



Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iavaramin.ac.ir



In silico study to Identify New Inhibitors of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Sortase A

Hasan SahebJamei^{1*}, MehrAli Mohmoud Janlou²

1. Assistant Professor, Department Biophysics, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Assistant Professor, Department Biology, School of Biological Science, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Golestan, Iran.

.Place of Research: Department of Biology, School of Biological Science, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran

| Article Info | Abstract |
|--|---|
| <p>Article History:</p> <p>Recived 01.06.2024 Revised 01.27.2024 Accepted 02.08.2024 Online 02.08.2024</p> <p>KeyWords:</p> <p>Srt A inhibitors <i>Staphylococcus aureus</i> Molecular docking Molecular dynamics simulation</p> <p>*Corresponding author: E-mail address</p> <p>sahebjam.has@gmail.com mfs21@gmail.com</p> | <p>Introduction: Inhibition of key enzymes in bacteria that exert low evolutionary pressure can be a drug development strategy for bacterial antibiotic resistance. Sortase A (Srt A) is a transpeptidase that is widely used in site-specific protein modification. This enzyme has a key function in the interactions between <i>Staphylococcus aureus</i> and the host and has been considered a promising target for the drug development of resistant bacteria. To date, some Srt A inhibitors have been discovered most of them are derived from flavonoid compounds, like myricetin.</p> <p>Aim: Since computational methods for monitoring the behavior of biomolecules at the microscopic level are more accurate and cost-effective, therefore, in this research, our goal is to use computational methods to find similar molecules but with higher binding and inhibitory effect than myricetin.</p> <p>Materials and Methods: In this study, we used computational methods such as structure-based virtual screening, molecular docking, MM-PBSA approach, and MD simulation. A molecular docking approach was used to understand protein-ligand interactions and inhibition constants in terms of affinity. MD simulation technique was used to monitor the conformational changes of Srt A enzyme. After the MD simulation studies, the MM-PBSA approach was used to interpret the binding free energy.</p> <p>Results: First, Chempider's chemical library was screened by the «Similarity search» method, in which myricetin was placed as a reference molecule. The second stage of screening was done using PyRx software, so that the top 10 compounds were carefully selected based on their inhibitory potential from the set of ligands obtained from the previous stage. These compounds were subjected to Autodock4.2 for molecular docking. As a result, it was observed that compound73945561- has a higher inhibitory effect than myrsteine. To investigate the stability and efficiency of ligand binding mode, free Srt A, its complexes with myrsteine and the best selected compound were subjected to 50s molecular dynamics simulation. MD simulation results showed that compound73945561- had better binding profiles and interactions than myrsteine as a reference inhibitor, and steadily unstable behavior was observed in the docking complex.</p> <p>Conclusion: Overall, compound73945561- may serve as a new inhibitor or provide a scaffold for further optimization toward the design of more potent SortA inhibitors. The development of such inhibitors would be an essential strategy against resistant bacteria.</p> |

Cite this article: SahebJamei.H*, Mahmoud Janlou M.A. In silico study to Identify New Inhibitors of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Sortase A. Iranian Journal of Biological Sciences. 2023; 18(3):13-25

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



مطالعه مجازی تعیین مهارکننده های جدید آنزیم سورتازآ در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس

حسن صاحب جمعی^{۱*} و مهرعلی محمودجانلو^۲

۱- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گلستان، ایران

محل انجام تحقیق: گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

مقدمه: مهار آنزیم‌های کلیدی در باکتری‌هایی که فشار تکاملی پایینی اعمال می‌کنند می‌تواند یک استراتژی توسعه دارویی برای مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتریایی باشد. سورتازآ (Srt A) یک ترانس پپتیداز است که به طور گسترده در مطالعات مهار عفونت باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این آنزیم یک عملکرد کلیدی در تعاملات بین استافیلوکوکوس اورئوس و میزبان دارد و به عنوان یک هدف امیدوارکننده برای توسعه دارویی باکتری‌های مقاوم در نظر گرفته شده است. تا به امروز، برخی از مهارکننده‌های Srt A کشف شده‌اند که بیشتر آنها از ترکیبات فلاونوئیدی مانند مایرستتین (Myricetin) مشتق شده‌اند.

هدف: از آنجاییکه روش‌های محاسباتی برای نظارت بر رفتار مولکول‌های زیستی در سطح میکروسکوپی دقیق‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند، لذا در این تحقیق هدف ما اینست که با استفاده از روش‌های محاسباتی مولکول‌هایی مشابه اما با قدرت اتصال و مهار بالاتر نسبت به مایرستتین یافته شود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ما از روش‌های محاسباتی مانند غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، اتصال مولکولی و شبیه‌سازی Molecular Dynamic (MD) بهره جستیم. رویکرد اتصال مولکولی برای درک برهم‌کنش‌های پروتئین-لیگاند و ثابت مهار از نظر میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. برای نظارت بر تغییرات ساختاری آنزیم Srt A، از تکنیک شبیه‌سازی MD استفاده شد. پس از مطالعات شبیه‌سازی MD، رویکرد MM-PBSA برای تفسیر انرژی اتصال آزاد استفاده شد.

نتایج: ابتدا کتابخانه شیمیایی Chemspider را به روش «جستجوی مشابه» (Similarity search) که در آن مایرستتین به عنوان مولکول مرجع قرار داده شد، غربال گردید. مرحله دوم غربالگری با استفاده از نرم افزار PyRx صورت گرفت بطوریکه 10 ترکیب برتر بر اساس پتانسیل بازدارندگی آنها از مجموعه لیگاند‌های حاصل از مرحله قبل به دقت انتخاب شدند. این ترکیبات در معرض Autodock4.2 برای داکینگ مولکولی قرار گرفتند. که در نتیجه آن مشاهده گردید که ترکیب Chemspider ID=73945561 از قدرت مهار بالاتری نسبت به مایرستتین برخوردار است. برای بررسی پایداری و کارایی حالت اتصال لیگاند، Srt A آزاد، کمپلکس‌های آن با مایرستتین و بهترین ترکیب منتخب، تحت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی 50 ns قرار گرفتند. نتایج شبیه‌سازی MD نشان داد که ترکیب Chemspider ID=73945561 پروفایل‌ها و برهمکنش اتصال بهتری نسبت به مایرستتین به عنوان یک بازدارنده مرجع دارد، و رفتار ناپایدار پیوسته در کمپلکس داکینگ مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: در مجموع، ترکیب Chemspider ID=73945561 ممکن است به عنوان یک بازدارنده جدید عمل کند یا دارای داربستی برای بهینه‌سازی بیشتر به سمت طراحی مهارکننده‌های SortA قوی‌تر باشد. پیشنهاد می‌گردد که توسعه این مهارکننده می‌تواند یک استراتژی اساسی برای مهار باکتری‌های مقاوم باشد.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۲/۱۰/۱۶

