

پیشگویی اثر برازین وحشی و جهش یافته‌های آن در موقعیت آسپاراتات ۴۰ بر روی TLR5 با استفاده از روش‌های مدل‌سازی بر مبنای داکینگ مولکولی

الهه کریمی پور^۱، وهب جعفریان^{۲*}

۱- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

* صندوق پستی ۸۷۱۹۹۸۴۷۴۹۴، زنجان، ایران

v.jafarian@znu.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۰۸

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۹

چکیده

امروزه از پپتیدها و پروتئین‌های با خواص ضد سرطانی، ضد آلرژی و ضد التهابی برای درمان استفاده می‌شود. برازین پروتئینی شیرین با ۵۴ باقی‌مانده آمینو اسیدی است که ویژگی ضد سرطانی مبتنی بر توالی و ساختار دارد. در این پژوهش نقش آسپاراتات موقعیت ۴۰ در ساختار و عملکرد پروتئین برازین وحشی و جهش یافته‌ها و نیز ویژگی ضد سرطانی پپتیدهای حاصل شده بر روی گیرنده TLR5 بررسی شد. بنابراین، چندین مدل از فرم‌های جهش یافته با استفاده از نرم‌افزار Modeller.v.9.20 طراحی و ساخته شد. سپس، صحت مدل‌ها و ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی نوع وحشی و جهش یافته‌های D40R، D40N و D40Deletion با استفاده از سرورها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختلفی از جمله ProtParam، ProtScale، SAVES، PIC، ModEval، و PredyFlexy ارزیابی شد. توالی پروتئین‌ها برای پیش‌بینی خاصیت ضد سرطانی با استفاده از سرورهای ACPred و iACP بررسی و مقایسه شد. کیفیت و تحلیل اتصالات پروتئین وحشی و جهش یافته‌ها به‌عنوان لیگاند با گیرنده TLR5 ایجادکننده مسیر سیگنالینگ ضد سرطانی، به کمک داکینگ مولکولی و با استفاده از نرم‌افزار HADDOCK بررسی شد. نتایج بررسی فراسنجه‌های بیوانفورماتیکی نشان‌دهنده احتمال بهبود پایداری ساختار و عملکرد پروتئین برازین و احتمال افزایش سطح در دسترس برای اتصال با گیرنده می‌باشند. همچنین، بنا بر نتایج حاصل از بررسی داکینگ مولکولی، احتمال اتصال پروتئین برازین جهش یافته D40R به گیرنده TLR5 نسبت به دیگر پروتئین‌ها بیشتر است و این نشان‌دهنده احتمال افزایش خاصیت ضد سرطانی این جهش یافته می‌باشد. بنابر این پژوهش، قابلیت ارتقای کارکرد زیستی و دارویی برازین با ایجاد جهش‌های گوناگون در موقعیت آسپاراتات ۴۰ وجود دارد.

کلید واژگان: پایداری حرارتی، پروتئین شیرین، داکینگ مولکولی، جهش‌زایی هدفمند، ویژگی ضد سرطانی.

۱- مقدمه

برازئین نوعی پروتئین شیرین با قابلیت شیرین کنندگی بسیار بالا و مقدار بسیار ناچیز کالری است که در صنایع غذایی، دارویی و پزشکی استفاده می‌شود [۱]. برازئین نخستین بار از میوه گیاه گرمسیری *Pentadiplandra brazzeana* Baillon استخراج شد و به عنوان کوچکترین پروتئین شیرین کننده با وزن مولکولی ۶/۵ کیلو دالتون و با طعمی نزدیک به طعم شکر شناخته شده است [۲]. شیرینی برازئین حدود ۲۰۰۰ برابر بیشتر از ساکارز ۲ درصد و تقریباً ۵۰۰ برابر بیشتر از ساکارز ۱۰ درصد می‌باشد و تنها انسان و پریمات‌ها قادر به درک مزه شیرین این پروتئین هستند [۳]. توان شیرین کنندگی برازئین باعث شده است تا جایگزین خوبی برای شیرین کننده‌های وحشی مانند استویوسیدها باشد. علاوه بر این، برازئین دارای خصوصیات فیزیکی و شیمیایی متعددی از قبیل قابلیت انحلال پذیری بسیار بالا در آب (حداقل ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر)، پایداری حرارتی در گستره دمایی بسیار بالا و پایداری pH در محدوده ۲/۵ تا ۸ می‌باشد [۳]. این پروتئین علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و نقش مهمی که در حذف رادیکال‌های آزاد از قبیل ۲,۲-آزینو بیس-۳-اتیل بنزو تیا زولین-۶- سولفونیک اسید (ABTS) دارد، دارای خواص ضدالتهابی و ضد حساسیت نیز است [۴]. اولین ساختار سه بعدی برازئین در سال ۱۹۹۸ با استفاده از رزونانس مغناطیس هسته‌ای (NMR) به دست آمد. نتایج حاصل از NMR نشان داد که برازئین دارای یک ماریپچ آلفا کوتاه و ۳ صفحه بتا موازی ناهمسو در حالت محلول و یک ماریپچ آلفا اضافی کوچک در حالت بلوری است و سه لوپ انعطاف پذیر دارد. همچنین، این پروتئین دارای ۸ باقی مانده سیستئین است که نقش اصلی را در ایجاد پیوندهای دی سولفیدی و احتمالاً در پایداری حرارتی برازئین ایفا می‌کنند. پروتئین برازئین غنی از لیزین و فاقد

متیونین، ترئونین، تربیتوفان و گروه‌های آزاد سولفیدریل است و با توالی ۵۴ آمینو اسیدی خود pH ایزوالکتریک کمتری (۵/۴) نسبت به سایر پروتئین‌های شیرین دیگر دارد.

طراحی پپتیدهای جدید و ایجاد پروتئین‌های نو ترکیب نیاز به کسب اطلاعاتی جامع در مورد روابط بین ساختار و عملکرد ضدسرطانی پروتئین و همچنین ارتباط پروتئین با گیرنده دارد، درحالی که انجام عملیات پروتئومیکس به صورت تجربی و تعیین ساختار سه بعدی پروتئین‌ها در محیط آزمایشگاه کاری هزینه‌بر، زمان‌بر و بسیار مشکل می‌باشد؛ به همین دلیل امروزه استفاده از دانش بیوانفورماتیک، مطالعات ساختاری و روابط ساختار و عملکرد پروتئین را تا حدودی آسان تر ساخته است [۵].

