

## بررسی بیوانفورماتیکی نقش جایگاه آمینواسیدی ۱۳۴ در اختصاصیت سوبسترای آنزیم دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز دخیل در بیوسنتز آنتوسیانین‌ها

رحیم سروستانی<sup>۱</sup> و محمدرضا نقوی<sup>۲\*</sup>

۱، ۲، دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استاد گروه بیوتکنولوژی کشاورزی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران، تهران- ایران

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۲/۲)

## Bioinformatical Study of the of role 134<sup>th</sup> Amino Acid Position in Substrate Specificity of Dihydroflavonol 4-Reductase in Anthocyanins Biosynthesis

R. SARVESTANI<sup>1</sup> AND M. R. NAGHAVI<sup>2\*</sup>

1, 2, M.Sc. Student, and Professor, Department of Agricultural Biotechnology,

College of Agricultural, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: Jan. 21, 2012 - Accepted: Feb. 21, 2012)

### Abstract

Plant colors are basically arisen from three categories namely, flavonoid, carotenoid and betalains. Flavonoid and in particular anthocyanins are main colored pigments of flower, fruits and seeds. The biosynthetic pathway leading to biosynthesis of anthocyanin among species is well conserved. One of the key enzymes in anthocyanins biosynthesis pathway is dihydroflavonol 4-reductase which converts dihydroflavonols into their leucoanthocyanidins. In order to investigate the role of the 134<sup>th</sup> amino acid position in substrate specificity determination of dihydroflavonol 4-reductase enzyme, different amino acid sequences of this enzyme were collected from the database and analyzed. Multiple amino acid sequence alignment showed that the amino acid sequence of this enzyme is protected among different species. In the two studied species, neither of the two conserved amino acids including asparagine and aspartic acid were found in this position. Our results clearly indicate that this position alone cannot be responsible for determination of substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase enzyme, and that lateral positions of the 134<sup>th</sup> residue could also be involved.

**Keywords:** Anthocyanins, Substrate specificity, 134<sup>th</sup> position, dihydroflavonol 4-reductase

### چکیده

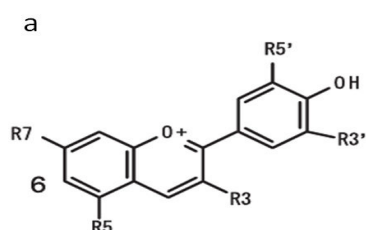
رنگ گیاهان اساساً ناشی از سه دسته ترکیبات فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و بتالین‌ها می‌باشد. فلاونوئیدها و به‌طور خاص آنتوسیانین‌ها رنگ‌رزه‌های اصلی گل‌ها، میوه‌ها و بذر هستند. سه آنتوسیانین سیانیدین، پلارگونیدین و دلفینیدین آنتوسیانین‌های اصلی در گیاهان می‌باشند. مسیر بیوسنتزی منتهی به آنتوسیانین‌ها در بین گونه‌های مختلف به‌خوبی محافظت شده است. آنزیم دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز یکی از آنزیم‌های کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها است که دی‌هیدرو فلانول‌ها را به لئوکوآنتوسیانیدین‌های مربوطه تبدیل می‌کند. برای بررسی نقش جایگاه آمینواسیدی ۱۳۴ آنزیم دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز در تعیین اختصاصیت سوبسترای آنزیم در گونه‌های مختلف، توالی‌های آمینواسیدی این آنزیم را از پایگاه‌های اطلاعاتی جمع‌آوری کرده و مورد تجزیه و تحلیل قرار داده‌ایم. نتایج هم‌ردیفی چندگانه آمینواسیدی نشان داد که توالی آمینواسیدی آنزیم دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز در بین گونه‌های مختلف محافظت شده می‌باشد. در دو گونه از گونه‌های مورد بررسی هیچ‌کدام از اسید آمینه‌های محافظت‌شده آسپارژین و آسپارتیک‌اسید در این جایگاه وجود نداشته است. نتایج ما به‌وضوح نشان داد که این جایگاه به تنهایی نمی‌تواند مسئول تعیین اختصاصیت آنزیم دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز باشد و جایگاه‌های آمینواسیدی مجاور جایگاه ۱۳۴ نیز ممکن است در این تعیین اختصاصیت سهم باشند.

**واژه‌های کلیدی:** آنتوسیانین‌ها، اختصاصیت سوبسترا، جایگاه ۱۳۴، دی‌هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز

## مقدمه

گیاهان بالغ بر ۲۰۰۰۰۰۰ نوع مختلف ترکیبات را تولید می‌کنند و انواع رنگ‌ها نیز جزء آن‌ها می‌باشند (Fiehn. 2002). رنگ‌های گل، میوه، بذر و گاهی اوقات برگ‌ها در نتیجه تولید و تجمع متابولیت‌های ثانویه‌اند (Nakatsuka *et al.* 2007) و اساساً ناشی از سه دسته ترکیبات فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها و بتالین‌ها هستند (Tanaka *et al.* 2005). فلاونوئیدها گروهی از متابولیت‌های ثانویه‌اند که به کلاس فنیل پروپانوئیدها متعلق‌اند و دامنه وسیعی از رنگ‌ها از زرد کم‌رنگ تا آبی را تولید می‌کنند (Tanaka *et al.* 2008). همه فلاونوئیدها دارای ساختمان ۱۵ کربنه‌ای بوده و در سه حلقه آرایش یافته‌اند (Brenda. 2001). آنتوسیانین‌ها کلاسی از فلاونوئیدها بوده که در میان رنگرزه‌های متنوع در گلبرگ‌ها از اجزای اصلی به‌شمار می‌روند و عامل ایجاد رنگ گل از نارنجی تا بنفش محسوب می‌شوند و ساختار شیمیایی آن‌ها عمدتاً تعیین‌کننده رنگ آن‌ها است (Katsumoto *et al.* 2007). این ترکیبات محلول در آب بوده، در واکوئل ذخیره شده و به‌طور وسیع در بذور گیاهان پراکنده‌اند (Tanaka *et al.* 2008). نقش شناخته‌شده رنگرزه‌های آنتوسیانین و رنگرزه‌های کمی، استخدام و به‌کارگیری گرده‌افشان‌ها و پخش‌کننده‌های بذر می‌باشد (Brenda. 2001). آنتوسیانین‌ها رنگرزه‌های اصلی گل‌ها و میوه‌ها می‌باشند و علاوه بر آن، خاصیت ضدسرطانی و ضدالتهابی و جلوگیری‌کننده از رسوب چربی در رگ‌های انسان را دارند (Saito and

Yamazaki. 2002). همچنین به‌عنوان مکانیسم غیرآنزیمی برای مقابله با اثرات تخریبی گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن شناخته شده‌اند (Diaponmaka *et al.* 2010). ساختمان آنتوسیانین‌ها و به‌طور خاص تعداد گروه‌های هیدروکسیلی روی حلقه B و تغییرات آنتوسیانین‌ها با گروه‌های آروماتیک روی رنگ آنتوسیانین‌ها اثر می‌گذارند. رنگ نهایی گل‌هایی که در درجه اول ترکیبات آنتوسیانین را انباشته می‌کنند به فاکتورهای مختلفی از جمله ساختار آنتوسیانین‌ها، نوع و غلظت رنگرزه‌ها کمی و pH و واکوئل بستگی دارد (Tanaka *et al.* 2009). تفاوت بین آنتوسیانین‌های فردی مربوط به تعداد گروه‌های هیدروکسیل، ماهیت و تعداد گروه‌های قندی متصل به مولکول، موقعیت این اتصال‌ها (موقعیتی که گروه‌های قندی به مولکول متصل می‌شوند) و ماهیت و تعداد گروه‌های آلیفاتیک و آروماتیک اسیدی متصل به قندها در مولکول می‌باشد (Kong *et al.* 2003). از میان ترکیب فاکتورهای مختلف صدها آنتوسیانین گزارش شده که بر مبنای سه آنتوسیانین اصلی پلارگونیدین، سیانیدین و دلفینیدین می‌باشند (Tanaka *et al.* 2009). سیانیدین، دلفینیدین و پلارگونیدین در بخش‌های خوراکی گیاهان به‌ترتیب در حدود ۵۰ درصد، ۱۲ درصد و ۷ درصد وجود دارند (Kong *et al.* 2003). این سه آنتوسیانین پایه ترکیبات رنگی گیاهی بوده و و به‌ترتیب به‌وجود آورنده رنگ‌های قرمز، آبی و پرتقالی می‌باشند و تفاوت آن‌ها در موقعیت هیدروکسیله‌شده حلقه B می‌باشد (شکل ۱).



