

مطالعه‌ی قدرت مهاری ترکیبات بیس ایندولی سنتتیک بر فرآیند فیبریلایسیون آمیلوئیدی با استفاده از روش‌های شبیه‌سازی مولکولی

کاوه خدایاری^۱، پرویز عبدالمالکی^{۲*}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۰

چکیده

تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی به دلیل ایجاد بیماری‌هایی مانند آلزایمر، پارکینسون، و دیابت نوع ۲، مورد توجه محققان است. از جمله مهارکننده‌های مهم، حلقه‌های ایندولی می‌باشند. مطالعات تجربی بر روی دو نوع ترکیب بیس ایندولی نشان داده است که ترکیب بیس ایندولیل ۲-متیل فنیل متان (BI2MPM) مهارکننده‌ی فیبریلایسیون آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم است. اما ترکیب بیس ایندولیل ۳-نیتروفنیل متان (BI3NPM) قدرت مهاری چندانی ندارد. در این مطالعه با استفاده از روش‌های داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، میانکنش این دو لیگاند با پروتئین مدل شده‌ی آمیلوئیدی بررسی شد. روش داکینگ مولکولی تمایلی مشابه اما با جایگاه اتصالی متفاوت برای دو لیگاند نشان داد. اما نتایج دینامیک مولکولی نشان داد که لیگاند BI2MPM با تخریب عمده‌ی ساختار بنای هسته‌های اولیه، موجب کاهش میانکنش بین آن‌ها و با افزایش تغییرات ساختاری در رشته‌های بتا باعث ناپایداری و توقف رشد فیبریلایسیون می‌گردد. اما ترکیب BI3NPM تغییرات اندکی بر ساختار هسته‌های فیبریلی اعمال می‌کند.

واژه‌های کلیدی: میانکنش‌های پای، بیماری‌های آمیلوئیدی، ساختار بتا، حلقه ایندول، دینامیک مولکولی

مقدمه

یکی از عمده‌ترین و مهم‌ترین حالات غیرطبیعی و غیرعملکردی پروتئین تجمع آن‌ها به صورت اشکال و خصوصیات منحصر به فرد است. طی این فرایند مولکول پروتئین ساختار طبیعی خود را طی فرآیندهای پیچیده‌ی تاشدن صحیح^۲، برای عملکرد کاملاً اختصاصی از دست می‌دهد و به حالت غیرطبیعی در می‌آید. این مولکول‌های غیرطبیعی می‌توانند به هم متصل شوند و به سه شکل فیبریل (تجمعات منظم)، آمورف (تجمعات نامنظم) و الیگومرهای محلول درآیند. در این پروسه عوامل محرک فیزیکی و شیمیایی با ایجاد تغییرات جزئی در ساختمان پروتئین، قسمت‌هایی از آن را تغییر می‌دهند و یا تاخوردگی

۱- دانشجوی دکترای بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲-استاد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوفیزیک

* (نویسنده مسئول Parviz@modares.ac.ir)

اشتباهی را متحمل می‌شوند و آن را در جهت فرآیند تجمع^۱ هدایت می‌کنند. این ساختارهای تجمع یافته‌ی منظم پروتئینی، عموماً آمیلوئید^۲ نامیده می‌شوند. امروزه مطالعه‌ی تجمع غیرطبیعی پروتئین‌ها و تشکیلات آمیلوئیدی و همچنین مکانیزم‌های احتمالی تشکیل آنها به علت اهمیت آنها در درک و شناخت بسیاری از بیماری‌ها، مورد توجه محققان قرار گرفته است. از مهم‌ترین بیماری‌هایی که در ارتباط مستقیم با این نوع از اختلالات ساختاری پروتئین‌ها می‌توان به آن اشاره کرد بیماری‌های تحلیل برنده‌ی سیستم عصبی مانند آلزایمر، پارکینسون و هانتینگتون، و بیماری‌های دیگری چون آمیلوئیدوز سیستمیک و دیابت نوع ۲ هستند. نکته جالبی در مورد این نوع بیماری‌ها وجود دارد؛ پروتئین‌هایی که تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی می‌دهند صرف‌نظر از اینکه دارای کدام نوع از ساختارهای دوم پروتئینی (α ، β و یا ترکیبی از آنها) هستند در هنگام تجمع تبدیل به صفحات بتا می‌شوند. در مراحل بعدی پروتوفیلامنت‌ها از کنار هم قرار گرفتن این صفحات بتا، ایجاد می‌شوند که آن‌ها نیز به نوبه خود تشکیل کمپلکس‌های فراساختاری^۳ را به صورت فیبریل‌های آمیلوئیدی می‌دهند که طویل و بدون شاخه‌اند و به صورت کلاف‌های در هم پیچیده درون یا بیرون سلول رسوب پیدا می‌کنند (Obici *et al.*, 2005; Chiti & Dobson, 2006; Buxbaum, 2003).

علاوه بر قدرت بیماری‌زایی تجمعات آمیلوئیدی، به دلیل اینکه امروزه پپتیدها و پروتئین‌ها طیف وسیعی از داروها را تشکیل می‌دهند فرآیند تجمع پروتئین در مراحل مختلف تولید صنعتی این نوع از داروها اختلال ایجاد می‌کند (Shukla *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Dische *et al.*, 1998; Espargaro *et al.*, 2008). به عنوان مثال می‌توان به تخریب ساختار طبیعی و تشکیل تجمعات آمیلوئیدی در هنگام نگهداری آن‌ها و یا مصرف طولانی مدت داروهای پروتئینی اشاره کرد (Kueltzo *et al.*, 2008). از این رو مطالعه روی ساختار پروتئین‌های مستعد تجمع و شرایط ایجاد آنها و نیز مهار آنها به منظور درمان بیماری‌های مرتبط، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. براساس مطالعات، شرایط ویژه‌ای مثل دمای بالا، فشار زیاد، pH پایین و یا حضور غلظت‌های ملایمی از حلال‌های آلی به واسطه‌ی جزئی ساختار پروتئین‌ها کمک می‌کنند و آنها را برای تجمع مستعد می‌سازند. تشکیل مولکول‌های فراساختاری تجمع یافته باعث آسیب و سمیت سلولی می‌گردند و به مرور، سلول را در جهت آپوپتوز (مرگ برنامه ریزی شده سلول) پیش می‌برند (Jahn *et al.*, 2006; Tipping *et al.*, 2015).

امروزه راهکارهای درمانی و مهارکننده‌ی تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی بر روی ترکیباتی تمرکز کرده است که قادرند فرآیند تشکیل را مهار یا حداقل در آن تاخیر ایجاد کنند و یا باعث معکوس کردن این فرآیند شوند و بدین صورت راهکار درمانی برای بیمارهای مستعد تجمع، ایجاد نمایند (Abedini *et al.*, 2016; Young *et al.*, 2014; Baranczak & Kelly, 2016). امروزه ابزارهای محاسباتی نیز به‌طور گسترده‌ای برای بررسی مشکلات ناشی از تجمع پروتئینی به کار گرفته شده‌اند. محدودیت‌های روشهای تجربی موجب ظهور نوآوری‌هایی در روش‌های محاسبات کامپیوتری شده و از ترکیب این دو روش درک عمیق‌تری از

¹ Aggregation

² Amyloid

³ Super Structure

تغییرات ساختاری پروتئین‌ها و شناخت مکانیزم‌های مولکولی دخیل در فرآیند تجمع پروتئینی، حاصل شده است (Sharma *et al.*, 2006; Klimov & Thirumalai, 2004). در دهه‌ی اخیر مطالعات زیادی بر روی تجمع پروتئینی پپتیدهای کوتاه (Klimov & Thirumalai, 2004)، پپتیدهای با اندازه متوسط از جمله پپتید $A\beta$ (Buchete *et al.*, 2005)، β میکروگلوبولین (Park & Saven, 2006; Armen & Daggett, 2005; Deng *et al.*, 2006) و پروتئین‌های بزرگتر (DeMarco & Daggett, 2004) با استفاده از روشهای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی انجام شده است.

در این میان انواع مختلف قطعات پپتیدی $A\beta$ به طور وسیعی با این روش‌ها بررسی شدند و پیش‌بینی‌های مفیدی برای درک مکانیزم تجمع آمیلوئیدی ارائه داده‌اند (Han & Wu, 2005; Nelson *et al.*, 2005). الگوریتم‌های اولیه‌ای که در دو دهه‌ی اخیر توسعه داده شده‌اند تنها با در نظر گرفتن خصوصیات فیزیکوشیمیایی آمینواسیدها (مانند تغییرات محتوی آب‌گریزی پروتئین یا تمایل به قرارگیری آمینواسیدها در ساختارهای دوم بتا که معماری اصلی فیبریل‌های آمیلوئیدی را تشکیل می‌دهند) قادر بودند که تمایل به تجمع پروتئین‌ها را در سطوح مختلف از جمله توالی، ساختار کلی پروتئین، نقاط مستعد تجمع و در نهایت در سطح ساختار سوم آمیلوئیدها بررسی کنند (Tiwari *et al.*, 2005; Chiti *et al.*, 2003).

