

بررسی تأثیر جهش‌های نقطه‌ای ژن آنزیم آسپل کوآ- دهیدروژناز زنجیر کوتاه (SCAD) بر ساختار آنزیم با مدل‌سازی

آزاده ابراهیم حبیبی^{۱*}، فرزانه عباسی^۱، باقر لاریجانی^۱

چکیده

مقدمه: یکی از اختلالات مربوط به اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری، کمبود SCAD (اسپل کوآ- دهیدروژناز زنجیر کوتاه) است، که ساختار آنزیم آن در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌ها: جهش‌های منتخب با استفاده از نرم‌افزار MOE در ساختار آنزیم (2VIG.pdb) وارد شده و برهم کنش‌های اسید آمینه طبیعی و جهش یافته در این ساختار با یکدیگر مقایسه شدند. از سه نرم‌افزار Tango, Aggrescan و CAMlila برای بررسی پیشگویی تأثیر جهش بر میزان تجمع آنزیم استفاده شد.

یافته‌ها: جهش‌های بررسی شده سه نوع عمده را در بر می‌گرفتند که در میان آنها، تغییر نوع اسید آمینه از باردار/قطبی به آلیفاتیک/آروماتیک و بالعکس به صورت مشخصی بر ساختار آنزیم تأثیر می‌گذارد. در مورد تغییر اسید آمینه آلیفاتیک یا آروماتیک به یک اسید آمینه دیگر از همین نوع، بررسی اولیه ساختار می‌تواند دلیل تأثیر گذاری نامطلوب جهش را روشن کند، لیکن در مقایسه این نوع جهش‌ها با یکدیگر، موفق عمل نمی‌کند. در بین نرم‌افزارهای پیشگویی تمایل به تجمع نیز، در این مطالعه، CAMlila بهتر عمل می‌کند.

نتیجه‌گیری: بررسی ساختار سه بعدی پروتئین برای یافتن میزان اهمیت جهش در تمایل پروتئین به تغییر ساختار تا حدود زیادی راهگشاست و حتی ابزارهای کاملاً متداول و در دسترس نیز می‌تواند در این زمینه مورد استفاده باشد. از طرفی، برای بررسی موارد ظریف‌تر، نظیر اختلاف تأثیر دو جهش نسبتاً مشابه، نیاز به استفاده از ابزار پیشرفته‌تر نظیر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی وجود دارد.

واژگان کلیدی: اسپل کوآ- دهیدروژناز، جهش نقطه‌ای، ساختار پروتئین، تجمع، مدل‌سازی مولکولی

۱- مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی تهران

* **نشانی:** تهران، خیابان کارگر شمالی، بیمارستان دکتر شریعتی، طبقه پنجم، مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران، کد پستی ۱۴۱۱۴۱۳۷۱۳۷ تلفن: ۸۸۲۲۰۰۳۷، نمابر: ۸۸۲۲۰۰۵۲، پست الکترونیک: aehabibi@sina.tums.ac.ir

مقدمه

اکسیداسیون اسیدهای چرب در میتوکندری، یک مسیر انرژی‌زای ضروری است و طی دوره‌های طولانی مدت گرسنگی، وقتی که بدن بایستی از چربی‌ها استفاده کند از اهمیت حیاتی برخوردار است [۱].

اختلالات مربوط به اکسیداسیون اسیدهای چرب چند زیر گروه تقسیم می‌شوند، که تقریباً تمامی آن‌ها به دنبال نقایص ژنتیکی بروز نموده و به صورت توارث مغلوب منتقل می‌شوند. از این میان، اختلالات مربوط به سیکل بتااکسیداسیون اسیدهای چرب، نوع مورد بحث مقاله حاضر می‌باشد [۱،۲]. نقایص ارثی در ۹ پروتئین، که مستقیماً در این پروسه دخالت دارند، در انسان شناسایی شده‌اند که مهم‌ترین آنها عبارتند از: ¹ (SCAD, LCHAD, MCAD, LCAD, CPT, I, II) [۲]. به طور کلی نقایص بتااکسیداسیون اسیدهای چرب میتوکندریایی دارای دو نوع تظاهرات پاتولوژیک هستند.

نخستین آنها کمبود انرژی و به دنبال آن کمبود سوسترا برای گلوکونئوزنز است. دومین نوع به علت اثرات سمی متابولیت‌های حادفاصل بروز می‌کند که در نتیجه تجمع در محل نقص آنزیمی رخ می‌دهد [۳]. کمبود MCAD، شایع‌ترین نقص در این مسیر است و شایع‌ترین علائم بیماری اپی‌زودهای هیپوگلیسمی، هیپوکتوتیک است که با بروز گرسنگی تشدید می‌شود [۲].

سایر بیماری‌های ناشی از نقایص مسیر بتااکسیداسیون اسیدهای چرب بیشتر با علائم موجود در عضلات اسکلتی و یا قلبی تظاهر می‌کند که از این بین می‌توان به بیماری کمبود SCAD اشاره نمود [۴] که تا کنون بیشتر از ۳۰۰ مورد از آن در دنیا گزارش گردیده است. در مورد علائم بالینی بیماری و ارتباط بین ژنوتیپ و فنوتیپ بیماری هنوز هم اختلاف نظر وجود دارد [۲،۴،۵،۶]. به نظر می‌رسد که میوپاتی اسکلتی در اکثر این بیماران وجود داشته باشد ولی مانند بیماران مبتلا به کمبود MCAD هیپوگلیسمی

هیپوکتوتیک را نشان نمی‌دهند [۷]. برخی از بیماران دچار اسیدوز متابولیک شدید شده و در اکثر بیماران نشانه‌های نورولوژیک وجود دارد [۱].

تشخیص بیماری صرفاً بر پایه وضعیت دفع متابولیت‌های اختصاصی گذاشته می‌شود که عمده آنها اسیداتیل مالونیک و بوتیریل کارنیتین در خون و ادرار می‌باشد. قابل ذکر است که گاهی دفع متابولیت‌ها به طور دائمی نبوده و تنها به صورت گاهگاهی قابل دستیابی است. از طرف دیگر افراد مبتلا به انواع خفیف بیماری ممکن است از نظر بالینی بی‌علامت بوده و تنها افزایش مختصر متابولیت‌های اختصاصی را در ادرار نشان دهند [۱،۲،۴].

