

## The Effects of Temperature Changes on Human Prion Protein Conformation Using Molecular Dynamic Simulation

Dayer MR<sup>1\*</sup>, Azari N<sup>2</sup>, Razmi N<sup>3</sup>, Dayer MS<sup>4</sup>

1- Department of Biology, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran.

2- Biochemistry Department, Fars Science& Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

3- Biochemistry Department, Fars Science& Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.

4- Department of Parasitology and Medical Entomology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 5 May 2014, Accepted: 23 Jul 2014

### Abstract

**Background:** Prion diseases are neurodegenerative disorders which ultimately results in the death of their victims. They are caused by structural transformation of cellular prion (PrP<sup>C</sup>) to its  $\beta$ -rich and anomalous isoform (PrP<sup>Sc</sup>) and the accumulation of amyloid fibrillar deposits in the central nervous system. The precise mechanism underlying this conversion is yet to be well understood. This study aimed to investigate the effect of non physiological temperatures on the misfolding mechanism of the human prion protein.

**Materials and Methods:** The crystal structure of human prion protein (90-231), (PDB code: 2Lej) in pdb format was used as a starting structure in this study. Three model structures of this coordinate structure were used separately to simulate PrP<sup>C</sup> at 27°C, 37°C and 47°C. Molecular dynamic simulations were then performed using double-precision MPI version of GROMACS 4.5.5 for 10 ns and the results were analyzed using SPSS software, SPDBV and VebLab programs.

**Results:** The change of temperature from 37°C to 27°C or 47°C induced significant structural changes to PrP<sup>C</sup>. These temperatures caused PrP<sup>C</sup> to attain a more folded and less flexible tertiary structure compared to its native structure at 37°C. They, also, reduce protein-solvent hydrogen bonds and therefore increasing access of hydrophobic solvent to PrP<sup>C</sup> which may be behind the lower water solubility of PrP<sup>C</sup> and its increased resistance to proteolytic degradations.

**Conclusion:** This study shows that changes of temperatures accelerate structural changes of PrP<sup>C</sup> and reduce its solubility while rendering it vulnerable to transition into PrP<sup>Sc</sup>.

**Keywords:** Human Prion Protein, Molecular Dynamic Simulation, Prion Disease, Temperature

\*Corresponding Author:

Address: Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University, Ahvaz, Iran

Email: mrdayer@scu.ac.ir

## بررسی تأثیر تغییرات درجه‌ی حرارت بر کنفورماسیون پروتئین پرئون انسانی به روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

محمد رضا دایر<sup>۱\*</sup>، نوشین آذری<sup>۲</sup>، نعمت اله رزمی<sup>۲</sup>، محمد سعید دایر<sup>۳</sup>

۱- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

۲- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات فارس، فارس، ایران

۴- استادیار، گروه انگل‌شناسی و حشره‌شناسی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۱

### چکیده

**زمینه و هدف:** بیماری‌های پرئونی گروهی از اختلالات تحلیل برنده دستگاه عصبی بوده که منجر به مرگ بیمار می‌شوند. این بیماری‌ها تبدیل پروتئین پرئون سلولی طبیعی ( $\text{PrP}^{\text{C}}$ ) به ایزوفرم غیرطبیعی آن با صفحات بتای فراوان ( $\text{PrP}^{\text{Sc}}$ )، تشکیل و تجمع رشته‌های آمیلوئیدی با مکانیسمی ناشناخته در سلول‌های عصبی را به دنبال دارند. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر افزایش یا کاهش موضعی درجه حرارت بر این فرآیند تبدیل می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه علمی-پژوهشی، ساختار بلوری پروتئین پرئون انسانی از بانک اطلاعات پروتئین (با کد 2LEJ) به عنوان ساختار اولیه استفاده و به طور جداگانه در دماهای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی‌گراد در بازه زمانی ۱۰ نانو ثانیه و با کمک نرم‌افزار گرومکس شبیه‌سازی گردید. نتایج حاصل از شبیه‌سازی با استفاده از دستورات گرومکس از فایل مسیر استخراج و با کمک نرم‌افزارهای SPSS، SPDBV و WebLab تحلیل گردید.

**یافته‌ها:** تغییر درجه حرارت از ۳۷ به ۲۷ یا ۴۷ درجه سانتی‌گراد باعث ایجاد تغییرات قابل توجهی در ساختار  $\text{PrP}^{\text{C}}$  می‌گردد و  $\text{PrP}^{\text{C}}$  ساختار سوم بسیار تاخورد تری در مقایسه با ساختار طبیعی آن در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پیدا می‌کند. علاوه بر این، کاهش در تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پروتئین و حلال در این دو دما میزان سطح قابل دسترس حلال هیدروفوبیک  $\text{PrP}^{\text{C}}$  را افزایش می‌دهد که این می‌تواند دلیلی برای افزایش مقاومت پروتئین به هیدرولیز پروتئولیتیک و کاهش قابلیت انحلال آن در آب باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که تغییرات درجه حرارت باعث تسریع تغییرات ساختاری  $\text{PrP}^{\text{C}}$  و کاهش حلالیت آن می‌شود و آن را مستعد تبدیل شدن به  $\text{PrP}^{\text{Sc}}$  می‌سازد.

