

مطالعه دینامیک مولکولی برهمکنش‌های بین کوپلیمر پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید در نسبت‌های مختلف مونومرها و پروتئین ضد سرطان p53

محبت انصاری^۱، محسن شهلایی^۱، دانیال کهریزی^۲، طاهره ناصریه^۳، امین نوروزی^{۱*} و سجاد مرادی^{۱*}

^۱ ایران، کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، پژوهشکده فناوری سلامت، مرکز تحقیقات دارورسانی نانو

^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

^۳ ایران، کرمانشاه، دانشگاه رازی کرمانشاه، دانشکده فناوری‌های نوین، گروه نانوبیوتکنولوژی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۴

چکیده

جهش و اختلال در عملکرد پروتئین p53 یکی از مهم‌ترین عوامل دخیل در بسیاری از سرطان‌ها است و همین موضوع استفاده از فرم وحشی آن را بعنوان داروی ضد سرطان هم به روش انتقال ژن و هم رسانش مستقیم پروتئین مورد توجه قرار داده است. با وجود کارایی و اختصاصیت بالای داروهای پروتئینی، به دلیل حساسیت زیاد ساختاری به استرس‌های محیطی چه در زمان نگهداری و چه حمل و نقل توسعه این دسته از داروها همواره به کندی صورت می‌گیرد. از طرف دیگر بهینه‌سازی حامل‌های مناسب برای استفاده در فرمولاسیون و رسانش داروهای پروتئینی با صرف هزینه و زمان زیادی همراه است. بعنوان یک گزینه ایمن، کوپلیمر پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید به دلیل زیست‌سازگاری بالا یکی از پرکاربردترین پلیمرهای مورد استفاده در صنایع دارویی است که می‌تواند بعنوان پایدارکننده فرمولاسیون‌های پروتئینی نیز بکار رود. در این تحقیق با استفاده از روش محاسباتی شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برهمکنش این پلیمر با پروتئین p53 بعنوان کاندیدای داروی ضد سرطان مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا سه نوع کوپلیمر پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید با نسبت‌های مختلف لاکتیک و گلایکولیک اسید به ۱، ۲ به ۱ و ۱ به ۲ بهینه‌سازی و اطلاعات توپولوژی آنها بدست آمد. ساختار مولکولی پروتئین نیز از پایگاه داده RCSB تهیه شد. در نهایت شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار گرومکس در دمای ۳۰۰ کلوین و فشار ۱ بار به مدت ۱۰۰ نانوثانیه انجام شد. نتایج نشان دادند هر سه نوع کوپلیمر موجود به خوبی قادر به برهمکنش با پروتئین هستند اما کمیت و کیفیت این برهمکنش‌ها متفاوت است. با افزایش میزان گلایکولیک اسید در پلیمر، انعطاف پذیری و توانایی برهمکنش پلیمر با پروتئین بیشتر شده و برهمکنش پایدارتری بین دو مولکول ایجاد می‌شود. از طرف دیگر پایدارسازی ساختار دوم پروتئین که ارتباط مستقیمی با پایدارسازی ساختار پروتئین دارد در حالت استفاده از کوپلیمر با نسبت مولی مساوی از مونومرها بیشتر است. در نهایت نتایج بدست آمده در این تحقیق نشان می‌دهند که پلیمر پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید با نسبت‌های مساوی مونومرها می‌تواند بعنوان یک گزینه مناسب بمنظور پایدارسازی فرمولاسیون‌های پروتئین p53 در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: سرطان، برهمکنش پروتئین-پلیمر، گرومکس، نانو فرمولاسیون، دارورسانی نانو

* نویسندگان مسئول، پست الکترونیکی: amin.nowroozi@yahoo.com و Sajad.moradi@kums.ac.ir

مقدمه

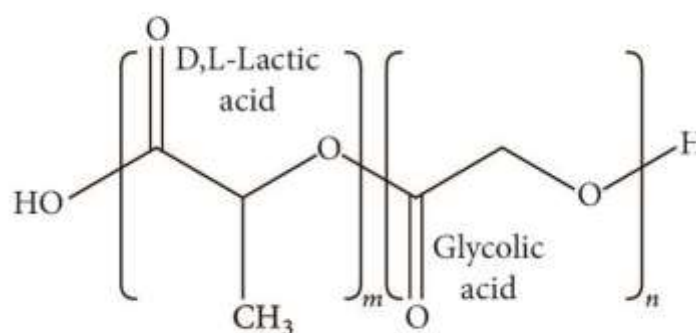
غیرطبیعی و کنترل‌نشده و تکثیر و رشد بیش از اندازه، در عملکرد عادی بدن اختلال ایجاد می‌کنند (۵). سرطان یک بیماری ترکیبی و مختلط بوده و در ایجاد آن ژن‌ها و

سرطان یکی از بیماری‌های شایع و یکی از علل اصلی مرگ و میر در جهان است. در این بیماری سلول‌ها از مسیر تقسیم و رشد عادی خود منحرف شده و با تقسیم

اینچنین مشکلاتی از مواد همراه مختلفی در فرمولاسیون‌ها استفاده می‌شود که پلیمرها از ترکیبات عمده در این خصوص هستند (۱۱). کاربرد پلیمرها در صنایع غذایی بعنوان امولسیفایر پایدارکننده و در داروسازی بعنوان ماده همراه و یا اخیرا بعنوان حامل سیستم‌های دارورسانی نانو، به فراوانی انجام می‌شود (۳ و ۲۷). سیستم‌های دارورسانی نانو معمولا حاوی یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر و زیست‌سازگار غیرسمی بعنوان حامل دارو می‌باشند که علاوه بر انتقال هدفمند مواد دارویی به بدن و رهاسازی آن در زمان و مکان مشخص، محافظت از دارو در برابر تخریب شیمیایی یا زیستی آن را نیز برعهده دارند (۴ و ۲۴). در سال‌های اخیر کوپلیمر پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید (PLGA) از جذاب‌ترین و پرکاربردترین پلیمرهای مورد استفاده در تحقیقات ساخت قطعات مهندسی بافت و سامانه‌های دارورسانی بوده است. این کوپلیمر از مونومرهای لاکتیک اسید و گلایکولیک اسید تشکیل شده‌است که دارای خواص زیست‌تخریب‌پذیری و زیست‌سازگاری است که با تنظیم مناسب نسبت دو مونومر سازنده و همچنین جرم مولکولی آن به طیف گسترده‌ای از خواص فیزیکی، مکانیکی و سرعت تخریب می‌توان دست یافت و از همه مهمتر این پلیمر دارای تائیدیه از سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) است که تائیدی بر عدم اثرات منفی بر سلامت انسان است (۷ و ۱۷ و ۲۲). شماتیک ساختار مولکولی این کوپلیمر در زیر نشان داده شده است.

بهینه‌سازی یک سیستم دارورسانی کار، در اغلب اوقات با مشکلات، صرف وقت و هزینه‌های بسیار زیادی همراه است که همین امر استفاده از روش‌هایی که بتوانند بعنوان جایگزین روش‌های تجربی، و به‌طور محاسباتی قادر به پیش بینی حالت بهینه سیستم باشند را در اولویت تحقیقات تعداد زیادی از گروه‌های تحقیقاتی در دنیا قرار داده‌است. دانشمندان به دلایل مختلفی از مدل‌های مولکولی استفاده می‌کنند.

