

«مقاله پژوهشی»

مطالعه بیوانفورماتیکی پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم (CPK) در گیاه آلورپوس (*Aeluropus littoralis* L.) لیتورالیس

مژده عرب^۱، حمید نجفی زرینی^۲، قربانعلی نعمت‌زاده^۳، سیدحمیدرضا هاشمی‌پطرودی^{۴*}

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۳. استاد، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

۴. استادیار، گروه مهندسی ژنتیک و بیولوژی، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۱۹)

Bioinformatics analysis of calcium-dependent protein kinase (CPK) in *Aeluropus littoralis* L.

Mozhdeh Arab¹, Hamid Najafi Zarrini², Ghorbanali Nematzadeh³, Seyyed Hamidreza Hashemipetroodi^{4*}

1. M.Sc. Student in Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

2. Associated Professor, Department of Biotechnology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU), Sari, Iran.

3. Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU)

4. Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biology, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan (GABIT), Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (SANRU)

(Received: Dec. 26, 2020 - Accepted: Jun. 9, 2021)

Abstract

Calcium-dependent protein kinase (CPK), as a member of Ser/Thr kinases superfamily, plays a vital role in responding and adapting to biotic and abiotic stresses. The halophyte plant, *Aeluropus littoralis*, has been considered an attractive model to improve genetic resources of crops and plant stress genomic research. In order to identify the *A. littoralis* CPK gene family, the whole genome sequences were used to analyze the phylogenetic relationships, exon/intron structure, protein motif/domain organization and the prediction of protein-protein interaction networks. Fourteen *AICPK* genes were identified in *A. littoralis* that were homologous to nine *Arabidopsis thaliana* CPK genes. The protein domain analysis of *AICPK* showed that all studied genes belong to the CPK family due to having several EF-hand (except for *AICPK29.2*, which does not have an EF-hand domain) and Kinase domains. *AICPK29.2* protein had the lowest molecular weight and aliphatic index, the highest instability index and gravity among the studied proteins. Gene structure analysis showed that most of *AICPKs* (69.8%) have more than seven exons. Besides, *AICPK8* protein was predicted with two N-myristoylation and two palmitoylation motifs, while *CPK34.1* protein lacked N-myristoylation, and palmitoylation motif and *AICPK5.1* protein had three palmitoylation motifs. Transcriptome analysis of 34 members of the *AtCPK* gene family in five abiotic stresses showed that *AtCPK* genes had diverse expression at different treatments, which could be evidence for *AtCPK* tissue/ stress-specific expression. The *ABF4* gene was identified as one of the components of ABA signaling in *AICPK* protein-protein interactions. The findings of this research can be used to classify the roles and pathways of the stress response by studying *AICPK* gene expression under different abiotic stresses.

Keywords: Calcium sensors, CDPK, gene network, Genomic-wide analysis, kinases.

چکیده

پروتئین کیناز وابسته به کلسیم (CPK) به عنوان عضوی از ابرخانواده کینازهای Ser/Thr، نقشی حیاتی در پاسخ و سازگاری به تنش دارد. گیاه هالوفیت، *Aeluropus littoralis*، به عنوان یک مدل ارزشمند برای بهبود منابع ژنتیکی گیاهان زراعی و تحقیقات ژنومیکس تنش مورد توجه می‌باشد. به منظور شناسایی خانواده ژنی CPK در گیاه آلورپوس لیتورالیس (*AICPK*)، از داده‌های ژنومی برای تجزیه و تحلیل روابط فیلوژنتیک، ساختار اگزون/اینترون، سازماندهی موتیف‌ها/ دامنه‌ها و پیش‌بینی شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین-پروتئین استفاده شد. ۱۴ ژن *AICPK* در این گیاه شناسایی شد که از همولوژی بالایی با نه ژن آرآبیدوپسیس تالیانا برخوردار بودند. بررسی اعضای خانواده ژنی *AICPK* در پایگاه‌های اختصاصی دمین نشان داد که همه ژن‌های مورد بررسی (به جز *AICPK29.2*) با توجه به دارا بودن چند دمین EF-hand و Kinase به خانواده ژنی CPK تعلق دارند. پروتئین *AICPK29.2* دارای کمترین وزن مولکولی و شاخص آلیفاتیک، بیشترین شاخص ناپایداری و هیدروپاتی در بین پروتئین‌های مورد بررسی بوده است. تجزیه و تحلیل ساختار ژنی نشان داد که بیشتر *AICPK*ها (۶۹/۸٪) بیش از هفت اگزون برخوردارند. پروتئین *AICPK8* دارای دو موتیف میریستویلاسیون و دو موتیف پالمیتویلاسیون بود، پروتئین *CPK34.1* فاقد موتیف میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون و پروتئین *AICPK5.1* دارای سه موتیف پالمیتویلاسیون می‌باشد. بیان مقایسه‌ای ۳۴ عضو خانواده ژنی *AtCPK* در پنج تنش غیرزنده نشان داد که اعضای خانواده ژنی در سطوح مختلف کنترل و تنش از بیان متفاوتی برخوردار بودند که می‌تواند دلیلی بر بیان بافت-اختصاصی و البته تنش-اختصاصی اعضای این خانواده باشد. ژن *ABF4* به عنوان یکی از اجزای پیام‌رسان ABA، در بررسی تعاملات پروتئین-پروتئین اعضای خانواده *AICPK* شناسایی گردید. نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعات بیان ژن‌های *AICPK* تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف به منظور شناسایی عملکردها و سازکارهای پاسخ به تنش سودمند باشد.

واژه‌های کلیدی: حسگرهای کلسیم، شبکه ژن، کیناز، گستره ژنومی، CPK.

مقدمه

کلسیم (Ca^{2+}) به‌عنوان پیام‌رسان ثانویه در سلول‌های گیاهی بوده که در رشد، نمو، تکامل و سازگاری به تنش‌های محیطی نقش دارد (Bi et al., 2021). پیام‌های خارجی منجر به افزایش موقتی غلظت یون کلسیم آزاد در سیتوزول می‌شوند. به این ترتیب که یون کلسیم با اتصال به پروتئین‌های متصل‌شونده به کلسیم (CBP) یا حسگرهای کلسیم^۱، موجب رمزگشایی پیام‌ها شده که نهایتاً به تغییرات سلولی در فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی ختم می‌شود (Tian et al., 2020). تاکنون پنج نوع حسگر یون کلسیم در گونه‌های مختلف گیاهی شناسایی شده که شامل کالمادولین (CaM)، پروتئین شبه‌کلسینورین B^۲ (CBL)، پروتئین کیناز وابسته به کلسیم/ کالمادولین (CcaMK) و پروتئین کیناز وابسته به کلسیم^۳ (CDPK/CPK) می‌باشد (Schulz et al., 2013). در مقایسه با پروتئین‌های CaM، CBL و CML، CPKها مستقیماً پیام Ca^{2+} را به آشارهای فسفوریلاسیون تبدیل می‌نمایند، که همین امر CPKها را به مولکول‌هایی با عملکرد دوگانه، یعنی حسگرهای کلسیم و پاسخ‌دهنده تبدیل می‌کند (Harper et al., 2004). بیشتر تحقیقات شناسایی و تعیین مشخصه‌سازی CPKها عمدتاً در تنش‌های غیرزیستی سریع و پاسخ‌های پیام‌رسانی مرتبط با ایمنی گیاه صورت گرفته است. در حالی که به نسبت، تحقیقات کمتری در خصوص عملکرد CPKها در فرآیندهای سازگاری طولانی مدت یا رشد گیاه انجام گرفته است (Schulz et al., 2013).

CPKها در گیاهان عالی، جلبک‌های سبز، اومایست‌ها و پروتست‌ها^۴ شناسایی شده است، اما در حیوانات و قارچ‌ها وجود ندارند. در حالی که کینازهای مرتبط با CPK^۵ (CRK) تنها فقط در گیاهان مشاهده می‌شوند (Hrabak et al., 2003). CRKها هر چند به لحاظ ساختار پروتئینی مشابه با CPKها بوده ولی به دلیل دامنه کالمادولین دژنره امکان اتصال یون کلسیم در آنها وجود ندارد (Harper et al., 2004). همانگونه که در شکل ۱ (الف) نشان داده شده CPKها از چهار دامنه‌ی عملکردی برخوردارند که شامل دامنه سرین/ ترئونین کیناز (STKD یا K)، دامنه متغیر انتهایی آمینی (V)، دامنه خودمهاری^۶ (AID) یا سوبسترای کاذب (PS) و نهایتاً دامنه‌ی شبه- کالمادولینی (CLD) می‌باشند (Schulz et al., 2013; Hamel et al., 2014). دامنه STKD در واقع دامنه کاتالیزوری اتصال ATP با درجه حفاظت‌شدگی بسیار بالا بوده که در مجاورت دامنه خودمهاری قرار دارد. دامنه انتهایی آمینی شامل جایگاه‌های میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون است که برای مکان‌یابی در سلول و عملکرد مولکولی بسیار مهم بوده (Bi et al., 2021) ضمن این که بالاترین واگرایی^۷ توالی را در بین دامنه‌های CPK نشان می‌دهند (Ahmed et al., 2020). AIDها حاوی یک توالی سوبسترای کاذب بوده که جهت تعامل با سایت‌های فعال یا مهار فعالیت کینازی عمل می‌نمایند. دامنه شبه‌کالمادولین شامل یک تا چهار موتیف EF-hand برای اتصال یون کلسیم می‌باشد. به دلیل این ویژگی‌های منحصر به فرد، CPKها به یون کلسیم حساس بوده و نقش مهمی در تنظیم اجزای پایین‌دست مسیر سیگنالینگ کلسیم دارند (Wernimont et al., 2011; Zhang

