

## مطالعه دینامیک مولکولی تجمع پپتیدها با استفاده از پپتیدهای مدل: $A\beta$ در غشا، EAK16 در محلول

کارگر، فائزه<sup>۱</sup>؛ عمادی، سعید<sup>۲</sup>؛ فضل، حسین<sup>۱</sup>

<sup>۱</sup> دانشکده فیزیک، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان

<sup>۲</sup> دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی علوم پایه زنجان

### چکیده

تجمعات آمیلوئیدی از پپتید  $A\beta$  به عنوان مهمترین مضمون در بیماری آلزایمر شناخته شده است. مطالعه رفتار و برهمکنش این پپتید(ها) در محیط غشا (جایی که  $A\beta$  متولد می‌شود) اهمیت بسیاری دارد. مشاهده شده است که فیبرهای آمیلوئیدی در فضای بین سلولی وجود دارند و باعث تخریب سلول‌های نورونی می‌شوند. ما با روش شبیه‌سازی دینامیک مولکولی درشت‌دانه به مطالعه رفتار پپتید(های)  $A\beta 40$  در غشای DPPC پرداخته‌ایم و نقش غشا در شکل‌گیری تجمعات را بررسی کرده‌ایم. برای بررسی دینامیک تجمعات در محلول، فرایند تجمع پپتیدهای EAK16-I و EAK16-IV را مورد بررسی قرار داده‌ایم و به ترتیب دو نوع تجمع فیبری و گلبولی از پپتیدها را مشاهده کرده‌ایم.

## Molecular Dynamic Study of Peptides Aggregation with the Use of Model Peptides: $A\beta$ in Membrane, EAK16 in solution

Kargar, Faezeh<sup>1</sup>; Emadi, Saeed<sup>2</sup>; Fazli, Hossein<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Physics, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan.

<sup>2</sup> Department of Biological Sciences, Institute for Advanced Studies in Basic Sciences (IASBS), Zanjan.

### Abstract

Amyloid aggregations of  $A\beta$  peptide are known as the most important candidate for Alzheimer disease. Study of the behavior and interaction of the peptide(s) in membrane environment (where  $A\beta$  is generated) is very important. Amyloid fibrils have been seen in intercellular spaces and they cause neurons damaging. We have studied  $A\beta 40$  peptide(s) in DPPC membrane using molecular dynamics simulations and have investigated the impact role of membrane in aggregates formation. To investigate aggregation dynamics, we have studied solution of peptides EAK16-I and EAK16-IV and observed two types of aggregates of fibril and globule respectively.

### مقدمه

یابد. بنابراین درک اتفاقاتی که بلافاصله بعد از متولد شدن  $A\beta$  در درون غشا می‌افتد، از اهمیت بالایی برخوردار است. شبیه‌سازهای کامپیوتری ابزاری مفید برای تحلیل و بررسی پدیده‌های تجربی هستند. در شبیه‌سازی‌های اتمی تمام جزئیات وارد می‌شود ولی مقیاس‌های طولی و زمانی کوتاهتری را می‌توان مورد بررسی قرار داد. پدیده تاشدن پروتئین و خوداجتماعی پپتیدها و پروتئین‌ها در مقیاس‌های زمانی و مکانی بزرگ رخ می‌دهند و مطالعه آنها با مدل‌های اتمی بسیار زمان‌بر است. در این‌جاست که می‌توان با شبیه‌سازی‌های درشت‌دانه سیستم‌های بزرگ‌تر را در زمان طولانی‌تر مدل‌سازی کرد در حالی‌که هنوز بعضی از جزئیات ساختاری واقعی آن حفظ می‌شود و می‌توان اطلاعات کافی و مناسب از تجمعات ابرمولکولی به دست آورد. فلسفه استفاده از مدل درشت‌دانه توصیف ساده‌تر برهم‌کنش‌های

تجمعات پپتیدی از نظر قابلیت‌های کاربردی در زمینه‌هایی همچون تحویل دارو و ترمیم پوست اهمیت دارند. همچنین، بیماری‌هایی همچون آلزایمر وجود دارند که از تجمعات پپتیدی و تشکیل فیبرهای آمیلوئیدی ناشی می‌شوند. بیماری آلزایمر یکی از شایع‌ترین بیماری‌های تحلیل‌عصبی است که هنوز علت و درمان آن به طور واضح مشخص نیست. از اصلی‌ترین علائم و نشانه‌های این بیماری تجمع و رسوب پپتید آمیلوئید-بتا ( $A\beta$ ) در بافت نورونی است. پپتید  $A\beta$  از پروتئین پیش ماده آمیلوئید و با برش پی درپی پروتئولیتیک سکرنازهای مقید به غشای بتا و گاما مشتق می‌شود.  $A\beta$  تا حدی در غشای سلولی جاسازی شده است اما در طول زمان می‌تواند بیرون بیاید و در فضای خارج سلولی تجمع

لازم به ذکر است که به دلیل محدودیت میدان نیروی مارتینی ساختار دوم پیتیدها در طول شبیه‌سازی ثابت نگه داشته می‌شود ولی ذرات نسبت به هم می‌توانند حرکت کنند. پیتید  $A\beta 40$  با دو ساختار چنبره‌ای و حداکثر آلفا شبیه‌سازی شده است. علت انتخاب ساختار چنبره این است که در شبیه‌سازی‌های اتمی [3] مشاهده شده که اکثر اسیدآمینها در اکثر اوقات بدون ساختار هستند. ساختار حداکثر آلفا از سایت PDB با نام IBA4 [4] گرفته شده است. مختصات اتم‌های هر دو نوع پیتید EAK16 از شبیه‌سازی‌های اتمی [5] به دست آمده است.

در زیر توالی اسیدآمینها و ساختار دومی که آنها در طول پیتید به خود می‌گیرند به ترتیب برای پیتید  $A\beta 40$  از فایل IBA4 و پیتیدهای EAK16-I و EAK16-IV آورده شده است:

$A\beta 40$ :  
 DAEFRHDSGYEVHH<sup>15</sup>QKLVFFAEDVGSNKGAI  
 GLMV<sup>37</sup>GGVV  
 CCCCCCCCSCSS<sup>15</sup>HHHHHHHHHHHHHHHHHH  
 HHHHHH<sup>37</sup>TCCC  
 EAK16-I: AEAKAEAKAEAKAEAK  
 CCCCCCCEEEEECEC  
 EAK16-IV: AEAEAEAEAKAKAKAK  
 CCECCSSSSCCCCCEC

که  $C, E, H, S, T$  به ترتیب نشاندهنده ساختار دوم تاخورد،

شکسته، ماریچ، بتای گسترده و چنبره است.

**نتایج (شبیه‌سازی‌های  $A\beta 40$ -DPPC):** مدت زمان هر شبیه‌سازی  $1.5\mu s$  است. در همه شبیه‌سازی‌ها در ابتدای شبیه‌سازی اسیدآمین K28 روی مرز آب و غشا قرار گرفته است و دلیل آن این است که از این اسیدآمین تا انتهای C پیتید کاملاً آبریز است. برای درک ساز و کار تجمعات و برهمکنش‌های پیتیدها، بررسی برهمکنش‌های دوتایی و چندتایی از پیتیدها سودمند است. بنابراین، بعد از شبیه‌سازی تک رشته به شبیه‌سازی دو و 8 رشته می‌پردازیم. مشاهده شد که تک رشته  $A\beta 40$  با ساختار ماریچ طوری نسبت به غشا موضع‌گیری می‌کند که اسیدآمینهای D1-H14 خارج از غشا بسر می‌برند و بقیه پیتید روی سطح غشا قرار دارد (پنل‌های a-d در شکل ۱-A). در شبیه‌سازی‌های دو پیتیدی نیز چنین وضعیتی برای پیتیدها وجود دارد با این تفاوت که به دلیل برهمکنش پیتیدها با یکدیگر، مدت

