

مطالعه *In Silico* خانواده ژنی *OLD101/SAL1*، بررسی miRNAها و

داکینگ SAL1 و موتانت *old101* در آراییدوپسیس

In Silico Study of the OLD101/SAL1 Gene Family and Investigation of miRNAs and Molecular Docking of SAL1 and the old101 in Arabidopsis thaliana

اعظم السادات موسوی زاده^۱، رضا شیرزادیان خرم آباد^{۲*}، نجف الهیاری فرد^۲

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست فناوری سامانه‌ای، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

Moosavizadeh A¹, Shirzadian-Khorramabad R^{*1}, Allahyari Fard N²

1- PhD student, Associate Professor, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Gilan, Iran

2- Associate Professor, Department of Systems Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB)

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.shirzadian@guilan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۲/۰۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۲۴)

چکیده

خانواده آنزیمی *OLD101/SAL1* به واسطه عملکرد دوگانه نوکلئوتیدازی/افسافنازی، نقش مهمی در تنظیم فرآیندهای حیاتی و پاسخ به تنش‌های محیطی در *Arabidopsis thaliana* ایفا می‌کند. مطالعه حاضر با بهره‌گیری از روش‌های *in silico* و رویکرد یکپارچه سلسله‌مراتبی، از سطح خانواده ژنی تا بررسی برهم‌کنش‌های اتمی ناشی از جهش نقطه‌ای به بررسی تکاملی و عملکردی خانواده *SAL1* پرداخته و اثر جهش نقطه‌ای *old101* در *SAL1* را مورد ارزیابی قرار داده است. بررسی خانواده فوق منجر به شناسایی ۹ همولوگ حاوی دومین حفاظت شده اینوزیتول مونوفسفاز (*Sun et al*) در آراییدوپسیس شد که علی‌رغم اشتراک در کلاس آنزیمی (EC)، دامنه‌های عملکردی متفاوتی از خود نشان می‌دهند؛ با این حال، *PAP* به‌عنوان سوبسترای مشترک در اغلب آن‌ها حفظ شده است. بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از *MEGA11* نشان داد *AtSAL1* به‌همراه *AtSAL3.1*، *AtSAL4* و *AtSAL2.1* یک خوشه تکاملی نزدیک با حمایت بوت‌استرپ بالا تشکیل می‌دهد، در حالی که *IMPL*ها و *VTC4* مسیر تکاملی متمایزتری را طی کرده‌اند. بررسی مسیرهای زیستی نشان داد *SAL1* و پارالوگ‌های آن در تقاطع مسیرهای متابولیسم فسفات، اینوزیتول فسفات و ترکیبات گوگردی قرار داشته و به‌عنوان هاب (گره) مرکزی در شبکه متابولیسمی عمل می‌کنند. تحلیل *miRNA-mRNA* پیش‌بینی می‌کند جهش *old101* منجر به بازآرایی شبکه تنظیمی در سطح رونوشت نشده و الگوی تنظیم پسا رونویسی *SAL1* حفظ شده است. مدل‌سازی ساختاری، ناحیه اطراف یون Mg^{2+} را به‌عنوان پاکت اتصال اصلی *SAL1/old101* مشخص و بستر مناسبی برای مطالعات داکینگ فراهم ساخت. نتایج داکینگ مولکولی این فرضیه را مطرح می‌کند که اگرچه جهش *old101* موجب بازآرایی موضعی پاکت اتصال و تغییر دینامیک برهم‌کنش‌ها می‌شود، اما قابلیت اتصال لیگاند حفظ شده و فعالیت آنزیمی به‌طور کامل مختل نمی‌گردد. تغییر الگوی اتصال لیگاند به‌حدی نیست که مانع قابلیت اتصال شود. همچنین یافته‌های حاضر چارچوبی علمی و دقیق برای درک سازوکارهای مولکولی این خانواده ژنی ارائه می‌کنند و پایه‌ای محکم برای مطالعات آینده در زمینه طراحی عملکردی و پیش‌بینی اثر جهش‌های دیگر روی ژن *SAL1* فراهم می‌آورند.

واژه‌های کلیدی

آنزیم *SAL1*
داکینگ مولکولی
مطالعات بیوانفورماتیک
مدل‌سازی ساختاری

مقدمه

خانواده آنزیمی اینوزیتول منوفسفاتازها (IMPs)¹، فسفاتازهای وابسته به یون Mg^{2+} ، شامل گروهی از آنزیم‌ها هستند که طی تکامل برای فعالیت خود به یون‌های فلزی دو ظرفیتی وابسته‌اند (York et al. 1995). این خانواده آنزیمی با حذف یک فسفات از سوبستراهای اینوزیتول فسفات، آن را کاتالیز می‌کنند. آنزیم‌های خانواده IMP در موجودات بسیاری شامل گیاهان، جانوران، انسان، مخمر و حتی برخی از باکتری‌ها شناسایی شده و فعالیت می‌کنند (Seelan et al. 2004).

در یک مطالعه فیلوژنی همولوگ‌های حفاظت شده خانواده آنزیمی اینوزیتول منوفسفاتازها در موجودات مختلف از جمله گیاهان، قارچ‌های خاکستری و پستانداران شناسایی شده‌اند (Gy et al. 2007). پروتئین SAL1 مشابه چندین آنزیم حساس به Li^+ و Na^+ از قبیل HAL2/MET22 در مخمر، CysQ در باکتری اشرشیاکلی و INPPs در موش، مگس سرکه و انسان است (Xiong et al. 2001). علاوه بر این پیش بینی می‌شود که آنزیم‌های همولوگ HAL2 در مخمر و SAL1 در آرابیدوپسیس از لحاظ عملکردی نیز مشابه باشند (Gy et al. 2007). آنزیم SAL1 در آرابیدوپسیس نیز، از لحاظ عملکردی متعلق به این خانواده می‌باشد (Gy et al. 2007). برخی از نقش‌های مهم آنزیم OLD101/SAL1 در گیاه آرابیدوپسیس در پژوهش‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته‌است: آنزیم SAL1 در فرآیند تغییرات وابسته به سن برگ نقش دارد (Shirzadian-Khorramabad et al. 2022). از آنجا که SAL1-IP3 تنظیم کننده منفی اسید آبسزیک و سیگنال دهی استرس در آرابیدوپسیس است، نقش مهمی را در رشد و نمو گیاه از جمله جنین زایی، خواب بذر، رشد ریشه و ساقه، تعرق و تحمل استرس ایفا می‌کند (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2004). همچنین SAL1 به عنوان یکی از ۴۰ پروتئین دخیل در بیوستتیز، اصلاح اسیدهای چرب و لیپیدهای پیچیده میتوکندری شناسایی شده‌است (Liu et al. 2022). بین سیگنال دهی رتروگرا د SAL1-PAP، هموستازی آهن و سیگنال دهی اتیلن ارتباط وجود دارد (Estavillo et al. 2011; Phua et al. 2018). به علاوه SAL1-IP3 در مسیر سیگنال دهی Ca^{+2} ، نیز نقش

دارد و تنظیم کننده قطبیت سلول و هورمون اکسین در گیاه می‌باشد (Zhang et al. 2011). ژن SAL1 با کد دسترسی AT3G63980 در آرابیدوپسیس یک زنجیر پلی‌پپتیدی شامل ۳۵۳ آمینواسید را کد می‌کند. OLD101/SAL1 یک آنزیم دو عملکردی است، فعالیت آنزیم SAL1 برای سوبستراهای آن ۳-پلی آدنوزین ۵-فسفات (PAP) و اینوزیتول ۱، ۴، ۵-تری فسفات (IP3)² بسیار اختصاصی است. ژن SAL1، همچنین با اسامی (Xiong et al. 2001) *ALX8* (Wilson et al. 2009) *FIERY1* *ATFRY1* (Quintero et al. 1996) *ATSAL1* (Xiong et al. 2004) *HOS2* (Shirzadian-Khorramabad et al. 2008) و *OLD101* (Robles et al. 2010) شناخته می‌شود.

