

تجزیه بیوانفورماتیکی و مطالعات مدل سازی ساختاری آنزیم هلیکاز ترمیم کننده DNA (UvrD) در آرابیدوپسیس و برنج

Bioinformatic analysis and structural modeling study on DNA repair helicase (UvrD) from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa*

افسانه سادات فرساد^{۱*}، سعید ملک زاده شفارودی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار، دانشگاه فردوسی مشهد

Farsad AS^{*1}, Malekzadeh Shafaroudi S¹

1. PhD Student, Assistant Professor, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farsadafsanah@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

پروتئین های مسئول ترمیم خطاهای تکثیر DNA یا MMRها نقش مهمی در برقراری پایداری ژنوم کل موجودات ایفا می کنند. آنزیم هلیکاز UvrD، جزئی از کمپلکس MMR بوده و نقش موثری در فرایند ترمیم DNA از طریق باز کردن پیچش های آن بر عهده دارد. در این مقاله آنالیز بیوانفورماتیکی آنزیم هلیکاز UvrD در دو گونه گیاهی آرابیدوپسیس و برنج بررسی شد. این آنزیم در آرابیدوپسیس و برنج به ترتیب پروتئینی با ۱۱۶۹ (۱۲۹ کیلو دالتون) و ۱۱۶۵ (۱۳۰ کیلو دالتون) اسید آمینه می باشد. این پروتئین ها تمام دامین های حفاظتی را دارا بوده و به دلیل دارا بودن انتهای آمینی و توالی های لینکر بلندتر، از آنزیم هلیکاز UvrD در *E.coli* بزرگتر می باشند. اثبات شواهدی نظیر وجود سایت اتصال ATP در انتهای آمینی UvrD و حفاظت شدگی موتیف ها در هر دو گونه گیاهی مشابه با UvrD باکتری *E.coli*، پیشنهاد می کند که قطعات انتهای آمینی و کربوکسیلی آنزیم در این دو گیاه می توانند فعالیت ATP آزی و DNA هلیکازی ۳' به ۵' نظیر باکتری مورد نظر از خود نشان دهند. با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی، ساختار سه بعدی آنزیم UvrD در دو گیاه مختلف ارزیابی شد و آنزیم هلیکاز REP باکتری *E. coli* به عنوان الگو برای طراحی ساختار آنزیم استفاده شد. ساخت تصاویر گرافیکی مولکولی و آنالیزهای ساختاری بهترین مدل ساخته شده نیز با نرم افزار کایمرا انجام گرفت. نتایج بیانگر عدم وجود تفاوت آشکار در ساختار سوم پروتئین های UvrD در دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج بود. بنابراین این آنزیم ها طی فرایند تکامل دامین های اصلی خصوصیات بیوشیمیایی نظیر فعالیت ATP آزی و هلیکازی را حفظ کرده اند.