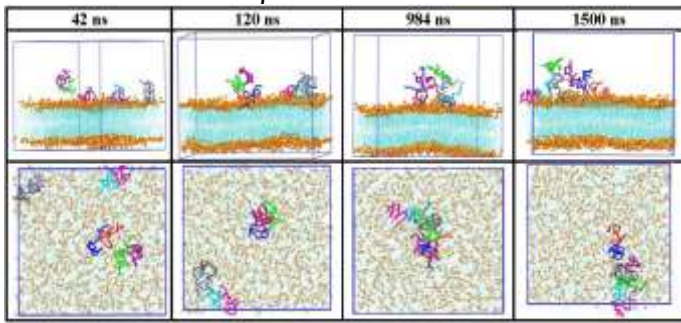
موثر در یک سیستم است در حالی که بتوان باز هم خواص سیستم را به درستی پیش‌بینی کرد. ما قصد داریم با شبیه‌سازی درشت‌دانه مدل مارتینی [2]، به شبیه‌سازی پیتید(های)  $A\beta$  درون غشای DPPC و همچنین پیتیدهای EAK16 درون محلول پردازیم.

**روش شبیه‌سازی درشت‌دانه:** همه مراحل آماده‌سازی، مینیم‌سازی، به تعادل رساندن و اجرای شبیه‌سازی MD با بسته نرم افزاری گرومکس [1] و با میدان نیروی مارتینی انجام شده‌اند. تحلیل داده‌ها با بسته گرومکس و کدهای نوشته شده در گروه انجام گرفته‌اند. در ابتدا روش آماده‌سازی سیستم  $A\beta 40$ -DPPC و سپس سیستم EAK16 محلول در آب شرح داده می‌شود.

برای شبیه‌سازی‌های  $A\beta 40$  از تک رشته، دو رشته و 8 رشته درون غشای DPPC استفاده کردیم که مراحل آماده‌سازی سیستم در همه شبیه‌سازی‌ها یکسان است. در ابتدا بر روی پیتید با میدان نیروی درشت‌دانه مارتینی و در خلا فرآیند مینیم‌سازی انرژی انجام می‌شود. فایل ساختاری به تعادل رسیده‌ی غشای DPPC با 128 لیپید از سایت گروه مارتینی دانلود شده است. سپس سیستم ترکیبی  $A\beta 40$ -DPPC آماده می‌شود و بعد از مینیم‌سازی انرژی با آب درشت‌دانه در یک جعبه شبیه‌سازی قرار می‌گیرد. برای ختشی‌سازی کل سیستم به ازای هر پیتید سه یون  $Na^+$  اضافه می‌شود. بر روی سیستم آماده شده فرآیندهای کمینه‌سازی انرژی و به تعادل رساندن (که شامل شبیه‌سازی آنسامبلی NVT و NPT که فشار در دو جهت X-Y, Z به طور مستقل برای سیستم پیتید و غشا اعمال می‌شود) با شرط مرزی دوره‌ای در دمای 323K انجام می‌شود.

از پیتیدهای EAK16-I به تعداد 16 و 250 رشته و پیتیدهای EAK16-IV به تعداد 125 رشته شبیه‌سازی درشت‌دانه با میدان نیروی مارتینی به عمل آمده است. در هر سیستم پیتیدها بعد از کمینه‌سازی انرژی در آب درشت‌دانه درون یک جعبه شبیه‌سازی حل شده‌اند. فرآیندهای کمینه‌سازی انرژی و به تعادل رساندن (که شامل شبیه‌سازی آنسامبلی NVT و NPT که فشار به صورت همگن در سیستم اعمال می‌شود) با شرط مرزی دوره‌ای و در دمای 300K انجام می‌شود. گام زمانی 0.03ps برای همه شبیه‌سازی‌ها است.

