

شبیه سازی دینامیک مولکولی برهمکنش ساخارین با پروتئین p53 انسانی

محسن شهلائی^۱، محبوبه منصوریان^{۲*}

^۱گروه شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران، ^۲مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج
تاریخ وصول: ۱۴۰۲/۰۶/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۵

چکیده

زمینه و هدف: نقش شیرین کننده‌های مصنوعی در وقوع خطر سرطان در طی چند دهه گذشته به طور گسترده‌ای مورد بحث قرار گرفته است. لذا هدف از این مطالعه تعیین شبیه‌سازی دینامیک و مولکولی بر همکنش ساخارین (SA) با پروتئین p53 انسانی بود.

روش بررسی: این مطالعه بیوانفورماتیک در سال ۱۴۰۲ انجام شد. بر همکنش SA و سدیم ساخارین (SSA) با پروموتور (راه انداز) ژن p53 انسانی (Pp53g) قبلاً در سال ۱۳۹۹ در دو بخش نظری و تجربی چاپ شده است، اما در مطالعه حاضر، قابلیت اتصال و جایگاه اتصال لیگاند SA به عنوان یک شیرین کننده مصنوعی با پروتئین p53 انسانی (رستپتور) به عنوان سرکوبگر تومور به صورت نظری انجام شد. رزیجوهای اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش، انرژی آزاد اتصال و ثابت اتصال تعیین شد. برای محاسبات برهمکنش مولکولی، از داکینگ مولکولی استفاده شد. اطلاعات دقیق‌تر در خصوص شیوه اتصال کمپلکس لیگاند رستپتور با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD) به دست آمد. فایل ساختار و توپولوژی برای پروتئین p53 انسانی استخراج شده از پایگاه داده پروتئین بر اساس میدان نیروی AMBER 99 با برنامه GROMACS 5.3.1 ساخته شد. برنامه acpype/Antechamber با GAFF برای ایجاد فایل ساختار و توپولوژی لیگاند در شبیه سازی MD استفاده شد. این میدان نیرو با میدان نیروی AMBER 99 سازگار است. زمان شبیه سازی در حلال صریح ۵۰ نانوثانیه برای کمپلکس پروتئین p53 با SA بود. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف و مقایسه با نتایج مقالات مرتبط تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج داکینگ مولکولی نشان داد که ترکیب SA به پروتئین p53 انسانی با انرژی اتصال (پیوندی)، ۴/۵۵- کیلوکالری بر مول و ثابت اتصال ۴۶۲/۱۸ میکرومولار اتصال یافت. یک پیوند پیوند هیدروژنی بین SA با اسید آمینه Leu137 تشکیل شد. تغییرات کنفورماسیونی حاصل از شبیه‌سازی MD برای کمپلکس لیگاند - پروتئین نشان داد که SA می‌تواند از طریق دو پیوند هیدروژنی به Arg196 و His179 به عنوان اسید آمینه‌های کلیدی پروتئین p53 در ناحیه اتصال به DNA متصل شود. SA هم‌چنین می‌تواند در مجاورت اسید آمینه‌های اسید آمینه‌های Leu137، Ala138، His179، Asp184، Met237 از طریق پیوندهای هیدروفوب قرار گیرد. مقادیر نمودارهای انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD)، نوسان جذر میانگین مربعات (RMSF)، شعاع چرخش (Rg)، برای پروتئین p53 آزاد و در حضور لیگاند SA نشان از اتصال پایدار SA به پروتئین p53 دارد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در مورد مکانیسم اتصال SA و پروتئین p53 انسانی به عنوان یک درشت مولکول در سطح مولکولی با جزئیات ریز اتمی ارائه کند. نتایج این مطالعه می‌تواند در تعیین احتمال خطر بالقوه سرطان‌زایی این شیرین کننده با توجه به مصرف زیاد آن و طراحی و سنتز شیرین کننده‌های مصنوعی جدیدتر و ایمن‌تر مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: ساخارین، پروتئین p53 انسانی، داکینگ مولکولی، شبیه سازی دینامیک مولکولی، سرطان

*نویسنده مسئول: محبوبه منصوریان، یاسوج، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

مقدمه

ساخارین(SA)^(۱) به عنوان اولین شیرین کننده مصنوعی، در سال ۱۸۷۹ به طور تصادفی به وسیله شیمی دانی به نام فالبرگ کشف شد(۱). SA نیز با نام‌های E954 و بنزوئیک سولفیماید^(۲) نیز شناخته می‌شود. این شیرین کننده، عمدتاً به صورت نمک سدیم محلول و SA آزاد کم محلول وجود دارد. SA به صورت پودر یا قرص عرضه می‌گردد و در جهان به شکل گسترده‌ای به عنوان شیرین کننده در محصولات مختلف از جمله نوشابه، مواد غذایی و صنایع دارویی به کار می‌رود. بیش از یک قرن است که این ترکیب به شکل‌های مختلف تولید و در اختیار بیماران دیابتی و یا رژیمی قرار گرفته است(۲). در اوایل دهه ۱۹۷۰، در اغلب پژوهش‌های منتشر شده سرطان‌زایی SA موضوع بحث‌های اپیدمیولوژیک متعددی بوده است و دوزهای بسیار بالای SA از دلایل بروز سرطان مثانه در موش‌ها شناخته شد(۳ و ۴)، پس از آن سازمان غذا و داروی آمریکا(FDA)^(۳) مصرف آن را محدود نمود و در سال ۱۹۷۷ ممنوعیت استفاده از SA را پیشنهاد کرد. طبق نظر FDA، برچسب هشدار روی همه محصولات دارای SA قرار گرفت تا مشخص کند که SA یک عامل بالقوه ایجاد کننده سرطان در موش‌های آزمایشگاهی می‌باشد، ولی نتایج پژوهش‌های بعدی، رابطه قابل توجهی بین استفاده از SA و افزایش بروز خطر سرطان مثانه در انسان را تأیید نکرد(۵ و ۶) و نتایج ضد و نقیضی در بعضی پژوهش‌ها به دست آمد(۵-۹ و ۳، ۲). با این حال، ممنوعیت SA در ایالات متحده برداشته شد و در سال ۲۰۰۰، برچسب‌های

هشدار حذف شدند(۱۰ و ۸، ۵، ۲). علی رغم محدودیت مصرف SA به مدت طولانی در کانادا، اداره غذای وزارت بهداشت کانادا^(۴) در حال بررسی لیست کردن مجدد SA به عنوان افزودنی غذایی می‌باشند و بسیاری از کشورهای جهان، اما نه کانادا، در حال حاضر اجازه استفاده از SA را به عنوان یک عامل شیرین کننده غیر مغذی در غذاها می‌دهند(۱۱ و ۸، ۲)^۱.

سرطان نتیجه تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌ها است که تحت تأثیر عوامل محیطی و اختلال‌های ژنتیکی به وجود می‌آید. فقدان ژن‌های مهار کننده توموری باعث تقسیم غیر قابل کنترل سلول‌های سرطانی می‌شود. عوامل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی از جمله تغییر در مسیرهای سیگنالی ژن‌های سرکوبگر تومور^(۵) p53 در بروز سرطان نقش به سزایی دارند. ژن p53 به عنوان نگهبان ژنوم، یکی از مهم‌ترین ژن‌های مهم در جلوگیری از سرطان در انسان می‌باشد(۱۳ و ۱۲). پروتئین p53 هم مهار کننده و هم ارتقاء دهنده سلول‌های سرطانی است. پروتئین p53 یک عامل نسخه‌برداری هسته‌ای می‌باشد که به صورت یک تترامر به جایگاه‌های معینی بر روی DNA متصل می‌شود(۱۶-۱۴). حدود ۸۰ درصد جهش‌های نقطه‌ای^(۶) p53، در سرطان‌های انسان در محل اتصال پروتئین p53 به DNA روی می‌دهند که

- 1-Saccharin
- 2-Benzoic sulfimide
- 3-Food and Drug Administration
- 4-Health Canada's Food Directorate
- 5-Tumor suppressor
- 6-Point mutation

صرفه لیگاند(دارو)، گیرنده (رسیپتور) در یک بازه زمانی بسیار کوتاه محبوبیت پیدا کرده است(۲۰). برهمکنش‌های پروتئین-لیگاند در فرآیندهای سلولی نقش اساسی دارد، این برهمکنش‌ها در زمینه‌های مختلف نظیر بیوانفورماتیک، شیمی دارویی و بیولوژی سلولی مطالعه شده‌اند. هدف شبیه‌سازی مولکولی، فهم و پیشگویی خواص ماکروسکوپی بر اساس اطلاعات جزئی در مقیاس اتمی و میکروسکوپی می‌باشد(۲۱).^۲ اساس خیلی از پروژه‌های کاربردی در سطوح مختلف می‌تواند پژوهش‌های تئوریک باشد، این رویکردهای نظری به عنوان پیش‌آگهی به پژوهش‌های تجربی در جای خود نیز موجب کم کردن هزینه‌های پژوهشی خواهند شد. با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک، می‌توان محاسبات برهمکنش‌های مولکولی را انجام داد که اساس کار این روش‌ها بر منطق بیوفیزیکی استوار است. استفاده از نتایج روش‌های نظری نرم افزارهای کامپیوتری در کنار روش‌های آزمایشگاهی باعث تسریع درک ما از برهمکنش و اثر متقابل مولکول‌ها خواهد شد(۲۲ و ۲۰). بنابراین به عنوان یک روش آلترناتیو، بررسی برهمکنش SA با گیرنده پروتئین p53 انسانی، از طریق روش‌های بیوانفورماتیک انجام شد.