تأیید تشخیص با استفاده از سنجش آنزیم در سلول‌های کشت شده فیبروبلاست و تست‌های مبتنی بر cDNA صورت می‌پذیرد [۲،۶]. درمان معمولاً شامل محدودیت چربی غذایی و اجتناب از بروز استرس ناشی از گرسنگی است [۱،۴].

به نظر می‌رسد بتوان ارتباط بین جهش در آنزیم و بیماری را منطقی تلقی کرد. یک استدلال در این زمینه، یافت نشدن طیف وسیعی از جهش‌ها در نوزادان طبیعی است و بنابراین، جهش‌های مذکور می‌بایست بیماری‌زا و تهدید کننده حیات باشند [۸]. در مورد بیماری کمبود SCAD، انواع جهش یافته آنزیم از نظر استعداد تجمع و عدم تشکیل تترامر (شکل طبیعی آنزیم) مورد بررسی قرار گرفته‌اند و این بیماری به عنوان یک بیماری از دسته نقص در تاخوردگی صحیح پروتئین‌ها مطرح شده است [۸]. می‌توان فرض کرد که بررسی ساختار سه بعدی پروتئین‌های طبیعی و جهش یافته بتواند اطلاعاتی در مورد اهمیت هر کدام از این جهش‌ها بدست دهد.

روش‌ها

قابل ذکر است که جهت انجام این تحقیق انحصاراً از نرم‌افزارهای مدل‌سازی مولکولی استفاده شده و تحقیق در محل مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

1- SCAD: short-chain acyl-CoA dehydrogenase
LCHAD: long chain 3-hydroxy acyl-CoA dehydrogenase
MCAD: medium-chain acyl-CoA dehydrogenase
LCAD: long-chain acyl-CoA dehydrogenase
CPT I, II: carnitine palmitoyl-CoA transferase I, II

قرار گرفته است که از زنجیرهای جانبی C17,F20, M88, L25, M46, L51, M88 تشکیل شده است (شکل ۲). نکته قابل توجه این است که این اسید آمینه‌ها در ماریپچ‌های ۱،۳،۶ و در لوپ بین ماریپچ ۱ و ۲ و نیز لوپ بین ماریپچ ۳ و ۴ قرار دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد یک شبکه از برهم کنش‌های هیدروفوب در این ناحیه جهت نگه داشتن ساختار سه بعدی پروتئین اهمیت داشته باشد. تبدیل شدن این اسید آمینه به آسپاراژین که یک اسید آمینه قطبی است، این شبکه برهم کنش را مختل خواهد کرد.

جهش R79C: برهم کنش آرژینین با واسطه یک مولکول آب با E76 در همان ماریپچ رخ می‌دهد (شکل ۳). در عین حال، احتمال برقراری پیوند با D268 و T257 نیز وجود دارد. در صورت تبدیل آرژینین به سیستئین هیچ یک از این برهم کنش‌ها ممکن نخواهد بود.

جهش W111C: تریپتوفان شماره ۱۱۱ امکان برقراری برهم کنش‌های هیدروفوبی را دارد که با تبدیل شدن به سیستئین، با توجه به کوتا‌تر شدن زنجیر جانبی، احتمالاً قدرت پیوندهای قبلی را نخواهند داشت (شکل ۴).

جهش W149R: تریپتوفان شماره ۱۴۹ در دومن دوم پروتئین شامل صفحات بتای پروتئین واقع شده است و با اسید آمینه‌های صفحات بتای مجاور برهم کنش‌های هیدروفوب و π - π برقرار می‌کند. با تبدیل به آرژینین چنین برهم کنش‌هایی امکان‌پذیر نخواهند بود و احتمالاً منجر به باز شدن این منطقه از پروتئین خواهد شد.

جهش A164V: این جهش عمدتاً به حجیم‌تر شدن زنجیر جانبی می‌انجامد و امکان بروز برخوردهای نامناسب بین اسید آمینه‌های مجاور وجود خواهد داشت. نکته قابل توجه انرژی بالای بهترین روتامر بدست آمده (۱۷/۰۴ kcal/mol) می‌باشد.

جهش A171V: در این مورد نیز مانند جهش ذکر شده در بالا، حجیم شدن زنجیر جانبی مشکل اصلی خواهد بود. البته انرژی روتامر انتخاب شده در این

ایجاد جهش در ساختار پروتئین (in silico)

جهش‌ها بر مبنای اطلاعات موجود (در ادبیات علمی مرتبط) در مورد شدت تاثیرگذاری آنها بر ایجاد تترامر پروتئین (اختلال در تشکیل تترامر) و افزایش تمایل آن به تجمع [۸] انتخاب شده و در ساختار پروتئین انسان با کد 2VIG.pdb وارد شدند. جهش‌های مورد نظر به شرح زیر بودند:

R18W,
I77N,R79C,W111C,W149R,A164V,A171V,A248T,S
249F,A266D,A304V,E316G,S325L,R352W,R355C

(جهت سهولت بحث، در این گزارش از کدهای یک حرفی اختصاری اسید آمینه‌ها استفاده شده است و شماره‌گذاری اسید آمینه‌ها بر مبنای محاسبه آغاز توالی بعد از بخش سیگنال است). با استفاده از نرم‌افزار (The MOE Molecular Operating Environment) Version 2008.10 در هر مورد برای اسید آمینه جانشین شده بین روتامرهای در دسترس بهترین آنها انتخاب شده و برهم کنش‌های اسید آمینه اصلی و اسید آمینه جهش یافته با سایر اسید آمینه‌های پروتئین، در محدوده ۵ تا ۱۰ آنگستروم اطراف آن بررسی و مقایسه شدند.

بررسی تمایل به تجمع در پروتئین (in silico)

در توالی آنزیم اسیل کوآ-دهیدروژناز زنجیر کوتاه، تمام جهش‌های انتخاب شده وارد شده و هر دو توالی اصلی و تغییر یافته با استفاده از برنامه‌های Aggrescan [۹]، Tango [۱۰] و CAMlila [۱۱] از نظر میزان تمایل به تجمع بررسی شدند.

