

مدل‌سازی به روش هومولوژی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین Rab23 انسانی به هدف انجام مطالعات Docking با لیگاند کلسترول

شیوا کلانتری^۱

محمد تقی زاده^۳

معصومه دهقانی^۲

آرمین مددکار سبحانی^۲

مصطفی رضایی طاویرانی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۰۵

تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۰۳/۰۵

چکیده

Rab23 یکی از پروتئین‌های خانواده *Rab* می‌باشد که مسوول تنظیم ادغام و اتصال غشاء و یزیکولها با اندامکهای سلولهای یوکاریوتی می‌باشد. این پروتئین یک تنظیم‌کننده منفی خودکار سلولی برای علامت‌دهی *hedgehog* (*Signaling*) در مهره‌داران است. مسیر علامت‌دهی *hedgehog* در رشد اکثر ارگانها و بافتهای مهره‌داران نقش محوری داشته و ارتباط آن با نقایص مادرزادی و بسیاری از انواع تومورها مشخص شده است. بنابراین دخالت *Rab23* در این مسیر و ناهنجاریهای بیانی آن در بسیاری از انواع بیماریها دیده می‌شود. از جمله بیماریهایی که ناشی از جهش در ژن این پروتئین و یا به طور کلی بیان غیر نرمال آن می‌باشند عبارتند از: سندرمهای *Carpenter* و *Gorlin*، کارسینوماهای تیروئید، هیپاتوسل کارسینوما، تومورزایی و انواع مختلف سرطان.

۱. دانشجوی دکترا، مرکز تحقیقات پروتئومیکس بالینی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۲. دانشیار گروه علوم پایه، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

۳. دانشجوی دکترا، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران (نویسنده مسئول)؛ taghizadeh@ibb.ut.ac.ir

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مدل‌سازی این پروتئین با استفاده از نرم‌افزار *Modeller9v7* پس از انتخاب الگوی مناسب با میزان شباهت بالا از داده پایگاه *PDB* به انجام رسید. بهترین مدل ساخته شده از طریق آنالیزهای نرم‌افزار *Procheck* برای ورود به مرحله شبیه‌سازی انتخاب شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آن با استفاده از نرم‌افزار *GROMACS* به انجام رسید و سپس نواحی اتصال آن با کلاسترول با استفاده از نرم‌افزار *Autodock4.2* به دست آمد.

یافته‌ها: پایداری نمودار *RMSD* و انرژی نشان می‌دهند که مدل ساختار سه‌بعدی به دست آمده کاملاً پایدار بوده لذا به واقعیت نزدیک است. مطالعات *Docking* نشان می‌دهد که این پروتئین جایگاه اتصالی برای کلاسترول دارد.

نتیجه‌گیری: داشتن جایگاه اتصال برای کلاسترول بدان معنی است که این پروتئین علاوه بر انجام عملکرد خود با همکاری دیگر پروتئین‌ها مثل *GLI2* و *GLI3* با ورود به داخل غشا در ناحیه‌ای که دارای کلاسترول است بخش دیگری از عملکرد خود را در اتصال غشا و زیگول انجام می‌دهد. با توجه به اهمیت بیولوژیک *Rab23*، شبیه‌سازی آن در محیط *in silico* می‌تواند در جهت اهداف درمانی برای طراحی دارو و یا لیگاندهای مهارتی مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: مولکولی بنیان (هولوژی)، شبیه‌سازی دینامیک مدل‌سازی به روش همسان، *Rab23*

مقدمه

نیز در غشای پلاسمایی و مسیر اندوسیتیک واقع می‌باشد (Evans et al. 2003 و Marcos et al. 2003). عملکرد پروتئینهای *Rab* با گردش بین یک فرم غیر فعال سیتوزولی متصل به *GDP* و یک فرم فعال در اتصال به غشای متصل به *GTP* انجام می‌گیرد. این چرخه عملکردی به شدت با یک سری پروتئینهای یدکی (Olkonen et al. 1997 و Alory et al. 2001) تنظیم می‌شود. پروتئینهای *Rab* توسط مهارکننده‌های تفکیکی نوکلئوتید گوانین

Rab23 یکی از پروتئینهای خانواده *Rab* می‌باشد که مسوول تنظیم ادغام و اتصال (*docking*) غشا و زیگولها با اندامکهای سلولهای یوکاریوتی از مخمر تا انسان است (Evans et al. 2003). ژن این پروتئین در ناحیه پری سانترومری کروموزوم ۶ بین مارکرهای میکرو ساتلایت *D6S257* و *D6S1659* و درون ناحیه بحرانی و مهم *RP25* قرار گرفته است (Marcos et al. 2003) و خود پروتئین

کلیدهای مولکولی برای هماهنگی انتقالات غشایی با ظرافت تمام عمل می کنند. *Rab23* یک تنظیم کننده منفی خودکار سلولی برای علامت دهی *hedgehog* در مهره داران است (Simpson et al. و Eggenschwiler et al. 2009). علی رغم مشخص شدن اینکه *Rab23* علامت دهی *sonic hedgehog* را در طول رشد تنظیم می کند اما پروتئینی که توسط *Rab23* در این مسیر انتقال می یابد هنوز ناشناخته است (Wang et al. 2006). به نظر می رسد که *Rab23* معکوس کننده علامت دهی *hedgehog* باشد و جهش ژن این پروتئین موجب نقص شدید در رشد لوله عصبی در موش می گردد (Wang et al. و Eggenschwiler et al. 2001). همچنین ناهنجاریهایی در اندامهای مختلف در بیماران مبتلا به دو سندرم *Carpenter* و *Gorlin* ایجاد می کند (Oostra et al. 2006 و Jenkins et al. 2007). به علاوه از آنجایی که ژنهای *hedgehog* مثل *shh* خواص انکوژنیک دارند (Ruiz et al. 1999)، *Rab23* در کارسینوژنسیس درگیر خواهد بود. بیان غیرعادی *Rab23* در سلولهای کبدی همانند کارسینومای تیروئید مشاهده شده است (Liu et al. 2007 و Denning et al. 2007). افزایش بیان *Rab23* در بیماریهایی از قبیل *atrophic gastritis* که نوع ابتدایی سرطان معده است نیز مشاهده شده است (Kim et al. 2007). علامت دهی *hedgehog* به طور خلاصه در زیر شرح داده شده است.

