



بررسی شباهت ها و تفاوت های ترانسپورترهای آمونیوم گیاهی و انسانی

تارخ احسان^{۱*}، دلاوری آذر^۲، ابراهیمی اسماعیل^{۳**}

*^۱- دانشجوی کارشناسی بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، ehsan.tarokh@yahoo.com

^۲- دانشجوی کارشناسی ارشد پژوهشکده ی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، biotech_dlvtr@yahoo.com

^۳** - استادیار بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده ی کشاورزی، دانشگاه شیراز، ebrahimie@shirazu.ac.ir

چکیده

آمونیم یکی از بهترین منابع نیتروژن در ارگانسیم های زنده می باشد که انتقال آن از میان غشای سلولی آن ها یک فرآیند مهم بنیادی است. انتقال غشایی آمونیم توسط پروتئین های ترانسپورتر آمونیم متعلق به خانواده ی پروتئین ترانسپورتر آمونیم / متیل آمین پرمیاز / رزوس پروتئین انجام می گیرد. در انسان پروتئین های رزوس گروه خونی (Rh) به این خانواده ی پروتئینی تعلق دارند که نقش آن هنوز ناشناخته باقی مانده است، ولی در گیاهان نقش این پروتئین به عنوان انتقال دهنده ی آمونیم شناخته شده است. از آن جا که نقش خانواده ی پروتئینی ترانسپورترهای آمونیم در موجودات زنده ی مختلف فرق دارد، در این مطالعه به مقایسه ی توالی های اسید آمینه ای این خانواده ی پروتئینی در بین انسان و گیاهان پرداخته ایم. ویژگی های مربوط به این پروتئین ها در دو گروه گیاهان و انسان مورد بررسی قرار گرفت و ویژگی هایی که در بین این دو گروه متفاوت است معرفی و شناسایی شد. در این پژوهش از فرآیند Feature selection استفاده شده است، که ابزاری مناسب در بیوانفورماتیک می باشد و با استفاده از آن مهمترین ویژگی ها مشخص می شوند. این ویژگی ها با استفاده از معنی داری مقدار P داده ها، بر اساس آزمون F-Test مهم تشخیص داده می شوند. سپس مقایسه ی میانگین با استفاده از آزمون t-Test و آمار توصیفی روی داده ها انجام شد. همان طور که نتایج نشان داد میانگین تعداد لوسین و والین که تعیین کننده ی میزان خطی بودن پروتئین هستند و همچنین میانگین فراوانی پرولین و تعداد والین که تعیین کننده ی میزان آبگریزی پروتئین است در انسان بیشتر می باشد. در مقابل آن، میانگین فراوانی آلانین، گلیسین، تریپتوفان و تیروزین در گیاهان بیشتر است.

واژه های کلیدی: ترانسپورترهای آمونیم، Feature selection، آبدوست، آبگریز، بیوانفورماتیک



