ژنتیک نوین
دوره سیزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۷
صفحه ۱۷۹ - ۱۷۵

پیش‌بینی اثراتSNP غیرمترادف ژن Hsp70 گاومیش بر ساختار و عملکرد پروتئین آن

Prediction of nonsynonymous SNP consequences in heat shock protein 70 (Hsp70) gene of *bubalus bubalis* on structure and function of its protein

آرزو عسکری راد[۱]، جمال فیاضی*[۲]، محمود نظری[۲]، محمدرضا حجاری[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- به‌ترتیب دانشیار، استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، گروه علوم دامی

۳- استادیار، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه ژنتیک

Askari Rad A[1], Fayazi J[*2], Nazari M[2], Hajjari MR[3]

1- MSc Student, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor, Assistant Professor, Khuzestan Agricultural Sciences and Natural Resources University, Department of Animal Science
3- Assistant Professor, Shahid Chamran University of Ahvaz, Department of Genetic

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: j_fayazi@ramin.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۲/۱۳)

چکیده

پیشرفت‌های اخیر در توالی‌یابی DNA و الگوریتم‌های محاسباتی منجر به تشخیص اسنیپ‌هایی با ارزش بالاتر شده‌است. از طرفی مطالعه آزمایشگاهی آلل‌های حاصل از اسنیپ‌ها دشوار و زمان‌بر است. در این تحقیق از چندین الگوریتم محاسباتی برای بیان تاثیر ساختار و عملکرد اسنیپ‌های ژن پروتئین شوک حرارتی۷۰ (HSP70) بر عملکرد پروتئین در ژنوم گاومیش استفاده شد. HSP70 یک چاپرون مولکول است که در پاسخ به استرس بیان می‌شود. از سویی دیگر گاومیش یکی از دام‌های مقاوم به استرس گرمایی است. در این بررسی از تراشه اسنیپ 90K افیمتریکس در۱۱۲ گاومیش خوزستانی و اطلاعات توالی منتشر شده برای گاومیش هندی استفاده شده‌است. در Data Set گاومیش خوزستانی اسنیپی یافت نشد، اما در Data Set گاومیش هندی، یک اسنیپ تشخیص داده شد. آنالیز اسنیپ M5T (Methionine/Threonine) با استفاده از نرم‌افزارهای SIFT, PROVEAN انجام شد. SIFT با محاسبه ضریب ۱ و الگوریتم PROVEAN با محاسبه ضریب ۰/۳۳ این جهش یا اثر اسنیپ را غیر مخرب و پروتئین را با عملکرد طبیعی نشان دادند. الگوریتم I-mutant که برای بررسی ثبات پروتئین جهش یافته hsp70 استفاده شد و تاثیر اسنیپ بر پایداری و استحکام پروتئین را با کمک رگرسیون براساس تغییر در انرژی آزاد (DDG=۰/٤۷) پیش‌بینی می‌کند، نشان داد که اسنیپ Met5Thr در دمای ۲۵درجه سانتی‌گراد و pH=۷ ثبات پروتئین را کمی کاهش می‌دهد. اعتبارسنجی مدل به‌کمک نقشه‌های راماچاندران و Prosa Z-Score حاکی از انحراف جزئی در پروتئین جهش‌یافته در مقایسه با مدل طبیعی است. داکینگ مولکولی نحوه اتصال HSP70 به لیگاندش آدنوزین دی فسفات (ADP) در هر دو مدل طبیعی و جهش‌یافته نشان می‌دهد که جهش منجر به کاهش پایداری پروتئین و تغییر ساختار آن می‌شود که ضمن تغییر ساختار جایگاه اتصال لیگاند نیز تغییر می‌کند. با این وجود به‌طورکلی جهش پیدا شده تاثیر مخرب و بزرگی بر ساختار پروتئین در این بررسی نشان نمی‌دهد.

واژه‌های کلیدی

اسنیپ
پروتئین شوک حرارتی ۷۰
گاومیش
داکینگ
همولوژی مدلینگ

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.16.3]

مقدمه

در حوزه ژنتیک و اصلاح، اطلاع از ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها می‌تواند کمک بزرگی برای برنامه‌ریزی در اجرای طرح‌های اصلاح نژادی و از همه مهم‌تر، حفظ ذخایر ژنتیکی باشد. روش‌های مولکولی و استفاده از نشانگرهای مولکولی در این زمینه یکی از بهترین گزینه‌ها به حساب می‌آید، زیرا با توجه به اطلاعات زیادی که به‌دست می‌دهد می‌تواند نتایجی که از تجزیه و تحلیل رکوردها با روش‌های آماری به‌دست آمده است را تأیید و تکمیل نموده و حتی ممکن است که آن‌ها را رد کند (Alinaghizadeh et al. 2010). به‌علاوه، استفاده از ژنتیک ملکولی فواید زیادی دارد که یکی از این فواید معنی‌دار تعیین ژنوتیپ افراد برای جایگاه خاصی است (Mousavizadeh et al. 2009) هم‌چنین استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در انتخاب و اصلاح نژاد حیوانات ممکن است به‌طور مهیجی پیشرفت ژنتیکی را تسریع کند (Javanmard et al. 2008). هم‌چنین مطالعه تنوع ژنتیکی نژادهای بومی برای حفاظت از منابع ژنتیکی ذخایر بومی لازم و ضروری است (Mohammadi et al. 2009). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای بومی و محلی بسیار اهمیت دارد (Shojaei et al. 2010; Zamani et al. 2013).

پروتئین‌های شوک حرارتی، حفظ‌کننده فیلوژنتیکی محصولات ژن هستند که کاتالیزکننده مناسبی برای تاخوردگی مجدد پروتئین‌های تغییریافته در طول دناتوره شدن یا دیگر حوادث فیزیکوشیمیایی هستند. ترکیب مناسب و عمل این پروتئین‌ها در طول تغییرات زیست محیطی و هم‌چنین در حفظ فعالیت‌های عادی و بیوشیمیایی سلول برای زنده‌مانی سلول ضروری هستند (Marai et al. 2014). شرایط استرس گرمایی اثرات منفی بر پارامترهای تولیدی شامل: تخمک‌گذاری، تولیدشیر، مصرف خوراک، سرعت رشد و سلامتی حیوان دارد. نگرانی در مورد اثرات تنش محیطی در سال‌های اخیر افزایش یافته است. تاکنون به‌طور کامل مشخص نشده است که استرس گرمایی چرا و چگونه بر تولید شیر تاثیر می‌گذارد. گاومیش تنها در مناطق مرکزی دنیا، آسیا، بعضی کشورها در اروپا شرقی و بیش‌تر کشورهای آمریکا لاتین یافت می‌شود. گاومیش‌های آبی به دو گونه تقسیم می‌شوند: گاومیش‌های باتلاقی و گاومیش‌های رودخانه‌ایی. گاومیش و تولیدات اقتصادی آن تحت تاثیر تعداد زیادی فاکتور است مخصوصا شرایط محیطی و خوراک، که تاثیر بعضی فاکتورها ممکن است بیش‌تر باشد، اثر منفی درجه حرارت محیطی بالا بر اشتها و مصرف خوراک در نهایت با رشد کند و اختلال در تولیدمثل به پایان می‌رسد (Patir et al. 2010). فهمیدن تنوع DNA در ژنوم می‌تواند به‌طور اساسی اجزاء ژنتیکی صفات انطباقی پیچیده را شناسایی و تفسیر کند. تحمل حرارت یک صفت کمی است که جهش در ژن آن، اثرات مختلفی بر رفتار تحمل حرارت دارد (Sodhi et al. 2013). گاهی اوقات ایجاد جهش در نواحی پروموتر ژن یا نواحی اینترون ژن سبب تغییر در بیان رونویسی ژن و پایداری RNA و در نهایت تغییر بیان پروتئین مربوطه می‌گردد (Bhattacharya et al. 2016). یافتن اثر تغییر یک نوکلئوتید در ژنوم دام بر روی عملکرد دام، حوزه مطالعاتی بنام پویش ژنومی (GWAS) را ایجاد نموده است. بر این اساس تراشه‌های اسنیپ با تراکم مختلف برای هر دام طراحی شده‌است. با توجه به اینکه اخیرا تراشه اسنیپ برای گاومیش خوزستان در دسترس قرار گرفت، لذا یافتن اسنیپ‌های احتمالی در بخشی از ژنوم مرتبط با استرس گرمایی (پروتئین شوک حرارتی۷۰) در دام مقاومی هم‌چون گاومیش و برآورد اثر جهش منجر به اسنیپ بر روی عملکرد پروتئین، حاصل از اهداف این تحقیق بود. برای این بررسی از دو مجموعه داده (data set) استفاده شد. الف) اطلاعات ژنوتایپینگ ۱۱۲ گاومیش خوزستانی که به‌کمک تراشه اسنیپ 90k شرکت افیمتریکس تعیین ژنوتایپ شده‌اند و پس از اعمال فیلترهای معمول و مرسوم، بیش از ۸۰ هزار اسنیپ را در سرتاسر ژنوم نشان دادند و ب) توالی‌های منتشر شده در بستر اینترنت برای گاومیش هندی. گاومیش‌های خوزستانی با استفاده از آرایه‌های Genotyping Array Axiom Buffalo 90k در شرکت افی‌متریکس و با استفاده از پروتکل استاندارد افی‌متریکس ژنوتیپ شدند. آرایه‌های طراحی شده جهت تعیین ژنوتیپ گاومیش، امکان ژنوتیپ ۸۹۹۸۰ جایگاه مارکری SNP را فراهم می‌آورد. هر چیپ دارای ۹۶ آرایه می‌باشد و هر آرایه برای بررسی یک حیوان مورد استفاده قرار می‌گیرد. توالی پروتئینی مربوط به گاومیش هندی با شماره دستیابی (ADQ27309.1) از پایگاه داده پروتئین