بازنگری ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

پذیرش ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

نهایی ۱۴۰۲/۱۱/۱۹

کلمات کلیدی

مهارکننده های سورتازآ
استافیلوکوکوس اورئوس
داکینگ مولکولی
شبیه سازی دینامیک مولکولی

* نویسنده مسؤل

sahebjam.has@gmail.com
mfs21@gmail.com

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: صاحب جمعی ح. محمودجانلو م.ع. مطالعه مجازی تعیین مهارکننده های جدید آنزیم سورتازآ در باکتری استافیلوکوکوس اورئوس. مجله

دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲: ۱۸(۳): ۲۵-۱۳

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا | شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶ | شاپا الکترونیکی: ۲۷۱۷-۴۵۹X | نویسندگان: © حق مؤلف

مقدمه:

منجر به ظهور سریع سویه های مقاوم به دارو به دلیل فشار تکاملی بالا می شود. در واقع، مقاومت آنتی بیوتیکی آنها یکی از مشکلات عمده بهداشتی در سراسر جهان است (۱۱). افزایش مقاومت ضد میکروبی، همراه با کمبود قابل توجه سرمایه گذاری دارویی در توسعه آنتی بیوتیک های جدید، تحقیقات در مورد استراتژی های جایگزین برای آنتی بیوتیک های معمولی برای مبارزه با پاتوژن های باکتریایی را سبب شده است. در دهه گذشته، استراتژی هایی برای نسل بعدی داروهای ضد میکروبی توسعه یافته است. یکی از آنها به طور خاص مسیر متابولیسمی را مورد هدف قرار می دهد بطوریکه در این مسیر به دلیل فشار تکاملی پایین اعمال شده مقاومت آنتی بیوتیکی ایجاد نخواهد شد (۱۲). مطالعات بیولوژیکی نشان داده است که جهش ژن *Sortase A (Srt A)* در استافیلوکوکوس اورئوس از چسبیدن ارگانیسیم به IgG، فیرونکتین و فیبرینوژن جلوگیری می کند و ظرفیت پاتوژن را برای ایجاد عفونت حاد در موش تا حد زیادی کاهش می دهد (۱۳). *Srt A* تقریباً در تمام سویه های متعلق به گونه های گرم مثبت از جمله استافیلوکوک ها، استرپتوکوک ها، انتروکوک ها و لیستریا مونوسیتوژنز وجود دارد و نقش مهمی در مراحل مختلف فرآیند بیماری زایی مانند چسبندگی به بافت میزبان، فرار از دفاع میزبان و تشکیل بیوفیلم ایفا می کند (۱۴، ۱۵). بنا به گزارش برخی از محققین، غیرفعال سازی ژن *Srt A* در برخی از پاتوژن های گرم مثبت باعث ایجاد نقص های متعدد در پاتوژن آنها شده است (۱۶). با این حال، برای رشد یا بقای باکتری ها حیاتی نیست. اینها، دلایل بیشتری را تقویت می کنند که چرا *Srt A* یک هدف ایده آل برای توسعه داروهای ضد باکتریایی است. بنابراین یک هدف امیدوارکننده برای توسعه داروهای ضد عفونی جدید در نظر گرفته می شود که هدف آنها تداخل با مکانیسم های بیماری زایی مهم باکتری های گرم مثبت است (۱۷). *Srt A* یک ترانس پپتیداز است که واکنش اتصال پروتئین سطحی باکتری های گرم مثبت به پپتیدوگلیکان پیشساز دیواره سلولی را کاتالیز می کند. پروتئین های سطحی نقش مهمی

توسعه آنتی بیوتیک هایی که مولکول های زیستی خاصی در سلول های باکتریایی را مورد هدف قرار می دهند، و نیز اثرات جانبی برای سلول های انسانی نداشته باشند، نقش به سزایی در رشد جمعیت انسانی و بهبود کیفیت زندگی در ۷۵ سال اخیر داشته اند. با این وجود، ظهور گونه های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی مقاوم چند دارویی، باعث محدودیت تاثیر کلینیکی اغلب آنتی بیوتیک های تجاری شده است. بنا به گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO) در سال ۲۰۱۱، مقاومت دارویی باکتری ها باعث ایجاد مرگ ۵۰۰۰ نفر در سال در بریتانیا و ۲۵۰۰۰ نفر در اروپا گردید. تخمین زده می شود که در هر سال حداقل دو میلیون نفر در آمریکا به باکتری آلوده می شوند و ۲۳۰۰۰ نفر آنها می میرند، زیرا مبتلایان به گونه های باکتریایی موجود با استفاده از هیچ آنتی بیوتیک رایج مورد درمان قرار نمی گیرند (۱، ۲). این آمار نیاز مبرم به تولید داروهای ضد عفونی جدید و موثرتر علیه باکتری های بیماری زا را نشان می دهد.

استافیلوکوک ها (*Staphylococcus*) جنس مهمی از باکتری های گرم مثبت هستند. آنها مانند استرپتوکوک ها به شکل کوکسی می باشند اما تقسیم آنها در دو محور انجام می گیرد و به شکل خوشه ای دیده می شوند. استافیلوکوک دارای حداقل ۴۰ گونه می باشد که مهمترین گونه در جنس (سرده) از نظر پزشکی استافیلوکوک اورئوس می باشد. بیشتر استرپتوکوک ها از نظر تولید آنزیم های کاتالاز و اکسیداز، منفی بوده و بی هوازی اختیاری هستند (۳). استافیلوکوکوس اورئوس باعث طیف وسیعی از بیماری ها مانند عفونت های پوستی، اندوکاردیت، پنومونی، استئومیلیت و عفونت های خونی با عوارض و مرگ و میر بالا می شود (۴، ۵). اگرچه آنتی بیوتیک های مختلفی مانند *Oritavancin* (۶)، *Delbavancin* (۷)، *Tedizolid Delafloxazine* (۸)، *Lefamulin* (۹)، (۱۰) برای درمان عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس ساخته شده اند، با این حال، به دلیل مکانیسم اثر این داروها، سویه های مقاوم به دارو در سراسر جهان پدید آمده اند. جلوگیری از عفونت باکتریایی با مهار رشد، و یا کشتن باکتری ها

