

Analysis of Predicted Single Nucleotide Mutations in Functional Hot Spots of Aconitate Decarboxylase Enzyme in Inflammatory and Metabolic Processes of Cancer and Various Diseases Using Bioinformatics Tools

Saeed Pirmoradi^{1*}, Mohammad Darvish Khadem¹

1- Ph.D. in Biochemistry, Department of Biochemistry, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Corresponding Author: Saeed Pirmoradi, PhD in Biochemistry, Department of Biochemistry, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Email: pirmoradi150@gmail.com

Received: 4 Sep 2022

Accepted: 28 Oct 2022

Abstracte

Introduction: Inhibition of inflammatory processes in various diseases can have effective therapeutic applications. The effective function of cis-aconitate decarboxylase (CAD) enzyme, a product of IRG1 gene, in the inflammatory processes of various diseases has been recently proven in clinical studies. In humans, the enzyme (CAD) catalyzes cis-aconitic acid to itaconic acid.

Methods: In this work, with the help of bioinformatics tools, functional hotspots were identified and their position in ACOD1 structure was investigated. Then, the effects of all mutation modes at these points were investigated and more dangerous mutations were selected. Interactions of selected mutant enzymes with other proteins were evaluated and visualized.

Results: This article is a meta-analytical process, during the analysis of different mutations in the functional hot spots of ACOD1 enzyme, it was found that 9 mutations (A247C, A248T, A101C, L156P, A244P, N248C, N248F, E150Y, E150W) in the seven predicted hot spots have the most They had destructive effects in terms of functionality and reduced stability and interaction of ACOD1 enzyme with other proteins.

Conclusions: From the bioinformatic analysis of the results of the predicted SNPs of the functional hot spots of the human ACOD1 gene, finally, among all the studied mutations, 9 mutations were obtained that had more destructive effects on the ACOD1 enzyme function. which researchers can use to investigate their role and effectiveness in clinical processes and as diagnostic markers in cancer diseases related to inflammation or as possible drug targets. This insilico study provides a possible path to clarify the study of molecular mechanisms involved in inflammatory processes caused by IRG1 gene mutation and its protein product (ACOD1).

Keywords: Hotspots, Bioinformatics, Mutations, Aconite Decarboxylase.

تحلیل اثر جهشهای تک نوکلئوتیدی پیشگویی شده نقاط داغ عملکردی آنزیم اکونیتات دکربوکسیلاز در مسیرهای التهابی و متابولیسمی سرطانهای مختلف با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی

سعید پیرمرادی^{۱*}، محمد درویش خادم^۱

۱- دکتری بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

نویسنده مسئول: سعید پیرمرادی، دکتری بیوشیمی، گروه آموزشی بیوشیمی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
ایمیل: pirmoradi150@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۶

چکیده

مقدمه: مهار فرایندهای التهابی در بیماریهای مختلف مانند سرطان کاربردهای درمانی موثری میتواند داشته باشد. عملکرد موثر آنزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز (CAD) محصول ژن IRG1، در فرایندهای التهابی سرطانها مختلف جدیداً طی تحقیقاتی بالینی اثبات شده است. در انسان آنزیم (CAD) کاتالیز سیس اکونیتیک اسید به ایتاکونیک اسید را بر عهده دارد.

روش کار: در این کار با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی به شناسایی نقاط داغ عملکردی و بررسی جایگاه آن در ساختار ACOD1 پرداخته شد سپس به بررسی اثرات تمام حالات جهش در این نقاط پرداخته و جهش های خطرناکتر انتخاب شدند و پایداری ACOD1 در اثر جهش های بدست آمده بررسی شدند و برهم کنشهای آنزیم دارای جهشهای انتخاب شده با دیگر پروتئینها ارزیابی و مصورسازی شد.

یافته ها: این مقاله یک فرایند فراتحلیلی است که طی آنالیز جهشهای مختلف در نقاط داغ عملکردی آنزیم ACOD1 مشخص شد که ۹ جهش (A247C, A248T, A101C, L156P, A244P, N248C, N248F, E150Y, E150W) در هفت نقطه داغ پیش بینی شده دارای بیشترین اثر مخرب از لحاظ عملکردی و کاهش پایداری و برهمکنشی آنزیم ACOD1 با دیگر پروتئینها را داشتند.

نتیجه گیری: از تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی پیامدهای SNPهای پیش گوئی شده نقاط داغ عملکردی ژن ACOD1 انسانی در نهایتاً از بین تمام جهشهای مورد مطالعه ۹ جهش بدست آمد که اثر مخربتری بر عملکرد آنزیم ACOD1 داشتند که محققان می توانند از بررسی نقش و عملکرد اثرگذاری آنها در فرایندهای بالینی و نیز به عنوان نشانگرهای تشخیصی در بیماریهای سرطان وابسته به التهاب و یا به عنوان اهداف دارویی احتمالی استفاده کنند. این مطالعه *insilico* یک مسیر احتمالی برای روشن تر شدن مطالعه مکانیسمهای مولکولی درگیر در فرایندهای التهابی ناشی از جهش ژن IRG1 و محصول پروتئینی آن (ACOD1) را ارائه می دهد.

کلید واژه ها: نقاط داغ، بیوانفورماتیک، جهش، اکونیتات دکربوکسیلاز.

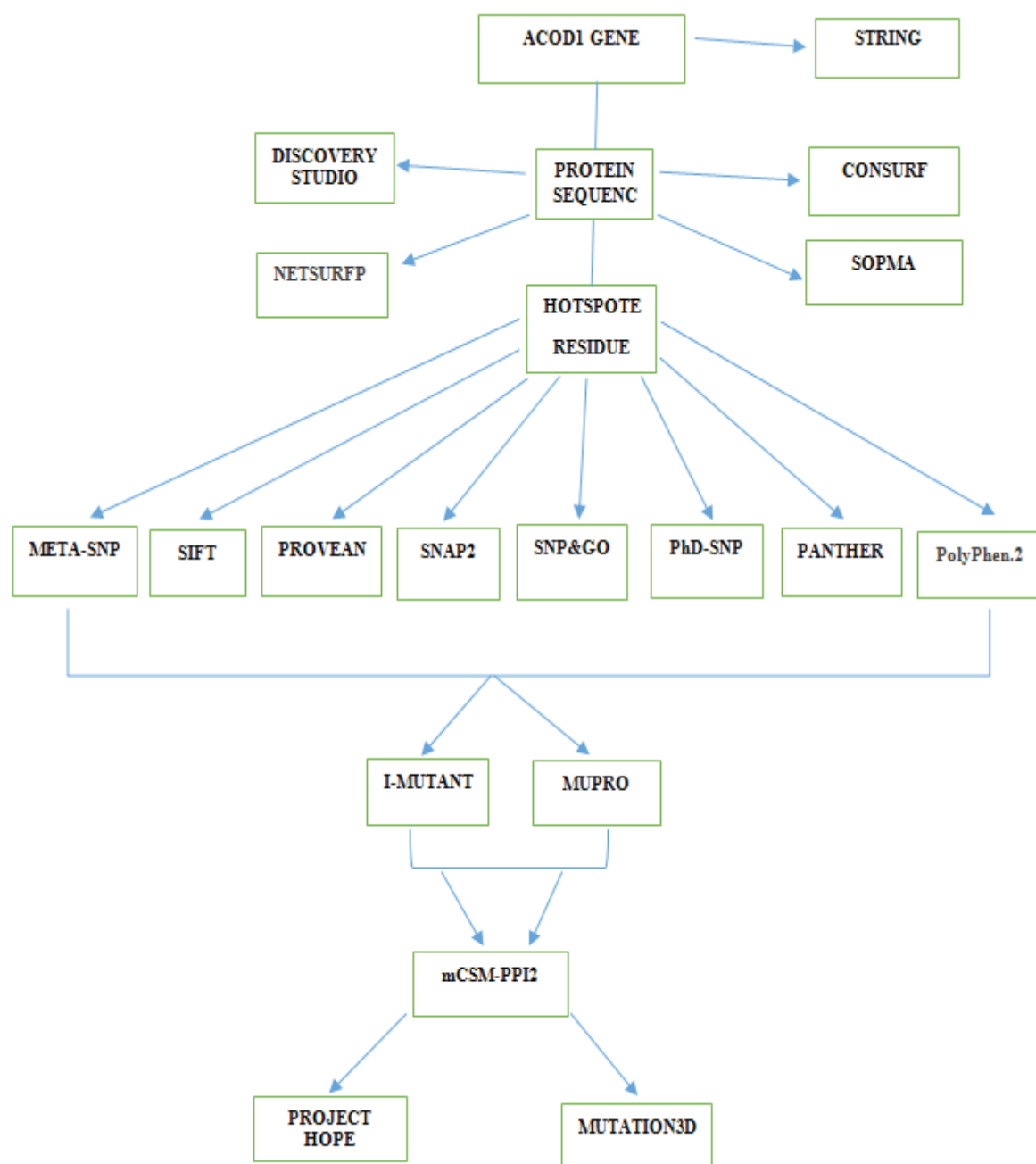
مقدمه

امروزه با توجه به پیشرفت تکنولوژی، غربالگری اولیه بیماریزایی مکان های جهش بر اساس تجزیه و تحلیل محاسباتی با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک به شکلی گسترده توسط دانشمندان مورد استفاده قرار گرفته است

