

Evaluation of Fam83h Interaction with Cytoskeleton Keratin- An In-Silico Study

Sherko Nasser¹, Sako Mirzaie², Zakaria Vahabzadeh³, Mohammad Bagher Khadem-Erfan⁴, Bahram Nikkhoo⁵, Zhila Bahrami Rad⁶, Negar Zamani⁷, Fardin Fathi⁸

1. Assistant Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Medical University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, 0000-0003-3113-7694

2. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Islamic Azad University, Sanandaj Branch, Sanandaj, Iran, 0000-0003-4080-9210

3. Assistant Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, 0000-0002-9854-9653

4. Associate Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Medical University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, 0000-0002-3101-2165

5. Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran, 0000-0002-5050-793X

6. Master of Science, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Medical University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, 0000-0002-0123-471X

7. Master of Science, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Medical University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, 0000-0002-7849-160X

8. Professor, Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Medical University of Kurdistan, Sanandaj, Iran, 0000-0002-4648-5598, Email: Farfath@gmail.com

ABSTRACT

Background and Aim: Fam83h Protein is a non-secretory protein that interacts with Casein Kinase1 Alpha (CSNK1A1) through its N-terminal.

Materials and Methods: In this study, the C-terminal domains of Fam83h in human and mouse were modeled using the I-TASER software for prediction of protein structure and function. The molecular dynamics (MD) simulations were performed by GROMACS version 5.0.2 to investigate their temporal behavior. FEL analysis was done for each model after MD. Protein-protein docking was done by PIPER to investigate the interaction of Fam83h C-terminal with cytoskeletal keratins5 as a cellular keratin model.

Results: The results showed that the human protein is more stable and compact than the mouse protein. Assessment of the interaction between the C-terminal of the mouse Fam83h and Keratin-5 proteins showed the residues Arg378, Pro391, Ser663, Glu710, Arg923 in mouse Fam83h protein made hydrogen bonds with Leu474, Arg417, Tyr453, Glu 397, Gln 396 and Glu 390 of the chain A and B of mouse keratin-5, respectively. Human Fam83h and keratin 5 form hydrogen bonds via residues of Thr433, His447 and Arg477 and Leu473, Gly476, Glu420 and Arg407.

Conclusion: According to the previous experimental reports, Fam83h can interact with keratin cytoskeleton and has a role in cancer progression. It can be concluded that Fam83h protein can directly interact with keratin filaments through its C-terminal. Therefore, our hypothesis based on in-silico study is: non-sense mutation in C-terminal of Fam83h protein may lead to truncated protein and subsequently disruption of keratin cytoskeleton bundling which can be regarded as a mechanism involved in cancer progression.

Keywords: Fam83h Protein, Keratin-5, CSNK1A1, Molecular Dynamics Simulation

Received: Feb 23, 2021

Accepted: Dec 21, 2021

How to cite the article: Sherko Nasser¹, Sako Mirzaie, Zakaria Vahabzadeh, Mohammad Bagher Khadem-Erfan, Bahram Nikkhoo, Zhila Bahrami Rad, Negar Zamani, Fardin Fathi. Evaluation of Fam83h Interaction with Cytoskeleton Keratin- An In-Silico Study. SJKU 2022;27(4):35-45.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

ارزیابی برهمکنش C-Terminal پروتئین Fam83h و کراتین اسکلت سلولی - یک مطالعه In-Silico

شیرکو ناصری^۱، ساکو میرزایی^۲، زکریا وهاب زاده^۳، محمد باقر خادم عرفان^۴، بهرام نیکخو^۵، ژیلا بهرامی راد^۶، نگار زمانی^۷، فردین فتحی^۸

۱- استادیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۳۱۱۳-۷۶۹۴

۲- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد سنندج، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۳-۴۰۸۰-۹۲۱۰

۳- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۹۸۵۴-۹۶۵۳

۴- دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۳۱۰۱-۲۱۶۵

۵- دانشیار گروه آسیب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۵۰۵۰-۷۹۳

۶- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۰۰۰۲-۴۷۱

۷- کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۷۸۴۹-۱۶۰

۸- استاد، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران، تلفن ثابت: ۰۸۷-۰۳۳۶۶۴۶۵۳-۰۸۷، farfath@gmail.com

Email: کد ارکید: ۰۰۰۰-۰۰۰۲-۴۶۴۸-۵۵۹۸

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین Fam83h یک پروتئین غیر ترشحی است که از طریق N-ترمینال خود با کازئین کیناز ۱ آلفا ۱ (CSNK1A1) برهمکنش دارد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، دومین‌های C-ترمینال در Fam83hFam83h، در انسان و موش با استفاده از نرم‌افزار I-TASSER برای پیش‌بینی ساختار و عملکرد پروتئین مدل‌سازی شدند. شبیه‌سازی دینامیک مولکولی توسط نسخه 5.0.2 نرم‌افزار گرومکس (GROMACS) برای بررسی رفتارهای پروتئین در طی زمان انجام شد. سپس برای هر مدل پس از انجام شبیه‌سازی مولکولی، آنالیز FEL صورت گرفت و داکینگ پروتئین-پروتئین برای بررسی برهمکنش C-ترمینال پروتئین Fam83h با کراتین-۵ اسکلت سلولی به عنوان مدلی از کراتین سلولی توسط PIPER انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که پروتئین انسانی پایدارتر و فشرده‌تر از موش است. علاوه بر این، ارزیابی برهم‌کنش بین C ترمینال پروتئین‌های Fam83h و کراتین-۵ در موش نشان داد که آمینواسیدهای آرژنین ۳۷۸، پرولین ۳۹۱، سرین ۶۶۳، گلوتامات ۷۱۰ و آرژنین ۹۲۳ در پروتئین Fam83h موش به ترتیب با لوسین ۴۷۴، آرژنین ۴۱۷، تیروزین ۴۵۳، گلوتامات ۳۹۷، گلوتامین ۳۹۶ و گلوتامات ۳۹۰ در کراتین-۵ اسکلت سلولی موش پیوند هیدروژنی ایجاد می‌کنند. پروتئین Fam83h انسان و کراتین-۵ انسانی نیز از طریق آمینو اسیدهای تراونین ۴۳۳، هیستیدین ۴۴۷ و آرژنین ۴۷۷ و لوسین ۴۷۳، گلايسين ۴۷۶، گلوتامات ۴۲۰، آرژنین ۴۰۷ پیوندهای هیدروژنی تشکیل می‌دهند.

