مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

بررسی اثر داروی مزالازین بر پروتئین تاو و نقش آن به‌عنوان مهارکننده فیبریلاسیون تاو: مطالعه‌ای آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی

سبا نصرتی[۱]، ولی اکبری[۱*] ، سیف الله بهرامی کیا[۱]، خدیجه پورآقاجان[۲]

[۱]گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

[۲]دکتری بیوشیمی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۷/۰۷

چکیده

بیماری آلزایمر، یک بیماری پیش‌رونده است که با تشکیل پلاک‌های عصبی توسط آمیلوئید بتا، گره‌های نوروفیبریلاری متشکل از تاو فسفریله و از دست دادن نورون مشخص می‌شود. در مغز، تاو طبیعی نقش مهمی در تثبیت میکروتوبول دارد. استفاده از لیگاندهای آلی کوچک به منظور جلوگیری از تجمعات پروتئین، یک استراتژی جذاب برای درمان بیماری‌های تخریب‌کننده عصبی است. مزالازین (۵-آمینو-۲ هیدروکسی بنزوئیک اسید) به عنوان داروی ضد التهابی و غیراستروئیدی یک درمان بالقوه برای بیماران کرون و کولیت اولسراتیو می‌باشد. در این مطالعه پس از تخلیص پروتئین تاو (ایزوفرم 1N4R)، اثر مزالازین بر تجمع فیبریل‌های آمیلوئید با استفاده ازچندین تکنیک طیف‌سنجی و میکروسکوپ الکترونی، همچنین روش‌های محاسباتی دینامیک مولکولی/ اتصال مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، مزالازین به روشی وابسته به غلظت، نسبت‌های مختلف ۱:۴،۱:۲،۳:۴،۱:۱،۵:۴ میکرومولار (مزالازین به پروتئین تاو) تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی را مهار می‌کند. این اثر مهاری احتمالا به علت وجود گروه آمین بر روی حلقه آروماتیک است. علاوه بر این، مطالعه داکینگ مولکولی ما اتصال مزالازین به پروتئین تاو را از طریق پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز تایید کرد. با توجه به نتایج مشاهده شده در شرایط آزمایشگاهی، می‌توان ترکیباتی با ساختار و گروه‌های عاملی مشابه با مزالازین سنتز کرد که قابلیت عبور از سد خونی مغزی را داشته باشند و در نتیجه اثر آنها بر روی کاهش تشکیل تجمعات تاو در شرایط درون‌تنی مورد بررسی قرار داد.

واژگان کلیدی: آلزایمر، پروتئین تاو، توده‌های نوروفیبریلی، مهارکننده تجمع پروتئین تاو، مزالازین

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: akbari.v@lu.ac.ir

مقدمه

پروتئین تاو یک پروتئین مرتبط با میکروتوبول است، که در تثبیت میکروتوبول‌های عصبی و در ترویج رشد آکسون نقش دارد. از نظر ساختاری تاو پروتئینی باز شده، بسیار محلول، و تمایل کمی به تجمع دارد (۶۶). تاو در سیستم عصبی مرکزی و محیطی، و به میزان کمتری در کلیه، ریه و بیضه بیان می‌شود ولی بیشترین فراوانی آن، در آکسون‌های عصبی است (۴۹). تاو عملکرد میتوکندری، یکپارچگی DNA عصبی، تحرک پروتئین‌های حرکتی و مسیر سیگنال دهی انسولین مغز را تنظیم می‌کند (۱, ۶۴).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

بیماری آلزایمر، یک بیماری تخریب کننده عصبی و به‌آرامی پیش‌رونده است (۱۷) که اصلی‌ترین تغییرات آن تشکیل و رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در خارج سلول است. هم‌چنین در داخل سلول پروتئین‌های تاو فسفریله می‌شوند که منجر به تشکیل گره‌های نوروفیبریلاری می‌شود (۴۲). مکانیسم‌های مولکولی پیچیده‌ای که منجر به آلزایمر می‌شوند هنوز به طور کامل مشخص نشده‌است اما در میان مسیرهای چندعاملی مختلفی که این بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهند می‌توان به ناهنجاری‌های عروقی، تغییرات مضر میتوکندری، استرس اکسیداتیو، کاهش مصرف گلوکز مغز و التهاب عصبی اشاره کرد که باعث شروع بیماری و یا پیشرفت آن می‌شود (۵۷). هم‌چنین فرضیه‌های مختلفی برای علل بیماری آلزایمر وجود دارد: فرضیه آبشار آمیلوئید، هیپرفسفریلاسیون پروتئین تاو، فرضیه آبشار میتوکندری و فرضیه کولینرژیک (۱۸). تاو یک پروتئین ذاتاً بی‌نظم است و به‌طور گسترده قابلیت فسفریله شدن دارد که به‌طور غیرعادی سرشار از اسیدهای آمینه قطبی و باردار می‌باشد و در شرایط نرمال محلول می‌باشد (۷, ۴۴). طبق شواهدی که از NMR و پراکندگی پرتو ایکس با زاویه کوچک به‌دست آمده است، مولکول تاو به‌طور طبیعی باز شده‌است یا به‌طور ذاتی آشفته است و تمایلی به تجمع ندار (۵۰, ۵۸, ۵۹). فاکتورهای مختلفی برای القاء یا ترویج تجمع پروتئین تاو، نشان داده شده‌است. از جمله: جهش، اصلاح پس از ترجمه، یون‌های فلزی، و برهم‌کنش با پلی‌آنیون، یا مولکول‌های دیگر (۶۴). تاو در معرض طیف وسیعی از تغییرات پس از ترجمه از جمله فسفریلاسیون، استیلاسیون، یوبی‌کوئیتیناسیون، گلیکوزیلاسیون و برشقرار می‌گیرد (۲۸). فسفریلاسیون تاو، تاو را از میکروتوبول‌ها جدا می‌کند و باعث می‌شود تاو از آکسون‌ها به داخل بخش سوماتودندریتیک منتقل شود و باعث اختلال سیناپسی می‌شود. مقدار پروتئین تاو، و فسفریلاسیون آن می‌تواند عملکرد تاو را به‌عنوان تثبیت کننده میکروتوبول تغییر دهد و منجر به‌ایجاد رشته‌های مارپیچ زوج (Paired helical filaments) (PHFs) در اختلالات عصبی مختلف، مانند آلزایمر شود (۳۳).

پروتئین تاو، توده‌های فیبریلاری پاتولوژیک را تشکیل می‌دهد که معمولا با مرگ سلول‌های عصبی مرتبط است و منجر به انواع مختلف بیماری‌ها از جمله: زوال عقل، اختلالات حرکتی و بیماری نورون حرکتی می‌شود (۲۰). اختلالات تحلیل سیستم عصبیتاو هیپرفسفریله شده میکروتوبول‌ها را بی‌ثبات و مختل، و انتقال آکسونی را مهار می‌کند (۶۵, ۶۹). تاو هیپرفسفریله شده باعث الیگومریزاسیون می‌شود و هم‌چنین الیگومرهای تاو ممکن است باعث آسیب میتوکندری و تخریب عصبی شوند (۳۵, ۶۰). تاو هیپرفسفریله، تشکیل توده‌های سمی Neurofibrillary tangles (NFTs) را کاتالیز می‌کند (۶۵, ۳۷, ۹). در شرایط آزمایشگاهی فرآیند تجمع تاو توسط مدل هسته‌زایی توصیف می‌شود (۷۲). فیبریلاسیون پروتئین تاو در سه مرحله انجام می‌شود و نمودار سیگموئیدی دارد: فعال‌سازی و هسته‌زایی (فاز تاخیر)، افزایش طول (فاز رشد)، و فاز ثابت (۵). تصور می‌شود گونه‌های هسته‌زا، مونومر با قابلیت مونتاژ یا محلول الیگومر باشد. تاو در شرایط عادی پایدار است. با این حال، عوامل القا کننده تشکیل الیگومرها با قرار گرفتن در معرض بخش‌های آبگریز باعث افزایش تجمع تاو می‌شود. تاو حاوی چندین محل اتصال یون فلزی می‌باشد که اتصال تاو به یون‌های فلزی باعث افزایش

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

تجمع تاو می‌شود (۷۲). پترسون و همکارانش از طریق یک تکنیک اتصال متقابل فتوشیمیایی نشان دادند که دایمر شدن یک مرحله اولیه در فرآیند تجمع تاو است (۵۳). مولکول‌های پلی‌آنیونی مانند: گلیکوزامینوگلیکان‌های سولفاته، آراشیدونیک اسید، یا وزیکول‌های لیپیدی برای افزایش سرعت تجمع تاو استفاده می‌شوند (۶۸).

مولکول‌ها یا داروهای کوچکی که می‌توانند فرآیند فیبریلاسیون را به‌تاخیر اندازند یا فرآیند تا کردن نادرست را معکوس‌کنند می‌توانند به‌عنوان عامل امیدوارکننده در برابر بیماری‌های ناتوان‌کننده عمل کنند (۶۲). یکی از مولکول‌های کوچکی که اثر مهارکنندگی برای بیماری‌های آمیلوئیدی را دارد و دارای حلقه و گروه OH است مزالازین است (۲۴). مزالازین یک مولکول آروماتیک می‌باشد که شامل گروه‌های عاملی کربوکسیلیک اسید، الکل و آمید است (۵۵). مزالازین (مسالامین، اسید ۵- آمینو سالیسیلیک) یک داروی ضد التهابی و غیراستروئیدی است که به‌عنوان یک درمان بالقوه برای بیماران مبتلا به کرون و کولیت اولسراتیو مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین به عنوان یک عامل شیمی‌پروفیلاکسی برای محافظت در برابر رشد سرطان کولورکتال و فیبروز کبد است، و اثر آپوپتوز روی سلول‌های سرطانی روده بزرگ دارد (۱۶, ۵۶). مزالازین به‌عنوان یک جذب کننده قوی گونه‌های فعال اکسیژن در نظر گرفته می‌شود که نقش چشم‌گیری در مهار سنتز آنتی‌بادی، مهار مسیر سیکلواکسیژناز و لیپواکسیژناز و پاتوژنز بیماری التهابی روده دارد (۵۶).

اگرچه عوامل متعددی می‌توانند بر تجمع فیبریل تأثیر بگذارند، ولی مکانیسم‌های دقیق به وضوح شناسایی نشده‌اند. رایج‌ترین رویکرد در مورد فیبریلاسیون پروتئین‌ها بررسی انواع مهارکننده‌های فیبریلاسیون است. در سال‌های اخیر توجه زیادی به مولکول‌های کوچک که تشکیل فیبریل آمیلوئید را مهار می‌کند، معطوف شده است (۸, ۲۵). در این مطالعه تأثیر مزالازین بر روند تشکیل فیبریل و فیبریل‌زایی پروتئین تاو توسط روشهای مختلف اسپکتروسکوپی بررسی شد. همچنین مورفولوژی فیبریل‌های آمیلوئیدی توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی و برهم‌کنش تاو- مزالازین با استفاده از دینامیک مولکولی/داکینگ و پراش پرتوایکس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد

آکریل آمید از شرکت فلوکا (Fluka)، آمونیوم پرسولفات از شرکت AppliChem، هپارین از شرکت Celsus Laboratories،
آنیلینونفتالین-۸-سولفونیک اسید (ANS) و تیوفلاوین T (ThT) از شرکت *Sigma-Aldrich* (سن لوئی، میسوری، ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند. کوماسی بلو، تمامی نمک‌ها و حلال‌های آلی از شرکت Merck (دارمشتات، آلمان) تأمین شده‌اند. مزالازین از شرکت داروسازی آریا، تهران، ایران تهیه شده است.

بیان و تخلیص پروتئین تاو

توالی نوکلئوتیدی تاو در وکتور pET21 با پرایمر T7 Promoter توسط شرکت Microsynth سوئیس تعیین توالی شد. برای تخلیص پروتئین از کروماتوگرافی تمایلی یون فلزی تثبیت شده با نیکل-سفارز استفاده شد. اساس این روش بر پایه اتصال دنباله هیستیدینی بر روی پروتئین بیان شده (بیان

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

سیتوپلاسمی) به نیکل تثبیت شده روی ستون کروماتوگرافی می‌باشد (۲۶). هر چند که حضور دنباله هیستیدینی به عنوان یکی از محدودیت های انجام کار می‌باشد که بعد از فرایند تخلیص از پروتئین اصلی جدا نشده است اما در مقالات قبلی نشان داده اند که هم پروتئین‌های تاو حاوی تگ هیستیدین و هم پروتئین‌های تاو بدون تگ، از نظر تمایل به تجمع، توانایی تشکیل فیلامنت‌های مشابه آلزایمر و ویژگی‌های ساختار ثانویه کاملاً عملکردی هستند (۳۹). پلاسمیدهای pET21-Tau که حاوی ایزوفرم 1N4R تاو بودند، به *Escherichia coli* BL21(DE3) منتقل شده و در محیط Luria Broth + آموکسی‌سیلین تا رسیدن به OD_{600} بین ۰.۶ تا ۰.۷ رشد داده شدند. سپس ایزوپروپیل β-D-۱- تیوگالاکتوزید (IPTG) به میزان ۱ میلی‌مولار اضافه شد و کشت‌ها به مدت ۲ ساعت دیگر درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و سرعت دوران ۲۰۰ rpm قرار گرفتند. بعد از القاء، محتویات بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ گردید که فاز رویی آن دور ریخته شد و وزن رسوب آن اندازه‌گیری شد. سپس رسوب بدست آمده مجددا در بافر لیز (۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، ۳۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، ۲ میلی‌مولار PMSF، ۵ میلی‌مولار DTT، pH 8) حل شدند. پس از حل کردن رسوب باکتری در بافر لیز کننده، به دنبال آن هر نیم ساعت یکبار نصف حجم اولیه موجود در بافر لیز و مدت ۲ ساعت فنیل‌متیل‌سولفونیل‌فلوراید که مهارکننده سرین پروتئازها می‌باشد به آن اضافه گردید. در این مدت درون یخچال و در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. برای شکستن دیواره و غشاهای سلولی نمونه‌های مورد نظر بر روی یخ به‌وسیله امواج فراصوت با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروب‌دار (مدل Bandelin sonopuls HD 2200, 20 kHz، ساخت کشور آلمان) با قدرت ۲۵ وات {پالس ۴۵ ثانیه روشن و ۶۰ ثانیه خاموش به مدت ۱۲ دقیقه} و بر روی یخ سونیکیه گردیدند. بعد از سونیکیت نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند که در ادامه فاز رویی آنها که حاوی پروتئین تاو مورد نظر می‌باشد جمع‌آوری و با فیلترهای ۰/۲ میکرونی فیلتر شدند. تخلیص با استفاده از کروماتوگرافی تمایلی و از طریق سفارز Ni^{2+}NTA (Qiagen، والنسیا، ایالات متحده) انجام شد که در آن پروتئین هنگام عبور از ستون تمایلی به Ni^{2+} متصل می‌شود و سپس در بافر آزاد کننده‌ی NPI250 (۵۰ میلی‌مولار تریس-HCl، ۲۵۰ میلی‌مولار ایمیدازول، ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl، pH 8) آزاد می‌شود. خلوص تاو پروتئین با الکتروفورز ژل SDS-PAGE تأیید شد و سپس پروتئین به قسمت‌های کوچک تقسیم شده و در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. در این مطالعه غلظت پروتئین‌ها با استفاده از قانون بیر-لامبرت (معادله ۱) از طریق جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. ضریب جذب مولی پروتئین تاو برابر با $7450 M^{-1} cm^{-1}$ می‌باشد (۴۰).

$$A=\varepsilon L c \quad \text{(معادله ۱)}$$

A: میزان جذب نور، ε: ضریب جذب مولی، L : طول مسیر نوری، c: غلظت

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

خاموشی فلوئورسانس

برای بررسی مکانیسم خاموشی فلوئورسانس توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Agilent کشور آمریکا، مدل : Cary-Eclipse)،از طول موج ۲۸۵ تا ۴۸۵ نانومتر اسکن گردید درحالیکه طول موج تهیج ۲۷۵ نانومتر، و نشر و پهنای شکاف تهیج به‌ترتیب ۱۰ نانومتر و ۵ نانومتر بود. برای اندازه‌گیری خاموشی ثابت اتصال مزالازین به پروتئین تاو از روش تیتراسیونی در ناحیه‌ی نشر ۲۸۰ تا ۵۰۰ نانومتر و تهیج ۲۷۵ نانومتر استفاده شد. محلول ۲۰ میکرومولار تاو در حضور غلظت‌های مختلف مزالازین (۵ تا ۲۵ میکرومولار) مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی فیبریلاسیون توسط نشر فلوئورسانس تیوفلاوین تی

۲۰ میکرولیتر از پروتئین تاو انکوبه شده (پروتئین تاو تخلیص شده+ محلول مزالازین) و یک نمونه شاهد (پروتئین تاو تخلیص شده‌ی فاقد محلول مزالازین) در ۴ روز متوالی در حضور تیوفلاوین تی (۲۰ میکرومولار) و در بافر فسفات ۱ میلی‌مولار، نشر آن در ناحیه ۷۰۰-۴۵۰ نانومتراندازه‌گیری شد (طول موج تهیج ۴۴۰ نانومتر). افزایش فلوئورسانس در طول موج ۴۸۵ نانومتر، تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید را نشان می‌دهد. این ارزیابی در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از هپارین به نسبت (۱ به ۴ به ترتیب هپارین به عنوان القا کننده و پروتئین) و به صورت ثابت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام شد. این فرایند در دوره های زمانی ۲۴ ساعته و به مدت ۱۲۰ ساعت انکوبه گذاری انجام شد.

