مطالعه توالی، خاصیت آنتی‌ژنی و ساختار سه بعدی پروتئینهای غیراختصاصی ناقل لیپید۲ در برنج ایرانی: مطالعه بیوانفورماتیکی

فاطمه زهرا درویشی[۱]، مهران میراولیائی[۱*]، رحمان امام زاده[۱]، مجید متولی باشی[۲] و محبوبه نظری[۳]

[۱] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش سلولی و مولکولی

[۲] اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

[۳] تهران، پژوهشکده فناوریهای نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن سینا، مرکز تحقیقات ریزفناوری زیستی

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۸

چکیده

پروتئینهای غیراختصاصی ناقل لیپید ۲ (non specific Lipid Transfer Protein 2: nsLTP2) یکی از اعضای خانواده پرولامینها هستند که به دلیل ساختار ویژه خود توانایی انتقال ترکیبات لیپوفیل مختلفی را دارند. با وجود مزیتهای نسبی پروتئین nsLTP2 در انتقال دارو، خاصیت آلرژنی این پروتئینها نیز گزارش شده است. هدف مطالعه حاضر بررسی توالی و ساختار پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی و نیز بهبود برخی از ویژگیهای آن برای استفاده در سیستمهای تحویل دارو، توسط ابزارهای بیوانفورماتیک است. مقایسه توالی پروتئینهای nsLTP2 انواع برنج، حداقل ۵۱ درصد شباهت بین گونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. بر اساس ارزیابیهای فیلوژنی مشخص شد که بیشترین شباهت بین توالی ژن این پروتئین با گونه ژاپنی (Accession NO. NP 0011048723.1) وجود دارد. موتیفها و جایگاههای مختلف nsLTP2 برنج ایرانی با کمک آنالیز توالی به دست آمدند. همچنین مطالعات بیوانفورماتیکی نشان دهنده ۴ جایگاه با خاصیت شبه‌آنتی‌ژنی است که ۳ عدد آن بعد از تغییرات پس از ترجمه باقی می‌ماند و حضور آنها احتمالاً می‌تواند خاصیت آلرژنی این پروتئینها را توجیه کند. همچنین، بررسی توالی دو گونه ژاپنی و ایرانی مؤید این است که اسیدهای آمینه شرکت کننده در جایگاه فعال، به‌طورکامل حفاظت شده است. به‌منظور مطالعه تاثیر حذف توالیهای آلرژن بر تمایل به لیگاندهای هیدروفوب، از روش مدل‌سازی در راستای تعیین ساختار، استفاده گردید. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در صورت اعمال تغییراتی در توالی و حذف بخشهای آلرژن nsLTP2، احتمالا می‌توان بازده پروتئین را در سیستمهای تحویل دارو افزایش داد.

واژه های کلیدی: nsLTP2، مدل‌سازی براساس تشابه، دارورسانی، آلرژن

* نویسنده مسئول، تلفن:۰۳۱۳۷۹۳۲۴۷۵ پست الکترونیکی: MMiroliaei@yahoo.com

مقدمه

پروتئینهای انتقال دهنده لیپید در همه رده‌های جانوران شامل باکتریها، مخمرها، گیاهان و جانوران وجود دارند. این پروتئینها جزء رایج‌ترین و فراوان‌ترین پروتئینهای محلول در گیاهان هستند (۸ و ۹) و به دلیل توانایی ویژه آنها در انتقال لیگاندهای مختلف مانند گلیکولیپیدها، اسیدهای چرب و استروئیدها بین غشاهای زیستی، با نام عمومی non-specific lipid transfer proteins (nsLTP) شناخته می‌شوند (۱۲ و ۳۵). آنها را براساس وزن مولکولی، به دو دسته nsLTP1 و nsLTP2 تقسیم می‌کنند (۲۶). اسکلت پلی‌پپتیدی پروتئینهای nsLTP متشکل از چهار مارپیچ راست‌گرد است که توسط لوپهای انعطاف-پذیری به هم متصل‌شده و توسط چهار پیوند دی‌سولفیدی

پایدار شده‌است (۲۵). خاصیت اتصال و انتقال مولکولهای مختلف لیپیدی توسط این پروتئینها، به واسطه وجود یک حفره هیدروفوب داخل مولکولی تسهیل می‌شود (۳۰). یکی از مهمترین کاربردهای این پروتئینها استفاده در سیستمهای انتقال دارو است. این ناقلها از یک سو با تمایل زیاد به داروها متصل و از اکسیداسیون و تخریب آنها جلوگیری می‌کنند. ازسوی دیگر با نگهداری داروها در فضای بسته خود سبب کاهش اثر سمی آنها بر سلولهای غیرهدف می‌شوند (۹ و ۳۳). همچنین، خواص آلرژنی پروتئینهایی مثل nsLTPها (۱۳، ۱۶ و ۳۹) که غنی از آلفاهلیکس و اسیدآمینه‌های قطبی مانند سیستئین و اسیدآمینه‌های بارداری مانند لیزین و آرژینین می‌باشند، به اثبات رسیده است (۵، ۶، ۷، ۱۵، ۲۲، ۲۳، ۳۲ و ۳۸). پروتئینهای nsLTP2 به‌دلیل ساختار کوچکتر خود نسبت به nsLTP1ها، با کاهش خاصیت آنتی‌ژنی و افزایش سرعت انتقال و آزادکردن لیگاندها و توانایی اتصال به لیگاندهای متعدد (۴۲)، برای استفاده در سیستمهای تحویل دارویی مناسب‌تر می‌باشند (۹). ویژگیهای nsLTP2ها مانند نحوه اتصال به لیگاند و بررسی اتصال انواع لیگاند کمتر از nsLTP1ها شناخته شده است. تاکنون پروتئین nsLTP2 از تعدادی از گونه ها (۹، ۲۸، ۳۹ و ۴۷) و از جمله گونه ایرانی برنج با نام علمی *Oryza sativa* به دست آمده است (۲۶) و توالی کدکننده پروتئین آن کلون شده است. به‌علاوه بررسیها نشان داده که nsLTP2 نوع ایرانی از انواع ژاپنی آن کوچک‌تر است که می‌تواند سبب افزایش سرعت انتقال و آزادکردن لیگاند توسط آن شود. به همین دلیل تمرکز مطالعه حاضر روی nsLTP2 برنج ایرانی است. در مطالعه‌ای که در سال 2004 توسط Cheng انجام گرفت پتانسیل ذاتی زیستی این پروتئین به منظور استفاده در سیستم تحویل دارویی با ایجاد جهش نقطه‌ای فلورسانس افزایش یافت (۹). با کمک روش Site-direct mutagenesis و نرم‌افزارهای داکینگ نقش واحدهای آمینواسیدی هیدروفوب در ساختار، پایداری اتصال به لیگاند و فعالیت انتقال به لیپید nsLTP2 برنج نوع ژاپنی مشخص شده است (۱۰). به دلیل هدفمندکردن تحقیقات آزمایشگاهی، در این مطالعه با کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی، توالی ژن nsLTP2 برنج ایرانی، ساختار پروتئینی و نواحی دارای خاصیت آنتی‌ژنی آن بررسی شده است. به علاوه با هدف کاهش خاصیت آنتی ژنیسیته و همزمان افزایش کارآیی پروتئین فوق در اتصال به لیپید، ابتدا با روش تشابه، ساختار آن مدل سازی شد و در ادامه، تأثیر تغییرات اسیدآمینه‌ای که منجر به کاهش خاصیت آنتی‌ژنی و افزایش کارآمدی این پروتئین می‌شوند، پیش‌بینی شد. دستاوردهای پژوهش حاضر احتمالا می‌تواند به‌منظور دستورزی ژن این پروتئین و در راستای ارتقا کارآمدی آن، برای تولید ناقلهای داروررسان نوین با خاصیت زیست سازگاری بیشتر مفید باشد.

مواد و روشها

جمع‌آوری و انطباق توالی پروتئینهای nsLTP2 برنج: توالیهای مورد استفاده در این مطالعه از بانک ژن (www.ncbi.nlm.nih.gov/genebank/) به دست آمد. به علاوه توالی نوکلئوتیدی nsLTP2 گونه هندی (Accession No. A2XBN5.2)، از پایگاه داده SWISS-PROT به دست آمد. دستورزی، بررسی و ترجمه هر یک از توالیهای نوکلئوتیدی کدکننده پروتئین به وسیله پایگاه داده مولکولی Expassy (www.expasy.ch)، انجام شد (۴۶). مطالعات ردیف سازی چندتایی (Multiple sequence alignments) با استفاده از BLAST موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov.blast) و CLUSTAL W موجود در پایگاه اطلاعاتیExpassy (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) انجام شد (۲۴).

مطالعه فیلوژنیک، بررسی توالی پروتئینی و خاصیت آنتی‌ژنیستی ns-LTP2 برنج ایرانی: مطالعات فیلوژنی توالی پروتئین nsLTP2 گونه ایرانی و یازده پروتئین مشابه

با استفاده از پایگاه(www.genebee.msu.su) GeneBee به اجرا درآمد (۱۵، ۱۷و۲۰).

محاسبه تئوری pI و وزن مولکولی پروتئین با استفاده از ابزارهای موجود در پایگاه داده Expassy (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) انجام شد. موتیفهای موجود بر روی ساختار nsLTP2 مورد بررسی قرار گرفتند (www.expasy.ch/ motif scan). خاصیت آنتی‌ژنسیتی ns-LTP2 برنج ایرانی با کمک پایگاه داده دانشگاه مادرید با آدرس http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl بررسی شد. این پایگاه با استفاده از روش Kolaskar and Tongaonkar و بر اساس نتایج تجربی اپی‌توپهای شناخته شده موجود عمل می‌کند (۲۱، ۲۷ و ۴۵). به دلیل ارتباطی که بین nsLTP های گیاهی و آلرژیهای انسانی گزارش شده است (۴ و ۳۸)، برای مثال قابلیت اتصال nsLTPهای ذرت به IgE مشخص شده است که حتی پس از حرارت دیدن هم این ویژگی در پروتئین فوق حفظ می شود، میانکنش بین nsLTP2 برنج ایرانی با MHC-II نیز بررسی شد (۲، ۲۰، ۲۳، ۳۲ و ۳۸).

مدل‌سازی پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی: مدل سه بعدی پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی، ابتدا با استفاده از پایگاه M4T (http://manaslu.aecom.yu.edu/M4T/) و به روش مدل‌سازی براساس تشابه (Homology modeling) به دست آمد (۱۸ و ۴۰). بمنظور پیدا کردن مدل مناسب، در این مرحله توالی nsLTP2 برنج ایرانی با توالی ساختارهای شناخته شده BLAST شد و توالیهای Nonspecific Lipid Transfer Protein (شماره دستیابی۱l6h)، Nonspecific lipid transfer protein 2G (شماره دستیابی۱tuk)، lipid transfer protein (شماره دستیابی۱n89)، Nonspecific lipid transfer protein (شماره دستیابی۱uvc) و Nonspecific lipid transfer protein 2G (شماره دستیابی۱rzl) همسانی ۹۷ تا ۳۵ درصد با توالی nsLTP2 ایرانی نشاد دادند. در نتیجه توالیهای Nonspecific Lipid Transfer Protein (شماره دستیابی۱l6h) با بیشترین همسانی برای مدل سازی به روش تشابه (Homology modeling) استفاده شد. در ادامه بهینه‌سازی مدل با استفاده از سرور YASARA و با استفاده از میدان نیروی GROMOS 96 انجام شد (۱۸ و ۳۷) و Q-mean score (http://swissmodel.expasy.org/qmean) و Z-score آن محاسبه شد (۱، ۳، ۱۳، ۲۸ و ۴۴).