محصولات ژنی فراوانی درگیر هستند. شاید بتوان گفت مهمترین این محصولات ژنی، پروتئین P53 است که در بیش از ۵۰ درصد سرطان‌ها ردپایی از اختلال در عملکرد آن دیده می‌شود (۸). پروتئین P53 یکی از مهمترین تنظیم‌کننده‌های چرخه تکثیر سلولی است که با ایجاد وقفه در مرحله G2 باعث توقف چرخه سلولی می‌شود و با این کار برای آنزیم‌های ترمیم کننده ژنوم، فرصت کافی را فراهم می‌آورد تا جهش‌ها و شکستگی‌های پیش‌آمده در زمان همانندسازی را ترمیم کنند (۲۸). در صورت وجود نقایص غیر قابل ترمیم، با القای آپوپتوز در واقع موجب مرگ سلول شده و به این طریق از توارث جهش‌های سرطان‌زا به نسل‌های بعدی سلولی جلوگیری کرده، باعث پیش‌گیری از سرطان می‌شود. به طور خلاصه این پروتئین نقش حیاتی در پایداری ژنومی، سرکوب توموری همراه با القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، پیری و مهار رگ‌زایی دارد. باتوجه به نقش‌های حیاتی در مهار و درمان سرطان، افزایش میزان این پروتئین در سلول‌های سرطانی بعنوان یکی از مسیرهای مهم درمان سرطان در نظر گرفته می‌شود. این عمل به دو صورت انتقال ژن کدکننده p53 با استفاده از حامل‌های ژنتیکی مهندسی‌شده و یا رسانش مستقیم پروتئین تولید یا استخراج‌شده به بافت هدف انجام پذیر است (۱۰ و ۲۱ و ۲۶). در این میان، رسانش مستقیم پروتئین به دلیل عدم نیاز به ماشین‌های بیان‌کننده سلول‌های بافت هدف و در نتیجه سرعت بالاتر اثربخشی، نسبت به سایر روش‌ها برتری دارند. تعداد زیادی از داروهای پروتئینی هم‌اکنون در بخش درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند که هم در زمان حمل و نقل و هم در زمان نگهداری، امکان قرارگیری آن‌ها در معرض تنش‌های محیطی مانند دما وجود دارد. این تنش‌ها می‌توانند ساختار پروتئین را ناپایدار کرده و عملکرد درمانی آن را مختل کنند. این موضوع بعنوان یکی از مشکلات مهم در مسیر توسعه داروهای پروتئینی همواره مد نظر بوده و بمنظور رفع



ساختار مولکولی پلی لاکتیک-کو-گلایکولیک اسید

انرژی در نرم افزار آوگادرو انجام شد (۲۰ و ۲۱). فایل های توپولوژی های مربوط به مولکول ها از سرور PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/prodrg>) بدست آمد و سپس بمنظور همسان سازی و بالا بردن دقت محاسبات، اطلاعات مربوط به بار اتم های سیستم بصورت دستی و طبق اطلاعات مربوط به میدان نیروی gromos53a6 اصلاح گردید. اطلاعات ساختار کریستال شده پروتئین P53 نیز از پایگاه داده های پروتئینی RCSB (<http://www.rcsb.org>) با فرمت PDB و کد 4MZI بدست آمد و پارامترهای توپولوژیک آن با استفاده از نرم افزار گرومکس تهیه شد. پلیمرهای با نسبت های مختلف مونومرهای لاکتیک و گلایکولیک اسید بترتیب، نسبت ۱:۱ با PLGA، نسبت ۲:۱ گلایکولیک اسید به لاکتیک اسید PLLGA، و نسبت ۲:۱ گلایکولیک اسید به لاکتیک اسید بنام PLGGA نامیده می شوند. تعداد پلیمر در کلیه جعبه های شبیه سازی ثابت و با ابعاد ۷ نانومتر مکعب قرار داده شد. پس از یک کمینه سازی اولیه در خلا بمنظور رفع برخوردهای نزدیک، سیستم با استفاده از مدل آب SPC/E آبدی شد. با توجه به بار نهایی سیستم تعداد مشخصی از یون های سدیم اضافه شد تا بار سیستم کاملاً خنثی شود. کمینه سازی انرژی با استفاده از الگوریتم steep و تا رساندن سیستم ها به حداکثر نیروی کمتر از ۱۰ کیلوژول بر مول بر نانومتر انجام شد. با استفاده از هنگردهای NVT و NPT بترتیب دما و فشار سیستم در ۳۰۰ کلوین و ۱ بار تنظیم و نگهداری شد. در

بیشتر این دلایل ریشه مشترکی دارند: روش های مدل سازی به تجسم مولکول ها و رفتار آنها کمک می کنند. همچنین این روش ها به بررسی ساختارهای مولکول بدون نیاز به ابزارهای پیشرفته و بررسی تغییرات ساختار بدون نیاز به فرایند شیمیایی کمک می کنند (۲۱ و ۲۰). این روش ها ارزان، سریع و ساده هستند و در فهم مکانیسم های مولکولی برهمکنش ها نقش بسیار مهمی را ایفا می کنند (۱۹). مطالعات زیادی وجود دارند که مطابقت بالای نتایج بدست آمده از روش های تجربی و محاسباتی را نشان می دهند (۲۳ و ۱۶). با توجه به اینکه استفاده از پروتئین p53 خالص شده بعنوان یک گزینه مناسب در درمان سرطان مطرح بوده و از طرف دیگر تهیه یک فرمولاسیون کارا برای رسانش این پروتئین به بافت های درگیر یکی از موانع اصلی در این مسیر است در این تحقیق سعی بر آن است تا با استفاده از روش های محاسباتی، برهمکنش انواع مختلف کوپلیمر PLGA را با پروتئین p53 مورد بررسی قرار داده و در نهایت مناسب ترین نوع پلیمر برای استفاده در فرمولاسیون دارویی این پروتئین معرفی شود.

مواد و روشها

تمامی شبیه سازی های رایانه ای با استفاده از نرم افزار گرومکس (GROMACS) ورژن ۵ انجام شد (۲۹). در ابتدا ساختار دو بعدی مربوط به پلیمرها با استفاده از نرم افزار ACD/LAB ترسیم و سپس ساختار سه بعدی و کمینه سازی

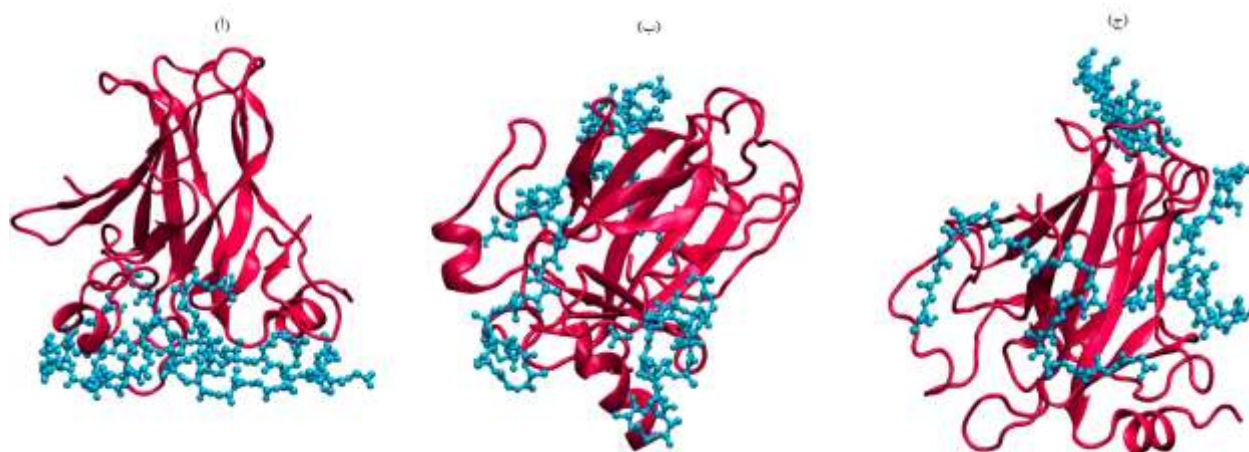
همچنان که مشاهده می شود هر سه پلیمر توانسته اند به سطح پروتئین متصل شوند اما پلیمر حاوی گلائیکولیک اسید بیشتر، ظاهراً به علت انعطاف پذیری و داشتن گروه های عاملی کربونیل بیشتر که قادر به ایجاد پیوند هیدروژنی هستند جای گیری فشرده تری بر روی پروتئین ایجاد کرده است. در ادامه بمنظور بررسی دینامیک این برهمکنش و مطالعه تغییرات ساختاری پروتئین آنالیزهای تکمیلی انجام شد.