آنالیز پراش تابش ایکس

جهت بررسی XRD در ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ ساعت در بافر فسفات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌ها، (محلول پروتئین تاو در حضور و غیاب مزالازین با غلظت ۲۵ میکرومولار) روی شیشه زده و بعد از خشک شدن، کریستال تهیه گردید. بلورهای به‌دست آمده توسط دستگاه XRD با سرعت اسکن ۴۰ بر دقیقه و با زاویه پراش 2θ از ۵ تا ۳۰ درجه اسکن شد.

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی (FE-SEM) برای بررسی تجمعات آمیلوئیدی و شکل ظاهری تجمعات مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش ۵۰ میکرولیتر از پروتئین تاو ۲۰ میکرومولار با مزالازین ۲۵ میکرومولار به مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه‌های انکوبه شده (در حضور و عدم حضور مزالازین ۲۵ میکرومولار) روی لامل ریخته و اجازه داده شد تا خشک شود. سپس توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی آنالیز گردید.

شبیه سازی دینامیک مولکولی

در پژوهش حاضر، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به منظور بررسی رفتار مولکولی پروتئین تاو در حضور لیگاند مزالازین و برای بدست آوردن مختصات بهینه سازی شده پروتئین تاو در داکینگ و آنالیز پاکت اتصالی انجام شد. در این مطالعه از میدان نیروی GROMOS 56A7استفاده شد. میدان نیرو GROMOS 56A7، یکی از ابزارهای مهم در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، به‌ویژه برای مدل‌سازی

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

لیگاندهای شیمیایی و تعاملات آن‌ها با پروتئین‌ها و سایر مولکول‌های زیستی، کاربرد دارد. این میدان نیرو به خاطر پارامترهای دقیق و به‌روز خود، توانایی بالایی در شبیه‌سازی تعاملات پیچیده بین لیگاندها و اهداف بیولوژیکی ارائه می‌دهد.

در مقایسه با میدان‌های نیروی دیگر مانند AMBER، که ممکن است در مدل‌سازی جزئیات دقیق‌تر تعاملات الکترواستاتیک و واندروالسی دقت بیشتری داشته باشد، یا CHARMM و OPLS که برای شبیه‌سازی‌های پیچیده و سیالات بهینه شده‌اند، GROMOS 56A7 به‌دلیل بهینه‌سازی‌های ویژه‌اش در تعاملات لیگاند-پروتئین و کارایی بالا در شبیه‌سازی‌های بلندمدت، ابزار مؤثری در تحلیل و پیش‌بینی رفتار لیگاندهای شیمیایی است. انتخاب میدان نیروی مناسب بستگی به نوع سیستم شبیه‌سازی و نیاز به دقت در مدل‌سازی تعاملات لیگاندها دارد (۲۹). مختصات اولیه پروتئین تاو از مدل ساختاری پیشین ما با کد 9fs4 استخراج گردید (۳).

در این شبیه‌سازی، پروتئین در مرکز یک جعبه مکعبی قرار گرفت و با مولکول‌های آب مدل SPC/E حلال‌پوشی شد .جهت خنثی‌سازی بار الکتریکی سیستم، تعداد مناسبی از یون‌های سدیم (Na^+) یا کلر (Cl^-) به صورت تصادفی جایگزین مولکول‌های آب شدند تا بار خالص جعبه شبیه‌سازی به صفر برسد.

در این شبیه‌سازی، از شرایط مرزی دوره‌ای (PBC) در هر سه جهت دکارتی (x, y, z)استفاده شد. پتانسیل لنارد-جونز با شعاع قطع (Cut-off) ۱.۴ نانومتر محدود گردید که این مقدار بر اساس پارامترهای بهینه‌شده در میدان نیروی GROMOS 56A7 انتخاب شده است تا دقت محاسبات در تعاملات غیرکووالانسی تضمین شود. لازم به ذکر است که ابعاد جعبه شبیه‌سازی به گونه‌ای انتخاب شد که فاصله بین پروتئین و مرزهای جعبه همواره بزرگتر از شعاع قطع باشد تا از رعایت شرط (قرارداد تصویر حداقلی) Minimum Image Convention و عدم تداخل تصاویر دوره‌ای اطمینان حاصل گردد. استفاده از شعاع قطع ۱.۴ نانومتر برای پتانسیل لنارد-جونز مطابق با توصیه‌های استاندارد میدان نیروی GROMOS 56A7 انتخاب شده است. این مقدار به منظور اطمینان از محاسبه دقیق تعاملات واندروالسی در فواصل میان‌برد و جلوگیری از ناپایداری‌های انرژی در سیستم‌های شامل لیگاند در نظر گرفته شد. همچنین ابعاد جعبه شبیه‌سازی به گونه‌ای تنظیم شده است که شرط قرارداد تصویر حداقلی رعایت شود (یعنی طول هر ضلع جعبه حداقل دو برابر شعاع قطع باشد) تا از برهم‌کنش اتم با تصویر خودش در مرزهای دوره‌ای جلوگیری گردد (۱۲, ۵۲). انرژی الکترواستاتیک دوربرد نیز با استفاده از الگوریتم Particle-Mesh Ewaldو محدوده ۰/۹ نانومتر کنترل شد. سرعت‌های اولیه ذرات با توزیع ماکسول تولید شدند و شبیه‌سازی، با استخراج مختصات هر ۱۰ پیکوثانیه ادامه یافت (۳۲, ۲۱). در تمام مراحل شبیه‌سازی، کلیه پیوندهای اتمی (All-atom)شامل پیوندهای هیدروژنی با استفاده از الگوریتم LINCS صلب (Constrained)گردیدند که این امر امکان استفاده از گام زمانی ۲ فمتوثانیه را فراهم آورد . متعادل‌سازی سیستم در دو مرحله NVT و NPT هر کدام به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه انجام شد .دما در ۳۰۰ کلوین با الگوریتم Berendsen و فشار در ۱ بار با الگوریتم Parrinello-Rahman تنظیم گردید. محاسبات ساختاری شامل RMSF، RMSD، شعاع

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

ژیراسیون و سطح تماس قابل دسترسی به حلال با استفاده از ماژول‌های gmxrms ، gmxrmsf، gmx gyrate و در زمانی که RMSD به حالت تعادل رسید، انجام شد. برای بررسی اثر دارو بر ساختار پروتئین تاو، شبیه‌سازی دیگری با افزودن مولکول دارو به سیستم پروتئین تاو به‌تنهایی و با استفاده از شرایط مشابه قسمت اول صورت گرفت.

در این مطالعه، از دو سیستم شبیه‌سازی مختلف استفاده شد. ابتدا، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پروتئین تاو به مدت ۳۰ نانوثانیه برای پروتئین آپوتاو و همراه با مزالازین به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد تا ساختارهای فضایی مختلف پروتئین استخراج شوند و نوسانات ساختاری کاهش یابد. با توجه به انعطاف‌پذیری بالای پروتئین تاو، شبیه‌سازی تا رسیدن به ساختارهایی با اعتبار آماری کافی ادامه یافت.

جستجوی ناحیه اتصال دارو به پروتئین تاو

از آنجایی که تاو یک پروتئین بسیار انعطاف‌پذیر است و ساختار سوم مشخصی از خود نشان نمی‌دهد، در ابتدا با استخراج مجموعه های ساختاری و استفاده از سرور آنلاین CASTp به جستجوی ناحیه اتصال در زمان به تعادل رسیده، پرداخته شد (۱۵). تعداد بیست بنای فضایی در اینتروال یک نانوثانیه از این شبیه‌سازی استخراج شد و برای مشخص کردن پاکت‌های اتصالی هم پوشانی نتایج انجام شد.

داکینگ مولکولی

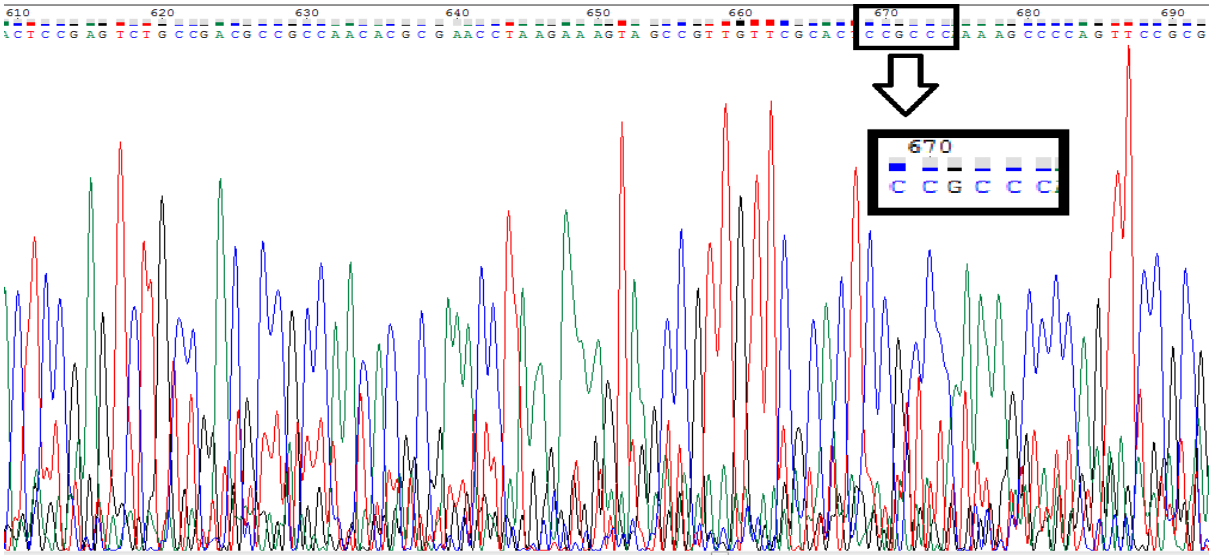
در ادامه برای بررسی دقیق نوع میان‌کنش ها و ریشه-های درگیر اتصال پروتئین تاو/مزالازین، داکینگ مولکولی با استفاده از روش داکینگ مولکولی Vina انجام شد (۲۲). در این فرایند، ابتدا مولکول‌های آب از ساختار پذیرنده حذف شدند و سپس اتم‌های هیدروژن قطبی به پروتئین اضافه گردیدند. بارهای جزیی با استفاده از روش Gasteiger محاسبه شدند. همچنین، ساختارهای لیگاند و پذیرنده در فرمت PDBQT ذخیره شدند. انرژی تمایلی لیگاند در هر وضعیت فضایی پروتئین تاو با بهره‌گیری از نرم‌افزار AutoDock Vina محاسبه گردید و به‌صورت کیلوکالری بر مول ارائه شد.

نتایج

تخلیص پروتئین تاو

نتایج هم‌ردیفی تعیین توالی با ژن ایزوفرم 1N4R در NCBI حاکی از فرآیند بهینه‌سازی کدون روی توالی نوکلئوتیدی تاو برای افزایش بیان در سیستم‌های پروکاریوتی می‌باشد (شکل ۱).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339



Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
335 bits(860)	4e-113	Compositional matrix adjust.	173/173(100%)	173/173(100%)	0/173(0%)

```
Query  1    GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQA  60
            GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQA
Sbjct  49   GIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQA  108

Query  61   NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKV  120
            NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKV
Sbjct  109  NATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKV  168

Query  121  AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN  173
            AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN
Sbjct  169  AVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIIN  221
```

شکل ۱- (بالا) طیف کروماس مربوط به توالی نوکلئوتیدی پلاسمید حاوی پروتئین وحشی که به کمک پرایمر T7 پروموتور که در ناقل مورد نظر (pET21a) قرار دارد تعیین توالی شد. (پایین) مقایسه ردیف توالی اسیدهای آمینه پروتئین تاو وحشی با توالی ایزوفرم 1N4R در NCBI.

توالی نوکلئوتیدی پروتئین تاو وحشی (isoform tau-E, 1N4R, 412aa) در سایت NCBI

ATGGCTGAGC CCCGCCAGGA ATTTGACACG ACAGAAGATC ACGCTGGAGA CTACACCCTG
CTCCAAGACC AGGACGGGGA CACAGAGCCC GGCCTGAAAG AGTCTCCCCC GCAGACTCCT
GCTGATGACG GATCCGAGGA ACCAGGCTCT GAGACCTCTG ATGCTAAGAG CACTCCGACG
GCCGAAGCTG AAGAAGCAGG CATTGGAGAC ACTCCAAACC TGGAAGACCA AGCCGCCGGA
CATGTGACTC AAGCTCGCAT CAGCAAAGGC AAAGACGGGA CTGGAAATGA GGACCGAAAA

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

GCAAAGGGGG CTGATGGCAA AACTGGAACA AAGAGCGCTG CACCCCGGGG CGCAGCCCCT
TCCGGTCAGA AAGGTGCTGC GAGCGCCACC AGGATTCCAG CCAAAACCCC AGCTGCCCCA
AAGACGCCGC CCGGCACTGG CGAATCTGCA AAGTCTGGGG ACCGCAGTGG CTACAGCAGT
CCCGGCTCCC CTGGGACCCC AGGCAGCCGC TCGCGCACCC CGTCTCTACC CACCCCACCC
ACCCGAGAGC CCAAGAAGGT GGCCGTGGTC CGCACCCCGC CCAAGTCGCC GTCCACCACC
AAGAGCCGCC TGCAGACTGC CCCTGTGCCT ATGCCCGACT TGAAGAACGT CAGGTCCAAG
ATCGGCTCCA CTGAGAACCT GAAGCACCAG CCGGGAGGCG GGAAGGTGCA GATAATTAAT
AAGAAGCTGG ATCTTAGCAA CGTCCAGTCC AAGTGTGGCT CAAAGGATAA TATCAAACAC
GTCCCGGGCG GCGGCAGTGT GCAAATAGTC TACAAACCCG TGGACCTGAG CAAGGTGACC
TCCAAGTGCG GCTCCTTAGG CAACATCCAC CATAAACCAG GAGGTGGACA GGTGGAAGTG
AAATCTGAGA AGCTGGACTT CAAGGACAGA GTCCAGTCGA AGATCGGGTC CCTGGACAAC
ATCACCCACG TCCCTGGAGG AGGGAATAAG AAGATCGAAA CCCACAAGCT GACCTTCCGC
GAGAACGCCA AGGCCAAGAC TGACCACGGG GCGGAGATCG TGTACAAGTC ACCGGTGGTG
TCAGGGGACA CGTCCCCGCG ACACCTCAGC AACGTCTCCT CCACTGGCAG CATCAACATG
GTGGACTCGA TGCAGCTCGC CACGCTAGCC GATGAGGTGT CCGCGTCCCT GGCCAAGCAG
GGTTTGTGA

توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین تاو وحشی (isoform tau-E, 1N4R, 412aa) در سایت NCBI

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT
PTEDGSEEPG SETSDAKSTP TAEAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS
KSKDGTGSDD KKAKGADGKT KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP
KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR SRTPSLPTPP TREPKKVAVV
RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ PGGGKVQIIN
KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH
HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

ENAKAKTDHG AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

توالی نوکلئوتیدی تاو کلون شده در وکتور pET21،

...CATCAGGATC AGGAAGGCGA TACCGATGCC GGCTTGAAGG AGTCTCCGCT GCAAACGCCG ACCGAAGATG GGAGCGAAGA ACCGGGTTCG GAAACGAGCG ATGCCAAATC AACGCCAACA GCGGAAGCCG AGGAAGCGGG CATTGGCGAT ACTCCGTCGT TGGAGGACGA GGCTGCAGGT CATGTCACTC AGGCTCGCAT GGTGAGCAAA TCGAAAGACG GAACCGGGAG TGATGACAAG AAAGCGAAAG GTGCAGATGG GAAAACCAAA ATTGCGACGC CGCGCGGGGC AGCGCCGCCT GGGCAGAAAG GCCAAGCGAA TGCAACCCGG ATTCCCGCCA AGACGCCTCC AGCCCCGAAA ACACCGCCAA GCTCTGGCGA ACCGCCGAAA AGCGGCGATC GTTCAGGCTA CTCCAGTCCG GGTAGCCCTG GCACCCCTGG TAGTCGTTCG CGTACTCCGA GTCTGCCGAC GCCGCCAACA CGCGAACCTA AGAAAGTAGC CGTTGTTCGC ACTCCGCCCA AAAGCCCCAG TTCCGCGAAA ATCTCGCCTT CAGACCGCAC CGGTTCCAAT GCCAGACTC...

