

پیش‌بینی آثار SNP‌های غیر مترادف ژن استروژن رسپتور بر ساختار و عملکرد پروتئین آن در گاومیش خوزستانی

• آرزو عسکری راد

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

• جمال فیاضی (نویسنده مسئول)

استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، گروه علوم دامی

• محمود نظری

استادیار دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، گروه علوم دامی

• محمدرضا حجاری

استادیار دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۳-۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۸-۰۲

Email: j_fayazi@ramin.ac.ir



چکیده

پیشرفت‌های اخیر در توالی‌یابی DNA و الگوریتم‌های محاسباتی منجر به تشخیص SNP‌هایی با ارزش بالاتر شده است. در این تحقیق از چندین الگوریتم محاسباتی برای بیان تاثیر SNP‌های ژن استروژن رسپتور آلفا (ESR α) بر عملکرد پروتئین در ژنوم گاومیش استفاده شد. در این بررسی از تراشه Affymetrix ۹۰K SNP در ۱۱۲ گاومیش خوزستانی استفاده شده است. دو Argenin۴۳Histedin, Th (SNP Alanin۱۵ronin) برای ژن ESR α یافت شد. آنالیز این SNP‌ها با استفاده از سرورهای Panther, Sift و Provean انجام گردید. Sift با محاسبه ضریب صفر اثر SNP‌ها را مخرب و موثر بر عملکرد پروتئین پیش‌بینی کرد و Panther برای دو SNP اثرات مخرب و موثر بر عملکرد پیش‌بینی کرد. الگوریتم Provean با محاسبه ضریب ۰/۰۸- برای Alanin ۱۵-Thronin SNP و با محاسبه امتیاز ۰/۱۳- برای Argenin۴۳Histedin-SNP اثرات این SNP را طبیعی پیش‌بینی کرد. برای بررسی بیشتر اثرات این SNP‌ها بر پایداری پروتئین و استحکام از الگوریتم I-mutant استفاده شد. الگوریتم I-mutant تاثیر SNP بر پایداری پروتئین را با کمک رگرسیون و براساس تغییر در انرژی آزاد (DDG=-۰/۴۹) پیش‌بینی کرد. Argenin۴۳Histedin-SNP-Thronin۱۵Alanin در دمای ۲۵ درجه و pH=۷ ثبات پروتئین را کاهش می‌دهد. Argenin۴۳Histedin با محاسبه امتیاز (DDG=-۰/۵۳) ثبات پروتئین را کاهش می‌دهد. مدل‌سازی پروتئین ESR α با سرور I-taser انجام شد. اعتبارسنجی مدل‌ها به کمک نقشه‌های راماجاندران و سرور Pro-SA حاکی از انحراف پروتئین جهش‌یافته در مقایسه با مدل طبیعی است. مقایسه نتایج داکینگ در دو مدل، نشان‌دهنده تغییر غیرمستقیم آمینواسیدهای درگیر در اینترکشن در مدل جهش‌یافته است. SNP‌ها در اکتیوسایت نمی‌باشند ولی با تغییر ساختار پروتئین، به طور غیرمستقیم بر آمینواسیدهای درگیر در اینترکشن تاثیرگذار بوده‌اند و باعث کاهش میل اتصالی لیگاند در مدل جهش‌یافته شده‌اند.

کلمات کلیدی: استروژن رسپتور، گاومیش، داکینگ، همولوژی مدلینگ

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 31-39

Prediction of nonsynonymous SNPs effects in Esterogene Receptor (ESR) gene on Protein Structure and Performance in Khuzestani Buffaloes

By: Askari Rad, A., M.Sc. Student of Animal Breeding. Fayazi, J., (Corresponding Author) Associate Professor, Department of Animal Science, Ramin University of Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan. Nazari, M., Assistant Professor, Department of Animal Science, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan. and Hajari, M.R., Assistant Professor, Department of Genetic, Shahid Chamran University of Ahvaz.
Email: j_fayazi@ramin.ac.ir

Received: 2017-6-8 Accepted: 2017-10-24

Recent developments in DNA sequencing and computational algorithms have leading to the discovery of higher value SNPs. In this research, several computational algorithms were used to express the effect of ESR α gene SNPs on protein function in buffalo genome. In this study genomic information of 112 Khuzestani buffaloes that revealed by Affymetrix-90K-SNP-Chip were used. We found two SNPs for ESR α gene. The analysis of these SNPs was performed using Sift, Provean servers. Sift by calculating a zero coefficient, predict that SNPs effects were destructive and effective on protein function. Provean algorithm predict a natural effect by calculating a coefficient of -0.08 for Thr15Ala-SNP and a score of -0.13 for Argenin 43 Histedin-SNP. The SNPs were examined using I-mutant for further investigation of SNPs effects on Protein stability. I-mutant algorithm predict the effect of SNP on protein stability by regression and based on the change in free energy (DDG=-0.49). The result suggested that Thronin15Alanin-SNP at 25 °C and pH=7 will reduce the protein stability and Argenin 43 Histedin-SNP, because of its score (DDG=-0.53), has same effect on protein stability. ESR α protein modeling was performed by I-taser server. Validation of the models by Ramachandran plot and Pro-SA server, indicating a deviation in the mutant protein compared to the natural model. Molecular docking in both natural and mutant models indicates no direct changes in the amino acids involved in the interaction. However by side effect and indirectly there is a decrease in ligand binding affinity for the receptor in the mutated model compare to the natural model.

Key words: ESR α , SNP, Docking, Homology modeling

توسط ژن‌های جداگانه‌ای کد می‌شوند. گیرنده استروژن آلفا (ESR α) یک گیرنده ضعیف است که در تنظیم عملکرد ژن استروژن، پاسخ لاکتوفرین نقش دارد. پروتئین‌های استروژن آلفا و پرولاکتین در طول همه شرایط فیزیولوژیکی مانند لاکتیشن تعیین می‌شوند. استروژن و گیرنده استروژن آلفا در تنظیم پاسخ ژن استروژن نقش دارند. از اثرات ویژه آن اثر بر روی بیولوژی غدد پستانی است. طول سیکل فعلی در گاو میش از ۱۷ تا ۲۶ روز با متوسط ۲۱ روز است. بی‌نظمی‌های زیادی در طول سیکل فعلی گاو میش به دلیل عوامل مختلف، از جمله شرایط زیستی نامطلوب تغذیه‌ای و بی‌نظمی در ترشح هورمون‌های استروئیدی تخمدان دیده می‌شود. فعلی خاموش مسئله اصلی برای تولیدمثل گاو میش است. فصول سال اثر عمده‌ای بر بروز فعلی خاموش در گاو میش دارند. فعلی خاموش در فصول گرم و معتدل به ترتیب ۸۵ و ۵۶ درصد است (۲۱). بیان فعلی ضعیف و طولانی مدت و فاصله گوساله‌زایی زیاد، محدودیت‌ها در بهره‌وری از گاو میش را در فصل گرم تشدید می‌کند، در واقع پتانسیل تولیدمثل کم گاو میش یک نگرانی عمده برای چندین

مقدمه

در گاو میش سیکل فعلی یک دوره کوتاه است. یکی از مشکلات عمده در تولیدمثل گاو میش شناسایی و یا تشخیص فعلی است، چون نشانه فعلی به خوبی در گاو میش در مقایسه با گاو و سایر پستانداران که علائم فعلی را می‌توان به وضوح دید، مشخص نشده است. فعلی (استروس) گاو میش به عنوان یک فعلی خاموش نشان داده می‌شود. برای غلبه به این مشکل در حال حاضر چندین روش در تشخیص فعلی گاو میش پیشنهاد شده است، اما تا به امروز هیچکدام از این روش‌ها کارآمد و قابل اعتماد نبوده است (۱۶).

عوامل ژنتیکی نقش مهمی در کنترل رفتار فعلی در گاو دارد. از طریق تکنیک‌های RT-PCR، ریزآرایه، SNP-PCR-RFLP برآورده شده که تقریباً ۲۶۹ ژن نقش مهمی در فعلی دارند. این ژن‌ها تحت تأثیر برخی تغییرات قابل توجه در سطح رونویسی در طول سیکل فعلی هستند. گیرنده‌های استروژن فاکتورهای رونویسی می‌باشند که با استروژن باند می‌شوند و رونویسی آن را تنظیم می‌کنند. دو ایزوفرم آن ESR α و ESR β

ویا قابل تحمل (Tolerate) پیش بینی می‌کند (۱۵).

پیش‌بینی اثر عملکردی SNP‌های غیر مترادف با استفاده از Provean

Protein Variation Effect Analyser (PROVEAN) بر اساس الگوریتم‌هایی اثر جانیشینی آمینواسید و یا بی‌اثر بودن آن بر عملکرد پروتئین را پیش‌بینی می‌کند. (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php) این الگوریتم باعث ایجاد تعادل میان جانیشینی طبیعی و مخرب با کمک ارزش آستانه (Threshold value) می‌شود. ارزش آستانه این نرم‌افزار ۲/۵- می‌باشد. توالی‌ها در فرمت Fasta آماده شدند. توالی‌هایی که دارای امتیاز کمتر از ۲/۵- باشند مخرب و توالی‌هایی که ارزش آن‌ها بالاتر از ۲/۵- باشد، طبیعی پیش‌بینی می‌شوند (۷، ۸).

پیش‌بینی ویژگی‌های عملکردی SNP‌های غیر مترادف با Panther

برای تایید نتایج Sift از Panther (Protein Analysis Through Evolutionary Relationship) استفاده شد. پیش‌بینی‌های این سرور بر اساس برآورد Hidden Markov Model است. نمره پیش‌فرض این سرور ۳- می‌باشد، که اگر امتیاز پیش‌بینی شده برای توالی بزرگتر از ۳- باشد، این توالی مخرب پیش‌بینی می‌شود و اگر کوچکتر از ۳- باشد، طبیعی در نظر گرفته می‌شود (۲۳).

بررسی ثبات پروتئین با استفاده از I-MUTANT

I-MUTANT (<http://folding.biofold.org/cgi-bin/i-cgi.mutant200>) نرم‌افزاری است که به طور اتوماتیک تغییر در استواری و ثبات پروتئین ناشی از جهش‌های منفرد را با استفاده از تغییر در انرژی آزاد گیبس (DDG) پیش‌بینی می‌کند. پیش‌بینی‌های این نرم‌افزار بر اساس پایگاه داده (Protherm) (<http://www.abren.net/protherm/>) است (۹). توالی پروتئینی با فرمت Fasta به همراه SNP‌ها به‌عنوان ورودی برای نرم‌افزار هستند. خروجی برای I-mutant مقدار تغییر انرژی آزاد یا نشانه DDG است. نشانه DDG توسط معادله مقدار انرژی آزاد گیبس پروتئین جهش‌یافته تانخورده منهای انرژی آزاد نوع طبیعی تانخورده برحسب Kcal/mol محاسبه می‌شود. پیش‌بینی‌ها به سه دسته تقسیم می‌شوند که عبارت از خنثی با دامنه: $DDG > 0.05$ ، کاهش شدید با دامنه: $DDG < -0.05$ و افزایش شدید با دامنه: $DDG < -0.05$ می‌باشند (۴).

مدل‌سازی با I-taser

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین با استفاده از توالی آمینواسیدی یکی از مسائل مهم در زیست‌شناسی محاسباتی ساختاری است. انجمن گسترده ارزیابی انتقادی پیش‌بینی ساختار (CASP) طی آزمایشی نشان داد که I-TASER به‌عنوان بهترین روش در بخش سرور از آزمایش CASPY بود. دقت مدل پیش‌بینی شده توسط I-Taser دارای میانگین ارور ۰/۰۸ برای (Tm-Score) (Template modeling score) و ۲ آنگستروم برای RMSD است. Tm-score اندازه شباهت بین دو ساختار پروتئین با ساختارای سوم دیگر است. امتیاز TM به‌عنوان یک اندازه‌گیری دقیق از کیفیت ساختارهای پروتئینی است که از اندازه RMSD و GDT استفاده می‌کند. این سرور برای تولید خودکار ساختار سه بعدی پروتئین است

دهه بوده است. گیرنده استروژن بتا در تنظیم لاکتوفیرین نقش دارد. گاو میش گونه مهم در سراسر جهان از نظر تولید گوشت و شیر است. عمده محدودیت‌ها برای بهره‌برداری کامل از پتانسیل تولیدی گاو میش بازده ذاتی تولیدمثل پایین آن با توجه به تاخیر در بلوغ، سن بالاتر در اولین زایمان، دوره طولانی آنستروس بعد از زایمان، فعلی خاموش، تأثیر فصل در پرورش و نرخ آبستنی کم است (۶). با توجه به اهمیت ژن گیرنده استروژن آلفا در بیان ژن استروژن و نقش این ژن در بروز فعلی و همچنین محدودیت‌هایی که فعلی خاموش و طولانی برای بهره‌وری از گاو میش ایجاد می‌کنند، مطالعه عوامل موثر در بروز فعلی خاموش حائز اهمیت می‌باشد. بروز جهش در ژن‌های درگیر در بیان استروژن می‌تواند یکی از عوامل اثرگذار بر بروز فعلی خاموش باشد.

SNP‌هایی که در نواحی کدکننده رخ می‌دهند مورد توجه پژوهشگران بوده اند. این SNP‌ها بر ساختار mRNA و پایداری پروتئین موثر هستند و اغلب سبب تغییر عملکرد بیولوژیکی پروتئین‌ها می‌گردند. گاهی اوقات ایجاد جهش در نواحی پروموتور ژن یا نواحی اینترون ژن سبب تغییر در بیان رونویسی ژن و پایداری RNA و در نهایت بیان پروتئین مربوطه می‌گردد (۱). یافتن اثر تغییر یک نوکلئوتید در ژنوم دام بر روی عملکرد دام، حوزه مطالعاتی بنام پویش ژنومی (GWAS) را ایجاد نموده است. بر این اساس تراشه‌های SNP با تراکم مختلف برای هر دام طراحی شده است. با توجه به اینکه اخیراً تراشه SNP برای گاو میش خوزستان در دسترس قرار گرفت، لذا یافتن SNP‌های احتمالی در بخشی از ژنوم مرتبط با فعلی خاموش ($ESR\alpha$) در دام مقاومی همچون گاو میش و برآورد اثر جهش بر عملکرد پروتئین از اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از اطلاعات ژنوتایپینگ ۱۱۲ گاو میش خوزستانی که درش منطقه در خوزستان پراکنده هستند، از جمله شهرستان‌های دزفول، شوش، شوشتر، اهواز، شادگان و دشت آزادگان که از مهم‌ترین شهرستان‌های پرورش‌دهنده این جمعیت می‌باشند استفاده شد. نمونه‌گیری به گونه‌ای انجام شد که متناسب با پراکندگی جمعیت در شهرستان‌ها باشد. نمونه‌ها برای تعیین ژنوتایپ به پارک علم و فناوری پردانو در ایتالیا فرستاده شدند و با کمک تراشه اسنیپ ۹۰k شرکت افیمتریکس تعیین ژنوتایپ شدند و پس از اعمال فیلترهای معمول و مرسوم، ۸۹۹۸۰ جایگاه SNP را در سرتاسر ژنوم نشان دادند. آرایه‌های طراحی شده جهت تعیین ژنوتایپ گاو میش امکان ژنوتایپ ۸۹۹۸۰ جایگاه مارکری SNP را فراهم می‌آورد. هر چیپ دارای ۹۶ آرایه می‌باشد و هر آرایه برای بررسی یک حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد.

پیش‌بینی اثرات SNP با استفاده از Sift

برای پیش‌بینی اثرات SNP‌های غیر مترادف (Nonsynonymous) (SNP) بر ساختار و عملکرد پروتئین از Sift (Sorting Intolerant From Tolerant) استفاده شد (<http://sift.jcvi.org>). توالی پروتئینی $ESR\alpha$ با فرمت Fasta به همراه جهش‌های مربوطه ($R^{23}H, T^{15}A$) در نرم‌افزار اجرا شد. امتیازدهی Sift بر اساس ۰/۰۵ می‌باشد. امتیاز کوچکتر و یا مساوی ۰/۰۵ را مخرب و موثر بر عملکرد و امتیاز بالاتر از ۰/۰۵ را طبیعی

بررسی تاثیر جهش بر ساختار پروتئین و عملکرد آن و بررسی نحوه اتصال لیگاند به اکتیو سایت از داکینگ استفاده شد. لیگاند پروتئین ESR α استرادیول (EST) از سایت PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/>) با home.do) دانلود شده و پس از مینیمایز شدن و آماده شدن، داکینگ با نرم‌افزار اتوداک ۱،۵،۶ Auto Dock Tools به تعداد ۱۰۰ بار و با الگوریتم، ژنتیک الگوریتم و با گرید باکس (۵۶×۵۶×۴۶) انجام شد.

String (Search Tool for the Retrieval of interacting Genes/ Protein)

در زیست‌شناسی مولکولی String یک پایگاه داده بیولوژیکی است که تعاملات پروتئین-پروتئین را پیش‌بینی می‌کند. شبکه‌های متقابل پروتئین-پروتئین یک عنصر مهم برای درک سطح فرایند سلولی هستند. این پایگاه داده حاوی اطلاعات از منابع متعددی است، از جمله داده‌های تجربی، روش‌های پیش‌بینی محاسباتی که این اطلاعات مرتب به روز می‌شوند. آخرین نسخه این نرم‌افزار (نسخه ۱۰) حاوی اطلاعاتی درباره حدود ۹/۶ میلیون پروتئین از بیش از ۲۰۰۰ موجود زنده است (۵). برای بررسی پروتئین‌های وارد اینترکشن شده با استروژن رسپتور آلفا، توالی آمینواسیدی این پروتئین در نرم‌افزار String اجرا شد، سپس شبکه پروتئین پیش‌بینی شد.

نتایج

در بررسی Data set مربوط به گاو میش‌های خوزستانی دو SNP (R^{43H}, T^{15A}) برای ژن ESR α یافت شد. با توجه به تغییراتی که SNP‌های مخرب می‌توانند در ساختار و عملکرد بیولوژیکی پروتئین‌ها بوجود آورند و نقش حائز اهمیت گیرنده استروژن (ESR α) در بیان ژن استروژن و با توجه به اینکه جهش‌های موجود در این ژن یکی از عوامل

که از سیستم نمره‌دهی برای به دست آوردن ارزیابی کمی از مدل‌ساخته شده کمک می‌گیرد (۲۲). این سرور به صورت رایگان و آنلاین در دسترس می‌باشد (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). مدل طبیعی و بدون جهش ESR α با استفاده از I-taser مدل‌سازی شد، (شکل ۱) سپس با استفاده از نرم‌افزار Chimera جهش‌ها (T15A, R43H) اعمال شدند.

اعتبارسنجی مدل ساخته شده

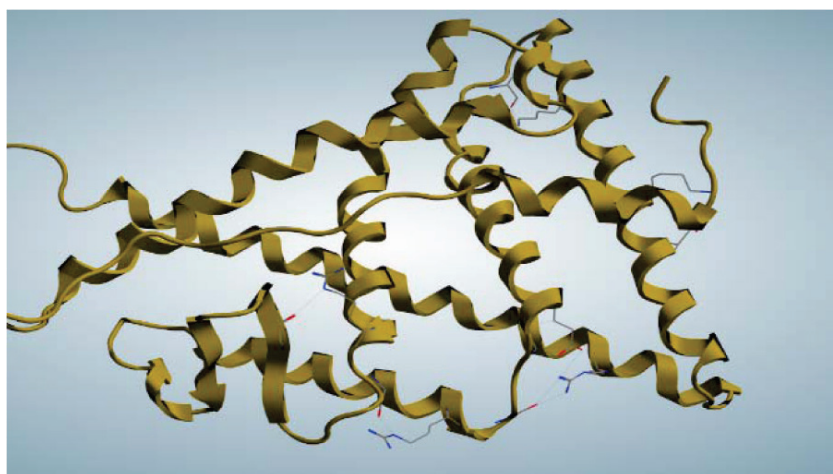
برای ارزیابی ساختار و کیفیت شیمی فضائی دو مدل طبیعی و جهش‌یافته، از نقشه‌های رامانچاندرا و سرور pro-SA استفاده شد. سرور Pro-SA کیفیت مدل تولید شده را با محاسبه Z-score بیان می‌کند. Z-score معیاری است که کیفیت کلی مدل را نشان می‌دهد (۱۰).

سوپرایمپوز دو ساختار

برای بررسی انحراف ساختارها از یکدیگر ساختار بدون جهش با ساختار جهش‌یافته سوپرایمپوز شدند. سوپرایمپوز دو ساختار با استفاده از نرم‌افزار Chimera انجام شد. شاخص RMSD میزان انحراف دو ساختار را از یکدیگر نشان می‌دهد که مقدار RMSD هرچه کمتر باشد نشان‌دهنده انحراف کمتر این ساختارها از یکدیگر است. پس از سوپرایمپوز کردن ساختار جهش‌یافته با جهش جانشینی و ساختار طبیعی مقدار RMSD بین دو مدل ۱/۳۳۹ گزارش شده است که نشان‌دهنده انحراف در ساختار اولیه نسبت به ساختار جهش‌یافته است.

داکینگ مولکولی

روش کلیدی در پیش‌بینی ساختار کمپلکس رسپتور-لیگاند و روشی ارزشمند برای شناخت بهتر برهم کنش‌های رسپتور-لیگاند است. برای



شکل ۱- مدل طبیعی ESR α گاو میش خوزستانی

شده به‌عنوان ورودی Provean مورد آنالیز قرار گرفت. امتیاز برآورد شده Provean برای (T¹⁵A) SNP برابر با ۰/۱۳- است که پیش‌بینی می‌شود این SNP طبیعی می‌باشد. (R⁴³H) SNP توسط Provean به‌عنوان یک SNP طبیعی پیش‌بینی شد. به منظور افزایش و بهبود دقت پیش‌بینی کلی، از الگوریتم I-mutant برای بررسی ثبات پروتئین جهش یافته ESR α استفاده شد. این الگوریتم تأثیر SNP بر پایداری و استحکام پروتئین را با کمک رگرسیون بر اساس تغییر در انرژی آزاد (DDG) پیش‌بینی می‌کند. براساس آنالیزهای این سرور (T¹⁵A) SNP با DDG = -۰/۴۹ در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد. پیش‌بینی I-mutant برای (R⁴³H) SNP DDG = -۰/۵۳ است که در دما ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۷ پایداری پروتئین را کاهش می‌دهد.

ESR α طبیعی از نظر ساختاری پایدارتر است

ساختار سه‌بعدی پروتئین برای پیش‌بینی اثر SNP‌های غیرمترادف بر ساختار کلی پروتئین بسیار موثر می‌باشد (۲۰۳). برای مدل‌سازی از سرور I-taser استفاده شد. پیش‌بینی‌های این سرور بر اساس ارزیابی‌های کمی از ساختار مدل شده است. توالی پروتئینی با فرمت Fasta به‌عنوان ورودی نرم‌افزار و خروجی نرم‌افزار پنج مدل پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار به همراه Tm-score (Template modeling score), C-score, Rmsd برای

موثر در ایجاد فعلی خاموش در گاو میش می‌باشد، بررسی SNP‌های این ژن و پیش‌بینی اثرات آن‌ها حائز اهمیت می‌باشد. در این مطالعه ضمن آنالیز SNP‌های غیرمترادف گاو میش خوزستانی با سرورهای Sift, Provean, I-mutant, Panther اثرات SNP‌ها بر شکل سوم پروتئین و عملکرد آن نیز پیش‌بینی شد. به منظور تعیین ویژگی جهش در ESR α با استفاده از توالی‌ها و ساختارهای مشاهده شده در نرم‌افزارها، ساختار و عملکرد ناشی از جایگزینی آمینواسیدها پیش‌بینی شد. این مقاله بر اساس استفاده از چندین روش مانند پیش‌بینی اثرات SNP‌ها، آنالیز اثر جهش بر ساختار پروتئین، آنالیز اثرات جهش بر برهمکنش پروتئین با لیگاندش استوار است. نتایج آنالیز SNP‌ها در جداول (۱،۲) زیر بیان شده است. امتیاز پیش‌بینی شده Sift با استفاده از هم‌ردیفی چندگانه (multiple alignment) توالی‌ها برای این SNP‌ها صفر می‌باشد. اگر امتیاز پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار Sift برای SNP کمتر از ۰/۰۵ باشد، مخرب و اگر بیشتر از ۰/۰۵ باشد، طبیعی در نظر گرفته می‌شود. امتیاز پیش‌بینی شده Sift برای هر دو SNP صفر می‌باشد که به‌عنوان مخرب و موثر بر عملکرد پیش‌بینی شده است. پیش‌بینی Panther برای این دو SNP نیز مخرب و موثر بر عملکرد پیش‌بینی شد. برای بررسی بیشتر اثرات SNP‌های مورد نظر و بررسی اثرات آن بر عملکرد پروتئین توالی پروتئینی در فرمت Fasta و با مشخص کردن جایگاه SNP و نوع اسیدآمینه جانشین

جدول ۱- نتایج پیش‌بینی شده برای SNP غیرمترادف و تغییر اسیدآمینه Thr¹⁵Ala در ESR α گاو میش خوزستانی توسط چهار نرم‌افزار: Sift, Provean, I-mutant, Panther

نتایج I mutant		نتایج Provean		نتایج Panther		نتایج Sift		
عملکرد	امتیاز* DDG	RI*	عملکرد	مقدار پارامتر	عملکرد	مقدار پارامتر	مقدار پارامتر	
کاهش می‌یابد	-۰/۴۹ (Kcal/mol)	۶	طبیعی	-۰/۰۸	مخرب	-۳/۸۶	مخرب	۰/۰

* این امتیاز در دمای ۲۵ و pH برابر ۷ بدست آمده است.

Reliability Index* شاخص اطمینان برای پیش‌بینی سرور I-mutant

جدول ۲- نتایج پیش‌بینی شده برای SNP غیرمترادف و تغییر اسیدآمینه Arg⁴³His در ESR α گاو میش خوزستانی توسط چهار نرم‌افزار: Sift, Provean, I-mutant, Panther

نتایج I mutant		نتایج Provean		نتایج Panther		نتایج Sift		
عملکرد	امتیاز* DDG	RI*	عملکرد	مقدار پارامتر	عملکرد	مقدار پارامتر	مقدار پارامتر	
کاهش می‌یابد	-۰/۵۳	۵	طبیعی	-۰/۱۳	مخرب	-۳/۵	مخرب	۰/۰

* این امتیاز در دمای ۲۵ و pH برابر ۷ بدست آمده است.

Reliability Index* شاخص اطمینان برای پیش‌بینی سرور I-mutant

است و باعث کاهش میل اتصال (Binding affinity) لیگاند به رسپتور شده است، به طوری که در مدل طبیعی میل اتصال لیگاند به رسپتور ۰۰/۳۱- و در مدل جهش‌یافته ۰۰/۲۱- مشاهده شد (جدول ۳).

بحث

در گلوامیش سیکل فعلی یک دوره کوتاه است. یکی از مشکلات عمده در تولیدمثل گلوامیش شناسایی فعلی است. از عوامل موثر بر ایجاد فعلی خاموش می‌توان به عوامل ژنتیکی نیز اشاره کرد. طی مطالعه‌ای برآورد شد که تقریباً ۲۶۹ ژن نقش مهمی در فعلی دارند. یکی از این ژن‌ها ژن گیرنده استروژن می‌باشد (۱۸). گیرنده استروژن به استروژن متصل می‌شود و رونویسی آن را تنظیم می‌کند، در نتیجه در پاسخ ژن استروژن نقش دارد (۲۰).

شناسایی SNP‌های غیر مترادف (Nonsynonymous SNPs) که اثرات مخرب و موثر بر عملکرد دارند از SNP‌هایی که قابل تحمل می‌باشند راه مناسبی برای تحلیل حساسیت فرد به بیماری می‌باشد. تمامی SNP‌ها عملکردی زیان‌آور نداشته و تاثیر برخی قابل تحمل می‌باشد (۱۲). امروزه عمده نگرانی مربوط به SNP‌های غیر مترادف است که از لحاظ عملکردی حائز اهمیت می‌باشند (۱۳). برای تعیین اثرات عملکردی SNP‌های غیر مترادف مربوط به ژن ESR از سه ابزار Sift, Panther, Provean, I-mutant استفاده شد. به دلیل اینکه روش‌های آزمایشگاهی به وقت و هزینه زیادی نیاز دارند این ابزارها می‌توانند روش مناسبی برای فیلتر کردن SNP‌های غیر مترادف قبل از مراحل آزمایشگاهی باشند. تفاوت در پیش‌بینی این سه ابزار ناشی از تفاوت در ویژگی روش‌های استفاده شده می‌باشد، بنابراین انتظار می‌رود که نتایج در برخی موارد غیر مشابه باشد (۱۷). برای بررسی اثرات این SNP‌ها بر پایداری ساختار پروتئین از مدل‌سازی استفاده شد. تغییر در ساختار پروتئین مدل شده را می‌توان تاییدی برای اثر SNP‌های غیر مترادف بر پایداری پروتئین قبل از تایید مراحل آزمایشگاهی در نظر گرفت. برای بررسی اثرات جهش بر شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین از STRING استفاده شد. بررسی اثرات متقابل پروتئین-پروتئین یک رویکرد ضروری برای شناخت عملکرد شبکه‌ای پروتئین است (۱۱). در این مطالعه پیش‌بینی شده است که ESR با PRL, MAPK, FOS در تعامل است (شکل ۵) و همچنین در چرخه‌های Estrogen Signaling Pathway, Prolactin Signaling Pathway, Thyroid hormone Signaling Pathway دخیل می‌باشد و هر گونه تغییر در ساختار

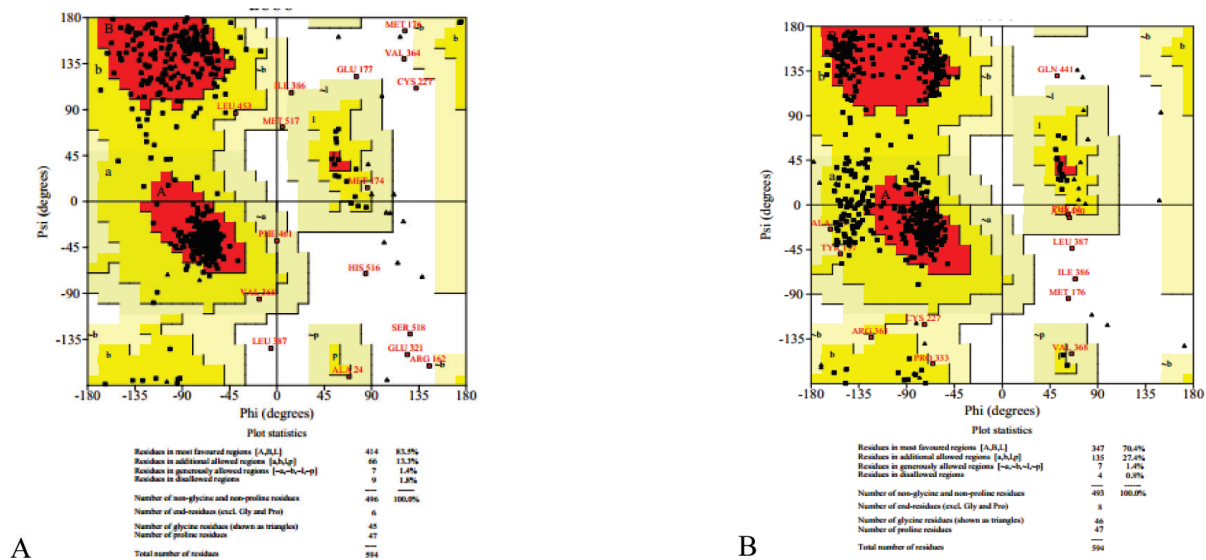
هر مدل می‌باشد. C-score بالاترین ارزش معناداری مدل را با صحت بالا نشان می‌دهد. مدل طبیعی ESR با $C\text{-score} = -2/89$ و $Tm = 57/$ ساخته شده و با استفاده از نقشه‌های رام‌چاندرا و سرور Pro-SA اعتبارسنجی شد. نتایج نشان دادند که در مدل طبیعی ۸۳/۵ درصد از مدل ساخته شده در منطقه ایده‌آل می‌باشد و ۱۳/۳ درصد در منطقه قابل قبول می‌باشد (۱/۴ درصد را با چشم‌پوشی از خطا می‌توان قابل قبول در نظر گرفت) و ۱/۸ درصد در منطقه غیر قابل قبول می‌باشد. در حالیکه در مدل جهش‌یافته ۷۰/۴ درصد در منطقه ایده‌آل، ۲۷/۴ درصد در منطقه قابل قبول (۱/۴ درصد را با چشم‌پوشی از خطا می‌توان قابل قبول در نظر گرفت) و ۰/۸ درصد در منطقه غیر قابل قبول می‌باشد (شکل ۲) که این تغییر ساختار از منطقه ایده‌آل به منطقه قابل قبول نشان‌دهنده اثرات جهش بر ساختار پروتئین است. نتایج Pro-SA نشان می‌دهد که Z-score در مدل طبیعی برابر با ۳/۶- و در مدل جهش‌یافته ۳/۵۹- می‌باشد، که این نشان‌دهنده انحراف در ساختار پروتئین طی جهش می‌باشد (شکل ۳).

آنالیز داکینگ مولکولی بین ESRα و لیگاندش EST

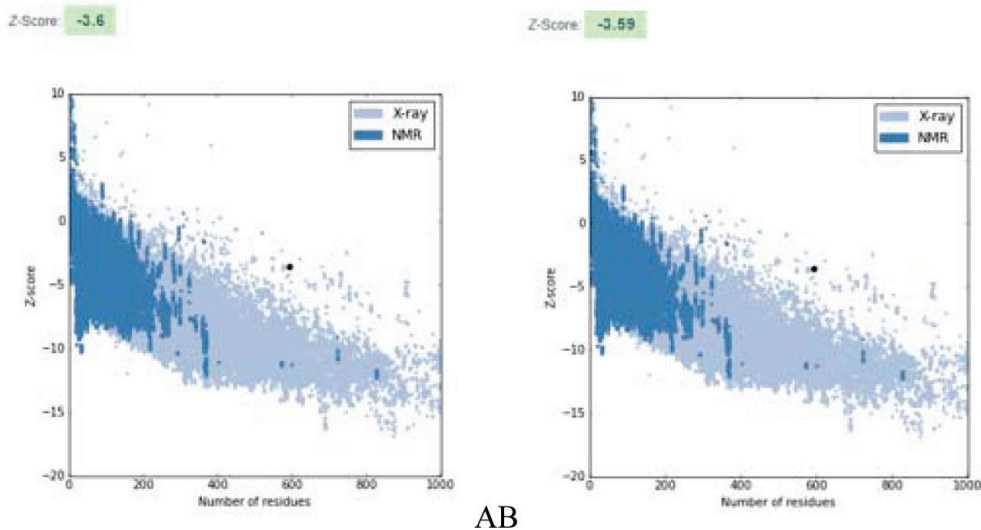
تغییر در یک آمینواسید ممکن است باعث تخریب جایگاه اتصال لیگاند یا جایگاه اتصال پروتئین شود و بر عملکرد پروتئین با استفاده از تغییر ثبات پروتئین یا سرعت تاخوردگی پروتئین تاثیرگذار باشد (۱۹). جایگزینی یک آمینواسید در توالی پروتئینی ممکن است بر میل اتصال پروتئین به لیگاندش تاثیرگذار باشد (۱۴)، بنابراین برای بررسی اثرات جهش‌ها بر میل اتصال لیگاند به رسپتور و عملکرد پروتئین از داکینگ استفاده شد. داکینگ با نرم‌افزار Auto Dock Tools ۱,۵,۶ به تعداد ۱۰۰ ران و با گرید باکس (۵۶×۵۶×۴۶) در هر دو مدل طبیعی و جهش‌یافته انجام شد. ضمن بررسی نتایج داکینگ مقایسه داکینگ دو مدل طبیعی و جهش‌یافته، تغییر در آمینواسیدهای درگیر در اینترکشن مشاهده شد. SNP‌های مورد مطالعه، در منطقه اکتوسایت نمی‌باشند ولی با تغییر ساختار پروتئین باعث تغییر جایگاه اتصال لیگاند به رسپتور شده‌اند و به طور غیرمستقیم بر جایگاه اتصال لیگاند به رسپتور موثر بوده‌اند، به طوری که در مدل طبیعی، ترئونین و پرولین وارد اینترکشن با استرادیول شده‌اند، در حالی که در مدل جهش‌یافته استرادیول با لوسین، ترئونین و آرژنین وارد اینترکشن شده است (شکل ۴). انرژی اتصال در مدل طبیعی برابر با ۶/۱۹- و در مدل جهش‌یافته ۵/۷۲- برآورد شد، که نشان‌دهنده منفی‌تر شدن انرژی اتصال در مدل جهش‌یافته نسبت به مدل طبیعی

جدول ۳- نتایج داکینگ با اتوداک، میان ESRα طبیعی و جهش یافته با لیگاند (EST)

انرژی اتصال داکینگ	میل اتصال لیگاند	
-۰/۳۱	-۶/۹۱	ESRα طبیعی با EST
-۰/۲۱	-۵/۷۲	ESRα جهش یافته با EST



شکل ۲ - نقشه رامچاندرا در دو مدل طبیعی (A) و مدل جهش یافته (B)



شکل ۳ - Z-SCORE در مدل طبیعی (A) و در مدل جهش یافته (B). به ترتیب: -۳/۵۹، -۳/۶

در پایداری پروتئین نیز مشاهده شد که می‌تواند در متابولیسم پروتئین موثر باشد.

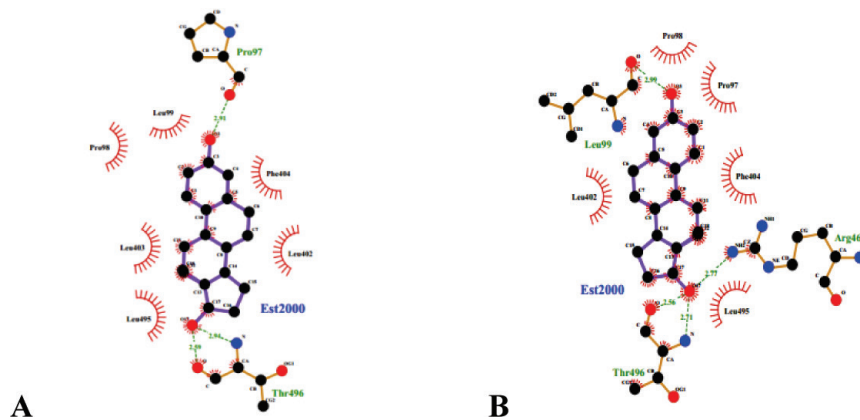
پروتئین و عملکرد آن می‌تواند بر این مسیرها موثر باشد.

منابع مورد استفاده

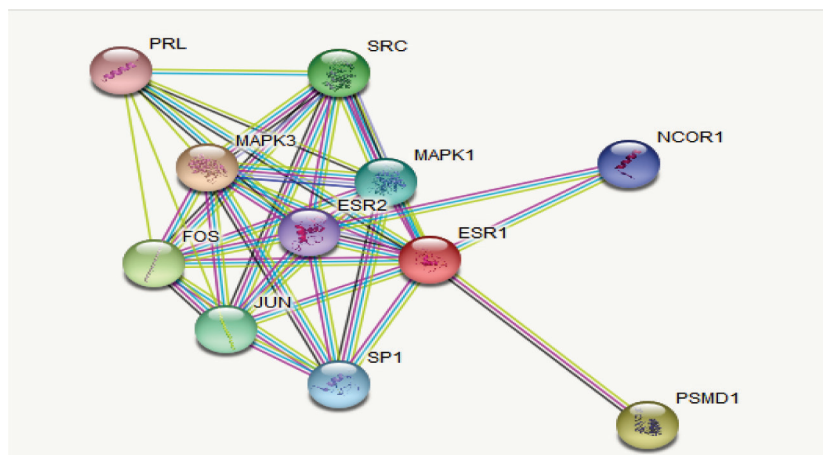
1. Bhattacharya, R., Rose, P.W., Burley, S. K. and Prlc, A. 2016. Impact of genetic variation on three dimensional structure and function of proteins. *PLOS ONE*. 12(3): e0171355
2. Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N.,

نتیجه‌گیری کلی

طی تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی انجام شده بر SNP‌های غیر مترادف مربوط به ژن $ESR\alpha$ در گاومیش‌های خوزستانی این SNP‌ها موثر بر عملکرد پروتئین پیش‌بینی شده‌اند، به طوریکه با اثر بر ساختار پروتئین به طور غیرمستقیم باعث کاهش میل اتصال لیگاند به رسپتور شده‌اند، هم‌چنین با مدل‌سازی ساختار پروتئین و اعمال جهش، تغییر



شکل ۴- برهمکنش دو بعدی میان استروژن رسپتور آلفا طبیعی (A) و جهش یافته (B) با لیگاندش استرادیول



شکل ۵ - برهمکنش پروتئین-پروتئین استروژن رسپتور آلفا

- Weissig, H., Shindyalov, I.N., and Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242
3. Bg, H. 1990. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics.* 126:5-16
4. Bava, K.A., Gromiha, M.M., Uedaira, H., Kitajima, and K. Sarai. A. 2004. ProTherm, version 4.0: thermodynamic database for proteins and mutants. *Nucleic Acids Res.* 32:D120-D121.
5. Brohee, S., and VanHelden, G. 2006. Evaluation of clustering algorithms for protein-protein interaction networks. *Bmc Bioinformatic.* 7:488-498
6. Connor, E.E., Wood, D.L., Sonestigard, T.S., Da Mota, A.F., Bennet, G.L., Williams, J.L. and Capuco, A.v. 2005. Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland. *Journal of Endocrinology.* 185:593-603
7. Choi, Y., Sims, G.E., Murphy, S., Miller, J.R., and Chan, A.P. 2012. Predicting the Functional Effect of Amino Acid Substitutions and Indels. *PLoS ONE.* 7: e466-488
8. Choi, Y., and Chan, A.P. 2015. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 31: 2745-2747.
9. Capriotti, E., Fariselli, P. and Casadio, R. 2005. I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Research.* 33: W306-310
10. Curtis, A.E., Smith, T.A., Ziganshin, B.A., and Elefteriades, J.A. 2016. The Mystery of the Z-Score. 4:124-130
11. Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P., Mering, C., and Jensen, L.J. 2013. String: Protein-Protein interaction Networks with increased coverage and integration. 41:808-815
12. George Priya Doss, C., Nagasundaram, M., Chakraborty, C., Chen, L., and Zhu, H. 2013. Extrapolating the effect of deleterious nsSNPs in the binding adaptability of flavopiridol with CDK7 protein: a molecular dynamics approach. *Hum Genom.* 7: 10-20
13. Johnson, M.M., Houck, J., and Chen, C. 2005. Environmental aspects selection for EEE using ANP method Screening for Deleterious Nonsynonymous Single-nucleotide Polymorphisms in Genes Involved in Steroid Hormone. *Metabolism and Response.* 14:1326-1329
14. Kabsch, W., and Sander, C. 1983. Dictionary of protein secondary structure: pattern of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 22: 2577-2637
15. Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 4:1073-1081
16. Muthukumar, S., Rajkumar, R., Karthikeyan, K., Liao, C.C., Singh, D., Akbarsha, M.A. and Archunan, G. 2014. Buffalo cervico-vaginal fluid proteomics with special reference to estrous cycle: heat shock protein (HSP)-70 appears to be an estrus indicator. *Biol Reprod.* 8:90-97
17. Peng, Y., Zhaolong, L., and John, M. 2005. Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J. Mol. Biol.* 353: 459-473.
18. Perera, B.M. 2011. Reproductive cycles of Buffalo. *Animal Reproduction Sci.* 124:194-199
19. Rasel, K.D., Chakrapani, V., Patra, S.K., Jena, S., Mohapatra, S.D., Nayak, S., Sundaray, J.K., Jayasankar, P., and Barman, H.K. 2015. Identification and prediction of the consequences of non-synonymous SNPs in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of zebrafish *Danio rerio*. *Turkish Journal of Biology.* 40:43-54
20. Suthar, V. S., and Dhama, A. J. 2010. Estrus Detection Methods in Buffalo. *Veterinary World.* 3: 94-96
21. Imran, S., Javed, M., Yaqub, T., Iqbal, M., Nadeem, A., Mukhtar, and N. Macece, F. 2014. Genetic Basis of Estrous in Bovine: A Review. *International Journal Of Advanced Research.* 2:962-966
22. Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics.* 9: 40-48
23. Thomas, P.D., Campbell, M.J., Kejariwal, A., Karlak, B., Daverman, R., and Diemer, K. 2003. PANTHER: A Library of Protein Families and Subfamilies Indexed by Function. *Genom Res.* 13:2129-2141.

