

Analysis of Missense Mutations of CX3CR1 Gene in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Using Bioinformatics Tools

Bahareh Mazrouei¹ , Mohammad Mehdi Heidari^{1*} , Mehri Khatami¹ 

¹ Dept of Biology, Faculty of Science, University of Yazd, Yazd, Iran

Article Info

Article type:

Research article

Article History:

Received: 06 February 2021

Revised: 27 October 2021

Accepted: 29 January 2022

Published Online: 23 July 2022

* Correspondence to:

Mohammad Mehdi Heidari
Dept of Biology, Faculty of Science,
University of Yazd, Yazd, Iran
Email:
heidarimm@yazd.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Abortion is a common complication that refers to the early termination of pregnancy with the death of the fetus before the 20th week of pregnancy. Previous studies show that many genes are involved in this disease, including the CX3CR1 gene, which is one of the inflammatory response genes in the immune system. The pathogenicity of these variants was determined in this study using bioinformatics analysis.

Material & Methods: In this study, the effects of rs3732378 and rs3732379 mutation were predicted using bioinformatics tools including SIFT, PolyPhen2, PROVEAN, Predict SNP, and Exome Variant Server. Changes in the stability of mutant proteins were investigated using I-Mutant and DynaMut tools. Moreover, modeling of the protein structure, docking, and protein-ligand interaction were performed using SWISS-MODEL, SwissDock, and FRODOCK tools as well as PyMOL, Hawkdock, and MolSoft software, respectively.

Findings: Many polymorphisms related to the CX3CR1 gene have been known to date. Out of 244 missense mutations in the dbSNP database, two variants (rs3732378 and rs3732379) have been reported in association with recurrent pregnancy loss related to the CX3CR1 gene. The results of bioinformatics analyses showed that both variants were predicted as pathogenic mutations and changed the stability of the protein structure and played a key role in interaction with the ligand.

Discussion & Conclusion: The findings of this study indicate that two missense mutations in the CX3CR1 gene are an important candidate for recurrent miscarriage and their identification in patients with recurrent miscarriage can be regarded as a risk factor.

Keywords: Bioinformatics, CX3CR1 gene, Pathogenic mutation, Recurrent pregnancy loss

➤ How to cite this paper

Mazrouei B, Heidari M M, Khatami M. Analysis of Missense Mutations of CX3CR1 Gene in Patients with Recurrent Pregnancy Loss Using Bioinformatics Tools. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(3): 12-28.

آنالیز جهش‌های بدمعنی ژن CX3CR1 در بیماران سقط مکرر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی

بهاره مزروعی^۱ , محمدمهدی حیدری^{۱*} , مهری خاتمی^۱ 

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۱۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۹

تاریخ انتشار: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

نویسنده مسئول:

محمد مهدی حیدری

گروه زیست‌شناسی، دانشکده

علوم، دانشگاه یزد، یزد، ایران

Email:

Heidarimm@yazd.ac.ir

مقدمه: سقط عارضه شایعی است که به پایان زودرس بارداری، با مرگ جنین پیش از هفته ۲۰ بارداری اطلاق می‌شود. بررسی‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های فراوانی در بروز این اختلال دخالت دارند. ژن CX3CR1 یکی از این ژن‌های پاسخ‌دهنده در دستگاه ایمنی است. در این مطالعه، با به‌کارگیری روش‌های مختلف آنالیز بیوانفورماتیکی، به اثبات بیماری‌زایی واریانت‌های rs3732378 و rs3732379 پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی اثر جهش‌های rs3732378 و rs3732379 شامل SIFT، PolyPhen 2، PROVEAN، Predict SNP و Exome Variant Server استفاده گردید. تغییرات پایداری پروتئین جهش‌یافته با ابزارهای I-Mutant و DynaMut بررسی شد؛ همچنین مدل‌سازی، بررسی ساختار پروتئین، داکینگ و برهم‌کنش پروتئین-لیگاند به‌ترتیب با استفاده از ابزارهای SWISS-MODEL، FRODOCK و SwissDock، نرم‌افزار PyMOL، Hawkdock و نرم‌افزار MolSoft انجام گرفت.

یافته‌ها: پلی‌مورفیسم‌های بسیار فراوانی در ارتباط با ژن CX3CR1 شناخته شده‌اند. از میان پلی‌مورفیسم‌های گزارش‌شده، تعداد ۲۴۴ پلی‌مورفیسم مربوط به جهش بدمعنی در بانک اطلاعاتی dbSNP گزارش شده بود که از این تعداد، ۲ جهش بدمعنی rs3732378 (G>A) (g.39307162) و p.Thr280Met و rs3732379 (p.Val249Ile و g.39307256 C>T) مربوط به بیماری سقط مکرر بود و بررسی گردید. نتایج به‌دست‌آمده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی نشان داد که احتمالاً هر دو واریانت به‌عنوان جهش بیماری‌زا پیش‌بینی شده و باعث تغییر پایداری ساختار پروتئین گردیده‌اند و در میان‌کنش با لیگاند تأثیرگذارند.

بحث و نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که این دو جهش بدمعنی ژن CX3CR1، به‌عنوان کاندید مهمی برای بیماری‌زایی سقط مکرر عمل می‌کنند و شناسایی آن‌ها در بیماران مبتلا به سقط مکرر می‌تواند به‌عنوان یک عامل خطر در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، ژن CX3CR1، جهش بیماری‌زا، سقط مکرر

استناد: مزروعی، بهاره؛ حیدری، محمد مهدی؛ خاتمی، مهری. آنالیز جهش‌های بدمعنی ژن CX3CR1 در بیماران سقط مکرر با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، شهریور ۱۴۰۱؛ ۳(۳): ۲۸-۱۲.

طی ۱۰ سال گذشته، کاربرد مارکرهای مولکولی که نشان‌دهنده سطح تنوع پلی مورفیسم DNA هستند، نقش فراوانی در مطالعات ژنتیک ایفا می کنند. SNP یا چندشکلی های تک نوکلئوتیدی به سبب اینکه مارکرهای دوآلی هستند، مورد توجه قرار گرفته اند (۱-۳).

مارکر SNP تنها تغییر یک باز در توالی DNA است و مکان باز با تنوع توالی در DNA ژنومی به عنوان SNP در نظر گرفته می شود. تصور می گردد که کمینه فراوانی آلی ۱ درصد است. احتمال تغییر در دو باز مستقل در یک مکان به ندرت اتفاق می افتد و فراوانی آن بین 10^{-9} تا 5×10^{-9} در هر نوکلئوتید تخمین زده می شود؛ همچنین به علت سازوکارهای مختلف جهش نیز، این احتمال را پایین در نظر می گیرند (۴، ۱).

سقط مکرر حالتی است که عوامل بسیاری در بروز آن دخالت دارند. عوامل ژنتیکی و جهش در ژن های مختلف در بروز سقط مکرر مؤثرند. امروزه ژن های بسیاری شناخته شده اند که در مسیرهای مولکولی مختلف دخالت دارند و جهش در هر کدام از این ژن ها، این مسیر ها را دچار اختلال می کند و به بروز مشکلاتی در دوران بارداری منجر می شوند که در نهایت، به سقط می انجامد (۵، ۶). در طول سال های اخیر، چندین تحقیق و بررسی درباره ژنتیک و تعیین ارتباط میان سقط مکرر و پلی مورفیسم های ژنی مرتبط با سیتوکین ها صورت گرفته است (۷).

در جریان ایجاد رویان، رحم تحت تأثیر فرایندهای مهمی قرار می گیرد که اصطلاحاً دسیدوآلیزاسیون نام دارد که در موش و انسان، این فرایند برای بارداری موفق مورد نیاز است. این فرایند شامل تغییرات ظاهری در سلول های استرومای رحم است که طی این مراحل، رحم برای لانه گزینی و شکل گیری جفت و نمو آن آماده می شود. همراه با این تغییر، به کارگیری تعداد خاصی از سلول های ایمنی مادر مورد نیاز است. این سلول ها لوکوسیت های دسیدوآل نام دارند که در مراحل اولیه حاملگی، حدود

۷۰ درصد از سلول های رحمی را شامل می شوند (۸). لوکوسیت های دسیدوآل سازوکارهایی را در طول دیواره رحمی به کار می گیرند که برای بارداری سالم مورد نیاز است؛ زیرا باعث رشد و حفظ جنین در این ناحیه می گردند و همه این اتفاقات توسط دستگاه ایمنی بدن مادر به سهولت انجام می شود. درواقع، عبور و مرور لوکوسیت ها توسط مجموعه خاصی از مولکول های چسبندگی، جاذب شیمیایی و پاسخ های جاذب شیمیایی تنظیم می گردند. کموکاین ها خانواده بزرگی از پپتیدهای جاذب شیمیایی هستند که به جذب مجموعه های مختلف لوکوسیت ها منجر می شوند (۹). آزمایش های هیبریداسیون درجا نشان داده اند که در قسمت های بافتی درگیر میان جنین و مادر، سلول های دسیدوآل به میزان فراوانی به بیان کموکاین ها می پردازند (۱۰). ارتباط چشمگیر بیان این گیرنده ها نشان دهنده لیگاند های کموکاین خاص روی سطح لوکوسیت های دسیدوآل است. در این میان، گیرنده های خاص سلول های NK و سلول های T منحصراً به فراوانی لیگاند هایشان حضور دارند (۱۱).

ژن CX3CR1 روی کروموزوم ۳ قرار دارد و مکان ژنی آن به طور دقیق 3p22.2 است. این ژن ۱۸۲۴۲ جفت باز دارد. پروتئین کدشونده توسط این ژن یک گیرنده برای فراکتالکین است. فراکتالکین و گیرنده اش، CX3CR1، در چندین بافت تولید مثلی مثل تخمدان ها، لوله های فالوپ، رحم و بیضه ها بیان می شوند (۱۲-۱۴). فراکتالکین/CX3CL1 یک کموکاین منحصربه فرد CX3C است که به عنوان یک مولکول غشایی، توسط سلول های اندوتلیال فعال و با سیتوکاین های پیش التهابی سنتز می شود؛ همچنین بیان ژن CX3CR1 روی تروفوبلاست های انسانی مهاجم نیز شناسایی شده است؛ بنابراین پیشنهاد می گردد این مولکول ها در کنترل رگ زایی رحمی-جفتی درگیر هستند (۱۵، ۱۲، ۱۰)؛ همچنین مشخص شده است که فرم متصل شونده به غشای

اینترنتی استفاده شده (National Center for Biotechnology Information). اطلاعات مورد نیاز درباره ژن CX3CR1، پروتئین و همچنین اطلاعات مربوط به SNP ها از این پایگاه به دست آمده که در بررسی های بعدی از آن ها استفاده شده است (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

سایت *Sorting Intolerant From SIFT Tolerant* از سایت SIFT برای بررسی تأثیر احتمالی جهش روی ساختار پروتئین و در نتیجه، بر عملکرد پروتئین استفاده گردید. این سایت تأثیر جهش را به صورت امتیاز بیان می کند، به این صورت که جهش با امتیاز پایین تر از ۰/۰۵ پاتوژن و بالاتر از ۰/۰۵ خوش خیم در نظر گرفته می شود. اساس امتیازدهی توسط این پایگاه، بررسی هم ردیفی توالی پروتئین مدنظر با تعداد بسیاری از توالی های همولوگ است (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>).

سایت *PolyPhen 2 (Prediction of Functional Affects of Human ns SNPs)*: پایگاه اینترنتی PolyPhen 2 تأثیر تغییر اسید آمینه بر ساختار و عملکرد پروتئین را بر اساس امتیاز پیش بینی می کند که عددی بین صفر و یک است، به این صورت که اگر عددی بین ۰-۰/۲ باشد، خوش خیم؛ بین ۰/۲-۰/۸۵ باشد، احتمالاً بیماری زا و بین ۰/۸۵-۱ باشد، بیماری زا است و در نهایت، خوش خیم یا بدخیم بودن جهش را پیش بینی می کند. این پیش بینی بر اساس توالی و اثر جایگزینی اسید آمینه جهش یافته بر ساختار فیلولژنی است. سازوکار این برنامه بر اساس هم ردیفی چندگانه توالی ساختار سه بعدی پروتئین است. همه این اطلاعات از چندین پایگاه مختلف پروتئین جمع آوری شده اند؛ سپس برای هر جایگاه خاص امتیازدهی صورت گرفته است (<http://genetics.bwh.harvard.edu>).

سایت *PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer)*: پایگاه اینترنتی PROVEAN برای پیش بینی تأثیر جابجایی اسید آمینه بر فعالیت بیولوژیکی پروتئین استفاده می شود. این سایت برای شناسایی تأثیرات

فراکتالکین، باعث افزایش چسبندگی مقاوم لکوسیت ها به سلول های اندوتلیال می شود که این جریان با کمک پروتئین G در CX3CR1 صورت می گیرد و به فرایند لانه گزینی کمک می کند (۱۶، ۱۰). دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی شایع I249 Val و M280 Thr (M280) در ناحیه کدکننده ژن CX3CR1 گزارش شده اند (۱۷، ۱۸).

پره اکلامپسی (PE) عارضه شایعی است که در حدود ۲-۷ درصد از حاملگی ها اتفاق می افتد و یکی از علل عمده مرگ جنین و مادران در دوران بارداری است. با توجه به مطالعات پاتوفیزیولوژی درباره عارضه پره اکلامپسی، ایسکمی جفت و اختلال در عملکرد اندوتلیال از علل برجسته این حالت است. افزایش مارکرهای دخیل در اختلال عملکرد اندوتلیال از جمله ترومبومودولین، عامل فون ویلبراند (VWF) و VCAM-1 به طور مکرر در زنان مبتلا به پره اکلامپسی گزارش شده است. پیشنهاد می شود که آزاد شدن عامل هایی از جفت در پاسخ به ایسکمی، به اختلال در عملکرد اندوتلیال در کل گردش خون مادر منجر می گردد؛ همچنین به نظر می رسد که فعالیت سلول های اندوتلیال بازتاب دهنده افزایش حالت التهابی عمومی است (۱۵).

در مطالعات عدم تعادلی پیوستگی هاپلوتیپ شایع I249 M280 گزارش شده است. هاپلوتیپ IM با کاهش خطر بیماری کرونری حاد و آترواسکلروزیس و با کاهش واکنش پذیری اندوتلیال همراه است. در ژن جهش یافته در این مکان ها، اختلال در بیان این گیرنده و ظرفیت های تغییر یافته چسبندگی افزایش یافته است (۱۹، ۱۵).

به علت بیان بالای این ژن در سلول های رحم، در این تحقیق قصد بر آن است ارتباط میان واریانت های بیماری زای ژن CX3CR1 (rs3732378 و rs3732379) با سقط مکرر، با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی بررسی شود.

مواد و روش ها

جمع آوری اطلاعات: اولین و اصلی ترین پایگاه

احتمالی جهش های غیر هم معنی و اهمیت آن ها بر فعالیت پروتئینی بسیار پرکاربرد است. این پایگاه بر اساس امتیاز محاسبه شده تحت تأثیر جایگزینی اسید آمینه، جهش های با امتیاز کمتر از $2/5$ - را زیان آور و بیشتر از $2/5$ - را خنثی پیش بینی می کند (<http://provean.jcvi.org>).

سایت *Predict SNP* از پایگاه اینترنتی Predict SNP برای آنالیز و بررسی تأثیر جهش ها بر ساختار پروتئین استفاده شده است که نتایج حاصل شامل بررسی های چندین سایت است که بر اساس درصد (که بیشتر نتایج بر اساس بررسی های هم ردیفی توالی پروتئینی توسط هر پایگاه بر اساس ابزار استفاده شده آن پایگاه است) و با رنگ سبز برای جهش خنثی و رنگ قرمز برای جهش زیان آور مشخص شده است. نتایج به دست آمده از این پایگاه نمایش دهنده نتایج محاسبه شده از پایگاه های SIFT، PolyPhen2، Predict SNP، MAPP، PHD-SNP، PolyPhen1 و SNAP است (<https://loschmidt.chemi.muni.cz>).

سایت *Exome Variant Serve* این پایگاه اطلاعاتی از اطلاعات واریانت ها از تعیین توالی اگزوم چندین جمعیت بزرگ از افراد با نیای اروپایی و آمریکایی-آفریقایی به دست آمده است (<https://evs.gs.washington.edu>).

سایت *I-Mutant* از این پایگاه اینترنتی برای بررسی و پیش بینی تغییرات پایداری پروتئین و تأثیر جهش تک نوکلئوتیدی بر ساختار پروتئین استفاده شده است. با وارد کردن توالی پروتئین با فرمت FASTA در کادر مربوطه و تعیین شماره اسید آمینه دارای جهش و وارد کردن اسید آمینه جایگزین، پایگاه مقدار پایداری پروتئین را پیش بینی می کند (<https://folding.biofold.org>).

سایت *SNPs and Go* این پایگاه اینترنتی برای پیش بینی بیماری زایی جهش کاربرد دارد. پیش بینی ها بر اساس تشخیص واریانت های خنثی و بیماری زا در توالی پروتئین انجام می شود که امتیازدهی نهایی سایت

نتیجه بررسی توسط دو ابزار PANTHER و PhD-SNP است. این بررسی ها بر پایه شاخص اطمینان و فراوانی اسید آمینه ها در توالی پروتئین است که احتمال بیماری زایی جهش را به صورت عددی بین ۰ تا ۱ نشان می دهد و چنانچه امتیاز جهش بالاتر از $0/5$ باشد، بیماری زا در نظر گرفته می شود (<https://snps.biofold.org/snps-and-go>).

نرم افزار *PyMOL* از این نرم افزار برای مشاهده ساختار سه بعدی پروتئین و ایجاد جهش هدفمند و بررسی تأثیر آن روی عملکرد پروتئین استفاده شد که با مقایسه تعداد و طول پیوندها، میزان تأثیر جهش بررسی گردید. به سبب آنکه برای بررسی پروتئین با این نرم افزار به ساختار سه بعدی پروتئین نیاز است، مدل های مربوط به این پروتئین که توسط سایت SWISS-MODEL مدل سازی شده بود، بررسی شد و به علت آنکه برای این پروتئین، هیچ کدام از مدل ها دقیقاً با توالی پروتئین مدنظر تطبیق نداشتند؛ پس مدل های این سایت حذف گردیدند و از سایت I-TASSER برای مدل سازی ساختار سه بعدی پروتئین نرمال استفاده شد و مدل های ساخته شده برای بررسی های نرم افزار PyMOL به کار رفتند.

سایت *DynaMut* از پایگاه اینترنتی DynaMut برای دست یابی به ساختار سه بعدی پروتئین جهش یافته و بررسی تغییرات پایداری پروتئین های جهش یافته نسبت به پروتئین نرمال استفاده گردید (<http://biosig.unimelb.edu.au>).

سایت *Hawkdock* از سایت Hawkdock برای داکینگ پروتئین ها استفاده شد. ابتدا مدل مولکولی برای ساختار سه بعدی پروتئین جهش یافته از پایگاه اینترنتی DynaMut به دست آمد؛ سپس برای بررسی برهم کنش میان دو پروتئین گیرنده CX3CR1 و لیگاند آن که فراکتالکین است، از مدل ها استفاده گردید و در پایگاه Hawkdock به کار رفت و ساختار سه بعدی برهم کنش پروتئینی برای هر دو پروتئین نرمال و جهش یافته بررسی

از این مطالعه حذف گردیدند؛ به عبارت دیگر، این مطالعه برای بررسی جهش های بدمعنی، با هدف تعیین پلی مورفیسم های بیماری زا و همچنین تعیین میزان بیماری زایی آن ها در سقط مکرر طرح ریزی شد. از ۲۴۴ پلی مورفیسم بدمعنی، تعداد ۲ SNPs به عنوان پلی مورفیسم های بیماری زا و همچنین به عنوان عامل خطر در نظر گرفته شده بودند. با بررسی های بیشتر در بانک اطلاعاتی NCBI مشخص گردید که از این تعداد، ۲ پلی مورفیسم با شناسه های rs3732378 و rs3732379 در بروز تعدادی بیماری دخالت دارند (شکل شماره ۲)؛ سپس آن ها را با پایگاه های مختلف بررسی کردیم و با توجه به مطالعات گذشته در زمینه ناباروری مشخص شد که این پلی مورفیسم ها در ژن *CX3CR1* در بروز سقط مکرر دخالت دارند.

با توجه به اهمیت عملکرد این ژن و نقش این پلی مورفیسم ها در بروز انواع بیماری ها، مطالعات بیوانفورماتیکی از نظر تغییر عملکرد و ساختار پروتئین برای اثبات بیماری زایی و فاکتور خطر انجام گردید. مراحل انتخاب جهش های بررسی شده، با استفاده از شکل شماره ۲ از بانک اطلاعاتی dbSNP برای ژن *CX3CR1* صورت گرفت.

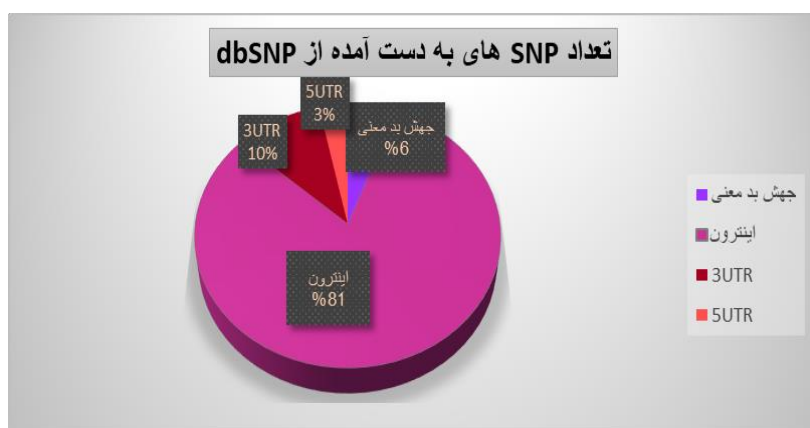
شد (<http://cadd.zju.edu.cn>).

نرم افزار *Molsoft* از این نرم افزار برای بررسی تغییرات برهم کنش میان گیرنده و لیگاند در پروتئین جهش یافته و سالم استفاده گردید. این نرم افزار تغییرات ساختار فضایی و موقعیت قرارگیری اسید آمینه مدنظر را در کمپلکس پروتئینی گیرنده و لیگاند بررسی کرد. نرم افزارهای آنلاین *داینک*: *SwissDock* یک سرویس تحت وب است که برای پیش بینی میان کنش های مولکولی بین پروتئین هدف و یک مولکول کوچک استفاده می شود و *FRODOCK* سرویس تحت وب برای پیش بینی ساختار میان کنش های پروتئین - پروتئین است.

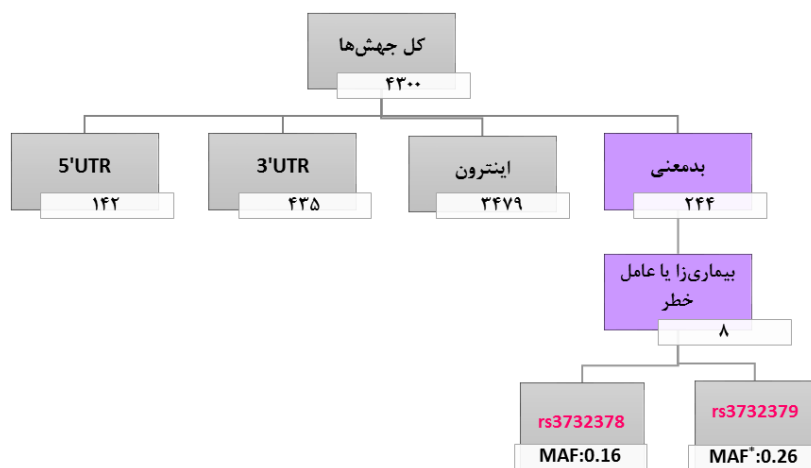
یافته ها

برای دست یابی به اطلاعات مربوط به ژن *CX3CR1* و پلی مورفیسم های این ژن از بانک اطلاعاتی NCBI/dbSNP استفاده شد. درصد فراوانی پلی مورفیسم های این ژن در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

به سبب آنکه این ژن کدکننده نوعی گیرنده پروتئینی است، مبنای مطالعه روی توالی کدکننده پروتئینی قرار داده شد و جهش های ناحیه ایترون، 3'-UTR و 5'-UTR



شکل شماره ۱. نمودار درصد فراوانی انواع SNP های شناسایی شده در ژن *CX3CR1* بر اساس بانک اطلاعاتی NCBI/dbSNP. برای جهش بدمعنی تعداد ۲۴۴ SNP، برای جهش در ناحیه اینترون تعداد ۳۴۷۹ SNP، برای جهش در ناحیه 3'-UTR تعداد ۴۳۵ SNP و برای جهش در ناحیه 5'-UTR تعداد ۱۴۲ SNP گزارش شده است.



شکل شماره ۲. روند دست‌یابی به جهش‌های هدف با استفاده از پایگاه NCBI/dbSNP.

پلی‌مورفیسم‌های مرجع انتخاب گردیدند. نتایج به‌دست‌آمده از سایت SIFT در جدول شماره ۱ گردآوری شده است. همان‌طور که در جدول شماره ۱ آمده است، rs3732378 با امتیاز ۰ پاتوژن پیش‌بینی شده است.

همان‌طور که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است، پلی‌مورفیسم بیماری‌زا شامل پلی‌مورفیسم rs3732378 که MAF* (کمینه فراوانی آللی) برابر با ۰/۱۶ و همچنین پلی‌مورفیسم rs3732379 که MAF برابر با ۰/۲۶ دارد، به‌عنوان

جدول شماره ۱. نتایج به‌دست‌آمده از سایت SIFT

SNP	آمینواسید تغییر یافته	شناسه پروتئین	آمینواسید طبیعی	پیش‌بینی	امتیاز SIFT
rs3732378	T280M	NP_001164642	ترئونین	تأثیر بر عملکرد پروتئین	۰
rs3732379	V249I	NP_001164642	والین	تأثیر نداشتن بر عملکرد پروتئین	۱

جهش T280M (rs3732378) با امتیاز ۰/۷۷۴ پاتوژن پیش‌بینی شده است (اختصاصیت ۰/۹۲ و حساسیت ۰/۸۵).



جهش V249I (rs3732379) با امتیاز ۰/۰۳۳ خوش‌خیم پیش‌بینی شده است (اختصاصیت ۰/۸۲ و حساسیت ۰/۹۵).



شکل شماره ۳. در این شکل نتایج به‌دست‌آمده از سایت PolyPhen2 نشان داده شده است. همان‌طور که پیش‌بینی شده است، جهش T280M با امتیاز نزدیک به ۱، احتمالاً پاتوژن و جهش V249I با امتیاز نزدیک به ۰، خوش‌خیم پیش‌بینی شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از سایت PROVEAN در جدول شماره ۲ جمع‌آوری شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از سایت PolyPhen2 در شکل شماره ۳ نشان داده شده است.

جدول شماره ۲. نتایج سایت PROVEAN

SNP	آمینواسید تغییر یافته	امتیاز سایت	پیش‌بینی اثر جهش
rs3732378	T280M	-۲/۸۶۰	پاتوژن
rs3732379	V249I	۰/۴۰۱	خفنی

جدول شماره ۳. نتایج پایگاه Predict SNP

SNP	آمینواسید تغییر یافته	Predict SNP	MAPP	PhD-SNP	PolyPhen1	PolyPhen2	SIFT	SNAP
rs3732378	T280M	۶۵ درصد	۶۶ درصد	۶۶ درصد	۶۷ درصد	۴۱ درصد	۵۳ درصد	۶۷ درصد
rs3732379	V249I	۸۳ درصد	۸۵ درصد	۸۹ درصد	۶۷ درصد	۷۲ درصد	۹۰ درصد	۸۳ درصد

PHD-SNP، PolyPhen 1 و SNAP خنثی و به رنگ سبز پیش‌بینی شده‌اند؛ اما جهش T280M، مانند نتایج یاد شده در جداول بالا، در ابزارهای SIFT و PolyPhen 2 پاتوژن پیش‌بینی شده است. علت این تناقض‌ها در نتایج به‌دست‌آمده در ابزارهای مختلف، می‌تواند رویکرد متفاوت این ابزارها در بررسی جهش‌ها باشد. سایت Exome Variant Server اطلاعاتی شامل نوع جهش، جایگاه پلی‌مورفیسم در cDNA، میزان حفاظت‌شدگی و نتایج مربوط به PolyPhen 2 را گزارش داد که در جدول شماره ۴ گردآوری شده است.

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، rs3732378 مربوط به جهش T280M است، با امتیاز ۲/۸۶۰- به‌عنوان جهش پاتوژن پیش‌بینی شده است. نتایج به‌دست‌آمده از سایت Predict SNP در جدول شماره ۳ آورده شده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، چنانچه جهشی در هر کدام از پایگاه‌ها پاتوژن پیش‌بینی شود، به رنگ قرمز و اگر اثر جهش خنثی باشد، به رنگ سبز نمایش داده می‌شود. طبق اطلاعات به‌دست‌آمده از این سایت، این دو جهش توسط ابزارهای Predict SNP، MAPP،

جدول شماره ۴. نتایج سایت Exome Variant Server

SNP	آمینواسید تغییر یافته	حفاظت‌شدگی	نتایج PolyPhen2
rs3732378	T280M	۳/۹۸	پاتوژن ۰/۷۷۴
rs3732379	V249I	-۲/۳۲	خوش‌خیم ۰/۰۳۳

جدول شماره ۵. نتایج سایت I-Mutant

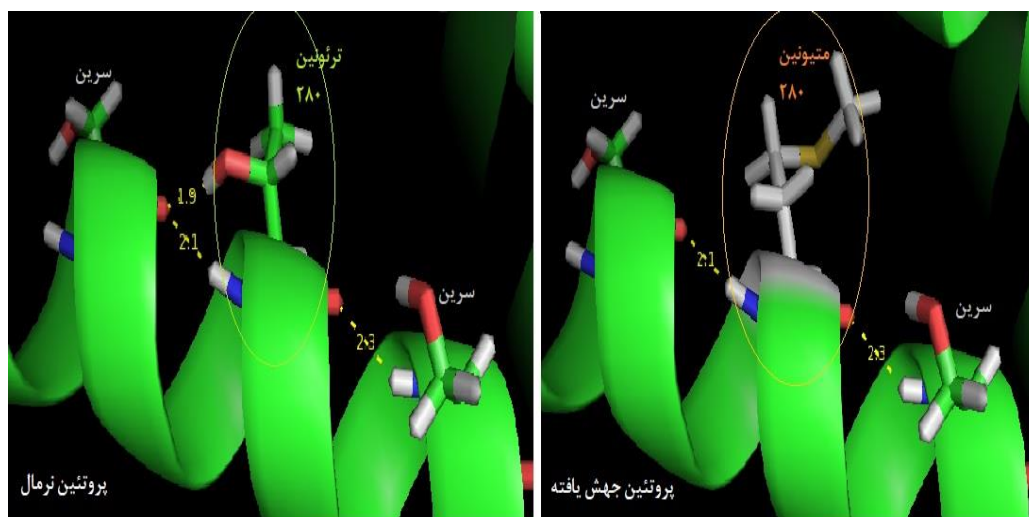
SNP	آمینواسید تغییر یافته	تأثیر بر پایداری پروتئین	مقدار DDG
rs3732378	T280M	کاهش	۱/۴۱- (کیلوکالری/مول)
rs3732379	V249I	کاهش	۰/۷۶- (کیلوکالری/مول)

پروتئین جهش‌یافته شده اند. DDG کمتر از صفر نشان‌دهنده کاهش پایداری است و DDG بزرگ‌تر از صفر بیانگر افزایش پایداری است. نتایج به‌دست‌آمده از سایت SNPs and GO در جدول شماره ۶ آورده شده است.

نتایج مربوط به تغییر پایداری پروتئین جهش‌یافته که از سایت I-Mutant به‌دست‌آمده، در جدول شماره ۵ آورده شده است. طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، هر دو جهش بر پایداری پروتئین اثر گذاشته و باعث کاهش پایداری

جدول شماره ۶. نتایج سایت SNPs and Go

جهش	پیش‌بینی	شاخص اطمینان	امتیاز سایت
T280M	PhD-SNP	۶	۰/۲۰۶
	PANTHER	۳	۰/۶۳۳
	SNPs&Go	۴	۰/۲۷۷
V249I	PhD-SNP	۷	۰/۱۳۴
	PANTHER	۹	۰/۰۶۷
	SNPs&Go	۱۰	۰/۰۱۲

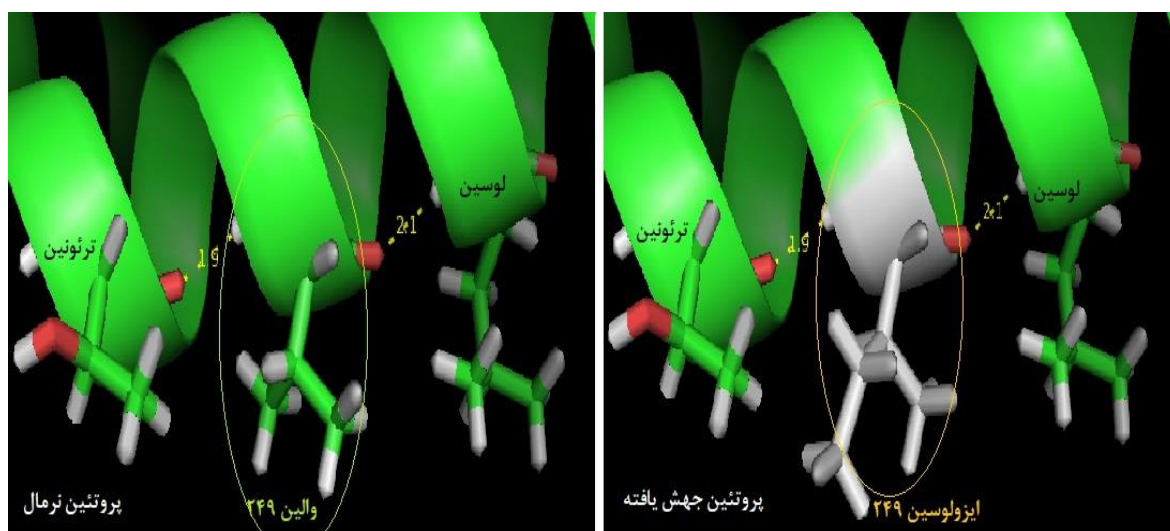


شکل شماره ۴. نتایج به دست آمده از تأثیر جهش Thr280Met در rs3732378 بر ساختار سه بعدی پروتئین

طبق نتایج به دست آمده از این سایت که در جدول شماره ۶ آورده شده است، ابزار PANTHER با بررسی فراوانی اسید آمینه طبیعی و جهش یافته بر اساس الگوریتم خاص، جهش T280M را با شاخص اطمینان ۳ و امتیاز $0.633 (>0.5)$ بیماری زا در نظر گرفته است. نتایج به دست آمده از نرم افزار PyMOL در ارتباط با تأثیر جهش بر ساختار سه بعدی پروتئین و پیوندهای هیدروژنی در شکل های شماره ۴ و ۵ نشان داده شده است.

همان طور که در شکل شماره ۴ نمایش داده شده است، در این جهش، در پروتئین جهش یافته تعداد پیوند میان اسید آمینه متیونین ۲۸۰ با اسید آمینه سرین ۲۷۶

کاهش یافته است. در پروتئین طبیعی، اسید آمینه ترئونین ۲۸۰ با اسید آمینه سرین ۲۷۶ دو پیوند با طول پیوندهای ۱/۹ و ۲/۱ آنگستروم و در موقعیت ۲۸۴، با اسید آمینه سرین یک پیوند با طول ۲/۳ آنگستروم برقرار کرده است؛ اما در پروتئین جهش یافته، اسید آمینه متیونین ۲۸۰ با اسید آمینه سرین ۲۷۶ یک پیوند با طول ۲/۱ آنگستروم و در موقعیت ۲۸۴، با اسید آمینه سرین دیگر یک پیوند با طول ۲/۳ آنگستروم برقرار نموده است؛ بنابراین، جهش T280M بر تعداد پیوندها اثر گذاشته و در پروتئین جهش یافته یک پیوند میان متیونین و ۲ اسید آمینه سرین حذف شده است.



شکل شماره ۵. نتایج به دست آمده از تأثیر جهش Val249Ile در rs3732379 بر ساختار سه بعدی پروتئین

جدول شماره ۷. نتایج سایت DynaMut

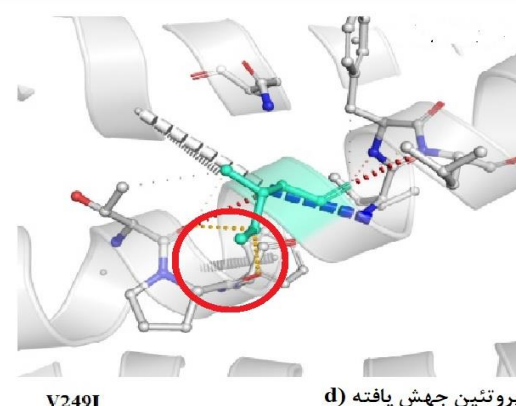
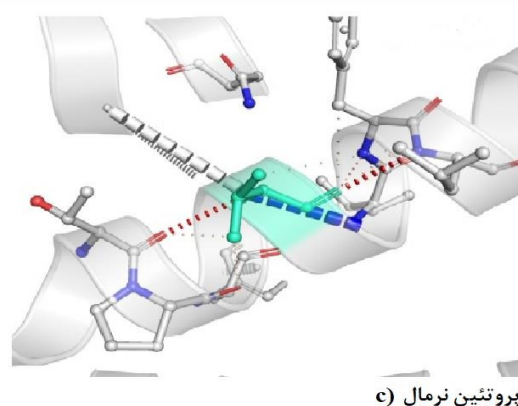
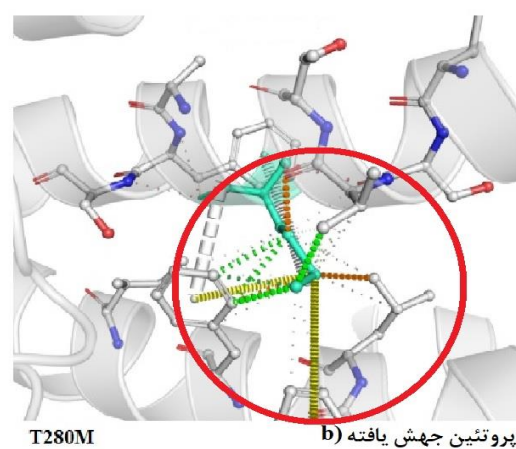
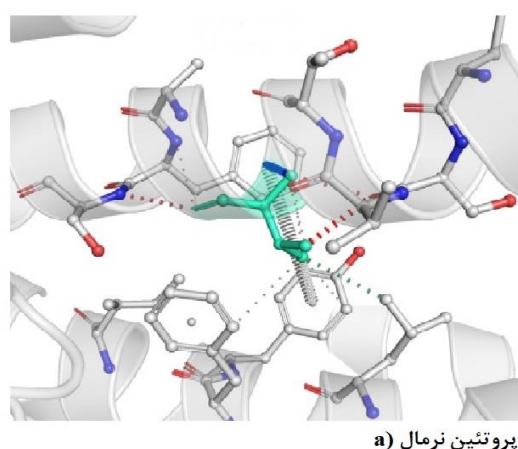
جهش	پایداری	پیش بینی بر اساس NMR	انرژی آنتروپی جنبشی میان پروتئین جهش یافته و طبیعی	مقدار $\Delta\Delta G$
T280M	ثابت	بی ثبات	کاهش انعطاف پذیری مولکول	1.252 (kcal/mol)
V249I	ثابت	بی ثبات	کاهش انعطاف پذیری مولکول	0.186 (kcal/mol)

همان طور که در شکل شماره ۵ مشخص شده، این جهش بر تعداد پیوندها و همچنین بر طول پیوندها تأثیری نداشته است. در پروتئین طبیعی، میان اسید آمینه والین ۲۴۹ با اسید آمینه ترئونین ۲۴۵ یک پیوند با طول ۱/۹ آنگستروم و با اسید آمینه لوسین ۲۵۳ یک پیوند با طول ۲/۱ آنگستروم برقرار کرده است؛ اما در پروتئین جهش یافته، میان اسید آمینه ایزولوسین ۲۴۹ با اسید آمینه ترئونین ۲۴۵ پیوندی با طول ۱/۹ و با اسید آمین، لوسین ۲۵۳ پیوندی با طول ۲/۱ آنگستروم برقرار شده است.

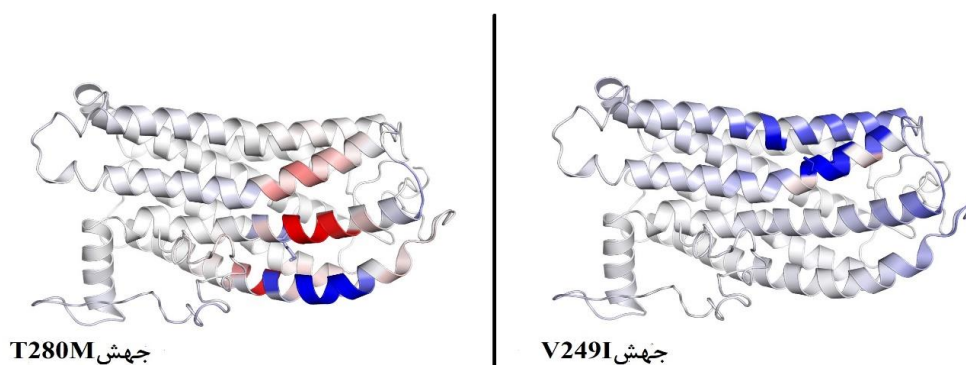
نتایج به دست آمده از سایت DynaMut در جدول شماره ۷ گردآوری شده است.

همان طور که در جدول شماره ۷ نشان داده شده است، هر دو جهش تأثیری بر پایداری پروتئین در کمپلکس میان گیرنده و لیگاند ندارند؛ اما به کاهش انعطاف پذیری مولکول در برهم کنش میان دو پروتئین منجر خواهند شد. تغییرات انرژی آزاد که در حالت جهش یافته اتفاق افتاده، مثبت و نزدیک به صفر است و می توان گفت واکنش در حالت تعادل است.

با استفاده از این سایت، بررسی های بیشتری درباره طول پیوند میان اسید آمینه های جهش یافته با اسید آمینه های مجاور صورت گرفت؛ همچنین کمپلکس از نظر تغییرات انرژی بررسی گردید. نتایج این بررسی در شکل های شماره ۶ و ۷ نشان داده شده است.



شکل شماره ۶. بررسی تعداد پیوند با سایت DynaMut برای جهش های T280M و V249I



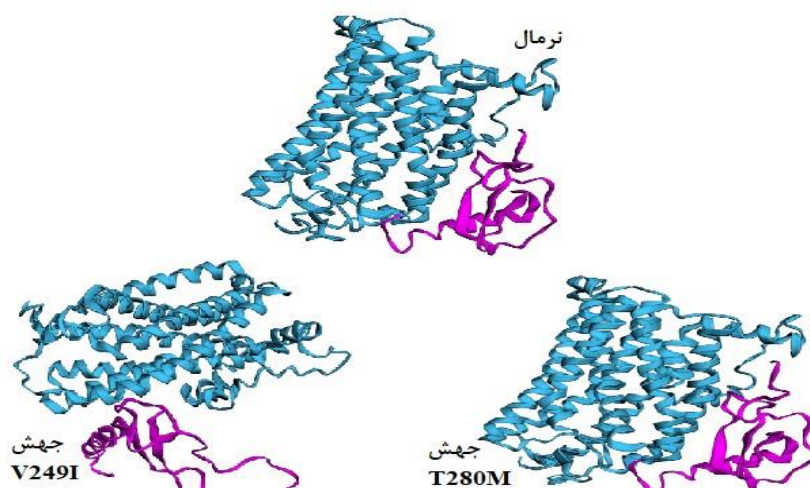
شکل شماره ۷. بررسی انرژی آنتروپی جنبشی در اثر بروز جهش

می شود مولکول در کمپلکس کمترین جنبش را داشته باشد و رنگ قرمز نشان دهنده افزایش انعطاف پذیری مولکول در کمپلکس است. طبق نتایج به دست آمده از سایت، مقدار تغییرات انرژی آنتروپی جنبشی برای جهش T280M برابر است با $-0.078 \text{ kcal/mol.k}$ و برای جهش V249I برابر است با $-0.038 \text{ kcal/mol.k}$ که هر دو جهش باعث کاهش انعطاف پذیری مولکول خواهند شد.

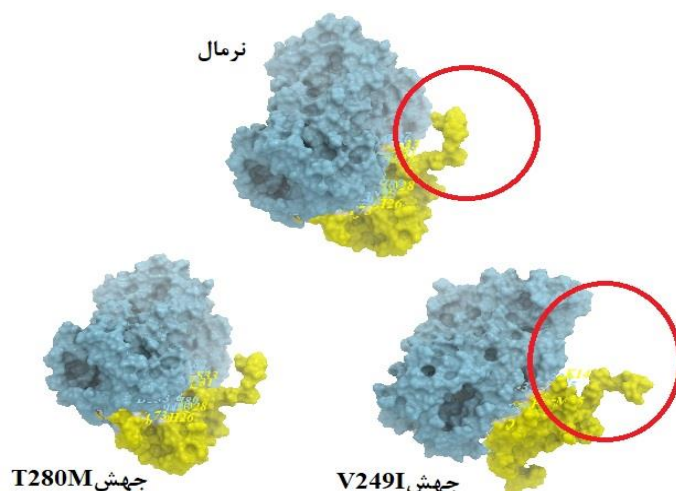
نتایج سایت *Hawkdock* از این سایت برای تعیین ساختار سه بعدی پروتئین جهش یافته و مدل سازی کمپلکس پروتئینی گیرنده و لیگاند استفاده گردید که نتایج به دست آمده از آن در شکل شماره ۸ نشان داده شده است (رنگ آبی گیرنده پروتئینی CX3CR1 و رنگ صورتی لیگاند آن یعنی فراکتالکین است).

همان طور که در شکل شماره ۶ نشان داده شده است، در کمپلکس پروتئینی جهش یافته حاصل از جهش T280M، تعداد پیوندهای هیدروژنی و یونی میان اسید آمینه جهش یافته و اسید آمینه های مجاور شدیداً افزایش یافته است که به برهم کنش بیشتر میان اسید آمینه ها در ساختار سه بعدی پروتئین منجر خواهد شد (شکل شماره ۶ a و b). در کمپلکس پروتئینی جهش یافته حاصل از جهش V249I، تعداد پیوندهای یونی افزایش یافته است که نشان دهنده برهم کنش بیشتر اسید آمینه ها در ساختار سه بعدی پروتئین است (شکل شماره ۶ c و d).

همان طور که در شکل شماره ۷ نشان داده شده است، نقاط آبی نشان دهنده محکم شدن ساختار و سختی آن است؛ این بدان معنی است که درواقع، جهش باعث



شکل شماره ۸. نتایج به دست آمده از سایت *Hawkdock*



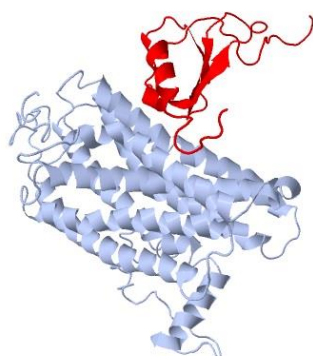
شکل شماره ۹. بررسی نحوه برهم کنش دو پروتئین در نرم افزار MolSoft

می دهد (شکل شماره ۹).

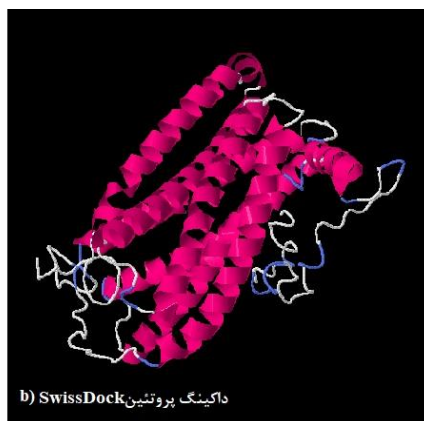
همان طور که در شکل شماره ۹ نشان داده شده است، گیرنده CX3CR1 به رنگ آبی و لیگاند آن که فراکتالکین است، به رنگ زرد است. جهش V249I به تغییر در برهم کنش میان دو پروتئین منجر شده است که احتمالاً به علت دافعه و جاذبه های میان اتم ها است. از نتایج به دست آمده از دو پایگاه SwissDock و FRODOCK برای مقایسه و انتخاب کمپلکس مناسب تر استفاده گردید که در شکل شماره ۸ آورده شده است. داکینگ پروتئین انجام شده توسط سایت FRODOCK و در نهایت کمپلکس به دست آمده از این سایت، برای بررسی با نرم افزار PyMOL استفاده گردید که در شکل های شماره ۱۰ تا ۱۲ آورده شده است.

همان طور که در شکل شماره ۸ نشان داده شده است، در مدل هایی که توسط این سایت شبیه سازی شده است، نحوه برهم کنش دو پروتئین در کمپلکس پروتئینی حاصل از جهش T280M تغییر چشمگیری نداشته است؛ اما در کمپلکس پروتئینی حاصل از جهش V249I در برهم کنش میان دو پروتئین نسبت به پروتئین طبیعی، تغییراتی ایجاد شده است. از این مدل ها برای مطالعات بعدی در نرم افزار MolSoft استفاده گردید که نتایج حاصل از آن در ادامه آمده است.

نتایج به دست آمده از نرم افزار MolSoft شامل شبیه سازی شکل قرارگیری دو پروتئین در کمپلکس پروتئینی است و همچنین اطلاعاتی درباره موقعیت اسید آمینه مدنظر در کمپلکس پروتئینی در اختیار ما قرار

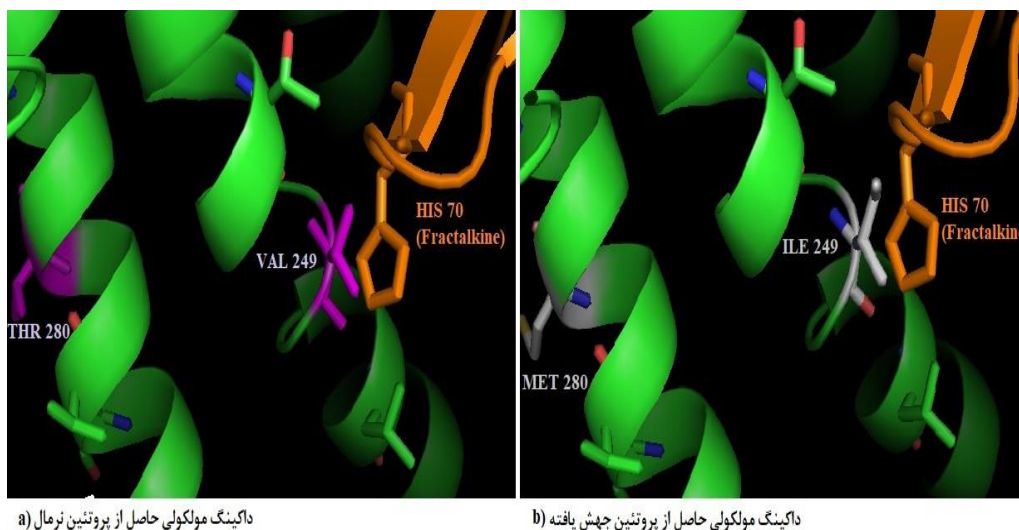


داکینگ پروتئین FRODOCK a)



داکینگ پروتئین SwissDock b)

شکل شماره ۱۰. داکینگ پروتئین به دست آمده از دو سایت FRODOCK و SwissDock

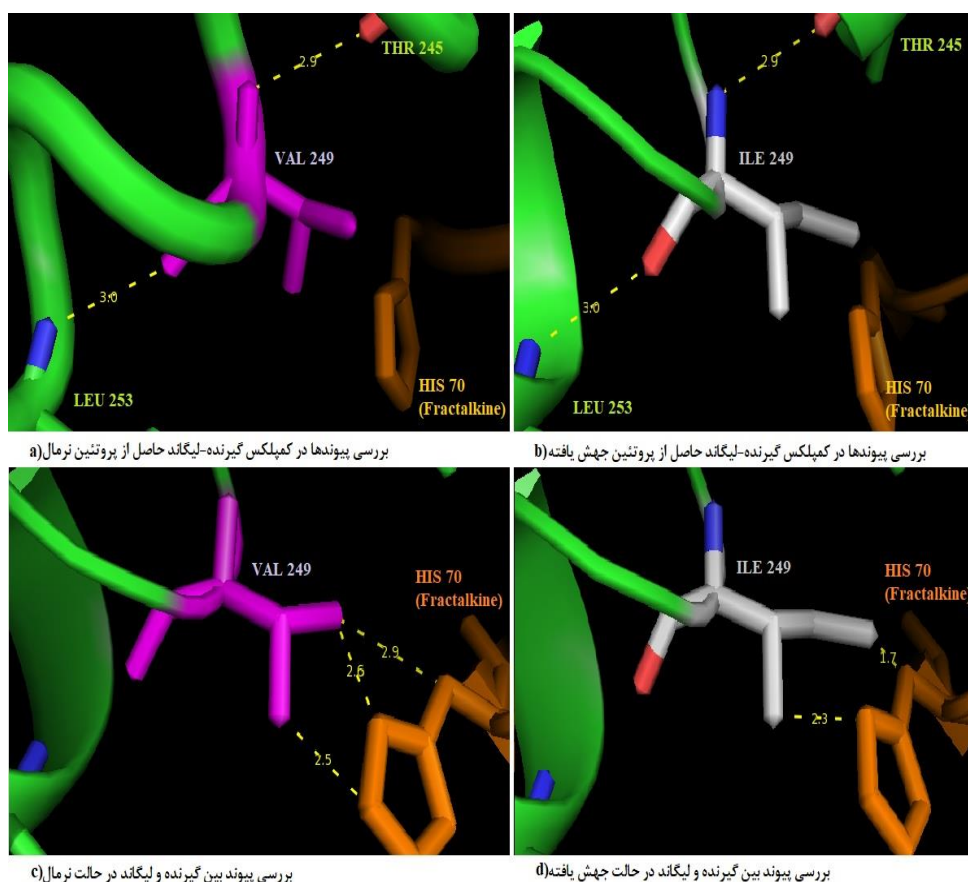


شکل شماره ۱۱. بررسی قرارگیری اسید آمینه‌های هدف T280 و V249 در کمپلکس گیرنده-لیگاند

PyMOL استفاده شد.

همان‌طور که در شکل شماره ۱۱ نشان داده شده است، اسید آمینه Val در موقعیت ۲۴۹ در نزدیکی اسید آمینه His در موقعیت ۷۰ پروتئین فراکتالکین قرار می‌گیرد.

همان‌طور که در شکل شماره ۱۰ نمایش داده شده است، با مقایسه مدل کمپلکس گیرنده-لیگاند که توسط این دو سایت پیش‌بینی شده است، در نهایت، از مدل پیش‌بینی شده توسط FRODOCK برای بررسی پیوندها با نرم افزار



شکل شماره ۱۲. بررسی پیوندها در کمپلکس گیرنده-لیگاند

همان فراکتالکین، توسط برهم‌کنش با CX3CR1 میسر می‌شود. از نظر ساختاری، گیرنده CX3CR1 به کلاس متابوتروپیک تعلق دارد که به‌عنوان پروتئین G متصل‌شونده به گیرنده نیز شناخته می‌گردد. این پروتئین ۷ ناحیه گذرنده از غشا دارد و زنجیره ای پلی پپتیدی متشکل از ۷ ساختار آلفا هلیکس ایجاد می‌کند. زیرواحدهای تکی پروتئین G در ساختار این گیرنده که هتروتریمریک هستند، با شکل آزاد (محلول در سیتوزول) CX3CL1 برهم‌کنش می‌دهند. این پروتئین بخش‌های خارج سلولی، غشایی و داخل سلولی دارد. لوپ خارجی زنجیره ای پلی پپتیدی است که مکانی برای اتصال به لیگاند CX3CL1 و CCL26 است. لوپ‌های داخل سلولی در سیتوپلاسم هستند و به انتهای C پایانه ختم می‌شوند که به پروتئین Gαi هتروتریمریک متصل می‌گردد (۲۰). پیام سلولی وابسته به TNF-R1 و CX3CR1 که نوعی خودتنظیمی طبیعی برای این مسیر پیام‌رسانی به‌شمار می‌آید، توسط برهم‌کنش میان CX3CL1 و CX3CR1 انجام می‌شود (شکل شماره ۱۳) (۲۰).

پروتئین CX3CR1 در دوران بارداری در مایع آمنیوتیک حضور دارد که به علت اهمیت بالای آن در پاسخ التهابی و عملکرد دستگاه ایمنی است. این پروتئین باعث تعدیل دستگاه ایمنی میان مادر و جنین می‌شود و به فرایند حاملگی و سلامت آن کمک می‌کند (۲۲).

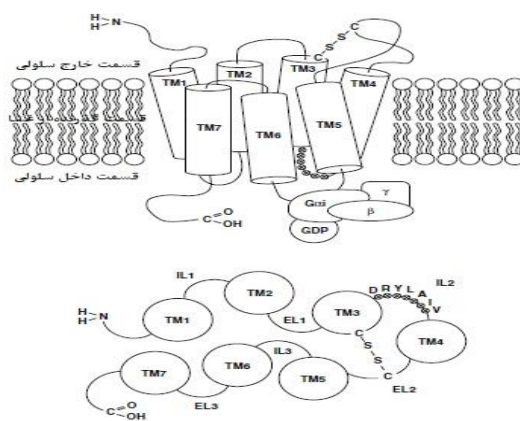
با توجه به مطالعات گذشته و بررسی‌های انجام‌شده در زمینه مولکولی، مشخص شده است که حضور پروتئین سالم در مسیرهای التهابی نقش مهمی دارد و چنانچه این پروتئین دچار جهش گردد، در عملکرد طبیعی آن اختلال ایجاد می‌شود. اهمیت دستگاه ایمنی در دوران بارداری بر کسی پوشیده نیست و همان‌طور که گفته شد، این پروتئین نقش ویژه ای در این مسیر دارد؛ زیرا رویان در دوران جنینی توسط دستگاه ایمنی مادر حفاظت می‌گردد تا بدون هیچ مشکلی به مرحله تولد برسد (۱۵).

در این مطالعه یکی از ژن‌های مهم مسیر التهابی

همان‌طور که در شکل شماره ۱۲ نشان داده شده است، در کمپلکس گیرنده-لیگاند به‌دست آمده از پروتئین طبیعی (a)، اسید آمینه والین در موقعیت ۲۴۹ با ترئونین در موقعیت ۲۴۵ یک پیوند با طول ۲/۹ آنگستروم و با لوسین ۲۵۳ یک پیوند با طول ۳/۰ آنگستروم برقرار کرده است. در کمپلکس گیرنده-لیگاند به‌دست آمده از پروتئین جهش‌یافته (b)، اسید آمینه ایزولوسین ۲۴۹ با ترئونین در مکان ۲۴۵ یک پیوند با طول ۲/۹ آنگستروم و با لوسین ۲۵۳ پیوندی با طول ۳/۰ آنگستروم برقرار نموده که در تعداد و طول پیوندها تغییری حاصل نشده است. با نرم افزار PyMOL، بررسی‌های دیگری در ارتباط با تغییرات پیوند میان گیرنده و لیگاند در موقعیت ۲۴۹ به‌سبب فاصله نزدیک این اسید آمینه با فراکتالکین نیز صورت گرفت. اسید آمینه هیستیدین ۷۰ پروتئین فراکتالکین با اسید آمینه ۲۴۹ پروتئین گیرنده برهم‌کنش دارد. در پروتئین طبیعی والین ۲۴۹ با هیستیدین ۷۰ فراکتالکین سه پیوند با طول‌های ۲/۵ و ۲/۶ و ۲/۹ آنگستروم و در پروتئین جهش‌یافته ایزولوسین ۲۴۹ با هیستیدین دو پیوند با طول‌های ۲/۳ و ۱/۷ آنگستروم برقرار می‌کند که طول و تعداد پیوند در حالت جهش‌یافته کاهش پیدا کرده است و گیرنده و لیگاند نسبت به هم بیشتر متمایل شده‌اند که احتمالاً به علت جاذبه و دافعه اسید آمینه‌های مختلف است.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق مطالعات گذشته، دو ایزوفرم برای CX3CL1 وجود دارد: یکی به شکل محلول در سیتوزول و دیگری به‌صورت متصل‌شونده به غشای سلولی است. حضور هر دو ایزوفرم در بدن نقش مهمی در شبکه کموکایینی ایفا می‌کنند. شکل محلول این پروتئین یک عامل کموتاکتیک برای سلول‌های NK، سلول‌های T، مونوسیت‌ها و مست‌سل‌ها است. نقش آن به‌عنوان عامل القاکننده رگ‌زایی و همچنین در کموتاکسی سلول‌های اندوتلیال نیز اثبات شده است. شکل متصل‌شونده به غشای سلولی در سلول‌های اندوتلیال رگ‌ها حضور دارد و در تعدیل اتصال نوتروفیل‌ها و چسبندگی سلول‌ها دخالت می‌کند (۲۰). اثر زیستی CX3CL1 یا

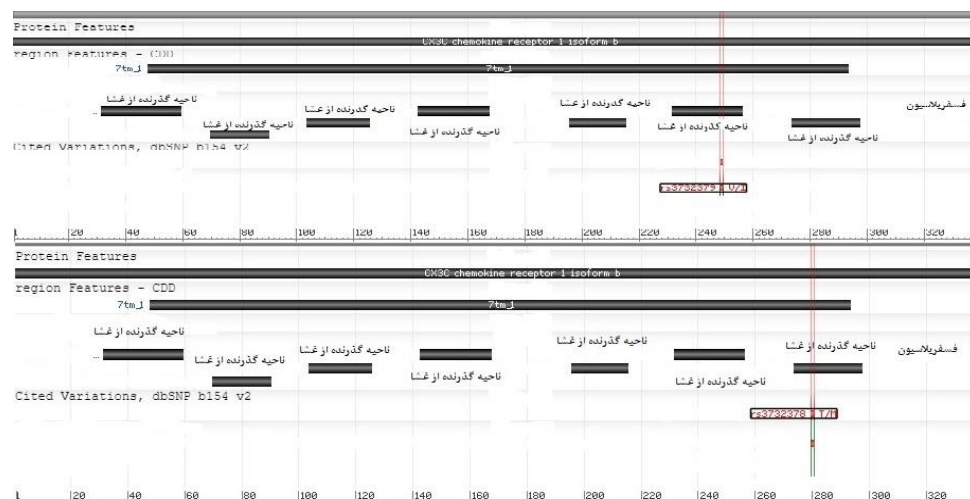


شکل شماره ۱۳. ساختار شماتیک پروتئین CX3CR1 (۲۱)

است در نهایت به سقط جنین منجر گردد؛ همچنین طی مطالعات گذشته عنوان شده است که اختلال در برهم کنش این گیرنده و لیگاند ممکن است به ترومبوز بینجامد که خود علت دیگری برای سقط جنین است (۲۳-۲۶).

با برنامه PyMOL، این پروتئین از نظر ساختاری بررسی و مشخص شد که جهش Thr280Met باعث تغییر در ساختار سه بعدی پروتئین می شود و همین امر احتمالاً ممکن است در ساختار فضایی پروتئین مشکل ایجاد کند و موجب اختلال در اتصال لیگاند به گیرنده گردد و در نهایت، این اختلال به فعالیت نداشتن درست پروتئین منجر می شود (۲۰). طی بررسی های انجام شده توسط سایت NCBI (شکل شماره ۱۴) مشخص شد که rs3732378 در ناحیه گذرنده از غشا و نزدیک به سطح خارج سلولی اتفاق می افتد و ممکن است در نحوه قرارگیری پروتئین در غشا اثر بگذارد که این رخداد در ساختار غشا و برهم کنش با لیگاند اختلال ایجاد می کند. همین بررسی ها برای rs3732379 نیز صورت گرفت و مشخص شد که این جهش هم در ناحیه گذرنده از غشا و در نزدیکی بخش خارج سلولی اتفاق می افتد. با توجه به ساختار شماتیک بررسی شده، هر دو جهش از نظر مکان پروتئینی در نزدیکی هم اتفاق می افتند و چنانچه هم زمان رخ دهند، می توانند اثر یکدیگر را تشدید کنند و در مسیر مولکولی نیز تأثیر بگذارند و اختلال ناشی از این اتفاق در دوران بارداری، در نهایت به سقط جنین منجر خواهد شد.

بررسی گردید و با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، دو مورد SNP مهم ژن CX3CR1 که در سقط مکرر شناسایی شده بودند، بررسی گردیدند تا میزان بیماری زایی آن ها در این عارضه مشخص شود. SNP های بررسی شده rs3732378 (Thr280Met) و rs3732379 (Val249Ile) بودند که با توجه به آنالیزهای انجام شده از نظر پایداری، ساختاری و عملکردی در سطح پروتئین مشخص گردید که هر دو جهش از نظر تأثیر بر ساختار پروتئین بدمعنی و از لحاظ عملکردی rs3732378 پاتوژن پیش بینی شده اند. طبق بررسی هایی که درباره پایداری پروتئین جهش یافته انجام شد، دریافتیم که هر دو جهش باعث کاهش پایداری پروتئین می شوند و با کاهش پایداری، پروتئین سریع تر تجزیه می گردد و در نتیجه، زودتر از بین می رود. با توجه به اینکه برهم کنش CX3CR1 و CX3CL1 (فراکتالکین) به فعالیت طبیعی این پروتئین در سلول منجر می شود، افزایش تعامل پلاکت-لکوسیت و چسبندگی لکوسیت به سلول های اندوتلیال شریانی تحریک شده توسط TNF α تا حدی به تنظیم دوباره CX3CL1 اندوتلیال و افزایش بیان CX3CR1 در پلاکت ها، مونوسیت ها و لنفوسیت ها منجر می گردد؛ پس با کاهش پایداری پروتئین و تجزیه آن، میزان گیرنده سلولی برای فراکتالکین کاهش می یابد و مسیر التهابی و پاسخ ایمنی مختل خواهد شد؛ در نتیجه، در واکنش های ایمنی میام مادر و جنین اختلال ایجاد می شود و ممکن



شکل شماره ۱۴. نتایج سایت NCBI درباره مکان جهش در ساختار پروتئینی

به سبب فاصله نزدیک این اسید آمینه با فراکتالکین نیز صورت گرفت. اسید آمینه هیستیدین در موقعیت ۷۰ در پروتئین فراکتالکین با اسید آمینه موقعیت ۲۴۹ پروتئین گیرنده برهم کنش دارد. در پروتئین جهش یافته تعداد پیوند کاهش یافته است و گیرنده و لیگاند نسبت به هم بیشتر متمایل شده اند که احتمالاً به سبب جاذبه و دافعه اسید آمینه های مختلف است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه یزد انجام گرفته است و مراتب امتنان خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه اعلام می داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تضاد منافی در این مطالعه وجود ندارد.

References

1. Dabhi B, Mistry KN. In silico analysis of single nucleotide polymorphism (SNP) in human TNF- α gene. Meta gene 2014;2:586-95. doi: 10.1016/j.mgene.2014.07.005
2. Yadav AK, Tomar S, Jha AK, Singh J. Importance of molecular markers in livestock improvement: a review. Int J Agriculture Innov Res 2017;5:614-22.
3. Al-Samarai FR, Al-Kazaz AA. Molecular markers: An introduction and applications. Euro J molec biotech 2015;9:118-30. doi: 10.13187/ejmb.2015.9.118
4. Vignal A, Milan D, SanCristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. Genet Sel Evol 2002;34:275-305. doi: 10.1051/gse:002009
5. Mazrouei B, Heidari MM, Khatami M, Tahmasebi M. Molecular Mechanisms of Recurrent Pregnancy Loss. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2020;28:2255-71. doi: 10.18502/ssu.v28i1.3129
6. Heidari MM, Sheikholeslami M, Yavari M,

طی بررسی های انجام گرفته، به سبب آنکه پروتئین مطالعه شده نوعی گیرنده است؛ بنابراین، بررسی هایی با کمک سایت DynaMut و نرم افزار MolSoft انجام شد. با کمک سایت DynaMut ساختار سه بعدی پروتئین جهش یافته از نظر نحوه برهم کنش با پروتئین فراکتالکین بررسی گردید. طبق بررسی های انجام شده، این جهش ها از نظر انرژی جنبشی مولکولی، برهم کنش پروتئینی را تحت تأثیر قرار می دهند و همچنین باعث سخت یا منعطف شدن ساختار شدند. ساختار سه بعدی کمپلکس پروتئینی شبیه سازی شده توسط این سایت با نرم افزار MolSoft بررسی گردید و مشخص شد که از نظر موقعیت اسید آمینه در پروتئین طبیعی و جهش یافته، تفاوت هایی ایجاد شده که احتمالاً به علت تغییر در انرژی و تمایلات اسید آمینه ها نسبت به یکدیگر است. با نرم افزار PyMOL، بررسی های دیگری در ارتباط با تغییرات پیوند میان گیرنده و لیگاند در موقعیت ۲۴۹

- Khatami M, Seyedhassani SM. The association of renin-angiotensinogen system genes polymorphisms and idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Fertil* 2019;22:164-70. doi: 10.1080/14647273.2017.1388545
7. Parveen F, Faridi R, Singh B, Agrawal S. Analysis of CCR5 and CX3CR1 gene polymorphisms in association with unexplained recurrent miscarriages among north Indian women. *Cytokine* 2011;56:239-44. doi: 10.1016/j.cyto.2011.07.009
 8. Moffett A, Loke C. Immunology of placentation in eutherian mammals. *Nat Rev Immunol* 2006;6:584-94 doi: 10.1038/nri1897
 9. Sonmez O, Sonmez M. Role of platelets in immune system and inflammation. *Porto Biomed J* 2017;2:311-14. doi: 10.1016/j.pbj.2017.05.005
 10. Drake PM, Gunn MD, Charo IF, Tsou C-L, Zhou Y, Huang L, et al. Human placental cytotrophoblasts attract monocytes and CD56 bright natural killer cells via the actions of monocyte inflammatory protein 1α. *J Exp Med* 2001;193:1199-212. doi: 10.1084/jem.193.10.1199
 11. Red-Horse K, Drake PM, Fisher SJ. Human pregnancy: the role of chemokine networks at the fetal-maternal interface. *J Exp Med* 2004;6:1. doi: 10.1017/S1462399404007720
 12. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX 3 C motif. *Nature*. 1997;385:640-4. doi: 10.1038/385640a0
 13. Hannan NJ, Jones RL, Critchley HO, Kovacs GJ, Rogers PA, Affandi B, et al. Coexpression of fractalkine and its receptor in normal human endometrium and in endometrium from users of progestin-only contraception supports a role for fractalkine in leukocyte recruitment and endometrial remodeling. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:6119-29. doi: 10.1210/jc.2003-031379
 14. Huang S, Zhao P, Yang L, Chen Y, Yan J, Duan E, et al. Fractalkine is expressed in the human ovary and increases progesterone biosynthesis in human luteinised granulosa cells. *Reprod Biol Endocrinol* 2011;9:95. doi: 10.1186/1477-7827-95
 15. Stepanian A, Benchenni S, Beillat-Lucas T, Omnes S, Defay F, Peynaud-Debayle E, et al. Search for an association between V249I and T280M CX3CR1 genetic polymorphisms, endothelial injury and preeclampsia: the ECLAXIR study. *PLoS One* 2009;4:e6192. doi: 10.1371/journal.pone.0006192
 16. Kervancioglu Demirci E, Salamsen LA, Gauster M. The role of CX3CL1 in fetal-maternal interaction during human gestation. *Cell Adh Migr* 2016;10:189-96. doi: 10.1080/19336918.2015.1089378
 17. Cardona SM, Kim SV, Church KA, Torres VO, Cleary IA, Mendiola AS, et al. Role of the fractalkine receptor in CNS autoimmune inflammation: new approach utilizing a mouse model expressing the human CX3CR1I249/M280 variant. *Front Cell Neurosci* 2018;12:365. doi: 10.3389/fncel.2018.00365
 18. Mwapagha L, Ng'ang'a Z, Mutui S, Miheso B, Khamadi S. Genetic Polymorphisms of the CX3CR1 Gene Associated with HIV-1 Infections in Kenyan Population. *J AIDS Clin Res*. 2017;8:2. doi: 10.4172/2155-6113.1000712
 19. Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara MEW, Seknadji P, McDermott DH, et al. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 2001;97:1925-8. doi: 10.1182/blood.V97.7.1925
 20. Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Kotela A, Deszczyński J, Kotela I, Szukiewicz D. The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: occurrence and potential role in osteoarthritis. *Arch Immunol Ther Exp* 2014;62:395-403. doi: 10.1007/s00005-014-0275-0
 21. Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Krawczyk M, Szukiewicz D, Gasik R, Kubasewski Ł, et al. Analysis of the role of CX3CL1 (Fractalkine) and its receptor CX3CR1 in traumatic brain and spinal cord injury: Insight into recent advances in actions of neurochemokine agents. *Mol Neurobiol* 2017;54:2167-88. doi: 10.1007/s12035-016-9787-4
 22. Shimoya K, Zhang Q, Tenma K, Ota Y, Hashimoto K, Shizusawa Y, et al. Fractalkine (FRK) levels in amniotic fluid and its production during pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2003;9:97-101. doi: 10.1093/molehr/gag009
 23. Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, et al. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-30. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80438-9
 24. Aguiar TFM, Rivas MP, Costa S, Rodrigues T, de Barros JS, Barbosa AC, et al. Mutational burden of hepatoblastomas: a role for the CX3CL1/CX3CR1 chemokine signaling pathway. *bioRxiv* 2019:555466. doi: 10.1101/555466
 25. Daher S, Shulzhenko N, Morgun A, Mattar R, Rampim GF, Camano L, et al. Associations between cytokine gene polymorphisms and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol* 2003;58:69-77. doi: 10.1016/S0165-0378(02)00059-1
 26. Furio E, García-Fuster MJ, Redon J, Marques P, Ortega R, Sanz MJ, et al. CX3CR1/CX3CL1 Axis Mediates Platelet-Leukocyte Adhesion to Arterial Endothelium in Younger Patients with a History of Idiopathic Deep Vein Thrombosis. *Thromb Haemost* 2018;118:562-71. doi: 10.1055/s-0038-1629897