بیوانفورماتیک یک علم بین‌رشته‌ای شامل روش‌ها و نرم‌افزارهایی برای فهم اطلاعات زیستی است که به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های پیچیده و حجیم زیست‌شناسی از ترکیب علوم کامپیوتر، آمار، ریاضی و مهندسی استفاده می‌کند. از آنجاکه عملکرد پروتئین‌ها وابسته به ساختار سه بعدی آن‌ها است، شناخت و پیش‌بینی این ساختار، میان کش‌های درونی و بیرونی پروتئین و بررسی انواع فراسنجه‌های ساختاری امری مهم در دست‌یابی به اطلاعات ضروری در مورد آن‌ها می‌باشد [۶]. یکی از عوامل مؤثر در ارتقای کاربردهای زیستی و دارویی برازئین، بهبود کیفی و کمی اتصال به گیرنده‌ها است. تحقیقات گسترده‌ای از طریق جهش‌زایی هدفمند در جایگاه‌های خاصی از توالی پروتئین که در اتصال به گیرنده‌ها نقش دارند، باهدف بهبود ساختار برای اتصال به گیرنده انجام شده است [۷,۸]. در ارتباط با چگونگی اتصال برازئین با گیرنده، بررسی مدل‌های کامپیوتری و داکینگ مولکولی نشان می‌دهد که سطحی از پروتئین که به طور غالب دارای بار مثبت بیشتری است با قسمتی از گیرنده‌ی دارای بار منفی

† Steviosid

† Brazzein

جهش یافته در مقایسه با پروتئین وحشی به این گیرنده می باشد.

طبق مطالعات انجام شده با استفاده از جهش‌زایی نقطه‌ای، ویژگی‌های اساسی که در ایجاد شیرینی برازئین دخیل هستند شامل نوع آمینواسیدهای کلیدی، بار الکتریکی و طول زنجیره جانبی آنها می باشد [۱]. دلیل اصلی انتخاب موقعیت آسپاراتات ۴۰ برای اعمال جهش، دست‌کاری بار منفی آسپاراتات ۴۰ و همچنین قرارگیری این جایگاه در اطراف Arg43 که یکی از جایگاه‌های اصلی دخیل در اتصال برازئین به گیرنده است می باشد [۱۳].

داکینگ مولکولی یکی از فنون پر کاربرد در زیرمجموعه مدل‌سازی مولکولی در علم بیوانفورماتیک است که با تعیین جهت‌گیری صحیح اتصال و انرژی پیوند یک ترکیب به‌عنوان لیگاند در جایگاه فعال یک پروتئین، میزان تمایل اتصال را تخمین می‌زند. استفاده از روش‌های سریع داکینگ مولکولی برای درک بخشی از عملکرد پروتئین امری ضروری و قابل توجه می باشد [۱۴].

در این پژوهش با ایجاد سه جهش در موقعیت آسپاراتات ۴۰ به بررسی دو موضوع اصلی یعنی (الف) نقش جایگاه اعمال جهش در بهبود شیرینی و خاصیت ضدسرطانی پروتئین و (ب) بررسی یکسان بودن جایگاه‌های حائز اهمیت در ایجاد شیرینی و ایجاد پاسخ‌های ضد سرطانی، پرداخته شده است. در بخش اول سعی شده است تا با تبدیل بار منفی آسپاراتات موقعیت ۴۰ به بار مثبت آرژینین و بار خنثی باقی مانده آسپارژین اثر تغییر بار در این موقعیت و همچنین با حذف آسپاراتات از این موقعیت نقش طول زنجیره جانبی آسپاراتات موقعیت ۴۰ و اثرات ساختاری و عملکردی کلی جهش‌های اعمال شده بر اساس خواص فیزیکی شیمیایی آمینو اسیدها با استفاده از سیستم مدل‌سازی برای پروتئین‌های نوترکیب و سپس با استفاده از مطالعات بیوانفورماتیکی بررسی شود.

متوسط درگیر می‌شود؛ بنابراین، اتصال مؤثر برازئین با گیرنده توسط شکل و بار مکمل تضمین می‌شود.

گیرنده‌های شبه Toll پروتئین‌هایی با خاصیت فعال‌سازی ایمنی ذاتی هستند که نشانک‌ها یا سیگنال‌های متفاوتی را در پاسخ به عوامل بیماری‌زایی مختلف ایجاد می‌کنند. این گیرنده‌ها در ابتدا در مگس دروزوفیلا کشف شد و با گذشت زمان همسان‌های انسانی آن در پاسخ به التهابات و به‌عنوان عاملی علیه عفونت و میکروب به‌دست آمد [۹]. گیرنده‌های TLR بسته به ژن رمز کننده، لیگاند فعال‌کننده و نوع سیگنالی که ایجاد می‌کنند به ۱۰ نوع مختلف در انسان دسته‌بندی می‌شوند و در انواع مختلفی از سلول‌های ایمنی نظیر سلول‌های لنفوسیتی T و B، ماکروفاژها، مونوسیت‌ها، نوتروفیل، بازوفیل و سلول‌های غیر ایمنی از قبیل سلول‌های اپیتلیال و اندوتلیال بیان می‌شوند. TLRهایی که در سطح سلول بیان می‌شوند شامل TLRهای ۲، ۴، ۵ هستند. تمامی TLRها دارای یک دومن خارج سلولی غنی از لو سین هستند که در شناسایی و اتصال به لیگاند نقش اساسی را ایفا می‌کند [۱۰]. TLR5 تنها گیرنده شبه Toll که لیگاند اصلی آن می‌تواند پروتئین باشد، در انسان توسط ژن TLR5 رمزگذاری می‌شود و نقش اصلی آن در شناسایی فلاژلین تشکیل‌دهنده تازک باکتریایی می‌باشد. سازوکار پاسخ این گیرنده اپیتلیالی به‌گونه‌ای است که با اتصال لیگاند (فلاژلین) فعالیت ضد توموری علیه سرطان پستان از خود نشان داده و سبب فعال‌سازی ترشح سیتوکین و پاسخ التهابی می‌شود، همچنین با تنظیم آداپتور اتوفازی MAPIS سبب تقویت فعالیت ضد توموری در سرطان پستان خواهد بود [۱۱، ۱۲]. علت اصلی انتخاب این گیرنده برای اتصال به پروتئین برازئین در این پژوهش بررسی خاصیت ضدالتهابی نوع وحشی و جهش‌یافته‌های D40N، D40R و D40Deletion برازئین و همچنین مقایسه میزان تغییرات اتصال پروتئین‌های

در بخش دوم این پژوهش ابتدا مقایسه توالی پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به پروتئین وحشی از لحاظ خاصیت ضدسرطانی بودن با استفاده از دو سرور اختصاصی انجام شده و در نهایت مقایسه بهبود خاصیت ضدسرطانی بودن پروتئین‌ها از طریق بهبود اتصال با گیرنده TLR5 بررسی شد.

