

شناسایی، بررسی و مقایسه پروتئین‌های آرگونات موجود در ژنوم شش گیاه دارویی

محمد حسن شمس‌ی فرد¹، خالد میرزایی¹، بهمن بهرام نژاد^{2*}

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

2- دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج

* سنندج، صندوق پستی 416

b.bahramnejad@uok.ac.ir

(دریافت مقاله: 91/1/5 پذیرش مقاله: 94/1/30)

چکیده- پروتئین‌های آرگونات از پروتئین‌های دخیل در بحث خاموشی ژن هستند که فعالیت اندونکلئوتیتیکی برای بسیاری از آنها به اثبات رسیده است. شناسایی و بررسی این پروتئین‌ها در گیاهان مختلف می‌تواند کمک شایانی برای انجام پروژه‌های مهندسی ژنتیک در گیاهان مختلف باشد. هدف از این تحقیق شناسایی و بررسی پروتئین‌های آرگونات موجود در ژنوم 6 گیاه دارویی با استفاده از ابزارها و روش‌های بیوانفورماتیکی است. توالی‌های اسید آمینه پروتئین‌های آرگونات گیاهان مورد بررسی با استفاده از توالی‌های پروتئین‌های آرگونات آرآبیدوپسیس، از پایگاه اطلاعاتی فیترزوم دریافت شد، سپس همردیفی توالی‌ها، ساختار سه بعدی، دومین‌ها و درخت فیلوژنی این پروتئین‌ها مشخص شد. این تحقیق نشان داد که گیاهان دارویی مورد بررسی دارای 6 تا 18 ژن کدکننده پروتئین آرگونات در ژنوم خود هستند. پروتئین‌های آرگونات موجود در این گیاهان به طور کلی دارای سه دومین اصلی به نام‌های MID، PAZ و PIWI می‌باشند، این پروتئین‌ها هنگام رسم درخت فیلوژنی در سه دسته مجزا قرار می‌گیرند که نشان از حفظ شدگی بالای آنها است. طول این پروتئین‌ها در گیاهان مورد بررسی بین 846 اسید آمینه تا 1187 اسید آمینه می‌باشد که میانگین طول و وزن این پروتئین‌ها در این گیاهان به ترتیب 970 اسید آمینه و 108 کیلو دالتون است. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که پروتئین‌های آرگونات گیاهان دارویی مورد بررسی ویژگی‌های کلی پروتئین‌های آرگونات را دارند و تفاوت بین این پروتئین‌ها بیشتر در تعداد و خصوصیات فیزیکی آنها است.

کلیدواژگان: بیوانفورماتیک، پروتئین‌های آرگونات، 6 گیاه دارویی.

1- مقدمه

پروتئین‌ها به صورت منفرد و برخی دیگر به صورت یک خانواده پروتئینی می‌باشند. یکی از مهم‌ترین خانواده‌های پروتئینی که در سال‌های اخیر توجه محققان را به خود

پروتئین‌های موجود در جانداران هر کدام به علت فعالیت ویژه‌ای که دارند از اهمیت خاصی برخوردارند، برخی از

archae به وسیله کریستالوگرافی اشعه ایکس و رزونانس مغناطیس هسته از لحاظ ساختار مورد مطالعه قرار گرفته است. نتایج آزمایش بر روی باکتری‌ها و حیوانات نقش این دومین‌ها را مشخص کرده است که دومین MID به انتهای فسفات 5' از RNAs کوچک متصل می‌شود و نقش نگه‌دارنده RNAهای کوچک را بازی می‌کند و به علاوه این دومین در برهمکنش‌های بین پروتئین-پروتئین نیز دخالت داشته و به عنوان یک عضو ضروری در این برهمکنش‌ها به کار می‌رود. مطالعه روی دومین‌های PAZ نشان داده که این دومین‌ها حاوی یک جایگاه اتصال مجزا و نگه‌دارنده برای دو نکلئوتید 3' از RNAهای کوچک حاصل از برش RNase III می‌باشند. دومین PIWI ساختاری شبیه به انزیم RnaseH با فعالیت اندونوکلئازی دارد که جایگاه فعال این دومین حاوی موتیف‌های Asp-Asp-His (DDH) است.

RNAهای کوچک به همراه پروتئین‌های آرگونوات در تنظیم بیان ژن در سطوح مختلف نقش دارند که این سطوح عبارتند از: حذف توالی داخلی DNA ژنومی (در مژه داران)، سرکوبی ترجمه (در جانوران)، و برش یا شکافتن RNA (در تمامی یوکاریوت‌ها) که در برخی از موارد تنظیم بیان ژن از طریق متیلاسیون DNA و کروماتینی شدن صورت می‌گیرد اگر چه تمام پروتئین‌های AGO دارای سه دومین PAZ، MID (middle) و PIWI می‌باشند، ولی بر اساس روابط فیلوژنتیکی و ظرفیت آنها در اتصال به RNAهای کوچک به سه گروه اصلی تقسیم می‌شوند. اعضای گروه 1 شامل آن دسته از پروتئین‌ها هستند که به میکرو RNAها⁶ (miRNAs) و RNAهای کوچک مداخله‌گر⁷ (siRNAs) متصل می‌شوند و به پروتئین‌های AGO معروف هستند. اعضای گروه 2 شامل پروتئین‌هایی هستند که به PIWI- interacting RNAs (piRNAs) متصل می‌شوند و به

جلب کرده است، خانواده پروتئین‌های آرگونوات¹ است. این خانواده پروتئینی ابتدا در گیاهان شناسایی شد ولی تقریباً در تمام یوکاریوت‌ها موجود می‌باشد [1]. پروتئین‌های آرگونوات به عنوان اجزای کاتالیزوری مجموعه پروتئینی ریسک² می‌باشند، که این مجموعه پروتئینی مسئول خاموش کردن RNAهای مداخله‌گر³ است [2,3]. اعضای این خانواده پروتئینی نقش‌های کلیدی را در مسیر خاموش کردن ژن‌ها به وسیله siRNA بازی می‌کنند [4-6]. این پروتئین‌های اکثر 100 کیلو دالتونی [7]، بیشتر در سیتوپلاسم فعالیت می‌کنند اما گزارش‌های مبنی بر فعالیت آنها در هسته نیز منتشر شده است [8]. آرگونوات‌ها در ابتدا با نام PAZ (نام یکی از دومین‌های این پروتئین‌ها) شناخته می‌شدند. در ادامه برای تمایز پروتئین‌های آرگونوات از پروتئین‌های دایسر (Dicer)، این پروتئین‌ها به (PAZ PIWI DOMAINS) PPD تغییر نام دادند، در نهایت برای رفع یک سری ابهامات بین این پروتئین‌ها و پروتئین‌های برشی دیگر، اصطلاح (Argonaute) AGO برای نام‌گذاری آنها انتخاب شد [9,10].

پروتئین‌های آرگونوات به عنوان جزئی جدایی ناپذیر از تمام RNAهای کوچک⁴ شناخته شده می‌باشند که در هدایت مسیرهای تنظیمی و نظارتی مهم موجود در سلول نقش دارند [11-14]. این پروتئین‌ها دارای 3 دومین به نام‌های PAZ، MID و PIWI می‌باشند. دومین متصل شونده به RNA، به نام PAZ (PIWI/ Argonaut/Zwille)، به نام RNase H، به نام PIWI، شناخته می‌شوند که فعالیت برشی اندونوکلئولیتیکی⁵ دارند [15]. کریستاله کردن کامل ساختار آرگونوات پروتئین‌های ارگانیسیم‌های بزرگ هنوز به صورت کامل انجام نشده است. تنها دومین‌ها و آرگونوات‌های کامل مربوط به

1. Argonaute protein family
2. RISC(RNA-induced silencing complex)
3. RNA interference(RNAi)
4. Small RNAs
5. Endonucleolytic

6. MicroRNA

7. Small interfering RNAs

بر روی پروتئین‌های آرگونات این 6 گیاه دارویی انجام شده است و هدف از این تحقیق بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین‌های آرگونات در این گیاهان و مقایسه آن با آرگونات‌های آرابیدوپسیس است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- دریافت توالی‌های مورد نظر

توالی‌های اسید آمینه مربوط به پروتئین‌های آرگونات گیاه آرابیدوپسیس با جستجوی پروتئین آرگونات آرابیدوپسیس در قسمت پروتئین‌های سایت NCBI⁵ دریافت شد و برای دریافت توالی‌های آرگونات گیاهان دارویی مورد بررسی از قسمت blastp پایگاه اطلاعاتی فیروزوم⁶ استفاده استفاده شد و با بلاست توالی‌های آرگونات آرابیدوپسیس بر علیه ژنوم گیاهان مورد بررسی پروتئین‌های آرگونات این گیاهان شناسایی شدند. برای اطمینان از صحت توالی‌های بدست آمده، بلاست با استفاده از توالی‌های آرگونات بدست آمده بر علیه ژنوم گیاهان مختلف مورد بررسی نیز انجام شد که نتایج با نتایج بلاست توالی‌های آرابیدوپسیس بر علیه ژنوم گیاهان مورد بررسی، مشابه بود. توالی‌های بدست آمده از گیاهان کاساوا، کرچک، کتان، کیسه کشیش، پاپایا و اوکالیپتوس به ترتیب به صورت

Rc-AGO1 تا Me-AGO11، Rc-AGO1 تا Rc-AGO8،
Lu-AGO1 تا Lu-AGO17، Cr-AGO1 تا Cr-AGO10،
Cp-AGO1 تا Cp-AGO6 و Eg-AGO1 تا Eg-ago18
نام‌گذاری شدند.

2-2- هم‌ردیفی⁷ و مشخص کردن مناطق حفظ شده

هم‌ردیفی توالی‌های پروتئین‌های آرگونات بدست آمده از آرابیدوپسیس و گیاهان دارویی مورد بررسی با استفاده از

پروتئین‌های PIWI معروف هستند. اعضای گروه 3 فقط در خزندگان توصیف شده‌اند و به siRNAsهای ثانویه متصل می‌شوند [16]. مبنای ساختاری اتصال RNA به این پروتئین‌ها به وسیله کریستالوگرافی اشعه ایکس بر روی دومین باند شونده با RNA در پروتئین‌های آرگونات مورد بررسی قرار گرفته است و نتایج نشان داده است که انتهای 5' از رشته RNA و یک کاتیون دو ظرفیتی مانند منیزیم نقش مؤثری را در این اتصال دارند [17]. تعداد و تنوع این پروتئین‌ها در میان جانداران مختلف بسیار متفاوت است به طور مثال در مخمر *Schizosaccharomyces pombe* یک پروتئین AGO وجود دارد در حالی که در نماتد الگانس *Caenorhabditis elegans* 27 عدد گزارش شده است یا در آرابیدوپسیس و برنج به ترتیب 10 و 18 عدد یافت شده است. بیشتر پروتئین‌های آرگونات موجود در گیاهان از نوع AGO می‌باشند. در بین گیاهانی که پروتئین‌های آرگونات موجود در آنها مورد بررسی قرار گرفته است، می‌توان به آرابیدوپسیس¹ اشاره کرد. گیاه آرابیدوپسیس که به عنوان یک گونه مدل می‌باشد، دارای 10 پروتئین آرگونات متعلق به 3 کلاس فیلوژنتیکی است [19, 18].

کاساوا² (*Manihot esculenta*)، کرچک (*Ricinus communis*)، کتان (*Linum usitatissimum*)، کیسه کشیش (*Capsella rubella*)، پاپایا³ (*Carica papaya*) و اوکالیپتوس⁴ (*Eucalyptus grandis*) به ترتیب دارای سطوح پلوئیدی $2n=2x=36$ ، $2n=2x=20$ ، $2n=2x=30$ ، $2n=2x=16$ ، $2n=2x=18$ و $2n=2x=22$ می‌باشند [20-25] که در سال‌های اخیر ژنوم آنها تعیین توالی شده است و طول ژنوم این گیاهان به ترتیب 760، 400، 318/3، 134/8، 135 و 691 Mbp می‌باشد [26]. تاکنون مطالعه‌ای

1. *Arabidopsis thaliana*
2. Cassava
3. papaya
4. *Eucalyptus*

5. www.ncbi.nlm.nih.gov
6. http://phytozome.net
7. Alignment

ژن‌ها در ژنوم این گیاهان مشخص نشده است و داده‌های مربوط به ژنوم این گیاهان به صورت خام می‌باشد. این تحقیق نشان داد که گیاهان کاساوا، کرچک، کتان، کیسه کشیش، پاپایا و اوکالیپتوس به ترتیب دارای 11، 8، 17، 10، 6 و 18 پروتئین آرگونوات می‌باشند که E-value پروتئین‌های آرگونوات در اوکالیپتوس، پاپایا، کیسه کشیش، کتان، کرچک و کاساوا به ترتیب بین 0 تا $7.4e-132$ ، $4.8e-124$ و $3.4e-126$ ، $1.3e-116$ ، $5.9e-125$ ، $2.1e-110$ است. درصد تشابه بین توالی‌های پروتئین‌های آرگونوات در آرابیدوپسیس با توالی‌های آرگونوات گیاهان مورد بررسی بین 33% تا 77% می‌باشد.

همردیفی انجام شده بر روی توالی‌های پروتئین‌های آرگونوات گیاهان مورد بررسی و آرابیدوپسیس نشان داد که بیشترین حفظ شدگی در این پروتئین‌ها در مناطق مربوط به دومین‌ها است که با رنگ مشکی تمایز یافته‌اند و کمترین حفظ شدگی مربوط به مناطق ابتدایی و انتهایی این پروتئین‌ها است (شکل 1).

پروتئین‌های آرگونوات گیاهان دارویی مورد بررسی، ویژگی‌های کلی پروتئین‌های آرگونوات مانند وجود دومین‌های اصلی PAZ، MID و PIWI و قرار گرفتن در سه کلاس فیلوژنتیکی را دارند. نتایج حاصل از رسم دندروگرام توالی‌های 6 گیاه دارویی مورد بررسی و آرابیدوپسیس نشان داد که پروتئین‌های آرگونوات موجود در این گیاهان به طور کلی در سه دسته یا کلاستر مجزا قرار گرفته‌اند که این تقسیم‌بندی بیشتر به خاطر خصوصیات این پروتئین‌ها مانند دومین‌های حفظ شده و مناطق مشابه بین این پروتئین‌ها است.

رسم درخت‌های فیلوژنی مجزا برای توالی‌های پروتئین‌های آرگونوات گیاهان مورد بررسی و آرابیدوپسیس نشان داد که این پروتئین‌ها در سه کلاس مجزا قرار می‌گیرند به طوری که این موضوع در مورد هر 6 گیاه دارویی و آرابیدوپسیس صدق می‌کند (شکل 2).

نرم‌افزار آنالین ClustalW [27] انجام شد. در ادامه پس از ویرایش قسمتی از نتیجه همردیفی، با استفاده از نرم‌افزار آنالین Boxshade¹ نواحی حفظ شده روی توالی‌ها به وضوح مشخص شدند.

2-3- رسم فیلوژنی

نتایج حاصل از همردیفی به وسیله نرم‌افزار آنالین ClustalW به نرم‌افزار MEGA4 [28] داده شد و با روش نزدیک‌ترین همسایگی و با بوت استرپ 100 فیلوژنی مربوط به توالی‌های گیاهان مورد بررسی و آرابیدوپسیس به صورت مجزا و توأم رسم شد.

2-4- رسم دومین‌های حفظ شده

دومین‌های حفظ شده پروتئین‌های آرگونوات گیاهان مورد بررسی با استفاده از نرم‌افزار CDD مربوط به سایت NCBI و همچنین با تجزیه و تحلیل مناطق حفظ شده بر روی توالی‌ها، از طریق نرم‌افزار BioEditor، مشخص و رسم شد.

2-5- رسم ساختار سه بعدی

ساختار سه بعدی پروتئین‌های At-AGO1، Cp-AGO1، Cr-AGO1، EG-AGO15، Lu-AGO1، Me-AGO2، Me-AGO4 و Rc-AGO1 - که از سه کلاس مختلف فیلوژنی می‌باشند - برای بررسی موقعیت مکانی دومین‌های PAZ، MID و PIWI روی پروتئین‌های آرگونوات، به کمک نرم‌افزار آنالین PHYRE2 [29] و نرم‌افزار افلاین YASARA رسم شد.

3- نتایج و بحث

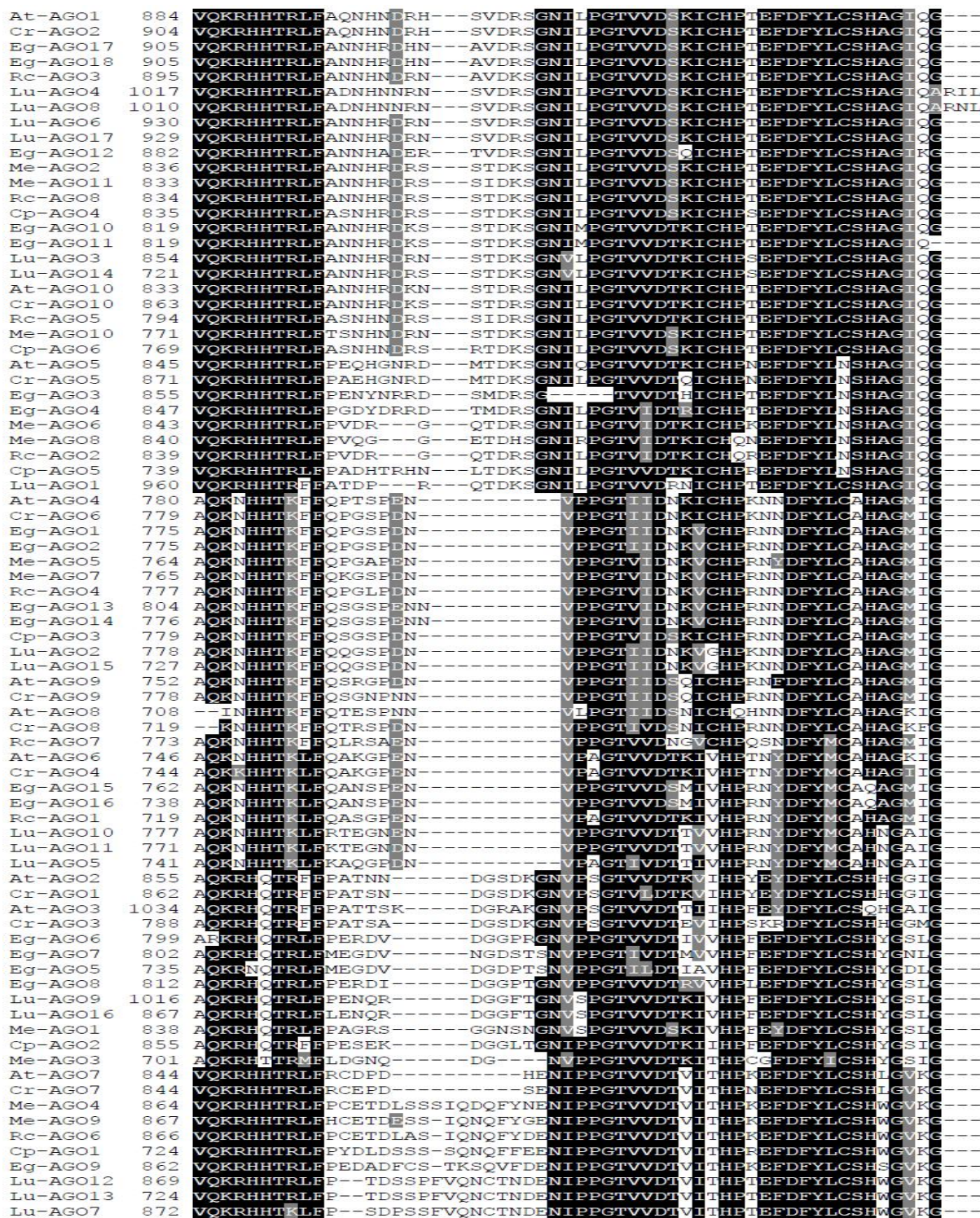
ژنوم گیاهان دارویی مورد بررسی بیشتر به صورت اسکافولد² موجود می‌باشد و هنوز وظایف و کارکرد

1. Boxshade version 3.3.1, by Kay Hofmann and Michael D. Baron.

2. Scaffolds

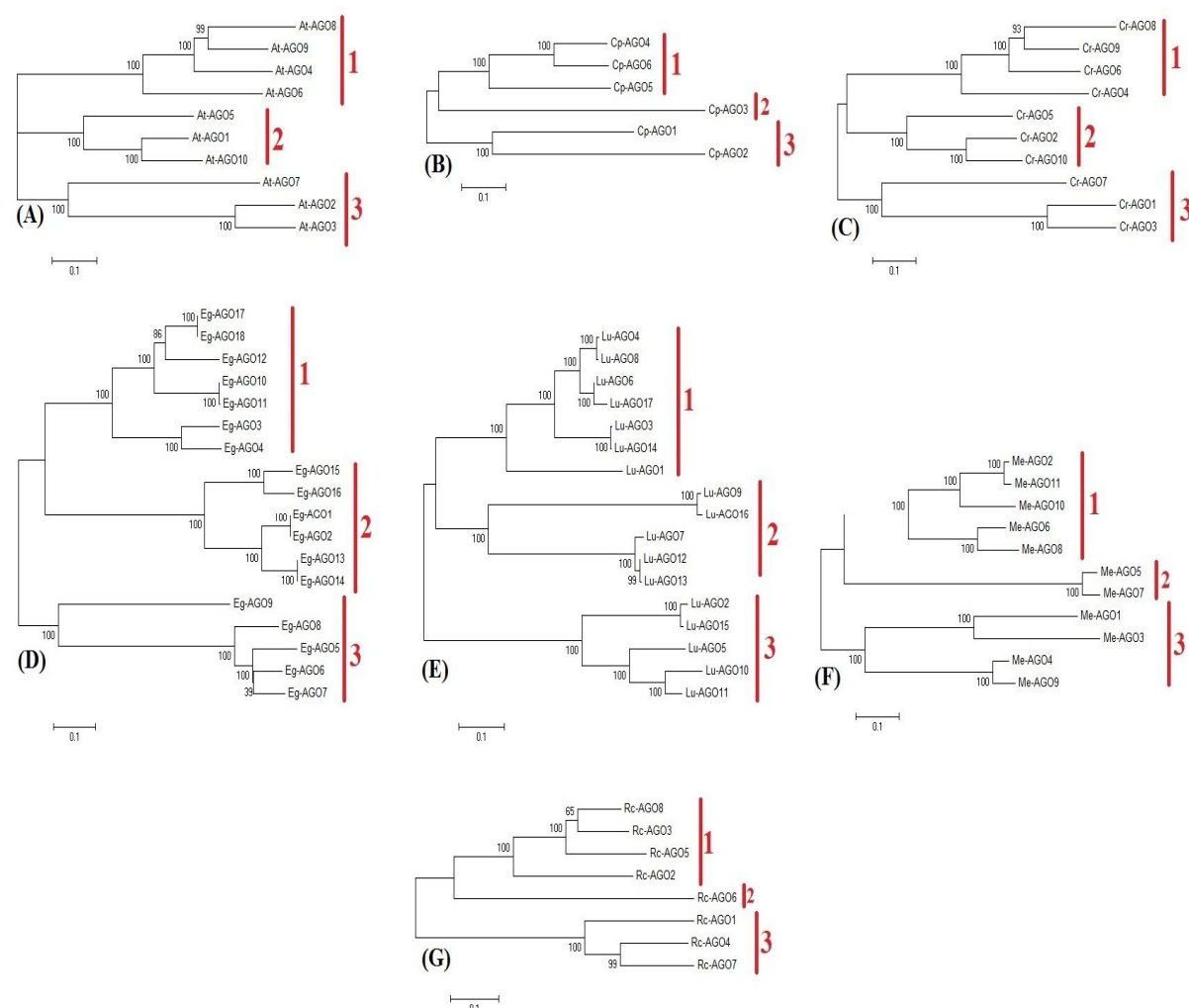
درخت فیلوژنی حاصل از ترکیب توالی‌های گیاهان مجزا تقسیم شد (شکل 3).

دارویی مورد بررسی و آراییدوپسیس نیز به سه کلاس



شکل 1 قسمتی از نتیجه همردیفی توالی‌های پروتئین‌های آرگونات آراییدوپسیس و 6 گیاه دارویی حاصل از

نرم‌افزار clustalW و BOXSHADE



شکل 2 درخت های فیلوژنی مجزا مربوط به پروتئین‌های آرگونوات آرابیدوپسیس و 6 گیاه دارویی

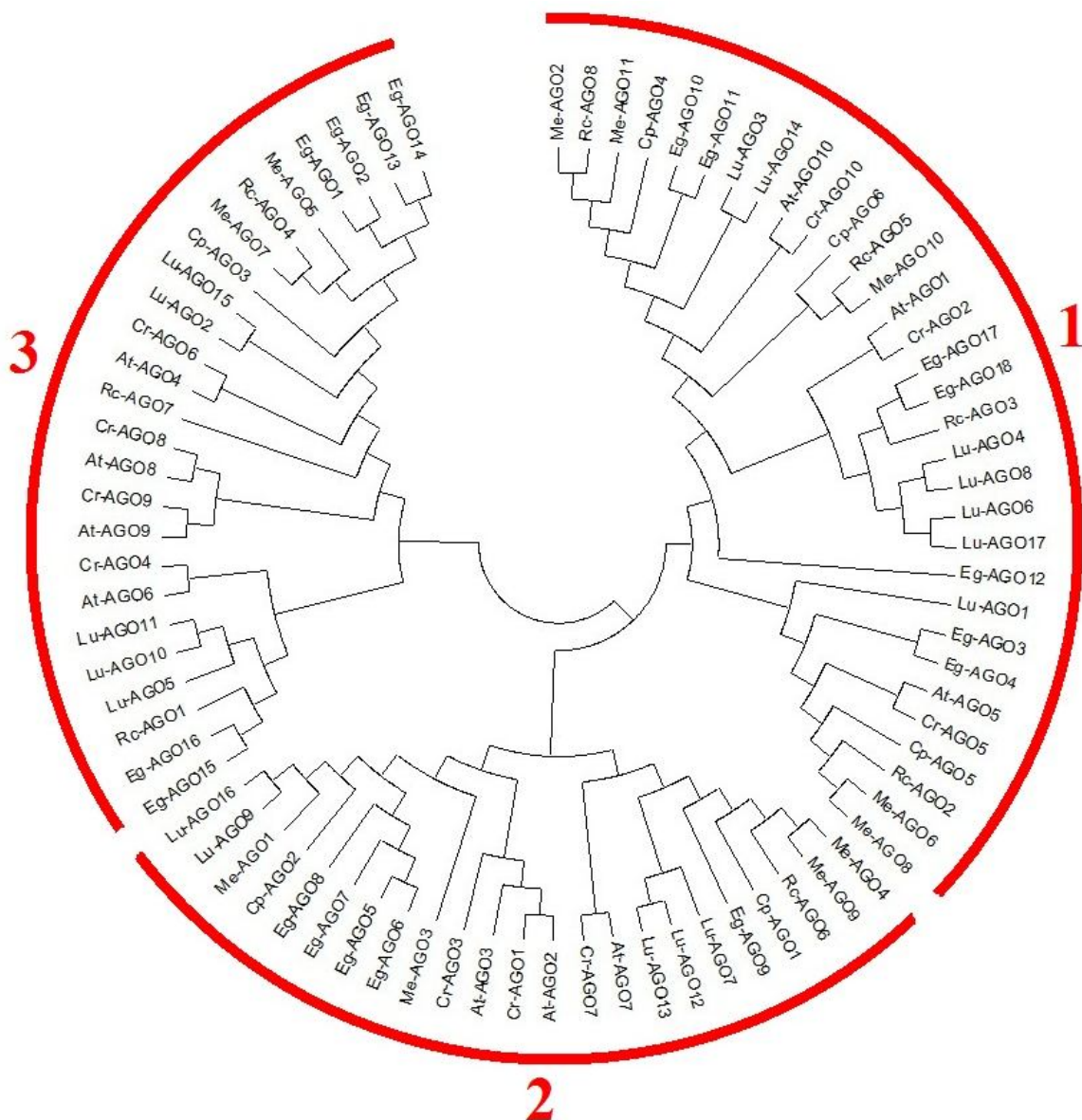
وظیفه ملکولی آنها مشخص شده است، به عنوان مثال آرگونوات‌های شماره 4 و 6 آرابیدوپسیس وظیفه خاموشی هتروکروماتینی را به عهده دارد [9]. بررسی‌های صورت گرفته بر روی دومین‌های حفظ شده این پروتئین‌ها نشان داد که پروتئین‌های آرگونوات موجود در 6 گیاه دارویی مورد بررسی دارای سه دومین اصلی به نام‌های MID, PAZ و PIWI می‌باشند که دومین PIWI به عنوان بزرگترین و دومین PAZ به عنوان کوچکترین دومین حفظ شده در این پروتئین‌ها است. نکته جالب در مورد دومین‌های گیاهان مورد بررسی وجود دو دومین PAZ در پروتئین آرگونوات شماره 1 کتان (Lu-AGO1)

علت اینکه این توالی‌ها در تمام گیاهان مورد بررسی در سه دسته مجزا قرار می‌گیرند وجود مناطق حفظ شده در بین این توالی‌ها است که قسمت اعظم این مناطق را دومین‌های این پروتئین‌ها تشکیل می‌دهند. سه دسته شدن توالی‌های اسید آمینه این پروتئین‌ها در تمام گیاهان مورد بررسی بیانگر این مطلب است که در طول تکامل و تفرق گونه‌های مختلف گیاهی، این پروتئین‌ها به صورت حفاظت شده باقی مانده‌اند. مطالعات بیوشیمیایی پروتئین‌های آرگونوات در برخی از اورگانیزم‌ها نشان داده است که هرکدام از پروتئین‌های AGO وظیفه خاصی دارند که در بعضی از گیاهان مانند آرابیدوپسیس

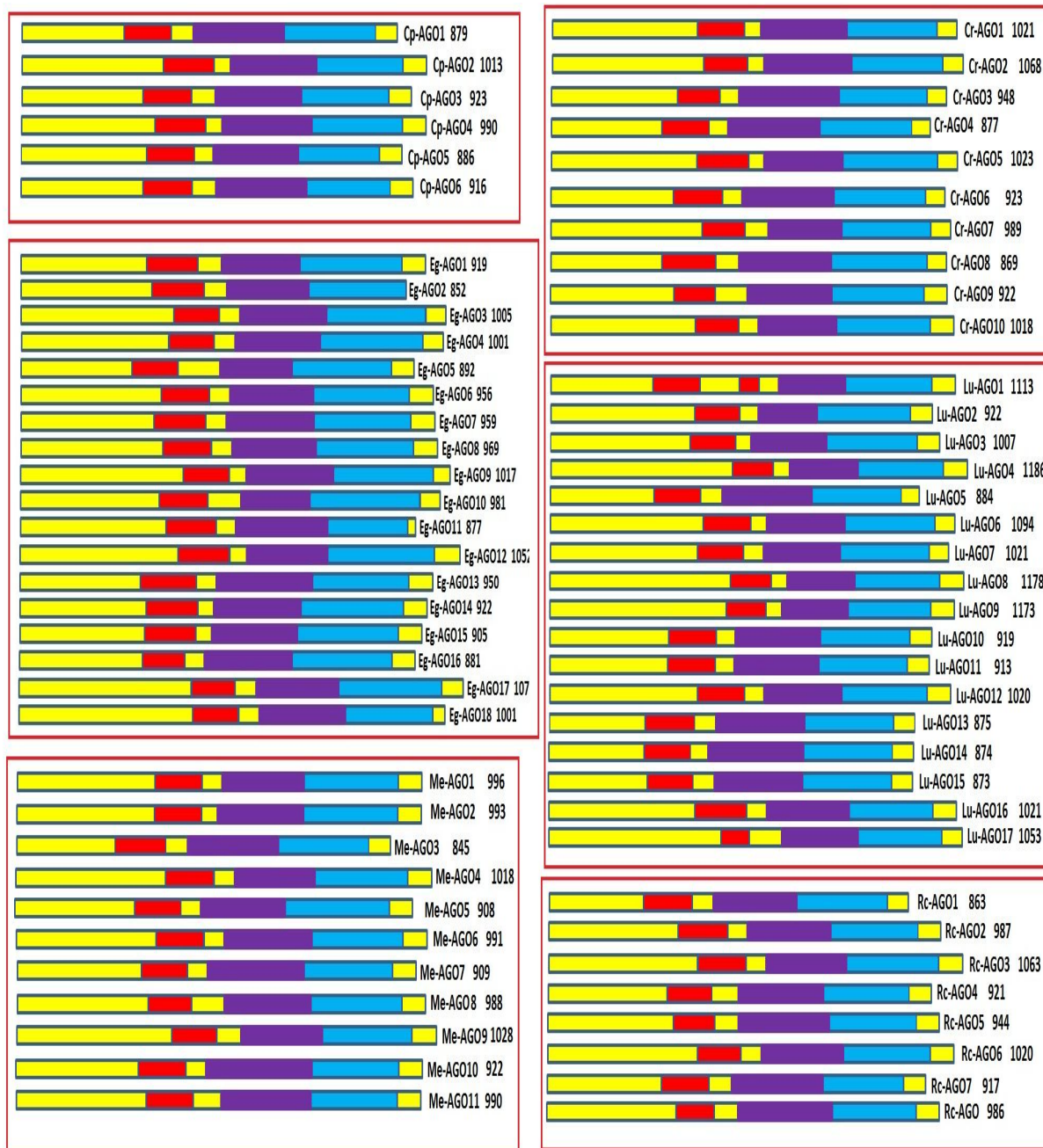
پروتئین قرار گرفته‌اند به طوری که دو دومین PAZ و MID که نقش نگه‌دارنده دارند، دو طرف توالی RNA کوچک را گرفته و دومین PIWI که فعالیت اندونوکلئازی دارد، کار برش توالی مورد نظر را انجام می‌دهد، همان‌طور که در ساختار سه بعدی نیز مشخص است دو دومین PAZ و MID در دو طرف پروتئین آرگونات و دومین PIWI در میانه پروتئین قرار گرفته است که احتمالاً این آرایش فضایی در انجام فعالیت دومین‌ها نقش مهمی دارد.

است که این موضوع تا به حال در هیچ گیاه دیگری گزارش نشده است. علت وجود دو دومین PAZ در این پروتئین موضوعی است که نیازمند مطالعه بیشتر بر روی این پروتئین می‌باشد (شکل 4).

ساختار سه بعدی پروتئین‌های آرگوناتی که هرکدام در یکی از سه کلاس مجزا قرار گرفته‌اند، برای مشخص کردن جایگاه دومین‌ها در پروتئین‌های آرگونات رسم شد. این ساختارها نشان دادند که دومین‌ها در مناطق سطحی



شکل 3 درخت فیلوژنی مربوط به پروتئین‌های آرگونات آرابیدوپسیس و 6 گیاه دارویی



شکل 4 دومین‌های مربوط به پروتئین‌های آرگونوات در 6 گیاه دارویی، با استفاده از نرم‌افزار CDD مربوط به سایت NCBI

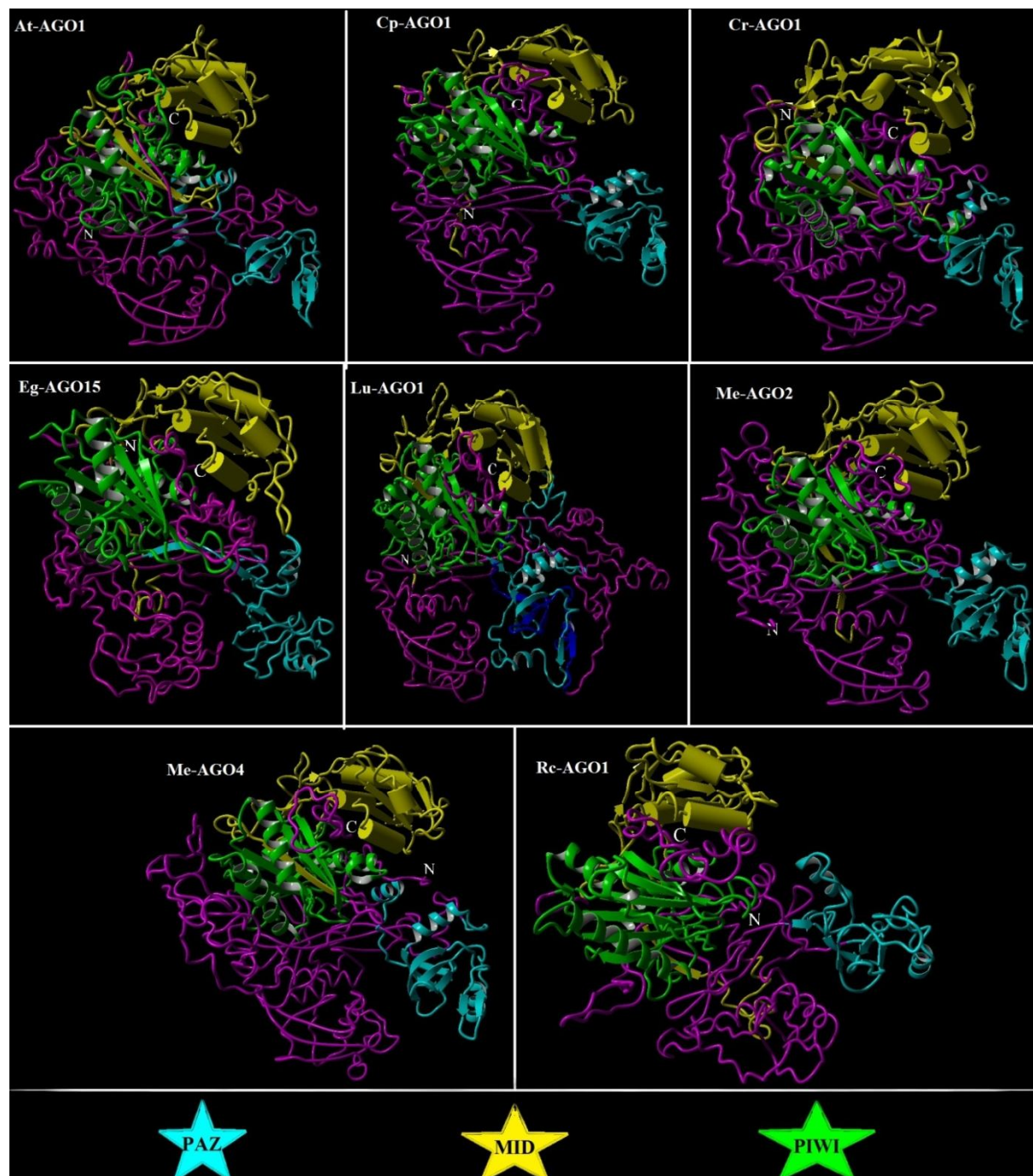
وزن، محتوای ریشه‌ها و غیره بود نشان داد که طول این پروتئین‌ها در 6 گیاه دارویی مورد بررسی بین 846 (Me-AGO3) اسید آمینه تا 1187 (Lu-AGO4) اسید آمینه می‌باشد که میانگین طول این پروتئین‌ها در گیاهان دارویی مورد بررسی 970 اسید آمینه است که از میانگین طول پروتئین‌های آرگونوات در ارابیدوپسیس با طول 978 اسید

علاوه بر این محل قرار گرفتن دومین‌ها از لحاظ ساختار فضایی در یک جایگاه مشابه است و تفاوت آنها در میزان توسعه یافتگی و تعداد صفحات بتا و مارپیچ‌های آلفا موجود در ساختار فضایی آنها می‌باشد (شکل 5) و (جدول 1).

بررسی سایر خصوصیات این پروتئین‌ها که شامل طول،

میانگین وزن این پروتئین‌ها در گیاهان دارویی مورد بررسی 108 کیلو دالتون است و از میانگین وزن پروتئین‌های اراییدوپسیس با وزن 109 کیلودالتون کمتر است.

امینه، کمتر است. وزن پروتئین‌های آرگونات در گیاهان دارویی مورد بررسی بین 95/25 کیلو دالتون (Eg-AGO2) تا 131/16 کیلو دالتون (Lu-AGO9) است که



شکل 5 ساختار سه بعدی توالی‌های At-AGO1، Cp-AGO1، Cr-AGO1، Eg-AGO15، Lu-AGO1، Me-AGO2، Me-AGO4 و Rc-AGO1 که با استفاده از نرم‌افزارهای PHYRE₂ و Yasasra رسم شده است. مناطق فیروزه‌ای رنگ مربوط به دومین PAZ، مناطق سبز رنگ مربوط به دومین PIWI و مناطق زرد رنگ مربوط به دومین MID می‌باشد. مناطق انتهایی N و C نیز مشخص شده است.

جدول 1 سایر ویژگی‌های پروتئین‌های آرگونات در 6 گیاه دارویی و اراییدوپسیس. طول بر حسب اسید آمینه و

وزن بر حسب کیلودالتون

نام	ID ژن	طول	وزن	نقطه ایزوالکتریک	شاخص الیفاتیکی	محتوای ریشه های		محتوای بار		تعداد ماریج الفا و صفحات بتا	
						هیدروفوبیک و هیدروفیلیک	هیدروفیلیک	ریشه ها	مثبت منفی	الف	بتا
At-AGO 1	NP_175274.1	1048	116/19	9/48	74/494	0/477	0/279	0/094	0/124	30	33
At-AGO 2	NP_174413.2	1014	113/422	9/65	70/227	0/477	0/242	0/113	0/148	22	45
At-AGO 3	NP_174414.1	1194	129/183	9/51	70/461	0/490	0/243	0/110	0/135	25	51
At-AGO 4	NP_565633.1	924	102/839	9/25	80/271	0/476	0/275	0/104	0/123	26	42
At-AGO 5	NP_850110.1	997	111/087	9/63	78/857	0/454	0/287	0/100	0/136	26	38
At-AGO 6	NP_180853.2	878	98/68	8/92	84/681	0/475	0/264	0/110	0/124	15	46
At-AGO 7	NP_177103.1	990	113/395	9/43	81/98	0/449	0/278	0/100	0/133	33	31
At-AGO 8	NP_197602.2	850	95/506	9/18	82/435	0/462	0/293	0/096	0/118	20	35
At-AGO 9	NP_197613.2	896	100/523	9/35	80/692	0/479	0/277	0/099	0/124	23	37
At-AGO 10	NP_199194.1	988	110/866	9/51	80/192	0/465	0/277	0/098	0/135	31	38
Eg-AGO1	Eucgr.B03780.1	919	102/433	9/33	83/372	0/484	0/260	0/107	0/127	19	44
Eg-AGO2	Eucgr.B03780.3	852	95/25	9/41	84/658	0/482	0/252	0/110	0/133	17	42
Eg-AGO3	Eucgr.B03907.1	1005	110/807	9/62	79/272	0/502	0/238	0/100	0/134	32	35
Eg-AGO4	Eucgr.B03909.1	1001	111/03	9/52	79/959	0/495	0/247	0/103	0/133	29	36
Eg-AGO5	Eucgr.D00105.1	892	102/091	9/3	84/74	0/463	0/275	0/102	0/130	20	40
Eg-AGO6	Eucgr.D00106.1	956	109/882	9/24	75/699	0/436	0/263	0/120	0/145	24	35
Eg-AGO7	Eucgr.D00109.1	959	109/148	8/86	75/89	0/441	0/271	0/121	0/133	30	32
Eg-AGO8	Eucgr.D01097.1	969	111/95	9/36	79/193	0/441	0/259	0/118	0/147	32	36
Eg-AGO9	Eucgr.G02476.1	1017	115/091	9/51	82/663	0/459	0/272	0/100	0/135	25	33
Eg-AGO10	Eucgr.H00532.1	981	110/163	9/56	79/764	0/465	0/276	0/098	0/137	39	28
Eg-AGO11	Eucgr.H00532.3	877	98/727	9/61	82/541	0/466	0/273	0/099	0/139	35	25
Eg-AGO12	Eucgr.H00615.1	1052	116/685	9/48	72/983	0/458	0/280	0/102	0/133	24	37
Eg-AGO13	Eucgr.J00634.1	950	105/926	9/17	81/809	0/476	0/277	0/102	0/120	20	40
Eg-AGO14	Eucgr.J00634.2	922	102/63	9/26	79/857	0/474	0/274	0/104	0/124	20	39
Eg-AGO15	Eucgr.K00735.1	905	101/456	9/39	84/573	0/464	0/278	0/105	0/133	23	34
Eg-AGO16	Eucgr.K00736.1	881	98/989	9/41	85/015	0/459	0/277	0/106	0/134	23	33
Eg-AGO17	Eucgr.K02304.1	1075	119/521	9/45	70/157	0/477	0/265	0/098	0/127	25	33
Eg-AGO18	Eucgr.K02304.2	1001	111/823	9/3	72/006	0/472	0/267	0/102	0/126	22	32
Me-AGO1	4.1_000920m	996	110/36	9/53	77/077	0/485	0/254	0/099	0/131	26	41
Me-AGO2	4.1_000932m	994	111/379	9/42	78/238	0/465	0/275	0/100	0/131	36	34
Me-AGO3	4.1_001630m	846	96/005	9/1	85/187	0/466	0/266	0/113	0/130	22	43
Me-AGO4	4.1_000845m	1018	115/983	9/6	80/49	0/456	0/280	0/095	0/135	34	33
Me-AGO5	4.1_001312m	909	102/145	9/27	83/024	0/473	0/264	0/110	0/130	22	42

