

## Simulation of Pentapeptide Drug Interaction with $\beta$ -Sheet-Rich Monomers of A $\beta$ Protein for Alzheimer Treatment

V. Khandan<sup>1</sup>, B. Firoozabadi<sup>2\*</sup>, M. S. Saidi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>M.Sc Student, Mechanical Engineering Department, Sharif University of Technology

<sup>2</sup>Professor, Mechanical Engineering Department, Sharif University of Technology

### Abstract

A hallmark of Alzheimer disease (the most common type of dementia in the elderly) is the aggregation and deposition of toxic species ranging from small soluble oligomers to insoluble fibril plaques of Amyloid-Beta protein originates from the cleavage of APP by Beta and Gamma Secretase (Amyloid Hypothesis). An attractive therapeutic approach to treat AD is to identify small ligands capable of binding to A-Beta monomers and reverse its amyloidosis process. Here, a peptide drug having the sequence of GLMVG which has been derived from the C-terminal of A-Beta was used as breaker for a monomer of Beta sheet rich structure. The combination of Docking and Molecular Dynamics methods were used for simulation of drug-receptor interaction. This simulation implied that pentapeptide altered secondary structure of A-Beta monomer and declined its stability. This study proved that pentapeptide is capable to reverse Beta-sheet formation and can be considered as an AD drug in other preclinical studies.

**Keywords:** *Alzheimer's disease (AD), Amyloid Beta (A $\beta$ ),  $\beta$ -Sheet Breaker, Docking, Molecular dynamics (MD)*

انجمن مهندسی پزشکی ایران

\*Corresponding author

Address: Bahar Firoozabadi, Mechanical Engineering Department, Sharif University of Technology, P.O.Box: 11365-9567, Tehran, Iran

Tel: +98 21 66165683

Fax: +98 21 66000021

E-mail: firoozabadi@sharif.edu

## شبیه‌سازی نحوه‌ی اثر داروی پپتیدی بر تجزیه‌ی واحدهای منومری از صفحه‌های توسعه یافته‌ی پروتیین آمیلوئیدتا برای درمان بیماری آلزایمر

وحید خندان<sup>۱</sup>، بهار فیروزآبادی دهقان<sup>۲\*</sup>، محمدسعید سعیدی<sup>۲</sup>  
<sup>۱</sup>دانشجو کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران  
<sup>۲</sup>استاد، دانشکده مهندسی مکانیک، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

### چکیده

مطابق نظریه‌ی آمیلوئید، علت آسیب دیدن سلول‌های عصبی سیستم اعصاب مرکزی در بیماران آلزایمری، تجمع و تشکیل توده‌های پروتیین آمیلوئیدتا است. بدین منوال، تجزیه‌ی صفحه‌های بتا در مرحله‌ی ابتدایی این فرایند به عنوان یک روش درمان مناسب برای این بیماری پیشنهاد می‌شود. دارویی که درین تحقیق مطابق همین هدف استفاده شده، پنج پپتید جداشده از پایانه‌ی کربوکسیل آمیلوئیدتا با توالی گلیسین، لوسین، متیونین، والین و گلیسین است که اثر آن بر یک منومر جدا شده از صفحه‌ی بتای توسعه یافته به عنوان گیرنده، به روش شبیه‌سازی ترکیبی داکینگ و دینامیک مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این شبیه‌سازی نشان می‌دهد که دارو با اتصال به منومر پروتیین آمیلوئیدتا در یک محل پیوند پایدار، ساختار ثانویه‌ی آن را تغییر داده و با حذف عوامل پایدار کننده‌ی ساختار منومر، فرایند تشکیل صفحه‌های بتا را در جهت عکس مسیر پیش‌رفت بیماری سوق می‌دهد. پنتاپتاید به عنوان یک ناپایدار کننده‌ی صفحه‌های تجمع یافته‌ی بتا از پروتیین آمیلوئیدتا معرفی شد. این دارو، می‌تواند در مراحل دیگر روند طراحی آن مورد بررسی قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: آلزایمر، آمیلوئیدتا، شکننده‌ی صفحه‌ی بتا، داکینگ و دینامیک مولکولی

انجمن مهندسی پزشکی ایران

\*عهده‌دار مکاتبات

نشانی: تهران، خیابان آزادی، دانشگاه صنعتی شریف، دانشکده مهندسی مکانیک، صندوق پستی: ۱۱۳۶۵-۹۵۶۷  
 تلفن: ۰۲۱-۶۶۱۶۵۶۸۳-۰۲۱، دورنگار: ۰۲۱-۶۶۰۰۰۲۱-۰۲۱، پیام نگار: firoozabadi@sharif.edu

## ۱- مقدمه

بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است، استفاده از داروهای پپتیدی با توالی‌های مشابه قسمت‌های مختلف آمیلوئیدبتا برای مهار منومرها و یا تجزیه‌ی صفحه توسعه یافته‌ی بتا است [۵].

مطابق این ایده، نخستین بار در سال ۱۹۹۶، با استفاده از توالی لیزین-۱۶-فنیل‌آلانین-۲۲ به عنوان داروی مهارکننده، از تجمع پروتئین آمیلوئید بتا جلوگیری شد [۶، ۷]. در پژوهشی دیگر، مشخص شد که هسته‌ی آب‌گریز لوسین-۱۷-آلانین-۲۱، در نقش داروی مهار کننده‌ی پپتیدی، رشد صفحه‌های بتا و تشکیل ساختارهای فیبری را متوقف کرده و برای نخستین بار اصطلاح شکننده‌ی صفحه‌های بتا<sup>۱۱</sup> به این مهار کننده اطلاق شد [۸، ۹]. بیش‌تر داروهای پپتیدی که تاکنون برای درمان بیماری آلزایمر به کار رفته، بر مهار پایانه‌ی آمین پروتئین آمیلوئیدبتا متمرکز است و همواره به طراحی داروی پپتیدی که توانایی مهار کامل آمیلوئیدبتا برای جلوگیری از تجمع و تشکیل صفحه‌های بتا نیاز دارد تا از نفوذ و ایجاد حفره در سطح غشا ممانعت شود. پنتاپتاید جداشده از ناحیه‌ی آب‌گریز ۳۳ تا ۳۷ پایانه کربوکسیل نخستین بار در سال ۲۰۱۳ توسط پیترز و هم‌کاران طراحی و امکان مهار پروتئین آمیلوئیدبتا با این دارو به‌روش‌های تصویربرداری فلوروسنت<sup>۱۲</sup> و میکروسکوپ الکترونی<sup>۱۳</sup> بررسی شد. پنتاپتاید با مهار منومرهای آمیلوئیدبتا می‌تواند فرایند تجمع و تشکیل توده‌های فیبری را متوقف کند [۱۰]. در سال ۲۰۱۴ به روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، محل‌های تشکیل پیوند این دارو با ساختار منومری غیرتوسعه یافته شناسایی شد و توانایی مهار فرایند توده‌ای شدن با این دارو مورد بررسی قرار گرفت [۱۱]. به هر حال، تاکنون نحوه‌ی تجزیه صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا آمیلوئیدبتا با این دارو نامشخص است.