بحث: طبق مطالعات انجام شده قبلی، پروتئین Fam83h با کراتین اسکلت سلولی برهمکنش داشته و در پیشرفت سرطان نقش دارد. می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین Fam83h می‌تواند به طور مستقیم با رشته‌های کراتین از طریق C-ترمینال خود برهمکنش داشته باشد؛ بنابراین، فرضیه ما در In-silico، این است که اختلال در C-ترمینال پروتئین Fam83h ممکن است منجر به اختلال در بسته‌بندی کراتین اسکلت سلولی به عنوان مکانیسمی در پیشرفت سرطان شود.

کلمات کلیدی: پروتئین Fam83h، کراتین-۵، شبیه‌سازی دینامیک مولکولی

وصول مقاله: ۱۴۰۰/۱۲/۷ اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۶/۱۵ پذیرش: ۱۴۰۱/۷/۱۶

پیشرفت، تکثیر و تهاجم سلول‌های سرطانی مانند سلول‌های سرطان پروستات (۹)، سرطان کبد (۱۰)، کارسینومای کلیه (۱۱) و سرطانی روده بزرگ نقش دارد (۲، ۱۲). پیشنهاد شده است که Fam83h با ایجاد بی‌نظمی در کراتین اسکلت سلولی به واسطه مسیر سیگنالینگ Wnt / β -catenin در پیشرفت سلول‌های سرطانی نقش داشته باشد. همچنین پیشنهاد شده است که Fam83h به پروتئین‌های اسکلت سلولی مانند کراتین ۵، ۸، ۱۴، ۱۸ از طریق انتهای C خود متصل می‌شود؛ اما هنوز دومین اتصالاتی خاصی برای کراتین‌ها شناسایی نشده است (۲، ۷)؛ بنابراین، مطالعه دقیق رفتار ساختاری پروتئین Fam83h، به ویژه برهمکنش C-ترمینال آن با کراتین‌های اسکلت سلولی، حائز اهمیت است. پس، ویژگی‌های دینامیک مولکولی پروتئین Fam83h در هر دو مدل موش و انسان مورد آنالیز قرار گرفت. همچنین برهمکنش آن‌ها با رشته‌های کراتین-۵ به عنوان مدلی برای مقایسه و آنالیز بیوانفورماتیکی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

پیش‌بینی ساختار سه بعدی Fam83h برای یافتن شباهت جایگاه توالی اسید آمینه در پروتئین Fam83h بین موش و انسان، از مجموعه blastp از کتابخانه ملی پزشکی ایالات متحده (National Library of Medicine, USA) استفاده شد. توالی‌های Fam83h انسان و موش هم‌ردیف شدند که ۹۶ درصد شباهت را از اسید آمینه ۱ تا پرولین ۳۷۵ را نشان داد، بقیه توالی پروتئین حاوی ناحیه C-ترمینال شباهت توالی ۸۰٪ داشتند؛ بنابراین، دو پروتئین Fam83h انسانی و موشی از پرولین ۳۷۵ تا آخرین اسید آمینه، برای ارزیابی ساختار پروتئین مدل شدند. همچنین، برهمکنش آن‌ها با کراتین-۵ اسکلت سلولی انسانی و موشی، مورد آنالیز

پروتئین Fam83h، اولین ژن در ایجاد بیماری آملوژنریس ایمپرکتا (Amelogenesis imperfecta, AI) یا نقص تشکیل مینای دندان است. این پروتئین در انتهای N-ترمینال خود دارای دومین DUFF1669 است که با کازئین کیناز ۱ آلفا ۱ که یکی از مدياتورهای مسیر سیگنالینگ Wnt / β -catenin است، برهمکنش ایجاد می‌کند (۱-۳). همچنین این پروتئین ممکن است با ایزوفرم‌های مختلف کازئین کیناز ۱ (CK1) و کراتین‌ها تعامل داشته باشد و کراتین‌سازماندهی اسکلت سلولی و دسموزوم را وساطت کند (۴، ۵). جهش در N-ترمینال پروتئین Fam83h، موجب محلی سازی نامناسب آن درون سلول می‌شود و متعاقباً از اتصال آن به CSNK1A1 جلوگیری می‌کند (۱). علاوه بر این احتمالاً با به دام انداختن کازئین کیناز در دومین N-ترمینال خود و انتقال یک گروه فسفات به رشته‌های کراتین سلولی، نقش کلیدی در سازماندهی اسکلت سلولی ایفا می‌کند (۱، ۶). جهش در C-ترمینال پروتئین Fam83h با بی‌نظمی رشته کراتین مرتبط است که منجر به اختلال در اتصالات دسموزوم در آملوبلاست‌ها می‌شود (۲، ۵، ۷، ۸). همچنین این پروتئین در سلول‌های اپیتلیال به کراتین اسکلت سلولی متصل می‌شود تا فرآیندهای سلولی مانند مهاجرت سلولی و پلازمازیون را انجام دهد (۲، ۷). کوگا و همکاران نشان دادند که پروتئین Fam83h به عنوان پلی بین CK1-a و کراتین اسکلت سلولی عمل می‌کند و حالت رشته‌ای کراتین را تنظیم می‌کند، به این معنی که شکست Fam83h باعث القای بسته‌بندی رشته‌های کراتین می‌شود، در حالی که بیان بیش از حد Fam83h، رشته‌های کراتین را از هم جدا می‌کند (۲، ۷). اخیراً گزارش شده است که بیان بیش از حد ژن Fam83h با سرطان‌های روده، ریه، سینه، کبد، تخمدان، پانکراس و معده مرتبط است (۶). همچنین گزارش شده است که Fam83h در

