

طراحی، مدلینگ، داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی یک فیوژن پپتید با توانایی اتصال به فاکتور رشد پروتئین های مورفوژنتیک استخوان

مینا بحری^{۱*}، صادق حسن نیا^۲، علیرضا شیرینی همدانی^۳، سودابه عسکری^۴

۱-دکترای تخصصی، گروه امور آکادمیک، مجموعه بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲-دکترای تخصصی، گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳-کارشناس ارشد، گروه امور آکادمیک، مجموعه بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۴-دکترای تخصصی، زیست تولید رازی، کرمانشاه، ایران

*صندوق پستی ۱۴۵۱۹۷۴۳۱۸، تهران، ایران

m-bahri@farabi.tums.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸

دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۰۶

چکیده

امروزه، مهندسی بافت استخوان، برای فراهم سازی سلول های مناسب برای استخوان سازی و فاکتورهای رشد، با ترکیب مواد زیستی به همراه یک داربست، راهکارهای ویژه ای را برای ترمیم بافت استخوانی به وجود آورده است. در این پژوهش، با روش های بیوانفورماتیکی پپتید فیوژنی طراحی شد که می تواند به فاکتورهای رشد دخیل در ترمیم بافت استخوان متصل و منجر به، به دام انداختن این فاکتورها در محل ضایعه شود. در این مطالعه در پپتید طراحی شده دومین متصل شونده به هپارین قرار داده شد و این پپتید با کمک داکینگ با فاکتور رشد در حالت های مونومر و دایمر کمپلکس شد. ساختارهای کمپلکس بر اساس کمترین امتیاز به دست آمده که به ترتیب شامل ۱۱۱۷- و ۹۱۲,۵- بود، انتخاب شدند. با توجه به نتایج داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی، این فیوژن پپتید قادر به اتصال به فاکتور رشد پروتئین های مورفوژنتیک استخوان می باشد. بر اساس نتایج شبیه سازی برخلاف پپتید در حالت مونومر، تغییرات نمودار RMSD کمپلکس پپتیدی در حالت دایمر بعد از ۱۰ نانو ثانیه از زمان شبیه سازی به ثبات رسیده و تا پایان شبیه سازی ثبات خود را حفظ کرده است.

کپی رایت © ۲۰۲۵، انتشارات دانشگاه تربیت مدرس (TMU Press). این مقاله به صورت دسترسی آزاد منتشر شده و تحت مجوز بین المللی Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 قرار دارد. بر اساس این مجوز، شما می توانید این مطلب را در هر قالب و رسانه ای کپی، باز نشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیر تجاری استفاده کنید.

این نتایج نشان می‌دهد که کمپلکس حاصل در حالت دایمر در اتصال به فاکتور رشد با توجه به بررسی میزان فاکتور RMSD دارای الگوی بهتری از پایداری نسبت به حالت مونومر می‌باشد.

کلید واژگان: فیوژن پپتید، فاکتور رشد، داکینگ، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، هپارین

۱- مقدمه

امروزه روش‌های جدیدی برای بازسازی و بهبود بافت‌های به شدت آسیب دیده یا از دست رفته توسط مهندسی بافت استخوان ارائه شده است. کمبود منابع استخوان، احتمال انتقال بیماری‌ها، تحریک سیستم ایمنی، تهاجمی بودن روش برداشت از بافت میزبان و امکان پس زدن استخوان پیوندی از جمله معایبی می‌باشند که در روش‌های مرسوم مانند آلوگرافت (بافت فرد دیگر) و اتوگرافت وجود دارد. با توجه به اینکه اکثر سلول‌های بدن بر روی یک ماتریکس خارج سلولی^۱ (ECM) رشد می‌کنند، بنابراین، ایجاد یک داربست مشابه ECM در محیط خارج از بدن از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار می‌باشد، زیرا این بستر به نوعی فعالیت‌های مختلف سلولی از جمله رشد، تکثیر، مهاجرت، تمایز و ... را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۱]. پروتئوگلیکان‌های ECM نظیر فیبرونکتین، فیبرین، ویترونکتین و ... دارای ساختار مشترکی به نام دومین متصل شونده به هپارین می‌باشند که از طریق آن به فاکتورهای رشد متصل می‌شوند [۲]. مشخص شده است که استفاده از این دومین‌ها به همراه فاکتورهای رشد باعث انتشار آهسته این فاکتورها تا ۳ هفته می‌شود که بسیار در مهندسی بافت با ارزش می‌باشد. با استفاده از روش سنجش SPR و الایزا نشان داده شده است که فیبرین یا فیبرونوژن و دومین متصل شونده به هپارین مربوط به آن به چندین فاکتور رشد از خانواده $TGF-\beta$ ، FGF، VEGF، PDGF و خانواده نوروتروپین متصل می‌شوند. بنابراین، بر اساس این اینترکشن‌های بی‌قاعده و بسیار قوی بین فاکتورهای رشد و فیبرین (نوژن) می‌توان گفت که اتصال

