ژنتیک نوین
دوره هجدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲
صفحه ۳۷۶ - ۳۶۷

مطالعه و بررسی برهمکنش‌های پروتوپورفیرین 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 J[1], Shariat M*[2], Neysi S[2]

1- Professor, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan
2- 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 به‌عنوان بخشی از زنجیره انتقال الکترون نقش دارد و باتوجه به اینکه این ژن منجر به تولید انرژی در دام و افزایش بازدهی می‌شود، شناخت مناسب‌ترین 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 پروتوپورفیرین 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 ملکولی و بررسی نتایج حاصل با استفاده از سرورهای آنلاین نشان داد که پروتوپورفیرین دارای بیشترین تعداد اسید آمینه شرکت‌کننده در تعامل الکترو استاتیک و هیدروفوبی نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید می‌باشد و با توجه به نتایج به‌دست 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، پروتوپورفیرین دارای منفی‌ترین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود و می‌توان گفت بیشتر بودن تعداد اینترکشن‌ها و پیوندهای تشکیل شده از ترکیب پروتوپورفیرین با سیتوکروم B می‌تواند صحت و تایید این ادعا باشد. آرژینین دارای بار مثبت زیادی می‌باشد و در تشکیل پیوند هیدرژنی که احتمال باعث افزایش تعامل الکترواستاتیک در ترکیب پروتوپورفیرین 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

پروتوپورفیرین
داکینگ ملکولی
سیتوکروم B
شبیه سازی
فلاوین مونونوکلئوتید
گوسفند

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

مقدمه

ژن سیتوکروم b دارای کدون‌هایی با سرعت تکاملی بالا و کدون‌های با سرعت تکاملی پایین می‌باشد و نیز دارای بخش‌هایی خیلی متغیر و هم خیلی حفاظت‌شده است. بنابراین این ژن برای پاسخ به انواع سوالات سیستماتیکی از فیلوژنی در سطح بالا تا جمعیت‌ها و سطوح تازه جدا شده به‌کار برده می‌شود. البته معایبی نظیر انحراف در ترکیب بازهای آن، نرخ 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 همهٔ بافت‌های زنده یافت شده و به سه نوع اصلی a، b و c تقسیم‌بندی می‌شوند. میزان هر یک از انواع برحسب 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 اَبَر 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 هوازی، فرآیندی که طی آن سلول‌ها الکترون‌ها را از قندها، چربی‌ها و پروتئین‌ها به اکسیژن مولکولی (O2) منتقل می‌کنند، در سوخت و ساز انرژی همه یوکاریوت‌ها و بسیاری از پروکاریوت‌ها نقش اساسی دارد. مراحل پایانی تنفس هوازی در میتوکندری انجام می‌شود. زنجیره انتقال الکترون میتوکندری (ETC) مجموعه‌ای از غشای داخلی میتوکندری (IMM)، واکنش‌های انتقال الکترون انتهایی را کاتالیز می‌کند. زنجیره انتقال الکترون 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 B2 است. این انزیم‌ها وظیفه انتقال الکترون‌ها را در زنجیره انتقال الکترون تنفس سلولی برعهده 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 به‌عنوان یک مکمل غذایی استفاده می‌شود (Mansoorabadi et al. 2007). ریبوفلاوین یکی از چندین گروه پروستتیک یا فاکتورهای مشترک در زنجیره انتقال الکترون 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 سیتوکروم‌b، پروتئین حاوی آهن – گوگرد (Fe-S) به‌نام مرکز Rieske و پروتئین سیتوکروم c تشکیل شده است. کمپلکس چهارم از پروتئین‌های سیتوکروم c، a و a_3 تشکیل شده است. این مجموعه شامل دو گروه هِم و سه یون مس است (Baradaran et al. 2013; Iwata et al. 1995; sun et al. 2005; Tsukihara et al. 1996). اخیراً، مطالعات زیادی در زمینه ساختار کمپلکس ۱ به‌عنوان بزرگ‌ترین کمپلکس زنجیره انتقال الکترون انجام شده است .CI یک کمپلکس پروتئین غشایی با ۴۵ زیر واحد پروتئینی برای تشکیل دو بازو، یکی در غشای 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 اَبَر کمپلکس 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 بر خلاف تصوری که نشان می‌داد دو مخزن CoQ در IMM وجود دارد (Enrique 2016; Lapuente-Brun et al. 2013). پروتوپورفیرین IX یک ترکیب آلی است که به‌عنوان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

