

بررسی خصوصیات ساختاری و فیلوژنی پروتئین سیتوکروم P450 در حشرات

Structural, and phylogenetic analysis of cytochrome P450 protein in insects

ثمین صدیق

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۳/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۹/۲۴

چکیده

آنزیم‌های سیتوکروم P450 (cyps) منواکسیژنازهای حاوی هم هستند که در متابولیسم مواد داخلی و خارجی دخالت دارند. آن‌ها شامل یک بالاخانواده از آنزیم‌ها هستند که در موجودات مختلف مانند پستانداران، گیاهان، باکتری‌ها و حشرات یافت می‌شوند. cyp ها متنوع بوده و سوبستراهای زیادی را متابولیزه می‌کنند، اما ساختار آن‌ها بسیار حفاظت شده است. در این مطالعه، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی آنزیم‌های P450 در سی گونه از حشرات متعلق به خانواده‌های مختلف انجام گرفت. بر اساس موتیف‌های به دست آمده از ابزارهای MEME و MAST، ۳ موتیف در تمام حشرات مشترک بود. آنالیز ساختاری هفت گونه از حشرات انتخاب شده توسط ابزارهای ProtParam و SOPMA در پایگاه EXPASY انجام شد. ساختار سوم *Drosophila melanogaster* (شماره دسترسی: NP_525031) به عنوان حشره نمونه و شش گونه دیگر با استفاده از سرور Phyre2 و با استفاده از مدل "c4lxjA" (کد دسترسی: 4lxj) پیش‌بینی گردید. توالی پروتئین‌ها با استفاده از الگوریتم ClustalW توسط نرم افزار MEGA 6.06 هم‌ترازسازی شده و درخت فیلوژنی با استفاده از روش اتصال-همسایگی (NJ) ترسیم گردید. با توجه به نتایج، شباهت زیادی بین پروتئین‌های cyp در گونه‌های مختلف حشرات وجود دارند به طوری که احتمالاً از یک جد مشترک مشتق شده‌اند. داده‌های به دست آمده پیش زمینه‌ای را برای مطالعات بیوانفورماتیکی راجع به عملکرد و تکامل این پروتئین در حشرات فراهم می‌آورد.

واژگان کلیدی: بیوانفورماتیک، سیتوکروم P450 (cyp)، درخت فیلوژنی، حشرات، تجزیه و تحلیل ساختاری

مقدمه

آنزیم‌های P450 پروتئین‌هایی هستند که در تمام ارگانیسم‌ها (از باکتری‌ها تا پستانداران) وجود دارند. این آنزیم‌ها در سوخت و ساز مواد داخلی و خارجی دخالت دارند. اصطلاح P450 یا آنزیم‌های P450 برای پروتئین‌هایی استفاده می‌شود که به وسیله ژن‌های سیتوکروم P450 (*cyp*) کد می‌شوند (بندانی، ۱۳۹۳). سیتوکروم P450 (*cyp*) متعلق به بالا خانواده‌ای از پروتئین‌ها به نام هموپروتئین‌ها است که به دلیل داشتن کوفاکتور هم به این نام نامیده شده است. Cypها در واکنش‌های شیمیایی از تعداد زیادی از مولکول‌های کوچک و بزرگ به عنوان سوبسترا استفاده می‌کنند (Nelson, 2011). نام P450 از پیگمان (P) میکروزومی کبد پستانداران گرفته شده که در سال ۱۹۵۸ کشف شد. این پیگمان قادر به اتصال به مونواکسید کربن است، وقتی که با مونواکسید کربن اشباع و احیا شود دارای حداکثر جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خواهد بود. بنابراین از خصوصیات مشترک تمامی آن‌ها، حداکثر جذب کمپلکس Fe^{2+} -Co در طول موج ۴۵۰ نانومتر است که بر این اساس نامگذاری شده‌اند (بندانی، ۱۳۹۳). ژن‌های سیتوکروم P450 خانواده بزرگی هستند که فعالیت‌های متابولیکی متنوعی دارند (Feyereisen, 1999). ایزوفرم‌های مختلفی از *cyp* وجود دارد که آن‌ها را بر اساس اسید آمینه شناخته شده آن‌ها در ۱۸ خانواده و ۵۷ زیرخانواده طبقه‌بندی کرده و بر اساس توالی کل اسیدهای آمینه نامگذاری می‌کنند (Nelson, 2011). ژن‌های بالا خانواده P450 با پیشوند *cyp* نامگذاری می‌شوند. شماره خانواده بعد از پیشوند قرار می‌گیرد، سپس یک حرف بزرگ الفبا برای نامگذاری زیرخانواده و در نهایت یک شماره برای نوع ژن استفاده می‌شود. ژن‌ها به صورت ایتالیک ولی محصول ژنی (مثل mRNA یا پروتئین) با حرف بزرگ نوشته می‌شوند. در حشرات ۶ خانواده *cyp* شناسایی شده‌اند که خانواده اختصاصی برای حشرات هستند و به نام‌های *cyp4*، *cyp9*، *cyp12*، *cyp18* و *cyp28* نامگذاری شده‌اند. خانواده *cyp4* که در حشرات وجود دارد دارای توالی مشترک با مهره‌داران است (بندانی، ۱۳۹۳).

آنزیم‌های P450 دارای عملکردهای گوناگون هستند و تنوع عملکرد این آنزیم‌ها ناشی از تنوع شکل آن‌ها است. ژنوم هر گونه حشره دارای بیش از صد ژن P450 است که تمامی آن‌ها از یک منشا سرچشمه گرفته‌اند. پروتئین‌های P450 دارای وزن مولکولی ۴۵ تا ۵۵ کیلو دالتون بوده و بیش از ۶۰ واکنش شیمیایی را کاتالیز می‌کنند (بندانی، ۱۳۹۳). Cypهای یوکاریوت‌ها معمولاً دارای ۴۸۰ تا ۵۶۰ اسید آمینه هستند. تمامی اعضای این بالا خانواده دارای یک ساختار کروی تا مثلثی شکل بوده که در نیمه انتهایی کربوکسیل دارای تعداد زیادی مارپیچ آلفا و در نیمه انتهایی آمینی دارای تعداد زیادی صفحات بتا هستند. اغلب صفحات بتا و مارپیچ‌های آلفا در یک صفحه قرار می‌گیرند (Danielson, 2002). Cypها همچنین دارای یک گروه آهن هم در مرکز جایگاه فعال خود هستند (Guengerich, 2007). آنزیم‌های P450 به صورت قابل حل در آب مانند باکتری‌ها (پروکاریوت‌ها) و یا متصل به غشا در غشای میکروزوم و میتوکندری سلول‌های یوکاریوت وجود دارند (بندانی، ۱۳۹۳).