(۱،۲). چندشکلی تک نوکلئوتیدی (SNP) از شایع ترین نوع عوامل تنوع ژنتیکی هستند (۳) زیرا منجر به تغییر در ساختار تاخوردگیها وعدم ثبات عملکرد پروتئین و اختلال در آنها می شوند (۴،۵). تغییرات ناشی از پلی مورفیسم ژن IRG1 که در انسان آنزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز (CAD) سنتز میکند کاتالیز سیس اکونیتیک اسید به

کننده اصلی آنتی اکسیدانی NRF2 و همچنین القا کردن فاکتور رونویسی ضدالتهابی فاکتور رونویسی فعال کننده ۳ (ATF3) می باشد. همچنین بر اساس نتایج حاصل از برخی مطالعات مختلف، مشاهده شده است که فعالیت آنزیم IRG1 در پاتوژنز و یا گسترش بیماری های عفونت تنفسی RSV در کودکان (۱۲)، رشد، تهاجم و تومورزایی سلول های گلیوما (۱۳)، تومور تخمدان (۱۴) و افزایش تومورهای پریتونال (۱۵) نقش قابل توجهی دارد. از طرف دیگر فعل و انفعالات متقابل بین پروتئین ها و بین پپتیدها، اسیدهای نوکلئیک یا لیگاندها نقشی حیاتی در هر فرآیند بیولوژیکی دارند. درک دقیق مکانیسم این فرآیندها مستلزم شناسایی آمینواسیدهای مهم عملکردی است که مسئول این فعل و انفعالات هستند. بدین خاطر از طریق برخی سرورهای بیوانفورماتیکی میتوان برای طراحی خودکار جهش ها و کتابخانه های هوشمند جهت مهندسی عملکرد پروتئین و پایداری ساختارهای پروتئینی استفاده کرد تا از این طریق و با شناسایی نقاط داغ جهش زایی در این پروتئین ها و بر اساس ادغام اطلاعات ساختاری، عملکردی و تکاملی به دست آمده از طریق این سری پایگاه داده بیوانفورماتیک و ابزارهای محاسباتی به پیشگویی و شناسایی جهشهای مضر موثر بر ساختار و عملکرد پروتئینهای مختلف در این نقاط داغ پرداخت. در این کار مطالعاتی پس از شناسایی نقاط داغ پروتئین مورد بررسی با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف پیش گویی کننده جهش های پاتوژنیک مختلف در این نقاط شد و بررسی پایداری پروتئین بعد از اعمال جهشهای مختلف در نهایت به شناسایی خطرناکترین جهشها در نقاط داغ بدست آمده و اثرات آنها در ساختار پروتئین بررسی شد. هدف اصلی این است تا بتوان به جهشهای اصلی و کلیدی این آنزیم که نقش مهمتری در بیماریهای مختلف دارند پی برد که از طریق شناسایی آنها راه های درمانی جدیدی که بواسطه اثر جهش های بدست آمده ارایه داد و نیز تغییرات مهم ساختاری پروتئین مذکور ناشی از جهش های پیشگویی شده و مستعد جهش را که در شکل گیری برخی بیماریها نقش دارند را جهت بررسی های تحقیقاتی آینده محققان و نقش آنها در شکل گیری برخی بیماریها معرفی کرد (جدول ۱).

ایتاکونیک اسید را در طول چرخه کربس بر عهده دارد و اختلال در عملکرد این ترکیب می تواند سرمنشاء بسیاری از مشکلات ناشی از اختلال در فرایند التهاب در بیماریهای مختلف از جمله انواع مختلف سرطان وابسته به التهاب باشد (۶،۷). این ژن تحت شرایط التهابی در ماکروفاژ و میکروگلیاها به شدت بیان می شود و نقش مهمی را در تنظیم مهار پاسخهای التهابی دارد. این ترکیب با تحریک بیان پروتئین TNFAIP3 ناشی از فاکتور نکروز تومور و از طریق گونه های اکسیژن فعال (ROS) در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS به عنوان یک تنظیم کننده منفی پاسخهای التهابی ذاتی و با واسطه گیرنده های Toll مانند (TLRs)، عمل می کند و در پاسخهای ایمنی ذاتی ضد میکروبی سلول های ایمنی نقش دارد و با تولید اسید ایتاکونیک با واسطه ACOD1 به فعالیت ضد میکروبی ماکروفاژها کمک می کند (۶،۷). همچنین در پاسخ ضد ویروسی به دنبال عفونت توسط فلاوی ویروس در نورون ها نقش دارد. تولید ایتاکونات با واسطه ACOD1 فعالیت سوکسینات دهیدروژناز را مهار می کند و یک حالت متابولیکی در نورون ها ایجاد می کند که تکثیر ژنوم های ویروسی را سرکوب می کند. به طور کلی در مطالعات صورت گرفته نقش ضد التهابی آنزیم IRG1 نشان داده شده که افزایش بیان این آنزیم، سبب کاهش معنی دار تولید $IL-6$ ، $TNF\alpha$ و $INF-\beta$ در ماکروفاژهای تحریک شده با LPS می شود (۸،۹) و ناک اوت کردن این ژن نیز سبب بدتر شدن پاسخ التهابی در ماکروفاژهای مغز استخوان (BMDM) موش تحریک شده با LPS و سلول های میلوئید عفونی شده با مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می شود (۱۰،۱۱). IRG1 در شرایط پیش التهابی مانند عفونت های باکتریایی و بیماری های التهابی مختلف مانند آسیب طناب نخاعی در پستانداران به میزان زیادی بیان می شود. محصول این پروتئین، ایتاکونات می باشد که به عنوان یک متابولیت ضدالتهابی، موجب کاهش تولید سیتوکین هایی مانند $IL-1\beta$ و $IL-6$ و در نتیجه سبب کاهش پاسخ های التهابی از طریق مکانیسم های مختلفی شامل مهار تولید گونه های فعال اکسیژن (ROS) ایجاد شده توسط سوکسینات دهیدروژناز (SDH)، فعال کردن پروتئین تنظیم



نمودار ۱: نمودار نحوه و مراحل اجرای کار تحقیقاتی

برای استنتاج در مورد عملکرد پروتئین‌های ناشناخته است. ورودی ژن مربوط به ACOD1 بود، در حالی که خروجی تصویری بود که تعامل شبکه بیولوژیکی بین ACOD1 و ژن‌های مرتبط با آن را نشان می‌دهد (۱۷). پیدا کردن جایگاه فعال انزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز و تعیین امینواسیدهای جایگاه فعال در این مرحله از نرم افزار دیسکاوری استودیو که نرم افزاری کاربردی جهت

تهیه توالی پروتئینی انزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز اطلاعات و دیتاهای مربوط به انزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز بر اساس کد دسترسی از طریق پایگاه داده UniProt A6NK06 و RCSB 6R6U (۱۶). بررسی شبکه برهم کنشی ژن سیس اکونیتات دکربوکسیلاز SRTING پایگاه داده برای تشخیص عملکرد پروتئین با پیش‌بینی ادغام چندین منبع ژنومیک و پروتئومیکس

هشت ابزار آنالیز بیوانفورماتیکی با الگوریتمهای مختلف استفاده شد. SIFT, PolyPhen-2, PROVEAN, SNAP2, SNPs&GO, PANTHER PHD-SNP استفاده شد. SIFT برای تشخیص اثر هر جایگزینی اسید آمینه بر عملکرد پروتئین ACOD1 استفاده شد. SNP، SIFT های آسیب‌رسان را بر اساس میزان باقی‌مانده‌های اسید آمینه حفظ‌شده در توالی‌های هم‌تراز با توالی‌های نزدیک، که از طریق PSI-BLAST جمع‌آوری شده‌اند، پیش‌بینی می‌کند. نمرات SIFT از ۰ تا ۱ متغیر است و نمرات ≥ 0.05 توسط الگوریتم پیش‌بینی می‌شود که جایگزین‌های اسید آمینه مضر باشد، در حالی که امتیازات < 0.05 قابل تحمل در نظر گرفته می‌شود (۲۱). از سرور PolyPhen-2 بالقوه هر جایگزین اسید آمینه بر خواص ساختاری و عملکردی پروتئین ACOD1 با استفاده از رویکردهای فیزیکی و مقایسه‌ای استفاده شد (۲۲). PROVEAN یک ابزار آنالیز کاربردی آموزش دیده که عملکردش به امتیاز مبتنی بر تراز بستگی دارد. پس از آنکه توالی پروتئین همراه با جهش اسید آمینه بدون تغییر تنظیمات پیش فرض در آن درج شد پیش‌بینی می‌شود که جهش‌ها دارای اثرات خنثی یا مضر بر اساس امتیاز هم‌ترازی آنها به ترتیب بیشتر یا کمتر از ۲.۵- را دارند یا خیر (۲۳). SNAP2 یک ابزار کاربردی آموزش دیده است که مبتنی بر شبکه عصبی است. با در نظر گرفتن ویژگی‌های مختلف، بین بیماری و جهش‌های خوش‌خیم با دقت ۸۳٪ تفاوت قائل می‌شود (۲۴). SNPs&GO یک ماشین بردار پشتیبان (SVM) است که بر اساس این روش برای پیش‌بینی دقیق جهش‌های مرتبط با بیماری از توالی پروتئین عمل می‌کند. امتیاز احتمال بالاتر از ۰.۵ اثر جهش مرتبط با بیماری را بر عملکرد پروتئین نشان می‌دهد. SNPs&GO ابزار دیگری به نام PHD-SNP دارد که نتایج را به جهش مضر یا خنثی طبقه بندی می‌کند (۲۵). الگوریتم PANTHER بر اساس کتابخانه‌ای از مدل‌های پنهان مارکوف به دست آمده از ترازهای توالی چندگانه خانواده‌های پروتئینی مختلف (HMM) است (۲۶). PANTHER اثر nsSNV ها را در دو مرحله پیش‌بینی می‌کند. روش اول ابتدا، پروتئین آسیب‌دیده با تمام HMM های موجود در کتابخانه مقایسه می‌شود تا HMM خانواده پروتئین query را پیدا کند (۲۷). سپس این HMM برای محاسبه احتمال اختلال nsSNV در

بررسی و پیدا کردن جایگاه فعال انزیم و مشخص کردن رزیدوهای فعال و درگیر در جایگاه فعال این انزیم با لیگاند متصل به جایگاه فعال می‌باشد استفاده شد.