b

Pelargonidin: R3'=H R5'=H

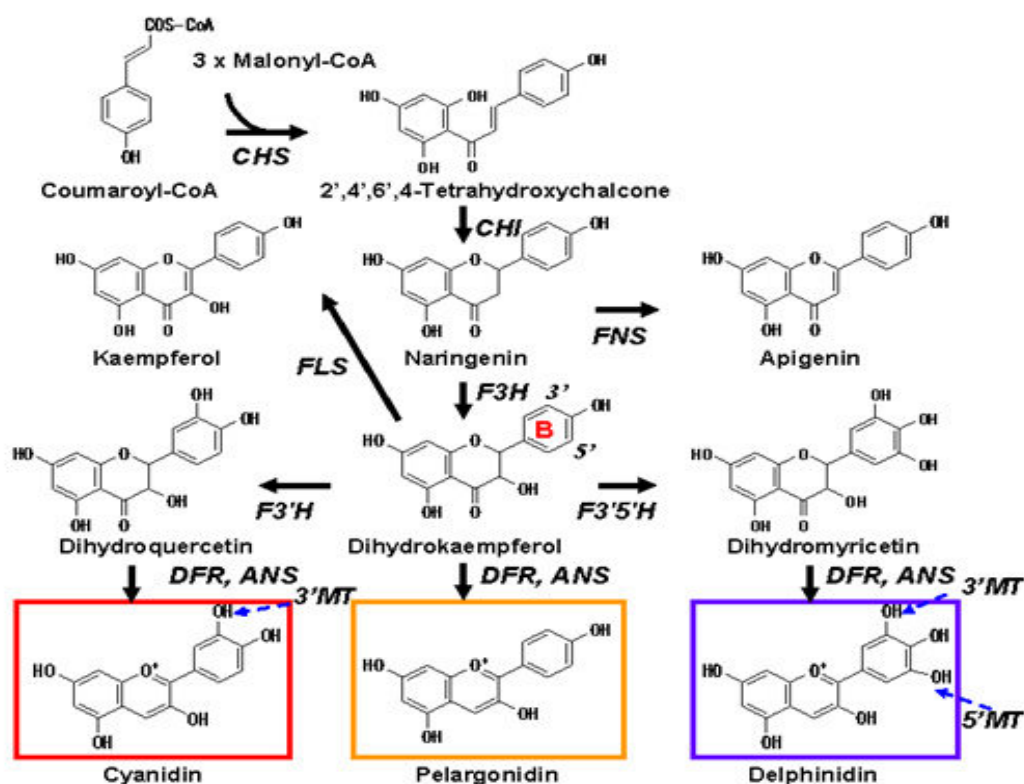
Cyanidin: R3'=OH R5'=H

Dephinidin: R3'=OH R5'=OH

شکل ۱- ساختمان آنتوسیانیدین. a: اسکلت پایه آنتوسیانیدین‌ها و b: الگوی جایگزینی گروه‌های مختلف در موقعیت‌های متفاوت (Tanaka *et al.* 2009)

p-کوماریل کوآنزیم A و ۳ مولکول مالونیل کوآنزیم A منجر به تولید یک مولکول تترا هیدرکسی چالکون می‌شود که یک واسطه کلیدی در بیوسنتز فلاونوئیدهاست و این واکنش توسط چالکون سینتاز کاتالیز می‌شود (To and Wang. 2006). آنتوسیانین‌ها به وسیله گلیکوزید ترانسفرازها (GT) در موقعیت‌های مختلف گلیکوزیل می‌شوند (Jones and Vogt. 2001). اضافه شدن گروه‌های آسیل به آنتوسیانین‌ها باعث افزایش پایداری و حلالت آن‌ها شده و مولکول‌ها را در برابر تجزیه آنزیمی حفاظت می‌کند (Yu et al. 2009) و افزایش تعداد گروه‌های هیدروکسل روی حلقه B آنتوسیانین‌ها و گروه‌های آسیل متصل شده، آنتوسیانین‌ها را به سمت آبی بودن تغییر می‌دهد (Tsuda et al. 2004).

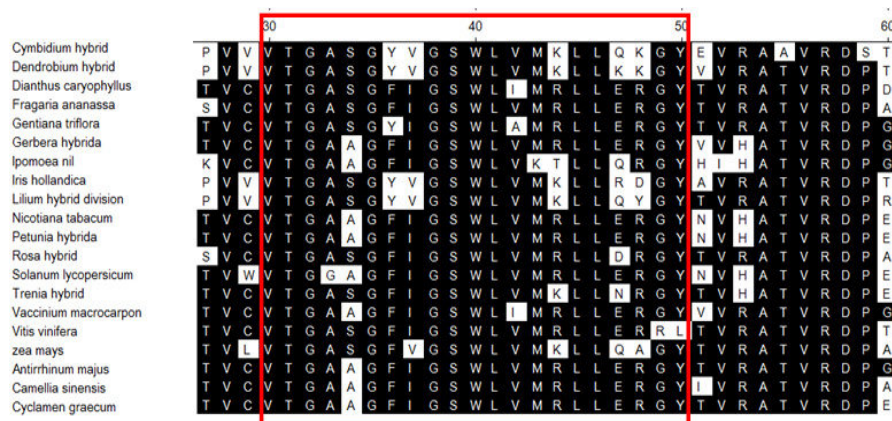
مسیر بیوسنتز آنتوسیانین‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است و این مسیر در بین گونه‌های مختلف، به خوبی محافظت شده است (Guo et al. 2008). اگر چه اکثر واکنش‌های بیوسنتزی این مسیر در گونه‌های مختلف مشترک می‌باشد اما تفاوت‌های مهمی در نوع آنتوسیانین تولید شده توسط هر گونه وجود دارد (Holton and Cornish. 1995). اسکلت پایه همه آنتوسیانین‌ها مرکب از سه حلقه آروماتیکی می‌باشند (Koes et al. 2005)، که در سیتوزول سنتز شده و در واکوئل ذخیره می‌شوند. همان‌طور که معمول است برای تشکیل فلاونوئیدها به دو پیش‌ماده P-کوماریل کوآنزیم A و مالونیل کوآنزیم A که به ترتیب از فنیل‌آلانین و استیل کوآنزیم A مشتق شده‌اند نیاز می‌باشد (Saito and Yamazaki. 2002). ترکیب یک مولکول



شکل ۲- مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها در گیاهان. این مسیر در بین گیاهان مختلف به خوبی محافظت شده است. عبارات خلاصه شده به ترتیب: CHS: چالکون سینتاز؛ CHI: چالکون ایزومراز؛ F3H: فلاون-۳-هیدروکسیلاز؛ FNS: فلاون سینتاز؛ FLS: فلاونول سینتاز؛ F3'H: فلاونوئید ۳-هیدروکسیلاز؛ F3'5'H: فلاونوئید ۵'۳-هیدروکسیلاز؛ DFR: دی هیدرو فلاونول ۴-ریدوکتاز؛ ANS: آنتوسیانیدین سینتاز؛ GT: گلیکوزید ترانسفراز؛ MT: متیل ترانسفراز و AT: آسیل ترانسفراز (Tanaka et al. 2009).

آن در بین گونه‌های مختلف گیاهی به خوبی محافظت شده است (Liu *et al.* 2005). این آنزیم‌ها برای احیاء دی‌هیدروفلاونول‌ها با فلانول سینتازها (FLS) که فلانول‌ها را به وجود می‌آورند و هیدروکسیلازها (F3'H و F3'5'H) که سایر دی‌هیدروفلاونول‌ها را به وجود می‌آورند رقابت می‌کنند (شکل ۲) و تغییر تعادل بین فعالیت آنزیم‌های DFR و FLS با استفاده از دست‌ورزی ژنتیکی می‌تواند راهکار مفیدی برای معرفی و یا افزایش تولید آنتوسیانین‌ها در گونه‌های گیاهی باشد (Davies *et al.* 2003).

آنزیم دی‌هیدروفلاونول ۴-ریدوکتاز (DFR) کاهش دی‌هیدروفلاونول‌ها را به لئوکوآنتوسیانیدین‌ها (فلانول ۴،۳ دیول) کاتالیز می‌کند (شکل ۳) و لئوکوآنتوسیانیدین‌ها پیش‌ماده فوری برای بیوستنتر آنتوسیانین‌ها می‌باشند (Shimida *et al.* 2004; To and Wang. 2006). آنزیم دی‌هیدروفلاونول ۴-ریدوکتاز آنزیم کلیدی در مسیر بیوستنتر آنتوسیانیدین‌ها می‌باشد و ژن‌های کدکننده آن در بسیاری از گونه‌های گیاهی از قبیل ذرت، اطلسی، جو، آرابیدوبسیس و گل‌میمون شناسایی شده (Holton and Cornish. 1995) و توالی ژن‌های



شکل ۳- هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های آمینواسیدی آنزیم DFR به روش Clustal W (Thompson *et al.* 1994) با برنامه DNA star. ناحیه مشخص شده محل اتصال NADP را به‌عنوان کوفاکتور نشان می‌دهد (Lacombe *et al.* 1997).

نیست. Beld *et al.* (1989) ناحیه‌ای به طول ۱۳ آمینواسید را محل تعیین این اختصاصیت دانسته‌اند و Johnson *et al.* (2001) یک ناحیه محافظت‌شده به طول ۲۶ اسید آمینه را که در بردارنده ناحیه ۱۳ اسید آمینه‌ای فوق نیز بوده جایگاه تعیین اختصاصیت سوبسترا اعلام کرده‌اند و جایگاه ۱۳۴ آن را تعیین‌کننده خصوصیت دانسته‌اند (Johnson *et al.* 2001). در این تحقیق با استفاده از توالی‌های موجود در پایگاه‌های اطلاعات داده و آنالیز بیوانفورماتیکی نقش این جایگاه آمینواسیدی در تعدادی از گونه‌های گیاهی شناخته‌شده مورد بررسی قرار گرفت.

آنزیم DFR خصوصیت با ارزشی را در تعیین سوبسترای خود نشان می‌دهد که باعث به‌نمایش درآمدن الگوی مشخصی از آنتوسیانین‌ها می‌شود (Martens *et al.* 2002). خصوصیت سوبسترای این آنزیم باعث انباشته‌شدن آنتوسیانین‌های متفاوت در گونه‌های گیاهی مختلف شده که در نتیجه آن هر گونه رنگ خاصی را به‌نمایش در می‌آورد. آنزیم DFR در برخی گونه‌هایی گیاهی دی‌هیدروکامپرفول را به‌عنوان سوبسترا به‌کار نمی‌برد و این گونه‌های گیاهی فاقد آنتوسیانین‌های نوع پلارگونیدین می‌باشند (Katsumoto *et al.* 2007). اختصاصیت این آنزیم در تشخیص سوبسترا چندان شناخته‌شده

