



Structural Insight into the Role of Inhibitory Peptide Derived from Tumstatin-Integrin Complex in Inhibitory Mechanism: A Molecular Dynamics Simulations Study

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Ghorbani M.¹ MSc,

Taghdir M.*¹ PhD

How to cite this article

Ghorbani M, Taghdir M. Structural Insight into the Role of Inhibitory Peptide Derived from Tumstatin-Integrin Complex in Inhibitory Mechanism: A Molecular Dynamics Simulations Study. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):137-144.

¹Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

Phone: -

Fax: -

taghdir@modares.ac.ir

Article History

Received: October 3, 2019

Accepted: December 18, 2019

ePublished: June 10, 2020

ABSTRACT

Integrin inhibitors may change the conformational and dynamical properties of integrin, but its molecular properties in this process are not clearly understood. Tumstatin is an anti-angiogenesis protein derived from collagen XVIII, but little is known about how Tumstatin applies its antiangiogenic and antitumor effects. It has been reported that 18 amino acids fragment of Tumstatin has anti-angiogenesis and anti-tumor activities similar to Tumstatin. In this study, molecular docking and molecular dynamics simulations were used to describe the inhibitory activity of peptide at the molecular level. Peptide can bind to the Hybrid/EGF-4 interface which these interactions might contribute to improved hydrophobic interactions at these regions and also bound mobile domains to fixed domain of integrin. In the complex, we recognized a novel binding site on integrin for integrin inhibitors that may have a critical role in integrin inhibition. These results support the idea that hydrophobic interactions between the Hybrid/EGF-4 domain and peptide-anti tumor might contribute to the stability of bended state and therefore inhibit integrin activation. The findings can be applied to understand the mechanism of out-in pathway integrin signaling and the development of integrin targeted drugs.

Keywords Tumstatin; Anti-Angiogenesis; Integrin; Molecular Dynamics Simulations Studies; Molecular Docking; Anticancer Peptides; Conformational Properties of Integrin Activation

CITATION LINKS

[1] On the activation of integrin α IIb β 3: Outside-in and inside-out pathways [2] Integrin signaling in control of tumor growth and progression [3] Integrin cytoplasmic tail interactions [4] Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γ C peptide by the platelet integrin α IIb β 3 [5] Talin binding to integrin β tails: A final common step in integrin activation [6] The final steps of integrin activation: The end game [7] Molecular dynamics simulations of forced unbending of integrin α V β 3 [8] Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity [9] High affinity vs. native fibronectin in the modulation of α V β 3 integrin conformational dynamics: Insights from computational analyses and implications for molecular design [10] Structural analysis of the N-terminal fragment of the antiangiogenic protein endostatin: A molecular dynamics study [11] Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth [12] Talin-driven inside-out activation mechanism of platelet α IIb β 3 integrin probed by multimicrosecond, all-atom molecular dynamics simulations [13] Protein structure modeling with MODELLER. In: Kobe B, Guss M, Huber T, editors. Structural proteomics [14] Announcing the worldwide protein data bank [15] GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis [16] A smooth particle mesh Ewald method [17] ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. Nucleic Acids Res [18] The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking [19] The PyMOL molecular graphics system [20] The anti-tumor properties of two tumstatin peptide fragments in human gastric carcinoma [21] RGD-based strategies to target α (v) β (3) integrin in cancer therapy and diagnosis [22] A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins

بررسی مکانیزم اثر مهارکنندگی پپتید مشتق از تومستاتین بر فعالیت اینتگرین: یک مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

محمد قربانی MSc

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

مجید تقدیر* PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

مهارکننده‌های اینتگرین از طریق تغییر ویژگی‌های ساختاری و حرکتی این پروتئین نقش مهارکنندگی خود را اعمال می‌کنند، اما مکانیزم دینامیک مولکولی آن به‌طور مشخص کامل نیست. تومستاتین یک پروتئین ضد رگ‌زایی مشتق‌شده از کلاژن XVIII است، اما اطلاعات کمی در مورد مکانیزم ضد رگ‌زایی و ضد توموری آن در دسترس است. پپتید ۱۹ آمینواسیدی مشتق‌شده از تومستاتین دارای ویژگی‌های ضد رگ‌زایی و ضد توموری مشابه پروتئین اصلی است. در این مطالعه با استفاده از داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به مطالعه مکانیزم مولکولی مهارکنندگی پپتید مذکور پرداخته شد. جایگاه اتصال پپتید در مرز بین پایانه‌های EGF-4 و هیبرید است. پپتید از طریق اندرکنش‌های هیدروفوب در مرز بین پایانه‌های هیبرید- EGF-4 اثر مهارکنندگی خود را اعمال می‌کند. همچنین نتایج مربوط به سطح در دسترس حاکی از اثر مهارکنندگی پپتید در باز شدن پایانه‌های اینتگرین از یکدیگر و فعال شدن آن است. در واقع پپتید از طریق پایدارکنندگی حالت بسته اینتگرین نقش مهارکنندگی خود را اعمال می‌کند. این یافته‌ها می‌تواند در طراحی مهارکننده‌های نوین برای اینتگرین راه‌گشا باشد.

کلیدواژه‌ها: تومستاتین، ضد رگ‌زایی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، داکینگ مولکولی، پپتیدهای ضد سرطان، پارامترهای ساختاری فعال شدن اینتگرین

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۲۹

*نویسنده مسئول: taghdir@modares.ac.ir

مقدمه

اینتگرین از خانواده گیرنده‌های سطحی سلول، نقش مهمی در بسیاری از فرآیندهای سلولی نظیر مهاجرت سلولی، اتصال، رشد، تمایز و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی بر عهده دارد. مسیر پیام‌رسانی اینتگرین در دو سوی داخل به خارج و خارج به داخل تقسیم می‌شود که این دو بر هم تاثیر می‌گذارند. ساختار اینتگرین از زیرواحدهای آلفا و بتا تشکیل شده است که از طریق اندرکنش‌های غیرکووالان با یکدیگر در تماس هستند. پروتئین اینتگرین شامل یک پایانه خارج سلولی در اتصال با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی، یک پایانه درون غشایی و یک پایانه سیتوپلاسمی در اتصال با پروتئین‌های داخل سلولی نظیر تالین و کیندلین است [1-4].

