

## اثرات دافعه الکترواستاتیکی بارهای مثبت در انتهای کربوکسیل بر ساختمان و میانکنش پپتید مشتق از اندواستاتین

ریحانه چمنی<sup>1</sup>، سید محسن اصغری<sup>2\*</sup>

1- دانشجوی دکتری بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت  
2- استادیار بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

\* رشت، صندوق پستی 41335-19141

sm\_asghari@guilan.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/3/25 پذیرش مقاله: 94/5/3)

**چکیده** - اندواستاتین رشد و پیشرفت تعداد زیادی از تومورها را از طریق اتصال به پروتئین‌های موجود در سطح سلول‌های اندوتلیال و ماتریکس خارج سلولی مانند اینتگرین، هپارین، ماتریکس متالوپروتئیناز2 و ترانس گلوتامیناز2 سرکوب می‌کند. در سطح اندواستاتین یک موتیف غنی از آرژنین وجود دارد که برای اتصال به برخی از پروتئین‌های مذکور ضروری هستند. نشان داده شده است که پپتید 27 آمینواسیدی مشتق از اندواستاتین مسئول اعمال ضد رگزایی و ضد توموری آن است و جهش هیستیدین‌های متصل شونده به Zn فعالیت آن را تا حد زیادی کاهش می‌دهد. در مطالعه حاضر با توجه به اهمیت لوپ متصل شونده به Zn در انتهای آمین و آرژنین 27 در انتهای کربوکسیل، پپتیدهایی مطابق با این ناحیه و یک فرم جهش یافته حاوی جهش ایزولوسین 26 به آرژنین سنتز شدند و ساختار و میانکنش آنها با ماتریکس متالوپروتئیناز2 و ترانس گلوتامیناز2 با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فلوروسانس، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی و داکینگ مولکولی بررسی گردید. هدف از این مطالعه بررسی اثر کنار هم قرار گرفتن دو آمینواسید آرژنین با بار مثبت بر ساختار و میانکنش این قطعه از اندواستاتین بود. نتایج نشان دادند که قرار گرفتن دو آرژنین کنار یکدیگر در انتهای کربوکسیل موجب افزایش نوسانات در کل ساختار پپتید، تغییر ناحیه لوپ متصل شونده به یون Zn در انتهای آمین و منفی‌تر شدن انرژی اتصال پپتید به ماتریکس متالوپروتئیناز2 و ترانس گلوتامیناز2 می‌شود. می‌توان چنین استنتاج نمود که دافعه آرژنین‌های با بار مثبت در انتهای کربوکسیل موجب القای تغییرات کانفورماسیونی در کل ساختار و بخش لوپ انتهای آمین شده است.

**کلیدواژگان:** اندواستاتین، پپتید، طیف‌سنجی فلوروسانس، شبیه‌سازی داکینگ مولکولی، دافعه الکترواستاتیکی.

### 1- مقدمه

از قبل، بوده و مهار این پدیده یکی از روش‌های درمانی نوین سرطان می باشد [1]. مهارکننده‌های زیادی هم اکنون در مراحل مختلف آزمون‌های پیش‌بالینی و بالینی

سلول‌های توموری برای رشد و متاستاز وابسته به رگزایی، تشکیل رگ‌های خونی جدید از رگ‌های موجود

در سال‌های اخیر با پیشرفت و گسترش روش‌های جدید سنتزی، استفاده از پپتیدها به عنوان دارو رو به گسترش بوده است. تاکنون بیش از 60 پپتید سنتزی درمانی با اندازه کوچکتر از 50 آمینو اسید وارد بازار جهانی شده است که برای درمان بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، آلرژی، آسم، آرتریت، طاسی، بیماری‌های قلبی عروقی، ایمنی، عفونی، دیابت و چاقی به کار می‌روند [19]. این امر به دلیل مزیت‌هایی است که پپتیدها در مقایسه با پروتئین‌ها و آنتی‌بادی‌ها دارند. آنها به دلیل اندازه کوچک خود قادر به نفوذ به درون بافت‌ها و تومورها می‌باشند. علاوه بر آن پپتیدهای درمانی معمولاً ایمنی‌زایی کمتری نسبت به پروتئین‌های نوترکیب و آنتی‌بادی‌ها دارند. مزیت دیگر آنها هزینه تولید کمتر، فعالیت بیشتر بر واحد جرم، پایداری بیشتر، توانایی بلوکه کردن میانکشن‌های پروتئین-پروتئین، تجمع بسیار کم در بافت و در نتیجه سمیت کم است [19].

در این راستا چندین مطالعه برای شناسایی موتیف‌ها و پپتیدهای فعال مسئول فعالیت ضد رگرایی و ضد سرطانی اندواستاتین انجام شده است [20-24]. به عنوان مثال Tjin و همکاران نشان دادند که پپتید 27 آمینو اسیدی مشتق از انتهای آمین اندواستاتین انسانی مسئول فعالیت ضد رگرایی، ضد مهاجرتی و ضد توموری آن بوده و جهش هیستیدین‌های متصل شونده به Zn در این قطعه موجب کاهش فعالیت‌های ضد توموری و ضد مهاجرتی آن می‌شود [20]. به نظر می‌رسد که ساختار لوپ متصل شونده به Zn در انتهای آمین و آرژنین 27 در انتهای کربوکسیل نقش مهمی در فعالیت ضد رگرایی این قطعه از اندواستاتین ایفا نماید اما تاکنون ساختار این قطعه و میانکشن آن با پروتئین‌ها مورد مطالعه قرار نگرفته است. از این رو در مطالعه حاضر ساختار پپتید طبیعی مشتق از اندواستاتین با نام ES-Zn و پپتید جهش یافته با عنوان ES-RR که حاوی جهش ایزولوسین 26 به آرژنین بود،

قرار دارند [3,2] که از میان آنها اندواستاتین، یک پروتئین 20 کیلودالتونی مشتق از دمین غیرکلاژنی زنجیره  $\alpha$ -1 کلاژن XVIII، یکی از مهارکننده‌هایی است که رشد انواع وسیعی از تومورها را بدون سمیت مهار می‌نماید [5,4].