سطح در دسترس پروتئین و از سرور ProtScale برای بررسی شاخص آنگریزی پروتئین‌ها کمک گرفته شد [15]. مقادیر pKa باقی‌مانده‌های آمینواسیدی موجود در موقعیت باقی‌مانده ۴۰ توالی پروتئین‌های جهش‌یافته و وحشی (در قدرت یونی ۵۰ میلی‌مولار، دمای ۳۱۰ K و pH برابر ۷) با استفاده از برنامه Macrodox نسخه 2.0.2 محاسبه شد. برای اطمینان از میزان پایداری احتمالی پروتئین‌های جهش‌یافته، ارزیابی میزان انرژی آزاد پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها به کمک سرور DDFIRE/DFIRE2 CALCULATION ENERGY به نشانی [http://sparks-\(-\)lab.org/yueyang/server/ddfire/index.php](http://sparks-(-)lab.org/yueyang/server/ddfire/index.php) انجام شد. نمرات اختصاص یافته به کیفیت مدل‌های منتخب برای هر جهش از طریق سرور ProQ3/ProQ3D به نشانی <http://proq3.bioinfo.se/pred/> به‌دست آمد. پیش‌بینی خاصیت ضدسرطانی توالی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها با استفاده از دو سرور ACPred <http://codes.bio/acpred/> و iACP [http://lin-\(-\)group.cn/server/iACP](http://lin-(-)group.cn/server/iACP) انجام شد. سپس، با دریافت پوشه PDB گیرنده TLR5 با کد 3J0A از بانک اطلاعاتی پروتئین PDB و همچنین با استفاده از فایل مدل‌های ساخته شده پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها و فلاژلین به‌عنوان لیگاند برای گیرنده، داکینگ مولکولی به کمک سرور HADDOCK انجام شد. در نهایت شکل گرافیکی حاصل از داکینگ، توسط نرم‌افزار Chimera ارزیابی شد.

۳- نتایج و بحث

پس از طراحی ۱۰ مدل ساختاری بر اساس الگوی به‌دست‌آمده از سایت PDB برای هر یک از جهش‌یافته‌ها، صحت مدل‌های ساخته شده با استفاده از فراسنجه‌های موجود در سرورها و نرم‌افزارهای مربوطه بررسی و بهترین ساختار برای هر یک از جهش‌یافته‌ها انتخاب شد. نتایج RMSD به‌دست‌آمده برای تمامی مدل‌های ساخته شده کمتر از یک می‌باشد که می‌تواند تأکیدی بر پایداری

در ابتدا برای طراحی ساختار سه بعدی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌های D40N, D40R و D40Del، توالی آمینواسیدی پروتئین از بانک اطلاعاتی NCBI به نشانی <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> استخراج و با استفاده از برنامه BLAST توالی آن در بانک اطلاعاتی PDB به نشانی <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> جستجو شد و نزدیکترین ساختارهای سه بعدی موجود در این بانک اطلاعاتی شناسایی شدند. بر این اساس، ساختار برازئین با کد 2LY5 به‌عنوان الگوی ساختاری در نرم‌افزار Modeller نسخه 9.20 وارد شد. سپس، از فراسنجه‌های RMSD و Z-DOPE و ERRAT، و VERIFY3-D که به ترتیب از نرم‌افزار spdbviewer سرور <https://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation> و سرور <http://services.mbi.ucla.edu/saves> به‌دست آمدند برای انتخاب برترین مدل استفاده شد. برای بررسی و نمایش شکل گرافیکی مدل‌های پیش‌بینی شده پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها و همچنین مقایسه ساختاری آنها از نرم‌افزار Chimera1.13.1 استفاده شد. محاسبه انواع برهم‌کنش‌های درون مولکولی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌های آن از سایت <http://pic.mbu.iisc.ernet.in> حاصل شد و فراسنجه‌های مبتنی بر توالی پروتئین‌ها (وزن مولکولی، نقطه‌ی ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری) توسط سرور ProtParam محاسبه شد. از سایت VADAR برای ارزیابی

۲- روش‌ها

در ابتدا برای طراحی ساختار سه بعدی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌های D40N, D40R و D40Del، توالی آمینواسیدی پروتئین از بانک اطلاعاتی NCBI به نشانی <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> استخراج و با استفاده از برنامه BLAST توالی آن در بانک اطلاعاتی PDB به نشانی <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> جستجو شد و نزدیکترین ساختارهای سه بعدی موجود در این بانک اطلاعاتی شناسایی شدند. بر این اساس، ساختار برازئین با کد 2LY5 به‌عنوان الگوی ساختاری در نرم‌افزار Modeller نسخه 9.20 وارد شد. سپس، از فراسنجه‌های RMSD و Z-DOPE و ERRAT، و VERIFY3-D که به ترتیب از نرم‌افزار spdbviewer سرور <https://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation> و سرور <http://services.mbi.ucla.edu/saves> به‌دست آمدند برای انتخاب برترین مدل استفاده شد. برای بررسی و نمایش شکل گرافیکی مدل‌های پیش‌بینی شده پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌ها و همچنین مقایسه ساختاری آنها از نرم‌افزار Chimera1.13.1 استفاده شد. محاسبه انواع برهم‌کنش‌های درون مولکولی پروتئین وحشی و جهش‌یافته‌های آن از سایت <http://pic.mbu.iisc.ernet.in> حاصل شد و فراسنجه‌های مبتنی بر توالی پروتئین‌ها (وزن مولکولی، نقطه‌ی ایزوالکتریک، شاخص ناپایداری) توسط سرور ProtParam محاسبه شد. از سایت VADAR برای ارزیابی

بررسی نتایج حاصل از بررسی میزان بار و pK_a پروتئین‌های جهش‌یافته در مقایسه با پروتئین وحشی با استفاده از نرم‌افزار Macrodox بیانگر افزایش بار مثبت کلی پروتئین در جهش‌یافته‌های D40N و D40R و نیز افزایش بار منفی پروتئین در جهش‌یافته D40Del نسبت به پروتئین وحشی می‌باشد (جدول ۱).

