

مطالعه رایانه ساختار دمین FK در پروتئین شبه فولیستاتین 1

سیده شهربانو جعفری¹، رحمان امام زاده^{2*}، محبوبه نظری^{۳,4}، محمدرضا گنجعلی خانی⁵

1. دکتری، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
2. دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
3. دانشیار، مرکز تحقیقات غدد، انستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
4. دانشیار، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده ابن سینا، ACECR، تهران، ایران
5. دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده مسئول: r.emamzadeh@sci.ui.ac.ir

پذیرش: 1402/4/25

دریافت: 1401/11/26

چکیده

هدف: پروتئین شبه فولیستاتین 1 (FSTL1) نقش مهمی در تنظیم بقای سلول، تکثیر، تمایز، مهاجرت و تعدیل سیستم ایمنی بدن برعهده دارد. دمین FK این پروتئین 10 باقیمانده سیستئین محافظت‌شده دارد که پنج پیوند دی‌سولفیدی تشکیل می‌دهند. با وجود مطالعه‌های گسترده درباره عملکرد FSTL1، اطلاعات ساختاری محدودی از این مولکول مهم زیستی در دسترس است. به نظر می‌رسد افزایش دانش ما در این زمینه باعث بهبود کاربردهای زیست‌فناوری این پروتئین مهم با ارزش بالینی شود.

مواد و روش‌ها: با استفاده از سرور SWISS-MODEL و با استفاده از ساختار کریستالی دمین FK پروتئین FSTL1 موش با کد (PDB: 6jzw) به‌عنوان الگو، الگوهای ساختاری دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی تهیه شد. در مرحله بعد ساختارهای حاصل با استفاده از نرم‌افزار Swiss-PDB Viewer 4.10، Chimera 1.12، نمودار رامچاندن و سرور PDBSUM، از نظر فاصله دو باقیمانده سیستئین، محدوده خطای مدل‌سازی و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی بررسی شدند. سپس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از بسته نرم‌افزاری AMBER و با میدان نیروی ff14SB انجام شد.

نتایج: نتایج نشان داد که دمین FK بدون پیوند دی‌سولفیدی با ریشه میانگین مجذور انحراف‌ها (RMSD) و ریشه میانگین مجذور نوسان‌ها (RMSF)، بالاتری از دمین FK طبیعی است. علاوه بر این، شعاع ژیراسیون در دمین بدون پیوند دی‌سولفیدی به‌طور چشمگیری کمتر از دمین FK طبیعی است. نتایج حاصل بیان می‌کند که پیوندهای دی‌سولفیدی دمین FK در پایداری تاخوردگی ساختاری پروتئین نقش دارند و حذف این پیوندها باعث افزایش انعطاف‌پذیری ساختاری این دمین می‌شود.

واژه‌های کلیدی: انعطاف‌پذیری، پروتئین FSTL1، پیوندهای دی‌سولفیدی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

1- مقدمه

پروتئین شبه فولیستاتین¹ (FSTL1) یک گلیکوپروتئین ترشحی است که در آغاز به عنوان یک ژن القایی فاکتور رشد بتا انتقالی (TGF- β) شناسایی شد [1]. FSTL1 متعلق به خانواده پروتئین‌های Secreted protein acidic rich in cysteine- Follistatin (SPARC - Fst) است که یک دمین فولستاتین مانند (FS)، یک دمین kazal، یک جفت دمین اتصال به کلسیم EF-hand و به دنبال آن یک دمین انتهای کربوکسیلی مشابه با دمین فاکتور فون ویلبراند نوع C (VWFC) دارد. همچنین دمین FS به عنوان دمین FK نیز نامیده می‌شود، زیرا می‌تواند به یک دمین شبه فولیستاتین/استئونکتین (FOLN) و دمین kazal تقسیم شود [2]. دمین FK 10 باقیمانده سیستئین محافظت شده دارد که پنج پیوند دی سولفیدی تشکیل می‌دهد. این پنج پیوند دی سولفید (که در خانواده فولیستاتین بسیار محافظت شده است) برای پایداری تاخوردگی کلی ساختار پروتئین ضروری می‌باشد [3]. پروتئین FSTL1 به چهار پروتئین خانواده BM-40/SPARC/Osteonectin شباهت ساختاری زیادی دارد. طول حلقه بین دمین FS (باقیمانده‌های 30-35) و دمین Kazal (باقیمانده‌های 48-100) متغیر است و انعطاف‌پذیری نسبی متفاوت بین دمین FS و دمین Kazal در میان این پروتئین‌ها نشان می‌دهد. علاوه بر این، مطالعه‌ها نشان داده است که لوپ بین رشته بتای 2 و 3 (باقیمانده‌های 52-63) این پروتئین‌ها پتانسیل بار الکترواستاتیکی بسیار متفاوتی دارد و در اتصال به فاکتورهای اتصالی متفاوت نیز نقش دارد [3]. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که دو عضو دیگر این خانواده، یعنی FS و FSTL3 (FS-like 3) به اکتیوین، میوستاتین و پروتئین مورفوژنیک استخوان (BMP) متصل می‌شوند [2-9]. همچنین نشان داده شده است که FSTL1 به پروتئین‌های ابرخانواده TGF- β متصل می‌شود [10].

FSTL1 با مهار سیگنال‌دهی BMP در طول رشد ریه جنین، از آسیب ریه جلوگیری می‌کند [5] در حالی که با آسان‌سازی سیگنال‌دهی TGF- β در فیبروبلاست‌ها، فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین را هدایت می‌کند [8]. [13-11]. علاوه بر این مشخص شده است که FSTL1 چندین مسیر دیگر از جمله مسیر پروتئین تعاملی دیسکو 2 همولوگ (DIP2A) A، پروتئین کیناز اختصاصی سرین/ترئونین (AKT)، کیناز تنظیم‌شده با سیگنال خارج سلولی (ERK) و مسیر پروتئین کیناز فعال‌شده با AMP (AMPK) را در مسیرهای وابسته به نوع سلول و وابسته به محتوا تنظیم می‌کند [14-18]. مطالعه‌های پیشین نشان داده است که FSTL1 می‌تواند در الگوهای حیوانی به عنوان فاکتور ضدالتهاپی یا پروالتهاپی عمل کند. به تازگی نیز مشخص شده است که FSTL1 در پاسخ به رشد هیپرتروفی ناشی از سرین-ترئونین کیناز (AKT) و استرس قلبی از جمله افزایش فشار، آسیب ایسکمی و انفارکتوس قلبی، در قلب افزایش پیدا می‌کند [17]. در موش تجویز نظامند FSTL1 قلب را در برابر آسیب ایسکمی پرفیوژن (که همراه با کاهش آپوپتوز میوسیت است) محافظت می‌کند [17؛ 19]. FSTL1 باعث عملکرد سلول‌های اندوتلیال در شرایط *in vitro* می‌شود و رگ‌زایی دوباره عروق ناشی از ایسکمی را در داخل بدن سریع می‌کند. مطالعه FSTL1 در بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، آرتروز، فیبروز ریه و چاقی بر پتانسیل آن به عنوان نشانگر زیستی و همچنین هدفی برای مدیریت روند بیماری تأکید دارد [17؛ 20]. علاوه بر این در *in vivo*، پروتئین FSTL1 به طور موقت و موضعی بیان شده است و بیشتر با بافت‌هایی که در حالت بازسازی قرار دارند، چه در طی مراحل طبیعی رشد یا در پاسخ به آسیب، ارتباط دارد [9؛ 21]. شواهد نشان می‌دهد بیان FSTL1 در ناحیه زخمی افزایش پیدا می‌کند و این افزایش سبب تقویت مهاجرت کراتینوسیت‌ها می‌شود [6].