|             | 134  |
|-------------|--|
| Antirrhinum | TVKKFI FT T SGGT VNVVEEHQKPVYDETDSSDMD FINSK KMTG WMYFVSKILAEKA  |
| Torenia     | TVKRLI FT NSAGT LNVVEEHQKPVYDESNWSDLD F IYST KMTG WMYFVSKVLAEKA  |
| Petunia     | TVKRLV FT SSAGT LDVQEQKLFYDQTSWSDLD F IYAK KMTG WMYFASKILAEKA    |
| Solanum     | TVKRLV FT SSAGT LDVQEQKLFYDETSWSDLD F IYAK KMTG WMYFVSKILAEKA    |
| Nicotiana   | TVKRLV FT SSAGT LLDVQEQKLFYDETSWSDLD F IYAK KMTG WMYFVSKILAEKA   |
| Ipomoea     | TVKRLV FT SSAGT LNVQPPQKPVYDETCWSDLD F IYAK KMTG WMYFASKILAEKE   |
| Gentiana    | TVKKLV FT SSAGT VDVQEQKPVYDENDWSDLD F INST KMTG WMYFVSKILAEKA    |
| Gerbera     | TVKKLV FT SSAGT VNGQEQKLVHYDESHWSDLD F IYSK KMTAWMYFVSKTLAEKA    |
| Cyclamen    | TVKKLV FT SSAGT VNVQATQKSVYDESDWSDLD F IYAK KMTAWMYFVSKTLAELA    |
| Vaccinium   | TVKRLV FT SSAGT AVVDQEQHQLVFDENNWS D VDFLYDK KMTG WTYFVSKTLAERA  |
| Camellia    | TVKRLV FT SSAGT VNVQEQHQPVF DENNWS DLHF INKK KMTG WMYFVSKTLAEKA  |
| Fragaria    | TVRRV FT SSAGT AVAIEEHRKEVYSEN NWS DVVFCR KVM T G WMYFVSKTLAEQA  |
| Rosa        | TVRRLV FT SSAGT VNVVEETQKPVYNE SNWSDV EFCRRV KMTG WMYFASKTLAEQE  |
| Vitis       | TVRRLV FT SSAGT VNIQEQHQLPVYDE SCWSDMEFCRAK KMTAWMYFVSKTLAEQA    |
| Zea         | TVRRIV FT SSAGT VNL EERQRPVYDEE SWTDVDFCRRV KMTG WMYFVSKTLAEKA   |
| Dendrobium  | SVQRVI FT SSAGT VNVVEEHQA AVYDE SCWSDLD FVNRV KMTG WMYFLSKTLAEKA |
| Cymbidium   | TVKRVI FT SSAGT VNVVEEHQATVYDESSWSDLD FVTRV KMTG WMYFVSKTLAEKA   |
| Lilium      | TVKRII FT SSAGT VNVVHEHQMPYDESSWSDI DFIRRV KMTG WMYFVSKILAEKA    |
| Iris        | TVKRIV FT SSAGT VDVKEHQTEYDESSWSDVDFCRRV KMTG WMYFVSKTLAERA      |
| Dianthus    | KLRRV FT SSGGT VNVVEATQKPVYDETCWSDLD F IRSV KMTG WMYFVSKILAEQA   |

شکل ۴- انطباق چندگانه توالی‌های DFR در ناحیه تشخیص سوبسترا. ناحیه‌ای که در جعبه مشخص شده است ناحیه مسئول تعیین اختصاصیت سوبسترا می‌باشد (پیشنهادشده توسط Johnson *et al.* 2001) اسیدآمینوهای ستاره‌دار بخشی از محل فعال (active site) آنزیم‌اند. رزیدو ۱۳۴ اسیدآمینوهای است که نقش کلیدی در تعیین سوبسترا دارد. (پیشنهادشده توسط Johnson *et al.* 2001).

در مرحله اول از تمام بخش‌های توالی‌ها استفاده کرده و عمل هم‌ردیفی کامل (Global Alignment) را انجام داده و بعد تنظیمات دستی اعمال شد. بر اساس نتیجه هم‌ردیفی مرحله اول قسمتی از پایانه C توالی‌ها که باعث ایجاد اختلاف و عدم هم‌ردیفی مطلوب بین نمونه‌ها می‌شد حذف شده و دومین مرحله هم‌ردیفی که در آن تمام توالی‌ها دارای ۳۳۰ اسید آمینه بوده‌اند انجام شد. علاوه بر این هم‌ردیفی محلی (Local Alignment) با ناحیه قلمدادشده به‌عنوان ناحیه تشخیص سوبسترا نیز به‌صورت جداگانه انجام شده است. نام علمی گونه‌های مورد استفاده در این مطالعه و کد دستیابی آن‌ها برای آنزیم DFR در پایگاه‌های اطلاعاتی به‌شرح زیر می‌باشد:

## مواد و روش‌ها

در این بخش ابتدا اطلاعات مربوط به توالی‌های اسیدآمینوهای آنزیم DFR را از گونه‌های مختلف با فرمت Fasta از پایگاه‌های مختلف اطلاعاتی (پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا NCBI و پایگاه اطلاعات توالی پروتئین Uni prot با آدرس اینترنتی <http://www.uniprot.org/uniprot> به‌دست آمد. این آنزیم در پایگاه‌های پروتئینی با EC: 1.1.1.219 شناخته می‌شود. در ادامه همولوژی و یکسانی توالی‌های به‌دست‌آمده از ۲۰ گونه ذکر شده در بالا به کمک برنامه BLAST تأیید شد. برای محاسبه هم‌ردیفی و آنالیز داده‌ها به روش Clustal W از نرم‌افزارهای DNA star و EBI استفاده شد.

