

## استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای مطالعه پروتئین مایوستاتین

### Use of Bioinformatics Tools to Study Myostatin Protein

علی دیناری<sup>۱</sup>، سیده نسیم طباطبایی پور<sup>۲</sup>، علیرضا فتحی<sup>۳</sup> و مرتضی هادی زاده<sup>۴\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۱/۲۶

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۶

#### چکیده

ژن مایوستاتین متعلق به خانواده فاکتورهای تمایز رشد ( $TGF-\beta$ ) می باشد که در رشد و نمو و بلوغ و به طور اختصاصی در توسعه ماهیچه اسکلتی بالغ بیان می شود. در این پژوهش با بهره گیری از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی، توالی اسیدآمینه ای پروتئین مایوستاتین در گونه های مختلف از جمله گاو، گوسفند، بز، اسب، خوک، مرغ، بوقلمون، اردک، غاز، کبوتر، موش و انسان بررسی شد. در هم ردیفی بخش پایانی پروتئین مایوستاتین (فرم فعال پروتئین مایوستاتین که به صورت دایمر بیان می شود)، درجه بالایی از حفاظت شدگی مشاهده شد، به طوری که نوسان تغییرات در این بخش نسبت به سایر قسمت های توالی پروتئینی، کمترین مقدار ممکن بود. با استفاده از سایت های تخصصی Proteus و Phyre<sup>2</sup> ساختارهای ثانویه ای از قبیل مارپیچ آلفا، صفحات بتا و ساختار سه بعدی پروتئین مایوستاتین مورد بررسی قرار گرفت. اسیدآمینه های لوسین، لیزین، ایزولوسین و گلوتامیک اسید در گاو و گوسفند و بز فراوانی یکسانی را نشان دادند اما در مقایسه با ماکیان مانند مرغ، فراوانی بیشتری داشتند. حال آن که فراوانی این اسیدآمینه ها در توالی پروتئینی مایوستاتین انسان و خوک متوسط بود. بررسی درخت فیلوژنی نشان داد که تفاوت در توالی اسیدآمینه ای مایوستاتین در بین گونه های یاد شده باعث قرار گرفتن پرندگان در گروهی جدا شده از پستانداران شده است. بررسی ساختار سه بعدی نشان داد که ژن مایوستاتین دارای حفاظت شدگی بالایی در گونه ها است.

**واژه های کلیدی:** ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی پروتئینی، مایوستاتین

۱. دانشجوی دکتری گروه نانو بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس تهران، تهران

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد تهران، تهران

۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز

۴. مدرس گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران

Email: [morteza.hadizade@gmail.com](mailto:morteza.hadizade@gmail.com)