یافته‌ها

بررسی تاثیر جهش‌ها در ساختار پروتئین

- جهش R18W: نتیجه تبدیل شدن آرژینین به تریپتوفان، اختلال در ایجاد پل نمکی با E76 می‌باشد. این گلوتامات در ماریپچ مجاور قرار گرفته است (شکل ۱) و از بین رفتن این اتصال احتمالاً باعث ایجاد فاصله طبیعی بین دو ماریپچ می‌گردد.
- جهش I77N: زنجیر جانبی ایزولوسین شماره ۷۷ که در ماریپچ پنجم واقع شده، در یک پاکت هیدروفوب

- است، این ارتباط از بین می‌رود و ارتباط ماریپچ دوم و سوم دومن انتهایی پروتئین به هم می‌خورد.
- جهش S325L: در مورد این سرین، با واسطه آب، احتمال برقراری پیوند هیدروژنی با S367 وجود دارد. از آنجا که S367 در یک ماریپچ دیگر (آخرین ماریپچ تشکیل دهنده ساختار پروتئین) قرار دارد (شکل ۶)، در صورت تبدیل شدن این اسید آمینه به لوسین، احتمال بروز اختلال در این بخش ساختار وجود دارد که می‌تواند منجر به باز شدن پروتئین در این ناحیه شود. قابل توجه است که احتمال دارد K321 نیز در این شبکه پیوند هیدروژنی دخیل باشد (شکل ۶). در عین حال، تبدیل شدن به لوسین، یک زنجیر جانبی حجیم‌تر را وارد آن منطقه می‌کند که ممکن است با لیزین مذکور و سایر اسید آمینه‌های ماریپچ حاوی لوسین جهش یافته برخورد (clash) داشته باشد. انرژی بهترین روتامر لوسین نیز $22/36$ kcal/mol بدست آمده است.
- جهش R352W: برهم کنش‌های احتمالی این آرژینین با واسطه مولکول‌های آب می‌باشد. در صورت تبدیل شدن به تریپتوفان، زنجیر جانبی جدید قادر خواهد بود با اسید آمینه‌های ماریپچ‌های مجاور پیوندهای هیدروفوب و کاتیون- π برقرار کند و ممکن است منجر به فشرده‌تر شدن این ناحیه شود.
- جهش R355C: نکته قابل توجه در مورد برهم کنش‌های این آرژینین که در ماریپچ انتهایی پروتئین در دومن سوم آن قرار دارد، وجود ارتباط با D31 از ماریپچ دوم دومن اول و کربونیل زمینه‌ای L203 از یک لوپ موجود در دومن دوم حاوی صفحات بتاست. این مسئله نشان دهنده اهمیت این اسید آمینه در حفظ ساختار سوم پروتئین است. در صورت تبدیل آرژینین به سیستئین تمام این برهم کنش‌ها از بین می‌روند و نتیجه این امر باز شدن ساختار در این ناحیه و فاصله گرفتن سه دومن از یکدیگر است.
- مورد $4/39$ kcal/mol بوده است که به نسبت جهش فوق‌الذکر بهتر است.
- جهش A248T: احتمال برهم کنش‌های متعدد بین ترئونین و اسید آمینه‌های باردار موجود در دو ماریپچ مجاور آن به نسبت آلانین بیشتر است. بنابراین در صورتی که این جهش رخ دهد، و ترئونین بتواند خود را در جایگاه آلانین قرار دهد، احتمال فشرده‌تر شدن ساختار سه ماریپچ در این منطقه وجود دارد که می‌تواند در مناطق دیگر باعث به هم خوردن ساختار سوم پروتئین باشد.
- جهش S249F: سرین ۲۴۹ یک اسید آمینه قطبی است که در ساختار پروتئین مورد استفاده یک برهم کنش با کربونیل زمینه‌ای گلیسین ۲۴۶ را نشان می‌دهد. صرف نظر از موضوع از بین رفتن این برهم کنش، ورود یک گروه بسیار حجیم اتفاق می‌افتد که نمی‌تواند خود را به راحتی در آن منطقه جای دهد. انرژی بهترین روتامر بدست آمده برای این گروه $15/95$ kcal/mol است.
- جهش A266D: چنانکه در شکل ۵ مشاهده می‌شود، در پروتئین عادی آلانین می‌تواند با L286, I282, I338 برهم کنش‌های هیدروفوب برقرار کند. قابل توجه است که این اسید آمینه‌ها در ماریپچ‌های مجاور قرار دارند (شماره‌گذاری ماریپچ‌ها در دومن سوم پروتئین مجدداً از ۱ آغاز شده است). با ورود آسپاراتات، نه تنها این برهم کنش‌ها غیر ممکن می‌شوند، بلکه حجم آسپاراتات نیز برای قرارگیری در این ناحیه مشکل‌ساز خواهد شد. در عین حال، احتمال اختلال در برهم کنش با مونومر مجاور هم وجود دارد.
- جهش A304V: در این مورد نیز، حجیم شدن زنجیر جانبی مشکل اصلی خواهد بود. انرژی روتامر در این مورد $9/27$ kcal/mol بوده است.
- جهش E316G: گلوتامات شماره ۳۱۶ با R302 به صورت مستقیم، و به واسطه آب با K 315 برهم کنش دارد. از آنجا که گلیسین فاقد زنجیر جانبی