حاضر، پنج پیوند دی سولفیدی موجود در دمین FK حذف و سپس با شبیه سازی دینامیک مولکولی تغییرات ساختاری و دینامیکی این دمین بررسی شد. در این پژوهش پیوندهای دی سولفیدی از راه مطالعه های شبیه سازی دینامیک مولکولی حذف شدند. سپس برای مقایسه تغییرات صورت بندی ناشی از حذف پیوندهای دی سولفیدی، شبیه سازی دینامیک مولکولی دمین حاصل و دمین طبیعی انجام شد. در این پژوهش دمین FK نو ترکیب بدون پیوند دی سولفیدی rFK نامیده شد.

2- مواد و روش ها

2-1 شبیه سازی مولکولی

شبیه سازی دینامیک مولکولی دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی در حالت طبیعی و بدون پیوند دی سولفیدی با استفاده از بسته شبیه ساز AMBER 15 انجام شد [12].

2-2 آماده سازی دمین FK برای انجام شبیه سازی

مولکولی

از آنجایی که پروتئین FSTL1 انسانی بدون ساختار کریستال است، توالی آمینواسیدی آن از بانک اطلاعاتی UniProt با کد (Q12841) به دست آمد. سپس توالی آمینواسیدی مربوط به دمین FK آن جدا شد و با استفاده از سرور SWISS-MODEL و با استفاده از ساختار کریستالی دمین FK پروتئین FSTL1 موشی با کد (PDB: 6jzw) به عنوان الگو، مدل های ساختاری از دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی تهیه شد. در مرحله بعد ساختارهای حاصل با استفاده از نرم افزار Swiss-PDB Viewer 4.10، Chimera1.12 [12، 23]، نمودار رامانچاندان و سرور PDBSUM از نظر فاصله دو باقیمانده سیستئین، محدوده خطای مدل سازی و تشکیل باندهای دی سولفیدی بررسی شدند. سپس مطلوب ترین ساختار دمین FK انتخاب و در مطالعه شبیه سازی

اگرچه عملکردها و سازوکارهای FSTL1 به طور کامل درک نشده است، مجموعه ای از پژوهش ها در حال انجام هستند که نقش FSTL1 را در تنظیم بقای سلول [6، 22]، تکثیر، تمایز، مهاجرت [18] و همین طور التهاب [20] و تعدیل سیستم ایمنی بدن شناسایی کرده اند. بنابراین، با توجه به عملکردهای برجسته FSTL1 هدف گیری این پروتئین ممکن است برای مطالعه های بالینی مرتبط با این پروتئین مفید باشد. بهبود دانش ما درباره پروتئین FSTL1 باعث بهبود کاربردهای زیست فناوری این پروتئین مهم می شود. تاکنون مطالعه های گسترده ای در مورد FSTL1 انجام شده است ولی با این وجود اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم زیستی در دست است. مطالعه ها نشان داده است که دمین FK این پروتئین نقش مهمی در ساختار و عملکرد آن دارد. دمین FK پنج پیوند دی سولفیدی محافظت شده دارد که برخی از مطالعه ها نقش این پیوندها را پایداری فولدینگ پروتئین گزارش کرده اند. به این ترتیب که لی و همکاران (2019) FSTL1 را کریستاله کردند ولی متأسفانه پس از بررسی ساختار متوجه شدند که فقط دمین FK در ساختار کریستالی وجود دارد و پنج پیوند دی سولفیدی در آن دیده می شود. به علاوه بررسی های بیشتر با ایجاد ساختارهایی از پروتئین FSTL1 با طول کامل توالی آمینواسیدی و پروتئین FSTL1 با تنها دمین FK نقش عملکردی این دمین را نیز تأیید کرد [2]. با وجود این مطالعه های اندک درباره پروتئین FSTL1 تاکنون هیچ مطالعه ای به طور اختصاصی به بررسی تغییرات ساختاری و دینامیکی دمین FK در حضور و حضورنداشتن پنج پیوند دی سولفیدی نپرداخته است. به نظر می رسد مطالعه این تغییرات برای مطالعه های جهش زایی هدفمند آینده به منظور افزایش و یا کاهش انعطاف پذیری این دمین به صورت هدفمند و با حفظ ساختار عملکردی این دمین می تواند در بهبود عملکرد این پروتئین مؤثر و مفید باشد. بنابراین در مطالعه

هیدروژنی برای ساختار محاسبه شد. علاوه بر این فاصله بین آمینواسیدهای درگیر در پیوند دی‌سولفیدی و سطح در دسترس این آمینواسیدها نیز ارزیابی شدند. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار xmgrace نتایج حاصل از این محاسبات به صورت نمودار نمایش داده شد [12].

3- نتایج

اثر حذف پیوندهای دی‌سولفیدی دمین FK بر کانفورماسیون این دمین با استفاده از مطالعه‌های دینامیک مولکولی ارزیابی شدند. توالی‌های پروتئین FSTL1 انسانی از بانک اطلاعاتی UniProt به دست آمد. سپس توالی آمینواسیدی مربوط به دمین FK جدا شد و با استفاده از سرور SWISS-MODEL و با استفاده از ساختار کریستالی دمین FK پروتئین FSTL1 موش به عنوان الگو، ساختار دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی در حالت طبیعی و بدون پنج پیوندهای دی‌سولفیدی مدل‌سازی شد. پنج پیوند دی‌سولفیدی شامل Cys31-Cys42، Cys36-Cys52، Cys54-Cys82، Cys58-Cys77 و Cys66-Cys98 در ساختار دمین FK انسان وجود دارد [27-29]. برای شبیه‌سازی MD دمین FK و دمین rFK از نرم‌افزار 15 AMBER Tools استفاده شد. سپس میزان RMSD، شعاع ژیراسیون و پیوندهای هیدروژنی با استفاده از نرم‌افزارهای CPPTRAJ و xmgrace برای کل ساختار دمین محاسبه شدند که در شکل 1 تا 4 نشان داده شده است [30-31].

4- نمودار RMSD

نتایج RMSD کربن آلفا (Ca) هر دو دمین در شکل 1 نشان داده شده است. RMSD و یا ریشه مربع میانگین انحراف کربن آلفا پروتئین مربوط به موقعیت هر اتم در زمان شبیه‌سازی است و برای مقایسه صورت‌بندی ساختار در طول شبیه‌سازی استفاده می‌شود. براساس شکل 1

دینامیک مولکولی استفاده شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با استفاده از بسته نرم‌افزاری AMBER و با میدان نیروی ff14SB انجام شد [12]. خنثی‌سازی بار ساختار با یون سدیم به وسیله ماژول LEaP انجام شد. سپس ساختار در یک جعبه 20 وجهی همراه با یک لایه از مولکول‌های آب مدل TIP3P به ضخامت 10 آنگستروم قرار داده شد [24].

