

## Investigation of AKR1C3 protein inhibition mechanism and design of new inhibitors

Farzad Atrian Afyani

Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran



### Abstract

**Aim and Background:** The AKR1C3 protein plays a very important role in various diseases, especially cancer, and is an attractive target for drug development in hormone-dependent cancers and inflammatory diseases. Therefore, the aim of the present study was to investigate the inhibitory mechanism of AKR1C3 protein and to design new inhibitors.

**Materials and methods:** In the present study, the three-dimensional structure of AKR1C3 was obtained from the three-dimensional protein structure database using molecular systems. Then, the obtained structure was optimized using the molecular dynamics technique, and then the protein interactions with the existing inhibitors were investigated using the docking technique and Autodock4 software. Then, in order to perform molecular dynamics, AMBER software version 18 was used. Finally, 4 new inhibitor combinations with Data Warrior software were designed as new inhibitors and introduced to inhibit AKR1C3.

**Results:** The amino acids tyrosine 55 and histidine 117 are involved in the formation of strong hydrogen bonds with the designed inhibitors. The amino acids tyrosine 55, histidine 117, and phenylalanine 311 play an important role in the interaction of proteins with designed inhibitors. The study of binding energy of these compounds to protein showed that the binding energy values of these compounds with AKR1C3 protein are in the range of -17.8 to -29.1 kcal / mol, which can be well competitive with known protein inhibitors. Meanwhile, the structure of D1 as a designed compound with a binding energy of -32.9 kcal / mol was able to show the greatest tendency for protein among the inhibitory compounds known and designed in this study, which can be considered as a compound with a high potential for Introduce inhibition of AKR1C3 protein in laboratory and clinical studies.

**Conclusion:** The results of docking and molecular dynamics studies showed that the new compounds based on mefenamic acid could be potential compounds to inhibit the AKR1C3 protein, and by making appropriate changes in them, these target compounds could be used as effective compounds to inhibit and fight disease. Used inflammatory disease sentence.

**Keywords:** Inhibitory mechanism, AKR1C3 protein, inhibitor design, molecular dynamics, Iau Science.

**Corresponding author:**

Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

**Email:** Farzad.Atrian@yahoo.com

## مکانیسم مهارى پروتئین AKR1C3 و طراحی نوین مهارکننده‌ها در بیماری‌های سرطان و التهابی فرزاد عطریان افیانی

گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات

۳۴

### چکیده

**سابقه و هدف:** پروتئین AKR1C3 نقش کلیدی در بیماری‌های مختلف، به خصوص سرطان، ایفا می‌کند. در سرطان‌های وابسته به هورمون و بیماری‌های التهابی، این پروتئین مهم است. فعالیت افزایش یافته AKR1C3 ممکن است به افزایش هورمون‌های آلدوسترون و تستوسترون و همچنین تولید مواد التهابی منجر شود. به عنوان یک هدف در توسعه داروهای جدید در درمان سرطان و بیماری‌های التهابی، تحقیقات بر روی مهار AKR1C3 و طراحی داروهای نوین در حال انجام است. بنابراین هدف از تحقیق حاضر بررسی مکانیسم مهارى پروتئین AKR1C3 و طراحی مهارکننده‌های جدید می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش حاضر با استفاده از سیستم‌های مولکولی ساختار سه بعدی AKR1C3 از بانک اطلاعات ساختار سه بعدی پروتئین گرفته شد. سپس ساختار به دست آمده با استفاده از تکنیک دینامیک مولکولی بهینه‌سازی شد و در ادامه برهمکنش‌های پروتئین با مهارکننده‌های موجود با استفاده از تکنیک داکینگ و نرم افزار Autodock4 مورد بررسی قرار گرفتند. در ادامه به منظور انجام دینامیک مولکولی از نرم افزار AMBER نسخه ۱۸ استفاده شد. در نهایت ۴ ترکیب مهارکننده جدید با نرم افزار Data Warrior به عنوان مهارکننده‌های جدید طراحی شده و برای مهار AKR1C3 معرفی شد.

**یافته‌ها:** اسید آمینه‌های تیروزین ۵۵ و هیستیدین ۱۱۷ در تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی با مهارکننده‌های طراحی شده نقش دارند و همچنین اسکن آلانین نشان داد که برهمکنش‌های مشابهی بین اسید آمینه‌های پروتئین با ترکیبات مهارکننده طراحی شده نسبت به ترکیبات شناخته شده دارند و اسیدآمینه‌های تیروزین ۵۵، هیستیدین ۱۱۷ و فنیل آلانین ۳۱۱ نقشی مهم در برهمکنش پروتئین با مهارکننده‌های طراحی شده دارند. بررسی انرژی اتصال این ترکیبات به پروتئین نشان داد که مقادیر انرژی اتصال این ترکیبات با پروتئین AKR1C3 در محدوده ۱۷/۸- تا ۲۹/۱- کیلوکالری بر مول می‌باشد که می‌تواند به خوبی قابل رقابت با مهارکننده‌های شناخته شده پروتئین باشند. همچنین ساختار طراحی شده D1 با انرژی اتصال ۳۲/۹- کیلوکالری بر مول توانست بیشتر میزان تمایل به پروتئین در میان ترکیبات مهارکننده شناخته شده و طراحی شده در این مطالعه را نشان دهد که می‌تواند آن را به عنوان یک ترکیب با پتانسیل بالا برای مهار پروتئین AKR1C3 در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی معرفی نماید.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از بررسی‌های داکینگ و دینامیک مولکولی نشان دادند ترکیبات جدید که بر پایه مفنایمیک اسید ایجاد شده‌اند، می‌توانند ترکیبات بالقوه‌ای برای مهار پروتئین AKR1C3 باشند و با ایجاد تغییرات مناسب در آن‌ها می‌توان از این ترکیبات هدف بعنوان ترکیبات موثری برای مهار و مبارزه با بیماری از جمله بیماری التهابی استفاده نمود.