برهمکنش SA و سدیم ساخارین (SSA)^(۱) با پروموتور(راه انداز) ژن p53 انسانی(Pp53g)^(۲) قبلاً در دو بخش نظری و تجربی در سال ۱۳۹۹ انجام شده است(۲۳). در این مطالعه، جایگاه اتصال نظری و

باعث می‌شود ژن‌های تحت کنترل p53 نتوانند نسخه‌برداری نمایند. پروتئین p53 جهش یافته که به DNA متصل نمی‌شود، پروتئین ناقصی ایجاد می‌کند که فعالیت پروتئین طبیعی را مهار می‌کند(۱۷ و ۱۲).

شیرین کننده‌های مصنوعی ممکن است اثرات مضر و موتاژنی بر بدن داشته باشند و باعث بسیاری از خطرات مثل سرطان شوند(۱۹ و ۱۸، ۸، ۲). به عنوان مثال، مطالعه آندره آتا و همکاران با هدف تعیین نقش شیرین کننده‌های مصنوعی در ایجاد تومورهای دستگاه ادراری در آرژانتین انجام شد. خطر ابتلا به سرطان در افرادی که در مدت طولانی(بیشتر از ده سال) از شیرین کننده‌های مصنوعی از جمله SA استفاده کرده‌اند، به طور معنی‌دار در مقایسه با افرادی که از این شیرین کننده‌ها در مدت کوتاه‌تری استفاده کرده‌اند، با در نظر گرفتن سن، جنس و موقعیت اجتماعی افزایش چشمگیری داشته است(۱۹).

در نتیجه با در نظر گرفتن همه این مطالب، حدس زده شد که اتصال SA به پروتئین p53 انسانی، می‌تواند باعث تغییر شکل فضایی و کنفورماسیون پروتئین و دیگر پارامترهای مهم و مدنظر در شبیه‌سازی شود و در نتیجه باعث شود که پروتئین p53 عملکرد صحیح خود را نداشته باشد. در آن صورت با توجه به نتایج آنالیزها می‌توان به صورت بالقوه احتمال به سرطان زا بودن SA به عنوان مختل کننده عملکرد صحیح پروتئین p53 داد.

داکینگ مولکولی در جامعه علمی به عنوان

ابزاری مهم برای بررسی برهمکنش‌های مقرون به

1-Sodium Saccharin
2-Pp53g: promoter of human p53 gene

برهمکنش SA با پروتئین p53 انسانی با روش‌های داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (MD)^(۱) مورد بررسی قرار گرفته است تا اطلاعاتی از نحوه برهمکنش اولیه پروتئین p53 انسانی با SA، رزجو(باقی مانده)های اسید آمینه درگیر در برهمکنش، انرژی آزاد اتصال^(۲) و ثابت مهار یا اتصال^(۳) با روش داکینگ مولکولی به دست آید و همچنین اطلاعات دقیق‌تری از نحوه اتصال کمپلکس SA با پروتئین p53 انسانی با شبیه‌سازی MD به دست آید. نتایج این کار می‌تواند در نشان دادن خطر بالقوه سرطان‌زایی SA مفید باشد، لذا هدف از این مطالعه تعیین شبیه‌سازی دینامیک و مولکولی برهمکنش ساختارین (SA) با پروتئین p53 انسانی بود.

روش بررسی

در این مطالعه بیوانفورماتیک که در سال ۱۴۰۲ انجام شد، از روش داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی MD استفاده شد. در ابتدا، پژوهش‌های داکینگ مولکولی برای یافتن مکان‌های برهمکنش اولیه، موقعیت و جهت مطلوب SA به عنوان یک لیگاند بر روی پروتئین p53 انسانی انجام شد. سپس، لیگاند داک شده نهایی به پروتئین p53 برای شبیه‌سازی MD استفاده شد. امروزه، شبیه‌سازی‌های MD متعارف و معمول برای تشخیص بهترین شیوه اتصال و مطالعه برهم‌کنش‌های بین اهداف و لیگاندها استفاده می‌شوند (۲۳ و ۲۱). اطلاعات دقیق‌تر در خصوص شیوه اتصال کمپلکس SA- پروتئین p53 انسانی با

شبیه‌سازی MD به دست آمد. مدل‌سازی مولکولی می‌تواند یک تصویری از ویژگی‌های اتصال لیگاندهای کوچک به ماکرومولکول در اختیار بگذارد و به تکمیل شدن و گویاتر شدن نتایج تجربی کمک کند.^(۴) در این پروژه ابتدا از نرم‌افزار اتوداک^(۵) استفاده شد که از قدیمی‌ترین و مشهورترین برنامه‌های داکینگ مولکولی می‌باشد (۲۴). محاسبات کامپیوتری بر طبق پروتکل‌های گزارش شده در منابع انجام شدند (۲۲). این مطالعه با استفاده از پروتئین p53 انسانی به عنوان گیرنده انجام شد. توالی انسانی رسپتور از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI)^(۶) دریافت شد. ساختار اشعه ایکس سه بعدی (3D)^(۷) رسپتور انسانی از بانک داده‌های پروتئین (PDB)^(۸) در مرکز همکاری پژوهشی بیوانفورماتیک ساختاری (RCSB)^(۹) دانلود شد. در این پژوهش، چون ساختار کریستالوگرافی 3D پروتئین p53 انسانی در PDB موجود بود، مرحله همولوژی مدلینگ مورد نیاز نبود، ولی بعد از داکینگ لیگاند SA به پروتئین p53 با استفاده از نرم‌افزار اتوداک تولز^(۹) (۲۵ و ۲۴)، شبیه‌سازی MD، برای ایجاد ساختار پایدار لیگاند- پروتئین طی اجرای دو سیستم جداگانه بر روی پروتئین p53 انسانی در حضور و در غیاب SA با

- 1-Molecular Dynamics Simulation
- 2-Estimated Free Energy of Binding
- 3-Estimated Inhibition Constant, K_i
- 4-AutoDock 4.2
- 5-National Center for Biotechnology Information (NCBI)
- 6-Three-dimensional (3D)
- 7-Protein Data Bank (PDB)
- 8-Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB)
- 9-Auto Dock Tools

بهینه سازی گردید. با استفاده از میدان نیروی مکانیکی مولکولی MM⁺، محاسبات بهینه سازی هندسی 3D برای لیگاند تا زمان به دست آمدن گرادیان ریشه میانگین مربعی کمتر از ۰/۰۱ کیلوکالری بر (آنگستروم مول) انجام شد. کنفورماسیون نهایی با روش AM1 نیمه تجربی محاسبه شد. ساختار مولکولی با استفاده از الگوریتم پولاک - ریبری^(۴) تا زمان رسیدن به گرادیان ریشه میانگین مربعی برابر با ۰/۰۱ کیلوکالری بر (آنگستروم مول) بهینه سازی شد. جزییات روش بهینه سازی قبلاً توصیف شده است (۲۷)، فرمول مولکولی SA، C₇H₆NO₃S می باشد (۱).^۴ ۲- تعیین جایگاه اتصال و میزان انرژی اتصال ساخارین به پروتئین p53 انسانی با استفاده از روش داکینگ مولکولی، در این مرحله انرژی آزاد حاصل از برهمکنش لیگاند SA با رسپتور (پروتئین)، اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش به دست آمد. SA بر روی مکان های پیوندی (اتصال) رسپتور با استفاده از نرم افزار اتوداک قرار گرفت. داکینگ مولکولی با استفاده از روش معمول و پارامترهای پیش فرض این نرم افزار انجام شد (۲۴). در پروتکل داکینگ، لیگاند به عنوان یک مولکول انعطاف پذیر برای چرخش همه پیوندهای قابل چرخش لیگاند و به دست آوردن بهترین و بهینه ترین کانفورمر لیگاند درون مکان های فعال رسپتور در نظر گرفته شد. در مرحله اول،

استفاده از نرم افزار گرومکس^(۱) انجام شد (۲۶). در نهایت بررسی و تجزیه و تحلیل پژوهش های شبیه سازی های MD و محاسبه انرژی های برهمکنش به طور مفصل انجام شد. نحوه انجام این مراحل به طور خلاصه به شرح ذیل می باشد: ۱- بهینه سازی ساختار سه بعدی پروتئین p53 انسانی به عنوان تارگت و ساخارین به عنوان لیگاند، در این مرحله از اطلاعات ساختاری که در سایت www.expasy.ch استفاده شد. پروتئین p53 پروتئینی به طول ۳۹۳ اسید آمینه می باشد که در ارتباط با DNA بوده و در انسان به وسیله ژن p53 کد می شود. جایگاه اتصال به DNA پروتئین p53 از دو صفحه بتا و یک اتم روی تشکیل شده است که باعث پایداری ساختار پروتئین می شود. پروتئین p53 به صورت یک تترامر به جایگاه های معینی بر روی DNA متصل می شود (۱۵). ساختار کریستال (بلورین) پروتئین p53 انسانی با شناسه PDB ID: 1TSR با رزولوشن 2.20 Å و به طول ۲۱۹ اسید آمینه به عنوان تارگت انتخاب شد (۱۵). زنجیره B رسپتور مورد نظر برای داکینگ انتخاب شد، در نهایت بعد از این که ساختار پایدار رسپتور پروتئینی به دست آمد، بایستی ساختار 3D از SA به عنوان لیگاند برای برهمکنش با پروتئین p53 انسانی رسم و بهینه گردد. ساختار 2D شیرین کننده SA با استفاده از نرم افزار کم درا اولترا^(۲) ۸ ترسیم شد (شکل ۱) و با استفاده از نرم افزار هپراک^(۳) ۷