Molecular Docking: مطالعات Docking با استفاده از نرم‌افزار Molegro (Molegro Virtual Docker (MVD)) و براساس یک الگوریتم هیبرید با نام تکامل افتراقی هدایت شده انجام گرفت. به این منظور، لیگاند مورد استفاده LysPC14 از Pubchem به دست آمده است. کمپلکسهای لیگاند- پروتئینی بر اساس MolDock Score امتیازدهی شده‌اند (۴۳ و ۵۰).

نتایج

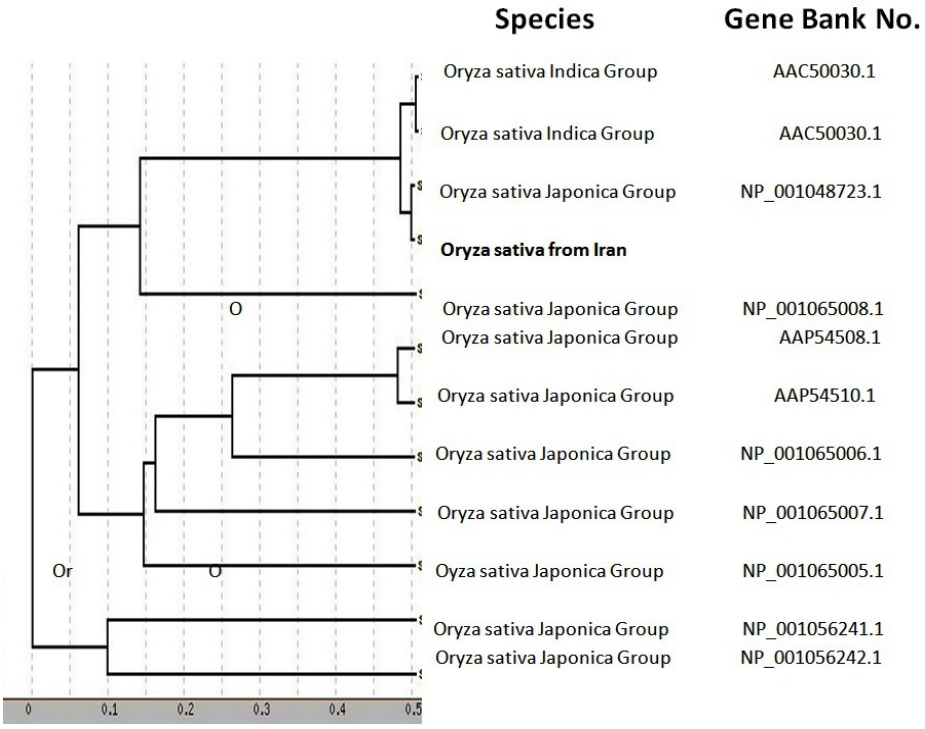
در مطالعه بیوانفورماتیک حاضر، پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی در سطح توالی و ساختار بررسی و موتیفهای آنتی‌ژن آن مشخص شده است. دستاوردهای مطالعه حاضر قابلیت استفاده در دستورزیهای پروتئینی آینده را بر روی nsLTP2 دارد.

مطالعه توالی و خاصیت آنتی‌ژنیسیتی nsLTP2 برنج ایرانی: nsLTP2 شامل ۹۶ اسید آمینه است، که سیگنال پپتید ۲۶ اسیدآمینه‌ای انتهای آمینی آن می‌تواند از پپتید جدا شده و پروتئین بالغ در مسیر ترشحی به خارج از سلول، هدایت شود (۲۰ و ۳۹). pI و وزن مولکولی این پروتئین با کمک ابزارهای پایگاه Expasy به ترتیب ۹/۳۳ و ۷/۶۵kDa محاسبه شد. موتیفهای موجود در ساختار nsLTP2 نیز مورد بررسی قرار گرفت (جدول۱). به طور جالب توجه nsLTP2 دارای شباهت با مهارکننده پروتئازی Tryp_alpha_amyl است. اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که

اغلب پروتئینهای آلرژن موجود در برنج دارای موتیفهای مشابه این نوع از مهارکنندها هستند و با وجود شباهت ساختاری در اعضای این خانواده از پروتئینهای آلرژن، همه آنها الزاماً فعالیت مهارکنندگی بر روی سرین پروتئاز تریپسین ندارند و درنتیجه تاکنون نقش این پروتئینها در گیاهان مشخص نشده است (۴۸). براین اساس، احتمال دارد این پروتئین نقشهای دیگری را هم در سیستمهای زیستی ایفاء کند که تاکنون شناخته نشده است.

جدول۱- موتیفها و مکان قرارگیری گروههای مختلف nsLTP2 برنج ایرانی .

Amino acid position	Motif information
1-31	Prokaryotic membrane Lipoprotein lipid attachment Site profile
21-26	N-myristoylation sit**es**
28-33	
41-46	
56-58	Phosphorylation site
31-96	Tryp_alpha_amyl Proteases Inhibitor Seed storage



شکل ۱- درخت فیلوژنی Rice-nsLTP2. فیلوگرام حاضر توسط Clustal-W alignment توالیهای پروتئینی شناخته شده این ژن و با استفاده از نرم افزار TreeTop program (www.genebee.msu.su/genebee.html) به دست آمده است. طول شاخه‌ها در محور X نشان‌دهنده فاصله بین توالیهای مورد استفاده‌اند که توسط BLOSUM62 substitution matrix محاسبه شده است.

جدول۲- ماتریکس فاصله، فاصله هر گونه با خودش صفر می‌باشد.

