

بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در آراییدوپسیس Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*

فاطمه دهقان نیری^۱، هوشنگ علیزاده^۲، محمد رضا نقوی^۳، سید ابوالقاسم محمدی^۴ و
مسعود سلطانی نجف آبادی^۵

چکیده

دهقان نیری، ف.، ه. علیزاده، م. ر. نقوی، س. ا. محمدی و م. سلطانی نجف آبادی. ۱۳۸۹. بررسی الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در آراییدوپسیس. مجله علوم زراعی ایران. ۱۲ (۳) ۳۶۳-۳۴۶.

چرخه سلولی اساس تقسیم سلولی و رشد موجودات زنده است که تنظیم آن از دقت بالایی برخوردار است. تنظیم بیان ژن‌ها سازوکار مهمی در کنترل چرخه سلولی در موجودات زنده می‌باشد. در این تحقیق با استفاده از کشت سلولی همزمان شده آراییدوپسیس توسط aphidicolin، روند تغییرات بیان ژن‌های مؤثر در مراحل مختلف چرخه سلولی و نیز الگوی بیان تعدادی از ژن‌های مربوط به چرخه سلولی شامل ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن عامل رونویسی و نقش احتمالی آنها در چرخه سلولی بوسیله تکنیک بسیار حساس qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت. از میان ژن‌هایی که طی پیشرفت چرخه سلولی تغییر سطح بیان نشان دادند، ژن‌های سایکلین نوع A و B و ژن‌های CDK نقش کلیدی داشتند. اغلب ژن‌های سایکلین نوع A و B الگوی تظاهر بسیار مشابهی داشتند. ژن‌های CYCA3 با حداکثر سطح تظاهر در مرحله S از کینازهای اصلی مرحله S می‌باشند. ژن‌های CDK نیز در مراحل گذر G1/S و G2/M نقش مهمی دارند. سطح تظاهر ژن‌های خانواده‌های مختلف عوامل رونویسی در چرخه سلولی با نوساناتی همراه بود که در کنترل دقیق فرآیندهای چرخه سلولی نقش اساسی ایفا می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: چرخه سلولی، ژن‌های پایه چرخه سلولی، سوسپانسیون سلولی آراییدوپسیس و عوامل رونویسی.

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۱۰/۱۰

- ۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (پست الکترونیک: fatemeh-dn@yahoo.com)
- ۲- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۳- دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
- ۴- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز
- ۵- استادیار مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج

مقدمه

چرخه سلولی فرآیند حیاتی در همه موجودات زنده است که تنظیم آن از دقت بالایی برخوردار است. برای شناسایی چگونگی تنظیم رشد موجودات زنده، شناسایی تنظیم کننده‌های تقسیم سلولی ضروری است. طی چرخه سلولی به دنبال همانندسازی DNA، توزیع دقیق مواد ژنتیکی به سلول‌های دختری صورت می‌گیرد (Planchais et al., 2000). چرخه سلولی براساس تغییرات مولکولی و سیتولوژیکی به چهار مرحله شامل: همانندسازی DNA (مرحله S)، مرحله تقسیم (M یا میتوز) و مراحل رشدی G1 و G2 به ترتیب برای آمادگی سلول جهت ورود به مراحل S و M تقسیم می‌شود. طی مرحله G1 اندازه و محیط داخل سلول برای همانندسازی DNA کنترل می‌شود در صورتی که در مرحله G2 صحت DNA همانندسازی شده و آمادگی سلول برای ورود به مرحله میتوز تعیین می‌شود (De Veylder et al., 2003). مراحل مختلف چرخه سلولی به وسیله ژن‌های پایه چرخه سلولی (Core cell cycle genes) و عوامل رونویسی (Transcription factors (TFs)) متعددی کنترل می‌شوند. ژن‌های پایه چرخه سلولی شامل ژن‌های سایکلین، ژن‌های کیناز وابسته به سایکلین (CDKs)، ژن‌های کیناز فعال کننده CDK (CAKs) و ژن‌های بازدارنده CDK (KRP) می‌باشند (Inzé, 2007). پیشرفت چرخه سلولی از طریق تولید و تجزیه سایکلین‌ها کنترل می‌شود. میزان بیان ژن‌های رمز کننده سایکلین‌ها در چرخه سلولی متغیر و تعیین کننده اصلی زمان فعالیت ژن‌های CDK است. سایکلین‌ها به دو گروه سایکلین‌های میتوزی نوع A و B (CYCA, CYCB) و سایکلین‌های اختصاصی مرحله G1 (CYCD) تقسیم‌بندی می‌شوند. سایکلین‌های نوع A دارای زیرگروه‌های A1، A2، A3 (از جمله CYCA1)، نوع B دارای زیرگروه‌های B1 و B2 (از جمله CYCB2) و نوع D دارای زیرگروه‌های D1 تا D7 (از جمله CYCD3) می‌باشند. این زیرگروه‌ها نیز به

زیرگروه‌های دیگری تقسیم می‌شوند، به عنوان مثال CYCD3;1 و CYCD3;3 در گروه سایکلین‌های CYCD3 قرار دارند (Inzé, 2007). ژن‌های CDK نقش مهمی در شروع، پیشرفت (تداوم) و تکمیل وقایع چرخه سلولی دارند (Planchais et al., 2000). در گیاهان دو گروه اصلی از ژن‌های CDK (نوع A و B) همراه با سایکلین‌ها، گذر از مراحل G1 به S و G2 به M را تنظیم می‌کنند. واسطه برهم کنش پروتئین‌های CDK و سایکلین‌ها، گروه دیگری از ژن‌های پایه چرخه سلولی به نام CKS هستند (Inzé, 2007). فعالیت مجموعه پروتئینی CDK-سایکلین بطور منفی با فسفوریلاسیون زیرواحد CDK به وسیله کیناز WEE1 و بطور مثبت با حذف گروه‌های بازدارنده فسفات توسط CDC25 فسفاتاز تنظیم می‌شود. بازدارندگی فعالیت CDK میتوزی توسط WEE1، یکی از سازوکارهای بازدارنده گذر سلول از مرحله G2 به M می‌باشد (Vandepoele et al., 2002).

به دنبال وقوع تنش یا تولید عوامل بازدارنده پیشرفت مراحل چرخه سلولی در سلول، مجموعه پروتئینی CDK-سایکلین به وسیله پروتئین‌های بازدارنده CDK (CKI) از بین می‌رود. در آرآبیدوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*) هفت ژن CKI شناسایی و به نام‌های KRP1 تا KRP7 نامگذاری شده‌اند (Inzé, 2007). در گیاهان، کشت سوسپانسیون سلولی شامل جمعیت همگنی از سلول‌ها است که در مراحل مختلف چرخه سلولی قرار دارند و مطالعه تقسیم سلولی را در غیاب فرآیندهای نموی سلول امکان‌پذیر می‌سازد. از آنجائیکه با استفاده از روش‌های موجود امکان مطالعه چرخه سلولی در تک سلول وجود ندارد، مطالعه فرآیندهای سلولی به جمعیتی از سلول‌ها در یک مرحله خاص از چرخه سلولی نیاز دارد. برای این منظور از روش‌های مختلف همزمان‌سازی (Synchronization) سلول‌ها استفاده می‌شود. همزمان‌سازی روشی است که برای غنی‌سازی جمعیت سلولی در یک مرحله خاص چرخه سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش‌های

مرحله G1/S با استفاده از aphidicolin گزارش نمودند. ارزیابی همزمانی سلول‌ها با روش‌های مختلف شامل روش‌های سیتولوژیکی (شاخص متافاز- آنافاز)، فلوسیتومتری و بهره‌گیری از نشانگرهای مولکولی امکان‌پذیر است (Planchais *et al.*, 2000). جهت ارزیابی میزان همزمانی سلول‌ها، از سطح تظاهر برخی ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی به عنوان نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. به عنوان مثال در سلول‌های آرآیدوپسیس، رونوشت‌های ژن هیستون H4 در مرحله S و ژن‌های سایکلین میتوزی در مرحله G2/M آشکار می‌شوند. همچنین افزایش سطح بیان سایکلین نوع D معرف مرحله G1 است (Planchais *et al.*, 2000). با استفاده از تکنیک qRT-PCR (Quantitative real time polymerase chain) می‌توان سطح بیان ژن‌های معرف مراحل مختلف چرخه سلولی را اندازه‌گیری نمود و الگویی برای میزان همزمانی سلول‌ها ارائه کرد.

هدف از این آزمایش بررسی تغییرات سطح بیان تعدادی از ژن‌های پایه چرخه سلولی و عوامل رونویسی در مراحل مختلف چرخه سلولی به منظور شناسایی ژن‌های تأثیرگذار در مراحل مختلف چرخه سلولی بود. برای این منظور از القاء همزمانی در کشت سلولی آرآیدوپسیس با استفاده از aphidicolin استفاده شد.

مواد و روش‌ها

کشت سوسپانسیون سلولی آرآیدوپسیس

سوسپانسیون لاین سلولی سریع‌الرشد MM2d آرآیدوپسیس تالیانا تهیه شده از ریزنمونه ساقه اکوتیپ *Landsberg erecta* از دانشگاه کمبریج دریافت گردید. واکشت سلول‌های MM2d بصورت هفتگی در محیط MSS تازه (نمک موراشیگ و اسکوگ، ۳ درصد ساکارز، ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۰/۰۵ میلی‌گرم در لیتر کینتین، pH= ۵/۸) انجام شد. جهت واکشت، ۳/۵ میلی‌لیتر از کشت سوسپانسیون MM2d به

متعددی برای القاء همزمانی در سوسپانسیون سلولی وجود دارد که بیشتر آنها روی مراحل گذر چرخه سلولی (G1/S، G2/M) تأثیر می‌گذارند. طی سال‌های اخیر، اطلاعات مربوط به فرآیندهای مولکولی مؤثر در چرخه سلولی بعلافت استفاده از سوسپانسیون سلولی همزمان شده، بطور قابل توجهی افزایش یافته است. کشت سلولی همزمان شده مدل مناسبی برای مطالعه رفتار ژن‌های چرخه سلولی محسوب می‌شود (Planchais *et al.*, 2000).

