



همسانه‌سازی و بررسی بیوانفورماتیکی ژن *CCD1* در زعفران (*Crocus sativus* L.) ایران

محمدجواد حبیب‌زاده^۱، سیدمهدی زیارت‌نیا^{۲*}، ابراهیم دورانی علیایی^۳، مصطفی ولیزاده^۴

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۲- استادیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.

۳- دانشیار، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

۴- استاد، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول: m.ziaratnia@rifst.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۸/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۲/۱۷

چکیده

ایران بزرگترین تولیدکننده زعفران جهان می‌باشد بر همین اساس زعفران در کشور به عنوان یک محصول راهبردی محسوب می‌گردد. از آنجا که متابولیسم آپوکاروتنوئیدها عامل ارزش اقتصادی در گیاه زعفران است، لذا جداسازی و تجزیه و تحلیل شیمیایی ژن‌های درگیر در متابولیسم کاروتنوئیدها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. با توجه به اهمیت ژن *CsCCD1* در بیوسنتز آپوکاروتنوئیدها، در این تحقیق به منظور شناخت بیشتر از ساختار ژنومی زعفران ایران، به بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی این ژن پرداخته شد. همچنین روابط فیلوژنتیکی آنزیم *CsCCD1* توسط سرورها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی با هدف مطالعه پتانسیل ساختاری آن مورد پیش‌بینی قرار گرفت. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی و فیزیولوژی پروتئین *CsCCD1* توسط سرورها و ابزارهای *SOPMA*, *ProtParam*, *ProtScale*, *Pfam*, *ProtComp*, *SignalP*, *TMHMM*, *TargetP* و *ChloroP* بررسی شدند. همچنین با استفاده از سرور *Swiss-Model* ساختار سه‌بعدی پروتئین *CCD1* مورد بررسی قرار گرفت و جهت اعتبار سنجی ساختاری مدل ترسیم شده سه‌بعدی، پلات رامانچاندرا ترسیم گردید. نتایج تجزیه و تحلیل درخت فیلوژنتیکی نشان داد که از لحاظ ساختار اسید آمینه‌ای، پروتئین *CsCCD1* بیشترین قرابت را با *CaCCD* داشت. نتایج تجزیه و تحلیل ساختار پروتئین *CsCCD1* حاکی از فقدان وجود توالی راهنما و منطقه تراغشایی در آن بود و بطور کلی، نتایج نشان داد که پروتئین *CsCCD1*، آنزیمی از خانواده کاروتنوئیداکسیژنازها و پایدار در شرایط آزمایشگاهی است. تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی انجام شده بر روی پروتئین *CsCCD1* زمینه را برای مطالعات عملکردی آینده فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: *CsCCD1*، آپوکاروتنوئید، بررسی فیلوژنتیک، بیوانفورماتیک، مدل‌سازی.

مقدمه

خصوصیات اصلی زعفران به دلیل تجمع سه نوع آپوکاروتنوئید شامل کروستین، پیکروکروسین و سافرانال می‌باشد که به ترتیب عامل ایجاد رنگ قرمز، طعم تلخ و عطر آن در کلاله می‌باشند (Demurtas et al., 2018). مطالعات صورت گرفته نشان می‌دهد در کلاله زعفران، کروستین می‌تواند از پیش‌ماده‌های بتا-کاروتن یا زیرانتین تولید شود (Rubio et al., 2009). این مولکول‌های کاروتنوئیدی بواسطه واکنش برشی که توسط تعدادی از آنزیم‌های خانواده CCD^f ها صورت می‌گیرد، تشکیل می‌شوند (Giuliano et al., 2003). تاکنون، انواع مختلفی از آنزیم‌های کاروتنوئید اکسیژناز در گیاهان شناسایی و طبقه‌بندی شده‌اند. اولین ژن شناسایی شده از خانواده CCD ها، ژن $Vp14^h$ ذرت بود که در تشکیل اسیدآبسیک نقش دارد و در حال حاضر تحت عنوان $NCED^f$ به عنوان یک کلاس از خانواده بزرگ CCD ها طبقه‌بندی می‌شوند. (Gomez-Gomez et al., 2010) علاوه بر $NCED$ ، CCD ها در گیاهان به پنج دسته شامل $CCD1$ ، $CCD2$ ، $CCD4$ ، $CCD7$ و $CCD8$ طبقه‌بندی می‌شوند (Ahrazem et al., 2016) که در نوع پیش‌ماده و جایگاه فعالیت با هم تفاوت دارند (Rubio-Moraga et al., 2014). در کلاله زعفران، چهار نوع CCD شامل $CsCCD1$ ، $CsCCD2$ ، $CsCCD4a$ و $CsCCD4b$ شناسایی شده‌اند (Rubio et al., 2008).

آنزیم $CsCCD1$ در سیتوزول فعالیت می‌کند، محلی که احتمالاً در برش آپوکاروتنوئیدها نقش دارد، در حالی که آنزیم‌های $CsCCD2$ و $CsCCD4$ در پلاستیدها، جایگاه حضور پیش‌ماده‌ها، قرار دارند (Ahrazem et al., 2010). $CCD1$ آنزیمی فاقد هم‌ Fe^{2+} به عنوان کوفاکتور نیاز دارد و از اکسیژن برای برش متقارن انواع پیش‌ماده‌های کاروتنوئیدی در جایگاه‌های ۹،۱۰ و ۱۰'، ۹' استفاده می‌کند و باعث تولید آلدئیدها یا دی آلدئیدها و کتون‌ها می‌شود (Vogel et al., 2008).

آنزیم $CCD1$ از جنس‌های مختلف گیاهی از جمله انگور (Mathieu et al., 2005)، طالبی (Ibdah et al.,

کاروتنوئیدها ترکیباتی متنوع و آبرگریزی هستند که از بسیاری از موجودات زنده جداسازی شده‌اند (Ahrazem et al., 2016). با این حال، بیوسنتز آنها به گیاهان و برخی از باکتری‌ها و قارچ‌ها محدود می‌گردد. در گیاهان رنگ‌های زرد، نارنجی و قرمز گل‌ها و میوه‌ها به واسطه تجمع کاروتنوئیدها در کروموپلاست‌های آنها می‌باشد. در این بافت‌ها، کاروتنوئیدها به عنوان جاذب حشرات گرده‌افشان و عوامل پراکندگی بذر عمل می‌کنند (Ahrazem et al., 2016). خاصیت سلامتی بخش و تغذیه‌ای کاروتنوئیدها، نه تنها برای گیاهان، بلکه برای حیوانات و انسان نیز مفید می‌باشند (Fraser and Bramley, 2004). نقش مهم این ترکیبات برای سلامتی انسان و حیوانات، مطالعه در خصوص متابولیسم کاروتنوئیدها را بسیار جذاب ساخته است (Gomez-Gomez et al., 2010).

ترکیبات مهمی که به واسطه برش اکسیداتیوی^۱ کاروتنوئیدها سنتز می‌شوند به نام آپوکاروتنوئیدها شناخته می‌شوند (Gomez-Gomez et al., 2010). در گیاهان برش اکسیداتیوی کاروتنوئیدها منجر به آزاد شدن تعدادی از ترکیبات آپوکاروتنوئیدی می‌شود که نقش‌های حیاتی از جمله تولید رنگدانه، فتوسنتز، محافظت در برابر نور و مولکول‌های سیگنالی را دارا می‌باشند، همچنین دارای عملکردهای متنوع دیگری نیز هستند (Ahrazem et al., 2015).

برخی از آپوکاروتنوئیدها، همانند بیکسین^۲ و کروستین^۳ رنگدانه‌های گیاهی با ارزش اقتصادی می‌باشند. کروستین توسط زعفران (*Crocus sativus L.*) و دیگر جنس‌های خویشاوند آن مانند *Buddleja* (Liao et al., 1999)، *Jacquinia angustifolia* (Eugester et al., 1969) و *Coleus forskolii* (Tandon et al., 1979) سنتز می‌شود (Gomez-Gomez et al., 2010)، ولی در هیچکدام از این جنس‌ها، تجمع آپوکاروتنوئیدهای کروستین و کروستین به میزان آنچه که در کلاله زعفران (بیش از هشت درصد وزن خشک آن) گزارش شده است، نمی‌باشد (Hosseinpour azad et al., 2016).

4- Carotenoid Cleavage Dioxygenases
5- VIVIPAROUS14
6- 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase
7- Heme

1- Oxidative Cleavage
2- Bixin
3- Crocetin

پس از جمع آوری نمونه های پیاز و برگ زعفران از مزرعه تحقیقاتی مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی و انجماد آنها در نیتروژن مایع، DNA ژنومی به روش CTAB تغییر یافته (*Beiki et al., 2011*) استخراج و با استفاده از نانودراپ (*BOECO N-1C, Germany*) و ژل آگارز یک درصد کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد بررسی قرار گرفت. به منظور شناسایی توالی های ژنی CCD1 زعفران، اطلاعات مربوط به توالی های نوکلئوتیدی DNA و mRNA این ژن از بانک ژن استخراج NCBI⁴ و با استفاده از نرم افزار *Oligo version 7.60* آغازگر برای ژن فوق الذکر طراحی شد (جدول ۱).

ژن CCD1 با واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)⁵ شامل چهار دقیقه ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱۰ چرخه دمایی شامل ۲۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه ۵۳ درجه سانتی گراد (۰/۵) درجه افزایش در هر چرخه، چهار دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و ۲۵ چرخه دمایی شامل ۲۰ ثانیه ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۰ ثانیه ۵۸ درجه سانتی گراد، چهار دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد و چهار دقیقه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد، از DNA ژنومی و cDNA با آغازگرهای طراحی شده با استفاده از ترکیب آنزیم های *Pfu polymerase* و *Taq polymerase* تکثیر و تمامی محصولات حاصل از PCR با استفاده از کیت *GeNet Bio* بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، از ژل آگارز خالص سازی شد (شکل ۱).

همسانه سازی و توالی یابی ژن CCD1 زعفران ایران

با استفاده از کیت *pTG19-T PCR cloning vector* (*Malaysia, Vivantis*) و آنزیم *T4 DNA Ligase* (USA *Thermo Fisher Scientific*) واکنش های اتصال محصول PCR به داخل ناقل همسانه سازی *pTG19-T* انجام شد، سپس پلاسمید محتوی ژن CCD1 با استفاده از روش شوک حرارتی (*Maniatis et al., 1995*) به باکتری مستعد *E. coli* (*Escherichia coli*) سویه *JM109* منتقل شد. سلول های تراریخت در محیط ^۶LB-agar حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین ($50 \mu\text{g.ml}^{-1}$) گزینش شدند. دو روش *Colony PCR* و هضم آنزیمی با آنزیم برشی *BamHI* (*Germany, Jena Bioscience*) جهت تأیید ورود ژن

(*Crocus*, *Bouvier et al., 2003*)، مرکبات (*Kato et al., 2006*) و قهوه (*Simkin et al., 2008*) جداسازی شده و مشخص شده که عامل طعم دهنده های فرار را ایجاد می کند. CCD1 در گوجه فرنگی عوامل ایجاد طعم شامل گرانیل استون^۱، سودویونون^۲ و بتا- یونون^۳ را تولید می کند (*Ibdah et al., 2006*). فعالیت این آنزیم در ذرت *ZmCCD1* با چندین پیش ماده کاروتنوئیدی مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شد که CCD1 کاروتنوئیدهای خطی و حلقوی را در جایگاه های ۱۰ و ۹ (۱۰' و ۹') برش داده و تولید آپوکاروتنوئیدهای فرار می نماید (*Vogel et al., 2008*).

علی رغم مطالعات فراوان انجام شده، تاکنون تلاشی برای اندازه گیری فرآورده های تولید شده توسط CCD1 به صورت کمی انجام نشده است، زیرا انجام چنین مطالعاتی در محیط *In vitro* بسیار دشوار است (*Vogel et al., 2008*). لذا شناسایی آنزیم ها و پیش ماده هایی که منجر به تولید ترکیبات آپوکاروتنوئیدی می شوند، برای درک متابولیسم کاروتنوئید و نقش بیولوژیکی محصولات آپوکاروتنوئیدی ضروری است (*Vogel et al., 2008*).

در زعفران به علت با ارزش بودن ترکیبات کلاله، (ترکیبات کاروتنوئیدی و آپوکاروتنوئیدی)، شناخت ژن های شرکت کننده در مسیر تولید کاروتنوئیدها یکی از اولویت های مهم در این گیاه است که با روشن شدن این مسیر می توان ابتکار عمل در بهبود کمی و کیفی محصول را در دست گرفت.

بدین منظور در این پژوهش در اولین گام، تکثیر، همسانه سازی و شناسایی ژن CCD1 زعفران ایران و سپس دسترسی به توالی رمزگردان این ژن، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک آنها و مشخص کردن عملکرد، ساختار دوم و سوم پروتئین و بررسی تجزیه و تحلیل های بیوانفورماتیکی در راستای تعیین مشخصات پروتئین مذکور بخشی از اهداف این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش ها

استخراج DNA ژنومی

4- www.ncbi.nih.gov/genbank
5- Polymerase Chain Reaction
6- Luria-Bertani

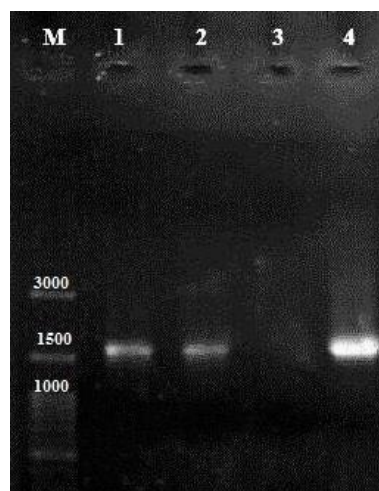
1- Geranylacetone
2- Pseudo ionone
3- β -ionone

توالی‌یابی با آغازگرهای یونیورسال *M13* و همچنین آغازگرهای اختصاصی به شرکت ماکروژن کره جنوبی (*Korea, Macrogen*) ارسال شدند.

مورد نظر به باکتری انجام و پس از تایید، با استفاده از کیت استخراج *TPG* (پیشگامان انتقال ژن-ایران) پلاسمیدها از کلون‌های مختلف جداسازی شد. پس از خالص‌سازی جهت

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در بررسی ژن *CsCCDI*

ژن Gene	آغازگر Primer	توالی Sequence
<i>CCDI</i>	<i>F1</i>	5'- ATG GGA GAA GTA GCG AAG GAG GAA -3'
	<i>R1</i>	5'- TCA TAC GTC GGT TTG CTG CCA CT-3'



شکل ۱. ژل الکتروفورز پس از PCR، قطعه ۱۶۴۱ جفت بازی تکثیر شده از DNA ژنومی (لاین ۲) و cDNA (لاین‌های ۱ و ۴)
Fig. 1. Electrophoresis gel of PCR reaction, 1641 bp fragment amplified from genomic DNA (line 2) and cDNA (lines 1, 4)

اسید آمینه با ترجمه توالی نوکلئوتیدی ژن *CCDI* به وسیله نرم‌افزارهای ترجمه داده پایگاه مولکولی *Expassy* بدست آمد (شکل ۲) (*Artimo et al., 2012*). برای بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی پروتئین *CCDI* شامل وزن مولکولی، pI ، شاخص آلیفاتیک، شاخص پایداری و نیمه-عمر پروتئین از نرم‌افزار *ProtParam* (*Gasteiger et al., 2005*)، پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین بیان‌شونده از *SOPMA* (*Combet et al., 2000*)، پیش‌بینی توالی حفاظت شده با نرم‌افزار *Pfam* (*El-Gebali et al., 2019*)، شناسایی جایگاه درون سلولی از نرم‌افزار *ProtComp*، الگوی آبگریزی-آبدوستی بر اساس روش کیت و دولیتل (*Kyte & Doolittle, 1982*) از نرم‌افزار *ProtScale* (*Gasteiger et al., 2005*)، وجود سیگنال‌های پتیدی در پروتئین از نرم‌افزار *SignalP 5.0*

استخراج RNA و سنتز cDNA

کل با استفاده از کیت استخراج RNA (*AccuZol™ RNA Total RNA Extraction Solution from Bioneer USA*) از کلاله زعفران استخراج گردید. سنتز *cDNA*، پس از حذف *DNA* با آنزیم *DNase*، با استفاده از کیت سنتز *cDNA* (*RevertAID™ M-MuLV*) (*Thermo Fisher Scientific USA*) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت.

بررسی توالی نوکلئوتیدی

بررسی، اصلاح و حذف آلودگی ناقل از نتایج پس از توالی‌یابی قطعه مورد نظر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی و با استفاده از نرم‌افزار *Chromas version 2.6.2* صورت گرفت. به منظور یافتن توالی‌های مشابه از پایگاه داده *NCBI*، برنامه *BLAST N* استفاده شد. همچنین توالی

(Waterhouse et al., 2018; Bienert et al., 2017;)
 و جهت‌گیری مرتبط با پروتئین *CCD1* از نرم‌افزار
TMHMM (Krogh et al., 2001) و برای بررسی هدف-
 گیری پروتئین از بانک‌های *ChloroP* و *TargetP* استفاده
 شد. با استفاده از پایگاه اطلاعاتی *SWISS-MODEL*

(Almagro Armenteros et al., 2019)، ناحیه تراغشایی
 و جهت‌گیری مرتبط با پروتئین *CCD1* از نرم‌افزار
TMHMM (Krogh et al., 2001) و برای بررسی هدف-
 گیری پروتئین از بانک‌های *ChloroP* و *TargetP* استفاده
 شد. با استفاده از پایگاه اطلاعاتی *SWISS-MODEL*

MGEVAKEEVEERRSIVAVNPQPSKGLVSSAVDLIEKAVVYLFHDKSKPCHYLSGNFAPVVDDETPPCP
 DLPVVRGHLPECLNGEFVVRVGPNNPKFMPVAGYHWFDDGMIHGMRIKDGKATYVSRYVKTSRLKQ
 EEYFEGPKFMKIGDLKGGFFGLFMVQMQLLRAKLKVIDVSYGVGTGNTALIYHHGKLLALSEADKPY
 VVKVLEDGDLQTLGLLDYDKRLSHSFTAHPKVDPFTDEMFAFGYAHTPPYVTVRISKDGMVRDP
 VPITIPASVMMHDFAITENYSIFMDLPLYFQPKEMVKGKLIFFSFATKARFGVLPYAKDDSLIR
 WFELPNCIFHNANAWEEGDEVVLITCRLENPDLDMVNGAVKEKLENFKNELYEMRFNMKTGAAS
 QKQLSVSAVDFPRINESYTTTRKQRYVYGTILDNITKVKGIKFDLHAEPEAGKKKLEVGGNVQGFIDL
 GPGRYGSEAVFVPRERGIKSEEDDGYLIFVHDENTGKSEVNVDAKTMSAEPVAVVELPNRVPYGF
 HAFFVNEEQQLQWQQTDV