قرار گرفتند. دومین C-ترمینال Fam83h در انسان و موش با استفاده از پایگاه داده (I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBly Refinement مدل سازی شد (۱۳). از آنجایی که شباهت توالی کمی بین سؤال ما و ساختار سه بعدی پروتئین ها که به صورت تجربی حل شده بود، وجود داشت، استراتژی بند کشی (threading) برای مدل سازی Fam83h از ساختار اولیه آن، اعمال شد. برای انسان و موش به ترتیب پروتئین های با شناسه های 3GAW (فاکتور H انسانی) و 3HMJ (ساکارومایسس سرویزیه FAS نوع I) به عنوان الگوهای Fam83h استفاده شدند. سپس، هر کدام از ساختارهای استخراج شده برای مطالعه دینامیک مولکولی (MD) استفاده شدند. شبیه سازی دینامیک مولکولی (Molecular Dynamic Simulation):

پس از پیش بینی مدل ها، برای هر کدام به صورت مستقل شبیه سازی دینامیک مولکولی، برای بررسی رفتارهای زمانی آن ها انجام شد. از نسخه 5.0.2 نرم افزار GROMACS برای اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی به مدت ۲۰ نانو ثانیه (ns) استفاده شد (۱۴). برای هر دو اجرای شبیه سازی دینامیک مولکولی، AMBER 99SB و Tip3p به ترتیب به عنوان میدان نیرو و مدل آب اختصاص داده شدند (۱۴). از سرور PROPKa 2.0 برای محاسبه وضعیت یونیزاسیون مناسب گروه های قابل یونیزاسیون استفاده شد (۱۵). برای خنثی کردن مدل شبیه سازی شده به ترتیب از جایگزینی ۱۲ و ۱۵ یون سدیم به جای مولکول های حلال برای هر دو نوع پروتئین طبیعی و نوع جهش یافته پروتئین استفاده شد. الگوریتم تندترین شیب (steepest descent integrator) و همچنین الگوریتم گرادیان کانژوگ (conjugate gradient algorithm)، برای رسیدن نیرو به حداکثر مقدار (کمتر از ۱۰۰۰ کیلوژول بر مول بر نانومتر) و حداقل مقدار انرژی بر

روی هر اتم، به دست آمد. یک طرح منقطع دو بُرد برای تخمین برهمکنش های کوتاه بُرد و غیر پیوندی، با برهمکنش های واندروالس (کوتاه شده در 1.4 نانومتر) و برهمکنش های الکترواستاتیکی (کوتاه شده در 0.9 نانومتر) طراحی شد. از روش ذرات مش اوالد (PME)، برای محاسبه برهمکنش های دور برد الکترواستاتیک استفاده شد (۱۶). برای رساندن سیستم به 300K از V-rescale (ترموستات برندن اصلاح شده) (۱۶) و برای تنظیم فشار به ۱ بار از Parrinello-Rahman ensemble استفاده شد (۱۷). یک دوره زمانی ۲ فمتوثانیه برای حل معادلات حرکت نیوتن اختصاص داده شد. علاوه بر این، از الگوریتم حل محدودیت خطی برای درمان تمام پیوندهای شامل پیوندهای هیدروژنی استفاده شد (۱۶، ۱۸، ۱۹). VMD (۲۰)، PyMOL (۲۱) و همچنین ماژول های اجرا شده در GROMACS برای تجزیه و تحلیل خروجی های شبیه سازی دینامیک استفاده شد.

آنالیز انرژی آزاد (Free-Energy Landscape):

از آنجایی که شبیه سازی MD ساختارهای متعددی را که در طول زمان از پیش تعریف شده تولید می کند، آنالیز Free-Energy Landscape (FEL) برای هر مدل پس از اتمام اجرای MD انجام شد. برای استخراج پایدارترین ساختار با کمترین انرژی آزاد گیبس، آنالیز FEL برای هر اجرا شبیه سازی دینامیک اعمال شد. در این مطالعه از ماژول g_sham بسته GROMACS برای محاسبه انرژی آزاد (-Free Energy Landscape) استفاده شد.

