چکیده

اگزوسیتوز سیناپسی یکی از موارد مهم در بررسی و توضیح مکانیسم الحاق غشایی می باشد. بر اساس مهمترین مدل ارائه شده به نام مدل الحاق کامل، وزیکول های ترشحی برای آزاد سازی نوروتراسمیترها در فضای سیناپسی به طور کامل در غشا فیوز شده و جزئی از غشاء پلاسمایی سلول پیش سیناپسی می شوند. تراکم وزیکول های درون سلولی حاوی نوروتراسمیتر ها، مطرح کننده سؤالی می باشد مبنی براینکه چگونه وزیکول های ترشحی به صورت هماهنگ با غشاء پلاسمایی الحاق می شوند. پروتئین کمپلکسین یکی از شناخته ترین پروتئین هایست که مطالعات آزمایشگاهی نشان داده است با تنظیم تشکیل کمپلکس اسنار، باعث هماهنگ شدن ترشح نوروترانسمیتر ها می شود، اما اینکه کمپلکسین به عنوان مهار کننده عمل می کند یا به عنوان تحریک کننده هنوز به طور واضح مشخص نشده است. در این تحقیق با استفاده از شبیه سازی دینامیک مولکولی به مطالعه برهمکنش کمپلکسین با کمپلکس اسنار سیستم عصبی پرداخته شده است. کمپلکس اسنار با ناحیه هلیکس مرکزی از کمپلکسین از طریق پیوند های هیدروژنی و الکترواستاتیکی برهمکنش می نماید. کمپلکسین همچنین قادر است به جای سیناپتوبروین با کمپلکس Q-SNARE برهمکنش کرده و باعث کاهش انعطاف پذیری آن شود. نتایج حاصل از این مطالعه همچنین نشان می دهد که هلیکس اکسسوری از کمپلکسین و انتهای کربوکسیلی سیناپتوبروین با یک ناحیه از پروتئین سینتاکسین واقع در کمپلکس اسنار برهمکنش می نمایند. بر اساس نتایج حاصل، می توان نتیجه گرفت با وجود آنکه هلیکس اکسسوری باعث اتصال محکم کمپلکسین به کمپلکس اسنار می شود اما حضور همزمان آن با سیناپتوبروین باعث ناپایداری هلیکس های Q-SNARE شده که این امر می تواند باعث مهار الحاق غشایی شود. یکی دیگر از موارد بررسی شده در این مطالعه نقش پروتئین اسنپ-25 در اتصال کمپلکسین به کمپلکس اسنار می باشد زیرا بر اساس ساختار حاصل از کریستالوگرافی، اسنپ-25 برهمکنش مستقیمی با کمپلکسین برقرار نمی کند. نتایج به دست آمده نشان می دهد که اسنپ-25 باعث پایداری ساختار هلیکسی کمپلکسین در هنگام اتصال به کمپلکس اسنار می شود.

کلمات کلیدی: الحاق غشایی، اگزوسیتوز سیناپسی، کمپلکس اسنار، کمپلکسین، شبیه سازی دینامیک مولکولی.

فهرست مطالب

عنوان.....صفحه

چکیده..... یک

فصل اول: مقدمه

۱-۱- ترشح..... ٤

۱-۲- پروتئین های اسنار ٦

۱-۳- مکانیسم الحاق غشایی..... ۹

۱-٤-کمپلکسین ۱۱

فصل دوم: روش ها

۲-۱- مقدمه ای بر شبیه سازی کامپیوتری ۱۷

۲-۲- طراحی شبیه سازی برای محیط آب..... ۱۹

۲-۲-۱- انتخاب و دستیابی به ساختار اولیه..... ۱۹

۲-۲-۲- آماده سازی فایل اولیه برای شبیه سازی ۲۰

۲-۲-۳- ساختن جعبه شبیه سازی..... ۲۰

۲-۲-٤- اضافه کردن آب..... ۲۰

۲-۲-۵- کمینه سازی انرژی..... ۲۰

۲-۲-٦- متعادل کردن محدودیت مکانی سیستم شبیه سازی..... ۲۰

۲-۲-۷- اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی..... ۲۳

۲-۳- روشهای آنالیز..... ۲٤

۲-۳-۱- جذر میانگین مربع تغییرات در ساختار..... ۲٤

۲-۳-۲- پیوند هیدروژنی..... ۲٤

۲-۳-۳- تابع توزیع شعاعی ۲۵

فصل سوم: نتایج

۳-۱- نتایج بخش اول..... ۲۹

۳-۱-۱ دینامیک و ساختار..... ۳۱

۳-۱-۲ برهمکنش های الکترواستاتیک..... ۳٦

۳-۱-۳ پیوند هیدروژنی ٤٠
۳-۲- نتایج بخش دوم..... ٤١
۳-۲-۱- دینامیک و ساختار ٤٣
۳-۲-۲- برهمکنش های الکترواستاتیک ٤٩
۳-۲-۳- پیوند هیدروژنی ٤٩
فصل چهارم: تفسیر و پیشنهادات
٤-۱- تفسیر ٥٣
٤-۲- پیشنهادات ٥٧
منابع ٥٩
چکیده(انگلیسی)