جهش‌های مختلفی تاکنون در ژن SAL1 در آرابیدوپسیس شناخته شده‌است که منجر به تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی متعددی در گیاهان موتاسیون یافته شده است (Lee et al. 2012). یکی از موتاسیون‌های نقطه‌ای در ژن SAL1 *old101* است که موجب تأخیر پیری در گیاهان موتاسیون یافته *old101* شده و سبب تغییر فعالیت این آنزیم در تجزیه‌ی ماکروملکول IP3 شده است، جهش *old101* منجر به جایگزینی آسپارتات (GAT) به آسپاراژین (AAT) در جایگاه ۳۸ در پروتئین شده است (Shirzadian-Khorramabad et al. 2022).

با وجود مطالعات گسترده بر نقش خانواده آنزیمی OLD101/SAL1 در متابولیسم PAP و سیگنال‌دهی اینوزیتولی در آرابیدوپسیس، هنوز بررسی‌های تکاملی، شبکه‌ای، تنظیمی در سطح رونوشت و ساختاری برای این خانواده آنزیمی به طور نظام‌مند انجام نشده است. به ویژه، اثر جهش نقطه‌ای *old101* بر پیوند میان تنظیم پس ترجمه‌ای، ساختار پاکت اتصال به خوبی روشن نیست. بنابراین در این مطالعه به تحلیل خانواده ژنی OLD101/SAL1 در آرابیدوپسیس، و همچنین تنظیم بیان رونوشت‌های SAL1 و *old101* توسط miRNAها و تعاملات مولکولی با بهره‌گیری از روش‌های داکینگ بررسی شده‌اند تا ارتباط میان ویژگی‌های ساختاری و نقش عملکردی این خانواده

² 3-polyadenosine 5-phosphate³ Inositol 1, 4, 5-trisphosphate⁴ onset of leaf death 101¹ Inositol Mono Phosphatase

ژنی به صورت جامع روشن شود.

مواد و روش‌ها

۱،۲- بررسی و شناسایی خانواده ژنی *SAL1* در آرآبیدوپسیس جهت شناسایی اعضای خانواده ژنی *SAL1* در آرآبیدوپسیس بر مبنای دومین اینوزیتول منوفسفاتاز^۱، از پروفایل HMM (با کد PF00459) در سرور Pfam استفاده شده است (Mistry et al. 2021). IMP، یک دومین فسفاتاز وابسته به فلز است که تنظیم‌کننده کلیدی مسیرهای سیگنالینگ مبتنی بر اینوزیتول و هموستازی فسفات محسوب می‌شود. این دومین به دلیل ساختار محافظت‌شده، به جهش‌های نقطه‌ای در رزیجوهای پاکت اتصال بسیار حساس است (Pollack et al. 1994). این پروفایل در ابزار HMMSearch و HMMScan مورد بررسی قرار گرفت (Potter et al. 2018) و توالی‌های دارای دومین مورد نظر، و همچنین اطلاعات بیشتر این خانواده ژنی شامل مشخصات عمومی مانند نام و آیدی ژن با استفاده از بانک اطلاعاتی Plantensembl (Yates et al. 2022) مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات آنزیمی از پایگاه داده KEGG (Kanehisa et al. 2025) و پایگاه داده پروتئینی Uniprot (Bairoch et al. 2005) دریافت شد.

۲،۲- مطالعه روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی *SAL1* در این مطالعه جهت بررسی روابط تکاملی ژن‌های شناسایی شده، هم‌ردیف سازی پروتئین‌های همولوگ *SAL1* در آرآبیدوپسیس، و سپس تهیه درخت فیلوژنتیک^۲ با استفاده از نرم‌افزار MEGA11، با روش Neighbor-Joining و با استفاده از مدل p-distance برای محاسبه فاصله‌های تکاملی بین توالی‌های پروتئینی انجام شد (Tamura et al. 2021) صحت درخت رسم شده با Bootstrap=1000 ارزیابی شد.

۳،۲- تحلیل شبکه بیولوژیکی برهم‌کنش *SAL1* در آرآبیدوپسیس پروتئین *SAL1* با کد Q42546 در پایگاه داده پروتئینی Uniprot در دسترس می‌باشد. جهت بررسی شبکه ارتباطی پروتئین *SAL1* با پروتئین‌های دیگر در سلول، از سرورهای موجود نظیر

¹ Inositol Monophosphatase Family

² Phylogenetic tree

GeneMANIA استفاده شد (Warde-Farley et al. 2010). همچنین جهت یافتن مسیرهای بیولوژیکی مهم از پایگاه داده KEGG استفاده شد.

۴،۲- شناسایی و تحلیل miRNAهای تنظیم‌کننده رونوشت‌های *SAL1* و *old101*

miRNAهای هدف رونوشت ژن‌های *SAL1* و *old101*، با استفاده از پایگاه داده psRNATarget شناسایی شدند (Dai et al. 2018) و سپس توسط سرور تحت وب RNAhybrid (Krüger and Rehmsmeier 2006) مورد آنالیز قرار گرفتند.

۵،۲- تحلیل ساختاری جایگاه اتصال و مدل‌سازی موتاسیون *old101* در پروتئین

ساختار کریستالی *SAL1* با شناسه (PDB ID: 8F9Y) و وضوح Å ۲،۶۰ از بانک داده پروتئین RCSB PDB دریافت شد (Burley et al. 2025). همچنین جهت انجام مطالعات ساختاری، مدل‌سازی و اعتبار سنجی ساختار پروتئین *old101* توسط نرم‌افزار AlphaFold₂ colab انجام شده است. میزان دقت و صحت ساختار پیش‌بینی‌شده *old101*، توسط سرور ProTSAV مورد صحت سنجی قرار گرفت (Singh et al. 2016). نتایج اعتبارسنجی نشان داد که مدل در محدوده قابل قبول کیفیت ساختاری قرار دارد که بیانگر مناسب بودن ساختار پیش‌بینی شده برای انجام مطالعات بعدی شامل تحلیل‌های ساختاری، داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی است.

در این مطالعه جهت شناسایی جایگاه اتصال^۳ لیگاند- پروتئین، از همولوگ یعنی HAL2 در مخمر الگوبرداری شده است. بدین منظور توسط نرم‌افزار Pymol روی دو ساختار *SAL1* و HAL2 هم‌ترازی (Superimposition) اعمال شد.

۶،۲- مطالعه برهم‌کنش پروتئین- لیگاند (Docking Analysis) برهم‌کنش‌های مولکولی میان *SAL1* و لیگاندهای آن، IP3 و PAP، با نرم‌افزار DockThor تحلیل شد (Guedes et al. 2024). ساختارهای سه‌بعدی لیگاندها از پایگاه PubChem دریافت شدند

³ Active site

ژن اختصاصی درج شده است و در صورت نداشتن نام اختصاصی، پس از عبارت IMP، براساس ترتیب قرارگیری و همچنین شماره رونوشت شماره گذاری شدند. اطلاعات آنزیمی در جدول (۱) شامل: مشخصات عمومی مانند نام و آیدی ژن، سویستراهای اختصاصی و کلاس آنزیمی (EC) گردآوری شد. بررسی تطبیقی آنزیم های گزارش شده (AtIMPL1، AtIMPL2.1، AtSAL3.1، AtSAL4، AtVTC4، AtHL، AtIMP1.1، AtSAL1، AtSAL2.1) در جدول (۱)، نشان می دهد که علی رغم تشابه در شماره EC، دامنه ی واقعی عملکرد این آنزیم ها متنوع است. بخشی از آنزیم ها در کلاس های EC:3.1.3.7 و EC:3.1.3.57 قرار می گیرند که عمدتاً فسفاتازهای مرتبط با PAP و IP3/Ins(1,4)P2 را شامل می شوند (مانند AtSAL1)، در حالی که برخی دیگر (مانند AtHL) با وجود داشتن EC مشابه، عمدتاً PAP specific هستند.

(S. Kim et al. 2025). در تنظیمات داکینگ، ابعاد باکس محاسباتی برابر ۱۵×۱۷×۱۵ آنگستروم و بهترین حالت برهم کنش بر اساس کمترین انرژی اتصال انتخاب شد. تحلیل بصری نتایج با نرم افزار Pymol (DeLano 2002) و Ligplot (Agrawal et al. 2024) انجام گرفت. تمامی مراحل داکینگ در شرایط ثابت به منظور کاهش خطای محاسباتی انجام شدند.