*Antirrhinum majus*: P14721, *Dianthus caryophyllus*:P51104, *Gerbera hybrid*:P51105, *zea mays*: P51108, *Petunia hybrida*: P14720, *Solanum lycopersicum*: P51107, *Vitis vinifera*: P51110, *Dendrobium hybrid*: ACJ54348, *Cymbidium hybrid*: AAC17843, *Gentiana triflora*: BAA12736, *Ipomoea nil*: BAA22072, *Fragaria ananassa*: Q5UL13, *Rosa hybrid*: BAH24302, *Cyclamen graecum*: BAJ08043, *Torenia hybrid*: BAB20075, *Lilium hybrid*: BAB40789, *Iris hollandica*: A9EDN7, *Vaccinium macrocarpon*: AAL89715, *Nicotiana tabacum*: ABN80437, *Camellia sinensis*: AAT66505

## نتایج و بحث

NADP به‌عنوان کوفاکتور آنزیم تعیین‌شده بود (Lacombe *et al.* 1997) در بین توالی‌های مورد بررسی حفاظت بالایی را نشان داده است (شکل ۴). ناحیه گزارش‌شده به‌عنوان ناحیه تشخیص سوبسترا (Beld *et al.* 1989; Johnson *et al.* 2001) نیز در بین همه توالی‌ها دارای حفاظت بالایی بوده است. هم‌ردیفی چندگانه توالی‌ها در ناحیه گزارش‌شده به‌عنوان محل تشخیص سوبسترا به‌صورت مجزا نیز صورت گرفته و نتایج آن در شکل ۵ نشان داده شده است. حفاظت بسیار بالایی در این ناحیه بین اسیدآمین‌ها وجود داشته و جایگاه اسیدآمین‌های ۱۳۴ در آن‌ها مشخص شده است. به پیشنهاد Johnson *et al.* (2001) این موقعیت تعیین‌کننده خصوصیت سوبسترا بوده و تغییر محافظت‌شده اسیدآمین اسپارژین (N) به اسپارتیک‌اسید (D) در این جایگاه باعث پذیرفتن دی‌هیدروکامپرفول به‌عنوان سوبسترا توسط آنزیم DFR می‌شود. نکته جالب توجه این است که در جایگاه مذکور، توالی دو گونه مورد بررسی یعنی گونه *Vaccinium macrocarpon* و *Fragaria ananassa* فاقد هر دو اسیدآمین محافظت‌شده اسپارژین (N) و اسپارتیک‌اسید (D) است. تعدادی از گونه‌های مورد بررسی شامل *Vitis vinifera*, *Gentiana retiflora*, *Iris hollandica*, *Cymbidium hybrid*, *Nicotiana*, *Solanum lycopersicum* و *Petunia hybrida* توانایی کاتالیز کردن دی‌هیدروکامپرفول را نداشته و در نتیجه آن رنگدانه پلارگونیدین را تولید نمی‌کنند (Tanaka

تنها تعداد کمی از گونه‌های گیاهی توانایی تولید همه رنگ‌های ممکن را دارند. برخی از نهاندانگان دامنه محدودی از رنگ گل را به‌نمایش می‌گذارند و این محدودیت می‌تواند ناشی از عدم وجود یک ژن بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها و یا اختصاصیت سوبسترای آنزیم کلیدی بیوسنتز آنتوسیانین‌ها یعنی آنزیم دی‌هیدروفلاونول ۴-ریدوکتاز باشد (Johnson *et al.* 1999). آنزیم دی‌هیدروفلاونول ۴-ریدوکتاز یک آنزیم محوری در بیوسنتز فلاونوئید (آنتوسیانین)‌ها می‌باشد که به خانواده دی‌هیدروژناز/ ریدوکتازهای کوتاه زنجیره و یا ابرخانواده DFR تعلق دارد. این آنزیم پیش‌ماده‌های تولیدشده توسط مسیر عمومی بیوسنتزی فنیل‌پروپانوئید را در بیوسنتز لیگنین و فلاونوئیدها به‌کار می‌برد (Martens *et al.* 2002). مکانیسم تعیین‌کننده ویژگی سوبسترای به‌کار برده شده در این آنزیم چندان شناخته‌شده نیست و هم‌ردیفی توالی‌ها نیز چندان کمک‌کننده نبوده است. هم‌ردیفی چندتایی برخی از توالی‌های موجود این آنزیم در پایگاه مختلف داده به کمک برنامه Clustal W (Thompson *et al.* 1994) از پایگاه EBI انجام شده است. برای بهتر شدن نتیجه هم‌ردیفی چندتایی از انتهای پایانه C همه توالی‌های انتخاب‌شده مقداری حذف‌شده تا به طول ۳۳۰ اسیدآمین برسند. هم‌ردیفی توالی‌ها ابتدا با کل طول زنجیره پلی‌پپتیدی انجام گرفت که در نتیجه آن حفاظت بالایی در بین توالی‌های مورد بررسی مشاهده شد. ناحیه پایانه N که به‌عنوان محل اتصال

