

مطالعه و بررسی برهمکنش‌های پروتوبورفیرین IX (HEM) و فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) زنجیره تنفسی سیتوکروم B در گونه گوسفند

Investigating the Interactions Between Protoporphyrin IX (HEM) and Flavin Mononucleotide (FMN) in the Cytochrome B Respiratory Chain of Sheep

جمال فیاضی^۱، مریم شریعت^{۲*}، سعید نیسی^۲

۱- استاد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- دانشجویان دکتری، ژنتیک و اصلاح نژاد دام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

Fayazi J¹, Shariat M^{*2}, Neysi S²

۱- Professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan

۲- PhD Students, of genetics and animal breeding, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Maryamshariat00@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۰۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹)

چکیده

سیتوکروم B به عنوان بخشی از زنجیره انتقال الکترون نقش دارد و با توجه به اینکه این ژن منجر به تولید انرژی در دام و افزایش بازدهی می‌شود، شناخت مناسب قرین عوامل مؤثر بر این ژن و مقایسه بهترین لیگاندهای کاربردی در مسیر چرخه انتقال الکترون، می‌تواند باعث افزایش و بهبود تولیدات دامی و مطالعه کاربردی ژنتیکی شود. در این پژوهش برهمکنش‌های پروتوبورفیرین و فلاوین مونونوکلئوتید در ترکیب با سیتوکروم B با استفاده از داکینگ مولکولی شبیه‌سازی شد تا با مقایسه دو لیگاند کاربردی، مؤثرترین لیگاند در انتقال الکترون انتخاب شود. نتایج داکینگ مولکولی و بررسی نتایج حاصل با استفاده از سرورهای آنلاین نشان داد که پروتوبورفیرین دارای بیشترین تعداد اسید آمینه شرکت‌کننده در تعامل الکترو استاتیک و هیدروفوبی نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید می‌باشد و با توجه به نتایج بدست آمده داکینگ مولکولی از لحاظ بهترین انرژی اتصال (Binding enregy) مقایسه و بهترین پوز با منفی قرین انرژی و بزرگ قرین عدد که بهترین اتصال کمپلکس لیگاند و پروتئین را نشان می‌دهد، پروتوبورفیرین دارای منفی قرین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود و می‌توان گفت بیشتر بودن تعداد ایترکشن‌ها و پیوندهای تشکیل شده از ترکیب پروتوبورفیرین با سیتوکروم B می‌تواند صحت و تایید این ادعا باشد. آرژینین دارای بار مشت زیادی می‌باشد و در تشکیل پیوند هیدرژنی که احتمال باعث افزایش تعامل الکترواستاتیک در ترکیب پروتوبورفیرین با سیتوکروم B شده باشد. شبکه برهمکنش پروتئینی سیتوکروم B پیشگویی شده براساس پروتئین‌های میتوکندری، ۱۰ پروتئین دارای امتیاز بالا از نظر درجه گره بالقوه معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی

پروتوبورفیرین

داکینگ مولکولی

سیتوکروم B

شبیه سازی

فلاوین مونونوکلئوتید

گوسفند

مقدمه

وظیفه انتقال الکترون‌ها را در زنجیره انتقال الکtron تنفس سلولی بر عهده دارند (Le and Nguye. 2019). کوفاکتور فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) بیش از ۸۰ سال پیش کشف شد. آنزیم‌های حاوی فلاوین تقریباً ۱٪ پروتئین‌های سلولی را تشکیل می‌دهند (Leys and Scrutton 2016; Piano et al. 2017; Walsh and Wencewicz 2013). نقش مهمی در فرآیندهای بیولوژیکی متنوع از جمله واکنش‌های اکسایش و کاهش ایفا می‌کند و اغلب Mansoorabadi et al. به عنوان یک مکمل غذایی استفاده می‌شود (2007). ریبوفلاوین یکی از چندین گروه پروستیک یا فاکتورهای مشترک در زنجیره انتقال الکtron است. کمپلکس دوم موسوم به سوکسینات دهیدروژناز، کمپلکس II مستقیماً FADH₂ را دریافت می‌کند، این حامل الکترونی نمی‌تواند از کمپلکس I عبور کند. ترکیبی که کمپلکس‌های اول و دوم را به کمپلکس سوم متصل می‌کند، یوبی کینون (Ubiquinone Q) نام دارد. این مولکول که به کوآنزیم کیو (Q) نیز معروف است، محلول در چربی بوده و آزادانه از طریق هسته آبگریز غشا حرکت می‌کند. کمپلکس ۳ موسوم به سیتوکروم اکسیدوردوکتاز، از سیتوکروم b، پروتئین حاوی آهن - گوگرد (Fe-S) به نام مرکز Rieske و پروتئین سیتوکروم c تشکیل شده است. کمپلکس چهارم از پروتئین‌های سیتوکروم a₃ و a₁ تشکیل شده است. این مجموعه شامل دو Baradaran et al. 2013; Iwata et al. 1995; sun et al. 2005; Tsukihara et al. 1996 مطالعات زیادی در زمینه ساختار کمپلکس ۱ به عنوان بزرگترین کمپلکس زنجیره انتقال الکtron انجام شده است. CI. یک کمپلکس پروتئین غشایی با ۴۵ زیر واحد پروتئینی برای تشکیل دو بازو، یکی در غشاء داخلی و دیگری در ماتریکس میتوکندری، با یکدیگر ادغام شده‌اند (Hirst 2013; Sazanov 2015). کرایو توموگرافی الکترونی بر روی میتوکندری پستانداران، گیاهان و مخمرها نشان داد که آبر کمپلکس II SCI+III₂ بیشترین حفاظت ساختاری را دارد (Davies et al. 2018). شواهد بر خلاف فرضیه نقش مهم کانال‌های سوبسترا در زنجیره تنفسی استوار است، بهویژه برخلاف تصوری که نشان می‌داد دو مخزن Enrique 2016; Lapuente-Brun et al. 2013 در IMM وجود دارد (CoQ در FMN شکل بیولوژیکی فعال ویتامین 2B است. این انزیم‌ها

ژن سیتوکروم b دارای کدون‌هایی با سرعت تکاملی بالا و کدون‌هایی با سرعت تکاملی پایین می‌باشد و نیز دارای بخش‌هایی خیلی متغیر و هم خیلی حفاظت شده است. بنابراین این ژن برای پاسخ به انواع سوالات سیستماتیکی از فیلوژنی در سطح بالا تجمعیت‌ها و سطوح تازه جدا شده به کار برده می‌شود. البته معایبی نظیر انحراف در ترکیب بازهای آن، ترتیب تغییرات در بین لاین‌ها، اشباع در موقعیت کدون سوم و تغییرات محدود در موقعیت کدون اول و دوم را دارد که باعث می‌شود در سطوح بالای فیلوژنی اطلاعات کمتری بدهد و در سطوح جمعیت، در موقعیت کدون سوم دارای جایگاه‌های اطلاع‌رسان کمتری باشد (Sultana et al. 2004).

سیتوکروم b در بر گیرنده حدود ۳۸۰ آمینواسید می‌باشد، در همه بافت‌های زنده یافت شده و به سه نوع اصلی a، b و c تقسیم‌بندی می‌شوند. میزان هر یک از انواع بر حسب میزان فعالیت تنفسی بافت متفاوت است. (Kocher et al. 1984) در میتوکندری قلب پستانداران، اغلب کمپلکس ۱ (CI) با کمپلکس CIII و CIV در ارتباط بوده و آبر کمپلکسی تحت عنوان SC I+III₂+IV تشکیل می‌دهند. برخی نیز فقط در ارتباط با CIII (SC I+III₂) یافت می‌شود. مطالعات اخیر ساختار و نقش کمپلکس‌ها را در تنفس میتوکندری پستانداران روشن کرده است (Gu et al. 2016; Guo et al. 2017; Letts et al. 2016b; Sousa et al. 2016; Wu et al. 2016). تنفس سلولی هوایی، فرآیندی که طی آن سلول‌ها الکترون‌ها را از قندها، چربی‌ها و پروتئین‌ها به اکسیژن مولکولی (O₂) منتقل می‌کند، در سوخت و ساز انرژی همه یوکاریوت‌ها و بسیاری از پروکاریوت‌ها نقش اساسی دارد. مراحل پایانی تنفس هوایی در میتوکندری انجام می‌شود. زنجیره انتقال الکtron میتوکندری (ETC) مجموعه‌ای از غشاء داخلی میتوکندری (IMM)، واکنش‌های انتقال الکtron انتهایی را کاتالیز می‌کند. زنجیره انتقال الکtron میتوکندری (ETC) از چهار کمپلکس پروتئین غشایی بزرگ تشکیل شده است: کمپلکس اول NADH دهیدروژناز، موسوم به کمپلکس I، از فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) و پروتئین حاوی آهن-گوگرد (Fe-S) تشکیل شده است FMN شکل بیولوژیکی فعال ویتامین 2B است. این انزیم‌ها

باشدند. هدف از این پژوهش بررسی برهمنش‌های موجود بین سیتو کروم B، پروتوبورفیرین و فلاوین مونونوکلئوتید دوتا از لیگاندهای مؤثر در زنجیره تنفسی میتوکندری از طریق داکینگ ملکولی و انتخاب بهترین ترکیب برای انتقال الکترون می‌باشد.

مواد و روش‌ها

داده‌های ژنومی و پروتئینی شامل توالی‌های نوکلئوتیدی و اسید‌آمین‌های ژن سیتوکروم b از سایت مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (NCBI) با شماره دسترسی CCB90266.1 مربوط به گونه گوسفند به منظور بررسی خواص فیزیک و شیمیایی و همچنین پیش‌بینی ساختار سه بعدی استخراج شد. ساختار سوم (سه بعدی) ژن سیتوکروم B با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیک پیش‌بینی شدند. بر اساس این روش‌ها، پس از استخراج توالی‌های اسید‌آمینه‌ای از طریق نرمافزا و سورهای آنلاین Uniprot و Swiss-model ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی استفاده شد و ساختار آن به فرمت PDB دانلود و دخیره شد. پروتوبورفیرین IX (HEM) و فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) نیز برای بررسی برهمنش‌های آن‌ها با ژن سیتوکروم b از بانک ژن دانلود شدند. مشخصات سیتوکروم B، پروتوبورفیرین IX، فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است.

جدول ۱- مشخصات ژن سیتوکروم B

نام ژن	
cytochrome b (COB, CYTB, MTCYB)	
6QBX	PDB
Ovis Aries	ارگانسم
Electron Microscopy Resolution: 4.6 Å	متند
b1.	زنجره
379	تعداد اسید آمینه

جدول ۲- مشخصات لیگاندها مورد استفاده در داکینگ ملکولی

(HEM) Protoporphyrin	(FMN) flavin mononucleotide	مشخصات لیگاندها
440068832	440068835	PubChem
43	31	تعداد اتم
616.487	456.3	وزن ملکولی
C ₃₄ H ₃₂ FeN ₄ O ₄	C ₁₇ H ₂₁ N ₄ O ₉ P	فرمول ملکولی

با استفاده از نرم‌افزار Auto Dock، لیگاند و کوفاکتورهای اضافی و مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالی پروتئین حذف شدند. نرم‌افزارهایی که برای انجام این برهمنش‌ها انتخاب و مورد استفاده قرار

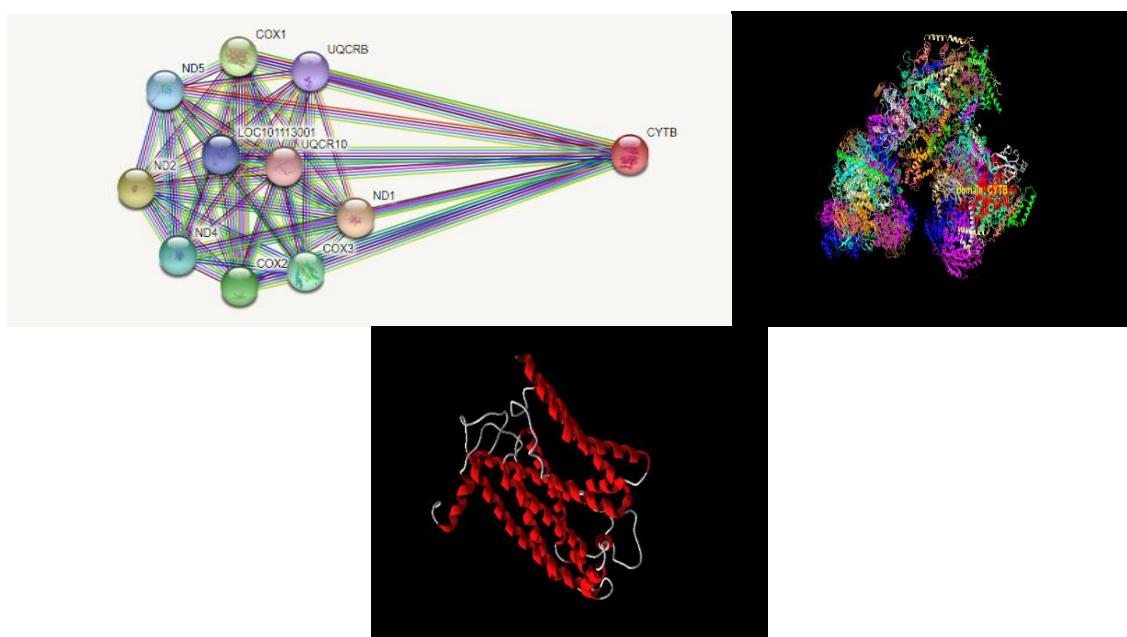
پورفیرین طبقه‌بندی می‌شود و نقش مهمی در موجودات زنده به عنوان پیش ساز سایر ترکیبات حیاتی مانند هم و کلروفیل McNeely et al. 2021). پروتوبورفیرین IX یک تترایپرول حاوی ۴ زنجیره جانبی متیل، ۲ پروپیونیک و ۲ زنجیره جانبی وینیل است که پیش ساز متابولیک هم، سیتوکروم c و کلروفیل است. پروتوبورفیرین IX از اکسیداسیون پل متیلن پروتوبورفیرینوژن توسط آنزیم پروتوبورفیرینوژن اکسیداز تولید می‌شود. یک تترایپرول حلقوی که شامل پورفیرین حاوی چهار جایگزین متیل در موقعیت‌های ۳، ۸، ۱۳ و ۱۷، دو جایگزین وینیل در موقعیت‌های ۷ و ۱۲ و دو جایگزین ۲-کربوکسی اتیل در موقعیت‌های ۲ و ۱۸ است. پروتوبورفیرین به طور معمول در غلاظت بسیار کم در گلبول‌های قرمز RBC وجود دارد. مقادیر بالا نشان‌دهنده اختلال اولیه در وضعیت تغذیه‌ای آهن است که اطلاعاتی در مورد تغییرات تدریجی در تأمین آهن به مغز می‌دهد (Hisamatsu et al. 2018). تداخل بین پروتئین‌ها و سایر مولکول‌ها نقش مهمی در فرایندهای مختلف بیولوژیکی از جمله رونویسی و بیان ژن، تنظیم متابولیک، انتقال سیگنال و ارتباط سلولی اینفا می‌کند. آگاهی از جنبه‌های ساختاری یک پروتئین با شریک اتصال دهنده آن می‌تواند به درک مکانیسم چنین تعاملی کمک کند و بنابراین برای کشف و توسعه دارو مهم است. با این حال، به دست آوردن ساختارهای پیچیده با NMR روش‌های آزمایشی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس یا همچنان مشکل و گران قیمت است. بنابراین، داکینگ مولکولی یک رویکرد مهم برای پیش‌بینی ساختارهای سه بعدی این قطعات مکمل در نظر گرفته می‌شود (Kiebert et al. 1998). داکینگ مولکولی یکی از ابزارهای کلیدی در زیست‌شناسی مولکولی ساختاری است. هدف از داکینگ پروتئین-لیگاند، پیش‌بینی جایگاه اتصال مناسب لیگاند به پروتئین با ساختار سه بعدی شناخته شده است. روش‌های موفقیت آمیز داکینگ فضاهای با ابعاد بالا را به طور مؤثر بررسی می‌کند و از تابع امتیازدهی استفاده می‌کند تا به درستی کاندیدهای داکینگ را امتیازبندی کند. روش داکینگ مولکولی می‌تواند جهت‌گیری مناسب این مولکول در این ترکیب و همچنین شدت پیوند بین این دو مولکول را پیش‌بینی کند. به این منظور ساختار این دو مولکول باید شناخته شده

می‌رود و گاهی می‌تواند منجر به شناسایی نادرست شود، اما استفاده از روش‌های دقیق‌تر و سریع‌تر می‌تواند منجر به شناسایی موجودات زنده و بررسی ژن‌های کاربردی آن‌ها شود. این ژن در تحقیقات ژنتیکی مرتبط با با جانوران، ژنوم میتوکندری ارجاعیت بیشتری به ژنوم هسته دارد (Wade 2004). ژن سیتوکروم به عنوان مناسب‌ترین ژن برای تحقیقات جانوری، و جداسازی و تمایز گونه‌های بسیار نزدیک به هم می‌باشد (Hebert et al. 2003). یکی از روش‌هایی که می‌توانند در این مسیر کمک شایانی به این روند داشته باشد داکینگ ملکولی می‌باشد. با استفاده از داکینگ مولکولی، می‌توان به اطلاعاتی مانند محل اتصال لیگاند به پروتئین، نقش هر یک از آمینو اسیدهای پروتئین یا اتم‌های لیگاند در بر همکنش و انرژی‌های اتصال دست یافت. همچنان ارزیابی بر همکنش دو پروتئین با یکدیگر و یا لیگاند با DNA نیز با این تکنیک امکان‌پذیر است. یافتن بهترین جهت‌گیری لیگاند نسبت به سایت فعال گیرنده و تخمین انرژی پیوندی دو جنبه مهم الگوریتم داکینگ می‌باشند. ساختار رسپتور و لیگاندها در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

گرفت Molegro Virtual Docker Ucsf chimera ۰.۷۵ و بررسی میزان صحت با نرم‌افزار SAVES ۰.۵ و بررسی پالت راماچاندران، LIGPLOT جهت ارزیابی پیوندهای هیدروژونی و آبگریز بین لیگاند و رسپتور و همچنین تعداد و طول آنها، برای مشخص کردن نواحی الفا و بتا، بررسی برهمکنش، اتم‌های لیگاند و پیوندهای هیدروفوبیک برای نمایش و تفکیک نوع پیوند، برهمکنش‌های لیگاند با رسپتور، تفکیک نوع پیوند، برهمکنش‌های لیگاند با رسپتور مشخص کردن protein-ligand interaction profiler اسیدآمینه‌هایی که در آن شرکت دارند، در نهایت با استفاده از الگوریتم‌های Expasy ProtParam استفاده شد. در نهایت با استفاده از زیر حاصل شد.

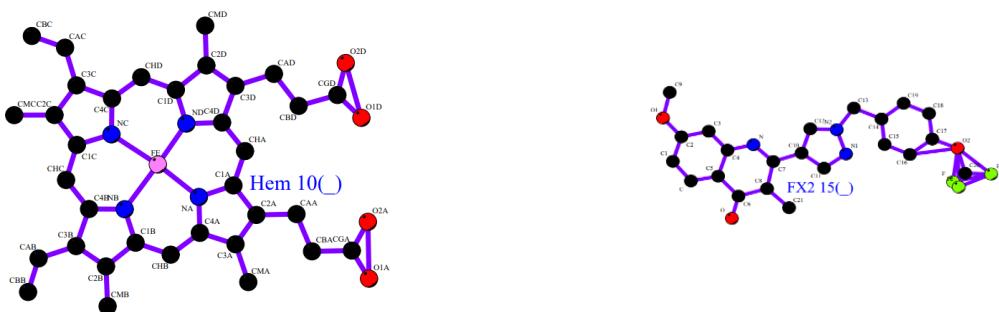
نتایج

تعیین خصوصیات ژنتیکی موجودات زنده، اولین قدم برای اصلاح آن‌ها می‌باشد. این تحقیق در راستای مطالعه و بررسی یکی از مهم‌ترین و کاربردی ترین ژن‌ها (سیتوکروم B) در تولید انرژی و بررسی برهمکنش دو لیگاند مهم و بررسی نوع پیوندها و میزان انرژی اتصال می‌باشد. بهینه کردن کمپلکس، به لیگاند این اجزاء را می‌دهد تا در جایگاه فعال پروتئین، موقعیتی با کمترین انرژی را کسب کند. انعطاف‌پذیری فنوتیپی و تغییر پذیری ژنتیکی در صفات ژنتیکی که در تشخیص گونه‌ها و کاربرد ژن‌ها به کار



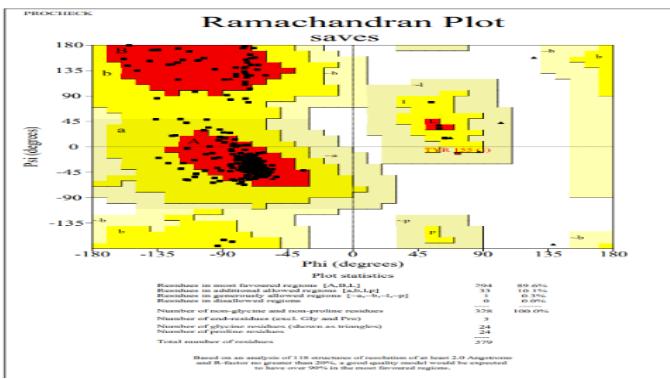
شکل ۱- از سمت راست (آ) کمپلکس ساختار سه بعدی میتوکندری (NCBI)، (ب) آنالیز شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین توسط پایگاه داده (STRING)، (پ)

ساختار سه بعدی ژن سیتوکروم B جدا شده از کمپلکس



شکل ۲- ساختار (FMN) فلاوین مونونوکلوتید و (HEM) پروتوبورفیرین IX

نتایج مربوط به بررسی توالی اسیدآمینه‌ای سیتوکروم B، با استفاده از روش Blast در سایت NCBI نشان داد که شباهت بسیار کمی بین این توالی با سایر ساختارهای سه بعدی ثبت شده وجود دارد. در نتیجه از نرمافزار Tasser-I استفاده شد. بررسی میزان صحت با نرمافزار SAVES 0.v5 و بررسی نقشه راماچاندران با میزان صحت حدود ۸۳٪ پیش‌بینی شد که نشان می‌دهد که این ساختار دارای زنجیره استروکیمی خوبی است، درصد گروههای باقیمانده که در ناحیه قرمز قرار می‌گیرند دارای بیشترین میزان مقبولیت است (شکل ۱).



شکل ۱- نقشه راماچاندران پیش‌بینی شده ساختار پروتئینی ژن سیتوکروم B

بعد از آماده سازی رسپتور و لیگاندها که شامل حذف ملکول‌های اضافی که با رسپتور کریستاله شده‌اند حذف ملکول‌های آب، کامل کردن زنجیرهای پروتئینی ناقص، مینی مایز کردن برای کاهش سطح انرژی رسپتور که برای رسیدن به بهترین حالت داکینگ ملکولی لازم می‌باشد. مرحله بعد مشخص کردن آمینواسیدهای اکتیو سایت برای گرفتن بهترین نتیجه لازم می‌باشد.

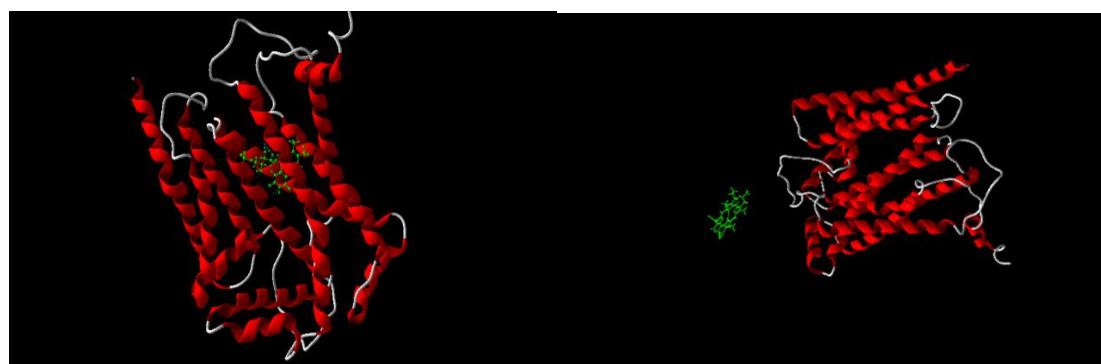
ژن سیتوکروم B ۳۷۹ اسید آمینه دارد که تعداد و نوع آن‌ها در جدول ۳ آمده است. بررسی اسید آمینه‌های تشکیل دهنده‌ی سیتوکروم B نشان داد که بیشترین میزان مربوط به لوسین و لیزین می‌باشد. با وجود اینکه مکانیسم‌های درگیر در تمایز مایوژنیک نسبتاً خوب شناخته شده است، نقش محرک‌های خارج سلولی در کنترل تمایز به مقدار زیادی غیره قابل حل مانده است. لوسین و لیزین به عنوان اسیدآمینه‌های ضروری در کنترل رشد می‌تواند مهم باشد لوسین به عنوان یک تنظیم‌کننده ستز پروتئین عضله به خوبی شناخته شده است (Averous et al. 2012). لوسین و لیزین دو اسید آمینه‌ی ضروری هستند که ثابت شده است وجود آن‌ها در جیره باعث افزایش رشد و نمو می‌شود. اسید آمینه لیزین تأثیر زیادی بر بیان ژن‌ها و فاکتورهای رشد و عضله سازی دارد و نبود و کمبود این اسید آمینه باعث کاهش سطح فاکتورهای رشد می‌شود (Azizi et al. 2017).

جدول ۳- تعداد و انواع اسید آمینه‌های سیتوکروم B گوسفنده

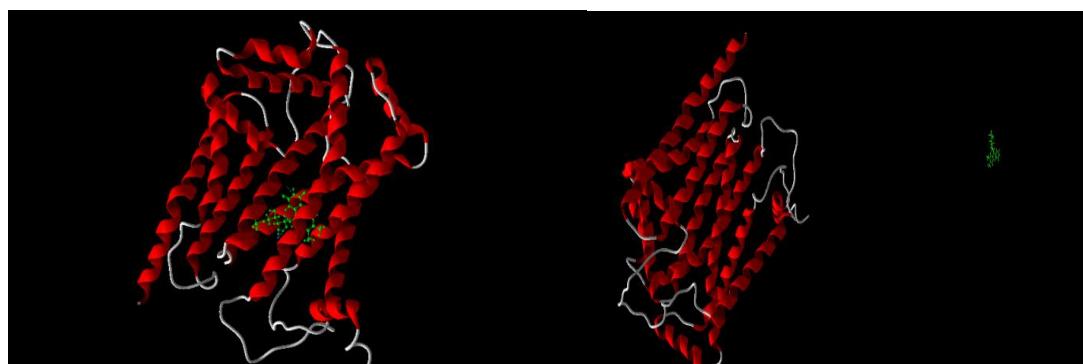
آمینو اسید	تعداد	آمینو اسید	تعداد
Lys	۵۳	Ala	۲۳
Met	۸	Arg	۸
Phe	۱۸	Asn	۱۹
Pro	۲۶	Asp	۱۱
Ser	۲۴	Cys	۴
Thr	۲۷	Gln	۶
Trp	۱۲	Gly	۶
Tyr	۱۵	His	۲۴
Val	۱۸	Ile	۱۲
		Leu	۴۵

نشان داده شده است. بعد از انجام فرایند داکینگ، نتایج به دست آمده از لحاظ بهترین انرژی اتصال (Binding energy) مقایسه و بهترین پوز با منفی ترین انرژی و بزرگ‌ترین عدد که بهترین اتصال کمپلکس لیگاند و پروتئین را نشان می‌دهد، انرژی اتصال نشان‌دهنده قدرت اتصال بین ترکیبات مولکولی طراحی شده و جایگاه فعال آنزیم است. برای پروتوبورفیرین $157/386$ -عدد و برای فلاوین مونونوکلئوتید $137/53$ -انتخاب شدند. مشخص شد که پروتوبورفیرین دارای منفی ترین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود.

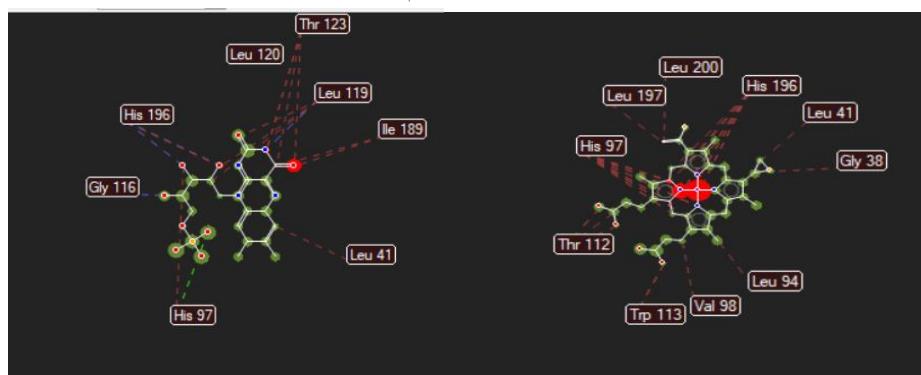
مختصات برای لیگاند پروتوبورفیرین برای مشخص کردن آمینواسیدهای اکتیو سایت به صورت $X:414.09, Y:385.04, Z:239.01$ و برای لیگاند فلاوین مونو نوکلئوتید $X:414.77, Y:385.69, Z:292.70$ به دست آمد. بعد از انجام این مراحل جهت انجام داکینگ از برنامه اتودادک وینا (AutoDockVina) استفاده شد. جعبه گرید یا (Box) به صورتی تعریف شد تا تمامی پروتئین را پوشش دهد. فضای سه بعدی برای داکینگ منظور جایگاه فعال و آمینواسیدهای واکنش دهنده در ساختار سه بعدی مشخص شد که اصطلاحاً به آن گرید می‌گویند. در شکل ۲ و ۳ قبل و بعد ساختار سیتوکروم B لیگاندهای شرکت کننده در فرایند داکینگ



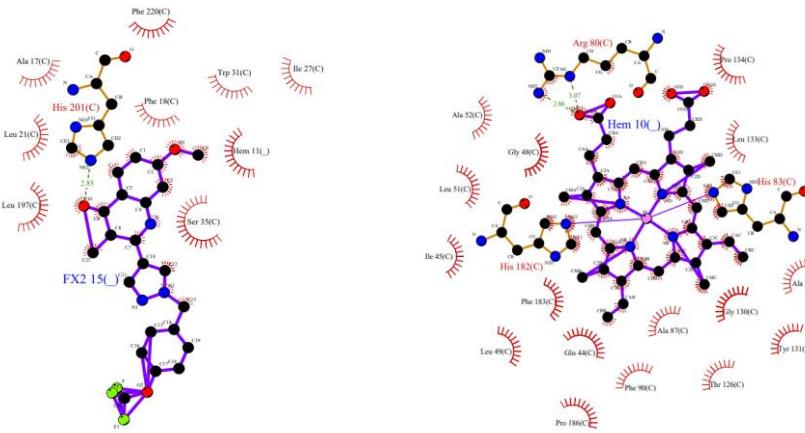
شکل ۲- قبل و بعد از برهمکنش سیتوکروم B و پروتوبورفیرین



شکل ۳- قبل و بعد از برهمکنش سیتوکروم B و فلاوین مونونوکلئوتید



شکل ۴- بررسی رزیدوهای (آمینواسیدهای) در گیر در تشکیل پیوند با (سمت راست) پروتوبورفیرین و (سمت چپ) فلاوین مونونوکلئوتید



ترکیب پروتوبورفیرین و فلاوین

Lig plot مونونوکلئوتید با رسپتور سیتوکروم B توسط نرم‌افزار

Molecular modeling software

انرژی که ایجاد شده با ۴۵ اتم لیگاند و انرژی که ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار MVD برهمکنش‌های هر دو لیگاند که پوز مناسب آنها انتخاب شده بود به صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). بررسی ایترکشن‌های لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید نشان داد که هیستیدین ۱۹۶، گلاسین ۱۱۶ و لوسین ۱۱۹ که با خط چین آبی در تشکیل پیوند هیدروژنی، هیستیدین ۹۷ با خط چین سبز در تشکیل پیوند الکترواستاتیک، هیستیدین ۱۹۷، گلاسین ۱۱۶، هیستیدین ۹۷، لوسین ۱۲۰، تروئین ۱۲۳، ایزولوسین ۱۸۹ و لوسین ۴۱ با خط چین قرمز در تشکیل پیوند استری شرکت داشتند، بیشترین ایترکشن‌ها مربوط به پیوندهای استری و اسید آمینه لوسین بود. سهم هر کدام از اتم‌ها و باقی مانده‌ها در انرژی که ایجاد شده با ۳۱ اتم لیگاند و انرژی که ایجاد شده با ۱۲۵/۹۷۲ بود. بررسی ایترکشن‌های لیگاند پروتوبورفیرین با رسپتور سیتوکروم B، سرین ۱۰۶ در تشکیل پیوند هیدروژنی، هیستیدین ۱۹۷ و ۹۷ با خط چین قرمز در تشکیل پیوند الکترو استاتیک و هیستیدین ۹۷، لوسین ۲۰۰، هیستیدین ۱۹۶، لوسین ۴۱، گلاسین ۳۸، لوسین ۹۴، والین ۹۸، تروئین ۱۱۲، والین ۹۸، تریپتوфан ۱۱۳ شرکت داشتند که تعداد اسید آمینه بیشتری در این پیوند شرکت داشتند و نسبت به لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید، اسید آمینه‌های دیگری مانند تریپتوфан و والین در برهمکنش شرکت داشتند که در لیگاند قبلی در برهمکنش با سیتوکروم B شرکت نداشتند و در ترکیب لیگاند پروتوبورفیرین با رسپتور سیتوکروم B باز لوسین بیشترین سهم را به خود اختصاص داد. سهم هر کدام از اتم‌ها و باقی مانده‌ها در

نتایج داکینگ ملکولی با استفاده از سایت protein-ligand interaction profiler که در شکل برای هر دو لیگاند نیز مورد بررسی قرار گرفت نتایج حاصل نشان داد برای لیگاند پروتوبورفیرین گروه هیدروکسیل موجود، با آمینو اسید آرژینین ۸۰ و برای لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید هیستیدین ۲۰۱ در بر همکنش هیدروژنی شرکت می‌کند و همچنین با آمینو اسیدهای پروولین ۱۳۴، لوسین ۱۳۳، آلانین ۸۴، گلاسین ۱۳۰، تروئین ۱۲۶، تیروزین ۱۳۱، فنیل آلانین ۹۰، پروولین ۱۸۶، لوسین ۴۹، فنیل آلانین ۱۸۳، ایزولوسین ۴۵، لوسین ۵۱، گلاسین ۴۸ و آلانین ۵۲ در ترکیب پروتوبورفیرین با سیتوکروم B بر همکنش‌های هیدروفوبي ترا نشان می‌دهد. بر همکنش‌های هیدروفوبي فلاوین مونونوکلئوتید را اسید آمینه‌های فنیل آلانین ۲۲۰، آلانین ۱۷، لوسین ۲۱، لوسین ۱۹۷، سرین ۳۵، فنیل آلانین ۱۸، تریپتوфан ۳۱، ایزولوسین ۲۷ را شامل شد. اسید آمینه‌های شرکت کننده در تشکیل بر همکنش‌های هیدروفوبي برای لیگاند پروتوبورفیرین بیشتر از فلاوین مونونوکلئوتید بود.

بحث

هدف از این پژوهش پیدا کردن بهترین لیگاند جهت انتقال الکترون برای تولید انرژی بود. با توجه به نتایج حاصل از آنالیزها و مقایسات بین دو تا لیگاند، پروتوبورفیرین با مرکزیت آهن

که اسید آمینه‌های دیگری مانند تریپتوфан و والین در برهمکنش شرکت داشتند که در لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید در برهمکنش با سیتوکروم B شرکت نداشتند و در ترکیب لیگاند پروتوبورفیرین با رسپتور سیتوکروم B لوسین بیشترین سهم را به خود اختصاص داد. اما نتیجه تشکیل پیوندهای هیدروژنی، حاصل از ترکیب فلاوین مونونوکلئوتید با سیتوکروم B از پروتوبورفیرین بیشتر بود. آرژینین دارای بار مثبت زیادی می‌باشد و در تشکیل پیوند هیدروژنی که احتمال باعث افزایش تعامل الکترواستاتیک در ترکیب پروتوبورفیرین با سیتوکروم B شده باشد. شبکه برهمکنش پروتئینی سیتوکروم B پیشگویی شده بر اساس پروتئین‌های میتوکندری،^{۱۰} پروتئین دارای امتیاز بالا از نظر درجه گره بالقوه معرفی شدند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که با بررسی و شناخت عوامل تاثیر گذار کوفاکتورهای مهم و مؤثر می‌تواند به عملکرد بهینه زنجیره تنفسی و شناخت ساختار آن‌ها کمک شایانی داشته باشد و با برهمکنش بین لینگاندها و رسپتورهای کاربردی می‌توان اسید آمینه‌هایی که بیشترین ایترکشن را با توجه به انرژی بهینه‌ای که در بهترین پوز مناسب انتخاب شده‌اند شناسایی و مکانیسم آن‌ها را در تولید و بازدهی بررسی کرد. که در این پژوهش مشخص شد که اسید آمینه لیزین و لوسین تأثیر زیادی بر بیان ژن‌ها و فاکتورهای رشد، عضله‌سازی و تولید انرژی دارند بیشترین تعداد را به خود اختصاص داد. با توجه به اینکه که متabolیسم انرژی برای سلامتی حیوان حائز اهمیت می‌باشد، و با علم به اینکه ژن‌ها و لیگاندهای دیگری در مسیر تولید انرژی و انتقال الکترون نیز نقش دارند پیشنهاد می‌شود که دیگر لیگاندهای مربوط به ژن‌های کاربردی و مؤثر در تولید نیز بررسی شود تا با شناخت عوامل مؤثر بتوانیم مسیرهای تولید انرژی را شناسایی و مورد بررسی قرار دهیم و از نتایج آن در زمینه تولیدات دامی استفاده کنیم.

بهترین و مناسب‌ترین انرژی اتصال و جهت‌گیری را نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید به خود اختصاص داد نتایج به شرح به دست آمد: مینیمم مقدار انرژی یا بهینه کردن، تکنیک مهمی در محاسبات اتصال مولکولی می‌باشد. بهینه کردن کمپلکس به لیگاند این اجازه را می‌دهد تا در جایگاه فعال پروتئین، موقعیتی با کمترین انرژی را کسب کند. این فرایند برای هر دولیگاند مورد استفاده در پژوهش، پروتوبورفیرین انرژی اولیه ۱۱۰۱۶ بود که به ۸۹۲۱/۹ کاهش یافت و برای فلاوین مونونوکلئوتید انرژی از ۷۰۲/۲۹۱ به ۵۴۶/۰۳۵ کاهش یافت که این نتجه حاکی از این است که هر دو لیگاند با بهینه کردن سطح انرژی خود در جایگاه مناسبی برای اتصال با سیتوکروم B قرار گرفتند و این نتایج در پروتوبورفیرین نشان اتصال بهینه و مناسب‌تری نسبت فلاوین مونونوکلئوتید بود. همچنین ارزیابی بر همکنش دو پروتئین با یکدیگر و یا لیگاند با DNA نیز با این تکنیک امکان پذیر است. یافتن بهترین جهت‌گیری لیگاند نسبت به سایت فعلی گیرنده و تخمین انرژی پیوندی دو جنبه مهم الگوریتم داکینگ می‌باشند، نتایج به دست آمده داکینگ ملکولی از لحاظ بهترین انرژی اتصال (Binding enregy) مقایسه و بهترین پوز با منفی‌ترین انرژی و بزرگ‌ترین عدد که بهترین اتصال کمپلکس لیگاند و پروتئین را نشان می‌دهد، پروتوبورفیرین دارای منفی‌ترین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود و می‌توان گفت بیشتر بودن تعداد ایترکشن‌ها و پیوندهای تشکیل شده از ترکیب پروتوبورفیرین با سیتوکروم B میتواند صحت و تایید این ادعا باشد. مولکول‌های هیدروفوب یا آب گریز غیرقطبی هستند و بهمین خاطر تمایل به دیگر مولکول‌ها و حلال‌های غیرقطبی دارند. نتایج داکینگ ملکولی برای مشخص کردن پیوندهای هیدروفوب، اسید آمینه‌های شرکت کننده در تشکیل بر همکنش‌های هیدروفوبی برای لیگاند پروتوبورفیرین بیشتر از فلاوین مونونوکلئوتید بود. در پژوهشی اعلام داشتند که کردن ایترکشن‌ها در ساختار سوم پروتئین‌ها، نیروی اصلی در پروتئین‌ها حاصل ایترکشن‌های هیدروفوبیک در ساختار است (Li et al. 1997). بررسی تشكل پیوند الکترواستاتیک نشان داد

منابع

- Agip AA, Blaza JN, Bridges HR, Viscomi C, Rawson S, Muench SP, Hirst J (2018) Cryo-EM structures of complex I from mouse heart mitochondria in two biochemically defined states. *Nature structural and molecular biology* 25:548-556.
- Averous J, Gabillard JC, Seiliez I, Dardevet D (2012) Leucine limitation regulates myf5 and myoD expression and inhibits myoblast differentiation. *Experimental cell research* 318:217-227.
- Azizi S, Nematollahi MA, Mojazi Amiri B, Gutiérrez J (2016) The study of impacts of IGF-I, IGF-II, leucine and lysine starvation on myogenesis in gilthead sea bream cultured myocytes (*Sparus aurata*). *Journal of Fisheries* 69:367-376. (In Farsi)
- Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494:443-448.
- Blaza JN, Vinothkumar KR, Hirst J (2018) Structure of the deactive state of mammalian respiratory complex I. *Structure* 26:312-319.
- Dare NA, Brammer L, Bourne SA, Egan TJ (2018) Fe (III) Protoporphyrin IX Encapsulated in a Zinc Metal-Organic Framework Shows Dramatically Enhanced Peroxidatic Activity. *Inorganic Chemistry* 57:1171-1183.
- Davies KM, Blum TB, Kuhlbrandt W (2018) Conserved *in situ* arrangement of complex I and III2 in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115:3024-3029.
- Enri'quez JA (2016) Supramolecular organization of respiratory complexes. *Annu. Rev. Physiol* 78:533-561.
- Fiedorczuk K, Letts JA, Degliesposti G, Kaszuba K, Skehel M, Sazanov LA (2016) Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. *Nature* 538:406-410.
- Gu J, W, M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N, Yang M (2016) The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 537:639-643.
- Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M (2017) Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2. *Cell* 170:1247-1257.e12.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 270:313-321.
- Hirst J (2013) Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry* 82:551-575.
- Hisamatsu Y, Umezawa N, Yagi H, Kato K, Higuchi T (2018) Design and synthesis of a 4-aminoquinoline-based molecular tweezer that recognizes protoporphyrin IX and iron (iii) protoporphyrin IX and its application as a supramolecular photosensitizer. *Chemical science* 9:7455-7467.
- Howell N (1989) Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. *Journal of molecular evolution* 29:157-169.
- Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science* 281:64-71.
- Kiebert GM, Curran D, Aaronson NK, Bolla M, Menten J, Rutten EHJM, Group ERCO (1998) Quality of life after radiation therapy of cerebral low-grade gliomas of the adult: results of a randomised phase III trial on dose response (EORTC trial 22844). *European Journal of Cancer* 34:1902-1909.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:6196-6200.
- Lapuente-Brun E, Moreno-Loshuertos R, Acr'n-Pé'rez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quiro's P.M, Calvo E, Rodri'guez-Herna' ndez M.A (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340:1567-1570.
- Letts JA, Fiedorczuk K, Degliesposti G, Skehel M, Sazanov LA (2019) Structures of respiratory supercomplex I+ III2 reveal functional and conformational crosstalk. *Molecular cell* 75:1131-1146.
- Letts JA, Sazanov LA (2017) Clarifying the supercomplex: the higherorder organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat. Struct. Mol. Biol* 24:800-808.
- Leys D, Scrutton, NS (2016) Sweating the assets of flavin cofactors: new insight of chemical versatility from knowledge of structure and mechanism. *Current opinion in structural biology* 41:19-26.
- Li H, Tang C, Wingreen NS (1997) Nature of driving force for protein folding: a result from analyzing the statistical potential. *Physical review letters* 79:765.
- Mansoorabadi SO, Thibodeaux CJ, Liu HW (2007) The diverse roles of flavin coenzymes nature's most versatile thespians. *The Journal of organic chemistry* 72:6329-6342.
- McNeely J, Ingraham HM, Premasiri WR, Ziegler LD (2021) Chemical enhancement effects on protoporphyrin IX surface-enhanced Raman spectra: Metal substrate dependence and a vibronic theory analysis. *Journal of Raman Spectroscopy* 52:323-338.
- Piano V, Palley BA, Mattevi A (2017) Flavins as covalent catalysts: new mechanisms emerge. *Trends in biochemical sciences* 42:457-469.
- Sazanov LA (2015) A giant molecular proton pump: structure and mechanism of respiratory complex I. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 16:375-388.
- Sousa JS, Mills DJ, Vonck J, Kühlbrandt W (2016) Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome. *Elife* 5:e21290.
- Sultana S, Mannen H (2004) Polymorphism and evolutionary profile of mitochondrial DNAcontrol region inferred from the sequences of Pakistani goats. *Animal Science Journal* 75:303-309.
- Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, Bartlam M, Rao Z (2005) Crystal structure of mitochondrial

respiratory membrane protein complex II. *Cell* 121:1043-1057.

Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-1144.

Wade NICHOLAS (2004) A species in a second: Promise of DNA'bar codes'. *The New York Times* 14.

Walsh CT, Wencewicz TA (2013) Flavoenzymes: versatile catalysts in biosynthetic pathways. *Natural product reports* 30:175-200.

Wu M, Gu J, Guo R, Huang Y, Yang M (2016) Structure of mammalian respiratory supercomplex I1III2IV1. *Cell* 167:1598-1609.e10.

Wu M, Gu J, Guo R, Huang Y, Yang M (2016) Structure of mammalian respiratory super complex I1III2IV1. *Cell* 167:1598-1609

Zhang K (2016) Gctf: real-time CTF determination and correction. *J. Struct. Biol* 193 1-12.

Zhu J, Vinod Kumar K.R, Hirst J (2016) Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature* 536:354-3.