روش‌های القاء همزمان‌سازی شامل روش‌های فیزیکی از قبیل فلوسیتومتری (مرتب کردن سلول‌ها براساس اندازه و محتوای DNA آنها) و روش‌های شیمیایی با استفاده از اعمال بازدارنده‌های اختصاصی مراحل مختلف چرخه سلولی و یا حذف و اضافه نمودن مجدد یک ماده ضروری برای رشد از قبیل فسفات، نیترات، هورمون‌ها یا ساکارز می‌باشند (Menges and Murray, 2002؛ Tate and Ferrigno, 2005). به عنوان مثال، فرست و همکاران (Fuerst *et al.*, 1996) با استفاده از غلظت کم سیکلوهگزامید، سلول‌های آرآیدوپسیس را در مرحله G1 متوقف نمودند، ولی پس از ۱۲ ساعت از حذف این ماده، همزمانی سلول‌ها از بین رفت. ریو-خاملیچی و همکاران (Riou-Khamlichi *et al.*, 2000) با حذف ساکارز و افزودن مجدد آن به کشت سوسپانسیون سلولی آرآیدوپسیس، همزمانی سلول‌ها را در مرحله گذر از G1 به S گزارش نمودند. بازدارنده‌های مرحله S چرخه سلولی عموماً با کاهش میزان dNTPs سلول یا ورود در رشته‌های DNA در حال ساخت تأثیر می‌گذارند. یکی از بازدارنده‌های مرحله S چرخه سلولی aphidicolin است. این ماده شیمیایی مانع اتصال dNTPs به DNA پلیمراز آلفا می‌شود ولی روی فعالیت DNA پلیمراز بتا و سیگما تأثیر ندارد (Tate and Ferrigno, 2005). منگنز و موری (Menges and Murray, 2002) در آزمایشی همزمانی حدود ۸۰ درصد سلول‌های آرآیدوپسیس را در

فواصل ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۴، ۱۶ و ۱۹ ساعت پس از شستشو برداشت شدند. برای کنترل آزمایش، سلول‌های MM2d با DMSO (Dimethylsulfoxide) (حلال aphidicolin) تیمار شدند و پس از نگهداری به مدت ۲۴ ساعت در شرایط ذکر شده، شستشوی سلول‌ها و نمونه‌گیری انجام شد. سلول‌ها پس از نمونه‌گیری، در نیتروژن مایع منجمد و سپس در دمای ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند. همزمانی سلول‌های MM2d با استفاده از روش‌های فلوسیتومتری (انجام شده در آزمایشگاه Gent بلژیکی)، میکروسکوپی و نشانگرهای مولکولی مورد تأیید قرار گرفت (نتایج ارائه نشده است).

استخراج RNA و ساخت cDNA

RNA کل از سلول‌های تیمار شده با aphidicolin و براساس روش ترایزول (Invitrogen, Germany) استخراج شد. غلظت RNA استخراج شده با استفاده از اسپکتروفتومتر تخمین زده شد و کیفیت آن با استفاده از ژل یک درصد آگارز واسرشته‌ساز (حاوی فرمالدئید) بررسی گردید. بقایای DNA ژنومی موجود در نمونه‌های RNA با *DNaseI* عاری از *RNase* (Roche, Mannheim, Germany) هضم شد. نمونه‌های RNA پس از هضم، مجدداً مورد ارزیابی کیفی و کمی (به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز واسرشته‌ساز و اسپکتروفتومتر) قرار گرفتند. وجود یا عدم وجود بقایای DNA ژنومی در نمونه‌های RNA تیمار شده با *DNaseI* بوسیله qRT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی یک اینترون (Skirycz *et al.*, 2007) دارای توالی‌های:

forward primer: 5'-AACAGCAACAACAATGCAACTACTGATT-3'

reverse primer: 5'-ACAAACAGAGACAAGAGACAAGACATGG-3'

آنزیمی قرار گرفتند. mRNA موجود در نمونه‌های فاقد DNA ژنومی، توسط آنزیم رونوشت‌بردار معکوس

فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه انتقال یافت و در دمای ۲۶ درجه سانتیگراد، تاریکی ممتد و روی شیکر انکوباتور با ۱۳۰ دور در دقیقه نگهداری شد. برای بررسی دینامیک رشد سلول‌های MM2d، هر ۲۴ ساعت نمونه‌گیری از کشت سوسپانسیون انجام شد و تعداد سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتومتر (Neubauer, Germany) شمارش گردید. مطالعات میکروسکوپی کشت سوسپانسیون سلولی با استفاده از میکروسکوپ اپی فلورسنس Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) انجام شد.

القای همزمان‌سازی سلول‌های MM2d

سلول‌های MM2d با استفاده از aphidicolin (Sigma) در مرحله G1/S بطور برگشت‌پذیر متوقف می‌شوند (Planchais *et al.*, 2000). برای القای همزمان‌سازی ۲۰، ۲۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی در ابتدای مرحله سکون (Early stationary phase) (۵ روز پس از واکشت) به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه حاوی ۴ میکروگرم در میلی‌لیتر aphidicolin انتقال یافت و به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط فوق نگهداری گردید. برای شستشوی سلول‌ها و حذف aphidicolin، سلول‌ها با استفاده از صافی نایلونی مخصوص (با اندازه سوراخ‌های ۴۷ میکرومتر) و یک ونیم لیتر محیط MSS به آرامی شستشو داده شدند و به فلاسک‌های حاوی ۱۲۰ میلی‌لیتر محیط MSS تازه انتقال داده شدند. فلاسک‌ها در شرایط مذکور (۱۳۰ دور در دقیقه، ۲۶ درجه سانتیگراد، تاریکی ممتد) نگهداری شدند. اولین نمونه‌گیری بلافاصله پس از شستشو (T0) و نمونه‌های بعدی در

مربوط به ژن *late elongated hypocotyl* بررسی شد و نمونه‌های دارای DNA ژنومی مجدداً مورد هضم

Invitrogen, Germany, Super script III reverse transcriptase kit) به cDNA تبدیل شد. غلظت cDNA ساخته شده بوسیله qRT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *UBQ10* دارای توالی‌های:

forward primer: 5'-GGCCTTGTATAATCCCTGATGAATAAG-3'

reverse primer: 5'-AAAGAGATAACAGGAACGGAAACATAGT-3'

مورد ارزیابی قرار گرفت. کیفیت cDNA با استفاده از دو جفت آغازگر مربوط به دو انتهای ژن *GAPDH* دارای توالی‌های زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند:

GAPDH3' forward primer: 5'-TTGGTGACAACAGGTCAAGCA-3'

GAPDH3' reverse primer: 5'-AAACTTGTGCTCAATGCAATC-3'

GAPDH5' forward primer: 5'-TCTCGATCTCAATTCGCAAAA-3'

GAPDH5' reverse primer: 5'-CGAAACCGTTGATTCCGATTC-3'

تغییرات سطح تظاهر (C_T) هر یک از ژن‌ها پس از نرمال‌سازی (یا ΔC_T) برحسب میزان تظاهر بلافاصله پس از حذف aphidicolin (T_0) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه و بصورت FC (Fold change) (یا $-\Delta\Delta C_T$) ارائه شد. C_T عبارت است از تعداد چرخه‌ای که تغییر مقدار سیگنال فلورسنت SYBR green طی فاز نمایی تکثیر DNA در واکنش PCR به یک مقدار مشخص برسد.

$$(2) \quad -\Delta\Delta C_T = \Delta C_T - \Delta C_{T, T_0} \quad \text{ژن مورد نظر} \quad -\Delta\Delta C_T$$

نتایج

الگوی رشد لاین سلولی MM2d

سوسپانسیون سلولی لاین سلولی سریع‌الرشد MM2d حاوی گروه‌های نسبتاً "کوچک از سلول‌های کرمی رنگ است. این سلول‌ها توانایی تولید کلروفیل را پس از انتقال به شرایط نوری دارا می‌باشند (Menges and Murray, 2002). سلول‌های MM2d در محیط کشت MSS و شرایط نگهداری ذکر شده در قسمت مواد و روش‌ها تقریباً "از هم جدا بوده و به سرعت تقسیم می‌شوند. شمارش سلول‌ها با استفاده از لام هموسیتمتر تا هشت روز پس از واکنش و تعیین

qRT-PCR

واکنش qRT-PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با استفاده از پانچ میکرولیتر معسر استفاده از SYBR Green (Applied Biosystems, Fostercity, CA) چهار میکرولیتر جفت آغازگر (۰/۵ میکرومولار) و یک میکرولیتر الگو (cDNA یا RNA کل)، در دستگاه Gene Amp 7300 انجام شد. تجزیه داده‌های qRT-PCR با استفاده از نرم‌افزار SDS 2.2.1 (Applied Biosystems) و تجزیه خوشه‌ای و بررسی الگوی تظاهر ژن‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Excel و MeV (نسخه ۴/۳) صورت گرفت.

جهت تکثیر ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن رمزکننده عوامل رونویسی از cDNA نمونه‌های تیمار شده با aphidicolin (T_1 ... و T_{19}) استفاده شد. رقیق‌سازی cDNA و استفاده از آن در واکنش qRT-PCR براساس تکثیر ژن *UBQ10* صورت گرفت. نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR با استفاده از ژن مرجع *UBQ10* و بر اساس رابطه ۱ انجام شد.

