ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ٤، زمستان ١٣٩٤
صفحه ٦٠٥-٦٠١

تجزیه بیوانفورماتیکی و مطالعات مدل‌سازی 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*[1]، سعید ملک زاده شفارودی[1]

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

Farsad AS*[1], Malekzadeh Shafaroudi S[1]

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

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

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

چکیده

پروتئین‌های مسئول ترمیم خطاهای تکثیر DNA یا MMRها نقش مهمی در برقراری پایداری ژنوم کل موجودات ایفا می‌کنند. آنزیم هلیکاز UvrD، جزئی از کمپلکس MMR بوده و نقش موثری در فرایند ترمیم DNA از طریق باز کردن پیچش‌های 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 ١١٤٩ (١٢٩ کیلو دالتون) و ١١٦٥ (١٣٠ کیلو دالتون) اسید آمینه می‌باشد. این پروتئین‌ها تمام دمین‌های حفاظتی را دارا بوده و به دلیل دارا بودن انتهای آمینی و توالی‌های لینکر بلندتر، از آنزیم هلیکاز UvrD در *E.coli* بزرگتر می‌باشند. اثبات شواهدی نظیر وجود سایت اتصال ATP در انتهای آمینی UvrD و حفاظت شدگی موتیف‌ها در هر دو گونه گیاهی مشابه با UvrD باکتری *E.coli*، پیشنهاد می‌کند که قطعات انتهای آمینی و کربوکسیلی آنزیم در این دو گیاه می‌توانند فعالیت ATP آزی و DNA هلیکازی ٣′ به ٥′ نظیر باکتری مورد نظر از خود نشان دهند. با استفاده از نرم‌افزارهای 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 نرم‌افزار کایمرا انجام گرفت. نتایج بیانگر عدم وجود تفاوت آشکار در ساختار سوم پروتئین-های UvrD در دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج بود. بنابراین این آنزیم‌ها طی فرایند تکامل دمین‌های اصلی خصوصیات بیوشیمیایی نظیر فعالیت ATP آزی و هلیکازی را حفظ کرده‌اند.

واژه‌های کلیدی

آرابیدوپسیس
آنزیم هلیکاز
برنج
ترمیم DNA
تنش ژنوتوکسیک

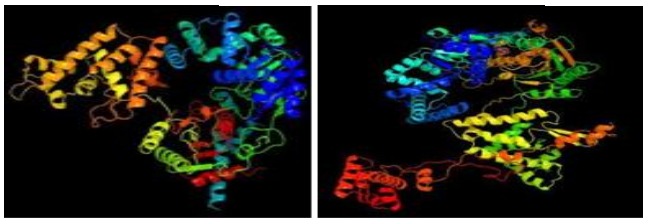
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.16.8]

مقدمه

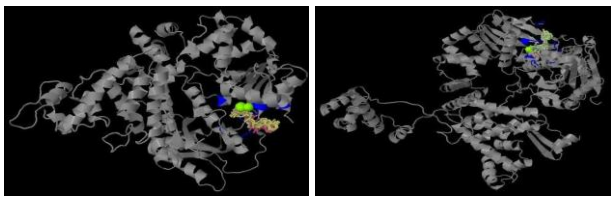
هلیکازها آنزیم‌هایی هستند که ساختار اسیدهای نوکلئیک را تغییر داده و برای تخریب باندهای هیدروژنی در DNA، ATP استفاده می‌کنند (Tuteja et al. 2009). آنزیم UvrD به عنوان DNA هلیکاز II در *E.coli*، عضو اصلی خانواده هلیکازها شناخته شده که پیچش DNA را در جهت ′۳ به ′۵ باز می‌کند. این آنزیم در فرایندهای همانندسازی، 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 ٦٤٧–۵۵۱ 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 دوبلکس DNA واکنش می‌دهند. موتیف‌های I، Ia، II، VI وQ 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 ، Id IVb ، 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[1] 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 شدیدا حفاظت‌شده 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).

الف ب



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.

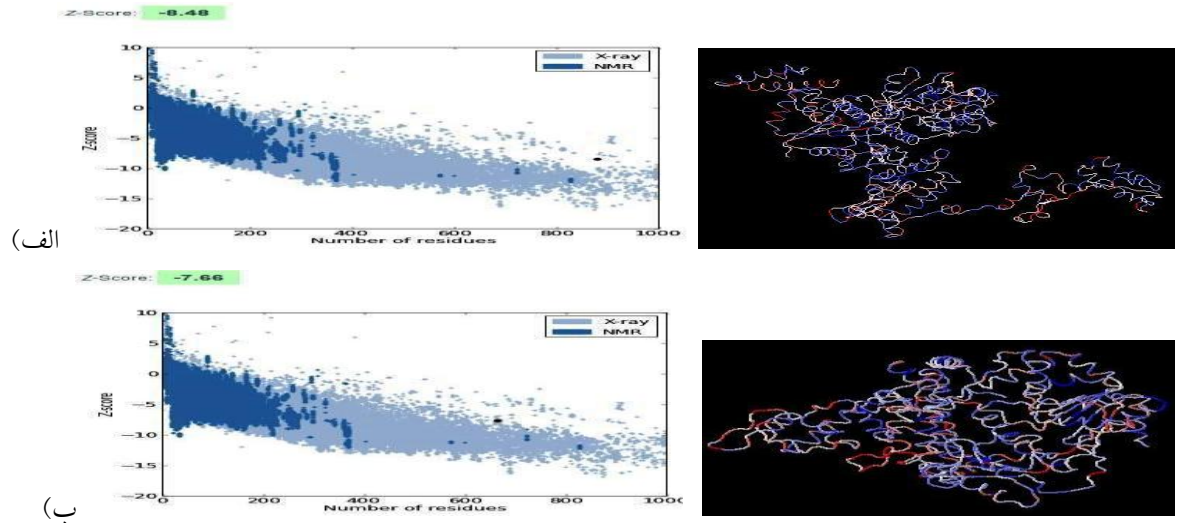
الف ب



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 می باشند.

[1] Genotoxic agents

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.16.8]



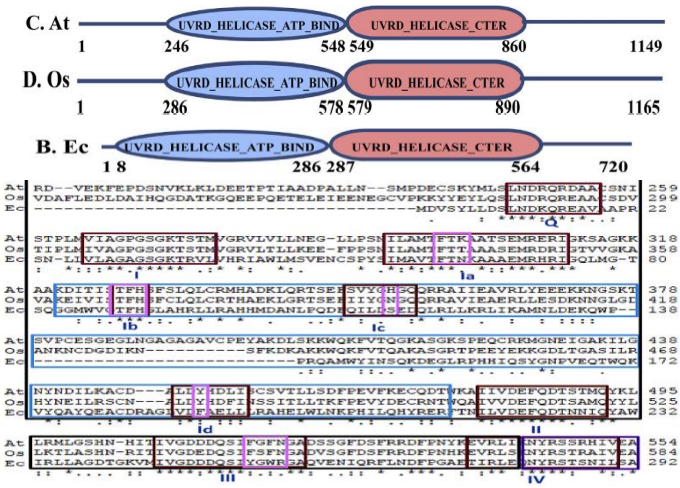
شکل۳- نتایج نرم‌افزار PROSA در شکل‌های سمت چپ. نمودار Z-score ساختار پیش‌گویی شده AtUvrD (الف) و OsUvrD (ب) را نشان می‌دهند که ساختارهای مفروض به ساختارهای کریستالوگرافی شده پروتئین‌های همولوگ هم‌سایز خود نزدیک می‌باشند. شکل‌های سمت راست انرژی سطحی پروتئین در ساختارهای پیش گویی شده را نمایش می دهند. خطوط قرمز رنگ نشان دهنده حداکثر انرژی و خطوط آبی رنگ نشان دهنده حداقل انرژی می‌باشند. در واقع پایین بودن انرژی نشان دهنده پایداری ساختار پروتئین و اعتبار کیفیت آن است.

نرم‌افزار dligand site۳ محل اتصال لیگاند ATP را در ساختار سه بعدی مولکول پیش‌بینی کرد. در واقع این نرم‌افزار 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 نرم‌افزار PROSA (شکل ۳) ساختارهای مورد نظر با روش‌های متفاوت X-ray و NMR به ترتیب توسط رنگ‌های آبی کم رنگ و پر رنگ متمایز شدند. این نمودار نشان داد که Z-score پروتئین‌های AtUvrD و OsUvrD (۸/٤۸- و ۷/٦٦-) در محدوده نمره‌های مشخصه پروتئین‌های بومی کریستالوگرافی شده هم‌سایز خود قرار دارد و این امر کیفیت مدل‌های ساختاری نرم‌افزار Phyre را تایید کرد. در بخش دیگری از نتایج این نرم افزار ساختار سه بعدی پروتئین‌های ورودی قابل مشاهده می‌باشد که اسید آمینه‌های آن‌ها بر اساس افزایش میزان انرژی سطحی پروتئین از آبی تا قرمز رنگ‌آمیزی شده‌اند. به طور کلی ساختار پروتئین‌ها طوری شکل می‌گیرد که انرژی سطحی آن حدالامکان به حداقل نزدیک‌تر باشد. مشاهده غالبیت رنگ آبی بر قرمز در ساختار هر دو پروتئین گویای پایداری آن ساختارها است. ساختار پیش‌گویی شده خروجی نرم-افزار Phyre توسط نرم‌افزار PROSA به عنوان بهترین مدل انتخاب شد. جهت تخمین مدل‌های ساختاری تجزیه کامل توالی-های پروتئینی با استفاده از سایت Expasy انجام گرفت. توالی‌های دانلود شده توسط برنامه ClustalW هم‌ردیف شدند. تعیین مدل-های ساختاری توسط سرور همولوژی مدلینگ[1] 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 مدل‌های ساختاری نشان داد که AtUvrD یک پروتئین ۱۱٤۹ اسیدآمینه‌ای با وزن مولکولی ۱۲۹ کیلو دالتون و OsUvrD پروتئینی ۱۱٦۵ اسید آمینه‌ای 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 می‌باشند (شکل ٤A و ٤B). مقایسه توالی اسیدهای آمینه UvrD در *E.coli*، آرابیدوپسیس و برنج نشان داد که AtUvrD و OsUvrD، ٤ دمین عملکردی اصلی (1B، 1A، 2A و 2B) و تمام موتیف‌های حفاظت شده هلیکازهای UvrD شامل Q، Ia، Id، II، IV، Iva، IVc، V، Va، VI، Via را دارا می‌باشند. آنزیمAtUvrD و OsUvrD به‌ترتیب

[1] Homology modeling

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.16.8]

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) می‌باشند (شکل ٤C و ٤D). دمین 1A در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسیدآمینه ۱ تا ۵۴۲ و ۱ تا ۵۷۲ و دمین 1B در AtUvrD و OsUvrD به ترتیب از اسید آمینه ۳۲۰ تا ٤۷۷ و ۳۶۰ تا ۵۰۵ را شامل می‌شود (شکل ٤A). 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 ٦٤٣ تا ٨٤٦ و ٦٧٣ تا ٨٧٥ را در برمی‌گیرد (شکل ٤A).



شکل٤- دیاگرام‌های شماتیک که ترتیب دمین‌های UvrD را در *E.coli*، آرابیدوپسیس و برنج نشان می‌دهد. تجزیه دمین‌ها توسط برنامه Scan Prosite انجام شد. باکس‌های آبی پر، دمین اتصال به ATP آنزیم هلیکاز UvrD و باکس‌های صورتی پر، دمین انتهای کربوکسیلی UvrD را نشان می‌دهند. اعداد نشان دهنده اسیدهای آمینه این دمین‌ها می‌باشند (الف). مقایسه توالی اسیدهای آمینه هلیکازهای UvrD در *E.coli*، آرابیدوپسیس و برنج. موتیف های حفاظت شده توسط باکس‌های قرمز نشان داده شده است و نام هر موتیف (از Q تا VIa) با حروف یونانی مشخص شده‌است. باکس‌های صورتی هنگام مقایسه با توالی REP باکتری *E.coli* نشان دهنده نواحی متعلق به سایت اتصال به DNA تک رشته‌ای می باشند (A).

نتایج نشان داد که این دمین‌های حفاظت شده بزرگتر از دمین‌های حفاظت شده UvrD *E.coli* می‌باشند. 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 توالی‌های اسید آمینه-ای، AtUvrD OsUvrD، ۵۱ درصد یکسانی با یکدیگر و ۲۵-۲٤ درصد یکسانی با UvrD باکتری *E.coli* نشان دادند. در نتیجه آنزیم هلیکاز UvrD گیاهان می‌تواند 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 رشته‌ای دارای اسیدآمینه‌هایی از موتیف‌های Ia، III و V و نیز اسیدآمینه‌هایی از نواحی غیر موتیف می‌باشد (Meng et al. 2008)، در این مطالعه نیز مقایسه آنزیم هلیکاز Rep باکتری *E.coli* با AtUvrD و OsUvrD، اسید آمینه‌های درگیر در سایت اتصال به DNA تک‌رشته‌ای را مشخص کردند (شکل ٤A). 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 ۲٤٦ تا ۹٤۱ و ۲۸٦ تا ۹۷۱ ساختار اولیه AtUvrD و OsUvrD، به ترتیب ۲٦ 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 دمین‌ها و موتیف‌های UvrD باکتری *E.coli* در گیاهان مورد بررسی، این آنزیم می‌تواند فعالیت هلیکازی ′۳ به ′۵ مشابهی نیز در این گیاهان داشته باشد. بر اساس مطالعات قبلی کشف همولوگ‌های این آنزیم در موجودات دیگر دلیلی بر مشاهده عملکرد مشابه آنزیم در آن موجودات می‌باشد و این امر نشان‌دهنده حفاظت شدگی تکاملی عملکرد آنزیم هلیکاز در موجودات مختلف می‌باشد (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 آرابیدوپسیس و برنج دارای تمامی دمین‌های حفاظت شده UvrD باکتری *E.coli* می‌باشد و تنها توالی‌های لینکر که در حد فاصل دمین‌ها قرار دارند بلندتر شده‌اند. با استناد به تحقیق Ansari et al. (2014) که به بررسی شباهت‌های ساختاری و عملکردی آنزیم UvrD در گونه‌های متفاوت پلاسمودیوم می-پردازد، یکی از احتمالات ممکن در این زمینه، مبحث تکامل و افزایش توالی‌های غیر کد کننده در موجودات یوکاریت در مقایسه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.16.8]

با پروکاریوت‌ها می‌باشد. بر اساس این تحقیق آنزیم UvrD در هر دو گیاه دارای سایت اتصال ATP در انتهای آمینی می‌باشد
بنابراین دارای فعالیت ATP آزی مشابه UvrD باکتری *E.coli* نیز می‌باشد. Kumura and Sekiguchi (2002) نشان دادند که القای موتاسیون در موتیف‌های حفاظت‌شده آنزیم UvrD موجب حذف تمام فعالیت‌های هلیکازی و ATP آزی این آنزیم می‌شود و این فعالیت‌ها رابطه مستقیم با موتیف‌های حفاظت‌شده پروتئین دارند. همچنین برای فعالیت هلیکازی تنها دامین‌های حفاظت شده ضروری بوده و توالی‌های حد فاصل هیچ نقشی بر عهده ندارند. پس از یک سو به دلیل حفاظت شدگی موتیف‌های اصلی در ساختار UvrD دو گونه گیاهی، فعالیت ATP آزی و DNA هلیکازی قطعات انتهای آمینی و کربوکسیلی آنزیم تایید می‌شود و از سوی دیگر حذف یا اضافه شدن توالی‌های 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 است. اگرچه این مطالعه به درک ساختار هلیکازها در گیاهان کمک موثری کرده اما جهت شناخت مکانیسم عمل این آنزیم‌ها علاوه بر مطالعه ساختاری، بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیکی نیز از اهمیت گسترده‌ای برخوردار است. در مطالعه حاضر نشان داده شد که تفاوت آشکاری در ساختار سوم پروتئین های UvrD در دو گیاه آرابیدوپسیس و برنج وجود نداشته و آن‌ها طی فرایند تکامل دمین‌های اصلی و در نتیجه خصوصیات بیوشیمیایی خود نظیر فعالیتATP آزی و هلیکازی را حفظ کرده‌اند. 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

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.4.16.8]