در حشرات، ژن‌های کد کننده P450 در بافت‌های مختلف وجود دارند، اما کانال گوارشی (معدۀ میانی) و بافت چربی منابع غنی از P450ها محسوب می‌شوند (بندانی، ۱۳۹۳). مهم‌ترین عملکرد P450ها به دلیل نقش منواکسیژناز آن‌ها است که سبب کاتالیز کردن یک اتم اکسیژن مولکولی به درون سوبسترا شده، در حالی که اتم دیگر اکسیژن به آب احیا می‌شود. علاوه بر کاتالیز کردن اکسیژن، این آنزیم عملکردهای دیگری نظیر اکسیداز، رداکتاز، ایزومراز و دی ساچوراز (Desaturase) را نیز دارد. انواع مختلفی از این آنزیم‌ها وجود دارند که در بیوسنتز و تجزیه مولکول‌های سیگنال مانند فرومون‌ها نقش دارند. این آنزیم‌ها در متابولیسم مواد خارجی مانند سموم گیاهی، داروها و آفت‌کش‌های شیمیایی نیز دخالت دارند (بندانی، ۱۳۹۳؛ Feyereisen, 1999).

P450ها شامل سیستم‌های آنزیمی است که برای سم‌زدایی یا فعال سازی حشره‌کش‌ها ضروری می‌باشند. مقاومت به حشره-کش‌ها به ژن‌های P450 مانند *cyp6A1*، *cyp6A2*، *cyp6D1*، *cyp6E1*، *cyp6Z1* و *cyp6G1* نسبت داده می‌شود که از نژادهای مقاوم جداسازی شده است (Feyereisen *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1992; Tomita and Scott, 1995; Kasai *et al.*, 1998; Nikou *et al.*, 2003; Schlenke and Begun, 2004).

این ایزوفرم‌های P450 به میزان زیادی در نژادهای مقاوم بیان می‌شوند، برای مثال *cyp6A2* (Brun *et al.*, 1996) و *cyp6G1* (Daborn *et al.*, 2002; McCart, 2008) در *Drosophila melanogaster* مقاوم به DDT به میزان زیادی بیان می‌شوند. *cyp6A1*

در نژادهای مقاوم به دیازینون مگس خانگی (*Musca domestica*) (Feyereisen *et al.*, 1995)، *cyp6B7* در نژادهای *Helicoverpa armigera* مقاوم به پیرتروئیدها (Ranasinghe and Hobbs, 1998)، *cyp6E1* در *Culex pipiens quinquefasciatus* مقاوم به پیرتروئیدها (Kasai *et al.*, 1998) و *cyp6Z1* در *Anopheles gambiae* مقاوم به پیرتروئیدها (Nikou *et al.*, 2003) به میزان زیادی بیان می‌شوند. در *Anopheles gambiae* که ناقل مالاریا است *cyp6Z1* باعث سوخت و ساز DDT می‌شود (Chiu *et al.*, 2008). خانواده *cyp6* در تعدادی از حشرات باعث متابولیسم مواد شیمیایی دفاعی گیاهان (Scott *et al.*, 1998, Kahn and Durst, 2000) و حشره‌کش‌ها (Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Scott and Wen, 2001) می‌شود. تنوع در بیان P450 در طی تکامل کاملاً واضح است. بعضی از P450ها مثل *cyp4D1* و *cyp6A1* در طول تمام مراحل تکاملی بیان می‌شوند (Gandhi *et al.*, 1995; Cohen and Feyereisen, 1992)، در حالی که میزان بیان در سایرین مانند *cyp6B1*، *cyp6B2*، *cyp6B3*، *cyp6D1* و *cyp6L1* بر اساس سن متفاوت است (Scott *et al.*, 1998; Harrison *et al.*, 2001; Wen and Scott, 2001). در این مطالعه تجزیه و تحلیل پروتئین P450 با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک در ۳۰ گونه از راسته‌های مختلف حشرات برای پیش‌بینی ساختارهای مختلف و خصوصیات این آنزیم انجام گرفت. نتایج این بررسی می‌تواند پیش‌زمینه‌ای برای مطالعات آینده روی این آنزیم باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری داده‌ها

به منظور تجزیه بیوانفورماتیک پروتئین P450 در حشرات، توالی داده‌های اصلی (Reference Sequences) با دو فرمت FASTA و GenBank در تمامی حشراتی که پروتئین مورد نظر در آن‌ها شناسایی شده است از سایت NCBI جستجو و جمع‌آوری گردید (تاریخ دریافت داده‌ها فروردین ۱۳۹۴، مارس ۲۰۱۵).

با توجه به تعداد زیاد توالی‌های شناسایی شده از این پروتئین در حشرات امکان بررسی تمام توالی‌ها در یک بررسی امکان‌پذیر نیست، لذا از هر خانواده متعلق به راسته‌های مختلف حشرات یک توالی انتخاب شده و به عنوان داده اولیه مورد استفاده قرار گرفت، به طوری که تعداد داده‌های نهایی ۳۰ عدد بود. در بررسی‌های ساختاری نیز از هر راسته یک گونه به عنوان نماینده آن راسته انتخاب شده و مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت، تعداد آن‌ها ۷ عدد و متعلق به راسته‌های Hemiptera، Homoptera، Hymenoptera، Diptera، Lepidoptera، Phthiraptera و Coleoptera بود. به منظور سهولت در تشخیص داده‌ها در تجزیه‌های مورد نظر برای هر یک از آن‌ها یک مشخصه در نظر گرفته شد. به این صورت که ابتدا حرف اول جنس و گونه مورد نظر، سپس نام پروتئین (P450) نوشته شد. اگر موجودات مورد نظر دارای حرف اول مشابه در جنس و گونه بودند از حروف بعدی گونه آن‌ها استفاده شد.

در جدول ۱ مشخصات داده‌های مربوط به حشرات مورد استفاده در این تحقیق شامل نام علمی، خانواده، راسته، مشخصه مورد استفاده و شماره دسترسی (Accession number) آن داده پروتئینی در بانک NCBI ذکر شده است.

شناسایی توالی‌های حفاظت شده

ابزارهای زیادی برای تعریف وجود یا عدم وجود دمن‌های حفاظت شده وجود دارند، اما آن‌ها قادر به تشخیص موتیف‌های کوچک و الگوهای متفاوت نیستند. از این‌رو برای مطالعه تنوع پروتئین P450 در حشرات و تعیین موتیف‌های حفاظت شده از برنامه‌های MEME (Multiple Em for Motif Elicitation; version 4.10.2) و Motif Alignment Search Tool (Motif Alignment Search Tool; version 4.10.2) در وب سایت <http://meme-suite.org/> استفاده گردید (Bailey *et al.*, 2009). نرم‌افزار برای یافتن ۱۰ موتیف به اندازه‌های ۳۰-۱۵ اسید آمینه و با میزان ظهور صفر تا یک بار در طول توالی برای سی گونه حشره تنظیم شد.

جدول ۱- ۳۰ گونه مختلف از حشرات متعلق به راسته‌های مختلف که در این تحقیق استفاده شده است.

Table 1. The list of thirty insect species of different orders analyzed in the current study.

ردیف Index	نام علمی حشرات Insect's Scientific Names	اختصار نویسی Abbreviation	خانواده Family	راسته Order	شماره دسترسی Accession Number
1	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Ap-P450	Aphididae	Homoptera	NP_001156683
2	<i>Aedes aegypti</i>	Aa-P450	Culicidae	Diptera	XP_001652225
3	<i>Anopheles gambiae str. PEST</i>	Ag-P450	Culicidae	Diptera	XP_318345
4	<i>Apis dorsata</i>	Ad-P450	Apidae	Hymenoptera	XP_006625127
5	<i>Apis florea</i>	Af-P450	Apidae	Hymenoptera	XP_003694529
6	<i>Apis mellifera</i>	Am-P450	Apidae	Hymenoptera	NP_001035323
7	<i>Bombus impatiens</i>	Bi-P450	Apidae	Hymenoptera	XP_003491954
8	<i>Bombyx mori</i>	Bm-P450	Bombycidae	Lepidoptera	NP_001140197
9	<i>Bombus terrestris</i>	Bt-P450	Apidae	Hymenoptera	XP_003399985
10	<i>Ceratitis capitata</i>	Cc-P450	Tephritidae	Diptera	XP_004537773
11	<i>Culex quinquefasciatus</i>	Cq-P450	Culicidae	Diptera	XP_001870609
12	<i>Diaphorina citri</i>	Dc-P450	Psyllidae	Hemiptera	XP_008476340
13	<i>Drosophila ananassae</i>	Da-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_001967242
14	<i>Drosophila erecta</i>	De-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_001982611
15	<i>Drosophila grimshawi</i>	Dg-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_001986708
16	<i>Drosophila melanogaster</i>	Dm-P450	Drosophilidae	Diptera	NP_525031
17	<i>Drosophila mojavensis</i>	Dmo-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_001998935
18	<i>Drosophila persimilis</i>	Dpe-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002018192
19	<i>Drosophila pseudoobscura pseudoobscura</i>	Dp-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002132781
20	<i>Drosophila sechellia</i>	Ds-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002044523
21	<i>Drosophila simulans</i>	Dsi-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002085396
22	<i>Drosophila virilis</i>	Dv-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002060433
23	<i>Drosophila willistoni</i>	Dw-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002075256
24	<i>Drosophila yakuba</i>	Dy-P450	Drosophilidae	Diptera	XP_002100302
25	<i>Megachile rotundata</i>	Mr-P450	Megachilidae	Hymenoptera	XP_003708491
26	<i>Microplitis demolitor</i>	Mde-P450	Braconidae	Hymenoptera	XP_008550694
27	<i>Musca domestica</i>	Md-P450	Muscidae	Diptera	NP_001273810
28	<i>Nasonia vitripennis</i>	Nv-P450	Pteromalidae	Hymenoptera	NP_001166018
29	<i>Pediculus humanus corporis</i>	Ph-P450	Pediculidae	Phthiraptera	XP_002430933
30	<i>Tribolium castaneum</i>	Tc-P450	Tenebrionidae	Coleoptera	NP_001177722

بررسی ساختاری و فیلوژنتیکی پروتئین P450

به منظور بررسی ساختارها و خصوصیات مختلف پروتئین P450 در حشرات از ۷ گونه حشره از راسته‌های مختلف به عنوان نماینده حشرات استفاده گردید. ساختار این پروتئین به وسیله ابزارهای مختلف موجود در سایت <http://www.expasy.org> تعیین گردید. در بررسی ساختار اولیه پروتئین‌ها، نقطه ایزوالکتریک (مقدار PH خاص که در آن بار ناخالص یک مولکول آمفوتریک صفر است)، وزن مولکولی، نوع و تعداد اسیدهای آمینه، فرمول شیمیایی، تعداد اتم‌ها، شاخص بی‌ثباتی، شاخص آلیفاتیک و متوسط آبدوستی (GRAVY) با استفاده از ابزار ProtParam تعیین گردید (Gasteiger *et al.*, 2005). ساختار دو بعدی پروتئین‌ها برای تعیین درصد مارپیچ آلفا، صفحه بتا و فنر مارپیچ تصادفی با ابزار SOPMA تعیین گردید (Geourjon and Deleage, 1995). برای

تعیین ساختار سه بعدی این پروتئین از ابزار Phyre 2 استفاده شد (Kelley and Sternberg, 2009). سپس نتایج به دست آمده توسط نرم افزار Chimera 1.11 مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت. برای انجام مقایسه‌ها ساختار سه بعدی پروتئین P450 در مگس سرکه به عنوان حشره مدل تعیین گردید. ساختار سه بعدی نمونه‌های نماینده روی ساختار پروتئین مگس سرکه قرار گرفته و میزان شباهت آن‌ها با استفاده از سرور TM-score (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/TM-score>) تخمین زده شد (Xu and Zhang, 2010; Zhang and Skolnick, 2004).

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی توالی‌های پروتئین P450 با استفاده از نرم افزار MEGA 6.06 انجام گردید (Tamura, et al., 2013). ۳۰ توالی مورد نظر با استفاده از روش Clustalw هم‌تراز سازی شده و درخت فیلوژنتیکی به روش Neighbor-joining (NJ) با bootstrap ۱۰۰۰ ترسیم گردید.

نتایج

در این بررسی تعداد ۳۰ توالی پروتئین P450 از گونه‌های مختلف حشرات متعلق به هفت راسته مختلف با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. هفت حشره از راسته‌های مختلف به عنوان نماینده آن راسته انتخاب شده و در بررسی‌های ساختاری از آن‌ها استفاده شد.

موتیف حفاظت شده یک الگوی توالی است که بارها در یک گروه از توالی‌های پروتئینی تکرار می‌شود. تجزیه و تحلیل موتیف‌های پروتئین P450 در حشرات به منظور یافتن الگوی موتیف‌های حفاظت شده در توالی‌های حشرات انجام شد. ۱۰ موتیف حفاظت شده توسط MEME و MAST شناسایی شدند (شکل ۱) که در توالی آن‌ها در جدول ۲ آمده است. این نتایج نشان داد که حداقل ۵ موتیف در پروتئین P450 در حشرات یافت می‌شود که در بین این سی گونه مشترک می‌باشند.

جدول ۲- توالی موتیف‌های P450 شناسایی شده توسط MEME و MAST

Table 2. P450 Motif sequences identified by MEME and MAST.

موتیف Motif	عرض Width	ارزش E E-value	جایگاه Sites	بهترین نوع توالی Best possible match
1	30	3.0e-343	31	PFGAGPRNCIGQRFAMMQMKVCLAKILRNY
2	21	8.1e-207	31	MPYLDMCIKETLRMYPPVPMI
3	21	9.5e-200	31	HMDPRYWPNPEKFDPERWLEE
4	30	6.0e-266	30	GHETTSSTMSFCLYELALNPDVQKRCREEI
5	30	5.8e-163	25	AGLFMMQGQKWHHMRKKLTPAFHQGKCLKQM
6	21	1.8e-066	18	YTTDIICSCAMGVKINSQKNP
7	28	2.5e-080	29	VYGVYVGHQPAVVIHDPHEHVEEVLSKDF
8	21	4.8e-077	27	ADYDVPNSGYTIPKGTNIWIS
9	28	2.1e-058	12	VVWDTIEYREKNNVVRNDMIHLLMQLHK
10	18	4.9e-042	26	VGPWWPIFGNYWDCLG

به منظور شناسایی ساختار و وظایف پروتئین P450 هفت گونه از حشرات مورد آزمایش به عنوان نماینده حشرات از راسته‌های مختلف انتخاب شده و با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بررسی ساختار اولیه با استفاده از ابزار ProtParam انجام گرفت. طول توالی‌های انتخاب شده به عنوان نمایندگان رده حشرات بین ۵۰۸ تا ۷۷۱ بود. تغییرات وزن مولکولی و نقطه ایزوالکتریک به ترتیب بین ۵۷۲۴۱/۱-۸۷۵۶۸/۵ دالتون و ۵/۶۲-۹/۲۷

مشاهده گردید. نرخ شاخص GRAVY در حشرات نماینده بین *D. melanogaster* ۵/۶۲ و *D. citri* ۹/۲۷ متغیر بود. کمترین شاخص آلیفاتیک در *Ph*-P450 و بیشترین آن در *Bm*-P450 مشاهده شد. بررسی شاخص ناپایداری پروتئین P450 در حشرات نماینده نشان داد که بیشترین این شاخص مربوط به *Dc*-P450 (۴۹/۷۹) و کمترین آن متعلق به *Tc*-P450 (۲۶/۳۴) است.



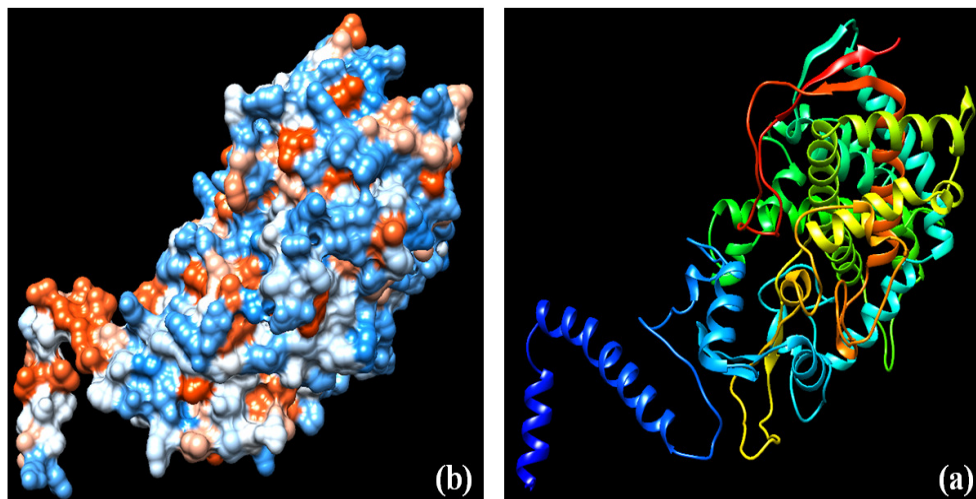
شکل ۱- موتیف‌های حفاظت شده پروتئین P450 در حشرات توسط MEME. موتیف‌ها با قاب‌هایی به رنگ‌های متفاوت نشان داده شده‌اند.
 Fig. 1. Discovered conserved motifs of P450 proteins in insects by MEME tool. The motifs were shown as different-colored boxes.

پیش‌بینی ساختار ثانویه پروتئین P450 در حشرات نمونه با استفاده از ابزار SOPMA انجام شد تا نسبت ماریپیج آلفا، صفحه بتا، فنر ماریپیج تصادفی و صفحات گسترده در توالی پروتئین تعیین گردد. پیش‌بینی ساختار ثانویه بر اساس شبکه‌های عصبی انجام گرفته (Combet *et al.*, 2000) و نشان داد که بیشترین ساختار مربوط به ماریپیج آلفا و کمترین آن مربوط به صفحه بتا است.

ساختار سوم پروتئین *Dm*-P450 به عنوان گونه مدل حشرات با استفاده از ابزار PHYRE2 تعیین شده و مقایسه ساختاری سایر نمونه‌ها بر اساس مدل c4lxjA (شماره دسترسی PDB: 4lxj) انجام گرفت.

برای شناسایی روابط فیلوژنتیکی بین حشرات مورد مطالعه بر اساس پروتئین مورد نظر، با استفاده از نرم‌افزار MEGA 6.06 و روش اتصال-همسایگی (Neighbour-joining (NJ)) و الگوریتم Clustalw درخت فیلوژنتیکی ترسیم گردید. روش NJ یک روش

سریع بوده، در هر مرحله به صورت بهینه عمل کرده و درختی که به دست می‌آید به درخت بهینه نزدیک است. نتایج به دست آمده از این بررسی نشان داد که توالی‌های P450 در ۷ گروه قرار می‌گیرند که از ۱-۷ شماره‌گذاری شده‌اند. اغلب گروه‌ها با bootstrap بالای ۵۰ حمایت می‌شدند که در روی شاخه‌ها نشان داده شده است. بر اساس درخت به دست آمده Ap-P450 به دلیل bootstrap پائین متعلق به هیچ گروهی نبود (شکل ۳).



شکل ۲- ساختار سوم پروتئین P450 در *D. melanogaster* به عنوان حشره مدل (شماره دسترسی: NP_525031، شماره دسترسی PDB: 4l1xj) به دست آمده از سرور Phyre 2. (الف) مدل روبان مانند، مارپیچ آلفا به شکل فنر مانند و صفحات بتا با فلش نشان داده شده‌اند. (a) مدل سطوح آب‌دوستی با استفاده از نرم‌افزار Chimera. رنگ قرمز و نزدیک به آن نشان‌دهنده پتانسیل منفی، نزدیک به آبی نشان‌دهنده پتانسیل مثبت و نزدیک به سفید نشان‌دهنده خنثی بودن است.

Fig. 2. Tertiary structure of P450 protein in *D. melanogaster* as the insect model (Accession number: NP_525031, PDB accession code: 4l1xj) using Phyre2 server. (a) Ribbons model, alpha helices are shown with helix shape and beta sheets with arrows. (b) Hydrophobicity surface model using Chimera 1.11. Color from red for negative potential, to blue for positive potential.

جدول ۳- ساختار اولیه P450 در حشرات نماینده از راسته‌های مختلف

Table 3. Primary structure of P450 in representative insects from different orders

ردیف Index	نمونه Sample	طول Length	فرمول Formula	تعداد تمام اتم‌ها Total No. of atoms	ProtParam			وزن مولکولی Molecular weight	نقطه ایزوالکتریک Theoretical PI
					شاخص آلیفاتیک Aliphatic index	شاخص ناپایداری instability index	Gravy		
1	Am-P450	548	C ₂₈₂₁ H ₄₄₇₈ N ₇₄₈ O ₇₉₆ S ₂₀	8863	-0.160	97.50	39.19	62250.3	8.68
2	Ap-P450	508	C ₂₇₁₀ H ₄₂₀₀ N ₆₆₄ O ₇₄₂ S ₂₃	8339	-0.005	95.37	31.66	58692.5	8.55
3	Bm-P450	493	C ₂₆₂₀ H ₄₁₃₄ N ₇₀₄ O ₆₉₄ S ₂₀	8172	0.006	110.28	43.37	57241.1	8.69
4	Dc-P450	771	C ₃₉₂₀ H ₆₂₀₁ N ₁₀₉₅ O ₁₀₉₉ S ₄₁	12356	-0.323	83.99	49.79	87568.5	9.27
5	Dm-P450	556	C ₂₈₂₁ H ₄₄₆₂ N ₇₅₆ O ₈₁₇ S ₂₉	8885	-0.188	90.67	41.76	62970.7	6.98
6	Ph-P450	602	C ₃₀₇₂ H ₄₈₃₂ N ₈₂₂ O ₉₀₈ S ₂₄	9658	-0.426	83.07	45.08	68578.5	8.20
7	Tc-P450	521	C ₂₇₂₇ H ₄₂₂₉ N ₇₀₅ O ₇₅₇ S ₂₅	8441	-0.226	85.70	26.34	59776.3	8.84

جدول ۴- مشخصات ساختار ثانویه و سوم پروتئین P450 در حشرات نماینده از راسته‌های مختلف. ساختار سوم بر اساس مدل c4lxjA بررسی شده است.

Table 4. Secondary structure and tertiary structure characteristics of P450 protein in representative insects from different orders. Tertiary structures are based on “c4lxjA” model and confidence 100%.

ردیف Index	نمونه Sample	ساختار ثانویه Secondary Structure				ساختار سوم Tertiary Structure
		مارپیچ آلفا	صفحات گسترده	صفحات بتا	فتر مارپیچ تصادفی	TM-Score
		Alpha helix	Extended strand	Beta turn	Random coil	
1	<i>Am</i> -P450	43.98	16.79	8.94	30.29	0.2537
2	<i>Ap</i> -P450	40.16	18.90	8.27	32.68	0.2109
3	<i>Bm</i> -P450	48.07	17.44	10.95	23.53	0.1641
4	<i>Dc</i> -P450	39.30	15.43	7.13	38.13	0.1280
5	<i>Dm</i> -P450	51.98	14.21	8.45	25.36	-
6	<i>Ph</i> -P450	35.71	19.27	8.64	36.38	0.1769
7	<i>Tc</i> -P450	41.84	19.39	9.98	28.79	0.1978

بحث

تجزیه و تحلیل پروتئومیکس، بررسی انبوهی از داده‌ها را در یک آزمایش امکان‌پذیر می‌سازد (Wojcik and Schächter, 2000). امروزه پروتئومیکس و بیوانفورماتیک نگرشی جدید را نسبت به فرآیندهای موجود در سلول‌ها و ارگانسیم‌ها فراهم می‌آورد (Darabi and Seddigh, 2015; Seddigh and Darabi, 2016).

اخیرا از بیوانفورماتیک در شناسایی و بررسی موتیف‌های حفاظت شده و ساختارهای مختلف پروتئین‌ها استفاده می‌شود (Baloglu *et al.*, 2011; Bordoli and Schwede, 2012; Zhang *et al.*, 2012). در این بررسی، از ابزارهای بیوانفورماتیک برای شناسایی خصوصیات و ساختارهای مختلف پروتئین P450 در سی گونه از حشرات از راسته‌های مختلف، استفاده گردید.

آنزیم‌های P450 یکی از مهم‌ترین بالا خانواده‌های پروتئین‌ها در کل موجودات زنده را شامل می‌شوند. این‌که فعالیت این آنزیم روی دامنه وسیعی از سوبستراها (اکسیداستروئیدها، هورمون‌های جوانی، هیدروکربن‌ها، توکسین‌های گیاهی، آفت‌کش‌های شیمیایی و ...) انجام می‌شود، نشان می‌دهد که تعداد زیادی P450 در هر موجود زنده وجود دارد (بندانی، ۱۳۹۳). در این بررسی، تجزیه و تحلیل پروتئین P450 برای یافتن الگوی موتیف‌های حفاظت شده با استفاده از سرور MEME انجام شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است از بین ۱۰ موتیف شناسایی شده موتیف‌های ۱، ۲ و ۳ در تمامی گونه‌های حشرات مورد بررسی وجود داشت. موتیف ۴ نیز در تمامی حشرات به جز *D. sechellia* وجود داشت. هفت گونه از حشرات مورد مطالعه دارای ۱۰ موتیف شناسایی شده بودند که عبارتند از: *Aa*-P450، *Af*-P450، *Ap*-P450، *Bi*-P450، *Bt*-P450، *Mde*-P450 و *Tc*-P450. موتیف ۹ کم‌تر از سایرین در حشرات مشاهده گردید، به طوری‌که این توالی تنها در ۱۲ گونه حشره مشاهده گردید.

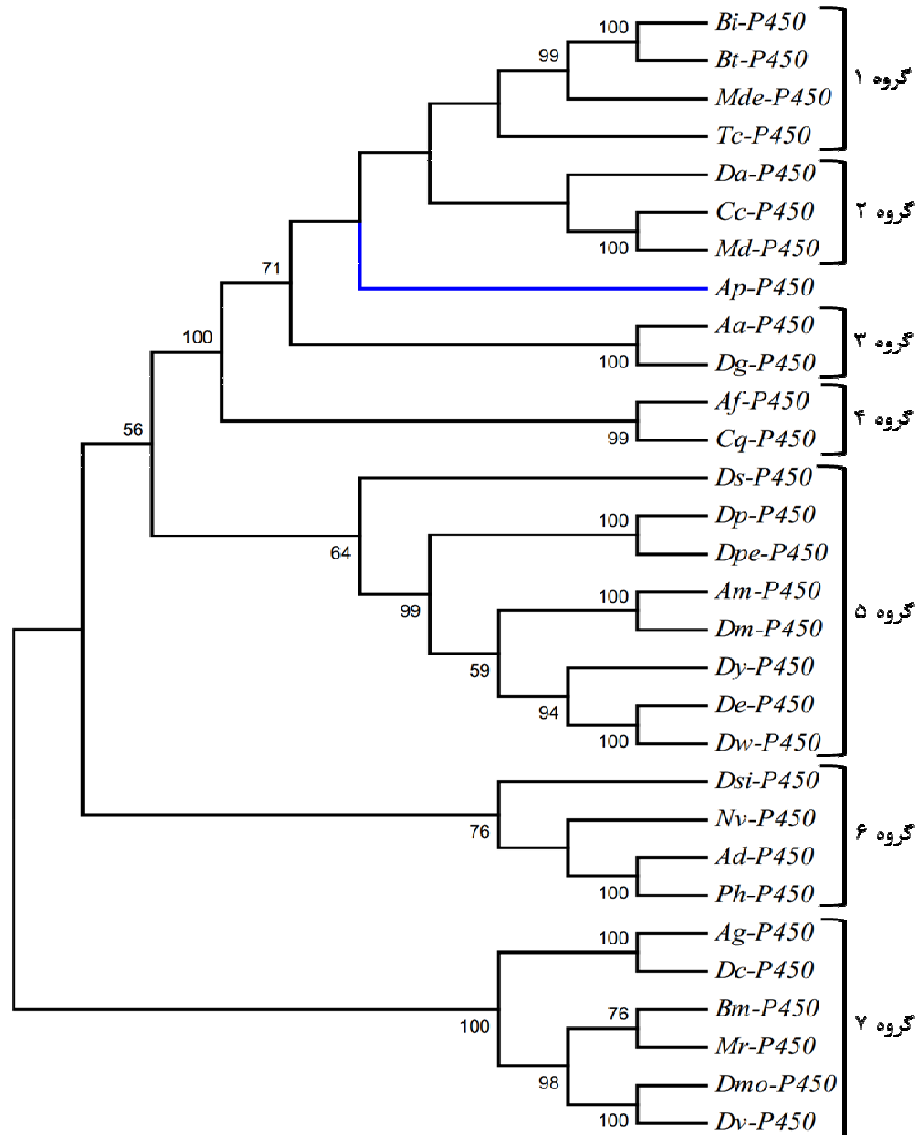
بررسی ساختار اولیه پروتئین P450 در حشرات نشان داد که *Dc*-P450 دارای بیش‌ترین وزن مولکولی (۸۷۵۶۸/۵) و بیش‌ترین تعداد اسید آمینه (۷۷۱) و *Bm*-P450 دارای کم‌ترین وزن مولکولی (۵۷۲۴۱/۱) و کم‌ترین تعداد اسید آمینه بود. نقطه ایزوالکتریک نقطه‌ای در pH است که در آن، پروتئین در میدان الکتریکی حرکت و مهاجرت نمی‌کند. این نقطه نقش مهمی در

تخلیص پروتئین‌ها دارد. نقطه ایزوالکتریک (PI) کم‌تر از ۷ نشان‌دهنده پروتئین اسیدی و بیش‌تر از ۷ نشان‌دهنده بازی بودن پروتئین است. در تجزیه و تحلیل نقطه ایزوالکتریک توسط سرور ProtParam نشان داده شد که بیش‌ترین نقطه ایزوالکتریک متعلق به *Dc-P450* (۹/۲۷) و کم‌ترین آن متعلق به *D. melanogaster* با نقطه ایزوالکتریک ۶/۹۸ بود. این بررسی نشان داد که پروتئین P450 در حشرات در طبیعت دارای خاصیت قلیایی است. معیار Gravy یک پروتئین از طریق تقسیم مجموع میزان هیدروپسی تمام اسیدهای آمینه بر تعداد اسیدهای آمینه موجود در توالی محاسبه می‌شود (Kyte and Doolittle, 1982). شاخص GRAVY پروتئین‌ها بین اعداد مثبت و منفی تغییر می‌کند. به طوری که اگر این شاخص منفی باشد پروتئین تقریباً کروی (دارای خاصیت آب‌دوستی) است و اگر بالاتر از صفر و مثبت باشد نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر غشایی (دارای خاصیت آب‌گریزی) می‌باشد. در بررسی انجام گرفته مشخص گردید که شاخص GRAVY در تمام حشرات نمونه مورد مطالعه منفی می‌باشد به جز پروانه *Bombyx mori* که دارای ارزش ۰/۰۰۶ بود. این نتایج نشان می‌دهد که در بین هفت گونه حشره مورد بررسی، پروتئین P450 در تمام آن‌ها دارای خاصیت آب‌دوستی است به جز *B. mori*. شاخص آلیفاتیک یک پروتئین اندازه حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک اسیدهای آمینه آلانین، والین، لوسین و ایزولوسین در پروتئین‌ها می‌باشد.

همان‌طور که در جدول ۳ نشان داده شد بیش‌ترین شاخص آلیفاتیک متعلق به *B. mori* و کم‌ترین آن متعلق به *P. humanus corporis* بود. بر اساس نتایج به دست آمده در این بررسی بالا بودن شاخص آلیفاتیک در پروتئین P450 نشان دهنده پایداری ساختاری این پروتئین می‌باشد. ضریب ناپایداری یک پروتئین به منظور تعیین پایداری پروتئین در محیط لوله آزمایش به کار می‌رود. اگر این ضریب کم‌تر از ۴۰ باشد آن پروتئین احتمالاً در تیوب آزمایش پایدار و اگر بیش‌تر از ۴۰ باشد ناپایدار خواهد بود (Guruprasad et al., 1990). نتایج این بررسی نشان داد که چهار گونه از حشرات نمونه شامل *Dm-P450*، *Dc-P450*، *Bm-P450* و *Ph-P450* دارای ساختار ناپایدار بوده و سایرین دارای ساختار پایداری بودند. بررسی ساختار دوم پروتئین P450 در حشرات نمونه نشان داد که مارپیچ آلفا و فنر مارپیچ تصادفی دارای بیش‌ترین درصد پراکندگی بوده و صفحات گسترده و صفحات بتا در بین این ساختارها پراکنده شده‌اند.

شناسایی ساختار سه بعدی پروتئین هدف اصلی پیش‌بینی ساختار پروتئین و برای درک کامل عملکرد پروتئین ضروری می‌باشد. در این مطالعه شباهت ساختاری بین پروتئین *Dm-P450* به عنوان نمونه مدل در حشرات، و شش گونه دیگر از حشرات نمونه براساس مدل c4lxjA و با استفاده از معیار TM-score محاسبه گردید. TM-score یک مقدار عددی برای محاسبه شباهت ساختاری بین دو پروتئین است. میزان عددی TM-score بین صفر و یک متغیر است، به طوری که ۱ نشان دهنده بیش‌ترین شباهت است. در این محدوده، اعداد کم‌تر از ۰/۱۷ نشان دهنده کم‌ترین میزان شباهت می‌باشند و نشان‌دهنده این است که ساختارهای مورد نظر ممکن است حتی مربوط به دو پروتئین متفاوت باشند. در حالی که عدد بالاتر از ۰/۵ نشان‌دهنده این است که ساختارهای مورد مطالعه به‌طور کلی دارای ترکیبات مشابه می‌باشند. در این بررسی، بیش‌ترین شباهت ساختار سوم نسبت به مدل *D. melanogaster* در *Am-P450* با میزان تقریبی ۰/۲۵۳ و کم‌ترین شباهت در *Dc-P450* با مقدار ۰/۱۲۸ مشاهده گردید.

در بررسی روابط فیلوژنی بین سی گونه مختلف حشرات از راسته‌های مختلف ۷ گروه شناسایی گردید. هر گروه شامل گونه‌های مختلف از راسته‌های متفاوت بودند. گونه *Acyrtosiphon pisum* به دلیل bootstrap پائین جز هیچ کدام از گروه‌ها طبقه‌بندی نشد (شکل ۳).



شکل ۳- درخت فیلوژنی پروتئین P450 در حشرات با استفاده از روش ClustalW و برنامه MEGA 6.06. روش NJ برای ترسیم درخت استفاده گردید. اعداد بالای شاخه‌ها bootstrap بیش‌تر از ۵۰ را در روش NJ نشان می‌دهد. هفت گروه شناسایی گردید که از ۱ تا ۷ شماره‌گذاری شدند.

Fig. 3. The phylogenetic tree of P450 protein from insects using the ClustalW and MEGA 6.06 program. The NJ method was used to construct the tree. Numbers associated with branches show bootstrap support values for NJ analyses higher than 50. Seven groups, designated from 1 to 7.

گروه ۱ شامل سه گونه از راسته بالغشائیان و *Tribolium castaneum* از راسته سخت بالپوشان است. البته گونه *T. castaneum* با bootstrap کم‌تر از ۵۰ و در یک زیر شاخه مجزا در این گروه قرار گرفت که این خود می‌تواند نشان‌دهنده تفاوت پروتئین P450 میان این گونه با سایر اعضای گروه باشد. گروه‌های ۲ و ۳ شامل حشرات مربوط به یک راسته مجزا بودند به‌طوری که سه گونه از راسته Diptera در گروه ۲ و دو گونه از راسته Hymenoptera در گروه ۳ قرار گرفتند. گونه‌های *Apis florea* از

راسته Hymenoptera و *Culex quinquefasciatus* از راسته Diptera گروه ۴ را تشکیل می‌دادند. گروه ۵ همانند گروه ۱ دارای گونه‌های مشابه به جز یک استثنا بود، به طوری که هفت گونه از مگس‌های خانواده Drosophilidae به همراه زنبور *Apis mellifera* در این گروه قرار گرفتند. *D. melanogaster* هم که در این بررسی به عنوان گونه مدل در نظر گرفته شده و بررسی ساختمان سوم پروتئین P450 براساس ساختار آن انجام گردید در این گروه و در یک زیر گروه با زنبور عسل قرار گرفت. این شباهت فیلوژنی می‌تواند نتایج حاصل از بررسی شباهت ساختار سوم با استفاده از TM-score را نیز تأیید کند. زیرا در آن بررسی نیز همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود بیش‌ترین شباهت ساختار سه بعدی مگس سرکه با گونه‌های نماینده حشرات در گونه زنبور عسل مشاهده گردید. گروه‌های ۶ و ۷ شامل گونه‌های مختلف حشرات از راسته‌های مختلف بودند. در گروه ۶ گونه *Pediculus humanus corporis* علیرغم تفاوت‌های زیاد با سایر اعضای رده بالداران در یک زیر گروه با *Apis dorsata* از راسته بالغشائیان قرار گرفت. این مسأله نشان می‌دهد که پروتئین P450 در تمامی حشرات بسیار به هم مشابه بوده و احتمالاً از یک جد مشترک مشتق شده‌اند.

References

منابع

- بندانی، ع. ۱۳۹۳. فیزیولوژی حشرات، هموستازیس، کوتیکول، اندام چربی، خون، P450، تنظیم دما. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، ۴۵۷ صفحه.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., Li, W. W. and Noble, W. S. 2009. MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research* 37 (Web Server issue): W202-208.
- Baloğlu, M. C., Negre-zakharov, F., ökten, H. A. and Yücel, A. M. 2011. Molecular cloning, characterization, and expression analysis of a gene encoding a Ran binding protein (RanBP) in *Cucumis melo* L. *Turkish Journal of Biology* 35: 387-397.
- Bordoli, L. and Schwede, T. 2012. Automated protein structure modeling with SWISS-MODEL Workspace and the Protein Model Portal. *Homology Modeling: Methods and Protocols* 857: 107-136.
- Brun, A., Cuany, A., le Mouel, T., Berge, J. and Amichot, M. 1996. Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, CYP6A2, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 26: 697-703.
- Chiu, T. L., Wen, Z., Rupasinghe, S. G. and Schuler, M. A. 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(26): 8855-8860.
- Cohen, M. B. and Feyereisen, R. A. 1995. Cluster of cytochrome P450 genes of the CYP6 family in the house fly. *DNA and Cell Biology* 14: 73-82.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. and Deleage, G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 147-150.
- Daborn, P. J., Yen, J. L., Bogwitz, M. R., le Goff, G., Feil, E., Jeffers, S., Tijet, N., Perry, T., Heckel, D., Batterham, P., Feyereisen, R., Wilson, T. G. and ffrench-Constant, R. H. 2002. A single P450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* 297: 2253-2256.
- Danielson, P. 2002. The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Current Drug Metabolism* 3(6): 561-597.
- Darabi, M. and Seddigh, S. 2015. Bioinformatic characterization of aspartic protease (AP) enzyme in seed plants, *Plant Systematics and Evolution* 301: 2399-2417.
- Feyereisen, R. 1999. Insect P450 enzymes. *Annual Review of Entomology* 44: 507-533.
- Feyereisen, R., Anderson, J. F., Carino, F. A., Cohen, M. B. and Koener, J. F. 1995. Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of CYP6A1 in an insecticide-resistant strain. *Pesticide Science* 43: 233-239.
- Gandhi, R., Varak, E. and Goldberg, M. L. 1992. Molecular analysis of a cytochrome P450 gene of family 4 on the *Drosophila* X chromosome. *DNA and Cell Biology* 11: 397-404.

- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D. and Bairoch, A. 2005.** Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: Walker J. M., (ed.). The Proteomics Protocols Handbook. Totowa, NJ, USA: Humana Press, pp. 571–607.
- Geourjon, C. and Deleage, G. 1995.** SOPMA: significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. Computer applications in the biosciences: CABIOS 11: 681-684.
- Guengerich, F. P. 2007.** Cytochrome p450 and chemical toxicology. Chemical research in toxicology 21(1): 70-83.
- Guruprasad, K., Reddy, B. B. and Pandit, M. W. 1990.** Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence, Protein Engineering 4: 155-161.
- Harrison, T. L., Zangerl, A. R. and Schuler, M. A. and Berenbaum, M. R. 2001.** Developmental variation in cytochrome P450 expression in *Papilio polyxenes* in response to xanthotoxin, a hostplant allelochemical. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 48: 179–189.
- Kahn, R. and Durst, F. 2000.** Function and evolution of plant cytochrome P450. Recent Advances in Phytochemistry 34: 151–189.
- Kasai, S., Shono, T. and Yamakawa, M. 1998.** Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. Insect Molecular Biology 7: 185–190.
- Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. 2009.** Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server, Nature Protocols 4: 363-371.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. 1982.** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, Journal of Molecular Biology 157: 105-132.
- McCart, C. 2008.** Dissecting the insecticide-resistance-associated cytochrome P450 gene *Cyp6g1*. Pest Management Science 64(6): 639-645.
- Nelson, D. R. 2011.** Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics 1814(1): 14-18.
- Nikou, D., Ranson, H. and Hemingway J. 2003.** An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector, *Anopheles gambiae*. Gene 318: 91–102.
- Ranasinghe, C. and Hobbs, A. A. 1998.** Isolation and characterization of two cytochrome P450 cDNA clones for CYP6B6 and CYP6B7 from *Helicoverpa armigera* (Hubner): Possible involvement of CYP6B7 in pyrethroid resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology 28: 571–580.
- Schlenke, T. A. and Begun, D. J. 2004.** Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 1626–1631.
- Scott, J. G. 1999.** Cytochromes P450 and insecticide resistance. Insect Biochemistry and Molecular Biology 29(9): 757-777.
- Scott, J. G., Liu, N. and Wen, Z. 1998.** Insect cytochromes P450: Diversity, insecticide resistance and tolerance to plant toxins. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology 121(1): 147-155.
- Scott, J. G. and Wen, Z. 2001.** Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. Pest Management Science 57(10): 958-967.
- Seddigh, S. and Darabi, M. 2016.** Proteomics comparison of aspartic protease enzyme in insects. Turkish Journal of Biology 40, 69-83.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution 30(12): 2725-2729.
- Tomita, T. and Scott, J. G. 1995.** cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: The putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. Insect Biochemistry and Molecular Biology 25: 275–283.
- Waters, L. C., Zehlf, A. C., Shaw, B. J. and Ch'ang, L. Y. 1992.** Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 89: 4855–4859.
- Wen, Z. and Scott, J. G. 2001.** Cytochrome P450 CYP6L1 is specifically expressed in the reproductive tissues of adult male German cockroaches, *Blattella germanica* (L.). Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 179–187.
- Wojcik, J. and Schächter, V. 2000.** Proteomic databases and software on the web, Briefings in Bioinformatics 1: 250-259.
- Xu, J. and Zhang, Y. 2010.** How significant is a protein structure similarity with TM-score= 0.5?. Bioinformatics 26: 889-895.

- Zhang, Y. and Skolnick, J. 2004.** Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 57: 702-710.
- Zhang, Q. C., Petrey, D., Deng, L., Qiang, L., Shi, Y., Thu, C. A., Bisikirska, B., Lefebvre, C., Accili, D., Hunter, T., Maniatis, T., Califano, A. and Honig, B. 2012.** Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale. *Nature* 490: 556-560.