### D: 8 A $\beta$ chains- Coil structure

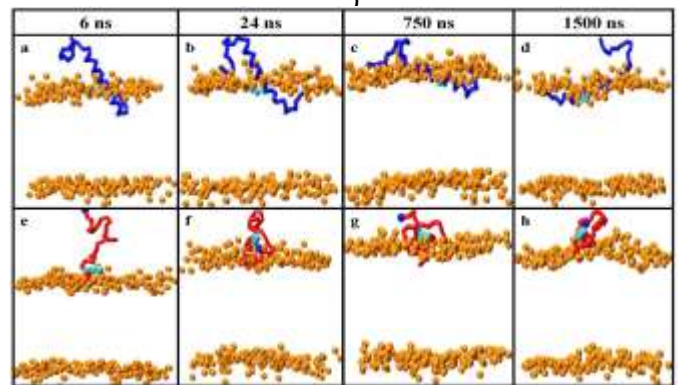


شکل ۱: تصاویر انتخابی از سیستم‌های تک (A) و دو (B) و 8 (C,D) A $\beta$ . تصاویر e, c از دو رشته و ردیف پایین تصاویر C,D از نمای بالا است. با نزدیک و اضافه شدن پپتیدها به یکدیگر، پپتیدها حالت ایستاده‌تری به خود می‌گیرند به طوری که در تجمع پپتیدها دو جهت ارجحیت دارد. حتی با دینامیک کل اجتماع پپتیدها این زاویه نیم صفحه بین پپتیدها حفظ می‌شود (شکل ۱-C).

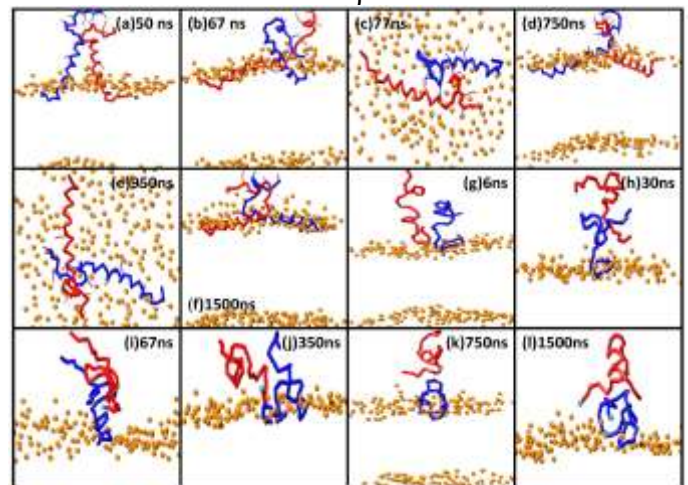
همان‌طور که از تصاویر (e-h) در شکل ۱-A مشاهده می‌شود پس از مدت زمان کوتاهی تک پپتید A $\beta$  با ساختار چنبره همانند کلاف نخ پیچ خورده‌ای در می‌آید. اگرچه اکثر اسیدآمین‌های پپتید از غشا (ناحیه‌ی سرهای قطبی لایه بالا) خارج هستند ولی هنوز بعضی از اسیدآمین‌ها به غشا وابسته هستند و این عامل باعث مقید شدن رشته به غشا می‌شود. این وضعیت پپتید نسبت به غشا در تا انتهای شبیه‌سازی 1.5 $\mu$ s حفظ می‌شود. در شبیه‌سازی دو پپتیدی A $\beta$  با ساختار چنبره، در ابتدای شبیه‌سازی دو پپتید خود را به سطح غشا نزدیک می‌کنند پس از گذشت زمان دو انتهای N پپتیدها با یکدیگر برهمکنش می‌کند و یکی از پپتیدها فرصت پیدا می‌کند و از سطح غشا جدا می‌شود در حالی که با پپتید اول اندرکنش می‌کند و در زمان‌های بسیار کوتاهی به سرهای غشا نزدیک می‌شود. این رفتار دو پپتید تا انتهای شبیه‌سازی ادامه دارد (پنل‌های g-1 در شکل ۱-B). در شکل ۱-D تحول زمانی سیستم 8 پپتیدی با ساختار چنبره نمایش داده شده است. مانند شبیه‌سازی‌های دو پپتیدی، در همان زمان‌های ابتدای شبیه‌سازی، یکی از پپتیدهای هر جفت پپتید، در حالی که هنوز با پپتید دیگر برهمکنش دارد از سطح غشا فاصله می‌گیرد. این جفت پپتیدها (یکی در تماس با سطح غشا و دیگری دور از غشا ولی در حال برهمکنش با پپتید اول) با همین وضعیت به یکدیگر نزدیک می‌شوند و تجمع می‌یابند.