فاکتورهای رشد یکی از عملکردهای اصلی فیبرین می‌باشد و در ترمیم بافت‌ها، نقش بسیار اساسی را ایفا می‌کند. برای ارزیابی ظرفیت اتصال فاکتورهای رشد به این بخش از دومین اتصال شونده به هپارین، ابتدا ظرفیت اتصال فاکتورهای رشد به فیبرونوژن را بررسی و مشاهده کردند که فاکتورهای رشد از خانواده PDGF و FGF و نیز از سوپر فامیلی $TGF-\beta$ که شامل $TGF-\beta 1$ ، $TGF-\beta 2$ ، BMP-2/7 heterodimer و BMP-2 می‌باشند، به فیبرینوژن متصل می‌شوند. سپس، ظرفیت اتصال این فاکتورهای رشد را برای اتصال به دومین متصل شونده به هپارین مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که تمامی فاکتورهای رشد ذکر شده، با این دومین نیز اتصال دارند و تنها اتصال فاکتورهای FGF-7 و $TGF-\beta 2$ به این دومین اندکی ملایم‌تر از اتصال آنها به فیبرینوژن می‌باشد. بنابراین، فیبرین (نوژن) می‌تواند نقش گسترده‌ای در اتصال فاکتورهای رشد درون لخته فیبرینی بازی کند. در نهایت، با مهندسی یک ماتریکس مقلد فیبرین که ویژگی‌های اتصال به فاکتورهای رشد را همانند فیبرین از خود نشان می‌دهد می‌توان به اهداف مهندسی بافت در زمینه بهبود زخم و سایر زمینه‌ها، دست یافت. با این کار نشان داده شد که استفاده از اینترکشن بین ECM و GFs در بیومتریال‌هایی با منشأ غیرانسانی از نظر بالینی می‌تواند مفید باشد که با الحاق بخش Fg $\beta 15-66$ از دومین متصل شونده به هپارین نو ترکیب به این ماتریکس مقلد فیبرین یا سایر بیومتریال‌ها می‌توان ظرفیت اتصال آن بیومتریال‌ها را بررسی کرد [۳-۸]. در این مطالعه با استفاده از دومین متصل شونده به هپارین در N ترمینال فیبرونوژن با استفاده

¹ Extracellular matrix

از یک مطالعه این سیلیکو فیوژن پپتیدی طراحی شد که دارای یک قسمت هیدروکسی آپاتیت به منظور خالص سازی آن در زمان ساخت نو ترکیب آن است. در ارتباط با طراحی این فیوژن پپتید و متعاقبا سنتز و بررسی فعالیت درون آزمایشگاهی آن، آنالیز ساختارهای سه بعدی و رفتار دینامیکی آن و انجام یک مطالعه این سیلیکو می تواند اولین گام برای انجام مطالعه تجربی برای این فیوژن پپتید باشد. انجام داکینگ و شبیه سازی دینامیک مولکولی می تواند ابزارهای مناسبی برای پیش بینی اتصال این فیوژن پپتید با فاکتورهای رشد باشد [۹]. در این مطالعه با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و سرورهایی که موجود است یک داربست زیستی و با بهره گیری از ناحیه دومین متصل شونده به هپارین در فیبرین، یک پپتید فیوژن با قابلیت اتصال هم زمان به داربست سرامیکی از یکسو و از سمت دیگر قابلیت اتصال و به دام اندازی فاکتورهای رشد طراحی شد و نحوه اتصال آن با فاکتور رشد BMP با داکینگ مولکولی و همچنین پایداری آن با شبیه سازی دینامیک مولکولی بررسی شد.

۲- مواد و روش ها

در این مطالعه، توان اتصال فیوژن پپتید به فاکتورهای رشد با کمک مطالعات بیوانفورماتیکی بررسی شد. در ابتدا توالی آمینواسیدی فیوژن پپتید مورد نظر طراحی شد و ساختار سه بعدی و میانکنش آن با فاکتور رشد بررسی و در نهایت شبیه سازی دینامیک مولکولی برای آنالیز این میانکنش انجام شد و فاکتورهای مختلفی بررسی شد. مراحل کار در ادامه با جزئیات توضیح داده شده است.

۱-۲ طراحی سازه فیوژن پپتید

یک فیوژن پپتید با سه ناحیه مشخص به طول ۷۴ آمینواسید طراحی شد (شکل ۱). بخش اول شامل آمینواسیدهای ۱۵ تا ۶۵-N-ترمینال زنجیره بتای فیبرونوژن می باشد و مربوط به دومین متصل شونده به هپارین است و ناحیه دوم یک لینکر انعطاف پذیر است که از دو توالی لینکر عمومی G4S تشکیل شده است. بخش سوم نیز، یک توالی ۱۲ آمینواسیدی (SVSVGMKPSRP) شامل ناحیه متصل شونده به بستر سرامیکی هیدروکسی آپاتیت و توالی حاصل از یک پژوهش آزمایشگاهی مبتنی بر بیان فاژی می باشد [۱۰]. توالی مربوط به قسمت های مختلف ژن کد کننده این فیوژن پپتید از بانک ژنی NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) به دست آمد.

۲-۲ پیش بینی ساختار سه بعدی فیوژن پپتید

برای تعیین ساختار سه بعدی پپتید فیوژن، از روش مدل سازی مقایسه ای و با استفاده از نرم افزار modeler 9.20 انجام شد. از نرم افزارهای Chimera 1.10.2 [۱۱] و Swiss-PDB viewer 4.10 [۱۲] برای انجام مطالعات ساختاری استفاده شد. از میان مدل های حاصل، مدلی که با پایین ترین مقدار تابع هدف، به عنوان مدل اصلی برای ادامه بررسی ها انتخاب شد. تأیید اعتبار مدل ها نیز با استفاده از فاکتورهای Verify 3D، Errat، ProSA و ProQ انجام شد [۱۳ و ۱۴].

۳-۲ بررسی میانکنش فیوژن پپتید با پروتئین BMP

پس از آنکه ساختارهای مربوط به حالت مونومر و دایمر پپتید ایجاد شد، در مرحله بعد میانکنش این پپتیدها با پروتئین BMP با روش داکینگ و با استفاده از سرور CLUSPRO (<https://cluspro.org/login.php>) ارزیابی شد.