**کلمات کلیدی:** پروتئین پرئون انسانی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، بیماری‌های پرئونی، درجه حرارت

\*نویسنده مسئول: اهواز، بلوار گلستان، دانشگاه شهید چمران، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

Email: mrdayer@scu.ac.ir

مقدمه

پروتئین پریون انسانی ( Human Prion Protein) در ساختمان اول یا کووالان خود دارای ۲۵۳ اسید آمینه است. ژن این پروتئین در انسان بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۰ قرار دارد که آن را *PRNP* می نامند (۱). این ژن در بسیاری از سلول ها مانند سلول های عصبی و سیستم ایمنی بیان می شود (۲، ۳). فرم طبیعی این پروتئین، *PrP<sup>C</sup>* (Cellular Prion Protein) نام دارد که دارای یک انتهای آمینی انعطاف پذیر و یک انتهای کربوکسیل سخت و انعطاف ناپذیر است. انتهای آمینی این پروتئین از تعداد زیادی ساختار ثانویه ی نامنظم تشکیل شده است که این ساختمان ها بدون نظم خاصی در کنار هم قرار دارند و باقیمانده های ۸۹-۱ را شامل می شوند. این در حالی است که انتهای کربوکسیلی از سه ماریچ *آلفا* و دو ساختار دوم بتای کوتاه موازی و مختلف الجبهت تشکیل شده است و باقیمانده های ۲۵۳-۹۰ را در بردارد. در این ناحیه یک پیوند دی سولفیدی (بین اسیدهای آمینه ۱۷۹ و ۲۱۴) و دو ناحیه گلیکوزیله (در *Asn-181* و *Asn-197*) وجود دارد که پس از سنتز پروتئین در دستگاه گلژی، فرآیند گلیکوزیلاسیون روی آنها صورت می گیرد. پس از اتمام فرآیند گلیکوزیلاسیون پروتئین به سطح سلول فرستاده می شود تا از طریق انتهای کربوکسیلی خود و به واسطه لنگری از جنس گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول به سطح خارجی غشای پلاسمایی سلول متصل شود (۴-۶). فعالیت و نقش اصلی پروتئین پریون هنوز به درستی روشن نشده است، ولی بر اساس شواهد موجود چند نقش احتمالی از جمله شکل دهی ساختار پوشش میلینی اطراف نوروں ها، شرکت در ارتباطات بین سلولی، پیام رسانی داخل سلولی، محافظت غشا در برابر استرس های اکسیداتیو، آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده سلولی و تنظیم چرخه شبانه روزی خواب و بیداری را برای آن در نظر می گیرند (۷-۹). ایزوفرم غیر طبیعی این پروتئین، *PrP<sup>Sc</sup>* (Scrapie Prion Protein) نام دارد. دو ایزوفرم طبیعی و غیر طبیعی از لحاظ توالی اسیدهای آمینه کاملاً مشابه هستند، و تفاوت آنها در میزان

ساختارهای دوم *آلفا* و بتا است. *PrP<sup>C</sup>*، ۴۲ درصد ماریچ *آلفا* و ۳ درصد بتا دارد، اما *PrP<sup>Sc</sup>* حاوی ۳۰ درصد ماریچ *آلفا* و ۴۳ درصد بتا است (۱۰، ۱۱). مطالعات انجام شده نشان می دهد که *PrP<sup>Sc</sup>* پس از برقراری تماس با *PrP<sup>C</sup>*، با مکانیسمی ناشناخته آن را به فرم هایی مشابه خود تبدیل می کند به طوری که با زیادتر شدن مقدار *PrP<sup>Sc</sup>*، سرعت تکثیر نیز بیشتر می شود. با افزایش تعداد *PrP<sup>Sc</sup>* ها، این پروتئین های غیر طبیعی تمایل خواهند داشت تا به هم متصل شده و رشته های آمیلوئیدی نامحلول ایجاد کنند. رسوب و تجمع رشته های آمیلوئیدی در فضای بین سلولی، سلول های عصبی را دچار آپوپتوزیس یا مرگ برنامه ریزی شده ی سلولی می کند. مرگ سلولی خود سبب ایجاد حفره و ضایعاتی در مغز بیماران می شود که در نهایت باعث اختلالات تحلیل برنده دستگاه عصبی یا بیماری های پریونی می گردند (۱۵-۱۲). مهم ترین این بیماری ها در انسان شامل بیماری کرویتزفلد-یاکوب (CJD)، بیماری خواب کشنده خانوادگی (FFI)، نشانگان گریستمن-اشتراسلر-شنکر (GSS) و بیماری کورو می باشند (۱۶، ۱۷). بیماری های پریونی به سه شکل تک گیر (۸۵ درصد موارد)، خانوادگی (۱۵ درصد موارد) و اکتسابی (کمتر از ۱ درصد موارد) در انسان بروز می یابند که هر سه روند بیماری زایی مشترکی دارند. در موارد تک گیر و خانوادگی جهش ها نقش مهمی دارند؛ اما حالت اکتسابی ناشی از پیوند عضو، وسایل جراحی آلوده، هورمون درمانی و استفاده از غذای آلوده است (۲۰-۱۸). بیماری های پریونی با وجود نادر بودن از اهمیت قابل توجهی برخوردارند، زیرا اتیولوژی و پاتوژنز منحصر به فرد آن ها اصول اساسی زیست شناسی را به چالش کشانده است. علی رغم انجام تحقیقات گسترده بر روی فرآیند غیر طبیعی شدن پروتئین پریون تحت تاثیر عوامل مختلف مانند pH، درجه حرارت و عوامل مختلف دیگر و اثبات دخالت آنها در این فرآیند، متاسفانه هنوز مکانیزم دقیق ملکولی این فرآیند و سهم هر کدام از این عوامل روشن نشده است. از این رو در این تحقیق بر آن شدیم تا به کمک روش دینامیک ملکولی تغییرات ساختاری پروتئین پریون را

علاوه بر دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در دماهای ۲۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد نیز مطالعه قرار دهیم؛ به این امید که بتوانیم جزئیات بیشتری از فرآیند تبدیل را استخراج نماییم. هرچند که دو دمای ۲۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد ممکن است در شرایط طبیعی محقق نشود، ولی علت انتخاب آنها به دو دلیل بود. دلیل اول این است که؛ افزایش یا کاهش ۱۰ درجه‌ای باعث بزرگ نمودن تغییرات ساختاری اعمال شده در پروتئین پریون می گردد. بنابراین احتمال به دام انداختن تغییرات کوچک که ممکن است در فرآیند غیرطبیعی شدن آن نقش تعیین کننده‌ای داشته باشند را افزایش می دهد. دلیل دوم این است که؛ هرچند احتمال وجود این دو درجه حرارت در بخش های وسیعی از بدن موجودات زنده مبتلابه کم است، ولی این امکان وجود دارد که تغییرات دمایی موضعی و شدیدی در محیط های میکرو اتفاق بیافتد که باعث شروع فرآیند غیرطبیعی شدن پریون (هرچند با روندی کند) گردد. نظر به این که فرآیند مورد مطالعه در این تحقیق تغییرات کنفورماسیونی پریون می باشد که به استناد گزارشات متعدد موجود فرآیندی است که در حد نانوثانیه قابل تشخیص است لذا بازه زمانی ده نانوثانیه برای انجام آزمایشات دینامیک ملکول (MD) انتخاب گردید (۲۳-۲۱).