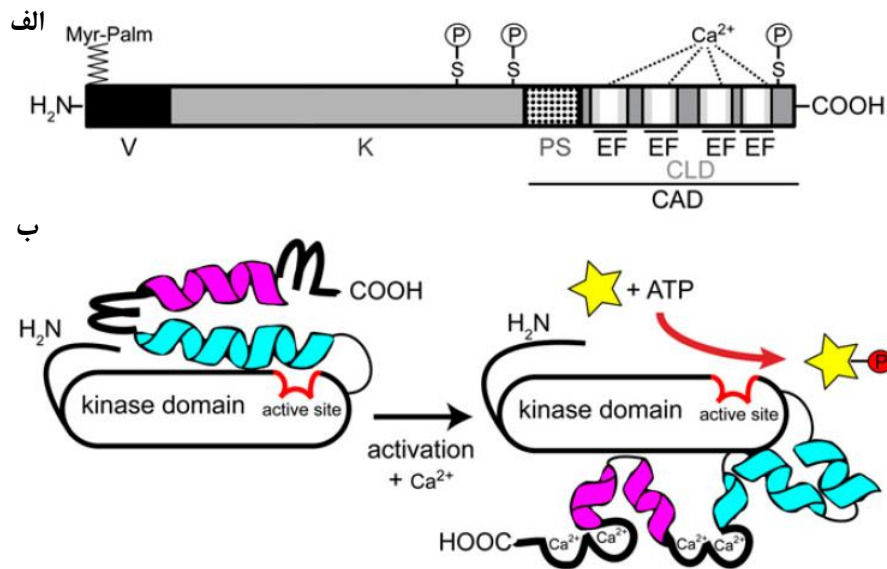
6. Oomycetes and protists
7. CDPK-related kinase (CRK)
8. Auto-inhibitory domain
9. Convergent

1. Calcium binding proteins (CBP)
2. Ca^{2+} sensors
3. Calmodulin-like protein
4. Calcineurin B-like protein
5. Calcium-dependent protein kinase

در *distachyon* (Wen et al., 2020) ۲۰ ژن در گندم (Li et al., 2008)، ۱۱ ژن در توت‌فرنگی (Zhao et al., 2020)، ۲۴ ژن در یونجه (Wang et al., 2021) و ۱۷ ژن در سویا (et al., 2019) شناسایی شده است. با توجه به تعیین توالی WGS ژنوم گیاه *Aeluropus littoralis* این گیاه هالوفیت به عنوان یک مدل هالوفیت تک‌لپه با اندازه ژنوم کوچک برای بهبود منابع ژنتیکی محصولات زراعی و تحقیقات ژنومیکس عملکردی گیاهان علفی مورد توجه قرار گرفته است (Fatemi et al., 2019; Hashemi et al., 2020b). آلورپوس لیتورالیس گیاهی از تیره گندمیان بوده که از سازگاری بالایی به شرایط سخت محیطی و تنش‌های غیرزنده خصوصاً تنش شوری برخوردار است (Hashemi et al., 2020c). این گیاه، علاوه بر تحمل به تنش شوری، به دلیل پتانسیل ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی از سازگاری بالایی به تنش خشکی، گرما و سرما نیز برخوردار است (Hashemi et al., 2012; Hashemi et al., 2014). بنابراین آلورپوس لیتورالیس می‌تواند به‌عنوان یک منبع ژنتیکی غنی جهت شناسایی ژن‌های جدید مرتبط با تحمل به شوری، خشکی و گرما برای اصلاح گیاهان زراعی در نظر گرفته شود (Hashemi et al., 2018; Hashemi et al., 2020d). در این تحقیق به منظور شناسایی خانواده ژنی *CPK* و بررسی رابطه ساختار-عملکرد این ژن‌ها در گیاه آلورپوس لیتورالیس، آنالیز جامعی از سازمان‌دهی ژنوم، ساختار ژنی، شناسایی موتیف‌ها و دامین‌های مختلف پروتئینی مدنظر قرار گرفت. بررسی پروفایل بیان *AtCPK* در تنش‌های مختل شوری، سرما، گرما، تنش اکسیداتیو و خشکی در کنار مطالعه شبکه ژنی تعاملات پروتئین-پروتئین در ژن‌های *AtCPK* از دیگر اهداف تحقیق حاضر می‌باشد.

در شکل ۱ (ب) نحوه فعال‌سازی و کارکرد پروتئین *CPK* نشان داده شده است. اتصال یون کلسیم به موتیف *EF-hand* (حلقه) باعث تغییر ساختار فضایی پروتئین شده، که به‌واسطه آن ماریپیج ۱ (قسمت آبی) و ماریپیج ۲ (قسمت سرخایی) با تشکیل پیچش خاصی به دامنه شبه-کالمادولین متصل می‌شوند. این چرخش به دور دامنه شبه-کالمادولینی باعث افزایش قابلیت دسترسی به دامنه متغیر انتهای آمینی و همچنین جایگاه فعال (بخش قرمز) در دامنه کینازی (بخش سیاه) می‌شود که به نوبه خود امکان فسفوریلاسیون پروتئین‌های سوبسترا را فراهم می‌کند (ستاره زرد، P, Schulz et al., 2013). پروتئین‌های *CPK* توزیع منحصر به فردی در بافت‌ها و اندامک‌های مختلف نشان می‌دهند که با عملکردهای کاملاً متفاوت آنها مطابقت دارد (Gao et al., 2018). گزارش‌های متعددی در خصوص کارکردها *CPK*‌ها در پاسخ گیاه به تنش شوری ارائه شده است. به عنوان مثال در بررسی پاسخ خانواده ژنی *CPK* تحت تنش شوری در گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*)، ۱۹ ژن زود-پاسخ به تنش نمکی و تیمار اتیلن در سطح رونویسی شناسایی شدند که نشان‌دهنده هم‌پوشانی پاسخ به تنش شوری و تیمار اتیلن بود. در بررسی عملکردی این ژن‌ها به روش خاموشی ژن نیز، نقش این ژن‌ها در برابر تحمل به تنش شوری با کاهش تحمل گیاه مورد تایید قرار گرفت (Gao et al., 2018). بیش‌بین ژن *OsCPK7* در برنج تراریخت، افزایش مقاومت در برابر تنش شوری را سبب شده ضمن اینکه القای بیان برخی از ژن‌های پاسخگو به تنش نظیر *rab16A* را در پی داشت (Saijo et al., 2000).

تا به امروز، به کمک تجزیه و تحلیل گسترده ژنوم، ۳۴ ژن *CPK* در آرابیدوپسیس (Hrabak et al., 2003)، ۳۱ ژن در برنج (Asano et al., 2005)، ۳۰ ژن در *Brachypodium*



شکل ۱. ساختار ماجولار ژن *CPK* و نحوه فعال‌سازی آن. الف) ساختار دامنه پروتئین AtCPK28 متشکل از ۵۲۳ اسید آمینه ترسیم گردیده که شامل بخش‌های V، دامنه متغیر انتهای آمینی؛ K، دامنه کینازی؛ PS، بخش سوسترای کاذب؛ CLD، دامنه شبه-کالمادولینی؛ EF، موتیف‌های EF hand. چهار میله سفید درون موتیف‌های EF hand نیز نشان‌دهنده حلقه‌های اتصال کلسیم است. جایگاه‌های مریستولاسیون و پالمیتولاسیون (Myr-Palm)، جایگاه‌های اتوفسفریلاسیون *in vivo* (P) و اسیدآمینه‌های سرین (S) به تصویر کشیده شده است. ب) مدل فعال‌سازی *CPK*. برگرفته از (Schulz *et al.*, 2013).

Prosites، SMART و بررسی شد (Sigrist *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2014; Letunic *et al.*, 2018; El-Gebali *et al.*, 2019).

پایش خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها با استفاده از ابزار ProtParam در سایت ExPasy خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌های *CPK* مانند تعداد اسیدآمینه، وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک (https://web.expasy.org/protparam/) محاسبه شد (Gasteiger *et al.*, 2005). جایگاه سلولی پروتئین‌ها با استفاده از برنامه WoLFPSORT (https://wolfpsort.hgc.jp/) پیش‌بینی شد (Horton *et al.*, 2007).

شناسایی موتیف‌ها و ساختار آگزون-اینترون و شناسایی موتیف‌های palmitoylation و myristoylation با استفاده از برنامه‌های آنالیز

مواد و روش‌ها

شناسایی اعضای خانواده ژنی *CPK* آلورپوس لیتورالیس

برای شناسایی ژن‌های همولوگ *CPK* در گیاه آلورپوس لیتورالیس (*AICPK*)، ابتدا توالی‌های پروتئینی OsCPK و AtCPK برنج و آرابیدوپسیس، به ترتیب از پایگاه‌های تخصصی داده‌های برنج و آرابیدوپسیس یعنی RGAP (http://rice.plantbiology.msu.edu/) و TAIR (https://www.arabidopsis.org/) اخذ شد. در ادامه با استفاده از این توالی به عنوان Query، جستجوی با ابزار Local tBLASTn در توالی ژنوم گیاه آلورپوس لیتورالیس (Hashemi *et al.*, 2020b) با نرم‌افزار BioEdit (Hall *et al.*, 2011) با E-value کمتر از 1E-10 صورت گرفت. پس از دریافت تمام توالی‌ها و حذف توالی‌های تکراری، توالی‌ها دمین‌های این خانواده ژنی در پایگاه‌های Pfam، InterProScan، Scan

در نرم‌افزار GeneSpring (Agilent) بررسی گردیدند. کد ارائه شده در داخل پرانتز، کد دسترسی داده‌های هر تنش در پایگاه اطلاعاتی TAIR می‌باشد. بررسی بیان ژن‌های *AtCPK* در تنش‌های مختلف شامل شوری (150 mM NaCl)، سرما (38 °C for 3 h)، اکسیداتیو (10 uM Methyl viologen)، گرما (38 °C for 3 h) و خشکی (کاهش ۱۰ درصد وزن تر گیاه) در دو بافت برگ و ریشه و در دو زمان ۳۰ دقیقه و ۲۴ ساعت پس از اعمال تنش بوده است (Kilian *et al.*, 2007). اعمال تنش در گیاهچه‌های ۱۸ روزه و در دو تکرار بیولوژیکی و در شرایط نوری 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ بود. تغییرات بیان ژن‌ها در هر تنش نسبت به سطح کنترل (FC) محاسبه گردیده و ارائه نتایج Log2 FC در Heatmap با استفاده از نرم‌افزار heatmap (http://www.heatmap.ca/expression) صورت گرفت. به منظور شناسایی تعاملات مستقیم (فیزیکی) و همچنین غیرمستقیم (عملکردی) پروتئین‌های AICPK، آنالیز شبکه ژنی با استفاده از پایگاه STRING (https://string-db.org) صورت گرفت.

نتایج و بحث

شناسایی اعضای خانواده ژنی CPK در گیاه آلوروپوس لیتورالیس
در این مطالعه از الگوریتم tBLASTn استفاده شد و توالی‌های پروتئینی خانواده CPK آرآبیدوپسیس و برنج، در ژنوم آلوروپوس لیتورالیس برای شناسایی اعضای خانواده ژنی CPK جستجو شد. با بررسی همولوژی این توالی‌ها، ۱۶ ژن کاندید به‌عنوان اعضای خانواده CPK در گیاه آلوروپوس شناسایی شد. برای اطمینان از وجود دامنه‌ی EF-hand و Kinase، توالی‌های شناسایی شده از طریق

PlantsP و CSS-Palm 3.0 (www.mendel.imp.ac.at/myristate) صورت گرفت. موتیف‌های حفاظت‌شده در برنامه MEME (http://meme-suite.org/tools/meme/) با پارامترهای پیش‌فرض (شامل انتخاب موتیف‌ها بدون توجه به دفعات تکرار، شناسایی حداکثر ۱۰ موتیف، E-value کمتر از ۰/۰۰۰۱ و کمترین و بیشترین طول موتیف‌ها به ترتیب ۲۴ و ۵۰ اسیدآمین) شناسایی شد (Bailey *et al.*, 2009). هم‌ردیفی توالی‌های پروتئینی AICPK با استفاده از نرم‌افزار ClustalW انجام و درخت فیلوژنتیک آن‌ها بر اساس روش اتصال همسایه در MEGA 6.0 ترسیم شد (Tamura *et al.*, 2013). در ادامه با استفاده از توالی‌های CDS و ژنی آلوروپوس، ساختار اگزون-اینترون ژن‌های CPK با استفاده از برنامه GSDB (http://gsds.cbi.pku.edu.cn/) ترسیم گردید.

آنالیز بیان ژن‌های *AtCPK*

در این تحقیق با توجه به محدود بودن مطالعات بیانی در گیاه آلوروپوس لیتورالیس، بیان ژن‌های اورتولوگ CPK در گیاه مدل آرآبیدوپسیس در تنش‌های مختلف غیرزیستی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور پروفایل بیانی خانواده ژنی *AtCPK* با استفاده از داده‌های ریزآرایه چیپ افی‌ماتریکس ATH1 (ATLAS Niolabs GmbH, Berlin, Germany) ارائه شده در پروژه اطلس بیانی AtGenExpress مورد بررسی قرار گرفت (Schmid *et al.*, 2005). داده‌های بیانی تنش‌های مختلف نظیر تنش سرما (ME00325)، تنش خشکی (ME00338)، تنش UV-B (ME00329)، تنش شوری (ME00328)، تنش اکسیداتیو (ME00340) و تنش گرمایی (ME00339) پس از دریافت از سایت TAIR (http://www.arabidopsis.org)

و *AICPK29.2* به ژن *AtCPK29* با کد دسترسی AT1G76040.2 به ترتیب با درصد همسانی ۷۰/۲۴ و ۵۴/۵۵، ژن‌های *AICPK34.1* و *AICPK34.2* به ژن *AtCPK34* با کد دسترسی AT5G19360.1 به ترتیب با درصد همسانی ۷۵/۰۰ و ۷۶/۴۱ شباهت داشت. در این تحقیق نامگذاری ژن‌های *AICPK5* با توجه به داشتن درصد همسانی مشابه، بر اساس جایگاه این ژن‌ها در درخت فیلوژنتیکی صورت گرفت (Dezhsetan *et al.*, 2018).

تجزیه و تحلیل دمین‌ها و موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های *AICPK*

بررسی اعضای خانواده ژنی *AICPK* در پایگاه‌های اختصاصی دمین نشان داد که همه ژن‌های مورد بررسی (به جز *AICPK29.2*) با توجه به دارا بودن چند دمین EF-hand و Kinase به خانواده ژنی CPK تعلق دارند (جدول ۱). تمام ژن‌ها در دو پایگاه Pfam و InterProScan دارای دمین EF-hand و Kinase به ترتیب به شماره دسترسی PF00069، PF13499 و IPR000719، IPR011009 بودند. برای پروتئین *AICPK29.2* در نرم‌افزار Pfam، نمای شماتیکی از موتیف EF-hand ارائه نشده و پروتئین ژن‌های *AICPK7.1* و *AICPK7.2* و *AICPK34.1* فاقد موتیف کامل EF-hand می‌باشند. بررسی در سایت SMART نشان داد تمام ژن‌ها، دارای چهار موتیف EF-hand و یک دمین S-TKc می‌باشند، به جز *AICPK7.2* که دارای دو موتیف EF-hand بوده، *AICPK29.2* فاقد دمین EF-hand و *AICPK34.1* دارای سه موتیف EF-hand می‌باشد. شماره دسترسی موتیف EF-hand به Kinase شناسایی شده در پایگاه ScanProsite به ترتیب به PS50011 و PS50222 بوده و نتایج مشاهده شده مشابه نتایج Pfam و SMART بود.

پایگاه‌های Pfam، Scan Prosite، InterProScan و SMART بررسی شد دو توالی ژنی به دلیل عدم وجود دامنه‌ی کینازی حذف شدند که در نهایت ۱۴ ژن، به‌عنوان اعضای خانواده CPK در گیاه آلوروپوس مورد تایید قرار گرفت که در ۱۴ کانتینگ مختلف قرار داشتند. نام‌گذاری ژن‌های *CPK* با توجه به روابط فیلوژنتیک و مشابهت توالی آنها با ژن‌های اورتولوگ آراییدوپسیس صورت گرفت (Hashemi *et al.*, 2019). بدین صورت که ابتدا پیشوند Al به ابتدای هر ژن اضافه گردید و در ادامه شماره هر ژن بر مبنای شماره ژن همولوگ آن در آراییدوپسیس انتخاب شد. در صورت وجود بیش از یک ژن آلوروپوس برای هر ژن همولوگ آراییدوپسیس، شماره‌گذاری ورژن هر ژن بر اساس میزان همسانی ژن‌ها به اورتولوگ‌شان در آراییدوپسیس به ترتیب از یک انجام شد. ژن *AICDPK1* به ژن *AtCPK1* با کد دسترسی AT5G04870.1 با درجه همسانی ۶۹/۵۸ درصد، ژن *AICPK3* به ژن *AtCPK3* با کد دسترسی AT4G23650.1 با درجه همسانی ۸۰/۰۴ و ژن‌های *AICPK5.1* و *AICPK5.2* به ژن *AtCPK5* با کد دسترسی AT4G35310.1 با ترتیب با درصد همسانی ۷۰/۳۶ و ۸۸/۲۴، ژن‌های *AICPK7.1* و *AICPK7.2* به ژن *AtCPK7* با کد دسترسی AT5G12480.1 به ترتیب با درصد همسانی ۷۳/۷۳ و ۵۷/۸۴، ژن *AICPK8* به ژن *AtCPK8* با کد دسترسی AT5G55990.1 با همسانی ۶۶/۴۲ درصد تشابه، ژن‌های *AICPK13.1* و *AICPK13.2*، به ژن *AtCPK13* با کد دسترسی AT3G51850.1 به ترتیب با درصد همسانی ۷۹/۴۱ و ۶۴/۰۸، ژن *AICPK21* به ژن *AtCPK21* با کد دسترسی AT4G04720.1 با همسانی ۷۵/۷۰ درصد تشابه، ژن‌های *AICPK29.1*

جدول ۱. ساختار دامین‌های شناسایی شده در خانواده ژنی CPK در گیاه آلورپوس لیتورالیس.

سازماندهی دامین		همولوژی با ژن‌های <i>AtCPK</i>			کد دسترسی				
Domain organization			Homology to <i>AtCPK</i>		Accession no.				
SMART	Pfam	Scan Prosite	مجموع امتیاز	همپوشانی	اسم ژن				
SM00220/SM00054	PF00069/PF13499	PS50011/PS50222	Total score	Coverage	Contig no.	Gene name			
				Ident.					
						<i>A. thaliana</i>	<i>A. littoralis</i>		
			806	89%	80.04%	contig_4475	<i>AICPK3</i>	AT4G23650.1	Alg9468
			523	99%	76.41%	contig_67700	<i>AICPK3.2</i>	AT5G19360.1	Alg12809
			536	97%	64.08%	contig_521	<i>AICPK1.3.2</i>	AT3G51850.1	Alg10689
			761	99%	66.42%	contig_66767	<i>AICPK8</i>	AT5G19450.1	Alg12703
			254	50%	54.55%	contig_60242	<i>AICPK29.2</i>	AT1G76040.2	Alg11866
			753	99%	88.24%	contig_1816	<i>AICPK5.2</i>	AT4G35310.1	Alg3815
			635	90%	57.84%	contig_17496	<i>AICPK7.2</i>	AT5G12480.1	Alg3616
			782	97%	70.36%	contig_20247	<i>AICPK5.1</i>	AT4G35310.1	Alg4314
			704	84%	70.24%	contig_1409	<i>AICPK29.1</i>	AT1G76040.2	Alg2369
			799	92%	75.70%	contig_2849	<i>AICPK21</i>	AT4G04720.1	Alg6178
			702	99%	75.00%	contig_74295	<i>AICPK34.1</i>	AT5G19360.1	Alg13599
			814	99%	73.73%	contig_25934	<i>AICPK7.1</i>	AT5G12480.1	Alg5648
			887	98%	79.41%	contig_74324	<i>AICPK13.1</i>	AT3G51850.1	Alg13606
			837	98%	69.58%	contig_1722	<i>AICPK1</i>	AT5G04870.1	Alg3533

پروتئین است که اثر مثبتی بر افزایش مقاومت حرارتی پروتئین‌های کروی دارد (Jalili *et al.*, 2019). طول پروتئین‌های این خانواده از ۴۰۶ اسیدآمین (AICPK13.2) الی ۵۹۳ اسیدآمین (AICPK1) و دامنه نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها از ۵/۱۳ در AICPK5.2 تا ۷/۵۷ در AICPK7.2 متغیر بوده. همان‌طور که اشاره شد غیر از پروتئین AICPK7.2، همه پروتئین‌ها دارای نقطه ایزوالکتریک اسیدی می‌باشند. نتایج مشابه در گوجه‌فرنگی (Wang *et al.*, 2016) و سیب‌زمینی (Bi *et al.*, 2021) نیز حاکی از اسیدی بودن نقطه ایزوالکتریک اکثر CPK‌ها بوده است. شایان ذکر است پروتئین‌های StCPK5 و StCPK6 گیاه سیب‌زمینی که از تعداد موتیف hand-EF کمتری برخوردار بودند نیز دارای نقطه ایزوالکتریک قلیایی بودند. لازم به ذکر است در این تحقیق، پروتئین AICPK29.2 دارای کمترین وزن مولکولی و شاخص آلفاتیک، بیشترین شاخص ناپایداری و GRAVY (شاخص هیدروپاتی) در بین پروتئین‌های مورد بررسی بوده است. همه پروتئین‌های شناسایی شده دارای شاخص GRAVY منفی بودند که نشان‌دهنده آبدوست بودن این پروتئین‌ها می‌باشد (Rezaee *et al.*, 2020). پروتئین‌های AICPK

پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها در گیاه آلورپوس

پایش ویژگی‌های فیزیوشیمیایی پروتئین‌ها می‌تواند در تعیین فرایندهای بیولوژیکی، کارکرد مولکولی و مکان‌یابی آن‌ها در سلول تأثیرگذار باشد. ارزیابی این سیلیکو ویژگی‌های فیزیوشیمیایی در پروتئین‌های CPK به آشکارسازی وزن مولکولی متغیر در محدوده ۴۵/۰۰۴ الی ۶۰/۷۳۱ کیلوالتون، محدوده نقطه ایزوالکتریک اسیدی همه CPK‌ها (به جز AICPK7.2)، شاخص ناپایداری ۵/۱۳ تا ۷/۵۷ درصد و شاخص آلفاتیک ۷۵/۱۷ تا ۹۱/۱۷ منجر شد. همان‌طور که در جدول ۲ دیده می‌شود پروتئین AICPK7.2 بیشترین وزن مولکولی را داشته در حالی که منفی‌ترین بار الکتریکی به AICPK3 اختصاص داشت. بیشترین و کمترین شاخص آلفاتیک به ترتیب به دو پروتئین AICPK5.2 و AICPK29.2 و بیشترین و کمترین شاخص ناپایداری به ترتیب به پروتئین‌های AICPK29.2 و AICPK34.1 تعلق داشت. شاخص آلفاتیک حجم نسبی زنجیره آلفاتیک در آمینو اسیدهای آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین

1. Localization

غشایی بودند هر چند که حضور این موتیف‌ها در SiCPK مرتبط با زیرگروه‌های فیلوژنتیکی آنها بود (Wang *et al.*, 2016). از بین ۱۸ CmCPK شناسایی شده در خربزه نیز، هفت CmCPK دارای موتیف میریستویلاسیون و ۱۶ ژن حاوی موتیف پالمیتویلاسیون بودند در حالی که دو CmCPK فاقد هر دو جایگاه میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون بودند (Kong *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2017b).

شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین‌های AICPK

برای شناسایی موتیف‌های حفاظت‌شده و تعیین موقعیت این موتیف‌ها در دمین‌های EF-hand و Kinase، پروتئین‌های CPK آلوروپوس با استفاده از نرم‌افزار MEME مورد آنالیز قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل MEME با توجه به پارامترهای پیش فرض نرم‌افزار نشان داد که CaCPK‌ها دارای ۱۰ موتیف حفاظت‌شده بوده (شکل ۲-الف) که به صورت Motif-1 تا Motif-10 نامگذاری شده‌اند.

در شکل ۲-ب نحوه پراکنش موتیف‌های مختلف در پروتئین‌های مختلف AICPK نشان داده شده است. همه موتیف‌های حفاظت‌شده، در پروتئین‌های AICPK1 و AICPK3 و AICPK5.1 و AICPK13.1 و AICPK21 و AICPK29.1 موجود می‌باشند. پروتئین AICPK7.1 و AICPK8 فاقد موتیف چهار، پروتئین AICPK5.2 فاقد موتیف شش، پروتئین AICPK34.2 فاقد موتیف نه می‌باشند. پروتئین AICPK34.1 فاقد موتیف‌های نه و ده، پروتئین AICPK7.2 فاقد موتیف‌های هفت و ده و پروتئین AICPK13.2 فاقد موتیف‌های شش، هشت و نه می‌باشند. پروتئین AICPK29.2 دارای چهار موتیف یک، دو، سه و نه می‌باشد. سه موتیف یک، دو و سه در همه CPK‌ها وجود دارد.

دارای تنوع بالایی در خصوصیات فیزیکی‌شیمیایی مورد بررسی بودند که نشان می‌دهد این پروتئین‌ها در مسیرهای مختلف سلولی درگیر هستند (Ahmadizadeh *et al.*, 2020).

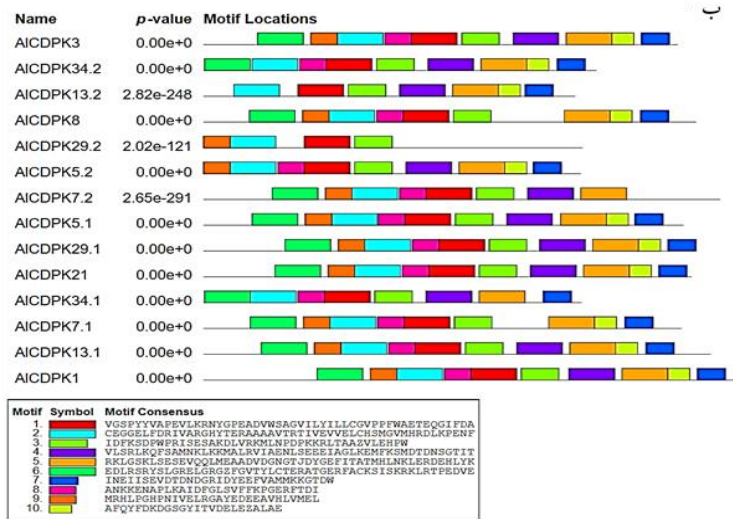
تغییرات پس از ترجمه میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون

میریستویلاسیون^۱ و پالمیتویلاسیون^۲ دو فرآیند پس از ترجمه بوده که در حسگرهای پروتئینی کلسیم (به جز پروتئین‌های کالمادولین) به منظور هدایت و مکان‌یابی پروتئین‌ها در سلول صورت می‌گیرد (Mohanta *et al.*, 2017). میریستویلاسیون نقشی حیاتی در شناسایی غشا و انتقال پیام پاسخ به تنش محیطی در گیاهان داشته، ضمن اینکه می‌تواند بر پایداری ساختاری پروتئین‌ها و همچنین توانایی آنها در تعامل با غشاها یا دمین‌های آبگریز سایر پروتئین‌ها اثر گذارد (Podell *et al.*, 2004). با بررسی توالی پروتئینی CPK، موتیف‌های میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون در برخی از اعضای خانواده ژنی شناسایی شدند (جدول ۲). موتیف میریستویلاسیون در همه CPK‌های آلوروپوس، به جز AICPK34.2 و AICPK13.2، موتیف پالمیتویلاسیون در همه CPK‌های آلوروپوس، به جز AICPK29.2 و AICPK5.2 مشاهده شد. پروتئین AICPK8 دارای دو موتیف میریستویلاسیون و دو موتیف پالمیتویلاسیون بوده، در حالی که ژن *CPK34.1* فاقد موتیف میریستویلاسیون و پالمیتویلاسیون می‌باشد. پروتئین AICPK5.1 دارای سه موتیف پالمیتویلاسیون بوده که دو موتیف آن دارای توالی مشابه (SSSSSSCCSGKSGS-SSSSSSCCSGKSGST) می‌باشند. بررسی‌ها نشان می‌دهد ۱۴ ژن CPK گوجه‌فرنگی نیز دارای موتیف میریستویلاسیون انتهایی آمینی برای ارتباط