فرایند طراحی و تأیید یک دارو، مسیری طولانی و پرهزینه است که با آزمایش و بررسی‌های مختلف انجام می‌شود. عمده‌ی این پژوهش‌ها مربوط به مرحله پیش از انجام آزمایش روی انسان است که در اصطلاح به آن مطالعات پیش کلینیکی گفته می‌شود. در سال‌های اخیر، شبیه‌سازی نحوه‌ی

آلزایمر یک بیماری پیش‌رونده‌ی زوال حافظه و دیگر کارکردهای مهم ذهنی است. آلزایمر شایع‌ترین نوع دمانس<sup>۱</sup> (زوال عقل) است. دمانس، گروهی از اختلال‌های مغزی<sup>۲</sup> است که منجر به از دست دادن مهارت‌های فکری و اجتماعی می‌شود. این تغییرات به اندازه‌ای شدید است که می‌تواند زندگی روزمره‌ی فرد را تحت تأثیر قرار دهد. تعداد افراد مبتلا به آلزایمر در سال ۲۰۱۰ حدود ۳۵ میلیون نفر گزارش شده است [۱].

به هر حال، تاکنون علت اصلی بیماری آلزایمر و روش درمان قطعی آن ناشناخته است. داروهای موجود فقط توانایی کنترل و کاهش سیر پیش‌رفت بیماری را دارند. بنابراین، یافتن روشی مناسب برای پیش‌گیری آن و کنترل پیش‌رفت آن از طریق مهار عوامل ایجاد بیماری اهمیت ویژه‌ای دارد [۲]. براساس مطالعه‌های آسیب‌شناختی<sup>۳</sup> و نظریه‌ی آمیلوئید<sup>۴</sup> توده‌های تجمع یافته‌ی محلول<sup>۵</sup> و پلاک‌های فیبری نامحلول<sup>۶</sup> تشکیل شده از پروتئین آمیلوئیدبتا، علت اصلی آسیب دیدن سلول‌های عصبی در مغز افراد آلزایمری است [۱].

آمیلوئیدبتا، پروتئین کوچکی با توالی‌های<sup>۷</sup> ۳۹ تا ۴۳ آمینواسید است که در محیط برون سلولی با تجزیه‌ی پروتئین پیش‌ساز خود توسط آنزیم‌های بتا-ساکراتیز و گاما-ساکراتیز ایجاد می‌شود [۳]. مشخصه‌ی اصلی این پروتئین، ناپایداری شکل منومری آن و تمایل به ایجاد توده‌های تجمع یافته است. اولین مرحله‌ی فرایند توده‌ای شدن، تغییر ساختار ثانویه<sup>۸</sup> از مارپیچ آلفا<sup>۹</sup> به صفحه‌ی بتا است که نتیجه‌ی آن تشکیل صفحه‌های توسعه یافته‌ی<sup>۱۰</sup> بتا خواهد شد [۴].

به دلیل فراوانی و آسیب‌رسانی بیش‌تر توالی ۴۲ آمینواسیدی آمیلوئیدبتا، تمرکز پژوهش‌ها روی این توالی است. یک روش درمانی که براساس نظریه‌ی آمیلوئید برای

<sup>1</sup> Dementia

<sup>2</sup> Neurodegeneration

<sup>3</sup> Pathological studies

<sup>4</sup> Amyloid Hypothesis

<sup>5</sup> Soluble Oligomers

<sup>6</sup> Insoluble Fibril Plaques

<sup>7</sup> Sequences

<sup>8</sup> Secondary structure

<sup>9</sup> Alpha Helix

<sup>10</sup> Beta Sheet Reach

<sup>11</sup> Beta Sheet Breaker (BSB)

<sup>12</sup> Forster Resonance Energy Transfer

<sup>13</sup> Transmission Electron Microscopy

مدل هندسی دارو نیز پس از طراحی و کمیته‌سازی اولیه<sup>۱۸</sup> توسط شبیه‌سازی تعادلی دینامیک مولکولی به مدت ۵ns، ساختار پایدار خود را پیدا کرده‌است. مدل‌های هندسی دارو و گیرنده‌های پروتئینی پس از تهیه در مرحله‌ی بعد در اختیار شبیه‌سازی داکینگ قرار می‌گیرد.

## ۱-۲- شبیه‌سازی داکینگ

واکنش اتصال دارو به گیرنده در مرتبه زمانی نانوثانیه تا ثانیه اتفاق می‌افتد که شبیه‌سازی آن به روش دینامیک مولکولی بسیار پرهزینه و حتا ناممکن است [۱۴]. شبیه‌سازی داکینگ، تمامی برهم‌کنش‌های ممکن را در یک شبکه محاسباتی توزیع می‌کند. براساس روش‌های بهینه‌سازی<sup>۱۹</sup> و تبدیل‌ها برپایه‌ی شبکه<sup>۲۰</sup> ساختارهایی که بهترین رتبه را دارند برای محتمل-ترین حالت‌های تشکیل پیوند بین دو ساختار پروتئینی معرفی را می‌کند. این روش، شبیه‌سازی‌ها را ساده‌تر کرده و بر بسیاری از محدودیت‌های محاسباتی غلبه می‌کند [۱۵]. شبیه‌سازی‌های داکینگ درین پژوهش برای گیرنده‌ی منومری آمیلویدبتا توسط سرور دانشگاه بوستن<sup>۲۱</sup> صورت گرفته‌است [۱۶-۱۸]. درین سرور، ساختارهای پروتئینی به صورت صلب است و تابع هدف آن تمامی برهم‌کنش‌های آب‌گریزی، الکتروستاتیک و واندوالس را در نظر می‌گیرد.