توالی اسیدآمینه‌ای تاو کلون شده در وکتور pET21 که با توالی اسیدآمینه‌ای ایزوفرم 1N4R در NCBI مطابقت دارد.

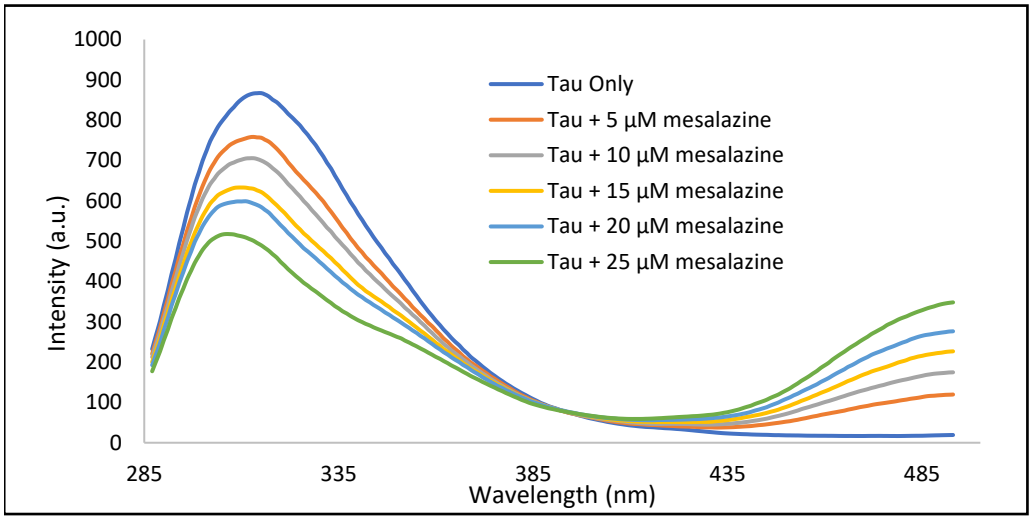
...HQDQEGDTDA GLKESPLQTP TEDGSEEPGS ETSDAKSTPT AEAEEAGIGD TPSLEDEAAG HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK SRLQTAPVPM PDL...

پس از تخلیص پروتئین، از روش آنالیز ژل الکتروفورز SDS-PAGE رنگ‌آمیزی شده توسط آبی کوماسی، برای تعیین کیفیت پروتئین تاو استخراج شده، استفاده گردید (۳, ۴, ۱۴, ۲۳, ۴۱, ۴۶, ۲) . ایزوفرم 1N4R پروتئین تاو دارای وزن مولکولی ۴۳ کیلودالتون می‌باشد که به علت ساختار غیرفشرده آن کمی کندتر حرکت می‌کند.

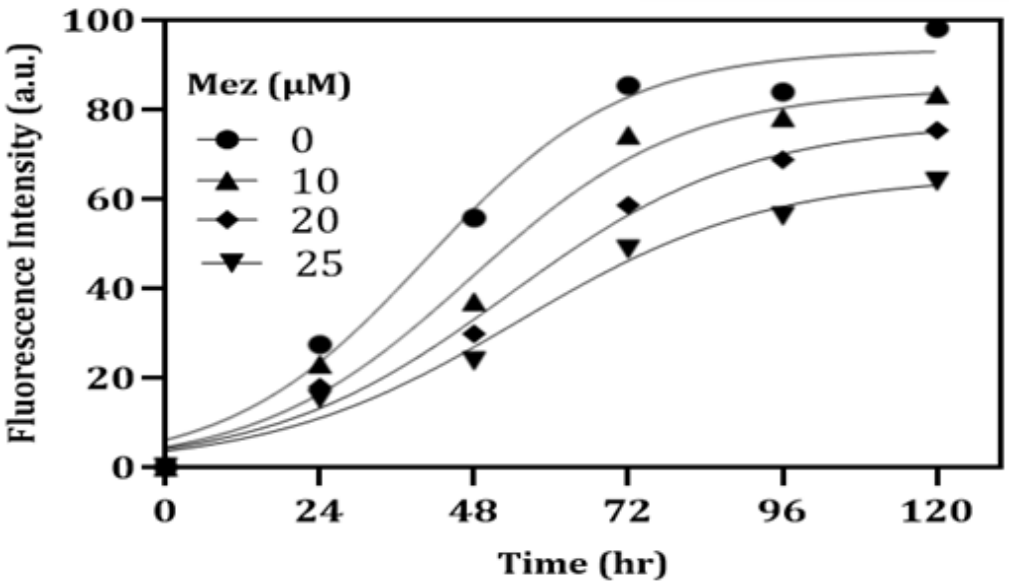
خاموشی فلوئورسانس

خاموشی فلوئورسانس، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، در غیاب مزالازین (محلول تاو ۲۰ میکرومولار) و در حضور مزالازین (غلظت ۵ تا ۲۵ میکرومولار) بررسی شد (شکل ۲ الف). طبق نتایج به دست آمده هر بار که از غلظت‌های مختلف مزالازین به‌عنوان خاموش کننده استفاده شد، نمودار روند کاهشی داشت. بنابراین در این مرحله، اتصال مزالازین به پروتئین تاو اثبات گردید. از آنجا که برهم‌کنش مزالازین با پروتئین تاو باعث کاهش فلوئورسانس می‌شود (۳۶) نشان دهنده این است که مزالازین احتمالا به جایگاهی نزدیک باقیمانده های آمینواسیدی فلورسانس کننده (تریپتوفان، تیروزین و یا فنیل‌آلانین) متصل می‌شود.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339



الف



ب

شکل ۲ -الف- نمودار خاموشی فلوئورسانس پروتئین تاو (۲۰ میکرومولار) در حضور غلظت‌های مختلف مزالازین (۵ تا ۲۵ میکرومولار). طیف فلوئورسانس از طول موج ۲۸۵ تا ۴۸۵ نانومتر اسکن گردید درحالیکه طول موج تهیج ۲۷۵ نانومتر، و نشر و پهنای شکاف تهیج به‌ترتیب ۱۰ نانومتر و ۵ نانومتر بود. داده‌های به‌دست‌آمده میانگین داده‌های سه آزمایش مستقل هستند. ب- نمودار سینتیک تشکیل تجمعات پروتئین تاو (۲۰ میکرومولار در غلظت ۱ میلی‌مولار بافر فسفات، pH ۷/۶) توسط نشر تیوفلاوین تی در حضور غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میکرومولار مزالازین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد. اندازه‌گیری فلورسانس هر ۲۴ ساعت یکبار و به مدت ۱۲۰ ساعت انجام شد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

بررسی سینتیک تشکیل تجمعات آمیلوئیدی با استفاده از نشر فلوئورسانس ThT

ژو و همکارانش (۷۰) گزارش داده‌اند که شدت نشر فلوئورسانس تیوفلاوین تی با غلظت آمیلوئیدی شدن رابطه خطی دارد. بنابراین از ThT می‌توان برای اندازه‌گیری غلظت آمیلوئید استفاده کرد. رسوبات آمیلوئیدی در سطح مولکولی ساختار بتا متقاطع دارند که این ساختار بتا از صفحات لایه‌لایه‌ای تشکیل شده‌است که رشته‌های آن‌ها نسبت به محور طولی فیبریل به‌صورت عمودی قرار می‌گیرند. تیوفلاوین تی یک رنگ بنزاتیازول کاتیونی می‌باشد که قرار گرفتن آن بین صفحات بتا باعث ممانعت چرخش آزاد پیوند کربن- کربن بین بنزیل آمین و حلقه بنزاتیول می‌شود بنابراین نشر آن افزایش می‌یابد (۱۳). سنجش فلوئورسانس ThT برای تعیین کمیت تشکیل آمیلوئید، الیگومریزاسیون سمی تاو، و هم‌چنین بررسی تاثیر مزالازین بر سرعت تشکیل فیبریل بررسی گردید. شدت نشر تیوفلاوین تی در طول موج ۴۸۵ نانومتر و در فواصل زمانی ۲۴ ساعت، به مدت ۱۲۰ ساعت اندازه‌گیری شد. فلوئورسانس ThT برای تشخیص ساختار ورقه‌ای متقاطع آمیلوئید استفاده شده‌است که در برهم‌کنش با ساختار ورق متقاطع بتا، ThT منجر به افزایش قابل توجهی در شدت فلوئورسانس می‌شود. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود سینتیک تجمع پروتئین تاو یک ظاهر سیگموئیدی معمولی را در انواع غلظت‌های پروتئین نشان می‌دهد که حاوی فاز تاخیری مرتبط با هسته‌زایی، فاز رشد سریع مرتبط با ازدیاد طول، انتشار فیبریل‌ها، و فاز ثابت نهایی می‌باشد. مطالعات سینتیکی نشان دهنده اثر مهاری مزالازین در روند فیبریلاسیون پروتئین تاو می‌باشد (شکل ۲ ب).

پارامترهای سینتیکی با استفاده از معادلات ۳-۲ و با استفاده از نسخه ۱۰ نرم افزار گراف پد پریسم محاسبه شدند (۱۹, ۴۷) (جدول ۱):

$$F = F_{\mathrm{i}} + [F_{max} - F_{\mathrm{i}}]/[1 + exp^{(t-t_m)/\tau}] \quad \text{(معادله ۲)}$$

$$t_D = t_m - 2\tau \qquad \tau = \frac{1}{K_{app}} \quad \text{(معادله ۳)}$$

جدول ۱- پارامترهای سینتیکی تشکیل تجمعات غلظت‌های مختلف، توسط تیوفلاوین تی

Mez (μm)	۰	۱۰	۲۰	۲۵
$F_{\max}$	۹۳.۴۵ ± ۲.۴	۸۴.۶۱±۱.۳۱	۷۷.۱±۰.۹۱	۶۵.۲۴±۱.۱۱
$k_{\mathrm{app}\ (\mathrm{h}^{-1})} \times 10^2$	۶.۵ ±۰.۳۳	۶ ±۰.۴۱	۵.۳ ±۰.۵۷	۵.۱ ±۰.۳۹
t_{m}	۴۰.۶۱ ±۲.۱۲	۴۷.۴۴ ±۱.۹۴	۵۳.۲۸ ±۱.۸۶	۵۴.۸ ±۲.۰۱
$t_{\mathrm{D}\ (\mathrm{h})}$	۱۰.۰۷ ±۰.۹۱	۱۴.۴۴ ±۱.۰۳	۱۶.۰۷ ±۱.۴۴	۱۶.۱۰ ±۱.۵۲

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

که در این جدول F سیگنالی است که در زمان t مشاهده می‌شود، F_i و F_{max} به ترتیب مقادیر اولیه و نهایی سیگنال هستند. k_{app} ثابت سرعت ظاهری آگریگیشن، t_m زمان مورد نیاز برای رسیدن به نیمه حداکثر سیگنال F_{max} ، τ ثابت ویژگی زمان و t_D زمان مورد نیاز برای هسته‌سازی است.

آنالیز پراش پرتو ایکس (XRD)

پراکندگی نور رایلی از صفحات کریستال، اساس کار X-ray diffraction (XRD) می‌باشد. اصل روش XRD زاویه سیگنال پراکنده شده و ساختارهای اتمی دوره‌ای می‌باشد. رابطه کلی بین طول موج پرتوهای ایکس تابیده شده، زاویه تابش و فاصله بین صفحات شبکه کریستالی اتم‌ها به‌عنوان قانون برگ شناخته می‌شود که به‌صورت زیر بیان می‌شود (معادله ۴) (۳۰).

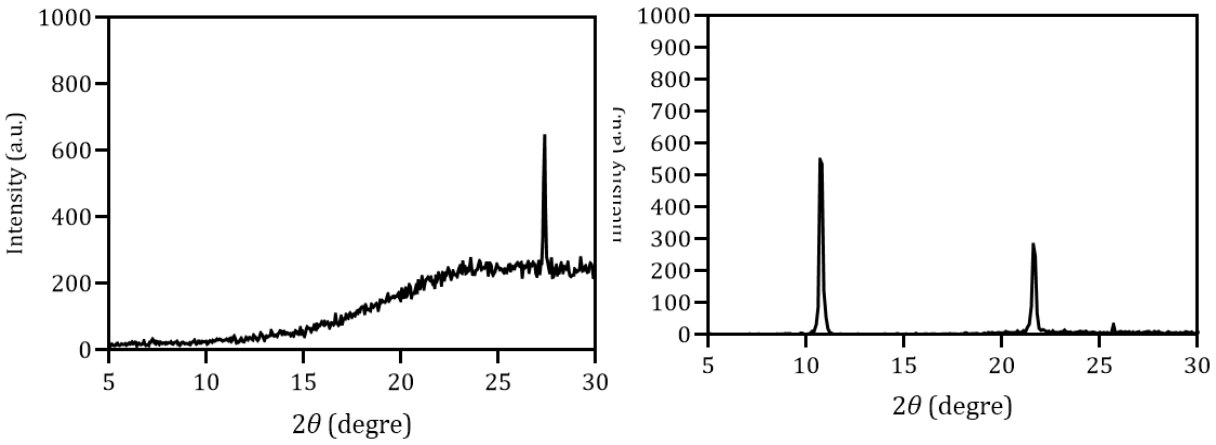
$$n\lambda=2d\sin\theta \quad \text{(معادله ۴)}$$

طبق فرمول براگ هنگامی‌که ساختار یک ماده با تابش ثابتی مانند X بررسی شود اگر فاصله بین صفحات (d) کاهش پیدا کند 2θ افزایش پیدا می‌کند. در آنالیز XRD اندازه‌گیری سیگنال‌های پراش که از کریستال نشات می‌گیرد در مقایسه با سیگنال‌های ضعیف دریافت شده از یک تک مولکول آسان‌تر است (۴۵).

