مقاله پژوهشی

معرفی سوبستراهای احتمالی آنزیم گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی

جعفر وطن دوست [1*]، ***ملیکا فصیح فر*** [2]

[1] استادیار، دکترای ژنتیک مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

[2] دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه آموزشی مهندسی زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد، واحد سبزوار، ایران

نشانی نویسنده مسئول: سبزوار، توحید شهر، دانشگاه حکیم سبزواری، جعفر وطن دوست

E-mail: j.vatan@hsu.ac.ir

وصول:۹۳/۳/۱۰، اصلاح:۹۳/۶/۱۶، پذیرش:۹۳/۶/۲۴

چکیده

زمینه و هدف: مطالعه‌ی حاضر با هدف آشکارسازی پروتئین(های) کاندید به‌عنوان سوبسترای آنزیم گاماکربوکسیلاز در دروزوفیلا جهت به‌کارگیری پروپپتید مربوط برای گاماکربوکسیله‌کردن بهتر پروتئین‌هایی مثل فاکتور ۹ انسانی که برای فعالیت خود نیاز به گاما کربوکسیله‌شدن دارند، انجام‌شد.

موادّ و روش‌ها: **توالی نوکلئوتیدی تمام پروتئین‌های واجد ناحیه‌ی گاما کربوکسی گلوتامیک اسید (گلا) در انسان، دروزوفیلا و حلزون حلقوی موجود در بانک ژن (NCBI) مورد استفاده قرارگرفتند. جستجوی ژنوم‌ها با استفاده از برنامه‌های Blastn و Blastp انجام‌شد. موقعیت پروپپتید و ناحیه گلا درتمام این پروتئین‌ها با استفاده از برنامه بلاست بررسی‌گردید. همچنین از برنامه‌ی tblastn برای پیش‌بینی حضور پروتئین مشابه، از** نرم‌افزار ProDom **برای یافتن پروتئین‌های کاندید واجد ناحیه‌های گلا، از نرم‌افزار** PROSITE **برای یافتن پروتئین‌های دروزوفیلایی با الگوهای مشابه و از برنامه‌ی** Pfam **و**SMART برای **ارزیابی موقعیت ناحیه‌ی گلای احتمالی در پروتئین‌های کاندید استفاده‌گردید.**

یافته‌ها: **جستجوی بانک اطلاعاتی ژنوم دروزوفیلا براساس توالی اجمالی ناحیه‌ی گلا، توالی اجمالی پروپپتید، الگوی حاصل از پروپپتید پستانداران و توالی اجمالی پروپپتید پروتئین‌های گلای حلزون حلقوی، هیچ پروتئین واجد گلایی را آشکارنساخت. اما جستجوی ژنوم دروزوفیلا با استفاده از توالی پروپپتیدی تک تک پروتئین‌های گلای حلزون حلقوی منجر به آشکارسازی حداقل ۹ پروتئین واجد ناحیه گلا در دروزوفیلا شد.**

نتیجه‌گیری: **تعداد و موقعیت جایگاه کربوکسیلاسیون بروی اسید امینه‌های گلوتامیک اسید در این ۹ پروتئین مشابه پروتئین‌های گلای شناخته‌شده‌ی مهره‌داران است. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش اطلاعات اولیه را جهت انتخاب سوبسترای مناسب گاماکربوکسیلاز دروزوفیلا فراهم می‌نماید.**

واژه‌های کلیدی: ***فاکتورهای انعقادی، سلول دروزوفیلا، گاما کربوکسیلاز، پروپپتید، ناحیه گلا.***

مقدمه

تاکنون پروتئین‌های زیادی در مهره‌داران (۱۶ پروتئین) و بی‌مهره‌ها (۱۷ پروتئین) پیدا شده است که واجد «دمین» یا ناحیه‌ای به نام «گلا» هستند (۱, ۲). این ناحیه، غنی از اسید آمینه‌های گلوتامیک اسید است که توسط آنزیم گاما کربوکسیلاز، در موقعیت کربن گاما،

کربوکسیله‌می‌شوند (۳). این فرایند که در شبکه‌ی اندوپلاسمیک رخ‌می‌دهد، باعث تغییر اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید (Glu) به گاما کربوکسی گلوتامیک اسید (گلا، Gla) می‌شود (۱, ٤). لذا دمین گلا در این پروتئین-ها، نشأت گرفته از وجود واحدهای اسیدآمینه‌ی گلا در انتهای آمینی غالب این پروتئین‌هاست (۵).

