

## جداسازی، همسانه‌سازی و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن کد کننده هیستامیناز نخود (*Cicer arietinum*) توده بومی گریت

هادی کریمی‌بیگی<sup>۱</sup>، فرهاد نظریان‌فیروزآبادی<sup>۲\*</sup>، صابر گلکاری<sup>۳</sup>، احمد اسماعیلی<sup>۴</sup>، مسعود علیرضایی<sup>۵</sup>

۱. کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد.

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد.

۳. استادیار مؤسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه.

۴. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد.

۵. دانشیار، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، خرم‌آباد.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۲/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۹/۱۹)

## Isolation, cloning and bioinformatic analysis of a histaminase encoding gene from chickpea grit landrace (*Cicer arietinum* L.)

Hadi Karimbeigi<sup>1</sup>, Farhad Nazarian Firouzabadi<sup>2\*</sup>, Saber Golkari<sup>3</sup>, Ahmad Ismaili<sup>4</sup>, Masoud Alirezaei<sup>5</sup>

1. M.Sc., Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Assistance Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran.

4. Associate Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

5. Associate Professor, Faculty of Veterinary Medicine Lorestan, Khorramabad, Iran

(Received: Apr. 30, 2018 - Accepted: Dec. 10, 2018)

### Abstract

Histamine, an important biogenic amine, is produced by many organisms and play a diverse role in living organisms. Many micro-organisms synthesis and stored histamine in food, especially in canned food products, posing health threat to human. Diamine oxidase or histaminase catalysis histamine in healthy individuals and reduces its harmful side effects. In this study, a full-length cDNA encoding an amine oxidase was isolated from a chickpea (*Cicer arietinum*) landrace (grit), deposited in Genbank database (KU058599) and cloned in a binary expression vector. The cloned cDNA had an ORF with 2013 bp length encoding a protein with 670 amino acids and a molecular mass of 75.7 KDa. Multiple sequence alignments analysis showed that the active site and important amino acids are highly conserved in *E.coli*, pea and grit histaminases. Bioinformatics analysis revealed differences in 4 amino acids between grit histaminase and that of GenBank deposited *Cicer arietinum* amine oxidase (CAA08855). Phylogenetic analysis grouped grit histaminase (KU058599) with plant, especially legume histaminases with 99% bootstrapping.

**Keywords:** Histaminase, Active site, Phylogenetic, Cloning, Chickpea.

### چکیده

هیستامین، یک آمین بیوژنیک مهم، توسط بسیاری از ارگانیسم‌ها تولید می‌شود و نقش‌های متنوعی در حیات و زندگی جانداران دارد. ذخیره هیستامین در غذا به خصوص در محصولات غذایی کنسرو شده مانند تن ماهی، سلامتی انسان‌ها را تهدید و به بدن فرد آسیب می‌رساند. دی آمین اکسیداز یا هیستامیناز، هیستامین موجود در بدن انسان را تجزیه و از اثرات مضر آن می‌کاهد. در این مطالعه cDNA کدکننده کامل یک آنزیم آمینواکسیداز، از نخود توده بومی گریت جداسازی شد و در پایگاه GenBank به شماره دسترسی Ku058599 ثبت گردید. به علاوه این توالی در یک پلاسمید بیانی همسانه سازی شد. cDNA جداسازی شده دارای یک ORF با طول ۲۰۱۳bp، پروتئینی با ۶۷۰ اسید آمینه و وزن مولکولی ۷۵/۷ KDa را تولید می‌کند. نتایج آنالیزهای هم ردیفی توالی چندگانه این پروتئین نشان داد که جایگاه‌های فعال و اسید آمینه‌های مهم در هیستامیناز باکتری ای کولای، نخود زراعی و نخود بومی گریت بسیار حفاظت شده هستند. بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که هیستامیناز توده بومی گریت با هیستامیناز نخود موجود در پایگاه Genbank (CAA08855) در ۹۹٪ اسید آمینه با هم اختلاف داشتند. نتایج حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی هیستامینازهای موجودات مختلف نشان داد که هیستامیناز نخود توده بومی گریت با هیستامینازهای گیاهان و مخصوصاً خانواده لگومینوزها با بوت استرپ ۹۹٪ در یک گروه قرار گرفتند.

**واژه‌های کلیدی:** هیستامیناز، جایگاه فعال، فیلوژنی، همسانه‌سازی، نخود.

## مقدمه

آمین‌های بیوژنیک از بنیادی‌ترین ترکیباتی هستند که توسط طیف وسیعی از موجودات زنده، حیوانات، گیاهان، باکتری‌ها و ویروس‌ها تولید می‌شوند (Alirezaei et al., 2014). این ترکیبات در طیف وسیعی از انواع ترکیبات مهم بیولوژیکی از قبیل مونو، دی و پلی‌آمین‌ها، هیستامین، آگماتین و کاتکول آمین وجود دارند. اکسیداسیون آمین‌های بیوژنیک توسط دو گروه اصلی از آنزیم‌ها؛ یعنی آمینواکسیدازهای حاوی مس و آمینواکسیدازهای حاوی فلاوین کاتالیز می‌شود که بر اساس طبیعت شیمیایی کوفاکتورشان گروه‌بندی می‌شوند (Massey 2000; Mondovi et al., 1997). به آمین اکسیدازهای حاوی مس (E.C.1.4.3.6; Cu-DAOs)، دی‌آمین اکسیداز<sup>۱</sup> (DAOs) یا به عبارتی هیستامیناز نیز اطلاق می‌شود (Masini et al., 2007). آمین اکسیداز حاوی مس یک پروتئین همودایمر است که در هر یک از زیر واحدهای خود یک یون مس و در بیشتر موارد دارای ۵،۴،۲ تری هیدروکسی فنیل آلانین کوئینون<sup>۲</sup> (TPQ) (Klinman and Mu 1994; Mateescu et al., 1997) است و در هر دو مورد، اکسیژن مولکولی پذیرنده الکترون و پراکسید هیدروژن (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) محصول واکنش می‌باشد (Federico et al., 2006).

دی آمین اکسیدازها در پستانداران از جمله انسان، پوترسین، کاداوارین، آگماتین و هیستامین را اکسید کرده و آلدئیدها را تولید می‌کنند (Duff et al., 2004; Federico et al., 2006; Masini et al., 2007; Alirezaei et al., 2014). در بدن انسان، دی‌آمین اکسیدازهای لایه موکوسی روده، مانع تجمع هیستامین تولیدی در بدن و مانع تجمع هیستامین در مواد غذایی می‌شوند (Maintz and Novak 2007). به علاوه، تحقیقات نشان می‌دهند که دی‌آمین اکسیداز در پاسخ

به شوک آنافیلاکسی در خوکیه‌های (Masini et al., 2002) و علیه آسیب‌های ناشی از ایسکمی قلبی (نرسیدن خون کافی به قلب) موش صحرایی مؤثر است (Masini et al., 2003). در حال حاضر، از دی‌آمین اکسیدازها جهت درمان ایسکمی میوکارد استفاده می‌شود. به عنوان مثال؛ اخیراً یک شرکت دارویی آمریکایی ادعا کرده است که می‌تواند با استفاده از یک هیستامیناز گیاهی، شوک آنافیلاکسی، آسم و همه بیماری‌های مرتبط با تجمع هیستامین از قبیل ورم آلرژیک و التهابات پوستی در انسان را درمان کند.