## ۱-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

نتایج داکینگ، هندسه‌ی ورودی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی را دربر می‌گیرد. تمامی شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی به صورت تعادلی، با گام زمانی ۲fs و با شرط مرزی پرپدیو<sup>۲۲</sup> انجام شده‌است [۱۹، ۲۰]. شعاع برش ۱۲Å بوده و کمیته‌سازی اولیه در مدت ۱۰ps است. محیط محلول با ۲۵ تا ۳۰Å لایه گذاری<sup>۲۴</sup> مولکول‌های آب در اطراف ساختارهای سه-بعدی دارو و گیرنده مدل‌سازی شده که این مقدار با توجه به ابعاد پروتئین، برای جلوگیری از خروج دارو یا گیرنده از

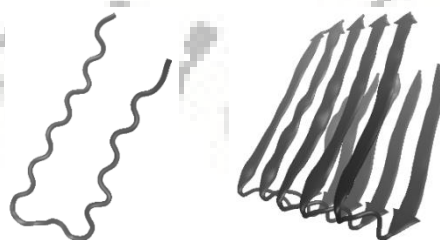
اثر دارو، جای‌گاه ویژه‌ای در بین این مطالعه‌ها پیدا کرده و ابزاری مناسب برای کاهش هزینه‌ی طراحی دارو است [۱۲]. استفاده از داروهای پپتیدی برای درمان انواع سرطان‌ها، بیماری دیابت و دیگر بیماری‌های عصبی مفید است [۱۰]. بدین روی، شبیه‌سازی نحوه‌ی اثر داروی پپتیدی با توالی گلیسین، لیوسین، متیونین، والین و گلیسین (مشابه توالی ۳۳ تا ۳۷ پایانه کربوکسیل پروتئین آمیلویدبتا) روی واحدهای منومری از صفحه‌ی توسعه یافته‌ی بتا و استفاده از آن به عنوان یک شکننده‌ی صفحه‌ی بتای جدید به روش شبیه‌سازی ترکیبی داکینگ و دینامیک مولکولی<sup>۱۴</sup> هدف از انجام این پژوهش است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۱-۲- تهیه مدل هندسی

پروتئین آمیلویدبتا در محیط‌های محلول، ساختار سه‌بعدی واحدی ندارد. این نوع پروتئین‌ها در اصطلاح بدون ساختار ذاتی<sup>۱۵</sup> نامیده می‌شوند و به روش کریستالوگرافی قابل تصویربرداری نیستند. بدین سبب، مدل‌های هندسی این پروتئین به روش‌های تشدید مغناطیسی هسته‌ای<sup>۱۶</sup> و یا دینامیک مولکولی طراحی شده‌اند.

همان طور که در شکل (۱) مشاهده می‌شود، مدل هندسی استفاده شده درین پژوهش برای گیرنده‌ی دارو، واحد منومری جدا شده از ساختار فیبری آمیلویدبتا است که در سال ۲۰۰۵ توسط لوریس و هم‌کاران تهیه شده‌است [۱۳].<sup>۱۷</sup>



شکل (۱)- نمایش مدل‌های هندسی ساختار صفحه‌ی بتای توسعه

یافته (راست) و منومر جدا شده از آن (چپ)

<sup>18</sup> CHIMERA software

<sup>19</sup> Optimization Methods

<sup>20</sup> Grid-base transformation

<sup>21</sup> ClusPro Boston university (BU)

<sup>22</sup> Periodic Boundary Condition

<sup>23</sup> NAMD software

<sup>24</sup> Padding

<sup>14</sup> Molecular Dynamics (MD)

<sup>15</sup> Intrinsically Unstructured

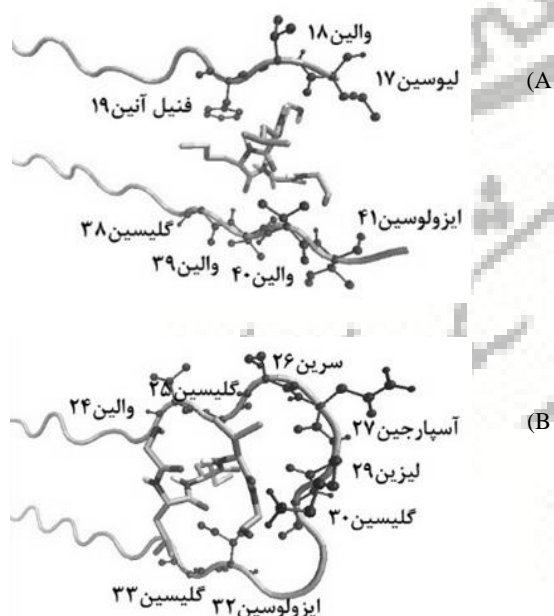
<sup>16</sup> NMR spectroscopy

<sup>17</sup> Pdb ID: 2BEG

ایزولوسین ۴۱ از منومر آمیلویدبتا ۴۲ تشکیل شده است. شش آمینواسید گلیسین ۲۵، سرین ۲۶، آسپارژین ۲۷، لیزین ۲۹، گلیسین ۳۰ و ایزولوسین ۳۲ بین واحدهای والین ۲۴ تا گلیسین ۳۳ از گیرنده آمیلویدبتا، در شکل گیری مد پیوند B دخالت دارند.

### ۳-۱- تحلیل پایداری پیوندهای محتمل

تغییرات ساختارهای هندسی دارو و گیرنده در حین فرایند اثر دارو بسیار مهم و تاثیرگذار است، به طوری که بسیاری از محل‌های مناسب تشکیل پیوند با این تغییرات هندسی آشکار شده و در دسترس دارو قرار می‌گیرند. برای اینکه شبیه‌سازی داکینگ ساختارهای هندسی دارو و گیرنده را به صورت صلب در نظر می‌گیرد، بررسی تغییرات ساختارهای هندسی دارو و گیرنده با این روش ناممکن است. این امکان نیز وجود دارد که دارو در برخی از محل‌های پیش‌بینی شده، از گیرنده جدا شده و با تغییر دادن ساختار هندسی گیرنده، محل پیوند جدیدی را پیدا کند. بدین سبب، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بررسی تغییرات ساختار سه‌بعدی گیرنده و دارو و بررسی پایداری پیوندهای پیش‌بینی شده ضروری است.



شکل (۲) - نمایش نتیجه‌ی شبیه‌سازی داکینگ در اتصال پنتاپتاید

به واحد منومری در دو مد پیوند A و B.

واحد شبیه‌سازی<sup>۲۵</sup> مناسب به نظر می‌رسد. هم‌چنین مدل‌های متفاوتی برای مدل‌سازی اتمی مولکول‌های آب وجود دارد که درین تحقیق از مدل سه‌اتمی صلب<sup>۲۶</sup> به دلیل سادگی و کارایی بالا برای این منظور استفاده شد [۲۱].