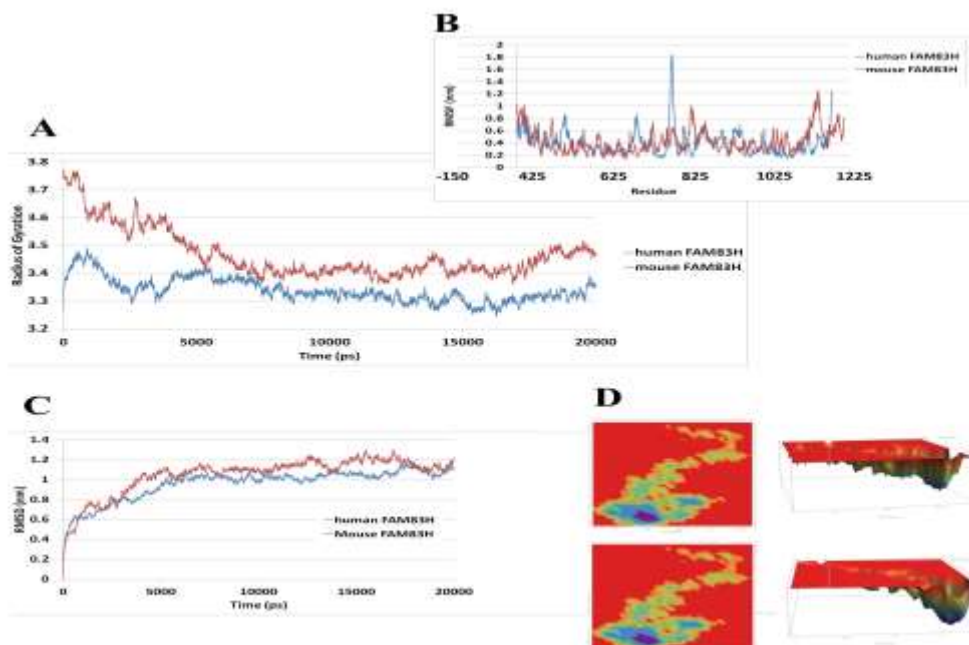
$$G\alpha = -K_B T \ln \left[\frac{P(q\alpha)}{P_{\max}(q)} \right]$$

که در آن KB ثابت بولتزمن است، T دمای شبیه سازی، P(qα) تخمینی از تابع چگالی احتمال به دست آمده از هیستوگرام داده های MD و Pmax(q) احتمال محتمل ترین حالت است. با در نظر گرفتن دو مختصات واکنش مختلف qi

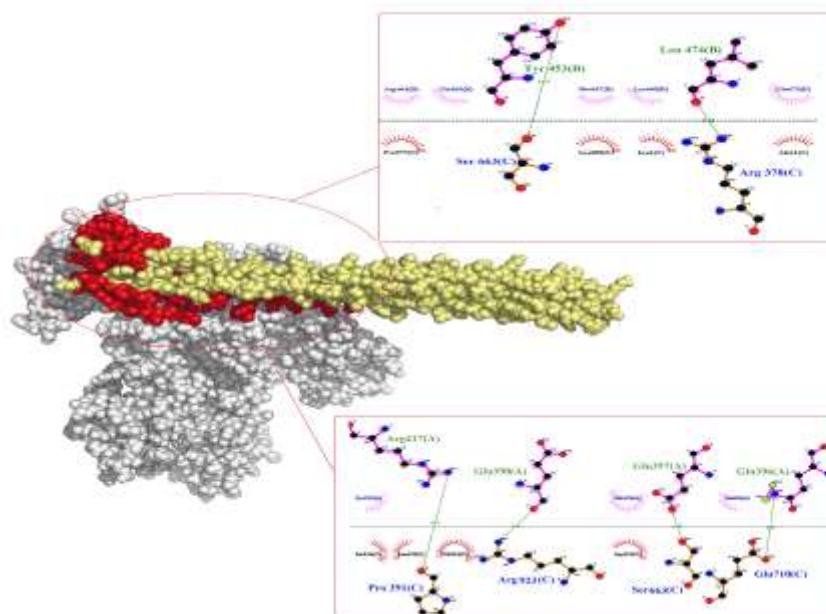
پس از استخراج مختصات، اتصال هر دو مدل Fam83h انسان و موش به کل ساختار کراتین-۵ مورد بررسی قرار گرفتند. داکینگ پروتئین-پروتئین مبتنی بر FFT با پتانسیل های زوجی، توسط PIPER انجام گرفت.

و qj، مناظر انرژی آزاد دو بعدی از توزیع احتمال مشترک $P(qj)$ ، سیستم به دست آمد. نمایش دو بعدی و سه بعدی FEL با استفاده از Wolfram Mathematica تولید شد. (شکل ۱) (۲۲).

آنالیز برهمکنش پروتئین-پروتئین:



شکل ۱. آنالیز MD در پروتئین Fam83h انسان و موش. A شعاع چرخش را در طول ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی MD نشان می دهد که به رنگ آبی (انسان) و قرمز (موش) نشان داده شده است. در مقایسه با موش، پروتئین Fam83h انسانی شعاع ژیراسیون (RG) کمتری دارد. این پارامتر به عنوان شاخص فشردگی ساختار پروتئین استفاده می شود؛ بنابراین پروتئین انسانی فشرده تر از Fam83h موش است. B. مقادیر انحراف جذر میانگین مربعات (FAM83H RMSF) انسان و موش در طول ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی MD. C. مشخصات زمانی انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) هر دو پروتئین نشان داده شده است، همان طور که مشاهده می شود در مقایسه با موش، پروتئین FAM83H انسانی دارای مقادیر RMSD کمتری است؛ بنابراین پایداری FAM83h در انسان بالاتر از موش است. هر دو پروتئین پس از ۶۰۰۰ پیکوثانیه به تعادل رسیدند. D. آنالیز FEL انسان (بالا) و موش (پایین) Fam83h پس از ۲۰ نانوثانیه شبیه سازی MD به عنوان نمایش ۲ بعدی (چپ) و ۳ بعدی (راست) نشان داده شده است. ناحیه بنفش و قرمز به ترتیب با مختصات با انرژی آزاد گیبس کم و زیاد مطابقت دارد.