(A171V, A248T, S249F, A304V, E316G, S325L

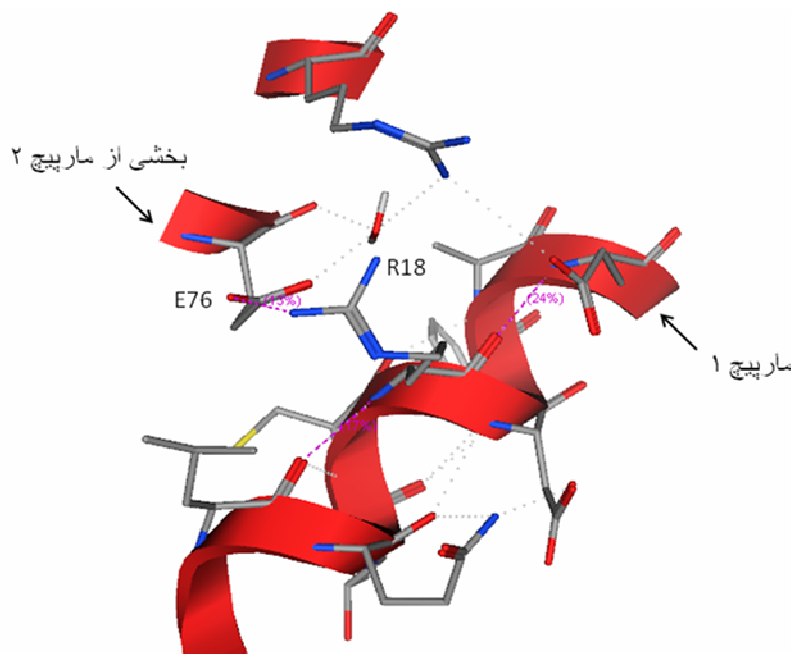
افزایش تمایل به تجمع را نشان می‌دهد (شکل ۷ ب). تفاوت برنامه CAMIla با دو برنامه دیگر در این است که این برنامه از اطلاعات مربوط به توالی استفاده می‌کند ولی در عین حال یک شبیه‌سازی سریع نیز برای توالی‌های ارائه شده انجام می‌دهد. این برنامه سه خروجی مربوط به انرژی تشکیل بالقوه صفحات بتا موازی (PARA)، صفحات ناموازی (ANTI) و مجموع این دو را به دست می‌دهد. هر قدر میزان انرژی تشکیل پایین‌تر باشد، احتمال تجمع به صورت صفحات بتا بیشتر است. در شکل ۷ ج تنها نتایج مربوط به خروجی صفحات موازی آورده شده است که بهترین نتیجه را به دست داده است. چنانکه در شکل مشخص است، پیشگویی تنها در دو مورد ناموفق بوده است که شامل W149R و A266D می‌باشد.

بررسی تمایل به تجمع در پروتئین

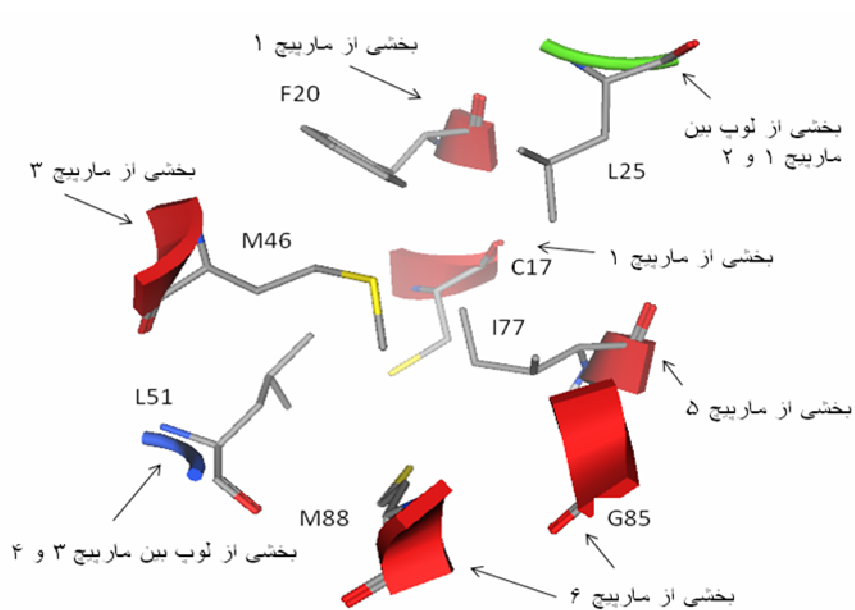
ارتباط بین میزان بیماری‌زایی پروتئین‌ها و میزان تمایل آنها به تجمع وجود دارد. جهت بررسی امکان پیش بینی اختلال در ساختار پروتئین از برنامه‌های پیشگویی میزان تجمع استفاده شد. توالی اصلی پروتئین و نیز توالی حاوی تمام جهش‌های بررسی شده در بخش قبل با استفاده از سه نرم‌افزار بررسی شدند.

نتایج حاصل از برنامه Tango در شکل ۷ الف آمده است. افزایش میزان تمایل به تجمع پروتئین تنها در سه مورد از چهارده جهش پیش‌بینی شده است که شامل A164V, A171V, S249F می‌باشد.

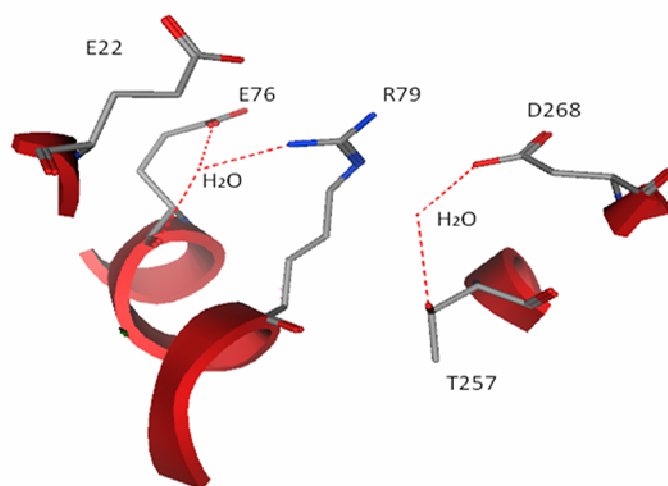
برنامه Aggrescan در این زمینه موفق‌تر عمل کرده است و پیش‌بینی آن درباره هفت مورد از جهش‌ها (A164V,