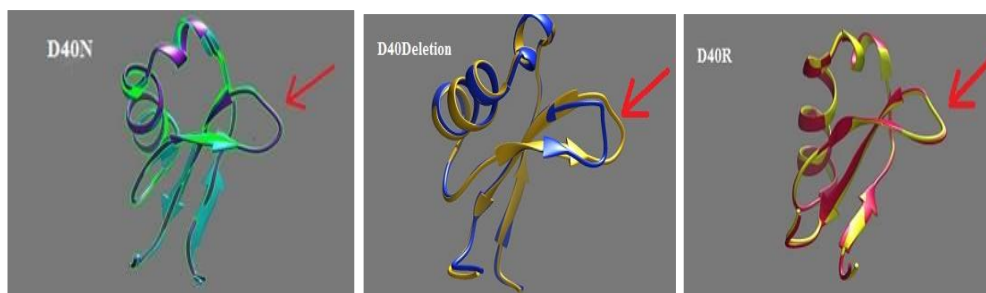
شکل ۱ تصاویر گرافیکی موقعیت ۴۰ واقع در لوپ براژئین وحشی و جهش‌یافته‌ها و نیز تطبیق ساختار سه‌بعدی آنها را با استفاده از نرم‌افزار UCSF Chimera نشان می‌دهد. نتایج حاکی از این بود که جهش‌یافته D40DEL پس از انطباق تصویر سه‌بعدی بر ساختار پروتئین وحشی بیشتر از بقیه جهش‌یافته‌ها دچار تغییرات ساختاری شده و در محل ایجاد جهش دارای اختلاف بیشتری است.

و صحت انتخاب برترین مدل‌های ساختار تولید شده می‌باشد. همچنین، بررسی فراسنجه‌های مبتنی بر توالی بیانگر افزایش وزن مولکولی جهش‌یافته‌ها نسبت به پروتئین وحشی است. دلیل چنین افزایشی می‌تواند تغییر طول زنجیره جانبی در جایگزینی آمینواسیدها با اندازه‌های متفاوت باشد.

کاهش شاخص ناپایداری بیانگر افزایش میزان پایداری پروتئین است. بنابراین، باتوجه به نتایج جدول ۱، شاخص ناپایداری در هر سه جهش‌یافته کاهش پیدا کرده است که می‌تواند بیانگر افزایش پایداری پروتئین پس از اعمال جهش‌های نقطه‌ای مذکور باشد (جدول ۱). کاهش شاخص ناپایداری برای جهش‌یافته D40R از سایر جهش‌یافته‌ها بیشتر بوده و بیانگر پایداری شدن این جهش‌یافته نسبت به سایر جهش‌یافته‌ها است.

جدول ۱ ارزیابی مدل‌های ساخته شده با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی SAVES، ModEval، SpdbViewer و محاسبه بار الکتریکی و pK_a پروتئین‌های جهش‌یافته و وحشی با استفاده از نرم‌افزار MACRODOX.

پروتئین	PI	شاخص ناپایداری	وزن مولکولی	RMSD	VERIFY 3D	Z-DOPE	ERRAT	بار کلی	مجموع DELTA pK_a
WT-Bra	۶/۷۱	۴۹/۴۳	۶۳۷۰/۹	۰	% ۹۸/۱۱	-۰/۷۱۵	۲۸/۸۸	-۵/۳۶	-۱۸/۱۵
D40N	۷/۶۸	۴۴/۸۷	۶۳۶۹/۲۱	۰/۳۱	% ۹۸/۱۱	-۰/۷۴۶	۳۷/۷۷	-۴/۳۶	-۱۳/۵۳
D40R	۸/۱۶	۴۱/۶۸	۶۴۱۱/۲۹	۰/۳۲	% ۱۰۰	-۰/۷۳۳	۳۷/۷۷	-۲/۴۳	-۱۱/۱۸
D40Del	۷/۶۸	۴۴/۰۹	۶۲۵۵/۱	۰/۵۹	% ۹۶/۵۱	-۰/۶۱۹	۵۰	-۶/۷۴	-۱۷/۱۴



شکل ۱ نمایش شکل گرافیکی و مقایسه ساختار سه‌بعدی پروتئین‌های جهش‌یافته و پروتئین وحشی به کمک نرم‌افزار UCSF Chimera

بنابراین طبق رابطه کولن نیروی الکترواستاتیک قوی خواهد بود. برعکس در سطح پروتئین و محیط قطبی ضریب دی‌الکتریک بالا بوده و قدرت نیروی الکترواستاتیک کم خواهد شد.

البته دست زدن به آمینواسید باردار در عمق پروتئین خطرناک بوده، زیرا آمینواسید باردار بدون پیوند، به شدت ناپایدارکننده خواهد بود و هزینه انرژی زیادی به پروتئین تحمیل خواهد کرد. پس به‌طور کلی در مورد جهش‌هایی که آمینواسید باردار دست‌کاری می‌شوند باید به موقعیت تغییر توجه ویژه کرد. در تبدیل D به R چون بار تغییر پیدا کرده است، اگر موقعیت تغییر محلی غیر از سطح پروتئین باشد می‌تواند موجب به هم ریختگی‌های شدید در ساختار و عملکرد پروتئین شود.

با در نظر گرفتن شاخص آب‌گریزی ارائه شده توسط Kyte & Doolittle که میزان آب‌گریزی و آب‌دوستی را نشان می‌دهد (جدول ۳)، هرچه مقیاس عددی آمینواسید منفی‌تر باشد تمایل به آب‌دوستی بیشتر است [۱۶]. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که با مقایسه آسپارتیک اسید و آرژینین در پروتئین جهش‌یافته D40R هر دوی این آمینواسیدها تمایل به میان‌کنش با حلال قطبی آب داشته و وجود این آمینواسیدها در سطح پروتئین می‌تواند به حلالیت پروتئین کمک کند. با این حال، وجود آرژینین با شاخص آب‌گریزی منفی‌تر نسبت به آسپاراتات مطلوب‌تر به نظر می‌رسد (جدول ۲). در پروتئین جهش‌یافته D40Del شاخص آب‌گریزی مقدار عددی مثبت‌تری نسبت به پروتئین وحشی دارد. بنابراین، از نظر ترمودینامیکی پروتئین تغییر یافته حاصل از حذف آسپاراتات و حضور گلوتامیک اسید در این موقعیت نسبت به پروتئین وحشی آب‌گریزتر خواهد بود و عامل ناپایداری کننده‌ای برای پیکربندی پروتئین خواهد بود. در مورد پروتئین جهش‌یافته D40N شاخص آب‌گریزی نسبت به پروتئین وحشی بدون

