

مطالعه موقعیت اینترون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین انگور

Analysis of introns position in grape *thioredoxin* genes

رضا حیدری جاپلاغی^۱، رحیم حداد^{*۲} و قاسمعلی گروسی^۳

۲۰۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران، دانشگاه بین المللی امام خمینی (ره)، قزوین، ایران.

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

۱,2,3. 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 جبهه انگور جداسازی و همسانه‌سازی گردیدند. قطعه DNA ژنومی VvCxxS2 حاوی دو اینترون در موقعیت‌های 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 *u* 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 تیوردوکسین‌های *f* و *h* و *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *m* *p* *x* و *u* مشا پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی

انگور،
اینترون،
تکامل،
تیوردوکسین،
کلامیدوموناس

مقدمه

Gelhaye et al. (2003a) گلوتاتیون/گلوتاردوکسین وابسته می‌باشد ().

خانواده چند ژنی تیوردوکسین‌ها به طور وسیع در گیاهان مختلف، به ویژه گیاه مدل آراییدوپسیس (*A. thaliana*) مورد بررسی قرار گرفته است. در پژوهشی، موقعیت ایترون و اگرون شش قطعه ژنومی کد کننده تیوردوکسین *h* از گیاه مدل آراییدوپسیس 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 آیزوفرم‌ها حاوی توالی جایگاه فعال متفاوت بوده و به زیرگروه‌های مختلفی تعلق دارند (Gelhaye et al. 2003b). بررسی فعالیت کاتالیتیکی ژن *AtTRXh5* در گیاه آراییدوپسیس نشان داد که این ژن برخلاف سایر ژن‌های تیوردوکسین *h* آراییدوپسیس، در اثر زخم‌شدگی، پیری، ریزش و عامل بیماری‌زای باکتریایی *Pseudomonas syringae* به میزان زیادی القاء شده و احتمالاً نقش مهمی در Laloï et al. (2004) واکنش به تنفس‌های اکسنده و عوامل بیماری‌زا دارد (). 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 ایترون-اگرون ژن‌های تیوردوکسین در گیاه انگور (*Vitis vinifera* L.) انجام نشده و این اولین پژوهش در این زمینه می‌باشد. در این مطالعه، قطعات *h* ژنومی و ORF یک ژن کد کننده تیوردوکسین نوع *h* DNA تحت عنوان VvCxxS2، متعلق به زیرگروه III از بافت حبه انگور عسکری (*V. vinifera* L. cv. Askari) همسانه‌سازی و توالی یابی شده و موقعیت ایترون‌های 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 ردوكس سلولی دخالت دارند (Gelhaye et al. 2005). این پروتئین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی یافت شده و تنوع گسترده‌ای را در موجودات فتوسترز کننده نشان می‌دهند (Gelhaye et al. 2004). برای مثال، حداقل ۴۸ ژن کد کننده تیوردوکسین و شبیه تیوردوکسین در ژنوم توالي (Arabidopsis thaliana) یابی شده گیاه مدل آراییدوپسیس (Meyer et al. 2008) شناسایی شده است (). 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-Maeda et al. (2008).

گیاهان عالی حاوی انواع مختلفی از ژن‌های تیوردوکسین می‌باشند که عبارتند از: تیوردوکسین‌های کلروپلاستی *f m p x y*، تیوردوکسین‌های متیوکندریایی *o* تیوردوکسین‌های شبکه آندوپلاسمی *s* و تیوردوکسین‌های *h* (Gelhaye et al. 2004; Alkhalfioui et al. 2008; Meng et al. 2010) تیوردوکسین‌های *m x y* و منشأ پروکاریوتی داشته اما تیوردوکسین‌های *f o* و *o h* ویژه موجودات یوکاریوتی می‌باشند (Gelhaye et al. 2004). تیوردوکسین‌های کلروپلاستی در هسته کد شده و به وسیله FTR (فردوکسین و آنزیم فردودکسین- تیوردوکسین ردوکتاز) احیاء می‌شوند (Lemaire et al. 2007)، در حالی که احیاء تیوردوکسین‌های *o h* و *s* توسط NADPH و آنزیم NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) انجام می‌شود (Gelhaye et al. 2004; Alkhalfioui et al. 2008). تیوردوکسین‌های *h* بر اساس بررسی ساختار اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی به سه زیرگروه مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند (Gelhaye 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 ستر شده (با RNA کل تیمار شده با DNase I) به عنوان الگو انجام شد. آغازگرهای اولیگو‌نوکلئوتیدی بر اساس انتهای ۵' و ۳' چارچوب باز خواندنی توالی VvCxxS2 (با شماره دستیاری EE089310 موجود در پایگاه اطلاعات توالی GenBank در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار Oligo ۵ طراحی شدند. آغازگرهای اختصاصی شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی BamHI در انتهای ۵' بودند که توسط شرکت Metabion آلمان ستر شدند. از آغازگر رفت (VvCxxSF) با توالی ۵'- tacggatccATGGAAAATCAGGAGCCG-3' برگشت (VvCxxSR) با توالی ۵'- atcggatecCTAGGCTACATACACGCGAAA-3' استفاده شد. مخلوط واکنش در حجم نهایی $50\text{ }\mu\text{l}$ حاوی (pH ۸/۸) mM Tris-HCl، 10 mM KCl، 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، 0.1 mg/ml BSA، 0.1 mg/ml Triton X-100، 2 mM MgSO_4 ng از هر 50 pM dNTP (رفت و برگشت)، $1/25$ واحد از آنزیم *Pfu* DNA polymerase ۱۰۰ مورد استفاده قرار گرفت. واکنش PCR با استفاده از یک دستگاه ترموسایکلر قابل برنامه‌ریزی (Techne-TC512، انگلستان) در ۳۵ مرحله و اسرشتنگی در دمای 94°C درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای 58°C درجه سانتی‌گراد و به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد و به مدت یک تا دو دقیقه بود. همچنین مرحله و اسرشتنگی اولیه در دمای 94°C درجه سانتی‌گراد و به مدت سه دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72°C درجه سانتی‌گراد و به مدت ده دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی و توالی یابی DNA