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.16.3]

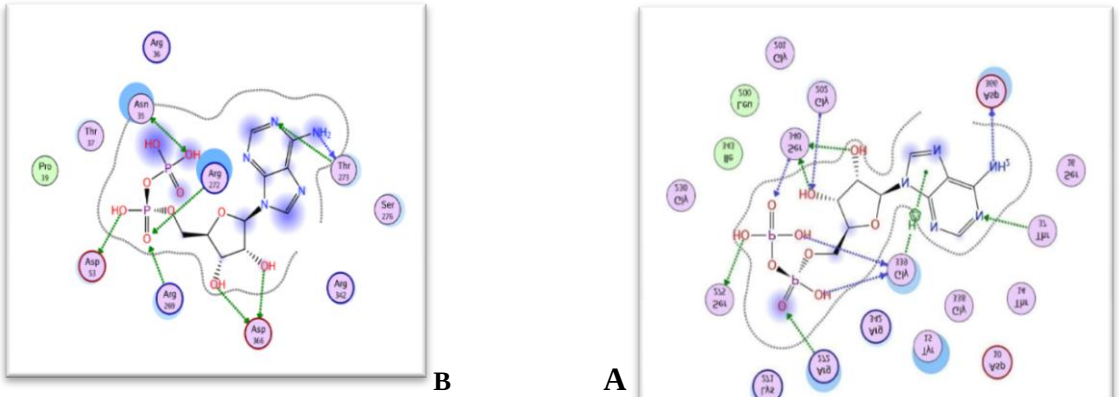
موجود در مرکز ملی اطلاعات بیولوژی (NCBI) به‌دست آمد. ساختارهای الگو از پایگاه داده پروتئین (PDB) با مشخصات (5FPN_A, 3C7N_B, 1YUW_A, 2V7Z_A, 2E88_A, 2E8A_A, 3A8Y_A, 5BN8_A, 3JXU_A 5BN8_A,3JXU_A, 5BN9_A) برای مدل‌سازی به‌دست آمدند. ساختار سه‌بعدی پروتئین برای پیش‌بینی اثر اسنیپ‌های غیرمترادف بر ساختار کلی پروتئین بسیار موثر می‌باشد (Topham et al. 1997). برای مدل‌سازی، ساختارهای همولوگ از پایگاه داده پروتئین (PDB) به‌دست آمدند. توالی‌های شناسایی شده از مدل‌های انتخاب شده، با پروتئین hsp70 گاومیش ٨٦٪، ٨٩٪، ٨٨٪ و، ٩٩٪ شباهت داشتند. پیش‌بینی شکل سه بعدی پروتئین hsp70 گاومیش با سه نرم‌افزار MODEL، SWISS-MODELER و I-TASER انجام شده‌است. سپس مدل‌های ساخته‌شده با نقشه‌های راماچاندران اعتبارسنجی شده‌اند. برای افزایش صحت مدل نهایی، مجددا سه مدل ساخته شده به‌همراه توالی پروتئینی hsp70 گاومیش به نرم‌افزار مدلر داده شد. مدل نهایی مدلی است که توسط نرم‌افزار مدلر ساخته می‌شود (شکل A٢). تابع ارزیابی نرم‌افزار برای مدل ساخته شده : Dope Score می‌باشد که هر چقدر Dope Score منفی‌تر باشد، مدل بهتر ترسیم شده‌است (Fiser et al. 2003). تابع ارزیابی شده برای این مدل،Dope Score=-37503 می‌باشد. مدل جهش‌یافته hsp70 گاومیش پس از اعمال جهش Met5Thr (با استفاده از نرم‌افزار MOE)، ساخته شد (شکل B٢). اعتبار سنجی هر دو مدل با استفاده از نقشه‌های راماچاندران و pro-SA انجام شد. در نقشه، زوایای فی و سای برای مدل طبیعی ساخته شده توسط نرم‌افزار مدلر ٩٠ درصد در منطقه ایده آل، ٤ درصد در منطقه مجاز و ٤ درصد در منطقه‌ی غیرمجاز می‌باشد. در مقایسه نتایج Rampage مدل جهش‌یافته با مدل طبیعی، ٨٧ درصد از مدل جهش‌یافته در منطقه ایده‌آل می‌باشد که در مقایسه با مدل طبیعی این مقدار کاهش‌یافته است، ١٠ درصد درمنطقه مجاز که این مقدار نسبت به مدل طبیعی افزایش‌یافته است و دو درصد درمنطقه غیرمجاز می‌باشد. این نتایج نشان می‌دهد که جهش منجر به تغییر مدل از منطقه ایده‌آل به منطقه قابل قبول شده‌است. نرم‌افزار Pro-SA با استفاده از برآورد Z-SCORE انرژی کلی را برای هر دومدل طبیعی و جهش‌یافته محاسبه می‌کند. ارزش Z-SCORE برای مدل طبیعی و جهش‌یافته به‌ترتیب ٧/٨٥- و ٦/٦٢- برآورد شده‌است. این نتایج نشان می‌دهد که یک انحراف جزئی در پروتئین جهش‌یافته در مقایسه با مدل طبیعی وجود دارد. تغییر در یک آمینواسید ممکنه باعث تخریب جایگاه اتصال لیگاند یا جایگاه اتصال پروتئین شود و بر عملکرد پروتئین با استفاده از تغییر ثبات پروتئین یا سرعت تاخوردگی پروتئین تاثیرگذار باشد (Rasel et al. 2015). به هر حال جایگزینی یک آمینواسید در توالی پروتئینی ممکنه بر میل اتصال پروتئین به لیگاندش تاثیرگذار باشد (Ng et al. 2001). متیونین در مکانیسم دفاعی آنتی‌اکسیدانی و هم‌چنین در تنظیم متابولیسم سلولی نقش مهمی دارد، یکی از نقش‌های دفاعی آن باعث حفاظت سلول در برابر آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود (Levine et al. 1998) طبق پیش‌بینی نرم‌افزار SIFT PROVEAN، این اسنیپ یک اسنیپ طبیعی و غیرمخرب می‌باشد و در اکتیوسایت نمی‌باشد، طبق پیش‌بینی I-MUTANT این اسنیپ با ارزش DDG=٠/٤٧ باعث کاهش ثبات پروتئین می‌شود .