فهرست شکل ها

عنوان.....صفحه
شکل۱-۱- مسیر ترشح و ترافیک وزیکول های درون سلولی ۳
شکل۱-۲- اگزوسیتوز..... ۳
شکل۱-۳- نیروی دهیدراسیون در حین الحاق غشایی..... ٤
شکل۱-٤- ترشح پیوسته و ترشح تنظیمی ٥
شکل۱-٥- پروتئین های اسنار ٦
شکل۱-٦- کمپلکس اسنار سیناپسی..... ۷
شکل۱-۷- نقش پروتئین Rab در الحاق غشایی ۱۰
شکل۱-۸- نقش پروتئین NSF در باز شدن کمپلکس اسنار..... ۱۰
شکل۱-۹- نواحی ساختاری پروتئین کمپلکسین..... ۱۲
شکل۱-۱۰- ساختار کمپلکس چهار جزئی کمپلکسین/اسنار ۱۲
شکل۱-۱۱- پیوندهای هیدروژنی و الکتروستاتیک در جایگاه کمپلکسین به کمپلکس اسنار ۱۳
شکل۲-۱- معیارهای ژئومتری پیوند هیدروژنی..... ۲٥
شکل۳-۱- شبیه سازی های انجام شده در بخش اول ۳۰
شکل۳-۲- جذر میانگین مربع نوسانات ۳۳
شکل۳-۳- جذر میانگین مربع نوسانات..... ۳٤
شکل۳-٤- درصد وجود ساختار آلفا-هلیکس به ازای هر آمینو اسید در طی زمان ۳٥
شکل۳-٥- هیستوگرام فراوانی فاصله مابین گروه های باردار ۳۸
شکل۳-٦- تابع توزیع شعاعی..... ۳۹
شکل۳-۷- الگوی پیوندهای هیدروژنی ٤۲
شکل۳-۸- شبیه سازی های انجام شده در بخش دوم ٤۳
شکل۳-۹- جذر میانگین مربع نوسانات..... ٤٥
شکل۳-۱۰- درصد وجود ساختار آلفا-هلیکس به ازای هر آمینو اسید در طی زمان..... ٤٦
شکل۳-۱۱- هیستوگرام طول ساختار آلفا-هلیکسی کمپلکسین در طی زمان ٤۷
شکل۳-۱۲- نمودار راماچاندران..... ٤۸
شکل۳-۱۳- الگوی پیوندهای هیدروژنی..... ٥

فهرست جدول ها

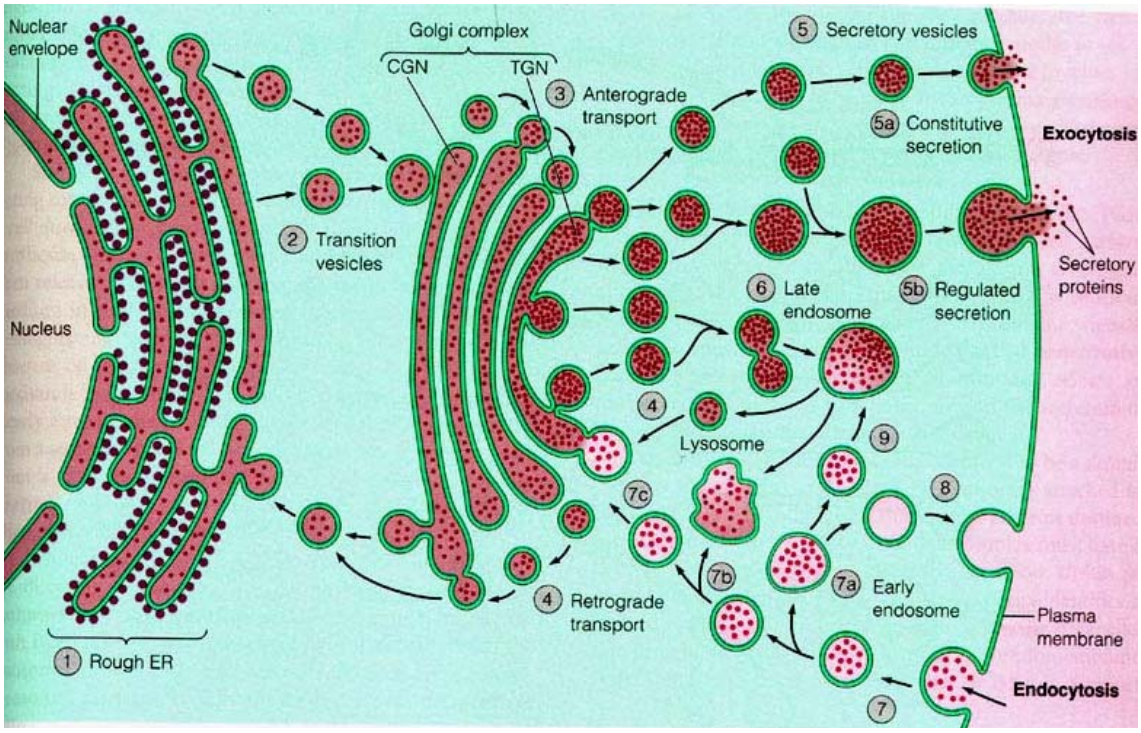
عنوان.....صفحه
جدول۲-۱- فایل em.mdp مورد نیاز برای کمینه سازی انرژی ۲۱
جدول۲-۲- فایل pr.mdp مورد نیاز برای مرحله تعادل سازی..... ۲۲
جدول۲-۲- فایل md.mdp مورد نیاز برای اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی..... ۲۳
جدول۳-۱- جذر میانگین مربع انحراف بر حسب نانومتر..... ۳۱
جدول۳-۲- جذر میانگین مربع انحرافات ٤٤
جدول۳-۳- میانگین فاصله مابین آمینو اسید های باردار با بار مخالف در طی زمان ۵۰
جدول۳-٤- میانگین پیوندهای هیدروژنی در طی زمان ۵۱

فصل اول:

