



Constructing *Hordeum vulgare* Protein- Protein Interaction Network Based on Interolog Method

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Hekmati J.¹ MSc,
Alami A.¹ PhD,
Zahiri J.^{*2} PhD

How to cite this article

Hekmati J, Alami A, Zahiri J. Constructing *Hordeum vulgare* Protein-Protein Interaction Network Based on Interolog Method. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):557-564.

ABSTRACT

Hordeum vulgare is a one-year-old herb of the Poaceae family. It is an important cereal used by humans which has been applied in many cases instead of wheat. The limitation of experimental methods is one of the important problems for identifying protein-protein interactions. So, in recent years, computational methods have played an important role in predicting and identifying protein-protein interactions. In this study, for constructing protein-protein interaction (PPI) network, the experimental PPI information of six model organisms includes *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Oryza sativa*, and *Arabidopsis thaliana* were extracted from the Intact database. InParanoid was used for identifying barley orthologous proteins with model organisms. The Interolog method which was used in this study can predict protein-protein interactions by mapping protein interactions of the model organisms on orthologous proteins. After removing repetitive interactions, the final predicted barley PPI network contained 235966 interactions between 7350 proteins. This study is the first report presented on protein-protein interaction prediction in barley.

Keywords Computational Methods; Interolog; Model Organisms; Protein-Protein Interaction

CITATION LINKS

[1] Protein-protein interactions: Switch from classical methods to ... [2] Analyzing protein-protein interactions by quantitative ... [3] A proteome-scale map of the human interactome ... [4] Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction ... [5] A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the ... [6] Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction ... [7] Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces* ... [8] Large-scale identification of yeast integral membrane protein ... [9] A comprehensive analysis of protein-protein interactions in ... [10] High-quality binary protein interaction map of the yeast ... [11] A map of the interactome network of the ... [12] Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein-protein interactome ... [13] Protein interaction mapping: A *Drosophila* case ... [14] A protein interaction map of *Drosophila* ... [15] A protein complex network of *Drosophila* ... [16] Border control-a membrane-linked interactome of ... [17] Yeast two-hybrid systems and protein interaction ... [18] Plant protein-protein interaction network and ... [19] PPIevo: Protein-protein interaction prediction from PSSM based evolutionary ... [20] Agricultural-based protein by-products ... [21] A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley ... [22] The MIntAct project-IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction ... [23] The BioGRID interaction database: 2011 ... [24] MINT, the molecular interaction database ... [25] DIP, the database of interacting proteins: A research tool for studying cellular ... [26] Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as resources for phosphoproteome ... [27] STRING 8-a global view on proteins and their functional interactions in 630 ... [28] Predicting protein-protein interactions in *Arabidopsis thaliana* through integration of orthology, gene ontology and ... [29] A predicted interactome for ... [30] PRIN: A predicted rice interactome ... [31] DIPOS: Database of interacting proteins in *Oryza* ... [32] Inferring the *Brassica rapa* interactome using protein-protein interaction data from *Arabidopsis* ... [33] PPIM: A protein-protein interaction database for ... [34] Prediction of cassava protein interactome based on interolog ... [35] PTIR: Predicted tomato interactome ... [36] Prediction and functional analysis of the sweet orange ... [37] Predicting whole genome protein interaction ... [38] InParanoid 8: Orthology analysis between 273 proteomes, mostly ...

¹Biotechnology Department, Agricultural Sciences Faculty, Guilan University, Gilan, Iran

²Biophysics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884779
Fax: +98 (21) 82884717
zahiri.j@gmail.com

Article History

Received: October 19, 2018

Accepted: February 10, 2019

ePublished: December 21, 2019

پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین در گیاه جو براساس روش اینترولوگ

ژاله حکمتی MSc

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

علی اعلی PhD

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران

چواد ظهیری PhD

گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

جو (*Hordeum vulgare*) گیاهی یک‌ساله از خانواده Poaceae است. این گیاه از غلات مهم مورد استفاده انسان بوده و در بسیاری از موارد جایگزین گندم شده است. محدودیت‌های مربوط به روش‌های آزمایشگاهی شناسایی برهمکنش‌های پروتئینی را با مشکل روبه‌رو کرده است. در سال‌های اخیر روش‌های محاسباتی گام موثری در پرکردن خلا موجود برداشته و نقش مهمی در زمینه پیش‌بینی و شناسایی برهمکنش‌های پروتئینی ایفا کرده است. در این مطالعه به منظور ساخت شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین گیاه جو از اطلاعات برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین مربوط به شش ارگانیزم مدل شامل ساکارومایسس سروریه (*Saccharomyces cerevisiae*)، سینورابتیدیس الگانس یا نماتد (*Caenorhabditis elegans*)، دروزوفیلا ملانوکاستر یا مگس میوه (*Drosophila melanogaster*)، انسان (*Homo sapiens*)، برنج (*Oryza sativa*) و آرابیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) استخراج شده از پایگاه داده Intact استفاده شد و استخراج اطلاعات ارتولوگ‌های گیاه جو با ارگانیزم‌های مدل با استفاده از Inparanoid صورت گرفت. روش اینترولوگ که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، از منطبق کردن برهمکنش‌های پروتئینی ارگانیزم‌های مدل بر ارتولوگ‌های گیاه جو استفاده کرده و منجر به پیش‌بینی ۲۴۷۷۴۵ برهمکنش پروتئین- پروتئین شد که پس از حذف برهمکنش‌های تکراری ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش غیرتکراری بین ۷۳۵۰ پروتئین به دست آمد. مطالعه صورت‌گرفته اولین گزارش ارایه‌شده در زمینه پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین گیاه جو است.