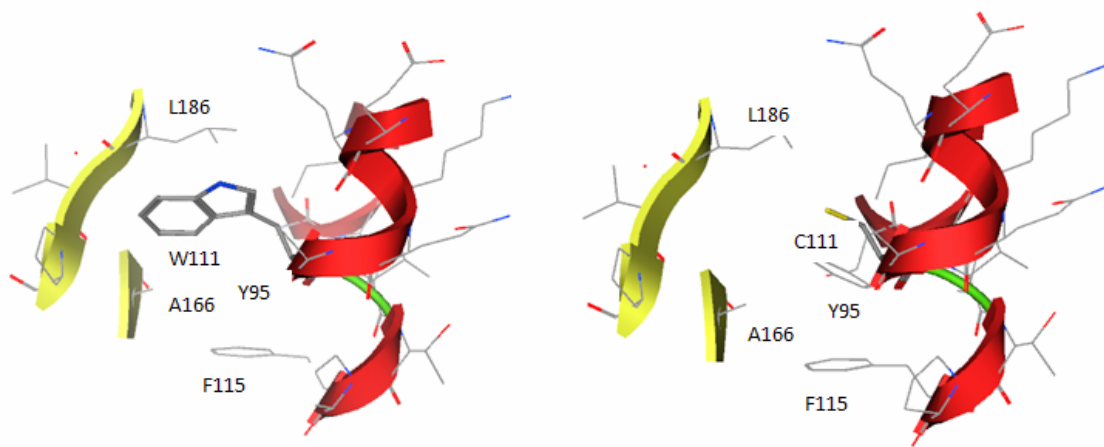
شکل ۱- بررسی موقعیت و برهم‌کنش‌های آرژینین ۱۸ در ساختار آنزیم طبیعی



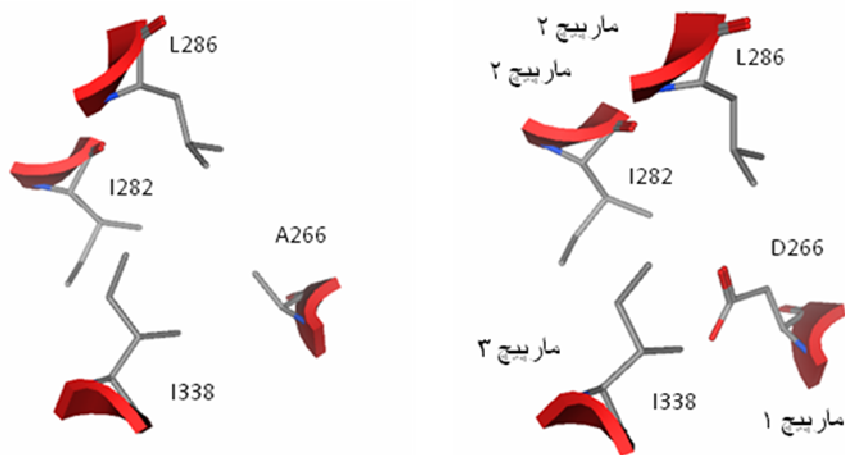
شکل ۲- بررسی پاکت هیدروفوب احاطه کننده ایزولوسین ۷۷ در ساختار آنزیم طبیعی



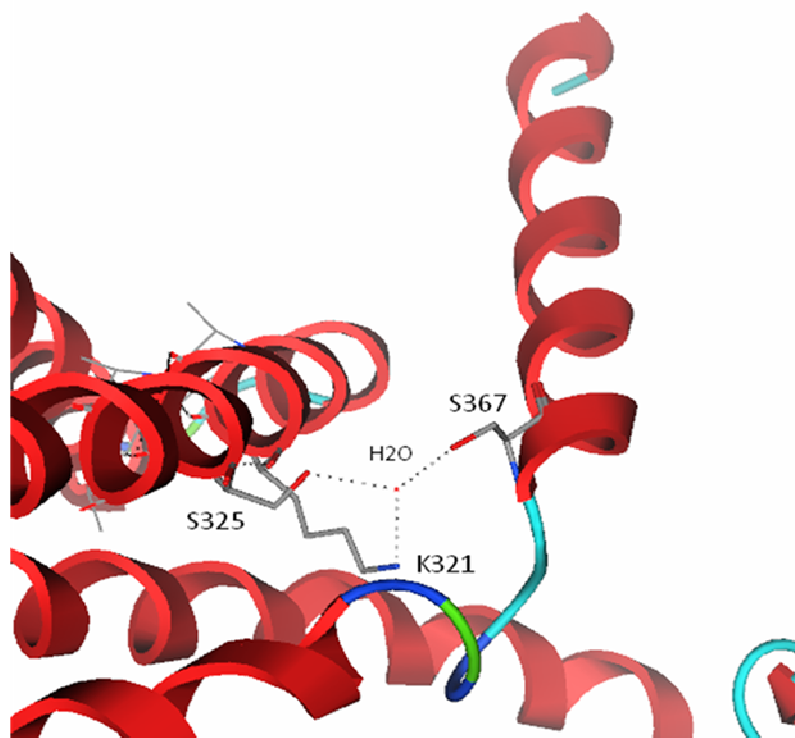
شکل ۳- بررسی موقعیت و برهم کنش‌های آرژینین ۷۹ در ساختار آنزیم طبیعی



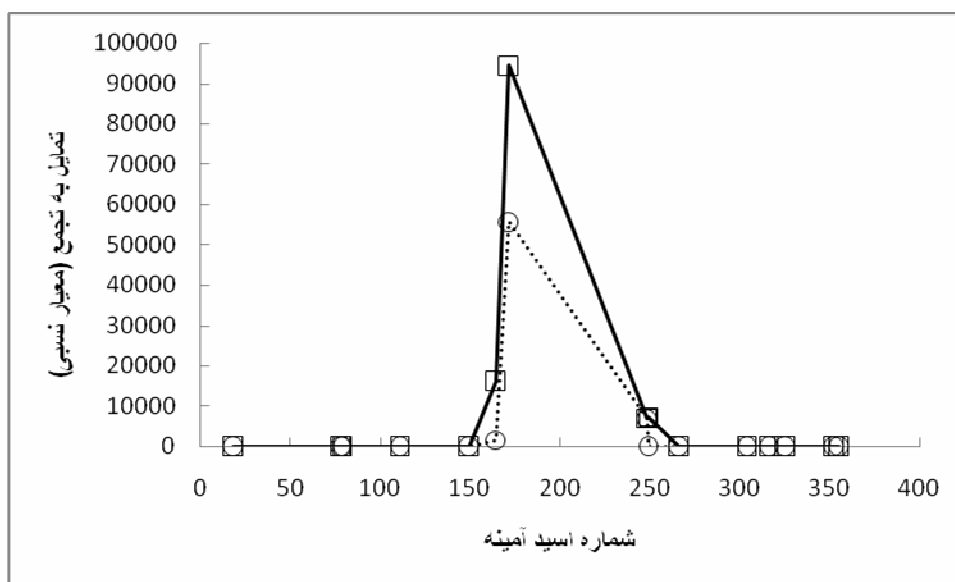
شکل ۴- مقایسه موقعیت و بر هم کنش‌های تریپتوفان ۱۱۱ در آنزیم طبیعی با سیستئین ۱۱۱ در آنزیم جهش یافته



