

مطالعه فیلوژنتیکی و ساختاری پلی‌آمین اکسیدازهای گیاهی

محسن حسینی^۱، عباس سعیدی^{۲*}

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. استاد گروه علوم و زیست‌فناوری گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۹/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۷)

Phylogenetic and structural study of plant Polyamine Oxidases

Mohsen Hosseini¹, Abbas Saidi^{2*}

1. Ph.D. Candidate, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C, Tehran, Iran.

2. Professor, Department of Plant Sciences and Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C, Tehran, Iran.

(Received: Dec. 3, 2018 -Accepted: Jul. 29, 2019)

Abstract

Intracellular polyamine contents are regulated not only by biosynthesis and transport but also by catabolism through FAD dependent polyamine oxidases (PAOs). The results of various studies on PAO proteins in developmental processes and response to environmental stresses confirm the importance of this protein in plant life; however, there is no comprehensive study of phylogenetic and structural relationships of plant PAOs. In the present study, to better understand phylogenetic and structural relationships of PAO proteins, bioinformatics analyses were performed on 58 PAO protein sequences of 15 different plant species. Multiple clusters with gene duplications were identified in both dicot and monocot-species. According to the conserved motifs obtained by MEME and MAST tools, four motifs were similar in most plant species. As there is no structural information available on PAOs, structural analyses were carried out on PAOs from *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* as representative of monocot and dicot plants, respectively. Secondary structure analysis revealed that alpha helix dominated among secondary structure elements followed by random coils, extended strand and beta turns for all sequences. Tertiary structures were predicted with SWISS-MODEL server. The best templates with high similarity that their structure determined by experimental methods were selected. To our knowledge, this is the first report of phylogenetic and structural relationships of plant PAOs. Our results may provide a theoretical basis for future studies of functional and structural details of plants PAOs.

Keywords: Bioinformatics analysis, Phylogenetic, Polyamine, Polyamine oxidases.

چکیده

محتوای پلی‌آمین‌های درون سلولی نه تنها توسط بیوسنتز و انتقال بلکه توسط کاتابولیسم آن‌ها به وسیله پلی‌آمین اکسیدازهای (PAO) وابسته به فلاوین آدنین دی‌نوکلوئید (FAD) تنظیم می‌شود. نتایج حاصل از مطالعات مختلف در مورد پروتئین‌های PAO در فرایندهای مختلف نمو و پاسخ به تنش‌های محیطی تأیید کننده اهمیت این پروتئین در زندگی گیاهی می‌باشد، با این حال مطالعه جامعی در مورد روابط فیلوژنتیکی و ساختاری PAOs گیاهی وجود ندارد. در این مطالعه آنالیزهای بیوانفورماتیک به منظور درک بهتر روابط فیلوژنتیکی و ساختاری بر روی ۵۸ توالی پروتئینی PAO از ۱۵ گونه مختلف گیاهی انجام شد. کلاسترهای چندگانه با دو برابر شدگی ژنی هم در گونه‌های تک‌لپه‌ای و هم در گونه‌های دو لپه‌ای شناسایی شد. بر اساس موتیف‌های حفاظت شده به دست آمده توسط ابزارهای MEME و MAST، چهار موتیف در بیشتر گونه‌های گیاهی یکسان بودند. آنالیزهای ساختاری بر روی PAOs مربوط به *Arabidopsis thaliana* و *Oryza sativa* به عنوان نماینده گیاهان تک‌لپه‌ای و دو لپه‌ای که اطلاعات ساختاری آن‌ها در دسترس نبود، انجام شد. آنالیز ساختار دوم نشان داد که مارپیچ آلفا در میان عناصر ساختار دوم غالب بوده و پس از آن به ترتیب راندم کوئل، صفحات بتا و دور بتا برای تمامی توالی‌ها دارای بیشترین مقدار بود. پیش بینی ساختار سوم توسط سرور SWISS-MODEL انجام شد. ساختمان این توالی‌ها دارای دو دومین مشترک بود. این اولین مطالعه در مورد روابط فیلوژنتیکی و ساختاری PAOs گیاهی است و این نتایج ممکن است مبنای نظری برای مطالعات آتی در مورد جزئیات ساختمانی و عملکردی PAOs گیاهی فراهم کند.

واژه‌های کلیدی: آنالیزهای بیوانفورماتیک، پلی‌آمین، پلی‌آمین اکسیداز، فیلوژنتیک

مقدمه

پلی‌آمین‌ها (PA) مولکول‌های پلی‌کاتیونیک کوچک و آلیفاتیک هستند که هم در سلول‌های یوکاریوتی و هم پروکاریوتی وجود دارند. معمول‌ترین نوع PA در بسیاری از سلول‌های زنده دی‌آمین پوترسین^۲ (Put)، تری‌آمین اسپرمیدین^۳ (Spd) و تترا‌آمین اسپرمین^۴ (Spm) هستند (Samasil et al., 2017; Freitas et al., 2018). PA در گیاهان در طیف وسیعی از فرایندهای گیاهی مانند تقسیم سلولی، اندام‌زایی، گل‌دهی، پیری برگ، توسعه میوه و سازگاری با تنش‌های محیطی درگیر هستند. محتوای PA درون سلولی نه تنها توسط بیوسنتز و انتقال بلکه توسط کاتابولیسم آن‌ها تنظیم می‌شود (Kamada-Nobusada et al., 2008; Agudelo-Romero et al., 2013). در کاتابولیسم PA دو نوع آنزیم، دی‌آمین اکسیدازهای وابسته به مس^۵ (DAO) و پلی‌آمین اکسیدازهای^۶ (PAO) وابسته به فلاوین آدین دی‌نوکلئوتید^۷ (FAD) درگیر هستند. DAOs و PAOs نقش مرکزی را در کاتابولیسم PA در گیاهان بازی می‌کنند (Liu et al., 2014). PAOs گیاهی به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول از این آنزیم‌ها، Spd و Spm را اکسید کرده و به ترتیب تولید ۴-آمینوبوتانول^۸ و ۳-دی‌آمینو پروپان^۹ و پراکسید هیدروژن (H₂O₂) کرده و در کاتابولیسم انتهایی PA فعال است. گروه دوم کربن را در سمت خارجی N⁴ نیتروژن مربوط به Spd و Spm اکسید کرده و تولید Spd از Put و Spm به همراه H₂O₂ کرده و در مسیر

تبدیل برگشتی PA دخالت دارد (Mo et al., 2015; Freitas et al., 2018). استفاده از استیل-CoA جهت تشکیل N-استیل اسپرمیدین و Spm به وسیله آنزیم N-استیل ترانسفراز اسپرمیدین/اسپرمین (SSAT; EC 2.3.1.57) اولین مرحله از پروسه برگشت پذیر کاتابولیسم PA است. بنابراین مشتقات N-استیل مشتقات ترجیحی PAOs (PAO, EC 1.5.3.11) به ترتیب جهت تولید Spd و Put است. ZmPAO که یک آنزیم گلیکوپروتئین مونومریک ۵۳ کیلودالتونی حاوی یک مولکول FAD است، اولین PAO بود که در اپوپلاست سلول‌های ذرت شناسایی شد (Cervelli et al., 2004). علاوه بر این، نتایج حاصل از مطالعات مختلف نشان داده که PAOs گیاهی در واکوئل، آپوپلاست، سیتوپلاسم و پراکسی‌زوم یافت می‌شوند (Cervelli et al., 2004; Tavladoraki et al., 2006; Moschou et al., 2008; Freitas et al., 2018).

آنزیم‌های PAOs گیاهی توسط یک خانواده ژنی کوچک که شامل چند عضو است، کد می‌شود. برای مثال در ژنوم *Arabidopsis thaliana* پنج ژن PAO (*AtPAO1-AtPAO5*) و در ژنوم برنج هفت ژن (*OsPAO1-OsPAO7*) شناسایی شده است. مطالعات متعدد نشان داده است که این پنج ژن PAO در *A. thaliana* عمدتاً در تبدیل برگشتی PA درگیر هستند. همچنین مطالعه *In silico* انجام شده توسط Moschou et al. (2008) بر روی این پنج ژن PAOs در *A. thaliana* نشان داد که *AtPAO3* از نظر همولوژی در مقایسه با دیگر ژن‌های PAO متفاوت و غیر معمول است. این محققین، ژن *AtPAO3* را بیان و پروتئین مربوط به آن را در *E. coli* خالص‌سازی کردند. در این مطالعه مشخص شد که آنزیم PAO3 واکنش متوالی تبدیل برگشتی Spm را به Spd کاتالیز می‌کند و به همین خاطر با PAOs پستانداران تشابه عملکردی دارد. همچنین در

1. Polyamine
2. Putrescine
3. Spermidine
4. Spermine
5. Cu-dependent diamine oxidase
6. Polyamine Oxidase
7. FAD-dependent polyamine oxidase
8. 4-Aminobutanol
9. N-(3-aminopropyl)-4-aminobutanol

این تحقیق آن‌ها نشان دادند که AtPAO3 در C-ترمینال حاوی یک موتیف، جهت جایابی در پراکسیزوم است. این نتایج با آزمایشات تجربی نیز ثابت شد (Moschou et al., 2008). در برنج چهار ژن (*OsPAO1*, *OsPAO3*, *OsPAO4* و *OsPAO5*) از هفت ژن در تبدیل برگشتی PAS درگیر هستند (Ahou et al., 2014; Wang et al., 2014). یکی دیگر از ژن‌های PAO که بخوبی مطالعه شده است *ZmPAO1* در ذرت است که در کاتابولیسم نهایی PAS دخالت دارد. مطالعات انجام شده مشخص کرده‌اند که خانواده PAO در ذرت دارای ژن‌های ارتولوگ در آرابیدوپسیس (*AtPAO1-5*) و برنج (*OsPAO1-7*) است و همان تعداد ژن در *Citrus sinensis* (*CsPAO1-6*) ثابت باقی مانده است. آنالیزهای فیلوژنتیکی پروتئین‌های *ZmPAO* را در سه دسته *I* (*ZmPAO1*), *II* (*ZmPAO5*), *III* (*ZmPAOs 2*)، طبقه بندی کرد. *ZmPAO1* بیشتر به *OsPAO7* که یک آنزیم درگیر کاتابولیسم انتهایی PAS است، شباهت دارد (Jasso-Robles et al., 2016). در مطالعه حاضر توالی پروتئین PAO که در گیاهان مختلف شناسایی شده از منابع و بانک‌های اطلاعاتی بازیابی، و مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور مطالعه روابط فیلوژنتیکی و ساختاری PAO در ۱۵ گونه گیاهی انجام شد. اطلاعات حاصل از این مطالعه رابطه بین جنبه‌های ساختاری و فیلوژنتیکی PAOs گیاهی را نشان داده و پیش‌زمینه خوبی را جهت مطالعه ساختار و عملکرد PAOs در گیاهان دیگر فراهم می‌کند.