علامت دهی *hedgehog* چیست؟

مسیر علامت دهی *hedgehog* در رشد اکثر ارگانها و بافتهای مهره داران نقش محوری

GDI: guanine (nucleotide dissociation) inhibitors در وضعیت غیر فعال متصل به *GDP* در سیتوزول نگه داشته می شوند. این مهارکننده ها با اتصال به قسمت پرنیله شده C-ترمینال و پوشانیدن این جایگاه تغییر پس ترجمه ای هیدروفوبیک عمل خود را انجام می دهند. به محض اتصال پروتئین *Rab* به یک ویزیکول *GDI* توسط فاکتور تفکیک کننده *GDI* برداشته می شود. فاکتورهای تعویض نوکلئوتید گوانین (*GEFs: Guanine nucleotide exchange factors*) تعویض *GTP* با *GDP* را تسهیل کرده، باعث فعال شدن پروتئین *Rab* و برداشته شدن مقاومت آن برای کنده شدن از غشا توسط *GDI* می شوند. اتصال یا لنگر اندازی (*docking*) ویزیکول دهنده با غشاء هدف زمانی اتفاق می افتد که پروتئین *Rab* در وضعیت فعال خود یا فرم متصل به *GTP* باشد. پروتئین *Rab* فعال با هیدرولیز *GTP* به *GDP* به وضعیت غیر فعال خود بر می گردد که این مرحله توسط خود پروتئین *Rab* کاتالیز شده و با کمک پروتئینهای فعال کننده (*GTPase*) و با کمک پروتئینهای فعال کننده (*GAPs: GTPase activating proteins*) سرعت می یابد. زمانی که پروتئین در وضعیت متصل به *GDP* است، *GDI* پروتئین *Rab* را از غشای هدف به سیتوزول یعنی محل شروع مجدد چرخه، رها می کند (Evans et al. 2003). پروتئینهای *Rab* در وضعیت فعالشان یک سری مولکولهای افکتور درگیر در تشکیل ویزیکول را آماده کرده و ویزیکولها را نیز برای غشای هدفشان و مراحل ادغام غشایی و همچنین به اسکلت سلولی آماده می کنند (Grosshans et al. 2006). در حین انجام این گونه اعمال، این پروتئینها به مانند

نقش‌های دیگر *Rab23*

افزایش بیان *Rab23* قطعاً می‌تواند به مهار تمایز کندروژنیک بیانجامد و همچنین بیان ژنهای ماتریکس، از قبیل کلاژن تیپ II و اگرکان (Yang et al. 2008) را کاهش می‌دهد. این پروتئین همچنین در غنی‌سازی مغز و نورونها نیز نقش دارد (Geppert et al. 1977). علاوه بر اینها در فرآیند رشد نورونها فرای علامت‌دهی *sh* نیز مؤثر می‌باشد چرا که بیان آنها در نورونهای بزرگسالان نیز مشاهده شده است (Guo et al. 2006). این پروتئین در سلولهای مزانشیال و پودوسیتها در گلومرول نیز بیان می‌شود (Huang et al. 2009). ظاهراً بیان *Rab23* می‌تواند بر تکثیر سلولی تأثیرگذار باشد. اخیراً در چندین گزارش به بیان بیش از اندازه *Rab23* در انواع مشخصی از سرطانها اشاره شده است (Liu et al. 2007 و Denning et al. 2007 و Kim et al. 2007). حذف پروتئین *Rab23* در واقع می‌تواند رشد سلولهای هیپاتوکارسینوما را مهار کند (Liu et al. 2007) و این نشان‌دهنده اثر تسهیل‌کننده این پروتئین در هیپاتوماها می‌باشد. اگرچه که این پروتئین می‌تواند مسیر علامت‌دهی *hedgehog* را متوقف کرده (Wang et al. 2006) و باعث پیشرفت رشد در سلولهای سرطانی خاص شود (Yuan et al. 2007 و Zhang et al. 2007 و Zhu et al. 2007)، اما می‌تواند بر عکس، برای بعضی از سلولهای خاص هم نقش ضد تکثیری داشته باشد.

Rab23 و بیماری‌ها

Rab23 نقش مهمی در تومورزایی *HCC* (هیپاتوسل کارسینوما) و سایر تومورها داشته، بنابراین می‌توان از آن به عنوان یک

داشته و ارتباط آن با نقایص مادرزادی و بسیاری از انواع تومورها مشخص شده است (MacMahon et al. 2003 و et al. 2007). به طور خلاصه پیش‌سازهای لیگاند *Hh* که از فراوانترین آنها می‌توان به *sonic hedgehog* اشاره کرد (*shh*) به طور اتوکاتالیتیک از یک فرم ۴۵ کیلودالتونی به یک پروتئین متصل به لیپید ۱۹ کیلودالتونی پردازش می‌شوند که توسط سلولها به ماتریکس خارج سلولی ترشح می‌گردند. تغییراتی که به طور کوالان بر روی *Hh*های ترشح شده صورت می‌گیرد عبارتند از: اتصال اسید پالمیتوئیل به N-ترمینال (Pepinsky et al. 1998) و کلسترول به C-ترمینال (Porter et al. 1996). لیگاند ترشچی به گیرنده خود به نام *ptch* متصل شده و بنابراین سرکوب پروتئینی به نام *smo* که هفت بار عرض غشا را طی می‌کند برداشته می‌شود. پروتئین *smo* به نوبه خود سیگنالی است برای آبشار علامت‌دهی *hedgehog* توسط اتصال لیگاند *sonic hedgehog (shh)*، *desert hedgehog (Dhh)* و یا *Indian hedgehog (Inn)* به گیرنده *PTCH* (که می‌تواند *PTCH1* و یا *PTCH2* باشد) آغاز می‌گردد. چنین اتصالی باعث برداشته شدن مهار فعالیت از *SMO* شده که فاکتورهای رونویسی هومولوگ انکوژن همراه گلیوما (*Gli*) را (که شامل *Gli 1*، *Gli 2* و *Gli 3* است) برای اثرگذاری بر بیان ژنهای هدفشان فعال می‌کند (Ruiz et al. 1999). با این حال از زمان ایجاد جنین تا بزرگسالی، سلولهای منشاء معدی-رودی و پوست توسط علامت‌دهی *Hh* تنظیم می‌شوند (Ruizi et al. 2002 و Clatworthy et al. 2001) و (Van den Brink et al. 2004).

