

## باز طراحی محاسباتی آنتی‌بادی‌نمای دارپین G3 دما پایدار برای تسهیل مدیریت تولید، نگهداری و تجویز

مریم احساسات وطن<sup>۱</sup>، بهرام باغبان کهنه‌روز<sup>۱\*</sup>

<sup>۱</sup> گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

\*نویسنده‌ی مسئول: گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱۳۳۳۳۹۲۰۲۱. پست الکترونیکی: bahrambaghban.kr@tabrizu.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۲

### چکیده

**مقدمه:** پروتئین‌های تکرار آنکرینی طراحی شده (دارپین‌ها) پروتئین‌های داربست غیرایمونوگلوبولینی نسبتاً کوچک و با تمایل بالا نسبت به اهداف اختصاصی خود هستند. دارپین G3 یک نوع دارپین طراحی شده برای اتصال به پروتئین گیرنده تیروزین کیناز HER2 (گیرنده ۲ فاکتور رشد اپیدرمی انسان) است.

**اهداف:** در این مطالعه، با استفاده از آنالیزهای *in silico* و ایجاد تغییرات آمینواسیدی در توالی تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینی و کربوکسیلی دارپین G3، نسخه‌های دما پایدار از این پروتئین دارویی طراحی و تغییرات ساختاری و پایداری دینامیکی آن‌ها در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی بررسی شد.

**روش بررسی:** ساختار اولیه و ثانویه دارپین‌های G3 باز طراحی شده به روش محاسباتی و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی بررسی و ویژگی‌های اساسی آن‌ها پیش‌بینی شد. مدل سه‌بعدی پروتئین‌های باز طراحی شده توسط Robetta ایجاد و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توسط گرومکس برای ۵۰ نانوثانیه انجام شد. داکینگ مولکولی بین پروتئین‌های باز طراحی شده و دمین خارج سلولی گیرنده HER2 توسط سرور ZDOCK انجام و برهمکنش‌های آمینواسیدی توسط LigPlot بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای ساختارهای حاصل نشان داد که دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار در دمای ۳۵۰ کلون در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 پایداری بالاتری دارند. نتایج داکینگ مولکولی تأییدکننده اتصال دارپین‌های G3 دما پایدار به گیرنده HER2 با انرژی اتصال قابل مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 بود. تغییرات آمینواسیدی در تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینی و کربوکسیلی دارپین G3 منجر به افزایش ۱۶ تا ۳۵ درجه سانتی‌گرادی دمای ذوب این پروتئین و در نتیجه افزایش پایداری ترمودینامیکی آن در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 می‌شود.

**نتیجه‌گیری:** طراحی و تولید پروتئین‌های دما پایدار، منجر به ماندگاری بلند مدت و پایداری این پروتئین‌ها در دماهای بالا شده و در نتیجه نیاز به نگهداری در زنجیره سرد با هزینه بالا برطرف و مدیریت تجویز و حمل و نقل این پروتئین‌ها تسهیل می‌شود.

**واژگان کلیدی:** HER2، دارپین، دما پایدار، شبیه‌سازی مولکولی، داکینگ مولکولی

### ۱. مقدمه

حفظ زنجیره سرد در طی حمل و نقل هستند (۱، ۲). پروتئین‌های تکرار آنکرینی طراحی شده (دارپین‌ها) نوع نسبتاً جدیدی از کاوشگرهای هدفمند با کاربردهای تشخیصی و درمانی هستند که حساسیت بالایی را در آزمایشات بالینی برای تصویربرداری رادیونوکلئیدی از اهداف مولکولی نشان داده‌اند (۳). دارپین‌ها از پروتئین‌های داربست مهندسی شده کوچک، با پایداری ترمودینامیکی بالا و با ویژگی‌هایی برابر یا برتر

استفاده از پروتئین‌ها و پپتیدها با اهداف درمانی و تشخیصی برای انواع سرطان‌ها، اختلالات متابولیک، بیماری‌های عصبی یا عفونی به طور روز افزونی در حال افزایش است. در حال حاضر، پروتئین‌های دارویی عمدتاً با استفاده از سیستم‌های کشت سلولی پستانداران، مخمرها یا باکتری‌ها و گیاهان تولید می‌شوند که باید استخراج و خالص‌سازی شوند. این پروتئین‌ها علاوه بر ماندگاری کوتاه، نیازمند فرآیندهای پرهزینه و پیچیده نگهداری و

گرفته شده است (۲۱). چنین تکرارهایی در *abicipar pegol* به عنوان اولین دارپین تأیید شده توسط FDA وجود دارند. چندین دارپین دیگر از جمله دارپین G3 در مراحل ۲ یا ۳ آزمایشات بالینی هستند. اگرچه دارپین‌ها مولکول‌های پایدار هستند. علیرغم اعتبارسنجی بالینی آن‌ها، هنوز توالی آمینواسیدی تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی و کربوکسیلی آن‌ها بهینه‌سازی نشده است. مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، آزمایش‌های دنا توره‌سازی، مطالعات ساختاری و آزمایشات NMR نشان داده است که تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی و کربوکسیلی دارپین‌ها می‌توانند عامل محدودکننده پایداری این پروتئین‌ها باشند و بهینه‌سازی توالی این تکرارها می‌تواند منجر به افزایش پایداری به‌ویژه، افزایش پایداری دمایی آن‌ها شود. در مطالعات اخیر، محققان توانسته‌اند با ایجاد جهش در اسیدهای آمینه تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی و یا کربوکسیلی و جایگزینی اسیدهای آمینه پایداری دمایی در دارپین‌های مدل که شامل یک تکرار داخلی و تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی و کربوکسیلی هستند را افزایش دهند (۲۴-۲۲).

## ۲. اهداف

از آنجایی که تولید پروتئین‌های دارویی با پایداری دمایی بالا برای ماندگاری بلند مدت و پایداری این پروتئین‌ها برای کاربردهای بالینی موفق ضروری است، و با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای برای افزایش پایداری ترمودینامیکی دارپین G3 انجام نشده است هدف از این تحقیق، افزایش پایداری دمایی پروتئین دارپین G3 با ایجاد تغییرات آمینواسیدی هدفمند در توالی تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی و کربوکسیلی و بررسی ساختار و پایداری پروتئین باز طراحی شده با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است.

## ۳. مواد و روش‌ها

### ۳.۱. طراحی دارپین دما پایدار

در این مطالعه سه نسخه دما پایدار از دارپین G3 طراحی و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا توالی آمینواسیدی دارپین G3 از پایگاه اطلاعات پروتئینی از سرور RCSB PDB با شماره دسترسی 2JAB با قالب FASTA بازیابی شد. در نسخه اول دارپین G3 دما پایدار (TS DARPin G3-1) اسیدآمینه آسپارتیک اسید در موقعیت ۱۷ تکرار سرپوش‌دار انتهایی آمینی با اسیدآمینه لوسین جایگزین شد. در نسخه دوم دارپین G3 دما پایدار (TS DARPin G3-2) علاوه بر جایگزینی قبلی، اسیدهای آمینه ایزولوسین ۲۲، متیونین ۲۴، آلانین ۲۵ و آسپارژین ۲۶ در تکرار سرپوش‌دار انتهایی آمینی به ترتیب با گلوتامیک اسید، لوسین، لیزین و آلانین جایگزین شدند. در نسخه سوم (TS DARPin G3-3) علاوه بر تغییرات مذکور در تکرار سرپوش‌دار انتهایی آمینی، اسیدهای آمینه آلانین ۱۰۵، ایزولوسین ۱۰۸، سرین ۱۰۹، لوسین ۱۱۷، ایزولوسین ۱۲۰، لوسین ۱۲۴ و آسپارژین ۱۲۵ در

نسبت به پروتئین‌های مبتنی بر ایمونوگلوبولین‌ها هستند (۴، ۵). دارپین‌ها قادر به اتصال به آنتی‌ژن هدف با تمایل و اختصاصیت بالا بوده، اما برخلاف آنتی‌بادی‌ها به‌طور ویژه برای هدف‌گیری پروتئین‌های درون سلولی مناسب هستند، چرا که فاقد سیستمین بوده و موجب اتصال عملکردی در برابر اهداف درون سلولی می‌شوند (۶، ۷). دارپین‌ها به‌عنوان مولکول‌های آداپتور داخل سلولی طیف گسترده‌ای از وظایف بیولوژیکی را ایفا می‌کنند (۸، ۹).

دمین‌های تکرار آنکرین اغلب شامل چهار تا شش تکرار و با وزن مولکولی ۱۴ تا ۲۰ کیلو دالتون (بسته به تعداد تکرارهای آنکرین) هستند، که منجر به ساختار سلنوتیدی راست‌گرد با یک هسته آب‌دوست پیوسته و سطحی بزرگ و قابل دسترس برای واکنش با حلال می‌شود (۱۰، ۱۱). به این ترتیب یک شیار در سطح آن ایجاد می‌شود و اسید آمینه‌های متغیر در سطح آن می‌توانند به اهداف مختلف متصل شوند (۱۲). هر یک از تکرارهای مستحکم آنکرین، اغلب از ۳۳ باقی‌مانده اسیدآمینه ساخته شده‌اند که ۲۷ باقی‌مانده چارچوب آن و ۶ باقی‌مانده جایگاه اتصال پروتئین را تشکیل می‌دهند. هر تکرار، متشکل از یک واحد ساختاری شامل یک پیچ  $\beta$  و سپس دو مارپیچ غیرموازی  $\alpha$  و یک حلقه بدون ساختار است که به پیچ  $\beta$  تکرار بعدی متصل می‌شود. تکرارهای سرپوش‌دار انتهایی آمینی (N-cap) و انتهایی کربوکسیلی (C-cap) در دو انتهای این مولکول قرار دارند که برای تاخوردگی صحیح و عدم تجمع در هنگام بیان پروتئین ضروری می‌باشند (۱۳، ۱۴). هر تکرار پتانسیل اتصال به هدف را داشته و بنابراین تمایل اتصال بالایی بین دارپین و مولکول هدف ایجاد می‌شود.