هم‌ردیفی چندگانه توالی‌ها با استفاده از برنامه Clustal Omega انجام شد (Sievers et al., 2011). درخت‌های فیلوژنتیکی براساس Neighbor-joining و Maximum likelihood به ترتیب با استفاده از برنامه‌های ClustalX و PhyML 3.0 و به وجود آمدند. توپولوژی درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 کشیده شد. بر روی درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 نقاط دو برابر شدگی و گونه‌زایی مشخص شدند.

آنالیز موتیف‌های حفاظت شده

موتیف‌های حفاظت شده با استفاده از برنامه Multiple Em for Motif Elicitation ((MEME; Search Tool (MAST; version 4.9.1) و (Bailey et al., 2009). پارامترهای آنالیز MEME به شرح زیر اعمال شدند: توزیع وقوع موتیف‌ها: صفر یا یک در هر توالی، تعداد موتیف‌های متفاوت: ۱۰، حداقل عرض موتیف: ۶ و حداکثر طول موتیف: ۵۰.

این تحقیق آن‌ها نشان دادند که AtPAO3 در C-ترمینال حاوی یک موتیف، جهت جایابی در پراکسیزوم است. این نتایج با آزمایشات تجربی نیز ثابت شد (Moschou et al., 2008). در برنج چهار ژن (*OsPAO1*, *OsPAO3*, *OsPAO4* و *OsPAO5*) از هفت ژن در تبدیل برگشتی PAS درگیر هستند (Ahou et al., 2014; Wang et al., 2014). یکی دیگر از ژن‌های PAO که بخوبی مطالعه شده است *ZmPAO1* در ذرت است که در کاتابولیسم نهایی PAS دخالت دارد. مطالعات انجام شده مشخص کرده‌اند که خانواده PAO در ذرت دارای ژن‌های ارتولوگ در آرابیدوپسیس (*AtPAO1-5*) و برنج (*OsPAO1-7*) است و همان تعداد ژن در *Citrus sinensis* (*CsPAO1-6*) ثابت باقی مانده است. آنالیزهای فیلوژنتیکی پروتئین‌های *ZmPAO* را در سه دسته *I* (*ZmPAO1*), *II* (*ZmPAO5*), *III* (*ZmPAOs 2*)، طبقه بندی کرد. *ZmPAO1* بیشتر به *OsPAO7* که یک آنزیم درگیر کاتابولیسم انتهایی PAS است، شباهت دارد (Jasso-Robles et al., 2016). در مطالعه حاضر توالی پروتئین PAO که در گیاهان مختلف شناسایی شده از منابع و بانک‌های اطلاعاتی بازیابی، و مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور مطالعه روابط فیلوژنتیکی و ساختاری PAO در ۱۵ گونه گیاهی انجام شد. اطلاعات حاصل از این مطالعه رابطه بین جنبه‌های ساختاری و فیلوژنتیکی PAOs گیاهی را نشان داده و پیش‌زمینه خوبی را جهت مطالعه ساختار و عملکرد PAOs در گیاهان دیگر فراهم می‌کند.

مواد و روش

آنالیزهای فیلوژنتیکی

در این تحقیق ۵۸ توالی آمینواسیدی مربوط به PAOs در ۱۵ گونه گیاهی شامل ۹ گونه دو لپه‌ای، ۵ گونه تک‌لپه‌ای و یک گونه گیاه پست که تا به حال شناسایی شده‌اند، از بانک‌های اطلاعاتی UniProt، Ensembl

جدول ۱. اعضای خانواده PAOs گیاهی با خلاصه‌ای از ویژگی‌های برجسته. پروتئین‌ها به سه دسته تک‌لپه‌ای، دو لپه‌ای و گیاهان پست تقسیم شده‌اند.

Plants	Family	Protein name	Accession no.	Chromosome Occurrence no.	Amino acid residues
Dicots <i>A. thaliana</i>	Brassicaceae	AtPAO1	Q9FNA2 NM_121373	5	472
		AtPAO2	Q9SKX5 AF364952	2	490
		AtPAO3	Q9LYT1 AY143905	3	488
		AtPAO4	Q8H191 AF364953	1	497
		AtPAO5	Q9SU79 AK118203	4	533
<i>S. lycopersicum</i>	Solanaceae	SIPAO1	Solyc01g087590 XP_004229651.1	1	497
		SIPAO2	Solyc07g039310	7	513
<i>B. juncea</i>	Brassicaceae	BjPAO	AY188087	#	541
<i>N. tabacum</i>	Solanaceae	NtPAO	AB200262	#	495
<i>V. vinifera (Grape)</i>	Vitaceae	VvPAO1	VIT_01s0127g00750	1	489
		VvPAO2	VIT_01s0127g00800	1	495
		VvPAO3	VIT_03s0017g01000	3	677
		VvPAO4	VIT_04s0043g00220	4	490
		VvPAO5	VIT_12s0028g01120	12	490
		VvPAO6	VIT_12s0055g00480	12	463
		VvPAO7	VIT_13s0019g04820	13	1026
<i>L. usitatissimum</i>	Linaceae	LuPAO1	Lus10020726	#	490
		LuPAO2	Lus10005021	#	464
		LuPAO3	Lus10039599	#	496
		LuPAO4	Lus10029495	#	472
		LuPAO5	Lus10019725	#	481
<i>C. rubella</i>	Brassicaceae	CrPAO2	Carubv10023090m.g	#	485
		CrPAO3	Carubv10019588m.g	#	487
		CrPAO4	Carubv10020181m.g	#	496
<i>C. sinensis</i>	Rutaceae	CsPAO1	Cs7g02060.1	7	496
		CsPAO2	Cs7g18840.2 orange1.1g010001m.g	7	520
		CsPAO3	Cs6g15870.1 orange1.1g039105m.g	6	493
		CsPAO4	Cs4g14150.1	4	569
		CsPAO5	Cs7g23790.1	7	485
		CsPAO6	Cs7g23670.1	7	487
		GmPAO2A	Glyma08g41570	#	494
		GmPAO2B	Glyma18g14620	18	498
GmPAO3A	Glyma14g03610	14	489		
GmPAO3B	Glyma02g45140	2	487		
GmPAO4	Glyma11g33090	13	493		
<i>H. vulgare Monocots</i>	Poaceae	HvPAO1	AJ298131	#	495
		HvPAO2	AJ298132	#	503
<i>O. sativa</i>	Poaceae	OsPAO1	Os01g0710200 XP_015630114	2	512
		OsPAO2	Os03g0193400 NM_001055782	3	351
		OsPAO3	Os04g0623300 NM_001060458	4	484
	Poaceae	OsPAO4	Os04g0671200 NM_001060753	4	487
		OsPAO5	Os04g0671300 NM_001060754	4	492
		OsPAO6	Os09g0368200 NM_001069545	9	496
		OsPAO7	Os09g0368500 NM_001069546	9	474
<i>Z. mays</i>	Poaceae	ZmPAO1	NM_001111636 GRMZM2G034152	10	500
		ZmPAO2	GRMZM2G000052	#	481
		ZmPAO3	GRMZM2G396856	#	482
		ZmPAO4	GRMZM2G150248	#	493
		ZmPAO5	GRMZM2G035994	#	504
		ZmPAO6	GRMZM2G078033	#	487
<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	SbPAO1	XM_002448510	6	483
		SbPAO2	Sb06g032450	6	487
		SbPAO3	Sb06g032460	6	491
<i>S. italic</i>	Poaceae	SiPAO2	Si009973m.g	#	483
		SiPAO3	Si021886m.g	#	487
		SiPAO4	Si021875m.g	#	491
Lower plants <i>M. neglectum</i>	Selenastraceae	MnPAO1	XP_013904807.1	#	532
		MnPAO2	XP_013904806.1	#	325

آنالیزهای ساختاری

آنالیزهای مقایسه‌ای و بیوانفورماتیکی به صورت آنلاین در وب سایت ExpASy انجام شد (Gasteiger *et al.*, 2003; Saidi & Hajibarat, 2019). پارامترهای فیزیولوژیکی شامل تعداد آمینواسید، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک، درصد چربی و درصد آبگریزی به وسیله ProtParam پیش-بینی شدند (Gasteiger *et al.*, 2005; Saidi and Hajibarat, 2018). پیش‌بینی ساختار دوم توسط SOMPA انجام شد (Geourjon and Deleage, 1995). پیش‌بینی توالی راهنمای جایابی در میتوکندری و پلاستید با استفاده از سرور Predotar 1.03 انجام شد (Small *et al.*, 2004). پیش‌بینی توالی راهنما و جایگاه‌های برشی در داخل آن با استفاده از سرور SignalP 4.1 انجام شد (Petersen *et al.*, 2011). شناسایی هلیکس ترانس‌ممبران در توالی پروتئین‌ها به وسیله TMHMM 2.0 انجام شد (Krogh *et al.*, 2001). برای شناسایی جایگاه سلولی پروتئین‌ها از برنامه آنلاین ProtComp استفاده شد (Yu *et al.*, 2006). پیش‌بینی ساختار سوم با استفاده از سرور SWISS-MODEL انجام شد (Biasini *et al.*, 2014) و با استفاده از نرم افزار Molegro Virtual Viewer تصاویر سه بعدی آن‌ها نمایان شد. کیفیت مدل پیش‌بینی شده با استفاده از سرور ProSA-web ارزیابی شد (Wiederstein *et al.*, 2007).