### مواد روش ها

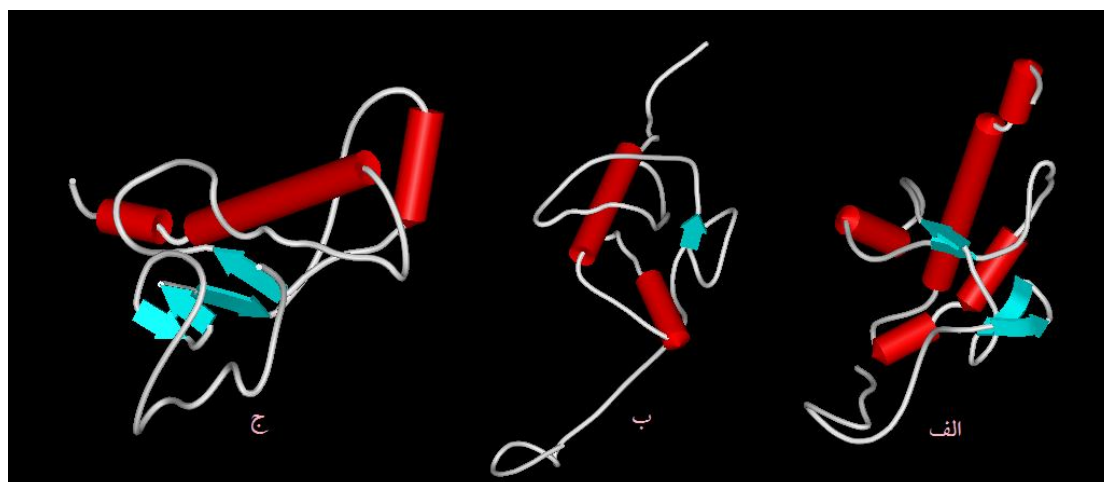
در این مطالعه علمی-پژوهشی، ساختار بلوری پروتئین پریون انسانی با کد شناسایی 2LEJ در قالب فایل متنی از بانک اطلاعات پروتئین، PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) تهیه شد. این فایل محتوی اطلاعات مربوط به موقعیت اتم های پروتئین بوده و نسبت به سایر فایل های موجود کامل ترین توالی را در بر داشت. سه نسخه از این ساختار به طور جداگانه برای انجام شبیه سازی در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد مورد استفاده قرار گرفت. سه ساختار به طور جداگانه در مرکز یک جعبه مستطیلی شکل به ابعاد  $۱۲/۱۵ \times ۵/۳۱ \times ۶/۰۲$  نانومتر قرار داده شدند. سپس جعبه ها توسط ۱۲۴۴۷ ملکول آب (مدل SPC/E) به عنوان حلال پر شدند به طوری که لایه‌ای از آب

به ضخامت حدود ۱ نانومتر اطراف پروتئین را فرا گرفت. شبیه سازی ها با استفاده از نسخه 4.5.5 نرم افزار گرومکس و با استفاده از میدان نیروی GROMOS43a1 در فشار ثابت ۱ اتمسفر، مدت زمان ۱۰ نانوثانیه و گام زمانی ۱ فمتوثانیه انجام گردید. بار سیستم ها قبل از شبیه سازی با اضافه کردن یون های کلر مورد نیاز خنثی گردید. سپس برای اطمینان از پیشرفت صحیح شبیه سازی، سیستم به سطح حداقلی از انرژی (۳۰۰ کیلوژول بر مول) رسانده شد. الگوریتم LINCS برای کنترل طول پیوندها و الگوریتم SETTLE برای محدود کردن هندسه ملکول های آب در تمام شبیه سازی ها استفاده شدند. ترموستات اندرسن، باروستات برنسن و روش PME به ترتیب برای تنظیم دما، فشار و برهم کنش های الکترواستاتیکی به کار برده شد. پس از رسیدن سیستم به حالت تعادلی، نمونه برداری از سیستم به عمل آمد. در نهایت اطلاعات مورد نظر به کمک دستورات گرومکس از فایل مسیر (trajectory) استخراج و تحلیل گردید.

نتایج حاصل جهت تحلیل به نرم افزار اکسل منتقل و شکل ها و جداول در این نرم افزار ایجاد شدند. تحلیل آماری نتایج به کمک نرم افزار SPSS صورت گرفته و سطح معنی داری نیز کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. نرم افزار SPDBV و WebLab برای مشاهده و اصلاح ساختارهای موجود نیز مورد استفاده قرار گرفتند.

### یافته ها

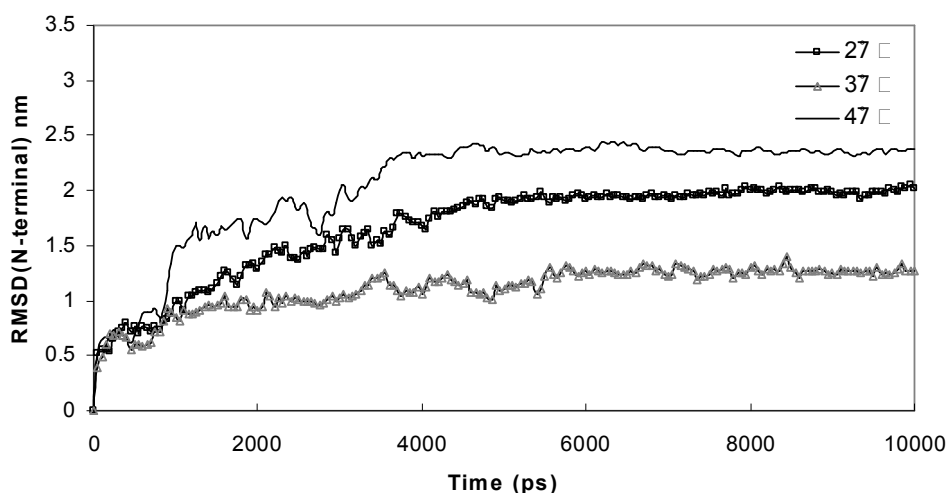
قبل از تحلیل نتایج حاصل از شبیه سازی پریون در دماهای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد، بایستی نگاهی به ساختار نهایی آن بیاندازیم تا از وقوع فرآیند غیرطبیعی شدن مطمئن شویم. همان طور که در شکل ۱ (الف تا ج) ملاحظه می شود؛ در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد (شکل ۱-ب) در دماهای ۲۷ (شکل ۱-الف) و ۴۷ درجه سانتی گراد (شکل ۱-ج) فرایند غیرطبیعی شدن رخ داده و ساختارهای دوم بتا (پیکان های آبی رنگ) در آنها بیشتر شده است. لذا می توان به نتایج حاصل از شبیه سازی اعتماد کرد.



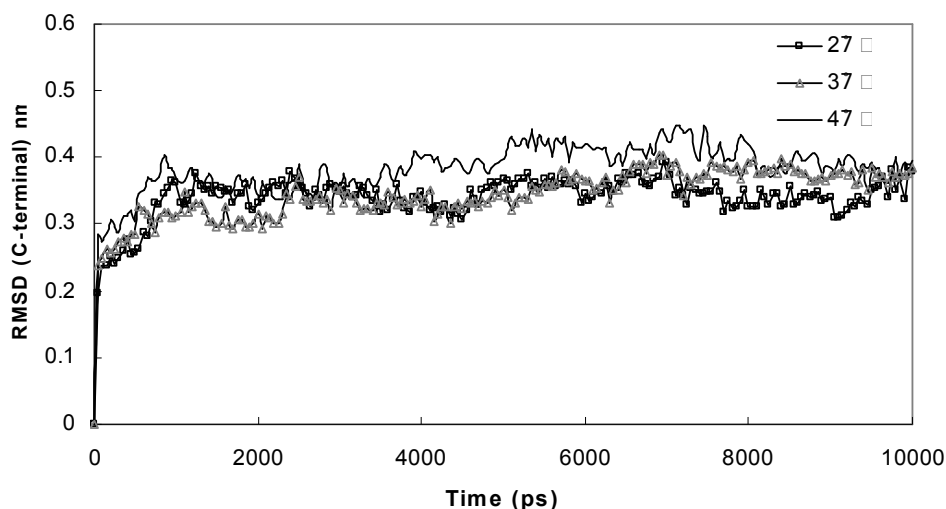
شکل ۱. ساختار PrP<sup>C</sup> پس از شبیه سازی: الف- در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد ب- در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ج- در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد. این ساختارها به کمک نرم افزار WebLab رسم شده اند.

همان طور که در نمودار ۱-الف ملاحظه می شود بیشترین تغییرات RMSD (یا بیشترین تغییرات ساختاری) انتهای آمینی PrP<sup>C</sup> در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به ترتیب مربوط به دماهای ۲۷ و ۴۷ درجه می باشد. این وضعیت در مقیاس کوچک تر برای انتهای کربوکسیل نیز دیده می شود (نمودار ۱-ب). بنابراین PrP<sup>C</sup> در دو دمای ۴۷ و ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، به ترتیب از ساختار فشرده تری برخوردار است. هم چنین با توجه به تغییرات RMSD، PrP<sup>C</sup> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد دارای بیشترین پایداری و کمترین تغییرات ساختاری و در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد بالعکس است.

یک معیار رایج برای ارزیابی شبیه سازی دینامیک ملکولی و اطمینان از صحت آن، تعیین میزان انحراف معیار جذر میانگین مربعات اسکلت پروتئین (RMSD) نسبت به ساختار اولیه آن در طول زمان شبیه سازی است. این پارامتر شاخصی از میزان خوب بودن شبیه سازی و حصول یا عدم حصول حالت تعادلی در سیستم شبیه سازی شده می باشد. در حالت تعادل مقدار تغییرات RMSD اتم های اسکلت پروتئین بایستی کمتر از ۲ آنگستروم باشد. هر قدر میزان RMSD برای یک یا گروهی از اتم ها در طول شبیه سازی بیشتر باشد، میزان تغییرات ساختاری آنها در طی شبیه سازی بیشتر خواهد بود (۲۴).



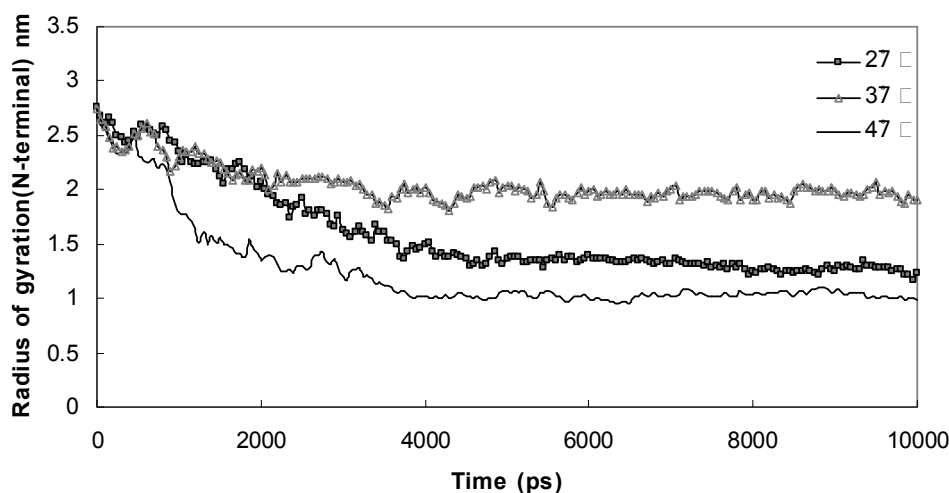
نمودار ۱. الف. تغییرات مقدار RMSD انتهای آمینی PrP<sup>C</sup> در طول شبیه سازی نسبت به ساختار اولیه ی آن در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه ی سانتی گراد.