دارپین G3 یک نوع دارپین با وزن مولکولی ۱۵-۱۴ کیلودالتون بوده و از دو تکرار داخلی تشکیل شده است، و تکرار سرپوش‌دار انتهایی کربوکسیلی آن بیشترین میل ترکیبی را با HER2 (۹۰ pmol/L) دارد (۱۷-۱۵). همچنین، دارپین G3 دارای ۴ جهش در جایگاه‌های چارچوب است که موجب افزایش میل ترکیبی آن نسبت به واریانت دارای چارچوب مورد توافق است (۱۸). اگرچه دارپین G3 و تراستوزومب هر دو به زیردمین IV از دمین خارج سلولی گیرنده HER2 متصل می‌شوند، با این حال اپی‌توپ آن‌ها همپوشانی نداشته و بسیار گسسته است، به این معنی که اتصال یکی مانع اتصال دیگری نمی‌شود (۱۵). پرتوزومب به دمین II دامنه خارج سلولی HER2 متصل می‌شود، بنابراین می‌تواند در حضور دارپین G3 نیز به HER2 متصل شود. این ویژگی‌ها می‌تواند آن را به یک عامل تصویربرداری ایده‌آل برای ارزیابی دقیق سطح HER2 سلولی در طول و قبل از دوره درمان بدون تداخل با درمان‌های ضد HER2 تبدیل کند. دارپین G3 در سیستم میزبان باکتری *E. coli* (۱۷)، مخمر *P. pastoris* (۵)، (۱۹) و گیاه توتون (۲۰) با موفقیت تولید شده است، و هم‌اکنون در فاز II مطالعات بالینی می‌باشد.

در اصل، انتهایی سرپوش‌دار آمینی و کربوکسیلی در دارپین‌ها از پروتئین متصل شونده به گوانین-آدنین انسانی (hGABP\_beta1)

تصویرسازی شدند.

### ۵.۳. هم‌دیفی ساختاری

برای بررسی‌های تطبیقی، ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی شده دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار روی ساختار کریستالوگرافی دارپین G3 قرار گرفت تا نسبت شباهت ساختارهای مدل‌سازی شده با ساختار تجربی مورد ارزیابی قرار گیرد. به این منظور ساختار سه‌بعدی دارپین G3 با شماره دسترسی 2JAB در پایگاه اطلاعات پروتئینی از سرور RCSB PDB باز یابی و هم‌دیفی آن با ساختارهای سه‌بعدی پیش‌بینی شده پروتئین‌های باز طراحی شده توسط نرم‌افزار PyMOL انجام شد.

### ۶.۳. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به منظور اصلاح آرایش اتم‌ها، بهبود جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی و متعادل‌سازی پروتئین برای سه سیستم مستقل شامل سه نسخه دما پایدار از دارپین G3 انجام شد. برای مطالعات دینامیک مولکولی از نرم‌افزار گرومکس نسخه ۲۰۱۹،۲ (۳۵) و میدان نیروی CHARMM27 استفاده شد. هر سیستم در یک جعبه مکعبی با فاصله ۱ نانومتر از لبه جعبه در تمام جهات در محلول آبی با فرمت SPC قرار گرفت. بار کلی هر سیستم با استفاده از مقادیر مناسبی از یون‌های سدیم و کلر خنثی گردید. از الگوریتم Steepest Descent برای به حداقل رساندن انرژی در مراحل اولیه آماده‌سازی سیستم‌ها استفاده شد. شبیه‌سازی تحت شرایط مرزی و با حجم و فشار ثابت (NVT/NPT) برای هر سیستم به مدت ۵۰ نانوثانیه در دماهای ۳۰۰ و ۳۵۰ کلوین و فشار ثابت ۱ بار انجام شد. پیکربندی سیستم‌ها در هر ۰/۲ ثانیه ذخیره‌سازی شد. مسیرهای ذخیره شده در شبیه‌سازی برای آنالیزهای انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) برای کربن آلفا، جذر میانگین مربعات نوسانات (RMSF) و شعاع چرخش (Rg) استفاده شد. نتایج حاصل از شبیه‌سازی توسط نرم‌افزار MS Excel مورد ارزیابی قرار گرفت.

### ۷.۳. برهم‌کنش پروتئین-پروتئین

خروجی نهایی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار به عنوان مولکول هدف گیر و دمین خارج سلولی گیرنده HER2 متصل به تراستوزومب با شماره دسترسی 1N8Z در پایگاه اطلاعات پروتئینی از سرور RCSB PDB به عنوان مولکول هدف برای انجام بررسی‌های داکینگ مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. به این منظور، ابتدا انرژی خروجی نهایی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی شده دارپین‌های G3 دما پایدار با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera نسخه ۱،۱۶ (۳۶) به حداقل رسیده و فرآیند داکینگ جسم سخت بین این پروتئین‌ها و گیرنده هدف با استفاده از سرور ZDOCK نسخه ۳،۰۲ (۳۷) انجام گرفت. برای

تکرار سرپوش‌دار انتهایی کربوکسیلی به ترتیب با پرولین، لوسین، آلانین، ایزولوسین، والین، آلانین و آلانین جایگزین شدند. در این تحقیق، تمام تغییرات آمینواسیدی بر اساس مطالعات قبلی انجام شده بر روی دارپین‌های مدل صورت گرفته است (۲۴-۲۲). هم‌دیفی توالی آمینواسیدی نسخه‌های باز طراحی شده دما پایدار و نسخه اصلی دارپین G3 به منظور مشخص کردن تغییرات جایگزینی، توسط سرور Clustal Omega نسخه ۱،۲،۴ (۲۵) انجام شد.

### ۲.۳. آنالیز ساختاری دارپین‌های G3 باز طراحی شده

ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی دارپین‌های G3 دما پایدار باز طراحی شده شامل وزن مولکولی (MW)، نقطه ایزوالکتریک نظری (pI)، شاخص ناپایداری (II)، شاخص آلیفاتیک (AI) و GRAVY پروتئین با استفاده از ابزار ProtParam از سرور ExPasy مورد بررسی قرار گرفت (۲۶). حلالیت و سمیت بالقوه پروتئین‌ها به ترتیب با استفاده از سرورهای آنالیز Protein-Sol (۲۷) و ToxDL (۲۸) بررسی شد. ToxDL دمین‌های سمی ساختار پروتئین را از طریق الگوریتم‌های یادگیری ماشینی پیش‌بینی می‌کند. ساختار دوم پروتئین‌های همجوشی طراحی شده شامل ترکیب مارپیچ‌های آلفا، صفحات بتا، کوئل‌ها و پیچ‌های بتا با استفاده از ابزار SOMPA از سرور NPS تعیین شد (۲۹). پارامترهای عرض خروجی، تعداد حالت‌های فضایی (Coil, Helix, Sheet, Turn)، آستانه‌ی تشابه و عرض پنجره به ترتیب بر روی مقادیر ۰،۷، ۸، ۴ و ۱۷ تنظیم شدند.

### ۳.۳. بررسی پایداری دمایی

پایداری دمایی دارپین‌های G3 باز طراحی شده با استفاده از سرور آنالیز DeepSTABp پیش‌بینی شد (۳۰). DeepSTABp با استفاده از تکنیک‌های یادگیری عمیق و توالی آمینواسیدی پروتئین مورد نظر به عنوان ورودی، دمای ذوب پروتئین را پیش‌بینی می‌کند. DeepSTABp قادر به پیش‌بینی پایداری دمایی طیف وسیعی از پروتئین‌ها است که آن را تبدیل به ابزاری قدرتمند و کارآمد برای پیش‌بینی در مقیاس بزرگ می‌کند.

### ۴.۳. پیش‌بینی و اعتبارسنجی مدل سه بعدی

ساختار سه بعدی پروتئین‌های باز طراحی شده با استفاده از سرور آنالیز Robetta پیش‌بینی شد (۳۱). بهترین مدل‌ها با بالاترین C-score انتخاب و آنالیز و اعتبارسنجی آن‌ها با استفاده از ترسیم پلات رامچاندرا توسط PROCHECK (۳۲) و تعیین فاکتور کیفیت کلی توسط ERRAT (۳۳) از سرور SAVES نسخه ۶ و تأیید ساختار ژئومتری مدل‌های پیش‌بینی شده برای پروتئین‌های باز طراحی شده به عنوان یک پروتئین طبیعی با استفاده از سرور ProSA (۳۴) انجام شد. ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های همجوشی طراحی شده با استفاده از (The) PyMol (PyMOL Molecular Graphics System; Version 2.3.2\_81)

محاسبه شد که کمی بالاتر از نقطه ایزوالکتریک محاسبه شده برای نسخه اصلی دارپین G3 (4/71) بود. این محدوده نقطه ایزوالکتریک نشان دهنده غالب بودن تعداد اسیدهای آمینه با بار منفی در این پروتئین‌ها است. شاخص ناپایداری (II) تخمینی از پایداری پروتئین‌ها در شرایط آزمایشگاهی ارائه می‌دهد. شاخص ناپایداری کمتر از 40 محاسبه شده توسط ProtParam به معنی پایداری ساختارهای پیش‌بینی شده می‌باشد (39). با توجه به اینکه تمامی دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار و نسخه اصلی دارپین G3 دارای شاخص ناپایداری کمتر از 40 بوده و همچنین به دلیل دارا بودن شاخص آلیفاتیک بالا، تمام پروتئین‌های مورد مطالعه در گروه پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی شدند (40). با این حال، این شاخص در دارپین‌های G3 دما پایدار کمتر از نسخه اصلی دارپین G3 بود و کمترین مقدار شاخص ناپایداری (3/73) مربوط به TS DARPin G3-3 بود. GRAVY محاسبه شده برای دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار و همچنین نسخه اصلی دارپین G3 نشان می‌دهد که این پروتئین‌ها قطبی هستند. نتایج بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های مورد مطالعه به طور کلی نشان دهنده بهبود نسبی این ویژگی‌ها در دارپین‌های G3 دما پایدار می‌باشد. بررسی‌های مربوط به حلالیت و سمیت نشان داد که تمام دارپین‌های G3 باز طراحی شده به صورت محلول در *E. coli* بیان شده و غیرسمی هستند.