با محاسبه تعداد میان‌کنش‌های درون‌مولکولی در پروتئین‌های جهش‌یافته و مقایسه آن با مدل نوع وحشی، تا حدودی می‌توان میزان پایداری پروتئین‌ها را پیش‌گویی کرد. نتایج حاصل از بررسی تعداد میان‌کنش‌های آب‌گریز، یونی، آروماتیک-آروماتیک، کاتیونی و پیوندهای دی‌سولفیدی پروتئین وحشی برازئین و جهش‌یافته‌های آن که از طریق سرور PIC به دست آمد، نمایانگر افزایش تقریبی تعداد پیوندها در جهش‌یافته‌های D40R و D40N و کاهش تقریبی میان‌کنش‌های درون پروتئینی در جهش‌یافته D40Del می‌باشد. اهمیت نقش میان‌کنش‌ها در پایداری ساختار پروتئین‌ها [۱۶]، این فرضیه را تقویت می‌کند که با اعمال جهش‌های فوق، پایداری پروتئین به میزان قابل توجهی در جهش‌یافته‌های D40R و D40N، با افزایش تعداد کل میان‌کنش‌ها افزایش یافته است.

در واقع در استدلال بر اساس خواص فیزیکوشیمیایی آمینواسیدها باید به موقعیت سطحی یا عمقی بودن آمینواسید در پروتئین و نیز قطبیت محیط تغییر (قطبی یا آب‌گریز) توجه کرد. در D40R با افزایش تعداد اتم‌ها در موقعیت مورد نظر به علت سایز بزرگ‌تر آرژینین، برخی حفره‌های واندروالسی پر شده و این میان‌کنش می‌تواند در برای پایداری بیشتر پروتئین تقویت شود. نکته دیگر این که آسپارتیک اسید در مقایسه با آرژینین فضای کانفورماسیونی بیشتری به لحاظ زوایای دی‌هیدرال دارد و بنابراین باعث انعطاف‌پذیری بیشتر در منطقه مورد نظر می‌شود. به این معنا که آرژینین با کاهش فضای کانفورماسیونی در جهش‌یافته D40R می‌تواند موجب افزایش پایداری شود.

همچنین، در مورد میان‌کنش‌های یونی بر حسب اینکه آمینواسید مورد نظر در محیط قطبی و سطح پروتئین و یا در عمق پروتئین و محیط هیدروفوب قرار گرفته، شدت تاثیر میان‌کنش یونی در پایداری پروتئین کم و یا زیاد خواهد بود. در عمق پروتئین ضریب دی‌الکتریک پایین و

و آمینواسیدهای آب دو ست تمایل به ماندگاری در سطح پروتئین و ایجاد تماس بیشتر با حلال را دارند. بنابراین، هر قدر هسته مرکزی پروتئین در ساختار پیچ خورده خاصیت آب‌گریزی بیشتری داشته باشد، نواحی کمتری از پروتئین در دسترس حلال بوده و باعث پایداری پروتئین در بخش مرکزی خواهد بود [۱۶].

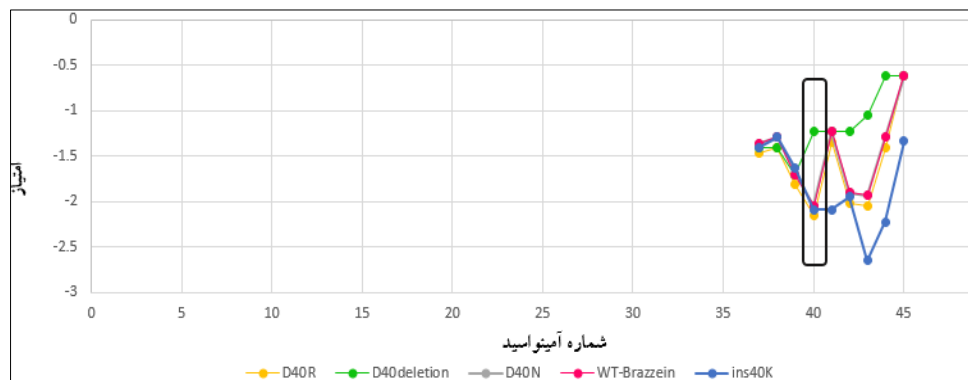
تغییر بوده است و احتمالاً تأثیری بر تغییر میزان آب‌دوستی و آب‌گریزی پروتئین نخواهد داشت (شکل ۲). آمینواسیدهایی با شاخص آب‌گریزی بیشتر دارای خاصیت آب‌گریزی بوده و در طی فرایند تا خوردگی و تعیین کانفورماسیون پروتئین، تمایل بیشتری به قرارگیری در مرکز پروتئین و مشارکت در هسته آب‌گریز پروتئین دارند

جدول ۲ میانگین انواع برهمکنش‌های درون مولکولی به دست آمده توسط سایت PIC server

پروتئین	میان‌کنش‌های آب‌گریزی	پیوند دی‌سولفیدی	پیوند هیدروژنی زنجیره اصلی-زنجیره اصلی	پیوند هیدروژنی زنجیره جانبی-زنجیره جانبی	پیوند هیدروژنی زنجیره جانبی-زنجیره جانبی	میان‌کنش یونی آروماتیک-سولفور	میان‌کنش یونی آروماتیک-آروماتیک	میان‌کنش یونی کاتیون- π
WT-Bra	۸	۴	۵۲	۳۹	۳۷	۲	۰	۲
D40DEL	۸	۴	۵۱	۳۹	۲۹	۴	۰	۲
D40N	۹	۴	۵۵	۳۹	۴۱	۲	۰	۴
D40R	۹	۴	۵۳	۲۷	۳۱	۲	۰	۲

جدول ۳ مقادیر عددی شاخص Kyte & Doolittle

آمینواسید	شاخص آب‌گریزی	آمینواسید	شاخص آب‌گریزی
آسپارتیک اسید	-۳/۵	آرژینین	-۳/۵
گلوتامیک اسید	-۳/۵	آرژینین	-۴/۵



