Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

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

Bahareh Mazrouei[1], **Mohammad Mehdi Heidari**[1*], **Mehri Khatami**[1]

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

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 06 Febuary 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

A B S T R A C T

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.

© The Author(s)

Publisher: Ilam University of Medical Sciences

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام
JIUMS
P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸
E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

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

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

چکیده

مقدمه: سقط عارضهٔ شایعی است که به پایان زودرس بارداری، با مرگ جنین پیش از هفتهٔ ۲۰ بارداری اطلاق می شود. بررسی ها نشان می دهند که ژن های فراوانی در بروز این اختلال دخالت دارند. ژن CX3CR1 یکی از این ژن های پاسخ التهابی در دستگاه ایمنی است. در این مطالعه، با به‌کارگیری روش های مختلف آنالیز بیوانفورماتیکی، به اثبات بیماری زایی واریانت‌های rs3732378 و rs3732379 پرداخته شد.

مواد و روش ها: در این مطالعه، از ابزارهای بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی اثر جهش های 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، SwissDock و FRODOCK، نرم افزار PyMOL، Hawkdock و نرم‌افزار MolSoft انجام گرفت.

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

بحث و نتیجه‌گیری: یافته های این مطالعه نشان می دهد که این دو جهش بدمعنی ژن CX3CR1، به‌عنوان کاندید مهمی برای بیماری زایی سقط مکرر عمل می‌کنند و شناسایی آن‌ها در بیماران مبتلا به سقط مکرر می تواند به‌عنوان یک عامل خطر در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، ژن CX3CR1، جهش بیماری زا، 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؛۳۰(۳): ۲۸-۱۲.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

CC BY NC

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۲۸-۱۲

مقدمه

طی ۱۰ سال گذشته، کاربرد مارکرهای مولکولی که نشان‌دهندهٔ سطح تنوع پلی مورفیسم DNA هستند، نقش فراوانی در مطالعات ژنتیک ایفا می کنند. SNP یا چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی به‌سبب اینکه مارکرهای دوآللی هستند، مورد توجه قرار گرفته اند (۳-۱).

مارکر SNP تنها تغییر یک باز در توالی DNA است و مکان باز با تنوع توالی در DNA ژنومی به‌عنوان SNP در نظر گرفته می شود. تصور می گردد که کمینهٔ فراوانی آللی ۱ درصد است. احتمال تغییر در دو باز مستقل در یک مکان به‌ندرت اتفاق می‌افتد و فراوانی آن بین ۱×۱۰^{-۹} تا ۵×۱۰^{-۹} در هر نوکلئوتید تخمین زده می شود؛ همچنین به علت سازوکار های مختلف جهش نیز، این احتمال را پایین در نظر می‌گیرند (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 هرکدام از این ژن ها، این مسیر ها را دچار اختلال می‌کند و به بروز مشکلاتی در دوران بارداری منجر می شوند که درنهایت، به سقط می‌انجامد (۶، ۵). در طول سال های اخیر، چندین تحقیق و بررسی دربارهٔ ژنتیک و تعیین ارتباط میان سقط مکرر و پلی‌مورفیسم 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 موردنیاز 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، به‌کارگیری تعداد خاصی از سلول های ایمنی مادر موردنیاز است. این سلول ها لوکوسیت های دسیدوآل نام دارند که در مراحل اولیهٔ حاملگی، حدود ۷۰ درصد از سلول های رحمی را شامل می شوند (۸). لوکوسیت های دسیدوآل سازوکار هایی را در طول دیوارهٔ رحمی به‌کار می‌گیرند که برای بارداری سالم موردنیاز است؛ زیرا باعث رشد و حفظ جنین در این ناحیه می‌گردند و همهٔ این اتفاقات توسط دستگاه ایمنی بدن مادر به سهولت انجام می شود. درواقع، عبور و مرور لوکوسیت ها توسط مجموعهٔ خاصی از مولکول های چسبندگی، جاذب شیمیایی و پاسخ های جاذب شیمیایی تنظیم می‌گردند. کموکاین ها خانوادهٔ بزرگی از پپتیدهای جاذب شیمیایی هستند که به جذب مجموعه های مختلف لوکوسیت ها منجر می شوند (۹). آزمایش‌های 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 نشان‌دهندهٔ لیگاندهای کموکاین خاص روی سطح لوکوسیت های دسیدوآل است. در این میان، گیرنده های خاص سلول های NK و سلول های T منحصراً به فراوانی لیگاندهایشان حضور دارند (۱۱).

ژن CX3CR1 روی کروموزوم ۳ قرار دارد و مکان ژنی آن به‌طور 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 تولیدمثلی مثل تخمدان ها، لوله های فالوپ، رحم و بیضه ها بیان می شوند (۱۴-۱۲).

فراکتالکین/CX3CL1 یک کموکاین منحصربه‌فرد CX3C است که به‌عنوان 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 شناسایی‌شده است؛ بنابراین پیشنهاد می‌گردد این مولکول ها در کنترل رگ زایی رحمی-جفتی درگیر هستند (۱۵، ۱۲، ۱۰)؛ همچنین مشخص‌شده است که فرم متصل شونده به غشای

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

فراکتالکین، باعث افزایش چسبندگی مقاوم لکوسیت ها به سلول های اندوتلیال می شود که این جریان با کمک پروتئین G در CX3CR1 صورت می‌گیرد و به فرایند لانه گزینی کمک می کند (۱۶، ۱۰). دو پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی شایع Val249Ile (I249) و Thr280Met (M280) در ناحیهٔ کدکنندهٔ ژن CX3CR1 گزارش شده اند (۱۸، ۱۷).

پره‌اکلامپسی (PE) عارضهٔ شایعی است که در حدود ۷-۲ درصد از حاملگی ها اتفاق می افتد و یکی از علل عمدهٔ مرگ جنین و مادران در دوران بارداری است. با توجه به مطالعات پاتوفیزیولوژی دربارهٔ عارضهٔ پره‌اکلامپسی، ایسکمی جفت و اختلال در عملکرد اندوتلیال از علل برجستهٔ این حالت است. افزایش مارکرهای دخیل در اختلال عملکرد اندوتلیال ازجمله ترومبومودولین، عامل فون‌ویلبراند (VWF) و VCAM-1 به‌طور مکرر در زنان مبتلا به پره‌اکلامپسی گزارش‌شده است. پیشنهاد می شود که آزاد شدن عامل‌هایی 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 بازتاب‌دهندهٔ افزایش حالت التهابی عمومی است (۱۵).

در مطالعات عدم تعادلی پیوستگی هاپلوتیپ شایع I249 M280 گزارش‌شده است. هاپلوتیپ IM با کاهش خطر بیماری کرونری حاد و آترواسکلروزیس و با کاهش واکنش‌پذیری اندوتلیال همراه است. در ژن جهش‌یافته در این مکان ها، اختلال در بیان این گیرنده و ظرفیت های تغییریافتهٔ چسبندگی افزایش‌یافته است (۱۹، ۱۵).

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

مواد و روش ها

جمع‌آوری اطلاعات: اولین و اصلی ترین پایگاه اینترنتی استفاده‌شده NCBI (National Center for Biotechnology Information) است. اطلاعات موردنیاز دربارهٔ ژن *CX3CR1*، پروتئین و همچنین اطلاعات مربوط به SNPها از این پایگاه به‌دست آمده که در بررسی های بعدی از آن‌ها استفاده شده است (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

سایت SIFT (Sorting Intolerant From Tolerant): از سایت SIFT برای بررسی تأثیر احتمالی جهش روی ساختار پروتئین و درنتیجه، بر عملکرد پروتئین استفاده گردید. این سایت تأثیر جهش را به‌صورت امتیاز بیان می‌کند، به این صورت که جهش با امتیاز پایین‌تر از ۰/۰۵ پاتوژن و بالاتر از ۰/۰۵ خوش خیم در نظر گرفته می‌شود. اساس امتیازدهی توسط این پایگاه، بررسی هم‌ردیفی 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 می‌کند که عددی بین صفر و یک است، به این صورت که اگر عددی بین ۰/۲-۰ باشد، خوش خیم؛ بین ۰/۸۵-۰/۲ باشد، احتمالاً بیماری زا و بین ۱-۰/۸۵ باشد، بیماری زا است و درنهایت، خوش خیم یا بدخیم بودن جهش را پیش‌بینی می‌کند. این پیش بینی بر اساس توالی و اثر جایگزینی اسید آمینهٔ جهش‌یافته بر ساختار فیلوژنی است. سازوکار این برنامه بر اساس هم‌ردیفی چندگانهٔ توالی ساختار سه‌بعدی پروتئین است. همهٔ 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام /شهریور ۱۴۰۱، دوره ۳۰، شماره ۳، ۲۸-۱۲

احتمالی جهش های غیر هم‌معنی و اهمیت آن‌ها بر فعالیت پروتئینی بسیار پرکاربرد است. این پایگاه بر اساس امتیاز محاسبه‌شدهٔ تحت تأثیر جایگزینی اسید آمینه، جهش‌های با امتیاز کمتر از ۲/۵- را زیان آور و بیشتر از ۲/۵- 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 استفاده‌شده است که نتایج حاصل شامل بررسی های چندین سایت است که بر اساس درصد (که بیشتر نتایج بر اساس بررسی های هم‌ردیفی توالی پروتئینی توسط هر پایگاه بر اساس ابزار استفاده‌شدهٔ آن پایگاه است) و با رنگ سبز برای جهش خنثی و رنگ قرمز برای جهش زیان آور مشخص‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده از این پایگاه نمایش‌دهندهٔ نتایج محاسبه‌شده از پایگاه های SIFT، PolyPhen2، PolyPhen1، PHD-SNP، MAPP، Predict SNP و SNAPاست (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 به‌دست‌آمده 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 استفاده‌شده است. با وارد کردن توالی پروتئین با فرمت FASTA در کادر مربوطه و تعیین شمارهٔ اسید آمینه دارای جهش و وارد کردن اسید آمینهٔ جایگزین، پایگاه مقدار پایداری پروتئین را پیش بینی می‌کند (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 نتیجهٔ بررسی توسط دو ابزار PANTHER و PhD-SNP است. این بررسی ها بر پایهٔ شاخص اطمینان و فراوانی اسید آمینه ها در توالی پروتئین است که احتمال بیماری زایی جهش را به‌صورت عددی بین ۰ تا ۱ نشان می دهد و چنانچه امتیاز جهش بالاتر از ۰/۵ باشد، بیماری زا در نظر گرفته می شود (https://snps.biofold.org/snps-and-go/).

نرم افزار PyMOL: از این نرم افزار برای مشاهدهٔ ساختار سه‌بعدی پروتئین و ایجاد جهش هدفمند و بررسی تأثیر آن روی عملکرد پروتئین استفاده شد که با مقایسهٔ تعداد و طول پیوندها، میزان تأثیر جهش بررسی گردید. به‌سبب آنکه برای بررسی پروتئین با این نرم افزار به ساختار سه‌بعدی پروتئین نیاز است، مدل های مربوط به این پروتئین که توسط سایت SWISS-MODEL مدل‌سازی شده بود، بررسی شد و به علت آنکه برای این پروتئین، هیچ‌کدام از مدل ها دقیقاً با توالی پروتئین مدنظر تطبیق نداشتند؛ پس مدل های این سایت حذف گردیدند و از سایت I-TASSER برای مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی پروتئین نرمال استفاده شد و مدل های ساخته‌شده برای بررسی های نرم افزار PyMOL به‌کار رفتند.

سایت DynaMut: از پایگاه اینترنتی DynaMut برای دست یابی به ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته و بررسی تغییرات پایداری پروتئین‌های جهش‌یافته نسبت به پروتئین نرمال استفاده گردید (http://biosig.unimelb.edu.au/).

سایت Hawkdock: از سایت Hawkdock برای داکینگ پروتئین‌ها استفاده شد. ابتدا مدل مولکولی برای ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته از پایگاه اینترنتی DynaMut به‌دست آمد؛ سپس برای بررسی برهم‌کنش میان دو پروتئین گیرندهٔ CX3CR1 و لیگاند آن که فراکتالکین است، از مدل ها استفاده گردید و در پایگاه Hawkdock به‌کار رفت و ساختار سه‌بعدی برهم‌کنش پروتئینی برای هر دو پروتئین نرمال و جهش‌یافته بررسی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

شد (http://cadd.zju.edu.cn/).

نرم افزار Molsoft: از این نرم افزار برای بررسی تغییرات برهم‌کنش میان گیرنده و لیگاند در پروتئین جهش‌یافته و سالم استفاده گردید. این نرم افزار تغییرات ساختار فضایی و موقعیت قرارگیری اسید آمینهٔ مدنظر را در کمپلکس پروتئینی گیرنده و لیگاند بررسی کرد.

نرم‌افزارهای آنلاین داکینگ: SwissDock یک سرویس تحت وب است که برای پیش‌بینی میان کنش های مولکولی بین پروتئین هدف و یک مولکول کوچک استفاده می‌شود و FRODOCK سرویس تحت وب برای پیش‌بینی ساختار میان‌کنش‌های پروتئین - پروتئین است.

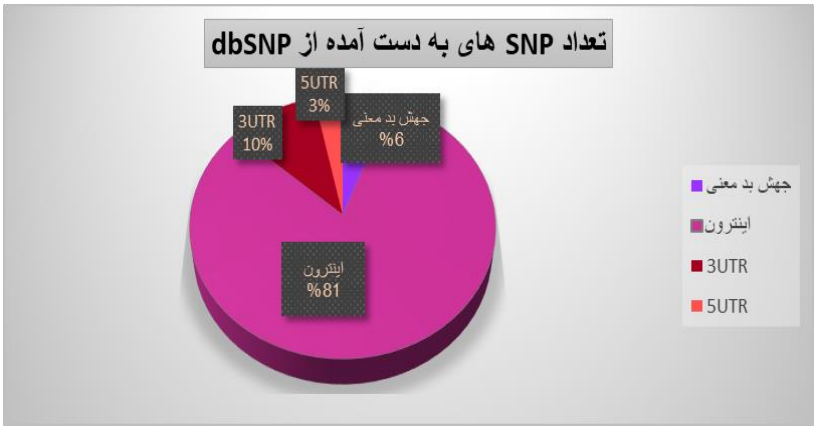
یافته ها

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

به‌سبب آنکه این ژن کدکننده نوعی گیرندهٔ پروتئینی است، مبنای مطالعه روی توالی کدکنندهٔ پروتئینی قرار داده شد و جهش های ناحیهٔ اینترون، 3'-UTR و 5'-UTR از این مطالعه حذف گردیدند؛ به‌عبارت‌دیگر، این مطالعه برای بررسی جهش‌های بدمعنی، با هدف تعیین پلی مورفیسم های بیماری زا و همچنین تعیین میزان بیماری زایی آن‌ها در سقط مکرر طرح‌ریزی شد. از ۲۴۴ پلی مورفیسم بدمعنی، تعداد ۲ SNPs به‌عنوان پلی مورفیسم های بیماری زا و همچنین به‌عنوان عامل خطر در نظر گرفته‌شده بودند. با بررسی های بیشتر در بانک اطلاعاتی NCBI مشخص گردید که از این تعداد، ۲ پلی مورفیسم با شناسه‌های rs3732378 و rs3732379 در بروز تعدادی بیماری دخالت دارند (شکل شمارهٔ ۲)؛ سپس آن‌ها را با پایگاه های مختلف بررسی کردیم و با توجه به مطالعات گذشته در زمینهٔ ناباروری مشخص شد که این پلی مورفیسم ها در ژن *CX3CR1* در بروز سقط مکرر دخالت دارند.

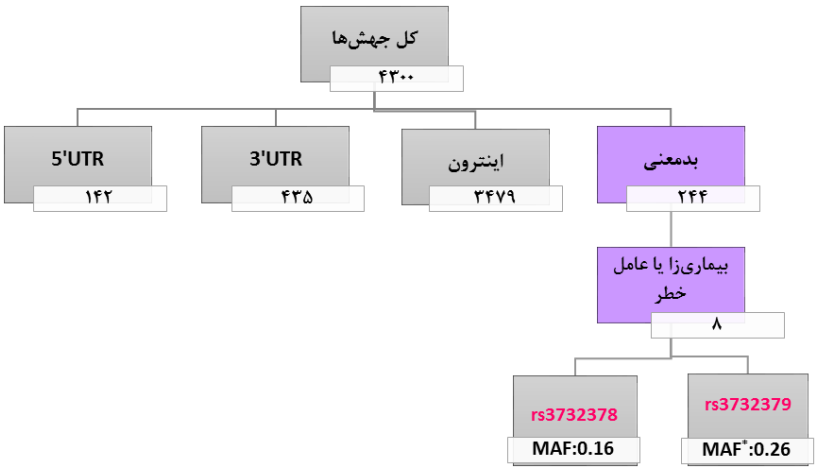
با توجه به اهمیت عملکرد این ژن و نقش این پلی مورفیسم ها در بروز انواع بیماری‌ها، مطالعات بیوانفورماتیکی از نظر تغییر عملکرد و ساختار پروتئین برای اثبات بیماری زایی و فاکتور خطر انجام گردید.

مراحل انتخاب جهش های بررسی‌شده، با استفاده از شکل شمارهٔ ۲ از بانک اطلاعاتی dbSNP برای ژن *CX3CR1* صورت گرفت.



شکل شمارهٔ ۱. نمودار درصد فراوانی انواع SNPهای شناسایی‌شده در ژن *CX3CR1* بر اساس بانک اطلاعاتی NCBI/dbSNP. برای جهش بدمعنی تعداد ۲۴۴ SNP، برای جهش در ناحیهٔ اینترون تعداد ۳۴۷۹ SNP، برای جهش در ناحیهٔ 3'-UTR تعداد ۴۳۵ SNP و برای جهش در ناحیهٔ 5'-UTR تعداد ۱۴۲ SNP گزارش‌شده است.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

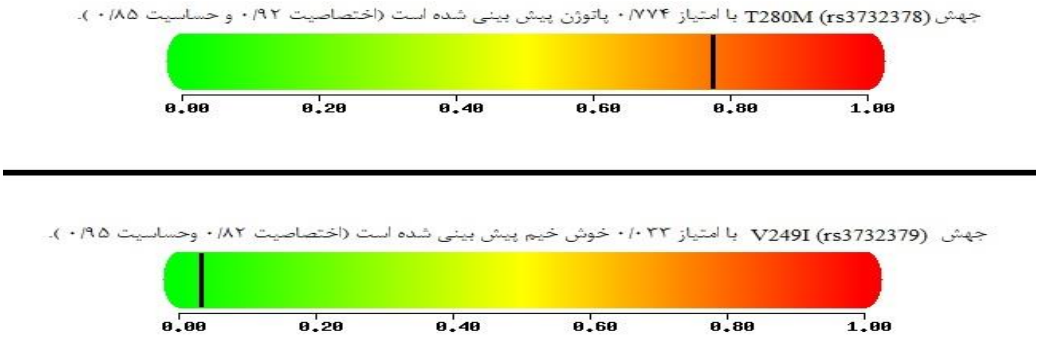


شکل شمارهٔ ۲. روند دست یابی به جهش های هدف با استفاده از پایگاه NCBI/dbSNP.

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۲ نشان داده‌شده است، ۲ پلی مورفیسم بیماری زا شامل پلی مورفیسم rs3732378 که MAF* (کمینهٔ فراوانی آللی) برابر با ۰/۱۶ و همچنین پلی مورفیسم rs3732379 که MAF برابر با ۰/۲۶ دارد، به‌عنوان پلی‌مورفیسم‌های مرجع انتخاب گردیدند. نتایج به‌دست‌آمده از سایت SIFT در جدول شمارهٔ ۱ گردآوری‌شده است. همان‌طور که در جدول شمارهٔ ۱ آمده است، rs3732378 با امتیاز ۰ پاتوژن پیش‌بینی‌شده است.

جدول شمارهٔ ۱. نتایج به‌دست‌آمده از سایت SIFT

SNP	آمینواسید تغییریافته	شناسهٔ پروتئین	آمینواسید طبیعی	پیش بینی	امتیاز SIFT
rs3732378	T280M	NP_001164642	ترئونین	تأثیر بر عملکرد پروتئین	۰
rs3732379	V249I	NP_001164642	والین	تأثیر نداشتن بر عملکرد پروتئین	۱



شکل شمارهٔ ۳. در این شکل نتایج به‌دست‌آمده از سایت PolyPhen2 نشان داده‌شده است. همان‌طور که پیش‌بینی‌شده است، جهش T280M با امتیاز نزدیک به ۱، احتمالاً پاتوژن و جهش V249I با امتیاز نزدیک به ۰ ، خوش خیم پیش‌بینی‌شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از سایت PolyPhen2 در شکل شمارهٔ ۳ نشان داده‌شده است. نتایج به‌دست‌آمده از سایت PROVEAN در جدول شمارهٔ ۲ جمع‌آوری‌شده است.

جدول شمارهٔ ۲. نتایج سایت PROVEAN

SNP	آمینواسید تغییریافته	امتیاز سایت	پیش‌بینی اثر جهش
rs3732378	T280M	-۲/۸۶۰	پاتوژن
rs3732379	V249I	۰/۴۰۱	خنثی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

جدول شمارهٔ ۳. نتایج پایگاه Predict SNP

SNP	آمینواسید تغییریافته	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

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، rs3732378 که مربوط به جهش T280M است، با امتیاز ۲/۸۶۰- به‌عنوان جهش پاتوژن پیش‌بینی‌شده است.

نتایج به‌دست‌آمده از سایت Predict SNP در جدول شمارهٔ ۳ آورده شده است.

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، چنانچه جهشی در هرکدام از پایگاه ها پاتوژن پیش بینی شود، به رنگ قرمز و اگر اثر جهش خنثی باشد، به رنگ سبز نمایش داده می شود. طبق اطلاعات به‌دست‌آمده از این سایت، این دو جهش توسط ابزارهای Predict SNP، MAPP، PHD-SNP، PolyPhen 1 و SNAP خنثی و به رنگ سبز پیش‌بینی شده‌اند؛ اما جهش T280M، مانند نتایج یادشده در جداول بالا، در ابزارهای SIFT و PolyPhen 2 پاتوژن پیش‌بینی‌شده است. علت این تناقض‌ها در نتایج به‌دست‌آمده در ابزارهای مختلف، می تواند رویکرد متفاوت این ابزار ها در بررسی جهش ها 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 شمارهٔ ۴ گردآوردی شده است.

جدول شمارهٔ ۴. نتایج سایت Exome Variant Server

SNP	آمینواسید تغییریافته	حفاظت‌شدگی	نتایج PolyPhen2
rs3732378	T280M	۳/۹۸	پاتوژن ۰/۷۷۴
rs3732379	V249I	-۲/۳۲	خوش خیم ۰/۰۳۳

جدول شمارهٔ ۵. نتایج سایت I-Mutant

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

نتایج مربوط به تغییر پایداری پروتئین جهش یافته که از سایت I-Mutant به‌دست آمده، در جدول شمارهٔ ۵ آورده شده است.

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت، هر دو جهش بر پایداری پروتئین اثر گذاشته و باعث کاهش پایداری پروتئین جهش‌یافته شده اند. DDG کمتر از صفر نشان‌دهندهٔ کاهش پایداری است و DDG بزرگ‌تر از صفر بیانگر افزایش پایداری است.

نتایج به‌دست‌آمده از سایت SNPs and GO در جدول شمارهٔ ۶ آورده شده است.

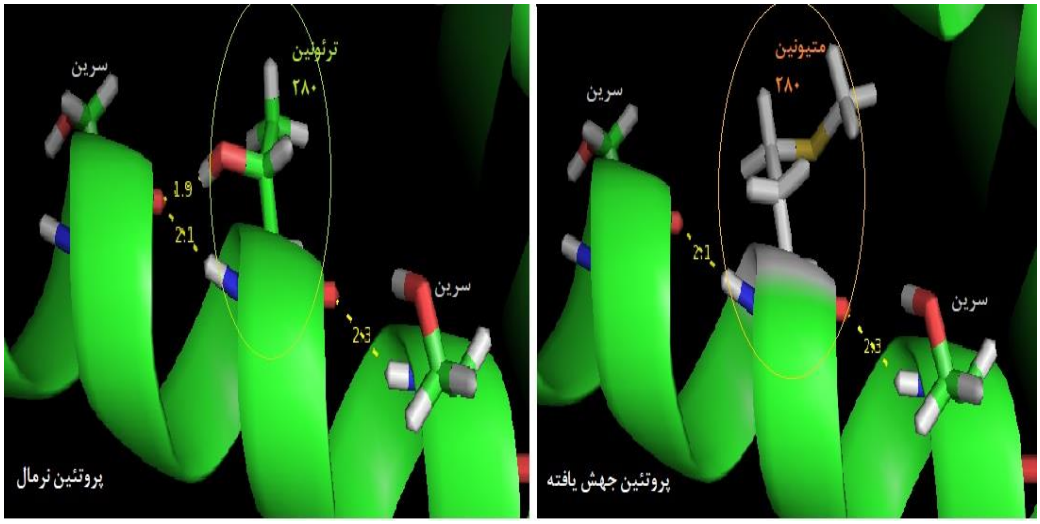
جدول شمارهٔ ۶. نتایج سایت SNPs and Go

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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]

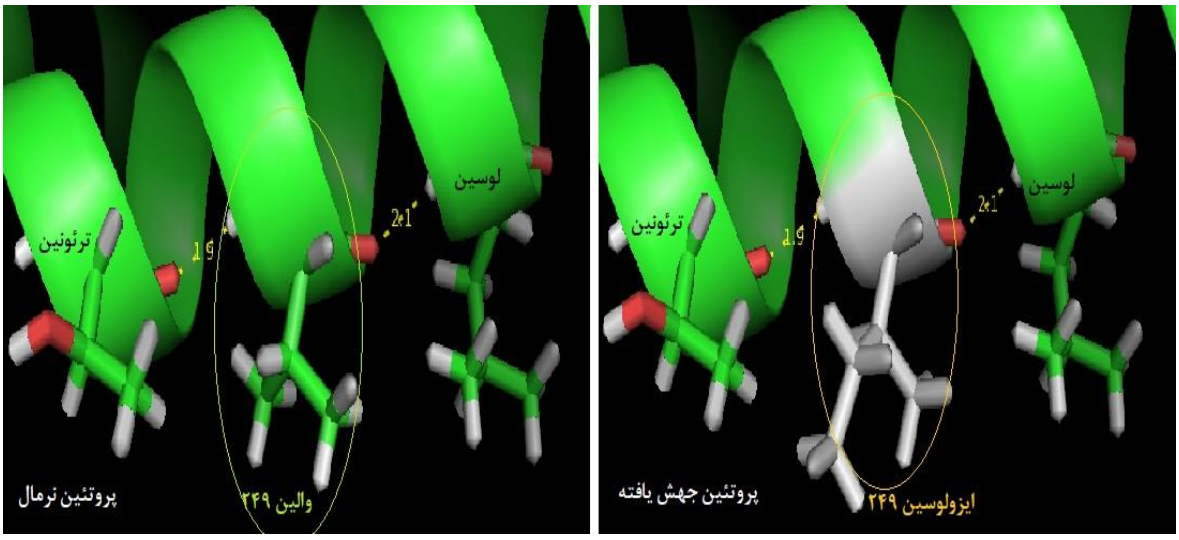
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]



شکل شمارهٔ ۴. نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر جهش Thr280Metدر rs3732378 بر ساختار سه‌بعدی پروتئین

طبق نتایج به‌دست‌آمده از این سایت که در جدول شمارهٔ ۶ آورده شده است، ابزار PANTHER با بررسی فراوانی اسید آمینهٔ طبیعی و جهش یافته بر اساس الگوریتم خاص، جهش T280M را با شاخص اطمینان ۳ و امتیاز ۰/۶۳۳ (>۰/۵) بیماری زا در نظر گرفته است. نتایج به‌دست‌آمده از نرم افزار PyMOL در ارتباط با تأثیر جهش بر ساختار سه‌بعدی پروتئین و پیوندهای هیدروژنی در شکل‌های شمارهٔ ۴ و ۵ نشان داده‌شده است.

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۴ نمایش داده‌شده است، در این جهش، در پروتئین جهش‌یافته تعداد پیوند میان اسید آمینهٔ متیونین ۲۸۰ با اسید آمینهٔ سرین ۲۷۶ کاهش یافته است. در پروتئین طبیعی، اسید آمینهٔ ترئونین ۲۸۰ با اسید آمینهٔ سرین ۲۷۶ دو پیوند با طول پیوندهای ۱/۹ و ۲/۱ آنگستروم و در موقعیت ۲۸۴، با اسید آمینهٔ سرین یک پیوند با طول ۲/۳ آنگستروم برقرار کرده است؛ اما در پروتئین جهش‌یافته، اسید آمینهٔ متیونین ۲۸۰ با اسید آمینهٔ سرین ۲۷۶ یک پیوند با طول ۲/۱ آنگستروم و در موقعیت ۲۸۴، با اسید آمینهٔ 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 آمینهٔ سرین حذف‌شده است.



شکل شمارهٔ ۵. نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر جهش Val249Ile در rs3732379 بر ساختار سه‌بعدی پروتئین

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

جدول شمارهٔ ۷. نتایج سایت DynaMut

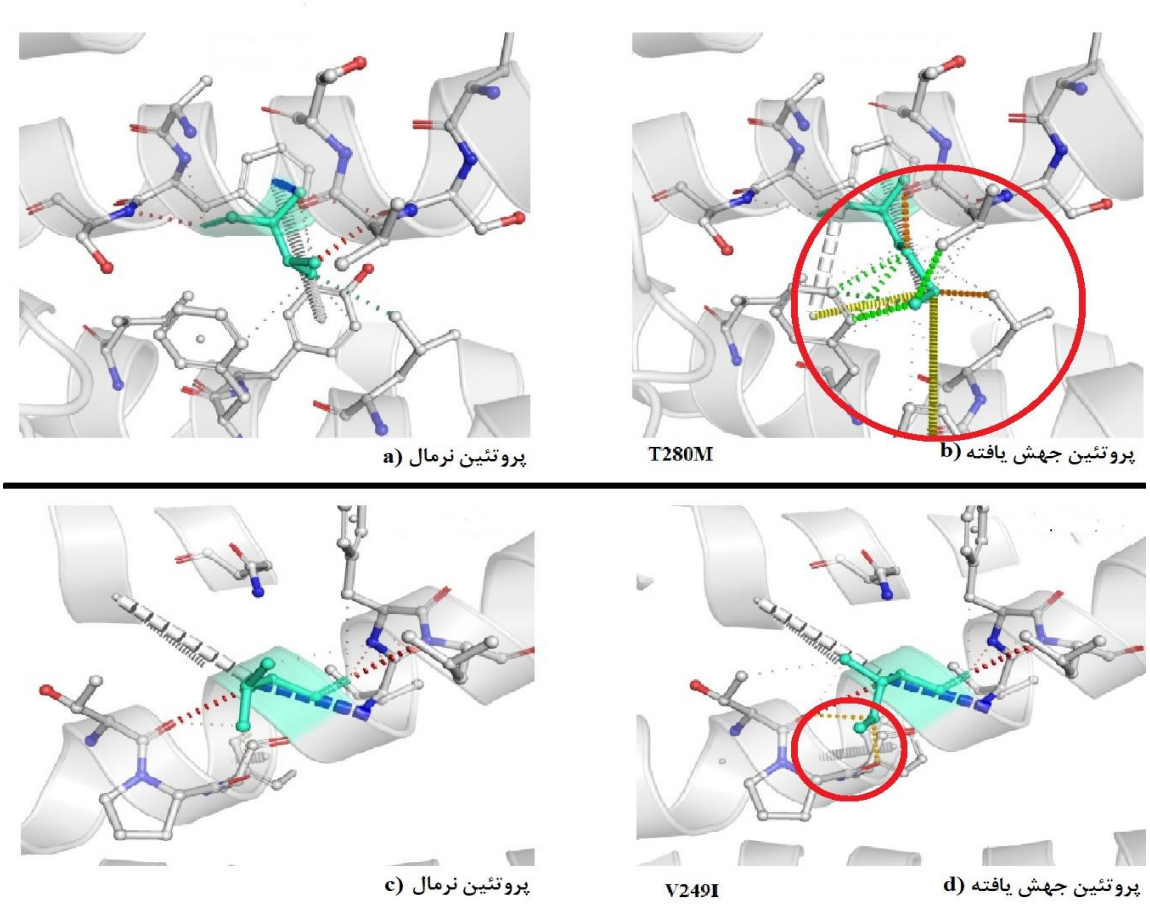
جهش	پایداری	پیش بینی بر اساس NMR	انرژی آنتروپی جنبشی میان پروتئین جهش‌یافته و طبیعی	مقدار ΔΔG
T280M	ثابت	بی‌ثبات	کاهش انعطاف‌پذیری مولکول	1.252 (kcal/mol)
V249I	ثابت	بی‌ثبات	کاهش انعطاف‌پذیری مولکول	0.186 (kcal/mol)

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

نتایج به‌دست‌آمده از سایت DynaMut در جدول شمارهٔ ۷ گردآوری شده است.

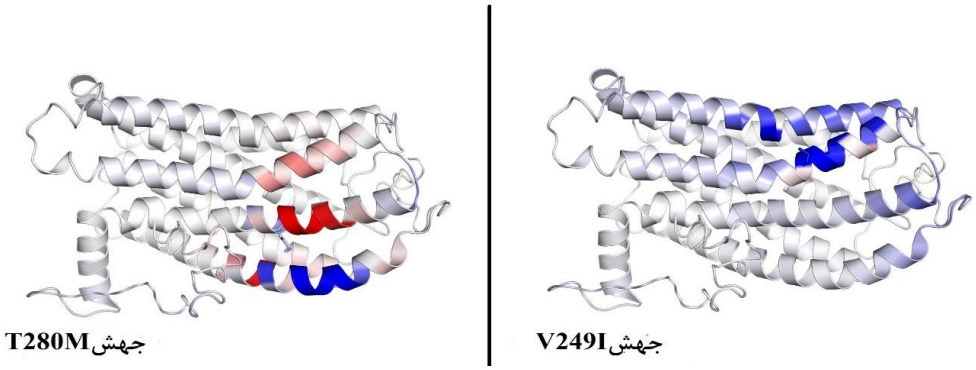
همان‌طور که در جدول شمارهٔ ۷ نشان داده‌شده است، هر دو جهش تأثیری بر پایداری پروتئین در کمپلکس میان گیرنده و لیگاند ندارند؛ اما به کاهش انعطاف‌پذیری مولکول در برهم‌کنش میان دو پروتئین منجر خواهند شد. تغییرات انرژی آزاد که در حالت جهش‌یافته اتفاق افتاده، مثبت و نزدیک به صفر است و می توان گفت واکنش در حالت تعادل است.

با استفاده از این سایت، بررسی های بیشتری دربارهٔ طول پیوند میان اسید آمینه های جهش‌یافته با اسید آمینه های مجاور صورت گرفت؛ همچنین کمپلکس از نظر تغییرات انرژی بررسی گردید. نتایج این بررسی در شکل‌های شمارهٔ ۶ و ۷ نشان داده‌شده است.



شکل شمارهٔ ۶. بررسی تعداد پیوند با سایت DynaMut برای جهش‌های T280M و V249I

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

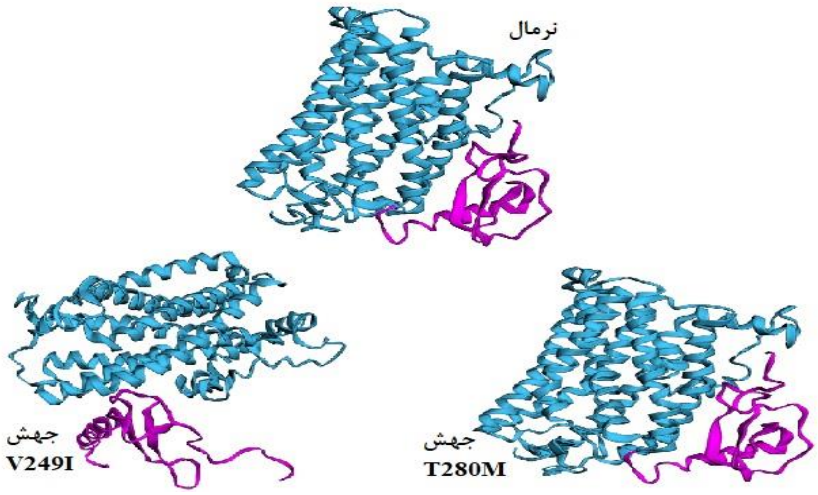


شکل شمارهٔ ۷. بررسی انرژی آنتروپی جنبشی در اثر بروز جهش

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۶ نشان داده‌شده است، در کمپلکس پروتئینی جهش‌یافتهٔ حاصل از جهش T280M، تعداد پیوندهای هیدروژنی و یونی میان اسید آمینهٔ جهش‌یافته و اسید آمینه های مجاور شدیداً افزایش یافته است که به برهم‌کنش بیشتر میان اسید آمینه ها در ساختار سه‌بعدی پروتئین منجر خواهد شد (شکل شمارهٔ ۶ a و b). در کمپلکس پروتئینی جهش‌یافتهٔ حاصل از جهش V249I، تعداد پیوندهای یونی افزایش یافته است که نشان‌دهندهٔ برهم‌کنش بیشتر اسید آمینه ها در ساختار سه‌بعدی پروتئین است (شکل شمارهٔ ۶ c و d).

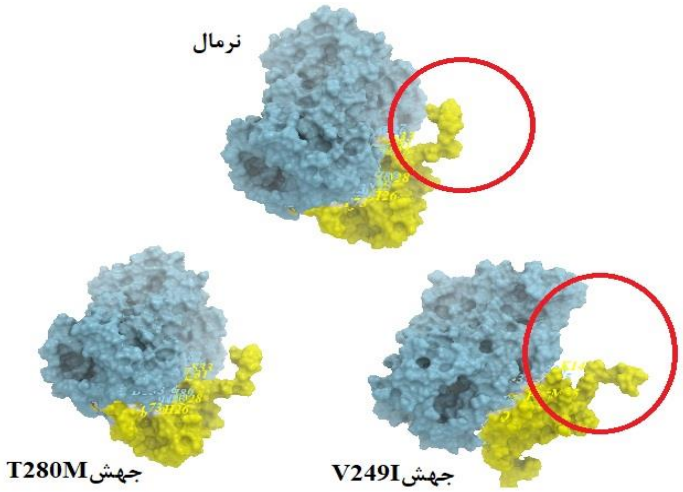
همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۷ نشان داده‌شده است، نقاط آبی نشان‌دهندهٔ محکم شدن ساختار و سختی آن است؛ این بدان معنی است که درواقع، جهش باعث می شود مولکول در کمپلکس کمترین جنبش را داشته باشد و رنگ قرمز نشان‌دهندهٔ افزایش انعطاف‌پذیری مولکول در کمپلکس است. طبق نتایج به‌دست‌آمده از سایت، مقدار تغییرات انرژی آنتروپی جنبشی برای جهش T280M برابر است با 0.078 kcal/mol.k- و برای جهش V249I برابر است با 0.038 kcal/mol.k- که هر دو جهش باعث کاهش انعطاف‌پذیری مولکول خواهند شد.

نتایج سایت Hawkdock: از این سایت برای تعیین ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته و مدل‌سازی کمپلکس پروتئینی گیرنده و لیگاند استفاده گردید که نتایج به‌دست‌آمده از آن در شکل شمارهٔ ۸ نشان داده‌شده است (رنگ آبی گیرندهٔ پروتئینی CX3CR1 و رنگ صورتی لیگاند آن یعنی فراکتالکین است).



شکل شمارهٔ ۸. نتایج به‌دست‌آمده از سایت Hawkdock

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]



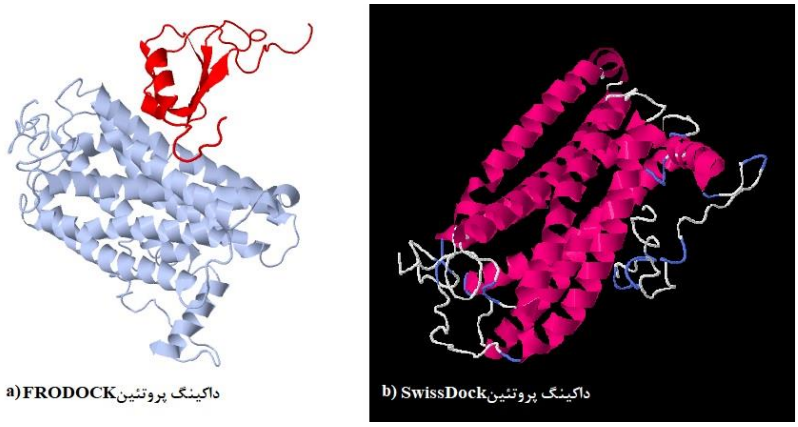
شکل شمارهٔ ۹. بررسی نحوهٔ برهم‌کنش دو پروتئین در نرم افزار MolSoft

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۸ نشان داده‌شده است، در مدل هایی که توسط این سایت شبیه‌سازی‌شده است، نحوهٔ برهم‌کنش 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 ایجادشده است. از این مدل ها برای مطالعات بعدی در نرم افزار MolSoft استفاده گردید که نتایج حاصل از آن در ادامه آمده است.

نتایج به‌دست‌آمده از نرم افزار MolSoft شامل شبیه‌سازی شکل قرارگیری دو پروتئین در کمپلکس پروتئینی است و همچنین اطلاعاتی دربارهٔ موقعیت اسید آمینهٔ مدنظر در کمپلکس پروتئینی در اختیار ما قرار می‌دهد (شکل شمارهٔ ۹).

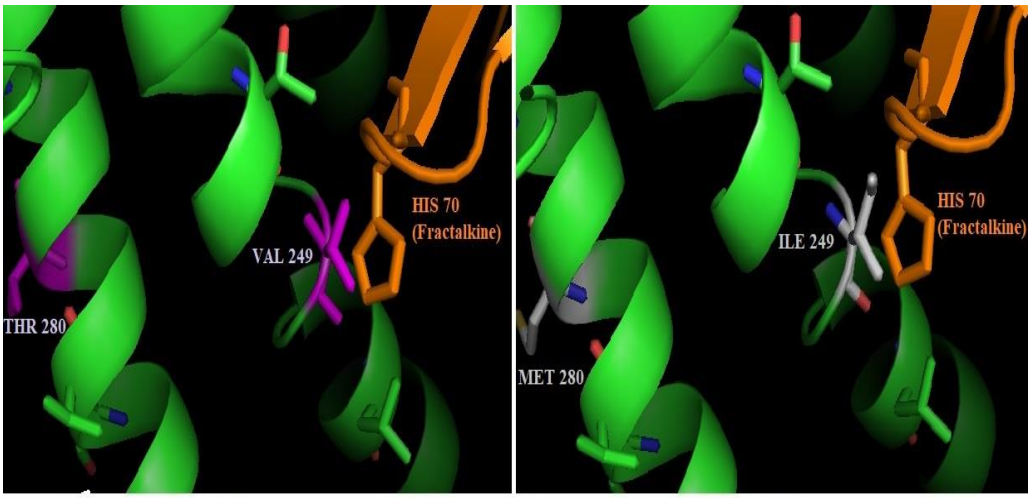
همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۹ نشان داده‌شده است، گیرندهٔ CX3CR1 به رنگ آبی و لیگاند آن که فراکتالکین است، به رنگ زرد است. جهش V249I به تغییر در برهم‌کنش میان دو پروتئین منجر شده است که احتمالاً به علت دافعه و جاذبه های میان اتم ها است.

از نتایج به‌دست‌آمده از دو پایگاه SwissDock و FRODOCK برای مقایسه و انتخاب کمپلکس مناسب تر استفاده گردید که در شکل شمارهٔ ۸ آورده شده است. داکینگ پروتئین انجام‌شده توسط سایت FRODOCK و درنهایت کمپلکس به‌دست‌آمده از این سایت، برای بررسی با نرم افزار PyMOL استفاده گردید که در شکل های شمارهٔ ۱۰ تا ۱۲ آورده شده است.



شکل شمارهٔ ۱۰. داکینگ پروتئین به‌دست‌آمده از دو سایت FRODOCK و SwissDock

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]



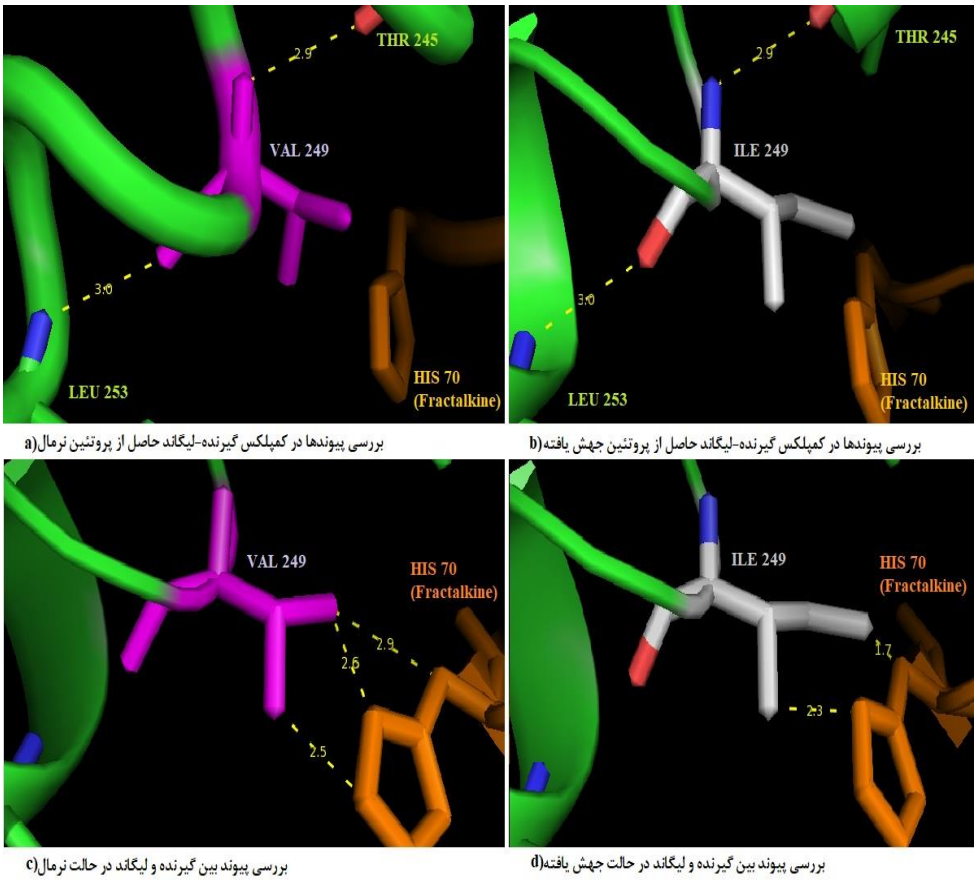
a) داکینگ مولکولی حاصل از پروتئین نرمال

b) داکینگ مولکولی حاصل از پروتئین جهش یافته

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

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۱۰ نمایش داده‌شده است، با مقایسهٔ مدل کمپلکس گیرنده-لیگاند که توسط این دو سایت پیش‌بینی‌شده است، درنهایت، از مدل پیش‌بینی‌شده توسط FRODOCK برای بررسی پیوندها با نرم افزار PyMOL استفاده شد.

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۱۱ نشان داده‌شده است، اسید آمینهٔ Val در موقعیت ۲۴۹ در نزدیکی اسید آمینهٔ His در موقعیت ۷۰ در پروتئین فراکتالکین قرار می گیرد.



a) بررسی پیوندها در کمپلکس گیرنده-لیگاند حاصل از پروتئین نرمال

b) بررسی پیوندها در کمپلکس گیرنده-لیگاند حاصل از پروتئین جهش یافته

c) بررسی پیوند بین گیرنده و لیگاند در حالت نرمال

d) بررسی پیوند بین گیرنده و لیگاند در حالت جهش یافته

شکل شمارهٔ ۱۲. بررسی پیوندها در کمپلکس گیرنده-لیگاند

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

همان‌طور که در شکل شمارهٔ ۱۲ نشان داده‌شده است، در کمپلکس گیرنده-لیگاند به‌دست‌آمده از پروتئین طبیعی (a)، اسید آمینهٔ 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 به‌دست‌آمده از پروتئین جهش‌یافته (b)، اسید آمینهٔ 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، بررسی های دیگری در ارتباط با تغییرات پیوند میان گیرنده و لیگاند در موقعیت ۲۴۹ به‌سبب فاصلهٔ نزدیک این اسید آمینه با فراکتالکین نیز صورت گرفت. اسید آمینهٔ هیستیدین ۷۰ در پروتئین فراکتالکین با اسید آمینهٔ ۲۴۹ پروتئین گیرنده برهم کنش دارد. در پروتئین طبیعی والین ۲۴۹ با هیستیدین ۷۰ فراکتالکین سه پیوند با طول های ۲/۵ و ۲/۶ و ۲/۹ آنگستروم و در پروتئین جهش‌یافتهٔ ایزولوسین ۲۴۹ با هیستیدین دو پیوند با طول های ۲/۳ و ۱/۷ آنگستروم برقرار می کند که طول و تعداد پیوند در حالت جهش‌یافته کاهش پیدا کرده است و گیرنده و لیگاند نسبت به هم بیشتر متمایل شده اند که احتمالاً به علت جاذبه و دافعهٔ اسید آمینه های مختلف است.

بحث و نتیجه‌گیری

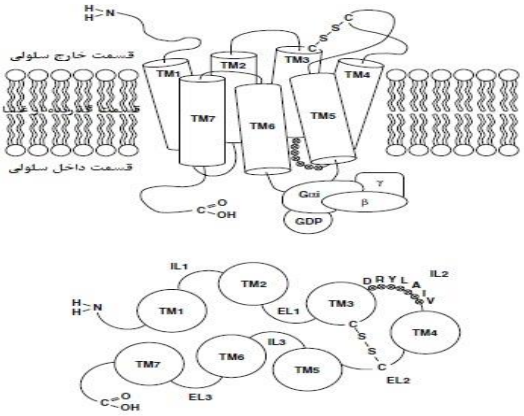
طبق مطالعات گذشته، دو ایزوفرم برای *CX3CL1* وجود دارد: یکی به شکل محلول در سیتوزول و دیگری به‌صورت متصل‌شونده به غشای سلولی است. حضور هر دو ایزوفرم در بدن نقش مهمی در شبکهٔ کموکاینی ایفا می کنند. شکل محلول این پروتئین یک عامل کموتاکتیک برای سلول های NK، سلول های T، مونوسیت ها و مست‌سل ها است. نقش آن به‌عنوان عامل القاکنندهٔ رگ‌زایی و همچنین در کموتاکسی سلول های اندوتلیال نیز اثبات‌شده است. شکل متصل‌شونده به غشای سلولی در سلول های اندوتلیال رگ ها حضور دارد و در تعدیل اتصال نوتروفیل ها و چسبندگی سلول ها دخالت می کند (۲۰). اثر زیستی CX3CL1 یا همان فراکتالکین، توسط برهم‌کنش با CX3CR1 میسر می شود. از نظر ساختاری، گیرندهٔ CX3CR1 به کلاس متابوتروپیک تعلق دارد که به‌عنوان پروتئین G متصل‌شونده به گیرنده نیز شناخته می گردد. این پروتئین ۷ ناحیهٔ گذرنده از غشا دارد و زنجیره ای پلی پپتیدی متشکل از ۷ ساختار آلفا هلیکس ایجاد می کند. زیرواحدهای تکی پروتئین G در ساختار این گیرنده که هتروتریمریک هستند، با شکل آزاد (محلول در سیتوزول) CX3CL1 برهم‌کنش می دهند. 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. لوپ های داخل‌سلولی در سیتوپلاسم هستند و به انتهای C پایانه ختم می شوند که به پروتئین Gαi هتروتریمریک متصل می گردد (۲۰). پیام سلولی وابسته به TNF-R1 و CX3CR1 که نوعی خودتنظیمی طبیعی برای این مسیر پیام‌رسانی به‌شمار می آید، توسط برهم‌کنش میان CX3CL1 و CX3CR1 انجام می شود (شکل شمارهٔ 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 می شود و به فرایند حاملگی و سلامت آن کمک می کند (۲۲).

با توجه به مطالعات گذشته و بررسی های انجام‌شده در زمینهٔ مولکولی، مشخص‌شده است که حضور پروتئین سالم در مسیرهای التهابی نقش مهمی دارد و چنانچه این پروتئین دچار جهش گردد، در عملکرد طبیعی آن اختلال ایجاد می شود. 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 می گردد تا بدون هیچ مشکلی به مرحلهٔ تولد برسد (۱۵).

در این مطالعه یکی از ژن های مهم مسیر التهابی

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

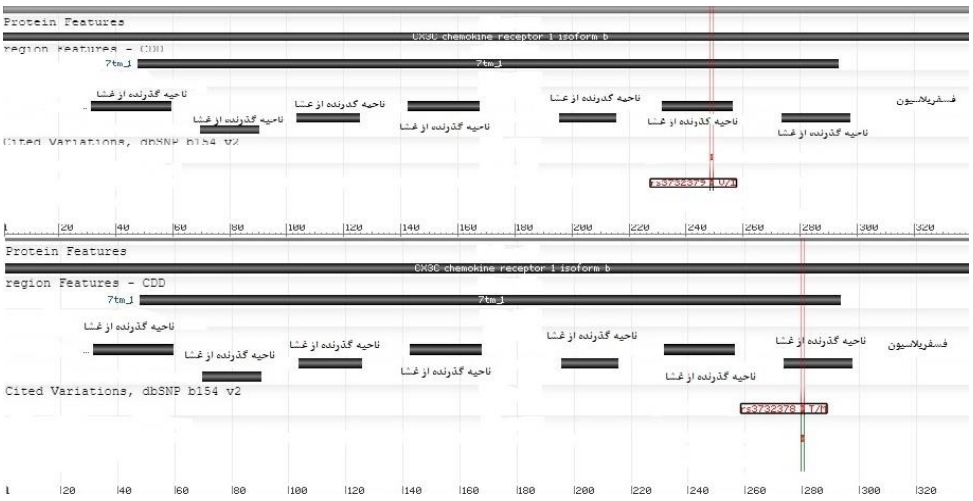


شکل شمارهٔ ۱۳. ساختار شماتیک پروتئین *CX3CR1* (۲۱)

بررسی گردید و با استفاده از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، دو مورد SNP مهم ژن *CX3CR1* که در سقط مکرر شناسایی‌شده بودند، بررسی گردیدند تا میزان بیماری زایی آن‌ها در این عارضه مشخص شود. SNPهای بررسی‌شده rs3732378 (Thr280Met) و rs3732379 (Val249Ile) بودند که با توجه به آنالیزهای انجام‌شده 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 پیش‌بینی شده‌اند. طبق بررسی هایی که دربارهٔ پایداری پروتئین جهش‌یافته انجام شد، دریافتیم که هر دو جهش باعث کاهش پایداری پروتئین می شوند و با کاهش پایداری، پروتئین سریع تر تجزیه می‌گردد و درنتیجه، زودتر از بین می رود. با توجه به اینکه برهم‌کنش CX3CR1 و CX3CL1 (فراکتالکین) به فعالیت طبیعی این پروتئین در سلول منجر می شود، افزایش تعامل پلاکت-لکوسیت و چسبندگی لکوسیت به سلول‌های اندوتلیال شریانی تحریک‌شده توسط TNFα تا حدی به تنظیم دوبارهٔ CX3CL1 اندوتلیال و افزایش بیان CX3CR1 در پلاکت‌ها، مونوسیت ها و لنفوسیت ها منجر می‌گردد؛ پس با کاهش پایداری پروتئین و تجزیهٔ آن، میزان گیرندهٔ سلولی برای فراکتالکین کاهش می‌یابد و مسیر التهابی و پاسخ ایمنی مختل خواهد شد؛ درنتیجه، در واکنش های ایمنی میام مادر و جنین اختلال ایجاد می‌شود و ممکن است درنهایت به سقط‌جنین منجر گردد؛ همچنین طی مطالعات گذشته عنوان‌شده است که اختلال در برهم‌کنش این گیرنده و لیگاند ممکن است به ترومبوز بینجامد که خود علت دیگری برای سقط‌جنین است (۲۳-۲۶).

با برنامهٔ PyMOL، این پروتئین از نظر ساختاری بررسی و مشخص شد که جهش Thr280Met باعث تغییر در ساختار سه‌بعدی پروتئین می‌شود و همین امر احتمالاً ممکن است در ساختار فضایی پروتئین مشکل ایجاد کند و موجب اختلال در اتصال لیگاند به گیرنده گردد و درنهایت، این اختلال به فعالیت نداشتن درست پروتئین منجر می‌شود (۲۰). طی بررسی های انجام‌شده توسط سایت NCBI (شکل شمارهٔ ۱۴) مشخص شد که rs3732378 در ناحیهٔ گذرنده از غشا و نزدیک به سطح خارج سلولی اتفاق می افتد و ممکن است در نحوهٔ قرارگیری پروتئین در غشا اثر بگذارد که این رخداد در ساختار غشا و برهم‌کنش با لیگاند اختلال ایجاد می‌کند. همین بررسی ها برای rs3732379 نیز صورت گرفت و مشخص شد که این جهش هم در ناحیهٔ گذرنده از غشا و در نزدیکی بخش خارج سلولی اتفاق می افتد. با توجه به ساختار شماتیک بررسی‌شده، هر دو جهش از نظر مکان پروتئینی در نزدیکی هم اتفاق می افتند و چنانچه هم‌زمان 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، درنهایت به سقط‌جنین منجر خواهد شد.

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]



شکل شمارهٔ ۱۴. نتایج سایت NCBI دربارهٔ مکان جهش در ساختار پروتئینی

طی بررسی های انجام‌گرفته، به‌سبب آنکه پروتئین مطالعه‌شده نوعی گیرنده است؛ بنابراین، بررسی هایی با کمک سایت DynaMut و نرم افزار MolSoft انجام شد. با کمک سایت DynaMut ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته از نظر نحوهٔ برهم‌کنش با پروتئین فراکتالکین بررسی گردید. طبق بررسی‌های انجام‌شده، این جهش ها از نظر انرژی جنبشی مولکولی، برهم‌کنش پروتئینی را تحت تأثیر قرار می‌دهند و همچنین باعث سخت یا منعطف شدن ساختار شدند. ساختار سه‌بعدی کمپلکس پروتئینی شبیه‌سازی‌شده توسط این سایت با نرم افزار MolSoft بررسی گردید و مشخص شد که از نظر موقعیت اسید آمینه در پروتئین طبیعی و جهش‌یافته، تفاوت هایی ایجاد شده که احتمالاً به علت تغییر در انرژی و تمایلات اسید آمینه‌ها نسبت به یکدیگر است. با نرم افزار PyMOL، بررسی های دیگری در ارتباط با تغییرات پیوند میان گیرنده و لیگاند در موقعیت ۲۴۹ به‌سبب فاصلهٔ نزدیک این اسید آمینه با فراکتالکین نیز صورت گرفت. اسید آمینهٔ هیستیدین در موقعیت ۷۰ در پروتئین فراکتالکین با اسید آمینهٔ موقعیت ۲۴۹ پروتئین گیرنده برهم‌کنش دارد. در پروتئین جهش‌یافته تعداد پیوند کاهش یافته است و گیرنده و لیگاند نسبت به هم بیشتر متمایل شده اند که احتمالاً به‌سبب جاذبه و دافعهٔ اسید آمینه های مختلف است.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه یزد انجام‌گرفته است و مراتب امتنان خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه اعلام می‌داریم.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تضاد منافعی 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 molecul 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,

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]

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, Salamonsen 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, Mutuiri 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, Kubaszewski 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

[Downloaded from sjimu.medilam.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.15634728.1401.30.3.4.7]
[DOI: 10.52547/sjimu.30.3.12]