



مقاله پژوهشی

تولید یک پروتئین ناقص و بیماری کم‌خونی دیاموند-بلاک فان در اثر یک جهش جدید بی‌معنی

در ژن RPS19

جواد رودگر صفاری، محمد مهدی فرقانی فرد*، وجیهه زرین‌پور

گروه زیست‌شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

*مسئول مکاتبات: forghanifard@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۲۳

DOI: 10.22034/ascij.2022.1968818.1433

چکیده

کم‌خونی مادرزادی هیپوپلاستیک یا کم‌خونی دیاموند-بلاک فان (DBA) معمولاً در سال اول زندگی رخ می‌دهد و بیماران مبتلا به DBA اکثراً تا سن شش سالگی زنده می‌مانند. به ازای هر یک میلیون تولد زنده پنج تا هفت نوزاد با این بیماری درگیر می‌شوند. در ۸۵-۸۰ درصد موارد، این اختلال ناشی از جهش ژن پروتئین ریپوزومی و در حدود ۲۵ درصد این موارد، ژن RPS19 علت این عارضه است. نقص این ژن می‌تواند تعادل سلول‌های خونی را مختل سازد که به صورت کم‌خونی نرموسیتیک، کم‌خونی شدید و تغییر ماکروسیتیک، همراه با کاهش رتیکولوسیت‌ها در مغز استخوان ظاهر می‌شود. بیماران به مصرف کورتیکواستروئیدها در طولانی مدت نیاز دارند. توالی‌یابی کل‌اگزوم نمونه خون بیمار مبتلا به DBA انجام گرفت. جهش بیماری‌زا در بیمار، خانواده وی و ۳۰ نفر بررسی شد. ساختار سه بعدی پروتئین با استفاده از مدل‌سازی همسانی و برهمکنش پروتئین جهش‌یافته با پروتئین‌های دیگر در زیرواحد 40S ریپوزومی مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش خون محیطی یک جهش را روی اگزون ۳ ژن PRS19 (H42fs c.126-127 ins TA NM-00102) و ناحیه کروموزومی 19q13.2 نشان داد. این جهش به صورت اتوزومال غالب بود که طی آن آمینواسید شماره ۴۲ هیستیدین به کدون توقف تبدیل شده و یک پروتئین کوتاه شده تولید شد. رفتار این پروتئین با ژن PRS18 در حالت‌های سالم و جهش‌یافته نشان می‌دهد که وقتی جهش در PRS19 روی می‌دهد، آمینواسیدهای Leu45, Ala46, Pro47, Tyr48, Asp49, Glu50 و Trp52 که باقیمانده‌های مهم متصل‌شونده به RPS18 هستند، دیگر در این پروتئین وجود ندارند. از این رو، اتصال RPS19 کوتاه شده به RPS18 به طور قابل توجهی کاهش می‌یابد. اگرچه به نظر می‌رسد که وجود این باقیمانده‌ها ممکن است مانع از برهمکنش RPS19 با RPS16 در حالت جهش‌یافته نشود، این احتمال وجود دارد که پروتئین جهش‌یافته آرایش فضایی پروتئین‌های دیگر را مختل سازد و بر برهمکنش‌های آن‌ها تأثیر بگذارد.

کلمات کلیدی: توالی‌یابی کل‌اگزوم، کم‌خونی دیاموند-بلاک فان، RPS19.

مقدمه

بیماری کم‌خونی دیاموند-بلاک فان یا DBA (Diamond Blackfan Anemia) یک آپلازی مادرزادی است و معمولاً در دوران نوزادی (شیرخوارگی) رخ می‌دهد. این اختلال تعداد گلبول‌های قرمز خون را کاهش می‌دهد در حالی که سایر عناصر خونی مانند گلبول‌های سفید خون و پلاکت‌ها

بپردازد (۲۴).

این مطالعه با هدف شناسایی جهش بیماری‌زا با استفاده از توالی‌یابی کلی اگزوم در بیمار و بررسی اثرات این جهش بر پروتئین ازلحاظ داده‌های بیوانفورماتیکی انجام شد (۳).

مواد و روش‌ها

این مطالعه با معاینه یک بیمار، یک دختر ۹ ساله از والدین غیرخویشاوند با علائم کم‌خونی و تشخیص DBA در او، انجام شد. این بیمار یک خواهر کوچکتر سالم دارد. افراد سالمی که از آن‌ها خون گرفتیم، مشکل خونی نداشتند. این مطالعه با شناسه اخلاق IR.IAU.DAMGHAN.REC.1401.023 مصوب شد.

استخراج DNA: در مرحله اول، DNA ژنوم بر مبنای پروتکل استاندارد سالتینگ-اوت از خون کامل فرد مورد آزمایش استخراج و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

توالی‌یابی کل اگزوم (WES): توالی‌یابی در آزمایشگاه با استفاده از دستگاه NovaSeq 6000 به منظور توالی‌یابی دوطرفه با طول ۱۵۰ جفت باز و نوع لایبری SureSelect V6-Post انجام شد. سپس جهش به وسیله توالی‌یابی سنگر در تمام نمونه‌ها تأیید شد. توالی‌یابی پیش‌فرض پروتئین‌ها با استفاده از نمونه‌های DNA استخراجی در LIGPLOT, PyMOL, MODELLER V9.22 انجام شد. الگوریتم‌ها و بیوانفورماتیک‌ها در وبسایت‌های UniProt, Expasy و NCBI در دسترس است.

اطلاعات ساختاری و توالی پروتئین RPS19: توالی‌های پروتئینی از پایگاه داده UniProt (<http://www.uniprot.org>) گردآوری شد. یک توالی پروتئینی مورد تأیید از RPS19 با شماره دسترسی P39019 در وبسایت موجود است. ساختار سه

تحت تأثیر قرار نمی‌گیرند (۲۰). حدود ۴۷ درصد بیماران دارای ناهنجاری‌های مادرزادی مانند بدشکلی‌های صورت، ناهنجاری‌های لب و مشکلات قلبی و تناسلی هستند (۱۶). این اختلال در هر میلیون تولد زنده بر ۵ تا ۷ نوزاد تأثیر می‌گذارد. ژن‌های مختلفی در ابتلا به این اختلال درگیر هستند و یک گروه از مهم‌ترین این ژن‌ها ژن‌های ریپوزومی است که از میان آن‌ها RPS19 بیشترین میزان بروز جهش را دارد. این جهش تقریباً ۲۵ درصد موارد را تشکیل می‌دهد (۲). انواع مختلفی از جهش‌ها در بیش از ۵۰ درصد جهش‌های RPS مشاهده شده است. از بین انواع جهش‌ها در ژن RPS جهش‌های حذف، اضافه، بی-معنی، جهش در جایگاه پیرایش، و جهش‌های تغییر چارچوب وجود دارد. این جهش‌ها به نقص در پروتئین RPS19 منتج می‌گردد که با عنوان haploinsufficiency شناخته شده است (۷). تا حدود ۵۰ درصد موارد DBA دارای یک جهش هتروزیگوت ژن ریپوزومی با ازدست دادن عملکرد در یک کپی از ژن هستند (۲۳، ۲۷).