زمان بیشتری طول می‌کشد تا پپتیدها روی سطح غشا قرار بگیرند. دو پپتید از انتهای N به هم نزدیکند و با هم برهمکنش می‌کنند و دو انتهای C از یکدیگر بیشترین فاصله را دارند به طوری که در اکثر مواقع دو پپتید تقریباً با هم زاویه 180 درجه می‌سازند (پنل‌های a-f در شکل ۱-B). در شبیه‌سازی 8 رشته‌ای با ساختار ماریچ پپتیدهای A $\beta$ ، مشاهده می‌شود با گذشت زمان پپتیدها بر روی سطح غشا حرکت می‌کنند و به یکدیگر نزدیک می‌شوند.

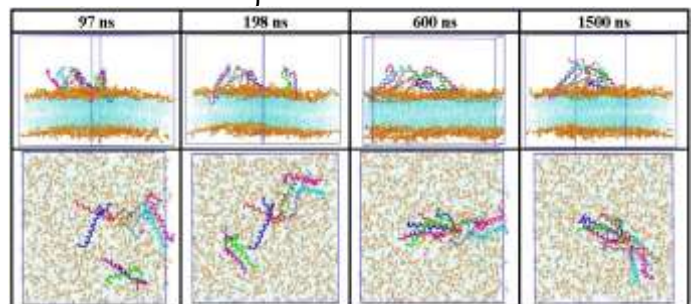
### A: 1 A $\beta$ chain



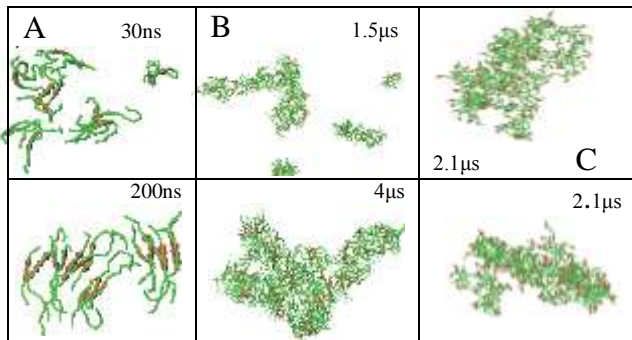
### B: 2 A $\beta$ chains



### C: 8 A $\beta$ chains- Helix structure



می ماند که بعد ضخامت آن در مقابل قطر تقریبی سطح مقطع کوچکتر است. پدیده خوداجتماعی گلوبولی شکل پپتیدهای EAK16-IV در کارهای تجربی گزارش شده اند [5, 6].



شکل ۲: تصاویر انتخابی از سیستم های ۸ (ستون A)، ۲۵۰ (ستون B) از پپتید EAK16-I و ۱۲۵ تایی از پپتید EAK16-IV از دو نمای روبرو و کنار (ستون C).

**نتیجه گیری:** در شبیه سازی های  $\alpha\beta$  با دو ساختار دوم مارپیچ و چنبره پپتید(ها) روی سطح قرار می گیرد ولی از غشا جدا نمی شود. با اضافه شدن پپتیدها و تجمع آنها فرصتی پیدا می شود تا بعضی از پپتیدها از سطح غشا اندکی فاصله بگیرند ولی در کل این اجتماع از یک انتها به غشا متصل است. غشا محل مناسبی برای تجمع پپتیدهاست چون پپتیدها به جای سه بعد در دو بعد (سطح غشا) حرکت می کنند و تجمع می یابند و می توانند قسمت های آبگریزان را در اندرکنش با غشا قرار دهند. چینش اسید آمینه ها در طول پپتید بر روی برهمکنش های دوتایی پپتیدها و همچنین ساختار دومشان تاثیر می گذارد که این نیز در تشکیل تجمعات نقش مهمی دارند. همان طور که مشاهده شد پپتیدهای EAK16-I تجمعات فیبری و پپتیدهای EAK16-IV تجمعات گلوبولی تشکیل می دهند.