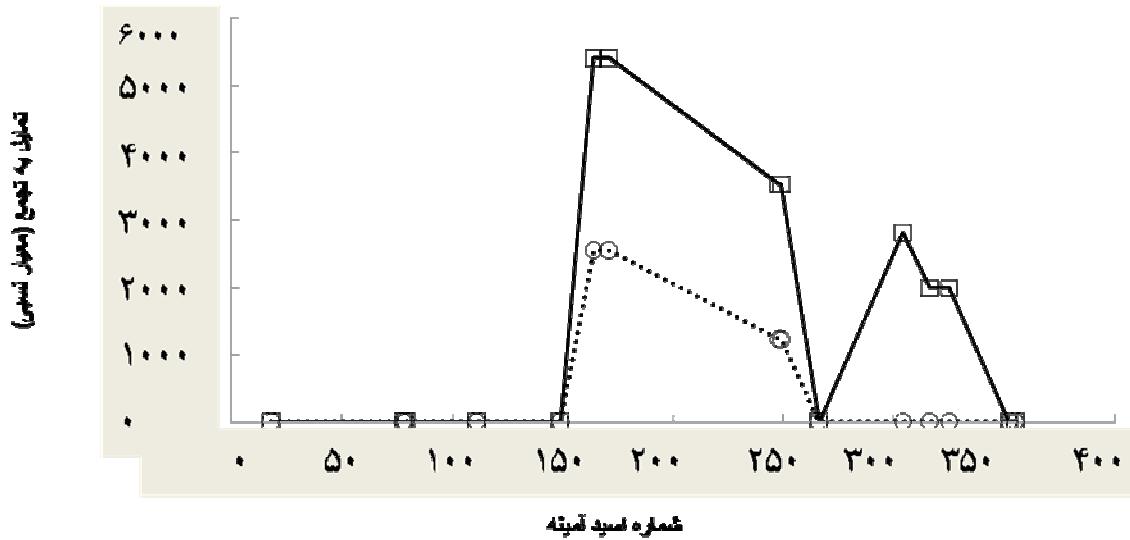
شکل ۵- مقایسه موقعیت و بر هم کنش‌های آلانین ۲۶۶ در آنزیم طبیعی با اسپاراتات ۲۶۶ در آنزیم جهش یافته



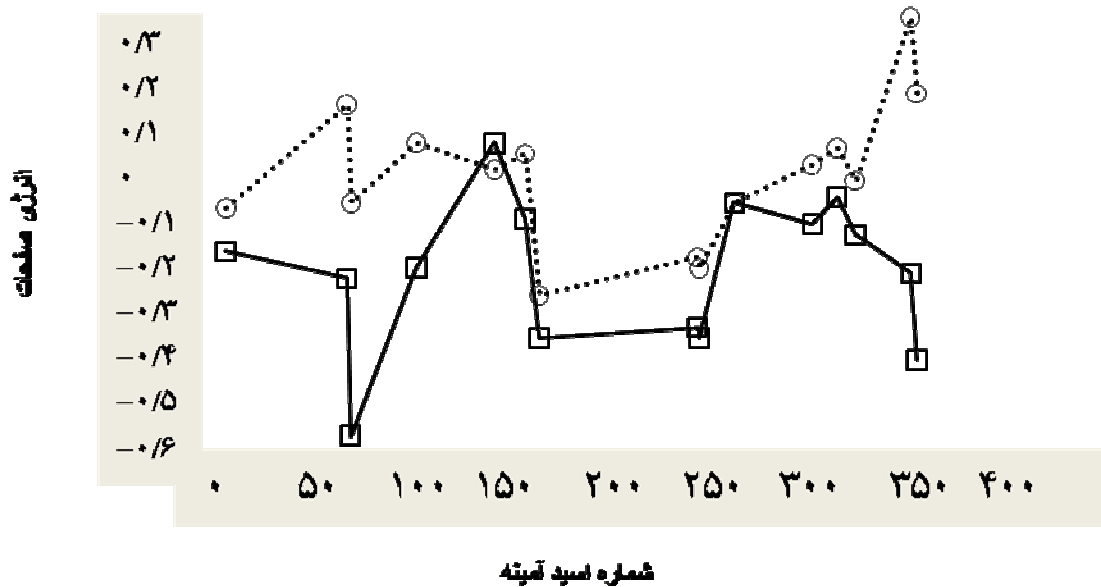
شکل ۶- بررسی موقعیت و برهم کنش‌های سرین ۳۶۷ در ساختار آنزیم طبیعی



شکل ۷ (الف) - نتایج حاصل از برنامه Tango. تمایل به تجمع مربوط به ۱۴ اسید آمینه با یک معیار نسبی مقایسه شده است. اسید آمینه‌های مربوط به شکل طبیعی پروتئین با نماد (○) و اسید آمینه‌های مربوط به شکل جهش یافته پروتئین با نماد (□) نمایش داده شده اند.



شکل ۷ (ب) - نتایج حاصل از برنامه Aggrecan. تمایل به تجمع مربوط به ۱۴ اسید آمینه با یک معیار نسبی مقایسه شده است. اسید آمینه‌های مربوط به شکل طبیعی پروتئین با نماد (..○..) و اسید آمینه‌های مربوط به شکل جهش یافته پروتئین با نماد (-□-) نمایش داده شده‌اند.



شکل ۷ (ج) - نتایج حاصل از برنامه CAMIla. تمایل به تجمع مربوط به ۱۴ اسید آمینه با معیار میزان انرژی صفحات بتای بالقوه‌ای که تشکیل می‌دهند مقایسه شده است. اسید آمینه‌های مربوط به شکل طبیعی پروتئین با نماد (..○..) و اسید آمینه‌های مربوط به شکل جهش یافته پروتئین با نماد (-□-) نمایش داده شده‌اند.