واژه های کلیدی

آرابیدوپسیس

آنزیم هلیکاز

برنج

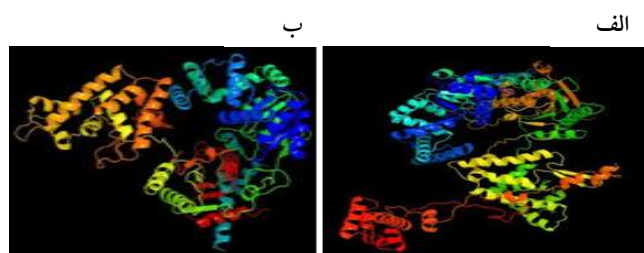
ترمیم DNA

تنش ژنوتوکسیک

مقدمه

هلیکازها آنزیم‌هایی هستند که ساختار اسیدهای نوکلئیک را تغییر داده و برای تخریب باندهای هیدروژنی در DNA، ATP استفاده می‌کنند (Tuteja et al. 2009). آنزیم UvrD به عنوان DNA هلیکاز II در *E. coli*، عضو اصلی خانواده هلیکازها شناخته شده که پیچش DNA را در جهت ۳' به ۵' باز می‌کند. این آنزیم در فرایندهای همانندسازی، نوترکیبی، ترمیم DNA و مسیر ترمیم خطا ایفای نقش می‌کند. UvrD دارای چهار دمین ساختاری است که شامل دمین 1A (۸۹-۱ و ۲۸۰-۲۱۵ اسیدآمینه)، دمین 1B (۲۱۴-۹۰) اسیدآمینه، دمین 2A (۳۷۷-۲۸۱ و ۶۴۷-۵۵۱ اسیدآمینه) و دمین 2B (۵۵۰-۳۷۸) اسیدآمینه می‌باشند. دمین 1A و 2A هسته هلیکازی را تشکیل می‌دهند که مسئول اتصال به ATP و فعالیت هیدرولازی می‌باشد. دمین 1B و 2B نیز با دوبرکس DNA واکنش می‌دهند. موتیف‌های I، Ia، II، VI و Q حفاظت شده بوده و در فرآیند اتصال به ATP و موتیف‌های III و V نیز در اتصال به DNA تک رشته‌ای عمل می‌کنند. علاوه بر این هفت موتیف جدید (Va، IVc، IVb، Id، Ic، Ib و Via) نیز در UvrD به طور محافظت شده شناسایی شده‌اند که در فرایند اتصال به DNA یا برهمکنش دمین‌های 1B و 2B نقش ایفا می‌کنند. عوامل ژنوتوکسیک^۱ مانند تنش‌های غیرزیستی مسئول ایجاد اثرات مخرب بر پایداری ژنوم و رشد و باروری گیاه می‌باشند (Gill and Tuteja 2010). جهت حفاظت DNA شبکه کاملی از مکانیسم‌های ترمیم DNA در فرآیند تکامل شناسایی شده‌است. سیستم ترمیم خطا (MMR) مسیر اصلی ترمیم DNA محسوب و مسئول تصحیح خطاهای بیوسنتزی در رشته تازه تکثیر یافته DNA می‌باشد. این مسیر در *E. coli*، باکتری‌ها و موجودات عالی شدیداً حفاظت شده می‌باشد (Jackson et al. 2006). مطالعات Kimura and Sakaguchi (2006) نشان داد که ژن‌های MMR گیاهان دارای چندین مورد تشابه با ژن‌های MMR در *E. coli* می‌باشند. به عنوان مثال گیاه آرابیدوپسیس دارای ژن‌های همولوگ با ژن‌های MMR در باکتری *E. coli* می‌باشد، اما تاکنون تحقیقاتی مبنی بر آنالیز ساختاری آنزیم هلیکازی UvrD در گیاهان گزارش

نشده‌است (Curti et al. 2007). در این تحقیق برای اولین بار آنالیز ساختاری آنزیم UvrD با هدف بررسی ساختار سه بعدی و سایت اتصال ATP، شناسایی موتیف‌های حفاظت شده و طراحی مدل‌های ساختاری در دو گونه مهم گیاهی آرابیدوپسیس و برنج انجام شد. توالی‌های مشابه با پروتئین UvrD باکتری *E. coli* با استفاده از داده‌های بیوانفورماتیکی در گیاهان مدل بررسی شد تا بتوان تخمینی از فعالیت ATP آزی و هلیکازی این آنزیم در گیاهان داشت. به این منظور توالی اسید آمینه‌ای AtUvrD با شماره دسترسی F4JSH5 و توالی OsUvrD با شماره دسترسی Q6ZHK2 از سایت UniProt تهیه شده و با استفاده از نرم افزارهای زیر بررسی شد. نرم‌افزار Phyre با هم‌ترازی توالی پروتئین مورد نظر با پروتئین‌های همولوگ تعیین ساختار شده و تعیین درجه اطمینان یک ساختار سه بعدی فرضی برای پروتئین ما معرفی کرد (شکل ۱).

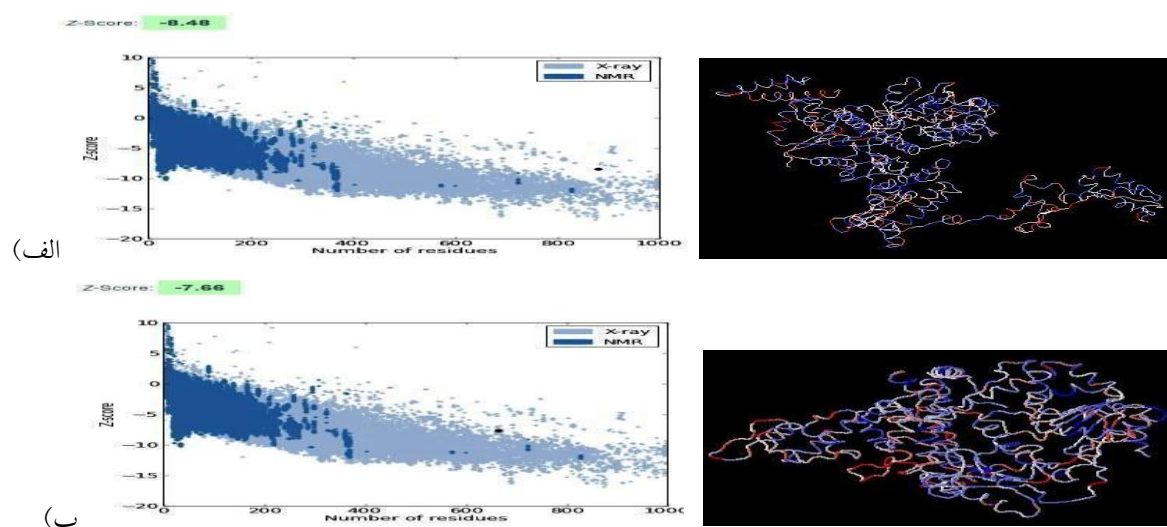


شکل ۱- نتایج نرم‌افزار Phyre در خصوص ساختار سه بعدی پروتئین AtUvrD (الف) و OsUvrD (ب) که نتیجه هم‌ردیفی این پروتئین‌ها با ساختارهای الگو می‌باشد.



شکل ۲- نتایج نرم‌افزار 3DLigand در خصوص محل اتصال لیگاند ATP به ساختار سه بعدی پروتئین AtUvrD (الف) و OsUvrD (ب) می‌باشد. آنزیم های AtUvrD و OsUvrD هر دو دارای دمین هلیکازی اتصال به ATP می‌باشند.

¹ Genotoxic agents



شکل ۳- نتایج نرم افزار PROSA در شکل های سمت چپ. نمودار Z-score ساختار پیش گویی شده AtUvrD (الف) و OsUvrD (ب) را نشان می دهند که ساختارهای مفروض به ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین های همولوگ هم سایز خود نزدیک می باشند. شکل های سمت راست انرژی سطحی پروتئین در ساختارهای پیش گویی شده را نمایش می دهند. خطوط قرمز رنگ نشان دهنده حداکثر انرژی و خطوط آبی رنگ نشان دهنده حداقل انرژی می باشند. در واقع پایین بودن انرژی نشان دهنده پایداری ساختار پروتئین و اعتبار کیفیت آن است.

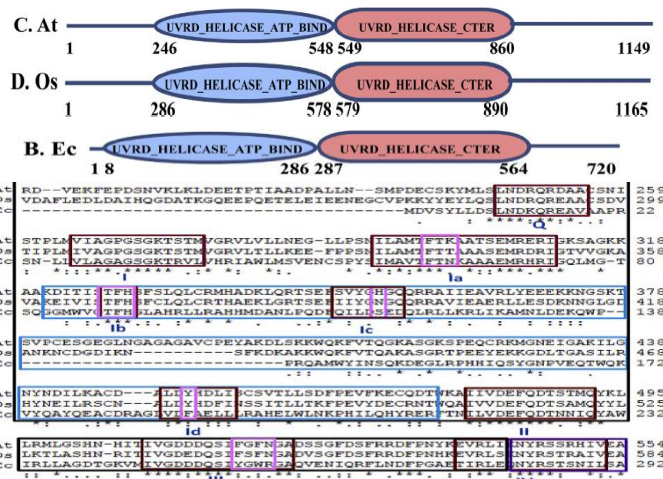
انتخاب شد. جهت تخمین مدل های ساختاری تجزیه کامل توالی های پروتئینی با استفاده از سایت Expasy انجام گرفت. توالی های دانلود شده توسط برنامه ClustalW هم ردیف شدند. تعیین مدل های ساختاری توسط سرور همولوژی مدلینگ¹ Swissmodel انجام شد و از برنامه UCSF برای بررسی تشابه و تفاوت ساختارهای سه بعدی، ترسیم تصاویر گرافیکی مولکولی و از ابزار Matchmaker جهت منطبق کردن ساختارها استفاده شد. نتایج بررسی مدل های ساختاری نشان داد که AtUvrD یک پروتئین ۱۱۴۹ اسید آمینه ای با وزن مولکولی ۱۲۹ کیلو دالتون و OsUvrD پروتئینی ۱۱۶۵ اسید آمینه ای با وزن مولکولی ۱۳۰ کیلو دالتون بوده و از *E.coli* UvrD که پروتئینی ۷۳ کیلو دالتونی است و تنها ۷۲۰ اسید آمینه طول دارد بزرگتر می باشند (شکل ۴A و ۴B). مقایسه توالی اسیدهای آمینه UvrD در *E.coli*، آراییدوپسیس و برنج نشان داد که AtUvrD و OsUvrD، ۴ دمین عملکردی اصلی (1A، 1B، 2A و 2B) و تمام موتیف های حفاظت شده هلیکازهای UvrD شامل Q، Ia، Id، II، IV، Iva، IVc، V، Va، VI، Via را دارا می باشند. آنزیم AtUvrD و OsUvrD به ترتیب