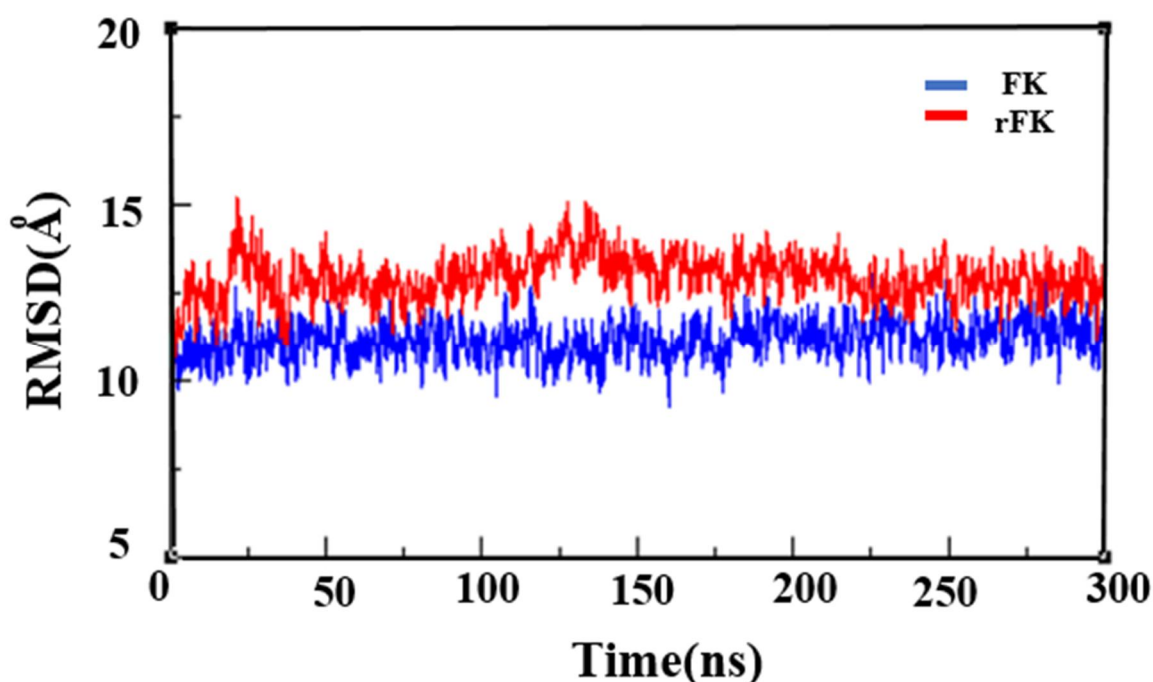
فایل‌های Topology و coordination حاصل برای مراحل بعدی شبیه‌سازی ذخیره شدند. کمینه‌سازی انرژی ساختار در دو مرحله انجام شد. به این ترتیب که در مرحله اول مولکول‌های آب و یون‌ها با گام به روش descent Steepest کمینه‌سازی شدند. در مرحله دوم کل ساختار به وسیله 1000 گام به روش conjugate gradient کمینه‌سازی شد. دینامیک مولکولی در دو مرحله محاسبه شد. در مرحله اول و در شرایط حجم ثابت، دما از صفر تا 300 کلین به مدت زمان 100 پیکوثانیه با روش لانگوین بالا برده شد. در مرحله دوم سیستم در فشار ثابت در 400 پیکوثانیه به تعادل رسانده شد. میانکشی‌های غیرکوالان نیز به وسیله PME و با فاصله 10 آنگستروم محاسبه شدند. محدود کردن پیوندها از جمله پیوندهای هیدروژنی با الگوریتم SHAKE انجام شد. برنامه‌های sander و pmemd برای شبیه‌سازی استفاده شدند. در نهایت شبیه‌سازی در 300 نانوثانیه و در فاصله زمانی 500 پیکوثانیه انجام گرفت و اطلاعات حاصل با فرمت netcdf ذخیره شد. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی با سه تکرار انجام شد [25-26].

3-2 آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی

با استفاده از CPPTRAJ در 15 AMBER Tools آنالیز نتایج حاصل از شبیه‌سازی انجام شد و ریشه میانگین مجذور نوسان‌ها (RMSF)، ریشه میانگین مجذور انحراف‌ها (RMSD)، شعاع ژیراسیون (ROG) و پیوندهای

به طور کلی با توجه به نمودار RMSD، دمین rFK در طول شبیه روند افزایشی ملایم جنبش‌های مولکولی را نشان می‌دهد جزء اینکه این تغییرات در فاصله زمانی 225 تا 300 ns همانند دمین FK طبیعی به تعادل رسیده است. بنابراین با توجه به شکل 1، واضح است که حضور و عدم حضور پیوندهای دی‌سولفیدی نقش مؤثری در تغییرات ساختاری دمین FK در این شبیه‌سازی داشته است.

دمین rFK نسبت به دمین FK از درجه بالاتر نوسان‌ها در مقدار RMSD اتم‌های کربن اسکلتی برخوردار است در حالی که تغییرات RMSD دمین FK طبیعی از آغاز تا انتهای شبیه‌سازی یکنواخت به نظر می‌رسد. تغییرات در RMSD دمین rFK از آغاز شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تا 30 ns و از 45 ns تا 145 ns روند افزایشی ملایمی را نشان می‌دهد. این موضوع در حالی است که از 225 تا 300 ns این تغییرات در هر دو دمین به تعادل رسیده است.