پس از اضافه شدن مولکول‌های آب به محیط شبیه‌سازی، یون‌های نمک سدیم کلرید برای خنثی کردن واحد شبیه‌سازی به محلول اضافه شد. واحد پرئودیک به طور تقریبی، مکعبی به ابعاد ۹۰ Å و تعداد ۶۰۰۰۰ اتم است. محاسبه کمیت‌های ترمودینامیکی در دسته جواب ترمودینامیکی تعداد (N)، فشار (P) و دمای (T) ثابت انجام شد. دما و فشار محیط شبیه‌سازی در شرایط بیولوژیک (دمای ۳۱۰°K و فشار ۱atm) ثابت نگه داشته شد. برای ثابت نگه داشتن دما و فشار از ترموستات لانجورین با ضریب دمپینگ<sup>۲۷</sup>  $1\text{ps}^{-1}$  و باروستات لانجورین با دوره نوسانی<sup>۲۸</sup> ۲۰۰fs و مقیاس دمایی دمپینگ<sup>۲۹</sup> ۵۰fs استفاده شد. با استفاده از الگوریتم اولدز<sup>۳۰</sup> محاسبه پتانسیل‌های دوربرد الکتروستاتیک ساده‌تر شد. تمامی پیوندهای یگانه (خطی<sup>۳۱</sup>) اتم‌های متصل به اتم هیدروژن بدون نوسان در نظر گرفته شد.

### ۳- یافته‌ها و بحث

دارویی که درین شبیه‌سازی برای درمان بیماری آلزایمر بررسی شد، توالی گلیسین ۳۳، لیوسین ۳۴، متیونین ۳۵، والین ۳۶ و گلیسین ۳۷ از پایانه‌ی کربوکسیل پروتئین آمیلویدبتا است که هدف استفاده از آن، معکوس کردن فرایند تشکیل صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا است. منومرهای تشکیل دهنده‌ی این ساختار، مشابه یک‌دیگر بوده و ازین نظر، درین پژوهش فقط یکی از منومرها به عنوان گیرنده‌ی دارو در نظر گرفته شد.

شبیه‌سازی داکینگ، دو محل پیوند محتمل برای اثر دارو بر منومر آمیلویدبتا، پیش‌بینی می‌کند. این دو مد پیوند A و B در شکل (۲) نشان داده شده است. براساس نتایج این شبیه‌سازی، مد پیوند A از اتصال دارو به واحدهای لوسین ۱۷، والین ۱۸، فنیل‌آلانین ۱۹، گلیسین ۳۸، والین ۳۹، والین ۴۰ و

<sup>25</sup> Simulation Box

<sup>26</sup> TIP3P

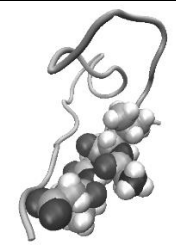

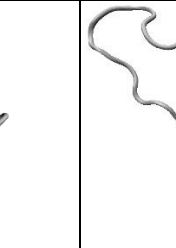
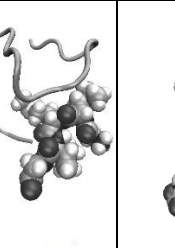
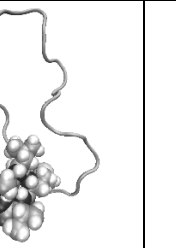
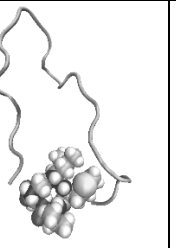
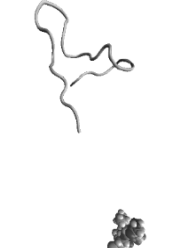
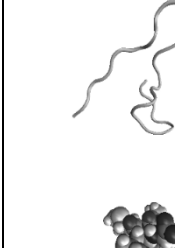
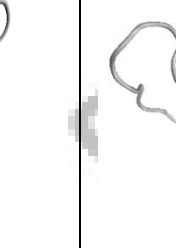

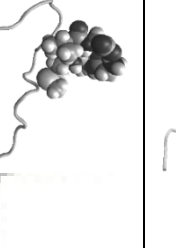
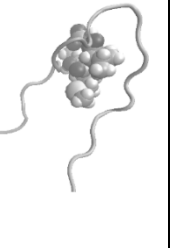
<sup>27</sup> Langevin Damping

<sup>28</sup> Langevin Piston Period

<sup>29</sup> Langevin Piston Decay

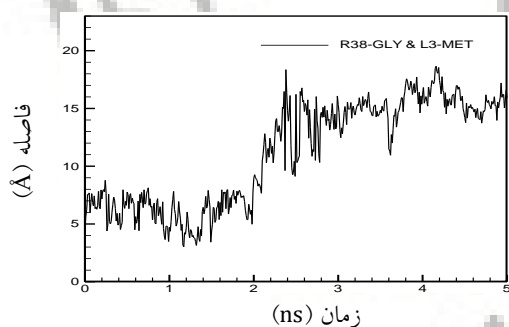
<sup>30</sup> Particle Mesh Ewalds (PME)

<sup>31</sup> Linear Bonds

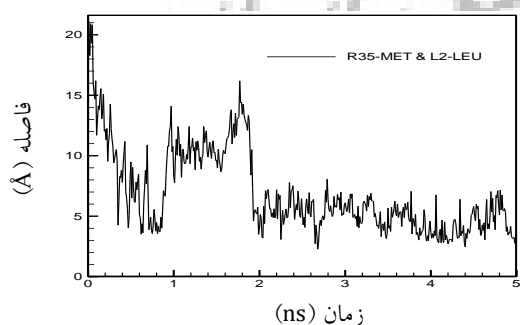
						(A)
						(B)
۵ns	۴ns	۳ns	۲ns	۱ns	۰ns	

شکل (۳) - موقعیت دارو و گیرنده در طول شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای دو محل پیوند A و B: درین شکل تمامی اتم‌های تشکیل دهنده ساختار دارو نشان داده شده، ولی ساختار هندسی گیرنده، فقط با نمایش اتصال اتم‌های بدنه‌ی اصلی واحدهای پروتئینی مشخص شده‌است.

محاسبه شده در طول شبیه‌سازی، به تعادل رسیدن سیستم را نشان می‌دهد.



شکل (۴) - فاصله‌ی بین اتم‌های Ca از واحدهای گلیسین ۳۸ گیرنده و متیونین دارو



شکل (۵) - فاصله‌ی بین اتم‌های Ca از واحدهای لوسین دارو و متیونین ۳۵ از گیرنده

نتیجه‌ی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای این دو مدل پیوند نشان می‌دهد که پنتاپتاید در مدل پیوند A در تمام طول مدت ۵ نانوثانیه از گیرنده جدا نشده‌است (شکل ۳). همچنین مشاهده شد که اتصال بین واحدهای گلیسین ۳۸ از گیرنده منومری و متیونین ۳ دارو پایدار نبوده و با گذشت حدود ۲ نانوثانیه از شروع شبیه‌سازی شکسته شده (شکل ۴) و با پیوند واحدهای لوسین ۲ دارو و متیونین ۳۵ از گیرنده، جای‌گزین می‌شود (شکل ۵).

برخلاف مدل A، مدل پیوند B محل مناسبی را برای اثر دارو بر گیرنده نشان نمی‌دهد. دارو در محل این مدل پیوند، پس از گذشت حدود ۲ نانوثانیه اتصال خود را با گیرنده از دست می‌دهد (شکل ۳) و از گیرنده منومری فاصله می‌گیرد. پایداری دارو در محل پیوند با بررسی نمودارهای انحراف جذر میانگین مربع‌ها<sup>۳۲</sup> تحلیل شد. در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، انحراف جذر میانگین مربع‌ها معیاری از تفاوت دو آرایش فضایی متفاوت است. حالت ابتدایی شروع شبیه‌سازی به عنوان حالت مرجع در نظر گرفته شد و انحراف جذر میانگین مربع‌ها در طول شبیه‌سازی نسبت به این حالت مرجع محاسبه است. هم‌گرا شدن انحراف جذر میانگین مربع‌ها

<sup>32</sup>Root-mean-square Deviation, RMSD



دست آورد، اما مد پیوند B محل مناسبی برای اثر دارو بر منومر آمیلوئیدبتا نیست.

شکل (۶) نشان می‌دهد که مقادیر انحراف جذر میانگین مربع‌ها برای دارو و گیرنده در مد پیوند B تا لحظه‌ی حدود ۲ نانوثانیه رفتار مشابهی دارند، اما پس از این لحظه به دلیل شکستن پیوند، دو نمودار از هم فاصله گرفته و رفتار متفاوتی نسبت به هم پیدا می‌کنند. پس از شکستن پیوند B، منومر در زمان حدود ۳/۵ نانوثانیه پایدار شد، ولی مقادیر انحراف جذر میانگین مربع‌ها برای دارو هم‌گرا نشده و تا پایان شبیه‌سازی، دارو ناپایدار باقی می‌ماند.

### ۳-۲- تحلیل ساختاری پیوندهای فعال

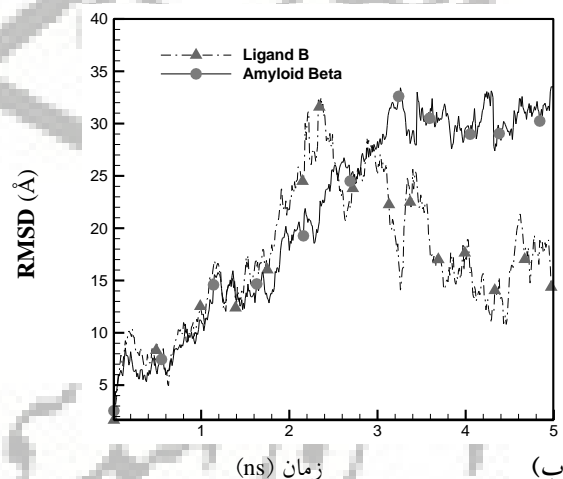
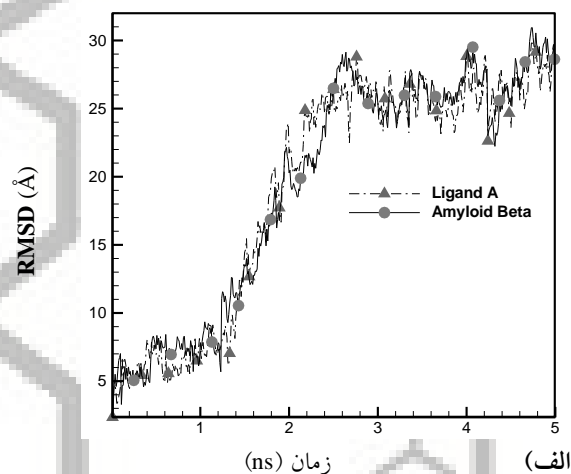
در مراحل پیشین، شبیه‌سازی ترکیبی داکینگ و دینامیک مولکولی محل پیوند فعال A را برای اتصال پنتاپتاید به منومر آمیلوئیدبتا معرفی کرد. درین مرحله، جزئیات ساختاری این محل پیوند پایدار، شامل برهم‌کنش‌های آب‌گریزی و پیوندهای هیدروژنی بین دارو و گیرنده مورد بحث قرار دارد. پیوندهای هیدروژنی پایدار کننده، همواره وجود ندارند و در طول مدت اتصال ساختارهای پروتئینی در بازه‌های زمانی مختلف تشکیل می‌شوند. در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، درصد سکونت یک پیوند هیدروژنی برابر نسبت تعداد دفعات برقراری پیوند به کل زمان پایداری اتصال دو ساختار است.

در جدول (۱)، اطلاعات مربوط به پیوندهای هیدروژنی پایدار کننده‌ی محل پیوند فعال A نشان داده شده‌است. درین جدول فقط پیوندهای با طول کم‌تر از ۴ Å و درصد سکونت بالای ۴۰ نمایش داده شده‌است.

برهم‌کنش‌های آب‌گریزی نیز یکی دیگر از عوامل پایدار کننده‌ی اتصال داروهای پپتیدی به گیرنده‌های پروتئینی است که با بخش‌های غیرقطبی آمینواسیدها ارتباط دارد [۲۲]

در شکل (۷)، برهم‌کنش‌های آب‌گریزی موجود در ساختار تعادلی محل پیوند فعال A در پایان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بازه‌ی طول پیوند ۲/۹ Å تا ۴/۹ Å نشان داده شده‌است.

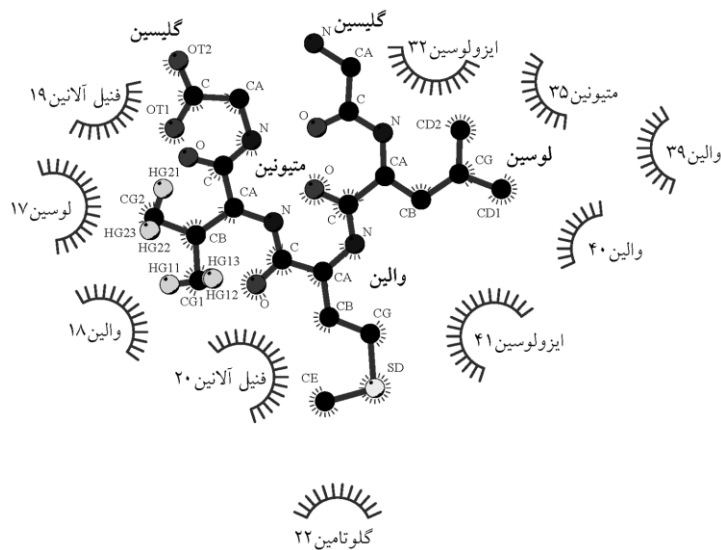
به عبارت دیگر، می‌توان گفت که هم‌گرا بودن نمودار انحراف جذر میانگین مربع‌ها، پایداری را معرفی می‌کند و وجود تشابه در رفتار نمودارهای انحراف جذر میانگین مربع‌ها مربوط به دارو و ناحیه درگیر در پیوند از گیرنده در نتیجه‌ی پایدار بودن مد پیوند مورد نظر است. در محاسبه‌ی انحراف جذر میانگین مربع‌ها برای یک پروتئین، معمولاً اتم‌های غیر هیدروژنی بدنه‌ی اصلی پروتئین در نظر گرفته می‌شوند. درین پژوهش نیز از همین روش استفاده شد.