بررسی انرژی و تمایل اتصال نتایج داکینگ از سرور PRODIGY (38) استفاده شد. بهترین ساختارها با منفی‌ترین انرژی اتصال و در نتیجه بیشترین تمایل برای اتصال توسط نرم‌افزار PyMOL تصویرسازی و اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش‌های بین پروتئینی با استفاده از نرم‌افزار LigPlot نسخه 2.2.5 مورد بررسی قرار گرفت و نمودار دو بعدی برهم‌کنش‌ها ترسیم گردید.

## 4. نتایج

### 4.1. بررسی ساختاری و فیزیکی-شیمیایی دارپین‌های دما پایدار

در این تحقیق، با ایجاد تغییرات آمینواسیدی در تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینی و کربوکسیلی، سه نسخه دما پایدار از دارپین G3 طراحی شد. همدردیفی توالی نسخه‌های طراحی شده دارپین G3 دما پایدار توسط نرم‌افزار Clustal Omega انجام و نتایج در **تصویر 1** نشان داده شده است. ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی مختلف ساختار اولیه دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 در **جدول 1** ارائه شده است. بر اساس این اطلاعات، نقطه ایزوالکتریک (pI)، که برای انتخاب و بهینه‌سازی روش‌های خالص‌سازی پروتئین از جمله کروماتوگرافی تبادل یونی مفید می‌باشد، برای تمام دارپین‌های G3 دما پایدار در حدود 4/8

	↓ ↓ ↓ ↓	
DARPin_G3	SDLGKKLLEAARAGQDDEVRIILMANGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA	60
Thermostable_DARPin_G3-1	SDLGKKLLEAARAGQLDEVRIILMANGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA	60
Thermostable_DARPin_G3-2	SDLGKKLLEAARAGQLDEVRELLKAGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA	60
Thermostable_DARPin_G3-3	SDLGKKLLEAARAGQLDEVRELLKAGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA	60
***** * : *****		
	↓ ↓ ↓ ↓	
DARPin_G3	DVNAVDIAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEI	120
Thermostable_DARPin_G3-1	DVNAVDIAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEI	120
Thermostable_DARPin_G3-2	DVNAVDIAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEI	120
Thermostable_DARPin_G3-3	DVNAVDIAIGFTPLHLAAFIGHLEIAEVLLKHGADVNAQDKFGKTPFDLAIIGNGNEIDAEV	120
***** : : ***** : *		
	↓ ↓	
DARPin_G3	LQKLN	125
Thermostable_DARPin_G3-1	LQKLN	125
Thermostable_DARPin_G3-2	LQKLN	125
Thermostable_DARPin_G3-3	LQKAA	125
***		

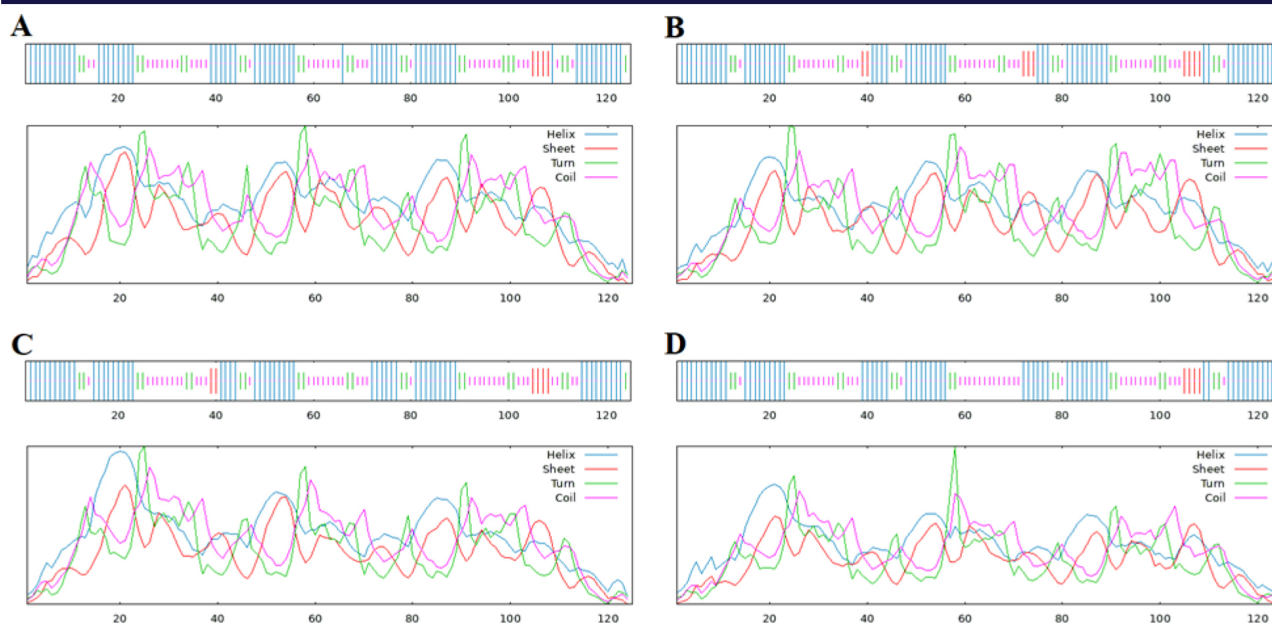
**تصویر 1.** همدردیفی توالی نسخه اصلی دارپین G3 و سه نسخه دما پایدار از آن توسط نرم‌افزار Clustal omega. حروف رنگی نشان‌دهنده اسیدهای آمینه هستند. \*! نشان‌دهنده همانند بودن، !! نشان‌دهنده جانشینی حفظ شده، ! نشان‌دهنده جانشینی نیمه حفظ شده و !! نشان‌دهنده فاصله می‌باشد.

**جدول 1:** خصوصیات فیزیکی و شیمیایی دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار تعیین شده در سرور ProtParam

پروتئین	وزن مولکولی (Da)	نقطه ایزوالکتریک	شاخص ناپایداری (II)	شاخص آلیفاتیک (AI)	GRAVY
DARPin G3	۱۳۲۸۵/۰۳	۴/۷۱	۸/۱۳	۱۱۴/۰۸	۰/۰۳
TS DARPin G1-3	۱۳۲۸۳/۱۰	۴/۸	۶/۵۹	۱۱۷/۲۰	۰/۰۸۹
TS DARPin G2-3	۱۳۲۹۵/۱۰	۴/۸۴	۴/۵۹	۱۱۷/۲۰	۰/۰۳۷
TS DARPin G3-3	۱۳۲۰۶	۴/۸۴	۳/۷۳	۱۱۴/۸۸	۰/۰۵۴

عمده‌ای از ساختار دارپین G3 از مارپیچ‌های آلفا و کویل‌های تصادفی تشکیل شده است.

ساختار دوم دارپین‌های G3 دما پایدار با استفاده از سرور آنالیز SOMPA پیش‌بینی شد و نتایج حاصل در تصویر ۲ و جدول ۲ ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، بخش



تصویر ۲. پیش‌بینی ساختار دوم A، نسخه اصلی دارپین G3؛ B، C و D، دارپین‌های G3 دما پایدار با استفاده از ابزار SOMPA از سرور NPS.

جدول ۲: پیش‌بینی و آنالیز ساختار دوم دارپین‌های دما پایدار توسط SOPMA از سرور

پروتئین	تعداد اسید آمینه	مارپیچ آلفا	صفحات بتا	کویل‌ها	پیچ بتا
DARPin G3	۱۲۵	۴۹/۶۰٪	۰٪	۲۹/۶۰٪	۱۷/۶۰٪
TS DARPin G1-3	۱۲۵	۴۶/۴۰٪	۰٪	۲۸/۸۰٪	۱۷/۶۰٪
TS DARPin G2-3	۱۲۵	۴۶/۴۰٪	۰٪	۳۲٪	۱۶/۸۰٪
TS DARPin G3-3	۱۲۵	۵۱/۲۰٪	۰٪	۳۱/۲۰٪	۱۴/۴۰٪

## ۲.۴. پایداری دمایی دارپین‌های G3 باز طراحی شده

بر خط DeepSTABp با استفاده از مدل یادگیری عمیق نقطه ذوب (Tm) پروتئین مورد نظر را پیش‌بینی می‌کند. نتایج پیش‌بینی Tm دارپین‌های G3 باز طراحی شده در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان می‌دهد که تغییرات آمینواسیدی در تکرارهای سرپوش دار انتهای آمینی و کربوکسیلی دارپین G3 منجر به افزایش Tm این پروتئین به میزان ۱۶ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد شده است.