تهیه ساختار دوم انزیم و تعیین دسترس پذیری حلال امینواسیدهای آن و جایگاه ساختاری آنها جهت پیدا کردن و بررسی ساختار دوم پروتئین مورد نظر از لحاظ نوع ساختار و عملکرد آن و نیز محتوای امینواسیدهای آن از سرور NetSurfP2.0 و sopma استفاده شد. SOPMA از طریق الگوریتم شبکه عصبی استفاده می‌کند و توان تشخیص ۸۲.۲٪ از باقیمانده‌ها را دارد. NetSurfP-2.0 ساختار ثانویه پروتئین و قابلیت دسترسی به حلال نسبی سرور و دسترسی سطحی، ساختار ثانویه، بی‌نظمی و زوایای دووجهی فی/پسی اسیدهای آمینه را در یک توالی اسید آمینه پیش‌بینی می‌کند (۱۸).

تهیه ساختار انزیم و تعیین سطحی یا درونی و عملکردی یا ساختاری بودن امینواسیدهای آن در این مرحله برای شناسایی محتوای امینواسیدی از لحاظ درونی یا بیرونی بودن و عملکردی یا ساختاری بودن آنها از سرور consurf استفاده گردید. ConSurf برای ارزیابی حفظ تکاملی اسیدهای آمینه با پیش‌بینی امتیاز حفاظت از طریق الگوریتمی متمایز استفاده شد. اسیدهای آمینه با امتیازهای بین ۷ و ۹ آمینو اسیدهای محافظه کار تکاملی بودند. ورودی توالی پروتئین در قالب FASTA بود، در حالی که خروجی تصویری بود که اسید آمینه حفظ شده را در بین گونه‌ها نشان می‌دهد که موقعیت خود را با الگوریتم خاصی مشخص می‌کند (۱۹).

تهیه نقاط داغ عملکردی انزیم

نقاط داغ عملکردی مکان‌هایی از پروتئین هستند که در برهمکنشها و فعالیتهای پروتئین بیشترین نقش را ایفا می‌کنند. HotSpot Wizard3 یک وب سرور برای طراحی خودکار جهش‌ها و کتابخانه‌های هوشمند برای مهندسی عملکرد پروتئین و پایداری و حاشیه نویسی ساختارهای پروتئین است. همچنین قادر به شناسایی نقاط داغ جهش‌زایی بر اساس ادغام اطلاعات ساختاری، عملکردی و تکاملی به دست آمده از چندین پایگاه داده بیوانفورماتیک و ابزارهای محاسباتی است. (۲۰)

بررسی شبیه‌سازی اثرات تمام حالات جهش در نقاط داغ انزیم توسط ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی و مطالعه دقیق بیماری‌زایی SNP های ACOD1، از

عملکرد پروتئین آسیب دیده استفاده می شود. توجه داشته باشید که وقتی PANTHER نتواند پروتئین آسیب دیده را به یکی از خانواده های موجود در کتابخانه خود نقشه برداری کند، هیچ خروجی برگردانده نمی شود. Meta-SNP یک طبقه بندی کننده باینری تصادفی مبتنی بر جنگل برای تمایز بین SNV های غیر مترادف مرتبط با بیماری و چند شکلی ها می باشد (۲۸). ابزار Meta-SNP برای بهبود تشخیص انواع جهش های مضرخروجی های PANTHER، Meta-SNP، SIFT و PhD-SNP را ترکیب می کند. یک پیاده سازی کتابخانه تصادفی جنگلی WEKA (۲۹) با ۱۰۰ درخت است که در SV-2009 با استفاده از اعتبارسنجی متقابل ۲۰ برابری آموزش داده شده است. پیش بینی کننده احتمال مرتبط بودن یک nsSNV معین را به بیماری نشان می دهد، که در آن امتیازات > 0.5 نشان می دهد که نوع ورودی داده شده بیماری زا است.

تعیین پایداری انزیم پس از اعمال جهشها در نقاط داغ انزیم

پایداری پروتئین عامل اصلی تاثیرگذار بر عملکرد و فعالیت مولکول های بیولوژیکی است. انرژی آزاد باز شدن پروتئین برای پایداری پروتئین حیاتی است. از این رو تأثیر جهش بر پایداری پروتئین را می توان با مطالعه تأثیر جهش بر انرژی آزاد دقیقاً تعیین کرد. سرور I-Mutant 3.0 یک ابزار مبتنی بر SVM است که پیش بینی می کند که آیا جهش SNPs ساختار پروتئین را با محاسبه تغییر انرژی آزاد و از طریق پیش بینی های جفت با ابزار FOLD-X مبتنی بر انرژی، منجر به تثبیت یا بی ثباتی می شود (۳۰). Mupro یک ابزار تجزیه و تحلیل ساختاری آنالین برای محاسبه تغییرات پایداری پروتئین بر روی SNP های دلخواه است (۳۱).

تصویر سازی جایگاه جهشهای برتر در نقاط داغ انزیم
جهت نمایش ساختار و جایگاه جهشهای اثرگذار نقاط داغ از ابزارهای بیوانفورماتیکی MUTATION3D, PYMOL و ROJECT HOPE استفاده شد.

جدول ۱: جدول حاوی تمام نرم افزارها و سرورهای مورد استفاده همراه با توضیح مختصری از عملکرد آنها میباشد

سرور/نرم افزار	آدرس	نحوه عملکرد
UNIPROT	https://www.uniprot.org	یک منبع پیشرو و با کیفیت بالا و جامع و رایگان و در دسترس توالی پروتئین و اطلاعات عملکردی در جهان است.
RCSB	https://www.rcsb.org	یک مرکز داده در ایالات متحده برای بانک جهانی داده های پروتئین (PDB) بایگانی داده های ساختار سه بعدی مولکول های بیولوژیکی بزرگ (پروتئین ها، DNA و RNA) ضروری، برای تحقیق و آموزش در زمینه زیست شناسی بنیادی، سلامت، انرژی و بیوتکنولوژی است.
STRING	/https://string-db.org	پایگاه داده برای تشخیص عملکرد پروتئین با پیش بینی ادغام چندین منبع ژنومیک و پروتئومیکس برای استنتاج در مورد عملکرد پروتئین های ناشناخته است.
DISCOVERY STUDIO	SOFTWARE	BIOVIA Discovery Studio. علوم پیشگویی و مدل سازی و شبیه سازی در علوم زندگی است. شامل برنامه شبیه سازی بسیار کارآمد مکانیک مولکولی CHARMM است. با بیش از ۳۰ سال بررسی دقیق تحقیقات دانشگاهی، CHARMM با تمرکز اصلی بر پروتئین های مطالعه، پپتید، لیگاند های مولکول های کوچک، اسیدهای نوکلئیک، لیپید ها و کربوهیدرات ها ایجاد شده است.
PAYMOL	SOFTWARE	نرم افزار پایمول (PyMOL) یک شبیه ساز مولکولی است و از سال ۲۰۰۶ به محققان امکان دستکاری و بررسی مولکول های زیستی را در فضای کامپیوتری فراهم کرده است
CONSURF	https://consurf.tau.ac.il/consurf_index.php	الگوی تکاملی اسیدهای آمینه/نوکلئیک ماکرومولکول را تجزیه و تحلیل می کند تا مناطقی را که برای ساختار و/یا عملکرد مهم هستند، آشکار کند. با شروع از یک دنباله یا ساختار پرس و جو، سرور به طور خودکار همولوگ ها را جمع آوری می کند، هم تراز می کند توالی آنها را استنباط می کند و یک درخت فیلوژنتیک را بازسازی می کند که روابط تکاملی آنها را منعکس می کند.
SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=NPSA/npsa_sopma.html	این روش ها مبتنی بر روش همولوگ لوین و همکاران هستند. در محاسبات SOPMA اطلاعات یک هم تراز از توالی های متعلق به یک خانواده را در نظر گرفته میشود.

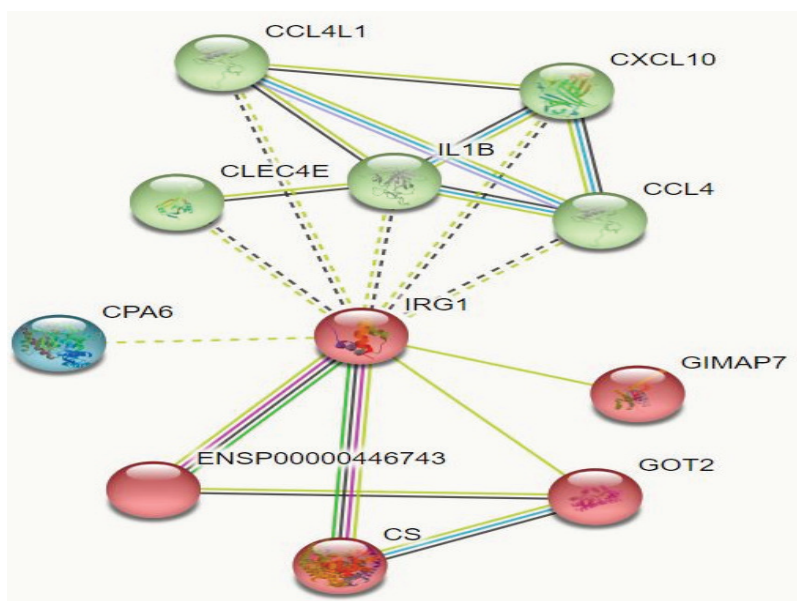
NETSURFP	https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?Net-SurfP-3.0	سرور دسترسی سطح، ساختار ثانویه، بی نظمی و زوایای دو وجهی فی/پسی اسیدهای آمینه را در یک توالی اسید آمینه پیش بینی می کند.
HotSpot Wizard ^v	https://loschmidt.chemi.muni.cz/hotspotwizard	یک وب سرور است که برای شناسایی خودکار نقاط مهم در طراحی پروتئین استفاده می شود
META-SNP	https://snps.biofold.org/meta-snp/pages/methods.html	یک طبقه بندی تصادفی مبتنی بر جنگل برای تمایز بین SNV های غیر مترادف مرتبط با بیماری و چند شکلیها را ارائه می دهد.
SIFT	http://sift.bii.a-star.edu.sg	پیش بینی می کند که آیا یک جایگزین اسید آمینه بر عملکرد پروتئین بر اساس همسانی توالی و خواص فیزیکی اسیدهای آمینه تأثیر می گذارد یا خیر.
PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php	یک ابزار نرم افزاری است که پیش بینی اثر جایگزینی اسید آمینه بر عملکرد بیولوژیکی پروتئین را انجام می دهد
SNAP2	https://roslab.org/services/snaprweb	یک ابزار کاربردی آموزش دیده است که مبتنی بر شبکه عصبی است. با در نظر گرفتن ویژگی های مختلف، بین بیماری و جهش های خوش خیم با دقت ۸۳٪ تفاوت قائل می شود
SNP&GO	http://snps-and-go.biocomp.unibo.it/snps-and-go	پیش بینی جهش های مرتبط با بیماری های انسانی در پروتئین ها با تعیین اثر عملکردی
PHD-SNP	https://snps.biofold.org/phd-snp/phd-snp.html	ابزار مبتنی بر یک طبقه بندی کننده مبتنی بر SVM است که جهت بررسی اثر جهش در ساختار پروتئین ها در بیماری های مختلف استفاده می شود.
PANTHER	http://pantherdb.org	عملکردش بر اساس کتابخانه ای از مدل های پنهان مارکوف به دست آمده از ترازهای توالی چندگانه خانواده های پروتئینی مختلف (HMM) است.
POLYPHEN ^v	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph	شامل مجموعه ای از برنامه های یادگیری ماشین برای پیش بینی اینکه چگونه جهش اسید آمینه تک محلی بر پایداری پروتئین تأثیر می گذارد میباشد.
I-MUTANT	http://folding.uib.es/i-mutant/i-mutant2.0.html	پیش بینی می کند که آیا جهش SNPs ساختار پروتئین را با محاسبه تغییر انرژی آزاد و از طریق پیش بینی های جفت با ابزار FOLD-X مبتنی بر انرژی، منجر به تثبیت یا بی ثباتی می شود.
MUPRO	https://mupro.proteomics.ics.uci.edu	
mCSM-PPI2	http://biosig.unimelb.edu.au/mcsm_ppi2	یک وب سرور است که یک برای پیش بینی اثرات جهش های نادرست در میل پروتئین-پروتئین عمل می کند. و از یک رویکرد مبتنی بر نمودار بهینه سازی شده برای ارزیابی بهتر مکانیسم مولکولی جهش، با مدل سازی اثرات تغییرات بر روی شبکه تعامل غیر کووالانسی بین باقی مانده با استفاده از هسته های گراف، اطلاعات تکاملی، معیارهای شبکه پیچیده و اصطلاحات پراورزی استفاده می کند.
PROJECT HOPE	http://www.cmbi.ru.nl/hope	تجزیه و تحلیل اثرات ساختاری جهش مورد نظر توسط وب سایت Project HOPE را انجام میدهد. پروژه HOPE با همکاری سرورهای پیش بینی UniProt و DAS، پروتئین جهش یافته را در یک ساختار سه بعدی قابل مشاهده نشان می دهد .
MUTATION ^v D	http://mutationrd.org	یک ابزار پیش بینی و تجسم عملکردی جهت مطالعه آرایش فضایی جایگزین های اسید آمینه بر روی مدل ها و ساختارهای پروتئینی است. و برای شناسایی خوشه های جایگزین اسیدهای آمینه ناشی از جهش های سرطان سوماتیک در بسیاری از بیماران به منظور شناسایی نقاط حساس عملکردی استفاده می شود.

یافته ها

مسیرهای مختلف متابولیکی و سیگنالینگ درون سلولی میباشد. بدین خاطر به دلیل اهمیت بالای این نقاط داغ عملکردی در ساختار پروتئین ACOD1 مطالعه و شناسایی جهش های خطرناک در این نقاط در شکل گیری بیماری های مختلف بسیار ضروری میباشد. در شبکه برهمکنشی زیر

نتایج بررسی شبکه برهمکنشی ژن سیس اکونیتات دکربوکسیلاز برهمکنش های مختلف پروتئین ACOD1 بیانگر داشتن نقش برخی از آمینواسیدهای این پروتئین بعنوان نقاط داغ عملکردی در برقراری ارتباط با دیگر پروتئین های

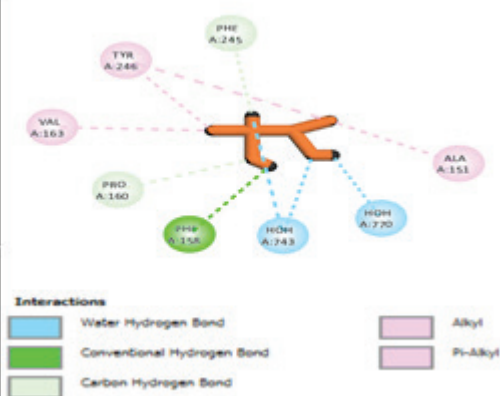
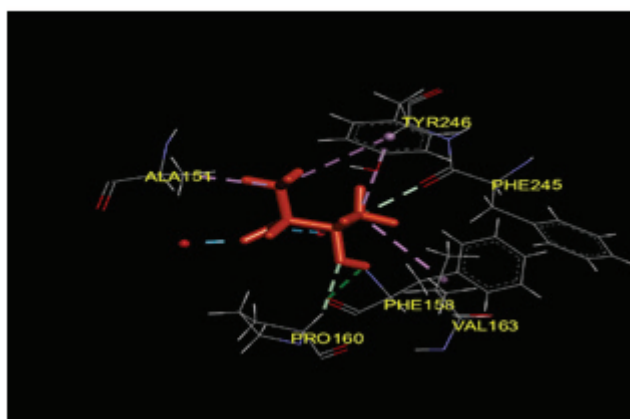
تعدادی از پروتئین های مرتبط با پروتئین ACOD1 مشخص شده است (تصویر ۱).



تصویر ۱: نمایش شبکه برهمکنش ژن IRG1 (ACOD1) با دیگر پروتئینها توسط STRING

این آمینواسید که هم در جایگاه فعال و هم یکی از نقاط داغ عملکردی آنزیم بشمار می آید در بخش ساختاری و درونی و در یکی از بخشهای COIL قرار دارد که جهش در آن توسط ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی پیش بینی شد و مشخص گردید که جهش در این جایگاه خطرناک و باعث کاهش پایداری آنزیم می شود (تصویر ۲).

نتایج پیدا کردن جایگاه فعال آنزیم سیس اکونیتات دکربوکسیلاز و تعیین آمینواسیدهای جایگاه فعال با کمک نرم افزار دیسکاوری استودیو جایگاه فعال آنزیم ACOD1 مشخص شد و آمینواسیدهای درگیر در آن تعیین شدند که در بین آنها یکی از آمینواسیدهای مهم جایگاه فعال بنام ALA151 جزء نقاط داغ فعال آنزیم نیز به شمار می آید

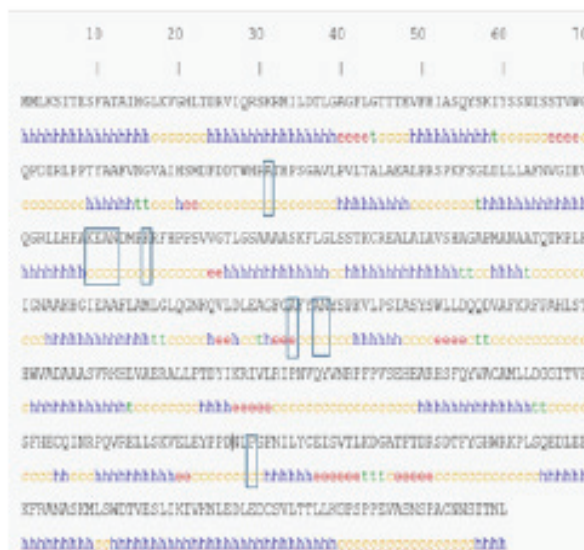


تصویر ۲: ساختار دوبعدی و سه بعدی جایگاه فعال آنزیم و نمایش آمینواسیدهای و پیوندهای درگیر در جایگاه فعال آنزیم ACOD1