### مرجع ها

- [1]. B. Hess, C. Kutzner, D. van der Spoel and E. Lindahl, *J. Chem. Theory Comput.*, 2008, **4**, 435.
- [2]. Marrink, Siewert J, Risselada, H Jelger, Yefimov, Serge, Tieleman, D Peter, and De Vries, Alex H. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2007 **111**, 7812.
- [3]. F. Kargar, S. Emadi, H. Fazli, submitted.
- [4]. M. Coles, W. Bicknell, A. A. Watson, D. P. Fairlie and D. J. Craik, *Biochemistry*, 1998, **37**, 11064. PDB entry: 1ba4.
- [5]. S. Emamyari, F. Kargar, V. Sheikh-Hasani, S. Emadi, H. Fazli, *Eur Biophys J*, 2015, **44**, 263.
- [6]. H. Fazli, S. Emadi, S. Emamyari, V. Sheikh-Hasani, F. Kargar, *J. Iran. Chem. Soc.*, 2011, **8**, A78.

**نتایج (شبیه سازی های EAK16):** در ابتدا یک سیستم تک رشته ای و سپس دو رشته ای از پپتید EAK16-I با شبیه سازی اتمی مورد مطالعه قرار گرفته است [5] سپس در ادامه سیستم دو رشته ای را درشت دانه کرده و با تکثیر جفت پپتید EAK16-I یک سیستم بس پپتیدی درشت دانه تولید کرده ایم. همچنین شبیه سازی های اتمی تک و دو رشته ای EAK16-IV انجام شدند [5] و از آنجایی که در شبیه سازی های اتمی دو رشته ای نوع IV هیچ تمایلی بین دو پپتید پس از گذشت 100ns مشاهده نشد بنابراین تک رشته ای EAK16-IV را درشت دانه کردیم و با تکثیر تک پپتید EAK16-IV یک سیستم بس پپتیدی درشت دانه ساختیم.

**شبیه سازی EAK16-I:** در ابتدا محلول 16 عدد (8 جفت) پپتید را به مدت 200ns شبیه سازی کرده ایم. تصاویر انتخابی از سیستم شبیه سازی در شکل ۳ ستون A نشان داده شده است. صفحات بتا در این شکل ها به رنگ قرمز نشان داده شده اند. این صفحات بتا بسیار به هم نزدیک هستند و در دو دسته کوچک درون خوشه ای به صورت موازی با هم قرار گرفته اند. دیده شده است که تعداد پپتیدهای این دو دسته کوچک و همچنین جهت انباشته شدنشان تغییر می کند ولی تمام این تغییرات به گونه ای است که صفحات بتا در نزدیک ترین فاصله از هم و به صورت موازی با هم هستند. به دلیل کنار هم قرار گرفتن صفحات بتا به نظر می رسد که پپتیدهای EAK16-I تمایل به تشکیل فیبر داشته باشند بنابراین ما تصمیم گرفتیم سیستم محلول 250 رشته ای را شبیه سازی کنیم. همان طور که از تصاویر شکل ۳ ستون B پیداست رشد فیبر مانند این پپتیدها قابل تشخیص است. پدیده خوداجتماعی فیبری شکل پپتیدهای EAK16-I در نتایج تجربی نیز مشاهده شده است [5, 6].

**شبیه سازی EAK16-IV:** برای مشاهده پدیده خوداجتماعی این پپتیدها محلول 125 پپتیدی شبیه سازی شده است. تصاویر تهیه شده از سیستم در شکل ۳ ستون C نشان داده شده است. همان طور که مشاهده می شود با گذشت زمان پپتیدهای درشت دانه شده EAK16-IV در یک خوشه تجمع کرده اند. در مدت زمان شبیه سازی چگونگی تجمع پپتیدها و کنار هم قرار گرفتن قسمت های بتا نظم خاصی ندارد. خوشه نهایی همانند یک دیسک