

بررسی تأثیر چندشکلی‌های گیرنده هورمون لپتین بر روی تمایل اتصال آن‌ها به هورمون لپتین در گاوشیری به روش داکینگ مولکولی

فاطمه لایقی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 . مهدی خدائی مطلق (نویسنده مسئول)

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران
 . محمد یحیائی

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰-۱۱-۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰-۱۲-۰۳

Email: mmotlagh2002@gmail.com



چکیده

اتصال هورمون لپتین به گیرنده اختصاصی خود (LR) اولین گام مسیر تأثیرگذاری آن بر عملکردهای تولیدی و تولیدمثلی در گاوشیری است. لذا یکی از مسیرهای تنظیمی عملکرد لپتین الگوی اتصال آن به LR می‌باشد. هدف از انجام مطالعه حاضر مقایسه چندشکلی‌های مختلف گیرنده لپتین از نظر ساختار سوم پروتئین و تمایل برهمکنش آن‌ها با لپتین در گاوشیری بود. برای این منظور توالی‌های آمینواسیدی مختلف LR از بانک ژن گرفته شد. چندشکلی‌های مختلف LR با آنالیز هم‌ترازی شناسایی و ساختارهای سوم مربوط به آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Modeller پیش‌بینی گردید. ساختارهای پیش‌بینی شده با نرم افزار گرافیکی PyMol 2.5.1 مشاهده و با استفاده از نمودار رامچاندران و نرم‌افزارهای Provan و I-MUTANT مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین شاخص‌های مختلف فیزیکیوشیمیایی پروتئین‌های مدل شده مانند نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، تعداد دنباله‌های منفی و مثبت و مقدار GRAVY با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه Expasy محاسبه گردید. در ادامه میزان تمایل لپتین به هر کدام از چندشکلی‌های LR با استفاده از تکنیک داکینگ مولکولی و بر پایه دو شاخص موقعیت فضائی و انرژی اتصال مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده تنها دو چندشکلی (LR1 و LR2) در میان توالی‌های مورد مطالعه شناسائی شد و در آنها آمینواسید آرژنین جایگزین سرین شده است. تفاوتی در شاخص‌های فیزیکیوشیمیایی بین دو چندشکلی مشاهده نشد. ارزیابی‌های نمودار رامچاندران و I-MUTANT نشان دادند جایگزین شدن سرین با آرژنین به میزان محدودی ثبات LR2 را تحت تأثیر قرار می‌دهد با این وجود به حسب نتایج Provan این تأثیرگذاری به حدی نمی‌باشد که ساختار و عملکرد آن را تحت تأثیر قرار دهد. نتایج داکینگ نشان داد میزان تمایل اتصال لپتین به LR1 در مقایسه با LR2 بیشتر می‌باشد و از دیدگاه تئوریک انتظار می‌رود LR1 عملکرد مناسب‌تری نسبت به LR2 در انتقال پیام لپتین داشته باشد. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند نقش مؤثری در درک رابطه چندشکلی و فعالیت فیزیولوژیک داشته باشد.

کلمات کلیدی: برهمکنش مولکولی، چندشکلی‌های گیرنده لپتین، داکینگ مولکولی، ساختار سوم پروتئینی

● Veterinary Researches & Biological Products No 137 pp: 104-113

Considering the effect of Leptin Receptor (LR) polymorphisms on their binding affinity to Leptin in dairy cow with docking method

By: layeghi, F., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran. Khodaei Motlagh, M., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran. and yahyaei, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, 38156-8-8349, Iran.

Received: 2022-01-23 Accepted: 2022-02-22

Email: mmotlagh2002@gmail.com

Binding of leptin to its specific receptor (LR) is the first step in its effect on production and reproductive functions in dairy. Therefore, one of the main regulatory pathways of leptin function is its binding pattern to LR. The aim of this study was to compare the tertiary structure of different LR polymorphisms and their binding affinity to leptin in dairy cows. For this purpose, LR amino acid sequences were obtained from Gene bank. Firstly, Polymorphisms were identified by alignment analysis. Their related third structures were predicted by homology modeling technique using Modeller software. The created structures were observed and evaluated using PyMol 2.5.1 graphics software, Ramachandran plot, Provean and I-MUTANT softwares. Also, different physico-chemical parameters of the modeled proteins such as isoelectric point, molecular weight, and number of negative and positive sequences and Grand Average of hydropathicity (GRAVY) were calculated using ProtParam tool in ExPasy database. Then, the affinity of leptin to each of the LR polymorphism was evaluated using molecular docking technique based on binding energy and spatial position indices. Based on the results, only two polymorphisms (LR1 and LR2) were identified among the studied sequences in which serine has been replaced by arginine. There was no difference in structural and physicochemical parameters between two polymorphisms. Ramachandran and I-MUTANT diagram evaluations showed that serine replacement with arginine had a limited effect on LR2 stability. However, according to Provean results, this effect is not sufficient to affect its structure and performance. Docking results showed that the binding affinity of leptin to LR1 is higher compared to LR2 and from a theoretical point of view it is expected that LR1 will have a better performance than LR2 in transmitting leptin messages. In general, the results of this study can play an effective role in understanding the relationship between polymorphism and physiological activity.