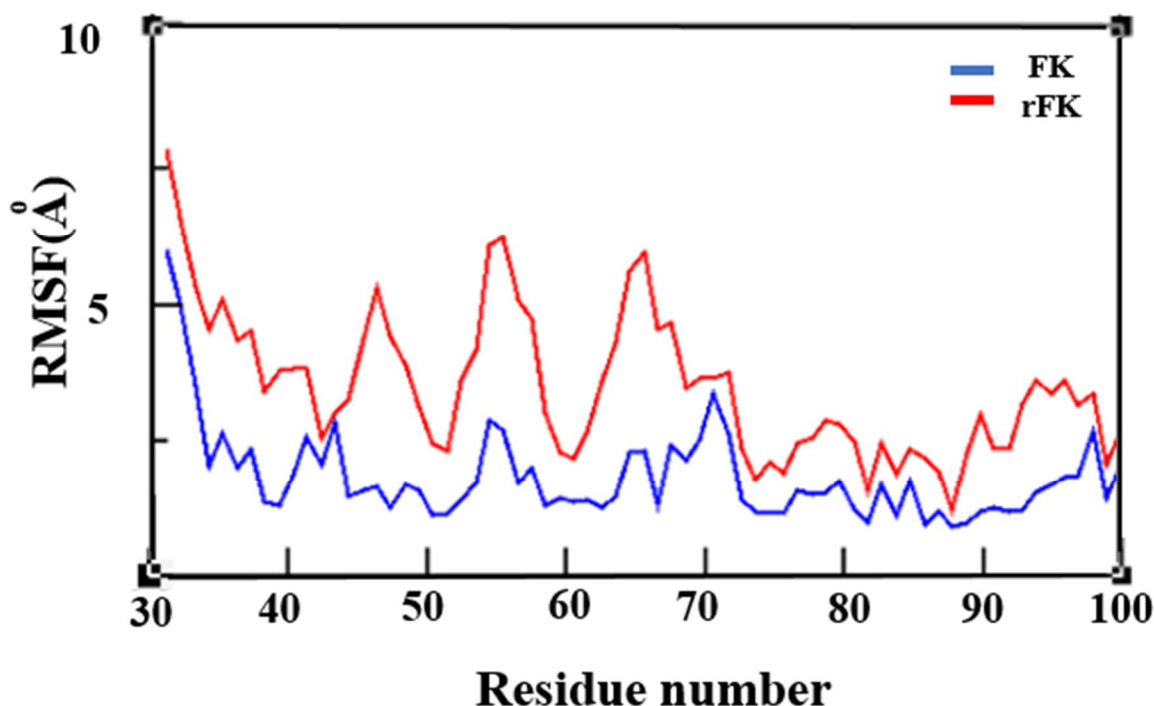


شکل 1 نمودار RMSD بر حسب زمان دمین FK طبیعی (گراف آبی‌رنگ) و بدون پیوندهای دی‌سولفیدی (گراف قرمز رنگ) در 300 نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

نمودار RMSF دمین FK در حضورنداشتن پیوندهای دی‌سولفیدی نشان‌دهنده افزایش میزان انعطاف‌پذیری و نوسان‌های چشمگیر در محدوده باقیمانده‌های 36 تا 40 و در باقیمانده‌های 45، 54، 66، 78، 84، 87 و 90 تا 98 است که نشان‌دهنده تغییرات ناشی از حذف پنج پیوند دی‌سولفیدی Cys31-Cys42، Cys36-Cys52، Cys54-

1-4 نمودار RMSF

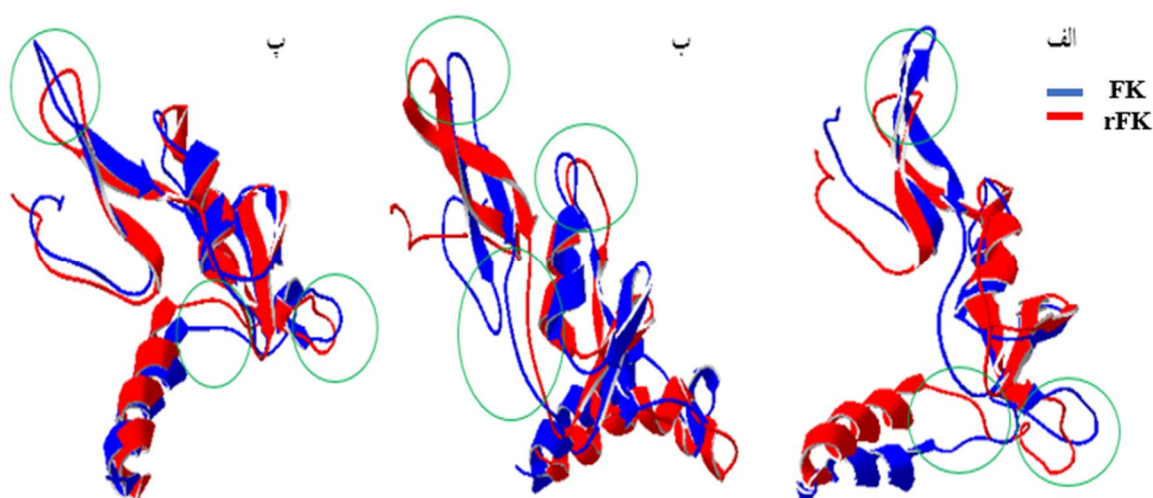
تغییرات RMSF باقیمانده‌های دمین FK بدون پیوند دی‌سولفیدی بیشتر از دمین FK طبیعی بود (شکل 2). به طور کلی RMSF یا ریشه مربع میانگین نوسان‌ها، نوسان و انعطاف‌پذیری یک مولکول را نشان می‌دهد. RMSF اتم‌های کربن آلفای دمین FK طبیعی و بدون پیوند دی‌سولفیدی در شکل 2 نشان داده شده است.



شکل 2 نمودار RMSF دمین FK طبیعی (گراف آبی) و بدون پیوندهای دی سولفیدی (گراف قرمز رنگ) در طول شبیه سازی مولکولی

ساختارها روی هم قرار نگرفته اند و موقعیت فضایی متفاوتی نسبت به یکدیگر دارند که در طول شبیه سازی نیز بیشتر و بیشتر شده و شاید ناشی از حذف پیوندهای دی سولفیدی می باشد. به نظر می رسد این نواحی به علت حضور نداشتن پیوندهای دی سولفیدی آزادی حرکت بیشتری پیدا کرده اند. همان طور که مشخص است، بیشترین حرکت در پروتئین ها در مناطق لوپ و لولا دیده می شود که در ساختار هر دو دمین نیز مناطق با تحرک های بالا ساختار لوپ و لولا دارند.

همچنین در شکل 3 ساختار و تغییرات ساختاری انجام شده در مقاطع خاصی از زمان شبیه سازی مولکولی دمین FK طبیعی (گراف آبی رنگ) و بدون پیوندهای دی سولفیدی (گراف قرمز رنگ) مقایسه شده است. براساس با شکل تغییرات ساختاری چشمگیری در هر دو پروتئین در زمان های ابتدایی (الف)، میانی (ب) و انتهایی (پ) شبیه سازی در نواحی اطراف پیوندهای دی سولفیدی، ناحیه بین رشته بتای 2 و 3 و نواحی لوپ و لولا مشاهده می شود که در شکل نیز مشخص شده است. همان طور که در شکل 3 می توان مشاهده کرد، نواحی مشخص شده در

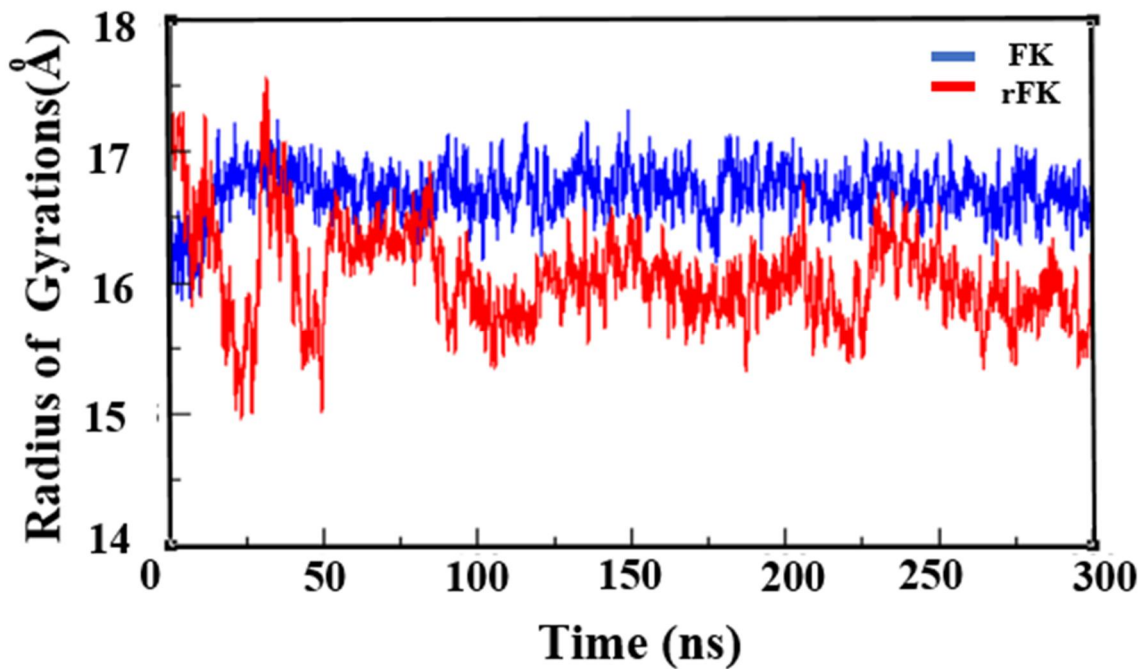


شکل 3 در این شکل مقایسه ساختار و تغییرات ساختاری انجام شده در زمان‌های مختلف و در طول 300 نانوثانیه شبیه‌سازی مولکولی دمین FK طبیعی (گراف آبی‌رنگ) و بدون پیوند دی‌سولفیدی (گراف قرمز رنگ) نشان داده شده است. هر شکل شامل ساختار دمین FK طبیعی (آبی) و بدون پیوندهای دی‌سولفیدی (قرمز) در مقاطع زمانی مختلف شبیه‌سازی است. شکل‌های الف، ب و پ به ترتیب ساختارهای مربوط به زمان آغازین، میانی و انتهایی شبیه‌سازی را نشان می‌دهند. تغییرات ساختاری چشمگیر در هر دو دمین در یک مقطعی از زمان شبیه‌سازی مولکولی با دایره مشخص شده است.

2-4 نمودار شعاع ژیراسیون

شعاع ژیراسیون، فاصله یک اتم از مرکز جرم اتم‌های کل ساختار پروتئین را نشان می‌دهد. براساس شکل 4 تغییرات شعاع ژیراسیون دمین FK در اثر حذف پیوندهای دی‌سولفیدی به‌طور جالبی کاهش پیدا کرده است و این رفتار نشان‌دهنده کاهش سطح در دسترس دمین FK است. تغییرات شعاع ژیراسیون دمین rFK در 10 ns آغاز شبیه‌سازی بیشتر از دمین FK بود در حالی که از 10 ns تا پایان شبیه‌سازی میزان این تغییرات کمتر از دمین FK شد. دمین rFK در 100 ns آغاز شبیه‌سازی نوسان‌های چشمگیری را در شعاع ژیراسیون در مقایسه با دمین FK نشان داد ولی از این زمان تا پایان شبیه‌سازی نوسان‌های همگن و متعادلی را نشان داد. این در حالی است که

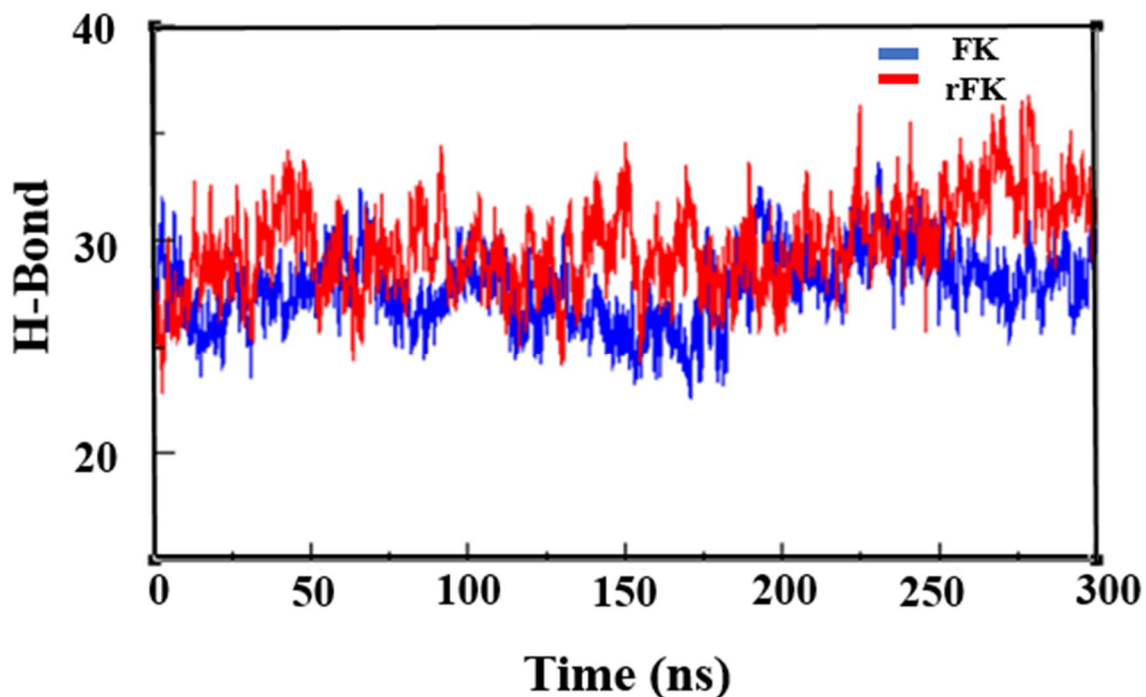
دمین FK از 10 ns تا پایان 300 ns نوسان‌های چشمگیری را نشان داد و به نظر می‌رسد تغییرات شعاع به یک حالت پایدار و تعادلی رسیده است. به نظر می‌رسد حذف پیوندهای دی‌سولفیدی در دمین FK منجر به تغییرات اندک در شعاع ژیراسیون این ساختار شده است. همچنین با توجه به شکل می‌توان گفت که در بیشتر طول شبیه‌سازی، مقادیر نوسان‌های دمین rFK در محدوده 16,5 تا 17 می‌باشد در حالی که مقادیر این نوسان‌ها در دمین FK در محدوده 15,5 تا 16,5 است که به نظر می‌رسد حذف پیوندهای دی‌سولفیدی در دمین FK منجر به افزایش میانگین انعطاف‌پذیری کلی ساختار و در نتیجه تغییرات بیشتر در شعاع ژیراسیون شده است.



شکل 4 نمودار شعاع ژیراسیون برحسب زمان دمین FK طبیعی (گراف آبی رنگ) و بدون پیوندهای دی سولفیدی (گراف قرمز رنگ) در طول شبیه سازی مولکولی

زمان های 10-50، 75-95، 125-165 ns و 250-300 ns نشان داد درحالی که تغییراتی مشابه را دمین FK طبیعی در زمان 90-120 ns و 250-300 ns نشان داد.

نمودار پیوندهای هیدروژنی دمین FK طبیعی (گراف آبی) و rFK (گراف قرمز) در شکل 5 نشان داده شده است. براساس این نمودار، دمین rFK افزایش چشمگیری را در نوسان های پیوند هیدروژنی درمقایسه با FK طبیعی در



شکل 5 نمودار پیوندهای هیدروژنی دمین FK. پیوندهای هیدروژنی دمین FK طبیعی (گراف آبی) و بدون پیوندهای دی سولفیدی (گراف قرمز) در طول 300 ns شبیه سازی

5- بحث

درصد شباهت را نشان می‌دهد [4: 8: 12]. FSTL1 متعلق به خانواده پروتئین‌های SPARC است، پروتئین‌هایی که یک دمین FK (شامل یک دمین فولیستاتین مانند و دمین Kazal) و یک جفت دمین EF-hand دارند. هامبروک و همکاران FSTL1 نوترکیب را در سلول‌های یوکاریوتی بیان کردند و سپس ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن را با سایر اعضای خانواده پروتئین‌های BM-40/SPARC/osteonectin مقایسه کردند. نتایج بیانگر حضور FSTL1 محلول در دو ایزوفرم گلیکوزیله بود. ارزیابی ساختاری هر دو ایزوفرم با طیف‌سنجی دورنگ‌نمایی دورانی و فلورسانس ذاتی، تغییرات ساختاری چشمگیری را با افزایش و یا کلسیم نشان نداد [1]. این یافته‌ها بیان می‌کند که دمین اتصال به کلسیم خارج سلولی در FSTL1 بدون عملکرد است. عدم حفظ ویژگی‌های مهم عملکردی مشترک برای چندین عضو دیگر خانواده BM-40 نشان می‌دهد، FSTL1 با وجود همسانی توالی خود به BM-40، ویژگی‌های به‌طور

FSTL1 عضوی از خانواده پروتئین‌های ماتریکس ترش‌جی و خارج سلولی SPARC است. مطالعات نشان داده است که FSTL1 می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور ضدالتهاب یا پیشبرنده التهاب عمل کند [4]. نقش مهمی در تنظیم تکثیر و مهاجرت سلول‌های فیروبلاست و کراتینوسیت و در نهایت ترمیم زخم دارد [3; 32]. مطالعات نشان داده است که FSTL1 در مسیرهای سیگنالینگ مختلفی مانند فعال‌سازی AMPK، AKT یا MAPK، ERK نقش دارد [2; 6; 9; 33; 34].

FSTL1 در بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان [8; 14]، آرتروز، فیروز ریه و چاقی نیز نقش دارد و این موضوع بر پتانسیل آن به‌عنوان یک نشانگر زیستی و همچنین هدفی برای مدیریت روند بیماری پافشاری می‌کند. به‌طور کلی FSTL1 در تنظیم بقای سلول، تکثیر [16; 22]، تمایز [10]، مهاجر [18]، التهاب و تعدیل سیستم ایمنی بدن نقش دارد. توالی پروتئین FSTL1 انسان با موش 94,4

دینامیک مولکولی می‌باشد. برای این منظور توالی آمینواسیدی پروتئین FSTL1 انسانی از بانک اطلاعاتی UniProt با کد (Q12841) به دست آمد. سپس توالی آمینواسیدی مربوط به دمین FK آن جدا شد و با استفاده از سرور مدل‌سازی SWISS-MODEL و با استفاده از دمین FK پروتئین FSTL1 موشی با کد (PDB: 6jzw) به‌عنوان الگو، ساختاری از دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی مدل‌سازی شد [35]. مدل‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار Swiss-Chimera 1.12. PDB Viewer 4.10، نمودار رام‌چاندرا و سرور PDBSUM، بررسی شدند. سپس مطلوب‌ترین ساختار دمین FK برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی به‌وسیله بسته نرم‌افزاری AMBER و با میدان نیروی ff14SB استفاده شد. پیوندهای دی‌سولفیدی موجود در دمین FK حذف شد و سپس با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تغییرات ساختاری و دینامیکی این دمین و دمین طبیعی بررسی شد. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بیانگر درجه بالاتر نوسان‌ها در مقدار RMSD اتم‌های کربن اسکلتی در دمین FK بدون پیوند 5 دی‌سولفیدی در مقایسه با دمین FK طبیعی می‌باشد.

با توجه به نمودار RMSD (شکل 1)، مقدار RMSD دمین rFK از آغاز شبیه‌سازی تا 150 ns پایان شبیه‌سازی شکل ناپایداری را در مقایسه با دمین FK طبیعی دارد. حذف پیوندهای دی‌سولفیدی از دمین FK پروتئین FSTL1 که در تاخوردگی پروتئین نقش دارد، منجر به افزایش انعطاف‌پذیری صورت‌بندی این دمین شده است. درجه بالاتر نوسان‌ها در مقدار RMSD دمین بدون پیوند دی‌سولفیدی را می‌توان به حذف پیوند دی‌سولفیدی و بازآرایی ساختاری موضعی دمین در زمان شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نسبت داد. به‌طور کلی براساس نمودار RMSD دمین rFK در طول شبیه‌سازی افزایش ملایم جنبش‌های مولکولی را نشان می‌دهد جزء اینکه تغییرات در این پارامتر در فاصله زمانی 225 تا 300 ns به تعادل

کامل تکامل یافته‌ای دارد [1]. لی و همکاران نیز در مطالعه خود یک رده سلولی S2 دروزوفیلا را ایجاد کردند که به‌طور پایدار دمین‌های عملکردی FSTL1 موش، یعنی دمین FK را بیان می‌کرد. پروتئین حاصل بیش از 95 درصد خلوص با بازدهی 3/75 میلی‌گرم بر لیتر را داشت. همچنین، مطالعات کریستالوگرافی یک شکل کوتاه‌شده FSTL1 با دمین فولیستاتین‌مانند و روش انتشار بخار قطره‌ای نشسته انجام شد. لی و همکاران پروتئین FSTL1 نو ترکیب فعالی را تولید و تخلیص کردند که برای مطالعات بیشتر ساختار پروتئین و کشف داروهای مهم است [2].

مطالعات نشان داده است که دمین FK با 10 باقیمانده سیستئین است که 5 پیوند دی‌سولفیدی تشکیل می‌دهند [35]. این پیوندهای دی‌سولفیدی در پایداری تاخوردگی کلی ساختار پروتئین نقش دارند [2]. با وجود مطالعات گسترده در مورد FSTL1، اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم زیستی و به‌ویژه دمین FK در دسترس می‌باشد. دستوری پروتئین‌ها و تولید باکتریایی آن اهمیت کلیدی در تولید پروتئین‌های نو ترکیب با اهمیت زیست‌فناوری دارد. مطالعات بیوانفورماتیکی و پیش‌بینی حرکت‌های ساختاری و دینامیکی پروتئین‌ها نیز می‌تواند نقش مهمی در بررسی این موضوع داشته باشد [34].

پیش‌بینی حرکت‌های ساختاری و دینامیکی دمین FK می‌تواند برای دستیابی به درک بهتر بیشتر فرایندهای بیولوژیکی که این مولکول مهم در آن نقش دارد، امری مفید و مؤثر باشد و باعث توسعه کاربردهای زیست‌فناوری این پروتئین با ارزش بالینی شود.