در این میان، کیتی (Chiti, 2003) و همکاران اولین تلاش‌ها را برای بررسی ارتباط بین توالی پروتئین با میزان تمایل به تجمع انجام دادند. آن‌ها یک معادله خطی توسعه دادند که می‌توانست تغییرات بار کلی و هیدروفیسیته رزیدوهای جهش‌یافته نسبت به انواع طبیعی را اندازه‌گیری و از این طریق سرعت تجمع پروتئین‌ها را پیش‌بینی کند (Chiti *et al.*, 2003). بعد از آنها گروه کافلیش (Cafilisch, 2004) با توسعه‌ی بیشتر معادله، تاثیر عوامل دیگری مانند سطح ناحیه‌ی در دسترس، ممان دو قطبی و تغییرات آروماتیسیتته رزیدوها را نیز در معادله در نظر گرفتند (Tartaglia *et al.*, 2004; Tartaglia *et al.*, 2005). این مدل‌ها قادر بودند نقش توالی پروتئین بر روی فرآیند تجمع را نسبتاً خوب پیش‌بینی کنند. مدل‌های دیگر مانند TANGO، به جای در نظر گرفتن پروتئین به صورت کلی، توانایی تجمع یک پپتید در درون پروتئین را مد نظر قرار دادند (Fernandez-Escamilla *et al.*, 2004). این الگوریتم میزان تمایل هر رزیدو را نسبت به قرارگیری در چهار حالت مارپیچ^۱، دور^۲، تاننده^۳ و تجمع‌یافته^۴ محاسبه می‌کند و بدین صورت قابلیت پیش‌بینی میزان تمایل تجمع را بهبود می‌دهد. این قابلیت بعدها در الگوریتم WALTZ با میزان خطای کمتری توسعه داده شد (Maurer-Stroh *et al.*, 2010). با وجود بهبود این مدل‌ها در توانایی پیش‌بینی میزان تمایل به تجمع در پروتئین‌های مختلف، هنوز یک سری از چالش‌ها به قوت خود باقی ماندند (Nelson *et al.*, 2005; Neudecker *et al.*, 2012). در ادامه‌ی این تلاش‌ها، روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی All-Atom توانستند خصوصیات اتمی دقیقی از مراحل اولیه‌ی تجمع و بد تا شدگی پروتئین‌ها را آشکار سازند (Ding *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). این شبیه‌سازی‌ها با

¹ Helix

² Turn

³ Unfolded

⁴ Aggregated

کمک قدرت محاسباتی کامپیوترهای امروزی اگرچه توانستند جزئیات دقیقی از میانکنش‌ها و تغییرات دینامیک اتم‌ها در مولکول‌های پروتئینی فراهم کنند اما در شبیه‌سازی سیستم‌ها در مقیاس‌های زمانی طولانی‌تر و پلی‌پپتیدهای بزرگتر دارای محدودیت بودند. برای مدل‌سازی چنین سیستم‌هایی در مقیاس زمانی بالا، یک مدل ساده‌سازی شده با نام Coarse-Grain Molecular Dynamics توسعه پیدا کرده است. در این روش چندین اتم با هم به صورت یک ذره در نظر گرفته می‌شوند و بدین صورت بار محاسباتی سیستم کاهش می‌یابد و امکان شبیه‌سازی در مدت زمان طولانی‌تری امکان‌پذیر می‌شود (Wu & Shea, 2011). امروزه روش‌های مدل‌سازی Multi-Scale از قابلیت‌های هر دو روش All-atom و Coarse-grain برای انجام شبیه‌سازی‌های تجمع پروتئینی در مقیاس زمانی طولانی و با دقت بالا استفاده می‌کنند (Ayton *et al.*, 2007; Tozzini, 2010; Brancolini & Tozzini, 2019).

در سال‌های اخیر ترکیبات مهارکننده‌ی مختلفی با استفاده از روش‌های تجربی و شبیه‌سازی بررسی شده‌اند که با استفاده از مکانیزم‌های متفاوتی مانع از تشکیل فیبریل‌ها می‌شوند. مطالعات زیادی نشان داده‌اند ترکیباتی که دارای بخش‌های حلقوی در ساختمان خود هستند می‌توانند با ایجاد تداخل در اندرکنش‌های پای-پای رشته‌های آمیلوئیدی، باعث مهار تشکیل و یا تجزیه آن‌ها گردند. این امر باعث شده است که مطالعات زیادی بر روی انواع ترکیبات با منشا گیاهی که عمدتاً دارای بخش‌های آروماتیک هستند، صورت گیرد. تاکنون تاثیر گیاهانی همچون زردچوبه، سیر، دارچین، جینکو، جینسینگ، چای سبز و ترکیباتی نظیر دوبوتامین، آپومورفین، کاتکسین، رسوراترول، اسید تانیک، کافئین و رزماریک اسید بر روی مهار فرآیند فیبریلاسیون مشخص شده است (Park *et al.*, 2008; Gupta & Rao, 2007; Park & Kim, 2002; Chauhan, 2006; Tohda, 2006; Ko *et al.*, 2007; Porat *et al.*, 2006). گزارش‌های دیگری نیز مبنی بر اثر مهار ترکیبات آلی کوچک بر روی تشکیل فیبریل‌ها در پروتئین‌های مختلف وجود دارد. یکی از مهمترین این مولکول‌ها مشتقات ایندولی هستند که به دلیل خصوصیات آنتی آمیلوئیدی، بسیار مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. مشتقات ایندولی می‌توانند به پروتئین‌ها اتصال یافته و نوع ساختار و حتی گروه‌های عاملی متصل به آن‌ها می‌توانند در این اتصال اهمیت زیادی داشته باشند (Morshedi *et al.*, 2007). با توجه به اهمیت حلقه‌های ایندولی و اثبات نقش آن‌ها در مهار فرآیند فیبریلاسیون آمیلوئیدی، رامشینی و همکاران چند نوع از ترکیبات سنتزی بیس ایندولی را که دارای دو حلقه ایندول و هر کدام دارای استخلاف‌های متفاوتی در ساختمان خود هستند بر روی فیبریلاسیون لیزوزیم سفیده تخم مرغ به عنوان پروتئین مدل بررسی کرده‌اند (Ramshini *et al.*, 2016). اهمیت این مطالعه بدان جهت است که این ترکیبات هم از نظر دارا بودن دو حلقه ی ایندولی و هم از نظر تفاوت در گروه‌های عاملی مختلف متصل، بررسی شده‌اند. نتایج این مطالعه نشان داد که نوع و جایگاه هر استخلاف می‌تواند کاملاً بر میزان اثر مهارکنندگی آن و نحوه اندرکنش با پروتئین موثر باشد. در ادامه‌ی این مطالعه و در راستای بررسی دقیق‌تر نتایج تجربی بدست آمده، بر آن شدیم که با استفاده از ابزارهای

داکينگ مولکولى و شبیه‌سازى دينامیک مولکولى به بررسی دقیق‌تر مکانيزم احتمالی اثر این تركيبات بر روی پروتئين مدل آمیلوئیدی بپردازيم.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازى فایل‌ها

در مطالعه‌ی انجام شده توسط رامشینی و همکاران، از پروتئين لیزوزيم سفیده تخم مرغ (HEWL)^۱ استفاده شده که تحت شرایط دمای بالا و pH پایین یک بازشدگی جزئی در ساختار اتفاق افتاده است و از این طریق وارد فاز تجمع می‌شود. بنای فضایی طبیعی این آنزيم (PDB code: 2VB1) یک بنای فضایی بتا-دور-بتا و شامل ۱۲۹ آمینواسید است که توالی ۱۶ رزیدویی ۴۹-۶۴ آن به شدت مستعد تجمع می‌باشد. به دلیل اینکه ساختارهای آمیلوئیدی متشکل از این آنزيم تاکنون کریستالوگرافی نشده‌اند لذا فایل PDB آن موجود نیست. بنابراین مدل هسته آمیلوئیدی با استفاده از چهار عدد توالی ۱۶ رزیدویی ۴۹-۶۴ این پروتئين که در حالت بنای فضایی β هستند به وسیله نرم افزارهای (VMD) Visual Molecular Dynamic v1.9 و AutoDock v4.0 و Discovery Studio Visualizer (DSV) v 16/1/0 تولید و بهینه شد. از این مدل به عنوان گیرنده^۲ در داکينگ مولکولى برای پیش‌بینی حالت‌های محتمل اتصال لیگاندها به هسته‌های مدل آمیلوئیدی استفاده شد (Ramazzotti *et al.*, 2016).

تولید و بهینه‌سازى لیگاندها

لیگاندهای مطالعه شده توسط رامشینی و همکاران، تركيبات بيس ايندولى دارای گروه‌های استخلافی مختلف هستند که ساختار پایه‌ای همه آن‌ها متشکل از دو حلقه ايندولى می‌باشند. این تركيبات از واکنش جانشینى الکترون دوستی حلقه ايندول با آلدهیدهای حلقوی و یا استیل آلدهیدها تحت شرایط بدون حلال و با واکنش کاتالیزوری هتروفولیک اسید تولید می‌شوند (Tayebie *et al.*, 2013). از بین این ساختارها تركيب شماره ۵ تحت عنوان بيس ايندولیل (۲-متیل فنیل) متان (BI2MPM) به عنوان لیگاند مهارى و تركيب شماره ۳ تحت عنوان بيس ايندولیل (۳-نیترو فنیل) متان (BI3NPM) به عنوان لیگاند غیرمهارى در فرآيند فيبريلاسيون آمیلوئیدی انتخاب شدند. ساختار سه بعدی این دو لیگاند با استفاده از نرم افزار HyperChem v8.0.6^۳ طراحی و بهینه گردید.

داکينگ مولکولى

¹ Hen Egg White Lysozyme

² Receptor

³ HyperChem(TM) Professional 8.0, Hypercube, Inc., 1115 NW 4th Street, Gainesville, Florida 32601, USA.