	Species	Gene Bank NO.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1.	Oryza sativa Indica Group	AAC50030.1	0.000	0.027	0.000	0.365	0.483	0.477	0.500	0.513	0.450	0.476	0.478	0.014
2.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001048723.1	0.027	0.000	0.027	0.369	0.495	0.488	0.511	0.530	0.472	0.482	0.486	0.005
3.	Oryza sativa Indica Group	AAC50030.1	0.000	0.027	0.000	0.365	0.483	0.477	0.500	0.513	0.450	0.476	0.478	0.014
4.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001065008.1	0.365	0.369	0.365	0.000	0.414	0.413	0.419	0.405	0.350	0.463	0.524	0.358
5.	Oryza sativa Japonica Group	AAP54508.1	0.483	0.495	0.483	0.414	0.000	0.023	0.302	0.256	0.372	0.501	0.545	0.485
6.	Oryza sativa Japonica Group	AAP54510.1	0.477	0.488	0.477	0.413	0.023	0.000	0.309	0.227	0.378	0.501	0.538	0.478
7.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001065005.1	0.500	0.511	0.500	0.419	0.302	0.309	0.000	0.414	0.359	0.499	0.568	0.502
8.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001065006.1	0.513	0.530	0.513	0.405	0.256	0.227	0.414	0.000	0.311	0.561	0.571	0.521
9.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001065007.1	0.450	0.472	0.450	0.350	0.372	0.378	0.359	0.311	0.000	0.474	0.522	0.469
10.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001056241.1	0.476	0.482	0.476	0.463	0.501	0.501	0.499	0.561	0.474	0.000	0.407	0.473
11.	Oryza sativa Japonica Group	NP_001056242.1	0.478	0.486	0.478	0.524	0.545	0.538	0.568	0.571	0.522	0.407	0.000	0.475
12.	Oryza sativa from Iran		0.014	0.005	0.014	0.358	0.485	0.478	0.502	0.521	0.469	0.473	0.475	0.000

مطالعه و بررسی توالی ژنی و پروتئینی nsLTP2 برنج ایرانی نشان‌دهنده شباهت زیاد توالی آن به نوع خاصی از گونه ژاپنی (Accession NO. NP 001048723.1) (۹۸ درصد) و نوع هندی (۹۷ درصد) است و کمترین شباهت آن با nsLTP2 ژاپنی دیگر (Accession No. NP_001056242.1) به میزان ۵۱ درصد است. نتایج حاصل با مطالعات فیلوژنیکی همخوانی دارد، به طوری که nsLTP2 برنج ایرانی با گونه ژاپنی (Accession NO. NP_0010562421) یک گروه هموفیلیک تشکیل می‌دهد، در حالی‌که با نمونه هندی در دو گروه هتروفیلیک قرار دارند (شکل۱ و جدول۲). به‌علاوه این نتایج نشان‌دهنده کاربرد توالیها و ژنهای جدید در تعیین روابط بین گونه‌ای در گیاهان می باشد.

بررسی‌های بیوانفورماتیکی پروتئین nsLTP2 گونه *Oryza sativa* ایرانی موید وجود ۴ توالی آنتی‌ژنی در ساختار آن است که بزرگترین آن در قسمت سیگنال پپتید قرار دارد. طول، محل شروع و خاتمه توالی‌های آنتی‌ژنی پروتئین ns-LTP2 برنج ایرانی در جدول ۳ قابل مشاهده است.

جدول ۳- بررسی خاصیت آنتی ژنیسیتی توالی nsLTP2 ایرانی. (http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl)

n	Start Position	Sequence	End Position
1	4	LAVLVLAVAMVAACGGGVVGVAGA	27
2	29	CNAGQLTVCTG	39
3	47	PTAACCSSLRAQQGCFCQF	65
4	80	ARKAVSSCGIAL	91

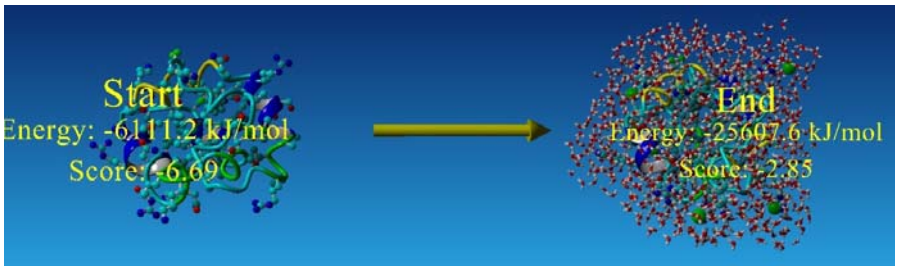
بررسیهای ایمونوژنیسیتی دقیق‌تر با سرور دوم ذکرشده در بخش روشها، به‌صورت اختصاصی آمینواسیدهای اصلی درگیر در میانکنش بین سلولهای T و پپتید موردنظر را نشان می‌دهد (جدول۴).

جدول ۴- نواحی آنتی‌ژنی موجود در nsLTP2 که با MHC-II برهمکنش می‌دهند.

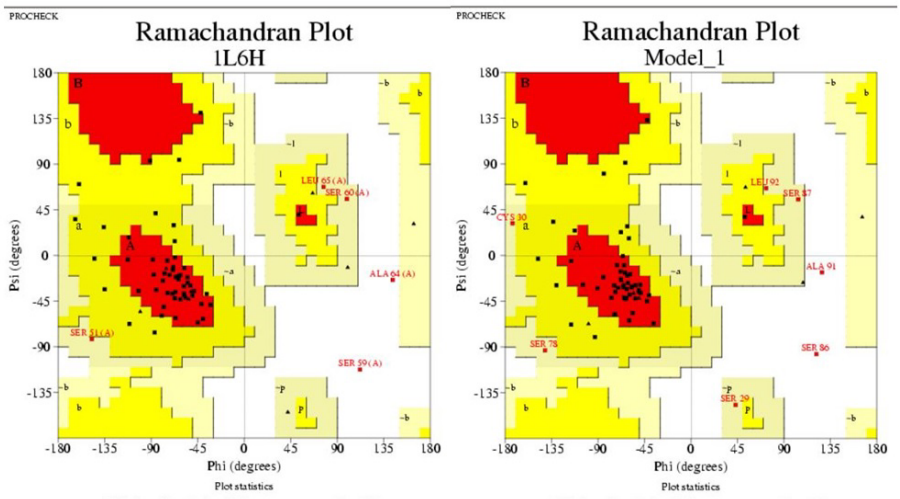
n	Start Position	Sequence	End Position
1	6	VLVLAVAMVA	15
2	20	VVGVAGASC	28
3	54	LRAQQGCFC	62

مدل‌سازی پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی و آنالیز ساختار پروتئینی: پیش بینی ساختار سه بعدی توسط سرور M4T انجام و از ساختار کریستالوگرافی nsLTP2 برنج هندی به عنوان ساختار الگو استفاده شد. سپس با استفاده از سرور

YASARA و با اضافه کردن مولکول آب به محیط مدل، انرژی کل ساختار از kJ/mol ۶۱۱۱/۲- به kJ/mol ۲۵۶۰۷/۶- کاهش یافت (شکل۲). میزان Z-score: ۱/۵- و Q-mean: ۰/۷۴۸ برای مدل نهایی بهدست آمد. بررسی کیفیت مدل نهایی با تعیین میزان Qmean بیشتر از ۰/۷ به دست آمد، که نشان دهنده کیفیت مناسب مدل پیش-بینی شده می‌باشند. نمودار راماچاندران پروتئینهای نوع هندی و ایرانی به ترتیب در شکل۳ آورده شده است (http://nihserver.mbi.ucla.edu/SAVES).



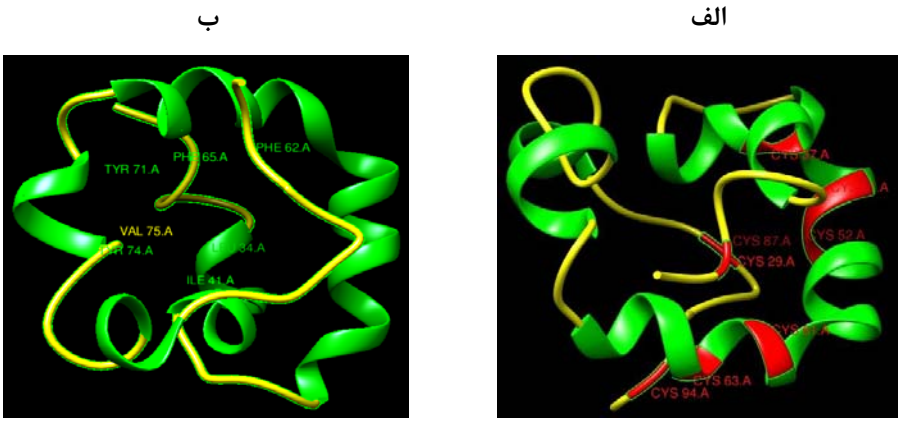
شکل ۲- سمت چپ تصویر مدل اولیه پروتئین با میزان انرژی kJ/mol ۶۱۱۱/۲- و در سمت راست مدل نهایی با مولکول‌های آب در اطراف آن و میزان انرژی kJ/mol ۲۵۶۰۷/۶-.



شکل۳- نمودار راما چاندران nsLTP2 برنج نوع ایرانی و نوع هندی (NIH MBI Laboratory for Structural Genomics and Proteomics).

این پروتئین دارای ۳ مارپیچ آلفای غالب و یک مارپیچ کوچک است که انتهای C پروتئین شامل ۴۰ واحد اسیدآمینه است. الگوی پیوندهای دی سولفیدی در نوع ژاپنی به صورت Cys 3_Cys 35/Cys 11_ Cys 25/Cys37_ Cys61/ Cys28_ Cys68 است (۲۷) و به نظر می‌رسد توالی نوع هندی و ایرانی نیز از همین الگو پیروی کند (شکل ۴ قسمت الف). با مطالعه توالی و ساختار پروتئینی rice-nsLTP2 نوع ایرانی با نوع ژاپنی مشخص گردید که آمینواسیدهای درگیر در تشکیل حفره

هیدروفوب این پروتئینها مشابه یکدیگر هستند (شکل ۴ قسمت ب).



شکل۴- ساختار فضایی، رزیدوهای شرکت کننده در حفره هیدروفوب و الگوی باندهای دی سولفیدی در nsLTP2 نوع ایرانی (Chimera 1.7rc and M4T Server) ، الف) رزیدوهای شرکت کننده در تشکیل باندهای دی سولفیدی، ب) رزیدوهای شرکت کننده در تشکیل حفره هیدروفوب.

جهش‌زایی پروتئین nsLTP2 برنج ایرانی و Molecular Docking : جستجو به منظور یافتن حفره آب گریز در ساختار سه بعدی nsLTP2 بر مبنای هیدروفوبیسیته سطحی با نرم‌افزار MVD نشان داد، یک حفره آب گریز با حجم ۲۲/۵۳ آنگستروم مکعب با منفذ ورودی در مرکز این پروتئین وجود دارد که این حفره توسط ساختارهای آلفاهلیکسی پروتئین احاطه شده و ناحیه اتصال و استقرار مولکولهای هیدروفوب است. مطالعات جهش‌زایی که روی nsLTP2 برنج ژاپنی انجام شده است، اثر اسیدهای آمینه حفاظت شده آروماتیکی مانند: Y45, F39, F36 و Y48، آمینواسیدهای هیدروفوبی مانند Il15, L8 و V49 روی ساختار پروتئین، پایداری، اتصال به لیگاند و فعالیت انتقال لیپید را نشان داده‌است (۱۰).

به منظور کاهش خاصیت آنتی‌ژنی پروتئین nsLTP2، تعدادی از این اسیدآمینه‌های باردار یا قطبی موجود، در بین توالی آلرژن پروتئین جهش داده شد. انجام مطالعات بیوانفورماتیکی نشان داد (۱۴) که تغییر در تعدادی از توالیهای آلرژن و با جایگزینی آمینواسیدهای L28 و F39 و نیز تغییر در هر دو موقعیت به آلانین، باعث بهبود در خاصیت آنتی ژنی nsLTP2 می‌شود. تغییر این اسیدآمینه عموماً در محل تشکیل Turnهای پروتئین انجام گرفت، تا کمترین تأثیر بر روی ساختار پروتئین ایجاد شود.