یکی از نکات جالب توجه در مورد دی‌آمین اکسیدازهای گیاهی در مقایسه با دی‌آمین اکسیدازهای جانوری تفاوت‌های کلیدی است که آنها را از نظر پزشکی حائز اهمیت می‌کند. به‌طور کلی دی‌آمین اکسیدازهای گیاهی دارای مزایای متعددی چون (۱) عمل کاتالیزوری بیشتر و اکسیداسیون کمتر مجدد آنزیم‌ها (۲) میل ترکیبی بیشتر با هیستامین و (۳) پایداری بالاتری در مقایسه با انواع جانوری هستند (Mondovi et al., 1983; Veronese and Pasut 2005). برای مثال، ربا و همکاران (۲۰۰۴) در تحقیقات خود نشان دادند که بیان ژن آمینواکسیداز نخود در گیاه توتون مقدار تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> را در دیواره سلولی بالا می‌برد، تولید H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> در توسعه سلولی و مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی نقش دارد. این محققان نشان دادند که هیچ تغییری در سطح لیگنینی شدن و مورفولوژی گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت مشاهده نشد (Rea et al., 2004). در تحقیقات مشابه دیگری ژن آمینواکسیداز مس دار در گیاه توتون بیان شد و گیاه توتون تراریخت به تنش شوری و خشکی (غیرزیستی) و بیماری‌های قارچی (زیستی) مقاوم گردید (Waie and Rajam 2003).

دون و همکاران (۲۰۰۸) ژن اگزالات اکسیداز را از گندم جدا و در گیاه کلزا بیان کردند. گیاهان تراریخت ۹۰/۲ درصد کاهش بیماری نسبت به والدین غیر تراریخت در برابر قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*

1. Diamine oxidase (DAOs)

2. 2,4,5-trihydroxyphenulalanine quinone

سپس ژن جداسازی شده با ژن‌های همولوگ و ارتولوگ با منشا موجودات مختلف، از نظر توالی‌های اسید نوکلئیک و پروتئین هیستامیناز مقایسه شده و پتانسیل آنزیم حاصل برای خالص‌سازی و یا تولید انبوه از طریق همسانه‌سازی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

بذر نخود توده محلی گریت از مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان تهیه شد. بذرها به مدت یک دقیقه در الکل ۷۰ درصد و ۱۰ دقیقه در هیپوکلرایت سدیم یک درصد ضدعفونی شدند. سپس بذرها سه بار با آب استریل شستشو داده شدند و پس از خشک شدن در شرایط کاملاً استریل کشت شدند. بذور در یک محیط تاریک در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تا ظهور جوانه‌های سفید رنگ نگهداری شدند (Rea *et al.*, 1998).

### استخراج RNA

از جوانه‌های سفیدرنگ هفت‌روزه ساقه‌چه نخود، RNA کل به روش کلرید لیتیم (LiCl) استخراج شد (Nazarian Firouzabadi *et al.*, 2007). از RNA استخراج شده برای تولید cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از کیت Fermentas First Strand cDNA Synthesis Kit (شرکت فرمنتاز) استفاده شد.

جدول ۱- مواد استفاده شده در هر واکنش PCR

| میزان به میکرولیتر | مواد موردنیاز             |
|--------------------|---------------------------|
| 2.5                | بافر کامل (10X)           |
| 1                  | dNTPs (10mM)              |
| 1.5                | آغازگر پیش‌رو (10pm)      |
| 1.5                | آغازگر برگشتی (10pm)      |
| 2                  | DNA الگو (20 ng/ $\mu$ l) |
| 1                  | Pfu (5u/ $\mu$ L)         |
| 15.5               | آب استریل                 |
| 25                 | حجم واکنش                 |

نشان دادند. ژن اگزالیک اکسیداز سم ترشح شده از پاتوژن را به  $\text{CO}_2$  و  $\text{H}_2\text{O}_2$  تبدیل می‌کند (Dong *et al.*, 2008). هو و همکاران (۲۰۰۳) ژن اگزالات اکسیداز را به گیاه آفتابگردان انتقال دادند و نتایج این تحقیق نشان داد که گیاه آفتابگردان تراریخت به قاچ *Sclerotinia sclerotiorum* مقاوم بود (Hu *et al.*, 2003). تحقیقات نشان می‌دهد که آمینوآکسیدازهای حاوی مس در کاتابولیسم پلی‌آمین‌ها در گیاهان نقش دارند و با غنی بودن گیاهان از پلی‌آمین، سوبسترای کافی برای واکنش آنزیم وجود دارد (Poonpipatgul *et al.*, 2012). به دلیل اهمیت هیستامینازهایی با منشأ گیاهی، امروزه محققان این آنزیم را با پلی‌اتیلن‌گلیکول متصل می‌کنند تا اثرات دارویی این آنزیم و ماندگاری آن را حفظ کنند و در جریان تزریق به بدن پستاندارانی مانند موش، اثرات حفاظتی بیشتری روی بدن داشته باشند.

تولید بسیار آسان هیستامیناز گیاهی و نیز خواص بهبودیافته آن پس از اتصال به ترکیبات دارویی دیگر هیستامینازهای گیاهی را به یک جایگزین دارویی مناسب برای درمان بیماری‌های ناشی از هیستامین تبدیل کرده است (Federico *et al.*, 2006; Veronese and Pasut 2005). به همین دلیل، یک مکمل غذایی خوراکی حاوی هیستامیناز بذر نخود به همراه نشاسته‌ای دارای متیل کربوکسیل در بازار وجود دارد که با مصرف آن سطح هیستامین بدن کنترل می‌شود (Calinescu *et al.*, 2012).

از آنجایی که منبع جداسازی هیستامیناز در میزان فعالیت آن موثر است (Federico *et al.*, 2006) و تاکنون در این خصوص مطالعه‌ای روی توده‌های محلی از جمله نخود زراعی صورت نگرفته است، در این مطالعه ژن کدکننده آنزیم هیستامیناز از گیاه نخود زراعی توده بومی گریت جداسازی گردید.