نمودار ۱. ب. تغییرات مقدار RMSD برای انتهای کربوکسیل PrP<sup>C</sup> در طول شبیه سازی نسبت به ساختار اولیه ی آن در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه ی سانتی گراد.

به دو دمای دیگر بزرگ تر است. هم چنین Rg در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به ۴۷ درجه سانتی گراد بزرگتر است. از آنجا که با افزایش اندازه شعاع چرخشی، سرعت تا خوردن پروتئین کاهش یافته و پروتئین ساختار بازتری پیدا می کند (۲۵)، PrP<sup>C</sup> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۴۷ درجه سانتی گراد از ساختار بازتری برخوردار است.

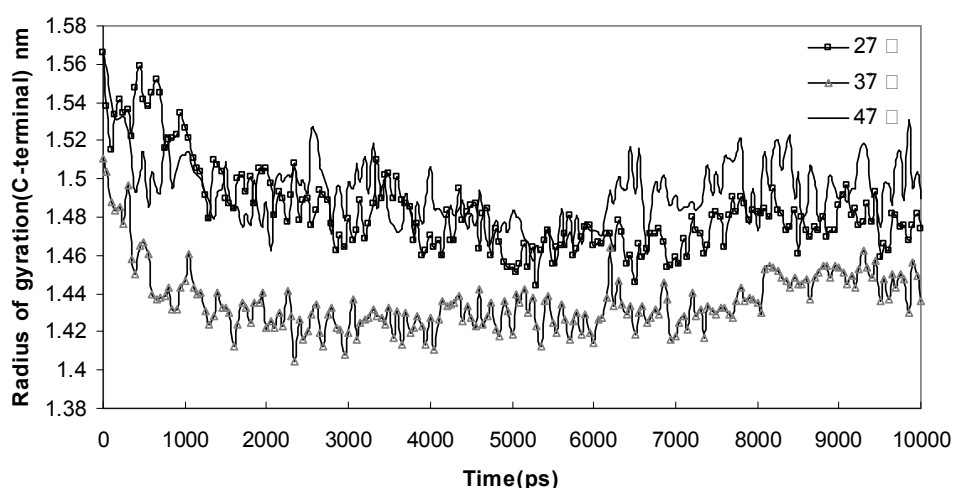
نمودارهای ۲-الف و ۲-ب تغییرات شعاع چرخشی (Radius of gyration) انتهای آمینی و کربوکسیلی PrP<sup>C</sup> را در طول شبیه سازی را نشان می دهند. شعاع چرخشی مقیاسی از شعاع پروتئین است. برای پروتئین های کروی هر قدر شعاع چرخشی بزرگتر باشد فشردگی ساختاری پروتئین کمتر است و بالعکس (۲۵). انتظار می رود که تغییر دما، باعث تغییر شعاع چرخشی و در نهایت تغییر ساختمان پروتئین گردد. با توجه به نمودار ۲-الف، شعاع چرخشی PrP<sup>C</sup> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نسبت



نمودار ۲. الف. تغییرات شعاع چرخشی (Radius of gyration) مربوط به انتهای آمینی PrP<sup>C</sup> نسبت به اسکلت ساختاری آن در طول شبیه سازی در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه ی سانتی گراد.

بیشتر از قطعه N-ترمینال است که این امر بیان گر ناپایداری این ناحیه از ساختار PrP<sup>C</sup> است. همان طور که مشاهده می شود، شدت تغییرات در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد بیشتر است. بنابراین انتهای کربوکسیلی PrP<sup>C</sup> در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۷ درجه سانتی گراد ناپایدارتر است. هم چنین با مقایسه میزان تغییرات Rg در دو ناحیه C-ترمینال و N-ترمینال می توان نتیجه گرفت که ناحیه C-ترمینال نسبت به تغییرات دما حساس تر از ناحیه N-ترمینال است.

با توجه به نمودار ۲-ب، شعاع چرخشی PrP<sup>C</sup> در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر بزرگ تر است. هم چنین Rg در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۷ درجه سانتی گراد بزرگ تر است. با وجود این که تغییرات شعاع چرخشی C-ترمینال الگوی متفاوتی نسبت به قطعه N-ترمینال نشان می دهد، PrP<sup>C</sup> در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر و در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از ساختار فشرده تری برخوردار است، زیرا فشردگی حاصل از قطعه N-ترمینال بر باز شدگی دومین C-ترمینال غلبه می کند. از طرف دیگر شدت تغییرات Rg در دومین C-ترمینال بسیار



نمودار ۲-ب. تغییرات شعاع چرخشی (Radius of gyration) مربوط به انتهای کربوکسیلی PrP<sup>C</sup> نسبت به اسکلت ساختاری آن در طول شبیه سازی در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد.