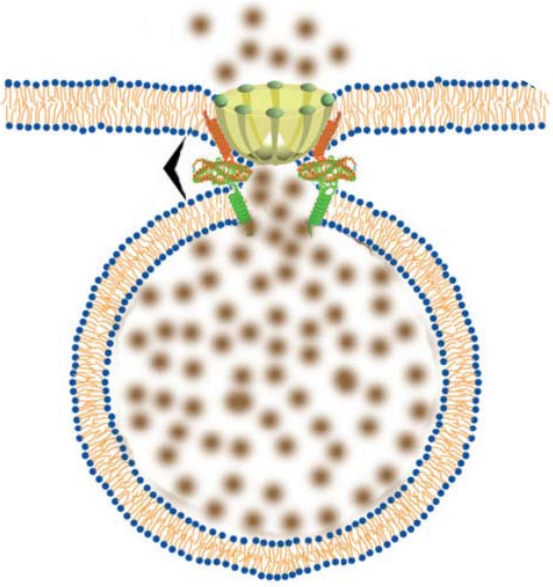
مقدمه

محیط پرتراکم درون یک سلول طرح کننده سؤالی می باشد مبنی بر آنکه چگونه از برهمکنش های غیراختصاصی پروتئین های درون سلولی با یکدیگر جلوگیری می شود یا به عبارت دیگر چگونه پروتئین ها در محیط متراکم سیتوپلاسم به صورت اختصاصی با هم برهمکنش می کنند. مطالعات انجام شده حاکی از آن است که یکی از راه حل های در پیش گرفته شده برای کاهش احتمال برهمکنش های غیراختصاصی، تشکیل ارگانل های درون سلولی [۱] بوده است. به عبارت دیگر غلظت پروتئین های از یک نوع در نقاط مختلف سلول با یکدیگر متفاوت است به عنوان مثال پروتئین های هیدرولازی در لیزوزوم تجمع می یابند و این امر باعث افزایش احتمال برهمکنش های اختصاصی مابین این پروتئین ها می شود(۱). از طرف دیگر درصد بسیار بالایی از پروتئین های یک سلول طی عمل ترجمه[۲] در سیتوپلاسم ساخته می شوند و این امر سؤال دیگری را به دنبال خود مطرح می کند مبنی بر اینکه چگونه پروتئین های ساخته شده در سیتوپلاسم به محل یا ارگانل ویژه خود منتقل می شوند. یکی از مکانیسم های اولیه در انتقال پروتئین ها مسیر ترشح[۳] مواد درون سلولی به بیرون از سلول می باشد که در طی آن وزیکول های غشایی هم زمان با عمل ترشح[٤] پروتئین ها را نیز از یک ارگانل درون سلولی به ارگانل دیگری منتقل می کنند(۲)(شکل۱-۱). عمل ترشح در طی چندین مرحله که به طور کامل تحت کنترل می باشند انجام می شود. هدف از انجام این تحقیق مطالعه آخرین مرحله از مسیر ترشح به نام اگزوسیتوز[٥] می باشد که طی آن غشاء وزیکول ترشحی با غشاء سیتوپلاسمی الحاق[٦] شده تا مواد درون وزیکول به بیرون از سلول منتقل گردند (شکل۱-۲).

[۱] Compartmentalization
[۲] Translation
[۳] Secretory Pathway
[٤] Secretion
[٥] Exocytosis
[٦] Fuse



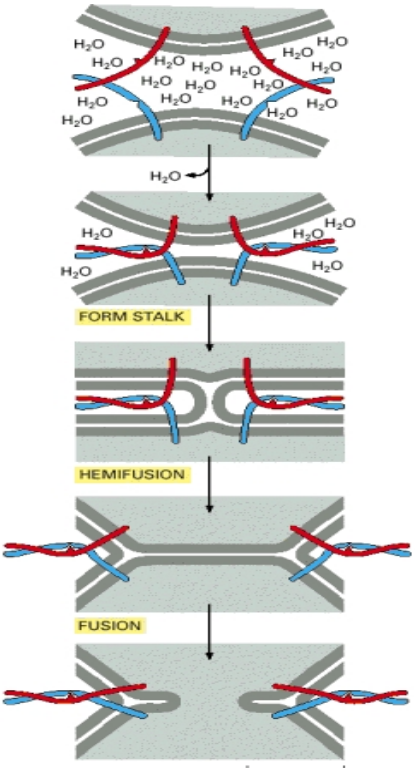
شکل ۱-۱ مسیر ترشح و ترافیک وزیکول های درون سلولی



شکل ۱-۲ اگزوسیتوز

۱-۱ ترشح

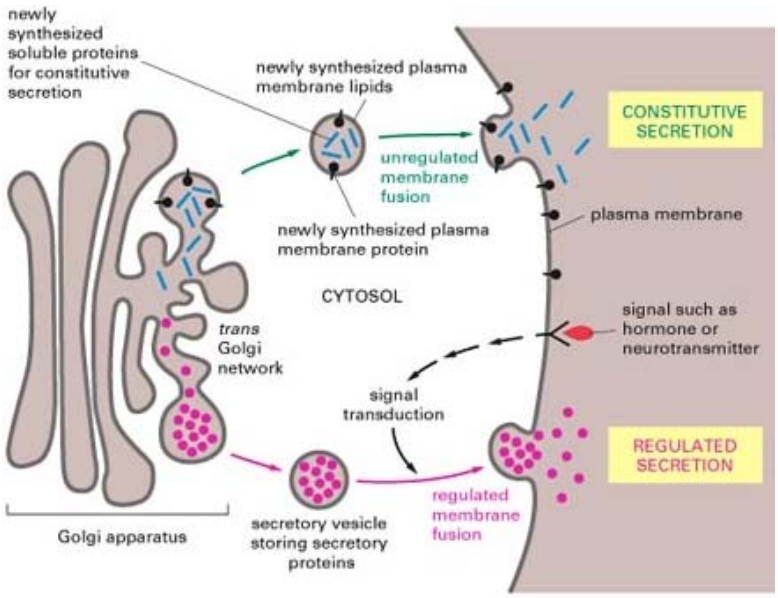
ترشح موادی چون هورمون ها، فاکتورهای رشد و نوروترانسمیترها یکی از مهمترین پروسه هایی است که موجودات زنده جهت انتقال پیام از یک سلول به سلول دیگر از آن بهره می گیرند(۳). مهمترین مرحله در مسیر ترشح، الحاق غشاء وزیکول ترشحی با غشاء پلاسمایی سلول می باشد. در محیط های آبی همانند سیتوپلاسم با نزدیک شدن دو لایه فسفولیپیدی به یکدیگر به دلیل تجمع مولکول های آب در فضای بین دولایه لیپیدی، یک نیروی دهیدراسیون[۱] ایجاد می شود که از الحاق دو غشاء جلوگیری به عمل می آورد. در طی تکامل برای غلبه بر این نیروی دافعه، پروتئین هایی طراحی شده اند تا باعث افزایش سرعت ممزوج شدن دو لایه فسفولیپیدی در یکدیگر شوند(٤). در این راستا تاکنون پروتئین های زیادی شناسایی گشته اند که از مهمترین آن ها می توان به پروتئین های اسنار[۲] اشاره کرد(۵)(شکل ۱-۳).