در اینتگرین دومینی وجود دارد که نقش مهمی در حرکات دومینی ضمن فعال شدن اینتگرین ایفا می‌کند. این پایانه در واقع یک لیگاند داخلی است که نقش مهمی در کنترل فعال‌سازی بر عهده دارد. نشان داده شده است که این پایانه به همراه پایانه هیبرید در تبدیل حرکات داخل دومینی به حرکات و انتقالات وسیع ساختاری

اینتگرین نقش مهمی دارد. طی فعال‌سازی اینتگرین مشخص شده است که تغییرات وسیعی ایجاد می‌شود که این تغییرات شامل فاصله‌گرفتن قسمت سر از غشا و باز شدن ساختار اینتگرین است. این اطلاعات از مقایسه ساختارهای باز و بسته اینتگرین که ساختار کریستالی آنها موجود بوده، به دست آمده است. این پایانه در بالای پایانه معروف β -propeller قرار گرفته شده است [5].

مطالعات نشان می‌دهند که اتصال پروتئین‌ها در تنظیم مسیر پیام‌رسانی داخل به خارج سلولی نقش اصلی را بر عهده دارد. در مسیر داخل به خارج پروتئین‌های سیتوپلاسمی نظیر تالین و کیندلین با اتصال به بخش سیتوپلاسمی اینتگرین و تغییر ساختار پروتئینی آن بین دو حالت باز و بسته می‌شوند. در مسیر خارج به داخل پیام‌رسانی اینتگرین، اتصال پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی به محل‌های اتصالی خود روی اینتگرین منجر به جدایی زیرواحدهای اینتگرین از یکدیگر و تغییر ساختار آن می‌شود [1, 3, 6]. در مسیر پیام‌رسانی اینتگرین اندرکنش‌های مهمی نظیر اندرکنش بین زیرواحدهای β TD و β A، همچنین پیوندهای نمکی بین نواحی سیتوپلاسمی از بخش داخل غشایی و گروهی از اندرکنش‌های هیدروفوب در پایانه خارج سلولی در ساختار اینتگرین نقش دارند [6].

در مسیر پیام‌رسانی خارج به داخل، مرز بین پایانه‌های خارج سلولی نقش مهمی در پیام‌رسانی اینتگرین بر عهده دارند. اتصال اینتگرین با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی موجب تغییر ساختار اینتگرین از حالت بسته به باز می‌شود. این تغییرات محرک پیام‌های داخل سلولی (که کنترل‌کننده قطبیت سلولی، ساختار اسکلت سلولی، بیان ژنی و تکثیر سلولی هستند) است. در حالت بسته اندرکنش‌های هیدروفوب بین EGF-4 و پایانه هیبرید و همچنین پیوندهای نمکی بین β TD و β A نقش اصلی را در حفظ حالت بسته بر عهده دارند. مطالعات نشان می‌دهند که اکثر مهارکننده‌ها و فعال‌کننده به این نواحی متصل می‌شوند [7-9].

تومستاتین یک پروتئین مشتق‌شده از پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی با فعالیت ضد رگ‌زایی و ضد توموری است که اینتگرین $\alpha 5\beta 3$ یکی از اهداف این پروتئین مشتق‌شده است. اینتگرین $\alpha 5\beta 3$ نقش مهمی در رگ‌زایی، رشد تومور و تهاجم سلولی دارد. طبق مطالعات اخیر، دو پپتید مشتق‌شده از تومستاتین فعالیت ضد توموری و ضد رگ‌زایی مشابه پروتئین اولیه را دارند. با این وجود مکانیزم مهارتی اینتگرین توسط پپتیدهای مذکور مشخص نیست [4, 10, 11]. مطالعات متعددی پیرامون مکانیزم فعال شدن اینتگرین در سال‌های اخیر انجام شده است. چن و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی فعال شدن اینتگرین بخش سیتوپلاسمی پرداختند. آنها نشان دادند که میان‌کنش‌های هیدروفوب در پایانه‌های هیبرید و EGF-4 نقش مهمی در پایدار نگه داشتن حالت غیرفعال اینتگرین دارند. همچنین اتصال پپتید RGD با تضعیف میان‌کنش‌ها در این ناحیه موجب تسریع فعال‌سازی اینتگرین می‌شود [7]. در مطالعه‌ای دیگر پروسی و همکاران به بررسی اثر پروتئین‌های داخل سلولی نظیر

و کلر سیستم خنثی و سپس غلظت نمکی به ۱۰۰ میلی مولار رسانده شد [16]. برای مرحله بهینه سازی از روش نزول شیب دار استفاده شد. مرحله تعادل سازی در هنگردهای NVT و NPT و در نهایت شبیه سازی به مدت ۲۰۰ نانوثانیه برای اینتگرین- پپتید انجام شد. تمامی آنالیزها از ۲۰ نانوثانیه انتهایی انجام گرفت.