هدف از مطالعه حاضر، بررسی تغییرات انعطاف‌پذیری دمین FK (باقیمانده‌های 30-100) پروتئین FSTL1 انسانی در حضور و عدم حضور 5 پیوند دی‌سولفیدی، Cys31-Cys42، Cys36-Cys52، Cys54-Cys82، Cys58-Cys77 و Cys98-Cys66 با استفاده از مطالعات شبیه‌سازی

این مولکول می‌شود. بنابراین براساس با یافته‌های قبلی سایر پژوهشگران [2] به نظر می‌رسد که پیوندهای دی‌سولفیدی دمین FK، پیوندهای حفاظت‌شده است که در پایداری تاخوردگی ساختاری پروتئین نقش دارد. بنابراین براساس با برخی پژوهش‌ها که نشان داده‌اند افزایش انعطاف‌پذیری یک ناحیه میان‌کنشی مهم در لیگاند یا گیرنده باعث آسانی اتصال و شناسایی لیگاند-گیرنده می‌شود و در نتیجه فعالیت موردنظر نیز افزایش پیدا می‌کند [30؛ 33]. به نظر می‌رسد پژوهش حاضر می‌تواند در آینده و در تعیین یک ناحیه هدف بالقوه برای مطالعات جهش‌زایی هدفمند جهت افزایش فعالیت FSTL1 و همین‌طور افزایش پایداری پروتئین مفید باشد.

7- تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

8- تشکر

نویسندگان از حمایت مالی پارک فناوری اطلاعات و ارتباطات از این رساله در قالب کد اعتباری 469629 قدردانی می‌کنند. این طرح، حاصل اجرای یک طرح فناوری مصوب است و بودجه آن به وسیله ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول‌های بنیادی در قالب کد اعتباری 57947/11 تأمین شده است.

منابع

- [1] Hambrock, H. (2004). O, Kaufmann B, Müller S, Hanisch F, G, Nose K, Paulsson M, Maurer P, Hartmann U. Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms. *J Biol Chem*, 279, 11727-11735.
- [2] Li, X., Li, L., Chang, Y., Ning, W., & Liu, X. (2019). Structural and functional study of FK domain of Fstl1. *Protein Science*, 28(10), 1819-1829.

می‌رسد. بنابراین با توجه به شکل 1، واضح است که حضور و عدم حضور پیوندهای دی‌سولفیدی نقش مؤثری در تغییرات ساختاری دمین FK در این شبیه‌سازی داشته است. همچنین توجه به نمودار RMSF (شکل 2) نشان می‌دهد که حذف پیوندهای دی‌سولفیدی دمین FK باعث افزایش قابل توجه تغییرات ساختاری در محدوده باقیمانده‌های 36 تا 40 و در باقیمانده‌های 45، 54، 66، 78، 84، 87 و 90 تا 98 می‌شود که بیانگر تغییرات ناشی از حذف 5 پیوند دی‌سولفیدی Cys31-Cys42، Cys36-Cys52، Cys54-Cys82، Cys58-Cys77 و Cys66-Cys98 در ساختار دمین FK انسانی است و نیز در نتیجه آزاد شدن ساختار پروتئین و آزادی حرکت بیشتر این باقیمانده‌ها و همین‌طور ایجاد حرکت‌های جدید و لولا ماندی است که در اطراف این نواحی با ساختار لوپ و مارپیچ الفا ایجاد شده است. براساس شکل 3 تغییرات شعاع ژیراسیون دمین FK در اثر حذف 5 پیوند دی‌سولفیدی به‌طور جالبی کاهش پیدا کرده است و این رفتار نشان‌دهنده کاهش سطح در دسترس دمین FK و شاید ایجاد یک کانفورماسیون فشرده‌تر از ساختار دمین FK می‌باشد. دمین FK بدون پیوندهای دی‌سولفیدی از آغاز تا پایان شبیه‌سازی روند صعودی و نزولی چشمگیری را در تغییرات شعاع ژیراسیون نشان داد. این در حالی است که تغییرات شعاع ژیراسیون در دمین FK طبیعی طول شبیه‌سازی یکنواخت می‌باشد. بنابراین، به نظر می‌رسد حذف پیوندهای دی‌سولفیدی در دمین FK منجر به تغییرات شعاع ژیراسیون در این مولکول شده است.

6- نتیجه‌گیری

به‌طور کلی به نظر می‌رسد نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دمین FK پروتئین انسانی بیانگر این است که حذف پیوندهای دی‌سولفیدی در این دمین موجب افزایش انعطاف‌پذیری و تغییرات کانفورماسیونی

- [12] Ouchi, N., Oshima, Y., Ohashi, K., Higuchi, A., Ikegami, C., Izumiya, Y., & Walsh, K. (2008). Follistatin-like 1, a secreted muscle protein, promotes endothelial cell function and revascularization in ischemic tissue through a nitric-oxide synthase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32802-32811.
- [13] Ogura, Y., Ouchi, N., Ohashi, K., Shibata, R., Kataoka, Y., Kambara, T., ... & Murohara, T. (2012). Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation*, 126(14), 1728-1738.
- [14] Sumitomo, K., Kurisaki, A., Yamakawa, N., Tsuchida, K., Shimizu, E., Sone, S., & Sugino, H. (2000). Expression of a TGF- β 1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer letters*, 155(1), 37-46.
- [15] Trombetta-eSilva, J., & Bradshaw, A. D. (2012). Suppl 1: the function of SPARC as a mediator of fibrosis. *The open rheumatology journal*, 6, 146.
- [16] Sundaram, G. M., Common, J. E., Gopal, F. E., Srikanta, S., Lakshman, K., Lunny, D. P., & Sampath, P. (2013). 'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing. *Nature*, 495(7439), 103-106.
- [17] Sylva, M., Moorman, A. F. M., & Van den Hoff, M. J. B. (2013). Follistatin-like 1 in vertebrate development. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, 99(1), 61-69.
- [18] Shi, D. L., Shi, G. R., Xie, J., Du, X. Z., & Yang, H. (2016). MicroRNA-27a inhibits cell migration and invasion of fibroblast-like synoviocytes by targeting follistatin-like protein 1 in rheumatoid arthritis. *Molecules and cells*, 39(8), 611 .
- [19] Xi, Y., Gong, D. W., & Tian, Z. (2016). FSTL1 as a potential mediator of exercise-induced cardioprotection in post-myocardial infarction rats. *Scientific reports*, 6(1), 1-11.
- [20] Xu, C., Jiang, T., Ni, S., Chen, C., Li, C., Zhuang, C., & Wang, Y. (2020). FSTL1 promotes nitric oxide-induced chondrocyte apoptosis via activating the SAPK/JNK/caspase3 signaling pathway. *Gene*, 732, 144339.
- [21] Chaly, Y., Marinov, A. D., Oxburgh, L., Bushnell, D. S., & Hirsch, R. (2012). FSTL1
- [3] Johnston, I. M., Spence, H. J., Winnie, J. N., McGarry, L., Vass, J. K., Meagher, L., & Ozanne, B. W. (2000). Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene*, 19(47), 5348-5358. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203927>.
- [4] Kawabata, D., Tanaka, M., Fujii, T., Umehara, H., Fujita, Y., Yoshifuji, H., ... & Ozaki, S. (2004). Ameliorative effects of follistatin-related protein/TSC-36/FSTL1 on joint inflammation in a mouse model of arthritis. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 50(2), 660-668.
- [5] Niekraszewicz, B., & Niekraszewicz, A. (2009). The structure of alginate, chitin and chitosan fibres. In *Handbook of textile fibre structure*. Woodhead Publishing, 230, 266-304. [6] Miyabe, M., Ohashi, K., Shibata, R., Uemura, Y., Ogura, Y., Yuasa, D., ... & Ouchi, N. (2014). Muscle-derived follistatin-like 1 functions to reduce neointimal formation after vascular injury. *Cardiovascular research*, 103(1), 111-120.
- [7] Jafari, S. S., Jafarian, V., Khalifeh, K., Ghanavati, P., & Shirdel, S. A. (2016). The effect of charge alteration and flexibility on the function and structural stability of sweet-tasting brazzein. *RSC advances*, 6(64), 59834-59841.
- [8] Ni, X., Cao, X., Wu, Y., & Wu, J. (2018). FSTL1 suppresses tumor cell proliferation, invasion and survival in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, 39(1), 13-20.
- [9] Mattiotti, A., Prakash, S., Barnett, P., & van den Hoff, M. J. (2018). Follistatin-like 1 in development and human diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 75(13), 2339-2354. [10] Chaly, Y., Blair, H. C., Smith, S. M., Bushnell, D. S., Marinov, A. D., Campfield, B. T., & Hirsch, R. (2015). Follistatin-like protein 1 regulates chondrocyte proliferation and chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Annals of the rheumatic diseases*, 74(7), 1467-1473.
- [11] Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.