برای بررسی جایگاه‌های احتمالی اتصال لیگاندها به هسته‌های آمیلوئیدی، با استفاده از نرم افزار AutoDock Vina نسخه ۱٫۱، داکینگ انجام شد (Trott & Olson, 2010). مرکز grid بر روی مرکز گیرنده تعریف شد و یک جعبه به حجم \AA^3 $70 \times 70 \times 70$ برای پوشش کامل گیرنده، تعریف گردید. تنظیمات مربوطه بر روی تعداد ۱۰۰ حالت بنای فضایی تصادفی هر یک با ۱۰۰ حالت داک شونده‌ی مختلف و در محدوده انرژی $\pm 3 \text{ kcal/mol}$ تنظیم گردید. ساختار گیرنده یا همان هسته‌های آمیلوئیدی به صورت صلب^۱ و لیگاندهای شماره ۵ و ۳ به ترتیب با سه و چهار پیوند قابل چرخش در نظر گرفته شد. این شبیه‌سازی بنای فضایی‌هایی از لیگاند را که دارای بالاترین انرژی اتصال به پروتئین هستند، بر حسب واحد انرژی کیلوکالری بر مول مرتب می‌کند. این محتمل‌ترین بنای فضایی‌ها و رزیدوهای درگیر در پاکت اتصالی گیرنده از نظر نوع و خصوصیات میانکنش‌های موجود، مورد آنالیز و مقایسه قرار گرفت.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بر روی بهترین حالت محتمل کمپلکس لیگاند-پروتئین بدست آمده از داکینگ مولکولی با استفاده از نرم افزار گرومکس نسخه ۵٫۱٫۴ انجام شد (Abraham *et al.*, 2019). سپس در راستای الگوبرداری از مکانیزم ایجاد و رشد رشته‌های پروتوفیبریلی آمیلوئیدی، از کنار هم قرار دادن دو هسته آمیلوئیدی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای سه حالت هسته‌های آمیلوئیدی تنها، هسته‌های آمیلوئیدی+BI2MPM و هسته‌های آمیلوئیدی+BI3NPM انجام شد. میدان نیروی استفاده شده GROMOS54a7 (Schmid *et al.*, 2011) و مدل آب SPC^۲ (Berendsen *et al.*, 1981) انتخاب شد. فایل توپولوژی لیگاندها و بارهای جزئی اتم‌های آن‌ها با استفاده از سرور ATB^۳ (Malde *et al.*, 2011) تولید شد. دما به صورت تدریجی از صفر تا ۳۳۲ درجه کلون و به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه با استفاده از الگوریتم V-rescale افزایش یافت (Cheng & Merz, 1996; Parrinello & Rahman, 2008; Mor *et al.*, 2008; Lingeneil *et al.*, 2008). سپس با استفاده از الگوریتم Parrinello-Rahman (Parrinello & Rahman, 1981) در مدت زمان یک نانوثانیه فشار سیستم بر روی یک بار ثابت نگه داشته شد. میانکنش‌های الکترواستاتیک دوربرد به وسیله روش PME^۴ (Darden *et al.*, 1993) محاسبه گردید. الگوریتم LINCS (Hess *et al.*, 1997) برای اعمال محدودیت بر روی طول پیوندها اعمال شد. سیستم در یک جعبه دوازده وجهی قرار گرفته و در نهایت ۱۰۰ نانو ثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در جعبه محتوی آب و ۰٫۱۵ میلی‌مولار از یون‌های سدیم و کلر برای خنثی‌سازی محیط جعبه شبیه‌سازی، استفاده شد. معادلات حرکت با الگوریتم Leap-frog (Van.Gunsteren & Berendsen, 1988) انجام شد. در انتهای شبیه‌سازی، تعداد ۱۰۰۰ فریم از سه حالت شبیه‌سازی انجام شده برای آنالیز انتخاب شد.

¹ Rigid

² The flexible three-site simple point-charge water model

³ Automated Topology Builder

⁴ Particle Mesh Ewald

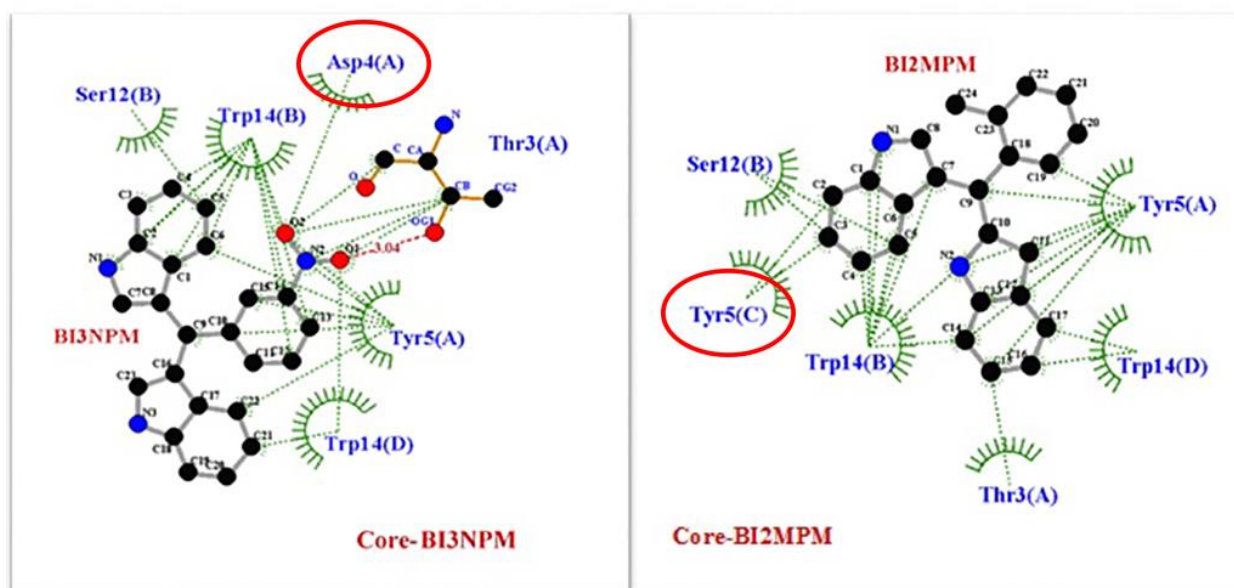
نتایج و بحث

نتایج داکینگ

در این پژوهش چنان‌که اشاره شد، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بر روی توالی مستعد تجمع ۴۹-۶۴ از پروتئین لیزوزیم سفیده تخم مرغ صورت گرفت. با تولید ساختار بتا به صورت ناموازی از ۴ رشته از این توالی آمینواسیدی که به عنوان پروتئین هدف یا هسته‌های اولیه آمیلوئیدی در نظر گرفته شدند، میزان تمایل هر کدام از لیگاندها و جایگاه ترجیحی اتصال آنها مورد بررسی قرار گرفت. پایین‌ترین انرژی اتصال به‌دست آمده برای لیگاند BI2MPM برابر $6/1 \text{ kcal/mol}$ و برای لیگاند BI3NPM برابر $6/5 \text{ kcal/mol}$ است. اگرچه انرژی اتصال این دو نوع لیگاند به پروتئین بسیار نزدیک به هم می‌باشد اما در آزمون‌های تجربی که برای بررسی مهار پروسه فیبریلاسیون آمیلوئیدی در پروتئین لیزوزیم انجام شده است این دو نوع لیگاند رفتار کاملاً متمایزی از خود نشان داده‌اند. بدین‌صورت که لیگاند بیس ایندولیل (۲-متیل فنیل) متان یا به اختصار BI2MPM کاملاً پروسه تشکیل فیبریل‌ها را مهار می‌کند و لیگاند بیس ایندولیل (۳-نیترو فنیل) متان یا به اختصار BI3NPM فاقد هر گونه قدرت مهار کنندگی در فرآیند مذکور است. بنابراین مسلم است که علاوه بر انرژی اتصال صرف، عوامل دیگری نیز دخیل باشند. جایگاه اتصال هر دو لیگاند بر روی هسته شامل ناحیه‌ای با شش نوع رزیدو است که دو کمپلکس در یک نوع رزیدو با هم تفاوت دارند. رزیدوهای مشترک Thr3(A), Tyr5(A), Ser12(B), Trp14(D) و رزیدوهای متفاوت در لیگاند BI2MPM, Tyr5(C) و در لیگاند BI3NPM, Asp4(A) است. در شکل ۱ نتایج به‌دست آمده از آنالیز با نرم‌افزار LigPlot (Laskowski & Swindells, 2011) خوبی موقعیت آمینواسیدی اطراف لیگاندها را در دو نوع کمپلکس نشان می‌دهد. آنچه در این‌جا اهمیت دارد این است که لیگاند BI3NPM به دلیل داشتن گروه قطبی نیترو (NO_2) تمایل بیشتری به میانکنش با رزیدوهای قطبی‌تر دارد. چنانچه که می‌بینیم برهمکنش با رزیدوی آسپاراتات شماره ۴ از رشته‌ی A که جزء آمینواسیدهای قطبی محسوب می‌شود یک پیوند هیدروژنی با طول پیوند $3/04$ آنگستروم تشکیل داده است. این پیوند قطبی می‌تواند شاخص آب‌گریزی جایگاه اتصال را تا حدودی کاهش دهد. این شاخص با استفاده از ابزار Prot Param (Gasteiger *et al.*, 2005) از سرور ExpASY نیز محاسبه شد. رزیدوهای جایگاه اتصال لیگاند در کمپلکس پروتئین-BI2MPM و پروتئین-BI3NPM به ترتیب شامل TYSWYW و TDYSW هستند که مقدار شاخص GRAVY^۱ هر کدام به ترتیب با استفاده از ابزار Prot Param برابر $0/98$ - و $1/35$ - به‌دست آمد. عدد منفی پایین‌تر مربوط به رزیدوهای پاکت اتصالی در کمپلکس پروتئین-BI3NPM موید این نکته است که خصوصیت آب‌گریزی کمتری نسبت

^۱ Grand average of hydrophobicity

به کمپلکس دیگر دارد. این امر به دلیل حضور آمینو اسید آسپارتیک اسید در آن جایگاه است که به طور ذاتی قطبی است و تمایل کمتری به حضور در محیط غیرقطبی دارد. بنابراین جایگاه اتصال لیگاند BI3NPM به پروتئین تا حدودی آب‌گریزی



کمتری از لیگاند BI2MPM دارد و این به دلیل وجود گروه نیترو با یک اتم نیتروژن و دو اتم هیدروژن است که تمایل کمتری را به ایجاد میانکنش‌های آب‌گریز در این لیگاند القا می‌کند.