یافته‌ها و بحث

مطالعات ساختاری پپتید

برای مطالعه پایداری ساختاری پپتید پارامتر rmsd مربوط به کربن آلفای آمینواسیدها محاسبه شد. نتایج تغییرات ساختاری پپتید نشان دهنده پایداری آن در ۷۰ نانوثانیه پایانی است. ابتدا مقادیر پارامتر rmsd به ۱/۴ نانومتر افزایش می یابد و سپس در این مقدار باقی می ماند. شکل اولیه پپتید طی شبیه سازی به فرم سنجاق سر در آمده است. علاوه بر این، مطالعات حاکی از پایداری ساختار دوم در ۵۰ نانوثانیه انتهایی است. همچنین طبق نمودار ۱ پپتید طی شبیه سازی به فرم ساختار بتا با دو صفحه تبدیل می شود. یکی از آنالیزهای مرسوم برای بررسی تغییرات ساختاری و پایداری ساختار استفاده از روش های کلاستر بندی براساس پارامترهایی نظیر rmsd است. در این مطالعه کلاستر بندی ساختار طی زمان نشان از پایداری ساختار پپتید در طول شبیه سازی است. به این معنی که ساختار کلی در مراحل اولیه شبیه سازی شکل گرفته و طی زمان ساختار دوم مناسب برای پایداری بیشتر در پپتید ایجاد شده است. نتایج مطالعات انعطاف پذیری نیز حاکی از انعطاف پذیری کم پپتید در نواحی صفحات بتا و انعطاف پذیری بالا در موقعیت های دو انتهای آمین و کربوکسیل و بین دو صفحه است (نمودار ۱). درواقع آمینواسیدهای ۵، ۶ و ۷ به همراه ۱۳، ۱۴ و ۱۵ از طریق ایجاد صفحات بتا به پایداری پپتید کمک کرده اند و شکل گیری ساختارهای سنجاق سر موجب افزایش پایداری ساختار پپتید شده اند. همچنین در بسیاری از پپتیدهای ضد رگ زایی دیگر نیز ساختارهای سنجاق سر مشاهده می شود. به نظر می رسد ساختار سنجاق سر یک ساختار پایه برای پپتیدهای با فعالیت های ضد رگ زایی است [8, 10, 11].

مطالعه میان کنش پپتید- اینتگرین

مطالعات متعددی نشان داده اند که پپتید مذکور دارای فعالیت هایی نظیر مرگ برنامه ریزی شده سلولی و مهار رشد تومور هستند، در حالی که گیرنده اصلی آنها در این مکانیزم ها اینتگرین $\alpha 5 \beta 3$ است [8, 20]. مطالعات متعددی نشان دهنده اتصال این پپتید به جایگاه های non-RGD روی اینتگرین است. برای دستیابی به جایگاه اتصال پپتید روی اینتگرین دو مرحله داکینگ مولکولی انجام شد. ابتدا جایگاه اتصال با روش داکینگ مولکولی بدون هدف انجام شد. در نهایت محل اتصال پپتید روی اینتگرین براساس کمترین انرژی و بزرگترین کلاستر انتخاب شد. جایگاه اتصال پپتید روی اینتگرین در مرز بین دو زیر واحد α/β است. از این اطلاعات برای انجام داکینگ مولکولی دقیق و هدف دار با برنامه داکینگ مولکولی Haddock 9 استفاده شد (جدول ۱).

تالین روی مسیر فعال سازی از داخل سلول با روش های شبیه سازی پرداختند. در این مطالعه به اهمیت زوایای بین بخش های داخل غشایی دو زیر واحد اینتگرین نسبت به یکدیگر پی برده شد [12]. در مطالعه حاضر، به بررسی اثر مهاری پپتیدهای مذکور روی اینتگرین در سطح مولکولی پرداخته شد. همچنین جایگاه اتصال پپتیدها روی اینتگرین و اثر آن بر مکانیزم سلولی بررسی شد.

مواد و روش ها

همولوژی مدلینگ

ساختار پپتید مورد نظر با استفاده از برنامه Modeller 9.12 از طریق روش همولوژی مدلینگ مدل سازی شد [13]. ساختار تومستاتین از پایگاه داده RCSB با کد 1LI1 برای این منظور استخراج شد [14] و در نهایت ساختاری با کمترین عملکرد عینی برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

شبیه سازی دینامیک مولکولی پپتید

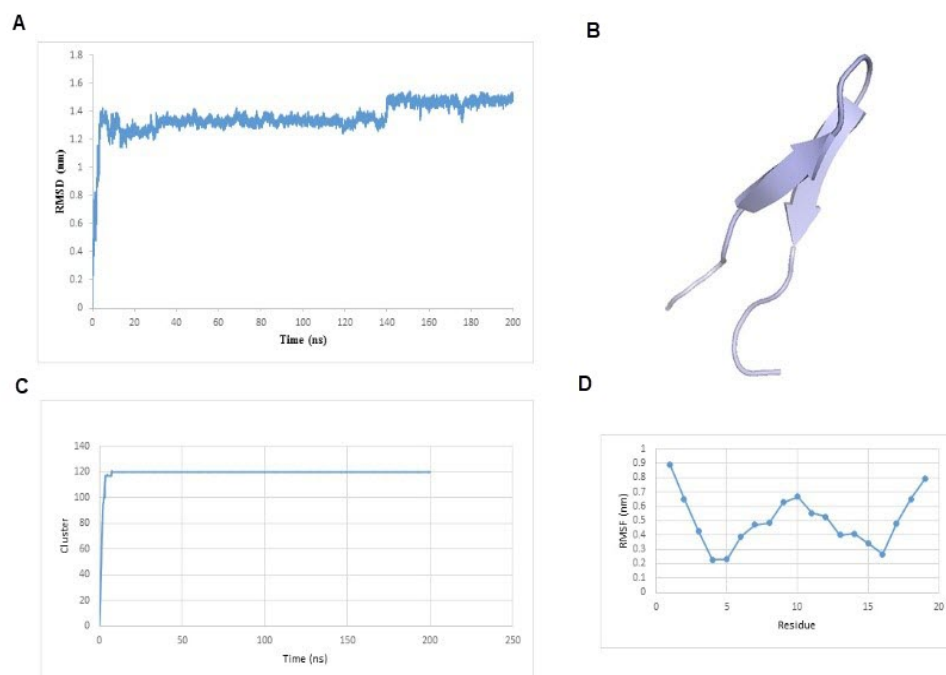
شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه گرومکس 5/۱ و ثابت های نیروی gromos 53a6 انجام شد [15]. مدل آب مورد استفاده در این شبیه سازی TIP3P و جعبه استفاده شده به صورت مکعبی انتخاب شد. بهترین حالت داکینگ مولکولی اینتگرین- پپتید برای ساختار اولیه به منظور شبیه سازی انتخاب شد. از روش PME برای محاسبه اندرکنش های الکتروستاتیک بلندبرد استفاده شد. به منظور فراهم سازی شرایط فیزیولوژیک ابتدا با یون های سدیم و کلر سیستم خنثی و سپس غلظت نمکی به ۱۰۰ میلی مولار رسانده شد [16]. برای مرحله بهینه سازی از روش نزول شیب دار (Steepest descend) استفاده شد. مرحله تعادل سازی در هنگردهای NVT و NPT و در نهایت شبیه سازی به مدت ۲۰۰ نانوثانیه برای پپتید انجام شد.