پایداری دمایی پروتئین یک پارامتر مهم برای درک عملکرد پروتئین، طراحی داروهای پروتئینی و بهبود پایداری آنزیم‌های مورد استفاده در فرآیندهای صنعتی است. پایداری دمایی دارپین‌های باز طراحی شده با استفاده از ابزار DeepSTABp و توالی آمینواسیدی آن‌ها به عنوان ورودی پیش‌بینی شد. رابط

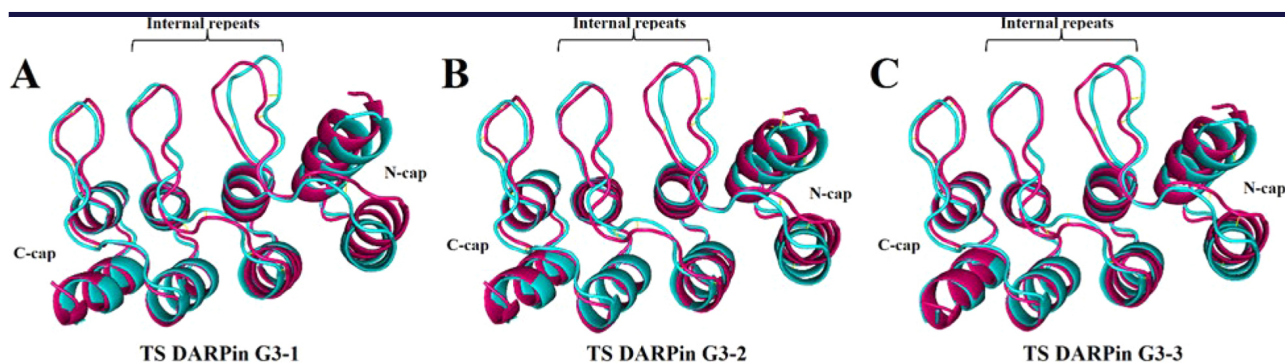
جدول ۳: Tm دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار پیش‌بینی شده با DeepSTABp

Tm (°C)	پروتئین
۳۹/۶	DARPin G3
۵۶/۲	TS DARPin G1-3
۷۳/۸۴	TS DARPin G2-3
۷۵/۸۳	TS DARPin G3-3

### ۳.۴. پیش‌بینی، تأیید و اعتبارسنجی ساختار سه‌بعدی دارپین‌های دما پایدار

C-score بین صفر تا یک تخمین زده می‌شود و مقادیر بالاتر از ۰/۵ اغلب مدلی با توپولوژی صحیح پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد. در میان مدل‌های پیش‌بینی شده مدلی که بالاترین C-score را داشته باشد به عنوان بهترین مدل انتخاب می‌شود. هم‌دیفی ساختاری بهترین مدل‌های پیش‌بینی شده از هر دارپین G3 باز طراحی شده (با C-score بیش از ۰/۹) با ساختار کریستالوگرافی دارپین G3 با شماره دسترسی 2JAB در پایگاه اطلاعات پروتئینی در تصویر ۳ نشان داده شده است.

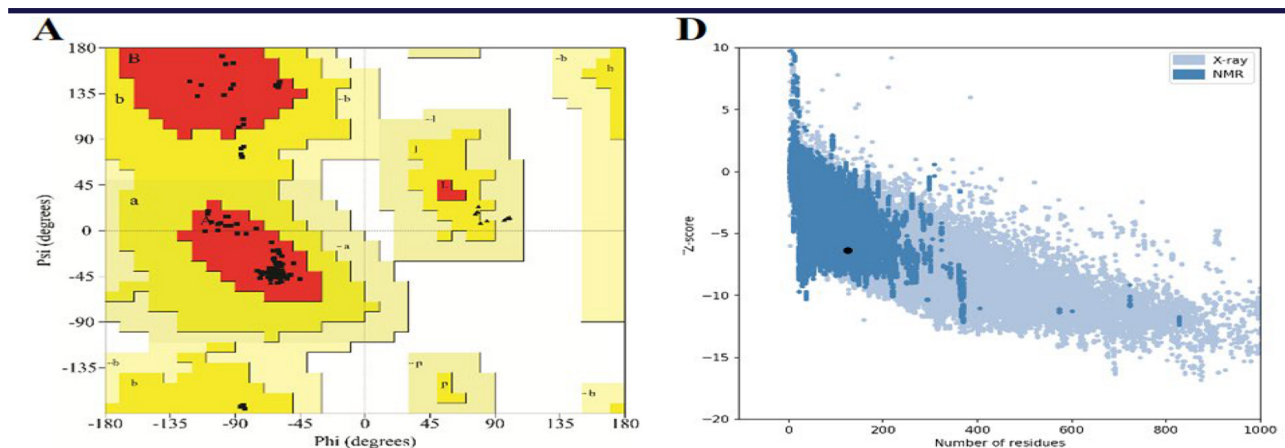
ساختار سه‌بعدی دارپین‌های G3 باز طراحی شده توسط Robetta، که الگوریتم مبتنی بر یادگیری عمیق برای پیش‌بینی سریع و دقیق ساختار پروتئین است، پیش‌بینی گردید. سرور Robetta پنج مدل نهایی را بر اساس انرژی گزارش می‌کند. دقت هر مدل به صورت کمی توسط C-score ارزیابی می‌شود.

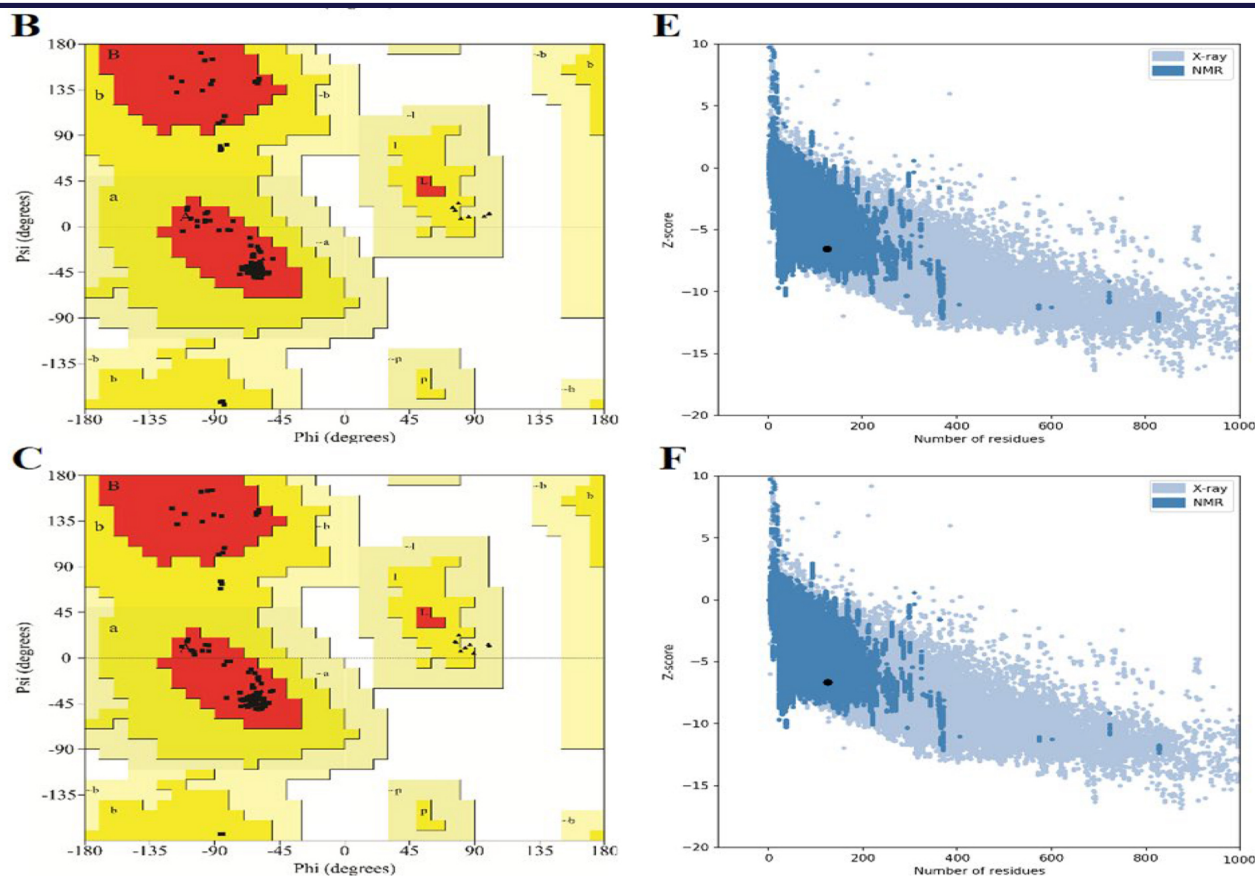


تصویر ۳. هم‌دیفی ساختاری دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار با ساختار کریستالوگرافی دارپین G3 با شماره دسترسی 2JAB در پایگاه اطلاعات پروتئینی به ترتیب برای نسخه‌های اول (A)، دوم (B) و سوم (C). ساختار کریستالوگرافی به رنگ فیروزه‌ای و ساختارهای مدل‌سازی شده به رنگ صورتی نشان داده شده‌اند.

از دارپین‌های G3 باز طراحی شده، بیش از ۹۳ درصد اسیدهای آمینه در نواحی مطلوب و تعداد کمی نیز در نواحی مجاز واقع شده‌اند و در هیچ‌کدام از پلات‌ها، اسیدآمینه‌ای در نواحی غیرمجاز وجود ندارد (تصویر ۴ A و B و C). بنابراین، مدل‌های پیش‌بینی شده از لحاظ نوع و مکان قرارگیری زوایای موجود در آن قابل قبول هستند. همچنین، Z-score تخمین زده شده توسط PTOSA برای مدل‌های پیش‌بینی شده از نسخه‌های یک تا سه دارپین‌های G3 باز طراحی شده به ترتیب ۶/۳۸، ۶/۵۷ و ۶/۶۸ بود که نزدیک به محدوده‌ی پروتئین‌های طبیعی با اندازه‌ی مشابه است (تصویر ۴ D، E و F). بنابراین، این نتایج تأیید کننده کیفیت بالای ساختار مدل‌های پیش‌بینی شده برای دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار می‌باشد.

برای اعتبارسنجی مدل‌های پیش‌بینی شده سه‌بعدی، فاکتور کیفیت کلی توسط ERRAT محاسبه، پلات رامانچاندرا ترسیم و Z-score توسط ProSA تعیین شد. ERRAT مناطق نادرست ساختار پروتئین را با توجه به خطاهایی که منجر به توزیع تصادفی اتم‌ها می‌شود شناسایی و از توزیع‌های صحیح متمایز می‌کند (۲۳). فاکتور کلی کیفیت محاسبه شده توسط ERRAT برای ساختارهای سوم پیش‌بینی شده برای تمام دارپین‌های G3 باز طراحی شده ۱۰۰ درصد به دست آمد که بیانگر کیفیت بسیار خوب مدل‌های پیش‌بینی شده است. پلات رامانچاندرا، روشی بسیار پر کاربرد برای مطالعه زوایای چرخشی پروتئین و ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار مدل‌سازی شده است. بر اساس پلات‌های رامانچاندرا همه مدل‌های پیش‌بینی شده





**تصویر ۴.** A-C, پلات راماجاندران به ترتیب برای نسخه‌های ۱، ۲ و ۳ دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار، نواحی مختلف در پلات به صورت زیر مشخص شده‌اند: [A, B, L]: باقی مانده‌ها در نواحی مطلوب، [a, b, l, p]: باقی مانده‌ها در نواحی مجاز، [a~، ~b، l~، ~p]: باقی مانده‌ها در نواحی کمتر مجاز. نواحی سفیدرنگ شامل نواحی غیر مجاز می‌باشند. باقی مانده گلاپسین به شکل مثلث نشان داده شده است. D-F, اعتبارسنجی ProSA و نمره Z به ترتیب برای نسخه‌های ۱، ۲ و ۳ دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار.

در دمای ۳۵۰ کلوین نیز TS DARPIn G3-3 با میانگین مقادیر  $1/36 \pm 0/19$  RMSD آنگستروم و کمترین نوسانات در طول شبیه‌سازی، پایدارترین ساختار را داشته و TS DARPIn G3-2 و TS DARPIn G3-1 به ترتیب با مقادیر میانگین  $0/28 \pm 0/28$  RMSD و  $1/56 \pm 0/33$  و  $1/62 \pm 0/33$  در رتبه‌های بعد قرار داشتند. نسخه اصلی دارپین G3 در دمای ۳۵۰ کلوین با میانگین مقادیر  $0/2 \pm 0/10$  آنگستروم و نوسانات بالا در طول شبیه‌سازی از کمترین پایداری برخوردار بود (تصویر ۵B).

جذر میانگین مربعات نوسانات (RMSF)، میزان تحرک و انعطاف‌پذیری باقی مانده‌ها آمینواسیدها در طول زمان شبیه‌سازی را نشان می‌دهد. مقادیر بالای RMSF نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری بالای باقی مانده اسیدهای آمینه است. نمودار RMSF در ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در دو دمای ۳۰۰ و ۳۵۰ کلوین در تصویر ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، با توجه به مقادیر کمتر RMSF کربن آلفا در TS DARPIn G3-3، این نسخه در بین دارپین‌های دما پایدار ساختار پایدارتری دارد که قابل مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 است (تصویر ۵C و D).

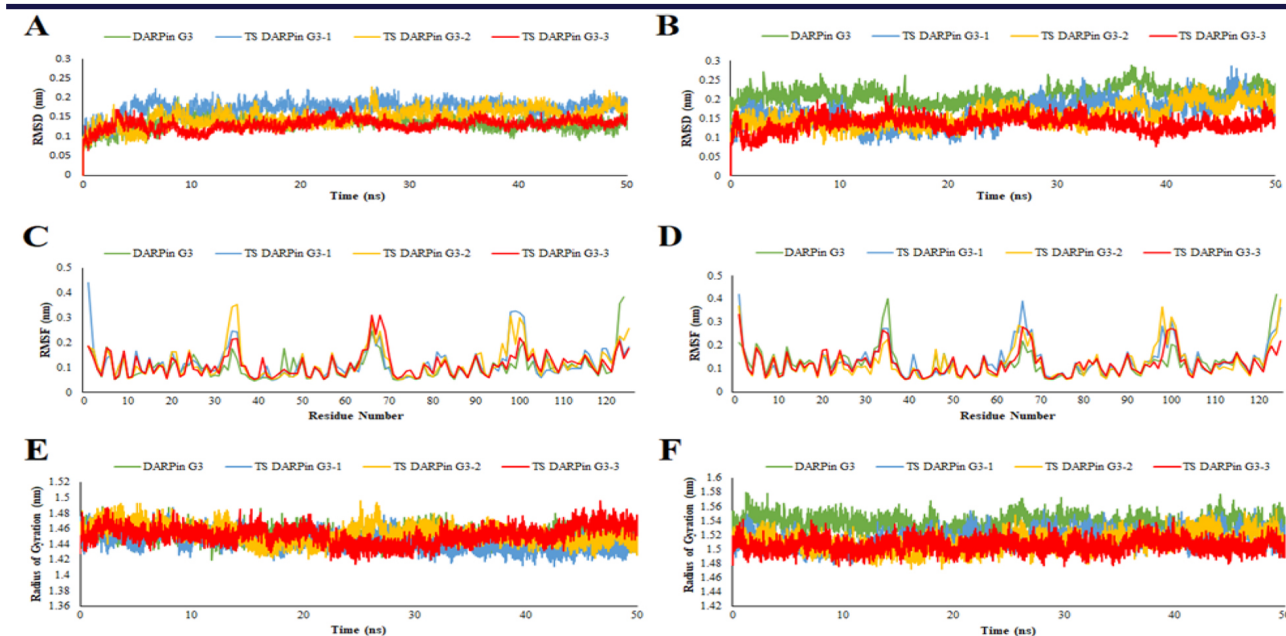
شعاع چرخش (Rg) منعکس کننده فشردگی ساختار پروتئین

#### ۴.۴. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) یکی از پارامترهای مهم در مطالعات دینامیک مولکولی به منظور اطمینان از به تعادل رسیدن سیستم در طول شبیه‌سازی است و میزان انحراف موقعیت ذرات نسبت به موقعیت اولیه را در هر نقطه از زمان نشان می‌دهد. مقادیر پائین RMSD نشان‌دهنده پایداری سیستم در طول شبیه‌سازی است. تصویر ۵ نمودار RMSD را برای دارپین‌های G3 دما پایدار مدل سازی شده در مقایسه با ساختار کریستالوگرافی نسخه اصلی دارپین G3 در دمای ۳۰۰ و ۳۵۰ کلوین نشان می‌دهد. بر اساس نمودار RMSD برای دارپین‌های مورد مطالعه در دمای ۳۰۰ کلوین، تمام سیستم‌ها بعد از حدود ۱۰ نانوثانیه به تعادل رسیده و این تعادل در ادامه شبیه‌سازی حفظ شده است. با این حال، TS DARPIn G3-3 با میانگین مقادیر  $1/14 \pm 0/14$  RMSD (با میانگین مقادیر  $1/31 \pm 0/16$  RMSD به نسخه اصلی دارپین G3) پایدارترین ساختار را حتی نسبت به نسخه اصلی دارپین G3-1 و TS DARPIn G3-2 در دمای ۳۰۰ کلوین به ترتیب برابر با  $1/19 \pm 0/22$  و  $1/22 \pm 0/22$  آنگستروم بود (تصویر ۵A). در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

توجهی ندارد. با این حال، در دمای ۳۵۰ کلوین TS DARPIn G3-3 بیشترین و نسخه اصلی دارپین G3 کمترین فشردگی را دارد (تصویر ۵ E و F).

است. برای تشخیص فشردگی ساختار کلی، نمودار شعاع چرخش پروتئین در سه سیستم محاسبه و در تصویر ۵ نشان داده شده است. فشردگی دارپین‌های G3 دما پایدار و نسخه اصلی دارپین G3 در شبیه‌سازی در دمای ۳۰۰ کلوین تفاوت قابل



تصویر ۵. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین‌های مدل‌سازی شده در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه. RMSD برای دارپین‌های G3 دما پایدار در دمای ۳۰۰ کلوین (A)؛ و ۳۵۰ کلوین (B)؛ RMSF برای دارپین‌های G3 دما پایدار در دمای ۳۰۰ کلوین (C)؛ و ۳۵۰ کلوین (D)؛ RG برای دارپین‌های G3 دما پایدار در دمای ۳۰۰ کلوین (E)؛ و ۳۵۰ کلوین (F).

پایدار با گیرنده HER2 تعاملات محکمی برقرار می‌کنند. هر چه  $\Delta G$  منفی‌تر و Kd عدد کوچکتری را نشان دهد تعاملات پروتئین-پروتئین قوی‌تر است (۴۱، ۴۲). در میان دارپین‌های G3 دما پایدار، TS DARPIn G3-2 و TS DARPIn G3-3 باز طراحی شده تمایل بیشتری نسبت به HER2 داشته و اتصالات محکم‌تری برقرار می‌کنند. مدل‌های نهایی حاصل از داکینگ توسط نرم‌افزار PyMOL تصویرسازی و نمودار دو بعدی برهم‌کنش بین دارپین‌های G3 دما پایدار و گیرنده HER2 توسط LigPlot رسم شد (تصویر ۶). میل ترکیبی بالاتر TS DARPIn G3-2 و TS DARPIn G3-3 نسبت به HER2 را می‌توان به تعداد پیوندهای هیدروژنی بالاتر آن‌ها در مقایسه با نسخه اول دارپین G3 دما پایدار نسبت داد.