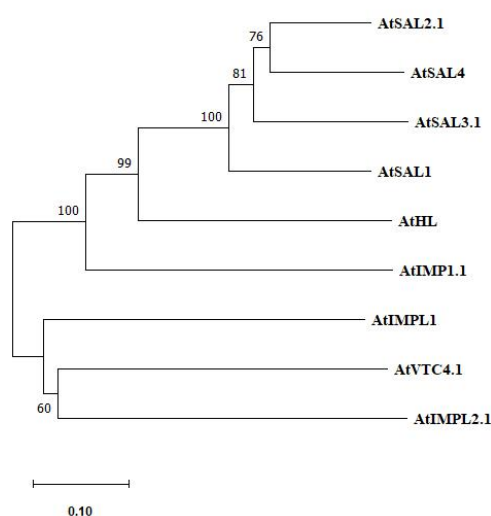
نتایج و بحث

۱،۳- شناسایی و مطالعه خانواده آنزیمی SAL1
این مطالعه به منظور شناسایی ژن های دارای دومین IMP در آراییدوپسیس انجام شد. اعضای خانواده ژنی SAL1 با کد شناسایی Pfam: PF00459 در آراییدوپسیس شناسایی شدند و در نهایت ۹ همولوگ موجود در آراییدوپسیس معرفی شد. برای نامگذاری ژن ها، ابتدا پیشوند At برای آراییدوپسیس، و سپس اسم

جدول ۱- بررسی آنزیمی همولوگ های SAL1 در *Arabidopsis thaliana*

EC	substrats	Structure	Enzyme name	Acc. number	References
EC:3.1.3.7 3.1.3.57	PAP				(Gy et al., 2007)
	IP3	Available	AtSAL1	AT5G63980	(Xiong et al., 2001)
	PAP P2 Ins(1,4)	-	AtSAL2.1	AT5G64000	Prediction in Uniprot: (Gil- Mascarell et al., 1999)
	PAP	-	AtSAL3.1	AT5G63990	Prediction in Uniprot: (Gil- Mascarell et al., 1999)
EC:3.1.3.7	PAP	-	AtSAL4	AT5G09290	Prediction in Uniprot: (Gil- Mascarell et al., 1999)
	PAP	-	AtHL	AT5G54390	Prediction in Uniprot: (Gil- Mascarell et al., 1999)
	PAP	-	AtIMP1.1	AT4G05090	Prediction in Uniprot: (Gil- Mascarell et al., 1999)
EC:3.1.3.25	Gal L- 1-P D-Ins 3-P Fru 1,6-bisP D-Glc 6-P	-	AtVTC4.1	AT3G02870	Prediction in Uniprot: (Torabinejad et al., 2009)
	D-Ins 3-P	-	AtIMPL1	AT1G31190	(Petersen et al., 2010)
	D-Ins 3-P L-Gal 1-P D-Ins 1-P	-	AtIMPL2.1	AT4G39120	(Petersen et al., 2010)

AtSAL1 قرار گرفتند و پیش بینی می‌کند واگرایی تکاملی نسبی در عین حفظ خویشاوندی صورت گرفته‌است.



شکل ۲- روابط فیلوژنتیکی پروتئین‌های IMP از آراییدوپسیس مقادیر درج‌شده روی شاخه‌ها بیانگر بوت‌استرپ هستند و نوار مقیاس (۰,۱۰) نرخ جانیشینی اسیدآمینه در هر رزیکو را نشان می‌دهد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 و روش Neighbor-Joining و با ۱۰۰۰ bootstraps ترسیم شده‌است.

در مقابل، AtIMPL1، AtVTC4.1 و AtIMPL2.1 خوشه‌ای مستقل و دورتر تشکیل دادند که بیانگر فاصله‌ی تکاملی بیشتر نسبت به پروتئین AtSAL1 است.

یافته‌های این مطالعه بیانگر آن است که اگرچه اعضای خانواده‌ی SAL1 در طول تکامل دچار تنوع عملکردی قابل توجهی شده‌اند، اما از یک چارچوب کاتالیتیک محافظت شده و مشترک برخوردارند (Styer et al. 2004).

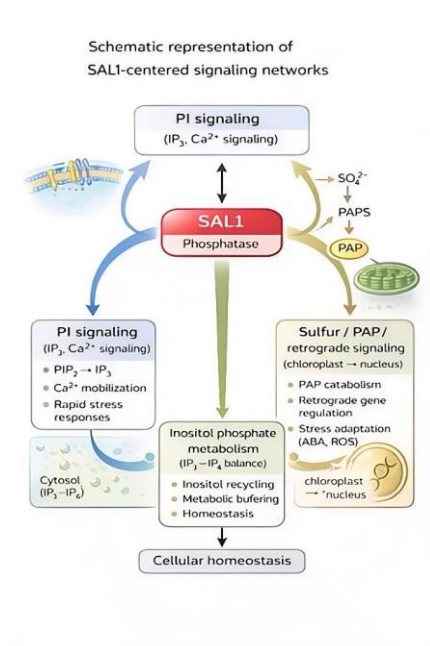
با توجه به نتایج حاصل از تحلیل‌های تکاملی، شناسایی همولوگ‌ها و بررسی روابط فیلوژنتیکی خانواده SAL1 در *Arabidopsis thaliana* مشخص شد آنزیم SAL1 به‌عنوان فرم مرجع (Canonical) دارای داده ساختاری می‌باشد و برای تحلیل‌های ساختاری در دسترس است (Chan et al. 2016)، که در این مطالعه مبنای مطالعات ساختاری می‌باشد. همچنین آنزیم SAL1 همزمان نقش فسفاتازی/ نوکلئوتیدازی را در این خانواده بر عهده دارد و از این‌رو به‌عنوان یک مدل مناسب برای مطالعه‌ی عمیق‌تر انتخاب شد. بر همین اساس، در ادامه‌ی این مطالعه تمرکز

در مقابل، آنزیم‌های طبقه‌بندی شده در EC:3.1.3.25 فسفاتازهایی با طیف عملکردی وسیع‌تر محسوب می‌شوند که روی انواع قند-فسفات‌ها و اینوزیتول‌فسفات‌ها عمل می‌کنند. هرچند تأیید تجربی مستقیم آن برای تمامی همولوگ‌ها هنوز گزارش نشده است. خانواده‌ی SAL1 /IMP در گیاهان صرفاً تک‌سوبستری نیست، زیرا در آنزیم SAL1 و دیگر همولوگ‌ها نیز ترجیحات متفاوتی برای سوبسترا دارند (Nourbakhsh et al. 2015). حفاظت بالای دومین کاتالیتیک و موتیف‌های فعال در میان همولوگ‌های خانواده‌ی SAL1/IMP نشان می‌دهد که PAP به‌احتمال زیاد یک سوبسترای عملکردی مشترک در سطح این خانواده بوده است (Estavillo et al. 2011; Gil-Mascarell et al. 1999; Steidle et al. 2016)، همچنین باید توجه داشت که تخصیص شماره‌های EC در KEGG بیشتر بر اساس شباهت توالی و پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی انجام می‌شود و لزوماً با ویژگی‌های بیوشیمیایی واقعی هر آنزیم منطبق نیست.

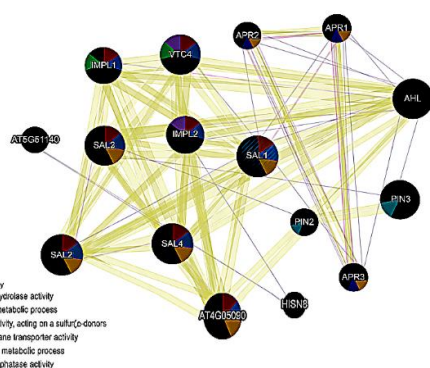
در مجموع یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که در حالی‌که اعضای خانواده SAL1، احتمالاً از یک چارچوب کاتالیتیک مشترک برخوردارند، در طول تکامل دچار تنوع عملکردی شده‌اند و این امر احتمالاً نقش آن‌ها را در فرآیندهای متفاوتی در گیاه تعیین کرده است.