شکل ۱-۳ نیروی دهیدراسیون در حین الحاق غشایی

[۱] Dehydration Force
[۲] SNARE

تا به حال دو مکانیسم اصلی برای عمل ترشح در سلول های یوکاریوتی گزارش شده است که عبارتند از ترشح پیوسته[۱] و ترشح تنظیمی یا ناپیوسته[۲]، در ترشح پیوسته مواد ترشحی به محض سنتز در درون سلول از طریق وزیکول های ترشحی به فضای خارج سلولی[۳] ترشح می گردند که از این نوع می توان به ترشح موادی چون کلاژن اشاره نمود. اما در ترشح ناپیوسته، عمل ترشح بلافاصله بعد از سنتز مواد ترشحی صورت نمی گیرد بلکه این مواد بعد از تولید شدن در وزیکول های ترشحی که در اصطلاح زیموژن[٤] نامیده می شوند ذخیره می گردند (٦). در این حالت، وزیکول های ترشحی (زیموژن) با فرا رسیدن یک پیام خاص که در اغلب موارد با وارد شدن یون کلسیم به درون سیتوپلاسم همراه می باشد به صورت هماهنگ[٥] با غشاء پلاسمایی الحاق شده و عمل ترشح صورت می گیرد. به همین دلیل به ترشح تنظیمی، ترشح وابسته به کلسیم نیز گفته می شود. از این نوع ترشح می توان به ترشح انسولین در پانکراس یا ترشح نوروترانسمیترها در سیستم عصبی اشاره نمود (شکل ۱-٤).

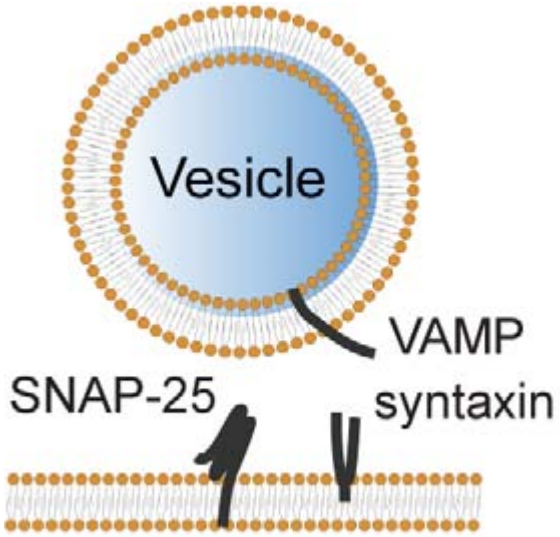


شکل ۱-٤ ترشح پیوسته و ترشح تنظیمی

[۱] Constitutive Secretion
[۲] Regulated or non Constitutive Secretion
[۳] Extra Cellular Matrix
[٤] Zymogen
[٥] Synchronize

۱-۲ پروتئین های اسنار

اسنارها، یک خانواده پروتئینی می باشند که تاکنون ۲٤ ایزومر آن ها در مخمر و بیشتر از ۳۵ نوع اسنار در پستانداران شناسایی شده است. پروتئین های اسنار به دو گروه اصلی تقسیم می شوند. گروه اول شامل آن دسته از اسنارها می باشد که درون غشاء وزیکول ترشحی قرار گرفته اند و v-SNARE نامیده می شوند. گروه دوم شامل اسنارهایی است که در غشاء هدف[۱] محبوس[۲] شده اند و t-SNARE نامیده می گردند(۲)(شکل ۱-۵).



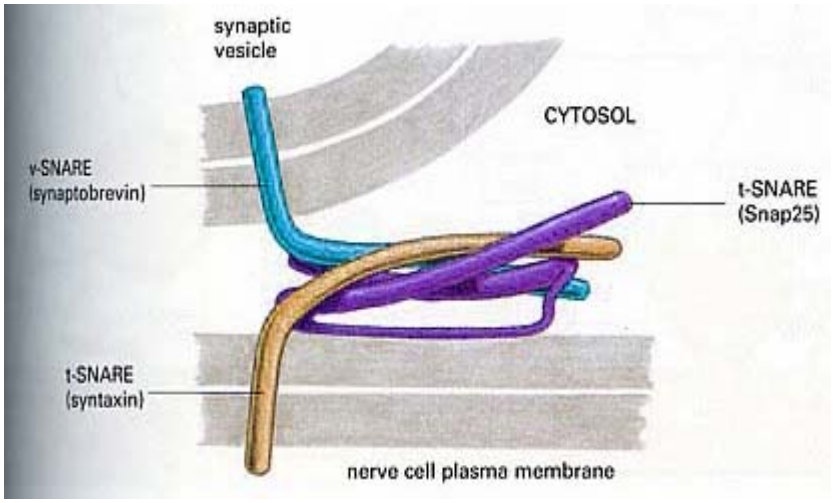
شکل ۱-۵ پروتئین های اسنار

پروتئین های اسنار واقع در وزیکول و غشاء هدف به ترتیب v-SNARE و t-SNARE نامیده میـشوند. در اینجا سیناپتوبروین(VAMP) به عنوان v-SNARE و پروتئین های سینتاکسین و اسنپ۲۵ به عنـوان t-SNARE نشان دادهشده اند.