نتایج و بحث

بررسی روابط تکاملی PAOs گیاهی

درخت فیلوژنی که نزدیکی و دوری PAOs گیاهی را نشان می‌دهد در شکل ۱ آورده شده است. این درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی کامل ۵۸ پروتئین مربوط به PAO گیاهی بر اساس روش Neighbor-joining ساخته شد. بر اساس روش Maximum

Likelihood نیز درخت فیلوژنتیکی بسیار مشابهی به دست آمد (فایل پیوست ۱). بر اساس تفکیک تکاملی موجود بین گیاهان پست و گیاهان عالی همان‌طور که انتظار می‌رفت، پروتئین‌های مربوط به PAOs جلبک قرمز یک کلاستر جداگانه را تشکیل داده است (Kaur *et al.*, 2018). امتیاز بوت استرپ بسیار بالا تأییدکننده این موضوع بود (فایل پیوست ۱).

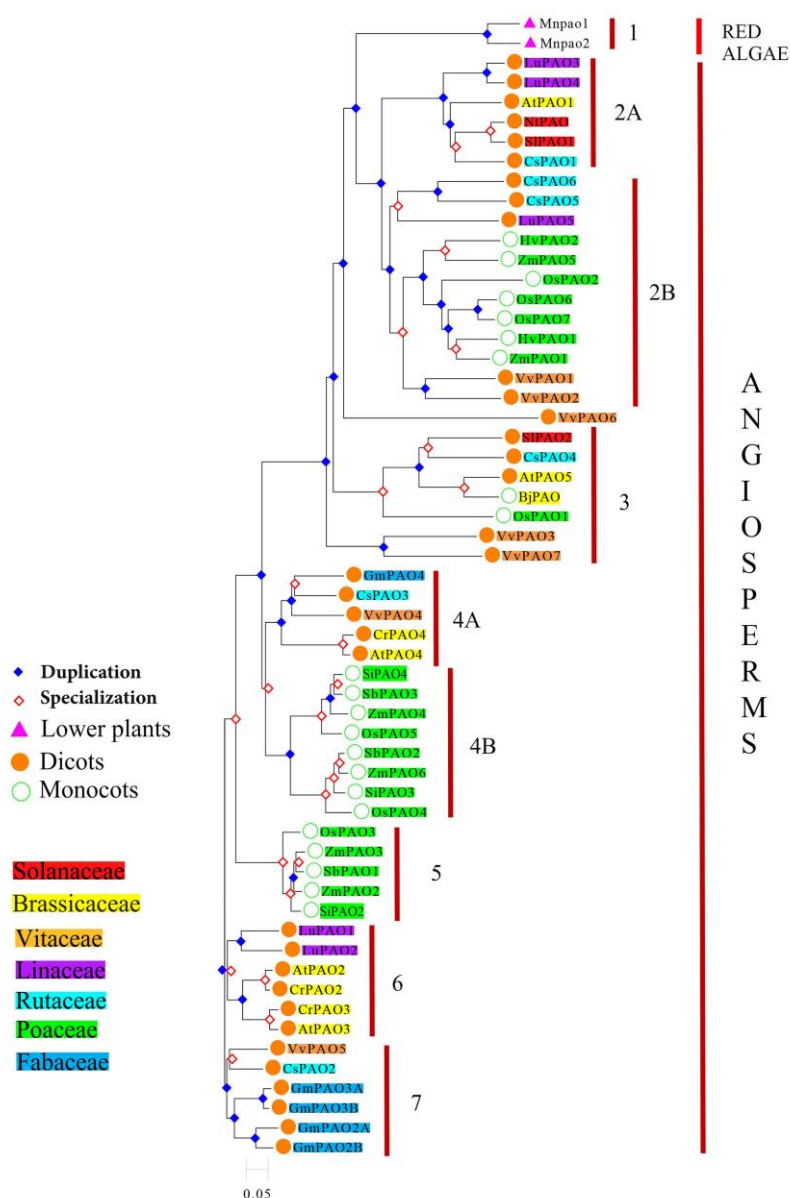
پروتئین‌های PAOs در گیاهان عالی به ۶ کلاستر اصلی (کلاستر ۲ تا ۷) تقسیم شدند. در بین این ۶ کلاستر، کلاسترهای ۲ و ۴ به دو زیرکلاستر (A و B) تقسیم شدند. کلاستر ۱ اعضای خانواده جلبک قرمز *M. neglectum* را نشان می‌دهد که دارای دو پروتئین PAO است. زیر کلاستر 2A بیشتر شامل دو لپه‌ای‌ها در حالی که در کلاستر 2B تعداد گونه‌های تک‌لپه‌ای بیشتر است. زیر کلاستر 2A دارای ۶ عضو است که شامل دو پروتئین از *L. usitatissimum* و یک پروتئین از هر کدام از *A. thaliana* و *N. tabacum* است. *S. licopersicum* و *C. sinensis* AtPAO1 در این زیر کلاستر در مسیر تبدیل برگشتی PAs درگیر است و با PAO گیاه (*NtPAO*) *N. tabacum* دارای ۸۳ درصد توالی یکسان است و در پژوهش‌های قبلی همواره در یک زیر شاخه یکسان قرار گرفته‌اند و به همین دلیل به نظر می‌رسد *NtPAO* نیز دارای ویژگی کاتالیتیکی مشابهی باشد (Tavladoraki *et al.*, 2006). بیشتر پروتئین‌های زیرکلاستر 2B مربوط به تک‌لپه‌ای‌های خانواده Poaceae است که شامل سه پروتئین از *O. sativa*، دو پروتئین از *Z. mays* و *H. vulgare* است. در این زیر کلاستر، ZmPAO1 بسیار نزدیک به آنزیم‌های OsPAO2، -6، -7، -2، HvPAO1 است که در مسیر کاتابولیسم انتهایی PAs درگیر هستند (Ono *et al.*, 2012; Kusano *et al.*, 2015; Jasso-Robles *et al.*, 2016). نکته قابل توجه دور بودن HvPAO1 و HvPAO2 در این زیرکلاستر است،

کلاستر 4B مربوط به گیاهان تک‌لپه‌ای خانواده Poaceae است. کلاستر ۵ نیز مانند زیر کلاستر 4B تمام اعضای آن مربوط به گیاهان تک‌لپه‌ای خانواده Poaceae است. PAOs ذرت شامل 4B، -3، -4، -6 در کلاستر ۵ و زیر کلاستر 4B به آنزیم‌های پراکسی‌زومی برنج نزدیک بودند. ژن‌های 4B، -3، -4، -6 یک سازماندهی ژنومی حفاظت شده با ۱۰ اگزون دارند، طول همه این اگزون‌ها و موقعیت اینترون‌ها تقریباً ثابت باقی مانده است. همه این نتایج تأیید کننده این است که این ژن‌ها حاصل دو برابر شدگی ژنی هستند (Jasso-Robles *et al.*, 2016).

تمامی آنزیم‌های موجود در کلاستر 4B و ۵ در مسیر تبدیل برگشتی PAS دخالت دارند، البته اختصاصی بودن آن‌ها برای PAS متفاوت است (Ono *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). تمام اعضای کلاستر ۶ و ۷ مربوط به پروتئین‌های گیاهان دو لپه‌ای است. کلاستر ۶ شامل دو پروتئین LuPAO1 و LuPAO2 از خانواده Linaceae و پروتئین‌های AtPAO2، CrPAO2، CrPAO3 و AtPAO3 از خانواده Brassicaceae هستند. پروتئین‌های AtPAO2 و AtPAO3 که در این کلاستر قرار دارند، جزء آنزیم‌های پراکسی‌زومی بوده و در تبدیل برگشتی PAS دخالت دارند و به ترتیب ارتولوگ‌های CrPAO2 و CrPAO3 هستند (Liu *et al.*, 2014). در کلاستر ۷ به استثنای دو پروتئین CsPAO2 و VvPAO5 که به ترتیب مربوط به خانواده‌های Rutaceae و Vitaceae هستند، بقیه اعضای این کلاستر را PAOs گیاه سویا که مربوط به خانواده Fabaceae است تشکیل می‌دهند. پروتئین CsPAO2 در تبدیل برگشتی Spd به Put درگیر است. این پروتئین حاوی توالی مکان‌یابی در پراکسیزوم بوده و از آنجایی که این پروتئین از نظر تشابه توالی بیشترین تشابه را به VvPAO5 دارد بنظر می‌رسد فعالیت VvPAO5 مشابه CsPAO2 باشد (Wang & Liu, 2015).

که به نظر می‌رسد توسعه C-انتهایی با توالی موتیف AEAK حفاظت شده در HvPAO2 که جهت مکان‌یابی درون سلولی مورد نیاز است دلیل این دوری باشد (Samasil *et al.*, 2017). OsPAO7 در این کلاستر حاوی دومین ترانس‌ممبران در موقعیت آمینواسیدهای ۲۹-۲۰ است که جهت ترشح به درون فضای آپوپلاست لازم، و از این نظر شبیه ZmPAO1 و HvPAO1 است (Wang and Liu, 2015). تمامی پروتئین‌های زیر کلاستر 2B حاوی ۴۷۵-۵۰۰ آمینواسید هستند در حالی که OsPAO2 دارای ۳۵۱ آمینواسید است و فاقد ناحیه N-ترمینال که باقیمانده‌های ضروری جهت فعالیت کاتالیتیکی در آنجا قرار دارند، است. بنابراین این آنزیم ممکن است فاقد فعالیت کاتالیتیکی باشد (Liu *et al.*, 2014). بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق پروتئین‌های VvPAO1 و VvPAO2 که مربوط به این زیر کلاستر می‌باشند، ممکن است مانند دیگر پروتئین‌های این زیر کلاستر در آپوپلاست یا سیتوپلاسم مکان‌یابی شده و در مسیر کاتابولیسم انتهایی PAS درگیر باشند. تأیید صحت این پیش‌بینی با کارهای آزمایشگاهی در تحقیقات بعدی مرحله ضروری جهت درک فعالیت و اهمیت بیولوژیکی این دو پروتئین است.

