

## بررسی تأثیر pH بر جهش در ژن P53 با استفاده از روش‌های محاسباتی و مدل سازی

نسترن اصغری مقدم<sup>۱</sup> مجید منجمی<sup>۲</sup> مجید صادقی زاده<sup>۳</sup> سید مهدی رضایت<sup>۴</sup> مریم تاج آبادی ابراهیمی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی دکترا، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۲. هیأت علمی گروه شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۳. هیأت علمی گروه ژنتیک، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
۴. هیأت علمی گروه داروسازی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران
۵. هیأت علمی گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** ژن سرکوبگر تومور P53 که به عنوان "محافظ ژنوم" شناخته می‌شود، در بیشتر از نیمی از تمام انواع سرطان‌های انسانی جهش یافته است. پروتئین P53 یک عامل رونویسی است که وظیفه آن کنترل رونویسی از ژن‌های مسئول آپتوز و توقف چرخه سلولی است. هم‌چنین پروتئین P53 می‌تواند رونویسی از ژن‌هایی که در پیشرفت چرخه سلولی نقش دارند جلوگیری نماید. بنابراین بدیهی است که از دست دادن فعالیت این ژن با فراوانی بالا در انواع مختلفی از سرطان‌ها مشاهده شده است. مشاهدات تجربی هم‌زمانی بین افزایش اسیدیته و نیز جهش در کدون‌های خاص ژن P53 (به طور خاص کدون ۲۴۸) را نشان داده‌اند. این امر می‌تواند تا حدود زیادی ناشی از پروتونه شدن این توالی سه نوکلئوتیدی باشد. جهش در این کدون خاص باعث جایگزینی اسید آمینه می‌گردد که نتیجه آن ایجاد پروتئینی با خاصیت انکوژنی می‌باشد. در این مطالعه تأثیر pH اسیدی را بر پایداری کدون ۲۴۸ در ژن P53 بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از روش مکانیک مولکولی برای پاسخ پرسش این مطالعه استفاده شد. در این مطالعه از نرم‌افزار HYPERCHEM استفاده شد. هم‌چنین به‌منظور دست یافتن به بهترین پیش‌بینی از میدان‌های نیروی AMBER، BIO<sup>+</sup>، MM<sup>+</sup> و OPLS استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج به‌دست‌آمده در میدان‌های نیروی مختلف همگی نشان دادند که در pH اسیدی سطح انرژی توالی مورد بررسی به میزان زیادی بالاتر از شرایط فیزیولوژیک می‌باشد.

**نتیجه‌گیری:** نتایج این مطالعه پاسخ قابل ملاحظه‌ای را درباره هدف مطرح شده ارائه نمود و نشان داد که pH اسیدی می‌تواند به لحاظ تئوریک ناپایداری مولکول را نسبت به pH فیزیولوژیک افزایش دهد.

**کلمات کلیدی:** ژن P53، pH اسیدی، جهش‌زایی

### مقدمه

نویسنده مسئول: نسترن اصغری مقدم

پست الکترونیکی: [Namoghadam@gmail.com](mailto:Namoghadam@gmail.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۴/۱۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۵/۲۷

پزشکی کرده است (۱). نتیجه جهش در P53 پیشرفت سرطان، متاستاز، مقاومت در برابر شیمی درمانی و اشعه درمانی است (۱۵).

برخلاف دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور (مانند APC.RB و BRCA1) که غیرفعال شدن با تغییر چهار چوب و جهش بی معنی همراه است، حدود ۸۰٪ جهش‌های P53 از نوع بد معنی هستند (۱۷).

نقاط داغ جهش‌های P53 در ناحیه متصل شونده به DNA است. کدون ۲۴۸ با توالی CGG به تنهایی ۹/۶٪ از جهش‌ها را به خود اختصاص می‌دهد (۱۷).

اهمیت بررسی الگوهای جهشی P53 در درک بهتر از عملکرد دومین‌های مختلف P53، درگیری آنها در کارکردهای سرکوبی سرطان و نیز طبیعت مواد اتیلوژیک به عنوان مارکرهای زیستی ایجادکننده محیطی است (۲۲).

درحالی‌که pH نرمال فیزیولوژی ۷/۴ می‌باشد، متوسط pH در محیط توموری عموماً در طیف ۶/۹-۶/۲ قرار دارد و در مراحل اولیه ترمیم زخم میزان آن در حدود ۵/۷-۶/۱ است (۹ و ۱۱). شواهد جمع‌آوری شده در ۶۰ سال گذشته نشان داده که pH تومورهای انسانی کمتر از بافت‌های نرمال است. به عنوان مثال Barrett's esophagus به میزان زیادی به رفلکس اسیدی معده وابسته است (۱۱) و حتی جهش در ژن P53 در مراحل اولیه ایجاد این بیماری مشاهده شده است (۲۶). از سویی دیگر مشاهده شده است که pH اسیدی باعث تغییر در بیان ژن‌هایی می‌شود که در پیشرفت سرطان و متاستاز نقش دارند (۳۳).