**کلمات کلیدی:** مکانیسم مهارى، پروتئین AKR1C3، طراحی مهارکننده، دینامیک مولکولی، Iau Science

### مقدمه

آلدو-کتو ردوکتاز IC3 (AKR1C3) شامل زیر خانواده‌ای از ابر خانواده‌های آلدو کتو ردوکتاز است که با نام‌های پروستاگلاندین f سنتاز، دی هیدرودیول دهیدروژناز X و نوع ۵-۱۷ بتا هیدروکسی استروئید دهیدروژناز نیز شناخته می‌شود. به طور کلی AKR1C یک آنزیم انسانی است و شامل ۴ ایزوفرم AKR1C1 تا AKR1C4 است. AKR1C3 کاهش گروه‌های کربونیل را در استروئید و

#### نویسنده مسئول:

گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران ایران، گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات  
پست الکترونیکی: Farzad.Atrian@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۳۰

مورد بررسی قرار گرفته‌اند. NSAID ها به ایزوفرم‌های آلدو-کتو ردوکتاز: AKR1C1 (AKR)، 1C2 و 1C3 با قدرت اتصال متفاوت متصل می‌شوند. تلاش‌های اخیر طراحی مهارکننده AKR1C3 بر دو قالب مولکولی ترکیبات مشتق شده از اسید فلوفنامیک و ایندومتاسین متمرکز شده است که تعداد کمی از مشتقات را شامل شده است (۴). با توجه به اهمیت پروتئین AKR1C3 در بیماری‌های مختلف از جمله سرطان‌ها در این تحقیق بر آن شدیم تا به بررسی مکانیسم مهار پروتئین AKR1C3 و طراحی مهارکننده‌های جدید بپردازیم.

## مواد و روش‌ها

### تعیین ساختارهای سه بعدی برای پروتئین و مهار کننده

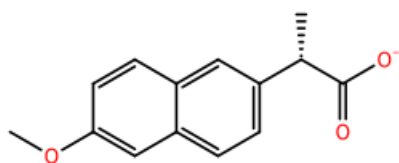
در این مطالعه از ساختار سه بعدی پروتئین AKR1C3 با کد 3R6I در بانک اطلاعات ساختار سه بعدی پروتئین (<https://www.rcsb.org>) استفاده شد. به منظور تعیین مهار کننده‌های مختلف پروتئین AKR1C3، مطالعه‌ای کتابخانه‌ای انجام شد و مهم‌ترین ساختارهای شناخته شده مهار کننده این پروتئین بر اساس اطلاعات مندرج در مقالات علمی استخراج گردید (شکل ۱).

### آماده‌سازی ساختاری و انجام داکینگ مولکولی

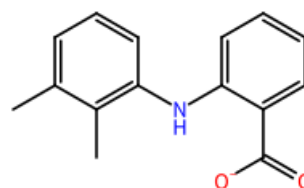
آماده‌سازی ساختار پروتئین شامل افزودن اتم‌های هیدروژن به ساختار پروتئین و تعیین حالت صحیح پروتونه شدن اسید آمینه‌های باردار با استفاده از سرور محاسباتی H++ (<http://biophysics.cs.vt.edu>) انجام شد. همچنین بهینه‌سازی ساختاری بر روی ساختار سه بعدی پروتئین توسط میدان نیروی OPLS4 و به واسطه مجموعه نرم افزاری شرودینگر ۲۰۲۱ انجام شد. از سوی دیگر ساختارهای مهار کننده شناخته شده توسط نرم افزار LigPrep (۱۳، ۱۴) موجود در مجموعه نرم افزاری شرودینگر ۲۰۲۱ مورد بهینه‌سازی ساختاری قرار گرفتند. در طول بهینه‌سازی ساختاری ترکیبات شیمیایی از نرم افزار Epik (۱۵) برای تعیین حالت پروتونه شدن صحیح ترکیب و از میدان نیروی OPLS4 برای بهینه‌سازی ساختاری ترکیبات شیمیایی استفاده شد. در ادامه داکینگ مولکولی با در نظر گرفتن ساختار کمپلکس پروتئین AKR1C3 و مهار کننده مفنامیک اسید با کد 3R6I در بانک اطلاعات PDB به عنوان مرجع ساختاری و با استفاده از نرم افزار Glide (۱۶) انجام شد. در داکینگ مولکولی محدوده داکینگ در جعبه-ای با مرکزیت مفنامیک اسید در جایگاه فعال پروتئین و با

پروستاگلاند کاتالیز می‌کند. آلدو-کتو ردوکتاز 1C3، ترکیب ۴-آندروستن-۳،۱۷-دیون را به تستوسترون، استرون را به ۱۷بتا استرادیول و پروژسترون را به ۲۰ آلفا هیدروکسی پروژسترون تبدیل می‌کند. به‌طور کلی تستوسترون میل گیرنده آندروژن را افزایش می‌دهد، ۱۷بتا استرادیول میل گیرنده استروژن را افزایش می‌دهد و ۲۰ هیدروکسی پروژسترون میل گیرنده‌های پروژسترون را کاهش می‌دهد (۴-۱) که این محصولات در سیگنال‌دهی بسیار اهمیت دارند. در غیاب AKR1C3، PGD2 به‌طور خود به خود کم آب می‌شود و ایزومریزه می‌شود و محصولات PGJ2 را تولید می‌کند که ضدالتهاب هستند، موجب شروع فرآیند تمایز سلولی شده و در نهایت اثر ضد نئوپلاستیک را نشان می‌دهند (۶-۴). نقش AKR1C3 در سرطان‌های وابسته به هورمون و وابسته به پروستاگلاندین و در تعدادی از بیماری‌ها از جمله سرطان سینه، سرطان پروستات، سرطان آندومتر و لوسمی میلوژن حاد بررسی شده است (۷) و بیان بیش از حد AKR1C3 در سرطان پروستات و سینه با شدت بیماری در ارتباط است (۸). بنابراین AKR1C3 و متابولیسم پروستاگلاندین یک هدف جذاب برای توسعه دارو با کاربرد در سرطان‌های وابسته به هورمون و سرطان‌های مستقل است (۴). بررسی بانک اطلاعات پروتئینی (PDB) ساختار AKR1C3 را در ترکیب با مولکول‌های مختلف از جمله کوفاکتور NADP+، ۴-آندروسترون-۳،۱۷-دیون و پروستاگلاندین D2 نشان می‌دهد (۹، ۱۰، ۴). این آنزیم یک ساختار استوانه a8b8 با یک جایگاه فعال بزرگ و چند حفره ای ایجاد می‌کند و با اتصال لیگاند، هم در سطح زنجیره‌های جانبی و هم در کل مناطق حلقه انعطاف پذیری از خود نشان می‌دهد. جایگاه فعال شامل یک تتراد کاتالیزوری محافظت شده متشکل از H117-Y55-K84-D50 با Tyr-55 به عنوان یک اسید و باز عمومی می‌باشد (۴). همچنین کوفاکتور NADP+ در عمق جایگاه فعال است. زنجیره‌های جانبی Tyr-55 و His-117 به همراه قسمت نیکوتین آمید مولکول NADP+ یک محل اکسیداسیون تشکیل می‌دهند که در آن گروه‌های کربونیل می‌توانند برای کاتالیز متصل شوند. داروهای ضدالتهابی غیر استروئیدی (NSAIDs) به‌عنوان مهار کننده‌های قوی AKR1C3 شناخته شده‌اند (۱۱، ۴). این مولکول‌ها بر عملکرد ضد التهابی و ضد درد و همچنین عوارض جانبی تحریک دستگاه گوارش از طریق مهار سیکلواکسیژناز و انسداد گونه‌های پروستاگلوئیدی پایین دست تأثیر می‌گذارند (۱۲). NSAID ها برای اثر ضد تکثیری خود از طریق اتصال سیکلواکسیژناز و همچنین از طریق چندین مکانیسم دیگر از جمله مهار AKR1C3

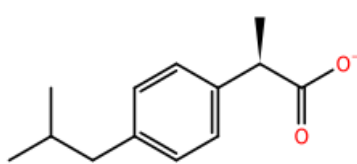
ابعاد ۲۰ ننگسترومی در نظر گرفته شد و پارامترهای مقیاس شعاع واندوالس و قطع بارهای جزئی به ترتیب برابر با ۰/۸ و ۰/۱۵ در نظر گرفته شد.



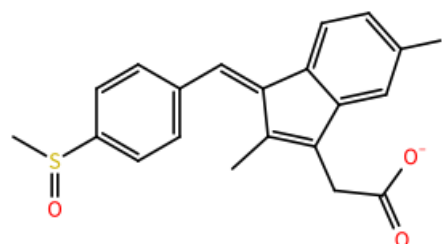
ناپروکسن



مفنامیک اسید



ایبوپروفن



سولینداک

شکل ۱- ساختار مهم‌ترین مهار کننده‌های پروتئین AKRIC3 به دست آمده از جستجوهای کتابخانه‌ای

استفاده شد. جعبه شبیه سازی هشت وجهی برای انجام شبیه سازی انتخاب شد و حداقل فاصله لبه پروتئین با سطح جعبه شبیه سازی ۱۰ آنگستروم در نظر گرفته شد. پس از اضافه کردن حلال آب به محیط شبیه سازی، بار سیستم توسط یون‌های تک ظرفیتی خنثی شد و ۵۰۰۰ گام بهینه سازی ساختاری بر روی ساختارهای کمپلکس شبیه سازی شامل ۲۵۰۰ گام بهینه سازی ساختاری با روش کاهش پرشیب و ۲۵۰۰ گام بهینه سازی با استفاده از روش گرادیان مزدوج انجام شد. در نهایت پس از اطمینان از بهینه شدن ساختار و کمینه شدن نیروهای پیوندی در ساختارهای مورد مطالعه دو مرحله آماده سازی ساختار شامل ۱ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در هنگرد NVT و ۵ نانوثانیه شبیه‌سازی در هنگرد NPT انجام شد و پس از اطمینان از پایدار شدن پارامترهای ترمودینامیکی همچون دما و فاکتور RMSD شبیه‌سازی نهایی به مدت ۱۰۰ نانو ثانیه در هنگرد NPT انجام شد. پس از اتمام شبیه سازی از نرم افزارهای CPPTRAJ (۱۹) و MMPBSA.py (۲۰) به منظور آنالیز ساختاری و محاسبه انرژی اتصال پروتئین به مهار کننده‌ها استفاده شد.

**طراحی مهار کننده و استفاده از تکنیک‌های تکاملی**  
در این مطالعه به منظور طراحی ساختارهای مهار کننده مبتنی بر ساختارهای مهار کننده موجود از نرم افزار

سایر پارامترهای مورد نیاز برای استفاده در داکینگ برابر با پارامترهای پیش فرض نرم افزار Glide در نظر گرفته شد. در نهایت پس از داکینگ مولکولی و ارزیابی ساختارهای متصل شده با مقایسه جهت گیری فضایی ترکیبات مهار کننده در جایگاه فعال پروتئین با مطالعات تجربی، ساختار-های کمپلکس پروتئین و مهار کننده به منظور بررسی برهمکنش‌های مولکولی توسط تکنیک دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

### دینامیک مولکولی

به منظور انجام دینامیک مولکولی از نرم افزار AMBER (۱۷) نسخه ۱۸ استفاده شد. برای انجام دینامیک مولکولی ابتدا ساختارهای کمپلکس حاصل از داکینگ توسط نرم افزار Pdb4amber برای ورود به نرم افزار آماده سازی شدند و در ادامه پارامترهای مورد نیاز برای انجام شبیه‌سازی‌های مولکولی بر روی ترکیبات شیمیایی توسط نرم افزار antechamber استخراج گردید (۱۸). تعیین بارهای جزئی برای مهار کننده‌های شیمیایی توسط روش AM1-BCC صورت پذیرفت و میدان نیروی GAFF برای شبیه سازی ترکیبات مهار کننده مورد استفاده قرار گرفت. از سوی دیگر میدان نیروی AMBER ff99SB برای شبیه سازی ساختار پروتئین استفاده شد و از مدل آب TIP3P به منظور پارامتریزه کردن حلال در طول شبیه سازی

این پروتئین به منظور بررسی بیشتر جهت انجام دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت و برهمکنش این ساختار-ها با پروتئین و همچنین قدرت اتصال این ساختارها به جایگاه فعال پروتئین مورد ارزیابی قرار گرفت. لازم به ذکر است که پروتکل شبیه‌سازی برای ترکیبات طراحی شده دقیقاً مطابق با پروتکل ذکر شده برای شبیه‌سازی ترکیبات شناخته شده مهار کننده پروتئین AKR1C3 در نظر گرفته شد.

## یافته‌ها

### داکینگ مولکولی

در اولین مرحله از انجام این مطالعه، داکینگ مولکولی به منظور تعیین حالت صحیح برهمکنش پروتئین AKR1C3 با مهار کننده‌های انتخابی انجام شد و ساختارهای اتصالی مهار کننده‌ها به جایگاه فعال پروتئین تعیین گردید. به منظور ارزیابی نتایج به دست آمده، برهمکنش‌های مولکولی تعیین شده توسط داکینگ با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی و همچنین مقایسه برهمکنش‌ها با الگو-های به دست آمده از مطالعات آزمایشگاهی تایید گردید. در همین راستا بررسی برهمکنش پروتئین با مهار کننده-های مختلف حاکی از برهمکنش‌های هیدروژنی اسید-آمینوهای تیروزین ۵۵ و هیستیدین ۱۱۷ با گروه‌های کربوکسیل مهارکننده‌های انتخابی بود. همچنین برهمکنش‌های متعدد غیر قطبی اسید آمینوهای فنیل آلانین ۳۱۱، فنیل آلانین ۳۰۶، لوسین ۵۴، اسپارژین ۱۶۷، متیونین ۱۲۰ و گروه‌های غیر قطبی مهار کننده‌های انتخابی پروتئین AKR1C3 به دست آمد (شکل ۲).