(Hypercube, Inc, Gainesville, FL, USA; <http://www.hyper.com>)

1-GROMACS
2-ChemDraw Ultra 8
3-HyperChem 7.0
4-Polak-Ribiere

فایل‌های مختصاتی^(۱) رسپتور و لیگاند آماده شد که این فایل‌ها اطلاعات مورد نیاز اتوگرید^(۲) و اتوداک را در بر دارد. در مرحله بعد، گرید مپ‌ها^(۳) با استفاده از اتوگرید (بخشی از بسته نرم‌افزاری اتوداک) ترسیم گردید. چون موقعیت محل اتصال لیگاند در کمپلکس از طریق موتاژن‌ز یا جهش‌زایی هدایت یافته مکانی (SDM)^(۴) مشخص شده است، گرید باکس^(۵) بر روی اتم Cys277 (۲۸-۳۱) از پروتئین p53 انسانی (1TSR) در مختصات $Z=85/768$, $Y=30/286$ و $X=63/186$ قرار گرفت (۱۵). با استفاده از اتوگرید ۴، فایل پارامتر شبکه از طریق مقادیر محورهای X، Y، Z با ابعاد گرید باکس $50 \times 50 \times 50$ تنظیم شد. فاصله نقطه شبکه 3.75 \AA به صورت مقدار پیش فرض در نظر گرفته شد. برای سیستم‌های معمولی، اتوداک چندین بار اجرا می‌شود تا چندین کنفورماسیون داک شده به دست آید. تحلیل خوشه‌ای با ۲۰۰ اجرا انجام شد (۲۲). داکینگ با استفاده از چندین متد جستجوی انجام می‌شود. از بین سه الگوریتم متفاوت جستجوی نوع پیوندها و گروه‌های عاملی درگیر اتصال لیگاند برای برهمکنش با گیرنده، از برنامه الگوریتم ژنتیک لامارکی (LGA)^(۶) به عنوان کارآمدترین متد استفاده شد (۳۲). انرژی پیوندی برهمکنش نیز با استفاده از اتوداک محاسبه شد. در نهایت، در این مرحله انرژی آزاد حاصل از برهمکنش SA با پروتئین p53 انسانی، ثابت مهار و اسیدهای آمینه درگیر در برهمکنش به دست آمد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین p53 انسانی در حضور ساخارین، شبیه‌سازی MD

برای پروتئین p53 انسانی آزاد و کمپلکس پروتئین p53 انسانی با SA برای مطالعه اثرات کلی این لیگاند بر روی پروتئین انجام شد. بنابراین دو فاز مجزای شبیه‌سازی MD پروتئین p53 انسانی به تنهایی و در حضور SA داک شده همان طور که قبلاً توصیف شده انجام شدند (۲۶ و ۲۳). فایل ساختار و توپولوژی برای پروتئین p53 انسانی استخراج شده از پایگاه داده پروتئین بر اساس میدان نیروی AMBER 99 با برنامه گرومکس ۵.۳.۰۱ ساخته شد. برنامه acpype/Antechamber^(۷) برای ایجاد فایل ساختار و توپولوژی لیگاند در شبیه‌سازی MD استفاده شد. این میدان نیرو با میدان نیروی AMBER 99 سازگار است (۳۳ و ۲۷). زمان شبیه‌سازی در حلال صریح^(۸) 50 ns نانو ثانیه برای هر کدام از سیستم‌ها بود.^۵

شبیه‌سازی‌های MD در یک گروه NPT با شرایط مرزی دوره‌ای انجام شد. نیروهای وان در والسی با استفاده از حداقل مقدار ۱۰ آنگستروم بررسی شدند. برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک با استفاده از مدل ذرات مش اوالد (PME)^(۹) با حداقل مقدار ۱۰ آنگستروم محاسبه شد (۳۴). سیستم‌ها با یک لایه مدل آب TIP4P^(۱۰) با حداقل مقدار ۱۲ آنگستروم در همه جهات حلال پوشی شد (۳۵). فرکانس به روز

- 1-Coordinate
- 2-AutoGrid
- 3-Grid map
- 4-Site-directed mutagenesis
- 5-Grid box
- 6-Lamarckian genetic algorithm
- 7-General AMBER Force Field (GAFF)
- 8-Explicit
- 9-Particle-Mesh Ewald (PME)
- 10-The 4-site transferable intermolecular potential (TIP4P)

p53 آزاد و کمپلکس(پروتئین p53 و SA) به ترتیب شامل ۲۷۶۳۳ و ۲۷۶۱۶ مولکول آب بود. انرژی پتانسیل و جنبشی و دما با استفاده از یک دستور انرژی G^(۶) در بسته نرم‌افزاری گرومکس ۵ محاسبه شد.^۶

در بخش بیوانفورماتیک، اتوداک تولز دارای چندین روش برای آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی داکینگ است که شامل ابزاری برای دسته بندی نتایج بر اساس شباهت کنفورماسیون، دیدن کنفورماسیون‌ها، دیدن پتانسیل‌های تمایلی^(۷) ایجاد شده به وسیله اتوگرید است. نتایج به دست آمده از داکینگ شامل فایل خروجی داکینگ و اشکال ۳D از لیگاند متصل شده به ماکرومولکول(رسپتور) می‌باشد که با ابزار های گرافیکی قابل مشاهده است و در تحلیل و به دست آوردن بهترین حالت از لیگاند برای برهمکنش با ماکرومولکول به ما کمک می‌کند. در میان کنفورماسیون‌های مختلف، کنفورماسیون با بهترین حالت و با کم‌ترین انرژی پیوندی(برحسب کیلوکالری بر مول) انتخاب شد. آنالیز انرژی‌های محاسبه شده و منطقی بودن نتایج دست به دست هم داده تا بهترین جواب را تعیین کنند. در همه این مراحل ساختارهای مولکولی با استفاده از نرم افزار 3D مانند دینامیک

رسانی لیست مجاور^(۱) برابر با ۱ پیکوثانیه بود. شبیه سازی MD برای هر دو سیستم در چهار مرحله انجام شد؛ در نخستین مرحله، کل سیستم با استفاده از الگوریتم تندترین شیب^(۲) و سپس با الگوریتم گرادیان مزدوج^(۳) کمینه‌سازی شد. در دومین مرحله، حلال و یون‌های کلر با استفاده از کمینه‌سازی و MD در گروه NVT برای ۵۰۰ پیکوثانیه و در گروه NPT برای ۱۰۰۰ پیکوثانیه در دمای ۱۰۰ درجه کلوین، که در آن پیکربندی ساختارها ثابت نگه داشته شده بود به حالت کمپلکس درآمدند. در سومین مرحله، به منظور دست یابی به حالت تعادل در ۳۰۰ درجه کلوین و فشار ۱ بار، سیستم در کوپلینگ دمای ضعیف(پیکوثانیه T=۰/۱) و کوپلینگ فشار(پیکوثانیه T=۱) گرمادهی شد. الگوریتم برندنسن^(۴) برای ترموستات و باروستات در فاز تعادل انتخاب شد(۳۶). برای محدودسازی طول پیوندهای حاوی هیدروژن، الگوریتم LINCS استفاده شد(۳۷). دمای سیستم از ۱۰۰ درجه تا ۳۰۰ درجه کلوین افزایش یافت و سرعت‌ها در هر مرحله بر طبق توزیع مکسول-بولتزمن^(۵) در آن دما تعیین شد(۳۸). در مرحله تولید نهایی، شبیه‌سازی‌های MD، ۵۰ نانوثانیه در ۳۰۰ درجه کلوین با یک گام زمانی ۲ فمتوثانیه برای دو سیستم پروتئین p53 انسانی در غیاب و حضور SA انجام شد و ساختارهای نهایی به دست آمدند. ترموستات و باروستات برای مرحله تولید، ترموستات نوز-هاور و باروستات پارینلو-رحمان بودند(۳۶). برای خنثی نگه داشتن سیستم‌ها با استفاده از برنامه genion، با افزودن چهار یون کلر، مولکول‌های آب با یون‌های کلر در نقاطی تصادفی جایگزین شدند. باکس شبیه‌سازی پروتئین

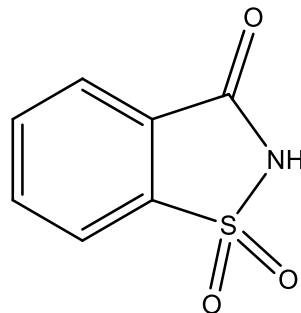
- 1-Neighbor list
- 2-Steepest Descent Algorithm
- 3-Conjugate Gradient Algorithm
- 4-Berendsen Algorithm
- 5-Maxwell-Boltzmann Distribution
- 6-G_energy Command
- 7-Affinity Potentials

است، کمترین انرژی آزاد اتصال با مقدار ۴/۵۵- کیلوکالری بر مول و ثابت اتصال ۴۶۲/۱۸ میکرومولار گزارش شد و SA قادر به اتصال به پروتئین p53 انسانی می‌باشد. همان طور که مکان‌های اتصال SA در شکل 2A نشان داده است، SA در پروتئین p53 قرار داشت. یک پیوند پیوند هیدروژنی بین اتم اکسیژن O2 متصل به S از SA با هیدروژن متصل به اتم نیتروژن N2 رزیجو اسیدآمینه Leu137 با طول پیوند ۲/۷۲ آنگستروم تشکیل شد. علاوه بر پیوندهای هیدروژنی، حلقه فنیل SA عمیقاً در پروتئین p53 از طریق پیوندهای آب گریز با رزیجوهای اسیدآمینه، Gln 136, Leu137, Lys139, Asn239, Cys275, Ala276 قرار گرفته است.