شکل ۱: جایگاه اتصال دو نوع لیگاند بر روی پروتئین مدل هسته‌ای آمیلوئیدی با استفاده از نرم افزار LigPlot ترسیم شده است. دو جایگاه اتصال در یک نوع رزیدو با هم اختلاف دارند که با دایره‌ی قرمز رنگ نشان داده شده است.

قبلاً اشاره شد که ساختار هر دو لیگاند علاوه بر بخش حلقوی فنیلی و گروه استخلافی متفاوت متصل به آن، دارای دو گروه حلقوی ایندولی هستند که این گروه‌های ایندولی نقش مهمی در ایجاد میانکنش‌های آب‌گریز به خصوص میانکنش‌های آب‌گریز ناشی از الکترون‌های پای این حلقه‌ها دارند. به طور کلی این میانکنش‌های کلیدی بین لیگاند و ماکرومولکول شامل پیوندهای هیدروژنی، فشردگی π - π حلقه‌ها، میانکنش‌های π -کاتیون، اثرات آب‌گریز، پیوندهای هالوژنی و پل‌های نمکی هستند (Kukic & Nielsen, 2010; Neves-Petersen & Petersen, 2003). در ساختارهای حلقوی به دلیل چگالی الکترونی بالای ناشی از الکترون‌های اتم‌های تشکیل **Core-BI2MPM** مختلفی از میانکنش‌ها از جمله میانکنش‌های فشردگی پای-پای^۱، میانکنش‌های کاتیون-پای^۲، میانکنش‌های آنیون-پای^۳، میانکنش‌های پای-CH و غیره می‌توانند تشکیل شوند (McGaughey *et al.*, 1998). همچنین با وجود رزیدوهای دارای بخش‌های آروماتیک مانند فنیل آلانین، تایروزین و تریپتوفان در پروتئین‌ها، تشکیل میانکنش‌های ناشی از الکترون‌های π حلقه‌ها نقش مهمی در اتصالات برگشت‌پذیر با لیگاند ایفا می‌کنند. با بررسی

¹ π - π -Stacking

² Cation- π Interactions

³ Anion- π Interactions

میانکنش‌های فشرده‌ی پای-پای در دو کمپلکس مورد مطالعه‌ی ما، می‌توانیم به نحوه‌ی شکل‌گیری و خصوصیات این نوع از میانکنش‌ها بین حلقه‌های لیگاندها با رزیدوهای حلقوی پروتئین دست یابیم. با استفاده از نرم افزار DSV¹ انواع میانکنش‌های بین لیگاندها و پروتئین و موقعیت اتصالی بررسی شد. در جداول شماره یک و دو، نوع و خصوصیات میانکنش‌های بین لیگاندهای BI2MPM و BI3NPM با رشته‌های بتای مدل آمیلوئیدی آورده شده است. شکل ۲ نیز نمای شماتیکی از رزیدوهای درگیر در مدل هسته آمیلوئیدی با دو لیگاند و نحوه‌ی میانکنش آنها را نشان می‌دهد.

جدول ۱: انواع میانکنش‌های ایجاد شده بین لیگاند مهارى BI2MPM با هسته‌ی پروتئینی و خصوصیات آنها. منظور از اتم دهنده و گیرنده، دو اتم شرکت کننده در یک میانکنش می باشد.

گروه	نام پیوند	نوع پیوند	اتم دهنده	اتم گیرنده	طول پیوند	زاویه تتا*	زاویه گاما**
Lig-Trp14B	پیوند هیدروژنی	هیدروژن-Pi	H2-لیگاند	Trp14B-Pi	2/75	11/76	-
Lig-Tyr5A	آب‌گربز	Pi-Pi T-shaped	Tyr5A	لیگاند	5/85	25/49	75/34
Lig-Trp14B	آب‌گربز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	4/53	60/54	55/74
Lig-Trp14B	آب‌گربز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	5/29	27/48	71/63
Lig-Trp14B	آب‌گربز	Pi-Pi T-shaped	Trp14B	لیگاند	4/82	13/34	71/63

*زاویه تتا(θ) زاویه بین محور متصل کننده دو مرکز جرم با صفحه حلقه آروماتیک در پروتئین **زاویه گاما(□) زاویه بین دو صفحه آروماتیک

جدول ۲: انواع میانکنش‌های ایجاد شده بین لیگاند مهارى BI3NPM با هسته‌ی پروتئینی و خصوصیات آنها

گروه	نام پیوند	نوع پیوند	اتم دهنده	اتم گیرنده	طول پیوند	زاویه تتا	زاویه گاما
Lig-Thr3A	پیوند هیدروژنی	پیوند هیدروژنی	A:THR3:HG1	Ligand:O1	2/46	-	-
Lig-Trp14B	آب‌گربز	Pi-Pi Stacked	B:TRP14	لیگاند	4/54	35/2	28/03
Lig-Trp14B	آب‌گربز	Pi-Pi Stacked	B:TRP14	لیگاند	4/34	31.35	28/04
Lig-Tyr5A	آب‌گربز	Pi-Pi T-shaped	A:TYR5	لیگاند	5/21	28/12	66/16

¹ Discovery Studio Visualizer (Dassault Systèmes BIOVIA, [Discovery Studio Visualizer], [2016], San Diego)

برابر با $-1/48$ kcal/mol و در حالت میانکنش پای از نوع T شکل تقریباً برابر $-2/46$ kcal/mol می‌باشد (Tsuzuki *et al.*, 2002). در اینجا نیز با توجه به این که عمده میانکنش‌های لیگاند BI2MPM با پروتئین از نوع T شکل هستند، اتصال این لیگاند به نواحی آب‌گریز پروتئین با مطلوبیت بالاتری نسبت به لیگاند BI3NPM برقرار شده است. همان‌طور که اشاره شد دو نوع لیگاند، رفتار کاملاً متفاوتی در مهار تجمع هسته‌های پروتئینی به سمت تشکیل ساختارهای آمیلوئیدی دارند. از طرف دیگر تنها با مقایسه‌ی جایگاه اتصال نمی‌توان رفتار متفاوت لیگاندها را توجیه کرد. بنابراین برای بررسی دقیق‌تر مکانیزم مولکولی میانکنش این لیگاندها با پروتئین، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در طول زمان برای تجزیه و تحلیل نتایج رفتاری لیگاندها استفاده شد.

نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

آنالیز RMSD

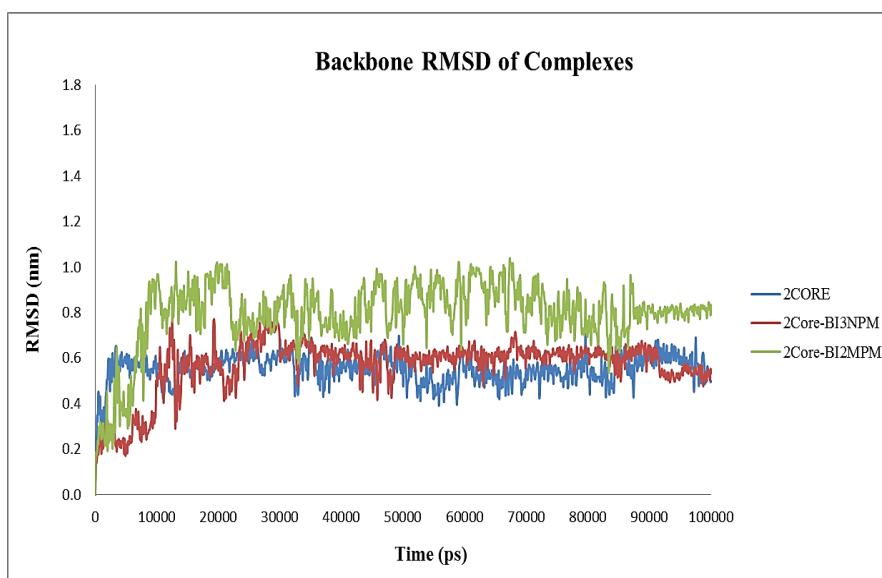
اولین و مهم‌ترین فاکتور صحت انجام شبیه‌سازی نمودار میانگین مربعات خطا یا همان RMSD است که نشان می‌دهد تغییرات سیستم بعد از مدت زمان مورد نظر به چه صورت تغییر کرده است. در شکل ۳ نمودار میانگین مربعات خطای هر کدام از کمپلکس‌ها نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود میزان تغییرات ساختاری القا شده به گیرنده در کمپلکس دارای لیگاند مهارى BI2MPM بیشتر از دو حالت دیگر است. همچنین در بخش‌های قبلی دیده شد که لیگاند مهارى BI2MPM نسبت به لیگاند غیرمهارى BI3NPM با ایجاد تغییرات عمیق‌تر ساختاری در هسته‌های پیش‌ساز آمیلوئیدی، باعث تخریب بخش