۲,۳- مطالعه روابط فیلوژنتیکی خانواده ژنی SAL1 در آراییدوپسیس

این مطالعه جهت بررسی روابط تکاملی ژن‌های شناسایی شده، همردیف سازی پروتئین‌های همولوگ SAL1 در آراییدوپسیس و سپس رسم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA11 انجام شده است. نتیجه به‌دست آمده یک درخت فیلوژنتیکی از نوع Unrooted است، می‌توان گفت اغلب این خوشه‌بندی‌ها بسیار قابل اعتمادند. نتایج بررسی روابط فیلوژنتیکی نشان داد که ژن‌های شناسایی شده در گروه‌های تکاملی مجزا قرار گرفتند (شکل ۲). تحلیل فیلوژنتیکی نشان داد که AtSAL1 همراه با AtSAL2.1 و AtSAL4، AtSAL3.1 یک خوشه‌ی کاملاً مجزا با حمایت بوت‌استرپ بالا (۸۱-۱۰۰ درصد) تشکیل می‌دهد که بیانگر هم‌ریشگی نزدیک و حفظ بالای توالی در این زیرخانواده است. AtHL و AtIMP1.1 در موقعیتی مجاور اما جدا از خوشه



شکل ۳- بر مبنای پایگاه داده KEGG: مسیر واکنش‌هایی که در آن آنزیم SAL1 فسفاتاز/نوکلوئیداز دخیل است توسط نرم‌افزار گرافیکی Illustrator مدل‌سازی شده‌است. شامل مسیر متابولیسم اینوزیتول فسفات، مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول و مسیر متابولیسم سولفور یکپارچه سازی و نشان داده شده است.



شکل ۴- شبکه تعاملات عملکردی و هستی‌شناسی ژن برای خانواده آنزیم SAL1 در *Arabidopsis thaliana* خطوط باریک‌تر نشانه ارتباط ژن‌های هم بیان و خطوط ضخیم‌تر ارتباط پروتئین‌های با دومین مشابه همچنین قسمت‌های رنگی روی هر پروتئین، سهم آن پروتئین در عملکردهای بیولوژیکی مختلف را نشان می‌دهد.

گره‌ها (دایره‌ها) پروتئین‌ها هستند که توسط یال‌ها (خطوط)، انواع ارتباط‌ها هم‌بیانی^۱، تعاملات فیزیکی و اشتراک دومین‌های ساختاری^۲ به یکدیگر متصل شده‌اند؛ ضخیم‌بودن یال‌ها

از تحلیل سطح خانواده به بررسی چندلایه‌ی ژن- پروتئین SAL1 و موتانت آن *old101* معطوف می‌شود.

۳،۳- بررسی مسیرهای بیولوژیکی SAL1 و برهم‌کنش‌های مولکولی آن در آرآبیدوپسیس

بر اساس بررسی انجام شده در پایگاه داده KEGG، آنزیم SAL1 در مسیرهای بیولوژیکی متابولیسم اینوزیتول فسفات (Inositol (phosphate metabolism)، مسیر متابولیسم سولفور (Sulfur (metabolism) و مسیر متابولیسم سولفور مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول (Phosphatidylinositol signaling system) نقش دارد. به‌منظور تبیین نقش تنظیمی ژن SAL1 با استفاده از پایگاه KEGG، و سپس به‌صورت مفهومی در شکل (۳) مدل‌سازی شدند نتایج شکل (۳) نشان می‌دهد که آنزیم SAL1 در محل تلاقی این مسیرها قرار گرفته و به‌عنوان یک گره تنظیمی مرکزی، هموستازی فسفات‌های اینوزیتولی را کنترل می‌کند.

بر مبنای بررسی داده‌های پایگاه KEGG (شکل ۳)، آنزیم SAL1 با فعالیت فسفاتازی خود در کاهش سطح مولکول IP₃ و مشتقات فسفریله‌ی آن نقش دارد و از این طریق شدت و تداوم سیگنالینگ وابسته به IP₃ را تعدیل می‌کند. تولید IP₃ در اثر فعالیت فسفولیپاز C در مسیر سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول، منجر به فعال‌سازی مسیرهای وابسته به کلسیم می‌شود (Broad et al. 2001). مسیر مفهومی یکپارچه‌شده نشان می‌دهد که آنزیم SAL1 از طریق مشارکت در مسیر متابولیسم سولفور و سیگنالینگ فسفاتیدیل اینوزیتول، یک شبکه‌ی به‌هم‌پیوسته از تنظیم متابولیکی و سیگنالینگ را شکل می‌دهند که در مرکز آن قرار دارد. چنین الگویی با مدل‌های شناخته‌شده‌ی تکامل خانواده‌های آنزیمی سازگار است که در آن‌ها حفظ هسته‌ی پاکت اتصال همراه با واگرایی عملکردی، امکان سازگاری با نیازهای فیزیولوژیک متنوع را فراهم می‌کند (Wilson et al. 2009).

در بخش دیگری از مطالعه، با استفاده از سرور GeneMANIA پیش‌بینی شبکه‌های ژنی-پروتئینی انجام شد. شکل (۴) یک شبکه‌ی برهم‌کنش پروتئینی را نشان می‌دهد که در مرکز آن اعضای خانواده پروتئینی SAL1 قرار دارند.

¹ Co-expression genes

² Shared protein domains

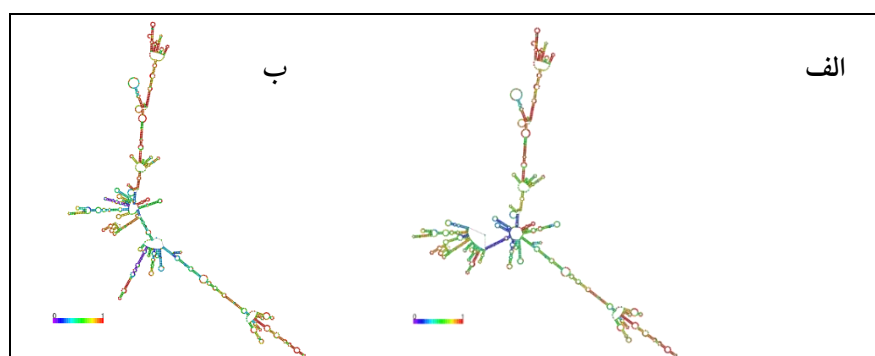
فسفات‌های اینوزیتولی نیز فعال است و می‌تواند فعالیت فسفاتازی روی IP_3 داشته باشد که خود با تنظیم سیگنالینگ کلسیمی، انتقال اکسین (Zhang et al. 2011)، متابولیسم ترکیبات گوگردی (Lee et al. 2012) و پاسخ به استرس مرتبط است (Chen et al. 2012; Xiong et al. 2001).

۴،۳- بررسی ساختار ثانویه mRNA ژن‌های *SAL1* و *old101* در این مطالعه، ساختار ثانویه mRNAهای *SAL1* و *old101* در شرایط حداقل انرژی آزاد (MFE) مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵) از نظر کارکردی، حلقه‌ها و نواحی تک‌ رشته‌ای (که در نقشه انرژی با رنگ‌های زرد و قرمز مشخص می‌شوند) بیشترین احتمال برای برهم‌کنش با miRNAها را دارند، در حالی‌که ساقه‌های پایدارتر (آبی و سبز) کمتر در دسترس قرار می‌گیرند. هدف از انجام این بخش، ارزیابی این موضوع بوده است که آیا موتاسیون موجود در *old101* فراتر از تغییر در توالی کدکننده، باعث تغییر در سازمان‌دهی ساختار ثانویه mRNA می‌شود یا خیر.

نشان‌دهنده ارتباط قوی‌تر یا شواهد بیشتر برای تعامل است. بخش رنگی هر گره، غنای آن ژن در اصطلاحات مختلف هستی‌شناسی ژن (GO) را بازتاب می‌دهد؛ رنگ‌های مرتبط با «فعالیت فسفاتازی»، «فعالیت هیدرولاز استرهای فسفری»، «متابولیسم ترکیبات حاوی گوگرد»، «مسیرهای اینوزیتول فسفات» و «فعالیت ترانسپورتر غشایی اکسین» در هر گره دیده می‌شود.

این الگو پیش‌بینی می‌کند که اعضای پروتئینی *SAL1*، *SAL2*، *SAL3*، *SAL4* و *AHL* در هاب مرکزی شبکه قرار گرفته و با آنزیم‌های درگیر در متابولیسم فسفات، متابولیسم ترکیبات گوگردی (*APR1*، *APR2*، *APR3*) انتقال اکسین (*PIN2*، *PIN3*) و مسیرهای مرتبط با اینوزیتول فسفات (*IMPL1*، *IMPL2*)، *VTC4* به شدت متصل‌اند.

نتایج این مطالعه و دیگر مطالعات پیشین نشان می‌دهد که از یک سو، *SAL1* نقش مشخص و قطعی در مسیر رتروگراد *SAL1*-PAP دارد (Phua et al. 2018)؛ از سوی دیگر، این آنزیم در مسیر

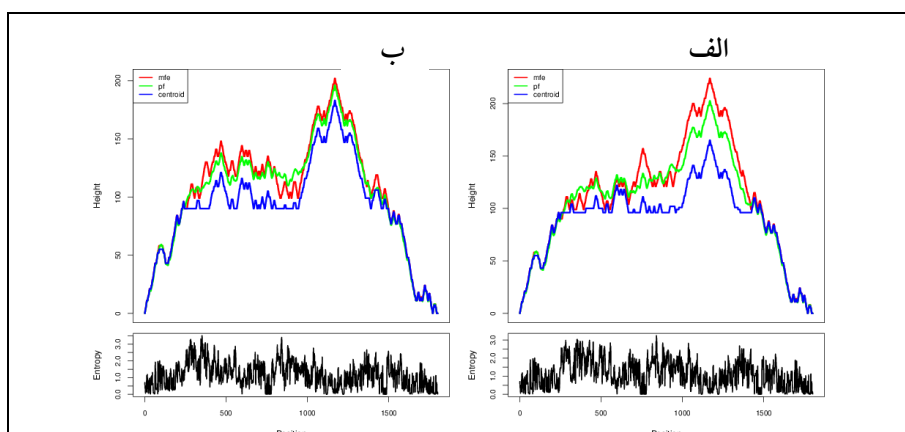


شکل ۵- ساختار ثانویه mRNA در حالت حداقل انرژی آزاد (MFE) برای دو ژن الف) *SAL1* mRNA و ب) *old101* mRNA. رنگ‌بندی نشان‌دهنده‌ی پایداری نسبی نواحی مختلف RNA است؛ به‌طوری‌که نواحی آبی دارای بیشترین پایداری (ΔG کمتر) و نواحی قرمز دارای کمترین پایداری می‌باشند.

بیشتر حالت فشرده دارد و شامل چندین ساقه کوتاه‌تر و حلقه‌های کوچک‌تر در اطراف مرکز می‌باشد.

در بخش دیگری از مطالعه به بررسی پایداری ساختار mRNA حوالی نوکلئوتید موتاسیون یافته پرداخته شد. نمودار mountain plot نشان می‌دهد حوالی نوکلئوتید ۳۳۸ در هر دو رونوشت در ناحیه‌ای با جفت‌بازی پایدار قرار دارد. ساختار ثانویه mRNA با استفاده از RNAfold پیش‌بینی شد، RNA موتانت *old101* پایداری مشابهی با رونوشت‌های طبیعی نشان داد، اما تغییرات در ساختار ممکن است بر تنظیم پسارونویسی تأثیر بگذارد.

از آنجا که ساختار ثانویه mRNA می‌تواند دسترسی ریبوزوم، اسکن ناحیه 5'UTR و دینامیک ترجمه را مستقل از شبکه miRNA-mRNA تحت تأثیر قرار دهد، این تحلیل برای تفکیک اثرات تنظیمی در سطح RNA از اثرات مستقیم موتاسیون پروتئینی ضروری بوده است (Gu et al. 2014). نتایج این پیش‌بینی نشان می‌دهد که در mRNA *SAL1* یک بازوی طولانی و پایدار از مرکز ساختار منشعب می‌شود که در انتهای خود شامل چندین حلقه کوچک است. در حالی‌که، ساختار *old101* mRNA



شکل ۶- نمودار mountain plot ساختار ثانویه mRNA در حالت حداقل انرژی آزاد (MFE) برای دو ژن الف) *SAL1* mRNA و ب) *old101* RNA. رنگ‌بندی نشان‌دهنده‌ی پایداری نسبی نواحی مختلف RNA است؛ به‌طوری‌که نواحی آبی دارای بیشترین پایداری (ΔG کمتر) و نواحی قرمز دارای کمترین پایداری می‌باشند.

جدول ۲- miRNAهای دخیل در تنظیم بیان ژن‌های *SAL1* و *old101*

miRNA Acc.	Target	Alignment	MFEs in mRNA- miRNA kcal/mol
ath-miR5025	mRNA <i>SAL1&old101</i>	miRNA 21 ACAGUGAAUGUAUAUAUGUCA 1 ::: ::::: :::::	-21.7
		Target 1138 GUUCAGGGACAUAUAUGCAGC 1158	
ath-miR5631	mRNA <i>SAL1& old101</i>	miRNA 21 UUUUAAUACAGAAAGGACGGU 1 ::: ::::: :::::	-22.1
		Target 1288 UAAAUUGCUUCUUUCCUCCU 1308	
ath-miR2112-3p	mRNA <i>SAL1& old101</i>	miRNA 21 ACGCGUUUACGCCUAUAUUUC 1 ::: ::::: :::::	-27.2
		Target 1572 UGUCGACAUGCGGAUGUAAAU 1592	
ath-miR5022	mRNA <i>SAL1& old101</i>	miRNA 21 GUAAGCUAGUAUGGGGUACUG 1 ::: ::::: :::::	-25.8
		Target 1346 CAUUUGAUGAUGUUCUAUGUU 1366	
ath-miR5628	mRNA <i>SAL1& old101</i>	miRNA 21 AUUAGUAUAGAAGCGAUAAG 1 ::: ::::: :::::	-21.9
		Target 877 AAGUCAAUCUUC-UUAUUUC 896	

با توجه به نقش کلیدی مولکول‌های miRNA در تنظیم پسا رونویسی بیان ژن و تأثیر آن‌ها بر کارکردهای سلولی، miRNAهای دخیل در تنظیم بیان ژن‌های *SAL1* و *old101* در سطح پس از رونویسی مورد بررسی قرار گرفتند.

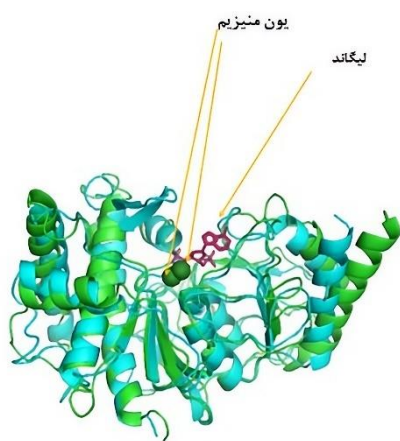
پنج miRNA شامل ath-miR5025، ath-miR5631، ath-miR2112-3p، ath-miR5022 و ath-miR5628 به‌عنوان تنظیم‌کننده‌های هر دو رونوشت *SAL1* و *old101* پیش‌بینی شدند. میزان مکمل‌بودن توالی miRNA با ناحیه هدف در mRNA (ستون Alignment)، مقادیر برابر حداقل انرژی آزاد اتصال (MFE) برای تمامی miRNAها در هر دو حالت طبیعی و موتاسیون یافته و مقادیر منفی MFE در بازه‌ای حدود 21- تا 27- کیلوکالری بر مول، نشان‌دهنده‌ی تشکیل کمپلکس‌های پایدار

با مطالعات تکمیلی در بخش بعدی، به بررسی تنظیمات پس از رونویسی پرداخته می‌شود.

تحلیل ساختار ثانویه mRNA برای ژن‌های *SAL1* و *old101* با پیش‌بینی حالت کمینه انرژی نشان داد که نوکلئوتید ۳۳۸ در هر دو رونوشت درون یک ناحیه تاخوردۀ قابل‌توجه قرار دارد. مطالعات تجربی نشان داده‌اند که ساختار ثانویه‌ی RNA و دسترسی ساختاری محل‌های هدف miRNA می‌توانند به‌طور قابل‌توجهی اثرگذاری mRNA-miRNA را تعدیل کنند (Kertesz et al. 2007).

۵،۳- شناسایی برهمکنش‌های miRNA-mRNA در رونوشت‌های *old101* و *SAL1*

نیست. بنابراین مقایسه نحوه اتصال پروتئین- لیگاند همولوگ (HAL2)، می‌تواند الگوی مناسبی برای مطالعه حاضر باشد (Gil-Mascarell et al. 1999). از این رو مقایسه ساختاری Superimposition انجام شد (شکل ۸).



شکل ۸- نتیجه Superimposition ساختار پروتئین SAL1 و HAL2 با $RMSE=1.279$. ساختار آبی رنگ پروتئین SAL1 و ساختار سبز رنگ HAL2 می‌باشد. یون Mg^{2+} به رنگ سبز تیره به شکل گوی، و لیگاند به رنگ بنفش نشان داده شده‌است.

ساختار آنزیم SAL1 با شماره PDB: 8F9Y در پایگاه RCSB دسترسی می‌باشد. شکل (۸) نشان می‌دهد دو پروتئین همولوگ SAL1 و HAL2 باهم مطابقت داده شدند، $RMSD = 1.279$. نشان دهنده مشابهت قابل قبول دوساختار مورد نظر است. بنابراین محدوده اطراف یون Mg^{2+} را می‌توان به عنوان پاکت اتصال جهت انجام مطالعات داکینگ در نظر گرفت (Andreini et al. 2008).

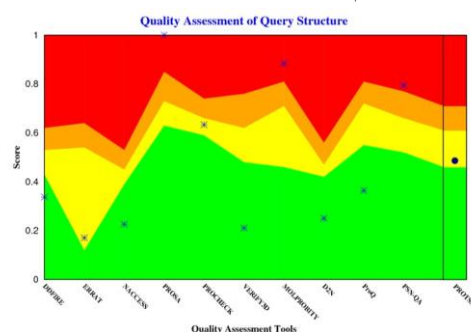
۷،۳- مطالعه و مقایسه برهمکنش پروتئین‌ها و لیگاند با استفاده از داکینگ مولکولی

جهت مقایسه برهمکنش پروتئین و لیگاند کمپلکس‌های مورد مطالعه، به جهت انرژی اتصال لیگاندها، انرژی الکترواستاتیک و انرژی بین مولکول در جدول (۳) آورده شده‌است.

miRNA-mRNA است. در مجموع، یکسان بودن توالی‌های هدف (به جز در یک نوکلئوتید)، الگوی هم‌ترازی و انرژی اتصال در هر دو ژن حاکی از آن است که جهش موجود در ژن *old101* تغییری در جایگاه اتصال یا قدرت برهم‌کنش miRNAها ایجاد نکرده است (Bartel 2009). مطالعه بخش پیشین پیش‌بینی کرد که ساختار ثانویه mRNA و پایداری ترمودینامیکی آن می‌تواند از طریق تعیین دسترس‌پذیری ساختاری جایگاه‌های هدف، بر کارایی برهم‌کنش‌های miRNA-mRNA اثرگذار باشد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگرچه احتمالاً در رونوشت موتانت *old101* تغییرات موضعی محدودی در ساختار ثانویه مشاهده می‌شود، این تغییرات منجر به تغییر معنی‌دار در پایداری کلی رونوشت نشده‌اند، به تبع آن، الگوی miRNAهای مشترک میان رونوشت وحشی و موتانت حفظ شده و شواهدی از بازآرایی شبکه‌ی تنظیمی miRNA-mRNA مشاهده نمی‌شود (Kertesz et al. 2007).

۶،۳- بررسی ساختاری جایگاه اتصال در ساختار پروتئین و مدل‌سازی پروتئین *old101*

در این مطالعه جهت برهم‌کنش‌های پروتئین- لیگاند، ساختار پروتئین SAL1 و *old101* آماده سازی شد. بنابراین ساختار موتانت *old101* با الگوی ساختاری SAL1، مدل‌سازی شد، نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد که مدل در محدوده زرد (بسیار نزدیک به سبز) از لحاظ کیفیت ساختاری قرار می‌گیرد که نشان‌دهنده کیفیت مناسب و قابلیت استفاده از آن در تحلیل‌های ساختاری و مطالعات برهم‌کنش مولکولی است (شکل ۷).



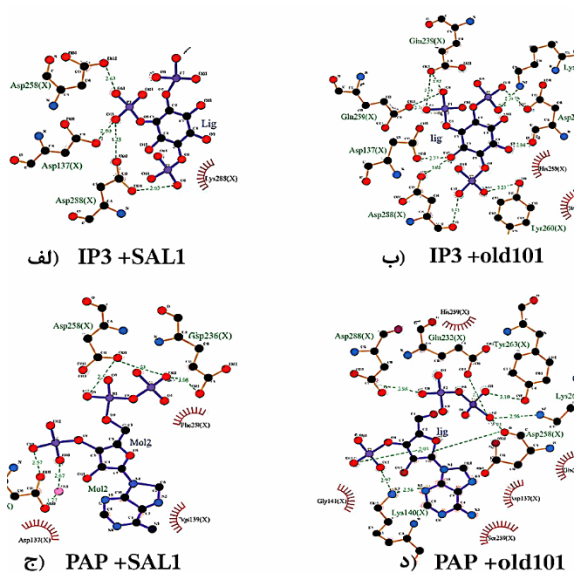
شکل ۷- نتیجه ارزیابی ساختار مدل شده *old101* توسط نرم افزار

ProTSAV

از سوی دیگر جهت مطالعات داکینگ، جایگاه اتصال این پروتئین‌ها حائز اهمیت است، و اطلاعات کاملی از آن در دسترس

جدول ۳- مقادیر میل ترکیبی لیگاند در مقابل جایگاه فعال آنزیم پس از انجام داکینگ با استفاده از برنامه DockThor

انرژی نهایی	انرژی الکتروستاتیک	انرژی بین مولکولی	انرژی پیوندی	ترکیب
kcal/mol	kcal/mol	kcal/mol	kcal/mol	Compound
-۱۴۷،۷۴۳	-۷۶،۷۱۷	۱۵،۳۹۸	-۶،۲۳۶	(SAL1+IP3)
-۱۳۲،۱۹۵	-۷۶،۶۷۸	۷،۱۸۷	-۶،۵۱	(SAL1+PAP)
-۱۵۳،۰۸	-۹۱،۲۷۹	۱۹،۴۵۵	-۵،۹۹۷	(old101+IP3)
-۱۳۵،۹۹	-۸۲،۸۴	۱۰،۲۱۷	-۶،۶۷	(old101+PAP)



شکل ۹- تحلیل تعامل پروتئین-لیگاند شامل کمپلکس‌های داک شده است. بر اساس تصویر LigPlot خطوط سبز نشان‌دهنده پیوندهای هیدروژنی بین لیگاند و رزیدوهای درگیر هستند. رزیدوهایی که از طریق پیوندهای هیدروفوبیک با لیگاند در ارتباطند، به صورت کمان‌های قرمز نشان داده شده‌اند. مولکول لیگاند به صورت مخفف Lig نوشته شده است.

در کمپلکس **IP3 + SAL1**، حدود ۳ پیوند هیدروژنی مؤثر عمده‌تاً بین گروه‌های اکسیژنی لیگاند و Asp/Glu‌های پکت اتصال وجود دارد. سایر برهم‌کنش‌ها شامل Lys285 با نقش الکترواستاتیک، Tyr263 جهت پایداری هندی و چند تماس آب‌گریز ضعیف برای قفل شدن لیگاند به چشم می‌خورد (Myslinski et al. 2011). در حالی‌که، در کمپلکس **IP3 + old101** پکت کمی بازرتر شده و لیگاند برای پایدار ماندن با رزیدوهای جانبی درگیر شده است.

در این جدول، انرژی نهایی (Total Energy) به عنوان نمایانگر انرژی کلی سیستم پس از تشکیل کمپلکس آنزیم-لیگاند ارائه شده است، که مقادیر منفی آن نشان‌دهنده پایداری کمپلکس‌ها است؛ انرژی الکتروستاتیک (Electrostatic Energy) ناشی از تعاملات الکتروستاتیکی بین بارهای مثبت و منفی در آنزیم و لیگاند است و مقادیر منفی آن نشان‌دهنده وجود تعاملات قوی الکتروستاتیکی است؛ انرژی بین مولکولی (vdW Energy) نیز به انرژی ناشی از نیروهای واندروالس بین مولکول‌ها اشاره دارد و می‌تواند بر پایداری کمپلکس تأثیر بگذارد؛ و در نهایت، انرژی پیوندی (Affinity) نشان‌دهنده میل ترکیبی لیگاند به آنزیم است و مقادیر منفی آن نشان‌دهنده میل بالای لیگاند به اتصال به آنزیم است. تحلیل داکینگ مولکولی این فرضیه را مطرح می‌کند که جهش *old101* منجر به اختلال بنیادی در شناسایی لیگاند توسط پروتئین SAL1 نمی‌شود. لیگاندهای IP3 و PAP در هر دو حالت طبیعی و موتاسیون‌یافته قادر به استقرار در پکت اتصال باقی می‌مانند که بیانگر حفظ چارچوب عملکردی جایگاه فعال است.

جهت بررسی بیشتر و مقایسه برهم‌کنش‌های آنزیم-لیگاند در کمپلکس‌های SAL1 و *old101*، از نرم‌افزار LigPlot استفاده شد. هدف اصلی این مطالعه شناسایی رزیدوهای کلیدی دخیل در سطح دوبعدی ساختار و لیگاند است. در شکل (۹) تعامل پروتئین-لیگاند چهار کمپلکس مورد مطالعه نشان داده شده است. در همه ترکیبات، لیگاند دقیقاً در پکت اتصال آنزیم قرار گرفته است و با رزیدوهای کلیدی شامل: Asp288، Asp258، Asp137، Glu232، Tyr263، Lys285 ارتباط دارد. بنابراین داکینگ از نظر مکان اتصال (binding site fidelity) معتبر است.

مشاهده شده در مسیرهای متابولیکی و سیگنالینگ فسفات به صورت یکپارچه تفسیر شود.

نتیجه گیری کلی

نتایج این مطالعه پیش بینی می کند که خانواده ی ژنی/پروتئینی *SAL1* یک سامانه سلسله مراتبی و ماژولار را تشکیل می دهد که در آن آنزیم *SAL1* به عنوان یک هاب (گره) تنظیمی سیتوزولی-پلاستی، نقش محوری در اتصال مسیرهای سیگنالینگ فسفات، متابولیسم اینوزیتول فسفات، متابولیسم سولفور و فرآیندهای وابسته به اکسین ایفا می کند، در حالی که سایر همولوگ ها با نقش های تخصصی تر یا پایه ای تر، پایداری و تداوم این شبکه ی متابولیکی را تضمین می کنند. در این مطالعه، انتظار می رود که اثرات فنوتیپی موتاسیون نه از طریق تغییر در سطح رونوشت، بلکه عمدتاً در سطح ساختار و عملکرد پروتئین بروز یابد. این برهمکنش ها برای عملکرد صحیح پروتئین *SAL1* در متابولیسم فسفات حیاتی هستند. این نتیجه می تواند به درک بهتر از نحوه عملکرد این پروتئین در شرایط محیطی مختلف کمک کند. یافته های حاضر نیازمند اعتبارسنجی آزمایشگاهی و مطالعات تجربی تکمیلی هستند، همچنین جهت مطالعات آینده پیشنهاد می شود شناسایی اثرات دیگر لیگاندها و موتاسیون ها بر فعالیت *SAL1* نیز شناسایی شوند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه گیلان و پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری جهت فراهم کردن امکانات لازم قدردانی می کنند.

در کمپلکس *SAL1 + PAP*، Tyr263 در برهمکنش های غیرهیدروژنی و Lys ها بیشتر در الکترواستاتیک و پایداری بار منفی PAP نقش دارند (Salonen, 2011; Steidle et al., 2016).

در حالیکه در کمپلکس *PAP + old101* برخی پیوندهای مستقیم PAP با Asp137 ضعیف تر یا حذف شده اند. در عوض، تعامل با یون Mg^{2+} باعث ایجاد تعاملات غیرمستقیم و جبرانی شده و از فروپاشی کمپلکس جلوگیری می کند (Andreini et al. 2008).

نهایتاً بررسی نمای کلی تعاملات در شکل (۹) و جدول (۳)، افزایش تعداد پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های جانبی را در کمپلکس موتاسیون یافته نشان داد، که این موضوع احتمالاً با بهبود انرژی اتصال محاسبه شده در نتایج داکینگ همخوانی دارد. اگرچه در ساختارهای موتاسیون یافته تعداد پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های الکترواستاتیک افزایش یافته است، این تماس ها عمدتاً ماهیت جبرانی داشته و از نظر هندسی بهینه نیستند (Klebe, 2015). بنابراین پیش بینی شود جهش ایجاد شده در ساختار *ol101*، موجب بازآرایی موضعی پاکت اتصال شده است. اهمیت این تمایز در آن است که تغییر در کارایی آنزیمی *SAL1* صورت گرفته، حتی در شرایطی که تنظیم رونوشت و شبکه ی miRNA دست نخورده باقی مانده باشد. داکینگ مولکولی در مطالعه ی حاضر به عنوان یک حلقه ی واسطه تحلیلی میان تکامل خانواده ی *SAL1*، ویژگی های ساختاری پروتئین و پیامدهای بیوشیمیایی و تنظیمی آن عمل می کند. تمرکز بر شناسایی رزیجوهای کلیدی دخیل در شناسایی لیگاند امکان می دهد تا ارتباط میان تغییرات تکاملی در سطح توالی، بازآرایی های ساختاری و اثرات عملکردی

منابع

- Agrawal R, Punarva H, Heda GO, Vishesh Y, Karunakar P (2024) VinaLigGen: a method to generate LigPlots and retrieval of hydrogen and hydrophobic interactions from protein-ligand complexes. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 42: 12040-12043.
- Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, Holliday GL, Thornton JM (2008) Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry* 13: 1205-1218.
- Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M

- (2005) The universal protein resource (UniProt). *Nucleic acids research* 33: D154-D159.
- Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *cell* 136: 215-233.
- Broad LM, Braun F-J, Lievremon J-P, Bird GSJ, Kurosaki T, Putney JW (2001) Role of the phospholipase C-inositol 1, 4, 5-trisphosphate pathway in calcium release-activated calcium current and capacitative calcium entry. *Journal of Biological Chemistry* 276: 15945-15952.
- Burley SK, Bhatt R, Bhikadiya C, Bi C, Biester A, Biswas P, Bittrich S, Blaumann S, Brown R, Chao H (2025) Updated resources for exploring experimentally-

- determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank. Nucleic acids research 53: D564-D574.
- Chan KX, Mabbitt PD, Phua SY, Mueller JW, Nisar N, Gigolashvili T, Stroehrer E, Grassl J, Arlt W, Estavillo GM (2016) Sensing and signaling of oxidative stress in chloroplasts by inactivation of the SAL1 phosphoadenosine phosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences 113: E4567-E4576.
- Chen H, Li Z, Xiong L (2012) A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. Febs Letters 586: 1742-1747.
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). Nucleic acids research 46: W49-W54.
- DeLano WL (2002) Pymol: An open-source molecular graphics tool. CCP4 Newsl. protein crystallogr 40: 82-92.
- Estavillo GM, Crisp PA, Pornsiriwong W, Wirtz M, Collinge D, Carrie C, Giraud E, Whelan J, David P, Javot H (2011) Evidence for a SAL1-PAP chloroplast retrograde pathway that functions in drought and high light signaling in Arabidopsis. The Plant Cell 23: 3992-4012.
- Gil-Mascarell R, López-Coronado JM, Bellés JM, Serrano R, Rodríguez PL (1999) The Arabidopsis HAL2-like gene family includes a novel sodium-sensitive phosphatase. The Plant Journal 17: 373-383.
- Gu W, Xu Y, Xie X, Wang T, Ko J-H, Zhou T (2014) The role of RNA structure at 5' untranslated region in microRNA-mediated gene regulation. Rna 20:1369-1375.
- Guedes IA, da Silva MMP, Galheigo M, Krempser E, de Magalhães CS, Barbosa HJC, Dardenne LE (2024) DockThor-VS: a free platform for receptor-ligand virtual screening. Journal of Molecular Biology 436: 168548.
- Gy I, Gasciolli V, Laressergues D, Morel J-B, Gombert J, Proux F, Proux C, Vaucheret H, Mallory AC (2007) Arabidopsis FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. The Plant Cell 19:3451-3461.
- Kanehisa M, Furumichi M, Sato Y, Matsuura Y, Ishiguro-Watanabe M (2025) KEGG: biological systems database as a model of the real world. Nucleic acids research 53: D672-D677.
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. Nature genetics 39: 1278-1284.
- Kim S, Chen J, Cheng T, Gindulyte A, He J, He S, Li Q, Shoemaker BA, Thiessen PA, Yu B (2025) PubChem 2025 update. Nucleic acids research 53: D1516-D1525.
- Klebe G (2015) Applying thermodynamic profiling in lead finding and optimization. Nature Reviews Drug Discovery 14: 95-110.
- Krüger J, Rehmsmeier M (2006) RNAhybrid: microRNA target prediction easy, fast and flexible. Nucleic acids research 34: W451-W454.
- Lee B-R, Huseby S, Koprivova A, Chetelat A, Wirtz M, Mugford ST, Navid E, Brearley C, Saha S, Mithen R (2012) Effects of *fou8/fry1* mutation on sulfur metabolism: is decreased internal sulfate the trigger of sulfate starvation response? PLoS One 7: e39425.
- Liu Y-T, Senkler J, Herrfurth C, Braun H-P, Feussner I (2022) Defining the lipidome of Arabidopsis leaf mitochondria: Specific lipid complement and lipid biosynthesis capacity. bioRxiv: 2022.2007.2014.500104.
- Mistry J, Chuguransky S, Williams L, Qureshi M, Salazar GA, Sonnhammer EL, Tosatto SC, Paladin L, Raj S, Richardson LJ (2021) Pfam: The protein families database in 2021. Nucleic acids research 49: D412-D419.
- Myslinski JM, DeLorbe JE, Clements JH, Martin SF (2011) Protein-ligand interactions: thermodynamic effects associated with increasing nonpolar surface area. Journal of the American Chemical Society 133: 18518-18521.
- Nourbakhsh A, Collakova E, Gillaspie GE (2015) Characterization of the inositol monophosphatase gene family in Arabidopsis. Frontiers in plant science 5:725.
- Petersen LN, Marineo S, Mandala S, Davids F, Sewell BT, Ingle RA (2010) The missing link in plant histidine biosynthesis: Arabidopsis myo-inositol monophosphatase-like2 encodes a functional histidinol-phosphate phosphatase. Plant physiology 152: 1186-1196.
- Phua SY, Yan D, Chan KX, Estavillo GM, Nambara E, Pogson BJ (2018) The Arabidopsis SAL1-PAP Pathway: A case study for integrating chloroplast retrograde, light and hormonal signaling in modulating plant growth and development? Frontiers in plant science 9: 1171.
- Pollack SJ, Attack JR, Knowles MR, McAllister G, Ragan CI, Baker R, Fletcher SR, Iversen LL, Broughton HB (1994) Mechanism of inositol monophosphatase, the putative target of lithium therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences 91: 5766-5770.
- Potter SC, Luciani A, Eddy SR, Park Y, Lopez R, Finn RD (2018) HMMER web server: 2018 update. Nucleic acids research 46: W200-W204.
- Quintero FJ, Garcíadeblas B, Rodríguez-Navarro A (1996) The SAL1 gene of Arabidopsis, encoding an enzyme with 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase activities, increases salt tolerance in yeast. The Plant Cell 8: 529-537.
- Robles P, Fleury D, Candela H, Cnops G, Alonso-Peral MM, Anami S, Falcone A, Caldana C, Willmitzer L, Ponce MR (2010) The RON1/FRY1/SAL1 gene is required for leaf morphogenesis and venation patterning in Arabidopsis. Plant physiology 152: 1357-1372.
- Salonen LM. (2011). Molecular recognition at the active site of factor Xa ETH Zurich.
- Seelan RS, Parthasarathy LK, Parthasarathy RN (2004) Lithium modulation of the human inositol monophosphatase 2 (IMPA2) promoter. Biochemical and biophysical research communications 324: 1370-1378.
- Shirzadian-Khorramabad R, Jing H-C, Hille J, Dijkwel PP (2008) Identification of Arabidopsis stay green mutants with a functional ethylene-response pathway. Seeds for futures. Agronomy Society of New Zealand Special Publication: 119-129.
- Shirzadian-Khorramabad R, Moazzenzadeh T, Sajedi RH, Jing H-C, Hille J, Dijkwel PP (2022) A mutation in Arabidopsis SAL1 alters its in vitro activity against IP3 and delays developmental leaf senescence in association

with lower ROS levels. *Plant Molecular Biology* 108: 549-563.

Singh A, Kaushik R, Mishra A, Shanker A, Jayaram B (2016) ProTSAV: A protein tertiary structure analysis and validation server. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics* 1864: 11-19.

Steidle EA, Chong LS, Wu M, Crooke E, Fiedler D, Resnick AC, Rolfs RJ (2016) A novel inositol pyrophosphate phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*: Siw14 protein selectively cleaves the β -phosphate from 5-diphosphoinositol pentakisphosphate (5PP-IP5). *Journal of Biological Chemistry* 291: 6772-6783.

Styer JC, Keddle J, Spence J, Gillaspay GE (2004) Genomic organization and regulation of the LeIMP-1 and LeIMP-2 genes encoding myo-inositol monophosphatase in tomato. *Gene* 326: 35-41.

Sun Z, Li W, Lenzo JC, Holden JA, McCullough MJ, O' Connor AJ, O'Brien-Simpson NM (2021) The potential of calcium phosphate nanoparticles as adjuvants and vaccine delivery vehicles. *Frontiers in Materials* 8: 788373.

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution* 38: 3022-3027.

Torabinejad J, Donahue JL, Gunsekera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspay GE (2009) VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant physiology* 150: 951-961.

Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, Franz M, Grouios C, Kazi F, Lopes CT (2010) The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic acids research* 38: W214-W220.

Wilson PB, Estavillo GM, Field KJ, Pornsiriwong W, Carroll AJ, Howell KA, Woo NS, Lake JA, Smith SM, Harvey Millar A (2009) The nucleotidase/phosphatase SAL1 is a negative regulator of drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 58: 299-317.

Xiong L, Lee B-h, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu J-K (2001) FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes & development* 15: 1971-1984.

Xiong L, Lee H, Huang R, Zhu JK (2004) A single amino acid substitution in the *Arabidopsis* FIERY1/HOS2 protein confers cold signaling specificity and lithium tolerance. *The Plant Journal* 40: 536-545.

Yates AD, Allen J, Amode RM, Azov AG, Barba M, Becerra A, Bhai J, Campbell LI, Carbajo Martinez M, Chakiachvili M (2022) Ensembl Genomes 2022: an expanding genome resource for non-vertebrates. *Nucleic acids research* 50: D996-D1003.

York JD, Ponder JW, Majerus PW (1995) Definition of a metal-dependent/Li (+)-inhibited phosphomonoesterase protein family based upon a conserved three-dimensional core structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92: 5149-5153.

Zhang J, Vanneste S, Brewer PB, Michniewicz M, Grones P, Kleine-Vehn J, Löffke C, Teichmann T, Bielach A, Cannoot B (2011) Inositol trisphosphate-induced Ca²⁺ signaling modulates auxin transport and PIN polarity. *Developmental cell* 20: 855-866.