داکینگ مولکولی

داکینگ مولکولی با استفاده از برنامه Cluspro 3 برای یافتن جایگاه اتصال پپتید انجام شد [17]. ساختار پپتید حاصل از شبیه سازی دینامیک مولکولی و اینتگرین از پایگاه داده RCSB با کد 1L5G به دست آمد. برای دستیابی به اندرکنش دقیق تر پپتید- اینتگرین داکینگ مولکولی با استفاده از برنامه Haddock 9 انجام شد [18]. در این مطالعه آمینواسیدهای موثر در اتصال به اینتگرین حاصل از داکینگ مولکولی قبلی برای این مرحله استفاده شد. کلیه شکل ها توسط برنامه PyMol 5 به دست آمد [19].

شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس پپتید- اینتگرین

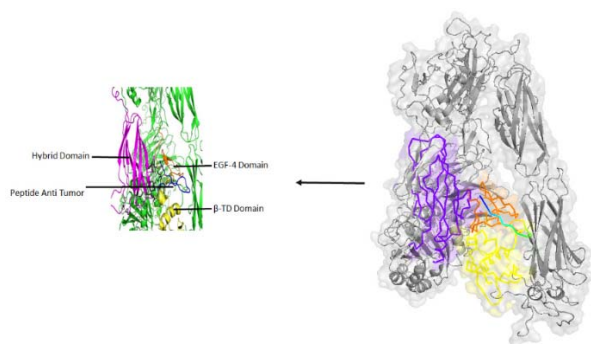
شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از برنامه گرومکس 5/۱ و ثابت های نیروی gromos 53a6 انجام شد [15]. مدل آب مورد استفاده در این شبیه سازی TIP3P و جعبه استفاده شده به صورت مکعبی انتخاب شد. بهترین حالت داکینگ مولکولی اینتگرین- پپتید برای ساختار اولیه به منظور شبیه سازی انتخاب شد. از روش PME برای محاسبه اندرکنش های الکتروستاتیک بلندبرد استفاده شد. به منظور فراهم سازی شرایط فیزیولوژیک ابتدا با یون های سدیم



نمودار (۱) الف) ساختار پپتید بعد از شبیه‌سازی به همراه تغییرات rmsd: ب) کلاستر طی زمان: ج) انعطاف‌پذیری از ۲۰ نانوثانیه انتهایی

جدول (۱) نتایج داکینگ مولکولی پپتید و اینتگرین

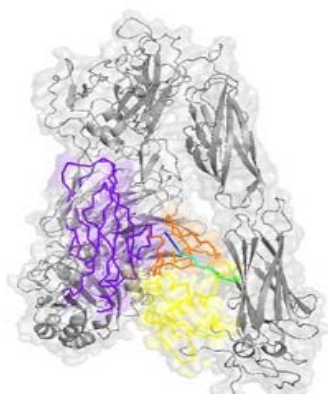
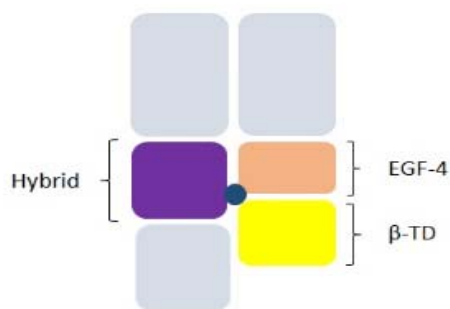
خوشه	امتیاز Haddock	اندازه خوشه	انرژی واندروالسی	انرژی الکتروستاتیکی	Desolvation Energy	Restraints violation Energy	Buried Surface	Z-score
۱	-۳۹۷/۴	۴۸	-۵۹/۹	-۱۱۴/۱	-۳۳۴/۵	۱۹۸/۴	۱۶۷۲/۹	-۰/۴
۲	-۴۱۶/۲	۴۷	-۷۴/۲	-۱۱۷/۷	-۳۴۰/۸	۲۲۳	۲۰۴۵/۵	-۱/۳
۳	-۴۰۴	۲۹	-۸۱/۵	-۶۴/۷	-۳۲۹/۱	۱۹۵/۳	۲۰۰۶/۵	-۰/۷
۴	-۳۸۵/۷	۲۰	-۴۲/۲	-۸۹/۸	-۳۴۷/۹	۲۲۲/۶	۱۴۹۳/۶	۰/۱
۵	-۴۱۷/۱	۱۷	-۷۴/۵	-۱۴۵/۲	-۳۲۷/۱	۱۳۵/۲	۲۰۹۵/۹	-۱/۳
۶	-۳۹۴/۷	۱۵	-۶۶	-۱۶۴/۴	-۳۱۴/۴	۱۸۶/۵	۲۰۳۰	-۰/۳
۷	-۳۵۳	۷	-۴۱	-۵۹	-۳۲۳/۴	۲۳۱/۵	۱۴۲۷/۴	۱/۶
۸	-۳۶۱/۷	۴	-۵۳/۷	-۱۱۲/۸	-۳۱۰/۲	۲۴۸/۳	۱۷۱۳/۹	۱/۲
۹	-۳۶۴/۸	۴	-۵۲/۷	-۹۰/۱	-۳۱۵/۶	۲۱۴/۷	۱۶۳۴	۱/۱



شکل (۱) اینتگرین- پپتید و محل اتصال پپتید روی اینتگرین

در اتصال بین پپتید و اینتگرین اندرکنش‌های هیدروفوب نقش مهمی دارند. آمینواسیدهای هیدروفوب در پپتید با محل‌های هیدروفوب در مرز هیبرید- EGF-4 اندرکنش برقرار می‌کنند و در

نتایج داکینگ مولکولی حاکی از اتصال پپتید به مرز بین دو زیرواحد اینتگرین است که طبق یافته‌های قبلی نقش مهمی در مسیر پیام‌رسانی اینتگرین دارد [1, 6]. این نواحی شامل مرز بین پایانه‌های هیبرید- β TD و هیبرید- EGF-4 است (شکل ۱). مهرپود و همکاران نشان دادند که بخش هیدروفوب بین بخش‌های متحرک و ثابت نظیر β TD و β A یکی از جایگاه‌های اتصال پروتئین‌های خارج سلولی در اینتگرین است. اتصال آنها به این محل موجب به‌هم‌ریختن میان‌کنش‌ها در این منطقه و در ادامه فعال‌شدن اینتگرین می‌شود. درواقع به‌هم‌ریختن میان‌کنش‌ها در این محل موجب تغییر وضعیت اینتگرین از حالت بسته به باز و فعال‌سازی اینتگرین می‌شود. بنابراین محل‌های هیدروفوب در مرز بین دو بخش متحرک و ثابت در اینتگرین از محل‌های اتصال پروتئین‌های خارج سلولی و داروهای موثر بر اینتگرین است [1].



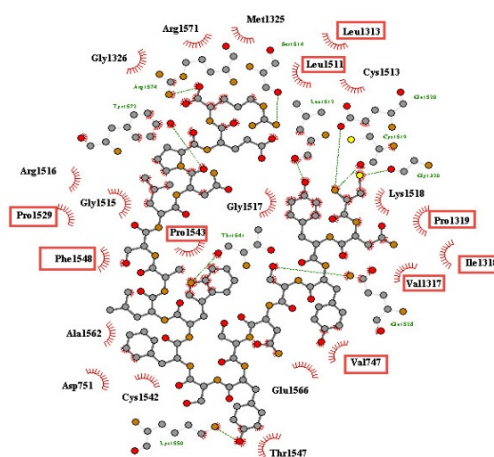
شکل ۳) تصویر شماتیک و اتمی مربوط به محل اتصال پپتید در اندرکنش با اینتگرین

در راستای بررسی نقش اتصال پپتید روی دینامیک اینتگرین سطح در دسترس دو پایانه βA و βTD بررسی شد. نتایج نشان می‌دهند که در دو پایانه سطح در دسترس در حضور پپتید نسبت به حالت کنترل کمتر است (نمودارهای ۳ و ۴). طی فعال‌سازی اینتگرین از حالت خمیده به حالت باز در می‌آید که در این تغییر حالت فاصله بین این دو زیرواحد بین دو بخش ثابت و متحرک اینتگرین افزایش می‌یابد. در اینجا اتصال پپتید به اینتگرین موجب مهار فاصله‌گرفتن دو پایانه βTD و βA از یکدیگر و مهار فعال‌سازی اینتگرین می‌شود^[1,7]. درواقع پپتید به واسطه تقویت اندرکنش‌ها در مرز بین زیرواحدهای موثر در فعال‌سازی آن فعالیت مهارکنندگی خود را اعمال می‌کند. بسیاری از فعال‌کننده و مهارکننده‌ها در مرز بین پایانه‌های مذکور بین دو بخش متحرک و ثابت اینتگرین قرار می‌گیرند. به‌طور مثال، توالی آرژنین- گلايسين- آسپارات با اتصال به مرز بین پایانه متحرک و ثابت با شکستن برخی پیوندها بین دو زیرواحد موجب فعال‌سازی اینتگرین می‌شود. احتمالاً در مدل مهارکنندگی برای پپتید مورد مطالعه عکس این حالت اتفاق افتاده است، به این صورت که با تقویت اندرکنش‌های هیدروفوب به‌عنوان اندرکنش‌های موثر در پایداری حالت خمیده و غیرفعال، اثر مهارکنندگی خود را اعمال می‌کنند^[10, 21, 22].

همچنین در نمودارهای ۵ و ۶ تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پایانه‌های موثر در فعال‌سازی اینتگرین نشان داده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در حضور پپتید پیوندهای هیدروژنی بین پایانه‌های مذکور نسبت به عدم حضور پپتید بیشتر است. درواقع

بهبود اندرکنش‌های هیدروفوب در این محل نقش دارند که موجب فعال‌سازی اینتگرین نیز می‌شوند. به نظر می‌رسد که پپتید با اتصال به مرز بین پایانه‌ها و تقویت اندرکنش‌ها در این محل موجب جلوگیری از باز شدن و فعال‌شدن اینتگرین می‌شود^[7,8].

در شکل ۲ محل اتصال پپتید در مرز بین پایانه‌های هیبرید و EGF-4 روی اینتگرین نشان داده شده است. در این اتصال آمینواسیدهای لوسین ۳۷۹، والین ۳۸۳، ایزولوسین ۳۸۴، لوسین ۳۸۷ و لوسین ۵۷۸ بیشترین نقش را بر عهده دارند (شکل ۲). طبق نتایج گذشته در مرز بین پایانه‌های هیبرید و EGF-4 آمینواسیدهایی نظیر لوسین ۳۷۵، ایزولوسین ۳۸۰، لوسین ۳۸۳ و لوسین ۵۷۸ نقش اصلی را در مقابل فعال‌سازی اینتگرین ایفا می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد که اتصال پپتید در مرز بین پایانه‌های هیبرید و EGF-4 موجب تقویت اندرکنش‌های هیدروفوب در این محل و تقویت اتصال در این ناحیه شود. درواقع اتصال پپتید در این محل موجب مهار فعال‌سازی اینتگرین از طریق تقویت اتصالات در این محل می‌شود^[1,7].



شکل ۲) آمینواسیدهای موثر در اندرکنش اینتگرین- پپتید (کادرهای قرمز آمینواسیدهای هیدروفوب موثر در اندرکنش موجود در کمپلکس هستند).

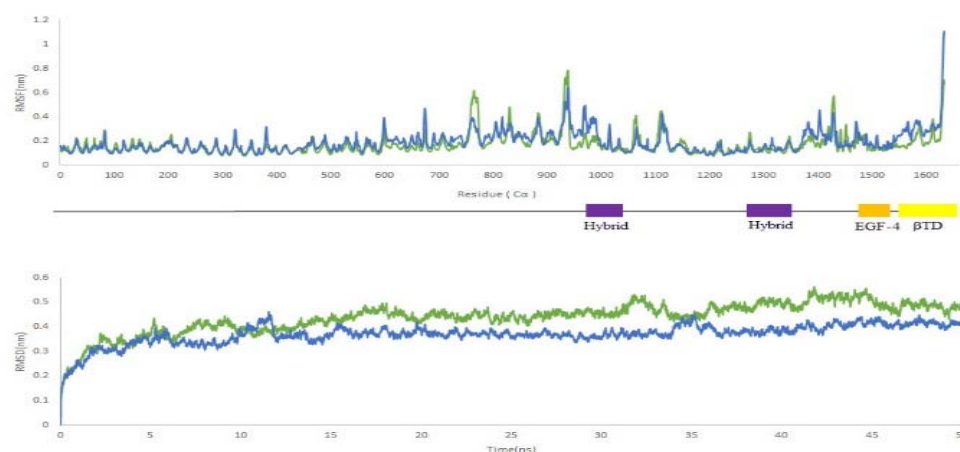
مطالعه اثر پپتید بر عملکرد پروتئین اینتگرین

نتایج پارامتر $rmsd$ اتم‌های زنجیره اصلی اینتگرین برای دو حالت اینتگرین و اینتگرین- پپتید ۳/۸ و ۴/۵ آنگستروم محاسبه شد. این اطلاعات نشان‌دهنده تغییرات ساختاری کمتر برای اینتگرین در حضور پپتید است. در راستای مطالعه انعطاف‌پذیری پروتئین اینتگرین و اثر پپتید روی این انعطاف‌پذیری پارامتر $rmsf$ محاسبه شد که نتایج حاصل انعطاف‌پذیری اندکی کمتر اینتگرین در حضور پپتید را نشان داد. در شکل ۳ محل اتصال پپتید روی ساختار اینتگرین به‌صورت شماتیک و ساختار اتمی قابل مشاهده است. نمودار ۲ نیز نتایج تغییرات ساختاری و انعطاف‌پذیری شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اینتگرین در حالت حضور و عدم حضور پپتید را نشان می‌دهد.

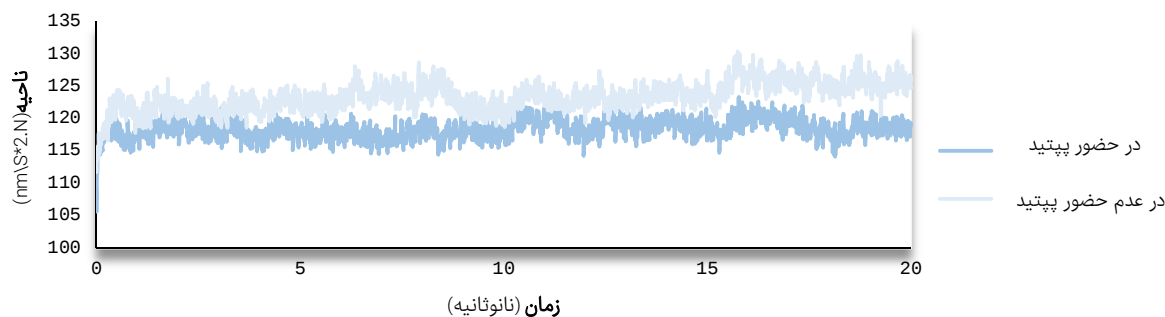
اینتگرین از طریق ناپایداری میان‌کنش‌های این قسمت موجب تغییر وضعیت اینتگرین به حالت فعال و باز خود می‌شود^[1,7]. در مطالعه حاضر، همچون سایر ترکیبات موثر بر فعالیت اینتگرین پپتید تومستاتین به مرز بین بخش‌های متحرک و ثابت متصل و از طریق تقویت میان‌کنش‌های هیدروفوب در این ناحیه موجب افزایش پایداری و حفظ حالت بسته و غیرفعال اینتگرین می‌شود.

پپتید از جدایی این پایانه‌ها طی فعال‌سازی ممانعت می‌کند و موجب مهار فعال‌سازی اینتگرین می‌شود.