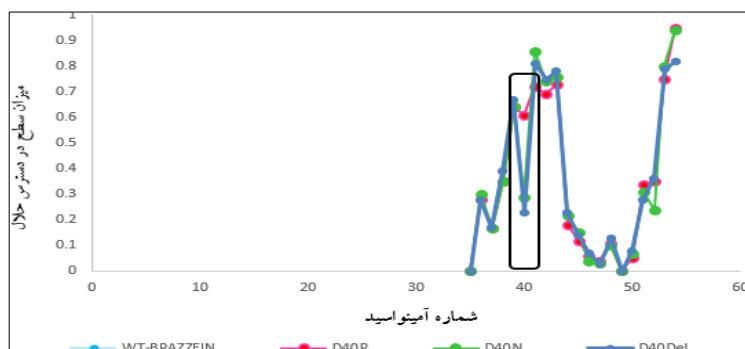
شکل ۲ نمودار مقایسه شاخص آب‌گریزی پروتئین‌های جهش‌یافته و پروتئین وحشی با استفاده از سرور Protoscale

پایداری پروتئین می باشد، بنابراین با بررسی نمرات اختصاص داده شده به میزان انرژی آزاد هر پروتئین جهش یافته و پروتئین وحشی و حرکت انرژی آزاد به سمت مقادیر منفی تر، می توان به میزان پایداری پروتئین ها پی برد [۱۷]. نتایج جدول ۴ نشان می دهد که جهش یافته D40R تقریباً به اندازه ۱ کیلو کالری بر مول از پروتئین وحشی پایدارتر است. از نظر آماری این اختلاف انرژی به مفهوم بالاتر بودن جمعیت جهش یافته D40R در مقایسه با پروتئین وحشی و سایر جهش یافته ها است. به عبارت دیگر از نظر عملی می توان چنین نتیجه گیری کرد که در شرایط غلظتی برابر از دو پروتئین مورد مقایسه، تمایل به تشکیل کمپلکس های جهش یافته D40R از پروتئین وحشی بیشتر است. بنابراین، می توان از پارامتری به نام غلظت مؤثر نیز در تبیین نتایج بهره برد. به نظر می رسد که از جنبه عملی غلظت مؤثر جهش یافته D40R در مقایسه با پروتئین وحشی بیشتر بوده و می توان در شرایط غلظتی برابر انتظار عملکرد بالاتری از جهش یافته مورد نظر را داشت.

سرورهای ACPred و iACP نتایجی صرفاً مبتنی بر توالی و ساختار اولیه پروتئین ها را ارائه می دهند که باقی مانده های آبگریز، باقی مانده های سیستئین بر روی صفحات بتا و ماریپیج های آمفی پاتیک نقش مهمی در بررسی فعالیت ضد سرطانی توالی های پپتیدی در این سرورها دارد. میزان دقت سرور ACPred ۹۵/۶۱ درصد و سرور iACP ۹۵/۰۶ درصد است [۱۸].

برای بررسی جایگاه قرارگیری باقی مانده های موقعیت ۴۰ در پروتئین های جهش یافته و وحشی برازئین با استفاده از سرور VADAR، ابتدا سطح در دسترس باقی مانده های پروتئین وحشی برازئین و سپس پروتئین های جهش یافته بررسی شد. نتایج این بررسی نشان داد که در پروتئین وحشی باقی مانده ی آسپارتیک اسید واقع در موقعیت ۴۰ در سطح پروتئین قرار دارد و در تماس با مولکول های قطبی آب می باشد. با در نظر گرفتن شاخص آبگریزی این آمینواسید قرارگیری این باقی مانده در این موقعیت مطلوب به نظر می آید. در مورد پروتئین های جهش یافته نیز می توان گفت که آرژینین جایگزین شده در پروتئین جهش یافته D40R نسبت به پروتئین وحشی، سطح در دسترس حلال را افزایش داده است. در حالی که، حضور آسپارتین در این موقعیت در پروتئین جهش یافته D40N تأثیری در تغییر سطح در دسترس پروتئین نداشته است. حذف آسپارتیک اسید از موقعیت ۴۰ و جایگزینی گلوتامیک اسید در این موقعیت در پروتئین جهش یافته D40Deletion باعث کاهش سطح در دسترس حلال پروتئین شده است (شکل ۳).

بررسی نهایی مدل های ساخته شده و میزان کیفیت آنها توسط سرور ProQ3/ProQ3D بیانگر انتخاب مدل های برتر با بیشترین پایداری نسبت به دیگر مدل ها برای هر جهش می باشد. مقدار انرژی آزاد هر پروتئین معیاری از



شکل ۳ نمودار بررسی جایگاه باقی مانده موقعیت ۴۰ در سطح پروتئین های جهش یافته و وحشی با استفاده از سرور VADAR

جدول ۴ شاخص‌های ارائه شده برای بررسی کیفیت مدل ساختاری پروتئین و میزان انرژی آزاد پروتئین که به ترتیب از طریق سرورهای ProQ3/ProQ3D و dDFIRE/DFIRE 2 Energy Calculation به دست آمده‌اند.

پروتئین	طول توالی آمینواسیدی	PROQ2D	PROQ3D	انرژی کل	DFIRE2	تعداد اتم‌های سنگین مؤثر
WT-BRA	۵۳	۰/۲۱۶	۰/۳۰۲	-۸۸/۷۳	-۶۶/۵۷	۴۴۰
D40DEL	۵۲	۰/۱۶۰	۰/۲۶۸	-۸۵/۸۳	-۶۶/۱۴	۴۳۲
D40R	۵۳	۰/۲۰۸	۰/۲۹۹	-۹۰/۱۹	-۶۷/۹۳	۴۴۳
D40N	۵۳	۰/۲۴۴	۰/۳۴۲	-۸۹/۸۷	-۶۶/۹۰	۴۴۰

جدول ۵ بررسی میزان خاصیت ضدسرطانی پروتئین‌های جهش‌یافته در مقایسه با پروتئین وحشی با استفاده از دو سرور ACPred و

iACP

Protein	WT-Bra	D40del	D40R	D40N
iACP	۹۲%	۹۳ %	۹۳ %	۹۴ %
ACPred	۷۷ %	۷۷/۲ %	۷۷/۵%	۷۷/۵%

