

Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses

Sahar Faraji¹, Ghorbanali Nematzadeh^{1,2}, Seyed Kamal Kazemitabar¹,
Ali Pakdin-Parizi^{3*}(ORCID: 0000-0003-4570-8021)

1. Department of Plant Breeding, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

2. Department of Molecular Biology and Genetics Engineering, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. Department of Citrus and Medicinal Plants, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

Correspondence:

Ali Pakdin-Parizi

Email: a.pakdin@sanru.ac.ir

Received: 16, Mar. 2024

Accepted: 21, Jun. 2024

How to cite:

Faraji, S., Nematzadeh, Gh., Kazemitabar, S. K., & Pakdin-Parizi, A. (2024). Identification of *FAD* family genes in the genome of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) microalgae and investigation of cellular functions in response to abiotic stresses. *Crop Biotechnology*, 14(1), 87-106.
(DOI: [10.30473/cb.2024.70853.1963](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70853.1963))

ABSTRACT

Arthrospira platensis (Spirulina) is a valuable photosynthesizing prokaryote with numerous industrial and food applications. Fatty acid desaturase enzymes (FADs) are responsible for the production of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. In the present study, the genome of *A. platensis* C1 was investigated using bioinformatics methods in order to identify *ApFAD* genes family. A total of 8 *ApFAD* genes were identified in *Spirulina* genome and classified into Omega, Sphingolipid, CrtR_beta-carotene-hydroxylase and Acyl-CoA groups. Four conserved histidine motifs that are essential for binding to the di-iron structures and catalytic activities were identified. Investigation of post-translational modifications of *ApFAD* proteins revealed a wide range of glycosylation and phosphorylation changes. Evaluation of *FAD* gene promoter regions revealed different types of *cis*-regulatory elements responsive to phytohormones and stress conditions, especially in Omega (*ApFAD-6*) and Acyl-lipid (*ApFAD-3*) desaturases. Also, protein-protein interaction networks showed the relations between *ApFADs* and genes involved in dealing with stresses through the biosynthetic process of secondary metabolites and electron transfer. Analysis of RNA-seq data of orthologous genes in *Arabidopsis* showed the potential of Omega and Acyl-lipid genes, such as *ApFAD-3*, *ApFAD-6* and *ApFAD-7*, in response to various environmental stresses. In general, the results of this study can contribute to a more complete understanding of the function of *FAD* genes in *Spirulina* and lay the basis for the transgenic study of these genes with the aim of increasing the content of unsaturated fatty acids, improving the nutritional value of oils, as well as promoting the stress tolerance of plants.

KEYWORDS

Arthrospira platensis, Bioinformatic analysis, Fatty acid desaturase, Genome analysis, Stress dealing.



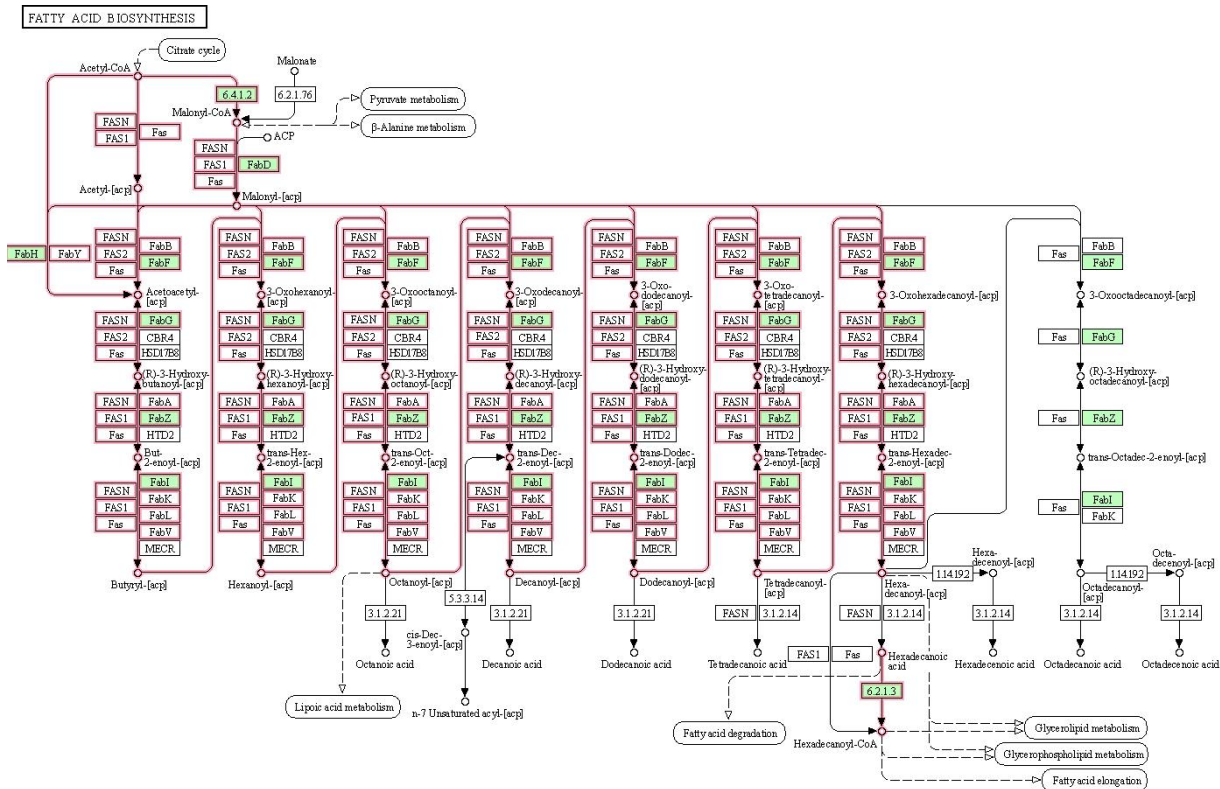
مقدمه

سیانوباکتری‌ها، ریزجانداران پروکاریوتی فتوسنتز کننده هستند که گروه بزرگی از باکتری‌های حقیقی را تشکیل می‌دهند. این ریزجانداران از نظر مورفولوژیکی تک سلولی یا رشته‌ای بوده و به لحاظ عملکردی به دو گروه تثبیت کننده نیتروژن (هتروسیت‌دار) و غیرتثبیت کننده نیتروژن تقسیم می‌شوند (Hoiczyk, 2000). اسپیرولینا (*Arthrospira platensis*) یک سیانوباکتری با خصوصیات تغذیه‌ای و سلامتی بخش متعدد می‌باشد (Van Tuerenhout, 2005). این ریز جلبک یک منبع غنی پروتئین (۷۰ درصد وزن خشک) حاوی همه اسیدهای آمینه ضروری، ویتامین‌های گروه B و ویتامین C، مواد معدنی، اسیدهای چرب چندگانه غیراشباع ضروری و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی شامل کاروتنوئیدها، فیکوسیانین‌ها و کلروفیل می‌باشد. محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در اسپیرولینا سبب خواص ضدالتهابی، ضدسرطانی و تقویت سیستم ایمنی می‌شود (Wan et al., 2021). اسیدهای چرب (FAs) بلوک‌های سازنده آسیل-لیپیدها هستند که عموماً شامل لیپیدهای غشایی قطبی و چربی‌های ذخیره‌ای خنثی می‌باشند. لیپیدهای غشایی قطبی، که به عنوان مرزهای حفاظت سلولی عمل می‌کنند، نه تنها یکپارچگی بخش‌های درون سلولی را حفظ می‌کنند، بلکه در آغاز سیگنال‌های درون سلولی طی فرآیندهای مختلف رشد و مقابله با تنش‌های گوناگون نیز نقش بسیار مهمی دارند (Li-Beisson et al., 2013; Lu et al., 2020). از سوی دیگر، لیپیدهای ذخیره‌ای خنثی نیز، به عنوان گروه چربی‌های چگال انرژی‌زا، به عنوان منابع مهمی برای ذخیره کربن و انرژی هستند. میزان و کارایی غیراشباع سازی اسیدهای چرب، که با عملکرد اسید چرب دسچورازها (FADs)^۲ تعیین می‌شود، در جانداران مختلف، تفاوت داشته و به تنش‌های غیرزیستی و زیستی پاسخ می‌دهد (Tang et al., 2018; Wu et al., 2021).

در طی بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه (PUFAها) در سلول‌ها، مراحل مختلف اشباع و طویل شدن به عنوان بخشی از یک مسیر پیچیده رخ می‌دهد (شکل ۱). وارد کردن پیوند دوگانه به زنجیره هیدروکربنی اسیدهای چرب اشباع و تبدیل آنها به نوع غیراشباع یکی از این مراحل است که توسط

^۱ Fatty acids^۲ Fatty acid desaturases^۳ Polyunsaturated fatty acids

آنزیم‌های اسید چرب دسچوراز تنظیم می‌شود (Lee et al., 2016). مهمترین اسیدچرب دسچورازهای گیاهی شامل دسچورازهای آسیل-لیپید، دسچورازهای محلول و دسچورازهای امگا-۳ و امگا-۶ هستند (Li-Beisson et al., 2013). قارچ‌ها و باکتری‌ها نیز دارای اسیدچرب دسچورازهای متعددی می‌باشند که ممکن است نقش متفاوتی نسبت به دسچورازهای گیاهی داشته باشند (Lu et al., 2020; Racine & Deckerbaum, 2007). اسیدهای چرب غیراشباع سنتز شده توسط این دسچورازها در ساختار غشا، سیالیت و سایر عملکردهای سلولی این جانداران دخالت دارند. تنظیم و تغییر لیپیدهای غشایی توسط دسچورازهای متصل به غشا، از جمله اسید آسیل لیپید D9-دسچوراز (ADS) و اسفنگولیپیدهای D4-دسچوراز (DES) انجام می‌شود (Li-Beisson et al., 2013). یک ویژگی مشترک در ساختار همه پروتئین‌های دسچوراز حضور موتیف‌های هیستیدین حفاظت شده می‌باشد. این موتیف حاوی یک ناحیه اتصال دای-آهن است که پیوند C-H را برای تولید آب طی فرآیند غیراشباع‌سازی جدا می‌کند (Alonso et al., 2003; Díaz et al., 2018). تقریباً ۶۰٪ مختلف، از جمله ژن‌های کدکننده اسیدهای چرب دسچوراز، در مسیر سازمان‌دهی ساختارهای متنوع آسیل-لیپیدی در *Arabidopsis thaliana* نقش دارند (Li-Beisson et al., 2013). از کاربردهای دستوری اسیدچرب دسچورازها می‌توان به افزایش محتوای اسیدهای چرب غیراشباع و بهبود ارزش تغذیه‌ای روغن‌های گیاهی، تغییر ترکیب و پروفایل اسیدهای چرب، افزایش تحمل به تنش‌های محیطی مانند دمای بیش از حد، خشکی و حمله عوامل بیماری‌گر، مهندسی متابولیک، تولید سوخت زیستی و نیز تولید مکمل‌های رژیمی، ترکیبات دارویی و تغذیه‌ای اشاره کرد. مهندسی ژنتیک اسیدچرب دسچورازهای گیاهان و ریزجانداران نیازمند شناخت ساختار، عملکرد و نقش‌های فیزیولوژیکی این ترکیبات می‌باشد. برای دستیابی به این منظور، در مطالعه حاضر، توالی ژنوم کامل *A. platensis* C1 با ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف مورد جستجو قرار گرفته و ژن‌های اسیدچرب دسچوراز شناسایی و برای ارزیابی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی مورد مطالعه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق یک تصویر کامل از اسیدچرب دسچورازهای سیانوباکتریایی ارائه می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های دستوری مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع مورد استفاده قرار گیرد.



شکل ۱. مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در ریزجلیک اسپیرولینا، به دست آمده از پایگاه KEGG (Kanehisa, 2002)

پیشینه پژوهش

مزایای سلامتی بخش اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه با زنجیره بسیار بلند (VLC-PUFAs) مانند اسید آراشیدونیک (ARA؛ ۲۰:۴ω۶)، ایکوزاپنتانویک اسید (EPA؛ ۲۰:۵ω۳) و اسید دوکوزاهگزانویک (DHA؛ ۲۲:۶ω۳)، توجه بسیاری را به خود معطوف کرده است (Connor *et al.*, 2007; Zárate *et al.*, 2017). این ترکیبات از اجزای ساختاری فسفولیپیدهای غشایی بوده و از طرفی به عنوان پیش سازهای خانواده ایکوزانویدهای مولکول‌های سیگنال دهنده، از جمله پروستاگلاندین‌ها، ترومبوکسان‌ها و لکوترین‌ها، نقش ایفا می‌کنند (Abedi & Sahari, 2014). علاوه بر کنترل اثرات تنظیمی و فعالیت‌های فیزیولوژیکی درون سلول، VLC-PUFAها نقش مهمی در تغذیه کودکان دارند (Kaur *et al.*, 2010; Schuchardt *et al.*, 2014).

ماهیان و روغن‌های خوراکی حاصل از آن‌ها منابع غذایی اصلی حاوی VLC-PUFAها می‌باشند، اما با توجه به کاهش جمعیت ماهیان وحشی و همچنین آلودگی روزافزون دریاهای اقیانوس‌ها، به منابع پایدار جایگزین برای این امر نیاز می‌باشد

(Racine & Deckelbaum, 2007). ریزجانداران به دلیل توانایی بالای تولید ترکیبات مختلف، نرخ رشد بالا در محیط‌های غیرپيچیده و سهولت دست‌ورزی ژنتیکی یک منبع بسیار ارزنده برای استحصال لیپیدها می‌باشند. برخی از مخمرها و کپک‌ها به عنوان ریزجانداران روغنی شناخته می‌شوند. سطوح بالایی از تری‌اسیل گلیسرول‌ها در این موجودات انباشته می‌شود که ممکن است حتی تا ۷۰ درصد وزن زیست توده را تشکیل دهد (Kumar *et al.*, 2021; Ratledge & Wynn, 2002).

ریزجلیک *Arthrospira platensis* توانایی بالای تولید متابولیت‌های زیست فعال را دارد (Khan *et al.*, 2005; Mazo *et al.*, 2004). محتوای پروتئین این گونه بیش از ۶۰ درصد توده خشک را تشکیل داده و منبع غنی پروتئین است، حاوی مقادیر قابل توجهی از لیپید (۷/۲ درصد وزنی)، کربوهیدرات (۱۰/۳ درصد وزنی بر وزن)، فیبر خام (۸/۵ درصد) و مواد معدنی (۶/۹ درصد وزنی بر وزن) می‌باشد (Ciferri & Tiboni, 1985). برخی از محققان گزارش کرده‌اند که *A. platensis* منبع غنی اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه، اسید γ -لینولنیک (GLA) و استرول‌ها است

گزارش شده است (Kargiotidou *et al.*, 2008). علاوه بر این، با خاموش کردن سه ایزوفرم *GmFAD3* در گیاه سویا، مقاومت در برابر ویروس لکه‌ای غلاف لوبیا در نهال‌ها کاهش یافته است (Singh *et al.*, 2011). کیفیت روغن‌های خوراکی نیز به محتوای FADs که سطح اسیدهای چرب غیراشباع را تنظیم می‌کنند، بستگی دارد (Zárate *et al.*, 2017). همچنین، ژن‌های *FAD* می‌توانند توانایی مقابله با تنش‌های مختلف، مانند شوری، خشکی، سرما، گرما و عوامل بیماری‌زا را به‌طور قابل توجهی در گونه‌های مختلف تنظیم کنند (Domínguez *et al.*, 2010; Hajiahmadi *et al.*, 2020; Singh *et al.*, 2011). بنابراین، ژن‌های *FAD* در مسیرهای حیاتی مختلف وظایف مهمی را برای تولید PUFAها ایفا می‌کنند. در این راستا، بررسی خصوصیات مختلف ساختاری و عملکردی این ژن‌ها و پروتئین‌ها، با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی، در *Arthrospira platensis* می‌تواند مسیر را برای درک دقیق مکانیسم عمل *FAD*ها در سلول و همچنین کاندید کردن ژن‌ها به منظور مطالعات انتقال ژن و بیش‌بیان، برای بهبود تولید متابولیت‌های ارزشمند در گونه‌های مختلف، هموار کند.

روش شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم *A. platensis* تا کنون جدایه‌های مختلفی از *A. platensis* از جمله NIES-39، C1، NIES-46، PCC، KCTC و غیره، در نقاط مختلف دنیا جداسازی و شناسایی شده است. اطلاعات ژنومیکی برخی از این جدایه‌ها در پایگاه‌های داده ثبت و در دسترس می‌باشد. در مطالعه حاضر ژنوم ریزجلبک *A. platensis* C1 که توالی کامل آن با طول تقریبی ۶/۴ میلیون جفت باز و با کد دسترسی CP019998.1 منتشر شده، مورد ارزیابی قرار گرفته است. توالی کامل ژنوم جدایه C1 از پایگاه داده NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج و با استفاده از پایگاه GeneMarkS (http://exon.gatech.edu/genemark/genemarks.cgi) (Lomsadze *et al.*, 2018)، همه پروتئین‌های کد شده توسط این ژنوم شناسایی شدند. در مرحله بعد برای استخراج تمامی اعضای خانواده *FAD*، با استفاده از ابزارهای پلتفرم Galaxy (https://usegalaxy.org)، پایگاه داده اختصاصی برای ژنوم C1 ساخته شد و توالی حفاظت شده دمین عملکردی خانواده *FAD* (PF00487) و *FA_desaturase* (PF10520) (PF03405) در پروتئین‌های این پایگاه داده با آستانه E^{-10} ، مورد جستجو قرار گرفت. علاوه بر این تمامی

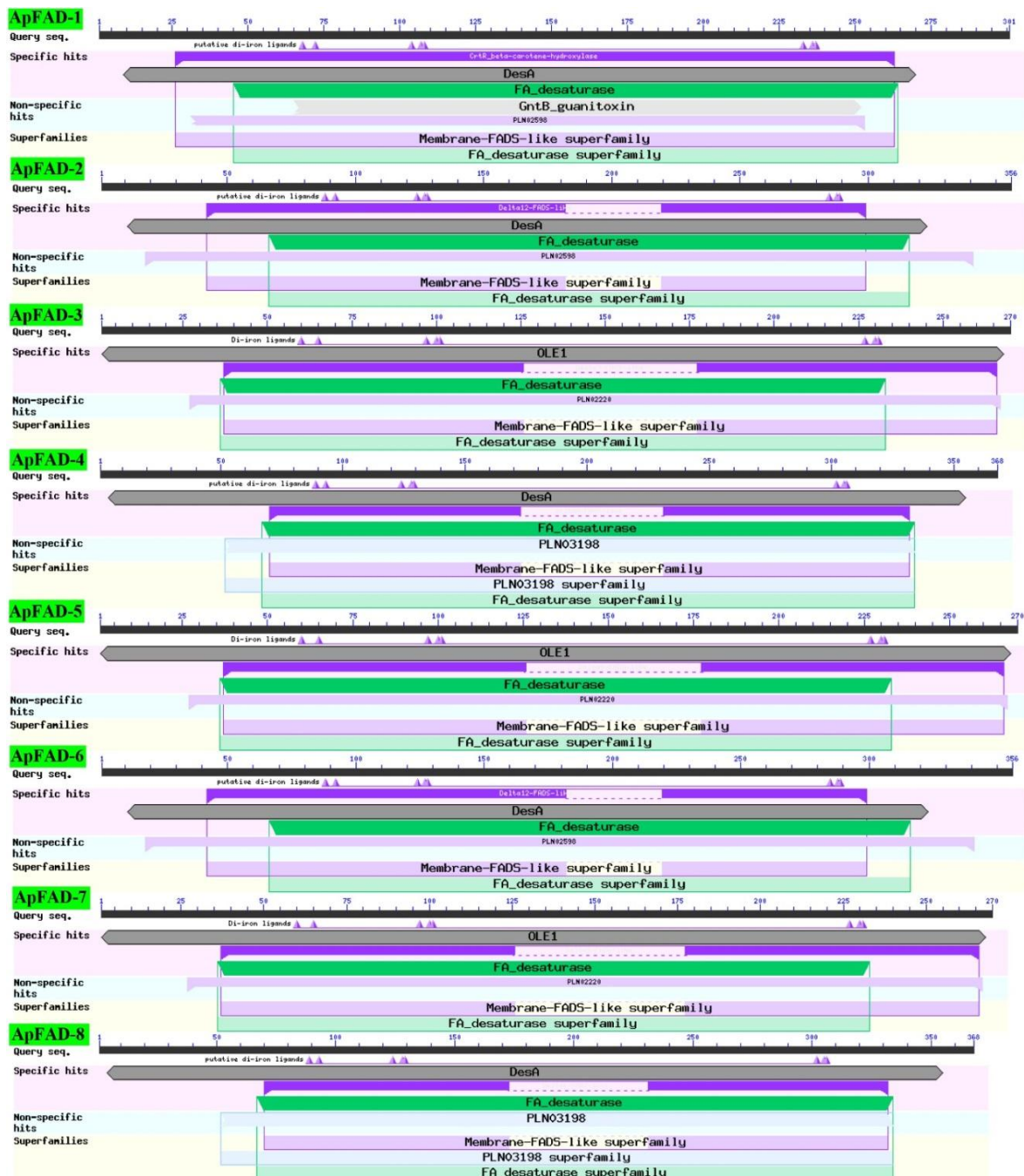
(Connor *et al.*, 2007; Kaur *et al.*, 2014) بر اساس نتایج حاصل از مطالعه (Lupatini *et al.*, 2017)، *A. platensis* غنی از ویتامین‌ها و دارای بالاترین محتوای نیاسین B3 (۱۴ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین B6 (۰/۸ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین B12 (۰/۳۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) و ویتامین K (۲/۲ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) است. بسته به منطقه جغرافیایی، فصل برداشت و روش خشک کردن، تغییرات قابل توجهی در محتوای بتاکاروتن در *Arthrospira* (از ۳۳/۵ تا ۲۳۱/۶ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) مشاهده شده است (BATIONO *et al.*, 2015). ترکیب اسیدهای چرب موجود در لیپیدهای جلبکی عمدتاً شامل اسید پالمیتیک (C16: 0، ۴۶٪) و اسید لینولئیک (C18: 2n-6، ۱۷/۴٪) و به همراه محتوای کمتری از اسید گاما-لینولئیک (C18: 3n-6)، اسید پالمیتولئیک (C16: 1n-7)، اسید اولئیک (C18: 1n-9) و اسید میریستیک (C14: 0) می‌باشد (Diraman *et al.*, 2009). تجزیه و تحلیل ترکیب اسیدهای آمینه نشان داده که اسپیرولینا حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه گلوتامات (۸/۱۵٪)، آسپاراتات (۵/۳۴٪)، آلانین (۴/۵۴٪)، لوسین (۴/۸۴٪) آرژنین (۳/۹۶٪) والین (۳/۳۴٪)، گلیسین (۰/۳٪)، تیروزین (۲/۵۸٪) و پرولین (۲/۱۵٪) می‌باشد (Khan *et al.*, 2005; Mazo *et al.*, 2004).

مطالعات بسیاری اثبات کرده‌اند که سطوح اسیدهای چرب غیراشباع تک و چندگانه برای خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لیپیدهای غشاء حیاتی بوده و حفظ عملکرد مناسب غشاهای بیولوژیکی به وضعیت فیزیولوژیکی لیپیدهای این غشاها بستگی دارد (Alonso *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2016). این بدان معناست که تنظیم فرآیند غیراشباع سازی در پاسخ به تغییرات محیطی، به‌ویژه در شرایط تنش دمایی، رخ می‌دهد، بنابراین حفظ عملکرد مناسب غشاهای بیولوژیکی و در نتیجه بقای سلول‌ها، امری حیاتی است.

طیف گسترده‌ای از عملکردها، از پاسخ به محرک‌های مختلف زیستی و غیرزیستی تا تنظیم سیستم‌های سیگنال‌دهی هورمونی، توسط پروتئین‌های *FAD* انجام می‌پذیرد (Chi *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2011). به عنوان مثال، گیاهان گوجه‌فرنگی با بیش بیان ژن *FAD3*، مقاومت قابل توجهی را پس از قرار گرفتن در معرض تنش سرما نشان داده‌اند (Domínguez *et al.*, 2010). بیان القایی دو ژن *FAD2-3* و *FAD2-4* در شرایط تنش‌های سرما و نور در گیاهچه‌های پنبه

Schultz) (<http://smart.embl-heidelberg.de>) SMART (et al., 2000) حضور دمین‌های اختصاصی در اعضای این خانواده ژنی تایید شد (شکل ۲). توالی‌های DNA و مکان کروموزومی مربوط به این ژن‌ها از ژنوم کامل جدایه C1 استخراج شد و ژن‌ها بر اساس ترتیب قرارگیری در ژنوم اسپیرولینا نام‌گذاری شدند. خصوصیات فیزیوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD با استفاده از برنامه ProtParam در پایگاه ExPasy (<https://web.expasy.org/protparam>) (Gasteiger et al., 2005) پیش‌بینی شدند.