Me-AGO6	4.1_000940m	992	110/995	9/7	75/513	0/460	0/280	0/097	0/137	32	35
Me-AGO7	4.1_001305m	910	102/027	9/28	80/899	0/467	0/268	0/110	0/131	19	40
Me-AGO8	4.1_000956m	989	110/999	9/52	77/905	0/461	0/280	0/100	0/132	28	40
Me-AGO9	4.1_000826m	1022	116/594	9/52	82/269	0/451	0/294	0/095	0/130	31	36
Me-AGO10	4.1_028612m	924	104/614	9/4	83/893	0/462	0/281	0/098	0/132	27	41
Me-AGO11	4.1_000946m	990	111/221	9/47	78/495	0/466	0/270	0/10	0/135	35	30
Rc-AGO1	27389.m000069	863	97/113	9/41	82/897	0/459	0/286	0/101	0/132	23	33
Rc-AGO2	29589.m001295	987	110/115	9/63	78/034	0/467	0/278	0/097	0/137	31	35
Rc-AGO3	29677.m000188	1063	117/809	9/49	73/17	0/486	0/271	0/094	0/125	26	33
Rc-AGO4	29684.m000322	921	102/866	9/2	79/848	0/477	0/264	0/109	0/127	16	42
Rc-AGO5	29807.m000479	944	107/108	9/19	85/604	0/458	0/280	0/107	0/131	33	39
Rc-AGO6	29813.m001544	1020	116/266	9/62	81/716	0/459	0/284	0/093	0/133	38	23
Rc-AGO7	29828.m000386	917	102/702	9/11	81/167	0/480	0/264	0/108	0/123	25	38
Rc-AGO8	29844.m003212	986	110/938	9/42	79/696	0/462	0/277	0/100	0/133	37	30
Lu-AGO1	Lus10014386	1114	124/918	9/48	80/026	0/469	0/279	0/098	0/127	29	50
Lu-AGO2	Lus10025537	923	102/661	8/99	91/916	0/499	0/248	0/108	0/120	24	36
Lu-AGO3	Lus10006627	1008	112/685	9/48	77/072	0/466	0/279	0/097	0/130	34	32
Lu-AGO4	Lus10017983	1187	128/888	9/61	68/76	0/500	0/277	0/083	0/115	23	38
Lu-AGO5	Lus10015155	885	98/901	9/48	82/755	0/484	0/267	0/099	0/129	21	38
Lu-AGO6	Lus10031331	1095	120/935	9/55	71/076	0/476	0/281	0/093	0/126	26	34
Lu-AGO7	Lus10037136	1022	115/749	9/45	79/852	0/449	0/289	0/092	0/124	26	50
Lu-AGO8	Lus10041978	1179	129/183	9/59	72/942	0/496	0/277	0/083	0/117	23	43
Lu-AGO9	Lus10040619	1174	131/16	9/16	77/818	0/469	0/256	0/115	0/131	29	55
Lu-AGO10	Lus10029989	920	103/388	9/6	85/346	0/473	0/277	0/092	0/127	26	35
Lu-AGO11	Lus10035331	914	101/665	9/34	86/749	0/476	0/269	0/101	0/125	25	38
Lu-AGO12	Lus10036794	1021	115/563	9/43	78/128	0/449	0/294	0/091	0/122	24	50
Lu-AGO13	Lus10036795	876	98/945	9/4	84/473	0/463	0/277	0/098	0/129	22	45
Lu-AGO14	Lus10039386	875	98/553	9/25	83/975	0/478	0/266	0/104	0/129	31	30
Lu-AGO15	Lus10026750	874	97/206	9/26	84/804	0/491	0/253	0/108	0/127	22	34
Lu-AGO16	Lus10018290	1022	114/635	9/36	73/257	0/476	0/250	0/112	0/135	25	46
Lu-AGO17	Lus10031904	1054	116/291	9/65	72/636	0/476	0/282	0/091	0/128	24	35
Cr-AGO1	Carubv10008180m	1022	113/835	9/73	71/564	0/477	0/245	0/109	0/146	42	29
Cr-AGO2	Carubv10008158m	1069	118/351	9/52	73/553	0/476	0/281	0/092	0/123	31	28
Cr-AGO3	Carubv10010881m	949	106/092	9/35	70/61	0/467	0/267	0/112	0/131	42	24
Cr-AGO4	Carubv10022614m	878	98/825	9/19	84/44	0/470	0/270	0/107	0/128	39	20
Cr-AGO5	Carubv10025461m	1024	113/462	9/78	78/368	0/471	0/275	0/096	0/136	40	30
Cr-AGO6	Carubv10022599m	924	102/934	9/29	80/561	0/481	0/271	0/103	0/123	40	25
Cr-AGO7	Carubv10019715m	990	113/566	9/47	82/04	0/445	0/277	0/101	0/135	29	35
Cr-AGO8	Carubv10002706m	862	97/077	9/52	81/124	0/466	0/280	0/097	0/130	31	25

Cr-AGO9	Carubv10000166m	923	103/293	9/42	81/45	0/479	0/276	0/101	0/127	42	24
Cr-AGO10	Carubv10025804m	1018	114/413	9/61	80/147	0/464	0/276	0/097	0/139	37	36
Cp-AGO1	supercontig_1.68	880	100/056	9/39	84/805	0/468	0/276	0/101	0/128	29	28
Cp-AGO2	supercontig_135.40	1013	114/149	9/27	76/79	0/457	0/263	0/110	0/135	48	20
Cp-AGO3	supercontig_26.59	924	103/268	9/17	84/241	0/481	0/258	0/111	0/128	42	20
Cp-AGO4	supercontig_44.130	991	111/736	9/4	78/364	0/461	0/273	0/103	0/134	32	34
Cp-AGO5	supercontig_47.31	887	100/264	9/4	85/703	0/468	0/277	0/101	0/130	35	29
Cp-AGO6	supercontig_75.90	916	103/857	9/28	83/598	0/444	0/275	0/102	0/128	43	26

سایر گیاهان تشابه زیادی دارند و تفاوت‌های موجود در آنها بیشتر مربوط به تعداد این پروتئین‌ها و ویژگی‌های فیزیکی آنها است [۳۰، ۱۹، ۱۸].

4- منابع

- [1] Pare J. M, et al. (2011) MicroRNA-binding is required for recruitment of human Argonaute 2 to stress granules and P-bodies. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 414; 259–264.
- [2] Cenik E.S, Zamore P D (2011) Argonaute proteins. *Current Biology*, 21: 446-449.
- [3] Rivas F.V, et al (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nature Structural & Molecular Biology*, 12:340-349.
- [4] Hock J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9 : 210-218.
- [5] Joon Song J. et al (2006) Argonaute and RNA — getting into the groove. *Current Opinion in Structural Biology*, 16: 5–11.
- [6] Traci M. Hall T (2005) Structure and Function of Argonaute Proteins. *Structure*, 13: 1403–1408.
- [7] Garcia Silva M. R, et al. (2010) Cloning, characterization and subcellular localization of a *rypanosoma cruzi* argonaute protein defining a new subfamily distinctive of trypanosomatids. *Gene*, 466: 6–35.
- [8] Noto T. et al. (2010) The Tetrahymena Argonaute-Binding Protein Giw1p Directs a Mature Argonaute-siRNA Complex to the Nucleus. *Cell*, 140: 692–703.
- [9] Hutvagner G, Simard M.J (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*, 9: 22–32.
- [10] Tolia N.H, Joshua Tor. L (2007) Slicer and the argonautes, *Nat.Chem. Biol*, 3: 36–43.
- [11] Mallory A. et al (2010) Form, Function, and

میانگین نقطه ایزو الکتريک در پروتئین‌های آرگونوات این گیاهان 9/40 می‌باشد؛ همچنین میانگین شاخص الیفاتیکی این پروتئین‌ها برابر 79/83 و در پروتئین‌های آرگونوات ارایدوپسیس 78/42 می‌باشد که نشان دهنده مقاومت حرارتی بالای پروتئین‌های آرگونوات گیاهان دارویی مورد بررسی نسبت به پروتئین‌های آرگونوات ارایدوپسیس است. میانگین محتوای ریشه‌های هیدروفوبیک و هیدروفیلیک، میانگین محتوای بار ریشه‌های منفی و مثبت و میانگین تعداد صفحات الفا و بتا به ترتیب 0/27، 0/46، 0/13، 0/1 و 34 است (جدول 1).

با توجه به این حقیقت که پروتئین‌های AGO برای اولین بار 14 سال پیش در گیاهان شناسایی شدند ولی فقط بعضی از AGO‌های خانواده آرایدوپسیس به صورت عمیق و دقیق مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و وظایف نیمی از اعضای خانواده AGO‌ها هنوز ناشناخته است. بنابراین بسیاری از پرسش‌های بنیادی در مورد وظایف این خانواده ژنی بزرگ در گیاهان هنوز بدون پاسخ مانده است که این موضوع می‌تواند زمینه تحقیقاتی جذابی برای بیشتر محققان باشد. نتیجه این مطالعه به طور کلی نشان داد که 6 گیاه دارویی مورد بررسی همانند بیشتر موجودات زنده دارای پروتئین‌های آرگونوات می‌باشند که با مطالعات سایر محققان مبنی بر وجود این پروتئین‌ها در بیشتر موجودات زنده مطابقت دارد؛ همچنین این پروتئین‌ها از نظر ویژگی‌های کلی با پروتئین‌های آرگونوات

- [22] Murray B. (1980) Analyses of meiotic metaphase in haploids and hybrids of haploid × diploid flax (*Linum usitatissimum*), *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 22: 597-606.
- [23] Nassar N. M. A., Ortiz R (2006) Cassava improvement: challenges and impacts, *Journal of Agricultural Science*, 145: 163-171.
- [24] Oliver, R. et al. (2011), Model SNP development for complex genomes based on hexaploid oat using high-throughput 454 sequencing technology. *BMC Genomics* Vol. 12, 77-92.
- [25] Pedro C.D.J., et al. (2009) Karyotype determination in three Caricaceae species emphasizing the cultivated form (*C. papaya* L.), *Caryologia*, 62:10-15.
- [26] Phytozome v8.0, *Manihot esculenta* (Cassava), *Ricinus communis* (Castor bean plant), *Linum usitatissimum* (Flax), *Capsella rubella* (Red shepherd's purse), *Carica papaya* (Papaya) and *Eucalyptus grandis* (Eucalyptus). [<http://www.phytozome.net/>].
- [27] Thompson J.D., Higgins D.G. and Gibson T.J (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignments through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* 22:4673-4680.
- [28] Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- [29] Kelley LA, Sternberg MJE (2009) Protein structure prediction on the web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols* 4: 363 – 371.
- [30] Mirzaei KH. et al. (2014) *In Silico* Identification, Phylogenetic and Bioinformatic Analysis of Argonaute Genes in Plants. *International Journal of Genomics*, Article ID 967461.
- Regulation of ARGONAUTE Proteins. *Plant Cell*, 22:3879-3889.
- [12] Parker J. S, et al. (2006) Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 31: 622-630.
- [13] Peters L, Meister M (2007) Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing. *Molecular Cell*, 26: 611-623.
- [14] Vaucheret H. (2008) Plant ARGONAUTES, *Trends in Plant Science*, 7: 350-358.
- [15] Tahmasebi A. A., Zangane M. (2010) Interaction of RNA silencing in plants with plant viruses, *Genetics in the Third Millennium*, 3: 2095-2105. (in farsi).
- [16] Yigit E. et al. (2006) Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell*, 127: 747–757.
- [17] Ma J. et al. (2005) Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature*, 434: 666-670.
- [18] Mallory A. et al (2009) Redundant and Specific Roles of the ARGONAUTE Proteins AGO1 and ZLL in Development and Small RNADirected Gene Silencing. *PLoS Genetics*, 5: 1-12.
- [19] Morel J.B., et al. (2002) Fertile hypomorphic ARGONAUTE (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *Plant Cell*, 14: 629–639.
- [20] Acarkan A., et al. (2000), Comparative genome analysis reveals extensive conservation of genome organisation for *Arabidopsis thaliana* and *Capsella rubella*. *plant journal*, 23:55-62.
- [21] Gedil M. et al. , (2009) Development of molecular genomic tools for verification of intergeneric hybrids between castor bean (*Ricinus communis* L.) and cassava (*Manihot esculenta* Crantz), *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 7: 534-539.