مقدمه

آمونیم یکی از بهترین منابع نیتروژن در ارگانیزم‌های زنده می‌باشد که انتقال آن از میان غشای سلولی آن‌ها یک فرآیند مهم بنیادی است. از آن‌جا که لایه‌ی میانی غشای سلولی آبگریز است مولکول‌های قطبی نمی‌توانند وارد سلول شوند. برای انتقال مولکول‌های قطبی راه‌های مختلفی از جمله کانال‌های پروتئینی و پروتئین‌های ناقل وجود دارد که هر کدام وظیفه‌ی انتقال مولکول‌های خاصی را به عهده دارند. انتقال غشایی آمونیم توسط ترانسپورترهای آمونیم متعلق به خانواده‌ی پروتئینی، ترانسپورتر آمونیم/ متیل آمین پرمناز / رزوس پروتئین^۱ انجام می‌گیرد (۳). این خانواده‌ی پروتئینی در همه‌ی سلسله‌های موجودات زنده یافت می‌شود. ژن‌هایی که ترانسپورترهای آمونیم را کد می‌کنند پروتئین‌هایی را تولید می‌کنند که آبگریز هستند و به طور کلی بین ۴۰۰ تا ۴۵۰ اسید آمینه دارند و در باکتری‌ها، آرکی باکتری‌ها^۲، قارچ‌ها، گیاهان، نماتدها، حشرات و انسان یافت می‌شوند (۷). در حال حاضر، بیش از ۲۰۰ ژن متعلق به خانواده‌ی Mep/AMT/Rh شناخته شده است. پروتئین‌های مربوط به آن‌ها دارای ۱۰ تا ۱۲ هلیکس تراغشایی^۳ با انتهای کربوکسیلی سیتوپلاسمی هستند (۷). خانواده‌ی پروتئین‌های غشایی که جذب آمونیم را انجام می‌دهند به عنوان خانواده‌ی ترانسپورترهای آمونیم^۴ شناخته می‌شوند (۴). نقش زیستی پروتئین‌های ترانسپورتر آمونیم جذب آمونیم در غلظت‌های کم آن می‌باشد. همه‌ی پروتئین‌های AMT که قبلاً مورد بررسی قرار گرفته اند در غشای پلاسمایی قرار داشته‌اند، که دلالت بر نقش آن‌ها در استفاده‌ی سلول‌های گیاهی از آمونیم دارد (۶). اخیراً شباهت مولکولی این ترانسپورترها در بسیاری از ارگانیزم‌های مختلف شناسایی شده است (۶). بر اساس تجزیه و تحلیل توالی‌ها، پروتئین‌های رزوس گروه خونی^۵ (Rh) انسان به خانواده‌ی Mep/Amt (۲) مربوط می‌باشند. نقش دقیق این پروتئین در انسان هنوز ناشناخته باقی‌مانده است. خانواده‌ی Rh از آنتی ژن‌های گروه خونی اریترویید و همولوگ‌های غیر اریتروییدی تشکیل شده‌اند که در بافت‌های کلیه، کبد و پوست بیان می‌شوند (۱). آزمایش‌های دیگر ثابت کرد که پروتئین Rh انسانی باعث رشد یک موتانت از مخمر شد که کمبود آمونیم داشت (۳). این نشان می‌دهد که این گروه از پروتئین‌ها می‌توانند به عنوان Amt عمل کنند. انتقال آمونیم در ارگانیزم‌های مختلف و بافت‌های متفاوت در یک ارگانیزم متفاوت می‌باشد. مثلاً^۵ LeAmt1 در گیاهان⁺ NH₄ را انتقال می‌دهد در صورتی که RhCG نوع خنثی را انتقال می‌دهد (۵). این مطلب این فرضیه را ایجاد کرد که Amt‌های گیاهان و پستانداران یا Amt‌های نوع Rh مشخصات کارکردی متفاوتی را دارند. از آن‌جا که نقش خانواده‌ی پروتئینی Amt در موجودات زنده‌ی مختلف فرق دارد، در این مطالعه به مقایسه‌ی توالی‌های اسید آمینه‌ای این خانواده‌ی پروتئینی در بین انسان و گیاهان پرداخته‌ایم. ویژگی‌های مربوط به این پروتئین‌ها در هر دو گروه مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از Feature Selection ویژگی‌هایی که در بین این دو گروه متفاوت است معرفی و شناسایی شدند. Feature selection ابزاری مناسب در بیوانفورماتیک است و زمانی استفاده می‌شود که با انبوهی از داده‌ها رو به رو هستیم. ویژگی‌ها با استفاده از معنی‌داری مقدار P داده‌ها بر اساس آزمون F-Test که روی آن‌ها انجام می‌شود درجه‌بندی و به آن‌ها نمره داده می‌شود. درجه‌بندی داده‌ها به صورت marginal important و unimportant مشخص می‌شود. داده‌هایی که دارای اطلاعات مرتبط نیستند حذف می‌شوند. ویژگی‌های باقی‌مانده در شناسایی بهتر این دو خانواده‌ی پروتئینی کمک خواهند کرد و با بررسی‌های دقیق‌تر شاید بتوان با ایجاد تغییراتی در