#### ۵.۴. برهم‌کنش پروتئین-پروتئین

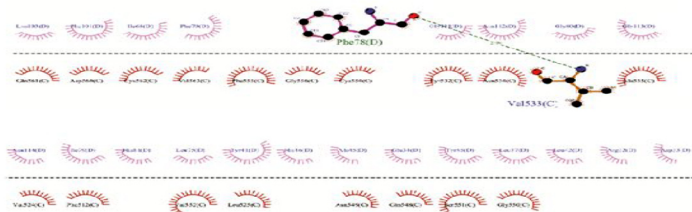
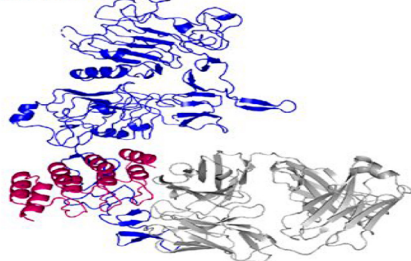
محاسبات داکینگ پروتئین-پروتئین توسط سرور آنالاین ZDOCK نسخه ۳,۰,۲ صورت گرفت. به این منظور از خروجی نهایی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار به عنوان لیگاند و دمین خارج سلولی گیرنده HER2 متصل به تراستوزومب به عنوان گیرنده استفاده شد، چرا که دارپین G3 به اپی‌توپی غیر از اپی‌توپ اتصال تراستوزومب متصل می‌شود و در اتصال به HER2 با تراستوزومب رقابت ندارد. انرژی آزاد گیبس ( $\Delta G$ ) و ثابت تفکیک (Kd) برای کمپلکس‌های پروتئینی توسط سرور آنالاین PRODIGY محاسبه و نتایج آن در جدول ۴ خلاصه شده است. نتایج داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که تمام دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما

جدول ۴:  $\Delta G$  و Kd کمپلکس دارپین‌های G3 دما پایدار با گیرنده HER2 محاسبه شده در سرور PRODIGY

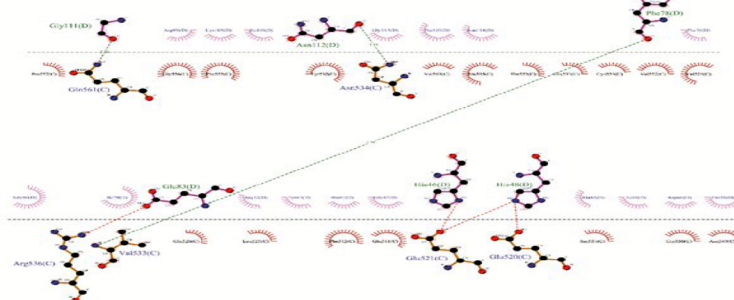
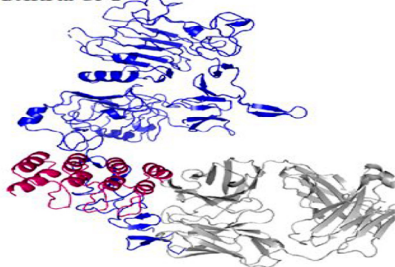
ثابت تفکیک (M)	$\Delta G$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )	کمپلکس پروتئین-پروتئین
$9/5 \times 10^{-13}$	-۱۶/۴	DARPIn G3/HER2
$9/8 \times 10^{-10}$	-۱۲/۳	TS DARPIn G1-3/HER2
$1/5 \times 10^{-11}$	-۱۴/۸	TS DARPIn G2-3/HER2
$2/1 \times 10^{-11}$	-۱۴/۶	TS DARPIn G3-3/HER2



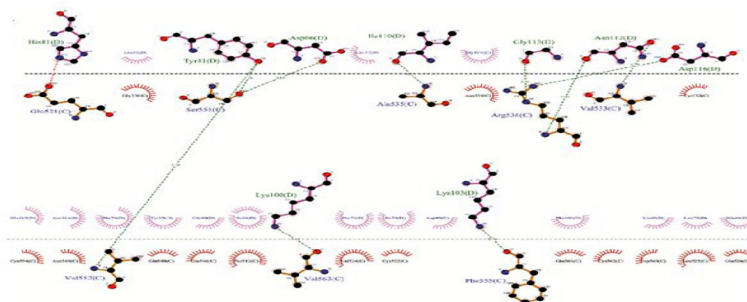
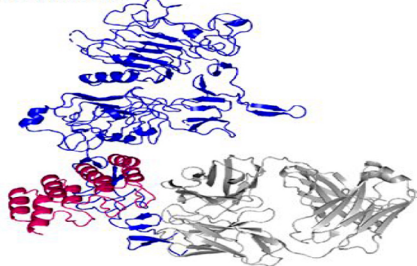
TS DARPin G3-1



TS DARPin G3-2



TS DARPin G3-3



تصویر ۶. داکینگ پروتئین-پروتئین و بررسی آمینواسیدهای درگیر در تشکیل پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب دارپین‌های G3 دما پایدار (صورتی) با گیرنده HER2 (آبی) متصل به تراستوزومب (خاکستری).

## ۵. بحث

پایدار از دارپین G3 به عنوان یک پروتئین هدف گیر HER2 برای تصویربرداری از تومورهای HER2 مثبت شد.

اینترلندی و همکاران نشان دادند که هفت جهش نقطه‌ای، شامل پنج جهش در سطح مشترک با تکرار داخلی قبلی و دو جهش در انتهای کربوکسیلی از تکرار انتهای سرپوش‌دار کربوکسیلی منجر به افزایش پایداری دمایی دارپین مدل NIC (شامل تکرار سرپوش‌دار انتهای آمینی اصلی، یک تکرار داخلی و تکرار سرپوش‌دار انتهای کربوکسیلی تغییر یافته) شده و آن حدود ۱۷ درجه سانتی‌گراد یعنی از ۶۰ درجه سانتی‌گراد به ۷۷ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت (۲۲). در تحقیقی دیگر که منجر به ثبت اختراع به شماره WO2012/069655 شده است، روتنبرگر و همکاران از یک دارپین متصل شونده به سرم آلبومین حاوی انتهای سرپوش‌دار آمینی تغییر یافته در یک پروتئین سه کاره با نام تجاری *ensovibep* که انواع مختلف SARS-CoV-2 را مهار می‌کند استفاده کردند. تغییرات آمینواسیدی در انتهای سرپوش‌دار آمینی این دارپین منجر به افزایش ۷ درجه سانتی‌گرادی دمای ذوب این پروتئین شد (۲۳). بهبود پایداری دمایی در این دارپین به تغییر اسیدآمینه متیونین شماره ۲۴ به لوسین نسبت داده شده است. در یک مطالعه اخیر، شیلینگ و همکاران با استفاده از آنالیزهای *in silico* و آزمایش‌های باز

دارپین‌ها ویژگی‌های منحصر به فردی دارند که آن‌ها را تبدیل به نامزدی برای توسعه داروهای پروتئینی می‌کند؛ از جمله وزن مولکولی کم، حلالیت بالا، سطح بیان بالا، میل ترکیبی در حد پیکومولار، پایداری بالا و پتانسیل ایجاد دارپین‌های چند کاره. تمام ویژگی‌های ذکر شده بر پایه پایداری این پروتئین داربست است. بنابراین، افزایش پایداری حرارتی همانطور که در این مطالعه ارائه شده است، از جنبه‌های مختلف تأثیر مثبتی در توسعه پروتئین‌های دارویی مبتنی بر دارپین خواهد داشت. در پروتئین‌های تکراری، بر خلاف پروتئین‌های کروی، برهمکنش‌های درون یک تکرار و بین تکرارهای مجاور تعیین کننده و تثبیت کننده ساختارها می‌باشند. همان‌گونه که ذکر شد دارپین‌ها پروتئین‌های پایداری هستند که این پایداری با افزایش تعداد تکرارهای داخلی آن‌ها بیشتر می‌شود. با این حال، از آنجایی که تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینی و کربوکسیلی بر خلاف تکرارهای داخلی فقط یک تکرار داخلی مجاور دارند، از استحکام و پایداری کمتری برخوردار بوده و بنابراین برای پایداری و استحکام دارپین‌ها دارای اهمیت زیادی هستند (۴۳)، بر همین اساس و با استفاده از نتایج مطالعات قبلی بر روی دارپین‌های مدل، در این تحقیق اقدام به طراحی سه نسخه دما

دنبال مطالعات بیوانفورماتیک برای تأیید نتایج پیش‌بینی‌های محاسباتی ضروری به نظر می‌رسد. از آنجایی که نتایج این تحقیق نیز در قالب مطالعات محاسباتی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی ارائه شده است، صحت‌سنجی این نتایج با استفاده از آزمایشات تجربی ضروری است.

مطالعات مختلف نشان داده‌اند که افزایش پایداری دمایی پروتئین‌ها با کاهش تمایل آن‌ها به تجمع ارتباط دارد (۴۵). بنابراین افزایش پایداری دمایی دارپین‌ها می‌تواند همراه با کاهش خطرات ایمنی‌زایی آن‌ها باشد. از سوی دیگر، بهبود پایداری دمایی دارپین‌ها برای مهندسی این پروتئین‌ها در شرایط درمانی مختلف به ویژه زمانی که فعالیت بیولوژیکی آن نیاز به بهینه‌سازی داشته باشد (به عنوان مثال برای تنظیم دقیق فعال شدن گیرنده‌ها) از اهمیت بالایی برخوردار است (۴۶). در نهایت، افزایش پایداری دمایی دارپین‌ها منجر به تولید مقرون به صرفه این پروتئین‌ها با تسهیل مدیریت تجویز، نگهداری و حمل و نقل می‌شود.