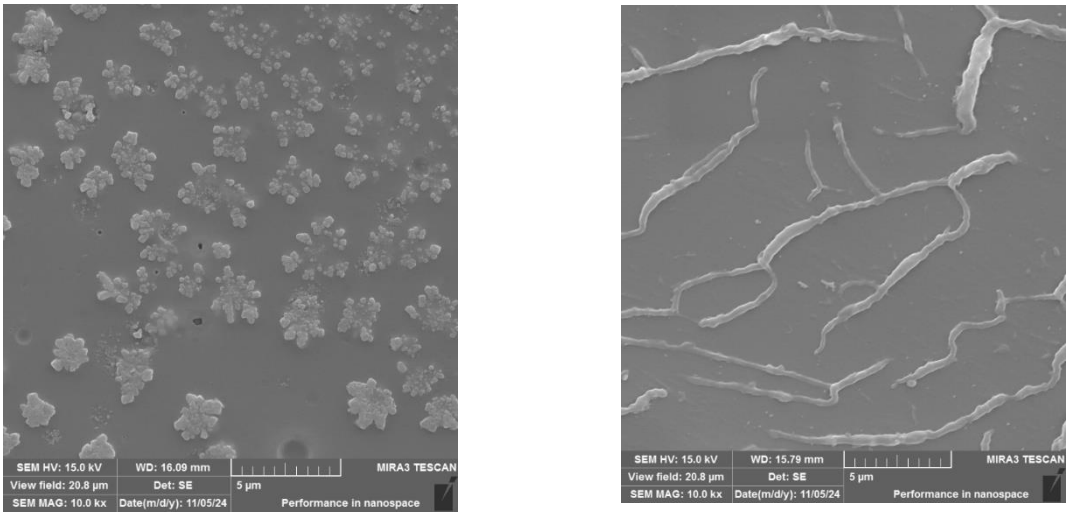
XRD روشی دقیق برای بررسی ساختارهای اتمی پروتئین‌های بزرگ می‌باشد. این روش اطلاعات مستقیمی را از ساختار مولکولی فراهم می‌کند و برای بررسی ساختارهای متقاطع بتا به‌کار می‌رود. دو نوع الگوی پراش در ساختار بتای مولکول‌های تجمع یافته دیده می‌شود (۳۴, ۴۸). یکی از این الگوها مربوط به فاصله بین رشته‌های هیدروژنی ساختارهای بتا است که پیک 2θ آن حدود ۲۰ درجه می‌باشد. و الگوی دیگر پراش مربوط به فاصله بین صفحات بتا می‌باشد که بستگی به زنجیره‌های جانبی و اندازه اسیدآمینه بین صفحات بتا دارد و پیک 2θ آن حدود ۱۰ درجه است (۱۰). با توجه به اینکه فیبریل‌های تاو توسط دو موتیف آب‌گریز و کوتاه هگزاپپتید (PHF6 , ❋) PHF6هدایت می‌شود، این پیک‌های ذکر شده مربوط به ساختارهای کریستال مانند توسط این دو قطعه آمیلوئیدوژنیک می‌باشد.

نمودار XRD نمونه پروتئین تاو در عدم حضور مزالازین (نمودار الف) و در حضور مزالازین (۲۵ میکرومولار) (نمودار ب)، در (شکل ۳) آورده شده‌است. نمونه انکوبه شده در عدم حضور مزالازین (نمودار الف)، یک الگوی پراشی قابل تشخیص را نشان می‌دهد که مشخصه ساختارهای صفحات بتا می‌باشد. در حضور مزالازین (نمودار ب) شدت پیک های شاخص به وضوح کاهش پیدا کرده است. این نتایج اثر مهاری مزالازین در فیبریلاسیون تاو را تایید می‌کند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339



ب الف



د ج

شکل ۳ الف و ب- الگوی پراش پرتو x در نمونه‌های پروتئین تاو در عدم حضور مزالازین (نمودار الف) و در حضور مزالازین (۲۵ میکرومولار) (نمودار ب) که پس از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۷/۶ به‌دست آمده است. ج و د- تصاویر میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM) از تجمعات پروتئین تاو انکوبه شده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲۰ ساعت در عدم حضور مزالازین (شکل ج) و در حضور مزالازین (شکل د).

تصاویر مورفولوژی فیبریل‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی

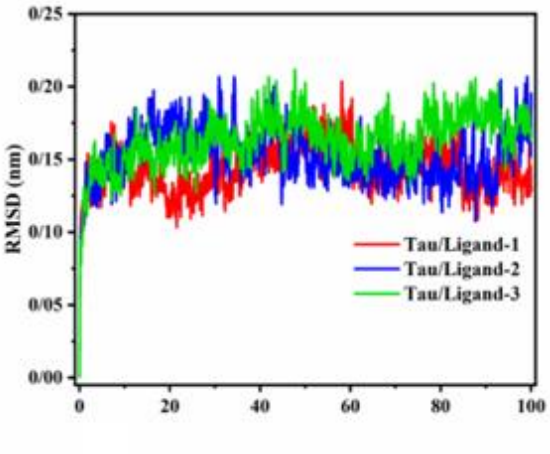
FE-SEM روشی برای بررسی تجمعات آمیلوئیدی و توصیف مورفولوژی و شکل ظاهری تجمعات می‌باشد. پس از ۱۲۰ ساعت انکوباسیون پروتئین تاو به‌منظور تشکیل فیبریل‌های تاو در عدم حضور مزالازین، و تغییرات مورفولوژی تجمعات آمیلوئیدی در حضور مزالازین از FE-SEM استفاده شد (شکل ۳). نمونه انکوبه شده پروتئین تاو در غیاب مزالازین، منجر به تشکیل فیبریل‌های تاو گردید که تصاویر به‌دست آمده از FE-SEM نتایج مربوط به نشر ThT را نیز تایید می‌کند (شکل ج). در حالی‌که نمونه انکوبه پروتئین تاو با مزالازین منجر به تجمعات الیگومریک کوچک تاو

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

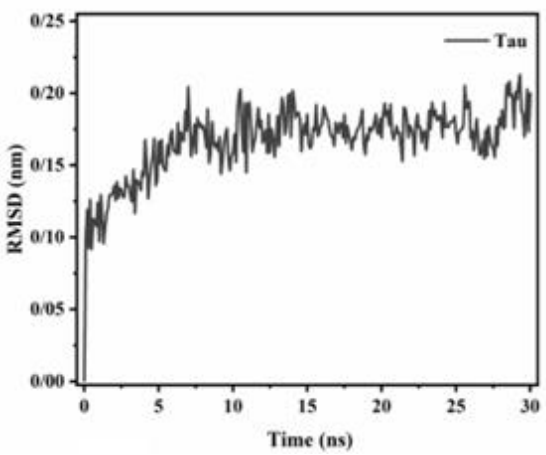
گردید (شکل د). از این تصاویر می‌توان نتیجه گرفت مزالازین به‌عنوان یک مهار کننده متوسط فیبریلاسیون و نه یک سرکوبگر تجمع در نظر گرفته می‌شود.

بررسی پاکت‌های اتصال

برای تمایز و ارزیابی دینامیک پاکت‌های احتمالی در طول بیست نانوثانیه به تعادل ترمودینامیکی رسیده از انتهای مسیر شبیه‌سازی (شکل ۴)، تعداد بیست بنای ساختاری در هر نانوثانیه استخراج شد و در سرور آنلاین CASTp (Computational Atlas of Surface Topography of Proteins) بررسی شد. چراکه با بررسی رفتار پروتئین در این بازه زمانی مقدار $\Delta RMSF \leq 0.1$ nm برای پروتئین بود. [الگوریتم CASTp برای شناسایی و تحلیل نواحی سطحی پروتئین‌ها بر اساس روش‌های مبتنی بر سطح مولکولی و شبیه‌سازی توپی برای مقایسه ساختاری و ویژگی‌های سطحی پروتئین‌ها طراحی شده است. این الگوریتم به طور خاص برای شناسایی حفره‌ها روی سطح پروتئین‌ها استفاده می‌شود و به کمک روش‌های پیچیده تحلیل ساختار، اطلاعات دقیق و مفیدی ارائه می‌دهد. در CASTp، شبیه‌سازی حفره‌ها و تحلیل نواحی فعال با استفاده از الگوریتم‌های سطح دوگانه (Dual Surface)انجام می‌شود که شامل مدل‌سازی دقیق سطح مولکولی پروتئین است. این الگوریتم ابتدا سطح مولکولی پروتئین را با استفاده از توپ‌های فرضی، نمایانگر مولکول‌های آب، شبیه‌سازی می‌کند تا سطح قابل دسترسی به دست آید. سپس، با استفاده از توپ‌های کوچکتر، سطح داخلی یا حفره‌های پروتئین مدل‌سازی می‌شود تا نواحی فرو رفته و غیرقابل دسترس شبیه‌سازی شوند (۶۱). در ادامه، حجم، عمق و ویژگی‌های هندسی این حفره‌ها به دقت محاسبه و تحلیل می‌شود. علاوه بر این، ویژگی‌های شیمیایی حفره‌ها، از جمله توزیع گروه‌های عاملی و تعاملات بالقوه، نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد. این فرآیند به CASTp امکان می‌دهد تا حفره‌ها و نواحی فعال را به طور دقیق شبیه‌سازی کرده و اطلاعات مفیدی برای پژوهش‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها فراهم آورد.

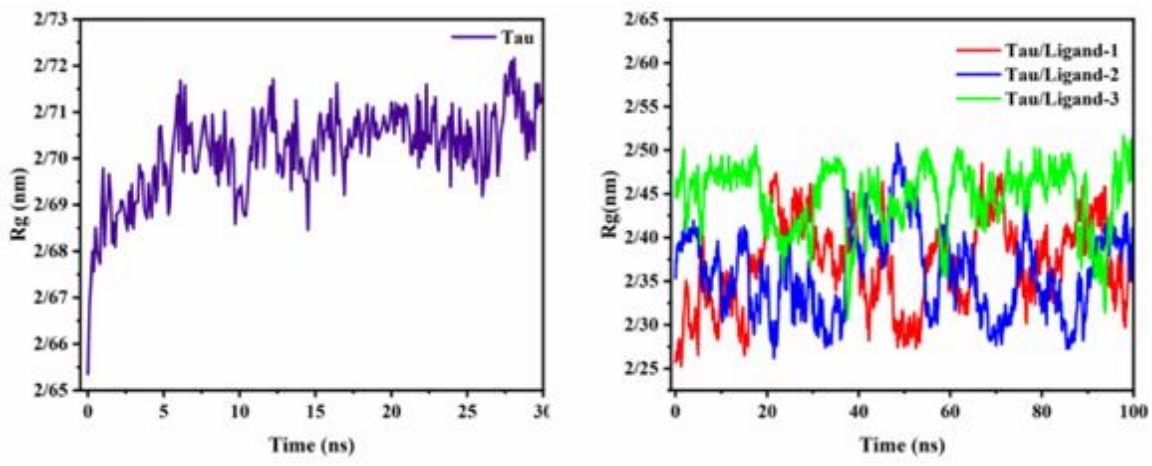


الف



ب

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339



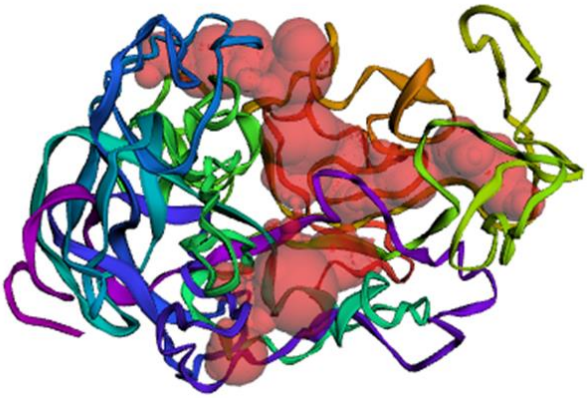
د ج

شکل ۴- آنالیز عملگرهای ساختاری در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکول. نمودار RMSD اسکلت اصلی (Backbone) پروتئین تاو در حالت آزاد که نشان‌دهنده رسیدن به پایداری نسبی در بازه زمانی ۱۰ تا ۳۰ نانوثانیه است (B) .نمودار RMSD برای کمپلکس تاو/مزالازین در سه جایگاه اتصال(Pocket 1-3) ؛ همان‌طور که مشاهده می‌شود، تمامی تراژکتوری‌ها پس از ۲۰ نانوثانیه به تعادل ترمودینامیکی رسیده‌اند که نشان‌دهنده پایداری لیگاند در جایگاه اتصال است (C) .نمودار شعاع ژیراسیون (Rg) برای پروتئین تاو بدون دارو که نوسانات ذاتی ساختار باز پروتئین را نشان می‌دهد (D) .نمودار Rg برای کمپلکس تاو/مزالازین در سه جایگاه اتصال؛ کاهش مقادیر Rg در مقایسه با حالت آزاد(C) ، افزایش فشردگی (Compaction) ساختار پروتئین در اثر تعامل با دارو را تایید می‌کند.

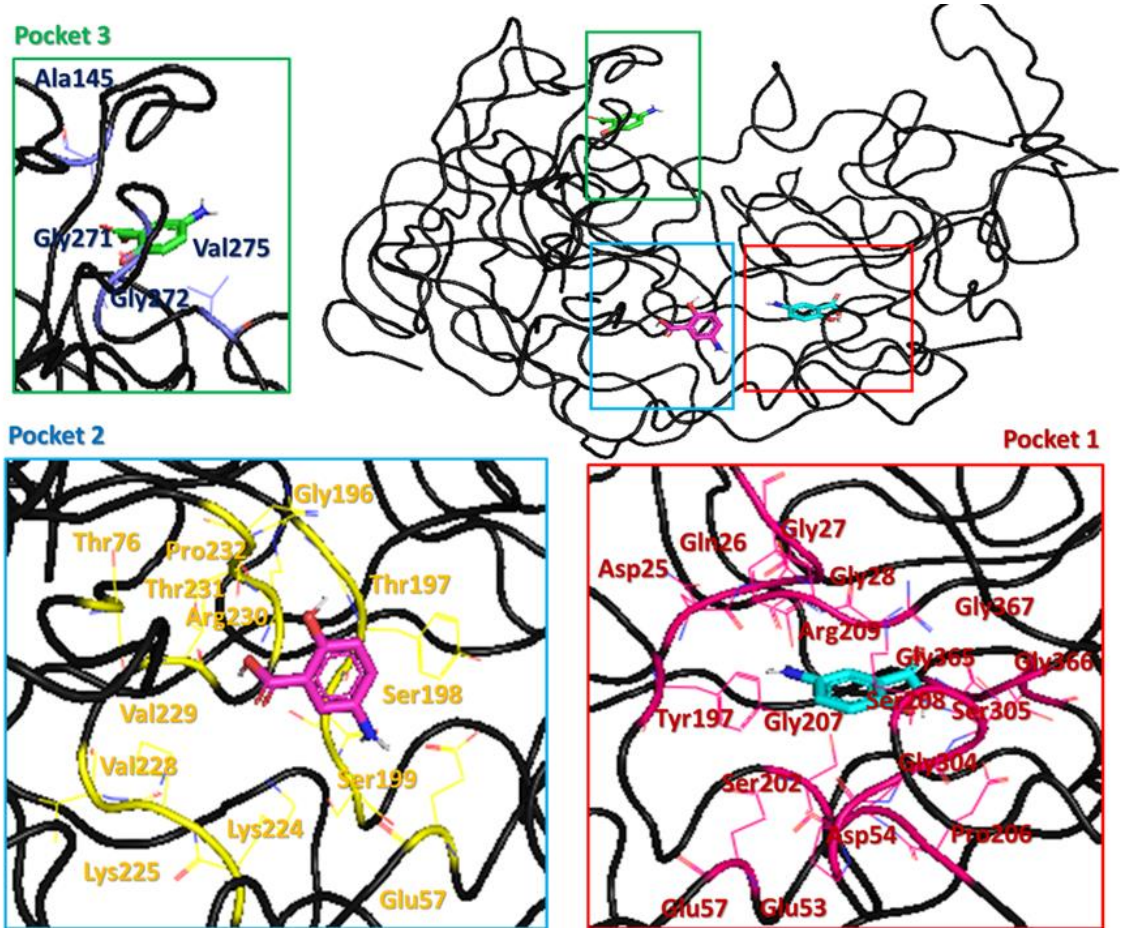
برای محاسبه حجم حفره‌ها در پروتئین‌ها، روش‌های ریاضی دقیق از جمله روش سطحی-توپی (Surface-Ball Method) به‌کار می‌رود. در این روش، ابتدا سطح مولکولی پروتئین با استفاده از الگوریتم‌های مثلث‌بندی محاسبه می‌شود و سپس با شبیه‌سازی توپی کوچک (مدل‌سازی مولکول‌های آب)، حجم نواحی قابل دسترسی و حفره‌های موجود روی سطح پروتئین تعیین می‌شود. توپ‌های مجازی به آرامی به سطح پروتئین نزدیک شده و نواحی که به دلیل حجم توپ‌ها پوشانده نمی‌شود، به عنوان حفره‌های پروتئین شناسایی می‌شوند. حجم حفره‌ها به کمک محاسبات هندسی و انتگرال‌گیری بر اساس تغییرات در سطح توپی و حجم پروتئین محاسبه می‌شود. این روش به دقت حجم و عمق حفره‌ها را تعیین کرده و به تحلیل ویژگی‌های بیولوژیکی و شیمیایی حفره‌های پروتئین کمک می‌کند (۲۷).