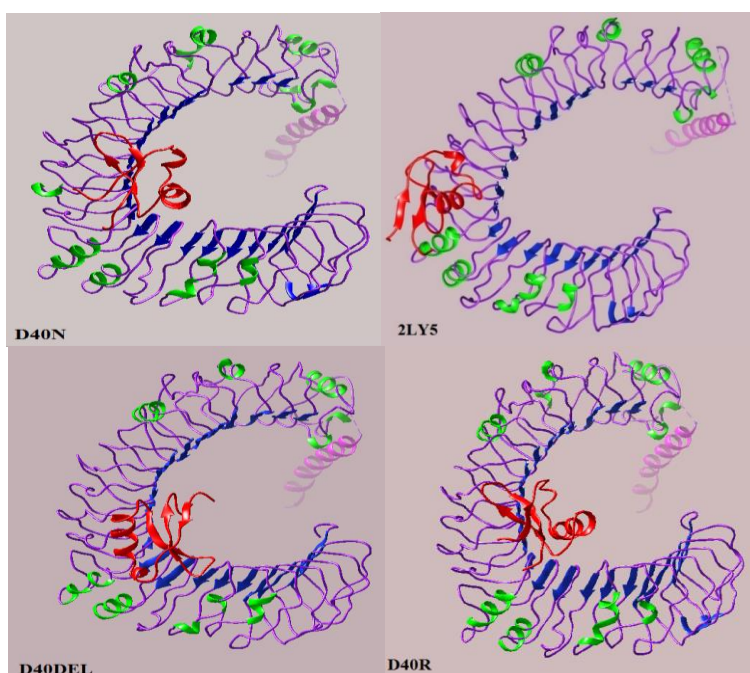
انرژی اتصال جهش‌یافته D40R نسبت به سایر پروتئین‌ها به‌عنوان لیگاند منفی تر بوده، تمایل آن برای برهم‌کنش با گیرنده بیشتر است و در اثر اتصال، گیرنده را پایدارتر می‌کند؛ زیرا از لحاظ ترمودینامیکی هراندازه مقدار انرژی آزاد برهم‌کنش منفی تر باشد، مقدار قدر مطلق انرژی آزاد بیشتر بوده و پروتئین با قدرت بیشتری جذب گیرنده می‌شود [۱۹]. منفی بودن انرژی آزاد برهم‌کنش سبب محکم‌تر شدن پیوندها شده و سیستم لیگاند گیرنده پایدارتر می‌شود و امکان وقوع واکنش اتصال افزایش می‌یابد. پایداری در ترمودینامیک به معنای انرژی آزاد منفی تر می‌باشد و شرط خودبه‌خودی بودن یک واکنش شیمیایی برای تشکیل پیوند منفی بودن انرژی آزاد می‌باشد [۱۹]. طبق امتیازدهی داکینگ و نتایج به‌دست آمده، هرچه اتصال پروتئین به گیرنده محکم‌تر باشد، بیان‌کننده این است که احتمال عدم اتصال به گیرنده در اثر یک تغییر کوچک رخ خواهد داد.

اگرچه اختلافات مشاهده شده در داده‌های جدول ۵ به‌دلیل ماهیت برنامه، می‌تواند در محدوده خطای پیش‌بینی باشد، با این حال عدم وجود مغایرت با نتایج تجربی تاییدی بر صحت نتیجه‌گیری نهایی فرض شده است که مبتنی بر مشاهدات تکرارپذیر آزمایشگاهی است.

اطلاعات مربوط به مقایسه انرژی اتصال، برهم‌کنش‌های مؤثر شامل پیوندهای اندروالسی و الکترواستاتیک و همچنین امتیازات حاصل از انجام داکینگ پروتئین برازئین وحشی و جهش‌یافته‌ها در جدول ۶ و نیز شکل ۴ ارائه شده است. با توجه به ارزیابی این داده‌ها توسط توضیحات ارائه شده سرور HADDOCK، می‌توان نتیجه گرفت که محکم‌ترین اتصال با منفی‌ترین امتیازدهی نسبت به فرم وحشی و سایر جهش‌یافته‌ها، متعلق به جهش‌یافته D40R است. در حالی که ضعیف‌ترین اتصال مربوط به جهش‌یافته‌ای است که در آن آسپاراتات با آسپارژین جایگزین شده است. همچنین، می‌توان نتیجه گرفت که

جدول ۶ فراسنجه‌های مبتنی بر اتصال پروتئین و گیرنده به روش داکینگ مولکولی

	HADDOCK SCORE	Z-SCORE	انرژی واندروالسی	انرژی الکترواستاتیکی	RMSD	انرژی اتصال
WT-Bra	-۱۴۱/۲	-۲/۲	-۶۰/۳	-۴۳۴/۳	۰/۹	-۷۰۷۰/۴۴
D40N	-۱۳۲/۲	-۱/۹	-۵۷	-۴۰۴/۹	۱/۲	-۷۴۵۲/۴۳
D40R	-۱۵۳/۱	-۲/۵	-۷۴/۹	-۳۶۳/۳	۰/۹	-۷۵۱۴/۳۲
D40Del	-۱۲۳/۸	-۲	-۶۰	-۳۵۳/۶	۱	-۷۴۵۲/۴۳



شکل ۵ تصاویر گرافیکی اتصال پروتئین به گیرنده توسط داکینگ مولکولی. شکل اول مربوط به پروتئین وحشی. شکل‌های رنگی مربوط به جهش‌یافته‌ها که در آن لیگاند فلاژلین به صورت ماریچ صورتی رنگ، برازئین قرمز رنگ و گیرنده TLR5 نمایش داده شده است.

۴- نتیجه‌گیری

حالی است که جایگزینی آرژینین با بار مثبت بیشتر نسبت به آسپارژین در موقعیت ۴۰ سبب افزایش پایداری نسبی پروتئین می‌شود، ولی جایگزینی آسپارژین پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد. همچنین در بررسی داکینگ مولکولی مشاهده شد که اتصال جهش‌یافته D40R به لیگاند نسبت به پروتئین وحشی تا حد زیادی بهبود یافته است، و می‌توان گفت که جهش‌یافته D40R در مقایسه با سایر جهش‌یافته‌ها دارای اتصال مطلوب‌تری به گیرنده TLR5 می‌باشد. بنابراین، پروتئین وحشی و جهش‌یافته

در بررسی نتایج حاصل از ایجاد جهش در موقعیت ۴۰ توالی پروتئینی برازئین مشاهده شد که ساختار جهش‌یافته‌ها به جز D40R نسبت به پروتئین وحشی تغییر چندانی نداشته است. پایداری پروتئین در جهش‌یافته D40DEL نسبت به سایر جهش‌یافته‌ها مقداری افزایش می‌یابد و این می‌تواند به این معنا باشد که با حذف بار منفی از موقعیت ۴۰ و همچنین حذف اثر زنجیره جانبی آسپاراتات، پایداری پروتئین افزایش خواهد یافت. این در

Protein Science, 25, 711-719.

