

تعیین دامین‌های کارکردی و مدل توپولوژی ژن دلتا ۶ دسچوراز غشائی قارچ *Mortierella alpina*

عصمت اشعارقدیم^۱، شاهرخ قرنجیک^{۲*}، بهرام باغبان کهنه‌روز^۳

۱. کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
 ۲. استادیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
 ۳. دانشیار گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
- (تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۲ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۹/۲۴)

Determination of functional Domains and topology model of membrane-bound Delta-6 Desaturase enzyme from *Mortierella alpina*

Esmat Ashaar Ghadim¹, Shahrokh Gharanjik^{2*}, Bahram Baghban Kohnerouz³

1. M.Sc. Student of Agricultural Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran.
3. Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

(Received: Sep. 2, 2016 - Accepted: Dec. 14, 2016)

Abstract

Desaturase enzymes (EC: 1.14.19.3) catalyze dehydrogenation reactions and creates a double bond in the fatty acid chains. These enzymes classified into two groups, soluble and membrane each with different consensus motifs. Despite the Delta-6 desaturase is a key enzyme in the biosynthesis of unsaturated fatty acids but due to lack of structural information of membrane-bound desaturase, it's three-dimensional and crystal structure has not been determined. *Mortierella alpina* is a rich source for production of unsaturated fatty acid arachidonic and has an active Delta-6 desaturases enzyme. The aim of this study was obtain encoding sequences of Delta-6 desaturase gene, and determination of functional domains using comparative analysis and molecular model and propose a membrane topology model for this enzyme. Thus, after extraction of total RNA and cDNA synthesis using gene specific primers, PCR product was cloned into pBlueScriptSK+ vector and then sequenced. Based on bioinformatics analysis by Swissmodel, Predict and Phobius servers presence of functional domains cytochrome b5 carrying motif (HPGG), three His-box motifs and transmembrane regions were identified. Then we proposed a membrane topology model for the Delta-6 desaturase enzyme.

Keywords: Δ6 Desaturases enzyme, Membrane-bound desaturase, Domain, *Mortierella alpina*.

چکیده

دسچورازها (EC: 1.14.19.3) کاتالیزگرهای واکنش دهیدروژناسیون بوده و باعث ایجاد پیوند دوگانه در زنجیره اسیدچرب می‌شوند. این آنزیم‌ها به دو گروه محلول و غشائی تقسیم گردیده، هر یک دارای موتیف‌های متفاوتی می‌باشند. با اینکه دلتا ۶ دسچوراز آنزیم کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع می‌باشد، ولی بخاطر غشائی بودن، ساختار کریستالی و سه‌بعدی آن تعیین نگردیده است. قارچ *Mortierella alpina* منبع غنی تولید اسیدچرب غیراشباع اسید آراشیدونیک بوده و دارای آنزیم دلتا ۶ دسچوراز فعالی می‌باشد. هدف از این تحقیق، دستیابی به توالی کدکننده ژن دلتا ۶ دسچوراز و تعیین جایگاه دامین‌های کارکردی با استفاده از آنالیزهای مقایسه‌ای و مدل‌های مولکولی و پیشنهاد یک مدل توپولوژی غشائی برای این آنزیم می‌باشد. بدین منظور پس از استخراج RNA و سنتز cDNA توسط آغازگرهای اختصاصی، همسانه‌سازی در ناقل pBlueScriptSK+ انجام و سپس توالی‌یابی شد. بر اساس بررسی‌های بیوانفورماتیکی توسط سرورهای Swissmodel، Predict، Phobius و وجود دامین سیتوکروم b5 حاوی موتیف (HPGG)، ۳ موتیف جعبه هیستیدینی و نواحی ترانس‌ممبران تعیین و سپس یک مدل توپولوژی غشائی برای توالی موردنظر پیشنهاد گردید.

واژه‌های کلیدی: آنزیم دلتا ۶ دسچوراز، دسچوراز غشائی، دامین، قارچ *Mortierella alpina*.

مقدمه

اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه بیش از دو پیوند دوگانه در زنجیره هیدروکربنی خود دارند. این اسیدهای چرب برای رشد مغز مفید شناخته شده و از بیماری‌های بسیاری مانند سرطان، دیابت و نارسایی‌های قلبی جلوگیری می‌کنند. اسیدهای چرب غیراشباع از اجزاء اصلی تشکیل‌دهنده غشاهای زیستی در موجودات زنده بوده و به همین دلیل خصوصیات ویژه‌ای به آن می‌بخشند. این اسیدهای چرب باعث قابلیت انعطاف، سیالیت و نفوذپذیری انتخابی غشاءها گردیده (Ward and Singh, 2005) در انتقال پیام سلولی نیز نقش دارند (Needleman et al., 1986; Sakuradani et al., 1999). در حال حاضر منبع اصلی اسیدهای چرب غیراشباع چندگانه در رژیم غذایی انسان، ماهی یا کپسول روغن ماهی و دیگر غذاهای دریایی است. اما در مدت زمان طولانی، این منابع به دلیل بهره‌برداری بیش از اندازه از ذخایر، پاسخگوی نیاز رشد جمعیتی نخواهند بود (Mayer and Worm, 2003). همچنین این نگرانی و تردید وجود دارد که استفاده از روغن ماهی به دلیل آلودگی‌های محیطی مانند دیوکسین‌ها و فلزات سنگین مانند جیوه که توسط ماهی‌ها جذب شده و در کبد و سایر اندام‌های آن‌ها تجمع یافته‌اند، خطرناک باشد. این معضل باعث جستجوی منابع دیگر تولید این اسیدهای چرب گردیده است (Shahidi, 2005).

چربی‌ها ابتدا به صورت اسیدهای چرب اشباع سنتز می‌گردند. غیراشباع‌سازی آن‌ها شامل یک واکنش آنزیماتیک است، که طی آن پیوند دوگانه، درون زنجیره هیدروکربنی یا زنجیره آسیل چرب ایجاد می‌گردد. آنزیم‌هایی که عمل غیراشباع‌سازی^۲ را برعهده دارند، تحت عنوان کلی دسچوراز نامیده

می‌شوند. انواع مختلفی از دسچورازها یافت شده‌اند که با ایجاد پیوند دوگانه در موقعیت‌های مختلف زنجیره اسیدهای چرب، باعث سنتز انواع اسیدهای چرب غیراشباع می‌گردند (Parker et al., 2000). براساس موقعیت و کوفاکتورهای مورد نیاز، آنزیم‌های دسچوراز به دو گروه اصلی تقسیم می‌گردند. دسچورازهای محلول که دسچورازهای آسیل - ACP بوده و تنها در پلاستید گیاهان عالی یافت می‌گردند، گروه دوم دسچورازهای غشائی می‌باشند که در یوکاریوت‌ها و باکتری‌ها یافت می‌شوند. بر اساس بررسی‌های بیوانفورماتیکی، مشخص شده است که هر یک از دسچورازهای محلول و غشائی دارای موتیف‌های حفاظت شده هستند. دسچورازهای محلول شامل سه موتیف جعبه هیسیتیدینی حفاظت شده بوده، در حالی که آنزیم‌های دسچوراز غشائی به همراه موتیف‌های جعبه هیسیتیدینی، معمولاً دارای یک موتیف دیگر اتصال هم مانند سیتوکروم b5 در انتهای آمینی خود نیز می‌باشند. حذف این دامین‌ها یا جهش در یکی از آمینواسیدهای کلیدی در این موتیف‌ها منجر به از دست دادن فعالیت آنزیمی می‌گردد (Sayanova et al., 1999; Qiu et al., 2003). با وجود این که ساختار کریستالی دسچورازهای محلول گیاهانی مانند کرچک^۳ و پایتال^۴ راه را برای مهندسی انواع فعالیت‌های کاتالیزوری و اختصاصی جدید هموار ساخته است (Whittle et al., 2008)، اما در حال حاضر، به دلیل مشکلات تکنیکی موجود در خالص‌سازی پروتئین‌های غشائی، پیشرفت بسیار کمی در شناخت این دسچورازها نسبت به دسچورازهای محلول صورت گرفته است. اولین بار مدل توپولوژی آنزیم-های دسچوراز غشائی توسط (Stukey 1990)، با انجام تحقیقات بر روی ایجاد شپمر از آنزیم‌هایی که

3. *Ricinus communis*
4. *Hedera Helix*

1. Poly-unsaturated Fatty Acids
2. Desaturation

جامع به صورت یک مدل توپولوژی غشائی پیشنهاد گردیده است. نتایج حاصل از این بررسی می‌تواند در مطالعات آتی، جهت انتقال ژن این آنزیم به گیاهان دانه روغنی به منظور تولید اسیدهای چرب غیراشباع بلندزنجیر و دست‌ورزی‌های بعدی حائز اهمیت باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA و سنتز cDNA

نمونه قارچی *Mortierella alpina* در محیط YPD^۸ کشت و در انکوباتور به مدت دو شبانه‌روز با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد شیک گردید. استخراج RNA کل با استفاده از کیت RNX-Plus (شرکت سیناژن) صورت پذیرفته و برای سنتز cDNA، از آغازگر عمومی الیگو dT و آنزیم نسخه‌بردار معکوس M-MuLV Reverse transcriptas (شرکت فرمنتاز Cat No.: R911658) استفاده گردید (شرکت فرمنتاز). کمیت و کیفیت RNA استخراجی توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد و اسپکتروفوتومتر بررسی گردید.

طراحی آغازگرها و واکنش PCR

آغازگرهای ژن دلتا ۶ دسچوراز (جدول ۱) با توجه به توالی قطعه ژن موردنظر با شماره دسترسی AF110510 از قارچ *Mortierella alpina* در بانک اطلاعاتی NCBI طراحی گردید. در طراحی آغازگرها پس از بررسی نقشه آنزیمی ژن دلتا ۶ دسچوراز، توسط نرم‌افزار NEB Cutter، در انتهای ۵' آغازگر مستقیم سایت برشی *XbaI* و در انتهای ۳' آغازگر معکوس سایت برشی *SacI* اضافه گردید. جهت افزایش کارایی برش، دو نوکلئوتید به عنوان لنگرگاه آنزیم به دو سمت آغازگرها افزوده شد. سنتز آغازگرها به سفارش شرکت تکاپوزیست (توسط شرکت بیونیر کره جنوبی) صورت گرفت.

بر روی سوپستراهای متفاوتی عمل می‌کنند، پیشنهاد گردید. سپس محققین دیگر مدل توپولوژی آنزیم-های مختلف دسچوراز گونه‌های مختلف را بررسی و رسم کردند (Meesapyodsuk et al., 2007; Hoffmann et al., 2007; Vanhercke et al., 2010; Wang et al., 2013).

آنزیم دلتا ۶ دسچوراز باعث تبدیل اسید لینولئیک^۱ به اسید گامالینولئیک^۲ و اسید آلفالینولئیک^۳ به اسید استئاریدونیک^۴ می‌گردد. در واقع این آنزیم، یک آنزیم کلیدی در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع مانند اسید آراشیدونیک^۵، اسید اکوزاپنتانویک^۶ و اسید دکزاهگزانویک^۷ می‌باشد. به عبارت دیگر این آنزیم به عنوان دروازه‌ای برای ورود اسیدهای چرب به مراحل بعدی طویل و غیر اشباع‌سازی است. اما به دلیل غشائی بودن، ساختار مولکولی سه‌بعدی و کریستالی آن هنوز تعیین نگردیده است.