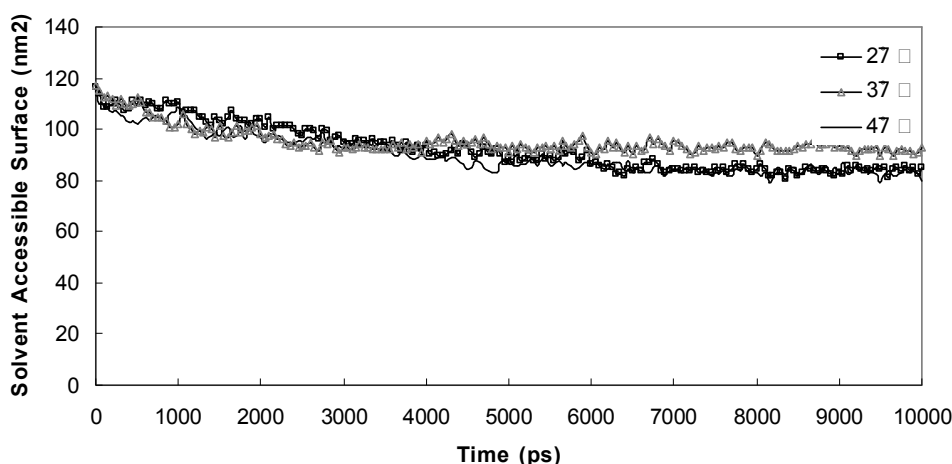
۳۷ درجه سانتی گراد ساختار هیدراته تری نسبت به دو دمای دیگر دارد. میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-حلال در این دما، برابر ۳۱۴ و در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد، به ترتیب برابر ۳۰۳ و ۳۰۰ است. علاوه بر این، میانگین تعداد پیوندهای هیدروژنی پروتئین-پروتئین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برابر ۹۱ و در دو دمای دیگر به ترتیب برابر ۹۸ و ۸۹ است. به طور کلی تعداد پیوندهای هیدروژنی دمای ۳۷ درجه سانتی گراد از دو دمای دیگر بیشتر است. در نتیجه بیشتر اسیدهای آمینه هیدروفوب در سطح داخلی آن قرار گرفته اند. به همین دلیل

تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین باقیمانده های آمینواسیدی ساختار دوم و یا سوم پروتئین از یک طرف و بین باقیمانده های آمینواسیدی پروتئین و ملکول های حلال از طرف دیگر، منعکس کننده برخی از ویژگی های ساختاری پروتئین است. تغییرات پیوندهای هیدروژنی در طول شبیه سازی یک شاخص مفید برای پیگیری حوادث متوالی ای است که منجر به بی ثباتی پروتئین می گردند. بررسی این تغییرات و محاسبه تعداد پیوندهای هیدروژنی با اجرای برنامه hbond گرومکس صورت گرفت. اطلاعات حاصل از این برنامه نشان می دهند که PrP<sup>C</sup> انسانی در دمای

نظر کرد. با توجه به این که تغییرات دما باعث تغییر ساختار پروتئین می شود، انتظار می رود این تغییر ساختاری باعث کاهش یا افزایش حلالیت آن شود. همان طور که در نمودار ۳ ملاحظه می شود سطح قابل دسترس حلال  $PrP^C$  در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد از دو دمای دیگر بیشتر است. کاهش سطح قابل دسترس حلال  $PrP^C$  در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد، کاهش حلالیت و فشردگی ساختاری بیشتری را به دنبال خواهد داشت. این امر خود تأییدی برای یافته های فوق است.

$PrP^C$  در این دما بیشترین برهم کنش را با ملکول های حلال دارد. از طرف دیگر،  $PrP^C$  در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد تمایل بیشتری برای ایجاد پیوندهای هیدروژنی درون ملکول دارد. افزایش پیوندهای هیدروژنی درون ملکول باعث تشکیل ساختار تاخورد تری می شود.

نمودار ۳، تغییرات سطح قابل دسترس حلال (SAS) را برای  $PrP^C$  در طول شبیه سازی نشان می دهد. SAS از پارامترهای مهم در بررسی ساختار پروتئین و تغییرات حلالیت آن می باشد. با استفاده از میزان تغییرات این پارامتر می توان در خصوص شیوه تغییرات ساختاری اظهار



نمودار ۳. تغییرات سطح قابل دسترس حلال (Solvent Accessible Surface Area- SAS)  $PrP^C$  در طول شبیه سازی در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه ی سانتی گراد.

جدول ۱. تغییرات ساختارهای دوم  $PrP^C$  در طول شبیه سازی به مدت ۱۰ نانوثانیه و در pH خنثی، فشار یک اتمسفر و در جعبه ای از آب SPC/E در سه دمای ۲۷، ۳۷ و ۴۷ درجه سانتی گراد.

ساختار دوم	درصد تغییرات در ۲۷ درجه سانتی گراد	درصد تغییرات در ۴۷ درجه سانتی گراد
مارپیچ آلفا	+۷	-۵
ساختار دوم بتا	+۱	+۲
ساختارهای نامنظم	-۸	+۲

جدول ۱، تغییرات ساختار دوم  $PrP^C$  را در طول شبیه سازی در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نشان می دهد. این داده ها از ساختارهای بلوری  $PrP^C$  قبل و بعد از شبیه سازی MD و با استفاده از نرم افزار (<http://www.expasy.org/spdbv>) به دست آمد. بر اساس این اطلاعات، نوسانات دما در محدوده ذکر شده می تواند باعث افزایش ساختارهای دوم بتا در  $PrP^C$  شود. اما این اثر در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد بیشتر مشهود است.