علی‌رغم اهمیت pH اسیدی در کارسینوژنز، مکانیسم مولکولی آن بسیار کم شناخته شده است. چندین مطالعه نشان داده‌اند که pH اسیدی می‌تواند آسیب به DNA را در سلول القا کند. به عنوان مثال در سلول‌های کشت شده هامستر چینی pH اسیدی ناهنجاری‌های کروموزومی شامل تبادل کروماتیدهای خواهری و شکست کروماتیدی را افزایش می‌دهد (۲۶). از سویی دیگر، pH اسیدی مانند مواد آسیب‌زننده به DNA بیان زیاد ژن P53 را تنظیم می‌کند و باعث القای آپتوز و وابسته به P53 در سلول‌های کارسینوما و آدنوما می‌شود. این مطالعات پیشنهاد می‌کنند که pH اسیدی می‌تواند آسیب به DNA را القا کند و ممکن است در فعالیت کارسینوژنز مشارکت داشته باشد (۲۶).

P53 مهم‌ترین حس‌گر استرس پستانداران است (۲۹). به P53 لقب محافظ ژنوم<sup>۱</sup> را داده‌اند (۳). ژن P53 بر بازوی کوتاه کروموزوم ۱۷ (17p13.1) قرار گرفته است (۲۲). این ژن دارای ۱۱ اگزون و به طول ۲۰ کیلو باز می‌باشد (۱۷). در تمام انواع سلول‌ها و بافت‌ها این ژن رونویسی می‌گردد اما سطوح بیانی mRNA آن در بافت‌ها و حالات مختلف بیماری و سلامت متفاوت است (۶). یکی از نتایج فعالیت آن متوقف کردن سلول در G1 در پاسخ به مواد آسیب‌زننده به DNA است که به سلول امکان تعمیر آسیب وارده و ادامه حیات را می‌دهد و نتیجه دیگر، حذف کلونال از طریق آپتوز و یا توقف دائمی تکثیر در G2 در پاسخ به آسیب‌های DNA وارده و عفونت‌های ویروسی می‌باشد که باعث از بین رفتن سلول‌های آسیب دیده می‌گردد. این کار را از طریق فعال کردن یا مهار کردن رونویسی برخی از ژن‌ها انجام می‌دهد (۱۰ و ۳۰). P53 مکانیسم انتقال سیگنال یکپارچه و سریعی را برای حفظ پاسخ به استرس آسیب DNA حاد یا مزمن فراهم می‌کند (۱۶). سیگنال‌هایی نظیر هایپوکسی، فعالیت انکوژنی (۲۴) و استرس‌هایی شامل انواع آسیب‌های DNA در نتیجه تأثیر مواد سرطان‌زای محیطی و جهش‌زای درونی مانند نیتریک اکساید (۲۸)، پروتئولیز یونیزان و آسیب‌های اکسیداتیو (۸) و هم‌چنین سیگنال رشد نامناسب یا فعالیت انکوژنی و استرس همانندسازی (۱۵) باعث فعالیت P53 می‌شوند.

جهش در P53 منجر به از دست‌دادن عملکرد پروتئین وحشی می‌شود (۲۱) که خود باعث از دست دادن کنترل بر تمام شبکه کنترل شده توسط آن یا تغییرات در طیف ژن‌های کنترل شده با P53 می‌گردد (۲۷ و ۲۴) و نیز ظرفیت سلول برای پاسخ مناسب کاهش می‌یابد (۲۱). از سویی دیگر، مکانیسم‌های سلولی (به ویژه آپتوز) که معمولاً سلول‌های دارای DNA آسیب دیده را حذف می‌کنند، در سلول‌های توموری مهار می‌شوند که منجر به باقی ماندن سلول‌های موتانت و رشد زیاد زادگان جهش‌یافته‌شان می‌گردد (۵). یکی دیگر از نقش‌های موتاسیون در ژن P53 افزایش بازآرایی ژنومی یا ناپایداری ژنومی است (۱۵).

جهش یا حذف در ژن P53 در تقریباً ۵۰ درصد سرطان‌های انسانی دیده می‌شود که کارکرد سرکوبگر توموری آن را از بین می‌برند (۷). به سخی دیگر، غیرفعال شدن آن متداول‌ترین رویداد تک ژنی است که در سرطان‌های انسانی دیده می‌شود که این موضوع P53 را کانون توجه تحقیقات بالینی و علوم پایه

<sup>1</sup> guardian of genome

سیستم‌های مولکولی هستند. سپس محاسبات مکانیک مولکولی با روش محاسباتی Monte Carlo انجام شد (۲۰). برای محاسبات از سه پارامتر انرژی مهم یعنی انرژی جنبشی، انرژی پتانسیل و انرژی کل در ۴ دمای شبیه سازی متفاوت (308 K, 310 K, 312 K, 314 K) با ۱۰۰ مرحله زمانی استفاده شد.

## نتایج

شبیه سازی کدون CGG در هر ۴ میدان نیروی ذکر شده در ۴ دمای مختلف (308 K, 310 K, 312 K, 314K) و تحت تأثیر دو pH فیزیولوژیک (۷/۴) و نیز اسیدی (۶/۸) انجام شد. برطبق نتایج مندرج در جدول ۱ انرژی جنبشی توالی سه نوکلئوتیدی CGG با افزایش دما به طور پیوسته افزایش می‌یافت.

