

متا-آنالیز ترانسکریپتوم ژن‌های مسیر موالونیک اسید و متیل اریتریتول فسفات برای بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در گیاهان

زهرا امین‌فر^۱، بابک ربیعی^{۲*}، مسعود توحیدفر^۳، محمدحسین میرجلیلی^۴

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۲. استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۳. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۴. دانشیار، گروه کشاورزی، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱/۲۲)

Meta-analysis of Transcriptomics related to the genes of the mevalonate (MVA) and the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathways for isoprenoids biosynthesis in plants

Zahra Aminfar¹, Babak Rabieei^{2*}, Masoud Tohidfar³, Mohammad Hossein Mirjalili⁴

1. Ph.D. Student of Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

2. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran

3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran.

4. Associate Professor, Department of Agriculture, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, G.C., Tehran, Iran.

(Received: Sep. 8, 2018 - Accepted: Apr. 11, 2019)

Abstract

Isoprenoids and their derivatives represent the largest group of natural compounds in plants that are biosynthesized from isoprenyl diphosphate C5 units. These C5 units generated by two distinctive biosynthetic pathways in plants including mevalonate (MVA) pathway in the cytoplasm and methylerythritol phosphate (MEP) pathway in plastids. To perform a meta-analysis of two pathways of MVA and MEP, expression data of the microarray experiments in different tissues, developmental stages, biotic and abiotic stresses were used in *Arabidopsis thaliana* as a model plant. The transcriptome meta-analysis was carried out using Genevestigator as a large database containing transcriptomics data of GEO in NCBI and ArrayExpress in EBI. The results of the meta-analysis showed that the transcription of genes encoding the enzymes of MVA and MEP pathway did not coordinate and they had different expression patterns in developmental stages, various tissues and conditions. MVA pathway genes show the highest expression in the roots and reproductive organs, while the MEP pathway genes are expressed in photosynthetic tissues. The results obtained here can help to understand how the underlying pathway gene networks are organized and regulated in different conditions, tissues and developmental stages.

Keywords: Genevestigator, Isoprenoids, Meta-analysis, Microarray, Transcriptome.

چکیده

ایزوپرنوئیدها و مشتقات آنها بزرگترین گروه از ترکیبات طبیعی در گیاهان هستند که از واحدهای پنج کربنه ایزوپرنیل فسفات ساخته می‌شوند. این واحدهای پنج کربنه در گیاهان از طریق دو مسیر بیوسنتزی مجزا شامل مسیر موالونات (MVA) در سیتوپلاسم و مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP) در پلاستید، تولید می‌شوند. به منظور انجام متا-آنالیز ژن‌های دو مسیر MVA و MEP از داده‌های بیانی آزمایشات ریزآرایه در بافت‌های مختلف، مراحل نمو، تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* استفاده شد. متا-آنالیز ترانسکریپتوم با استفاده از ابزار Genevestigator به عنوان یک بانک اطلاعاتی بزرگ شامل داده‌های ترانسکریپتوم مخازن GEO در NCBI و ArrayExpress در EBI انجام گرفت. نتایج حاصل از متا-آنالیز نشان داد که به طور کلی رونویسی ژن‌های کد کننده آنزیم‌های دو مسیر MVA و MEP گیاهی با هم هماهنگ نیست و در بافت‌ها، مراحل رشدی و شرایط مختلف الگوی بیانی متفاوتی دارند. ژن‌های مسیر MVA بیشترین بیان را در ریشه و اندام‌های زایشی نشان می‌دهند، در حالی که ژن‌های مسیر MEP بیشتر در بافت‌های فتوسنتزی بیان می‌شوند. این نتایج می‌تواند به درک چگونگی تولید پیش سازهای ایزوپرنوئیدها از طریق دو مسیر با جایگاه متفاوت کمک کرده و همچنین سازماندهی شبکه‌های ژنی و تنظیم آنها در شرایط، بافت‌ها و مراحل نمو مختلف را آشکار می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: ایزوپرنوئیدها، ترانسکریپتوم، ریزآرایه، متا-آنالیز، Genevestigator

مقدمه

ایزوپرینوئیدها از بزرگترین و متنوع‌ترین خانواده‌های ترکیبات متابولیسی ساختاری و عملکردی در گیاهان هستند که در فرآیندهای ضروری گیاه از جمله تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی، هورمون‌ها (آبسزیک اسید، جبرلیک اسید، سیتوکینین، براسینواستروئید و استریگولاکتون)، اجزای ساختاری غشا، زنجیره انتقال الکترون و ترکیبات دفاعی گیاه نقش بسزایی دارند (Lombard and Moreira 2010). بسیاری از این ترکیبات، از نظر اقتصادی دارای اهمیت بوده و کاربردهای مختلفی در صنایع تولید لاستیک، مواد پاک‌کننده و ضدعفونی‌کننده، طعم‌دهنده، عطر، رنگدانه‌ها و مواد شیمیایی زراعی دارند (Bohlmann and Keeling 2008). علاوه بر این بسیاری از این ترکیبات دارای خواص درمانی بوده و در صنایع پزشکی و دارویی نیز استفاده می‌شوند (Sawai and Saito 2011). ایزوپرینوئیدها با وجود داشتن ساختار و عملکرد متنوع، پلیمر ساده‌ای از واحدهای ایزوپروپنیل کربنه، ایزوپنتیل دی فسفات^۱ (IPP) و ایزومر آللیک آن با نام دی متیل آلیل دی فسفات^۲ (DMAPP) هستند و به خاطر ریشه‌های شیمی آلی منظم، مورد توجه و علاقه پژوهشگران در سرتاسر دنیا قرار دارند. واحدهای پنج کربنه پیش‌ساز ایزوپرینوئیدها از طریق دو مسیر مولونات^۳ (MVA) و متیل اریتریتول فسفات^۴ (MEP) تولید می‌شوند و به استثنای گیاهان، اکثر موجودات تنها از یکی از این دو مسیر استفاده می‌کنند (Vranová et al., 2013). مسیر MVA در اکثر موجودات از جمله آرکئی باکتری‌ها (Smit and Mushegian 2000)، باکتری‌های گرم مثبت (انتروکوکوس، استافیلوکوکوس و استریپتوکوکوس) (Wilding et

al., 2000)، مخمر (Disch and Rohmer 1998) و حیوانات (Kovacs et al., 2002) وجود دارد، درحالی‌که بیشتر باکتری‌های گرم منفی (اشرشیا کولای و باسیلوس) (Rohmer et al., 1993)، سیانوباکتری‌ها (Proteau, 1998) و جلبک سبز (Disch et al., 1998) تنها از مسیر MEP استفاده می‌کنند. این دو مسیر بیوسنتزی نه تنها در محل انجام و مواد اولیه، بلکه در محصولات نهایی نیز با هم اختلاف دارند. مسیر سیتوزولی MVA پیش‌سازهای IPP و DMAPP را برای ساخت ترکیبات سزکویی و تری‌ترین‌ها تأمین می‌کند، درحالی‌که مسیر پلاستییدی MEP، ترکیبات IPI و DMAPP را برای مونو، دی و تتراترین‌ها فراهم می‌کند (Aharoni et al., 2006). چالش عمده در تجاری‌سازی ایزوپرینوئیدهای مشتق از گیاه، سطوح پایین تولید آن‌ها در گیاه و تقاضای مداوم صنعت برای مولکول‌های با فعالیت‌های بیولوژیکی جدید و یا برتر است. در نتیجه شناخت تمام مراحل تولید پیش‌سازهای این ترکیبات امری اجتناب‌ناپذیر است. آنزیم‌ها و مراحل دو مسیر MVA و MEP در شکل ۱ نشان داده شده است.

مسیر MVA در تمام یوکاریوت‌ها شروع یکسانی دارد و منبع کربن آن مولکول استیل کوآنزیم A است. در مسیر وابسته به مولونات ابتدا دو ملکول استیل کوآنزیم A با هم ترکیب شده و استو استیل کوآنزیم A را به وجود می‌آورند. سپس با اضافه شدن یک ملکول دیگر از استیل کوآنزیم A به استو استیل کوآنزیم A و تحت تأثیر آنزیم مربوطه، ۳- هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل کوآنزیم A (HMG-CoA) به وجود می‌آید که در ادامه با یک واکنش کاهشی به مولونات تبدیل می‌شود. این سه مرحله آنزیمی تحت عنوان مسیر مولونات بالادستی^۵

1. Isopentenyl pyrophosphate
2. Dimethylallyl pyrophosphate
3. Mevalonate pathway
4. Methyl-erythritol phosphate pathway

5. Upper mevalonate pathway

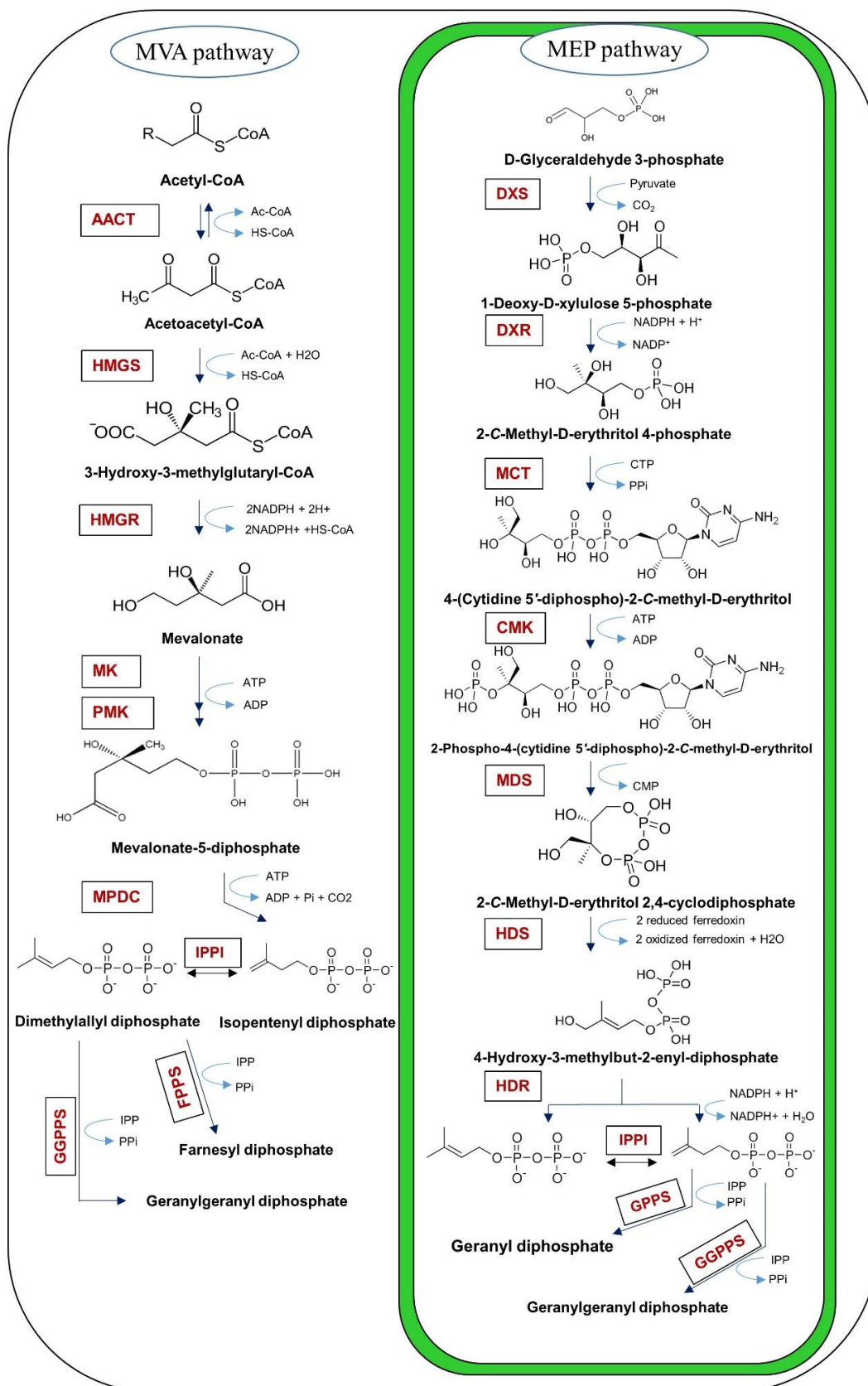
یکی کردن داده‌های بررسی‌های مختلف با فرضیه‌های مرتبط است که روشی ارزشمند برای افزایش توان تجزیه آماری و نیز بالا بردن تکرارپذیری نتایج نسبت به تجزیه بررسی‌های انفرادی است. در این راستا، ابزارهای جدید و قدرتمندی برای تجزیه و تحلیل داده‌های بیانی ایجاد شده است. Genevestigator یک ابزار مبتنی بر وب است که بیان ژن‌ها را در بین هزاران داده آزمایشگاهی بررسی می‌کند و نتایج قابل تکرار و قابل اعتمادی را ارائه می‌کند (Hruz *et al.*, 2008). در واقع این ابزار از مفهوم متا-پروفایل^۲ استفاده می‌کند. در این مفهوم، هر مقدار بیان، میانگین سطوح بیان در مجموعه‌ای از نمونه‌ها است که این نمونه‌ها مربوط به یک زمینه ژنتیکی مشابه هستند، مانند نمونه‌های مربوط به یک بافت خاص. در مقابل، در پروفایل بیانی استاندارد، هر مقدار بیان، مربوط به سطح بیان یک ژن در یک نمونه است. تنظیم مسیرهای MVA و MEP در گیاهان به دلیل وجود هر دو مسیر در یک سلول و درک دامنه گسترده‌ای از محرک‌های محیطی، پیچیده‌تر از سایر موجودات مانند مخمر و پستانداران است. تنظیم بیان ژن این دو مسیر اغلب در سطح رونویسی انجام می‌گیرد، هرچند که تنظیم بعد از رونویسی را نیز نمی‌توان نادیده گرفت. در سطح رونویسی، سیگنال‌های نموی و محیطی، بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند (Hemmerlin *et al.*, 2012). در این مطالعه، بیان ژن‌های مسیرهای MVA و MEP در گیاه مدل آراییدوپسیس در بافت‌ها، مراحل نموی مختلف و شرایط محیطی مختلف که از آزمایشات ریزآرایه به‌دست آمده‌اند، با استفاده از روش متاآنالیز و ابزار Genevestigator مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از این بررسی می‌تواند اطلاعات ارزشمندی در درک کنترل جریان مسیرهای MVA و MEP برای سنتز پیش‌سازهای ایزوپرنوئیدها ارائه کند.

شناخته می‌شوند. در مسیر مولونات پایین‌دستی^۱ در یوکاریوت‌ها، تبدیل مولونات به IPP و DMAPP از طریق دو واکنش فسفریلاسیون در موقعیت 5-OH مولونات و یک واکنش دکربوکسیلاسیون صورت می‌گیرد (Miziorko 2011). در مسیر دوم (MEP) یا مسیر متیل اریترول دی فسفات، ابتدا پیروات با دی گلیسرآلدئید ۳-فسفات ترکیب می‌شود و دی اوکسی گزیلوز ۵-فسفات تولید می‌شود. این ماده نیز در ادامه تبدیل به متیل اریتریتول ۴-فسفات می‌شود و پس از انجام یک سری واکنش دیگر ایزوپنتیل دی فسفات ایجاد می‌شود و ادامه مراحل مانند مسیر وابسته به مولونات رخ می‌دهد (Zhao *et al.*, 2013). طی چندین سال گذشته، ژن‌ها، آنزیم‌ها و واسطه‌های این دو مسیر بیوستتزی، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در حال حاضر ثابت شده است که تمام آنزیم‌های مسیر MEP توسط ژنوم هسته‌ای کدگذاری شده و سپس وارد پلاستید می‌شوند. در مقابل، آنزیم‌های مسیر MVA در بخش‌های مختلف سلولی توزیع می‌شوند (Pulido *et al.*, 2012). مهمترین آنزیم تنظیم کننده مسیر MVA، آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوئاریل کوآ-ردوکتاز (HMGR) است که به اندوپلاسمیک رتیکولوم لنگر می‌شود و دومین کاتالیتیکی پروتئین به طرف سیتوپلاسم قرار می‌گیرد، درحالی‌که سایر آنزیم‌های این مسیر در سیتوزول و پراکسیزوم یافت می‌شوند (Sapir-*et al.*, 2008, Mir *et al.*, 2011).

با پیشرفت تکنولوژی‌هایی که قادر به تولید حجم عظیم داده‌ها به خصوص در حوزه ترانسکریپتوم هستند، حجم انبوهی از داده‌های ژنتیکی در پایگاه داده‌ها ذخیره شده‌اند. اکنون چالش بیولوژیست‌ها کشف روش‌های تحلیل این داده‌ها است تا بتوانند به درک سیستم پویای پیچیده حیات کمک کنند. متا-آنالیز، روشی آماری برای

2. Meta-profile

1. Lower mevalonate pathway



شکل ۱. مراحل آنزیمی مسیرهای MVA و MEP در گیاه آرابیدوپسیس.

نام کامل هر آنزیم در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. آنزیم‌های مسیر موالونات (MVA)، متیل اریتریتول فسفات (MEP) و نقاط انشعاب در گیاه آرابیدوپسیس

