

## Evaluating the Effects of Molecular Dynamic And Docking of Abemaciclib, Hymenialdisine, and Indirubin on CDK-2 Inhibition by Simulation Study

Asadi-Samani M<sup>1</sup>, Jamali N<sup>2</sup>, Saffari-Chaleshtori J\*<sup>3</sup>, Ashrafi-Dehkordi K\*<sup>4</sup>

1. Cellular and Molecular Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

2. Department of Laboratory Sciences, Sirjan School of Medical Sciences, Sirjan, Iran

3. Clinical Biochemistry Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

4. Medical Plant Research Center, Basic Health Sciences Institute, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran

\*Corresponding author. Tel: +983833331471, Fax: +983833331471, E-mail: [j\\_saffari@yahoo.com](mailto:j_saffari@yahoo.com)

\*Corresponding author. Tel: +983833331471, Fax: +983833331471, E-mail: [kdashrafi@gmail.com](mailto:kdashrafi@gmail.com)

Received: May 5, 2022

Accepted: Sep 5, 2022

### ABSTRACT

**Background & objectives:** Cyclin-dependent kinase 2 (CDK-2) is a serine/threonine protein kinase with regulatory activity in the cell cycle. Inhibitors of this protein are the treatment of choice for a variety of cancers by stopping the cell cycle. In this *in silico* study, the effects of docking and molecular dynamics of Abemaciclib, Hymenialdisine, and Indirubin on the inhibition of CDK-2 as one of the most important factors in the cell cycle have been investigated.

**Methods:** PDB file of CDK-2 protein as well as three-dimensional structures of Abemaciclib, Hymenialdisine, and Indirubin were obtained from the protein database (<http://www.rcsb.org>) and pubchem server, respectively. After simulating CDK-2 in Gromacs software, molecular docking of compounds on CDK-2 was performed by AutoDock 4.2 software. Finally, the most important molecular dynamics factors such as RMSD, the radius of gyration and total energy in the pre-docking state were analyzed and compared to these factors in the post-docking stage.

**Results:** Abemaciclib has the highest affinity for binding to amino acids at the CDK-2 binding site by releasing binding energy equivalent to 8.23 kJ/mol. The binding of Abemaciclib, Hymenialdisine, and Indirubin to CDK-2, resulted in significant reductions in some molecular dynamics factors such as mean total energy, the radius of gyration, RMSD, and changes in CDK-2 secondary structure.

**Conclusion:** Abemaciclib, Hymenialdisine, and Indirubin have a high tendency to interact with CDK-2, and this binding can induce significant dynamic molecular changes in the structure of CDK-2 molecule. Based on the results of molecular dynamics simulation, the secondary structure of CDK-2 changes after each ligand binds to it and makes the complex of ligand and protein more stable.

**Keywords:** CDK-2; Abemaciclib; Hymenialdisin; Indirubin; Molecular Dynamic Simulation

## ارزیابی اثرات داکینگ و دینامیکی مولکولی ترکیبات Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin بر CDK-2 با مطالعه شبیه‌سازی

مجید اسدی سامانی<sup>۱</sup>، نوید جمالی<sup>۲</sup>، جواد صفاری چالشتی<sup>۳\*</sup>، کوروش اشرفی دهکردی<sup>۴\*</sup>

۱. مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران  
 ۲. گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده علوم پزشکی سیرجان، سیرجان، ایران  
 ۳. مرکز تحقیقات بیوشیمی بالینی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران  
 ۴. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده علوم پایه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران  
 \* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۳۱۴۷۱. فاکس: ۰۳۸۳۳۳۳۱۴۷۱. پست الکترونیک: j\_saffari@yahoo.com  
 \* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۸۳۳۳۳۱۴۷۱. فاکس: ۰۳۸۳۳۳۳۱۴۷۱. پست الکترونیک: kdashrafi@gmail.com

### چکیده

**زمینه و هدف:** کیناز وابسته به سیکلین ۲ (CDK-2) یک سرین/ترئونین پروتئین کیناز با فعالیت تنظیمی در چرخه سلولی است. مهارکننده‌های این پروتئین با توقف چرخه سلولی راهکارهای انتخابی برای درمان انواع سرطان‌ها هستند. در این مطالعه شبیه‌سازی شده، اثرات داکینگ و دینامیک مولکولی Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin بر CDK-2 به عنوان یکی از مهمترین فاکتورهای موثر در چرخه سلولی مورد بررسی قرار گرفته است.

**روش کار:** فایل PDB پروتئین CDK-2 و ساختار سه بعدی Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به ترتیب از بانک اطلاعات پروتئین (<http://www.rcsb.org>) و سرور pubchem به دست آمدند. پس از شبیه‌سازی CDK-2 در نرم‌افزار Gromacs، داکینگ مولکولی ترکیبات بر روی CDK-2 توسط نرم‌افزار AutoDock 4.2 انجام شد. در نهایت مهمترین فاکتورهای دینامیک مولکولی مانند RMSD، شعاع چرخشی و انرژی کل در حالت قبل از داکینگ در مقایسه با این فاکتورها در مرحله بعد از داکینگ مورد آنالیز قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** Abemaciclib با آزادسازی انرژی اتصال معادل  $-۸/۲۳$  kcal/mol بیشترین تمایل برای اتصال به اسیدهای آمینه موجود در جایگاه اتصال CDK-2 دارد. در عین حال اتصال Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به CDK-2، منجر به کاهش معنادار در برخی فاکتورهای دینامیک مولکولی مانند میانگین انرژی کل، شعاع چرخشی، RMSD و همچنین ایجاد تغییر در ساختار ثانویه CDK-2 شدند.

**نتیجه‌گیری:** Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin تمایل بالایی برای برهمکنش با CDK-2 دارند. بر اساس نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، ساختار ثانویه CDK-2 پس از اتصال هر لیگاند به آن تغییر می‌کند و مجموعه لیگاند و پروتئین را پایدارتر می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** CDK-2، Abemaciclib، Hymenialdisine، Indirubin، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۱۴

دریافت: ۱۴۰۱/۲/۱۵

### مقدمه

پروتئین کینازهای سرین/ترئونین هستند که چرخه سلولی را تنظیم می‌کنند [۱]. توقف چرخه سلولی در هر یک از فازهای G0، G1، S، G2 و میتوز احتمال

تنظیم چرخه سلولی نقش مهمی در سرنوشت سلول ایفا می‌کند. کینازهای وابسته به سیکلین، دسته‌ای از

آپوپتوز را افزایش می‌دهد و رشد و تکثیر سلولی را که برای کنترل سلول‌های سرطانی ضروری است، متوقف می‌کند [۲]. توقف چرخه سلولی عوامل خاصی را فراهم می‌کند که در ترمیم آسیب سلولی نقش داشته و فرصت بیشتری برای ارزیابی عملکرد سلول و تأییدیه سلامت سلول فراهم می‌شود [۳]. در زمان توقف سلولی در صورت آسیب ژنوم سلول، عوامل ترمیم کننده DNA زمان بیشتری برای ترمیم ژنوم خواهند داشت اما اگر آسیب فوق‌العاده شدید باشد و سلول نتواند خود را ترمیم کند، آپوپتوز و مرگ سلولی رخ می‌دهد [۴].

فاز سلولی G0/G1 طولانی‌ترین مرحله تقسیم سلولی است که در آن سلامت اولیه سلول ارزیابی می‌شود. اگر عوامل تنظیمی هیچ گونه آسیبی را در سلول تشخیص ندهند، سیکلین D افزایش می‌یابد و باعث فسفریله شدن کیناز وابسته به سیکلین ۴ (CDK-4) و کیناز وابسته به سیکلین ۶ (CDK-6) می‌شود که به نوبه خود منجر به فسفریله و فعال شدن پروتئین تنظیمی Rb می‌شود و بنابراین چرخه سلولی به طور طبیعی پیشرفت می‌کند. فسفریله شدن پروتئین Rb عوامل لازم برای ورود به فاز S را فراهم می‌کند [۵]. کیناز وابسته به سیکلین (CDK-2) مهمترین نقش را در کنترل رشد سلولی در میانه چرخه سلولی در فاز G2 بازی می‌کند. بنابراین، مهار CDK-2 باعث توقف سلول در فاز G2 و فعال شدن سیستم ترمیم سلولی خواهد شد. لذا مهار این پروتئین می‌تواند به عنوان هدف بسیاری از داروهای ضد سرطان برای جلوگیری از ورود سلول به فاز تقسیم عمل کند [۶].

سه ترکیب شیمیایی Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به عنوان مهارکننده‌های قوی کینازهای وابسته به سیکلین (CDK) شناخته شده‌اند که می‌توانند برای درمان بسیاری از انواع سرطان‌ها استفاده شوند [۷]. Abemaciclib یک ترکیب مصنوعی است که در بسیاری از سرطان‌ها، به ویژه سرطان سینه، برای مهار

CDK و القای آپوپتوز و مرگ سلولی استفاده می‌شود [۸،۹]. Indirubin یک ترکیب آلکالوئیدی است که از تخمیر برخی گیاهان دارویی به دست می‌آید که با اعمال اثر بازدارنده بر CDKها، می‌تواند اثرات ضدسرطانی ایجاد کند و آپوپتوز سلولی را القا کند [۱۰، ۱۱]. Hymenialdisine که از اسفنج دریایی مشتق شده است، می‌تواند اثرات بازدارنده‌ای بر CDKها ایجاد کند. در واقع Abemaciclib، Indirubin و Hymenialdisine می‌توانند سلول را در مراحل مختلف رشد با مهار فعالیت CDKها، مهار کنند [۱۲].

مطالعه اثرات داکینگ مولکولی این ترکیبات بر روی CDKها می‌تواند به شناخت بهتر در عملکرد این مهارکننده‌ها کمک کند همچنین به منظور طراحی مهارکننده‌های قوی‌تر با اثرات جانبی بسیار محدودتر مفید باشد. این مطالعه با هدف بررسی اثرات داکینگ مولکولی Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin بر روی مولکول CDK-2 در شرایط شبیه‌سازی شده و بررسی تغییرات ناشی از اتصال این ترکیبات بر ساختار ثانویه مولکول تنظیم کننده چرخه سلولی (CDK-2) انجام شده است.

## روش کار

### آماده‌سازی فایل‌های PDB

در این مطالعه بنیادی- کاربردی ابتدا فایل PDB مربوط به CDK-2 از سرور بانک اطلاعاتی پروتئین (www.rcsb.org) تهیه و با نرم افزار Arguslab بهینه شد. سپس فایل‌های Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin (به ترتیب با ID: 370، ID: 72281 و ID: 10281) از سرور Pubchem تهیه و توسط نرم افزار Arguslab به فایل‌های PDB تبدیل شدند.