آبی با استفاده از نرم افزار GROMACS در این مقاله به انجام رسیده است.

روش ها همترازی توالی

در مرحله اول، توالی پروتئینی *Rab23* انسان (با کد شناسایی *Q9ULC3* در Uniprot) که یک پروتئین مربوط به خانواده *Ras* است از داده پایگاه Uniprot به فرمت FASTA گرفته شد. سپس از طریق ابزار BLAST بر علیه پایگاه داده PDB مورد جستجو قرار گرفت تا از این طریق الگوی مناسبی با شباهت قابل قبول و همچنین E-Value پایین به دست آمد. بر این اساس ساختار کریستالوگرافی شده زنجیره A از پروتئین *Rab23* *GTAPase* متصل به *GDP* موشی (PDB:1z22) انتخاب و به عنوان ساختار الگو برای مدل کردن ۳ بعدی *Rab23* انسان مورد استفاده قرار گرفت.

پیش گویی ساختار سوم از طریق مدلسازی به روش هومولوژی

ساختار سوم پروتئین هدف با استفاده از نرم افزار Modeller9V7 (Sali Blundell, 1993) با استفاده از مدلسازی مقایسه ای ایجاد شده و با استفاده از نرم افزار weblab viewer (Accelrys®) مشاهده و بررسی گردید. (این نکته لازم به ذکر است که با استفاده از نرم افزار Modeller9V7 ۱۰۰۰۰ مدل ساخته شد).

ارزیابی ساختار سوم

بهترین مدل از بین ۱۰۰۰۰ مدل ساخته شده توسط Modeller به کمک دو معادله ارزیابی کننده به نامهای Dope score و Molpdf انتخاب شد. یک مدل انتخابی بر اساس هر

هدف بیولوژیک جدید برای پیشگیری و درمان *HCC* یاد کرد. از آنجا که بیان آن در *HCC* زیاد شده و یا فعالیت آن افزایش می یابد می توان آن را هم به عنوان یک پیشگویی کننده این بیماری و هم هدفی برای درمان آن دانست (Liu et al. 2007). *Rab23* در پیشرفت *FSGS* (*Focal Segmental Glomerulosclerosis*) نیز نقش داشته و می توان آن را به عنوان مارکر بیولوژیک *FSGS* به حساب آورد (Huang et al. 2009). از آنجایی که این پروتئین به طور پیوسته در سلولهای مزانشیال بیان می شود در واقع می توان انتظار داشت که انتقال پروتئینهای مختلف را که نقش فیزیولوژیک دارند و برای سلولهای مزانشیال ضروری هستند، عهده دار است.

با این حال با توجه به افزایش بیان *Rab23* در سلولهای مزانشیال در بیماران مبتلا به *FSGS* می توان چنین برداشت کرد که بعضی از پروتئینهایی که توسط آن در سلولهای مزانشیال انتقال می یابند در رشد یا پیشرفت بیمار *FSGS* دخالت دارند (Huang et al. 2009). علاوه بر بیماریهای ذکر شده درگیر بودن این پروتئین به واسطه جهشهای ایجاد شده در ژن آن در بیماری سندرم *Carpenter* نیز گزارش شده است (Jenkins et al. 2007).

با توجه به اهمیت این پروتئین در بیماریهای ذکر شده و با توجه به اینکه نوع انسانی آن کریستالوگرافی نشده است به نظر می رسد که مدلسازی آن به عنوان اولین قدم در راستای اهداف آینده برای تست کردن داروهای احتمالی در جهت مهار آن در بعضی بیماریهای خاص ضروری باشد. مدلسازی این پروتئین کلیدی با استفاده از نرم افزار Modeller 9V7 و شبیه سازی آن در محیط

تایید می‌شود. الگوی منتخب دارای ۲۳۷ اسید آمینه می‌باشد و در سال ۲۰۰۷ با قدرت تفکیک ۲/۰۶ آنگستروم کریستالوگرافی شده است. میزان یکسانی الگو با پروتئین هدف ۹۶٪ و میزان شباهت آن ۹۸٪ می‌باشد. از آنجایی که میزان شباهت الگو با پروتئین هدف بسیار زیاد است و این احتمال را ایجاد می‌کند که مزیتی در مدلسازی برای آن وجود ندارد اما باید خاطر نشان کرد که با توجه به اهمیت این پروتئین در پروسه‌های اندام زایی و علامت‌دهی و درگیر بودن آن در بسیاری از بیماریها و به خصوص سرطان اولین قدم در انجام مطالعات بعدی جهت طراحی دارو یا لیگاند‌های مهارتی و یا فعال‌کننده بسته به نوع بیماری، قطعاً مدلسازی این پروتئین می‌باشد. لازم به ذکر است که فقط ۱۶۸ رزیدو از پروتئین الگو با هدف هم‌ریف شده و برای بقیه رزیدوهای آن در PDB الگوی مناسبی یافت نشد. این بدان معنی است که ۶۹ رزیدو از *Rab23* مورد مدلسازی قرار نگرفته است اما فقدان این قسمت از پروتئین هدف اشکالی در مدل نهایی ساخته شده ایجاد نخواهد کرد چراکه بر طبق اطلاعات حاصل از Uniprot این ناحیه از پروتئین در کنار توالی سیگنال پپتید واقع است که در پروتئین بالغ حذف شده و جایگاه اتصال محسوب نمی‌شود. چنانکه در شکل یک می‌بینید ساختار دارای مقدار Random Coil (ریبون خاکستری) اندکی است و بخش اعظم ساختار مدل از هلیکس‌های آلفا و رشته‌های بتا در قالب یک صفحه بتا تشکیل شده است.

نحوه ارزیابی مدل

به چهار روش مختلف میزان صحت و کیفیت مدل مورد بررسی قرار گرفت. اول با استفاده

کدام از این دو معادله به عنوان بهترین مدل احتمالی ارائه شد. بهترین مدل به دست آمده با کمترین میزان Dope score برای شبیه سازی دینامیک (Molecular Dynamic: MD) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور ارزیابی کیفیت پارامترهای ساختاری مدل ساخته شده از نرم افزاری به نام Procheck استفاده شد. نمودارهای رامانچاندران برای الگو و پروتئین هدف به دست آمد که در ادامه مورد بحث قرار خواهد گرفت.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

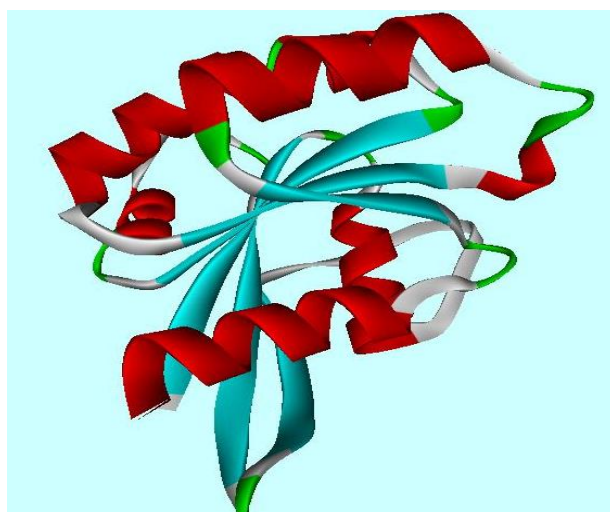
شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GROMACS (version 4.07) به انجام رسید. برای خنثی‌سازی سیستم و ایجاد تعادل بار، دو یون سدیم به جای مولکولهای آب به سیستم اضافه گردید. زمان شبیه‌سازی ۱۰ نانو ثانیه در نظر گرفته شد و گام‌ها را معادل ۲ پیکو ثانیه در نظر گرفتیم و از مدل آب SPC و ویژه Force Field گروموس در این شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده شد.

جایابی لیگاند (Docking)

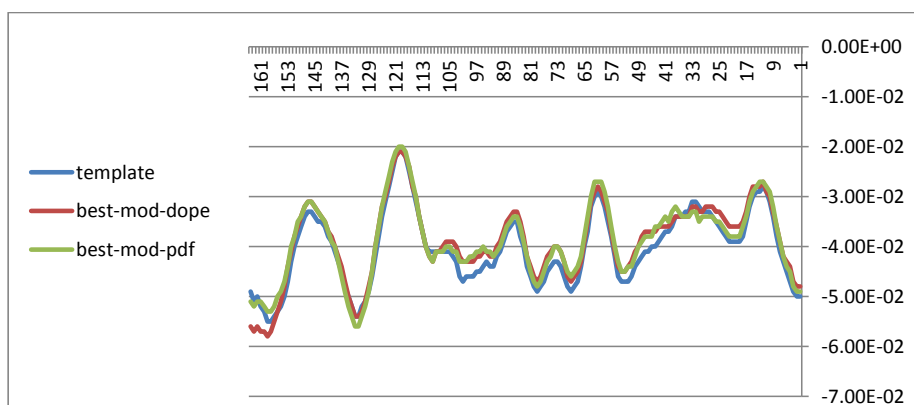
برای انجام Docking از نرم‌افزار Autodock4.2 استفاده شد و برای این منظور الگوریتم ژنتیک لامارکین به منظور جستجوی کنفورماسیون‌ها انتخاب شد.

نتایج و بحث

مدلسازی ساختار سه بعدی *Rab23* انسانی با استفاده از یک الگوی با شباهت بالا با پروتئین *Rab23* انسانی یک مدل با کیفیت از این پروتئین ساخته شد. با استفاده از چندین روش ارزیابی که در ادامه ذکر شده است کیفیت بالای مدل



شکل ۱. ساختار سه بعدی مدل پروتئین *Rab23* انسانی



شکل ۲. مقایسه بین الگو و بهترین مدل انتخاب شده بر اساس Dope و PDB

بخش‌هایی از توالی که امتیاز دوپه مساوی یا کمتر از ۰/۰۳ را دارا هستند جز نقاط قابل قبول به حساب می‌آیند و در بخش‌های بالای این مقدار اگر برای الگو نیز شریط به همین صورت باشد باز هم قابل قبول خواهد بود. بر این اساس کل باقیمانده‌ها در هر دو ساختار انتخاب شده وضعیت قابل قبولی دارند. این به آن دلیل است که هر دو ساختار مدل شباهت زیادی با یکدیگر و با ساختار الگوی خود دارند. روش سوم ارزیابی کیفیت مدل استفاده از Procheck است که در بخش بعدی ذکر شده است. روش چهارم ارزیابی بررسی پایداری ساختار در جعبه شبیه‌سازی مولکولی بود که

از توابع ارزیابی نرم‌افزار Modeller شامل Dope Score و MolPdf. هر کدام از آنها یک امتیاز برای هر یک از ۱۰۰۰۰ ساختار ساخته شده ارائه دادند. برای هر دو تابع کمترین مقدار بهترین ساختار را نشان می‌داد لذا با استفاده از هر تابع یک ساختار انتخاب شد. روش دوم شامل بررسی نمودار Dope Score برای هر باقیمانده اسید آمینه‌ای بود. چنانکه در شکل ۲ می‌بینید نمودار Dope Score برای ساختار کریستالوگرافی الگو با عنوان Template و هر دو ساختار مدل انتخاب شده به وسیله هر دو تابع ارزیابی دیده می‌شود. هر سه با هم شباهت‌های زیادی دارند. در این نمودار

