مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد چهاردهم، شماره ششم، بهمن ـ اسفند ۱۳۸۶
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

نقش ژن *RecQl4A* اربیدوپسیس در ترمیم صدمات وارده به گیاه توسط اشعه ماورای بنفش

محمدباقر باقریه‌نجار[1]* و پل دایکول[2]

[1]استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

[2]استادیار گروه زیست شناسی مولکولی گیاهی دانشگاه گرونینگن، هلند

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۱۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/۲

چکیده

هر چند اشعه ماورای بنفش (UV) در فتوسنتز گیاهان نقش مهمی ایفا نمی‌کند اما قادر است رشد رویشی و زایشی گیاهان را در مناطق مرتفع به مخاطره اندازد. یکی از اثرات اشعه UV در گیاهان صدمه به مولکول DNA می‌باشد که اگر قبل از همانندسازی DNA یا در حین آن ترمیم نگردد، باعث می‌شود تقسیم سلولی متوقف شود. مسیرهای بیوشیمیایی مختلف و پروتئین‌های بسیاری در ترمیم صدمات وارده به DNA دخالت دارند که از جمله آنها می‌توان به پروتئین‌های خانواده RecQ اشاره کرد که در پروکاریوت‌ها و گروه‌های مختلف یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. اخیراً توالی کامل ژنوم گیاه اربیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) تعیین گردیده و هفت ژن متعلق به خانواده *RecQ* در آن یافت شده است. گیاهانی که در آنها ژن *AtRecQl4A* جهش یافته است در مقایسه با گیاه وحشی در ترمیم برخی صدمات وارده به DNA ناتوان‌تر هستند. این موضوع مبین نقش ژن *AtRecQl4A* در کنترل پاسخ گیاه به صدمات وارده به DNA می‌باشد. جهت بررسی دقیق‌تر نقش ژن *RecQl4A* در ترمیم صدمات وارده توسط اشعه UV گیاهان جهش یافته و وحشی تیمار شده با شدت‌های مختلف اشعه UV جهت سپری کردن دوره ترمیم تحت شرایط نوری متفاوت قرار گرفتند تا مسیرهای مختلف ترمیمی در آنها فعال گردد. نتایج حاصل از جداسازی و مطالعه فنوتیپی سه لاین مستقل گیاهان جهش یافته نشان داد که ژن *RecQl4A* اربیدوپسیس در مسیرهای ترمیمی فعال در تاریکی، نور قرمز و مسیر فتولیزی ترمیم صدمات وارده به DNA نقش اساسی ایفا می‌کند. نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد می‌کند احتمالا با دست ورزی ژن *RecQl4A* در گیاهان می‌توان گیاهان تراریختی تولید کرد که مقاومت بیشتری به اشعه UV داشته باشند.

واژه‌های کلیدی: اربیدوپسیس، اشعه ماورای بنفش، RecQ، تمامیت ژنوم.

مقدمه

حفظ تمامیت اطلاعات وراثتی موجود در سلول‌های زنده که در مولکول DNA ذخیره شده‌اند از جمله مهمترین فعالیت‌های زیستی یک سلول زنده محسوب می‌گردد. جهت جلوگیری از انتقال صدمات احتمالی وارده به نسل‌های بعد، سلول‌ها دارای فرآیندی هستند که در صورت تشخیص نابسامانی در مولکول DNA تقسیم سلولی را متوقف کرده و مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را

*- مسئول مکاتبه: bagherieh@gau.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

فعال می‌کنند. سپس بسته به نوع صدمات وارده، مسیرهای مختلفی برای ترمیم آنها در سلول فعال می‌گردد (ساماداشویلی و همکاران، ۱۹۹۷؛ مک گلین و لوید، ۲۰۰۲).

انرژی موجود در اشعه UV توسط مولکول تیمین موجود در مولکول DNA جذب گردیده و با تغییر ساختمان آن جهش ایجاد می‌کند. در اغلب موارد این صدمات عبارتند از: پیریمیدین ٦-٤ پیریمیدون فتوپروداکت‌ها[1] که حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد صدمات و دایمرهای پیریمیدین حلقوی[2] که بقیه صدمات را تشکیل می‌دهند. هر چند اثرات مخرب فتوپروداکت‌ها در ممانعت از همانندسازی DNA از دایمرهای پیریمیدین بیشتر است، هر دو نوع از صدمات مذکور هنگام رونویسی[3] فعالیت آنزیم RNA پلیمراز II را مختل می‌کنند و به این ترتیب می‌توانند مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را فعال سازند (سیگنور و همکاران، ۱۹۹۸؛ کورسله و همکاران، ۲۰۰۳).

در سلول‌های یوکاریوت، آنزیم‌های تیپ II فتولیز کننده که برای هر نوع از صدمات مذکور به‌طور اختصاصی عمل می‌کنند قادرند در فرآیندی مصون از خطا صدمات وارده را در حضور نور آبی بر طرف نمایند (سوبودا و فوس، ۱۹۹۵). حضور این آنزیم‌ها در کنار ترکیباتی همچون فلاونوییدها، کاروتنوییدها و واکس‌های موجود در کوتیکول و دیواره سلولی گیاهان باعث می‌شود تا مقاومت گیاهان به تشعشع UV نسبت به جانوران افزایش یابد. در شرایطی که نور قرمز برای ترمیم صدمات وارده به DNA وجود داشته باشد، پدیده نوترکیبی همولوگی[4] در ترمیم صدمات وارده فعال می‌گردد و در شرایط تاریکی اغلب صدمات وارده توسط مسیر ترمیمی حذف نوکلئوتید[5] (NER) انجام می‌شود. این مسیر ترمیمی دارای چند مرحله است و میزان خطا در آن نسبتاً فراوان بوده و نیازمند انرژی ATP است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که مسیر ترمیمی وابسته به نور با توجه به اینکه نیازی به انرژی زیستی به فرم ATP نداشته و مصون از خطا است در عمل از ارجحیت برخوردار است و فقط هنگامی که شدت صدمات وارده بسیار بالا باشد به‌طور همزمان NER نیز فعال می‌گردد (ریس و همکاران، ۲۰۰۰).

پروتئین RecQ ابتدا در *E.coli* به‌عنوان یکی از اجزای مسیر نوترکیبی RecF معرفی گردید (ناکایاما و همکاران، ۱۹۸٤). سپس همولوگ‌های RecQ در باکتری‌ها، قارچ‌ها، جانوران و گیاهان شناسایی شدند (گانگلوف و همکاران، ۱۹۹٤؛ هارتونگ و همکاران ۲۰۰۰؛ باقریه و همکاران، ۲۰۰۳ و ۲۰۰۵). در موارد مورد مطالعه این پروتئین‌ها دارای فعالیت هلیکازی در جهت ′۳ به ′۵ بوده‌اند و با کنترل نحوه نوترکیبی DNA در حفظ تمامیت ژنوم نقش اساسی ایفا می‌کنند (اومزو و همکاران، ۱۹۹۰؛ جانساک و همکاران، ۲۰۰۳). پروتئین‌های RecQ با پروتئین‌های توپوایزومراز II، III و پروتئین اتصالی به زنجیره تک رشته‌ای DNA[6] اندرکنش دارند و همگی برای باز کردن مارپیچ دو رشته‌ای DNA، دو رشته ناهمگون DNA-RNA، ساختمان‌های نامعمول چهار رشته‌ای گوانین-گوانین[7] و اتصالات هالیدی[8] ضروری می‌باشند (هارمون و کوالزیکوسکی، ۱۹۹۸).

در حالی که موجودات تک سلولی فقط یک ژن متعلق به خانواده RecQ دارند، چند کپی از این ژن در موجودات پرسلولی وجود دارد که همولوژی قابل توجه در هفت دامین[9] حفاظت شده هلیکازی دارند. انسان دارای ۵ ژن *RecQ* است. جهش در ژن *WRN* عامل بروز سندرم ورنر[10] است که در آن بیماران به پیری زودرس و افزایش شانس ابتلا به سرطان مبتلا می‌گردند (یو و همکاران، ۱۹۹٦). جهش در ژن *BLM* عامل بروز

1- Pyrimidine 6-4 pyrimidon photoproducts
2- Cyclic pyrimidine dimmers
3- Transcription
4- Homologous recombination
5- Nucleotide excision repair

6- Single stranded binding protein
7- G-G tetraplex
8- Holiday junctions
9- Domain
10- Werner syndrome

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری بلوم[1] محسوب می‌گردد که علایم آن عبارتند از: کوتاهی قد نامعمول، نازایی، حساسیت به نور خورشید و افزایش شانس ابتلا به سرطان (الیس و همکاران، ۱۹۹۵). جهش در ژن *RTS* انسانی که عضو دیگری از خانواده *RecQ* می‌باشد عامل بروز سندروم رتموند-تامسون[2] است که علایم آن سرطان پوست و کوتولگی قد است (ناکایاما، ۲۰۰۲).

اخیراً هفت ژن متعلق به خانواده *RecQ* در گیاه اربیدوپسیس به نام‌های *AtRecQl1, 2, 3, 4A, 4B, 5* یافت شده است (هارتونگ و همکاران،۲۰۰۰؛ باقریه و همکاران، ۲۰۰۳) که بر روی چهار کروموزوم مختلف قرار گرفته‌اند. اخیراً مؤلف نشان داد ژن *AtRecQl4A* در کنترل و تنظیم پاسخ گیاه به صدمات وارده به DNAو فراوانی نوترکیبی هموlوگی[3] DNA نقش دارد (باقریه و همکاران، ۲۰۰۵). در این مقاله نقش ژن *RecQl4A* اربیدوپسیس در ترمیم صدمات وارده به DNA توسط اشعه ماورای بنفش و ممانعت از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول با دقت بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و بررسی گیاهان جهش یافته: در PCR انجام شده بر روی DNAی مجموعه‌ای[4] از گیاهان جهت جداسازی گیاهانی که در آنها یک کپی از T-DNA داخل ژن *RecQl4A* قرار گرفته است از پرایمرهای P1 (5'-TTGAGCTCAAGTCGGTGGTGGCC ATTTTA-3') و پرایمر موجود در انتهای سمت چپ T-DNA (JL-202, 5'-CATTTTATAATAACGCTGCGGACA TCTAC-3') استفاده شد. هر واکنش PCR حاوی ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۲ مایکرو مولار از هر پرایمر، ۲ مایکرو لیتر DNA، ۱× بافر آنزیم EXTaq دی-ان-ای پلیمراز و یک واحد آنزیم EXTaq دی-ان-ای پلیمراز بود. شرایط PCR عبارت بود از ۹۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشتگی[5] اولیه، ۳۶ سیکل به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۵۸-۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه به ازای هر کیلو باز و ۱۰ دقیقه برای گسترش نهایی[6] در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از این دو پرایمر قطعه‌ای به طول ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر گردید که در PCR انجام شده برروی مجموعه‌های کوچکتر هم مشاهده گردید تا در نهایت یک گیاه منفرد حاوی T-DNA به‌دست آمد. برای جداسازی DNA از روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استفاده گردید.