### شبیه‌سازی و دینامیک مولکولی CDK-2

مطالعات مربوط به شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختار پروتئینی CDK-2 ابتدا در محیط آب انجام

شد و ساختار مربوطه تحت شرایط تغییرات دما، فشار و غلظت ۱۴۰ میلی مولار قرار گرفت و به حالت تعادل رسید. برای این منظور از نرم افزار Gromacs-4.6.1 و میدان نیروی G43A1 استفاده گردید. در این مطالعه از مدل SPC216 برای شبیه سازی پروتئین در محیط آب و نمک استفاده گردید. بر اساس استانداردهای موجود غلظت املاح سیستم را با افزودن مقادیر مورد نیاز یون  $Na^+$  و  $Cl^-$  به غلظت ۱۴۰ میلی مولار رسانده شد و به دنبال آن تعداد یون مذکور با لال آب جایگزین شد. مسیرهای ذخیره شده در شبیه سازی به عنوان کنترل برای تجزیه و تحلیل پارامترهای ساختاری پروتئین CDK-2 در حضور لیگاندهای مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. در ادامه بر روی فایل PDB خروجی از ساختار شبیه سازی شده در آب، مطابق روش زیر داکینگ مولکولی انجام گردید. برای تمام زمان های شبیه سازی، دما روی ۳۰۰K تنظیم شد و زمان شبیه سازی ۱۰ نانوثانیه بود. برای انجام این مطالعه شبیه سازی از الگوریتم تندترین کاهش در ۱۰۰۰۰ مرحله استفاده شد. سپس مراحل تعادل رسانی با کمک هنگردهای هم دما و هم فشار (NPT) و هم دما و هم حجم (NVT) با کمک الگوریتم LINCS انجام گرفت.

#### داکینگ مولکولی

اتصال مولکولی Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به CDK-2 برای یافتن بهترین جایگاه های اتصال برای لیگاند- گیرنده و تعیین پایدارترین حالت انرژی آزاد لیگاند- گیرنده با استفاده از نرم افزار Autodock v.4.2 انجام شد. در این مطالعه، فایل های PDBQ و PDBQT برای مولکول های Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin (به عنوان لیگاند) برای مولکول CDK-2 (به عنوان گیرنده) ایجاد شد. در ادامه برای گیرنده یک جعبه مجازی با ابعاد  $72 \times 120 \times 60$  nm (x×y×z) تعریف شد. پس از ۲۰۰ مرتبه داکینگ مولکولی روی لیگاندها،

از الگوریتم ژنتیک<sup>۱</sup> و Lamarckian GA استفاده شد. در نهایت داده های به دست آمده از فایل dlg مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت [۱۴]. در این مطالعه از نرم افزار LigPlot plus v.2.1 برای تعیین تعداد پیوندهای آبگریز و پیوندهای هیدروژنی بین CDK-2 با Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin استفاده شد. همچنین، نوع و تعداد اسیدهای آمینه موجود در محل اتصال تعیین گردید. **مطالعات شبیه سازی و داکینگ مولکولی CDK-2 و مهارکننده ها**

در آخرین مرحله شبیه سازی دینامیک مولکولی، پایدارترین کمپلکس لیگاند- گیرنده برای هر کدام از لیگاندهای Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin در اتصال با CDK-2، با پایین ترین میزان انرژی اتصال شناسایی شد و مشابه دستورالعمل شبیه سازی پروتئین در آب شبیه سازی شدند. همانند قبل، از مسیرهای ذخیره شده در شبیه سازی برای تجزیه و تحلیل پارامترهای ساختاری کمپلکس استفاده شد. نتایج شبیه سازی مولکول CDK-2 به تنهایی و کمپلکس های آن با هر یک از این لیگاندها با استفاده از نرم افزار Ghrapher-10 مورد تجزیه و تحلیل مقایسه ای قرار گرفت.

در نهایت مهمترین پارامترهای دینامیک مولکولی مانند: میزان انرژی کل<sup>۲</sup>، انحراف جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین (RMSD)<sup>۳</sup> و شعاع جرخشی (RG)<sup>۴</sup> پروتئین و همچنین میزان تغییرات در ساختار دوم پروتئین در حالت قبل و بعد از داکینگ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

#### تجزیه و تحلیل آماری

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS-22 تجزیه و تحلیل شدند. آزمون t زوجی برای تجزیه و تحلیل

<sup>1</sup> Genetic Algorithm

<sup>2</sup> Total Energy

<sup>3</sup> Root Mean Square Deviation

<sup>4</sup> Radius of Gyration

دینامیک مولکولی انجام شد.  $p < 0.001$  به عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

جدول ۱ انرژی اتصال (BE)، انرژی بین‌مولکولی نهایی (FIE)، ثابت مهارتی تخمینی (EIC) و تعداد پیوندهای برهمکنش مانند پیوند هیدروژنی و پیوند هیدروفوب در CDK-2 متصل به Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin را نشان می‌دهد. پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب بین Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin با آمینواسیدهای CDK-2 در شکل ۱ نشان داده شده است. Abemaciclib با دو پیوند هیدروژنی و ۱۰