ساختارهای

گردید. آنالیز

RMSD

بتای



عمده‌ای از

بتای رشته‌ها

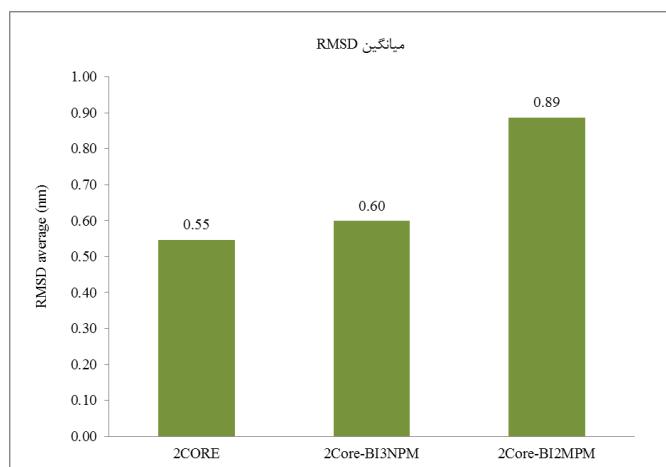
میانگین

رشته‌های

تشکیل‌دهنده‌ی هسته‌های آمیلوئیدی نیز در راستای تایید این اثر انجام شد. مشخص گردید که لیگاند مهارى BI2MPM با میانگین RMSD برابر $0/89$ نانومتر، باعث افزایش نوسانات ساختاری و تداخل در پایداری می‌شود. اما لیگاند غیر مهارى BI3NPM با تغییر جزئی در میزان میانگین RMSD $0/6$ نانومتر نسبت به $0/55$ نانومتر در حالت بدون لیگاند، تاثیر چندانی بر

روی پایداری ساختار هسته‌ها ندارد. بنابراین مشخص است که هر چه رشته‌های بتا میانگین RMSD پایین‌تری داشته باشند پایدارترند و در جهت رشد رشته‌های پروتوفیبریلی پیش‌ساز آمیلوئید پیش می‌روند. بنابراین اولین مرحله برای مهار رشد ساختارهای پیش‌ساز آمیلوئیدی، تداخل در پایداری زیر واحدهای رشته‌ای بتای آنهاست که می‌تواند توانایی دارویی مهمی برای لیگاندها ایجاد کند. شکل ۴ میانگین RMSD را برای سه حالت شبیه‌سازی شده نشان می‌دهد.

شکل ۳: نمودار میانگین مربعات خطا یا RMSD سه نوع کمپلکس شبیه‌سازی شده که میزان تغییرات ساختاری آنها را در طول ۱۰۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی نشان می‌دهد. کمپلکس دارای لیگاند BI2MPM تغییرات ساختاری شدیدتری در طول زمان از خود نشان داده است.



شکل ۴: میانگین RMSD دو لیگاند بر روی هسته‌های آمیلوئیدی در مقایسه با هسته‌های فاقد لیگاند. همان‌طور که مشخص است افزایش قابل توجه در RMSD کمپلکس پروتئین-BI2MPM نسبت به لیگاند دیگر در مقایسه با کمپلکس پروتئینی بدون لیگاند، تغییرات ساختاری بیشتری در زیرواحدهای بتای هسته‌ها اعمال می‌کند و آنها را در راستای تخریب و اختلال در رشد فیبریل‌ها پیش می‌برد.

آنالیز درصد ساختار دوم بتا

در ادامه‌ی مطالعه از بنای فضایی‌های اتصال‌ی لیگاندها به پروتئین که از داکینگ مولکولی به‌دست آمد سه حالت شبیه‌سازی انجام شد. حالت اول دو هسته در کنار هم و بدون حضور لیگاند با دو حالت دیگر که در هر کدام یکی از لیگاندها بین هسته‌ها حضور دارند مقایسه شد. همان‌طور که اغلب نتایج تجربی نشان داده‌اند، یکی از مهمترین خصوصیات پروتئین‌های تجمع‌یافته‌ی آمیلوئیدی وجود ساختارهای عمده‌ی بتا است که از کنار هم قرار گرفتن آن‌ها، رشد آن‌ها به صورت کمپلکس‌های فراساختاری ممکن می‌شود. بنابراین مقایسه تغییرات القا شده بر روی ساختار بتا در طول زمان شبیه‌سازی نشانگر مهمی برای توانایی تخریبی لیگاندها بر روی ساختار بتا است. آنالیز درصد ساختار دوم بتا در هر سه حالت شبیه‌سازی نشان داد که بعد از مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه از ابتدای شبیه‌سازی، کمپلکس پروتئینی بدون لیگاند ۴۳ درصد از ساختار دوم بتای خود را حفظ می‌کند، در حالی که کمپلکس پروتئین- BI3NPM دارای ۳۹ درصد و کمپلکس پروتئین- BI2MPM دارای ۲۵ درصد ساختار بتا است. این امر موید این مطلب است که لیگاند غیرمهاری BI3NPM تاثیر چندانی بر درصد ساختار بتای هسته‌های پروتئینی نداشته است، در حالی که وجود لیگاند مهاری BI2MPM تا حدود زیادی میزان حضور رزیدوها در ساختارهای بتا را کاهش داده است (شکل ۵).

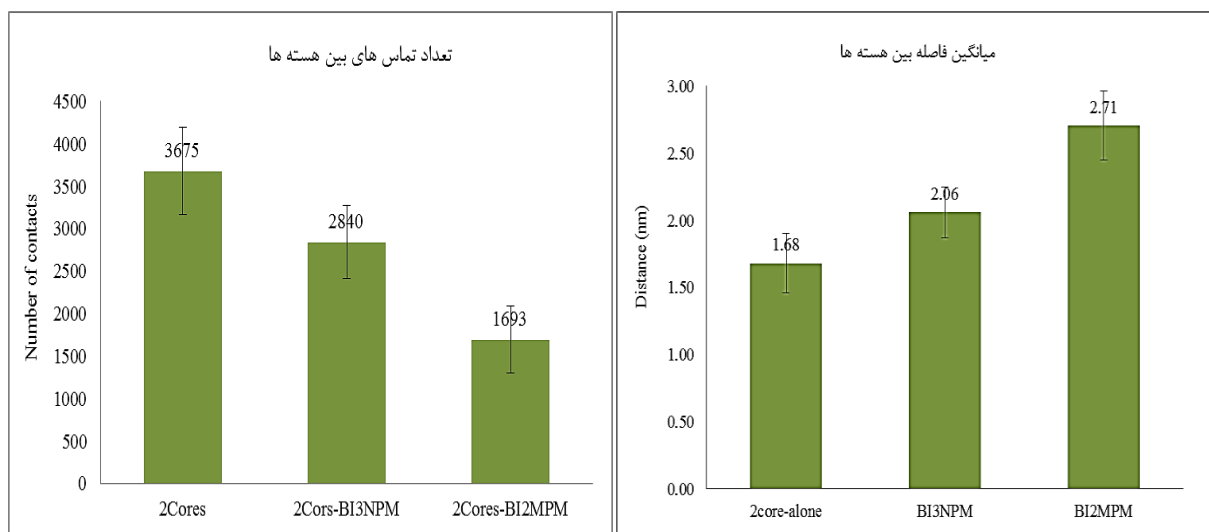


شکل ۵: میزان درصد ساختار بتا در حالت‌های بدون حضور لیگاند و با حضور دو لیگاند بعد از ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. کاهش عمده ساختار بتا در حضور لیگاند BI2MPM نسبت به لیگاند BI3NPM نشان دهنده‌ی قدرت مهاری در فرآیند رشد هسته‌های فیبریلی است.

آنالیز فاصله بین هسته‌ها

در یک بررسی دیگر، فاصله‌ی ایجاد شده بین مرکز جرم دو هسته‌ی پروتئینی را به منظور مقایسه‌ی نحوه عملکرد دو نوع لیگاند در ایجاد فاصله‌ی بین هسته‌های آمیلوئیدی مورد ارزیابی قرار دادیم. با آنالیز فاصله‌ی بین دو هسته در طول ۱۰۰

نانوئانیه تفاوت معنی داری در فاصله‌ی مرکز جرم دو هسته دیده شد. میانگین فاصله‌ی به وجود آمده بین دو هسته در ۴۰ نانوئانیه‌ی انتهایی از کل زمان ۱۰۰ نانوئانیه‌ی شبیه‌سازی، نشان داد که لیگاند مهاری BI2MPM قادر است فاصله‌ی بین صفحات هسته‌ها