کلیدواژه‌ها: ارگانیزم‌های مدل، اینترولوگ، برهمکنش پروتئین- پروتئین، روش‌های محاسباتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۱

*نویسنده مسئول: zahiri.j@gmail.com

مقدمه

پس از تعیین توالی ژنوم انسان و بسیاری از موجودات دیگر، تحقیق در مورد ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها و عملکرد آنها (ژنومیکس کارکردی) تشدید شد. پس از آن، با مشاهده این که پروتئین‌ها در واقع افکتور مولکولی فرآیندهای سلولی هستند، پروتئومیکس متولد شد. واضح است که پروتئین‌ها به عنوان یک نهاد تنها عمل نمی‌کنند بلکه مانند یک شبکه پویا از بازیکنان یک تیم هستند که باید با یکدیگر ارتباط برقرار کنند. اگرچه روش‌های ژنتیکی (مخمر دوهیبری؛ Y2H) و روش‌های بیوشیمیایی (Co-IP و AP) از روش‌های انتخابی در شروع مطالعه برهمکنش پروتئین- پروتئین

(PPI) بود، در سال‌های اخیر یک تغییر جهت به سمت روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک به وجود آمده است [1].

PPI بر تماس فیزیکی غیرتصادفی بین دو یا تعداد بیشتری پروتئین دلالت دارد. برهمکنش‌ها وابسته به یک سیگنال خاص، محرک، یا یک شرایط خاص سلولی تنظیم می‌شوند. این برهمکنش‌ها به عوامل بسیاری، از جمله نوع سلول، مرحله رشد سلول، فاز چرخه سلولی، شرایط خارجی و بدیهی است که وجود پروتئین‌های دیگر بستگی دارند. بنابراین، شناسایی شرکای اتصال یک پروتئین در یک محیط سلولی ضروری است چون اجرای عملکرد یک پروتئین خاص به شدت وابسته به تماس با سطوح پروتئین‌های همسایه خواهد بود. بیشتر فرآیندها نیاز به تماس مستقیم بین پروتئین‌ها در کمپلکس‌های دوتایی یا بزرگ‌تر دارند که در آن پروتئین‌های متعددی درگیر هستند [2].

تحقیقات PPI کاری بسیار سخت برای سلول‌های پویا است که تحت تغییرات مداوم در زمان و فضا است اگرچه دانش ما از شبکه پیچیده پروتئین هنوز هم بسیار ضعیف است اما تحقیقات منجر به شناسایی نقشه اینترکتوم در انسان (*Homo Sapiens*) [3-5] و همچنین موجودات مدل مانند مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) [6-10]، نماتد (*Caenorhabditis elegans*) [11, 12]، مگس میوه (*Drosophila melanogaster*) [13-15] و آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) [16] شد. اگرچه پایگاه داده اینترکتوم برای این موجودات همچنان روبه‌رشد است، ما هنوز از ایجاد یک نقشه اینترکتوم کامل برای هر یک از آنها بسیار فاصله داریم [11, 14, 17].

با وجود پروتکل‌های بهبودیافته و روش‌های تکامل‌یافته، هزینه و زمان مورد نیاز از جمله عواملی است که مطالعات تجربی را محدود می‌کند و در نتیجه تنها مطالعات خیلی کمی روی شبکه برهمکنش پروتئینی انجام شده است. روش‌های بیوانفورماتیک در حد مطلوب به عنوان یک گام ارزشمند اولیه به شناسایی برهمکنش‌های بالقوه پروتئین‌ها می‌پردازد. بیوانفورماتیک براساس ابزارهای ساختاری و پایگاه‌های داده‌ای که در حال حاضر در دسترس است می‌تواند یک مکمل ایده‌آل برای نتایج تجربی باشد و نقش کلیدی در مرتب‌سازی، سازماندهی و کاوش مفاهیم دقیق از داده‌های تجربی را بازی کند [18].

به طور کلی، روش‌های بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی برهمکنش پروتئین- پروتئین را می‌توان به چهار دسته تقسیم کرد: دسته اول، روش‌هایی که از الگوریتم‌های یادگیری ماشین استفاده می‌کنند که در آن از مجموعه‌ای از توصیف‌گرهای مختلف پروتئین، برای ساخت یک مدل که بتواند برهمکنش پروتئین- پروتئین را پیش‌بینی کند، استفاده می‌شود. این روش‌ها معمولاً از ویژگی‌های توالی‌ها برای یادگیری استفاده می‌کنند. الگوریتم‌های یادگیری ماشین مختلف هستند، که از انواع آن می‌توان به Support Vector Machines (SVM)، Multilayer perceptron (MLP)، Naïve Bayes و Random forest اشاره کرد. دسته دوم، روش‌هایی که از اطلاعات

پیش‌بینی‌شده با روش‌های محاسباتی، توسعه یافته‌اند. اگرچه در زمینه برهمکنش پروتئین-پروتئین تعدادی مطالعات تجربی و محاسباتی در موجودات مختلف به خصوص ارگانیزم‌های مدل انجام شده است، اما مطالعات محاسباتی در گیاهان همچنان ناقص بوده و محدود به گونه‌های *آرابیدوپسیس تالیانا* (*Arabidopsis thaliana*) [28, 29]، برنج (*Oryza sativa*) [30, 31]، به‌عنوان گیاه مدل، *براسیکا رابا* (*Brassica rapa*) [32]، ذرت [33]، *Manihot esculenta* [34]، گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) [35]، پرتقال (*Citrus sinensis*) [36] و *Populus trichocarpa* [37] (به‌عنوان محصولات زراعی اقتصادی) است.

بنابراین مطالعات مربوط به شناسایی و پیش‌بینی PPI در اکثر گیاهان به‌خصوص جو همچنان ناقص باقی‌مانده است. به همین منظور در این مطالعه شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین گیاه جو با استفاده از اطلاعات برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین مربوط به شش ارگانیزم مدل شامل *ساکارومایسیس سروریه* (*Saccharomyces cerevisiae*)، *سینورابتیدیس الگانس* یا نماتد (*Caenorhabditis elegans*)، *دروزوفیلا ملانوگاستر* یا مگس میوه (*Drosophila melanogaster*)، انسان (*Homo sapiens*)، برنج (*Oryza sativa*) و *آرابیدوپسیس تالیانا* (*Arabidopsis thaliana*) استخراج‌شده از پایگاه داده Intact و استخراج اطلاعات ارتولوگ‌های گیاه جو با ارگانیزم‌های مدل با استفاده از InParanoid پیش‌بینی شد. این گزارش اولین شبکه PPI ارایه‌شده در این گیاه است که نتیجه آن پیش‌بینی ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش غیرتکراری بین ۷۳۵۰ پروتئین بود.

مواد و روش‌ها

منابع داده‌ها: مجموعه داده‌های اینترکتوم مربوط به شش ارگانیزم مدل شامل *ساکارومایسیس سروریه*، *سینورابتیدیس الگانس*، *دروزوفیلا ملانوگاستر*، انسان، برنج و *آرابیدوپسیس تالیانا* از پایگاه داده IntAct (<https://www.ebi.ac.uk/intact/>) که حاوی تعداد قابل توجهی برهمکنش‌های پروتئینی شناسایی‌شده با روش‌های آزمایشگاهی با کارایی بالا است، استخراج شد. به‌منظور شناسایی کلاسترهای ارتولوگ جو با شش ارگانیزم از الگوریتم شناسایی‌کننده ارتولوگ‌ها، InParanoid (<http://inparanoid.sbc.su.se/cgi-bin/index.cgi>) [38] استفاده شد که مقایسه تمام جفت توالی‌های پروتئین را از طریق الگوریتم خود، که براساس محاسبات BLAST است، انجام می‌دهد. پروتئین‌هایی با بالاترین شباهت به‌عنوان پروتئین کاندیدا انتخاب می‌شوند، همه پروتئین‌های ارتولوگ در دو گونه از طریق این روش‌های غربالگری به دست می‌آیند. فقط جفت‌های بالا که توسط InParanoid کلاستر می‌شوند، انتخاب خواهند شد تا کنترل خاصی روی میزان مثبت‌های کاذب اعمال شود.

اینترولوگ: این روش براساس یک اصل ساده و منطقی استوار است: اگر پروتئین A و پروتئین B در گونه مدنظر (در اینجا جو) به‌ترتیب

ژنومی و ساختار پروتئین استفاده می‌کنند که می‌توان به همسایه ژن، رابطه فیلوژنتیک، ادغام ژن، بیان همزمان ژن‌ها و اطلاعات ساختار سه‌بعدی اشاره کرد. دسته سوم، روش‌هایی که با استفاده از توپولوژی شبکه به پیش‌بینی برهمکنش پروتئین-پروتئین می‌پردازد. دسته چهارم، روش‌های تشخیص برهمکنش پروتئین-پروتئین با استفاده از Text mining و Literature mining (یا جست‌وجوی پایگاه داده‌ها) [19] هستند.

با وجود این که با استفاده از روش‌های محاسباتی براساس فاصله فیلوژنتیک پروتئین‌ها، یک سری PPI پیش‌بینی شده است که منجر به افزایش تعداد داده‌های برهمکنش پروتئین‌ها در پایگاه‌های بزرگ داده مانند STRING شد، تاکنون برای گیاهان، تعداد محدودی PPI در این پایگاه داده گنجانده شده است. در حالی که روش‌های مبتنی بر اینترولوگ برای پیش‌بینی برهمکنش پروتئین‌ها با موفقیت توسعه یافته و برای بسیاری از گونه‌ها به کار برده شده است، استفاده از الگوریتم‌های یادگیری ماشین زمانی که مجموعه داده‌ها حاوی اعداد بزرگ‌تر و تنوع بیشتری است منجر به بهبود دقت پیش‌بینی می‌شود. به‌طور کلی، رویکردهای متمایزی توسط محققان مختلف ارایه شده است که هر یک اطلاعات منحصربه‌فردی برای شبکه را تامین کرده است. بنابراین، استفاده از ترکیبی از روش‌های گوناگون با ویژگی‌های متعدد برای پیش‌بینی، منجر به افزایش درصد اطمینان پیش‌بینی می‌شود.

گیاه جو (*Hordeum vulgare*) از خانواده Poaceae، از غلات مهمی است که به‌عنوان یک گیاه مدل سازگار با شرایط آب و هوایی محسوب می‌شود. از نظر سطح زیر کشت در جهان در رتبه چهارم بعد از گندم (*Triticum species*)، ذرت (*Zea mays*) و برنج (*Oryza sativa*) قرار می‌گیرد. در سال ۲۰۱۴ سطح زیر کشت جو، ۱۴۴ میلیون تن بود که روسیه، فرانسه و آلمان به‌ترتیب بزرگ‌ترین تولیدکنندگان این گیاه بودند. گیاه جو به‌دلیل سازگاری با شرایط نامساعد آب و خاک و همچنین اهمیت آن در صنعت مالت، قرن‌هاست که کشت می‌شود [20].

این گیاه دیپلوئید بوده و حاوی ۱۴ کروموزوم است به همین دلیل می‌تواند به‌عنوان یک گیاه مدل برای خانواده Triticeae محسوب شود. در سال ۲۰۱۲ با تلاش‌های کنسرسیوم بین‌المللی توالی‌یابی جو و همچنین کنسرسیوم توالی‌یابی انگلستان ژنوم جو با موفقیت توالی‌یابی شد. ژنوم این گیاه ۵/۳ گیگابایت است و از ژنوم‌های دیپلوئید طویلی محسوب می‌شود که تاکنون توالی‌یابی‌شده و متشکل از هفت جفت کروموزوم هسته‌ای، یک کروموزوم میتوکندری و یک کروموزوم کلروپلاستی است [21].

تقریباً در تمام فرآیندهای زیستی شامل انتقال پیام، مسیرهای متابولیسمی و عملکردهای مولکولی تعداد زیادی برهمکنش‌های پروتئینی درگیر هستند. پایگاه داده‌های IntAct [22]، BioGRID [23]، MINT [24]، DIP [25]، HPRD [26] و STRING [27] به‌منظور ذخیره‌سازی اطلاعات مربوط به برهمکنش‌های پروتئینی شناسایی‌شده با روش‌های آزمایشگاهی و همچنین برهمکنش‌های

حاوی اطلاعات مربوط به فاصله تکاملی است در این پایگاه اطلاعات مربوط به ۳۱۶۳ مطالعه مختلف روی ۵۰۶۳۲ گونه در قالب یک درخت زندگی جمع‌آوری شده که فاصله بین گونه‌های مختلف را برحسب زمان ارایه می‌دهد. به‌منظور وزن‌دارکردن شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین، اطلاعات مربوط به فاصله تکاملی گیاه جو با شش ارگانیزم مدل مورد نظر از سایت TimeTree استخراج شد.

نحوه امتیازدهی به شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو: یک جفت پروتئین دارای برهمکنش هستند به شرطی که ارتولوگ‌های هر یک از آنها حداقل در یکی از شش گونه مورد نظر یافت شود. به این ترتیب براساس نتایج به‌دست‌آمده از روش اینترولوگ، میزان اطمینان برهمکنش‌های پیش‌بینی‌شده تعیین شد. امتیاز اطمینان نشان‌دهنده درجه اطمینانی است که به هر یک از برهمکنش‌ها تعلق می‌گیرد. بالا بودن امتیاز اطمینان نشان‌دهنده این است که آن برهمکنش در اکثر گونه‌های مورد نظر حفظ و وجود آن توسط اکثر روش‌های آزمایشگاهی اثبات شده است. به این ترتیب امتیاز اطمینان به هر یک از برهمکنش‌های پیش‌بینی‌شده براساس فرمول زیر تعلق می‌گیرد:

$$confidence\ score\ (CS) = \frac{z}{x \times y} * \frac{1}{\ln(ed)}$$

به‌طوری که "z" نشان‌دهنده تعداد برهمکنش (بین پروتئین A و B) استخراج‌شده از هر گونه، "x" و "y" به‌ترتیب تعداد ارتولوگ‌های مربوط به هر کدام از پروتئین‌های A و B است. "ed" نشان‌دهنده فاصله تکاملی بین گیاه جو و هر یک از شش گونه است که از TimeTree استخراج شده است.

امتیاز نهایی برای هر برهمکنش (هر جفت پروتئین A و B) از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$final\ score = \frac{\sum CS}{\sum \ln(ed)/6}$$

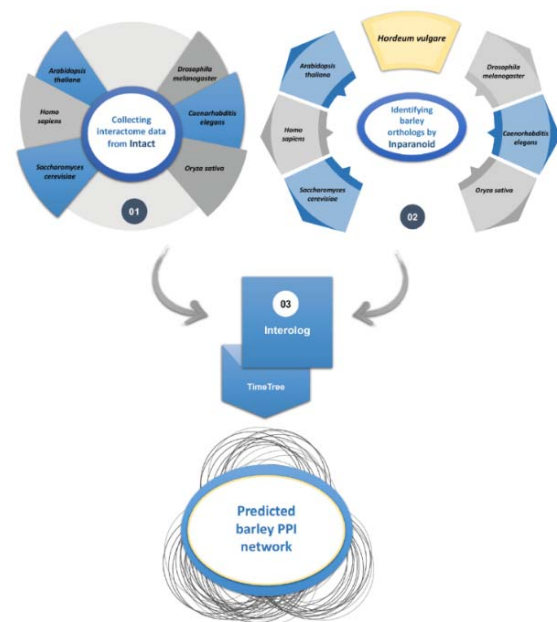
صورت کسر نشان‌دهنده مجموع امتیازهای اطمینان هر برهمکنش در گونه‌هایی است که در این پیش‌بینی شرکت کرده‌اند و مخرج کسر میانگین $\ln(ed)$ برای شش گونه است.

نتایج و بحث

شناسایی پروتئین‌های ارتولوگ توسط Inparanoid و استخراج اطلاعات از Intact: در این مطالعه Inparanoid8، یک روش تمام اتوماتیک برای شناسایی ارتولوگ‌های بین دو گونه، به‌منظور تشخیص کلاسترهای ارتولوگ مورد استفاده قرار گرفت. این پایگاه حاوی اطلاعات ۲۷۳ گونه شامل ۲۴۶ یوکاریوت، ۲۰ باکتری و ۷ آرکئا است. با استفاده از اطلاعات پروتئوم شش ارگانیزم مدل شامل ساکارمایسس سروزیه، سینورایتیدیس الگانس، دروزوفیلا ملانوگاستر، انسان، برنج و آرابیدوپسیس تالیانا (موجود در پایگاه Inparanoid) شناسایی ارتولوگ‌های این ارگانیزم‌ها با گیاه جو صورت گرفت. نمودار ۱ نحوه توزیع ارتولوگ‌های جو با شش ارگانیزم مدل را نمایش می‌دهد.

با پروتئین A1 و پروتئین B1 در گونه مرجع (ارگانیزم مدل) ارتولوگ باشند و برهمکنش بین پروتئین A1 و پروتئین B1، با روش‌های تجربی در گونه مرجع تایید شده باشد، به این ترتیب پیش‌بینی می‌شود که پروتئین A و پروتئین B با یکدیگر برهمکنش دارند. اگر اینترولوگ پروتئین A و پروتئین B در بیش از یک گونه پیدا شد، قابلیت اطمینان متقابل آنها افزایش می‌یابد [30]. روش اینترولوگ براساس درنظرگرفتن حفاظت تکاملی در چند گونه بین جفت پروتئین‌های دارای برهمکنش است، بنابراین به‌طور طبیعی دارای حساسیت زیادی در پیش‌بینی برهمکنش بین پروتئین‌ها است. در این مطالعه از روش اینترولوگ به‌منظور پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین گیاه جو با استفاده از اطلاعات ارتولوگ‌ها و برهمکنش‌های تجربی شش ارگانیزم مدل استفاده شد.

منطبق‌کردن پروتئین‌های ارتولوگ بر اینترکتوم: ارتولوگ‌های به‌دست‌آمده از Inparanoid روی مجموعه داده‌های اینترکتوم گونه‌های مرجع (استخراج‌شده از Intact) منطبق می‌شوند و مکان‌هایی که در آن پروتئین گندم با پروتئین‌های گونه‌های مرجع منطبق می‌شود به‌عنوان گروه‌های پروتئینی دارای برهمکنش ثبت شد. سپس با حذف برهمکنش‌های تکراری، یک شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین منحصر به فرد ایجاد شد. شکل ۱ مراحل ساخت شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو را نمایش می‌دهد.