شکل ۱ توالی آمینو اسیدی پپتید فیوژن

۲-۴ شبیه سازی دینامیک مولکولی^۱

شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از نرم افزار AMBER انجام شد. ساختارهای ورودی با میدان نیروی^۲ ff99SB [۱۵] آماده سازی شدند. وضعیت صحیح هیدروژن هیستیدین ها برای تمامی هیستیدین های موجود در ساختار ایجاد و پیوندهای دی سولفید برای پروتئین تعریف شد. سپس، بار سطحی ساختار با افزودن چند یون سدیم و کلر خنثی شد. پروتئین در لایه ای از مولکول های آب TIP3P به ضخامت ۸ آنگستروم قرار داده شد. کاهش انرژی^۳ بر روی ساختارها با ۵۰۰۰ گام با روش steepest descent برای حذف ایتراکشن های واندروالس و تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکول های آب و کمپلکس انجام شد. در مرحله بعد، دمای سیستم به تدریج از ۰ تا ۲۹۸ درجه کلون به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه در حجم ثابت افزایش یافت و پس از آن در فشار ثابت به مدت ۱۰۰ پیکوثانیه سیستم به حالت تعادل رسانده شد. شبیه سازی دینامیک مولکولی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و در مدت زمان ۵۰ نانوثانیه به انجام رسید. میانکنش های غیرپیوندی^۴ با فاصله ۱۰ آنگستروم به روش PME^۵ محاسبه شد. برای افزایش سرعت محاسبات از الگوریتم SHAKE برای محدود کردن پیوندهای درگیر در اتم هیدروژن استفاده شد [۱۶]. در نهایت اطلاعات شبیه سازی در فواصل ۰/۴ پیکوثانیه برای انجام آنالیز ذخیره شد.

۲-۵ آنالیز نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی

نتایج شبیه سازی با کمک نرم افزار AMBER به صورت ریشه میانگین مجذور انحراف ها^۶ (RMSD)، ریشه میانگین مجذور نوسانات^۷ (RMSF) و شعاع ژیراسیون^۸ با استفاده از ماژول های gmx gyrate، gmx rmsf، gmx rms بررسی شد. محاسبه RMSD بین ساختارهای حاصل و یک ساختار مرجع مهم ترین روش برای ارزیابی پایداری شبیه سازی دینامیک مولکولی در طول زمان می باشد. برای مطالعه حرکات اصلی در سیستم، RMSD برای اتم های کربن آلفا به دست آمد. همچنین، انعطاف پذیری ساختار بر اساس RMSF اتم های کربن آلفا محاسبه شد. شعاع ژیراسیون نیز که یکی از پارامترهای تعیین کننده در میزان تراکم ساختار می باشد، در طول مدت شبیه سازی به دست آمد [۲۰-۱۷].

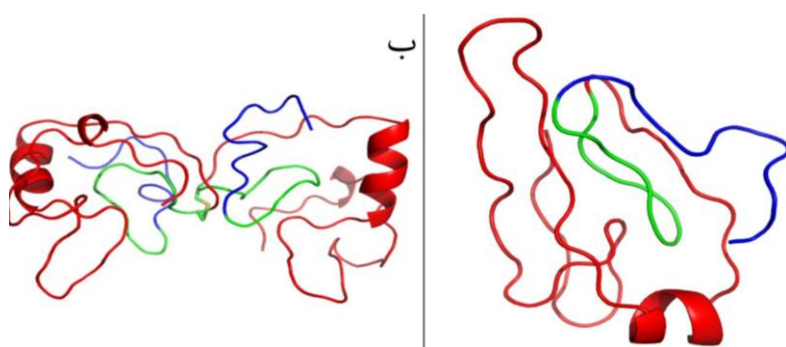
۳- نتایج و بحث

در این مطالعه، طراحی و توان اتصال فیوژن پپتید به فاکتورهای رشد با کمک ابزارها و سرورهای بیوانفورماتیکی به صورت یک مطالعه/این سیلیکو بررسی شد. آنالیز/این سیلیکو از طریق پیش بینی ساختار سه بعدی و شبیه سازی داکینگ مولکولی و نیز برای پیش بینی تمایل اتصال فیوژن پپتید می تواند راهی موثر در کاهش زمان و هزینه در انتخاب فیوژن پپتید های موثر پیش از انجام مطالعات درون آزمایشگاهی باشد [۲۱ و ۲۲]. در این

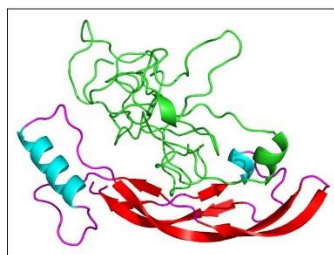
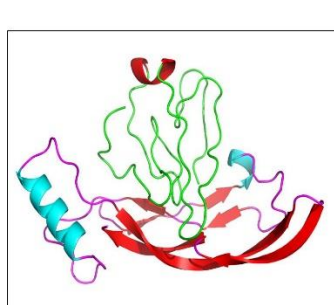
^۱ Particle Mesh Ewald^۲ Root Mean Square Deviation^۳ Root Mean Square Fluctuation^۴ Radius of gyration^۵ Molecular Dynamics Simulation^۶ Force field^۷ Energy Minimization^۸ Non-bonded interactions

مطالعه، برای مدل‌سازی فیوژن پپتید در حالت مونومر از سرور phyre2 و در حالت intensive استفاده شد (شکل ۲). این سرور برای مدل‌سازی پروتئین از دو روش normal و intensive استفاده می‌کند که روش normal سرعت بالاتر و دقت پایین‌تری دارد. در حالی که، روش intensive دقیق و نسبتاً زمان‌بر می‌باشد به همین دلیل از روش intensive استفاده شد. برای مدل‌سازی پپتید در حالت دایمر حاوی پیوند دی‌سولفید نیز از نرم‌افزار MODELLER استفاده شد (شکل ۲ ب). این سرورها به طور گسترده برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین‌ها استفاده می‌شوند. با این وجود، روش‌های دیگری از جمله مدل‌های یادگیری عمیق یا RF-diffusion نیز برای طراحی ساختار پروتئین وجود دارند. RF-diffusion روشی برای طراحی ساختار، با یا بدون اطلاعاتی مانند موتیف و غیره است که می‌تواند طیف وسیعی از چالش‌های طراحی پروتئین را انجام دهد [۲۳].