## ۱.۵. نتیجه‌گیری

از آنجایی که جزئیات ساختاری و دینامیکی به درک نیروهای محرکه‌ای که منجر به پایداری پروتئین‌ها در دماهای مختلف می‌شود کمک کرده و مهندسی پروتئین‌ها را برای افزایش پایداری دمایی تسهیل می‌کند، در این مطالعه سه نسخه دما پایدار از دارپین G3 از طریق ابزارهای بیوانفورماتیک مورد مقایسه قرار گرفتند. به طور کلی، نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان‌دهنده پایداری ترمودینامیکی دارپین‌های G3 باز طراحی شده دما پایدار بود. در این میان، TS DARPin G3-3 که دارای تغییرات آمینواسیدی در تکرارهای انتهای سرپوش‌دار آمینو و کربوکسیلی بود از دمای ذوب بالاتر و در نتیجه پایداری ترمودینامیکی بالاتری برخوردار بود. به طور کلی، افزایش پایداری دمایی پروتئین‌های دارویی علاوه بر تسهیل شرایط خاص‌سازی، نگهداری و حمل و نقل این داروها می‌تواند امکان توسعه آژوسول‌ها یا فرمولاسیون پودر خشک استنشاقی داروهای مبتنی بر دارپین را فراهم کند.

## تشکر و قدردانی:

این مقاله از طرح پژوهشی با شماره قرارداد ۲۷/۱۱۴۸/۲۷ و از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تبریز استخراج گردیده است.

## مشارکت نویسندگان:

م.ا. و. ایده و طراحی مطالعه، انجام آنالیزها و جمع‌آوری داده‌ها، آنالیز و تفسیر نتایج، نگارش نسخه اول مقاله؛ ب. ب. ک. مدیر پروژه، ایده‌پردازی اولیه، بررسی نتایج آنالیزها، ویرایش و بازنگری نهایی مقاله؛ همه نویسندگان نتایج را بررسی نموده و نسخه نهایی مقاله را تأیید نمودند.

شدن در دمای بالا در حالت تعادل، اسیدآمینه آسپارات شماره ۱۷ در تکرار سرپوش‌دار انتهای آمینو دارپین‌ها را به عنوان پاشنه آشیل این پروتئین‌ها برای افزایش پایداری دمایی معرفی کردند (۲۴). نتایج مطالعه آن‌ها بر روی دارپین‌های مدل حاوی یک تکرار داخلی و تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینو و کربوکسیلی نشان داد که تغییر اسیدآمینه آسپارات شماره ۱۷ به لوسین منجر به افزایش پایداری دمایی دارپین‌های مدل بین ۸ تا ۱۶ درجه سانتی‌گراد می‌شود.

ساختارهای بررسی شده در این تحقیق شامل سه نسخه دما پایدار باز طراحی شده از دارپین G3 حاوی تغییرات آمینواسیدی در تکرارهای سرپوش‌دار انتهای آمینو و یا کربوکسیلی هستند. بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی، خصوصیات برتر این پروتئین‌ها را در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 نشان داد. بررسی‌های سمیت و حلالیت نشان داد که این پروتئین‌ها سمی نیستند و می‌توانند به صورت محلول در *E. coli* بیان شوند. نتایج بررسی ساختارهای ثانویه و تطبیق ساختارهای مدل‌سازی شده تغییرات قابل توجهی را در مقایسه با نسخه اصلی دارپین G3 نشان نداد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داد که نسخه‌های دما پایدار دارپین G3 در دمای بالا پایداری ترمودینامیکی بیشتری نسبت به نسخه اصلی دارپین G3 دارند و در این میان نسخه سوم دارپین G3 باز طراحی شده پایدارترین ساختار را دارد. نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که هر سه نسخه دارپین G3 دما پایدار تمایل بالایی برای اتصال به آمینواسیدهای زیر دمین IV از دمین خارج سلولی گیرنده HER2 از طریق پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوبی دارند. کاهش میل ترکیبی دارپین‌های باز طراحی شده نسبت به نسخه اصلی دارپین G3 را می‌توان به جایگزینی‌های اسید آمینه‌ای در جیگاه‌های اتصال احتمالی این پروتئین‌ها به گیرنده HER2 نسبت داد. با این حال، تمایل اتصال TS DARPin G3 و 2-TS DARPin G3-3 نسبت به گیرنده HER2 بالاتر از TS DARPin G3-1 بود. جایگزینی‌های آمینواسیدی در هر سه نسخه باز طراحی شده از دارپین G3 با حفظ ساختار عملکردی دارپین‌ها منجر به افزایش پایداری دمایی این پروتئین شد. با این حال، بیشترین افزایش دمای ذوب و در نتیجه پایداری دمایی با ۳۶/۲۳ درجه سانتی‌گراد مربوط به TS DARPin G3-3 بود که شامل تغییرات آمینواسیدی متعدد در تکرارهای انتهای سرپوش‌دار آمینو و کربوکسیلی می‌باشد.

ابزارهای بیوانفورماتیک می‌توانند با دور زدن آزمایشات پرهزینه و زمان‌بر تجربی، سرعت تحقیقات زیستی را افزایش دهند. با این حال، از آنجایی که این مطالعات با حجم عظیمی از داده‌ها سر و کار دارند، نیاز به سرورها و کامپیوترهای قدرتمند داشته و ذخیره‌سازی داده‌های آن‌ها می‌تواند چالش برانگیز باشد. همچنین درک و تفسیر داده‌های این ابزارها پیچیده بوده و فاقد روش‌های استاندارد شده است که می‌تواند بر اعتبارسنجی نتایج آن تأثیرگذار باشد. بنابراین، انجام آزمایشات تجربی به

## References

- Daniell H, Singh ND, Mason H, Streatfield SJ. Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. *Trends Plant Sci.* 2009;**14**(12):669-79. [PubMed ID:19836291]. [PubMed Central ID:PMC2787751]. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.09.009>.
- Kwon KC, Nityanandam R, New JS, Daniell H. Oral delivery of bioencapsulated exendin-4 expressed in chloroplasts lowers blood glucose level in mice and stimulates insulin secretion in beta-TC6 cells. *Plant Biotechnol J.* 2013;**11**(1):77-86. [PubMed ID:23078126]. [PubMed Central ID:PMC3535676]. <https://doi.org/10.1111/pbi.12008>.
- Krasniqi A, D'Huyvetter M, Devoogdt N, Frejd FY, Sorensen J, Orlova A, et al. Same-Day Imaging Using Small Proteins: Clinical Experience and Translational Prospects in Oncology. *J Nucl Med.* 2018;**59**(6):885-91. [PubMed ID:29545374]. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.199901>.
- Boersma YL, Pluckthun A. DARPinS and other repeat protein scaffolds: advances in engineering and applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2011;**22**(6):849-57. [PubMed ID:21715155]. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.06.004>.
- Goldstein R, Sosabowski J, Livanos M, Leyton J, Vigor K, Bhavsar G, et al. Development of the designed ankyrin repeat protein (DARPin) G3 for HER2 molecular imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2015;**42**(2):288-301. [PubMed ID:25391547]. [PubMed Central ID:PMC4315530]. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2940-2>.
- Kummer L, Parizek P, Rube P, Millgramm B, Prinz A, Mittl PR, et al. Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;**109**(34):E2248-57. [PubMed ID:22843676]. [PubMed Central ID:PMC3427131]. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205399109>.
- Parizek P, Kummer L, Rube P, Prinz A, Herberg FW, Pluckthun A. Designed ankyrin repeat proteins (DARPins) as novel isoform-specific intracellular inhibitors of c-Jun N-terminal kinases. *ACS Chem Biol.* 2012;**7**(8):1356-66. [PubMed ID:22568706]. <https://doi.org/10.1021/cb3001167>.
- Bork P. Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally? *Proteins.* 1993;**17**(4):363-74. [PubMed ID:8108379]. <https://doi.org/10.1002/prot.340170405>.
- Canepa ET, Scassa ME, Ceruti JM, Marazita MC, Carcagno AL, Sirkin PF, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life.* 2007;**59**(7):419-26. [PubMed ID:17654117]. <https://doi.org/10.1080/15216540701488358>.
- Kobe B, Kajava AV. When protein folding is simplified to protein coiling: the continuum of solenoid protein

## بازیابی داده ها:

مجموعه داده ارائه شده در مطالعه با درخواست از نویسندگان مربوطه در حین ارسال یا پس از انتشار در دسترس است.

## تضاد منافع:

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ تضاد منفعی در رابطه با نویسندگی و یا انتشار این مقاله ندارند.

## حمایت مالی/معنوی:

این مقاله از طرح پژوهشی با شماره قرارداد ۱۱۴۸/۲۷ و از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه تبریز استخراج گردیده است.

## کد اخلاق:

طبق آیین‌نامه کمیته اخلاق دانشگاه تبریز، صدور کد اخلاق برای تحقیقات بیوانفورماتیکی و میدانی برای طرح‌های خاتمه یافته و در حال خاتمه انجام نمی‌گیرد و از آن جایی که تاریخ شروع به تحقیقات منتج به این مقاله قبل از آغاز به کار کمیته صدور کد اخلاق بوده، نتایج این تحقیق بدون کد اخلاق می‌باشد.

structures. *Trends Biochem Sci.* 2000;**25**(10):509-15. [PubMed ID:11050437]. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01667-4](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01667-4).

- Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem Sci.* 1999;**24**(8):311-6. [PubMed ID:10431175]. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01426-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01426-7).
- Merz T, Wetzel SK, Firbank S, Pluckthun A, Grutter MG, Mittl PR. Stabilizing ionic interactions in a full-consensus ankyrin repeat protein. *J Mol Biol.* 2008;**376**(1):232-40. [PubMed ID:18155045]. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.047>.
- Kawe M, Forrer P, Amstutz P, Pluckthun A. Isolation of intracellular proteinase inhibitors derived from designed ankyrin repeat proteins by genetic screening. *J Biol Chem.* 2006;**281**(52):40252-63. [PubMed ID:17050543]. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602506200>.
- Walker RG, Willingham AT, Zuker CS. A Drosophila mechanosensory transduction channel. *Sci.* 2000;**287**(5461):2229-34. [PubMed ID:10744543]. <https://doi.org/10.1126/science.287.5461.2229>.
- Epa VC, Dolezal O, Doughty L, Xiao X, Jost C, Pluckthun A, et al. Structural model for the interaction of a designed Ankyrin Repeat Protein with the human epidermal growth factor receptor 2. *PLoS One.* 2013;**8**(3):e59163. [PubMed ID:23527120]. [PubMed Central ID:PMC3602593]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059163>.