شکل ۱ نمایش مراحل پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو؛ مجموعه داده‌های اینترکتوم شش ارگانیزم مدل از پایگاه داده Intact جمع‌آوری شد، الگوریتم Inparanoid به‌منظور کلاستربندی پروتئین‌های ارتولوگ بین گیاه جو با شش ارگانیزم مدل مورد استفاده قرار گرفت و اینترولوگ به‌عنوان روش پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین استفاده شد. فاصله تکاملی بین گیاه جو و شش ارگانیزم مدل به‌منظور وزن‌دارکردن شبکه به کار رفت.

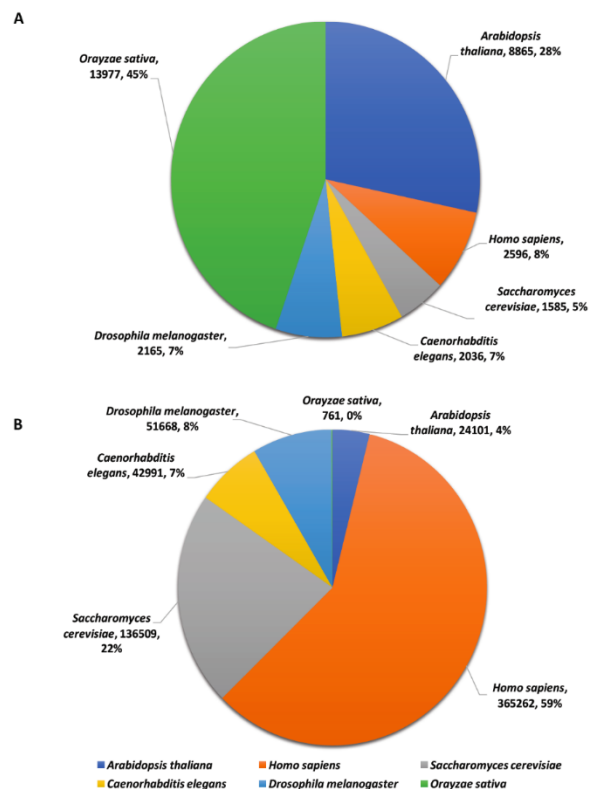
وزن‌دارکردن شبکه براساس اطلاعات تکاملی: وب‌سایت TimeTree (<http://www.timetree.org/>) یک وب‌سایت

همان‌طور که در نمودار ۱- B مشاهده می‌شود، بیشترین تعداد برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین را انسان با ۳۶۵۲۶۲ و پس از آن مخمر با ۱۳۶۵۰۹ برهمکنش را به خود اختصاص دادند، که حدود ۸۱٪ کل برهمکنش‌های پروتئینی مربوط به شش ارگانیزم مدل استخراج‌شده از Intact را شامل می‌شود، اینها گونه‌هایی هستند که به دلیل مطالعات آزمایشگاهی بیشتر حاوی اینترکتوم کامل‌تری نسبت به سایر ارگانیزم‌ها هستند. به این ترتیب سایر ارگانیزم‌ها تنها حدود ۱۹٪ برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین را شامل شدند. آرآبیدوپسیس و برنج به‌ترتیب با ۲۴۱۰۱ و ۷۶۱ برهمکنش حاوی کمترین تعداد PPI در بین شش ارگانیزم مدل بودند.

ساخت شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین گیاه جو: در این مطالعه پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئینی بر این اصل استوار است که پروتئین‌هایی که طی تکامل حفظ می‌شوند، دارای برهمکنش‌های حفاظت‌شده هستند. فرآیندی که در این مسیر به‌کاررفته از طریق انطباق پروتئین‌های ارتولوگ بر اینترکتوم ارگانیزم‌های متنوع منجر به شناسایی و پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین می‌شود که تحت عنوان اینترولوگ شناخته شده است. ساخت شبکه PPI در گیاه جو یک فرآیند سه‌مرحله‌ای بود: (۱) جمع‌آوری اطلاعات اینترکتوم مربوط به شش ارگانیزم مدل، (۲) شناسایی پروتئین‌های ارتولوگ‌های گیاه جو با شش ارگانیزم مدل، (۳) انجام فرآیند اینترولوگ بین گیاه جو با شش ارگانیزم مدل.

جمع‌آوری اطلاعات اینترکتوم از پایگاه داده Intact صورت گرفت و Inparanoid به‌عنوان الگوریتم پیش‌بینی‌کننده ارتولوگ‌ها به کار گرفته شد که قابل اطمینان و در دسترس است. شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین گیاه جو از طریق انطباق ارتولوگ‌های جو بر اینترکتوم شش ارگانیزم مدل طی فرآیند اینترولوگ صورت گرفت که نتیجه آن پیش‌بینی ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش غیرتکراری بین ۷۳۵۰ پروتئین بود. به‌منظور سازماندهی برهمکنش‌های پروتئینی پیش‌بینی‌شده برهمکنش‌های تکراری حذف و مجموعه داده‌ای حاوی برهمکنش‌های پروتئینی پیش‌بینی‌شده ایجاد شد که در آن تعداد ارتولوگ برای هر پروتئین و تعداد برهمکنش برای هر جفت پروتئین مشخص شد.

نتایج به‌دست‌آمده منجر به پیش‌بینی ۲۴۷۷۴۵ برهمکنش پروتئین-پروتئین شد که پس از حذف برهمکنش‌های تکراری ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش به دست آمد. همان‌طور که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود دو ارگانیزم مخمر و انسان به‌ترتیب با ۱۰۱۴۸۵ و ۱۰۱۵۱۱ برهمکنش، بیشترین تعداد برهمکنش‌های پروتئینی استخراج‌شده را به خود اختصاص دادند به‌طوری که ۸۲٪ کل برهمکنش‌های استخراج‌شده را شامل می‌شد، این دو ارگانیزم در بین شش ارگانیزم مدل استفاده‌شده در این مطالعه بیشترین تعداد PPI ثبت شده به لحاظ آزمایشگاهی را داشتند و به همین دلیل نقش مهم آنها در پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئینی قابل انتظار بود. پس از این دو ارگانیزم، *دروزوفیلا ملانوگاستر* با ۲۳۹۴۴ برهمکنش، *آرآبیدوپسیس تالیانا* با ۱۵۱۲۲ برهمکنش، *سینورابتیدیس الگانس* با ۵۶۲۰

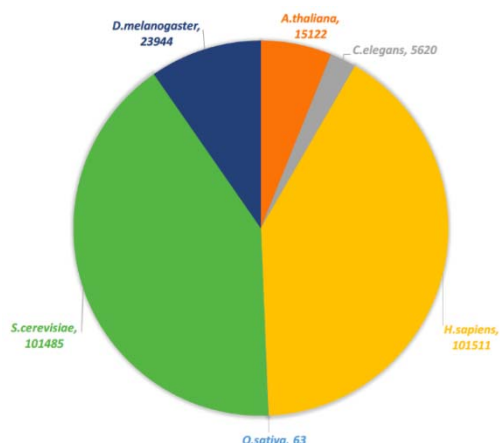


نمودار ۱) نمایش توزیع ارگانیزم‌های مدل به‌منظور پیش‌بینی شبکه PPI در گیاه جو: A: توزیع پروتئین‌های ارتولوگ گیاه جو در شش ارگانیزم مدل. B: توزیع تعداد برهمکنش‌های تجربی استخراج‌شده از Intact

همان‌طور که در نمودار ۱- A مشاهده می‌شود، گیاه برنج در میان ارگانیزم‌های مدل بیشترین میزان ارتولوگ را با گیاه جو دارد به‌طوری که ۱۳۹۷۷ ارتولوگ، ۴۵٪ کل ارتولوگ‌های استخراج‌شده را به خود اختصاص داده است. به‌دلیل این که *اوریزا ساتیوا* نزدیک‌ترین جد مشترک را (از بین ارگانیزم‌های بررسی‌شده در این مطالعه) با گیاه جو دارد این تعداد ارتولوگ قابل انتظار است. *آرآبیدوپسیس تالیانا* با ۸۸۶۵ ارتولوگ، حدود ۲۸٪ کل ارتولوگ‌ها را شامل می‌شود و حدود ۲۷٪ ارتولوگ‌های باقیمانده به‌ترتیب از انسان، مگس میوه، نماد و مخمر استخراج شد. به این ترتیب مخمر به‌عنوان یک یوکاریوت تک‌سلولی تنها ۵٪ ارتولوگ‌های جو را به خود اختصاص داد. تعداد کل ارتولوگ‌های استخراج‌شده از شش ارگانیزم مدل که توسط Inparanoid انجام شد شامل ۳۱۲۲۴ بود. اگرچه دو گیاه برنج و *آرآبیدوپسیس* به‌دلیل فاصله تکاملی کمتر با گیاه جو، بیشترین تعداد پروتئین‌های ارتولوگ را با این گیاه دارند ولی از سایر ارگانیزم‌های بررسی‌شده نیز تعداد قابل توجهی ارتولوگ استخراج شد.

مجموعه داده‌های برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین که با روش‌های آزمایشگاهی اثبات شده‌اند، به‌خصوص در مورد ارگانیزم‌های مدل، در حال رشد است. اطلاعات مربوط به برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین با مراجعه به پایگاه داده Intact استخراج شد این پایگاه برهمکنش‌های پروتئینی را که با روش‌های آزمایشگاهی با کارایی بالا انجام شده‌اند، ذخیره کرده است.

جو، برهمکنش‌های استخراج‌شده از این دو ارگانیزم قابلیت اطمینان بالاتری خواهند داشت.



نمودار (۲) توزیع شش ارگانیزم در پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو

برهمکنش و برنج با ۶۳ برهمکنش در جایگاه‌های بعدی قرار می‌گیرند. اطلاعات مربوط به این شش ارگانیزم در جدول ۱ قابل مشاهده است.

گیاه برنج با تنها ۶۳ برهمکنش کمترین تعداد برهمکنش‌های استخراج‌شده را نشان می‌دهد. با وجود این که گیاه برنج به دلیل فاصله تکاملی کمتر با گیاه جو بیشترین تعداد پروتئین ارتولوگ را با این گیاه دارد اما به دلیل فقدان اطلاعات برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین آزمایشگاهی ثبت‌شده برای آن، این گیاه نقش مهمی در پیش‌بینی شبکه پروتئین-پروتئین گیاه جو ایفا نکرده است. کاملاً قابل انتظار بود که ارگانیزم‌های گیاهی به دلیل نبود اطلاعات کافی، نقش چندان مهمی در پیش‌بینی شبکه برهمکنش گیاه جو نداشتند و در مجموع ۱۵۱۸۵ برهمکنش پروتئین-پروتئین از دو گیاه آرابییدوپسیس و برنج استخراج شد، اگرچه این تعداد برهمکنش تنها ۶٪ کل برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین استخراج‌شده را شامل می‌شود اما به دلیل فاصله تکاملی نزدیک‌تر این دو ارگانیزم به گیاه

جدول (۱) اطلاعات ژنوم و PPI مربوط به شش ارگانیزم مدل

گونه‌ها	اطلاعات ژنوم		برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین تاییدشده با روش‌های آزمایشگاهی		برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی‌شده	
	تعداد ژن‌ها	تعداد پروتئین‌ها	تعداد برهمکنش‌ها	تعداد پروتئین‌ها	برهمکنش‌های استخراج‌شده	ارتولوگ‌های جو
سینورابتیدیس الگانس	۲۰۵۱۷	۲۶۷۹۳	۴۲۹۹۱	۳۲۸۱	۵۶۲۰	۲۰۳۶
انسان	۲۰۴۵۷	۷۳۱۱۲	۳۶۵۲۶۲	۲۲۸۰۰	۱۰۱۵۱۱	۲۵۹۶
ساکارومایسس سروریه	۶۶۹۲	۶۰۴۹	۱۳۶۵۰۹	۷۱۵۷	۱۰۱۴۸۵	۱۵۸۵
دروزوفیلا ملانوگاستر	۱۳۹۳۷	۲۱۹۳۹	۵۱۶۶۸	۸۸۵۵	۲۳۹۴۴	۲۱۶۵
آرابیدوپسیس تالیانا	۲۷۴۱۶	۳۹۳۶۲	۲۴۱۰۱	۹۵۷۱	۱۵۱۲۲	۸۸۶۵
برنج	۵۷۹۳۹	۱۸۰۰۳۰	۷۶۱	۷۵	۶۳	۱۳۹۷۷

در توضیح مکانیزم‌های مولکولی انتقال پیام و مسیرهای متابولیکی داشته و به فهم بیشتر فرآیندهای تنظیمی مانند تنظیم رونویسی کمک خواهد کرد. در این مطالعه به‌منظور پیش‌بینی شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو از شناسایی ارتولوگ‌ها، پیش‌بینی PPI براساس روش اینترولوگ و در نظر گرفتن فاصله تکاملی استفاده شد. تعداد بالای برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین تاییدشده آزمایشگاهی مربوط به ارگانیزم‌های مدل و تعداد زیاد پروتئین‌های ارتولوگ شناسایی‌شده برای جو از عوامل مهم کنترل‌کننده کیفیت برهمکنش‌های پیش‌بینی‌شده است. ساخت شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین در گیاه جو با اطلاعات شش ارگانیزم مدل و با استفاده از روش اینترولوگ صورت گرفت. شبکه پیش‌بینی‌شده ما حاوی ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش بین ۷۳۵۰ پروتئین است که اولین شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین ارایه‌شده برای گیاه جو است. این مطالعه اطلاعات ارزشمندی را برای پژوهش‌های بعدی در سطح پروتئین فراهم کرده و کمبود اطلاعات در زمینه برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین در گیاه جو را پوشش می‌دهد. از محدودیت‌های مطالعه حاضر می‌توان به عدم وجود اطلاعات برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و نبود پایگاه داده مختص گیاه جو برای استخراج اطلاعات مربوط به این گیاه اشاره کرد.

از مطالعات قبلی می‌توان به بررسی روی گیاه آرابییدوپسیس تالیانا با پیش‌بینی ۱۴۵۴۹۴ برهمکنش بین ۹۴۸۰ پروتئین [28, 29]، برنج با پیش‌بینی ۷۶۵۸۵ برهمکنش بین ۵۰۴۹ پروتئین [30, 31]، ذرت با پیش‌بینی ۲۷۳۴۰۰۰ برهمکنش بین ۱۰۷۹۳ پروتئین [33]، گوجه‌فرنگی با پیش‌بینی ۳۵۷۹۴۶ برهمکنش بین ۱۰۶۲۶ پروتئین [35] و پرتغال با پیش‌بینی ۱۲۴۴۹۱ برهمکنش بین ۸۱۹۵ پروتئین [36] اشاره کرد. در تمامی این مطالعات استخراج اطلاعات برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین مربوط به ارگانیزم‌های مدل از پایگاه داده‌های ثبت‌کننده برهمکنش‌های پروتئینی تاییدشده با روش‌های آزمایشگاهی صورت گرفته و Inparanoid به‌منظور یافتن ارتولوگ‌های گیاه مورد نظر با ارگانیزم‌های مدل استفاده شده است. همچنین اینترولوگ روش مورد استفاده برای پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین بود، در این مطالعه نیز اقدامات انجام‌شده منجر به پیش‌بینی ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش غیرتکراری بین ۷۳۵۰ پروتئین شد، همچنین از فاصله تکاملی برای امتیازدهی به برهمکنش‌های پیش‌بینی‌شده استفاده شد که در مطالعات قبلی مورد توجه قرار نگرفته بود.

برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین تقریباً در تمام فرآیندهای بیولوژیکی مشاهده می‌شود، شناسایی این برهمکنش‌ها نقش مهمی

6- Gandhi TK, Zhong J, Mathivanan S, Karthick L, Chandrika KN, Mohan SS, et al. Analysis of the human protein interactome and comparison with yeast, worm and fly interaction datasets. *Nat Genet.* 2006;38(3):285-93.

7- Krogan NJ, Cagney G, Yu H, Zhong G, Guo X, Ignatchenko A, et al. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2006;440(7084):637-43.

8- Miller JP, Lo RS, Ben-Hur A, Desmarais C, Stagljar I, Noble WS, et al. Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(34):12123-8.

9- Uetz P, Giot L, Cagney G, Mansfield TA, Judson RS, Knight JR, et al. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 2000;403(6770):623-7.

10- Yu H, Braun P, Yildirim MA, Lemmens I, Venkatesan K, Sahalie J, et al. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network. *Science.* 2008;322(5898):104-10.

11- Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science.* 2004;303(5657):540-3.

12- Simonis N, Rual JF, Carvunis AR, Tasan M, Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, et al. Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein-protein interactome network. *Nat Methods.* 2009;6(1):47-54.

13- Formstecher E, Aresta S, Collura V, Hamburger A, Meil A, Trehin A, et al. Protein interaction mapping: A *Drosophila* case study. *Genome Res.* 2005;15(3):376-84.

14- Giot L, Bader JS, Brouwer C, Chaudhuri A, Kuang B, Li Y, et al. A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. *Science.* 2003;302(5651):1727-36.

15- Guruharsha KG, Rual JF, Zhai B, Mintseris J, Vaidya P, Vaidya N, et al. A protein complex network of *Drosophila melanogaster*. *Cell.* 2011;147(3):690-703.

16- Jones AM, Xuan Y, Xu M, Wang RS, Ho CH, Lalonde S, et al. Border control-a membrane-linked interactome of *Arabidopsis*. *Science.* 2014;344(6185):711-6.

17- Walhout AJ, Boulton SJ, Vidal M. Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast.* 2000;17(2):88-94.

18- Zhang Y, Gao P, Yuan JS. Plant protein-protein interaction network and interactome. *Curr Genomics.* 2010;11(1):40-6.

19- Zahiri J, Yaghoubi O, Mohammad-Noori M, Ebrahimpour R, Masoudi-Nejad A. PPlevo: Protein-protein interaction prediction from PSSM based evolutionary information. *Genomics.* 2013;102(4):237-42.

20- Dhillon GS, Kaur S, Oberoi HS, Spier MR, Brar SK. Agricultural-based protein by-products: Characterization and applications. In: Singh Dhillon G, editor. *Protein byproducts: Transformation from environmental burden Into value-added products.* Cambridge: Academic Press; 2016. pp. 21-36.

21- International Barley Genome Sequencing Consortium, Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, et al. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature.* 2012;491(7426):711-6.

22- Orchard S, Ammari M, Aranda B, Breuza L, Briganti L, Broackes-Carter F, et al. The MIntAct project-IntAct as a common curation platform for 11 molecular interaction databases. *Nucleic Acids Res.* 2013;42(D1):D358-63.

پیشنهاد می‌شود به‌منظور پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین در گیاه جو علاوه بر ارگانیزم‌های مدل از سایر ارگانیزم‌ها نیز استفاده شده و روش‌های دیگری نظیر روش‌های یادگیری ماشین به کار گرفته شود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه از شناسایی ارتولوگ‌ها، فاصله تکاملی و روش اینترولوگ برای پیش‌بینی برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین در گیاه جو استفاده شد. همچنین کنترل کیفیت برهمکنش‌های پیش‌بینی‌شده با استفاده از تعداد بسیار زیاد برهمکنش‌های پروتئین- پروتئین استخراج‌شده از ارگانیزم‌های مدل و پروتئین‌های ارتولوگ با امتیاز بالای InParanoid صورت گرفت. شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین ارائه‌شده اولین شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین برای گیاه جو است که حاوی ۲۳۵۹۶۶ برهمکنش بین ۷۳۵۰ پروتئین است.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از اعضای گروه بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه گیلان و گروه بیوفیزیک دانشگاه تربیت مدرس به‌خصوص آزمایشگاه بیوانفورماتیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس سپاسگزاری کنند.

تابییدیه اخلاقی: در این مطالعه هیچ گونه کار آزمایشگاهی (مطالعات بالینی انسانی و حیوانی) انجام نشده است.

تعارض منافع: نویسندگان مقاله اعلام می‌کنند هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: ژاله حکمتی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۴٪)؛ علی اعلی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۳۳٪)؛ جواد ظهیری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۳۳٪)

منابع مالی: در این مطالعه از هیچ گونه کمک مالی استفاده نشده است.

منابع

- 1- Wetie AGN, Sokolowska I, Woods AG, Roy U, Deinhardt K, Darie CC. Protein-protein interactions: Switch from classical methods to proteomics and bioinformatics-based approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(2):205-28.
- 2- Paul FE, Hosp F, Selbach M. Analyzing protein-protein interactions by quantitative mass spectrometry. *Methods.* 2011;54(4):387-95.
- 3- Rolland T, Taşan M, Charlotiaux B, Pevzner SJ, Zhong Q, Sahni N, et al. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell.* 2014;159(5):1212-26.
- 4- Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature.* 2005;437(7062):1173-8.
- 5- Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, et al. A human protein-protein interaction network: A resource for annotating the proteome. *Cell.*

2011;12(161):1-13.

31- Sapkota A, Liu X, Zhao XM, Cao Y, Liu J, Liu ZP, et al. DIPOS: Database of interacting proteins in *Oryza sativa*. *Mol Biosyst*. 2011;7(9):2615-21.

32- Yang J, Osman K, Iqbal M, Stekel DJ, Luo Z, Armstrong SJ, et al. Inferring the *Brassica rapa* interactome using protein-protein interaction data from *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. 2013;3:297.

33- Zhu G, Wu A, Xu XJ, Xiao PP, Lu L, Liu J, et al. PPIM: A protein-protein interaction database for maize. *Plant Physiol*. 2016;170(2):618-26.

34- Thanasomboon R, Kalapanulak S, Netrphan S, Saithong T. Prediction of cassava protein interactome based on interolog method. *Sci Rep*. 2017;7(1):17206.

35- Yue J, Xu W, Ban R, Huang Sh, Miao M, Tang X, et al. PTIR: Predicted tomato interactome resource. *Sci Rep*. 2016;6:25047.

36- Ding YD, Chang JW, Guo J, Chen D, Li S, Xu Q, et al. Prediction and functional analysis of the sweet orange protein-protein interaction network. *BMC Plant Biol*. 2014;14:213.

37- Rodgers-Melnick E, Culp M, DiFazio SP. Predicting whole genome protein interaction networks from primary sequence data in model and non-model organisms using ENTS. *BMC Genomics*. 2013;14(1):608.

38- Sonnhammer ELL, Östlund G. InParanoid 8: Orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(D1):D234-9.

23- Stark C, Breitkreutz BJ, Chatr-Aryamontri A, Boucher L, Oughtred R, Livstone MS, et al. The BioGRID interaction database: 2011 update. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(suppl-1):D698-704.

24- Licata L, Briganti L, Peluso D, Perfetto L, Iannuccelli M, Galeota E, et al. MINT, the molecular interaction database: 2012 update. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(D1):D857-61.

25- Xenarios I, Salwinski L, Duan XJ, Higney P, Kim SM, Eisenberg D. DIP, the database of interacting proteins: A research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(1):303-5.

26- Goel R, Harsha HC, Pandey A, Prasad TK. Human Protein Reference Database and Human Proteinpedia as resources for phosphoproteome analysis. *Mol Biosyst*. 2012;8(2):453-63.

27- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, et al. STRING 8-a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(suppl-1):D412-6.

28- De Bodt S, Proost S, Vandepoele K, Rouzé P, Van De Peer Y. Predicting protein-protein interactions in *Arabidopsis thaliana* through integration of orthology, gene ontology and co-expression. *BMC Genomics*. 2009;10(288):1-15.

29- Geisler-Lee J, O'Toole N, Ammar R, Provart NJ, Millar AH, Geisler M. A predicted interactome for *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2007;145(2):317-29.

30- Gu H, Zhu P, Jiao Y, Meng Y, Chen M. PRIN: A predicted rice interactome network. *BMC Bioinform*.