همانطور که در (شکل ۵ الف) مشخص است در مجموع در بیست ساختار با هم‌پوشانی نتایج در مجموع حفره ای به حجم ۹۴۳.۵۸۱ Å3 و سطح ۱۵۶۲.۰۵۸ Å2 به دست آمد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

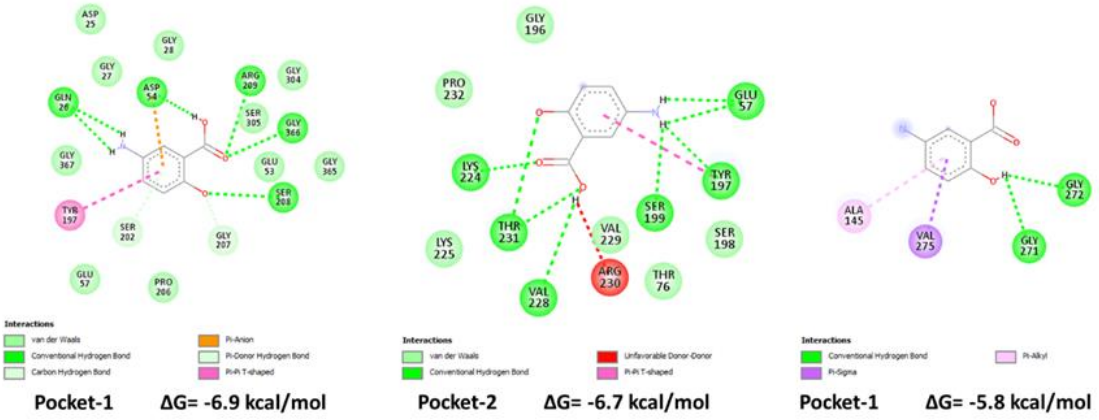


الف

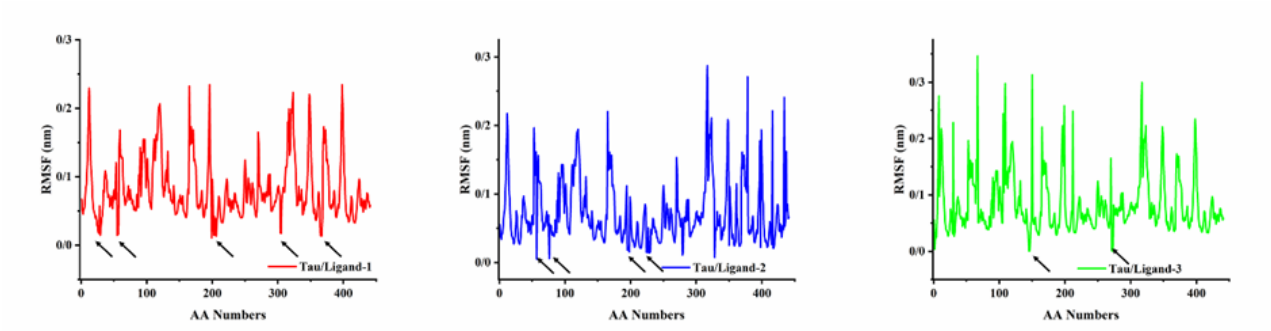


ب

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339



ج



د

شکل ۵ الف-: جایگاه‌های احتمالی پیش‌بینی شده توسط سرور CASTp در طول ۲۰ نانوثانیه پایانی که شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به تعادل رسیده بود را نشان می‌دهد. پروتئین تاو با سطح رنگی و پاکت‌ها در کره های قرمز رنگ نشان داده شده‌اند.

ب و ج- نتایج داکینگ مولکولی AutoDock Vina : سه جایگاه اتصالی پیش بینی شده در داکینگ مولکولی برای مزالازین، در پاکت اتصالی۱، ریشه ها با نمایش خطی قرمز، در پاکت ۲ به رنگ زرد، و در پاکت ۳ با رنگ آبی نشان داده شده‌اند. پایداری جایگاه‌های اتصال و آنالیز ریشه‌های درگیر در پایان شبیه‌سازی. این تصویر پیکره‌بندی نهایی (Final Snapshot) مزالازین را در سه جایگاه پیش‌بینی شده (Pocket 1-3)پس از ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی نشان می‌دهد. ریشه‌های آمینواسیدی که در فاصله قطع (Cut-off) ۴ آنگستروومی از لیگاند قرار دارند، استخراج شده‌اند. تطابق موقعیت لیگاند در پایان شبیه‌سازی با نتایج اولیه داکینگ مولکولی، نشان‌دهنده پایداری و ماندگاری اتصال مزالازین در نواحی مجاور موتیف‌های PHF6 و PHF6* است. جزئیات تعاملات شامل پیوندهای هیدروژنی، تعاملات آب‌گریز و پل‌های نمکی در این شکل به تفکیک ریشه‌های آمینواسیدی نمایش داده شده است. د- عملگر ساختاری RMSF حاصل از آنالیز شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. نمودارهای RMSF نشان می‌دهد که مقادیر RMSF اسیدهای آمینه موجود در پاکت‌های اتصالی ۱ تا ۳ به شدت کاهش می‌یابد. این نواحی با فلش های سیاه رنگ مشخص شده اند.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

داکینگ مولکولی

از داکینگ مولکولی برای پیش‌بینی تعاملات بین تاو و مزالازین استفاده شد در حالی که گرید باکس منطبق بر نواحی حفره های پیش بینی شده در CASTp تنظیم شد. این تحلیل به‌درک بهتر مکانیسم‌های میان‌کنش و شناسایی ریشه های موثر تاو کمک می‌کند.

AutoDock Vina به‌دلیل سرعت بالای شبیه‌سازی، دقت مناسب در پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال، و مصرف کمتر منابع محاسباتی، مزایای قابل توجهی نسبت به سایر نرم‌افزارهای داکینگ مولکولی دارد. این نرم‌افزار به سادگی قابل استفاده است و با انواع مختلف فایل‌های ورودی سازگار است. همچنین، پیکربندی انعطاف‌پذیر آن به کاربران امکان تنظیم دقیق پارامترهای داکینگ را می‌دهد، که به خوبی نیازهای خاص پروژه‌های مختلف را برآورده می‌کند. برای پیش‌بینی محل اتصال مزالازین به پروتئین تاو و بررسی تمایل آن، از این نرم‌افزار داکینگ مولکولی استفاده شده است. تحلیل داکینگ در نواحی با پتانسیل اتصال پیش‌بینی‌شده انجام شده است تا بهترین نقاط اتصال مزالازین به پروتئین تاو شناسایی گردد.

داکینگ مولکولی از داکینگ مولکولی برای پیش‌بینی تعاملات بین پروتئین تاو و مزالازین استفاده شد. جهت افزایش دقت، فضای جستجو (Search Space) یا گرید باکس بر روی نواحی حفره‌های پیش‌بینی شده توسط CASTp متمرکز گردید. ابعاد این باکس به مقدار ۳۴ × ۲۴ × ۴۴ آنگستروم و مرکز آن بر روی مختصات X=324.272, Y=5.028, Z=-0.132 تنظیم شد. این ابعاد به گونه‌ای انتخاب شدند که تمامی ریشه‌های درگیر در پاکت‌های ۱، ۲ و ۳ را به طور کامل پوشش دهند. جهت تضمین دقت در یافتن پایدارترین پیکره‌بندی اتصال، پارامتر Exhaustiveness بر روی مقدار ۸ تنظیم گردید.

نتایج نشان داد که دامنه تمایل داکینگ از ۵/۸- تا ۶/۹- کیلوکالری بر مول است. ناحیه اتصال دارو دقیقاً مطابق با آنالیز جایگاه اتصال است و دارو در ۳ جایگاه مجزا شامل پاکت‌های ۱ تا ۳ قرار می‌گیرد. فراوانی اتصال در دو جایگاه اول بیشتر از جایگاه‌های ۳ است. که شامل پاکت (۱) در نزدیکی موتیف PHF6 یعنی ^{306}VQIVYK^{311} و شامل Asp25, Gln26, Gly27, Gly28, Glu53, Asp54, Glu57, Tyr197, Ser202, Prp206, Gly207, Ser208, Arg209, Gly304, Ser305, Gly365, Gly366, Gly367، و پاکت (۲) در امتداد باقیمانده اسیدهای آمینه Glu57, Thr76, Gly196, Tyr197, Ser198, Ser199, Lys224, Lys225, Val228, Val229, Arg230,Thr231, Pro232، و پاکت (۳) در امتداد باقیمانده‌های Ala145, val25, Gly271, Gly272 که در نزدیکی موتیف (PHF6*) ^{275}VQIINK^{280} می‌باشد. میزان انرژی تمایل اتصال پیش بینی شده نیز به ترتیب ۶/۹-، ۶/۷- و ۵/۸- برای پاکت ۱، پاکت ۲ و پاکت ۳ بود (ب و ج).

مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از گرومکس (GROMACS)به دلیل سرعت بالا، کارایی بالا، و قابلیت‌های تحلیلی پیشرفته، به‌ویژه برای سیستم‌های بزرگ و پیچیده، مورد توجه قرار دارد. این نرم‌افزار به دلیل بهینه‌سازی‌های دقیق و پشتیبانی از پردازش‌های موازی، اجرای شبیه‌سازی‌های طولانی‌مدت را با کارایی

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

بالا ممکن می‌سازد (۳۸). در مقایسه با سایر روش‌های شبیه‌سازی مانند AMBER یا CHARMM، که نیز در شبیه‌سازی‌های مولکولی و بیومولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند، گرومکس به‌ویژه برای شبیه‌سازی‌های بزرگ و محاسباتی با تعداد بالا از مولکول‌ها بهینه شده است (۳۱). در حالی‌که AMBERو CHARMM نیز ابزارهای قدرتمندی هستند و هر کدام مزایای خاص خود را دارند، گرومکس با داشتن قابلیت‌های موازی‌سازی و کارایی بالا در پردازش، اغلب برای پروژه‌های بزرگ و پیچیده انتخاب می‌شود (۳۱) محاسبات دینامیک مولکولی به‌عنوان یک ابزار قدرتمند برای شبیه‌سازی تعاملات پروتئین-لیگاند، به‌طور گسترده‌ای برای مقایسه با داده‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. این روش به تحلیل دقیق ساختار و پویایی پروتئین‌ها و لیگاندها در مقیاس اتمی کمک می‌کند، به‌ویژه در بررسی نحوه تعامل لیگاندها با نقاط خاصی از پروتئین. با استفاده از دینامیک مولکولی، می‌توان پیش‌بینی‌های دقیقی درباره انرژی‌های تمایلی، تغییرات ساختاری و پویایی سیستم‌های میان‌کنش پروتئین/لیگاند به‌دست آورد. این پیش‌بینی‌ها به ویژه زمانی که با داده‌های تجربی مانند XRD یا Atomic Force Microscopy (AFM) مقایسه می‌شوند، می‌توانند به اعتبارسنجی و بهبود مدل‌های مولکولی کمک کنند. تطابق یا عدم تطابق بین نتایج شبیه‌سازی و داده‌های آزمایشگاهی می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های تعامل منجر شود (۶).

در ادامه برای برای بررسی سایر رفتارهای تاو، پویایی و ماندگاری اتصال وتعیین اسید های آمینه در گیر در اتصال در حضور مزالازین به عنوان لیگاند، سه سیستم شبیه‌سازی متفاوت شامل تاو در کمپلکس با مولکول لیگاند در سه موقعیت داک شده طراحی شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در همان شرایط قسمت اول در بازه زمانی ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. عملگرهای ساختاری RMSD، RMSF، Rg برای همه سیستم ها محاسبه و مقایسه شد (شکل ۴ و شکل ۵ د).

RMSD در بازه زمانی انجام‌شده در سیستم شبیه‌سازی تاو ۰/۱۵ تا ۰/۲۰ نانومتر بود، در حالی که در حضور دارو به ۰/۱۰ تا۰/۲۰ نانومتر رسیده است. شعاع ژیراسیون در پروتئین تاو به دلیل ویژگی ذاتی این پروتئین دارای نوسانات زیادی است و کمترین و بیشترین مقدار آن برای تاو بدون اتصال دارد بین ۲/۶۸ تا ۲/۷۲ نانومتر است که در اثر اتصال مزالازین به تاو این شعاع کلی پروتئین کمتر شد و به حدود ۲/۲۵ تا ۲/۵۰ نانومتر رسید. این داده‌ها نشان می‌دهد که فشردگی پروتئین در حضور دارو افزایش می‌یابد.

مقادیر RMSD محاسبه شده برای اسکلت اصلی پروتئین (Backbone) در حضور مزالازین، ثباتی در محدوده ۰.۱ تا ۰.۲ نانومتر را نشان داد (شکل ۴). اگرچه پروتئین تاو ذاتاً دارای انعطاف‌پذیری بالایی است، اما مشاهده این میزان محدود از نوسانات در طول ۱۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی، نشان‌دهنده تأثیر مستقیم اتصال دارو بر کاهش پویایی غیرساختاری و تثبیت پیکره‌بندی فشرده (Compacted State) پروتئین است. این نتایج با داده‌های حاصل از شعاع ژیراسیون (Rg)که نشان‌دهنده کاهش ابعاد کلی پروتئین و افزایش فشردگی آن است، کاملاً همخوانی دارد.

پس از اتمام ۱۰۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، برای جستجوی ریشه های اصلی درگیر در اتصال محاسبات عملگر RMSF و بررسی آخرین

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

ساختار استخراج شده در نرم افزار Discovery Studio 2024 نشان داد که میزان نوسانات جایگاه-های اتصال در مقایسه با تاو به تنهایی کاهش یافته است. بررسی موقعیت لیگاند متصل شده در داکینگ و بعد از انجام شبیه سازی نشان می دهد اتصال در همان محل آنالیز داکینگ حفظ شده و تا انتهای شبیه سازی از محل جدا نشده اند. اسیدهای آمینه پاکت‌های ذکر شده (شکل ۵ ج) در فرآیند اتصال درگیر هستند و هات اسپاتها از این نواحی شامل اسیدهای آمینه Gln26, Asp54, Tyr197, Ser208, Arg209, Gly366 برای پاکت ۱، Glu57,Tyr197, Ser199, Lys224, Val228, Thr231 برای پاکت ۲ و Ala145, Val275, Gly271, Gly272 برای پاکت ۳ است (شکل ۵ ج). این داده‌ها یعنی نتایج آنالیز داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی و آنالیز جستجوی جایگاه‌های اتصال به روشنی در موافقت هستند. محاسبات RMSF همچنین نشان داد که مقدار نوسان باقیمانده‌های اسیدهای آمینه ذکر شده به شدت کاهش می‌یابد (شکل ۵ د).