شکل (۶) - مقادیر RMSD برای دارو و گیرنده؛

(الف) در مد پیوند A؛ (ب) در مد پیوند B

با توجه به نمودار الف در شکل (۶)، برای مد پیوند A مقادیر انحراف جذر میانگین مربع‌ها برای دارو و گیرنده در طی مدت شبیه‌سازی رفتار مشابهی دارد. هر دو ساختار پس از زمان حدود ۳/۵ نانوثانیه پایداری خود را در محیط به



شکل (۷) - نمایش برهم‌کنش‌های آب‌گریزی بین پنتاپپتاید و واحدهای منومر آمیلوئیدبتا در محل پیوند A

ایزولوسین ۳۲ و تجزیه‌ی پل نمکی<sup>۳۴</sup> لیزین ۲۸-آسپارژین ۲۳ است که هر دو از اجزای پایدار کننده‌ی صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا هستند.

در فرایند تشکیل صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا، ساختار ثانویه‌ی پروتئین آمیلوئیدبتا از مارپیچ آلفا (شبهه L) به صفحه بتا (شبهه U) تغییر پیدا می‌کند. مرحله‌ی ابتدایی و انتهایی این فرایند در شکل (۸) نشان داده شده‌است.



شکل (۸) - (الف) ساختار منومر در مرحله‌ی ابتدایی؛ (ب) ساختار منومر در مرحله‌ی انتهایی؛ فرایند تشکیل صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا؛ درین دو ساختار، ناحیه‌ی مرکزی گلیسین ۲۹-ایزولوسین ۳۲ با رنگ روشن تمایز داده شده‌است.

در مرحله انتهایی این فرایند، شکل‌گیری پیچ‌خوردگی بتا در ناحیه‌ی مرکزی گلیسین ۲۹-ایزولوسین ۳۲ باعث پایداری ساختار صفحه‌ی بتا شده و باعث شکل‌گیری توده‌های محلول و پلاک‌های فیبری می‌شود.

جدول (۱) - پیوندهای هیدروژنی بین پنتاپپتاید و واحدهای منومر آمیلوئیدبتا در محل پیوند A

واحد اهدا کننده	واحد دریافت-کننده	درصد سکونت
لوسین ۱۷	گلیسین (دارو)	۹۳٫۴۱
لوسین ۱۷	گلیسین (دارو)	۹۰٫۲۲
لوسین ۱۷	متیونین (دارو)	۸۷٫۲۳
والین ۱۸	لوسین (دارو)	۶۳٫۴۷
ایزولوسین ۴۱	متیونین (دارو)	۶۲٫۰۸
گلیسین ۳ (دارو)	لوسین ۱۷	۶۱٫۲۸
لوسین (دارو)	متیونین ۳۵	۶۱٫۲۸
والین ۱۸	متیونین (دارو)	۵۷٫۸۸
والین ۱۸	متیونین (دارو)	۵۰٫۳
لوسین (دارو)	والین ۳۹	۴۸٫۱
والین ۳۹	لوسین (دارو)	۴۶٫۷۱
ایزولوسین ۴۱	متیونین (دارو)	۴۵٫۵۱
فنیل آلانین ۱۹	والین (دارو)	۴۰٫۱۲

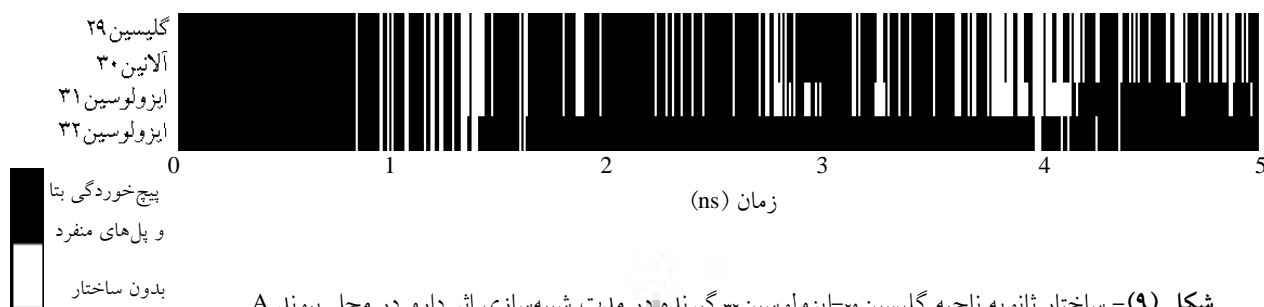
### ۳-۳- تحلیل ساختاری گیرنده

هدف از مطالعه واحد منومری، بررسی نحوه‌ی اثر پنتاپپتاید در تغییر ساختار ثانویه‌ی گردش بتا ۳۳ در توالی لیزین ۲۸ تا

<sup>34</sup> Salt Bridge

<sup>33</sup> B Tum





شکل (۹) - ساختار ثانویه ناحیه گلیسین ۲۹-ایزولوسین ۳۲ گیرنده در مدت شبیه‌سازی اثر دارو در محل پیوند A

هیدروژنی میان واحدهای تشکیل دهنده این دو ناحیه شکسته شده‌اند. با شکسته شدن این پیوندها، ساختار منومر ناپایدار شده و ساختار آن از شکل U (شکل پایدار در صفحه‌ی بتا توسعه یافته) در جهت برگشت فرایند تشکیل صفحه‌های بتا به شکل L (مارپیچ آلفا) متمایل می‌شود.

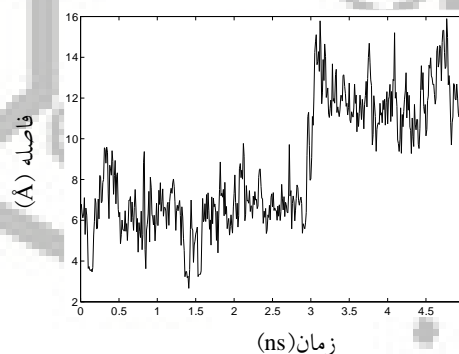


شکل (۱۱) - (الف) نمایش پیوندهای هیدروژنی پایدار کننده‌ی ساختار منومر در ساختار صفحه‌ی بتای توسعه یافته؛ (ب) پس از اثر دارو در محل پیوند A

بر اساس مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ انجام شد، توانایی اتصال پنتاپتاید با توالی گلیسین، لوسین، متیونین، والین و گلیسین به پروتیین آمیلوئید بتا و مهار تجمع پروتیین آمیلوئید بتا به روش تجربی به کمک تصویربرداری با میکروسکوپ الکترونیکی تأیید شده است [۱۰]. نتایجی که درین پژوهش به روش شبیه‌سازی ترکیبی انجام شد، به طور

شکل (۹) نشان می‌دهد پنتاپتاید با اتصال به منومر آمیلوئید بتا در محل پیوند A، ساختار ثانویه‌ی ناحیه‌ی گلیسین ۲۹-ایزولوسین ۳۲ را تغییر داده و پیچ‌خوردگی بتا شکل گرفته درین ناحیه را حذف می‌کند.