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

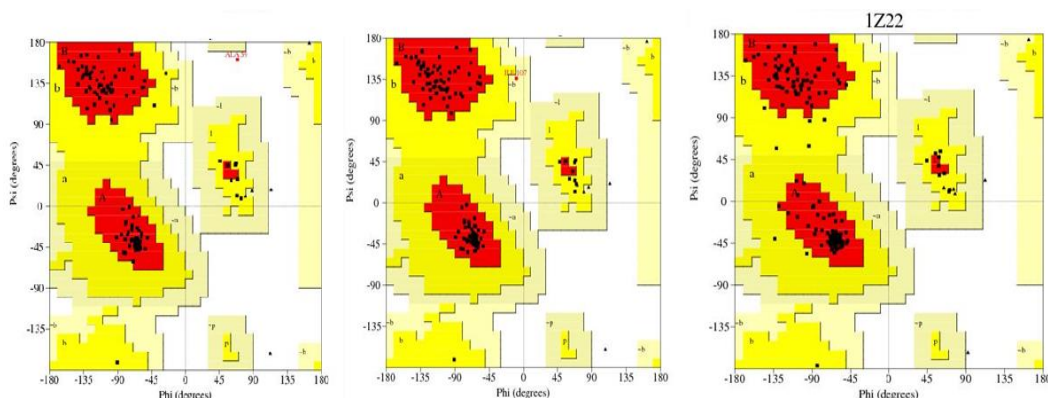
مدل دوپه برای *Rab23* انسانی در مجاورت مولکولهای آب قرار داده شد تا بتواند به کنفورماسیون پایدار در محیط آبی برسد. مقایسه هر snapshot از شبیه‌سازی که هر ۰/۰۰۲ پیکوثانیه ساخته می‌شود با frame اولیه در شکل ۸ نشان داده شده است. این مقایسه به صورت (Root Mean Square Deviation) RMSD بین هر دو frame در فرایند شبیه‌سازی بیان می‌شود. شیب نمودار RMSD بیان‌کننده پایدار بودن مدل در طول زمان شبیه‌سازی (۱۰ نانوثانیه) است. هر چه این شیب به صفر نزدیکتر باشد مدل شبیه‌سازی شده پایدارتر و هر چه شیب به تدریج افزایش یابد و یا نوسان زیادی داشته باشد مدل، ناپایدارتر خواهد بود. در مورد مدل *Rab23* هیچ ناپایداری در طول زمان شبیه‌سازی مشاهده نشد (شکل ۴).

نمودار دیگری که روند صحیح فرایند شبیه‌سازی را نشان می‌دهد نمودار انرژی است (شکل ۵). برخلاف نمودار RMSD، کاهش شیب نمودار انرژی بیانگر کیفیت بهتر شبیه‌سازی است چراکه انرژی کمتر در

در بخش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به آن پرداخته شده است.

نتایج Procheck

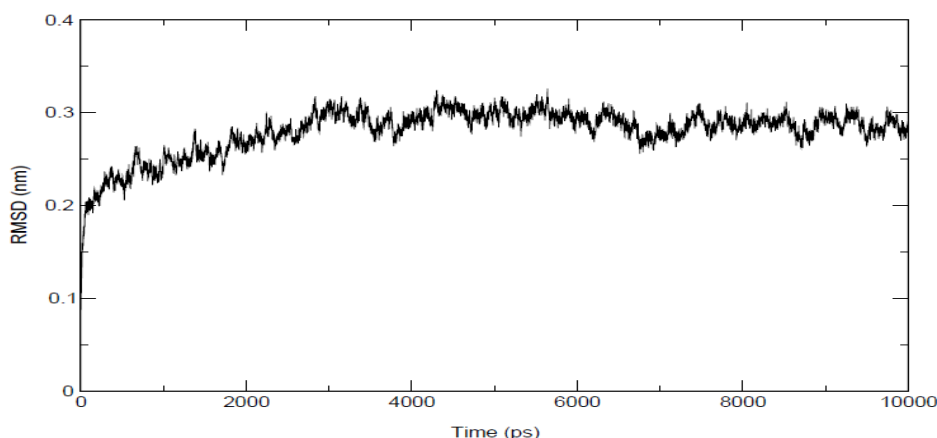
برای ارزیابی کیفیت ساختار *Rab23* انسانی به عنوان مدل ساخته شده نیاز به بررسی فاکتورهای بیشتری وجود دارد. شکل ۳ نمودارهای رامچاندوران برای پروتئین الگو، مدل منتخب دوپه و مدل منتخب MolPDF را نشان می‌دهد. چنانکه دیده می‌شود نقاط قرمز غیر مجاز در هر سه نمودار بسیار اندک‌اند و این بدان معنی است که هر دو مدل که کاملاً با هم شبیه هستند کیفیت بالایی دارند. جدول ۱ دربرگیرنده پارامترهای آماری نمودارهای رامچاندوران است. چنانکه دیده می‌شود هر دو مدل در ناحیه غیر مجاز کمتر از ۱ درصد باقیمانده را نشان می‌دهند و البته این عدد برای مدل دوپه صفر است. و این نشان می‌دهد مدل دوپه اندکی بهتر است. بررسی‌های دیگری به وسیله پروچک انجام شد که تنها به این نکته اشاره می‌شود که دیگر بررسی‌ها نیز بر کیفیت بالای ساختارهای مدل بدست آمده تاکید می‌کنند.



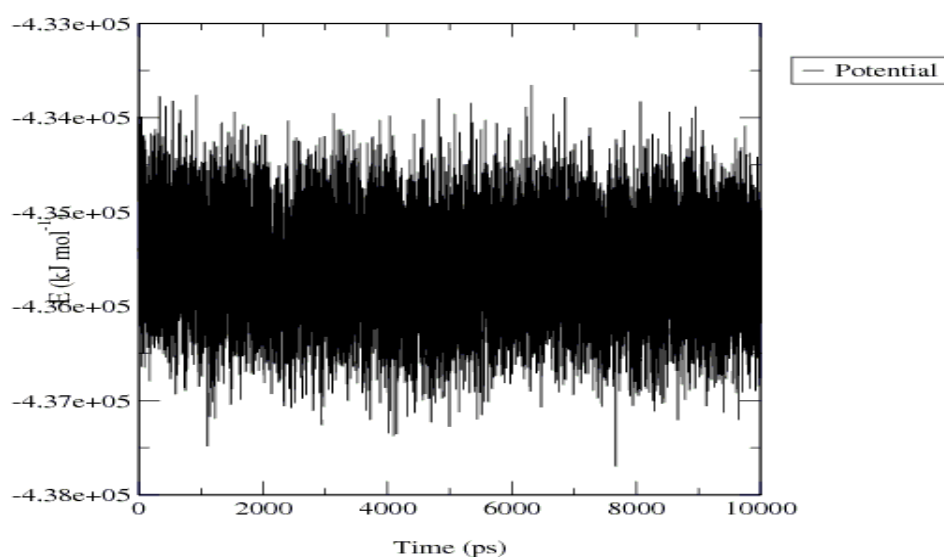
شکل ۳. نمودار رامچاندوران به ترتیب از راست به چپ برای پروتئین الگو، مدل منتخب دوپه (Dope) و مدل منتخب MolPDF قرار داده شده است. چهار ناحیه با رنگ‌های مختلف در هر نمودار دیده می‌شود. ناحیه کاملاً سفید ناحیه غیرمجاز است و هر نقطه قرمز رنگ در هر نمودار نشان‌دهنده یک اسید آمینه با زاویه فی و سای غیرمجاز را نشان می‌دهد.

جدول ۱. مقایسه پارامترهای آماری نمودار رامچاندرا برای الگو، Dope score و Molpdf

| Disallowed region% | Generously allowed region% | Additional allowed region% | Most favored regions | Name |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------|------------|
| 0% | 0% | 9.2% | 90.8% | Template |
| 0% | 0.7% | 5.2% | 94.1% | Dope model |
| 0.7% | 0% | 6.5% | 92.8% | PDF model |



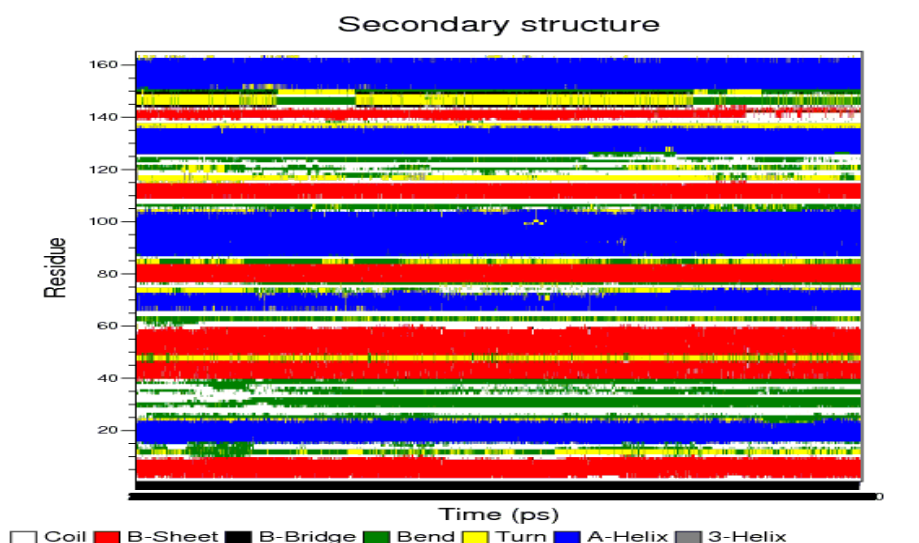
شکل ۴. نمودار RMSD برای مدل های ساخته شده در GROMACS



شکل ۵. نمودار انرژی پروتئین شبیه سازی شده در طول ۱۰ نانو ثانیه

قبول است. این در حالی است که در نمودار انرژی این شبیه سازی دینامیک مولکولی بازه نوسان بسیار کمتر از این مقدار است. وضعیت تغییرات ساختار دوم در طول زمان شبیه سازی در شکل ۶ نمایش داده شده است. استمرار یک رنگ از سمت چپ به راست به

حالت پایداری بیشتر حاصل می شود. تغییرات انرژی در این نمودار پس از کاهش در ابتدای فرایند در باقی مسیر با نوسان ثابتی همراه بوده و بنابراین مدل ساخته شده در طول زمان شبیه سازی پایدار می باشد. بازه نوسان به مقدار ۰/۰۰۲ تا ۰/۰۰۳ کیلوژول بر مول قابل



شکل ۶. نمودار برآورد پایداری ساختار دوم پروتئین هدف در طول زمان شبیه‌سازی

به عبارت دیگر طراحی یک داروی مؤثر برای فعال‌سازی و یا مهار یک پروتئین خاص در یک بیماری خاص با شبیه‌سازی ساختار سوم آن پروتئین مقرون به صرفه بوده و روند درمان را تسریع می‌کند.

از آنجایی که افزایش بیان پروتئین *Rab23* به انواعی به سرطان منجر می‌شود، پیشگویی ساختار آن می‌تواند اولین قدم برای گرفتن اطلاعات در مورد خواص ساختاری این پروتئین به منظور مهار و یا توقف فعالیت آن در جلوگیری از سرطان باشد.

آنالیز نتایج جایابی لیگاند (*Docking*) برای *Rab23* به عنوان گیرنده و کلاسترول به عنوان لیگاند

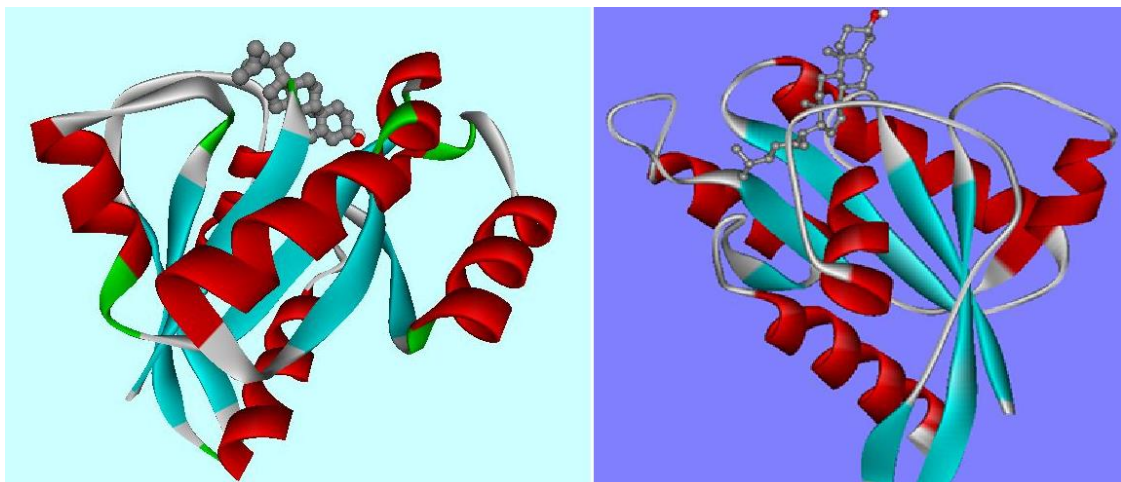
با استفاده از نرم افزار اتوداک (AutoDock) یک جایگاه اتصال با تمایل زیاد برای کلاسترول به دست آمد. بهترین مکان اتصال دارای تغییرات انرژی آزاد اتصال $-8/2$ کیلوکالری بر مول بود. شکل ۷ نمایش‌دهنده بهترین کنفورماسیون انتخابی اتصال *Rab23* به کلاسترول توسط اتوداک را نشان می‌دهد.

معنی پایداری ساختار دوم در آن ناحیه است و ناپایداری ساختار دوم، معادل تغییرات رنگ در هر خط می‌باشد. بنابراین تفاسیر به نظر می‌رسد که در مورد پروتئین هدف ساختار دوم در طول زمان پایدار باشد. با بررسی بخشهای دارای نوسان ساختار دوم می‌توان به نتایج جالبی رسید. اما در این بررسی‌ها ما از این نمودار فقط برای مشخص کردن پایداری ساختار استفاده کردیم و پس از اطمینان از کیفیت بالای ساختار مول به دست آمده از آن برای مطالعه مکانیسم عملکرد پروتئین *Rab23* انسانی استفاده کردیم. البته از چنین ساختاری می‌توان در بررسی‌ها و آزمایشات دیگر استفاده کرد.

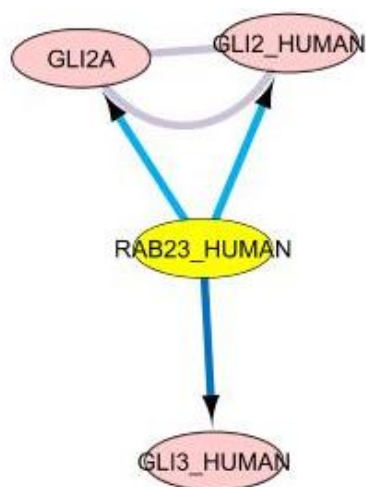
پیشگویی ساختار سوم بعضی از پروتئینها که به سختی کریستال می‌شوند برای اهداف درمانی مزایای زیادی دارد. به عنوان مثال، اگر پروتئینی نقش حیاتی در مسیرهای شناخته شده داشته باشد و یا نقش آن در مکانیسم یک بیماری معلوم باشد، پیشگویی ساختار آن از طریق ابزار *in silico* به منزله میانبری برای طراحی داروی آن بیماری خواهد بود.

در برهمکنش کلاسترول با پروتئین باقیمانده *ASP-117* با گروه هیدروکسیل کلاسترول پیوند هیدروژنی برقرار می کند همچنین سه باقیمانده *PHE27*، *TYR-31* و *ALA-12* تماس نزدیکی با کلاسترول دارند که در ایجاد برهمکنش و اندروالسیس و آب گریز می تواند نقش مهمی داشته باشد لذا می توان گفت نقش برهمکنش و اندروالسیس و آب گریز تا حدودی بیشتری از برهمکنش های الکتروستاتیک است (بر این اساس که بیشتر باقیمانده های اطراف لیگاند از نوع آب گریز هستند). البته این پروتئین با کمک گرفتن از پروتئین های دیگری مانند *GLI2* و *GLI3* وظایف خود را به انجام می رساند. در شکل ۸ برهمکنش *Rab23* با دیگر پروتئین ها دیده می شود. با نمایش این شکل که بخشی از شبکه (Protein-Protein interaction) PPI انسانی است سعی شده است تاکید شود که عملکرد پروتئین *Rab23* در اتصال غشا و زیگول ها و اندامک ها علاوه بر آنچه در این بررسی ها پیشنهاد شد با کمک گرفتن از پروتئین های بسیار بزرگ *GLI2* و *GLI3* به انجام می رسد. لذا آنچه پیشنهاد شد تنها بخشی

چنین جایگاه اتصالی می تواند نشان دهنده مکانیسم احتمالی عملکرد *Rab23* در اتصال غشا و زیگول ها با غشا اندامک ها باشد. این نتایج پیشنهاد می دهد پروتئین *Rab23* در هنگام قرار گرفتن بر سطح غشا تا نیمه در داخل غشا فرو می رود و همچنین جذب جایگاه های دارای کلاسترول می شود و به این ترتیب وظایف خود را به انجام می رساند. بخشی از ساختار که در شکل ۷ دیده می شود و در اطراف لیگاند کلاسترول قرار دارد در واقع بخشی است که به پیشنهاد نتایج به دست آمده از بررسی های داک در داخل غشا فرو می رود. جهت گیری کلاسترول در جایگاه اتصال خود نیز این مکانیسم را تایید می کند. دو کنفورماسیون برتر که در شکل دیده می شوند دو جهت گیری مقابل یکدیگر را در پاکت کلاسترولی *Rab23* به وجود آورده است. یکی با سر قطبی رو به بالا و دیگری با سر قطبی رو به پایین دیده می شود. سر قطبی رو به بالا می تواند از لایه دوم غشا به پروتئین پیوندد یعنی از لایه دورتر و کلاسترول با سر قطبی رو به پایین در واقع از لایه نزدیک به *Rab23* به این پروتئین می رسد.



شکل ۷. بهترین کنفورماسیون اتصال پروتئین *Rab23* با کلاسترول که توسط بررسی های داک به دست آمده است. ساختار کلاسترول با مدل توپ و عصا (Ball and Stick) نمایش داده شده است. در سمت راست با پس زمینه آبی رنگ سر قطبی کلاسترول را به سمت بالا نشان می دهد و در سمت چپ با پس زمینه روشن سر قطبی کلاسترول را به سمت پایین می توان دید.



شکل ۸. برهمکنش *Rab23* با پروتئین‌های دیگر انسانی دیده می‌شود. شکل با استفاده از نرم افزار Cytoscape و با استفاده از پایگاه داده‌ای به نام *Pathway Commons* که مجموعه‌ای از چندین پایگاه داده است ساخته شده است.

از کل مکانیسم می‌تواند باشد و البته باید تاکید کنیم که این تنها یک مکانیسم پیشنهادی است و برای اثبات آن نیاز به بررسی‌های بیشتر تجربی و محاسباتی وجود دارد. در صورت تایید بیشتر مکانیسم پیشنهادی به وسیله آزمایشات و بررسی‌های دیگر می‌توان بخش قابل توجهی از مکانیسم اتصال وزیکول‌ها به غشا‌های مختلف در سلول را مشخص کرد که قابل توجه خواهد بود. شواهدی دال بر تاثیر پروتئین‌های *RAB* بر ذخیره و متابولیسم لیپیدها وجود دارد (Wang et al. 2012) اما در مورد برهمکنش با کلاسترول اطلاعات تجربی ارائه نشده است لذا با توجه به نتایج ارائه شده در این مقاله بررسی برهمکنش کلاسترول با *RAB23* می‌تواند به رد یا قبول پیشنهادات احتمالی این کار منجر شود.

References

- Alory, C. Balch, W.E. (2001). *Traffic*. 2: 532–543.
- Clatworthy, J. Subramanian, V. (2001). *Mechanism of Development*. 101(1-2): 3-9.
- Denning, K. Smyth, P.C. Cahill, S.F. Finn, S.P. Conlon, E. Li, J. Flavin, R.J. Aherne, S.T. Guenther, S.M. Ferlinz, A. O'Leary, J.J. Sheils, O.M. (2007). *Modern Pathology*. 20(10):1095–1102.
- Eggenschwiler, J.T. Bulgakov, O.V. Qin, J. Li, T. Anderson, K.V. (2006). *Developmental Biology*. 290(1):1–12.
- Eggenschwiler, J.T. Espinoza, E. Anderson, K.V. (2001). *Nature*. 412(6843): 194–198.
- Evans, T.M. Ferguson, C. Wainwright, B.J. Parton, R.G. Wicking, C. (2003). *Traffic*. 4(12):869-884.
- Geppert, M. Goda, Y. Stevens, C.F. Sudhof, T.C. (1977). *Nature*. 387:810–814.
- Grosshans, L. Grosshans, D. O. Novick, P. (2006). *Proceedings of the National Academy of Science*. 103(32):11821–11827.
- Guo, A. Wang, T. Ng, E.L. Aulia, S. Chong, K.H. Teng, F.Y. Wang, Y. Tang, B.L. (2006). *Journal of Neuroscience Research*. 83(6):1118–1127.
- Huang, T. Shui, H. Ka, S.M. Tang, B.L. Chao, T.K. Chen, J.S. Lin, Y.M. Chen, A. (2009). *Nephrology Dialysis Transplantation*. 24(3): 743–754.
- Jenkins, D. Seelow, D. Jehee, F.S. Perlyn, C.A. Alonso, L.G. Bueno, D.F. Donnai, D. Josifiova, D. Mathijssen, I.M. Morton, J.E. Ørstavik, K.H. Sweeney, E. Wall, S.A. Marsh, J.L. Nürnberg, P. Passos-Bueno, M.R. Wilkie, A.O. (2007). *American Journal of Human Genetics*. 80(6):1162-1170.
- Kim, K. Oh, S.Y. Park, U.C. Wang, J.H. Lee, J.D. Kweon, H.J. Kim, S.Y. Park, S.H. Choi, D.K. Kim, C.G. Choi, S.H. (2007). *Korean Journal of Gastroenterology*. 49(4):209–224.
- Liu, Y. Wang, Q. Li, W. Huang, X. Zhen, M. Huang, S. Chen, L. Xue, L. Zhang, H. (2007). *World Journal of Gastroenterology*. 13(7):1010-1017.
- Marcos, I. Borrego, S. Antinolo, G. (2003). *International Journal of Molecular Medicine*. 12: 983-987.
- McMahon, A.P. Ingham, P.W. Tabin, C.J. (2003). *Current Topics in Developmental Biology*. 53:1–114.
- Olkkonen, V.M. Stenmark, H. (1997). *International Review of Cytology*. 176: 1–85.
- Oostra, R.J. Maas, M. (2006). *American Journal of Medical Genetic A*. 140(A19):2135–2138.
- Pepinsky, R.B. Zeng, C. Wen, D. Rayhorn, P. Baker, D.P. Williams, K.P. Bixler, S.A. Ambrose, C.M. Garber, E.A. Miatkowski, K. Taylor, F.R. Wang E.A. Galdes, A. (1998). *Journal of Biological Chemistry*. 273(22):14037–14045.
- Porter, J.A. Ekker, S.C. Park, W.J. von Kessler, D.P. Young, K.E. Chen, C.H. Ma, Y. Woods, A.S. Cotter, R.J. Koonin E.V. Beachy, P.A. (1996). *Cell*. 86(1): 21–34.
- Riobo, N.A. Manning, D.R. (2007). *Biochemistry Journal*. 403(3):369–379.
- Ruiz, A. (1999). *Trends in Genetics*. 15(10):418–425.
- Ruizi, A. Sanchez, P. Dahmane, N. (2002). *Nature Reviews Cancer*. 2(5): 361-372.
- Sali, A. Blundell, T.L. (1993). *Journal of Molecular Biology*. 234(3):779-815.
- Simpson, F. Kerr, M.C. Wicking, C. (2009). *Mechanisms of Development*. 126(5-6): 279-288
- van den Brink, G. Bleuming, S.A. Hardwick, J.C. Schepman, B.L. Offerhaus, G.J. Keller, J.J. Nielsen, C. Gaffield, W. van Deventer, S.J. Roberts, D.J. Peppelenbosch, M.P. (2004). *Nature Genetics*. 36(3): 277-282.
- Wang, Y. Ng, E.L. Tang, B.L. (2006). *Traffic*. 7:746–750.
- Wang, Y. McMahon, A.P. Allen, B.L. (2007). *Cell Biology*. 19(2):159–165.
- Wang C, Liu Z, Huang X. (2012). *PLoS ONE*. 7(2): e32086.
- Yang, L. Clinton, J.M. Blackburn, M.L. Zhang, Q. Zou, J. Zielinska-Kwiatkowska, A. Tang, B. Chansky, H.A. (2008). *Journal of Biological Chemistry*. 283(16):10649-10657.
- Yuan, Z. Goetz, J.A. Singh, S. Ogden, S.K. Petty, W.J. Black, C.C. Memoli, V.A. Dmitrovsky, E. Robbins, D.J. (2007). *Oncogene*. 26(7):1046–1055.
- Zhang, J. Lipinski, R. Shaw, A. Gipp, J. Bushman, W. (2007). *Journal of Urology*. 177(3):1179–1185.
- Zhu, G. Zhang, L. Shehata, B. Wang, X. Cerwinka, W.H. Elmore, J. He, D. (2007). *Prostate*. 67(6):674–684.