

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 مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
2. دانشیار، گروه زیست‌شناسی سلولی 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 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 سیستمین 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 Chimera1.12، Swiss-PDB Viewer 4.10، PDBSUM، از نظر فاصله دو باقیمانده سیستمین، 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 تاختوردگی 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 انعطاف پذیری 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] درحالی‌که با آسان‌سازی سیگنال‌دهی TGF- β در فیبروبلاست‌ها، فیبروز ریوی ناشی از بلئومایسین را هدایت می‌کند [8]. [11-13]. 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 تنظیم شده با سیگنال خارج سلولی (ERK) و مسیر پروتئین کیناز فعال شده 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 ضد التهابی یا پرو التهابی 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].

اگرچه عملکردها و سازوکارهای FSTL1 به طور کامل درک نشده است، مجموعه‌ای از پژوهش‌ها در حال انجام هستند که نقش FSTL1 را در تنظیم بقای سلول [6، 22]، تکثیر، تمایز، مهاجرت [18] و همین‌طور التهاب [20] و تعدیل سیستم ایمنی بدن شناسایی کرده‌اند. بنابراین، با توجه به عملکردهای برجسته FSTL1 هدف‌گیری این پروتئین ممکن است برای مطالعه‌های بالینی مرتبط با این پروتئین مفید باشد. بهبود دانش ما درباره پروتئین FSTL1 باعث بهبود کاربردهای زیست‌فناوری این پروتئین مهم می‌شود. تاکنون مطالعه‌های گسترده‌ای در مورد FSTL1 انجام شده است ولی با این وجود اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم زیستی در دست است. مطالعه‌ها نشان داده است که دمین FK این پروتئین نقش مهمی در ساختار و عملکرد آن دارد. دمین FK پنج پیوند دی‌سولفیدی محافظت‌شده دارد که برخی از مطالعه‌ها نقش این پیوندها را پایداری فولدینگ پروتئین گزارش کرده‌اند. 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 دی‌سولفیدی در آن دیده می‌شود. به علاوه بررسی‌های 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 مطالعه‌های اندک درباره پروتئین FSTL1 تاکنون هیچ مطالعه‌ای به طور اختصاصی به بررسی تغییرات ساختاری و دینامیکی دمین FK در حضور و حضورداشتن پنج پیوند دی‌سولفیدی نپرداخته است. به نظر می‌رسد مطالعه این تغییرات برای مطالعه‌های جهش‌زایی هدفمند آینده به منظور افزایش و کاهش انعطاف‌پذیری این دمین به صورت هدفمند و با حفظ ساختار عملکردی این دمین می‌تواند در بهبود عملکرد این پروتئین مؤثر و مفید باشد. بنابراین در مطالعه

حاضر، پنج پیوند دی‌سولفیدی موجود در دمین FK حذف و سپس با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی تغییرات ساختاری و دینامیکی این دمین بررسی شد. در این پژوهش پیوندهای دی‌سولفیدی از راه مطالعه‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی حذف شدند. سپس برای مقایسه تغییرات صورت‌بندی ناشی از حذف پیوندهای دی‌سولفیدی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دمین حاصل و دمین طبیعی انجام شد. در این پژوهش دمین FK نو ترکیب بدون پیوند دی‌سولفیدی rFK نامیده شد.

2- مواد و روش‌ها

2-1 شبیه‌سازی مولکولی

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی در حالت طبیعی و بدون پیوند دی‌سولفیدی با استفاده از بسته شبیه‌ساز AMBER 15 انجام شد [12].

2-2 آماده‌سازی دمین FK برای انجام شبیه‌سازی 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، مدل‌های ساختاری از دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی تهیه شد. در مرحله بعد ساختارهای حاصل با استفاده از نرم‌افزار Swiss-PDB Viewer 4.10، Chimera 1.12، [12، 23]، نمودار رامچاندرا و سرور PDBSUM از نظر فاصله دو باقیمانده سیستئین، محدوده خطای مدل‌سازی و تشکیل باندهای دی‌سولفیدی بررسی شدند. سپس مطلوب‌ترین ساختار دمین FK انتخاب و در مطالعه شبیه‌سازی

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

3- نتایج

اثر حذف پیوندهای دی-سولفیدی 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 دی-سولفیدی مدل‌سازی شد. پنج پیوند دی-سولفیدی 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 نرم افزار 15 AMBER Tools استفاده شد. سپس میزان RMSD، RMSF، شعاع ژیراسیون و پیوندهای هیدروژنی با استفاده از نرم افزارهای 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 ($C\alpha$) 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]. خنثی سازی 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].