پس از خالص‌سازی محصولات PCR با اندازه مورد نظر از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک (GF-1 PCR Clean) pUC19 (Up Kit-Vivantis)، قطعات مورد نظر و ناقل پلاسمیدی توسط آنزیم برشی BamHI هضم گردیده و واکنش اتصال با 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 ایترنون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین‌های *f*, *o*, *m*, *p*, *x* و *y* نشان می‌دهیم که تیوردوکسین‌های *f*, *h*, *o* منشأ یوکاریوتی و تیوردوکسین‌های *x*, *p*, *y* منشأ پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت جبه 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 بالاصله درون ازت مایع ثبیت گردید. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای -80°C 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 $5\text{ }\mu\text{g}$ RNase-free DNase I محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم RevertAidTM M-MuLV (Fermentas)، آنزیم نسخه‌بردار معکوس (Qiagen) Oligo (dT)₁₈ (Fermentas) و آغازگرهای (Pfu) (Qiagen) Oligo (dT)₁₈ ترکیب هر واکنش نسخه‌برداری شامل (pH ۸/۳) mM Tris-HCl، 10 mM dithiothreitol، 4 mM MgCl₂، 5 mM KCl، $500\text{ }\mu\text{M}$ dNTP و سر انجام $200\text{ }\mu\text{M}$ Oligo (dT)₁₈ primer و 200 units RevertAidTM M-MuLV RT برداری در دمای 42°C درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت انجام و عمل غیر فعال‌سازی آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) در دمای 70°C درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه صورت گرفت. بدین ترتیب از رشته اول مولکول cDNA با استفاده از 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 (Lemaire et al. 2007). تیوردوکسین‌های p و d که به تازگی در گیاهان آراییدوپسیس و یونجه (*Medicago truncatula*) شناسایی شده‌اند نیز در شاخه تیوردوکسین‌های پروکاریوتی قرار گرفته و همراه با تیوردوکسین- $Alkhalfioui$ et al. 2008; Arsova et al. 2010 های x و y دارای منشاء پروکاریوتی می‌باشند (Arsova et al. 2010; Meng et al. 2010; Translate et al. 2008). در حالی که تیوردوکسین d 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 (Alkhalfioui et al. 2008).

تیوردوکسین‌های باکتریایی نیز یک گروه مجرما را درون تیوردوکسین m گیاهان عالی تشکیل می‌دهند که نشان دهنده شباهت بالای توالي 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 و o گیاهان عالی تقسیم‌بندی می‌شود. تیوردوکسین f درون کلروپلاست‌ها قرار داشته (Lemaire et al. 2007) و یک گروه مجرما را نزدیک مهره‌داران، قارچ‌ها، جلبک سبز کلامیدوموناس تشکیل می‌دهد. نکته جالب توجه آن است که اگر چه تیوردوکسین‌های f , m , x , y و o 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 اشتریاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5α, انتقال داده شدند (Sambrook and Russell 2001). پس از انجام آزمون سفید-آبی، پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل GeneJET™ (Fermentas) Plasmid Miniprep Kit قلیایی با SDS استخراج گردیده و با استفاده از کیت (Seqlab) Dideoxynucleotide توالي یابی (Sequence Laboratories Gottingen-Germany) انجام شد.

بررسی توالي و مطالعات فیلوژنتیکی بررسی و تعیین موقعیت توالي‌های ایترنون و اگرون ژن همسانه- BLAST شده با استفاده از برنامه (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) اطلاعات بیوتکنولوژی امریکا (NCBI) انجام گرفته و توالي نوکلئوتیدی حاصل از توالي یابی با استفاده از برنامه Translate (http://www.expasy.ch/tools) مورد ترجمه قرار گرفت. همچنین تهیه هم‌دیفسازی‌های چندگانه و ساخت درخت فیلوژنتیکی با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های موجودات مختلف (http://ClustalW.genome.ad.jp) ClustalW نرم‌افزار NCBI که برای ساخت هم‌دیفسازی‌های 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 توالي اسید‌آمینه‌ای تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالي NCBI GenBank 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 یوکاریوتی از تیوردوکسین‌های باکتریایی و تیوردوکسین‌های m , x و y گیاهان عالی تشکیل شده است.