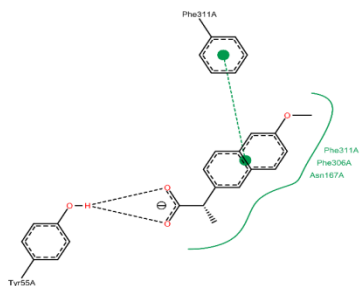
### مطالعات دینامیک مولکولی

به منظور بررسی برهمکنش‌های مولکولی پروتئین و ساختارهای مهار کننده مجموعه‌ای از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با هدف نمونه برداری مولکولی از ساختارهای پایدار پروتئین-مهار کننده صورت پذیرفت. در همین راستا به منظور اطمینان از پایداری ترمودینامیکی ساختارهای مولکولی، پارامتر ریشه میانگین انحراف مربعات جایجایی اتم‌ها در سیستم یا RMSD مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصل در نمودار ۱ نشان داده شده است. بررسی نتایج پایداری ساختاری ترکیبات نشان می‌دهد که نمودار RMSD در طول زمان برای ساختارهای مورد بررسی ثابت بوده و دارای تغییرات بسیار کمی بوده است که نشان دهنده ثبات ساختاری کمپلکس پروتئین و مهار کننده در طول شبیه‌سازی می‌باشد.

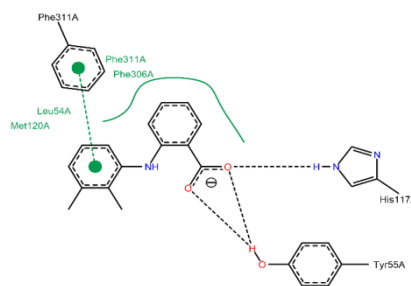
DataWarrior استفاده شد (۲۱). در همین راستا با استفاده از الگوریتم‌های تکامل ساختاری تعریف شده در نرم افزار، ۴ ساختار مهارکننده شناخته شده پروتئین AKR1C3 به عنوان مرجع در نظر گرفته شد و با در نظر گرفتن قوانین لپینسکی برای طراحی دارو، ساختارهای جدید با تکنیک‌های حذفی، جایجایی و یا با استفاده از اضافه کردن گروه‌های شیمیایی بر روی ساختارهای والدینی طراحی شد. در همین راستا تعداد ۴۰۰۰ ترکیب شیمیایی دارای ویژگی‌های شبه دارویی و ساختار مشابه با مهار کننده‌های AKR1C3 طراحی شد و در ادامه ساختار-های مورد بررسی بهینه‌سازی شده و حالت‌های صحیح پروتئین شدن با استفاده از نرم افزار Epik موجود در این مجموعه نرم افزاری تعیین گردید.

### غربالگری مجازی

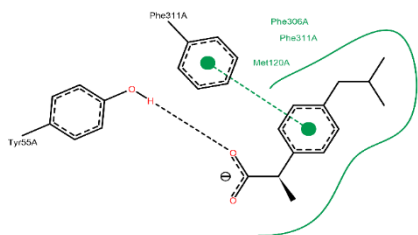
اولین گام در غربالگری مجازی ساختارهای طراحی شده، استفاده از مدل‌های فارماکوفور بر پایه ساختار کریستال شده کمپلکس پروتئین AKR1C3 با مفنایک اسید به عنوان یکی از شناخته‌ترین مهارکننده‌های این پروتئین با کد 3R6I در بانک اطلاعاتی ساختار سه بعدی پروتئین بود. به طور کلی در مدل‌های غربالگری بر پایه فارماکوفور، کلیه برهمکنش‌های موجود بین پروتئین و ساختار مهار کننده در کمپلکس کریستال شده پروتئین-مهار کننده مورد بررسی قرار می‌گیرد و مهمترین ویژگی‌های شیمیایی و ساختاری مهار کننده برای مهار پروتئین استخراج می‌گردد. مدل‌های فارماکوفور می‌توانند برای پیش و امتیازدهی ساختارهای مهار کننده احتمالی مورد بررسی قرار گرفته و بهترین ترکیبات از نظر فارماکوفوری را در یک کتابخانه ترکیبات شیمیایی شناسایی کنند. بر همین اساس در مدل فارماکوفور ساخته شده در مطالعه حاضر برای پیش کتابخانه ترکیبات شیمیایی تولید شده توسط تکنیک‌های تکاملی قرار گرفت و تعداد هزار ترکیب به عنوان بهترین ترکیبات احتمالی برای مهار پروتئین شناسایی و جدا سازی شدند. در ادامه این ترکیبات با استفاده از تکنیک داکینگ مولکولی و به وسیله نرم افزار اتوداک وینا در داخل جایگاه فعال پروتئین قرار گرفته و انرژی اتصال پروتئین به مهار کننده برای این ترکیبات محاسبه گردید. به منظور انجام داکینگ مولکولی جعبه ای مکعبی به ابعاد ۲۰ آنگستروم در محدوده جایگاه فعال پروتئین قرار گرفته و از مدل بار گسستگی برای تعیین بارهای جزئی اتمی استفاده شد. در نهایت پس از امتیاز دهی به ساختارهای مهار کننده مختلف پروتئین AKR1C3 تعداد ۵ ساختار برتر متصل شونده به