بعنوان اولین و پایه ترین ابزار برای آنالیز شبیه سازی سیستم های پروتئینی از بررسی تغییرات میانگین مربعات جابجایی اتم های سیستم $\text{Root Mean Squared Deviation}$ (RMSD) استفاده می شود. نتایج تحلیل RMSD برای بررسی تعادل یا عدم تعادل سیستم و نیز تعیین مناسب بودن زمان شبیه سازی مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲) (۲۷). در مورد پروتئین آزاد پس از جهش اولیه در میزان RMSD یک کاهش مشاهده و نهایتاً از زمان ۵۰ نانوثانیه تا انتهای شبیه سازی مقدار ثابتی را نشان داده است.

این قسمت الگوریتم ترموستاتی V-rescale و برای ثابت کردن فشار از باروستات پارینلو-رحمان استفاده شد. کلیه پارامترهای پیوندی با استفاده از روش LINCS حول محور تعادلی خود نگه داشته شدند (۱۴). محاسبه برهمکنش های واندروالسی با تابع لnard جونز و برهمکنش های الکترواستاتیکی با روش جمع اوالد و هردو تا شعاع ۱ نانومتر انجام شد. سپس تمامی سیستم ها به مدت ۱۰۰ نانوثانیه و تحت الگوریتم نیم گام جهشی leap frog شبیه سازی شدند (۱۹۹ و ۳۰). انرژی برهمکنش ها با استفاده از mmppsba محاسبه و تمام شکل ها با استفاده از نرم افزار Visual Molecular Dynamic (VMD) تهیه شدند (۱۳).

نتایج و بحث

بمنظور بررسی برهمکنش و مقایسه اثرات کوپلیمر PLGA با نسبت های مختلف لاکتیک و گلائیکولیک اسید بر ساختار و دینامیک پروتئین P53 از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. ساختار نهایی پروتئین در برهمکنش با پلیمرها در شکل ۱ نشان داده شده است.



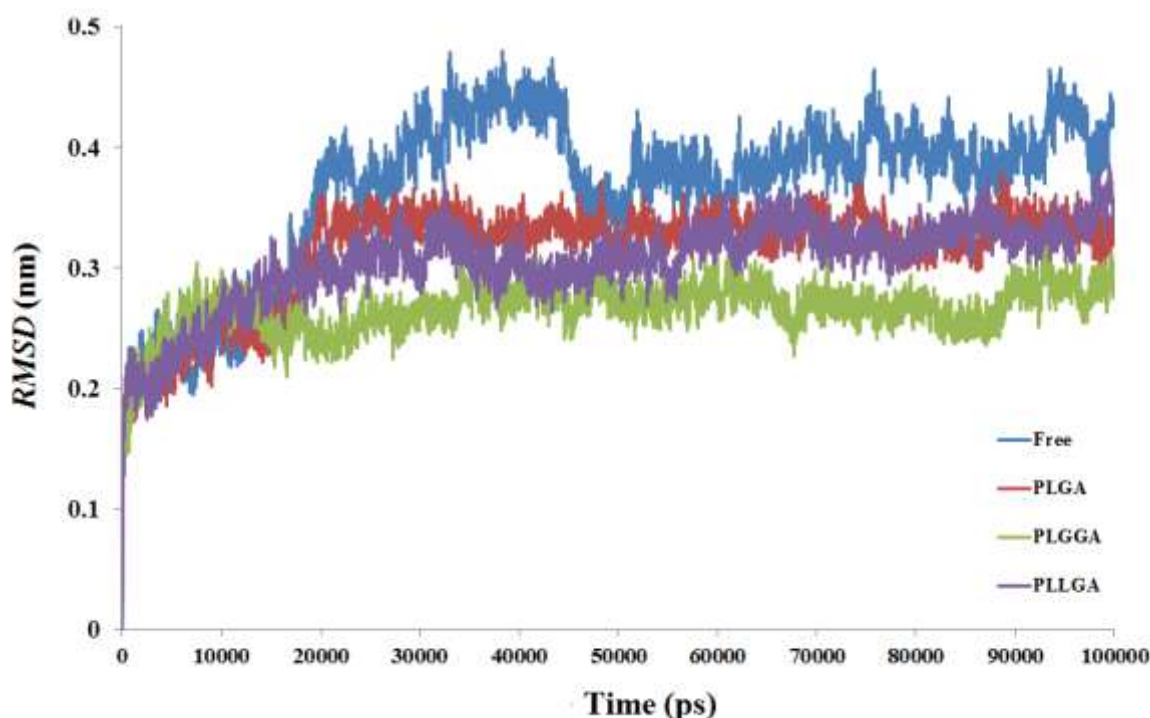
شکل ۱- کانفورماسیون نهایی برهمکنش پروتئین و پلیمرها (الف): پروتئین و پلیمر حاوی گلائیکولیک اسید بیشتر، (ب): پروتئین و پلیمر با نسبت مساوی مونومرها، (ج): پروتئین و پلیمر با نسبت بیشتر لاکتیک اسید.

انتخاب شده برای شبیه سازی این پروتئین می باشد. در همه سیستم های حاوی پلیمر، پروتئین هم در مقدار میانگین

این نتیجه نشان می دهد ساختار دینامیکی پروتئین در این زمان به تعادل رسیده و تاییدی بر مناسب بودن زمان

لاکتیک اسید در سیستم وجود دارد نیز دیده می‌شود. کمترین نوسان همراه با مقدار میانگین کمتر RMSD نسبت به پروتئین آزاد در سیستم با نسبت مساوی مونومرها دیده می‌شود که نشان‌دهنده اثرات بهتر این کوپلیمر در پایداری ساختاری پروتئین می‌باشد.

RMSD و هم در میزان نوسانات آن کاهش قابل‌توجهی را نشان داد که دلالت بر اثرات مثبت پایداری‌کنندگی همه پلیمرها بر ساختار پروتئین دارد. با افزایش میزان گلائیکولیک اسید، مقدار میانگین کاهش داشته اما تغییرات آن با مقداری نوسان همراه است. وجود نوسانات در مقدار RMSD همچنین در حالتی که کوپلیمر با نسبت بیشتر

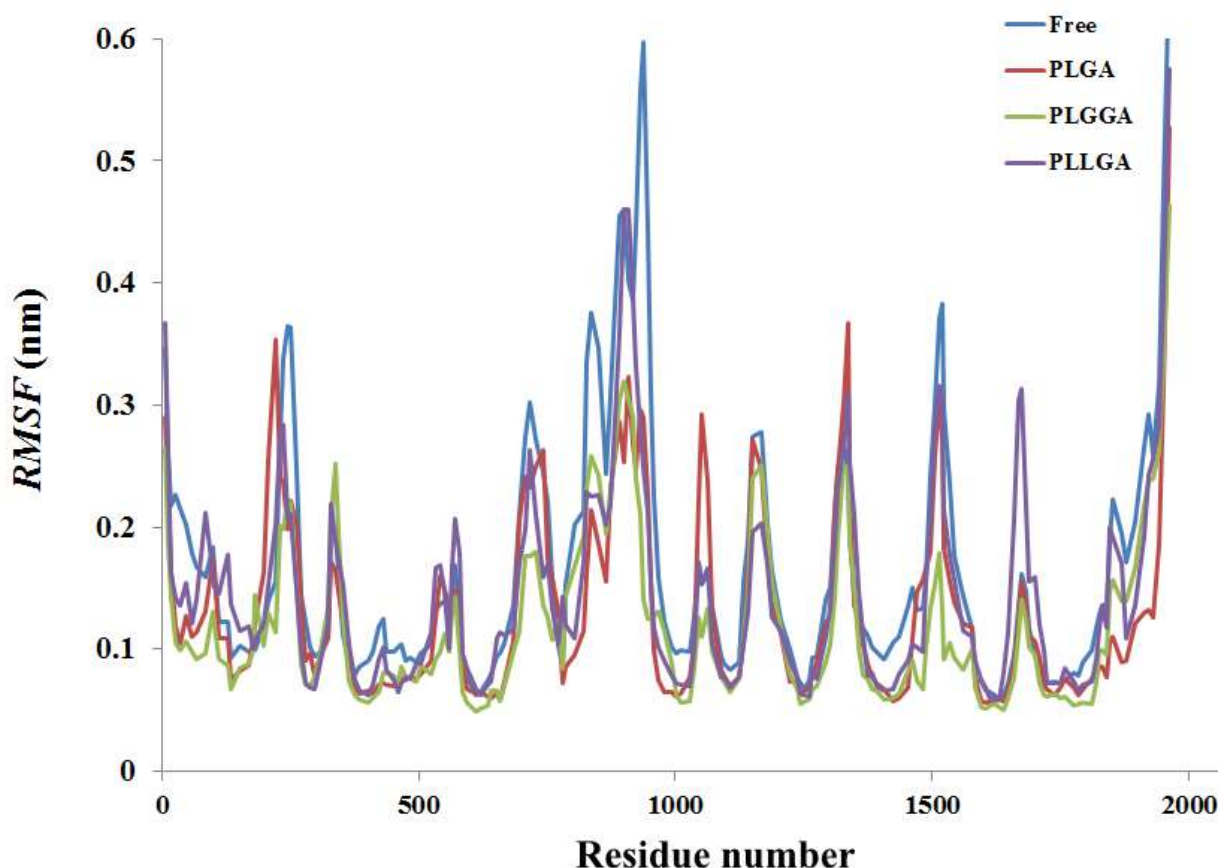


شکل ۲- تغییرات میانگین جابجایی اتم‌ها در طول زمان برای سیستم‌های مختلف پروتئین-پلیمر