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

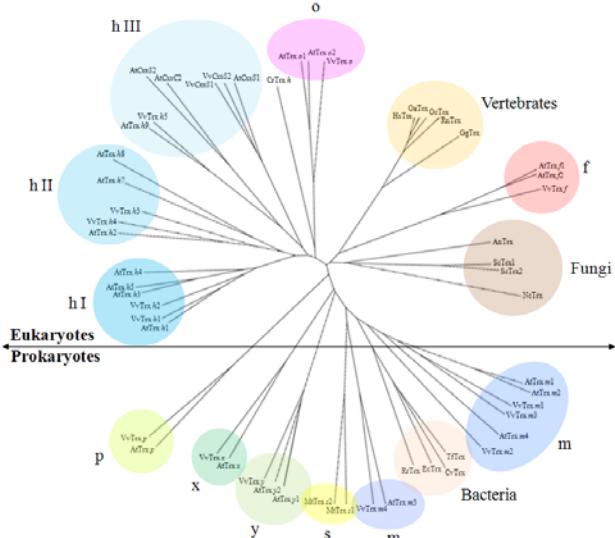
ردیف	نام موجود زنده	اسم علمی	نام ژن	شماره دستیابی
۱	انسان	<i>Homo sapiens</i>	HsTrx	X70286, X70287, X70288
	موس صحرایی	<i>Rattus norvegicus</i>	RnTrx	P11232
	خرگوش	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	OcTrx	P08628
	مرغ	<i>Gallus gallus</i>	GgTrx	P08629
	گوسفند	<i>Ovis aries</i>	OaTrx	P50413
۲	گیاهان عالی	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtTrx h1	U35827
			AtTrx h2	U35826
			AtTrx h3	U35640
			AtTrx h4	U35828
			AtTrx h5	U35829
			AtTrx h7	AC007258
			AtTrx h8	AC010675
			AtTrx h9	AC012562
			AtCxxS1	At1g11530
			AtCxxS2	U35639
			AtCxxC2	At3g56420
			AtTrx o1	AC004238
			AtTrx o2	At1g31020
			AtTrx m1	At1g03680
			AtTrx m2	AL161497
			AtTrx m3	AC006248
			AtTrx m4	At3g15360
			AtTrx f1	AC018363
			AtTrx f2	At5g16400
			AtTrx x	AC007980
			AtTrx y1	At1g76760
			AtTrx y2	At1g43560
			AtTrx p	AC023912
	انگور	<i>Vitis vinifera</i>	VvTrx h1	NC_012010
			VvTrx h2	NC_012024
			VvTrx h3	NC_012007
			VvTrx h4	NC_012020
			VvTrx h5	NC_012014
			VvCxxS1	EU280166
			VvTrx o	NW_002239150
			VvTrx m1	NC_012018
			VvTrx m2	NC_012024
			VvTrx m3	NC_012025
			VvTrx m4	NC_012009
			VvTrx f	NC_012010_2
			VvTrx x	NW_002239280
			VvTrx y	NW_002238144
			VvTrx p	NW_002239885
	بونجه	<i>Medicago truncatula</i>	MtTrx s1	DQ121444
			MtTrx s2	DQ121445
۳	جلبک‌ها	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CrTrx h	P80028
۴	قارچ‌ها	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ScTrx1	M59168
			ScTrx2	M59169
			NcTrx	D45892
			AnTrx	XM-652682
			EcTrx	P0AA27
			CvTrx	P09857
			RrTrx	P10473
			TfTrx	U20361
۵	باکتری‌ها	<i>Neurospora crassa</i>		
		<i>Aspergillus nidulans</i>		
		<i>Escherichia coli</i>		
		<i>Chromatium vinosum</i>		
		<i>Rhodospirillum rubrum</i>		
		<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>		
	ثوروسپورا			
	اسپرژیلوس			
	اشریشاکلی			
	کروماتیوم			
	رودوسپیریلوم			
	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 آمدند، اما دستخوش یک تکامل سریع درون یوکاریوت‌ها قرار گرفته به نحوی که موقعیت‌ها و توالی‌های ایترنون درون ژن‌های تیوردوکسین می‌توانند 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 *g* و *h* و *o* گیاهان عالی مطابقت داشته و نشان می‌دهد که به احتمال زیاد تیوردوکسین‌های *p* و *s* نیز دارای منشا یوکاریوتی می‌باشند.

موقعیت ایترنون‌ها 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* شناسایی شده بر NCBI EST شناسایی شده در پایگاه اطلاعات توالی GenBank، همسانه‌سازی و توالی‌بایی گردیدند. قطعات ۸۶۷ bp ژنومی و چارچوب باز خواندنی ژن *VvCxxS2* به ترتیب ۳۸۱ bp طول داشته و یک پروتئین با ۱۲۶ اسید‌آمینه را کد می‌نماید (شکل ۲). بررسی با برنامه BLAST نشان داد که توالی *VvCxxS2*، ثبت شده در پایگاه اطلاعات توالی GenBank تحت شماره دستیابی HM370528، حاوی سه توالی اگرون (به ترتیب با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی ایترنون (به ترتیب با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد (شکل ۳). اتصالات اگرون-ایترنون در ژن *VvCxxS2* همانند ژن‌های گیاهان عالی از قانون GT-AG تبعیت نموده (Gallie 1993) و توالی‌های ایترنون در مقایسه با توالی‌های کد کننده اگرون از نظر AT نسبتاً غنی می‌باشد.

به منظور مقایسه راحت‌تر، جایگاه اتصال بین توالی‌های اگرون و ایترنون در توالی‌های پروتئینی بوسیله اسید‌آمینه شماره‌گذاری شده بر اساس موقعیت اسید‌آمینه مشابه در توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشريشیاکلی (*E. coli*) نشان داده می‌شود. به



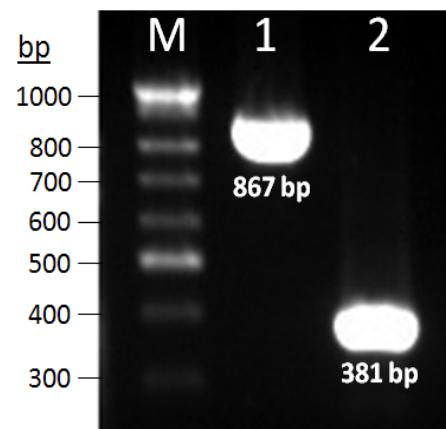
شکل ۱- درخت فیلوزنیکی تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف. درخت فیلوزنیکی با استفاده از توالی اسید‌آمینه‌ای تیوردوکسین‌ها از موجودات مختلف، موجود در پایگاه اطلاعات توالی NCBI GenBank و توسط نرم‌افزار ClustalW به روش اتصال همسایه (Neighbor joining) ساخته شد.

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 زیرسلولی 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 موقعیت تکامل با سرعت اندک در تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های عالی است، در حالی که تیوردوکسین‌های یوکاریوت‌های پست از قیل فارچها 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 فیلوزنیکی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌ها به فراوانی در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی وجود داشته اما تنوع و گستردگی آن‌ها

66A] واقع هستند. بررسی توالی ژنومی تیوردوکسین‌های h سایر گیاهان عالی نشان داد که ژن‌های AtTrx h1 [صفر)، 24V، 66S، 24L، AtTrx h2 [صفر)، 24D، 66D، 24G، 12G، 24I، 24E از آراییدوپسیس، ژن NtTrx [صفر)، 24I از CxxS1 (Nicotiana tabacum) h2 [صفر)، 66S از تنباکو (Brugidou et al. 1993) و ژن h1 OsTrx [صفر)، 24V از برنج (Oryza sativa) (Ishiwatari et al. 1995) نیز حاوی ایترنون‌هایی در مکان‌های مشابه با ژن‌های تیوردوکسین h انگور می‌باشند (شکل ۴ ب). بنابراین نتایج نشان دهنده موقعیت حفظ شده دو توالی ایترنون در ژن‌های تیوردوکسین h گیاهان عالی می‌باشد (Meyer et al. 2002).

برخلاف سایر ژن‌های تیوردوکسین h گیاهان عالی با دو توالی ایترنون، ژن‌های h5 و AtTrx h9 و AtTrx h5 ایترنون، ایترنون ژن‌های h5 AtTrx h9 و AtTrx h5 ایترنون را در طی تکامل از نظر تعداد ایترنون‌ها نشان می‌دهند که بیانگر تکامل سریع در این ژن هاست. در ژن h5 AtTrx که تنها حاوی یک ایترنون مطابق با اولین ایترنون ژن‌های تیوردوکسین‌های h است، ایترنون دوم خود را طی یک واکنش حذف‌شده‌گی در طی تکامل از دست داده است (Sahrawy et al. 1996)، در حالی که در ژن h9 AtTrx h9 شرایط بالعکس می‌باشد. اکثر نتایج بدست آمده موقعیت حفظ شده و اندازه متفاوت دو ایترنون را در ژن‌های تیوردوکسین h گیاهان VvTrx h2 و VvTrx h1 نشان می‌دهد. در انگور، ژن‌های h1 و h2 نسبت به سایر تیوردوکسین‌های h انگور، ایترنون‌های خیلی بزرگتری دارند. همچنین برخلاف ژن VvCxxS1، توالی ایترنون یک نسبت به ایترنون دو در ژن‌های h1، VvTrx h2 و VvTrx h3 و VvTrx h4 بزرگتر می‌باشد، در حالی که اندازه ایترنون‌ها در ژن hای h3 و h4 VvTrx تقریباً یکسان است (شکل ۴ الف). اندازه ایترنون‌ها به نوع گونه گیاهی بستگی دارد (Sahrawy et al. 1996)، به عنوان مثال اندازه ایترنون‌ها در ژن‌های تیوردوکسین h آراییدوپسیس در مقایسه با انگور (VvTrx h1 و VvTrx h2)، تنباکو (NtTrx h2) و برنج (OsTrx h1) خیلی کوتاهتر می‌باشد. ژن AtTrx hای VvCxxS2 و VvTrx h2 ایترنون با ژن‌های h1 در اینکه ایترنون یک آن‌ها بزرگتر از ایترنون دو است، مشابه هستند (شکل ۴ الف).



شکل ۲- نتایج PCR و RT-PCR ژن VvCxxS2 و الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد. (M) نشانگر مولکولی DNA PCR (۱)، 100 bp قطعه ژنومی ژن VvCxxS2 به طول ۸۶۷ bp و (۲) قطعه RT-PCR ژن VvCxxS2 به طول ۳۸۱ bp.

عبارت دیگر عدد صفر نشان دهنده جایگاه اتصال بین اسیدآمینه نشان داده شده و اسیدآمینه قبلی بوده و اعداد یک و دو نشان می-دهند که جایگاه اتصال درون اسیدآمینه مورد نظر می‌باشد با این تفاوت که عدد یک مربوط به جایگاه اتصال بین اولین و دومین نوکلئوتید و عدد دو نشان دهنده جایگاه اتصال بین دومین و سومین نوکلئوتید است. بررسی ساختار ژن‌های تیوردوکسین در موجودات مختلف نشان می‌دهد که برخلاف پروکاریوت‌ها و قارچ‌ها، این ژن‌ها در مهره‌داران، گیاهان عالی و جلبک‌ها حاوی ایترنون‌هایی با اندازه‌های متفاوت می‌باشند (شکل ۴ الف). توالی ژنومی VvCxxS2 همراه با سایر ژن‌های تیوردوکسین h انگور (Jaillon et al. 2007) دارای ایترنون‌هایی در مکان‌های مشابه می-باشند. این توالی‌های ژنومی وجود دو ایترنون را در ژن‌های VvTrx h1 [صفر)، 24I، 66S، 24V، 24T، 66D، 24M، 66E و VvTrx h3 [صفر)، 24D، 66C، 24V، 24T، 66B، 24A] نشان می‌دهند (شکل ۴ ب). در ژن VvCxxS2، اسیدهای امینه والین (Val) و آلانین (Ala) به ترتیب در موقعیت‌های ۳۶ و ۷۷ قرار گرفته و جایگاه‌های اتصال بین دومین و سومین نوکلئوتید برای اسیدآمینه والین (GT/T) و اولین و دومین نوکلئوتید برای اسیدآمینه آلانین (G/C/G) می‌باشند.

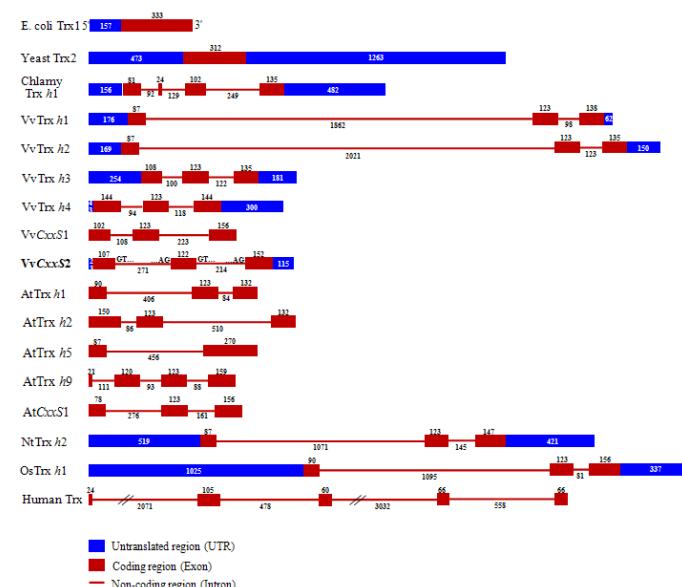
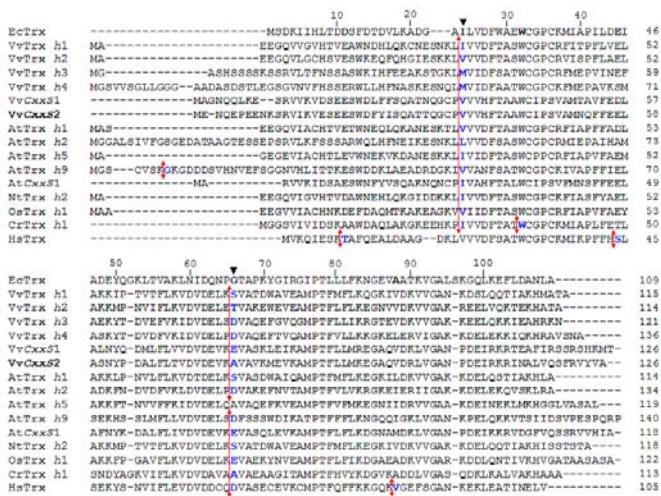
	Exon1 (107 bp) →	
1	ATGGAAAATCAGGAGCCGGAGGAAAACAAGTCTAGGGTTATTAAGGTGGAGTCTGAGGAGTCATGG	22
	M E N Q E P E E N K S R V I K V E S E E S W	
67	GATTCTATATCAGCCAAGCCACCACCAAGGCTGCCCTGTGTCAAATTCTTCCCCATCATCATCA	36
D F Y I S Q A T T Q G C P V		
133	TCAACTCACAAATTTCATTTCTCATTTCCATATTGTATCTGTCTCTGCTGTTTGATTTAAC	
199	AACTGATTCAGTGAACCGTCTCACTTCTCACCCATAATGACTTTGATGGAAATCATCCC	
265	ATGTAACCTGACATGCCAGATAGATCAATCGATCCAACTTCATATTCAATCCAACTTGATGATG	
	Exon2 (122 bp) →	
331	ATTTGAAAGTGTAAATTGGGTTGTGGGGTTGTGGAATTGCGTAGTGTGTCACTTCACTGC	42
V V H F T A		
397	TGCATGGTGCATCCCTCTGTGCCATGAACCAGTTTGAGAAAGACTGGCTCAAATTACCCAGA	
A W C I P S V A M N Q F F E E L A S N Y P D		64
	Intron2 (214 bp) →	
463	TGCTCTGTTCTCACTGTTGATGTGGATGAAGTTAAGGGTAGCCCCCTCTGTGTTATGGAAATGT	76
A L F L T V D V D E V K		
529	CACTGATCACCTTGTGGCTTGATCTCTAAAAAGTCCTTGCTTGAACGCAACCAAAGGG	
595	GGGAAGAGGGAGTGGAGATGGTTATGCTTATGCCCTGTGAATTAAACAACAAATTGATGCCAG	
	Exon3 (152 bp) →	
661	TTTGTATGGTGTGAACATAATTGTTCTCTGGTTGGTTGAGCGGTTGCGGTC	80
A V A V		
727	→ AAAATGGAAGTAAAGGCCATGCCACATTCTGCTGATGAAGGAAGGAGCTCAGGTGGACAGGCTG	
K M E V K A M P T F L L M K E G A Q V D R L		102
793	GTGGGTGCCAATCCAGATGAGATAAGGAAAAGGATAGATGCTTGGTGCAGTCCTTCGCGTGTAT	
V G A N P D E I R K R I N A L V Q S F R V Y		124
859	GTAGCCTAG	
V A *		126

شکل ۳- توالی‌های نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای ژن VvCxxS2 حاوی سه توالی اگزون (با اندازه‌های ۱۰۷ bp، ۱۲۲ bp و ۱۵۲ bp) و دو توالی ایترنون (با طول‌های ۲۷۱ bp و ۲۱۴ bp) می‌باشد که به ترتیب با رنگ‌های سبز و قرمز مشخص شده‌اند. اتصالات اگزون- ایترنون () 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] از جلبک کلامیدوموناس [صفر)؛ ۶۶A] اولین و سومین ایترنون با دو ایترنون ژن VvCxxS2 و ژن‌های تیوردوکسین *h* گیاهان عالی مطابقت داشته در حالی که دومین ایترنون درون توالی اگزون دو قبل از جایگاه فعل قرار گرفته است (شکل ۴). همچنین در انسان و سایر مهره‌داران، ژن‌های تیوردوکسین دارای ۴ توالی ایترنون در موقعیت‌های مشابه [صفر)؛ ۱۱T؛ ۴۵S؛ ۶۶D؛ ۸۸V] بوده، به طوری که ایترنون سه آن‌ها در موقعیت مشابه با ایترنون دو تیوردوکسین‌های *h* گیاهان عالی قرار گرفته است (شکل ۴). 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 ایترنون در موقعیت ۶۶ می‌باشند.

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

ب



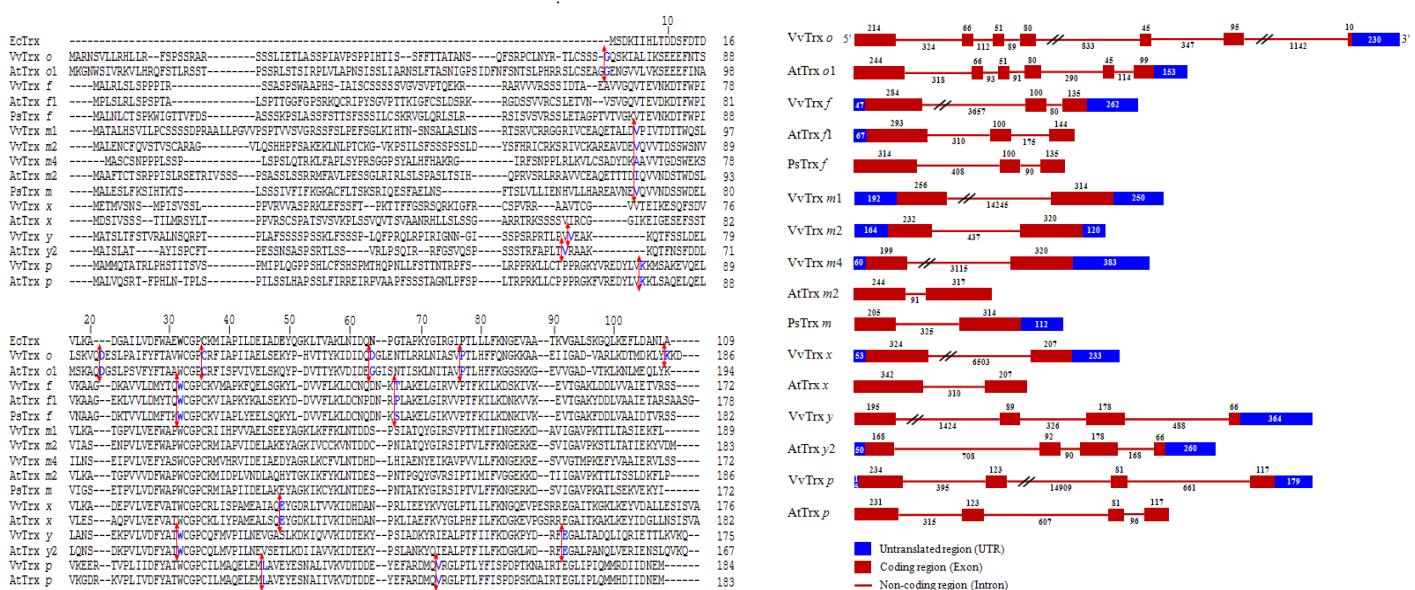
شکل ۴- ساختار و موقعیت ایترنون‌های ژن VvCxxS2 و سایر ژن‌های تیوردوکسین از موجودات مختلف. الف) ساختار ژن تیوردوکسین h انگور و ژن‌های تیوردوکسین از انسان، گیاهان عالی، جلبک کلامیدومonas، مخمر کلامیدومonas، باکتری اشریشیاکلی. نواحی غیرقابل ترجمه (UTR)، رمزگردان (Exon) و غیر رمزگردان (Intron) با ذکر اندازه، به ترتیب با نوارهای آبی، قرمز و خطوط قرمز رنگ نشان داده شده‌اند. ب) موقعیت ایترنون‌ها در ژن VvCxxS2 تیوردوکسین h انگور و ژن‌های تیوردوکسین از انسان، گیاهان عالی، جلبک کلامیدومonas و باکتری اشریشیاکلی. توالی‌های پروتئینی بدست آمده از تیوردوکسین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalW هم‌دیده شده و موقعیت ایترنون‌ها با علامت فلش مشخص شده‌اند. از توالی پروتئینی تیوردوکسین باکتری اشریشیاکلی برای شماره-گذاری استفاده گردیده و اسیدآمینه آغاز کننده توالی ایترنون‌ها نیز با رنگ آبی و علامت مثلث نشان داده است. شماره دستیابی ژن‌های *Oryza* از برنج (*OsTrx h1*) و *Nicotiana tabacum* (sativa) از توتون (*NtTrx h2*) به ترتیب عبارتند از: Z11803 و D26547

کند (Hartman et al. 1990). در ژن‌های تیوردوکسین f مورد بررسی، توالی ایترنون یک بزرگتر از ایترنون دو بوده و ژن VvTrxf در مقایسه با دو ژن دیگر دارای بزرگترین توالی ایترنون یک می‌باشد (شکل ۵الف). ژن‌های VvTrxo [یک)؛ G؛ (یک)؛ D؛ (یک)؛ ۳۶C؛ (صفرا؛ ۷۷P؛ ۶۴D؛ (صفرا؛ ۲؛ ۱۰۹K] انگور و AtTrxo1 [یک)؛ G؛ (یک)؛ D؛ (یک)؛ ۳۶C؛ (صفرا؛ ۶۴G؛ (صفرا؛ ۶۴D] از آراییدوپسیس به ترتیب دارای ۶ و ۵ ایترنون در مکان‌های مشابه می‌باشند (شکل ۵ب). همان طور که مطالعات فیلوژنتیکی نشان داد، تیوردوکسین o همانند تیوردوکسین‌های f و h دارای منشا یوکاریوتی می‌باشند (شکل ۱). به هر حال در تیوردوکسین o توالی‌های ایترنون با موقعیت مشابه با تیوردوکسین‌های f و h مشاهده نشده و به نظر می‌رسد که ایترنون‌های تیوردوکسین o در طی یک تکامل دیرهنگام به توالی ژنومی اضافه شده‌اند (Sahrawy et al. 1996).

موقعیت ایترنون‌ها در توالی ژنومی تیوردوکسین‌های انگور و سایر گیاهان

بررسی ساختار ژن‌های تیوردوکسین‌های f, o, m, p, x, y, r, s, t, u, v, w, z, و y در انگور و گیاهانی از قبیل آراییدوپسیس و نخود فرنگی (P. sativum) نشان داد که این ژن‌ها همانند ژن‌های تیوردوکسین h حاوی ایترنون‌هایی در موقعیت‌های متفاوت با اندازه‌های مختلف می‌باشند (شکل ۵الف). ژن‌های VvTrxf [دو)؛ ۳۲W؛ (صفرا؛ ۶۶T] و AtTrxf1 [دو)؛ ۳۲W؛ (صفرا؛ ۶۶P] آراییدوپسیس و PsTrx انگور، AtTrxf1 [دو)؛ ۳۲W؛ (صفرا؛ ۶۶P] آراییدوپسیس و f [دو)؛ ۳۲W؛ (صفرا؛ ۶۶S] از نخود فرنگی حاوی دو ایترنون در مکان‌های مشابه ۳۲ و ۶۶ می‌باشند (شکل ۵ب). اولین ایترنون قبل از اسیدآمینه تریپتوфан جایگاه فعل (W۳۲)، مشابه با ایترنون دوم تیوردوکسین h کلامیدومonas قرار گرفته و موقعیت ایترنون دوم مطابق با دومین ایترنون ژن‌های تیوردوکسین h گیاهان عالی است که نظریه یوکاریوتی بودن تیوردوکسین f را قویا تایید می-

الف



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

تیوردوکسین *x* همانند تیوردوکسین *m* تنها دارای یک ایترنون می‌باشد که طول آن در گونه‌های مختلف گیاهی متفاوت است. این توالی ایترنون در موقعیت مشابه در ژن‌های تیوردوکسین *x* قرار دارد: *VvTrx x* [صفر)، *AtTrx x* [صفر) *49E* و *AtTrx y2* [صفر) *49E* (شکل ۵ب). بررسی ژن‌های تیوردوکسین‌های *p* و *y* از انگور و آراییدوپسیس نیز نشان داد که هر یک از آن‌ها حاوی سه ایترنون در موقعیت‌های مشابه بوده به طوری که توالی ایترنون یک در ژن‌های تیوردوکسین *y* و توالی ایترنون دو در ژن‌های تیوردوکسین *p* نسبت به ایترنون‌های دیگر بزرگتر می‌باشد (شکل ۵الف). در ژن‌های *y* *VvTrx y2* [صفر) *77V*؛ *2(2)* [صفر) *92E* و *AtTrx y2* [صفر) *77V*؛ *2(2)* [صفر) *32W* اولین ایترنون مابین توالی پیتید انتقالی و پروتئین بالغ قرار گرفته و موقعیت ایترنون دوم مشابه با اولین ایترنون تیوردوکسین *f* و دومین ایترنون ژن *CrTrx h* می‌باشد (شکل ۵ب). همچنین در ژن‌های *AtTrx p* *VvTrx p* [صفر) *6K*؛ [صفر) *46L*؛ [صفر) *46V* و *AtTrx p* [صفر) *6K*؛ [صفر) *46L*؛ [صفر) *73V*، ایترنون یک، توالی پیتید

تیوردوکسین *m* از انگور: *VvTrx m1* [۵V)، *VvTrx m2* [۵V)، *VvTrx m4* [۵V)، *AtTrx m2* [۵V)، *PsTrx m* [۵V)، *VvTrx x* [۵I] و نخود فرنگی: *VvTrx y* [۵V)، *AtTrx y2* [۵V)، *VvTrx p* [۵V)، *AtTrx p* [۵V). تیوردوکسین *m* از انگور حاوی یک ایترنون در موقعیت مشابه می‌باشد که بین توالی پیتید 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 ایترنون‌هایی با اندازه بزرگتر بوده و همان طور که گفته شد، اندازه ایترنون‌ها به نوع گونه گیاهی بستگی دارد (شکل ۵الف). موقعیت ایترنون در ژن‌های *h* تیوردوکسین *m* با موقعیت ایترنون‌ها در تیوردوکسین‌های *f* و مشابه نبوده و این نشان دهنده اضافه شدن تازه توالی ایترنون در طول تکامل دیرهنجام 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 ایترنون مابین پیتید انتقالی و پروتئین بالغ واقع نشده و پس از جایگاه فعل 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 o مشابه نبوده و احتمالاً، برخلاف تیوردوکسین‌های یوکاریوتی، الگوی متفاوتی از تکامل را دارا می‌باشند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. ژن‌های تیوردوکسین m و p و u دارای یک ایترون بین توالی پیتید انتقالی و پروتئین‌های m و p باشند که در سایر ژن‌های هسته‌ای کد کننده پروتئین‌های بالع 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 m , p , q و u 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 منشاً پروکاریوتی داشته و الگوی متفاوتی از تکامل را نشان می‌دهند. با این وجود همچنان نکات مهم بیشماری باقی می‌ماند که نباز 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 فعلیت داشته باشند؟ نحوه تکامل تیوردوکسین o با منشا یوکاریوتی چگونه است؟ آیا همانند تیوردوکسین‌های f و h از کلامیدوموناس تکامل یافته‌اند یا خیر؟

منابع

- Alkhalfioui F, Renard M, Frendo 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

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 u با تیوردوکسین‌های f 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 فیلوجنتیکی، 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 از CrTrx از کلامیدوموناس را بوجود آورده‌اند که متعاقباً با ناپدید شدن یک ایترون دیگر به طور تصادفی، ژن‌هایی با دو ایترون (تیوردوکسین‌های f و h) تشکیل شدند. به عارت دیگر، این CrTrx h از ژن h ایترون دارد که تیوردوکسین‌های f و h از ژن h ایترون دارند. تکامل بیشتر در ژن‌های تیوردوکسین با منشا یوکاریوتی منجر به ایجاد یک ژن تیوردوکسین h با یک توالی ایترون منفرد (AtTrx h5) 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

- 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, Grienberger 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