16. Zahnd C, Kawe M, Stumpp MT, de Pasquale C, Tamaskovic R, Nagy-Davidescu G, et al. Efficient tumor targeting with high-affinity designed ankyrin repeat proteins: effects of affinity and molecular size. *Cancer Res.* 2010;**70**(4):1595-605. [PubMed ID:20124480]. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2724>.
17. Zahnd C, Wyler E, Schwenk JM, Steiner D, Lawrence MC, McKern NM, et al. A designed ankyrin repeat protein evolved to picomolar affinity to Her2. *J Mol Biol.* 2007;**369**(4):1015-28. [PubMed ID:17466328]. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.03.028>.
18. Zahnd C, Amstutz P, Pluckthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat Methods.* 2007;**4**(3):269-79. [PubMed ID:17327848]. <https://doi.org/10.1038/nmeth1003>.
19. Livanos M. Production of DARPins in the Yeast *Pichia pastoris* [thesis]. London: University College London; 2019.
20. Ehsasatvatan M, Kohnhrouz BB, Gholizadeh A, Ofoghi H, Shanebandi D. The production of the first functional antibody mimetic in higher plants: the chloroplast makes the DARPIn G3 for HER2 imaging in oncology. *Biol Res.* 2022;**55**(1):32. [PubMed ID:36274167]. [PubMed Central ID:PMC9590205]. <https://doi.org/10.1186/s40659-022-00400-7>.
21. Binz HK, Stumpp MT, Forrer P, Amstutz P, Pluckthun A. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol.* 2003;**332**(2):489-503. [PubMed ID:12948497]. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00896-9](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00896-9).
22. Interlandi G, Wetzl SK, Settanni G, Pluckthun A, Caflisch A. Characterization and further stabilization of designed ankyrin repeat proteins by combining molecular dynamics simulations and experiments. *J Mol Biol.* 2008;**375**(3):837-54. [PubMed ID:18048057]. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.09.042>.
23. Rothenberger S, Hurdiss DL, Walser M, Malvezzi F, Mayor J, Ryter S, et al. The trispesific DARPIn ensovibep inhibits diverse SARS-CoV-2 variants. *Nat Biotechnol.* 2022;**40**(12):1845-54. [PubMed ID:35864170]. [PubMed Central ID:PMC9750863]. <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01382-3>.
24. Schilling J, Jost C, Ilie IM, Schnabl J, Buechi O, Eapen RS, et al. Thermostable designed ankyrin repeat proteins (DARPins) as building blocks for innovative drugs. *J Biol Chem.* 2022;**298**(1):101403. [PubMed ID:34793836]. [PubMed Central ID:PMC8683736]. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101403>.
25. Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res.* 2022;**50**(W1):W276-W9. [PubMed ID:35412617]. [PubMed Central ID:PMC9252731]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac240>.
26. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud Se, Wilkins MR, Appel RD, et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: Walker JM, editor. *The proteomics protocols handbook* Totowa, New Jersey: Humana Press; 2005. p. 571-607.
27. Hebditch M, Carballo-Amador MA, Charonis S, Curtis R, Warwicker J. Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence. *Bioinformatics.* 2017;**33**(19):3098-100. [PubMed ID:28575391]. [PubMed Central ID:PMC5870856]. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx345>.
28. Pan X, Zuallaert J, Wang X, Shen HB, Campos EP, Marushchak DO, et al. ToxDL: deep learning using primary structure and domain embeddings for assessing protein toxicity. *Bioinformatics.* 2021;**36**(21):5159-68. [PubMed ID:32692832]. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa656>.
29. Combet C, Blanchet C, Geourjon C, Deleage G. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci.* 2000;**25**(3):147-50. [PubMed ID:10694887]. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01540-6](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01540-6).
30. Jung F, Frey K, Zimmer D, Muhlhaus T. DeepSTABp: A Deep Learning Approach for the Prediction of Thermal Protein Stability. *Int J Mol Sci.* 2023;**24**(8). [PubMed ID:37108605]. [PubMed Central ID:PMC10138888]. <https://doi.org/10.3390/ijms24087444>.
31. Kim DE, Chivian D, Baker D. Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Res.* 2004;**32**(Web Server issue):W526-31. [PubMed ID:15215442]. [PubMed Central ID:PMC441606]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh468>.
32. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallography.* 1993;**26**(2):283-91. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.
33. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci.* 1993;**2**(9):1511-9. [PubMed ID:8401235]. [PubMed Central ID:PMC2142462]. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020916>.
34. Wiederstein M, Sippl MJ. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* 2007;**35**(Web Server issue):W407-10. [PubMed ID:17517781]. [PubMed Central ID:PMC1933241]. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.
35. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem.* 2005;**26**(16):1701-18. [PubMed ID:16211538]. <https://doi.org/10.1002/jcc.20291>.
36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Couch GS, Croll TI, et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.* 2021;**30**(1):70-82. [PubMed ID:32881101]. [PubMed Central ID:PMC7737788]. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>.
37. Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim BH, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction

- of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics*. 2014;**30**(12):1771-3. [PubMed ID:24532726]. [PubMed Central ID:PMC4058926]. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>.
38. Xue LC, Rodrigues JP, Kastritis PL, Bonvin AM, Vangone A. PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. *Bioinformatics*. 2016;**32**(23):3676-8. [PubMed ID:27503228]. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw514>.
39. Guruprasad K, Reddy BV, Pandit MW. Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Eng*. 1990;**4**(2):155-61. [PubMed ID:2075190]. <https://doi.org/10.1093/protein/4.2.155>.
40. Ikai A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J Biochem*. 1980;**88**(6):1895-8.
41. Dehghan P, Tabatabaee M, Seifati SM. [Molecular docking simulation of 1-tosyl-1H,1,2,4-triazol-5-amine as breast cancer inhibitor]. *Koomesh J*. 2023;**25**(5):141-141. Persian.
42. Atefi A, Larypoor M, Tabatabaee M, Bahramali G. [Molecular docking simulation of Antibacterial properties of Silver (I) complex with N-(2,5-Dihydro-pyrimidine-2-yl)-4-methyl-benzenesulfonamide as Escherichia coli Dihydrofolate synthetase inhibitor]. *Koomesh J*. 2023;**25**(5):138-138. Persian.
43. Wetzel SK, Settanni G, Kenig M, Binz HK, Pluckthun A. Folding and unfolding mechanism of highly stable full-consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol*. 2008;**376**(1):241-57. [PubMed ID:18164721]. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.11.046>.
44. Kohl A, Binz HK, Forrer P, Stumpp MT, Pluckthun A, Grutter MG. Designed to be stable: crystal structure of a consensus ankyrin repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;**100**(4):1700-5. [PubMed ID:12566564]. [PubMed Central ID:PMC149896]. <https://doi.org/10.1073/pnas.0337680100>.
45. Asial I, Cheng YX, Engman H, Dollhopf M, Wu B, Nordlund P, et al. Engineering protein thermostability using a generic activity-independent biophysical screen inside the cell. *Nat Commun*. 2013;**4**:2901. [PubMed ID:24352381]. <https://doi.org/10.1038/ncomms3901>.
46. Mohan K, Ueda G, Kim AR, Jude KM, Fallas JA, Guo Y, et al. Topological control of cytokine receptor signaling induces differential effects in hematopoiesis. *Science*. 2019;**364**(6442). [PubMed ID:31123111]. [PubMed Central ID:PMC7274355]. <https://doi.org/10.1126/science.aav7532>.

## Research Article

## Computational Redesign of Thermostable DARPin G3 Antibody Mimetic to Facilitate Production, Storage, and Administration Management

Maryam Ehsasatvatan <sup>1</sup>, Bahram Baghban Kohnehrouz <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Corresponding Author: Department of Plant Breeding & Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: bahramrouz@yahoo.com

Received 11/10/2023; Accepted 11/6/2024

### Abstract

**Introduction:** Designed ankyrin repeat proteins (DARPin) are relatively small non-immunoglobulin scaffolds with high affinity for specific targets. G3 is a DARPin designed to bind to the HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) tyrosine kinase receptor. This study aimed to evaluate the thermostability of DARPin G3 using *in silico* analyses and amino acid substitutions in the sequences of its N- and C-capping repeats. Bioinformatic tools were used to compare the structural changes and dynamic stability of the designed thermostable proteins with those of the original DARPin G3.

**Materials and methods:** Computational analysis of the primary and secondary structures of the redesigned DARPin G3 was conducted to predict certain properties. The 3D model of the redesigned proteins was created using the Robetta server, and molecular dynamic simulations were conducted using GROMACS for 50 ns. Molecular docking between the redesigned proteins and the extracellular domain of the HER2 receptor was conducted using the ZDOCK server, and amino acid interactions were plotted using LigPlot.

**Results:** Molecular dynamic simulations of the structures revealed that the redesigned thermostable DARPin G3 at 350 K was more stable than the original DARPin G3. Molecular docking confirmed the binding of the redesigned thermostable DARPin G3 to the HER2 receptor, with a binding energy comparable to that of the original DARPin G3. The amino acid substitution in the capping repeats of DARPin G3 resulted in an increase of 35–16 °C in the melting temperature of this protein, as well as an improvement in its dynamic stability when compared to the original DARPin G3.

**Conclusion:** The design and production of thermostable proteins enhance their durability and stability at high temperatures, thereby addressing the need for costly cold storage and simplifying the administration management and transportation of these proteins.

**Keywords:** : DARPin, HER2, Molecular Docking, Molecular Dynamics, Thermostable