که یافتن مولکول‌های جدید مشابه مایرستین اما با اثرات بازدارندگی بالاتر و فارماکوکینتیک بهتر می‌تواند اهداف دارویی و درمانی باشد. از سوی دیگر، تولید داروی جدید پرهزینه و زمان بر است. آخرین ارزیابی که توسط Joe D. Massi، اقتصاددان مرکز تافتز در سال ۲۰۱۴ انجام شد، برآورد کرد که کل هزینه توسعه و کسب تأییدیه بازاریابی برای یک داروی جدید حدود ۲/۶ میلیارد دلار است (۲۸). علاوه بر این، روند توسعه و ورود به بازار یک داروی جدید می‌تواند ۱۰-۱۲ سال طول بکشد. هنگامی که یک دارو در بازار عرضه می‌شود، اغلب تحقیقات پس از تأیید برای ارزیابی اثربخشی کامل داروی کشف شده انجام می‌شود. بدیهی است که بررسی رفتار ساختاری پروتئین‌ها می‌تواند به اطمینان از اتصال صحیح دارو و کارایی آن کمک کند. برخلاف مطالعات آزمایشگاهی، روش‌های محاسباتی برای نظارت بر رفتار مولکول‌های زیستی در سطح میکروسکوپی دقیق‌تر و مقرون به صرفه‌تر هستند. از این رو، در این مطالعه، ما از روش‌های محاسباتی مانند غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، اتصال مولکولی و شبیه‌سازی MD بهره جستیم. رویکرد اتصال مولکولی برای درک برهم‌کنش‌های پروتئین-لیگاند و ثابت مهار از نظر میل ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MDS) یک روش محاسباتی است که برای مشاهده و تجزیه و تحلیل حرکات اتم‌ها و مولکول‌ها استفاده می‌شود (۲۹). این قوانین حرکت نیوتن و قوانین برخورد اتمی را برای پیش‌بینی تحرک مولکول‌ها در یک سیستم ترکیب می‌کند (۳۰). برای نظارت بر تغییرات ساختاری آنزیم Srt A، از تکنیک شبیه‌سازی MD استفاده شد. پس از مطالعات شبیه‌سازی MD، رویکرد MM-PBSA برای تفسیر انرژی اتصال آزاد استفاده شد. ما امیدواریم که دانش ارائه شده در این تحقیق منجر به پیشرفت در مطالعات بالینی مهارکننده‌های قوی‌تر Srt A و همچنین تلاش برای تحقیق در مورد توسعه داروهای ضد باکتریایی برای درمان جایگزین یا مکمل بیماری‌های عفونی در آینده نزدیک شود.

در چسبندگی و تهاجم به بافت‌های انسانی دارند. Srt A بواسطه موتیف شناخته شده LPXTG در پروتئین‌های سطحی، طی یک واکنش ترانس‌پپتیدازی باعث اتصال پروتئین سطحی به پپتیدوگلیکان پیش‌ساز دیواره سلولی می‌شود (۱۸). مطالعه ساختاری Srt A نشان داد که اسیدهای آمینه غیرقطبی شامل Ala118 (۶۰)، Trp194 (۱۳۶)، Val168 (۱۱۰)، Val193 (۱۳۵)، Ala92 (۳۴)، Ala104 (۴۶)، Leu169 (۱۱۱)، و Ile182 (۱۲۴) یک جایگاه آبگریز در مجاورت محل فعال آنزیم ایجاد می‌کند. جهش نقطه ای این اسیدهای آمینه منجر به از دست دادن فعالیت ترانس‌پپتیداز Srt A می‌شود. جایگاه فعال Srt A شامل سه رزیدوی آمینواسیدی حفاظت شده متشکل از آمینواسیدهای His120 (۶۲)، Cys184 (۱۲۶)، و Arg197 (۱۳۹) در انتهای یک شیار بلند در امتداد یک طرف ساختار دوم بتا است که تقریباً در معرض حلال قرار می‌گیرد. نشان داده شده است که جهش در هر یک از اینها به شدت فعالیت کاتالیزوری Srt A را کاهش می‌دهد (۱۹). همچنین، نشان داده شده است که Arg197 بر اساس حالت باردار پروتئین، برهم‌کنش متمایزی را ایجاد می‌کند، که به تثبیت فرم فعال کاتالیزوری جایگاه فعال آنزیم Srt A کمک می‌کند (۲۰).

نشان داده شده است که برخی از ترکیبات طبیعی در برابر آنزیم Srt A فعال بوده و باعث مهار آنزیم می‌گردد. مطالعات گذشته نشان می‌دهد که عصاره مایرستین (Myricetin) به عنوان یک گیاه دارویی بهترین اثر بازدارندگی را بر روی Srt A دارد و سمیت کمی بر روی سلول‌های انسانی نشان می‌دهد (۲۱).

مایرستین عضوی از طبقه فلاونوئیدها به نام فلاونول است که در سبزیجات (از جمله گوجه فرنگی)، میوه‌ها (از جمله پرتقال)، آجیل، انواع توت‌ها و شراب قرمز موجود است (۲۲). در واقع، ساختار هیدروکسیله مایرستین در مقایسه با سایر فلاونول‌ها مسئول خواص بیولوژیکی آن می‌باشد (۲۳). گزارش شده است که مایرستین دارای تعدادی از اثرات دارویی است، از جمله، آنتی‌اکسیدان (۲۴)، ضد سرطان (۲۵)، ضد التهاب و ضد ویروس (۲۶) و ضد باکتری (۲۷). بدیهی است

مواد و روش ها

آماده سازی پروتئین

ساختار کریستالی (PDB ID: 1T2P) با قدرت تفکیک ۲Å از بانک داده پروتئین (<http://www.rcsb.org>) به دست آمد قبل از اتصال مولکولی، ساختار پروتئین توسط نرم افزار UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera>) برای آماده سازی اتصال مولکولی بارگذاری شد. زنجیره A در ساختار PDB، که شامل ۱۴۶ باقیمانده آمینواسیدی بوده است انتخاب شد. سپس لیگاندها حذف و بارهای گاستیگر و اتم های هیدروژن اضافه شدند. در نهایت، آنزیم آماده شده با فرمت pdb برای مطالعات داکینگ ذخیره شد.