در مجموع از نتایج دینامیک مولکولی می‌توان نتیجه گرفت که بر اثر برهم‌کنش تاو- مزالازین پروتئین فشرده می‌شود و در نتیجه آزادی چرخش و سطح تماس در دسترس برای برهم‌کنش با دیگر مولکول‌ها در مجاورت آن کاهش می‌یابد و منجر به کاهش فیبریلاسیون‌های تاو خواهد شد. در این شرایط دو موتیف پپتیدی (PHF6*) ^{275}VQIINK^{280} و (PHF6) ^{306}VQIVYK^{311} که طبق گزارش ها برای تجمع ضروری هستند درنواحی درونی پروتئین دفن می‌شوند. از آنجایی که این دو توالی در زمینه اتصال میکروتوبول‌ها قرار دارند، احتمال دارد که این تغییرات بر تعامل تاو با میکروتوبول‌ها نیز تأثیر بگذارد. تحقیقات نشان داده است که ترکیبات با وزن مولکولی پایین می‌توانند از طریق این مکانیزم بر تعامل تاو-تاو تأثیر بگذارند و این برهم‌کنش‌ها را مسدود کنند.

داده‌های حاصل از شبیه‌سازی و آنالیزهای پایداری نشان‌دهنده آن است که مزالازین تعامل پایداری (Stable Interaction) با پروتئین تاو در مجاورت موتیف‌های آمیلوئیدوژنیک PHF6 و PHF6* برقرار می‌کند؛ به طوری که بر اساس نتایج داکینگ و تکرارپذیری در طول مسیر شبیه‌سازی، فراوانی حضور لیگاند در موقعیت PHF6 نسبت به سایر نواحی بالاتر ارزیابی گردید. بررسی‌های دینامیک مولکولی، موتیف‌های PHF6*/PHF6 را به عنوان جایگاه‌های ترجیحی و اصلی اتصال مزالازین در مولکول تاو پیشنهاد می‌دهند. این الگوی اتصالی، توجیهی ساختاری برای رفتارهای کاهش‌دهنده فیبریلاسیون فراهم می‌کند؛ چرا که اشغال این نواحی توسط لیگاند و متعاقباً افزایش فشردگی پروتئین، دسترسی به ریشه‌های کلیدی برای تجمع پروتئین را محدود می‌سازد.

محاسبات انرژی آزاد به‌روش MMPBSA

آنالیزهای محاسبات انرژی اتصال لیگاند پروتئین به روش‌های کامپیوتری، شامل مجموعه‌ای از تکنیک‌های پیچیده هستند که برای بررسی تعاملات مولکولی و تعیین انرژی‌های مرتبط با این تعاملات به کار می‌روند. یکی از روش‌های کلیدی در این زمینه، MMPBSA (Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area) است که به طور خاص برای ارزیابی انرژی‌های پیوندی در سیستم‌های پروتئین-لیگاند استفاده می‌شود. MMPBSA در واقع برای ارزیابی انرژی‌های اتصال در سیستم‌های

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

پروتئین-لیگاند، با استفاده از تکنیک‌های پیچیده دینامیک مولکولی و محاسبات الکتروشیمیایی و ترمودینامیکی طراحی شده است. این روش ابتدا به شبیه‌سازی دینامیکی مولکولی (MD) می‌پردازد تا نمونه‌های نماینده از مسیرهای مختلف سیستم پروتئین-لیگاند را به دست آورد. سپس، برای هر نمونه، انرژی‌های مکانیکی سیستم شامل انرژی‌های پیوندی و غیرپیوندی محاسبه می‌شود. انرژی‌های مکانیکی از طریق مدل‌های مکانیک مولکولی به دست می‌آید که شامل انرژی‌های واندروالسی و الکتروستاتیک است. این انرژی‌ها با استفاده از معادلات مربوط به نیروهای پیوندی و کشسانی محاسبه می‌شود .در مرحله بعد، محاسبات Poisson-Boltzmann (PB) برای ارزیابی انرژی‌های الکتروستاتیک در محیط آبی انجام می‌شود. این محاسبات به حل معادله پوآسون-بولتزمن می‌پردازد که تأثیرات الکتریکی و حل‌پذیری در محیط آبی را مدل‌سازی می‌کند. در نهایت، انرژی‌های سطحی از طریق محاسبه مساحت سطحی مورد نیاز برای تعاملات پروتئین-لیگاند، به وسیله مدل‌های سطحی انجام می‌شود (۶۳, ۵۴).

(معادله ۵)

$$\Delta G_{bind}=\Delta G_{complex}-(\Delta G_{protein}+\Delta G_{ligand})$$

که در آن :ΔG_{bind} انرژی آزاد اتصال بین پروتئین و لیگاند : $\Delta_{Gcomplex}$ انرژی آزاد حل‌پذیری برای سیستم پروتئین-لیگاند به صورت کلی : $\Delta G_{protein}$ انرژی آزاد حل‌پذیری برای پروتئین به تنهایی : ΔG_{ligand}انرژی آزاد حل‌پذیری برای لیگاند به تنهایی.

ماژول GMMPBSA (Generalized MMPBSA)در بسته نرم‌افزار شبیه‌سازی دینامیک مولکولیGROMACS ، برای تحلیل انرژی‌های اتصال در سیستم‌های پروتئین-لیگاند در دسترس است. این روش نسخه‌ای عمومی‌تر از MMPBSA است که به طور خاص برای کار با خروجی‌های شبیه‌سازی‌های GROMACS طراحی شده است. GMMPBSAاز داده‌های شبیه‌سازی دینامیکی مولکولی برای محاسبه انرژی‌های پیوندی و غیرپیوندی و حل شوندگی ها استفاده می‌کند و سپس با استفاده از مدل‌های پوآسون-بولتزمن و مدل‌های سطحی، انرژی‌های الکتروستاتیک و سطحی را ارزیابی می‌کند (۴۳).

در روش GMMPBSA (Generalized MMPBSA)برای محاسبه انرژی آزاد اتصال، از یک فرمول ترکیبی استفاده می‌شود که شامل انرژی‌های مکانیکی و انرژی‌های حل‌پذیری است (معادله ۵).

برای محاسبه هر یک از این مقادیر، انرژی آزاد به‌طور معمول به ترکیب انرژی‌های مکانیکی و انرژی‌های حل‌پذیری تقسیم می‌شود (معادله ۶):

$$\Delta G=\Delta E_{MM}+\Delta G_{solv}$$ (معادله ۶)

که در آن ΔE_{MM} :تغییرات انرژی مکانیکی که شامل انرژی‌های پیوندی، زاویه‌ای، دیهیدرال، و واندروالسی و الکتروستاتیک است : ΔG_{solv}تغییرات انرژی حل‌پذیری که به صورت زیر محاسبه می‌شود: انرژی حل‌پذیری قطبی(Polar Solvation Energy) ،

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

انرژی حل‌پذیری غیرقطبی (Nonpolar Solvation Energy)

بنابراین، انرژی آزاد اتصال می‌تواند به تفکیک به صورت زیر نوشته شود (معادله ۷):

(معادله ۷) $\Delta G_{bind}=$ $(\Delta E_{complex}+\Delta G_{solv,\ complex})-(\Delta E_{protein}+\Delta G_{solv,protein}+\Delta E_{ligand}+\Delta G_{solv,ligand})$

که در آن:

$\Delta E_{protein}$, $\Delta E_{complex}$ و ΔE_{ligand} : تغییرات انرژی مکانیکی برای سیستم‌های مربوطه.

$\Delta G_{solv,protein}$, $\Delta G_{solv,complex}$ و $\Delta G_{solv,ligand}$: انرژی‌های حل‌پذیری برای سیستم‌های مربوطه.

برای هرکدام از کمپلکس های تاو/مزالازین در سه جایگاه محاسبات انرژی آزاد کل و تجزیه آن به اجزا انجام شد که نشان می دهد لیگاند ها در هر سه جایگاه، از لحاظ انرژی اتصال وضعیت تقریبا مشابهی را نشان میدهد (جدول ۲) و این در حالی است که نیروی پیش برنده اتصال برای پاکت های یک و دو از نوع بیشتر قطبی و برای پاکت سوم از نوع بیشتر غیر قطبی است.

جدول ۲- نتایج حاصل از محاسبات انرژی آزاد اتصال به روش MMPBSA برای سه کمپلکس منتخب در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس این داده‌ها، انرژی آزاد کل اتصال (ΔG_{bind}) برای هر سه جایگاه مقادیر منفی و مطلوبی را نشان می‌دهد که تاییدکننده تشکیل کمپلکس پایدار بین مزالازین و پروتئین تاو است. تحلیل اجزای انرژی نشان می‌دهد که در پاکت ۱، انرژی الکترواستاتیک نقش غالب را در پایداری کمپلکس ایفا می‌کند، که با حضور ریشه‌های قطبی و باردار در اطراف موتیف PHF6 همخوانی دارد. در مقابل، در پاکت ۳، سهم انرژی غیرقطبی نسبت به پاکت ۱ افزایش یافته است که نشان‌دهنده غلبه تعاملات آب‌گریز در مجاورت موتیف PHF6* می‌باشد. مقدار انحراف معیار در پاکت ۳ به دلیل انعطاف‌پذیری بالاتر این ناحیه، نسبت به سایر پاکت‌ها بیشتر گزارش شده است.

	POCKET−1	POCKET−2	POCKET−3
ΔE_{ELE}	−16.11 ± 3.37	−11.17 ± 4.13	−5.39 ± 13.15
ΔG_{PB}	−7.20 ± 5.01	−5.08 ± 3.01	−6.25 ± 4.01
ΔE_{POLAR}	−23.31 ± 11.14	−16.25 ± 1.24	−11.64 ± 3.17
ΔE_{VDW}	−10.33 ± 1.20	−6.70 ± 3.33	−6.66 ± 7.64
ΔG_{SA}	7.0 ± 0.35	−0.16± 1.08	−1.03 ± 1.11
$\Delta E_{NON-POLAR}$	−3.33 ± 1.03	−6.86 ± 2.05	−7.69 ± 7.24
ΔG_{BIND}	−26.64± 5.08	−23.11 ± 10.01	−19.33 ± 11.0

ΔE_{ele} انرژی برهم‌کنش الکترواستاتیک در خلأ.(Gas-phase electrostatic energy)

ΔE_{vdW} انرژی برهم‌کنش واندروالسی.(Van der Waals interaction energy)

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

ΔG_{PB} انرژی حل‌پذیری قطبی محاسبه شده با معادله پوآسون-بولتزمن.(Polar solvation energy)

ΔG_{SA} انرژی حل‌پذیری غیرقطبی مربوط به سطح تماس.(Non-polar solvation energy)

ΔE_{polar} مجموع کل انرژی‌های قطبی

$\Delta E_{non-polar}$ مجموع کل انرژی‌های غیرقطبی

ΔG_{bind} انرژی آزاد کل اتصال.(Total binding free energy)

به‌وضوح نشان‌دهنده پایداری ترمودینامیکی این برهم‌کنش‌ها و تمایل ذاتی مزالازین برای اتصال به پروتئین تاو است. با این حال، بررسی دقیق مؤلفه‌های انرژی در این سه جایگاه نشان می‌دهد که مکانیسم‌های پایداری در آن‌ها یکسان نبوده و تحت کنترل نیروهای متفاوتی قرار دارند.

در پاکت شماره ۱ که در مجاورت موتیف کلیدی PHF6 قرار دارد، این جایگاه با انرژی آزاد اتصال 26.64 kcal/mol−به‌عنوان پایدارترین ناحیه اتصال شناسایی شد. تحلیل اجزای انرژی نشان داد که انرژی الکترواستاتیک (ΔEele=−16.11kcal/mol) نقش غالبی در تثبیت کمپلکس در این ناحیه ایفا می‌کند. نکته قابل توجه، مقدار مثبت انرژی حلال‌پوشی غیرقطبی (ΔGSA≈ +7.0kcal/mol) است که در نگاه نخست پدیده‌ای غیرمعمول به نظر می‌رسد. این افزایش انرژی بیانگر آن است که جایگیری مزالازین در این حفره خاص و جابجایی مولکول‌های آب از نظر هندسی با هزینه‌ی انرژی حلال‌زدایی (desolvation penalty) همراه است. با این وجود، جاذبه الکترواستاتیک بسیار قوی ناشی از حضور ریشه‌های باردار اطراف موتیف PHF6 قادر است بر این سد انرژی غلبه کرده و در نهایت یک اتصال اختصاصی، پایدار و ترمودینامیکی مطلوب ایجاد

بحث

بیماری آلزایمر یک بیماری تخریب کننده عصبی می‌باشد. این بیماری به مرور زمان باعث کاهش عملکرد شناختی و کاهش کیفیت زندگی فرد می‌شود و هنگامی رخ می‌دهدکه مقادیرغیرطبیعی آمیلوئیدبتا در قالب پلاک آمیلوئیدی و پروتئین تاو در قالب توده‌های نوروفیبریلار در مغز ایجاد شود (۷۳). یکی از استراتژی‌های مهم برای کنترل و کاهش بیماری‌های مرتبط با آمیلوئید مانند آلزایمر استفاده از مهار کننده‌های مولکول‌های کوچک به منظور جلوگیری از تجمعات پروتئین می‌باشد. در این مطالعه میان‌کنش بین مزالازین و ایزوفرم 1N4R پروتئین تاو با روش دینامیک مولکولی و آنالیز اسپکتروسکوپی بررسی شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده‌ی ما از FE-SEM, XRD و فلوئورسانس ThT اثر مهاری مزالازین ثابت شد که این دارو اثر مهاری بر روی فیبریلاسیون تاو دارد. هم‌چنین نتایج حاصل از آنالیز دینامیک مولکولی/داکینگ مولکولی با نتایج آزمایشگاهی مطابقت داشت. تحلیل ترمودینامیکی بر پایه روش MMPBSA دیدگاه عمیق‌تری نسبت به ماهیت نیروهای هدایت‌کننده در تشکیل کمپلکس تاو–مزالازین فراهم می‌کند. مقادیر منفی انرژی آزاد کل اتصال (ΔG_{bind}) در هر سه پاکت پیش‌بینی‌شده،

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

مؤثر در اطراف موتیف‌های تجمع‌دهنده PHF6*/PHF6 ایجاد کند. این پوشش‌دهی، با کاهش انرژی آزاد کل سیستم، تمایل پروتئین تاو برای برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی و در نهایت تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی را به حداقل رسانده و به‌طور مکانیکی، مکانیسم مهار تجمع پروتئین توسط مزالازین را تبیین می‌کند.

مطالعات قبلی نشان داده است که در شرایطی خاص مانند استرس و تب، در بافت‌ها و اندام‌های مختلف آنزیم لیزوزیم جهش یافته به‌شکل فیبریل‌های آمیلوئیدی رسوب می‌کند که این تجمعات منجر به تخریب بافت و پاتوژنز یک بیماری می‌شود. لیزوزیم‌های انسان و مرغ دو پروتئین همولوگ هستند که ساختار بسیار مشابهی دارند. در مطالعات قبلی تاثیر داروی مزالازین بر پیشگیری از تجمع لیزوزیم و حذف فیبرهای لیزوزیم، با روش‌هایی مانند فلوئورسانس ThT، SEM، CD، داکینگ مولکولی پرداخته شده‌است که لیزوزیم سفیده تخم مرغ را در غیاب و حضور مزالازین در شرایط pH اسیدی و دمای بالا انکوبه کرده‌اند که نتایج آن نشان داده‌است داروی مزالازین در تمام غلظت‌ها به‌ویژه در نسبت‌های ۱:۱ و بالاتر دارو به پروتئین، اثر مهاری قوی بر فیبریلاسیون پروتئین دارد و هم‌چنین مزالازین تاثیر قابل قبولی بر برگشت‌پذیری فیبریل‌های HEWL در هیچ یک از غلظت‌های مرتبط را نشان نمی‌دهد (۲۴). هم‌چنین نتایج داکینگ این مطالعه نشان داده‌است که مزالازین به محل فعال پروتئین متصل می‌شود و پیوندهای هیدروژنی به‌علاوه برهم‌کنش آب‌گریز با HEWL تشکیل می‌دهد که این پیوندها از محل فعال پروتئین در برابر قرار گرفتن در معرض سطحی باقی‌مانده‌های آب‌گریز آن محافظت می‌کنند. مزالازین می‌تواند کند. این رفتار، اختصاصی بودن برهم‌کنش مزالازین با ناحیه PHF6 را برجسته می‌سازد.