شکل ۲. توالی اسید آمینه *CCD1* زعفران

Fig. 2. Saffron *CCD1* amino acid sequence

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی اسیدهای آمینه پروتئین
CsCCD1 با *ProtParam* نشان داد که نقطه ایزو
 الکتریک تئوری این پروتئین pI ۵/۹ و وزن مولکولی آن
 حدود ۶۱/۷ کیلودالتون است. شاخص ناپایداری آن ۲۹/۸۸
 محاسبه شد. با توجه به وجود متیونین در انتهای *N* توالی
 اسیدآمینه، نیمه‌عمر برآورد شده در شرایط آزمایشگاه ۳۰
 ساعت، در مخمر و باکتری /شرشیاکولی به ترتیب بیش از
 ۲۰ و ۱۰ ساعت برآورد گردید. شاخص آلیفاتیک پروتئین
CsCCD1، ۸۸/۳۴ بود که این مقدار شاخص آلیفاتیک یک
 فاکتور مثبت افزایش پایداری ساختار کروی پروتئین در
 برابر حرارت محسوب می‌گردد (Mirhoseini et al.,
 2016). از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۷۵ اسید آمینه بار
 منفی (آسپاراتات و گلوتامات) و ۶۵ اسید آمینه بار مثبت
 (آرژنین+ لیزین) دارند. میانگین نسبی آبدوستی- آبگریزی
 (*GRAVY*) پروتئین *CsCCD1* نیز ۰/۲۷۶- بدست آمد و
 والین با ۹/۵ درصد فراوان‌ترین اسید آمینه آن بود.

جهت پیش‌بینی سیگنال‌های پپتیدی پروتئین‌ها و
 مناطق برش، از نرم‌افزار *SignalP* با صحت ۸۷ درصد
 (Bendtsen et al., 2004) استفاده شد. نتیجه حاصل
 مشخص کرد که این پروتئین، فاقد کدهای انتقال به
 پلاستید در توالی پپتیدی خود است (شکل ۳a). از آنجا که
 آنزیم‌های *CCD* از کاروتنوئیدها به عنوان پیش‌ماده استفاده

بررسی ویژگی‌های فیلوژنتیکی *CsCCD1*

برای ایجاد یک درخت فیلوژنتیکی، سه مرحله اساسی
 شامل، هم‌ردیف کردن توالی‌های *DNA* یا اسیدهای آمینه و
 به دست آوردن داده‌های مقایسه‌ای، تبدیل داده‌های
 مقایسه‌ای و ارزیابی صحت درخت بازسازی شده، مورد نیاز
 می‌باشند.

در این مطالعه، هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با نرم‌افزار *Mega*
 6 (Tamura et al., 2013) انجام و بر اساس روش اتصال
 مجاور که یکی از روش‌های رایج ایجاد درخت تکاملی است،
 درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. همچنین با استفاده از
 آزمون *Bootstrap* که یک روش ساده برای سنجش
 پایداری نسبی گروه‌ها در درون یک درخت است (Nassaj
 & Shamsbakhsh, 2010)، صحت درخت‌ها با
 تکرارپذیری ۱۰۰۰ مورد ارزیابی قرار گرفت.

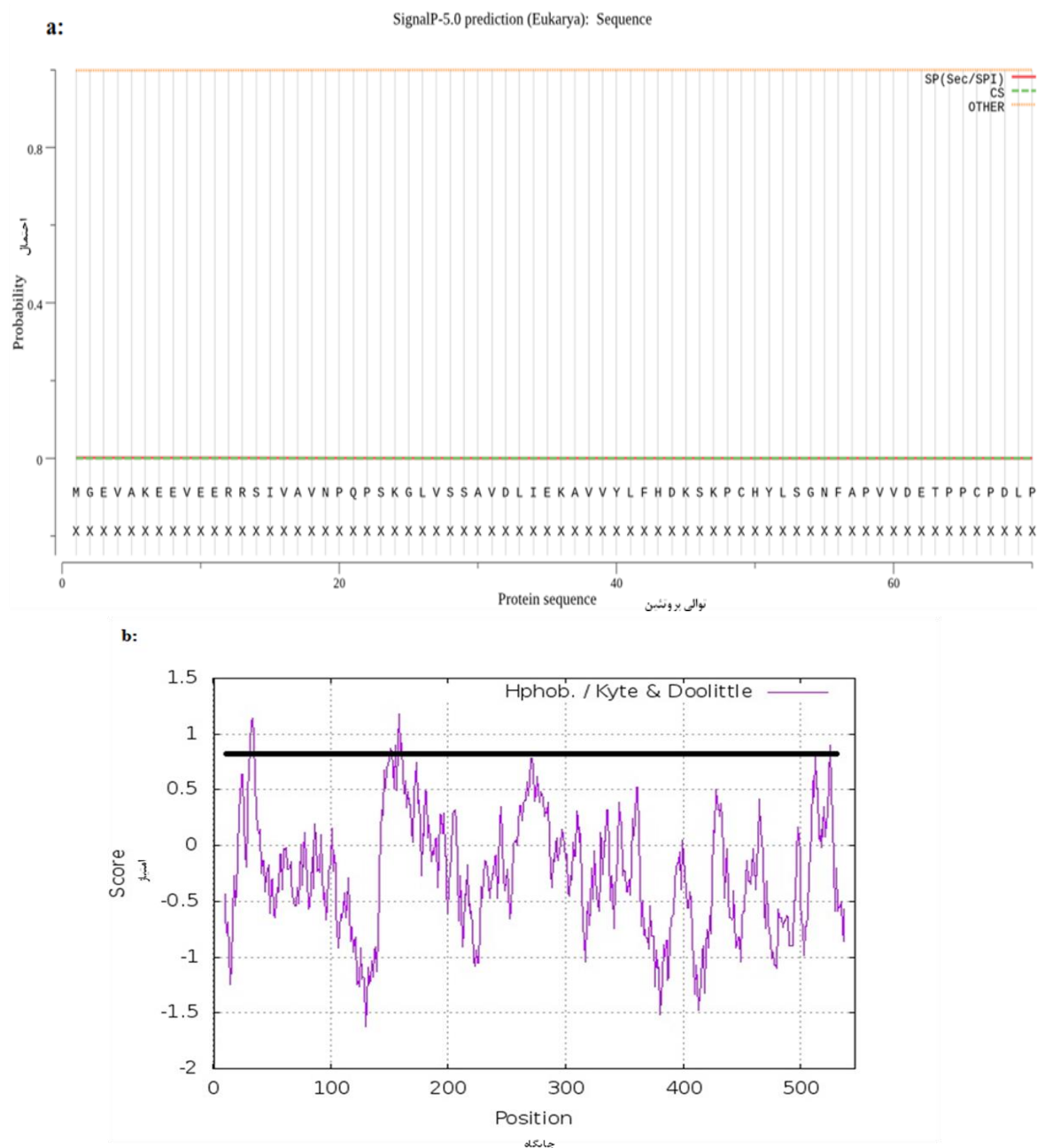
نتایج و بحث

تکثیر، همسانه‌سازی و توالی‌یابی

نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعه *CCD1* تکثیر شده به روی
DNA ژنومی و *cDNA* نشان داد که این ژن فاقد اینترون
 بوده و با رونویسی و ترجمه آن، پروتئین‌هایی به طول ۵۴۶
 اسید آمینه تشکیل می‌شود.

نتایج بیوانفورماتیکی ساختار پروتئین‌ها

می‌کنند، تعیین مشخصات آبگریزی- آبدوستی این آنزیم‌ها و خاصیت تراغشایی آنها مهم می‌باشد. الگوی آبگریزی- آبدوستی برای زنجیره پلی‌پپتیدی *CsCCD1*، کمترین امتیاز (۲/۶۱۱-) در موقعیت ۱۰ برای اسید آمینه گلوتامات (*E*) و بیشترین مقادیر آبگریزی برای اسید آمینه آلانین در موقعیت ۳۰ (با امتیاز ۱/۹۱۱) بدست آمد (شکل ۳b).



شکل ۳. بررسی سیگنال‌های پپتیدی در پروتئین *CsCCD1*. a: نتایج بررسی با نرم‌افزار SignalP b: الگوی آبگریزی- آبدوستی پروتئین *CsCCD1*

Fig. 3. Peptide signaling in *CsCCD1* proteins. a: Results of SignalP software for peptide signaling characterization, b: Hydrophobic-hydrophilic pattern of *CsCCS1* protein

سرور *Pfam* جهت تعیین توالی حفاظت شده پروتئین، توالی ۵۳۴ تا ۵۶ می‌باشد که این توالی در خانواده کاروتنوئید اکسیژنازها قرار می‌گیرد (شکل ۴).



شکل ۴. الگوی حفاظت شده پروتئین *CsCCD1* بدست آمده از *Pfam*

Fig. 4. Conserved pattern of *CsCCD1* protein obtained from *Pfam*

همولوژیکی این است که توالی پروتئین با یک یا چند پروتئین با ساختار شناخته شده شباهت داشته باشد. این روش، مدل‌سازی مقایسه‌ای نیز نامیده می‌شود (*Yousefi Javan, 2017*). در روش مدل‌سازی مقایسه‌ای، ساختمان پروتئین بر اساس مشابهت توالی ساختمان با توالی یا ساختمان‌های شناخته شده با روش‌های تجربی پیش‌بینی می‌شود. در واقع، این روش بر این اصل استوار است که اگر دو پروتئین از نظر توالی تشابه بالایی داشته باشند، احتمالاً ساختمان سه‌بعدی بسیار مشابهی خواهند داشت (*Babaabasi, 2017*).

