مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیکی ساختار و عملکرد سم لبستاتین جداشده از زهرمار ماکروویپریالبتینا

مریم ربیعی [۱]، حسین سازگار [۱*]، فرزانه محمدی فارسانی [۲]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران
۲. گروه ژنتیک، دانشکده زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۹/۲۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۲/۰۳

چکیده

زمینه و هدف: لبستاتین، یک دیس اینتگرین پلی‌پپتیدی تک زنجیره‌ای متشکل از ۱۰۷ آمینواسید است که از زهرمار ماکروویپریالبتینا جداسازی شده است. لبستاتین بااتصال به اینتگرین و مهار عملکرد آن، چسبندگی و مهاجرت سلول‌های اندوتلیال را خنثی کرده و اثر ضد رگ‌زایی دارد. هدف از انجام این پژوهش، بررسی برهمکنش این پپتید با اینتگرین و شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم درگیر در این برهمکنش است.

مواد و روش‌ها: با توجه به اهمیت لبستاتین در مهار چسبندگی و مهاجرت سلول‌های سرطانی؛ در این پژوهش ساختار سه‌بعدی این پپتید توسط سرور phyre2 شبیه‌سازی‌شده و با پپتیدهای مشابه مورد مقایسه قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، به‌منظور شناسایی مکانیسم دقیق عملکرد این پپتید، برهمکنش آن با زیرواحد اینتگرینی α1 با استفاده از سرور Z-Dock بررسی شد. نتایج حاصل از این برهمکنش نیز با کمک نرم‌افزارهای Chimera1.5.3 و SPDBV آنالیز گردید.

نتایج: نتایج حاصل از شبیه‌سازی لبستاتین نشان داد که این سم ازلحاظ ساختار، شباهت بسیاری زیادی با پروتئین‌های هم‌خانواده‌ی خود دارد. به‌علاوه بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که ریشه‌های Lys50، Cys71 و Tyr92 از لبستاتین و Asp20، Tyr17 و His118 از زیر واحد α1 از مهم‌ترین اسیدهای آمینه‌ی درگیر در برهمکنش این دو پروتئین هستند.

نتیجه‌گیری: بررسی‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این پژوهش، سبب شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم درگیر در برهمکنش میان لبستاتین و اینتگرین هدف آن گردید. این نتایج را می‌توان در طراحی و تولید مصنوعی پپتیدهای متفاوت و قوی‌تر برای مهار اینتگرین و درنتیجه مهار مهاجرت و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار داد.

کلمات کلیدی: سم لبستاتین، موتیف KTS، دیس‌اینتگرین، اینتگرین α1 β1

مقدمه

باوجود تلاش‌های بسیار محققان سراسر جهان جهت درمان سرطان، هنوز هم این بیماری عامل یک‌پنجم مرگ‌ومیرها است. روش‌هایی همچون جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی برای درمان این بیماری کافی نبوده و به‌علاوه سلول‌های سالم را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند. بیش از یک قرن است که محققان به دنبال یافت ترکیباتی هستند که به‌صورت طبیعی توسط گیاهان و جانوران تولید می‌شوند و می‌توانند به‌عنوان دارو برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرند. سموم و توکسین‌های موجود در آن‌ها، ازجمله ترکیباتی هستند که فعالیت ضد سرطانی آن‌ها در طول سه دهه گذشته موردتوجه زیادی قرار گرفته است و این امر منجر به شناسایی مولکول‌های بسیاری با این ویژگی گردیده است. بررسی‌ها نشان داده است که سم خزندگانی مانند مار، دوزیستانی مانند قورباغه و وزغ و عنکبوتیانی مانند عقرب، دارای توکسین‌هایی با خاصیت ضد سرطانی می‌باشند (۱). ازجمله توکسین‌های موجود در سم مار که دارای خاصیت ضد سرطانی می‌باشند، می‌توان به دیس-اینگترین‌ها اشاره کرد. دیس‌اینتگرین (Disintegrin) و پروتئین‌های شبه دیس‌اینتگرین در سم چهار خانواده مار افعی شامل اتراکتاسپیدید (Atractaspididae)، الاپید (Elapidae)، ویپرید (Viperidae) و کروتالید (Crotalidae) یافت می‌شوند (۲). این مهارکننده‌های اینتگرینی انواع مختلف دارند و با توجه به طول زنجیره‌های پلی‌پپتیدی خود و تعداد باندهای

*نویسنده مسئول: **حسین سازگار**، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران Email:hoseinsazgar@yahoo.com

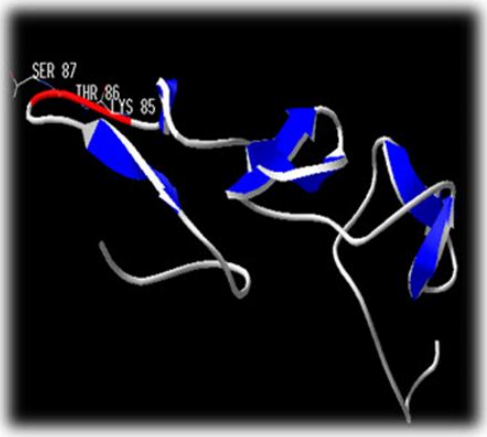
دی‌سولفیدی در ۵ دسته طبقه‌بندی می‌شوند: ۱) دیس-اینتگرین‌های خیلی بلند شامل ۱۰۰ اسیدآمینه و هشت پیوند دی‌سولفیدی، ۲) دیس‌اینتگرین‌های بلند شامل ۸۳ آمینواسید و هفت پیوند دی‌سولفیدی، ۳) دیس‌اینتگرین‌های متوسط دارای ۷۳-۶۸ اسیدهای‌آمینه و شش پیوند دی‌سولفید، ۴) دیس‌اینتگرین کوتاه زنجیر دارای ۵۱-۴۹ اسیدآمینه و چهار پیوند دی‌سولفید و ۵) دیس‌اینتگرین‌های دایمر دارای ۶۷ اسیدآمینه و چهار پیوند دی سولفیدی در هر مونومر (۳، ۴). دیس‌اینتگرین‌های سم مار افعی، آنتاگونسیت‌های قوی برای انواع اینتگرین‌هایی می‌باشند که ازلحاظ ساختاری به‌صورت هترودیمرهای الفا-بتا هستند. این نوع اینتگرین‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی پیچیده‌ای مانند تکوین جنین و نگهداری از بافت شرکت دارند (۵، ۶). همچنین این پروتئین‌ها، در بهبود فرآیندهای پاتولوژیکی مانند التهاب زخم و تغییرات بدخیم مانند رشد سلول، تمایز و مهاجرت دخیل هستند (۷). بررسی‌ها نشان داده است که دیس‌اینتگرین‌های موجود در پپتید مار افعی دارای فعالیت ضد رگ‌زایی بوده و مانع مهاجرت سلولی در تومورهای بدخیم می‌شوند (۸). فعالیت بازدارندگی اینتگرین در پپتیدهای دیس‌اینتگرینی، به جفت شدن مناسب موتیف سیستئینی آن‌ها که به لوپ‌های مهاری معروف هستند بستگی دارد (۹). بیشتر دیس‌اینتگرین‌ها، شامل موتیف (RGD) آرژنین-گلایسین- آسپارتیک اسید در انتهای c-ترمینال خود می‌باشند که برای تعامل با اینتگرین و اعمال فعالیت مهاری آن‌ها ضروری است (۱۰، ۱۱). پپتید لبستاتین با وزن مولکولی 4408.8 دالتون با روش طیف‌سنج جرمی خالص‌سازی شد و توسط کالچ-زیری و همکاران به این نام شناخته شد. مشخص شده است که لبستاتین به‌طور مستقیم با زیر واحد ۱α اینتگرین برهمکنش نموده و سبب مهار اتصال آن به کلاژن تیپ I و تیپ IV می‌شود. این پپتید نیز همانند دیگر پپتیدهای دیس‌اینتگرینی، دارای خواص ضدچسبندگی، ضد رگ‌زایی و مهاجرت است (۳). باوجود اثرات بسیار مفید پپتید لبستاتین در مهار مهاجرت و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی، تاکنون نحوه‌ی برهمکنش این پپتید با زیرواحد اینتگرینی مورد بررسی قرار نگرفته است. در این پژوهش، به‌منظور شناخت مکانیسم دقیق عملکرد لبستاتین و شناسایی اسیدهای آمینه‌ی درگیر در این فرآیند، برهمکنش میان این دیس‌اینتگرین و زیرواحد ۱α مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جهت بررسی مکانیسم عملکردی سم لبستاتین و پیدا کردن آمینواسیدهای درگیر در برهمکنش‌های میان آن با زیرواحد اینتگرینی1α، ابتدا به ساختار سه‌بعدی این دو مولکول نیاز است. به‌منظور آماده‌سازی ساختار سه‌بعدی پپتید لبستاتین، ابتدا توالی پروتئینی آن با شماره دسترسی CAJ34939.1 از پایگاه اطلاعاتی NCBI دریافت شد. سپس توالی پروتئینی به‌دست‌آمده، به سرور phyre2 داده شد. این سرور یک ابزار تحت وب بسیار مناسب برای پیشگویی و آنالیز ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها بر اساس روش همولوژی مدلینگ است (۱۲، ۱۳). نزدیک‌ترین ساختار سه‌بعدی پیشگویی شده توسط این سرور برای پپتید لبستاتین با فرمت pdb ذخیره-سازی شد. برای به دست آوردن ساختار سه‌بعدی زیرواحد اینتگرینی1α، از ساختار کمپلکس آن با کلاژن استفاده شد. جهت به دست آوردن این ساختار به پایگاه اطلاعاتی pdb مراجعه شد و ساختار آن با کد دسترسی 2M32 با فرمت pdb دریافت گردید. سپس کلاژن از این فایل حذف‌شده و ساختار زیرواحد α1 با فرمت pdb ذخیره‌سازی شد و برای مراحل بعد مورداستفاده قرار گرفت. برای انجام داکینگ و بررسی برهمکنش زیرواحد α1 و لبستاتین از سرور Z-DOCK، استفاده شد. سرور Z-Dock، ازجمله سرورهای بسیار پرکاربرد در بررسی کمپلکس‌های پروتئینی است که از برنامه‌ی داکینگ سخت (Rigid) برای پیشگویی نحوه‌ی برهمکنش‌های پروتئینی استفاده می‌نماید (۱۴، ۱۵). فایل pdb لبستاتین به‌عنوان لیگاند و فایل pdb زیرواحد α1 به‌عنوان رسپتور به سرور داده شد و داکینگ میان رسپتور و لیگاند توسط این سرور صورت پذیرفت. درنهایت نتایج حاصل از این برهمکنش با فرمت pdb از سرور Z-DOCK دریافت شده و با استفاده از نرم‌افزارهای Chimera1.5.3 و SPDBV موردبررسی و آنالیز قرار گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از شبیه‌سازی پپتید لبستاتین در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود، پپتید لبستاتین دارای شش صفحه بتا (Beta sheet) در محل اسیدآمینه‌های (۵۱-۵۳)، (۵۸-۶۰)، (۷۰-۷۲)، (۷۵-۷۷)، (۸۱-۸۳)، (۹۱-۹۳) است. نتایج حاصل از مقایسه‌ی ساختار و توالی ناحیه عملکردی پپتید لبستاتین و دو پپتید مشابه آن،

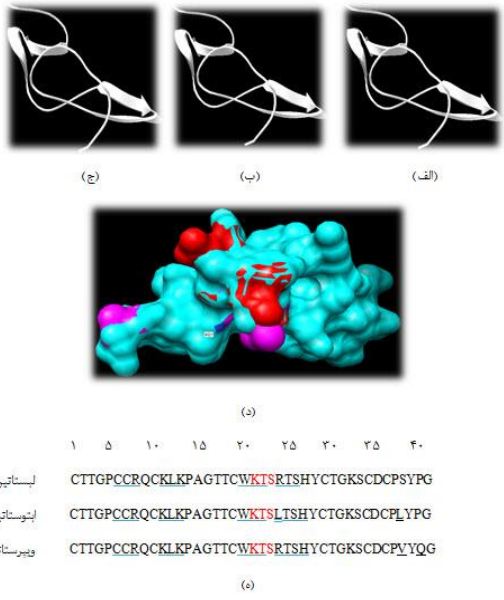


(الف)

MIQVLLVIICLAVFPFQGSSKTLKSGNVNDYEVVNPGTVTGLPKGAVEEKHEPMKGNTLQ
KFPLCTTGPCCRQCKLKPAGTTCWKTSRTSHYCTGKSCDCPSYPGNG

(ب)

شکل ۱- ساختار سه‌بعدی پیشگویی شده برای پپتید لبستاتین. (الف) ساختار سه‌بعدی این پپتید در نرم‌افزار Chimera، همان‌گونه که دیده می‌شود، این پپتید دارای شش صفحه‌ی بتا در ساختار خود است. در این شکل موتیف KTS نیز نشان داده شده است. (ب) توالی آمینواسیدی پپتید لبستاتین، توالی‌هایی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است، محل تشکیل صفحات بتا را نشان می‌دهد.



شکل ۲- مقایسه ساختار سه‌بعدی و توالی ناحیه عملکردی پپتید لبستاتین با دو دیس اینتگرین ابتوستاتین و ویپریستاتین. الف) ساختار سه‌بعدی ناحیه عملکردی لبستاتین، (ب) ساختار سه‌بعدی پپتید ابتوستاتین، (ج) ساختار سه‌بعدی پپتید ویپرستاتین. همان‌گونه که دیده می‌شود، هر سه پپتید دارای تطابق بالایی در ستون اصلی، حلقه اتصال اینتگرینی و همین‌طور در ناحیه c ترمینال خود هستند. (د) Alignment ساختاری سه پپتید لبستاتین (رنگ آبی)، ابتوساتین (رنگ قرمز) و ویپرستاتین (رنگ صورتی). (ه) مقایسه توالی سه پپتید لبستاتین، ابتوساتین و ویپرستاتین. نواحی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است، توالی‌های ایجادکننده‌ی صفحات بتا هستند.

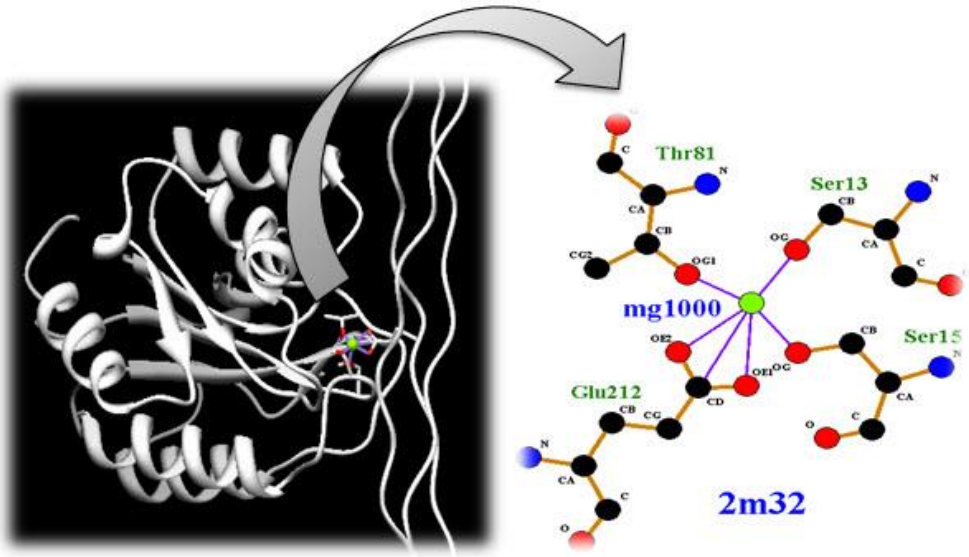
یعنی ابتوستاتین (Obtustatin) و ویپریستاتین (Viperistatin) نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که در این شکل دیده می‌شود، پپتید لبستاتین ازلحاظ ساختاری شباهت بسیار زیادی با دو پپتید هم‌خانواده‌ی خود دارد.

به‌منظور بررسی برهمکنش میان پپتید لبستاتین و زیرواحد اینتگرینی α1، ناحیه اتصالی این زیرواحد با کلاژن، به‌عنوان ناحیه مهم در برهمکنش با دیس‌اینتگرین در نظر گرفته شد و آنالیز داکینگ با استفاده از سرور Z-DOCK انجام گرفت. نتایج حاصل از انجام این برهمکنش در شکل ۳ نشان داده شده است.

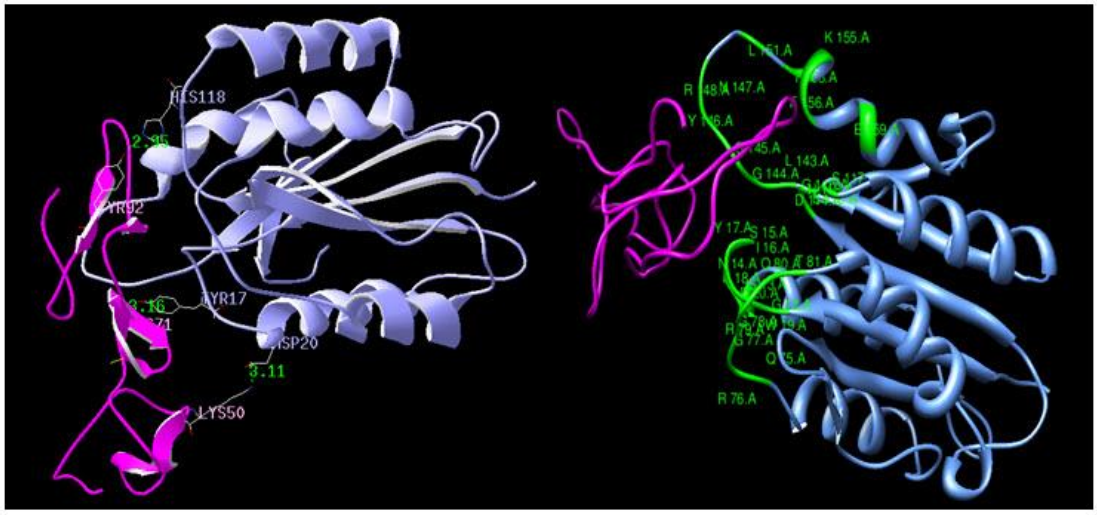
اسیدهای آمینه‌ی درگیر در پیوند هیدروژنی میان پپتید لبستاتین و زیرواحد اینتگرینی α1 نیز در جدول ۱ نشان داده شده است.

بحث

سم حیوانات منبع عظیمی از توکسین‌های فعالی است که امروزه در مطالعات متعدد اهمیت ویژه‌ای یافته‌اند. برای مثال این مولکول‌ها ابزارهای بسیار مناسبی جهت بررسی ساختار و عملکرد کانال‌های یونی و دیگر رسپتورهای سطحی سلول می‌باشند. مطالعات آزمایشگاهی، انجام تکنیک‌های مانند جهش-



شکل ۳- نمایی سه‌بعدی از برهمکنش کلاژن و اینتگرین α_1. قسمت مشخص شده، منطقه درگیر در برهمکنش است.



(ب) (الف)

شکل ۴- نمایی از ساختار سه‌بعدی برهمکنش اینتگرین α۱ و پپتید لبستاتین. (الف) تصویر سه‌بعدی برهمکنش در نرم‌افزار Chimera. زیرواحد α1 بارنگ آبی و پپتید لبستاتین بارنگ ارغوانی نشان داده شده است. اسیدهای آمینه‌ی مربوط به زیر واحد α1 که در برهمکنش با لبستاتین هستند بارنگ سبز نشان داده شده‌اند (ب) تصویر سه‌بعدی برهمکنش‌های هیدروژنی میان پپتید لبستاتین با زیرواحد α1 در نرم‌افزار SPDBV. در این تصویر، ریشه‌های درگیر در برهمکنش‌های هیدروژنی نشان‌دار شده‌اند و طول پیوند میان آن‌ها بارنگ سبز نشان داده شده‌اند.

زایی مستقیم و بررسی اشکال شیمیایی این توکسین‌ها، ازجمله روش‌هایی هستند که جهت بررسی عملکرد این مولکول‌های فعال مورد استفاده قرار می‌گیرند. بااین‌حال، انجام چنین مطالعاتی برای تمامی این پپتیدها، دشوار بوده و به‌صرف انرژی زیادی نیاز دارد. در این میان، مطالعات بیوانفورماتیکی می‌توانند به انتخاب آزمایش‌های ضروری کمک

جدول ۱- مهم‌ترین اسیدهای آمینه‌ی درگیر در تشکیل پیوند هیدروژنی میان لبستاتین و زیرواحد اینتگرینی

اسیدهای آمینه‌ی پپتید لبستاتین	اسیدهای آمینه‌ی زیرواحد اینتگرینی	طول پیوند هیدروژنی تشکیل شده (آنگستروم)
Lys50	Asp20	3.11
Cys71	Tyr17	3.16
Tyr92	His118	2.95

نموده و سبب افزایش کارآیی این‌گونه بررسی‌ها گردند (۱۶). بررسی‌های مقایسه‌ای میان توالی‌های نوکلئوتیدی و پروتئینی توکسین‌ها یکی از اساسی‌ترین مطالعات بیوانفورماتیکی در بررسی این مولکول‌ها است و اغلب به‌منظور رسم درخت‌های فیلوژنتیکی (۱۷)، یافت موتیف‌های ساختمانی مشابه (۱۸)، بررسی میزان تنوع و حفاظت‌شدگی این توکسین‌ها (۱۹)، بررسی ساختارهای ژنی و ارتباطات تکاملی آن‌ها (۲۰) و به‌خصوص شناسایی، طبقه‌بندی و پیشگویی عملکرد توکسین‌های جدید (۲۱) مورد استفاده قرار می‌گیرد. آنالیزهای ساختار سه‌بعدی توکسین‌ها نیز اغلب در شناسایی ریشه‌های عملکردی این مولکول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌علاوه ترکیب این آنالیزها با اطلاعات حاصل از بررسی‌های همولوژی مدلینگ، می‌تواند به شناسایی مولکول‌های دارای برهمکنش با این توکسین‌ها و نیز نحوه‌ی انجام این برهمکنش‌ها کمک فراوانی نماید. تعیین ساختار یک مولکول پروتئینی توسط روش‌هایی که نیازمند کریستاله نمودن مولکول می‌باشند، فرآیندی پیچیده و بسیار کند است. پیشگویی ساختار سه‌بعدی توکسین‌ها توسط تکنیک‌های مدلینگ، روش ساده و تغییریافته‌ای است که توسط آن می‌توان ارتباطات ساختاری-عملکردی تعداد زیادی از این مولکول‌ها را در زمان کوتاهی مورد بررسی قرار داد (۱۶). ازآنجایی‌که سم مارها حاوی بیش از صد هزار پپتید توکسیک مختلف است و تعداد توالی‌های شناسایی‌شده در حال افزایش است، آنالیزهای بیوانفورماتیکی ابزارهای بسیار ضروری در بررسی عملکرد این توکسین‌ها به شمار می‌آیند.

تاکنون گزارشی از ساختار کریستالوگرافی لبستاتین ارائه نشده است و مطالعه‌ی حاضر اولین گزارش از پیشگویی ساختار آن به روش همولوژی مدلینگ است. بررسی و آنالیز ساختار شبیه‌سازی برای لبستاتین توسط سرور phyre2 در نرم‌افزار spdbv که یک نرم‌افزار مناسب در تحلیل و بررسی ساختارهای پروتئینی است (۲۲)، نشان داد که این پپتید ازلحاظ ساختاری شباهت بسیاری زیادی با پروتئین‌های هم‌خانواده‌ی خود یعنی دو پپتید ابتوستاتین و ویپریستاتین دارد. همان‌گونه که قبلاً نیز اشاره شد، پپتید لبستاتین عضوی از خانواده‌ی KTS دیس-اینتگرین‌ها است. ابتوستاتین و ویپریستاتین، دو دیس اینتگرین جداسازی شده از سم افعی ابتوسالبتینا (Obtusa lebetina) و افعی پالستینه (Palestinae) می‌باشند (۲۳، ۲۴). این دیس-اینتگرین‌ها، شامل ۴۱ آمینواسید بوده و جزء کوتاه‌ترین دیس‌اینتگرین‌هایی هستند که تاکنون یافت شده‌اند. به‌علاوه حاوی موتیف لیزین-ترئونین-سرین (KTS) در جایگاه فعال خود می‌باشند و مهار اینتگرین $\alpha 1\beta 1$ در اتصال به کلاژن نوع I و نوع IV را بر عهده دارند (۲۵، ۲۶). همان‌گونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، ابتوستاتین نسبت به لبستاتین در موقعیت ۲۴ (ارژنین/ لوسین) و ۳۸ (سرین / لوسین) متفاوت است و همین‌طور ویپرستاتین نسبت به لبستاتین در موقعیت ۳۸ (سرین / والین) و ۴۰ (پرولین / گلوتامین) متمایز است. بااین‌حال، این سه پپتید شباهت ساختاری بسیار زیادی دارند به‌طوری‌که تنه اصلی، لوپ‌های اتصالی در اتصالات اینتگرینی و دنباله‌های N-ترمینال و C-ترمینال در هر سه ساختار پپتیدی کاملاً روی‌هم افتادگی دارند و هم‌پوشان همدیگر می‌باشند (شکل ۲ د).

زیرواحد اینتگرینی α1، حاوی شش صفحه بتا و یک ناحیه کویل-کویل (Coiled-Coiled) یا فشرده شامل هشت توالی آلفا هلیکس است (۲۷). ازآنجاکه پپتید دیس‌اینتگرین، مانع از برهمکنش این زیرواحد با کلاژن می‌گردد، بنابراین ناحیه اتصالی این زیرواحد با کلاژن، به‌عنوان ناحیه مهم در برهمکنش

با دیس‌اینتگرین در نظر گرفته شد و آنالیز داکینگ با استفاده از سرور Z-DOCK انجام گرفت. همان‌گونه که در شکل ۳ نشان داده شده است، سه آمینواسید سرین-۱۵، سرین-۱۳ و ترئونین ۸۱ به‌واسطه منیزیم که یکی از سه عنصر واسطه اصلی است، بااتصال به آمینواسید گلوتامین ۲۱۲ کلاژن، مرکز اصلی این برهمکنش می‌باشند؛ بنابراین آمینواسیدهای اطراف این نقطه مرکزی به فاصله کمتر از ۰/۵ آنگستروم به‌عنوان منطقه اتصالی در اینتگرین ۱α برای برهمکنش با پپتید لبستاتین در نظر گرفته شدند و داکینگ میان این مولکول‌ها با استفاده از سرور Z-DOCK انجام شد. ساختار ناحیه درگیر در برهمکنش میان پپتید لبستاتین و زیر واحد اینتگرینی α1 نیز در شکل ۴ نشان داده شده است. جدول ۱ نیز طول پیوند هیدروژنی تشکیل شده میان پپتید لبستاتین و زیر واحد اینتگرینی α1 را نشان می‌دهد. ازآنجایی‌که تشکیل پیوند هیدروژنی میان دارو و مولکول هدف، ازجمله مهم‌ترین عوامل مؤثر در پایداری ساختار کمپلکس دارو-پروتئین است، بنابراین می‌توان این اسیدهای آمینه را به‌عنوان مهم‌ترین اسیدهای آمینه‌ی درگیر در برهمکنش با اینتگرین معرفی نمود. مطالعات متعدد نشان داده است که تغییرات کوچک در توالی آمینواسیدی پپتیدهای دیس‌اینتگرین می‌تواند سبب تغییرات بزرگ در عملکرد این پپتیدها شود. برای مثال، کیسیل و همکاران در سال ۲۰۰۴ و نیز براون و همکاران در سال ۲۰۰۹ عنوان نمودند که خاصیت ضداینتگرینی ویپرستاتین حدود ۲۵ برابر قوی‌تر است، به نظر می‌رسد جایگزینی لوسین ۲۴ / ارژنین ۲۴ سبب افزایش این قدرت مهاری شده است. همچنین جایگزینی والین ۳۸ در ویپرستاتین با سرین ۳۸ در لبستاتین و یا گلایسین ۴۰ در ویپرستاتین با پرولین ۴۰ در لبستاتین تغییرات و پتانسیل‌های بالقوه و مهمی در ناحیه C ترمینال هستند (۲۶، ۲۸). دایدون و همکاران در سال ۲۰۱۳ با انجام مطالعات دینامیک مولکولی گزارش نمودند که باوجود تفاوت‌های جزئی در ساختار لبستاتین و ابتوستاتین، لبستاتین دنباله‌ی C-ترمینال انعطاف‌پذیرتری برای برهمکنش با اینتگرین داشته و می‌تواند ویژگی‌هایی ایجاد کند که تمایل آن را برای اتصال به اینتگرین در مقایسه با ابتوستاتین افزایش می‌دهد که این نتایج با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد که تغییرات اسیدهای آمینه در ساختار پپتید می‌تواند بر برهمکنش آن با اینتگرین تأثیرگذار باشد (۲۹). همان‌گونه که قبلاً نیز اشاره شد، تاکنون گزارشی مبنی بر نحوه‌ی برهمکنش زیرواحد آلفا و پپتید لبستاتین ارائه نشده است. ازآنجایی‌که تغییرات کوچک در توالی و ساختار لبستاتین و پپتیدهای مشابه می‌تواند عملکرد این ترکیبات را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد، شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم در برهمکنش میان این مولکول و هدف آن‌که در این پژوهش مورد بررسی قرار گرفت، از اهمیت فراوانی برخوردار است و از نقاط قوت این پژوهش محسوب می‌گردد. بااین‌حال، آنالیز دقیق‌تر بر روی ساختار و نحوه‌ی برهمکنش این پپتید با زیرواحد اینتگرینی α1 به آنالیزهای شبیه‌سازی مولکولی (MD) نیاز دارد که می‌تواند به‌عنوان یک هدف در پژوهش‌های بعد مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

داکینگ مولکولی، روش محاسباتی بسیار پرکاربرد در پیشگویی ساختارهای کمپلکس رسپتور-لیگاند است. پیشگویی دقیق حالت اتصال لیگاند و پروتئین یکی از اساسی‌ترین مراحل در روش‌های طراحی دارو است. در این مطالعه، برهمکنش میان پپتید لبستاتین به‌عنوان یک مهارکننده‌ی مهاجرت و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی، باهدف اینتگرینی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های بیوانفورماتیکی مورد استفاده در این پژوهش، سبب شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم درگیر در برهمکنش میان لبستاتین و اینتگرین هدف آن گردید. ازآنجایی‌که تغییرات کوچک در توالی و ساختار لبستاتین و پپتیدهای مشابه می‌تواند عملکرد این ترکیبات را به‌شدت تحت تأثیر قرار دهد، شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم در برهمکنش میان این مولکول و هدف آن می‌تواند به طراحی و تولید مصنوعی پپتیدهای متفاوت و شاید قوی‌تر برای مهار اینتگرین و درنتیجه مهار مهاجرت و رگ‌زایی سلول‌های سرطانی منجر شود. به‌علاوه، شناسایی اسیدهای آمینه‌ی مهم درگیر در برهمکنش میان این پپتید و مولکول اینتگرین می‌تواند به شناسایی پلی‌مورفیسم‌های مؤثر در مقاومت احتمالی این رسپتور به لبستاتین کمک نماید.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد انجام

شده است. بدین‌وسیله از تمامی حمایت‌های صورت گرفته توسط این واحد تشکر و قدردانی به عمل می‌آید. کد اخلاق این پژوهش ۱۳۳۳۰۵۰۳۹۵۵۱۰۰۷ است.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده‌اند.

References

1. Heinen TE, da Veiga ABG. Arthropod venoms and cancer. Toxicon. 2011;57(4):497-511.
2. Vija H, Samel M, Siigur E, Aaspõllu A, Tõnismägi K, Trummal K, et al. VGD and MLD-motifs containing heterodimeric disintegrin viplebedin-2 from Vipera lebetina snake venom: purification and cDNA cloning. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2009;153(3):253-60.
3. Olfa K-Z, José L, Salma D, Amine B, Najet SA, Nicolas A, et al. Lebestatin, a disintegrin from Macrovipera venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. Laboratory Investigation. 2005;85(12):1507-16.
4. Marcinkiewicz C. Applications of snake venom components to modulate integrin activities in cell–matrix interactions. The international journal of biochemistry & cell biology. 2013;45(9):1974-86.
5. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 2002;110(6):673-87.
6. Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. Nature reviews Molecular cell biology. 2004;5(10):816-26.
7. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Koteliansky VE, de Fougerolles AR, Detmar M. The α 1 β 1 and α 2 β 1 integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. The American journal of pathology. 2002;160(1):195-204.
8. Sheu J-R, Yen M-H, Kan Y-C, Hung W-C, Chang P-T, Luk H-N. Inhibition of angiogenesis in vitro and in vivo: comparison of the relative activities of triflavin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide and anti-α v β 3 integrin monoclonal antibody. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1997;1336(3):445-54.
9. McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S. Viper venom disintegrins and related molecules. Experimental Biology and Medicine. 1998;219(2):109-19.
10. Dennis MS, Henzel WJ, Pitti RM, Lipari MT, Napier MA, Deisher TA, et al. Platelet glycoprotein IIb-IIIa protein antagonists from snake venoms: evidence for a family of platelet-aggregation inhibitors. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1990;87(7):2471-5.
11. Thibault G. Sodium dodecyl sulfate-stable complexes of echistatin and RGD-dependent integrins: a novel approach to study integrins. Molecular Pharmacology. 2000;58(5):1137-45.
12. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nat Protocols. 2015;10(6):845-58.
13. Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic acids research. 2001;29(1):308-11.
14. Pierce BG, Wiehe K, Hwang H, Kim B-H, Vreven T, Weng Z. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers. Bioinformatics. 2014;30(12):1771-3.
15. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. Nature protocols. 2015;10(6):845-58.
16. Tan PTJ, Khan AM, Brusic V. Bioinformatics for venom and toxin sciences. Briefings in bioinformatics. 2003;4(1):53-62.
17. Possani LD, Merino E, Corona M, Bolivar F, Becerril B. Peptides and genes coding for scorpion toxins that affect ion-channels. Biochimie. 2000;82(9,10):861-8.
18. Soli R, Kaabi B, Barhoumi M, El-Ayeb M, N S-A. Bioinformatic characterizations and prediction of K+ and Na+ ion channels effector toxins. BMC Pharmacology. 2009;9:4-25.
19. Kozminsky-Atias A, Bar-Shalom A, Mishmar D, Zilberberg N. Assembling an arsenal, the scorpion way. BMC Evolutionary Biology. 2008;8:333-46.
20. Froy O, Sagiv T, Poreh M, Urbach D, Zilberberg N, M G. Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels. J Mol Evol. 1999;48:187-96.
21. Tan PTJ, Srinivasan KN, Seah SH, Koh JLY, Tan TW, Ranganathan S, et al. Accurate prediction of scorpion toxin functional properties from primary structures. Molecular Graphics and Modelling. 2005;24:17-24.
22. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. electrophoresis. 1997;18(15):2714-23.
23. Moreno-Murciano MP, Monleón D, Calvete JJ, Celda B, Marcinkiewicz C. Amino acid sequence and homology modeling of obtustatin, a novel non-RGD-

containing short disintegrin isolated from the venom of Vipera lebetina obtusa. Protein science. 2003;12(2):366-71.
24. Walsh EM, Marcinkiewicz C. Non-RGD-containing snake venom disintegrins, functional and structural relations. Toxicon. 2011;58(4):355-62.
25. Marcinkiewicz C, Weinreb PH, Calvete JJ, Kisiel DG, Mousa SA, Tuszynski GP, et al. Obtustatin A Potent Selective Inhibitor of α1 β1 Integrin in vitro and Angiogenesis in vivo. Cancer Research. 2003;63(9):2020-3.
26. Kisiel DG, Calvete JJ, Katzhendler J, Fertala A, Lazarovici P, Marcinkiewicz C. Structural determinants of the selectivity of KTS-disintegrins for the α1 β1 integrin. FEBS letters. Federation of European Biochemical Societies.2004;577(3):478-82.
27. Springer TA, Wang J-H. The three-dimensional structure of integrins and their ligands, and conformational regulation of cell adhesion. Advances in protein chemistry. 2004;68:29-63.
28. Brown MC, Eble JA, Calvete JJ, Marcinkiewicz C. Structural requirements of KTS-disintegrins for inhibition of α1 β1 integrin. Biochemical Journal. 2009;417(1):95-101.29.
29. Daidone I, Aschi M, Patamia M, Bozzi A, Petruzzelli R. Structural and dynamical properties of KTS-disintegrins: A comparison between Obtustatin and Lebestatin.Biopolymers.2013;99(1):47-54.

Original Article

Bioinformatics Analysis of Structure and Function of Lebestatine Isolated from Macrovipera Venom

Rabiee M[1], Sazegar H[1]*, Mohamadi Farsani F[2]

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Department of Genetics, Faculty of Biology, University of Isfahan, Isfahan, Iran

Received: 15 Dec 2016 Accepted: 23 Apr 2017

Abstract

Background & Objective: Lebestatin is a new member of disintegrin family. This single-chain poly peptide comprises 107 amino acids isolated from Macrovipera venom. Lebestatin is connected to integrin, counteracts the adhesion and emigration of endothelial cells through inhibiting the action of this protein and has anti-vessel formation effect. The goal of this study was to survey the interaction of this peptide with integrin and identify important amino acids involved in this interaction.

Material & methods: Given the importance of Lebestatin in inhibiting the adhesion and migration of cancer cells, in this study the structure of this peptide was constructed through Phyre2 server and it was compared with other similar peptides. In the next step, in order to identify the mechanisms of the action of this peptide, its interaction with integrin α1 subunit was investigated with Z-Dock server. The results of this interaction were analyzed with Chimera 1.5.3 and SPDBV.

Results: The results obtained from simulation showed that the structure of Lebestatin is closely similar to its co-family proteins. Moreover, bioinformatics studies showed that Lys50, Cys71 and Thy92 residues of Lebestatin and Asp20, Tyr17, His118 of integrin α1 subunit are significant amino acids involved in the interaction between Lebestatin and its target integrin.

Conclusion: Bioinformatics studies applied in this investigation resulted in identifying significant amino acids involved in the interaction between Lebestatin and its target integrin. Results of this study could facilitate the development of more effective peptides for the inhibition of integrin, metastasis and angiogenesis of cancer cells.

Keywords: Diazinon, Ovary, Oocyte, Graafian follicle, Female Rat

Corresponding Author: Hossein Sazegar, Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
Email:hoseinsazgar@yahoo.com

Journal of Fasa University of Medical Sciences 7 (2017): 248-256