در پاکت شماره ۲ (ناحیه میانی)، انرژی آزاد اتصال $-23.11 kcal/mol$ نشان‌دهنده پایداری قابل توجه، هرچند کمتر از پاکت ۱، است. برخلاف پاکت ۱، در این ناحیه سهم انرژی‌های قطبی و غیرقطبی در پایداری کمپلکس متعادل‌تر است. افزایش سهم مؤلفه غیرقطبی $(\Delta E_{non-polar} = -6.86 kcal/mol)$ نسبت به پاکت ۱ نشان می‌دهد که برهم‌کنش‌های هیدروفوب و واندروالسی نقش برجسته‌تری در تثبیت لیگاند در این جایگاه دارند. این الگوی انرژی حاکی از یک اتصال نسبتاً پایدار اما کمتر اختصاصی در مقایسه با پاکت مجاور PHF6 است.

در پاکت شماره ۳ که در نزدیکی موتیف PHF6* قرار دارد، اگرچه مقدار انرژی آزاد کل همچنان منفی و ترمودینامیکی مطلوب است $(-19.33 kcal/mol)$، اما انحراف معیار بالای گزارش‌شده در مؤلفه‌های انرژی، به‌ویژه در بخش الکترواستاتیک ± 11.0 تا ± 13.15، بازتاب‌دهنده پویایی ساختاری بالای این ناحیه است. با توجه به ماهیت ذاتاً بی‌نظم(IDP) پروتئین تاو، نوسانات ساختاری شدید در مجاورت موتیف PHF6* موجب تغییر مداوم هندسه اتصال در این پاکت می‌شود. این عدم قطعیت انرژی نشان می‌دهد که اتصال در پاکت ۳، برخلاف پاکت ۱، کمتر مبتنی بر برهم‌کنش‌های اختصاصی و صلب بوده و بیشتر تحت تأثیر عوامل آنتروپیک و نوسانات تصادفی زنجیره پروتئینی قرار دارد.

در مجموع، مقایسه‌ی پروفایل‌های انرژی در سه پاکت اتصال نشان می‌دهد که مزالازین با ترجیح اتصال به پاکت‌های ۱ و ۲ قادر است یک سد فیزیکی و شیمیایی

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

به‌فرد است و دارای طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های بیولوژیکی از جمله ضد درد، ضد تومور، محافظت کننده عصبی و ضد التهابی است. انسولین توسط این دو دارو (5-ASA و ASA) که به‌ترتیب دارای گروه عملکردی استیل و آمینو هستند توسط طیف سنجی‌های متعدد مانند ThT ، پراکندگی ریلی، نشر فلورسانس برای مهار فیبریلاسیون در گاو مورد بررسی قرار گرفته‌است. مقدار کدورت نمونه‌های انسولین گاوی را در pH:۲ و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در غیاب و حضور دو دارو را بررسی کردند. نتایج نشان داده‌است هر دو دارو قادر به تاخیر انداختن فرآیند هسته‌زایی هستند که این پدیده به‌دلیل کاهش آب‌گریزی سطح رخ می‌دهد و فیبریلاسیون انسولین را مهار می‌کنند ولی تصاویر میکروسکوپی فلورسانس در حضور 5-ASA مهار فیبریل‌های آمیلوئیدی را نشان می‌دهد در حالی‌که در حضور ASA هنوز تعداد کمی فیبریل مشاهده می‌شد که نشان از اثر مهاری بیشتر 5-ASA دارد که ممکن است به‌دلیل وجود گروه آمینه روی حلقه آروماتیک 5-ASA باشد (۷۱). نتایج این مطالعه مشابه با نتایج ما اثر مهاری مزالازین را احتمالا به علت وجود گروه آمینه در ساختار آن اثبات کرده است. بنابراین مزالازین ممکن است بتواند به استراتژی‌های درمانی کمک کند.

در یک مطالعه اثرات مزالازین بر فیبریلاسیون پروتئین انسولین انسانی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شده است. انسولین گاوی را در بافر گلیسین ۵۰ میلی‌مولار و pH:۲ در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و تجمع پروتئین را با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی، تصویربرداری و محاسباتی مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج آنالیزهای تصویربرداری و محاسباتی در این مطالعه توانایی بالای مزالازین در مهار و بی‌ثبات کردن کینین-ایمین را تشکیل دهد که از طریق پیوند کووالانسی با محل فعال لیزوزیم در تعامل است. کینوپروتئین برهم‌کنش‌های بین مولکولی و درون مولکولی HEWL را تغییر می‌دهد و در نهایت منجر به مهار فیبریلاسیون می‌شود. مزالازین به احتمال زیاد فیبریلاسیون لیزوزیم را از طریق برهم‌کنش‌های آب‌گریز، پیوند هیدروژنی، برهم‌کنش‌های کووالانسی مهار می‌کند (۲۴). نتایج این مطالعه همانند نتایج ما نشان داده است که داروی مزالازین از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید جلوگیری کرده است و یا در کم کردن فیبریل‌های تشکیل شده تاثیر بسزایی دارد. بنابراین داروی مزالازین می‌تواند به عنوان دارویی برای پیشگیری از تشکیل فیبریل‌های آمیلوئید استفاده شود.

طبق توضیحات یک مطالعه انسولین گاوی یک هورمون پپتیدی با ۵۱ اسیدآمینه است که متابولیسم گلوکز را تنظیم می‌کند و در درمان دیابت استفاده می‌شود. انسولین گاوی پروتئینی است که به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته و از نظر ساختاری همولوگ با انسولین انسانی است. انسولین گاوی تحت شرایط دمای بالا و pH پایین فیبرهای آمیلوئید معمولی را تشکیل می‌دهد. در این شرایط تفکیک هگزامر، باز شدن مونومرها و هم‌چنین تماس سطوح آبگریز منجر به تجمع و در نتیجه تشکیل فیبریل آمیلوئیدی می‌شود. استیل سالیسیلیک اسید و اسید ۵- آمینو سالیسیلیک داروهای التهابی هستند که در یک مطالعه برای جلوگیری از تجمع فیبریل‌های آمیلوئیدی مورد بررسی قرار گرفته است. ASA یک مسکن رایج و تب بر است که متابولیزه شده و به اسید سالیسیلیک منتقل می‌شود و برای متابولیسم در انسان ضروری است. 5-ASA در بین سالیسیلات‌ها منحصر

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

تاثیر بگذارند (۶۷) که مطابق با نتایج ما داروهای ضد استروئیدی احتمالا با اثر روی آنزیم‌های سیکلواکسیژناز در پاسخ التهابی ناشی از پاتوژنز آلزایمر تاثیر و باعث کاهش آن شود.

نتیجه‌گیری

در طول چند دهه گذشته، تلاش‌های گسترده‌ای برای درک پاتوفیزیولوژی آمیلوئیدوز مرتبط با بیماری‌های دژنراتیو مانند آلزایمر انجام شده است که به طور بالقوه منجر به استراتژی‌های درمانی جدید می‌شود. استفاده از مولکول‌ها یا داروهای کوچکی که بتوانند حالت بومی پروتئین را تثبیت، فرآیند فیبریلاسیون را به تاخیر و فرآیند تا کردن نادرست را معکوس کنند به عنوان استراتژ های مهم برای درمان این بیماریها مطرح هستند. یکی از مولکول‌های کوچکی که اثر مهارکنندگی برای بیماری‌های آمیلوئیدی را دارد و دارای حلقه و گروه OH است مزالازین است. مطالعات قبلی در آزمایشگاه ما، اثرات بالقوه ضد آمیلوئیدوژنیکی و ناپایدارکنندگی فیبریل های از قبل تشکیل شده را روی پروتئین های لیزوزیم سفیده تخم مرغ و انسولین گاوی را به اثبات رسانده است. در این مطالعه تأثیر مزالازین به عنوان یک مهارکننده‌ی ضدالتهابی و غیراستروئیدی بر روند تشکیل فیبریل و فیبریل‌زایی پروتئین تاو توسط روشهای مختلف اسپکتروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، مزالازین به روشی وابسته به غلظت، نسبت‌های مختلف ۱:۴، ۱:۲، ۳:۴، ۱:۱، ۵:۴ میکرومولار (مزالازین به پروتئین تاو) تشکیل فیبریل‌های آمیلوئیدی را مهار می‌کند. این اثر مهاری احتمالا به علت وجود گروه آمین بر روی حلقه آروماتیک است. علاوه بر این، مطالعه حاضر اتصال فرآیند فیبریلاسیون در تمام غلظت‌های آزمایش شده به ویژه در نسبت ۱:۵ (انسولین به مزالازین) را نشان داده‌است (۱۱). نتایج این مطالعه مشابه با نتایج ما احتمالا به دلیل اینکه مزالازین ساختاری آب‌گریز است ممکن است از طریق برهم‌کنش‌های آب‌گریز، بین حلقه‌های آروماتیک توالی‌های آمیلوئیدوژنتیک تاثیر بگذارد و یا گروه OH متصل به حلقه بنزن مزالازین می‌تواند با پروتئین برهم‌کنش هیدروژنی داشته باشد و بر فیبریلاسیون تاثیر بگذارد.

در یک مطالعه نشان داده شده است که فرآیندهای التهابی در زوال عقل نقش دارند. در این مطالعه دو داروی ضدالتهابی متوتروکسات و سولفاسالازین برای بررسی ارتباط آن‌ها با زوال عقل بررسی شده است. طبق نتایجی که از بیماران بالای ۵۰ سال مبتلا به آرتریت روماتوئید گزارش شده است بیمارانی که بیش از چهار سال از متوتروکسات استفاده کردند کمترین خطر زوال عقل را داشتند. و هم‌چنین استفاده از داروی سولفاسالازین با زوال عقل همراه نبود (۵۱).

در یک مطالعه دیگر گزارش شده است که داروهای ضد التهابی غیراستروئیدی مانند ASA، التهاب در مغز را کاهش می‌دهند و به‌عنوان یک هدف جدید برای کاهش سرعت پیشرفت آلزایمر می‌باشند. در این مطالعه بیماران مبتلا به آلزایمر را به دو گروه مصرف کنندگان ASA و مصرف کنندگان غیر ASA تقسیم کردند که داده‌های این مطالعه نشان داده بیمارانی که دچار آلزایمر بودند و ASA مصرف می‌کردند با کاهش آهسته‌تر شناختی در طول زمان همراه بودند. داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی ممکن است با تنظیم مثبت فاکتور رونویسی هسته‌ای پراکسی‌زوم پرولیفراتور ۷ و با کاهش COX1 و COX2 بر پاسخ التهابی آلزایمر

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷

DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

مولکولی مزالازین به پروتئین تاو را از طریق پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز تایید کرد. با توجه به نتایج مطالعه حاضر و نتایج مطالعات قبلی می توان این نتیجه را گرفت که می توان با مطالعات بیشتر روی مسیرهای سیگنالینگ در شرایط سلولی و حیوانی، از داروی مزالازین در کنار اثرات ضد التهابی و ضد کولیتی اثبات شده آن، برای درمان و یا پیشگیری بیمارهای مرتبط با آمیلوئید استفاده کرد. از طرفی، با توجه به نتایج مشاهده شده در شرایط آزمایشگاهی، می‌توان ترکیباتی با ساختار و گروه‌های عاملی مشابه با مزالازین سنتز کرد که قابلیت عبور از سد خونی مغزی را داشته باشند و در نتیجه اثر آنها بر روی کاهش تشکیل تجمعات تاو در شرایط درون‌تنی مورد بررسی قرار داد.

تضاد منافع: نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

تقدیر و تشکر: نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه لرستان در انجام این تحقیق قدردانی می‌کنند. از جناب آقای پروفسور رضا خدارحمی (دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه) که PDB coordinate file و پلاسمید تاو جهت انجام این پژوهش در اختیار ما قرار دادند کمال تقدیر و تشکر را داریم. همچنین از Dr. Markus Zweckstetter ، Shaolong Zhu و Dr. Derek J. Wilson بابت فراهم کردن PDB coordinate file برای « Tau ensemble native» تاو که از تحقیقات NMR/HDX آن‌ها پیش‌بینی شده است کمال تقدیر و تشکر را داریم.

فهرست منابع:

1. Akbari V, Bahramikia S (2026). Tau physiology and pathology: impacts on cellular structures and neurodegenerative diseases. Inflammopharmacology, 1-22. https://doi.org/ 10.1007/s10787-026-02328-w.

2. Akbari V, Bahramikia S, Jalalvand AR, Mehrabi M, Ezati M, Khodarahmi R (2023). The induction of tau aggregation is restricted by sulfamethoxazole and provides new information regarding the use of the drug. J Biomol Struct Dyn, 1-15. https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2273433.

3. Akbari V, Ghobadi S, Mohammadi S, Khodarahmi R (2020). The antidepressant drug; trazodone inhibits Tau amyloidogenesis: Prospects for prophylaxis and treatment of AD. Arch Biochem Biophys, 679:108218. https://doi.org/10.1016/j.abb.2019.108218.

4. Akbari V, Mohammadi S, Mehrabi M ,Ghobadi S, Farrokhi A, Khodarahmi R (2022). Investigation of the role of prolines 232/233 in RTPPK motif in tau protein aggregation: An in vitro study. Int J Biol Macromol, 219:1100-11. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.160.

5. Alali S, Riazi G ,Ashrafi-Kooshk MR, Meknatkhah S, Ahmadian S, Hooshyari Ardakani M, Hosseinkhani B (2021). Cannabidiol inhibits tau aggregation in

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

vitro. Cells, 10:3521. https://doi.org/10.3390/cells10123521.

6. AlRawashdeh S, Barakat KH (2023). Applications of molecular dynamics simulations in drug discovery. Computational drug discovery and design, 127-41. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3441-7_7.

7. Alyenbaawi H, Allison WT, Mok S-A (2020). Prion-like propagation mechanisms in tauopathies and traumatic brain injury: challenges and prospects. Biomolecules, 10:1487. https://doi.org/10.3390/biom10111487.

8. Bahramikia S, Yazdanparast R (2013). Inhibition of human islet amyloid polypeptide or amylin aggregation by two manganese-salen derivatives. Eur J Pharmacol, 707,17-25, https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.03.017.

9. Bandyopadhyay B, Li G, Yin H, Kuret J (2007). Tau aggregation and toxicity in a cell culture model of tauopathy. J Biol Chem, 282:16454-64. https://doi.org/10.1074/jbc.M700192200.

10. Banerjee S, Maity S, Chakraborti AS (2016). Methylglyoxal-induced modification causes aggregation of myoglobin. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 155:1-10. https://doi.org/10.1016/j.saa.2015.10.022.

11. Bardineshin F, Bahramikia S, Khodarahmi R, Hadi F (2023). Mesalazine inhibits amyloid formation and destabilizes pre-formed amyloid fibrils in the human insulin. J Fluoresc, 33:1317-24. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2207289/v1.

12. Berendsen HJ, Postma Jv, Van Gunsteren WF, DiNola A, Haak JR (1984). Molecular dynamics with coupling to an external bath. J Chem Phys, 81:3684-90. https://doi.org/10.1063/1.448118.

13. Biancalana M, Koide S (2010). Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. Biochim Biophys Acta, 1804:1405-12. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.04.001.

14. Bijari N, Balalaie S, Akbari V, Golmohammadi F, Moradi S, Adibi H, Khodarahmi R (2018). Effective suppression of the modified PHF6 peptide/1N4R Tau amyloid aggregation by intact curcumin, not its degradation products: Another evidence for the pigment as preventive/therapeutic “functional food”. Int J Biol Macromol, 120:1009-22. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.175.