[۱] Target Membrane
[۲] Span

پروتئین های اسنار در تمام موجودات یوکاریوتی که مورد مطالعه قرار گرفته اند، شناسایی شده اند به طوری که توالی آمینواسیدی[۱] اسنارهای موجودات مختلف حفظ شده و شبیه به هم می باشد. این امر دال بر این مطلب است که به احتمال زیاد در طی تکامل مکانیسم یکسانی برای کاتالیز الحاق شدن وزیکول های ترشحی با غشاء پلاسمایی اتخاذ شده است(۲).

پروتئین های اسنار سیناپسی[۲] در پستانداران از شناخته شده ترین پروتئین های اسنار می باشند و بسیاری از اطلاعات موجود در رابطه با این پروتئین ها و نقش آن ها در الحاق وزیکول های غشایی با غشاء هدف، از مطالعه بر روی اسنارهای سیناپسی به دست آمده است. کمپلکس اسنار سیناپسی[۳]، از یک v-SNARE به نام سیناپتوبروین[۴] (بر روی وزیکول ترشحی) و دو نوع t-SNARE به نام های سینتاکسین ۱[۵] و اسنپ ۲۵[۶] (بر روی غشاء پلاسمایی) تشکیل شده است(۷)(شکل ۱-٦).



شکل ۱-٦ کمپلکس اسنار سیناپسی

[۱] Amino Acid Sequence
[۲] Synaptic SNAREs
[۳] Synaptic SNARE Complex
[۴] Synaptobrevin
[۵] Syntexn۱
[٦] SNAP۲۵

مطالعات ساختاری انجام شده نشان داده است که سینتاکسین ۱ در حالت مونومر ساختار آلفاهلیکس خود را تا حدی حفظ می کند در حالیکه سیناپتوبروین و اسنپ ۲۵ در حالت مونومر ساختار دوم خود را از دست می دهند. با اتصال اسنپ ۲۵ به سینتاکسین ۱ و تشکیل کمپلکس دو جزئی t-SNARE [۱]، ساختار دوم القا شده و اسنپ ۲۵ ساختار آلفا–هلیکس به خود می گیرد. همچنین با اتصال سیناپتوبروین به کمپلکس t-SNARE در جهت تشکیل کمپلکس سه جزئی اسنار[۲]، سیناپتوبروین نیز ساختار آلفا–هلیکس به خود می گیرد(۸).

نتایج حاصل از کریستالوگرافی اشعهX بر روی کمپلکس سه جزئی اسنار سیناپسی نشان داده است که پروتئین های سیناپتوبروین و سیتاکسین ۱ هر کدام یک هلیکس و پروتئین اسنپ ۲۵ دو هلیکس برای تشکیل این کمپلکس سه جزئی به اشتراک می گذارند. بنابراین کمپلکس سه جزئی اسنار سیناپسی متشکل از چهار هلیکس می باشد که به صورت موازی به یکدیگر متصل شده اند به نحوی که انتهای کربوکسیلی[۳] این کمپلکس در نزدیکی محل الحاق غشاء وزیکول با غشاء پلاسمایی قرار می گیرد و انتهای آمینی[۴] آن در فاصله دورتر نسبت به محل الحاق غشایی استقرار می یابد. مشاهدات انجام گرفته حاکی از این مطلب است که پروتئین های اسنار از انتهای آمینی خود شروع به برهمکنش با یکدیگر کرده و این برهمکنش به صورت جهت دار از سمت انتهای آمینی به انتهای کربوکسیلی ادامه می یابد تا در نهایت کمپلکس سه جزئی تشکیل شود(۷).

مطالعات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی انجام شده بر روی کمپلکس پروتئینی اسنار نشان داده است که این کمپلکس پروتئینی در برابر غلظت های ۵ مولار گوانیدینوم کلراید و ۱۰ مولار اوره مقاوم بوده و دناتوره نمی شود. همچنین این کمپلکس پروتئینی قادر است در دمای حدود ۹۰ درجه سانتیگراد نیز ساختار هلیکسی خود را حفظ کند(۹). نتایج حاصل از این مطالعات در کنار مطالعات انجام شده بر روی پروتئین های اسنار در حالت مونومر نشان می دهد با وجود اینکه پروتئین های اسنار از جمله سیناپتوبروین و اسنپ ۲۵ در حالت مونومر ساختار هلیکسی خود را از دست می دهند اما کمپلکس حاصل از برهمکنش این پروتئین ها بسیار پایدار بوده به طوری که در برابر غلظت های بالای ترکیبات دناتوره کننده ای مثل اوره و گوانیدینوم کلراید ساختار هلیکسی خود را حفظ می کند. نتایج حاصل از مطالعه دینامیک مولکولی[۵] کمپلکس اسنار نشان داده است که پیوندهای هیدروژنی،

---

[۱] t-SNARE Binary Complex
[۲] SNARE Ternary Comlex
[۳] C-Terminal
[۴] N-Terminal
[۵] Molecular Dynamics

برهمکنش های الکترواستاتیک و پل های نمکی از مهمترین نیروهای پایدار کننده این کمپلکس پروتئینی می باشند(۱۰).

