



## مطالعه مکانیزم مولکولی جدایش پیوند پی سلکتین/PSGL-1 تحت کشش با استفاده از روش دینامیک مولکولی

هاجر حسنی اردکانی<sup>1</sup>، هانیه نیرومند اسکویی<sup>2\*</sup>

1- دانشجوی دکتری، مهندسی مکانیک، گرایش بیومکانیک، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز

2- دانشیار، مهندسی مکانیک، گرایش بیومکانیک، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز

\* تبریز، صندوق پستی 51335-1996 niroomand@sut.ac.ir

### اطلاعات مقاله

مقاله پژوهشی کامل

دریافت: 08 اسفند 1394

پذیرش: 14 اردیبهشت 1395

ارائه در سایت: 22 خرداد 1395

کلید واژگان:

دینامیک مولکولی

نمد

لکوسیت

جدایش پیوند پی سلکتین/PSGL-1

انرژی ناپیوندی

### چکیده

روش دینامیک مولکولی یک روش شبیه سازی کامپیوتری است که با حل معادلات حرکت کلاسیک به مطالعه حرکت فیزیکی اتم ها و مولکول ها در یک سیستم  $N$  ذره‌ای می پردازد. در این تحقیق از روش مذکور جهت بررسی تغییر ساختاری یکی از پیوندهای حیاتی در بدن استفاده شده است. این پیوند مابین گیرنده‌های موجود بر سطح سلول‌های دیواره عروقی (اندوتلیال) به نام پی سلکتین و لیگندهای متناظر آنها (PSGL-1) که بر سطح لکوسیت (سلول سفید خون) توزیع گشته‌اند، ایجاد می‌شود. یکی از فاکتورهای واسط در فرایند مهاجرت لکوسیت‌ها به سمت بافت عفونی، که با غلتش این سلول‌ها روی سلول‌های اندوتلیال آغاز می‌شود، تشکیل و شکست متوالی این پیوند می‌باشد. شناخت مکانیزم جدایش این پیوند در بستر مولکولی در دریافت پاسخ‌های درمانی اهمیت دارد. بدین منظور جدایش این پیوند تحت کشش به روش دینامیک مولکولی و با استفاده از کد نمد شبیه سازی و نتایج خروجی با استفاده از نرم افزار گرافیکی وی ام دی تحلیل شد. نتایج حاکی از این است که یون کلسیم اهمیت بالایی در بقای پیوند دارد. همچنین با مطالعه مکانیزم شکست باقیمانده‌های مرزی، مشاهده می‌شود که پیوندهای هیدروژنی ما بین یون کلسیم و باقیمانده فوکوز از گروه قندی و همچنین پیوندهای بین باقیمانده‌های تایروسین سولفات شده و باقیمانده‌های مجاور آنها، دارای بیشترین میزان انرژی ناپیوندی هستند. به همین علت با تأخیر نسبت به بقیه پیوندها می‌شکنند که نشان از اهمیت این باقیمانده‌ها در پیوند مذکور دارد.

## Investigation of the mechanism of dissociation of P-selectin/PSGL-1 complex under stretching with molecular dynamics method

Hajar Hassani Ardekani, Hanieh Niroomand Oscuii\*

Department of Biomechanics, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

\* P.O.B. 51335-1996, Tabriz, niroomand@sut.ac.ir

### ARTICLE INFORMATION

Original Research Paper  
Received 27 February 2016  
Accepted 03 May 2016  
Available Online 11 June 2016

**Keywords:**  
Molecular Dynamics  
NAMD  
Leukocyte  
P-selectin/PSGL-1 bond dissociation  
non-bonded energy

### ABSTRACT

Molecular Dynamics (MD) method is a computer simulation for studying the physical movements of atoms and molecules of an  $N$ -body system by solving classical equations of motion. Here, this method is used to investigate the structural changes of a vital molecular bond in the body. This bond is created by the interaction of P-selectin, expressed on activated endothelium, and its counterpart P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) which is expressed on leukocytes. Frequent association and dissociation of these bonds allow the leukocyte to roll on the endothelium layer which is a pivotal step in inflammatory responses. Understanding the mechanism underlying the dissociation process of this bond is helpful in pathological researches. Here this process is simulated with MD method using the program NAMD and Visual Molecular Dynamics (VMD). The results indicate that the hydrogen bonds between ion  $Ca^{2+}$  and residue fucose of glycan group of PSGL-1 and also between sulfated tyrosine residues are the most effective bonds in binding.

### 1- مقدمه

فرایند که دیapedz<sup>4</sup> لقب گرفته است، شامل چهار مرحله اصلی می باشد که عبارتند از: 1. به دام انداختن لکوسیت<sup>5</sup>، 2. غلتش<sup>6</sup> لکوسیت در طول دیواره رگ، 3. چسبندگی کامل<sup>7</sup> و 4. مهاجرت سلول از میان سلول‌های اندوتلیال عروقی و رسیدن به محل التهاب. در هر مرحله مولکول‌های چسبان<sup>8</sup> متفاوتی

فرایند فعال شدن لکوسیت<sup>1</sup>ها (سلول‌های سفید خون) و مهاجرت این سلول ها از میان سلول‌های اندوتلیال<sup>2</sup> عروقی به سمت بافت‌های عفونی، نقش مهمی در پاسخ‌های التهابی<sup>3</sup> سیستم ایمنی بدن ایفا میکند [1-4]. این

<sup>4</sup> Diapedes  
<sup>5</sup> Leukocyte recruitment  
<sup>6</sup> rolling  
<sup>7</sup> Firm adhesion  
<sup>8</sup> Adhesion molecules

<sup>1</sup> Leukocyte  
<sup>2</sup> Endothelial  
<sup>3</sup> inflammatory responses

Please cite this article using:

H. Hassani Ardekani, H. Niroomand Oscuii, Investigation of the mechanism of dissociation of P-selectin/PSGL-1 complex under stretching with molecular dynamics method, *Modares Mechanical Engineering*, Vol. 16, No. 6, pp. 63-70, 2016 (in Persian)

برای ارجاع به این مقاله از عبارت ذیل استفاده نمایید:

H. Hassani Ardekani, H. Niroomand Oscuii, Investigation of the mechanism of dissociation of P-selectin/PSGL-1 complex under stretching with molecular dynamics method, *Modares Mechanical Engineering*, Vol. 16, No. 6, pp. 63-70, 2016 (in Persian)

## 2- تئوری

روش دینامیک مولکولی یک روش کاربردی جهت مطالعه رفتار بیومولکول‌ها در بستر اتمی با استفاده از روش‌های محاسباتی است. از آنجایی که سیستم‌های مولکولی عموماً شامل تعداد زیادی از ذرات (اتم‌ها) هستند بدست آوردن ویژگی‌های سیستم‌های پیچیده بطور تحلیلی امکان پذیر نمی باشد. لذا شبیه سازی دینامیک مولکولی با استفاده از روش‌های محاسباتی به کمک حل اینگونه مسائل آمده است. این روش شامل حل عددی و مرحله به مرحله معادلات حرکت کلاسیک (معادلات نیوتن) می باشد که برای یک سیستم اتمی متشکل از  $N$  ذره بصورت زیر نوشته می شود:

$$m_{\alpha} \ddot{\vec{r}}_{\alpha} = - \frac{\partial}{\partial \vec{r}_{\alpha}} U_{\text{total}}(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, \vec{r}_N) \quad , \quad \alpha = 1, 2, \dots, N \quad (1)$$