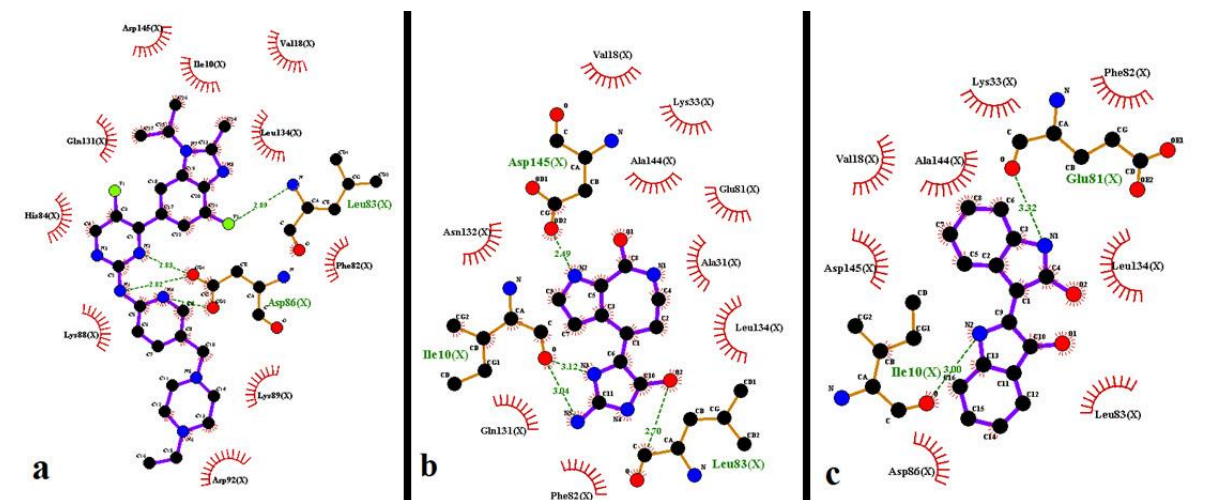
پیوند هیدروفوب به آمینواسیدهای پروتئین CDK-2 در جایگاه اتصال متصل می‌شود و در نتیجه آن بیشترین میزان انرژی اتصال<sup>۱</sup> معادل  $-۸/۲۴$  kcal/mol - انرژی آزاد می‌شود. اما Hymenialdisine با ۳ پیوند هیدروژنی و ۹ پیوند هیدروفوب به آمینواسیدهای پروتئین CDK-2 در جایگاه اتصال متصل می‌شود و در نتیجه آن  $-۶/۹۳$  kcal/mol - انرژی آزاد می‌شود. همچنین Indirubin با ۲ پیوند هیدروژنی و ۸ پیوند هیدروفوب به آمینواسیدهای پروتئین CDK-2 در جایگاه اتصال متصل شده و در نتیجه آن  $-۷/۷۳$  kcal/mol انرژی آزاد می‌شود.

<sup>۱</sup> Binding Energy

جدول ۱. برهمکنش‌های مولکولی بین Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin با CDK-2

Ligand- receptor	BE kcal/mol	FIE kcal/mol	EIC	انواع برهمکنش‌ها	
				پیوند هیدروژنی	برهمکنش هیدروفوب
CDK-2- Abemaciclib	-۸/۲۳	-۱۰/۰۲	۹۲۴/۰۴ (nM)	Leu83, Asp86	Phe82, Lys89, Asp92, Lys88, His84, Glu131, Asp145, Ile10, Val18, Leu134
CDK-2- Hymenialdisine	-۶/۹۳	-۷/۵۳	۸/۳۴ (μM)	Ile10, Leu83, Asp145	Phe82, Gln131, Asn132, Val18, Lys33, Ala144, Glu81, Ala31, Leu134
CDK-2- Indirubin	-۷/۷۳	-۸/۶۳	۲/۱۴ (μM)	Ile10, Glu81	Asp145, Val18, Ala144, Lys33, Phe82, Leu134, Leu83, Asp86

اختصارات: BE: انرژی آزاد اتصال (کیلو کالری/مول)، FIE: انرژی بین مولکولی نهایی (کیلو کالری/مول)، EIC: ثابت مهارتی تخمینی (μM)

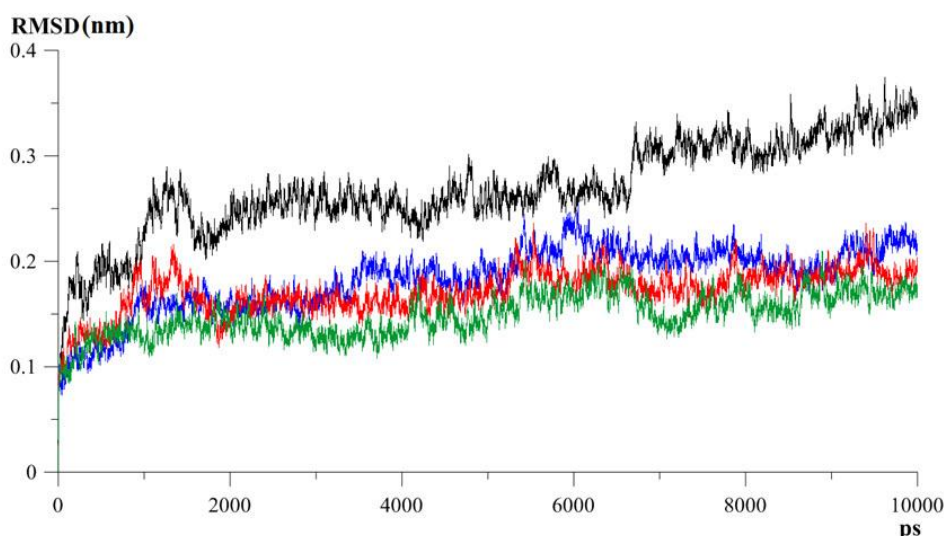


شکل ۱. برهمکنش پروتئین-لیگندهای (A) Abemaciclib، (B) Hymenialdisine و (C) Indirubin

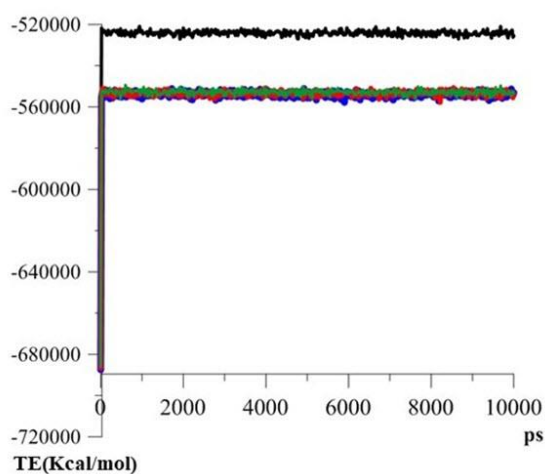
این پایداری سیستم برای مولکول پروتئین تنها بعد از زمان ۶۰۰۰ پیکوثانیه اتفاق افتاده است. همچنین، میانگین RMSD برای پروتئین تنها بسیار بالاتر از کمپلکس لیگاند- پروتئین است. در حقیقت با اتصال با Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به پروتئین CDK-2 میانگین RMSD به طور معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) کاهش یافته و سیستم شبیه‌سازی نیز به پایداری می‌رسد.