شکل ۲ ساختار سه بعدی فیوژن پپتید در حالت مونومر (آ) و دایمر (ب). در این تصویر رنگ قرمز نشان دهنده توالی قبل از لینکر، رنگ سبز خود لینکر و رنگ آبی بعد از لینکر می‌باشد.



شکل ۲ ساختار سه بعدی فیوژن پپتید در حالت مونومر (آ) و دایمر (ب). در این تصویر رنگ قرمز نشان دهنده توالی قبل از لینکر، رنگ سبز خود لینکر و رنگ آبی بعد از لینکر می‌باشد.



شکل ۳ تصویر حاصل از داکینگ فیوژن پپتید مورد نظر در حالت مونومر (آ) و دایمر (ب) با پروتئین BMP

پس از آنکه ساختارهای سه بعدی مربوط به حالت مونومر و دایمر پپتید ایجاد شد، میانکنش این پپتیدها با پروتئین BMP با روش داکینگ و با استفاده از سرور CLUSPRO بررسی شد. تصویر حاصل از داکینگ فیوژن پپتید مورد نظر در حالت مونومر و دایمر با پروتئین BMP در شکل ۳ نشان داده شده است.

کمپلکس انتخاب شده در حالت مونومر مربوط به کلاستر صفر می باشد. همان طور که در جدول ۱ نشان داده شده است، این کلاستر دارای ۱۲۸ عضو بوده و اسکور میانی آن برابر ۷۷۴- و بهترین اسکور نیز برابر با ۹۱۲- می باشد. در حالت دایمر نیز مانند حالت قبل بهترین کلاستر جهت ادامه کار انتخاب شد و نتایج ۳ کلاستر اول در جدول ۲ مشاهده می شود. لازم به ذکر است که هر اندازه اسکور مورد نظر منفی تر باشد نشان دهنده قوی بودن اتصال بین دو پروتئین می باشد. در واقع، پیش بینی میل اتصال فیوژن پپتید به BMP

با داکینگ نشان داد که این فیوژن پپتید اتصال خوبی با BMP برقرار می کند. در ادامه برای بررسی پایداری کمپلکس ایجاد شده از روش شبیه سازی دینامیک مولکولی استفاده شد. تاخوردگی مناسب و پایداری ساختاری از چالش های اساسی در کاربرد فیوژن پپتیدها می باشد [۲۴]. شبیه سازی دینامیک مولکولی با فراهم آوردن اطلاعاتی در زمینه ساختار دینامیکی و پیش بینی تاخوردگی پروتئین و پایداری ساختاری از مزایای مهمی برخوردار است [۲۵]. شبیه سازی دینامیک مولکولی این امکان را فراهم می کند که آمینواسیدهای درگیر در میانکنش جابه جا شده و بهترین جایگاه را اشغال کنند و در نتیجه باعث پایداری ساختار کمپلکس ایجاد شده می شود. در این مطالعه، برای انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی از نرم افزار گرومکس استفاده شد و شبیه سازی به مدت زمان ۵۰ نانوثانیه انجام شد.

جدول ۱ نتایج ۳ کلاستر اول داده های مربوط به ویژگی های ساختارهای انتخاب شده در اتصال مونومر با پروتئین BMP

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	128	Center	-774.5
		Lowest Energy	-912.2
1	88	Center	-737.3
		Lowest Energy	-839.9
2	85	Center	-776.8
		Lowest Energy	-873

جدول ۲ نتایج ۳ کلاستر اول داده های مربوط به ویژگی های ساختارهای انتخاب شده در اتصال دایمر با پروتئین BMP

Cluster	Members	Representative	Weighted Score
0	128	Center	-894.3
		Lowest Energy	-1117.5
1	88	Center	-979.5
		Lowest Energy	-1006.2
2	85	Center	-915.7
		Lowest Energy	-1017.7

نتیجه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی یک پروتئین، رفتار ماکرومولکول یا سیستم در طی یک زمان مشخص و مورد نظر است که با استفاده از معادلات حرکت نیوتن و توابع انرژی پتانسیل حاصل می‌شود.