که در آن  $m_{\alpha}$  جرم هر اتم،  $\vec{r}_{\alpha}$  مکان آن و  $U_{\text{total}}$  انرژی پتانسیل کل است که به مکان همه اتم‌ها وابسته است. انرژی پتانسیل که توسط میدان نیرویی در شبیه سازی دینامیک مولکولی مشخص می‌شود، مهمترین بخش یک شبیه سازی است زیرا که باید به درستی برخورد بین اتم‌ها را بصورت یک معادله ریاضی توضیح دهد. معادله ریاضی که مشخص کننده انرژی پتانسیل سیستمی از ذرات می باشد بصورت تابعی متشکل از توابع نیرویی به شکل زیر توضیح داده می شود:

$$U_{\text{total}} = \sum_{\text{bonds } i} K_i^{\text{bond}} (r_i - r_{0i})^2 + \sum_{\text{angles } i} K_i^{\text{angle}} (\theta_i - \theta_{0i})^2 + \sum_{\text{dihedrals } i} K_i^{\text{dih}} (1 + \cos[n_i \varphi_i - \gamma_i]) + \sum_i \sum_{i < j} 4 \epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{R_{ij}^{\text{min}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_i \sum_{i > j} \frac{q_i q_j}{D r_{ij}} \quad (2)$$

در معادله بالا سه ترم اول بیان کننده انرژی پیوندی بین اتم هاست که به ترتیب برخوردهای پیوندی خطی، زاویه‌ای و دایهدرال را شامل می شود.

پارامترهای  $r$  و  $\theta$  طول و زاویه پیوندی را نشان می‌دهند. اندیس  $i$  و  $0i$  به ترتیب مربوط به اندازه این پارامترها برای اتم  $i$ ام در لحظه مورد نظر و لحظه اولیه می‌باشد.  $\varphi$ ،  $n$  و  $\gamma$  به ترتیب زاویه دایهدرال، ضریب بسیاری دایهدرال و تغییر فاز می‌باشند. پارامترهای  $K_r$ ،  $K_{\theta}$  و  $K_{\varphi}$  به ترتیب ثابت‌های نیرویی پیوند خطی، زاویه‌ای و دایهدرال می‌باشد. مقادیر این پارامترها با استفاده از روش‌های تجربی و محاسبات مکانیک کوانتومی بدست می‌آیند. محققان برای طیف وسیعی از پیوندها، این پارامترها را محاسبه و نتایج را در فایل‌های پارامتری ذخیره کرده اند [30-32]. یکی از مهمترین پایگاه‌های اطلاعاتی در این خصوص پایگاه اطلاعاتی چارم می‌باشد [31]. دو ترم آخر انرژی ناپیوندی بین دو اتم مجاور  $i$  و  $j$  (که به فاصله  $r_{ij}$  قرار گرفته‌اند) را توصیف می‌کند که به ترتیب شامل انرژی ناشی از نیروهای ون در والس (که با یک پتانسیل لنارد-جونز 6-12 توصیف شده است) و برخوردهای الکترواستاتیکی می باشد.  $R_{ij}^{\text{min}}$  بیان کننده فاصله بین دو اتم مجاور در جایی است که پتانسیل لنارد-جونز صفر است.  $\epsilon_{ij}$  عمق نمودار این انرژی را نشان می‌دهد. انرژی الکترواستاتیک کولمب نیز توسط  $D$  (ثابت دی الکتریک) و  $q_i$  (بار نسبی اتم  $i$ ) محاسبه می‌شود.

بعلاوه در حالتی که سیستم تحت یک نیروی خارجی قرار می‌گیرد ترم انرژی پتانسیل ناشی از این نیروی خارجی که بر روی یک یا چند اتم اعمال می شود به صورت یک ترم در معادله بالا اضافه می شود [33,34]. به این روش دینامیک مولکولی هدفمند گفته می شود. در واقع در این روش هدف مطالعه تغییر ساختاری (بیکربندی) مولکول تحت یک نیروی خارجی می

در برخورد بین لکوسیت و سلول اندوتلیال مؤثر می باشد [5,6]. در مرحله اول با تحریک سلول‌های اندوتلیال توسط بافت‌های عفونی، لکوسیت‌های سرگردان در جریان خون به سمت این سلول‌ها جذب می‌شوند. سپس مرحله غلتش لکوسیت روی سطح اندوتلیوم آغاز و سلول به سمت بافت عفونی هدایت می‌شود. این مرحله از مهم ترین بخش‌های دیاپدز محسوب می‌شود. مولکول‌های درگیر در این بخش عبارتند از پروتئین‌های گیرنده پی-سلکتین<sup>1</sup> (که روی سطح سلول اندوتلیال فعال شده گسترده شده‌اند) و با لیگاند گلیکوپروتئینی<sup>2</sup> متناظر خود به نام PSGL-1 (که روی سطح لکوسیت توزیع شده‌اند) تشکیل پیوند می‌دهند [7,8]. توالی در شکست پیوندهای پستی که با تشکیل پیوند جدید در جلوی لکوسیت جبران می‌شود، باعث ایجاد غلتش این سلول‌ها بر روی سطح اندوتلیوم عروقی و حرکت آنها به سمت بافت عفونی می‌شود. مطالعات متعدد طی سال‌های گذشته نشان دادند که فرایند تشکیل و شکست این پیوندها یک فرایند بیو شیمیایی و بیوفیزیکی می باشد [9-11]. لذا علاوه بر اتصالات بین مولکول‌های سطحی لکوسیت و اندوتلیال، یک سری سیگنال‌های متوالی و نیروی‌های مکانیکی نیز در انجام یک دیاپدز کارآمد درگیر هستند [12]. پیوند مابین پی-سلکتین و PSGL-1 از یک طرف تحت نیروهای اعمالی از طرف جریان خون عروقی و از طرف دیگر تحت نیروهای مولکولی قرار دارد. بالانس مابین این نیروها باعث شکست یا عدم شکست این پیوند می‌شود. بنابراین، بررسی این پیوند از دیدگاه مولکولی و شناخت مکانیزم جدایش آن از اهمیت خاصی برخوردار است. به این منظور مدل‌های ریاضی بسیاری جهت شبیه‌سازی فرایند غلتش لکوسیت در سیستم‌های میکروجریان ارائه شده است [13-17]. هدف اصلی این مطالعات بررسی اثر تنش برشی اعمالی از طرف جریان خون، تغییر فرم لکوسیت و دانسیته مولکول‌های چسبان بر سرعت غلتش لکوسیت و فرایند شکست پیوند مابین آن و اندوتلیال بوده است. همچنین، تحقیقات آزمایشگاهی بسیاری در زمینه تشخیص اثر نیروهای اعمالی بر جدایش این پیوند انجام شده است [18-21]. بدین منظور تکنیک‌های مختلفی از جمله میکروسکوپ ویدیویی، میکروسکوپ نیروی اتمی و انبرک نوری بکار گرفته شده است. بعلاوه در سال‌های اخیر، روش دینامیک مولکولی هدفمند<sup>3</sup> (اس ام دی)، برای مطالعه تغییر شکل مولکولی پیوند تحت نیروی اعمالی و نشان دادن ارتباط بین این دو استفاده شده است [22-26]. لو و همکارانش نشان دادند که جدایش ساختار بین پی سلکتین و PSGL-1، تحت نیروی کششی، پس از بهم ریختگی ساختار درونی مولکولی پی سلکتین رخ می‌دهد. بدین معنی که ابتدا ساختار این مولکول باز<sup>4</sup> می‌شود و پس از آن جدایش این مولکول از لیگاند مربوطه آغاز می شود [27]. آنها همچنین اثر سرعت کشش و جهت نیروی اعمالی بر جدایش سه نوع پیوند مختلف را بطور کیفی بررسی کردند [28]. بعلاوه، آنها اثر واحدهای توالی CR<sup>5</sup> بر دینامیک تغییر شکل پی سلکتین را بررسی کردند [29].