adherent cells. *Analytical Methods*, 6(12), 4199-4204.

[29] Fang, Y., Zhang, S., Li, X., Jiang, F., Ye, Q., & Ning, W. (2017). Follistatin like-1 aggravates silica-induced mouse lung injury. *Scientific Reports*, 7(1), 1-12.

[30] Ding, F., & Peng, W. (2019). Probing the local conformational flexibility in receptor recognition: mechanistic insight from an atomic-scale investigation. *RSC advances*, 9(25), 13968-13980.

[31] Chidambaram, S., Ali, D., Alarifi, S., Gurusamy, R., Radhakrishnan, S., & Akbar, I. (2021). Tyrosinase-mediated synthesis of larvicidal active 1, 5-diphenyl pent-4-en-1-one derivatives against *Culex quinquefasciatus* and investigation of their ichthyotoxicity. *Scientific reports*, 11(1), 1-18.

[32] Alteköester, A. K., & Harvey, R. P. (2015). Bioengineered FSTL1 patches restore cardiac function following myocardial infarction. *Trends in Molecular Medicine*, 21(12), 731-733.

[33] Mukherjee, J., & Gupta, M. N. (2015). Increasing importance of protein flexibility in designing biocatalytic processes. *Biotechnology Reports*, 6, 119-123.

[34] Nazari, M., Zarnani, A. H., Ghods, R., Emamzadeh, R., Najafzadeh, S., Minai-Tehrani, A., ... & Nejadmoghaddam, M. R. (2017). Optimized protocol for soluble prokaryotic expression, purification and structural analysis of human placenta specific-1 (PLAC1). *Protein Expression and Purification*, 133, 139-151.

[35] Jafari, S.S., Emamzadeh, R., Nazari, M., S. Jafari., M.R., & Ganjalikhany. (2023). Investigation of 36-32 disulfide bond in structural changes and flexibility of FK domain of FSTL1 protein: An in silico study. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*.

promotes arthritis in mice by enhancing inflammatory cytokine/chemokine expression. *Arthritis & Rheumatism*, 64(4), 1082-1088.

[22] Wu, J., Dong, Y., Teng, X., Cheng, M., Shen, Z., & Chen, W. (2015). Follistatin-like 1 attenuates differentiation and survival of erythroid cells through Smad2/3 signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 466(4), 711-716.

[23] Farzannia, A., Roghanian, R., Zarkesh-Esfahani, S. H., Nazari, M., & Emamzadeh, R. (2015). FcUni-RLuc: an engineered Renilla luciferase with Fc binding ability and light emission activity. *Analyst*, 140(5), 1438-1441.

[24] Miyamae, T., Marinov, A. D., Sowders, D., Wilson, D. C., Devlin, J., Boudreau, R., ... & Hirsch, R. (2006). Follistatin-like protein-1 is a novel proinflammatory molecule. *The Journal of Immunology*, 177(7), 4758-4762.

[25] Case, D. A., Cheatham, T. E., Darden, T., Gohlke, H., Luo Jr, R., KMM, O. A., Simmerling, C., Wang, B., and Woods, RJ (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem*, 26, 1668-1688.

[26] Greenfield, N. J., & Pietruszko, R. (1977). Two aldehyde dehydrogenases from human liver. Isolation via affinity chromatography and characterization of the isozymes. *Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 483(1), 35-45.

[27] Chan, Q. K., Ngan, H. Y., Ip, P. P., Liu, V. W., Xue, W. C., & Cheung, A. N. (2009). Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis—a differential expression and functional analysis. *Carcinogenesis*, 30(1), 114-121.

[28] Emamzadeh, R., Nazari, M., & Najafzadeh, S. (2014). Adherent state apoptosis assay (ASA): a fast and reliable method to detect apoptosis in

In silico study of the structure of FK domain in follistatin-like protein 1

S. Shahrbanoo Jafari ¹, Rahman Emamzadeh ^{*2}, Mahboobeh Nazari ^{3,4}, and Mohamad Reza Ganjalikhany ⁵

1-PhD, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

2- Associate professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

3- Associate professor, Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4-Associate professor, Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, Iran

5- Associate professor, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

*Corresponding author :

r.emamzadeh@sci.ui.ac.ir

Received: 2023/2/15

Accepted: 2023/7/16

Abstract

Aim: Follistatin-like protein 1 (FSTL1) is a secreted glycoprotein that plays an important role in regulating cell survival, proliferation, differentiation, migration, inflammation, and modulating the immune system. The FK domain in FSTL1 has 10 conserved cysteine residues that form 5 disulfide bonds. Despite extensive studies on the function of FSTL1, limited structural information is available about this biologically important molecule. It seems that increasing our knowledge in this field will improve the biotechnological applications of this important protein with clinical value.

Materials and Methods: Using the SWISS-MODEL server and using the crystal structure of the FK domain of the mouse FSTL1 protein with the code (PDB: 6jzw) as a template, structural models of the FK domain of the human FSTL1 protein were prepared. In the next step, the resulting structures were checked using Swiss-PDB Viewer 4.10, Chimera 1.12 software, Ramachandran diagram and PDBSUM server, in terms of the distance between two cysteine residues, the modeling error range, and the formation of disulfide bonds.

Molecular dynamics simulations were performed using the AMBER software package with the ff14SB force field.

Results: The results showed that the FK domain without disulfide bond has root mean square deviations (RMSD) and root mean square fluctuations (RMSF), higher than the native FK domain. In addition, the radius of gyration in domain without disulfide bonds is significantly lower than that of native FK domain. The results show that the disulfide bonds of the FK domain play a role in the stability of the structural folding of the FK domain and the removal of these bonds increases the structural flexibility of this domain.

Keywords: Flexibility, FSTL1 protein, disulfide bonds, molecular dynamics simulation