جدول١- نتایج پیش‌بینی شده برای اسنیپ غیرمترادف و تغییر اسیدآمینه M5T توسط سه نرم‌افزار SIFT، PROVEAN و I-MUTANT

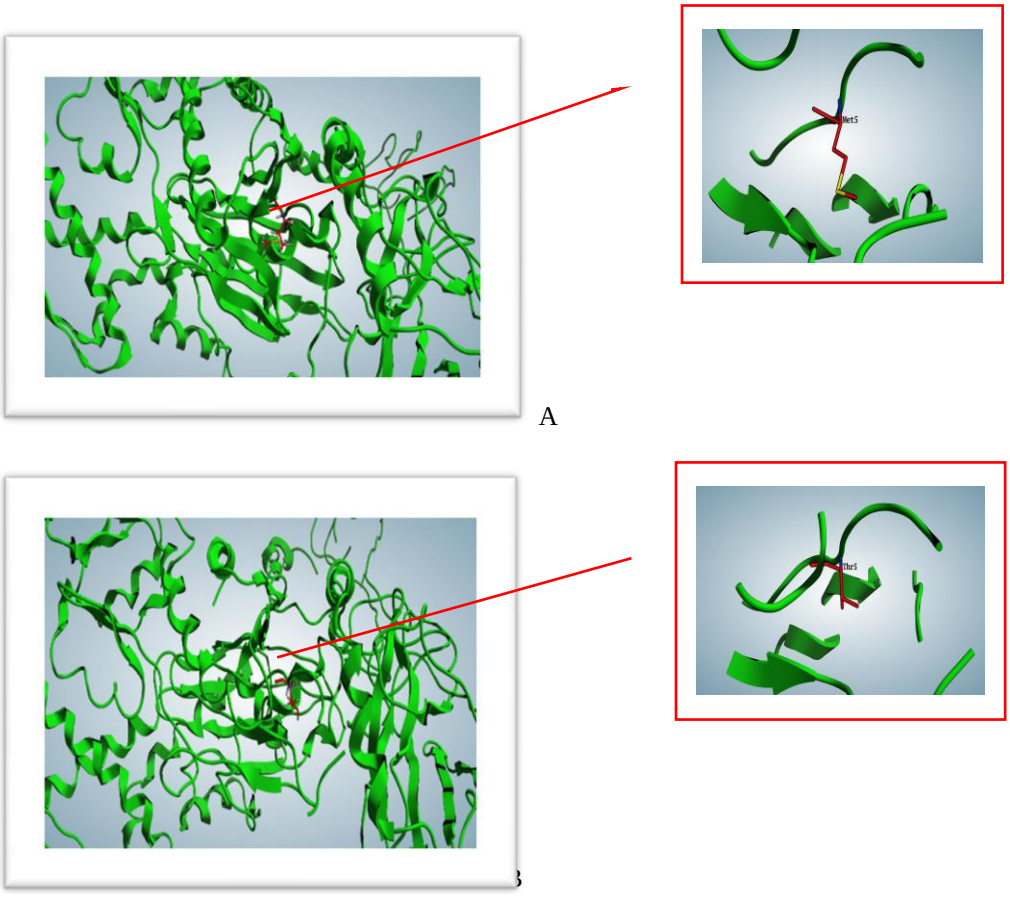
نتایج SIFT		نتایج PROVEAN		نتایج I.MUTANT	
مقدار پارامتر	عملکرد	مقدار پارامتر	عملکرد	امتیاز DDG *	عملکرد
١	قابل تحمل	٠/٣٣	طبیعی	٠/٤٧	کاهش می‌یابد

* این امتیاز در دمای ٢٥ و pH برابر ٧ به‌دست آمده است.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.16.3]



شکل ۱- دیاگرام اینترکشن میان پروتئین طبیعی و جهش‌یافته با لیگاند. اینترکشن میان پروتئین hsp70 طبیعی با لیگاندش ADP (A). اینترکشن میان hsp70 جهش‌یافته با لیگاندش ADP (B).



شکل ۲- مدل طبیعی و جهش‌یافته HSP70. مدل طبیعی (A) با نرم‌افزار مدلر طراحی شده‌است که اسیدآمینه متیونین طبیعی را در جایگاه ۵ نشان می‌دهد. مدل پروتئین hsp70 جهش‌یافته که آمینواسید تغییریافته ترئونین را نشان می‌دهد.

نقشه‌های راماچاندران در هر دو ساختار طبیعی و جهش‌یافته نشان‌می‌دهند که جهش باعث تغییر در چه مناطقی شده‌است. بنابراین میل اتصال ADP به هر دو ساختار طبیعی و جهش‌یافته hsp70 با استفاده از نرم‌افزار AutoDock4.2 (با گرید باکس: ۸۰×۸۰×۸۰) (تعداد ران: ۱۰۰ران) (الگوریتم: ژنتیک لاماکرین) بررسی شد. ضمن بررسی نتایج داکینگ و مقایسه داکینگ دو مدل طبیعی و جهش‌یافته، سه آمینواسید کلیدی که در پاکت حضور دارند شامل: ASP366,ArG272,Gly339 می‌باشد که در مقایسه دو مدل جهش‌یافته و طبیعی، جهش باعث تغییر جایگاه اتصال لیگاند شده است که لیگاند به GLy339 متصل نشده‌است و به

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.16.3]