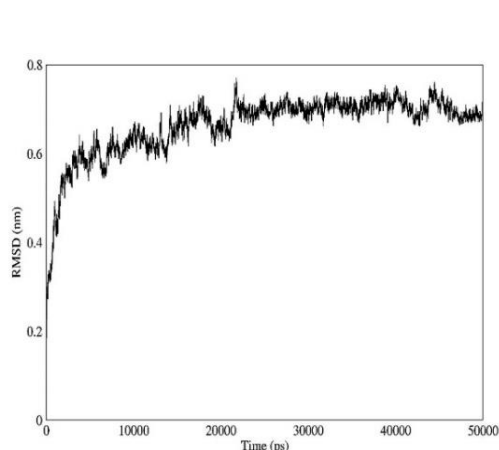
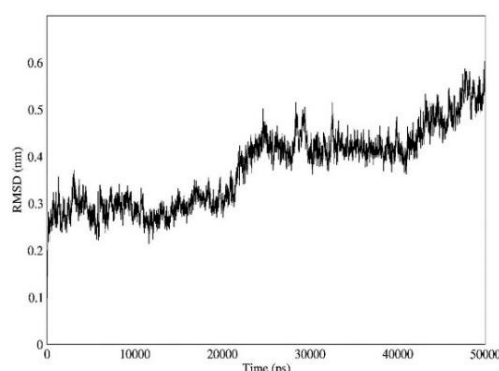
خروجی شبیه‌سازی یک سری از ساختارهای ایجاد شده در طی زمان شبیه‌سازی است که روند تغییرات ساختار را در طی زمان مورد نظر ارائه می‌دهد که چگونگی این تغییرات دینامیک سیستم یا مولکول را منعکس می‌کند. اغلب شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی تحت شرایط مقادیر ثابت تعداد اتم، حجم، دما انجام می‌گیرد. اما اخیراً شبیه‌سازی‌ها تحت شرایط ثابت تعداد اتم، فشار و دما انجام می‌شود. زیرا تحت این شرایط نتایج شبیه‌سازی با شرایط آزمایشگاهی بیشتر همخوانی دارد و رفتار واقعی سیستم در شرایط تجربی بهتر منعکس می‌شود. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی می‌تواند به فهم تغییرات ساختاری، انعطاف پذیری نواحی مختلف مولکول در سطح اتمی کمک کند. اطلاعات مربوط به ساختمان سه بعدی پروتئین‌ها که با روش‌های تجربی به دست می‌آید در واقع میانگینی از رویدادهایی است که به طور لحظه‌ای در مولکول اتفاق می‌افتند و به همین دلیل بسیاری از جزئیات لازم برای درک سازوکار عمل پروتئین را روشن نمی‌کند. حتی اگر حالت ماکروسکوپی سیستم ثابت باشد، حالت میکروسکوپی مولکول‌های مختلف با هم اندکی متفاوت هستند. گرچه این تفاوت‌ها اندک هستند، اما با توجه به ابعاد و ظرافت عمل مولکول‌های پروتئینی به هیچ وجه قابل صرف نظر نیستند. از این منظر ساختمان سه بعدی یک مولکول پروتئینی یک ساختار منحصربه‌فرد نیست، بلکه مجموعه‌ای از ساختارهای نزدیک به هم است که با گذشت زمان به یکدیگر تبدیل می‌شوند و همه آنها باید در محاسبه‌ها و تحلیل‌های مربوط به مطالعه نحوه عمل پروتئین‌ها در نظر گرفته شوند [۲۹-۲۶]. در حال حاضر،

شواهد کافی وجود دارد که حرکت‌های درون مولکولی پروتئین‌ها برای تأمین نیازهای مختلف مراحل متعدد سازوکار عمل یک مولکول، پویایی لازم را فراهم می‌کنند [۳۱ و ۳۰]. این شواهد همچنین نشان می‌دهند که حرکت‌های درون مولکولی در تمام جهت‌های فضا یکسان نیستند و حرکت‌هایی که اهمیت بیشتری برای عمل پروتئین دارند با احتمال بالاتری روی می‌دهند [۳۲-۳۴]. با توجه به اهمیت این حرکت‌ها در تاخوردگی پروتئین‌ها^۱، فعالیت آنزیمی، اتصال و شناسایی مولکولی^۲ و مطالعات دینامیک مولکولی راهی اساسی برای شناخت رابطه حرکت‌های مولکول و نحوه کارکرد آن است. یافتن عوامل ساختاری که به حرکت‌های درون مولکولی جهت می‌دهند یک گام اساسی برای شناخت رابطه ساختمان و عمل پروتئین‌ها است که در حال حاضر یکی از اولویت‌های پژوهش‌های زیست‌شناسی است و به‌ویژه برای مهندسی و طراحی پروتئین مهم است. مطالعه حرکت‌های درون مولکولی با روش‌های تجربی با مشکلات خاصی همراه است. روشی برای این مطالعات مناسب است که علاوه بر فراهم کردن اطلاعات کافی از جزئیات ساختاری بر دو مشکل که روش‌های فعلی تجربی مطالعه ساختمان سه بعدی با آن مواجه هستند فائق آید. اول اینکه زمان ثبت بسیار کوتاه (در حد فمتوثانیه) داشته باشد و دوم اینکه بتواند اطلاعات تنها یک مولکول را ثبت کند. بنابراین، شبیه‌سازی رایانه‌ای در حال حاضر دقیق‌ترین روش مطالعه حرکت‌های درون مولکولی است. در این مطالعه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای فیوژن پپتید موردنظر به همراه پروتئین BMP انجام شد. برای ارزیابی پایداری ساختاری، یکی از بهترین فاکتورها در شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی فاکتور RMSD می‌باشد. این فاکتور نشان دهنده میانگین جابه‌جایی اتم‌های کربن آلفا در طول زمان شبیه‌سازی می‌باشد و در واقع RMSD نشان دهنده پایداری فیوژن

^۲. Molecular recognition^۱. Protein folding

ثانیه)، نمودار به ثبات رسیده و تا پایان شبیه‌سازی ثبات خود را حفظ کرده است. در مطالعه‌ای مشابه و این سیلیکو با انجام مطالعات بیوانفورماتیک و داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اتصال به فاکتور رشد اندوتلیال واسکولار را بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که این اتصال برقرار می‌شود و پایدار می‌باشد [۳۶]. در مطالعه‌ای که توسط لیو و همکاران اخیراً انجام شده است، پایداری حالت‌های مختلف اتصال لیگاند به پروتئین با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بررسی شده است. آنها نشان دادند که شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی به اندازه کافی دقیق هستند تا اکثر موقعیت‌های اتصال تجربی را به درستی نشان دهند [۳۷].

