

مطالعه موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین انگور

Analysis of introns position in grape *thioredoxin* genes

رضا حیدری جاپلغی^۱، رحیم حداد^{۲*} و فاسمعلی گروسی^۳

۲،۱ و ۳- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

Heidari Japelaghi R¹, Haddad R^{*2}, Garousi GA³

1,2,3. Graduate Student and Assistant Professors, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: raheemhaddad@yahoo.co.uk

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۴)

چکیده

قطعات DNA ژنومی و ORF یک ژن تیوردوکسین *h* تحت عنوان *VvCxxS2*، از بافت حبه انگور جداسازی و همسانه‌سازی گردیدند. قطعه DNA ژنومی *VvCxxS2* حاوی دو اینترون در موقعیت‌هایی مشابه با ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و گیاهان عالی بوده و اتصالات اینترون-اگزون آن همانند ژن‌های گیاهان عالی از قانون GT-AG تبعیت می‌نماید. بررسی موقعیت اینترونی نشان داد که دو اینترون از ژن تیوردوکسین کلامیدوموناس و یک اینترون از ژن تیوردوکسین مهره‌داران در موقعیتی مشابه با اینترون‌های ژن‌های تیوردوکسین‌های *f* و *h* گیاهان عالی قرار گرفته‌اند که به احتمال قوی یک خاستگاه اولیه را برای جلبک کلامیدوموناس، تیوردوکسین‌های *f* و *h* گیاهان عالی و مهره‌داران پیشنهاد می‌نماید. بررسی موقعیت اینترونی ژن‌های تیوردوکسین *o* نشان داد که این ژن‌ها دستخوش یک تکامل دیرهنگام شده و در مقایسه با تیوردوکسین‌های *f* و *h* الگوی متفاوتی از تکامل را دارا می‌باشند. موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* نیز مورد مطالعه قرار گرفته و نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که این ژن‌ها دارای یک اینترون بین توالی پیتید انتقالی و پروتئین بالغ بوده و اینترون‌های خود را در طی یک تکامل دیرهنگام بدست آورده‌اند. در مجموع، نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که تیوردوکسین-های *f*، *h* و *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *m*، *p*، *x* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی

انگور،
اینترون،
تکامل،
تیوردوکسین،
کلامیدوموناس

مقدمه

گلوکاتایون/گلوکاتاردوکسین وابسته می‌باشد (Gelhay et al. 2003a).

خانواده چند ژنی تیوردوکسین‌ها به طور وسیع در گیاهان مختلف، به ویژه گیاه مدل آرابیدوپسیس (*A. thaliana*) مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهشی، موقعیت اینترون و آگزون شش قطعه ژنومی کد کننده تیوردوکسین *h* از گیاه مدل آرابیدوپسیس و قطعات ژنومی کد کننده تیوردوکسین‌های *m* و *f* از گیاه نخود فرنگی (*Pisum sativum*) مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده نظریه یوکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *h* و *f* و پروکاریوتی بودن تیوردوکسین *m* را قویاً تایید نمود (Sahrawy et al. 1996). در صنوبر (*Populus trichocarpa*)، سه توالی کد کننده تیوردوکسین *h* از کتابخانه EST بافت‌های برگ و ریشه جداسازی و همسانه‌سازی شده و بررسی ویژگی‌های کاتالیتیکی پروتئین‌های کد شده آن‌ها نشان داد که این آیزوفرما حاوی توالی جایگاه فعال متفاوت بوده و به زیرگروه‌های مختلفی تعلق دارند (Gelhay et al. 2003b). بررسی فعالیت کاتالیتیکی ژن *AtTRXh5* در گیاه آرابیدوپسیس نشان داد که این ژن برخلاف سایر ژن‌های تیوردوکسین *h* آرابیدوپسیس، در اثر زخم‌شدگی، پیری، ریزش و عامل بیماریزای باکتریایی *Pseudomonas syringae* به میزان زیادی القاء شده و احتمالاً نقش مهمی در واکنش به تنش‌های اکسنده و عوامل بیماریزا دارد (Laloi et al. 2004). همچنین بررسی فرآیند جوانه‌زنی بذور غلات نشان داده است که با دخالت تیوردوکسین‌های *h* پروتئین‌های موجود به شکل اکسید شده در بذور خشک و رسیده، پس از جذب آب توسط بذر به حالت احیاء شده درآمده و موجب جوانه‌زنی بذر می‌شوند (Alkhalfioui et al. 2007).

تاکنون پژوهشی در زمینه بررسی موقعیت اینترون- آگزون ژن‌های تیوردوکسین در گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) انجام نشده و این اولین پژوهش در این زمینه می‌باشد. در این مطالعه، قطعات DNA ژنومی و ORF یک ژن کد کننده تیوردوکسین نوع *h* تحت عنوان VvCxxS2، متعلق به زیرگروه III از بافت حبه انگور عسکری (*V. vinifera* L. cv. Askari) همسانه‌سازی و توالی‌یابی شده و موقعیت اینترون‌های آن با ژن‌های تیوردوکسین *h* انگور و

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک (۱۲ تا ۱۳ کیلو دالتون) و مقاوم در برابر حرارت هستند که در تنظیم ردوکس سلولی دخالت دارند (Gelhay et al. 2005). این پروتئین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت شده و تنوع گسترده‌ای را در موجودات فتوسنتز کننده نشان می‌دهند (Gelhay et al. 2004). برای مثال، حداقل ۴۸ ژن کد کننده تیوردوکسین و شبه تیوردوکسین در ژنوم توالی یابی شده گیاه مدل آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) شناسایی شده است (Meyer et al. 2008). نکته جالب در مورد تیوردوکسین‌ها این است که آن‌ها دارای یک ساختار سه‌بعدی کاملاً پایدار می‌باشند که تحت عنوان پیچ و تاب‌خوردگی مختص تیوردوکسین‌ها (Thioredoxin Fold) نامیده شده و در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌ها از قبیل: جلبک-ها، گیاهان عالی و مهره‌داران مشاهده می‌شود (Maeda et al. 2008).

گیاهان عالی حاوی انواع مختلفی از ژن‌های تیوردوکسین می‌باشند که عبارتند از: تیوردوکسین‌های کلروپلاستی *f*، *m*، *p*، *x* و *y*؛ تیوردوکسین‌های میتوکندریایی *o*؛ تیوردوکسین‌های شبکه آندوپلاسمی *s* و تیوردوکسین‌های *h* (Gelhay et al. 2004; Meng et al. 2010; Alkhalfioui et al. 2008). تیوردوکسین‌های *o*، *x*، *m* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته اما تیوردوکسین‌های *f*، *h* و *o* ویژه موجودات یوکاریوتی می‌باشند (Gelhay et al. 2004). تیوردوکسین‌های کلروپلاستی در هسته کد شده و به وسیله فردوکسین و آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) احیاء می‌شوند (Lemaire et al. 2007). در حالی که احیاء تیوردوکسین‌های *h*، *o* و *s* توسط NADPH و آنزیم NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) انجام می‌شود (Gelhay et al. 2008; Alkhalfioui et al. 2004). تیوردوکسین‌های *h* بر اساس بررسی ساختار اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی به سه زیرگروه مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند (Gelhay et al. 2004). اعضای زیرگروه‌های I و II توسط آنزیم NTR احیاء شده، در حالی که احیاء اعضای زیرگروه III به سیستم

اولیگونوکلئوتیدی و DNA ژنومی (تیمار شده با RNase A) یا cDNA سنتز شده (با RNA کل تیمار شده با DNase I) به عنوان الگو انجام شد. آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی بر اساس انتهای 5' و 3' چارچوب باز خواندنی توالی VvCxxS2 (با شماره دستیابی EE089310 موجود در پایگاه اطلاعات توالی GenBank در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار Oligo. V5 طراحی شدند. آغازگرهای اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی BamHI در انتهای 5' بودند که توسط شرکت Metabion آلمان سنتز شدند. از آغازگر رفت (VvCxxSF)؛ با توالی 5'-
 3'-tacggatccATGGAAAATCAGGAGCCG-5' و آغازگر برگشت (VvCxxSR)؛ با توالی 5'-
 3'-atcggatccCTAGGCTACATACACGCGAAA-5' استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی 50 µl حاوی (pH 8.8) mM Tris-HCl 20، mM (NH₄)₂SO₄ 10، mM KCl 10، mM MgSO₄ 2، Triton X-100 0.1 درصد، mg/ml BSA 0.1، µM از هر 500 pM، dNTP از هر 500 واحد از آنزیم Pfu DNA polymerase مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در 35 چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد و به مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال در دمای 58 درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و به مدت یک تا دو دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد و به مدت سه دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی و توالی‌یابی DNA

پس از خالص‌سازی محصولات PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean Up Kit-Vivantis)، قطعات مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 توسط آنزیم برشی BamHI هضم گردیده و واکنش اتصال استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 انجام گرفته و محلول‌های اتصال به طور جداگانه و به روش شوک حرارتی به سلول‌های مستعد

ژن‌های تیوردوکسین از سایر موجودات، به ویژه گیاه مدل آرابیدوپسیس مورد مقایسه قرار می‌گیرد. همچنین با بررسی موقعیت ایترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *o*، *h*، *f*، *m*، *p*، *x* و *y* نشان می‌دهیم که تیوردوکسین‌های *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *x*، *p*، *m* و *y* منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت حبه گیاه انگور عسکری (*V. vinifera* L.cv. Askari) در مرحله ترش- شیرین (Veraison) (Heidari et al. 2010) از مزارع انگور در ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان، به میزان یک گرم توزین، درون ورقه‌های آلومینیومی بسته‌بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای 80- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، نگهداری شدند.

استخراج اسیدهای نوکلئیک و سنتز رشته اول cDNA استخراج DNA ژنومی و RNA کل به روش (Heidari et al. 2011) انجام شده و رشته اول cDNA با استفاده از 5 µg محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم RNase-free DNase I (Fermentas)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس RevertAid™ M-MuLV RT (Fermentas) و آغازگرهای (Qiagen) Oligo (dT)₁₈ سنتز شد. ترکیب هر واکنش نسخه‌برداری شامل mM Tris-HCl (pH 8.3) 50، mM KCl 50، mM dithiothreitol 10، mM MgCl₂ 4، µM Oligo (dT)₁₈ primer 50، از هر 500 µM dNTP و سر انجام 200 units RevertAid™ M-MuLV RT بود. واکنش نسخه- برداری در دمای 42 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام و عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در دمای 70 درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه صورت گرفت. بدین ترتیب از رشته اول مولکول cDNA مولکول RNA-DNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش RT-PCR استفاده شد.

طراحی آغازگرهای اختصاصی و واکنش PCR واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) به منظور تکثیر ژن VvCxxS2 با استفاده از آنزیم Pfu (Fermentas)، آغازگرهای

تیوردوکسین‌های m ، x و y در هسته کد شده و درون کلروپلاست‌ها قرار گرفته و دارای یک انتهای آمینو با طول زیاد می‌باشند که احتمالاً به عنوان یک پپتید انتقالی برای ورود به درون کلروپلاست‌ها عمل می‌نماید (Lemaire et al. 2007). تیوردوکسین‌های p و s که به تازگی در گیاهان آرابیدوپسیس و یونجه (*Medicago truncatula*) شناسایی شده‌اند نیز در شاخه تیوردوکسین‌های پروکاریوتی قرار گرفته و همراه با تیوردوکسین‌های m ، x و y دارای منشأ پروکاریوتی می‌باشند (Alkhalifi et al. 2010; Arsova et al. 2008). تیوردوکسین p با موقعیت کلروپلاستی و مشارکت در بیان ژن‌های پلاستی، نسبت به تیوردوکسین‌های m ، s ، x و y در فاصله دورتری قرار گرفته و گروه مجزایی را تشکیل می‌دهد (Arsova et al. 2010; Meng et al. 2010). در حالی که تیوردوکسین s در مجاورت تیوردوکسین m قرار گرفته و احتمالاً پس از تفکیک گیاهان عالی از یکدیگر، از این گروه (تیوردوکسین m) تکامل یافته و محل فعالیتش درون شبکه آندوپلاسمی است (Alkhalifi et al. 2008). تیوردوکسین‌های باکتریایی نیز یک گروه مجزا را درون تیوردوکسین m گیاهان عالی تشکیل می‌دهند که نشان دهنده شباهت بالای توالی پروتئینی بین آن‌ها و به احتمال قوی تکامل تیوردوکسین m از تیوردوکسین‌های باکتریایی می‌باشد (Sahrawy et al. 1996). شاخه یوکاریوتی به تیوردوکسین‌های مهره‌داران، قارچ‌ها، جلبک سبز کلامیدوموناس (*Chlamydomonas reinhardtii*) و تیوردوکسین‌های f ، h و o گیاهان عالی تقسیم‌بندی می‌شود. تیوردوکسین f درون کلروپلاست‌ها قرار داشته (Lemaire et al. 2007) و یک گروه مجزایی را نزدیک مهره‌داران تشکیل می‌دهد. نکته جالب توجه آن است که اگر چه تیوردوکسین‌های f ، m ، p و x و y از نظر موقعیت زیرسلولی مشابه بوده و همگی درون کلروپلاست قرار دارند، اما به نظر می‌رسد که نحوه تکامل ژنتیکی تیوردوکسین f با سایر تیوردوکسین‌های کلروپلاستی متفاوت بوده و از یک تیوردوکسین یوکاریوتی مشتق شده است (Sahrawy et al. 1996). تیوردوکسین o با داشتن یک پپتید انتقالی و موقعیت زیرسلولی میتوکندریایی (Laloi et al. 2001) از نظر تکاملی به

باکتری اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5 α ، انتقال داده شدند (Sambrook and Russell 2001). پس از انجام آزمون سفید-آبی، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلبیایی با SDS استخراج گردیده و با استفاده از کیت GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) خالص‌سازی شدند. توالی یابی DNA پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از آغازگرهای راه-انداز باکتیروفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت و با روش توالی‌یابی Dideoxynucleotide توسط شرکت SeqLab (Sequence Laboratories Gottingen-Germany) انجام شد.

بررسی توالی و مطالعات فیلوژنتیکی

بررسی و تعیین موقعیت توالی‌های اینترون و اگزون ژن همسانه-سازی شده با استفاده از برنامه BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا (NCBI) انجام گرفته و توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate (<http://www.expasy.ch/tools>) مورد ترجمه قرار گرفت. همچنین تهیه هم‌مدیف‌سازی‌های چندگانه و ساخت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های موجودات مختلف به کمک نرم‌افزار ClustalW (<http://ClustalW.genome.ad.jp>) انجام شد. شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI که برای ساخت هم‌مدیف‌سازی‌های چندگانه و درخت فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند در جدول ۱ آورده شده است.

نتایج و بحث

مطالعه فیلوژنتیکی ژن‌های تیوردوکسین از موجودات مختلف مطالعه فیلوژنتیکی توالی اسید آمینه‌ای تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank، با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به روش اتصال همسایه (Neighbor joining) منجر به ساخت یک درخت فیلوژنتیکی با گروه‌های مختلف گردید (شکل ۱). درخت فیلوژنتیکی به دو شاخه اصلی شامل تیوردوکسین‌های پروکاریوتی و یوکاریوتی تقسیم‌بندی می‌شود. شاخه پروکاریوتی از تیوردوکسین‌های باکتریایی و تیوردوکسین‌های m ، p ، s ، x و y گیاهان عالی تشکیل شده است.

جدول ۱- شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در NCBI GenBank مورد استفاده برای ساخت هم‌مدیف‌سازی‌های چندگانه و درخت فیلوژنتیکی

شماره دستیابی	نام ژن	اسم علمی	نام موجود زنده	ردیف
X70286, X70287, X70288	HsTrx	<i>Homo sapiens</i>	انسان	۱
P11232	RnTrx	<i>Rattus norvegicus</i>	موش صحرایی	
P08628	OcTrx	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	خرگوش	
P08629	GgTrx	<i>Gallus gallus</i>	مرغ	
P50413	OaTrx	<i>Ovis aries</i>	گوسفند	
U35827	AtTrx h1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	ارابیدوپسیس	۲
U35826	AtTrx h2			
U35640	AtTrx h3			
U35828	AtTrx h4			
U35829	AtTrx h5			
AC007258	AtTrx h7			
AC010675	AtTrx h8			
AC012562	AtTrx h9			
At1g11530	AtCxxS1			
U35639	AtCxxS2			
At3g56420	AtCxxC2			
AC004238	AtTrx o1			
At1g31020	AtTrx o2			
At1g03680	AtTrx m1			
AL161497	AtTrx m2			
AC006248	AtTrx m3			
At3g15360	AtTrx m4			
AC018363	AtTrx f1			
At5g16400	AtTrx f2			
AC007980	AtTrx x			
At1g76760	AtTrx y1			
At1g43560	AtTrx y2			
AC023912	AtTrx p			
NC_012010	VvTrx h1	<i>Vitis vinifera</i>	انگور	
NC_012024	VvTrx h2			
NC_012007	VvTrx h3			
NC_012020	VvTrx h4			
NC_012014	VvTrx h5			
EU280166	VvCxxS1			
NW_002239150	VvTrx o			
NC_012018	VvTrx m1			
NC_012024	VvTrx m2			
NC_012025	VvTrx m3			
NC_012009	VvTrx m4			
NC_012010.2	VvTrx f			
NW_002239280	VvTrx x			
NW_002238144	VvTrx y			
NW_002239885	VvTrx p			
DQ121444	MtTrx s1	<i>Medicago truncatula</i>	یونجه	
DQ121445	MtTrx s2			
P80028	CrTrx h	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	جلبک سبز	۳
M59168	ScTrx1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	مخمر	۴
M59169	ScTrx2			
D45892	NcTrx	<i>Neurospora crassa</i>	نئوروسپورا	
XM-652682	AnTrx	<i>Aspergillus nidulans</i>	اسپرژیلوس	
P0AA27	EcTrx	<i>Escherichia coli</i>	اشریشیاکلی	۵
P09857	CvTrx	<i>Chromatium vinosum</i>	کروماتیوم	
P10473	RrTrx	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	رودواسپیریلیوم	
U20361	TfTrx	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	تیوباسیلوس	

در گیاهان عالی قابل مقایسه با پروکاریوت‌ها و سایر یوکاریوت‌ها، به ویژه مهره‌داران نیست. به عبارت دیگر، اگر چه تیوردوکسین‌ها به احتمال زیاد از یک جد مشترک بوجود آمده‌اند، اما دستخوش یک تکامل سریع درون یوکاریوت‌ها قرار گرفته به نحوی که موقعیت‌ها و توالی‌های اینترون درون ژن‌های تیوردوکسین می‌تواند به عنوان نشانه‌هایی از تکامل مورد توجه قرار گیرند (Sahrawy et al. 1996). به هر حال، این نتایج با فرضیه پروکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *x* و *y* و یوکاریوتی بودن تیوردوکسین‌های *h* و *o* گیاهان عالی مطابقت داشته و نشان می‌دهد که به احتمال زیاد تیوردوکسین‌های *p* و *s* نیز دارای منشا پروکاریوتی می‌باشند.

موقعیت اینترون‌ها در توالی ژنومی تیوردوکسین‌های *h* انگور و سایر گیاهان عالی

توالی‌های DNA ژنومی و ORF ژن *VvCxxS2* با استفاده از آغازگرهای ویژه *VvCxxSF* و *VvCxxSR*، طراحی شده بر اساس توالی EST شناسایی شده در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank، همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردیدند. قطعات DNA ژنومی و چارچوب بازخواندنی ژن *VvCxxS2* به ترتیب ۸۶۷ bp و ۳۸۱ bp طول داشته و یک پروتئین با ۱۲۶ اسیدآمینو را کد می‌نماید (شکل ۲). بررسی با برنامه BLAST نشان داد که توالی ژنومی *VvCxxS2*، ثبت شده در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank تحت شماره دستیابی HM370528، حاوی سه توالی آگزون (به ترتیب با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی اینترون (به ترتیب با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد (شکل ۳). اتصالات آگزون- اینترون در ژن *VvCxxS2* همانند ژن‌های گیاهان عالی از قانون GT-AG تبعیت نموده (Gallie et al. 1993) و توالی‌های اینترون در مقایسه با توالی‌های کد کننده آگزون از نظر AT نسبتاً غنی می‌باشند.

به منظور مقایسه راحت‌تر، جایگاه اتصال بین توالی‌های آگزون و اینترون در توالی‌های پروتئینی بوسیله اسیدآمینو شماره‌گذاری شده بر اساس موقعیت اسیدآمینو مشابه در توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی (*E. coli*) نشان داده می‌شود. به



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی اسیدآمینو تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank و توسط نرم‌افزار ClustalW به روش اتصال همسایه (Neighbor joining) ساخته شد.

گروه تیوردوکسین‌های *h* و جلبک کلامیدوموناس نزدیک می‌باشد. گروه تیوردوکسین‌های *h* در مقایسه با سایر تیوردوکسین‌های شناسایی شده دارای اشکال متنوع و چندگانه‌ای بوده که بطور وسیع در گیاهان عالی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Gelhaye et al. 2004). تیوردوکسین‌های *h* درون سیتوزول، میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی، غشاء پلاسمایی و حتی هسته سلول قرار داشته و بر اساس بررسی توالی اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسولوی به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی می‌شود (Gelhaye et al. 2005). تیوردوکسین‌های مهره‌داران نیز از نظر تکاملی بسیار به یکدیگر نزدیک می‌باشند که این نشان دهنده شباهت زیاد بین توالی‌های پروتئینی و وقوع تکامل با سرعت اندک در تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های عالی است، در حالی که تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های پست از قبیل قارچ‌ها و جلبک کلامیدوموناس (به عنوان یک جد شناخته شده برای تیوردوکسین‌های گیاهان عالی به ویژه *h* و *o*) از نظر تکاملی بسیار با یکدیگر متفاوتند (Sahrawy et al. 1996).

نتایج بدست آمده از بررسی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت-ها تا یوکاریوت‌های عالی وجود داشته اما تنوع و گستردگی آن‌ها

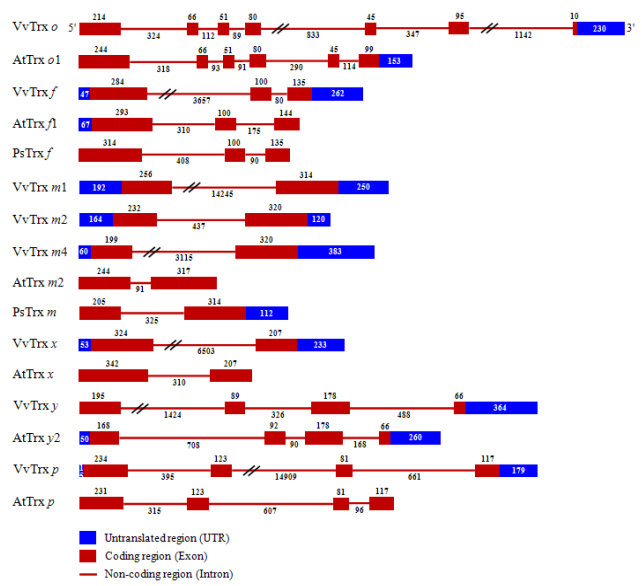


شکل ۳- توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌های ژن *VvCxxS2*. ژن *VvCxxS2* حاوی سه توالی آگزون (با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی اینترون (با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد که به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز مشخص شده‌اند. اتصالات آگزون- اینترون () به صورت و شماره‌های نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه به ترتیب در سمت چپ و راست نشان داده شده‌اند.

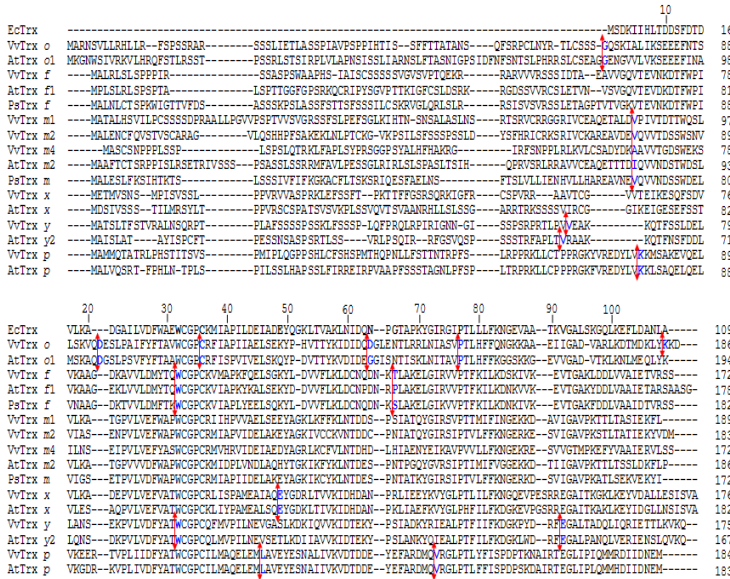
CrTrx h از جلبک کلامیدوموناس [صفر) ۲۴I؛ صفر) ۳۲W؛ صفر) ۶۶A] اولین و سومین اینترون با دو اینترون ژن *VvCxxS2* و ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی مطابقت داشته در حالی که دومین اینترون درون توالی آگزون دو قبل از جایگاه فعال قرار گرفته است (شکل ۴ب). همچنین در انسان و سایر مهره‌داران، ژن‌های تیوردوکسین دارای ۴ توالی اینترون در موقعیت‌های مشابه [صفر) ۱۱T؛ صفر) ۴۵S؛ صفر) ۶۶D؛ صفر) ۸۷V] بوده، به طوری که اینترون سه آن‌ها در موقعیت مشابه با اینترون دو تیوردوکسین‌های *h* گیاهان عالی قرار گرفته است (شکل ۴ب). این نتایج نشان می‌دهد که ژن‌های تیوردوکسین از جلبک کلامیدوموناس و مهره‌داران به همراه تیوردوکسین‌های *h* گیاهان عالی، اگر چه دارای تفاوت‌هایی در توالی اسیدآمینه‌ای خود می‌باشند، اما همگی آن‌ها به احتمال زیاد دارای یک جد مشترک با حداقل یک توالی اینترون در موقعیت ۶۶ می‌باشند.

که نشان دهنده یک کاهش یا افزایش هماهنگ شده در توالی نوکلئوتیدی اینترون‌ها در طی تکامل می‌باشد (Sahrawy et al. 1996). بررسی توالی اینترون‌ها با استفاده از برنامه BLAST، هیچ گونه شباهتی را بین توالی‌های اینترون از ژن‌های تیوردوکسین *h* متفاوت و توالی‌های نزدیک از یک گونه گیاهی نشان نداد که می‌تواند تأیید کننده این فرضیه باشد که توالی‌های اینترون سریعتر از توالی‌های کد کننده (آگزون‌ها) تکامل می‌یابند (Koonin 2006). موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین از باکتری اشریشیاکلی، مخمر ساکارومیسس (*Saccharomyces cerevisiae*)، جلبک سبز کلامیدوموناس (*C. reinhardtii*) و انسان (*Homo sapiens*) نیز مورد بررسی قرار گرفت. ژن‌های تیوردوکسین از باکتری اشریشیاکلی و مخمر ساکارومیسس فاقد اینترون بوده در حالی که ژن‌های تیوردوکسین از جلبک کلامیدوموناس و انسان به ترتیب حاوی سه و چهار توالی اینترون می‌باشند (شکل ۴الف). در ژن

الف



ب



شکل ۵- ساختار و موقعیت اینترون‌های ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*, *o*, *m*, *p*, *x* و *y* گیاهان عالی. الف) ساختار ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*, *o*, *m*, *p*, *x* و *y* در گیاهان آراییدوپسیس، انگور و نخود فرنگی. نواحی غیرقابل ترجمه (UTR)، رمزگردان (Exon)، غیر رمزگردان (Intron) با ذکر اندازه، به ترتیب با نوارهای آبی، قرمز و خطوط قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. ب) موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*, *o*, *m*, *p*, *x* و *y* در گیاهان آراییدوپسیس، انگور و نخود فرنگی. توالی‌های پروتئینی بدست آمده از تیوردوکسین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW هم‌مدیف شده و موقعیت اینترون‌ها با علامت فلش مشخص شده‌اند. از توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی برای شماره‌گذاری استفاده گردیده و اسیدآمینو آغاز کننده توالی اینترون‌ها نیز با رنگ آبی نشان داده شده است.

تیوردوکسین *x* همانند تیوردوکسین *m* تنها دارای یک اینترون می‌باشد که طول آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. این توالی اینترون در ژن‌های تیوردوکسین *x* قرار دارد: [VvTrx *x*] (صفر) [۴۹E]، [AtTrx *x*] (صفر) [۴۹E] (شکل ۵ب). بررسی ژن‌های تیوردوکسین‌های *p* و *y* از انگور و آراییدوپسیس نیز نشان داد که هر یک از آن‌ها حاوی سه اینترون در موقعیت‌های مشابه بوده به طوری که توالی اینترون یک در ژن‌های تیوردوکسین *y* و توالی اینترون دو در ژن‌های تیوردوکسین *p* نسبت به اینترون‌های دیگر بزرگتر می‌باشند (شکل ۵الف). در ژن‌های *y* [VvTrx *y*] (صفر) [۷۷-]؛ (۲) [۳۲W]؛ (صفر) [۹۲E] و *y*2 [AtTrx *y*2] (صفر) [۷۷-]؛ (۲) [۳۲W]؛ (صفر) [۹۲E] اولین اینترون مابین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ قرار گرفته و موقعیت اینترون دوم مشابه با اولین اینترون تیوردوکسین *f* و دومین اینترون ژن *h* CrTrx می‌باشد (شکل ۵ب). همچنین در ژن‌های *p* [VvTrx *p*] (صفر) [۶K]؛ (صفر) [۴۶L]؛ (صفر) [۷۳۷] و *p* [AtTrx *p*] (صفر) [۶K]؛ (صفر) [۴۶L]؛ (صفر) [۷۳۷]، اینترون یک، توالی پپتید

تیوردوکسین *m* از انگور: [VvTrx *m*1] (یک) [۵V]، [VvTrx *m*2] (یک) [۵V]، [VvTrx *m*4] (یک) [۵A]، آراییدوپسیس: [AtTrx *m*2] (یک) [۵I] و نخود فرنگی: [PsTrx *m*] (یک) [۵V] تنها حاوی یک اینترون در موقعیت مشابه می‌باشند که بین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ قرار می‌گیرد (Jaillon et al. 2007) (شکل ۵ب). در مقایسه با گیاهان آراییدوپسیس و نخود فرنگی، ژن‌های تیوردوکسین *m* از انگور حاوی اینترون‌هایی با اندازه بزرگتر بوده و همان‌طور که گفته شد، اندازه اینترون‌ها به نوع گونه گیاهی بستگی دارد (شکل ۵الف). موقعیت اینترون در ژن‌های تیوردوکسین *m* با موقعیت اینترون‌ها در تیوردوکسین‌های *f* و *h* مشابه نبوده و این نشان دهنده اضافه شدن تازه توالی اینترون در طول تکامل دیر هنگام در توالی ژنومی تیوردوکسین *m* می‌باشد که تایید کننده منشا پروکاریوتی آن‌هاست (Sahrawy et al. 1996). این وضعیت در ژن‌های تیوردوکسین *x* نیز مشاهده می‌شود با این تفاوت که توالی اینترون مابین پپتید انتقالی و پروتئین بالغ واقع نشده و پس از جایگاه فعال پروتئین قرار می‌گیرد.

تیوردوکسین o با منشا یوکاریوتی در طی تکامل با کاهش در تعداد ایترون‌ها مواجه نشده و به نظر می‌رسد که ایترون‌های خود را در طی یک تکامل دیرهنگام بدست آورده باشند، چرا که موقعیت ایترون‌های آن‌ها با جد مشترک یا حداقل با تیوردوکسین‌های f و h مشابه نبوده و احتمالاً، برخلاف تیوردوکسین‌های یوکاریوتی، الگوی متفاوتی از تکامل را دارا می‌باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. ژن‌های تیوردوکسین های p و m دارای یک ایترون بین توالی پپتید انتقالی و پروتئین بالغ می‌باشند که در سایر ژن‌های هسته‌ای کد کننده پروتئین‌های کلروپلاستی نیز دیده می‌شود که نشان دهنده منشا پروکاریوتی این تیوردوکسین‌ها می‌باشد. به هر حال عدم وجود حتی یک توالی ایترون مشابه در ژن‌های تیوردوکسین‌های p ، m ، x و y نشان می‌دهد که احتمالاً این ایترون‌ها در طی یک تکامل دیرهنگام به توالی ژن‌ها اضافه شده‌اند.

در مجموع، نتایج بدست آمده در این بررسی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های f ، h و o منشا یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های m ، p ، x و y منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند. با این وجود همچنان نکات مبهم بیشماری باقی می‌ماند که نیاز به پژوهش‌های بیشتری دارد، از قبیل اینکه در طی تکامل تعداد ایترون‌ها در ژن‌های یوکاریوتی کاهش می‌یابد یا افزایش؟ آیا این کاهش یا افزایش تعداد ایترون‌ها یک امر تصادفی است یا یک فرآیند برنامه‌ریزی شده؟ به چه نحو تیوردوکسین‌های f و o با منشا یوکاریوتی به ترتیب می‌توانند در اندامک‌های کلروپلاست و میتوکندری فعالیت داشته باشند؟ نحوه تکامل تیوردوکسین o با منشا یوکاریوتی چگونه است؟ آیا همانند تیوردوکسین‌های f و h از کلامیدوموناس تکامل یافته‌اند یا خیر؟

انتقالی را از توالی پروتئین بالغ جدا نموده و موقعیت سایر ایترون‌ها شباهتی با تیوردوکسین‌های بحث شده ندارد. به هر حال، موقعیت ایترون‌ها در تیوردوکسین‌های p و y با تیوردوکسین‌های f ، h و o با منشا یوکاریوتی هیچ شباهتی نداشته و بنابراین چنین به نظر می‌رسد که احتمالاً این ژن‌ها دستخوش یک تکامل دیرهنگام شده و با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعات فیلوژنتیکی، خاستگاه پروکاریوتی آن‌ها تأیید می‌شود (Meyer et al. 2002).

نتیجه‌گیری

امروزه نقش ایترون‌ها در تکامل و ارزش آن‌ها به عنوان نشانه‌هایی از تکامل، موضوع بحث پژوهش‌های فراوانی است. با بررسی دقیق توالی اسیدآمینه‌ای و مقایسه موقعیت ایترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین از موجودات یوکاریوتی، تصویر جامعی از آغاز تکامل این ژن‌ها از یک جد مشترک با حداقل هفت ایترون بدست می‌آید. به هر حال، ژن‌های تیوردوکسین در یوکاریوت‌های عالی از قبیل جانوران و گیاهان عالی با کاهش در تعداد ایترون‌ها مواجه شده، به طوری که این کاهش در یوکاریوت‌های پست شامل قارچ‌ها و جلبک‌ها بیشتر می‌باشد.

در گیاهان عالی، ژن‌های تیوردوکسین، ایترون‌های زیادی را از دست داده و ژن‌هایی با سه ایترون، مشابه با ژن h CrTrx از کلامیدوموناس را بوجود آوردند که متعاقباً با ناپدید شدن یک ایترون دیگر به طور تصادفی، ژن‌هایی با دو ایترون (تیوردوکسین‌های f و h) تشکیل شدند. به عبارت دیگر، این احتمال وجود دارد که تیوردوکسین‌های f و h از ژن h CrTrx کلامیدوموناس تکامل یافته باشند. تکامل بیشتر در ژن‌های تیوردوکسین با منشا یوکاریوتی منجر به ایجاد یک ژن تیوردوکسین h با یک توالی ایترون منفرد ($h5$ AtTrx) در آرابیدوپسیس گردید. برخلاف آنچه که گفته شد، ژن‌های

(2007) Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiol* 144:1559-1579

Arsova B, Hoja U, Wimmelbacher M, Greiner E, Ustun S, Melzer M, Petersen K, Lein W and Bornke F (2010) Plastidial thioredoxin z interacts with two fructokinase-like proteins in a thiol-dependent manner: evidence for an essential role in chloroplast development in

منابع

- Alkhalfioui F, Renard M, Frenedo P, Keichinger C, Meyer Y, Gelhaye E, Hirasawa M, Knaff DB, Ritzenthaler C and Montrichard F (2008) A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiol* 148:424-435
- Alkhalfioui F, Renard M, Vensel WH, Wong J, Tanaka CK, Hurkman WJ, Buchanan BB and Montrichard F

- Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. <http://www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.110.220512>
- Brugidou C, Marty I, Chartier Y and Meyer Y (1993) The *Nicotiana tabacum* genome encodes two cytoplasmic thioredoxin genes which are differently expressed. *Mol Gen Genet* 238:285-293.
- Gallie DR (1993) Post-transcriptional regulation of gene expression in plants. *Ann Rev Plant Physiol* 44:77-105
- Gelhay E, Rouhier N, Jacquot JP (2003a) Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction *FEBS Letters* 555:443-448
- Gelhay E, Rouhier N, Jacquot JP (2004) The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiol Biochem* 42:265-271.
- Gelhay E, Rouhier N, Navrot N, Jacquot JP (2005) The plant thioredoxin system. *CMLS Cell Mol Life Sci* 62:24-35.
- Gelhay E, Rouhier N, Vlamis-Gardikas A, Girardet JM, Sautière PE, Sayzet M, Martin F, Jacquot JP (2003b) Identification and characterization of a third thioredoxin *h* in poplar. *Plant Physiol Biochem* 41:629-635
- Hartman H, Syvanen M, Buchanan BB (1990) Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins *f* and *m*. *Mol Biol Evol* 7:247-254.
- Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2010) Expression analysis of three h-type thioredoxin isoforms in three Iranian grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars, indicating differential expression in different tissues. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding* 1:26-33.
- Heidari Japelaghi R, Haddad R, Garoosi GA (2011) Rapid and efficient isolation of high quality nucleic acids from plant tissues rich in polyphenols and polysaccharides. *Mol Biotech* 49:129-137.
- Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, Nakamura S, Hirano H, Mori S, Fujiwara T, Hayashi H and Chino M (1995) Thioredoxin *h* is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* 195:456-463.
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, Choisne N, Aubourg S, Vitulo N, Jubin C (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm. *Nature* 449:463-467.
- Koonin EV (2006) The origin of introns and their role in eukaryogenesis: a compromise solution to the introns-early versus introns-late debate? *Biol Direct* 1:1-23.
- Laloi C, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:14144-14149.
- Laloi C, Mestres OD, Marco Y, Meyer Y, Reichheld JP (2004) The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor *Plant Physiol* 134:1006-1016.
- Lemaire SD, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V and-Issakidis-Bourguet E (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* 51:343-365.
- Maeda K, Hagglund P, Finnie C, Svensson B, Henriksen A (2008) Crystal structures of barley thioredoxin *h* isoforms *HvTrxh1* and *HvTrxh2* reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. *Protein Science* 17:1015-1024.
- Meng L, Wong JH, Feldman LJ, Lemaux PG, Buchanan BB (2010) A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *PNAS* 107:3900-3905
- Meyer Y, Siala W, Bashandy T, Riondet C, Vignols F and Reichheld JP (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim Biophys Acta* 1783:589-600.
- Meyer Y, Vignols F, Reichheld JP (2002) Classification of plant thioredoxins by sequence similarity and intron position. *Meth Enzymol.* 347:394-402.
- Sahrawy M, Hecht V, Jaramillo JL, Chueca A, Chartier Y, Meyer Y (1996) Intron position as an evolutionary marker of thioredoxins and thioredoxin domains. *J Mol Evol.* 42:422-431.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Vol:1-3. Cold Spring Harbor Laboratory. Press Cold Spring Harbor New York USA