Key words: Molecular Interaction, Leptin receptor polymorphisms, molecular docking, Protein tertiary structure

مقدمه

گاو شیری گزارش شده است که می‌تواند بر روی عملکرد لپتین تأثیرگذار باشند. از این رو بررسی‌ها نشان می‌دهند ژن گیرنده لپتین این قابلیت را دارد که به عنوان یک ژن کاندید و بزرگ اثر مؤثر بر صفات تولیدی در برنامه‌های اصلاح نژاد دام مدنظر قرار گیرد. در پژوهشی Liefers و همکاران (۲۰۰۴)، نشان دادند ارتباط معنی‌داری بین جهش رخ داده در اگزون ۲۰ ژن گیرنده لپتین و غلظت لپتین در مرحله آخر آبستنی، در گاو شیری وجود دارد (۱۵). در مطالعه‌ای که بر روی گاوهای لهستانی هلشتاین-فریزین انجام پذیرفت، ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن گیرنده لپتین و صفات عملکردی شامل سلول‌های سوماتیک در شیر، طول عمر و صفات تولیدمثلی مشاهده شد (۱۴). همچنین ارتباط معنی‌داری بین چندشکلی ژن گیرنده‌های لپتین با چربی پشت بدن، وزن زنده و وزن لاشه در گاوهای چینی گزارش شده است (۱۶). در مطالعه دیگری که بر

لپتین هورمونی مؤثر در کنترل مصرف خوراک، بکارگیری انرژی، تولیدمثل، رشد جنین و ایمنی می‌باشد. لپتین عمدتاً توسط بافت چربی سفید تولید و ترشح می‌شود. لیکن در اندام‌های دیگر نظیر جفت، معده، ماهیچه و مغز نیز بیان می‌شود. لپتین ماهیت پروتئینی دارد و از ۱۴۶ اسید آمینه تشکیل شده است (۳). نقش آفرینی کارآمد لپتین وابسته به فاکتورهای مختلفی نظیر غلظت و زمان مناسب حضور در سطح بافت هدف، تعداد و سطح در دسترس گیرنده (۲۰) و برهمکنش پایدار آن با گیرنده خود در سطح سلول‌های هدف می‌باشد (۹،۲۴). LR ماهیتی گلیکوپروتئینی دارد و شامل ۳ بخش خارج سلولی، میان سلولی و درون سلولی است (۲۳). ژن گیرنده لپتین در گاو بر روی کروموزوم شماره ۳ قرار دارد (۲۱، ۲۵). چندشکلی‌ها و ایزوفروم‌های متنوعی از LR در

به منظور بررسی اثر جایگزینی آمینواسیدی بر ساختار و عملکرد پروتئین‌ها از ابزار Provean استفاده شد (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) (۴). همچنین به منظور بررسی تأثیر جهش بر روی ثبات پروتئین‌ها از نرم افزار (۲) I-MUTANT (<http://folding.biofold.org/>)، cg-bin/i- cgi.mutant۲,۰ استفاده شد.

پیش‌بینی نواحی درگیر در میانکنش LR و لپتین

به منظور تعیین نواحی درگیر در میانکنش LR و لپتین دو مسیر قابل دسترس بود. مسیر اول استفاده از سرور CPORT (www.milou.science) و دیگری الگوگیری از ساختار کریستال برهمکنش‌های مشابه با برهمکنش LR و لپتین. در این مطالعه مسیر دوم به منظور انتخاب نواحی درگیر در میانکنش استفاده شد و برای این منظور ساختار کریستال برهمکنش LR و لپتین استفاده شد (۱۹).

بررسی میانکنش لپتین و LR

به منظور بررسی میانکنش لپتین و LR از سرور HADDOCK 2.4 استفاده گردید (۲۲). HADDOCK با توجه به این‌که در حین فرآیند داکینگ از نواحی درگیر در میانکنش استفاده می‌نماید، یک روش داکینگ داده-محور می‌باشد لذا نتایج حاصل از آن با نتایج بدست آمده از آزمایشگاه مطابقت بالایی دارد (۵، ۶). نتایج بدست آمده از داکینگ با استفاده از نرم‌افزار LigPlot+1.4.5 به منظور بررسی جزئیات برهمکنش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۸).

نتایج و بحث

نتایج مربوط به آنالیز چندشکلی‌های LR در شکل شماره ۱ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود تنها یک جایگزینی بین چندشکلی‌های مختلف پروتئین قابل مشاهده است. جایگزینی در آمینواسید شماره ۱۸۱ که در آن آرژنین (Arg) جایگزین سرین (Ser) شده است، مشاهده گردید. بررسی جزئی‌تر نشان داد جایگزینی صورت گرفته در دومین خارج سلولی پروتئین گیرنده لپتین می‌باشد (شکل ۱).

از آنجایی‌که ساختار سوم پروتئین تابع توالی آمینواسیدی آن می‌باشد لذا این احتمال وجود دارد که چندشکلی‌های مختلف یک پروتئین ساختارهای سوم متفاوت و متعاقباً عملکرد متفاوت داشته باشند. از این رو ساختار دو چندشکلی LR مشاهده شده در این مطالعه به منظور بررسی تأثیر جایگزینی آمینواسیدی بر ساختار آنها مدل سازی شد. با توجه به اینکه جایگزینی آمینواسیدی در دومین خارج سلولی LR رخ داده است مدل‌سازی محدود به این ناحیه بود. برای هر دو چندشکلی، بهترین مدل از بین ۵ مدل ساخته شده توسط Modeller براساس کمترین میزان شاخص ترتیب Dope score انتخاب گردید. میزان Dope score برای LR1 و LR2 به ترتیب 18002.22 و 18057.35- بدست آمد. مقایسه بین مدل‌های انتخاب شده برای چندشکلی‌های مورد بررسی نشان داد اختلاف معنی‌داری در شاخص Dope score، بین آنها قابل مشاهده نمی‌باشد (شکل ۲).

با استفاده از آنالیزهای متعددی میزان صحت و کیفیت مدل‌های پیش‌بینی شده و تأثیر جایگزینی آمینواسیدها بر روی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از نمودار رامانچاندرا در شکل شماره

روی سه نژاد برزیلی برنجس، چورلیس و برانگوس انجام گرفت مشاهده گردید، جهش رخ داده در ژن گیرنده لپتین هیچ گونه تأثیری بر روی پارامترهای تولیدمثلی و افزایش وزن روزانه ندارد (۱).