نرم افزار dligand site^۳ محل اتصال لیگاند ATP را در ساختار سه بعدی مولکول پیش بینی کرد. در واقع این نرم افزار با تطبیق ساختارهای پروتئینی مختلف با پروتئین مورد نظر ما، دمین انتهای آمینی هلیکازی پروتئین UvrD را به عنوان محل اتصال ATP شناسایی کرد (شکل ۲). در نرم افزار PROSA (شکل ۳) ساختارهای مورد نظر با روش های متفاوت X-ray و NMR به ترتیب توسط رنگ های آبی کم رنگ و پر رنگ متمایز شدند. این نمودار نشان داد که Z-score پروتئین های AtUvrD و OsUvrD (-۷/۶۶ و -۸/۴۸) در محدوده نمره های مشخصه پروتئین های بومی کریستالوگرافی شده هم سایز خود قرار دارد و این امر کیفیت مدل های ساختاری نرم افزار Phyre را تایید کرد. در بخش دیگری از نتایج این نرم افزار ساختار سه بعدی پروتئین های ورودی قابل مشاهده می باشد که اسید آمینه های آن ها بر اساس افزایش میزان انرژی سطحی پروتئین از آبی تا قرمز رنگ آمیزی شده اند. به طور کلی ساختار پروتئین ها طوری شکل می گیرد که انرژی سطحی آن حداقل امکان به حداقل نزدیک تر باشد. مشاهده غالبیت رنگ آبی بر قرمز در ساختار هر دو پروتئین گویای پایداری آن ساختارها است. ساختار پیش گویی شده خروجی نرم افزار Phyre توسط نرم افزار PROSA به عنوان بهترین مدل

¹ Homology modeling

ای، OsUvrD AtUvrD، ۵۱ درصد یکسانی با یکدیگر و ۲۵-۲۴ درصد یکسانی با UvrD باکتری *E.coli* نشان دادند. در نتیجه آنزیم هلیکاز UvrD گیاهان می تواند در مسیر ترمیمی مشابه با مسیر MMR باکتری *E.coli* عمل کند. تحقیقات قبلی نشان داد که در آنزیم هلیکاز Rep باکتری *E.coli*، سایت اتصال به DNA تک رشته ای دارای اسید آمینه هایی از موتیف های Ia، III و V و نیز اسید آمینه هایی از نواحی غیر موتیف می باشد (Meng et al. 2008)، در این مطالعه نیز مقایسه آنزیم هلیکاز Rep باکتری *E.coli* با AtUvrD و OsUvrD، اسید آمینه های درگیر در سایت اتصال به DNA تک رشته ای را مشخص کردند (شکل ۴A). بهترین مدل ساختاری توسط سرور همولوژی مدلینگ Swissmodel تعیین شد مدل دوم AtUvrD و تنها مدل OsUvrD با استفاده از الگو قرار دادن ساختار کریستالی شناخته شده آنزیم هلیکاز Rep باکتری *E.coli*، ساخته شدند. اسیدهای آمینه ۲۴۶ تا ۹۴۱ و ۲۸۶ تا ۹۷۱ ساختار اولیه AtUvrD و OsUvrD، به ترتیب ۲۶ و ۲۵ درصد یکسانی با آنزیم هلیکاز Rep باکتری *E.coli* نشان دادند. بررسی تشابه توالی UvrD باکتری *E.coli* و دو گیاه مدل نشان داد که به دلیل حفاظت شدگی دمین ها و موتیف های UvrD باکتری *E.coli* در گیاهان مورد بررسی، این آنزیم می تواند فعالیت هلیکازی ۳' به ۵' مشابهی نیز در این گیاهان داشته باشد. بر اساس مطالعات قبلی کشف همولوگ های این آنزیم در موجودات دیگر دلیلی بر مشاهده عملکرد مشابه آنزیم در آن موجودات می باشد و این امر نشان دهنده حفاظت شدگی تکاملی عملکرد آنزیم هلیکاز در موجودات مختلف می باشد (Tuteja et al. 2013). تفاوت ساختاری این آنزیم در دو گونه گیاهی مورد بررسی با باکتری *E.coli* را شاید بتوان به بحث تکامل ژنوم در موجودات مختلف نسبت داد زیرا همان گونه که در تحقیق اخیر نشان داده شد آنزیم UvrD در آرکیدوپسیس و برنج دارای تمامی دمین های حفاظت شده UvrD باکتری *E.coli* می باشد و تنها توالی های لینکر که در حد فاصل دمین ها قرار دارند بلندتر شده اند. با استناد به تحقیق Ansari et al. (2014) که به بررسی شباهت های ساختاری و عملکردی آنزیم UvrD در گونه های متفاوت پلاسمودیوم می پردازد، یکی از احتمالات ممکن در این زمینه، مبحث تکامل و افزایش توالی های غیر کد کننده در موجودات یوکاریت در مقایسه

دارای دمین انتهای کربوکسیلی (اسید آمینه ۵۴۹ تا ۸۶۰، اسید آمینه ۵۷۹ تا ۸۹۰) و دمین متصل شونده به ATP (اسید آمینه ۲۴۶ تا ۵۴۸، اسید آمینه ۲۸۶ تا ۵۷۸) می باشند (شکل ۴C و ۴D). دمین ۱A در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسید آمینه ۱ تا ۵۴۲ و ۱ تا ۵۷۲ و دمین 1B در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسید آمینه ۳۲۰ تا ۴۷۷ و ۳۶۰ تا ۵۰۵ را شامل می شود (شکل ۴A). دمین 2A در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسید آمینه ۵۴۳ تا ۱۰۵۰ و ۵۷۳ تا ۱۰۶۶ و دمین 2B در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسید آمینه ۶۴۳ تا ۸۴۶ و ۶۷۳ تا ۸۷۵ را در برمی گیرد (شکل ۴A).



شکل ۴- دیگرام های شماتیک که ترتیب دمین های UvrD را در *E.coli*، آرکیدوپسیس و برنج نشان می دهد. تجزیه دمین ها توسط برنامه Scan Prosite انجام شد. باکس های آبی پر، دمین اتصال به ATP آنزیم هلیکاز UvrD و باکس های صورتی پر، دمین انتهای کربوکسیلی UvrD را نشان می دهند. اعداد نشان دهنده اسیدهای آمینه این دمین ها می باشند (الف). مقایسه توالی اسیدهای آمینه هلیکازهای UvrD در *E.coli*، آرکیدوپسیس و برنج. موتیف های حفاظت شده توسط باکس های قرمز نشان داده شده است و نام هر موتیف (از Q تا VIa) با حروف یونانی مشخص شده است. باکس های صورتی هنگام مقایسه با توالی REP باکتری *E.coli* نشان دهنده نواحی متعلق به سایت اتصال به DNA تک رشته ای می باشند (A).

نتایج نشان داد که این دمین های حفاظت شده بزرگتر از دمین های حفاظت شده UvrD *E.coli* می باشند. نتایج PROSITE نیز تایید کرد که سایت اتصال ATP در ناحیه مابین انتهای آمینی دمین اتصال به ATP و آغاز ناحیه انتهای کربوکسیلی هلیکازی قرار دارد. نتایج ClustalW نشان داد که در سطح توالی های اسید آمینه-

است. اگرچه این مطالعه به درک ساختار هلیکازها در گیاهان کمک موثری کرده اما جهت شناخت مکانیسم عمل این آنزیم ها علاوه بر مطالعه ساختاری، بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی نیز از اهمیت گسترده ای برخوردار است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که تفاوت آشکاری در ساختار سوم پروتئین های UvrD در دو گیاه آراییدوپسیس و برنج وجود نداشته و آن ها طی فرایند تکامل زمین های اصلی و در نتیجه خصوصیات بیوشیمیایی خود نظیر فعالیت ATP آزی و هلیکازی را حفظ کرده اند. در مجموع، در این تحقیق امکان آنالیز بیوانفورماتیکی آنزیم مهم هلیکاز UvrD مربوط به مسیر MMR و امکان بررسی ساختار سه بعدی آن فراهم شد و به این ترتیب اطلاعاتی در مورد تشابهات و اختلافات ساختار کلی این آنزیم در دو گونه گیاهی مهم حاصل شد. با این وجود اما مطالعات آتی پیرامون خصوصیات عملکردی و بیوشیمیایی این آنزیم به منظور شناسایی نقش آن در تنش های مختلف بسیار ضروری به نظر می رسد

با پروکاریوت ها می باشد. بر اساس این تحقیق آنزیم UvrD در هر دو گیاه دارای سایت اتصال ATP در انتهای آمینی می باشد بنابراین دارای فعالیت ATP آزی مشابه UvrD باکتری *E.coli* نیز می باشد. (Kumura and Sekiguchi 2002) نشان دادند که القای موتاسیون در موتیف های حفاظت شده آنزیم UvrD موجب حذف تمام فعالیت های هلیکازی و ATP آزی این آنزیم می شود و این فعالیت ها رابطه مستقیم با موتیف های حفاظت شده پروتئین دارند. همچنین برای فعالیت هلیکازی تنها دامین های حفاظت شده ضروری بوده و توالی های حد فاصل هیچ نقشی بر عهده ندارند. پس از یک سو به دلیل حفاظت شدگی موتیف های اصلی در ساختار UvrD دو گونه گیاهی، فعالیت ATP آزی و DNA هلیکازی قطعات انتهای آمینی و کربوکسیلی آنزیم تایید می شود و از سوی دیگر حذف یا اضافه شدن توالی های لینکر حد فاصل در طی فرایند تکامل، تاثیری بر ساختار کلی پروتئین ندارد و آنزیم UvrD در هر دو گونه گیاهی دارای ساختار و فعالیت یکسانی

منابع

- Ansari A, Tarique M, Tuteja R (2014) Genetically Engineered Synthetic Miniaturized Versions of Plasmodium falciparum UvrD Helicase Are Catalytically Active. BMC Biochemistry 9: 90951-90966.
- Curti E, Smerdon SJ, Davis EO (2007) Characterization of the Helicase Activity and Substrate Specificity of *Mycobacterium tuberculosis* UvrD. Journal of Bacteriology 180:1542-1555.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.
- Jackson N, Sanchez-Moran E, Buckling E, Armstrong SJ, Jones GH, Franklin FCH (2006) Reduced meiotic crossovers and delayed prophase I progression in

- AtMLH3-deficient Arabidopsis. EMBO Journal 25: 1315-1323.
- Kimura S, Sakaguchi K (2006) DNA repairs in plants. Chemical Reviews 106: 753-766.
- Kumura K, Sekiguchi M (2002) Identification of the UvrD gene product of Escherichia coli as DNA helicase II and its induction by DNA-damaging agents. Journal of Biological Chemistry 259: 1560-1565.
- Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Huang CC, Ferrin TE (2008) Tools for integrated sequence-structure analysis with UCSF Chimera. BMC Bioinformatics 7: 339.
- Tuteja N, Ahmad P, Panda BB, Tuteja R (2009) Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. Mutation Research 681: 134-149.
- Tuteja R (2013) In silico analysis of Plasmodium species specific UvrD helicase. Communicative and Integrative Biology 6: 23125-23133.