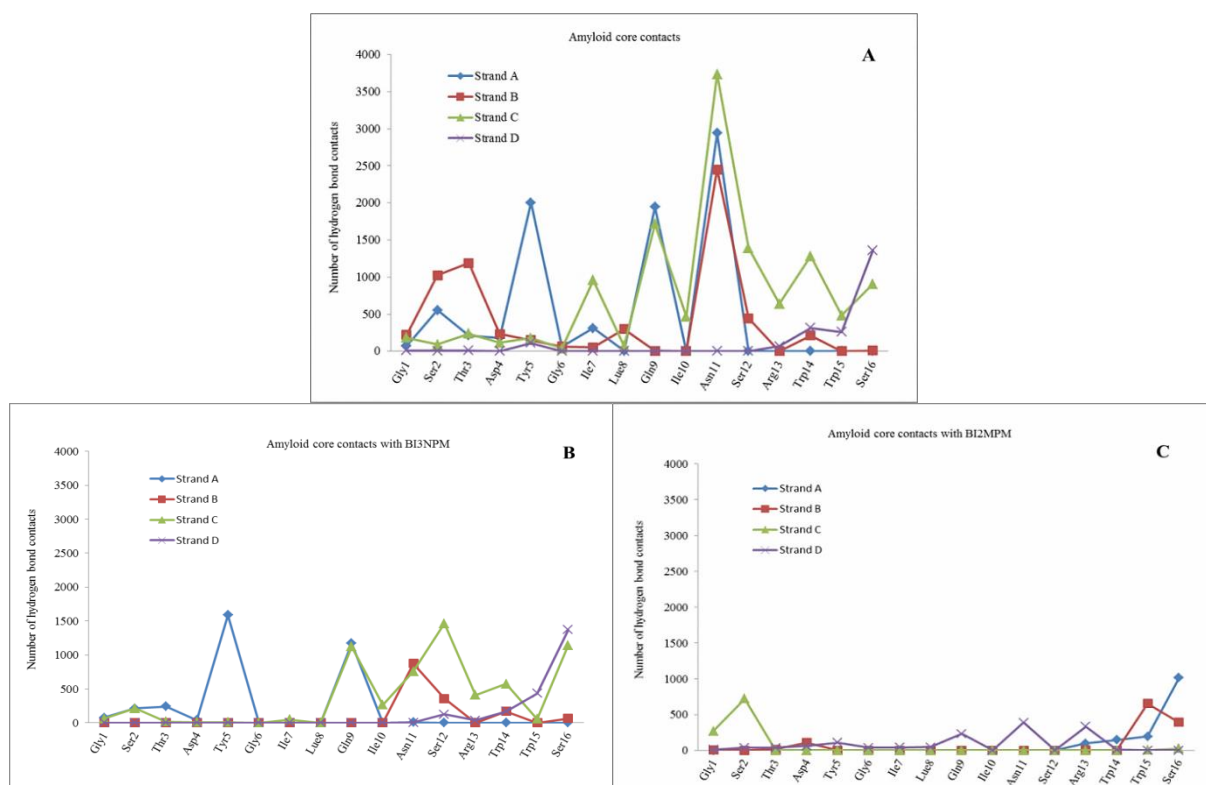
را از 1/68 نانومتر به 2/71 نانومتر افزایش دهد. این امر موید این مطلب است که این لیگاند قادر است با افزایش فاصله‌ی بین هسته‌ها احتمال میانکنش آن‌ها با همدیگر را کاهش دهد و مانع رشد آن‌ها در کنار یکدیگر شود. این در حالی است که لیگاند غیر مهاری BI3NPM با ایجاد فاصله‌ی تقریباً دو نانومتری، قدرت کمتری در ایجاد فاصله بین هسته‌ها دارد (شکل ۶ راست). در راستای تایید این افزایش فاصله، با استفاده از ابزارهای آنالیز تراژکتوری شبیه‌سازی در گرومکس، تعداد تماس‌های بین دو هسته در حالت دو هسته‌ی تنها با حالت‌های حضور لیگاندها در بین هسته‌ها مقایسه شد. با استفاده از ابزار gmx mindist از پکیج gromacs تعداد تماس‌های بین هسته‌ها در فاصله کمتر از شش آنگستروم محاسبه گردید. نتایج این آنالیز نشان داد که تعداد تماس‌های بین دو هسته در حالتی که لیگاند مهاری BI2MPM حضور دارد بسیار کمتر از لیگاند BI3NPM است. این نتیجه، تصدیق کننده‌ی وجود فاصله‌ی بیشتر هسته‌ها در حضور این لیگاند است. در حالی که لیگاند غیرمهاری BI3NPM به این دلیل که قادر نیست فاصله‌ی قابل توجهی بین هسته‌ها ایجاد کند تعداد تماس‌هایی تقریباً نزدیک به حالت دو هسته‌ی بدون لیگاند دارد (شکل ۶ چپ).

شکل ۶: راست: میانگین فاصله بین مرکز جرم هسته‌های پروتئینی در فاصله زمانی ۶۰-۱۰۰ نانوئانیه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در سه حالت دو هسته‌ی پروتئینی تنها بدون حضور لیگاند (2Cores)، هسته‌ی پروتئینی با حضور لیگاند BI3NPM و هسته‌ی پروتئینی با حضور لیگاند BI2MPM. چپ: تعداد تماس‌های ایجاد شده بین دو هسته در سه حالت مذکور در فاصله زمانی ۴۰ نانوئانیه انتهایی شبیه‌سازی.

نقشه‌ی پیوندهای هیدروژنی

معیار مهم دیگری که نشان می‌دهد میانکنش لیگاند با هسته‌ها می‌تواند باعث تداخل در میانکنش بین هسته‌های پروتئینی پیش‌ساز پروتوفیبریل‌ها و در نهایت عدم رشد آنها گردد تعداد پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده بین هسته‌هاست. در

حالاتی که لیگاند حضور ندارد، رزیدوهای رشته‌های بتای دو هسته‌ی مجاور هم قادرند با تشکیل پیوندهای هیدروژنی به استحکام ساختار آمیلوئیدی کمک کنند. این پیوندها در کنار میانکنش‌های فشردگی پای ناشی از حلقه‌های رزیدوهای آروماتیک، باعث استحکام ساختارهای پیش ساز فیبریلی می‌شوند. در این راستا نقشه‌ی پیوند هیدروژنی یک هسته‌ی چهار رشته‌ای بتا با هسته‌ی مشابه دیگر نشان داد که در طول مدت زمان ۱۰۰ نانوثانیه تعداد ۲۹۲۲۸ پیوند هیدروژنی بین رزیدوهای دو هسته تشکیل می‌شود که رزیدوهای ASN11 در اکثر رشته‌ها و GLN9 در رشته‌های A و C و همچنین TYR5 رشته‌ی A با ایجاد بیشترین تعداد پیوندهای هیدروژنی مسئول اصلی پایداری در مدل هسته‌ی آمیلوئیدی هستند. این در حالی است که تعداد میانکنش هسته‌ها با هم دیگر در حضور لیگاند BI3NPM به ۱۳۰۹۵ و در حضور لیگاند BI2MPM به ۴۹۵۶ عدد می‌رسد (شکل ۷). ترجیح توالی ناحیه SER16-GLN9 در هر کدام از رشته‌ها برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی تا حد زیادی در حضور لیگاند BI3NPM حفظ می‌شود. اما در حضور لیگاند BI2MPM اکثر رزیدوهای هر چهار رشته، تمایل زیادی به ایجاد پیوند هیدروژنی ندارند. بنابراین ثابت می‌شود که توانایی لیگاند مهاری BI2MPM در ایجاد فاصله‌ی بیشتر بین هسته‌های آمیلوئیدی، دلیل اصلی تشکیل تعداد کم پیوند هیدروژنی و ناپایداری متعاقب هسته‌ها می‌باشد.



شکل ۷: نقشه‌ی پیوند هیدروژنی بین هسته‌های آمیلوئیدی چهار رشته‌ای برای سه حالت (A) دو هسته بدون حضور لیگاند، (B) در حضور لیگاند BI3NPM و (C) در حضور لیگاند BI2MPM. رزیدوهای ASN11، GLN9 و TYR5 با ایجاد بیشترین تعداد پیوند هیدروژنی با هسته آمیلوئیدی دوم، میانکنش قوی بین هسته‌ها برقرار می‌کنند. در حالت‌های حضور لیگاند، به دلیل ایجاد فاصله‌ی بین هسته‌ها تعداد پیوندهای هیدروژنی کمتری بین هسته‌ها تشکیل شده است.