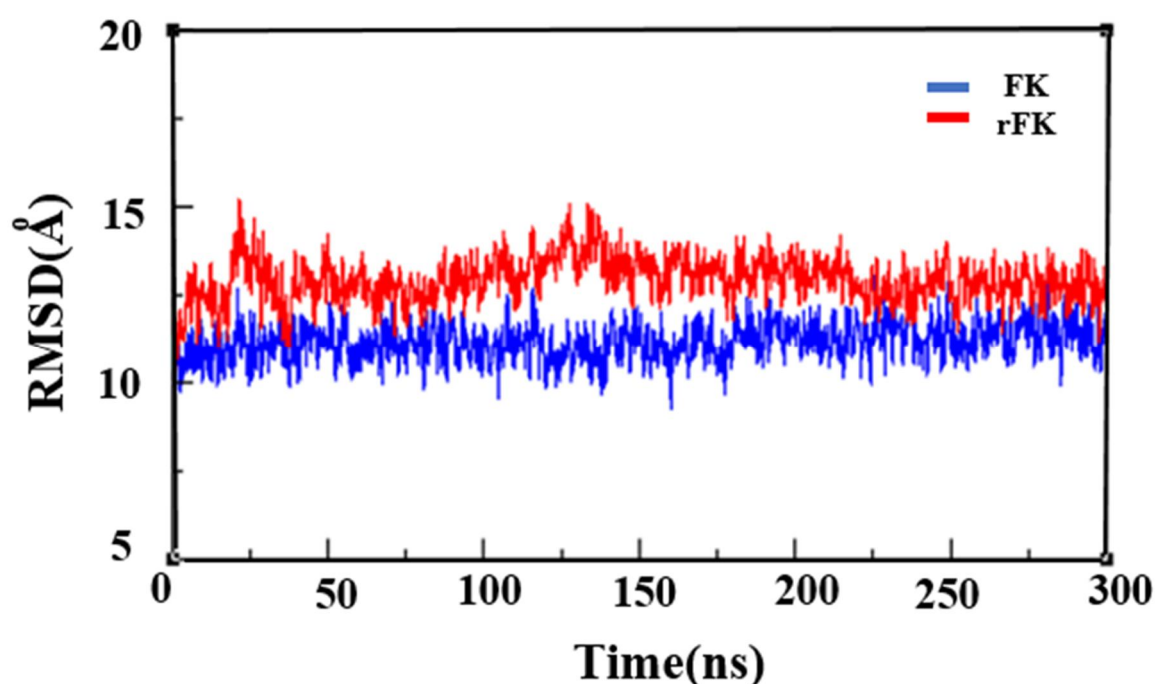
فایل‌های Topology و coordination حاصل برای مراحل بعدی شبیه‌سازی ذخیره شدند. کمینه‌سازی انرژی ساختار در دو مرحله انجام شد. به این ترتیب که در مرحله اول مولکول‌های آب و یون‌ها با گام به روش descent Steepest کمینه‌سازی شدند. در مرحله دوم کل ساختار به وسیله 1000 گام به روش conjugate gradient کمینه‌سازی شد. 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 جنبش های مولکولی را نشان می دهد 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 دی سولفیدی نقش مؤثری در تغییرات ساختاری دمین FK در این شبیه سازی داشته است.

دمین rFK نسبت به دمین FK از درجه بالاتر نوسان ها در مقدار RMSD اتم های کربن اسکلتی برخوردار است در حالی که تغییرات RMSD دمین FK طبیعی از آغاز تا انتهای شبیه سازی یکنواخت به نظر می رسد. تغییرات در RMSD دمین rFK از آغاز شبیه سازی دینامیک مولکولی تا 30 ns و از 45 ns تا 145 ns روند افزایشی ملایمی را نشان می دهد. این موضوع در حالی است که از 225 تا 300 ns این تغییرات در هر دو دمین به تعادل رسیده است.