غربال گری مجازی و انجام داکینگ مولکولی

چندین پایگاه داده قابل دسترس از ترکیبات شیمیایی ایجاد شده است که ده ها میلیون مولکول شیمیایی را در خود ذخیره نموده اند. در این پژوهش از کتابخانه شیمیایی (<http://www.chemspider.com>)، برای شناسایی و غربالگری مجازی مولکول های شیمیایی استفاده شد. با توجه به حجم بالای کتابخانه، از ضریب تانیموتوی بالای ۰٫۹، برای پردازش جستجوی شباهت به عنوان معیار غربالگری استفاده شد. همچنین، مولکول مایرسیتین به عنوان ساختار مرجع برای غربالگری مبتنی بر شکل انتخاب شد. پس از غربال گری، تعداد مولکول های شیمیایی مشابه مایرسیتین به ۳۲۴ عدد کاهش یافت. نکته مهم این است که پایگاه داده ChemSpider منبع خوبی از ترکیبات امیدوارکننده با فعالیت بالقوه علیه اهداف بیولوژیکی می باشد. پس از به حداقل رساندن انرژی ساختاری مولکول ها با اعمال مجموعه پایه HyperChem ۶/۳۱G-۶/۳LYP با استفاده از نرم افزار ۷٫۵، مرحله دوم غربال گری مجازی با استفاده از Autodock vina (PyRx) انجام شد. PyRx یک ابزار غربالگری مجازی با یک پروتکل برای اتصال مولکولی پیشرفته است و برای طراحی دارو به کمک رایانه استفاده می شود (۳۱). لیگاندهایی که دارای بهترین انرژی اتصال در این مرحله بودند انتخاب شده و برای مرحله سوم غربالگری قرار گرفتند که این مرحله

مهم از طریق اتصال هر یک از لیگاندهای منتخب از مرحله قبل با استفاده از نرم افزار Autodock4.2 بوده است. مشخص شده است که Autodock4.2 دارای عملکرد بهتری نسبت به Autodock vina برای بررسی اتصال لیگاندها می باشد (۳۲). همانگونه که قبلا اشاره شد، همه انواع سورتازها حاوی یک سه آمینواسید حفاظت شده His۱۲۰، Cys۱۸۴ و Arg۱۹۷ در محل فعال هستند و برای فعالیت مورد نیاز هستند. همچنین بررسی دقیق محیط باقیمانده Cys۱۸۴ در محل فعال ساختار کریستالی Srt A چندین باقیمانده قابل یونیزاسیون Thr۱۸۳، Asp۱۸۵، Lys۱۹۶، Arg۱۹۷، Glu۱۰۵، Ser۱۱۶، Thr۱۸۰ و Try۱۸۷ را نشان داد (۲۲). بر اساس این اطلاعات، مختصات جعبه شبکه مرکزی بصورت: مرکز: x: ۳۰۶/۳۰۵، مرکز: y: ۲۲۹/۱۶- و مرکز: z: ۰۰۰/۲، فاصله بین نقاط شبکه در ۳۷۵Å/۰ و تعداد نقاط در x، y و بعد z به ترتیب ۴۸، ۴۰ و ۴۴ بود. این پارامترها با توجه به اندازه جایگاه اتصال لیگاندها انتخاب شدند. به طوری که کل محل اتصال و باقی مانده های مجاور آن را پوشش دهند. برای همه لیگاندها و مولکول مرجع (مایرسیتین)، از اندازه جعبه شبکه و سایر پارامترهای یکسان استفاده شد. برای هر اجرا مستقل، عدد الگوریتم ژنتیک (GA) روی ۱۰۰ تنظیم شد. سایر پارامترها به طور پیش فرض در نرم افزار Autodock تنظیم شدند. متعاقباً، برهم کنش های دو بعدی و سه بعدی بین لیگاند-آنزیم به ترتیب توسط نرم افزار Discovery Studio Client 2017 و PyMol مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

شبیه سازی دینامیک مولکولی و آنالیز MM/PBSA دینامیک برهمکنش های بین پروتئین و لیگاندهای مذکور با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی (MD) به شرح زیر مورد بررسی قرار گرفت: شبیه سازی ها با استفاده از GROMACS نسخه 5.1.1 انجام شد (۳۳). پارامترهای پروتئین با استفاده از میدان نیروی gromos۵۳a۶ تولید شد. پارامترهای لیگاند برای همان میدان نیرو با استفاده از سرور PRODRG تولید شد (۳۴). ابزار Gmx editconf برای تولید جعبه شبیه

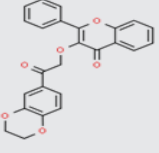
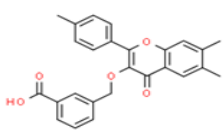
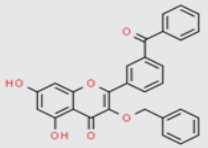
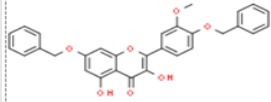
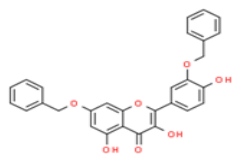
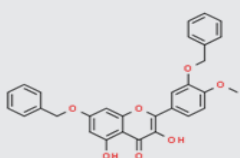
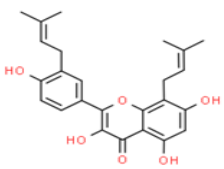
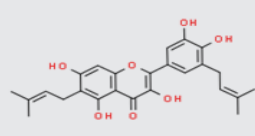
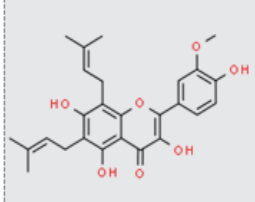
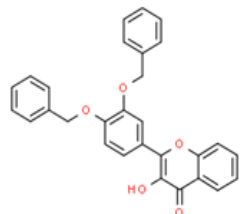
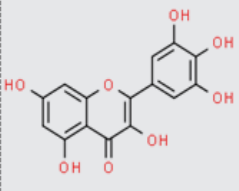
ریشه (RMSF) پروتئین به ترتیب با استفاده از ابزار $gmx\ rmsf$ و $gmx\ rms$ محاسبه شد و مساحت سطح قابل دسترسی حلال (SASA) و شعاع چرخش (Rg) نیز با $gmx\ sasa$ و gmx اندازه‌گیری شد. مقدار قدرت انرژی‌های برهمکنش پروتئین-لیگاند در حالت پویا با استفاده از اسکریپت «GROMACS» g_mmpbsa با مکانیک مولکولی سطح پواسون-بولتزمن (MM/PBSA) و محاسبه‌های انرژی آزاد اتصال تخمین زده شد (۳۶،۳۷). در نهایت قدرت انرژی‌های برهمکنش پروتئین-لیگاند در یک حالت دینامیکی با محاسبات انرژی آزاد اتصال سطح پواسون-بولتزمن مکانیک مولکولی (MM/PBSA) همراه با برهمکنش‌های کوتاه برد کولمبی (SR) ندارد- جونز بین پروتئین هدف و لیگاند محاسبه شد برآورد شد (۳۸).