نتیجه گیری کلی

در تمامی آنالیزهای انجام شده بر روی شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس های مذکور، تفاوت معنی داری بین رفتار دو لیگاند در اندرکنش با هسته های پروتئینی دیده شد. همان طور که اشاره شد تفاوت ساختار مولکولی دو لیگاند تنها در گروه عاملی متصل به حلقه ی بنزن آنهاست که در لیگاند BI2MPM (که توانایی مهار پروسه فیبریلاسیون دارد) یک گروه متیل و در لیگاند BI3NPM (که هیچ قدرت مهاری در این پروسه از خود نشان نمی دهد) یک گروه نیترو بر روی حلقه ی بنزن قرار دارد. بقیه ی ساختار، دو گروه ایندول متصل در دو طرف حلقه بنزن مرکزی هستند که ثابت شده است این حلقه های ایندولی با ساختاری حلقوی و مشابه با گروه ایندول آمینواسید تریپتوفان، توانایی مهار فیبریلاسیون آمیلوئیدی را دارند. مطالعات انجام شده توسط داکینگ مولکولی و شبیه سازی دینامیک مولکولی بر روی پروتئین مدل هسته های اولیه پیش ساز آمیلوئید، در راستای تایید آزمایشات تجربی اثرات این لیگاندها بر روی تجمع آمیلوئیدی پروتئین لیزوزیم است. روش داکینگ مولکولی جایگاه های متفاوتی برای دو نوع لیگاند بر روی پروتئین نشان داد که اتصال لیگاندها به این جایگاه ها عمدتاً با واسطه میانکنش های غیر کووالانی صورت می گیرد. تحقیقات فراوانی بر روی این میانکنش های غیر کووالانی به دلیل اهمیت آنها در موارد تشخیص مولکولی و کاربردهای عملی اکتشاف دارو انجام گرفته است. مشخص شده است که ترکیبات فعال دارویی یک قدرت کافی و اختصاصی برای اتصال لیگاند به گیرنده ی هدف را دارند و این اختصاصی بودن اتصال، ناشی از مناسب بودن خصوصیات شیمیایی لیگاند برای اتصال غیر کووالانی با گیرنده هدفش است (Chen & Kurgan, 2009; Zhou *et al.*, 2012; Gallina *et al.*, 2014). این نوع اتصالات برگشت پذیر، ضعیف و دارای تنوع زیادی است و غالباً بین لیگاندهای کوچک دارویی و زنجیره های جانبی رزیدوهای پاکت اتصال پروتئین تشکیل می شوند. یکی از مهمترین میانکنش های تشکیل شونده بین حلقه های آروماتیک چه بین لیگاند و پروتئین و چه بین خود رزیدوها در داخل پروتئین، میانکنش های فشرده گی پای-پای یا π -Stacking هستند (Sinnokrot *et al.*, 2006). این میانکنش های غیر کووالان جاذبه ای، اگرچه فراوانی پیوندهای هیدروژنی و میانکنش های آب گریز را ندارند اما نقش حیاتی در شکل گیری و سازماندهی درشت مولکول های زیستی ایفا می کنند. این میانکنش ها دارای یک انرژی پیوندی حدود ۲-۳ kcal/mol هستند و عواملی مثل فاصله های میانکنش کننده، ساختار فضایی حلقه ها و نحوه ی قرارگیری سطوح هندسی حلقه ها نسبت به هم (زاویه) در شکل گیری و استحکام آنها نقش مهمی دارند (Janda *et al.*, 1975; Jaffe & Smith, 2002). از طرف دیگر لیگاند مهاری BI2MPM به دلیل داشتن گروه استخلافی غیر قطبی تمایل بیشتری به میانکنش های آب گریز نشان می دهد. نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی نیز نشان داد که این لیگاند می تواند با نفوذ بیشتر به مابین رشته های بتا که زیر واحدهای تشکیل دهنده ی هسته های پیش ساز آمیلوئیدی محسوب می شوند، باعث افزایش فاصله و متعاقب آن کاهش میانکنش و کاهش پایداری رشته ها گردد. این نوع تاثیرات ناپایدارسازی بر روی هسته های پروتئینی، که در

مسير تجمع و تشكيل رشته‌هاى بالغ فيبريلى قرار مى‌گيرند يکى از مهمترين روش‌هاى مهار فرآيند فيبريل شدن در راستای درمان و يا کاهش اثرات بيمارى‌هاى آميلوئيدى به شمار مى‌رود.

منابع

- Abedini, A., Plesner, A., Cao, P., Ridgway, Z., Zhang, J., Tu, L.H., Middleton, C.T., Chao, B., Sartori, D.J., Meng, F., Wang, H., Wong, A.G., Zanni, M.T., Verchere, C.B., Raleigh, D.P. and Schmidt, A.M. (2016). Time-resolved studies define the nature of toxic IAPP intermediates, providing insight for anti-amyloidosis therapeutics. *ELife*, 5:e12977.
- Abraham, M.J., Van.der.Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B. and the GROMACS development team. *GROMACS User Manual*. (2019).
- Armen, R.S. and Daggett, V. (2005). Characterization of two distinct beta2 microglobulin unfolding intermediates that may lead to amyloid fibrils of different morphology. *Biochemistry*, 44: 16098-16107.
- Ayton, G.S., Noid, W.G. and Voth, G.A. (2007). Multiscale modeling of biomolecular systems: in serial and in parallel. *Current Opinion in Structural Biology*, 17: 192-198.
- Baranczak, A and Kelly, J.W. (2016). A current pharmacologic agent versus the promise of next generation therapeutics to ameliorate protein misfolding and/or aggregation diseases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 32: 10-21.
- Berendsen, H.J.C., Postma, J.P.M., van.Gunsteren, W.F., Hermans, J. (1981). Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. Pages 331-342 In: Pullman, B. (eds). *Intermolecular Forces. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry*: Springer.
- Brancolini, G. and Tozzini, V. (2019). Multiscale modeling of proteins interaction with functionalized nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 41: 66-73.
- Buchete, N.V., Tycko, R. and Hummer, G. (2005). Molecular dynamics simulations of Alzheimer's beta-amyloid protofibrils. *Journal of Molecular Biology*, 353: 804-821.
- Buxbaum, J.N. (2003). Diseases of protein conformation: what do in vitro experiments tell us about in vivo diseases? *Trends in Biochemical Science*, 28: 585-592.
- Chauhan, N.B. (2006). Effect of aged garlic extract on APP processing and tau phosphorylation in Alzheimer's transgenic model Tg2576. *Journal of ethnopharmacology*, 108: 385-394.
- Chen, K. and Kurgan, L. (2009). Investigation of atomic level patterns in protein-small ligand interactions. *PLoS One*, 4: e4473.
- Cheng, A. and Merz, K.M. (1996). Application of the Nosé-Hoover Chain Algorithm to the Study of Protein Dynamics. *Journal of Physical Chemistry*, **100**: 1927-1937.
- Chiti, F. and Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, 75: 333-366.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G. and Dobson, C.M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, 424: 805-808.
- Darden, T., York, D. and Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *Journal of Chemical Physics*, 98:10089-10092.

- DeMarco, M.L. and Daggett, V. (2004). From conversion to aggregation: protofibril formation of the prion protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 2293-2298.
- Deng, N.J., Yan, L., Singh, D. and Cieplak, P. (2006). Molecular basis for the Cu²⁺ binding-induced destabilization of beta 2-microglobulin revealed by molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 90: 3865-3879.
- Ding, F., LaRocque, J.J. and Dokholyan, N.V. (2005). Direct observation of protein folding, aggregation, and a prion-like conformational conversion. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 40235-40240.
- Dische, F.E., Wernstedt, C., Westermark, G.T., Westermark, P., Pepys, M.B., Rennie, J.A., Gilbey, S.G. and Watkins, P.J. (1988). Insulin as an amyloid-fibril protein at sites of repeated insulin injections in a diabetic patient. Pages 158-161. *Diabetologia*: Springer.
- Espargaro, A., Castillo, V., de Groot, N.S. and Ventura, S. (2008). The in vivo and in vitro aggregation properties of globular proteins correlate with their conformational stability: the SH3 case. *Journal of Molecular Biology*, 378: 1116-1131.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. and Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, 22: 1302-1306.
- Flores, S.C., Bernauer, J., Shin, S., Zhou, R. and Huang X. (2011). Multiscale modeling of macromolecular Biosystems. Pages 395-405 in *Briefings in Bioinformatics*: Oxford University Press.
- Gallina, A.M., Bork, P. and Bordo, D. (2014). Structural analysis of protein-ligand interactions: the binding of endogenous compounds and of synthetic drugs. *Journal of Molecular Recognition*, 27: 65-72.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D. and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. Pages 571-607 In John M. Walker (ed): *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press.
- Gupta, V.B. and Rao, K.S. (2007). Anti-amyloidogenic activity of S-allyl-L-cysteine and its activity to destabilize Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro. *Neuroscience Letters*, 429: 75-80.
- Han, W. and Wu, Y.D. (2005). A strand-loop-strand structure is a possible intermediate in fibril elongation: long time simulations of amyloid-beta peptide (10-35). *Journal of American Chemical Society*, 127: 15408-15416.
- Hess, B., Bekker, H., Berendsen, H.J.C. and Fraaije, J.G.E.M. (1997). LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry*, 18: 1463-1472.
- Hunter, C.A. and Sanders, J.K.M. (1990). The nature of pi-pi interactions. *Journal of the Chemical Society*, 112: 5525-5534.
- Hunter, C.A., Lawson, K.R., Perkins, J. and Urch, C.J. (2001). Aromatic interactions. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 2: 651-669.
- Jaffe, R.L. and Smith, G.D. (1996). A quantum chemistry study of benzene dimer. *The Journal of Chemical Physics*, 105: 2780-2788.
- Jahn, T.R., Parker, M.J., Homans, S.W. and Radford, S.E. (2006). Amyloid formation under physiological conditions proceeds via a native-like folding intermediate. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13: 195-201.
- Janda, K.C., Hemminger, J.C., Winn, J.S., Novick, S.E., Harris, S.J. and Klemperer, W. (1975). Benzene dimer: A polar molecule. *The Journal of Chemical Physics*, 63: 1419-1421.