جدول ۲. سیکل گرمایی استفاده شده در هر واکنش

| مرحله واکنش       | تعداد سیکل | دما (درجه سانتی‌گراد) | زمان      |
|-------------------|------------|-----------------------|-----------|
| واسرشت‌سازی اولیه | 1          | 94                    | 5 min     |
| واسرشت‌سازی       | 40         | 94                    | 1 min     |
| اتصال آغازگرها    | 40         | 68                    | 45 Sec    |
| تکثیر DNA الگو    | 40         | 72                    | 1.5-3 min |
| تکثیر نهایی       | 1          | 72                    | 15 min    |

بانک اطلاعات ژنی در پایگاه NCBI و پایگاه پروتئینی UniProtKB اخذ شد. از پایگاه دمین‌های حفاظت شده برای پیدا کردن دمین‌ها استفاده شد (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های هیستامیناز گیاهان، قارچ‌ها، باکتری‌ها و حیوانات به کمک الگوریتم CLUSTAL-Omega انجام شد. رسم درخت فیلوژنی به کمک نرم‌افزار MEGA7 با روش حداکثر درست‌نمایی صورت گرفت (Kumar *et al.*, 2016). برای رسم ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها و هر کدام از دمین‌ها، از نرم‌افزار آنلاین Phyre2 استفاده شد (Lawrence *et al.*, 2015). برای تعیین تعداد ساختار دو بعدی آن از نرم‌افزارهای بر خط PDBsum، از سایت SignalP برای تعیین سیگنال پپتید و از سایت CDD برای بررسی اجزای ساختار ژن استفاده شد (Ganguly *et al.*, 2015).

### نتایج و بحث

RNA کل استخراج شده از کمیت و کیفیت خوبی برخوردار بود و نتایج حاصل نشان داد که جوانه‌های هفت روزه نخود دارای مقادیر متنابهی از RNA هستند. همچنین نتایج این بخش از مطالعه نشان داد که استفاده از کلرید لیتیم برای جداسازی RNA کل، قادر است تا ۱۰۰۰ ng/μl عملکرد داشته باشد. همچنین داده‌های مربوط به نسبت‌های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ به ترتیب در محدوده ۱/۹-۲ و تقریباً ۲ بود. همان‌طوری که در شکل A۱ دیده می‌شود، دو

یک جفت آغازگر اختصاصی (آغازگر رفت: 5'-TTAGAGCTCATGGCTTCCACCACCA-3'؛ آغازگر برگشت: 5'-TACCCCGGGTTAATTGGAGCAACC-3') بر اساس توالی ژن هیستامیناز نخود (به شماره دسترسی AJ009825) با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI10 به گونه‌ای طراحی شدند تا ناحیه کد کننده ژن هیستامیناز به طول کامل ۲۰۱۳ bp تکثیر شود. برای سهولت همسانه‌سازی محصول PCR، جایگاه برشی آنزیم *SacI* و کدون شروع در توالی آغازگر رفت و جایگاه آنزیم *SmaI* در توالی آغازگر برگشت به همراه کدون پایان طراحی شدند. واکنش مربوط به PCR در (جدول ۱) و برنامه PCR برای تکثیر ژن هیستامیناز در (جدول ۲) گزارش شده اند. محصول PCR روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز گردید و از ladder 1kb (شرکت Bioron آلمان) به عنوان نشانگر استفاده شد. محصول PCR ژن هیستامیناز با کیت GeneJET Gel Extraction Ki (شرکت فرمنتاز) از ژل خالص‌سازی شد و در ناقل همسانه‌سازی pTZ57RT (شرکت فرمنتاز) همسانه‌سازی گردید تا پلاسمید pTZ57/RT-Hista حاصل شود. هیستامیناز این مطالعه برای صحت تکثیر به روش سانگر و با کمک آغازگرهای آشیانه‌ای توالی‌یابی شد.

### مطالعات بیوانفورماتیکی

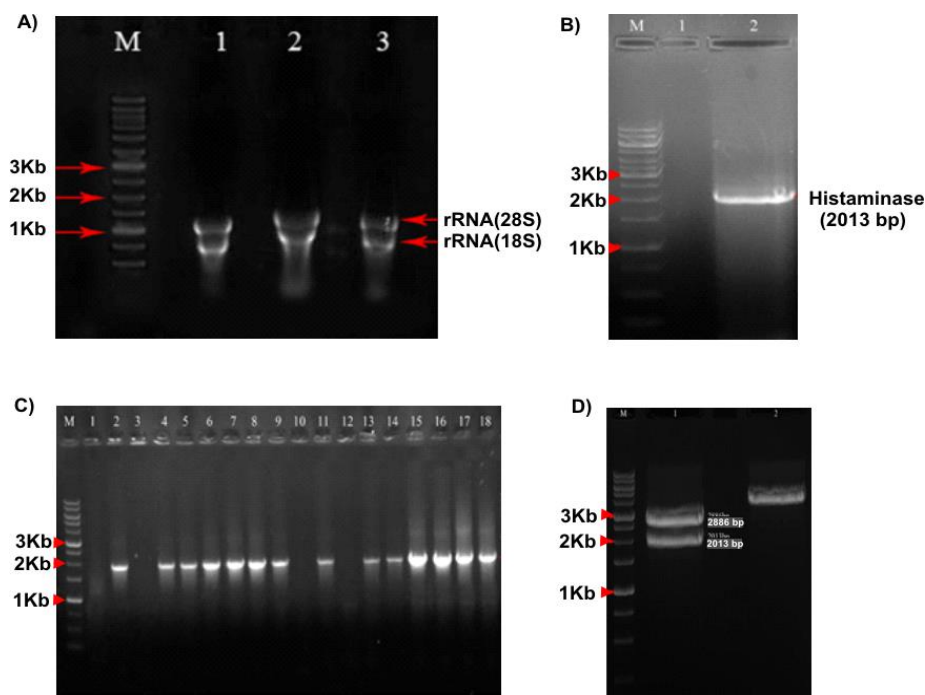
توالی اسید آمینه‌ای و نوکلئوتیدی ژن کدکننده ۴۵ ژن هیستامیناز با منشأ گیاهی، حیوانی، قارچی و باکتریایی از

همسانه‌سازی pTZ57/RT همسانه‌سازی شد. آزمون کلنی PCR روی کلنی‌های باکتریایی نشان داد که ژن هیستامیناز به درستی در ناقل مربوطه همسانه سازی شده است (شکل C۱). همچنین هضم آنزیمی با آنزیم‌های *SmaI* و *SacI* منجر به جداسازی قطعه‌ای به طول تقریبی ۲ Kb از پلاسمید pTZ57RT/Hista شد (شکل D۱). برای اطمینان از صحت توالی نوکلئوتیدی ژن هیستامیناز، پلاسمید pTZ57RT/Hista به روش سانگر توالی‌یابی شد. نتایج توالی‌یابی نشان داد که ژن کدکننده آنزیم هیستامیناز به درستی همسانه‌سازی شده است و پروتئینی به طول ۶۷۰ اسید آمینه را بیان خواهد کرد.

باند RNA ریپوزومی (28S, 18S) به خوبی از هم تفکیک شده‌اند و هیچ شکستگی در طول مسیر حرکت RNA مشاهده نمی‌شود. این موضوع نشان می‌دهد که روش کلرید لیتیم از کارایی خوبی برای جداسازی RNA از جوانه‌های نخود برخوردار بود.