نام اختصاری	نام کامل ژن	شماره EC	شناسه ژن	مکان قرارگیری در سلول
مسیر مولونات (MVA)				
AACT	استیل کوآ-استیل ترانسفراز	2.3.1.9	At5g47720 At5g48230	سیتوزول، پراکسیزوم
HMGS	۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآ-سنتتاز	2.3.3.10	At4g11820	سیتوزول
HMGR	۳-هیدروکسی-۳-متیل گلو تاریل کوآ-ردوکتاز	1.1.1.34	At1g76490 At2g17370	اندوپلاسمیک رتیкулوم
MK	مولونات کیناز	2.7.1.36	At5g27450	سیتوزول
PMK	فسفو مولونات کیناز	2.7.4.2	At1g31910	پراکسیزوم
MPDC	دی-فسفو مولونات کربوکسیلاز	4.1.1.33	At2g38700 At3g54250	نامشخص
مسیر متیل اریتریتول فسفات (MEP)				
DXS	۱-داکسی-D-گزیلوز ۵-فسفات سنتتاز	2.2.1.7	At4g15560	پلاستید
DXR	۱-داکسی-D-گزیلوز ۵-فسفات ردوکتوایزومراز	1.1.1.267	At5g62790	پلاستید
MCT	۲-C-متیل-D-اریتریتول ۴-فسفات سیتیدیل ترانسفراز	2.7.7.60	At2g02500	پلاستید
CMK	۴-سیتیدین ۵'-دی فسفات(۲-C-متیل-D-اریتریتول کیناز	2.7.1.148	At2g26930	پلاستید
MDS	۲-C-متیل-D-اریتریتول ۲-سیکلو دی فسفات سنتتاز	4.6.1.12	At1g63970	پلاستید
HDS	۴-هیدروکسی-۳-متیل بوت-۲-انیل-دی فسفات سنتتاز	1.17.7.1	At5g60600	پلاستید
HDR	۴-هیدروکسی-۳-متیل بوت-۲-انیل-دی فسفات ردوکتاز	1.17.1.2	At4g34350	پلاستید
نقاط انشعاب (Branch points)				
IPPI	ایزوپرنیل دی فسفات ایزومراز	5.3.3.2	At3g02780 At5g16440	پراکسیزوم، میتو کندری، پلاستید
GPSS	گرانیل دی فسفات سنتتاز	2.5.1.1	At4g36810 At4g38460	پلاستید
FPSS	فارنسیل دی فسفات سنتتاز	2.5.1.10	At5g47770 At4g17190 At1g49530 At2g18620 At2g18640 At2g23800	سیتوزول، میتو کندری، اندوپلاسمیک رتیкулوم، پلاستید
GGPSS	گرانیل-گرانیل دی فسفات سنتتاز	2.5.1.29	At3g14530 At3g14550 At3g20160 At3g29430 At3g32040 At4g36810	سیتوزول، میتو کندری، اندوپلاسمیک رتیкулوم، پلاستید

مواد و روش‌ها

زیستی بود که در مجموع ۱۰۶۱۵ سمپل را شامل شد (Affymetrix Arabidopsis ATH1 Genome array). کنترل کیفیت داده‌ها در این ابزار با استفاده از نرم‌افزار آماری R و بسته‌های متعددی از قبیل simpleaffy و affyQCReport برای داده‌های Affymetrix و کتابخانه‌های متعددی از Bioconductor برای داده‌های ریزآرایه Agilent و Illumina انجام می‌گیرد. کنترل کیفیت داده‌ها، در

در این تحقیق، از نرم‌افزار تحت وب Genevestigator نسخه ۳ (Hruz et al., 2008)، برای انجام متا-آنالیز ژن‌های مسیرهای MVA و MEP در گیاه مدل آرابیدوپسیس استفاده گردید. پلت‌فرم انتخاب شده برای انجام آنالیز، داده‌های ریز آرایه مربوط به آزمایشات بیانی مختلف، شامل بافت‌های مختلف، مراحل نمو، استرس‌های زیستی و غیر

نتیجه هر مرحله شامل چند صد نمونه است که میانگین مقادیر آن‌ها محاسبه می‌شود. با این وجود تفسیر نتایج این مرحله باید با احتیاط انجام گیرد، زیرا برخی پیک‌های بیانی ممکن است در نتیجه شرایط خاصی باشد که در آن مرحله نمودی اتفاق افتاده است. با استفاده از ابزار Anatomy، در مجموع ۱۰۵ بافت و ارگان مختلف برای میزان بیان هر ژن آنالیز شدند و ابزار تجزیه کلاستر برای تعیین پروفایل بیانی مشابه ژن‌ها در بافت‌ها و ارگان‌های مختلف استفاده شد. ماتریس داده‌های بیانی حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های بیانی تحت تأثیر شرایط مختلف با استفاده از ابزار Perturbations ایجاد شد و به صورت نمودار heatmap نمایش داده شد که شامل دامنه وسیعی از فاکتورها از جمله تیمارهای مختلف، شدت نور، کمبود مواد غذایی، زخم و انواع تنش‌ها بود و در مجموع ۳۲۸۲ شرایط مختلف را شامل شد. برای دستیابی به شرایطی که بیان ژن‌های مورد نظر در آن‌ها معنی‌دار بود، میزان $Fold-change=|2|$ و $P-value < 0.01$ تنظیم گردید. خوشه‌بندی سلسله مراتبی^۴ برای گروه‌بندی ژن‌ها و شرایطی که پروفایل بیانی مشابهی داشتند، با استفاده از روش فاصله اقلیدسی^۵ و متوسط پیوند^۶ ترسیم شد. الگوریتم خوشه‌بندی سلسله مراتبی، امکان خوشه‌بندی ماتریس را در یک یا در هر دو جهت فراهم می‌کند (یعنی گروه‌بندی ژن‌های با الگوی بیان مشابه در شرایط انتخاب شده یا گروه‌بندی شرایط با الگوی بیان مشابه برای ژن‌های انتخاب‌شده). در مقایسه با ابزار خوشه‌بندی سلسله مراتبی که گروه‌ها را با اندازه‌گیری شباهت بیان در تمام شرایط انتخاب شده طبقه‌بندی می‌کند، ابزار Biclustering گروه‌هایی از ژن‌ها را نشان می‌دهد که شباهت آن تنها در یک زیرمجموعه‌ای از شرایط، صرف نظر از پروفایل بیان

سطوح مختلف پروب مانند چک کردن شدت سیگنال و واریانس، تخریب RNA و همبستگی آرایه به آرایه انجام می‌شود و نمونه‌های با واریانس بالا، RNA تخریب شده، سطح سیگنال پایین (هیپریداسیون یا برچسب گذاری ضعیف) و همبستگی ضعیف با تکرارهای خود در همان شرایط آزمایشگاهی از آنالیزها کنار گذاشته می‌شوند. نرمال کردن داده‌ها در این ابزار با استفاده از یک روش دو مرحله‌ای انجام می‌شود. ابتدا داده‌های خام مربوط به هر آزمایش با استفاده از روش نرمال‌سازی بر اساس چندک^۱ و به روش RMA پردازش می‌شوند و سپس نرمال‌سازی به روش مقیاس‌گذاری^۲ برای تمام آزمایشات انجام می‌شود. در این مرحله، محاسبه میانگین تمام مقادیر بیانی پس از حذف مقادیر بیانی ۵٪ بالا و ۵٪ پایین انجام می‌شود. برای داده‌های Affymetrix، بسته‌های affy و affyExtensions در نرم‌افزار R جهت نرمال‌سازی استفاده می‌شوند.

ژن‌ها و آنزیم‌های مربوط به دو مسیر MVA و MEP و نقاط انشعاب^۳ در پایگاه‌داده KEGG به آدرس <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> جستجو و اطلاعات مربوط به هر آنزیم، شامل شماره EC، شناسه ژن و محل قرارگیری در سلول در جدول ۱ تدوین شدند. به منظور تعیین میزان بیان ژن‌ها در مراحل رشدی مختلف، نمودار پراکنش بیانی ژن‌ها با استفاده از ابزار Development ترسیم شد. این ابزار بیان ژن‌ها را در تمام مراحل چرخه رشدی گیاه از جوانه‌زنی بذر تا گیاه بالغ در اختیار قرار می‌دهد. برای هر ارگان‌سیم عموماً بین ۱۰ تا ۱۵ مرحله رشدی تعریف شده است. در این آنالیز شرایط آزمایشگاهی که روی بیان ژن‌ها اثر می‌گذارند، تا حد امکان کم شده تا فقط میزان بیان مربوط به مراحل نمودی به دست آید. در

4. Hierarchical Clustering
5. Euclidian distance
6. Average Linkage

1. Quantile normalization
2. Global scaling
3. Branch points

مرحله بر اساس میانگین بیان نمونه‌های آزمایشات مختلف ریزآرایه به دست آمده است. در این بررسی و طبق پلت فرم مورد استفاده، مرحله گیاهچه^۲ بیشترین تعداد نمونه (۲۷۸۵) و مرحله پیری^۳ کمترین تعداد نمونه (۱۸) را داشت. همان‌طور که نمودارهای پراکنش در شکل ۲ نشان می‌دهند، پروفایل بیانی تمام ژن‌های مورد بررسی تا قبل از مرحله پیری، تقریباً روند یکنواختی دارد و به دور از افت و خیزهای بیانی شدید است. اما میزان بیان ژن‌های هر مسیر با هم متفاوت است، به طوری که بیشترین بیان در هر مسیر مربوط به آنزیم‌هایی است که به عنوان ژن‌های کلیدی تنظیم‌کننده هر مسیر شناخته شده‌اند (Zhou 2018). میزان بیان این ژن‌ها ارتباط نزدیکی با میزان ایزوپرنوئیدها در گیاه دارد. در میان ژن‌های مورد بررسی مربوط به آنزیم‌های مسیر MVA، ۳- هیدروکسی-۳-متیل گلووتاریل کوآ-ردوکتاز (HMGR; EC 1.1.1.34) در تمام مراحل رشدی، بالاترین بیان را دارد. این آنزیم تترامر، یک پروتئین سرتاسری در شبکه آندوپلاسمی است و مرحله برگشت ناپذیر سنتز موالونات را کاتالیز می‌کند. این واکنش، مرحله محدودکننده در تشکیل ایزوپرنوئیدهای گیاهی است و جایگاه کنترلی مهمی در بیوسنتز این ترکیبات دارد، به طوری که مهار یا تسریع آن موجب کاهش یا افزایش سایر واکنش‌ها می‌شود (Leivar et al., 2011, Robertlee et al., 2018). آنزیم HMGR در بسیاری از گیاهان به وسیله ژن‌های پارالوگ متعددی کد می‌شود. در آرآبیدوپسیس دو ایزوفرم *AtHMGR1* (At2g17370) و *AtHMGR2* (At1g76490) مسئول کد کردن ایزوزایم‌های HMGR هستند (Lumbreras et al., 1995). نکته جالب توجه این

آن‌ها در سایر شرایط است. منطق استفاده از بای کلاسترینگ این است که هر ژن مجموعه‌ای از تنظیم‌کننده‌های خود را دارد و در شرایط خاص، تنظیمات مشترک را با ژن‌های دیگر به اشتراک می‌گذارد. بنابراین، ابزار Biclustering ماژول‌های ژنی هم تنظیم^۱ را جستجو می‌کند. Genevestigator با استفاده از الگوریتم BiMax (Prelić et al., 2006) که یک الگوریتم بسیار دقیق است، تمام بای کلاسترها را در یک ماتریس شناسایی می‌کند. این الگوریتم بر روی یک ماتریس باینری (یعنی داده‌هایی که دارای دو حالت هستند مانند افزایش بیان و عدم افزایش بیان) کار می‌کند. بنابراین، ماتریس داده‌های بیانی ابتدا بر اساس یک آستانه مشخص شده توسط کاربر، به یک ماتریس صفر و یک تبدیل می‌شود. یعنی داده‌های بیانی به دوگروه تغییر بیان (سیاه) و بدون تغییر بیان (سفید) طبقه‌بندی می‌شوند. بر اساس این ماتریس باینری، BiMax تمام بای کلاسترها را شناسایی می‌کند. یک بای کلاستر در اینجا به صورت مجموعه‌ای از ژن‌ها و مجموعه‌ای از شرایط تعریف می‌شود که داده‌های بیانی ژن‌ها در آن شرایط حداکثر است به طوری که چنین شرایطی در هیچ بای کلاستر دیگری وجود ندارد. در نهایت با استفاده از نرم‌افزار STRING ورژن ۱۱ اثرات متقابل پروتئینی برای تمام آنزیم‌های مورد بررسی ترسیم گردید.

نتایج و بحث

بررسی بیان ژن‌های مسیر موالونیک اسید و متیل اریتریتول فسفات در مراحل نمو مختلف نمودار پراکنش بیانی ژن‌های مسیرهای MVA، MEP و نقاط انشعاب در مراحل مختلف نمو گیاه آرآبیدوپسیس از جوانه‌زنی بذر تا مرحله پیری در شکل ۲ نشان داده شده است. میزان بیان در هر

2. Seedling
3. Senescence

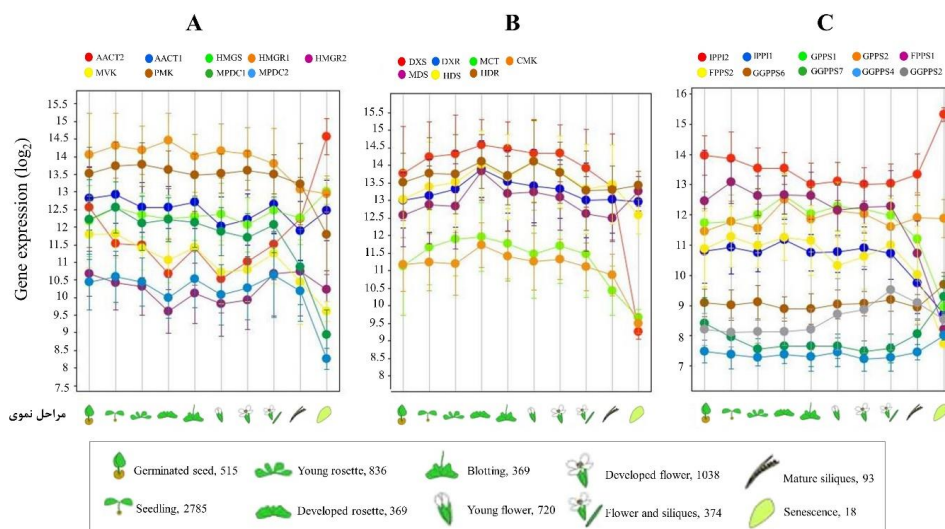
1. Modules of co-regulated genes

می‌تواند جریان کربن را در مسیر MEP کنترل کرده و مکانیسم تنظیمی این مسیر باشد. به‌طور کلی، متابولیت‌های نهایی مسیر MEP اندازه مخزن خود را از طریق کنترل فعالیت آنزیم‌های اولیه مسیر تعیین می‌کنند. بازخورد میزان آخرین متابولیت در فعالیت اولین آنزیم در یک مسیر، یک مکانیسم نظارتی رایج است (Banerjee and Sharkey 2014, Liang *et al.*, 2019).

از میان چهار ژن مورد بررسی در نقاط انشعاب، میزان بیان نسخه‌های ژنی مربوط به آنزیم گرانیل-گرانیل دی فسفات سنتتاز (GGPPS; EC 2.5.1.29) در تمام مراحل نمونه در سطح پایین‌تری قرار داشتند (>۹/۵). این آنزیم توسط پارالوگ‌های ژنی کدگذاری می‌شود و نقش آن در تنظیم جریان ایزوپرنوئید به‌طور کامل مشخص نشده است. در آرآیدوپسیس، GGPPS به‌وسیله یک خانواده ژنی متشکل از ۱۱ عضو کد می‌شود (Lange and Ghassemian 2003) که عملکرد و مکان قرارگیری تعدادی از آن‌ها در سلول از نظر آزمایشگاهی تأیید شده است (Okada *et al.*, 2000, Wang and Dixon 2009).

که بیان *AtHMGR1* بسیار بیشتر از *AtHMGR2* در تمام بافت‌ها در مراحل نمونه مختلف گزارش شد و بیشترین و کمترین بیان در میان ژن‌های مسیر MVA متعلق به این دو ژن بود. مطالعات موتاسیون این دو ایزوفرم نشان داده است که جهش عملکردی *AtHMGR1* سبب تغییرات فنوتیپی شدیدی از قبیل پیری، عقیمی و کوتولگی گیاه می‌شود که احتمالاً به کاهش میزان استرول مربوط می‌شود (Suzuki *et al.*, 2004). در مقابل موتاسیون ژن *AtHMGR2* هیچ‌گونه تغییر فنوتیپی متمایزی را نشان نداده است (Suzuki *et al.*, 2009).

آنزیم ۱-داکسی-D-گزیلوز ۵-فسفات سنتتاز (DXS; EC 2.2.1.7) بالاترین میزان بیان را در بین آنزیم‌های مورد بررسی در مسیر MEP داشت. هرچند که میزان بیان ژن‌های این مسیر نسبت به مسیر MVA از همگرایی بیشتری برخوردار بود. این آنزیم اولین واکنش مسیر MEP را کاتالیز می‌کند که مرحله محدودکننده سرعت این مسیر است (Xiang *et al.*, 2012). مطالعات تنظیمی نشان داده است که این آنزیم توسط محصولات نهایی IPP و DMAPP مهار می‌شود (Aparajita Banerjee *et al.*, 2013). بازدارندگی فیدبک DXS به‌وسیله IPP و DMAPP



شکل ۲. بیان ژن‌های مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه. A: ژن‌های مسیر MVA; B: ژن‌های مسیر MEP; C: ژن‌های نقاط انشعاب. مراحل مختلف نمونه به همراه تعداد نمونه‌ها در کادر مشخص شده در شکل نشان داده شده است.

علت تقاضای تولید فیتواسترول و دیگر ایزوپرنوئیدهایی است که در عملکرد ریشه نقش دارند (Vranová et al. 2013). ژن‌های مسیر MEP نیز در ریشه‌ها بیان زیادی دارند، به خصوص ژن *AtDXS* که فعالیت زیادی در بافت‌های آوندی ریشه (root vascular tissues) دارد. علت بیان زیاد ژن‌های MEP در ریشه به این علت است که ریشه‌ها، آبسزیک اسید، استریگولاکتون و فیتوکروم کروموفور تولید می‌کنند که تمام این‌ها از مسیر MEP مشتق می‌شوند. برخلاف ژن‌های مسیر MVA که در تمام مراحل و بافت‌های زایشی فعال هستند، ژن‌های مسیر MEP در این بافت‌ها فعالیت کم یا محدودی دارند. الگوی بیان ژن‌های دو مسیر MVA و MEP در بافت‌های مختلف نشان می‌دهد که هر دو مسیر سهم مشخصی در بیوسنتز ایزوپرنوئیدها در بافت‌های مختلف دارند و رونویسی ژن‌های کدکننده آنزیم‌های این دو مسیر به طور قابل ملاحظه‌ای با هم هماهنگ نیست. اگرچه زمانی که تقاضا برای پیش‌سازهای IPP و DMAPP زیاد باشد، mRNAهای آنزیم‌ها یا آیزوزایم‌های مسیر در سطوح مختلف در بافت‌های مختلف انباشته می‌شوند. چنانچه انتظار می‌رفت ژن‌های *AtIPPI* در آرابیدوپسیس در ریشه، گل و برگ بسیار فعال هستند (Okada et al., 2008, Phillips et al., 2008). ژن‌های *AtFPPS* نیز در تمام بافت‌های گیاهی فعال هستند و بیشترین بیان را در ریشه‌ها، گل‌ها و بذور دارند، در حالی که فعالیت آن‌ها در بافت‌های فتوسنتزی کاهش می‌یابد (Closa et al., 2010). ژن‌های *AtGGPPS* عمدتاً در بافت‌های سبز بیان می‌شوند ولی چون یک خانواده ژنی بزرگ هستند، از نظر عملکردی و تنظیمی تنوع زیادی دارند. نکته قابل توجه دیگر این است که الگوی بیان ژن‌های پارالوگی که یک آنزیم را کد می‌کنند، در بافت‌های مختلف بسیار متفاوت است که این موضوع در مراحل مختلف نمو نیز دیده شد. برای مثال بیان *AtHMGR1* به استثنای

میزان بیان چهار نسخه ژنی آنزیم GGPPS در شکل ۲ نشان داده شده است. محصول این آنزیم در گیاهان (گرانیل-گرانیل دی فسفات)، پیش‌ماده تولید ترکیباتی مانند دی‌ترین، جیبرلین، کلروفیل، کارتنوئید، آبسزیک اسید، توکوفرول، فیلوکوئینین و پلاستوکوئینین است. این آنزیم به صورت همودایمر عمل می‌کند و GPP، FPP و DMAPP را به عنوان سوبسترا مصرف می‌کند (VanderMoten et al., 2009). اگرچه میتوکندری تولیدکننده IPP نیست ولی آنزیم‌های سنتزکننده DMAPP، FPP و GGPP در میتوکندری نیز قرار دارند (جدول ۱). هر چند مطالعات موتانت در آرابیدوپسیس نشان داده است که فقدان این آنزیم‌ها در میتوکندری، هیچ تغییر فنوتیپی در مقایسه با نوع وحشی ایجاد نمی‌کند (Vranová et al. 2013).

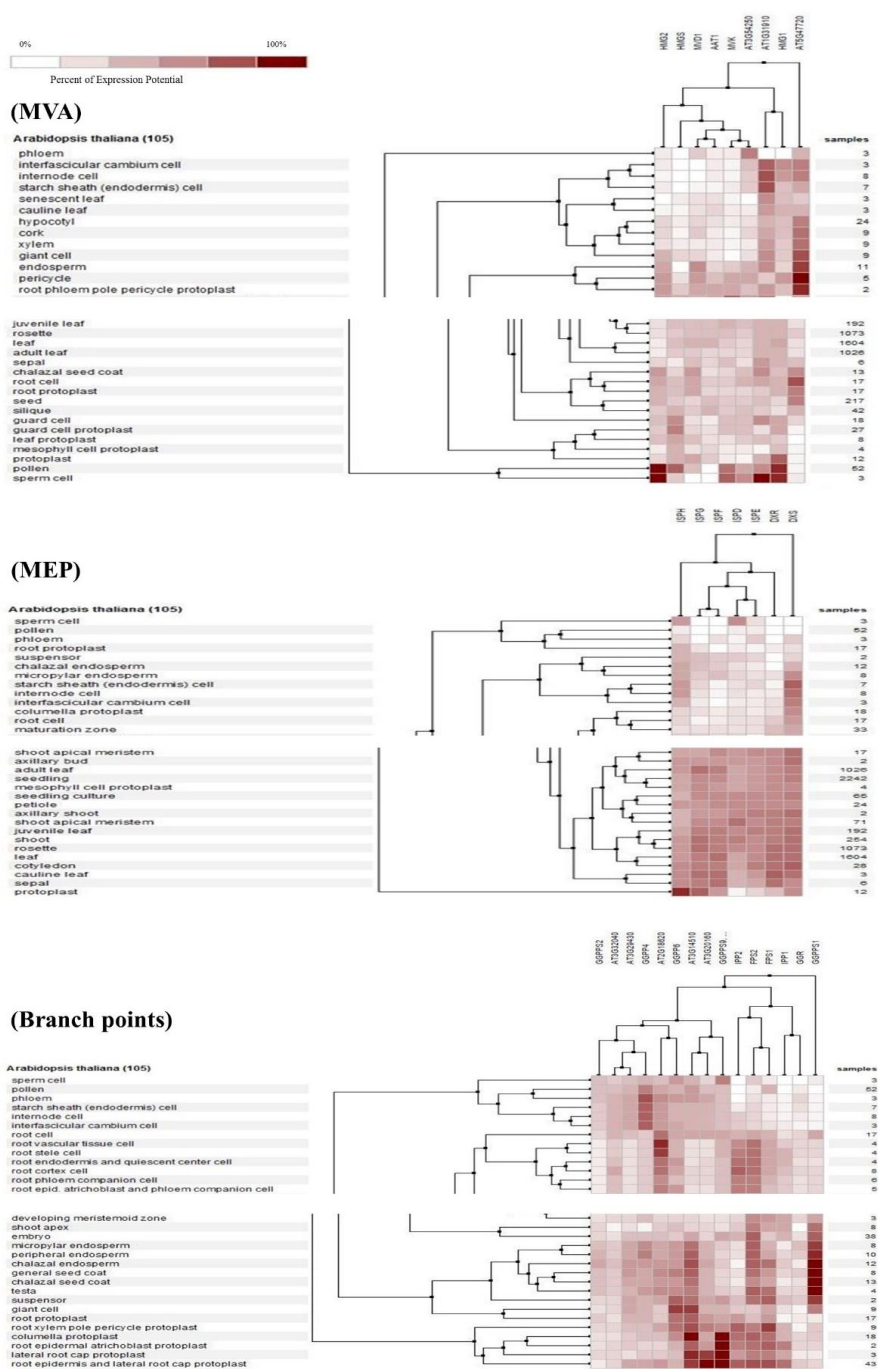
بررسی بیان ژن در بافت‌های مختلف

در مجموع ۱۰۵ بافت و ارگان مختلف برای هر ژن مورد بررسی قرار گرفت و بافت‌ها و ژن‌های مختلف بر اساس خوشه‌بندی سلسله مراتبی گروه‌بندی شدند (شکل ۳).

خوشه‌بندی سلسله مراتبی برای شناسایی ماژول‌های با الگوی بیان مشابه استفاده شد. گروه‌بندی ژن‌های مسیر MVA نشان داد که اکثر ژن‌های این مسیر به جز *AtAACT1* در یک کلاستر قرار دارند. ژن‌های مسیر MVA بیشترین بیان را در ریشه و اندام‌های زایشی (مانند بذر و گل) نشان می‌دهند، در حالی که ژن‌های مسیر MEP بیشتر در بافت‌های فتوسنتزی (برگ) بیان می‌شوند. *AtHMGR1* تقریباً با سطح یکسانی (میانگین سطح بیان ۱۴/۰۵) در تمام بافت‌ها و ارگان‌های گیاه بیان می‌شود. در هر کدام از مسیرها، بیان آنزیم‌ها حتی در یک بافت خاص ممکن است متغیر باشد. تمام ژن‌های مسیر MVA به‌طور فعالی در ریشه‌ها رونویسی شده و بیشترین سطوح رونویسی را در مریستم رأسی ریشه دارند که این به

دیگر مانند *AtIPPI1* و *AtIPPI2* و همچنین *AtFPPS1* و *AtFPPS2* با وجود نقش‌های فیزیولوژیکی متفاوت با هم هم‌پوشانی داشت (Closa et al., 2010; Okada et al., 2008).

بافت‌های گامتوفیتی نر، در سایر بافت‌ها بیشتر از *AtHMGR2* گزارش شد. به‌طور مشابهی *AtMPDC1* نیز نسبت به *AtMPDC2* در ریشه و دانه بسیار فعال‌تر است. الگوهای بیان پارانیم‌های



شکل ۳. الگوی بیان ژن‌های مسیر MVA، MEP و نقاط انشعاب در بافت‌های مختلف گیاه آرابی‌دوپسیس. به دلیل محدودیت از نمایش کامل نمودار heatmap اجتناب شده است. داده‌های بیان ریزآرایه در بافت‌های مختلف از پایگاه داده Genevestigator استخراج شده‌اند. خوشه‌بندی سلسله‌مراتبی در دو جهت ژن‌ها و بافت‌های مختلف با استفاده از روش فاصله اقلیدسی انجام شده است.

سیگنال مهم محیطی برای انباشت متمایز متابولیت‌های مشتق شده از ایزوپرنوئیدها در هنگام رشد و نمو گیاه است. برای مثال سنتز کارتنوئیدها با افزایش شدت نور زیاد می‌شود که پیامد افزایش رونوشت‌های بیانی ژن‌های مسیر MEP در اثر سیگنال نور است (Cordoba et al., 2009; Rodríguez-Concepción, 2006). تنظیم رونویسی در اثر نور در تمام گونه‌های گیاهی تأیید شده است (Hemmerlin et al., 2012). در گیاه آرابیدوپسیس، نور همچنین آنزیم‌های کدکننده ژن‌های مسیرهای پایین دست مانند *AtGGPPS* را القا می‌کند (Ghassemian et al., 2006). رونویسی تمام ژن‌های مسیر MEP در تاریکی به شدت کم می‌شود به جز *AtHDR* که سطح رونویسی آن همچنان بالا باقی می‌ماند. این تغییرات وابسته به نور مربوط به بیان ژن‌های مسیر MEP همیشه ارتباط مستقیمی با تجمع ایزوپرنوئیدها ندارد و قطعاً مکانیسم‌های تنظیمی بعد از رونویسی نیز در کنترل فعالیت آنزیم‌های مسیر MEP دخیل هستند. در مقابل، نور اثر منفی بر رونویسی ژن‌های مسیر MVA دارد که می‌تواند به دلیل کاهش محصولات نهایی مانند سیتواسترول و استیگماسترول باشد (Chenge- Espinosa et al., 2018, Ghassemian et al., 2006). رونویسی ژن‌های مسیر MVA و MEP همچنین به وسیله سیگنال‌های محیطی متعدد دیگری از قبیل تنش‌های اسمزی، دمای کم یا زیاد، پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی، الیسیاتور و زخم تنظیم می‌شود. هر چند اطلاعات دقیقی راجع به مسیرهای انتقال سیگنال و فاکتورهای رونویسی که اطلاعات محیط را به یک پاسخ رونویسی تبدیل می‌کنند، در دسترس نیست (Cordoba et al., 2009; Tholl and Lee, 2011). اما به طور کلی آنزیم HMGR در مسیر MVA و آنزیم DXS در مسیر MEP

از آنجا که بسیاری از ژن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی مختلفی نقش دارند، ممکن است متعلق به کلاسترهای متعددی باشند. این ایراد توسط تکنیک بای کلاسترینگ برطرف شده و به یکی از محبوب‌ترین تکنیک‌ها برای مطالعات داده‌های بیان ژنی برای کشف مجموعه‌ای از ژن‌ها که در زیر مجموعه‌ای از شرایط الگوی بیانی یکسانی دارند، تبدیل شده است (Pontes et al., 2015). در این تحقیق، برای پیدا کردن گروه‌هایی از ژن‌ها که پروفایل بیانی یکسانی در زیر مجموعه‌ای از بافت‌ها داشتند، از آنالیز بای کلاستر استفاده شد. در این آنالیز ابتدا ماتریس باینری بر اساس افزایش و عدم افزایش بیان تولید شد و آستانه تولید بای کلاستر ۰/۵ در نظر گرفته شد. نمونه‌ای از بای کلاسترهای تولید شده برای هر کدام از مسیرها در شکل ۴ نشان داده شده است. برای مسیر MVA ۶۰ بای کلاستر مختلف گزارش شد. بزرگترین بای کلاستر تولید شده مربوط به ۵ ژن *AtMK*، *AtHMGS*، *AtAACT1*، *AtMPDC1* و *AtMPDC2* بود که در ۱۸ بافت مختلف ریشه بیان مشابهی داشتند. برای مسیر MEP ۵ بای کلاستر گزارش شد که بزرگترین آن‌ها ۲۰×۵ بود. این بای کلاستر مربوط به ۵ ژن *AtDXS*، *AtDXR*، *AtCMK*، *AtMDS* و *AtHDS* بود که در ۱۵ بافت که اکثراً بافت‌های فتوسنتزی بودند، الگوی بیان مشابهی داشتند. برای ژن‌های نقاط انشعاب نیز ۷ بای کلاستر مختلف گزارش شد که بزرگترین بای کلاستر تولید شده (۸×۵) متعلق به ژن‌های *AtIPP2*، *AtFPSP1*، *AtFPSP2* و دو پارالوگ *AtGGPPS* بود که در ۸ بافت مختلف ریشه‌ای بیان مشابهی داشتند.

بررسی الگوی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف

بررسی بیان ژن‌ها در شرایط مختلف حاکی از تنظیم فعالیت مسیر بیوسنتزی ایزوپرنوئیدها تحت تأثیر سیگنال‌های محیطی است. در این میان، نور یک

درجه اطمینان برای اثرات متقابل رسم شود. همان طور که مورد انتظار بود، آنزیم‌های درون هر مسیر به شدت با هم پیوسته بودند. در حالی که پیوستگی اندکی بین مسیرها وجود داشت. این موضوع نشان می‌دهد که بیوستنتر ایزوپرنوئیدها از طریق دو مسیر MVA و MEP به‌وسیله شبکه‌های تنظیمی مستقل کنترل می‌شود. پروتئین‌های مربوط به هر مسیر با دواپر رنگی در شکل ۶ از هم جدا شده‌اند. اتصال مسیرهای پایین دستی به مسیرهای MVA و MEP از طریق پروتئین FPPS1 برقرار شده است که در شکل ۶ با فلش نشان داده شده است. این آنزیم پیش‌ماده ترپن‌ها یعنی فارنسیل دی فسفات (FPP) را فراهم می‌کند که از متراکم شدن دو واحد IPP با یک واحد DMAPP ایجاد می‌شود. به طور کلی، تنها بر اساس رابطه هم‌بیانی، دو ماژول هم‌بیان در شبکه شناسایی شد. ماژول اول شامل ۳ ژن *AtHDR*، *AtHDS*، *AtDXR* و *AtMDS* بود که به مسیر MEP مربوط بود و ماژول دوم شامل ۹ ژن بود که ۶ ژن آن *AtHMGR1*، *AtHMGR2*، *AtHMG2S*، *AtMPDC1*، *AtMPDC2*، *AtMK* و *AtIPPI* متعلق به مسیر MVA و ۳ ژن آن *AtFPPS1*، *AtFPPS2* و *AtFPPS1* مربوط به نقاط انشعاب بودند. هم‌بیانی ژن‌های مسیر MVA با سه ژن مربوط به نقاط انشعاب نشان می‌دهد که تنظیم رونویسی این مسیر محدود به ژن‌های داخل مسیر نیست و ژن‌های پایین دستی نیز در این فرآیند دخیل هستند.

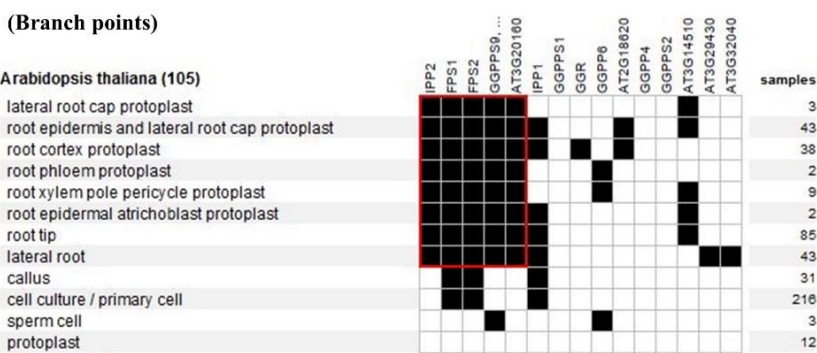
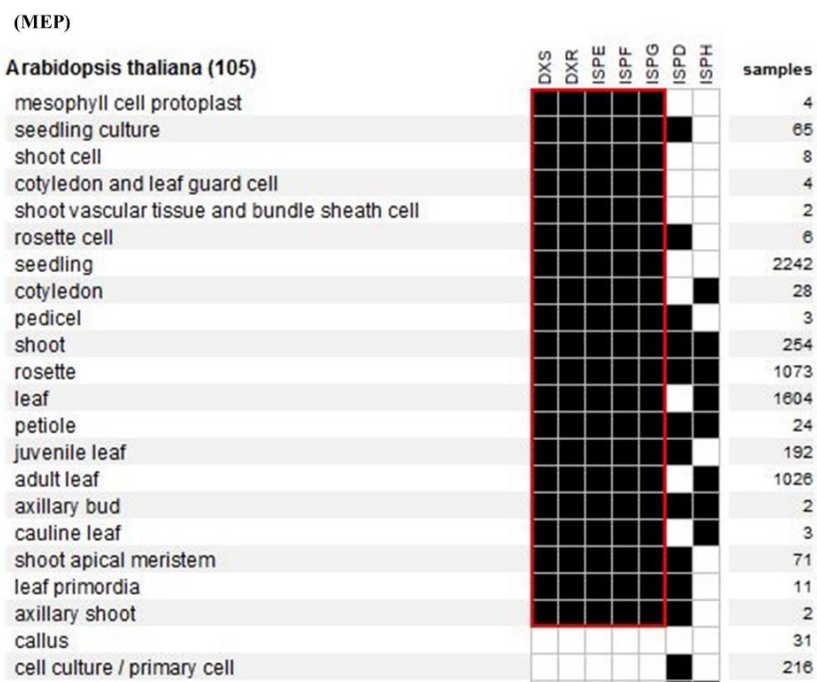
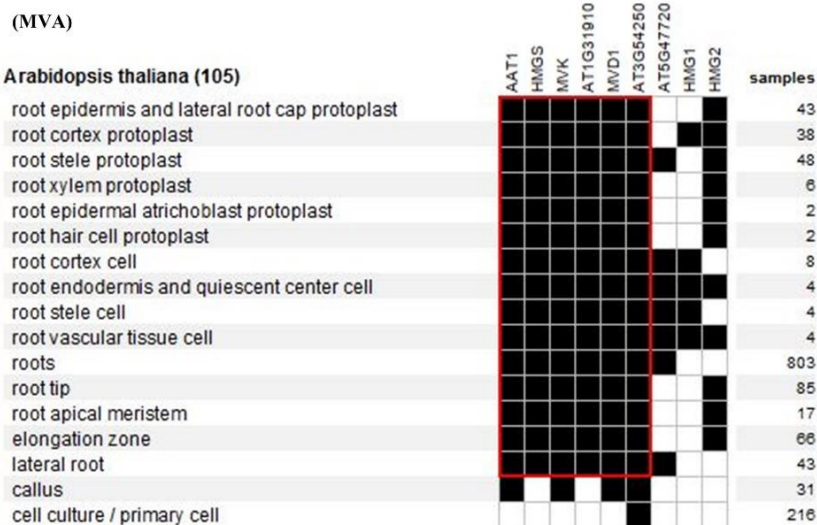
تنظیم مسیرهای MVA و MEP در گیاهان پیچیده‌تر از سایر موجودات است و جریان مسیر ایزوپرنوئیدهای گیاهی در سطوح رونویسی، پروتئین و تنظیم فیدبک کنترل می‌شود. همچنین وجود آیزوزایم‌ها در مراحل آنزیمی مختلف، وجود هر دو مسیر MVA و MEP در یک سلول و گستره وسیعی از محرک‌های محیطی که گیاهان درک می‌کنند، به پیچیدگی تنظیم سنتز ایزوپرنوئیدها در گیاهان افزوده است (Liang et al., 2019; Sawai and Saito, 2011).

به‌عنوان آنزیم‌های محدودکننده سرعت در این دو مسیر شناخته شده‌اند و میزان فعالیت آن‌ها بیشتر از سایر آنزیم‌های مسیر می‌تواند در تجمع ایزوپرنوئیدها نقش داشته باشد (Dos Santos et al., 2003; Walter et al., 2002). بر اساس خوشه‌بندی سلسله مراتبی ژن‌ها در شرایط مختلف، ژن‌های *AtPMK* و *AtHMGR1* در مسیر MVA و ژن‌های *AtHDR* و *AtDXS* در مسیر MEP در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند درحالی‌که سایر ژن‌های مسیر در یک گروه قرار داشتند. تجزیه بای کلاستر برای هر کدام از مسیرهای مورد بررسی در نهایت وجود ۵ بای کلاستر در مسیر MVA، ۱۸ بای کلاستر در مسیر MEP و ۷ بای کلاستر در نقاط انشعاب را گزارش داد. همان طور که انتظار می‌رفت بیشتر بای کلاسترهای گزارش شده در مسیر MEP مربوط به ۵ ژن *AtCMK*، *AtMCT*، *AtDXR* و *AtMDS* بود (این ژن‌ها طبق خوشه بندی سلسله مراتبی نیز در یک گروه قرار داشتند) که در شرایط مختلف شدت نور و تنش‌های اسمزی مانند تنش شوری از الگوی بیان مشابهی پیروی می‌کردند (شکل ۵). الگوی بیانی مشابه این ژن‌ها در این شرایط، به عناصر تنظیمی^۱ مشترک در ناحیه پروموتور این ژن‌ها مربوط می‌شود که نشان می‌دهد رونویسی این ژن‌ها به وسیله عوامل رونویسی^۲ مشترک در شرایط یکسان کنترل می‌شود (Chenge- Espinosa et al., 2018).

شبکه برهمکنش پروتئین-پروتئین

شبکه برهمکنش پروتئینی آنزیم‌های مسیر MVA، MEP و نقاط انشعاب با استفاده از نرم‌افزار STRING ترسیم گردید (شکل ۶). حداقل نمره اطمینان برای رسم شبکه ۰/۹ تنظیم شد تا شبکه پروتئینی با بالاترین

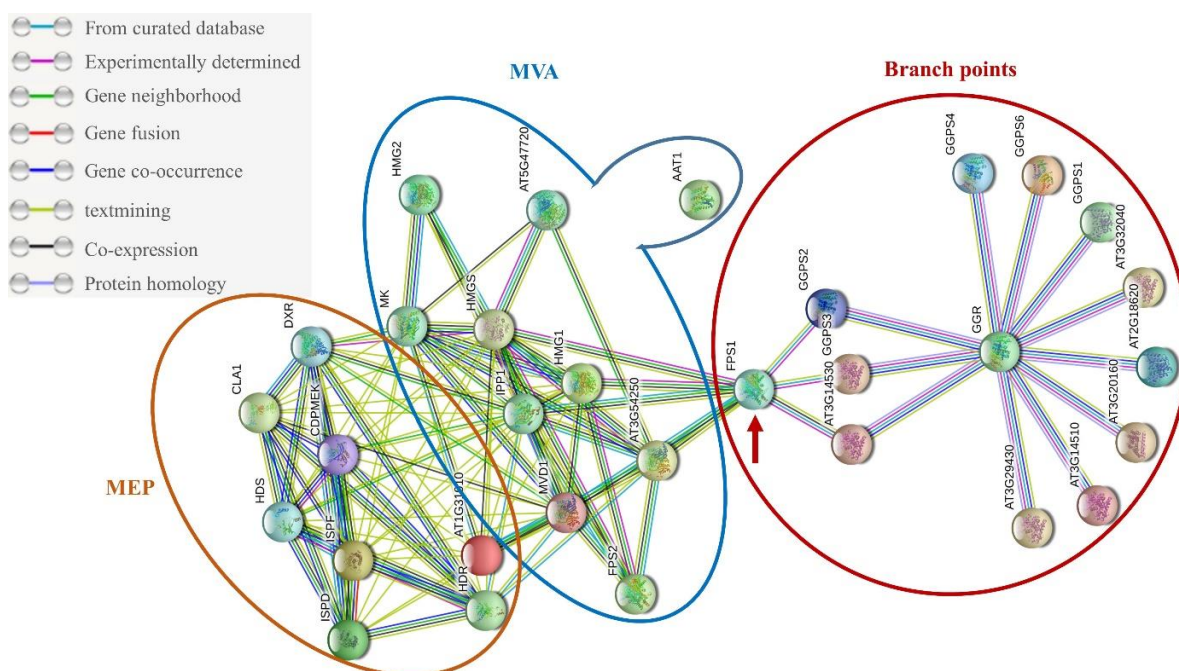
1. Cis-elements
2. Transcription factors



شکل ۴. آنالیز بای کلاستر ماتریس داده‌های بیانی مربوط به بافت‌های مختلف در گیاه آرابیدوپس. مربع‌های سیاه و سفید به ترتیب مقادیر بالاتر و پایین‌تر از حد آستانه (۰/۵) را نشان می‌دهند. کادر قرمز رنگ نمایش دهنده بای کلاستر شناسایی شده است.

Arabidopsis thaliana (3282)		DXR	ISPC	ISPE	ISPF	ISPG	DXS	ISPT	samples
AT-00127	BL study 2 (brx) / mock treated seedlings (brx)								2 / 2
AT-00490	germination (48h) / seed desiccation								3 / 3
AT-00490	germination (48h) / stratification (48h)								3 / 3
AT-00002	light study 2 / dark grown Col-0 seedlings								4 / 3
AT-00003	light study 3 / dark grown Ler-0 seedlings								5 / 5
AT-00276	light study 6 (Col-0) / dark grown Col-0 seedlings								3 / 3
AT-00390	red study 3 (45h) / dark grown seedlings (Col-0)								3 / 6
AT-00492	red study 4 (18h) / dark study 5 (18h)								3 / 3
AT-00656	salt / FACS (3h) / root epidermis and lateral root cap protoplast samples of...								3 / 3
AT-00656	salt / FACS (8h) / root epidermis and lateral root cap protoplast samples of...								3 / 3
AT-00656	salt / FACS (20h) / root epidermis and lateral root cap protoplast samples ...								3 / 3
AT-00656	salt / FACS (48h) / root epidermis and lateral root cap protoplast samples ...								3 / 3
AT-00501	shift lincomycin+R+B 0.5µmol m-2 s-1 to lincomycin+R+B 60µmol m-2 s-1 ...								4 / 4
AT-00693	shift low to high light study 4 (Col-0) / low light study 5 (Col-0)								3 / 3
AT-00693	shift low to high light study 4 (rap2.4a) / low light study 5 (rap2.4a)								3 / 3
AT-00501	shift R+B 0.5µmol m-2 s-1 to R+B 60µmol m-2 s-1 (24h) / R+B study 2 (0.5...								3 / 4
AT-00646	shoot regeneration study 2 (met1-1) / callus formation study 5 (met1-1)								3 / 3
AT-00576	cop1-4 / Col-0								3 / 3
AT-00576	cop1-4 BBX22-GFPox / Col-0								3 / 3
AT-00597	efr-1 / Col-0								3 / 3
AT-00435	sdg2-1 / Col-0								3 / 3
AT-00417	(NH4)2SO4 / NH4NO3 (Col-0)								2 / 2

شکل ۵. آنالیز بای کلاستر داده‌های بیانی مسیر MEP در شرایط مختلف در گیاه آرابیدوپسیس. مربع‌های سیاه و سفید به ترتیب مقادیر بالاتر و پایین‌تر از حد آستانه (۰/۵) را نشان می‌دهند. کادر قرمز رنگ نمایش دهنده بای کلاستر شناسایی شده است.



شکل ۶. پیش‌بینی اثرات متقابل پروتئینی آنزیم‌های مسیر MVA، MEP و نقاط انشعاب در گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از نرم‌افزار STRING. خطوط رنگی بین پروتئین‌ها نشان‌دهنده نوع ارتباط است. فلش مشخص شده در شکل نقطه اتصال مسیرهای پایین دستی به مسیرهای MVA و MEP را نشان می‌دهد.

مکانیسم‌های تنظیمی بعد از رونویسی نیز سطح تنظیمی دیگری برای فعالیت آنزیم‌ها هستند. اما شناسایی تنظیم ژن از طریق میزان بیان ژن‌ها

این نکته را نیز باید توجه داشت که تغییرات بیانی در این دو مسیر همیشه تجمع متابولیت‌های ایزوپرنوئیدی را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد و

می‌دهند، می‌تواند به عنوان راهکارهایی برای افزایش تولید ایزوپرنوئیدها در گیاهان باشد.

سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق توسط معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی و دانشگاه گیلان تأمین شده است که بدین‌وسیله نگارندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

می‌تواند به عنوان یکی از زیر لایه‌های تکامل در نظر گرفته شود، زیرا کنترل زمان‌بندی، مکان و مقدار ژن می‌تواند تأثیر مهمی در عملکرد ژن‌ها در درون سلول و کل ارگانیسم داشته باشد. بنابراین افزایش بیان ژن‌های کلیدی که اثر تنظیم‌کنندگی بیشتری در هر کدام از مسیرها دارند و همچنین مهندسی متابولیک و دستکاری ژنتیکی ژن‌هایی که از نظر بیانی انعطاف‌پذیری بیشتری در شرایط مختلف نشان

REFERENCES

- Aharoni A, Jongsma MA, Kim T-Y, Ri M-B, Giri AP, Verstappen FW, Schwab W, Bouwmeester HJ (2006) Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochem. Rev.* 5: 49-58.
- Banerjee A, Sharkey T (2014) Methylerythritol 4-phosphate (MEP) pathway metabolic regulation. *Nat. Prod. Rep.* 31: 1043-1055.
- Banerjee A, Wu Y, Banerjee R, Li Y, Yan H, Sharkey TD (2013) Feedback inhibition of deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase regulates the methyl erythritol 4-phosphate pathway. *J. Biol. Chem.* 288: 464636.
- Bohlmann J, Keeling CI (2008) Terpenoid biomaterials. *Plant J.* 54: 656-669.
- Chenge- Espinosa M, Cordoba E, Romero- Guido C, Toledo- Ortiz G, León P (2018) Shedding light on the methylerythritol phosphate (MEP) - pathway: long hypocotyl 5 (HY 5)/phytochrome interacting factors (PIF s) transcription factors modulating key limiting steps. *Plant J.* 96: 828-841.
- Closa M, Vranová E, Bortolotti C, Bigler L, Arró M, Ferrer A, Grissem W (2010) The *Arabidopsis thaliana* FPP synthase isozymes have overlapping and specific functions in isoprenoid biosynthesis, and complete loss of FPP synthase activity causes early developmental arrest. *Plant J.* 63: 512-525.
- Cordoba E, Salmi M, León P (2009) Unravelling the regulatory mechanisms that modulate the MEP pathway in higher plants. *J. Exp. Bot.* 60: 2933-2943.
- Disch A, Rohmer M (1998) On the absence of the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway for isoprenoid biosynthesis in fungi and yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 201-208.
- Disch A, Schwender J, Muller C, Lichtenthaler HK, Rohmer M (1998) Distribution of the mevalonate and glyceraldehyde phosphate/pyruvate pathways for isoprenoid biosynthesis in unicellular algae and the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6714. *Biochem. J.* 333: 381-388.
- Dos Santos CV, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P (2003) Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobancha ramosa*. *Phytopathology.* 93: 451-457.
- Ghassemian M, Lutes J, Tepperman JM, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Quail PH, Lange BM (2006) Integrative analysis of transcript and metabolite profiling data sets to evaluate the regulation of biochemical pathways during photomorphogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 448: 45-59.
- Hemmerlin A, Harwood JL, Bach TJ (2012) A raison d'être for two distinct

- pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog. Lipid Res.* 51: 95-148.
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv. Bioinf.* 2008.
- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK (2002) Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 41: 369-391.
- Lange BM, Ghassemian M (2003) Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant molecular biology.* 51: 925-948.
- Leivar P, Antolín-Llovera M, Ferrero S, Closa M, Arró M, Ferrer A, Boronat A, Campos N (2011) Multilevel control of Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by protein phosphatase 2A. *Plant Cell.tpc.* 110.074278.
- Liang Y-F, Liu H, Li H, Gao W-Y (2019) Determination of the Activity of 1-Deoxy-d-Xylulose 5-Phosphate Synthase by Pre-column Derivatization-HPLC Using 1, 2-Diamino-4, 5-Methylenedioxybenzene as a Derivatizing Reagent. *Protein J.* 1-7.
- Lombard J, Moreira D (2010) Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Molecular biology and evolution.* 28: 87-99.
- Lumbreras V, Campos N, Boronat A (1995) The use of an alternative promoter in the *Arabidopsis thaliana* HMG1 gene generates an mRNA that encodes a novel 3- hydroxy- 3- methylglutaryl coenzyme A reductase isoform with an extended N- terminal region. *Plant J.* 8: 541-549.
- Miziorko HM (2011) (Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 505: 131-143.
- Okada K, Kasahara H, Yamaguchi S, Kawaide H, Kamiya Y, Nojiri H, Yamane H (2008) Genetic evidence for the role of isopentenyl diphosphate isomerases in the mevalonate pathway and plant development in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology.* 49: 604-616.
- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M, Kamiya Y (2000) Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 122: 1045-1056.
- Phillips MA, D'Auria JC, Gershenzon J, Pichersky E (2008) The Arabidopsis thaliana type I isopentenyl diphosphate isomerases are targeted to multiple subcellular compartments and have overlapping functions in isoprenoid biosynthesis. *Plant Cell.* 20: 677-696.
- Pontes B, Giráldez R, Aguilar-Ruiz JS (2015) Biclustering on expression data: A review. *J Biomed Inform.* 57: 163-180.
- Prelić A, Bleuler S, Zimmermann P, Wille A, Bühlmann P, Gruissem W, Hennig L, Thiele L, Zitzler E (2006) A systematic comparison and evaluation of biclustering methods for gene expression data. *Bioinformatics.* 22: 1122-1129.
- Proteau PJ (1998) Biosynthesis of phytol in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. UTEX 2470 :utilization of the non-mevalonate pathway. *J. Nat. Prod.* 61: 841-843.
- Pulido P, Perello C, Rodriguez-Concepcion M (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol Plant.* 5: 964-967.
- Robertlee J, Kobayashi K, Tang J, Suzuki M, Muranaka T (2018) Evidence that the Arabidopsis thaliana 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 1 is phosphorylated at Ser577 in planta.

- Plant Biotechnol. 17:1208 a.
- Rodríguez-Concepción M (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochem. Rev.* 5: 1-15.
- Rohmer M, Knani M, Simonin P, Sutter B, Sahn H (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* 295: 517-524.
- Sapir-Mir M, Mett A, Belausov E, Tal-Meshulam S, Frydman A, Gidoni D, Eyal Y (2008) Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggest that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiol.* 148: 1219-1228.
- Sawai S, Saito K (2011) Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Front Plant Sci.* 2: 25.
- Simkin AJ, Guirimand G, Papon N, Courdavault V, Thabet I, Ginis O, Bouzid S, Giglioli-Guivarc'h N, Clastre M (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta.* 234: 903.
- Smit A, Mushegian A (2000) Biosynthesis of isoprenoids via mevalonate in Archaea: the lost pathway. *Genome Res.* 10: 1468-1484.
- Suzuki M, Kamide Y, Nagata N, Seki H, Ohyama K, Kato H, Masuda K, Sato S, Kato T, Tabata S (2004) Loss of function of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 1 (HMG1) in Arabidopsis leads to dwarfing, early senescence and male sterility, and reduced sterol levels. *Plant J.* 37: 750-761.
- Suzuki M, Nakagawa S, Kamide Y, Kobayashi K, Ohyama K, Hashinokuchi H, Kiuchi R, Saito K, Muranaka T, Nagata N (2009) Complete blockage of the mevalonate pathway results in male gametophyte lethality. *J. Exp. Bot.* 60: 2055-2064.
- Tholl D, Lee S (2011) Terpene specialized metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book.* 9.
- Vandermoten S, Haubruge É, Cusson M (2009) New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* 66: 3685-3695.
- Vranová E, Coman D, Grisse W (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu Rev Plant Biol.* 64: 665-700.
- Walter MH, Hans J, Strack D (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.* 31: 243-254.
- Wang G, Dixon RA (2009) Heterodimeric geranyl (geranyl) diphosphate synthase from hop (*Humulus lupulus*) and the evolution of monoterpene biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106: 9914-9919.
- Wilding EI, Brown JR, Bryant AP, Chalker AF, Holmes DJ, Ingraham KA, Iordanescu S, So CY, Rosenberg M, Gwynn MN (2000) Identification, evolution, and essentiality of the mevalonate pathway for isopentenyl diphosphate biosynthesis in gram-positive cocci. *J. Bacteriol.* 182: 4319-4327.
- Xiang S, Usunow G, Lange G, Busch M, Tong L (2012) 1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase (DXS), a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms* (pp. 17-28): Springer.
- Zhao L, Chang W-c, Xiao Y, Liu H-w, Liu P (2013) Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 82: 497-530.
- Zhou YJ (2018) Expanding the terpenoid kingdom. *Nat. Chem. Biol.* 14: 1069.