دارند زیرا توانایی برقراری برهمکنش‌های الکترواستاتیکی و هیدروژنی در گلائیکولیک اسید به دلیل گروه‌های کربونیلی بیشتر از لاکتیک اسید است. در مورد سیستم پروتئین آزاد به دلیل تحرک بیشتر، میزان نوسانات بیشتر از سایر سیستم‌ها است. نتایج این تحلیل در شکل ۳ نشان داده شده‌اند.

سنجش میزان فشردگی یا بازشدگی ساختار پروتئین در طول زمان شبیه‌سازی با آنالیز شعاع دوران انجام می‌شود. تغییرات شعاع دوران مولکول p53 در طول زمان شبیه‌سازی در شکل ۴ نشان داده شده‌است.

نتایج تحلیل RMSF نوسانات هر بخش از سیستم را نسبت به میانگین نوسانات کل محاسبه می‌کند. در حالتی که سیستم شامل پروتئین آزاد است نوسانات بیشتر از حالت متصل به پلیمر است. در حالت‌هایی که پلیمر به سیستم اضافه شده نوسانات باقیمانده‌های پروتئین نسبت به سیستم پروتئین آزاد کمتر شده که این به این دلیل است که برهمکنش‌های الکترواستاتیکی افزایش می‌یابد و سبب افزایش صلبیت پروتئین می‌شوند. از طرف دیگر بسته به میزان هر مونومر، نوسانات متفاوت است و بترتیب در میان سیستم‌های شامل پلیمر، سیستم‌های حاوی گلائیکولیک اسید و لاکتیک اسید بیشتر، کمترین و بیشترین نوسانات را



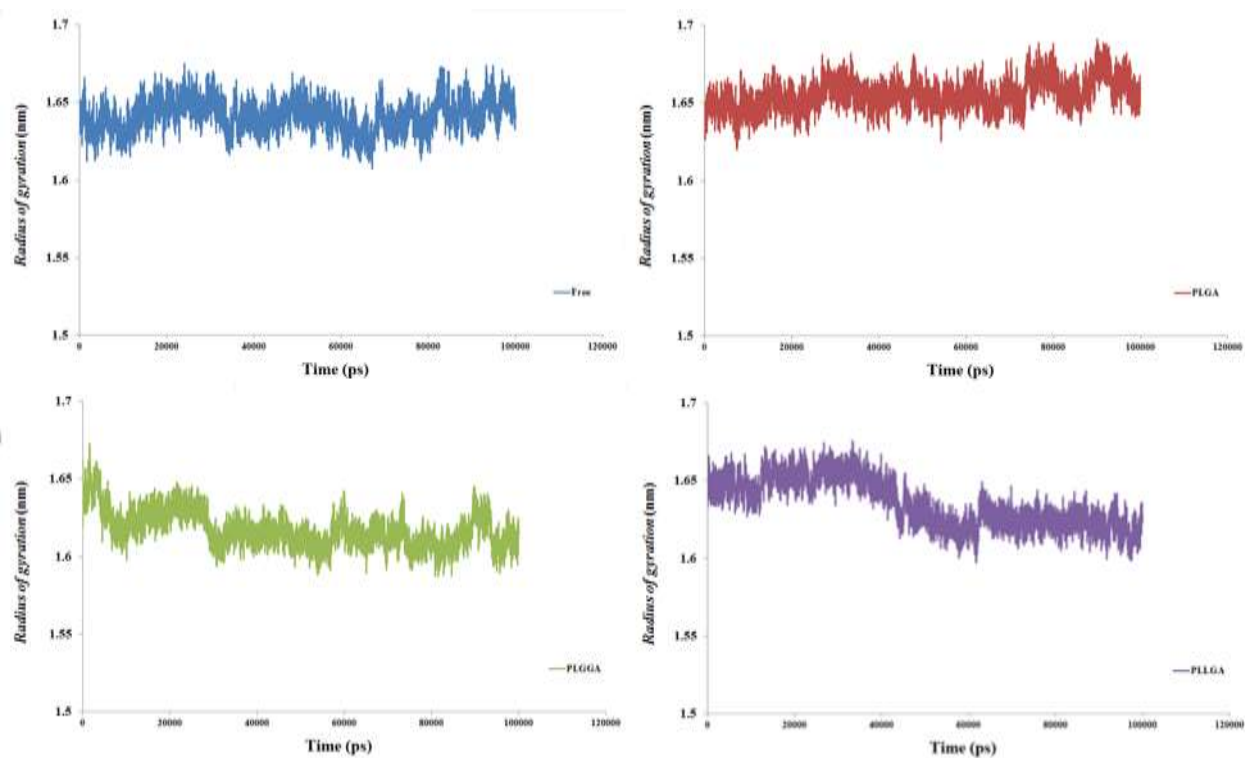
شکل ۳- تغییرات نوسانات اتم‌های پروتئین در برهمکنش با پلیمر

در نظر گرفته شود. طبق نتایج بدست آمده که در شکل ۵ نشان داده شده است تعداد برخوردها در مورد سیستم‌های کوپلیمرهای با نسبت‌های مساوی مونومرها و نسبت گلائیکولیک اسید بیشتر تفاوت چندانی با هم ندارند و هردو تقریباً دو برابر تعداد برخوردهای سیستم با کوپلیمر حاوی لاکتیک اسید بیشتر هستند. بنابراین طبق نتایج حاصل از این تحلیل می‌توان گفت با کاهش نسبت گلائیکولیک اسید در پلیمر، تمایل پلیمر به پروتئین کمتر شده و نزدیکی و برهمکنش‌های آنها نیز کاهش می‌یابد.

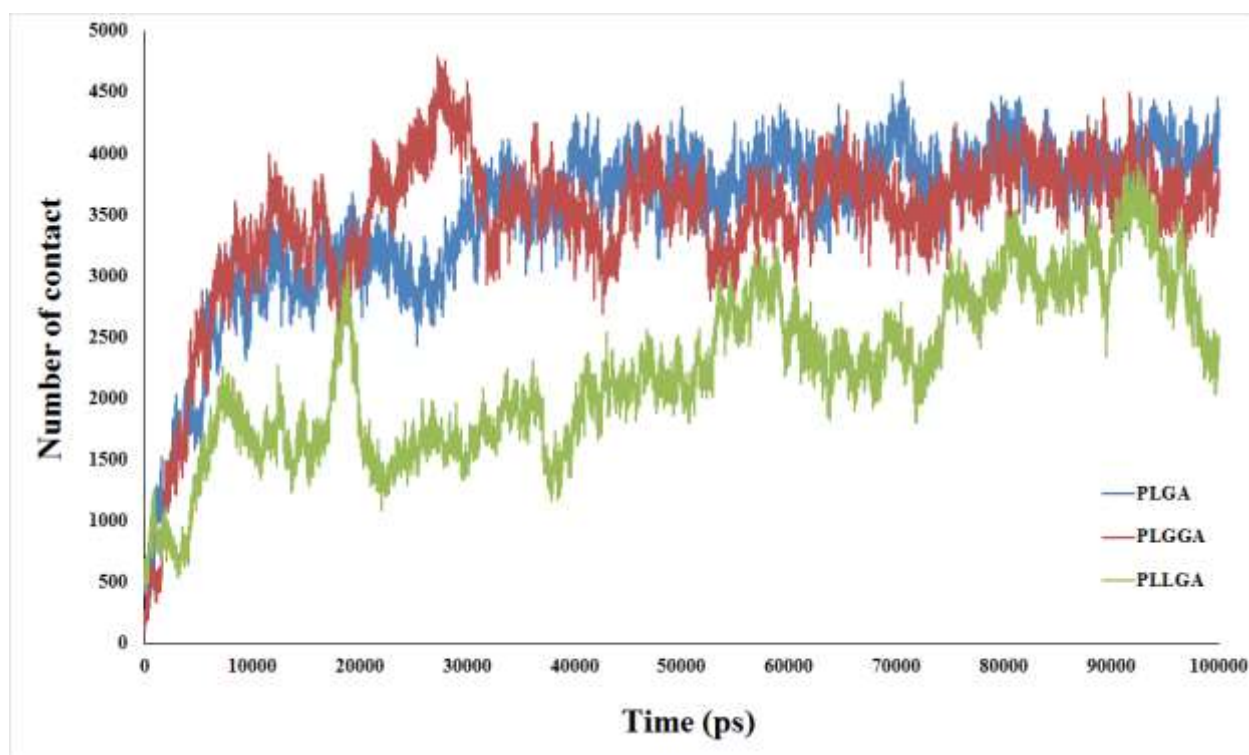
عملکرد خاص هر پروتئین ناشی از ساختار منحصر به فرد دوم و سوم آن است و هرگونه کاهش، تغییر و یا جابجایی در میزان و محل این ساختارها می‌تواند موجب تغییر رفتار پروتئین شود. بمنظور بررسی جزئیات این تغییرات ساختاری از تحلیل DSSP استفاده شد.

در مورد پروتئین آزاد میانگین میزان شعاع دوران تقریباً ثابت مانده و فقط مقداری بی‌ثباتی در آن دیده می‌شود. در سیستم‌های حاوی پروتئین و پلیمرهای با نسبت بیشتر یکی از مونومرها مقداری فشردگی در ساختار پروتئین ایجاد شده و شعاع دوران مولکول کاهش یافته است. طبق این نتایج با افزایش مونومرهای گلائیکولیک اسید شعاع دوران پروتئین نسبت به مقدار اولیه کاهش بیشتری را نشان می‌دهد. در مورد پروتئین در حالت اتصال با پلیمر با نسبت مساوی مونومرها همانند پروتئین آزاد شعاع دوران ثابت مانده و همزمان میزان نوسانات در مقادیر آن ثابت مانده است. در موافقت با آنالیز RMSD این نتایج نشان‌دهنده اثر بهتر این نوع پلیمر نسبت به دو نوع دیگر می‌باشد.

تعداد برخوردهای پروتئین با پلیمر می‌تواند بعنوان معیاری برای نزدیک شدن و ایجاد برهمکنش بین پروتئین و پلیمر

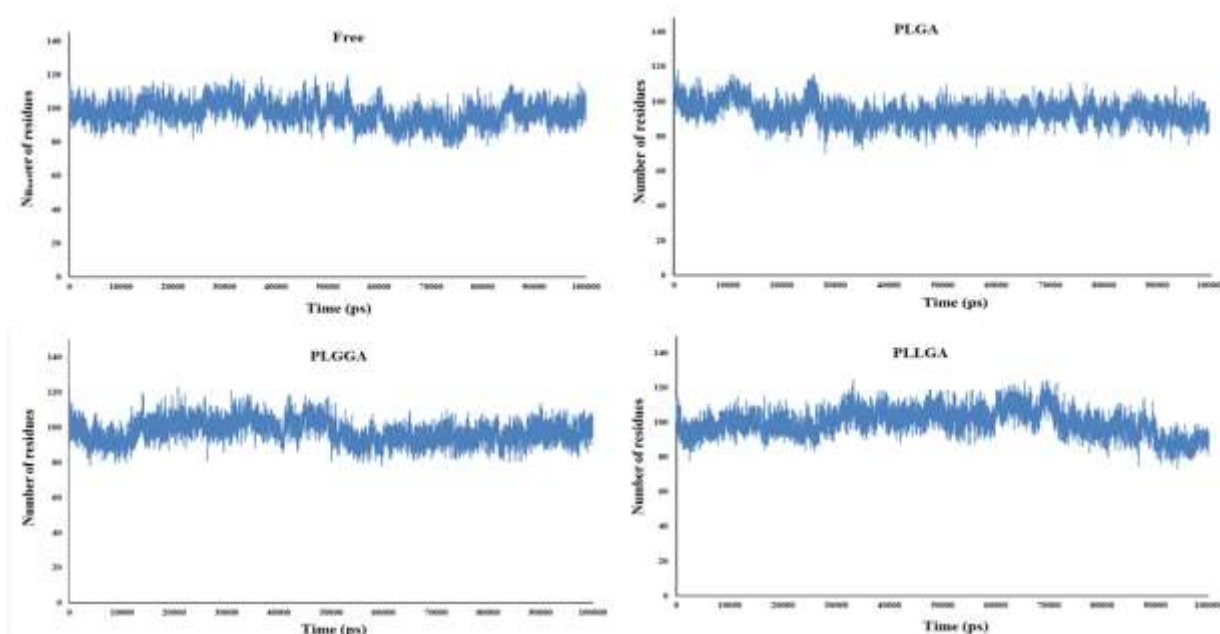


شکل ۴- تغییرات شعاع دوران پروتئین در سیستم‌های مختلف و در طول زمان شبیه سازی



شکل ۵- نمودار مربوط به تغییرات زمانی تعداد برخوردهای پلیمرها با پروتئین در سیستم‌های مختلف

بسیار کمتر و نمودار آن در زمان تعادل صاف تر از حالات دیگر حتی پروتئین آزاد است. با توجه به نقش ساختارهای دوم در حفظ عملکرد پروتئین، نتایج این آنالیز می تواند پیش بینی کننده تاثیر بهتر این نوع پلیمر در حفظ عملکرد p53 باشد.



شکل ۶- تعداد اسیدهای آمینه موجود در مجموع ساختارهای دوم در طول زمان

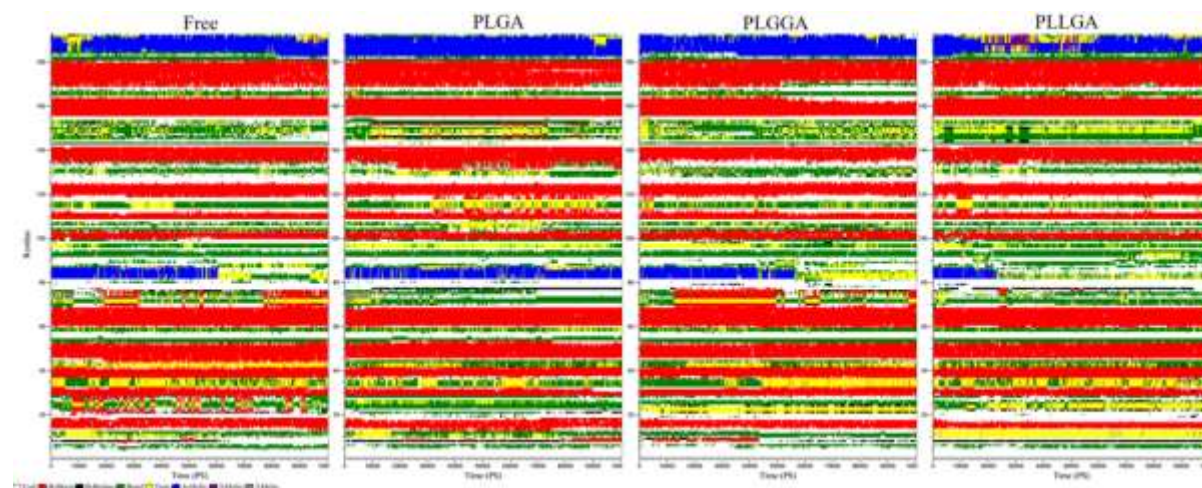
محاسبه انرژی برهمکنش پروتئین با پلیمر و همچنین نوع انرژی ها با استفاده از روش mmPBSA انجام و نتایج آن در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- انرژی های برهمکنش پلیمرهای مختلف با پروتئین

انرژی کل	انرژی الکترواستاتیکی	انرژی واندروالسی	
-۲۸۰۱	-۲۷۹۴	-۷	گلاپکولیک اسید بیشتر
-۲۳۱۶	-۲۲۳۹	-۷۷	نسبت مساوی مونومرها
-۱۵۸۴	-۱۴۳۰	-۱۵۴	لاکتیک اسید بیشتر

نتایج به دست آمده نشان می دهند در طول شبیه سازی، در سیستم شامل پروتئین آزاد، تعداد اسیدهای آمینه شرکت کننده در مجموعه ساختارهای دوم تغییر محسوسی ایجاد نکرده اند اما در برخی نواحی جابجایی هایی میان ساختارها مشاهده شده است (شکل ۶). نوسانات در این مقادیر برای پروتئین در برهمکنش با پلیمر با نسبت مساوی مونومرها

از نظر جابجایی های ساختاری نیز همچنان که مشاهده می شود مارپیچ آلفای ناحیه باقیمانده های ۸۲ تا ۸۸ در پروتئین آزاد به پیچه تصادفی تبدیل شده است (شکل ۷). در سایر قسمت ها نیز ناپایداری هایی در ساختارهای مختلف دیده می شود. از این نظر تنها پروتئینی که مارپیچ آلفای ذکر شده در آن تا پایان زمان شبیه سازی حفظ شده است سیستم با مقدار مساوی مونومرها است. در این سیستم همچنین سایر ساختارها در قسمت های دیگر نیز بیشتر از دیگر سیستم ها حفظ شده و پایداری نسبتاً کاملی در ساختارهای دوم پروتئین دیده می شود. در موافقت با نتایج بدست آمده از سایر آنالیزها، بررسی ساختارهای دوم پروتئین نیز نشان دهنده اثرات بهتر پلیمر با نسبت مساوی مونومرها بر پایداری ساختار p53 است.



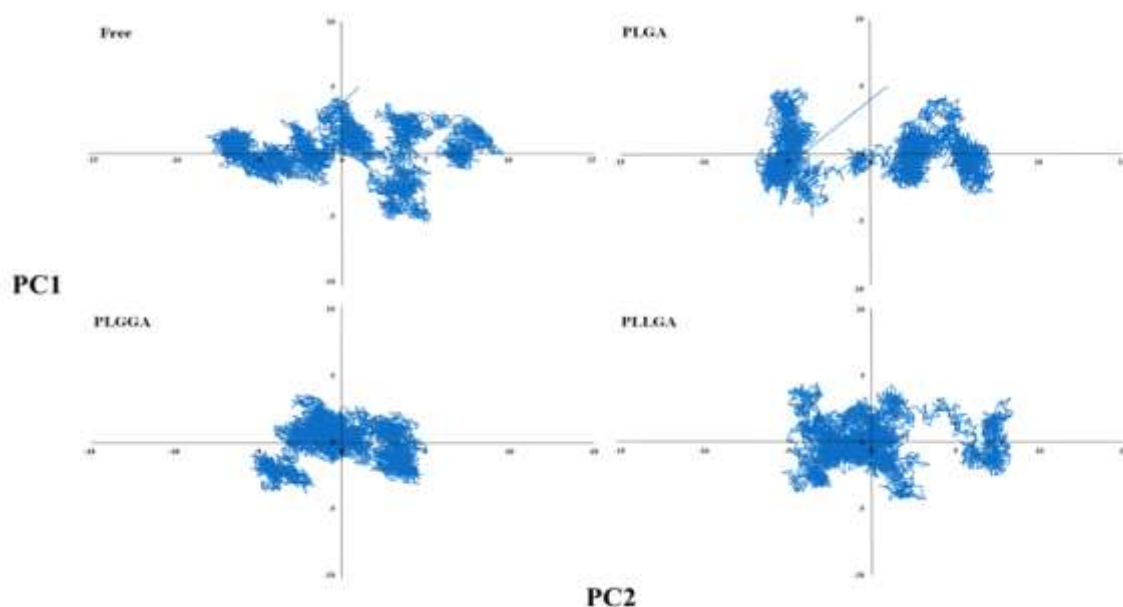
شکل ۷- تغییرات و جابجایی‌های ساختاری اسیدهای آمینه در طول زمان برای سیستم‌های مختلف

برهمکنش با پلیمر حاوی نسبت‌های مساوی مونومرها می‌باشد که نشان‌دهنده حداقل تغییرات الگوی حرکتی در این سیستم می‌باشد. با توجه به اینکه حرکات اصلی پروتئین یکی از فاکتورهای مهم در عملکرد آن می‌باشند، این همسانی در الگوی حرکتی می‌تواند نشانه‌ای از عدم تأثیرات منفی این نوع پلیمر بر عملکرد p53 بر اثر برهمکنش با پلیمر باشد. علاوه بر این همچنان‌که در شکل دیده می‌شود دامنه مقادیر بر روی PC1 برای پروتئین پس از برهمکنش با پلیمرهای با نسبت بیشتر هریک از مونومرها کاهش یافته که این می‌تواند به معنی کاهش در انعطاف پذیری پروتئین به دلیل اتصال پلیمرها باشد. بیشترین کاهش در حالت اتصال به پلیمر حاوی مقادیر بیشتر گلائیکولیک اسید دیده می‌شود که این موضوع می‌تواند به برهمکنش قویتر این پلیمر با پروتئین ارتباط داشته باشد.

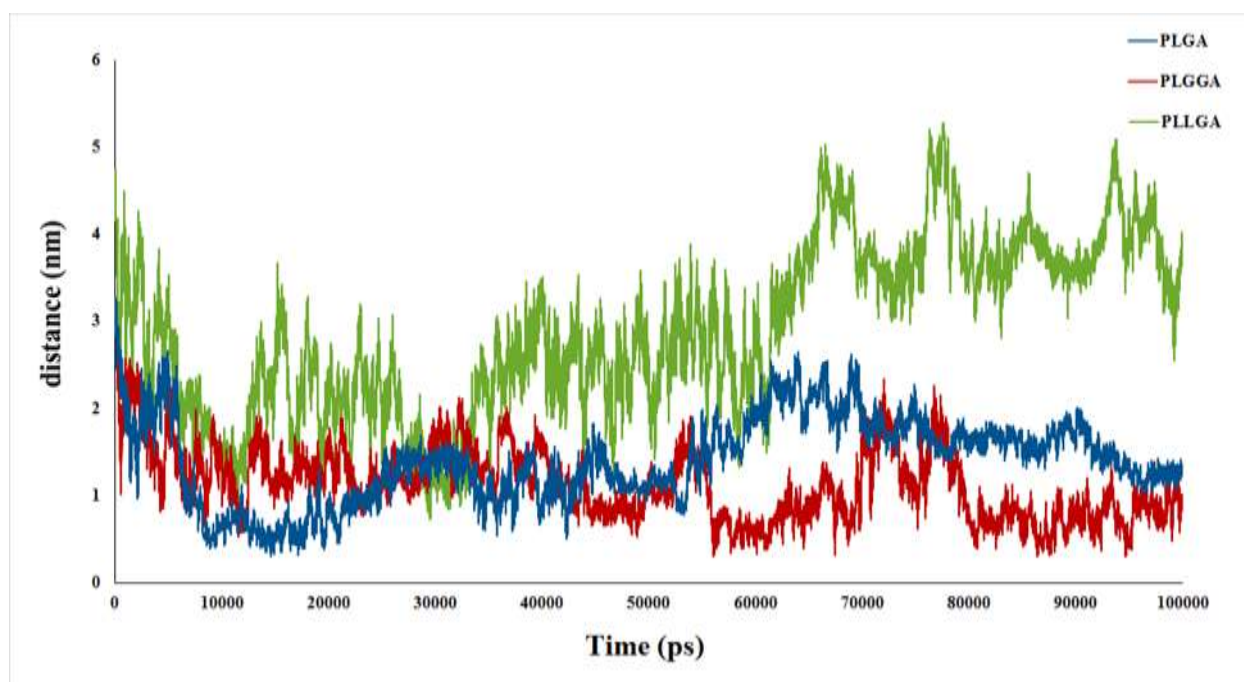
خواص دینامیکی پلیمرها نیز در طول زمان شبیه‌سازی با همدیگر مورد مقایسه قرار گرفت. این تحلیل با اندازه‌گیری تغییرات فاصله دو اتم انتهایی برای هر پلیمر انجام و نتایج در شکل ۹ آورده شده است.