\* نویسنده مسوول

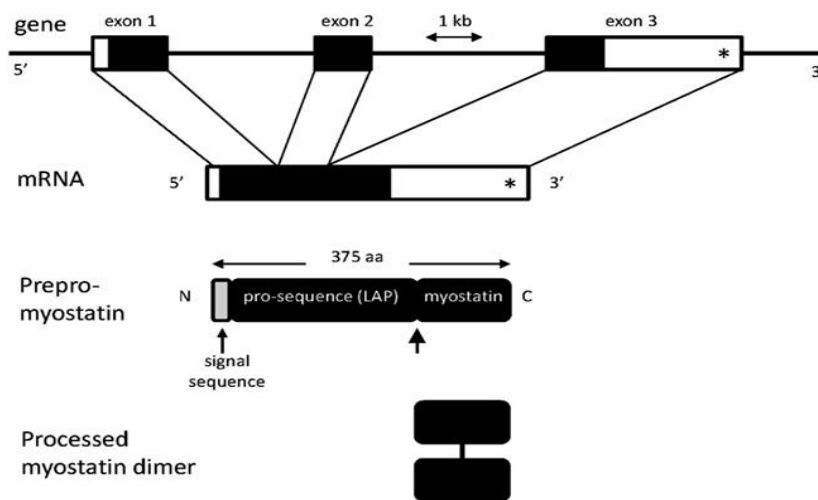
## مقدمه

ژن در سه بخش مهم ماهیچه شامل؛ فیبرها، بافت پیوندی و بافت چربی داخل ماهیچه‌ای از خصوصیات کاملاً مشهور در دام‌های با ماهیچه مضاعف می‌باشد (جولیا-اکازا و کابلو، 2006؛ یوترهاگن، 1994). از سال ۱۸۰۷ که یک کشاورز انگلیسی برای اولین بار در مورد بزرگ شدن عضلات بدن گاو مطلبی را نوشت تا عصر حاضر روی ژن مایوستاتین و عملکرد آن در بدن حیوانات به‌ویژه دام‌های اهلی پژوهش‌های زیادی صورت گرفته است بلینگ و همکاران (Bellinge *et al.*, 2004). پژوهش‌های مربوط به ژن مایوستاتین در ایران بیشتر روی چندشکلی این ژن بوده است. صوفی و همکاران (۱۳۸۸) در گوسفند نژاد سنجایی و میار و همکاران (۱۳۹۰) در گوسفندان نژاد شال، زل و زندی به بررسی پلی‌مورفیسم در ژن مایوستاتین پرداختند. در بررسی بیوانفورماتیکی خانواده ژنی TGF $\beta$ ، هادی‌زاده و همکاران (۱۳۹۲) نیز ژن و پروتئین GDF9 و BMP15 را بررسی نمودند. هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع و گوناگونی ژن مایوستاتین در سطح توالی DNA و توالی اسیدآمینه‌های کدکننده پروتئین با استفاده از ابزارها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی در گونه‌های پستانداران و ماکیان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

توالی ژن مایوستاتین گونه‌های مختلف از جمله گاو (Cow)، گوسفند (Sheep)، بز (Goat)، اسب (Horse)، خوک (Pig)، مرغ (Chicken)، بوقلمون (Turkey)، اردک (Duck)، غاز (Goose)، کبوتر (Columba)، موش (Mouse) و انسان (Human) از شبکه اطلاعات ژنی NCBI جمع‌آوری و با استفاده از نرم‌افزار MEGA 4 درخت فیلوژنی رسم و سپس با نرم‌افزار Vector NTI 10 ساختار اولیه و هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها انجام گرفت. با استفاده از پایگاه Proteus به آدرس <http://www.proteus2.ca/proteus2/index.jsp> تعداد ساختارهای ثانویه  $\alpha$  helix و  $\beta$  sheet در گونه‌های یاد شده تعیین گردید. پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین مایوستاتین توالی‌های اسیدآمینه مربوط به این ژن در پایگاه Phyre<sup>2</sup> به آدرس <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index> ارزیابی شد.

ژن مایوستاتین (MSTN) یا (GDF-8) متعلق به خانواده فاکتورهای تمایز رشد (TGF- $\beta$ ) می‌باشد که در مدت رشد و نمو و بلوغ، به‌طور اختصاصی در توسعه ماهیچه اسکلتی بالغ بیان می‌شود. توالی کامل این ژن از ۳ اگزون و ۲ اینترون تشکیل شده است و مشابه دیگر اعضاء این خانواده دارای درجه بالایی از حفاظت شدگی می‌باشد (جولیا-اکازا و کابلو، یوترهاگن و همکاران (Joulia-Ekaza and Cabello, 2006; Uytterhaegen *et al.*, 1994). پروپتید مایوستاتین ۳۷۶ اسیدآمینه دارد. همانند سایر اعضاء ابرخانواده TGF- $\beta$ ، شامل سه دومین (Domain) است. یک هسته آگریز از آمینواسیدها در نزدیکی پایانه آمینی که به‌عنوان یک سیگنال ترشحی عمل می‌کند، یک پایانه کربوکسیل یا مولکول فعال و یک توالی نشانه میار و همکاران (Miar *et al.*, 2011). پس از هضم پروتئاز در جایگاه ۲۶۶-۲۶۳، یک پپتید ۲۶ کیلودالتونی فعال ایجاد می‌شود و پپتید پردازش شده‌ی بالغ با گیرنده خود باند می‌شود تا عملکرد بیولوژیکی خود را انجام دهد. فرم فعال پروتئین MSTN به‌صورت دایمر است (شکل ۱) توماس و همکاران (Thomas *et al.*, 2000). مایوستاتین پس از سنتز در عضله اسکلتی به گردش خون ترشح می‌شود و در سطح سلول عضلانی از طریق اتصال به گیرنده سرین/ ترئونین کینازی اکتیوین IIB به افزایش بیان P21 (مهارکننده سایکلین‌های چرخه سلولی) می‌انجامد. مشخص شده است که مایوستاتین در زمان بلوغ از طریق تنظیم گونادوتروپین‌ها و GnRH نقش مهمی در فعالیت‌های تولیدمثلی دارد (خانی و همکاران (Khani *et al.*, 2014). یکی از ویژگی‌های جالب توجه در مورد ژن مایوستاتین پدیده ماهیچه مضاعف (DM) است. نام DM که بیانگر ماهیچه مضاعف به معنی دوتایی شدن در اثر تکثیر می‌باشد، مانند تکثیر DNA نیست بلکه افزایش در تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای (هایپرپلازی) و افزایش طول فیبرها (هایپرتروفی) می‌باشد. در واقع دام‌های دارای ماهیچه مضاعف در هنگام تولید دارای تعداد فیبرهای ماهیچه‌ای دو برابر در مقایسه با نوع دام‌های معمولی هستند. در این نوع دام‌ها درصد بیشتری از فیبرهای ماهیچه‌ای از نوع سفید بوده و میزان کمتری از آن دارای کلاژن می‌باشند. تغییر یافتن الگوی بیان



شکل ۱: ساختار پروتئین مایوستاتین  
Fig. 1: Myostatin protein structure

### نتایج و بحث

گونه‌های یاد شده اسیدآمینه اسپارژین (N) وجود دارد. در گروه نشخوارکنندگان، تنها تفاوت بین گاو با سایر گونه‌ها در اسیدآمینه‌های شماره ۳۵۶ و ۳۵۷ است که به ترتیب مربوط به اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید (E) و گلیسین (G) است. تنها تفاوت توالی پروتئینی گوسفند و بز در اسیدآمینه‌های جایگاه ۳۱۶، ۳۳۳ و ۳۵۷ می‌باشد که به ترتیب لوسین (L)، لایزین (K) و گلیسین (G) است. در مرغ، حضور اسیدآمینه پرولین (P) در جایگاه ۳۳۵، در اردک اسیدآمینه‌ی گلوتامیک اسید (E) در جایگاه ۳۱۱ و در غاز اسیدآمینه لوسین (L) در جایگاه ۳۲۸ با توالی پروتئینی سایر گونه‌ها تفاوت اندکی ایجاد کرده است.

همان‌طور که در بالا اشاره شد، فرم نهایی پروتئین مایوستاتین به صورت دایمر می‌باشد، بنابراین این بخش از توالی در همه گونه‌های مورد مطالعه هم‌ردیف شد. نتیجه هم‌ردیفی توالی‌های یاد شده در شکل ۲ آمده است. کمترین میزان تغییر در توالی اسیدآمینه‌ها در قسمت پایانی پروتئین که دایمر را تشکیل می‌دهد وجود داشت. توالی مورد نظر از اسیدآمینه ۲۶۳ یا ۲۶۴ تا ۳۷۵ می‌باشد. مثلاً تنها تفاوت این بخش از پروتئین بین انسان و خوک، اسیدآمینه سرین (S) است که در موقعیت ۳۰۷ قرار دارد، در این جایگاه، در پروتئین مایوستاتین انسان و سایر

	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370					
[Human]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Cow]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Goat]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Sheep]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Pig]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Horse]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Mouse]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Rat]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Chicken]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Turkey]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Columba]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Duck]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS
[Goose]	DTPKRSRRD	FGLDCDEH	STESRCCRY	PLTVDFEAF	FGWDWII	APKRYK	NYCS	GECEF	FLQKYPHT	HLVQANP	FGS	AGPCCTPTK	MSPINMLY	FNGKE	QIIYGKI	PAMV	DRCGCS

شکل ۲: هم‌ردیفی توالی پروتئین در قسمت بالغ مایوستاتین  
Fig. 2: Alignment of protein sequence in the adult Myostatin

در واقع توالی‌های خاصی از پروتئین، از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، برای مثال جایگاه واکنش (Catalytic site) یا جایگاه اتصال (Binding site) برای فعالیت پروتئین لازم هستند ملبوبی و همکاران (Malboobi *et al.*, 2009).

همان‌طور که از شکل پیداست این قسمت از توالی یا به عبارت بهتر، موتیف دارای نقش تعیین‌کننده در ساختار و عملکرد پروتئین مایوستاتین است، بنابراین این توالی‌های مشترک به دلیل اهمیت عملکردی در طول تکامل حفظ شده‌اند که به

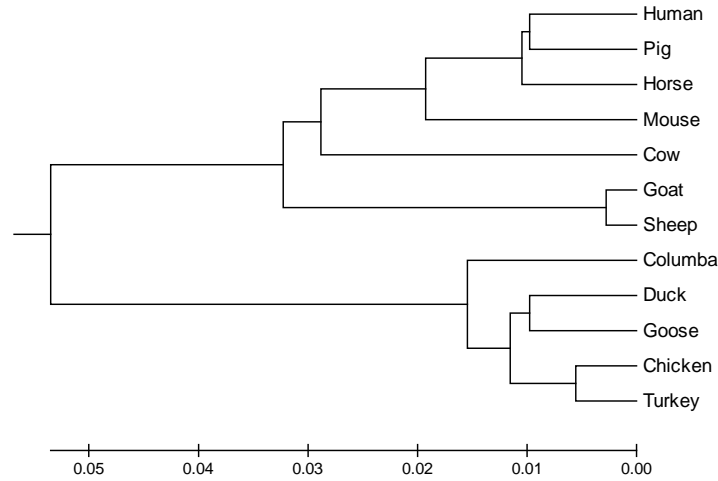
آن‌ها توالی‌های حفاظت شده می‌گویند. به عبارت دیگر یک مجموعه از توالی حفاظت شده به وسیله توالی‌های مشترک ارایه می‌شود. جهش در موتیف‌ها سبب می‌شود که انتخاب طبیعی علیه آن عمل کند.

در هر پروتئین خاص ریشه‌های اسیدآمینه‌ای که برای فعالیت آن پروتئین ضروری‌اند طی تکامل حفظ شده‌اند. ریشه‌هایی که نقش کمتری در عملکرد پروتئین دارند ممکن است با گذشت زمان تغییر کنند، یعنی یک اسیدآمینه

گونه‌های نزدیک به هم مانند بز و گوسفند و یا مرغ و بوقلمون مشاهده می‌شود. دور بودن گونه‌ها در نمودار درختی در واقع بیانگر تفاوت بیشتر در توالی پروتئینی این گونه‌ها است. به‌عنوان مثال تفاوت زیاد در توالی اسیدآمینه‌ای مایوستاتین در بین گونه‌ها باعث قرار گرفتن پرندگان در گروهی جدا شده از پستانداران می‌شود.

جایگزین اسیدآمینه دیگر شود و این ریشه‌های بی‌ثبات، اطلاعاتی برای ردیابی مسیر تکامل فراهم کنند نلسون و کاکس (Nelson and Cox, 2008).

درخت فیلوژنی به‌وسیله نرم‌افزار MEGA 4 مورد بررسی قرار گرفت که آن‌ها را در گروه‌های متفاوتی قرار داد (شکل ۳). بیشترین شباهت و همبستگی قابل مشاهده در شکل ۳ بین



شکل ۳: درخت فیلوژنی گونه‌های مختلف براساس توالی پروتئین مایوستاتین

Fig. 3: Phylogenetic tree of protein sequence for Myostatin

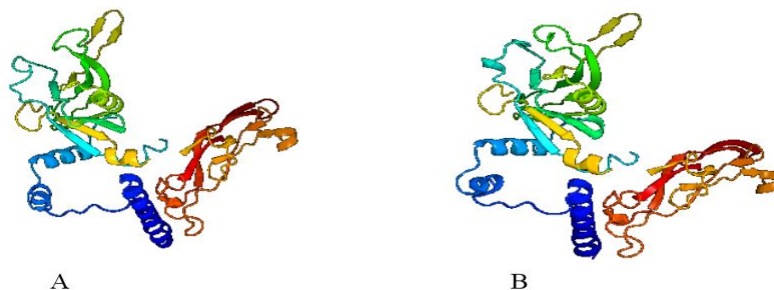
قابل توجهی از اسیدآمینه گلوتامیک اسید بیشتر می‌باشد. این الگوی اسیدآمینه‌ای در اردک نیز روندی مشابه نشان داد. مطالعات انجام شده بر روی ساختار اول پروتئین‌های مختلف نشان داد که وجود اسیدآمینه‌های لوسین، گلوتامیک اسید، آلانین و متیونین در توالی اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین، شکل‌گیری ساختار  $\alpha$  helix را سبب می‌شود درحالی که ایزولوسین، والین و ترئونین تمایل به تشکیل صفحات بتا دارند. مطالعات حاصل از پروتئین‌ها و پپتیدهای سنتزی، برخی دلایل ارجحیت را نشان می‌دهد. به‌عنوان مثال شاخه‌دار بودن ایزولوسین، والین و ترئونین به دلیل ممانعت فضایی در اتم کربن  $\beta$  باعث ناپایدار کردن مارپیچ  $\alpha$  می‌شوند. این آمینواسیدها به آسانی در رشته‌های  $\beta$  قرار می‌گیرند که در این رشته‌ها زنجیره‌های جانبی از صفحه‌ای که زنجیره اصلی در آن قرار دارد به سمت خارج جهت‌گیری می‌کنند موسوی موحدی و همکاران (Mousavi-Movahedi et al. 2009). پژوهش‌های انجام شده نشان داد که میزان اسیدآمینه لوسین در گاو، گوسفند و بز فراوانی یکسانی دارد (۳۷ اسید آمینه لوسین). فراوانی این اسیدآمینه در مرغ و سایر ماکیان در مقایسه با مایوستاتین نشخوارکنندگان (گاو، گوسفند و بز) کمترین فراوانی را داشت (۳۰ اسیدآمینه لوسین)، حال آن‌که فراوانی

بررسی فراوانی اسیدآمینه‌های تشکیل‌دهنده پروتئین مایوستاتین در گونه‌ها با بهره‌گیری از پایگاه Proteus انجام شد. بررسی انجام شده بر روی پروتئین مایوستاتین گاو نشان داد که فراوانی اسیدآمینه لوسین برابر با ۹/۸۳ بود، به‌عبارت دیگر تعداد باقی‌مانده لوسین تکرار شده در طول توالی این پروتئین برابر با ۳۷ عدد بود. اسیدآمینه‌های لیزین و ایزولوسین و گلوتامیک‌اسید به‌ترتیب با ۷/۲، ۶/۶۷ و ۶/۶۷ فراوانی در مراتب بعدی قرار دارند. از طرف دیگر کمترین فراوانی مربوط به اسیدآمینه‌های هیستیدین و تریپتوفان با فراوانی ۱/۶۰ و تعداد برابر با ۶ می‌باشد. بررسی‌ها نشان داد توالی اسیدآمینه پروتئین مایوستاتین بز شباهت بالایی با توالی مایوستاتین گاو دارد. فراوانی اسیدآمینه‌ها در این دو گونه روندی مشابه دارد. در اینجا نیز بیشترین فراوانی مربوط به لوسین و در ادامه لیزین دارای بیشترین فراوانی می‌باشد. بررسی‌های مربوط به توالی این پروتئین در گوسفند نشان داد که فراوانی باقی‌مانده‌های اسیدآمینه‌ای کاملاً مشابه بز می‌باشد. در مورد پرندگان اهلی نیز بررسی‌های انجام شده نتایج مشابهی را نشان داد. به‌عنوان مثال بررسی توالی اسیدآمینه‌ای مرغ روندی مشابه پستانداران نشان می‌دهد اما تفاوت مشاهده شده در این مورد، فراوانی اسیدآمینه باردار آسپارتیک اسید (اسیدآمینه با بار منفی) است که به‌طور

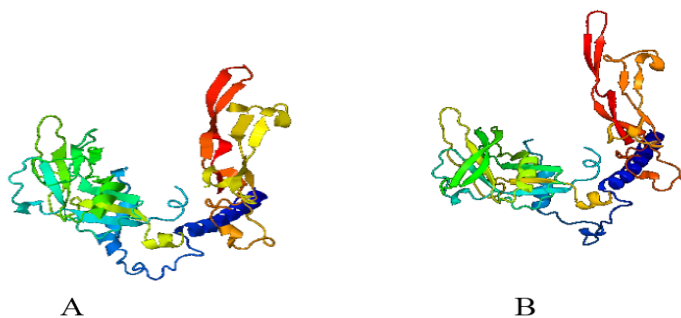
(لیگاندها، پروتئین، DNA و ...) و فهم اثرات فنوتیپیکی جهش‌ها می‌باشد. برطبق نتایج به‌دست آمده از درخت فیلوژنی دورترین و نزدیک‌ترین ساختار سه بعدی از توالی اسیدآمینه‌ها با بهره‌گیری از پایگاه Phyre<sup>2</sup> رسم گردید (شکل ۴ و ۵).

این اسیدآمینه در توالی پروتئین مایوستاتین انسان و خوک متوسط بود (به ترتیب ۳۳ و ۳۴).

ساختار سه بعدی پروتئین منبع مهم اطلاعاتی برای درک بهتر عملکرد پروتئین، اثرات متقابل آن با اجزای دیگر



شکل ۴: ساختار سه بعدی مربوط به انسان (A) و مربوط به بوقلمون (B)  
Fig. 4: Three-dimension structure for Human (A) and Turkey (B)



شکل ۵: ساختار سه بعدی مربوط به بز (A) و مربوط به گوسفند (B)  
Fig. 5: Three-dimension structure for Goat (A) and Sheep (B)

آمده مشخص گردید که تفاوت چندانی در این ساختارها دیده نمی‌شود، که نشان می‌دهد پروتئین مایوستاتین مشابه دیگر اعضاء خانواده  $TGF-\beta$  دارای درجه بالایی از حفاظت‌شدگی است (شکل ۳ و ۴) (میار و همکاران، 2011).

بنابراین توالی اسیدآمینه انسان و بوقلمون به‌عنوان کم شباهت-ترین (درصد تشابه ۸۹/۶) و توالی گوسفند و بز به‌عنوان دو توالی‌هایی که شباهت زیادی داشتند (درصد تشابه ۹۹/۵) انتخاب شدند. اعداد تشابه بالا براساس امتیاز هم‌ردیفی نرم‌افزار Vector NTI 10 به‌دست آمد. با بررسی ساختارهای به‌دست

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۳-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.