قارچ *Mortierella alpina* متعلق به زیرشاخه *Mucoromycotina* بوده، قارچی روغنی است و بیش از ۵۰٪ وزن خشک آن را اسیدهای چرب تشکیل می‌دهند. این قارچ بدلیل اینکه منبع غنی برای تولید اسیدچرب غیراشباع اسید آراشیدونیک بوده و دارای دلتا ۶ دسچوراز فعالی می‌باشد، مورد توجه فراوان بشر قرار گرفته است (Liu et al., 2011). در تحقیق حاضر، دستیابی به اطلاعات مولکولی پایه با جداسازی ژن دلتا ۶ دسچوراز از قارچ *Mortierella alpina* آغاز شده و پس از دسترسی به توالی رمزگردان آنزیم دلتا ۶ دسچوراز، جایگاه دامین‌های کارکردی آن با استفاده از آنالیزهای مقایسه‌ای و مدل مولکولی، صورت گرفته و نتایج

1. Linoleic acid
2. Gamma-Linolenic acid
3. Alpha Linoleic acid
4. Stearidonic acid
5. Arachidonic acid
6. Eicosapentaenoic acid
7. Docosahexaenoic acid

8. Yeast extract Peptone Dextrose

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن دلتا ۶ دسچوراز

نام آغازگر	توالی (۵' → ۳')	طول محصول (bp)
D6D-F	5'-aaTCTAGAccaccatggctgctgccag-3'	1394
D6D-R	5'-gcGAGCTCttactgtgccttccccatcttg-3'	

۱۶ ساعت، چند کلونی سفید انتخاب و با استفاده از کلونی-PCR و هضم آنزیمی غربالگری شدند. یک کلونی نو ترکیب انتخاب و پس از استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی (Sambrook *et al.*, 1996)، جهت توالی‌یابی توسط آغازگرهای T7 و T3 به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید.

آنالیز بیوانفورماتیکی

نتایج حاصل از توالی‌یابی پلاسمید نو ترکیب، با توالی این ژن در پایگاه اینترنتی NCBI بلاست و سپس به توالی آمینواسیدی ترجمه گردید. توالی پروتئینی جهت تشخیص دامین‌ها توسط سرور (www.swissmodel.expasy.org/) بررسی شد. سرور (<http://phobius.sbc.su.se/cgi-bin/>) (predict.pl) جهت شناسایی محل هلیکس‌های ترانس ممبران، مناطق درون غشائی و خارج غشائی استفاده شد. مقایسه ساختار دوم پروتئین با توالی ژن‌های مشابه، توسط سرور (https://npsa-prabi.ibcp.fr/NPSA/npsa_sopma.html) انجام گردید. هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی ۸ گونه و تعیین نواحی حفاظت شده با استفاده از سرور (<http://embnet.vital-it.ch/software/Clustalw>) انجام شد. سپس بر اساس این نتایج یک مدل توپولوژی رسم گردید.

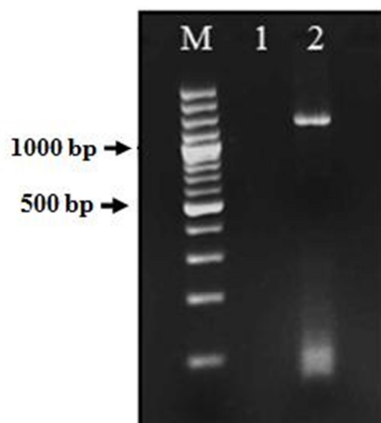
نتایج و بحث

انجام واکنش PCR بر روی cDNA سنتز شده موجب تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۳۹۴ جفت نوکلئوتید گردید که معادل طول کامل منطقه رمزگردان ژن دلتا ۶ دسچوراز می‌باشد (شکل ۱).

cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، برای سنتز DNA دو رشته‌ای و تکثیر ژن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، توسط آنزیم Taq DNA Polymerase (شرکت سیناژن) مورد استفاده قرار گرفت. شرایط بهینه برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، و سپس ۳۵ چرخه (واسرشت‌سازی یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال یک دقیقه در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، بسط یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به دست آمد. محصول واکنش پلیمرز بر روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و خالص‌سازی قطعه DNA توسط کیت استخراج از ژل آگارز (شرکت بیونیر کره جنوبی) انجام گرفت.

همسازسازی در ناقل پلاسمیدی

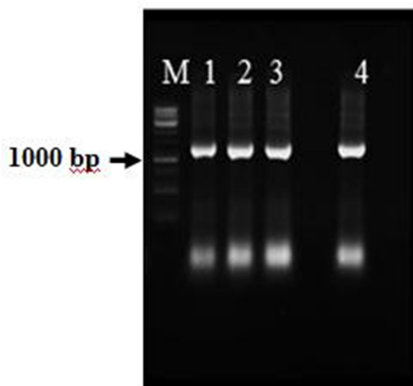
محصول PCR خالص‌سازی شده از ژل، توسط آنزیم‌های *SacI* و *XbaI* برش داده شد. همزمان وکتور pBlueScript SK(+) نیز با این آنزیم‌ها هضم گردید. جهت اتصال قطعه رمزگردان ژن دلتا ۶ دسچوراز به وکتور تخلیص شده خطی، از آنزیم لیگاز باکتریوفاز T4 استفاده شد. برای تهیه باکتری‌های مستعد *E. coli* سویه DH5α و تراریختی آن به ترتیب از روش کلریدکلسیم سرد و شوک حرارتی (Maniatis *et al.*, 1995) استفاده گردید. باکتری‌های ترانسفورم شده پس از طی دوره بازیافت اولیه در محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و X-gal، IPTG کشت گردیدند. پس از



شکل ۱. محصول PCR ژن دلنا ۶ دسچوراز قارچ *M. alpina*. M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (شرکت فرمتناز) ۱: کنترل منفی (-RT)، ۲: محصول واکنش PCR.

باکتری‌های حامل آن‌ها بود. واکنش PCR بر روی کلنی‌های سفید به منظور تایید وجود ژن تکثیر یافته انجام پذیرفت و قطعه‌ای به طول قطعه کلون شده در پلاسمید نوترکیب به دست آمد (شکل ۲).

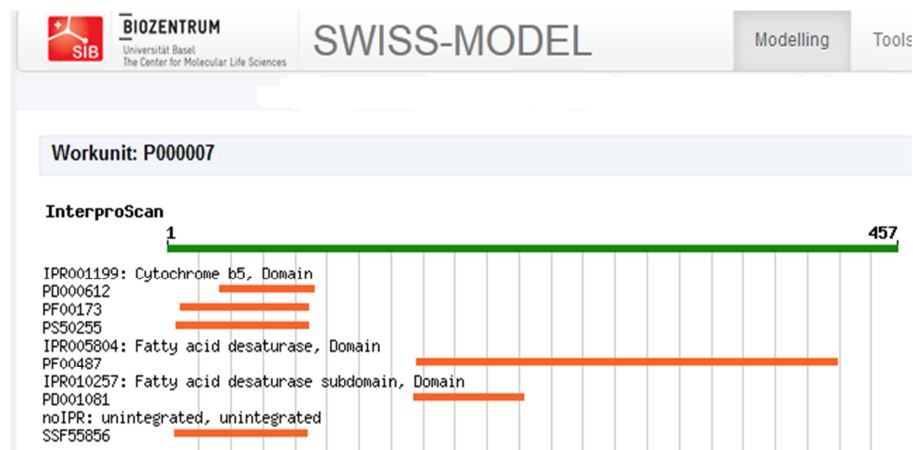
پس از انتقال این ژن به پلاسمید pBlueScript KS (+)، رشد کلونی‌ها در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، نشانگر وجود پلاسمید در باکتری، و وجود کلونی‌های سفید نمایانگر نوترکیب بودن



شکل ۲. کلونی PCR ناقل نوترکیب pBlueScriptSK+ M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز (شرکت فرمتناز)، ۱، ۲، ۳: محصول PCR بر روی کلونی‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکثیر قطعه‌ای با طول تقریبی ۱۳۹۴ جفت باز. ۴: کنترل مثبت (cDNA)

اسیدچرب دسچوراز که در این ژن‌ها حفاظت شده هستند، تأیید گردید نتایج حاصل از آنالیز در پایگاه و CDD (conserved domain database) و Interpro وجود دامین‌های ذکر شده را در توالی ترجمه شده تأیید کرد (شکل ۳).

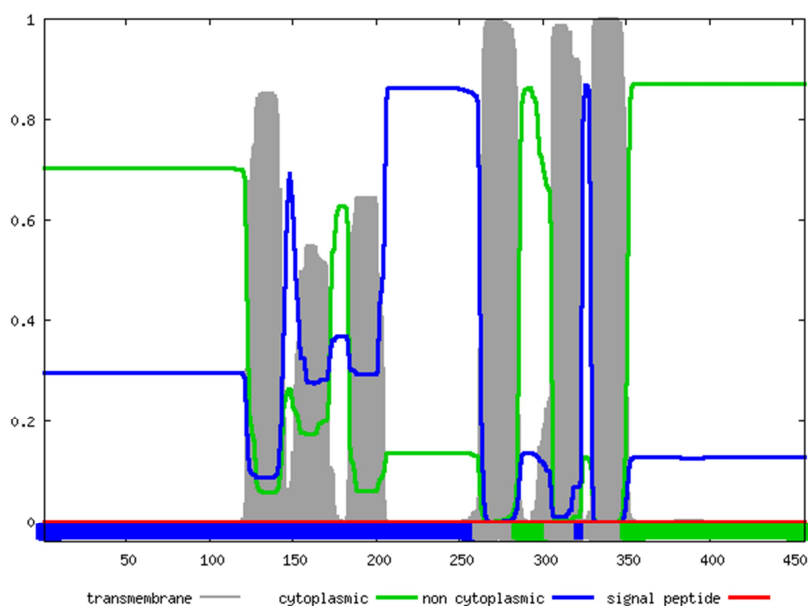
سرور swissmode نوعی بلاست بر روی توالی داده شده با خانواده‌های دامینی شناسایی شده انجام و در صورت وجود چنین شباهت‌هایی، دامین‌های شناسایی شده را معرفی می‌کند. بر اساس نتایج حاصل از این سرور، وجود دامین‌های سیتوکروم b5 و



شکل ۳. شناسایی دامین‌های حفاظت شده توسط پایگاه Swissmodel. دامین‌های سیتوکروم b5 و اسیدچرب دسچوراز توسط این سرور شناسایی شده‌اند.

(آسپارژین و گلوتامین) و ۳۴ اسیدآمینه دارای بار مثبت (آرژنین و لیزین) می‌باشد. در بررسی توالی پروتئینی توسط سرور Phobius، نواحی درون غشائی و خارج غشائی تعیین گردید. نتایج نشان داد که این پروتئین دارای ۴ ناحیه درون غشائی است که در مکان‌های آمینواسیدی (۱۴۵-۱۲۳)، (۱۷۰-۱۵۰)، (۳۲۳-۳۰۶) و (۳۵۰-۳۲۹) قرار دارند (شکل ۴).

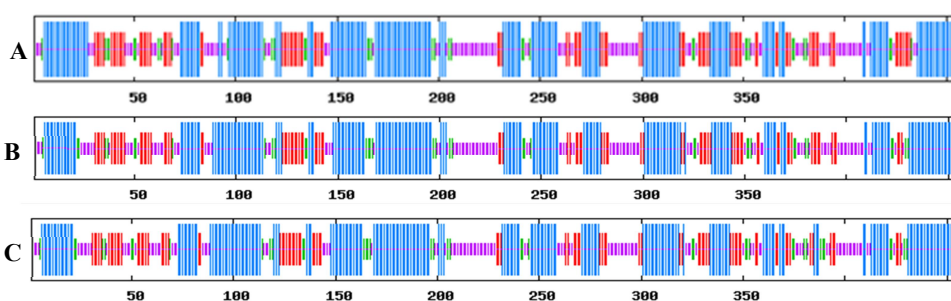
شاخص آبگریزی (Hydropathy) محاسبه شده با استفاده از برنامه ProtScale به روش Doolittle & Kyte نشان داد که توالی پروتئینی این آنزیم به میزان زیادی آب‌گریز است. این نتایج در تعیین خواص بیوشیمیایی توسط سرور ProtParam تأیید گردید. شاخص آبگریزی محاسبه شده توسط این سرور ۸۱/۳۱ تعیین شد. از مجموع ۴۵۷ اسیدهای آمینه، ۴۹ اسیدآمینه آن دارای بار منفی



شکل ۴. تعیین ۴ ناحیه درون غشائی توسط سرور Phobius

اسیدآمینیه)، ۱۹/۰۴ درصد رشته گسترده (۸۷ اسیدآمینیه) و ۲۶/۷۰ درصد ماریچ تصادفی (۱۲۲ اسیدآمینیه) و گونه دیگر با ۴۶/۶۱ درصد ماریچ آلفا (۲۱۳ اسیدآمینیه)، ۱۸/۰۶ درصد رشته گسترده (۸۵ اسیدآمینیه) و ۲۶/۷۰ درصد ماریچ تصادفی (۱۲۲ اسیدآمینیه) تشابه بالایی نشان داد. درصد بالای ماریچ آلفا از مشخصات این پروتئین‌ها و پروتئین‌های غشائی می‌باشد (شکل ۵).