واقع بود بقیه در بخشهای coil از ساختار دوم قرار داشتند که این بیانگر اهمیت این نوع از حالتی ساختارهای دوم در فعالیت و عملکرد این آنزیم را می رساند و اینکه چون اکثریت نقاط داغ در بخشهای سطحی آنزیم واقع بودند بدین خاطر سطح دسترسی به حلال مناسبی داشتند بجز ALA101, ALA244, ALA151 که چون در موقعیت

نتایج تهیه ساختار دوم آنزیم و تعیین دسترس پذیری حلال آمینواسیدهای آن و جایگاه ساختاری آنها با کمک سرورهای Netsurfp-2.0 و SOPMA ساختار دوم توالی آنزیم ACOD1 از لحاظ سطح دسترسی و نوع حالت ساختار دوم مورد آنالیز قرار گرفت که بر این اساس اکثریت آمینواسیدهای نقاط داغ عملکردی بجز آمینواسید ALA244 که در بخش helix

Hotspot residue	Relative surface accessibility (RSA)	secondary structure(SS)	Position HOT/functional residue
ALA101	21%	COIL	buried & structural residue
LYZ149	44%	COIL	exposed residue
GLU150	48%	COIL	exposed & functional residue
ALA151	37%	COIL	buried & structural residue
ASN152	59%	COIL	exposed residue
LYZ150	40%	COIL	exposed residue
ALA144	26%	HELIX	buried residue
ALA147	33%	COIL	exposed residue
ASN248	78%	COIL	exposed residue
PRO379	51%	COIL	exposed residue



فعال عملکردی (GLU150) بودند که امینواسید ALA151 یکی از امینواسیدهای جایگاه فعال انزیم ACOD1 نیز بشمار می آید و در بین امینواسیدهای موجود در جایگاه داغ فعال انزیم فقط امینواسیدهای الاین در بخش درونی انزیم بودند ولی بقیه در بخش سطحی ان قرار داشتند (تصویر۴).

نتایج تهیه ساختار انزیم و تعیین سطحی یا درونی و عملکردی یا ساختاری بودن امینواسیدهای ان نتایج حاصل از سرور consurf نشان داد که بیشترین نقاط داغ عملکردی در سطح خارجی انزیم ACOD1 بودند که برخی از انها دارای نقش ساختاری (ALA101, ALA151) و برخی دارای نقش



تصویر۴: نمایش ساختار انزیم ACOD1 و تعیین سطحی یا درونی و عملکردی یا ساختاری بودن امینواسیدهای ان

نتایج تهیه نقاط داغ عملکردی انزیم

داشتند و همگی خاصیت جهش پذیری داشتند اما بجز ALA247, PRO379, ASN248, GLU150 بقیه در درون پاکت کاتالیکی انزیم قرار داشتند (جدول ۲).

نتایج حاصل از سرور HOTSPOOT بیانگر این بود که همگی نقاط داغ عملکردی در داخل تونلهای انزیم قرار

جدول ۲: نقاط داغ عملکردی انزیم ACOD1

POSITION RESIDUE	MUTABLE	IN TUNNEL	HOTSPOT	IN CATALYTIC POCKET
ALA101	√	√	√	√
LYS149	√	√	√	√
GLU150	√	√	√	×
ALA151	√	√	√	√
ASN152	√	√	√	√
LYS156	√	√	√	√
ALA244	√	√	√	√
ALA247	√	√	√	×
ASN248	√	√	√	×
PRO379	√	√	√	×

از بین ۱۹۰ حالت مختلف جهش در ده نقطه داغ عملکردی انزیم حدود ۲۹ حالت از آنها که بیشترین امتیاز را از لحاظ اثر گذار بودن توسط هشت سرور مختلف را داشتند و بعنوان جهشهای خطرناک در ۱۰ نقطه داغ عملکردی انزیم ACOD1 انتخاب شدند (جدول ۳).

نتایج بررسی شبیه سازی اثرات تمام حالات جهش در نقاط داغ انزیم توسط ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی پس از بدست آوردن نقاط داغ عملکردی انزیم ACOD1 با کمک هشت نرم افزار آنالیز کننده اثر جهش در عملکرد انزیم به آنالیز اثر نوزده حالت جهش مختلف در هر نقطه داغ عملکردی انزیم ACOD1 پرداخته شد و

جدول ۳: نتایج بررسی شبیه سازی اثرات تمام حالات جهش در نقاط داغ انزیم توسط ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی

PREDICTION OF SNPs PATHOGENICITY									
POSITION RESIDUE MUTATION	PANTHER	PhD-SNP	SIFT	SNAP2	Meta-SNP	PROVEN	Poly-Phen.2	SN-Ps&GO	TOTAL SCORE
A247C	1	1	1	1	1	0	0	0	5
A247F	1	1	1	1	1	0	0	0	5
A247W	1	1	1	1	1	1	1	0	7
A151W	1	1	1	1	1	1	1	0	7
A101C	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A101D	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A101H	1	1	0	1	1	1	1	0	6
A101W	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A247Y	0	1	1	1	1	0	0	0	4
E150W	1	0	1	1	1	1	1	0	5
E150Y	1	0	1	1	1	1	1	0	5
A151C	1	0	1	1	1	1	1	0	5
A151D	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A151K	1	1	0	1	1	1	1	0	6
K156P	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244D	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244E	1	1	0	1	1	1	1	1	7

سعید پیرمرادی و همکاران

A244F	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244K	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244H	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244L	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244N	1	1	0	1	1	1	1	1	7
A244P	1	1	0	1	1	1	1	1	7
N248C	0	1	1	1	1	1	1	0	6
N248F	1	0	1	1	1	1	1	0	6
N248W	1	0	1	1	1	1	1	0	6
N248Y	1	0	1	1	1	0	1	0	5
P379W	1	0	1	1	1	1	1	0	6
A244W	0	1	1	1	1	1	1	0	6

دادند که این جهشها باعث کاهش پایداری انزیم شدند و در یک مورد (ALA151) هر دو سرور نشان دادند جهش مذکور باعث افزایش پایداری انزیم ACOD1 می شود و در دو حالت دیگر (A244L,N248C) سرور I-MUTANT کاهش و MUPRO افزایش و در یک حالت (E150Y) سرور I-MUTANT افزایش و MUPRO کاهش پایداری در انزیم را نشان دادند (جدول ۴).

نتایج تعیین پایداری انزیم پس از اعمال جهشها در نقاط داغ انزیم

نتایج حاصل از آنالیز میزان اثر جهش در نقاط داغ عملکردی انزیم ACOD1 توسط دو سرور مختلف نشان داد که در بیست و نه حالت انتخاب شده جهش با امتیاز بالا از هشت سرور مختلف در ۲۵ مورد از آنها هر دو سرور تعیین میزان اثر جهش بر پایداری انزیم ACOD1 نشان

جدول ۴: تعیین پایداری انزیم پس از اعمال جهشها در نقاط داغ انزیم

POSITION RESIDUE MUTATION	I-MUTANT.2	MUPRO
A247C	Decrease	Increase
A247F	Decrease	Decrease
A247W	Decrease	Decrease
A151W	Decrease	Decrease
A101C	Decrease	Decrease
A101D	Decrease	Decrease
A101H	Decrease	Decrease
A101W	Decrease	Decrease
A247Y	Decrease	Decrease
E150W	Decrease	Decrease
E150Y	Increase	Decrease
A151C	Increase	Increase
A151D	Decrease	Decrease
A151K	Decrease	Decrease
K156P	Decrease	Decrease
A244D	Decrease	Decrease
A244E	Decrease	Decrease
A244F	Decrease	Decrease
A244K	Decrease	Decrease
A244H	Decrease	Decrease
A244L	Decrease	Increase
A244N	Decrease	Decrease

A244P	Decrease	Decrease
N248C	Decrease	Increase
N248F	Decrease	Decrease
N248W	Decrease	Decrease
N248Y	Decrease	Increase
P379W	Decrease	Decrease
A244W	Decrease	Decrease

نتایج بررسی اثر جهش بر برهمکنش های پروتئینی
 نتایج حاصل از سرور Mscm_ppi2 تعیین کرد که از بین ۲۹
 جهش اثرگذار در نقاط داغ عملکردی انزیم ACOD1 تعداد
 ۹ عدد از آنها باعث کاهش عملکردی برهمکنش پروتئین
 ACOD1 با دیگر پروتئین ها و ۲۰ عدد دیگر از آنها باعث
 افزایش برهمکنش پروتئین ACOD1 با دیگر پروتئین ها
 می شود (جدول ۵).