1. N-myristoylation
2. Palmitoylation

جدول ۲. خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین های AICPK

Palmitoylation	N-Myristoylation: MGXXXS/T	GRAVY	شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	شاخص ناپایداری Instability index	نقطه ایزوالکتریک Isoelectric point	وزن مولکولی Molecular weight (kDa)	تعداد اینترون Intron number	تعداد اگزون Exon number	طول پروتئین Protein length (aa)	نام ژن Gene Name
94 ATGRRYACKSIAARK	2 MGGRASRHR	-0.564	77.41	49.11	6.21	58.693	7	8	518	AICPK3
6 MEDVKCTYTIGKE	————	-0.409	83.68	33.59	5.27	48.234	8	9	429	AICPK34.2
54 KEDIEDLCAGGELFD	————	-0.327	86.48	38.54	5.18	45.323	5	6	406	AICPK13.2
402 SSLSRKLCCKETS	————	-0.492	77.54	40.39	6.49	57.47	7	8	512	AICPK8
4 MGNCCTPATQ	2 MGNCCTPATQ	-0.157	75.17	59.15	5.58	45.004	2	3	414	AICPK29.2
5 MGNCCTPATQ	6 MGNCCTPATQGG	-0.218	91.17	36.57	5.13	46.169	6	7	412	AICPK5.2
————	6 MARLAGHPNVVDL	-0.42	84.30	37.99	7.57	60.731	7	8	539	AICPK7.2
4 MGGCYSVIAVT	2 MGGCYSVIA	————	————	————	————	————	————	————	————	————
5 MGNSCRGDYDY	3 MGGCYSVIAV	-0.197	85.65	40.66	5.41	57.538	2	3	524	AICPK5.1
26 SSSSSSSCCSGKSGS	2 MGNSCRGDY	-0.451	76.88	48.41	6.47	60.336	7	8	538	AICPK29.1
27 SSSSSSSCCSGKSGT	————	-0.447	75.59	41.92	5.90	59.797	7	8	533	AICPK21
4 MGNCTKTYEI	2 MGNCTKTY	-0.400	85.98	29.76	5.74	46.441	6	7	413	AICPK34.1
5 MGNCTKTYEIP	————	-0.446	82.57	36.80	5.94	58.570	7	8	522	AICPK7.1
4 MGQCCSRSTAP	2 MGQCCSRST	-0.447	82.73	41.53	6.32	61.584	6	7	554	AICPK13.1
5 MGQCCSRSTAPD	————	-0.317	83.52	42.77	5.57	65.353	6	7	593	AICPK1
4 MGNCVTPSGA	2 MGNCVTPS	————	————	————	————	————	————	————	————	————
5 MGNCVTPSGAD	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————
4 MGNCRSPAAA	2 MGNCRSPA	————	————	————	————	————	————	————	————	————
5 MGNCRSPAAAA	————	————	————	————	————	————	————	————	————	————
5 MGNTCVGPSITK	2 MGNTCVGPS	————	————	————	————	————	————	————	————	————



شکل ۲. آنالیز موتیف در توالی های پروتئینی CPK. (الف) موتیف لوگو توالی پروتئین های AICPK ترسیم شده در برنامه MEME. اندازه هر اسید آمینه، بیانگر فراوانی آن در موتیف مربوطه می باشد. (ب) پراکنش موتیف های شناسایی شده در توالی پروتئینی.

دیگر اگرچه طول این ژن‌ها متفاوت است ولی تعداد و یا موقعیت درج اینترون‌ها در آنها مشابه به نظر می‌رسد (Wang *et al.*, 2016).

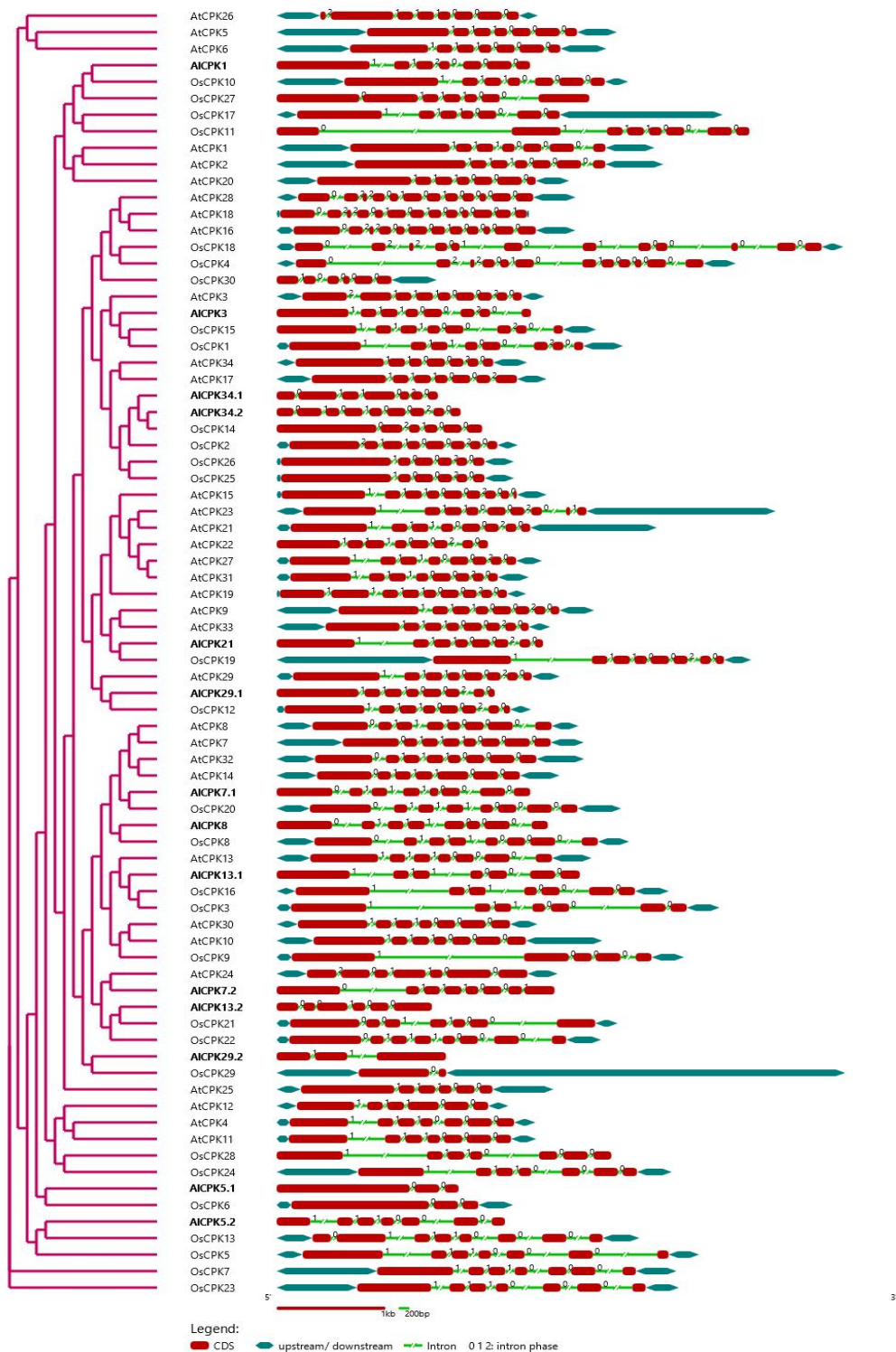
در بررسی فاز اسپلایسینگ^۱، طبقه‌بندی اینترون‌ها در سه فاز مختلف صورت می‌گیرد اینترون‌های فاز صفر (0) بین دو کدون متوالی وجود دارند، اینترون‌های فاز یک (1) بین نوکلئوتید اول و دوم یک کدون و نهایتاً اینترون‌های فاز دو (2) بین نوکلئوتید دوم و سوم یک کدون وجود دارند (Kaur *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2016). در شکل ۳ آرایش ساختار اگزون-اینترون و ترتیب فازهای اینترون ژن‌های *AtCBL*، *OsCBL* و *AICBL* نشان داده شده است. اکثر ژن‌های *AtCBL*، *OsCBL* و *AICBL* دارای اینترون فاز یک و صفر می‌باشند و ژن‌های *AtCPK26*، *AtCPK3*، *AtCPK24* و *OsCPK2* دارای اینترون فاز ۲ هستند (اولین اینترون معیار بررسی است) در حالی که *AICPK*‌ها دارای فاز یک و صفر می‌باشند. بررسی رابطه هومولوژی بر مبنای ترسیم درخت فیلوژنتیکی در سه گیاه آلوروپوس، آراییدوپسیس و برنج نشان داد برخی از ژن‌های آلوروپوس از جمله ژن *AICPK3* (ژن *AtCPK3*)، ژن *AICPK29.1* (*AtCPK29*)، ژن *AICPK29.2* (*OsCPK29*)، ژن *AICPK8* (*OsCPK8*)، ژن *AICPK13.1* (*AtCPK13*)، ژن *AICPK5.2* (*OsCPK5*)، ژن *AICPK7.1* (*AtCPK7*) و ژن *AICPK21* (*AtCPK21*)، در کنار ژن‌های اورتولوگ خود در دو گیاه آراییدوپسیس و برنج قرار گرفتند. بر اساس نتایج ژنومیکس مقایسه‌ای می‌توان کارکرد این ژن‌های آلوروپوس را بر اساس کارکرد ژن‌های همولوگ آنها در آراییدوپسیس و برنج پیش‌بینی نمود (Ladan *et al.*, 2020).

بررسی نتایج نشان می‌دهد توزیع مکانی موتیف‌ها، در پروتئین‌های آلوروپوس، تقریباً یکسان بود. وجود موتیف‌های حفاظت‌شده در میان اعضای یک خانواده ژنی، شواهدی در خصوص کارکرد و عملکرد این ژن‌ها به لحاظ عملکرد مولکولی و مسیر بیولوژیکی ارائه می‌دهد. بنظر می‌رسد پروتئین‌هایی که از ترکیب موتیف مشابه‌ای برخوردارند احتمالاً عملکردهای مشابهی را بروز می‌دهند (El-Gebali *et al.*, 2019). همچنین برخی از موتیف‌ها در خارج از ناحیه فعال پروتئینی مشاهده شد که وجود آنها نشان‌دهنده عملکردهای ویژه این پروتئین‌ها می‌باشد (Heidari *et al.*, 2019) که نیاز است در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرند.

شناسایی ساختار ژنی و روابط فیلوژنتیکی

بررسی ساختار اگزون-اینترونی خانواده ژنی *CPK* نشان داد که ۴۲/۸ درصد ژن‌های *AICPK* دارای هشت اگزون و هفت اینترون، ۲۸/۶ درصد ژن‌ها دارای هفت اگزون و شش اینترون و حدود ۱۴ درصد ژن‌های *CPK* آلوروپوس دارای سه اگزون و دو اینترون، حدود ۷ درصد ژن‌ها دارای نه اگزون و هشت اینترون و حدود ۷ درصد ژن‌ها دارای شش اگزون و پنج اینترون هستند. تجزیه و تحلیل ساختار ژن در دیگر گیاهان نشان می‌دهد که بیشتر *CPK*‌های گیاهان سیب‌زمینی (Bi *et al.*, 2021)، ارزن داماسی (Yu *et al.*, 2018) و هندوانه (Wei *et al.*, 2019) از ۶ یا ۷ اینترون برخوردارند در حالی که در سویا (Liu *et al.*, 2016)، تعداد اینترون‌ها بیشتر از این مقدار می‌باشد. در گیاه آلوروپوس طویل‌ترین طول ژن مربوط به ژن *AICPK13.1* و کوتاه‌ترین طول ژن مربوط به *AICPK13.2* می‌باشد (شکل ۳). آن‌گونه که از روابط تکاملی پروتئین‌های *CPK* برداشت می‌شود، بسیاری از اعضای *CPK* که در زیرگروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند از ساختارهای اینترون / اگزون بسیار مشابهی برخوردارند از جمله تعداد اینترون و طول اگزون / اینترون. به عبارت

1. Splicing phase



شکل ۳. آنالیز ساختار ژنی و درخت فیلوژنتیکی اعضای خانواده CPK در آلوروپوس لیتورالیس، آرابیدوپسیس تالیانا و برنج

اعضای خانواده ژنی در سطوح مختلف کنترل و تنش از بیان متفاوتی برخوردار بودند. همانگونه که در شکل ۴، نمای Heatmap و خوشه‌بندی سلسله

آنالیز ترانسکریپتومیکس *AtCPK* بیان مقایسه‌ای ۳۴ عضو خانواده ژنی CPK در پنج تنش غیرزنده و در دو زمان مختلف نشان داد که

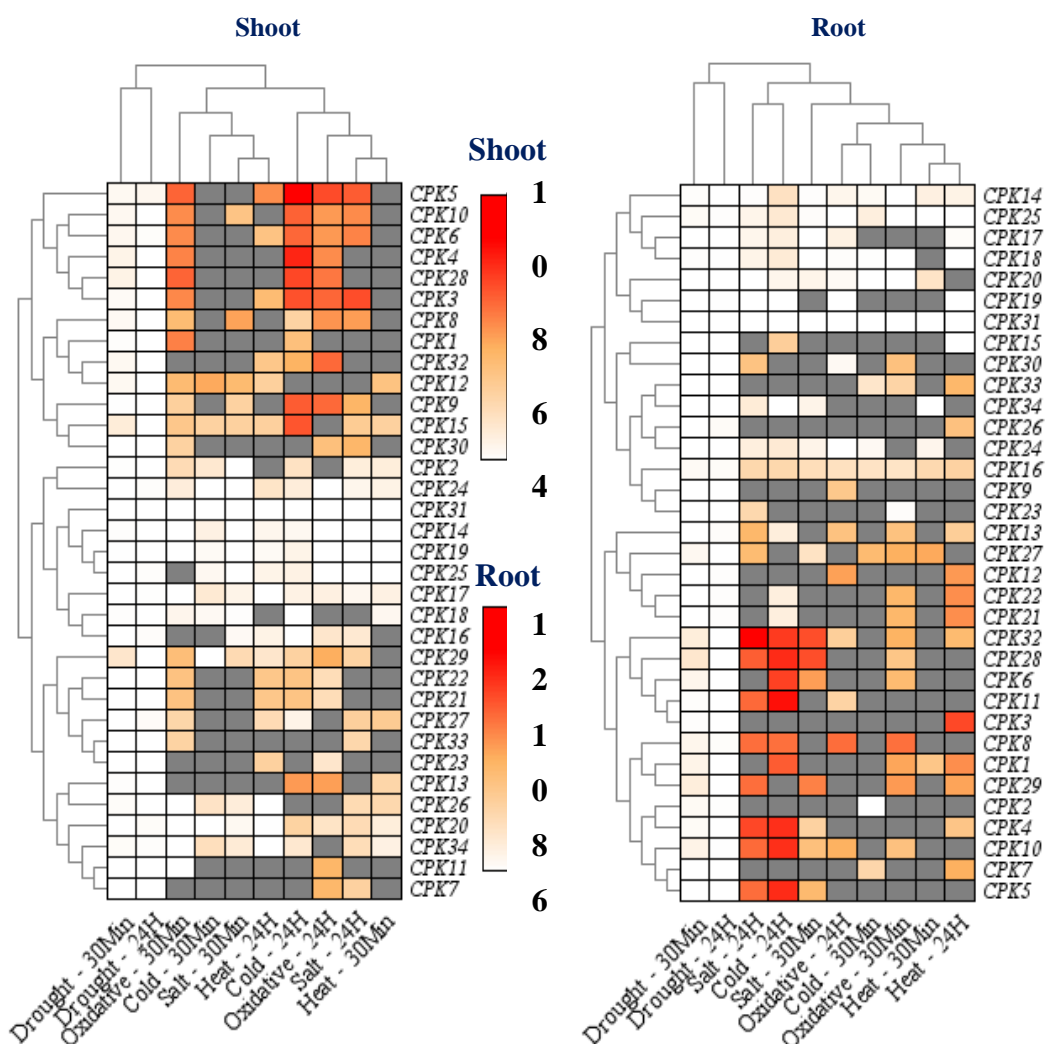
SiCPK20) تحت تیمار ABA افزایش بیان داشتند (Yu et al., 2018). در گیاه انگور همه ژن‌های (۱۹ ژن) *CPK* دستکم در یک تنش غیر زیستی افزایش بیان نشان دادند (Zhang et al., 2015). در دو وارسته سیب‌زمینی نیز افزایش یا کاهش بیان *StCPK*‌ها در زمان‌های مختلف پس از اعمال تنش خشکی مشاهده شد که القا بیان ژن‌های *StCPK3*، *StCPK13*، *StCPK21* و *StCPK23* در ۱ و ۳ ساعت به عنوان شاهدهی بر نقش این ژن‌ها در پاسخ به تنش خشکی در نظر گرفته شد (Bi et al., 2021).

آنالیز شبکه ژنی *AICPK*

پروتئین‌ها و فعل و انفعالات عملکردی آنها ستون فقرات ماشین‌های سلولی را تشکیل می‌دهند. فعالیت پروتئین‌ها به صورت یکپارچه بوده و در قالب شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین^۱ (PPI) عمل می‌نمایند (Fabregat et al., 2018). بنابراین برای بررسی در سطح پروتئین و به منظور شناسایی تعاملات مستقیم (فیزیکی) و همچنین غیرمستقیم (عملکردی) پروتئین‌های *AICPK*، آنالیز شبکه ژنی با استفاده از پایگاه STRING صورت گرفت. در بررسی ۱۴ پروتئین *AICPK*، ۲۹ نود^۲ با ۲۲۹ اثر متقابل (لبه)^۳ در این شبکه شرکت داشتند (< PPI p-value: 1.0e-16). از مهمترین پروتئین‌های پیش‌بینی شده که با پروتئین‌های *AICPK* تعاملات داشتند عبارتند از *AtCPK1*، *AtCPK28*، *AtCPK4*، *AtCPK9*، *SLAH3* (S-type anion channel)، *RBOHD*، ترانسپوتر مالیک اسید/دکربوکسیلیت (*OZS1*)، پروتئین‌های متصل‌شونده به اکسی‌استرول (*OSBP*) و در نهایت *ABF4* می‌باشد.

مراتبی ژن‌های *AtCPK* تحت شرایط تنش شوری، گرما، اکسیداتیو، سرما و خشکی و در دو بافت برگ و ریشه مشاهده می‌شود علی‌رغم مشاهده بیان قابل‌ملاحظه در اکثر تنش‌ها (به‌جز تنش خشکی)، شدت بیان در میان این ژن‌ها متفاوت بود. این نتایج می‌تواند دلیلی بر بیان بافت- اختصاصی و البته تنش- اختصاصی اعضای این خانواده باشد. به‌عنوان نمونه ژن‌های *CPK7* و *CPK29* در دو بافت ریشه و شاخساره از الگوی بیان متفاوتی در تنش‌ها برخوردار بود. همانگونه که در شکل ۴ مشاهده می‌شود بیشتر سطح بیان صرف نظر از نوع بافت و تنش در ژن *CPK3* مشاهده شد که اورتولوگ آن در آلوروپوس به نام *AICPK3* در این تحقیق شناسایی گردید. قرارگیری ژن‌های هم بیان در کنار هم در گروه‌بندی فیلوژنتیکی می‌تواند دلیلی بر مکانیسم‌های تنظیم بیان مشابه این ژن‌ها باشد (Mohammadian, 2020). از طرف دیگر تنوع بیان مشاهده شده در اعضای این خانواده نیز می‌تواند دلیلی بر وجود مکانیسم‌های تنظیمی متفاوت در تنظیمات بیان این ژن‌ها باشد. مقایسه سطح بیان نسبتاً پایین اعضای *AtCPK* در تنش خشکی با تنش شوری نشان می‌دهد شدت بالای بیان مشاهده شده در تنش شوری احتمالاً ناشی از اثرات یونی بوده تا اثرات اسمزی. به دلیل نقش و کارکرد ژن‌های *CPK* در هدایت پیام در مراحل رشدی گیاه و تحمل در برابر تنش‌های غیرزیستی و زیستی، الگوهای بیان اعضای این خانواده ژنی در بسیاری از گیاهان مورد بررسی قرار گرفته است. به عنوان مثال ژن *CPK6* در هندوانه و ژن ارتولوگ آن در خیار (*CsCPK14*) در تنش شوری القا می‌شوند، در حالی که *CiCPK6* و *CiCPK16* سطح بالایی از بیان را در گل‌های نر نشان می‌دهند (Wei et al., 2019). در ارزن دم‌روباهی، ۱۳ و ۱۱ ژن به ترتیب تحت تنش خشکی افزایش بیان و کاهش بیان نشان دادند، در حالی که بیشتر ژن‌های *SiCPK* (به‌جز *SiCPK4* و

1. Protein- protein interaction networks
2. Node
3. Edges



شکل ۴. نمایش Heatmap و خوشه‌بندی سلسله مراتبی ژن‌های *AtCPK* تحت شرایط تنش شوری، گرما، اکسیداتیو، سرما و خشکی، در دو بافت شاخساره و ریشه. ردیف و ستون‌ها در Heatmap به ترتیب بیانگر ژن‌ها و تنش‌های مورد بررسی می‌باشد.

یکی از اجزای پیام‌رسانی ABA عمل نموده و بیان ژن‌های پاسخ‌گو به ABA را به واسطه تنظیم *ABF4* تنظیم می‌نماید (Choi et al., 2005).

خانواده ژنی *CPK* در گیاهان دارای کارکردهای متنوعی بوده و در طیف وسیعی از پاسخ‌های بیولوژیکی، به‌خصوص در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مشارکت دارند. ضمن اینکه مکانیسم‌های پاسخگویی متنوعی را در پاسخ به تنش‌های مختلف، به نمایش می‌گذارند (Harper et al., 2004; Hamel et al., 2014). گزارش‌ها در برنج نشان می‌دهد که رونوشت‌های *OsCPK21* و *OsCPK12*، *OsCPK7*، *OsCPK4*

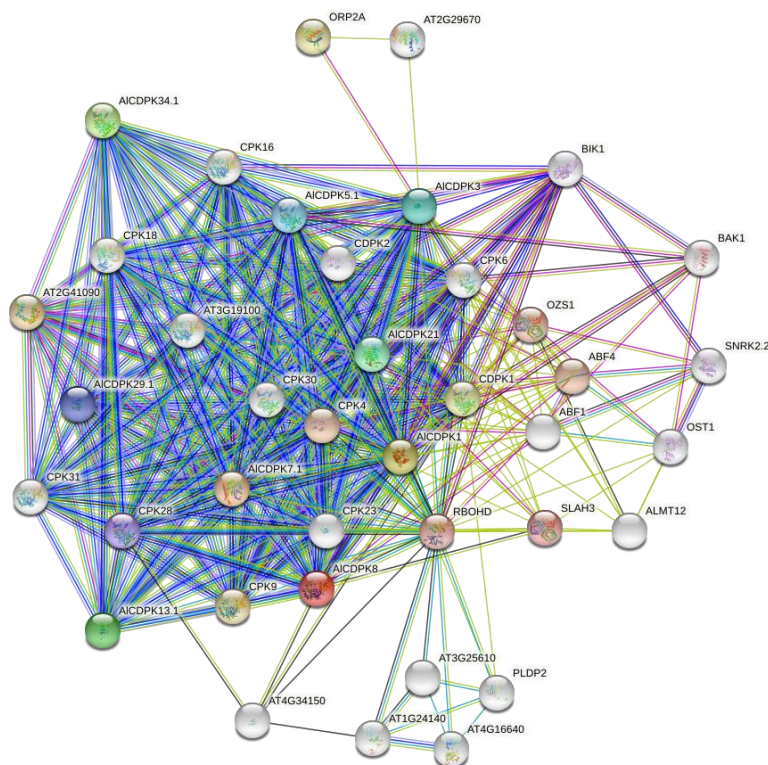
حضور ژن *ABF4* در شبکه تعاملات ژنی *AtCPK* به دلیل کارکرد مولکولی آن یعنی فعال‌سازی رونویسی، بسیار حائز اهمیت می‌باشد. مطالعات این‌ویترو و بیان موقت نشان می‌دهد فاکتور رونویسی *ABF4* هنگام اتصال به عناصر سیس *ABRE* موجود در پروموتورهای ژن‌های پاسخ دهنده به کم‌آبی نظیر *RD29B*، سبب فعال‌سازی آنها می‌شوند (Na et al., 2017). به‌عنوان مثال، مطالعات اثر متقابل هیبرید مخمر-دوگانه^۱ در گیاه آرابیدوپسیس نشان می‌دهد که *AtCPK32* به عنوان

1. Yeast two-hybrid system

مطالعه مکانیسم‌های مولکولی این تنش بوده است (Fatemi *et al.*, 2019; Hashemi *et al.*, 2020a). از سوی دیگر با توجه به تعیین‌توالی ژنومی این گیاه، ضمن شناسایی ۱۴ ژن *AICPK* موتیف‌ها و دامنه‌های پروتئینی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی و روابط فیلوژنتیکی این ژن‌ها، پروفایل بیان ژن‌های *AtCPKs* نیز بررسی گردید. تجزیه و تحلیل گستره ژنومی اعضای این خانواده ژنی نشان داد که *AICPK*‌ها با توجه به دارا بودن ویژگی‌های پیام‌رسانی منحصربفرد، احتمالاً از عوامل مهم سازگاری تکاملی و تحمل به تنش این گونه به‌شمار می‌روند. این بررسی به‌عنوان اولین مطالعه جامع خانواده پروتئین کینازهای وابسته به کلسیم، اطلاعاتی برای پیش‌بینی عملکرد ژن‌های *AICPK* در تحمل به تنش شوری فراهم می‌نماید. مطالعات تکمیلی بیان ژن‌های خانواده ژنی *AICPK* تحت تنش‌های غیرزیستی مختلف به روش Real-time PCR در تحقیقات آتی می‌تواند در درک عملکردها و سازکارهای پاسخ به تنش سودمند باشد.

در پاسخ به تنش نمکی القا می‌شوند (Asano *et al.*, 2005; Wan *et al.*, 2007). در تحقیق دیگری به منظور بررسی کارکرد ژن *OsCPK4* نشان داده شد که این ژن به عنوان تنظیم‌کننده مثبت در تنش نمکی و خشکی در برنج از طریق محافظت از غشاهای سلولی در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از تنش، عمل می‌کند (Campo *et al.*, 2014). در گیاه مدل آرابیدوپسیس نیز افزایش بیان ژن‌های *AtCPK3*، *AtCPK6* و *AtCPK23* در تنش خشکی و شوری مشاهده می‌شود (Ma *et al.*, 2007; Mehlmer *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010). یا در تحقیق دیگری بیش‌بیان ژن *AtCPK6* نه تنها به طور قابل توجهی تحمل به تنش شوری را بهبود داده بلکه به افزایش بیان ژن همولوگ آن در تنش شوری منجر شد (Zhang *et al.*, 2017a).

سازگاری و تطابق‌پذیری بالای گیاه آلوروپوس لیتورالیس به شرایط سخت محیطی نظیر خشکی، شوری، سرما و گرما دلیل اصلی انتخاب این گونه جهت



شکل ۵. نمایش شبکه برهم کنش پروتئین-پروتئین مرتبط با خانواده ژنی *AICPK*

کشاورزی و منابع طبیعی ساری و از محل طرح تحقیقاتی مصوب حمایت از پایان نامه دانشجویی انجام شده است که بدین وسیله قدردانی می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم

REFERENCES

- Ahmadizadeh M, Chen J-T, Hasanzadeh S, Ahmar S, Heidari P (2020) Insights into the genes involved in the ethylene biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 18(1): 1-20.
- Ahmed B, Alam M, Hasan F, Emdad EM, Islam S, Rahman N (2020) Jute CDPK genes and their role in stress tolerance and fiber development: A genome-wide bioinformatic investigation of *Chorchorus capsularis* and *C. olitorius*. *Plant Gene*. 24: 100252.
- Asano T, Tanaka N, Yang G, Hayashi N, Komatsu S (2005) Genome-wide identification of the rice calcium-dependent protein kinase and its closely related kinase gene families: comprehensive analysis of the CDPKs gene family in rice. *Plant and Cell Physiology*. 46(2): 356-366.
- Bailey TL, Boden M, Buske FA, Frith M, Grant CE, Clementi L, Ren J, Li WW, Noble WS (2009) MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Res*. 37: 202-208.
- Bi Z, Wang Y, Li P, Sun C, Qin T, Bai J (2021) Evolution and expression analysis of CDPK genes under drought stress in two varieties of potato. *Biotechnology Letters*. 43(2): 511-521.
- Campo S, Baldrich P, Messeguer J, Lalanne E, Coca M, San Segundo B (2014) Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation. *Plant physiology*. 165(2): 688-704.
- Choi H-I, Park H-J, Park JH, Kim S, Im M-Y, Seo H-H, Kim Y-W, Hwang I, Kim SY (2005) *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiology*. 139(4): 1750-1761.
- Crizel RL, Perin EC, Vighi IL, Woloski R, Seixas A, Da Silva Pinto L, Rombaldi CV, Galli V (2020) Genome-wide identification, and characterization of the CDPK gene family reveal their involvement in abiotic stress response in *Fragaria x ananassa*. *Scientific Reports*. 10(1): 1-17.
- Dezhsetan S, Behnamian M, Fathi Ajirlou S, Ebrahimi MA, Yazdani B (2018) Identification, classification and bioinformatics expression analysis of NAC transcription factor gene family in *Hordeum vulgare* cv. Morex genome. *Crop Biotechnology*. 8(21): 17-35.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*. 47(D1): D427-D432.
- Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, Haw R, Jassal B, Korninger F, May B (2018) The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic acids research*. 46(D1): D649-D655.
- Fatemi F, Hashemi-Petroudi SH, Nematzadeh G, Askari H, Abdollahi MR (2019) Exploiting differential gene expression to discover ionic and osmotic-associated transcripts in the halophyte grass *Aeluropus litoralis*. *Biological procedures online*. 21(1): 1-16.
- Gao W, Xu F-C, Guo D-D, Zhao J-R, Liu

- J, Guo Y-W, Singh PK, Ma X-N, Long L, Botella JR (2018) Calcium-dependent protein kinases in cotton: insights into early plant responses to salt stress. *BMC plant biology*. 18(1): 1-15.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker JM. (ed) *The proteomics protocols handbook*, Humana Press, New York City, New York, United States, pp 571-607.
- Hall T, Bioinformatics I, Carlsbad C (2011) BioEdit: an important software for molecular biology. *GERF Bull Biosci*. 2(1): 60-61.
- Hamel L-P, Sheen J, Séguin A (2014) Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in plant science*. 19(2): 79-89.
- Harper JF, Breton G, Harmon A (2004) Decoding Ca²⁺ signals through plant protein kinases. *Annu. Rev. Plant Biol*. 55: 263-288.
- Hashemi S, Nematzadeh G, Mohammadi S, Kuhlmann M (2020a) Expression pattern analysis of heat shock transcription factors (HSFs) gene family in *Aeluropus littoralis* under salinity stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 13(2).
- Hashemi SH, Arab M, Dolatabadi B, Kuo Y-T, Baez MA, Himmelbach A, Nematzadeh G, Maibody SaMM, Schmutzer T, Mälzer M (2020b) Initial Description of the Genome of *Aeluropus Littoralis*, a Halophile Grass.
- Hashemi SH, Ghorbani H (2020c) RT-qPCR analysis of some members of DEVIL gene family in *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl. under salinity stress. *Environmental Stresses in Crop Sciences*. 13(4): 1245-1258.
- Hashemi SH, Ghorbani H, Kuhlmann M (2018) Isolation Phosphoglycerate Dehydrogenase gene from *Aeluropus littoralis* halophyte plant and functional analysis of T-DNA mutant in *Arabidopsis thaliana*. *Crop Biotechnology*. 8(23): 79-92.
- Hashemi SH, Mohammadi S (2020d) Identification of the ERF gene family in *Aeluropus littoralis* halophyte plant and analysis of their expression pattern in response to salt stress. *Crop Biotechnology*. 9(29): 53-66.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Askari H, Ghahary S (2014) Involvement of Cytosine DNA methylation in different developmental stages of *Aeluropus littoralis*. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 2(2): 56-67.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Askari H, Ghasemi Y (2012) Pattern of DNA cytosine methylation in *Aeluropus littoralis* during temperature stress. *Journal of Plant Molecular Breeding*. 1(1): 16-24.
- Hashemi SH, Nematzadeh G, Kuhlmann M (2019) Identification and analysis of a DEVIL paralog gene cluster in *Aeluropus littoralis* by a comparative genomic approach. *Crop Biotechnology*. 9(25): 75-87.
- Heidari P, Ahmadzadeh M, Izanlo F, Nussbaumer T (2019) In silico study of the CESA and CSL gene family in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*: Focus on post-translation modifications. *Plant Gene*. 19: 100189.
- Horton P, Park K-J, Obayashi T, Fujita N, Harada H, Adams-Collier C, Nakai K (2007) WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res*. 35: 585-587.
- Hrabak EM, Chan CW, Gribskov M, Harper JF, Choi JH, Halford N, Kudla J, Luan S, Nimmo HG, Sussman MR (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK superfamily of protein kinases. *Plant physiology*. 132(2): 666-680.
- Jalili MM, Haddad MA, Housaindokht MR (2019) Biocomputational Investigations of Structural and Functional Properties of Cry Proteins for Malaria Biocontrol.
- Jones P, Binns D, Chang H-Y, Fraser M,

- Li W, Mcanulla C, Mcwilliam H, Maslen J, Mitchell A, Nuka G (2014) InterProScan 5: genome-scale protein function classification. *Bioinformatics*. 30(9): 1236-1240.
- Kaur A, Pati PK, Pati AM, Nagpal AK (2017) In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*. *PloS one*. 12(9): e0184523.
- Kaur G, Pati PK (2016) Analysis of cis-acting regulatory elements of respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions. *Computational biology and chemistry*. 62: 104-118.
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weinkl S, Batistic O, D'angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *The Plant Journal*. 50(2): 347-363.
- Kong X, Lv W, Jiang S, Zhang D, Cai G, Pan J, Li D (2013) Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize. *BMC genomics*. 14(1): 1-15.
- Ladan Moghdam A (2020) Genome wide bioinformatics analysis BES1 gene family in *Vitis vinifera* L. *Crop Biotechnology*. 10(30): 71-86.
- Letunic I, Bork P (2018) 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic acids research*. 46(D1): D493-D496.
- Li A-L, Zhu Y-F, Tan X-M, Wang X, Wei B, Guo H-Z, Zhang Z-L, Chen X-B, Zhao G-Y, Kong X-Y (2008) Evolutionary and functional study of the CDPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant molecular biology*. 66(4): 429-443.
- Liu H, Che Z, Zeng X, Zhou X, Siteo HM, Wang H, Yu D (2016) Genome-wide analysis of calcium-dependent protein kinases and their expression patterns in response to herbivore and wounding stresses in soybean. *Functional & integrative genomics*. 16(5): 481-493.
- Ma S-Y, Wu W-H (2007) AtCPK23 functions in *Arabidopsis* responses to drought and salt stresses. *Plant molecular biology*. 65(4): 511-518.
- Mehlmer N, Wurzinger B, Stael S, Hofmann-Rodrigues D, Csaszar E, Pfister B, Bayer R, Teige M (2010) The Ca²⁺-dependent protein kinase CPK3 is required for MAPK-independent salt-stress acclimation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 63(3): 484-498.
- Mohammadian N (2020) Analysis of the sucrose synthase (SUS) gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.) based on bioinformatics methods. *Crop Biotechnology*. 9(28): 37-52.
- Mohanta TK, Kumar P, Bae H (2017) Genomics and evolutionary aspect of calcium signaling event in calmodulin and calmodulin-like proteins in plants. *BMC plant biology*. 17(1): 38.
- Na JK, Metzger JD (2017) Guard-cell-specific expression of *Arabidopsis* ABF4 improves drought tolerance of tomato and tobacco. *Molecular breeding*. 37(12): 1-11.
- Podell S, Gribskov M (2004) Predicting N-terminal myristoylation sites in plant proteins. *BMC genomics*. 5(1): 37.
- Rezaee S, Ahmadizadeh M, Heidari P (2020) Genome-wide characterization, expression profiling, and post-transcriptional study of GASA gene family. *Gene Reports*. 20: 100795.
- Saijo Y, Hata S, Kyojuka J, Shimamoto K, Izui K (2000) Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*. 23(3): 319-327.
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape

- UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nature genetics*. 37(5): 501-506.
- Schulz P, Herde M, Romeis T (2013) Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant physiology*. 163(2): 523-530.
- Sigrist CJ, De Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I (2012) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res*. 41(D1): D344-D347.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*. 30(12): 2725-2729.
- Tian W, Wang C, Gao Q, Li L, Luan S (2020) Calcium spikes, waves and oscillations in plant development and biotic interactions. *Nature plants*. 6(7): 750-759.
- Wan B, Lin Y, Mou T (2007) Expression of rice Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPKs) genes under different environmental stresses. *FEBS letters*. 581(6): 1179-1189.
- Wang D, Liu Y-X, Yu Q, Zhao S-P, Zhao J-Y, Ru J-N, Cao X-Y, Fang Z-W, Chen J, Zhou Y-B (2019) Functional analysis of the soybean GmCDPK3 gene responding to drought and salt stresses. *International journal of molecular sciences*. 20(23): 5909.
- Wang J-P, Xu Y-P, Munyampundu J-P, Liu T-Y, Cai X-Z (2016) Calcium-dependent protein kinase (CDPK) and CDPK-related kinase (CRK) gene families in tomato: genome-wide identification and functional analyses in disease resistance. *Molecular Genetics and Genomics*. 291(2): 661-676.
- Wei C, Zhang R, Yang X, Zhu C, Li H, Zhang Y, Ma J, Yang J, Zhang X (2019) Comparative analysis of calcium-dependent protein kinase in Cucurbitaceae and expression studies in watermelon. *International journal of molecular sciences*. 20(10): 2527.
- Wen F, Ye F, Xiao Z, Liao L, Li T, Jia M, Liu X, Wu X (2020) Genome-wide survey and expression analysis of calcium-dependent protein kinase (CDPK) in grass *Brachypodium distachyon*. *BMC genomics*. 21(1):1-17.
- Wernimont AK, Amani M, Qiu W, Pizarro JC, Artz JD, Lin YH, Lew J, Hutchinson A, Hui R (2011) Structures of parasitic CDPK domains point to a common mechanism of activation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 79(3): 803-820.
- Xu J, Tian Y-S, Peng R-H, Xiong A-S, Zhu B, Jin X-F, Gao F, Fu X-Y, Hou X-L, Yao Q-H (2010) AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*. 231(6): 1251-1260.
- Yu T-F, Zhao W-Y, Fu J-D, Liu Y-W, Chen M, Zhou Y-B, Ma Y-Z, Xu Z-S, Xi Y-J (2018) Genome-wide analysis of CDPK family in foxtail millet and determination of SiCDPK24 functions in drought stress. *Frontiers in plant science*. 9: 651.
- Zhang H, Wei C, Yang X, Chen H, Yang Y, Mo Y, Li H, Zhang Y, Ma J, Yang J (2017a) Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase and its related kinase gene families in melon (*Cucumis melo* L.). *PLoS One*. 12(4): e0176352.
- Zhang K, Han Y-T, Zhao F-L, Hu Y, Gao Y-R, Ma Y-F, Zheng Y, Wang Y-J, Wen Y-Q (2015) Genome-wide identification and expression analysis of the CDPK gene family in grape, *Vitis* spp. *BMC plant biology*. 15(1): 1-19.
- Zhang M, Liu Y, He Q, Chai M, Huang Y, Chen F, Wang X, Liu Y, Cai H, Qin Y (2020) Genome-wide investigation of calcium-dependent

- protein kinase gene family in pineapple: evolution and expression profiles during development and stress. *BMC genomics*. 21(1): 1-16.
- Zhang M, Shen Z, Meng G, Lu Y, Wang Y (2017b) Genome-wide analysis of the *Brachypodium distachyon* (L.) P. Beauv. Hsp90 gene family reveals molecular evolution and expression profiling under drought and salt stresses. *PloS one*. 12(12): e0189187.
- Zhao P, Liu Y, Kong W, Ji J, Cai T, Guo Z (2021) Genome-Wide Identification and Characterization of Calcium-Dependent Protein Kinase (CDPK) and CDPK-Related Kinase (CRK) Gene Families in *Medicago truncatula*. *International journal of molecular sciences* 22(3): 1044.