### همسانه‌سازی محصول PCR

واکنش PCR روی cDNA حاصل از جوانه‌های نخود زراعی توده‌گرفت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، به تکثیر قطعه‌ای شامل ژن هیستامیناز به طول ۲۰۱۳ جفت باز منجر گردید (شکل B۱). محصول PCR پس از خالص‌سازی از ژل، در ناقل



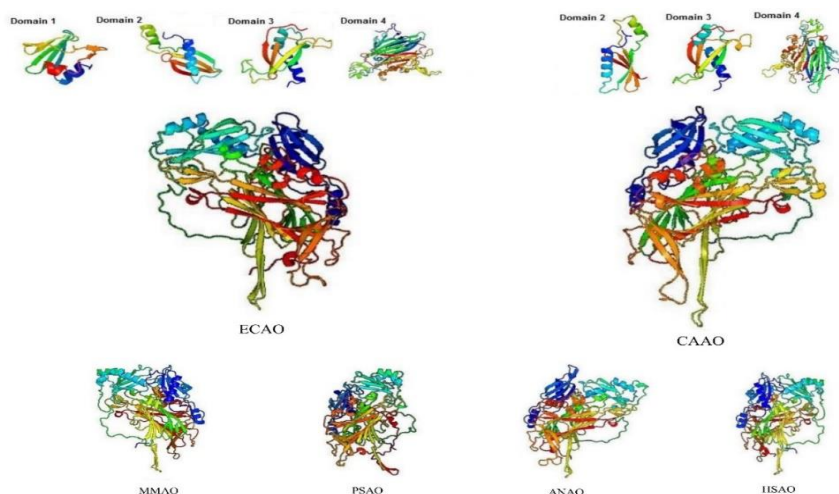
شکل ۱. تجزیه و تحلیل‌های مولکولی ژن کدکننده هیستامیناز جداسازی شده از توده‌بومی نخود‌گرفت. (A) الکتروفورز RNA کل استخراج شده از جوانه‌های هفت روزه ساقچه بذر نخود. چاهک M نشانگر اندازه 1kb، چاهک‌های ۱، ۲ و ۳ RNA استخراج شده از سه نمونه بذر نخود توده‌بومی گرفت. (B) الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه کدکننده ژن هیستامیناز، چاهک (M) نشانگر اندازه 1Kb چاهک ۱ کنترل منفی و چاهک ۲ محصول PCR حاصل از تکثیر ژن هیستامیناز. (C) الکتروفورز محصول کلنی PCR از کلونی‌های نوترکیب به منظور تشخیص پرگنه‌های دارای ژن هیستامیناز. چاهک (M) نشانگر اندازه 1 kb، چاهک‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶ قطعه چاهک ۲۰۱۳bp مربوط به ژن هیستامیناز، چاهک ۱۷، ۱۸ کنترل مثبت (محصول PCR). (D) الکتروفورز محصول هضم آنزیمی ناقل pTZ57RT/Hista با استفاده از آنزیم‌های برشی *SmaI* و *SacI*. چاهک (M) نشانگر اندازه 1kb، چاهک (۱) پلاسمید هضم شده و چاهک (۲) پلاسمید هضم نشده.

### همسانه‌سازی ژن هیستامیناز در ناقل بیانی pGSA1285

قطعه کامل ناحیه کدکننده ژن هیستامیناز پس از جداسازی از ناقل pTZ57RT/Hista با آنزیم‌های *SmaI* و *SacI* در همین جایگاه‌ها در ناقل بیانی pGSA1285 همسانه‌سازی شد تا ناقل بیانی pGSA1285/Hista تولید شود. این ناقل با تراریزش به *E. coli* وارد شد.

توالی ژن هیستامیناز نخود گریت به طول ۶۷۰۳ bp و تعداد ۶۷۰ آمینو اسید آمینه به شماره دسترسی KU058599 در پایگاه داده NCBI ثبت شد. مقایسه این توالی با توالی پروتئین‌های این خانواده با استفاده از Blastn نشان داد که این توالی با توالی ژن هیستامیناز نخود زراعی (AJ009825) ۹۹ درصد مشابهت دارد. نتایج آنالیز بلاست این توالی نشان داد که این پروتئین با پروتئین‌های عدس (۸۵ درصد)، خلر (۸۵ درصد)، باقلا (۸۵ درصد)، یونجه (۸۶ درصد)، نخودفرنگی (۸۵ درصد)، شیر سگ (۸۳ درصد)، سویا (۷۹ درصد) و ذرت (۸۶ درصد)، همولوگ است. هم‌ردیفی جفتی توالی نوکلئوتیدی نخود توده گریت با توالی همین ژن در نخود زراعی

(به شماره دسترسی AJ009825) در تعدادی از نوکلئوتیدها متفاوت بود و چند شکلی نشان داد. تفاوت در نوکلئوتیدهای مشاهده شده منجر به تغییر در تعدادی از اسید آمینه‌های هیستامیناز نخود گریت نسبت به توالی پروتئین نخود موجود در پایگاه NCBI شد. برای مثال، اسید آمینه شماره ۲۵۷ در توالی نخود تیروزین، اما در توالی پروتئین نخود گریت هیستیدین بود. همچنین اسید آمینه موقعیت ۲۹۱ در نخود زراعی پایگاه سرین و در نخود گریت پرولین و اسید آمینه موقعیت ۳۴۶ در توالی نخود پایگاه گلوتامین، اما در توالی پروتئین نخود گریت لوسین بود. همچنین اسید آمینه موقعیت ۳۶۲ لوسین نخود زراعی پایگاه اسید آمینه سرین تعویض شده بود. از آنجایی که ممکن است این جایگزینی‌ها منجر به تغییرات اساسی در فعالیت و یا ساختار سه بعدی هیستامیناز نخود توده گریت شود، مقایسه بین ساختار سه بعدی این پروتئین با همولوگ‌های مربوطه صورت گرفت. نتایج این مقایسه نشان داد که هیچ کدام از این تغییرات در جایگاه فعال آنزیم قرار ندارند و به نظر می‌رسد که این جایگاهی‌ها تأثیری روی فعالیت آنزیم نداشته باشد (شکل ۲).



شکل ۲. شکل کلی ساختار سه بعدی آمینواکسیدازهای مربوط به نخودفرنگی (Pisum sativum; PSAO)، قارچ (*Aspergillus niger*; ANAO)، باکتری ایکولای (*Escherichia coli*; ECAO)، انسان (*Homo sapiens*;)، موش (*Mus musculus*; MMAO) و نخود زراعی توده گریت (*Cicer arietinum* landrace grit;) (HSAO)، با استفاده از نرم‌افزار phyre2.

### مقایسه بین دمین‌ها

مقایسه‌های بیوانفورماتیکی دمین‌های توالی هیستامیناز در گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوانات نشان داد که پروتئین‌های این خانواده از سه تا چهار دمین تشکیل شده‌اند. هیستامیناز این مطالعه از ۳ دمین تشکیل شده است. همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، هر دایمر به صورت کلی دارای چهار دمین می‌باشد که به شکل قارچ دیده می‌شوند. دمین یک به صورت دسته قارچ در ساختار سه‌بعدی پروتئین دیده می‌شود و در همه گونه‌ها وجود ندارد. دمین‌های ۲ و ۳ در حاشیه قرار گرفته‌اند. دمین ۳ در کانال‌های ورودی و خروجی سوبسترای آمین‌ها دخالت دارد. دمین ۴ از ۴۴۰ اسید آمینه در انتهای کربوکسیلی پروتئین قرار دارد و حاوی اتم‌های فعالی است که توسط TPQ و مس احاطه شده‌اند.

دمین Cu-amine oxidN2 با طول تقریباً ۱۰۰ اسید آمینه در بین همه موجودات مشترک است. نقش این دمین، اکسیداسیون دی آمین‌ها است به طوری که گروهی از آمین‌های اولیه را به آلدهیدها تبدیل می‌کنند. در واقع، این آنزیم‌ها مواد پرخطر را به مواد کم‌خطرتر تبدیل می‌کنند، در نتیجه اکسیژن مولکولی را کاهش داده و به پراکسید هیدروژن تبدیل می‌کنند. دمین Cu\_amine\_oxidN3 در هیستامینازهای گیاهی، باکتریایی و جانوری وجود دارد و در قارچ‌ها مشاهده نمی‌شود (Parsons et al., 1995; Elovaara et al., 2015). نقش این دمین در تشکیل ساختار دوم و سوم آمینواکسیدازهای حاوی مس است که عمل کاتالیزوری را بر عهده دارند. دمین TynA در هیستامینازهای جانوری، باکتری و قارچی وجود دارد، اما در هیستامینازهای گیاهی مشاهده نمی‌شود و عملکرد آن معلوم نیست. دمین موسوم به family Cu\_amine\_oxidN3 super در هر چهار دسته از موجودات مشاهده می‌شود، ولی در همه گونه‌ها وجود ندارد و همچنین دمین Cu\_amine\_oxidN2 super

family در حیوانات مشاهده نشده و دمین Cu\_amine\_oxidN1 super family فقط در باکتری‌ها مشاهده می‌شود. دمین Cu\_amine\_oxidN1 فقط در باکتری‌ها مشاهده شده و دمین PrpE فقط در بعضی از باکتری‌ها یافت شده است. دمین PLNO2566 فقط مخصوص گیاهان بوده و در همه گیاهان وجود دارد و عملکرد آن ناشناخته است (Marchler et al., 2016; Elovaara et al., 2015).

ژن کدکننده هیستامیناز نخود دارای ۵ اگزون است (Lu et al., 2014). این ژن دارای یک سیگنال پپتید به طول ۷۲bp است که برای ۲۴ اسید آمینه کد می‌شود و در ابتدای دمین شماره یک قرار گرفته است (Yu et al., 2014).

### جایگاه فعال آنزیم هیستامیناز

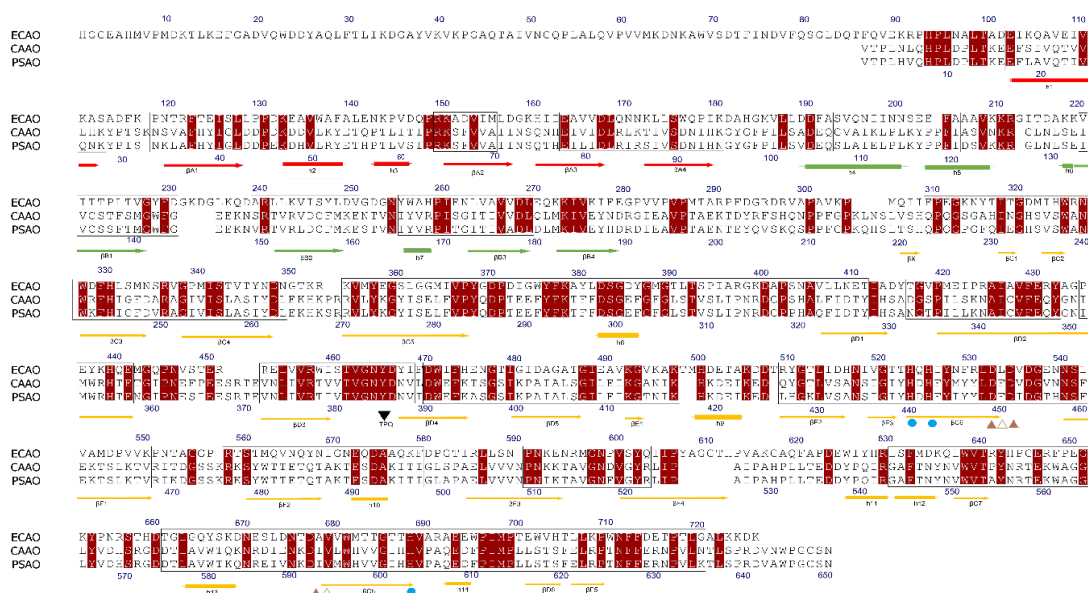
مقایسه ساختار کریستالی آمینواکسیدازهای پروکاریوتی (*E. coli*) و نخود فرنگی (*P. sativum*) با ساختار هیستامیناز نخود توده گریت این مطالعه نشان داد که جایگاه‌های فعال آنزیم در باکتری‌ها و گیاهان مشترک هستند. در دو جایگاه از جایگاه‌های فعال یون مس و در جایگاه دیگری کوفاکتور TPQ استقرار دارند که واکنش‌های مشابهی را انجام می‌دهند. مقایسه ساختار کریستالوگرافی هیستامیناز این موجودات نشان می‌دهد که ژن کدکننده این آنزیم در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها شباهت زیادی به هم دارند (Chen et al., 2000; Kumar et al., 1996). برای درک این موضوع، بین توالی پروتئینی آمینواکسیداز توده گریت این مطالعه با آمینواکسیدازهای ECAO و PSAO هم‌ردیفی صورت گرفت (شکل ۳).

همان‌طور که در هم‌ردیفی شکل ۳ مشاهده می‌شود، دو توالی PSAO و CAAO هرکدام از سه دمین تشکیل شده‌اند که برحسب تقسیم‌بندی به نام‌های دمین ۲ (D2)، دمین ۳ (D3) و دمین ۴ (D4)

است در هر سه پروتئین مشترک و کاملاً حفاظت شده است. به علاوه، توالی ناحیه TPQ در بین هر سه پروتئین کاملاً حفاظت شده بود و در همین چهارم قرار گرفته است (Klema and Wilmot 2012).

**تجزیه فیلوژنتیکی هیستامیناز نخود توده گریت**  
تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی، چگونگی ارتباط اعضای یک خانواده پروتئینی را نشان می‌دهند. این روابط به وسیله مطالعه جهش‌های جایگزینی، حذف، ازدیاد و جهش با آرایش مجدد تعیین می‌شود (Golovnina *et al.*, 2007).