مولکولی بصری (VMD)^(۱) (۳۹) قابل مشاهده است. طرح شماتیک 2D نتایج داکینگ به طور بصری (نموداری) برای درک الگوی برهم کنش با نرم افزار لیگ پلاس^(۲) تجزیه تحلیل شد (۴۰). برای بررسی دقیق‌تر، پایداری و انعطاف‌پذیری مسیر، آنالیزهای شبیه‌سازی MD با استفاده از ویژگی‌ها و پارامترهای مختلف انجام شد (۲۳). نتایج داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی MD بایستی با نتایج SDM مقالات مقایسه و ارزیابی شود (۲۵).

یافته‌ها

بررسی نتایج داکینگ نشان می‌دهد که انرژی آزاد اتصال (انرژی پیوندی) SA به پروتئین p53 منفی



1,1-dioxo-1,2-benzothiazol-3-one

شکل ۱. ساختار شیمیایی ساخارین^(۱)

1-Visual Molecular Dynamics (VMD)
2- LigPlus

پایدار بوده است. از سوی دیگر، نقاط داده میانگین RMSD برای پروتئین p53 آزاد و در حضور SA به ترتیب 0.30 ± 0.05 نانومتر و 0.22 ± 0.03 نانومتر می باشد (شکل 3A). RMSD مختصات پروتئین از مقادیر اولیه، به صورت تابعی از زمان شبیه سازی، از عوامل کلیدی پایداری و دریافت کنفورماسیونی، یک هدف کلیدی در شبیه سازی مولکولی می باشد. میانگین کم RMSD کمپلکس پروتئین p53 در حضور لیگاند در مقایسه با پروتئین آزاد نشان دهنده انعطاف پذیری کم بکن⁽⁵⁾ پروتئین به دلیل کمپلکس شدن می باشد. این نشان دهنده اتصال (پیوند) پایدار لیگاند با پروتئین می باشد که منجر به پایداری پروتئین می شود. بنابراین، این نشان می دهد که زمان شبیه سازی تحت تعادل حرارتی و شرایط شبیه سازی سیستمها کافی و پایدار (ثابت) است. با این حال، پس از کمینه سازی انرژی و حرارت دهی آهسته برای رسیدن به حالت تعادل، RMSD هر دو سیستم به حالت تعادل رسیده و حول مقدار میانگین در طول 50 نانوثانیه شبیه سازی نوسان دارد. ⁴همچنین، RMSD لیگاند برای درک اطلاعات مربوط به حرکات اتمهای لیگاند و نوسانات موقعیت آن محاسبه شد. RMSD لیگاند با میانگین 0.2 ± 0.02 نانومتر ثابت شد. نوسانات اصلی در دامنه RMSD اتمهای لیگاند نسبت به نقطه آغاز در طی MD نشان داد که لیگاند به نقاط پایدار می رسد. اغلب

هدف پژوهشهای شبیه سازی MD، معرفی الگوهای لیگاند- پروتئین p53 انسانی دقیقاً در حالت نزدیک به شرایط طبیعی و مطالعه الگوهای اتصال لیگاند می باشد. شبیه سازی MD حتی ضعیف ترین واریانسها را علی رغم گزارش ساختارهای اتصالی منطقی برای لیگاند با داکینگ مولکولی در نظر می گیرد. برای بررسی دقیق تر، پایداری و انعطاف پذیری مسیر کمپلکس SA و پروتئین p53 انسانی با استفاده از ویژگیهای مختلف نظیر انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD)⁽¹⁾، نوسان جذر میانگین مربعات (RMSE)⁽²⁾، شعاع چرخش (Rg)⁽³⁾، سطح در دسترس حلال (SASA)⁽⁴⁾، تعداد پیوندهای هیدروژنی به صورت تابعی از زمان محاسبه و ترسیم شد. علاوه بر این، میانگین حداقل فاصله، تعداد اتصالات بین پروتئین p53 انسانی و لیگاند، انرژی کل، انرژی پتانسیل، انرژی های لنارد- جونز (LJ) کوتاه برد (SR)، انرژی کولومب (SR) و دما به صورت تابعی از زمان تأیید شد (داده ها نشان داده نشده اند). دمای سیستمها در 300 کلوین همراه با انرژی پتانسیل ثابت شد. انرژی کل به دست آمده از شبیه سازی MD، نسبت بسیار پایین دریافت انرژی کل به انرژی کل متوسط (0.0002) را نشان داد.

نمودار مقادیر RMSD، RMSF و Rg برای پروتئین p53 آزاد و در حضور لیگاند SA در 50 نانوثانیه شبیه سازی MD در شکل 3A-C نشان داده شده است. همان طور که می توان در نمودارهای RMSD دید، در طی 20 نانوثانیه آخر شبیه سازی نسبتاً

1- Root Mean Square Deviation(RMSD)
2-Root Mean Square Fluctuation(RMSF)
3-The Radius of gyration(Rg)
4-Solvent Accessible Surface Area(SASA)
5-Backbone

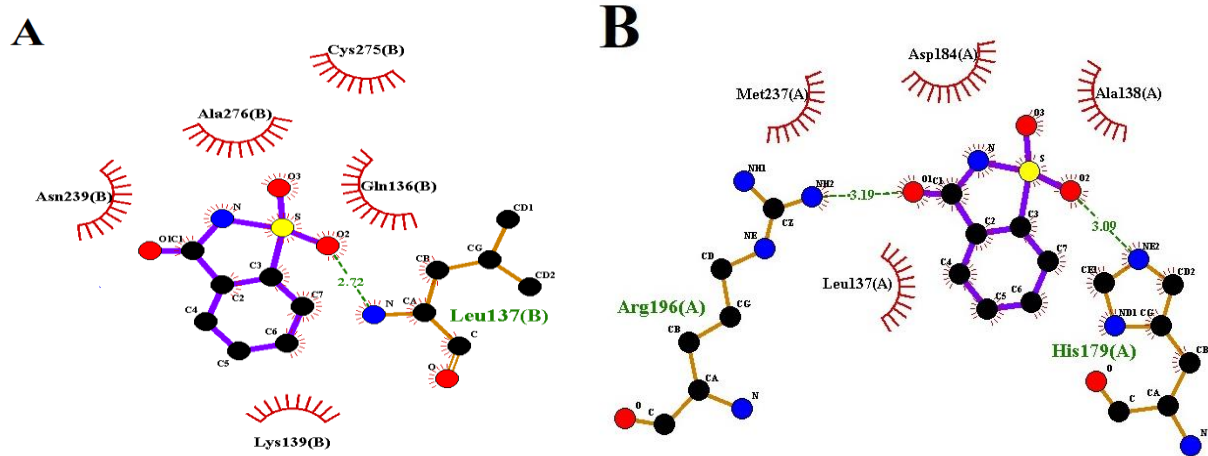
مقابل $0.1 \pm 1/67$ نانومتر برای پروتئین p53 می‌باشد (شکل ۳C). ساختار سه بعدی و پایداری پروتئین عمدتاً به حلالیت بستگی دارد. SASA به عنوان یک ویژگی مهم، سطح قابل دسترس پروتئین را به پروب حلال نشان می‌دهد. مقدار متوسط SASA در طول ۵۰ نانوثانیه دوره زمانی شبیه‌سازی برای پروتئین p53 آزاد و کمپلکس p53-SA به ترتیب $112/12 \pm 2/85$ نانومتر مربع و $112/11 \pm 1/98$ نانومتر مربع محاسبه شده است (شکل 3D). نتایج نشان می‌دهد که اتصال SA یک اثر جزیی بر روی کنفورماسیون ساختاری پروتئین p53 ایجاد می‌کند. بر طبق تجزیه تحلیل پیوند هیدروژنی، حداکثر پنج پیوند هیدروژنی با میانگین دو در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی برای SA به دست آمد (شکل ۴). نکته بارز این بود که در اکثر زمان شبیه‌سازی امکان تشکیل پیوند هیدروژنی برای SA وجود داشت. نتایج پیوند هیدروژنی (کوتاه‌تر از ۰.۳۵ نانومتر) در MD نشان داد که در بیشتر کانفورمرها در ۲۵ نانوثانیه آخر، دو تا سه پیوند هیدروژنی برای کمپلکس p53-SA وجود داشت (شکل ۴).

نتایج حاصل از شبیه‌سازی MD برای کمپلکس لیگاند-پروتئین نشان داد که اتم اکسیژن گروه آمیدی و اکسیژن متصل به اتم گوگرد مولکول SA می‌تواند از طریق دو پیوند هیدروژنی به هیدروژن‌های متصل به اتم‌های نیتروژن اسیدآمینه‌های Arg196 و His179 به عنوان اسید آمینه‌های کلیدی پروتئین p53 در ناحیه اتصال به DNA با طول‌های پیوندی به ترتیب $3/19$ و $3/09$ آنگستروم متصل شود. حلقه فنیل SA می‌تواند

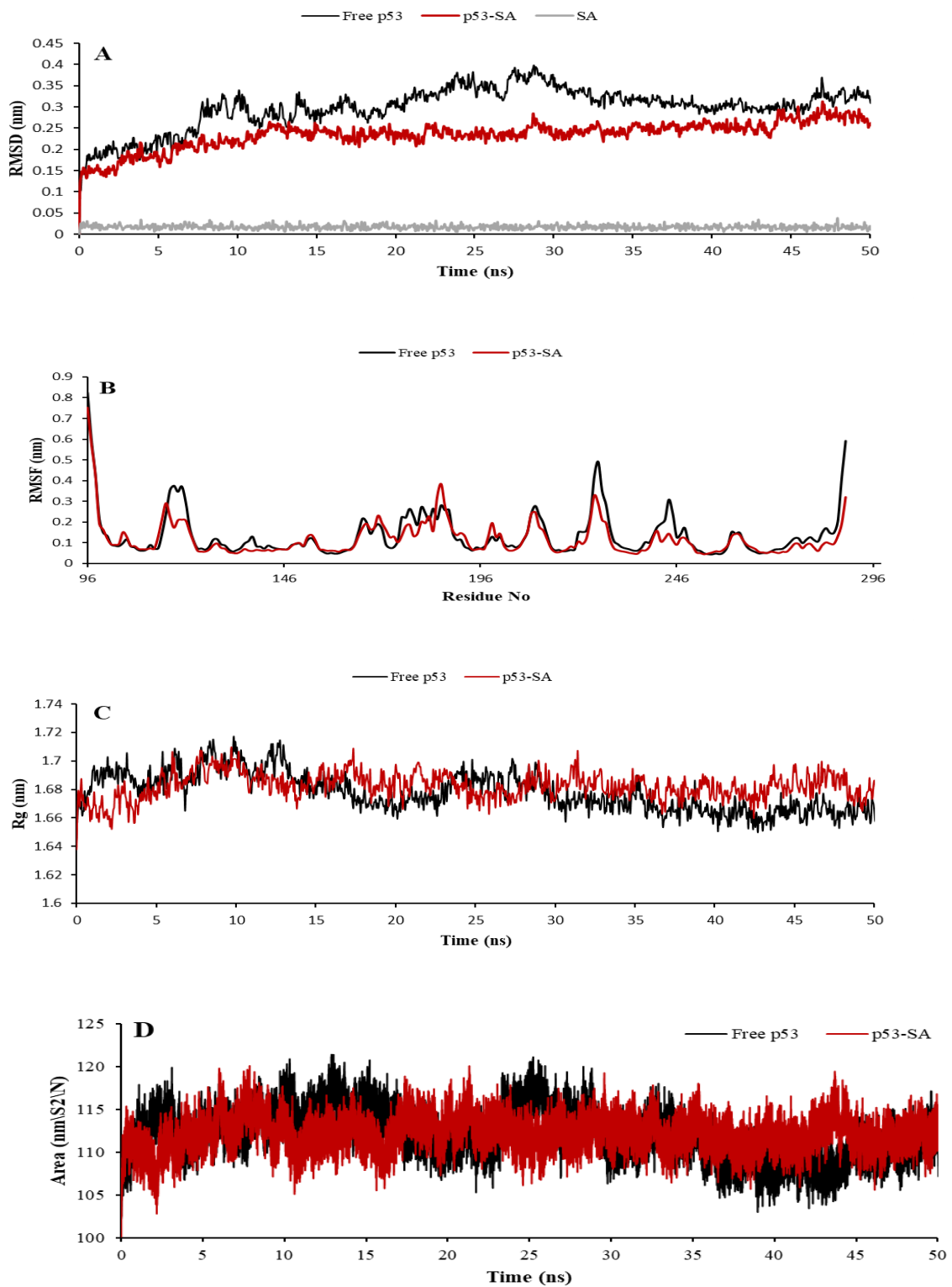
گفته می‌شود که مقادیر کوچک RMSD یک شبیه‌سازی نشان دهنده حالت پایدار سیستم است. این موضوع بر اتصال پایدار SA به پروتئین p53 اشاره دارد. به منظور مطالعه و مقایسه بیشتر رفتار پویا (دینامیک) یا انعطاف‌پذیری ساختاری سیستم‌ها، تفاوت در RMSF همه رزجوه‌های اسیدآمینه‌های پروتئین p53 با اتصال SA برای دست‌یابی به کسب اطلاعات بیشتر در خصوص انعطاف‌پذیری رزجوها محاسبه شد (شکل ۲B). تفاوت‌های نسبتاً اندکی در نوسانات این سیستم‌ها مشاهده شد که احتمالاً ناشی از تغییرات ساختاری خفیف می‌باشند، همسو با نتایج RMSD در صورت برهم‌کنش p53-SA سطح RMSF نسبتاً پایین‌تر است. میانگین RMSF برای پروتئین p53 آزاد و در حضور SA به ترتیب $0/14 \pm 0/11$ نانومتر و $0/12 \pm 0/09$ نانومتر می‌باشد. این به معنی استحکام بیشتر رزجوه‌های واقع در مکان اتصال لیگاند به دلیل اتصال به لیگاند می‌باشد. نکته جالب این که، منطقه‌ای که در معرض تماس SA قرار ندارد، در رزجو شماره ۱۸۶ در حالت اتصال SA انعطاف‌پذیرتر می‌شود. فشردگی دو سیستم مطالعه شده در شبیه‌سازی‌ها با استفاده از محاسبه مقدار Rg برای تعیین تغییرات در بعد پروتئین p53 به دلیل اتصال لیگاند بررسی شد. این شاخص نشان دهنده ویژگی بعد کلی ماکرومولکول در طی شبیه‌سازی بوده و فاصله ریشه دوم میانگین وزنی را از مرکز جرم یا مرکز ثقل همه اتم‌ها نشان می‌دهد. مقادیر میانگین در کل شبیه‌سازی برای کمپلکس p53-SA برابر $1/68 \pm 0/01$ نانومتر در

پیوند هیدروژنی بین اتم اکسیژن متصل به اتم گوگرد از SA با هیدروژن‌های متصل به اتم‌های نیتروژن متصل به Gly279 و Asp281 با طول‌های پیوندی به ترتیب ۲/۸۲ و ۲/۸۲ آنگستروم و دو تای دیگری بین هیدروژن متصل به اتم نیتروژن از SA با اتم‌های اکسیژن متصل به Ala276 و Cys277 با طول‌های پیوندی به ترتیب ۲/۹۷ و ۲/۹۶ آنگستروم می‌باشد. مقایسه شیوه اتصال لیگاند قبل و پس از شبیه‌سازی نشان می‌دهد که تغییرات کنفورماسیونی منجر به تشکیل پیوندهای هیدروژنی دیگر شد.

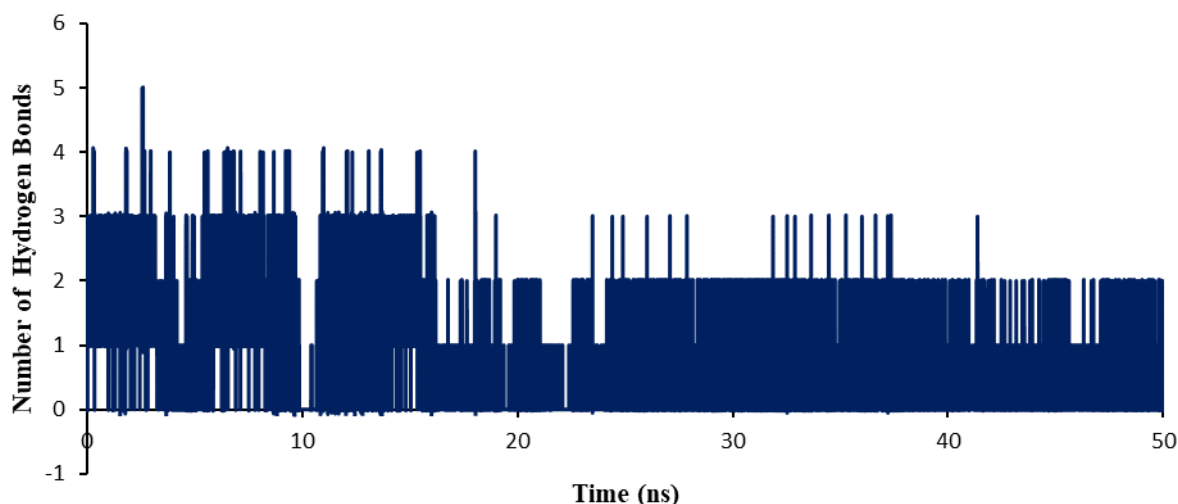
از طریق پیوندهای هیدروفوب در مجاورت با اسیدآمینه His179 به عنوان اسیدآمینه کلیدی پروتئین p53 در ناحیه اتصال به DNA قرار گیرد (شکل 2B). همچنین، SA عمیقاً در پروتئین p53 از طریق پیوندهای هیدروفوب با رزجوه‌های اسیدآمینه Leu137, Ala138, Asp184, Met237 قرار گرفته است. علاوه بر این، تغییرات کنفورماسیونی حاصل از شبیه‌سازی MD جداگانه‌ای از پژوهش‌های قبلی ما بر اساس میدان نیروی gmx برای کمپلکس لیگاند-پروتئین p53 نشان داد که SA می‌تواند از طریق ۴ پیوند هیدروژنی به پروتئین p53 انسانی متصل شود که شامل رزجوه‌های اسیدآمینه Ala276, Cys277, Gly279 و Asp281 است. دو



شکل ۲: برهمکنش شماتیک بهترین کنفورماسیون لیگاند، ساخارین و رسپتور پروتئین p53 انسانی بعد از (A) داکینگ مولکولی و (B) ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی ارایه شده به وسیله لیگ پلات (LigPlot) در این شکل، ترکیب لیگاند با رنگ آبی نشان داده شده است. پیوند هیدروژنی به رنگ سبز و برهمکنش‌های وان دروالس با دایره‌های قرمز نشان داده شده‌اند.



شکل ۴: تجزیه و تحلیل نمودارهای بک بن پروتئین p53 برای پروتئین آزاد و کمپلکس پروتئین - ساخارین (p53-SA) و ساخارین (SA) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی (A) RMSD، (B) RMSF، (C) Rg و (D) SASA



شکل ۴: نمودار توزیع پیوند هیدروژنی در مقابل زمان برای کمپلکس پروتئین - ساخارین (p53-SA) در طول ۵۰ نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی

بحث

در این پروژه برهمکنش پیوندی و تمایل

اتصال SA به پروتئین p53 انسانی از طریق داکینگ مولکولی و شبیه سازی MD تجزیه و تحلیل شد. داکینگ مولکولی و شبیه سازی MD یک روش مفید برای بررسی ارتباط لیگاندها به یک پروتئین هدف است و قبلاً برای شفاف سازی جزئیات خاصیت اتصال SA و نمک آن با Pp53g نشان داده شده است (۲۳).^۱ مطالعه قبلی در دو بخش نظری و تجربی برای پروموتور ژن مورد بررسی قرار گرفته بود، اما در مطالعه نظری حاضر، رسپتور مورد نظر پروتئین می باشد. پژوهش های کامپیوتری مربوط به بررسی رنکینگ^(۱) تمایل های اتصال به طور بالقوه نشان داد که SA تمایل اتصال بالایی به پروتئین p53 انسانی دارد و یک ارجحیت مشخص^(۲) به تارگت نشان داد.

نقش شیرین کننده های مصنوعی در وقوع خطر سرطان در طی چند دهه گذشته به طور گسترده ای مورد بحث قرار گرفته است. شیرین کننده های مصنوعی ممکن است اثرات مضر و موتاژنی بر بدن داشته باشند و باعث بسیاری از خطرات مثل سرطان شوند (۱۹ و ۱۸، ۸، ۲). سرطان زایی SA موضوع بحث های اپیدمیولوژیک متعددی بوده است (۳ و ۴)، پروتئین p53 هم مهار کننده و هم ارتقاء دهنده سلول های سرطانی است (۱۶-۱۴). پروتئین p53 جهش یافته که به DNA متصل نمی شود، پروتئین ناقصی ایجاد می کند که فعالیت پروتئین طبیعی را مهار می کند (۱۷ و ۱۲)، لذا هدف از این مطالعه تعیین شبیه سازی دینامیک مولکولی بر همکنش ساخارین (SA) با پروتئین p53 انسانی بود.

1-Ranking
2-Distinct preference

و SA بود. در این مطالعه، نتایج کامپیوتری، امکان وجود برهمکنش بین آن‌ها را اثبات کرد.

در توافق با مطالعه ژانگ و همکاران (۴۱)، نتایج نشان داده است که SA در کنفورماسیون با کم‌ترین انرژی به اسیدآمینه‌های پروتئین p53 انسانی متصل می‌شود. پس از بررسی نتایج شبیه‌سازی MD، مشخص شد که مولکول SA به اسیدآمینه‌های کلیدی p53 مانند His179، Arg196 و Cys277 در ناحیه اتصال به DNA یا پروتئین‌های دیگر از طریق پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب متصل می‌شود که با نتایج گزارش شده در منابع هم‌خوانی دارد (۴۲-۴۴ و ۲۸-۳۱). در پژوهش ژانگ و همکاران به صورت تجربی با استفاده از آنالیز تبدیل فوریه فروسرخ^(۱) و دورنگ نمایی حلقوی^(۲) و روش‌های چندگانه طیف سنجی و کمومتریکس^(۳)، به بررسی برهمکنش SSA با DNA تیموس گاوی (ctDNA)^(۴) پرداخته شده است و سپس با استفاده از روش داکینگ مولکولی و نتایج حاصل از نرم‌افزار اتوداک نشان داده شده است که SSA بعد از ۱۰۰ اجرای داکینگ، به باز گوانین ctDNA متصل می‌شود، در نتیجه SSA بر ctDNA اثر دارد.^{۱۰} نتایج حاصل از داکینگ نشان داده است که SSA به شیار کوچک ctDNA با دو پیوند هیدروژنی متصل می‌شود. اگرچه، ژانگ و همکاران، ویژگی‌های اتصال SSA به ctDNA را با استفاده از روش‌های تجربی و نظری از جمله داکینگ مولکولی مورد بررسی قرار

اجرای شبیه‌سازی MD بر روی کمپلکس بین لیگاند مورد نظر و پروتئین p53 انسانی نشان داد که بقیه اسیدآمینه‌های تعیین شده به وسیله داکینگ مولکولی تغییر یافتند. برخی اسیدآمینه‌های جدید در نزدیکی SA قرار گرفتند به طوری که در تشکیل پیوندهای هیدروژنی و هیدروفوب با SA مشارکت داشتند و پیوند هیدروژنی قبلی شامل Leu137 جایگزین شدند. بنابراین در پایان شبیه‌سازی MD موقعیت و جهت لیگاندها در مکان اتصال معرفی شده، تغییر کرد. با در نظر گرفتن همه این موارد و نتایج مطالعه فعلی، نشان داده شد که اتصال SA به p53 انسان در ناحیه اتصال به DNA در طول ۵۰ نانو ثانیه می‌تواند منجر به دفورماسیون (تغییر شکل) فضایی پروتئین p53 انسانی شود که منجر به برهم خوردن کنفورماسیونی و سایر پارامترهای مهم در شبیه‌سازی MD شده و در نهایت منجر به اختلال عملکرد پروتئین p53 شود.

یکی از پارامترهای کلیدی در هر درمان، اتصال به پروتئین p53 انسانی به دلیل نقش آن به عنوان هم مهار کننده و هم ارتقاء دهنده سلول‌های سرطانی است. بررسی برهم‌کنش‌های بین مولکول‌های کوچک و پروتئین یا DNA برای درمان و پیشگیری از بیماری‌ها ارزشمند خواهد بود، زیرا پروتئین یا DNA یک هدف دارویی مهم است و مواد شیمیایی مضر می‌تواند به آن آسیب وارد کند (۷). لذا هدف از این مطالعه، دست‌یابی به یک رویکرد نظری برای ارزیابی برهم‌کنش‌های بین پروتئین p53 انسانی

1-Fourier transform infrared
2-Circular dichroism spectra
3-Chemometrics
4-Calf thymus DNA

جایی که کمترین غلظت SA و SSA برهم کنش یافته با DNA در مطالعه قبلی ما ($10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 0.54$ برای SA و $10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \times 0.49$ برای SSA معادل ۰/۹۹ میلی‌گرم بر لیتر) بسیار کمتر از مقداری است که اکنون به عنوان یک افزودنی غذایی استفاده می‌شود (۲۳). از طرف دیگر، SA در محصولات مختلف وجود دارد، مصرف بالای این شیرین کننده مصنوعی می‌تواند موجب افزایش جذب تا بیش از ۱ گرم در روز شود. مصرف شیرین کننده مصنوعی سنگین شامل SSA (بیش از ۱.۷ گرم بر روز) منجر به افزایش ریسک نسبی ۱/۳ برای سرطان مثانه در انسان می‌شود (۵). به علاوه، گزارش شده است که شیرین کننده‌های مصنوعی ممکن است در غلظت‌های بالا در بلند مدت سمی باشند (۷). نتایج پیشین نشان داد که سلول‌ها در غلظت‌های بالاتر شیرین کننده SSA نامشخص و پراکنده می‌باشند، زیرا SSA منجر به قطعه قطعه شدن DNA در همه رده‌های سلولی نسبت به دیگر شیرین کننده‌ها می‌شود (۴۷ و ۷). برای مثال، فیندلیکی و همکاران به بررسی اثرات ژنوتوکسیک شیرین کننده‌های مصنوعی روی سلول‌های لنفوم پرداختند. نتایج آن‌ها یک افزایش معنی‌دار را در میزان آسیب SA به DNA در ۲/۵ ppm نشان داد که بیانگر بیشترین آسیب به DNA می‌باشد (۷). در مطالعه دیگری به وسیله وان ایک، اثرات احتمالی پنج شیرین کننده غیر مغذی از جمله SA

داده‌اند (۴۱)، نتایج به دست آمده از مطالعه حاضر، اتصال SA را به پروتئین p53 انسانی هم با استفاده از داکینگ مولکولی و هم بعد از ۵۰ نانوثانیه شبیه‌سازی MD نشان می‌دهد. علاوه بر این، در توافق با نتایج آن‌ها بر مبنای یافته‌های داکینگ مولکولی، پیوندهای هیدروژنی و نیروی وان دروالسی نقش مهمی در برقراری این اتصال و ایجاد برهمکنش ایفا می‌کنند، این نتایج با نتایج تجربی که به آنها اشاره شد مطابقت دارد، از آن جایی که فرآیند تغییر طیفی، بیانگر تغییرات کنفورماسیونی و ساختاری در DNA، پس از اتصال به SA یا SSA می‌باشد (۴۵ و ۴۱، ۲۳). به علاوه، ژانگ و همکاران گزارش کردند که برهمکنش مولکول‌های شیمیایی کوچک با ctDNA و اثرات SSA بر ctDNA را می‌توان در ارزیابی اثرات سم شناختی (توکسیکولوژیک) این شیرین کننده غذایی استفاده کرد (۴۱).

