بررسی پروموتور ژن آلیناز آرابیدوپسیس و برنج

محبوبه زارع مهرجردی[1*]

[1*] استادیارگروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

mzarem@ut.ac.ir

چکیده

سیر یکی از اعضای خانواده Alliaceae است که دارای اثرات سودمندی علیه بیماری‌های مختلفی همانند سرطان، دیابت و بیماری‌های قلبی است. همچنین این گیاه دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌بیوتیکی، ضدقارچی و ضدباکتریایی است. این ویژگی‌ها به ترکیبات ارگانوسولفوره آن همانند آلیسین نسبت‌داده‌می‌شود. آلیسین در اثر برهمکنش آلیناز با آلین حاصل‌می‌شود. آنالیز پروموتور ژن آلیناز به درک ما از نحوه تنظیم بیان این ژن کمک خواهدکرد. برای این منظور و به دلیل عدم وجود توالی پروموتور آلیناز سیر، توالی پروموتوری ژن‌های آلیناز گیاهان مدل آرابیدوپسیس و برنج از بانک اطلاعاتی Phytozome دریافت شد. آنالیز پروموتورها با استفاده از سایت PlantCARE انجام‌شد و موتیف‌ها موجود در هر پروموتور و نقش آنها شناسایی‌شد. نتایج نشان‌داد که در هر دو گیاه Cis-element های پاسخ به نور و استرس‌های زیستی و غیرزیستی در پروموتور ژن آلیناز وجود دارد و نشان می‌دهد که احتمالا بیان این آنزیم تحت تاثیر این عوامل است. مطالعات بعدی بر روی گیاه می‌تواند برای تایید این موضوع راهگشا باشد.

واژه‌های کلیدی: آرابیدوپسیس، آلیناز، برنج، پروموتور

مقدمه

سیر (*Allium sativum*) گیاهی از خانواده Alliaceae است که در سراسر جهان کشت شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد. علاوه بر مصرف آن به عنوان سبزی، خواص دارویی بی‌نظیر آن نیز توجه مردم را به خود جلب کرده‌است. مطالعات مختلف صورت گرفته بر روی این گیاه ویژگی‌های ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و کاهش‌دهنده قند و فشار خون را برای آن آشکار کرده‌است(Londhe et al., ۲۰۱۱). اثرات دارویی مفید سیر به ترکیبات ارگانوسولفوره آن به ویژه آلیسین نسبت داده می‌شود. آلیسین در اثر آنزیم آلیناز بر روی سوبسترای آلین ایجاد می‌شود. آلیناز پروتئینی است که تقریبا در همه بافت‌های سیر وجود دارد(Wang et al., ۲۰۱۱). آلیسین تولید شده در اثر عمل این آنزیم بسیار ناپایدار است و محققان در جستجوی راهکاری برای رفع این مشکل می‌باشند. این ترکیب در دمای اتاق ظرف چند ساعت و در اثر پخت در طی تنها چند دقیقه تجزیه می‌شود(Blania and Spangenberg, ۱۹۹۱). از جمله تلاشهای صورت گرفته برای دسترسی به آلیسین و رفع مشکل تجزیه سریع آن، ثابت کردن آنزیم آلیناز بر روی سطح یک ماتریکس و عبور آلین برای تولید آلیسین در موقع نیاز و یا فرستادن آلیناز به سمت سلول‌های سرطانی و در پی آن مصرف آلین برای ایجاد آلیسین است(Miron et al., ۲۰۰۳; Miron et al., ۲۰۰٦). دستیابی به تولید مقادیر مناسبی از آلیناز می‌تواند به محققان در رسیدن به این اهداف کمک نماید که برای تحقق آن مطالعه بر روی ژن آلیناز و ویژگی‌های آن ضروری است. بخش عمده‌ای از تنظیم بیان ژن‌های گیاهی مربوط به ناحیه‌ای حدودا ۱۵۰۰ جفت بازی در بالا دست مکان شروع رونویسی می‌باشد که به عنوان ناحیه پروموتوری شناخته می‌شود(Janaki and Joshi, ۲۰۰٤). این ناحیه متشکل از عناصر تنظیمی‌ای (Cis-elements) می‌باشد که توسط فاکتورهای رونویسی شناسایی شده و بیان ژن را تحت تاثیر قرار می‌دهند. Cis-element ها موتیف‌های کوتاه و ویژه‌ای از توالی DNA هستند که تقریبا ۵-۲۵ جفت باز طول دارند و نقش‌های متفاوتی را برعهده می

گیرند(Rani, ۲۰۰۷) شناسایی این موتیف‌ها می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در ارتباط با نحوه احتمالی تنظیم بیان ژن فراهم کند. برای شناسایی این موتیف‌ها از بانک های اطلاعاتی تحت web مختلفی همانند PlantCARE کمک گرفته می‌شود. این پایگاه‌ها با در اختیار داشتن توالی‌های تنظیمی شناخته شده موجود در پروموتورهای گیاهی می‌توانند برای آنالیز پروموتورها و بررسی موتیف‌ها مورداستفاده قرار گیرند. در ارتباط با نحوه تنظیم بیان پروتئین آلیناز و عوامل موثر در آن گزارشی وجودندارد. بنابراین یکی از راهکارهای اولیه برای بررسی این موضوع آنالیز پروموتور آن می‌باشد که در این مطالعه مورد توجه قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها

برای یافتن توالی پروموتور آلیناز از بانک اطلاعاتی Phytozome (www.phytozome.net) استفاده‌شد. از آنجا که توالی پروموتوری آلیناز سیر وجود نداشت، توالی پروموتوری آلیناز گیاهان مدل آرابیدوپسیس و برنج (به ترتیب دو لپه و تک لپه) ارزیابی‌شد. ۱۵۰۰ جفت باز بالا دست کدون آغازین(AUG) ژن آلیناز هر گیاه به عنوان ناحیه پروموتوری استخراج شد. (آنالیز پروموتورها با استفاده از سایت PlantCARE (http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/) صورت پذیرفت و موتیف‌های موجود در هر پروموتور و کارکرد آنها موردبررسی قرارگرفت.

نتایج و بحث

گیاهان مدل همواره ابزار مناسبی برای انجام مطالعات اولیه بیولوژیکی می‌باشند. استفاده از آرابیدوپسیس و برنج به عنوان نماینده‌ای از دولپه‌ای‌ها و تک‌لپه‌ای‌ها برای انجام مطالعات بیوانفورماتیکی مرسوم است. برای مثال برای یافتن موتیف‌های موجود در پروموتور ژن‌های پاسخ دهنده به اکسین از این دو گیاه و توالی ژنومی آنها استفاده شده‌است(Berendzen et al., ۲۰۱۲). در این مطالعه نیز پروموتورهای ژن آلیناز گیاهان آرابیدوپسیس و برنج به دلیل فقدان اطلاعات در گیاه سیر مورداستفاده قرارگرفتند. نتایج بررسی موتیف‌های مربوط به این پروموتورها، نشان داد که اغلب موتیف‌های موجود در ناحیه پروموتوری این دو گیاه مشابه یکدیگر هستند. موتیف‌های ۳-AF۱ binding site، AE-box، Box I و TCT-motif که در پاسخ به نور عمل می‌کنند، موتیف ARE که در القا در شرایط غیرهوازی نقش دارد، موتیف‌های CGTCA-motif و TGACG-motif که به متیل جاسمونات پاسخ می‌دهند، موتیف GARE-motif که به جیبرلین پاسخ می‌دهد ، موتیف MBS که در القا در شرایط خشکی نقش دارد، موتیف Skn-۱_motif که مربوط به بیان اندوسپرمی است و موتیف circadian که در کنترل circadian نقش دارد، از جمله موتیف‌های شناسایی شده در پروموتور ژن آلیناز هر دو گیاه می‌باشند. البته موتیف‌های CAAT-box به عنوان تشدیدگر و TATA-box به عنوان core promoter نیز به تعداد زیادی در هر دو پروموتور وجوددارند. موتیف‌های مشابه موجود در هر دو پروموتور نشان از تاثیرپذیری بیان ژن آلیناز در واکنش به نور و استرس‌های زیستی و غیر زیستی دارد. مطالعات نشان داده‌است که سیستم آلین/ آلیناز در طی تکامل و برای مقابله با دشمنان زیستی در سیر ایجاد شده‌است(Borlinghaus et al., ۲۰۱٤) و القاپذیری آلیناز در اثر این عوامل نیز موئید این امر می‌باشد. در میان موتیف‌های بررسی‌شده در هر گیاه، موتیف‌هایی نیز وجود دارد که مختص هر گیاه است و می‌توانند به دلیل انشعاب این دو گیاه از یکدیگر و در طی تکامل ایجاد شده‌باشد. به عنوان مثال موتیف‌های AAAC-

motif، Box ٤، CATT-motif، chs-CMA۱a وGT۱-motif که در پاسخ به نور عمل می‌کنند، Box-W۱ که در پاسخ به الیسیتورهای قارچی عمل می‌کند، HSE پاسخ دهنده به استرس گرمایی، LTR پاسخ دهنده به دمای پایین و-P box پاسخ دهنده به جیبرلین تنها در پروموتور آرابیدوپسیس شناسایی شدند. اما موتیف ABRE پاسخ دهنده به آبسیزیک اسید، ACE، G-Box، GAG-motif، GATA-motif وI-box پاسخ دهنده به نور، TC-rich repeats دخیل در پاسخ دفاعی و استرسی، TCA-element پاسخ دهنده به سالیسلیک اسید وTGA-element پاسخگو به اکسین مختص به پروموتور برنج بودند. همانطور که مشاهده می‌شود با وجود تفاوت در نوع موتیف‌ها، عمل آنها مشابه بوده و در پاسخ به نور و استرس‌های زیستی و غیرزیستی عمل می‌کنند. جدول ۱ برخی از موتیف‌های شناسایی شده در پروموتور هر گیاه، نقش و تعداد آن‌ها را نشان می‌دهد.

جدول ۱: موتیف‌های شناسایی شده در پروموتور ژن‌های آلیناز آرابیدوپسیس و برنج

نام موتیف	توالی موتیف	نقش موتیف	تعداد آن در آرابیدوپسیس	تعداد آن در برنج
۳-AF۱ binding site	TAAGAGAGGAA	پاسخ دهنده به نور	۱	۱
AAAC-motif	CAACAAAAACCT	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
ABRE	TACGTG	پاسخ دهنده به آبسیزیک اسید	۰	۱

ACE	ACGTGGA	پاسخ دهنده به نور	۰	۱
AE-box	AGAAACAA	پاسخ دهنده به نور	۱	۱
ARE	TGGTTT	القا شونده در شرایط بی هوازی	۲	٤
Box ٤	ATTAAT	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
Box I	TTTCAAA	پاسخ دهنده به نور	۱	۲
Box-W۱	TTGACC	پاسخ دهنده به الیسیتور قارچی	۲	۰
CAAT-box		تشدیدگر	۳۳	۳۷
CATT-motif	GCATTC	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
CGTCA-motif	CGTCA	پاسخ دهنده به متیل جاسمونات	۳	۱
ERE	ATTTCAAA	پاسخ دهنده به اتیلن	۱	۱
G-Box		پاسخ دهنده به نور	۰	۵
GA-motif	AAGGAAGA	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
GAG-motif	AGAGATG	پاسخ دهنده به نور	۰	۱
GARE-motif	TCTGTTG	پاسخ دهنده به جیبرلین	۱	۲

GATA-motif	GATAGGG	پاسخ دهنده به نور	۰	۱
GT۱-motif	GGTTAA	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
HSE	AAAAAATTTC	پاسخ دهنده به استرس گرما	۲	۰
I-box		پاسخ دهنده به نور	۰	۳
LTR	CCGAAA	پاسخ دهنده به دمای پایین	۲	۰
MBS		القا پذیر در شرایط خشکی	۲	٤
P-box	CCTTTTG	پاسخ دهنده به جیبرلین	۱	۰
Skn-۱_motif	GTCAT	بیان اندوسپرمی	۳	٤
TATA-box		جعبه TATA	٤۰	۵۷
TC-rich repeats	ATTTTCTTCA	پاسخ دهنده به استرس و دخیل در پاسخ دفاعی	۰	۱
TCA-element	CCATCTTTTT	پاسخ دهنده به سالیسیلیک	۰	۱
TCT-motif	TCTTAC	پاسخ دهنده به نور	۱	۲

TGA-element	AACGAC	پاسخ دهنده به اکسین	۰	۱
TGACG-motif	TGACG	پاسخ دهنده به متیل جاسمونات	۳	۱
chs-CMA۱a	TTACTTAA	پاسخ دهنده به نور	۱	۰
circadian	CAANNNNATC	کنترل Circadian	۱	۱

به نظر می‌رسد همانطور که در مورد سایر متابولیت‌های ثانویه مسیر بیوسنتزی در اثر نور، استرس‌های زنده و غیر زنده متاثر می‌شود(Gouvea et al., ۲۰۱۲; Ramakrishna and Ravishankar, ۲۰۱۱)، در ارتباط با آلیسین نیز این گونه بوده و بیان آنزیم آلیناز متاثر از این عوامل باشد. مطالعات آینده بر روی تغییرات بیان این ژن در اثر تیمارهای مختلف نوری و استرسی می‌تواند برای تایید این موضوع راه گشا باشد.

منابع

۱. Berendzen, K., Weiste, C., Wanke, D., Kilian, J., Harter, K., Droge-Laser, W. ۲۰۱۲. Bioinformatic cis-element analyses performed in Arabidopsis and rice disclose Bzip- and MYB-related binding sites as potential AuxRE-coupling elements in auxin-mediated transcription. BMC Plant Biology. ۱۲:۱۲۵-۱٤٤.

۲. Blania, G., Spangenberg, B.۱۹۹۱. Formation of allicin from dried garlic (*Alliumsativum*): a simple HPTLC method for simultaneous determination of allicin and ajoene in dried garlic and garlic preparations. Planta Medica. ٥۷: ۳۷۱-۳۷٥.

۳. Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C. H., Nwachukwu, I. D., Slusarenko, A. J. ۲۰۱٤. Allicin: Chemistry and Biological Properties. Molecules. ۱۹: ۱۲٥۹۱-۱۲٦۱۸.

٤. Gouvea, D. R., Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. ۲۰۱۲. The influence of biotic and abiotic factors on the production of secondary metabolites in medicinal plants, in plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives (ed V. Cechinel-Filho). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: ۱۰,۱۰۰۲/۹۷۸۱۱۱۸۲٦۰۰۰٥.ch۱۲

٥. Janaki, C., Joshi, R.R. ۲۰۰٤. Motif detection in Arabidopsis: correlation with gene expression data. In Silico Biology. ٤(۲):۱٤۹-۱٦۱.

٦. Londhe, V.P., Gavasane, A.T., Nipate, S.S., Bandawane, D.D., Chaudhari, P.D. ۲۰۱۱. Role of garlic (*Alliumsativum*) in various diseases: An overview. Journal of Pharmaceutical Research and Opinion. ۱(٤): ۱۲۹-۱۳٤.

۷. Miron, H., SivaRaman, A., Rabinkov, D., MirelmanWilchek, M. ۲۰۰٦. A method for continuous production of allicin using immobilized alliinase. Analytical Biochemistry. ۳۵۱(۱):۱۵۲-۱۵٤

۸. Miron, T., Mironchik, M., Mirelman, D., Wilchek, M., Rabinkov, A. ۲۰۰۳. Inhibition of tumor growth by a novel approach: In situ allicin generation using targeted alliinase delivery. Molecular Cancer Therapeutics. ۲(۱۲):۱۲۹۵-۳۰۱.

۹. Ramakrishna, A., Ravishankar, G. A. ۲۰۱۱. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plant Signaling & Behavior. ٦(۱۱): ۱۷۲۰-۱۷۳۱.

۱۰. Rani, V. ۲۰۰۷. Computational methods to dissect cis-regulatory transcriptional networks. Journal of Biological Sciences. ۳۲(۷): ۱۳۲۵-۱۳۳۰.

۱۱. Wang, J., Cao, Y., Sun, B., Wang, C., Mo, Y. ۲۰۱۱. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic.Ultrasonics Sonochemistry.۱۸: ۵۳٤-۵٤۰.

Bioinformatical evaluation of alliinase promoter in Arabidopsis and rice

Garlic is a member of the Alliaceae family, have been shown to possess beneficial effects to protect against several diseases, including cancer, diabetes and cardiovascular disease. Furthermore, it has antioxidant, bactericidal, fungicidal and antibiotic properties which appear to be related to the presence of organosulfur compounds such as allicin. Allicin is produced upon the interaction of the alliin with the alliinase. Promoter analysis for alliinase gene provides important information relating to its gene expression and regulation. Therefore, due to lack of promoter sequence of garlic alliinase, allinase promoter sequences from two model plants, Arabidopsis and rice were received by Phytozome cite and analysed with Plant CARE. The result showed that allinase gene has several cis-elements involve in light, biotic and abiotic stress responses may indicate that alliinase gene expression can be influenced by these factors. These observations may lay the foundation for future functional analysis of allinase gene in whole plants.

Key words: Arabidopsis, alliinase, rice, promoter