

بررسی پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ در تغییرات ساختاری و انعطاف پذیری دمین FK

پروتئین FSTL1، یک مطالعه محاسباتی

سیده شهربانو جعفری^۱، رحمان امام زاده^{۱*}، محبوبه نظری^۲، سپیده جعفری^۱ و محمدرضا گنجعلی خانی^۱

^۱ ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوریهای زیستی، گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، انیستیتو غدد درون ریز و متابولیسم، مرکز تحقیقات غدد

^۳ ایران، تهران، ACECR، پژوهشکده ابن سینا، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۲۹

چکیده

FSTL1 (فولیستاتین مانند ۱) (Follistatin like 1) گلیکوپروتئین خارج سلولی ترشحی است که عضوی از خانواده پروتئین‌های SPARC – Fst (Secreted protein acidic rich in cysteine- Follistatin) می‌باشد. FSTL1 در تنظیم بقا، تکثیر، تمایز، مهاجرت سلولی، توسعه اندام و همین‌طور در کارسینوم‌ها و متاستاز نقش دارد. با وجود مطالعات گسترده در مورد FSTL1، اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم زیستی در دسترس می‌باشد. پیش‌بینی حرکات ساختاری و دینامیکی پروتئین FSTL1 می‌تواند برای دستیابی به درک بهتر اکثر فرآیندهای بیولوژیکی که این مولکول مهم در آن نقش دارد، امری مفید و موثر باشد. بنابراین در مطالعه حاضر، از شبیه‌سازی دینامیکی مولکولی به منظور بررسی انعطاف‌پذیری دمین FK پروتئین FSTL1 که برای عملکرد این پروتئین ضروری است، استفاده شد. نتایج شبیه‌سازی نشان داد که پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی مقدار نمودار ریشه میانگین مجذور انحرافها (RMSD) بالاتری را از پروتئین طبیعی دارد. ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF) در پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی در محدوده باقی‌مانده‌های ۱۸-۹، ۳۱، ۵۲-۶۲، ۷۲ و ۱۶۰-۱۴۷، افزایش تغییرات ساختاری قابل توجهی را نشان داد. همچنین در پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ شعاع ژیراسیون (ROG) در زمان ۱ تا ۳ نانوثانیه بعد از شروع شبیه‌سازی بطور قابل توجهی افزایش یافت. این یافته‌ها بیان می‌کند که حذف پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ در دمین FK پروتئین FSTL1 باعث افزایش انعطاف‌پذیری پروتئین می‌شود. همچنین این یافته‌ها بیانگر این است که این پیوند می‌تواند یک ناحیه هدف بالقوه برای مطالعات جهش‌زایی هدفمند جهت افزایش انعطاف‌پذیری مولکول باشد.

واژه‌های کلیدی: FSTL1، پیوند دی سولفیدی، شبیه‌سازی دینامیکی مولکولی، انعطاف‌پذیری.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: r.emamzadeh@sci.ui.ac.ir

مقدمه

FSTL1 (BMP۴ Morphogenetic Proteins) [۵] و فیروز اندام شناخته شد [۸، ۹، ۱۴، ۴۰]. مطالعات پیشین نشان داده است که FSTL1 می‌تواند در مدل‌های حیوانی به عنوان یک فاکتور ضد التهاب [۳۸] یا پیشبرنده التهاب [۵، ۱۹، ۲۳] عمل کند. اخیراً، نیز مشخص شده است که FSTL1 در پاسخ به ضخیم شدن ماهیچه قلب ناشی از AKT

FSTL1 گلیکوپروتئین خارج سلولی ترشحی است که در ابتدا در رده سلولی استئوبلاست موش به عنوان یک ژن تنظیم‌کننده سوپرفامیلی فاکتور رشد بتا انتقالی (TGF-β (Transforming growth factor-β)) شناسایی شد [۳۹] و سپس به عنوان یک مهارکننده کنترل‌کننده رشد جنینی پروتئین مورفوزنتیک استخوان ۴ (Bone

ضروری می‌باشد [۲۰]. پروتئین FSTL1 به چهار پروتئین خانواده BM-40/SPARC/Osteonectin شباهت ساختاری زیادی دارد. طول حلقه بین دمین FS (باقی‌مانده‌های ۳۰-۳۵) و دمین Kazal (باقی‌مانده‌های ۴۸-۱۰۰) متغیر است و بیانگر انعطاف‌پذیری نسبی متفاوت بین دمین FS و دمین Kazal، در میان این پروتئین‌ها می‌باشد. علاوه بر این، مطالعات نشان داده است که لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ (باقی‌مانده‌های ۵۲-۶۳) این پروتئین‌ها دارای پتانسیل بار الکترواستاتیکی بسیار متفاوتی است که در اتصال به فاکتورهای اتصال متفاوت نقش دارد [۲۰]. با وجود مطالعات گسترده در مورد FSTL1، اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم زیستی در دسترس می‌باشد. هدف از این تحقیق بررسی تغییرات انعطاف‌پذیری لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ (باقی‌مانده‌های ۵۲-۶۳) پروتئین FSTL1 در حضور و عدم حضور پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ می‌باشد که در مجاورت نزدیک به این لوپ قرار گرفته است. لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ در دمین FK و دمین عملکردی پروتئین FSTL1 قرار گرفته است و دارای پتانسیل بار الکترواستاتیکی بسیار متفاوتی است که در اتصال به فاکتورهای اتصال متفاوت نقش دارد [۲۰]. علاوه بر این طبق برخی از تحقیقات مشخص شده است که افزایش انعطاف‌پذیری یک ناحیه میانکنشی مهم در لیگاند-گیرنده باعث تسهیل اتصال و شناسایی آن‌ها شده و در نتیجه فعالیت مورد نظر افزایش می‌یابد [۱۱، ۱۷، ۲۴]. بنابراین به نظر می‌رسد مطالعه تغییرات ساختاری و دینامیکی این لوپ برای مطالعات جهش‌زایی هدفمند آینده به منظور افزایش انعطاف‌پذیری این ناحیه بصورت هدفمند و با حفظ ساختار عملکردی دمین FK می‌تواند در توسعه عملکرد این پروتئین موثر و مفید باشد.

بنابراین در این تحقیق پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ از طریق مطالعات شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از بین برده شد تا اثر این تغییر بر ساختار و دینامیک دمین FK و کل ساختار مورد ارزیابی قرار گیرد. مدل ساختاری از

(threonine kinase Serine) و استرس قلبی، از جمله افزایش فشار، آسیب ایسکمی و سکت قلبی، افزایش می‌یابد [۲۲، ۲۸، ۲۹]. در موش تجویز سیستماتیک FSTL1، قلب را در برابر آسیب ایسکمی پرفیوژن که با کاهش آپوپتوز میوسیت همراه است، محافظت می‌کند [۳۴، ۳۷]. FSTL1 باعث عملکرد سلول‌های اندوتلیال تحت شرایط خارج سلولی می‌شود و رگ‌زایی مجدد عروق ناشی از ایسکمی را در داخل بدن تسریع می‌کند. مطالعه FSTL1 در بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان [۱۸، ۲۷، ۳۳]، آرتروز، فیروز ریه و چاقی، بر پتانسیل آن به عنوان نشانگر زیستی و همچنین هدفی برای مدیریت روند بیماری تأکید می‌کند. اگرچه عملکردها و سازوکارهای FSTL1 به طور کامل درک نشده است، ولی مجموعه‌ای از تحقیقات نقش FSTL1 را در تنظیم بقای سلول، تکثیر [۳۲، ۳۶]، تمایز [۷]، مهاجرت [۳۱] و همین‌طور التهاب و تعدیل سیستم ایمنی بدن نشان داده‌اند. به لحاظ ساختاری توالی آمینواسیدی پروتئین FSTL1، که در طول تکامل مهره‌داران بسیار محافظت شده است (شباهت توالی ۹۴/۴٪)، شامل یک دمین مشابه با فولیستاتین (FS)، یک دمین حاوی دو محل اتصال به کلسیم EF-hand (دمین EC) و به دنبال آن یک دمین کربوکسیل انتهایی مشابه با دمین فاکتور فون ویلبراند نوع C (VWFC) می‌باشد. دمین FS همچنین به عنوان دمین FK نیز نامیده می‌شود زیرا می‌تواند به یک دمین شبه فولیستاتین / استئونکتین (FOLN) و دمین kazal تقسیم شود [۲۰]. بررسی ساختار دمین‌های FSTL1 موش (TSC-36/Flik (TGF- β -stimulated clone 36)) نشان داده است که FSTL1 عضوی از خانواده پروتئین‌های SPARC - Fst است، گروهی که دارای یک دمین FK و یک جفت دمین EF-hand می‌باشند [۲۰، ۳۵]. دمین FK دارای ۱۰ باقی‌مانده سیستمین محافظت شده می‌باشد که ۵ پیوند دی سولفیدی تشکیل می‌دهد. این ۵ پیوند دی سولفیدی که در خانواده فولیستاتین بسیار محافظت شده است، برای پایداری تاخوردگی کلی ساختار پروتئین

ذخیره شدند. کمینه سازی انرژی پروتئین در دو مرحله انجام شد. در مرحله اول مولکول‌های آب و یون‌ها با گام به روش Steepest descent کمینه سازی شدند. سپس کل سیستم توسط ۱۰۰۰ گام به روش conjugate gradient کمینه سازی شد. دینامیک مولکولی در دو مرحله محاسبه گردید، در مرحله اول تحت شرایط حجم ثابت، دما از صفر تا ۳۰۰ کلوین به مدت زمان ۱۰۰ پیکوثانیه از طریق روش لانگوین بالا برده شد. در مرحله دوم سیستم در فشار ثابت طی ۴۰۰ پیکوثانیه به تعادل رسانده شد. میانکشی‌های غیرکوالان توسط PME و با فاصله ۱۰ آنگستروم محاسبه شدند. محدود کردن پیوندها از جمله پیوندهای هیدروژنی با الگوریتم SHAKE انجام شد. از برنامه‌های sander و pmemd برای شبیه سازی استفاده شد. در نهایت شبیه سازی در ۲۰۰ نانوثانیه و در فاصله زمانی ۵۰۰ پیکوثانیه انجام شد و اطلاعات حاصل با فرمت netcdf ذخیره شدند. قابل ذکر است شبیه سازی دینامیک مولکولی با سه تکرار انجام شد.

آنالیز نتایج حاصل از شبیه سازی: آنالیز نتایج حاصل از شبیه سازی با استفاده از CPPTRAJ در AMBER Tools 15 انجام شد [۶] ریشه میانگین مجذور نوسانات (RMSF)، ریشه میانگین مجذور انحراف‌ها (RMSD) و شعاع ژیراسیون (ROG) برای کل ساختار پروتئین محاسبه شد. به علاوه فاصله بین آمینواسیدهای درگیر در پیوند دی سولفیدی و سطح در دسترس این آمینواسیدها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل از این محاسبات نیز توسط نرم افزار xmgrace [۶] به صورت نمودار نمایش یافت.

نتایج

نتایج شبیه سازی: بررسی ساختار دمین‌های FSTL1 موش نشان داده است که FSTL1 عضوی از خانواده پروتئین Fst - SPARC است، گروهی که دارای یک دمین FK و یک جفت دمین EF-hand می‌باشند [۳۵]. دمین فولستاتین

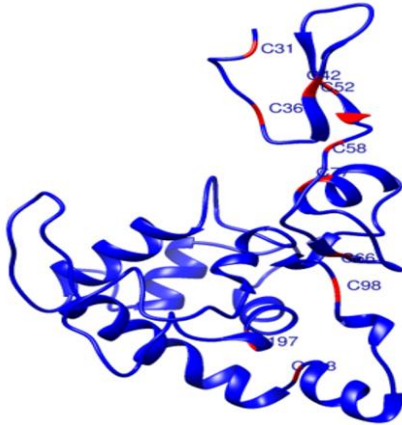
پروتئین FSTL1 تهیه شد و پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ که در مجاورت نزدیک به لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ پروتئین و در دمین FK پروتئین است حذف شد. در این مطالعه صرفاً پیوند دی سولفیدی از طریق مطالعات شبیه سازی دینامیک مولکولی از بین برده شد. سپس جهت مقایسه تغییرات صورت‌بندی ناشی از حذف پیوند دی سولفیدی، شبیه سازی دینامیک مولکولی پروتئین حاصل و پروتئین طبیعی انجام شد.

مواد و روشها

شبیه سازی مولکولی: به منظور انجام شبیه سازی دینامیک مولکولی از بسته شبیه ساز AMBER 15 [۳۰] استفاده شد.

آماده سازی پروتئین برای انجام شبیه سازی مولکولی: به دلیل این که پروتئین FSTL1 با طول توالی آمینواسیدی کامل فاقد ساختار کریستال می‌باشد، توالی آمینواسیدی آن از بانک اطلاعاتی UniProt با کد (Q12841) بدست آمد. سپس با استفاده از سرور SWISS-MODEL مدل‌های ساختاری از این پروتئین تهیه شد. ساختارهای حاصل ابتدا از نظر کلی، فاصله دو باقی مانده سیستمین، محدوده خطای مدل سازی و تشکیل باندهای دی سولفیدی بررسی شدند. این مطالعات ساختاری با استفاده از نرم افزار Swiss-PDB Viewer 4.10، Chimera1.12. [۱۵، ۳۰]، نمودار رامچاندان و سرور PDBSUM انجام شد. سپس مطلوب ترین ساختار انتخاب و در مطالعه شبیه سازی دینامیک مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از بسته نرم افزاری AMBER و با میدان نیروی ff14SB انجام شد [۶، ۳۰] خنثی سازی بار پروتئین با افزودن سدیم توسط ماژول LEaP صورت گرفت. سپس پروتئین در یک جعبه ۲۰ وجهی با یک لایه از مولکول‌های آب مدل TIP3P به ضخامت ۱۰ آنگستروم قرار داده شد و در ادامه فایل‌های Topology و coordination حاصل برای انجام مراحل بعدی شبیه سازی

پروتئین حذف شد و سپس شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این پروتئین و پروتئین طبیعی در مدت زمان ۲۰۰ نانوثانیه توسط نرم‌افزار AMBER انجام شد. RMSD و ROG برای کل ساختار پروتئین محاسبه شد که در شکل ۲ الی ۵ نشان داده شده است.



شکل ۱- ساختار و جایگاه‌های پیوند دی‌سولفیدی پروتئین FSTL1

مانند دارای ۱۰ باقیمانده سیستئین محافظت شده می‌باشد که ۵ پیوند دی‌سولفیدی را تشکیل می‌دهد (شکل ۱). پنج پیوند دی‌سولفیدی، که در خانواده فولستاتین بسیار محافظت شده‌اند، برای پایداری تاخوردگی ساختار پروتئین ضروری می‌باشد [۲۰]. پیوند دی‌سولفیدی ۵۲-۳۶ یکی از پنج پیوند دی‌سولفیدی است که در خانواده پروتئین‌های SPARC - Fst وجود دارد و این پیوند در ابتدای لوپ بین رشته بتای دو و سه قرار گرفته است. مطالعات تطابق توالی بین پروتئین‌های خانواده SPARC - Fst نشان داده است که لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ از جایگاه‌های بالقوه میانکش پروتئین FSTL1 با گیرنده خود می‌تواند باشد. بررسی این ناحیه به لحاظ بیوانفورماتیکی برای مطالعات بعدی جهش‌زایی هدفمندی جهت افزایش و یا کاهش انعطاف‌پذیری پروتئین می‌تواند مفید و موثر باشد. بنابراین به منظور بررسی اثر پیوند دی‌سولفیدی ۵۲-۳۶ در انعطاف‌پذیری لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ در ساختار پروتئین FSTL1 و در دمین FK، این پیوند در ساختار

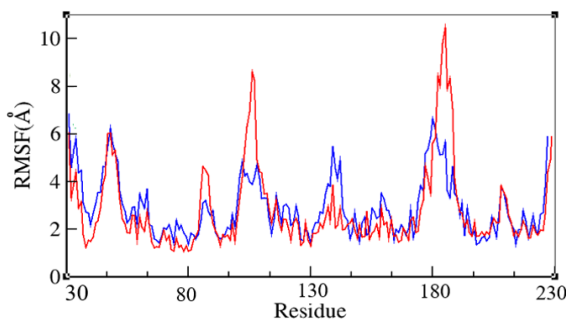
جدول ۱- مقادیر RMSD و ROG اندازه‌گیری شده برای پروتئین FSTL1 و FSTL1 فاقد پیوند دی‌سولفیدی ۵۲-۳۶ در ۱۰۰ نانوثانیه آخر شبیه‌سازی و در طول ۲۰۰ نانوثانیه

	RMSD (۲۰۰ns)	ROG (۲۰۰ns)	RMSD (۱۰۰ns)	ROG (۱۰۰ns)
FSTL1 طبیعی	۸۶.۶ ± ۰.۰۱	۱۸.۵۰ ± ۰.۰۱	۸۴.۶ ± ۰.۰۱	۱۸.۴۶ ± ۰.۰۱
FSTL1 فاقد پیوند دی‌سولفیدی	۱۰.۲۲ ± ۰.۰۱	۲۰.۹۹ ± ۰.۰۱	۱۰.۱۱ ± ۰.۰۱	۲۰.۸۳ ± ۰.۰۱

حذف پیوند دی‌سولفیدی و بازآرایی ساختاری موضعی پروتئین در حین شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است. با توجه به نمودار RMSD بطور کلی هر دو پروتئین در طول شبیه‌سازی روند افزایشی ملایم جنبش‌های مولکولی را نشان می‌دهند جز اینکه در فاصله زمانی ۳۲ تا ۵۰ نانوثانیه پروتئین طبیعی افزایش چشمگیر RMSD را نشان می‌دهند. بنابراین با توجه به شکل ۲، واضح است که حضور و عدم حضور پیوند دی‌سولفیدی ۵۲-۳۶ نقش موثری در تغییرات ساختاری پروتئین FSTL1 در این شبیه‌سازی داشته است.

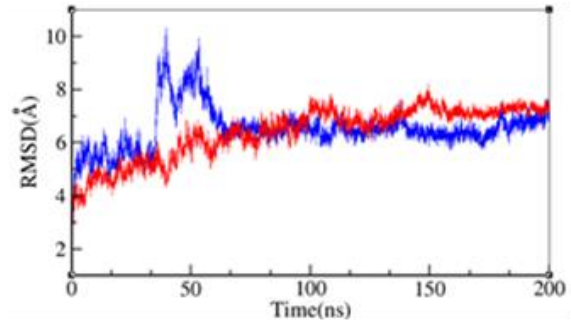
نمودار RMSD: RMSD و یا ریشه‌ی مربع میانگین انحراف کربن آلفا پروتئین، مربوط به موقعیت هر اتم در زمان شبیه‌سازی است و برای مقایسه صورت بندی ساختار در طول شبیه‌سازی استفاده می‌شود. پروتئین فاقد پیوند دی‌سولفیدی در ۳۲ ثانیه اول شبیه‌سازی RMSD کمتری را نسبت به پروتئین طبیعی نشان می‌دهد در حالی که از ۱۰۰ نانوثانیه تا پایان شبیه‌سازی درجه بالاتر این جنبشها را نشان می‌دهد. درجه بالاتر نوسانات در مقدار RMSD پروتئین فاقد پیوند دی‌سولفیدی احتمالاً مربوط به

دو پروتئین در زمان‌های ابتدایی (الف)، میانی (ب) و انتهای (پ) شبیه‌سازی در نواحی اطراف پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ و در واقع ناحیه بین رشته بتای ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که در شکل نیز مشخص شده است. همان‌طور که در شکل ۴ می‌توان مشاهده کرد، نواحی مشخص شده در ساختار FSTL1 فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ بر روی هم قرار نگرفته‌اند و موقعیت فضایی متفاوتی نسبت به یکدیگر دارند که در طول شبیه‌سازی نیز بیشتر و بیشتر شده و احتمالاً ناشی از حذف پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ پروتئین می‌باشد. به نظر می‌رسد به علت عدم حضور پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ این نواحی آزادی حرکت بیشتری را پیدا کرده‌اند. همان‌طور که مطلع هستید بیشترین حرکات در پروتئین‌ها در مناطق لوپ و لولا دیده می‌شود که در ساختار پروتئین FSTL1 نیز مناطق دارای حرکات بالا دارای ساختار لوپ و لولا می‌باشند.



شکل ۳- نمودار RMSF برحسب زمان پروتئین FSTL1 طبیعی (گراف آبی) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (گراف قرمز رنگ) در طول شبیه‌سازی مولکولی.

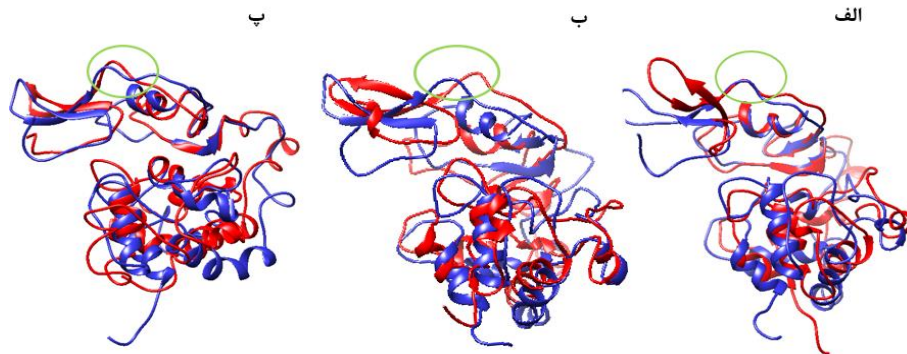
نمودار شعاع ژیراسیون: شعاع ژیراسیون، فاصله یک اتم از مرکز جرم اتم‌های کل ساختار پروتئین را نشان می‌دهد. مطابق با شکل ۵ تغییرات شعاع ژیراسیون در هر دو پروتئین از ۱ تا ۱۶ نانوثانیه بعد از شروع شبیه‌سازی روند نزولی دارد. در پروتئین طبیعی از ۱۶ نانوثانیه تا ۶۵ نانوثانیه تغییرات ساختاری روند صعودی دارد و از ۶۵ نانوثانیه تا پایان شبیه‌سازی این پروتئین تغییرات شعاع ژیراسیون قابل توجهی ندارد.



شکل ۲- نمودار RMSD برحسب زمان پروتئین FSTL1 طبیعی (گراف آبی رنگ) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (گراف قرمز رنگ) در ۲۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی دینامیک مولکولی.

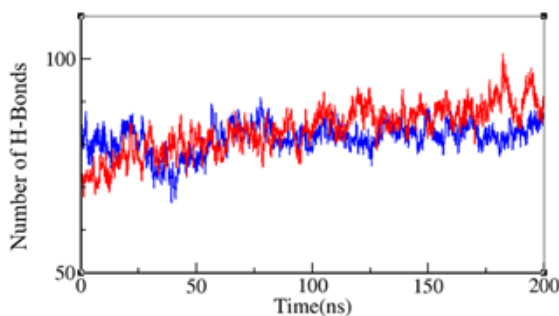
نمودار RMSF: RMSF یا ریشه‌ی مربع میانگین نوسانات، نوسان و انعطاف پذیری یک مولکول را به طور کلی نشان می‌دهد. RMSF اتم‌های کربن الفای پروتئین FSTL1 طبیعی و فاقد پیوند دی سولفیدی در شکل ۳ نشان داده شده است. نمودار RMSF پروتئین FSTL1 در عدم حضور پیوند دی سولفیدی نشان دهنده افزایش میزان انعطاف پذیری و نوسانات چشمگیر در محدوده باقی مانده‌های ۸۵، ۱۰۱-۱۱۶، ۱۸۰-۱۸۶، ۱۷۷ در مقایسه با پروتئین طبیعی می‌باشد. در شکل ۳، دو ناحیه اطراف باقیمانده‌های ۱۰۵ و ۱۸۰ در فرم بدون پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ پروتئین FSTL1، نوسانات قابل توجهی را خود نشان می‌دهد علت این نوسانات بدون شک ناشی از حذف پیوند دی سولفیدی از لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ پروتئین FSTL1 و در نتیجه آزاد شدن ساختار پروتئین و آزادی حرکت بیشتر این باقیمانده‌ها یعنی ایزولوسین ۱۰۵ و آلانین ۱۸۰ و همین‌طور ایجاد حرکات جدید و لولا ماندی می‌باشد که در اطراف این دو ناحیه دارای ساختار لوپ و مارپیچ الفا ایجاد شده است.

همچنین در شکل ۴ ساختار و تغییرات ساختاری صورت گرفته در مقاطع خاصی از زمان شبیه‌سازی مولکولی در FSTL1 طبیعی (ساختارهای آبی رنگ) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (ساختارهای قرمز رنگ) مقایسه شده است. مطابق با شکل تغییرات ساختاری قابل توجه در هر



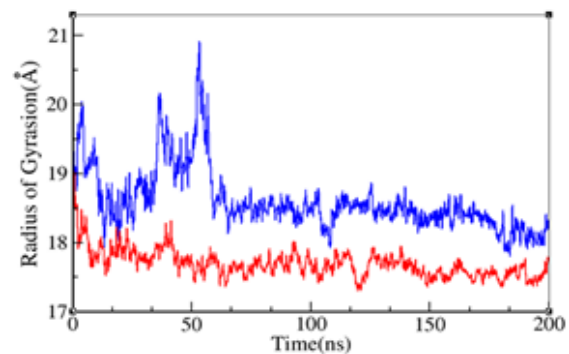
شکل ۴- مقایسه ساختار و تغییرات ساختاری صورت گرفته در مقاطع زمانی مختلف در طول ۲۰۰ نانوثانیه شبیه‌سازی مولکولی در FSTL1 طبیعی (آبی) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (قرمز). هر شکل شامل ساختار FSTL1 طبیعی (آبی) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (قرمز) در مقاطع زمانی مختلف شبیه‌سازی می‌باشد که برترتیب شکل‌های الف، ب، پ، ساختارهای مربوط به زمان‌های ابتدایی، میانی و انتهایی شبیه‌سازی می‌باشد. تغییرات ساختاری قابل توجه در هر دو پروتئین در یک مقطعی از زمان شبیه‌سازی مولکولی با دایره مشخص شده است.

فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ در زمان‌های ابتدای شبیه‌سازی یعنی ۰ تا ۲۵ نانوثانیه کاهش قابل توجه نوسانات پیوندهای هیدروژنی را نسبت به پروتئین طبیعی نشان می‌دهد. در حالی که این پروتئین در زمان‌های ۳۰ تا ۶۰ نانوثانیه و از ۱۲۰ نانوثانیه تا پایان شبیه‌سازی افزایش چشمگیر این نوسانات را نسبت به پروتئین طبیعی نشان می‌دهد. به علاوه در ۶۰ تا ۱۱۰ نانوثانیه نوسانات پیوندهای هیدروژنی در هر دو پروتئین بر هم منطبق می‌باشد. در جدول ۲ تعداد پیوندهای هیدروژنی داخلی مولکولی FSTL1 طبیعی و فاقد پیوند دی سولفیدی نیز نشان داده شده است.



شکل ۶- نمودار پیوندهای هیدروژنی برحسب زمان پروتئین FSTL1 طبیعی (گراف آبی) و فاقد پیوند دی سولفیدی (گراف قرمز)

به طور جالب توجه پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ نیز از ۱۶ نانوثانیه تا پایان شبیه‌سازی تغییرات شعاع ژیراسیون روند صعودی یا نزولی قابل توجهی را نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد حذف پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ در پروتئین FSTL1 منجر به تغییرات ساختاری در بخش انتهایی کربوکسیل (شکل ۴) و تغییرات اندک در شعاع ژیراسیون در این مولکول شده است.



شکل ۵- نمودار شعاع ژیراسیون بر حسب زمان پروتئین FSTL1 طبیعی (گراف آبی رنگ) و فاقد پیوند دی سولفیدی ۳۶-۵۲ (گراف قرمز رنگ) در طول شبیه‌سازی مولکولی

نمودار پیوندهای هیدروژنی پروتئین FSTL1 طبیعی (گراف آبی) و فاقد پیوند دی سولفیدی (گراف قرمز) در شکل ۶ نشان داده شده است. مطابق با این نمودار پروتئین

جدول ۲- تعداد پیوندهای هیدروژنی داخلی ملکولی FSTL1 طبیعی و فاقد پیوند دی سولفیدی در ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ نانوتانیه از شبیه سازی

تعداد پیوندهای هیدروژنی داخلی ملکولی	۵۰ns	۱۰۰ns	۱۵۰ns	۲۰۰ns
پروتئین FSTL1 طبیعی	۷۴ ± ۰,۰۱	۸۰ ± ۰,۰۱	۸۵ ± ۰,۰۱	۸۷ ± ۰,۰۱
پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی	۸۴ ± ۰,۰۱	۸۴ ± ۰,۰۱	۸۶ ± ۰,۰۱	۸۸ ± ۰,۰۱

بحث

افزایش و یا کلسیم نشان داد. این یافته‌ها بر خلاف نتایج به دست آمده برای چند عضو دیگر خانواده BM-40 است و نشان دهنده این است که، دمین اتصال به کلسیم خارج سلولی در TSC-36 فاقد عملکرد می‌باشد. عدم حفظ ویژگی‌های مهم عملکردی مشترک برای چندین عضو دیگر خانواده BM-40 نشان می‌دهد، TSC-36 با وجود همسانی توالی خود به BM-40، ویژگی‌های کاملاً تکامل یافته‌ای دارد [۱۶]. لی و همکاران [۲۰]، یک رده سلولی S2 دروزوفیلا را ایجاد کردند که به طور پایدار دومین‌های عملکردی FSTL1 موشی را بیان می‌کرد. پروتئین حاصل بیش از ۹۵ درصد خلوص با بازدهی ۳/۷۵ میلی‌گرم بر لیتر را داشت. علاوه بر این، کریستالوگرافی FSTL1 نوترکیب، یک شکل کوتاه شده‌ی FSTL1 دارای دمین فولیستاتین مانند، با استفاده از روش انتشار بخار قطره‌ای نشسته انجام شد. لی و همکاران پروتئین FSTL1 نوترکیب فعالی را تولید و تخلیص کردند، که برای مطالعات بیشتر ساختار پروتئین و کشف داروها مهم می‌باشد [۲۰]. مطالعات نشان داده است که دمین FS برای عملکرد مناسب FSTL1 در شرایط داخل سلولی ضروری است. مقایسه پروتئین FSTL1 با چهار پروتئین دیگر خانواده پروتئین‌های Fst - SPARC مشخص کرده است که طول حلقه بین دمین FS و دمین Kazal متغیر است و بیانگر این است که انعطاف پذیری نسبی بین دمین FS و دمین Kazal، در میان این پروتئین‌ها متنوع است. علاوه بر این، لوپ بین رشته بتای ۲ و ۳ این پروتئین دارای پتانسیل بار الکترواستاتیکی بسیار متفاوتی است که در اتصال به فاکتورهای اتصال متفاوت نقش دارد [۲۱، ۲۶]. FSTL1 یک پروتئین متصل شونده به خانواده TGF- β است و به عنوان یک مهارکننده

FSTL1 گلیکوپروتئین ترشحی کوچک با ۳۰۸ اسید آمینه است که تغییرات بیان را در طول رشد و بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و آرتریت روماتوئید نشان می‌دهد [۲۱]. اگر چه نقش محافظتی FSTL1 در قلب در سال‌های اخیر به شدت مورد مطالعه قرار گرفته است [۳۶]، ولی مکانیسم عمل آن مبهم است. FSTL1 در مسیرهای سیگنال دهی متعدد و فرآیندهای بیولوژیکی مهمی، از جمله رگ زدایی و تنظیم پاسخ ایمنی نقش دارد [۷، ۳۲، ۳۳]. آلتکوستر و همکاران [۲] اثر FSTL1 را بر روی عملکرد قلب بعد از سکته قلبی بررسی کردند. بهبود توانایی محدود قلب بعد از سکته قلبی برای بازسازی قلب ضروری است. محققین نشان داده‌اند که تحویل FSTL1 به قلب آسیب‌دیده از طریق وصله‌های کلاژنی، تکثیر کاردیومیوسیت و بازسازی عملکرد قلب را تحریک می‌کند. در واقع این تیمارها باعث افزایش بقای حیوان، آنژیوژنز، بازسازی منفذ و عملکرد قلب می‌شود [۳]. مطالعات ساختاری FSTL1 موش نشان داده است که این پروتئین دارای یک دمین فولیستاتین مانند، یک دمین kazal، یک جفت دمین EF-hand و یک دمین VWC می‌باشد. هامبروک و همکاران [۱۶] اشکال نوترکیب گلیکوپروتئین TSC-36/Flik را در سلول‌های انسانی بیان کردند و سپس ویژگی‌های ساختاری و عملکردی آن را با سایر اعضای خانواده پروتئین‌های BM-40/SPARC/osteonectin مقایسه کردند. TSC-36 در دو ایزوفرم مشاهده شد. تجزیه و تحلیل ساختاری هر دو ایزوفرم با طیف سنجی دورنگ‌نمایی دورانی و فلورسانس ذاتی، عدم وجود تغییرات ساختاری قابل توجهی را با

زیستی در دسترس است. دستوری پروتئین‌ها و تولید باکتریایی آن اهمیت کلیدی در تولید پروتئین‌های نوترکیب با اهمیت زیست‌فناوری دارد [۱، ۴، ۵، ۱۲ و ۱۳]. مطالعات بیوانفورماتیکی و پیش‌بینی حرکات ساختاری و دینامیکی پروتئین‌ها نیز می‌تواند نقش مهمی در بررسی این موضوع داشته باشد [۲۵]. پیش‌بینی حرکات ساختاری و دینامیکی پروتئین FSTL1 می‌تواند برای دستیابی به درک بهتر اکثر فرآیندهای بیولوژیکی که این مولکول مهم در آن نقش دارد، امری مفید و موثر باشد.

در مطالعه حاضر، از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برای بررسی تغییرات انعطاف‌پذیری لوپ بین رشته‌بتای ۲ و ۳ پروتئین FSTL1 واقع در دمین FK و دمین عملکردی پروتئین FSTL1 استفاده شد. در این تحقیق به منظور حفظ ساختار عملکردی دمین FK پروتئین و جلوگیری از انعطاف غیر هدفمند پروتئین، پیوند دی‌سولفیدی ۳۶-۵۲ که در مجاورت نزدیک به لوپ بین رشته‌بتای ۲ و ۳ و در دمین FK قرار گرفته است، توسط روش‌های شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از بین برده شد تا تغییرات ساختاری و دینامیکی این پروتئین و خصوصاً دمین FK بررسی شود. نتایج شبیه‌سازی بیانگر تغییرات کانفورماسیونی در پروتئین FSTL1 فاقد پیوند دی‌سولفیدی در مقایسه با پروتئین طبیعی می‌باشد. مطابق با نمودار RMSD (شکل ۲)، FSTL1 فاقد پیوند دی‌سولفیدی مقدار RMSD بالاتری را در ۱۰۰ نانوثانیه پایان شبیه‌سازی دارد و شکل ناپایداری را در مقایسه با FSTL1 طبیعی نشان داده است. حذف پیوند دی‌سولفیدی از دمین FK پروتئین FSTL1 که در تاخوردگی پروتئین نقش دارد منجر به افزایش انعطاف‌پذیری صورت بندی پروتئین می‌شود. همچنین توجه به نمودار RMSF (شکل ۳) نشان می‌دهد که حذف پیوند دی‌سولفیدی در FSTL1 باعث افزایش قابل توجه تغییرات ساختاری آمینواسیدهای ۸۵، ۱۱۶-۱۰۱، ۱۸۶-۱۸۰، ۷۷ می‌شود. مقایسه ساختار پروتئین FSTL1 طبیعی و فاقد پیوند دی‌سولفیدی در مقاطع زمانی مشخصی در طول

کنترل‌کننده رشد جنینی پروتئین BMP4 و فیبروز اندام شناخته شده است [۱۴، ۲۱]. خانواده پروتئین فولیستاتین نیز با پروتئین‌های $TGF-\beta$ کمپلکس تشکیل می‌دهند تا فرآیندهایی را در سلول تنظیم کنند، فرآیندهایی که با تغییرات ساختاری بزرگی برای این پروتئین‌ها قبل و بعد از وقوع کمپلکس همراه است. با مقایسه ساختار FSTL1 آزاد با ساختارهای مشابه آن در این کمپلکس‌ها، مبنایی برای بررسی تغییرات ساختاری FSTL1 در طول تعامل آن با سایر پروتئین‌ها فراهم شده است [۲۰]. BM-40 به طور خاص به کلاژن متصل می‌شود و کمپلکس تشکیل می‌دهد (کد (PDB: 2V53)). به طور کلی، FSTL1 بیشترین شباهت با BM-40 در کمپلکس BM-40-کلاژن در RMSD دارد. ساختار BM-40 پس از اتصال به کلاژن به طور قابل توجهی تغییر می‌کند. در مقایسه با BM-40 آزاد، دمین FOLN پروتئین BM-40 در کمپلکس به سمت کلاژن نزدیک‌تر می‌شود و در نتیجه دمین kazal تغییر ساختاری بزرگی به دست می‌آورد. بر اساس این مشاهدات و شباهت این پروتئین با FSTL1 بیان شده است که، FSTL1 پس از مواجهه با شرکای تعاملی، تغییر ساختاری احتمالی را ممکن است در ناحیه حلقه بین دمین‌های FS و kazal نیز کسب کند. مطالعات بیشتر نشان داد که انتهای آمینی FSTL1 منحصر به فرد است. این ناحیه دارای باقی‌مانده‌های باردار بیشتری است که یک ناحیه خاص با پتانسیل الکترواستاتیک کم را تشکیل می‌دهد. همچنین پتانسیل الکترواستاتیک بسیار متفاوتی در حلقه بین صفحات بتای ۲ و ۳، برای این دو پروتئین مشاهده شده است. در این ناحیه، برخلاف خاصیت اسیدی در BM-40، FSTL1 از خاصیت بازی بیشتری برخوردار می‌باشد. به طور کلی، این پتانسیل الکترواستاتیک متفاوت بین FSTL1 و BM-40 ممکن است شرکای اتصال متفاوت آن‌ها و در واقع جایگاه اتصال به گیرنده آن‌ها را دیکته کند [۲۰]. با وجود مطالعات گسترده‌ای که در مورد FSTL1 انجام شده است، اطلاعات ساختاری اندکی از این مولکول مهم

لیگاند یا گیرنده باعث تسهیل اتصال و شناسایی آن‌ها می‌شود و در نتیجه فعالیت مورد نظر نیز افزایش می‌یابد [۱۰، ۱۱، ۲۴]، به نظر می‌رسد تحقیق حاضر می‌تواند در آینده در تعیین یک ناحیه هدف بالقوه برای مطالعات جهش‌زایی هدفمند جهت افزایش فعالیت FSTL1 مفید باشد.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از حمایت مالی پارک فناوری اطلاعات و ارتباطات از این رساله در قالب کد اعتباری (کد اعتباری در صورت پذیرش، توسط دبیرخانه به هسته اعلام خواهد شد و می‌بایست در داخل متن استفاده شود) ۴۶۹۶۲۹ قدردانی می‌نمایند.

این طرح، حاصل اجرای یک طرح فناوری مصوب بوده و بودجه آن توسط ستاد توسعه علوم و فناوری‌های سلول-های بنیادی در قالب کد اعتباری ۵۷۹۴۷/۱۱ تأمین شده است.

شبیه‌سازی (شکل ۴) نیز تغییرات ساختاری قابل توجهی را در نواحی اطراف پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ و در واقع ناحیه بین رشته بتای ۲ و ۳ نشان داده است. به طور جالب توجه پروتئین فاقد پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ نیز از ۱۶ نانوثانیه تا پایان شبیه‌سازی تغییرات شعاع ژیراسیون روند صعودی یا نزولی قابل توجهی را نشان نمی‌دهد. به نظر می‌رسد حذف پیوند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ در پروتئین FSTL1 منجر به تغییرات اندک شعاع ژیراسیون در این مولکول شده است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی به نظر می‌رسد نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بیانگر این است که حذف باند دی سولفیدی ۵۲-۳۶ در دمین FK پروتئین FSTL1 سبب افزایش انعطاف پذیری و تغییرات کانفورماسیونی این مولکول می‌شود. بنابراین مطابق با یافته‌های قبلی سایر محققین [۲۰] به نظر می‌رسد که پیوندهای دی سولفیدی ۵۲-۳۶ که یکی از ۵ پیوند دی سولفیدی حفاظت شده در ساختار دمین FK پروتئین FSTL1 می‌باشد در پایداری تاخوردگی ساختاری نقش دارد. بنابراین مطابق با برخی تحقیقات که نشان داده‌اند افزایش انعطاف پذیری یک ناحیه میانکنشی مهم در

منابع

- Aliramaei, M. R., Khorasgani, M. R., Rahmani, M. R., Esfahani, S. H. Z., Emamzadeh, R. (2020). Expression of *Helicobacter pylori* CagL gene in *Lactococcus lactis* MG1363 and evaluation of its immunogenicity as an oral vaccine in mice. *Microbial Pathogenesis*, 142, 103926. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103926>
- Alteköester, A. K., & Harvey, R. P. (2015). Bioengineered FSTL1 patches restore cardiac function following myocardial infarction. *Trends in Molecular Medicine*, 21(12), 731-733. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.10.006>.
- Nakhaei Sistani, R. (2018). The designation of PCR test to detect the hepatitis B virus and evaluate the performance of this test in screening applicants for blood transfusion organization. *Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology)*, 30(4), 430-438. 20.1001.1.23832738.1396.30.4.10.5.
- Shirazi, N. H., Ranjbar B., Khajeh K. (2013). Isolation of lipase enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* HR59 bacteria resulting from burn infections and optimization of its culture medium using the Box-Behnken method. *Cellular and molecular research (Iranian Biology Journal)*, 20.1001.1.23832738.1392.26.2.8.1.
- Bellusci, S., Henderson, R., Winnier, G., Oikawa, T., & Hogan, B. L. (1996). Evidence from normal expression and targeted misexpression that bone morphogenetic protein (Bmp-4) plays a role in mouse embryonic lung

- morphogenesis. *Development*, 122(6), 1693-1702. <https://doi.org/10.1242/dev.122.6.1693>.
- 6- 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. <https://doi.org/10.1002/jcc.20290>.
 - 7- 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. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-204822>.
 - 8- Chaly, Y., Marinov, A. D., Oxburgh, L., Bushnell, D. S., & Hirsch, R. (2012). FSTL1 promotes arthritis in mice by enhancing inflammatory cytokine/chemokine expression. *Arthritis & Rheumatism*, 64(4), 1082-1088. <https://doi.org/10.1002/art.33422>.
 - 9- 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. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn215>.
 - 10- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-98281-5>.
 - 11- 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. <https://doi.org/10.1039/C9RA01906E>.
 - 12- Emamzadeh, R., Nazari, M., & Najafzadeh, S. (2014). Adherent state apoptosis assay (ASA): a fast and reliable method to detect apoptosis in adherent cells. *Analytical Methods*, 6(12), 4199-4204. <https://doi.org/10.1039/C4AY00328D>.
 - 13- 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. doi: 10.1039/c4an01946f.
 - 14- 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00478-0>.
 - 15- 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. [https://doi.org/10.1016/00052744\(77\)90005](https://doi.org/10.1016/00052744(77)90005).
 - 16- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309318200>.
 - 17- Jafari, S. S., Jafarian, V., Khalifeh, K., Ghanavatian, 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. <https://doi.org/10.1039/C6RA12626J>.
 - 18- 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>.
 - 19- 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. <https://doi.org/10.1002/art.27485>.
 - 20- 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. <https://doi.org/10.1002/pro.3696>.
 - 21- 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. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2805-0>.
- 22- 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. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu105>.
- 23- 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. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4758>.
- 24- Mukherjee, J., & Gupta, M. N. (2015). Increasing importance of protein flexibility in designing biocatalytic processes. *Biotechnology Reports*, 6, 119-123. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.04.001>.
- 25- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.03.011>.
- 26- Niekraszewicz, B., & Niekraszewicz, A. (2009). The structure of alginate, chitin and chitosan fibres. In *Handbook of textile fibre structure*. Woodhead Publishing, 230, 266-304. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089>.
- 27- 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. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6061>.
- 28- 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. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089>.
- 29- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803440200>.
- 30- 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. doi: 10.1002/jcc.20084.
- 31- 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. <https://doi.org/10.14348/molcells.2016.0103>.
- 32- 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. <https://doi.org/10.1038/nature11890>.
- 33- 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. <https://doi.org/10.3892/or.2017.6061>.
- 34- 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. <https://doi.org/10.1002/bdrc.21030>.
- 35- Trombetta-eSilva, J., & Bradshaw, A. D. (2012). Suppl 1: the function of SPARC as a mediator of fibrosis. *The open rheumatology journal*, 6, 146. <https://doi.org/10.2174/1874312901206010146>.
- 36- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.09.044>.
- 37- 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. <https://doi.org/10.1038/srep32424>.
- 38- 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. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144339>.
- 39- Zheng, X., Qi, C., Zhang, S., Fang, Y., & Ning, W. (2017). TGF- β 1 induces Fstl1 via the Smad3-c-Jun pathway in lung fibroblasts. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 313(2), L240-L251. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00523.2016>.
- 40- Zhou, X., Xiao, X., Huang, T., Du, C., Wang, S., Mo, Y., & Zhang, Z. (2016). Epigenetic inactivation of follistatin-like 1 mediates tumor immune evasion in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, 7(13), 16433. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7654>.

Investigation of 36-32 disulfide bond in structural changes and flexibility of FK domain of FSTL1 protein: An *in silico* study

Jafari S.Sh.¹, Emamzadeh R.^{1*}, Nazari M.², Jafari S.¹ and Ganjalikhany M.R.¹

¹ Dept. of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran

² Endocrine Research Center, Institute of Endocrinology and Metabolism, Iran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. of Iran

³ Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

FSTL1 (follistatin-like 1) is a secretory extracellular glycoprotein that is a member of the SPARC-Fst family of proteins. FSTL1 is involved in regulating survival, proliferation, differentiation, cell migration, organ development, as well as carcinogenesis and metastasis. Despite extensive studies on FSTL1, little structural information on this important biomolecule is available. Predicting the structural and dynamic movements of the FSTL1 protein can be useful and effective in gaining a better understanding of most of the biological processes in which this important molecule is involved. Therefore, in the present study, molecular dynamics simulation was used to evaluate the flexibility of the FK domain of the FSTL1 protein, which is essential for the function of this protein. The simulation results indicate that the disulfide-free protein has a higher root-mean-square deviation (RMSD) than the natural protein. The root-mean-square fluctuations (RMSF) diagram showed a significant increase in structural changes in the disulfide-free protein in the range of residues 9-18, 31, 62-52, 72, and 160-147. Also, in protein without sulfide bond, 36-52, the radius of gyration (ROG) was significantly increased at 1 to 3 nanoseconds after the start of the simulation. These findings indicate that deletion of the 36-32 disulfide bond in the FK domain of the FSTL1 protein increases the flexibility of the protein. These findings also suggest that this bond could be a potential target region for targeted mutagenicity studies to increase of flexibility of molecules.

Key words: FSTL1, Disulfide bond, Molecular dynamics simulation, Flexibility