نتایج بررسی اثر جهش بر برهمکنش های پروتئینی
 نتایج حاصل از سرور Mscm_ppi2 تعیین کرد که از بین ۲۹
 جهش اثرگذار در نقاط داغ عملکردی انزیم ACOD1 تعداد
 ۹ عدد از آنها باعث کاهش عملکردی برهمکنش پروتئین

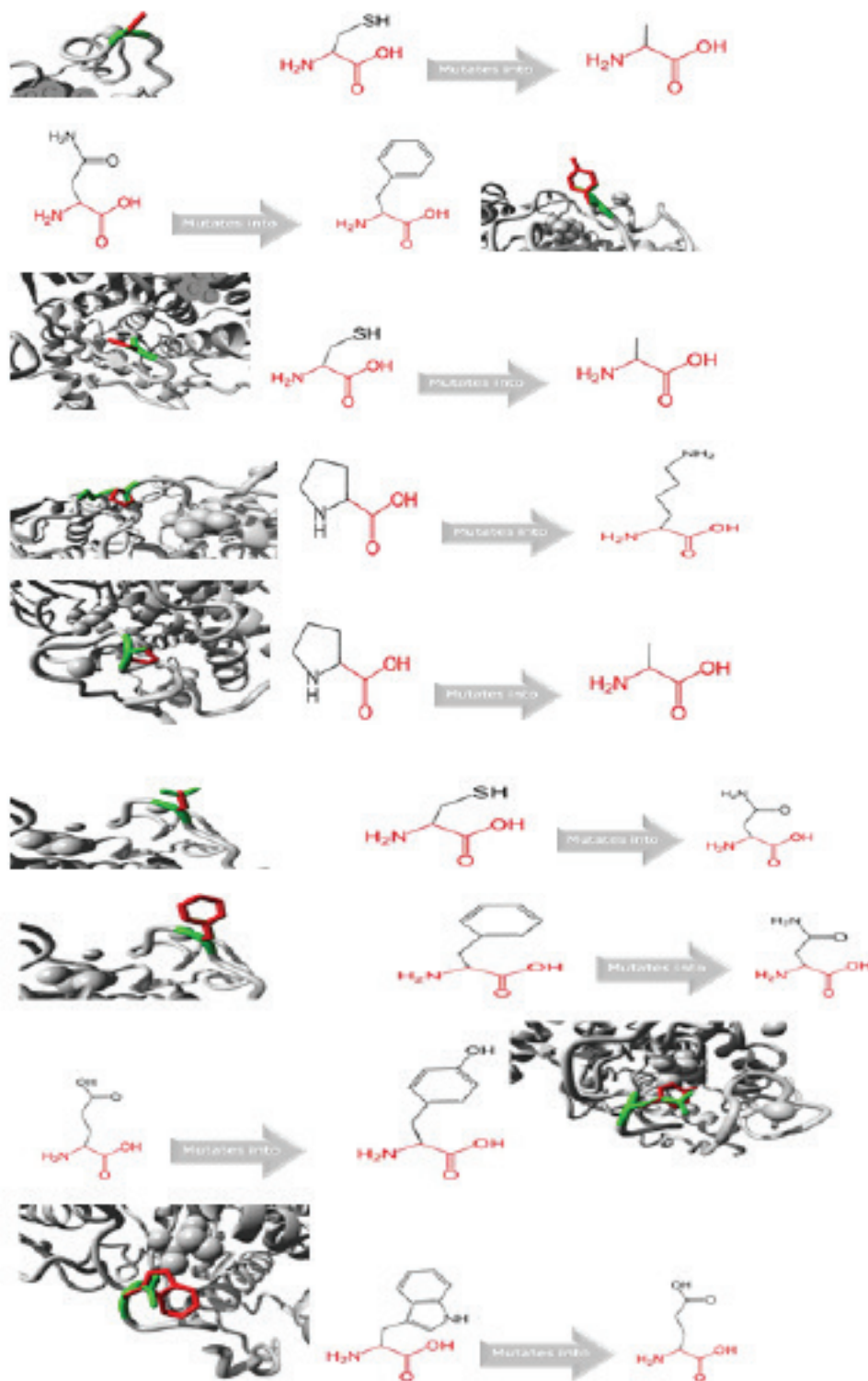
جدول ۵: بررسی اثر جهش بر برهمکنش های پروتئینی انزیم ACOD1

chain	wild-type	res-number	mutant	distance-to-interface	mcsm-ppi2-prediction	affinity
A	ALA	101	TRP	14.825	1.24	Increasing
A	ALA	247	CYS	7.488	-0.121	Decreasing
A	ALA	244	HIS	3.626	0.377	Increasing
A	ASN	248	TYR	9.091	-0.017	Decreasing
A	ALA	247	PHE	7.488	0.161	Increasing
A	ALA	244	LEU	3.626	0.323	Increasing
A	ALA	244	GLU	3.626	0.499	Increasing
A	ASN	248	TRP	9.091	0.032	Increasing
A	ALA	244	ASN	3.626	0.309	Increasing
A	ALA	151	TRP	14.935	0.913	Increasing
A	ALA	101	CYS	14.825	-0.096	Decreasing
A	ALA	244	TRP	3.626	0.592	Increasing
A	ALA	151	LYS	14.935	0.171	Increasing
A	ALA	101	HIS	14.825	0.795	Increasing
A	ALA	151	ASP	14.935	0.423	Increasing
A	LYS	156	PRO	3.635	-1.593	Decreasing
A	ALA	244	PRO	3.626	-0.202	Decreasing
A	PRO	379	TRP	14.315	0.279	Increasing
A	ALA	244	PHE	3.626	0.414	Increasing
A	ALA	247	TRP	7.488	0.448	Increasing
A	ALA	151	CYS	14.935	0.054	Increasing
A	ALA	101	ASP	14.825	0.265	Increasing
A	ASN	248	CYS	9.091	-0.248	Decreasing
A	ALA	247	TYR	7.488	0.083	Increasing
A	ALA	244	LYS	3.626	0.337	Increasing
A	ASN	248	PHE	9.091	-0.027	Decreasing
A	GLU	150	TYR	10.35	-0.132	Decreasing
A	GLU	150	TRP	10.35	-0.067	Decreasing
A	ALA	244	ASP	3.626	0.513	Increasing

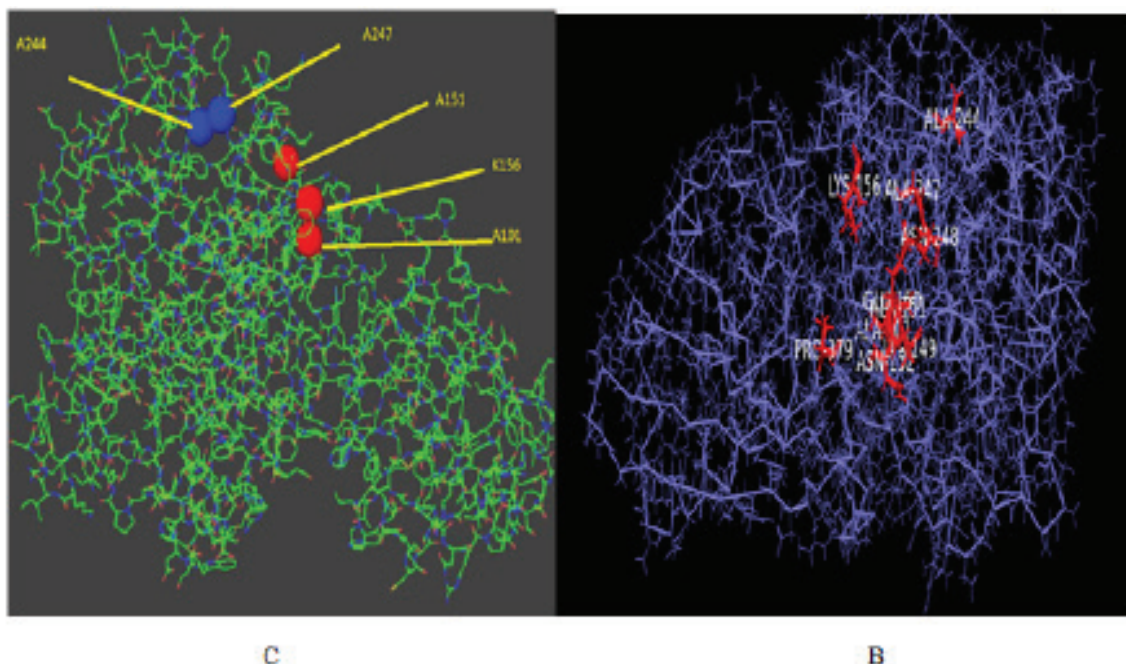
سعید پیرمادی و همکاران

تصویر کشانده است. همچنین توسط سرور MUTATION3D نیز نقاط داغ عملکردی دچار جهش شده را در سه خوشه مجزا دسته بندی و مصورسازی کرد (تصویر ۵).

نتایج تصویر سازی جایگاه جهش های برتر در نقاط داغ انزیم
 نتایج حاصل از سرور HOPE (<http://www.cmbi.ru.nl/>) که نوع جهش و جایگاه انرا در ساختار انزی به



A



تصویر ۵: A: تعیین جایگاه اثر ۹ جهش پرخطر موجود در نقاط داغ عملکردی انزیم B. ACOD1: تعیین جایگاه خوشه های اصلی جهشهای بدست آمده در نقاط داغ عملکردی انزیم C. ACOD1: مصور سازی جایگاه برخی جهش های پرخطر در نقاط داغ عملکردی انزیم

بحث

از آنها بعنوان موثر در بیماریزایی در بیماریهای مختلف طی مطالعات بالینی گزارش شده است که این بیانگر تشخیص درست نتایج این مطالعه و اهمیت عملکردی این نقاط داغ عملکردی در پاتوژنز بیماری هایی مانند سرطان می باشد (۳۴). جهش های خاموش ممکن است توالی های درگیر در پیوندها را تغییر دهند و منجر به تولید رونوشت های غیر طبیعی شوند. خطر نادیده گرفتن چنین جهش هایی در پایداری پروتئین ها برای فعالیت، عملکرد و تنظیم زیستی مولکول های آن ها بسیار مهم است زیرا هر گونه تا شدن نادرست و یا کاهش پایداری پیامدهای مضر و خطرناکی را بدنبال دارد (۳۵،۳۶). بدین خاطر در این کار با استفاده از هشت ابزار بیوانفورماتیک مکمل مختلف با الگوریتم های مختلف برای بررسی جهش در تمام حالات جهشی ممکن ۱۰ نقطه داغ عملکردی پیش گویی شده (حدود ۱۹۰ حالت) انجام شد که بیانگر بررسی وسعت ابعاد مسئله از جهات گوناگون با ابزارهای مختلف بیوانفورماتیکی با متدهای آنالیزی متفاوت میباشد (تصویر ۲). از بین ۱۹۰ عدد SNP ارزیابی شده به لحاظ پیامدهای ساختاری و پایداری در انزیم مورد مطالعه حدود ۲۹ عدد SNP انتخاب شد که بر اساس نتایج این هشت ابزار محاسباتی نسبت به بقیه از بین این ۱۹۰ جهش خطرناکتر بودنشان تایید شد. سپس از آنها جهت بررسی اثرشان بر پایداری ساختاری و عملکردی پروتئین توسط ابزار I-Mutant 3.0 و MUPro

در دهه اخیر با کمک روشهای نوین بیوانفورماتیکی به بررسی چگونگی نحوه برهمکنش های مختلف پروتئین ها با همدیگر پرداخته می شوند تا از این طریق به نقاط داغ عملکردی و رزیدوهای درگیر در برهمکنش با آنها دست یابند. تا با بررسی و پیش بینی حالات مختلف جهش در آنها و ارزیابی تغییرات ناشی از این جهشها در عملکرد بسیاری از مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با واکنشهای مهم و کلیدی بیوشیمیایی و متابولیکی بدن انسان، بتوانند علت بسیاری از اختلالات و بیماریهای مرتبط با این سری تغییرات را پیشگویی کنند. بدین خاطرشناسایی نقاط داغ فعال برهمکنش های پروتئین/پروتئین و پیش گویی انواع مختلف جهشهای موثر و بررسی آثار زیان بار ناشی از آنها با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیکی میتواند در ارائه راهکارهای درمانی سریعتر و جدید به محققین کمک کند تا عملکرد دقیق تری در ارائه روش های درمانی هدفمندتر و موثرتری ارائه دهند. معمولا SNP های ایجاد کننده بیماریها، اغلب در مناطق حفاظت شده تکاملی ایجاد می شوند بدین خاطر نقش مهمی در سطوح ساختاری و عملکردی پروتئینها دارند (۳۲،۳۳). در مطالعه حاضر نتایج کار مطالعاتی و تحلیلی در مجموع منجر به شناسایی ۱۰ نقطه داغ عملکردی در ساختار انزیم ACOD1 شد که تا کنون از واریانتهای مختلف از این نقاط پیش بینی شده سه نقطه (A101, A151, A152)

التهابات باشد که در این مطالعه با کمک سرور Mscm_ppi2 تمام ۲۹ جهش بدست آمده را مورد بررسی قرار دادیم که در بین آنها ۹ جهش (A247C, A248T, A101C, L156P, A244P, N248C, N248F, E150Y, E150W) علاوه بر کاهش پایداری پروتئین در کاهش برهمکنشهای موثر ACOD1 نقش داشتند بدین خاطر میتوان در مطالعات بالینی این سری جهشها را نسبت به دیگر جهشهای ارزیابی شده در ACOD1 مورد ارزیابی های ویژه ای قرارداد زیرا نسبت به بقیه اثرات کاهشی و مضرتری از آنها بر عملکرد ACOD1 طی آنالیزهای ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف بدست آمده است. با این حال، هر چه عوامل بیشتری در نظر گرفته شوند، پیش بینی دقیق تر خواهد بود (۴۲). اما در نهایت این انجام مطالعات آزمایشگاهی بالینی است که برای حمایت از این یافته ها توصیه می شود. نتایج حاصل از طریق دیتا بیسهای مختلف نتایج مطالعه حاضر را که با رویکرد *in silico* بدست آمده بود با رویکردهای بالینی مقایسه شدند که در منطقه SNP, A151, A101, A152 مضر بودند و نتیجه مطالعه حاضر با نتایج بالینی بدست آمده مطابقت داشت. در حالی که بقیه SNP های مضرتری که نسبت به بقیه جهشها خطرناکتر تشخیص داده شده بودن تا کنون مطالعه بالینی مرتبطی با آنها پیدا نشد که البته یک دلیل اصلی این میتواند این باشد که پروتئین مورد بررسی ترکیبی است که جدیداً محققان بر روی آن در حال انجام مطالعات مختلف هستند و هنوز دیتای کاملی از آن در دسترس نمی باشد. ولی با این حال خیلی از جهشهای پیش بینی شده در نقاط داغ عملکردی در نزدیک همان نواحی بودند که در برخی مطالعات بالینی بعنوان مکان خطرناک تشخیص داده شده بودند و این بیانگر حساسیت رزیدوهای آن نواحی از انزیم مربوطه به جهشها می باشد. اگرچه تمایز nsSNP های مضر از طریق مطالعات بالینی مطلوبتر است، اما دستیابی به آزمایش های مکرر روی همه جهشها زمان و هزینه زیادی می برد. بدین خاطر استفاده رویکردهای مختلف ارزیابی شبیه سازی کامپیوتری قبل از مطالعات بالینی درجه خاصی از قابلیت اطمینان را برای پیش بینی تهدید جهشها به ما می دهد.

نتیجه گیری

در تجزیه و تحلیل سیلیکونی از پیامدهای عملکردی و ساختاری SNP های پیش گوئی شده در نقاط داغ عملکردی

استفاده شد که نتایج تجزیه و تحلیلهای حاصل ازین دو ابزار نشان داد که در ۲۵ عدد SNP ها پایداری پروتئین را توسط هر دو ابزار کاهش یافت و در یک مورد توسط هر دو ابزار افزایش پایداری مشاهده شد و در سه حالت دیگر یکی از ابزارها افزایش و دیگری کاهش را نشان دادند (جدول ۴) بطور کلی در مطالعات مختلف مشخص شده است که موارد کاهش دهنده پایداری می توانند فعل و انفعالات اسید آمینه را بی ثبات کنند و تا حدی باعث انحراف عملکردی پروتئین شوند. بدین خاطر تحقیقات بیشتری را در مورد nsSNP هایی که منجر به بی ثباتی پروتئین می شوند و انجام مطالعه ای در مورد دینامیک مولکولی به منظور بررسی تأثیر جهش ها بر پایداری ساختار پروتئین را توصیه می کنیم (۳۷، ۳۸). nsSNP های پرخطرتر از بقیه که توسط هشت ابزار بیوانفورماتیکی بیشترین امتیاز را آوردند A248W, A151W, A101C, A101D, A101H, A247Y, A151D, K156P, A244D, A244E, A244F, A244K, A244H, A244L, A244P, 44 به عنوان مکان های مهم اتصال پروتئین مورد بررسی با دیگر پروتئینها پیش بینی شده اند و همگی به عنوان نواحی بسیار محافظت شده توسط سرور ConSurf مورد تایید قرار گرفتند (۳۹). علاوه بر این، تجزیه و تحلیلهای مشخص کردند که هم جهش های روی سطوح پروتئین و هم جهش هایی که به طور کامل یا جزئی در ساختار پروتئین مدفون شده اند هر دو آسیب رسان هستند (۴۰). بنابراین این نوع جهشها ممکن است باعث از بین رفتن فعل و انفعالات آبگریز در درون و نیز اختلال در برقراری برهمکنشها با دیگر فاکتورها در سطوح بیرونی پروتئین شوند پس نیاز است مورد بررسی بیشتری قرار گیرند. طبق نتایج ConSurf، و SOPMA همه nsSNP در موقعیت های بسیار حفاظت شده قرار دارند و ۱۰۰٪ درصد مکان های جهشها در مارپیچ های آلفا و coil ها (تصویرهای ۵-۷) قرار دارند و در چرخشهای β وجود ندارند که همگی اینها میتوانند با تغییر ساختار پروتئین بر عملکرد پروتئین ACOD1 تأثیر بگذارند (۴۱). از طرف دیگر پروتئین ACOD1 بخاطر اینکه نقش موثری در کاهش فرایند بسیاری از بیماریها دارد و این کار بخاطر برهمکنش هایش با دیگر پروتئینها انجام میدهد بدین خاطر کاهش این برهمکنشها ممکن است در پیشرفت التهاب نقش داشته باشد پس هر گونه جهشی که از جهشهای بدست آمده منجر به کاهش برهمکنشهای ACOD1 شود میتواند جهشی مضر در بیماریهای مرتبط با

پلت فرم نظری برای مکانیسم مولکولی درگیر در فرایندهای التهابی در بیماریهای مختلف ناشی از جهش ژن ACOD1 را ارائه می دهد.

سیاسگراری

نویسندگان از زحمات اساتید دانشگاه شهید چمران برای همکاری حمایتی قدردانی می کنند.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

در ژن ACOD1 انسانی، ۹ جهش (A247C, A248T, A101 بدست (C, L156P, A244P, N248C, N248F, E150Y, E150W) آمد که نسبت به دیگر جهشهای بدست آمده ممکن است در شکل گیری فرایندهای التهابی در بیماریهایی مانند انواع سرطان مختلف نقش موثرتری داشته باشند. و بطور کلی از بین ده نقطه داغ عملکردی تا کنون سه مورد از این نقاط (A101, A151, A152) در بیماریهای مختلف و طی ارزیابیهای بالینی تایید شده اند و پیش بینی ما را تایید کرده اند و اینها می توانند به عنوان نشانگرهای تشخیصی در بیماریهای وابسته به التهاب و یا به عنوان یک اهداف دارویی احتمالی استفاده شوند. این مطالعه *in silico*

References

1. Tenenbaum JD. Translational bioinformatics: past, present, and future. *Dev Reprod* 1.Biol Feb 2016;14:31-41. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.01.003>
2. Gefel D, Maslovsky I, Hillel J. Application of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for the detection of genes involved in the control of complex diseases. *Harefuah* May 2008;147:449-54. 476. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00358>
3. Chen X, Sullivan PF. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. *The pharmacogenomics journal*. 2003 Jan;3(2):77-96. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500167>
4. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Human mutation*. 2011 Apr;32(4):358-68. <https://doi.org/10.1002/humu.21445>
5. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. News from the protein mutability landscape. *J Mol Biol* Nov 1, 2013;425:3937-48. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.07.028>
6. Hoofman A, Angiari S, Hester S, Corcoran SE, Runtsch MC, Ling C, Ruzek MC, Slivka PF, McGettrick AF, Banahan K, Hughes MM. The immunomodulatory metabolite itaconate modifies NLRP3 and inhibits inflammasome activation. *Cell metabolism*. 2020 Sep 1;32(3):468-78. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.016>
7. Cordes, T., & Metallo, C. M. (2021). Exploring the evolutionary roots and physiological function of itaconate. *Current Opinion in Biotechnology*, 68, 144-150. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.11.005>
8. Li Y, Chen X, Zhang H, Xiao J, Yang C, Chen W, Wei Z, Chen X, Liu J. 4-Octyl itaconate alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by inhibiting oxidative stress and inflammation. *Drug design, development and therapy*. 2020;14:5547. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S280922>
9. Jamal Uddin M, Joe Y, Kim SK, et al. IRG1 induced by heme oxygenase-1/carbon monoxide inhibits LPS-mediated sepsis and pro-inflammatory cytokine production. *Cell Mol Immunol* 2016; 13: 170-179. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.02>
10. Chen M, Sun H, Boot M, Shao L, Chang SJ, Wang W, Lam TT, Lara-Tejero M, Rego EH, Galán JE. Itaconate is an effector of a Rab GTPase cell-autonomous host defense pathway against Salmonella. *Science*. 2020 Jul 24;369(6502):450-5. <https://doi.org/10.1126/science.aaz1333>
11. Nair S, Huynh JP, Lampropoulou V, et al. Irg1 expression in myeloid cells prevents immunopathology during M. tuberculosis infection. *J Exp Med* 2018; 215: 1035-1045. <https://doi.org/10.1084/jem.20180118>
12. Ni L, Xiao J, Zhang D, Shao Z, Huang C, Wang S, Wu Y, Tian N, Sun L, Wu A, Zhou Y. Immune-responsive gene 1/itaconate activates nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in microglia to protect against spinal cord injury in mice. *Cell death & disease*. 2022 Feb 10;13(2):1-6. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04592-4>
13. Pan, J., Zhao, X., Lin, C., Xu, H., Yin, Z., Liu, T., & Zhang, S. (2014). Immune

- responsive gene 1, a novel oncogene, increases the growth and tumorigenicity of glioma. *Oncology reports*, 32(5), 1957-1966. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3474>
14. McNeal, S. R., Bitterman, P., Bahr, J. M., Edassery, S. L., Abramowicz, J. S., Basu, S., & Barua, A. (2016). Association of immunosuppression with DR6 expression during the development and progression of spontaneous ovarian cancer in Laying Hen model. *Journal of immunology research*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2018/2590910>
 15. Weiss, J. M., Davies, L. C., Karwan, M., Ileva, L., Ozaki, M. K., Cheng, R. Y., ... & McVicar, D. W. (2018). Itaconic acid mediates crosstalk between macrophage metabolism and peritoneal tumors. *The Journal of clinical investigation*, 128(9), 3794-3805. <https://doi.org/10.1172/JCI99169>
 16. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Aguilera MA, Meyer R, Massouras A. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. 2019 Jun 6;35(11):1978. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
 17. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res Jul 2010*;38:W214-20 . <https://doi.org/10.1093/nar/gkq537>
 18. Geourjon C, Deleage G. SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci Dec 1995*;11:681-4. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/11.6.681>
 19. Ashkenazy H, Abadi S, Martz E, Chay O, Mayrose I, Pupko T, et al. ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules. *Nucleic Acids Res Jul 8, 2016*;44:W344-50. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
 20. Sumbalova, L., Stourac, J., Martinek, T., Bednar, D., Damborsky, J., 2018: HotSpot Wizard 3.0: Web Server for Automated Design of Mutations and Smart Libraries based on Sequence Input Information. *Nucleic Acids Research* 46 (W1): W356-W362. <https://doi.org/10.1093/nar/gky417>
 21. Sim NL, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res Jul2012*;40:W452-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
 22. Capriotti E, Altman RB. Improving the prediction of disease-related variants using protein three-dimensional structure. *BMC Bioinf 2011*;12(Suppl 4). S3. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S4-S3>
 23. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One 2012*;7:e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
 24. Hecht M, Bromberg Y, Rost B. Better prediction of functional effects for sequence variants. *BMC Genom 2015*;16(Suppl 8): S1. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-16-S8-S1>
 25. 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 Aug 2009*;30:1237-44. <https://doi.org/10.1002/humu.21047>
 26. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated with single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics Nov 15 2006*;22:2729-34. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl423>
 27. P. D. Thomas, A. Kejariwal, N. Guo, et al., "Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools," *Nucleic Acids Research*, vol. 34, pp. W645-W650, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2017.02.001>
 28. Pei J, Grishin NV. AL2CO: calculation of positional conservation in a protein sequence alignment. *Bioinformatics*. 2001;14(8):700-712. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.700>
 29. Ahmed Z, Zeeshan S. Applying WEKA towards machine learning with genetic algorithm and back-propagation neural networks. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*. 2014 Jan 1;5(2):1. <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000157>
 30. Capriotti E, Fariselli P, Casadio R. I-Mutant 2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic Acids Res Jul 1, 2005*;33:W306-10.

- <https://doi.org/10.1093/nar/gki375>
31. Cheng J, Randall A, Baldi P. Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins* Mar 1, 2006;62:1125-32. <https://doi.org/10.1002/prot.20810>
 32. Khan IA, Mort M, Buckland PR, O'Donovan MC, Cooper DN, Chuzhanova NA. In silico discrimination of single nucleotide polymorphisms and pathological mutations in human gene promoter regions using local DNA sequence context and regularity. *Silico Biol* 2006;6:23-34. <https://doi.org/10.1016/j.imu.2020.100447>
 33. Qu HQ, Lawrence SG, Guo F, Majewski J, Polychronakos C. Strand bias in complementary single-nucleotide polymorphisms of transcribed human sequences: evidence for functional effects of synonymous polymorphisms. *BMC Genom* Aug 17 2006;7:213. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-7-213>
 34. Chen F, Lukat P, Iqbal AA, Saile K, Kaever V, van den Heuvel J, Blankenfeldt W, Büsow K, Pessler F. Crystal structure of cis-aconitate decarboxylase reveals the impact of naturally occurring human mutations on itaconate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019 Oct 8;116(41):20644-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908770116>
 35. Ferrer-Costa C, Orozco M, de la Cruz X. Characterization of disease-associated single amino acid polymorphisms in terms of sequence and structure properties 1. *J Mol Biol* 02/01 2002;315:771-86. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5255>
 36. Bross P, Andresen B, Corydon T, Gregersen N. Protein misfolding and degradation in genetic disease. 2011.
 37. Vihinen M. Relationship of protein flexibility to thermostability. *Protein Eng Des Sel* 1987;1:477-80. <https://doi.org/10.1093/protein/1.6.477>
 38. Gromiha M, Oobatake M, Kono H, Uedaira H, Sarai A. Role of structural and sequence information in the prediction of protein stability changes: comparison between buried and partially buried mutations. *Protein Eng* 08/01 1999;12:549-55. <https://doi.org/10.1093/protein/12.7.549>
 39. Parker A. Genomics in early infantile epileptic encephalopathies - trials and tribulations. *Developmental medicine and child neurology*, vol. 58; 2015. p. 9-14. <https://doi.org/10.1016/j.spen.2016.06.002>
 40. Xu S, Xu JP. Present status and expectation of aristaless-related homeobox (ARX) in the endocrine pancreas. *Int J Dev Biol* 2019;63:579-87. <https://doi.org/10.1387/ijdb.190242sx>
 41. B. Ostrander, R. Butterfield, B. Pedersen, A. Farrell, R. Layer, A. Ward, et al., "Whole-genome analysis for effective clinical diagnosis and gene discovery in early infantile epileptic encephalopathy," *npj Genomic Medicine*, vol. 3, 12/21 2018. <https://doi.org/10.3390/jpm10040281>
 42. Hooftman A, O'Neill LA. The immunomodulatory potential of the metabolite itaconate. *Trends in immunology*. 2019 Aug 1;40(8):687-98. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.05.007>