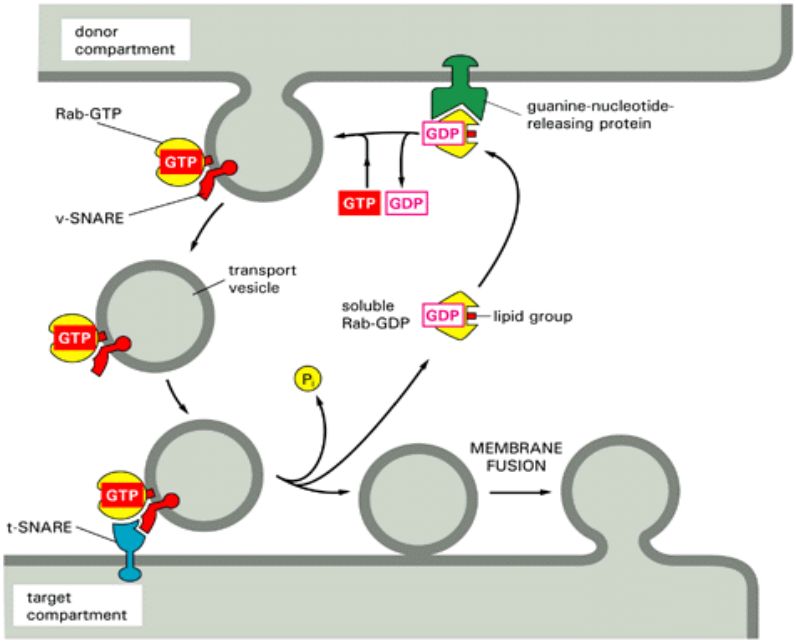
۱-۳ مکانیسم الحاق غشایی[۱]

الحاق شدن وزیکول ترشحی در غشاء پلاسمایی از دو مرحله اصلی تشکیل شده است. در مرحله نخست، وزیکول ترشحی غشاء پلاسمایی را شناسایی کرده و یک اتصال اولیه و سست با آن برقرار می کند. در این مرحله یک پروتئین GTPآز[۲] واقع در غشاء وزیکول به نام Rab نقش اصلی را ایفا می کند. پروتئین Rab در حالی که به یک مولکول GTP متصل است به گیرنده خود به نام Rab effector که در غشاء پلاسمایی مستقر است متصل می شود و در اثر این اتصال، وزیکول در کنار غشاء پلاسمایی قرار می گیرد. در مرحله دوم که در واقع مرحله ممزوج شدن غشاء وزیکول در غشاء پلاسمایی می باشد، بعد از قرار گرفتن وزیکول در کنار غشاء پلاسمایی توسط پروتئین Rab، پروتئین های اسنار موجود در هر دو غشاء از ناحیه انتهای آمینی با یکدیگر برهمکنش کرده و با تشکیل کمپلکس پایدار اسنار باعث نزدیکتر شدن وزیکول و برهمکنش قوی تر آن با غشاء پلاسمایی شده که در نتیجه آن دو لایه فسفولیپیدی وزیکول با دو لایه فسفولیپیدی غشاء پلاسمایی ممزوج شده و دو غشاء در یکدیگر الحاق می یابند(۱۱و۱۲)(شکل۱-۷). بعد از انجام این مرحله پروتئین های دیگری به نامNSF و آلفا-اسنپ با هیدرولیز یک مولکول ATP باعث باز شدن کمپلکس اسنار می گردند تا اسنارها در چرخه بعدی الحاق غشایی شرکت نمایند(شکل۱-۸).

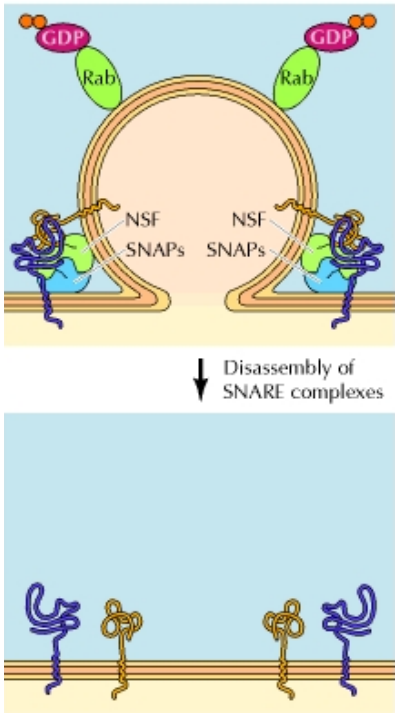
بر طبق مطالعات انجام شده، کمپلکس اسنار در هر دو نوع مکانیسم ترشح ایفای نقش می کند(٦). در مقایسه مکانیسم ترشح پیوسته با مکانیسم ترشح تنظیمی یا وابسته به کلسیم دو نکته حائز اهمیت می باشد. ۱- ترشح وابسته به کلسیم به جهت هماهنگ الحاق شدن وزیکول های ترشحی با غشاء پلاسمایی، تحت مکانیسم های کنترلی بیشتری قرار دارد. ۲- در ترشح وابسته به کلسیم، می بایست پیام حاصل از ورود یون کلسیم به درون سیتوپلاسم به عوامل القاکننده الحاق غشایی منتقل شود تا عمل ترشح انجام پذیرد.

---

[۱] Membrane Fusion
[۲] GTPase



شکل ۱–۷ نقش پروتئین Rab در الحاق غشایی



شکل ۱–۸ نقش پروتئین NSF در باز شدن کمپلکس اسنار

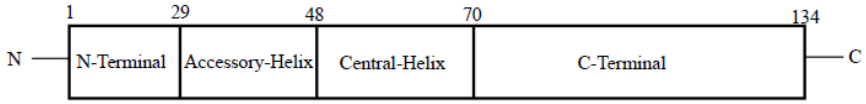
بنابراین نتیجه می شود که در ترشح وابسته به کلسیم علاوه بر کمپلکس پروتئینی اسنار، می بایست پروتئین های دیگری برای تنظیم و انتقال پیام حاصل از ورود یون کلسیم به عوامل الحاق غشایی در سلول های یوکاریوتی از جمله سلول هایی که ترشح وابسته به کلسیم در آن ها انجام می شود، بیان گردند. از جمله این پروتئین ها می توان به دو پروتئین به نام های سیناپتوتاگمین[۱] و کمپلکسین[۲] اشاره نمود.

۱-٤ کمپلکسین

خانواده پروتئینی کمپلکسین از چهار عضو به نام های کمپلکسین ۱، ۲، ۳ و ٤ تشکیل شده است. کمپلکسین ها، پروتئین های سیتوپلاسمی با وزن مولکولی کوچک و غنی از آمینواسیدهای باردار می باشند. آنالیزهای فیلوژنی نشان داده است که توالی آمینواسیدی چهار نوع کمپلکسین بیشتر از هشتاد درصد شباهت دارد اما با توجه به نتایج حاصل از بررسی بیان این پروتئین ها در بافت های مختلف، کمپلکسین ها دارای الگوی بیان متفاوت می باشند. به عنوان مثال کمپلکسین های ۱ و ۲ دارای هشتاد و شش درصد شباهت در توالی آمینواسیدی می باشند اما کمپلکسین ۱ در سیستم عصبی مرکزی و کمپلکسین ۲ در بافت های غیرعصبی بیان می شوند. همچنین کمپلکسین های ۳ و ٤ به طور عمده در سلول های رتینا واقع در چشم بیان می گردند. بیشتر اطلاعات موجود راجع به نقش و عملکرد پروتئین های کمپلکسین در مسیر ترشح وابسته به کلسیم از مطالعه برهمکنش کمپلکسین ۱ با کمپلکس اسنار سیستم عصبی پستانداران حاصل شده است(١٤).

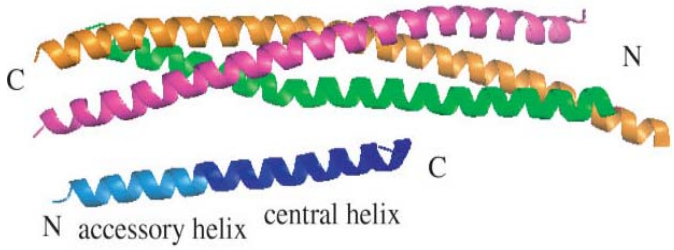
کمپلکسین ۱ از ۱۳٤ آمینواسید تشکیل شده است و از لحاظ ساختاری به چهار ناحیه تقسیم می شود که عبارتند از: ۱- ناحیه انتهای آمینی (آمینواسید ۱ تا ٢٦)، ۲- هلیکس اکسسوری[۳] (آمینواسید ۲۹ تا ٤٧)، ۳- هلیکس مرکزی[٤] (آمینواسید ٤٨ تا ۷۰) و ٤- ناحیه انتهای کربوکسیلی (آمینواسید ۷۱ تا ۱۳٤)(۱۵)(شکل ۱-۹).

[۱] Synapttagmin
[۲] Complexin
[۳] Accessory Helix
[٤] Central Helix



شکل ۱-۹ نواحی ساختاری پروتئین کمپلکسین

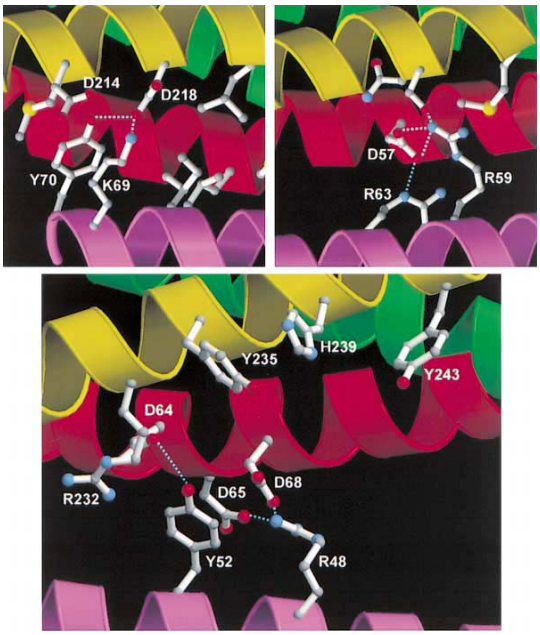
نتایج حاصل از مطالعات انجام شده نشان داده است که کمپلکسین از ناحیه هلیکس مرکزی به طور مستقیم به کمپلکس سه جزئی اسنار متصل می شود به نحوی که ناحیه انتهای آمینی کمپلکسین در مجاورت ناحیه انتهای کربوکسیلی کمپلکس اسنار قرار می گیرد. ساختار سه بعدی کمپلکس چهار جزئی کمپلکسین/اسنار برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ توسط Chen و همکارانش از طریق کریستالوگرافی اشعه X تعیین گردید(۱۶)(شکل ۱-۱۰).



شکل ۱-۱۰ ساختار کمپلس چهار جزئی کمپلکسین/اسنار

قرمز: سیناپتوبروین، سبز: سینتاکسین، صورتی: انتهای آمینی اسنپ۲۵، نارنجی: انتهای کربوکسیلی اسنپ۲۵، آبی: کمپلکسین

براساس ساختار به دست آمده، آمینواسیدهای اسیدی قرار گرفته بر روی شیاری[1] که توسط سیناپتوبروین و سینتاکسین ۱ تشکیل شده است با آمینواسیدهای موجود در هلیکس مرکزی کمپلکسین ۱ برهمکنش می کنند. دو ریشه تیروزین (Tyr۷۰ و Tyr۵۲) و سه ریشه آرژنین (Arg۶۳ و Arg۵۹ و Arg۴۸)از کمپلکسین نقش مهمی را در اتصال به کمپلکس اسنار ایفا می کنند. زنجیره جانبی تیروزین ۵۲ با زنجیره جانبی آسپارتیک اسید ٦٤ از سیناپتوبروین و زنجیره جانبی تیروزین ۷۰ با آسپارتیک اسید ۲۱۸ از سینتاکسین ۱ تشکیل پیوند هیدروژنی می دهند. زنجیره های جانبی آرژنین های ٤٨، ۵۹ و ٦٣ نیز به ترتیب با زنجیره های جانبی آسپارتیک اسیدهای ٦٨، ٦٥ و ۵۷ از سیناپتوبروین پیوند الکترواستاتیک تشکیل می دهند. همچنین یک پیوند الکترواستاتیک دیگر مابین ریشه آسپارتیک اسید ۲۱۸ از سینتاکسین ۱ و ریشه لیزین ٦٩ از کمپلکسین ۱ تشکیل می شود(١٦)(شکل۱-۱۱).