[9] Hashimoto, C., Hudson, K. L., & Anderson, K. V. (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269-279.

[10] Lacagnina, M. J., Watkins, L. R., & Grace, P. M. (2018). Toll-like receptors and their role in persistent pain. *Pharmacology & therapeutics*, 184, 145-158.

[11] Ayala-Cuellar, A. P., Cho, J., & Choi, K. C. (2019). Toll-like receptors: A pathway alluding to cancer control. *Journal of Cellular Physiology*, 234, 21707-21715.

[12] Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Eugene, C. Y., Goodlett, D. R., ..& Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410, 1099-1103.

[13] Maîtrepierre, E., Sigoillot, M., Le Pessot, L., & Briand, L. (2013). An efficient *Escherichia coli* expression system for the production of a functional N-terminal domain of the T1R3 taste receptor. *Bioengineered*, 4, 25-29.

[14] Kämper, A., Apostolakis, J., Rarey, M., Marian, C. M., & Lengauer, T. (2006). Fully automated flexible docking of ligands into flexible synthetic receptors using forward and inverse docking strategies. *Journal of chemical information and modeling*, 46, 903-911.

[15] Willard, L., Ranjan, A., Zhang, H., Monzavi, H., Boyko, R. F., Sykes, B. D., & Wishart, D. S. (2003). VADAR: a web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic acids research*, 31, 3316-3319.

[16] Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157, 105-132.

[17] Uziela, K., Menendez Hurtado, D., Shu, N., Wallner, B., & Elofsson, A. (2017). ProQ3D: improved model quality assessments using deep learning. *Bioinformatics*, 33, 1578-1580.

[18] Schaduangrat, N., Nantasenamat, C., Prachayasittikul, V., & Shoombuatong, W. (2019). ACPred: a computational tool for the prediction and analysis of anticancer peptides. *Molecules*, 24, 1973.

[19] Lengauer, T., & Rarey, M. (1996). Computational methods for biomolecular docking. *Current opinion in structural biology*, 6, 402-406.

D40R با اتصال چشمگیر به جایگاه اتصالی TLR5

می‌تواند گزینه مطلوبی برای پپتیدهای ضدسرطانی باشند.

معرفی پروتئین‌های وحشی و جهش‌یافته به‌عنوان پروتئین

ضدسرطانی در این پژوهش صرفاً بر اساس اطلاعات

بیوانفورماتیکی بوده و صحت این نتایج نیازمند روش‌های

آزمون و خطای آزمایشگاهی می‌باشد.

۵-منابع

1] Ming, D., & Hellekant, G. (1994). Brazzein, a new high-potency thermostable sweet protein from *Pentadiplandra brazzeana* B. *FEBS letters*, 355, 106-108.

[2] Assadi-Porter, F. M., Maillet, E. L., Radek, J. T., Quijada, J., Markley, J. L., & Max, M. (2010). Key amino acid residues involved in multi-point binding interactions between brazzein, a sweet protein, and the T1R2-T1R3 human sweet receptor. *Journal of molecular biology*, 398, 584-599.

[3] Hellekant, G., & Danilova, V. (2005). Brazzein a small, sweet protein: discovery and physiological overview. *Chemical senses*, 30, 88.

[4] Chung, J. H., Kong, J. N., Choi, H. E., & Kong, K. H. (2018). Antioxidant, anti-inflammatory, and anti-allergic activities of the sweet-tasting protein brazzein. *Food chemistry*, 267, 163-169.

[5] Jafari, S. S., Jafarian, V., Khalifeh, K., Ghanavati, P., & Shirdel, S. A. (2016). The effect of charge alteration and flexibility on the function and structural stability of sweet-tasting brazzein. *RSC advances*, 6, 59834-59841.

[6] Kmiecik, S., Gront, D., Kolinski, M., Wieteska, L., Dawid, A. E., & Kolinski, A. (2016). Coarse-grained protein models and their applications. *Chemical reviews*, 116, 7898-7936.

[7] Jiang, P., Ji, Q., Liu, Z., Snyder, L. A., Benard, L. M., Margolskee, R. F., & Max, M. (2004). The cysteine-rich region of T1R3 determines responses to intensely sweet proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 45068-45075.

[8] Singarapu, K. K., Tonelli, M., Markley, J. L., & Assadi-Porter, F. M. (2016). Structure-function relationships of brazzein variants with altered interactions with the human sweet taste receptor.

Prediction of the effect of wild type brazzein and its mutated forms in the position of aspartate 40 on TLR5 using modeling methods based on molecular docking

Elahe Karimipour¹, Vahab Jafarian^{2*}

1.M.Sc. of Biochemistry, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2. Associate Professor of Biochemistry, Faculty of Science, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

v.jafarian@znu.ac.ir

Receipt: 2020/12/29

Accepted: 2020/09/10/30

Abstract

Nowadays, the peptides and proteins possessing anti-cancer, anti-allergic and anti-inflammatory properties are used for disease treatment. Brazzein is a sweet protein containing 54 amino acids and according to reports, it has anti-cancer properties based on sequence and structure. In this study, the role of position 40 aspartate in the structure and function of wild brazzein protein and mutants as well as the anti-cancer properties of the peptides obtained on the TLR5 receptor were investigated. For this, several models of mutated forms were designed and constructed using Modeller.v.9.20 software. Then, the accuracy of the models and the physico-chemical properties of wild type (WT) and mutants of D40N, D40R and D40Deletion were evaluated using various bioinformatics servers and softwares including ProtParam, ProtScale, SAVES, PIC, ModEval, and PredyFlexy. For predicting anticancer properties, the sequence of WT protein and mutants was examined and compared using ACPred and iACP servers. The quality and analysis of WT protein and mutants binding as a ligand with TLR5 receptor, triggering an anti-cancer signaling pathway, were investigated through molecular docking using HADDOCK software. The results of bioinformatics parameters analysis indicated the possibility of improving the stability of brazzein structure and function, and the probability of increasing the available surface to bind to the receptor. Moreover, based on the results of molecular docking analyses, the ability binding TLR5 receptor was higher in D40R than the other proteins indicating an increased probability in anti-cancer properties of the mutant. According to this study, by implementing various mutations in aspartate position 40, there is capability for improving the brazzein function from biological and medicinal point of view.

Keywords: Anti-cancer property, Molecular docking, Sweet protein, Site-directed mutagenesis, Thermostability.