در شکل ۲، انحراف جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین (RMSD)<sup>۱</sup> در شبیه سازی CDK-2 به تنهایی و شبیه سازی CDK-2 در کمپلکس با Abemaciclib (آبی)، Hymenialdisine (قرمز) و Indirubin (سبز) در ۱۰ نانوثانیه شبیه‌سازی نشان داده شده است. سیستم شبیه‌سازی در زمان ۲۰۰۰ پیکوثانیه برای کمپلکس لیگاند- پروتئین به پایداری رسیده است اما

<sup>۱</sup> Root Mean Square Deviation



شکل ۲. تجزیه و تحلیل انحراف جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین (RMSD) مربوط به CDK-2 به تنهایی (سیاه) و به صورت کمپلکس با Abemaciclib (آبی)، Hymenialdisine (قرمز) و Indirubin (سبز)

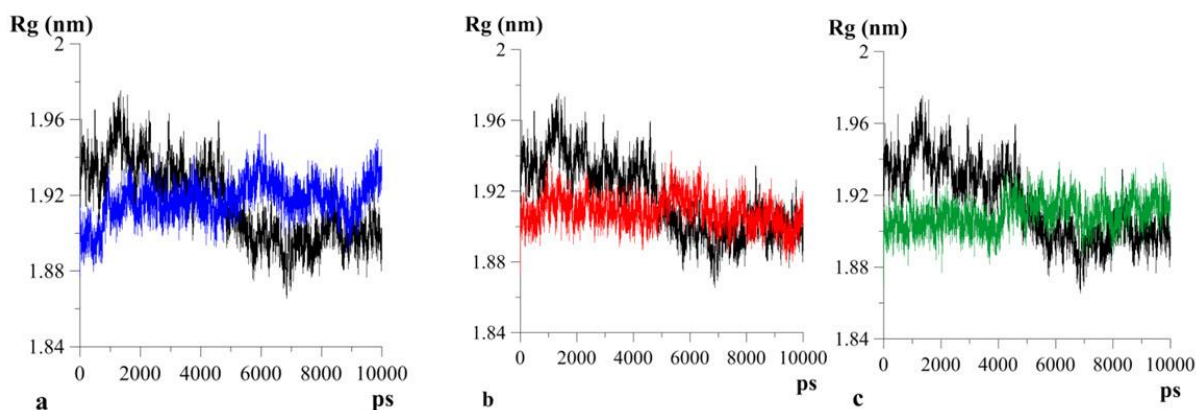


شکل ۳. انرژی کل CDK-2 (TE) به تنهایی (سیاه) و به صورت کمپلکس با Abemaciclib (آبی)، Hymenialdisine (قرمز) و Indirubin (سبز)

مقدار انرژی کل (TE) را در شبیه‌سازی CDK-2 به تنهایی و شبیه‌سازی CDK-2 به صورت کمپلکس با Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin در مدت زمان شبیه‌سازی ۱۰ نانوثانیه در شکل ۳ نشان داده شده است. میانگین انرژی کل در سیستم شبیه‌سازی CDK-2 به تنهایی معادل  $-524298 \text{ kJ/mol}$  اما با اتصال هر کدام از لیگاندهای Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به CDK-2 بعد از ۱۰ نانوثانیه از زمان شبیه‌سازی میزان انرژی اتصال به طور معنی‌دار ( $p < 0.001$ ) کاهش یافته و به ترتیب معادل  $-554254 \text{ kJ/mol}$ ،  $-553081 \text{ kJ/mol}$  و  $-553651 \text{ kJ/mol}$  شده است.

با اتصال هر کدام از لیگاندهای Abemaciclib، Indirubin و Hymenialdisine به CDK-2 بعد از ۱۰ نانوثانیه از زمان شبیه سازی میزان شعاع چرخشی کاهش یافته و به ترتیب معادل  $1/92 \pm 0/01$ ،  $1/91 \pm 0/01$  و  $1/91 \pm 0/01$  نانومتر شده است.

شکل ۴. میزان شعاع چرخش (Rg) را در شبیه سازی CDK-2 به تنهایی و شبیه سازی CDK-2 در کمپلکس با Abemaciclib (آبی)، Hymenialdisine (قرمز) و Indirubin (سبز) در مدت زمان ۱۰ نانوثانیه نشان می دهد. میانگین شعاع چرخشی برای CDK-2 در مدت زمان ۱۰ نانوثانیه معادل  $1/92 (0/02)$  است اما



شکل ۴. شعاع چرخش (Rg) برای CDK-2 به تنهایی (سیاه) و به صورت کمپلکس با Abemaciclib (آبی)، Hymenialdisine (قرمز) و Indirubin (سبز)

CDK-2 در کمپلکس با Abemaciclib، Indirubin و Hymenialdisine در مدت زمان ۱۰ نانوثانیه در جدول ۲ نشان داده شده است.

مقادیر عددی و آنالیز آماری تمامی پارامترهای دینامیک مولکولی مانند TE، RMSD و RG در ارتباط با شبیه سازی مولکول CDK-2 به تنهایی و شبیه سازی

جدول ۲. پارامترهای دینامیک مولکولی

	TE (kJ/mol)	RG (nm)	RMSD (nm)
CDK-2	-۵۲۴۲۹۸ (۳۸۶۶/۸)	$1/92 (0/02)$	$0/27 (0/04)$
CDK-2-Abemaciclib	-۵۵۴۲۵۴ (۶۰۶۶/۴) *	$1/92 (0/01)$	$0/18 (0/03)$ *
CDK-2-Hymenialdisine	-۵۵۳۶۵۱ (۶۰۷۰/۹) *	$1/91 (0/01)$ *	$0/17 (0/02)$ *
CDK-2-Indirubin	-۵۵۳۰۸۱ (۶۰۵۳/۳) *	$1/91 (0/01)$ *	$0/15 (0/02)$ *

اختصارات: TE: انرژی کل، RG: شعاع چرخش، RMSD: انحراف جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین، تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از آزمون تی نمونه مستقل انجام شد. هر نقطه نشان دهنده میانگین  $\pm$  انحراف معیار است. \* نشان دهنده  $P < 0/01$  در مقایسه با CDK-2 می باشد.