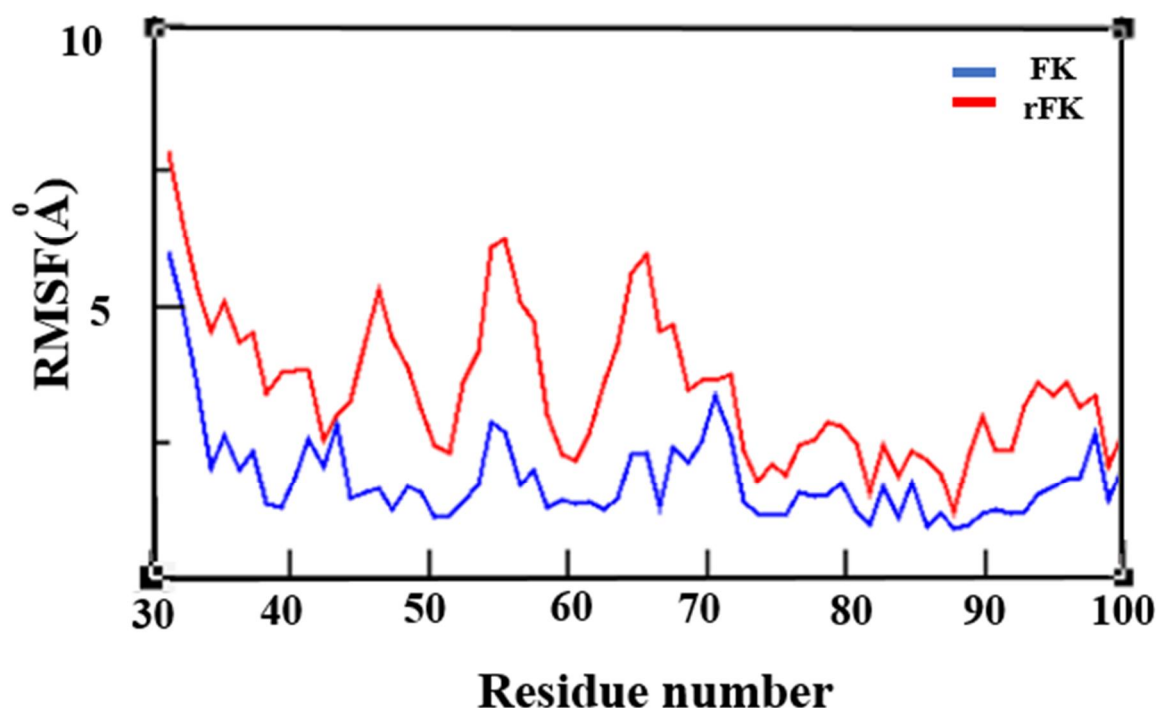


شکل 1 نمودار RMSD بر حسب زمان دمین FK طبیعی (گراف آبی رنگ) و بدون پیوندهای دی سولفیدی (گراف قرمز رنگ) در 300 نانوثانیه شبیه سازی دینامیک مولکولی

نمودار RMSF دمین FK در حضورنداشتن پیوندهای دی سولفیدی نشان دهنده افزایش میزان انعطاف پذیری و نوسان های چشمگیر در محدوده باقیمانده های 36 تا 40 و در باقیمانده های 45، 54، 66، 78، 84، 87 و 90 تا 98 است که نشان دهنده تغییرات ناشی از حذف پنج پیوند دی سولفیدی Cys31-Cys42، Cys36-Cys52، Cys54-