بحث

بیماری نقص در آنزیم اسید کوآ-دهیدروژناز زنجیر کوتاه (SCAD) با تغییر در ژن SCAD همراه است. نزدیک به تمام جهش‌هایی که در این ژن یافت شده‌اند از نوع جانشینی (substitution) در اسیدهای آمینه می‌باشند [۸،۱۲]. طبق یک نظریه، این بیماری در زمره بیماری‌های مربوط به تاخوردگی ناصحیح پروتئین‌ها (protein misfolding disorder) قرار دارد [۸،۱۳]. می‌توان فرض کرد که در صورتی که آنزیم مورد نظر دچار مشکل در تاخوردگی شود و اشکال غیر طبیعی به خود بگیرد، بسته به اینکه مکانیسم‌های مقابله با این وضعیت در افراد مختلف تا چه حد قادر به عمل کردن باشند، فنوتیپ بیماری متفاوت می‌شود. با استفاده از روش‌های مدل‌سازی مولکولی می‌توان به بررسی تأثیری پرداخت که جهش‌های جانشینی بر ساختار آنزیم دارند. در نتیجه، از یک طرف توجه اطلاعات بدست آمده از آزمایش‌های *in vitro* ممکن است، و از طرف دیگر تجربه کلی در مورد بررسی این نوع موضوعات افزایش می‌یابد. از آنجا که خصوصیت مورد بررسی در این تحقیق، میزان باز شدن ساختار یا تغییر در تاخوردگی در آنزیم بوده است، جهش‌های انتخاب شده مربوط به آنزیم‌هایی بوده‌اند که در مورد آنها تمایل شدید به تجمع گزارش شده است [۸].

در یک تحقیق منتشر شده، بررسی اولیه تأثیر احتمالی تعدادی از انواع جهش یافته این آنزیم با استفاده از ساختار آنزیم موش انجام شده است. در این بررسی تنها برهم کنش‌های احتمالی اسید آمینه‌های طبیعی در موقعیت‌های جهش یافته تا حدودی تعریف شده است و آنزیم‌های جهش یافته ساخته نشده‌اند [۱۴].

می‌توان جهش‌های بررسی شده در مطالعه حاضر را به سه بخش تقسیم کرد:

۱- جهش‌هایی که یک اسید آمینه باردار یا قطبی را به اسید آمینه آلیفاتیک یا آروماتیک تبدیل می‌کنند و بالقوه باعث تغییرات نامطلوب در ساختار پروتئین می‌باشند. این مسئله به دلیل از بین رفتن پیوندهای الکتروستاتیک موجود در پروتئین طبیعی است. با این همه به نظر می‌رسد موقعیت خاص اسید آمینه‌ها در این زمینه تعیین کننده باشد. برای

مثال، R355 در موقعیتی قرار دارد که سه بخش از پروتئین را با یکدیگر مرتبط می‌کند. بنابراین بروز جهشی که برهم کنش‌های آن را حذف نماید (تبدیل شدن سیستین) تأثیر بسیار شدیدی خواهد داشت. از طرف دیگر، در جایی که R352 قرار دارد، در صورت واقع شدن یک تریپتوفان، به صورت غیر منظره‌ای، احتمال ایجاد برهم کنش‌های بیشتر توسط تریپتوفان وجود دارد که منجر به فشرده‌تر شدن ساختار در این نقطه خواهد شد. البته این مسئله احتمال دارد به باز شدن ساختار در نواحی اطراف نیز منجر شود. در مجموع، این نوع جهش‌ها باعث از بین رفتن برهم کنش‌ها و احتمالاً بازتر شدن پروتئین در منطقه حضور این اسید آمینه‌ها خواهد شد و این موضوع در مورد R18W، R79C و E316G صادق است. در یک مورد که جهش از اسید آمینه قطبی به آروماتیک است (S249F)، علاوه بر مختل شدن برهم کنش‌ها، حجم اضافه اسید آمینه وارد شده نیز مشکل ساز می‌باشد.

۲- جهش‌هایی که منجر به تبدیل اسید آمینه‌های آلیفاتیک و آروماتیک به اسید آمینه‌های باردار یا قطبی می‌گردد نیز معمولاً منجر به از دست رفتن شبکه برهم کنش‌های هیدروفوب داخلی پروتئین می‌شوند. این موضوع در مورد جهش‌های W149R، I77N و A266D صادق است. چنین اتفاقی می‌تواند منجر به باز شدن پروتئین و در معرض قرار گرفتن بخش‌های هیدروفوب پوشیده باشد. در این نوع جهش‌ها نیز یک مورد استثنا، جهش A248T است که منجر به پیدایش برهم کنش‌های اضافه تر می‌شود و می‌تواند باعث ایجاد فشردگی ساختار در منطقه جهش باشد.

۳- جهش‌هایی که یک اسید آمینه آلیفاتیک یا آروماتیک را به یک اسید آمینه دیگر از همین نوع تبدیل می‌کند. در این حالت ممکن است نوع برهم کنش‌هایی که زنجیر جانبی قادر به انجام آنهاست تفاوت زیادی نکند. در واقع، مسئله اصلی در تغییر اندازه و ابعاد زنجیر مذکور است که در صورت کوتاه‌تر شدن انجام برهم کنش‌های قبلی را ناممکن می‌سازد. در صورتی که زنجیر حجیم گردد نیز باعث به هم خوردن نظم ساختار و نهایتاً بازتر شدن آن می‌شود که در

تحقیق، این تغییرات به صورت غیر مستقیم منجر به در معرض قرار گرفتن بخش‌های هیدروفوب پروتئین و افزایش تمایل به تجمع می‌شوند. در مجموع، به نظر می‌رسد کارایی این ابزارها در حال حاضر نسبتاً محدود است، ولی می‌تواند در مرحله اول بررسی‌های مربوط به تاثیر جهش روی ساختار، راهنما باشد.

