

Mechanical Stability Evaluation of the Actin-Cofilin Complex Induced by Oncogenic Actin Mutations Using Steered Molecular Dynamics Method

Sedighpour, Danial¹ / Ghalichi, Farzan² / Zoljanahi Oskui, Iman^{3*}

¹ - Ph.D. Candidate, Division of Biomechanics, Department of Biomedical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

² - Professor, Division of Biomechanics, Department of Biomedical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

³ - Assistant Professor, Division of Biomechanics, Department of Biomedical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

ARTICLE INFO

DOI: 10.22041/ijbme.2026.2086408.2023

Received: 23-2-2026

Revised: 7-6-2026

Accepted: 9-6-2026

KEYWORDS

Mutated Actin
Cofilin
Molecular Dynamics (MD)
Interaction Energy
Binding Affinity

ABSTRACT

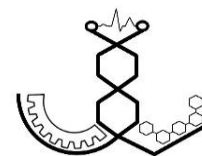
Cofilin plays a fundamental role in remodeling the actin cytoskeleton by binding to actin filaments and facilitating their severing and depolymerization. Disruption of actin-cofilin interactions, particularly as a result of actin mutations, has been implicated in the initiation and progression of various cancers, including skin cancer. In this study, the binding affinity of cofilin to wild-type (WT) actin and cancer-associated mutant actins (D288N, G168N, and R63Q) was investigated using steered molecular dynamics (SMD) simulations. Structural models of the actin-cofilin complex were constructed and subjected to constant-velocity pulling to quantify the maximum rupture force as well as interaction energy components, including van der Waals and electrostatic energies. The results of the SMD simulations indicated that the maximum separation force in the WT was approximately 4000 pN, whereas this value increased to 4200, 4400, and 4700 pN for the D288N, G168N, and R63Q, respectively. Energy analysis further revealed that these mutations produced more stable interactions compared with the WT, with the R63Q (van der Waals and electrostatic energies of -600 and -2900 kJ/mol, respectively) exhibiting the strongest stabilizing effect on the actin-cofilin interface. This behavior suggests an increased binding affinity and stability of the actin-cofilin complex in the presence of these mutations. These features may potentially serve as relatively stable controls in biochemical assays related to actin filament severing. They may also provide a foundation for the design of targeted modulators that could influence the rate of actin filament turnover through the regulation of cofilin activity. Overall, the findings of this study may offer insights into the molecular consequences of cancer-associated actin mutations and suggest that these mutations may play a role in the dysregulation of the cytoskeleton during cancer progression.

***Corresponding Author**

Address: Division of Biomechanics, Department of Biomedical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

E-Mail: zoljanahi@sut.ac.ir





ارزیابی پایداری مکانیکی ترکیب اکتین-کوفیلین در حضور جهش‌های سرطانی اکتین به روش دینامیک مولکولی هدایت شده

صدیق پور، دانیال^۱ / قالچی، فرزانه^۲ / ذوالجناحی اسکویی، ایمان^{۳*}

^۱ - دانشجوی دکتری، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

^۲ - استاد، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

^۳ - استادیار، گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

مشخصات مقاله

شناسه‌ی دیجیتال: 10.22041/ijbme.2026.2086408.2023

پذیرش: ۱۴۰۵/۳/۱۹

بازنگری: ۱۴۰۵/۳/۱۷

ثبت در سامانه: ۱۴۰۴/۱۲/۴

چکیده

واژه‌های کلیدی

پروتئین کوفیلین نقش اساسی در بازآرایی اسکلت سلولی اکتین ایفا می‌کند و از طریق اتصال به رشته‌های اکتین، فرآیندهای برش و دپلمیریزاسیون آن‌ها را تسهیل می‌نماید. اختلال در برهم‌کنش اکتین-کوفیلین، به‌ویژه در اثر جهش‌های اکتین، در بروز و پیشرفت انواع مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان پوست گزارش شده‌است. در این مطالعه، تمایل اتصال کوفیلین به اکتین گونه وحشی و اکتین‌های جهش‌یافته شامل R63Q، G168N، D288N با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده مورد بررسی قرار گرفت. مدل‌های ساختاری ترکیب اکتین-کوفیلین ایجاد شده و تحت کشش با سرعت ثابت قرار گرفتند تا حداکثر نیروی جدایش و مؤلفه‌های انرژی برهم‌کنش شامل انرژی‌های واندروالسی و الکترواستاتیک محاسبه شوند. نتایج شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت‌شده نشان داد که بیشینه نیروی جدایش در گونه وحشی حدود ۴۰۰۰ پیکونیوتن بود، در حالی که این مقدار در جهش‌های R63Q، G168N، D288N به ترتیب به مقادیر ۴۲۰۰، ۴۴۰۰ و ۴۷۰۰ پیکونیوتن افزایش یافت. همچنین، تحلیل انرژی نشان داد که جهش‌ها برهم‌کنش‌های پایدارتری نسبت به گونه وحشی ایجاد می‌کنند و جهش R63Q (با انرژی واندروالسی و الکترواستاتیک به ترتیب ۶۰۰- و ۲۹۰۰- کیلوژول بر مول) بیشترین اثر پایدارکننده را بر رابطه اکتین-کوفیلین دارد. این رفتار جهش‌ها بیانگر افزایش وابستگی اتصال و پایداری ترکیب اکتین-کوفیلین می‌باشد. این ویژگی‌ها می‌تواند به‌طور بالقوه به‌عنوان یک کنترل نسبتاً پایدار در آزمون‌های بیوشیمیایی مرتبط با برش رشته‌های اکتین مورد استفاده قرار گیرد و همچنین ممکن است مبنایی برای طراحی تعدیل‌کننده‌های هدفمندی که احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت کوفیلین بر نرخ نوسازی رشته‌های اکتین اثر می‌گذارند، باشد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش می‌تواند بینش‌هایی درباره پیامدهای مولکولی جهش‌های سرطانی اکتین فراهم کند و نشان می‌دهد که این جهش‌ها احتمالاً در اختلال تنظیم اسکلت سلولی طی پیشرفت سرطان نقش داشته باشند.

*نویسنده‌ی مسئول

نشانی: گروه بیومکانیک، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران

پست الکترونیک: zoljanahi@sut.ac.ir



۱- مقدمه

بازآرایی پویای^۱ اسکلت سلولی اکتین^۲ برای طیف گسترده‌ای از فرآیندهای حیاتی سلولی از جمله حرکت سلولی، انتقال درون سلولی و تقسیم سلولی ضروری است. اختلال در این تعادل دینامیکی می‌تواند منجر به تغییرات عمیق در رفتار سلولی و بروز بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان شود. در این میان، کوفیلین^۳ به عنوان یکی از مهم‌ترین پروتئین‌های متصل‌شونده به اکتین^۴، نقش کلیدی در تنظیم بازآرایی اسکلت سلولی (دپلیمریزاسیون)^۵ ایفا می‌کند [3-1]. افزایش پویایی و نوسازی سریع اکتین، به سلول اجازه می‌دهد تغییرات شکلی و ساختاری سریع‌تری را تجربه کند؛ رفتاری که به‌ویژه در سلول‌های مهاجر و تهاجمی اهمیت دارد. به همین دلیل، فعالیت و تنظیم کوفیلین نه تنها برای عملکرد طبیعی سلول، بلکه در زمینه‌های بیماری‌زا نظیر پیشرفت و متاستاز سرطان نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. هرگونه تغییر در نحوه اتصال یا پایداری ترکیب^۶ اکتین-کوفیلین می‌تواند تعادل بین پلیمریزاسیون^۷ و دپلیمریزاسیون اکتین را برهم زده و رفتار مکانیکی و دینامیکی سلول را به‌طور معناداری تغییر دهد [4,5]. اتصال کوفیلین به رشته‌های اکتین موجب بازآرایی‌های ساختاری قابل‌توجه (ناپایداری‌سازی رشته‌ها) در سطح زیرواحدهای اکتین^۸ می‌شود [6]. این بازآرایی‌ها شامل تغییر در زاویه و پیچش زیرواحدهای اکتین، کاهش هم‌ترازی طولی مونومرها و تضعیف برهم‌کنش‌های بین‌زیرواحدی است؛ عواملی که در مجموع، مقاومت مکانیکی رشته را کاهش داده و آن را مستعد برش و دپلیمریزاسیون می‌سازد. مطالعات نشان داده است که اتصال کوفیلین به اکتین یک فرآیند مشارکتی^۹ است، به‌گونه‌ای که رفتار مکانیکی و ساختاری رشته‌ها بسته به چگالی موضعی کوفیلین به‌طور چشمگیری تغییر می‌کند [3,7].