توالیهای تغییر یافته بار دیگر با استفاده از مدل‌سازی به روش تشابه (Homology modeling)، مدل‌سازی شده و در مطالعات داکینگ در حضور لیپید LysPC14 مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج برهم کنشهای انواع جهش‌یافته از لحاظ توانایی اتصال به مولکولهای هیدروفوب در جدول ۵ آورده شده است. به طور جالب توجه، جایگزینی آمینواسیدهای L28 و F39 به آلانین و یا تغییر در هر دو موقعیت، نه تنها باعث بهبود در خاصیت آنتی ژنی nsLTP2 می‌شود، بلکه خاصیت اتصال به لیپید را در پروتئین حاضر بهبود می دهد. بر این اساس پیشنهاد می-شود دستورزی در این مکانها باعث افزایش هیدروفوبیسیته جایگاه اتصال و بهبود خاصیت انتقال دارو در پروتئین nsLTP2 شود.

جدول۵- نتایج حاصل از جهش‌زایی پروتئین nsLTP2.

پروتئین	حجم حفره	MolDock Score (kcal/mol)	H Bond (kcal/mol)
نوع وحشی	22.53	-80.28	-5.75
جهش‌یافته نوع (L28A)	19.46	-85.88	-11.15
جهش‌یافته نوع (F39A)	29.67	-100.1	-10.01
جهش‌یافته نوع (L28A and F39A)	22.53	-110.04	-2.14

بحث

nsLTPs، پروتئینهای قلیایی کوچک با قابلیت اتصال و انتقال انواع لیپیدها هستند، و با توجه به جایگاه هیدروفوب سطحی در آنها، موضوع کاربرد این پروتئینها در انتقال داروها مطرح شده است (۳۱ و ۳۵). در مطالعه حاضر توالی و ساختار nsLTP2 برنج ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. توالی nsLTP2 های گونه‌های مختلف به شدت حفاظت شده است که احتمالاً نشان دهنده اهمیت توالی در عملکردهای سلولی پروتئین می باشد. به‌علاوه با توجه به رابطه فیلوژنی nsLTP2 برنج ایرانی با گونه هندی، به نظر می‌رسد این دو گونه دارای منشاء یکسان باشند (جدول ۲). با این حال تفاوتهای موجود بین این دو گونه می‌تواند، سبب تغیرات اندک در توالی اسیدآمینه‌ها و ساختار فضایی جایگاه اتصال شود. احتمال دارد چنین تفاوتهای بر روی خاصیت اتصال به لیپید و تمایل پروتئین به اتصال دارو اثرگذار باشد.

پروتئینهای غنی از آلفا هلیکس معمولاً به‌عنوان آلرژن برای سیستم ایمنی بدن شناخته می‌شوند. پروتئینهای غنی از اسیدآمینه‌های قطبی باردار، دارای خاصیت آنتی‌ژنی هستند و حداقل ۸ اسیدآمینه از این نوع باید درکنارهم قرار بگیرند تا برای سیستم ایمنی بدن محرک باشند. مطالعات ایمونولوژیکی، خواص آلرژنی پروتئینهایی مثل nsLTPها که غنی از آلفاهلیکس و اسیدآمینه‌های قطبی مانند سیستئین و اسیدآمینه‌های بارداری مانند لیزین و آرژنین هستند، را مشخص کرده‌اند (۱۱، ۲۱، ۴۶ و ۴۹). بررسی ساختار اول نشان دهنده وجود چهار توالی آنتی ژن بر روی توالی nsLTP2 ایرانی می باشد. با این وجود، دو توالی آنتی‌ژن در پروتئین nsLTP2 در ناحیه پپتید نشانه قرار دارند (جدول ۳)، در نتیجه پیش‌بینی می شود با حذف این بخش خاصیت آنتی‌ژنی آن کاهش یابد.

مطالعه توالیهای تغییر یافته نشان می‌دهند که هیچیک از تغییرات ایجاد شده در موتیفهای پس از ترجمه nsLTP2 ایرانی قرار ندارند. در نتیجه به نظر نمی‌رسد تغییر در توالی به طور مستقیم فرآیندهای همزمان با ترجمه و یا پس از ترجمه را با تغییرات شدید همراه کند. با این حال مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جهش F39A در این پروتئین (جدول۵)، با برهم زدن توالی آنتی‌ژنی پروتئین سبب کاهش خاصیت آنتی‌ژنی آن می‌شود. به علاوه افزایش سطح حفره هیدروفوب، افزایش خاصیت انتقال مولکولهای هیدروفوب را به همراه دارد. بررسیهای مشابه بر روی پروتئین nsLTP2 نوع ژاپنی نشان داده است که تغییر F39A اثری بر ساختار پروتئین ندارد (۱۰). به دلیل شباهت زیاد nsLTP2 برنج نوع ژاپنی با نوع ایرانی، استنباط می‌شود جایگزینی F39 با آلانین تغییر شدیدی در ساختار nsLTP2 ایرانی ایجاد نکند. به علاوه به نظر می رسد تغییر L28 در محل انعطاف‌پذیر ساختار پروتئین، کمترین تاثیر برروی ساختار سه بعدی nsLTP2 ایرانی داشته باشد. باوجود پیشبینی انجام شده، احتمال دارد تعداد زیادی از پپتیدهای کوچک که دارای توالی‌های هیدروفوب در ساختار خود هستند، تمایل بیشتری برای توده‌ای شدن و تشکیل فیبریلهای آمیلوئیدی داشته باشند (۱۹). مکان حفره هیدروفوب پروتئین nsLTP2 در درون ساختار است.

همچنین ایجاد جهش F39A تغییری در ساختار پروتئین نوع ژاپنی ایجاد نکرده است، به همین دلایل احتمال می رود که جهش فوق اثر ناچیزی برروی تاخوردگی پروتئین داشته باشند. همچنین برای حذف این اثر می‌توان از ناقلهایی با دنباله‌های پروتئینی محلول و بهینه‌سازی شرایط بیان استفاده کرد (۲۹، ۳۴ و ۳۶). مطالعات داکینگ نشان داد که تغییر در هر یک از موقعیت‌ها و یا تغییر همزمان آنها، نه تنها خاصیت آنتی‌ژنی پروتئین را کاهش می‌دهد، بلکه قابلیت اتصال به لیپید و احتمالا داروهای هیدروفوب را نیز بهبود می‌دهد (۴۱).

در نهایت باوجود پیش بینیهای بیوانفورماتیکی در جهت بهبود احتمالی عملکرد nsLTP2 ایرانی، اثر نهایی تغییرات ایجاد شده در توالی پروتئینی بر روی ساختار و فعالیت nsLTP2 ایرانی غیر قطعی می‌باشد. این موضوع به خصوص به علت کوچک بودن توالی و نیز حفاظت شدگی شدید آن به صورت چالش باقی مانده است و مطالعات آینده می‌تواند در پاسخ به آن مفید باشد. درمجموع نتایج مطالعه حاضر می‌تواند در دستورزیهای پروتئینی هدفمند بر روی nsLTP2، به‌منظور افزایش کارآیی پروتئین حاضر در اتصال لیگاند و به‌ویژه در سیستمهای تحویل دارو مورد استفاده قرار بگیرد.

منابع

1. Abbas AK, Lichtman AHH ,Pillai S. Cellular and Molecular Immunology: with Student Consult Online Access. Elsevier Health Sciences. 2011.
2. Abascal F, Zardoya R, Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics. 2005; 21(9):2104-5.
3. Benkert P, Kanzli M, Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation. Nucleic acids research. 2009; gkp322.
4. Bernardi ML, Giangrieco I, Camardella L, Ferrara R, Palazzo P, Panico MR, et al. Allergenic lipid transfer proteins from plant-derived foods do not immunologically and clinically behave homogeneously: the kiwifruit LTP as a model. PloS one. 2011; 6(11):e27856.
5. Blein J-P, Coutos-Thavenot P, Marion D, Ponchet M. From elicitins to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. Trends in plant science. 2002; 7(7):293-6.
6. Breiteneder H, Mills EN. Plant food allergens: structural and functional aspects of allergenicity. Biotechnology advances. 2005; 23(6):395-9.
7. Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, et al. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. FEBS letters. 2001; 509(1):27-30.
8. Carvalho AdO, Gomes VM. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology: a concise review. Peptides. 2007; 28(5):1144-53.
9. Cheng C-S, Chen M-N, Liu Y-J, Huang L-Y, Lin K-F, Lyu P-C. Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery. Enzyme and microbial technology. 2004; 35(6):532-9.
10. Cheng C , Cheng MN , Lai YT , Chen T, Lin K , Liu YJ , et al. Mutagenesis study of rice nonspecific lipid transfer protein 2 reveals residues that contribute to structure and ligand binding. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2008; 70(3):695-706.
11. Clare Mills E.N, Peter R. Shewry. Plant Food Allergen. 2008. Wily. P: 60-66.
12. Douliez J-P, Michon T, Marion D. Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 2000; 20-65:(1)1467.
13. Eastwood MP, Hardin C, Luthey-Schulten Z, Wolynes PG. Evaluating protein structure-prediction schemes using energy landscape theory. IBM Journal of Research and Development. 2001; 45(3.4):475-97.

14. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen Appl Plant Physiol. 2005; 31(1-2):105-24.

15. Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J. Evolutionary history of the non-specific lipid transfer proteins. Molecular plant. 2011; 4(6):947-64.

16. Egger M, Hauser M, Mari A, Ferreira F, Gadermaier G. The role of lipid transfer proteins in allergic diseases. Current allergy and asthma reports.2010; 10(5):326-35.

17. Emamzadeh AR, Hosseinkhani S, Sadeghizadeh M, Nikkhah M, Chaichi MJ, Mortazavi M. cDNA cloning, expression and homology modeling of a luciferase from the firefly Lampyroidea maculata. Journal of biochemistry and molecular biology. 2006; 39(5):578.

18. Fernandez-Fuentes N, Madrid-Aliste CJ, Rai BK, Fajardo JE, Fiser As. M4T: a comparative protein structure modeling server. Nucleic acids research. 2007; 35:W363-W8.

19. Fink AL. Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. Folding and design. 1998; 3(1):R9-R23.

20. Goff SA, Ricke D, Lan T-H, Presting G, Wang R, Dunn M, et al. A draft sequence of the rice genome (Oryza sativa L. ssp. japonica). Science. 2002; 296(5565):92-100.

21. Hartz C, Lauer I, del Mar San Miguel Moncin M, Cistero-Bahima A, Foetisch K, Lidholm J, et al. Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. International archives of allergy and immunology. 2010; 153(4):335-46.

22. Hoffmann-Sommergruber K. Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. Biochemical Society Transactions. 2002; 30(6):930-4.

23. Isaac Kirubakaran S, Begum SM, Ulaganathan K, Sakthivel N. Characterization of a new antifungal lipid transfer protein from wheat. Plant physiology and Biochemistry. 2008; 46(10):918-27.

24. Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuk Y, McGinnis S, Madden TL. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic acids research. 2008; 36(suppl 2):W5-W9.

25. Kader J-C. Lipid-transfer proteins in plants. Annual review of plant biology. 1996; 47(1):627-54.

26. Karimian M, Miroliaie M, Ghaedi K, Ehsanpour A, Zahraie Z. Construction of a Vector Containing Coding Sequence of Lipid Transfer Proten-2 (LTP2) Gene from Rice. Journal of Molecular Genetics. 2011; 3(1):1-4.

27. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. FEBS letters. 1990; 276(1):172-4.

28. Krieger E, Joo K, Lee J, Lee J, Raman S, Thompson J, et al. Improving physical realism, stereochemistry, and side chain accuracy in homology modeling: four approaches that performed well in CASP8. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics. 2009; 77(S9):114-22.

29. Kristensen AK, Brunstedt J, Nielsen KK, Roepstorff P, Mikkelsen JD. Characterization of a new antifungal non-specific lipid transfer protein (nsLTP) from sugar beet leaves. Plant Science. 2000; 155(1):31-40.

30. Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. Rice non-specific lipid transfer protein: the crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity .Journal of molecular biology. 1998; 276(2):437-48.

31. Liu Y-J, Samuel D, Lin C-H, Lyu P-C. Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (Oryza sativa). Biochemical and biophysical research communications. 2002; 294(3):535-40.

32. Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, et al. The major allergen of peach (Prunus persica) is a lipid transfer protein. Journal of allergy and clinical immunology. 1999; 103(3):56-20.

33. Pato C, Le Borgne M, Le Baut G, Le Pape P, Marion D, Douliez J-P. Potential application of plant lipid transfer proteins for drug delivery. Biochemical pharmacology. 2001; 62(5):555-60.

34. Peng L, Xu Z, Fang X, Wang F, Cen P. High-level expression of soluble human defensin-2 in Escherichia coli. Process Biochemistry. 2004; 39(12):2199-205.

35. Porth I, Koch M, Berenyi M, Burg A, Burg K. Identification of adaptation-specific differences in mRNA expression of sessile and pedunculate oak based on osmotic-stress-induced genes. Tree physiology. 2005; 25(10):1317-29.

36. Qing G, Ma L-C, Khorchid A, Swapna GVT, Mal TK, Takayama MM, et al. Cold-shock induced high-yield protein production in Escherichia coli. Nature biotechnology. 2004; 22(7):877-82.

37. Rodriguez, R., et al. 1998. Homology modeling, model and software evaluation: three related resources. Bioinformatics. 14(6): p. 523-528.

38. Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A. Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2007; 1771(6):781-91.

39. Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, Lyu P-C. Solution Structure of Plant nonspecific LipidTransfer Protein-2 from Rice (Oryza sativa). Journal of Biological Chemistry. 2002; 277: 35267-35273.

40. Sarowar S, Kim YJ, Kim KD, Hwang BK, Ok SH, Shin JS. Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. Plant cell reports. 2009; 28(3):419–27.

41. Schwede T, Kopp Jr, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic acids research. 2003; 31(13):3381-5.

42. Tassin-Moindrot Sv, Caille A, Douliez J , Marion D, Vovelle Fo. The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. European Journal of Biochemistry. 2000; 267(4):1117-24.

43. Thomsen R, Christensen MH. MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking. Journal of medicinal chemistry. 2006; 49(11):3315-21.

44. Tousheh M, Miroliaei M, Asghar Rastegari A, Ghaedi K, Esmaeili A, Matkowski A. Computational evaluation on the binding affinity of non-specific lipid-transfer protein-2 with fatty acids. Computers in biology and medicine. 2013; 43(11):1732-8.

45. Van Loon LC, Van Strien EA. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiological and molecular plant pathology. 1999; 55(2):85-97.

46. Varjonen E, Vainio E, Kalimo K, Juntunen-Backman K. Clinical importance of non-specific lipid transfer proteins as food allergens. Biochemical Society Transactions. 2002; 30(part 6).

47. Wang SY, Wu JH, Ng TB, Ye XY, Rao PF. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. Peptides. 2004; 25(8):1235-42.

48. Wang J, Yang L, Zhao X, Li J, Zhang D. Characterization and Phylogenetic Analysis of Allergenic Tryp_alpha_amyl Protein Family in Plants. Journal of agricultural and food chemistry. 2014; 62(1):270-8.

49. Wijesinha-Bettoni R, Alexeev Y, Johnson P, Marsh J, Sancho AI, U. Abdullah S, et al. The structural characteristics of nonspecific lipid transfer proteins explain their resistance to gastroduodenal proteolysis. 2010; Biochemistry. 49(10):2130-9.

50. Zhao X, Xia L, Ding X, Yu Z, Loe Y, Tao W. Homology modeling of Cyt2Ca1 of Bacillus thuringiensis and its molecular docking with inositol monophosphate. Chinese Journal of Chemistry. 2009; 27(10):2085-9.

Sequence Analyses, Antigenic Characteristic and Three-Dimensional Structure of Rice nonspecific Lipid Transfer Protein 2: a Bioinformatics Study

Darvishi F.Z.[1], Miroliaei M.[1], Emamzadeh R.[1], Motavelibashi M.[2] and Nazari M.[3]

[1] Molecular and Cell Biology Sec., Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan. Isfahan, I.R. of Iran

[2] Genetics Sec., Biology Dept., Faculty of Science, University of Isfahan. Isfahan, I.R. of Iran

[3] Nanobiotechnology Research Center, Avicenna Research Institute, ACECR, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nonspecific lipid transfer protein 2 (nsLTP2) is among prolamin super family, capable of transferring various lipophilic molecules such as sterols. Despite advantages of the protein in drug delivery systems, there are some reports on its allergenic properties. Comparative sequence analysis displayed at least 51% homology in different species of rice-nsLTP2. The aim of the current study was to evaluate gene sequence and protein structure analysis of Iranian rice-nsLTP2, by means of bioinformatics tools, to improve its potential capability for drug delivery systems. Gene sequence homology assessment revealed resemblance mostly with Japonica species (Accession NO. NP-0011048723.1). The presence of various specific sites and motifs in the structure of nsLTP2 were determined by sequence analysis. Preliminary studies demonstrated four antigenic determinants in the primary sequence of the protein, which three of them retain after post translational modification. Moreover, sequence assessment revealed that those residues contributing in the protein cavity are conserved totally among Japonica and Iranian species. Modeling approaches were used to determine the influence of deletion of allergenic sites on protein affinity toward hydrophobic ligands. The obtained results revealed the efficacy of nsLTP2, as a drug carrier protein, could be improve by appropriate swap at specific residues and elision of allergenic sites.

Key words: nsLTP2, homology modeling, drug delivery, antimicrobial activity