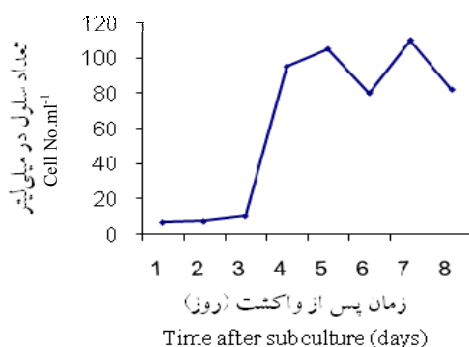
$$(1) \quad \Delta C_T = C_T - C_{T, UBQ10} \quad \text{ژن مورد نظر}$$

یعنی رشد و بزرگ شدن اندازه سلول را نشان دادند (نتایج ارائه نشده است). پس از رسیدن به مرحله سکون، نوسانات کوچکی در وضعیت رشدی این سلول‌ها مشاهده گردید که در مورد این لاین سلولی کاملاً طبیعی است (Menges and Murray, 2002).

ارزیابی همزمانی سلول‌های MM2d توسط نشانگرهای مولکولی

سطح تظاهر ۶۹ ژن پایه دخیل در فرآیند چرخه سلولی و ۸۱ ژن رمزکننده عامل رونویسی در زمان‌های مختلف پس از شستشوی سلول‌های تیمار شده با aphidicolin با استفاده از qRT-PCR اندازه‌گیری شد.

لگاریتم تعداد سلول‌ها در میلی‌لیتر محیط کشت نشان داد که سلول‌های MM2d به سرعت رشد کرده و الگوی رشدی سیگموئیدی داشتند (شکل ۱). از زمان واکشت تا روز سوم، سلول‌ها در فاز تأخیری بودند. به طوری که سرعت تکثیر کم و شیب منحنی کند بود. از روز سوم، منحنی وارد فاز نمایی شد که بیانگر رشد تصاعدی سلول‌ها است. این روند تا روز پنجم ادامه داشت به طوری که پنج روز پس از واکشت، تعداد سلول‌ها به حداکثر رسید. در این زمان، سلول‌های MM2d در ابتدای مرحله سکون بودند و براساس مشاهدات میکروسکوپی، خصوصیات رشدی این مرحله



شکل ۱- الگوی رشد لاین سلولی MM2d و ابتدای فاز سکون (D5). سرعت رشد سلول‌های MM2d با شمارش تعداد سلول‌ها ($\times 10^5$) در میلی‌لیتر محیط کشت بوسیله هموسیستمتر تعیین شد

Fig.1. Growth pattern of the MM2d cell line and early stationary phase (D5). Cells were subcultured and cell growth of cell lines MM2d monitored by determination of the number of cells ($\times 10^5$) per mL culture medium by hemocytometer

جدول ۱- میانگین C_T ژن‌های خانه‌دار *UBQ10*، *ACTIN2*، *GAPDH*، *PDF2* و *EXPRS* در سه تکرار آزمایش القای همزمانی در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin. زمان‌ها بر حسب ساعت می‌باشند

Table 1. Mean C_T value of the several housekeeping genes including *UBQ10*، *ACTIN2*، *GAPDH*، *PDF2* and *EXPRS* obtained from three replications of checking synchronization experiment in 10 time points after removal of aphidicolin. Times indicate hours in sampling

ژن‌های خانه‌دار Housekeeping genes	Time (h)									
	0	2	4	6	8	10	12	14	16	19
<i>UBQ10</i>	18.1	18.2	18.6	17	16.8	17.4	17.4	16.8	17.4	16.9
<i>ACTIN2</i>	21.8	21.9	22.2	20.5	20.6	20.8	20.6	20.2	20.8	20.2
<i>GAPDH</i>	22.4	22.5	22.2	20.7	20.4	21.1	21.1	20.7	21.3	20.7
<i>PDF2</i>	19.2	19.5	19	17.1	17.2	17.9	18.1	17.3	18	17.1
<i>EXPRS</i>	26	26.2	25.3	23.6	22.9	23.9	23.7	23	24	22.7

مختلف، نرمال کردن داده‌های C_T هر ژن با استفاده از C_T ژن *UBQ10* و رابطه شماره ۱ انجام شد. با وجود آنکه تغییرات مطلق FC ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin نسبت به زمان T0 چندان زیاد نبود، وجود نوسانات افزایش سطح تظاهر (بصورت داده‌های مثبت) و کاهش سطح تظاهر (بصورت داده‌های منفی) منجر به مقادیر بالای ضریب تغییرات برای هر ژن گردید که نشان دهنده نوسانات زیاد تظاهر ژن‌ها طی زمان‌های مختلف می‌باشد.

الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin

سطح تظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin با نوساناتی همراه بود. این نوسانات حتی در تکرارهای مختلف یک تیمار زمانی خاص نیز مشاهده شد. با وجود این، تعدادی از ژن‌ها از یک الگوی خاص تغییر سطح تظاهر در زمان‌های خاص پیروی می‌کنند به طوری که می‌توان برای تعدادی از ژن‌ها، زمان معینی را به عنوان زمان خاص تأثیرگذاری در نظر گرفت. برای گروه‌بندی ژن‌ها براساس بیان آنها در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin، تجزیه خوشه‌ای با استفاده از مقادیر FC انجام شد. برای این منظور، ژن‌هایی که دارای بیش از یک داده از دست رفته بودند از تجزیه حذف شدند. تجزیه خوشه‌ای با روش Complete linkage و در نظر گرفتن فاصله اقلیدسی، قادر به تفکیک گروه‌هایی از ژن‌ها شد که بطور پیوسته در تمامی زمان‌ها دچار کاهش یا افزایش سطح تظاهر نسبی بودند (شکل ۲). همه ژن‌هایی که بطور پیوسته دچار کاهش شدید سطح تظاهر نسبی بودند عوامل رونویسی می‌باشند (گروه I شکل ۲). گروهی از ژن‌ها در مراحل S و G2 کاهش سطح تظاهر نسبی نشان دادند در صورتی که در مراحل M و G1 سطح تظاهر آنها افزایش یافته بود (گروه I شکل ۲). همچنین تعدادی از ژن‌ها (که شامل عوامل رونویسی می‌باشند) در مراحل S و G2 کاهش سطح تظاهر نسبی نشان دادند که پس از

میانگین سطح تظاهر پنج ژن مرجع *UBQ10*، *Actin2*، *EXPRS* و *PDF2*، *GAPDH* در نمونه‌های تیمار شده با aphidicolin در سه تکرار آزمایش القاء همزمانی برحسب مقادیر C_T ارائه شده است (جدول ۱).

C_T این ژن‌ها در سه تکرار آزمایش و در زمان‌های مختلف پس از شستشوی سلول‌ها تقریباً "یکسان بود که بر پایداری سطح تظاهر این ژن‌ها در مراحل مختلف چرخه سلولی و عدم تأثیرپذیری آنها از شرایط محیطی دلالت دارد.

سطح تظاهر تعدادی از ژن‌ها نوسانات شدیدی حتی داخل هر زمان، بین تکرارهای مختلف نشان داد به طوری که در برخی از تیمارها سطح تظاهر قابل اندازه‌گیری برای برخی ژن‌ها مشاهده نشد. در تجزیه و تحلیل داده‌ها، تنها اطلاعاتی به عنوان قابل اطمینان در نظر گرفته شد که در هر زمان تیمار، حداقل دو تکرار واجد اطلاعات باشند.

جهت تعیین الگوی تغییر تظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف، میانگین حسابی سطح تظاهر سه تکرار (یا دو تکرار در مواردی که فقط دو تکرار واجد اطلاعات می‌باشند) محاسبه و میانگین تغییرات در زمان‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. سطح تظاهر ژن‌ها در زمان‌های مختلف تفاوت بسیار چشمگیری داشت به طوری که حداکثر مقدار ضریب تغییرات (CV) (براساس واریانس و میانگین تظاهر هر ژن در سه تکرار) معادل ۱۱/۱ مربوط به ژن *CDK1* بود. این ژن دارای مقدار تظاهر حداکثر در زمان ۱۰ ساعت پس از حذف aphidicolin بود. با وجود پایین بودن میانگین CV بین همه ژن‌ها، بعلاوه ماهیت بسیار حساس تکنیک qRT-PCR حتی تغییرات کم نیز حائز اهمیت می‌باشد.

به منظور مقایسه بین انجام PCR های مختلف و نیز نمونه‌های cDNA متفاوت، از ژن‌های مرجع *ACTIN2*، *UBQ10*، *GAPDH*، *PDF2* و *EXPRS* در هر PCR استفاده شد. بعلاوه سطح تظاهر نسبتاً "بالا تر ($C_T = 17 \pm 1$) و پایداری تظاهر *UBQ10* در نمونه‌های

ناگهانی پس از شش ساعت مجدداً کاهش یافت و پس از ۱۲ ساعت به بعد افزایش یافت (گروه VI شکل ۲).

تجزیه روند تغییرات سطح تظاهر ژن‌ها طی زمان، امکان جداسازی ژن‌هایی را که از یک الگوی زمانی تظاهر خاص پیروی می‌کنند، فراهم می‌نماید (شکل ۳). در این روندها، ژن‌هایی که دارای حداقل یا حداکثرهای مطلق یا محلی در زمان یا مراحل مختلف چرخه سلولی می‌باشند قابل شناسایی هستند. به عنوان مثال، چهار ساعت پس از حذف aphidicolin سطح تظاهر هفت ژن به سطح تظاهر زمان حذف رسید و مجدداً بطور یکنواخت در سرتاسر زمان‌های باقی‌مانده افزایش یافت (پانل ۲۰ شکل ۳). ۱۲ ژن تا حدود شش ساعت پس از حذف تیمار، افزایش سطح تظاهر نشان دادند و پس از آن با کاهش سطح تظاهر بطور یکنواخت بیان شدند (پانل ۱۸ شکل ۳). چهار ژن در مرحله S سطح تظاهر پایینی داشتند و پس از رسیدن به سطح تظاهر زمان حذف تیمار، در تمامی مراحل باقی‌مانده افزایش سطح تظاهر نشان دادند (پانل ۴ شکل ۳). گروهی از ژن‌ها که پس از حذف aphidicolin کاهش سطح تظاهر داشتند پس از حدود چهار ساعت به سطح تظاهر زمان حذف رسیدند و بطور ثابت تظاهر یافته و سپس روند افزایشی نشان دادند (پانل ۱۴ شکل ۳). سطح تظاهر هفت ژن بلافاصله پس از حذف aphidicolin افزایش یافت و پس از حدود هشت ساعت تقریباً بطور ثابت ادامه پیدا کرد (پانل ۱۱ شکل ۳).

