

## بررسی امکان اتصال بین میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب

سیدرضا مشیروخادم آستانه<sup>۱</sup>، الناز کرباسچیان<sup>۱</sup>، محمد رضا نصیری<sup>۱</sup>، علی جوادمش<sup>۱\*</sup>

گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. [javadmanesh@um.ac.ir](mailto:javadmanesh@um.ac.ir)

### چکیده

میوستاتین (MSTN) متعلق به خانواده فاکتور رشد ( $TGF-\beta$ ) است که عمدتاً توسط سلول های عضلانی تولید می شود که رشد توده عضلانی را مهار می کند. اکتیوین ها نیز رشد و تمایز انواع مختلف سلولها را تنظیم می کنند. فولیستاتین متضاد با عملکرد لیگاندهای  $TGF-\beta$ ، مانند MSTN و اکتیوین A عمل می کند. پروتئین نو ترکیب فولیستاتین می تواند ترمیم آسیب ها عضلات اسکلتی را بعد از آسیب و بیماری بهبود ببخشد. بنابراین، هدف از این مطالعه پیش بینی ساختار سه بعدی MSTN انسان و بررسی تعامل بین MSTN و فولیستاتین اسب با روش داکینگ مولکولی است. ساختار MSTN انسان با سرور SWISS MODEL پیش بینی شد و با سرور آنلاین SAVES 6.0 ارزیابی گردید. سپس، تعاملات MSTN انسان با فولیستاتین اسب با استفاده از سرور آنلاین H-DOCK بر اساس الگوریتم ترکیبی مدل سازی مبتنی بر الگو و اتصال آزاد ab-initio انجام شد. بررسی ERRAT، پلات رامچاندوران و Z-SCORE نشان دادند که پیش بینی دو ساختار با موفقیت انجام شده است. نتایج داکینگ مولکولی نیز نشان داد دو پروتئین مورد مطالعه در جایگاه مناسبی با امتیاز اطمینان بالای ۰/۷ به یکدیگر متصل شده اند. نتایج این مطالعه کاربرد احتمالی فولیستاتین اسب را برای مهار MSTN انسان نشان داد، اگرچه مطالعات دینامیک مولکولی بیشتر علاوه بر مطالعات آزمایشگاهی مورد نیاز است.

کلیدواژه: فولیستاتین، میوستاتین، داکینگ مولکولی

## Investigation of binding potential between human myostatin and horse follistatin

Seyed Reza Moshir va Khadem Astaneh<sup>1</sup>, Elnaz KArbaschian<sup>1</sup>, Mohammadreza Nassiri<sup>1</sup>, Ali Javadmanesh<sup>1\*</sup>

1-Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [javadmanesh@um.ac.ir](mailto:javadmanesh@um.ac.ir)

### Abstract

Myostatin (MSTN) belongs to the growth factor ( $TGF-\beta$ ) family, which is mainly produced by muscle cells, which inhibits the growth of muscle mass. Activins regulate the growth and differentiation of variety of cell types. Follistatin antagonizes the action of  $TGF-\beta$  ligands, such as MSTN and activin A. Recombinant follistatin protein improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration. Therefore, the aim of this study is to predict the three-dimensional structure of human MSTN and investigate the interaction between MSTN and equine follistatin by molecular docking method. The human MSTN structure was predicted with the SWISS MODEL server and evaluated with SAVES 6.0 online server. Then, the interactions of human MSTN with equine follistatin were performed using the H-DOCK online server based on the combined algorithm of template-based modeling and ab-initio free docking. Examination of ERRAT, Ramachandran plot and Z-SCORE



showed that the prediction of two constructs was done successfully. The results of molecular docking also showed that the two studied proteins are connected to each other in a suitable position with a high confidence score of 0.7. The results of this study indicated the potential utility of equine follistatin to inhibit human MSTN, although further molecular dynamics studies are needed in addition to in vitro experiments.

**Key words:** Follistatin, Myostatin, Molecular Docking

#### مقدمه

میوستاتین عضوی از خانواده پروتئین های فاکتور تغییر رشد بتا ( $TGF\beta$ ) است؛ که در ابتدا به عنوان تمایز فاکتور رشد ۸ ( $GDF-8$ ) نامیده می شد؛ مشخص شد که در بین گونه ها بسیار محافظت شده است (۱). ممانعت کردن از بیان ژن میوستاتین باعث افزایش توده عضلانی می شود (۵). به دلیل شباهت MSTN با اعضای دسته اکتیوین (تقریباً ۴۰٪) و اتصال آن به گیرنده ها و مهارکننده های اکتیوین مانند فولیستاتین ( $FST$ ) مدت ها بود که در ابتدا این پروتئین به عنوان عضوی از دسته اکتیوین در نظر گرفته می شد (کاتن و همکاران، ۲۰۱۸).  $FST$  یک گلیکوپروتئین خارج سلولی غنی از سیستئین است و ثابت شده است که  $FST$  با اتصال به  $MSTN$  و جلوگیری از اتصال  $MSTN$  به گیرنده آن فعالیت  $MSTN$  را مختل می کند. علاوه بر این، یک جهش هموزیگوت در ژن  $FST$  توده عضلانی را کاهش می دهد، که نشان می دهد این پروتئین نقش مهمی در تنظیم میوزن دارد و می توان از آن به منظور مهار فعالیت میوستاتین استفاده کرد (۳). کرباسچیان و جوادمنش (۲۰۲۳) کاربرد احتمالی فولیستاتین انسانی را جهت مهار  $MSTN$  موش صحرایی به روش بیوانفورماتیک و داکینگ مولکولی گزارش کرد (۳). استفاده از روش های مدل سازی جهت بررسی بر هم کنش میان دو ماده به همراه به کارگیری از علوم بیوانفورماتیک می توانند در کنار هم به کاهش هزینه ها و افزایش سرعت در کارهای آزمایشگاهی کمک کنند. استفاده از تکنیک ها محاسباتی مانند داکینگ مولکولی جهت بررسی عملکرد دو ماده نسبت به هم، فرآیند کشف ترکیبات جدید با عملکرد مورد نظر را تسریع و موجب کاهش هزینه ها می گردد.

#### مواد و روش ها

توالی اسیدآمینه ای میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب از Uniprot با کد دسترسی NP\_005250.1 و XP\_023481007.1 تهیه شدند. ساختار سوم میوستاتین و فولیستاتین با استفاده از نرم افزار Swiss Model پیش بینی شد. جهت سنجش میزان دقت و صحت ساختارهای ایجاد شده و گزینش مناسب ترین آن ها، بهترین ساختارها در قالب فرمت PDB ذخیره و توسط سرورهای آنالین SAVES v6.0 و ProSA مورد بررسی قرار گرفتند. برهم کنش میان میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب از طریق نرم افزار آنالین H-DOCK به صورت استاتیک انجام شد. ساختارهای مناسب بر اساس کمترین انرژی اتصال و جهت یابی صحیح به وسیله نرم افزارهای Pymol به منظور مشاهده ی پیوندهای هیدروژنی، پس از داکینگ مولکولی مورد ارزیابی واقع گردیدند (۴).

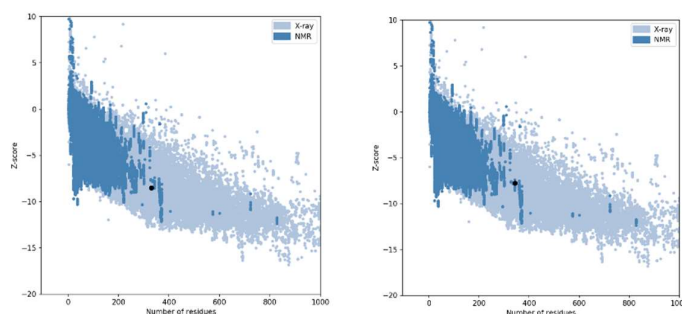


## نتایج و بحث

در این پژوهش، در ابتدا پیش بینی ساختار سوم میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب توسط نرم افزار تحت وب Swiss model با موفقیت صورت گرفت. ساختارهای منتخب در چندین بخش مختلف شامل پلات رامچاندرا، ERRAT و Z-score اعتبار سنجی شدند. نمودار رامچاندرا به بررسی وضعیت مجاز هر اسید آمینه در ساختارهای پروتئین می پردازد. در مطالعه حاضر، میزان صحت بر اساس نمودار رامچاندرا بیانگر این موضوع بود که اکثر اسید آمینه های ساختار پیش بینی شده در منطقه ی مطلوب واقع شده اند (به ترتیب برای میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب ۸۸/۲ و ۸۶/۸ درصد) که معیار مناسبی به منظور ارزیابی کیفیت استرئوشیمیایی ساختار پیش بینی شده است (۲).

میزان عددی نمودار Z-score برای میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب ۵۲/۸- و ۷۶/۷- ارائه شد. این پلات ملاکی از کیفیت پروتئین پیش بینی شده است. در صورتیکه امتیاز محاسبه شده توسط این سرور برای پروتئین مورد مطالعه خارج از رنج قدر مطلق ۲-۱۵ برای مدل واقعی با اندازه مشابه باشد، احتمالاً پیش بینی ساختار دارای خطا است (موسوی و همکاران، ۲۰۲۲). در پژوهش حاضر برای هر دو ساختار امتیاز در محدوده ی قابل قبول واقع شده است که ممکن است نمایانگر این موضوع باشد که این ساختارها با نتایج آزمایشگاهی قابل انطباق با درصد بالایی خواهند بود (شکل ۱).

در شاخص ERRAT ساختار سه بعدی پروتئین بر فرض اتصال هسته ای بین اتم های مختلف بررسی می شود (موسوی و همکاران، ۲۰۲۲). امتیاز حاصل از پلات ERRAT برای میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب به ترتیب ۹۳/۳۷ و ۹۷/۱۶ بود. ساختارها با کیفیت و وضوح بالا معمولاً مقادیری در حدود ۹۰ یا بالاتر تولید می کنند. برای رزولوشن های خوب و متوسط نیز (۲/۵ تا ۳ آنگستروم) میانگین ضریب کیفیت کلی حدوداً بالای ۸۰ درجه می باشد. در مطالعه ی حاضر مقادیر گزارش شده در نواحی مطلوب قرار گرفته است.



شکل ۱. نمودار Z score ترسیم شده از ساختارهای پیش بینی شده فولیستاتین اسب (چپ) و میوستاتین انسان (راست)

از دو ساختار پیش بینی شده جهت انجام داکینگ مولکولی استفاده شد. بدین منظور بررسی برهمکنش بین فولیستاتین اسب و میوستاتین انسان با سرور HDock صورت گرفت. نرم افزارهای مختلفی جهت بررسی داکینگ پروتئین- پروتئین ابداع شدند که در این میان HDock جزء آن

دسته از سروهایی است که تا به امروز در بیش از ۲۰۰ نشریه ارجاع داده شده است و نتایج قابل قبولی را ارائه داده است (۴).

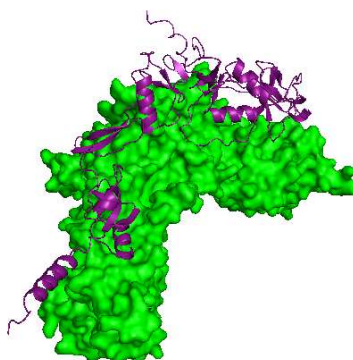
یکی از ملاک هایی که نشان می دهد نتایج در HDCK از صحت بالایی برخوردار است این است که داکینگ ها دارای امتیاز اطمینان بالایی (بیش از ۰/۷) باشند که نشان می دهد به احتمال زیاد دو مولکول به صورت قوی به یکدیگر متصل می باشند. در سایر موارد نظیر انرژی اتصال بین ۰/۵ و ۰/۷ اتصال قابل قبول بوده ولی در مقادیر زیر ۰/۵ نشان از اتصالات ضعیف و سستی دارد. با این وجود باز هم نمی توان به صورت مطلق در این رابطه نظر داد که نیازمند بررسی های بیشتر تطبیق با شرایط تجربی است. امتیاز داکینگ نیز یکی دیگر از ملاک های تصمیم گیری جهت قدرت اتصال می باشد به طوریکه این مقدار هر چقدر به عدد ۲۰۰ - نزدیک تر و بیشتر باشد؛ آن اتصال استحکام بیشتری خواهد داشت. نتایج داکینگ مولکولی بین میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب در جدول های ۱ و ۲ ارائه شده است. در شکل ۲ نیز جهت گیری اتصال این دو پروتئین نشان داده شده است. کرباسچیان و جوادمنش (۲۰۲۳)، نشان دادند که فولیستاتین انسان می توان محکم به ساختار MSTN پیش بینی شده موش با امتیاز ۲۴۴.۳۳- متصل شود که این قدرت اتصال نزدیک به مطالعه ی حاضر است (۳). نتایج این مطالعه کاربرد احتمالی فولیستاتین اسب را برای مهار MSTN انسان نشان داد، اگرچه مطالعات دینامیک مولکولی بیشتر علاوه بر آزمایش های آزمایشگاهی مورد نیاز است.

جدول ۱. نتایج داکینگ مولکولی بین میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب

| داکینگ                          | نمره اطمینان | انرژی اتصال |
|---------------------------------|--------------|-------------|
| فولیستاتین انسان+ میوستاتین اسب | ۰.۷۵۴۸       | -۲۰۶.۲۲     |

جدول ۲. اسیدآمینو های درگیر در برهمکنش ها بین میوستاتین انسان و فولیستاتین اسب

| میوستاتین | فولیستاتین | طول پیوند (Å) | تعداد پیوند |
|-----------|------------|---------------|-------------|
| K74       | G83        | 3.3           | 1           |
| R78       | K77        | 1.8           | 1           |
| R88       | N73        | 3.3           | 1           |
| R279      | E281       | 2.7 , 2.6     | 2           |
| E291      | N39        | 2.9           | 1           |
| H323      | T290       | 3.2           | 1           |



شکل ۲. داکینگ مولکولی حاصل از فولیستاتین اسب (بنفش) و میوستاتین انسان (سبز)

## References

- 1-Cotton, T. R., Fischer, G., Wang, X., McCoy, J. C., Czepnik, M., Thompson, T. B., & Hyvönen, M. (2018). Structure of the human myostatin precursor and determinants of growth factor latency. *The EMBO Journal*, 37(3), 367-383.
- 2-Hashemi Attar, M., Nassiry, M. R., Javadmanesh, A., & Nayeri Fasaai, B. (2019). Structural analysis of aspartate kinase enzyme in *Corynebacterium* species to find the best enzyme structure for high industrial production of lysine amino acid. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 11(4), 501-512.
- 3-Karbaschian, E., & Javadmanesh, A. (2023). Molecular docking of rat myostatin with human follistatin: an in-silico analysis. In 2nd International & 11th Iranian Conference on Bioinformatics.
- 4-Mousavi, Z., Rashidian, Z., Zeraatpisheh, Y., & Javadmanesh, A. (2022). Molecular docking of bacteriocin enterocin P peptide with mastitis-causing *E. coli* antigen in cattle. *Veterinary Research & Biological Products*, 35(4), 114-122.
- 5-Riasi, M., Mozaffari Jovin, S., & Javadmanesh, A. (2022). Effect of Intramuscular and Intraperitoneal Injections of conjugated MSTN-siRNA-cholesterol on Inhibition of Myostatin Gene expression. *Journal of Cell and Molecular Research*, 14(1), 20-27.