به منظور افزایش دقت آنالیز و تفسیر نتایج، ارقام حاصل از محاسبات انرژی پتانسیل، جنبشی و کل در دو pH مختلف، در دماهای متفاوت و نیز در میدان‌های نیروی مختلف با یکدیگر مقایسه شدند (اطلاعات به‌دست آمده در جدول‌های ۱، ۲ و ۳ آمده است). از نقطه نظر آماری داده‌های حاصل از پارامترهای ترمودینامیکی (انرژی جنبشی، انرژی پتانسیل و انرژی کل) در شرایط دمایی مختلف و تحت تأثیر pH های مختلف آنالیز شدند. بررسی مؤثر بودن میزان pH و دما بر روی انرژی پتانسیل با مطالعه مقدار P- value انجام شد و با توجه به نتایج آن مشخص شد که عامل pH بر روی انرژی پتانسیل و کل تأثیرگذار است. چون سطح معنی داری کمتر از ۰,۰۵ بود فرض صفر یعنی تأثیر نداشتن pH بر روی این دو انرژی رد گردید.

شناسایی خصوصیات فیزیکی DNA راه را برای مطالعه خصوصیات مهم ژنتیکی نظیر همانندسازی نیمه حفاظتی گشود (۱۸). مولکول DNA پیوسته تحت تأثیر طیف وسیعی از مواد شیمیایی و فیزیکی است که می‌توانند به ساختار آن صدمه بزند (۲۵). سخت بودن اندازه‌گیری pH در هسته می‌تواند علتی باشد برای انجام ندادن آزمایش‌های مولکولی و ژنتیکی بیشتر روی آنها از این رو می‌توان از شبیه‌سازی و نیز شیمی محاسباتی برای مطالعه استفاده نمود. با استفاده از روش‌های مورد نظر در این بررسی می‌توانیم اثر pH را در ایجاد جهش‌های بد معنی مورد ارزیابی قرار دهیم. در این مطالعه ما در تلاش هستیم تا مسیر جدید کارسینوژنی را بررسی کنیم که در نتیجه تغییر pH محیط ایجاد می‌شود که تغییر متداولی در سلول‌های سرطانی است. هدف مطالعه این بررسی میزان پایداری کدون ۲۴۸ در شرایط اسیدی و فیزیولوژیک بود.

## مواد و روش‌ها

در ابتدا ساختار تری نوکلئوتیدی CGG در دو رشته مکمل و موازی DNA با استفاده از نرم‌افزار HYPERCHEM رسم شد. سپس به منظور قرار دادن توالی کدون در بهترین حالت با کمک دستور Geometry Optimization نرم‌افزار بهینه حالت انرژی به‌دست آمد با کمک نرم‌افزار گوسین به‌دست آمد. در ادامه برای تعیین تأثیر pH بر روی این کدون، مکعب periodic به ابعاد ۳۰ آنگستروم رسم شد و با توجه به pH در آن به حالت متناظر یونهای  $H^+$  و  $OH^-$  برای ایجاد به ترتیب pH ۶/۸ و ۷/۴ قرار داده شد. در ادامه شبیه‌سازی با میدان‌های نیرو  $MM^+$ , AMBER,  $BIO^+$  و OPLS که به لحاظ محاسباتی روش‌های در دسترس برای یافتن پایداری و دینامیک

جدول ۱: مقدار انرژی کینتیک محاسبه شده در میدان‌های نیروی  $BIO^+$ , AMBER,  $MM^+$  و OPLS در دماهای مختلف و در pH اسیدی و فیزیولوژیک

Kinetic Energy (K Cal/mol)								
pH condition	6.8				7.4			
	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K
AMBER	208.4047	209.758	211.1113	212.4646	173.5176	174.6443	175.7711	176.8978
$BIO^+$	208.4047	209.758	211.1113	212.4646	173.5176	174.6443	175.7711	176.8978
$MM^+$	208.4047	209.758	211.1113	212.4646	173.5176	174.6443	175.7711	176.8978
OPLS	208.4047	209.758	211.1113	212.4646	173.5176	174.6443	175.7711	176.8978

جدول ۲: مقدار انرژی پتانسیل محاسبه شده در میدان‌های نیروی AMBER<sup>+</sup>، BIO<sup>+</sup>، MM<sup>+</sup> و OPLS در دماهای مختلف و در pH اسیدی و فیزیولوژیک

