشی بین آرژینین ۱۵۹ و هسپرادین شکل نگرفته است. لازم به ذکر است که آرژینین ۱۵۹ اختصاصی آرورا کیناز B است و باقیمانده معادل آن در آرورا کیناز A، لوسین ۲۱۵ است. بر اساس یافته‌های آنها، اکسیژن ستون فقرات آرژینین ۱۵۹ با هسپرادین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند در حالی که چنین پیوندی بین هسپرادین و لوسین ۲۱۵ آرورا کیناز A مشاهده نشد. اگر آرژینین ۱۵۹ از طریق زنجیره جانبی باردار و طویل خود با هسپرادین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کرد این نتیجه‌گیری منطقی به نظر می‌رسید. ولی برقراری پیوند هیدروژنی از طریق ستون فقرات که در هر دو باقیمانده آرژینین و لوسین یکسان است نمی‌تواند انتخاب‌پذیری بیشتر باراسرتیب را برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A توجیه کند.

در پژوهش حاضر، نتایج به‌دست آمده از آنالیز شبکه برهم‌کنشی هسپرادین نشان داد که در آرورا کیناز A، حلقه ایندولینون برهم‌کنش‌های اولیه خود را با ناحیه لولا (آلانین ۲۱۳ و گلوتامات ۲۱۱) از دست داده و علیرغم تشکیل یک پیوند هیدروژنی قوی با تیروزین ۲۱۲ و مشارکت شبکه برهم‌کنشی وان‌دروالس نتوانسته است جایگاه اولیه خود را حفظ

- [11] S. Hauf, R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. Van Meel, C.L. Rieder, J.-M. Peters, *J. Cell Biol.*, 161 (2003) 281.
- [12] S. Santaguida, A. Tighe, A.M. D'Alise, S.S. Taylor, A. Musacchio, *J. Cell Biol.*, 190 (2010) 73.
- [13] J.M. Elkins, S. Santaguida, A. Musacchio, S. Knapp, *J. Med. Chem.*, 55 (2012) 7841-7848.
- [14] D. Zhao, A.H. Kovacs, M. Campbell, W. Floriano, J. Hou, *J. Mol. Struct.*, 1292 (2023) 136178.
- [15] A. Šali, T.L. Blundell, *J. Mol. Biol.*, 234 (1993) 779.
- [16] R. Bayliss, T. Sardon, I. Vernos, E. Conti, *Mol. Cell.*, 12 (2003) 851.
- [17] M.A. Clark, R.A. Acharya, C.C. Arico-Muendel, S.L. Belyanskaya, D.R. Benjamin, N.R. Carlson, P.A. Centrella, C.H. Chiu, S.P. Creaser, J.W. Cuzzo, *Nat. Chem. Biol.*, 5 (2009) 647.
- [18] B. Zhao, A. Smallwood, J. Yang, K. Koretke, K. Nurse, A. Calamari, R.B. Kirkpatrick, Z. Lai, *Protein Sci.*, 17 (2008) 1791.
- [19] F. Sessa, M. Mapelli, C. Ciferri, C. Tarricone, L.B. Areces, T.R. Schneider, P.T. Stukenberg, A. Musacchio, *Mol. Cell.*, 18 (2005) 379.
- [20] N. Guex, M.C. Peitsch, *Electrophoresis*, 18 (1997) 2714.
- [21] A.W. Schüttelkopf, D.M. Van Aalten, *Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.*, 60 (2004) 1355.
- [22] S. Pronk, S. Páll, R. Schulz, P. Larsson, P. Bjelkmar, R. Apostolov, M.R. Shirts, J.C. Smith, P.M. Kasson, D. Van Der Spoel, *Bioinformatics*, 29 (2013) 845.
- [23] W.R. Scott, P.H. Hünenberger, I.G. Tironi, A.E. Mark, S.R. Billeter, J. Fennen, A.E. Torda, T. Huber, P. Krüger, W.F. Van Gunsteren, *J. Phys. Chem. A*, 103 (1999) 3596.
- [24] T. Darden, D. York, L. Pedersen, *J. Chem. Phys.*, 98 (1993) 10089.
- [25] B. Hess, H. Bekker, H.J. Berendsen, J.G. Fraaije, *J. Comput. Chem.*, 18 (1997) 1463.
- [26] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, *J. Chem. Phys.*, 126 (2007) 014101.
- [27] M. Parrinello, A. Rahman, *J. Appl. Phys.*, 52 (1981) 7182.
- [28] C.A. Dodson, M. Kosmopoulou, M.W. Richards, B. Atrash, V. Bavetsias, J. Blagg, R. Bayliss, *Biochem. J.*, 427 (2010) 19.
- [29] F. Girdler, F. Sessa, S. Patercoli, F. Villa, A. Musacchio, S. Taylor, *Chem. Biol.*, 15 (2008) 552.
- [30] F. Sessa, F. Villa, *Acta Crystallogr. F: Struct. Biol. Commun.*, 70 (2014) 294.
- [31] D.A. Sloane, M.Z. Trikić, M.L. Chu, M.B. Lamers, C.S. Mason, I. Mueller, W.J. Savory, D.H. Williams, P.A. Eyers, *ACS Chem. Biol.*, 5 (2010) 563.
- [32] C.O. de Groot, J.E. Hsia, J.V. Anzola, A. Motamedi, M. Yoon, Y.L. Wong, D. Jenkins, H.J. Lee, M.B. Martinez, R.L. Davis, *Front. Oncol.*, 5 (2015) 285.

کننده INCENP با ایجاد برهم‌کنش‌های گروه دوم، باعث تفاوت در انتخاب‌پذیری بیشتر هسپرادین برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A می‌شود. پروتئین فعال‌کننده INCENP در جای‌گیری صحیح هسپرادین در جایگاه فعال و حفظ برهم‌کنش‌های اختصاصی بین مهارکننده هسپرادین و آرورا کیناز B نقش تعیین‌کننده‌ای دارد. این یافته می‌تواند انتخاب‌پذیری بیشتر هسپرادین برای آرورا کیناز B نسبت به آرورا کیناز A را توضیح دهد و گامی مهم و ارزشمند در مسیر دستیابی به یک داروی جدید باشد.

### سپاسگزاری

نویسندگان تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز به‌دلیل تامین هزینه‌های پژوهش اعلام می‌کنند.

### \*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: ایران، استان فارس، شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده علوم، بخش زیست‌شناسی، آزمایشگاه بیوفیزیک و زیست‌شناسی محاسباتی.

### مراجع

- [1] J.R. Brown, K.K. Koretke, M.L. Birkeland, P. Sanseau, D.R. Patrick, *BMC Evol. Biol.*, 4 (2004) 1.
- [2] J.F. Bejar, Z. DiSanza, S.M. Quartuccio, *Exp. Cell Res.*, 407 (2021) 112803.
- [3] M. Kollareddy, P. Dzubak, D. Zheleva, M. Hajdich, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, 152 (2008) 1.
- [4] O. Gautschi, J. Heighway, P.C. Mack, P.R. Purnell, P.N. Lara, D.R. Gandara, *Clin. Cancer Res.*, 14 (2008) 1639.
- [5] Y. Cheng, F. Zhang, Q. Chen, J. Gao, W. Cui, M. Ji, C.-H. Tung, *J. Chem. Inf. Model*, 51 (2011) 2626.
- [6] J. Fu, M. Bian, Q. Jiang, C. Zhang, *Mol. Cancer Res.*, 5 (2007) 1.
- [7] D. Fancelli, J. Moll, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 15 (2005) 1169.
- [8] M.G. Manfredi, J.A. Ecsedy, K.A. Meetze, S.K. Balani, O. Burenkova, W. Chen, K.M. Galvin, K.M. Hoar, J.J. Huck, P.J. LeRoy, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104 (2007) 4106.
- [9] J. Schellens, D. Boss, P. Witteveen, A. Zandvliet, J. Beijnen, M. Voogel-Fuchs, C. Morris, D. Wilson, E. Voest, *J. Clin. Oncol.*, 24 (2006) 3008.
- [10] R.K. Tyler, N. Shpiro, R. Marquez, P.A. Eyers, *Cell Cycle*, 6 (2007) 2846.