بحث

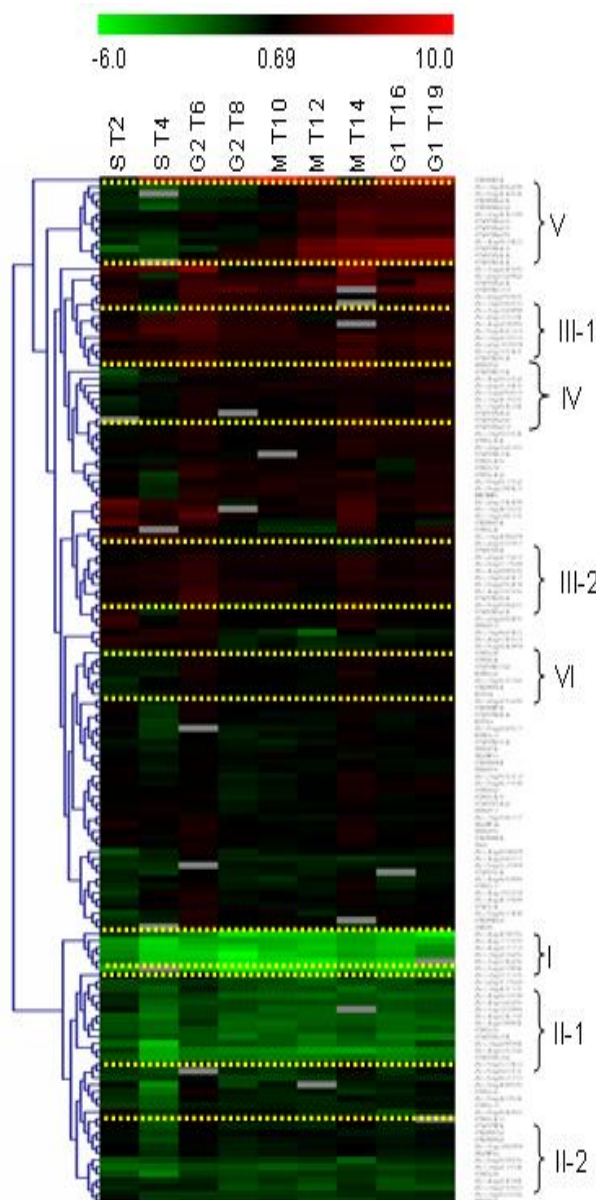
تغییر تظاهر ژن‌های دخیل در چرخه سلولی نقش اصلی در کنترل چرخه سلولی و پیشرفت آن ایفا می‌کند (De Veylder *et al.*, 2003). بیشتر ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی در کشت سلولی MM2d آراییدوپسیس بیان می‌شوند، بعبارت دیگر تظاهر ژن‌های موثر در چرخه سلولی به یک بافت خاص اختصاص ندارد (Menges *et al.*, 2005). بنابراین، کشت سلولی

آن در سایر مراحل، سطح تظاهر آنها افزایش یافته بود (گروه V شکل ۲).

صرف نظر از نوساناتی که در سطح تظاهر ژن‌ها در زمان‌ها و مراحل مختلف دیده شد، سطح تظاهر تعدادی از ژن‌ها در تمامی مراحل و زمان‌ها حفظ شد. این گروه از ژن‌ها در دو دسته شامل ژن‌هایی با کاهش سطح بیان و ژن‌هایی با افزایش سطح بیان طبقه‌بندی شدند. در دسته ژن‌های با کاهش سطح تظاهر، گروهی از ژن‌ها بطور پیوسته سطح تظاهر نسبی بسیار پایینی داشتند (گروه I شکل ۲) در صورتی که گروه‌های دیگری بودند که نوسان کمی در سطح تظاهر نشان دادند و براساس شدت کاهش سطح تظاهر به دو دسته II-1 و II-2 (شکل ۲) طبقه‌بندی شدند. دسته ژن‌هایی که بطور پیوسته افزایش سطح تظاهر نشان دادند نسبت به دسته ژن‌های با کاهش سطح تظاهر بسیار کمتر بودند. در این دسته دو گروه از ژن‌ها قابل تشخیص بودند: گروه III-1، که سطح کلی تظاهر آنها نسبت به گروه دیگر، III-2 بالاتر بود (شکل ۲).

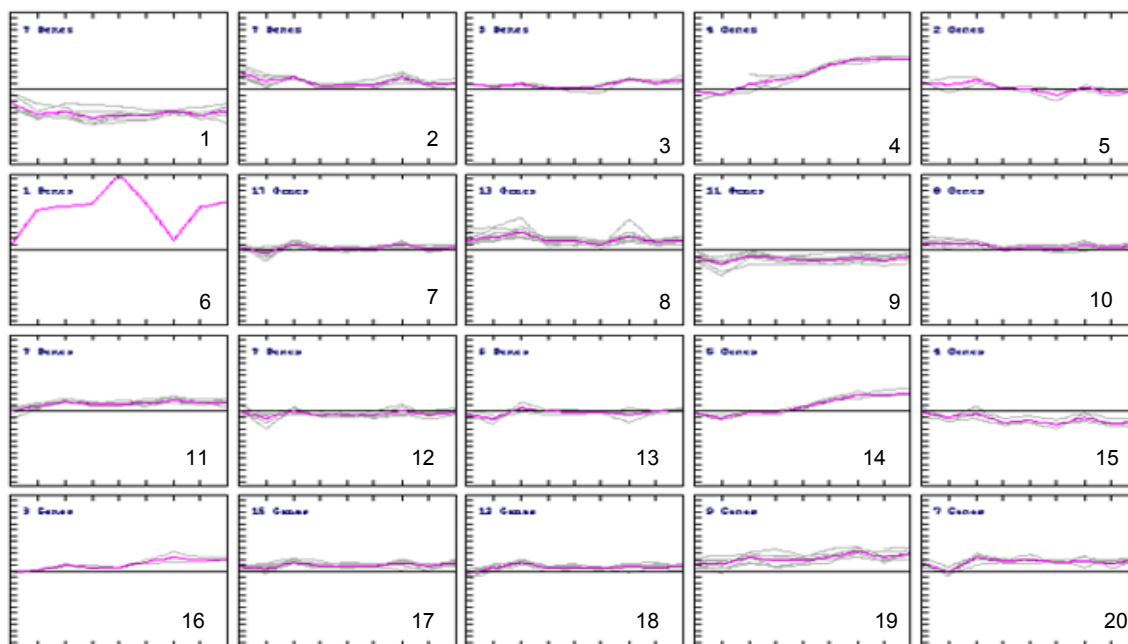
تغییر ماهیت سطح تظاهر ژن‌ها، یعنی از سطح تظاهر نسبی مثبت به منفی و بالعکس، در تعداد زیادی از ژن‌ها در طی زمان مشاهده شد. تعدادی از ژن‌ها تغییرات وابسته به مرحله‌ای از چرخه سلولی را نشان دادند. برای مثال، گروهی از ژن‌ها در مرحله S سطح تظاهر منفی داشتند حال آنکه در سایر مراحل چرخه سلولی سطح تظاهر آنها مثبت بود (گروه IV شکل ۲).

گروهی از ژن‌ها در مراحل اولیه پس از حذف aphidicolin دارای سطح تظاهر نسبی بسیار پایینی بودند (منفی)، ولی پس از مدتی (شش تا ۱۰ ساعت) سطح تظاهر آنها افزایش یافت به طوری که از ۱۲ ساعت به بعد سطح تظاهر آنها بسیار افزایش یافت و به سطح مثبت رسید (گروه V شکل ۲). بجز ژن‌های مذکور، تعدادی از ژن‌ها نوسانات زیادی طی زمان‌ها و مراحل مختلف داشتند. برای مثال، در ژن‌های گروه VI، ابتدا سطح تظاهر ژن‌ها بسیار پایین بود و سپس با یک افزایش



شکل ۲- الگوی بیان ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی شامل ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن عامل رونویسی با استفاده از نرم‌افزار MeV (نسخه ۳.۴). گروه‌بندی Hierarchical ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی. نسبت سطح تظاهر در زمان T0 (FC) (بدست آمده از تکنیک qRT-PCR) محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است ($\log_2 FC$). درجه اشباع رنگ، منعکس‌کننده مقدار میانگین $\log_2 FC$ است. برای هر زمان، میزان بیان بیشتر و کمتر از میزان بیان در زمان صفر بترتیب با رنگ‌های قرمز و سبز مشخص شده است. دندروگرام عمودی (سمت چپ) ارتباط بین ژن‌های دخیل در چرخه سلولی را با توجه به الگوی بیان آنها نشان می‌دهد. مقیاس رنگ (بالای شکل) رنگ متناسب به هر $\log_2 FC$ را نشان می‌دهد.