در مجموع، این تحقیق با هدف بررسی تاثیر جهش‌های گزارش شده بر ساختار آنزیم اسیل کوآ- دهیدروژناز زنجیر کوتاه (SCAD) با استفاده از ابزارهای متداول مدل‌سازی مولکولی انجام شد. در مورد آنزیم مورد بررسی، از آنجا که داده‌های آزمایشگاهی در دسترس است، می‌توان مشخص کرد که استفاده از روش‌های مدل‌سازی مولکولی تا چه حدی با نتایج واقعی تطابق دارد. نتیجه تحقیق نشان داد که بررسی ساختار سه بعدی پروتئین برای یافتن میزان اهمیت جهش در تمایل پروتئین به تغییر ساختار تا حدود زیادی راهگشاست و حتی ابزارهای کاملاً متداول و در دسترس نیز می‌تواند در این زمینه مورد استفاده باشد. از طرفی، برای بررسی موارد ظریف‌تر، نظیر اختلاف تاثیر دو جهش نسبتاً مشابه، نیاز به استفاده از ابزار پیشرفته‌تر وجود دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان از راهنمایی‌های ارزنده سرکار خانم دکتر مهسا محمد آملی تشکر و قدردانی می‌نمایند. این مطالعه با حمایت مالی مرکز تحقیقات غدد درون‌ریز و متابولیسم دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شده است.

هر سه مورد بررسی شده (A164V, A171V, A304V) همین مسئله صادق است.

میزان تاثیر جهش‌ها بر ساختار پروتئین تا حد قابل پذیرشی با داده‌های آزمایشگاهی مطابقت می‌نماید. یک مورد استثنا در این زمینه مربوط به جهش‌های A164V و A171V می‌باشد که در مطالعه مدل‌سازی جهش A164V نامناسب‌تر از جهش A171V بوده است، در حالی که در نتایج آزمایشگاهی (از نظر تمایل به تجمع)، عکس این مورد صادق است. بنابراین به نظر می‌رسد برای تفکیک چنین جهش‌هایی، باید از تکنیک‌های دیگری نظیر شبیه‌سازی دینامیک مولکولی استفاده کرد.

استفاده از ابزارهای پیشگویی میزان تجمع در پروتئین نتایج متفاوتی را بدست داده است. در مجموع، با استفاده از هیچکدام از این برنامه‌ها به تنهایی، نمی‌توان به پیشگویی قابل اطمینانی رسید. با این همه، قابل توجه است که در مورد برخی موقعیت‌ها، تمامی نرم‌افزارهای مذکور پیشگویی تمایل به تجمع را به درستی انجام داده‌اند. بخصوص نقاط ۱۶۴، ۱۷۱، ۲۴۸ و ۲۴۹ در همه برنامه‌ها مشترکاً مشخص شده‌اند، و نقاط ۳۰۴، ۳۱۶ و ۳۲۵ نیز بین دو برنامه از سه برنامه مشترک می‌باشند. با توجه به این مسئله، می‌توان فرض کرد که از جهت ایجاد تغییر در ساختار پروتئین، این جهش‌ها بالقوه از اهمیت بیشتری بهره‌مند باشند. موضوع قابل توجه دیگر عدم موفقیت همه برنامه‌ها در مورد نقطه ۲۶۶ و ۱۴۹ است. این دو نقطه جهش‌های آروماتیک/آلیفاتیک به باردار را شامل می‌شوند که در حالت عادی نباید منجر به افزایش هیدروفوبیسیته توالی پروتئین باشد. طبق بررسی به عمل آمده در این

مأخذ

1. Scriver CR. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 20th Edition. Vol 1 McGraw-Hill; 2007.
2. Gregersen N, Andersen BS, Pedersen CB, Olsen RKJ, Corydon TJ, Bross P. Mitochondrial fatty acid oxidation defects-remaining challenges, *Journal of Inherited Metabolic Diseases* 2008; 31: 643-657.
3. Gregersen N, Andersen BS, Corydon MJ, Corydon TJ, Olsen RKJ, Bolund L et al. Mutation analysis in mitochondrial fatty acid oxidation disorders, *Human Mutation* 2001; 18: 169-189.
4. Nelson Text Book of Pediatrics, 17th Edition .Genetic and metabolic diseases. W.B. Saunders Company; 2004.
5. Amendt BA, Greene C, Sweetman L, Cloherty J, Shih V, Moon A, et al. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency: clinical and biochemical studies in two patients. *The Journal of Clinical Investigation* 1987; 79: 1303-1309.

6. Naito E, Indo Y, Tanaka K. Identification of two variant short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase alleles, each containing a different point mutation in a patient with short chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Journal of Clinical Investigation* 1990; 85: 1575-1582.
7. Bhala A, Willi SM, Rinaldo P, Bennett MJ, Schmidt-Sommerfeld E, Hale DE. Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *The Journal of Pediatrics* 1995; 126:910-915.
8. Pedersen CB, Kølvrå S, Kølvrå A, Stenbroen V, Kjeldsen M, Ensenauer R et al. The ACADS gene variation spectrum in 114 patients with short-chain acyl-CoA dehydrogenase (SCAD) deficiency is dominated by missense variations leading to protein misfolding at the cellular level. *Human Genetics* 2008; 124:43-56
9. Conchillo-Solé O, de Groot NS, Avilés FX, Vendrell J, Daura X, Ventura S. AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* 2007; 8:65.
10. Fernandez-Escamilla AM, Rousseau F, Schymkowitz J, Serrano L. Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology* 2004; 22:1302-1306
11. Tartaglia GG. *Prediction of aggregation rate and aggregation-prone segments polypeptide sequences* [dissertation]. Universitat Zurich, 2005.
12. Jethva R, Bennett MJ, Vockley J. Short-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism* 2008; 95:195-200.
13. Pedersen CB, Bross P, Winter VS, Corydon TJ, Bolund L, Bartlett K et al. Misfolding, degradation, and aggregation of variant proteins. The molecular pathogenesis of short chain Acyl-coA dehydrogenase (SCAD) deficiency. *The Journal of Biological Chemistry* 2003; 278: 47449-47458
14. Battaile KP, Molin-Case J, Paschke R, Wang M, Bennett D, Vockley J, Kim JJP. Crystal structure of rat short chain acyl-coA dehydrogenase complexed with acetoacetyl-coA. Comparison with other acyl-coA dehydrogenases. *The Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 12200-12207.