### بحث

مطالعه بیولوژی پریون ها یک حوزه در حال گسترش از تحقیقات بیوشیمیایی را شامل می شود زیرا که



عوامل موثر در فرآیند هم چنان ناشناخته باقی مانده است. پروتئین ها تنها شکلی از موجودات هستند که اصول اصلی زیست شناسی را می شکنند و بر خلاف تمام اشکال حیاتی دیگر برای تکثیر به وجود DNA یا RNA وابسته نیستند با وجود آن که پروتئین ها صرفاً از پروتئین تشکیل شده اند، می توانند از روی پروتئین های طبیعی ساختارهای شبیه خود را بازسازی کنند. به این ترتیب که پس از برقراری تماس بین  $PrP^C$  و  $PrP^{Sc}$ ، این پروتئین پروتئین های طبیعی را به انواع مشابه خود تبدیل می کند. در نهایت پلیمریزه شدن و رسوب این پروتئین ها صورت رشته های آمیلوئیدی نامحلول در سلول های عصبی باعث تخریب این سلول ها می گردد. در اینجا می توان به برخی از شواهد تائید کننده موضوع اشاره کرد:

۱-  $PrP^{Sc}$  دارای ساختارهای دوم بتای فراوان و زنجیره های آلفای کمتری نسبت به  $PrP^C$  است. هم چنین  $PrP^{Sc}$  یک پروتئین نامحلول و مقاوم به پروتئاز سلولی است که این امر می تواند توجه کننده وجود رشته های آمیلوئیدی در مغز بیماران باشد.

۲- بیماری در حیواناتی که فاقد ژن  $PRNP$  هستند ظاهر نمی شود. یعنی امکان ایجاد  $PrP^{Sc}$  در این حیوانات وجود ندارد. لذا تکثیر پروتئین ها اتفاق نمی افتد. این مشخص می کند پروتئین حاصل از این ژن در بیماری زایی نقش دارد.

بررسی تغییرات RMSD انتهای آمینی (نمودار ۱-الف) نشان می دهد که افزایش یا کاهش درجه حرارت نسبت به دمای طبیعی تغییرات زیادی در این بخش از پروتئین می دهد که می تواند منشاء تغییرات ساختاری در فرآیند غیرطبیعی شدن پروتئین باشد. این مشاهده با یافته های دیگران کاملاً مطابقت دارد (۲۸-۲۶). نمودار ۱-ب تغییرات این پارامتر را برای دومین گروهی که همان انتهای کربوکسیلی پروتئین نشان می دهد. به دلیل پایداری ساختاری این دومین میزان تغییرات RMSD نسبت به انتهای آمینی به مراتب کمتر است، ولی در هر صورت میزان تغییرات در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد محسوس تر است. از روی نمودارهای ۲-الف و مشاهده فایل مسیر مشخص گردید که انتهای آمینی

در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر از حالت خطی دورتر شده، روی دومین کربوکسیلی تا شده و برهمکنش بیشتری با آن می دهد و لذا تغییرات ساختاری بیشتری در آن ایجاد می کند. به همین ترتیب دمای ۲۷ درجه سانتی گراد در درجه دوم قرار می گیرد. نمودار ۲-ب که تغییرات شعاع چرخشی انتهای کربوکسیلی را نشان می دهد، این ادعا را روشن می کند. برهم کنش بیشتر انتهای آمینی با انتهای کربوکسیلی در دو دمای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد نسبت به ۳۷ درجه سانتی گراد باعث القاء تغییرات شدیدتر در انتهای کربوکسیلی می شود که در نهایت باعث به هم خوردن ساختار و افزایش شعاع چرخشی می گردد. این اتفاق می تواند به تغییر ساختار دوم پروتئین منجر شود، یافته ای که با داده های نمودارهای ۱-الف و ۱-ب کاملاً همخوانی داشته و با گزارشات موجود در این زمینه تطابق دارد. هر چند که بعضی از محققین میزان این تغییرات را کم در نظر می گیرند (۲۸-۲۶).

منحنی های RMSD (نمودار ۲) و شعاع چرخشی (gyration) (نمودار ۳) مربوط به دومین های N-ترمینال و C-ترمینال در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد تغییرات ساختاری بیشتری برای  $PrP^C$  نشان دادند. ارتباط نزدیک بین RMSD و gyration این دو دومین با یکدیگر، ممکن است دلیلی بر اثر القایی دومین N-ترمینال بر دومین C-ترمینال باشد. این نکته نیز قابل توجه است که تغییرات RMSD و شعاع چرخشی در دمای ۴۷ درجه سانتی گراد از دو دمای دیگر بیشتر است.

محاسبه پیوندهای هیدروژنی تشکیل شده بین ریشه های پروتئین و ملکول های حلال نشان دهنده ی کاهش معنی داری ( $p < 0/005$ ) در پیوند هیدروژنی پروتئین-حلال و افزایش قابل توجهی ( $p < 0/005$ ) در پیوندهای هیدروژنی پروتئین-پروتئین (مقدار  $p < 0/001$ ) در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد است. این تغییر در الگوی پیوند هیدروژنی تمایل  $PrP^C$  را به داشتن یک ساختار متراکم تر با افزایش پیوندهای هیدروژنی بین ملکول افزایش می دهد. این امر منجر به تشکیل پروتئینی با حلالیت کمتر

## تشکر و قدردانی

در پایان از تمامی افرادی که ما را در انجام این طرح یاری نمودند تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## منابع

1. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. *American journal of human genetics*. 1991; 49(2):320-9.
2. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. *Physiological reviews*. 2008;88(2):673-728.
3. Bradford BM, Mabbott NA. Prion disease and the innate immune system. *Viruses*. 2012;4(12):3389-419.
4. Sakaguchi S. Molecular biology of prion protein and its first homologous protein. *J Med Invest*. 2007;54(3/4):211-23.
5. Mead S. Prion disease genetics. *European Journal of Human Genetics*. 2006;14(3):273-81.
6. Yin S, Pham N, Yu S, Li C, Wong P, Chang B, et al. Human prion proteins with pathogenic mutations share common conformational changes resulting in enhanced binding to glycosaminoglycans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007; 104(18): 7546-51.
7. Perez-Pineiro R, Bjorndahl TC, Berjanskii MV, Hau D, Li L, Huang A, et al. The prion protein binds thiamine. *FEBS Journal*. 2011; 278(21): 4002-14.
8. Linden R, Cordeiro Y, Lima LMT. Allosteric function and dysfunction of the prion protein. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2012; 69(7): 1105-24.
9. Kovacs GG, Budka H. Molecular pathology of human prion diseases. *International journal of molecular sciences*. 2009;10(3):976-99.
10. Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y. Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. *Biophysical journal*. 2003; 85(2): 1176-85.
11. Alonso DO, DeArmond SJ, Cohen FE, Daggett V. Mapping the early steps in the pH-induced conformational conversion of the prion