Potential Energy (K Cal/mol)																
Method	AMBER/ Monte Carlo								BIO <sup>+</sup> / Monte Carlo							
	6.8				7.4				6.8				7.4			
pH condition	6.8				7.4				6.8				7.4			
time (PS)	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K
10	2679.07	2722.68	2866.31	2757.24	689.78	703.76	696.50	688.02	2731.27	3022.49	2921.48	2958.93	965.80	973.77	1007.63	984.01
20	1828.45	1838.48	1871.00	1822.28	600.96	616.35	615.80	586.75	1876.07	2030.35	1935.14	1836.34	824.03	842.45	863.55	837.32
30	1491.39	1530.37	1517.42	1490.32	549.47	574.35	554.41	540.91	1583.21	1642.47	1557.36	1549.62	760.05	796.68	782.09	774.94
40	1312.39	1334.37	1342.15	1350.75		536.39	515.92	513.02	1421.86	1437.68	1368.78	1396.56	737.84	761.52	741.22	742.15
50	1219.50	1249.05	1239.88	1260.88	494.41	517.48	500.74	507.53	1331.21	1323.77	1264.51	1283.75	703.25	739.17	710.63	718.10
60	1154.66	1169.01	1181.70	1165.95	492.60	494.05	483.01	493.29	1261.54	1235.22	1192.88	1231.87	696.30	715.77	694.24	697.47
70	1101.11	1114.32	1128.91	1112.40	488.58	485.92	470.99	472.30	1207.84	1201.21	1149.31	1161.22	682.15	700.28	694.59	690.69
80	1066.59	1058.19	1092.91	1074.64	476.51	479.32	451.69	471.13	1158.06	1162.94	1098.59	1119.28	661.57	683.13	688.85	673.76
90	1032.37	1022.87	1033.79	1037.50	465.47	473.00	443.77	465.99	1109.91	1102.07	1080.35	1101.36	652.69	679.76	665.49	663.47
100	1005.04	996.55	1013.49	1020.11	464.78	470.10	435.40	452.69	1081.98	1081.96	1044.45	1069.42	641.24	669.21	659.05	665.35
Method	MM <sup>+</sup> / Monte Carlo								OPLS/ Monte Carlo							
	6.8				7.4				6.8				7.4			
pH condition	6.8				7.4				6.8				7.4			
time (PS)	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K
10	2660.62	2619.00	2626.52	2556.53	992.55	949.57	984.55	952.23	3223.29	3746.70	3731.38	3781.62	1437.03	1457.57	1478.06	1434.54
20	1667.60	1597.03	1593.34	1567.78	652.10	651.94	652.46	637.85	2577.62	2796.05	2800.68	2820.26	1306.20	1318.35	1317.53	1299.73
30	1191.72	1218.25	1140.03	1180.08	567.48	568.64	567.23	554.14	2375.46	2511.32	2480.82	2489.16	1261.05	1268.19	1265.67	1248.38
40	970.98	1033.94	958.09	975.46	526.08	540.32	534.89	515.15	2234.04	2369.82	2310.44	2325.25	1230.71	1234.98	1232.73	1232.75
50	872.38	925.17	859.72	869.40	497.55	512.14	508.65	503.40	2149.65	2278.77	2213.46	2228.83	1208.01	1207.33	1188.46	1194.40
60	798.79	842.69	796.05	785.72	497.38	491.44	482.75	486.63	2064.48	2200.83	2160.52	2158.90	1180.22	1187.67	1171.11	1170.18
70	745.17	796.70	744.86	709.34	485.85	481.63	482.66	467.82	2012.73	2145.75	2129.99	2122.54	1148.47	1163.81	1153.72	1153.87
80	716.31	741.26	692.52	656.29	473.87	467.21	470.85	459.38	1961.89	2085.64	2072.91	2074.20	1138.40	1144.85	1127.78	1139.18
90	682.80	684.57	665.59	627.35	473.27	461.57	476.31	464.76	1928.56	2047.56	2022.73	2032.42	1125.85	1138.70	1118.95	1131.58
100	650.62	664.19	633.18	605.79	469.60	460.17	466.61	457.65	1899.62	2000.91	1988.67	1982.64	1118.81	1126.07	1101.04	1115.17

جدول ۳: مقدار انرژی کل محاسبه شده در میدان‌های نیروی AMBER<sup>+</sup>، BIO<sup>+</sup>، MM<sup>+</sup> و OPLS در دماهای مختلف و در pH اسیدی و فیزیولوژیک