شکل ۲. حالت برهمکنش FAM83H (کره های سفید) و کراتین-۵ موش (کره های طلایی). برهمکنش به رنگ قرمز نشان داده شده است. پیوندهای هیدروژنی با جزئیات در جعبه ها نشان داده شده و با حروف A, B و C مشخص شده است که به زنجیره های آلفا و بتا کراتین و C-ترمینال Fam83h اشاره دارد. برهمکنش بین FAM83H موش و کراتین-۵ شامل آرژنین ۳۷۸، سرین ۶۶۳ از پروتئین کراتین و Fam83h موش به لوسین ۴۷۴ و تیروزین ۴۵۳ در زنجیره B از کراتین-۵ موش است. همچنین پرولین ۳۹۱، آرژنین ۹۲۳، سرین ۶۶۳ و گلوتامات ۷۱۰ در FAM83H موش به ترتیب با آرژنین ۴۱۷، گلوتامات ۳۹۰، گلوتامین ۳۹۷ و گلوتامات ۳۹۶ در زنجیره A از کراتین-۵ موش، پیوندهای هیدروژنی ایجاد می کنند.

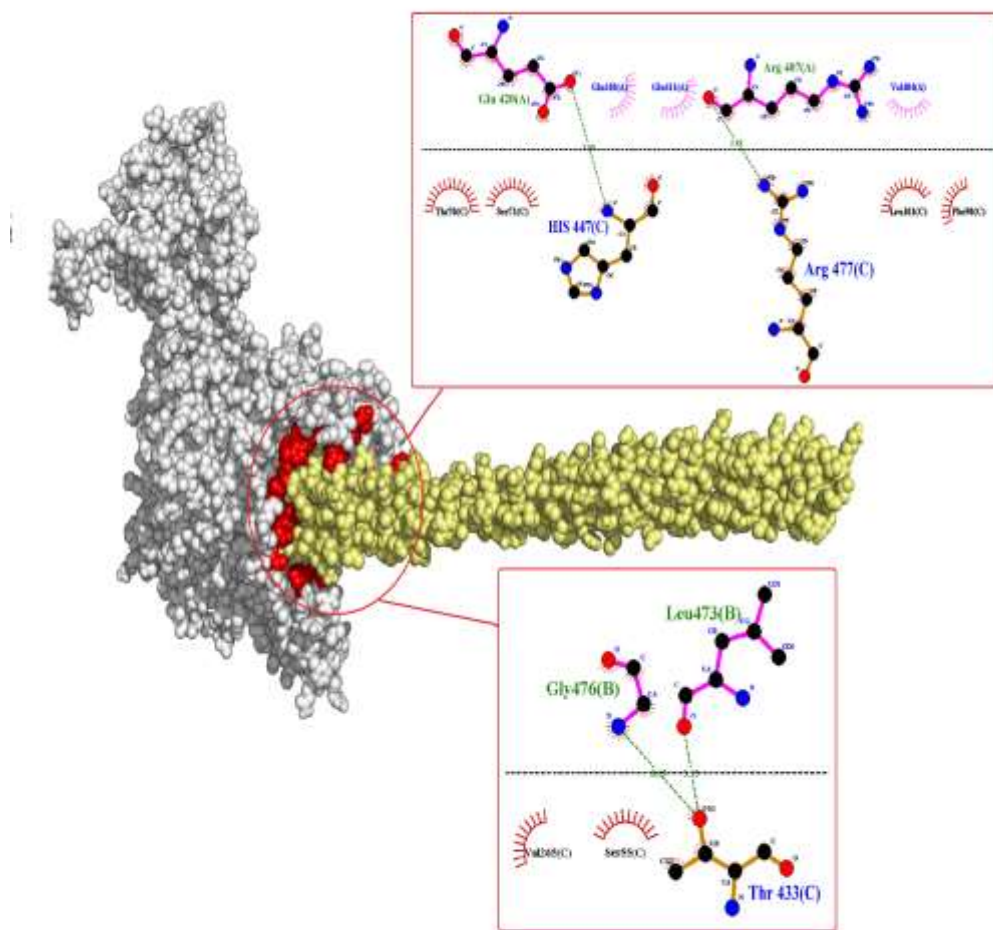
یافته ها

Deviation) هر دو پروتئین در شکل ۱ نشان داده شده است (شکل C۱) که نشان دهنده پایداری بالاتر Fam83h انسانی نسبت به موش است. شعاع چرخش مدل شبیه سازی شده در مدت زمان ۲۰ نانوثانیه در شکل ۱ نشان داده شده است (شکل A۱)؛ که نشان می دهد پروتئین Fam83h انسانی فشرده تر از پروتئین Fam83h موش است. پس از شبیه سازی MD، تعامل بین Fam83h و کراتین-۵ در انسان و موش بررسی شد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، برهمکنش بین Fam83h موش و کراتین-۵ شامل آرژنین ۳۷۸، سرین ۶۶۳ از پروتئین Fam83h موش به لوسین ۴۷۴ و تیروزین ۴۵۳ در زنجیره B از کراتین-۵ موش است. همچنین پرولین ۳۹۱،

آنالیز تلفیق و برهمکنش پروتئین Fam83h انسان و موش خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین ها Fam83h در انسان و موش با جزئیات کامل ارزیابی شد. برای هر مدل شبیه سازی شده آنالیز FEL جهت استخراج ترکیب پروتئین با کمترین انرژی آزاد گیبس در میان قالب های دینامیک مولکولی انجام شد (شکل D۱). مقادیر انحراف جذر میانگین مربعات RMSF (Root Mean Square Fluctuation) محاسبه شده برای پروتئین Fam83h انسان و موش در طول ۲۰ نانوثانیه در شکل ۱ (شکل B۱) نشان داده شده است. مشخصات زمانی انحراف جذر میانگین مربعات (RMSD) Root-Mean-Square

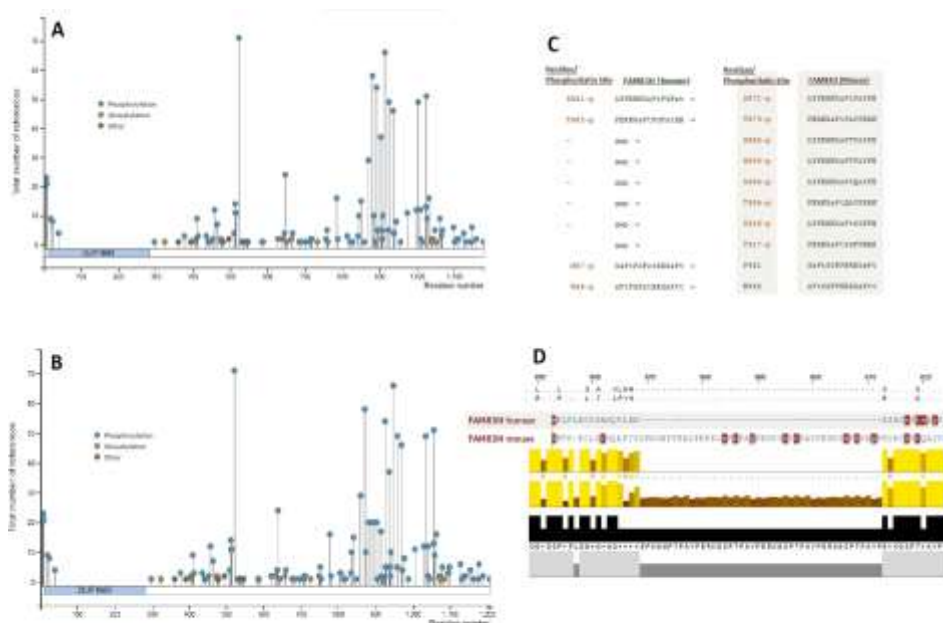
۵ انسان توسط پیوندهای هیدروژنی میان اسیدهای آمینه تره اونین ۴۳۳، هیستیدین ۴۴۷ و آرژنین ۴۷۷ از Fam83h با گلايسين ۴۷۶، لوسين ۴۷۳، گلوتامات ۴۲۰، و آرژنین ۴۰۷ در زنجیره B و A از کراتین-۵ ایجاد می شود (شکل ۳).

آرژنین ۹۲۳، سرین ۶۶۳ و گلوتامات ۷۱۰ در Fam83h موش به ترتیب با آرژنین ۴۱۷، گلوتامات ۳۹۰، گلوتامین ۳۹۷ و گلوتامات ۳۹۶ در زنجیره A از کراتین-۵ موش، پیوندهای هیدروژنی ایجاد می کنند، درحالی که برهمکنش بین کراتین-



شکل ۳. حالت برهمکنش FAM83H (کره های سفید) و کراتین-۵ انسان (کره های طلایی). برهمکنش به رنگ قرمز نشان داده شده است. پیوندهای هیدروژنی با جزئیات در جعبه ها نشان داده شده و با حروف A, B, و C مشخص شده است که به زنجیره های آلفا و بتا کراتین و C-ترمینال Fam83h اشاره دارد. برهمکنش بین کراتین-۵ انسان توسط پیوندهای هیدروژنی میان اسیدهای آمینه تره اونین

۴۳، هیستیدین ۴۴۷ و آرژنین ۴۷۷ از Fam83h با گلايسين ۴۷۶، لوسين ۴۷۳، گلو تامات ۴۲۰ و آرژنين ۴۰۷ در زنجيره B و A از کراتين-۵ ايجاد می شود.



شکل ۴. محل های فسفوریلاسیون روی سرین و ترئونین در طول پروتئین Fam83h در موش و انسان. A. تعداد محل فسفوریلاسیون در پروتئین Fam83h انسانی ۱۱۲ جایگاه است و بیشتر در ترمینال C قرار دارند. B. تعداد محل های فسفوریلاسیون روی پروتئین Fam83h موش ۱۱۶ است و بیشتر در پروتئین C ترمینال C قرار دارند. C. مقایسه بین اسید آمینه های Fam83h انسان و Fam83h موش (سرین s)، ترئونین t) و تیروزین y)؛ از که دارای نواحی پذیرنده فسفر هستند. D. مقایسه نواحی بین Fam83h انسان و Fam83h موش و محل های فسفوریلاسیون که در آن منطقه قرار دارند

بحث

انسان مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار گرفت. شباهت ۴۰ درصدی Fam83h بین ارتولوگ ها باعث شده است که این پروتئین در تمام ارتولوگ ها به شدت حفظ شود؛ بنابراین Fam83h به آرامی و به طور یکنواخت در طول زمان تکامل یافته است (۲۳). خانواده این پروتئین ها (خانواده پروتئین های FAM83) فقط در مهره داران وجود دارند مشخصه ضعیفی برای شناسایی داشتند. هوانگ و همکاران گزارش کردند که مکان های مثبت انتخابی در C-ترمینال وجود دارند و این نشان دهنده نقش های تطبیقی خاصی است که C-ترمینال Fam83h

از Fam83h از طریق برهمکنش با CK1-a نقش مهمی در تنظیم سازماندهی رشته های کراتین و مهاجرت سلول های اپیتلیال را ایفا می کند (۲). CSNK1A1 می تواند تعداد زیادی از پروتئین ها را فسفریله کند و با مشارکت در کمپلکس تخریب β -کاتین، به عنوان یک واسطه در مسیر سیگنالینگ Wnt در نظر گرفته می شود. علاوه بر این، تصور می شود که Fam83h نقش مهمی در بازآرایی اسکلت سلولی کراتین ایفا می کند؛ بنابراین برهمکنش Fam83h-کراتین در موش و

بنابراین بر اساس مطالعات قبلی نشان داده شده است که Fam83h با رشته‌های کراتین و همچنین به‌کارگیری CSNK1A1 (۲, ۷, ۱۲) کولوکالایز (Co-localize) می‌شود و همچنین نشان می‌دهد که Fam83h نقش مهمی در تنظیم اسکلت سلولی کراتین در مطالعات سرطان به ویژه تأثیر این ژن بر تکثیر، پیشرفت و مهاجرت سلول‌های سرطانی ایفا کرد. نالا و همکاران ۱۱ ژن مختلف را در سرطان پروستات مستقل از آندروژن مورد بررسی قرار دادند. Fam83h یکی از آن‌ها بود و در بین ژن‌های کاندید، نشان داد که ژن Fam83h بالاترین بیان را دارد و منجر به سرطان پروستات مستقل از آندروژن، از طریق سازماندهی اسکلت سلولی می‌شود (۲۷). MYC در تنظیم رونویسی بیان Fam83h نقش دارد، بیان بیش از حد MYC یا ناک اوت کردن MYC بیان mRNA MYC و پروتئین Fam83h را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بیان Fam83h با القای بیان MYC القا شد. کیم و همکاران نقش انکوژنیک Fam83h را که توسط انکوژن MYC در سرطان کبد القا می‌شود نشان دادند. همچنین نشان داده شد که Fam83h یک شاخص پیش‌آگهی ضعیف برای بیماران کارسینوما هیپاتوسلولار است (۲۸).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این مطالعه، ارزیابی مدل‌سازی محاسباتی و تجزیه و تحلیل MD از C-ترمینال پروتئین Fam83h، پروتئین Fam83h انسانی پایدارتر و فشرده‌تر از یک موش است. آنالیز برهمکنش پروتئین-پروتئین نشان داد که Fam83h دارای پتانسیل تعامل مستقیم با کراتین-۵ هم در انسان و هم در موش است؛ اما تعداد پیوندهای هیدروژنی در موش‌ها بیشتر از انسان بود؛ بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که Fam83h می‌تواند مستقیماً با کراتین اسکلت سلولی برهمکنش داشته باشد و به عنوان واسطه‌ای بین فسفوریلاسیون

در طول تکامل ایفا کرده است (۲۳). جهش در C-ترمینال باعث به هم ریختگی رشته کراتین و اختلال در دسموزوم‌ها می‌شود. قبلاً پیشنهاد شده بود که پروتئین Fam83h، CK1 را توسط N-Terminal به خدمت گرفته است. همچنین، paramio گزارش داد که خواص بسیار پویا پلی‌پپتیدهای کراتین را می‌توان با فسفوریلاسیون تعدیل کرد (۲۴). آگزون ۵ Fam83h در انسان اسیدآمینه ۲۴۷ تا اسیدآمینه ۱۱۷۹ را کد می‌کند که مکان‌های فسفوریلاسیون زایدی روی آن قرار دارند. بر اساس PhosphoSitePlus® v6.5.9.3، تعداد کل محل فسفوریلاسیون با توان بالا (بر اساس طیف سنجی جرمی کشف پروتئومی) در انسان ۱۱۲ و در موش‌ها ۱۱۶ بود که ممکن است مربوط به کمبود ۴۴ اسیدآمینه در انسان باشد. بر اساس PhosphoSitePlus® v6.5.9.3، تعداد کل محل فسفوریلاسیون با توان بالا (بر اساس طیف سنجی جرمی کشف پروتئومی) در انسان ۱۱۲ و در موش‌ها ۱۱۶ بود که ممکن است مربوط به کمبود ۴۴ اسیدآمینه در انسان باشد که از اسیدآمینه ۸۵۸ تا ۹۰۲ امتداد دارد (شکل ۴)؛ بنابراین نشان می‌دهد که پروتئین Fam83h انسانی دارای تعداد مکان‌های فسفوریلاسیون کمتری نسبت به موش است و احتمالاً پروتئین Fam83h انسانی پتانسیل انتقال فسفات کمتری دارد. با توجه به ارتباط بین CSNK1A1 به عنوان واسطه مسیر سیگنالینگ Wnt با Fam83h (۲۵) و وجود چندین گزارش مبتنی بر اینکه جهش در C-ترمینال Fam83h با به‌هم‌ریختگی اسکلت سلولی کراتین و اختلالات اپیتلیال (۲, ۷, ۱۲, ۲۶)، پیشنهاد می‌شود که Fam83h می‌تواند در تمایز و عملکرد سلول‌های اپیتلیال نقش داشته باشد. نقطه عطف در مورد عملکرد Fam83h، نقش در سازماندهی و/یا به هم ریختن ساختارهای اسکلت سلولی کراتین و برهمکنش با CK1a از یک طرف و برهمکنش با کراتین اسکلت سلولی از طرف دیگر است؛

این مقاله حاصل بخشی از داده های طرح تحقیقاتی «بررسی اثرات حذف ژن Fam83h به روش CRISPR/CAS9 در موش» که در مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان انجام گرفت و با کد اخلاق IR.MUK.REC.1396/181 توسط کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی کردستان به تصویب رسید.

CSNK1A1 و سازمان دهی رشته های کراتین عمل کند که به طور بالقوه با تنظیم کراتین اسکلت سلولی در سلول های سرطانی به ویژه در تکثیر، پیشرفت و حرکات سلول های سرطانی مرتبط است.

تشکر و قدردانی

منابع

1. Fulcher LJ, Bozatz P, Tachie-Menson T, Wu KZ, Cummins TD, Bufton JC, et al. The DUF1669 domain of FAM83 family proteins anchor casein kinase 1 isoforms. *Science signaling*. 2018;11(531).
2. Kuga T, Kume H, Kawasaki N, Sato M, Adachi J, Shiromizu T, et al. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I α and FAM83H in colorectal cancer. *Journal of cell science*. 2013;126(20):4721-31.
3. Bozatz P, Sapkota GP. The FAM83 family of proteins: from pseudo-PLDs to anchors for CK1 isoforms. *Biochemical Society Transactions*. 2018;46(3):761-71.
4. Zhou J, Shen B, Zhang W, Wang J, Yang J, Chen L, et al. One-step generation of different immunodeficient mice with multiple gene modifications by CRISPR/Cas9 mediated genome engineering. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;46:49-55.
5. Kim J-W, Lee S-K, Lee ZH, Park J-C, Lee K-E, Lee M-H, et al. FAM83H mutations in families with autosomal-dominant hypocalcified amelogenesis imperfecta. *The American Journal of Human Genetics*. 2008;82(2):489-94.
6. Tachie-Menson T, Gázquez-Gutiérrez A, Fulcher LJ, Macartney TJ, Wood NT, Varghese J, et al. Characterisation of the biochemical and cellular roles of native and pathogenic amelogenesis imperfecta mutants of FAM83H. *Cellular signalling*. 2020;72:109632.
7. Kuga T, Sasaki M, Mikami T, Miake Y, Adachi J, Shimizu M, et al. FAM83H and casein kinase I regulate the organization of the keratin cytoskeleton and formation of desmosomes. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-15.
8. Ding Y, Estrella M, Hu Y, Chan H, Zhang H, Kim J-W, et al. Fam83h is associated with intracellular vesicles and ADHCAI. *Journal of dental research*. 2009;88(11):991-6.
9. Nalla AK, Williams TF, Collins CP, Rae DT, Trobridge GD. Lentiviral vector-mediated insertional mutagenesis screen identifies genes that influence androgen independent prostate cancer progression and predict clinical outcome. *Molecular carcinogenesis*. 2016;55(11):1761-71.
10. Kim KM, Park S-H, Bae JS, Noh SJ, Tao G-Z, Kim JR, et al. FAM83H is involved in the progression of hepatocellular carcinoma and is regulated by MYC. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-13.
11. Kim KM, Hussein UK, Bae JS, Park S-H, Kwon KS, Ha SH, et al. The expression patterns of FAM83H and PANX2 are associated with shorter survival of clear cell renal cell carcinoma patients. *Frontiers in oncology*. 2019;9:14.
12. Kuga T, Kume H, Adachi J, Kawasaki N, Shimizu M, Hoshino I, et al. Casein kinase 1 is recruited to nuclear speckles by FAM83H and SON. *Scientific reports*. 2016;6(1):1-13.
13. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*. 2015;12(1):7-8.
14. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *Journal of computational chemistry*. 2005;26(16):1701-18.

15. Bas DC, Rogers DM, Jensen JH. Very fast prediction and rationalization of pKa values for protein–ligand complexes. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2008;73(3):765-83.
16. Mohseni SS, Nasri F, Davari K, Mirzaie S, Moradzadegan A, Abdi F, et al. Identification of novel inhibitor against endonuclease subunit of Influenza pH1N1 polymerase: A combined molecular docking, molecular dynamics, MMPBSA, QMMM and ADME studies to combat influenza A viruses. *Computational Biology and Chemistry*. 2018;77:279-90.
17. Parrinello M, Rahman A. Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method. *Journal of Applied physics*. 1981;52(12):7182-90.
18. Hosseini Y, Mollica A, Mirzaie S. Structure-based virtual screening efforts against HIV-1 reverse transcriptase to introduce the new potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Journal of Molecular Structure*. 2016;1125:592-600.
19. Karami M, Jalali C, Mirzaie S. Combined virtual screening, MMPBSA, molecular docking and dynamics studies against deadly anthrax: an in silico effort to inhibit *Bacillus anthracis* nucleoside hydrolase. *Journal of theoretical biology*. 2017;420:180-9.
20. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*. 1996;14(1):33-8.
21. Seeliger D, de Groot BL. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of computer-aided molecular design*. 2010;24(5):417-22.
22. Kozakov D, Brenke R, Comeau SR, Vajda S. PIPER: an FFT-based protein docking program with pairwise potentials. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2006;65(2):392-406.
23. Huang W, Yang M, Wang C, Song Y. Evolutionary analysis of FAM83H in vertebrates. *PloS one*. 2017;12(7):e0180360-e.
24. Paramio JM. A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *European journal of cell biology*. 1999;78(1):33-43.
25. Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current opinion in genetics & development*. 1998;8(1):95-102.
26. Lee S-K, Lee K-E, Jeong T-S, Hwang Y-H, Kim S, Hu J-C, et al. FAM83H mutations cause ADHCAI and alter intracellular protein localization. *Journal of dental research*. 2011;90(3):377-81.
27. Nalla AK, Williams TF, Collins CP, Rae DT, Trobridge GD. Lentiviral vector-mediated insertional mutagenesis screen identifies genes that influence androgen independent prostate cancer progression and predict clinical outcome. *Molecular carcinogenesis*. 2016;5. ۱۷۶۱-۷۱:(۱۱)۵
28. Kim KM, Park S-H, Bae JS, Noh SJ, Tao G-Z, Kim JR, et al. FAM83H is involved in the progression of hepatocellular carcinoma and is regulated by MYC. *Scientific reports*. 2017;7(1):3274.