جدول ۳ نشان داده شده است. پس از اتصال هر کدام از لیگاندها به پروتئین CDK-2 میانگین ساختار آلفا هلیکس افزایش و به طور معکوس میانگین ساختارهای Bend و Turn کاهش یافته است.

همچنین تغییر در ساختارهای ثانویه در پروتئین CDK-2 به تنهایی، در مقایسه با ساختارهای ثانویه پروتئین CDK-2 در حالت کمپلکس با لیگاندهای Abemaciclib، Indirubin و Hymenialdisine در مدت زمان ۱۰ نانوثانیه از زمان شبیه سازی در

جدول ۳. تغییرات ساختار ثانویه در CDK-2 در کمپلکس با لیگاندها

	$\alpha$ -Helix %	Turn %	Bend %	$\beta$ -Bridge %	$\beta$ -Sheet %	Coil %
CDK-2	۱۵/۶	۱۶/۰	۱۷/۳	۱/۷	۱۸/۰	۳۱/۴
CDK-2-Abemaciclib	۳۰/۹	۱۰/۹	۱۷/۲	۱/۵	۱۳/۸	۲۵/۷
CDK-2- Hymenialdisine	۳۲/۰	۱۱/۶	۱۵/۷	۱/۶	۱۴/۱	۲۵/۰
CDK-2- Indirubin	۳۲/۹	۱۲/۰	۱۴/۵	۱/۶	۱۳/۸	۲۵/۲

### بحث

این مطالعه نشان داد که Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به‌عنوان سه مهارکننده CDK-2 می‌توانند با تمایل بالا به CDK-2 متصل شوند و تغییرات ساختاری را در این سرین ترئونین پروتئین کیناز ایجاد کنند و به دنبال آن با توقف در فرایند چرخه سلولی موجب مهار رشد و تکثیر سلول‌ها شوند. در این مطالعه Abemaciclib، به عنوان یکی از مهارکننده‌های قوی خانواده تیروزین کینازها [۱۵]، تمایل بیشتری برای اتصال به CDK-2 نسبت به Hymenialdisine و Indirubin نشان داد. Abemaciclib ۲ پیوند هیدروژنی و ۱۰ پیوند آبگریز را با CDK-2 در محل اتصال تشکیل می‌دهد. این ترکیب با کمترین میزان ثابت مهارتی (۰.۰۴/۹۲۴ نانومولار)، انرژی اتصال ۸/۲۳ Kcal/mol را در اثر اتصال به CDK-2 آزاد می‌کند (شکل ۱ و جدول ۱). Abemaciclib یک مولکول کوچک است که با مهار فعالیت CDK-2 می‌تواند از پیشرفت در فرایند چرخه سلولی جلوگیری می‌کند [۱۶]. Hymenialdisine یک محصول طبیعی مشتق از اسفنج دریایی است که به عنوان مهارکننده قوی تیروزین کینازها شناخته شده است [۱۷]. Indirubin با ۳ و ۲ پیوند هیدروژنی به CDK-2 در محل‌های اتصال مختلف متصل می‌شوند (شکل ۱) اما تمایل اتصال آنها به CDK-2 متفاوت می‌باشد. Indirubin با تمایل بیشتر (انرژی اتصال: -۷.۷۳ Kcal/mol) و ثابت مهارتی کمتر (۲/۱۴ میکرومولار) نسبت به Hymenialdisine (انرژی اتصال -۶/۹۳ Kcal/mol و ثابت مهارتی ۸/۳۴

میکرومولار) به CDK-2 متصل می‌شود (جدول ۱). اما در هر صورت نتایج حاصل از داکینگ مولکولی در این مطالعه نشان می‌دهد که این سه ترکیب تمایل بالایی برای اتصال به آمینواسیدهای موجود در جایگاه اتصال از طریق پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب دارند. نه تنها این سه ترکیب Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin با تمایل بالا به CDK-2 متصل می‌شوند، بلکه با اعمال اثر بر CDK-2 ها و تغییراتی که در ساختار این پروتئین ایجاد می‌کنند، می‌توانند تا حد بسیار بالایی بر عملکرد این پروتئین تاثیرگذار باشند [۱۰]. نتایج حاصل از RMSD در شبیه‌سازی مولکول CDK-2 به تنهایی و کمپلکس‌های آن در اتصال با سه لیگاند نشان می‌دهد که سیستم شبیه‌سازی پس از گذشت مدت زمان ۶ نانوثانیه پایدار شده است. همچنین کاهش میزان میانگین RMSD برای هر سه کمپلکس CDK-2-لیگاند پس از شبیه‌سازی در حضور مهارکننده‌ها نسبت به میانگین RMSD مولکول CDK-2 به تنهایی (جدول ۲)، نشان از تحت تاثیر قرار گرفتن پروتئین CDK-2 در اثر اتصال هر کدام از لیگاندها به مولکول CDK-2 دارد. کاهش در میزان میانگین RMSD در واقع منجر به فشردگی پروتئین و نزدیک شدن کربن آلفا در هر یک از اسیدهای آمینه به یکدیگر می‌شود و این فرایند می‌تواند بر فعالیت پروتئین تاثیرگذار باشد [۱۸]. Abemaciclib باعث می‌شود مقدار انرژی کل از طریق اتصال به CDK-2 و مهار آن از ۵۲۴۲۸۹ KJ/mol (شبهه سازی CDK-2 در غیاب abemaciclib) به ۵۵۴۲۵۴ KJ/mol (شبهه سازی در حضور Abemaciclib) به طور قابل توجه کاهش یابد.



قسمت‌های عملکردی پروتئین بیشتر در نواحی Coil و Turn قرار دارند [۲۳]. به نظر می‌رسد که برآیند این تغییرات ساختاری می‌تواند منجر به اثرگذاری بر عملکرد CDK-2 شوند. CDK-2 یکی از مهمترین فاکتورهای موثر در فاز G چرخه سلولی است که منجر به هدایت سلول به سمت مرحله میتوز و تقسیم سلولی می‌شود [۶]. مهار CDK-2 می‌تواند فرایند چرخه سلولی را در فاز G2 متوقف کند و این فرصت مناسبی را برای فاکتورهای آپوپتوزی مانند P53 فراهم می‌کند که با شناسایی آسیب‌های سلولی فرایند تعمیر سلول را آغاز کند. همچنین در سلول‌های با آسیب شدید مانند سلول‌های سرطانی که امکان ترمیم وجود ندارد سلول به سمت آپوپتوز و مرگ برنامه‌ریزی شده سوق داده می‌شود [۲۳]. نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان می‌دهد که در سطح دینامیک مولکولی، هر سه لیگاند مورد مطالعه می‌توانند با اعمال تغییرات دینامیک مولکولی بر پروتئین CDK-2 منجر به اثرگذاری بر ساختار این پروتئین شوند که این تغییرات می‌توانند بر عملکرد CDK-2 تأثیر گذار باشند. از آنجا که نتایج آزمایشگاهی پیشین اثرات مهارکنندگی این ترکیبات را بر CDKها نشان داده‌اند [۷] به نظر می‌رسد که این تغییرات ساختاری می‌تواند دلیلی بر مهار عملکرد این سرین ترئونین کینازها باشد. با این وجود لازم است که مطالعات تکمیلی با استفاده از نرم‌افزارهای حوزه دینامیک مولکولی مخصوصاً در سطح بررسی رفتار اسیدهای آمینه و اتم‌های تشکیل‌دهنده پروتئین و در مدت زمان شبیه‌سازی طولانی‌تری صورت پذیرد.

### نتیجه‌گیری

هر سه ترکیب Hymenialdisine, Abemaciclib و Indirubin می‌توانند با تمایل بسیار بالایی به CDK-2 متصل شوند. این اتصال منجر به بروز تغییراتی در ساختار و به دنبال آن تغییر در عملکرد این پروتئین سرین/ترئونین کیناز می‌شود. از آنجا که

این کاهش میزان انرژی کل برای Hymenialdisine و Indirubin نیز قابل توجه است (شکل ۳ و جدول ۲). منفی شدن انرژی کل سیستم بعد از اتصال هر کدام از لیگاندها به پروتئین CDK-2 نشان‌دهنده برهمکنش‌هایی است که در درون پروتئین اتفاق افتاده و منجر به پایدارشدن سیستم شبیه‌سازی شده است [۱۹]. این مطالعه نشان می‌دهد که اگرچه Hymenialdisine تمایل کمتری برای اتصال به CDK-2 نسبت به Abemaciclib دارد، اما مشابه با Indirubin، Rg مربوط به CDK-2 را به شدت کاهش می‌دهد. Rg اندازه‌گیری شعاع پروتئین است. برای پروتئین‌های کروی، Rg بالا به معنای تراکم کم و عملکرد بالاتر ساختار پروتئین است [۲۰]. کاهش Rg در اتصال Hymenialdisine و Indirubin به CDK-2 باعث کاهش در دسترس بودن جایگاه‌های فعال و اثرگذاری بر میزان عملکرد آن می‌شود [۲۱]. سامیت<sup>۱</sup> و همکاران با بررسی چندین آنالوگ شیمیایی هیدروکسی متیل آمین و داکینگ آنها بر روی آنزیم 3CL<sup>PRO</sup> ویروس کرونا میزان پایداری آنزیم را بعد از اتصال آنالوگ‌های مذکور به پروتئین با استفاده از روش‌های دینامیک مولکولی و شبیه‌سازی شده بررسی کردند و همزمان با بررسی فاکتورهای دینامیک مولکولی مانند RMSD میزان تأثیرگذاری هر کدام از ترکیبات آنالوگی را مورد بررسی قرار دادند [۲۲]. زمانی که Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin به CDK-2 متصل شدند، تغییرات در ساختار ثانویه CDK-2 افزایش یافت (جدول ۳). کاهش ساختارهای Coil و Turn در تمام کمپلکس‌های CDK-2 با سه مهارکننده به ویژه Hymenialdisine و همینطور افزایش در ساختارهای  $\alpha$ -Helix و  $\beta$ -Sheet حکایت از آن دارند که این مهارکننده‌ها بر ساختار ثانویه CDK-2 تأثیر می‌گذارند. از آنجا که ساختارهای آلفا و بتا بیشتر نقش ساختمانی برای پروتئین ایفا می‌کنند و

<sup>1</sup> Sumit

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد (کد طرح: ۲۹۵۲) و تمامی افرادی که در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.  
کد اخلاق مقاله: IR.SKUMS.REC.1397.278

### تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

تغییر در ساختار فضایی پروتئین‌ها می‌تواند عملکرد آنها را تحت تاثیر قرار دهد، نتایج دینامیک مولکولی این مطالعه نشان می‌دهد که Abemaciclib، Hymenialdisine و Indirubin با اتصال مستقیم به CDK-2 می‌توانند بر این پروتئین تاثیر گذار باشند. CDK-2 نقش مهمی در فرایند چرخه سلولی و مخصوصاً انتقال سلول از فاز G2 ایفا می‌کند. در صورت مهار فعالیت CDK-2، توقف چرخه سلولی در فاز G2 اتفاق افتاده و به دنبال آن در سلول‌های آسیب دیده و یا سرطانی فاکتورهای آپوپتوزی می‌توانند فعال شوند و سلول را به سمت آپوپتوز هدایت کنند.