پل نمکی لیزین ۲۸-آسپارژین ۳۳ دیگر پارامتر پایدار کننده‌ی منومر آمیلوئید بتا در ساختار صفحه‌ی توسعه یافته‌ی بتا است. همان طور که در شکل (۱۰) نشان داده شده است، این پل نمکی در طول اثر پنتاپتاید در لحظه‌ی ۳ ns شکسته شده و ساختار منومر را ناپایدار می‌کند.



شکل (۱۰) - نمایش طول پیوند نمکی لیزین ۲۸-آسپارژین ۳۳

پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده میان واحدهای گیرنده نیز از دیگر عوامل پایدار کننده‌ی منومر گیرنده در صفحه‌ی توسعه یافته‌ی بتا است. در شکل (۱۱) می‌توان این ساختار را بعد از اثر دارو (لحظه‌ی پایان شبیه‌سازی) با حالتی که جزء تشکیل دهنده‌ی ساختار صفحه‌ی بتای توسعه یافته است (لحظه‌ی شروع شبیه‌سازی) از نظر پیوندهای هیدروژنی پایدار کننده، مقایسه کرد. همان طور که در شکل (۱۱) مشاهده می‌شود، با تأثیر دارو در محل پیوند A، ارتباط بین پایانه‌های کربوکسیل و آمین منومر آمیلوئید بتا حذف شده و پیوندهای

صفحه‌های بتای پروتئین آمیلوئیدبتا، معرفی می‌شود و تأیید می‌کند که این دارو را می‌توان در مراحل دیگر روند طراحی دارو و مطالعات پیش‌کلینیکی مورد بررسی قرار داد.

#### ۵- مرجع‌ها

- [1] J. Hardy, D. J. Selkoe, "The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics" *Science* 297 (5580): 353-356, 2002.
  - [2] S. Musardo, C. Saraceno, S. Pelucchi, E. Marcello, "Trafficking in neurons: Searching for new targets for Alzheimer's disease future therapies" *European Journal of Pharmacology* 719 (1-3): 84-106, 2013.
  - [3] C. R. Harrington, "The Molecular Pathology of Alzheimer's Disease" *Neuroimaging Clinics of North America*. 22 (1): 11-22, 2012.
  - [4] W. M. Tay, D. Huang, T. L. Rosenberry, A. K. Paravastu, "The Alzheimer's Amyloid- $\beta$ (1-42) Peptide Forms Off-Pathway Oligomers and Fibrils That Are Distinguished Structurally by Intermolecular Organization" *Journal of Molecular Biology* 425 (14): 2494-2508, 2013.
  - [5] K. L. Sciarretta, D. J. Gordon, S. C. Meredith, "Peptide-Based Inhibitors of Amyloid Assembly, in *Methods in Enzymology*" K. Indu and W. Ronald, Editors, Academic Press: 273-312, 2006.
  - [6] L. O. Tjernberg, C. Lilliehöök, D. J. Callaway, J. Näslund, S. Hahne, J. Thyberg, L. Terenius, C. Nordstedt, "Controlling amyloid beta-peptide fibril formation with protease-stable ligands" *J Biol Chem* 272 (19): 12601-5, 1997.
  - [7] L. O. Tjernberg, et al. "Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand" *J Biol Chem* 271 (15): 8545-8, 1996.
  - [8] C. Soto, "Alzheimer's and prion disease as disorders of protein conformation: implications for the design of novel therapeutic approaches" *Journal of Molecular Medicine* 77 (5): 412-418, 1999.
  - [9] C. Soto, et al. "Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation" *Biochem Biophys Res Commun* 226 (3): 672-80, 1996.
  - [10] C. Peters, M. S. Kindy, M. Baumann, B. Frangione, "Inhibition of amyloid beta-induced synaptotoxicity by a pentapeptide derived from the glycine zipper region of the neurotoxic peptide" *Neurobiology of aging* 34 (12): 2805-2814, 2013.
- [۱۱] خندان و هم‌کاران، "بررسی مکانیسم مولکولی جلوگیری از تشکیل توده‌های بتا-آمیلوئید توسط پنتاپپتاید به روش شبیه‌سازی داکینگ و دینامیک مولکولی" *مهندسی مکانیک مدرس*، دوره ۱۵، شماره ۱: ۳۹-۴۸، ۱۳۹۳.
- [12] H. Alonso, A. A. Bliznyuk, J. E. Gready, "Combining docking and molecular dynamic

کیفی امکان تشکیل پیوند بین این پنتاپپتاید با پروتئین آمیلوئیدبتا را تأیید می‌کند.

در فرایندهای طراحی دارو، نقش مطالعات شبیه‌سازی<sup>۳۵</sup> در طراحی ترکیب پیشرو<sup>۳۶</sup> و بررسی اثرات تغییرات ساختاری روی آن، برای دستیابی به ساختار نهایی بسیار پررنگ است و یکی از پرهزینه‌ترین مراحل طراحی دارو را به خود اختصاص می‌دهد. طبق پژوهش سال ۲۰۱۰ بروس که با هدف بررسی تأثیر آمینواسید پرولین در تجزیه صفحه‌های بتا توسط پنتاپپتاید LPFFD انجام شد، نحوه‌ی اثر این ترکیب پیشرو با ترکیب جای‌گزین LHFFD به روش شبیه‌سازی ترکیبی داکینگ و دینامیک مولکولی مقایسه شد [۲۳].

درین پژوهش، با معرفی پنتاپپتاید GLMVG به عنوان یک ترکیب پیشرو در درمان بیماری آلزایمر، زمینه را برای شکل‌گیری پژوهش‌های دیگر روی این ترکیب پیشرو را برای رسیدن به ساختار داروی مؤثر فراهم می‌آورد.