ساختار کریستالی اندواستاتین نشان دهنده یک فولد فشرده حاوی درصد زیادی صفحات بتا و لوپ به همراه دو ماریچج آلفا [6] و همچنین یک مکان اتصال به  $Zn^{2+}$  در انتهای آمین آن (هیستیدین‌های 1، 3 و 11 و آسپاراتات 76) بوده است [7-8]. اندواستاتین از طریق اتصال به پروتئین‌های موجود در سطح سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها و آغاز آبشارهای پیام رسان درون سلولی اثر خود را اعمال می‌نماید. تعدادی پروتئین مانند  $\alpha 5\beta 1$  و  $\alpha v\beta 3$  اینتگرین، هپارین، تروپومیوزین، glypican، لامینین، ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس گلوتامیناز 2 به عنوان گیرنده‌ها و پروتئین‌هایی شناسایی شده‌اند که اعمال ضد رگرایی اندواستاتین را میانجیگری می‌کنند [9-15].

مطالعات نشان دهنده وجود یک موتیف ویژه غنی از 11 آرژنین در سطح اندواستاتین انسانی است که با  $\alpha 5\beta 1$  اینتگرین و هپارین میانکشن داده و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال و تشکیل ساختارهای لوله مانند رگی را مهار می‌کنند [14]. مشخص شده است از میان آنها شش آرژنین مکان‌های اتصال اصلی برای هپارین بوده که در دو ناحیه قرار گرفته‌اند: یک ناحیه اصلی شامل آرژنین‌های 24، 27، 53، 139 و یک ناحیه کوچکتر شامل آرژنین‌های 62 و 63 در اندواستاتین انسانی [14]. جهش این آرژنین‌ها به آلانین و اثرات آن بر اتصال و فعالیت اندواستاتین موشی و انسانی توسط محققان مختلف بررسی شده است [15,16]. تعدادی از مطالعات نشان داده‌اند که جهش آرژنین‌های 27 و 139 به آلانین موجب کاهش فعالیت اندواستاتین می‌شود در حالی که برخی دیگر نشان دهنده حفظ فعالیت زیستی اندواستاتین جهش یافته غیر متصل شونده به هپارین بوده‌اند [17,18].

[26]. در تمامی شبیه‌سازی‌ها ابتدا سیستم برای 5000 گام به روش تندترین شیب<sup>1</sup> تحت روند کمینه‌سازی انرژی قرار گرفت تا میانکنش‌های نامناسب درون ساختاری برطرف شود و همچنین شرایط برقراری میانکنش‌های هیدروژنی بین مولکول پپتید و مولکول‌های حلال به شکل مناسب برقرار گردد. پس از انجام روند کمینه‌سازی انرژی شبیه‌سازی برای زمان 100 پیکو ثانیه در شرایط NVT انجام گرفت و در طی این زمان دما از 200 درجه کلونین به 310 درجه کلونین در مورد هر شبیه‌سازی افزایش یافت. سپس برای زمان 100 پیکو ثانیه شبیه‌سازی در شرایط NPT ادامه یافت تا سیستم در شرایط فشار ثابت به تعادل برسد. معیار به تعادل رسیدن سیستم در شرایط NVT دو پارامتر چگونگی روند تغییرات انرژی کل سیستم و همچنین دمای سیستم در نظر گرفته شد و معیار تعادل در شرایط NPT پارامترهای انرژی کل، انرژی جنبشی، انرژی پتانسیل و چگالی سیستم انتخاب شد. شبیه‌سازی‌ها در شرایط NPT به مدت 20 نانوثانیه ادامه یافت. در این محاسبات گام زمانی 2 فمتو ثانیه لحاظ شد. در تمام شبیه‌سازی‌ها از الگوریتم SHAKE جهت ثابت کردن ارتعاشات پیوندهای کوالان هیدروژن با اتم‌های درگیر در پیوند (X-H) استفاده گردید و حرکت‌های انتقالی مولکول هر 1000 گام در محاسبات حذف شد و در هر 0.4 پیکو ثانیه یک ساختار لحظه‌ای از مولکول ثبت و نگهداری شد و در نهایت در هر شبیه‌سازی 50000 ساختار جهت مطالعه ثبت گردید. برای بررسی پایداری شبیه‌سازی، انحراف ریشه میانگین مربعات<sup>2</sup> محاسبه و بررسی شد. تمام ساختارهای ثبت شده در طی بازه زمانی مورد نظر روی هم قرار گرفت و نوسانات ریشه میانگین مربعات کربن آلفا به عنوان معیاری از نوسانات این اتم محاسبه گردید.

مدل‌سازی شده و دینامیک مولکولی و میانکنش آن با ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس گلوتامیناز 2 شبیه‌سازی شد. همچنین ساختار آنها توسط طیف‌سنجی فلورسانس ذاتی با یکدیگر مقایسه گردید. هدف از این مطالعه بررسی اثر کنار هم قرار گرفتن دو آمینواسید آرژنین با بار مثبت در انتهای کربوکسیل بر ساختار و نحوه میانکنش این قطعه از اندواستاتین با پروتئین‌های دخیل در عملکرد آن بود.

## 2- مواد و روش‌ها

### 2-1- مواد

پپتیدها توسط شرکت Shine Gene Biotechnologies, Inc. (شانگهای، چین) با خلوص بیشتر از 95 درصد سنتز و خلوص آنها با استفاده از HPLC تایید شد.

### 2-2- مدل‌سازی پپتیدها

ساختار کریستالی پروتئین اندوستاتین با کد 1BNL از Protein Data Bank (PDB) استخراج شد. با استفاده از برنامه MODELER نسخه 9.9 [25] ساختار پپتیدهای ES-Zn و ES-RR ساخته شد. اطلاعات ساختاری مربوط به 27 باقی‌مانده آمینواسیدی ابتدای پروتئین به عنوان الگوی اصلی انتخاب شد. با استفاده از این برنامه ده مدل اولیه ساخته شد. از بین این مدل‌ها مناسب‌ترین مدل جهت بهینه‌سازی ساختار انتخاب شد. تأیید اعتبار مدل نهایی بر اساس فاکتورهای ProCheck, Errat و Verify 3D (<http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVS/>) صورت گرفت.

### 2-3- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

مدل‌های ساختاری انتخاب شده در مرحله مدل‌سازی توسط شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بهینه گردیدند. در این مطالعه از برنامه Amber 9 برای شبیه‌سازی استفاده شد

1. Steepest decent  
2. RMSD

**2-4- طیف‌سنجی فلوروسانس ذاتی**

طیف نشر فلوروسانس ذاتی فنیل آلانین پپتیدها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج Perkin Elmer LS55 ثبت شد. پپتیدها در 1ml بافر تریس 10 mM با pH 7/5 حل شد. به دلیل ضعیف بودن طیف فلوروسانس فنیل آلانین، غلظت نهایی استفاده شده در طیف‌سنجی 0/2 mg/ml بود. طول کووت 1 سانتی متر، طول موج نور جذبی 257 nm، طول موج نشری 265-350 nm، پهنای باند (slit) نور جذبی و نشری 10 nm و سرعت اسکن 500 بود. آزمایش در دمای 25<sup>o</sup> انجام شد.

**2-5- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی**

میانکشی پپتیدها با ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس-گلوتامیناز 2 به طور جداگانه با استفاده از برنامه cluspro 2.0 بررسی شد [27، 28]. ساختارهای ورودی شامل ساختارهای کریستالی ماتریکس متالوپروتئیناز 2 (PDB ID: 1CK7)، ترانس‌گلوتامیناز 2 (PDB ID: 2Q3Z) و مدل ساختاری میانگین و بهینه شده پپتیدها بودند. Cluspro یک سرور تمام اتوماتیک برای پیشگویی میانکشی‌های پروتئین-پروتئین می‌باشد. این برنامه در مرحله اول از PIPER که یک برنامه داکینگ سخت مبتنی بر FFT است بهره‌جسته و 1000 کمپلکس با انرژی پایین ایجاد می‌نماید. سپس در مرحله دوم کمپلکس‌های ایجاد شده را دسته‌بندی نموده و دسته‌های ناپایدار را حذف می‌نماید. سرانجام با استفاده از شبیه‌سازی مونت کارلو دسته‌های منتخب بهینه می‌گردند.

**3- نتایج****3-1- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی**

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی روشی ارزشمند برای بررسی ساختار و انعطاف‌پذیری مولکول‌های زیستی می‌باشد. از این رو برای بررسی تفاوت‌های ساختاری دو

پپتید شبیه‌سازی دینامیک مولکولی آنها در طی زمان 20 نانوثانیه انجام شد. به این منظور از مدل‌های ساخته شده توسط برنامه MODELER به عنوان ساختارهای ورودی استفاده شد. برای اطمینان از پایداری شبیه‌سازی‌ها در طی زمان شبیه‌سازی، انحراف ریشه میانگین مربعات اتم‌های کربن آلفا نسبت به ساختار اولیه محاسبه شد. شکل 1- الف نشان می‌دهد که مقدار RMSD تا 10 آنگسترم افزایش یافته و سپس در طی شبیه‌سازی ثابت می‌ماند. ES-Zn و ES-RR در حدود 9 نانوثانیه بعد از شروع شبیه‌سازی ثابت می‌شوند. هر دو ساختار ثابت بوده و انحرافی از ساختار اولیه نشان نمی‌دهند. همچنین نوسانات ریشه میانگین مربعات اتم‌های کربن آلفا در اسکلت پپتیدها در شکل 1- ب نشان داده شده است. آمینواسیدهای گلايسين 25، ایزولوسين 26 و آرژينين 27 در انتهای کربوکسیل ES-Zn بیش از سایرین نوسان نموده در حالی که آمینواسیدهای انتهای آمین یعنی هیستیدین 1، فنیل آلانین 6، گلوتامین 7 و پرولین 9 در ES-RR بیشترین انعطاف‌پذیری را دارند. در هر دو پپتید آمینواسیدهای مرکزی (آلانین 4 تا لوسین 10) تقریباً کمترین نوسانات را نشان می‌دهند. در تمام قسمت‌ها به جز در سه آمینواسید انتهای کربوکسیل، ES-RR بیشترین انعطاف‌پذیری را نسبت به ES-Zn دارا می‌باشد.

**3-2- طیف‌سنجی فلوروسانس ذاتی**

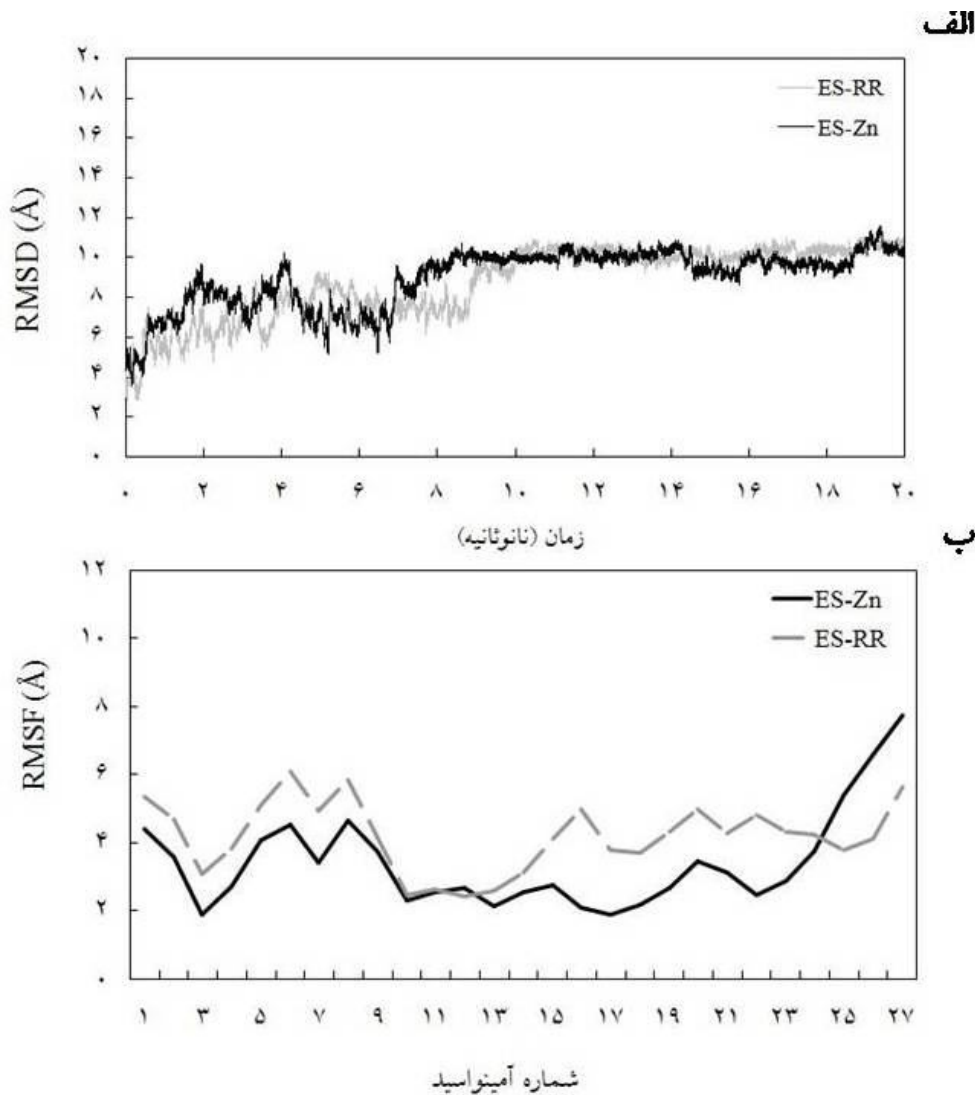
پپتیدهای ES-Zn و ES-RR تنها حاوی یک فلوروفور یعنی آمینواسید فنیل آلانین بوده که در موقعیت شماره 6 توالی آمینواسیدی و در ناحیه لوپ متصل شونده به Zn در انتهای آمین پپتیدها قرار دارد و می‌تواند نشانگر مناسبی برای بررسی تغییرات احتمالی ساختاری پپتیدها باشد. بیشینه نشر برای پپتید ES-Zn در 315 نانومتر و برای ES-RR در 308 نانومتر ثبت گردید. همان‌گونه که در شکل 2 مشاهده می‌شود طیف فلوروسانس ES-RR نشان دهنده

یک جابه‌جایی به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر می‌باشد.

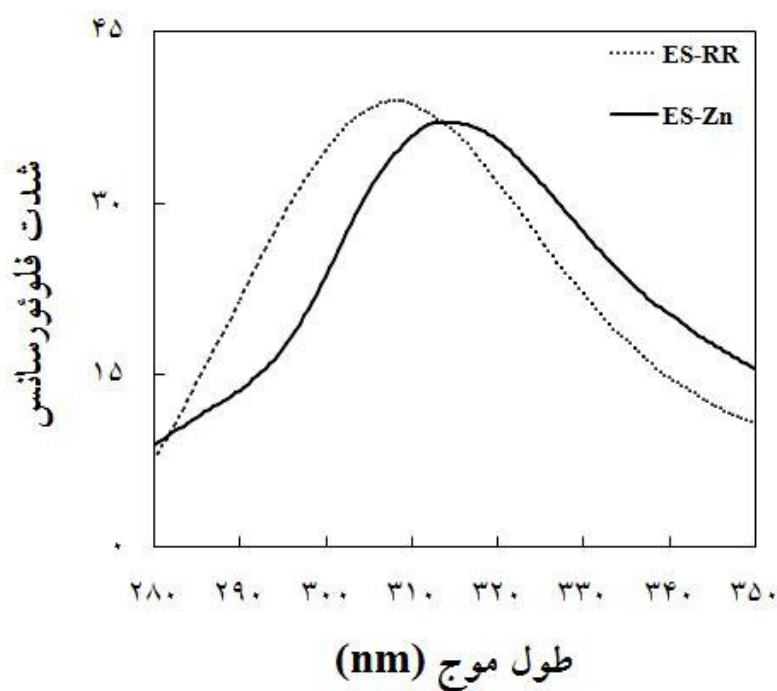
### 3-3- شبیه‌سازی داکینگ مولکولی

برای پیشگویی نحوه میانکنش پپتیدها با ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس گلوتامیناز 2 از سرور cluspro 2.0 استفاده گردید [27، 28]. بهترین کمپلکس که دارای پائین‌ترین مقدار انرژی و بیشترین تعداد در دسته برای هر پپتید

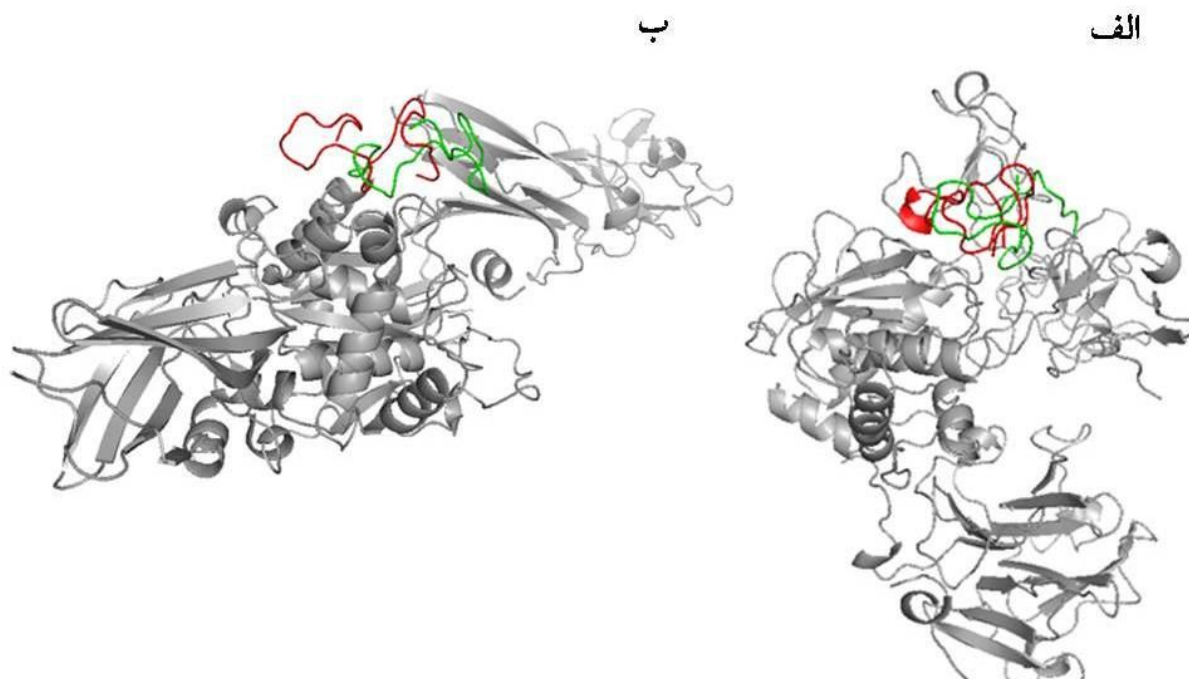
بود به وسیله نرم‌افزار PyMol (<http://www.Pymol.Org>) [29] مورد بررسی قرار گرفت (شکل 3). نتایج نشان دادند که با وجود اتصال پپتیدها به نواحی مشابه در دمین کاتالیتیک ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و یا به ناحیه متصل شونده به GTP در ترانس گلوتامیناز 2، انرژی اتصال ES-RR به این پروتئین‌ها منفی‌تر از ES-Zn می‌باشد (جدول 1).



**شکل 1** شبیه‌سازی دینامیک مولکولی پپتیدها. الف) مقدار RMSD بر حسب آنگسترم در طی 20 نانوثانیه زمان شبیه‌سازی. ES-Zn با رنگ مشکی و ES-RR با رنگ خاکستری نشان داده شده است. ب) مقدار RMSF کربن آلفای آمینواسیدها بر حسب آنگسترم. ES-Zn با خط ممتد سیاه و ES-RR با خط چین خاکستری نشان داده شده است.



شکل 2 طیف نشر فلورسانس ذاتی پپتیدهای ES-Zn (خط صاف) و ES-RR (نقطه چین) در ناحیه طول موج 280 تا 350 نانومتر.



شکل 3: شبیه‌سازی داکینگ مولکولی با استفاده از Cluspro 2.0. پپتیدها به صورت جداگانه داک گردیدند اما با استفاده از نرم افزار PyMol به صورت یک کمپلکس به تصویر کشیده شده‌اند. الف) کمپلکس ماتریکس متالوپروتئیناز 2 (خاکستری رنگ) با ES-Zn (سبز رنگ) و ES-RR (قرمز رنگ) ب) کمپلکس ترانس گلوتامیناز 2 با ES-Zn (سبز رنگ) و ES-RR (قرمز رنگ).

جدول 1 انرژی اتصال (kcal/mol) کمپلکس‌های حاصل از

شبیه‌سازی داکینگ مولکولی		
کمپلکس داک شده	تعداد اعضاء دسته منتخب	منفی‌ترین انرژی
ES-Zn و ماتریکس متالوپروتئیناز 2	68	-894.7
ES-RR و ماتریکس متالوپروتئیناز 2	98	-963.2
ES-Zn و ترانس گلوتامیناز 2	185	-834.1
ES-RR و ترانس گلوتامیناز 2	216	-990.6

#### 4- بحث

در این تحقیق ساختار پپتید طبیعی 27 آمینواسیدی مطابق با انتهای آمین اندوستاتین (ES-Zn) و پپتیدی که دارای جهش ایزولوسین 26 به آرژنین بود با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی فلوروسانس و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی مورد مطالعه قرار گرفت و میانکشی آنها با ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس گلوتامیناز 2 با استفاده از cluspro [27-28] شبیه‌سازی گردید. نتایج نشان دادند که قرار گرفتن یک آرژنین در کنار آرژنین پایانی در انتهای کربوکسیل پپتید موجب افزایش نوسانات در کل ساختار پپتید، تغییر ناحیه لوپ متصل شونده به یون Zn در انتهای آمین و منفی‌تر شدن انرژی اتصال پپتید به پروتئین‌های مذکور می‌گردد.

شبیه‌سازی دینامیک مولکولی اطلاعات ارزشمندی درباره ساختار و نوسانات پروتئین‌ها و پپتیدها در اختیار قرار می‌دهد. در این مطالعه به دلیل در اختیار نداشتن ساختار کریستالی پپتیدها، از ساختار کریستالی پروتئین کامل استفاده شد و ساختار پپتیدها با استفاده از برنامه MODELER مدل‌سازی شد [25]. مدل ساخته شده به وسیله شبیه‌سازی دینامیک مولکولی بهینه گردید. داده

حاصل از RMSD نشان دهنده پایداری شبیه‌سازی‌های انجام شده بود. RMSF میزان نوسانات کربن‌های آلفای آمینواسیدها را در ساختار پپتیدها نشان می‌دهد. بر این اساس نوسانات پپتید طبیعی در انتهای کربوکسیل بیشتر از سایر قسمت‌ها بوده در حالی که افزودن یک آرژنین در انتهای کربوکسیل موجب کاهش نوسانات این ناحیه و افزایش آن در انتهای آمین و کل ساختار پپتید ES-RR گردید. می‌توان پیشنهاد کرد که افزایش نوسانات می‌تواند به دلیل دافعه بین آرژنین‌های کنار هم در انتهای کربوکسیل و تاثیر آن بر روی کل ساختار و انتهای آمین پپتید باشد. نتایج حاصل از طیف‌سنجی فلوروسانس ذاتی نیز مؤید این فرضیه می‌باشد. با استفاده از بررسی جابجایی طول موج نشر فلوروسانس می‌توان به تغییر نحوه قرارگیری آمینواسیدهای فلوروفور در ساختار پروتئین‌ها و پپتیدها و تغییرات کانفورماسیونی آنها پی برد [30]. پپتیدهای مطالعه حاضر تنها دارای یک فلوروفور فنیل آلانین در داخل دور بتای متصل شونده به Zn بوده که می‌تواند نشانگر مناسبی برای مقایسه ساختار لوپ مذکور در انتهای آمین دو پپتید باشد. طیف نشر فلوروسانس فنیل آلانین در ES-RR جابجایی هفت نانومتری به سمت طول موج‌های کوتاه‌تر را نسبت به ES-Zn نشان داد. از آنجا که اساساً این جابه‌جایی به دلیل قرار گرفتن فلوروفور در محیط آبگریز یا غیرقطبی است [31]، در اینجا به نظر می‌رسد که فنیل آلانین به سمت داخل‌تر و دور از محیط آبی حلال قرار گرفته است که می‌تواند نشان دهنده تغییر کانفورماسیونی لوپ متصل شونده به Zn و انتهای آمین پپتید باشد. این نتایج در راستای مطالعه انجام شده توسط Toress و همکاران بوده [32] که نشان دادند آمینواسیدهای آرژنین بر پایداری انتهاهای کربوکسیل و آمین پپتید مؤثر هستند. آنها قطعه 27 آمینواسیدی انتهای آمین اندوستاتین انسانی با نام H27-Zn را با دو پپتید که فاقد آرژنین 27 در انتهای کربوکسیل و یا آرژنین 4 در

اتصال ضروری می‌باشند. احتمالاً اندواستاتین به محل اتصال به GTP در این آنزیم متصل می‌گردد [37]. میانکشی اندواستاتین و ترانس گلوتامیناز 2 برای تنظیم تکثیر و/ یا مهاجرت سلول‌های اندوتلیال حائز اهمیت بوده و این دو پروتئین در عملکردی هماهنگ رگزایی را تنظیم می‌نمایند [37]. همان طور که به وسیله شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان داده شد، پپتیدها به ناحیه‌ای نزدیک به محل اتصال به GTP در ترانس گلوتامیناز 2 متصل می‌گردند اما همانند ماتریکس متالوپروتئیناز 2، محل اتصال آنها کاملاً یکسان و منطبق نبوده و انرژی اتصال ES-RR منفی تر از ES-Zn است. بنابراین این گونه می‌توان استنباط نمود که تغییرات ساختاری انتهای کربوکسیل و آمینو اسیدی ES-RR ناشی از افزودن یک آمینو اسید آرژنین، موجب افزایش تمایل آن به پروتئین‌های دخیل در عملکرد آن شده و هرچند این پپتیدهای 27 آمینو اسیدی ساختار چندان پیچیده‌ای ندارند اما کانفورمسیون کلی آنها دارای اهمیت عملکردی بوده که این موضوع نیازمند بررسی‌های دقیقتر ساختاری و عملکردی می‌باشد.

به طور کلی، آمینو اسیدهای باردار از طریق ایجاد میانکشی الکترواستاتیکی با آمینو اسیدهای با بار مخالف و یا دافعه الکترواستاتیکی با گروه‌های هم بار به ترتیب نقش مهمی در پایدار یا ناپایدار نمودن ساختار پروتئین‌ها ایفا می‌نمایند [38]. به همین ترتیب، آرژنین نیز به دلیل دارا بودن گروه گوانیدین انعطاف‌پذیر با بار مثبت از جمله آمینو اسیدهای مهم و حیاتی در شکل‌گیری کانفورمسیون پروتئین‌ها می‌باشد. می‌توان چنین پیشنهاد نمود که دافعه آرژنین‌های با بار مثبت در انتهای کربوکسیل ES-RR موجب القای تغییرات ساختاری و کانفورمسیونی در کل ساختار و بخش لوپ انتهای آمینو و بهبود میانکشی آن با پروتئین‌ها شده است. در پایان می‌توان از مطالعه حاضر برای طراحی پپتیدهای درمانی کارآمدتر که به طور موثرتری به پروتئین‌ها متصل می‌شوند بهره جست.

انتهای آمینو بودند مقایسه کردند. نتایج بررسی RMSF و ساختار دوم نشان داد H27-Zn که در آن دافعه الکترواستاتیکی بین انتهای کربوکسیل و آمینو به دلیل داشتن آرژنین‌های اضافی، بیشتر از دو پپتید دیگر بود نوسانات و تمایل بیشتری به تشکیل ساختار صفحات بتا داشت [32].

همان‌گونه که قبلاً اشاره شد اعمال ضد رگزایی اندواستاتین از طریق اتصال به برخی پروتئین‌ها و گیرنده‌های سطح سلولی میانجیگری می‌شود که از آن میان میانکشی ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و ترانس گلوتامیناز 2 به دلیل در دسترس بودن ساختار کریستالی آنها در بانک داده‌های پروتئینی (PDB) با پپتیدها با استفاده از روش شبیه‌سازی داکینگ مولکولی بررسی شد. این روش یکی از ابزارهای متداول برای مطالعه نحوه میانکشی پروتئین- پروتئین می‌باشد. ماتریکس متالوپروتئینازها، دسته‌ای از آنزیم‌های اندوپپتیداز وابسته به Zn بوده که در رگزایی و متاستاز تومورها نقش دارند [33]. ماتریکس متالوپروتئیناز 2 می‌تواند ماتریکس خارج سلولی را تجزیه نموده و به تهاجم سلول‌های توموری به بخش‌های دیگر کمک نماید. اندواستاتین از طریق اتصال به دمین کاتالیتیکی ماتریکس متالوپروتئیناز 2 و مهار آن از گسترش سلول‌های اندوتلیال، رگزایی و تهاجم سلول‌های توموری جلوگیری می‌نماید [34، 35].

نتایج شبیه‌سازی داکینگ مولکولی نشان دادند پپتیدها به دمین کاتالیتیکی ماتریکس متالوپروتئیناز 2 متصل می‌شوند اما محل اتصال دو پپتید کاملاً منطبق بر یکدیگر نبوده و انرژی اتصال ES-RR منفی‌تر از پپتید طبیعی ES-Zn است. سطح سلول‌های اندوتلیال غنی از آنزیم ترانس گلوتامیناز 2 بوده که نقش مهمی در تنظیم فرایند رگزایی ایفا می‌نماید [36]. Faye و همکاران نشان دادند که اندواستاتین به ترانس گلوتامیناز 2 در ماتریکس خارج سلولی متصل شده و آرژنین‌های 27 و 139 برای این



519:147–152

## 5- منابع

- [12] MacDonald N.J, Shivers W.Y, Narum D. L, Plum S.M, Wingard J.N, Fuhrmann S.R, Liang H, Holland-Linn J, Chen D.H, and Sim B.K. (2001) Endostatin binds tropomyosin. A potential modulator of the antitumor activity of endostatin, *J. Biol. Chem.* 276:25190–25196
- [13] Kim Y.M, Hwang S, Kim Y.M, Pyun B.J, Kim T.Y, Lee S.T, Gho Y.S, and Kwon Y.G. (2002) Endostatin blocks vascular endothelial growth factor-mediated signaling via direct interaction with KDR/Flk-1, *J. Biol. Chem.* 277:27872–27879
- [14] Sasaki T, Larsson H, Kreuger J, et al. (1999) Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin, *EMBO J.* 18:6240–8
- [15] Kreuger J, Matsumoto T, Vanwildemeersch M, et al. (2002) Role of heparan sulfate domain organization in endostatin inhibition of endothelial cell function, *EMBO J.* 21:6303–11
- [16] Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S. (2009) Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem.* 14;284(33):22029-40
- [17] Fu Y, Chen Y, Luo X, Liang Y, Shi H, Gao L, Zhan S, Zhou D, Luo Y. (2009) The heparin binding motif of endostatin mediates its interaction with receptor nucleolin. *Biochemistry.* 15;48(49):11655-63.
- [18] Gaetzner S, Deckers MM, Stahl S, Löwik C, Olsen BR, Felbor U. (2005) Endostatin's heparan sulfate-binding site is essential for inhibition of angiogenesis and enhances in situ binding to capillary-like structures in bone explants. *Matrix Biol.* 23(8):557-61.
- [19] Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatisky M. (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today.* 15:40-56
- [20] Tjin Tham Sjin RM, Satchi-Fainaro R, Birsner AE, Ramanujam VM, Folkman J, Javaherian K. (2005) A 27-amino-acid synthetic peptide corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal Zinc-binding domain of endostatin is responsible for its anti-tumor activity. *Cancer Res* 65:3656-3663
- [21] Chillemi F, Francescato P, Ragg E, Cattaneo MG, Pola S, Vicentini L. (2003) Studies on the structure-activity relationship of endostatin: synthesis of human endostatin peptides
- [1] Folkman J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N. Engl. J. Med.* 285 :1182–1186
- [2] Ruegg C, Driscoll R, Werffeli-George P, Stupp R. (2003) Translational research in tumor angiogenesis: from bench to bedside and back to the bench, *Bull. Suisse Cancer.* 23:3–7
- [3] Ruegg C, Hasmin M, Lejeune F J, Alghisi G. C. (2006) Antiangiogenic peptides and proteins: From experimental tools to clinical drugs, *Biochim. et Biophys. Acta.* 1765:155–177
- [4] O'Reilly M.S, Boehm T, Yuen S, Fukai N, Vasios G, Lane W.S, Flynn E, Birkhead J, Olsen B.R, Folkman J. (1997) Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth, *Cell.* 88:277–285
- [5] Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. (2005) Endostatin: The logic of anti-angiogenic therapy, *Drug Resis Updat.* 8:59–74
- [6] Hohenester, E, Sasaki, T, Olsen B.R, and Timpl R. (1998) Crystal structure of the angiogenesis inhibitor endostatin at 1.5Å resolution, *EMBO J.* 17:1656–1664
- [7] Hohenester E, Sasaki T, Meann K, and Timpl R. (2000) Variable zinc coordination in endostatin, *J. Mol. Biol.* 297: 1–6
- [8] Ding, Y.H, Javaherian K, Lo K.M, Chopra R, Boehm T, Lanciotti J, Harris B.A, Li Y, Shapiro R, Hohenester E, Timpl R, Folkman J, and Wiley D.C. (1998) Zinc-dependent dimers observed in crystals of human endostatin. *PNAS.* 95:10443–10448.
- [9] Javaherian K, Park S.Y, Pickl W.F, LaMontagne K.R, Sjin R.T, Gillies S, and Lo K. M. (2002) Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain, *J. Biol. Chem.* 277:45211–45218
- [10] Karumanchi S.A, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai J.I, Venkataraman G, Shriver Z, Keiser N, Kalluri R, Zeng H, Mukhopadhyay D, Chen R.L, Lander A.D, Hagihara K, Yamaguchi Y, Sasisekharan R, Cantley L, Sukhatme V.P. (2001) Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors, *Mol. Cell.* 7:811–822
- [11] Lee S.J, Jang J.W, Kim Y.M, Lee H.I, Jeon J.Y, Kwon Y.G, and Lee S.T. (2002) Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2, *FEBS Lett.*

- [31] Uversky VN, Anatol'evich Permiakov E. (2006) *Methods in protein structure and stability analysis: Luminescence and circular dichroism*. Nova science publishers, Inc. New York.
- [32] Torres PH, Sousa GL, Pascutti PG. (2011) Structural analysis of the N-terminal fragment of the antiangiogenic protein endostatin: a molecular dynamics study. *Protein* 79(9):2684-2692.
- [33] Stetler-Stevenson, W.G. (2001) The role of matrix metalloproteinases in tumor invasion, metastasis, and angiogenesis. *Surg Oncol Clin North Am* 10:383-392.
- [34] Kim YM, Jang JW, Lee OH, Yeon J, Choi EY, Kim KW, Lee ST, Kwon YG. (2000) Endostatin inhibits endothelial and tumor cellular invasion by blocking the activation and catalytic activity of matrix metalloproteinase. *Cancer Res* 60(19):5410-5413
- [35] Lee SJ, Jang JW, Kim YM, Lee HI, Jeon JY, Kwon YG, Lee ST. (2002) Endostatin binds to the catalytic domain of matrix metalloproteinase-2. *FEBS Lett* 519(1-3):147-52.
- [36] Korner, G., Schneider, D. E., Purdon, M. A. and Bjornsson, T. D. (1989) Bovine aortic endothelial cell transglutaminase: enzyme characterization and regulation of activity. *Biochem J* 262:633-641
- [37] Faye C, Inforzato A, Bignon M, Hartmann DJ, Muller L, Ballut L, Olsen BR, Day AJ, Ricard-Blum S. (2010) Transglutaminase-2: a new endostatin partner in the extracellular matrix of endothelial cells. *Biochem J* 427(3):467-75
- [38] Whitford D. (2005) *Proteins, structure and function*. John Wiley & Sons Ltd.
- exhibiting potent anti-angiogenic activities. *J Med Chem* 46:4165-4172.
- [22] Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J. (2004) An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells. *J Biol Chem* 279,20178-20185.
- [23] Olsson AK, Johansson I, Akerud H, Einarsson B, Christofferson R, Sasaki T, et al. (2004) The minimal active domain of endostatin is a heparin-binding motif that mediates inhibition of tumor vascularization. *Cancer Res* 64:9012-9017.
- [24] Morbidelli L, Donnini S, Chillemi F, Giachetti A, Ziche M. (2003) Angiosuppressive and angiostimulatory effects by synthetic partial sequences of endostatin. *Clin Cancer Res* 9:5358-5369.
- [25] Šali A, Blundell TL. (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3):779-815.
- [26] Case DA, Darden T, Cheatham III TE, Simmerling C, Wang J, Duke RE. (2006) *AMBER 9*. University of California, San Francisco.
- [27] Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. (2004) ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinform* 20(1):45-50.
- [28] Comeau SR, Gatchell DW, Vajda S, Camacho CJ. (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucl Acid Res*. 32(2):96-99.
- [29] Delano WL. (2002) *The PyMol molecular graphics system*. Delano Scientific, San Carlos, CA, USA
- [30] Sheehan D. (2009) *Physical biochemistry: Principles and applications*, Second Edition, John Wiley & Sons Ltd, UK.