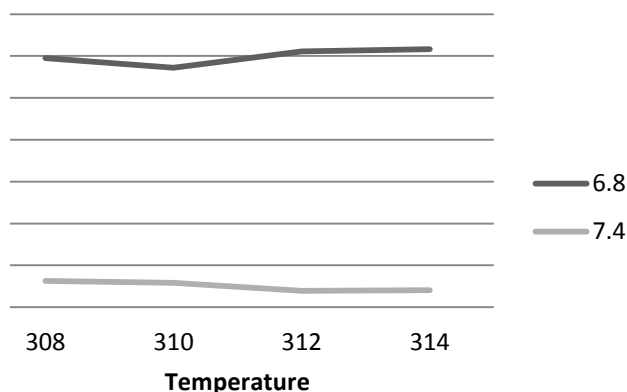
		Total Energy (K Cal/mol)								Total Energy (K Cal/mol)							
Method		AMBER/ Monte Carlo								BIO <sup>+</sup> / Monte Carlo							
pH condition		6.8				7.4				6.8				7.4			
time (PS)		308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K
10		2887.47	2932.44	3077.42	2969.70	863.29	878.40	872.27	864.92	2939.67	3232.25	3132.59	3171.39	1139.32	1148.41	1183.40	1160.90
20		2036.85	2048.24	2082.11	2034.75	774.48	790.99	791.57	763.64	2084.47	2240.11	2146.25	2048.81	997.55	1017.09	1039.32	1014.22
30		1699.80	1740.13	1728.53	1702.79	722.99	749.00	730.18	717.81	1791.62	1852.23	1768.47	1762.08	933.57	971.32	957.86	951.84
40		1520.80	1544.13	1553.26	1563.21	700.20	711.04	691.69	689.92	1630.26	1647.44	1579.89	1609.03	911.35	936.17	916.99	919.05
50		1427.91	1458.81	1450.99	1473.35	667.92	692.13	676.51	684.43	1539.61	1533.53	1475.62	1496.21	876.76	913.81	886.40	895.00
60		1363.07	1378.77	1392.81	1378.41	666.12	668.70	658.78	670.19	1469.94	1444.97	1404.00	1444.34	869.82	890.42	870.02	874.37
70		1309.51	1324.08	1340.02	1324.87	662.10	660.56	646.76	649.20	1416.25	1410.97	1360.42	1373.68	855.69	874.93	870.36	867.59
80		1275.00	1267.95	1304.02	1287.10	650.02	653.97	627.46	648.03	1366.46	1372.70	1309.70	1331.74	835.09	857.78	864.62	850.66
90		1240.77	1232.63	1244.90	1249.97	638.99	647.64	619.54	642.89	1318.32	1311.83	1291.46	1313.82	826.21	854.40	841.26	840.37
100		1213.45	1206.31	1224.61	1232.58	638.30	644.75	611.17	629.58	1290.39	1291.71	1255.57	1281.88	814.76	843.86	834.82	842.25
Method		MM <sup>+</sup> / Monte Carlo								OPLS/ Monte Carlo							
pH condition		6.8				7.4				6.8				7.4			
time (PS)		308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K	308 K	310 K	312 K	314 K
10		2869.03	2828.76	2837.63	2768.99	1166.06	1124.21	1160.32	1129.13	3431.70	3956.46	3942.49	3994.09	1610.54	1632.21	1653.83	1611.44
20		1876.00	1806.79	1804.45	1780.25	825.62	826.58	828.23	814.75	2786.02	3005.81	3011.79	3032.72	1479.72	1493.00	1493.30	1476.63
30		1400.13	1428.01	1351.14	1392.55	741.00	743.28	743.00	731.04	2583.86	2721.08	2691.93	2701.63	1434.57	1442.83	1441.44	1425.28
40		1179.39	1243.70	1169.20	1187.93	699.59	714.96	710.66	692.05	2442.44	2579.58	2521.55	2537.72	1404.23	1409.62	1408.50	1409.64
50		1080.78	1134.93	1070.83	1081.86	671.07	686.79	684.42	680.29	2358.06	2488.53	2424.57	2441.30	1381.52	1381.97	1364.23	1371.29
60		1007.20	1052.45	1007.16	998.18	670.90	666.08	658.52	663.53	2272.89	2410.59	2371.63	2371.37	1353.74	1362.32	1346.88	1347.07
70		953.57	1006.46	955.97	921.81	659.37	656.27	658.43	644.72	2221.14	2355.51	2341.11	2335.00	1321.99	1338.46	1329.49	1330.77
80		924.71	951.02	903.63	868.76	647.38	641.85	646.62	636.27	2170.29	2295.40	2284.02	2286.66	1311.92	1319.50	1303.56	1316.08
90		891.20	894.33	876.70	839.81	646.79	636.21	652.08	641.66	2136.96	2257.31	2233.84	2244.88	1299.36	1313.34	1294.72	1308.47
100		859.02	873.95	844.29	818.25	643.11	634.81	642.38	634.55	2108.02	2210.67	2199.79	2195.10	1292.32	1300.72	1276.81	1292.07

مکانیک مولکولی میان کنش‌ها را در سطح اتمی بررسی می‌کند. اتم‌ها توسط میدان‌ها در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند. عملکرد سیستم‌های بیولوژیکی از میان کنش پیوندهای بین اتمی و حرکت الکترون‌ها حاصل می‌شود. در این میان هدف اصلی یافتن کمترین سطح انرژی است که در آن مولکول در بهترین حالت به لحاظ پایداری است. در این مطالعه میدان‌های نیروی  $MM^+$ ، AMBER،  $BIO^+$  و OPLS برای انجام محاسبات انتخاب شدند (۳۲ و ۱۴). در نرم‌افزار HYPERCHEM از عملکردهای لرزشی (shaking)، چرخشی (rotating)، کششی (stretching) برای محاسبه مقدار انرژی پتانسیل کل استفاده می‌گردد. انرژی پتانسیل کل مجموع میان کنش‌های درگیر مطرح شده براساس میدان‌های نیرو است. بنابراین، میدان‌های نیرو مجموعه‌ای از پارامترهای انرژی عملکردی است که اجرا را ارزیابی می‌کند و نیز انرژی پتانسیل مولکول را در جایگاه‌های مختلف اتم‌ها و پیوندهای اصلی را محاسبه می‌کنند (۵).  $MM^+$  پارامتر مناسبی برای به‌دست‌آوردن پتانسیل کششی پیوند، دوقطبی‌های پیوند، دو وجهی، خمشی زاویه‌ای و واندروالسی است (۲). در میدان نیروی AMBER پارامترهای لازم برای اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها وجود دارد. در این میدان نیرو می‌توان پتانسیل‌هایی نظیر کششی پیوند، خمشی زاویه‌ای، دووجهی، واندروالسی، الکترواستاتیک و پیوندهای هیدروژنی را در انرژی پتانسیل کل به‌دست آورد (۳۱ و ۲۳). مشابه نیروی میدان OPLS، AMBER برای محاسبات بر روی پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک طراحی شده است. پتانسیل‌های پیوندی در این میدان نیرو مشابه میدان نیروی AMBER است و پتانسیل‌های غیر پیوندی آن عبارتند از واندروالسی و الکترواستاتیک. میدان  $BIO^+$  یک جزء گسترش یافته از میدان نیروی CHARMM است. مشابه AMBER و OPLS این میدان نیرو برای مطالعه ماکرومولکول‌ها طراحی شده است (۱۴).