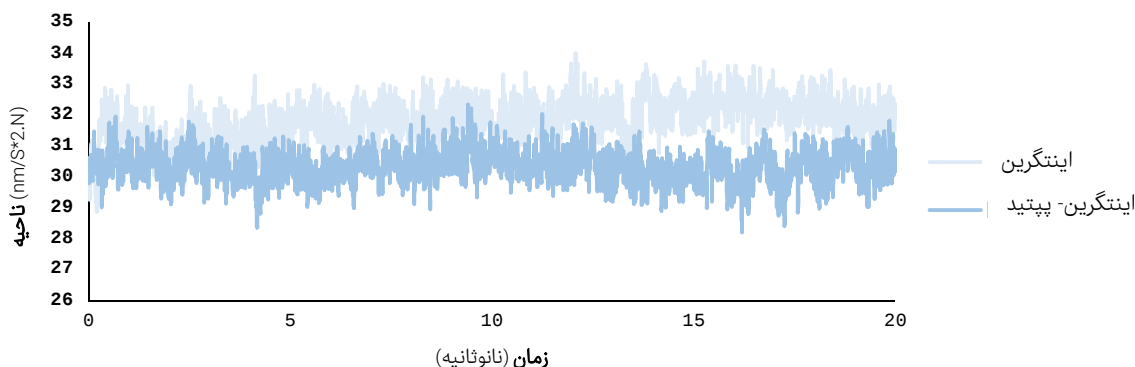
در مطالعات قبلی فعال‌کننده‌هایی نظیر پپتید RGD با تضعیف اندرکنش‌های هیدروفوب بین بخش‌های متحرک و ثابت اینتگرین نقش موثری در ناپایداری حالت بسته و تغییر وضعیت پروتئین اینتگرین به حالت باز و فعال دارند. در مطالعات چین و همکاران پپتید RGD با میان‌کنش با مرز بین دو بخش متحرک و ثابت



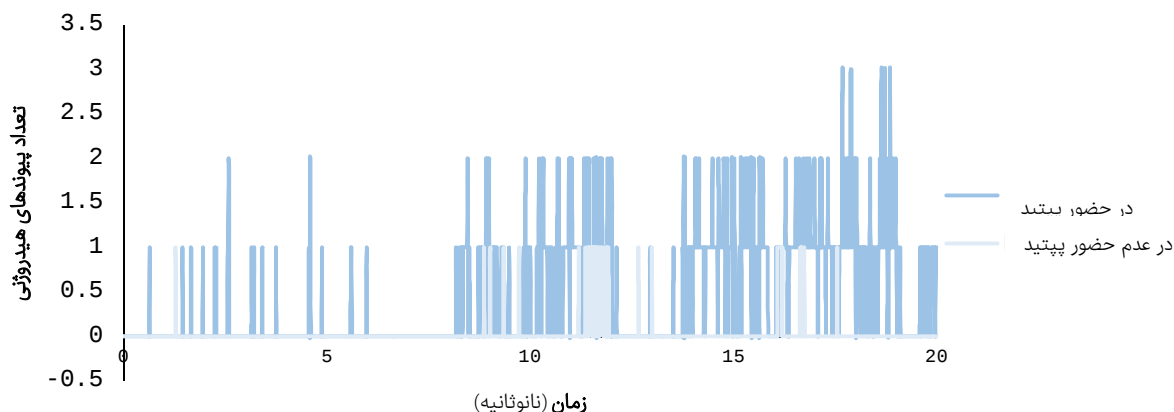
نمودار ۲) نتایج تغییرات ساختاری و انعطاف‌پذیری شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اینتگرین در حالت حضور و عدم حضور پپتید (رنگ آبی و سبز به ترتیب مربوط به شبیه‌سازی اینتگرین در حضور پپتید و عدم حضور آن هستند).



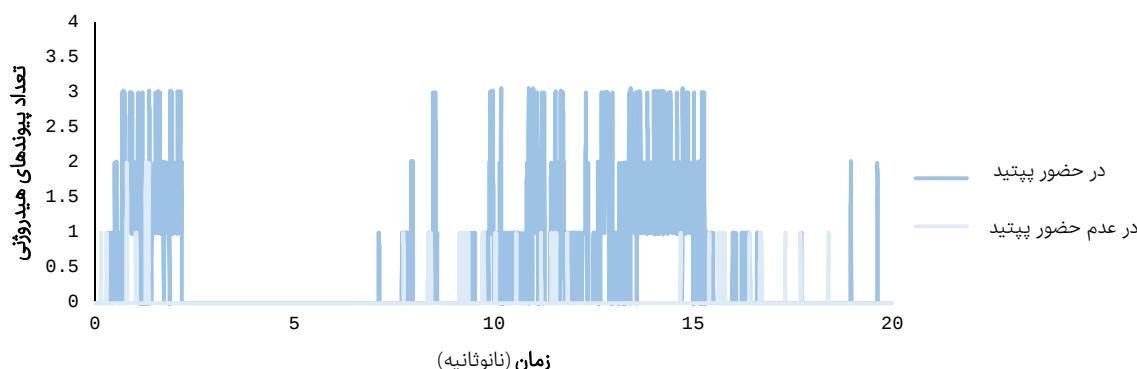
نمودار ۳) بررسی سطح در دسترس در پایانه βA در حضور و عدم حضور پپتید



نمودار ۴) بررسی سطح در دسترس در پایانه βTD در حضور و عدم حضور پپتید



نمودار ۵) تعداد پیوندهای هیدروژنی بین پایانه‌های EGF-4 و هیبرید در حضور و عدم حضور پپتید مهارکننده



نمودار ۶) تعداد پیوندهای هیدروژنی در حضور و عدم حضور پپتید بین دو پایانه βA و βTD

نگه‌داشتن پایانه‌های موثر در فعال‌سازی پپتید است. درواقع پپتید مشتق‌شده از تومستاتین با تقویت میان‌کنش‌های هیدروفوب بین بخش‌های متحرک و ثابت اینتگرین موجب حفظ و پایداری بیشتر حالت بسته این پروتئین شده است. در این مطالعه مکانیزم نوین برای مهارکننده‌های اینتگرین مطرح شد و نتایج حاصل می‌تواند به طراحی مهارکننده‌های دیگر کمک کند.