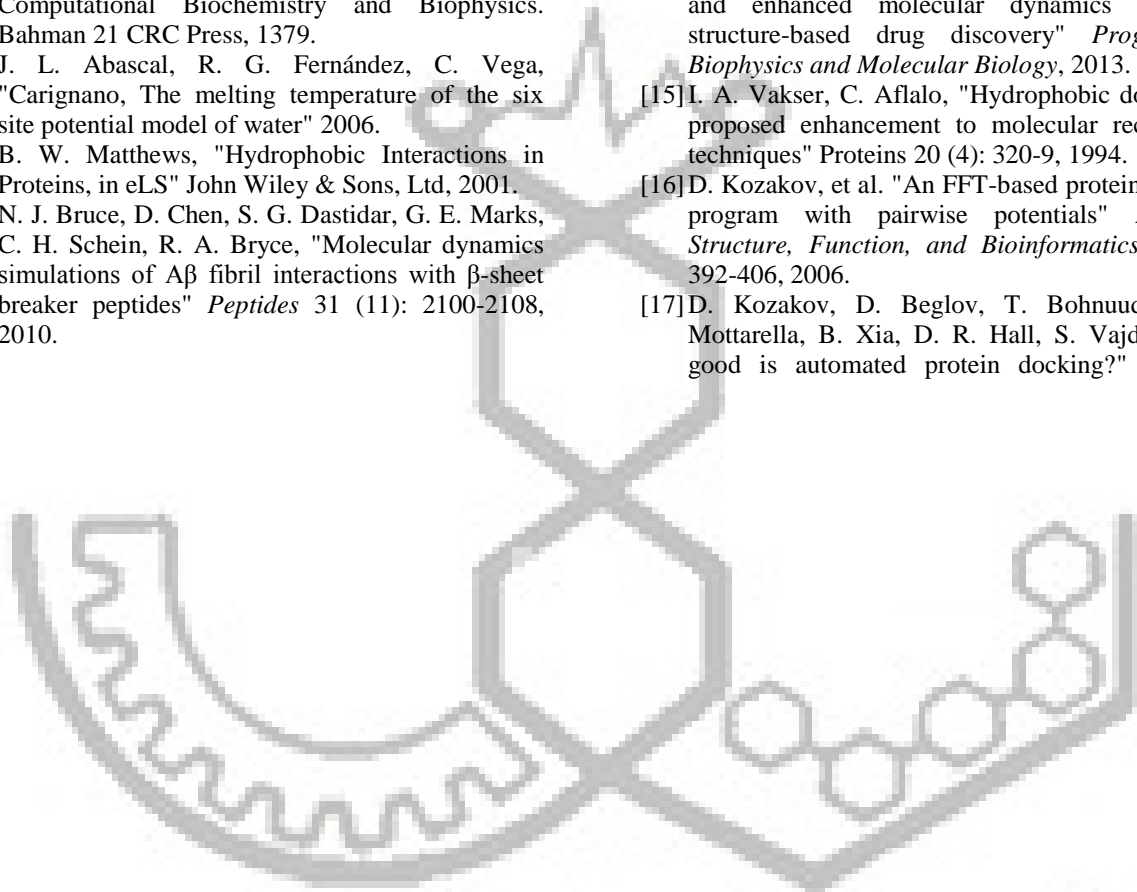
#### ۴- نتیجه‌گیری

تشکیل صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا، اولین مرحله از تشکیل توده‌های محلول و پلاک‌های فیبری نامحلول آمیلوئیدبتا است. یکی از روش‌های پیشنهادی برای درمان بیماری آلزایمر، معکوس کردن فرایند تشکیل این صفحه‌ها است. دارویی که بدین منظور درین پژوهش مورد استفاده قرار گرفت، توالی گلیسین ۳۳ تا گلیسین ۳۷ جدا شده از پایانه‌ی کربوکسیل پروتئین آمیلوئیدبتا است. نحوه‌ی اثر آن به روش ترکیبی داکینگ و دینامیک مولکولی بر یکی از منومرهای تشکیل دهنده‌ی صفحه‌های توسعه یافته‌ی بتا مورد مطالعه قرار گرفت. در نتیجه‌ی این شبیه‌سازی، دارو با اتصال به گیرنده در یک محل پیوند پایدار، ساختار ثانویه آن را تغییر داد. این تغییر، با حذف عوامل پایدار کننده‌ی ساختار منومر (پیچ‌خوردگی بتا، پل نمکی و پیوندهای هیدروژنی پایانه‌های کربوکسیل و آمین) فرایند تشکیل صفحه‌های بتا برای یک منومر تشکیل دهنده در جهت عکس پیش‌رفت بیماری آلزایمر انجام شده است. این پژوهش پنتاپپتاید مذکور را به عنوان یک شکننده‌ی

<sup>35</sup> In Silico Studies

<sup>36</sup> Lead Compound

- Structure, Function and Bioinformatics* 81 (12): 2159-2166, 2013.
- [18] S. R. Comeau, D. W. Gatchell, S. Vajda, C. J. Camacho, "ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking" *Nucleic Acids Research* 32 (suppl 2): 96-99, 2004.
- [19] J. C. Phillips, et al. "Scalable molecular dynamics with NAMD" *Journal of Computational Chemistry* 26 (16): 1781-1802, 2005.
- [20] Computational Biochemistry and Biophysics. Bahman 21 CRC Press, 1379.
- [21] J. L. Abascal, R. G. Fernández, C. Vega, "Carignano, The melting temperature of the six site potential model of water" 2006.
- [22] B. W. Matthews, "Hydrophobic Interactions in Proteins, in eLS" John Wiley & Sons, Ltd, 2001.
- [23] N. J. Bruce, D. Chen, S. G. Dastidar, G. E. Marks, C. H. Schein, R. A. Bryce, "Molecular dynamics simulations of A $\beta$  fibril interactions with  $\beta$ -sheet breaker peptides" *Peptides* 31 (11): 2100-2108, 2010.
- simulations in drug design" *Medicinal Research Reviews* 26 (5): 531-568, 2006.
- [13] T. Lührs, C. Ritter, M. Adrian, D. Riek-Loher, B. Bohrmann, H. Döbeli, D. Schubert, R. Riek, "3D structure of Alzheimer's amyloid- $\beta$  (1-42) fibrils" *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (48): 17342-17347, 2005.
- [14] S. Kalyanamoorthy, Y. P. P. Chen, "Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug discovery" *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 2013.
- [15] I. A. Vakser, C. Aflalo, "Hydrophobic docking: a proposed enhancement to molecular recognition techniques" *Proteins* 20 (4): 320-9, 1994.
- [16] D. Kozakov, et al. "An FFT-based protein docking program with pairwise potentials" *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 65 (2): 392-406, 2006.
- [17] D. Kozakov, D. Beglov, T. Bohnuud, S. E. Mottarella, B. Xia, D. R. Hall, S. Vajda, "How good is automated protein docking?" *Protein:*



انجمن مهندسی پزشکی ایران