شکل ۱-۱۱ پیوندهای هیدروژنی و الکترواستاتیک در جایگاه اتصال کمپلکسین به کمپلکس اسنار (١٦)

[1] Groove

با وجود اینکه نحوه اتصال کملکسین ۱ با کمپلکس اسنار سیستم عصبی به طور دقیق مشخص شده است اما نقش و تاثیر کمپلکسین ۱ بر روی ترشح وابسته به کلسیم به طور دقیق معلوم نمی باشد. برخی از گزارشات حاکی از نقش تحریک کنندگی و برخی دیگر حاکی از نقش مهارکنندگی کمپلکسین ۱ می باشند. در ادامه به بررسی اجمالی برخی از مهمترین این گزارشات در رابطه با عملکرد پروتئین کمپلکسین ۱ در ترشح وابسته به کلسیم در سیستم عصبی مرکزی[۱] برای ترشح نوروترانسمیترها به فضای سیناپسی خواهیم پرداخت. Giraudo و همکارانش در سال ۲۰۰٦، طی مطالعه ای در شرایط آزمایشگاهی[۲] نشان دادند که کمپلکسین ۱ از الحاق شدن لیپوزوم ها در یکدیگر جلوگیری می کند (۱۷). اما پس از آن شخص دیگری به نام Mingshan Xue به کمک همکارانش طی آزمایشی با مقایسه موش هایی که ژن کدکننده کمپلکسین در سیستم عصبی مرکزی آن ها خاموش شده بود و موش های نوع وحشی نشان داد که کمپلکسین باعث تحریک ترشح وابسته به کلسیم برای آزاد سازی نوروترانسیمترها به فضای سیناپسی در سیستم عصبی مرکزی می شود. زیرا آن ها مشاهده نمودند که در موش های جهش یافته که ژن کمپلکسین به وسیله روش های مهندسی ژنتیک در سیستم عصبی مرکزی آن ها خاموش شده است، انتقال پیام عصبی و ترشح نوروترانسمیترها با اختلال رو به رو می شود(٦). همچنین برخی از نتایج موجود نشان می دهد که کمپلکسین قادر است هر دو نقش تحریک کنندگی و مهارکنندگی را ایفا نماید. به این صورت که نواحی متفاوت کمپلکسین تاثیرات متفاوتی را از خود بروز می دهند. نشان داده شده است که ناحیه انتهای آمینی کمپلکسین می تواند به عنوان تحریک کننده و هلیکس اکسسوری می تواند به عنوان مهارکننده عمل نمایند(۱۵). آنالیز نتایج حاصل از روش رزونانس پارامگنتیک الکترون (EPR) [۳] نیز توضیح دیگری برای عملکرد کمپلکسین پیشنهاد می کند. براساس این نتایج، پروتئین کمپلکسین علاوه بر اتصال به کمپلکس سه جزئی اسنار می تواند به صورت ضعیف تر به کمپلکس دو جزئی t-SNARE نیز متصل شود. مدل مبتنی بر این نتایج فرض را بر این می گذارد که اتصال محکم کمپلکسین با کمپلکس سه جزئی اسنار باعث تحریک و اتصال ضعیف تر آن به کمپلکس دو جزئی t-SNARE باعث مهار ترشح وابسته به کلسیم می شود(۱۸). در سال ۲۰۰۹ طی مطالعه ای که در آزمایشگاه Rothman به انجام رسید مکانسیم جدیدی برای نقش مهارکنندگی هلیکس اکسسوری پیشنهاد شده است مبنی بر اینکه این ناحیه از کمپلکسین به دلیل شباهت در توالی آمینواسیدی با ناحیه انتهای کربوکسیلی از سیناپتوبروین، می تواند در اتصال به کمپلکس دو جزئی t-SNARE با

[۱] Central Nervous System
[۲] In Vitro
[۳] Electron Paramagnetic Resonance

پروتئین سیناپتوبروین رقابت نماید که در اثر این رقابت کمپلکس سه جزئی اسنار به طور کامل تشکیل نشده و لذا الحاق وزیکول ترشحی با غشاء پلاسمایی برای انجام ترشح وابسته به کلسیم مهار می گردد(۱۹).

همانطور که مشاهده می شود نتایج حاصل از مطالعات و آزمایشات مبتنی بر روش های آزمایشگاهی و تجربی نتوانسته اند به طور دقیق مکانیسمی برای عملکرد و نقش نواحی مختلف پروتئین کمپلکسین ۱ طی آزادسازی نوروترانسمیترها به فضای سیناپسی از طریق ترشح وابسته به کلسیم بیان نمایند. بنابراین برای بررسی نقش کمپلکسین ۱ به تصویری واضح تر از تغییرات ساختاری و دینامیکی پروتئین ها و همچنین تغییرات برهمکنش هایی که در دامنه های زمانی بسیار کوتاه ایجاد می شوند از جمله پیوندهای هیدروژنی، الکترواستاتیک و واندروالسی نیاز می باشد. بنابراین در این تحقیق تلاش شده است با استفاده از روش های محاسباتی مبتنی بر شبیه سازی دینامیک مولکولی[۱] به مطالعه تغییرات ساختاری و دینامیکی کمپلکس اسنار در اثر بر همکنش با پروتئین کمپلکسین ۱ پرداخته شود.

[۱] Molecular Dynamics Simulation