تشکر و قدردانی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: محمد قربانی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۵۰٪)؛ مجید تقدیر (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۵۰٪)

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Mehrbod M, Trisno S, Mofrad MR. On the activation of integrin $\alpha IIb\beta 3$: Outside-in and inside-out pathways. Biophys J. 2013;105(6):1304-15.
- 2- Xiong J, Balcioglu HE, Danen EH. Integrin signaling in control of tumor growth and progression. Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(5):1012-5.

نتیجه‌گیری

براساس مطالعات گذشته دینامیک و تغییرات ساختاری اینتگرین نقش اصلی را در فعال‌سازی این پروتئین بر عهده دارند. در مطالعه حاضر، به بررسی اثر مهارکنندگی پپتید مشتق‌شده از تومستاتین بر فعال‌سازی اینتگرین پرداخته شد. ابتدا شبیه‌سازی پپتید نشان‌دهنده شکل‌گیری ساختار سنجاق سر طی شبیه‌سازی است که به نظر می‌رسد موجب پایداری ساختار پپتید شود. از سوی دیگر، اکثر پپتیدهای ضد رگ‌زایی مشابه پپتید مذکور دارای ساختار سنجاق سری هستند. نتایج داکینگ اتصال پپتید به مرز بین پایانه‌های هیبرید- EGF4 را نشان می‌دهند که از طریق اندرکنش‌های هیدروفوب به این محل متصل شده است. اندرکنش‌های هیدروفوب این محل نقش مهمی در مهار فعال‌سازی اینتگرین دارند. بنابراین اتصال پپتید به این محل و همچنین تقویت اندرکنش‌های هیدروفوب موجود در این ناحیه منجر به مهار فعال‌سازی اینتگرین خواهد شد. نتایج حاصل از بررسی سطح در دسترس و پیوندهای هیدروژنی بین پایانه‌های $\beta TD/\beta A$ و هیبرید- EGF-4، اثر مهارکنندگی پپتید در فعال‌سازی اینتگرین و تقویت اندرکنش‌های بین پایانه‌های مذکور را نشان می‌دهند. در حضور پپتید، اندرکنش‌ها و تعداد پیوندهای هیدروژنی نسبت به عدم حضور پپتید افزایش معنی‌داری داشت که خود موید اثر تقویتی پپتید در کنار هم

- inside-out activation mechanism of platelet $\alpha\text{IIb}\beta 3$ integrin probed by multimicrosecond, all-atom molecular dynamics simulations. *Proteins Struct Funct Bioinform.* 2014;82(12):3231-40.
- 13- Eswar N, Eramian D, Webb B, Shen MY, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. In: Kobe B, Guss M, Huber T, editors. *Structural proteomics*. Totowa: Humana Press; 2008. pp. 145-59.
- 14- Berman H, Henrick K, Nakamura H. Announcing the worldwide protein data bank. *Nat Struct Mol Biol.* 2003;10(12):980.
- 15- Lindahl E, Hess B, Van Der Spoel D. GROMACS 3.0: A package for molecular simulation and trajectory analysis. *Mol Model Annu.* 2001;7(8):306-17.
- 16- Essmann U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG. A smooth particle mesh Ewald method. *J Chem Phys.* 1995;103(19):8577-93.
- 17- Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. ClusPro: A fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(suppl-2):W96-9.
- 18- De Vries SJ, Van Dijk M, Bonvin AM. The HADDOCK web server for data-driven biomolecular docking. *Nat Protoc.* 2010;5(5):883.
- 19- DeLano W. The PyMOL molecular graphics system; 2002.
- 20- Li YJ, Sun LC, He Y, Liu XH, Liu M, Wang QM, et al. The anti-tumor properties of two tumstatin peptide fragments in human gastric carcinoma. *Acta Pharmacol Sin.* 2009;30(9):1307-15.
- 21- Danhier F, Le Breton A, Pr  at V. RGD-based strategies to target alpha (v) beta (3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm.* 2012;9(11):2961-73.
- 22- Kapp TG, Rechenmacher F, Neubauer S, Maltsev OV, Cavalcanti-Adam EA, Zarka R, et al. A comprehensive evaluation of the activity and selectivity profile of ligands for RGD-binding integrins. *Sci Rep.* 2017;7:39805.
- 3- Morse EM, Brahme NN, Calderwood DA. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry.* 2014;53(5):810-20.
- 4- Springer TA, Zhu J, Xiao T. Structural basis for distinctive recognition of fibrinogen γC peptide by the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$. *J Cell Biol.* 2008;182(4):791-800.
- 5- Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, De Pereda JM, et al. Talin binding to integrin β tails: A final common step in integrin activation. *Science.* 2003;302(5642):103-6.
- 6- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: The end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(4):288-300.
- 7- Chen W, Lou J, Hsin J, Schulten K, Harvey SC, Zhu C. Molecular dynamics simulations of forced unbending of integrin $\alpha\text{V}\beta 3$. *PLoS Comput Biol.* 2011;7(2):e1001086.
- 8- Eikesdal HP, Sugimoto H, Birrane G, Maeshima Y, Cooke VG, Kieran M, et al. Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci.* 2008;105(39):15040-5.
- 9- Paladino A, Civera M, Belvisi L, Colombo G. High affinity vs. native fibronectin in the modulation of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin conformational dynamics: Insights from computational analyses and implications for molecular design. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(1):e1005334.
- 10- Monteiro Torres PH, Sousa GL, Pascutti PG. Structural analysis of the N-terminal fragment of the antiangiogenic protein endostatin: A molecular dynamics study. *Proteins Struct Funct Bioinform.* 2011;79(9):2684-92.
- 11- He GA, Luo JX, Zhang TY, Wang FY, Li RF. Canstatin-N fragment inhibits in vitro endothelial cell proliferation and suppresses in vivo tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(3):801-5.
- 12- Provasi D, Negri A, Collier BS, Filizola M. Talin-driven