سازی شش وجهی استفاده شد. حلال سازی با مدل آب SPC با استفاده از ابزار $gmx\ solvate$ انجام شد. بار خالص پروتئین +۱ بود، بنابراین خنثی سازی سیستم نیاز به افزودن یک یون کلر (Cl) داشت. کل سیستم با استفاده از روش $steepest\ descent$ ۱۰۰۰۰ پله و سپس روش $conjugate\ gradients$ تا ۵۰۰۰۰ به حداقل رسید. پس از به حداقل رساندن انرژی، سیستم در دو مرحله متعادل شد: در مرحله اول ۵۰۰ پیکوثانیه تعادل NVT، سیستم تا ۳۰۰K گرم شد تا دمای سیستم تثبیت شود. در مرحله دوم ۵۰۰ پیکوثانیه از مجموعه NPT، طول پیوندها با استفاده از الگوریتم حل محدودیت خطی (LINCS) در مقادیر تعادلی خود قرار گرفت (۳۵). در مرحله آخر شبیه‌سازی MD، هندسه‌های تعادلی با استفاده از شبیه‌سازی MD برای ۵۰ نانوثانیه در ۳۰۰K با زمان گام ۲fs به دست آمد. میانگین مربعات انحراف ریشه (RMSD) و نوسانات میانگین مربعات

نتایج

امتیاز انرژی اتصال برای ارزیابی قدرت برهمکنش‌های پروتئین-لیگاند و رتبه بندی آنها استفاده شد. امتیاز انرژی اتصال منفی تر، اتصال مطلوب تری بین لیگاند و پروتئین را نشان می‌دهد. انرژی اتصال و ثابت بازدارنده در بهترین خوشه برای مولکول‌های متصل شده توسط Autodock4.2 در جدول ۱ نشان داده شده است. یکی از اهداف اصلی دانش شیمی دارویی، کشف داروی کاندید با بیشترین میل پیوندی در کمترین غلظت است (۳۹). با توجه به این واقعیت که مقادیر انرژی اتصال ترکیبات پاسخ احتمالاً در نرم افزار Autodock بهبود می‌یابد، بر این اساس برای اطمینان بیشتر از مولکول منتخب و محدود کردن فضای جستجو، آستانه انرژی برای تعیین بهترین پاسخ را به ۸- کیلوکالری در مول کاهش دادیم. فرآیند اتصال نشان می‌دهد که فقط لیگاند شماره ۳ (جدول ۱) دارای انرژی اتصال کمتر از ۸- کیلوکالری در مول است که بسیار بهتر از میریستین است

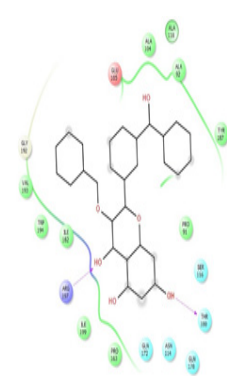
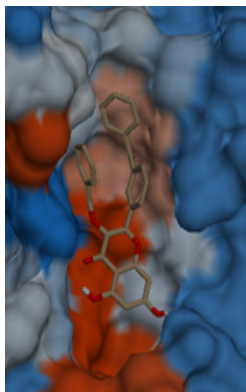
نتایج حاصل از غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار و اتصال مولکولی در مجموع ۳۲۴ ترکیب از پایگاه داده Chemspider بر اساس یک جستجوی مشابه تانیموتو ۹۰٪ در برابر مایرستیترین به عنوان یک مولکول مرجع برای توسعه مولکول‌های دارو به دست آمد. برای غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار لیگاند‌های حاصله از نرم افزار PyRx استفاده شد. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود، ۱۰ لیگاند از بهترین لیگاندها با توجه به انرژی اتصال به عنوان مولکول‌های پاسخ در این مرحله انتخاب شدند. اتصال مولکولی یک روش خوبی است که به طور گسترده در کشف دارو بر اساس غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار استفاده می‌شود. بر این اساس در مرحله بعد، ۱۰ لیگاند آماده شده همراه مولکول مرجع یک به یک و جداگانه با استفاده از Autodock4.2 به محل اتصال مولکول هدف (Srt A) اتصال داده شدند. از مقدار عددی

| | | | |
|---|---|--|---|
|  |  |  |  |
| ۱: ۶۰۴۲۲۱۵۱ | ۲: ۶۰۴۳۷۴۳ | ۳: ۷۳۹۴۵۵۶۱ | ۴: ۷۴۸۴۷۳۱۶ |
|  |  |  |  |
| ۵: ۷۴۸۴۷۳۱۸ | ۶: ۷۴۸۴۷۳۱۹ | ۷: ۸۰۴۳۵۹۹ | ۸: ۸۵۱۸۵۲۹ |
|  |  |  | |
| ۹: ۸۷۷۵۰۹۹ | ۱۰: ۸۷۹۸۷۹۲ | ۱۱: ۴۴۴۴۹۹۱ (Myricetin) | |

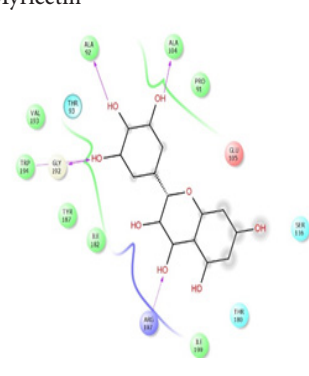
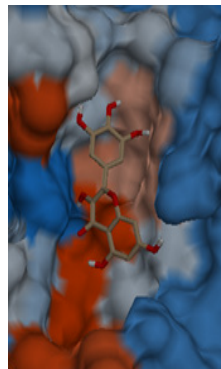
شکل ۱: ساختار دو بعدی مولکول مرجع همراه با ۱۰ ترکیب برتر شناسایی شده از طریق غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار توسط نرم افزار PyRx.

Chemspider ID

Ligand No. 3



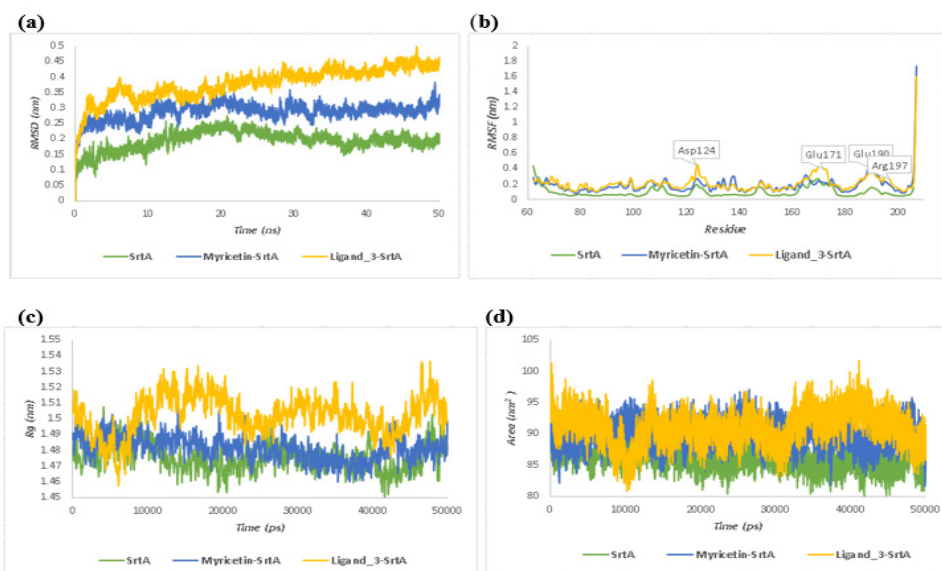
Myricetin



شکل ۲: تصاویر دو و سه بعدی برهمکنش بین مولکول مرجع و منتخب شماره ۳ در جایگاه اتصال آنزیم S. aureus Srt A.

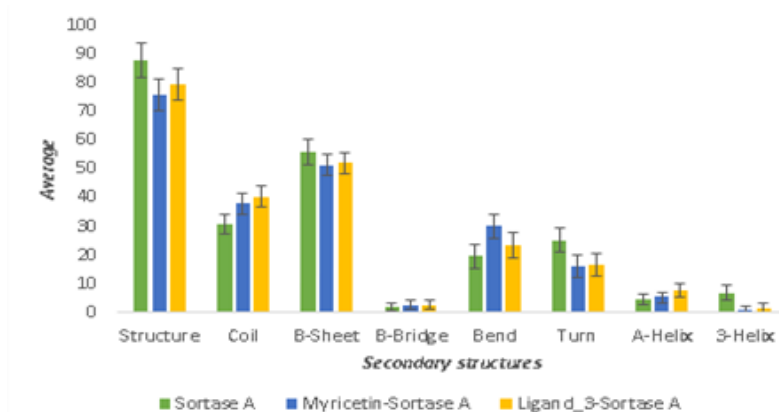
جدول ۱. انرژی های اتصال و ثابت های بازدارندگی ترکیبات در برابر Srt A.

| No | Chempid ID | Binding energy(kcal/mol) | Inhibition Constant(μ M) |
|----|------------|--------------------------|-------------------------------|
| ۱ | ۶۰۴۲۲۱۵ | -۴۵/۶ | ۴۷/۳ |
| ۲ | ۶۰۴۳۷۴۳ | -۵۴/۶ | ۰۲/۱۶ |
| ۳ | ۷۳۹۴۵۵۶۱ | -۰۷/۸ | ۲۱/۱ |
| ۴ | ۷۴۸۴۷۳۱۶ | -۱۷/۵ | ۶۹/۱۶۲ |
| ۵ | ۷۴۸۴۷۳۱۸ | -۹۱/۵ | ۸۴/۴۶ |
| ۶ | ۷۴۸۴۷۳۱۹ | -۸۸/۵ | ۵۸/۴۸ |
| ۷ | ۸۰۴۲۵۹۹ | -۱۴/۶ | ۷۳/۳۱ |
| ۸ | ۸۵۱۸۵۲۹ | -۵۶/۵ | ۵۱/۸۴ |
| ۹ | ۸۷۷۵۰۹۹ | -۵۴/۵ | ۲۹/۸۷ |
| ۱۰ | ۸۷۹۸۷۹۲ | -۰۲/۷ | ۱/۳ |
| ۱۱ | Myricetin | -۱۳/۵ | ۱۲/۱۷۳ |



شکل ۳: (a) RMSD، (b) RMSF، (c) Rag، و (d) SASA در طول شبیه سازی دینامیک مولکولی برای Apo- Sort A و کمپلکس های

. Ligand 3-Srt A و Myricetin-Sort A



شکل ۴: میانگین ساختارهای ثانویه در طول شبیه‌سازی MD برای اشکال Sort A اتصال یافته و آزاد.

جدول ۲: مقدار انرژی اتصال بر حسب kJ/mol برای کمپلکس‌های Sort A با دو مولکول میریستین و Ligand No. 3.

| Complex | E_{vdW} | E_{ele} | E_{Total} | Number of H-bonds |
|--------------|-----------|-----------|-------------|-------------------|
| Ligand No. 3 | -133.92 | -55/21 | -187/14 | ۰/۸ |
| Myricetin | -88/91 | -37/99 | -126/90 | ۱/۱۰ |

شعاع چرخش (Rag)، و سطح قابل دسترسی (SASA) انجام شد.

RMSD، خواص کلی از تغییرات ساختار پروتئین را نشان می‌دهد. پس از تعادل سیستم به مدت ۱۰ ns، RMSD اشکال کمپلکس نسبت به فرم آزاد (Apo-Sort) افزایش بیشتری نشان می‌دهد. در این بین، کمپلکس Ligand 3-Srt A تغییرات RMSD بالاتری را بین ۰ تا ۴۲/۰ نانومتر نشان داد. درحالی‌که کمپلکس Myricetin-Sort A تغییرات RMSD را کمی بالاتر از Apo-Sort A نشان داد (۰ تا ۲۷/۰ نانومتر) (شکل ۳(a)). مشابه توزیع RMSD، کمپلکس Ligand 3-Srt A بالاترین نمایه RMSF را نشان می‌دهد. علاوه بر این، تعداد کمی از باقیمانده‌های

(به ترتیب برای لیگاند شماره ۳ و میریستین -۰/۱۳ و ۰۷/۸- کیلو کالری در مول). همچنین از نقطه نظر ثابت بازداری (Ki)، لیگاند شماره ۳ نسبت به لیگاندهای دیگر از جمله میریستین برتری دارد. جزئیات برهمکنش‌های واندروالس و پیوند هیدروژنی بین زنجیره جانبی آمینواسیدها در پاکت اتصال Srt A با لیگاند مرجع و ترکیب شماره ۳ در شکل ۲ نشان داده شده‌اند.

تجزیه و تحلیل شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

۵۰ ns شبیه‌سازی MD برای ارزیابی پایداری ساختاری کمپلکس‌ها با تجزیه و تحلیل ریشه میانگین انحراف مربع (RMSD)، نوسانات ریشه میانگین مربع (RMSF)،

زمان (Time-dependent secondary structures) مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز نتایج حاصل از DSSP جالب توجه می باشد. در این نتایج دیده می شود که اگر چه اتصال مایرستین به جایگاه فعال Srt A همچون لیگاند شماره ۳ باعث کاهش ساختارهای دوم B-Sheet، Turn، و ۳-helix و تبدیل آنها به Coil، Bend و A-helix می شود، اما لیگاند شماره ۳ میزان بیشتری از Coil را ایجاد می کند که معیاری از عدم تاخوردگی پروتئین می باشد (شکل ۴). به طور کلی، تجزیه و تحلیل شبیه سازی دینامیک مولکولی نشان می دهد که اتصال لیگاند شماره ۳ در مقایسه با مایرستین به پاکت اتصال Srt A باعث باز شدن و ناپایداری بیشتر می شود.

جدول ۲ مقدار میانگین انرژی کل اتصال و همچنین سهم انرژی حاصل از برهمکنش های واندروالسی و الکترواستاتیکی از انرژی اتصال کل و میانگین تعداد پیوندهای H در حالت دینامیکی را نشان می دهد که برای اتصال دو مولکول مایرستین و لیگاند شماره ۳ با استفاده از روش مساحت سطح پواسون-بولتزمن مکانیک مولکولی (MM/PBSA) انجام شد. همانند مطالعات docking، لیگاند شماره ۳ دارای بالاترین انرژی اتصال با جایگاه اتصال Srt A است. همچنین، برخلاف Myricetin-Srt A که دارای میانگین پیوندهای هیدروژنی بالاتری است، سهم واندروالس در اتصال لیگاند شماره ۳ به جایگاه فعال بیشتر از الکترواستاتیکی است. این به وضوح اثر برجسته لیگاند شماره ۳ را در حفره Srt A نشان می دهد.

واقع در ابتدا و انتهای زنجیره پروتئینی، نوسانات بالاتر از ۴ نانومتر را نشان دادند (شکل ۳(b)). افزایش دو پارامتر فیزیکی RMSF و RMSD بیانگر آنست که اتصال لیگاند شماره ۳ به آنزیم Sort A نسبت به لیگاند مرجع، باعث تغییرات ساختاری همراه با ناپایداری بیشتر در آنزیم Sort A می شود. Rag که معیاری برای فشردگی پروتئین است و به نوبه خود پایداری ساختار پروتئین را نشان می دهد، نیز با توزیع های RMSF و RMSD در سراسر شبیه سازی همخوانی دارد (شکل ۳(c)). واضح است که یک تغییر قابل توجه (باز شدن بیشتر) در کمپلکس Ligand 3-Srt A در مقایسه با ساختار Apo-Sort A مشاهده شد. مقادیر Rag برای کمپلکس Myricetin-Sort A کمی بالاتر از ساختار Apo-Sort A به نظر می رسد، که نشان دهنده کاهش جزئی در فشردگی در مقایسه با Apo-Sort A است. همچنین شکل ۳(d) تغییر SASA را نسبت به زمان برای سه ساختار نشان می دهد. SASA سطح قابل دسترس بیومولکول ها به حلال است. میانگین مقدار SASA برای Myricetin-Sort A، Apo-Sort A و Ligand 3-Srt A به ترتیب ۱۰/۸۶ نانومتر مربع، ۹۲/۸۹ نانومتر مربع و ۹۲/۹۰ نانومتر مربع است. در اینجا نیز، افزایش مقدار SASA در Ligand 3-Srt A نشان دهنده متورم شدن آن در مقایسه با ساختار Apo-Sort A است. باز هم، به نظر می رسد که مقادیر SASA برای کمپلکس Myricetin-Sort A افزایش جزئی نسبت به ساختار Apo-Sort A نشان می دهد، که نشان دهنده تورم جزئی در مقایسه با پروتئین Sort A است. با استفاده از برنامه DSSP، ساختارهای دوم وابسته به

نتایج

های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس اورئوس می تواند یک استراتژی توسعه دارویی برای مهار باکتری ها و یک زمینه تحقیقاتی فشرده برای شیمیدانان دارویی باشد. مولکول مایرستین به عنوان یک مولکول طبیعی موجود در برخی از سبزیجات مانند گوجه فرنگی، میوه ها مانند پرتغال، انواع توت، و چای که خاصیت آنتی

امروزه مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری هایی مانند استافیلوکوکوس اورئوس ناشی از جهش های ژنی یکی از دغدغه های اصلی سازمان بهداشت جهانی است. بنابراین، توسعه نسل بعدی داروهای ضد میکروبی برای اهداف خاصی در باکتری هایی که فشار تکاملی پایینی اعمال می کنند، ضروری است. آنزیم Sort A در باکتری

جدید کاندیدای عالی برای تحقیقات بیشتر توسط Molecular Docking در نظر گرفته شدند. لیگاند شماره ۳ از جدول شماره ۱، بر اساس انرژی اتصال پیش بینی شده و ثابت بازدارندگی انتخاب به عنوان بهترین پاسخ انتخاب شد. جالب توجه است، نتایج شبیه سازی MD نشان می دهد که لیگاند شماره ۳ دارای پروفایلها و برهمکنش اتصالی بهتری نسبت به مایرستین به عنوان یک مهارکننده مرجع بوده، و باعث رفتار ناپایدار پیوسته در کمپلکس docking می شود.

اکسیدانی نیز دارد، توسط برخی از محققان به عنوان یک مهارکننده Sort A مورد مطالعه قرار گرفته است. اما تاکنون گزارشی مبنی بر استفاده از آن به عنوان یک داروی بالینی گزارش نشده است. در این مطالعه، ابتدا پس از غربالگری کتابخانه ای از ترکیبات شیمیایی مبتنی بر جستجوی شباهت و سپس غربالگری مجازی مبتنی بر ساختار، ۱۰ نامزد برتر از لیگاندها براساس میزان میل اتصال به جایگاه فعال آنزیم Sort A و ثابت بازدارندگی، به عنوان کلاس های جدید بازدارنده های مولکولی کوچک برای Sort A شناسایی شد. این بازدارنده های

نتیجه گیری:

کاربرد درمانی به آزمایش هایی مانند تعیین مهار آنزیم برای تأیید بیشتر ویژگی انتخاب پذیری و فعالیت ترکیبات در برابر Sort A، هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* بستگی دارد.

در مجموع، ما پیشنهاد می کنیم که لیگاند شماره 3 (Chemspider ID=73945561) می تواند یک ترکیب امیدوارکننده در برابر هدف Sort A به عنوان یک استراتژی درمانی باشد. با این حال، چنین استراتژی و

تشکر و قدردانی

نویسندگان از تمام کسانی که آنان را در انجام این تحقیق یاری رسانده اند تشکر و قدردانی می کنند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند هیچ تعارض منافی در انجام این مطالعه وجود نداشته است.