ژن RPS19 دستورالعمل‌های مربوط به تولید یکی از تقریباً ۸۰ پروتئین ریپوزومی مختلف را، که اجزای ساختارهای سلولی به نام ریپوزوم هستند، ارائه می‌دهد. ریپوزوم‌ها دستورات ژنتیکی سلول را برای تولید پروتئین‌ها پردازش می‌کنند. هر ریپوزوم متشکل از دو زیرواحد به نام زیرواحد بزرگ و زیرواحد کوچک است (۲۹). پروتئین تولیدی از ژن RPS19 در زیرواحد کوچک یافت شده است (۸).

انواع مختلفی از جهش‌های ژنتیکی در این ژن‌ها، از جمله جهش‌های نقطه‌ای، حذف و اضافه، حذف‌های بزرگ و کوچک و بازآرایی کروموزومی شناسایی شده است. روش‌های زیادی برای شناسایی این جهش‌ها به کار می‌رود مانند روش توالی‌یابی اگزوم. این روش می‌تواند به بررسی کلیه اگزون‌ها در ژنوم انسان

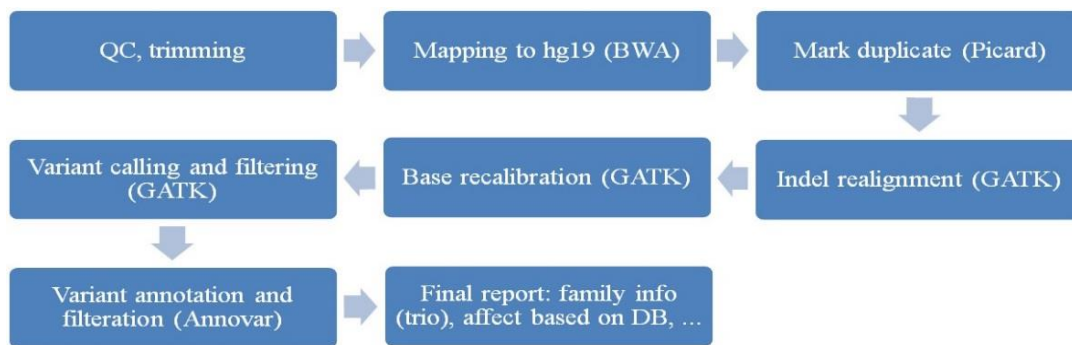
مدل‌ها بر اساس انرژی محاسبه شده (DOPE Score) پنج مدل دارای کمترین انرژی انتخاب شده و کیفیت اندازه‌گیری شد. بدین ترتیب، بهترین مدل برای پروتئین جهش‌یافته RPS19 انتخاب گردید.

ارزیابی کیفیت و تغییر مدل پروتئین جهش‌یافته:
نمودار Ramachandran برای هر مدل با استفاده از سرور PROCHECK ایجاد شد و انطباق باقیمانده‌های هر مدل با زوایای مجاز phi و psi بررسی شد. با استفاده از این نمودار، کیفیت (مشخصه) کلی مدل پروتئین ایجادشده را می‌توان تعیین کرد. سرور GalaxyRefine برای تغییر (اصلاح) مدل و بهبود زوایای دو سطحی، کاهش ممانعت فضایی زنجیره‌های جانبی و تغییر روتامرهای نامناسب استفاده شد. در این برنامه، شبیه‌سازی‌های دینامیک مولکولی کوتاه مدت استفاده شده و جایگذاری روتامرهای مناسب، برخوردهای فضایی نامطلوب را در زنجیره‌های جانبی کاهش می‌دهد، درحالی که ساختار اصلی پیوندهای پپتیدی و آرایش فضایی آن‌ها سالم می‌ماند. پس از بهبود مدل با این سرور، تغییرات معنی‌داری در مشخصات مدل انتخابی مشاهده شد و کیفیت مدل افزایش یافت.

بررسی برهمکنش پروتئین RPS19 با پروتئین‌های دیگر: برای بررسی برهمکنش پروتئین RPS19 با سایر پروتئین‌های موجود در کمپلکس 40S، فایل‌های PDB با استفاده از نرم‌افزار PyMol شناسایی شد و آمینواسیدهای درگیر در برهمکنش با استفاده از نرم‌افزار LIGPLOT به دقت مورد بررسی قرار گرفت. سرور STRING نیز برای شناسایی پروتئین‌های احتمالی در برهمکنش با RPS19 استفاده شد.

بعدی پروتئین RPS19 نیز از فایل‌های PDB در پایگاه داده PDB (<https://www.rcsb.org>) به دست آمد. فایل‌های PDB با شماره‌های دسترسی 6G4W، 6G4S، 6G18، 6G53، 6G5I، 6G5H، 6G51 و 6ZVH مورد استفاده قرار گرفت، که حاوی ساختار سه بعدی زیرواحد ریبوزومی 40S انسانی، به دست آمده از طریق روش میکروسکوپ الکترونی کرایو (cryo-EM) است. ساختار سایر پروتئین‌های در برهمکنش با RPS19 هم که در تشکیل 40S دخیل هستند، از جمله پروتئین‌های RPS18 و RPS16، از فایل‌های PDB مذکور استخراج شد.

پیش‌بینی ساختار پروتئین جهش‌یافته RPS19: پس از توالی‌یابی ژن جهش‌یافته، توالی نوکلئیک اسید به پروتئین ترجمه می‌شود. توالی آمینواسیدی ژن جهش‌یافته برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین به کار گرفته شد. با توجه به شباهت زیاد مدل، مدل‌سازی همسانی برای پیش‌بینی ساختار سه بعدی پروتئین استفاده شد. پیش‌بینی با استفاده از MODELLER V9.22 انجام شد. در مدل‌سازی همسانی، توالی پروتئین ابتدا با توالی پروتئین‌هایی که ساختار آن‌ها با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی از پیش مشخص شده است، مقایسه شده و سپس پروتئین‌هایی که همسانی زیادی با توالی مورد نظر داشتند، به عنوان الگو انتخاب گردید. آرایش فضایی تمامی اتم‌ها، به استثنای هیدروژن، بر اساس این الگو پیش‌بینی شد. در این مطالعه، فایل PDB پروتئین RPS19 طبیعی، به عنوان الگو برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته به کارگرفته شد. با استفاده از برنامه MODELLER V9.22، ۱۰۰۰۰ مدل اولیه به عنوان ساختار سه بعدی مشخص شد و پس از مرتب کردن



شکل ۱- روند توالی‌یابی کل اگزوم

نتایج

مشخصات مختلف مقایسه گردید. مدل‌های انتخابی با استفاده از سرور GalaxyRefine بهبود یافت. پس از آن کیفیت آن‌ها با استفاده از آنالیز نمودار Ramachandran ارزیابی شده و بهترین مدل انتخاب گردید. بررسی نمودار Ramachandran از این مدل نشان داد که ۹۷/۲ درصد آمینواسیدها در ناحیه مورد نظر قرار داشته و ۲/۸ درصد آمینواسید باقیمانده در منطقه مجاز بودند. آمینواسیدی در منطقه غیرمجاز وجود نداشت که نشانگر کیفیت بالای مدل ایجاد شده بود (شکل A-4).