است. در حالی که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، PrP<sup>C</sup> دارای ساختار هیدراته تری (دارای بیشترین پیوند هیدروژنی پروتئین - حلال) نسبت به دو دمای دیگر است. تغییرات سطح قابل دسترس حلال (SAS) یک شاخص مفید برای نشان دادن وضعیت تاخوردگی پروتئین در طول شبیه سازی است که افزایش آن با گذشت زمان به عنوان باز شدگی یا کاهش تاخوردگی پروتئین محسوب می شود. با توجه به نمودار ۳، تغییر قابل توجهی در سطح قابل دسترس حلال PrP<sup>C</sup> در دماهای ۲۷ درجه سانتی گراد و ۴۷ درجه سانتی گراد دیده نمی شود اما در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با گذشت زمان افزایش یافته است. از طرف دیگر سطح قابل دسترس حلال PrP<sup>C</sup> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد نسبت به دو دمای دیگر بیشتر است که تأیید کننده ساختار بازتر و هیدراته تر PrP<sup>C</sup> در این دما می باشد. این یافته ها بیان گر آن است که در روند تبدیل PrP<sup>C</sup> به PrP<sup>Sc</sup> در محدوده ی دمایی مورد بررسی، تغییرات ساختاری PrP<sup>C</sup> با دناتوراسیون پروتئین همراه نیست. تغییرات موضعی درجه حرارت بدن می تواند در تبدیل PrP<sup>C</sup> به PrP<sup>Sc</sup> نقش داشته باشد. این تغییرات صرفاً در جهت تبدیل مارپیچ های آلفا به ساختارهای دوم بتا نبوده و کل ساختار را تحت تأثیر قرار می دهند. تغییرات افزایشی اثر قابل توجه تری در این مورد خواهند داشت. از مطالعاتی که در این زمینه صورت گرفته است می توان به بررسی رفتار PrP<sup>C</sup> با استفاده از روش های الکتروشیمیایی اشاره کرد. نتایج حاصل از این روش ها، رابطه مثبت گذشت زمان و افزایش درجه حرارت را با تغییرات قابل توجه ساختاری PrP<sup>C</sup> نشان می دهند (۲۹).

## نتیجه گیری

نتایج نشان می دهد که تغییرات درجه حرارت باعث تسریع ساختاری prp<sup>C</sup> و کاهش حلالیت آن می شود و آن را مستعد تبدیل شدن به PrP<sup>Sc</sup> می سازد.

- protein. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001;98(6):2985-9.
12. DeMarco ML, Daggett V. Characterization of cell-surface prion protein relative to its recombinant analogue: insights from molecular dynamics simulations of diglycosylated, membrane-bound human prion protein. *Journal of neurochemistry*. 2009;109(1):60-73.
  13. Villa A, Mark AE, Saracino GA, Cosentino U, Pitea D, Moro G, et al. Conformational polymorphism of the PrP106-126 peptide in different environments: a molecular dynamics study. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(3):1423-8.
  14. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Lührs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Archives of neurology*. 2005; 62(4):545-52.
  15. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Current opinion in structural biology*. 2009;19(1):14-22.
  16. DeArmond SJ, Prusiner SB. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *The American journal of pathology*. 1995;146(4):785-6.
  17. Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J. Molecular and clinical classification of human prion disease. *British medical bulletin*. 2003; 66(1):241-54.
  18. Trevitt CR, Singh PN. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: pathology, epidemiology, and public health implications. *The American journal of clinical nutrition*. 2003; 78(3):651S-6S.
  19. Ironside J. Variant Creutzfeldt-Jakob disease: risk of transmission by blood transfusion and blood therapies. *Haemophilia*. 2006; 12(s1):8-15.
  20. Wisniewski T, Sigurdsson EM. Therapeutic approaches for prion and Alzheimer's diseases. *FEBS Journal*. 2007;274(15):3784-98.
  21. Beck DA, Daggett V. Methods for molecular dynamics simulations of protein folding/unfolding in solution. *Methods*. 2004;34(1):112-20.
  22. Lamoureux G, Harder E, Vorobyov IV, Roux B, MacKerell Jr AD. A polarizable model of water for molecular dynamics simulations of biomolecules. *Chemical Physics Letters*. 2006;418(1):245-9.
  23. Ren P, Ponder JW. Polarizable atomic multipole water model for molecular mechanics simulation. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2003;107(24):5933-47.
  24. Carugo O, Pongor S. A normalized root-mean-square distance for comparing protein three-dimensional structures. *Protein science*. 2001;10(7):1470-3.
  25. Lobanov MY, Bogatyreva N, Galzitskaya O. Radius of gyration as an indicator of protein structure compactness. *Molecular Biology*. 2008;42(4):623-8.
  26. Chen W, van der Kamp MW, Daggett V. Structural and dynamic properties of the human prion protein. *Biophysical journal*. 2014; 106(5): 1152-63.
  27. Gu W, Wang T, Zhu J, Shi Y, Liu H. Molecular dynamics simulation of the unfolding of the human prion protein domain under low pH and high temperature conditions. *Biophysical chemistry*. 2003;104(1):79-94.
  28. El-Bastawissy E, Knaggs MH, Gilbert IH. Molecular dynamics simulations of wild-type and point mutation human prion protein at normal and elevated temperature. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2001; 20(2):145-54.
  29. Sobrova P, Ryvolova M, Hynek D, Adam V, Hubalek J, Kizek R. Electrochemical behaviour of native and denatured  $\beta$ -sheet breaker prion protein. *Int J Electrochem Sci*. 2012; 7(2):928-42.