پروتئین‌های FAD در *Arabidopsis thaliana* نیز از پایگاه داده TAIR (<https://www.arabidopsis.org>) (Garcia-) (Hernandez et al., 2002) استخراج و به عنوان الگو برای انجام جستجوهای BLASTp در برابر ژنوم اسپیرولینا با مقدار $E < 10^{-10}$ مورد جستجو قرار گرفت. پروتئین‌های FAD شناسایی شده با هر دو روش ادغام شدند و توالی‌های تکراری و یا فاقد دمین اختصاصی کامل به صورت دستی حذف شدند. در نهایت تعداد ۸ توالی کامل و غیر تکراری تایید و با استفاده از برنامه‌های Pfam (<http://pfam.xfam.org>) (Bateman et al., 2004) و



شکل ۲. بررسی حضور و موقعیت دمین‌های عملکردی اختصاصی در اعضای خانواده پروتئین‌های ApFAD

بررسی حضور عناصر تنظیمی سیس در ناحیه پروموتور ژن‌های خانواده ApFAD و سنجش روابط تعاملی در شبکه پروتئینی

ناحیه پروموتوری مربوط به هر یک از ژن‌های کاندید در سیانوباکتری با استفاده از برنامه CNNPromoter_b (softberry.com/berry.phtml?topic=cnnpromoter_b) (Umarov & Solovyev, 2017) مورد شناسایی قرار گرفت و سپس عناصر تنظیمی عملکردی سیس در نواحی پروموتور ژن‌های ApFAD، با در نظر گرفتن ناحیه بالادستی ۱۰۰۰ جفت باز، به کمک برنامه PePPER (pepper.molgenrug.nl) (de Jong *et al.*, 2012) شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل از آنالیزهایی چون هستی‌شناسی ژنی و پروموتور، یکی از ژن‌های کلیدی ApFAD در فرآیندهای متابولیسمی لیپید کاندید و شبکه تعامل پروتئین-پروتئین با برنامه STRING v12.0 (string-db.org) (Szkarczyk *et al.*, 2016) و بر اساس اطلاعات پروتئومیکس ثبت شده در اسپیرولینا پیش‌بینی شد.

شبیه‌سازی پروفایل بیانی ژن‌های ApFAD بر اساس داده‌های RNA-seq

در مطالعه حاضر با توجه به عدم وجود داده‌های RNA-seq برای تمامی ژن‌های اسپیرولینا در شرایط تنش مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ برای هر ژن ApFAD در *Arabidopsis* استفاده شد. پروفایل بیانی ژن‌های FAD کاندید در شرایط تنش‌های محیطی شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور مقادیر FPKM مربوط به بیان هر ژن در شرایط بیولوژیکی مختلف، از پلتفرم Expression Atlas در پایگاه داده ELIXIR در EMBL-EBI (ebi.ac.uk/gxa/experiments) (Moreno *et al.*, 2022) استخراج شد. در مرحله نهایی مقادیر FPKM^۴ هر ژن به مقادیر log₂ تبدیل شده و برای ترسیم نقشه حرارتی مربوط به بیان این خانواده ژنی از نرم‌افزار TBtools استفاده شد (Chen *et al.*, 2020).

نتایج و بحث

روابط فیلوژنتیکی و موتیف‌های حفاظت شده پروتئین‌های ApFAD

توالی‌های پروتئینی خانواده FAD که در اسپیرولینا شناسایی شدند به همراه اعضای این خانواده ژنی در آرکیدوپسیس برای ارزیابی روابط فیلوژنتیکی بر اساس روش نزدیکترین همسایگی (NJ) با ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ از طریق نرم افزار MEGAX (Kumar *et al.*, 2018) استفاده شدند. برای شناسایی موتیف‌های پروتئینی حفاظت شده در ApFADها نیز، برنامه MEME (Multiple Em for Motif Elicitation) (Bailey *et al.*, 2009) مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه در اعضای خانواده ApFAD

ارزیابی هستی‌شناسی ژنی پروتئین‌های ApFAD، عملکردهای مولکولی، فرآیندهای بیولوژیکی و مکان‌های زیر سلولی پروتئین‌های ApFAD، از طریق برنامه CELLO2GO (cello.life.nctu.edu.tw/cello2go/) (Yu *et al.*, 2014) برخی از تغییرات مهم پس از ترجمه در توالی پروتئین‌های ApFAD، مانند فسفوریلاسیون^۱، نیتروزیللاسیون^۲، سومویلاسیون^۳ و N-گلیکوزیللاسیون^۴ به ترتیب از طریق سرویس services.healthtech.dtu.dk/services/NetPhosBac-1.0/ (Miller *et al.*, 2009) با مقدار پتانسیل < 0.5، (PredNTS (kurata14.bio.kyutech.ac.jp/PredNTS/index.php) (Nilamyani *et al.*, 2021) GPS-SUMO (Zhao *et al.*, 2014) (sumo.biocuckoo.cn/index.php) و برنامه ProGlycProt (proglycprot.org) (Choudhary *et al.*, 2019) پیش‌بینی شد.

^۱ Neighbor joining

^۲ Phosphorylation

^۳ N-nitrosylation

^۴ Sumoylation

^۵ N-glycosylation

می‌باشد. همچنین، پارامترهای شاخص آلیفاتیک و میانگین کل هیدروپاتیک (GRAVY) پروتئین‌های ApFAD به ترتیب در محدوده ۸۹/۴۹ (در ApFAD-2) تا ۱۰۱/۳ (در ApFAD-1) و ۰/۰۴۶- (در ApFAD-2) تا ۰/۲۲۲ (در ApFAD-5) پیش‌بینی شدند، که حاکی از آب‌گریز بودن این پروتئین‌ها و همچنین پتانسیل آنها در پاسخگویی به تنش‌های محیطی (Rao et al., 2008) می‌باشد.

روابط فیلوژنتیکی و طبقه‌بندی پروتئین‌های ApFAD

مطالعه روابط تکاملی پروتئین‌های ApFAD آنها را به چهار دسته اصلی Omega (با ۲ پروتئین امگا-۶) در گروه I، CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز (FAB2، با ۱ پروتئین) در گروه II، اسفنگولیپید (با ۲ پروتئین) در گروه III و آسیل-لیپید دسچوراز (First، شامل ۳ پروتئین) در گروه IV، طبقه‌بندی کرد، که پروتئین‌های حاضر در هر خوشه فیلوژنتیکی الگوهای موتیف مشابهی را نشان دادند (شکل ۳ الف و ب). همه پروتئین‌های مربوط به دسته First حاوی الگوی حفاظت شده‌ای از موتیف‌های ۳، ۲ و ۱ در ساختار خود بودند، در حالی که ApFAD‌های مربوط به گروه اسفنگولیپید تنها موتیف‌های ۳، ۴ و ۶ را در ساختار خود دارند (شکل ۳ الف و ب و جدول ۳). در هر دو پروتئین امگای شناسایی شده ترکیب و ترتیب موتیف‌ها به صورت موتیف‌های ۳، ۵، ۴ و ۶ بود. همچنین، در تنها عضو پروتئین دسچوراز از گروه CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز نیز، علیرغم شباهت ساختاری آن با پروتئین‌های اسفنگولیپید، تنها دارای موتیف‌های شماره ۳ و ۶ در الگوی موتیف خود بود (شکل ۳ الف و ب). موتیف شماره ۳، Histidin Box 1، که سازنده یکی از بخش‌های عملکردی کلیدی در همه پروتئین‌های ApFAD است در همه اعضای خانواده ApFAD حضور داشت.

به‌طور کلی، چهار جعبه هیستیدین عملکردی بسیار حفاظت شده، سه مورد در قسمت انتهای آمینی و یک مورد در ناحیه انتهای کربوکسیلی، در تمام پروتئین‌های ApFAD شناسایی شدند (جدول ۴ و شکل ۳ ج).

شناسایی اعضای خانواده ژنی ApFAD در ژنوم *A. platensis*

و ارزیابی خصوصیات فیزیوشیمیایی

ارزیابی سیستماتیک خانواده ژنی FAD در مقیاس ژنومی، می‌تواند یک اساس مولکولی قابل اتکا به منظور افزایش کیفیت روغن‌های خوراکی از طریق مهندسی متابولیک مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع فراهم کند. مطالعه ژنومی این خانواده در گونه‌های مختلف گیاهی و ریزجانداران، از قبیل (*Arabidopsis* Michaelson et al., 2009)، سویا (Chi et al., 2011)، گندم (Hajiahmadi et al., 2020)، برنج (Chen et al., 2019)، ریزجلبک‌های (*Thalassiosira pseudonana* Tonon et al., 2005)، و گونه‌های مختلف (*Schizochytrium* sp. Jia et al., 2022) و گونه‌های مختلف قارچ (*Aspergillus* Tang et al., 2018)، صورت گرفته است. با توجه به اهمیت فراوان ریزجلبک اسپیرولینا در زمینه‌های مختلف صنعتی، تغذیه و دارویی، در مطالعه حاضر ژنوم کامل این ریزجلبک، به منظور جستجوی اعضای خانواده ژنی FAD که نقش بسزایی در تامین مواد مغذی و همچنین ایجاد مقاومت به تنش‌های مختلف دارند، مورد بررسی قرار گرفت. پس از حذف توالی‌های تکراری و نیز موارد فاقد دمین اختصاصی کامل، تعداد ۸ پروتئین غیر تکراری بالقوه ApFAD در ژنوم *A. platensis* C1 شناسایی شدند (جدول ۱).

مطابق نتایج پیش‌بینی شده در این مطالعه، چهار نوع پروتئین ApFAD شامل، Omega (FAD2) Acyl-CoA desaturase، (First) CrtR_beta-carotene-hydroxylase (FAB2) و Sphingolipid desaturase، بر اساس توزیع دمین اختصاصی پروتئین در اسپیرولینا شناسایی شدند (جدول ۲). خواص فیزیوشیمیایی متنوعی در پروتئین‌های ApFAD پیش‌بینی شد وزن مولکولی پروتئین‌ها از ۳۱/۳۷ (در ApFAD-5) تا ۴۲/۱۵ کیلو دالتون (در ApFAD-4) متغیر بود. مقادیر نقطه ایزوالکتریک (pI) در پروتئین‌های ApFAD از ۶/۲۹ (در ApFAD-8) تا ۸/۹ (در ApFAD-1) متغیر بود، با این حال، اکثر پروتئین‌های شناسایی شده (~۶۲٪) مقادیر pI بیش از ۷ را نشان دادند، که ماهیت قلیایی اکثر این پروتئین‌ها را نشان می‌دهد (جدول ۲). مقادیر شاخص ناپایداری (II) در ~۶۲،۵٪ از ApFAD‌های شناسایی شده بیشتر از ۴۰ پیش‌بینی شد که نشان دهنده ناپایدار بودن این پروتئین‌ها

جدول ۱. لیست ژن‌های FAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپیرولینا و مشخصات ژنتیکی آنها

توصیف ژن	موقعیت ژنومی	اندازه DNA	نام ژن	شناسه دسترسی در NCBI
Gene description	Genomic position	DNA length (bp)	Gene symbol	NCBI locus ID
fatty acid desaturase; CrtR_beta-carotene-hydroxylase	304166..305071	906	ApFAD-1	AFXD01000010.1
Delta-12 acyl-phospholipid desaturase; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE	600352..601422	1071	ApFAD-2	APLC1_0651
delta-9 desaturase, desC; Stearoyl-CoA desaturase (Delta-	788338..789801	1464	ApFAD-3	AJ002065.1

9 desaturase								
delta-6 desaturase (D6d)	833310..834461	1151	<i>ApFAD-4</i>	FJ752023.1				
delta 9 fatty acid desaturase, acyl-lipid desaturase	1138073..1138438	813	<i>ApFAD-5</i>	AF002252.1				
delta-12 desaturase; desA; OMEGA-6 FATTY ACID DESATURASE	1432941..1434223	1282	<i>ApFAD-6</i>	X86736.1				
stearoyl-CoA desaturase (delta-9 desaturase)	2236276..2237088	813	<i>ApFAD-7</i>	APLC1_2346				
Delta6 Fatty Acid Desaturase (Delta6-FADS)-like	2397108..2398214	1107	<i>ApFAD-8</i>	APLC1_2499				

جدول ۲. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های ApFAD شناسایی شده در ژنوم ریزجلبک اسپرولینا

نام ژن Gene symbol	شناسه پروتئین Protein id	طول پروتئین Protein length (aa)	وزن مولکولی MW (Da)	نقطه ایزوالکتریک pI	شاخص ناپایداری Instability index	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	متوسط هیدروپاتی کل GRAVY	نوع پروتئین Protein type	دامین عملکردی Domain
<i>ApFAD-1</i>	EKD10288.1	301	34889.59	8.9	43.74	101.73	0.151	CrtR_beta-carotene-hydroxylase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
<i>ApFAD-2</i>	UWU45967.1	356	41842	6.56	42.28	89.49	-0.046	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
<i>ApFAD-3</i>	CAA05166.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-4</i>	ACN65115.1	368	42154.73	6.48	40.69	98.26	0.181	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)
<i>ApFAD-5</i>	AAD00996.1	270	31376.48	7.27	28.41	96.74	0.222	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-6</i>	CAA60415.1	351	40928.39	7.8	42.05	91.03	0.063	Omega 6; FAD2	FA_desaturase (PF00487)
<i>ApFAD-7</i>	UWU47577.1	270	31406.51	7.27	27.78	96.37	0.208	Acyl-CoA desaturase; First	FA_desaturase (PF00487), Lipid_DES (PF08557)
<i>ApFAD-8</i>	UWU47727.1	368	42057.52	6.29	41.15	97.99	0.191	Sphingolipid desaturase; FAB2	FA_desaturase_2 (PF03405)

جدول ۳. مشخصات و الگوی موتیف‌های حفاظت شده پیش‌بینی شده در پروتئین‌های ApFAD

شماره موتیف Motifs No.	E-value	Sites	طول Width	توالی Sequence	مستندسازی Annotation
1	1.50E-06	3	50	RIVVVHCTWFVNSATHKFGYQTYQSNDSKNCWWVALVTYGEGWHNNHH	C-terminal His-Box III
2	3.00E-06	3	50	WSHMGWMLREIPADADVPRFTKDINEDPVYLFQNYFIPIQVALGVVLYL	-
3	2.10E-02	7	21	HDITHRSFSRNKWNVNYLLGHT	N-terminal His-Box I
4	4.30E-03	4	41	WKFHRHTLLHHTYADIPGRDPEQWGDDELVRLSPSVEYRWY	-
5	3.30E-03	2	50	SWRIGHNQHHKYTNRMELDNAWQPWRKEEYQNAGKFMQVTYDLFRGRAWW	His-Box II
6	3.40E-02	5	41	NWLVGGJNYHIVHHLFPAIPWYNYRKAAPILAEEVCEEYGY	His-Box IV

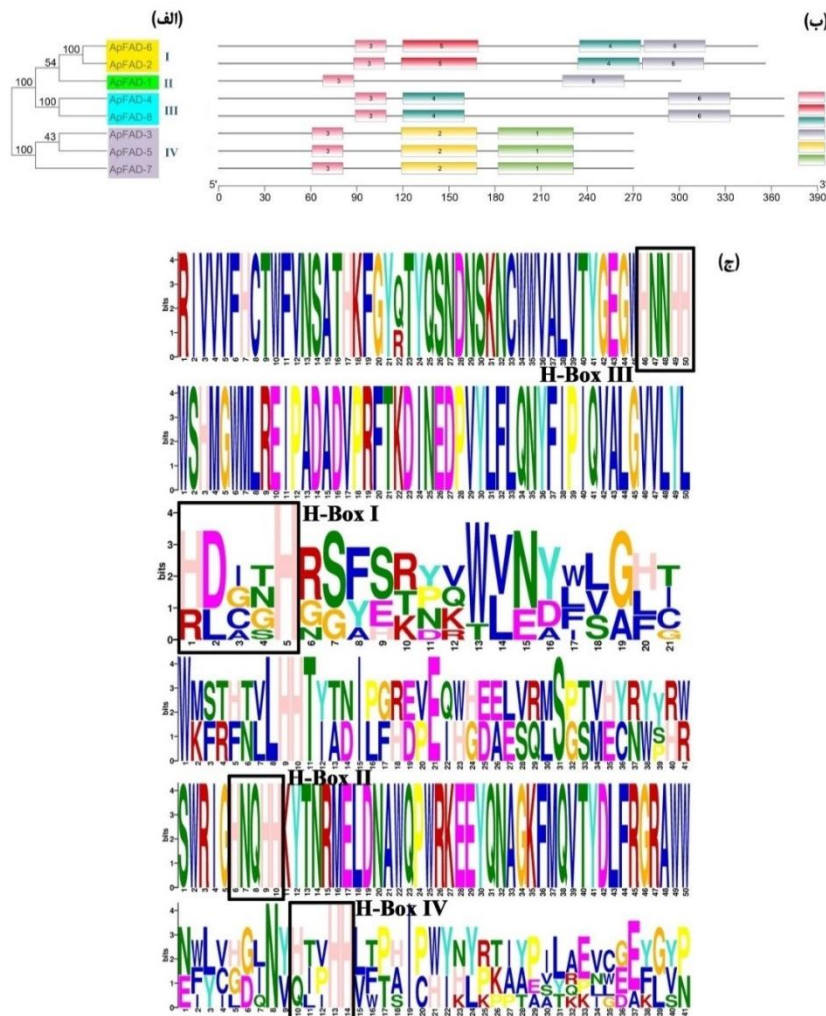
کربوکسیلی پروتئین‌های مرتبط با گروه آسیل-لیپید دساچوراز (*ApFAD-3*، *ApFAD-5* و *ApFAD-7*) پیش‌بینی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۴ (موتیف ۶) در گروه‌های Omega-CrtR، بتاکاروتن هیدروکسیلاز (*ApFAD-1*) و اسفنگولیپید (*ApFAD-4* و *ApFAD-8*) شناسایی شد. موتیف‌های هیستیدینی موجود در FADهای غشائی، معمولاً با الگوهای H(X)2-3HH، H(X)3-4H و H(X)2-3H (جدول ۳)، گزارش شده‌اند و فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها

در واقع این ساختارهای هیستیدینی حفاظت شده که در پروتئین‌های FAD موجودات مختلف یافت می‌شود، موجب تنظیم عملکرد سلولی این پروتئین‌ها به ویژه در شرایط تنش محیطی می‌شوند (Díaz et al., 2018). جعبه هیستیدین ۱ (موتیف ۳) در تمام پروتئین‌های *ApFAD*، شناسایی شد، در حالی که جعبه هیستیدین ۲ (موتیف ۵) تنها در پروتئین‌های *ApFAD-2* و *ApFAD-6* (پیش‌بینی شد (جدول ۳)). همچنین، جعبه هیستیدین ۳ (موتیف ۱) فقط در ناحیه انتهای

می‌شود، بنابراین بررسی روابط تکاملی بین گونه‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در رابطه با عملکردهای ژنی و پروتئینی فراهم کند.

به‌واسطه اتصال به ساختارهای دای-آهن از طریق همین نواحی حفاظت شده صورت می‌گیرد (Alonso *et al.*, 2003).

در مطالعه روابط تکاملی گونه‌های مختلف، رویدادهایی نظیر مضاعف‌شدگی ژنی و حتی ژنومی، بسیار مشاهده



شکل ۳. روابط فیلوژنتیکی، الگوی موتیف‌های پروتئینی و لوگوی ساختاری مربوطه در پروتئین‌های ApFAD. (الف) بررسی روابط فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGAX و ۱۰۰۰ تکرار بوت استرپ بر مبنای روش نزدیکترین همسایگی (NJ) پروتئین‌های FAD در ژنوم اسپیرولینا را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد. (ب) الگوی موتیف‌های پروتئینی در هر کلاستر منحصریفرود بود و موتیف شماره ۳ به‌عنوان His-Box 1 پایه در همه پروتئین‌ها پیش‌بینی شد. (ج) بررسی لوگوهای پیش‌بینی شده برای هر موتیف وجود چهار ناحیه حفاظت شده His-Box را در پروتئین‌های ApFAD مشخص ساخت، که محور عمودی بیانگر میزان حفاظت شدگی اسیدهای آمینه و محور افقی نیز نشان دهنده تنوع و تعداد آن‌ها است.

جدول ۴. نواحی جعبه هیستیدین عملکردی و حفاظت شده در ساختار پروتئین‌های ApFAD در اسپیرولینا

شناسه ژن Gene ID	Box 1		Box 2		Box 3		Box 4	
	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position	توالی Sequence	موقعیت Position
<i>ApFAD-1</i>	HDASH	68-88	-	-	-	-	HLIHH	224-264
<i>ApFAD-2</i>	HDCGH	88-108	HNQHH	119-168	-	-	HIPHH	276-316
<i>ApFAD-3</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-4</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	HTVHH	293-333
<i>ApFAD-5</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	91-140	-	-
<i>ApFAD-6</i>	HDCGH	89-109	HNQHH	120-169	-	-	HIPHH	277-317
<i>ApFAD-7</i>	RLITH	61-81	-	-	HNNHH	182-231	-	-
<i>ApFAD-8</i>	HDGNH	89-109	-	-	-	-	QTVHH	293-333

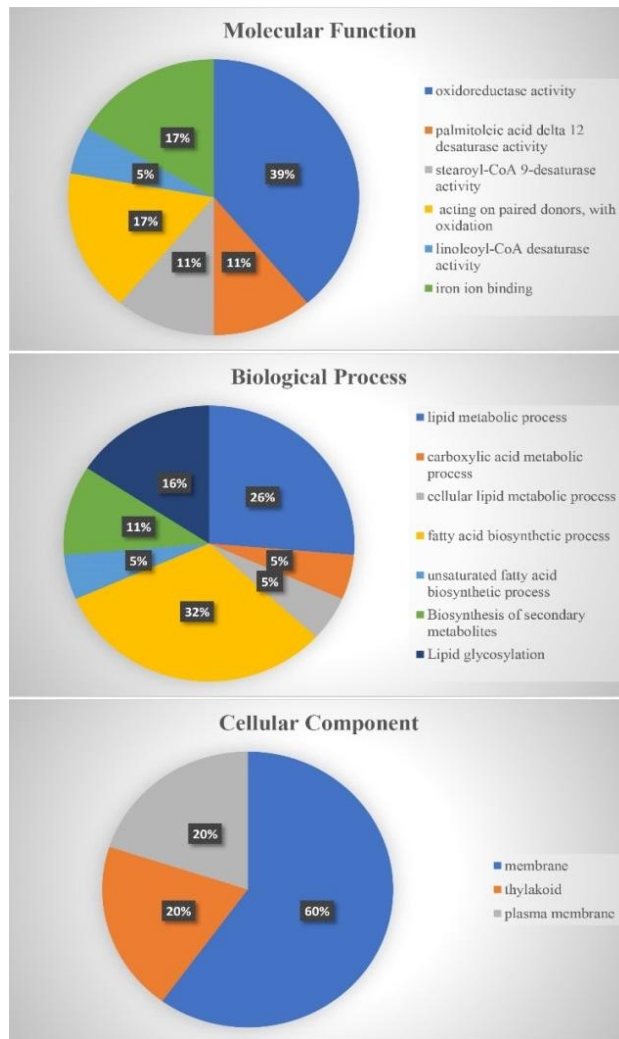
اکسیداسیون اکسیژن مولکولی و تبدیل آن به دو مولکول آب، نقش دارند. علاوه بر این، ۱۷ درصد از ApFADها دارای این پتانسیل بودند که به عنوان مولکول تنظیم کننده در اتصال پروتئین‌ها به یون‌های آهن عمل کنند. علاوه بر این، ۱۱، ۱۱ و ۵ درصد از ژن‌های ApFAD، به ترتیب به عنوان آنزیم‌های دساچوراز تنظیم کننده اصلی در فعالیت مولکولی اسیدهای چرب پالمیتوئیک، استئارویل-CoA و لینئول-CoA نقش دارند (شکل ۵). نتایج حاصل از بررسی فرآیندهای بیولوژیکی نشان داد که بیشتر ژن‌های ApFAD در فرآیند بیوسنتزی اسیدهای چرب (۳۷٪) و فرآیند متابولیسم لیپید (۳۱٪) ایفای نقش می‌کنند (شکل ۵). علاوه بر این، ۱۶ و ۱۱٪ از ApFADها، به ترتیب، دارای پتانسیل کنترل گلیکوزیلاسیون لیپیدها و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه بودند، که به نوبه خود بیانگر نقش پر اهمیت این پروتئین‌ها در اسپیرولینا به دنبال قرارگیری در شرایط دارای تنش می‌باشد (Lu et al., 2020). علاوه بر این، برخی از ژن‌های ApFAD احتمالاً در تنظیم فرآیند متابولیسم اسید کربوکسیلیک (۵٪)، نقش دارند، که می‌تواند دخالت گسترده ژن‌های ApFAD را در فرآیندهای سلولی مختلف در طول چرخه زندگی اسپیرولینا نشان دهد (Offermanns, 2017).

تغییرات پس از ترجمه، که اثرات مهمی بر تنظیم واکنش‌های ناشی از محرک‌ها در موجودات زنده دارند (Hashiguchi & Komatsu, 2016)، نواحی دارای تغییرات فسفوریلاسیون، N-نیتروزیلاسیون، سومیلیشن و N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های ApFAD پیش‌بینی شدند. به جز یکی از پروتئین‌های ApFAD متعلق به گروه Omega 6، (ApFAD-2)، سایر پروتئین‌های ApFAD پتانسیل گلیکوزیله شدن اتم نیتروزن در یکی از اسید آمینه‌های آسپاراژین (N) خود را دارا بودند، که در این میان پروتئین‌های ApFAD-4 و ApFAD-8 متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، بالاترین پتانسیل را نشان دادند (شکل ۶ الف). نتایج بررسی تغییرات سومیلیشن در پروتئین‌های ApFAD بیانگر وجود حداقل یک تغییر در هر پروتئین بود؛ به طوری که بیش‌ترین اسید آمینه‌های تغییر یافته در پروتئین‌های ApFAD-1، ApFAD-2، ApFAD-8، (به ترتیب از دسته بتاکاروتن هیدروکسیلاز، امگا ۶ و اسفنگولیپید) یافت شدند (شکل ۶ ب). علاوه بر این، همه ApFADهای متعلق به کلاس آسیل-لیپید دساچوراز و همچنین ApFAD-6 از گروه Omega 6، دارای تغییرات قابل توجهی در اسید آمینه لیزین (K) خود بودند (شکل ۶ ب و جدول S1).

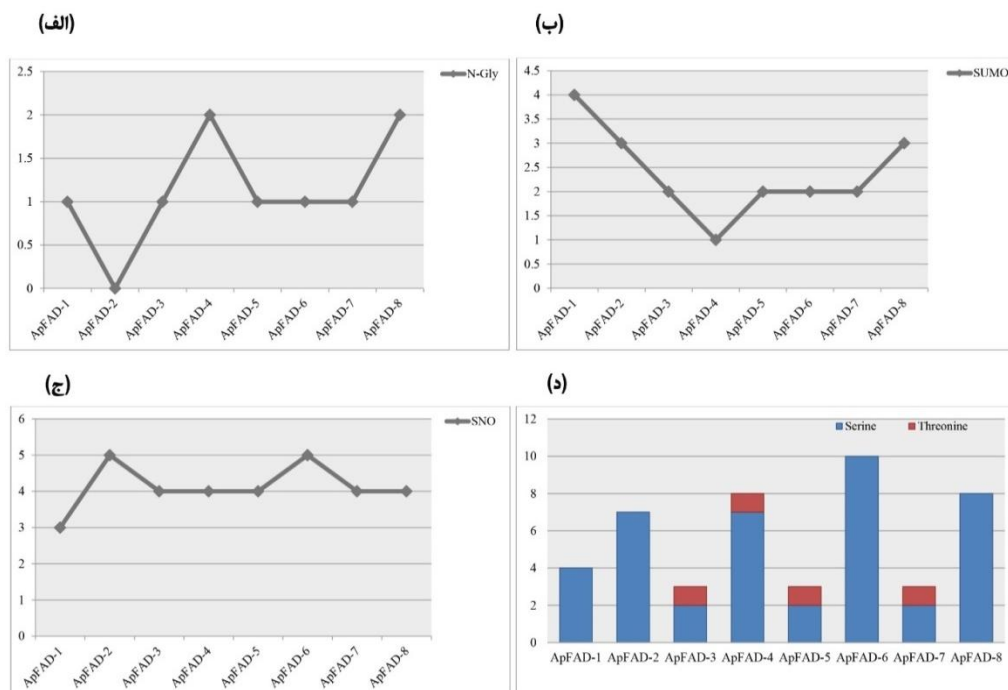
برای ارزیابی بیشتر روابط تکاملی ژن‌های FAD، یک درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های اسید آمینه پروتئین‌های FAD در *A. platensis* و *Arabidopsis thaliana* به عنوان یک موجود مدل تأیید شده، ترسیم شد. بر اساس نتایج بدست آمده، پروتئین‌های FAD در شش گروه مختلف دسته‌بندی شدند (شکل ۴). FADهای مربوط به کلاس امگا در این گونه‌ها در گروه I طبقه‌بندی شدند، در حالی که گروه II تنها پروتئین مربوط به گروه CrtR-بتاکاروتن هیدروکسیلاز را در خانواده ژنی FAD در اسپیرولینا در بر می‌گیرد. همچنین، اعضای مرتبط با خوشه‌های اسفنگولیپید در کلاس‌های III و IV گروه بندی شدند (شکل ۴). گروه V با ۱۲ عضو به عنوان بزرگترین کلاس در این درخت فیلوژنتیکی و به عنوان پروتئین‌های حاوی دمین‌های اختصاصی (PF00487) FA_desaturase و Lipid_DES (PF08557)، تحت عنوان گروه‌های آسیل-لیپید دساچوراز، شناسایی شد. گروه VI نیز با هشت عضو به عنوان گروه بزرگ دیگر، دربرگیرنده پروتئین‌های FAD4، پیش‌بینی شدند. علاوه بر این، با توجه به تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی، ApFADها در همه گروه‌ها بجز گروه VI وجود داشتند که بیانگر فقدان پروتئین‌های کلاس FAD4 در ژنوم اسپیرولینا می‌باشد، که این موضوع می‌تواند بیانگر امکان رخداد موتاسیون‌هایی در جهت حذف یا تغییر نوع فعالیت کاتالیزوری این پروتئین‌ها باشد (Lee et al., 2016). بر اساس نتایج مطالعه حاضر، می‌توان پیشنهاد کرد که منشأ تکاملی مشابهی ممکن است برای برخی از ژن‌های خوشه‌بندی شده وجود داشته باشد، که پتانسیل ایجاد عملکردهای مشابهی را در سلول‌ها فراهم می‌سازد.

تفسیر نتایج هستی‌شناسی ژنی و تغییرات پس از ترجمه در خانواده ApFAD

بر اساس نتایج هستی‌شناسی ژن، فرآیندهای بیولوژیکی تنظیم شده توسط ژن‌های خانواده ApFAD، مشارکت قابل توجه آنها را در فرآیندهای متابولیسم لیپید، فرآیندهای بیوسنتزی اسیدهای چرب و فرآیندهای اکسیداسیون-کاهش نشان داد. با توجه به تجزیه و تحلیل نتایج، بیشتر پروتئین‌های ApFAD در اسپیرولینا در غشای سلولی (۶۰٪)، غشای پلاسمایی (۲۰٪) و تیلاکوئید در کلروپلاست (۲۰٪) قرار گرفته‌اند (شکل ۵). پیش‌بینی عملکرد مولکولی ژن‌های ApFAD نشان داد که ۳۹ و ۱۷ درصد از آنها، به ترتیب در فعالیت اکسیدوردوکتازی و



شکل ۵. نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژن (Gene Ontology) پروتئین‌های ApFAD در ریزجلبک اسپیرولینا و عملکردهای مختلف سلولی در مسیرهای متنوع عملکرد مولکولی، فعالیت بیولوژیکی و اجزای زیر سلولی.



شکل ۶. نتایج حاصل از بررسی تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌های ApFAD. (الف) بالاترین میزان تغییرات N-گلیکوزیلاسیون در پروتئین‌های گروه اسفنگولیپید یافت شد. (ب) بیشترین و کمترین میزان تغییرات سومویلاسیون به ترتیب در تنها پروتئین گروه بتاکاروتن هیدروکسیلاز و ApFAD-4 از دسته اسفنگولیپید بود. (ج) تغییرات نیتروزیلاسیون دارای روند هماهنگی در پروتئین‌های ApFAD، با بالاترین میزان در گروه Omegaها بود. (د) نیمی از پروتئین‌های ApFAD تنها در اسید آمینه سرین و نیمی دیگر علاوه بر آن در اسید آمینه ترئونین نیز متحمل تغییرات فسفریلاسیون شدند. محور افقی نشانگر نام پروتئین و محور عمودی حاکی از تعداد اسید آمینه تغییر یافته پس از ترجمه در هر پروتئین است.

هورمون‌های مختلف و شرایط محرک، در ناحیه بالادست ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

عناصر مشترک سیس در پروموتور، مانند عنصر هسته CAAT-box و TATA-box، در تمام ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند، که تعداد این عناصر در ژن‌های *ApFAD-6*، *ApFAD-7* و *ApFAD-4* به ترتیب متعلق به کلاسترهای امگا، آسیل-لیپید و اسفنگولیپید، بیشتر بود که می‌تواند بیانگر پتانسیل بالای این ژن‌ها در تنظیم کارایی و صحت انجام رونویسی باشد (Tora & Timmers, 2010). عناصر مرتبط با هورمون‌ها، مانند ABRE (پاسخ‌دهی به اسید آبسزیک)، CGTCA (عنصر پاسخ‌دهنده به متیل جاسمونات) و TCA-element (عنصر پاسخ‌دهنده به اسید سالیسیلیک)، تقریباً در همه پروموتورها شناسایی شدند. تعدد و فراوانی تقریباً مشابه این عناصر پاسخگو به هورمون‌ها، در واقع بیانگر نقش مهم این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و همچنین پاسخ به تنش‌های محیطی در ریزجلیک اسپیرولینا می‌باشد؛ به طور مثال، تمامی ژن‌های پیش‌بینی شده در کلاستر آسیل-لیپیدها در اسپیرولینا دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌هایی نظیر متیل جاسمونات، اسید سالیسیلیک، اکسین و جیبرلین بودند، که می‌تواند نشانگر اهمیت این ژن‌ها در مسیرهای سلولی مختلفی چون تنظیم رشد و ایجاد پاسخ مقاومتی در برابر تنش‌های محیطی باشد (Verma *et al.*, 2016).

علاوه بر این، عناصر پاسخ‌دهنده به هورمون‌های جیبرلین (P-box) در *ApFAD-5* و اکسین (AuxRR-core) و TGA-element در *ApFAD-3* و *ApFAD-4* نیز پیش‌بینی شدند، که پتانسیل این ژن‌ها را در تعدیل جنبه‌های مختلف رشد و نمو در اسپیرولینا آشکار می‌سازد (Soria-García *et al.*, 2019).

عناصر پاسخگو به نور Box_4، G-Box و GATA-motif در همه ژن‌های *ApFAD* یافت شدند، که احتمالاً به پتانسیل بالای این ژن‌ها در زمینه تولید متابولیت‌هایی مانند فلاونوئیدها، اشاره دارد. فاکتورهای سیس مختلفی، از قبیل LTR (دخیل در پاسخگویی به دماهای پایین)، MYB (دخیل در پاسخگویی به تنش‌های

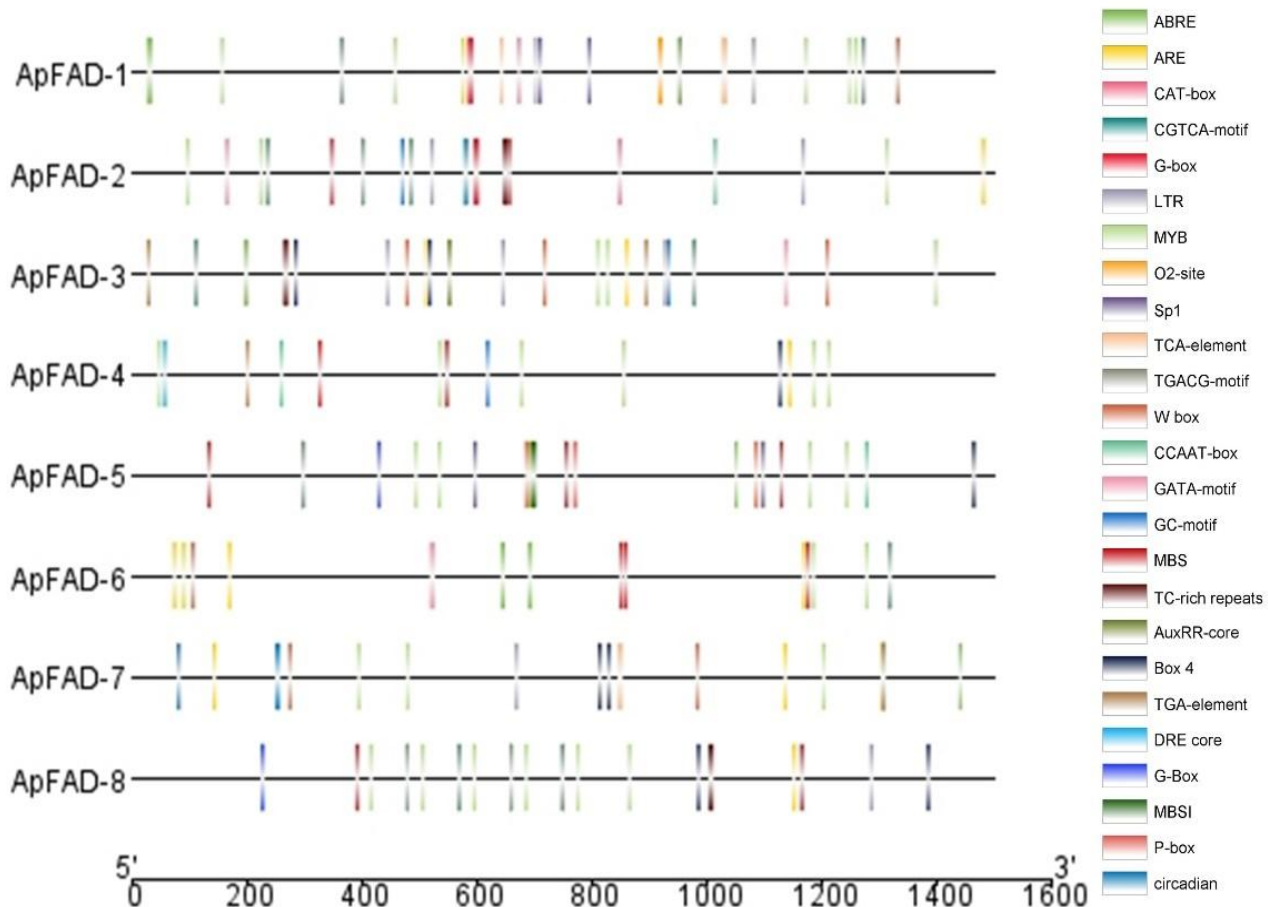
مطابق نتایج بدست آمده، پروتئین‌های متعلق به گروه Omega 6، شامل *ApFAD-2* و *ApFAD-6*، در اسپیرولینا، تنها در محل اسید آمینه سرین در ساختار خود متحمل تغییرات فسفریلاسیون شدند. پروتئین *ApFAD-1*، به عنوان تنها عضو متعلق به کلاس بتاکاروتن هیدروکسیلاز، نیز دارای ۴ ناحیه فسفریله شده در اسید آمینه سرین در ساختار خود بود. این در حالیست که، تمامی پروتئین‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دساجوراز به همراه تنها یک عضو از پروتئین‌های اسفنگولیپید (*ApFAD-4*)، هم در اسید آمینه‌های سرین و هم ترئونین در ساختار خود، متحمل تغییرات فسفریلاسیون شده بودند (جدول S1). بطور کلی، پروتئین‌های *ApFAD* متعلق به گروه‌های Omega 6 (*ApFAD-2* و *ApFAD-6*) و اسفنگولیپید (*ApFAD-4* و *ApFAD-8*) دارای بیشترین فسفریلاسیون در ساختار قابل ترجمه خود بودند، که این موضوع می‌تواند نقش این پروتئین‌ها را در ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی برجسته سازد (Kazanecki *et al.*, 2007). این تغییرات پس از ترجمه در ساختار پروتئین‌ها رویدادهای پردازش کووالانسی هستند که خواص بیوفیزیکی یک پروتئین را از طریق افزودن یک گروه اصلاح‌کننده به یک یا چند اسید آمینه تغییر داده (Yan *et al.*, 2023) و به عنوان مکانیسم‌های تنظیمی کلیدی در طیف وسیعی از پروتئوم‌ها عمل می‌کنند (Ramazi & Zahiri, 2021).

پیش‌بینی عناصر تنظیمی سیس در نواحی پروموتوری ژن‌های *ApFAD*

شناسایی عناصر تنظیم‌کننده سیس در نواحی پروموتوری می‌تواند به درک عملکرد دقیق ژن‌ها کمک کرده و شبکه‌های تعاملی بین آن‌ها را نشان دهد؛ به طوری که پروتئین‌های مختلف در مواجهه با تنش‌های غیرزیستی، از طریق اتصال به عناصر عملکردی موجود در پروموتور ژن‌های هدف، آن‌ها را تنظیم می‌کنند (Cao *et al.*, 2016). در مطالعه حاضر، نواحی پروموتوری مربوط به ژن‌های *ApFAD* در ژنوم اسپیرولینا برای یافتن عناصر تنظیم‌کننده سیس مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج حاصل، انواع مختلفی از عناصر سیس برای مقابله با

پاسخگویی به تنش خشکی)، به عنوان عناصر تنظیمی دفاعی و دارای اهمیت فراوان، در ناحیه پرموتری تمامی ژن‌های *ApFAD* پیش‌بینی شدند (شکل ۷).

محیطی)، W-box (متصل شونده به پروتئین‌های WRKY در راستای پاسخگویی به تنش‌های غیرزیستی)، TC-rich (دخیل در مکانیسم دفاعی و پاسخگویی به تنش‌ها) و MBS (دخیل در القای بیوستنز فلاونوئیدها و محل اتصال پروتئین‌های MYB در جریان



شکل ۷. عناصر سیس موجود در نواحی پرموتری ژن‌های *ApFAD* در اسپیرولینا.

طریق تحریک بیان ژن‌هایی چون اسفنگولیپید دسچورازها، قادر است شرایط تنش را تحمل کند. علاوه بر این، ژن‌های *ApFAD-5* (از کلاس آسیل-لیپید دسچوراز) و *ApFAD-6* (متعلق به گروه Omega 6)، نیز دارای تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیمی MBS در نواحی پرموتری خود بودند، که نشان دهنده پتانسیل این ژن‌ها در تولید متابولیت‌های فلاونوئیدی و در نتیجه نقش پررنگ آن‌ها در ایجاد ارزش غذایی بالا در اسپیرولینا می‌باشد (Kargiotidou et al., 2013; Li-Beisson et al., 2008). در واقع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مختلف موجود در گیاهان و ریزجلبک‌های سبز خوراکی نقش ارزشمندی را در راستای کاهش یا جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ناشی از رادیکال‌های آزاد، مانند رادیکال‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و گونه‌های رادیکال غیرآزاد مانند پراکسید هیدروژن، که می‌توانند باعث آسیب

ژن‌های متعلق به گروه آسیل-لیپید دسچورازها، علاوه بر فاکتورهای پاسخگو به تنش‌های مختلف، دارای عناصر سیس پاسخگو به هورمون‌های متعدد و متفاوتی چون اسید سالیسیلیک، جیبرلین و اکسین، در ناحیه پرموتری خود بودند، که وجه تمایز آن‌ها در مقایسه با سایر گروه‌های طبقه‌بندی بود و می‌تواند بیانگر پتانسیل قابل توجه این ژن‌ها در تنظیم مراحل مختلف رشد و نمو و نیز تحریک تولید متابولیت‌های مغذی در اسپیرولینا باشد (Lu et al., 2020). همچنین، مطابق نتایج بدست آمده مشخص شد که ژن‌های *ApFAD* متعلق به کلاس اسفنگولیپیدها، علاوه بر تعداد قابل توجهی از عناصر تنظیم کننده پاسخ به محرک‌ها، دارای عناصر تنظیمی موثر در تحریک بیوستنز فلاونوئیدها در سلول بودند؛ در واقع زمانی که اسپیرولینا در شرایط محیطی تنش‌زا قرار می‌گیرد، به واسطه دارا بودن پتانسیل تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف، از

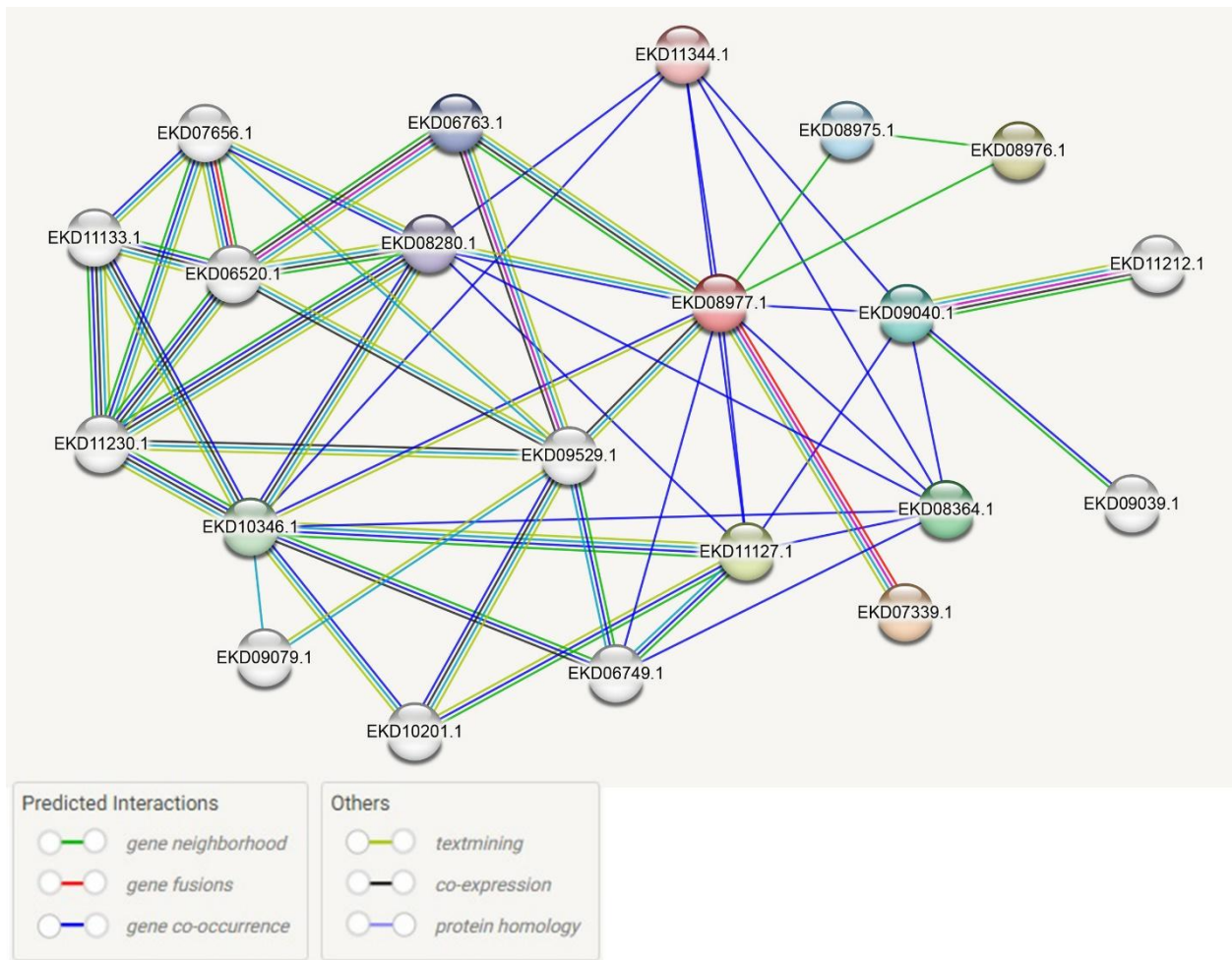
می‌باشد (شکل ۸ و جدول S2). در واقع، تفسیر نتایج حاصل از آنالیز هستی‌شناسی ژنی این پروتئین‌های FAD در تعامل با یکدیگر، نقش مهم این برهم‌کنش‌ها را در توسعه فرآیند بیوسنتزی اسیدهای چرب نشان می‌دهد (Kaur *et al.*, 2014). از دیگر پروتئین‌های دارای تعامل نزدیک با پروتئین FAD کاندید، می‌توان به Tic22-like (EKD11344.1)، Lycopene cyclase (EKD08280.1)، Ubiquinone biosynthesis hydroxylase (EKD09529.1)، Tocopherol UbiA prenyltransferase (EKD10346.1) و cyclase (EKD11127.1) اشاره داشت، که به ترتیب در فرآیندهای انتقال پروتئین‌ها درون سلول، بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه و تولید انرژی، تسهیل اتصال به دای‌نوکلئوتیدهای فلاوین آدنین و بیوسنتز یوبیکوئینون، فعالیت پرینیل ترانسفراز و بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه توکوفرول، نقش دارند.

در شبکه پروتئینی پیش‌بینی شده برای پروتئین FAD کاندید، ژن‌هایی چون hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (EKD10201.1) و Molybdopterine oxidoreductase (EKD11212.1)، که به واسطه فعالیت اکسیدوردوکتازی خود به ساختارهای حاوی یون فلزی متصل شده و در تنظیم فرآیندهای متابولیسمی اسید آمینه‌های آروماتیک و جذب نیترات نقش دارند، نیز پیش‌بینی شده است (شکل ۸ و جدول S2). علاوه بر این، پروتئینی از گروه Geranylgeranyl reductase (EKD11133.1) نیز دارای تعامل با پروتئین ApFAD-6 بود، که به نظر می‌رسد در فرآیند بیوسنتز کلروفیل و انتقال الکترون حین انجام فتوسنتز در اسپیرولینا دخیل باشد، که در نهایت می‌تواند رشد و بهره‌وری این ریزجلبک را تحت تاثیر قرار دهد (Wang *et al.*, 2014).

سلولی یا متابولیسمی، تسریع پیری و یا حتی ایجاد سرطان شوند، ایفا می‌کنند. به عنوان یک منبع پروتئینی کامل، اسپیرولینا و ویژگی‌های آن بر جنبه‌های مختلف سلامت انسان، از سوء‌تغذیه گرفته تا پتانسیل آنتی‌اکسیدانی تأثیر مثبت دارد (Kumar *et al.*, 2021; Maddaly, 2010). تنها عضو شناسایی شده از گروه بتاکاروتن هیدروکسیلاز در ژنوم اسپیرولینا نیز دارای فاکتورهای تنظیمی مختلفی هم در راستای تعدیل رشد و نمو و هم در جهت تنظیم پاسخگویی به محرک‌های محیطی بود، که نشان‌دهنده دخالت بالقوه این ژن‌ها در جنبه‌های مختلف چرخه زندگی این ریزجلبک می‌باشد (شکل ۷).

بررسی شبکه‌های تعامل پروتئین-پروتئین برای ژن کاندید از خانواده ApFAD در اسپیرولینا

به دنبال استخراج اطلاعات کامل پروتئوم در *A. platensis* و با توجه به مشخصه‌های ساختاری و فیزیولوژیکی پیش‌بینی شده قابل توجه در توالی مربوط به ژن ApFAD-6 در این مطالعه، پروتئین رمز شده توسط ژن مذکور به عنوان کاندیدی مناسب برای پیش‌بینی برهم‌کنش‌های پروتئین-پروتئین در خانواده ژنی اسیدهای چرب دساجوراز در ریزجلبک اسپیرولینا، در نظر گرفته شد. بر اساس نتایج حاصل، پروتئین ApFAD-6 (EKD08977.1) در شبکه پیش‌بینی شده، دارای تعامل نزدیکی با سایر پروتئین‌های اسید چرب دساجوراز، از قبیل EKD07339.1، EKD09040.1، EKD08976.1، EKD08975.1 و EKD06763.1 می‌باشد، که این تعامل دارای پتانسیل تنظیم فعالیت‌های اکسیدوردوکتازی، اتصال به یون‌های آهن، بیوسنتز لیپید و گلیکوزیلاسیون لیپیدها در سلول‌های اسپیرولینا



شکل ۸. شبکه پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده بر اساس داده‌های پروتئومیکس ریزجلبک اسپیرولینا با استفاده از برنامه STRING.

ژن‌های *FAD* را در کنترل پاسخ به تنش‌های مختلف را نمایان سازد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های *FAD* ارتولوگ بر اساس داده‌های RNA-seq

در مطالعه حاضر، با توجه به عدم ثبت داده‌های RNA-seq برای بیان تمامی ژن‌های اسپیرولینا در شرایط تنش‌های مختلف، از الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ برای هر ژن *ApFAD* در *Arabidopsis* به عنوان جاندار مدل، استفاده شد و پروفایل بیانی ژن‌های *FAD* کاندید در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، تمامی ژن‌های *FAD* در پاسخ به شرایط محرک دارای تغییرات واکنشی قابل توجهی در میزان بیان خود بودند (شکل ۹). بر اساس مقادیر FPKM استخراج شده، ژن‌های *AT4G30950* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-6*) از گروه 6 Omega و *AT1G06080* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-3*) متعلق

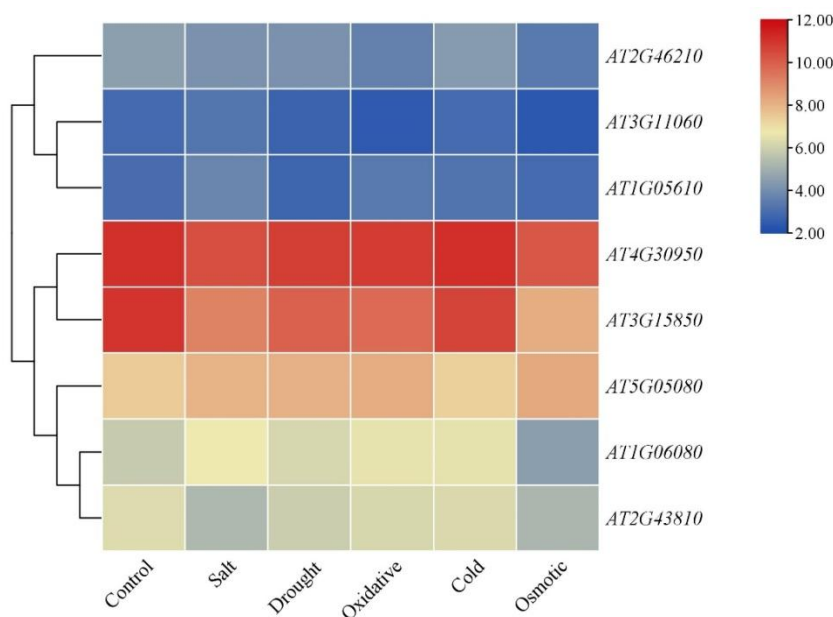
شایان توجه است که، تعداد زیادی از پروتئین‌های دارای برهم‌کنش با *ApFAD-6*، از قبیل Carotene 78- Phytoene synthase (EKD07656.1) desaturase Carotene isomerase و (EKD06520.1) نیز با فعالیت در مسیرهای کاتالیزوری و اکسیدوردوکنزازی به بیوسنتز متابولیت‌های ارزشمندی چون کاروتنوئیدها در شبکه دساچورازی اسپیرولینا کمک می‌کنند؛ در واقع این پروتئین‌ها علاوه بر نقش آفرینی در مسیر تولید مواد مغذی ارزشمند در اسپیرولینا، توانایی مقابله این ریزجلبک با عوامل متعدد محیطی را نیز تحت تاثیر مثبت قرار می‌دهند (Lee et al., 2016; Li-Beisson et al., 2013). همچنین، حضور پروتئین‌های Tocopherol O-methyltransferase (EKD06749.1) و Methyltransferase type 11 (EKD09079.1) در شبکه پروتئینی مربوط به *ApFAD-6*، که وظیفه کنترل فرآیند متیل ترانسفراز و در نهایت متیلاسیون پروتئین‌ها را بر عهده دارند، می‌تواند نقش برجسته شبکه‌های مرتبط با

(به ترتیب به عنوان نزدیکترین ارتولوگ‌ها برای ژن‌های *Ap-* *FAD-4* و *ApFAD-8* از گروه اسفنگولیپیدها) و *AT3G15850* (نزدیکترین ارتولوگ برای ژن *ApFAD-5* از گروه آسیل-لیپید دساچورازها)، در مقایسه با شرایط کنترل، در شرایط تنش مختلف تغییری مشاهده نشد که می‌تواند نشان دهنده نقش تنظیم‌کنندگی عملکردهای سلولی این ژن‌ها در اسپیرولینا باشد.

در تحقیق دیگر نیز با وجود افزایش سطح بیان ژن *Δ9ACPCiFAD* در پاسخ به شرایط تنش در ریزجلبک *Chlamydomonas sp.*، میزان رونوشت ژن‌های *Δ12CiFAD* و *ω3CiFAD2* طی ساعات اولیه اعمال تنش تغییری نشان نداد (An *et al.*, 2013). در واقع، ریزجلبک‌ها با تنظیم مسیر بیوسنتز لیپیدها، به تنش‌های مختلف پاسخ می‌دهند؛ تغییر در بیان ژن‌های *FAD* و تولید ترکیبات مختلف اسیدهای چرب در پاسخ به تنش‌های محیطی گزارش شده است (Liu *et al.*, 2011). بر اساس یافته‌های حاصل از این مطالعه، دو ژن *ApFAD-3* و *ApFAD-6*، به ترتیب از گروه‌های مربوط به Omega 6 و آسیل-لیپید دساچورازها، با توجه به مقادیر قابل توجه رونوشت آن‌ها و نیز در تکمیل نتایج حاصل از سایر آنالیزهای انجام شده در این مطالعه، از جمله بررسی تغییرات پس از ترجمه و نواحی پروموتری، می‌توانند به عنوان کاندیدهایی مناسب برای ارزیابی بیشتر پتانسیل آن‌ها در طول چرخه زندگی اسپیرولینا در نظر گرفته شوند.

به کلاستر آسیل-لیپید دساچوراز، دارای بالاترین میزان رونویسی در شرایط تنش‌های مختلف بودند. شایان ذکر است که، بیان ژن‌های فوق‌الذکر تنها در شرایط تنش اسمزی (برای ژن *AT1G06080*) و سرما (برای ژن *AT4G30950*)، در مقایسه با شرایط کنترل، پایین‌تر بود، که این نتایج با گزارشات سایر محققان مطابقت داشت (Liu *et al.*, 2015). به‌علاوه، میزان رونویسی ژن *AT5G05080* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-2*)، به عنوان یکی دیگر از ژن‌های *Omega* در این مطالعه، نیز دارای مقادیر قابل توجهی تحت تنش‌های مختلف به جز تنش سرما، در مقایسه با شرایط کنترل بود. در واقع، اسیدهای چرب دی‌نوئیک معمولاً توسط اسیدهای چرب *Omega* به اسیدهای چرب تری‌نوئیک تبدیل می‌شوند و در نهایت اسید جاسمونیک (JA) تولید شده و تجمع آن در سلول‌ها می‌تواند سبب تحریک پاسخ موجود به شرایط تنش گردد (Im *et al.*, 2002). همچنین، یکی دیگر از ژن‌های مربوط به گروه آسیل-لیپید دساچورازها، *AT1G05610* (نزدیکترین ارتولوگ برای *ApFAD-7*)، در پاسخ به تنش‌های شوری و اکسیداتیو، دارای مقادیر بیان بالاتر از نمونه کنترل بود، که با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت داشت (Tang *et al.*, 2018).

بر اساس نتایج بدست آمده، در سطوح بیان ژن‌های *AT3G11060* (نزدیکترین ارتولوگ برای ژن بتا-کاروتن هیدروکسیلاز *ApFAD-1*)، *AT2G46210* و *AT2G43810*



شکل ۹. نتایج حاصل از بررسی الگوی بیان نزدیک‌ترین ارتولوگ‌ها برای هر ژن *ApFAD* در *Arabidopsis* به عنوان جاندار مدل، در شرایط تنش‌های مختلف شوری، خشکی، اکسیداتیو، سرما و اسموتیک، در مقایسه با شرایط کنترل. در محور افقی تنش‌های محیطی و در محور عمودی کد دسترسی ژن‌های ارتولوگ آورده شده است.

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج این مطالعه در زمینه بررسی ژن‌های خانواده *FAD* در ژنوم اسپیرولینا، می‌تواند به حصول درک صحیحی از مکانیسم‌های تنظیمی مولکولی مسیر غیراشباع‌سازی اسیدهای چرب در این ریزجلبک و همچنین سایر محصولات روغنی دارای اهمیت تجاری، نظیر گیاهان روغنی، کمک کند. این مطالعه می‌تواند نقش کلیدی ژن‌های *FAD* را در رشد و نمو، تولید لیپیدها و متابولیت‌های مغذی و همچنین تحمل در برابر تنش‌های مختلف زیستی/ غیرزیستی، در ریزجانداران و نیز گونه‌های ارزشمند گیاهی آشکار سازد. در ارزیابی‌های بیشتر، انجام مطالعات بیانی و بیش‌بین هر یک از ژن‌های *FAD*، به‌ویژه از گروه Omega، می‌تواند مسیر را برای شناسایی عملکردهای خاص و همچنین تنوع فعالیت کاتالیزوری با هدف افزایش میزان تولید اسیدهای چرب ارزشمند و نیز ارتقای مقاومت به تنش‌ها در *A. platensis* و حتی گیاهان روغنی تجاری، هموار سازد.

این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های دساچوراز ممکن است در مسیرهای سیگنالی‌نگ تنش‌های شوری، خشکی و اکسیداتیو نقش داشته باشند و به واسطه تغییر نسبت محتوای اسیدهای چرب مختلف، نقش مهمی در پاسخ به تنش‌های مذکور ایفا کنند (Zhiguo *et al.*, 2019). تجمع مقادیر بالای لیپید در گونه‌های مختلف ریزجلبک *Chlorella*، *C. zofingiensis*، *C. vulgaris* و *C. protothecoides*، در شرایط تنش مختلف گزارش شده است. در واقع افزایش بیان ژن‌های *FAD* در کنار بیوسنتز متابولیت‌هایی مانند کاروتنوئیدها سبب افزایش توانایی موجود برای مقابله با شرایط تنش می‌گردد (Li *et al.*, 2011). ارزیابی بیشتر ویژگی‌های عملکردی این ژن‌ها، به واسطه آزمایش‌هایی چون سنجش میزان بیان در شرایط محیطی مختلف و نیز آزمون‌های انتقال و بیش‌بین ژنی، قابل دستیابی می‌باشد.

References

- Abedi, E., & Sahari, M. A. (2014). Long-chain polyunsaturated fatty acid sources and evaluation of their nutritional and functional properties. *Food science & nutrition*, 2(5), 443-463.
- Alonso, D. L., Garcia-Maroto, F., Rodriguez-Ruiz, J., Garrido, J., & Vilches, M. (2003). Evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases. *Biochemical systematics and ecology*, 31(10), 1111-1124.
- An, M., Mou, S., Zhang, X., Zheng, Z., Ye, N., Wang, D., Zhang, W., & Miao, J. (2013). Expression of fatty acid desaturase genes and fatty acid accumulation in *Chlamydomonas* sp. ICE-L under salt stress. *Bioresource Technology*, 149, 77-83.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), W202-W208.
- Bateman, A., Coin, L., Durbin, R., Finn, R. D., Hollich, V., Griffiths-Jones, S., Khanna, A., Marshall, M., Moxon, S., & Sonnhammer, E. L. (2004). The Pfam protein families database. *Nucleic acids research*, 32(suppl_1), D138-D141.
- Bationo, F., Savadogo, A., Kabore, D., Ouattara, L., Ouedraogo, H. G., Savadogo, B., & Traore, A. (2015). Storage influence on beta-carotene and alpha-tocopherol contents of solar-dried *Spirulina platensis* (Spirulina). *African journal of food Science*, 9(12), 546-554.
- Cao, J., Li, M., Chen, J., Liu, P., & Li, Z. (2016). Effects of MeJA on *Arabidopsis* metabolome under endogenous JA deficiency. *Scientific reports*, 6(1), 1-13.
- Chen, C., Chen, H., Zhang, Y., Thomas, H. R., Frank, M. H., He, Y., & Xia, R. (2020). TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular plant*, 13(8), 1194-1202.
- Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 1-11.
- Chi, X., Yang, Q., Lu, Y., Wang, J., Zhang, Q., Pan, L., Chen, M., He, Y., & Yu, S. (2011). Genome-wide analysis of fatty acid desaturases in soybean (*Glycine max*). *Plant molecular biology reporter*, 29(4), 769-783.
- Choudhary, P., Nagar, R., Singh, V., Bhat, A. H., Sharma, Y., & Rao, A. (2019). ProGlycProt V2. 0, a repository of experimentally validated glycoproteins and protein glycosyltransferases of prokaryotes. *Glycobiology*, 29(6), 461-468.
- Ciferri, O., & Tiboni, O. (1985). The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. *Annual review of microbiology*, 39(1), 503-526.
- Connor, K. M., SanGiovanni, J. P., Lofqvist, C., Aderman, C. M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E. A., Majchrzak, S., & Carper, D. (2007). Increased dietary intake of ω -3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nature medicine*, 13(7), 868-873.
- de Jong, A., Pietersma, H., Cordes, M., Kuipers, O. P., & Kok, J. (2012). PePPER: a webserver for prediction of prokaryote promoter elements and regulons. *BMC genomics*, 13, 1-10.
- Díaz, M. L., Cuppari, S., Soresi, D., & Carrera, A. (2018). In silico analysis of fatty acid desaturase genes and proteins in grasses. *Applied biochemistry and biotechnology*, 184(2), 484-499.
- Diraman, H., Koru, E., & Dibeklioglu, H. (2009). Fatty acid profile of *Spirulina platensis* used as a food supplement.

- Domínguez, T., Hernández, M. L., Pennycooke, J. C., Jiménez, P., Martínez-Rivas, J. M., Sanz, C., Stockinger, E. J., Sánchez-Serrano, J. J., & Sanmartín, M. (2010). Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant physiology*, 153(2), 655-665.
- The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. (2022). *Nucleic acids research*, 50(W1), W345-W351.
- Garcia-Hernandez, M., Berardini, T., Chen, G., Crist, D., Doyle, A., Huala, E., Knee, E., Lambrecht, M., Miller, N., & Mueller, L. A. (2002). TAIR: a resource for integrated Arabidopsis data. *Functional & integrative genomics*, 2, 239-253.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). *Protein identification and analysis tools on the ExPASy server*. Springer.
- Hajiahmadi, Z., Abedi, A., Wei, H., Sun, W., Ruan, H., Zhuge, Q., & Movahedi, A. (2020). Identification, evolution, expression, and docking studies of fatty acid desaturase genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC genomics*, 21(1), 1-20.
- Hashiguchi, A., & Komatsu, S. (2016). Impact of post-translational modifications of crop proteins under abiotic stress. *Proteomes*, 4(4), 42.
- Hoiczky, E. (2000). Gliding motility in cyanobacteria: observations and possible explanations. *Archives of microbiology*, 174, 11-17.
- Im, Y. J., Han, O., Chung, G. C., & Cho, B. H. (2002). Antisense expression of an Arabidopsis omega-3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecules and cells*, 13(2), 264-271.
- Jia, Y.-L., Wang, Y.-Z., Nong, F.-T., Ma, W., Huang, P.-W., & Sun, X.-M. (2022). Identification and characterization of fatty acid desaturases in *Schizochytrium* sp. HX-308. *Algal Research*, 67, 102861.
- Kanehisa, M. (2002). The KEGG database. 'In silico' simulation of biological processes: Novartis Foundation Symposium 247,
- Kargiotidou, A., Deli, D., Galanopoulou, D., Tsaftaris, A., & Farmaki, T. (2008). Low temperature and light regulate delta 12 fatty acid desaturases (FAD2) at a transcriptional level in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Journal of experimental botany*, 59(8), 2043-2056.
- Kaur, N., Chugh, V., & Gupta, A. K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods-a review. *Journal of food science and technology*, 51(10), 2289-2303.
- Kazanecki, C. C., Uzwiak, D. J., & Denhardt, D. T. (2007). Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. *Journal of cellular biochemistry*, 102(4), 912-924.
- Khan, Z., Bhadouria, P., & Bisen, P. (2005). Nutritional and therapeutic potential of *Spirulina*. *Current pharmaceutical biotechnology*, 6(5), 373-379.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Kumar, V., Jaiswal, K. K., Tomar, M. S., Rajput, V., Upadhyay, S., Nanda, M., Vlaskin, M. S., Kumar, S., & Kurbatova, A. (2021). Production of high value-added biomolecules by microalgae cultivation in wastewater from anaerobic digestates of food waste: a review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-18.
- Lee, J. M., Lee, H., Kang, S., & Park, W. J. (2016). Fatty acid desaturases, polyunsaturated fatty acid regulation, and biotechnological advances. *Nutrients*, 8(1), 23.
- Li-Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M. X., Arondel, V., Bates, P. D., Baud, S., Bird, D., DeBono, A., & Durrett, T. P. (2013). Acyl-lipid metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 11.
- Li, Y., Han, D., Sommerfeld, M., & Hu, Q. (2011). Photosynthetic carbon partitioning and lipid production in the oleaginous microalga *Pseudochlorococcum* sp. (Chlorophyceae) under nitrogen-limited conditions. *Bioresource Technology*, 102(1), 123-129.
- Liu, J., Huang, J., Sun, Z., Zhong, Y., Jiang, Y., & Chen, F. (2011). Differential lipid and fatty acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production. *Bioresource Technology*, 102(1), 106-110.
- Liu, W., Li, W., He, Q., Daud, M. K., Chen, J., & Zhu, S. (2015). Characterization of 19 genes encoding membrane-bound fatty acid desaturases and their expression profiles in *Gossypium raimondii* under low temperature. *PloS one*, 10(4), e0123281.
- Lomsadze, A., Gemayel, K., Tang, S., & Borodovsky, M. (2018). Modeling leaderless transcription and atypical genes results in more accurate gene prediction in prokaryotes. *Genome research*, 28(7), 1079-1089.
- Lu, J., Xu, Y., Wang, J., Singer, S. D., & Chen, G. (2020). The Role of Triacylglycerol in Plant Stress Response. *Plants (Basel)*, 9(4).
- Lupatini, A. L., Colla, L. M., Canan, C., & Colla, E. (2017). Potential application of microalga *Spirulina platensis* as a protein source. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 724-732.
- Maddaly, R. (2010). The beneficial effects of spirulina focusing on its immunomodulatory and antioxidant properties. *Nutr. Diet. Suppl.* 73. In.
- Mazo, V., Gmoshinskiĭ, I., & Zilova, I. (2004). Microalgae *Spirulina* in human nutrition. *Voprosy pitaniia*, 73(1), 45-53.
- Michaelson, L. V., Zauner, S., Markham, J. E., Haslam, R. P., Desikan, R., Mugford, S., Albrecht, S., Warnecke, D., Sperling, P., & Heinz, E. (2009). Functional characterization of a higher plant sphingolipid Δ 4-desaturase: defining the role of sphingosine and sphingosine-1-phosphate in Arabidopsis. *Plant physiology*, 149(1), 487-498.
- Miller, M. L., Soufi, B., Jers, C., Blom, N., Macek, B., & Mijakovic, I. (2009). NetPhosBac—a predictor for Ser/Thr phosphorylation sites in bacterial proteins. *Proteomics*, 9(1), 116-125.

- Moreno, P., Fexova, S., George, N., Manning, J. R., Miao, Z., Mohammed, S., Muñoz-Pomer, A., Fullgrabe, A., Bi, Y., & Bush, N. (2022). Expression Atlas update: gene and protein expression in multiple species. *Nucleic acids research*, 50(D1), D129-D140.
- Nilamyani, A. N., Auliah, F. N., Moni, M. A., Shoombuatong, W., Hasan, M. M., & Kurata, H. (2021). PredNTS: improved and robust prediction of nitrotyrosine sites by integrating multiple sequence features. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2704.
- Offermanns, S. (2017). Hydroxy-carboxylic acid receptor actions in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28(3), 227-236.
- Racine, R. A., & Deckelbaum, R. J. (2007). Sources of the very-long-chain unsaturated omega-3 fatty acids: eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 10(2), 123-128.
- Ramazi, S., & Zahiri, J. (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database*, 2021, baab012.
- Rao, P. K., Roxas, B. A., & Li, Q. (2008). Determination of global protein turnover in stressed mycobacterium cells using hybrid-linear ion trap-fourier transform mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(2), 396-406.
- Ratledge, C., & Wynn, J. P. (2002). The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Advances in applied microbiology*, 51, 1-52.
- Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M., & Hahn, A. (2010). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European journal of pediatrics*, 169, 149-164.
- Schultz, J., Copley, R. R., Doerks, T., Ponting, C. P., & Bork, P. (2000). SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains. *Nucleic acids research*, 28(1), 231-234.
- Singh, A. K., Fu, D.-Q., El-Habbak, M., Navarre, D., Ghabrial, S., & Kachroo, A. (2011). Silencing genes encoding omega-3 fatty acid desaturase alters seed size and accumulation of Bean pod mottle virus in soybean. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(4), 506-515.
- Soria-García, Á., Rubio, M. C., Lagunas, B., López-Gomollón, S., Luján, M. d. I. Á., Díaz-Guerra, R., Picorel, R., & Alfonso, M. (2019). Tissue distribution and specific contribution of Arabidopsis FAD7 and FAD8 plastid desaturases to the JA-and ABA-mediated cold stress or defense responses. *Plant and Cell Physiology*, 60(5), 1025-1040.
- Szklarczyk, D., Morris, J. H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N. T., Roth, A., & Bork, P. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein-protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic acids research*, gkw937.
- Tang, W., Ouyang, C., Liu, L., Li, H., Zeng, C., Wang, J., Fu, L., Wu, Q., Zeng, B., & He, B. (2018). Genome-wide identification of the fatty acid desaturases gene family in four *Aspergillus* species and their expression profile in *Aspergillus oryzae*. *AMB Express*, 8(1), 169.
- Tanon, T., Sayanova, O., Michaelson, L. V., Qing, R., Harvey, D., Larson, T. R., Li, Y., Napier, J. A., & Graham, I. A. (2005). Fatty acid desaturases from the microalga *Thalassiosira pseudonana*. *The FEBS journal*, 272(13), 3401-3412.
- Tora, L., & Timmers, H. T. M. (2010). The TATA box regulates TATA-binding protein (TBP) dynamics in vivo. *Trends in biochemical sciences*, 35(6), 309-314.
- Umarov, R. K., & Solovyev, V. V. (2017). Recognition of prokaryotic and eukaryotic promoters using convolutional deep learning neural networks. *PLoS one*, 12(2), e0171410.
- Van Tuerenhout, D. R. (2005). *The Aztecs: new perspectives*. Bloomsbury Publishing USA.
- Verma, V., Ravindran, P., & Kumar, P. P. (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC plant biology*, 16, 1-10.
- Wan, D., Wu, Q., & Kuča, K. (2021). Spirulina. In *Nutraceuticals* (pp. 959-974). Elsevier.
- Wang, P., Li, C., Wang, Y., Huang, R., Sun, C., Xu, Z., Zhu, J., Gao, X., Deng, X., & Wang, P. (2014). Identification of a geranylgeranyl reductase gene for chlorophyll synthesis in rice. *Springerplus*, 3, 1-9.
- Wu, T., Yu, L., Zhang, Y., & Liu, J. (2021). Characterization of fatty acid desaturases reveals stress-induced synthesis of C18 unsaturated fatty acids enriched in triacylglycerol in the oleaginous alga *Chromochloris zofingiensis*. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 184.
- Yan, Y., Jiang, J.-Y., Fu, M., Wang, D., Pelletier, A. R., Sigdel, D., Ng, D. C. M., Wang, W., & Ping, P. (2023). MIND-S is a deep-learning prediction model for elucidating protein post-translational modifications in human diseases. *Cell Reports Methods*, 3(3), 100430.
- Yu, C.-S., Cheng, C.-W., Su, W.-C., Chang, K.-C., Huang, S.-W., Hwang, J.-K., & Lu, C.-H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular LOCALization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS one*, 9(6), e99368.
- Zárate, R., el Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A., & Rodríguez, C. (2017). Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clinical and translational medicine*, 6, 1-19.
- Zhao, Q., Xie, Y., Zheng, Y., Jiang, S., Liu, W., Mu, W., Liu, Z., Zhao, Y., Xue, Y., & Ren, J. (2014). GPS-SUMO: a tool for the prediction of sumoylation sites and SUMO-interaction motifs. *Nucleic acids research*, 42(W1), W325-W330.
- Zhiguo, E., Chen, C., Yang, J., Tong, H., Li, T., Wang, L., & Chen, H. (2019). Genome-wide analysis of fatty acid desaturase genes in rice (*Oryza sativa* L.). *Scientific reports*, 9(1), 19445.