References

- Noorbakhsh F. Antibiotic resistance to beta-lactams in bacteria: Beta-Lactamases. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2022;17(2):67-80.
- Nourizadeh S, Khakvar R. Efflux Systems in plant-associated Bacteria and their Role in Multiple Drug Resistance. *Iranian Journal of Biological Sciences*. 2021;16(3):55-67.
- Patterson MJ. *Streptococcus*. Medical Microbiology. 4th edition. 1996.
- Kwiecinski JM, Horswill AR. Staphylococcus aureus bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol*. 2020;53:51-60.
- Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes . *Microbiol Spectr*. 2019;7(2):3-39.
- Cada D, Baker D. Oritavancin diphosphate. *Hosp Pharm*. 2014;49(11):1049-60.
- Leuthner KD, Yuen A, Mao Y, Rahbar A. Dalbavancin (BI-387) for the treatment of complicated skin and skin structure infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(2):149-59.
- Shorr AF, Lodise TP, Corey GR, De Anda C, Fang E, Das AF, et al. Analysis of the phase 3 ESTABLISH trials of tedizolid versus linezolid in acute bacterial skin and skin structure infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(2):864-71.
- Candel FJ, Peñuelas M. Delafloxacin: Design, development and potential place in therapy. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:881-91.
- Veve MP, Wagner JL. Lefamulin: Review of a Promising Novel Pleuromutilin Antibiotic. *Pharmacotherapy*. 2018;38(9):935-46.
- Shakour N, Hadizadeh F, Kesharwani P, Sahebkar A. 3D-QSAR Studies of 1,2,4-Oxadiazole Derivatives as Sortase A Inhibitors. *Biomed Res Int*. 2021;2021.
- Sapra R, Rajora AK, Kumar P, Maurya GP, Pant N, Haridas V. Chemical Biology of Sortase A Inhibition: A Gateway to Anti-infective Therapeutic Agents. *J Med Chem*. 2021;64(18):13097-130.
- Mazmanian SK, Liu G, Jensen ER, Lenoy E, Schneewind O. Staphylococcus aureus sortase mutants defective in the display of surface proteins and in the pathogenesis of animal infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(10):5510-5.
- Paterson GK, Mitchell TJ. The biology of Gram-positive sortase enzymes. *Trends Microbiol*. 2004;12(2):89-95.
- Parrino B, Diana P, Cirrincione G, Cascioferro S. Bacterial Biofilm Inhibition in the Development of Effective Anti-Virulence Strategy. *Open Med Chem J*. 2018;12(1):84-7.
- Marraffini LA, DeDent AC, Schneewind O. Sortases and the Art of Anchoring Proteins to the Envelopes of Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70(1):192-221.
- Si L, Li P, Liu X, Luo L. Chinese herb medicine against Sortase A catalyzed transformations, a key role in gram-positive bacterial infection progress. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31:184-96.
- Theile C. Site-specific C-terminal. *Nat Protoc*. 2014;8(9):20-40.
- Kappel K, Wereszczynski J, Clubb RT, McCammon JA. The binding mechanism, multiple binding modes, and allosteric regulation of Staphylococcus aureus Sortase A probed by molecular dynamics simulations. *Protein Sci*. 2012;21(12):1858-71.
- Jacobitz AW, Kattke MD, Wereszczynski J, Clubb RT. Sortase Transpeptidases: Structural Biology and Catalytic Mechanism. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2017;109:223-64.
- Cascioferro S, Totsika M, Schillaci D. Sortase A: An ideal target for anti-virulence drug development. *Microb Pathog [Internet]*. 2014;77:105-12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.10.007>
- Nitulescu G, Nicorescu IM, Olaru OT, Ungurianu A, Mihai DP, Zanfirescu A, et al. Molecular docking and screening studies of new natural sortase A inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10).
- Sato M, Murakami K, Uno M, Nakagawa Y, Katayama S, Akagi KI, et al. Site-specific inhibitory mechanism for amyloid β 42 aggregation by catechol-type flavonoids targeting the lys residues. *J Biol Chem*. 2013;288(32):23212-24.
- Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol*. 1997;29(2):121-6.
- Phillips PA, Sangwan V, Borja-Cacho D, Dudeja V, Vickers SM, Saluja AK. Myricetin induces pancreatic cancer cell death via the induction of apoptosis

and inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) signaling pathway. *Cancer Lett* [Internet]. 2011;308(2):181-8. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.05.002>

26. Pasetto S, Pardi V, Murata RM. Anti-HIV-1 activity of flavonoid myricetin on HIV-1 infection in a dual-chamber in vitro model. *PLoS One*. 2014;9(12):1-18.

27. Xu H, Ziegelin G, Schröder W, Frank J, Ayora S, Alonso JC, et al. Flavones inhibit the hexameric replicative helicase RepA. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(24):5058-66.

28. Rennane S, Baker L, Mulcahy A. Estimating the Cost of Industry Investment in Drug Research and Development: A Review of Methods and Results. Inq (United States). 2021;58:1-11.

29. Bhardwaj VK, Purohit R. Targeting the protein-protein interface pocket of Aurora-A-TPX2 complex: rational drug design and validation. *J Biomol Struct Dyn* 2021;39(11):3882-91.

<http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1772109>

30. Adcock SA, McCammon JA. Molecular dynamics: Survey of methods for simulating the activity of proteins. *Chem Rev*. 2006;106(5):1589-615.

31. Dallakyan S, Olson A. Participation in global governance: Coordinating "the voices of those most affected by food insecurity." *Glob Food Secur Gov*. 2015;1263:1-11.

32. Uba AI, Yelekçi K. Carboxylic acid derivatives display potential selectivity for human histone deacetylase 6: Structure-based virtual screening, molecular docking and dynamics simulation studies. *Comput Biol Chem*. 2018;75:131-42.

33. Abraham MJ, Murtola T, Schulz R, Páll S, Smith JC, Hess B, et al. Gromacs: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*. 2015;1-2:19-25.

34. Schüttelkopf AW, Van Aalten DMF. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2004;60(8):1355-63.

35. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GRGMACS 4: Algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput*. 2008;4(3):435-47.

36. Singh R, Bhardwaj V, Purohit R. Identification of a novel binding mechanism of Quinoline based molecules with lactate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *J Biomol Struct Dyn* [Internet]. 2021;39(1):348-56. <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2020.1711809>

37. Kumari R, Kumar R, Lynn A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J Chem Inf Model*. 2014;54(7):1951-62.

38. Homeyer N, Gohlke H. Free energy calculations by the Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area method. *Mol Inform*. 2012;31(2):114-22.

39. Weako J, Uba AI, Keskin Ö, Gürsoy A, Yelekçi K. Identification of potential inhibitors of human methionine aminopeptidase (type II) for cancer therapy: Structure-based virtual screening, ADMET prediction and molecular dynamics studies. *Comput Biol Chem* 2020;86(March):107244.

<https://doi.org/10.1016/j.compbiochem.2020.107244>