می‌توان دید که با افزایش مقدار گلائیکولیک اسید به دلیل افزایش برهمکنش‌های الکتروستاتیکی و کاهش برهمکنش‌های واندروالسی، اتصالات قوی‌تری تشکیل شده است. با افزایش لاکتیک اسید و کاهش گلائیکولیک اسید در سیستم، با افزایش سهم واندروالسی و همچنین کاهش مقدار برهمکنش‌های الکتروستاتیکی، مقدار انرژی کل برهمکنش کاهش و در نتیجه پایداری کمپلکس نیز کمتر شده است. همچنان‌که مورد انتظار است میزان انرژی برهمکنش بین پروتئین و پلیمر با نسبت‌های مساوی مونومر اعدادی بین دو پلیمر دیگر است.

بسته به ساختار ۳ بعدی هر پروتئین، مجموعه‌ای از حرکات توسط قسمت‌های مختلف آن انجام می‌شود که می‌توان الگوی اصلی این حرکات را با استفاده از تحلیل مولفه اصلی (PCA) principal component analysis مورد ارزیابی قرار داد. هر حرکت با یک ویژه‌بردار مشخص می‌شود و هر ویژه‌بردار دارای یک ویژه‌مقدار است که دامنه حرکت را نشان می‌دهد. نتایج تحلیل ۲ بعدی PCA برای پروتئین p53 در حالت آزاد و در ترکیب با پلیمرها در شکل ۸ نشان داده شده است. در مقایسه با الگوی بدست آمده برای پروتئین آزاد، شبیه‌ترین الگو مربوط به پروتئین در حالت



شکل ۸- نمایش ۲ بعدی ترکیبات اصلی حرکتی پروتئین در حالات مختلف بدون پلیمر و در حضور پلیمرهای مختلف



شکل ۹- تغییرات در فاصله اتم‌های انتهایی پلیمرهای مختلف در طول زمان شبیه سازی

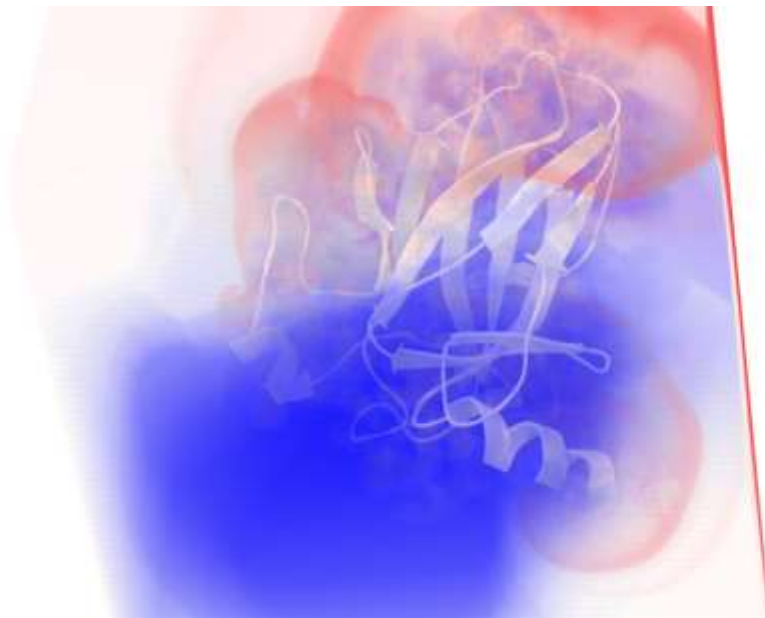
افزایش یافته و فاصله دو انتهای آن به همدیگر نزدیکتر شده است. این تفاوت‌های دینامیکی می‌تواند منجر به تغییر توانایی پلیمر برای پیچ‌وتاب خوردن در اطراف پروتئین

نتایج نشان می‌دهند که با افزایش میزان لاکتیک اسید از انعطاف‌پذیری پلیمر کاسته شده است. از طرف دیگر با افزایش مقدار گلایکولیک اسید انعطاف‌پذیری پلیمر

شده و احتمال می‌رود یکی از عوامل متفاوت بودن انرژی-های اتصال انواع مختلف پلیمر با پروتئین باشد. همچنان‌که دیده شد انرژی برهمکنش پلیمرهای مختلف و پروتئین ارتباط مستقیمی با افزایش مقادیر گلايکولیک اسید در سیستم دارد.

با توجه به اینکه p53 یک پروتئین متصل شونده به DNA بوده و از طرف دیگر از نظر پتانسیل الکتریکی، بار مولکول PLGA نیز مانند DNA منفی است، پیش‌بینی می‌شود این پلیمر از این نظر که احتمالا قادر باشد تا به محل‌های اتصال پروتئین به DNA متصل شود بتواند آن‌را در برابر ناپایداری حرارتی یا سایر شرایط نامطلوب محیطی حفظ

کند. به این منظور ابتدا با استفاده از روش APBS تعبیه‌شده در نرم افزار MGLtools پتانسیل الکتریکی پروتئین محاسبه شد (شکل ۱۰). همچنان‌که در شکل دیده می‌شود بار سطحی پروتئین در منطقه اتصال به DNA کاملاً مثبت بوده و همین امر موجب اتصال سریع‌تر پلیمرهای با بار منفی به آن می‌شود. از طرف دیگر با افزایش مقدار گلايکولیک اسید در ساختار کوپلیمر، تمایل و قدرت اتصال آن به پروتئین بیشتر می‌شود. این نتایج در موافقت با انرژی‌های برهمکنش بدست‌آمده با روش MMPBSA است که انرژی اتصال بیشتری از نوع الکترواستاتیک را با افزایش گلايکولیک اسید نشان می‌دهد.



شکل ۱۰- نمایش پتانسیل الکترواستاتیک سطحی پروتئین (رنگ آبی بار مثبت و رنگ قرمز بار منفی)

نتیجه‌گیری

بمنظور بررسی برهمکنش کوپلیمر پلی لاکتیک-کو-گلايکولیک اسید با نسبت‌های مختلف مونومرها و پروتئین p53 از روش‌های شبیه‌سازی رایانه‌ای دینامیک مولکولی استفاده شد. در این تحقیق از سه نسبت ۱ به ۱، ۱ به ۲ و ۲ به ۱ گلايکولیک اسید به لاکتیک اسید استفاده شد. نتایج، اثرات پایدارکنندگی هر سه پلیمر بر ساختار پروتئین را نشان می‌دهند هرچند این اثرات برای همه نسبت‌ها به یک اندازه

نیست. با افزایش میزان لاکتیک اسید در سیستم از طرفی از میزان انعطاف پذیری کوپلیمر کمتر شده و از طرف دیگر با کاهش گروه‌های اکسیژن کربونیلی توانایی پلیمر در ایجاد پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیکی کمتر می‌شود. هر دو این عوامل موجب برهمکنش ضعیف‌تر و ناپایدارتری بین پلیمر و پروتئین می‌شوند. در نقطه مقابل و با افزایش مقدار گلايکولیک اسید در سیستم، علاوه بر افزایش انعطاف-پذیری، گروه‌های کربونیلی با بار منفی بیشتر شده و پلیمر