### References

- 1- Zachleder V, Ivanov I, Vítová M, Bišová K. Effects of cyclin-dependent kinase activity on the coordination of growth and the cell cycle in green algae at different temperatures. *J Exp Bot.* 2019 Feb;70(3):845-58.
- 2- Xiong Y, Li T, Assani G, Ling H, Zhou Q, Zeng Y, et al. Ribociclib, a selective cyclin D kinase 4/6 inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human cervical cancer in vitro and in vivo. *Biomed Pharmacother.* 2019 Apr;112:108602.
- 3- Cui J, Qu Z, Harata-Lee Y, Nwe Aung T, Shen H, Wang W, et al. Cell cycle, energy metabolism and DNA repair pathways in cancer cells are suppressed by Compound Kushen Injection. *BMC cancer.* 2019 Jan;19(1):103.
- 4- Chiang SR, Lin CS, Lin HH, Shieh PC, Kao SH. Bergapten induces G1 arrest of non-small cell lung cancer cells, associated with the p53-mediated cascade. *Mol Med Rep.* 2019 Mar;19(3):1972-1978.
- 5- Dowdy SF. D-type Cyclins and Cancer. In: Hinds PW, Brown NE, editors. 1st ed. *Death of a dogma: Cyclin D activates Rb by mono-phosphorylation.* Switzerland: Springer. 2018:133-147.
- 6- Bortolozzi R, Mattiuzzo E, Trentin L, Accordi B, Basso G, Viola G. Ribociclib, a Cdk4/Cdk6 kinase inhibitor, enhances glucocorticoid sensitivity in B-acute lymphoblastic leukemia (B-ALL). *Biochem Pharmacol.* 2018 Jul;153:230-241.
- 7- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49.
- 8- Hurvitz S, Martin M, Press M, Wijayawardana S, Brahmachary M, Ebert P, et al. Abstract PD2-10: Treatment with abemaciclib modulates the immune response in gene expression analysis of the neoMONARCH neoadjuvant study of abemaciclib in postmenopausal women with HR+, HER2 negative breast cancer. *Cancer Res.* 2019 Feb;79(4\_Supplement):2-10.
- 9- Corona SP, Generali D. Abemaciclib: a CDK4/6 inhibitor for the treatment of HR+/HER2-advanced breast cancer. *Drug Des Devel Ther.* 2018 Feb;12:321-330.
- 10- Cheng W, Yang Z, Wang S, Li Y, Wei H, Tian X, et al. Recent development of CDK inhibitors: An overview of CDK/inhibitor co-crystal structures. *Eur J Med Chem.* 2019 Feb;164:615-639.
- 11- Wang Y, Hoi PM, Chan JY, Lee SM. New perspective on the dual functions of indirubins in cancer therapy and neuroprotection. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014 Nov;14(9):1213-9.
- 12- Sanchez-Martinez C, Gelbert LM, Lallena MJ, de Dios A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorg Med Chem Lett.* 2015 Sep;25(17):3420-35.

- 13- Project E, Nachliel E, Gutman M. Force field-dependant structural divergence revealed during long time simulations of Calbindin d9k. *J Comput Chem*. 2010 Jul;31(9):1864-72.
- 14- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. 1998 Nov;19(14):1639-62.
- 15- Iriyama N, Hino H, Moriya S, Hiramoto M, Hatta Y, Takei M, et al. The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor, abemaciclib, exerts dose-dependent cytostatic and cytotoxic effects and induces autophagy in multiple myeloma cells. *Leuk Lymphoma*. 2018 Jun;59(6):1439-50.
- 16- Palumbo A, Lau G, Saraceni M. Abemaciclib: the newest CDK4/6 inhibitor for the treatment of breast cancer. *Ann Pharmacother*. 2019 Feb;53(2):178-185.
- 17- Meijer L, Thunnissen AM, White AW, Garnier M, Nikolic M, Tsai LH, et al. Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3 $\beta$  and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent. *Chem Biol*. 2000 Jan;7(1):51-63.
- 18- Carugo O, Pongor S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein Sci*. 2001 Jul;10(7):1470-3.
- 19- Nguyen-Trong D, Nguyen-Tri P. Molecular dynamic study on factors influencing the structure, phase transition and crystallization process of NiCu6912 nanoparticle. *Mater Chem Phys*. 2020 Aug;250:123075.
- 20- Azam SS, Uddin R, Wadood A. Structure and dynamics of alpha-glucosidase through molecular dynamics simulation studies. *J Mol Liq*. 2012 Oct;174:58-62.
- 21- Lobanov MIu, Bogatyreva NS, Galzitskaia OV. Radius of gyration is indicator of compactness of protein structure. *Mol Biol (Mosk)*. 2008 Jul-Aug;42(4):701-6.
- 22- Kumar S, Sharma PP, Shankar U, Kumar D, Joshi SK, Pena L, et al. Discovery of new hydroxyethylamine analogs against 3CLpro protein target of SARS-CoV-2: Molecular docking, molecular dynamics simulation, and structure-activity relationship studies. *J Chem Inf Model*. 2020 Dec;60(12):5754-5770.
- 23- Sheng L, Wang J, Huang M, Xu Q, Ma M. The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. *Int J Biol Macromol*. 2016 Nov;92:600-6.