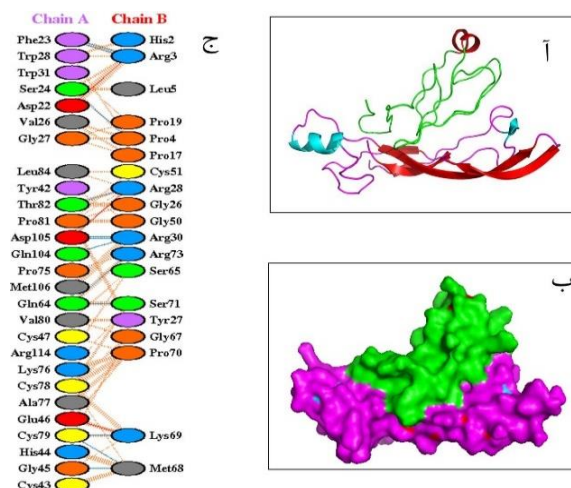
پیتید است [۳۵]. همان‌طور که در شکل ۴ آ مشاهده می‌شود تا زمان ۲۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی، ساختار پیتید فیوژن در حالت مونومر دارای پایداری نسبی می‌باشد، ولی پس از این زمان افزایش ۰/۱ نانومتری در میزان RMSD مشاهده می‌شود و تا زمان ۴۰ نانوثانیه در محدود ۰/۴ نسبتاً ثابت باقی می‌ماند و پس از این زمان مجدد افزایش چشمگیری در میزان RMSD دیده می‌شود که نشان می‌دهد کمپلکس پیتید پس از گذشت ۵۰ نانوثانیه از شبیه‌سازی پایدار نشده است. برای بررسی میزان پایداری فیوژن در حالت دایمر نیز فاکتور RMSD ارزیابی شد. همان‌طور که در شکل ۴ ب مشاهده می‌شود برخلاف پیتید مونومر، کمپلکس پیتیدی در حالت دایمر پایدار بوده و پس از زمان ۱۰۰۰۰ پیکوثانیه از شبیه‌سازی (۱۰ نانوثانیه)



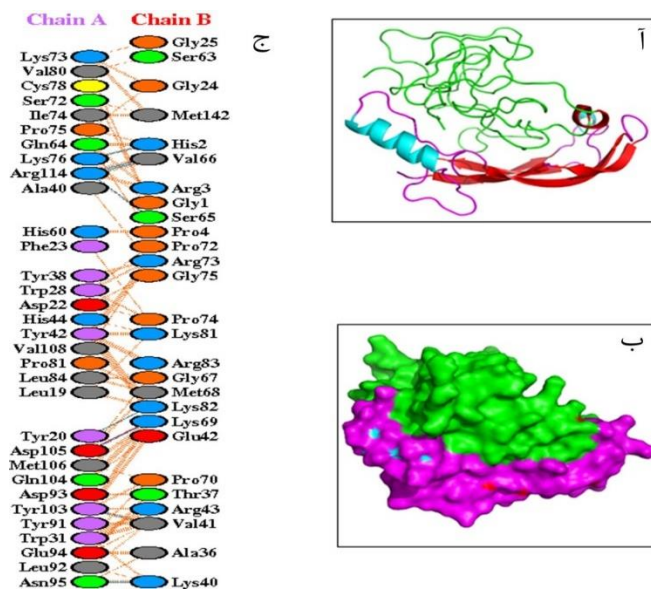
شکل ۴ RMSD مربوط به شبیه‌سازی ساختار فیوژن پیتید موردنظر در حالت مونومر (آ) و دایمر (ب) به همراه پروتئین BMP

در شکل ۶ در حالت دایمر که در دو حالت مختلف (حالت Ribbon و Surface) نشان داده شده است. در این دو تصویر زاویه دید دقیقاً از یک ناحیه بوده و ساختار سبز رنگ مربوط به پپتید و ساختار قرمز رنگ مربوط به BMP می‌باشد.

همچنین، در ادامه جایگاه میانکشی پپتید با پروتئین BMP مربوط به ساختار نهایی حاصل از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی در حالت مونومر و دایمر ارزیابی شد. برای بررسی آمینو اسیدهای درگیر در میانکشی از نرم‌افزار LIGPLOT که در سرور pdbsum قرار دارد استفاده شد. در شکل ۵ کمپلکس پپتید با پروتئین در حالت مونومر و



شکل ۵ کمپلکس پپتید فیوژن در حالت مونومر با پروتئین در دو حالت مختلف (حالت ribbon (آ) و surface (ب)) نشان داده شده است. تصویر ج نیز آمینواسیدهای درگیر در میانکشی را بین دو زنجیره نشان می‌دهد.



شکل ۶ کمپلکس پپتید فیوژن در حالت دایمر با پروتئین در دو حالت مختلف (حالت ribbon (آ) و surface (ب)) نشان داده شده است. تصویر ج نیز آمینواسیدهای درگیر در میانکشی را بین دو زنجیره نشان می‌دهد.

طراحی فیوژن پپتیدهایی با قابلیت اتصال به فاکتورهای رشد قبل از انجام مطالعات درون آزمایشگاهی باشد.

۵- منابع

- [1] Boal D, Boal DH. *Mechanics of the Cell*: Cambridge University Press; 2012.
- [2] Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(12):4563-8.
- [3] Cardin AD, Weintraub H. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc*. 1989.۳۲-۲۱:(۱)۹;
- [4] Sakiyama SE, Schense JC, Hubbell JA. Incorporation of heparin-binding peptides into fibrin gels enhances neurite extension: an example of designer matrices in tissue engineering. *The FASEB Journal*. 1999;13(15):2214-24.
- [5] Munoz EM, Linhardt RJ. Heparin-binding domains in vascular biology. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2004;24(9):1549-57.
- [6] Rajangam K, Behanna HA, Hui MJ, Han X, Hulvat JF, Lomasney JW, et al. Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels. *Nano letters*. 2006;6(9):2086-90.
- [7] Tae G, Kim Y-J, Choi W-I, Kim M, Stayton PS, Hoffman AS. Formation of a novel heparin-based hydrogel in the presence of heparin-binding biomolecules. *Biomacromolecules*. 2007;8(6):1979-86.
- [8] Martino MM, Briquez PS, Ranga A, Lutolf MP, Hubbell JA. Heparin-binding domain of fibrin (ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013:201221602.
- [9] Amidzadeh Z, Rismani E, Shokrgozar MA, Rahimi H, Golkar M. In silico design of fusion keratinocyte growth factor containing collagen-binding domain for tissue engineering application. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 2023;118:108351.
- [10] Roy MD, Stanley SK, Amis EJ, Becker ML. Identification of a highly specific

همچنین، در شکل ۵ ج و ۶ ج نیز آمینواسیدهای درگیر در میانکشی را بین دو زنجیره به ترتیب در دو حالت مونومر و دایمر را نشان می‌دهند. در این تصویر زنجیره B مربوط به فیوژن پپتید و زنجیره A مربوط به BMP می‌باشد. در این میانکشی، پیوند میان آمینواسیدهای مختلف بین دو زنجیره نشان داده شده است. در این مورد انواعی از پیوندهای یونی، واندروالس و هیدروژنی وجود دارد. در ارتباط با ایتراکشن‌های پروتئین-لیگاند با حضور پتانسیل‌های واندروالس، الکترواستاتیک و محافظت سطحی دقت پیش‌بینی بالایی (۹۳٪) برای این ایتراکشن وجود دارد [۳۸]. در این مطالعه اتصال پایدار BMP با فیوژن پپتید طراحی شده به واسطه دومین‌های متصل شونده به هپارین بررسی شد.

علاوه بر این، در مطالعه‌ای نها و همکاران حضور جایگاه‌های متصل شونده به هپارین را در BMP بررسی کردند [۳۹]. آنها گزارش کردند که احتمالاً محل‌های اتصال به هپارین در BMP-2 و 14 وجود داشته باشد. در مطالعه آنها شبیه‌سازی‌های داکینگ مولکولی وجود مکان‌های اتصال با میل ترکیبی بالا و پایین را در دایمر BMP-2 نشان داد. اخیراً نیز آیکول و همکاران نشان دادند که در BMP-4 محل اتصال به هپارین وجود دارد و توالی بازی در قسمت n-ترمینال به منظور اتصال به هپارین ضروری می‌باشد [۴۰]. همچنین، در مطالعه دیگری تشکیل استخوان القا شده توسط BMP9 به شدت با وارد کردن سایت‌های اتصال به هپارین افزایش می‌یابد و این توانایی با اتصال به ماتریکس‌های خارج سلولی تحریک می‌شود [۴۱].

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه با مدل‌سازی، داکینگ و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی فیوژن پپتیدی طراحی شد که قابلیت اتصال با فاکتور رشد رو دارد و می‌تواند اتصال پایداری برقرار کند. در این زمینه مطالعه بیوانفورماتیک می‌تواند گام موثری در

- design and discovery. *Frontiers Media SA*; 2020. p. 612.
- [22] Dana H, Mahmoodi Chalbatani G, Gharagouzloo E, Miri SR, Memari F, Rasoolzadeh R, et al. In silico analysis, molecular docking, molecular dynamic, cloning, expression and purification of chimeric protein in colorectal cancer treatment. *Drug design, development and therapy*. 2020;3:۲۹-۰۹
- [23] Watson JL, Juergens D, Bennett NR, Trippe BL, Yim J, Eisenach HE, et al. Broadly applicable and accurate protein design by integrating structure prediction networks and diffusion generative models. *BioRxiv*. 2022;2022.12. 09.519842.
- [24] Somers G. Structural aspects of fusion proteins determining the level of commercial success. *Fusion protein technologies for biopharmaceuticals: applications and challenges*. 2013;39-56.
- [25] Liu X, Shi D, Zhou S, Liu H, Liu H, Yao X. Molecular dynamics simulations and novel drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*. 2018;13(1):23-37.
- [26] Deng L, Vysotski ES, Markova SV, Liu ZJ, Lee J, Rose J, et al. All three Ca²⁺-binding loops of photoproteins bind calcium ions: The crystal structures of calcium-loaded apo-aequorin and apo-obelin. *Protein science*. 2005;14(3):663-75.
- [27] Karplus M, McCammon J. Dynamics of proteins: elements and function. *Annual review of biochemistry*. 1983;52(1):263-300.
- [28] Karplus M. Dynamics of proteins. *Advances in biophysics*. 1984;18:1.۹۰-۶۵
- [29] Karplus M, McCammon JA. The dynamics of proteins. *Scientific American*. 1986;254(4):42-51.
- [30] Karplus M, Swaminathan S, Ichiye T, Van Gunsteren W. Local and collective motions in protein dynamics. *Mobility and Function in Proteins and Nucleic Acids*. 1983:271.
- [31] Cannon WR, Singleton SF, Benkovic SJ. A perspective on biological catalysis. *Nature structural biology*. 1996;3(10):821.
- [32] Williams R. Are enzymes mechanical devices? *Trends in biochemical sciences*. 1993;18(4):115-7.
- [33] Ichiye T, Karplus M. Collective motions in proteins: a covariance analysis of atomic fluctuations in molecular dynamics and normal hydroxyapatite-binding peptide using phage display. *Advanced Materials*. 2008;20(10):1830-6.
- [11] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Wheeler DL. GenBank: update. *Nucleic acids research*. 20۲۰;۰۴suppl_1):D23-D6.
- [12] Rodriguez R, Chinea G, Lopez N, Pons T, Vriend G. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 1998;14(6):523-8.
- [13] Ye Y, Li Z, Godzik A. Modeling and analyzing three-dimensional structures of human disease proteins. *Biocomputing 2006: World Scientific*; 2006. p. 439-50.
- [14] Chiuri R, Maiorano G, Rizzello A, Del Mercato L, Cingolani R, Rinaldi R, et al. Exploring local flexibility/rigidity in psychrophilic and mesophilic carbonic anhydrases. *Biophysical journal*. 2009;96(4):1586-96.
- [15] Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its supplement TrEMBL in 1999. *Nucleic acids research*. 1999;27(1):49-54.
- [16] Duan Y, Wu C, Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Zhang W, et al. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *Journal of computational chemistry*. 2003;24(16):1999-2012.
- [17] Darden T, York D, Pedersen L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. *The Journal of chemical physics*. 1993;98(12):10089-92.
- [18] Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of chemical physics*. 1983;79(2):926-35.
- [19] Schippers PH, Dekkers HP. Direct determination of absolute circular dichroism data and calibration of commercial instruments. *Analytical Chemistry*. 1981;53(6):778-82.
- [20] Webster DM. *Protein structure prediction: methods and protocols*: Springer Science & Business Media; 2000.
- [21] Brogi S, Ramalho TC, Kuca K, Medina-Franco JL, Valko M. In silico methods for drug

- computer-aided molecular design. 2017;31:201-11.
- [38] Burgoyne NJ, Jackson RM. Predicting protein interaction sites: binding hot-spots in protein-protein and protein-ligand interfaces. *Bioinformatics*. 2006;22(11):1335-42.
- [39] Gandhi NS, Mancera RL. Prediction of heparin binding sites in bone morphogenetic proteins (BMPs). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2012;1824(12):1374-81.
- [40] Aykul S, Maust J, Martinez-Hackert E. BMP-4 extraction from extracellular matrix and analysis of heparin-binding properties. *Molecular biotechnology*. 2022:1-15.
- [41] Siverino C, Fahmy-Garcia S, Niklaus V, Kops N, Dolcini L, Misciagna MM, et al. Addition of heparin binding sites strongly increases the bone forming capabilities of BMP9 in vivo. *Bioactive Materials*. 2023;29:241-50.
- mode simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1991;11(3):205-17.
- [34] Amadei A, Linssen AB, Berendsen HJ. Essential dynamics of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 1993;17(4):412-25.
- [35] Simmerling C, Strockbine B, Roitberg AE. All-atom structure prediction and folding simulations of a stable protein. *Journal of the American Chemical Society* . ۹-۱۱۲۵۸:(۳۸)۱۲۴:۲۰۰۲
- [36] Mitsi M, Hong Z, Costello CE, Nugent MA. Heparin-mediated conformational changes in fibronectin expose vascular endothelial growth factor binding sites. *Biochemistry*. 2006;45(34):10319-28.
- [37] Liu K, Watanabe E, Kokubo H. Exploring the stability of ligand binding modes to proteins by molecular dynamics simulations. *Journal of*

Design, Modeling, Docking and Molecular Dynamics Simulation of a Fusion Peptide with the Ability to Bind to Bone Morphogenetic Protein Growth Factor

Mina Bahri^{1,*}, Sadegh Hassannia², Alireza Shiri Hamedani³, Sudabeh Askari⁴

1. PhD, Department of Academic Affairs, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran.

2. PhD, Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Master of Science, Department of Academic Affairs, Imam Khomeini Hospital Complex, Tehran University of Medical sciences, Tehran, Iran.

4. PhD, Razi Biotechnology, Kermanshah, Iran

m-bahri@farabi.tums.ac.ir

Receipt: 2024/04/25

Accepted: 2025/01/27

Abstract

Today, the engineering of bone tissue has created special solutions to restore bone tissue by combining biological materials with a scaffold to provide cells suitable for bone formation and growth factors. In this research, a fusion peptide was designed with bioinformatics methods that can bind to the growth factors involved in bone tissue repair and lead to the trapping of these factors in the lesion site. In this study, heparin-binding domain was placed in the designed peptide and this peptide was complexed with growth factor in monomer and dimer forms with the help of docking. The structures of the complex were selected based on the lowest scores obtained, which included -912.5 and -1117, respectively. According to the results of docking and molecular dynamics simulation, this fusion peptide was able to bind to the growth factor of bone morphogenetic proteins. Based on the results of the simulation, unlike the peptide in the monomer state, the changes in the RMSD diagram of the peptide complex in the dimer state became stable after 10 nanoseconds from the simulation time and remained stable until the end of the simulation. These results show that the resulting complex in the dimer state has a better pattern of stability compared to the monomer state according to the investigation of the RMSD factor.

Keywords: Peptide fusion, Growth factor, Docking, Molecular dynamics simulation, Heparin