اسیدآمینه دیگری متصل شده‌است (شکل۱). در نتایج هکس (Hex 8.0.0) برای اینترکشن میان پروتئین اولیه و لیگاندش، انرژی اتصال: ۳۰۵/۶۰- و در مدل جهش یافته انرژی اتصال ۲۸۲/۵۲- گزارش شد. این یافته‌ها با استفاده از تغییر در زوایا فی و سای و انحراف Z-SCORE حمایت می‌شوند. هم‌چنین تغییر در جایگاه اتصال لیگاند نیز تغییر ساختار و ثبات پروتئین را تایید می‌کند. این نتایج پیشنهاد می‌کنند که ساختار اولیه hsp70 در مقایسه با ساختار جهش‌یافته بیشترقابل قبول است. با توجه به نقشی که hsp70 در فولدینگ پروتئین‌های دیگر دارد (Mayer et al. 2005) و تغییری که این جهش می‌تواند در پایداری پروتئین ایجاد کند و تغییر در ساختار پروتئین و جایگاه اتصال لیگاند می‌تواند بر عملکرد پروتئین موثر باشد، اما این تاثیر خیلی چشمگیر نخواهد بود.

سپاسگزاری

از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به‌خاطر حمایت مالی و معنوی و از جناب آقای دکتر محمدمهدی رنجبر به‌خاطر توصیه های علمی کمال تشکر را داریم.

منابع

Alinaghizadeh H, Mohammad Abadi MR, Zakizadeh S (2010) Exon 2 of BMP15 gene polymorphism in Jabal Barez Red Goat. Journal of Agricultural Biotechnology 2:69-80 (In Farsi).

Bhattacharya R, Rose PW, Burley SK, Prlic A (2016) Impact of genetic variation on three dimensional structure and function of proteins. PLOS One 12:e0171355.

Fiser A, Sali A (2003) Modeller:generation and refinement of homology-based protein structure models. Methods Enzymology 374:461-491.

Javanmard A, Mohammad Abadi MR, Zarrigabayi GE, Gharahedaghi AA, Nassiry MR, Javadmansh A, Asadzadeh N (2008) Polymorphism within the intron region of the bovine leptin gene in Iranian Sarabi cattle (Iranian Bos taurus). Russion Journal of Genetics 44:495-497.

Levine RL, Berlett BS, Moskovitz J, Mosoni L, Stadtman ER (1998) Methionine residues may protect proteins from critical oxidative damage. Mechanisms of Ageing and Development 107:323-332.

Marai IFM, Haeeb AAM (2010) Buffalo biological functions as affected by heat stress. Livestock science 127:89-109.

Mayer MP, Bukau B (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. Cellular and Molecular Life Science 62:670-684.

Mohammadi A, Nassiry MR, Mosafer J, Mohammadabadi MR, Suimova GE (2009) Distribution of BOLA-DRB3 allelic frequencies and identification of a new allele in the Iranian cattle breed Sistani (Bos Indicus). Russion Journal of Genetics 45:198-202.

Mousavizadeh A, Mohammadabadi MR, Torabi A, Nassiry MR, Ghiasi H, Esmailizadeh AK (2009) Genetic Polymorphism at the growth hormone locus in Iranian Talli goats by polymerase chain reaction- single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). Iranian Journal of Biotechnology 7:51-53.

Ng PC, Henikoff S (2001) Predicting deleterious amino acid substitutions. Genome Research 11:863-874.

Patir H, Upadhyay RC (2010) Purification, characterization and expression kinetics of heat shock protein 70 from Bubalus bubalis. Research in Veterinary Science 88:258-262.

Rasel KD, Chakrapani V, Patra SK , Jena S, Mohapatra SD, Nayak S, Sundaray JK, Jayasankar P, Barman HK (2015) Identification and prediction of the consequences of nonsynonymous SNPs in glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene of zebrafish Danio rerio. Turkish Journal of Biology 40:43-54.

Shojaei M, Mohammadabadi MR, Asadi Fozi M, Dayani O, Khezri A, Akhondi M (2010) Association of growth trait and leptin gene polymorphism in Kermani sheep. Journal of Cell and Molecular Research 2:67-73.

Sodhi M, Mukesh M, Kishore AM, Mishra BP, Kataria RS, Joshi BK (2013) Novel polymorphisms in UTR and coding region of inducible heat shock protein 70.1 gene in tropically adapted Indian zebu cattle (Bos indicus) and riverine buffalo (Bubalus bubalis). Gene 527:606-615.

Topham CM, Srinivasan N, Blundell TL (1997) Prediction of the stability of protein mutants based on structural environment-dependent amino acid substitution and propensity tables. Protein Engineering 10:7-21.

Zammani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2013) Genetic variation of Mehraban Sheep using two intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Afrighan Journal of Biotechnology 10:1812-1817.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1397.13.1.16.3]