در این تحقیق علاوه بر نتیجه نرم‌افزار *Pfam* در خصوص قرار گرفتن توالی حفاظت شده این پروتئین در خانواده کاروتنوئید اکسیژنازها، معیارهایی نظیر وضوح در محدوده سه آنگستروم، شباهت بالای ۳۵ درصد الگو با توالی مورد مطالعه و *E-value* پایین اعمال گردید تا اعتبار و اطمینان پذیری مدل افزایش یابد.

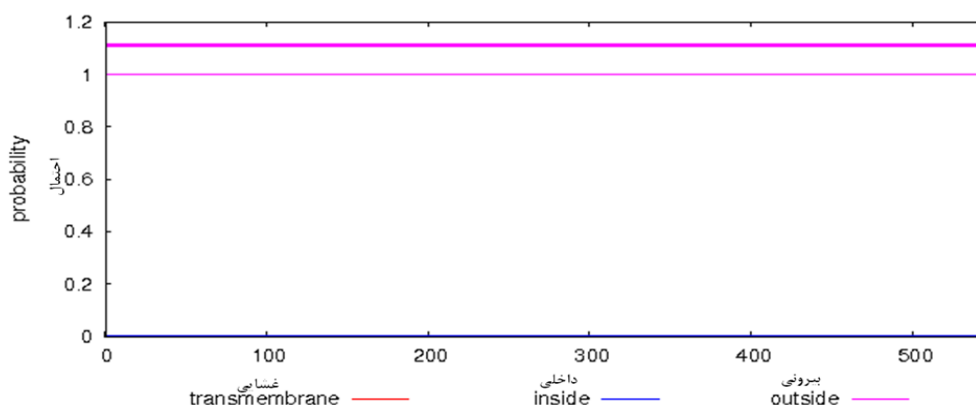
نتایج نرم‌افزار *SOPMA* تعیین کرد در ساختار دوم این پروتئین ۸۸ مارپیچ آلفا (۱۶/۱۲ درصد)، ۱۳۵ *Extended strand* (۲۴/۷۳ درصد)، ۳۷ *Beta turn* (۶/۷۸ درصد) و ۲۸۶ ساختار *Random coil* (۵۲/۳۸ درصد) وجود دارد (جدول ۲). نرم‌افزار *ProtComp* (امتیاز ۴/۸) سیئوپلاسم را به‌عنوان جایگاه درون سلولی پروتئین *CsCCD1* پیش‌بینی نمود. نرم‌افزارهای *ChloroP 1.1* و *TargetP 1.1* عدم وجود سیگنال با هدف‌گیری پلاستیدی را پیش‌بینی نمودند که این نتیجه توسط نرم‌افزار *TMHMM* نیز تأیید گردید. نتیجه حاصل از این نرم‌افزار نشان داد که این پروتئین فاقد سیگنال پپتیدی بوده و پروتئین خارج از غشاء قرار دارد (شکل ۵).

شکل فضایی بخش‌های متفاوت هر پروتئین، در واقع تعیین‌کننده کاربرد و عملکرد ویژه همان بخش از پروتئین بوده و هر نوع تغییر در این ساختار می‌تواند باعث اختلال در عملکرد آن شود. اساس پیش‌بینی توسط مدل‌سازی

جدول ۲. بررسی ساختار دو بعدی پروتئین *CsCCD1* با نرم‌افزار *SOPMA*

Table 2. Analysis of the secondary structure of the *CsCCD1* with the *SOPMA* software

نتایج <i>SOPMA</i> برای <i>CsCCD1</i>			
<i>SOPMA result for CsCCD1</i>			
<i>Alpha helix</i>	88	<i>is</i>	16.12%
<i>3₁₀ helix</i>	0	<i>is</i>	0%
<i>Pi helix</i>	0	<i>is</i>	0%
<i>Beta bridge</i>	0	<i>is</i>	0%
<i>Extended strand</i>	135	<i>is</i>	24.73%
<i>Beta turn</i>	37	<i>is</i>	6.78%
<i>Beta region</i>	0	<i>is</i>	0%
<i>Random coil</i>	286	<i>is</i>	52.38%
<i>Ambiguous states</i>	0	<i>is</i>	0%
<i>Other states</i>	0	<i>is</i>	0%



شکل ۵. بررسی ناحیه تراغشایی پروتئین CsCCD1 با برنامه TMHMM

Fig. 5. Investigation of transmembrane domains CsCCD1 protein

الگوی منتخب برای مدل‌سازی پروتئین VP_{14} در ذرت $(3npe.1.A)$ دارای ۶۰۴ اسید آمینه بود و در سال ۲۰۱۰ میلادی با قدرت تفکیک ۳/۲ آنگسترو از ذرت کریستالوگرافی شده است (Messing et al., 2010). میزان تطابق الگوی VP_{14} با پروتئین $CCD1$ ۴۱/۹۸ درصد و میزان شباهت آن ۴۱ درصد تعیین شد (جدول ۳).

جدول ۳. میزان شباهت اسید آمینه‌های پروتئین CsCCD1 با الگو (پروتئین VP_{14} در ذرت)

Table 3. The similarity of the amino acids of CsCCD1 with the pattern (VP14 protein of corn)

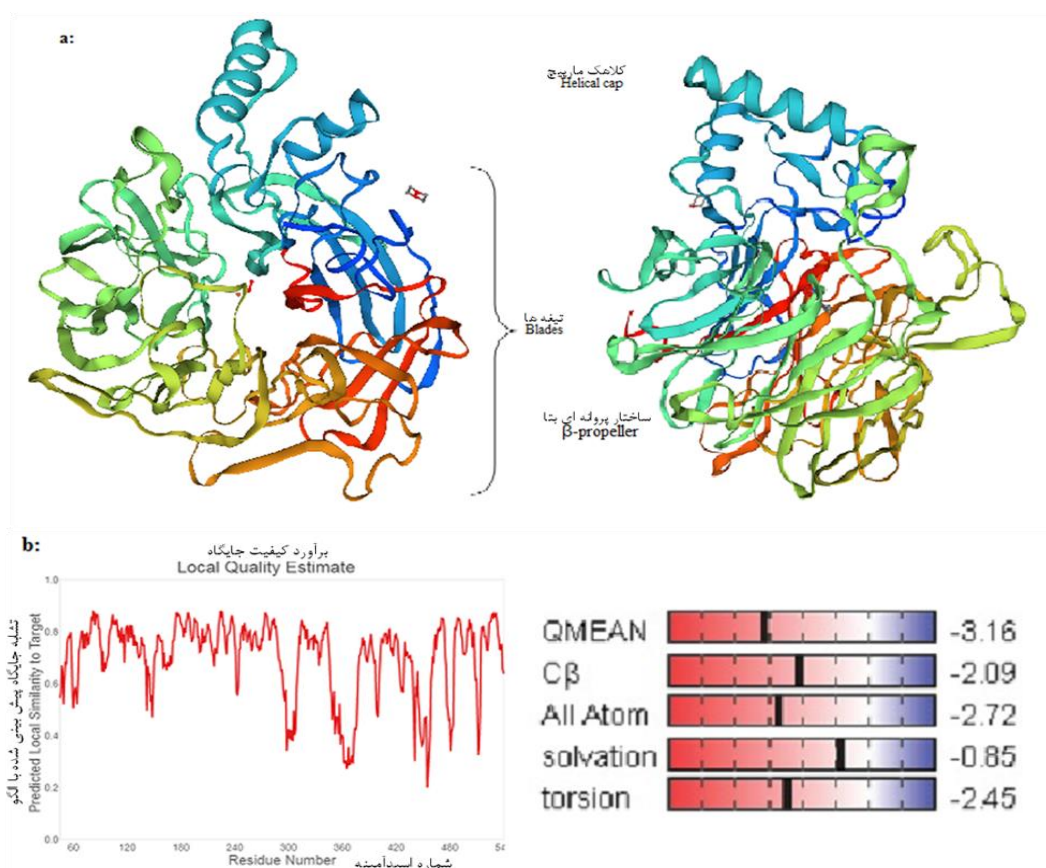
پروتئین Protein	الگو Template	همسانی توالی‌ها Seq. Identity	ساختار الیگومری Oligo-state	روش شناسایی Found by	روش Method	میزان وضوح Resolution	تشابه توالی‌ها Seq. Similarity	محدوده Range	میزان پوشش Coverage	شرح Description
<i>CCD1</i>	<i>3npe.1.A</i>	41.98%	monomer	BLAST	X-ray	3.2Å	0.41	46-542	87%	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase1

مطلوب، مجاز و یا غیرمجاز کیفیت مدل ورودی را تعیین می‌نماید (شکل ۷).

ارتباط فیلوژنتیکی

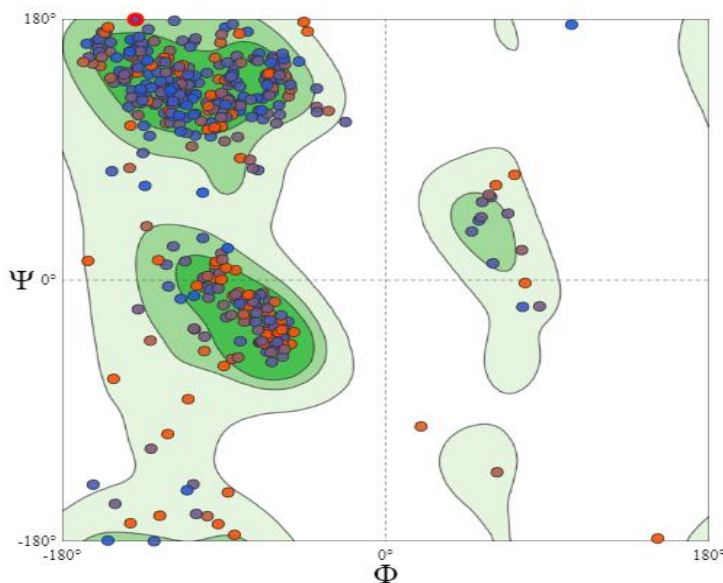
براساس هم‌ردیفی توالی اسید آمینه ژن *CsCCD1* در *NCBI* و با استفاده از نرم‌افزار *BLASTP* و انتخاب توالی‌های نزدیک که دارای ارزش *E* پایین یا صفر بودند، درخت فیلوژنتیکی (شکل ۸) رسم گردید.

از آنجا که میزان شباهت الگو با پروتئین مورد مطالعه پایین می‌باشد، احتمال این که مدل‌سازی بصورت ضعیف انجام شده باشد، وجود دارد (شکل ۶)، اما با توجه به نقش آنزیم *CsCCD1* در مسیر سنتز کروسین در زعفران و نقش مهم آن به عنوان یک آنزیم سیتوپلاسمی، این مدل‌سازی به عنوان نخستین گام در راستای مطالعه جایگاه‌های اتصال و یا لیگاندهای فعال‌کننده یا مهارکننده مفید می‌باشد. پس از مدل‌سازی، کیفیت پارامترهای ساختاری مدل‌های ساخته شده با پلات راماچاندران مورد ارزیابی قرار گرفت که این پلات با محاسبه درصد اسید آمینه‌های قرار گرفته در نواحی



شکل ۶. مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی بر اساس انتخاب یک الگو با شباهت بالا با پروتئین هدف با استفاده از پایگاه اطلاعاتی Swiss model. a: ساختار مدل‌سازی شده CsCCD1. b: نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی ساختار و نمودار Z-score برای CsCCD1

Fig. 6. Modeling the 3D structure based on the selection of a pattern with high similarity to the target protein using the Swiss model database. a: Ribbon diagrams showing the conserved secondary and tertiary of CsCCD1 and the constructed models. b: Global Model Quality Estimation and Z-score charts for the CsCCD1



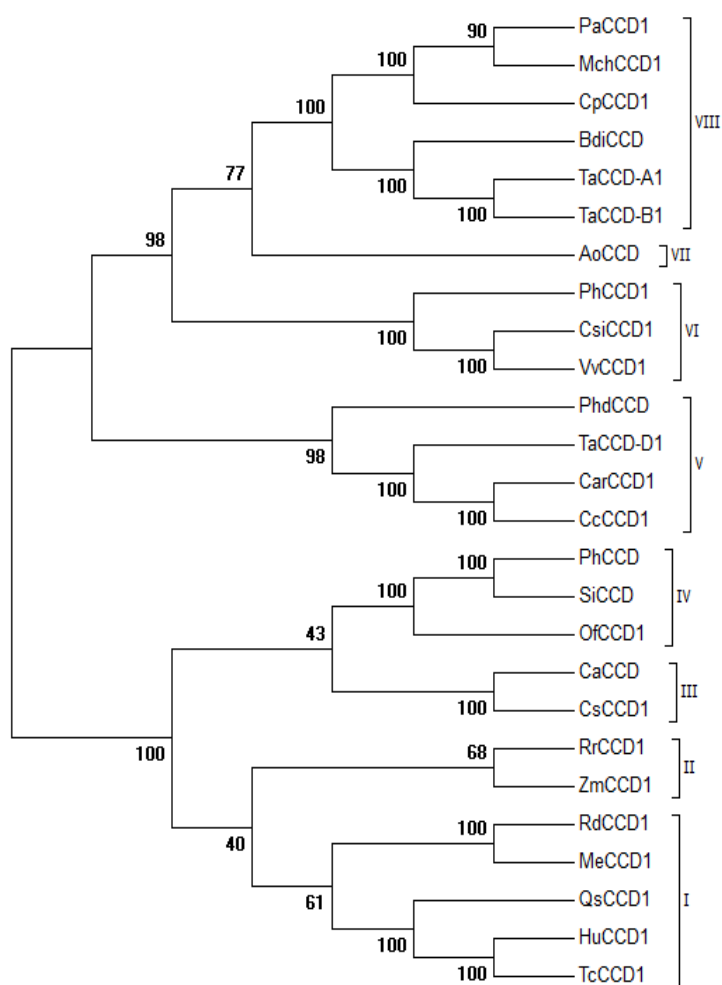
شکل ۷. نمودار رامچاندران ساختار مدل‌سازی شده CsCCD1

Fig. 7. Ramachandran plots for CsCCD1 constructed model

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، به منظور شناخت بیشتر از ساختار ژنومی زعفران ایران، به بررسی این ژن پرداخته شد. نتایج حاصله با داده‌های موجود در پایگاه *NCBI* و دیگر گونه‌های گیاهی مقایسه شدند و توالی نوکلئوتیدی بدست آمده از ژن *CCD1* زعفران ایران در پایگاه داده *NCBI* به شماره دسترسی *MN540633* به ثبت رسید. با بررسی جامعی که صورت گرفت، تاکنون هیچ گزارشی در خصوص ژن *CCD1* از زعفران ایران منتشر نشده، ولی در سایر کشورها، پژوهش‌های صورت گرفته نیز برای این پروتئین توالی با

۵۴۶ اسید آمینه و وزن مولکولی ۶۲ کیلودالتون را پیش‌بینی نموده و همچنین نتایج مشابهی برای *CaCCD1* و *AtCCD1* به ترتیب در فلفل و آرابیدوپسیس بدست آمده است (*Bouvier et al., 2003*). علاوه بر این، نیز همولوگ‌های *CCD1* در انگور (*Mathieu et al., 2005*)، شلیل (*Balderman et al., 2005*)، گوجه‌فرنگی (*Simkin et al., 2008*)، پتونیا (*Simkin et al., 2004*)، استار فروت (*Fleischmann et al., 2003*) و *Crocus* شناسایی شده است (*Auldridge et al., 2006*).



شکل ۸. درخت فیلوژنتیکی توالی اسید آمینه‌ای *CCD1* و *CsCCD1* در سایر گیاهان. شماره دسترسی‌های استفاده شده شامل: *Asparagus officinalis*, *AoCCD1* (XP_020276946.1). *Brachypodium distachyon*, *BdiCCD* (XP_003577313.1). *Camellia sinensis*, *CsiCCSD1* (AYK03324.1). *Citrus x paradise*, *CpCCD1* (AMA07786.1). *Coffea Arabica*, *CarCCD1* (ABA43904.1). *Coffea canephora*, *CcCCD1* (ABA43900.1). *Crocus ancyrensis*, *CaCCD* (AKN09908.1). *Crocus sativus*, *CsCCD1* (MN540633). *Herrania umbratica*, *HuCCD1* (XP_021280006.1). *Manihot esculenta*, *MeCCD1* (XP_021625990.1). *Momordica charantia*, *MchCCD1* (XP_022148582.1). *Osmanthus fragrans*, *OfCCD1* (BAJ05401.1). *Panicum hallii*, *PhCCD1* (XP_025808135.1). *Persea americana*, *PaCCD1* (AAK00622.1). *Petunia x hybrid*, *PhCCD1* (AAT68189.1). *Phoenix dactylifera*, *PhdCCD* (XP_008801952.1). *Quercus suber*, *QsCCD1* (XP_023927375.1). *Rosa x*

damascene, RdCCD1 (ABY47994.1). *Rosa rugosa*, RrCCD1 (AKT74334.1). *Setaria italic*, SiCCD (XP_004963348.1). *Theobroma cacao*, TcCCD1 (XP_007052518.1). *Triticum aestivum*, TaCCD-A-1 (ANT73642.1), TaCCD-B1 (ANT73643.1), TaCCD-D1 (ANT73644.1). *Vitis vinifera*, VvCCD1 (AFJ94680.1). *Zea mays*, ZmCCD1 (ABF85668.1)

Fig. 8. Phylogenetic tree of the sequence of CsCCD1 with CCD1 in other plants. Accession number used are: *Asparagus officinalis*, AoCCD1 (XP_020276946.1). *Brachypodium distachyon*, BdiCCD (XP_003577313.1). *Camellia sinensis*, CsiCCSD1 (AYK03324.1). *Citrus x paradise*, CpCCD1 (AMA07786.1). *Coffea Arabica*, CarCCD1 (ABA43904.1). *Coffea canephora*, CcCCD1 (ABA43900.1). *Crocus ancyrensis*, CaCCD (AKN09908.1). *Crocus sativus*, CsCCD1 (MN540633). *Herrania umbratica*, HuCCD1 (XP_021280006.1). *Manihot esculenta*, MeCCD1 (XP_021625990.1). *Momordica charantia*, MchCCD1 (XP_022148582.1). *Osmanthus fragrans*, OfCCD1 (BAJ05401.1). *Panicum hallii*, PhCCD1 (XP_025808135.1). *Persea americana*, PaCCD1 (AAK00622.1). *Petunia x hybrid*, PhCCD1 (AAT68189.1). *Phoenix dactylifera*, PhdCCD (XP_008801952.1). *Quercus suber*, QsCCD1 (XP_023927375.1). *Rosa x damascene*, RdCCD1 (ABY47994.1). *Rosa rugosa*, RrCCD1 (AKT74334.1). *Setaria italic*, SiCCD (XP_004963348.1). *Theobroma cacao*, TcCCD1 (XP_007052518.1). *Triticum aestivum*, TaCCD-A-1 (ANT73642.1), TaCCD-B1 (ANT73643.1), TaCCD-D1 (ANT73644.1). *Vitis vinifera*, VvCCD1 (AFJ94680.1). *Zea mays*, ZmCCD1 (ABF85668.1)

آمیندهای موجود بستگی دارد. شاخص ناپایداری محاسبه شده برای پروتئین‌های مورد بررسی نشان می‌دهند که پروتئین‌هایی که شاخص ناپایداری آنها کمتر از ۴۰ باشند با ثبات و در غیر این صورت بی‌ثبات خواهند بود. پروتئین‌های پایدار در شرایط تنش مثل تنش حرارتی می‌توانند ساختار سوم خود و در نتیجه عملکرد را در شرایط تنش حفظ کنند (Pettersen et al., 2004). شاخص ناپایداری پیش‌بینی شده برای پروتئین *CsCCD1*، ۲۹/۸۸ می‌باشد که نشان می‌دهد این پروتئین یک پروتئین پایدار تحت شرایط آزمایش است و قابلیت تحمل شرایط آزمایشگاهی جهت بررسی را دارد.

شاخص آلیفاتیک عامل مهم دیگری به منظور برآورد مقدار آبگریزی پروتئین و یک عامل مثبت برای پایداری حیاتی پروتئین و ساختار سه‌بعدی آن محسوب می‌شود که در واقع عبارت است از حجم نسبی پروتئین که با زنجیره‌های آلیفاتیک اشغال شده‌اند (I, L, A و V) (Fallah Ziarani et al., 2017). پروتئین‌هایی با شاخص آلیفاتیک بسیار بالا (بیشتر از ۱۰۰) ممکن است در دامنه دمایی بسیار بالا از خود ثبات نشان دهند. محاسبه عدد بالا (۸۱/۳۴) برای شاخص آلیفاتیک پروتئین *CCD1* از پایداری آن در محدوده مناسبی از دماها می‌باشد.

متوسط میزان آبدوستی- آبگریزی (*GRAVY*) محاسبه شده برای *CCD1* منفی می‌باشد. در صورتی که *GRAVY* محاسبه شده برای یک پروتئین منفی باشد، بدین معنی است که آن پروتئین غیرقطبی بوده و در صورت مثبت بودن آن قطبی محسوب می‌شود (Fallah Ziarani et al., 2017). منفی بودن *GRAVY* پروتئین *CCD1* آن را در

نتیجه درخت فیلوژنتیکی نشان داد که آنزیم‌های *CaCCD* و *CsCCD1* در یک گروه قرار می‌گیرند و این دو آنزیم توالی‌های مونوفیلیتیک^۱ هستند، زیرا دارای جد مشترکی می‌باشند که با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته (Baba et al., 2015) مشابهت دارد. درخت فیلوژنتیکی بدست آمده، پروتئین‌ها را به هشت گروه اصلی تقسیم نمود. مقادیر *Bootstrapping* در محل انشعاب شاخه‌های درخت نشان می‌دهد که درخت فیلوژنی حاضر از درجه اعتبار بالایی برخوردار است. بررسی و پیش‌بینی ویژگی‌های بیوشیمیایی و بیوانفورماتیکی پروتئین *CsCCD1* نشان می‌دهد که نقطه ایزوالکتریک آن در دامنه اسیدی (کمتر از ۷) بوده و خاصیت اسیدی دارد. اطلاع از نقطه ایزوالکتریک در ارزیابی حلالیت و نحوه حرکت پروتئین در میدان الکتریکی صفر مفید است و می‌تواند برای انتخاب و بهینه‌سازی روش‌های مورد استفاده برای خالص‌سازی پروتئین اعم از کروماتوگرافی تبادل یونی (*IEC*) و الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ (*IEF*) بسیار مفید باشد.

به علاوه پروتئین‌هایی که در محدوده *pH* ایزوالکتریک قرار داشته و مجموع بار مثبت و منفی رشته پپتیدی آنها با یکدیگر برابر می‌باشد، توانایی نگهداری آب را نداشته و ناگزیر رسوب می‌کنند. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها، تخمینی از ثبات پروتئین در شرایط لوله آزمایش می‌باشد (Mirhoseini et al., 2016) و این شاخص به نوع اسید

- 1- Monophyletic
- 2- Ion Exchange Chromatography
- 3- Isoelectric Focusing Electrophoresis

هسته قرار ندارد و همچنین یک پروتئین ترشحی نیست، همچنین نتیجه بررسی یافتن توالی سیگنال در توالی این پروتئین با استفاده از نرم‌افزار *SignalP* منفی بود و نشان داد که پروتئین *CCDI* بطور طبیعی فاقد سیگنال پپتیدی جهت هدایت این پروتئین به پلاستید است که با نتایج سایر مطالعات صورت گرفته مطابقت دارد (*Bouvier et al., 2003; Auldridge et al., 2006; Rubio et al., 2008*).

بر این اساس راهکار طراحی، انتخاب و اتصال توالی راهنمای مناسب جهت هدایت این پروتئین بصورت ترشحی به مکان صحیح می‌تواند در بهره‌برداری از پروتئین نوترکیب در تحقیقات آتی مورد استفاده قرار گیرد.

پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها با استفاده از توالی اسیدآمینه روشی سودمند جهت صرفه‌جویی در زمان و هزینه علاوه بر بسترسازی مناسب برای مهندسی پروتئین می‌باشد (*Mirhoseini et al., 2016*). مدل ساختار سه‌بعدی روبان پروتئین *CCDI* با نرم‌افزار *SWISS-MDEL* به روش *Homology modeling* شبیه‌سازی شد (شکل ۳a). ارزیابی مدل پیشنهاد شده در *Swiss Model* بر اساس پارامترهای $QMEAN_4$ و $GMQE^1$ می‌باشد. تابع $QMEAN_4$ یک تابع حسابی مرکب برای ارزیابی کیفیت *Global* (کل ساختار) و *Local* (هر اسید آمینه) ساختار مدل‌سازی شده می‌باشد. نمودار کیفیت *Local* برای هر اسید آمینه در مدل (محور X) شباهت مورد انتظار به ساختار بومی^۲ (محور Y) را نشان داد. به طور معمول، اسید آمینه‌هایی که امتیاز زیر صفر را نشان بدهند، از کیفیت پایینی برخوردارند. تابع $QMEAN_4$ شامل چهار توصیف ساختاری پتانسیل زاویه چرخش، پتانسیل فاصله اتم‌ها، اثر متقابل کربن بتا و پتانسیل حلال پوشی می‌باشد (شکل ۳b). $GMQE$ یک ارزیابی کیفی است که خصوصیات همترازی مدل-الگو را ترکیب می‌کند. نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی ساختار و میزان *Z-score* در مورد تابع حسابی مرکب $QMEAN_4$ تمامی اتم‌ها، کربن بتا، حلالیت و زوایای پرخشی در شکل ۳b نشان داده شده است.

ارزیابی کیفیت ساختار مدل شده پس از بهینه‌سازی انرژی به وسیله پلات رامانچاندان صورت گرفت. پلات رامانچاندان یک روش بسیار پرکاربرد جهت پلات زوایای

دسته پروتئین‌های غیرقطبی قرار می‌دهد. غیر قطبی بودن یک پروتئین باعث حلالیت کمتر آن نسبت به پروتئین‌های قطبی در حلال می‌گردد. در برابر حلال‌های ویژه هر پروتئین، پروتئین‌های قطبی در قسمت بیرونی و پروتئین‌های غیرقطبی در وسط تجمع پیدا می‌کنند.

در مطالعه‌ای با خاموش کردن ژن *CCDI* بواسطه *RNAi* نشان داده شد که برخلاف سایر *CCD*ها که کاروتنوئیدهای ۴۰ کربنه را به عنوان پیش‌ماده استفاده می‌کنند، آنزیم‌های *CCDI* در گیاهان کاروتنوئیدهای ۲۷ کربنه را به عنوان پیش‌ماده اصلی شناسایی می‌کنند. در این مطالعه مشخص شد که در این مسیر کاروتنوئیدهای ۴۰ کربنه در پلاستیدها توسط *CCD*های دیگر برش خورده و کاروتنوئیدهای ۲۷ کربنه را تولید می‌کنند و به دنبال آن با خروج کاروتنوئیدهای ۲۷ کربنه از پلاستیدها توسط آنزیم *Floss and Walter, 2009* در سیتوزول برش می‌خورند (*Floss and Walter, 2009*).

در تحقیقی دیگر نیز نشان داده شد که تأخیر بین بیان ژن *CCDI* و تولید آپوکاروتنوئیدها بیش از حد انتظار است و این امر شاید به دلیل تفاوت در جایگاه درون سلولی و به دنبال آن دسترسی به پیش‌ماده‌ها باشد (*Demurtas et al., 2018*). آنها نشان دادند که *CCDI* آنزیمی بی‌قاعده است و قادر به استفاده از فیتوئین، *Z*-کاروتن، لیکوپن، بتا-کاروتن، *D*-کاروتن، زیزانتین، ویولاکسانتین و نتولاکسانتین به عنوان پیش‌ماده در محیط *in vitro* برای سنتز محصولات مختلف می‌باشد (*Demurtas et al., 2018; Auldridge et al., 2006*). در حقیقت مطالعات انجام شده در خصوص *CCDI* باعث ایجاد شک و تردید در خصوص نقش انحصاری *CCDI* در ایجاد آپوکاروتنوئیدهای ۱۳ کربنه شده است؛ بطوری‌که با جلوگیری از رونویسی *CCDI*، حدود ۵۰ درصد از تولید آپوکاروتنوئیدهای ۱۳ کربنه در مقایسه با گیاهان وحشی کاهش یافت (*Floss & Walter, 2009*). در سایر تحقیقات صورت گرفته بر روی گیاهان، جایگاه *CCDI* را سیتوزول بدست آوردند (*Ahrazem et al., 2010; Tan et al., 2003*). در پژوهش حاضر نیز محل قرارگیری پروتئین *CsCCDI* با استفاده از نرم‌افزارهای مورد مطالعه، همانند نتایج مطالعات مورد اشاره، این موضوع را تأیید کرد که در هیچ یک از اندامک‌های داخل سلول مانند میتوکندری، کلروپلاست و

راهنما و فاقد منطقه تراغشايى است. نتايج اين تحقيق مى‌تواند در مطالعه رفتار و كنش آنزيم *CCDI* در مسير سنتز آپوكاروتنوئيدهاى زعفران بسيار مفيد باشد و به فهم چگونگى نحوه عمل اين آنزيم‌ها با ساير كاروتنوئيدها كمك كرده و زمينه‌ساز روشن‌تر شدن نحوه فعاليت آن در گياه زعفران باشد. تمامى نتايج بررسى‌هاى بيوانفورماتيكي آنزيم *CsCCDI* در اين تحقيق مى‌تواند زمينه مطالعه بيشتر براى انجام آزمايشات عملى در آينده بر روى اين آنزيم را فراهم آورد.

سياست‌سازى

از ستاد توسعه زيست‌فناورى به دليل حمايت مالى از اين پروژه تحقيقاتى، گروه زيست‌فناورى مواد غذايى مؤسسه پژوهشى علوم و صنايع غذايى به دليل در اختيار قراردادن امكانات آمايشگاهى و تحقيقاتى و كلييه بزرگوارانى كه در انجام اين پژوهش همكارى نموده‌اند، صميمانه تشكر و قدردانى مى‌گردد.

چرخشى پروتئين و ارزىابى كيفيت استرئوشيميايى ساختار مدل‌سازى شده مى‌باشد. اين پلات با محاسبه درصد اسيد آمينه‌هاى قرار گرفته در نواحى مطلوب، مجاز و يا غيرمجاز كيفيت مدل ورودى را تعيين مى‌نمايد (*Fallah Ziarani et al., 2017*).

همانطور كه در شكل ۵ مشاهده مى‌شود، ۸۹/۲۹٪ اسيد آمينه‌ها در *CsCCDI* براى ساختارهاى مدل شده در مناطق مطلوب و ۱/۶۳ درصد اسيد آمينه‌ها در مناطق مجاز دارند. با جمع نواحى مطلوب و مجاز ۹۰/۹۲ درصد بدست مى‌آيد و اين بدان معنى است كه مدل از كيفيت مقبولى برخوردار است. با توجه به نتايج ارزىابى كيفى مدل‌هاى ايجاد شده مى‌توان از اين مدل‌ها در بررسى‌ها و طراحي‌هاى بعدى استفاده نمود.

ساختارهاى كاملاً حفاظت شده و تخصصى از ويژگى‌هاى كلیدی هستند كه *CCD*ها را از ساير خانواده‌هاى پروتئينى نمازند به آهن متمايز مى‌نمايد (*Sui et al., 2013*). آنزيم‌هاى *CCD* بصورت يك ساختار پروانه‌اى بتا شكل هفت تيغه‌اى همراه با چندين مارپيچ آلفا كه يك دمين مارپيچ آلفا را در بالای اين ساختار تشكيل مى‌دهند، چين مى‌خورند (*Ahrazem et al., 2016*) همچنين وجود يك مارپيچ آلفا در ابتدای شروع ساختار ثانويه تمامى آنزيم‌هاى برش‌دهنده كاروتنوئيد نشان داده شده است (*Sui et al., 2013*) كه در نتايج بدست آمده از اين تحقيق مورد تأييد قرار گرفت. در ساختار سه بعدى مدل شده آنزيم *CCDI* (شكل ۳) نيز ساختار پروانه‌اى بتا با تيغه‌هاى تشكيل شده از صفحات بتا غيرموازي كه توسط مارپيچ‌هاى کوتاه به يكديگر متصل شده‌اند در بخش پايينى و عناصر مارپيچ آلفا به همراه *Random coil*ها در ناحيه بالايى آن قرار گرفته‌اند كه مى‌تواند نشان دهنده صحت مدل پيش‌بينى شده باشد.

از اين‌رو، علوم بيوانفورماتيک، شبيه‌سازى و مطالعه ساختارهاى مولكول‌هاى زيستى كمك شايانى را به غلبه بر مشكلات و چالش‌هاى پيش‌روى دانشمندان در جهت شناخت ذات و طبيعت پروتئين‌هاى مورد بررسى، مى‌كند و سبب کاهش چشمگير زمان و هزينه در مقايسه با بررسى آمايشگاهى آن مى‌گردد.

نتايج بررسى‌هاى فيلوژنتيكي و بيوانفورماتيكي نشان داد كه پروتئين *CsCCDI* پروتئينى پويا، پايدار، فاقد توالى

منابع

- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Argandola-Picazo, J., Castillo, R., and Gomez-Gomez, L., 2016. Intron retention and rhythmic diel pattern regulation of carotenoid cleavage dioxygenase 2 during crocetin biosynthesis in saffron. *Plant Mol. Biol.* 91(3), 355-374.
- Ahrazem, O., Trapero, A., Gomez, M.D., Rubio-Moraga, A., and Gomez-Gomez, L., 2010. Genomic analysis and gene structure of the plant carotenoid dioxygenase 4 family: A deeper study in *Crocus sativus* and its allies. *Genomics.* 96, 239-250.
- Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Berman, J., Capell, T., Christou, P., Changfu, Z., and Gomez-Gomez, L., 2015. The carotenoid cleavage dioxygenase CCD2 catalysing the synthesis of crocetin in spring crocuses and saffron is a plastidial enzyme. *New Phytol.* 209(2), 650-663.
- Almagro Armenteros, J.J., Tsirigos, K.D., Sønderby, C.K., Petersen, T.N., Winther, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nature Biotechnol.* 37(4), 420-423.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., de Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., Grosdidier, A., Hernandez, C., Ioannindis, V., Kuznetsov, D., Liechti, R., Moretti, S., Mostaguir, K., Redaschi, N., Rossier, G., Xenarios, I., and Stockinger, H., 2012. ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acid Res.* 40(W1), W597-W603.
- Auldridge, M.E., McCarty, D.R., and Klee, H.J., 2006. Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Plant Biol.* 9(3), 315-321.
- Armenteros, JJA., Tsirigos, KD., Sønderby, CK., Petersen, TN., Winther, O., Brunak, S., Von Heijne, G., and Nielsen, H., 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* 37(4), 420-423.
- Baba, S.A, Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M.K., Malik, A.H., Wani, Z.A., Abbas, N., Singh, A.K., and Ashraf, N., 2015. Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. *BMC Genomics.* 16(698), 1-14.
- Babaabasi, B., 2017. *Cellular and Molecular Bioinformatics.* Khalili Press. [in Persian].
- Balderman, S., Naim, M., and Fleischmann, P., 2005. Enzymatic carotenoid degradation and aroma formation in nectarines (*Prunus persica*). *Food Res. Int.* 38(8-9), 833-836.
- Beiki, A.H., Keify, F., and Mozafari, J., 2011. Rapid genomic DNA isolation from corm of *Crocus* species for genetic diversity analysis. *J. Med. Plant Res.* 5(18), 4596-4600.
- Bendtsen, J.D., Nielsen, H., Von Heijne, G., and Brunak, S., 2004. Improved prediction of signal 3.0. *J. Mol. Biol.* 340(4), 783-795.
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., and Schwede, T., 2017. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 7(1), 10480.
- Bienert, S., Waterhouse, A., de Beer, T.A.P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., and Schwede, T., 2017. The SWISS-MODEL Repository - new features and functionality. *Nucleic Acid Res.* 45, 313-319.
- Bouvier, F., Suire, C., Mutterer, J., and Camara, B., 2003. Oxidative remodeling of chromoplast carotenoids: identification of the carotenoid dioxygenase CsCCD and CsZCD genes involved in *Crocus* secondary metabolite biogenesis. *Plant Cell.* 15(1), 47-62.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G., 2000. NPS@: Network protein sequence analysis. *Trends Biochem. Sci.* 25(3), 147-150
- Dehghan, M., and Tohidfar, M., 2019. Phenylpropanoid gene expression analysis in saffron using transcriptome data. *J. Medic. Plant Biotechnol.* 4(2), 105-118.
- Demurtas, O. S., Frusciante, S., Ferrante, P., Diretto, G., Hosseinpour Azad, N., Pietrella, M., e Aprea, G., Taddei, A.

- R., Romano, E., Mi, J., Al-Babili, S., Frigerio, L., and Giuliano, G., 2018. Candidate enzymes for saffron crocin biosynthesis are localized in multiple cellular compartments. *Plant Physiol.* 177(3), 990-1006
- Eftekhari Manavi S., Peyghan, R., Soltani, M., Ghorbanpour, M., Ghalyanchi and Langrodi, A., 2016. Multi-aspect molecular and structural bioinformatic study of outer membrane protein (OmpTS) of *Aeromonas hydrophila* common cause of infectious septicemia in fish for immunization goals. *J. Animal Environ.* 8(1), 165-174.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S.R., Luciani, A., Potter, S.C., Qureshi, M., Richardson, L.J., Salazar, J.A., Smart, A., Sonnhammer, E.L.L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S.C.E., and Finn, R.D., 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acid Res.* 48(D1), D427- D432.
- Eugster, C.H., Hurlimann, H., and Leuenberger, H.J., 1969. Crocetininaldehyd und Crocetinhalbaldehyd als Blütenfarbstoffe von *Jacquinia angustifolia*. *Helvetica Chimica Acta.* 52(3), 89– 90.
- Fallah Ziarani, M., Tohidfar, M., and Aminfar, Z., 2017. Bioinformatic analysis of Acyl Carrier Protein (ACP) in eukaryotes and prokaryotes. *Crop Biotech.* 17, 15-29. [in Persian with English Summary].
- Fleischmann, P., Watanabe, N., and Winterhalter, P., 2003. Enzymatic carotenoid cleavage in star fruit (*Averrhoa carambola*). *Phytochemistry.* 63(2), 131-137.
- Floss, D.S., Walter, M.H., 2009. Role of carotenoid cleavage dioxygenase 1 (CCD1) in apocarotenoid biogenesis revisited. *Plant Signal. Bihav.* 4(3), 172-175.
- Fraser, P.D., Bramley, P.M. 2004. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Prog. Lipid Res.* 43(3), 228-265.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A., 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook.* Humana Press, New York. P. 571-607.
- Giuliano, G., Al-Babili, S., and Lintig, J., 2003. Carotenoid oxygenases: Cleave it or leave it. *Plant Sci.* 8(4), 145-148.
- Guex, N., Peitsch, M.C., and Schwede, T., 2009. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophoresis.* 30(S1), S162-S173
- Gomez-Gomez, L., Rubio-Moraga, A., and Ahrazem, O., 2010. Understanding carotenoid metabolism in saffron stigmas: Unravelling aroma and colour formation. *Func. Plant Sci. & Biotechnol.* 4(2), 56-63.
- Hosseini-pour Azad, N., Nematzadeh, G.H., Gouliano, G., Ranjbar, G.A., Yamch, A., 2016. Identification of Apo-Carotenoids' Crocin and Crocetin Isomers in Saffron Crude Extracts by HPLC Coupled to Atmospheric Pressure Chemical Ionization and High Resolution Orbitrap Mass Spectrometry. *Saffron Agron. & Technol.* 4(4), 291-299. [in Persian with English Summary].
- Ibdah, M., Azulay, Y., Portnoy, V., Wasserman, B., Bar, E., Meir, A., Burger, Y., Hirschberg, J., Schaffer, A.A., Katzir, N., Tadmor, Y., and Lewinsohn, E., 2006. Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry.* 67(15), 1579–1589.
- Kato, M., Matsumoto, H., Ikoma, Y., Okuda, H., and Yano, M., 2006. The role of carotenoid cleavage dioxygenases in the regulation of carotenoid profiles during maturation in citrus fruit. *J. Exp. Bot.* 57(10), 2153–2164.
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., and Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305(3), 567-580.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1), 105–32.
- Liao, H., Byeon, I., and Tsai, M., 1999. Structure and function of a new

- phosphopeptide-binding domain containing the FHA2 of rad53. *J. Mol. Biol.* 294(4), 1041-1049.
- Maniatis, T., Fritsch, E., and Sambrook, F., 1995. *Molecular cloning. A laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., and Gunata, Z., 2005. A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: Functional characterization and expression during grape berry development in relation to C₁₃-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* 56(420), 2721-2731.
- Messing, S.A., Gabelli, S.B., Echeverria, I., Vogel, T.J., Guan, J.C., Cai Tan, B., Klee, H.J., McCarty, R.D., and Amzel, L.M., 2010. Structural insights into maize viviparous14, a key enzyme in the biosynthesis of the phytohormone abscisic acid. *Plant Cell.* 22(9), 2970-2980.
- Mirhoseini, S.Z., Pezeshkian, Z., and Ghovvati, S., 2016. Phylogenetic and in silico analysis of interferon Beta-1b Protein. *J. Mazandaran Univ. MedicSci.* 26(145), 70-82. [in Persian with English Summary].
- Nassaj Hoseini, S.M., and Shamsbakhsh, M., 2010. *Phylogenetic Analysis Methods.* Haghshenass publication, Rasht, Iran. [in Persian].
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera-avisualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25(13), 1605-1612.
- Pfister, S., Meyer, P., Steck, A., and Pfander, H., 1996. Isolation and Structure Elucidation of Carotenoid-Glycosyl Esters in Gardenia Fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) and Saffron (*Crocus sativus* Linne). *J. Agric. & Food Chem.* 44(9), 2612-2615.
- Rubio, A., Rambla, J.L., Santaella, M., Gomez, D., Orzaez, D., Granell, A., Gomez-Gomez, L. 2008. Cytosolic and Plastoglobule-targeted Carotenoid Dioxygenases from *Crocus sativus* Are Both Involved in β -Ionone Release. *J. Biol. Chem.* 283(36): 24816-24825.
- Rubio, A., Rambla, J.L., Ahrazem, O., Granell, A., and Gomez-Gomez, L., 2009. Metabolic and target transcript analysis during *Crocus sativus* stigma Development. *Phytochemistry.* 70(8), 1009-1016.
- Rubio-Moraga, A., Rambla, J.L., Fernández-de-Carmen, A., Trapero-Mozos, A., Ahrazem, O., Orzáez, D., Granell, A., and Gómez-Gómez, L., 2014. New target carotenoids for CCD4 enzymes are revealed with the characterization of a novel stress-induced carotenoid cleavage dioxygenase gene from *Crocus sativus*. *Plant Mol. Biol.* 86(4-5), 555-569.
- Simkin, A.J., Underwood, B.A., Aldridge, M., Loucas, H.M., Shibuya, K., Schmelz, E., Clark, D.G., and Klee, H.J., 2004. Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of beta-ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* 136(3), 3504-3514.
- Simkin, A.J., Moreau, H., Kuntz, M., Pagny, G., Lin, C., Tanksley, S., and McCarthy, J., 2008. An investigation of carotenoid biosynthesis in *Coffea canephora* and *Coffea Arabica*. *J. Plant Physiol.* 165(10), 1087-1106.
- Sui, X., Kiser, P.D., Lintig, J.V., and Palczewski, K., 2013. Structural basis of carotenoid cleavage: From bacteria to mammals. *Arch. Biochem. Biophys.* 539(2), 203-213.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A., and Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
- Tan, B. C., Joseph, L.M., Deng, W.T., Liu, L., Li, Q.B., Cline, K., McCarty, D.R. 2003. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* 35, 44-56.

- Tandon, J.S., Katti, S.B., and Rüedi, P., 1979. Crocetin-dialdehyde from *Coleus forskohlii* BRIQ., Labiatae. *Helv. Chim. Acta.* 62(8), 2706-2707.
- Tramontano, A., Leplae, R., and Morea, V., 2001. Analysis and assessment of comparative modeling predictions in CASP4. *Proteins.* 45(S5), 22-38.
- Vogel, J.T., Tan, B.C., McCarty, D.R., and Klee, H.J., 2008. The carotenoid cleavage dioxygenase I enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J. Biol. Chem.* 283(17), 11364-11373.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., and Schwede, T., 2018. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46(W1), W296-W303.
- Yousefi Javan, I., and Gharari, F., 2017. The structure of the protein and gene expression of PIC2 affecting blooming flowers (*Crocus sativus L.*). *Saffron Agron. & Technol.* 5(1), 73-90. [in Persian with English Summary].



Original Article:

**Cloning and Bioinformatics Studies on *CCDI* Gene in Iranian Saffron
(*Crocus sativus* L.)**

Mohammad Javad Habibzadeh¹, Seyed Mahdi Ziaratnia^{2*}, Ebrahim Dorani-Uliaie³, Mostafa Valizadeh⁴
1- PhD. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad, Iran.

3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz 5166616471, Iran.

4- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author Email: m.ziaratnia@rifst.ac.ir

Received 27 October 2019; Accepted 07 March 2020

Abstract

Nowadays, saffron is considered as a strategic medicinal plant in Iran. Apocarotenoids are also known as economic compound in saffron stigmas. Therefore, isolation and functional analysis of genes involving in carotenoid metabolism in saffron has a great importance. In this study, regarding the role of *CsCCDI* gene in apocarotenoids biosynthesis of saffron was targeted for studying the genomic structure of *CCDI* gene in Iranian saffron. ProtParam, SOPMA, ProtScale, Pfam, ProtComp, SignalP, TMHMM, TargetP and ChloroPwre software's were used for studying the physical and chemical and physiological characterizations of *CCDI* protein. Swiss-Model server was used for investigate the 3D structure of *CCDI* protein followed by Ramachandran plotting for structural validation of 3D model. The results of phylogenetic analysis showed that amino acid structure of *CsCCDI* protein had the most similarity to CaCCD. It is also found that *CsCCDI* protein has no signal sequence and transmembrane domains. In addition, the results of this study demonstrated that *CCDI* protein belongs to carotenoid oxidase family and it is stable *in vitro*. These results can provide valuable information on the behavior and response of the *CCDI* enzyme in the pathway for the synthesis of apocarotenoids in saffron, and these results can be useful in future protein engineering programs.

Keywords: Apocarotenoid, *CsCCDI*, Phylogenetic, Bioinformatics, Modeling.