

## بررسی تأثیر تغییرات پی‌اچ بر نیروی بازشدگی بیست و هفتمین قلمروی ایمونوگلوبولین پروتئین تایتین با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده

محدثه عبیدی و رضا سهیلی‌فرد\*

ایران، سبزوار، دانشگاه حکیم سبزواری، دانشکده فنی و مهندسی، گروه مهندسی مکانیک

تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۸

تایخ دریافت: ۹۶/۷/۱۲

### چکیده

تایتین طول‌ترین پروتئین بدن است که در میوفیبریل‌های عضله‌های قلبی و اسکلتی یافت می‌شود. این پروتئین با طولی حدود یک میکرومتر شامل ناحیه‌های PEVK (دربردارنده آمینو اسیدهای پرولین، گلوتامیک اسید، والین و لیزین)، قلمروهای ایمونوگلوبولین و فیبرونکتین است. در عضلات، تایتین دارای خاصیت الاستیک منحصر به فردی در ناحیه باند I در سارکومر بوده و از این رو مسئول بازگرداندن عضله به طول استراحت خود در حین انقباضهای برون‌گراست. I27 (بیست و هفتمین قلمروی ایمونوگلوبولین) به عنوان یکی از ناحیه‌های پر اهمیت تایتین معرفی شده و از ویژگیهای مهم این ناحیه اتصال با یون کلسیم است. حضور یون کلسیم در I27، این ناحیه را باردار کرده و سبب تغییر پی‌اچ می‌شود. در این پژوهش با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده، تغییرات نیروی بازشدگی برای قلمروی I27 با در نظر گرفتن پی‌اچ‌های مختلف در سه حالت خنثی، اسیدی و بازی بررسی شده است. نتایج نشان دادند که نیروی بازشدگی قلمرو I27 به صورت قابل توجهی وابسته به تغییرات پی‌اچ بوده و از این رو با افزایش و یا کاهش مقدار پی‌اچ و فاصله گرفتن از حالت خنثی مقدار آن کاهش می‌یابد. بدین ترتیب که در حالت خنثی بیشترین نیرو برای شکستن پیوندهای هیدروژنی و آغاز فرآیند بازشدگی مورد نیاز است. با توجه به نتیجه حاصله از این پژوهش، می‌توان در صورت سخت‌تر شدن بیش از حد تایتین و بروز مشکل در باز شدگی، با تغییرات پی‌اچ در محدوده موردنظر عملکرد مناسب‌تری برای تایتین ایجاد نمود.

**واژه‌های کلیدی:** تایتین، تغییرات پی‌اچ، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده، نیروی باز شدگی

\* نویسنده مسئول، تلفن ۰۵۱۴۴۰۱۲۸۱۷، پست الکترونیکی: r.sohailifard@hsu.ac.ir

### مقدمه

پروتئین فنر مانند قابل تنظیم غول پیکری است که در سارکومر عضلات قلبی و اسکلتی مخطط یافت می‌شود. در حقیقت زمانی عملکرد تایتین آشکار می‌شود که عضله کشیده شده و طول آن افزایش می‌یابد؛ در این زمان نیروی غیر فعال عضله توسط تایتین توسعه یافته تا بتواند عضله را به طول استراحت خود بازگرداند (۱۰). این پروتئین طولی بیش از ۳۰۰۰۰ آمینو اسید دارد و در نیمی از طول سارکومر بین خطوط M و صفحات Z جای گرفته است. هنگامی که عضله کشیده می‌شود، تایتین که بین صفحه Z

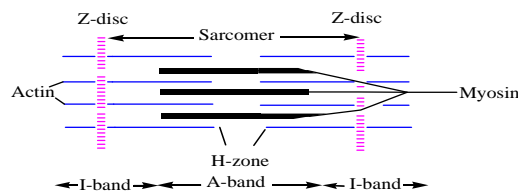
کوچکترین واحد انقباضی عضله سارکومر است که می‌توان از آن به عنوان عامل اصلی حرکت تمام بدن یاد کرد. رشته‌های ضخیم و نازک (اکتین و میوزین) که بخشی از ساختار سارکومر را تشکیل می‌دهند به طور مؤثری در عمل انقباض ایفای نقش می‌کنند (شکل ۱). علاوه بر دو رشته ذکر شده، پروتئین دیگری به نام تایتین در سارکومر وجود دارد که با خاصیت الاستیکی که به عضله می‌بخشد می‌تواند در عمل انقباض بسیار مفید باشد (۶). تایتین (در برخی مقالات از آن به عنوان کانکتین یاد شده است) یک

سال ۱۹۹۸ تا ۲۰۱۶ را به خود اختصاص می‌دهد که به طور کلی این پژوهش‌ها می‌توانند در دو دسته مشاهدات آزمایشگاهی (به وسیله میکروسکوپ نیروی اتمی و لیزر نوری) (۲۳) و پژوهش‌های محاسباتی با استفاده از روش دینامیک مولکولی طبقه‌بندی شوند. از جمله برخی از آنها می‌توان به مطالعه نیروی بیشینه بازشدگی قلمروها و نواحی مختلف تاخوردگی تایتین (۱۷، ۱۹، ۱۱، ۱۶)، تأثیر قرار گرفتن در معرض دماهای مختلف (۱۹، ۵)، انتخاب جهت‌های مختلف برای بازشدگی تاخوردگی قلمروها و تأثیر آن روی سختی (۲۰ و ۲۱) اشاره کرد.

با وجود تعدد قلمروها و نواحی تشکیل‌دهنده این پروتئین عظیم، برخی از نواحی به سبب عملکرد ویژه و یا اهمیت مکانی که در آن واقع شده‌اند مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته و از جهات مختلف بررسی شدند. به عنوان مثال می‌توان از ناحیه PEVK یاد کرد. این ناحیه در قسمت باند I سارکومر واقع است و در مقایسه با سایر قلمروهای تایتین بیشترین خاصیت الاستیک را ایجاد می‌کند. به علت ناشناخته بودن ساختار PEVK، مطالعاتی که تاکنون روی این ناحیه صورت گرفته به صورت آزمایشگاهی بوده است.

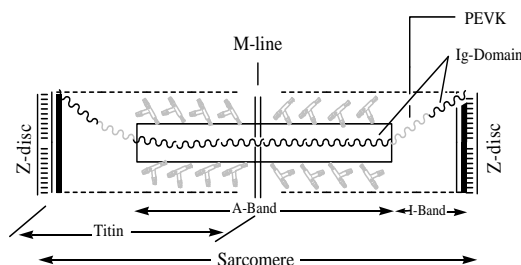
این ناحیه می‌تواند به مقدار زیادی باردار شود و این خصیصه سبب افزایش یا کاهش پی‌اچ و فاصله گرفتن مقدار آن از حالت خنثی شده و آن را به حالت اسیدی یا بازی سوق می‌دهد. با توجه به این امر تلاش‌های زیادی برای بررسی تأثیر پی‌اچ روی سختی مکانیکی آن انجام شده است. نتایج حاصل از آزمایش‌ها نشان دادند که سختی مکانیکی PEVK با کم و زیاد شدن مقدار پی‌اچ کاهش می‌یابد (۱۵). بررسی دیگری مرتبط با تغییرات پی‌اچ به صورت تئوری روی قلمروی فیبرونکتین ۳ توسط کرایگ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ انجام شده است (۷). در این مورد با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده مقاومت مکانیکی این ناحیه در طی باز شدن قلمرو

و خط M نگه داشته شده با اعمال یک نیروی غیر فعال اجزای سارکومر را به صورت یکنواختی ثابت و پایدار نگه می‌دارد (۱۶).



شکل ۱- ساختار سارکومر و قسمت‌های تشکیل‌دهنده آن. محل رشته‌های اکتین و میوزین (رشته‌های نازک و ضخیم) و نواحی باند I و A

همچنین تایتین در برخی از ناحیه‌های خود قادر به برقراری اتصال با یون کلسیم است. مشاهدات انجام شده توسط لیبیت و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که اتصال یون کلسیم به ناحیه ناشناخته PEVK شامل آمینو اسیدهای پرولین، گلوتامیک اسید، والین و لیزین، مقاومت خمشی این ناحیه را کاهش داده، در نتیجه سبب خم شدن راحت‌تر آن و پیچیدگی به دور رشته نازک و انعطاف پذیر اکتین با شعاعی حدود ۷ نانومتر شده است (۴ و ۱۴). شکل ۲ محل قرارگیری تایتین در سارکومر و اجزای تشکیل‌دهنده آن را نشان می‌دهد.



شکل ۲- شمانیکی از پروتئین تایتین و محل قرار گرفتن آن در سارکومر. ناحیه‌های PEVK و ایمونوگلوبولین (Ig) به ترتیب با فنرهای روشن و تیره نشان داده شده که نمایانگر الاستیک بودن ساختار تایتین هستند. با وجود این بخشی از تایتین که در باند I قرار گرفته به علت عدم حضور فیلامنت ضخیم از کشسانی بیشتری برخوردار است.

به سبب نقش مهم تایتین در عملکرد عضله، بررسی این پروتئین شمار زیادی از تحقیقات در زمینه‌های مختلف از

نیرو در راستای دو انتهای زنجیره دارای مقاومت کمتری برای آغاز فرآیند بازشدگی است (۲۰ و ۲۱).

با توجه به بررسی انجام شده به وسیله دووال و همکارانش در سال ۲۰۱۳ تأثیر حضور یون کلسیم روی سختی ناحیه I27 به صورت آزمایشگاهی تحلیل شد (۸) که با توجه به این امر یعنی امکان حضور یون کلسیم این نظریه وجود دارد که به طریقی سبب بار دار شدن I27 شده و در نتیجه مقدار پی اچ تغییر می‌کند. همچنین این ناحیه شامل تعدادی از آمینو اسیدهای گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، هیستیدین، لیزین و سیستئین با بارهای منفی و مثبت است و بنابراین قابلیت باردار شدن را خواهد داشت.

در پژوهش حاضر به منظور یافتن تأثیر تغییر پی اچ بر روی نیروی باز شدگی قلمرو I27، شبیه سازی دینامیک مولکولی هدایت شده برای حالات مختلف انجام گرفته است. در این شبیه سازی علاوه بر در نظر گرفتن دو حالت اسیدی و خنثی، حالت بازی که احتمال دارد در اثر باردار شدن آمینو اسید لیزین و سیستئین صورت گیرد نیز بررسی شده است. مورد دیگری که این مطالعه را حائز اهمیت می‌کند بررسی تأثیر همزمان تغییر پی اچ و سرعت کشیدگی است. به طور کلی هدف از انجام این پژوهش بررسی بیشینه نیروی لازم برای باز شدن قلمروی I27 در مقایسه با ناحیه PEVK در پی اچ‌های متفاوت است به گونه‌ای که بتوان گفت قلمروهای مجاور ناحیه PEVK دارای خواص و ویژگیهای مشابهی با این ناحیه هستند یا خیر؟

### مواد و روشها

در این مطالعه نیروی باز شدگی قلمرو I27 در پی اچ‌های متفاوت با استفاده از روش دینامیک مولکولی هدایت شده مورد بررسی قرار گرفته است. دینامیک مولکولی هدایت شده روشی است که نخستین بار در سال ۱۹۹۷ معرفی شده و در ابتدا به عنوان یک ابزار با ارزش در آشکار سازی

مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا برای کاهش پی اچ و ایجاد حالت اسیدی، آمینو اسیدهای آسپارتیک اسید ۷ و ۲۳ و گلوتامیک اسید ۹ طبق مقدار لگاریتم منفی ثابت تفکیک اسیدی خود پروتون دار شده و سپس تحت شبیه سازی دینامیک مولکولی هدایت شده قرار گرفتند. نتایج حاصل از شبیه سازیها نشان دادند که این بار بر خلاف ناحیه PEVK با کاهش پی اچ میزان سختی باز شدگی افزایش یافته و در پی اچ‌های پایین تر نیروی بیشتری برای شروع شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی نیاز است (۷).

ناحیه دیگری از پروتئین غول پیکر تایتین که مورد توجه بسیاری از محققین بوده و همواره در راستای مطالعات تایتین استفاده شده قلمرو I27 (۲۷) امین قلمروی ایمونوگلوبولین) تایتین است که در انتهای باند I سارکومر، در قسمت پایینی قلمروهای ایمونوگلوبولین و در مجاورت ناحیه PEVK جای می‌گیرد. علت انتخاب این ناحیه برای تجزیه و تحلیل‌های مرتبط با تایتین موقعیت مکانی است که در آن قرار گرفته است (۲۲). به طور کلی می‌توان گفت اکثر مطالعات صورت گرفته در رابطه با پروتئین تایتین مربوط به قلمرو I27 می‌باشد. از جمله این بررسیها می‌توان به محاسبه نیرو در آغاز فرآیند باز شدگی جهت شکستن اولین پیوندهای هیدروژنی در سرعت‌های متفاوت بازشدگی که برای اولین بار توسط لو و همکارانش در سال ۱۹۹۸ صورت گرفت (۱۶) اشاره کرد. سایر مواردی که در آنها به مطالعه I27 پرداخته شده شامل بررسی تأثیر عوامل گوناگون بر سختی و عملکرد آن می‌شود. در سالهای ۲۰۰۸ و ۲۰۱۱ بررسی تأثیر دما بر بازشدن مکانیکی این قلمرو به ترتیب به وسیله تینقوچی و همکارانش و بانگ و همکارانش صورت پذیرفت (۱۹ و ۵). همچنین تأثیر جهت اعمال نیرو در فرآیند بازشدگی I27 به هر دو روش محاسباتی و آزمایشگاهی به ترتیب به وسیله طوفانی و همکاران و تینقوچی و همکاران در سالهای ۲۰۰۶ و ۲۰۱۲ انجام گرفت که بر اساس این مطالعات I27 در اثر اعمال

قلمروی I27 دارای تمامی این آمینو اسیدها بجز آرژینین است با مراجعه به سرور PROPKA (واقع در سایت [http://nbcrc-222.ucsd.edu/pdb2pqr\\_2.0.0/](http://nbcrc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/)) و مشاهده مقادیر pKa، هر کدام از این آمینو اسیدها متناسب با مقدار پی اچ مورد نظر برای شبیه سازی در نرم افزار گرومکس پروتون‌دار شدند (شکل ۴).

در این بررسی تمامی آمینواسیدهای آسپارتیک، گلوتامیک و هیستیدین که مقدار pKa برای آنها بزرگ‌تر از ۳ و ۴ بوده برای رسیدن به حالت اسیدی به ترتیب با پی اچ ۳ و ۴، پروتون‌دار شدند. برای شبیه سازی حالت بازی نیز، تعدادی از آمینو اسیدهای لیزین با مقدار pKa کمتر از ۱۲ به منظور ایجاد خاصیت بازی پروتون از دست دادند (در این حالت به علت کم بودن تعداد آمینواسیدهای سیستمین از باردار کردن آنها صرف نظر شده است).

به منظور دقت بیشتر در رسیدن به پی اچ مورد نظر در شبیه سازی، آمینو اسیدهای پایانه‌های N و C نیز با توجه به مقادیر لگاریتم منفی ثابت تفکیک اسیدی مورد ارزیابی قرار گرفته و باردار و یا خنثی شدند. پس از آن هر سه مدل (خنثی، اسیدی و بازی) در سلولی به ابعاد  $40 \times 48 \times 6$  نانومتر قرار گرفته و در مدل آب Tip3p به صورت محلول درآمدند و محلول با اضافه کردن یونهای سدیم و کلر کاملاً بدون بار شد. سپس انرژی هر سه شبیه سازی به منظور حذف کرنشهای اضافی با استفاده از الگوریتم Steepest decent کمینه شدند. در مرحله بعد هر سه سیستم با شرایط یکسان به مدت ۱۱۰ پیکوثانیه با وجود ترموستات دما و فشار برنندسن به روش NPT و ثابت بودن تمام اتمهای سنگین در دمای ۳۰۰ کلوین متعادل شدند.

گام دوم متعادل سازی به مدت ۱/۵ نانوثانیه و با برداشتن تمام قیود و تنها با ثابت کردن اتمهای آلفا کربن آمینو اسیدهای اول و آخر زنجیره صورت گرفت. این مرحله به منظور اطمینان از صحت تعادل برای چند مورد از شبیه سازیها صورت گرفت که با توجه به متعادل شدن سیستم

جزئیات جدا شدن پروتئین از زیرلایه و به دنبال آن مطالعه بازشدگی پروتئینها در سطح اتمی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲ و ۱۳).

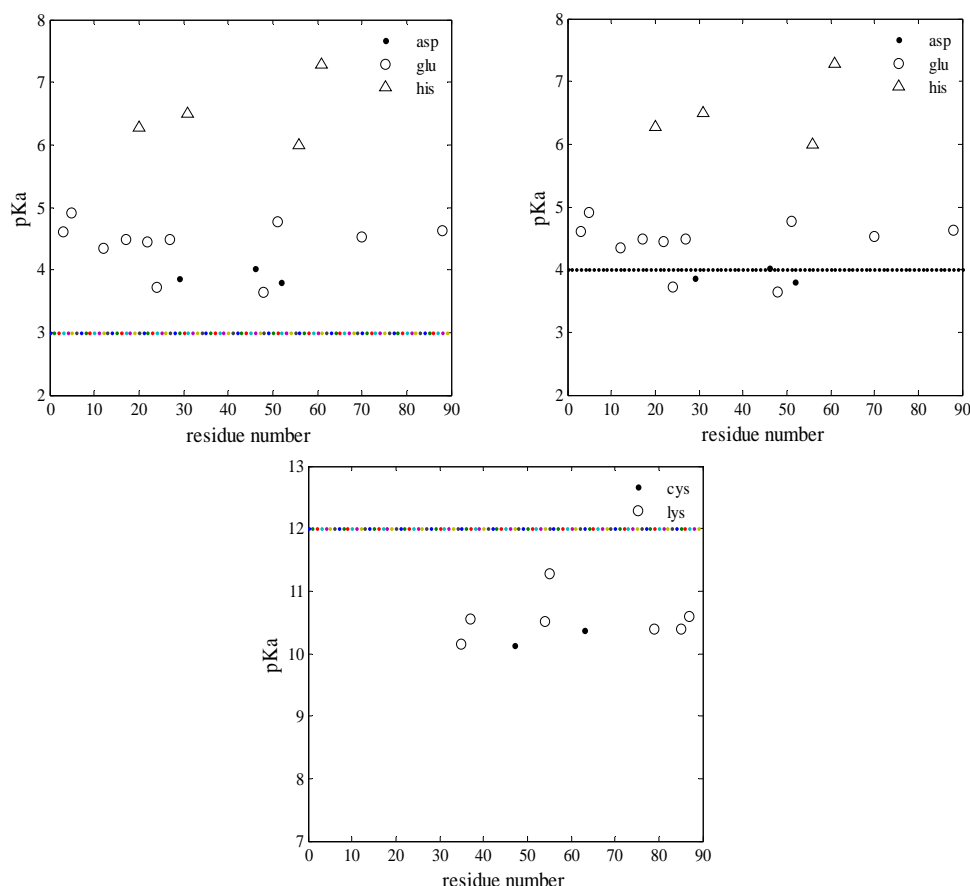
در این پژوهش، کلیه شبیه‌سازیها به روش دینامیک مولکولی هدایت شده در فضای نرم افزار GROMACS نسخه 4.6.5 و با استفاده از میدان نیروی CHARMM27 صورت گرفته است. بدین منظور ساختار کریستالی مورد نیاز قلمروی I27 از بانک داده پروتئین (PDB code: 1TIT) استخراج شد. شکل ۳، ساختار این قلمرو را که از نرم افزار Chem Office به دست آمده نشان می‌دهد. به منظور سهولت در انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی هدایت شده، با استفاده از نرم افزار PYMOL ابتدا پروتئین به صورتی چرخانده شد که دو انتهای زنجیره در راستای محور طولی قرار گیرند و پس از آن فرآیند بازشدگی و کشیدگی پروتئین در این راستا انجام پذیرفت.



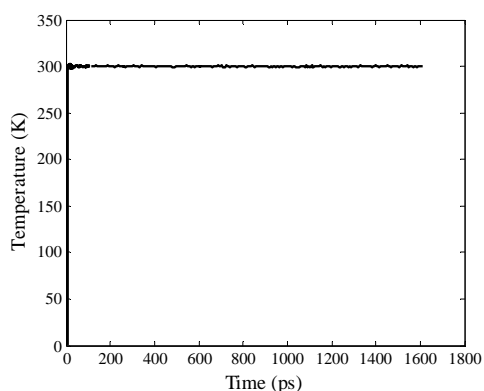
شکل ۳- ساختار قلمرو I27 پروتئین تایتین به دست آمده از کریستالوگرافی اشعه ایکس با استفاده از نرم افزار Chem Office به طور کلی از بین ۲۰ آمینو اسید موجود در ساختار پروتئینها، برخی به سبب داشتن قابلیت باردار شدن می‌توانند خاصیت‌های اسیدی و بازی را به پروتئین دهند. آمینو اسیدهای آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و هیستیدین دارای بار منفی بوده و با جذب پروتون با توجه به مقدار لگاریتم منفی ثابت تفکیک اسیدی خود (pKa) سبب ایجاد خاصیت اسیدی می‌شوند. همچنین آمینو اسیدهای لیزین و آرژینین نیز دارای بار مثبت بوده و خاصیت بازی ایجاد می‌کنند (۱۸). با توجه به این امر که

۱۱۰ پیکوثانیه انجام شد.

در زمانی کمتر و حجم بالای محاسبات برای حالت‌های بعدی شبیه‌سازی به جای ۱/۵ نانوثانیه گام دوم نیز در



شکل ۴- نمودارهای لگاریتم منفی ثابت تفکیک اسیدی (pKa) بر حسب شماره آمینواسید برای I27 به وسیله سرور PROPKA



شکل ۵- نمودار دما بر حسب زمان در گام متعادل سازی برای ۱۶۱۰ پیکوثانیه برای حالت خنثی

پس از اطمینان از صحت تعادل سیستمها، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت شده با به کارگیری روش

شکلهای ۵ و ۶ و ۷ به ترتیب نمودارهای دما، فشار و تغییرات انحراف معیار جذر میانگین مربعات بر حسب زمان را برای حالت خنثی نشان می‌دهند. همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود دما پس از گذشت مدت زمان حدوداً ۲ پیکوثانیه به مقدار ثابت ۳۰۰ کلوین رسیده و در همین دما باقی می‌ماند. با توجه به شکل ۶ نیز فشار پس از گذشت زمان کوتاهی حول مقدار ثابتی نوسان می‌کند. با مشاهده شکل ۷ نیز می‌توان تغییرات ساختاری I27 را قبل و بعد از متعادل سازی مشاهده کرد. بدین ترتیب که در زمانی بسیار کوتاه‌تر از ۱/۵ نانوثانیه تعادل مورد نظر به دست می‌آید. این نتیجه کاهش زمان متعادل سازی را توجیه می‌کند.

## نتایج

به منظور یافتن تأثیر تغییرات مقدار پی‌اچ روی میزان نیروی بازشدگی ۲۷ آمینو قلمرو پروتئین تایتین در یک باز شدگی کامل و در نرخهای مختلف کشیدگی ۱۲ شبیه سازی هدایت شده صورت گرفت که شرایط آنها به اختصار در جدول ۱ نشان داده شده است. در تمامی این شبیه سازیها فنر هارمونیک به یک انتها متصل بوده و انتهای دیگر زنجیره تا خورده ثابت نگه داشته شده است (شکل ۸).

جدول ۱- شرایط و ویژگیهای شبیه سازی

شبهه سازی	پی‌اچ	سرعت کشیدگی <sup>(*)</sup>
I27	3	0.5
I27	3	2
I27	3	5
I27	4	0.5
I27	4	2
I27	4	5
I27	7	0.5
I27	7	2
I27	7	5
I27	12	0.5
I27	12	2
I27	12	5

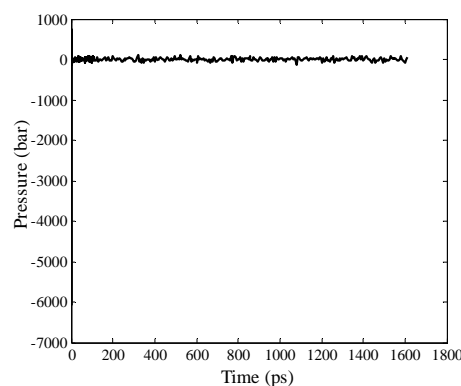
(\*) بر حسب آنگستروم بر پیکوثانیه



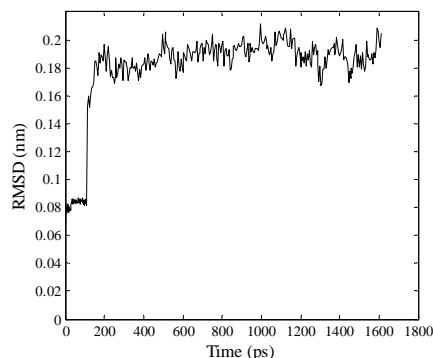
شکل ۸- ساختار قلمرو I27 پروتئین تایتین. مکانهای کشیدگی و ثابت شدن به ترتیب با فلش و خطوط مورب در سمت چپ مشخص شده‌اند.

قلمروی I27 دارای ساختار تاخورد‌های است که از کنار هم قرار گرفتن صفحات بتا ایجاد شده است (۱۴). صفحه بتا دومین حالت برای ساختار دوم پروتئیناست که از تعدادی رشته‌های بتا که به طور جانبی به وسیله ۳ یا تعداد

Umbrella، الگوریتم LINCS برای مقید کردن تمامی پیوندها، شعاع قطع ۱/۳ نانومتر برای پیوندهای واندروالس و به کارگیری روش PME برای برهم کنشهای الکترواستاتیکی انجام شد. گام زمانی برای کلیه شبیه سازیها ۱ فمتوثانیه در نظر گرفته شد و شبیه سازی با ثابت کردن اتم آلفا کربن آمینو اسید یک انتهای زنجیره I27 (Leu<sup>1</sup>) در ابتدای زنجیره و کشیدن اتم آلفا کربن آمینو اسید دیگری در انتهای زنجیره (Leu<sup>89</sup>) با نیروی حاصل از یک فنر هارمونیک با سختی  $10 \text{ k}_B\text{T}/\text{\AA}^2$  صورت گرفت (۱۶). همچنین در این شبیه سازیها تأثیر سرعتهای کشش ۵، ۲ و ۰/۵ آنگستروم بر پیکوثانیه بر هر ۴ حالت (پی‌اچ: ۳، ۴، ۷ و ۱۲) مورد ارزیابی قرار گرفت.



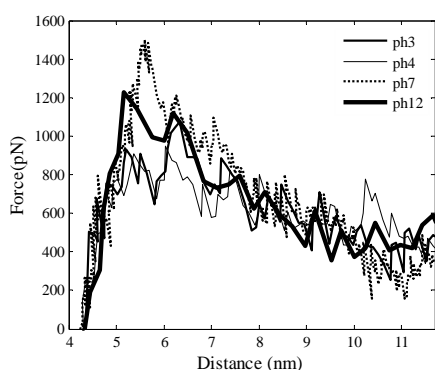
شکل ۶- نمودار فشار بر حسب زمان در گام متعادل سازی برای ۱۶۱۰ پیکوثانیه برای حالت خنثی



شکل ۷- نمودار تغییرات انحراف معیار جذر میانگین مربعات (RMSD) بر حسب زمان برای گام متعادل سازی در زمان ۱۶۱۰ پیکوثانیه برای حالت خنثی

ترتیب افزایش سرعت بیشتر شده و این نشانگر افزایش سختی پروتئین می‌باشد.

شکل ۱۰ نمودار نیرو بر حسب جا به جایی برای چهار پی اچ ۳، ۴، ۷ و ۱۲ در سرعت کشیدگی ۰/۵ آنگستروم بر پیکوثانیه و برای طول باز شدگی ۱۲ نانومتر را نشان می‌دهد. با توجه به این نمودار در هر ۴ مورد میزان جا به جایی از یک نقطه مشترک که همان فاصله اولیه بین دو آمینو اسید ثابت و کشیده شده است آغاز شده و در یک شیب تقریباً ثابت به بیشینه نیروی خود می‌رسند.

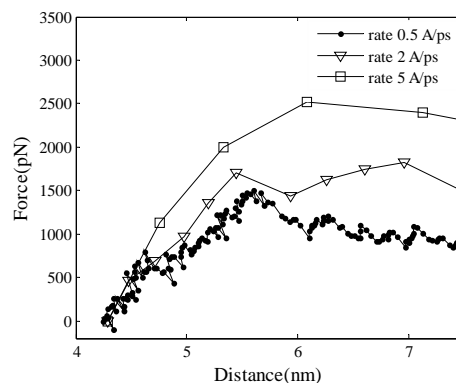


شکل ۱۰- نمودارهای نیرو بر حسب جابه جایی برای پی اچ متفاوت در سرعت ۰/۵ آنگستروم بر پیکوثانیه

با توجه به شکل ۱۰، نمودارها دارای بیشینه نیروهای متفاوتی هستند. در پی اچ ۷، که همان حالت خنثی است شاهد بیشترین بیشینه نیرو بوده و در پی اچ های اسیدی و بازی بیشینه نیرو مقدار کمتری را دارا هستند. این بررسی به لحاظ کیفی در تطابق با نتیجه‌ای است که لینک و همکارانش در خصوص ناحیه PEVK در سال ۱۹۹۸ به آن دست یافتند (۱۵). بنابراین می‌توان گفت قلمروی I27 و ناحیه PEVK، هنگام آغاز فرآیند باز شدگی خواص مشابهی را در اثر تغییرات پی اچ، از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این همان‌طور که از نتایج حاصل از کشیدگی قلمرو فیبرونکتین ۳ به وسیله کرایگ و همکارانش در سال ۲۰۰۴ مشاهده می‌شود به راحتی می‌توان دریافت که همجواری دو ناحیه تأثیر زیادی بر خواص مشترک آنها می‌گذارد. فیبرونکتین ۳ و I27 از این لحاظ دارای خواص

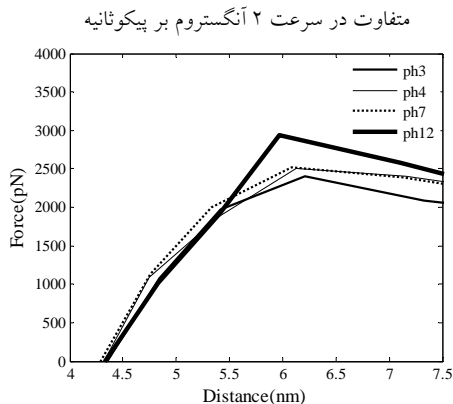
بیش‌تری پیوند هیدروژنی به هم وصل شده‌اند تشکیل شده اند. عموماً این صفحات حالتی تابیده و چین‌دار دارند (۳).

در ابتدای فرآیند کشیدگی نیروی ایجاد شده در I27 به منظور غلبه بر نیروی ناشی از فنر متصل به آمینو اسید لیوسین ۸۹، همراه با افزایش نیروی اعمالی فنر افزایش یافته تا سرانجام به بیشترین مقدار خود می‌رسد. پس از آن نیرو کاهش یافته و حدوداً در مقدار ثابتی نوسان می‌کند. با این حال مسئله‌ای که در این‌جا حائز اهمیت است بررسی میزان بیشینه نیروی مورد نیاز در هنگام آغاز فرآیند باز شدگی در ۱۲ شبیه سازی انجام شده است. بدین منظور نمودارهای نیرو بر حسب جا به جایی برای هر ۱۲ حالت رسم شده است. شکل ۹ نمودارهای نیرو بر حسب جابه جایی را برای پی اچ ۷ (حالت خنثی) در سرعت‌های مختلف کشیدگی نشان می‌دهد.



شکل ۹- نمودارهای نیرو بر حسب جابه جایی در سرعت‌های مختلف کشیدگی برای پی اچ ۷

با توجه به رفتار نمودارها در سرعت‌های متفاوت در شکل ۹ به راحتی روند افزایش بیشینه نیرو در اثر افزایش سرعت مشاهده می‌شود. در حقیقت این امر به سبب وجود خاصیت ویسکوالاستیک در قلمروهای تایتین به خصوص در نواحی PEVK و I27 که در مجاورت آن قرار گرفته است، می‌باشد (۱۶). با افزایش سرعت کشیدگی سختی پروتئین افزایش یافته و از این رو نیروی بیشتری برای شکستن اولین پیوندهای هیدروژنی مورد نیاز است. علاوه بر این بر افزایش نیروی بیشینه، شیب نمودارها نیز به



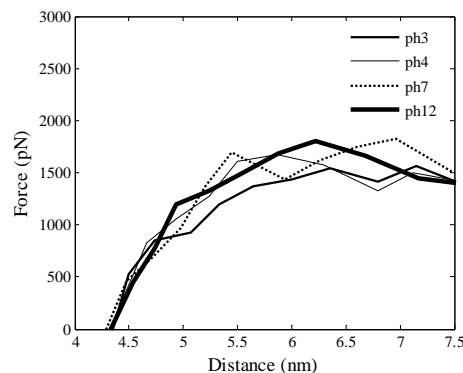
شکل ۱۲- نمودارهای نیرو بر حسب جابه‌جایی در ۴ پی‌اچ متفاوت در سرعت ۵ آنگستروم بر پیکوتانیه

با وجود این، بیش‌تر بودن قله نیرو در حالت خنثی باز هم قابل رؤیت است، با این تفاوت که نسبت به اعمال سرعت ۰/۵ آنگستروم بر پیکوتانیه نمودارها بی‌نظم‌تر شده و نیز اختلاف کمی بین بیشینه نیرو در پی‌اچ‌های ۴، ۷ و ۱۲ وجود دارد، به طوری که نمودارهای مربوط به پی‌اچ ۷ و ۱۲ تقریباً یک بیشینه نیرو را نشان می‌دهند. با توجه به شکل ۱۰ شیب اولیه در ۴ حالت یکسان نبوده و در پی‌اچ ۳ مقدار کم‌تری را در مقایسه با بقیه حالات نشان می‌دهد.

با در نظر گرفتن سرعت ۵ آنگستروم بر پیکوتانیه برای پی‌اچ‌های متفاوت نمودار شکل ۱۲ به دست آمده است. در این شکل نیز مانند شکل‌های ۹ و ۱۰، هر ۴ حالت از نقطه ۴/۳۱ نانومتر آغاز شده و با شیب یکسانی به بیشینه نیروی خود جهت شکستن پیوندهای هیدروژنی رسیده‌اند، با این تفاوت که قله نیرو به سبب مقدار سرعت بیشتر در نظر گرفته شده نسبت به حالات قبل افزایش یافته است. در باز شدگی قلمروی I27 به طول ۷/۵ نانومتر در این سرعت، بر اساس نتایج حاصل می‌توان مشاهده کرد که اختلاف بین نمودارهای مربوط به پی‌اچ‌های ۳، ۴ و ۷ بسیار کم بوده به صورتی که نمودارهای مربوط به پی‌اچ ۴ و ۷، تقریباً بر هم منطبق هستند. نمودار مربوط به حالت بازی (پی‌اچ ۱۲) نیز بیشینه نیرویی بالاتر از تمام حالات یعنی حتی حالت خنثی را نشان می‌دهد که بر خلاف نتایج حاصل از نمودارهای شکل ۱۰ است. البته علت این امر را می‌توان

غیر یکسانی چون بیشینه نیروی متفاوت بوده و این امر به سبب محل قرار گرفتن فیبرونکتین ۳ و ضعیف بودن پیوندهای هیدروژنی در این ناحیه است. از طرفی بررسی‌هایی که در خصوص تغییرات پی‌اچ در این ناحیه رخ داده حاکی از این امر هستند که با کاهش پی‌اچ و به عبارت دیگر افزایش خاصیت اسیدی، بیشینه نیروی باز شدگی مقدار بیشتری را به خود اختصاص می‌دهد (۷) که این مشاهده با نتایج حاصل از کشیدگی I27 مغایرت دارد. نمودارهای مربوط به پی‌اچ‌های ۳ و ۴ همان‌طور که مشاهده می‌شود تقریباً بر هم منطبقند و تفاوت زیادی بین این دو پی‌اچ با این سرعت کشیدگی دیده نمی‌شود. بیشینه نیروی مربوط به حالت بازی (پی‌اچ ۱۲) برای آغاز شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی مقدار بیشتری را نسبت به حالت‌های اسیدی نشان می‌دهد. موارد دیگر شبیه سازی در سرعت‌های بالاتر (۴ برابر و ۱۰ برابر حالت قبل) انجام شدند. شکل‌های ۱۱ و ۱۲ به ترتیب نمودارهای نیرو بر حسب جابه‌جایی را در سرعت‌های کشیدگی بالاتر نشان می‌دهند.

در شکل ۱۱ سرعت کشیدگی ۲ آنگستروم بر پیکوتانیه یعنی ۴ برابر سرعت قبل در نظر گرفته شده و با توجه به اهمیت نیروی بیشینه، نتایج تنها تا باز شدگی ۷/۵ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند. بیشینه نیرو برای هر ۴ حالت در مقایسه با شکل ۹ مقدار بیشتری را نشان می‌دهند که می‌توان علت آن را ناشی از افزایش ۴ برابری سرعت کشیدگی و در نتیجه سخت‌تر شدن I27 دانست.



شکل ۱۱- نمودارهای نیرو بر حسب جابه‌جایی برای پی‌اچ ۴



ارزیابی قرار گرفت. در حقیقت فرآیند باز شدن قلمروهای تا خورده تایتین در سیستم ببولژیکی بدن به صورت بسیار آهسته‌تر از سرعتی که برای شبیه‌سازیهای دینامیک مولکولی در نظر گرفته می‌شود رخ می‌دهد. با این وجود در نظر گرفتن چنین سرعتی برای انجام شبیه‌سازیهای رایانه‌ای مستلزم وجود زمان طولانی و در اختیار داشتن سیستمهای بسیار قدرتمند برای تجزیه و تحلیل داده‌ها است. از طرفی بررسی وقایع در سطح مولکولی و به وسیله تکنیکهای آزمایشگاهی بسیار پیچیده، پرهزینه و عمدتاً غیر قابل انجام می‌باشد (۲). با توجه به این امر شبیه‌سازیها همواره در سرعتهای بالاتری نسبت به حالت طبیعی خود انجام می‌شوند. در این پژوهش از سرعتهای مختلف برای کشیدگی استفاده شد. در حالی که در سرعت ۰/۵ آنگستروم بر پیکوثانیه نتایج بسیار خوب و مشابه با نتایج آزمایشگاهی انجام شده توسط لینک و همکاران در سال ۱۹۹۸ در خصوص ناحیه PEVK (۱۵) حاصل گردید، نشان داده شد با افزایش سرعت، نتایج از روند منطقی و مورد انتظار فاصله گرفته و نمی‌تواند به خوبی مورد استناد قرار گیرند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند گام نخستی جهت تحلیلهای کامل‌تر و با در نظر گرفتن شرایط محیطی بر باز شدگی پروتئین تایتین در مقیاس بزرگ‌تر باشد.

ناشی از سرعت بسیار بالای کشیدگی و عدم تطبیق آن با محدوده سرعتی که در بدن رخ می‌دهد دانست.

## بحث

در این پژوهش تأثیر عامل محیطی پی‌اچ در سرعتهای متفاوت کشیدگی بر نیروی بازشدگی پروتئین تایتین با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی که روشی قدرتمند در بررسی جزئیات ساختاری در پروتئینهاست (۱)، مورد بررسی قرار گرفت. تاکنون پژوهشهای زیادی روی ناحیه I27 به سبب محبوبیتی که میان پژوهش‌گران دارد صورت گرفته است.

نتایج و نمودارهای حاصل از شبیه‌سازی، نشان داد که مطابق انتظار قلمرو I27 بنا به محلی که در آن قرار گرفته (در نزدیکی و مجاورت PEVK) رفتاری مشابه رفتار ناحیه PEVK از خود نشان می‌دهد. به عبارت دیگر بیشینه نیرو جهت بازشدگی این ناحیه به هنگام اسیدی و یا بازی شدن نسبت به حالت خنثی کاهش یافته است. با این وجود در هر سه نمودار پس از گسیختگی نخستین پیوندهای هیدروژنی روند مشابهی مشاهده می‌شود.

علاوه بر این تأثیر سرعت کشیدگی در فرآیند باز شدن قلمروی تا خورده I27 نیز در پی‌اچ‌های متفاوت مورد

## منابع

- ۱- صفرزاده، م.، پاژنگ، م.، مهرنژاد، ف.، دوستدار، ف.، چاپارزاده، ن.، ربیعی فرادنبه، د.، یاری خسروشاهی، ا.، محمدپور، ع.، ۱۳۹۴. بررسی نحوه تأثیر جهش‌ها بر غیر فعال شدن آنزیم پیرازین آمیداز با شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. مجله پژوهش‌های سلولی مولکولی، جلد ۲۸: ۲۶۶-۲۷۸
- ۲- گنجعلی‌خانی، م.، رنجبر، م.، ۱۳۹۱. مطالعه دینامیک مولکولی و حرکات عملکردی آنزیم لیپاز A از گونه باسیلوس سوبتیلیس. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی، جلد ۲۷: ۲۹۶-۳۰۷
- ۳- لینگر، آ.، کاکس، م.، نلسون، د.، ل.، ۱۳۸۵. رضا محمدی آبیژ، اصول بیوشیمی لنینجر. شابک ۸-۰۵-۸۳۹۷-۹۶۴.
- ۴- مهرافرز، ب.، شاملو، آ.، فیروزبخش، ک.، ۱۳۹۵. مطالعه خواص مکانیکی پروتئین اکتین تحت بارگذاری کششی با استفاده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی. مجله مهندسی مکانیک مدرس، جلد ۱۶: ۳۷۵-۳۸۳.
- 5- Bung, N., Priyakumar, U. D., 2012. Computational investigation of the effect of thermal perturbation on the mechanical unfolding of titin I27. *Journal of molecular modeling*, Vol. 18, No. 6. pp. 2823-2829.
- 6- Caldwell, T. A., Sumner, I., Wright, N. T., 2015. Mechanical dissociation of the M-band titin/obscurin complex is directionally dependent, *FEBS letters*, Vol. 589, No. 15, pp. 1735-1739.

- 7- Craig, D., Gao, M., Schulten, K., Vogel, V., 2004. Tuning the mechanical stability of fibronectin type III modules through sequence variations, *Structure*, Vol. 12, No. 1, pp. 21-30.
- 8- DuVall, M. M., Gifford, J. L., Amrein, M., Herzog, W., 2013. Altered mechanical properties of titin immunoglobulin domain 27 in the presence of calcium, *European Biophysics Journal*, Vol. 42, No. 4, pp. 301-307.
- 9- Gao, M., Wilmanns, M., Schulten, K., 2002. Steered molecular dynamics studies of titin II domain unfolding, *Biophysical journal*, Vol. 83, No. 6, pp. 3435-3445.
- 10- Granzier, H. L., Labeit, S., 2006. The giant muscle protein titin is an adjustable molecular spring, *Exercise and sport sciences reviews*, Vol. 34, No. 2, pp. 50-53.
- 11- Greene, D. N., Garcia, T., Sutton, R. B., K. M. Gernert, Benian, G. M., Oberhauser, A. F., 2008. Single-molecule force spectroscopy reveals a stepwise unfolding of *Caenorhabditis elegans* giant protein kinase domains, *Biophysical journal*, Vol. 95, No. 3, pp. 1360-1370.
- 12- Gu, J., Wang, X., Yang, Y., 2013. A steered molecular dynamics method for receptor-ligand unbinding based on genetic algorithm, in *Proceeding of, IEEE*, pp. 698-703.
- 13- Klimov, D. K., Thirumalai, D., 2000. Native topology determines force-induced unfolding pathways in globular proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 97, No. 13, pp. 7254-7259.
- 14- Labeit, D., Watanabe, K., Witt, C., Fujita, H., Wu, Y., Lahmers S., Funck, T., Labeit, S., Granzier, H., 2003. Calcium-dependent molecular spring elements in the giant protein titin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 100, No. 23, pp. 13716-13721.
- 15- Linke, W. A., Ivemeyer, M., Mundel, P., Stockmeier, M. R., Kolmerer, B., 1998. Nature of PEVK-titin elasticity in skeletal muscle, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 95, No. 14, pp. 8052-8057.
- 16- Lu, H., Isralewitz, B., Krammer, A., Vogel, V., Schulten, K., 1998. Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation, *Biophysical journal*, Vol. 75, No. 2, pp. 662-671.
- 17- Lu, H., Schulten, K., 2000. The key event in force-induced unfolding of titin's immunoglobulin domains, *Biophysical journal*, Vol. 79, No. 1, pp. 51-65.
- 18- Shokuhfar, A., Ghaffari, A., Ghasemi, R. H., 2012. Cavity control of Prefoldin nano actuator (PNA) by temperature and pH, *Nano-Micro Letters*, Vol. 4, No. 2, pp. 110-117.
- 19- Taniguchi, Y., Brockwell, D. J., Kawakami, M., 2008. The effect of temperature on mechanical resistance of the native and intermediate states of I27, *Biophysical journal*, Vol. 95, No. 11, pp. 5296-5305.
- 20- Taniguchi, Y., Kobayashi, A., Kawakami, M., 2012. Mechanical unfolding studies of protein molecules, *Biophysics*, Vol. 8, pp. 51-58.
- 21- Toofanny, R. D., Williams, P. M., 2006. Simulations of multi-directional forced unfolding of titin I27, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Vol. 24, No. 5, pp. 396-403.
- 22- Tskhovrebova, L., Trinick, J., 2004. Properties of titin immunoglobulin and fibronectin-3 domains, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 45, pp. 46351-46354.
- 23- Wang, K., Forbes, J. G., Jin, A. J., 2001. Single molecule measurements of titin elasticity, *Progress in biophysics and molecular biology*, Vol. 77, No. 1, pp. 1-44.

## The effect of pH changes on the unfolding force of titin immunoglobulin domain I27 using steered molecular dynamic simulation

Abidi M. and Soheilifard R.

Dept. of Mechanical Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, I.R. of Iran

### Abstract

Titin is the longest protein found in striated skeletal and cardiac muscle myofibrils. This protein with a length of about  $1\mu\text{m}$ , has multiple domains consisting of PEVK region (proline, glutamic acid, valine, and lysine residues), and immunoglobulin-like (Ig) and fibronectin domains. In muscles, titin owns unique elastic properties in the I-band region and it is responsible for restoration of muscle to its slack length during the passive contractions. I27 (27<sup>th</sup> immunoglobulin domain) is one of the important regions of titin which has been studied extensively by researchers. An important feature of this region is the connection with calcium ion which charges the region and causes pH to change. In this paper the unfolding force of I27 domain has been investigated by considering various pHs in three states of neutral, acidic and basic, using steered molecular dynamic simulations. The results showed that unfolding stiffness of I27 domain depends significantly on pH changes. It decreases by increasing or decreasing pH value and getting away from the neutral state. In the neutral state the highest value of force is needed to break the hydrogen bonds and start the unfolding process. According to the results, titin's performance can be improved by changing pH. This proves useful in cases where titin is stiffer than usual or there is a malfunction in the unfolding process.

**Key words:** Titin, pH changes, Steered molecular dynamic simulation, Unfolding force