گیاهان استفاده شده و شرایط رشد: لاین‌های گیاهان مورد استفاده عبارت از *Arabidopsis thaliana* واریته کلمبیا(Columbia, Col-0) و واسیلوسکیا (Wassilewskija, WS) بودند. سطح بذرها توسط محلولی حاوی ۲۰ درصد مایع سفید کننده[7] و ۸۰ درصد اتانول ۹۶درصد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گردیده و پس از دو بار شستشو با اتانول ۹۶ درصد خشک و برروی محیط کشت آگار استریل حاوی محلول غذایی موراشیک و اسکوگ[8] (MS) کشت داده شدند. پلیت محتوی بذرها به مدت ٤ روز در حرارت ۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس به اطاقک رشد منتقل گردیده و تحت شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۶۰ $\mu molm^{-2}s^{-1}$ و هشت ساعت تاریکی در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ درصد قرار گرفتند.

تیمار UV: گیاهان ۱۰ روزه به مدت ٤٨ ساعت در معرض مقادیر مختلف نور ماورای بنفش تولید شده توسط دستگاه UV استراتلینکر[9] مدل ۱۸۰۰ ساخت کمپانی استراتژن[10] قرار گرفتند. سپس به مدت ٤٨ ساعت

1- Bloom syndrome
2- Rothmund-Thomson
3- Homologous recombination
4- Pool

5- Denaturation
6- Final extension
7- Bleach
8- Murashige and Skoog
9- UV-stratlinker
10- Stratgene

Archive of SID

www.SID.ir

جهت سپری کردن دوره ترمیم و بازیافت تحت شرایط نوری سفید فیلتر نشده، قرمز (فیلتر قرمز)، آبی (فیلتر آبی) و تاریکی (ورق آلومینیوم) به اطاقک رشد با شرایط مذکور در بالا منتقل شدند.

محاسبات آماری: در تمام اندازه‌گیری‌ها از میانگین و خطای استاندارد استفاده شد و اختلاف میانگین‌ها توسط آزمون student *t*-test دو طرفه[1] در سطح ۹۹ درصد مورد تأیید قرار گرفت.

نتایج و بحث

جداسازی و بررسی مولکولی گیاهان جهش یافته *recQl4A*: برای جداسازی گیاهان اربیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) که ژن *RecQl4A* در آنها جهش یافته باشد، از روش ژنتیک معکوس استفاده شد. یک پرایمر اختصاصی ژن *RecQl4A*، (P1) به همراه پرایمر اختصاصی T-DNA (JL202) برای غربال کردن مجموعه ای از گیاهان اربیدوپسیس واریته واسیلوسکیا[2] (WS)، ترانسفورم شده توسط یک T-DNA، موجود در دانشگاه ویسکانزین[3] (کریزان و همکاران، ۱۹۹۹) با استفاده از واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱). در اولین PCR انجام شده قطعه‌ای از DNA به طول kb ۱/٤ تکثیر گردید. پس از تعیین توالی قطعه DNA مذکور مشخص شد که در مجموعه گیاهان ترانسفورم شده فوق گیاهی وجود دارد که در آن یک نسخه از T-DNA بین اگزون سوم و چهارم ژن *AtRecQl4A* وارد شده است. پس از انجام چند سری PCR دیگر برروی مجموعه‌های کوچکتر در نهایت یک گیاه منفرد حاوی T-DNA در ژن *RecQl4A* به‌دست آمد که *AtrecQl4A-1* نامیده شد. گیاه جهش یافته به دست آمده ظاهری کاملاً نرمال داشت و قادر بود بذر تولید کند. آزمایش‌های PCR بعدی نشان دادند که این لاین نسبت به جهش واقع شده در ژن *RecQl4A* همی‌زایگوس است. بذرهای به دست آمده از این گیاه برروی محیط کشت حاوی کانامایسین[4] رشد داده شدند و به نسبت ۳:۱ تفرق یافتند (٤١٦ مقاوم به ١٤٤ حساس) مبنی بر اینکه در این لاین فقط یک جایگاه ورود T-DNA کامل وجود دارد. این نتیجه توسط آزمایش سادرن بلات[5] که در آن قسمتی از ژن GUS موجود در T-DNA به‌عنوان پروب استفاده شده بود، تایید گردید (باقریه و همکاران، ۲۰۰۵). با استفاده از آزمایش PCR برروی گیاهان مقاوم به کانامایسین گیاهان هموزایگوس نسبت به T-DNA به دست آمدند.

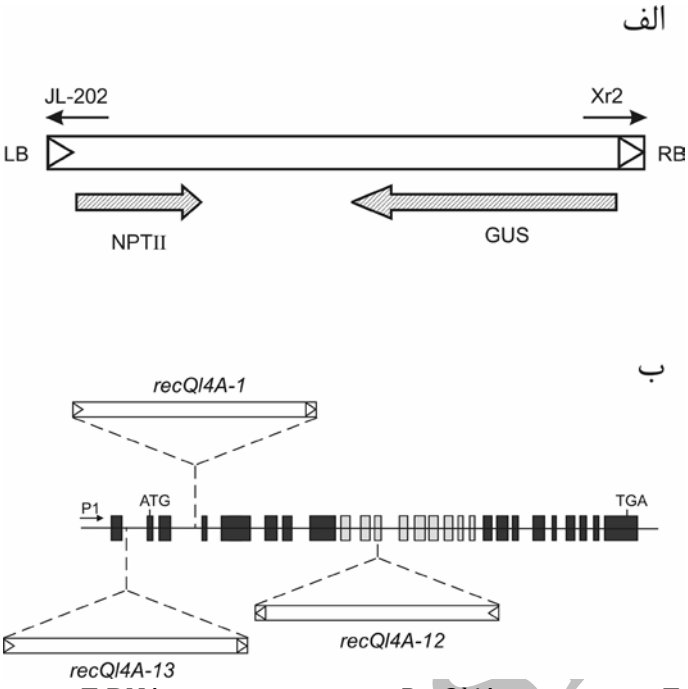
با استفاده از روشی نسبتاً مشابه دو لاین مستقل دیگر از واریته کلمبیا (Col-0) که هر یک حاوی یک T-DNA درون ژن *RecQl4A* بودند از بانک T-DNA موجود در انستیتو تحقیقاتی سینجنتا[6] در ایالات متحده استخراج گردیدند. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، T-DNA موجود در لاین *recQl4A-12* در اگزون شماره ۱۱ و در وسط دامین هلیکازی وارد شده و T-DNA موجود در لاین *recQl4A-13* در اولین اینترون[7] ژن مذکور در منطقه‌ی قبل از کدون آغازین (5' UTR) قرار دارد. جزییات مراحل جداسازی این لاین‌ها در مقاله دیگری به چاپ رسیده است (باقریه و همکاران، ۲۰۰۵). هر چند بررسی فنوتیپی گیاهان جهش یافته روش سریع و مناسبی برای درک نقش ژن‌ها محسوب می‌گردد (کریزان و همکاران، ۱۹۹۹)، اما در مواردی که احتمال می‌رود چند ژن در انجام یک عمل زیستی نقش مشابه یا مکمل داشته باشند استفاده از روش‌های *in vitro* جهت بررسی دقیق نقش پروتئین‌ها می‌تواند بسیار کارساز باشد (سینگر و همکاران، ۱۹۹۸؛ جانساک و همکاران، ۲۰۰۳).

بررسی فنوتیپی گیاهان جهش یافته: هنگامی که گیاهان تحت شرایط استاندارد رشد داده شدند، هیچیک از سه

1- Two tailed student *t*-test
2- Wassilewskija, WS
3- Wisconsin
4- Kanamycin
5- Southern blot
6- Syngenta
7- Intron

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- آنالیز مولکولی T-DNA ملحق شده به ژن *RecQl4A*. الف) ساختمان شماتیک T-DNA استفاده شده در ایجاد جهش در لاین *recQl4A-1*. جهت قرار گرفتن ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین (*NPTII*) و ژن بتا گلوکورونیدیز (*GUS*) با فلش نشان داده شده است. پرایمرهای JL-202 و XR2 مربوط به T-DNA نشان داده شده اند. LB انتهای سمت چپ T-DNA و RB انتهای سمت راست T-DNA می‌باشد. ب) ساختار مولکولی ژن *AtRecQl4A* که دارای ۲۶ اگزون است به همراه محل‌های الحاق T-DNA نشان داده شده است. محل قرار گرفتن پرایمر استفاده شده در PCR با P1 نشان داده شده است. ATG محل آغاز ترجمه و TGA محل توقف آن می باشد.

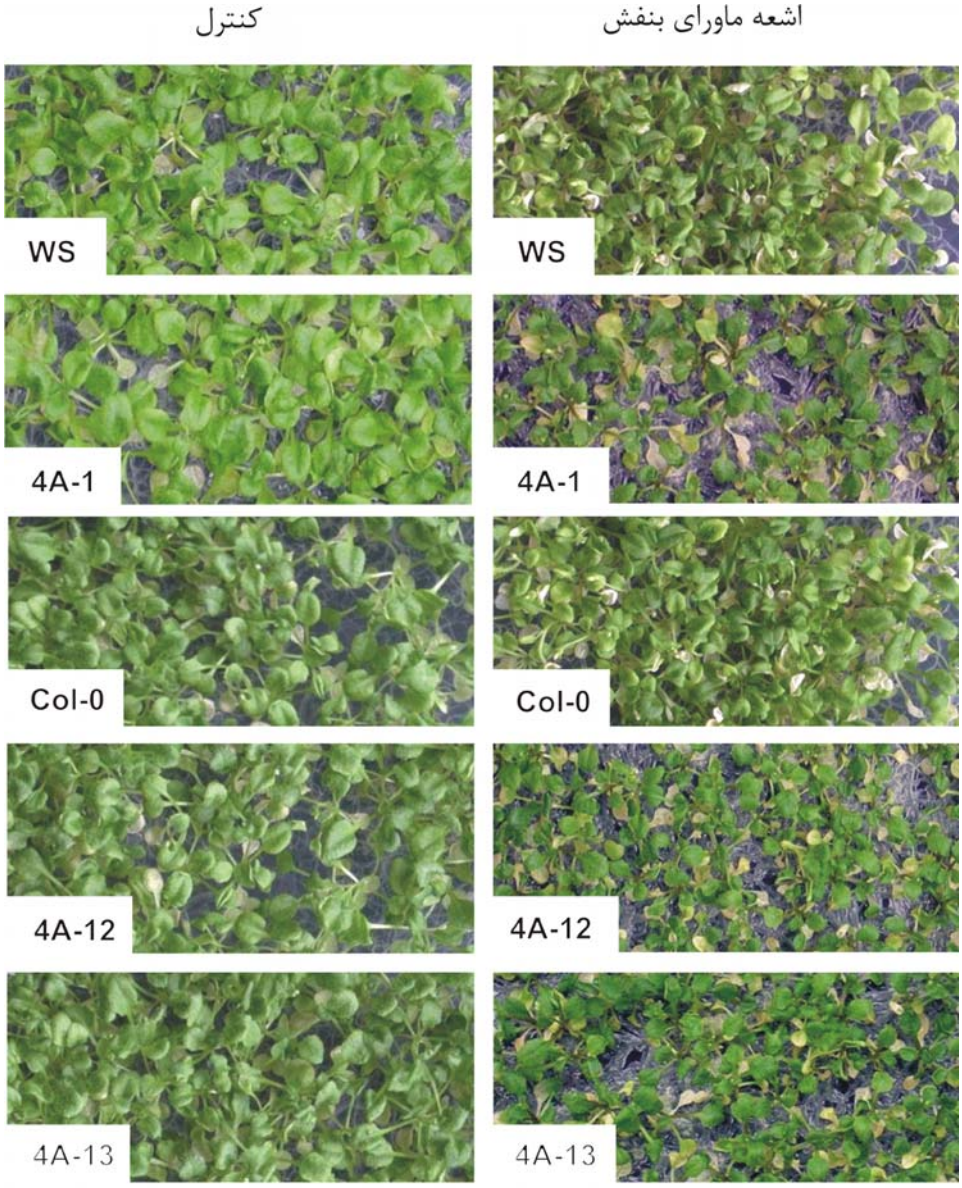
لاین جهش یافته به‌دست آمده چه در حالت همی‌زایگوس[1] و چه در حالت هموزایگوس تفاوت قابل تشخیصی با گیاهان وحشی نداشتند، اما در تأیید نتایج حاصل از آزمایش‌های قبلی (باقریه و همکاران، ۲۰۰۵) در مقایسه با گیاهان وحشی، حساسیت هر سه لاین به اشعه UV افزایش یافته بود (شکل ۲). بر این اساس به نظر می‌رسد ژن *AtRecQl4A* به احتمال زیاد در یکی از مسیرهای ترمیم صدمات وارده به DNA توسط اشعه UV نقش مهمی ایفا می‌کند. برای مطالعه بیشتر این نقش و تعیین مسیر ترمیمی مذکور تأثیر اشعه UV در رشد و نمو گیاهان جهش یافته *recQl4A* با دقت بیشتری مورد بررسی قرار گرفت. گیاهچه‌های وحشی و جهش یافته *recQl4A* ده روزه که برروی محیط کشت آگار جامد جوانه زده و در شرایط استاندارد رشد داده شده بودند با مقادیر مختلف اشعه UV تیمار شدند. نظر به اینکه مسیرهای مختلف مؤثر در ترمیم صدمات وارده به DNA تحت شرایط نوری متفاوت فعال می‌گردند، گیاهچه‌ها پس از تیمار با شدت‌های مختلف اشعه UV جهت سپری کردن دوره ترمیم تحت شرایط نور سفید کامل، نور قرمز، نور آبی و یا تاریکی قرار داده شدند. آزمایش‌های قبلی نشان داده بودند که گیاهان اربیدوپسیس واریته WS نسبت به واریته Col-0 حساسیت بیشتری به اشعه UV دارند (باقریه و همکاران، ۲۰۰۵). در تیمار کنترل بین گیاهان وحشی و جهش یافته در هر دو واریته تفاوت قابل تشخیصی مشاهده نگردید. در هر دو واریته پس از سپری کردن دوره ترمیم در تاریکی کامل کاتیلدون‌ها و اولین جفت برگ‌های رزت[2] حتی پس از کمترین سطح تیمار UV به کار برده شده ($mJcm^{-2}$ ۲۰۰) پیری زودرس مشاهده گردید، ریس و همکاران (۲۰۰۰) نتایج مشابهی را در خصوص پاسخ گیاه

1- Hemizygous

2- Rosette

Archive of SID

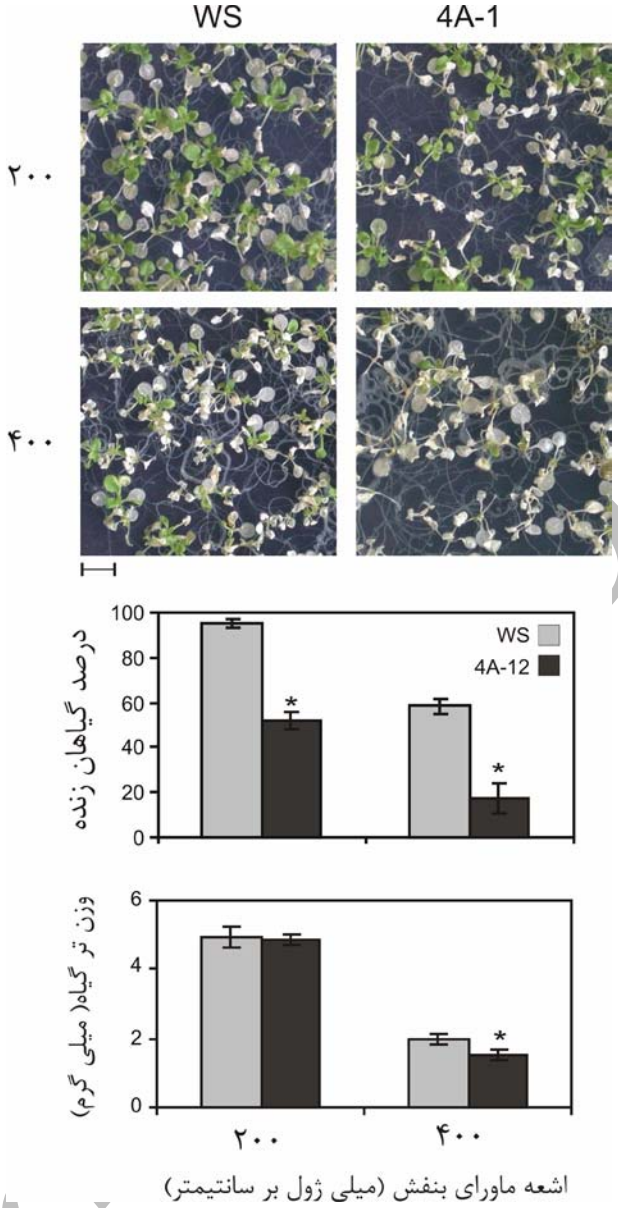
www.SID.ir



شکل ۲- حساسیت گیاهان جهش یافته *recQl4A* به اشعه ماورای بنفش پس از ترمیم در نور سفید. گیاهان ده روزه تیپ وحشی (WS, Col-0) و جهش یافته (4A-1, 4A-12, 4A-13) با اشعه ماورای بنفش تیمار شده و پس از سپری کردن ده روز دوره ترمیم در نور سفید عکس برداری انجام شد. مقیاس= یک سانتی‌متر.

اربیدوپسیس به اشعه ماورای بنفش گزارش نمودند. از این رو، می‌توان نتیجه گرفت تفاوت‌های مشاهده شده بین گیاه وحشی و *recQl4A*$^{-/-}$ پس از تیمار با اشعه ماورای بنفش و دوره ترمیم در تاریکی به تفاوت بین این دو گیاه در القای مکانیزم‌های ترمیمی تاریکی در جفت برگ‌های دوم و بعد از آن مرتبط است. با توجه به حساسیت بیشتر اکوتیپ WS، این واریته جهت بررسی اثر مقادیر مختلف اشعه UV بر رشد گیاهان وحشی و جهش یافته *recQl4A-1* انتخاب گردید و با توجه به مقاومت بیشتر گیاهان Col-0 از آنها در بررسی دقیق‌تر اثر شرایط مختلف ترمیم صدمات وارده بهره‌برداری شد. ظاهراً به نظر می‌رسد واریته کلمبیا که بومی مناطق کوهستانی است نسبت به واریته واسیلوسکیا که بومی مناطق پست است مقاومت بیشتری نسبت به بسیاری از عوامل محیطی دارد (باقریه، ۲۰۰٤).

www.SID.ir

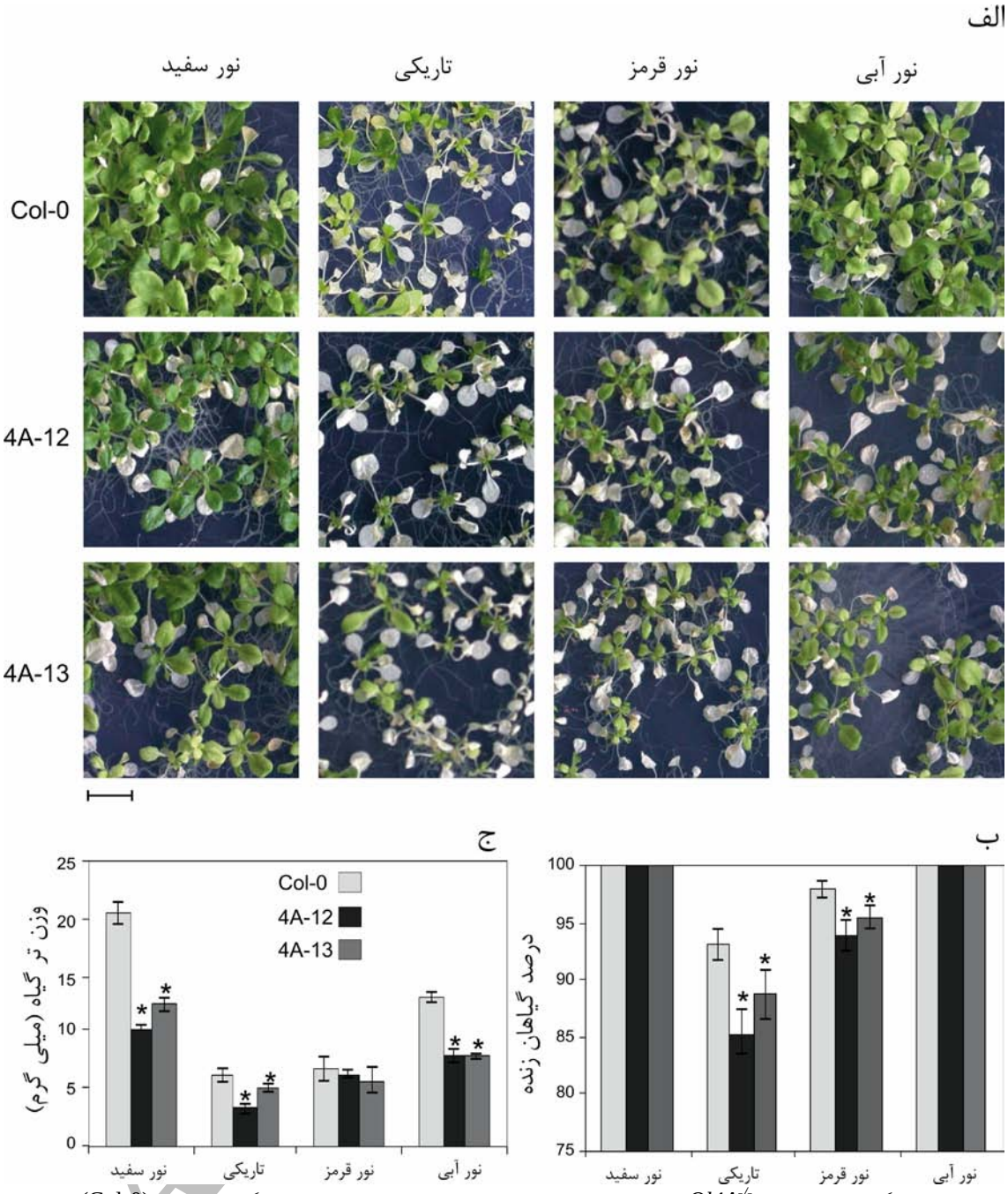


شکل ۳- حساسیت گیاهان جهش یافته *recQl4A*$^{-/-}$ به اشعه ماورای بنفش پس از ترمیم در تاریکی. گیاهان وحشی (WS) و جهش یافته (4A-1) ده روزه کشت شده بر روی محیط کشت آگار جامد با مقادیر مختلف اشعه ماورای بنفش تیمار شده و پس از سپری کردن دو روز دوره ترمیم در تاریکی و ۸ روز در نور سفید عکس برداری انجام شد. مقیاس= یک سانتیمتر. انحراف استاندارد با خطوط خطا در نمودار نشان داده شده است. ستاره نشان دهنده اختلاف معنی دار با گیاه وحشی در تیمار یکسان است.
(*t*-test, P<0.01, n>64).

گیاهان جهش یافته *recQl4A*$^{-/-}$ در ممانعت از فعال شدن مرگ برنامه‌ریزی شده سلول ناتوانند: قدرت حیاتی گیاهان جهش یافته *recQl4A*$^{-/-}$ پس از تیمار با اشعه UV و ترمیم در تاریکی در مقایسه با گیاه وحشی در کمترین مقدار UV استفاده شده (۲۰۰ $mJcm^{-2}$) کمتر از گیاه وحشی بود مبنی بر اینکه در گیاهان جهش یافته *recQl4A* ترمیم ضد اپوپتوسیس[1] نقصان یافته است (شکل ۳). وزن تر گیاهان سبز در دو تیمار نور و تاریکی با یکدیگر مقایسه گردید و گیاهان جهش یافته *recQl4A* حساسیت بیشتری نسبت به اشعه UV از خود نشان دادند (شکل ۳).

1- Apoptosis

www.SID.ir



شکل ٤- حساسیت گیاهان جهش یافته *recQl4A*$^{-/-}$ به اشعه ماورای بنفش پس از ترمیم درنورهای مختلف. گیاهان وحشی (Col-0) و جهش یافته (4A-12, 4A-13) ده روزه کشت شده بر روی محیط کشت آگار جامد با اشعه ماورای بنفش تیمار شده و پس از سپری کردن دو روز دوره ترمیم در شرایط مذکور و ۸ روز در نور سفید عکس برداری انجام شد. مقیاس= یک سانتی‌متر. انحراف استاندارد با خطوط خطا در نمودار نشان داده شده است. ستاره نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار با گیاه وحشی در تیمار یکسان است.
(*t*-test, P<0.01, n>43).

نوترکیبی همولوگی و مسیر فتولیزی اثرات مختلفی بر روی ترمیم صدمات وارده دارند: نظر به اینکه حضور نورهای مختلف در دوره ترمیم صدمات وارده به DNA توسط اشعه UV در فعال گشتن مسیرهای مختلف ترمیمی موثر است، برای درک نقش ژن *RecQl4A* در مسیرهای ترمیمی فوق گیاهان وحشی و جهش یافته ده روزه پس از تیمار با اشعه UV تحت شرایط مختلف نوری قرار داده شدند. نتایج این آزمایش نشان داد هنگامی

www.SID.ir

که گیاهان پس از تیمار با اشعه UV در شرایط نور آبی دوره ترمیم را سپری کردند تمام گیاهان جهش یافته *recQl4A* زنده ماندند در حالی که وزن تر گیاهان وحشی از گیاهان جهش یافته بیشتر بود (شکل ٤). این نتایج نشان می‌دهد ترمیم صدمات وارده از مسیر فتولیزی در عدم حضور ژن *RecQl4A* کاملاً مختل نگردیده و این مسیر ترمیمی توانسته است تا حدی نقصان موجود در مسیر ترمیمی فعال در تاریکی را جبران نماید. اگر مسیر ترمیمی فتولیزی در گیاهان جهش یافته *recQl4A* بدون تغییر باقی مانده بود، آنگاه انتظار می‌رفت رشد گیاهان جهش یافته و وحشی پس از تیمار با نور آبی مشابه باشد. ولی همانگونه که در شکل ٤ب نشان داده شده است در تیمار نور آبی وزن تر گیاهان جهش یافته از گیاهان وحشی کمتر است، مبنی بر اینکه ژن *RecQl4A* در مسیر فتولیزی ترمیم صدمات وارده به DNA نقشی بر عهده دارد. هنگامی‌که پس از تیمار با اشعه UV گیاهان در حضور نور قرمز مراحل ترمیم را سپری کردند قدرت بقای گیاهان جهش یافته در مقایسه با گیاهان تیمار شده در تاریکی افزایش یافت (شکل ٤ب) و وزن تر گیاهان *recQl4A* به اندازه آن در گیاهان وحشی رسید (شکل ٤ج). با توجه به اینکه نور قرمز مسیر ترمیمی وابسته به نوترکیبی همولوگی را فعال می کند، نتایج حاصله نشان می دهد مسیر ترمیمی وابسته به نوترکیبی همولوگی در گیاهان جهش یافته *recQl4A* بیش از گیاهان وحشی تقویت شده است. مطابق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد کارایی مسیر ترمیمی وابسته به نور از مسیر ترمیمی وابسته به نوترکیبی همولوگی بیشتر باشد (شکل ٤). ریس و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند که در گیاهان جهش یافته *uvr2-1* که پروتئین فتولیز کننده CPD در آنها از کار افتاده است، تجمع CPD باعث می‌گردد مقدار نوترکیبی همولوگی افزایش یابد. بنا بر این، احتمال دارد در گیاه جهش یافته *recQl4A* نیز در شرایطی که فتولیز CPD امکان‌پذیر نباشد، افزایش CPD منجر به افزایش نوترکیبی همولوگی شده باشد. هماهنگ با این فرضیه نگارندگان قبلا نشان دادند که فراوانی HR در گیاهان جهش یافته *recQl4A* نسبت به گیاهان وحشی حدود ۱۰ برابر افزایش یافته است.

در مجموع ژن *AtRecQl4A* یکی از ژن‌هایی است که در ترمیم صدمات وارده به DNA گیاه توسط اشعه ماورای بنفش نقش اساسی ایفا می‌کند. به نظر می رسد پروتئین کد شده توسط این ژن با کنترل منفی فرایند نوترکیبی همولوگی باعث می‌گردد ترمیم صدمات وارده به طور صحیح انجام گردیده و در نتیجه تمامیت ژنوم در گیاه حفظ گردد. با توجه به اینکه همراه با غیر فعال شدن ژن *AtRecQl4A* قدرت حیاتی گیاه پس از تیمار با اشعه UV کاهش می‌یابد، احتمالا با افزایش بیان ژن فوق در گیاه بتوان مقاومت گیاه را به اشعه ماورای بنفش افزایش داد.

منابع

1.Bagherieh-Najjar, M.B. 2004. DNA recombination in plants: Molecular and functional analysis of Arabidopsis *RecQ* genes. University of Groningen, The Netherlands.

2.Bagherieh-Najjar, M.B., De Vries, O.M.H., Kroon, J.T.M., Wright, E.L., Elborough, K.M., Hille, J., and Dijkwel, P.P. 2003. *Arabidopsis* RecQsim, a plant-specific member of the RecQ helicase family, can suppress the MMS hypersensitivity of the yeast *sgs1* mutant. Plant Mol. Biol. 52, 273-284.

3.Bagherieh-Najjar, M.B., De Vries, O.M.H., Hille, J., and Dijkwel, P.P. 2005. Increased DNA recombination and altered DNA damage response in the Arabidopsis *recQl4A* mutant. Plant J. 43, 789-98.

4.Courcelle, J., Donaldson, J.R., Chow, K.H., and Courcelle, C.T. 2003. DNA damage-induced replication fork regression and processing in *Escherichia coli*. Science 299, 1064-1067.

5.Dellaporta, S.L., Wood, J., and Hicks, J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1, 19-21.

Archive of SID

www.SID.ir

6.Ellis, N.A., Groden, J., Ye, T.Z., Straughen, J., Lennon, D.J., Ciocci, S., Proytcheva, M., and German, J. 1995. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. Cell 83, 655-666.
7.Gangloff, S., McDonald, J.P., Bendixen, C., Arthur, L., and Rothstein, R. 1994. The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. Mol. Cell Biol. 14, 8391-8398.
8.Harmon, F.G., and Kowalczykowski, S.C. 1998. RecQ helicase, in concert with RecA and SSB proteins, initiates and disrupts DNA recombination. Genes Dev. 12, 1134-1144.
9.Hartung, F., Plchova, H., and Puchta, H. 2000. Molecular characterisation of RecQ homologues in *Arabidopsis thaliana*. Nucleic Acids Res. 28, 4275-4282.
10.Janscak, P., Garcia, P.L., Hamburger, F., Makuta,Y., Shiraishi, K., Imai, Y., Ikeda, H., and Bickle, T.A. 2003. Characterization and mutational analysis of the RecQ core of the Bloom syndrome protein. J.Mol. Biol. 330, 29-42.
11.Krysan, P.J., Young, J.C., and Sussman, M.R. 1999. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. Plant Cell 11, 2283-2290.
12.McGlynn, P., and Lloyd, R.G. 2002. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 859-870.
13.Nakayama, H. 2002. RecQ family helicases: roles as tumor suppressor proteins. Oncogene 21, 9008-9021.
14.Samadashwily, G.M., Raca, G., and Mirkin, S.M. 1997. Trinucleotide repeats affect DNA replication in vivo. Nat. Genet. 17, 298-304.
15.Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D., and Michel, B. 1998. RuvAB acts at arrested replication forks. Cell 95, 419-430.
16.Svoboda, D.L., and Vos, J.M. 1995. Differential replication of a single, UV-induced lesion in the leading or lagging strand by a human cell extract: fork uncoupling or gap formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 11975-11979.
17.Umezu, K., Nakayama, K., and Nakayama, H. 1990. *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 5363-5367.
18.Yu, C.E., Oshima, J., Fu, Y.H., Wijsman, E.M., Hisama, F., Alisch, R., Matthews, S., Nakura, J., Miki, T., Ouais, S., and et al 1996. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. Science 272, 258-262.
19.Ries, G., Heller, W., Puchta, H., Sandermann, H., Seidlitz, H.K., and Hohn, B. 2000. Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. Nature 406, 98-101.

Archive of SID

www.SID.ir

J. Agric. Sci. Natur. Resour., Vol. 14(6), Feb-March 2008
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

Role of the Arabidopsis *RecQl4A* gene in the repair of UV-induced DNA damage

[*]M.B. Bagherieh-Najjar[1] and Paul P. Dijkwel[2]
[1]Assistant Prof., Dept. of Biology Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran,
[2]Assiatant Prof. Dept. of Molecular Biology of Plants, Groningen University, The Netherlands

Abstract
The ultra violet (UV) irradiation can inhibit vegetative and reproductive growth of the plants in high attitudes, although it does not have an important impact on photosynthesis. UV-irradiation may cause damage to the DNA molecule. Such DNA damages may halt the process of DNA duplication, if not repaired prior to or during DNA duplication. Various biochemical pathways and proteins such as members of the RecQ family, found in many prokaryotes and eukaryotes, are involved in the repair of DNA assaults. Recently, completion of the genome sequence of *Arabidopsis thaliana* allowed us to find 7 members of the *RecQ* family in this model plant. Arabidopsis plants with mutation in the *RecQl4A* gene showed altered responses to DNA damage as compared to the wild type plants, indicating that the *AtRecQl4A* gene plays an important role in the control of plant responses to DNA abnormalities. In order to unravel the repair pathways in which *RecQl4A* may play a role, wild type and *recQl4A* mutant plants were treated by various doses of UV-irradiation and allowed to recover under different light conditions. The results obtained from identification and analyses of three *recQl4A* mutant lines revealed that this gene plays a vital role in the repair systems activated in the dark, blue and red light. The data suggest that by manipulation of the *AtRecQl4A* gene we might be able to introduce new transgenic plants with higher UV resistance.

[1]***Keywords***: Arabidopsis; UV-irradiation; RecQ; Genome integrity.

*- Corresponding Author; Email: bagherieh@gau.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir