

# شناسایی اسید آمینه‌های درگیر در هترو دایمیریزاسیون فاکتور رونویسی MtKNOX3 طی تکوین نودول در *Medicago truncatula*: یک مطالعه درون رایانه‌ای

محبوبه آذرخش\*

گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر بجنورد، بجنورد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۴/۰۶

## چکیده

فاکتورهای رونویسی خانواده KNOX نقش مهمی در رشد و تکوین گیاه دارند. این فاکتورهای رونویسی در حفظ حالت تمایز نیافته سلول‌های مریستم راس ساقه نقش دارند. فاکتور رونویسی MtKNOX3، در طی تکوین گره‌های تثبیت نیتروژن (نودول) در گیاه *Medicago truncatula* بیان می‌شود و همچنین می‌تواند روی فعال شدن بیان ژنهای بیوسنتز سیتوکینین موثر باشد. پروتئین‌های خانواده KNOX، غالباً بصورت هومو یا هترو دایمر با فاکتورهای رونویسی BELL عمل می‌کنند. مطالعات اخیر نشان داد که فاکتور رونویسی MtBELL1-2 دارای بیان بالا در طی تکوین نودول در *M. truncatula* است و این فاکتور رونویسی می‌تواند با MtKNOX3 برهمکنش داشته باشد. هدف این مطالعه، شناسایی جایگاه‌های اتصال هومودایمر MtKNOX3-MtKNOX3 و هترو دایمر MtKNOX3-MtBELL1-2 است. برای شناسایی جایگاه‌های اتصال از روش‌های مختلف بیوانفورماتیکی شامل روش‌های مبتنی بر توالی پروتئین، روش‌های مبتنی بر سطح نسبی قابل دسترس پروتئین، روش‌های داکینگ، اسکن آلانین و شناسایی اسید آمینه‌های محافظت شده، استفاده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، دومین MEINOX و هومئودومین در برهمکنش هترو دایمر MtKNOX3-MtBELL1-2 نقش دارد، که با داده‌های قبلی در خصوص برهمکنش پروتئین‌های همولوگ آنها در گیاه آرابیدوپسیس مطابقت دارد. در خصوص هومودایمر MtKNOX3-MtKNOX3 علاوه بر دومین‌های یاد شده، ناحیه‌ای در بالادست دومین MEINOX نیز حائز اهمیت می‌باشد.

**واژه‌های کلیدی:** فاکتورهای رونویسی MtKNOX3، MtBELL، سیتوکینین، تثبیت نیتروژن، نودول

\* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mahhboobezaraksh@gmail.com

## مقدمه

ژن‌های هومئوباکس (Homeobox) دارای یک توالی محافظت شده ۱۸۰ جفت بازی میباشند که کد کننده یک دومین ۶۰ آمینواسیدی متصل شونده به DNA به نام هومئودومین (homeodomain) میباشد. این پروتئین‌ها به عنوان فاکتور رونویسی عمل میکنند و رونویسی ژن‌های هدف را تنظیم میکنند [۲۵، ۲۹]. فاکتورهای رونویسی حاوی هومئودومین نقش‌های مهم و متنوعی را در فرایند تکوین گیاهان و جانوران و قارچ‌ها ایفا میکنند [۱۸، ۵۵]. یک گروه از این فاکتورهای رونویسی ژن‌های هومئوباکس TALE (three amino acid loop extension) هستند که دارای سه اسید آمینه اضافی (پرولین-تیروزین-پرولین) در لوپ بین هلیکس اول و دوم هومئودومین میباشند. ژن‌های TALE به لحاظ تکاملی بسیار قدیمی هستند و به همین خاطر در طیف وسیعی از یوکاریوت‌ها وجود دارند. این دسته از ژن‌ها در گیاهان دارای دو رده ژن‌های *KNOX* (*KNOTTED-like homeobox*) و *BELL* (*BELI-like homeobox*) میباشد [۱۴، ۱۵، ۲۲، ۲۶، ۳۹، ۴۸].

ژن‌های *KNOX* به طور کلی با چهار دومین *KNOX1*، *KNOX2* (که با هم به عنوان *MEINOX* شناخته می‌شوند)، *ELK* و هومئودومین شناخته می‌شوند [۱۲، ۱۳، ۵۳]. این ژن‌ها در مریستم راس شاخه (*SAM: shoot apical meristem*) بیان می‌شوند و در حفظ حالت غیر تمایز یافته مریستم نقش دارند، علاوه بر این ژن‌های *KNOX* در پریموردیای برگ‌های پیچیده (*complex leaves*) هم بیان می‌شوند و در ایجاد حالت پیچیده برگ نقش دارند [۸، ۱۱، ۱۶، ۱۷، ۲۷، ۳۷]. بعلاوه ژن‌های *KNOX* در طی تکوین نودول در گیاه *Medicago truncatula* بیان می‌شوند و روی بیان ژن‌های *IPT: isopentenyl transferase* و ژن‌های *LOG: LONELY GUYS* که به ترتیب در بیوسنتز هورمون سیتوکینین و فعال شدن آن نقش دارند، تاثیر می‌گذارند [۲، ۳]. هورمون سیتوکینین نقش مهمی در تکوین گیاه و همچنین نودول دارد [۴، ۳۲].

مطالعات هیبریداسیون در محل نشان داد که mRNA ژن‌های *BELL* الگوی بیانی مشابهی با ژن‌های *KNOX* به لحاظ مکانی و زمانی دارد. این ژن‌ها در بافت‌های مریستمی، پریموردیوم اندام‌های جانبی گیاه، اندام‌های جوان رویشی و تولیدمثلی و در بافت‌های مرتبط با آوندها بیان می‌شوند [۴۰]. بعلاوه برهمکنش بین فاکتورهای رونویسی *KNOX* و *BELL* در گیاه آرابیدوپسیس، جو و سیب زمینی به کمک تکنیک دوهیبریدی مخمر نشان داده شده است [۷، ۱۹، ۳۱، ۴۰]. مشخص شده که برهمکنش بین *KNOX* و *BELL* برای جایگیری این فاکتورهای رونویسی در داخل هسته و همچنین اتصال آنها به DNA اهمیت دارد [۳۳، ۴۶، ۴۹]. این برهمکنش از طریق دومین *MEINOX* در پروتئین‌های *KNOX* و دومین *SKY* و *BELL* در پروتئین‌های *BELL* اتفاق می‌افتد [۲۸].

ژن‌های *BELL* همچنین در طی تکوین نودول در *Medicago truncatula* بیان می‌شوند [۲۳]. بعلاوه ژن *MtBELL1-2* الگوی بیانی مشابهی با ژن *MtKNOX3* در طی تکوین نودول نشان می‌دهد و امکان برهمکنش این دو پروتئین به کمک روش‌های داکینگ مولکولی و شبیه‌سازی دینامیک مولکولی نشان داده شده است [۵]. پروتئین‌های *KNOX* همچنین امکان برهمکنش به صورت هومودایمر را نیز دارند [۴۲].

هدف از این مطالعه شناسایی محتمل‌ترین حوزه‌های (دومین‌های) برهمکنش پروتئین - پروتئین در هومودایمر *MtKNOX3* و هترودایمر آن با *MtBELL1-2* به کمک روش‌های مختلف مبتنی بر توالی پروتئین‌ها، روش‌های مبتنی بر سطح نسبی قابل دسترس پروتئین (*RASA: relative accessible surface area*) و روش‌های مختلف داکینگ مولکولی است. بعلاوه از روش‌های اسکن آلانین و *ConSurf* جهت شناسایی مهمترین اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش پروتئین *MtKNOX3* استفاده شده است.

## مواد و روش‌ها

### جمع‌آوری داده‌ها

توالی پروتئین MtKNOX3 و MtBELL1-2 از پایگاه داده ای NCBI (National Center for Biotechnology Information) استخراج شد (به ترتیب کد دسترسی: ABO33480 و AET04003). این توالی‌ها جهت مدلسازی ساختار سه بعدی این پروتئین‌ها و بررسی جایگاه‌های اتصال در آنها مورد استفاده قرار گرفت.

### مدلسازی ساختار پروتئین

ساختار سه بعدی پروتئین MtBELL1-2 و MtKNOX3 بوسیله سرور I-TASSER (Iterative Threading ASSEMBLY Refinement) پیش‌بینی شد [۵۷]. بهترین ساختار پیش‌بینی شده بر اساس نمره C (C-score) انتخاب شد. نمره C کیفیت ساختار پیش‌بینی شده بوسیله I-TASSER را مشخص می‌کند. مدلی که بیشترین نمره C را داشت برای آنالیزهای بعدی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده در مقاله قبلی ما مورد استفاده قرار گرفته است [۵].

### پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال

برای پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال (اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش بین دو پروتئین) روش‌های مختلفی به شرح ذیل مورد استفاده قرار گرفت: ۱- روش‌های مبتنی بر توالی مثل Predict Protein [۹]، PSIVER [۴۱]، NPS-HOMPPPI [۵۶] و SCRIBER [۵۸] ۲- روش‌های مبتنی بر ساختار با محاسبه مقادیر بدست آمده برای سطوح نسبتاً قابل دسترس پروتئین (RASA: relative accessible surface area) مثل Cons-PPISP [۲۰]، meta-PPISP [۴۵]، VORFFIP [۴۷]، PINUP [۳۶]، SPPIDER [۴۴]، ۳- روش‌های مبتنی بر داکینگ شامل GRAMM-X [۵۰]، ClusPro [۲۱]، HawkDock [۵۴]، ROSIE [۳۸]، PRISM [۶]، HADDOCK (2021, Honorato et al.) [۲۴]، ZDOCK [۴۳]. روش‌های مبتنی بر توالی (شماره ۱) معمولاً بر اساس شناسایی اسید آمینه‌های محافظت شده از طریق مقایسه توالی پروتئین‌ها با توالی‌های همولوگ شان بدست می‌آید و روش‌های مبتنی بر ساختار (شماره ۲) بر اساس سطوح قابل دسترس برای برهمکنش در ساختار سه بعدی پروتئین حاصل می‌شود. در روش داکینگ (شماره ۳) اسید آمینه‌های درگیر در برهمکنش پروتئین - پروتئین بعد از انجام داکینگ مولکولی با پروتئین دوم (پارتنر) و بررسی محتمل‌ترین حالت اتصال دو پروتئین شناسایی می‌شوند. تفاوت روش‌های مختلف مربوط به هر گروه مربوط به نوع الگوریتم محاسباتی است که استفاده می‌شود. برای PSIVER، اسید آمینه‌های با اختصاصیت بیشتر از ۹۰ درصد ( $\geq 0.56$ ) و برای VORFFIP اسید آمینه‌های با امتیاز  $\geq 0.5$  به عنوان جایگاه اتصال در نظر گرفته شدند. برای روش‌های داکینگ، اسید آمینه‌های درگیر در پیوند هیدروژنی و الکترواستاتیک که توسط BIOVIA diacoverly studio (BIOVIA Ref. Dassault Systèmes BIOVIA, Studio Modeling Environment, San Diego: Dassault Systèmes, 2016) شناسایی شدند، به عنوان جایگاه اتصال در نظر گرفته شدند.

### ارزیابی مناطق حفاظت شده در پروتئین‌ها

وب سرور ConSurf (<http://consurf.tau.ac.il>) به منظور ارزیابی مناطق حفاظت شده در پروتئین‌ها استفاده شدند [۱]. در این روش توالی‌های همولوگ برای یک توالی داده شده به صورت اتوماتیک جمع‌آوری می‌شود سپس به کمک هم‌ردیفی (Alignment) توالی‌ها و ساخت درخت فیلوژنتیک، آمینواسیدهای محافظت شده یک ماکرومولکول شناسایی می‌شود. نواحی محافظت شده به کمک کدهای رنگی شناسایی شدند: طیف رنگی فیروزه‌ای تا بنفش، مربوط به موقعیت‌های متغیر (درجه ۱) تا محافظت شده (درجه ۹) می‌باشد.

### آلانی اسکینینگ (Interface Alanine scanning)

با هدف شناسایی اسید آمینه‌های مهم در برهمکنش پروتئین-پروتئین، اسکن آلانین انجام گرفت [۳۴]. در این روش به صورت درون رایانه‌ای (*In silico*) در اسیدهای آمینه جهش ایجاد می‌شود (تبدیل اسیدهای آمینه مختلف به آلانین) و اسید آمینه‌هایی که جهش در آنها باعث ناپایداری کمپلکس پروتئین-پروتئین می‌شود، شناسایی می‌شوند. کمپلکس‌های MtKNOX3-MtBELL1-2 بدست آمده با روش‌های داکینگ ZDOCK، ClusPro، HADDOCK و HawkDock برای این کار مورد استفاده قرار گرفتند. تغییرات انرژی اتصال ( $\Delta\Delta G_{bind}$ ) حین جهش به آلانین بدست می‌آید که مقادیر مثبت به این معنی است که جهش به آلانین باعث ناپایداری کمپلکس می‌شود و مقادیر منفی وجود یک اثر پایدارکننده را نشان می‌دهد. اسید آمینه‌های Hotspot انتهایی هستند که جهش آنها به آلانین باعث ناپایداری ساختار آنها و تغییر  $\Delta\Delta G$  اتصال به بیشتر از ۱ kcal/mol می‌شود [۳۴].

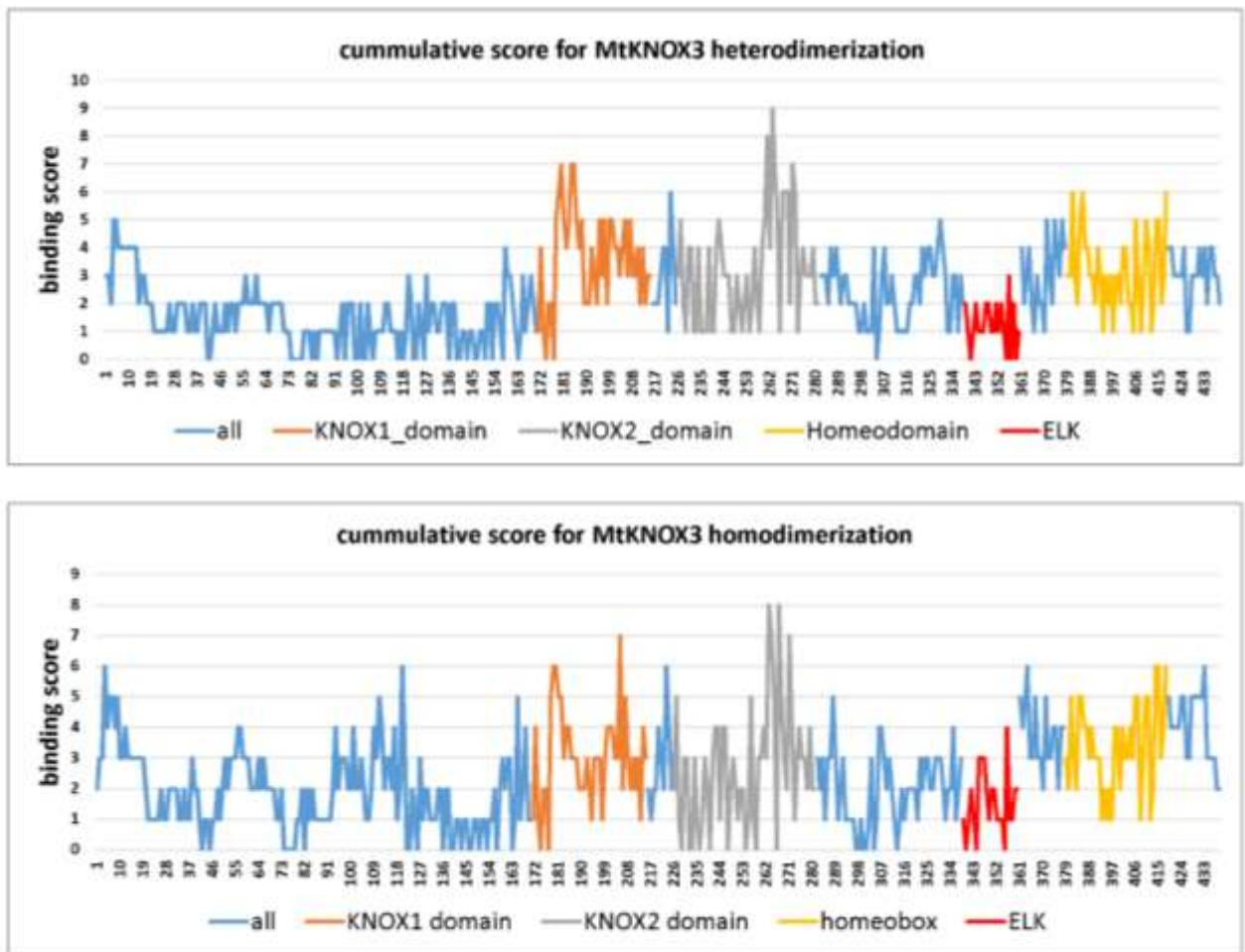
## نتایج

### مدلسازی ساختار پروتئین‌ها

با توجه به بیان همزمان ژن‌های MtKNOX3 و MtBELL1-2 در طی تکوین نودول در گیاه *Medicago truncatula* و امکان برهمکنش آنها در نودول، در این مقاله از ساختارهای سه بعدی پروتئین‌های MtKNOX3 و MtBELL1-2 که توسط سرور I-TASSER مدلسازی شده و در مقاله قبلی ما نیز بکاررفته بود، جهت شناسایی جایگاه‌های اتصال استفاده شد [۵].

### شناسایی جایگاه‌های اتصال

به منظور شناسایی جایگاه‌های اتصال در پروتئین KNOX3، روش‌های مختلف پیش‌بینی جایگاه اتصال شامل روش‌های مبتنی بر توالی و روش‌های مبتنی بر ساختار سه بعدی پروتئین و روش‌های داکینگ (بخش پیش‌بینی جایگاه‌های اتصال در قسمت مواد و روش‌ها ملاحظه شود) مورد استفاده قرار گرفت. در هر کدام از روش‌های مورد استفاده اسید آمینه‌های محتمل به عنوان جایگاه اتصال در پروتئین KNOX3 شناسایی شدند (فایل اکسل پیوست، صفحه ۱ و ۲). امتیاز تجمعی تمامی روش‌ها برای شناسایی محتمل‌ترین جایگاه‌های اتصال در پروتئین مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). روش بکار برده شده برای شناسایی جایگاه‌های اتصال قبلاً توسط Kamal و همکاران مورد استفاده قرار گرفته است [۳۰].



شکل ۱- امتیاز تجمعی برای جایگاه‌های اتصال روی پروتئین MtKNOX3 در حالت هومو و هترو دایمیریزاسیون

بر اساس این نتایج محتمل‌ترین جایگاه اتصال (برهمکنش) برای هترو دایمر MtKNOX3-MtBELL1-2، دومین MEINOX (شامل دومین KNOX1 و KNOX2) و هومئودومین است که با پژوهش‌های قبلی در خصوص هترو دایمیریزاسیون KNAT-BEL1 از طریق دومین MEINOX در گیاه آراییدوپسیس مطابقت دارد [۷]. برای هومو دایمیریزاسیون علاوه بر دومین MEINOX و هومئودومین، یک ناحیه بین اسید آمینه‌های ۹۰ تا ۱۲۶ هم در ایتترکشن درگیر است که ظاهراً این ناحیه برای هترو دایمیریزاسیون لازم نیست (شکل ۱).

### شناسایی مناطق حفاظت شده در پروتئین

به منظور شناسایی نواحی محافظت شده به لحاظ تکاملی در توالی پروتئین MtKNOX3، سرور Consurf مورد استفاده قرار گرفت [۱] (فایل اکسل پیوست، صفحه ۳). نواحی محافظت شده در پروتئین به کمک هم‌ردیفی توالی آن با توالی‌های هم‌ولوگ و ساخت درخت فیلوژنتیک بدست می‌آید. بر اساس این داده‌ها محافظت شده‌ترین ناحیه در توالی پروتئین MtKNOX3 در دومین‌های KNOX1، KNOX2 و هومئودومین وجود دارد که بیشترین نمره اتصال تجمعی (cumulative binding score) را دارد و بر اساس مقالات محتمل‌ترین ناحیه در برهمکنش از نوع هومو و هترو دایمیریزاسیون است.

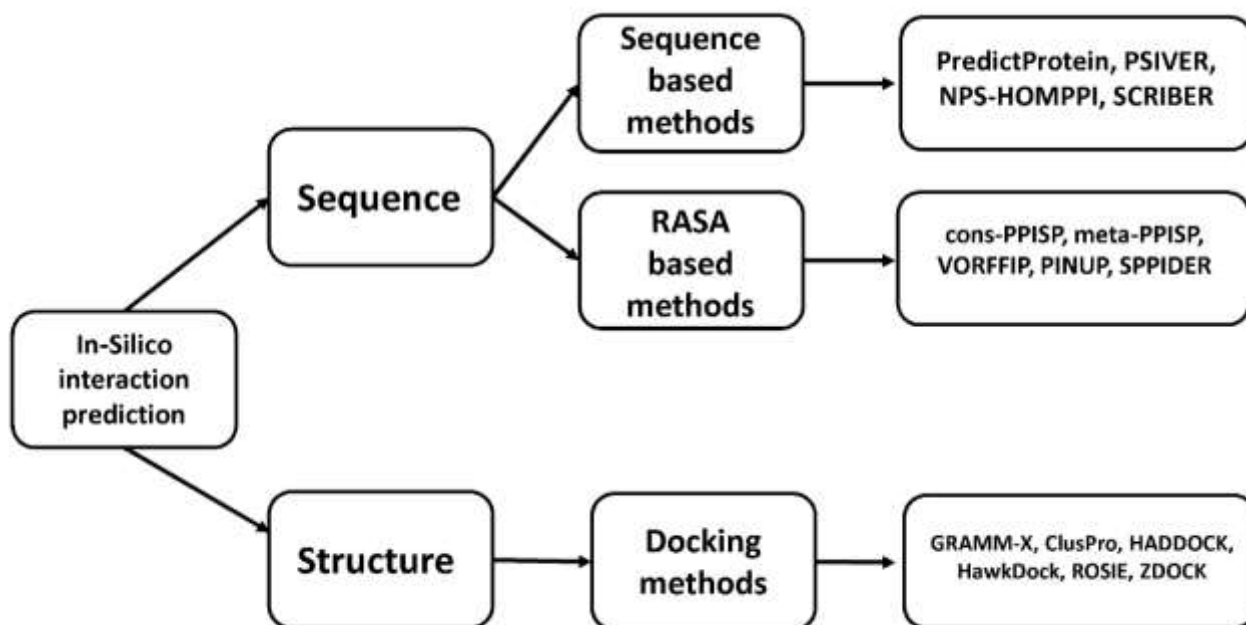
## آلانین اسکینینگ

برای شناسایی اسید آمینه‌های مهم به لحاظ انرژی در سطح برهمکنش پروتئین - پروتئین، آلانین اسکینینگ مورد استفاده قرار گرفت. در این روش اسیدآمینه‌های مختلف به آلانین جهش داده میشوند و میزان تغییر در انرژی اتصال پروتئین - پروتئین محاسبه میشود [۳۴]. به کمک این جهش‌زایی *In silico* نقاط هات اسپات (hot spots) با  $\Delta\Delta G$  اتصال بیشتر از 1 kcal/mol و اسید آمینه‌هایی که اثر ناپایدار کننده دارند، شناسایی میشوند (فایل اکسل پیوست، صفحه ۴ و ۵ و ۶). در نهایت اسیدآمینه‌هایی با حداقل نمره اتصال ۵ و نمره محافظت شدگی ۹ به عنوان محتمل‌ترین جایگاه‌های اتصال شناسایی شدند (جدول ۱).

جدول ۱ - محتمل‌ترین جایگاه‌های اتصال روی پروتئین MtKNOX3

residues	Cumulative score	Conserved seq score	hotspot	domain
H180	7	9	*	KNOX1
E184	7	7	*	KNOX1
Q185	7	9	- (positive score)	KNOX1
F223	6	1	*	Between KNOX1 and KNOX2
Y243	5	9	*	KNOX2
H261	8	9	*	KNOX2
M263	9	9	- (Positive score)	KNOX2
E264	7	9	*	KNOX2
M267	6	8	- (Positive score)	KNOX2
A268	6	9	-	KNOX2
C269	6	9	-	KNOX2
E271	7	7	-	KNOX2
I272	6	7	-	KNOX2
Q381	7	8	- (Positive score)	homeodomain
K385	6	9	-	homeodomain
W411	5	9	*	homeodomain
N414	6	9	*	homeodomain

شناسایی جایگاه‌های اتصال در پروتئین MtKNOX3 بر اساس روش‌های مختلف مبتنی بر توالی و ساختار در شکل ۲ خلاصه شده است.



شکل ۲ - فلوجارت روش‌های مختلف استفاده شده برای پیش‌بینی برهمکنش پروتئین MtKNOX3 به صورت *In silico* را نشان می‌دهد.

## بحث

فاکتورهای رونویسی خانواده KNOX غالباً از طریق هومو و هتروداایمیرزاسیون با فاکتورهای رونویسی خانواده BELL عمل می‌کنند [۴۹]. در پژوهش قبلی ما، امکان برهمکنش فاکتور رونویسی MtKNOX3 و پروتئین MtBELL1-2 و همچنین امکان هومودایمیرزاسیون MtKNOX3 در گیاه *Medicago truncatula* به کمک روش‌های داکینگ مولکولی و بررسی انرژی اتصال (gmx\_mmpbsa) نشان داده شد [۵].

در این مطالعه با توجه به اهمیت هومو و هتروداایمیرزاسیون پروتئین MtKNOX3 در عملکرد آن به عنوان فاکتور رونویسی در فعال کردن سیگنالینگ سیتوکینین طی تکوین نودول، از ابزارهای متعدد بیوانفورماتیکی جهت شناسایی جایگاه‌های درگیر در برهمکنش پروتئین MtKNOX3 استفاده شد.

بر اساس نتایج بدست آمده، اسید آمینه‌های درگیر در هومو و هتروداایمیرزاسیون پروتئین MtKNOX3 غالباً متعلق به دومین MEINOX و هومئودومین هستند که با داده‌های قبلی در خصوص برهمکنش KNAT با BELL در گیاه آراییدوپسیس و هومودایمیرزاسیون OSH15 (متعلق به خانواده KNOX) در گیاه برنج مطابقت دارد [۷]. دومین MEINOX ابتدا در پروتئین KNOX گیاهی شناسایی شد [۱۲]. که مشابه دومین MEIS/PBC در پروتئین‌های TALE حیوانی است [۱۳]. دومین MEIS/PBC در حیوانات نیز برای هتروداایمیرزاسیون مورد نیاز است [۱۰]. در خصوص هومودایمیرزاسیون MtKNOX3-MtKNOX3 علاوه بر

دومین MEINOX و هومئودومین، ناحیه ای در بالادست دومین MEINOX نیز حائز اهمیت می‌باشد که مطالعات بیشتر برای روشن شدن نقش دقیق این دومین مورد نیاز است.

علاوه بر این، ارزیابی مناطق محافظت شده در پروتئین MtKNOX3 نشان داد که محافظت شده ترین نواحی آن مربوط به دومین MEINOX و هومئودومین می‌باشد که با نقش محافظت شده این دومین در برهمکنش پروتئین - پروتئین در گیاهان و جانوران مطابقت دارد [۷، ۱۰].

در نهایت نقاط داغ (hotspot) در دومین MEINOX و هومئودومین که بیشترین تاثیر را در برهمکنش پروتئین - پروتئین دارند به کمک اسکن آلانین شناسایی شدند که شامل His180، Glu184، Phe223، Tyr243، His261، Glu264 در دومین MEINOX و Trp411 و Asn414 در هومئودومین می‌باشد (جدول شماره ۱).

با توجه به اینکه الگوی برهمکنش پروتئین MtKNOX3 مشابه آن چیزی است که برای همولوگ آن در گیاه آرابیدوپسیس نشان داده شده، نتایج بدست آمده در این مطالعه امکان هومو و هتروداپمیریزاسیون آن را در طی تکوین نودول تایید میکند. به این ترتیب هومو و هتروداپمیریزاسیون پروتئین MtKNOX3 میتواند در فعال شدن سیگنالینگ سیتوکینین در طی تکوین نودول در گیاه *Medicago truncatula* موثر باشد.

**تضاد منافع:** نویسندگان اعلام می‌کنند که هیچ تضاد منافی ندارند.

**سپاسگزاری:** از حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی وزارت علوم (کد: ICRP 1196) که در اجرای بخش‌هایی از این پروژه ما را یاری نمودند سپاسگزاری میشود.

## منابع

1. Ashkenazy H. Abadi S. Martz E. Chay O. Mayrose I. Pupko T. Ben-Tal N (2016). *ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules*. *Nucleic Acids Research*. **44**(W1): W344-W350. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw408>
2. Azarakhsh M. Kirienko A. Zhukov V. Lebedeva M. Dolgikh E. Lutova L (2015). *KNOTTED1-LIKE HOMEBOX 3: a new regulator of symbiotic nodule development*. *Journal of Experimental Botany*. **66**(22): 7181-7195. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv414>
3. Azarakhsh M. Rumyantsev AM. Lebedeva MA. Lutova LA (2020). *Cytokinin biosynthesis genes expressed during nodule organogenesis are directly regulated by the KNOX3 protein in Medicago truncatula*. *PLoS One*. **15**(4): e0232352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232352>
4. Azarakhsh M. Lebedeva MA (2023). *Lateral root versus nodule: the auxin-cytokinin interplay*. *Journal of Plant Growth Regulation*. **42**(11): 6903-6919. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-10983-4>
5. Azarakhsh M. Lebedeva M. Vishvakarma V (2024). *Modeling Protein-Protein Interaction of the KNOTTED-LIKE HOMEBOX 3 Protein Involved in Symbiotic Nodule Development in Medicago truncatula*. *Molecular Biology*. 1-10. <https://doi.org/10.1134/S0026893324020031>
6. Baspinar A. Cukuroglu E. Nussinov R. Keskin O. Gursoy A (2014). *PRISM: a web server and repository for prediction of protein-protein interactions and modeling their 3D complexes*. *Nucleic Acids Research*. **42**(W1): W285-W289. <https://doi.org/10.1093/nar/gku397>
7. Bellaoui M. Pidkowich MS. Samach A. Kushalappa K. Kohalmi SE. Modrusan Z. Crosby WL. Haughn GW (2001). *The Arabidopsis BELL1 and KNOX TALE homeodomain proteins interact through a domain conserved between plants and animals*. *The Plant Cell*. **13**(11): 2455-2470. <https://doi.org/10.1105/tpc.010161>

۱. <sup>۸</sup> Belles-Boix E. Hamant O. Witiak SM. Morin H. Traas J. Pautot V (2006). *KNAT6: an Arabidopsis homeobox gene involved in meristem activity and organ separation*. The Plant Cell. **18**(8): 1900-1907. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.041988>
۲. <sup>۹</sup> Bernhofer M. Dallago C. Karl T. Satagopam V. Heinzinger M. Littmann M. Olenyi T. Qiu J. Schütze K. Yachdav G (2021). *PredictProtein-predicting protein structure and function for 29 years*. Nucleic Acids Research. **49**(W1): W535-W540. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab354>
۳. <sup>۱۰</sup> Berthelsen J. Zappavigna V. Ferretti E. Mavilio F. Blasi F (1998). *The novel homeoprotein Prep1 modulates Pbx-Hox protein cooperativity*. The EMBO journal. **17**(5): 1434-1445. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.5.1434>
۴. <sup>۱۱</sup> Bharathan G. Goliber TE. Moore C. Kessler S. Pham T. Sinha NR (2002). *Homologies in leaf form inferred from KNOX1 gene expression during development*. Science. **296**(5574): 1858-1860. <https://doi.org/10.1126/science.1070343>
۵. <sup>۱۲</sup> Bürglin TR (1997). *Analysis of TALE superclass homeobox genes (MEIS, PBC, KNOX, Iroquois, TGIF) reveals a novel domain conserved between plants and animals*. Nucleic Acids Research. **25**(21): 4173-4180. <https://doi.org/10.1093/nar/25.21.4173>
۶. <sup>۱۳</sup> Bürglin TR (1998). *The PBC domain contains a MEINOX domain: coevolution of Hox and TALE homeobox genes?* Development Genes and Evolution. **208**(2): 113-116. <https://doi.org/10.1007/s004270050161>
۷. <sup>۱۴</sup> Bürglin TR. *Homeodomain subtypes and functional diversity*, in A handbook of transcription factors. 2011. Springer. p. 95-122.
۸. <sup>۱۵</sup> Bürglin TR. Affolter M (2016). *Homeodomain proteins: an update*. Chromosoma. **125**(3): 497-521. <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0543-8>
۹. <sup>۱۶</sup> Byrne ME. Simorowski J. Martienssen RA (2002). *ASYMMETRIC LEAVES1 reveals knox gene redundancy in Arabidopsis*. <https://doi.org/10.1093/dev.129.8.1957>
۱۰. <sup>۱۷</sup> Byrne ME. Imlay E. Ridza NNB (2024). *Shaping leaves through TALE homeodomain transcription factors*. Journal of Experimental Botany. erae118. <https://doi.org/10.1093/jxb/erae118>
۱۱. <sup>۱۸</sup> Calvo A. Dabholkar A. Wyman E. Lohmar J. Cary J. (2022). *Regulatory functions of homeobox domain transcription factors in fungi*. Applied and Environmental Microbiology. e02208-23. <https://doi.org/10.1128/aem.02208-23>
۱۲. <sup>۱۹</sup> Chen H. Rosin FM. Prat S. Hannapel DJ (2003). *Interacting transcription factors from the three-amino acid loop extension superclass regulate tuber formation*. Plant Physiology. **132**(3): 1391-1404. <https://doi.org/10.1104/pp.103.022434>
۱۳. <sup>۲۰</sup> Chen H. Zhou HX (2005). *Prediction of interface residues in protein-protein complexes by a consensus neural network method: test against NMR data*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. **61**(1): 21-35. <https://doi.org/10.1002/prot.20514>
۱۴. <sup>۲۱</sup> Desta IT. Porter KA. Xia B. Kozakov D. Vajda S (2020). *Performance and its limits in rigid body protein-protein docking*. Structure. **28**(9): 1071-1081. e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2020.06.006>
۱۵. <sup>۲۲</sup> Di Giacomo E. Iannelli MA. Frugis G (2013). *TALE and shape: How to make a leaf different*. Plants. **2**(2): 317-342. <https://doi.org/10.3390/plants2020317>
۱۶. <sup>۲۳</sup> Dolgikh AV. Rudaya ES. Dolgikh EA (2020). *Identification of bell transcription factors involved in nodule initiation and development in the legumes pisum sativum and medicago truncatula*. Plants. **9**(12): 1808. <https://doi.org/10.3390/plants9121808>
۱۷. <sup>۲۴</sup> Dominguez C. Boelens R. Bonvin AM (2003). *HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information*. Journal of the American Chemical Society. **125**(7): 1731-1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>
۱۸. <sup>۲۵</sup> Duverger O. Morasso MI (2008). *Role of homeobox genes in the patterning, specification, and differentiation of ectodermal appendages in mammals*. Journal of cellular physiology. **216**(2): 337-346. <https://doi.org/10.1002/jcp.21491>
۱۹. <sup>۲۶</sup> Hamant O. Pautot V (2010). *Plant development: a TALE story*. Comptes rendus biologiques. **333**(4): 371-381. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.01.015>
۲۰. <sup>۲۷</sup> Hareven D. Gutfinger T. Parnis A. Eshed Y. Lifschitz E (1996). *The making of a compound leaf: genetic manipulation of leaf architecture in tomato*. Cell. **84**(5): 737-747. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81051-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81051-x)
۲۱. <sup>۲۸</sup> Hay A. Tsiantis M (2010). *KNOX genes: versatile regulators of plant development and diversity*. Development. **137**(19): 3153-3165. <https://doi.org/10.1242/dev.030049>
۲۲. <sup>۲۹</sup> Hubert KA. Wellik DM (2023). *Hox genes in development and beyond*. Development. **150**(1): dev192476. <https://doi.org/10.1242/dev.192476>
۲۳. <sup>۳۰</sup> Kamal H. Minhas F-u-AA. Farooq M. Tripathi D. Hamza M. Mustafa R. Khan MZ. Mansoor S. Pappu HR. Amin I (2019). *prediction and validations of domains involved in Gossypium hirsutum SnRK1 protein interaction with cotton leaf curl Multan betasatellite encoded βCI*. Frontiers in Plant Science. **10**: 656. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00656>
۲۴. <sup>۳۱</sup> Kanrar S. Onguka O. Smith HM (2006). *Arabidopsis inflorescence architecture requires the activities of KNOX-BELL homeodomain heterodimers*. Planta. **224**: 1163-1173. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0298-9>
۲۵. <sup>۳۲</sup> Kazemi N. Kahrizi D. Mansouri M (2016). *Effects of plant growth regulators and explant on callus induction in Cuminum cymium L*. Journal of Genetic Resources. **2**(1): 21-25. <https://doi.org/10.22080/jgr.2016.1477>
۲۶. <sup>۳۳</sup> Kim D. Cho Yh. Ryu H. Kim Y. Kim TH. Hwang I (2013). *BLH 1 and KNAT 3 modulate ABA responses during germination and early seedling development in Arabidopsis*. The Plant Journal. **75**(5): 755-766. <https://doi.org/10.1111/tpj.12236>

- ۳۴ Kortemme T. Kim DE. Baker D (2004). *Computational alanine scanning of protein-protein interfaces*. *Science's STKE*. **2004**(219): pl2-pl2. <https://doi.org/10.1126/stke.2192004pl2>
- ۳۵ Kozakov D. Hall DR. Xia B. Porter KA. Padhorny D. Yueh C. Beglov D. Vajda S (2017). *The ClusPro web server for protein-protein docking*. *Nature Protocols*. **12**(2): 255-278. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.169>
- ۳۶ Liang S. Zhang C. Liu S. Zhou Y (2006). *Protein binding site prediction using an empirical scoring function*. *Nucleic Acids Research*. **34**(13): 3698-3707. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl454>
- ۳۷ Long JA. Moan EI. Medford JI. Barton MK (1996). *A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis*. *Nature*. **379**(6560): 66-69. <https://doi.org/10.1038/379066a0>
- ۳۸ Lyskov S. Chou F-C. Conchúir SÓ. Der BS. Drew K. Kuroda D. Xu J. Weitzner BD. Renfrew PD. Sripakdeevong P (2013). *Serverification of molecular modeling applications: the Rosetta Online Server that Includes Everyone (ROSIE)*. *PLoS One*. **8**(5): e63906. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063906>
- ۳۹ Mukherjee K. Brocchieri L. Bürglin TR (2009). *A comprehensive classification and evolutionary analysis of plant homeobox genes*. *Molecular Biology and Evolution*. **26**(12): 2775-2794. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp201>
- ۴۰ Müller J. Wang Y. Franzen R. Santi L. Salamini F. Rohde W (2001). *In vitro interactions between barley TALE homeodomain proteins suggest a role for protein-protein associations in the regulation of Knox gene function*. *The Plant Journal*. **27**(1): 13-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01064.x>
- ۴۱ Murakami Y. Mizuguchi K (2010). *Applying the Naive Bayes classifier with kernel density estimation to the prediction of protein-protein interaction sites*. *Bioinformatics*. **26**(15): 1841-1848. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq302>
- ۴۲ Nagasaki H. Sakamoto T. Sato Y. Matsuoka M (2001). *Functional analysis of the conserved domains of a rice KNOX homeodomain protein, OSH15*. *The Plant Cell*. **13**(9): 2085-2098. <https://doi.org/10.1105/tpc.010113>
- ۴۳ Pierce BG. Wiehe K. Hwang H. Kim B-H. Vreven T. Weng Z (2014). *ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers*. *Bioinformatics*. **30**(12): 1771-1773. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu097>
- ۴۴ Porollo A. Meller J. Cai W. Hong H. *Computational methods for prediction of protein-protein interaction sites in Protein-Protein Interactions-Computational and Experimental Tools*. 2012. p. 3-26.
- ۴۵ Qin S. Zhou H-X (2007). *meta-PPISP: a meta web server for protein-protein interaction site prediction*. *Bioinformatics*. **23**(24): 3386-3387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm434>
- ۴۶ Rutjens B. Bao D. Van Eck-Stouten E. Brand M. Smeekens S. Proveniers M (2009). *Shoot apical meristem function in Arabidopsis requires the combined activities of three BEL1-like homeodomain proteins*. *The Plant Journal*. **58**(4): 641-654. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2009.03809.x>
- ۴۷ Segura J. Jones PF. Fernandez-Fuentes N (2011). *Improving the prediction of protein binding sites by combining heterogeneous data and Voronoi diagrams*. *BMC bioinformatics*. **12**(1): 1-9. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-352>
- ۴۸ Sharma P. Lin T. Grandellis C. Yu M. Hannapel DJ (2014). *The BEL1-like family of transcription factors in potato*. *Journal of experimental botany*. **65**(2): 709-723. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert432>
- ۴۹ Smith HM. Boschke I. Hake S (2002). *Selective interaction of plant homeodomain proteins mediates high DNA-binding affinity*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **99**(14): 9579-9584.
- ۵۰ Tovchigrechko A. Vakser IA (2006). *GRAMM-X public web server for protein-protein docking*. *Nucleic Acids Research*. **34**(suppl\_2): W310-W314. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl206>
- ۵۱ Tuncbag N. Gursoy A. Nussinov R. Keskin O (2011). *Predicting protein-protein interactions on a proteome scale by matching evolutionary and structural similarities at interfaces using PRISM*. *Nature Protocols*. **6**(9): 1341-1354. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.367>
- ۵۲ Van Zundert G. Rodrigues J. Trellet M. Schmitz C. Kastiris P. Karaca E. Melquiond A. van Dijk M. De Vries S. Bonvin A (2016). *The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes*. *Journal of Molecular Biology*. **428**(4): 720-725. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.09.014>
- ۵۳ Vollbrecht E. Veit B. Sinha N. Hake S (1991). *The developmental gene Knotted-1 is a member of a maize homeobox gene family*. *Nature*. **350**(6315): 241-243. <https://doi.org/10.1038/350241a0>
- ۵۴ Weng G. Wang E. Wang Z. Liu H. Zhu F. Li D. Hou T (2019). *HawkDock: a web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA*. *Nucleic Acids Research*. **47**(W1): W322-W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz397>
- ۵۵ Williams RW (1998). *Plant homeobox genes: many functions stem from a common motif*. *Bioessays*. **20**(4): 280-282. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199804\)20:4<280::AID-BIES2>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199804)20:4<280::AID-BIES2>3.0.CO;2-U)
- ۵۶ Xue LC. Dobbs D. Honavar V (2011). *HomPPI: a class of sequence homology based protein-protein interface prediction methods*. *BMC Bioinformatics*. **12**(1): 1-24. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-244>
- ۵۷ Yang J. Yan R. Roy A. Xu D. Poisson J. Zhang Y (2015). *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. *Nature Methods*. **12**(1): 7-8. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>
- ۵۸ Zhang J. Kurgan L (2019). *SCRIBER: accurate and partner type-specific prediction of protein-binding residues from proteins sequences*. *Bioinformatics*. **35**(14): i343-i353. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz324>

# Identification of amino acids involved in homo and hetero dimerization of MtKNOX3 transcription factor during nodule development in *Medicago truncatula*: An In-silico study

Mahboobeh Azarakhsh\*

\* mahhboobeazarakhsh@gmail.com

Cell and molecular biology department, faculty of basic sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, Iran

KNOX family of transcription factors plays an important role in plant growth and development. These transcription factors are involved in maintaining the undifferentiated state of meristem cells in shoot apical meristem. The transcription factor KNOX3 is expressed during the development of nitrogen fixation nodules in *Medicago truncatula* and it has been shown that it can affect the expression of cytokinin biosynthesis genes. Proteins of KNOX family often act through homo- or heterodimerization with BELL transcription factors. Recent studies showed that the transcription factor MtBELL1-2 has high expression level during nodule development in *M. truncatula* and this transcription factor can interact with MtKNOX3. The aim of this study is to identify the binding sites in MtKNOX3-MtKNOX3 homodimer and MtKNOX3-MtBELL1-2 heterodimer. To identify the binding sites, various bioinformatics methods was used including methods based on protein sequence, the relative accessible areas of proteins, docking methods, alanine scanning, and identification of conserved amino acids. According to the obtained results, the MEINOX domain and the homeodomain are involved in the interaction of MtKNOX3-MtBELL1-2 heterodimer, which is consistent with the previous data regarding the interaction of their homologous proteins in *Arabidopsis*. Regarding the MtKNOX3-MtKNOX3 homodimer, in addition to the mentioned domains, an area upstream of the MEINOX domain is also important.

**Key words:** MtKNOX3 transcription factors, MtBELL, cytokinin, nitrogen fixation, nodule