کلاستر ۳ دارای پروتئین‌هایی از خانواده‌های مختلف گونه‌های تک‌لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای‌ها است و بیشتر اعضا این کلاستر مربوط به دو لپه‌ای‌ها است. این کلاستر دارای دو پروتئین VvPAO3 و VvPAO7 از خانواده Vitaceae است. دیگر اعضای این کلاستر شامل AtPAO5 و BjPAO از خانواده Brassicaceae است. آنزیم‌های این کلاستر سیتوپلاسمی بوده و در تبدیل برگشتی تترآمین‌های Spm و T-Spm به Spd (و نه به Put) درگیر است (Liu *et al.*, 2014). کلاستر ۴ شامل دو زیر کلاستر A و B بود که زیر کلاستر 4A مربوط به خانواده‌های مختلف از گیاهان دو لپه‌ای است. زیر



شکل ۱. رابطه فیلوژنتیکی PAOs گیاهی. این درخت بر اساس روش Neighbor-joining ساخته شده و تمامی PAOs گیاهی به ۷ کلاستر اصلی تقسیم شدند.

است. در این مدل توسعه وسیع در تعداد PAOs به دلیل دوبرابری در تک‌لپه‌ای‌ها و دو لپه‌ای‌ها نشان داده شده است (شکل ۲).

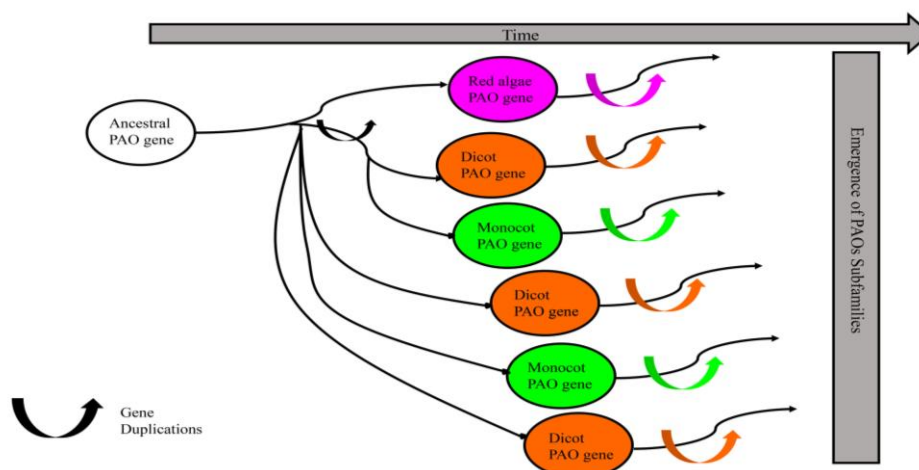
شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده

موتیف حفاظت‌شده به توالی اطلاق می‌شود که در گروهی از پروتئین‌های مرتبط به صورت مرتب تکرار می‌شود. بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش ۱۰

همان‌طور که گفته شد در گیاهان عالی توسعه بسیار وسیعی در تعداد پروتئین‌های PAO به دلیل دو برابر شدن ژنی دیده می‌شود. در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار مگا ۷ مناطق دوبرابری و گونه‌زایی بر روی درخت فیلوژنتیکی مشخص شده است (شکل ۱). با توجه به درخت فیلوژنتیکی، یک مدل که نشان‌دهنده تفکیک تکاملی و دوبرابری شدگی PAOs بین گیاهان پست (جلبک قرمز) و گیاهان عالی است رسم شده

است (Wang *et al.*, 2014). ترکیبی از تغییرات توالی مخصوص خانواده و موتیف‌های کاملاً حفاظت‌شده هنگام شکل‌گیری گونه‌های جدید به حفظ عملکرد پروتئین‌های PAO کمک می‌کند (Wang *et al.*, 2014). در OsPAO2 هیچ نوع موتیف یکسان حفاظت‌شده‌ای با هیچ یک از PAOs مورد بررسی پیدا نشد و این نتایج با نتایج پژوهش‌های انجام‌شده که پیشنهاد کرده بودند این پروتئین فاقد عملکرد است، همخوانی کامل دارد (Liu *et al.*, 2014).

موتیف حفاظت‌شده در ۵۸ توالی پروتئین مربوط به PAOs گیاهی شناسایی شد (جدول ۲ و شکل ۳). موتیف‌های شماره ۸، ۵، ۴ و ۱۰ به ترتیب در ۵۷، ۵۵، ۵۴ و ۵۰ عدد از توالی‌ها یکسان بودند. بنابراین این نتایج نشان می‌دهند که این موتیف‌ها در طول تکامل به شدت حفاظت شده‌اند. حفاظت تقریباً کامل این موتیف‌ها در PAOs نشان‌دهنده این است که از لحاظ عملکردی بسیار حائز اهمیت هستند، علاوه بر این تشکیل و توزیع آن‌ها در میان توالی‌های PAO از گونه‌های مختلف یک رویداد تکاملی قابل توجه



شکل ۲. دو برابرشدگی‌های ژنی در PAOs. مدل با توجه به شکل ۱ رسم شده است که نشان‌دهنده تفکیک تکاملی و دوبرابر شدگی ژنی PAOs بین گیاهان پست (جلبک) و گیاهان عالی و همچنین توسعه وسیع در تعداد PAOs به دلیل دوبرابر شدگی ژنی در گونه‌های تک‌په‌ای و دو‌په‌ای است.

جدول ۲. موتیف‌های حفاظت‌شده در توالی پروتئین PAO در ۱۵ گونه گیاهی که توسط برنامه MEME پیدا شدند.

Motif	E-value	Width	Sites	Sequence
1	3.4e-1304	50	30	HTDYSFG[FC]P[VI]D[LM]GASWLHGVC[NK]EN[PS] LAP[LIV]I[GR]RLGL[PR]LYRTSGD[ND]SVLYDH
2	6.0e-1193	50	29	[HY][EK]VLQW[YC][LIV]CR[ML]E[GA]WFA[AT]DA[DE]TISL[KQ][CGN] WDQE[EVI][LV]L[PT]GGHGLMV[RN]GY[RD]PVI[NK][TA]
3	1.2e-1220	50	30	NKI[AI]L[HR]FDNVFVWPVNE[FV]LGVV[AS][PDE]TSY[GA]C[SG] YFLNLHKATG[HN]PVLVYM[PA]AG[RQ]
4	1.4e-928	29	54	PV[GD][NR][LVI][FY]F[AT]GE[AH]TSEX[YHF][SP] G[SYT]VHGA[YF][SL][STA]G[IL][MD]
5	6.1e-689	21	55	[PA][TI][QD][YI]LV[SP]RW[GW][ST][DN][PR][NF][SF]LGSYS[YN] V[TK][TV]EDGS[TV][FY]VAD[AY][AV][IV][VI][STA]
6	8.1e-1008	36	49	V[PS][LI]GVL[KQ][AS][ND][LT][I][KQ]F[EK]P[KE]LPD DLESYAL[FY]D[MK]DGNQVPQELVTK[VI]G[EK][TI]FE[RE]
7	1.5e-954	50	30	IL[EK]ET[V]G[KVR][DE]E[HQT]D[EN]DM[SP][ILV][LA][QK]A PSVI[VI][IV]G[AG]G[M][SA]G[IL][AS]AA[RK]ALS[DN]A[SG]
8	2.9e-685	23	57	D[MV][AM][VI]YTKIFLKFYKFWPCGP[GE][KTR]EFF[LI] YA[HS][ES]RRGYY[TE][FV]WQ[HE][FLM]E[NK][EAQ]YP[GD][SA]N
9	6.3e-550	50	16	EK[LQM]SDE[AE][AT][AV][NA][FE][AV][MF]S[QV]L[KR]K[M][LF][PG]
10	5.9e-498	21	50	