برهمکنش محکم‌تری را با پروتئین برقرار می‌کند که عمده این برهمکنش‌ها در نواحی با بار مثبت در پروتئین است. طراحی و بهینه‌سازی فرمولاسیون‌های پروتئینی حساسیت‌های ویژه و متفاوتی نسبت به داروهای با مولکول‌های کوچک دارد. در این سیستم‌ها علاوه بر سایر اهداف فرمولاسیونی مانند محافظت از دارو، افزایش عبور از سدهای زیستی و یا هدفمندسازی رسانش دارو، حفظ پایداری ساختارهای پروتئینی و عدم تغییرات کانفورماسیونی در آنها بعنوان یکی از مهمترین اولویت‌ها مطرح می‌باشد. همچنین لازم است تا اتصال حامل به دارو بصورت تنظیم‌شده باشد تا پس از رسیدن به جریان خون و یا محل هدف، دارو بتواند از حامل جدا شده و اثر خود را اعمال نماید. همچنانکه در نتایج دیده شد پلیمر با نسبت مساوی مونومرها قادر بود تا بطور کامل از ساختارهای ثانویه پروتئینی محافظت کند و هیچ تغییری در مارپیچ‌های

منابع

- امیری فر، س.، مهنام، ک.، ۱۳۹۹. پیشگویی جهشهای پایدارکننده بالقوه پروتئین اینترفرون بتا (α1-سینووکس) به وسیله شبیه سازی دینامیک مولکولی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، دوره ۳۵، شماره ۴، ۱۴۰۱.
- بلبلیان، ش.، بزرگمهر، م.، مرسلی، ع.، ۱۴۰۰. تأثیر مشتقات بوسولیک اسید (AKBA) 3-O-Acetyl-11-keto-β-boswellic acid ساختار مونومر و دimer (α¹-β) و (α²-β): نگرش شبیه سازی دینامیک مولکولی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی، دوره ۳۵، شماره ۴، ۱۴۰۱.
- Aider, M., Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry. LWT-Food Science and Technology. 43, 837-842, 2010. DOI:10.1016/j.lwt. 2010. 01.021
- Allen, T.M. and P.R. Cullis, Drug delivery systems: entering the mainstream. Science. 303, 1818-1822, 2004. DOI:10.112/science.10533
- Anand, P., et al., Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharmaceutical research. 25, 2097-2116, 2008. DOI: 10.1007/s11095-008-9661-9
- Chen, J., P. Ashton, and T. Smith, Polymer-based, sustained release drug delivery system, Google Patents. 2003. DOI: 10.1016/j.jconrel. 2014090.030
- Cherreddy, K.K., G. Vandermeulen, and V. Préat, PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity. Wound Repair and Regeneration. 24, 223-236, 2016. DOI: 10.1111/wrr.12404 .
- Duffy, M.J., et al., p53 as a target for the treatment of cancer. Cancer treatment reviews. 40, 1153-1160, 2014. DOI: 10.1016/j.ctrv.2014. 10.004
- Essmann, U., et al., A smooth particle mesh Ewald method. The Journal of chemical physics. 103, 8577-8593, 1995. DOI: 10.1063/1.470117
- Evan, G.I. and K.H. Vousden, Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. Nature. 411, 342, 2001. DOI:10.1038/35077213
- Frokjaer, S. and D.E. Otzen, Protein drug stability: a formulation challenge. Nature Reviews Drug Discovery. 4, 298, 2005. DOI:10.1038/nrd1695
- Hanwell, M.D., et al., Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and

- analysis platform. *Journal of cheminformatics*. 4, 17, 2012. DOI:10.116/15-24-4-7
13. Hess, B., et al., GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *Journal of chemical theory and computation*. 4, 435-447, 2008. DOI:10.1021/ct700301q
 14. Hess, B., et al., LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. *Journal of computational chemistry*. 18, 1463-1472, 1997. DOI:10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:123.0.CO;2-H
 15. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*. 14, 33-38, 1996. DOI: 10.1016/0263-7855(96)00018-5
 16. Jafari, F., et al., Exploring the binding mechanism of paraquat to DNA by a combination of spectroscopic, cellular uptake, molecular docking and molecular dynamics simulation methods. *New Journal of Chemistry*. 41, 14188-14198, 2017. DOI:10.1039/C7NJ01645J
 17. Kapoor, D.N., et al., PLGA: a unique polymer for drug delivery. *Therapeutic delivery*. 41-58, 2015. DOI:10.4155/tde.14.91
 18. Karplus, M., Molecular dynamics of biological macromolecules: a brief history and perspective. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 68, 350-358, 2003. DOI: 10.1002/bip.10266
 19. Kneller, G.R., Comment on "Using quaternions to calculate RMSD"[*J. Comp. Chem*. 25, 1849 (2004)]. *Journal of computational chemistry*. 26, 1660-1662, 2005. DOI: 10.1002/jcc.20296
 20. Lee, C., W. Yang, and R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*. 37, 785, 1988. DOI: 10.1103/PhysRevB.37.785
 21. Lowe, S.W. and A.W. Lin, Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*. 21, 485-495, 2000. DOI: 10.1093/carcin/21.3.485
 22. Makadia, H.K. and S.J. Siegel, Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*. 3, 1377-1397, 2011. DOI:10.3390/polym3031377
 23. Moradi, S., et al., Study of dual encapsulation possibility of hydrophobic and hydrophilic drugs into a nanocarrier based on bio-polymer coated graphene oxide using density functional theory, molecular dynamics simulation and experimental methods. *Journal of Molecular Liquids*. 262, 204-217, 2018. DOI:10.1016/j.molliq.2018.04.089
 24. Nat, A.S., Drug delivery system, Google Patents. 2006.
 25. Pillai, O. and R. Panchagnula, Polymers in drug delivery. *Current opinion in chemical biology*. 5, 447-451, 2001. DOI:10.1016/S1367-5931(00)00227-1
 26. Reed, J.C., Dysregulation of apoptosis in cancer. *Journal of clinical oncology*. 17, 2941-2941, 1999. DOI:10.103/nrd165
 27. Saheb, D.N. and J.P. Jog, Natural fiber polymer composites: a review. *Advances in Polymer Technology: Journal of the Polymer Processing Institute*. 18, 351-363, 1999. DOI:10.2172/989448
 28. Takahashi, T., et al., p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. *Science*. 246, 491-494, 1989. DOI:10.1126/s.2554494
 29. Van Der Spoel, D., et al., GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*. 26, 1701-1718, 2005. DOI:10.1002/jcc.. 20291
 30. Van Gunsteren, W.F. and H. Berendsen, A leap-frog algorithm for stochastic dynamics. *Molecular Simulation*. 1, 173-185, 1988. DOI:10.180/0892702880808941

A molecular dynamics study on the molecular interactions between poly lactic-co-glycolic acid in different ratios of monomers and the anticancer protein of p53

Ansari M.¹, Shahlaei M.¹, Kahrizi D.², Naseriyeh T.³, Nowroozi A.¹ and Moradi S.¹

¹Nano Drug Delivery Research Center, Health Technology Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, I.R. of Iran

²Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

³Dept. of Nanobiotechnology, Faculty of Innovative Science and Technology, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

As the mutations in the tumor protein P53 are one of the most important factors in most cancers, applying its wild type into tumor sites is considered both as gene therapy or protein delivery methods. Despite higher efficacy, the protein delivery approach is less effective in most cases, mostly because of challenges in protecting the proteinous drug structures outside and inside the body. Optimizing a proper drug formulation for sensitive molecules is time-consuming and cost-consuming, which urges the development of other time and cost-effective methods. The copolymer of poly Lactic-Co-Glycolic Acid is one of the most widely used polymers in the pharmaceutical industry due to its high biocompatibility and safe biodegradability. In this research, the interactions between p53 and different monomer ratios of this polymer were investigated using the computational methods of molecular dynamics. The 3-D structure of polymers was designed with different monomers, and their related topologies were prepared using the PRODRG server. Simulations were performed using the GROMACS package for 100 nanoseconds at the temperature of 300K and pressure of 1bar. The results indicated that all three existing copolymers are capable of interacting with the protein, but the quantity and quality of these interactions are different. By increasing the ratio of glycolic acid in the polymer, the flexibility and ability to interact with the protein are enhanced. However, the polymer with an equal ratio of monomers was better able to maintain protein secondary structures and dynamic patterns. Ultimately, this study recommends that a poly lactic-co-glycolic acid with equal ratios of monomers is more suitable for stabilization of p53 in its formulations.

Keywords: Cancer, Protein-polymer interaction, GROMACS, Nano formulation, Nano drug delivery