مقدار جذب قابل قبول روزانه (ADI)^(۱) توصیه شده، ۰-۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم (۴۶ و ۴۱) یا کمتر از ۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد (۶). لازم به ذکر است که سطح باقی مانده حداکثر SA در غذاهای مختلف از ۸۰ تا ۲۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر متغیر است (۴۶). در ارزیابی اثرات توکسیکولوژیک این شیرین کننده غذایی به وسیله ژانگ و همکاران، کمترین غلظت برای SSA برابر با $8.12 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ معادل ۱۶/۴۱ میلی‌گرم بر لیتر بود (۴۱). با این وجود، کمترین غلظت SA و SSA که با ژن Pp53g در مطالعه قبلی ما برهم کنش دارد بسیار کمتر بود (۲۳)، از آن

1-Acceptable Daily Intake(ADI)

داده‌اند که SA برای مصرف انسان ایمن نیست (۴۶ و ۴۵، ۴۱).

با این حال، چون این شیرین کننده‌ها قادر به القای آسیب به DNA یا پروتئین هستند، از آن جایی که این شیرین کننده‌ها به طور متداول به کار می‌روند، شاید در غلظت‌های بالا برای مدت زمان طولانی، توکسیک باشند، بنابراین، اثرات شیرین کننده‌های مصنوعی روی انسان بایستی به طور جدی مورد توجه و بررسی قرار گیرد، به خصوص اگر آن‌ها به فراوانی در غلظت‌های بالا در نوشابه‌ها و مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۷). از سوی دیگر، چون بسیاری از شیرین کننده‌های مصنوعی در محصولات غذایی امروزی به صورت ترکیبی استفاده می‌شوند، تعیین دقیق‌تر عوامل (اجزای) آن امکان پذیر نیست (۵). با در نظر گرفتن ایمنی عمومی، ارزیابی‌های ایمنی جامع‌تر SA و SSA لازم و مهم می‌باشند (۴۱).

به طور کلی با توجه به مباحث و تناقضاتی که درباره شیرین کننده SA و استفاده گسترده آن می‌باشد و همچنین با توجه به قطعی بودن سرطان‌زایی این ماده در موش‌های آزمایشگاهی و احتمال سرطان‌زایی در انسان، این مطالعه ممکن است برای رفع اندکی از ابهامات و کمک به مطالعات قبلی، مفید باشد. با احتمال کارسینوژن بودن SA، این مطالعه می‌تواند آغاز راهی برای طراحی و سنتز و همچنین تجاری سازی ساختاری جدید از شیرین کننده غیر سرطان‌زا باشد. در این مطالعه برای اولین

روی تکثیر سلولی، مورفولوژی و DNA سلولی با استفاده از سه رده سلولی بررسی شد. نتایج نشان داد که SSA و سوکرالوز باعث قطعه قطعه شدن بیشتر DNA در همه خطوط سلولی نسبت به دیگر شیرین کننده‌ها شدند (۴۷). به علاوه، برخی پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که مصرف SA و SSA در غلظت‌های مختلف (بالتر از غلظت‌های مورد استفاده مطالعه قبلی ما (۲۲)) دارای یک اثر موتاژنیک (جهش‌زا) بوده و همچنین منجر به القای تغییرات سیتوژنتیک و تغییرات سلولی می‌شود (۴۹ و ۴۸). برای مثال، ولف و همکاران نشان دادند که دوزهای بالای SA موجب افزایش تبادل کروماتید خواهری در سلول‌های تخمدان همستر چینی و لنفوسیت‌های انسانی شد. آنها نشان دادند که SA، علاوه بر کارسینوژن بودن در موش، همچنین موتاژن می‌باشد (۴۸). اطلاعات مفیدتری برای نشان دادن مکانیسم‌های اثرات شیرین کننده‌های مصنوعی بر ساختار و خواص فیزیوشیمیایی DNA و ارزیابی سمیت بالقوه این مواد در بدن ارابه شده است (۴۵ و ۴۱). در تحقیقی دیگر سطوح پروتئین p53 را در سلول‌های فیبروبلاست موش برای بررسی مکانیسم ژنوتوکسیتی SSA آنالیز کردند. SSA باعث افزایش سطوح پروتئین p53 نشد که نشان می‌دهد اگر SSA ژنوتوکسیک باشد از طریق مکانیسم واکنشگر غیر DNA عمل می‌کند (۵۰). علی‌رغم بحث در مورد ایمنی SA، برخی پژوهش‌ها نشان

سمیت ژنی نشان داده‌اند. امید می‌رود که این تحقیق و مطالعه قبلی ما بتواند نه تنها داده‌های سودمندی را برای درک رفتار طیف سنجی و مولکولی SA و نمک آن با Pp53g ارایه کند، بلکه میل ترکیبی^(۱) آن و مکانیسم اتصال p53-SA در مقیاس بسیار ریز اتمی را نشان دهد. این مطالعه برخی شواهد را برای ارزیابی اثرات سمیت SA بر پروتئین p53 انسانی ارایه می‌کند.^{۱۲} نتایج MD نشان داد که اتصال SA به p53، منجر به دفورماسیون فضایی در کنفورماسیون پروتئین شده که نتیجه آن ایجاد برهم خوردگی کنفورماسیون و سایر پارامترهای مهم در شبیه‌سازی است که ممکن است منجر به اختلال در عملکرد p53 شود. هرچند این اتصال می‌تواند باعث تداخل اتصال پروتئین p53 با دیگر پروتئین‌ها شود، پروتئین‌هایی که می‌توانند در نقش سرکوبگر توموری این پروتئین نقش مثبت یا منفی ایفا کنند. از آن جایی که، پروتئین p53 با پروتئین‌های زیادی برهمکنش می‌دهد که سرنوشت عملکردی این پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بنابراین، بر طبق تحلیل نتایج، امکان بروز خاصیت سرطان‌زایی در SA به طور بالقوه وجود دارد، زیرا بر عملکرد مناسب و طبیعی p53 آسیب وارد می‌کند، لذا این یافته‌ها می‌توانند در هنگام در نظر گرفتن اثرات توکسیکولوژیک این شیرین کننده ارزشمند باشند. به هر حال، ارزیابی گسترده‌تر افزودنی‌های غذایی در

1-Binding affinity

بار به بررسی محل اتصال نظری SA با پروتئین p53 انسانی به عنوان پیش‌آگهی به پژوهش‌های تجربی پرداخته شده است و در این مرحله فقط می‌تواند به عنوان یک راهنمای اولیه در طراحی آزمایشات حیوانی و حتی کشت سلولی کمک کننده باشد، بنابراین، بررسی برهمکنش بین SA و p53 با استفاده از پژوهش‌های بیشتر، اطلاعات ارزشمندتری در اختیار خواهد گذاشت. در آینده، می‌توان تحقیقاتی به صورت تجربی در همین زمینه داشت. پژوهش‌ها در این زمینه بایستی کاملاً به وسیله چندین تکنیک دیگر به صورت تجربی تکمیل شوند. علاوه بر انجام تکنیک‌های آزمایشگاهی روش‌های طیف سنجی، پژوهش‌های *in-vivo* و *in-vitro* برای هرچه بهتر مشخص شدن اتصال بین p53 و SA و نیز پیامد این اتصال احتمالی پیشنهاد می‌شود. این پژوهش‌ها می‌تواند شامل بررسی اثر غلظت‌های مختلف SA بر روی عملکرد p53 در دوره‌های زمانی مختلف باشد، زیرا این شیرین کننده‌ها ممکن است در دراز مدت عمل کنند.

نتیجه‌گیری

افزودنی‌های غذایی به طور گسترده‌ای در صنایع غذایی کاربرد دارند. بنابراین، آن‌ها بایستی برای مصرف انسانی کاملاً ایمن باشند، با این حال پژوهش‌های علمی در خصوص این افزودنی‌ها، نتایج نامطلوبی را به ویژه در آزمایش‌های سرطان‌زایی و

حال حاضر لازم است. افراد بایستی اثرات منفی ناشی از SA که به طور گسترده‌ای به عنوان شیرین کننده در صنایع بسته‌بندی غذایی استفاده شده‌اند را درک کنند. این نشان دهنده ضرورت و لزوم توسعه مواد جایگزین برای بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از طرح پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج با کد اخلاق IR.YUMS.REC.1395.5 می‌باشد، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بدین وسیله از همکاری حوزه معاونت پژوهش دانشگاه علوم پزشکی یاسوج در جهت اجرای آن تقدیر و تشکر می‌شود.