گزارش شده بود بسیار محافظت شده می باشد (Beld *et al.* 1989; Johnson *et al.* 1999, 2001). جایگاه ۱۳۴ نیز در توالی های مذکور وجود داشته است اما در توالی آنزیم DFR دو گونه توت فرنگی (*Fragaria ananassa*) و قره قات (*Vaccinium macrocarpon*) در جایگاه آمینوی مذکور هیچ کدام از اسید آمینه های محافظت شده اسپارژین (N) و اسپارتیک اسید (D) وجود نداشته است. نتایج به خوبی نشان می دهد که اگرچه ممکن است جایگاه ۱۳۴ نقش محوری در تعیین اختصاصیت سوبسترای آنزیم DFR داشته باشد اما به تنهایی نمی تواند مسئول تعیین اختصاصیت سوبسترا باشد و این قبلاً با تخلیص و مطالعه فعالیت آنزیم DFR انگور (*Vitis vinifera*) در شرایط درون شیشه نیز ثابت شده بود (Petit *et al.* 2007). در ناحیه ذکر شده به عنوان ناحیه تعیین اختصاصیت سوبسترا هر کدام از جایگاه های آمینواسیدی در تشخیص سوبسترا می تواند نقش داشته باشد. در این ناحیه موقعیت هایی وجود دارد که در بین توالی های مختلف متغیر می باشند اما یافتن رابطه معنی دار بین این تغییرات و نوع سوبسترای تشخیص داده شده توسط آنزیم کاری دشوار است (Johnson *et al.* 1999). هر سه سوبسترای آنزیم دی هیدروفلانول ۴-ریدوکتاز شامل دی هیدروکامپفرول، دی هیدروماریسیترین و دی هیدروکوئرسیترین در ساختار بسیار شبیه به هم می باشند و تفاوت آن ها در تعداد گروه های هیدروکسیل حلقه B آن ها می باشد (Liu *et al.* 2005). پیشنهاد می شود برای تعیین مکانیسم اختصاصیت آنزیم باید رابطه ناحیه تعیین اختصاصیت و الگوی اتصال سوبستراهای مختلف و گروه های هیدروکسیل آن ها روشن شود و این به خالص سازی و تهیه کریستال آنزیم و بررسی الگوی اتصال هر سه سوبسترا به ناحیه اتصال در شرایط درون شیشه نیاز دارد.

(2010, 2009, *et al.*). نتایج هم ردیفی چندتایی نشان داد که آنزیم DFR در این گونه ها در موقعیت ۱۳۴ متغیر می باشد.

در توالی گونه های *Cymbidium hybrid* و *Vitis vinifera* که به طور طبیعی فاقد توانایی تولید پلارگونیدین می باشند در جایگاه ۱۳۴ اسید آمینه اسپارژین وجود دارد و این با نتایج Johnson *et al.* (2001) که اعلام کرده بود وجود اسپارژین در جایگاه مذکور باعث کاتالیز دی- هیدروکامپفرول می شود مغایرت دارد زیرا دو گونه مذکور به صورت طبیعی فاقد توانایی تولید پلارگونیدین می باشند. در بقیه گونه های ذکر شده در بالا به عنوان گونه های ناتوان در تولید پلارگونیدین، اسید آمینه اسپارتیک اسید (D) وجود داشته و با نتایج جانسون و همکاران همخوانی دارد (Johnson *et al.* 2001). توالی آنزیم DFR برخی از گونه های شناخته شده به عنوان گونه های تولید کننده آنتوسیانین های نوع پلارگونیدین نیز در این هم ردیفی شرکت داده شده اند که شامل *Gerbera*, *Rosa hybrid*, *zea mays* و *Antirrhinum majus* hybrid می باشند و آنزیم DFR آن ها توانایی کاتالیز دی هیدروکامپفرول را به عنوان سوبسترا دارد (Tanaka *et al.* 2009, 2010). طبق نتایج به دست آمده در توالی همه گونه های مذکور در جایگاه ۱۳۴ اسید آمینه اسپارژین (N) وجود داشته است و این با یافته ی Johnson *et al.* (2001) مطابقت دارد (شکل ۵).

هم ردیفی چندگانه توالی آمینواسیدی آنزیم DFR که یک آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها و به خصوص آنتوسیانین ها به عنوان رنگریزه های طبیعی گیاهی می باشد (Martens *et al.* 2002). برای بررسی نظریه Johnson *et al.* (2001) مبنی بر نقش تعیین کننده جایگاه ۱۳۴ در تعیین ویژگی سوبسترای این آنزیم انجام گرفته است. نتایج نشان داد که ناحیه شناخته شده برای تعیین اختصاصیت سوبسترا در بین توالی های مختلف همان طور که قبلاً

## REFERENCES

- Beld M, Martin C, Huits H, Stuitje AR, Gerats AGM (1989) Flavonoid synthesis in *Petunia hybrida*: partial characterization of dihydroflavonol-4-reductase genes. *Plant Mol. Biol.* 13: 491-502.
- Brenda WS (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol.* 126: 485-493.
- Daiponmak W, Theerakulpisut P, Thanonkao P, Vanavichit A, Prathepha P (2010) Changes of anthocyanin cyanidin-3-glucoside content and antioxidant activity in Thai rice varieties under salinity stress. *Science Asia.* 36: 286-291.
- Davies KM, Schwinn KE, Deroles SC, Manson DG, Lewis DH, Bloor SJ, Bradley JM (2003) Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica.* 131: 259-268.
- Guo J, Han W, Wang MH (2008) Ultraviolet and environmental stresses involved in the induction and regulation of anthocyanin biosynthesis: A review. *Afr J Biotechnol.* 7: 4966-4972.
- Holton TA, Cornish EC (1995) Genetics and Biochemistry of Anthocyanin Biosynthesis. *The Plant Cell.* 7: 1995.
- Fiehn O (2002) Metabolomics--the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.* 48: 155-71.
- Johnson ET, Yi H, Shin B, Oh BJ, Cheong H, Choi G (1999) *Cymbidium hybrida* dihydroflavonol 4-reductase does not efficiently reduce dihydrokaempferol to produce orange pelargonidin-type anthocyanins. *The Plant Journal.* 19: 81-85
- Johnson ET, Ryu S, Yi H, Shin B, Cheong H, Choi G (2001) Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase. *The Plant Journal* 25: 325-333.
- Jones P, Vogt T (2001) Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: Tranquilizers and stimulant controllers. *Planta.* 213: 164-174.
- Katsumoto Y, Fukuchi-Mizutani M, Fukui Y, Brugliera F, Holton TA, Karan M, Nakamura N, Yonekura-Sakakibara K, Togami J, Pigeaire A, Tao GQ, Nehra NS, Lu CY, Dyson BK, Tsuda S, Ashikari T, Kusumi T, Mason JG, Tanaka Y (2007) Engineering of the Rose Flavonoid Biosynthetic Pathway Successfully Generated Blue-Hued Flowers Accumulating Delphinidin. *Plant. Cell. Physiol.* 48: 1589-1600.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F (2005) Flavonoids: a colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Tren. Plan. Sci.* 10: 236-242.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R (2003) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry.* 64: 923-933.
- Lacombe E, Hawkins S, Van Doorselaere J, Piquemal J, Goffner D, Poeydomenge O, Boudet AM, Grima-Pettenati J (1997) Cinnamoyl CoA reductase, the first committed enzyme of the lignin branch biosynthetic pathway: cloning, expression and phylogenetic relationships. *Plant. Journal.* 11: 429-441.
- Liu MS, Wang F, Dong YX, Zhang XS (2005) Expression analysis of dihydroflavonol 4-reductase genes involved in anthocyanin biosynthesis in purple grains of wheat. *Journal of Integrative Plant Biology.* 47: 1107-1114.
- Martens S, Teeri T, Forkmann G (2002). Heterologous expression of dihydroflavonol 4-reductases from various plants. *FEBS. Lett.* 531: 453-8.



- Nakatsuka T, Abe Y, Kakizaki Y, Yamamura S, Nishihara M (2007) Production of red-flowered plants by genetic engineering of multiple flavonoid biosynthetic genes. *Plant. Cell. Rep.* 26: 1951-1959.
- Petit P, Granier T, d'Estaintot BL, Manigand C, Bathany K, Schmitter JM, Lauvergeat V, Hamdi S, Gallois B (2007) Crystal Structure of Grape Dihydroflavonol 4-Reductase, a Key Enzyme in Flavonoid Biosynthesis. *J. Mol. Biol.* 368: 1345-1357.
- Saito K, Yamazaki M (2002) Biochemistry and molecular biology of the late-stage of biosynthesis of anthocyanin: lessons from *Perillafrutescens* as a model plant. *New Phytologist.* 155: 9-23.
- Shimada S, Takahashi K, Sato Y, Sakuta M (2004) Dihydroflavonol 4-reductase cDNA from non-anthocyanin-producing species in the caryophyllales. *Plant and Cell Physiol.* 45: 1290-1298.
- Tanaka Y, Katsumoto Y, Brugliera F, Mason J (2005) Genetic engineering in floriculture. *Plant Cell, Tiss Org Cult.* 80: 1-24
- Tanaka Y, Sasaki N, Ohmiya A (2008) Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal.* 54: 733-749.
- Tanaka Y, Brugliera F, Chandler S (2009). *Recent Progress in Flower Color Modification by Biotechnology* Int. J. Mol. Sci. 10: 5350-5369.
- Tanaka Y, Brugliera F, Kalc G, Senior M, Dyson B, Nakamura N, Katsumoto Y, Chandler S (2010) Flower color modification by engineering of the flavonoid biosynthetic pathway: *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 1760-1769.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-80.
- To KY, Wang CK (2006) Molecular Breeding of Flower Color. *Floriculture, Ornamn. Plant Biotechnol. J.* 1: 300-310.
- Tsuda S, Fukui Y, Nakamura N, Katsumoto Y, Yonekura-Sakakibara K, Fukuchi-Mizutani M, Ohira K, Ueyama Y, Ohkawa H, Holton TA, Kusumi T, Tanaka Y. (2004) Flower color modification of *Petunia hybrida* commercial varieties by metabolic engineering. *Plant. Biotechnol. J.* 21: 377-386.
- Yu XH, Gou JY, Liu CJ (2009) BAHD superfamily of acyl-CoA dependent acyltransferases in *Populus* and *Arabidopsis*: Bioinformatics and gene expression. *Plant. Mol. Biol.* 70: 421-442.