پورفیرین طبقه‌بندی می‌شود و نقش مهمی در موجودات زنده به‌عنوان پیش ساز سایر ترکیبات حیاتی مانند هم و کلروفیل دارداین نام اغلب به‌صورت اختصاری PPIX است (McNeely et al. 2021). پروتوپورفیرین IX یک تتراپیرول حاوی ۴ زنجیره جانبی متیل، ۲ پروپیونیک و ۲ زنجیره جانبی وینیل است که پیش ساز متابولیک هِم، سیتوکروم c و کلروفیل است. پروتوپورفیرین IX از اکسیداسیون پل متیلن پروتوپورفیرینوژن توسط آنزیم پروتوپورفیرینوژن اکسیداز تولید می‌شود. یک تتراپیرول 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. پروتوپورفیرین به‌طور معمول در غلظت 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 ایفا 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، به‌دست آوردن ساختارهای پیچیده با روش‌های آزمایشی مانند کریستالوگرافی اشعه ایکس یا NMR 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 پروتئینی با ساختار سه بعدی شناخته شده است. روش‌های موفقیت آمیز داکینگ فضاهای با ابعاد بالا را به‌طور 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 باشند. هدف از این پژوهش بررسی برهمکنش‌های موجود بین سیتو کروم B، پروتوپورفیرین 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 به‌منظور 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 سرورهای آنلاین Swiss-model و Uniprot ساختارهای سه بعدی پیش‌بینی استفاده شد وساختار آن به فرمت PDB دانلود و ذخیره شد. پروتوپورفیرین IX (HEM) و فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) نیز برای بررسی برهم‌کنش‌های آن‌ها با ژن سیتوکروم b از بانک ژن دانلود شدند. مشخصات سیتوکروم B، پروتوپورفیرینIX، فلاوین مونونوکلئوتید (FMN) در جدول ۱ و ۲ ذکر شده است.

جدول ۱- مشخصات ژن سیتوکروم B

نام ژن	cytochrome b (COB, CYTB, MTCYB)
دسترسیPDB	6QBX
ارگانسیم	Ovis Aries
متد	Electron Microscopy Resolution: 4.6 Å
زنجیره	$b_{1.}$
تعداد اسید آمینه	379

جدول ۲- مشخصات لیگاندها مورد استفاده در داکینگ ملکولی

مشخصات لیگاندها	(FMN) flavin mononucleotide	(HEM) Protoporphyrin
دسترسی PubChem	440068835	440068832
تعداد اتم	31	43
وزن ملکولی	456.3	616.487
فرمول ملکولی	$C_{17}H_{21}N_4O9P$	$C_{34}H_{32}FeN_4O_4$

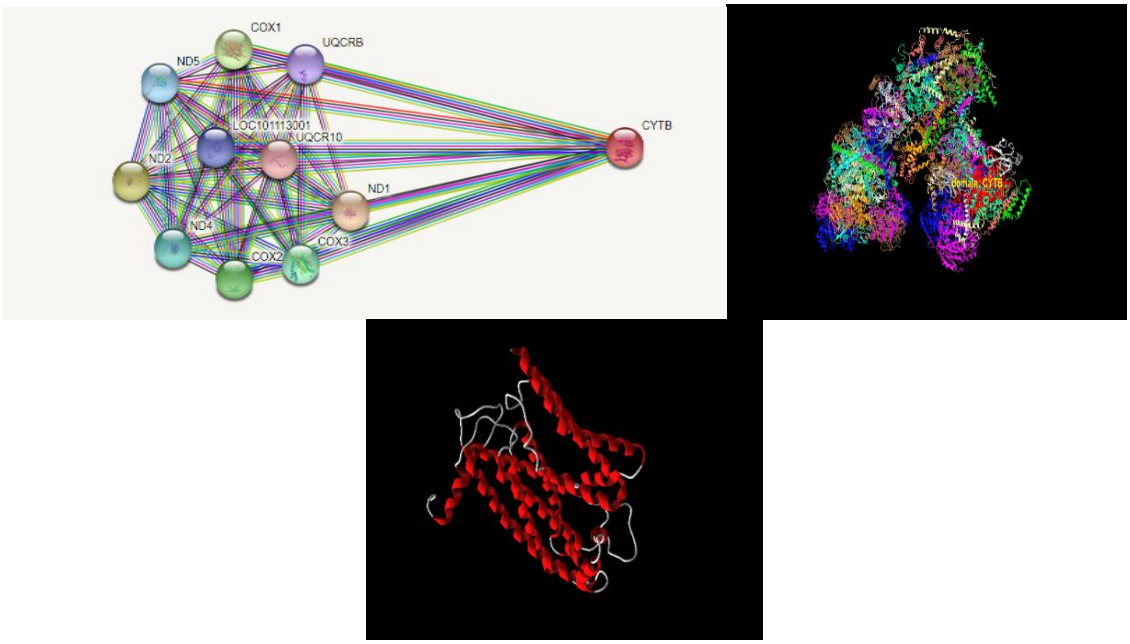
با استفاده از نرم‌افزار Auto Dock، لیگاند و کوفاکتورهای اضافی و مولکول‌های آب موجود در ساختار کریستالی پروتئین حذف شدند. نرم‌افزارهایی که برای انجام این برهمکنش‌ها انتخاب و مورد استفاده قرار

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

گرفت Ucsf chimera و Molegro Virtual Docker بود. نتایج حاصل با استفاد از سرورهای آنلاین که شامل: بررسی میزان صحت با نرم‌افزار SAVES 0.v5 و بررسی پالت راماچاندران، LIGPLOT جهت ارزیابی پیوندهای هیدرژونی و آبگریز بین لیگاند و رسپتور و همچنین تعداد و طول آن‌ها، برای مشخص کردن نواحی الفا و بتا ،بررسی برهمکنش، اتم‌های لیگاند وپیوندهای هیدروفوبیک برای نمایش و تفکیک نوع پیوند، برهمکنش‌های لیگاند با رسپتور، تفکیک نوع پیوند، برهمکنش‌های لیگاند با رسپتور مشخص کردن اسیدآمینه‌هایی که درآن شرکت دارند، protein-ligand interaction profiler Expasy ProtParam استفاده شد. در نهایت با استفاده ار الگوریتم‌های مختص هر سرور و نرم‌افزار نتایج زیر حاصل شد.

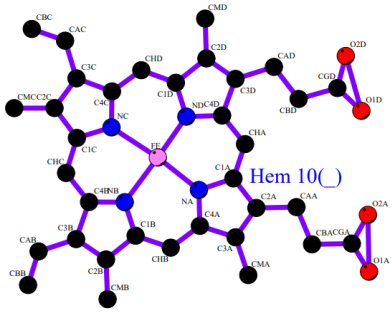
نتایج

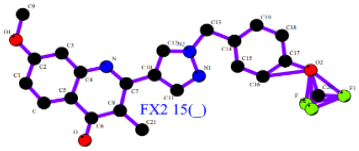
تعیین خصوصیات ژنتیکی موجودات زنده، اولین قدم برای اصلاح آن‌ها می‌باشد. این تحقیق در راستای مطالعه و بررسی یکی از مهم‌ترین و کاربردی ترین ژن‌ها (سیتوکروم‌B) در تولید انرژی و بررسی برهمکنش دو لیگاند مهم و بررسی نوع پیوندها و میزان انرژی اتصال می‌باشد. بهینه کردن کمپلکس، به لیگاند این اجازه را می‌دهد تا 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 به‌کار 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 ارجعیت بیشتری به ژنوم هسته دارد (Wade 2004). ژن سیتوکروم به‌عنوان مناسب‌ترین ژن برای تحقیقات جانوری، و جداسازی و تمایز گونه‌های بسیار نزدیک به‌هم 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. هم‌چنین 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.



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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]





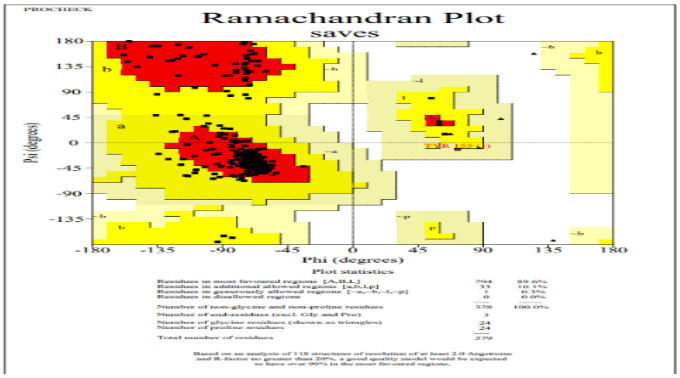
شکل ۲–ساختار(FMN) فلاوین مونونوکلئوتید و (HEM) پروتوپورفیرینIX

ژن سیتوکروم B ۳۷۹ اسید آمینه داردکه 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 به‌عنوان اسیدآمینه‌های ضروری در کنترل رشد می‌تواند مهم باشد لوسین به‌عنوان یک تنظیم‌کننده سنتز پروتیین عضله به‌خوبی شناخته شده است (Averous et al. 2012). لوسین و لیزین دو اسید آمینه‌ی ضروری هستند ک 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 آمینه¬های سیتوکروم B گوسفند

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

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).

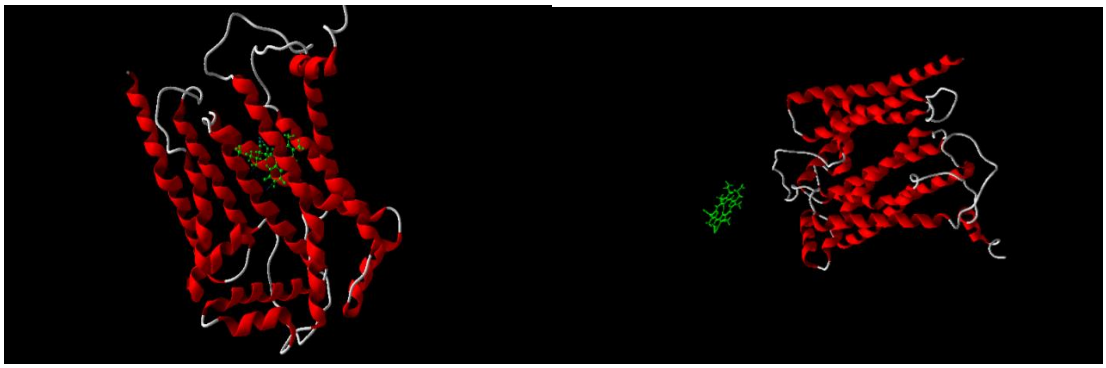


شکل ۱– نقشه راماچاندران پیش‌بینی شده ساختار پروتئینی ژن سیتوکروم B

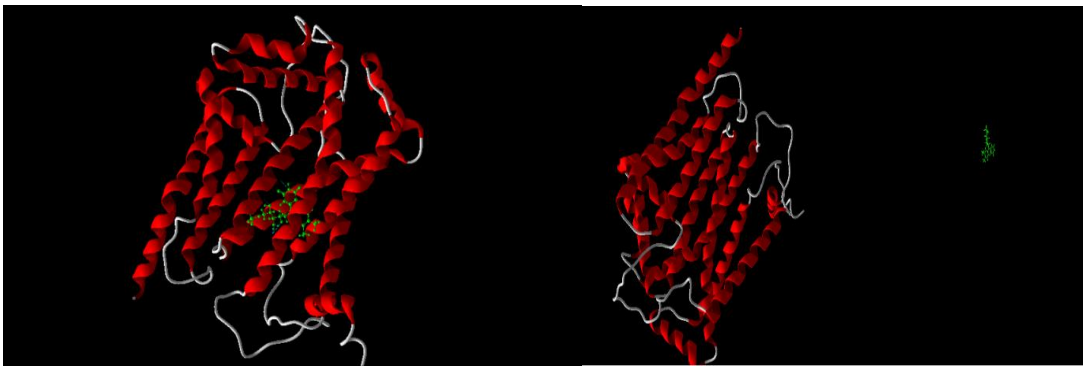
بعد از آماده سازی رسپتور و لیگاندها که شامل حذف ملکول‌های اضافی که با رسپتور کریستاله شده‌اند حذف ملکول‌های آب، کامل کردن زنجیرهای پروتئینی ناقص، مینی مایز کردن برای کاهش سطح انرژی رسپتور که برای رسیدن به بهترین حالت داکینگ ملکولی لازم می‌باشد. مرحله بعد مشخص کردن آمینواسیدهای اکتیو سایت برای گرفتن بهترین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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

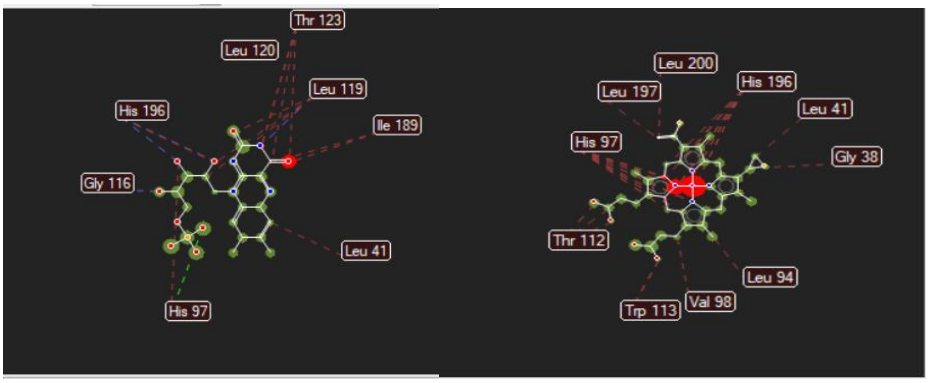
مختصات برای لیگاند پروتوپورفیرین برای مشخص کردن آمینواسیدهای اکتیو سایت به‌صورت X:414.09 ,Y:385.04 Z:239.01 و برای لیگاند فلاوین مونو نوکلئوتید X:414.77 Y:385.69 ,Z:292.70 به‌دست آمد. بعد از انجام این مراحل جهت انجام داکینگ از برنامه اتوداک وینا (AutoDockVina) استفاده شد. جعبه گرید یا (Box) به‌صورتی تعریف شد تا تمامی پروتئین را پوشش دهد. فضای سه بعدی برای داکینگ منظور جایگاه فعال و آمینو اسیدهای 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 نشان داده شده است. بعد از انجام فرایند داکینگ، نتایج به‌دست آمده از لحاظ بهترین انرژی اتصال (Binding energy) مقایسه و بهترین پوز با منفی‌ترین 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 پروتوپورفیرین ۱۵۷/۳۸۶-عدد و برای فلاوین مونونوکلئوتید ۱۳۷/۵۳- انتخاب شدند. مشخص شد که پروتوپورفیرین دارای منفی‌ترین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود.



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

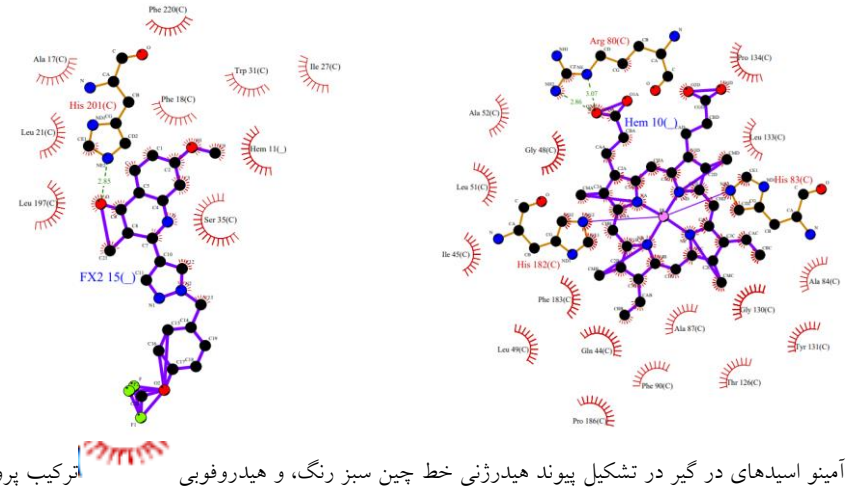


شکل ۳- قبل و بعد از برهمکنش سیتوکروم B و فلاوین مونونوکلئوتید



شکل ۴- بررسی رزیدوهای (آمینو اسیدهای) در گیر در تشکیل پیوند با (سمت راست) پروتوپورفیرین و (سمت چپ) فلاوین مونونوکلئوتید

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]



شکل ۵- بررسی آمینو اسیدهای در گیر در تشکیل پیوند هیدرژنی خط چین سبز رنگ، و هیدروفوبی ترکیب پروتوپورفیرین و فلاوین مونونوکلئوتید با رسپتور سیتوکروم B توسط نرم‌افزار Lig plot

با استفاده از نرم‌افزار مولیگرو (MVD) برهمکنش‌های هر دو لیگاند که پوز مناسب آن‌ها انتخاب شده بود به‌صورت جداگانه مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴). بررسی اینترکشن‌های لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید نشان داد که هیستیدین ۱۹۶،گلایسین ۱۱۶ ولوسین ۱۱۹که با خط چین آبی در تشکیل پیوند هیدروژنی، هیستدین ۹۷ با خط چین سبز در تشکیل پیوند الکترواستاتیک، هیستیدین ۱۹۷، گلایسین ۱۱۶، هیستدین ۹۷، لوسین ۱۲۰، تروئونین۱۲۳، ایزولوسین ۱۸۹ و لوسین ۴۱ باز با خط چین قرمز در تشکیل پیوند استری شرکت داشتند، بیشترین اینترکشن‌ها مربوط به پیوندهای استری و اسید آمینه لوسین بود. سهم هر کدام از اتم‌ها و باقی‌مانده‌ها در انرژی که ایجاد شده با ۳۱ اتم لیگاند و انرژی که ایجاد شده ۱۲۵/۹۷۲- بود. بررسی اینترکشن‌های لیگاند پروتوپورفیرین با رسپتور سیتوکرومB، سرین ۱۰۶در تشکیل پیوند هیدروژنی، هیستیدین ۱۹۷ و۹۷ با خط چین قرمز در تشکیل پیوند الکترو استاتیک و هیستیدین ۹۷، لوسین ۲۰۰، هیستدین۱۹۶، لوسین ۴۱، گلایسین ۳۸، لوسین ۹۴، والین ۹۸، تروئونین ۱۱۲، والین ۹۸، تریپتوفان ۱۱۳شرکت داشتند که تعداد اسیدآمینه‌یبیشتری در این پیوند شرکت داشتند و نسبت به لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید، اسید آمینه‌های دیگری مانند تریپتوفان و والین در برهم‌کنش شرکت داشتند که در لیگاند قبلی در برهمکنش با سیتوکروم B شرکت نداشتند و در ترکیب لیگاند پروتوپورفیرین با رسپتور سیتوکروم B باز لوسین بیشترین سهم را به‌خود اختصاص داد. سهم هر کدام از اتم‌ها و باقی‌مانده‌ها در انرژی که ایجاد شده با ۴۵ اتم لیگاند و انرژی که ایجاد شده ۱۵۶/۰۰۴- بود.

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 پروتوپورفیرین 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 پرولین ۱۳۴، لوسین۱۳۳، آلانین ۸۴، گلایسین۱۳۰، ترئونین۱۲۶، تیروزین ۱۳۱، فنیل آلانین۹۰، پرولین۱۸۶، لوسین۴۹، فنیل آلانین۱۸۳، ایزولوسین۴۵، لوسین۵۱، گلایسین۴۸ و آلانین۵۲ در ترکیب پروتوپورفیرین با سیتوکروم B بر همکنش‌های هیدروفوبی را نشان می‌دهد. برهمکنش‌های هیدروفوبی فلاوین مونونوکلئوتید را اسیدآمینه‌های فنیل آلانین۲۲۰، آلانین۱۷، لوسین۲۱، لوسین۱۹۷، سرین۳۵، فنیل آلانین۱۸، تریپتوفان۳۱، ایزولوسین۲۷ را شامل شد. اسید آمینه‌های شرکت کننده در تشکیل بر همکنش‌های هیدروفوبی برای لیگاند پروتوپورفیرین 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 دوتا لیگاند، پروتوپورفیرین با مرکزیت آهن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

بهترین و مناسب‌ترین انرژی اتصال و جهت‌گیری را نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید به‌خود اختصاص داد نتایج به شرح به‌دست 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، پروتوپورفیرین 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 پروتوپورفیرین 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 فعال گیرنده و تخمین انرژی پیوندی دو جنبه مهم الگوریتم داکینگ می‌باشند، نتایج به‌دست 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، پروتوپورفیرین دارای منفی‌ترین و بهترین انرژی اتصال با سیتوکروم B نسبت به فلاوین مونونوکلئوتید بود و می‌توان گفت بیشتر بودن تعداد اینترکشن‌ها و پیوندهای تشکیل شده از ترکیب پروتوپورفیرین با سیتوکروم B میتواند صحت و تایید این ادعا باشد. مولکول‌های هیدروفوب یا آب گریز غیرقطبی هستند و به‌همین 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 پروتوپورفیرین بیشتر از فلاوین مونونوکلئوتید بود. در پژوهشی اعلام داشتند که کردند اینترکنش‌ها در ساختار سوم پروتئین‌ها، نیروی اصلی در پروتئین‌ها حاصل اینترکشن‌های هیدروفوبیک در ساختار است (Li et al. 1997). بررسی تشکل پیوند الکترو استاتیک نشان داد که اسید آمینه‌های دیگری مانند تریپتوفان و والین در برهمکنش شرکت داشتند که در لیگاند فلاوین مونونوکلئوتید در برهمکنش با سیتوکروم B شرکت نداشتند و در ترکیب لیگاند پروتوپورفیرین 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 پروتوپورفیرین بیشتر بود. آرژینین دارای بار مثبت زیادی می‌باشد و در تشکیل پیوند هیدرژنی که احتمال باعث افزایش تعامل الکترواستاتیک در ترکیبپروتوپورفیرین با سیتوکروم B شده باشد. شبکه برهمکنش پروتئینی سیتوکروم B پیشگویی شده بر اساس پروتئین‌های میتوکندری، ۱۰پروتئین دارای امتیاز بالا از نظر درجه گره بالقوه معرفی شدند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این پژهش 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 اینترکشن 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 متابولیسم 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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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.

Enrı´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 cytochromeb 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, Acı´n-Pe´rez R, Latorre-Pellicer A, Colas C, Balsa E, Perales-Clemente E, Quiro´s P.M, Calvo E, Rodrı´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, Palfey 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]