در این مقاله از روش دینامیک مولکولی هدفمند برای بررسی تغییر پیکر بندی پیوند پی سلکتین/PSGL-1 تحت کشش با سرعت ثابت استفاده شد. همچنین در مورد باقیمانده<sup>6</sup> های مؤثر در عملکرد این پیوند با استفاده از آنالیز نمودار انرژی‌های ناپیوندی<sup>7</sup> بحث می‌شود.

<sup>1</sup> P-selectin

<sup>2</sup> P-selectin Glycoprotein Ligand

<sup>3</sup> Steered Molecular Dynamics

<sup>4</sup> unfold

<sup>5</sup> Consensus Repeats

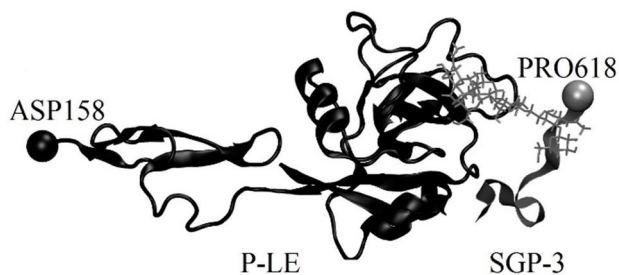
<sup>6</sup> Residue

<sup>7</sup> Non-bonded Energies

برنامه وی ام دی، در محیط آبی با ابعاد  $66.2 \times 67.4 \times 133.9 \text{ \AA}^3$  قرار داده شد تا امکان ایجاد پیکر بندی پایدار در محیط آبی فراهم شود. همچنین برای خنثی سازی سیستم و تعادل بار، به میزان 200 mM نمک کلرید سدیم به سیستم اضافه شد. در نهایت کل سیستم پس از انجام این عملیات از 57377 اتم تشکیل شده بود.

ساختار پیوند از دو بخش پروتئینی و قندی تشکیل شده است. جهت شبیه سازی دینامیک مولکولی به پارامترهای میدان نیرویی همه باقیمانده احتیاج است. پارامترهای میدان نیرویی گروه قندی در فایل par\_all36-carb.prm و پارامترهای نیرویی تمام باقیمانده های پروتئینی بجز تایروسین سولفات در فایل par\_all36-prot.prm در پایگاه اطلاعاتی چارم-1236 موجود می باشد. اما هیچ اطلاعاتی از میدان نیرویی باقیمانده تایروسین سولفات در این سایت موجود نمی باشد. لذا این پارامترها باید قبل از ادامه مسیر شبیه سازی بدست آورده شوند. برای این منظور از ابزار میدان نیرویی<sup>13</sup> نرم افزار وی ام دی استفاده شد [38]. مراحل اصلی در محاسبه این پارامترها به این روش عبارتند از: 1. ساخت پیکربندی تایروسین سولفات در وی ام دی، 2. حدس بار یونی اتم ها با استفاده از شباهت تایروسین سولفات با MS04 و Benz در فایل توپولوژی top-all36-cgenff.rtf، 3. بهینه سازی ساختار ساخته شده توسط نرم افزار کوانتومی گوسین، 4. اضافه کردن مولکول های آب و بهینه سازی بهینه سازی مجدد مکان اتم ها، 5. محاسبه مقادیر بار یونی اتم ها و ساخت فایل ساختاری مولکول، 6. بدست آوردن مقادیر میدان نیرویی (طول، مقدار زاویه ای و مقادیر دایهدرال).

سپس ساختار نهایی مولکول برای 5000 مرحله مینیمایز و پس از آن 3 نانوثانیه در انسامبل<sup>14</sup> دما و فشار ثابت<sup>15</sup> به تعادل رسانده شد. دمای سیستم توسط دینامیک لانژوین در 310 K ثابت نگه داشته شد و از باروستات نوز-هورر جهت کنترل فشار ثابت در 1 atm استفاده شد. مقدار ضریب میرایی در دینامیک لانژوین<sup>1</sup>  $1 \text{ ps}^{-1}$  و شعاع قطع  $11-14 \text{ \AA}$  در نظر گرفته شد. شرایط مرزی بصورت متناوب و اثر دوربرد نیروی الکتروستاتیکی با استفاده از روش



**Fig. 1** Secondary structure of P-LE/SGP-3 (P-LE is shown in black cartoon, SGP-3 peptide and glycan group are shown in gray Ribbon and Line, respectively, Two alpha carbon of terminal residues (ASP158 and PRO618) are shown in VDM representation)

شکل 1 نمایش ساختار ثانویه پیوند P-LE/SGP-3 (ساختار P-LE: در نمایش کارتونی<sup>16</sup> به رنگ سیاه، ساختار SGP-3 (واحد عملکردی PSGL-1): گروه پروتئینی و قندی به ترتیب در نمایش نواری<sup>17</sup> و خطی<sup>18</sup>، دو اتم آلفا کربن ترمینال ASP156 و PRO618 در نمایش وی دی دلبیو<sup>19</sup>)

باشد. روش دینامیک مولکولی هدفمند به دو صورت مختلف انجام می شود. در روش اول یک نیروی ثابت به یک اتم (یا تعدادی از اتم ها) اعمال می شود و در روش دوم یک و یا مرکز جرم چند اتم با یک قید هارمونیک (فنر مانند) به نقطه ای فرضی در فضا متصل می شود بگونه ای که با یک سرعت ثابت از پیش تعیین شده در جهت مشخص حرکت کند. این امر باعث می شود که بقیه اتم های محدود شده به این نقطه نیز از این جابجایی تبعیت کنند. برای گروهی از اتم ها که بصورت هارمونیک به حرکت با سرعت ثابت  $v$  در جهت  $\vec{n}$  و با ثابت نیرویی  $k$  مقید شده اند، یک ترم پتانسیل اضافی بکار برده می شود که از رابطه زیر بدست می آید.

$$\Delta U(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \dots, t) = \frac{1}{2} k [vt - (\vec{R}(t) - \vec{R}_0) \cdot \vec{n}]^2 \quad (3)$$

در این رابطه،  $\vec{R}(t)$  مرکز جرم کنونی اتم های اس ام دی و  $\vec{R}_0$  مرکز جرم اولیه و  $\vec{n}$  بردار یکه می باشد.

با مشخص شدن سیستمی از معادلات حرکت، با انتگرال گیری از معادلات در طول زمان، مکان هر اتم و تغییر پیکربندی مولکول قابل پیش بینی خواهد بود.

یکی از ابزارهایی که جهت حل معادلات حرکت سیستم های بیومولکولی ایجاد شده است برنامه دینامیک مولکولی نمود<sup>1</sup> می باشد [34] که همراه با برنامه گرافیک مولکولی وی ام دی<sup>2</sup> [35] کمک شایانی در شبیه سازی سیستم های پیچیده مولکولی می کند. نمود یک کد دینامیک مولکولی موازی است که جهت شبیه سازی سیستم های بیومولکولی بزرگ طراحی شده است. در این تحقیق از این برنامه جهت شبیه سازی جدایش یکی از پیوندهای بیولوژیکی مهم در بدن (که در بخش مقدمه توضیح داده شد) استفاده شد. در بخش روش انجام کار جزئیات بیشتری در مورد شبیه سازی این مسئله با استفاده از کد نمود ارائه شده است.

### 3- روش انجام کار

کوچکترین واحد عملکردی ساختار پی سلکتین/PSGL-1، به نام P-LE/SGP-3 بعنوان ساختار اولیه مورد مطالعه در نظر گرفته شد [25]. بدین منظور فایل حاوی مختصات اتمی (پی دی بی) ساختار مورد نظر از بانک اطلاعاتی پروتئین<sup>3</sup> با کد 1G1S استخراج شد [36]. این ساختار از دو بخش لکتین و فاکتور رشد اپیدرمال<sup>4</sup> مربوط به پی سلکتین و یک بخش با نام SGP-3 (که واحد عملکردی PSGL-1 می باشد) تشکیل شده است. SGP-3، شامل سه باقیمانده تایروسین سولفات شده<sup>5</sup> (TYS605, TYS607, TYS610) و یک گروه قندی متصل به باقیمانده THR616 می باشد. گروه قندی از 6 باقیمانده تشکیل شده که عبارتند از: دو گالاکتوز<sup>6</sup> (GAL)، یک گالاکتوزامین<sup>7</sup> (NGA)، یک گلوکوزامین<sup>8</sup> (NAG)، یک فوکوز<sup>9</sup> (FUC) و یک سیالیک اسید<sup>10</sup> (SIA). ساختار ثانویه پیوند در شکل 1 نشان داده شده است. با توجه به مطالعات قبلی پیوند P-LE و SGP-3 یک پیوند وابسته به کلسیم می باشد [37]. از این جهت یون استرانسیوم ( $\text{Sr}^{2+}$ ) موجود در فایل پی دی بی با یون کلسیم ( $\text{Ca}^{2+}$ ) جایگزین شد. سپس مولکول با استفاده از ابزار سولویت<sup>11</sup>

<sup>1</sup> NAMD

<sup>2</sup> Visual Molecular Dynamics (VMD)

<sup>3</sup> Protein Data Bank (PDB)

<sup>4</sup> Epidermal Growth Factor (EGF)

<sup>5</sup> Sulphated Tyrosine (TYS)

<sup>6</sup> galactose

<sup>7</sup> galactosamine

<sup>8</sup> glucosamine

<sup>9</sup> fucose

<sup>10</sup> sialic acid

<sup>11</sup> SOLVATE

<sup>12</sup> CHARMM36

<sup>13</sup> Force Field Toolkit

<sup>14</sup> Ensemble

<sup>15</sup> Isothermal-Isobaric

<sup>16</sup> Cartoon

<sup>17</sup> Ribbon

<sup>18</sup> Line

<sup>19</sup> VDW

از طرفی جهت بررسی کاربردی بودن میدان نیرویی جدید که توسط نویسندگان ایجاد شده و در کنار پارامترهای نیرویی برگرفته از چارم-36 استفاده شده است، RMSD بدون هیدروژن برای همه باقیمانده های گروه قندی در طول به تعادل رسانی بدست آورده شدند (شکل 3). با توجه به این نمودار، RMSD باقیمانده FUC در طول زمان به تعادل رسانی بدون تغییر باقی میماند که نشان از پیوند قوی و ساختار پایدار این باقیمانده دارد. باقیمانده های SIA و GLU (جهت اختصار نشان داده نشده) صرفنظر از ابتدای مسیر به یک مقدار ثابت می رسند و از لحاظ پیکربندی دچار تغییرات زیادی نمی شوند. در حالیکه بررسی باقیمانده های GAL نشان از انعطاف پذیری گروه های کربو هیدراتی این باقیمانده ها دارد. بنابراین انتظار می رود GAL نقش چندانی در چسبندگی پیوند نداشته باشد. این موضوع تأییدی بر صحت میدان نیرویی بکار برده شده می باشد زیرا تحقیقات گذشته نیز نشان دادند که باقیمانده GAL اهمیت قابل توجهی در چسبندگی پی سلکتین و SGP-3 ندارد [42,41].

#### 2-4- اثر سرعت کشیدن بر گزاره های ساختاری

جهت بررسی اثر سرعت جدایش، شبیه سازی های اس ام دی با سرعت های ثابت  $0.01$ ،  $0.1$  و  $0.5$  Å/ps انجام شده است. اتم آلفا کربن از باقیمانده ترمینال ASP158 بصورت ثابت در نظر گرفته شد و اتم آلفا کربن انتهایی از باقیمانده N-ترمینال PRO618 از پیپتید SGP-3 با سرعت ثابت کشیده شد. نتایج نیرو بر حسب تغییر طول پیوند برای این سه حالت مختلف در شکل 4 نشان داده شده است. شاخص تغییر طول بصورت اختلاف بین طول اولیه و نهایی پیوند در نظر گرفته شده است. همچنین، طول پیوند به فاصله میان اتم ترمینالی که ثابت در نظر گرفته شده و اتم انتهایی که کشیده می شود، اختصاص داده شده است.

نتایج نشان می دهد که در سرعت  $0.01$  Å/ps دو پیک نیرویی  $700$  pN در  $7.6$  Å و  $794$  pN در  $41.9$  Å مشاهده می شود. پیک نیرویی اول را می توان مربوط به تخریب داخل مولکولی فاکتور رشد اپیدرمال و مرز مشترک این بخش و بخش لکتین دانست و پیک نیرویی دوم را به لحظه جدا شدن دو مولکول اختصاص داد. در سرعت  $0.1$  Å/ps هم دو پیک نیرویی  $1510$  pN و  $1565$  pN در  $16$  Å و  $40$  Å مشاهده می شود با این تفاوت که به سمت راست نمودار متمایل شده اند. حال آنکه با افزایش سرعت پیک نیرویی اول نسبت به دوم افزایش می یابد که حاکی از آن است که با افزایش سرعت نیروی

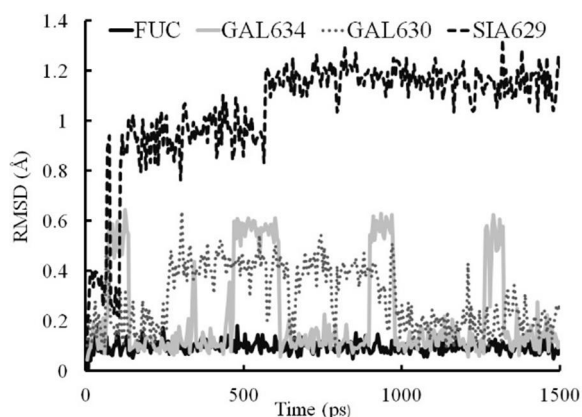


Fig.3 Time evaluations of RMSD of individual glycan residues during equilibrium processes

شکل 3 نمودار RMSD باقیمانده های گروه قندی در طول به تعادل رسانی

پی ام ای<sup>1</sup> در نظر گرفته شد. ضریب دی الکتریک یکتواخت<sup>2</sup> واحد در شبیه سازی ها بکار برده شد. تمامی شبیه سازی ها با نرم افزار نمد نسخه 2.9 انجام پذیرفت [39] و آنالیز داده های شبیه سازی توسط نرم افزار وی ام دی صورت گرفت. جهت بررسی نحوه جدایش پی سلکتین از PSGL-1 شبیه سازی های هدفمند دینامیک مولکولی (اس ام دی) انجام شده است. فرم ساختاری نهایی بدست آمده از بخش به تعادل رسانی، جهت ساختار اولیه در محاسبات اس ام دی استفاده شد. شبیه سازی های اس ام دی در انسامل کانونیکال<sup>3</sup> و به دو روش انجام گرفت. در روش اول اتم انتهایی P-LE به صورت ثابت و سرعت کششی بر اتم انتهایی SGP-3 اعمال شد. در روش دوم به منظور تمرکز بر جدایش باقیمانده های مرزی دو مولکول، 6 اتم بصورت ثابت در نظر گرفته شد و 6 اتم با سرعت ثابت کشیده شدند. ثابت فنر در محاسبات اس ام دی معادل  $10$  kcal/mol.Å<sup>2</sup> در نظر گرفته شد. همچنین نتایج شبیه سازی در سرعت های مختلف  $0.01$ ،  $0.1$ ،  $0.5$  Å/ps استخراج شده و اثر پارامتر سرعت بررسی شده است. در انتها با استفاده از آنالیز نمودار انرژی ناپیوندی در مورد مکانیزم جدایش ساختار مورد مطالعه و باقیمانده های مؤثر بحث شده است.

#### 4- نتایج

##### 1-4- وابستگی پیوند به یون کلسیم

انحراف جذر میانگین مربعات<sup>4</sup> (RMSD) از نتایج به تعادل رسانی شده مولکول در دو حالت با حضور یون کلسیم و بدون حضور این یون در شکل 2 نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می شود RMSD در حالتی که یون کلسیم در ساختار پیوند حضور دارد، به مقدار متوسط  $1.5$  Å رسیده است. در حالیکه با حذف این یون از ساختار مورد مطالعه، این پارامتر دارای مقدار متوسط بیشتری نسبت به حالت قبل می باشد. این مسئله حاکی از تاثیر پیوند بین یون کلسیم و باقیمانده های اطراف در پایداری سیستم می باشد. بعلاوه تأییدی بر نتایج مطالعات آزمایشگاهی است که پیوند بین پی سلکتین و PSGL-1 را یک پیوند وابسته به یون کلسیم معرفی کرده است [40].

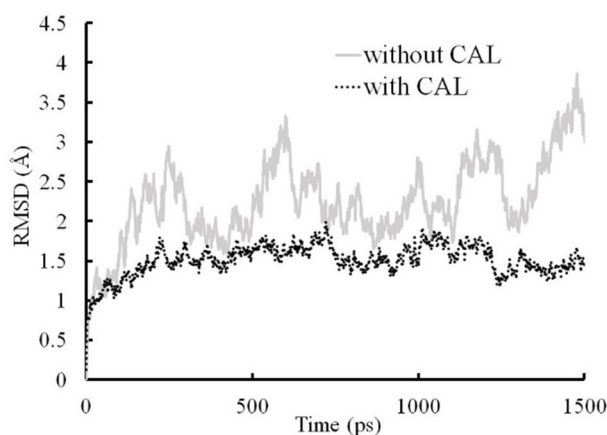


Fig. 2 Time evaluations of RMSD during equilibrium processes for two cases of with and without calcium ion

شکل 2 نمودار RMSD در طول به تعادل رسانی برای دو حالت با حضور و بدون حضور یون کلسیم در ساختار P-LE/SGP-3

<sup>1</sup> PME (Particle Mesh Ewald)

<sup>2</sup> uniform dielectric constant

<sup>3</sup> Canonical (NVT)

<sup>4</sup> Root Mean Square Deviation

حجم محاسبات بالایی (با توجه به بزرگ شدن جعبه آب مورد نیاز) لازم بود تا جدایش دو مولکول بطور کامل اتفاق بیفتد. لذا به منظور کاهش زمان و با هدف بررسی باقیمانده های مؤثر در جدایش و برای جلوگیری از کشیدگی پی سلکتین تعداد 6 اتم از این مولکول بصورت ثابت در نظر گرفته شدند که با رنگ مشکی در شکل 6 نشان داده شده اند. این اتم ها عبارتند از آلفا کربن های باقیمانده های ASP158, ASP124, THR141, PRO43, ASP106, ALA9. همچنین جهت اعمال سرعت ثابت به جای یک اتم، شش اتم از سمت SGP-3 انتخاب شدند تا زمان جدایش سریعتر اتفاق افتد. این اتم ها عبارتند از آلفا کربن های باقیمانده های PRO618, NAG631, SIA629, PRO614, TYS607, ASP611 که با رنگ قرمز نشان داده شده اند.

به منظور بررسی مکانیزم جدایش P-LE از پپتید SGP-3، از آنالیز نمودار انرژی ناپیوندی استفاده شد. برای این منظور تغییرات انرژی ناپیوندی باقیمانده هایی که در مرز P-LE و SGP-3 قرار گرفته اند بدست آمده و میزان اهمیت آنها در جدایش ساختار مورد مطالعه بررسی شد. این باقیمانده ها که تعدادی از آنها در شکل 7 نشان داده شده است عبارتند از باقیمانده های گروه قندی، تیروسین ها، یون کلسیم و باقیمانده های مجاور آن. پر واضح است که برای ایجاد جدایش ساختار مورد بحث باید پیوند ما بین باقیمانده های مرزی شکسته شوند.

بطور کلی پیوندهای اصلی مهم در این ساختار عبارتند از پیوند های غیر کووالانسی که شامل پیوندهای هیدروژنی، برخوردهای ون در والس و پیوندهای الکترواستاتیک مابین پی سلکتین و لیگاند SGP-3 می باشد. با قرار گرفتن ساختار تحت کشش با سرعت ثابت پیوندهای هیدروژنی موجود در ابتدا می شکنند. تغییر تعداد پیوندهای هیدروژنی با زمان در شکل 8 نشان داده شده است. ساختار در ابتدا توسط 7 پیوند هیدروژنی بین باقیمانده هایی که در مرز پی سلکتین با باقیمانده های تیروسین سولفات و گروه قندی از لیگاند SGP-3 قرار گرفته، پایدار شده است. اما در طول شبیه سازی تغییر پیکربندی مولکول منجر به شکست این پیوندها می شود.

با توجه به نتایج کریستالوگرافی بدست آمده از مطالعات قبل باقیمانده GAL630 با باقیمانده های TYR94 و GLU92 و همچنین باقیمانده SIA از گروه قندی با باقیمانده TYR48 تشکیل پیوند هیدروژنی می دهند [25]. مطالعه حاضر نیز با توجه به نتایج انرژی ناپیوندی حاکی از آن است که



**Fig.6** Snapshots of the dissociation of SGP-3 from P-LE with 6 atoms of P-LE considered as fixed and 6 atoms of SGP-3 stretched with constant velocity at 0.01 Å/ps (fixed and stretches atoms are shown in black and silver VDW, respectively)

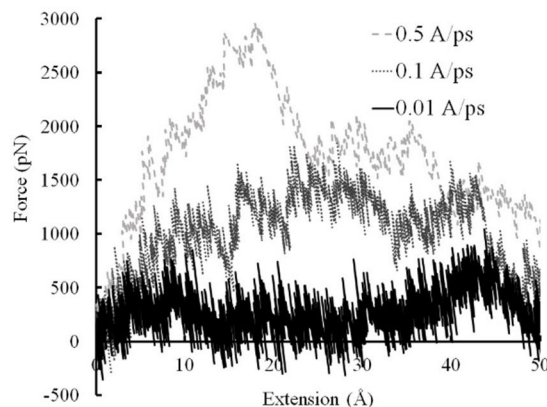
شکل 6 تصاویر لحظه ای جدایش SGP-3 از P-LE تحت کشش 6 اتم از SGP-3 (در نمایش VDW به رنگ قرمز ای) با سرعت ثابت 0.01 Å/ps و ثابت نگهداشتن 6 اتم از P-LE (در نمایش VDW به رنگ سیاه)

شکست بیشتر و تخریب فاکتور رشد اپیدرمال کاهش می یابد. در نتیجه، سرعت بالاتر باعث افزایش نیروی شکست و تخریب کمتر این بخش و مرز مشترک آن با لکتین قبل از شکست بین مولکولی می شود.

شکل 5 تصاویر لحظه ای جدایش ساختار تحت کشش با سرعت 0.01 Å/ps را نشان می دهد. همانطور که ملاحظه می شود قبل از جدایش پی سلکتین از SGP-3 ابتدا تمام نیروی اعمالی صرف باز شدن صفحه بتا<sup>1</sup> در پی سلکتین شده است و جدایش اصلی بین دو مولکول پس از آن رخ خواهد داد. این موضوع بدلیل خاصیت الاستیک پی سلکتین رخ می دهد که نتایج آزمایشگاهی گذشته نیز به این موضوع اشاره داشته اند [43]. از این رو به منظور بررسی مکانیزم جدایش به جای در نظر گرفتن یک اتم ثابت، چند اتم دیگر از پی سلکتین نیز بصورت ثابت در نظر گرفته شد که در بخش بعدی به آن پرداخته خواهد شد.

### 3-4- مکانیزم جدایش

نتایج بخش قبل نشان داد که با قرار گرفتن ساختار تحت کشش، بهم ریختگی درون مولکولی پروتئین پی سلکتین قبل از شکست بین مولکولی پی سلکتین و SGP-3 رخ می دهد. بنابراین، در شبیه سازی های حاضر زمان و



**Fig.4** Force versus extension profiles at three different velocities (0.01, 0.1 and 0.5 Å/ps)

شکل 4 نمودار تغییرات نیرو بر حسب تغییر طول برای سه سرعت مختلف 0.01، 0.1 و 0.5 Å/ps



**Fig.5** Snapshots of the dissociation of SGP-3 from P-LE with 1 fixed atom of P-LE (shown in black VDW) and 1 pulling atom of SGP-3 (shown in silver VDW) with constant velocity at 0.01 Å/ps

شکل 5 تصاویر لحظه ای جدایش SGP-3 از P-LE تحت کشش یک اتم ترمینال از SGP-3 با سرعت ثابت 0.01 Å/ps و ثابت نگهداشتن اتم ترمینال دیگر از P-LE

<sup>1</sup> Beta sheet



شکل 10 نشان داده شده است. مقدار منفی انرژی ما بین این باقیمانده و یون کلسیم حاکی از اهمیت یون کلسیم در برقراری پیوند ما بین این دو مولکول است. سپس همانطور که در نمودار مشاهده می شود پیوند بین یون کلسیم و باقیمانده فوکوز شکسته می شود که منجر به جدایش نهایی دو مولکول می شود. نتایج کریستالوگرافی موجود در مطالعات گذشته نیز گویای آن است که یون کلسیم توسط گروه هیدروکسیلی FUC داخل سیالیل-لویس ایکس<sup>1</sup> احاطه شده که این گروه میزان زیادی از انرژی اتصال را ایجاد می کند.

بعلاوه مطالعه حاضر نشان داد که بین باقیمانده LYS112 با GLU609 و GLU606 پیوند پل نمکی برقرار است که با وجود اینکه بیشترین انرژی پیوند بین آنها برقرار است اما در همان ابتدا می شکنند (شکل 11). این موضوع به دلیل تغییر در پیکربندی ساختار و محل قرار گرفتن این باقیمانده ها رخ می دهد که منجر به کاهش ناگهانی انرژی مابین آنها می شود.

یکی دیگر از باقیمانده هایی که اثر قابل توجهی در اتصال بین مولکولی ساختار مورد نظر ایفا می کند باقیمانده های تایروسین سولفاته شده (TYS) می باشند. این ساختار از 3 باقیمانده تایروسین سولفاته شده تشکیل شده است که تغییرات انرژی ناپیوندی مهمترین پیوندهای مذکور در شکل 12

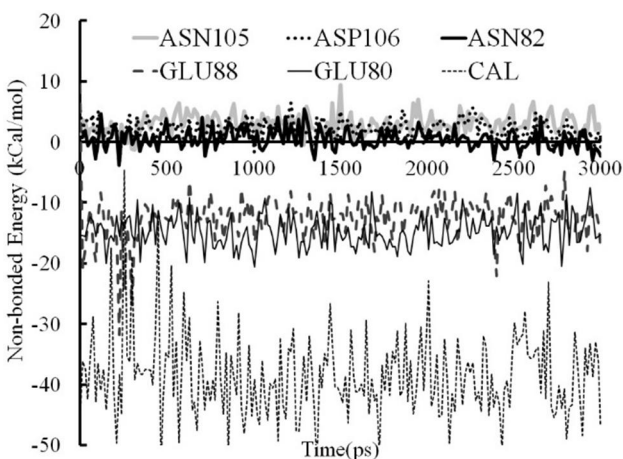


Fig. 10 The variation of non-bonded energies between FUC and CAL ion and its nearby residues during equilibration

شکل 10 تغییرات انرژی ناپیوندی بین باقیمانده FUC با یون CAL و باقیمانده های مجاور این یون در طول به تعادل رسانی

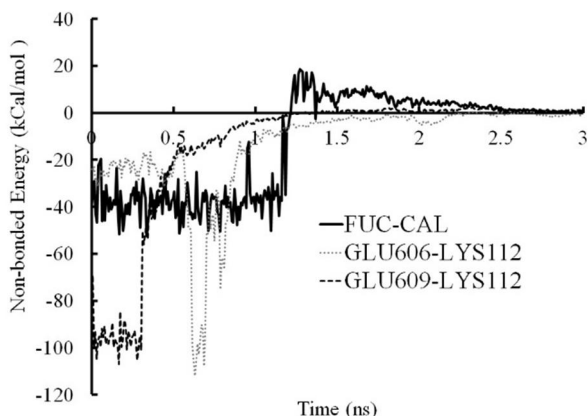


Fig. 11 The variation of non-bonded energies of the most effective residues in dissociation during pulling with constant velocity

شکل 11 تغییرات انرژی ناپیوندی بین باقیمانده های مرزی که بیشترین تأثیر را در جدایش ایفا می کنند در طی کشیدن ساختار تحت کشش با سرعت ثابت

<sup>1</sup> Sialyl-Lewis X (SLe<sup>x</sup>)

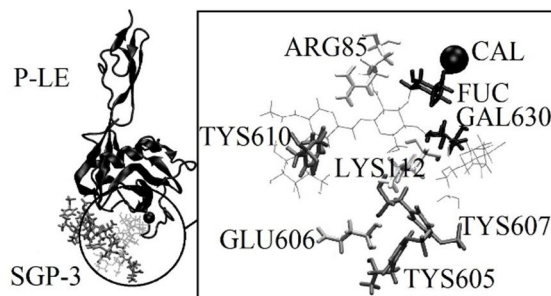


Fig.7 P-LE/SGP-3 interface residues including calcium ion and its near residues

شکل 7 نمایش تعدادی از باقیمانده های مرزی بین SGP-3 و P-LE (یون کلسیم و باقیمانده های مجاور آن و همچنین باقیمانده های TYS)

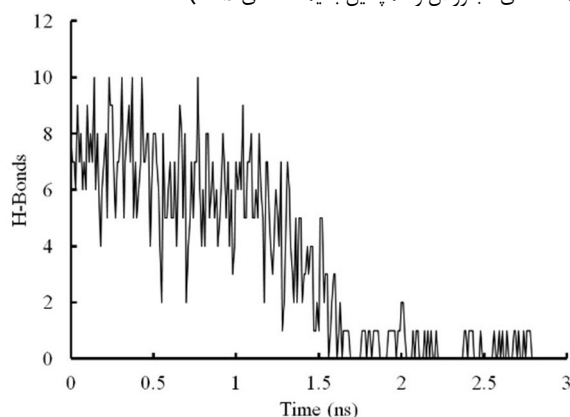


Fig.8 Changes in the number of hydrogen bonds during simulation

شکل 8 تغییر تعداد پیوندهای هیدروژنی طی فرایند کشش مولکول

باقیمانده TYR94 و GAL تشکیل یک پیوند ضعیف می دهند و پیوند بین این دو زودتر می شکنند (شکل 9). بعد از آن شکست بین مولکولی با شکست پیوند های هیدروژنی مابین TYR48 و SIA629 رخ می دهد و در نهایت پیوند بین GAL630 از گروه قندی و GLU92 از زنجیره P-LE جدا می شود. یکی از باقیمانده های مرزی، فوکوز از گروه قندی می باشد که همانطور که در شکل 7 نشان داده شده بود، در مجاورت یون کلسیم و باقیمانده های مرزی P-LE قرار دارد. نمودار انرژی ناپیوندی این باقیمانده با یون کلسیم و باقیمانده های اطراف این یون که در فاصله 5 Å از آن قرار گرفته اند در نمودار

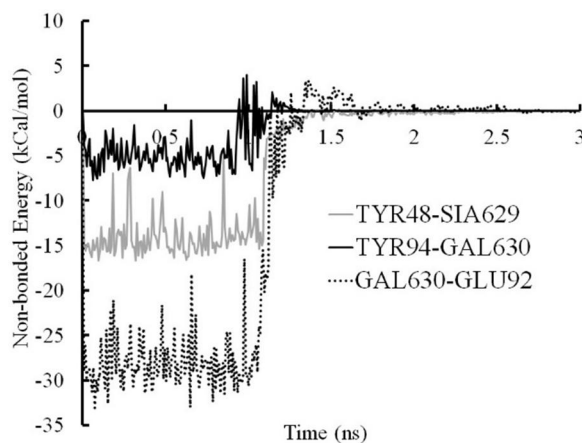
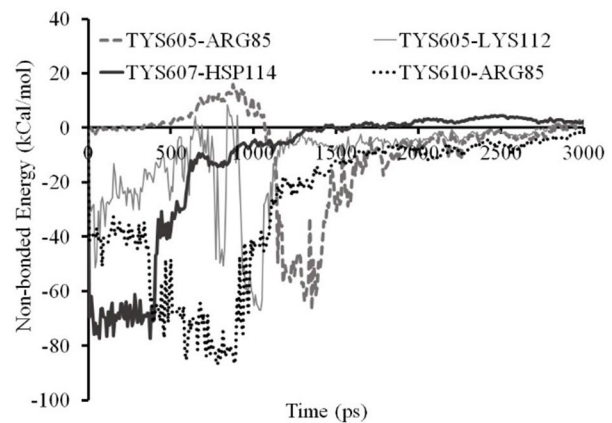


Fig. 9 The variation of non-bonded energies of some interface residues during pulling with constant velocity

شکل 9 تغییرات انرژی ناپیوندی بین بعضی از باقیمانده های مرزی طی کشیدن ساختار تحت کشش با سرعت ثابت

- [4] T. A. Springer, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm, *Cell*, Vol. 76, No. 2, pp. 301-314, 1994.
- [5] K. Ley, Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process, *Cardiovascular Research*, Vol. 32, No. 4, pp. 733-742, 1996.
- [6] K. Ley, Integration of inflammatory signals by rolling neutrophils, *Immunological reviews*, Vol. 186, No. 1, pp. 8-18, 2002.
- [7] K. Ley, P. Gaetgens, C. Fennie, M. S. Singer, L. A. Lasky, S. D. Rosen, Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo, *Blood*, Vol. 77, No. 12, pp. 2553-2555, 1991.
- [8] K. L. Moore, N. L. Stults, S. Diaz, D. F. Smith, R. D. Cummings, A. Varki, R. P. McEver, Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells, *The Journal of cell biology*, Vol. 118, No. 2, pp. 445-456, 1992.
- [9] K. E. Caputo, D. A. Hammer, Effect of microvillus deformability on leukocyte adhesion explored using adhesive dynamics simulations, *Biophysical journal*, Vol. 89, No. 1, pp. 187-200, 2005.
- [10] E. A. Evans, D. A. Calderwood, Forces and bond dynamics in cell adhesion, *Science*, Vol. 316, No. 5828, pp. 1148-1153, 2007.
- [11] W. E. Thomas, V. Vogel, E. Sokurenko, Biophysics of catch bonds, *Biophysics*, Vol. 37, No. 1, pp. 399-416, 2008.
- [12] K. Konstantopoulos, S. N. Thomas, Cancer cells in transit: the vascular interactions of tumor cells, *Annual review of biomedical engineering*, Vol. 11, pp. 177-202, 2009.
- [13] D. A. Hammer, S. M. Apte, Simulation of cell rolling and adhesion on surfaces in shear flow: general results and analysis of selectin-mediated neutrophil adhesion, *Biophysical Journal*, Vol. 63, No. 1, pp. 35, 1992.
- [14] H. Hassani-Ardekani, H. Niroomand-Oscuii, D. Khismatullin, computational determination of the detachment time of the leukocyte under different kinetic dissociation rate parameters, *Journal of Biological Systems*, Vol. 23, No. 03, pp. 457-469, 2015.
- [15] S. Jadhav, C. D. Eggleton, K. Konstantopoulos, A 3-D computational model predicts that cell deformation affects selectin-mediated leukocyte rolling, *Biophysical journal*, Vol. 88, No. 1, pp. 96-104, 2005.
- [16] D. B. Khismatullin, G. A. Truskey, A 3D numerical study of the effect of channel height on leukocyte deformation and adhesion in parallel-plate flow chambers, *Microvascular research*, Vol. 68, No. 3, pp. 188-202, 2004.
- [17] D. B. Khismatullin, G. A. Truskey, Three-dimensional numerical simulation of receptor-mediated leukocyte adhesion to surfaces: Effects of cell deformability and viscoelasticity, *Physics of Fluids (1994-present)*, Vol. 17, No. 3, pp. 031505, 2005.
- [18] R. Alón, D. A. Hammer, T. A. Springer, Lifetime of the P-selectin-carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow, *Nature*, Vol. 374, No. 6522, pp. 539-542, 1995.
- [19] S. Chen, T. A. Springer, An automatic braking system that stabilizes leukocyte rolling by an increase in selectin bond number with shear, *The Journal of cell biology*, Vol. 144, No. 1, pp. 185-200, 1999.
- [20] E. Evans, A. Leung, V. Heinrich, C. Zhu, Mechanical switching and coupling between two dissociation pathways in a P-selectin adhesion bond, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101, No. 31, pp. 11281-11286, 2004.
- [21] B. T. Marshall, M. Long, J. W. Piper, T. Yago, R. P. McEver, C. Zhu, Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules, *Nature*, Vol. 423, No. 6936, pp. 190-193, 2003.
- [22] K. N. Gunnerson, Y. V. Pereverzev, O. V. Prezhd, Atomistic simulation combined with analytic theory to study the response of the P-selectin/PSGL-1 complex to an external force, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 113, No. 7, pp. 2090-2100, 2009.
- [23] Y. Kang, S. Lü, P. Ren, B. Huo, M. Long, Molecular dynamics simulation of shear-and stretch-induced dissociation of P-selectin/PSGL-1 complex, *Biophysical journal*, Vol. 102, No. 1, pp. 112-120, 2012.
- [24] S. Lu, M. Long, Forced dissociation of selectin-ligand complexes using steered molecular dynamics simulation, *MCB-Tech SciencePress*, Vol. 2, No. 4, pp. 161, 2005.
- [25] W. S. Somers, J. Tang, G. D. Shaw, R. T. Camphausen, Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed



**Fig. 12** The variation of non-bonded energies between sulphated tyrosines and their nearby residues

شکل 12 تغییرات انرژی ناپیوندی بین تایروسین سولفات شده و باقیمانده های مجاور

نشان داده شده است. ملاحظه می شود که انرژی بالای بین این باقیمانده ها و باقیمانده های مجاور آن ها وجود دارد. بررسی تغییرات انرژی ناپیوندی این باقیمانده ها نشان می دهد که در ابتدا بین TYS607 و HSP114 پیوندی قوی (حدود 80 kCal/mol) برقرار است اما با شکست این پیوند و قرارگیری باقیمانده ARG85 در مجاورت TYS610 پیوند محکمی بین این دو برقرار شد. بطور مشابه، بعد از شکست این پیوند و همچنین شکست پیوند TYS605-LYS112، دو باقیمانده TYS605 و ARG85 با تغییر ایجاد شده در محل قرار گیری پیوند قابل توجهی تشکیل می دهد که در نهایت با ادامه کشیدگی این پیوند هم می شکند که منجر به جدایش ساختار می شود.

## 5- بحث و نتیجه گیری

شبه سازی ها نشان می دهد که جدایش ساختار وابسته به کشش مولکولی می باشد. در حالی که تخریب ساختار داخل مولکولی در P-LE/SGP-3 اساسا در نتیجه باز شدن ساختار مولکولی پی سلکتین رخ می دهد، جدایش بین مولکولی اساسا با جدا شدن باقیمانده FUC از یون کلسیم رخ می دهد. تغییرات پیکربندی در طول جدایش نیرویی وابسته به سرعت کشش می باشد. این مطالعه دید بهتری را در فهم تغییرات پیکر بندی و شناخت باقیمانده های مؤثر در برخوردهای گیرنده-لیگاند تحت نیروهای خارجی ایفا می کند.

نتایج نشان می دهد که انرژی ناپیوندی بین دو بخش P-LE و پپتید SGP-3 بیشترین مقدار را در میان بقیه باقیمانده های مرزی دارد. سپس، پیوندهای هیدروژنی بین یون کلسیم و باقیمانده فوکز از گروه قندی و همچنین بین باقیمانده های تایروسین از لیگاند SGP-3 بیشترین اثر را در اتصال بین مولکولی ایفا می کنند. همچنین مشاهده می شود که جدایش پی سلکتین از SGP-3 با شکست پیوند بین یون کلسیم و باقیمانده FUC رخ می دهد.

## 6- مراجع

- [1] T. A. Springer, Adhesion receptors of the immune system, *Nature*, Vol. 346, No. 6283, pp. 425-434, 1990.
- [2] R. P. McEver, Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation, *Thrombosis and haemostasis*, Vol. 86, No. 3, pp. 746-756, 2001.
- [3] R. P. McEver, Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow, *Current opinion in cell biology*, Vol. 14, No. 5, pp. 581-586, 2002.

- chemistry, Vol. 26, No. 16, pp. 1781-1802, 2005.
- [35] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD: visual molecular dynamics, *Journal of molecular graphics*, Vol. 14, No. 1, pp. 33-38, 1996.
- [36] F. C. Bernstein, T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, M. Tasumi, The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures, *Archives of biochemistry and biophysics*, Vol. 185, No. 2, pp. 584-591, 1978.
- [37] J. Geng, G. Heavner, R. McEver, Lectin domain peptides from selectins interact with both cell surface ligands and Ca<sup>2+</sup> ions, *Journal of biological chemistry*, Vol. 267, No. 28, pp. 19846-19853, 1992.
- [38] C. G. Mayne, J. Saam, K. Schulten, E. Tajkhorshid, J. C. Gumbart, Rapid parameterization of small molecules using the Force Field Toolkit, *Journal of Computational Chemistry*, Vol. 34, No. 32, pp. 2750-2770, 2013.
- [39] L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar, R. Brunner, A. Gursoy, N. Krawetz, J. Phillips, A. Shinozaki, K. Varadarajan, K. Schulten, NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics, *Journal of Computational Physics*, Vol. 151, No. 1, pp. 283-312, 1999.
- [40] K. Drickamer, Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins, *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 263, No. 20, pp. 9557-9560, 1988.
- [41] K. N. Kirschner, R. J. Woods, Solvent interactions determine carbohydrate conformation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 98, No. 19, pp. 10541-10545, 2001.
- [42] M. Kuttel, J. W. Brady, K. J. Naidoo, Carbohydrate solution simulations: producing a force field with experimentally consistent primary alcohol rotational frequencies and populations, *Journal of computational chemistry*, Vol. 23, No. 13, pp. 1236-1243, 2002.
- [43] B. T. Marshall, K. K. Sarangapani, J. Wu, M. B. Lawrence, R. P. McEver, C. Zhu, Measuring molecular elasticity by atomic force microscope cantilever fluctuations, *Biophysical journal*, Vol. 90, No. 2, pp. 681-692, 2006.
- by structures of P-and E-selectin bound to SLe X and PSGL-1, *Cell*, Vol. 103, No. 3, pp. 467-479, 2000.
- [26] A. M. Naserian-Nik, M. Tahani, Study of nanomechanical behavior of double-stranded DNA molecule under tensile forces, *Modares Mechanical Engineering*, Vol. 14, No. 12, pp. 104-112, 2015. (in Persian)
- [27] S. Lü, Y. Zhang, M. Long, Visualization of allostery in P-selectin lectin domain using MD simulations, *PloS one*, Vol. 5, No. 12, pp. e15417, 2010.
- [28] S. Lü, L. Mian, Forced extension of P-selectin construct using steered molecular dynamics, *Chinese Science Bulletin*, Vol. 49, No. 1, pp. 10-17, 2004.
- [29] S. Lü, S. Chen, D. Mao, Y. Zhang, M. Long, Contribution of the CR Domain to P-Selectin Lectin Domain Allostery by Regulating the Orientation of the EGF Domain, *PloS one*, Vol. 10, No. 2, pp. e0118083, 2015.
- [30] H. J. Berendsen, D. van der Spoel, R. van Drunen, GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation, *Computer Physics Communications*, Vol. 91, No. 1, pp. 43-56, 1995.
- [31] A. D. MacKerell Jr, D. Bashford, M. Bellott, R. L. Dunbrack Jr, J. D. Evanseck, M. J. Field, S. Fischer, J. Gao, H. Guo, S. Ha, All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins†, *The journal of physical chemistry B*, Vol. 102, No. 18, pp. 3586-3616, 1998.
- [32] S. J. Weiner, P. A. Kollman, D. A. Case, U. C. Singh, C. Ghio, G. Alagona, S. Profeta, P. Weiner, A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 106, No. 3, pp. 765-784, 1984.
- [33] J. Phillips, T. Isgro, M. Sotomayor, E. Villa, *Namd tutorial*, Windows Version. University of Illinois. NIH Resource for Macromolecular Modelling and Bioinformatics Beckman Institute, 2007.
- [34] J. C. Phillips, R. Braun, W. Wang, J. Gumbart, E. Tajkhorshid, E. Villa, C. Chipot, R. D. Skeel, L. Kale, K. Schulten, Scalable molecular dynamics with NAMD, *Journal of computational*