مطالعات پیشین، دیدگاه‌های ارزشمندی در خصوص برهم‌کنش اکتین-کوفیلین فراهم کردند و نشان دادند که اتصال کوفیلین پیامدهای ساختاری عمیقی برای رشته‌های اکتین به همراه دارد. به‌طور مشخص، محققان نشان دادند که اتصال کوفیلین موجب ایجاد پیچش قابل‌توجه در رشته‌های اکتین می‌شود؛ تغییری که مستقیماً به برش و ناپایداری‌سازی رشته‌ها منجر می‌گردد [8]. این پیچش، آرایش فضایی زیرواحدهای اکتین را تغییر داده و انسجام مکانیکی رشته را تضعیف می‌کند. در ادامه،

نشان دادند که میزان تغییر شکل ساختاری رشته‌ها به‌شدت به چگالی اتصال کوفیلین در طول رشته وابسته است [9]. علاوه بر مطالعات تجربی، بررسی‌های محاسباتی نیز نقش مهمی در روشن‌سازی مکانیسم‌های مولکولی این برهم‌کنش ایفا کرده است. پژوهشگران با استفاده از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی^{۱۰} نشان دادند که اتصال کوفیلین باعث تغییرات ساختاری در مقیاس اتمی در زیرواحدهای اکتین می‌شود و برهم‌کنش‌های بین‌زیرواحدی را تضعیف می‌کند [10]. با وجود این پیشرفت‌ها، بخش قابل‌توجهی از مطالعات پیشین عمدتاً بر اکتین گونه وحشی^{۱۱} متمرکز بودند و اثر جهش‌های ساختاری مرتبط با سرطان بر پایداری مکانیکی و انرژی برهم‌کنش اکتین-کوفیلین کمتر مورد توجه قرار گرفته است.

جهش‌ها در ژن‌های کدکننده اکتین با طیف متنوعی از اختلالات انسانی از جمله میوپاتی^{۱۲}، بیماری‌های عروقی و بدخیمی‌هایی نظیر سرطان‌های پوست، ریه و خون ارتباط دارند [11-13]. این تغییرات ژنتیکی می‌توانند با دگرگون‌سازی یکپارچگی ساختاری اکتین یا با برهم‌زدن تعامل آن با پروتئین‌های تنظیم‌کننده مانند کوفیلین، زمینه‌ساز رفتارهای سلولی غیرطبیعی شوند. به‌طور خاص، جهش‌های اکتین قادرند هندسه سطح تماس، توزیع بار الکتریکی و انعطاف‌پذیری موضعی رشته‌ها را تغییر دهند؛ عواملی که به‌طور مستقیم بر نحوه و پایداری اتصال کوفیلین اثر می‌گذارند. از آنجا که کوفیلین یکی از تنظیم‌کننده‌های اصلی نوسازی رشته‌های اکتین است، هرگونه تغییر در وابستگی اتصال یا پایداری ترکیب اکتین-کوفیلین می‌تواند تعادل بین پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون را مختل کرده و منجر به بازسازمان‌دهی غیرطبیعی اسکلت سلولی شود. چنین بازسازمان‌دهی‌هایی به‌ویژه در زمینه سرطان، پیامدهای مستقیمی برای فرآیندهایی مانند مهاجرت سلولی، تهاجم بافتی و پیشرفت تومور به همراه دارند. از این رو، بررسی اثر جهش‌های مرتبط با بیماری بر برهم‌کنش اکتین-کوفیلین در مقیاس اتمی، برای درک مکانیسم‌های مولکولی زمینه‌ساز بیماری‌های وابسته به اسکلت سلولی امری ضروری است.

برای درک عمیق‌تر رفتار مولکولی سامانه‌های زیستی، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی به‌عنوان جایگزینی قدرتمند و مکمل برای روش‌های تجربی و آزمایشگاهی مطرح شده است.

⁷ Polymerization

⁸ Actin subunits

⁹ Cooperative

¹⁰ Molecular Dynamics (MD)

¹¹ Wild-type (WT)

¹² Myopathy

¹ Dynamic

² Actin Cytoskeleton

³ Cofilin

⁴ Actin Binding Protein (ABP)

⁵ Depolymerization

⁶ Complex

ویژگی‌های انرژی اتصال، تنظیم طبیعی اسکلت سلولی را مختل کنند. این یافته‌ها نه تنها بینش‌های جدیدی درباره مبانی مولکولی رفتار تهاجمی سلول‌های سرطانی ارائه می‌دهند، بلکه می‌توانند مبنایی برای طراحی راهبردهای درمانی هدفمند با تمرکز بر برهم‌کنش‌های اکتین-کوفیلین فراهم آورند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ساختار ابتدایی

پیکربندی اتمی اولیه ترکیب اکتین-کوفیلین از بانک داده ساختارهای پروتئینی^۳ با کد دسترسی 5YU8 استخراج شد [18] (شکل ۱). این ساختار به‌عنوان مبنای تمامی شبیه‌سازی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت، چرا که شامل آرایش فضایی معتبر و با وضوح مناسب از سطح تماس میان اکتین و کوفیلین است.

با توجه به شیوع بالا و خطرات بالینی سرطان پوست در سطح جهانی، این مطالعه بر بررسی جهش‌های مرتبط با این نوع سرطان تمرکز داشت [19,20]. بدین منظور، سه جهش نقطه‌ای R63Q و G168N، D288N در پروتئین اکتین انتخاب شدند؛ جهش‌هایی که پیش‌تر در انواع مختلف سرطان پوست شناسایی شده‌است [13]. این سه جهش نقطه‌ای با توجه به شیوع آن‌ها در انواع سرطان پوست و بر اساس داده‌های استخراج‌شده از پایگاه cBioPortal for Cancer Genomics انتخاب شدند. این جهش‌ها به‌دلیل حضور و نزدیکی عملکردی به ناحیه تعامل اکتین-کوفیلین برگزیده شدند تا اثر آن‌ها بر پایداری مکانیکی و وابستگی اتصال این ترکیب بررسی شود.

ایجاد جهش‌ها با استفاده از افزونه Mutagenesis در نرم‌افزار PyMOL انجام شد. در این فرآیند، هر جهش به‌صورت مجزا و کنترل‌شده اعمال گردید، به‌گونه‌ای که کمترین اختلال ناخواسته در ساختار کلی پروتئین ایجاد شود و تنها ویژگی‌های شیمیایی و فضایی آمینواسید جهش‌یافته تغییر یابد. جهش‌ها به‌طور استراتژیک در نواحی واقع در سطح تماس مستقیم میان اکتین و کوفیلین اعمال شدند تا تأثیر آن‌ها بر هندسه‌ی فصل مشترک، توزیع بار سطحی و الگوهای برهم‌کنش بین مولکولی به‌وضوح قابل مشاهده باشد. این رویکرد امکان مقایسه‌ی مستقیم بین ترکیب گونه وحشی و فرم‌های جهش‌یافته را فراهم کرد و زمینه لازم برای تحلیل‌های بعدی شامل شبیه‌سازی دینامیک مولکولی، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت‌شده و ارزیابی مؤلفه‌های انرژی برهم‌کنشی را مهیا ساخت.

این شبیه‌سازی‌ها امکان ردیابی دقیق حرکت پروتئین‌ها در مقیاس اتمی را فراهم می‌کنند و بینش‌هایی بی‌واسطه درباره فرآیندهای دینامیکی ارائه می‌دهند که اغلب با تکنیک‌های متداول تجربی قابل دسترسی نیستند [14]. در میان رویکردهای پیشرفته دینامیک مولکولی، دینامیک مولکولی هدایت‌شده^۱ به‌عنوان یک روش قدرتمند برای شبیه‌سازی رویدادهای مکانیکی زیستی شناخته می‌شود. در این روش، با اعمال نیروهای جهت‌دار کنترل‌شده، می‌توان فرآیندهایی نظیر بازشدن ساختار پروتئین‌ها، جدایش ترکیب‌های پروتئینی و پارگی رشته‌ها را بازسازی کرد [15,16]. دینامیک مولکولی هدایت‌شده این امکان را فراهم می‌سازد که پاسخ‌های ساختاری و انرژی سامانه‌های زیستی در برابر تنش‌های مکانیکی به‌طور کمی مورد ارزیابی قرار گیرند. این روش در ابتدا با الهام از آزمایش‌های میکروسکوپ نیروی اتمی^۲ توسعه یافت، اما به‌مرور به یک چارچوب محاسباتی بالغ برای مطالعه مکانیک پروتئین‌ها و گذارهای ساختاری تبدیل شده‌است [17].

پژوهش‌های پیشین در زمینه جهش‌های اکتین با دو محدودیت اساسی همراه بودند. نخست آن‌که تمرکز اغلب این مطالعات بر جهش‌های مرتبط با میوپاتی‌های مادرزادی یا اختلالات عروقی بوده است، در حالی که بررسی جهش‌هایی که به‌طور مستقیم با بدخیمی‌ها، به‌ویژه سرطان پوست مرتبط هستند، به‌مراتب کمتر مورد توجه قرار گرفته است. دوم آن‌که این تحقیقات به‌طور عمده پیامدهای ساختاری کلی یا ویژگی‌های سلولی در مقیاس کلان را بررسی کردند و کمتر به این پرسش پرداختند که جهش‌های خاص مرتبط با سرطان چگونه تعامل اکتین با پروتئین‌های تنظیمی کلیدی مانند کوفیلین را در سطح مولکولی تغییر می‌دهند. به‌طور خاص، رفتار وابسته به نیرو در ترکیب‌های جهش‌یافته اکتین-کوفیلین، که نقش تعیین‌کننده‌ای در تنظیم دینامیک اسکلت سلولی دارد، همچنان به‌خوبی شناخته نشده‌است.

مطالعه حاضر با هدف پر کردن این خلأ دانشی، از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده برای تحلیل تأثیر جهش‌های اکتین مرتبط با سرطان پوست بر وابستگی اتصال و پایداری مکانیکی ترکیب اکتین-کوفیلین استفاده می‌کند. اعمال نیروی جهت‌دار در این چارچوب محاسباتی، امکان دستیابی به درکی کمی، با وضوح بالا و مبتنی بر نیرو و انرژی را فراهم می‌سازد و نشان می‌دهد که چگونه جهش‌های سرطانی می‌توانند از طریق تغییر پایداری مکانیکی یا

³ Protein Data Bank (PDB)

¹ Steered Molecular Dynamics (SMD)

² Atomic Force Microscopy (AFM)

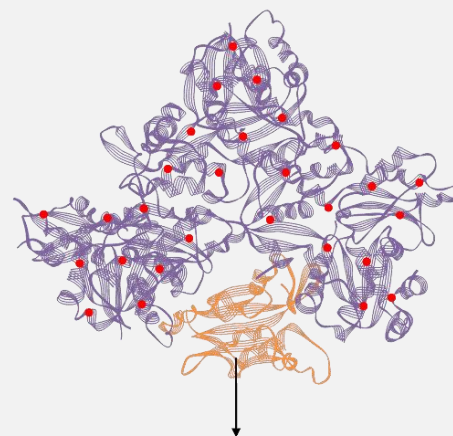
جدول (۱) - شرایط شبیه‌سازی سیستم‌ها

ابعاد جعبه (نانومتر)	نوع جعبه	تعداد یون‌های سدیم	تعداد مولکول‌های آب
۱۲×۱۵×۱۴	مکعبی	۲۹	۷۵۶۸۷

در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی، حرکت هر اتم بر اساس معادلات حرکت نیوتن توصیف می‌شود:

$$m_i \frac{d^2 \mathbf{r}_i}{dt^2} = -\nabla_{\mathbf{r}_i} U(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) \quad (1)$$

که در آن m_i جرم اتم i ، $\mathbf{r}_i$ بردار مکان و U پتانسیل کل سیستم است که شامل مؤلفه‌های پیوندی، واندروالسی و الکترواستاتیک می‌باشد. این معادلات با استفاده از الگوریتم جهش قورباغه^۱ [24] و با گام زمانی ۲ فمتوثانیه انترگرال‌گیری شدند. تمامی پیوندهای کووالانسی شامل اتم‌های هیدروژن با استفاده از الگوریتم LINCS [25] محدود شدند که امکان استفاده از گام زمانی بزرگتر را فراهم می‌کند و پایداری عددی را افزایش می‌دهد. پایداری عددی در طول شبیه‌سازی‌ها با ردیابی کل انرژی پتانسیل، دما و فشار مورد بررسی قرار گرفت؛ هیچ نوسان یا واگرایی غیرطبیعی مشاهده نشد. برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک دوربرد با استفاده از روش Particle-Mesh Ewald (PME) محاسبه شدند [26]، که به‌عنوان یک روش استاندارد و دقیق برای سیستم‌های زیست‌مولکولی در شرایط مرزی تناوبی شناخته می‌شود. برای محاسبه برهم‌کنش‌های واندروالسی، فاصله قطع ۱/۲ نانومتر در نظر گرفته شد؛ مقداری که با توصیه‌های میدان نیروی CHARMM36 سازگار است و تعادل مناسبی میان دقت فیزیکی و هزینه محاسباتی ایجاد می‌کند. فرآیند کمینه‌سازی انرژی با استفاده از الگوریتم steepest descent انجام شد [27] تا هرگونه درهم‌رفتگی یا تماس غیرواقعی بین اتم‌ها پیش از شروع شبیه‌سازی دینامیک مولکولی برطرف شود. پس از این مرحله، سامانه تحت یک فرآیند تعادل‌سازی دو مرحله‌ای به‌مدت مجموعاً ۲ نانوثانیه قرار گرفت. در مرحله اول، شبیه‌سازی در مجموعه‌ی آماری NVT (تعداد ذرات، حجم و دما ثابت) و در دمای ۳۱۰ کلین اجرا شد، که با استفاده از ترمواستات V-rescale [28] کنترل گردید تا دمای سامانه به‌طور یکنواخت تنظیم شود. در مرحله دوم، سامانه به مجموعه‌ی آماری NPT (تعداد ذرات، فشار و دما ثابت) منتقل شد، با فشار تنظیم‌شده روی ۱ بار و استفاده از بارواستات C-rescale [29] برای حفظ حجم و فشار



شکل (۱) - نمای سه‌بعدی ساختار ترکیب تری‌مر اکتین-کوفیلین گونه وحشی مورد مطالعه به‌صورت نمایش روبانی. ساختار کلی پروتئین تری‌مر اکتین با رنگ بنفش و پروتئین کوفیلین با رنگ نارنجی مشخص شده‌است. همچنین شرایط مرزی ثابت (نقاط قرمز) و جهت کشش در راستای محور Y (فلش) برای شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت‌شده نیز مشخص شده‌است.

۲-۲- شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی با استفاده از نرم‌افزار GROMACS نسخه 2022.4 انجام شد [21]. برای توصیف برهم‌کنش‌های بین‌اتمی، از میدان نیروی CHARMM36 [22] استفاده گردیده که به‌طور گسترده برای شبیه‌سازی پروتئین‌ها و ترکیب‌های پروتئین-پروتئین اعتبارسنجی شده‌است. محیط حلال با استفاده از مدل آب TIP3P شبیه‌سازی شد [23] تا شرایط فیزیولوژیک سیستم به‌صورت واقع‌گرایانه بازتولید شود. پارامترهای اصلی شبیه‌سازی در جدول ۱ خلاصه شده‌است. پیش از آغاز شبیه‌سازی، ترکیب اکتین-کوفیلین به‌صورت هدفمند در فضا جهت‌دهی شد تا مرکز جرم کوفیلین در امتداد محور Y قرار گیرد. سپس نیروی کششی در همین راستا اعمال شد. این تنظیم فضایی با هدف تعریف یک مسیر جدایش یکنواخت، کاهش برخوردهای تصادفی با نواحی مجاور محل اتصال و جلوگیری از اثرات غیرواقعی ناشی از جهت‌گیری‌های نامطلوب انجام شد. هر سیستم به‌گونه‌ای در جعبه شبیه‌سازی قرار داده شد که محور اعمال نیرو در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده در راستای محور Y هم‌تراز باشد؛ این هم‌راستاسازی به‌منظور تضمین یکنواختی و قابلیت مقایسه بین سیستم‌های مختلف انجام شد. به‌منظور حفظ خنثی بودن الکتریکی کل سامانه، یون‌های سدیم به تعداد لازم برای جبران بار خالص سیستم اضافه شدند.

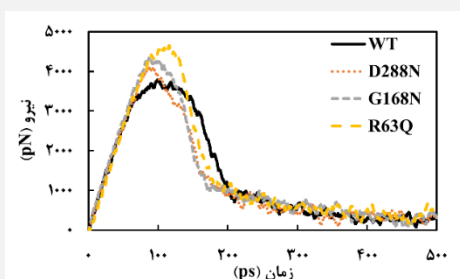
¹ Leap-frog

بود، زیرا این دو مؤلفه نقش غالبی در پایداری و استحکام مکانیکی ترکیب‌های پروتئین-پروتئین ایفا می‌کنند. به‌منظور افزایش قابلیت اعتماد و بازتولیدپذیری نتایج، هر آزمایش شبیه‌سازی سه بار تکرار شد و داده‌های حاصل برای محاسبه میانگین نیروهای جدایش، انرژی‌های واندروالسی و الکترواستاتیک مورد تحلیل قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بیشینه نیروی جدایش

به‌منظور ارزیابی وابستگی اتصال بین پروتئین کوفیلین و تری‌مر اکتین، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده بر روی اکتین گونه وحشی و سه فرم جهش‌یافته مرتبط با سرطان پوست شامل D288N، G168N و R63Q انجام شد. منحنی‌های نیرو-زمان حاصل از این شبیه‌سازی‌ها (شکل ۲) تفاوت‌های قابل توجهی را در بیشینه نیروی جدایش این ترکیب‌ها در حین فرآیند جدایش نشان می‌دهند که بازتابی از تغییر در قدرت و ماهیت برهم‌کنش‌های مولکولی ناشی از جهش‌ها است.



شکل (۲) - منحنی‌های نیرو-زمان برای ترکیب‌های کوفیلین-تری‌مر اکتین در گونه وحشی (WT) و جهش‌یافته‌های D288N، R63Q و G168N.

ترکیب اکتین گونه وحشی-کوفیلین بیشینه نیروی جدایش در حدود ۴۰۰۰ پیکونیوتن را نشان داد که بیانگر وجود برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی قوی و پایدار میان این دو پروتئین است. در مقابل، هر سه ترکیب جهش‌یافته نیروی بیشینه بالاتری نسبت به گونه وحشی از خود نشان دادند. در این میان، جهش R63Q بالاترین مقدار نیرو (تقریباً ۴۷۰۰ پیکونیوتن) را ایجاد کرد، و پس از آن جهش‌های G168N (تقریباً ۴۴۰۰ پیکونیوتن) و D288N (تقریباً ۴۲۰۰ پیکونیوتن) قرار گرفتند (شکل ۳). افزایش نیروی جدایش در این ترکیب‌ها نشان می‌دهد که جهش‌های مذکور منجر به افزایش پایداری مکانیکی و یا وابستگی اتصال کوفیلین به تری‌مر اکتین نسبت به گونه وحشی می‌شوند.

فیزیولوژیک. در طی مراحل تعادل، قیود اعمال‌شده بر اتم‌های کربن آلفا ($C\alpha$) به‌صورت تدریجی کاهش یافت تا ساختار پروتئینی فرصت تطبیق طبیعی با شرایط محیطی را پیدا کند و تنش‌های غیرواقعی از بین برود.

پس از برقراری تعادل کامل، شبیه‌سازی‌هایی دینامیک مولکولی هدایت‌شده برای بررسی رفتار مکانیکی جدایش کوفیلین از تری‌مر اکتین اجرا شدند. در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده، نیروی خارجی به‌صورت یک پتانسیل فنری وابسته به زمان بر مرکز جرم کوفیلین اعمال شد:

$$U_{\text{SMD}}(t) = \frac{1}{2} k [x(t) - (x_0 + vt)]^2 \quad (2)$$

که در آن k ثابت فنر، v سرعت کشش و $x(t)$ موقعیت لحظه‌ای مرکز جرم کوفیلین در راستای جدایش است. نیروی اعمالی از رابطه $F(t) = -\partial U_{\text{SMD}} / \partial x$ محاسبه شد. در این شبیه‌سازی‌ها، مجموعه‌ای اتم‌های کربن آلفا در تری‌مر اکتین به‌صورت ثابت نگه داشته شدند که معادل اعمال شرط مرزی جابه‌جایی صفر برای این بخش از سیستم است. با استناد به مطالعات پیشین، مرکز جرم کوفیلین با یک فنر مجازی (خطی) و با ثابت فنر 4393 kJ/mol/nm^2 [30-34] در راستای محور Y با سرعت کشش ثابت 0.1 nm/ps جابجا شد [30,31,35-37]. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت‌شده برای هر تکرار به مدت ۵۰۰ پیکوثانیه انجام گرفت. به‌منظور بررسی تکرارپذیری نتایج، هر شبیه‌سازی در سه تکرار مستقل انجام شد. در هر تکرار، از بذر تصادفی^۱ متفاوت برای مقاردهی اولیه سرعت‌ها استفاده شد تا وابستگی نتایج به شرایط اولیه به حداقل برسد. مقایسه روند تغییرات نیرو و انرژی در تکرارهای مختلف نشان داد که رفتار کلی سیستم‌ها سازگار و تکرارپذیر است. به‌منظور کمی‌سازی سهم انرژی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین در ترکیب اکتین-کوفیلین، از روش Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area (MM-PBSA) استفاده شد [38]. این روش که به‌طور گسترده به‌عنوان یک رویکرد قابل‌اعتماد برای برآورد انرژی‌های اتصال بین‌مولکولی شناخته می‌شود [35,39] و به کمک آن امکان تفکیک و تحلیل اجزای مختلف انرژی مؤثر بر پایداری ترکیب وجود دارد. در این چارچوب، انرژی مکانیکی مولکولی به‌عنوان مجموع دو انرژی برهم‌کنش الکترواستاتیک و انرژی برهم‌کنش واندروالسی میان اکتین و کوفیلین است. تمرکز اصلی در این مطالعه بر مقایسه مؤلفه‌های واندروالسی و الکترواستاتیک بین گونه وحشی و جهش‌های مرتبط با سرطان

¹ Random seed

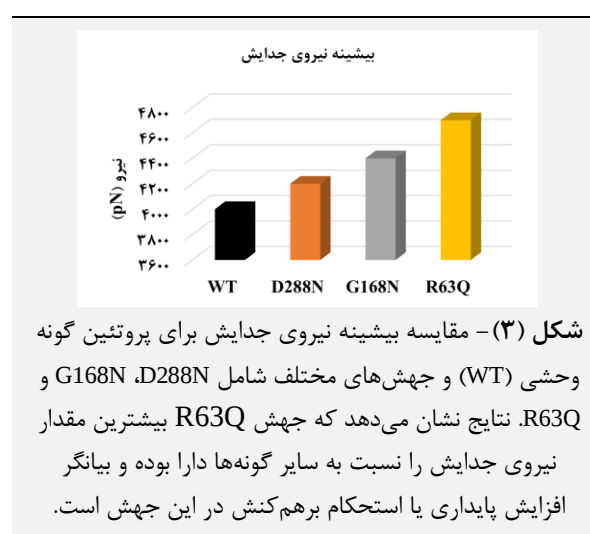
جهش‌ها ممکن است با ایجاد قفل‌شدگی هندسی مناسب‌تر یا توزیع بهینه‌تر تنش مکانیکی در سطح تماس، مقاومت ترکیب اکتین-کوفیلین را در برابر جدایش افزایش دهند. این پدیده به‌ویژه در زمینه عملکرد کوفیلین اهمیت دارد، زیرا این پروتئین نقشی اساسی در برش رشته‌های اکتین و تنظیم نرخ نوسازی آن‌ها ایفا می‌کند؛ فرآیندهایی که برای حفظ تحرک، تغییر شکل و مورفولوژی سلولی حیاتی هستند [42]. در نتیجه، هرگونه افزایش غیرطبیعی در پایداری اتصال کوفیلین به اکتین ممکن است تعادل بین پلیمریزاسیون و دپلیمریزاسیون اکتین را برهم زده و به اختلال در بازآرایی طبیعی اسکلت سلولی منجر شود. چنین اختلالی، به‌ویژه در سلول‌های سرطانی، شاید بتواند با افزایش توان مهاجرتی و تهاجمی سلول‌ها همراه باشد و نقش مهمی در پیشرفت بیماری ایفا کند.

۳-۲- انرژی و تعاملات واندروالسی

به‌منظور درک عمیق‌تر از مبانی انرژی حاکم بر پایداری ترکیب اکتین-کوفیلین، انرژی واندروالسی در طول شبیه‌سازی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. این مؤلفه انرژی با در نظر گرفتن نیروهای جاذبه و دافعه کوتاه‌برد میان اتم‌ها، شاخص مناسبی برای سنجش میزان تماس مؤثر و سطح اتصال میان دو پروتئین فراهم می‌کند. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، هر سه سیستم جهش‌یافته در کل بازه زمانی شبیه‌سازی، مقادیر انرژی واندروالسی منفی‌تری نسبت به سیستم گونه وحشی از خود نشان می‌دهند، در حالی که سطح انرژی واندروالسی میان جهش‌ها تقریباً در یک محدوده مشابه قرار دارد. منفی‌تر بودن انرژی واندروالسی در جهش‌ها نشان‌دهنده آن است که تعاملات اتمی نزدیک‌برد در سطح اتصال اکتین-کوفیلین از نظر انرژی پایدارتر و مطلوب‌تر شده‌است. این پدیده می‌تواند ناشی از بهبود تطابق فضایی، افزایش سطح تماس مؤثر، یا قرارگیری متراکم‌تر آمینواسیدها در ناحیه فصل مشترک اتصال باشد. به‌عبارت دیگر، جهش با اصلاح ریزساختار سطح تماس، امکان برقراری تعداد بیشتری از تعاملات واندروالسی را فراهم کرده است.

نکته حائز اهمیت آن است که این روند انرژی واندروالسی با افزایش نیروی جدایش مشاهده‌شده در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده هم‌خوانی دارد. چنین همبستگی‌ای نشان می‌دهد که پایداری مکانیکی بالاتر ترکیب در جهش‌ها، دست‌کم بخشی از منشأ خود را از تقویت تعاملات واندروالسی می‌گیرد. از دیدگاه مکانیکی، این نوع برهم‌کنش‌ها اگرچه به‌تنهایی ضعیف تلقی می‌شوند، اما به دلیل تعداد زیاد و توزیع گسترده در سطح تماس، می‌توانند نقش تعیین‌کننده‌ای

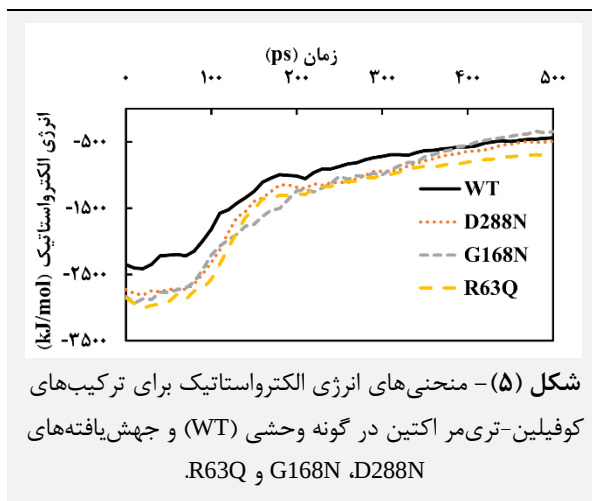
از منظر بیومکانیکی، چنین افزایشی در نیروی جدایش را می‌توان ناشی از بازآرایی مسیر جدایش و تغییر در نحوه توزیع تنش مکانیکی در سطح اتصال دانست. به بیان دیگر، جهش‌ها باعث افزایش تعداد تماس‌های مؤثر یا پایداری برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی (نظیر پیوندهای هیدروژنی، تعاملات الکترواستاتیک و واندروالسی) در طول فرآیند کشش می‌شوند، به‌گونه‌ای که شکست اتصال به‌صورت تدریجی‌تر و در نیروهای بالاتر رخ می‌دهد. این تفسیر با گزارش‌های پیشین مبنی بر نقش تعیین‌کننده هندسه سطح اتصال و مسیر اعمال نیرو در تعیین پاسخ مکانیکی ترکیب‌های پروتئینی هم‌خوانی دارد [40].



جهش‌های ایجادشده در زیرواحدهای اکتین می‌توانند منجر به تغییر در ساختار رشته اکتین و به‌تبع آن، تغییر در هندسه ناحیه تماس با پروتئین کوفیلین شوند. این تغییرات ساختاری با بازآرایی سطح اتصال و اصلاح جهت‌گیری آمینواسیدهای کلیدی، قادرند وابستگی اتصال کوفیلین به تری‌مر اکتین را به‌طور معناداری تحت تأثیر قرار دهند. در این راستا، نیروهای جدایش بالاتر مشاهده‌شده برای جهش‌های مرتبط با سرطان می‌توانند بازتابی از یک اثر جهش کارکردزای مکانیکی باشند؛ به‌طوری‌که این جهش‌ها با افزایش پایداری مکانیکی ترکیب، منجر به تثبیت ساختارهای غیرطبیعی یا نابهنجار اکتین می‌شوند. چنین پایداری‌هایی می‌تواند به‌عنوان یکی از مکانیسم‌های مولکولی مؤثر در ایجاد تغییرات دینامیکی اسکلت سلولی در سلول‌های سرطانی در نظر گرفته شود [41]. افزایش نیروی جدایش لزوماً به معنای افزایش انرژی آزاد اتصال در شرایط تعادلی نیست، بلکه می‌تواند ناشی از تغییر مسیر جدایش و افزایش تعداد یا پایداری برهم‌کنش‌های غیرکووالانسی مؤثر در طول فرآیند کشش باشد. به‌عبارت دیگر،

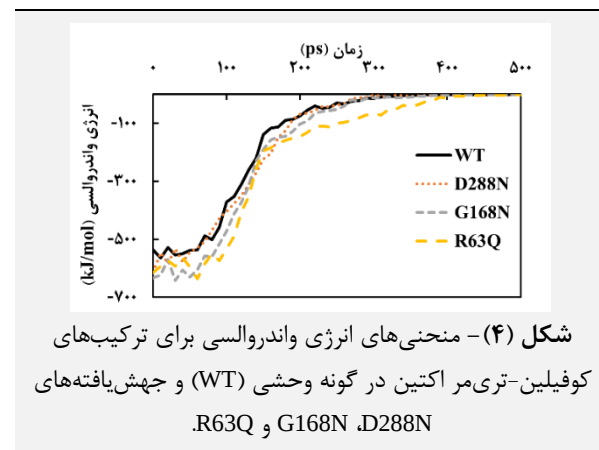
پایداری اتصال در این سیستم حاصل یک تعادل بهینه میان مؤلفه‌های مختلف انرژی برهم‌کنش است.

در مقاومت ترکیب در برابر جدایش تحت نیروی کششی ایفا کنند.



هم‌گرایی نتایج انرژی الکترواستاتیک و واندروالسی با داده‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده نشان می‌دهد که افزایش پایداری مکانیکی ترکیب‌های جهش‌یافته صرفاً ناشی از یک نوع برهم‌کنش خاص نیست، بلکه نتیجه هم‌افزایی میان تعاملات کوتاه‌برد (واندروالسی) و بلندبرد (الکترواستاتیک) است. این هم‌افزایی باعث می‌شود مسیر جدایش کوفیلین از اکتین نیازمند اعمال نیروی بیشتری باشد و در نتیجه، مقاومت مکانیکی ترکیب در برابر جدایش افزایش یابد. در مجموع، تغییرات مشاهده‌شده در انرژی الکترواستاتیک نشان می‌دهد که جهش‌های مرتبط با سرطان با بازتنظیم محیط بار سطحی و تقویت جاذبه‌های الکترواستاتیک در سطح اتصال، این افزایش پایداری انرژی، در کنار نتایج دینامیک مولکولی هدایت‌شده و انرژی واندروالسی، از شکل‌گیری یک اثر جهش کارکردزای مکانیکی و انرژی در ترکیب‌های جهش‌یافته حمایت می‌کند؛ اثری که شاید به اختلال در تنظیم طبیعی دینامیک اسکلت سلولی و تسهیل فنوتیپ‌های مهاجرتی و تهاجمی در سلول‌های سرطانی منجر شود [41,42].

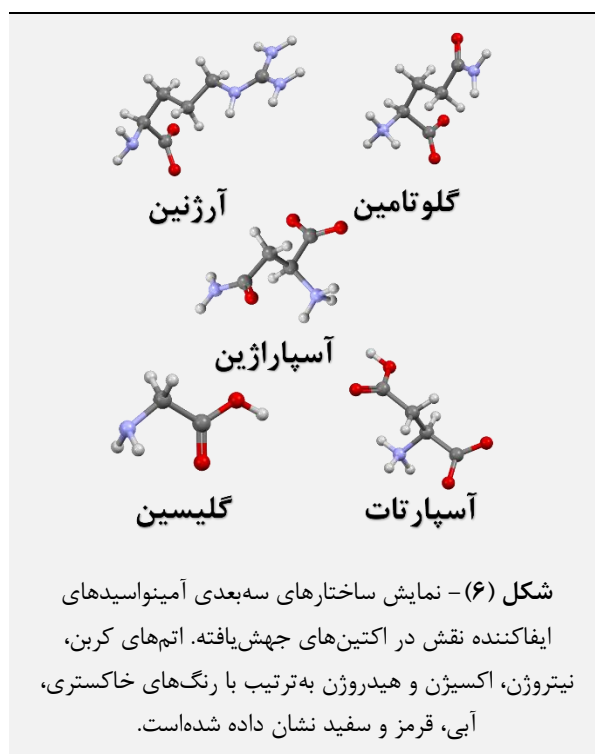
نکته‌ای که توجه ویژه‌ای را به خود جلب می‌کند، جهش R63Q است که در تمامی مؤلفه‌های بررسی‌شده شامل نیروی جدایش، انرژی واندروالسی و انرژی الکترواستاتیک، پایداریترین برهم‌کنش‌ها را نشان می‌دهد. این هم‌گرایی نتایج مکانیکی و انرژی بیانگر آن است که جهش R63Q نقش محوری در پایداریسازی رابط اتصال کوفیلین-اکتین ایفا می‌کند. چنین پایداریسازی غیرطبیعی می‌تواند منجر به اختلال در تنظیم طبیعی دینامیک اکتین شود؛ فرآیندی که برای بازآرایی اسکلت



۳-۳- انرژی و تعاملات الکترواستاتیکی

برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک نقش اساسی در پایداری ترکیب‌های پروتئین-پروتئین ایفا می‌کنند، به‌ویژه در سیستم‌هایی مانند ترکیب اکتین-کوفیلین که در آن توزیع بار سطحی و آرایش فضایی آمینواسیدها برای اتصال صحیح اهمیت حیاتی دارد. مطابق با نتایج نشان‌داده‌شده در شکل ۵، انرژی الکترواستاتیک در سیستم‌های جهش‌یافته، مشابه آنچه در انرژی واندروالسی مشاهده شد، در یک بازه تقریباً مشابه و به‌طور معناداری منفی‌تر از سیستم گونه وحشی قرار دارد که نشان‌دهنده پایداری الکترواستاتیک بالاتر این ترکیب‌ها است. منفی‌تر بودن مقادیر انرژی الکترواستاتیک در جهش‌ها حاکی از آن است که این تغییرات به‌واسطه جهش به تقویت جاذبه‌های الکترواستاتیک میان اکتین و کوفیلین منجر شده‌است و در نتیجه، نقش مهمی در پایداریسازی ترکیب ایفا می‌کنند. این اثر را می‌توان به تغییر در توزیع بار سطحی در اطراف نواحی جهش‌یافته نسبت داد، به‌گونه‌ای که آرایش جدید بارها امکان برقراری پیوندهای یونی قوی‌تر یا شبکه‌های پایداری از برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک را در سطح تماس فراهم می‌سازد. در این میان، جهش R63Q توجه ویژه‌ای را به خود جلب می‌کند، زیرا این جهش با وجود حذف یک آمینواسید باردار کلاسیک (آرژنین)، از طریق بازآرایی محیط الکترواستاتیک موضعی و بهبود تطابق فضایی، زمینه را برای شکل‌گیری برهم‌کنش‌های یونی مؤثرتر یا تقویت تعاملات قطبی فراهم کرده است. این تفسیر با مشاهده هم‌زمان انرژی الکترواستاتیک منفی‌تر، انرژی واندروالسی پایداری و نیروی جدایش بالاتر در این جهش سازگار است و نشان می‌دهد که

چندجهته، امکان تشکیل شبکه برهم‌کنشی جدیدی با کوفیلین را فراهم می‌کند. این بازآرایی در شبکه‌ی برهم‌کنش‌ها موجب پایداری بیشتر در حالت اتصال و کاهش انرژی برهم‌کنش می‌شود.



در مجموع، هر سه جهش با بهینه‌سازی توزیع بار سطحی، افزایش پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی و فشرده‌سازی آبگریز، سطح تماس اکتین-کوفیلین را از نظر استاتیکی و دینامیکی پایدارتر می‌کنند. پیامد این بازآرایی‌ها، افزایش نیروهای جدایش در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده و انرژی‌های واندروالسی و الکترواستاتیک منفی‌تر است؛ شواهدی که همگی نشان می‌دهند جهش‌ها از طریق هم‌افزایی میان تعاملات ضعیف اما پرشمار، یک حالت اتصال با میل بالاتر و پایداری مکانیکی قابل توجه ایجاد کردند.

این یافته‌ها بر اهمیت درک پیامدهای مولکولی جهش‌های اکتین در سرطان تأکید می‌کنند و نشان می‌دهند که هدف‌گیری برهم‌کنش‌های اکتین-کوفیلین می‌تواند راهبردی بالقوه برای اختلال در تنظیم غیرطبیعی اسکلت سلولی باشد که محرک پیشرفت سرطان است. کوفیلین یک پروتئین کلیدی متصل‌شونده به اکتین است که نقش اساسی در تنظیم دینامیک اسکلت سلولی ایفا می‌کند و از این طریق، رفتار سلول را به‌ویژه در زمینه سرطان به‌طور قابل توجهی تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این چارچوب، جهش‌هایی که با افزایش وابستگی اتصال کوفیلین به اکتین همراه هستند، ممکن است منجر به تغییرات

سلولی و عملکردهای وابسته به آن در سلول‌های سرطان پوست اهمیت حیاتی دارد. رفتار جهش R63Q نشان می‌دهد که این جهش با بازآرایی بهینه هندسه اتصال و توزیع بار سطحی، یک حالت اتصال کم‌انرژی و مقاوم در برابر جدایش ایجاد می‌کند. نتیجه چنین وضعیتی، افزایش مقاومت ترکیب اکتین-کوفیلین در برابر نیروهای مکانیکی و کاهش احتمال جدایش کوفیلین از رشته اکتین است که می‌تواند به افزایش نرخ بریدن و نوسازی رشته‌ها منجر شود. در مقابل، جهش‌های G168N و D288N اگرچه در مقایسه با سیستم گونه وحشی اتصال قوی‌تری به کوفیلین نشان می‌دهند، اما پایداری آن‌ها به اندازه R63Q نیست. این تفاوت می‌تواند نشان‌دهنده یک الگوی اتصال پویاتر و انعطاف‌پذیرتر باشد که اجازه می‌دهد برهم‌کنش اکتین-کوفیلین همچنان تا حدی قابل تنظیم باقی بماند. چنین رفتار پویایی ممکن است پیامدهای مهمی برای مهاجرت سلولی و تهاجم توموری داشته باشد، زیرا تعادل میان پایداری و دینامیک اسکلت سلولی یکی از عوامل کلیدی در حرکت سلول‌های سرطانی محسوب می‌شود.

در جهش‌های مورد بررسی، هر یک از جایگزینی‌های آمینواسیدی باعث تغییر معنی‌دار در ماهیت شیمیایی محیط اتصال اکتین-کوفیلین می‌شوند و در مجموع به افزایش پایداری و وابستگی اتصال منجر می‌گردند. در جهش R63Q، با جایگزینی آرژنین (دارای زنجیره بلند و بار مثبت) با گلوتامین (بی‌بار اما قطبی) (شکل ۶)، بخشی از دافعه‌های الکترواستاتیک مستقیم کاهش یافته و محیط باردار اطراف محل جهش متوازن‌تر شده و امکان تشکیل شبکه‌ای پایدار از پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های واندروالسی فراهم می‌شود. این تغییر موجب شکل‌گیری آرایش هندسی فشرده‌تر و بهینه‌تر در سطح تماس با کوفیلین می‌گردد و از مسیر الکترواستاتیک-هیدروژنی به افزایش پایداری کلی ترکیب منجر می‌شود.

در جهش G168N، جایگزینی گلیسین (کوچک و فاقد زنجیره جانبی) با آسپاراژین (قطبی و دارای قابلیت تشکیل پیوند هیدروژنی) (شکل ۶) موجب افزایش ظرفیت تعاملات هیدروژنی در فصل مشترک پروتئین-پروتئین می‌شود. این جهش با حذف درجه‌ای از انعطاف‌پذیری موضعی و افزایش تراکم باعث تقویت تعاملات کوتاه‌برد واندروالسی و پایداری بیشتر در ناحیه اتصال می‌گردد. در جهش D288N نیز یک ذره اسیدی (آسپارات) با یک اسیدآمینو قطبی ولی بدون بار (آسپاراژین) (شکل ۶) جایگزین شده‌است. حذف بار منفی مستقیم، باعث کاهش دافعه‌های الکترواستاتیک محلی می‌شود و از سوی دیگر، گروه آمیدی آسپاراژین با قابلیت تشکیل پیوندهای هیدروژنی

مکانیکی ایجاد کنند، به گونه‌ای که R63Q بیشترین مقاومت در برابر جدایش را نشان می‌دهد.

در مجموع، دو مطالعه در کنار یکدیگر تصویری مکمل ارائه می‌کنند: پژوهش پیشین اثر جهش‌ها را بر شبکه گسترده‌تر برهم‌کنش‌های مبتنی بر اکتین (اکتین-اکتین، مونومر اکتین-کوفیلین و مونومر اکتین-پروفیلین) آشکار ساخت، در حالی که مطالعه حاضر نشان می‌دهد این جهش‌ها چگونه می‌توانند ویژگی‌های مکانیکی و پایداری ترکیب تری‌مر اکتین-کوفیلین را تغییر دهند. این هم‌راستایی نتایج، اهمیت نقش جهش‌های مرتبط با سرطان را در بازآرایی دینامیک و مکانیک اسکلت سلولی برجسته می‌سازد.

اگرچه جهش‌های مورد بررسی در این مطالعه در چارچوب برهم‌کنش اکتین-کوفیلین تحلیل شدند و بررسی تأثیر آن‌ها بر پایداری ذاتی ساختار اکتین از اهداف پژوهش حاضر نیست، با این حال، نمی‌توان این موضوع را کاملاً نادیده گرفت. از طرفی، این موضوع پیش‌تر در مطالعه قبلی [35] درباره اثر جهش‌ها بر دایمر اکتین-اکتین و برهم‌کنش‌های مرتبط با اکتین نیز بررسی شده است. بنابراین، نتایج حاضر عمده‌تاً به‌عنوان اثرات ساختاری/مکانیکی این جهش‌ها بر ترکیب اکتین-کوفیلین تفسیر می‌شوند.

۳-۴- محدودیت‌های رویکرد محاسباتی

از دیدگاه روش‌شناختی، سرعت کشش به‌کاررفته در شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده بالاتر از نرخ‌های بارگذاری فیزیولوژیک است. این موضوع یکی از محدودیت‌های شناخته‌شده در این نوع شبیه‌سازی‌ها محسوب می‌شود که ناشی از محدودیت‌های زمانی و محاسباتی کنونی است. بنابراین، مقادیر مطلق نیرو و زمان جدایش لزوماً قابل تعمیم مستقیم به مقیاس‌های زمانی زیستی نیستند. با این حال، در مطالعه حاضر انتخاب این سرعت کشش با هدف ایجاد یک چارچوب مقایسه‌ای منسجم و اعمال شرایط بارگذاری یکسان برای اکتین گونه وحشی و جهش‌یافته انجام شده است، نه با هدف بازتولید کمی نرخ‌های فیزیولوژیک. از آنجا که تمامی سامانه‌ها تحت پروتکل شبیه‌سازی یکسانی بررسی شده‌اند، تفاوت‌های مشاهده‌شده در پاسخ مکانیکی را می‌توان به‌صورت نسبی و مقایسه‌ای تفسیر کرد و برای ارزیابی اثر جهش‌ها بر پایداری و مقاومت مکانیکی اتصال اکتین-کوفیلین به کار برد. همچنین، انتخاب ثابت فنر مجازی (4393 kJ/mol/nm^2) بر اساس مطالعات پیشین و با هدف ایجاد تعادل میان دو نیاز متضاد صورت گرفته است: از یک سو، ثابت فنر باید به اندازه

عمیق در سازمان‌دهی اسکلت سلولی و رفتار سلولی شوند و بدین ترتیب به پیشرفت سرطان کمک کنند. افزایش میل اتصال کوفیلین موجب بازآرایی شبکه اکتینی می‌شود؛ شبکه‌ای که برای بسیاری از فرآیندهای حیاتی سلولی از جمله مهاجرت، تهاجم و گذار اپی‌تلیال-مزانسیمی که یکی از رویدادهای کلیدی در متاستاز سرطان محسوب می‌شود نقش تعیین‌کننده‌ای دارد [43,44]. توانایی کوفیلین در بریدن رشته‌های اکتین باعث افزایش نرخ نوسازی اسکلت سلولی و تسهیل حرکت سریع سلول می‌شود؛ ویژگی‌ای که از مشخصه‌های اصلی سلول‌های سرطانی تهاجمی به‌شمار می‌رود [45,46]. در شرایطی که جهش‌های اکتین باعث پایداری بیش‌ازحد ترکیب اکتین-کوفیلین می‌شوند، این تعادل میان اتصال، بریدن و جدایش دچار اختلال می‌شود. چنین عدم تعادلی شاید به ایجاد الگوهای غیرطبیعی از بازآرایی اکتین منجر شده و در نهایت، مهاجرت جهت‌دار، تهاجم بافتی و رفتار متاستاتیک سلول‌های سرطانی را تقویت کند. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که کوفیلین با القای تغییرات ساختاری در اکتین می‌تواند بر پایداری رشته‌ها و برهم‌کنش‌های بین‌زیرواحدهای تأثیر بگذارد [8-10]. با این حال، بیشتر این پژوهش‌ها بر اکتین گونه وحشی متمرکز بوده‌اند. نتایج حاضر نشان می‌دهد که جهش‌های مرتبط با سرطان پوست، شامل D288N، G168N و R63Q، نسبت به گونه وحشی موجب افزایش نیروی جدایش و پایداری مکانیکی ترکیب اکتین-کوفیلین می‌شوند. در میان این جهش‌ها، R63Q بیشترین اثر را نشان داد که با تغییرات هم‌زمان در مؤلفه‌های واندروالسی و الکترواستاتیک سازگار است. بنابراین، مطالعه حاضر یک بسط مهم بر ادبیات پیشین محسوب می‌شود، زیرا اثر جهش‌های بیماری‌زا را در چارچوب تعامل اکتین-کوفیلین بررسی می‌کند.

در راستای تکمیل این یافته‌ها، در مطالعه پیشین [35] نیز اثر جهش‌های مرتبط با سرطان را بر پایداری دایمر اکتین (ترکیب اکتین-اکتین) و همچنین بر تعاملات مونومر اکتین با پروفیلین و کوفیلین بررسی شده بود. آن نتایج نشان داد که جهش‌هایی مانند G168N می‌توانند موجب ناپایداری قابل‌توجه در برهم‌کنش‌های اکتین-اکتین شوند و در عین حال، جهش‌هایی نظیر D288N و G168N تغییرات معنی‌داری در انرژی برهم‌کنش با کوفیلین ایجاد می‌کنند. در مقابل، مطالعه حاضر به‌طور اختصاصی بر پاسخ مکانیکی ترکیب تری‌مر اکتین-کوفیلین تحت شرایط کشش هدایت‌شده تمرکز دارد و نشان می‌دهد که همین جهش‌ها می‌توانند الگوی متفاوتی از پایداری

پایداری مکانیکی و انرژی ترکیب نشان داد. این جهش بالاترین نیروی جدایش و مطلوب‌ترین مؤلفه‌های انرژی برهم‌کنش را به خود اختصاص داد که بر نقش محوری آن در تثبیت سطح تماس اکتین-کوفیلین دلالت دارد. چنین رفتاری نشان می‌دهد که R63Q می‌تواند یکی از عوامل کلیدی در اختلال عملکرد اکتین وابسته به سرطان است و از اهمیت ویژه‌ای در مطالعات آینده برخوردار باشد. در مجموع، یافته‌های این پژوهش بر اهمیت بررسی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین در مقیاس اتمی و تحت شرایط اعمال نیرو تأکید می‌کنند و نشان می‌دهند که شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده ایزاری قدرتمند برای درک کمی پیامدهای مکانیکی جهش‌های سرطان‌زا هستند. نتایج حاصل، دینامیک اکتین-کوفیلین را به‌عنوان یک هدف بالقوه و امیدبخش برای راهبردهای درمانی آینده در سرطان مطرح می‌سازد، به‌ویژه در زمینه توسعه رویکردهایی که با تنظیم دقیق این برهم‌کنش، از بازآرایی غیرطبیعی اسکلت سلولی و پیشرفت تومور جلوگیری می‌کنند.

مراجع

- [1] K. Moriyama, I. Yahara, The actin-severing activity of cofilin is exerted by the interplay of three distinct sites on cofilin and essential for cell viability, *Biochem. J.* 365 (2002) 147–155. <https://doi.org/10.1042/bj20020231>.
- [2] J. Condeelis, How is actin polymerization nucleated in vivo?, *Trends Cell Biol.* 11 (2001) 288–293. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02008-6](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02008-6).
- [3] E.M. de la Cruz, How cofilin severs an actin filament, *Biophys. Rev.* 1 (2009) 51–59. <https://doi.org/10.1007/s12551-009-0008-5>.
- [4] T.D. Pollard, G.G. Borisy, Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments, *Cell* 112 (2003) 453–465. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00120-x](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00120-x).
- [5] M.F. Carlier, Role of Nucleotide Hydrolysis in the Dynamics of Actin Filaments and Microtubules, *Int. Rev. Cytol.* 115 (1989) 139–170. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)60629-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)60629-4).
- [6] J. Fan, M. Saunders, E. Haddadian, K. Freed, E. De La Cruz, G. Voth, Molecular origins of cofilin-linked changes in actin filament mechanics, *Biophys. J.* 104 (2013) 549a–550a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.3047>.
- [7] E. Andrianantoandro, T.D. Pollard, Mechanism of actin filament turnover by severing and nucleation at different concentrations of ADF/Cofilin, *Mol. Cell* 24 (2006) 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.08.006>.
- [8] A. McGough, B. Pope, W. Chiu, A. Weeds, Cofilin changes the twist of F-Actin: Implications for actin filament dynamics and cellular function, *J. Cell Biol.* 138 (1997) 771–781. <https://doi.org/10.1083/jcb.138.4.771>.
- [9] V.E. Galkin, A. Orlova, D.S. Kudryashov, A. Solodukhin, E. Reisler, G.F. Schröder, E.H. Egelman, Remodeling of actin filaments by ADF/cofilin proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20568–20572. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110109108>.
- [10] W.A. Elam, H. Kang, E.M. De La Cruz, Biophysics of actin filament severing by cofilin, *FEBS Lett.* 587 (2013) 1215–1219. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.062>.
- [11] K.J. Nowak, G. Ravenscroft, N.G. Laing, Skeletal muscle α -actin diseases (actinopathies): Pathology and mechanisms, *Acta Neuropathol.* 125 (2013) 19–32. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1019-z>.
- [12] D.C. Guo, H. Pannu, V. Tran-Fadulu, C.L. Papke, R.K. Yu, N. Avidan, S. Bourgeois, A.L. Estrera, H.J. Safi, E. Sparks, D. Amor, L. Ades, V. McConnell, C.E. Willoughby, D. Abuelo, M. Willing, R.A. Lewis, D.H. Kim, S. Scherer, P.P. Tung, C. Ahn, L.M.

کافی بزرگ باشد تا حرکت نقطه کشش به‌طور پایدار دنبال شود و جابجایی اعمال‌شده به‌طور کامل به ساختار منتقل گردد. از سوی دیگر، نباید آن‌قدر بزرگ باشد که پیش از وقوع جدایش طبیعی، نیرویی ناگهانی و غیرفیزیولوژیک به ساختار وارد کرده و باعث شکست مصنوعی شود. مقدار انتخاب‌شده در مطالعات متعدد شبیه‌سازی دینامیک مولکولی هدایت‌شده روی رشته‌های اکتین به‌کار رفته و نتایج معتبری ارائه داده است. به علاوه، این مطالعه تنها پنج جهش مشخص مرتبط با سرطان پوست را بررسی کرده است. بنابراین، اثرات مشاهده‌شده را نمی‌توان بدون انجام تحقیقات بیشتر به همه جهش‌های مرتبط با سرطان تعمیم داد. همچنین، از آنجا که این یافته‌ها بر پایه مدل‌های محاسباتی با محدودیت‌های ذاتی به دست آمده‌اند، لازم است با استفاده از روش‌های تجربی و آزمایشگاهی مورد اعتبارسنجی قرار گیرند. درک تغییرات ایجادشده در اسکلت سلولی در اثر جهش‌ها می‌تواند بینش‌های ارزشمندی برای مطالعات آینده فراهم کند که به بررسی راهبردهای درمانی بالقوه با هدف تنظیم اسکلت سلولی می‌پردازند.

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی هدایت‌شده به‌منظور بررسی اثر جهش‌های اکتین مرتبط با سرطان پوست بر برهم‌کنش و وابستگی اتصال پروتئین کوفیلین استفاده شد. نتایج به‌طور قاطع نشان داد که هر سه جهش مورد بررسی (R63Q و G168N, D288N) در مقایسه با حالت گونه وحشی، موجب افزایش وابستگی اتصال کوفیلین به اکتین می‌شوند. این افزایش تمایل اتصال با مشاهده نیروهای جدایش بالاتر و همچنین مطلوب‌تر شدن انرژی‌های برهم‌کنش و اندروالسی و الکترواستاتیک به‌خوبی تأیید شد که بیانگر پایداری بیشتر ترکیب اکتین-کوفیلین در حضور این جهش‌ها است. از دیدگاه زیست‌مولکولی و مکانیکی، این تقویت اتصال می‌تواند پیامدهای مهمی برای دینامیک غیرطبیعی اسکلت سلولی در سلول‌های سرطانی به همراه داشته باشد. پایداری بیش از حد ترکیب اکتین-کوفیلین ممکن است منجر به اختلال در تنظیم طبیعی چرخه برش، دپلمیریزاسیون و بازآرایی رشته‌های اکتین شود؛ فرآیندهایی که نقش کلیدی در تحرک سلولی، تهاجم و گسترش بدخیمی ایفا می‌کنند. از این رو، می‌توان استنباط کرد که شاید این جهش‌ها از طریق ایجاد یک عملکرد مکانیکی، زمینه را برای افزایش توان مهاجرتی و تهاجمی سلول‌های سرطانی فراهم می‌سازند. در میان جهش‌های بررسی‌شده، جهش R63Q قوی‌ترین اثر را بر افزایش

- 5 (2012) 1–13. <https://doi.org/10.1007/s12195-011-0181-z>.
- [31] B. Mehrafrooz, A. Shamloo, Mechanical differences between ATP and ADP actin states: A molecular dynamics study, *J. Theor. Biol.* 448 (2018) 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2018.04.010>.
- [32] M.I. Khan, S.F. Ferdous, A. Adnan, Mechanical behavior of actin and spectrin subjected to high strain rate: A molecular dynamics simulation study, *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19 (2021) 1738–1749. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.03.026>.
- [33] A.C. Lorenzo, E.R. Caffarena, Elastic properties, Young's modulus determination and structural stability of the tropocollagen molecule: A computational study by steered molecular dynamics, *J. Biomech.* 38 (2005) 1527–1533. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2004.07.011>.
- [34] A. Gautieri, S. Vesentini, F.M. Montevercchi, A. Redaelli, Mechanical properties of physiological and pathological models of collagen peptides investigated via steered molecular dynamics simulations, *J. Biomech.* 41 (2008) 3073–3077. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2008.06.028>.
- [35] D. Sedighpour, F. Ghalichi, I.Z. Oskui, Computational insights into the effect of mutation on actin–actin dimer and actin-related binding protein interactions, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 27 (2025) 20754–20764. <https://doi.org/10.1039/d5cp02961a>.
- [36] S. Li, J. Zhang, C. Wang, P. Nithiarasu, Atomistic modeling of F-actin mechanical responses and determination of mechanical properties, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 2794–2803. <https://doi.org/10.1021/acsbmaterials.8b00640>.
- [37] A. Shamloo, B. Mehrafrooz, Nanomechanics of actin filament: A molecular dynamics simulation, *Cytoskeleton* 75 (2018) 118–130. <https://doi.org/10.1002/cm.21429>.
- [38] R. Kumari, R. Kumar, A. Lynn, G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations, *J. Chem. Inf. Model.* 54 (2014) 1951–1962. <https://doi.org/10.1021/ci500020m>.
- [39] D. Sedighpour, H. Taghizadeh, The effects of mutation on the drug binding affinity of Neuraminidase: Case study of Capsaicin using steered molecular dynamics simulation, *J. Mol. Model.* 28 (2022) 36. <https://doi.org/10.1007/s00894-021-05005-7>.
- [40] V. Ekanayake, D. Nisan, P. Ryzhov, Y. Yao, F.M. Marassi, Lipoprotein particle formation by Proapoptotic tBid, *Biophys. J.* 115 (2018) 533–542. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.06.021>.
- [41] T.D. Pollard, J.A. Cooper, Actin, a central player in cell shape and movement, *Science* 326 (2009) 1208–1212. <https://doi.org/10.1126/science.1175862>.
- [42] B.W. Bernstein, J.R. Bamberg, ADF/Cofilin: A functional node in cell biology, *Trends Cell Biol.* 20 (2010) 187–195. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.01.001>.
- [43] H. Wang, H. Gu, J. Feng, Y. Qian, L. Yang, F. Jin, X. Wang, J. Chen, Y. Shi, S. Lu, M. Zhao, Y. Liu, Cellastrus orbiculatus extract suppresses the epithelial-mesenchymal transition by mediating cytoskeleton rearrangement via inhibition of the Cofilin 1 signaling pathway in human gastric cancer, *Oncol. Lett.* 14 (2017) 2926–2932. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6470>.
- [44] A. Popow-Woźniak, A.J. Mazur, H.G. Mannherz, M. Malicka-Błaszczkiewicz, D. Nowak, Cofilin overexpression affects actin cytoskeleton organization and migration of human colon adenocarcinoma cells, *Histochem. Cell Biol.* 138 (2012) 725–736. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-0988-2>.
- [45] X. Jiao, B. Wang, L. Yang, Q. Zhao, M. Zhang, X. Liu, C. Zhou, R. Wang, H. Chen, J. Wang, Y. Ren, P. Liu, FMNL2 suppresses cell migration and invasion of breast cancer: a reduction of cytoplasmic p27 via RhoA/LIMK/Cofilin pathway, *Cell Death Discov.* 8 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00964-z>.
- [46] J. Li, R. Yang, H. Yang, S. Chen, L. Wang, M. Li, S. Yang, Z. Feng, J. Bi, NCAM regulates the proliferation, apoptosis, autophagy, EMT, and migration of human melanoma cells via the Src/Akt/mTOR/cofilin signaling pathway, *J. Cell. Biochem.* 121 (2020) 1192–1204. <https://doi.org/10.1002/jcb.29353>.
- Buja, C.S. Raman, S.S. Shete, D.M. Milewicz, Mutations in smooth muscle α -actin (ACTA2) lead to thoracic aortic aneurysms and dissections, *Nat. Genet.* 39 (2007) 1488–1493. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.6>.
- [13] L. Witjes, M. Van Troys, B. Verhasselt, C. Ampe, Prevalence of cytoplasmic actin mutations in diffuse large B-cell lymphoma and multiple myeloma: A functional assessment based on actin three-dimensional structures, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 3093. <https://doi.org/10.3390/ijms21093093>.
- [14] I. Yu, M. Feig, Y. Sugita, All-atom molecular dynamics simulation of the altered protein-protein interaction with metabolites and ions in the cytoplasm, *Biophys. J.* 118 (2020) 217a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2019.11.1288>.
- [15] B. Isralewitz, M. Gao, K. Schulten, Steered molecular dynamics and mechanical functions of proteins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11 (2001) 224–230. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(00\)00194-9](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(00)00194-9).
- [16] M. Gunnoo, P.A. Cazade, A. Orlowski, M. Chwastyk, H. Liu, D.T. Ta, M. Cieplak, M. Nash, D. Thompson, Steered molecular dynamics simulations reveal the role of Ca^{2+} in regulating mechanostability of cellulose-binding proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 20 (2018) 22674–22680. <https://doi.org/10.1039/C8CP00925B>.
- [17] H. Lu, B. Isralewitz, A. Krammer, V. Vogel, K. Schulten, Unfolding of titin immunoglobulin domains by steered molecular dynamics simulation, *Biophys. J.* 75 (1998) 662–671. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)77556-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)77556-3).
- [18] K. Tanaka, S. Takeda, K. Mitsuoka, T. Oda, C. Kimura-Sakiyama, Y. Maéda, A. Narita, Structural basis for cofilin binding and actin filament disassembly, *Nat. Commun.* 2018 91 9 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04290-w>.
- [19] Z. Apalla, D. Nashan, R.B. Weller, X. Castellsagué, Skin cancer: Epidemiology, disease burden, pathophysiology, diagnosis, and therapeutic approaches, *Dermatol. Ther. (Heidelberg)* 7 (2017) 5–19. <https://doi.org/10.1007/s13555-016-0165-y>.
- [20] S. Garcovich, G. Colloca, P. Sollena, A. Bellieni, L. Balducci, W.C. Cho, R. Bernabei, K. Peris, Skin cancer epidemics in the elderly as an emerging issue in geriatric oncology, *Aging Dis.* 8 (2017) 643–661. <https://doi.org/10.14336/ad.2017.0503>.
- [21] M.J. Abraham, T. Murtola, R. Schulz, S. Páll, J.C. Smith, B. Hess, E. Lindah, GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers, *SoftwareX* 1–2 (2015) 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- [22] B.R. Brooks, C.L. Brooks, A.D. Mackerell, L. Nilsson, R.J. Petrella, B. Roux, Y. Won, G. Archontis, C. Bartels, S. Boresch, A. Cafflich, L. Caves, Q. Cui, A.R. Dinner, M. Feig, S. Fischer, J. Gao, M. Hodoscek, W. Im, K. Kuczera, T. Lazaridis, J. Ma, V. Ovchinnikov, E. Paci, R.W. Pastor, C.B. Post, J.Z. Pu, M. Schaefer, B. Tidor, R.M. Venable, H.L. Woodcock, X. Wu, W. Yang, D.M. York, M. Karplus, CHARMM: The biomolecular simulation program, *J. Comput. Chem.* 30 (2009) 1545–1614. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.
- [23] W.L. Jorgensen, J. Chandrasekhar, J.D. Madura, R.W. Impey, M.L. Klein, Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 79 (1983) 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.
- [24] R.W. Hockney, S.P. Goel, J.W. Eastwood, Quiet high-resolution computer models of a plasma, *J. Comput. Phys.* 14 (1974) 148–158. [https://doi.org/10.1016/0021-9991\(74\)90010-2](https://doi.org/10.1016/0021-9991(74)90010-2).
- [25] B. Hess, H. Bekker, H.J.C. Berendsen, J.G.E.M. Fraaije, LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations, *J. Comput. Chem.* 18 (1997) 1463–1472. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-987x\(199709\)18:12<1463::aid-jcc4>3.0.co;2-h](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-987x(199709)18:12<1463::aid-jcc4>3.0.co;2-h).
- [26] T. Darden, D. York, L. Pedersen, Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems, *J. Chem. Phys.* 98 (1993) 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- [27] S.P. Hirshman, J.C. Whitson, Steepest-descent moment method for three-dimensional magnetohydrodynamic equilibria, *Phys. Fluids* 26 (1983) 3553–3568. <https://doi.org/10.1063/1.864116>.
- [28] G. Bussi, D. Donadio, M. Parrinello, Canonical sampling through velocity rescaling, *J. Chem. Phys.* 126 (2007) 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>.
- [29] M. Bernetti, G. Bussi, Pressure control using stochastic cell rescaling, *J. Chem. Phys.* 153 (2020) 114107. <https://doi.org/10.1063/5.0020514>.
- [30] H. Ghodsi, M.T. Kazemi, Elastic properties of actin assemblies in different states of nucleotide binding, *Cell. Mol. Bioeng.*