¹. Ammonium Transporter/Methylamine permease/ Rhesus Protein Family

². Archeabacteria

³. Transmembrane Helices

⁴. Ammonium Transporter Family (AMT)

⁵. Rhesus blood group protein



پروتئین رزوس انسانی و انتقال به گیاهان جهت ارتقای فعالیت ترانسپورترهای آمونیوم در سلول‌های گیاهی و بالعکس و یا حتی ایجاد ترانسپورترهای فوق فعال استفاده کرد.

مواد و روش ها

مجموعه‌ی رکوردهای مورد بررسی در این پژوهش، از خصوصیات توالی‌های اسید آمینه‌ای تشکیل شده است و مربوط به خانواده‌ی پروتئینی Amt در گیاهان و انسان می‌باشد. برای مطالعه خصوصیات ۲۵ توالی اسید آمینه‌ای مربوط به خانواده‌ی پروتئینی Amt از سایت Expasy (<http://au.expasy.org>) گرفته شد که تعداد ۹ اسید آمینه متعلق به انسان و ۱۳ مورد به گیاهان مربوط می‌شود. ۷۴ ویژگی مربوط به ساختار اول این توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارها و بانک‌های اطلاعاتی مختلف استخراج شد. به عنوان مثال، این ویژگی‌ها شامل تعداد و فراوانی اسیدهای آمینه، عناصر (کربن، هیدروژن، اکسیژن، گوگرد و نیتروژن) و سیستئین احیا شده و احیا نشده، آگریزی و آبدوستی که تعداد و فراوانی اسیدهای آمینه‌ی آگریز و آبدوست را بیان می‌کند، نوع بار، طول توالی و وزن مولکولی، نیمه عمر در پستانداران، مخمر و باکتری اثرشیاکلی، شاخص خطی بودن (که به وجود اسیدهای آمینه‌ی خطی بستگی دارد) و محل اتصال به فلزات می‌باشد. در این بررسی Feature Selection انجام شد تا ویژگی‌های مهم شناسایی شوند.

در مرحله‌ی بعد توالی‌های خانواده‌ی پروتئینی ترانسپورتر آمونیوم در دو گروه گیاه و انسان به صورت دو تیمار مختلف و ویژگی‌هایی که در Feature selection به عنوان ویژگی مهم معرفی شدند به عنوان پارامتر در نظر گرفته شدند. در تجزیه و تحلیل آماری از آزمون مقایسه‌ی میانگین t-Test برای مقایسه‌ی میانگین بین این دو تیمار و تاثیر آن‌ها بر روی پارامترها انجام شد. معنی‌داری بین ویژگی‌ها و تیمارها مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین رابطه‌ی بین ویژگی‌های مهم معرفی شده و تیمارها آمار توصیفی نیز انجام شد که نتایج را می‌توان در جدول ۱ در قسمت بحث و نتایج مشاهده کرد.

نتایج و بحث

انجام Feature selection نشان داد که از بین این ویژگی‌های استخراج شده ۱۳ ویژگی مهم و در بین انسان و گیاهان متفاوت می‌باشند. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود فراوانی پرولین و تعداد والین به عنوان ویژگی‌های مهم معرفی شده‌اند. این دو اسید آمینه جز اسید آمینه‌های آگریز هستند و در خصوصیت آگریز یا آبدوست بودن این خانواده‌ی پروتئینی موثر می‌باشند. نتایج آمار توصیفی نشان داد که میانگین فراوانی پرولین و تعداد والین در انسان بیشتر از گیاهان می‌باشد و در نتیجه این خانواده‌ی پروتئینی در انسان دارای خاصیت آگریزی بیشتری می‌باشد. مطالعه‌ی قبلی نشان داده است که ایجاد موتاسیون در والین ۱۳۴ در RhCG باعث کاهش جذب آمونیوم شده است (۶). پس این اسید آمینه نقش مهمی در انتقال آمونیوم دارد. تعداد لوسین و والین و فراوانی آلانین از ویژگی‌های مهم معرفی شده هستند. این اسیدهای آمینه در دسته‌ی اسید آمینه‌های خطی قرار دارند که روی میزان خطی بودن اسید آمینه تاثیرگذار هستند.

آزمون t-Test تفاوت معنی‌داری را در سطح ۰/۰۵ میان دو گروه انسان و گیاه نشان داد. پس میزان خطی بودن این پروتئین در این دو گروه متفاوت است. میانگین تعداد لوسین و والین در انسان نسبت به گیاهان بیشتر است. در مقابل،



میانگین فراوانی آلانین، گلایسین، تریپتوفان و تیروزین در گیاهان بیشتر است. با توجه به مطالعات قبلی که بر روی ساختار آن صورت گرفته است لبهی خارجی منفذ ترانسپورتر آمونیوم دارای اسیدهای آمینهی خطی مثل تریپتوفان و فنیل آلانین می باشد که در جذب آمونیوم موثر است (۳).

جدول ۱. Feature selection و تجزیه و تحلیل آماری انجام گرفته بر روی داده ها

| Feature selection | | | t-Test | | | | |
|-------------------|--------------------|-------|----------------|---------------------|---------------|---------------------|----------|
| ترتیب | خصوصیات | نمره | میانگین(انسان) | انحراف معیار(انسان) | میانگین(گیاه) | انحراف معیار (گیاه) | P value |
| ۱ | فراوانی گلوتامین | ۱ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۰۸۵ | ۰/۰۲۰ | ۰/۰۰۷۲ | ** |
| ۲ | فراوانی تیروزین | ۰/۹۹۹ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۰۸۴ | ۰/۰۳۹ | ۰/۰۰۵۳ | ۰/۰۰۱** |
| ۳ | فراوانی آلانین | ۰/۹۹۷ | ۰/۰۸۵ | ۰/۰۱۴۳ | ۰/۱۱۵ | ۰/۰۲۳۹ | ۰/۰۰۲۹** |
| ۴ | سیستئین احیاء شده | ۰/۹۹۵ | ۱/۰۶۰ | ۰/۵۱۰ | ۱/۷۱۴ | ۰/۴۵۳۰ | ۰/۰۰۵** |
| ۵ | سیستئین احیاء نشده | ۰/۹۹۵ | ۱/۰۶۸ | ۰/۵۱۲۰ | ۱/۷۲۲ | ۰/۴۵۳۸ | ۰/۰۰۵** |
| ۶ | فراوانی گلایسین | ۰/۹۹۴ | ۱/۰۸۱ | ۰/۰۲۱۵ | ۰/۱۱۵ | ۰/۰۲۸۴ | ۰/۰۰۶** |
| ۷ | فراوانی تریپتوفان | ۰/۹۸۴ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۰۸۷ | ۰/۰۲۴ | ۰/۰۰۸۱ | ۰/۰۱۶* |
| ۸ | فراوانی پرولین | ۰/۹۷۸ | ۰/۰۴۷ | ۰/۰۱۲۶ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۰۷۵ | ۰/۰۲۱* |
| ۹ | تعداد متیونین | ۰/۹۷۴ | ۲۹/۵۶۰ | ۲۶/۹۶۰۰ | ۱۱/۵۳۸ | ۳/۹۷۱۰ | ۰/۰۲۶* |
| ۱۰ | تعداد لوسین | ۰/۹۷۱ | ۱۲۱ | ۱۱۳/۸۰۰ | ۴۷/۰۷۷ | ۱۱/۱۱۶۵ | ۰/۰۲۹* |
| ۱۱ | تعداد گوگرد | ۰/۹۶۹ | ۴۵/۲۰۰ | ۴۱/۷۰۰ | ۱۸/۳۰۸ | ۶/۲۵۰۱ | ۰/۰۳۱* |
| ۱۲ | تعداد والین | ۰/۹۶۱ | ۹۴/۲۰۰ | ۱۰۱/۹۰۰ | ۳۲/۵۳۸ | ۴/۵۲۰۶ | ۰/۰۲۹* |
| ۱۳ | تعداد گلوتامین | ۰/۹۵۶ | ۵۳/۸۰۰ | ۷۴ | ۹/۹۲۳ | ۴/۷۸۶۵ | ۰/۰۴۴* |

به طور کلی می توان این گونه بیان کرد که این خانوادهی پروتئینی در انسان نسبت به گیاهان آبگریز تر و دارای شاخص خطی بالاتری می باشد. در آخر با توجه به نتایج این تحقیق و همچنین نقش مشابه ترانسپورترهای آمونیوم در گیاه و انسان این می توان به این مهم پی برد که با ایجاد تغییراتی در ترانسپورترهای آمونیوم در انسان و انتقال آن به گیاه و بالعکس شاید امکان دستیابی به نتایج کاربردی موثر وجود داشته باشد.

جدول موجود در متن مقاله در صورت نیاز

| Feature selection | | | t-Test | | | | |
|-------------------|--------------------|-------|----------------|---------------------|---------------|---------------------|----------|
| ترتیب | خصوصیات | نمره | میانگین(انسان) | انحراف معیار(انسان) | میانگین(گیاه) | انحراف معیار (گیاه) | P value |
| ۱ | فراوانی گلوتامین | ۱ | ۰/۰۳۵ | ۰/۰۰۸۵ | ۰/۰۲۰ | ۰/۰۰۷۲ | ** |
| ۲ | فراوانی تیروزین | ۰/۹۹۹ | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۰۸۴ | ۰/۰۳۹ | ۰/۰۰۵۳ | ۰/۰۰۱** |
| ۳ | فراوانی آلانین | ۰/۹۹۷ | ۰/۰۸۵ | ۰/۰۱۴۳ | ۰/۱۱۵ | ۰/۰۲۳۹ | ۰/۰۰۲۹** |
| ۴ | سیستئین احیاء شده | ۰/۹۹۵ | ۱/۰۶۰ | ۰/۵۱۰ | ۱/۷۱۴ | ۰/۴۵۳۰ | ۰/۰۰۵** |
| ۵ | سیستئین احیاء نشده | ۰/۹۹۵ | ۱/۰۶۸ | ۰/۵۱۲۰ | ۱/۷۲۲ | ۰/۴۵۳۸ | ۰/۰۰۵** |
| ۶ | فراوانی گلایسین | ۰/۹۹۴ | ۱/۰۸۱ | ۰/۰۲۱۵ | ۰/۱۱۵ | ۰/۰۲۸۴ | ۰/۰۰۶** |
| ۷ | فراوانی تریپتوفان | ۰/۹۸۴ | ۰/۰۱۴ | ۰/۰۰۸۷ | ۰/۰۲۴ | ۰/۰۰۸۱ | ۰/۰۱۶* |
| ۸ | فراوانی پرولین | ۰/۹۷۸ | ۰/۰۴۷ | ۰/۰۱۲۶ | ۰/۰۳۶ | ۰/۰۰۷۵ | ۰/۰۲۱* |
| ۹ | تعداد متیونین | ۰/۹۷۴ | ۲۹/۵۶۰ | ۲۶/۹۶۰۰ | ۱۱/۵۳۸ | ۳/۹۷۱۰ | ۰/۰۲۶* |
| ۱۰ | تعداد لوسین | ۰/۹۷۱ | ۱۲۱ | ۱۱۳/۸۰۰ | ۴۷/۰۷۷ | ۱۱/۱۱۶۵ | ۰/۰۲۹* |
| ۱۱ | تعداد گوگرد | ۰/۹۶۹ | ۴۵/۲۰۰ | ۴۱/۷۰۰ | ۱۸/۳۰۸ | ۶/۲۵۰۱ | ۰/۰۳۱* |
| ۱۲ | تعداد والین | ۰/۹۶۱ | ۹۴/۲۰۰ | ۱۰۱/۹۰۰ | ۳۲/۵۳۸ | ۴/۵۲۰۶ | ۰/۰۲۹* |
| ۱۳ | تعداد گلوتامین | ۰/۹۵۶ | ۵۳/۸۰۰ | ۷۴ | ۹/۹۲۳ | ۴/۷۸۶۵ | ۰/۰۴۴* |



منابع

1. Ludwig, U., Wiren, N. V., Rentsch, D., Frommer, B. 2001. Rhesus factors and ammonium: a function in efflux?. *Genome Biology* 2:1-5.
2. Mayer, M., Dynowsky, M., and Ludwige, U. 2006. Ammoniumion transport by the AMT/Rh homologue LeAMT1;1. *Biochem Journal* 396: 431-37.
3. Mayer, M., Schaaf, G., Mouro, I., Lopez, C., Colin, Y., Neumann, P., Cartron, J. P., and Ludwig, U. 2001. Different transport mechanisms in plant and human AMT/Rh-type ammonium transporters. *Journal of Gen. Physiology* 127:133-44.
4. Wiren, N., and Merrick, M. 2004. Regulation and function of ammonium carriers in bacteria, fungi and plants. *Trends Current Genetics* 9: 95-120.
5. Yahiaoui, N. Z., Ripoche, P., Kim, C. L. V., Gane, P., D'Ambrosio, A. M., Cartron, J. P., Colin, Y., and Chanteloup, I. M. 2006. Ammonium transport properties of HEK293 cells expressing RhCG mutants: preliminary analysis of structure/function by site-directed mutagenesis. *Transfusion Clinique et Biologique* 13: 128-31.
6. Yuan, L., Loque, D., Kojima, S., Rauch, S., Ishiyama, K., Inoue, E., et al. 2007a. The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1 type transporters. *Plant Cell* 19:2636-52.
7. Zheng, L., Kostrewa, D., Berneche, S., Winkler, F. K., and Li, X. D. 2004. The mechanism of ammonia transport based on the crystal structure of AmtB of *Escherichia coli*. *Biophysics* 101: 17090-95.



Study of Similarities and Differences between Plants and Human Ammonium Transporters

Tarokh Ehsan^{1*}, Delavari Azar², Ebrahimi Esmail^{3**}

^{1*}BSc in Department of Crop Production & Plant Breeding, College of Agriculture, Shiraz University
(ehsan.tarokh@yahoo.com)

²MSc in Plant Biotechnology Center, College of Agriculture, Shiraz University (biotech_dlv@yahoo.com)

^{3**} Assistant professor in Department of Crop Production & Plant Breeding, College of Agriculture, Shiraz University
(ebrahimie@shirazu.ac.ir)

Abstract

Ammonium is an excellent nitrogen source for microorganisms and ammonium transfer is an important fundamental process in most organisms. Membrane transport of ammonium is mediated by ammonium transporters of the ammonium transporter/methylamine permease/rhesus (AMT/MEP/Rh) protein family. In human rhesus (Rh) blood group proteins belong to this family however it has role in ammonium transfer in plants. The function of Rh proteins remained unknown. Since ammonium transporters play different physiological roles in different organisms, in this study we looked into the characteristics of the amino acid sequences between plants and human. The attributes of these proteins among plants and human were investigated and the distinct attributes among these two groups were introduced. In this paper, feature selection, appropriate bioinformatics tools, was performed. The feature selection algorithm can be used to identify the fields that are most important for a given analysis. Since all predictors and targets are continuous p values based on the F statistic are used. The t-Test and descriptive statistics analysis was performed on data. The results showed that in human means of count of leucine and valine affect on aliphatic index and means of frequency of proline and count of valine determined the hydrophobicity of the protein are more than plants. In contrast, in plants the average of frequency of alanine, glycine, tryptophan and tyrosine are more.

Key words: Ammonium transporter proteins, Feature selection, Hydrophilic, Hydrophobic, Bioinformatics.