- Janiak, C. (2000). Critical account on pi-pi stacking in metal complexes with aromatic nitrogen containing ligands. *Journal of Chemical Society, Dalton Transactions*, 21: 3885-3896.
- Klimov, D.K. and Thirumalai, D. (2003). Dissecting the assembly of Abeta 16-22 amyloid peptides into antiparallel beta sheets. *Structure*, 11: 295-307.
- Ko, S.Y., Chang, K.W., Lin, S.C., Hsu, H.C. and Liu, T.Y. (2007). The repressive effect of green tea ingredients on amyloid precursor protein (APP) expression in oral carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Letters*, 245: 81-89.
- Kueltzo, L.A., Wang, W., Randolph, T.W. and Carpenter, J.F. (2008). Effects of solution conditions, processing parameters, and container materials on aggregation of a monoclonal antibody during freeze-thawing. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97: 1801-1812.
- Kukic, P. and Nielsen, J.E. (2010). Electrostatics in proteins and protein-ligand complexes. *Future Medicinal Chemistry*, 2: 647-666.
- Kumar, V., Sharma, V.K. and Kalonia, D.S. (2009). In situ precipitation and vacuum drying of interferon alpha-2a: development of a single-step process for obtaining dry, stable protein formulation. *International Journal of Pharmaceutics*, 366: 88-98.
- Laskowski, R.A. and Swindells, M.B. (2011). LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 51: 2778-2786.
- Lingenheil, M., Denschlag, R., Reichold, R. and Tavan, P. (2008). The Hot Solvent/Cold Solute Problem Revisited. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 4: 1293-1306.
- Malde, A.K., Zuo, L., Breeze, M., Stroet, M., Poger, D., Nair, P.C., Oostenbrink, C. and Mark, A.E. (2011). An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 7: 4026-4037.
- Maurer-Stroh, S., Debulpaep, M., Kuemmerer, N., Lopez-de-la-Paz, M., Martins, I.C., Reumers, J., Moris, K.L., Copland, A., Serpel, L., Serrano, L., Schymkowitz, J.W. and Rousseau, F. (2010). Exploring the sequence determinants of amyloid structure using position-specific scoring matrices. *National Methods*, 7: 237-242.
- McGaughey, G.B., Gagne, M.R. and Rappe, A.K. (1998). Pi Stacking Interactions Alive and well in proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 273: 15458-15463.
- Mor, A., Ziv, G. and Levy, Y. (2008). Simulations of Proteins with Inhomogeneous Degrees of Freedom: The Effects of Thermostats. *Journal of Computational Chemistry*, 29: 1992-1998.
- Morshedi, D., Rezaei-Ghaleh, N., Ebrahim-Habibi, A., Ahmadian, S. and Nemat-Gorgani, M. (2007). Inhibition of amyloid fibrillation of lysozyme by indole derivatives, possible mechanism of action. *The FEBS Journal*, 274: 6415-6425.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A., Riek, C., Grothe, R. and Eisenberg, D. (2005). Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, 435: 773-778.
- Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundstrom, P., Zarrine-Afsar, A., Sharpe, S., Vendruscolo, M. and Kay, L.E. (2012). Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation. *Science*, 336: 362-366.
- Neves-Petersen, M.T. and Petersen, S.B. (2003). Protein electrostatics: a review of the equations and methods used to model electrostatic equations in biomolecules, applications in biotechnology. *Future Medicinal Chemistry*, 9: 315-95.

- Nguyen, H.D. and Hall, C.K. (2006). Spontaneous fibril formation by polyanalines; discontinuous molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, 128: 1890-1901.
- Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R. and Merlini, G. (2005). Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochimica et Biophysica acta*, 1753: 11-22.
- Park, S. and Saven, J.G. (2006). Simulation of pH-dependent edge strand rearrangement in human beta-2 microglobulin. *Protein Science: a publication of the Protein Society*, 15: 200-207.
- Park, S.Y., Kim, D.S., Cho, E.K., Kwon, B.Y., Phark, S., Hwang, K.W. and Sul, D. (2008). Curcumin protected PC12 cells against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of oxidative damage and tau hyperphosphorylation. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 2881-2887.
- Park, S.Y. and Kim, D.S. (2002). Discovery of Natural Products from *Curcuma longa* that Protect Cells from Beta-Amyloid Insult: A Drug Discovery Effort against Alzheimer's Disease. *Journal of Natural Products*, 9: 1227-1231.
- Parrinello, M. and Rahman, A. (1981). Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied Physics*, 52: 7182-7190.
- Porat, Y., Abramowitz, A. and Gazit, E. (2006). Inhibition of Amyloid Fibril Formation by Polyphenols: Structural Similarity and Aromatic Interactions as a Common Inhibition Mechanism. *Chemical Biology & Drug Design*, 67: 27-37.
- Ramazzotti, M., Melani, F., Marchi, L., Mulinacci, N., Gestri, S., Tiribilli, B. and Innocenti, D. (2016). Mechanisms for the inhibition of amyloid aggregation by small ligands. *Bioscience Reports*, 36: e00385.
- Ramshini, H., Mannini, B., Khodayari, K., Ebrahim-Habibi, A., Moghaddasi, AZ., Tayebbee, R. and Chiti, F. (2016). Bis (indolyl) phenylmethane derivatives are effective small molecules for inhibition of amyloid fibril formation by hen lysozyme. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 124: 361-371.
- Schmid, N., Eichenberger, A.P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A.E. and van.Gunsteren, W.F. (2011). Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *European Biophysics Journal*, 40: 843-856.
- Sharma, S., Ding, F. and Dokholyan, N.V. (2008). Probing protein aggregation using discrete molecular dynamics. *Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library*, 13: 4795-4808.
- Shukla, A.A., Gupta, P. and Han, X. (2007). Protein aggregation kinetics during Protein A chromatography: case study for an Fc fusion protein. *Journal of Chromatography A*, 1171: 22-28.
- Sinnokrot, M.O. and Sherrill, C.D. (2006). High-Accuracy Quantum Mechanical Studies of π - π Interactions in Benzene Dimers. *The Journal of Physical Chemistry A*, 110: 10656-10668.
- Sinnokrot, M.O., Valeev, E.F. and Sherrill, C.D. (2002). Estimates of the ab initio limit for pi-pi interactions: the benzene dimer. *Journal of the American Chemical Society*, 124: 10887-10893.
- Tartaglia, G.G., Cavalli, A., Pellarin, R. and Caflich, A. (2004). The role of aromaticity, exposed surface, and dipole moment in determining protein aggregation rates. *Protein Science*, 13: 1939-1941.
- Tartaglia, G.G., Cavalli, A., Pellarin, R. and Caflich, A. (2005). Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments in polypeptide sequences. *Protein Science*, 14: 2723-2734.
- Tayebbee, R., Amini, M., Abdollahi, N., Aliakbari, A., Rabiei, S. and Ramshini, H. (2013). Magnetic inorganic-organic hybrid nanomaterial for the catalytic preparation of bis (indolyl) arylmethanes under solvent-free

- conditions: preparation and characterization of H5PW10V2O40/pyridino-Fe3O4 nanoparticles. *Applied Catalysis A: General*, 468: 75-87.
- Tipping, K.W., Karamanos, T.K., Jakhria, T., Iadanza, M.G., Goodchild, S.C., Tuma, R., Ranson, N.A, Hewitt, E.W. and Radford, S.E. (2015). PH-induced molecular shedding drives the formation of amyloid fibril-derived oligomers. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112: 5691-5696.
- Tiwari, A., Xu, Z. and Hayward, L.J. (2005). Aberrantly increased hydrophobicity shared by mutants of Cu, Zn-superoxide dismutase in familial amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 280: 29771-29779.
- Tohda, C., Ichimura, M., Bai, Y., Tanaka, K., Zhu, S. and Komatsu, K. (2008). Inhibitory Effects of *Eleutherococcus senticosus* Extracts on Amyloid Induced Neuritic Atrophy and Synaptic Loss. *Journal of Pharmacological Sciences*, 107: 329-339.
- Tozzini, V. (2010). Multiscale modeling of proteins. *Accounts of Chemical Research*, 43: 220-230.
- Trott, O. and Olson, A.J. (2010). AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31: 455-461.
- Tsuzuki, S., Honda, K., Uchimaru, T., Mikami, M. and Tanabe, K. (2002). Origin of attraction and directionality of the pi-pi interaction: model chemistry calculations of benzene dimer interaction. *Journal of American Chemical Society*, 124: 104-112.
- Van.Gunsteren, W.F. and Berendsen, H.J.C. (1988). A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*, 1:173-185.
- Wang, J., Tan, C., Chen, H.F. and Luo, R. (2008). All-atom Computer Simulations of Amyloid Fibrils Disaggregation. *Biophysical Journal*, 95: 5037-5047.
- Waters. M.L. (2002). Aromatic interactions in model systems. *Current Opinion in Chemical Society*, 6 : 736-741.
- Wu, C. and Shea, J.E. (2011). Coarse-grained models for protein aggregation. *Current Opinion in Structural Biology*, 21: 209-220.
- Young, L.M., Cao, P., Raleigh, D.P., Ashcroft, A.E. and Radford, S.E. (2014). Ion mobility spectrometry-mass spectrometry defines the oligomeric intermediates in amylin amyloid formation and the mode of action of inhibitors. *Journal of American Chemical Society*, 136: 660-670.
- Zhou, P., Huang, J. and Tian, F. (2012). Specific noncovalent interactions at protein-ligand interface: implications for rational drug design. *Current Medicinal Chemistry*, 19: 226-238.

Study of Inhibition Potential of Synthetic Bis-Indole compounds on Amyloid Fibrillation by Molecular Simulation methods

K.Khodayari¹, P.Abdolmalaki²

Received:2019.7.13

Accepted:2019.9.1

Abstract

Aggregation of proteins lead to form Amyloid diseases including Alzheimer, Parkinson and Diabetes type II has been increasingly considered recently. Compounds including indole rings are the best Amyloid aggregation inhibitors. Experimental studies have shown that Bis(indolyl)-2-methylphenylmethane (BI2MPM) has a great inhibitory potential on Lysozyme Amyloid fibril formation, While Bis(indolyl)-3-Nitrophenylmethane (BI3NPM) has shown weaker inhibitory power. In this study, the interaction of these two ligands was investigated on amyloid model protein using molecular docking and molecular dynamics simulation techniques. Molecular Docking method showed similar reluctance to both ligands in Amyloid nucleus model but in different binding positions. Molecular dynamics simulation showed that BI2MPM with major degradation on the Beta structure of early fibril precursors, leads to lower interaction. It also increases structural changes in the subtypes of beta-strands and induces instability and stops fibrillation growth, but BI3NPM has minimum changes on the fibrils core structures.

Keywords: Amyloid Diseases, Beta structure, Indole Ring, Molecular Dynamics, Pi interactions.

1- Biophysics, Biological Sciences, Tarbiat Modares, Tehran, Iran

2- Biophysics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran