

Bioinformatics analysis of plant-derived Hevein-like peptides: Potential for recombinant production with biological activity

Iman Sarrafan¹, Fatemeh Rajaei², Mojtaba Ranjbar^{3*}

1. Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies.

2. Department of Microbial Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies.

3. Department of Biotechnology, Faculty of Biotechnology, Amol University of Special Modern Technologies (Corresponding Author; ranjbarf@ausmt.ac.ir).

Article history:

Received:11/01/2025 Revised:10/02/2025 Accepted:01/02/2025

Abstract

Plants are one of the sources of bioactive cysteine-rich proteins that defend against pathogens. Hevein-Like is a family of antimicrobial and defensive peptides in plants. They bind to the surface of pathogens and disrupt the cell membrane, leading to their death. To identify and produce the best Hevein-Like with biological properties in genetic engineering, the product of the gene encoding Hevein-Like must be examined in terms of various structural, evolutionary, and physicochemical parameters. Based on evolutionary relationships, plant Hevein-Like is divided into two main groups with little genetic distance. All Hevein-Like in this study are classified as stable proteins. Therefore, the most suitable plant and Hevein-Like must be selected and examined based on the mentioned parameters before starting cloning and expression to produce peptides with high biological activity.

Keywords: Antimicrobial peptide, Hevein, Instability index, Biological activity, In silico

زیست‌شناسی مولکولی کاربردی

سال سوم / شماره ۵ / زمستان ۱۴۰۳

صفحات: ۴۱-۵۶

بررسی بیوانفورماتیکی پپتیدهای گیاهی شبه‌هوئین: پتانسیل تولید محصول نو ترکیب با فعالیت بیولوژیکی

ایمان صرافان^۱، فاطمه رجائی^۲، مجتبی رنجبر^{۳*}

۱. گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری نوین، آمل.

۲. کارشناسی، گروه زیست فناوری میکروبی، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل.

۳. دانشیار، گروه زیست فناوری، دانشکده زیست فناوری، دانشگاه تخصصی فناوری‌های نوین، آمل.
(نویسنده مسئول؛ ranjbarf@ausmt.ac.ir).

تاریخ بارگزاری: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۱۱/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۲۳

چکیده

گیاهان یکی از منابع پروتئین‌های زیست فعال غنی از سیستمین در برابر پاتوژن‌ها است. شبه‌هوئین‌ها خانواده‌ای از پپتیدهای ضد میکروبی و دفاعی گیاهان هستند. آن‌ها با اتصال به سطح پاتوژن و ایجاد اختلال در غشای سلولی منجر به مرگ آن‌ها می‌شوند. به منظور شناسایی و تولید بهترین شبه‌هوئین با خاصیت بیولوژیکی در مهندسی ژنتیک باید محصول ژن کدکننده شبه‌هوئین‌ها از نظر پارامترهای مختلف ساختاری، تکاملی و فیزیکوشیمیایی بررسی شود. براساس نتایج روابط تکاملی، شبه‌هوئین‌ها گیاهان به دو گروه اصلی با فاصله ژنتیکی کمی تقسیم می‌شوند. همه شبه‌هوئین‌های این پژوهش جزء پروتئین‌های پایدار طبقه‌بندی می‌شوند. بنابراین به منظور تولید پپتید با فعالیت بیولوژیکی بالا باید ابتدا قبل از شروع کلونینگ و بیان، مناسب‌ترین گیاه و شبه‌هوئین را براساس پارامترهای ذکر شده انتخاب و بررسی شوند.

کلمات کلیدی: پپتید ضد میکروبی، شبه‌هوئین، شاخص ناپایداری، فعالیت بیولوژیکی،
Insilco

۱. مقدمه

گیاهان در طول عمر خود باید با میکروارگانیسم‌ها و آفات مختلف مقابله کنند. ظهور میکروارگانیسم‌های مقاوم به ترکیبات دفاعی رایج گیاهی، انگیزه را برای جست‌وجو عواملی با خاصیت ضد میکروبی مانند پپتیدهای ضد میکروبی (AMPs) که کمتر مورد بهره‌برداری قرار گرفته‌اند تشویق می‌کند. [1] پپتیدهای ضد میکروبی گیاهی یکی از قدیمی‌ترین اجزای ایمنی ذاتی تکاملی گیاه را شامل می‌شود که اولین خط دفاع میزبان در برابر حملات پاتوژن به حساب می‌آید. [2] AMPهای گیاهی به وفور در طبیعت یافت می‌شوند و دارای طیف گسترده و عملکرد سریع در برابر میکروارگانیسم‌ها و سمیت سلولی کم برای حیوانات هستند. آن‌ها می‌توانند علیه قارچ‌ها، ویروس‌های پوشش‌دار عمل کنند، هیدرولازهای حشرات را مهار کنند و به‌عنوان ضد ویروس، ضد تومور، ضد التهاب و تعدیل‌کننده ایمنی عمل کنند. [1] همچنین دارای اثر ضد میکروبی بالقوه‌ای هستند که به محیط‌زیست آسیب نمی‌رساند. اکثر AMPهای گیاهی غنی از سیستئین هستند و حاوی ۲ تا ۱۲ باقی‌مانده سیستئین هستند در تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی شرکت می‌کنند و به تراکم ساختار آن‌ها و همچنین مقاومت در برابر تخریب شیمیایی و پروتئولیتیک کمک می‌کند. هدف اصلی AMPها غشای سیتوپلاسمی میکروارگانیسم‌ها است که یکپارچگی آن توسط پپتیدهای گیاهی مختل می‌شود؛ بنابراین برخلاف آنتی‌بیوتیک‌های رایج که باعث تشکیل پاتوژن‌های مقاوم می‌شوند، توسعه AMPها مقاومت آن‌ها را به حداقل می‌رساند. اما برخلاف پتانسیل ضد میکروبی تجاری، کمتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. [2] گیاهان گروهی از پپتیدهای ضد میکروبی بسیار پایدار تولید می‌کنند که به کیتین، یک پلی‌ساکارید طبیعی که در اسکلت بیرونی حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها وجود دارد، متصل می‌شوند. هوئین (Hevein)، اولین عضو این گروه، یک پپتید ضد میکروبی غنی از سیستئین (CRP) با ۴۳ اسید آمینه متعلق به ابرخانواده CRPهای گیاهی است که از لاتکس درخت لاستیک (*Hevea brasiliensis*) کشف شده است [3] که ۲ تا ۶ کیلو دالتون هستند و ۶ تا ۱۰ باقی‌مانده Cys با سه تا پنج پیوند دی‌سولفیدی در آن‌ها یافت می‌شود. CRPها براساس محتوای سیستئین، فاصله سیستئین و اتصال دی‌سولفیدی به خانواده‌های مختلفی طبقه‌بندی می‌شوند. پل‌های

دی‌سولفیدی متعدد عامل پایداری هوئین در برابر حرارت، اسید و تخریب ناشی از پروتئاز هستند. [5] هوئین یک لکتین در نظر گرفته می‌شود زیرا دارای فعالیت اتصال کربوهیدرات است. بر این اساس، تمام پروتئین‌های گیاهی که حداقل یک دامنه هوئین دارند، در خانواده لکتین‌های متصل‌شونده به کیتین طبقه‌بندی می‌شوند [4]. لکتین‌ها گلیکوپروتئین‌هایی هستند که می‌توانند به‌طور برگشت‌پذیر به کربوهیدرات‌های مونومر یا اولیگومر و به سطح ویروسی متصل شوند و با قندهای خاصی مانند مانوز، لاکتوز و گلیکان‌های مختلف پیوند متقابل داشته باشند و تعامل با گیرنده‌های مشترک را متوقف کنند و کاربردهای وسیع و متنوعی داشته باشند. به‌عنوان مثال، لکتین‌های مخصوص مانوز، فعالیت ضد ویروسی را در برابر ویروس‌های مختلف نشان داده‌اند و در میان عملکردهای دفاعی پاتوژن، لکتین‌ها می‌توانند فعالیت‌های باکتری‌کشی، قارچ‌کشی را نیز انجام دهند. [5] و [6] به دلیل انعطاف‌پذیری عملکردی لکتین‌ها، آن‌ها در فرایندهای بیولوژیکی متعددی از جمله دفاع در برابر پاتوژن‌ها، همزیستی و سیگنال‌دهی سلولی درگیر هستند؛ زیرا می‌توانند به‌طور خاص به کربوهیدرات‌هایی که معمولاً در مهره‌داران و گیاهان وجود ندارند، مانند کیتین یا کربوهیدرات پپتیدوگلیکان دیواره سلولی باکتری، متصل شوند. علاوه بر این، با هدف قرار دادن کیتین، می‌توان با چندین آفات مقابله کرد؛ زیرا کیتین جزء اصلی دیواره سلولی قارچ و همچنین اسکلت بیرونی بی‌مهرگان، مانند نماتدها و حشرات است. [5]

خانواده AMP‌های شبه‌هوئین نام خود را از هوئین جدا شده از لاتکس درخت لاستیک (*Hevea brasiliensis* Moll. Arg) گرفته‌اند. این خانواده کوچک در حال حاضر شامل حدود ۲۰ عضو جدا شده از گیاهان مختلف تک و دو لپه‌ای است. AMP‌های شبه‌هوئین دارای چندین ویژگی هستند: اول این‌که، آن‌ها پپتیدهای پایه کوتاه با ۲۹-۴۵ باقی‌مانده اسید آمینه (a.a) در طول هستند که با باقی‌مانده‌های سیستئین و گلیسین غنی شده‌اند. AMP‌های کلاسیک شبه‌هوئین، از جمله هوئین، حاوی ۸ باقی‌مانده سیستئین هستند. باین‌حال، اشکال بسیاری با ۶ یا ۱۰ سیستئین وجود دارد. [2] گیاهان را می‌توان با پپتیدهای هوئین‌مانند برای استخراج آفت‌کش‌های طبیعی یا برای تولید ژنوتیپ‌هایی که در برابر عوامل بیماری‌زا مقاوم هستند غنی کرد.

کنترل جایگزین آفات و بیماری‌ها در کشاورزی برای امنیت غذایی و حفظ محیط‌زیست استراتژیک است. [1] اخیراً علاقه به پپتیدهای شبه‌هوئین افزایش یافته است. با توجه به تعداد بالای باقی‌مانده‌های سیستمین، که یک موتیف معمولی برای این AMP ها را تشکیل می‌دهند، پپتیدهای شبه‌هوئین نشان‌دهنده ترکیبات بسیار پایداری هستند که در برابر حرارت و عمل پروتئاز مقاوم هستند. محل اتصال کیتین این پپتیدها را با توانایی اتصال به کیتین، جزء اصلی دیواره سلولی پاتوژن‌ها، که در گیاهان وجود ندارد، فراهم می‌کند. همچنین در گیاهان تک و دو لپه‌ای از خانواده‌های مختلف یافت شده است. تقریباً تمام پپتیدهای شبه‌هوئین در غلظت‌های میکرومولاری خود در برابر طیف وسیعی از پاتوژن‌های گیاهی فعال هستند که اغلب علاوه بر قارچ‌ها شامل باکتری‌ها نیز می‌شوند. این و سایر ویژگی‌های مشخصه پپتیدهای این خانواده آن‌ها را به اجزای مهم ایمنی ذاتی گیاه تبدیل می‌کند. همچنین در بیوتکنولوژی برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخته با مقاومت افزایش‌یافته در برابر پاتوژن‌های گیاهی استفاده می‌شوند. تعدادی از چنین گیاهانی که پپتیدهای مشابه هوئین را بیان می‌کنند به‌دست آمده است. سعی شده است از نواحی پروموتور ژن این پپتیدها برای تولید مقادیر زیادی دارو استفاده شود. [2] به همین جهت برای تولید پپتیدهای شبه‌هوئین با خاصیت بیولوژیکی بالا توسط میزبان‌های مختلف در مهندسی ژنتیک عوامل زیادی نقش دارد که طی آن باید ویژگی‌های ساختاری، تکاملی و فیزیوشیمیایی شبه‌هوئین مورد نظر بررسی شود. هدف از این مطالعه آنالیزهای بیوانفورماتیکی پپتیدهای شبه‌هوئین مختلف به جهت بررسی روابط تکاملی، ساختار دوم، شاخص ناپایداری، شاخص آلیفاتیک و تعیین حضور یا عدم حضور پیوند دی‌سولفیدی در گونه‌های گیاهی *Arabidopsis*، *Eutrema japonicum* و *Sambucus nigra* thaliana است.

۲. تئوری و پیشینه تحقیق

در میان لکتین‌ها، حوزه هوئین بسیار رایج است که در کیمرو لکتین‌ها، هولولکتین‌ها و مرو لکتین‌ها یافت می‌شود. نام «Hevein» توسط آرچر در سال ۱۹۶۰ پیشنهاد شد. ساختار کلی دامنه هوئین از یک صفحه β ضد موازی و گاه‌آمارپیچ‌های کوتاه تشکیل

شده است. ساختار توسط سه تا پنج پیوند دی‌سولفید تثبیت می‌شود. [5] ویژگی‌های ساختاری اصلی که می‌توان برای انتساب پپتید به خانواده AMP‌های شبه‌هوئین استفاده کرد، اندازه کوچک آن (۲۹-۴۵ a.a)، مولکول با بار مثبت، فراوانی باقی‌مانده‌های گلیسین و سیستئین است (۶، ۸، یا ۱۰) و وجود موتیف مشخصه سیستئین و محل اتصال کیتین است. اولین پپتیدهای ۱۰ سیستئینی شبه‌هوئین (پپتیدهای ۱۰-C-Hev) در سال ۲۰۰۲ از پوست گل آناناس برگ نارون (*Eucommia ulmoides*) متعلق به خانواده *Eucommiaceae* جدا شد و به‌عنوان EAFP1 و EAFP2 تعیین شد. وجود پنج پیوند دی‌سولفیدی در مولکول‌های پپتید از *Eucommia* آن‌ها را بسیار پایدار کرد. به‌طور خاص، آن‌ها حتی پس از ۳۰ دقیقه جوشیدن، فعالیت ضد قارچی خود را حفظ کردند و به راحتی کریستال تشکیل دادند. [2] پپتیدهای شبه‌هوئین به‌عنوان ترکیب امیدوارکننده برای کاربردهای بیوتکنولوژیکی، از جمله در تجارت کشاورزی و برای حیوانات درمانی توصیف می‌شوند. [1] با توجه به فعالیت ضد میکروبی برجسته در برابر پاتوژن‌های گیاهی، پپتیدهای شبه‌هوئین عمده‌تاً برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخته با افزایش مقاومت در برابر میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا استفاده می‌شوند. [2] اگرچه مکانیسم عمل پپتیدهای شبه‌هوئین به‌طور کامل مشخص نشده است، اما مشخص است که پپتیدهای شبه‌هوئین قادر به مهار رشد قارچ‌های حاوی کیتین هستند. این فعالیت قارچ‌کش مربوط به دامنه اتصال به کیتین آن است، جایی که طویل شدن دیواره سلولی پس از مرحله اتصال به کیتین به تأخیر می‌افتد یا متوقف می‌شود. برخی از پپتیدها همچنین قادر به مهار رشد قارچی و یا باکتریایی بدون کیتین هستند؛ زیرا این فعالیت‌ها به سطح کاتیونی و آمفی پاتیک آن‌ها مربوط می‌شود، که می‌تواند با غشای بار منفی پاتوژن‌های هدف تعامل داشته باشد. این پپتیدها را می‌توان در کلاس انتخابی پپتیدهای ناسازگار گنجانده، جایی که یک پپتید یا یک خانواده پپتید می‌تواند تحت شرایط محیطی مختلف فعالیت‌های متعددی داشته باشد. [5] در حال حاضر، تلاش‌هایی برای استفاده از پروموتور *hevein* (pHevP) برای به‌دست آوردن گیاهان تراریخته *Hevea* که مقادیر بیشتری از پروتئین‌های نوترکیب مورد استفاده در داروسازی را تولید می‌کنند، یعنی پروتامین ۱ انسانی و پپتید ناتریورتیک دهلیزی وجود دارد.

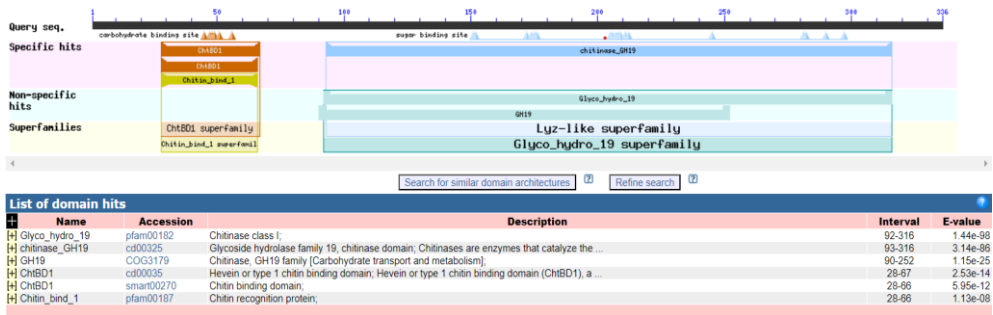
۳. مواد و روش‌ها

توالی‌های کامل نوکلئوتیدی کدکننده شبه‌هوئین گیاهان (Hevein-like mRNA complete cds) از بانک توالی نوکلئوتیدی NCBI استخراج شد و سپس از طریق protein-id توالی پروتئینی آن‌ها به فرمت FASTA به دست آمد. توالی‌های به دست آمده برای بررسی وجود دمین حفاظت شده عملکردی توسط ابزار آنالیز conserved domains در پایگاه NCBI مورد بررسی قرار گرفتند. برای تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ساختار پروتئین‌ها، از نرم‌افزار protparam موجود در وبسایت Expasy استفاده شد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی شبه‌هوئین‌ها نظیر وزن مولکولی، تعداد آمینواسیدها، نقطه ایزوالکتریک، شاخص آلیفاتیک و شاخص ناپایداری بررسی شد. برای بررسی ساختار دوم پروتئین‌ها از وبسایت Sopma و Psipred استفاده شد. برای بررسی حضور یا عدم حضور پیوند دی‌سولفیدی در شبه‌هوئین‌ها، از وبسایت آنالیز softberry استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی و آنالیز تجزیه کلاستر حاصل از توالی‌های به دست آمده با نرم‌افزار MEGA6 رسم شد. توالی‌ها با روش ClastalW هم‌ردیف شدند و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش neighbor-joining رسم شد. سپس روابط توالی‌ها از طریق محاسبه فاصله ژنتیکی آن‌ها نسبت به یکدیگر بررسی شد. از طریق نرم‌افزار megaAlign هم‌ردیفی توالی‌های پروتئین‌های شبه‌هوئین انجام شد و جایگزینی آمینواسیدهای پروتئین‌های خویشاوند و تغییرات خواص‌شان مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی وجود یا عدم وجود سیگنال پپتید در توالی آمینواسیدی مورد مطالعه و همچنین محل هدف شبه‌هوئین‌ها از ابزارهای برخط SignalP6 و DeepLoc2.1 استفاده شد.

۴. نتایج و بحث

با بررسی دمین‌های حفاظت شده عملکردی شبه‌هوئین‌ها مشخص شد که در همه پروتئین‌های شبه‌هوئین گیاهان مورد مطالعه دمینی از خانواده هوئین با دامنه اتصال کیتین نوع ۱ به نام (Hevein or type 1 chitin binding domain (ChtBD1)) با شماره دسترسی cl16916 یافت می‌شود. همچنین گونه *Sambucus nigra* علاوه بر

دمین ذکر شده دارای دو دمین عملکردی دیگر به نام‌های Glyco_hydro_19 با شماره دسترسی pfam00182 و chitinase_GH19 با شماره دسترسی cd00325 است. همچنین در گونه‌های *Eutrema japonicum* و *Arabidopsis thaliana* دمین عملکردی دیگری به نام DPBB_barwin-like با شماره دسترسی cd22777 یافت می‌شود (شکل ۱). همچنین در شناسایی و اتصال زیر واحدهای کیتین، که اغلب در دامنه‌های N ترمینال به گلیکوزیل هیدرولاز در کیتینازها وجود دارند، نقش دارد.



شکل ۱. دمین حفاظت شده در شبه‌هوئین‌های مورد مطالعه

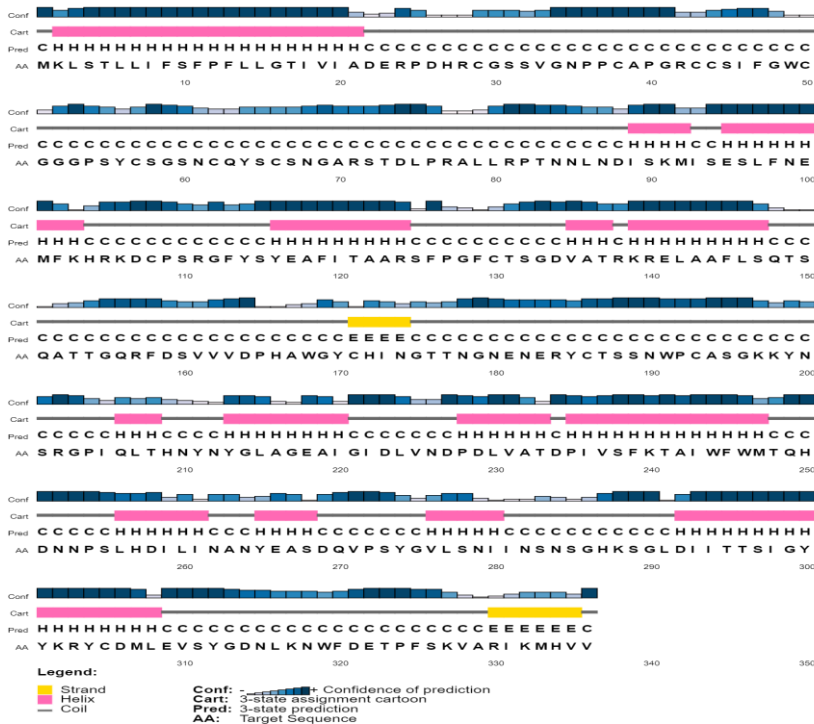
بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی شبه‌هوئین‌ها نشان داد که تعداد آمینواسیدها در این پروتئین‌ها در محدوده ۲۱۲ تا ۳۳۶ است و دارای جرم مولکولی ۲۴۸۹۲/۶۴ تا ۳۷۱۴۴/۶۹ هستند. شاخص ناپایداری شبه‌هوئین‌ها در بازه ۱۵/۰۷ تا ۳۲/۲۹ بود. شاخص ناپایداری پروتئین‌ها میزان ثبات یک پروتئین براساس ترکیب اسید آمینه موجود در آن پیش‌بینی می‌کند. همچنین بیانگر میزان پایداری آن‌ها در لوله آزمایش است. اگر این شاخص پایین‌تر از ۴۰ باشد، به‌عنوان یک پروتئین پایدار طبقه‌بندی می‌شود. درحالی‌که مقدار بیش از ۴۰ نشان‌دهنده بی‌ثباتی بالقوه است. با توجه به این موضوع همه پروتئین‌های مورد بررسی پایدار بوده که در بین آن‌ها پایدارترین شبه‌هوئین متعلق به گونه *Sambucus nigra* با شاخص ناپایداری ۱۵/۰۷ می‌باشد. نقطه ایزوالکتریک این پروتئین‌ها در محدوده ۵/۲۹ تا ۷/۸۹ بود که بیشتر این پپتیدها در محدوده اسیدی قرار داشتند و بیشترین درصد اسیدی مربوط به شبه‌هوئین گونه *Sambucus nigra* با شماره دسترسی AAD11407.1 بود. میان پپتیدهای مورد مطالعه بیشترین درصد قلیایی مربوط به شبه‌هوئین با شماره دسترسی AAM66966.1 بود. pH

ایزوالکتریک نقطه‌ای است که در آن بار خالص الکتریکی پروتئین برابر صفر است. همچنین نقطه ایزوالکتریک نقش مهمی در جداسازی و خالص‌سازی پروتئین‌ها دارد؛ زیرا نشان‌دهنده pH است که در آن حلالیت معمولاً حداقل است. شاخص آلیفاتیک بین ۶۲/۵۹ تا ۷۰/۹۳ است. شاخص آلیفاتیک اندازه‌گیری حجم نسبی اشغال شده توسط زنجیره‌های جانبی آلیفاتیک (آلانین، والین، ایزولوسین و لوسین) در یک توالی پروتئین است (Protparam - Documentation). پروتئین‌هایی با شاخص آلیفاتیک بالاتر معمولاً در طیف وسیع‌تری از دما پایدارتر هستند. [7] با توجه به آنالیزهای بیوانفورماتیکی شبه‌هوئین‌های گونه *Sambucus nigra*، دارای بیشترین شاخص آلیفاتیک بین دیگر پروتئین‌ها هستند که در بین آن‌ها شبه‌هوئین با شماره دسترسی AAD11407.1 دارای بیشترین شاخص آلیفاتیک برابر با ۷۰,۹۳ می‌باشد. GRAVY بین ۰/۲۳۸ - تا ۰/۲۱۸ است. شاخص GRAVY یک مقدار عددی است که نشان‌دهنده آبگریزی یا آب‌دوستی کلی یک پروتئین یا دنباله‌ای از اسیدهای آمینه است. با جمع کردن مقادیر هیدروپاتی هر اسید آمینه در توالی و تقسیم بر تعداد کل اسیدهای آمینه محاسبه می‌شود. GRAVY پایین یکی از ویژگی‌های پروتئین‌های مقاوم در برابر حرارت است. [8] با محاسبه بار خالص شبه‌هوئین‌ها نشان داده شد که نیمی از آن‌ها دارای بار مثبت و نیمی دارای بار منفی هستند (جدول ۱).

جدول ۱. بررسی خواص فیزیکوشیمیایی شبه‌هوئین‌ها

Plant	Protein name	length	Mw (KDa)	pI	(Arg + Lys)	(Asp + Glu)	Aliphatic index	Instability index	GRAVY
<i>Sambucus nigra</i>	Hevein-like	333	37077.61	5.68	26	33	69.76	30.13	-0.283
	Hevein-like	336	37144.69	6.73	10	4	70.36	19.79	0.218
	Hevein-like	330	36732.20	5.82	25	31	70.36	15.07	0.086
	Hevein-like	333	36922.30	5.29	24	34	70.93	32.29	-0.258
<i>Eutrema japonicum</i>	Hevein-like	231	24892.64	7.39	16	15	63.81	23.24	-0.328
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Hevein-like protein precursor	212	22936.63	7.89	17	15	62.59	22.07	-0.327

در بررسی ساختار دوم شبه‌هوئین‌ها، Alpha helix در محدوده ۲۸/۸۳-۱۶/۰۲٪، Extended strand در محدوده ۲۷/۲۷-۱۱/۱۱٪، Beta turn در محدوده ۴/۵۵-۱۰/۳۹٪ و Random coil در محدوده ۴۶/۳۲-۵۵/۳۶٪ بود (جدول ۲). براساس نتایج به‌دست آمده از ساختار دوم شبه‌هوئین‌ها، درصد Random coil به نسبت ساختارهای دیگر در مجموع بیشتر است و شبه‌هوئین با شماره دسترسی AAL30422.1 در گونه *Sambucus nigra* بیشترین درصد ساختار Random coil را با ۵۵/۳۶٪ در بین گونه‌های مورد بررسی داشت. همچنین شبه‌هوئین AAD11406.1 دارای بیشترین درصد ساختار Alpha helix با ۲۸/۸۳٪ بود. کمترین درصد ساختار Beta turn با ۴/۵۵٪ متعلق به شبه‌هوئین با شماره دسترسی AAL30421.1 است. طی مطالعات گذشته نشان داده شده است که Alpha helix نقش به‌سزایی در پایداری ساختاری و مقاومت حرارتی پپتیدهای کروی دارد (شکل ۲). [9]



شکل ۲. پیش‌بینی ساختار دوم توسط نرم‌افزار PSIPRED

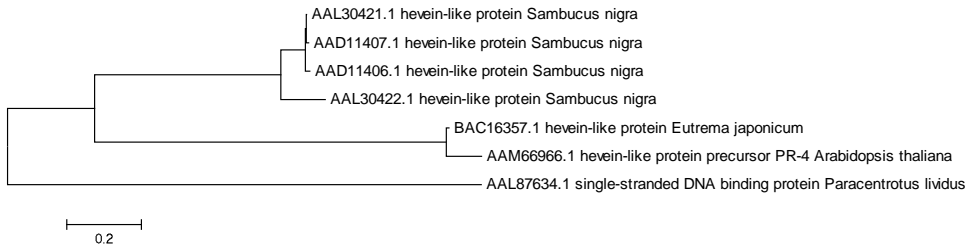
جدول ۲. آنالیز ساختار دوم شبه‌هوئین‌ها

Plant species	Protein ID	Alpha helix (%)	Extended strand (%)	Beta turn (%)	Random coil (%)
<i>Sambucus nigra</i>	AAD11406.1	28.83%	12.01%	6.01%	53.15%
	AAL30422.1	23.81%	16.07%	4.76%	55.36%
	AAL30421.1	27.88%	13.64%	4.55%	53.94%
	AAD11407.1	27.93%	11.11%	6.01%	54.95%
<i>Eutrema japonicum</i>	BAC16357.1	16.02%	27.27%	10.39%	46.32%
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM66966.1	16.98%	20.28%	8.49%	54.25%

نتایج حاصل از بررسی پیوند دی‌سولفیدی شبه‌هوئین‌ها توسط وب‌سایت softberry مشخص کرد که تمامی این پپتیدها دارای اسید آمینه سیستئین بوده و بیشتر این سیستئین‌ها در تشکیل پیوند دی‌سولفیدی شرکت می‌کنند. در این بررسی مشخص شد که شبه‌هوئین گونه *Eutrema japonicum* با شماره دسترسی BAC16357.1 دارای بیشترین تعداد سیستئین (۱۵ تا) و همچنین بیشترین پیوند دی‌سولفیدی (۷ تا) است. مابقی شبه‌هوئین‌ها دارای ۱۴ اسید آمینه سیستئین بوده که از این مقدار ۱۲ آمینواسید در تشکیل پیوند دی‌سولفیدی شرکت کرده که موجب تشکیل ۶ پیوند دی‌سولفیدی می‌شوند. به‌خوبی شناخته شده است که پیوندهای دی‌سولفیدی عامل اصلی مقاومت حرارتی پروتئین‌ها هستند. [10] پیوندهای دی‌سولفیدی نقش مهمی در عملکرد بیولوژیکی این پروتئین‌ها ایفا می‌کنند که بین دو باقی‌مانده سیستئین ایجاد می‌شوند و باعث تشکیل پیوند کووالانسی می‌شود که در ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها نقش مهمی دارد که پایداری آن‌ها را تعدیل می‌کنند و دینامیک ساختاری آن‌ها را محدود می‌کنند. [11]

با بررسی نتایج تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی شبه‌هوئین‌ها گیاهان مختلف مشخص شد که این پروتئین‌ها به دو گروه یا کلاستر کلی تقسیم می‌شوند که شبه‌هوئین‌های *Eutrema japonicum* و *Arabidopsis thaliana* در یک گروه و بقیه که همگی جزو گونه *Sambucus nigra* هستند در گروه دیگر قرار گرفتند. شبه‌هوئین‌های این گروه

کمترین فاصله ژنتیکی را نسبت به یکدیگر دارند (شکل ۳).



شکل ۳. درخت فیلوژنتیکی شبه‌هوئین‌ها در گیاهان مختلف

طی بررسی نتایج حاصل از Distance مشخص شد که شبه‌هوئین‌های گونه *Sambucus nigra* دارای فاصله ژنتیکی کمتری نسبت به یکدیگر هستند. در این گونه پروتئین‌ها با شماره دسترسی AAL30421.1 و AAL30407.1 دارای کمترین فاصله ژنتیکی بین پروتئین‌ها در این گروه هستند؛ به طوری که فاصله آن‌ها ۰/۰۰۷ است و با توجه به شکل حاصل از رسم درخت فیلوژنی در یک گروه قرار می‌گیرند. همچنین شبه‌هوئین‌های AAL30421.1 و AAL30406.1 در با فاصله ژنتیکی ۰/۰۱۴ در رتبه دوم قرار می‌گیرند (شکل ۲). این بررسی تأییدکننده نتایج درخت فیلوژنتیکی می‌باشد (شکل ۴).

	1	2	3	4	5	6	7
1. AAD11406.1 hevein-like protein <i>Sambucus nigra</i>							
2. AAL30422.1 hevein-like protein <i>Sambucus nigra</i>	0.189						
3. AAL30421.1 hevein-like protein <i>Sambucus nigra</i>	0.014	0.189					
4. AAD11407.1 hevein-like protein <i>Sambucus nigra</i>	0.021	0.198	0.007				
5. BAC16357.1 hevein-like protein <i>Eutrema japonicum</i>	1.543	1.609	1.511	1.511			
6. AAM66966.1 hevein-like protein precursor PR-4 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1.609	1.681	1.576	1.576	0.102		
7. AAL87634.1 single-stranded DNA binding protein <i>Paracentrotus lividus</i>	2.086	2.086	2.086	2.086	2.412	2.579	

شکل ۴. بررسی فاصله ژنتیکی بین توالی‌های شبه‌هوئین

با توجه به بررسی‌های حاصل از هم‌ردیفی دو شبه‌هوئین که فاصله ژنتیکی آن‌ها ۰/۰۰۷ است، شبه‌هوئین با protein-id (AAL30421.1) در طول تکامل کوتاه شده و ۳ آمینواسید کمتر از شبه‌هوئین همان گونه با protein-id (AAD11407.1) دارد. در این دو توالی ۱۲ جایگزینی صورت گرفته که از این تعداد ۲ جایگزینی غیرقطبی به قطبی، ۲ جایگزینی منفی به مثبت، ۲ جایگزینی منفی به بدون بار و ۱ جایگزینی غیرقطبی بدون

بار به قطبی مثبت بوده است. طی بررسی‌ها در توالی AAL30421.1 ۲ آمینواسید اسپارژین (N) با ۲ آمینواسید اسپاراتات (D) جایگزین شده که موجب کاهش بار منفی در پروتئین شده است. همچنین در این توالی جایگزینی آمینواسید آرژنین (R) با آمینواسید گلیسین (G) موجب افزایش بار مثبت می‌شود. در دو توالی مورد بررسی جایگزینی آمینواسید سرین (S) با آمینواسید گلیسین (G) و جایگزینی آمینواسید لایزین (K) با آمینواسید گلوتمات (E) مشترک بوده که به ترتیب موجب ایجاد خاصیت قطبی و ایجاد بار مثبت می‌شود. طی هم‌ردیفی مشخص شد طی تکامل، جهش‌هایی در این پروتئین‌ها به‌وجود آمده است که موجب تغییر در بعضی از خواص آن‌ها مانند بار الکتریکی و قطبیت شده است؛ به‌طوری که میزان بار خالص شبه‌هوئین AAL30421.1 مثبت‌تر از شبه‌هوئین AAD11407.1 شده است (شکل ۵).

Majority	MKLSILLILSFPFLGLTIVFADDADNGPWQCGRDAGGALCHDNLCCSFWG	
	10 20 30 40 50	
AAL30421.1.seq	MKLSTLLILSFPFLGLTIVFADN---GPWQCGRDAGGALCHDNLCCSFWG	47
AAD11407.1.seq	MKLSTLLILSFPFLGLTIVFADDADNGPWQCGRDAGGALCHDNLCCSFWG	50
Majority	FCGSTYQYCEDGQCQSCQCRDITGLRLDLPRALLRPTNRRNAISKMISKSLFN	
	60 70 80 90 100	
AAL30421.1.seq	FCGSTYQYCEDGQCQSCQCRDITGLRLDLPRALLRPTNRRNAISKMISKSLFN	97
AAD11407.1.seq	FCGSTYQYCEDGQCQSCQCRDTA RLTDLPRALLRPTNRRNAISKMISKSLFN	100
Majority	EMFKHRNDPCPSRGFYSEAFITAAGSFPGFCTISGDVATRKRRELA AFLSQT	
	110 120 130 140 150	
AAL30421.1.seq	EMFKHRNDPCPSRGFYSEAFITAA R S F P S FCTISGDVATRKRRELA AFLSQT	147
AAD11407.1.seq	EMFKHRNDPCPSRGFYSEAFITAAGSFPGFCTISGDVATRKRRELA AFLSQT	150
Majority	SQATTGGRLDSAVVDPHAWGYCYVNGTITDEQYCTSSNWPFCASGKQYNSRG	
	160 170 180 190 200	
AAL30421.1.seq	SQATTGGRLDSAVVDPHAWGYCYVNGTITDEQYCTSSNWPFCASGKQYNSRG	197
AAD11407.1.seq	SQATTGGRLDSAVVDPHAWGYCYVNGTITDEQYCTSSNWPFCASGKQYNSRG	200
Majority	PIQLTHNYYGLAGEALGIDLNVHPDLVATDPIVSFKTAIWFWMTOHDNN	
	210 220 230 240 250	
AAL30421.1.seq	PIQLTHNYYGLAGEALGIDLNVHPDLVATDPIVSFKTAIWFWMTOHDNN	247
AAD11407.1.seq	PIQLTHNYYGLAGEALGIDLNVHPDLVATDPIVSFKTAIWFWMTOHDNN	250
Majority	PSLHDILINANSEASDQVPSYGVISEIIDSNIHQSGLDITITTSIGYYKR	
	260 270 280 290 300	
AAL30421.1.seq	PSLHDILINANSEASDQVPSYGVIS R I I N S N FGHQSGLDITITTSIGYYKR	297
AAD11407.1.seq	PSLHDILINANSEASDQVPSYGVISEIIDSNIHQSGSLDITITTSIGYYKR	300
Majority	YCDMLEVSYGDNLNWFDETFPFSKVAHIKMSV	
	310 320 330	
AAL30421.1.seq	YCDMLEVSYGDNLNWFDETFP T K V Y H I K M S V	330
AAD11407.1.seq	YCDMLEVSYGDNL R N W F D E T P F S K V A H I K M S V	333

Decoration 'Decoration #1': Shade (with solid bright cobalt) residues that match the Consensus exactly.

شکل ۵. هم‌ردیفی چندگانه توالی‌ها

۶. مراجع

1. Games , P. D., et al. (2016). “**Computer aided identification of a Hevein-like antimicrobial peptide of bell pepper leaves for biotechnological use,**” *BMC Genomics*, vol. 17, no. Suppl 12, pp. 1–13, , doi: 10.1186/s12864-016-3332-8.
2. Slavokhotova, A. A., Shelenkov, A. A., Andreev, Y. A., and Odintsova, T. I. (2017). “**Hevein-like antimicrobial peptides of plants,**” *Biochem.*, vol. 82, no. 13, pp. 1659–1674, doi: 10.1134/s0006297917130065.
3. Loo, S., et al. (2021). “**Anti-fungal hevein-like peptides biosynthesized from quinoa cleavable hololectins,**” *Molecules*, vol. 26, no. 19, pp. 1–17, doi: 10.3390/molecules26195909.
4. Van Damme, E. J. M., et al, (1999). “**A gene encoding a hevein-like protein from elderberry fruits is homologous to PR-4 and class V chitinase genes,**” *Plant Physiol.*, vol. 119, no. 4, pp. 1547–1556, doi: 10.1104/pp.119.4.1547.
5. Porto , W. F., Souza, V. A., Nolasco, D. O., and Franco, O. L. (2012). “**In silico identification of novel hevein-like peptide precursors,**” *Peptides*, vol. 38, no. 1, pp. 127–136, doi: 10.1016/j.peptides.2012.07.025.
6. Naik , S. and Kumar, S. (2022). “**Lectins from plants and algae act as anti-viral against HIV, influenza and coronaviruses,**” *Mol. Biol. Rep.*, vol. 49, no. 12, pp. 12239–12246, doi: 10.1007/s11033-022-07854-8.
7. Ikai , A. (1980). “**Thermostability and aliphatic index of globular proteins,**” *J. Biochem.*, vol. 88, no. 6, pp. 1895–1898, doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133168.
8. Chang, K. Y. and Yang, J. R. (2013). “**Analysis and Prediction of Highly Effective Antiviral Peptides Based on Random Forests,**” *PLoS One*, vol. 8, no. 8, doi: 10.1371/journal.pone.0070166.
9. Yakimov, A. P., Afanaseva, A. S., Khodorkovskiy, M. A., and Petukhov, M. G. (2016). “**Design of Stable α -Helical Peptides and Thermostable Proteins in Biotechnology and Biomedicine,**” *Acta Naturae*, vol. 8, no. 4, pp. 70–81, doi: 10.32607/20758251-2016-8-4-70-81.
10. Akazawa-Ogawa, Y., Uegaki, K., and Hagihara, Y. (2016). “**The role of intradomain disulfide bonds in heat-induced irreversible denaturation of camelid single domain VHH antibodies,**” *J. Biochem.*, vol. 159, no. 1, pp. 111–121, doi: 10.1093/jb/mvv082.
11. Manteca, A., Alonso-Caballero, Á., Fertin, Poly, M., De Sancho, S., D., and Perez-Jimenez, R. (2017). “**The influence of disulfide bonds on the mechanical stability of proteins is context dependent,**” *J. Biol. Chem.*, vol. 292, no. 32, pp. 13374–13380, doi: 10.1074/jbc.M117.784934.