کربوکسیلاسیون اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید در پروتئین‌های واجد ناحیه‌ی گلا، نیاز به‌حضور یک جایگاه تشخیص گاما کربوکسیلاسیون دارد که معمولا درون یک پروپپتید ۱۲ تا ۲۸ اسیدآمینه‌ای، بلافاصله بعداز سیگنال پپتید انتهای آمینی قرارمی‌گیرد (۲, ٦). پروتئین‌های گاما کربوکسیله شامل فاکتورهای انعقادی ۷، ۹، ۱۰، پروترومبین، پروتئین C، Z و S اولین بار در پستانداران مشخص‌شدند (۷)و سپس در حلزون‌های حلقوی نیز کشف‌گردید (۲, ٤). پروتئین‌های گاما کربوکسیله در مهره‌داران، پروتئین‌های دخیل در انعقاد خون و انتقال سیگنال و در بی‌مهره ها، پروتئین‌های مسدودکننده‌ی کانال‌های یونی به‌نام کونوتوکسین هستند (٤). پروپپتید این پروتئین‌های گاما کربوکسیله، در برگیرنده‌ی توالی شناسایی آنزیم گاما کربوکسیلاز است که در بالابردن کارآیی کربوکسیلاسیون نقش ایفامی‌کنند (٤, ۸). ازطرفی بررسی‌های بعدی نشان‌داد که آنزیم گاما کربوکسیلاز علاوه بر مهره‌داران، در دو بی‌مهره‌ی حلزون حلقوی متعلق به جنس Conus (۸) و حشره‌ی دروزوفیلا ملانوگاستر (۷, ۹) نیز وجود دارد. خواص و مکانیسم کربوکسیلاز مهره‌داران و بی‌مهره ها مشابه است و هر دو قادرند که سوبستراهای همدیگر را کربوکسیله‌کنند (۲, ۷). اما برخلاف مهره‌داران و حلزون حلقوی، تاکنون پروتئین-های گاما کربوکسیله و ناحیه‌ی گلا در توالیِ ژنومیکِ دروزوفیلا، مشابه با ناحیه‌ی گلا در پروتئین‌های گلای شناخته‌شده، پیدانشده‌است (٤).

ژنوم دروزوفیلا، ٦۵ میلیون جفت باز دارد و بیشتر ژن‌هایش معادل‌های عملکردی انسانی دارند که می‌توانند جایگزین‌شوند. جستجوی tBlastn با استفاده از توالی اسید امینه‌ای آنزیم گاما کربوکسیلاز انسانی، باعث شناسایی همولوگ آن بروی کروموزوم 3L در دروزوفیلا شد. cDNA آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلا، ۲۳۰۰ جفت باز است که از آن پروتئینی حدود ٦۷۲ اسید آمینه با وزن مولکولی ۷۸/٤ kDa پیش‌بینی‌می‌شود. هم‌ردیفیِ چندگانه‌یِ توالیِ ترجمه‌شده‌ی آنزیم دروزوفیلایی، ۳۳٪ یکسانی و ٤۵٪ مشابهت با توالی اسید آمینه‌ای انسان نشان‌داد (۷). همچنین موتاسیون F16A باعث حذف کربوکسیلاسیون (کاهش۹۰٪) به‌وسیله‌ی هر دو آنزیم کربوکسیلاز دروزوفیلا و انسانی می‌شود (۸). درمقایسه با آنزیم انسانی، آنزیم دروزوفیلایی شامل ۲ اینترون خیلی کوتاه است که معادل اینترون ٤ و ۷ ژن آنزیم انسانی است. علاوه براین، توالی پروموتری در موقعیّت ۵۲۵ ، بالادستِ ATG شروع است (۷). یک تفاوت اصلی بین آنزیم دروزوفیلایی و انسانی این است که از انتهای کربوکسی، ۸٦ اسید امینه کمتر از آنزیم انسانی دارد و حذف آن اثری بر فعالیت آنزیم انسانی ندارد. بیان گاما کربوکسیلاز حدود ۱۰ برابر بیشتر در سرِ بالغین نسبت به هر بافت دیگری است و همچنین بیان بعد از ٤ ساعت از تکامل جنینی دیده می‌شود (۷, ۸). فعالیت کربوکسیلازی آنزیم دروزوفیلایی در سلول‌های Sf9 ترانسفکت‌شده درحضور ویتامین K نسبت به‌حالت عدم حضور ویتامین K حدود ۱۱ برابر است. فعالیت کربوکسیلازی خود سلول‌های Sf9 درحضور یا غیاب ویتامین K بسیار پایین است (۷).

حلزون حلقوی، تنها بی‌مهره‌ای است که آنزیم گاما کربوکسیلاز و محصولات گاما کربوکسی گلوتامیک اسید آن شناسایی (۲) و نشان داده‌شده‌است که گاما کربوکسیلاز حلزون، پروپپتید پستانداران را نمی‌شناسد (۷). Li و همکاران نیز بیان‌کردند که آنزیم دروزوفیلایی ازاین نظر با گاما کربوکسیلاز حلزون مشابه است و احتمالاً پروپپتید پستانداران را تشخیص‌نمی‌دهد (۷) زیرا

اگرچه پروپپتید و نواحی گاما کربوکسیله (گلا) پروتئین-های پستانداران هومولوژی قابل توجهی بین خودشان دارند، اما پپتیدهای به دست‌آمده از حلزون های حلقوی نشان‌می‌دهد که توالی‌های پروپپتید و گلای متفاوتی از پستانداران دارند.

اما بررسی‌های بعدی نشان‌داد که هرچند سوبستراهای طبیعی آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی تاکنون مشخص نشده و حتی ناحیه‌ی گلا در توالی ژنومیک دروزوفیلا مشابه با ناحیه‌ی گلا در پروتئین‌های گلای پستانداران نیز تاکنون پیدا نشده است (۷)، اما این آنزیم می‌تواند پروپپتید فاکتور ۹ و پروترومبین انسانی را به-عنوان سوبسترا شناسایی و ناحیه‌ی گلای آنها را کربوکسیله‌کند (۳, ۵, ۸). همچنین Bandyopadhyay و همکاران نشان دادند که آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی درشرایط in vitro دارای تمایل بالاتری برای شناسایی سوبستراهای واجد پروپپتید فاکتور ۹ و پروترومبین نسبت به حالت بدون پروپپتید است (۸). ازطرفی نشان‌داده‌شده که در شرایط و مقادیر یکسان، محصول کربوکسیله به‌دست‌آمده از آنزیم کربوکسیلاز دروزوفیلا (dγC) حدود ۵ برابر آنزیم کربوکسیلاز انسانی (hγC) است (۸). ما نیز در مطالعات in vivo نشان‌دادیم که فاکتور ۹ انسانی در سلول‌های دروزوفیلا توسط آنزیم گاما کربوکسیلاز شناسایی و کربوکسیله‌می‌شود (۳, ۵). به-نظرمی‌رسد که تمایل آنزیم گاما کربوکسیلاز به سوبسترا از طریق اتصال به پروپپتید و نه دمین گلای آن باشد.

با توجه به کارآمدبودن گاماکربوکسیلاز دروزوفیلا، به‌نظرمی‌رسد که چنانچه سوبسترای آن درمیان پروتئین-های دروزوفیلا یافته گردد، می‌توان از پروپپتید آن برای افزایش گاماکربوکسیلاسیون پروتئین‌های هترولوگ بیان-شده در سلول‌های دروزوفیلا استفاده‌نمود و به‌این‌ترتیب با به‌کارگیری پروپپتید یافته‌شده، امکان گاماکربوکسیله‌شدن بهتر پروتئین‌هایی که برای فعالیت خود نیاز به گاما کربوکسیله‌شدن دارند، در سامانه‌ی بیانی سلول‌های دروزوفیلا فراهم‌می‌شود.

مواد و روش‌ها

جستجوی ژنوم‌ها با استفاده از برنامه‌های Blastn و Blastp انجام شد. باهدف یافتن سوبستراهای آنزیم گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی، توالی نوکلئوتیدی تمام پروتئین‌های واجد ناحیه‌ی گلا در انسان، دروزوفیلا و حلزون حلقوی موجود در بانک ژن (NCBI) مورد استفاده قرار گرفتند. موقعیت پروپپتید و ناحیه‌ی گلا درتمام این پروتئین‌ها با استفاده از برنامه‌ی بلاست بررسی شد. برای پیش‌بینی حضور پروتئین مشابه با پروتئین‌های واجد ناحیه‌ی گلا در دروزوفیلا از برنامه‌ی tblastn استفاده-گردید. همچنین از نرم‌افزار ProDom برای یافتن پروتئین-های کاندید واجد ناحیه‌های گلا استفاده‌شد. با بهره‌گیری از الگوی پروپپتیدی و نواحی گلای پروتئین‌های انسانی و با استفاده از نرم‌افزار PROSITE نسبت به جستجو برای یافتن پروتئین‌های دروزوفیلایی با الگوهای مشابه اقدام-گردید. موقعیت ناحیه‌ی گلای احتمالی در پروتئین‌های کاندید نیز با استفاده از برنامه‌ی Pfam و SMART بررسی و ارزیابی‌شد.

یافته‌ها

باتوجه به‌این‌که آنزیم گاما کربوکسیلاز دروزوفیلایی، سوبسترای آنزیم گاما کربوکسیلاز مهره‌داران را شناسایی‌می‌کند، لذا انتظار می‌رود که بتوان درجریان یک مطالعه‌ی مقایسه‌ای با استفاده از توالی‌های پروپپتیدی پستانداران (جایگاه اتصال کربوکسیلاز به سوبسترا) و یا توالی‌های نواحی گلای پروتئین‌های پستانداران (جایگاه فعالیت کربوکسیلاز در سوبسترا)، سوبسترا(ها)ی احتمالی آنزیم گاماکربوکسیلاز را در ژنوم دروزوفیلا شناسایی‌نمود. از طرفی نشان داده شده که پروپپتید و نواحی گاما کربوکسیله (گلا) پروتئین‌های پستانداران هومولوژی قابل توجهی بین خودشان دارند، ولی پپتیدهای به‌دست‌آمده از

شکل ۱: همردیفی ناحیه پری پروپپتید و گلای پروتئین های واجد ناحیه گلا در پستانداران، علامتγ نشان دهنده جایگاه گاماکربوسیلاسیون است

پروتئین گلا	توالی اسید آمینه	موقعیت
	* * *	
Gla(1)-TxVI	HSKENINFLLKRKRAAD-R	-1/-20
Gla(2)-TxVI/A	KKIDFLSKGKTDAEKQQKR	-1/-20
Gla(2)-TxVI/B	KKIDFLSKGKADAEKQRKR	-1/-20
Gla(3)-TxVI	EKIKLLSKRKTDAEKQQKR	-1/-20
Gla-TxX	GRRRLIHMQK	+48/+57
Gla-TxXI	GKRAKLLEFFRQR	+32/+44
κ-BtX	GKRSKLQEFFRQR	+32/+44
PnVIIA	QQAKINFLSKRKPSAERWRR	-1/-20
TxVIIA	RKAEINFSETRKLARNKQKR	-1/-20
Tx9.1	DNRRNLQSKWKPVSLYMSRR	-1-20
Con-G	GKDRLTQMKRILKQRGNKA-R	-1/-20
Con-L	GNDRLTQMKRILKKRGNKA-R	-1/-20
Con-R	GNDRLTQMKRILKKRGNKA-R	-1/-20
Glacon-M	GRDNPGRARRKRMKVL	-1/-16
Mr5.2	PLASFHANVKRTLQIL-RDKR	-1/-20
Mr5.3	PLASSHANVKRTLQIL-RNKR	-1/-20
e-TxIX	PLSSLRDNLKRTIRTRLNIR	-1/-19

شکل ۲: همردیفی پروپپتید پروتئین های گلای حلزون حلقوی

حلزون‌های حلقوی توالی‌های پروپپتید و گلای متفاوتی از پستانداران دارند. لذا احتمال‌می‌رود توالی‌های پروپپتید و گلای پروتئین‌های دروزوفیلایی نیز متفاوت با پستانداران باشد. براساس این احتمالات و باهدف آشکارسازی پروتئین(های) کاندید سوبسترای گاماکربوکسیلازی در دروزوفیلا، بررسی‌ها در چهار مرحله ذیل انجام‌گردید:

۱- جستجو براساس ناحیه‌ی گلای پستانداران

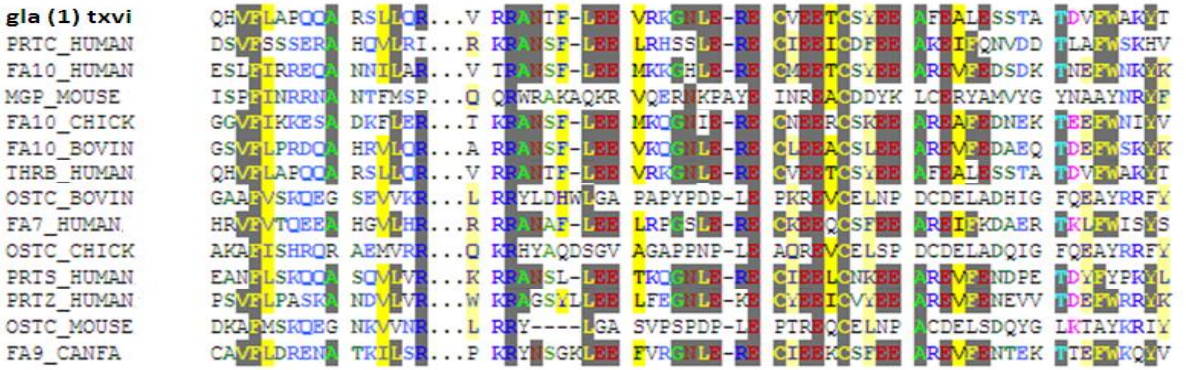
یک توالی اجمالی EXX (E/R)EXCXXXXXXXX(L/F/Y) بر اساس E-motif (XXXXXXXX(A/F)(Y/W)XX- (F/Y/H) و پروتئین‌های گلای پستانداران ساخته شده بود (۷) که در آن X، معادل با هر اسید آمینه و حروف داخل پرانتز نشان‌دهنده‌ی اسیدآمینه‌هایی هستند که می‌توانند به‌جای یکدیگر در آن موقعیت وجود داشته‌باشند. جستجوی بانک اطلاعاتی ژنوم دروزوفیلا با استفاده از این موتیف هیچ پروتئین واجد ناحیه‌ی گلایی را آشکارننمود. اگرچه این موتیف درتمام پروتئین‌های پستاندران واجد ناحیه‌ی گلا قابل تشخیص‌می‌باشد.

۲- جستجو براساس توالی اجمالی و یک الگوی حاصل از پروپپتید پروتئین‌های گلای پستانداران

دراین مرحله ابتدا یک توالی اجمالی از هم‌ردیفی ناحیه‌ی پروپپتید پستانداران (FXXXXAXXXLXXXXR) ساخته (شکل ۱) و سپس ژنوم دروزوفیلا براساس این توالی

جدول ۱: پروتئین‌های آشکار شده با جستجو در ژنوم دروزوفیلا با استفاده از توالی پروپپتیدی ۱۷ پروتئین گلای حلزون حلقوی

نام توالی پروپپتیدی مورد جستجو	توالی پروتئینی یافت شده (Gene ID)	طول پروتئین	گونه	موقعیت ناحیه‌ی گلا
gla(1) txvi	GI24120	۵۷۹	Drosophila mojavensis	۵۵ تا ۱۲۷
gla(2b) txvib	CG7177	۲٤۰٤	Drosophila melanogaster	۲۱۲۵ تا ۲۱۶۷
gla(2b) txvib	Q7ZVS3	۹٤۰	Danio rerio	۳۵۷ تا ٤۲۵
gla(3) txvi	GE13195	۸۲۱	Drosophila yakuba	۱٤۶ تا ۱۹۰
gla(3) txvi	GM17282	۸۲۲	Drosophila sechellia	۱٤۷ تا ۱۹۱
gla(3) txvi	GL19379	۳۸۷	Drosophila persimilis	۱۵٤ تا ۲۰۵
gla(3) txvi	GG21122	۸۱۶	Drosophila erecta	۱٤۱ تا ۱۸۵
gla(3) txvi	GF15062	۸۱۹	Drosophila ananassae	۱٤۶ تا ۱۹۰
e-txix	NP_001097541.1 Ect4, isoform D	۱۶۳۷	Drosophila melanogaster	۳۵۲ تا ٤۱۲



شکل ۳: مقایسه نواحی گلا در یکی از پروتئین های آشکار شده (gla(1) txvi) در دروزوفیلا با برخی پروتئین های گلای شناخته شده مهره داران

اجمالی جستجوشد که براین‌اساس، هیچ پروتئین واجد گلایی را آشکارنساخت. سپس ازهم‌ردیفی پروپپتیدهای پروتئین‌های گلای پستانداران لگوی {(V/A/L)F(L/V/I)XXXXAXXXLXRXXR} حاصل شد که جهت بررسی دقیق‌تر ژنوم دروزوفیلا مورد استفاده قرارگرفت ولی این روش نیز پروتئینی را با ویژگی‌های مورد نظر آشکارنکرد.

۳- جستجو براساس پروپپتید پروتئین های گلای حلزون حلقوی

جستجو باموتیف (Lys/Arg-X-X-J-X-X-X-X-Lys/Arg) که براساس هم‌ردیفی پروپپتید تمام پروتئین‌های گلای حلزون حلقوی پیشنهادشده‌بود (۲) (شکل ۲) نیز هیچ پروتئین واجد ناحیه‌ی گلایی را در بانک اطلاعاتی ژنوم دروزوفیلا آشکارنساخت.

٤- جستجو براساس پروپپتید تک تک پروتئین های گلای حلزون حلقوی

در نهایت جستجو در ژنوم دروزوفیلا با استفاده از تک‌تک توالی پروپپتیدی ۱۷ پروتئین گلای حلزون حلقوی (۲) منجر به آشکارسازی حدود ۷۵ پروتئین در گونه‌های مختلف دروزوفیلا شد. ازمیان پروتئین‌های آشکارشده، وجود و موقعیّت ناحیه‌ی گلا در انتهای آمینی ۹ پروتئین با استفاده از نرم‌افزار SMART آشکارگردید (جدول ۱). مقایسه‌ی نواحی گلا در پروتئین‌های آشکارشده دروزوفیلایی با برخی پروتئین‌های گلای شناخته‌شده‌ی مهره‌داران به‌طور مجزا، دلالت بر وجود شباهت (همولوژی) بالا دربین این نواحی دارد. شکل ۳ ، هم‌ردیفی و شباهت بالای یکی از این پروتئین‌های آشکارشده دروزوفیلایی (gla(1) txvi) را با برخی پروتئین‌های گلای شناخته شده‌ی پستانداران نشان می‌دهد. همانطور که دیده می‌شود تعداد و موقعیّت جایگاه کربوکسیلاسیون بروی اسیدامینه‌های گلوتامیک اسید (E) مشابه است.

بحث

از آنجایی که آنزیم گاماکربوکسیلاز برای فعالیّت خود تمایل به اتصال به پروپپتید دارد (۲, ۱۰)، بنابراین لازمه‌ی کربوکسیلاسیون یک سوبسترا توسط آنزیم گاما کربوکسیلاز، شناسایی آن سوبسترا و اتصال به پروپپتید آن می‌باشد. نتایج ما در in vivo نشان‌داد که گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی قادر به تشخیص فاکتور ۹ انسانی به‌عنوان سوبسترا می‌باشد (۳, ۵). این نتایج که در مطابقت با نتایج in vitro که به‌وسیله‌ی Bandyopadhyay انجام‌شده(۸) می‌باشد، تائیدی بر شناسایی پروپپتید سوبسترای انسانی توسط گاماکربوکسیلاز دروزوفیلایی در درون سلول می-باشد.

از طرفی نشان‌داده‌شده که فعالیت آنزیم گاماکربوکسیلاز در دروزوفیلا بسیار بیشتر از فعالیت آن در پستانداران است (۸). لذا استفاده از این آنزیم برای سوبستراهایی که برای فعالیتشان نیاز به گاماکربوکسیلاسیون دارند، موجب تولید محصولاتی با فعالیت بیولوژیکی بیشترمی‌شود. ازآنجایی که محل شناسایی سوبسترا توسط آنزیم اغلب بروی ناحیه‌ی پروپپتید انتهای آمینی پروتئین‌های هدف قرارگرفته‌است، لذا احتمالاً جایگزینیِ پروپپتیدِ سوبسترای طبیعیِ آنزیمِ دروزوفیلا، در انتهای آمینی پروتئین‌های نوترکیب بتواند منجر به گاما کربوکسیله‌شدنِ کارآمدتر آنها شود. بنابراین شناسایی سوبسترای طبیعی این آنزیم در دروزوفیلا که می‌تواند در بهبود بیان و فعالیت پروتئین‌های نوترکیب موثرباشد، موردبررسی قرارگرفت. هرچند نتایج جستجوی بانک اطلاعاتی ژنوم دروزوفیلا براساس توالی اجمالی ناحیه‌ی گلا، توالی اجمالی پروپپتید، الگوی حاصل از پروپپتید پستانداران و توالی اجمالی پروپپتید پروتئین‌های گلای حلزون حلقوی، هیچ پروتئین واجد گلایی را آشکارنساخت، اما جستجو در ژنوم دروزوفیلا با استفاده از تک‌تک توالی‌های پروپپتیدی ۱۷ پروتئین گلای حلزون حلقوی (۲) منجر به آشکارسازی حدود ۷۵ پروتئین در گونه‌های مختلف دروزوفیلا شد که در این میان ۹ پروتئین واجد ناحیه‌ی گلا شناخته‌شد.

نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش اطلاعات اولیه را درخصوص سوبسترا(های) کاندید گاماکربوکسیلاز دروزوفیلا فراهم نموده است که تایید ساختار و کارآیی آنها نیازمند بررسی‌های بیشتر بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی می‌باشد. همچنین نتایج *به‌دست‌آمده*، اطلاعات مناسبی را جهت انتخاب سوبسترای مناسب گاماکربوکسیلاز دروزوفیلا فراهم‌خواهدکرد. پس از تایید کارآمدی این سوبسترا، با به‌کارگیری پروپپتید مربوط، امکان گاماکربوکسیله‌شدن بهتر پروتئین‌هایی مثل فاکتور IX انسانی که برای فعالیت خود نیاز به گاما کربوکسیله‌شدن دارند، در سامانه‌ی بیانی سلول‌های حشرات فراهم‌می‌شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه در دانشگاه حکیم سبزواری و درقالب طرح مصوب شماره ۹۲/۲۶۱۲۸د انجام‌شد که بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه حکیم سبزواری کمال تشکر و سپاسگزاری را داریم.

References

1. Tuddenham EGD, Cooper DN. Factor IX and haemophilia B. Oxford Monographs on Medical Genetics. 1994;25:78–111.
2. Czerwiec E, Kalume DE, Roepstorff P, Hambe B, Furie B, Furie BC, Stenflo J. Novel gamma-carboxyglutamic acid-containing peptides from the venom of Conus textile. FEBS J. 2006;273(12):2779-88.
3. Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M., Aliyari R, Bos MH, Ataei F. Expression of biologically active human clotting factor IX in Drosophila S2 cells: gamma-carboxylation of a human vitamin K-dependent protein by the insect enzyme. Biotechnol Prog. 2012;28(1):45-51.
4. Brown MA, Begley GS, Czerwiec E, Stenberg LM, Jacobs M, Kalume DE, Roepstorff P, Stenflo J, Furie

BC, Furie B. Precursors of novel Gla-containing conotoxins contain a carboxy-terminal recognition site that directs gamma-carboxylation. Biochemistry. 2005;44(25):9150-9.
5. Vatandoost J, Zomorodipour A, Sadeghizadeh M, Aliyari R. Cloning and study of expression γ-carboxylated human factor IX in Drosophila S2 cells [dissertation]. Tehran: Tarbiat Modares University; 2012. [Persian]
6. Bandyopadhyay PK, Colledge CJ, Walker CS, Zhou LM, Hillyard DR, Olivera BM. Conantokin-G precursor and its role in gamma-carboxylation by a vitamin K-dependent carboxylase from a Conus snail. J Biol Chem. 1998; 273(10): 5447-50.
7. Li T, Yang CT, Jin DY, Stafford DW. Identification of a Drosophila vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase. J Biol Chem. 2000;275(24):18291-6.
8. Bandyopadhyay PK, Clark K, Stevenson BJ, Rivier JE, Olivera BM, Golic KG, Rong YS. Biochemical characterization of Drosophila gamma-glutamyl carboxylase and its role in fly development. Insect Mol Biol. 2006;15(2):147-56.
9. Walker CS, Shetty RP, Clark K, Kazuko SG, Letsou A, Olivera BM, Bandyopadhyay PK. On a potential global role for vitamin K-dependent gamma-carboxylation in animal systems - Evidence for a gamma-glutamyl carboxylase in Drosophila. J Biol Chem. 2001;276(11):7769-74.
10. Hallgren KW, Hommema EL, McNally BA, Bernker KL. Carboxylase overexpression effects full carboxylation but poor release and secretion of factor IX: Implications for the release of vitamin K-dependent proteins. Biochemistry. 2002;41(50):15045-55.

An introduction of candidate substrates for Drosophila Gamma-carboxylase

Jafar Vatandoost.,
Assistant Professor, PhD of Molecular Genetic, Department of Biology, Faculty of Science, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Melika Fasihfar.,
MSc student of agricultural biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Sabzevar Branch, Sabzevar, Iran

Received:31/05/2014**, Revised:**07/09/2014**, Accepted:**15/09/2014

Corresponding author:
Jafar Vatandoost,
Sabzevar, Faculty of Science,
Hakim Sabzevari University,
Sabzevar, Iran
Email: j.vatan@hsu.ac.ir

Abstract

Background and purpose : This study was aimed at detecting candidate protein (s) as a substrate for the drosophila gamma-carboxylase enzyme. Pro-peptide form of the candidates can be used for better gama carboxylation of proteins such as human FIX, that require gamma carboxylation for their activity .

Material and Methods: In this study nucleotide sequences of all proteins containing Gla region in human, drosophila and cone snail in the gene bank (NCBI) were used. Genomes screening was performed using the Blastn and Blastp programs. Pro-peptide and Gla region positions of all these proteins were determined using the BLAST program. In addition, other programs such as tblastn program (for predicting the presence of the same proteins), ProDom software (for finding candidate proteins containing Gla domain), PROSITE software (for detecting Drosophila proteins with similar pattern), Pfam and SMART programs (to assess the possible Gla region situation in the candidate proteins), were used.

Results: Screening of Drosophila genome data-base was not able to identify any Gla protein in Drosophila in any of fallowing consensus sequences : mammalian Gla domain, mammalian propeptide consensus sequence, mammalian propeptide pattern sequence and cone snail propeptide consensus sequence. However, screening of Drosophila database, using the propeptide sequences of individual Gla proteins in cone snail, has resulted the detection of at least 9 Gla proteins.

Conclusion: The Number and positions of carboxylation in these candidate proteins are similar to vertebrate Gla proteins. These results provide primary data toward selection of appropriate substrate from Drosophila Gamma–carboxylase.

Keywords: *coagulation factors, Drosophila, gamma-carboxylase, propeptide, Gla domain*