انطباق (هم‌ترازسازی) ساختاری مدل جهش‌یافته و پروتئین طبیعی RPS19 مشخص کرد که پروتئین کوتاه شده ساختارهای دوم و سوم خود را حفظ کرده است و علیرغم ناقص بودن، الگوی تاخوردگی آن مشابه با الگوی پروتئین طبیعی بود. ساختار اول هلیکس بلند (از Ser25 تا Gly11) نیز کاملاً در RPS19 کوتاه شده شکل گرفته بود و دوم هلیکس کوتاه روی دو طرف این هلیکس بلند که در ساختار پروتئین طبیعی وجود نداشت، تشکیل شد. با این وجود، کاملاً بدیهی است که پروتئین کوتاه شده دارای فقط یک موتیف کوچک از پروتئین اصلی است و بیشتر پروتئین طبیعی از چهار هلیکس بلند تشکیل می‌شود و چند بتا شیت از آن حذف شده بود (شکل B-4). از آنجا که این پروتئین جزء اصلی کمپلکس ریبوزومی 40S است، به بسیاری از پروتئین‌های

یک جهش روی اگزون ۳ ژن RPS19 (-H42fs c.126) در خون محیطی بیمار یافته شد. نمونه‌های گرفته شده از خانواده بیمار و ۳۰ نفر نیز بررسی شد. جهش به شکل غالب اوتوزومی رخ داد، که در طی آن کدون ۴۲ آمینواسید هیستیدین به کدون توقف تبدیل شد و در نتیجه، یک پروتئین ناقص تولید شد.

پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین جهش‌یافته RPS19 و تغییر مدل: ما به منظور بررسی تأثیر جهش بر ساختار پروتئین RPS19 و عملکرد آن در ارتباط با سایر پروتئین‌ها، به مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی پروتئین جهش‌یافته نیاز داریم. روش‌های مختلفی را می‌توان برای پیش‌بینی ساختار یک پروتئین به کار برد. انتخاب مناسب‌ترین روش به اطلاعاتی که از پروتئین‌های با تاخوردگی‌های مشابه داریم، بستگی دارد. وقتی یک پروتئین الگو با همسانی زیاد به دست آمده از آزمایشگاه وجود دارد، بهترین روش پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد نظر، استفاده از مدل‌سازی همسانی است. بنابراین، با توجه به اینکه ساختار پروتئین طبیعی RPS19 مشخص شده است، به عنوان مدل در مدل‌سازی پروتئین‌های جهش‌یافته به کار گرفته شد. پس از تهیه فایل‌های ورودی، ساختار سه‌بعدی پروتئین با استفاده از MODELLER V9.22 پیش‌بینی شد. سپس پنج مدل برتر انتخاب شد و

دو پروتئین در تقریباً تمام حالت‌های فعالیت زیرواحد 40S مشاهده گردید. آرایش فضایی این دو پروتئین پیرامون RPS19 به آن‌ها امکان می‌دهد تا تقریباً در هر دو طرف این پروتئین قرارگیرند و بخش‌های مشخص و مجزا از RPS19 با هر یک از این پروتئین‌ها برهمکنش دارند (شکل 5-A). بنابراین، نواحی اتصال این دو پروتئین همپوشانی و تداخل ندارند. آمینواسیدهای RPS19 که در برهمکنش با پروتئین-های RPS18 و RPS16 نقش اصلی دارند، به ترتیب در شکل‌های 5-B و 5-C نشان داده شده است.

همانطور که در شکل 5-C مشخص است، آمینواسیدهای Lys7, Asp8, Val9, Asn10, Gln11 و Gln12 با RPS16 برهمکنش دارند. جالب توجه است که این آمینواسیدها در پروتئین جهش‌یافته RPS19 هم وجود دارند و بنابراین پروتئین جهش‌یافته، مانند پروتئین طبیعی، از قابلیت برهمکنش مؤثر با RPS16 برخوردار است. با این حال، برخلاف آمینواسیدهای دخیل در برهمکنش با RPS16، آمینواسیدهایی که با RPS18 برهمکنش دارند، هم فراوان‌تر هستند و هم برخی از آن‌ها در پروتئین کوتاه شده وجود دارند. این آمینواسیدها در دو ناحیه مشخص به وسیله یک لوپ (حلقه) کوتاه از هم جدا شده است. رده اول این آمینواسیدها از شش باقیمانده یعنی Val34, Glu32, Asp35, Thr36, Val37 و Lys38 تشکیل شده‌اند که در هر دو شکل پروتئین طبیعی و جهش‌یافته وجود دارند. اما، رده دوم آمینواسیدها فقط در پروتئین-های طبیعی یافت شده است که شامل هشت باقیمانده Asp49, Tyr48, Pro47, Ala46, Leu45, Glu44 و Glu50 می‌شود (شکل 5-B). بنابراین، انتظار می‌رود که با کوتاه‌شدگی پروتئین RPS19 و از دست رفتن بیشتر باقیمانده‌های دخیل در برهمکنش با RPS18، پروتئین جهش‌یافته با گرایش بسیار کمتر به RPS18 متصل شود و روند ارتباطی بین این دو

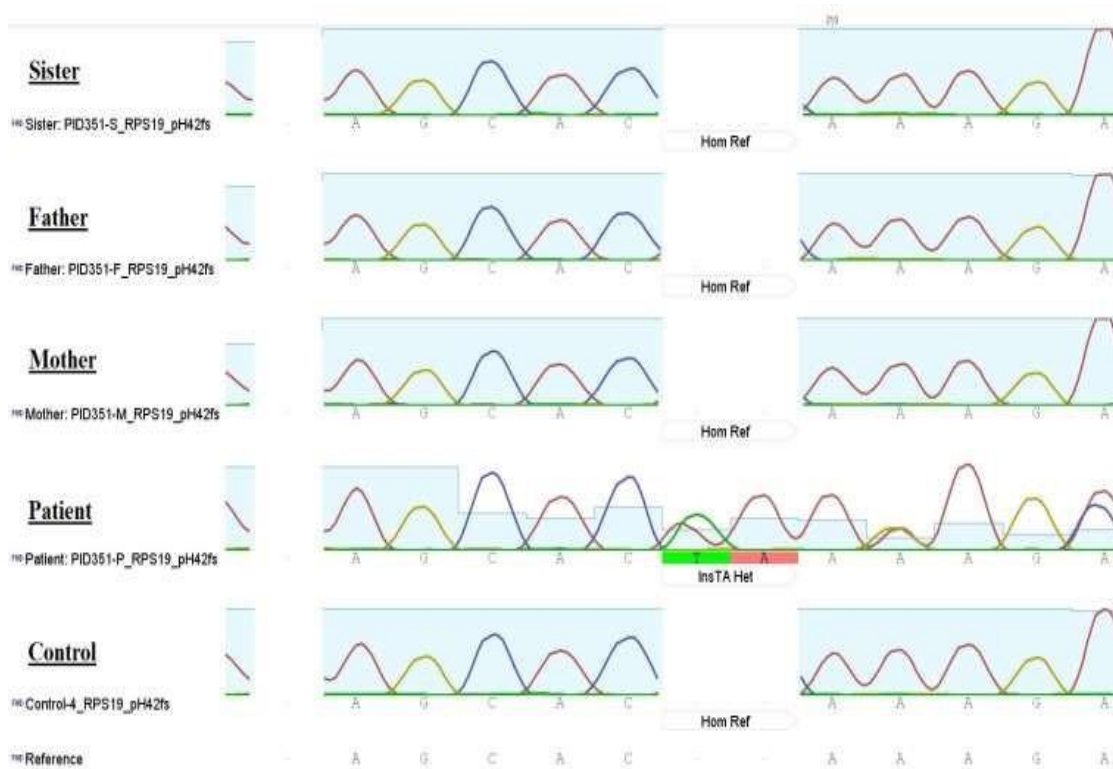
پیرامون و همچنین به RNA متصل می‌شود (شکل 4-C). بررسی شبکه ارتباطی آن روی سرور STRING همچنین نشان داد که حداقل ۱۰ پروتئین ریبوزومی نماینده برهمکنش با RPS19 هستند. اگرچه تمام جزئیات برهمکنش RPS19 با پروتئین‌های دیگر مشخص نشده است، وجود این شبکه ارتباطی گسترده بر اهمیت تمام موتیف‌های ساختاری این پروتئین تأکید دارد و حذف هر کدام می‌تواند برهمکنش این پروتئین حیاتی با پروتئین‌های دیگر را مختل سازد (شکل 4-D).

برهمکنش پروتئین‌های RPS19 طبیعی و کوتاه شده با پروتئین‌های دیگر در کمپلکس ریبوزومی 40S: همانطور که در شکل 5-C نشان داده شده است، پروتئین RPS19، همراه با تعداد زیادی از پروتئین‌های دیگر و RNA ریبوزومی، در تشکیل کمپلکس 40S دخیل هستند. برای یافتن پروتئین‌های اصلی که برهمکنش مستقیم با RPS19 در این کمپلکس دارند، فایل‌های PDB مربوط به ساختار زیرواحد 40S در حالت‌های مختلف به دقت موردتجزیه و تحلیل قرار گرفت. این فایل‌ها در پایگاه داده PDB با شماره‌های دسترسی 6G53, 6G18, 6G4S, 6G4W, 6G5H, 6G5I, 6G51 و 6ZVH موجود هستند. شناسایی فایل‌های PDB به وسیله نرم‌افزار PyMol مشخص کرد که آرایش فضایی RPS19 در زیرواحد 40S به گونه‌ای است که در حالت‌های مختلف این زیرواحد، حداقل چهار پروتئین از جمله RPS16, RPS25, RPS18 و RRP12 می‌توانند از نظر فضایی در مجاورت با RPS19 باشند. آمینواسیدهای دخیل در برهمکنش در تمامی فایل‌ها با استفاده از نرم‌افزار LIGPLOT و PDBsum به دقت تجزیه و تحلیل شد. این مطالعات نشان داد که پروتئین‌های RPS16 و RPS18 مشارکت‌کنندگان اصلی در برهمکنش با RPS19 در زیرواحد 40S هستند. برهمکنش بین این

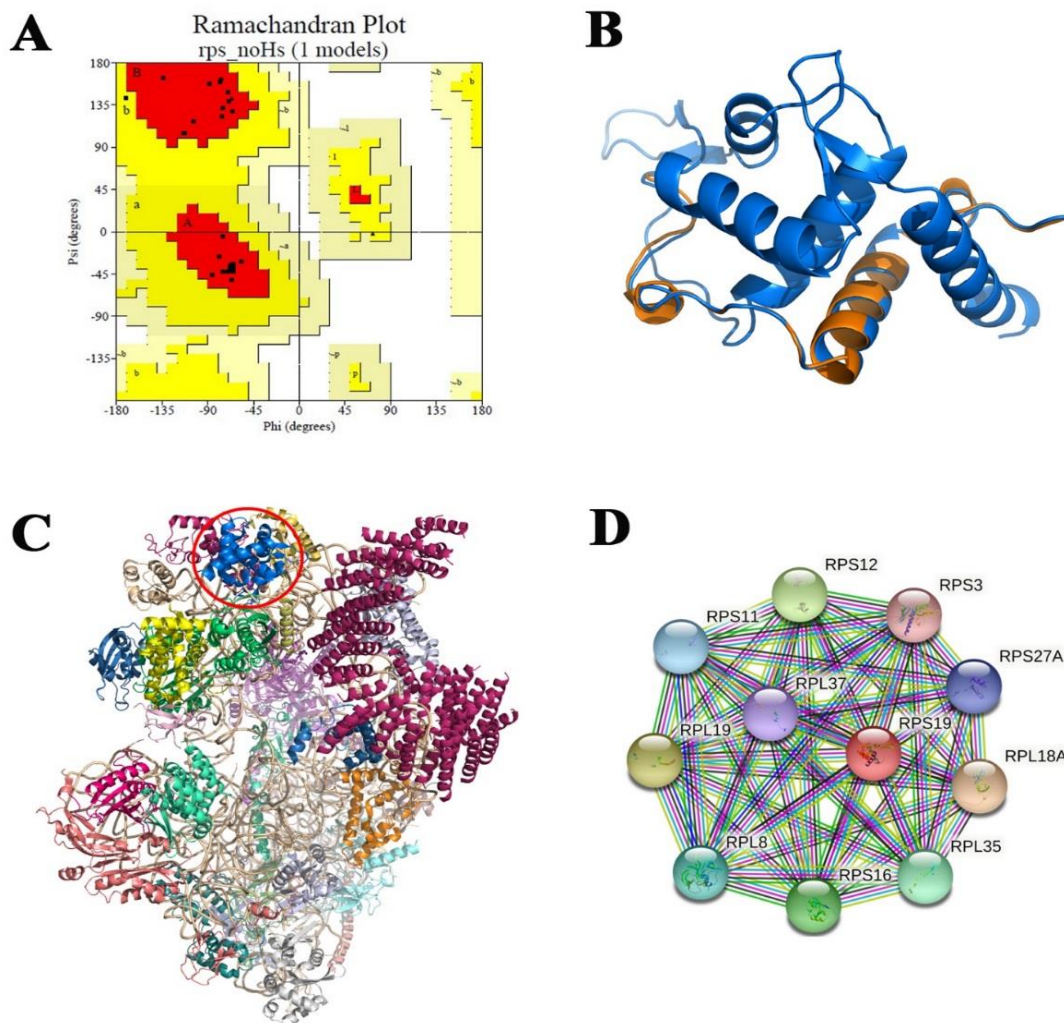
پروتئین به طورمعنی‌دار مختل شود. بنابراین، کوتاه- شدگی این پروتئین، علاوه بر اختلال در برهمکنش با سایر پروتئین‌ها و حتی پروتئین‌های غیرریبوزومی، می‌تواند اتصال زیرواحدهای 40S ریبوزومی را مختل سازد.

جدول ۱- توالی پرایمر برای ارزیابی جهش مورد نظر در بیمار، خانواده وی و افراد سالم.

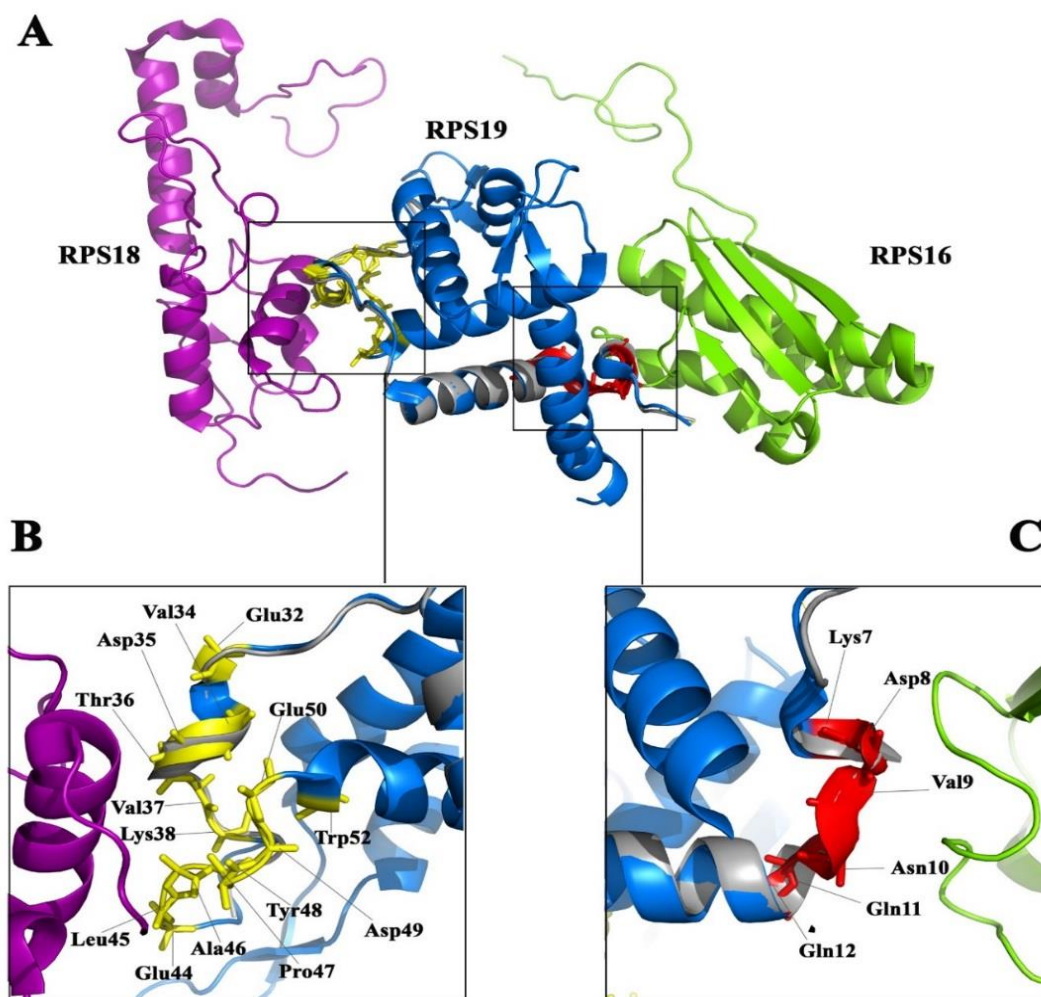
Name	Sequence (5'-3')	Tm	Product
RPS19-F	GGCATTGGGATATGGGGTAGT	59	231
RPS19-R	TATGGTTTGTGCCAGGGGTC	59	231



شکل ۲- تأیید جهش (NM_001022: exon3: c.126_127insTA) در بیمار و خانواده او.



شکل ۳- ساختار سوم پروتئین جهش‌یافته RPS19 و پروتئین‌های دربرهمکنش با RPS19. نمودار Ramachandran مدل نهایی برای جهش‌یافته RPS19 انتخاب شد (A). انطباق (هم‌ترازسازی) ساختاری دو شکل از پروتئین RPS19 به صورت طبیعی (آبی) و کوتاه شده (نارنجی) (B). محل پروتئین RPS19 در کمپلکس ریبوزومی 40S (C). پروتئین RPS19 به رنگ آبی و در داخل دایره قرمز نشان داده شده است. رشته‌های RNA به رنگ گندمی هستند و هر رشته پروتئین با یک رنگ خاص هایلایت شده است. شبکه ارتباطی پروتئین RPS19 با سایر پروتئین‌ها (D). به صورت دایره قرمز داخل شبکه دیده می‌شود.



شکل ۴- برهمکنش پروتئین RPS19 با پروتئین‌های RPS18 و RPS16. (A) آرایش فضایی پروتئین‌های RPS18 (ارغوانی) و RPS16 (سبز) در دو طرف پروتئین RPS19. پروتئین طبیعی RPS19 به رنگ آبی و پروتئین جهش‌یافته به رنگ خاکستری نشان داده شده است. (B) باقیمانده‌های درگیر در برهمکنش‌های RPS18 و RPS19 به رنگ زرد نشان داده شده است. (C) باقیمانده‌های دخیل در برهمکنش‌های RPS16 و RPS19 به رنگ قرمز نشان داده شده است.

بحث

یک بیمار مشخص شده و از لحاظ مدل‌سازی پروتئین در سلول مورد بررسی قرار گرفت. در ایالات متحده، با ۴ میلیون تولد زنده در سال، تقریباً ۲۵ تا ۳۰ بیمار جدید DBA در هر سال متولد می‌شود. به طور کلی، ۵۰۰۰ مورد جدید در سال در سرتاسر جهان گزارش می‌شود. DBA یک بیماری غالب اوتوزومی با ناهمگنی ژنتیکی است که در ۴۵ درصد موارد از والدین انتقال می‌یابد و در بقیه موارد بیماران دارای

کم‌خونی دیاموند-بلک‌فان یک اختلال ژنتیکی نادر است که مغز استخوان را درگیر می‌کند (۲۶). عملکرد اصلی مغز استخوان تولید سلول‌های خونی جدید است. مغز استخوان در DBA دچار اختلال می‌شود و گلبول‌های قرمز خون به اندازه کافی تولید نمی‌شوند. تقریباً نیمی از بیماران مبتلا به این نوع کم‌خونی دچار ناهنجاری‌های فیزیکی هستند (۱۰). در این مطالعه، با استفاده از تکنیک WES، یک جهش بیماری‌زا در

شناسایی شده است، که ۸۶ مورد آن‌ها بیماری‌زا بوده و بقیه پلی‌مورفیسم‌های غیربیماری‌زا بودند. این ۸۶ بیماری‌زا، ۱۳ جهش بی‌معنی (nonsense)، ۲۷ مورد جهش حذف و اضافه (indel)، ۱۴ جهش اینترون، ۷ جهش بزرگ و ۲۵ مورد بدمعنی (missense) بودند (۱۳).

بررسی شبکه ارتباطی RPS19 با استفاده از سرور STRING مشخص کرد که این پروتئین می‌تواند به بسیاری از پروتئین‌های ریوزومی متصل شود. همه این برهمکنش‌ها به زیرواحد ریوزومی 40S محدود نمی‌شود.

Orrù و همکاران به بررسی گسترده شبکه ارتباطی و برهمکنش‌شناسی RPS19 پرداختند و به پروتئین‌های زیادی از روش‌های آزمایشگاهی و کامپیوتری دست یافتند که نماینده برهمکنش با RPS19 بودند. از میان آن‌ها، پروتئین‌های با عملکردهای مختلف، از پروتئین‌های هسته‌ای و سیتوپلاسمی، وجود داشت که نقش‌های مختلف RPS19 را بیان کردند (۱۷).

از آنجا که مسیرهای مولکولی که RPS19 در آن دخالت دارد، هنوز کاملا مشخص نشده است، نقش این جهش در اتصالات پروتئینی جداگانه RPS19 را نمی‌توان مورد بررسی قرارداد. با این وجود، از آنجا که جهش‌ها پروتئین‌ها را کوتاه می‌کنند، انتظار می‌رود که پروتئین‌ها بیشتر اتصالات پروتئینی و در نهایت عملکرد خود را از دست بدهند. با توجه به در دسترس بودن اطلاعات ساختاری درباره کمپلکس 40S، آنالیز بیوانفورماتیک داده‌های ما در این مطالعه متمرکز بر نقش RPS19 در تشکیل زیرواحد 40S ریوزوم و ارتباط آن با سایر پروتئین‌ها در این کمپلکس بود (۹).

بررسی زیرواحد 40S در موارد مختلف نشان داد که پروتئین ما عمدتاً با دو پروتئین RPS16 و RPS18 در زیرواحد 40S ریوزوم ارتباط دارد که پیش و پس

سابقه خانوادگی از این بیماری نیستند (۱۴). WES یک روش بسیار پیچیده است که برای شناسایی تغییرات در DNA طراحی شده است. برخلاف روش توالی‌یابی که در آن فقط قطعه کوچکی از DNA یا یک ژن بررسی می‌شود، WES می‌تواند اگزوم‌های هزاران ژن را در یک زمان مورد بررسی قرار دهد. مبنای این آزمایش، توالی نوکلئوتید به نوکلئوتید است. این روش در واقع اگزوم را بررسی کرده و سپس آن را با یک نمونه مرجع و استاندارد مقایسه می‌کند. با توالی‌یابی اگزوم‌های بیمار و والدین وی و سپس مقایسه آن‌ها با توالی مرجع طبیعی، تغییرات و جهش‌ها در توالی DNA افراد شناسایی شده و بر اساس علایم بالینی بیمار گزارش می‌شود. اگرچه WES فقط اگزوم‌های ژن را بررسی می‌کند، در برخی موارد، بعضی از ژن‌ها ممکن است به طور کامل بررسی نشود و ممکن است گم شوند (از دست بروند). در این روش، بخش‌هایی از DNA که فقط حاوی اگزوم‌ها بوده و در مناطق کدگذاری هستند، انتخاب شده و سپس به وسیله تکنولوژی توالی‌یابی با توان عملیاتی بالا Illumina توالی‌یابی می‌شوند. ۱۸۰۰۰۰ اگزوم وجود دارد که تقریباً یک درصد از ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند (تقریباً ۳۰۰۰۰۰۰۰ باز) و جهش‌ها در این ۱ درصد از ژنوم انسان مهم‌تر از جهش‌ها در ۹۹ درصد دیگر ژنوم هستند. در این روش وارسته‌های (جهش‌یافته‌های) تک نوکلئوتیدی بررسی شده است و قابلیت شناسایی جهش موزاییکی شدن را ندارد. نتایج به دست آمده در این روش بایستی با روشی دیگر مورد تأیید قرار گیرد. علاوه بر این ممکن است در زمان شناسایی برخی از وارسته‌ها، اهمیت بالینی آن‌ها شناخته نشده باشد (۲۸).

RPS19 اولین ژن شناسایی شده در DBA با بیشترین فراوانی بود. بر اساس اطلاعات موجود در LOVD درباره DBA، ۲۱۹ جهش‌یافته در این بیماری

سنتز 18 SrRNA و ذخیره‌سازی 21S pre-Rna همراه است که در بیماران DBA نیز مشاهده شده است (۲۵).

مطالعات اخیر بیان می‌کند که نقص در RPS19 به تنظیم پایین دست پس از رونویسی زیرواحد کوچک پروتئین‌های ریوزومی مانند RPS20، RPS21 و RPS24 منجر می‌گردد (۱۸).

درواقع، آنالیز شبکه پروتئینی، اثربخشی داروهای هدف طراحی شده برای درمان DBA را بهبود می‌بخشد (۱۹).

از بین ژن‌های تنظیم بالادست شده، EGFL6، TNFAIP3 و SERPINB2 مهم‌ترین ژن‌ها بودند. این ژن‌ها در انواع مختلفی از فرآیندهای بیولوژیکی دخیل هستند (۵).

در مورد DBA، این ژن‌ها در تنظیم تکثیر سلولی، بیوسنتز L-سیرین، بیوسنتز آمینو اسید و متابولیسم گلايسين، سرين و ترئونين مشارکت دارند (۲۱).

ژن‌های اصلی در این واکنش با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape شناسایی شد. ژن AKT1 نقش بسیار قابل توجهی داشته و پس از آن ژن‌های IL6، NFKB1 و STAT3 نقش داشتند. از بین ژن‌های اصلی دخیل در این واکنش، ژن AKT1 به عنوان گزینه اصلی برای طراحی داروها مورد استفاده قرار گرفت (۲۲).

مکانیسمی که یک جهش در RPS19 می‌تواند به نقص در تولید RBC منجر گردد، کاملاً مشخص نیست. اعتقاد بر این است که پیش‌سازهای اریترئیدی نابالغ به نقص در پروتئین‌های ریوزومی حساس هستند. بیان زیاد RPS19 در مراحل اولیه تولید RBC دخیل است (۱).

سیف و همکاران برای اولین بار گزارش دادند که سرکوب RPS19 در سلول‌های کبدی موش به تنظیم پایین دست پروتئین‌های پیام‌رسانی اصلی RBC منجر شد (۱۵). از دست دادن RPS19 بیان MYB، یک

از این جهش رفتار متفاوتی را نشان می‌دهند. بنابراین، رفتار این پروتئین با RPS18 در حالت‌های سالم و جهش‌یافته بیانگر آن است که وقتی این جهش در RPS19 رخ می‌دهد، آمینواسیدهای Ala46، Leu45، Asp49، Tyr48، Pro47 و Glu50 و Trp52 که باقیمانده‌های اتصالی مهمی به RPS18 هستند، دیگر در این پروتئین وجود ندارند. بنابراین، اتصال RPS19 کوتاه شده به RPS18 تا حد زیادی کاهش خواهد یافت. با این وجود، به نظر می‌رسد که رفتار پروتئین RPS19 با RPS16 بسیار تحت تأثیر این جهش قرار نمی‌گیرد زیرا باقیمانده‌های اتصالی در پروتئین RPS19 قرار دارند که در اثر این جهش حذف نمی‌شود. اگرچه ظاهراً وجود این باقیمانده‌ها از برهمکنش RPS19 با RPS16 در حالت جهش‌یافته جلوگیری نمی‌کند، احتمالاً پروتئین جهش‌یافته آرایش فضایی پروتئین‌ها را در مجموعه مختل ساخته و ارتباط آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. ارزیابی واکنش‌های پروتئین-پروتئین در بیماران DBA نشان می‌دهد که ۱۵۹ پروتئین با RPS19 واکنش دارند از جمله NTPase، هیدرولاز، هلیکاز، ایزومراز، کینازها، فاکتورهای پیرایش، فاکتورهای ساختاری ریوزوم، عوامل رونویسی، ترانسفرازها، ترانسپورترها و پروتئین‌هایی که به RNA و DNA متصل می‌شوند (۴).

RPS19 نه تنها با زیرواحدهای تشکیل‌دهنده 40 S بلکه همچنین با 60 S ریوزوم‌ها ارتباط دارد. علاوه بر این، RPS19 همراه با سایر پروتئین‌های مهم در انتقال واحد کوچک از هسته تا سیتوپلاسم دخیل هستند. آن‌ها همچنین با پروتئین‌ها در سودویوریدینی شدن rRNA (یک مرحله اولیه در تولید ریوزوم) دخالت دارند (۱۱، ۱۲).

کاهش بیان RPS19 در محیط آزمایشگاهی، با نقص در بلوغ 40S، افزایش بیان زیرواحد 60S، کاهش

M., Buros C.M., Clinton C.M., Dobson L.J., Vlachos A., Atsidaftos E., Lipton J.M., Ellis S.R., Ramenghi U., Dianzani I. 2010. The ribosomal basis of Diamond-Blackfan Anemia: mutation and database update. *Human Mutation*, 31(12): 1269-1279.

3. Del Orbe Barreto R., rrizabalaga B., De la Hoz A.B., García-Orad Á., Tejada M.I., Garcia-Ruiz J.C., Fidalgo T., Bento C., Manco L., Ribeiro M.L. 2016. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *Internatonal Journal of Laboratory Hematology*, 38(6): 629-638.

4. DeLano W.L. 2002. The PyMOL molecular graphics system. Delano Scientific, San Carlos.

5. Gazda H., Lipton J.M., Willig T.N., Ball S., Niemeyer C.M., Tcherna G., Mohandas N., Daly M.J., Ploszynska A., Orfali K.A., Vlachos A., Glader B.E., Rokicka-Milewska R., Ohara A., Baker D., Pospisilova D., Webber A., Viskochil D.H., Nathan D.G., Beggs A.H., Sieff C.A. 2001. Evidence for linkage of familial Diamond-Blackfan anemia to chromosome 8p23. 3-p22 and for non-19q non-8p disease. *Blood*, 97(7): 2145-2150.

6. Gazda H.T., Sieff CA. 2006. Recent insights into the pathogenesis of diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, 135(2): 149-157.

7. Gerrard G., Valgañón M., Foong H.E., Kasperaviciute D., Iskander D., Game L., Müller M., Aitman T.J., Roberts I., de la Fuente J., Foroni L., Karadimitris A. 2013. Target enrichment and high-throughput sequencing of 80 ribosomal protein genes to identify mutations associated with Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology*, 162(4): 530-536.

8. Hahn C.N., Chong C.E., Carmichael C.L., Wilkins E.J., Brautigan P.J., Li X.C., Babic M., Lin M., Carmagnac A., Lee Y.K., Kok C.H., Gagliardi L., Friend K.L., Ekert P.G., Butcher C.M., Brown A.L.,

عامل رونویسی مهم در تولید RBC، را کاهش می‌دهد (۶). بررسی این شبکه به ما کمک می‌کند تا ساختار مولکولی بیماری DBA را بهتر درک کنیم. داشتن اطلاعات بیشتر درباره این مسیر مولکولی درمان را تسهیل می‌سازد. بررسی‌های گسترده درباره سیستم بیولوژیکی و تشکیل شبکه پروتئینی-پروتئینی با استفاده از داده‌های به دست آمده از STRING و GeneMANIA ضروری است زیرا به طور کامل مشخص نشده است که نقص ریبوزومی ناکارآمد و ضعیف چگونه می‌تواند به نقص در تولید RBC یا سرطان منجر شود (۱۷).

نتیجه‌گیری

نتیجه نهایی اینکه یک جهش بیماری‌زا در بیمار مورد نظر یافت شد. نبود جهش در خانواده بیمار و ۳۰ نفر از طریق توالی‌یابی سنگر تأیید شد. علاوه بر این، اثرات جهش بر پروتئین و همچنین بر سلول با استفاده از نرم‌افزار بیوانفورماتیک مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها نشان می‌دهد که این جهش تأثیر مهمی بر سلول و پروتئین دارد.

تشکر و قدردانی

از آقای دکتر محمد شهریوی و مدیریت آزمایشگاه سعید تهران بابت کمک‌های علمی و جمع‌آوری نمونه کمال تشکر و قدر دانی را داریم.

منابع

1. Assenov Y., Ramírez F., Schelhorn S.E., Lengauer T., Albrecht M. 2008. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics*, 24(2):282-284.

2. Boria I., Garelli E., Gazda H.T., Aspesi A., Quarello P., Pavesi E., Ferrante D., Meerpohl J.J., Kartal M., Da Costa L., Proust A., Leblanc T., Simansour M., Dahl N., Fröjmark A.S., Pospisilova D., Cmejla R., Beggs A.H., Sheen M.R., Landowski

extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3):1215.

17. Orrù, S., Aspesi A., Armiraglio M., Caterino M., Loreni F., Ruoppolo M., Santoro C., Dianzani I. 2007. Analysis of the ribosomal protein S19 interactome. *Molecular and cellular Proteomics*, 6(3): 382-393.

18. Proust A., Da Costa L., Rince P., Landois A., Tamary H., Zaizov R., Tchernia G., Delaunay J., 2003. Ten novel Diamond-Blackfan anemia mutations and three polymorphisms within the rps19 gene. *The Hematology Journal*, 4(2): 132-136.

19. Quarello P., Garelli E., Carando A., Brusco A., Calabrese R., Dufour C., Longoni D., Misuraca A., Vinti L., Aspesi A., Biondini L., Loreni F., Dianzani I., Ramenghi U. 2010. Diamond-Blackfan anemia: genotype-phenotype correlations in Italian patients with RPL5 and RPL11 mutations. *Haematologica*, 95(2): 206.

20. Rogers B.B., Bloom S.L., Buchanan G.R. 1997. Autosomal dominantly inherited Diamond-Blackfan anemia resulting in nonimmune hydrops. *Obstetrics and Gynecology*, 89(5): 805-807.

21. Roy V., Pérez W.S., Eapen M., Marsh J.C., Pasquini M., Pasquini R., Mustafa M.M., Bredeson C.N. 2005. Bone marrow transplantation for diamond-blackfan anemia. *Biology of Blood Marrow and Transplantation*, 11(8): 600-608.

22. Saladi S., Chattopadhyay T., Adiotomre P.J. 2004. Nonimmune hydrops fetalis due to Diamond-Blackfan anemia. *Indian Pediatrics*, 41(2): 187-188.

23. Sankaran V.G., Ghazvinian R., Do R., Thiru P., Vergilio J.A., Beggs A.H., Sieff C.A., Orkin S.H., Nathan D.G., Lander E.S., Gazda H.T. 2012. Exome sequencing identifies GATA1 mutations resulting in Diamond-Blackfan anemia. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(7): 2439-2443.

24. Soranzo N., Spector T.D., Mangino M., Kühnel B., Rendon A., Teumer A.,

Lewis I.D., To L.B., Timms A.E., Storek J., Moore S., Altree M., Escher R., Bardy P.G., Suthers G.K., D'Andrea R.J., Horwitz M.S., Scott H.S. 2011. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*, 43(10): 1012.

9. Heo L., Park H., Seok C. 2013., GalaxyRefine: Protein structure refinement driven by side-chain repacking. *Nucleic Acids Research*, 41(W1): 384-388.

10. Khurana M., Edwards D., Rescorla F., Miller C., He Y., Sierra Potchanant E., Nalepa G. 2018. Whole-exome sequencing enables correct diagnosis and surgical management of rare inherited childhood anemia. *Cold Spring Harbor Molecular Case Studies*, 4(5): a003152.

11. Laskowski R.A., MacArthur M.W., Moss D.S., Thornton J.M. 1993. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *International Journal of Applied Crystallography*, 26(2): 283-291.

12. Laskowski R.A., Swindells M.B. 2011. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. ACS Publications.

13. Lipton J.M., Ellis S.R. 2009. Diamond-Blackfan anemia: diagnosis, treatment, and molecular pathogenesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 23(2): 261-282.

14. Li H., Lodish H.F., Sieff C.A. 2018. Critical issues in Diamond-Blackfan anemia and prospects for novel treatment. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 32(4): 701-712.

15. Liu X., Jian X., Boerwinkle E.J. 2013. dbNSFP v2.0: a database of human non-synonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Human Mutation*, 34(9): E2393-E2402.

16. Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for

26. van Dooijeweert B., van Ommen C.H., Smiers F.J., Tamminga R.Y.J., Te Loo M.W., Donker A.E., Peters M., Granzen B., Gille H.J.J.P., Bierings M.B., MacInnes A.W., Bartels M. 2018. Pediatric Diamond-Blackfan anemia in the Netherlands: An overview of clinical characteristics and underlying molecular defects. *European Journal of Haematology*, 100(2): 163-170.
27. Vilboux T., Lev A., Malicdan M.C., Simon A.J., Järvinen P., Racek T., Puchalka J., Sood R., Carrington B., Bishop K., Mullikin J., Huizing M., Garty B.Z., Eyal E., Wolach B., Gavrieli R., Toren A., Soudack M., Atawneh O.M., Babushkin T., Schiby G., Cullinane A., Avivi C., Polak-Charcon S., Barshack I., Amariglio N., Rechavi G., van der Werff ten Bosch J., Anikster Y., Klein C., Gahl W.A., Somech R. 2013. A congenital neutrophil defect syndrome associated with mutations in VPS45. *The New England Journal of Medicine*, 369(1):54-65.
28. Vlachos A., Rosenberg P.S., Atsidaftos E., Alter B.P., Lipton J.M. 2012. Incidence of neoplasia in Diamond Blackfan anemia: a report from the Diamond Blackfan Anemia Registry. *Blood*, 119(16): 3815-3819.
29. Walne A.J., Dokal A., Plagnol V., Beswick R., Kirwan M., de la Fuente J., Vulliamy T., Dokal I., Dokal A., Plagnol V., Beswick R., Kirwan M., de la Fuente J., Vulliamy T., Dokal I. 2012. Exome sequencing identifies MPL as a causative gene in familial aplastic anemia. *Haematologica*, 97(4): 524-528.
- Willenborg C., Wright B., Chen L., Li M., Salo P., Voight B.F., Burns P., Laskowski R.A., Xue Y., Menzel S., Altshuler D., Bradley J.R., Bumpstead S., Burnett M.S., Devaney J., Döring A., Elosua R., Epstein S.E., Erber W., Falchi M., Garner S.F., Ghorri M.J., Goodall A.H., Gwilliam R., Hakonarson H.H., Hall A.S., Hammond N., Hengstenberg C., Illig T., König I.R., Knouff C.W., McPherson R., Melander O., Mooser V., Nauck M., Nieminen M.S., O'Donnell C.J., Peltonen L., Potter S.C., Prokisch H., Rader D.J., Rice C.M., Roberts R., Salomaa V., Sambrook J., Schreiber S., Schunkert H., Schwartz S.M., Serbanovic-Canic J., Sinisalo J., Siscovick D.S., Stark K., Surakka I., Stephens J., Thompson JR, Völker U., Völzke H, Watkins NA, Wells GA, Wichmann H.E., Van Heel D.A., Tyler-Smith C., Thein S.L., Kathiresan S., Perola M., Reilly M.P., Stewart A.F., Erdmann J., Samani N.J., Meisinger C., Greinacher A., Deloukas P., Ouwehand W.H., Gieger C.I., 2009. A genome-wide meta-analysis identifies 22 loci associated with eight hematological parameters in the HaemGen consortium. *Nature Genetics*, 41(11): 1182-1190.
25. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J. 2019. Mering CV.STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47(D1): D607-D613.

Production of An Incomplete Protein and Diamond Blackfan Anemia Disease Due to a New Nonsense Mutation in RPS19 Gene

Javad Rodgar Safari, Mohammad Mehdi Furqanifard*, Vajiheh Zarinpour

Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Abstract

Congenital hypoplastic anemia or Diamond-Blackfan anemia (DBA) usually occurs in the first year of life, and most patients with DBA survive until the age of six. For every one million live births, five to seven babies are affected by this disease. In 80-85% of cases, this disorder is caused by mutation of the ribosomal protein gene, and in about 25% of these cases, the RPS19 gene is the cause of this condition. The defect of this gene can disrupt the balance of blood cells, which appears as normocytic anemia, severe anemia, and macrocytic changes, along with a decrease in reticulocytes in the bone marrow. Patients need long-term corticosteroids. Whole exome sequencing of the blood sample of a patient with DBA was performed. The pathogenic mutation was investigated in the patient, his family and 30 people. The three-dimensional structure of the protein was evaluated using homology modeling and the interaction of the mutated protein with other proteins in the 40S ribosomal subunit. Peripheral blood test revealed a mutation on exon 3 of PRS19 gene (H42fs c.126-127 ins TA NM-00102) and chromosomal region 19q13.2. This mutation was autosomal dominant, during which amino acid number 42 of histidine was converted into a stop codon and a shortened protein was produced. The behavior of this protein with the PRS18 gene in healthy and mutated states shows that when the mutation occurs in PRS19, the amino acids Leu45, Ala46, Pro47, Tyr48, Asp49, Glu50 and Trp52, which are important residues connected are converted to RPS18, they are no longer present in this protein. Therefore, the binding of truncated RPS19 to RPS18 is significantly reduced. Although it seems that the presence of these residues may not prevent the interaction of RPS19 with RPS16 in the mutant state, it is possible that the mutant protein disrupts the spatial arrangement of other proteins and affects the interactions. affect them.

Keywords: Whole Exome Sequencing, Diamond-Blackfan Anemia, RPS19.