1-4 نمودار RMSF

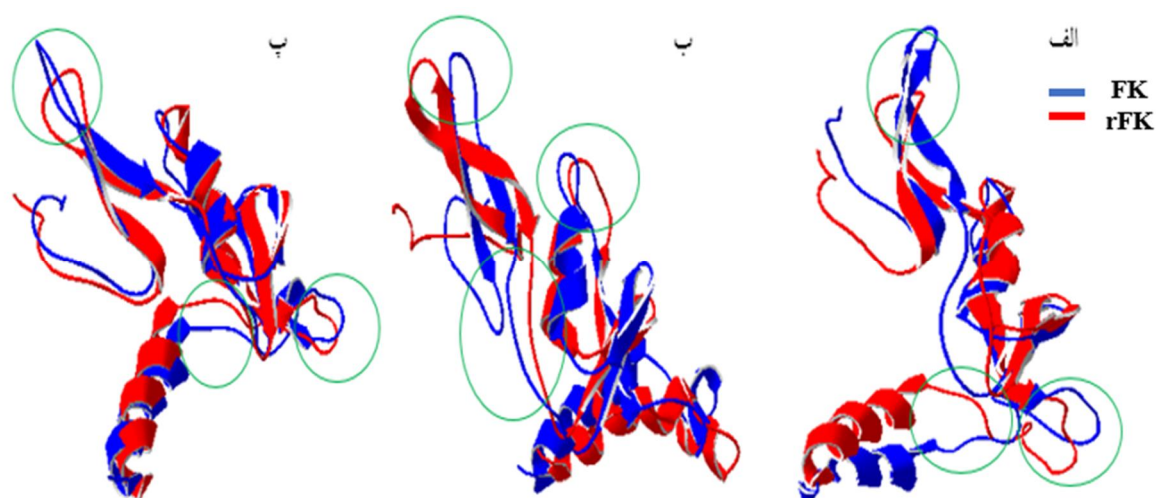
تغییرات RMSF باقیمانده های دمین FK بدون پیوند دی سولفیدی بیشتر از دمین FK طبیعی بود (شکل 2). به طور کلی RMSF یا ریشه مربع میانگین نوسان ها، نوسان و انعطاف پذیری یک مولکول را نشان می دهد. RMSF اتم های کربن آلفای دمین FK طبیعی و بدون پیوند دی سولفیدی در شکل 2 نشان داده شده است.



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 حضورنداشتن 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

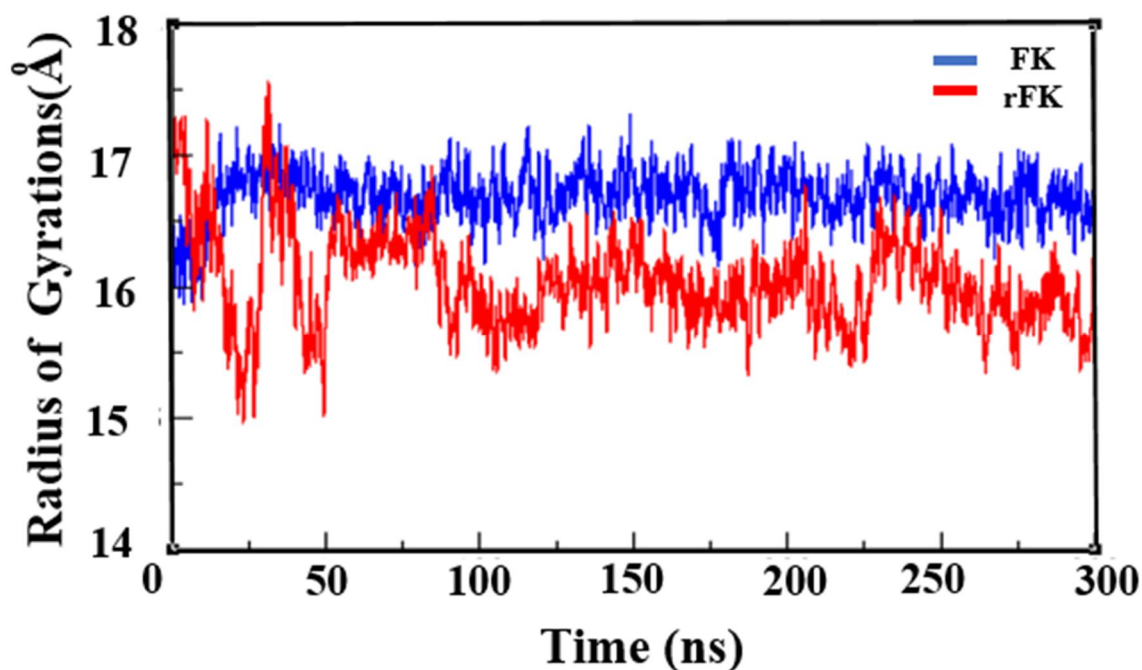


شکل 3 در این شکل مقایسه ساختار و تغییرات ساختاری انجام شده در زمان‌های مختلف و در طول 300 نانوثانیه شبیه‌سازی مولکولی دمین FK طبیعی (گراف آبی‌رنگ) و بدون پیوند دی‌سولفیدی (گراف قرمز رنگ) نشان داده شده است. هر شکل شامل ساختار دمین FK طبیعی (آبی) و بدون پیوندهای دی‌سولفیدی (قرمز) در مقاطع زمانی مختلف شبیه‌سازی 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 زیراسیون

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 زیراسیون 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 درحالی‌که 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 زیراسیون شده است.

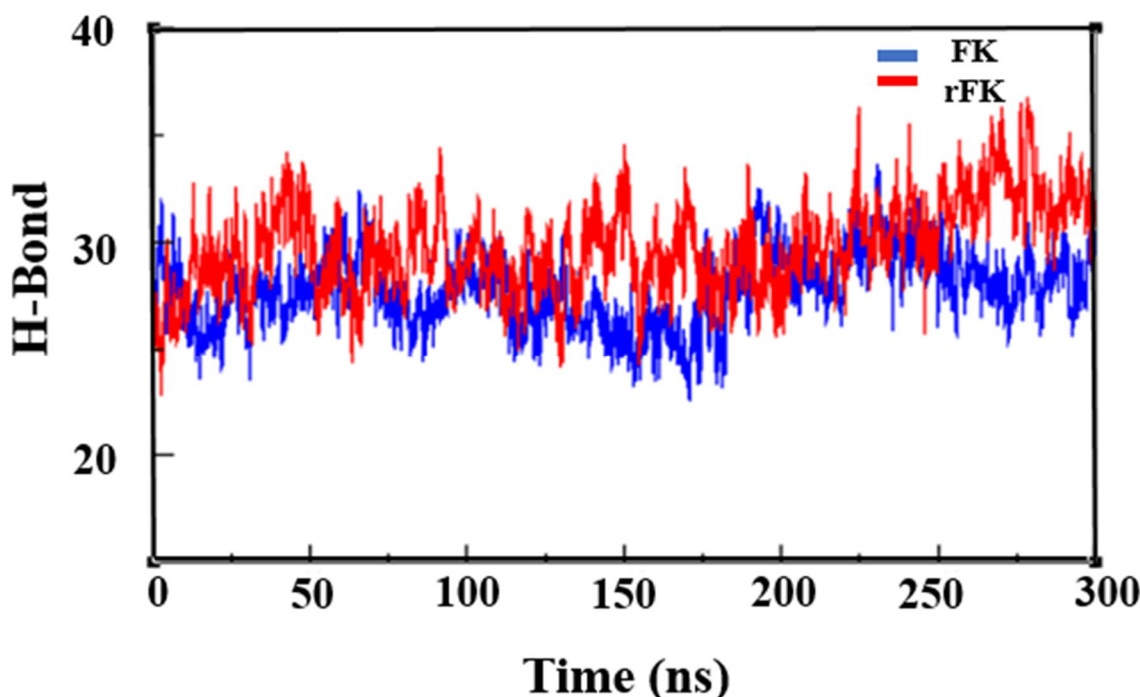
شعاع زیراسیون، فاصله یک اتم از مرکز جرم اتم‌های کل ساختار پروتئین را نشان می‌دهد. براساس شکل 4 تغییرات شعاع زیراسیون دمین FK در اثر حذف پیوندهای دی‌سولفیدی به‌طور جالبی کاهش پیدا کرده است و این رفتار نشان‌دهنده کاهش سطح در دسترس دمین FK است. تغییرات شعاع زیراسیون دمین rFK در 10 ns آغاز شبیه‌سازی بیشتر از دمین FK بود درحالی‌که 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 زیراسیون 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



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 50-10، 95-75، 165-125 ns و 300-250 ns نشان داد درحالی که تغییراتی مشابه را دمین FK طبیعی در زمان 120-90 ns و 300-250 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 می دهد [4: 8: 12]. FSTL1

متعلق به خانواده پروتئین های SPARC است، پروتئین هایی که یک دمین FK (شامل یک دمین فولیستاتین مانند و دمین Kazal) و یک جفت دمین EF-hand دارند. هامبروک و همکاران FSTL1 نو ترکیب را در سلول های یوکاریوتی بیان کردند و سپس ویژگی های ساختاری و عملکردی آن را با سایر اعضای خانواده پروتئین های BM-40/SPARC/osteonectin مقایسه کردند. نتایج بیانگر حضور FSTL1 محلول در دو ایزوفرم گلیکوزیله بود. ارزیابی ساختاری هر دو ایزوفرم با طیف سنجی دورنگ نمایی دورانی و فلورسانس ذاتی، تغییرات ساختاری چشمگیری را با افزایش و یا کلسیم نشان نداد [1]. این یافته ها بیان می کند که دمین اتصال به کلسیم خارج سلولی در FSTL1 بدون عملکرد است. عدم حفظ ویژگی های مهم عملکردی مشترک برای چندین عضو دیگر خانواده BM-40 نشان می دهد، FSTL1 با وجود همسانی توالی خود به BM-40، ویژگی های به طور

FSTL1 عضوی از خانواده پروتئین های ماتریکس ترشچی و خارج سلولی SPARC است. مطالعات نشان داده است که FSTL1 می تواند به عنوان یک فاکتور ضد التهاب یا پیش برنده التهاب عمل کند [4]. FSTL1 نقش مهمی در تنظیم تکثیر و مهاجرت سلول های فیرو بلاست و کراتینوسیت و در نهایت ترمیم زخم دارد [3: 32]. مطالعات نشان داده است که FSTL1 در مسیرهای سیگنالینگ مختلفی مانند فعال سازی AMPK، AKT یا MAPK، ERK نقش دارد [2: 6؛ 9؛ 33؛ 34].

FSTL1 در بیماری های قلبی عروقی، سرطان [8: 14]، آرتروز، فیروز ریه و چاقی نیز نقش دارد و این موضوع بر پتانسیل آن به عنوان یک نشانگر زیستی و همچنین هدفی برای مدیریت روند بیماری پافشاری می کند. به طور 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

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 میلی گرم بر لیتر را داشت. همچنین، مطالعات کریستالوگرافی یک شکل کوتاه شده FSTL1 با دمین فولیستاتین مانند 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 داروها مهم است [2].

مطالعات نشان داده است که دمین FK با 10 باقیمانده سیستئین است که 5 پیوند دی سولفیدی تشکیل می‌دهند [35]. این پیوندهای دی سولفید در پایداری تا خوردگی 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 زیست فناوری 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 زیست فناوری این پروتئین با ارزش بالینی شود.

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

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 مدل سازی SWISS-MODEL و با استفاده از دمین FK پروتئین FSTL1 موشی با کد (PDB: 6jzw) به عنوان الگو، ساختاری از دمین FK پروتئین FSTL1 انسانی مدل سازی شد [35]. مدل های حاصل با استفاده از نرم افزار Swiss Chimera 1.12، PDB Viewer 4.10، نمودار رامچاندرا و سرور PDBSUM بررسی شدند. سپس مطلوب ترین ساختار دمین FK برای شبیه سازی دینامیک مولکولی به وسیله بسته نرم افزاری AMBER و با میدان نیروی ff14SB استفاده شد. پیوندهای دی سولفیدی موجود در دمین FK حذف شد و سپس با شبیه سازی دینامیک مولکولی تغییرات ساختاری و دینامیکی این دمین و دمین طبیعی بررسی شد. نتایج شبیه سازی دینامیک مولکولی بیانگر درجه بالاتر نوسان‌ها در مقدار RMSD اتم‌های کربن اسکلتی در دمین FK بدون پیوند 5 دی سولفیدی در مقایسه با دمین FK طبیعی می‌باشد.

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

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 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 مانندی 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

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.

- [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., Srikantha, 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] Niekaszewicz, B., & Niekaszewicz, 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., ... & Nejadmoghadam, 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