Fig. 2. Expression pattern of cell cycle- regulated genes including 69 core cell cycle genes and 81 transcription factors using MeV software, version 4.3. Hierarchical clustering of cell cycle-regulated genes. The fold change values for each sample relative to time zero as control were \log_2 transformed. The mean values for the three independent biological replications were subjected to complete linkage hierarchical clustering. The color saturation reflects the magnitude of the averaged $\log_2 FC$. Expression values higher and lower than those of the control are shown in red and green. The vertical dendrogram (left) indicates the relationship among the genes regarding their expression patterns. The color scale (top) indicates the color assigned to each $\log_2 FC$



شکل ۳- الگوی بیان ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی شامل ۶۹ ژن پایه چرخه سلولی و ۸۱ ژن عامل رونویسی با استفاده از نرم‌افزار MeV (نسخه ۴.۳). نسبت سطح تظاهر در زمان T0 (FC) (بدست آمده از تکنیک qRT-PCR) محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است (Log₂ FC). اعداد محور افقی نشان‌دهنده زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin می‌باشد

Fig. 3. Expression pattern of cell cycle- regulated genes including 69 core cell cycle genes and 81 transcription factors using MeV software, version 4.3. Cell cycle-regulated gene expression profiles were plotted against the different time points after removal of aphidicolin

همزمان شده مدل مناسبی برای تعیین الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی است (Menges and Murray, 2002). از آنجائیکه تیمار سلول‌های MM2d با aphidicolin همزمانی بالایی را در مرحله S چرخه سلولی القاء می‌کند (Menges and Murray, 2002)، در این تحقیق بوسیله تکنیک qRT-PCR الگوی بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای سلولی شامل کنترل چرخه سلولی، رونویسی، فسفوریلاسیون و پاسخ به هورمون در سلول‌های همزمان شده آراییدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت.

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، اغلب ژن‌های سایکلین نوع A و B الگوی بیان بسیار مشابهی داشتند (پانل ۴ شکل ۳) که مطابق با نتایج منگز و همکاران

با *CYCA1;2* تظاهر الگوی *CYCA1;2* (Menges et al., 2005) است. الگوی تظاهر *CYCA1;2* با *CYCA2;1* بسیار مشابه بود ولی *CYCA2;1* در همه مراحل سطح تظاهر بیشتری داشت (شکل ۴، الف). الگوی بیان *CYCA2;2*، *CYCA2;3* و *CYCA2;4* یکسان بود. هر سه ژن مذکور دارای حداکثر میزان تظاهر در مرحله M بودند ولی ژن *CYCA2;4* ۱۴ ساعت پس از حذف aphidicolin میزان بیان بیشتری نسبت به دو ژن دیگر داشت (شکل ۴، الف). ژن‌های *CYCA1;2*، *CYCA2;2* و *CYCA2;3* همراه با عامل رونویسی همودامین (*At4g25530*) و پروتئین متصل شونده به DNA (*At3g61310*) در یک گروه (گروه IV شکل ۲ و پانل ۵ شکل ۳) قرار گرفتند. ژن‌های این گروه از مرحله G2 افزایش سطح تظاهر نشان دادند (شکل ۴، الف).

همزمان شده مدل مناسبی برای تعیین الگوی تظاهر ژن‌های مربوط به چرخه سلولی است (Menges and Murray, 2002). از آنجائیکه تیمار سلول‌های MM2d با aphidicolin همزمانی بالایی را در مرحله S چرخه سلولی القاء می‌کند (Menges and Murray, 2002)، در این تحقیق بوسیله تکنیک qRT-PCR الگوی بیان ژن‌های دخیل در فرآیندهای سلولی شامل کنترل چرخه سلولی، رونویسی، فسفوریلاسیون و پاسخ به هورمون در سلول‌های همزمان شده آراییدوپسیس مورد بررسی قرار گرفت.

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، اغلب ژن‌های سایکلین نوع A و B الگوی بیان بسیار مشابهی داشتند (پانل ۴ شکل ۳) که مطابق با نتایج منگز و همکاران

یافت. این ژن عامل محدودکننده سرعت برای گذر G1/S است (Menges *et al.*, 2006). افزایش بیان *CYCD3;1* در آراییدوپسیس منجر به افزایش تقسیمات سلولی و جلوگیری از خروج سلول از میتوز می‌شود (Dewitte *et al.*, 2003). همچنین ژن‌های *CYCD2;1* و *CYCD5;1* الگوی تظاهر تقریباً یکسانی نشان دادند که *CYCD5;1* دارای بیان بیشتری بود (شکل ۴، ر). گزارش شده است که افزایش بیان *CYCD2;1* در توتون باعث افزایش سرعت رشد می‌شود ولی روی اندازه و شکل برگ تأثیری ندارد (De Veylder *et al.*, 2003). سایر ژن‌های *CYCD* نشان دادند. سطح تظاهر این دو ژن همواره بیشتر از سایر ژن‌های *CYCD* بود (شکل ۴، ن). در آراییدوپسیس، به کمک ریزآرایه‌ها، سطح تظاهر بالای سه ژن گروه *CYCD3* و ژن‌های *CYCD1;1*، *CYCD6;1*، *CKL15* و *CYCA2;3* در گل‌های این گیاه گزارش شده است (Menges *et al.*, 2005). قرار گرفتن ژن‌های *CDKB2;1* و *CDKB2;2* در یک گروه (گروه V شکل ۲ و پانل ۴ شکل ۳) همراه با سایکلین‌های میتوزی (*CYCA* و *CYCB*) با نتایج منگز و همکاران (Menges *et al.*, 2005) مطابقت دارد. ژن‌های *CDKB2* حدود شش ساعت پس از حذف aphidicolin افزایش سطح تظاهر نشان دادند (گروه V شکل ۲). میزان تظاهر ژن‌های *CDKB2;1* و *CDKB2;2* تا شش ساعت پس از حذف aphidicolin بسیار پایین بود و پس از آن میزان تظاهر افزایش یافت به طوری که ۱۰-۱۲ ساعت پس از حذف aphidicolin (مطابق با مرحله G2/M، منگز و همکاران (Menges *et al.*, 2005) سطح تظاهر به بیشترین مقدار خود رسید (گروه V شکل ۲، پانل ۴ شکل ۳ و شکل ۴، و).

عوامل رونویسی تنظیم‌کننده مرحله میتوز (Menges *et al.*, 2003) در گروه V همراه با ژن‌های *CYCA* و *CYCB* (سایکلین‌های میتوزی) قرار گرفتند. در این گروه، عامل رونویسی *TINY*

الگوی بیان ژن‌های *CYCA3;1* و *CYCA3;2* مشابه بود ولی ژن *CYCA3;1* نوسان بیشتری در مراحل مختلف داشت (شکل ۴، ب). گروه ژن‌های *CYCA3* دارای حداکثر سطح تظاهر در مرحله S بودند در صورتی که سایر سایکلین‌های نوع A و B افزایش سطح تظاهر در G2/M نشان دادند که احتمالاً "بیانگر نقش تنظیمی آنها در این مراحل است (شکل ۴، ج). اثر تنظیمی این ژن‌ها در گذر G2/M توسط منگز و همکاران (Menges *et al.*, 2005) نیز گزارش شده است. الگوی بیان ژن‌های *CYCB* شباهت زیادی به یکدیگر داشت به طوری که این ژن‌ها در مرحله M حداکثر میزان بیان را نشان دادند (شکل ۴، ج). از میان ژن‌های *CYCB* مورد بررسی در این تحقیق (*CYCB1;1*، 14، 24، 25 و 31)، ژن‌های *CYCB2;4* و *CYCB2;5* الگوی بیان تقریباً یکسانی داشتند، به طوری که برای هر دو ژن سطح تظاهر در مرحله G1 حدود سه برابر مرحله S بود. بالاترین میزان بیان در مراحل M و G1 متعلق به *CYCB1;4* بود (شکل ۴، ج). با وجود این، *CYCB1;4* که نوسان بیشتری در سطح تظاهر داشت، طی مرحله S کاهش بیان داشت و در G2/M به حداکثر میزان بیان خود رسید ولی ژن‌های *CYCB2;4* و *CYCA2;4* نوسان کمتری در سطح تظاهر نشان دادند. تحقیق صورت گرفته روی سطح تظاهر این ژن‌ها به کمک ریزآرایه (Microarray) نیز مؤید این یافته است (Menges *et al.*, 2005). ژن‌های *CYCD* در گروه‌های نزدیک قرار گرفتند (گروه III-2 و VI شکل ۲). در مشاهدات مربوط به آزمایش حاضر، الگوی بیان *CYCD6;1* و *CYCD3;2* یکسان ولی میزان کمی تظاهر *CYCD6;1* بیشتر بود به طوری که در ابتدای مرحله G2، میزان تظاهر ژن *CYCD6;1* دو برابر *CYCD3;2* بود (شکل ۴، د). الگوی تظاهر *CYCD4;1* و *CYCD3;1* نیز شباهت زیادی داشت ولی میزان بیان *CYCD3;1* حدود ۲/۵ برابر *CYCD4;1* بود (شکل ۴، ذ). تظاهر *CYCD3;1* در مرحله S حداقل بود و از مرحله G2 افزایش و مجدداً در G1 کاهش

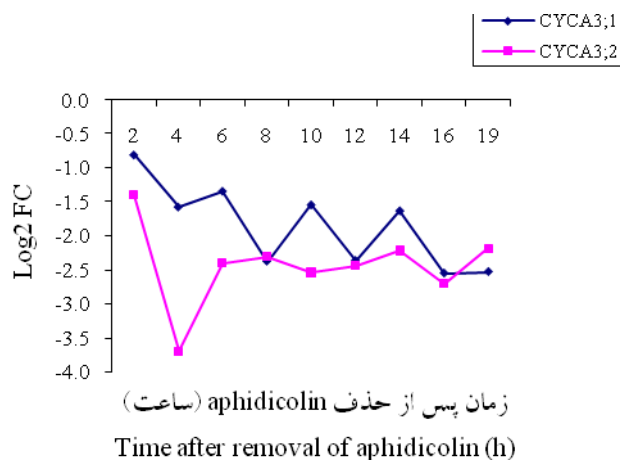
راه‌انداز خود می‌باشند (Inzé, 2007). این جایگاه توسط عوامل رونویسی خانواده MYB شناسایی می‌شود (Inzé, 2007). در آراییدوپسیس، ژن *AtMYB3R4* بیان ژن‌های دارنده جایگاه MSA را تنظیم می‌کند (Menges et al., 2005). جالب توجه اینکه در راه‌انداز ژن *AtMYB3R4* نیز سه جایگاه MSA وجود دارد (Menges et al., 2005). پروتئین ژن *At4g11080* بسوی پلاستید هدف‌گیری می‌شود. با توجه به قرار گرفتن این ژن در گروه V (گروه V شکل ۲) همراه با چند عامل رونویسی دیگر و ژن‌های پایه چرخه سلولی، وجود رابطه بین تقسیم هسته و پلاستید محتمل است (Menges et al., 2005). در این مطالعه ژن‌های *CDKC* و *CYCT* در گروه II-2 قرار گرفتند (گروه II-2 شکل ۲ و پانل ۲ شکل ۳). ژن‌های این گروه سطح تظاهر پایینی دارند. پروتئین *CDKC* با تشکیل کمپلکس با پروتئین *CYCT* به عنوان تنظیم‌کننده مثبت رونویسی عمل می‌کند در صورتی که پروتئین *CDKE* همراه با پروتئین *CYCC* به عنوان جزئی از هولوآنزیم *RNA* پلیمراز II اثر منفی بر رونویسی دارند (Inzé, 2007). عوامل رونویسی خانواده‌های متعددی شامل *WRKY* (*At5g22570*)، *AP2* (*At5g18550*) *C2H2* و (*At5g10510* و *At5g61600*) همراه ژن‌های پایه چرخه سلولی شامل *CDKG* و *CKL* دارای الگوی تظاهر یکسانی بودند (گروه II-2 شکل ۲). ژن‌های *CKL* در مراحل کنترل چرخه سلولی (*G1/S* و *G2/M*) افزایش سطح تظاهر نشان دادند (Menges et al., 2005 و Inzé, 2007). در بین ژن‌های تنظیم‌کننده چرخه سلولی، بیشتر اعضاء این خانواده بطور استثنایی بیان زیادی را در اندام یا بافت خاصی از گیاه نشان نمی‌دهند (Menges et al., 2005). در گروه II-2، ژن‌های *E2F* (شامل *E2Fa*، *E2Fb*، *E2Fc*) نیز قرار گرفتند (گروه II-2 شکل ۲). ژن‌های *E2F* در گذر *G1/S* افزایش سطح تظاهر نشان می‌دهند (Inzé, 2007). افزایش بیان *E2Fa* و *E2Fb* در آراییدوپسیس، بعلت تحریک تقسیم سلولی منجر به تغییر

(*At3g16280*) متعلق به خانواده *AP2* قرار دارد. گزارش شده است که افزایش بیان این ژن طی مراحل رویشی و زایشی مانع تقسیم سلول و بعلت کاهش طول سلول، باعث کاهش اندازه اندام‌ها در آراییدوپسیس می‌شود (Marsch- Martinez et al., 2006). برخی از اعضای خانواده *AP2* در تنظیم ژن‌های مربوط به چرخه سلولی دخالت دارند، به عنوان مثال، در آراییدوپسیس افزایش بیان یک ژن از خانواده *AP2* (*ANT*) باعث فعال شدن *CYCD3* می‌شود. این ژن نمو گل را تنظیم می‌کند و برای تشکیل تخمک ضروری است (Autran et al., 2002). افزایش بیان یک عامل رونویسی از خانواده *AP2* (*BOLITA*) باعث افزایش بیان ژن‌های *CYCD3;1* و *RB* می‌شود. *BOLITA* روی تعداد سلول، رشد و تمایز آن تأثیر دارد (Marsch- Martinez et al., 2006). ژن‌های *CYCD* و *RB* نیز در تقسیم سلولی و تمایز نقش دارند (Menges et al., 2005). بنابراین، عامل رونویسی *AP2* و ژن‌های پایه چرخه سلولی (*CYCD* و *RB*) با تأثیرگذاری بر تقسیم و تمایز سلول، بین این دو فرآیند رابطه برقرار می‌کنند. همچنین در گروه V، عامل رونویسی *SCARECROW* (*At1g63100*) متعلق به خانواده عوامل رونویسی *bZIP*، که دارای سطح بیان حداکثر در *G1* است در تقسیم سلولی نامتقارن نقش دارد (Oyama et al., 1997). ژن‌های *bZIP* دارای جایگاه اتصال در راه‌انداز ژن‌های هیستون هستند و تظاهر این ژن‌ها را طی مرحله S تنظیم می‌کنند (Okanami et al., 1996). از خانواده عوامل رونویسی MYB، ژن *AtMYB3R4* (*At5g11510*) نیز در گروه V قرار گرفته است (گروه V شکل ۲). *AtMYB3R4* از نظر ساختار ژن با ژن‌های *NtmybA1* و *NtmybA2* توتون شباهت زیادی دارد و رونویسی ژن‌های پایه چرخه سلولی مربوط به *G2/M* را تنظیم می‌کند (Ito et al., 2001). ژن‌های القاء شونده در مرحله میتوز دارای جایگاه فعال‌سازی اختصاصی میتوز (*MSA*) در

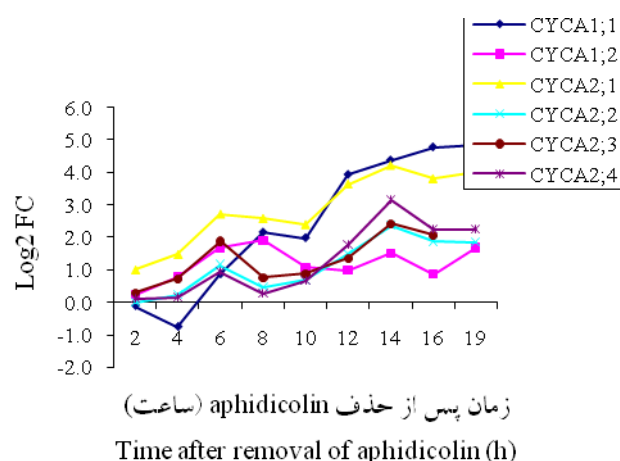
آراییدوپسیس می‌شود (Shin *et al.*, 2007). اکسین فیزیولوژی گیاه را با تنظیم برهم کنش عوامل رونویسی با عناصر پاسخ‌دهنده به اکسین در ژن‌های دارنده آن تنظیم می‌کند (Ulmasov *et al.*, 1997). ژن‌های متعددی از خانواده عوامل رونویسی MADS box (*At1g01530*)، AP2 (*At5g61890*) و انگشت روی (*At3g18290*) پروتئین القاء‌شونده با اکسین (IAA20) دارای الگوی تظاهر یکسانی هستند (پانل ۱۷ شکل ۳). ژن‌های MADS box در جنبه‌های مختلف رشد و نمو گیاه نقش دارند و بر تعداد و اندازه سلول‌ها تأثیر می‌گذارند (Tapia-López *et al.*, 2008). در میان عوامل رونویسی تنظیم‌کننده چرخه سلولی، خانواده‌های HD-ZIP و DOF نیز وجود دارند. در این مطالعه ژن *At4g32880* از خانواده HD-ZIP دارای تظاهر حداکثر در مرحله S می‌باشد. عوامل رونویسی HD-ZIP نیز توسط اکسین القاء می‌شوند (Mattsson *et al.*, 2003) و تنظیم‌کننده‌های کلیدی سرنوشت سلول و تخصصی شدن سلول در مراحل اولیه جنین‌زایی هستند (Inzé, 2007). در این تحقیق، عوامل رونویسی *At2g34140* و *At3g50410* از خانواده DOF دارای حداکثر سطح تظاهر در مرحله G1 بودند. ژن‌های این خانواده، به عنوان مثال ژن *OBP1*، با هدف قرار دادن ژن‌های پایه چرخه سلولی (*KRP7* و *CYCD3;3*) در کنترل مراحل G1 و S نقش دارند (Skirycz *et al.*, 2007).

نتایج تحقیق حاضر بیانگر فعالیت دو گروه ژن‌های پایه و عوامل رونویسی در فرآیند چرخه سلولی است. از آنجائیکه عوامل رونویسی به عنوان جایگاه‌های کلیدی و کنترل تنظیم سایر ژن‌ها مطرح می‌باشند، شناسایی الگوی تأثیرگذاری آنها در مراحل مختلف چرخه سلولی، امکان مهندسی فرآیند چرخه سلولی را فراهم می‌سازد. ژن‌های پایه دارای تأثیر مستقیم در کنترل مراحل مختلف چرخه سلولی می‌باشند که شناخت آنها و نیز زمان تأثیرگذاری آنها ابزاری جهت کنترل مراحل خاصی از چرخه سلولی می‌باشد. مطالعاتی در مورد نقش برخی از

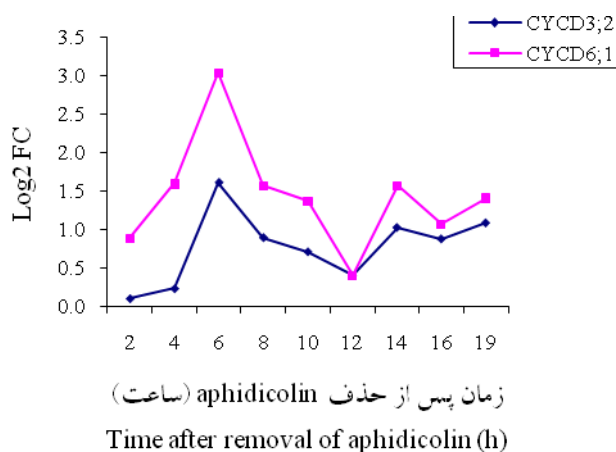
مورفولوژی ریشه‌ها، کوتیلدون و برگ‌ها می‌شود (Bonioti and Griffith, 2008). ژن‌هایی که در مرحله G1/S فعال می‌شوند (مانند *MCM5*) دارای جایگاه اتصال عوامل رونویسی *E2F* در راه‌انداز خود می‌باشند (Menges and Murray, 2002). از میان ژن‌های *KRP* مورد بررسی در این تحقیق، الگوی تظاهر ژن‌های *KRP3* و *KRP4* شباهت زیادی با یکدیگر و شباهت کمتری با *KRP1* داشتند. ژن‌های *KRP3* و *KRP4* حداکثر سطح بیان را در مرحله S نشان دادند (شکل ۴، ۵). بیان ژن‌های *KRP3* و *KRP7* در گذر G1/S افزایش و پس از آن کاهش یافت. سطح تظاهر *KRP4* در ابتدای G2 و *KRP1* در انتهای M حداکثر بود (شکل ۴، ۵). عوامل رونویسی از خانواده NAC (*At1g77450*)، *WRKY* (*At4g01250* و *At4g23810*)، پروتئین انگشت روی تحمل به شوری (*At1g27730*) و *AtMYB15* (*At3g23250*) در مراحل G1 و M افزایش سطح تظاهر نشان دادند (گروه I شکل ۲، پانل ۱۱ شکل ۳ و شکل ۴، ۵). یک عامل رونویسی از خانواده NAC (*NTM1*) با فعال کردن ژن‌های بازدارنده فعالیت *CDK* (*KRPs*) فعالیت ژن‌های هیستون *H4* را از بین می‌برد و منجر به کاهش تقسیم سلولی می‌شود. ژن‌های *CYCD3;1*، *KRP2* و *KRP7* توسط *NTM1* تنظیم می‌شوند. این ژن سیگنال‌دهی اکسین طی تشکیل ریشه‌های جانبی را تنظیم می‌کند (Kim *et al.*, 2006). اعضاء گروه I همراه با ژن‌های *KRP* در مراحل گذر G1/S و G2/M افزایش سطح بیان نشان دادند (گروه I شکل ۲). عوامل رونویسی نقش مهمی در انتقال سیگنال هورمون‌ها دارند و مسیرهای مختلف را به یکدیگر ارتباط می‌دهند. عوامل رونویسی با تغییر سیگنال‌های هورمونی روی تکثیر و اندازه سلول تأثیر می‌گذارند (Marsch-Martinez *et al.*, 2006). در این تحقیق، ژن *AtMYB77* (*At3g50060*) افزایش سطح تظاهر در مرحله میتوز نشان داد. *AtMYB77* با عوامل پاسخ‌دهنده به اکسین (ARFs) برهم کنش داشته و منجر به کاهش شدید تعداد ریشه‌های جانبی در



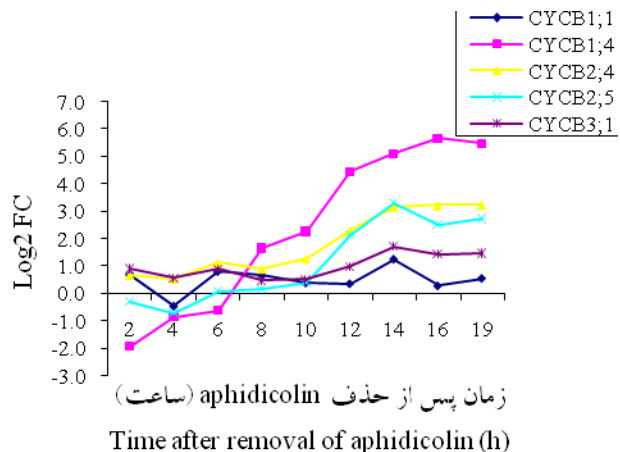
(b) ب



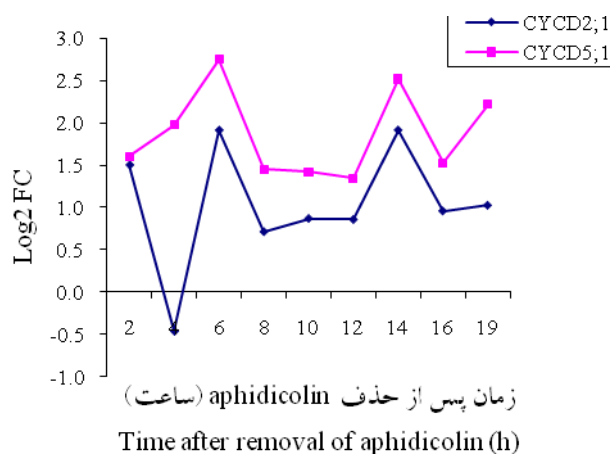
(a) الف



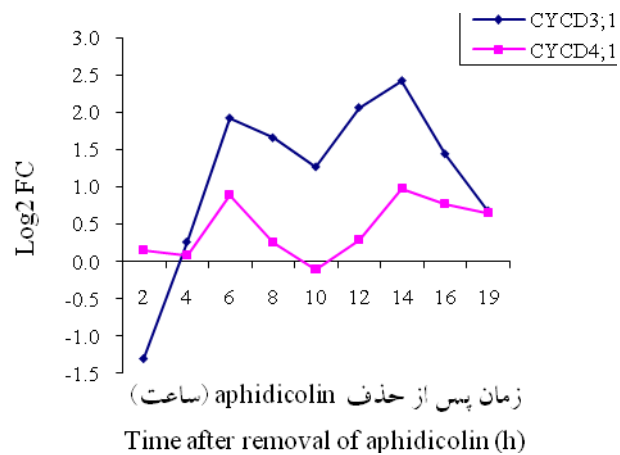
(d) د



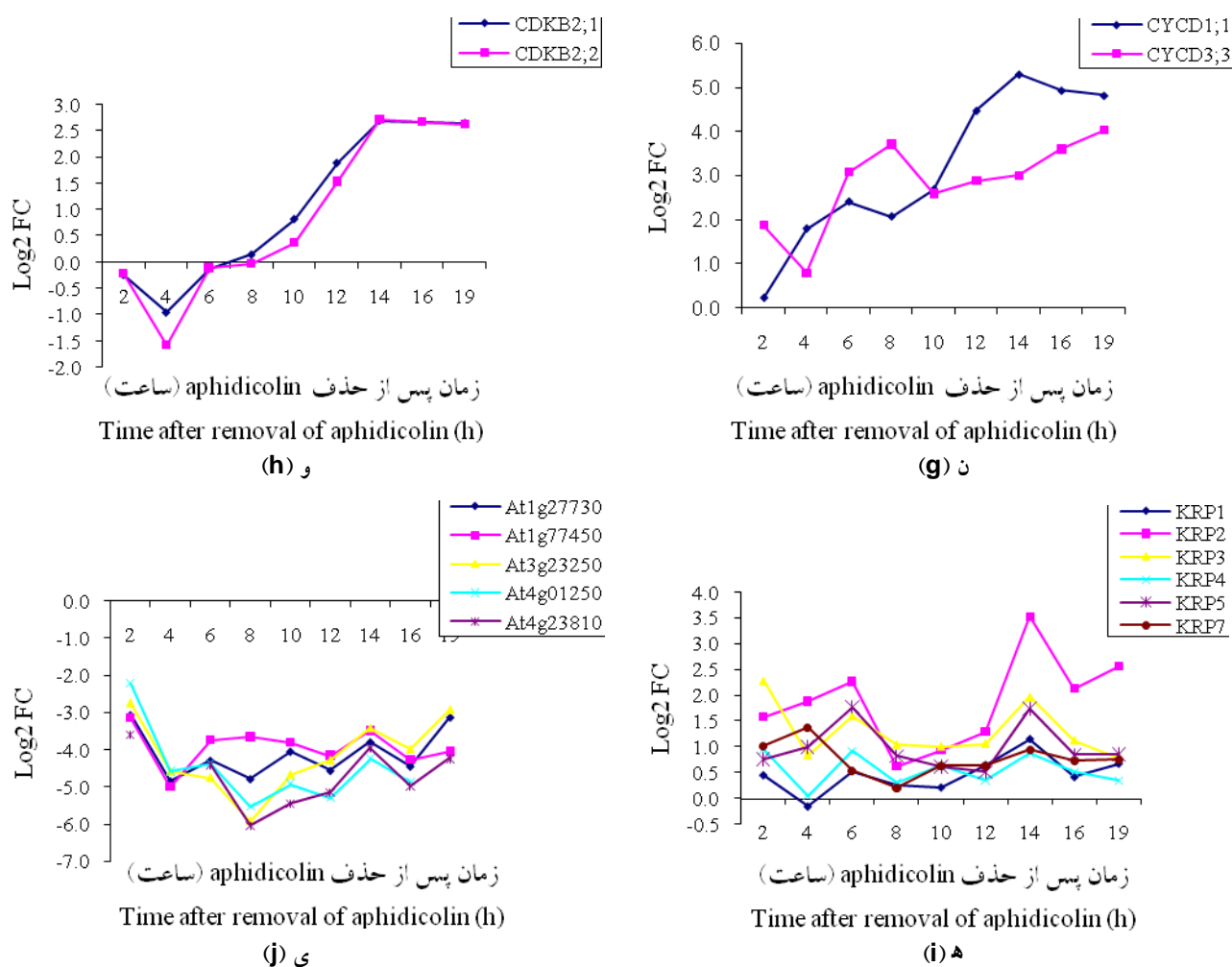
(c) ج



(f) ر



(e) ذ



شکل ۴- الگوی تغییر بیان تعدادی از ژن‌های تنظیم کننده چرخه سلولی در سلول‌های همزمان شده آراییدوپسیس در زمان‌های مختلف پس از حذف aphidicolin. نسبت سطح تظاهر در زمان T0 (FC) (بدست آمده از تکنیک qRT-PCR) محاسبه و میانگین حسابی لگاریتم در مبنای دو روی سه تکرار نشان داده شده است (Log₂ FC). الف) الگوی تظاهر ژن‌های *CYCA* (ب) الگوی بیان ژن‌های *CYCA3;2* و *CYCA3;1* (ج) الگوی بیان ژن‌های *CYCB* (د) الگوی بیان ژن‌های *CYCD6;1* و *CYCD3;2* (ذ) الگوی بیان ژن‌های *CYCD4;1* و *CYCD3;1* (ر) الگوی بیان ژن‌های *CYCD5;1* و *CYCD2;1* (ن) الگوی بیان ژن‌های *CYCD3;3* و *CYCD1;1* (و) الگوی بیان ژن‌های *CDKB2;2* و *CDKB2;1* (ه) الگوی بیان ژن‌های *KRP* (ی) الگوی بیان چند عامل رونویسی موثر در چرخه سلولی

Fig. 4. Several cell cycle-regulated gene expression patterns in aphidicolin-induced synchrony. The fold change values for each sample relative to time zero as control were log₂ transformed. The mean values for the three independent biological replications were plotted as Log₂FC. a) Expression pattern of *CYCA* genes. b) Expression pattern of *CYCA3;2* and *CYCA3;1*. c) Expression pattern of *CYCB* genes. d) Expression pattern of *CYCD6;1* and *CYCD3;2*. e) Expression pattern of *CYCD4;1* and *CYCD3;1*. f) Expression pattern of *CYCD2;1* and *CYCD5;1*. g) Expression pattern of *CYCD3;3* and *CYCD1;1*. h) Expression pattern of *CDKB2;1* and *CDKB2;2*. i) Expression pattern of *KRP* genes. j) Expression pattern of several cell cycle- related transcription factors

Bernd Mueller-Roeber در موسسه تحقیقات فیزیولوژی مولکولی گیاهی ماکس پلانک آلمان انجام شد که بدین وسیله از حمایت‌های علمی و مالی ایشان تشکر و قدردانی می‌شود. از دکتر Armin Schlereth از موسسه ماکس پلانک جهت برنامه‌ریزی ربات برای انجام واکنش‌های PCR و دکتر Aleksandra Skirycz از دانشگاه Gent بلژیک جهت اندازه‌گیری همزمانی کشت سوسپانسیون سلولی آراییدوپسیس بوسیله فلوسیتومتر سپاسگزاری می‌شود. از وزارت علوم، تحقیقات و فناوری جهت همکاری‌های همه‌جانبه سپاسگزاری می‌شود.

این ژن‌ها در فرآیندهای رشد و نمو صورت گرفته است که به چند مورد از آنها اشاره گردید. سالیان متمادی است که فرآیندهای رشدی به ژن‌ها منتسب شده‌اند، لیکن نحوه اثر این ژن‌ها که از طریق مراحل مختلف چرخه سلولی نقش خود را ایفا می‌کنند از جمله مواردی است که نقاط کلیدی مبهم موجود در شناسایی فرآیندهای رشد و نمو را برجسته‌تر می‌سازد. برای شناسایی تأثیر این ژن‌ها روی رشد و نمو از طریق کنترل مراحل مختلف چرخه سلولی، تحقیقات بیشتری لازم می‌باشد.

سپاسگزاری

این آزمایش در گروه تحقیقاتی پروفیسور

References

- Autran, D., C. Jonak, K. Belcram, T. S. Beeaster, G. Kronenberger, O. Grandjean, D. Inzé and J. Traas. 2002.** Cell numbers and leaf development in *Arabidopsis*: a functional analysis of the *STRUWELPETER* gene. The EMBO 21: 6036-6049.
- Boniotti, M. and M. E. Griffith. 2002.** Cross-talk between cell division cycle and development in plants. The Plant Cell 14: 11-16.
- De Veylder, L., J. Joubès and D. Inzé. 2003.** Plant cell cycle transitions. Current Opinion in Plant Biol. 6: 536-543.
- Dewitte, W., C. Riou-Khamlichi, S. Scofield, J. M. Healy, A. Jacquard, N. J. Kilby and J. A. H. Murray. 2003.** Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin *CYCD3*. The Plant Cell 15: 79-92.
- Fuerst, R. A. U. A., R. Soni, J. A. H. Murray and K. Lindsey. 1996.** Modulation of cyclin transcript levels in cultured cells of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 112: 1023-1033.
- Inzé, D. 2007.** Cell cycle control and plant development. Blackwell Publishing Ltd, UK. 364 PP.
- Ito, M., S. Araki, S. Matsunaga, T. Itoh, R. Nishihama, Y. Machida, J. H. Doonan, and A. Watanabe. 2001.** G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. The Plant Cell 13: 1891-1905.
- Kim, Y. S., S. G. Kim, J. E. Park, H. Y. Park, M. H. Lim, N. H. Chua and C. M. Park. 2006.** A membrane bound NAC transcription factor regulates cell division in *Arabidopsis*. The Plant Cell 18: 3132-3144.
- Marsch- Martinez, N., R. D. Greco, J. Becker, S. H. W. Dixit, J. Bergervoet, A. Karaba, S. De Folter and A. Pereira. 2006.** *BOLITA*, an *Arabidopsis* AP2/ERF – like transcription factor that affects cell expansion and proliferation/differentiation pathways. Plant Mol. Biol. 62: 825-843.

منابع مورد استفاده

- Mattsson, J., W. Ckurshumova and T. Berleth. 2003.** Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiol.* 131: 1327–1339.
- Menges, M. and J. A. H. Murray. 2002.** Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant J.* 30: 203-212.
- Menges, M., L. Hennig, W. Gruissem, and J. A. H. Murray. 2003.** Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol. Biol.* 53: 423-442.
- Menges, M., S. M. De Gager, W. Gruissem, and J. A. H. Murray. 2005.** Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *The Plant J.* 41: 546-566.
- Menges, M., A. K. Samland, S. Planchais and J. A. H. Murray. 2006.** The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 893-906.
- Okanami, M., T. Meshi, H. Tamai, and M. Iwabuchi. 1996.** *HALF-1*, a bZIP- type protein, interacting with the wheat transcription factor *HBP-1a* contains a novel transcriptional activation domain. *Genes to Cells* 1: 87-99.
- Oyama, T., Y. Shimura and K. Okada. 1997.** The *Arabidopsis* *HY5* gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes and Develop.* 11: 2983-2995.
- Planchais, S., N. Glab, D. Inzé and C. Bergounioux. 2000.** Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. *FEBS Lett.* 476: 78-83.
- Riou-Khamlichi, C., M. Menges, J. M. Healy and J. A. H. Murray. 2000.** Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell Biol.* 20: 4513-4521.
- Shin, R., A. Y. Burch, K. A Huppert, S. B Tiwari, A. S. Murphy, T. J. Guilfoyle and D. P. Schachtman. 2007.** The *Arabidopsis* transcription factor *MYB77* modulates auxin signal transduction. *The Plant Cell* 19: 2440-2453.
- Skirycz, A., S. Jozefczuk, M. Stobiecki, D. Muth, M.I. Zanor, I. Witt, and B. Mueller-Roeber. 2007.** Transcription factor *AtDOF;2* affects phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 175: 425-438.
- Tapia-López, R., B. García-Ponce, J. G. Dubrovsky, A. Garay Arroyo, R. V. Pérez-Ruíz, S. Kim, F. Acevedo, S. Pelaz and E.R. Alvarez-Buylla. 2008.** An *AGAMOUS*-related MADS-box gene, *XAL1* (*AGL12*), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol. Prev.* 107 PP.
- Tate, S. and P. K. Ferrigno. 2005.** Cell cycle: synchronization at various stages. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-5.
- Ulmasov, T., G. Hagen and T.J. Guilfoyle. 1997.** *ARF1*, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276: 1865-1868.
- Vandepoele, K., J. Raes, L. De Veylder, P. Rouzé, S. Rombauts and D. Inzé. 2002.** Genome- wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 903-916.

Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*

Dehghan Nayyari, F.¹, H. Alizadeh², M. R. Naghavi³, S. A. Mohammadi⁴ and M. Soltani-Najaf-Abadi⁵

ABSTRACT

Dehghan Nayyari, F., H. Alizadeh, M. R. Naghavi, S. A. Mohammadi and M. Soltani-Najafabadi. 2010. Expression patterns of cell cycle-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 12 (3) 346-363.

(In Persian)

Cell cycle, which is the basic reference for cell division and growth, is precisely regulated. Control of cell cycle progression in animal and plants needs regulation of gene expression. In this study, by means of inducing synchronization of *Arabidopsis* suspension cells using aphidicolin, trend of expression changes in several genes involving in different stages and biochemical pathways of cell cycle was investigated. Application of highly sensitive detection method, qRT-PCR enabled us to precisely monitor the behavior of the genes in different stages of the cell cycle. Expression patterns of 69 core cell cycle-related genes and 81 transcription factors were compared, and their possible roles in the specific stages of the cell cycle were analysed. Among the genes showing differential expression during progression of the cell cycle, cyclin type A and B and *CDK* have been reported to play key roles. The expression patterns of most of cyclin type A and B genes appeared to be similar. A subset of the cyclins, *CYCA3* showed maximum expression in S phase which is considered as the most important kinases involved in this phase. *CDK* genes showed important role in G1/S and G2/M transition stages. Many transcription factors belonging to different transcription factor families showed fluctuations in different time of progression of the cell cycle that play significant role in the precise control of the cell cycle processes.

Keywords: *Arabidopsis* cell suspension, Gene expression, Cell cycle, Core cell cycle genes and Transcription factors.

Received: October, 2009 Accepted: December, 2010

1- Ph.D. student, The University of Tehran, Karaj, Iran (Corresponding author) (Email: fatemeh-dn@yahoo.com)

2- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

3- Associate Prof., The University of Tehran, Karaj, Iran

4- Associate Prof., The University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- Assistant Prof., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran