مقاله پژوهشی

ارزیابی بیوانفورماتیکی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف (nsSNPs) بیماری‌زا در ناحیه کدکننده ژن پروتئین پریون انسانی (PRNP)

کورش بامداد[1*]، فاطمه رحیمی قره میرشاملو[2]، سیروس نعیمی[2]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران
۲- گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۲/۰۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۰۴/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی عامل ایجاد تنوع ژنتیکی در جانداران می‌باشند و در این میان، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف (nsSNPs) باعث تغییر در باقیمانده‌های اسیدآمینه می‌شوند. تحقیق اخیر با هدف بررسی احتمال ارتباط بین تمامی چندشکلی‌های گزارش‌شده از ژن پریون انسانی و بروز بیماری انجام‌شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توالی اسیدآمینه ایزوفرم اصلی ژن پروتئین پریون انسانی از پایگاه داده UniProt استخراج و توسط سرورهای FoldAmyloid و AmylPred موردبررسی قرار گرفت. همچنین تمامی پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف این پروتئین از پایگاه داده dbSNP استخراج و توسط سرورهای بیوانفورماتیکی SIFT، PolyPhen-2، I-Mutant-3.0، PANTHER، SNPs&GO، PHD-SNP، Meta-SNP و MutPred برای تعیین زیان‌بارترین SNP مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بررسی توالی پروتئین توسط سرورهای FoldAmyloid و AmylPerd، نواحی ۱۵-۵، ۱۷۸-۱۷۴، ۱۸۴-۱۸۰، ۲۱۷-۲۱۱ و ۲۵۲-۲۴۰ را به‌عنوان حساس‌ترین بخش‌های پروتئین در روند آمیلوئیدی شدن معرفی کردند. همچنین از غربالگری تمام nsSNPهای ایزوفرم اصلی پروتئین توسط سرورهای استفاده‌شده، ۱۰۵ مورد جایگزینی والین به‌جای آسپارتیک اسید در جایگاه ۱۷۸ با شناسه‌ی rs11538766 را به‌عنوان زیان‌بارترین nsSNP در ساختار پروتئین پیش‌بینی کردند.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج، جایگزینی والین به‌جای آسپارتیک‌اسید در موقعیت ۱۷۸ (D178V) به‌عنوان زیان‌بارترین جهش در ساختمان پروتئین پریون انسانی پیش‌بینی شد. همچنین مکانیسم مولکولی ارائه‌شده توسط سرور MutPred نیز دلالت بر افزایش ساختار بتا (Gain of sheet) در فرم فضایی پروتئین دارد که مسبب افزایش احتمال تولید و تجمع تشکیلات فیبریلی خواهد بود.

کلمات کلیدی: پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف، پروتئین پریون انسانی، جهش D178V

مقدمه

ژن پروتئین پریون انسانی (Human Prion Protein) بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۲۰، نوار ۱ و زیر نوار ۳ قرار دارد که PRNP نامیده می‌شود. پروتئین کد شونده توسط این ژن دارای ۲۵۳ اسیدآمینه در ساختمان اولیه خود است. ساختار پروتئین پریون انسانی از ۳ ناحیه تشکیل می‌شود. ناحیه انتهای آمینی که از تکرارهای اکتاپپتیدی که به Cu^{++} متصل می‌شود تشکیل‌شده است و شامل اسیدآمینه ۱۲۴-۲۳ می‌شود و انتهای کربوکسیلی که به‌صورت دومین گلوبولار است و از اسیدآمینه‌های ۲۳۱-۱۲۵ تشکیل‌شده است و دو ناحیه پپتیدهای سیگنالی که ۲ بخش اسیدآمینه ۲۳-۱ و ۲۵۳-۲۳۱ را دربر می‌گیرد. دومین گلوبولار پروتئین پریون که در انتهای کربوکسیلی این پروتئین قرار دارد دارای ۳ مارپیچ آلفا است که به ترتیب شامل توالی اسیدآمینه‌ای ۱۴۴-۱۵۴ (مارپیچ ۱)، ۱۷۳-۱۹۴ (مارپیچ ۲) و ۲۲۸-۲۰۰ (مارپیچ ۳) است و همچنین این ناحیه شامل ۲ ساختار بتای کوتاه موازی با جهت مخالف که شامل توالی اسیدآمینه‌ای ۱۳۱-۱۲۸ (ساختار بتا ۱) و ۱۶۴-۱۶۱ (ساختار بتا ۲) است. یک پل دی‌سولفیدی بین اسیدهای آمینه سیستئین ۱۷۹ و سیستئین ۲۱۴ قرار دارد که باعث اتصال مارپیچ آلفای ۲ و مارپیچ آلفای ۳

*نویسنده مسئول: کورش بامداد، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه پیام نور، ایران
Email: k.bamdad@farspnu.ac.ir

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

می‌شود. دو ناحیه گلیکوزیله در اسیدهای آمینه اسپارژین ۱۸۱ و آسپاراژین ۱۹۷ وجود دارد که پس از سنتز پروتئین در دستگاه گلژی، فرایند گلیکوزیلاسیون روی آن‌ها صورت می‌گیرد و پس از اتمام فرایند گلیکوزیلاسیون پروتئین به سطح سلول فرستاده می‌شود تا از طریق انتهای کربوکسیلی خود و به‌واسطه‌ی لنگری از جنس گلیکوزیل فسفاتیدیل اینوزیتول به سطح خارجی غشای پلاسمایی سلول متصل شود (۱-۷).

فعالیت و نقش اصلی پروتئین پریونی هنوز به‌درستی روشن نشده است، لیکن بر اساس شواهد موجود چند نقش احتمالی از جمله تشکیل ساختار میلینی اطراف نورون‌ها، شرکت در ارتباطات بین سلولی و تنظیم چرخه شبانه‌روزی خواب‌وبیداری را برای آن در نظر می‌گیرند و همچنین ازآنجایی‌که این پروتئین‌ها واجد قسمت‌هایی با تمایل بالا برای یون فلزی مس هستند، آن‌ها را از جمله پروتئین‌های دخیل در متابولیزم مس نیز می‌دانند (۸-۱۱).

ایزوفرم طبیعی پروتئین پریونی PrP^{C} و ایزوفرم غیرطبیعی این پروتئین، (Scrapie Prion Protein) PrP^{SC} نام دارد. PrP^{C}، واجد ۴۲ درصد مارپیچ آلفا و مقدار ناچیزی نزدیک به ۳ درصد صفحات بتا است. درحالی‌که شکل بیماری‌زا PrP^{SC}، دارای مقادیر بالای صفحات بتا در حدود ۴۲ درصد و مارپیچ آلفای کمتری در حدود ۳۰ درصد است (۱۲، ۱۳). تغییرات ساختاری در پریون‌ها به‌ویژه آنکه در سطح سلول‌های عصبی رخ می‌دهند به‌راحتی سبب بیماری‌های تخریب‌کننده سیستم عصبی و یا اصطلاحاً neurodegenerative disease می‌گردد (۱۴). ماهیت بیماری‌های پریونی به سه شکل عفونی، ژنتیکی و پراکنده است که جهش نقش مهمی در حالت‌های ژنتیکی و پراکنده ایفا می‌کند. حدوداً ۹ گونه مختلف بیماری توسط PrP^{SC} به وجود می‌آید (۱۵-۱۷) که مهم‌ترین بیماری‌های ایجادشده توسط پریون پروتئین‌ها در انسان شامل کرویتزفلد-جکوب (CJD)، بیماری خواب کشنده خانوادگی (FFI)، نشانگان گرستمن-اشتراسلر-شنکر (GSS) و بیماری کورو می‌باشند (۱۸، ۱۹).

بر اساس مطالعات صورت گرفته PrP^{SC} پس از برقراری تماس با PrP^{C}، با مکانیسمی ناشناخته آن را به شکل‌های شبیه خود تبدیل می‌کند و با افزایش مقدار PrP^{SC}، سرعت تکثیر نیز بیشتر می‌شود. با افزایش تعداد PrP^{SC}ها، این پروتئین‌های غیرطبیعی تمایل خواهند داشت تا به هم متصل شده و رشته‌های آمیلوئیدی نامحلول ایجاد کنند. به دلیل مقاومت نسبی این پروتئین‌های غیرطبیعی در مقابل پروتئازها و رسوب و تجمع رشته‌های آمیلوئیدی در فضای بین‌سلولی، فرمان مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی به‌وسیله سلول‌های عصبی داده می‌شود که این مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپاپتوزیس) باعث ایجاد حفراتی در مغز می‌گردد و در نتیجه باعث ایجاد بیماری پریونی می‌شود (۲۰-۲۳).

مطالعات ساختاری و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی از دومین‌های کروی پروتئین پریون پستانداران، نقش بالقوه‌ی مارپیچ ۲ (Helix2) و مارپیچ ۳ (Helix3) را در تبدیل PrP^{C} به PrP^{SC} پیشنهاد کرده‌اند (۲۴، ۲۵). مطالعات بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که مارپیچ ۲ و ۳ به‌طور ذاتی گرایش بالایی به تولید صفحات بتا و توانایی در پذیرفتن ترکیب‌های ساختاری چندتایی دارد درصورتی‌که مارپیچ ۱ این‌گونه نیست (۲۶، ۲۷). شبیه‌سازی‌ها نشان داده‌اند که مارپیچ‌های H_2 و H_3 برای تبدیل PrP^{C} به PrP^{SC} حیاتی است و فولد نشدن انتهای کربوکسیلی از مارپیچ H_2 توانایی تشکیل فیبریل بتا جدید را القاء می‌کند (۲۸). این مطالعات محاسباتی نشان می‌دهد که مارپیچ H_2 و H_3 بخشی از هسته‌ی رشته آمیلوئیدی پریون هستند. در مقابل مارپیچ H_1 برای پریون عفونی ضروری نیست و ساختار مارپیچی آلفا یک در PrP^{C} در طیف گسترده‌ای از شرایط تجربی واسرشته شدن حفظ می‌شود (۲۹).

به‌طورکلی SNPهای غیر مترادف، عملکرد پروتئین را به‌صورت تغییر در اسیدهای آمینه‌ی جایگاه فعال و همچنین تغییر بر اسکلت و ساختمان آن تحت تأثیر قرار می‌دهند. پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی (SNPs) علت بیشتر تنوع ژنتیکی است که در این میان، پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف (nsSNPs) باعث تغییر در باقی‌مانده اسیدآمینه‌ای می‌شوند (۳۰-۳۲).

ابزارهای بیوانفورماتیکی مانند سرور SIFT توانایی پیش‌بینی SNPهای زیان‌آور را دارا می‌باشند. این سرورهای پیش‌بینی کننده به ما کمک می‌کنند تا بتوانیم SNPهای کاندیدا از میان تعداد زیادی SNPهای یک ژن درگیر در ایجاد بیماری را موردبررسی قرار دهیم (۳۳). معیار سنجش زیان‌بار بودن این SNPها بر اساس حفظ شدن اسیدآمینه طی تکامل، نقش اسیدآمینه در تغییر ساختار و پایداری پروتئین و یا احتمال حضور آن در ساختارهای دوم پروتئین (مارپیچ آلفا و صفحات بتا)، میزان تغییر در انرژی آزاد گیبس در نتیجه جایگزینی اسیدهای آمینه، پیش‌بینی ارتباط nsSNPها با مکانیسم‌های

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

مولکولی تولیدکننده تغییر در پروتئین و مواردی از این قبیل است. از جمله این دست مطالعات به‌عنوان نمونه می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: تحقیقی که در سال ۲۰۱۳ صورت گرفت که در این تحقیق به بررسی حساسیت توالی پروتئین پریون انسان، گوسفند، موش، گاو و بز با استفاده از BLOSUM62 و PSSM(Position-specific scoring matrices) پرداخته‌شده است (۳۴) و یا بررسی توالی‌هایی از پروتئین که به سمت پریونی شدن می‌روند که نتایج شامل توالی‌های غنی از اسیدآمینه گلوتامین وآسپاراژین است (۳۵) و همچنین بررسی SNPهای پروتئین پریون به‌وسیله ۳ سرور Auto-Mute، PANTHER و PolyPhen، که این تحقیق بر nsSNPهای پاتوژن پروتئین پریون صورت گرفته و نتایج به‌دست‌آمده از شبیه‌سازی دینامیک مولکولی این SNPها تائید کننده دقت سرورها در بررسی SNPهای زیان‌بار است (۳۶).

در مطالعه حاضر ارزیابی nsSNPهای ژن PRNP توسط سرورهای بیوانفورماتیکی SIFT (۳۷)، Polyphen-2 (۳۸)، I-mutant-3.0(۳۹)، Phd-snp (۴۰)، SNPs&GO (۴۱)، Panther(۴۲)، Meta-SNP و Mutpred (۴۳)، به‌منظور شناسایی زیان‌آورترین SNPهای موجود در پروتئین پریون انسانی و از سرورهای Amylpred (۴۴) و FoldAmyloid (۴۵) برای شناسایی توالی‌های حساس به آمیلوئیدی شدن در این پروتئین استفاده شده است. ضمناً سطح معناداری شاخص‌های عددی استفاده شده برای هر سرور، در مقالات استناد داده‌شده برای هر یک از آن‌ها به‌صورت مبسوط مورد بررسی قرارگرفته است.

مواد و روش‌ها

پایگاه داده

پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف (nsSNP) گزارش‌شده برای پروتئین پریون انسانی (PRNP) توسط پایگاه داده‌SNP(dbSNP) (۴۶) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP) و توالی اسیدآمینه این پروتئین به فرمت Fasta از پایگاه داده uniProt با رکورد (P04156) به دست آمد که از ۱۰۵ مورد nsSNP به‌دست‌آمده توسط dbSNP، به‌وسیله سرورهای بیوانفورماتیکی پیش‌بینی کننده SNPهای زیان‌آور مورد ارزیابی قرار گرفت و SNPهای مرتبط با بیماری‌های پریونی از پایگاه داده OMIM (۴۷) و uniProt موردمطالعه قرار گرفت.

سرورهای پیش‌بینی کننده nsSNPهای زیان‌آور

سرورهای پیش‌بینی کننده پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی زیان‌آور مورداستفاده به شرح زیر است:

SIFT: سرور آنلاین SIFT (Sorting intolerant from tolerant) سروری است که پیش‌بینی‌های جایگزینی اسیدآمینه‌ی اثرگذار بر عملکرد پروتئین را بر اساس همولوژی توالی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی اسیدآمینه بازگو می‌کند. ازآنجاکه تغییرات اسیدآمینه در ساختار پروتئین می‌تواند ویژگی‌های ساختاری، پایداری و عملکرد پروتئین را تحت تأثیر قرار دهد بنابراین احتمال آن وجود دارد که بر ویژگی‌های فیزیولوژیک پروتئین نیز تأثیرگذار باشد. سرور از طریق همولوژی توالی موردنظر با ژن‌های مرتبط و دومین‌ها از میان گونه‌ها، امکان تماس همه ۲۰ اسیدآمینه ممکن در یک جایگاه را بررسی می کند و این امکان را به کاربر می‌دهد که تشخیص دهد کدام nsSNP می‌تواند دارای اهمیت بیشتری باشد و در طی تکامل حفظ‌شده‌تر است. نتیجه به‌دست‌آمده توسط این سرور برای هر nsSNP به‌صورت یک شاخص عددی بین ۱-۰ است، nsSNPهای ارزیابی شده با شاخص عددی P≤۰/۰۵ به‌صورت زیان‌آور (intolerant) و در غیر این صورت غیر زیان‌بار (tolerant) پیش‌بینی می‌شود.

Polyphen-2: سرور Polyphen-2 ارزیابی nsSNPها را بر اساس Position specific (اختصاصی جایگاه) بودن آن جایگاه اسیدآمینه انجام می‌دهد، به عبارت دیگر این سرور جایگزینی‌های اسیدآمینه‌ای را بر اساس عملکردی بودن آن ناحیه از پروتئین انجام می‌دهد، توالی‌هایی از پروتئین که در طول تکامل بین گونه‌های مختلف حفظ‌شده هستند نقش مهم‌تری در عملکرد پروتئین دارند ولی استثناءهایی هم دراین‌باره وجود دارد، سرور Polyphen مکمل سرور SIFT در ارزیابی nsSNPهای زیان‌آور به شمار می‌آید. خروجی حاصل از این سرور به‌صورت یک شاخص عددی-Position) PSIC specefic independent count) که دارای عددهای مختلف بین ۱ و ۰ است که هر چه به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد مخرب‌تر است. میزان زیان‌بار بودن خروجی حاصل از این سرور با کلمه‌های Probably damaging و Possibly damaging و قابل تحمل با کلمه Benign نشان داده می‌شود.

I-Mutant-3.0: یک تکنیک با روش SVM (Support Vector Machines) است و اساس پیش‌بینی آن پایداری

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

پروتئین است. فایل خروجی میزان تغییرات انرژی آزاد گیبس (DeltaDeltaG=DDG) را نشان می‌دهد. فایل خروجی به‌صورت DDG>0.5 و DDG<-0.5 طبیعی و -0.5≤ DDG ≤0.5) زیان‌آور) پیش‌بینی می‌شود (که زیان‌آور بودن SNPها با کلمه Decrease و غیر زیان‌آور بودن SNPها با کلمه Increase نشان داده می‌شود).

SNP&GO، PHD-SNP و Meta-SNP: سرور PHD-SNP بر اساس روش SVM به دسته‌بندی اثر پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی می‌پردازد. برای پیش‌بینی احتمال مشارکت nsSNP ایجادشده در پروتئین در ایجاد بیماری، از این ۳ سرور استفاده می‌شود برای هر nsSNP ارتباط آن با بیماری با کلمه DISEASE و غیر مرتبط بودن SNP با بیماری با کلمه NEUTRAL نشان داده می‌شود.

PANTHER (protein analysis through evolutionary relationships likelihood): سرور PANTHER، SNPهایی را که می‌تواند سبب اثرگذاری بر عملکرد پروتئین شود را پیش‌بینی می‌کند. این سرور بر اساس هم‌ردیفی تکاملی در پروتئین‌های مرتبط از طریق جایگزینی جایگاه‌های خاص تکاملی حفاظت‌شده SubPSEC (substitution position specific evolutionary conservation) این پیش‌بینی را انجام می‌دهد، زمانی که مقدار SubPSEC به صفر نزدیک‌تر باشد جایگزینی بدون تأثیر است و هرچه میزان آن منفی‌تر باشد زیان‌آور خواهد بود (P<-۳ زیان‌آور و P>-۳ غیر زیان‌آور).

MutPred: برای پیش‌بینی احتمال مشارکت nsSNP ایجادشده در پروتئین در ایجاد بیماری از این سرور استفاده می‌شود با این قابلیت که این سرور توانایی پیش‌بینی ۱۴ مکانیسم مولکولی ایجاد تغییر در پروتئین توسط nsSNPها را دارا است (به‌عنوان‌مثال افزایش یا کاهش تمایل رشته پلی پپتیدی به مارپیچ آلفا، پس از جانشینی اسیدآمینه و یا کم یا زیادشدن مکان‌های فسفریلاسیون در رشته، پس از ایجاد تغییر اسیدآمینه و مکانیسم‌های دیگر است) که با ارزیابی نمرات g و p خروجی توسط این سرور nsSNPهای زیان‌آور انتخاب می‌شوند.

سرورهای پیش‌بینی کننده توالی‌های حساس به توده‌ای شدن پروتئین و آمیلوئیدی شدن

FoldAmyloid و Amylpred: این ۲ سرور توالی‌های حساس به آمیلوئیدی شدن را در پروتئین بر اساس الگوی آمیلوئیدی شدن شناسایی می‌کنند که خروجی حاصل از این سرورها به‌صورت یک نمودار برای کل توالی پروتئین و شاخص‌های عددی مربوط به هر اسیدآمینه موجود در پروتئین است.

نتایج

تمامی nsSNPهای استخراج‌شده از پایگاه داده‌ی dbSNP، ۱۰۵ مورد را شامل می‌شوند (این تعداد مربوط به بازه زمانی انجام تحقیق است) که در ادامه به بررسی آن‌ها با سرورهای بیوانفورماتیکی اشاره خواهد شد. لازم به ذکر است که به دلیل حجم بالای شاخص‌های عددی مستخرج از سرورها، صرفاً نتایج مربوط به ارزیابی‌های نهایی در متن گزارش‌شده‌اند.

SNPهای زیان‌بار استخراج‌شده از سرور SIFT:

بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از سرور SIFT برای تک‌تک کدون‌ها از ۱۰۵ nsSNP، ۶۰ مورد توسط سرور، زیان‌آور پیش‌بینی‌شده‌اند که دارای نمره شاخص تحمل کوچک‌تر مساوی ۰/۰۵ می‌باشند.

SNPهای زیان‌بار یافت شده توسط سرور PolyPhen-2:

از ۱۰۵ nsSNP که توسط این سرور بررسی شد، ۶۴ مورد زیان‌بار شناسایی شدند که دارای نمره شاخص PSIC (Position-specific independent count) مابین ۱ و ۰ است. هر چه خروجی حاصل به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد جایگزینی مخرب‌تر خواهد بود.

SNPهای زیان‌بار یافت شده توسط سرور I-Mutant-3.0:

در این مرحله از سرور I-Mutant-3.0 برای بررسی nsSNPها استفاده‌شده است، بر اساس نتایج حاصل از خروجی این سرور برای ۱۰۵ nsSNP موردمطالعه، ۷۳ nsSNP زیان‌آور شناسایی‌شده است. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این ۳ سرور، یعنی SNPهایی که توسط هر ۳ سرور به‌طور مشترک زیان‌آور شناخته شوند استخراج می‌شود تا توسط ۵ سرور دیگر بررسی شود که ۳۵ nsSNP توسط این ۳ سرور به‌طور مشترک زیان‌بار شناخته‌شده است.

SNPهای زیان‌بار یافت شده توسط ۲ سرور SNPs&GO و PHD-SNP:

از بررسی ۳۵ SNP زیان‌بار استخراج‌شده توسط ۳ سرور قبلی که توسط ۲ سرور SNPs&GO و PHD-SNP به‌طور مشترک بررسی شده است ۱۵ SNP، استخراج شدند که زیان‌بارتر از سایرین می‌باشند و شامل: P105Q، E200K، D178N، F198S، Q217R، G131V، R208H، D178V،

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

G127S ،F12S ،Q212P ،R25C ،R148C ،N181S ،R148H می‌شوند.

SNPهای زیان‌بار یافت شده توسط ۲ سرور Meta-SNP و PANTHER:

از بررسی ۱۵ SNP زیان‌آور به‌دست‌آمده توسط مرحله قبل به‌وسیله سرورهای PANTHER و Meta-SNP به‌طور مشترک ۴ nsSNP به‌عنوان زیان‌آورترین SNPها انتخاب گردید تا به‌وسیله سرور MutPred موردبررسی قرار گیرد و مکانیسم مولکولی ایجاد بیماری توسط این تغییرات اسیدآمینه‌ای معین گردد. ۴ nsSNP به‌دست‌آمده توسط این روش شامل (G131V، R25C، D178V و R148H) است.

SNPهای زیان‌بار یافت شده توسط سرور MutPred:

با بررسی نتایج حاصل از سرورهای مراحل قبل، پلی مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی G131V، R25C، D178V و R148H مستخرج از ۷ سرور قبلی توسط سرور MutPred موردبررسی قرار گرفتند و جایگزینی اسیدآمینه‌ی والین به‌جای آسپارتیک اسید در جایگاه ۱۷۸ با شناسه rs11538766 (مکانیسم مولکولی پیش‌گویی شده توسط سرور MutPred برای این SNP حاکی از افزایش ایجاد صفحات بتا است) به‌عنوان زیان‌آورترین nsSNP در ساختار پروتئین پریون انسانی حاصل گردید.

همچنین از بررسی کل توالی پروتئین به‌وسیله سرورهای FoldAmyloid و AmylPerd، توالی‌های اسیدآمینه‌ای ۱۵-۵، ۱۷۴-۱۷۸، ۱۸۰-۱۸۴، ۲۱۱-۲۱۷ و ۲۵۲-۲۴۰ به‌طور مشترک توسط هر ۲ سرور به‌عنوان حساس‌ترین توالی‌های اسیدآمینه‌ای در ایجاد آمیلوئیدی شدن پیش‌بینی شدند.

بحث

به دلیل اهمیت نقش پلی‌مورفیسم‌های تک نوکلئوتیدی غیر مترادف (nsSNPs) در این تحقیق علمی به بررسی nsSNPهای پروتئین پریون انسانی (PRNP) با سرورهای بیوانفورماتیکی مختلف با قابلیت‌های مختلف برای تعیین زیان‌بارترین nsSNPهای پروتئین پریون انسانی (PRNP) پرداخته‌شده است. لازم به ذکر است که اگرچه ممکن است تقدم و تأخر استفاده از سرورها در نتایج نهایی تغییر ایجاد کند اما با توجه به عملکرد و دقت سرورها سعی شده است بهترین ترکیب انتخاب شود. از بررسی کل nsSNPها (۱۰۵ مورد) توسط ۳ سرور SIFT، PolyPhen و I-MUTANT-3.0 به‌طور مشترک و سپس از ۲ سرور SNPs&GO و PHD-SNP، nsSNP۱۵ استخراج‌شده‌اند که زیان‌آور و مرتبط با ایجاد بیماری پیش‌بینی شدند که عبارت‌اند از: P105Q، E200K، D178N، F198S، Q217R، G131V، R208H، D178V، R148H، N181S، R148C، R25C، Q212P، F12S، G127S.

در مقایسه با مطالعات تجربی انجام‌شده، از ۱۵ مورد nsSNP فوق‌الذکر، E200K (۴۸)، D178N (۴۹، ۵۰)، Q217R (۵۱)، F198S(۵۲)، R208H (۵۳)، G131V (۵۴) و R148H(۵۵) با توجه به مطالعات آزمایشگاهی صورت گرفته نیز مرتبط با بیماری‌های پریونی گزارش‌شده‌اند. بر اساس اطلاعات به‌دست‌آمده از پایگاه داده SNP (dbSNP) از این میان، ۵ SNPE200K، D178N، F198S، Q217R و R208H از جمله nsSNPهای پاتوژن دسته‌بندی می‌شوند و طبق نتایج این تحقیق ۶ nsSNP دارای نمره SIFT برابر ۰ و نمره PSIC برابر ۱ است که شامل nsSNPهای P105Q، D178N، G131V، D178V، R148C و G127S است که به‌عنوان دارنده بیشترین میزان حفاظت‌شدگی و نقش عملکردی و همچنین زیان‌آوری توسط سرور I-MUTANT-3.0 پیش‌بینی گردید و توسط ۲ سرور SNPs&GOو PHD-SNP نیز مرتبط با بیماری گزارش‌شده‌اند. بنابراین می‌توان nsSNPهای D178N و ایزوفرم آن (D178V)، R148H و ایزوفرم آن (R148C)، P105Q و G131V را جزء زیان‌بارترین nsSNPهای پروتئین پریون انسانی گزارش کرد که دارای شاخص عددی SubPSEC کوچک‌تر از ۳- و عدد P-deleterious بزرگ‌تر از ۰/۵ برای سرور PANTHER و نمره بزرگ‌تر از ۰/۵ برای سرور Meta-SNP می‌باشند. اگرچه تاکنون تحقیقات آزمایشگاهی بر روی ایزوفرم D178V صورت نگرفته است لیکن با توجه به نتیجه به‌دست‌آمده از بررسی سرور MutPred، پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی غیر مترادف D178V با نمره G-score، 0.859 و نمره P-score، 0.0266 با مکانیسم مولکولی افزایش صفحات بتا (Gain of sheet)، به‌عنوان زیان-آورترین nsSNP از مجموع ۱۰۵ مورد پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی غیر مترادف با نمره SIFT برابر ۰ و نمره PSIC برابر

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

۱ مطرح است. ازآنجاکه این پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی غیر مترادف، ایزوفرم پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی غیر مترادف D178N که یک پلی‌مورفیسم پاتوژن در ناحیه مارپیچ آلفای ۲ در ساختار پروتئین است، ناحیه‌ای حساس از پروتئین برای شروع ناپایداری‌های ساختاری است و با توجه به این‌که در مورد این جایگزینی، یک اسیدآمینه آب‌دوست (D) به یک اسیدآمینه آب‌گریز (V) تبدیل می‌شود و همچنین با عنایت به اینکه نتایج اخیر با مطالعات آزمایشگاهی نیز همخوانی دارد (۳۶، ۵۶-۵۹) بنابراین می‌توان چنین ادعا کرد که پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی غیر مترادف D178V با کد شناسه rs11538766 می‌تواند کاندیدای مناسبی برای انجام تحقیقات آزمایشگاهی به‌منظور تخمین میزان زیان‌بار بودن جهش موردبررسی باشد.

نتیجه‌گیری

با بررسی ۱۰۵ مورد nsSNP به‌دست‌آمده از پایگاه داده SNP برای پروتئین پریون انسانی با ۸ سرور بیوانفورماتیکی SIFT، PolyPhen-2، I-Mutant-3.0، PANTHER، SNPs&GO، PHD-SNP، Meta-SNP و MutPred جایگزینی اسیدآمینه‌ی والین به‌جای آسپارتیک اسید در جایگاه ۱۷۸ با شناسه rs11538766 و همچنین مکانیسم مولکولی پیش‌گویی شده توسط سرور MutPred برای این nsSNP به‌صورت افزایش ایجاد صفحات بتا (Gain of sheet) به‌عنوان زیان‌آورترین nsSNP در ساختار پروتئین PRNP پیش‌بینی شد و از بررسی کل توالی اسیدآمینه‌ای پروتئین پریون انسانی به‌وسیله سرورهای FoldAmyloid و AmylPerd، توالی‌های اسیدآمینه‌ای ۱۵-۵، ۱۷۴-۱۷۸، ۱۸۰-۱۸۴، ۲۱۱-۲۱۷ و ۲۵۲-۲۴۰ به‌طور مشترک توسط هر ۲ سرور به‌عنوان حساس‌ترین توالی‌های اسیدآمینه‌ای در ایجاد آمیلوئیدی شدن در ساختار این پروتئین پیش‌بینی گردید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از دانشگاه پیام نور استهبان و سایر عزیزانی که در به انجام رسیدن تحقیق اخیر، ما را حمایت و راهنمایی کردند تشکر و قدردانی نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض منافعی را اعلام نکرده اند.

References

1. Puckett C, Concannon P, Casey C, Hood L. Genomic structure of the human prion protein gene. Am J Hum Genet. 1991;49(2):320-329.
2. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(5):2042-7.
3. Zahn R, Liu A, Lührs T, Riek R, Von Schroetter C, García FL, et al. NMR solution structure of the human prion protein .Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(1):145-50.
4. DeMarco ML, Silveira J, Caughey B, Daggett V. Structural properties of prion protein protofibrils and fibrils: an experimental assessment of atomic models. Biochem. 2006;45(51):15573-82.
5. Govaerts C, Wille H, Prusiner SB, Cohen FE. Evidence for assembly of prions with left-handed β-helices into trimers. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101(22):8342-7.
6. Cobb NJ, Sönnichsen FD, Mchaourab H, Surewicz WK. Molecular architecture ofhuman prion protein amyloid: A parallel, in-register β-structure. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(48):18946-51.
7. Gossert AD, Bonjour S, Lysek DA, Fiorito F, Wüthrich K. Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(3):646-50.
8. Perez-Pineiro R, Bjorndahl TC, Berjanskii MV, Hau D, Li L, Huang A, et al. The prion protein binds thiamine. FEBS J. 2011;278(21):4002-14.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

9. Mariante RM, Nóbrega A, Martins RA, Areal RB, Bellio M ,Linden R. Neuroimmunoendocrine regulation of the prion protein in neutrophils. J Biol Chem. 2012;287(42):35506-15.
10. Kovacs GG, Budka H. Molecular pathology of human prion diseases. Int J Mol Sci. 2009;10(3):976-99.
11. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, et al. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. J Neurosci.1999;19(20):8866-75.
12. Sekijima M, Motono C, Yamasaki S, Kaneko K, Akiyama Y. Molecular dynamics simulation of dimeric and monomeric forms of human prion protein: insight into dynamics and properties. Biophys J. 2003;85(2):1176-85.
13. Alonso DO, DeArmond SJ, Cohen FE, Daggett V. Mapping the early steps in the pH-induced conformational conversion of the prion protein. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98(6):2985-9.
14. DeArmond SJ. Discovering the mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. Neurochem Res. 2004;29(11):1979-98.
15. Linden R, Martins VR, Prado MA, Cammarota M, Izquierdo I, Brentani RR. Physiology of the prion protein. Physiol Rev. 2008;88(2):673-728.
16. Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases. Virol J. 2011;8(1):1-9.
17. Pan KM, Baldwin M, Nguyen J, Gasset M, Serban A, Groth D, et al. Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90(23):10962-6.
18. Dearmond SJ, Prusiner SB .Etiology and pathogenesis of prion diseases. Am J Pathol.1995;146(4):785-811.
19. Wadsworth JD, Hill AF, Beck JA, Collinge J. Molecular and clinical classification of human prion disease. Br Med Bull. 2003;66(1):241-54.
20. Demarco ML, Daggett V. Characterization of cell-surface prion protein relative to its recombinant analogue: insights from molecular dynamics simulations of diglycosylated, membrane-bound human prion protein. J Neurochem. 2009;109(1):60-73.
21. Villa A, Mark AE, Saracino GA, Cosentino U, Pitea D, Moro G, et al. Conformational polymorphism of the PrP106-126 peptide in different environments: a molecular dynamics study. J Phys Chem B. 2006;110(3):1423-8.
22. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Lührs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. Arch Neurol. 2005;62(4):545-52.
23. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. Curr Opin Struct Biol. 2009;19(1):14-22.
24. Dima RI, Thirumalai D. Exploring the propensities of helices in PrP C to form β sheet using NMR structures and sequence alignments. Biophys J. 2002;83(3):1268-80.
25. Dima RI, Thirumalai D. Probing the instabilities in the dynamicsof helical fragments from mouse PrPC. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(43):15335-40.
26. Gendoo D, Harrison PM. Discordant and chameleon sequences: their distribution and implications for amyloidogenicity. Protein Sci. 2011;20(3):567-79.
27. Kuznetsov IB, Rackovsky S. Comparative computational analysis of prion proteins reveals two fragments with unusual structural properties and a pattern of increase in hydrophobicity associated with disease-promoting mutations. Protein Sci. 2004;13(12):3230-44.
28. Khorvash M, Lamour G, Gsponer Jr. Long-time scale fluctuations of human prion protein determined by restrained MD simulations. Biochem. 2011;50(47):10192-4.
29. Ziegler J, Sticht H, Marx UC, Müller W, Rösch P, Schwarzinger S. CD and NMR Studiesof Prion Protein (PrP) Helix 1 NOVEL IMPLICATIONS FOR ITS ROLE IN THE PrPC→ PrPSc CONVERSION PROCESS. J Biol Chem.2003;278(50):50175-81.
30. Collins FS, Brooks LD, Chakravarti A. A DNA polymorphism discovery resource for research onhuman genetic variation. Genome Res. 1998;8(12):1229-31.
31. Lander ES. The new genomics: global views of biology. Sci. 1996;274(5287):536-9.
32.Studer RA, Dessailly BH, Orengo CA. Residue mutations and their impact on protein structure and function: detecting beneficial and pathogenic changes. Biochemical Journal. 2013;449(3):581-94.
33. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Res. 2003;31(13):3812-4.
34. Lee JH, Bae SE, Jung S, Ahn I, Son HS. Discriminant analysis of prion sequences for prediction of susceptibility. Exp Mol Med. 2013;45(10):e48.
35. Sabate R, Rousseau F, Schymkowitz J, Ventura S. What makes a protein sequence a prion? PLoS Comput Biol. 2015;11(1):e1004013.
36. JahandidehS, Zhi D. Systematic investigation of predicted effect of nonsynonymous SNPs in human prion protein gene: a molecular modeling and molecular dynamics study. J Biomol Struct Dyn.2014;32(2):289-300.
37. Kumar P, Henikoff S, Ng PC .Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. Nat Protoc. 2009;4(7):1073-81.
38. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7(4):248-9.
39. Capriotti E, Fariselli P, Rossi I, Casadio R. A three-state prediction of single point mutations on protein stability changes. BMC bioinformatics. 2008;9(2):1.
40. Capriotti E, CalabreseR, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. Bioinformatics. 2006;22(22):2729-34.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

41. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. Hum Mutat. 2009;30(8):1237-44.
42. Thomas PD, Campbell MJ, Kejariwal A, Mi H, Karlak B, Daverman R, et al. PANTHER: a library of protein families and subfamilies indexed by function. Genome Res. 2003;13(9):2129-41.
43. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, et al. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. Bioinformatics. 2009;25(21):2744-50.
44. Frousios KK, Iconomidou VA, Karletidi CM, Hamodrakas SJ. Amyloidogenic determinants are usually not buried. BMC Struct Biol. 2009;9(1):44.
45. Garbuzynskiy SO, Lobanov MY, Galzitskaya OV. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence. Bioinformatics. 2010;26(3):326-32.
46. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Res. 2001;29(1):308-11.
47. Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A. McKusick's online Mendelian inheritance in man (OMIM®). NucleicAcidsRes. 2009;37(suppl 1):D793-D6.
48. Goldfarb L, Mitrová E, Brown P, Toh BH, Gajdusek DC. Mutation in codon 200 of scrapie amyloid protein gene in two clusters of Creutzfeldt-Jakob disease in Slovakia. Lancet. 1990;336(8713):514-5.
49. Rodríguez-Martínez AB, Barreau C, Coupry I, Yagüe J, Sánchez-Valle R, Galdós-Alcelay L, et al. Ancestral origins of the prion protein gene D178N mutation in the Basque Country. Hum Genet. 2005;117(1):61-9.
50. Marcon G, Indaco A, Di Fede G, Suardi S, Finato N, Moretti V, et al. Panencephalopathic Creutzfeldt-Jakob Disease with Distinct Pattern of Prion Protein Deposition in a Patient with D178N Mutation and Homozygosity for Valine at Codon 129 of the Prion Protein Gene. Brain Pathol. 2014;24(2):148-51.
51. Piccardo P, Dlouhy SR, Lievens PM, Young K, Phil D, Bird TD, et al. Phenotypic variability of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease is associated with prion protein heterogeneity. J Neuropathol Exp Neurol. 1998;57(10):979-88.
52. Vanik DL, Surewicz WK. Disease-associated F198S mutation increases the propensity of the recombinant prion protein for conformational conversion to scrapie-like form. J Biol Chem. 2002;277(50):49065-70.
53. Capellari S, Cardone F, Notari S, Schininà M, Maras B, Sità D, et al. Creutzfeldt-Jakob disease associated with the R208H mutation in the prion protein gene. Neurol. 2005;64(5):905-7.
54. Jansen C, Parchi P, Capellari S, Strammiello R, Dopper EG, van Swieten JC, et al. A second case of Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease linked to the G131V mutation in the prion protein gene in a Dutch patient. J Neuropathol Exp Neurol. 2011;70(8):698-702.
55. Krebs B, Lederer RM, Windl O, GrasbonFrodl EM, Zerr I, Kretzschmar HA. Creutzfeldt-Jakob disease associated with an R148H mutation of the prion protein gene. Neurogenet. 2005;6(2):97-100.
56. Chikan NA, Bukhari S, Shabir N, Amin A, Shafi S, Qadri RA, et al. Atomic Insight into the Altered O 6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Protein Architecture in Gastric Cancer. PloS one. 2015 May 26;10(5):e0127741.
57. Kumar A, Purohit R. Use of long term molecular dynamics simulation in predicting cancer associated SNPs. PLoS Comput Biol. 2014;10(4):e1003318.
58. Kumar CV, Kumar K, Swetha R, Ramaiah S, Anbarasu A. Protein aggregation due to nsSNP resulting in P56S VABPprotein is associated with amyotrophic lateral sclerosis. J Theor Biol.2014;354:72-80.
59. Doss CGP, Rajith B, Rajasekaran R, Srajan J, Nagasundaram N, Debajyoti C. In silico analysis of prion protein mutants: a comparative study by molecular dynamics approach. Cell Biochem Biophys. 2013;67(3):1307-18.

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]

Original Article

Bioinformatic Analysis of Deleterious Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphisms (nsSNPs) in the Coding Regions of Human Prion Protein Gene (PRNP)

Bamdad K[1*], Rahimi Gharemirshamlu F[2], Naeimi S[2]

1- Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University (PNU), Iran
2- Department of Genetic, Colleague of Science, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

Received: 24 Apr 2016 Accepted: 16 Jul 2016

Abstract

Background & Objective: Single nucleotide polymorphisms are the cause of genetic variation to living organisms. Single nucleotide polymorphisms alter residues in the protein sequence. In this investigation, the relationship between prion protein gene polymorphisms and its relevance to pathogenicity was studied.

Material & Method: Amino acid sequence of the main isoform from the human prion protein gene (PRNP) was extracted from UniProt database and evaluated by FoldAmyloid and AmylPred servers. All non-synonymous single nucleotide polymorphisms (nsSNPs) from SNP database (dbSNP) were further analyzed by bioinformatics servers including SIFT, PolyPhen-2, I-Mutant-3.0, PANTHER, SNPs & GO, PHD-SNP, Meta-SNP, and MutPred to determine the most damaging nsSNPs.

Results: The results of the first structure analyses by FoldAmyloid and AmylPerd servers implied that regions including 5-15, 174-178, 180-184, 211-217, and 240-252 were the most sensitive parts of the protein sequence to amyloidosis. Screening all nsSNPs of the main protein isoform using bioinformatic servers revealed that substitution of Aspartic acid with Valine at position 178 (ID code: rs11538766) was the most deleterious nsSNP in the protein structure.

Conclusion: Substitution of the Aspartic acid with Valine at position 178 (D178V) was the most pathogenic mutation in the human prion protein gene. Analyses from the MutPred server also showed that beta-sheets' increment in the secondary structure was the main reason behind the molecular mechanism of the prion protein aggregation.

Keywords: Non-Synonymous Single Nucleotide Polymorphism, Human Prion Protein, D178V

***Corresponding author: Kourosh Bamdad,** Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University (PNU), Iran
Email: k.bamdad@farspnu.ac.ir

Journal of Fasa University of Medical Sciences (2016) 6: 380-388

[Downloaded from journal.fums.ac.ir on 2025-07-12]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2016.6.3.17.3]