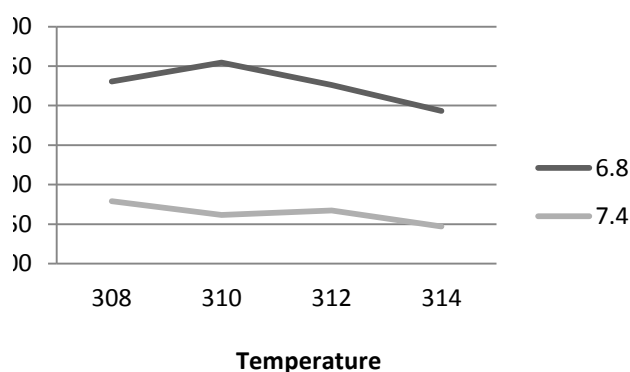
انرژی پتانسیل کل برای کدون CGG از رابطه کلی زیر به دست آمده است. در واقع در پیش فرض نرم‌افزار از این رابطه برای محاسبه انرژی پتانسیل استفاده می‌شود. به عبارت دیگر، برای تعریف انرژی پتانسیل محاسبه شده می‌توان از رابطه زیر استفاده کرد.

اعداد به‌دست‌آمده در جدول‌های فوق همگی نشان دهنده افزایش سطح انرژی در pH اسیدی است.

نمودار ۱ و ۲ نیز حداقل انرژی پتانسیل در time step صدم را در دماهای ذکر شده در دو میدان نیروی AMBER و  $MM^+$  است. نمودارها نیز سطح انرژی پایین‌تر را در pH فیزیولوژیک نشان می‌دهند.



نمودار ۱: مقایسه حداقل انرژی پتانسیل به‌دست آمده در دماهای مختلف در دو pH 7.4 و 6.8 با استفاده از میدان نیروی AMBER



نمودار ۲: مقایسه حداقل انرژی پتانسیل به‌دست آمده در دماهای مختلف در دو pH 7.4 و 6.8 با استفاده از میدان نیروی  $MM^+$

## بحث

جهش در ژن P53 در بیش از نیمی از سرطان‌ها مشاهده می‌شود. بررسی تأثیر عوامل محیطی نظیر pH به صورت تئوری می‌تواند در درک ما نسبت به علت ایجاد موتاسیون و نیز مکانیسم‌های مولکولی آن کمک نماید. در مطالعه حاضر محاسبات در فضای مدل‌سازی پیچیده و در عین حال مناسب محیط نرم‌افزاری انجام شد که به خاطر کیفیت و انعطاف‌پذیری‌اش شناخته شده است (۱۳ و ۱۹). این نرم‌افزار رویکرد

بیشتر است. انرژی پتانسیل در دو pH اسیدی و فیزیولوژیک در دمای ۳۱۰ کلوین به ترتیب ۹۷۲/۰۷۱ و ۴۵۸/۳۴ بود. نمودار ۲ همانند نمودار ۱ بود با این تفاوت که در آن محاسبات انجام شده برای میدان نیروی  $MM^+$  محاسبه شد. محاسبات این میدان یکی از دقیق‌ترین محاسبات مکانیک مولکولی محسوب می‌شود. در این میدان نیرو اختلاف سطح انرژی در دو pH مختلف به‌طور کلی حدود ۲۵٪ بود و این توالی سه نوکلئوتیدی DNA در pH فیزیولوژیک پایداری بیشتری دارد. نکته جالب در دمای ۳۱۰ کلوین دیده شد که در آن در pH فیزیولوژیک بیشترین پایداری دیده می‌شود ولی در pH اسیدی، بالاترین سطح انرژی را دارد که باعث ناپایدارتر شدن آن در این دما نسبت به دماهای دیگر می‌گردد. آنالیز داده‌های جدول ۳ که مربوط به انرژی کل است، نیز نشان‌دهنده افزایش انرژی کل تحت تأثیر pH اسیدی در دماهای مختلف بود.

این مطالعه به‌منظور تعیین نقش ترمودینامیکی pH اسیدی به لحاظ تئوری در ایجاد جهش در کدون شماره ۲۴۸ ژن P53 انجام شد. مطالعات تجربی نسبتاً زیادی درباره تأثیر pH اسیدی در ایجاد تغییرات انکولوژیکی در سلول‌ها انجام شده است (۱۱، ۹، ۲۶، ۱۲). اما تاکنون به لحاظ تئوری ماهیت تأثیر pH اسیدی مورد بررسی قرار نگرفته است. در این بررسی، آنالیز انرژی‌های جنبشی، پتانسیل و کل در ۴ میدان انرژی مکانیک مولکولی انجام گرفت. افزایش سطح انرژی در هر سه پارامتر بالا دیده شد. افزایش سطح انرژی منجر به ناپایداری بیشتر مولکول می‌شود. با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت که شرایط ناپایدار کننده اسیدی در محیط سلولی مستقیماً بر ساختار تری نوکلئوتید مزبور تأثیرگذار است و نتیجه آن کاهش پایداری می‌باشد. یکی از نتایج این ناپایداری می‌تواند ایجاد تغییراتی در این توالی ساختار نوکلئوتیدی باشد که به لحاظ سطح انرژی پایدارتر باشد. یکی از این تغییرات می‌تواند جایگزینی نوکلئوتیدی باشد. اگر این تغییر در سیستم بیولوژیکی شناسایی و ترمیم نشود، می‌تواند باعث ایجاد تغییر یا جهش در ماده ژنتیکی (DNA) گردد. با توجه به اینکه تغییرات ژنتیکی غالباً نقش منفی در سلول دارند، این اتفاق خود می‌تواند به عنوان مقدمه‌ای برای ایجاد سرطان باشد و اگر این تغییر در ژنی مانند P53 رخ دهد، نتیجه‌ی آن می‌تواند منجر به ایجاد سرطانی با پیش‌آگهی بسیار بد باشد. با ادامه تحقیقات درباره تأثیر pH در ایجاد جهش به صورت تجربی می‌توان بیشتر به نقش این عامل محیطی پی برد. هم‌چنین با استفاده از این یافته‌ها می‌توان

مقدار انرژی جنبشی و کل نیز در این تحقیق محاسبه شد. برای ارزیابی انرژی بهینه توالی CGG انرژی کل را با جمع مقدار انرژی پتانسیل و جنبشی به‌دست می‌آورند که به نام انرژی هامیلتونین شناخته می‌شود (۴) و از رابطه زیر به‌دست می‌آید:

$$E_{total} = \sum$$

ارقام به‌دست‌آمده برای انرژی جنبشی در time steps مختلف و نیز در میدان نیروهای مختلف (جدول ۱) یک مقدار ثابت بود و در دمای K ۳۱۴ به حداکثر مقدار خود یعنی ۱۷۶/۸۹۷۸ و ۲۱۲/۴۶۴۶ به ترتیب برای pH های ۷/۴ و ۶/۸ رسید. در شرایط اسیدی میزان انرژی جنبشی از مقدار آن در pH فیزیولوژیک (۷/۴) به میزان حدوداً ۲۵٪ بیشتر بود. این ویژگی باعث افزایش جنبش مولکول و در نتیجه ناپایداری بیشتر ساختار آن می‌گردد.

برای داشتن بهترین عملکرد در سیستم‌های زیستی می‌بایست سطوح انرژی در کمترین سطح ممکن باشد. با مقایسه داده‌های مربوط به pH های مختلف در جدول ۲ می‌توان استنباط کرد که در pH اسیدی مقدار انرژی پتانسیل بیشتر از pH فیزیولوژیک است که این افزایش را می‌توان در میدان‌های نیروی مختلف مشاهده کرد. در نمودار ۱ داده‌های حداقل انرژی پتانسیل حاصل از محاسبات در میدان نیروی AMBER برای هر دو pH استفاده شده‌اند. در این نمودار می‌توان افزایش انرژی پتانسیل را در pH اسیدی مشاهده نمود و می‌توان نتیجه گرفت که پایداری مولکول مورد نظر در pH فیزیولوژیک

کمک بزرگی در حفظ سلامتی مردم در رابطه با کنترل بیشتر  
روی این گونه تغییرات در مواد غذایی و عواملی که مردم به-  
طور روزانه آن‌ها را مصرف می‌کنند، داشت.

در خاتمه لازم می‌دانیم از کمک و راهنمایی آقایان دکتر  
چگینی و دکتر رسول‌زاده سپاسگزاری نماییم.

## سپاسگزاری

## منابع

1. Bourdon JC, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev* 15;19(18):2122-37.
2. Case D.A., Cheatham T.E. III, Darden T, Gohlke H, Luo R., Merz K.M. Jr, Onufriev A., Simmerling C, Wang B, and Woods R. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.*, 26, 1668–1688.
3. Chanda S, Dasgupta UB, Guhamazumder D, Gupta M, Chaudhuri U, Lahiri S, Das S, Ghosh N, Chatterjee D (2006). DNA hypermethylation of promoter of gene p53 and p16 in arsenic-exposed people with and without malignancy. *Toxicol Sci*; 89(2):431-7.
4. Deleeuw S.W, Perram J.W, and Petersen H. G (1990). Hamilton equations for constrained dynamic systems. *J. Stat. Phys.*, 61:1203.1222.
5. Foloppe N, Mackerell A.D (2000). All-atom empirical force field for nucleic acids: I. Parameter optimization based on small molecule and condensed phase macromolecular target data. *J. Comput. Chem.* 21:86-104.
6. Hahn WC, Weinberg RA (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*; 347(20):1593-603.
7. Hait WN, Yang JM (2006). The individualization of cancer therapy: the unexpected role of p53. *Trans Am Clin Climatol Assoc*; 117:85-101; discussion 101.
8. Halliwell B (2007). Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochem J*; 401(1):1-11.
9. <http://www.iarc.fr/p53>
10. Hurd C, Dinda S, Khattree N, Moudgil VK (1999). Estrogen-dependent and independent activation of the P1 promoter of the p53 gene in transiently transfected breast cancer cells. *Oncogene*; 18(4):1067-72.
11. Keswani RN, Noffsinger A, Waxman I, Bissonnette M (2006). Clinical use of p53 in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15(7):1243-9.
12. Lei X., Dai F., Rakesh K.J (2002). Acidic Extracellular pH Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Glioblastoma Cells via ERK1/2 MAPK Signaling Pathway. *Jbc*, 227(13): 11368–11374.
13. Lewars E (2003). Introduction to the theory and application of molecular and quantum mechanics, J. Computational chemistry, Ontario Canada
14. Mackerell A. D ,Jr (2004). Empirical force fields for biological macromolecules: Overview and issues. *J. Comput. Chem*, 25, 1584–1604.
15. Marusyk A, Wheeler LJ, Mathews CK, DeGregori J (2007). p53 mediates senescence-like arrest induced by chronic replicational stress. *Mol Cell Biol*; 27(15):5336-51.
16. Menendez D, Shatz M, Azzam K, Garantziotis S, Fessler MB, Resnick MA (2011). The Toll-like receptor gene family is integrated into human DNA damage and p53 networks. *PLoS Genet*; 7(3):e1001360.
17. Mogi A, Kuwano H (2011). TP53 mutations in nonsmall cell lung cancer. *J Biomed Biotechnol*; 2011:583929, 9 pages.
18. Monteiro Carlos ETB (2008). Acidic environment evoked by chronic stress: A novel mechanism to explain atherogenesis. Available from Infarct Combat Project at <http://www.infarctcombat.org/AcidityTheory.pdf>
19. Nam K, Gao J, York D. M (2008). Quantum mechanical / molecular mechanical simulation study of the mechanism of hairpin ribozyme catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* ,130, 4680-4691.
20. Norberg J, Nilsson L (2002). "Molecular dynamics applied to nucleic acids." *AcChem Res* 35(6): 465-72.
21. Oren M, Rotter V (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 2(2):a001107.
22. Peltonen JK, Helppi HM, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T, Vähäkangas KH (2010). p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. *Head Neck Oncol*; 2:36.



23. Perez A. , Marchan I. , Svozil D. , Sponer J. , Cheatham T. M. , Loughton C. A. , Orozco M. , ( 2007 ), Refinement of the AMBER force field for nucleic acids: Improving the description of alpha / gamma conformers, *J. Biophys.* , 92, 3817-3829
24. Perry ME (2010). The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 2(1):a000968.
25. Pinchuk A (2004). Optical constants and dielectric function of DNA's nucleotides in UV range. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer*; 85: 211-215.
26. Prescott DM, Charles HC, [Poulson JM](#), [Page RL](#), [Thrall DE](#), [Vujaskovic Z](#), [Dewhirst MW](#)(2000). The relationship between intracellular and extracellular pH in spontaneous canine tumors. *Clin Cancer Res*; 6(6):2501-5.
27. [Resnick MA](#), [Tomso D](#), [Inga A](#), [Menendez D](#), [Bell D](#) (2005). Functional diversity in the gene network controlled by the master regulator p53 in humans. *Cell Cycle*; 4(8):1026-9.
28. [Robles AI](#), [Harris CC](#) (2010). Clinical outcomes and correlates of TP53 mutations and cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*; 2(3):a001016.
29. [Serrano M](#) (2007). Cancer regression by senescence. *N Engl J Med*; 356(19):1996-7.
30. [Shukla S](#), [Gupta S](#) (2008). Apigenin-induced prostate cancer cell death is initiated by reactive oxygen species and p53 activation. *Free Radic Biol Med*; 44(10):1833-45.
31. Wang J. , Wolf R. M. , Caldwell J. W. , Kollman P. A. , Case D. A. , ( 2003 ), Development And testing of a general amber force field, *J. Comput. Chem.* , 25, 1157-1174
32. Weiner S.J, Kollman P.A, et al (1984). "A New Force-field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins." *Journal of the American Chemical Society* 106(3): 765-784.
33. Xu L, Fukumura D, Jain R.K. (2011). Acidic Extracellular pH Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Human Glioblastoma Cells via ERK1/2MAPK Signaling Pathway: MECHANISM OF LOW pH-INDUCED VEGF. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:11368-11374. doi: 10.1074/jbc.M108347200