نتایج بررسی توسط نرم‌افزار SOPMA نشان داد که این پروتئین حاوی ۴۵/۳۰ درصد ماریچ آلفا شامل ۲۰۷ اسیدآمینیه (رنگ آبی)، ۲۰/۳۵ درصد رشته گسترده شامل ۹۳ اسیدآمینیه (رنگ بنفش) و ۲۶/۲۶ درصد ماریچ تصادفی شامل ۱۲۰ اسیدآمینیه (رنگ قرمز) می‌باشد. این نتایج با ساختار دوم توالی پروتئینی ژن دلنا ۶ دسچوراز گونه‌های دیگر از قارچ *M. alpina* با ۴۶/۱۷ درصد ماریچ آلفا (۲۱۱)



شکل ۵. تعیین ساختار دوم پروتئین دلنا ۶ دسچوراز توسط برنامه SOMPA و مقایسه آن با توالی پپتیدی دیگر. A: (*Mortierella alpina*), B: (*Mortierella* sp.), C: (*Mortierella alpina*; BAA85588). ماریچ‌های آلفا، ماریچ‌های تصادفی و رشته گسترده به ترتیب با خطوط آبی، قرمز و بنفش نشان داده شده‌اند.

نمودار هیدروپاتی و همچنین تحقیقات پیشین صورت گرفته، مناطق درون غشایی در موقعیت‌های (۱۴۵-۱۲۳)، (۱۷۰-۱۵۰)، (۳۲۳-۳۰۶) و (۳۵۰-۳۲۹) آمینواسیدی تعیین گردید. جعبه‌های هیستیدینی به ترتیب در موقعیت‌های (۱۷۷-۱۷۲)، (۲۱۳-۲۰۹) و (۳۹۹-۳۹۵) و دامین اتصال هم HPGG در موقعیت (۵۳-۵۰) آمینواسیدی موقعیت‌یابی شدند. این نتایج با ایجاد جایگاه فعال پروتئین منطبق است. واضح است که جایگاه‌های فعال باید جهت دسترسی به سوبستراها و کوفاکتورهایی مانند NADH و NADPH، در سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی قرار داشته باشند. بر اساس این نتایج و پیشگویی ساختار توپولوژی آنزیم‌های دیگر مسیر تولید اسیدهای چرب، یک مدل توپولوژی برای آنزیم ۶ دسچوراز غشایی استخراج شده از قارچ *Mortierella alpina* رسم و پیشنهاد گردید (شکل ۷).

هم‌ردیفی توالی آمینواسیدی ژن استخراج شده با توالی‌های پروتئینی گونه‌های دیگر حاوی ژن دلنا ۶ دسچوراز، توسط نرم‌افزار ClustalW نشان داد که با وجود اختلاف در توالی‌های آمینواسیدی موردنظر، نواحی حفاظت شده مانند موتیف اتصال هم HPGG در ناحیه سیتوکروم b5 و همچنین سه موتیف جعبه هیستیدینی یک (HDVLHH)، دو (HNFHH) و سه (QIEHH) در گونه‌های مختلف کاملاً حفاظت شده می‌باشند و هیچ تغییر آمینواسیدی در این نواحی مشاهده نمی‌گردد. این نتایج بیانگر اهمیت این توالی‌ها در فعالیت این ژن بوده و احتمالاً حذف این دامین‌ها یا جهش در یکی از آمینواسیدهای کلیدی این موتیف‌ها منجر به از دست دادن فعالیت آنزیم می‌گردد (شکل ۶).

در این تحقیق بر اساس نتایج حاصل از تعیین دامین‌های حفاظت شده، مناطق ترانس‌ممبران، آنالیز

```

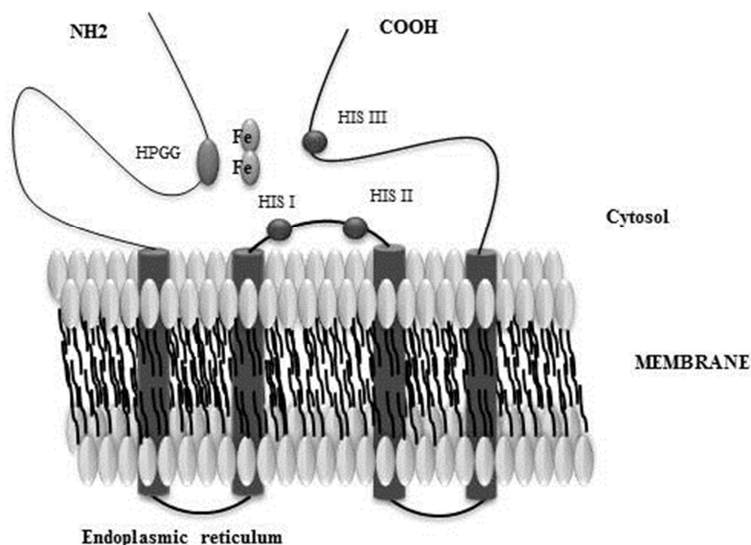
g1|ABH10627 MV-----DGPFKRIIT---WQEV---QQRSTYANGAWIVHHKYVDISKW-DHPGCG-
g1|BAC82359 MT----TSDFSVRAFTRESEVLHADAINEGKKNAAEAFPLMIIDNKVYDVREFTPHPGGS-
g1|BAC82360 MT----TSDFSVRAFTRESEVLHADAINEGKKNAAEAFPLMIIDNKVYDVREFTPHPGGS-
g1|? -M----AAAPSVRTFTRAEIINAEEALNEGKDAEAFPLMIIDNKVYDVREFTPHPGGS-
g1|AAG45092 -M----AAAPSVRTFTRAEIINAEEALNEGKDAEAFPLMIIDNKVYDVREFTPHPGGS-
g1|AAL73948 -M----AAAPSVRTFTRAEIINAEEALNEGKDAEAFPLMIIDNKVYDVREFTPHPGGS-
g1|AAS93682 MST---SDRQSVFTLKELELDINQKH---RDGDKSAMKFIIDIRKVYDVTEFLEHPGCGQ-
g1|AAR27297 MS SDVGATVPFHYTRAELELDIHQDV---LDKKPEARKLIUVENKVYDITDFVHPGGER
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 VMLSQAGEDATDITFTVCHPTSSWKLEQFYIGDVEDSTAPGTKDLSEEQTKKAKTDEFTI
g1|BAC82359 VILTHVGKDGTDVDFTEFHPEAAWETLANFYVGDIVES-----DRAIENDEFA
g1|BAC82360 VILTHVGKDGTDVDFTEFHPEAAWETLANFYVGDIVES-----DRAIENDEFA
g1|? VILTHVGKDGTDVDFTEFHPEAAWETLANFYVGDIDES-----DRAINDDFA
g1|AAG45092 VILTHVGKDGTDVDFTEFHPEAAWETLANFYVGDIDES-----DRAIKNDDFA
g1|AAL73948 VILTHVGKDGTDVDFTEFHPEAAWETLANFYVGDIDES-----DRAIKNDDFA
g1|AAS93682 VLLTHVGKDA SDVFFHAMGPE SAYE I LNNYFVGDVKA-----HVKEFPAQFA
g1|AAR27297 VLLTQEGRDATDVFFHEMHPFSA YELLANCYVGDCEPKLPIDST-----DKKALNSAFA
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 GAYRRIRIKIKMGGLYDASVMVYAWKILSTFPIWMTSVAIC--WFHDSWPMYILAACVMG
g1|BAC82359 AEVVKLRITLFPQLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSAFIVAKWQQTSTLANVLSASLLG
g1|BAC82360 AEVVKLRITLFPQLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSAFIVAKWQQTSTLANVLSASLLG
g1|? AEVVKLRITLFPQLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWQQTSTLANVLSAALLG
g1|AAG45092 AEVVKLRITLFPQLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWQQTSTLANVLSAALLG
g1|AAL73948 AEVVKLRITLFPQLGYDSSKAYYAFKVSFNLCIWGLSTFIVAKWQQTSTLANVLSAALLG
g1|AAS93682 SEMRQLRDLQKKEGCFHSSKAYYVYKVLSTIALCAAGLTLIYAYGHTSTLANVASAIVG
g1|AAR27297 QEIRDLRDLKLEKQGYFDASTGFIYKVSITLLVCIUGLA LKAWGRESTLAVFIAASLVG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|BAC82359 LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|BAC82360 LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|? LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|AAG45092 LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|AAL73948 LFVQQCGWLDHDFLHHVFFQDRFWGDLFGAFLGGVQQGFS SSSWKKIHNTHLAPNVHGE
g1|AAS93682 IFVQQCGWLDHDFGHHVCFEIRSWNDVULVVELGNFQQGFS SLSWKKIHNTHLSTNVHGE
g1|AAR27297 LFVQQCGWLDHYAHHVVIKDPNVNKLFLVIFGNLVQQGFS SLSWKKIHNTHLSTNVHGE
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 AKTKYLDGPDIDTMPILAWSKHMASRAYES-----SWGFF----FVSNQAVMYFFLLL
g1|BAC82359 -----DPDIDTHPILLTWSEHALEMFS DVDEELTQMWSRF----MVLNQAWFYFFILS
g1|BAC82360 -----DPDIDTHPILLTWSEHALEMFS DVDEELTQMWSRF----MVLNQAWFYFFILS
g1|? -----DPDIDTHPILLTWSEHALEMFS DVDEELTRMWSRF----MVLNQWTFYFFILS
g1|AAG45092 -----DPDIDTHPILLTWSEHALEMFS DVDEELTRMWSRF----MVLNQWTFYFFILS
g1|AAL73948 -----DPDIDTHPILLTWSEHALEMFS DVDEELTRMWSRF----MVLNQWTFYFFILS
g1|AAS93682 -----DPDIDTAPILLWDEYASAAAYASLDEEPT-MI SRF LAE SVLPHQTRYFFVILG
g1|AAR27297 -----DPDIDTAPILLWDEFAVANFYGSLKDNAS-CFDRFIAEHLIPYQTRYFFVILG
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 EARLSWCIQSILFVLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|BAC82359 EARLSWCIQSILFVLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|BAC82360 EARLSWCIQSILFVLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|? EARLSWCIQSDMFLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|AAG45092 EARLSWCIQSILFVLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|AAL73948 EARLSWCIQSILFVLVNGQAHKPAGARVPSILVEQLSLAMHWTWYLATMFLFIKDPVNM
g1|AAS93682 EARLSWAIQSILLYSFKQGAINKS----HQLNLFERFLVSHHTLPTCYTCLMWCINYHMI
g1|AAR27297 PARTSWAIQSIIYSFKNETLNKS----KLLSWCERIFLIVHWVFTYCTIAMISSIRNIA
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 TFFMLSQMSCGAFLAWFSVGHNGMSVYEREE--KDFWQLQVTTIRNITPGFMDWFCG
g1|BAC82359 VYFLVSOAVCCNLLAIVFSLNHNMGMPVISQEEAVDMDFFTQIITGRDVHPGLFANWFTG
g1|BAC82360 VYFLVSOAVCCNLLAIVFSLNHNMGMPVISQEEAVDMDFFTQIITGRDVHPGLFANWFTG
g1|? VYFLVSOAVCCNLLAIVFSLNHNMGMPVISQEEAVDMDFFTQIITGRDVHPGLFANWFTG
g1|AAG45092 VYFLVSOAVCCNLLAIVFSLNHNMGMPVISQEEAVDMDFFTQIITGRDVHPGLFANWFTG
g1|AAL73948 VYFLVSOAVCCNLLAIVFSLNHNMGMPVISQEEAVDMDFFTQIITGRDVHPGLFANWFTG
g1|AAS93682 LFFLVSOATTGTYLALVFAFNHNMGMPVITEKAE SMEFFEIQVITGRDVHTLSPLGDWFMG
g1|AAR27297 MFFVVSQITTCYLLAIVFAMNHNMGMPVYSPEANHTEFYE LQCITGRDVNCTVFGDWLWG
*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*
g1|ABH10627 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKVNPLVKS LCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAEF
g1|BAC82359 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVESLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|BAC82360 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVESLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|? GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|AAG45092 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|AAL73948 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|AAS93682 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIQPAVETLCKKYGVRYHTTQMIAGTAEVFSRLNEVSKAA
g1|AAR27297 GLNMQIEHHIFPMPRHNLSKIKVMSVKPIAGKYNI FYHDTTVIGGTIEVLQTLDFVQKIS
*****:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

```

شکل ۶ هم‌رديف‌سازی چندگانه توالی آمینواسیدی دلتا ۶ دسچوراز با استفاده از نرم‌افزار ClustalW.

(▲ delta-6D, *Mortierella alpina*), (delta-6D, *Mortierella alpina* II); BAC82359 (delta-6D, *Mortierella alpina*); BAC82360 (delta-6D, *Phytophthora citrophthora*); ABH10627 (delta-6D, *Mortierella alpina*); AAG45092 (delta-6D *Umbelopsis isabellina*); AAL73948 (delta-6D *Rhizopus oryzae*); AAS93682 (delta-6D *Amylomyces rouxii*); AAR27297

سه جعبه هیستیدینی و موتیف HPGG توسط مستطیل مشخص گردیده است.



شکل ۷. مدل توپولوژی پیشنهادی برای آنزیم دلتا ۶ دسچوراز غشائی. نتایج حاصل از آنالیز هیدروپاتی، مطابق با مدل توپولوژی این دسچوراز غشائی است. NH₂ و COOH اشاره به انتهای N و C دارد. ۳ موتیف جعبه هیستیدینی و HPGG در موقعیت‌های قرار گرفته در توالی نشان داده شده‌اند.

شده این ژن، تطابق بسیار بالایی با توالی گزارش شده از این ژن توسط Liu *et al.* (2011) داشت. شاخص آب‌گریزی بالا، وجود ۴۵ درصد ساختار آلفا هلیکس و ۴ ناحیه درون غشائی که در این توالی مشاهده گردید، از مشخصات دسچورازهای غشائی است. پس از تعیین موقعیت نواحی درون غشائی، مدل توپولوژی این آنزیم در توالی حاصل از قارچ *Mortierella alpina* ترسیم گردید. با توجه به ضرورت حضور ۸ هیستیدین موجود در موتیف‌های جعبه هیستیدین، که به‌عنوان لیگاندهایی برای اتم آهن می‌باشند و همچنین دامین اتصال هم (HPGG) در انتهای آمینی سیتوکروم b₅، که به منظور هماهنگی محور اتصال هم مرکزی ضروری است، در مدل طراحی شده این نواحی جهت دسترسی به سوبستراها و کوفاکتورها، در سطح سیتوپلاسمی شبکه آندوپلاسمی قرار داده شدند. این مدل با مدل پیشنهادی Shi *et al.* (2016) و Wang *et al.* (2013) مطابقت دارد.

با توجه به فقدان اطلاعات مربوط به ساختار

با توجه به این که آنزیم‌های دسچوراز، آغازگر مسیر سنتز اسیدهای چرب غیراشباع بلند زنجیر می‌باشند، بسیاری از مطالعات روی جداسازی و شناسایی ژن‌های کدکننده این آنزیم‌ها متمرکز گردیده است. آنزیم دلتا ۶ دسچوراز به دلیل اهمیتی که در بیوسنتز اسیدهای چرب غیراشباع مانند اسیدآراشیدونیک، اسیداکزایناتونیک و اسید دکزاهگزانوئیک دارا می‌باشد، به‌عنوان یک آنزیم کلیدی در مهندسی غشا محسوب می‌شود. در این تحقیق، پس از تکثیر و توالی‌یابی cDNA رمزگردان دسچوراز غشایی از قارچ *Mortierella alpina* دامین‌های کارکردی آن توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی و مطالعات پیشین، تعیین گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده، توالی‌های حفاظت شده دامین سیتوکروم b₅، اسیدچرب دسچوراز، موتیف (HPGG) و ۳ موتیف غنی از هیستیدین، بدون هیچ تغییری در توالی ترجمه شده شناسایی گردیدند. همچنین تعداد اسیدهای آمینه با بار مثبت و منفی، ساختار ثانویه و هلیکس‌های ترانس‌ممبران تعیین

جایگزینی توالی آمینواسیدی دسچورازهای غشائی پستانداران، حشرات، گیاهان عالی و سیانوباکتری‌ها، اثبات کرد که توالی آن‌ها دارای سه موتیف حفاظت شده جعبه هیستیدینی است. جهت بررسی عملکرد این ۳ موتیف، ۸ هیستیدین حفاظت شده به آلانین تغییر داده شدند. آنالیز وسترن بلات مخمرهای جهش یافته نشان داد که عدم رشد مخمرهای حاوی موتانت به دلیل فقدان بیان یا کاهش پایداری mRNA یا پروتئین بوده و به دلیل عدم عملکرد صحیح این پروتئین می‌باشد. در این تحقیقات، این موتیف‌ها از نظر کاتالیتیکی ضروری شناخته شده و به‌عنوان لیگاندی برای اتم آهن معرفی گردیدند. (Shanklin *et al.*, 1991). با وجود تمام این تحقیقات، به دلیل تنوع بسیار بالای دسچورازهای غشائی، تعیین ساختار کریستالی این آنزیم‌ها، شناخت ما را از ارتباط ساختار و عملکرد این گروه از خانواده پروتئینی افزایش خواهد داد. برای دستیابی به این هدف، با توجه به غشائی بودن این آنزیم‌ها، ابتدا باید سیستمی جهت بیان آن‌ها ایجاد و سپس جهت آنالیز ساختاری، روشی برای خالص‌سازی پروتئین فعال فراهم گردد.

کریستالی آنزیم‌های غشائی، اکثر تحقیقات پیشین روی تعیین موتیف‌های عملکردی، از طریق جهش‌زایی انجام پذیرفته است. نتایج حاصل از تحقیقات Mitchell and Martin (1995) با حذف ۳۴ آمینواسید از انتهای آمین دامن سیتوکروم b5 آنزیم دلتا ۹ دسچوراز مخمر و همچنین Sayanova *et al.* (1999) با حذف ۱۱۲ و ۱۴۶ جفت باز از همین ناحیه این دامین و انجام مطالعات پروفایل بیانی این ژن از طریق لکه‌گذاری نورترن، نشان داده است که فرم تغییر یافته این ژن پایداری کمتری دارد و نتیجه حاصله به این صورت تفسیر گردید که بخش حذف شده یا منجر به تغییر در پردازش mRNA گردیده و یا به دلیل فولدینگ نادرست شکل پردازش شده، موجب تولید آنزیم غیرفعال و یا آنزیم با پایداری کم گردیده است. جهش در اسیدآمینه هیستیدین ناحیه حفاظت شده دامین اتصال هم (HPGG) (هیستیدین - پرولین - گلايسين - گلايسين) در انتهای آمین سیتوکروم b5، نیز باعث عدم فعالیت این آنزیم می‌گردد. این نتایج بیانگر این بود که اسیدآمینه H41 حفاظت‌شده دامین اتصال هم، جهت فعالیت آنزیمی ژن دلتا ۶ دسچوراز ضروری بوده و به احتمال زیاد، هماهنگ‌کننده اصلی مرکز اتصال هم در این دامین می‌باشد (Sayanova

REFERENCES

- Hoffmann M, Hornung E, Busch S, Kassner N, Ternes P, Braus GH, Feussner I (2007) A small membrane-peripheral region close to the active center determines regioselectivity of membrane-bound fatty acid desaturases from *Aspergillus nidulans*. Biol. Chem. 282: 26666-26674.
- Liu J, Li D, Yin Y, Wang H, Li M, Yu L (2011) D6-Desaturase from *Mortierella alpina*: cDNA cloning, expression, and phylogenetic analysis. Biotechnol. Lett. 33: 1985-1991.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook F (1995) Molecular cloning. a laboratory Manual. Cold Spring Harb Lab. New York.
- Meesapyodsuk D, Reed DW, Covello PS, Qiu X (2007) Primary structure, regioselectivity, and evolution of the membrane-bound fatty acid desaturases of *Claviceps purpurea*. Biol. Chem. 282: 20191-20199.
- Meyer BJ, Mann NJ, Lewis JL, Milligan GC, Sinclair AJ, Howe PR (2003) Dietary intakes and food sources of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids. Lipids. 38: 391-398.

- Mitchell AG, Martin CE (1995) A novel cytochrome b5-like domain is linked to the carboxyl terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* D9 fatty acid desaturase. *Biol. Chem.* 270: 29766-29772.
- Needleman P, Turk J, Jackshik BA, Morrison AR and Lefkowitz JB (1986) Arachidonic acid metabolism, *Annual Annu. Biochem.* 55: 69-102.
- Parker-Barnes JM, Das T, Bobik E, Leonard AE, Thurmond JM, Chuang L (2000) Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 poly unsaturated fatty acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8284-8289.
- Qiu X (2003) Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4, 7, 10, 13, 16, 19): two distinct pathways. *Prostaglandins. Leukot. Fatty Acids.* 68: 181-186.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harb Lab. New York.
- Sakuradani E, Kobayashi M, Ashikari T, Shimizu S (1999) Identification of D12-fatty acid desaturase from arachidonic acid producing *Mortierella* fungus by heterologous expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the fungus *Aspergillus oryzae*. *Eur. Chem.* 261: 812-820.
- Sayanova O, Napier JA, Shewry PR (1999) Δ 6-Unsaturated fatty acids in species and tissues of the Primulaceae. *Phytochem.* 52: 419-422.
- Shanklin J, Somerville C (1991) Stearoyl-acyl-carrier-protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 2510-2514.
- Shanklin J, Cahoon EB (1998) Desaturation and Related Modifications of Fatty Acids. *Annu. Physiol. Mol. Biol.* 49: 611-641.
- Shahidi F (2005) *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, 6 Volume Set (Vol.4).*
- Shi H, Chen H, Gu Z, Song Y, Zhang H, Chen W, Chen YQ (2015) Molecular mechanism of substrate specificity for delta 6 desaturase from *Mortierella alpina* and *Micromonas pusilla*. *J. Lipid Res.* 56: 2309-2321.
- Vanhercke T, Shrestha P, Green AG, Singh SP (2011) Mechanistic and structural insights into the regioselectivity of an acyl-CoA fatty acid desaturase via directed molecular evolution. *Biol. Chem.* 286: 12860-12869.
- Ward OP and Singh A (2005) Omega 3/6 fattyacid: alternative sources of production. *Process. Biochem.* 40: 3627-3652.
- Wang M, Chen H, Gu Z, Zhang H, Chen W, Chen YQ (2013) ω 3 fatty acid desaturases from microorganisms: structure, function, evolution, and biotechnological use. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 10255-10262.
- Whittle EJ, Tremblay AE, Buist PH, Shanklin J (2008) Revealing the catalytic potential of an acyl-ACP desaturase: Tandem selective oxidation of saturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105: 14738-14743.