REFERENCES

1. Fahlberg C, Remsen I. Ueber die oxydation des orthotoluolsulfamids. *European Journal of Inorganic Chemistry* 1879; 12(1): 469-73.
2. Whitehouse CR, Boullata J, McCauley LA. The potential toxicity of artificial sweeteners. *AAOHN Journal* 2008; 56(6): 251-61.
3. Whysner J, Williams GM. Saccharin mechanistic data and risk assessment: urine composition, enhanced cell proliferation, and tumor promotion. *Pharmacology & Therapeutics* 1996; 71(1-2): 225-52.
4. Howe G, Burch J, Miller A, Morrison B, Gordon P, Weldon L, et al. Artificial sweeteners and human bladder cancer. *The Lancet* 1977; 310(8038): 578-81.
5. Weihrauch M, Diehl V. Artificial sweeteners—do they bear a carcinogenic risk? *Annals of Oncology* 2004; 15(10): 1460-5.
6. No DCR. Saccharin and its salts. Lyon, France: IARC; 1987.
7. Findikli Z, Turkoglu S. Determination of the effects of some artificial sweeteners on human peripheral lymphocytes using the comet assay. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 2014; 6(8): 147-53.
8. Saad A, Khan FA, Hayee A, Nazir MS. A review on potential toxicity of artificial sweeteners vs safety of stevia: A natural biosweetener. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 2014; 4(15): 1-12.
9. Bosetti C, Gallus S, Talamini R, Montella M, Franceschi S, Negri E, et al. Artificial sweeteners and the risk of gastric, pancreatic, and endometrial cancers in Italy. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2009; 18(8): 2235-8.
10. Ibrahim O. High intensity sweeteners chemicals structure, properties and applications. *Natural Science and Discovery* 2015; 1(4): 88-94.
11. Health Canada. Health Canada 2007 Questions and answers Saccharin Accessed 25_ July 2023, from <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/food-safety/food-additives/sugar-substitutes/questions-answers-saccharin-artificial-sweeteners.html> 2007.
12. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *cell* 2000; 100(1): 57-70.
13. Sonnenschein C, Soto AM. Theories of carcinogenesis: an emerging perspective. *Seminars in Cancer Biology* 2008; 18(5): 372-7.
14. Suzuki K, Matsubara H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. *BioMed Research International* 2011; 2011: 7.
15. Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP. Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 1994; 265(5170): 346-55.
16. Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale A, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 2007; 26(15): 2157-65.
17. Smith ML, Seo YR. p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 2002; 17(2): 149-56.
18. Rahimpour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omid M. Saccharin consumption increases sperm DNA fragmentation and apoptosis in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2014; 12(5): 307-12.
19. Andreatta M, Munoz S, Lantieri M, Eynard A, Navarro A. Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in Cordoba, Argentina. *Preventive Medicine* 2008; 47(1): 136-9.
20. Gupta M, Sharma R, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How Much Promising? *Computational biology and chemistry* 2018; 76: 210-7.

21. Leach AR. Molecular modelling: principles and applications: Pearson education. London, England: Pearson Education; 2001 .
22. Taheri S, Nazifi M, Mansourian M, Hosseinzadeh L, Shokoohinia Y. Ugi efficient synthesis, biological evaluation and molecular docking of coumarin-quinoline hybrids as apoptotic agents through mitochondria-related pathways. *Bioorganic Chemistry* 2019; 91: 103147.
23. Mansourian M, Mahnam K, Rajabi HR, Roushani M, Doustimotlagh AH. Exploring the binding mechanism of saccharin and sodium saccharin to promoter of human p53 gene by theoretical and experimental methods. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020; 38(2): 548-64.
24. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry* 2009; 30(16): 2785-91.
25. Goodsell DS, Morris GM, Olson AJ. Automated docking of flexible ligands: applications of AutoDock. *Journal of Molecular Recognition* 1996; 9(1): 1-5.
26. Hess B, Kutzner C, Van Der Spoel D, Lindahl E. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of Chemical theory and Computation* 2008; 4(3): 435-47.
27. Wang J, Wolf RM, Caldwell JW, Kollman PA, Case DA. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry* 2004; 25(9): 1157-74.
28. Shi T, Polderman PE, Pagès-Gallego M, Van Es RM, Vos HR, Burgering BM, et al. p53 Forms redox-dependent protein-protein interactions through cysteine 277. *Antioxidants* 2021; 10(10): 1578.
29. Buzek J, Latonen L, Kurki S, Peltonen K, Laiho M. Redox state of tumor suppressor p53 regulates its sequence-specific DNA binding in DNA-damaged cells by cysteine 277. *Nucleic Acids Research* 2002; 30(11): 2340-8.
30. Scotcher J, Clarke DJ, Weidt SK, Mackay CL, Hupp TR, Sadler PJ, et al. Identification of two reactive cysteine residues in the tumor suppressor protein p53 using top-down FTICR mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 2011; 22(5): 888-97.
31. Shi T, Dansen TB. Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxidants & Redox Signaling* 2020; 33(12): 839-59.
32. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry* 1998; 19(14): 1639-62.
33. Yadava U, Yadav SK, Yadav RK. Electronic structure, vibrational assignments and simulation studies with A/T rich DNA duplex of an aromatic bis-amidine derivative. *DNA Repair* 2017; 60: 9-17.
34. Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. *The Journal of Chemical Physics* 1993; 98(12): 10089-92.
35. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics* 1983; 79(2): 926-35.
36. Berendsen HJ, Postma Jv, van Gunsteren WF, DiNola A, Haak J. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 1984; 81(8): 3684-90.
37. Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG. LINCS :a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of Computational Chemistry* 1997; 18(12):1463-72.
38. Yadava U, Shukla BK, Roychoudhury M. Pyrazolo [3, 4-d] pyrimidines as the inhibitors of mycobacterial β -oxidation trifunctional enzyme. *Medicinal Chemistry Research* 2015; 24(12): 4002-15.
39. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular Graphics* 1996;14(1):33-8.

40. Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Engineering, Design and Selection* 1995; 8(2): 127-34.
41. Zhang G, Wang L, Zhou X, Li Y, Gong D. Binding characteristics of sodium saccharin with calf thymus DNA in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemis* 2014;62(4): 991-1000.
42. Joerger AC, Fersht AR. The p53 pathway: origins, inactivation in cancer, and emerging therapeutic approaches. *Annual Review of Biochemistry* 2016; 85: 375-404.
43. Caponio VCA, Troiano G, Adipietro I, Zhurakivska K, Arena C, Mangieri D, et al. Computational analysis of TP53 mutational landscape unveils key prognostic signatures and distinct pathobiological pathways in head and neck squamous cell cancer. *British Journal of Cancer* 2020; 123(8): 1302-14.
44. Criddle MP. Computational investigation of the DNA binding domain of p53: a drive towards novel therapeutics: University of Southampton; 2017.
45. Icel C, Yilmaz VT. In vitro DNA binding studies of the sweetening agent saccharin and its copper (II) and zinc (II) complexes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 2014; 130: 115-21.
46. Wang Y, Xu ZL, Xie YY, Tian YX, Shen YD, Young GM, et al. Development of polyclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sodium saccharin residue in food samples. *Food Chemistry* 2011; 126(2): 815-20.
47. Van Eyk AD. The effect of five artificial sweeteners on Caco-2, HT-29 and HEK-293 cells. *Drug and Chemical Toxicology* 2015; 38(3): 318-27.
48. Wolff S, Rodin B. Saccharin-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster and human cells. *Science* 1978; 200(4341): 543-5.
49. Suzuki H, Suzuki N. Detection of K-ras codon 12 mutation by polymerase chain reaction and differential dot-blot hybridization in sodium saccharin-treated human RSa cell. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1993;196(2): 956-61.
50. Yang J, Duerksen-Hughes P. A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis* 1998; 19(6): 1117-25.

Molecular Dynamics Simulation of the Interaction of Saccharin with Human p53 Protein

Shahlaei M¹, Mansourian M^{2*}

¹Department of Medicinal Chemistry, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran,

²Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 11 Sep 2023 Accepted: 16 Nov 2023

Abstract

Background & aim: The role of artificial sweeteners in the occurrence of cancer risk has been widely discussed during the last few decades. Therefore, the aim of the present study was to determine the dynamic and molecular simulation of the interaction of saccharin(SA) with human p53 protein.

Methods: The present bioinformatics study was conducted in 2023. The interaction of SA and sodium saccharin (SSA) with the human p53 gene promoter (Pp53g) has already been published in 2019 in two theoretical and experimental sections. But in the present study, the binding ability and the binding site of SA ligand as a synthetic sweetener with human p53 protein (receptor) as a tumor suppressor was theoretically performed. The amino acid residues involved in the interaction, energy free binding and binding constant were determined. Molecular docking was used for molecular interaction calculations. More detailed information about the binding method of the ligand-receptor complex was obtained by molecular dynamics (MD) simulation. The structure and topology file for the human p53 protein extracted from the protein database was created based on the AMBER 99 force field with the GROMACS 5.3.1 program. Acypype/Antechamber program with General AMBER Force Field (GAFF) was used to create structure file and ligand topology in MD simulation. This force field was compatible with the AMBER 99 force field. The simulation time in explicit solvent was 50 ns for SA-p53 protein complex. The collected data were analyzed using different software and compared with the results of related articles.

Results: The results of molecular docking indicated that the SA compound was bound to human p53 protein with a binding energy of -4.55 kcal/mol and a binding constant of 462.18 μ M. A hydrogen bond was formed between SA and amino acid Leu137. The conformational changes resulting from MD simulation for the ligand-protein complex showed that SA can bind to Arg196 and His179 as key amino acids of p53 protein in the DNA binding region through two hydrogen bonds. SA can also be placed in the adjacent of amino acids Leu137, Ala138, His179, Asp184 and Met237 through hydrophobic bonds. The values of the plots of root mean square deviation (RMSD), root mean square fluctuation (RMSF), radius of gyration (Rg) for free p53 protein and in the presence of SA ligand show the stable binding of SA to p53 protein.

Conclusion: The present study could provide valuable information about the binding mechanism of SA to human p53 protein as a macromolecule at the molecular level with subatomic details. The results can be useful in determining the potential carcinogenic risk of this sweetener due to its high consumption and the design and synthesis of newer and safer artificial sweeteners.

Keywords: Saccharin, Human p53 protein, Molecular docking, Molecular dynamics simulation, Cancer

*Corresponding author: Mansourian M, Medicinal Plants Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran.

Email: mahboubehmansourian90@gmail.com

Please cite this article as follows: Shahlaei M, Mansourian M. Molecular Dynamics Simulation of the Interaction of Saccharin with Human p53 Protein. Armaghane-danesh 2024; 28(6): 814-837.