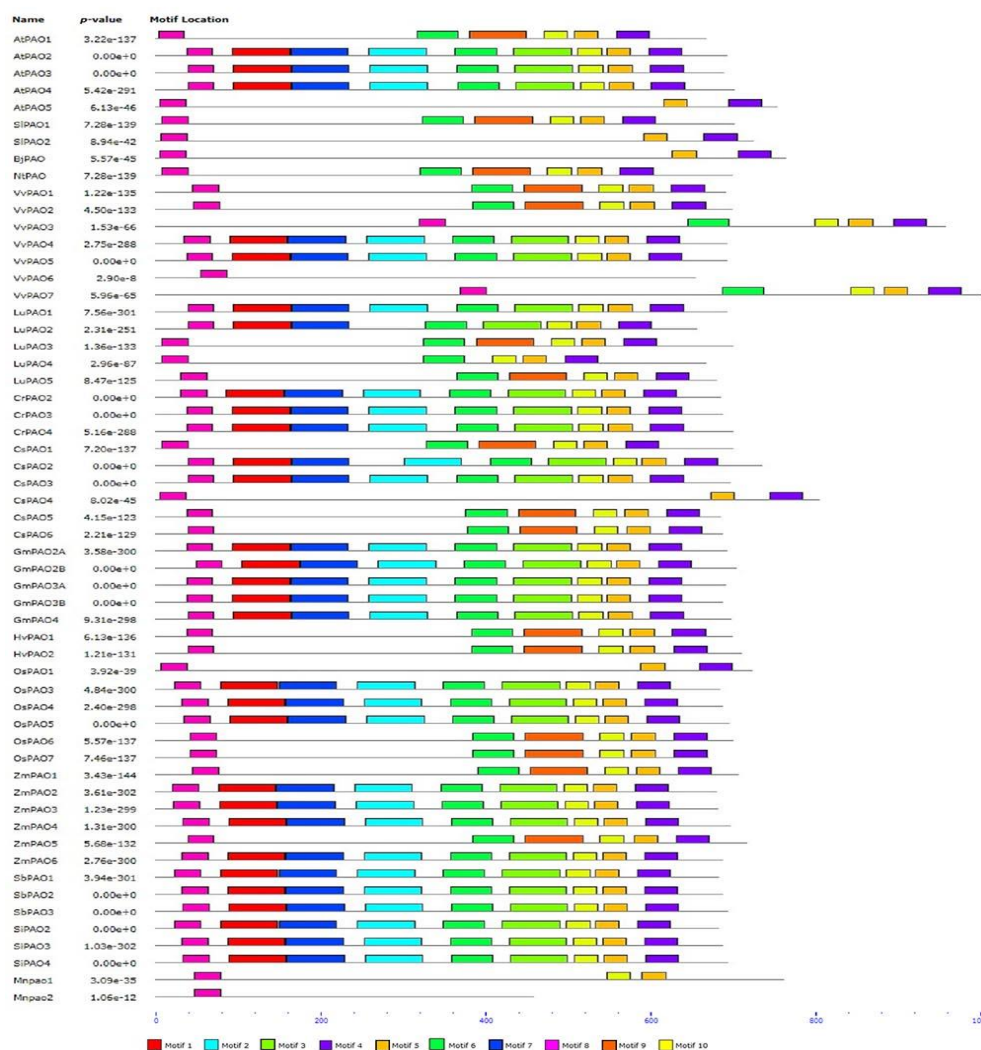
پیش‌بینی‌های ساختاری

به‌منظور بررسی ساختار پروتئین‌های PAO، *A. thaliana* به عنوان نماینده گیاهان دو لپه‌ای و *O. sativa* به عنوان نماینده گیاهان تک‌لپه‌ای انتخاب شدند. علاوه بر این، توالی پروتئینی مربوط به این دو گیاه در درخت فیلوژنتیکی، تقریباً در تمام کلاسترها حضور داشتند، بنابراین به‌نظر می‌رسد نماینده خوبی جهت بررسی ساختار PAOs گیاهی باشند. ساختار اولیه این پروتئین‌ها با سرور ProtParam آنالیز شدند (Gasteiger *et al.*, 2005). ProtParam پارامترهای مختلف فیزیوشیمیایی که از توالی پروتئینی استنباط می‌شود را محاسبه می‌کند. در آنالیزهای ساختار اولیه طول توالی، وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (pI value)، تعداد کل باقیمانده‌های با بار منفی (Asp+Glu)، تعداد کل باقیمانده‌های با بار مثبت (Arg+Lys)، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و میانگین آبگریزی (GRAVY) محاسبه شد (جدول ۳). از بین ۱۲ توالی مورد مطالعه که شامل AtPAO1 (472 aa)، AtPAO2 (490 aa)، AtPAO3 (488 aa)، AtPAO4 (497 aa)، AtPAO5 (533 aa)، OsPAO1 (512 aa)، OsPAO2 (351 aa)، OsPAO3 (484 aa)، OsPAO4 (487 aa)، OsPAO5 (492 aa)، OsPAO6 (496 aa) و OsPAO7 (474 aa) بودند، توالی‌های OsPAO2 و OsPAO5 به‌ترتیب دارای کمترین و بیشترین وزن مولکولی بودند. توالی OsPAO1 دارای وزن مولکولی 54.1kDa بود که با نتایج به‌دست‌آمده توسط دیگر محققین که وزن مولکولی را با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریلامید اندازه‌گیری کرده بودند، همخوانی کامل دارد (Liu *et al.*, 2014). PAO مربوط به گیاه ذرت یک پروتئین مونومری با وزن مولکولی 53-kDa است و بر اساس نتایج حاصل از برآورد وزن مولکولی می‌توان نتیجه گرفت که

PAOs دارای وزن مولکولی مشابه، ممکن است یک فرم مونومری به خود بگیرند (Ono *et al.*, 2012). نتایج مشابه به‌دست‌آمده برای OsPAO7 از آزمایشات تجربی نیز تأییدکننده این پیش‌بینی است (Liu *et al.*, 2014).

نقطه ایزوالکتریک محاسبه‌شده برای پروتئین‌های PAO بین ۴/۶۶ و ۵/۸۵ بودند که بیشترین آن مربوط به OsPAO1 و کمترین آن مربوط به OsPAO2 بود. نقطه ایزوالکتریک نقطه‌ای از pH است که در آن بار الکتریکی برابر صفر است. این مطلب در خالص‌سازی پروتئین دارای اهمیت بوده و در این pH انحلال پروتئین‌ها در کمترین حد و پویایی آن در سیستم الکتروفوکوسینگ برابر صفر است (Darabi *et al.*, 2014). بزرگترین عدد مربوط به باقیمانده‌های دارای بار منفی مربوط به پروتئین (69) AtPAO5 و پس از آن (66) OsPAO1 و کمترین آن مربوط به (31) OsPAO2 بود. علاوه بر این بزرگترین عدد مربوط به باقیمانده‌های دارای بار مثبت به‌ترتیب در پروتئین‌های (59) AtPAO5 و (55) OsPAO1 و کمترین آن در (19) OsPAO2 مشاهده شد.

پروتئینی که شاخص ناپایداری آن کمتر از ۴۰ باشد به‌عنوان یک پروتئین پایدار در نظر گرفته می‌شود و اگر پروتئینی شاخص ناپایداری آن بیشتر از ۴۰ باشد، ممکن است ناپایدار باشد. در بین ۱۲ توالی مورد بررسی سه عدد از توالی‌ها OsPAO2، AtPAO3 و AtPAO1 به‌ترتیب با شاخص ناپایداری ۴۱/۸۷، ۴۱/۴۷ و ۴۱/۰۶ دارای بیشترین مقدار بودند و توالی AtPAO5 با میزان شاخص ناپایداری ۳۱/۶۳ دارای کمترین میزان بود. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین به‌عنوان میزان نسبی زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) یک پروتئین تعریف می‌شود و ممکن است به عنوان یک فاکتور مثبت در جهت افزایش مقاومت به گرما در پروتئین‌های کروی در نظر گرفته شود (Darabi *et al.*, 2017).



شکل ۳. موتیف‌های حفاظت شده در PAOs که توسط برنامه MEME شناسایی شدند. موتیف‌ها در رنگ‌های متفاوت نشان داده شده‌اند.

جدول ۳. نتایج حاصل از آنالیز ساختار اول پروتئین‌های PAO در *O. sativa* و *A. thaliana*

Plants	Protein name	Amino acid residues	Molecular weight	PI	(Asp+Glu)	(Arg+Lys)	Instability index	Aliphatic index	GRAVY ^a
<i>A. thaliana</i>	AtPAO1	472	52866.12	5.30	55	43	41.06	87.56	-0.153
	AtPAO2	490	54321.11	5.75	60	51	39.93	91.29	-0.116
	AtPAO3	488	54131.65	5.64	63	52	41.47	91.11	-0.182
	AtPAO4	497	54930.78	5.15	61	45	34.90	93.76	-0.104
	AtPAO5	533	58686.42	5.80	69	59	31.63	80.69	-0.262
<i>O. sativa</i>	OsPAO1	512	54112.10	5.85	66	55	37.21	82.97	-0.151
	OsPAO2	202	22688.83	4.66	31	19	41.87	70.89	-0.697
	OsPAO3	484	53644.33	5.68	62	48	33.45	95.89	-0.060
	OsPAO4	487	52913.40	5.29	60	43	32.73	94.72	-0.041
	OsPAO5	492	54186.05	5.52	59	44	34.77	98.86	0.013
	OsPAO6	496	55653.95	5.54	62	53	35.27	80.56	-0.306
	OsPAO7	474	53258.15	5.08	59	45	36.30	83.48	-0.253

خواهد بود. نتایج پیش‌بینی‌شده در این پژوهش نشان می‌دهد که PAOs مربوط به *A. thaliana* نسبت به PAOs گیاه *O. sativa* تعامل بیشتری با محیط آبی پیرامون خود دارند. برعکس ماریپچ آلفا، ساختار صفحه‌های بتا در PAOs گیاه *O. sativa* بیشتر بود. ساختار صفحه‌های بتا، ساختار دوم بسیار کشیده و چین‌دار می‌باشد. یکی از تفاوت‌های مهم صفحه‌های بتا با ماریپچ آلفا این است که اسیدآمینه‌های که معمولاً در ساختار اول زنجیره پروتئینی با فاصله زیاد از هم قرار گرفته‌اند، برای تشکیل این ساختار در مجاورت هم قرار می‌گیرند، بنابراین صفحه‌های بتا تمایل به سختی داشته و انعطاف‌پذیری ناچیزی دارند. بنابراین به نظر می‌رسد پروتئین‌های PAOs در *O. sativa* در مقایسه با *A. thaliana* دارای انعطاف کمتر بوده و حلالیت کمتری دارد. انعطاف‌پذیری کمتر باعث پایداری بیشتر پروتئین می‌شود در نتیجه می‌توان گفت که PAOs در *O. sativa* دارای پایداری بیشتر هستند (Labadorf *et al.*, 2010; Misumi *et al.*, 2011).

پیش‌بینی تغییرات پس از ترجمه

پیش‌بینی تغییرات پس از ترجمه با سرورهای Predotar 1.03 و SignalP 4.1 انجام شد (Small *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2011). Predotar توالی‌های N-ترمینال که جهت مکان‌یابی پروتئین‌های پیش‌ساز مورد نیاز هستند را شناسایی می‌کند. برای هر توالی پروتئینی Predotar یک برآورد احتمالی از وجود توالی مکان‌یابی در میتوکندری، پلاستید و ER فراهم می‌کند و فرض چهارم پیش‌بینی عدم وجود توالی مکان‌یابی در داخل توالی است. این پیش‌بینی‌ها بر فرض اینکه توالی مورد نظر به صورت فرضی از پروتئوم انتخاب شده‌اند انجام می‌شود. در این صورت ۱۰ درصد توالی‌ها به سمت میتوکندری، ۱۰ درصد به سمت پلاستید و ۲۰ درصد به سمت ER هدف‌مند می‌شوند. بر اساس

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شده است بیشترین شاخص آلیفاتیک به ترتیب مربوط به توالی‌های OsPAO5 و OsPAO3 به ترتیب با مقدار ۹۸/۸۶ و ۹۵/۸۹ و کمترین مقدار مربوط به پروتئین AtPAO5 با مقدار ۸۰/۶۹ بود. بیشترین مقدار شاخص آلیفاتیک به ترتیب در توالی‌های OsPAO3 و OsPAO5 نشان‌دهنده پایداری ساختاری آن‌ها است (Darabi *et al.*, 2017). میزان GRAVY (حلالیت پروتئین) به دست‌آمده برای توالی‌ها فقط برای توالی OsPAO5 مثبت بود و برای بقیه توالی‌ها منفی بود. شاخص GRAVY حلالیت پروتئین را مشخص می‌کند. هرچه این شاخص با ارزش منفی کمتر باشد پروتئین‌ها آب‌گریزتر هستند.

ساختار دوم

پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین توسط سرور SOMPA (Self-Optimized Prediction Method with Alignment) انجام شد (Geourjon & Deleage, 1995). این سرور حضور ماریپچ آلفا، دور بتا، راندوم کوئل و صفحات بتا را در توالی پروتئینی تخمین می‌زند. در این مطالعه آنالیز ساختار دوم پروتئین‌های انتخابی در ۱۲ توالی مربوط به *A. thaliana* و *O. sativa* نشان داد که ساختار دوم ماریپچ آلفا (۳۳/۴۰-۴۲/۰۳ درصد) و راندوم کوئل (۲۸/۲۸-۳۶/۹۱ درصد) دارای بیشترین مقدار و کمترین مقدار مربوط به دور بتا (۸/۵۸-۱۲/۳۲ درصد) است (جدول ۴). به‌طور کلی ساختار دوم ماریپچ آلفا در پروتئین‌های PAO مربوط به گیاه *A. thaliana* بیشتر از گیاه *O. sativa* بود. معمول‌ترین مکان برای ماریپچ آلفا سطح هسته‌های پروتئین است که یک رابطه را برای تعامل با محیط آبی بیرون ایجاد می‌کند. قسمت داخلی ماریپچ تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب‌گریز و قسمت بیرونی تمایل به داشتن آمینواسیدهای آب‌دوست دارد، بنابراین در طول ماریپچ از هر چهار آمینواسید، سه آمینواسید آب‌گریز

در مرحله جوانه‌زنی و در مرحله گلدهی بیشترین بیان را دارند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده و همسو با تحقیقات انجام‌شده این سه عضو از PAOs حاوی توالی راهنما در C- ترمینال جهت مکان‌یابی در میتوکندری، پلاستید و غشای پلاسمایی نبوده و در عوض حاوی توالی راهنما جهت مکان‌یابی در پراکسیزوم بوده و جهت فعالیت به پراکسیزوم منتقل شده و در تبدیل برگشتی Spm به Spd و یا Put دخیل هستند (Ono *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014). بیان موقت فلورسنت سبز مشتق شده از پروتئین GFP که با OsPAO1 ادغام شده بود در سیتوپلاسم و هسته سلول‌های اپیدرم پیاز بمباران شده تأیید کننده این واقعیت است که OsPAO1 در سیتوپلاسم فعالیت می‌کند. پژوهش‌های مشابه نیز نشان داده‌اند که AtPAO1 و AtPAO5 نیز آنزیم‌های سیتوپلاسمی هستند (Moschou *et al.*, 2008; Ono *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق هیچ یک از توالی‌های پروتئینی حاوی توالی راهنما جهت مکان‌یابی در میتوکندری و پلاستید نبودند و تنها توالی AtPAO5 حاوی توالی راهنما جهت مکان‌یابی در شبکه اندوپلاسمی بودند (جدول ۵ و فایل پیوست ۲). سرور SignalP 4.1، وجود توالی راهنما و موقعیت سایت‌های برشی را در داخل آن پیش‌بینی می‌کند. توالی راهنما یک پپتید کوتاه (۳۰-۵ آمینواسید) موجود در N- انتهای اکثر پروتئین‌های تازه سنتز شده است که قرار است وارد مسیرهای ترشحی شوند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق توالی‌های AtPAO1، OsPAO6 و OsPAO7 حاوی توالی سیگنال بودند. *O. Sativa* که به عنوان گیاه مدل تک‌لپه‌ای‌ها در نظر گرفته می‌شود حاوی ۷ ژن کد کننده PAOs است. از این ۷ عدد PAO سه عدد از آن‌ها OsPAO4، OsPAO5 و OsPAO3 نسبت به چهار عضو دیگر

جدول ۴. نتایج حاصل از آنالیز ساختار دوم پروتئین‌های PAO در *O. sativa* و *A. thaliana*

Plants	Protein name	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
<i>A. thaliana</i>	AtPAO1	34.11	21.19	8.90	35.81
	AtPAO2	39.18	21.22	10.20	29.39
	AtPAO3	41.80	20.08	9.84	28.28
	AtPAO4	35.01	24.55	8.58	31.59
	AtPAO5	42.03	18.01	10.88	29.08
<i>O. sativa</i>	OsPAO1	33.40	19.34	10.35	36.91
	OsPAO2	36.14	21.78	10.89	31.19
	OsPAO3	37.19	22.93	9.92	29.96
	OsPAO4	36.55	22.59	12.32	28.54
	OsPAO5	35.98	21.14	10.98	31.91
	OsPAO6	34.88	19.76	11.29	34.07
	OsPAO7	34.18	20.04	10.55	35.23

جدول ۵. پیش‌بینی تغییرات پس از ترجمه در پروتئین‌های PAO در *O. sativa* و *A. thaliana*

Plants	Protein name	Mitochondrial	Plastid	ER ^a	Elsewhere	Prediction	Signal peptide	Tmhelix ^b
<i>A. thaliana</i>	AtPAO1	0.01	0.01	0.16	0.83	none	Yes	NO
	AtPAO2	0.02	0.01	0.00	0.97	none	NO	NO
	AtPAO3	0.01	0.01	0.00	0.98	none	NO	NO
	AtPAO4	0.01	0.00	0.00	0.99	none	NO	NO
	AtPAO5	0.23	0.00	0.80	0.16	ER	NO	NO
<i>O. sativa</i>	OsPAO1	0.01	0.02	0.05	0.93	none	NO	NO
	OsPAO2	0.04	0.03	0.00	0.93	none	NO	NO
	OsPAO3	0.01	0.00	0.00	0.99	none	NO	NO
	OsPAO4	0.12	0.00	0.81	0.16	none	NO	NO
	OsPAO5	0.01	0.00	0.99	0.01	none	NO	NO
	OsPAO6	0.01	0.00	0.99	0.01	ER	Yes	A ₂₀ -A ₂₉
	OsPAO7	0.01	0.03	0.00	0.96	none	Yes	A ₂₀ -A ₂₉

پروتئین‌ها بوده و جهت درک فعالیت پروتئین‌ها ضروری می‌باشد. پیش‌بینی ساختار سوم با استفاده از سرور SWISS-MODEL انجام شد (شکل ۴) (Biasini *et al.*, 2014). این پایگاه ساختار سه بعدی پروتئین‌ها را با استفاده از الگوریتم‌های مدل‌سازی که کار مدل‌سازی را با استفاده از هم‌ترازی توالی آمینواسیدی با توالی‌های که ساختار آن‌ها شناسایی شده است، انجام می‌دهد (Darabi *et al.*, 2014). در این تحقیق برای پیش‌بینی ساختار سوم توالی PAOs از توالی دیگر PAOs گیاهی و Lysine-Specific Histon Demethylase که ساختمان آن‌ها از طریق روش‌های تجربی مشخص شده بود، استفاده شد. ساختمان این توالی‌ها دارای یک توپولوژی مشترک با دو دومین است. اتصال این دو دومین باعث شکل گرفتن یک تونل کاتالیکی U-شکل شده که در حدود ۳۰ آنگسترم طول داشته و به‌صورت مطلوب جهت اتصال به سوبسترات‌های PA شکل گرفته است. دهانه این تونل U-شکل در دو طرف پروتئین در یک نقطه یکسان از سطح پروتئین قرار دارد. در این پروتئین یکی از دهانه‌ها دارای تعدادی باقیمانده آمینواسیدهای اسیدی است که احتمالاً در هدایت سوبسترات‌های PA پروتونه شده به جایگاه اتصال به سوبسترات نقش داشته باشند.

پیش‌بینی توپولوژی با استفاده از سرور TMHMM 2.0 انجام شد (Krogh *et al.*, 2001). نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان داد که تنها توالی‌های OsPAO6 و OsPAO7 دارای هلیکس ترانس‌ممبران هستند (جدول ۵ و فایل پیوست ۳). آمینواسیدهای ۱-۱۹ و ۲۹-۲۰ به‌ترتیب به‌عنوان سیگنال پپتید و هلیکس ترانس‌ممبران در این دو پروتئین شناسایی شدند. این نتایج نشان می‌دهد که این دو آنزیم آپوپلاستی بوده و جهت فعالیت به آپوپلاست منتقل می‌شوند. آزمایش‌های تجربی انجام‌شده توسط دیگر محققین در مورد پروتئین OsPAO7 تأییدکننده صحت این پیش‌بینی است (Liu *et al.*, 2014) اما در مورد OsPAO6 تأیید صحت این پیش‌بینی با کارهای آزمایشگاهی در تحقیقات بعدی ضروری بنظر می‌رسد.

پیش‌بینی ساختار سوم

ویژگی الگوهای پیش‌بینی‌شده شامل کد PDB توالی الگوی مورد استفاده برای پیش‌بینی مدل، میزان یکسانی توالی مدل با توالی الگو، نقطه شروع و پایان باقیمانده‌های که جهت مدلینگ از آن استفاده شده، توصیف الگو مورد استفاده جهت مدلینگ و Z-score در جدول ۶ آمده است. ساختار سه بعدی هدف نهایی پیش‌بینی ساختار

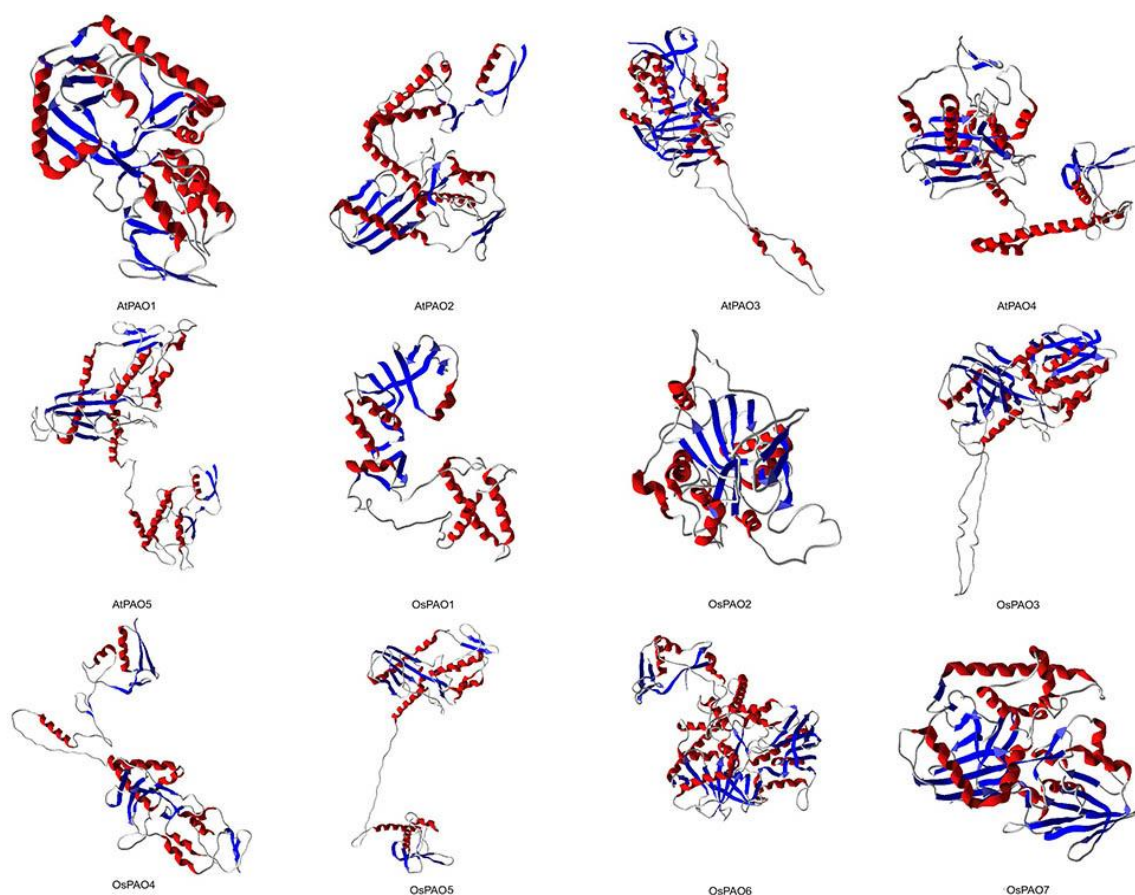
جدول ۶ ویژگی توالی الگو و مدل پروتئین‌های PAO در *O. sativa* و *A. thaliana*

Plants	Protein name	Residues	Seq Identity	Template	Description	Z-score
<i>A. thaliana</i>	AtPAO1	19-430	50.73	1h81.1.A	Polyamine Oxidase	-8.96
	AtPAO2	26-465	33.41	2y48.1.A	Lysine-Specific Demethylase 1A	-5.41
	AtPAO3	25-467	32.25	2xah.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-8.1
	AtPAO4	26-467	33.65	4bay.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-5.73
	AtPAO5	3-530	27.48	2uxn.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-5.06
<i>O. sativa</i>	OsPAO1	4-507	35.68	5mbx.1.A	Peroxisomal N(1)-acetyl-spm/spd oxidase	-8.29
	OsPAO2	4-347	79.75	3kpf.1.A	Polyamine oxidase	-5.3
	OsPAO3	13-452	32.78	2xah.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-9.08
	OsPAO4	20-459	35.14	2xah.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-5.02
	OsPAO5	22-462	34.12	2xah.1.A	Lysine-Specific Histon Demethylase 1A	-5.41
	OsPAO6	30-490	83.01	1h81.1.A	Polyamine oxidase	-10.2
	OsPAO7	30472	84.62	1h81.1.A	Polyamine oxidase	-10.15

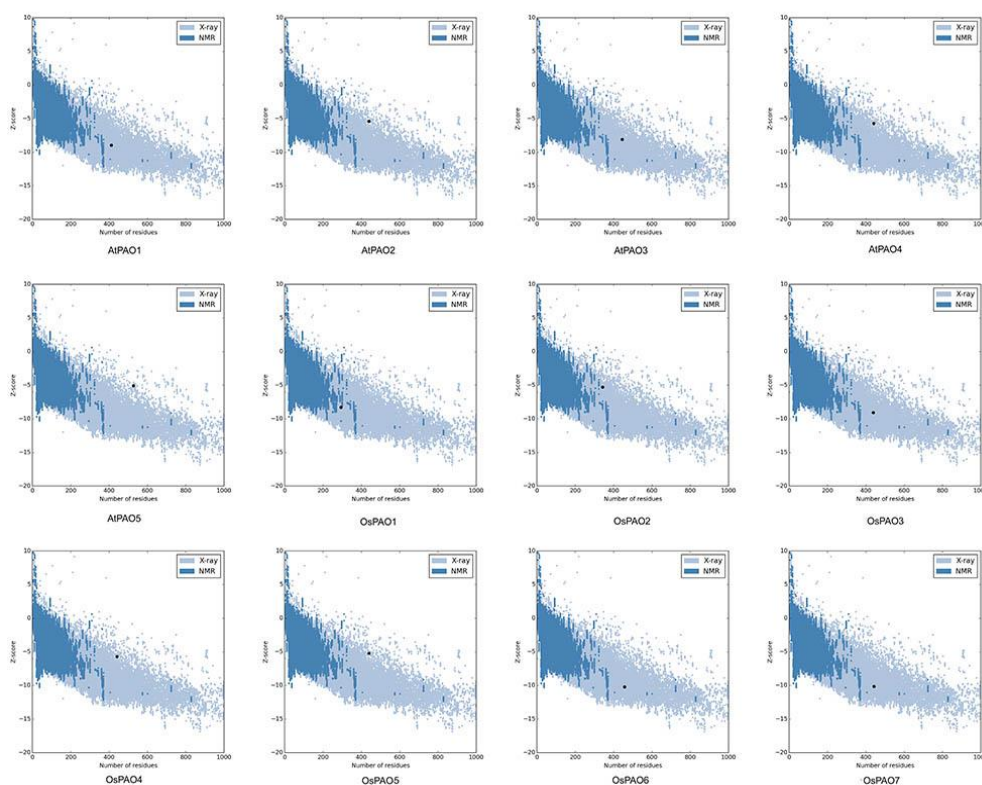
Z-score برای تمامی زنجیره‌های پروتئین که ساختار آن‌ها به صورت تجربی تعیین شده است و در حال حاضر در PDB وجود دارد، نمایش داده می‌شود (جدول ۶ و شکل ۵). در این طرح گروهی از ساختارها از منابع مختلف (X-ray و NMR) با رنگ‌های مختلف متمایز می‌شوند و از این طرح‌ها می‌توان برای بررسی این که آیا Z-score ساختار پیش‌بینی شده در محدوده امتیازهای که به طور معمول برای پروتئین‌های Native با اندازه مشابه یافت می‌شود هست یا نه (Sippl, 1993). در این تحقیق مدل‌های پیش‌بینی شده برای تمامی پروتئین‌های مورد بررسی در محدوده امتیازهای که به طور معمول برای پروتئین‌های Native با اندازه مشابه یافت می‌شود، بود.

قسمت میانی تونل حاوی تعدادی آمینواسید آروماتیک است و نهایتاً قسمت درونی تونل در مقابل فلاوین جهت ایجاد جایگاه کاتالیکی اکسیداسیون PA قرار گرفته است. با توجه به میزان یکسانی این توالی‌ها با توالی پروتئین الگو احتمالاً ساختمان سه بعدی بسیار مشابهی داشته باشند. ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده در این تحقیق میان‌بری برای مطالعه بعدی و بررسی جزئیات ساختاری این PAOs است (Binda *et al.*, 2002).

کیفیت مدل پیش‌بینی شده با استفاده از سرور ProSA-web ارزیابی شد (Wiederstein *et al.*, 2007). Z-score نشان‌دهنده کیفیت کلی مدل پیش‌بینی شده است. مقدار آن در یک طرح که حاوی



شکل ۴. پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین‌های PAO در *O. sativa* و *A. thaliana* با استفاده از سرور SWISS-MODEL. ماریپیج آلفا به رنگ قرمز، صفحات بتا به رنگ آبی و رانوم کوپل‌ها به رنگ خاکستری نشان داده شده است.



شکل ۵. طرح Z-score پروتئین‌های PAO با استفاده از سرور ProSA-web

نتیجه‌گیری

بیوانفورماتیک نقش اساسی در آنالیز و تفسیر داده‌های پروتئومیک و ژنومیک دارد و از متدها و تکنیک‌های علوم ریاضی، آمار، علوم رایانه، فیزیک، بیولوژی و پزشکی استفاده می‌کند. این علم می‌تواند به‌عنوان یک ابزار قدرتمند جهت پیش‌بینی روابط فیلوژنتیکی، ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها به کار برود. مطالعه بیوانفورماتیکی حاضر اولین مطالعه جامع در مورد روابط فیلوژنتیکی و ساختاری PAOs گیاهی است. در این تحقیق PAOs گیاهان پست یک کلاستر جداگانه از PAOs گیاهان عالی تشکیل داد. در گیاهان عالی توسعه بسیار وسیعی در تعداد پروتئین‌های PAO به دلیل دو برابر شدن ژنی دیده شد. PAOs در گیاهان عالی به ۷ کلاستر اصلی تقسیم شد. در بین این ۷ کلاستر، کلاسترهای ۲ و ۴ به دو زیرکلاستر (A و B) تقسیم شدند. کلاسترهای ۲، ۳ و ۴ شامل PAOs از گیاهان تک‌لپه‌ای و دو

لپه‌ای بود. در حالی که کلاستر ۵ مخصوص PAOs در گیاهان تک‌لپه‌ای و کلاسترهای ۶ و ۷ مخصوص گیاهان دو لپه‌ای بود. قرار گرفتن این توالی‌ها در کلاسترهای متفاوت نشان‌دهنده تفاوت آن‌ها در فعالیت کاتالیکی و مکان‌یابی درون سلولی است که آنالیز موتیف‌های حفاظت‌شده تأییدکننده این موضوع بود. به‌منظور مطالعات ساختاری ۱۲ توالی آمینواسیدی مربوط به گیاهان *O. sativa* و *A. thaliana* به ترتیب به‌عنوان نماینده گیاهان تک‌لپه‌ای و دو لپه‌ای که اطلاعات ساختاری آن‌ها در دسترس نبودند، انتخاب شدند. آنالیز ساختار دوم این پروتئین‌ها نشان داد که به ترتیب ماریپیج آلفا، راندوم کویل، صفحات بتا و دور بتا دارای بیشترین مقدار بود. ساختار دوم ماریپیج آلفا در پروتئین‌های PAO مربوط به گیاه *A. thaliana* بیشتر از گیاه *O. sativa* بود که نشان‌دهنده تعامل بیشتر PAOs مربوط به *A. thaliana* با محیط آبی پیرامون خود است. ساختار دوم صفحه‌های بتا در

بود، جهت درک فعالیت این پروتئین‌ها ضروری بنظر می‌رسد. اطلاعات فیلوژنتیکی، فیزیوشیمیایی و ساختاری پیش‌بینی شده در این مطالعه پایه خوبی برای مطالعات آتی در مورد جزئیات ساختمانی و عملکردی PAOs گیاهی از طریق روش‌های تجربی فراهم می‌کند.

PAOs گیاه *O. sativa* بیشتر بود. این نتایج نشان‌دهنده انعطاف‌پذیری کمتر و پایداری بیشتر PAOs گیاه *O. sativa* است. اطلاعات ساختاری حاصل، همسو با آنالیزهای فیزیوشیمیایی که نشان‌دهنده توالی‌های سیگنال پپتید و هلیکس ترانس‌ممبران تنها در برخی از PAOs گیاه *O. sativa*

REFERENCES

- Agudelo-Romero P, Bortolotti C, Pais MS, Tiburcio AF, Fortes M (2013) Study of polyamines during grape ripening indicate an important role of polyamine catabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* 67: 105-119.
- Ahou A, Martignago D, Alabdallah O, Tavazza R, Stano P, Macone A, Angelini R (2014) A plant spermine oxidase/dehydrogenase regulated by the proteasome and polyamines. *Journal of experimental botany* 65: 1585-1603.
- Bailey TL, Boden M, Buske F.A, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), pp. W202-W208.
- Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, Schmidt T, Kiefer F, Cassarino TG, Bertoni M, Bordoli L, Schwede T, (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42(W1), pp. W252-W258.
- Binda C, Mattevi A, Edmondson DE (2002). Structure-function relationships in flavoenzyme-dependent amine oxidations: a comparison of polyamine oxidase and monoamine oxidase. *Journal of biological chemistry*.
- Cervelli M, Caro OD, Penta AD, Angelini R, Federico R, Vitale A, Mariottini P 2004. A novel C-terminal sequence from barley polyamine oxidase is a vacuolar sorting signal. *The Plant Journal*, 40(3), pp.410-418.
- Darabi M, Seddigh S, Abarshahr M (2017) Structural, functional, and phylogenetic studies of cytochrome P450 (CYP) enzyme in seed plants by bioinformatics tools. *Caryologia* 70: 62-76.
- Freitas VS, de Souza Miranda R, Costa JH, de Oliveira DF, de Oliveira Paula S, de Castro Miguel E, Gomes-Filho E (2018) Ethylene triggers salt tolerance in maize genotypes by modulating polyamine catabolism enzymes associated with H2O2 production. *Environmental and Experimental Botany* 145: 75-86.
- Gasteiger E, Gattiker A, Hoogland C, Ivanyi I, Appel RD, Bairoch A (2003). ExpASY: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic acids research*, 31(13), pp.3784-3788.
- Geourjon C, Deleage G (1995) SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Bioinformatics* 11: 681-684.
- Jasso-Robles FI, Jiménez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Juárez-Montiel M, Gonzalez ME, Pieckenstain FL, Rodríguez-Kessler M (2016) Inhibition of polyamine oxidase activity affects tumor development during the maize-Ustilago maydis interaction. *Plant Physiology and Biochemistry* 102: 115-124.
- Kamada-Nobusada T, Hayashi M, Fukazawa M, Sakakibara H, Nishimura M (2008) A putative peroxisomal polyamine oxidase, AtPAO4, is

- involved in polyamine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 1272-1282.
- Kaur G, Guruprasad K, Temple BR, Shirvanyants DG, Dokholyan NV, Pati PK (2018) Structural complexity and functional diversity of plant NADPH oxidases. *Amino acids* 50: 79-94.
- Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL (2001). Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology*, 305(3), pp.567-580.
- Kusano T, Kim DW, Liu T, Berberich T (2015) Polyamine catabolism in plants. In *Polyamines* Springer, Tokyo 77-88
- Labadorf A, Link A, Rogers MF, Thomas J, Reddy AS, Ben-Hur A (2010). Genome-wide analysis of alternative splicing in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC genomics*, 11(1), p.114.
- Liu T, Wook Kim D, Niitsu M, Berberich T, Kusano T (2014) POLYAMINE OXIDASE 1 from rice (*Oryza sativa*) is a functional ortholog of *Arabidopsis* POLYAMINE OXIDASE 5. *Plant Signaling & Behavior* 9: e29773.
- Mahdizade VA, Nassaj Hosseini SM, Safaie N, Saidi A (2013) Practical Guide of NCBI. Agricultural Extension and Education Publishers (In Farsi).
- Misumi O, Yoshida Y, Nishida K, Fujiwara T, Sakajiri T, Hirooka S, Nishimura Y, Kuroiwa T (2008). Genome analysis and its significance in four unicellular algae, *Cyanidioshyzon merolae*, *Ostreococcus tauri*, *Chlamydomonas reinhardtii*, and *Thalassiosira pseudonana*. *Journal of plant research*, 121(1), pp.3-17.
- Mo H, Wang X, Zhang Y, Zhang G, Zhang J, Ma Z (2015) Cotton polyamine oxidase is required for spermine and camalexin signalling in the defence response to *Verticillium dahliae*. *The Plant Journal* 83: 962-975
- Moschou PN, Sanmartin M, Andriopoulou AH, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ, Roubelakis-Angelakis K (2008) Bridging the gap between plant and mammalian polyamine catabolism: a novel peroxisomal polyamine oxidase responsible for a full back-conversion pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 147: 1845-1857.
- Ono Y, Kim DW, Watanabe K, Sasaki A, Niitsu M, Berberich T, Takahashi Y (2012) Constitutively and highly expressed *Oryza sativa* polyamine oxidases localize in peroxisomes and catalyze polyamine back conversion. *Amino acids* 42: 867-876.
- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature methods* 8: 785.
- Saidi, A, Hajibarat Z (2018). In silico analysis of floral mads-box gene in *brachypodium distachyon*. *Bionature*, 366-375.
- Saidi A, Hajibarat Z (2019). Characterization of cis-elements in hormonal stress-responsive genes in *Oryza sativa*. *AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.* 27(95-102).
- Samasil K, de Carvalho LL, Mäenpää P, Salminen TA, Incharoensakdi A (2017) Biochemical characterization and homology modeling of polyamine oxidase from cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiology and Biochemistry* 119: 159-169.
- Seddigh S, Darabi M (2014) Comprehensive analysis of beta-galactosidase protein in plants based on *Arabidopsis thaliana*. *Turkish Journal of Biology* 38: 140-150.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Thompson JD (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539.

- Sippl MJ (1993) Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 17: 355-362.
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C (2004). Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics*, 4(6), pp.1581-1590.
- Tavladoraki P, Rossi MN, Saccuti G, Perez-Amador MA, Polticelli F, Angelini R, Federico R (2006) Heterologous expression and biochemical characterization of a polyamine oxidase from *Arabidopsis* involved in polyamine back conversion. *Plant Physiology* 141: 1519-1532.
- Wang P, Cheng T, Wu S, Zhao F, Wang G, Yang L, Lu M, Chen J, Shi J (2014) Phylogeny and molecular evolution analysis of PIN-FORMED 1 in angiosperm. *PloS one* 9: p.e89289.
- Wang W, Liu JH (2015) Genome-wide identification and expression analysis of the polyamine oxidase gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Gene* 555: 421-429.
- Wiederstein M, Sippl MJ (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), pp.W407-W410.
- Yu, CS, Chen, YC, Lu CH, Hwang JK (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), pp.643-651.