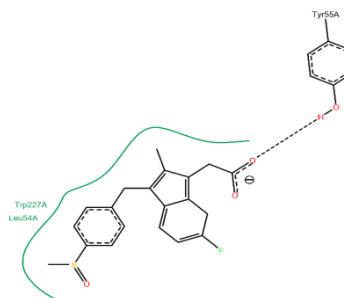
ناپروکسن



مفنامیک اسید

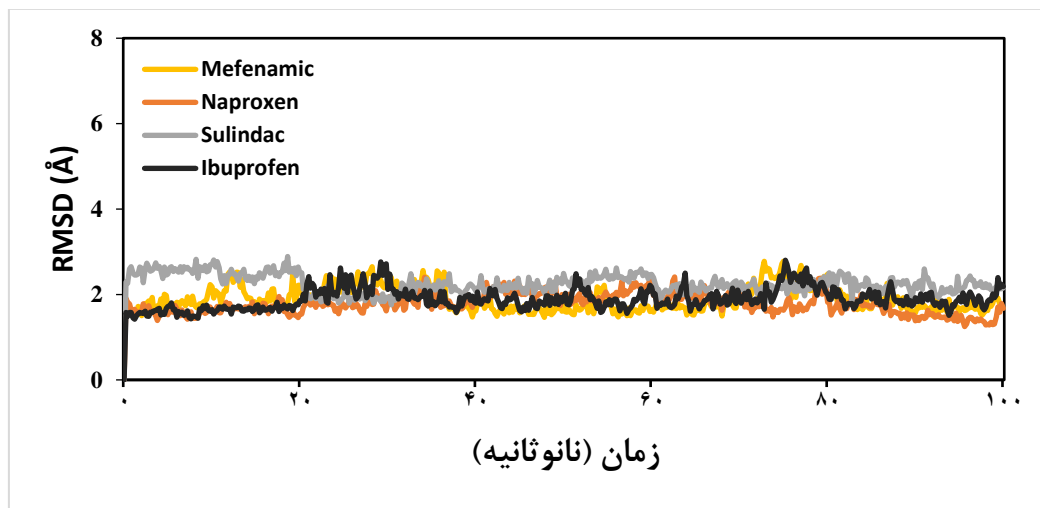


ایبوپروفن



سولینداک

شکل ۲- برهمکنش پروتئین AKR1C3 با مهم‌ترین مهارکننده‌های انتخابی شناخته شده



نمودار ۱- نمودار تغییرات حرکت اتم‌ها در طول زمان شبیه‌سازی برای اتم‌های سنگین کمپلکس پروتئین و مهارکننده


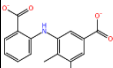

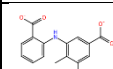

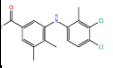

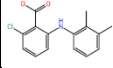
پروتئین به مهارکننده برای هر ساختار تعداد ۱۰۰۰ فریم از فایل شبیه‌سازی پروتئین-مهارکننده با فاصله زمانی ثابت استخراج شد و محاسبه انرژی اتصال برای ساختارهای مورد بررسی نشان داد که میزان تمایل مهارکننده‌ها به پروتئین AKR1C3 در محدوده ۱۷/۸- تا ۲۹/۱- کیلوکالری بر مول بوده و ترکیب مفنامیک اسید با انرژی

### تمایل اتصال

به طور کلی روش MM/PBSA یکی از متداول‌ترین روش‌ها برای محاسبه انرژی آزاد اتصال مهارکننده به پروتئین در مطالعات دینامیک مولکولی می‌باشد که می‌تواند میزان تمایل مولکولی را بر اساس پارامترهای برهمکنش قطبی و غیر قطبی، واندوالس و حلال پوشی محاسبه نماید. در همین راستا در این مطالعه به منظور محاسبه انرژی اتصال

اتصال ۲۹/۱- کیلوکالری برمول دارای قوی‌ترین تمایل به پروتئین از منظر ترمودینامیکی می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱- بررسی میزان انرژی اتصال مهارکننده‌های شناخته شده و طراحی شده به پروتئین AKR1C3

نام ترکیب	ساختار	MM/GBSA	نام ترکیب	ساختار	MM/GBSA
مفنامیک اسید		۲۹±۳,۲۲ -۱.	D1		۳±۴,۱۲ -۲,۹
ناپروکسن		۲۵±۲,۷۸ -۳.	D2		۲±۲,۹۹ -۶,۴
سولینداک		۲۶±۳,۵۱ -۴.	D3		۲±۳,۷۶ -۸,۵
ایبوپروفن		۱۷±۲,۰۳ -۸.	D4		۲±۴,۰۴ -۵,۹

### آنالیزهای پیوند هیدروژنی

به منظور بررسی مکانیسم برهمکنش پروتئین AKR1C3 و مهارکننده‌های انتخابی پیوندهای هیدروژنی در طول شبیه‌سازی آنالیز شده و نتایج در جدول ۲ نشان داده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که اسید آمینه‌های تیروزین ۵۵ و هیستیدین ۱۱۷ در جایگاه فعال پروتئین در تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی در طول شبیه‌سازی نقش دارند. تمامی پیوندهای هیدروژنی دارای طولی در محدوده ۲/۶۵ تا ۲/۸۶ آنگستروم بوده و کمتر از ۳ آنگستروم طول داشتند که در محدوده استاندارد پیوندهای هیدروژنی قرار داشت. در نهایت اسید آمینه تیروزین ۵۵ با برقراری پیوندهای هیدروژنی به مراتب پایدار در طول شبیه‌سازی قوی‌ترین پیوندهای هیدروژنی در برهمکنش پروتئین و مهارکننده‌ها را داشت.

جدول ۲- پیوند های هیدروژنی در طول شبیه سازی آنالیز شده

دهنده پیوند هیدروژنی	گیرنده پیوند هیدروژنی	طول پیوند هیدروژنی	درصد پایداری
تیروزین ۵۵	مفنامیک اسید	۲/۷۶	۸۷/۲۷
تیروزین ۵۵	ناپروکسن	۲/۷۱	۷۶/۲۱
تیروزین ۵۵	سولینداک	۲/۶۵	۷۷/۳۹
تیروزین ۵۵	ایبوپروفن	۲/۶۸	۷۲/۱۱
تیروزین ۵۵	D1	۲/۷۹	۸۴/۶۷
تیروزین ۵۵	D2	۲/۶۶	۶۱/۹۹
تیروزین ۵۵	D3	۲/۶۹	۷۲/۲۰
تیروزین ۵۵	D4	۲/۶۸	۷۰/۱۹
هیستیدین ۱۱۷	مفنامیک اسید	۲/۸۶	۶۸/۵۲
هیستیدین ۱۱۷	ناپروکسن	۲/۸۵	۶۰/۵۰
هیستیدین ۱۱۷	سولینداک	۲/۶۴	۲۷/۳۶
هیستیدین ۱۱۷	ایبوپروفن	۲/۶۷	۳۴/۱۱
هیستیدین ۱۱۷	D1	۲/۷۰	۶۹/۲۲
هیستیدین ۱۱۷	D2	۲/۸۱	۶۷/۲۹
هیستیدین ۱۱۷	D3	۲/۷۵	۵۰/۱۳
هیستیدین ۱۱۷	D4	۲/۷۶	۶۶/۰۷

### آنالیزهای جهش‌های اسکن آلانین

امروزه تولید جهش‌های اسکن آلانین یکی از روش‌های مطمئن و دقیق برای تعیین اسید آمینه‌های ضروری در برهمکنش‌های مهم پروتئین و مهارکننده می‌باشد. در این روش اسیدهای آمینه در محدوده ۵ آنگستروم لیگاند به ترتیب با اسید آمینه آلانین جایگزین شده و در هر مرحله انرژی اتصال پروتئین جهش یافته با پروتئین طبیعی مقایسه می‌گردد. از آنجا که اسید آمینه آلانین دارای زنجیره جانبی کوچکی می‌باشد اختلاف انرژی اتصال

### طراحی مهار کننده‌های جدید برای پروتئین

در این مطالعه تعداد ۴۰۰۰ ساختار جدید مشتق شده از ترکیبات شناخته شده مهار کننده پروتئین AKR1C3 با استفاده از تکنیک‌های تکاملی استخراج شد و پس از غربالگری توسط مدل فارماکوفور تعداد ۱۰۰۰ هزار ترکیب دارای بالاترین امتیاز سازگاری با مدل انتخاب شدند. این ترکیبات پس از بهینه سازی ساختاری به سطح پروتئین AKR1C3 توسط تکنیک داکینگ متصل شدند و بهترین ساختار های متصل شده شامل ۴ ساختار دارای بالاترین انرژی اتصال برای انجام دینامیک مولکولی انتخاب گردید (شکل ۳).

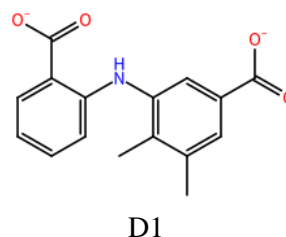
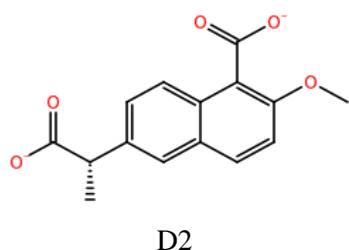
### ارزیابی مهارکننده‌های طراحی شده با استفاده از دینامیک مولکولی

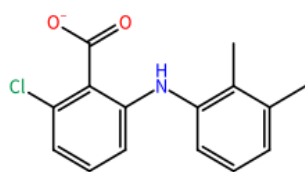
به منظور ارزیابی بیشتر صحت ترکیبات انتخابی به عنوان مهار کننده پروتئین AKR1C3، بر روی ساختارهای کمپلکس پروتئین و مهارکننده‌های طراحی شده شبیه سازی‌های دینامیک مولکولی انجام شد. آنالیز ساختاری نتایج حاصل از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی نشان داد که تمامی ساختارهای کمپلکس مهارکننده‌های طراحی شده در طول شبیه‌سازی پایدار باقی مانده و دارای مقایر RMSD بسیار پایداری می‌باشند. همچنین بررسی برهمکنش‌های بین مولکولی و پیوندهای هیدروژنی برای ترکیبات طراحی شده نشان داد که این ترکیبات دارای الگوهای برهمکنش مشابهی با مهار کننده‌های شناخته شده پروتئین AKR1C3 می‌باشند و می‌توانند برهمکنش‌های پایداری با اسید آمینه‌های درون جایگاه فعال پروتئین ایجاد نمایند (شکل ۴).

ساختارهای طبیعی و جهش یافته می‌تواند به عنوان انرژی اتصال اسید آمینه جهش یافته به مهار کننده در نظر گرفته شود و نقش آن اسید آمینه را در اتصال پروتئین به مهار کننده به صورت کمی نشان دهد. در این مطالعه از روش MM/PBSA به منظور بررسی اختلاف انرژی بین پروتئین‌های طبیعی و جهش یافته استفاده شد و نتایج حاصل برای آنالیز اسید آمینه‌های مهم در برهمکنش پروتئین و مهار کننده نشان داد که اسیدهای آمینه‌های تیروزین ۵۵ و فنیل آلانین ۳۱۱ نقشی حیاتی در برهمکنش پروتئین و ساختارهای مهارکننده انتخابی دارند. نتایج حاصل از اسکن آلانین در توافق با نتایج به دست آمده از آنالیز پیوند هیدروژنی انجام شده می‌باشد که نشان می‌دهد اسید آمینه تیروزین ۵۵ دارای پیوندهای هیدروژنی قوی در طول شبیه سازی می‌باشد (جدول ۳).

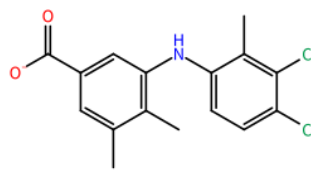
جدول ۳- اسید آمینه‌های دارای پیوند هیدروژنی

ساختار	تیروزین ۵۵	هیستیدین ۱۱۷	متیونین ۱۲۰	آسپ	فنیل آلانین
مفنامیک	-۹,۵	-۷,۵	-۱,۲	-۱,۰	۲,۲
اسید ناپروکسن	-۸,۲	-۴,۲	-۱,۱	-۰,۸	۲,۶
سولینداک	-۸,۸	-۵,۵	-۰,۵	-۲,۱	۲,۹
ایبوپروفن	-۶,۷	-۵,۱	-۰,۷	-۱,۵	۱,۱
D1	-۱۱,۸	-۷,۸	-۰,۹	-۲,۹	۲,۴
D2	-۸,۴	-۶,۲	-۱,۲	-۱,۸	۰,۵
D3	-۱۰,۸	-۷,۱	-۰,۴	-۰,۷	۱,۲
D4	-۹,۱	-۶,۸	-۰,۱	-۱,۳	۱,۷



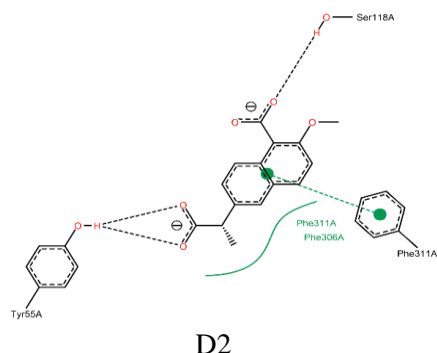


D4

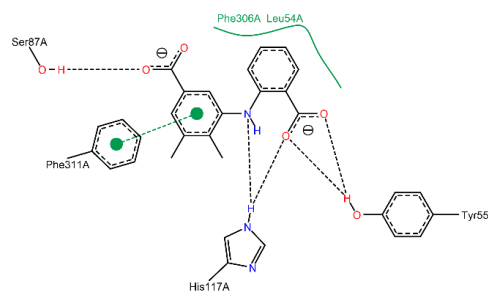


D3

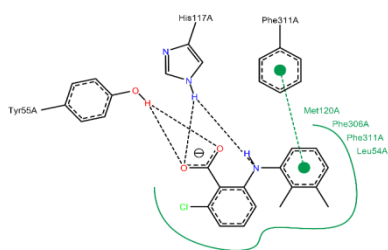
شکل ۳- ساختار مهار کننده‌های طراحی شده پروتئین AKR1C3 به دست آمده غربال‌گری مجازی



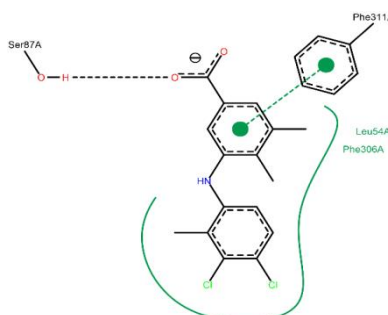
D2



D1



D4



D3

شکل ۴- برهمکنش پروتئین AKR1C3 با مهار کننده‌های طراحی شده در این مطالعه

ساختار D1 با انرژی اتصال  $-32/9$  کیلوکالری بر مول توانست بیشتر میزان تمایل به پروتئین در میان ترکیبات مهار کننده شناخته شده و طراحی شده در این مطالعه را نشان دهد که می‌تواند آن را به عنوان یک ترکیب با پتانسیل بالا برای مهار پروتئین AKR1C3 در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی معرفی نماید.

### بحث

خانواده AKR1C3 به عنوان تنظیم کننده فعالیت هورمون و سنتاز پروستاگلاندین شناخته می‌شود و تکثیر سلولی را تنظیم می‌کند. به دلیل بیان بیش از حد در بیماری‌های متابولیک و انواع سرطان‌های وابسته به هورمون و مستقل و همچنین ظهور مقاومت بالینی داروها، تعداد زیادی از مطالعات به بررسی مهار کننده‌های AKR1C3 پرداخته‌اند (۱). در تحقیق حاضر نیز به بررسی مهار کننده‌های AKR1C3 با هدف ارائه چشم اندازهای درمانی بالقوه در مورد مهار کننده‌های جدید پرداخته شده است و نتایج نشان داد که ترکیبات جدید بر پایه مفنمیک

همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است اسید آمینه‌های تیروزین ۵۵ و هیستیدین ۱۱۷ در تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی با مهار کننده‌های طراحی شده نقش دارند و الگوی مشابه برهم‌کنشی میان ساختارهای طراحی شده و ساختارهای شناخته شده مهار کننده پروتئین وجود دارد. از سوی دیگر مطالعات اسکن آلانین نشان داد که برهمکنش‌های مشابهی بین اسید آمینه‌های پروتئین با ترکیبات مهار کننده طراحی شده نسبت به ترکیبات شناخته شده دارند و اسید آمینه‌های تیروزین ۵۵، هیستیدین ۱۱۷ و فنیل آلانین ۳۱۱ نقشی مهم در برهمکنش پروتئین با مهار کننده‌های طراحی شده دارند. همچنین حضور گروه‌های باردار به خصوص در ترکیب D1 توانسته است موجب افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی شده و اسید آمینه‌هایی چون سرین ۸۷ و سرین ۱۱۸ را نیز در برهمکنش شرکت دهد. از سوی دیگر بررسی انرژی اتصال این ترکیبات به پروتئین نشان داد که مقادیر انرژی اتصال این ترکیبات با پروتئین AKR1C3 در محدوده  $-17/8$  تا  $-29/1$  کیلو کالری بر مول می‌باشد که می‌توانند به خوبی قابل رقابت با مهار کننده‌های شناخته شده پروتئین باشند. در این میان

در برهمکنش پروتئین با مهارکننده‌های طراحی شده دارند. بررسی انرژی اتصال این ترکیبات به پروتئین نشان داد که مقادیر انرژی اتصال ترکیبات شناخته شده مهار کننده با پروتئین AKR1C3 در محدوده ۱۷/۸- تا ۲۹/۱- کیلو کالری بر مول می‌باشد و در این میان ترکیبات طراحی شده ساختار D1 با انرژی اتصال ۳۲/۹- کیلوکالری بر مول توانست بیشتر میزان تمایل به پروتئین در میان ترکیبات مهار کننده شناخته شده و طراحی شده در این مطالعه را نشان دهد که می‌تواند آن را به عنوان یک ترکیب با پتانسیل بالا برای مهار پروتئین AKR1C3 در مطالعات آزمایشگاهی و بالینی معرفی نماید.

### نتیجه گیری

نتایج حاصل از بررسی‌های داکینگ و دینامیک مولکولی نشان دادند ترکیبات جدید که بر پایه مفنایمیک اسید ایجاد شده‌اند، می‌توانند ترکیبات بالقوه‌ای برای مهار پروتئین AKR1C3 باشند و با ایجاد تغییرات مناسب در آن‌ها می‌توان از این ترکیبات هدف بعنوان ترکیبات موثری برای مهار و مبارزه با بیماری از جمله بیماری‌های التهابی استفاده نمود.

### ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش اصول اخلاقی در نگارش مقاله، طبق دستورالعمل کمیته اخلاق کشوری و آیین نامه کمی رعایت شده است.

### مشارکت نویسندگان

نویسنده تمام معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بود.

### تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسنده تصریح می‌کند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

اسید می‌تواند ترکیبات بالقوه‌ای برای مهار پروتئین AKR1C3 باشند. هم راستا با این نتایج تحقیقاتی صورت گرفته است که در ادامه به بررسی آن‌ها پرداخته شده است. در سال ۲۰۰۹ Byrns و همکاران به بررسی مهار آنالوگ‌های داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی بر روی پروتئین AKR1C3 پرداختند. این دانشمندان اظهار داشتند که ایندومتاسین پروتئین را به درستی نتوانست مهار کند در صورتی که مفنایمیک اسید پروتئین را مهار می‌کند و شناسایی آنالوگ‌های آن می‌تواند بر روی بیماری سرطان موثر باشد (۲۲). در سال ۲۰۱۷ Shiiba و همکاران اظهار داشتند که مقاومت در برابر داروهای ضد سرطان اغلب منجر به نتایج ضعیف می‌شود. تجویز مفنایمیک اسید، یک داروی ضد التهابی غیر استروئیدی پرمصرف (NSAID) و یک مهارکننده شناخته شده AKR1Cs، حساسیت به CDDP و FU 5 را افزایش می‌دهد. مطالعه حاضر نشان می‌دهد که خانواده AKR1C ارتباط نزدیکی با مقاومت دارویی به CDDP و FU 5 دارد و مفنایمیک اسید از طریق فعالیت مهاری خود در سلول‌های سرطانی انسانی مقاوم به دارو حساسیت آن‌ها را افزایش می‌دهد. بنابراین، استفاده از مفنایمیک اسید برای کنترل عملکرد بیولوژیکی AKR1C ممکن است با غلبه بر مقاومت دارویی ضد سرطان منجر به نتایج بالینی موثری شود (۲۳). در سال ۲۰۲۰ Guzman-Esquivel و همکاران در یک مطالعه بالینی اظهار داشتند که با داروی ضد التهابی مفنایمیک اسید کاهش پیشرفت بیوشیمیایی در بیماران مبتلا به سرطان پروستات به دنبال خواهیم داشت (۲۴). در تحقیق حاضر نیز با بررسی مهارکننده‌های AKR1C3 نتایج نشان داد که ترکیبات جدید بر پایه مفنایمیک اسید می‌توانند ترکیبات بالقوه‌ای برای مهار پروتئین AKR1C3 باشند. همچنین این مطالعه نشان داد که اسید- آمینه‌های تیروزین ۵۵ و هیستیدین ۱۱۷ در تشکیل پیوندهای هیدروژنی قوی با مهارکننده‌های طراحی شده نقش دارند. از سوی دیگر اسکن آلانین نشان داد که برهمکنش‌های مشابهی بین اسید آمینه‌های پروتئین با ترکیبات مهار کننده طراحی شده نسبت به ترکیبات شناخته شده وجود دارد و اسید آمینه‌های تیروزین ۵۵، هیستیدین ۱۱۷ و فنیل آلانین ۳۱۱ نقشی مهم

1. Liu Y, He S, Chen Y, Liu Y, Feng F, Liu W, et al. Overview of akr1c3: inhibitor achievements and disease insights. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2020;63(20):11305-29.
2. Liu C, Yang JC, Armstrong CM, Lou W, Liu L, Qiu X, et al. AKR1C3 promotes AR-V7 protein stabilization and confers resistance to AR-targeted therapies in advanced prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*. 2019;18(10):1875-86.
3. Penning TM. AKR1C3 (type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase): Roles in malignancy and endocrine disorders. *Molecular and cellular endocrinology*. 2019;489:82-91.
4. Flanagan JU, Yosaatmadja Y, Teague RM, Chai MZ, Turnbull AP, Squire CJ. Crystal structures of three classes of non-steroidal anti-inflammatory drugs in complex with aldo-keto reductase 1C3. 2012.
5. Diers AR, Dranka BP, Ricart KC, Oh JY, Johnson MS, Zhou F, et al. Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy- $\Delta$ 12, 14-prostaglandin J2: implications for anti-metastatic therapy. *Biochemical Journal*. 2010;430(1):69-78.
6. O'Reilly MW, Kempgowda P, Walsh M, Taylor AE, Manolopoulos KN, Allwood JW, et al. AKR1C3-mediated adipose androgen generation drives lipotoxicity in women with polycystic ovary syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2017;102(9):3327-39.
7. Diers A, Dranka B, Ricart K, Oh J, Johnson M, Zhou F, et al. Modulation of mammary cancer cell migration by 15-deoxy. *Delta*. 12:14.
8. Guise CP, Abbattista MR, Singleton RS, Holford SD, Connolly J, Dachs GU, et al. The bioreductive prodrug PR-104A is activated under aerobic conditions by human aldo-keto reductase 1C3. *Cancer research*. 2010;70(4):1573-84.
9. Adeniji AO, Twenter BM, Byrns MC, Jin Y, Chen M, Winkler JD, et al. Development of potent and selective inhibitors of aldo-keto reductase 1C3 (type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase) based on N-phenyl-aminobenzoates and their structure-activity relationships. *Journal of medicinal chemistry*. 2012;55(5):2311-23.
10. Jackson VJ, Yosaatmadja Y, Flanagan JU, Squire CJ. Structure of AKR1C3 with 3-phenoxybenzoic acid bound. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*. 2012;68(4):409-13.
11. Hojnik M, Kenda Šuster N, Smrkolj Š, Frković Grazio S, Verdenik I, Rižner TL. AKR1C3 Is Associated with Better Survival of Patients with Endometrial Carcinomas. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(12):4105.
12. Yamashita N, Kanno Y, Saito N, Terai K, Sanada N, Kizu R, et al. Aryl hydrocarbon receptor counteracts pharmacological efficacy of doxorubicin via enhanced AKR1C3 expression in triple negative breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2019;516(3):693-8.
13. Lokhande KB, Ghosh P, Nagar S, Venkateswara Swamy K, Novel B, C-ring truncated deguelin derivatives reveals as potential inhibitors of cyclin D1 and cyclin E using molecular docking and molecular dynamic simulation. *Molecular Diversity*. 2021:1-15.
14. Release S. 4: LigPrep. Schrödinger, LLC, New York, NY. 2018:2018-4.
15. Shelley JC, Cholleti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, Uchimaya M. Epik: a software program for pK<sub>a</sub> prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *Journal of computer-aided molecular design*. 2007;21(12):681-91.

16. Halgren TA, Murphy RB, Friesner RA, Beard HS, Frye LL, Pollard WT, et al. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(7):1750-9.
17. Song LF, Lee T-S, Zhu C, York DM, Merz Jr KM. Using AMBER18 for relative free energy calculations. *Journal of chemical information and modeling*. 2019;59(7):3128-35.
18. Wang J, Wang W, Kollman PA, Case DA. Antechamber: an accessory software package for molecular mechanical calculations. *J Am Chem Soc*. 2001;222:U403.
19. Roe DR, Cheatham III TE. PTRAJ and CPPTRAJ: software for processing and analysis of molecular dynamics trajectory data. *Journal of chemical theory and computation*. 2013;9(7):3084-95.
20. Miller III BR, McGee Jr TD, Swails JM, Homeyer N, Gohlke H, Roitberg AE. MMPBSA.py: an efficient program for end-state free energy calculations. *Journal of chemical theory and computation*. 2012;8(9):3314-21.
21. Sander T, Freyss J, von Korff M, Rufener C. DataWarrior: an open-source program for chemistry aware data visualization and analysis. *Journal of chemical information and modeling*. 2015;55(2):460-73.
22. Byrns MC, Penning TM. Type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/prostaglandin F synthase (AKR1C3): role in breast cancer and inhibition by non-steroidal anti-inflammatory drug analogs. *Chemico-biological interactions*. 2009;178(1-3):221-7.
23. Shiiba M, Yamagami H, Yamamoto A, Minakawa Y, Okamoto A, Kasamatsu A, et al. Mefenamic acid enhances anticancer drug sensitivity via inhibition of aldo-keto reductase 1C enzyme activity. *Oncology reports*. 2017;37(4):2025-32.
24. Guzman-Esquivel J, Mendoza-Hernandez MA, Tiburcio-Jimenez D, Avila-Zamora ON, Delgado-Enciso J, De-Leon-Zaragoza L, et al. Decreased biochemical progression in patients with castration-resistant prostate cancer using a novel mefenamic acid anti-inflammatory therapy: A randomized controlled trial. *Oncology letters*. 2020;19(6):4151-60.