نامگذاری شدند (شکل ۳). این دمین‌ها شبیه به سه دمین از چهار دمین ساختار مولکولی ECAO هستند. دمین اضافی پایانه D1 N از ECAO در آنزیم‌های PSAO و CAAO وجود ندارد و آنزیم ECAO با این دمین D1 به شکل یک قارچ دیده می‌شود (Parsons *et al.*, 1995) با وجود این، مشابهت قابل توجهی بین این سه پروتئین وجود دارد. همان‌طور که در هم‌ردیفی شکل ۳ دیده می‌شود، دمین یک در PSAO و CAAO وجود ندارد، ولی دمین‌های ۲، ۳، ۴ بین PSAO، CAAO و ECAO تا حدودی مشابه هستند و جایگاه فعال مس که با دایره آبی‌رنگ نشان داده شده



شکل ۳. هم‌ردیفی چندگانه توالی‌های ساختار پروتئینی آمینواکسیداز با منشأ باکتری (ECAO)، نخودفرنگی (PSAO) و نخود گریت (CAAO) دمین‌های ۲ و ۳ و ۴ به ترتیب به رنگ‌های قرمز، سبز و نارنجی نشان داده شده‌اند. اسیدآمینو متصل به مس با دایره‌های توپر آبی و TPQ به شکل مثلث سیاه معکوس نشان داده شده‌اند. هم‌ردیفی توسط الگوریتم CLUSTALW و ایجاد تغییرات و های لایت مناطق توالی توسط BioEdit، GenDoc و CorelDraw صورت گرفت.

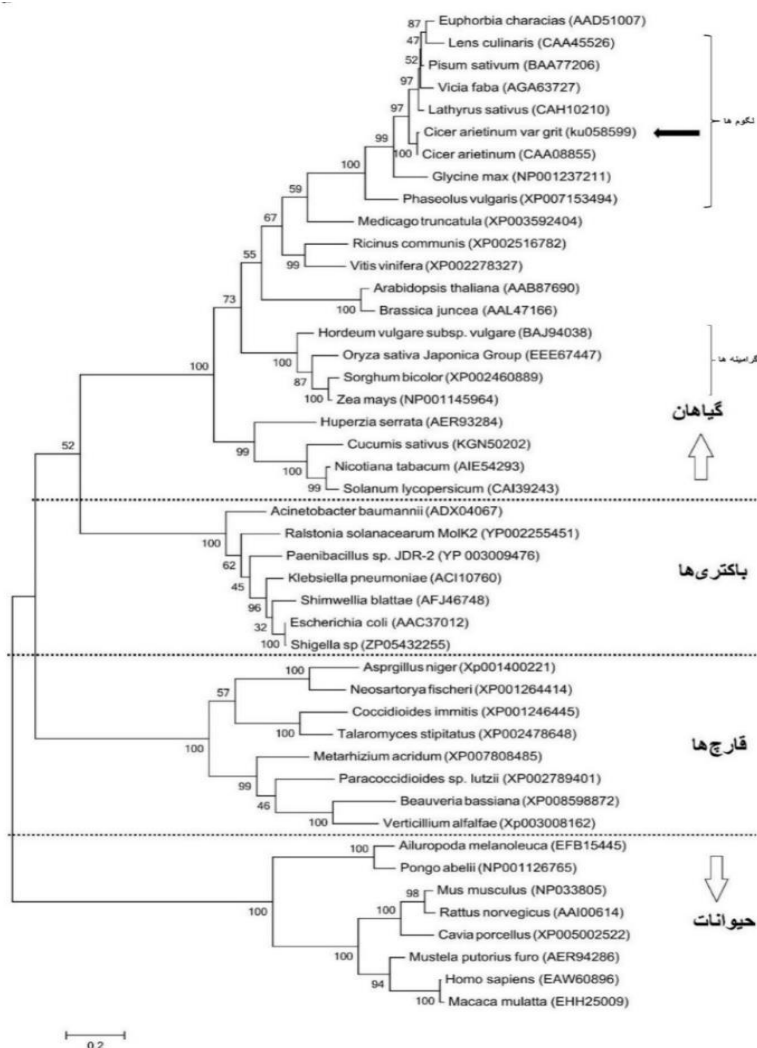
استرپ ترسیم شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، گیاهان خانواده لگومینوز در یک گروه و تک‌لپه‌ای‌ها هم در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند. این موضوع نشان می‌دهد که هیستامینازهای گیاهی قرابت ژنتیکی بیشتری در بین خانواده‌های گیاهی نسبت به هم دارند. به علاوه هیستامینازهای باکتریایی قرابت ژنتیکی بیشتری با

بر این اساس، درخت فیلوژنی حاصل از بررسی توالی‌های هیستامیناز گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوانات با توالی هیستامیناز نخود رقم گریت چهار گروه اصلی مختص به هر یک از گروه‌های چهارتایی گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و جانوران را نشان داد (شکل ۴). رابطه تکامل گونه‌ها در قالب درخت فیلوژنی به‌روش حداکثر درست‌نمایی با ۱۰۰۰ بوت



توده گریت (Ku058599) با یک بوت استرپ بالا (۱۰۰ درصد) با توالی هیستامیناز نخود زراعی پایگاه (CAA08855) در یک گروه با بیشترین قرابت (۹۹ درصد) قرار گرفتند.

هیستامینازهای گیاهان دارند. همان‌طوری که دیده می‌شود، قرابت ژنتیکی هیستامینازهای حیوانات با هیستامینازهای گیاهی نسبت به قارچ‌ها و باکتری‌ها کمتر است. هیستامیناز



شکل ۴. درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه توالی‌های پروتئینی هیستامینازهای برخی از گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوانات. این درخت به کمک روش حداکثر درست‌نمایی با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید.

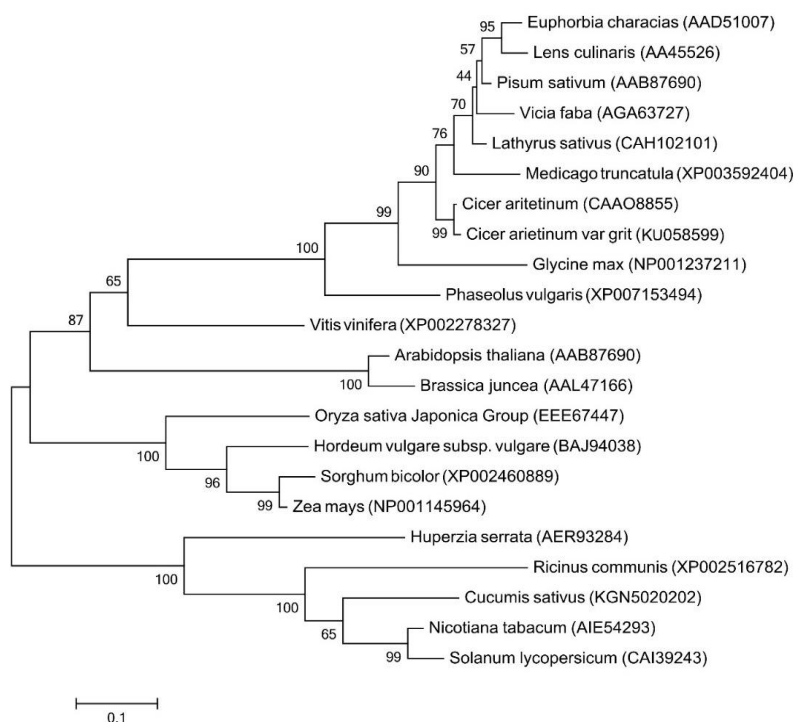
این نکته است که دمین چهارم، به دلیل حضور جایگاه فعال و توالی‌های حفاظت‌شده مشترک، مهم‌ترین دمین هیستامیناز در بین موجودات است (Dawkes and Phillips, 2001). رسم درخت فیلوژنی با روش حداکثر درست‌نمایی و با استفاده از توالی این دمین نیز نشان داد که دمین چهارم مهم‌ترین دمین در بین

همچنین گیاهان سیب‌زمینی، توتون نیز با بوت استرپ بالا (۹۹ درصد) در یک کلاد هستند. در دندروگرام حاصل از آنالیز فیلوژنتیکی در این بررسی اکثر گروه‌های شکل گرفته از بوت استرپ بالای ۷۰ درصد برخوردار هستند (شکل ۴). تحقیقات انجام‌شده روی هیستامینازها نشان‌دهنده

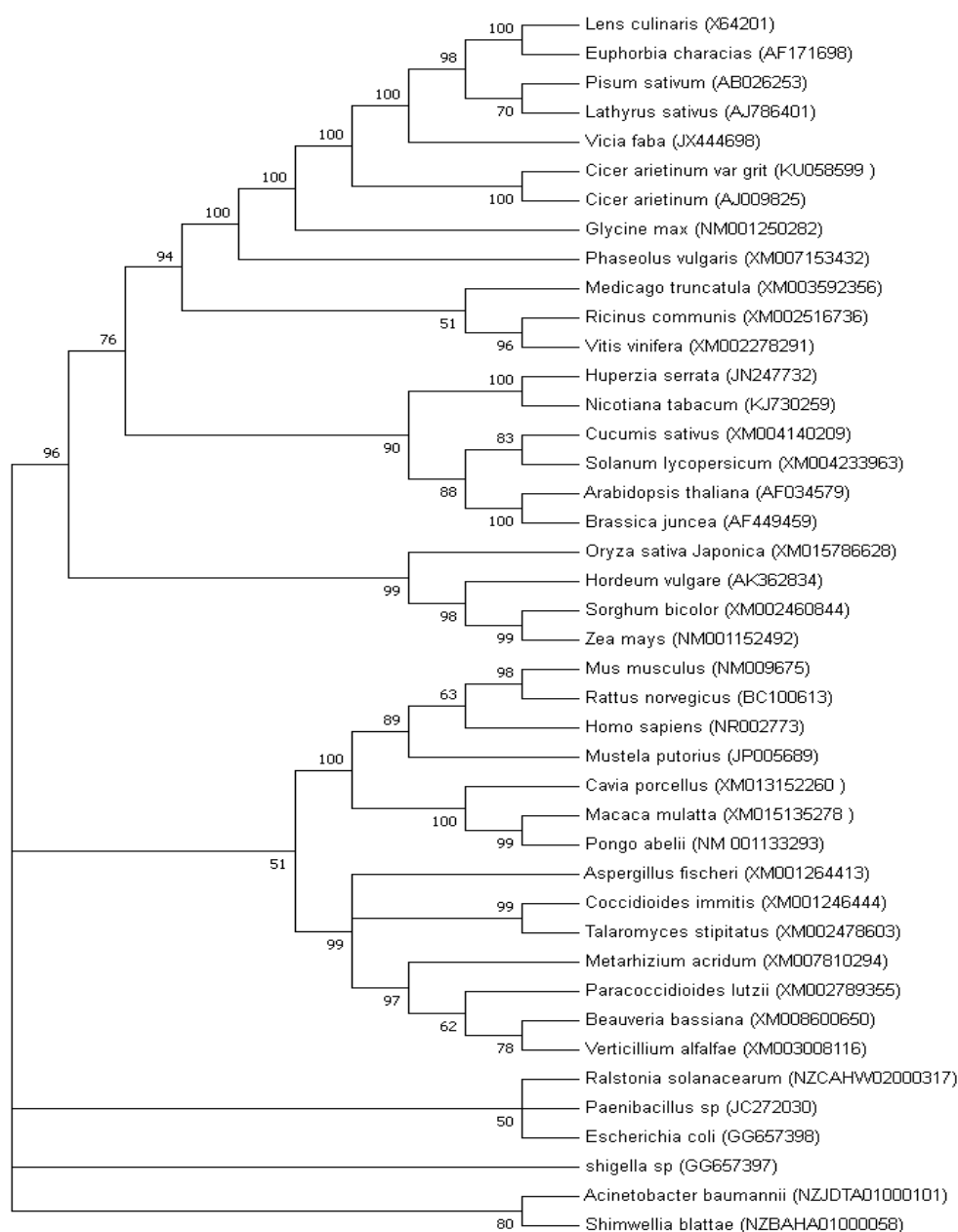
دمین‌های ژن هیستامیناز است، به طوری که دندروگرام حاصل از توالی کامل هیستامینازهای گیاهان با دندروگرام حاصل از دمین چهارم کاملاً مطابقت داشت (شکل ۵). نتایج مشابهی نیز از آنالیز فیلوژنتیکی توالی‌های ژن کدکننده هیستامیناز گیاهان و باکتری‌ها نیز به دست آمده است، به طوری که گیاهان با هم یک گروه اصلی و باکتری‌ها دو گروه اصلی را تشکیل دادند و اکثر زیر گروه‌ها دارای بوت استرپ بالای ۷۰٪ بودند (Sun et al., 2012).

مقایسه این درخت (شکل ۵) با درخت شکل ۴ نشان می‌دهد که این دو درخت بر هم منطبق هستند. همچنین هیستامینازهای کرچک (*Ricinus*)

و انگور (*Vitis vinifera*) در تجزیه فیلوژنی بر اساس توالی کل، دارای جد مشترک واحد هستند، درحالی‌که در تجزیه فیلوژنی بر مبنای دمین چهارم با هم متفاوت هستند. این موضوع نشان‌دهنده این مطلب است که دمین ۲ و ۳ در ترسیم درخت فیلوژنتیکی تأثیرگذار بوده‌اند. در رسم کامل درخت با توالی‌های DNA (شکل ۶) گیاهان در یک دسته جداگانه با بوت استرپ‌های بالای ۹۶٪ قرار گرفته‌اند و از این نظر، دو درخت تقریباً شبیه به هم هستند. در تحقیق حاضر و همسو با مطالعه سان و همکاران (۲۰۱۲)، باکتری‌ها در سه گروه با بوت استرپ بالا قرار گرفته‌اند (Sun et al., 2012).



شکل ۵. درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه توالی‌های دمین چهارم هیستامینازهای برخی گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوانات با استفاده از روش حداکثر درست‌نمایی و بوت استرپ ۱۰۰۰.



شکل ۶ درخت فیلوژنی حاصل از مقایسه توالی‌های DNA هیستامینازهای گیاهی، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حیوانات. این درخت به کمک روش حداکثر درست‌نمایی با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم گردید.

## REFERENCES

- Alirezaei M, Delfan B, Dezfoulian O, Kheradmand A, Divekan H, Rashidipour M, Khonsari A (2014) Hepatoprotective effects of purified oleuropein from olive leaf extract against ethanol-induced damages in the rat. Iranian Journal of Veterinary Research 3: 218-226.
- Calinescu C, Mondovi B, Federico R, Ispas-szabo P, Mateescu MA (2012) Carboxymethyl starch: chitosan monolith matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. International Journal of Pharmaceutics 428:48-56.
- Chen ZW, Schwartz B, Williams NKLIR, Klinman JP, Mathews FS (2000) Crystal Structure at 2.5 Å Resolution

- of Zinc-Substituted Copper Amine Oxidase polymorpha Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 39: 9709-9717.
- Dawkes HC, Phillips SE (2001) Copper amine oxidase: cunning cofactor and controversial copper. *Current Opinion in Structural Biology* 11:666-673.
- Dong X, Ji R, Guo X, Foster SJ, Chen H, Dong C, Liu Y, Hu Q, Liu S (2008) Expressing a gene encoding wheat oxalate oxidase enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape (*Brassica napus*). *Planta* 228: 331-340.
- Duff AP, Tramboliolo DM, Cohen AE, Ellis PJ, Juda GA, Shepard EM, Langley DB, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM (2004) Using xenon as a probe for dioxygen-binding sites in copper amine oxidases. *Journal of Molecular Biology* 344:599-607.
- Elovaara H, Huusko T, Maksimow M, Elima k, Yegutkin GG, Skurnik M, Dobrindt U, Siitonen A, Mcpherson MJ, Salmi M (2015) Primary amine oxidase of *Escherichia coli* is a metabolic enzyme that can use a human leukocyte molecule as a substrate. *Plos one* 10:e0142367.
- Federico R, Cona A, Caliceti P, Veronese FM (2006) Histaminase PEGylation: preparation and characterization of a new bioconjugate for therapeutic application. *Journal of Controlled Release* 115: 168-174.
- Golovnina K, Glushkov S, Blinov A, Mayorov V, Adkison L, Goncharov N (2007) Molecular phylogeny of the genus *Triticum* L. *Plant Systematics and Evolution* 264:195-216.
- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O, Lug (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133: 170-181.
- Klema VJ, Wilmot CM (2012) The role of protein crystallography in define the mechanisms of biogenesis and catalysis in copper amine oxidase. *International Journal of Molecular Sciences* 13:5375-5405.
- Klinman JP, Mu D (1994) Quinonozymes in biology. *Annual review of biochemistry* 63:299-43.
- Kumar S, Glen S, Koichiro T (2016) "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
- Kumar V, Dooley DM, Freeman HC, Guss JM, Harvey I, Mcguirl MA, Wilce MC, Zubak VM (1996). Crystal structure of a eukaryotic (pea seedling) copper-containing amine oxidase at 2.2 Å resolution. *Structure* 4: 943-955.
- Lawrence AK, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJE (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling prediction and analysis. *Nature Protocols* 10:845-858.
- Lu M, Zak J, Chen S, Sanchez-Pulido L, Severson DT, Endicott J, Ponting CP, Schofield CJ, Lu X (2014) A code for RanGDP binding in ankyrin repeats defines a nuclear import pathway. *Cell* 5:1130-1145.
- Maintz L, Novak N (2007) Histamine and histamine intolerance. *The American Journal of Clinical Nutrition* 85:1185-1196.
- Marchler-Bauer A, Bo Y, Han L, He J, Lanczycki CJ, Lu S, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M (2016) CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. *Nucleic Acids Research* 45: D200-D203.
- Masini E, Bani D, Marzocca C, Mateescu MAMA, Mannaioni PF, Federico R, Mondovi B (2007) Pea seedling histaminase as a novel therapeutic approach to anaphylactic and inflammatory disorders. *The Scientific World Journal* 7: 888-902.
- Masini E, Pierpaoli S, Marzocca C,

- Mannaioni PF, Pietrangeli P, Mateescu MA, Zelli M, Federico R, Mondovi B (2003) Protective effects of a plant histaminase in myocardial ischaemia and reperfusion injury in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309: 432-439.
- Masini E, Vannacci A, Marzocca C, Mannaioni PF, Befani O, Federico R, Toma A, Mondovi B (2002) A plant histaminase modulates cardiac anaphylactic response in guinea pig. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296: 840-846.
- Massey V (2000) The chemical and biological versatility of riboflavin in Portland Press Limited Biochemical society transactions. *Biochem Soc Trans* 28:283-296.
- Mateescu M, Dumoulin M, Wang X, Nadeau R, Mondovi B (1997) A new physiological role of copper amine oxidases. *Journal of Physiology and Pharmacology* 48: 110-121.
- Mondovi B, Turini P, Befani O, Sabatini S (1983) Purification of bovine plasma amine oxidase. *Methods in Enzymology* 94: 314-318.
- Mondovi B, Wang X, Pietrangeli P, Wang R, Nadeau R, Mateescu M (1997) New aspects on the physiological role of copper amine oxidases. *Cur Top Med Chem* 2: 31-34.
- Nazarian Firouzabadi F, Kok-Jacon GA, Vincken JP, Ji Q, Suurs LC, Visser RG (2007) Fusion proteins comprising the catalytic domain of mutansucrase and a starch-binding domain can alter the morphology of amylose-free potato starch granules during biosynthesis. *Transgenic Research* 16: 645-656.
- Parsons M, Convery M, Wilmot C, Yadav K, Blakeley V, Corner A, Phillips S, McPherson M, Knowles P (1995) Crystal structure of a quinoenzyme copper amine oxidase of *Escherichia coli* at 2 Å resolution. *Structure* 3: 1171-1184.
- Poonpipatgul S, Wongsangchantra PY, Udomsopagit S, Yuvaniyama J (2012) Purification and characterization of amine oxidase from *Vigna mungo* L seedlings. *African Journal of Biotechnology* 11: 14361-14367.
- Rea G, Laurenzi M, Tranquilli E, Dovidio R, Federico R, Angelini R (1998) Developmentally and wound regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Letters* 434: 177-182.
- Rea G, de Pinto MC, Tavazza R, Biondi S, Gobbi V, Ferrante P, De Gara L, Federico R, Angelini R, Tavladoraki P (2004) Ectopic expression of maize polyamine oxidase and pea copper amine oxidase in the cell wall of tobacco plants. *Plant Physiology* 134: 1414-1426.
- Sun J, Morita H, Chen G, Noguchi H, Abe I (2012) Molecular cloning and of copper amine oxidase from *Huperzia serrate*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 22: 5784-5790.
- Veronese FM, Pasut G (2005) PEGylation successful approach to drug delivery. *Drug Discovery Today* 10: 1451-1485.
- Waie B, Rajam MV (2003) Effect of increased polyamine biosynthesis on stress responses in transgenic tobacco by introduction of human S-adenosylmethionine gene. *Plant Science* 164: 727-734.
- Yu CS, Cheng CW, Su WC, Chang KC, Huang SW, Hwang JK (2014) CELLO2GO: A Web Server for Protein Subcellular Localization Prediction with Functional Gene Ontology Annotation. *PLoS ONE* 9.6: e99368.