15. Binkowski TA, Naghibzadeh S, Liang J (2003). CASTp: computed atlas of surface topography of proteins. Nucleic Acids Res., 31:3352-5. https://doi.org/10.1093/nar/gkg512.

16. Bokemeyer B, Hommes D, Gill I, Broberg P, Dignass A (2012). Mesalazine in left-sided ulcerative

DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

colitis: efficacy analyses from the PODIUM trial on maintenance of remission and mucosal healing. Journal of Crohn's and Colitis, 6:476-82. https://doi.org/10.1016/j.crohns.2011.10.006.

17. Breijyeh Z, Karaman R (2020). Comprehensive review on Alzheimer's disease: causes and treatment. Molecules, 25:5789. https://doi.org/10.3390/molecules25245789.

18. Cáceres C, Heusser B, Garnham A, Moczko E (2023). The major hypotheses of Alzheimer's disease: related nanotechnology-based approaches for its diagnosis and treatment. Cells, 12:2669. https://doi.org/ 10.3390/cells12232669.

19. Chaari A, Fahy C, Chevillot-Biraud A, Rholam M (2019). Investigating the effects of different natural molecules on the structure and oligomerization propensity of hen egg-white lysozyme. Int J Biol Macromol, 134:189-201. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.04.

20. Creekmore BC, Watanabe R, Lee EB (2024). Neurodegenerative disease tauopathies. Annu Rev Pathol, 19:345-70. https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-051222-120750.

21. Darden T, York D, Pedersen L (1993). Particle mesh Ewald: An N· log (N) method for Ewald sums in large systems. J Chem Phys, 98:10089-92. https://doi.org/https://doi.org/10.1063/1.464397.

22. Eberhardt J, Santos-Martins D, Tillack AF, Forli S (2021). AutoDock Vina 1.2. 0: new docking methods, expanded force field, and python bindings. J Chem Inf Model, 61:3891. https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203.

23. Esmaeili S, Ghobadi N, Akbari V, Moradi S, Shahlaie M, Ghobadi S, Jalalvand AR, Amani M, Khodarahmi R (2020). Pyridine-2, 3-dicarboxylate, quinolinic acid, induces 1N4R Tau amyloid aggregation in vitro: Another evidence for the detrimental effect of the inescapable endogenous neurotoxin. Chem-Biol Interact, 315:108884. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108884.

24. Faramarzian M, Bahramikia S, Shasaltaneh MD (2020). In vitro investigation of the effect of mesalazine on amyloid fibril formation of hen egg-white lysozyme and defibrillation lysozyme fibrils. Eur J Pharmacol, 874:173011. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173011.

25. Fortin JS, Benoit-Biancamano M-O (2016). Inhibition of islet amyloid polypeptide aggregation and associated cytotoxicity by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Can J Physiol Pharmacol, 94:35-48. https://doi.org/10.1139/cjpp-2015-0117.

26. Gaberc-Porekar V, Menart V (2001). Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods, 49:335-60.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

https://doi.org/10.1016/s0165-022x(01)00207-x.

27. Gabor J, Mikrut G, Flak T, Cebo P, Roczniok R, Swinarew B, Langer E, Popczyk M, Stanula A, Stach S (2023). Influence of Surface Structure on Ball Properties during a Professional Water Polo Game. Materials, 16:3048. https://doi.org/10.3390/ma16083048.

28. Guo T, Noble W, Hanger DP (2017). Roles of tau protein in health and disease. Acta Neuropathol, 133:665-704. https://doi.org/10.1007/s00401-017-1707-9.

29. Guvench O, MacKerell Jr AD (2008). Comparison of protein force fields for molecular dynamics simulations. Mol Model proteins, 63-88. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_4.

30. Henry D, Eby N, Goodge J, Mogk D (2012). X-ray reflection in accordance with Bragg's Law. SERC.

31. Hernández-Rodríguez M, C. Rosales-Hernández M, E. Mendieta-Wejebe J, Martínez-Archundia M, Correa Basurto J (2016). Current tools and methods in molecular dynamics (MD) simulations for drug design. Curr Med Chem, 23:3909-24. https://doi.org/10.2174/0929867323666160530144742.

32. Hess B, Bekker H, Berendsen HJ, Fraaije JG (1997). LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. J Comput Chem, 18:1463-72. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X (199709)18:123.0.CO;2-H.

33. Huda MN, Erdene-Ochir E, Pan C-H (2017). Assay for phosphorylation and microtubule binding along with localization of tau protein in colorectal cancer cells. JOVE-J VIS EXP, e55932. https://doi.org/10.3791/55932.

34. Inouye H ,Sharma D, Goux WJ, Kirschner DA (2006). Structure of core domain of fibril-forming PHF/Tau fragments. Biophys J, 90:1774-89. https://doi.org/10.1529/biophysj.105.070136.

35. Iqbal K, Gong C-X, Liu F (2013). Hyperphosphorylation-induced tau oligomers. Front Neurol, 4:112. https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00112.

36. Jalili C, Akbari V, Khodarahmi R, Goicoechea HC, Jalalvand AR (2021). Electrochemical-spectroscopic-chemometric investigation of binding and inhibition of myeloperoxidase by bivalirudin: Application to determination of myeloperoxidase as a biomarker for acute coronary syndrome. Microchem J, 166:106212. https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106212.

37. Johnson GV, Stoothoff WH (2004). Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction. J Cell Sci, 117:5721-9. https://doi.org/10.1242/jcs.01558.

38. Justino GC, Nascimento CP, Justino MC (2021). Molecular dynamics simulations and analysis for

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

bioinformatics undergraduate students. Biochem Mol Biol Educ, 49:570-82. https://doi.org/10.1002/bmb.21512.

39. Karikari TK, Turner A, Stass R, Lee LC, Wilson B, Nagel DA, Hill EJ, Moffat KG (2017). Expression and purification of tau protein and its frontotemporal dementia variants using a cleavable histidine tag. Protein Expr Purif, 130:44-54. https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.09.009.

40. Karima O, Riazi G, Khodadadi S, Aryapour H, Khalili MAN, Yousefi L, Moosavi-Movahedi AA (2012). Altered tubulin assembly dynamics with N-homocysteinylated human 4R/1N tau in vitro. FEBS lett, 586:3914-9. https//:doi.org/10.1016/j.febslet.2012.09.024.

41. Khodarahmi R, Akbari V, Mohammadi S, Farshadnia T, Rahimabadi MM, Goicoechea HC, Jalalvand AR (2021). Chemometric modeling of the electrochemical data to investigate proline cis/trans isomeration effect on aggregation of Tau protein. Protein Expr Purif, 182:105858. https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105858.

42. Knapskog A-B, Engedal K, Selbæk G, Øksengård A-R (2021). Alzheimers sykdom–diagnostikk og behandling. Tidsskr Nor Laegeforen, https://doi.org/10.4045/tidsskr.20.0919.

43. Kumari R, Kumar R, Consortium OSDD, Lynn A (2014). g_mmpbsa A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. J Chem Inf Model, 54:1951-62. https://doi.org/10.1021/ci500020m.

44. Mandelkow E-M, Mandelkow E (2012). Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. Cold Spring Harb perspect med, 2:a006247. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006247.

45. Mayer C (2017). X-Ray Diffraction in Biology: How Can We See DNA and Proteins in Three Dimensions ?X-ray Scattering, 1:13. https://doi.org/10.5772/64999.

46. Mehrabi M, Bijari N, Akbari V, Ranjbar S, Karima S, Sankian M, Ojaghi S, Khodarahmi R Effective reduction of Tau amyloid aggregates in the presence of Cyclophilin from Platanus orientalis pollens ;An alternative mechanism of action of the allergen. Curr Protein Pept Sci, https://doi.org/10.2174/1389203724666230530143704.

47. Morris AM, Watzky MA, Finke RG (2009). Protein aggregation kinetics, mechanism, and curve-fitting: a review of the literature. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom, 1794:375-97. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.10.016.

48. Morris KL, Serpell LC (2012). X-ray fibre diffraction studies of amyloid fibrils. Amyloid proteins: Methods and protocols, 121-35. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-551-0_9.

49. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011). The many faces of tau.

DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

Neuron, 70:410-26. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2011.04.009.

50. Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M (2009). Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. PLoS Biol, 7:e1000034. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000034.

51. Newby D, Prieto-Alhambra D, Duarte-Salles T, Ansell D, Pedersen L, Van Der Lei J, Mosseveld M, Rijnbeek P, James G, Alexander M (2020). Methotrexate and relative risk of dementia amongst patients with rheumatoid arthritis: a multi-national multi-database case-control study. Methotrexate and relative risk of dementia amongst patients with rheumatoid arthritis: a multi-national multi-database case-control study, 12:1-10.

52. Parrinello M, Rahman A (1980). Crystal structure and pair potentials: A molecular-dynamics study. Phys Rev Lett, 45:1196. https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.45.1196.

53. Patterson KR, Remmers C, Fu Y, Brooker S, Kanaan NM, Vana L, Ward S, Reyes JF, Philibert K, Glucksman MJ (2011). Characterization of prefibrillar Tau oligomers in vitro and in Alzheimer disease. J Biol Chem, 286:23063-76. https://doi.org/10.1074/jbc.M111 . 237974.

54. Poli G, Granchi C, Rizzolio F, Tuccinardi T (2020). Application of MM-PBSA methods in virtual screening. Molecules, 25:1971. https://doi.org/10.3390/molecules25081971.

55. Rahimpour E, Martinez F, Hemmati S, Ramezani AM, Jouyban A (2022). Study of mesalazine solubility in ternary mixtures of ethanol, propylene glycol, and water at various temperatures. Study of mesalazine solubility in ternary mixtures of ethanol, propylene glycol, and water at various temperatures, 111:2758-64.

56. Rezaei H ,Jouyban A, Martinez F, Barzegar-Jalali M, Hemmati S, Rahimpour E (2021). Solubility and thermodynamic profile of mesalazine in carbitol+ ethanol mixtures at different temperatures. J Mol Liq, 324:114763. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114763.

57. Rostagno AA. Pathogenesis of Alzheimer's disease. MDPI; 2022. p. 107.

58. Sales TA, Prandi IG, de Castro AA, Leal DH, da Cunha EF, Kuca K, Ramalho TC (2019). Recent developments in metal-based drugs and chelating agents for neurodegenerative diseases treatments. Int J Mol Sci, 20:1829.https://doi.org/10.3390/ijms20081829.

59. Schweers O, Schönbrunn-Hanebeck E, Marx A, Mandelkow E (1994). Structural studies of tau protein and Alzheimer paired helical filaments show

DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

no evidence for beta-structure. J Biol Chem, 269:24290-7. https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51080-8.

60. Shafiei SS, Guerrero-Muñoz MJ, Castillo-Carranza DL (2017). Tau oligomers: Cytotoxicity, propagation, and mitochondrial damage. Front Aging Neurosci, 9:83. https://doi.org/10.3389/fnagi 2017.00083.

61. Simoes T, Lopes D, Dias S, Fernandes F, Pereira J, Jorge J, Bajaj C, Gomes A, editors. Geometric detection algorithms for cavities on protein surfaces in molecular graphics: a survey. Computer graphics forum; 2017: Wiley Online Library.

62. Soldi G, Plakoutsi G, Taddei N, Chiti F (2006). Stabilization of a native protein mediated by ligand binding inhibits amyloid formation independently of the aggregation pathway. J Med Chem, 49:6057-64. https://doi.org/10.1021/jm0606488.

63. Wang C, Greene DA, Xiao L, Qi R, Luo R (2018). Recent developments and applications of the MMPBSA method. Front Mol Biosci, 4:87. https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00087.

64. Wang D, Huang X, Yan L, Zhou L, Yan C, Wu J, Su Z, Huang Y (2021). The structure biology of tau and clue for aggregation inhibitor design. Protein J, 40:656-68. https://doi.org/10.1007/s10930-021-10017-6.

65. Wang J-Z, Xia Y-Y, Grundke-Iqbal I, Iqbal K (2012). Abnormal hyperphosphorylation of tau: sites, regulation, and molecular mechanism of neurofibrillary degeneration. J Alzheimer's Dis, 33:S123-S39. https://doi.org/10.3233/JAD-2012-129031.

66. Wang Y, Mandelkow E (2016). Tau in physiology and pathology. Nat Rev Neurosci, 17:22-35. https://doi.org/10.1038/nrn.2015.1.

67. Weng J, Zhao G, Weng L, Guan J, Initiative AsDN (2021). Aspirin using was associated with slower cognitive decline in patients with Alzheimer's disease. PLoS One, 16:e0252969. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252969.

68. Wickramasinghe SP, Lempart J, Merens HE, Murphy J, Huettemann P, Jakob U, Rhoades E (2019). Polyphosphate initiates tau aggregation through intra-and intermolecular scaffolding. Biophys J, 117:717-28. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.07.028.

69. Wu X-L, Piña-Crespo J, Zhang Y-W, Chen X-C, Xu H-X (2017). Tau-mediated neurodegeneration and potential implications in diagnosis and treatment of Alzheimer's disease. Chin Med J, 130:2978-90. https://doi.org/10.4103/0366-6999.220313.

70. Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z (2017). Thioflavin T as an amyloid dye : fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷
DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

Roy Soc Open sci, 4:160696. https://doi.org/10.1098/rsos.160696.

71. Zaman M, Khan MV, Zakariya SM, Nusrat S, Meeran SM, Alam P, Ajmal MR, Wahiduzzaman W, Shahein YE, Abouelella AM (2018). Amino group of salicylic acid exhibits enhanced inhibitory potential against insulin amyloid fibrillation with protective aptitude toward amyloid induced cytotoxicity. J Cell Biochem, 119:3945-56. https://doi.org/10.1002/jcb.26538.

72. Zeng Y, Yang J, Zhang B, Gao M, Su Z, Huang Y (2021). The structure and phase of tau: from monomer to amyloid filament. Cell Mol Life Sci, 78:1873-86. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03681-x.

73. Zvěřová M (2019). Clinical aspects of Alzheimer's disease. Clin Biochem, 72:3-6. https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2019.04.015.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۴۷

DOI: 10.22034/cmr.2026.8704.3339

Investigation of the effect of mesalazine on tau protein and its role as an inhibitor of tau fibrillation: an experimental and bioinformatics study

Saba Nosrati[1], Vali Akbari[1*], Seifollah Bahramikia[1], Khadijeh Pouraghajan[2]

[1.]Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

[2.]Department of Biology, School of Sciences, Razi University, Kermanshah, Iran

Corresponding author E-mail: akbari.v@lu.ac.ir

Abstract:

Alzheimer's disease is a progressive condition marked by the formation of neurotic plaques by beta-amyloid, neurofibrillary tangles composed of phosphorylated tau, and neuronal loss. In the brain, normal tau plays a critical role in stabilizing microtubules. The use of small organic ligands to prevent protein aggregation is an appealing strategy for treating neurodegenerative diseases. Mesalazine (5-amino-2-hydroxybenzoic acid), as a non-steroidal anti-inflammatory drug, is a potential treatment for Crohn's disease and ulcerative colitis patients. In this study, after the purification of tau protein (1N4R isoform), the effect of mesalazine on amyloid fibril aggregation was investigated using several spectroscopic and electron microscopy techniques, as well as molecular dynamics/computational docking methods. Based on the obtained results, mesalazine inhibited the formation of amyloid fibrils in a concentration-dependent manner with varying ratios of 1:4, 1:2, 3:4, 1:1, and 5:4 μM (mesalazine to tau protein). This inhibitory effect is likely due to the presence of an amino group on the aromatic ring. Furthermore, our molecular docking study confirmed the binding of mesalazine to tau protein through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. Considering the observed results in laboratory conditions, compounds with a similar structure and functional groups to mesalazine can be synthesized that have the capability to cross the blood-brain barrier, and thus their effect on reducing tau aggregates formation in *in vivo* conditions can be studied.

Keywords: Alzheimer's, Tau protein, Neurofibrillary tangles, Tau aggregation inhibitor, Mesalazine