وجه اشتراک مطالعات اشاره شده در خصوص ارتباط بین چندشکلی‌ها و ایزوفرم‌های LR یا عملکرد تولیدی و تولیدمثلی این است که دامنه مطالعات فوق صرفاً ژنتیکی، محدود به معرفی ژنوتیپ و ایزوفرم و بررسی ارتباط معنی‌داری آن‌ها با صفات تولیدی و تولیدمثلی بوده است و در هیچکدام از مطالعات فوق تأثیر جهش و نوع ایزوفرم بر ساختار سوم پروتئین LR و تمایل برهمکنش آن با لپتین مورد توجه قرار نگرفته است. با توجه به اینکه اولین مرحله برای شروع اثر لپتین اتصال آن به LR در سطح سلول هدف می‌باشد لذا اینطور به نظر می‌رسد که تغییر ساختار سوم LR می‌تواند در پایداری برهمکنش آن با لپتین و متعاقباً میزان بروز اثرات آن مؤثر باشد. هدف مطالعه حاضر مقایسه چندشکلی‌های مختلف LR از نظر ساختار سوم پروتئینی و تمایل برهمکنش آن‌ها با لپتین می‌باشد. برای این منظور از تکنیک داکینگ مولکولی، که یکی از روش‌های مورد استفاده در مدل‌سازی مولکولی است و با استفاده از آن می‌توان جایگاه اتصال لیگاند به پروتئین و نیز شدت پیوند بین آن‌ها را پیش‌بینی و محاسبه نمود استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

آنالیز چندشکلی‌های پروتئین LR

با مراجعه به پایگاه داده‌های بانک پروتئین در NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) توالی‌های آمینواسیدی گزارش شده برای گیرنده لپتین در Bos Taurus شناسایی شد. هم‌ردیف‌سازی چندتایی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 5.0 و الگوریتم Clustalw صورت پذیرفت. در ادامه تعداد جهش‌ها و جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی آمینواسیدی رخ داده معلوم گردید و نتایج با استفاده از نرم‌افزار Bioedit7.2 مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفت (۱۰).

مدل‌سازی ساختار سوم LR

با توجه به عدم وجود ساختار کریستالوگرافی برای پروتئین LR گاوی در پایگاه اطلاعاتی PDB (www.rcsb.org)، ساختار کریستال آن به روش همولوژی مدلینگ پیش‌بینی شد. برای این منظور از ساختار کریستال پروتئین LR انسانی به عنوان ساختار الگو استفاده شد (۱۹) در ادامه ساختار کریستال چندشکلی‌های مختلف پروتئین LR گاوی با استفاده از نرم‌افزار مدلر (Modeller 9.1.5) (۷) تعیین گردید.

ارزیابی ساختارهای سوم مدل شده

ساختارهای ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار گرافیکی PyMol 2.5.1 و نمودار Ramachandran مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند. همچنین شاخص‌های مختلف فیزیکی-شیمیایی پروتئین‌های مدل شده مانند نقطه ایزوالکتریک، وزن مولکولی، تعداد دنباله‌های منفی و مثبت و مقدار Grand Average of hydropathicity (GRAVY) با استفاده از ابزار ProtParam در پایگاه (<http://expasy.org/tools/protparam>) html محاسبه گردید (۸).

Z-score= -1.5

HADDOCK-score: -85.7+/- 8.6

و برای کمپلکس L-LR2 به صورت زیر می‌باشد:

LR2:

Z-score= -1.4

HADDOCK-score: -81.3 +/- 2.6

بر پایه نتایج داکینگ ژست فضائی و تمایل اتصال به LR بین دو چندشکلی مورد ارزیابی در نواحی پیش‌بینی شده درگیر در برهمکنش متفاوت بود (شکل ۵). انرژی اتصالی LR برای کمپلکس L-LR1 و L-LR2 به ترتیب ۱۸۵،۴۹- و ۱۴۵،۴۷- محاسبه شد که بیانگر تمایل کمتر لپتین به چندشکلی LR2 در مقایسه با چندشکلی LR1 می‌باشد. گاهی اوقات تغییر در یک آمینواسید ممکن است باعث تخریب جایگاه اتصال لیگاند یا جایگاه اتصال پروتئین شود و از این طریق بر عملکرد پروتئین با استفاده از تغییر ثبات پروتئین یا سرعت تاخوردگی پروتئین تأثیرگذار باشد و از این طریق بر میل اتصال لیگاند بر جایگاهش نیز تأثیرگذار باشد. بررسی جهش‌ها در ژن BMP15 که یکی از ژن‌های بزرگ اثر چندقلوزائی می‌باشد نشان می‌دهد حتی جایگزینی یک آمینواسید می‌تواند تأثیر زیاد بر فعالیت پروتئین داشته و عملکرد آن را دچار تغییر نماید (۱۲). همچنین گزارش شده است برخی جهش‌های رخ داده در ژن‌های BMP15 و GDF9 از طریق تغییر در ساختار فضائی این پروتئین‌ها می‌توانند عملکردشان را تحت تأثیر قرار دهند (۱۲). Liefers و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه‌ای مشاهده کردند، ارتباط معنی‌داری بین جهش رخ داده در آگرون ۲۰ گیرنده لپتین و غلظت لپتین در مرحله آخر آبستنی در گاوشیری وجود دارد و آنها یکی از دلایل این ارتباط را میزان تمایل اتصال لپتین به گیرنده مربوطه‌اش بیان داشتند (۱۵). در مطالعه حاضر جهش رخ داده در ناحیه اتصال گیرنده به لیگاند می‌باشد و این احتمال وجود دارد که تغییر صورت گرفته هم به صورت مستقیم (از طریق برهمکنش با لیگاند) و هم بصورت غیرمستقیم (تغییر در ساختار گیرنده و تأثیرگذاری بر جایگاه اتصال لیگاند به گیرنده) بر میزان تمایل لپتین به گیرنده‌اش تأثیرگذار باشد. ارزیابی‌های نمودار راماچاندوران و I-MUTANT نشان داد ساختار چندشکلی LR2 در مقایسه با LR1 از پایداری و ثبات کمتری برخوردار است و این می‌تواند کاهش پایداری اتصال لپتین به آن را به همراه داشته باشد و نتایج بدست آمده از داکینگ نیز مؤید این ادعا می‌باشد. همراستا با نتایج ما در مطالعات متعددی تأثیر جهش در ناحیه اتصال لپتین گیرنده لپتین (LBD) بر میزان تمایل اتصال لپتین به آن مورد بررسی قرار گرفته است و اکثر این مطالعات نشان داده اند وقوع جهش در ناحیه مذکور کاهش تمایل اتصال لپتین به گیرنده را به همراه داشته است. به عنوان نمونه Niv-Spector و همکاران با مطالعه خود بر روی مرغ نشان دادند به صورت مجزا جایگزین شدن آمینواسیدهای ترئونین، فنیل آلانین، آرژنین که در ناحیه اتصال لپتین گیرنده قرار دارند با آمینواسید آلانین کاهش اتصال لپتین به گیرنده‌اش را به همراه دارد. آنها همچنین نشان دادند جایگزین شدن همزمان آمینواسیدهای والین و فنیل آلانین با آلانین عدم اتصال لپتین به گیرنده‌اش را به همراه داشت (۱۷). همچنین در مطالعه دیگری Iserentant و همکاران با مطالعه بر روی موش نشان دادند به

۳ نشان داده شده است. چنانچه دیده می‌شود نقاط قرمز رنگ نشان دهنده اسیدآمینینه با زاویه phi و psi غیرمجاز است. جدول ۱ در برگزیده پارامترهای آماری نمودارهای راماچاندوران می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود نقاط غیرمجاز برای LR1 کمتر از LR2 می‌باشد بطوریکه در LR1، ۹۵٪ و ۱،۶۵٪ درصد از مدل ساخته شده به ترتیب در منطقه ایده‌آل و غیرقابل قبول می‌باشد در حالیکه در LR2، این اعداد به ترتیب برابر ۹۰٪ و ۲،۳۱٪ بود. این تغییر ساختار از منطقه ایده‌آل به منطقه غیرقابل قبول نشان دهنده اثرات جهش بر ساختار پروتئین است. در جدول ۲ شاخص‌های فیزیکی-شیمیایی مربوط به چندشکلی‌های مورد مطالعه آورده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود جایگزینی آرژنین با سرین منجر به بازی‌تر شدن LR1 گردید که با توجه به ماهیت بازی آمینواسید سرین کاملاً طبیعی به نظر می‌رسد. همچنین جایگزینی این آمینواسید کاهش قطبیت LR1 را به همراه داشت.

بررسی تأثیر جایگزینی آمینواسید بر ثبات و ساختار و عملکرد پروتئین به ترتیب با استفاده از ابزارهای I-MUTANT و Provean صورت پذیرفت. I-MUTANT به صورت خودکار تغییر در پایداری و ثبات پروتئین را در اثر جایگزینی آمینواسیدها با استفاده از تغییر در انرژی آزاد گیبس پیش‌بینی می‌کند و براساس شاخص DDG (Kcal/mol) ارائه می‌گردد. شاخص $DDG < 0$ بیانگر کاهش پایداری و $DDG > 0$ بیانگر افزایش پایداری پروتئین در اثر جایگزینی آمینواسید است. در مطالعه ما شاخص $DDG = -1.2$ محاسبه گردید که نشان دهنده کاهش ثبات پروتئین بعد از جایگزینی آمینواسید آرژنین (R) به جای آمینواسید سرین (S) است. نتایج بدست آمده از این بخش با نتایج بدست آمده از نمودار راماچاندوران همخوانی داشت. بطوریکه در چندشکلی LR2 تعداد مناطق غیرقابل قبول افزایش نشان داد.

آنالیز Provean با استفاده از الگوریتم‌هایی اثر جاننشینی آمینواسید و یا بی‌اثر بودن آن بر عملکرد پروتئین را با ارائه شاخص ارزش آستانه پیش‌بینی می‌کند. توالی‌هایی که دارای امتیاز کمتر از ۲،۵- باشند مخرب و توالی‌هایی که ارزش آنها بالاتر از ۲،۵- باشد طبیعی پیش‌بینی می‌شوند. در این مطالعه provean score، ۲،۲ بدست آمد که نشان‌دهنده عدم تأثیرات مخرب جایگزینی آمینواسید آرژنین به جای آمینواسید سرین می‌باشد. به طور کلی نتایج بدست آمده از آنالیزهای مختلف نشان داد جایگزینی آرژنین با سرین به میزان محدودی ثبات LR را تحت تأثیر قرار می‌دهد با این وجود این تأثیرگذاری به حدی نمی‌باشد که ساختار و عملکرد آن را تحت تأثیر قرار دهد.

الگوی اتصال لپتین و گیرنده با استفاده از تکنیک داکینگ و در بستر سرور HADDOCK انجام پذیرفت. نواحی درگیر در برهمکنش براساس مطالعه Prokop و همکاران (۲۰۱۲) (۱۹) تعیین گردید که در شکل ۳ نشان داده شده است.

بررسی کیفیت کمپلکس‌ها و انتخاب بهترین آنها براساس موقعیت مناسب لپتین، حداقل میزان انرژی مورد نیاز برای اتصال، میزان Z-score و HADDOCK-score از بین کلاسترهای شبیه‌سازی شده انجام شد. میزان این فراسنجه‌ها برای بهترین داکینگ از کمپلکس L-LR1 به صورت زیر می‌باشد:

LR1:

شده متفاوت بود و LR1 منفی‌ترین سطح انرژی را به خود اختصاص داد. به طور کلی نتایج حاصل از این مطالعه می‌تواند نقش مؤثری در درک رابطه چندشکلی و فعالیت فیزیولوژیک لپتین داشته باشد.

پاورقی‌ها

- 1 - Molecular Docking.
- 2 - Protein Variation Effect Analyser.
- 3 - Consensus Prediction Of interface Residues in Transient complexes.
- 4 - Threshold value.
- 5 - Leptin binding domain.

منابع مورد استفاده

1. Almeida, S. E., L. Santos, D. T. Passos, Â. O. Corbellini, B. M. Lopes, C. Kirst, G. Terra, J. P. Neves, P. B. Gonçalves and J. C. Moraes. 2008. Genetic polymorphisms at the leptin receptor gene in three beef cattle breeds. *Genetics and Molecular Biology* 31: 680-685.
2. Bava, K. A., M. M. Gromiha, H. Uedaira, K. Kitajima and A. Sarai. 2004. ProTherm, version 4.0: thermodynamic database for proteins and mutants. *Nucleic acids research* 32: D120-D121.
3. Buchanan, F. C., C. J. Fitzsimmons, A. G. Van Kessel, T. D. Thue, D. C. Winkelman-Sim and S. M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics selection evolution* 34: 105-116.
4. Choi, Y. and A. P. Chan. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31: 2745-2747.
5. De Vries, S. J., A. S. Melquiond, P. L. Kastritis, E. Karaca, A. Bordogna, M. van Dijk, J. P. Rodrigues and A. M. Bonvin. 2010.

صورت مجزا جایگزین شدن آمینواسیدهای گلوتامین، آسپاراژین، آرژنین و آسپارتیک اسید که در ناحیه اتصال لپتین گیرنده لپتین قرار دارند با آمینواسید آلانین به ترتیب منجر به کاهش ۵۰٪، ۷۵٪، ۷۵٪ و ۲۵٪ انتقال سیگنال درون سلولی را به همراه داشت (۱۳). در یک بررسی که با هدف ارزیابی تأثیر چندشکلی گیرنده هورمون تحریک کننده رشد فولیکولی (FSHR) بر ساختار سوم و الگوی اتصال آن به هورمون رشد فولیکولی (FSH) انجام شد نشان داده شد FSHR دارای سه چندشکلی در دومین خارج سلولی می‌باشد و جایگزینی‌های آمینواسیدی صورت گرفته الگو و تمایل اتصال FSH به آن را تحت تأثیر قرار داد (۱۱).

جهت بررسی بیشتر جزئیات برهمکنش خروجی Ligplot+ مورد بررسی قرار گرفت (اشکال ۶ و ۷). تعداد برهمکنش‌های هیدروژنی و هیدروفوب برای هر دو جهش مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات به دست آمده نشان داد که تعداد پیوند هیدروژنی در هر دو جهش یکسان است. اما تعداد برهمکنش‌های هیدروفوب در کمپلکس L-LR1 بیشتر بود (جدول ۴-۵). به منظور بررسی جزئیات برهمکنش، اسیدآمینوهای درگیر در تشکیل برهمکنش‌ها مطابق جدول (۴-۵) نمایش داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است برای هر دو چندشکلی اسیدآمینوهای متنوعی در تشکیل پیوند هیدروژنی و هیدروفوب دخالت دارند و میزان آمینواسیدهای متشابه در هر دو اندک است. عدم تشابه سایر آمینواسیدهای درگیر در ناحیه برهمکنش کمپلکس‌ها را می‌توان به تفاوت جهت‌گیری پروتئین لپتین نسبت به هر کدام از چندشکل‌ها نسبت داد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه تنها دو چندشکلی (LR1 و LR2) در میان توالی‌های آمینواسیدی اخذ شده از پروتئین گیرنده هورمون لپتین در گاو شناسائی شد. مدل‌های ایجاد شده برای دو چندشکلی یافت شده از کیفیت مناسبی برخوردار بودند و تفاوتی در شاخص‌های فیزیک-شیمیائی بین آن‌ها مشاهده نشد. با این وجود چندشکلی LR2 از سطح ثبات و پایداری کمتری در مقایسه با چندشکلی LR1 برخوردار بود. براساس نتایج آنالیز داکینگ انرژی اتصال برای چندشکلی‌های مشاهده

```

LR1 SCETDGYLTKMTCRWSPNAIQSLAGSNLQLRYHRSSLYCSDVPSIHPVSEPKDCHLQRDGFYECIFQPIFLLSGYTMWIR
LR2 SCETDGYLTKMTCRWSPNAIQSLAGSNLQLRYHRSSLYCSDVPSIHPVSEPKDCHLQRDGFYECIFQPIFLLSGYTMWIR
*****

LR1 INHTLGSLDSPACVVPDSVVKPLPPSSVKAETVKIGLLKISWEKPVFPENNLQFQIRYGLSGKQVQWKMFEVYDAKLK
LR2 INHTLGSLDSPACVVPDSVVKPLPPSSVKAETVKIGLLKISWEKPVFPENNLQFQIRYGLSGKQVQWKMFEVYDAKLK
*****

LR1 SASLPVPDLCAVYTVQVRCKSLDGLGYWSNWSTPAHTTV
LR2 SASLPVPDLCAVYTVQVRCKRLDGLGYWSNWSTPAHTTV
*****
    
```

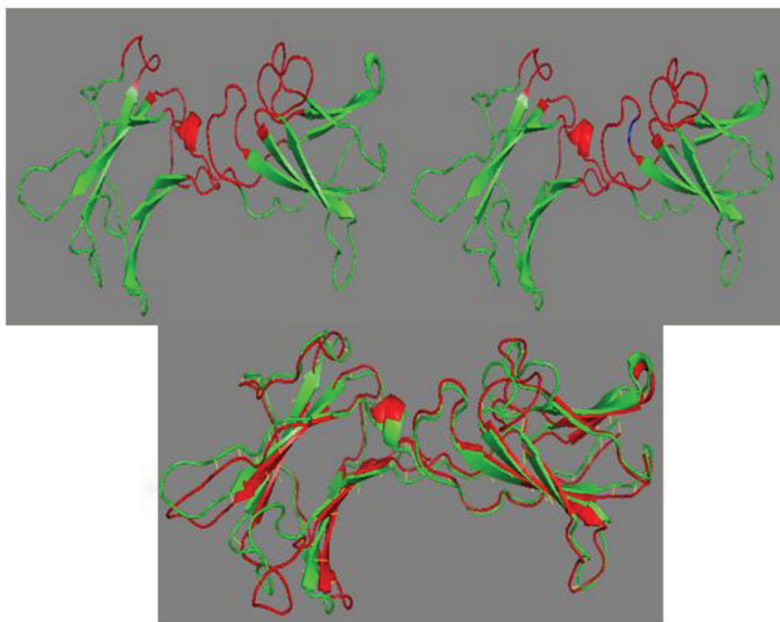
شکل ۱- مقایسه بین توالی آمینواسیدی دومین خارج سلولی چندشکلی‌های LR1 و LR2، جایگزینی آرژنین با سرین.

Strengths and weaknesses of data-driven docking in critical assessment of prediction of interactions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 78: 3242-3249.

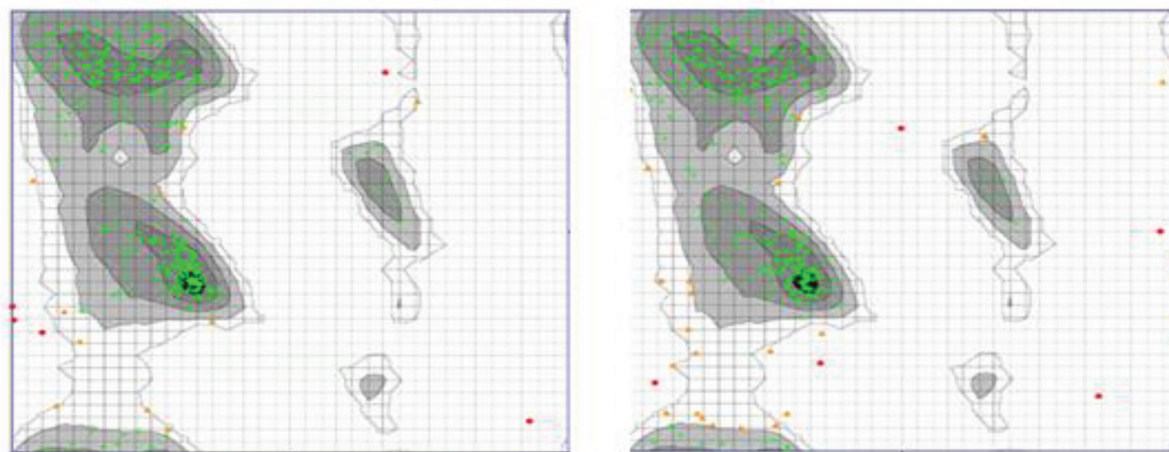
6. Dominguez, C., R. Boelens and A. M. Bonvin. 2003. HAD-

DOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society* 125: 1731-1737.

7. Eswar, N., B. Webb, M. A. Marti-Renom, M. Madhusudhan,



شکل ۲- ساختار سوم پیش‌بینی شده برای LR1 (بالا سمت چپ) و LR2 (بالا سمت راست) با استفاده از نرم افزار Modeller و Alignment کردن ساختار آن‌ها با یکدیگر (پایین).



شکل ۳- نقشه رامانچاندران ساختار سوم پیش‌بینی شده برای LR1 (سمت چپ) و LR2 (سمت راست).

D. Eramian, M. y. Shen, U. Pieper and A. Sali. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current protocols in bioinformatics* 15: 5.6. 1-5.6. 30.

8. Gasteiger, E., C. Hoogland, A. Gattiker, M. R. Wilkins, R. D. Appel and A. Bairoch. 2005. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. *The proteomics protocols handbook*: 571-607.

9. Ginther, O., D. Bergfelt, M. Beg and K. Kot. 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biology of reproduction*

64: 197-205.

10. Hall, T. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* p. 95-98.

11. Hamny, H., M. Jalaluddin, S. Aisyah, S. Wahyuni and A. a. Aulanni'am. 2017. Polymorphism of follicle stimulating hormone receptor influences the 3D structure and its binding pattern to FSH in *Bos taurus*. *Indian Journal of Animal Research* 51: 630-634.

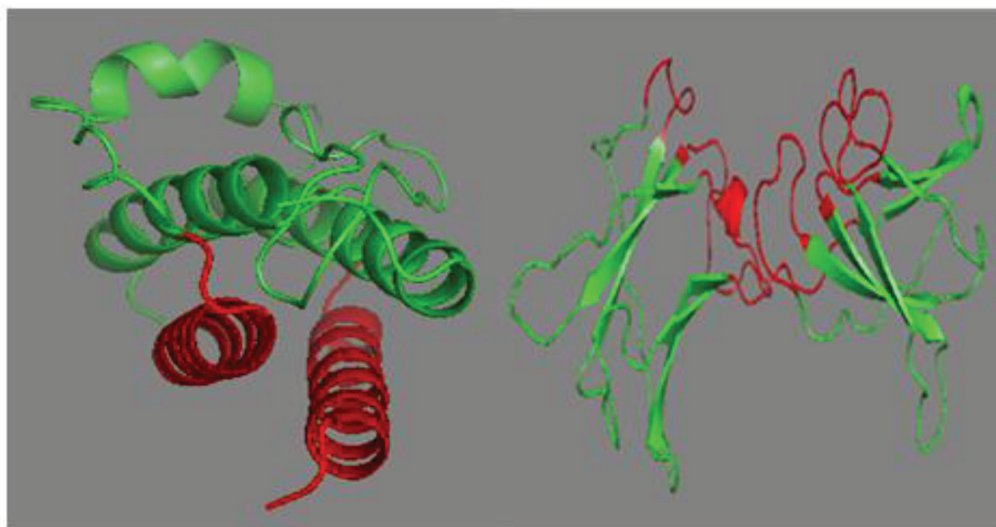
12. Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H.

جدول ۱- مقایسه فراسنجه‌های آماری نمودار رامچاندرا برای LR۱ و LR۲.

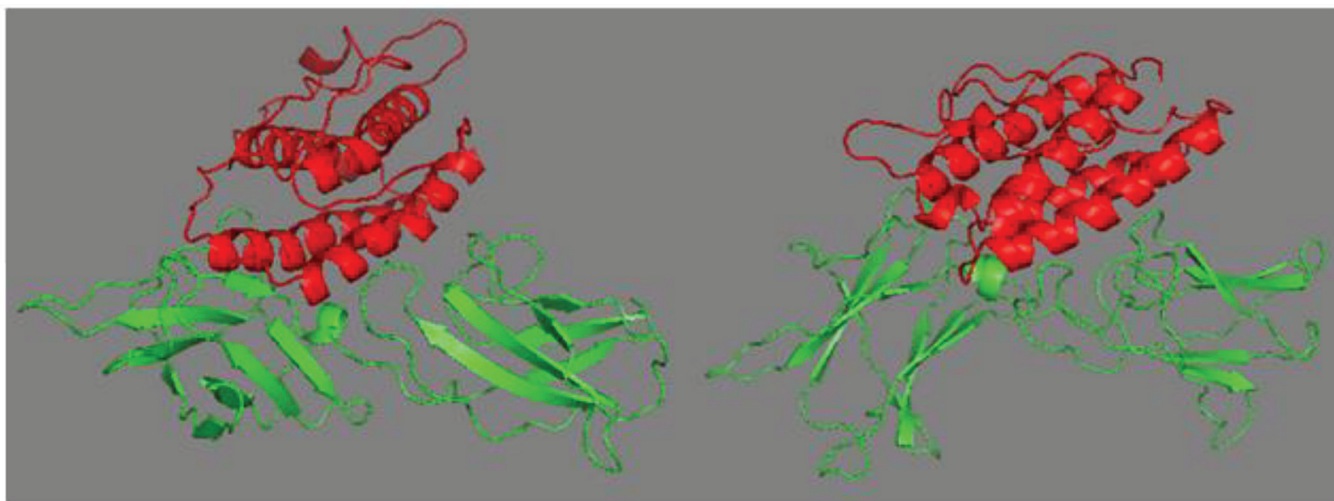
چندشکلی	مطلوب‌ترین نواحی	نواحی مجاز اضافی	مجاز متوسط	ناحیه غیرمجاز
LR۱	٪۹۵	٪۳,۳	-	٪۱,۶۵
LR۲	٪۹۰	٪۷,۵۹	-	٪۲,۳۱

جدول ۲- شاخص‌های فیزیکی-شیمیایی مربوط به LR۱ و LR۲.

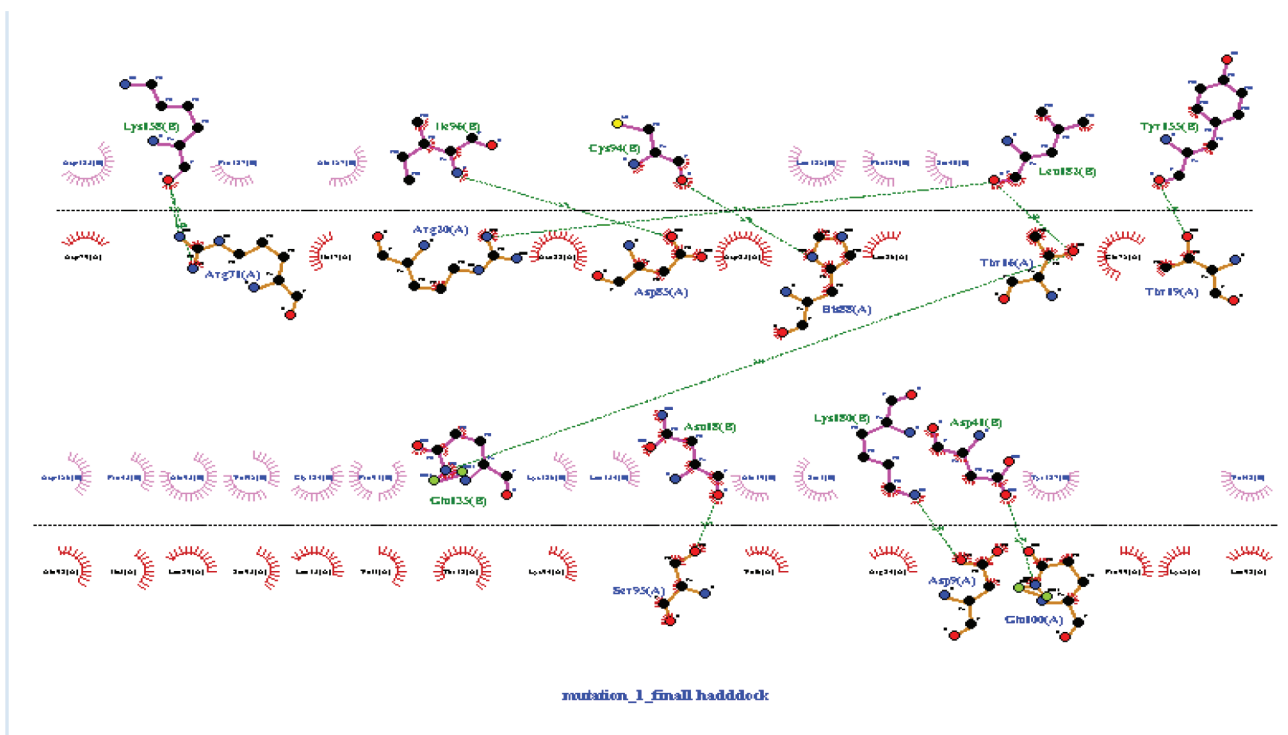
چندشکلی	وزن مولکولی (دالتون)	نقطه ایزوالکتریک	تعداد آمینواسیدهای منفی و مثبت	GRAVY
LR۱	۸۸/۲۲۴۱۲	۳۸/۸	۳۵	-۰,۱۲
LR۲	۹۹/۲۲۴۸۱	۵۹/۸	۳۶	-۰,۱۳



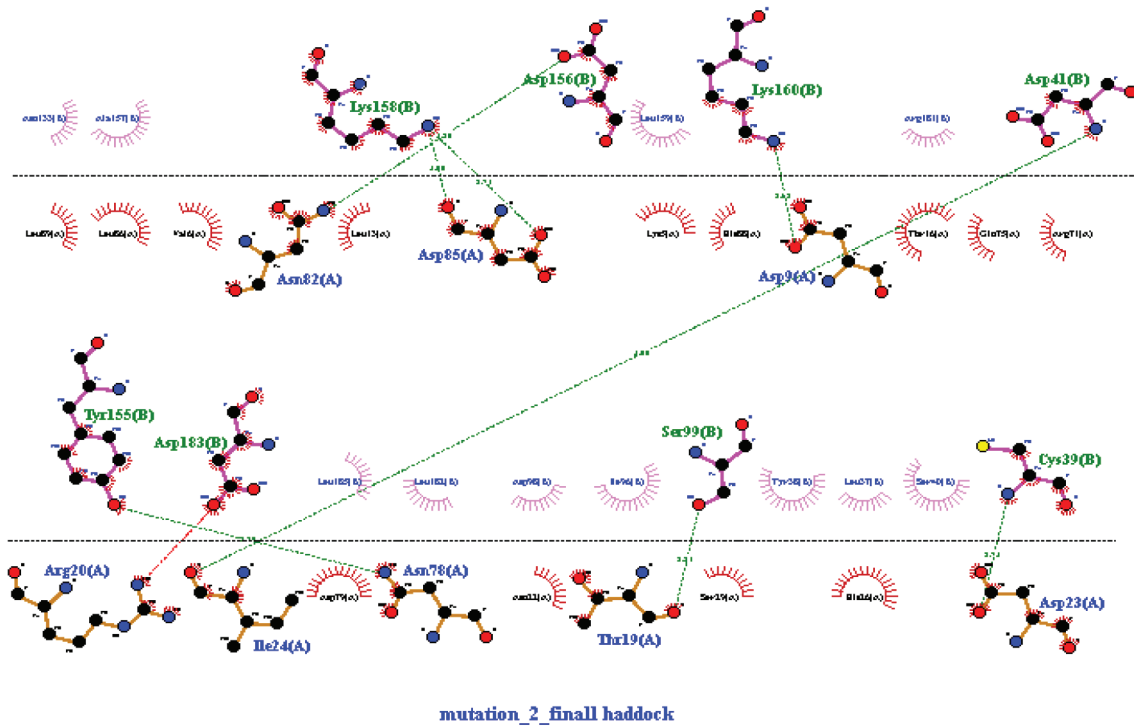
شکل ۴- نواحی درگیر در میانگنش لپتین (سمت چپ) با گیرنده خود (سمت راست)، نواحی قرمز رنگ در هر دو ساختار نشان دهنده نواحی درگیر در برهمکنش می‌باشند.



شکل ۵- نتایج داکینگ لپتین با چندشکلی‌های LR۱ (سمت چپ)، LR۲ (سمت راست).



شکل ۶- نتایج آنالیز از جزئیات برهمکنش لپتین با چندشکلی‌های LR۱.



شکل ۷- نتایج آنالیز از Ligplot+ از جزئیات برهمکنش لپتین با چندشکلی‌های LR۲.

جدول ۳- آمینواسیدهای درگیر در پیوند هیدروژنی کمپلکس‌های LR۱ و LR۲.

چندشکلی	اسیدآمینوهای درگیر در پیوند هیدروژنی	تعداد پیوند هیدروژنی	تعداد پیوند هیدروفوب	انرژی اتصال Kcal/mol
LR۱	Lys150- Arg71- Ile96-Asp85- Cys94- Glu88-Thr16- Gln135-Lys180-Asp9-Leu182-Arg20-Tyr155-Thr19- Asn18-Ser95- Asp41-Gln100	۱۰	۱۸	-۱۸۵/۴۹۱
LR۲	Lys158- Asp85- Asp156- Asn82- Lys160-Asp9- Asp41- Ile24-Tyr155- Asn78- Arg20- Asp183-Ser99- Thr19- Cys39-Asp23	۹	۱۳	-۱۴۵/۱۴۷

- Davis, R. Powell and S. M. Galloway. 2004. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of reproduction* 70: 900-909.
13. Iserentant, H., F. Peelman, D. Defeau, J. Vandekerckhove, L. Zabeau and J. Tavernier. 2005. Mapping of the interface between leptin and the leptin receptor CRH2 domain. *Journal of cell science* 118: 2519-2527.
14. Komisarek, J. 2010. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* 10: 133-141.
15. Liefers, S., M. Te Pas, R. Veerkamp and T. Van Der Lende. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 85: 1633-1638.
16. Liu, M., J. Sun, Y. Sun, C. Bock and Q. Chen. 2009. Thickness-dependent mechanical properties of polydimethylsiloxane membranes. *Journal of micromechanics and microengineering* 19: 035028.
17. Niv-Spector, L., N. Raver, M. Friedman-Einat, J. Grosclaude, E. Gussakovsky, O. Livnah and A. Gertler. 2005. Mapping leptin-interacting sites in recombinant leptin-binding domain (LBD) subcloned from chicken leptin receptor. *Biochemical Journal* 390: 475-484.
18. O'Boyle, N. M., M. Banck, C. A. James, C. Morley, T. Vandermeersch and G. R. Hutchison. 2011. Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of cheminformatics* 3: 1-14.
19. Prokop, J., R. Duff, H. Ball, D. Copeland and R. Londraville. 2012. Leptin and leptin receptor: analysis of a structure to function relationship in interaction and evolution from humans to fish. *Peptides* 38: 326-336.
20. Sun, L.-P., Q.-Z. Du, Y.-P. Song, J.-N. Yu, S.-J. Wang, L. Sang, L.-W. Song, Y.-M. Yue, Y.-Z. Lian and S.-L. Zhang. 2012. Polymorphisms in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effects on sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Molecular biology reports* 39: 7117-7123.
21. Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, L. A. Campfield, F. T. Clark and J. Deeds. 1995. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83: 1263-1271.
22. Van Zundert, G., J. Rodrigues, M. Trellet, C. Schmitz, P. Kastiris, E. Karaca, A. Melquiond, M. van Dijk, S. De Vries and A. Bonvin. 2016. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes. *Journal of molecular biology* 428: 720-725.
23. Veerkamp, R., J. Oldenbroek, H. Van Der Gaast and J. Van Der Werf. 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. *Journal of Dairy Science* 83: 577-583.
24. Wohlfres-Viana, S., E. Arashiro, T. Minare, C. Fernandes, J. Grazia, L. Siqueira, M. Machado and J. Viana. 2019. Differential expression of LHCGR and its isoforms is associated to the variability in superovulation responses of Gir cattle. *Theriogenology* 126: 68-74.
25. Zimin, A. V., A. L. Delcher, L. Florea, D. R. Kelley, M. C. Schatz, D. Puiu, F. Hanrahan, G. Pertea, C. P. Van Tassell and T. S. Sonstegard. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome biology* 10: 1-10.

