دو فصلنامه علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2018.110330.1255
جلد ۲۶، شماره ۱، صفحه ۲۲-۱۲ (۱۳۹۷)

جداسازی و مطالعه بیوانفورماتیکی ژن عامل رونویسی TbJAMYC دخیل در بیوسنتز تاکسول از سرخدار گونه ایرانی

داود جعفری[۱] و فاطمه دهقان نیری[۲*]

۱- دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی پزشکی، گروه بیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی، قزوین

پست الکترونیک: nayeri@alumni.ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۲۵

چکیده

داروی ضد سرطان تاکسول یا پاکلی‌تاکسل از متابولیت‌های بیوسنتز شده در سرخدار (*Taxus bacatta*) است. تاکسول یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین داروهای ضد سرطان در درمان سرطان ریه است که با جلوگیری از پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها مانع از تقسیم سلولی در بافت‌های سرطانی می‌شود. عامل رونویسی JAMYC از خانواده MYC دارای موتیف متصل‌شونده به DNA به‌نام bHLH می‌باشد که در سایر گونه‌های سرخدار شناسایی شده است. هدف از این تحقیق جداسازی و همسانه‌سازی ژن عامل رونویسی *TbJAMYC* برای اولین بار و تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیکی آن است. در ابتدا برای به‌دست آوردن گیاهچه‌های این گیاه رویان از دانه-های این گیاه خارج و در محیط کشت MS حاوی زغال فعال و اسیداسکوربیک کشت شد. از RNA استخراج شده با کیفیت و کمیت خوب cDNA سنتز شد. ژن عامل رونویسی *TbJAMYC* به‌وسیله PCR از cDNA و آغازگرهای اختصاصی این ژن تکثیر شد. قطعه تکثیر شده در ناقل همسانه‌سازی pTG 19 به‌روش TA کلونینگ همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. خانواده پروتئینی و دمین‌های پروتئین TbJAMYC به‌وسیله نرم‌افزار Pfam تعیین شدند. همچنین به‌وسیله نرم‌افزار Modeller ساختار سه بعدی دمین‌های متصل شونده به DNA این پروتئین تجزیه‌وتحلیل و مدل‌سازی شد. این تجزیه‌وتحلیل‌ها نشان دادند که پروتئین TbJAMYC جزء عوامل رونویسی MYC حاوی دمین bHLH برای اتصال به DNA و تنظیم بیان ژن‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌وتحلیل بیوانفورماتیکی، تاکسول، bHLH، سرخدار، عامل رونویسی MYC.

مقدمه

درخت سرخدار با نام علمی *Taxus sp.* یکی از سوزنی-برگان متعلق به خانواده Taxaceae است. سرخدار درختی است سایه‌پسند که به‌صورت مخلوط با سایر گونه‌های جنگلی، در اشکوب زیرین جنگل‌های مرطوب نواحی مدیترانه‌ای و برخی نقاط آسیا مثل شمال ایران یافت می‌شود. ارزش دارویی سرخدار به‌دلیل وجود ماده پاکلی‌تاکسل (Paclitaxel) با نام تجاری تاکسول (Taxol) در برگ‌های سوزنی آن است. با وجود ابداع روش‌های مصنوعی برای تولید تاکسول، هنوز استخراج از منبع گیاهی اهمیت و جایگاه خود را در تأمین این داروی ارزشمند حفظ کرده است (Hartzell, 1991). تاکسول در سال ۱۹۷۷ برای درمان سرطان رحم و سرطان پستان

توسط سازمان مدیریت غذا و دارو (USFDA) مورد تأیید قرار گرفت (Nims *et al.*, 2009). تاکسول با متوقف کردن چرخه سلولی در مراحل M یا G1 عمل خود را انجام می‌دهد. همچنین به‌دلیل یک سازوکار فعالیت خاص در مقایسه با سایر مواد ضدسرطان دارای کمترین عوارض جانبی می‌باشد (Arnal & Wade 1995). فعالیت ضدتوموری تاکسول عمدتا به‌دلیل وجود زنجیره جانبی، حلقه A، گروه بنزوییل C2 و حلقه اوکستان می‌باشد. فعالیت ضدسرطانی تاکسول توسط گروه آمیداسیل C3 در زنجیره C13 حفظ شده و توسط گروه هیدروکسیل در زنجیره C2 افزایش پیدا می‌کند (He *et al.*, 2000). تاکسول می‌تواند به توبولین‌های محلول در سیتوپلاسم و توبولین‌های موجود در ساختار میکروتوبول‌ها متصل گردد. جایگاه اتصال آن در سطح داخلی میکروتوبول و روی β-توبولین قرار دارد. اتصال تاکسول به این جایگاه از هیدرولیز GTP به GDP و از واسرشتگی (دپلیمریزاسیون) میکروتوبول-ها جلوگیری می‌کند. همچنین با اتصال تاکسول به این جایگاه سرعت پلیمریزاسیون میکروتوبول‌ها نیز افزایش می‌یابد. نتیجه عمل تاکسول مهار شدن پویایی میکروتوبول‌ها و مختل شدن وظایف سلولی آن است که مهمترین آنها ایجاد ناهنجاری در تقسیم سلول است. این ناهنجاری‌های به‌وجود آمده در سلول باعث فعال‌شدن فرایند آپوپتوز در سلول می‌گردد (Francis *et al.*, 1995). امروز از تاکسول برای درمان سرطان‌های متاستازیک تخمدان، پستان و سرطان سلول غیر کوچک ریه (Bourgaud *et al.*, 2001Giri & Narasu 2000) و درمان کاپوزی سارکوم وابسته به ایدز استفاده می‌شود (Gill *et al.*, 1999). مقدار تاکسول در گونه‌های مختلف گیاه سرخدار متفاوت می‌باشد. در گونه *Taxus globosa* مقدار آن کمتر از ۰/۰۰۱۳ تا ۰/۰۰۸۲ درصد وزن خشک پوست می‌باشد (Soto *et al.*, 2000). در حالی‌که گونه *Taxus brevifolia* مقدار بیشتری در حدود ۰/۰۱ تا ۰/۰۳ درصد (Hartzell, 1991) و گونه *T. Cuspidata* به‌مقدار ۰/۰۲۲ تا ۰/۰۳۵ درصد را در شاخه‌های جوان و برگ‌های سوزنی خود تولید می‌کند (Fett-Neto *et al.*, 1994). امروزه منبع اصلی تأمین پاکلی‌تاکسل روش نیمه سنتزی از پیش‌سازهای ماده تاکسول استخراج شده از برگ‌های سوزنی درخت سرخدار و کشت سوسپانسیون سلولی گیاه سرخدار است (Vongpaseuth & Kolewe *et al.*, 2008Robert, 2007). مسیر بیوسنتزی پاکلی‌تاکسل به‌صورت کامل شناخته نشده است (Nims *et al.*, 2009Croteau *et al.*, 2006) ولی شناسایی چند مرحله ناشناخته از مسیر بیوسنتزی پاکلی‌تاکسل و عوامل تنظیم‌کننده و مؤثر در این مسیر امری ضروری برای گسترش تحقیقات علمی در مورد این ماده با ارزش می‌باشد. عامل رونویسی AtMYC2 در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) عامل تنظیمی طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاه به متیل‌جاسمونات می‌باشد (Dombrecht *et al.*, 2007) . عامل رونویسی مشابه با نام *TcJAMYC* در گیاه *Taxus cuspidate* شناسایی شده است که دارای تشابه در توالی و در فعالیت با *AtMYC2* است. عامل رونویسی *TcJAMYC* از خانواده عوامل رونویسی bHLH است و باعث فعال شدن پروموتر ۵ ژن دخیل در مسیر بیوسنتزی تاکسول می‌شود (Nims *et al.*, 2009). عوامل رونویسی bHLH به موتیف‌های E-Box در ناحیه پروموتر متصل شده و در پاسخ به الیسیتور متیل-جاسمونات باعث افزایش رونویسی ژن‌های پایین‌دست خود می‌شوند (Qian *et al.*, 2007). موتیف‌های E-Box در گیاهان دیگر در پروموتر ژن‌های درگیر در دفاع گیاه شناسایی شده است (Kim *et al.*, 1992). هدف از انجام این تحقیق، شناسایی همولوگ عامل رونویسی TcJAMYC در سرخدار ایرانی (*Taxus baccata*) و بررسی بیوانفورماتیکی آن است.

مواد و روش‌ها

کشت گیاه و نجات جنین

دانه گیاه سرخدار گونه *baccata* از پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شد. دانه‌ها با الکل ۷۰ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه، هیپوکلریدسدیم به‌مدت ۱۵ دقیقه و سه بار شستشو ضدعفونی سطحی شدند. برای به‌دست آوردن گیاهچه از روش نجات جنین استفاده شد. به‌دلیل وجود بازدارنده‌های رشد در اندوسپرم، دانه‌های سرخدار به‌شدت در جوانه‌زنی ضعیف هستند. بنابراین با استفاده از

اسکالپل و پنس در یک پتری‌دیش استریل رویان از دانه جدا شد و بلافاصله در محیط MS حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم اسیدآسکوربیک و ۰/۵ درصد زغال فعال کشت شد. پس از ۵-۴ هفته گیاهچه‌های رشد کرده به‌عنوان نمونه برای استخراج RNA استفاده شدند.

استخراج RNA

از آنجایی‌که سرخدار جزء سوزنی‌برگان و بسیار پلی‌فنلیک است استخراج RNA از آن نسبت به گیاهان علفی با مشکلات زیادی مواجه است و کیت‌های تجاری مورد استفاده برای استخراج RNA از گیاهان در مورد این گیاه کارایی ندارند. از این‌رو با آزمون چندین روش و پروتکل برای گیاهان مختلف، از روش لیتیم‌کلراید تغییر یافته استفاده شد. این روش بسیار آسان و قابل انجام در هر آزمایشگاهی است و مقادیر RNA استخراج شده با آن از لحاظ کیفیت و کمیت در حد بالایی می‌باشد. بافرهای مورد استفاده در این روش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- بافرها و محلول‌های استفاده شده در استخراج RNA

بافر	ترکیبات موجود
بافر A (استخراج)	% DEPC۰,۱ ،mM Tris-HCl۱۰۰ ،M NaCl۲ ،mM EDTA۲۵ ،% PVP۳ ،% CTAB۳
محلول D (شستشو)	% DEPC۰,۱ ،% SDS۰,۵
بافر C (رسوب)	% DEPC۰,۱ ،M LiCl۱۰
محلول B	(V/V) Chloroform: Isoamyl alcohol۲۴:۱

به‌منظور حذف *RNase* همه مواد ترکیبی با محلول ۰/۱ درصد DEPC تهیه و بعد از آن دوبار اتوکلاو شدند. همه تیوب‌ها و سرسمپلرهای مورد استفاده در آب حاوی ۰/۱ درصد DEPC به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و بعد از آن دوبار اتوکلاو شدند. برای استخراج RNA ابتدا بافت گیاه در نیتروژن مایع داخل یک هاون به‌صورت کامل و به اندازه بسیار ریز پودر شد. سپس مقدار ۳۰۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده به تیوب ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر بافر استخراج از قبل گرم شده انتقال داده شد و به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هر دو دقیقه تیوب چند بار سر و ته شد. مقدار ۷۰۰ میکرولیتر کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل به‌محلول اضافه شد، به آرامی به‌مدت چند دقیقه سر و ته شد و بعد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. مایع رویی به تیوب سرد شده روی یخ منتقل شد و دوباره طبق مراحل قبل با کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل سانتریفیوژ شد. پس از انتقال مایع رویی به تیوب سرد، یک چهارم حجم بافر C به آن اضافه و به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. RNA کل با سانتریفیوژ کردن در ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور رسوب داده شد. مایع رویی حذف و رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر بافر D حل شد. در این مرحله پس از افزودن کلروفرم- ایزوآمیل‌الکل طبق مراحل قبل سانتریفیوژ انجام شد و مایع رویی به تیوب سرد منتقل شد. دو حجم ایزوپروپانول سرد اضافه و به‌مدت ۲ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌وسیله سانتریفیوژ ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه RNA رسوب داده شد. رسوب RNA بعد از خشک‌شدن در ۳۰ میکرولیتر آب دیونیزه تیمار شده با DEPC ۰/۱ درصد حل شد.

سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت Premix سنتز cDNA شرکت EURX که توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی تهیه شده بود انجام شد. مراحل انجام کار طبق پروتکل شرکت سازنده کیت انجام شد.

تکثیر ژن و همسانه‌سازی

برای تهیه پرایمر از ژن *TcJAMYC* با شماره دسترسی FJ608574 در پایگاه NCBI استفاده شد. از cDNA سنتز شده به‌عنوان الگو در واکنش PCR استفاده شد. برنامه دمایی PCR به‌صورت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۶۴ درجه سانتی‌گراد، ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌تعداد ۳۵ چرخه تکرار شد و در نهایت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه برای گسترش نهایی استفاده شد. قطعه تکثیر شده با کیت خالص‌ساز Expin Combo شرکت Genall از کشور کره جنوبی طبق پروتکل شرکت سازنده از ژل جداسازی و خالص‌سازی شد. قطعه تکثیر شده بعد از خالص‌سازی از لحاظ کمیت و کیفیت توسط اسپکتروفوتومتر بررسی و غلظت‌سنجی شد. واکنش اتصال با نسبت ۳ به ۱ (قطعه به وکتور) انجام شد و قطعه در پلاسمید pTG همسانه‌سازی شد. پلاسمید تراریخته به‌روش شوک حرارتی به باکتری‌های مستعدشده *E. coli* سویه *DH5α* انتقال داده شد. کلنی‌های تراریخت در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انتخاب شدند. پلاسمید به‌روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱) استخراج شد و آزمایش کلنی PCR و هضم آنزیمی انجام گردید. همچنین برای توالی‌یابی با آغازگرهای اختصاصی پلاسمید به شرکت پیشگام بیوتکنولوژی ارسال شد.

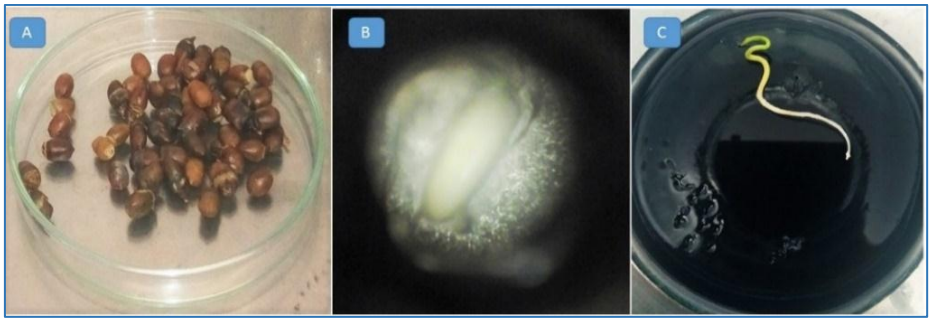
تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی

تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی با هدف تعیین ماهیت و خانواده پروتئین کد شده توسط این ژن انجام شد. در تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی از دو نرم‌افزار MODELLER و Pfam استفاده شد. نرم‌افزار Pfam دمین های مختلف پروتئین را پیش‌بینی می‌کند و نرم‌افزار MODELLER برای مدل‌سازی همولوژی ساختار سه بعدی دمین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

کشت گیاه و نجات جنین سرخدار

رویان‌های جدا شده از دانه سرخدار در محیط کشت قرار داده شدند. پس از ۱۴ روز گیاهچه‌های نوظهور از رویان‌ها رشد کرده و قابل مشاهده شدند (شکل ۱).



شکل ۱- گیاه کشت شده سرخدار به‌روش نجات جنین. A: دانه‌های ضدعفونی شده سرخدار، B: عکس میکروسکوپی رویان استخراج شده از دانه سرخدار و C: رویان رشد کرده پس از ۴ هفته در محیط کشت

استخراج RNA و سنتز cDNA

RNA استخراج شده از گیاهچه‌ها با استفاده از پروتکل تغییر یافته نشان‌دهنده کیفیت و کمیت بسیار خوب آن برای سنتز cDNA بود. اصولا در هنگام استخراج RNA مقداری

آلودگی DNA نیز وجود داشت که با تیمار توسط آنزیم *DNase* برطرف شد (شکل ۲).

شکل ۲- **RNA** استخراج شده از گیاهچه‌های سرخدار

شکل ۳- تکثیر ژن ***TbJAMYC*** به‌وسیله **PCR** از **cDNA** کل. شماره‌های ۱ تا ۴ باند ۲ کیلوبازی ژن را نشان می‌دهند که در دماهای مختلف ذوب تکثیر شده‌اند. **L**: خط‌کش مولکولی ۱ کیلوباز.

تکثیر ژن از cDNA به‌وسیله PCR

برای تکثیر ژن *TcJAMYC* از گیاه سرخدار از آغازگرهای رفت و برگشت این ژن استفاده شد و طبق انتظار قطعه‌ای در حدود ۲ کیلو جفت باز تکثیر شد (شکل ۳). دمای بهینه برای تکثیر این ژن ۶۴ درجه سانتی‌گراد (شکل ۲) بود.

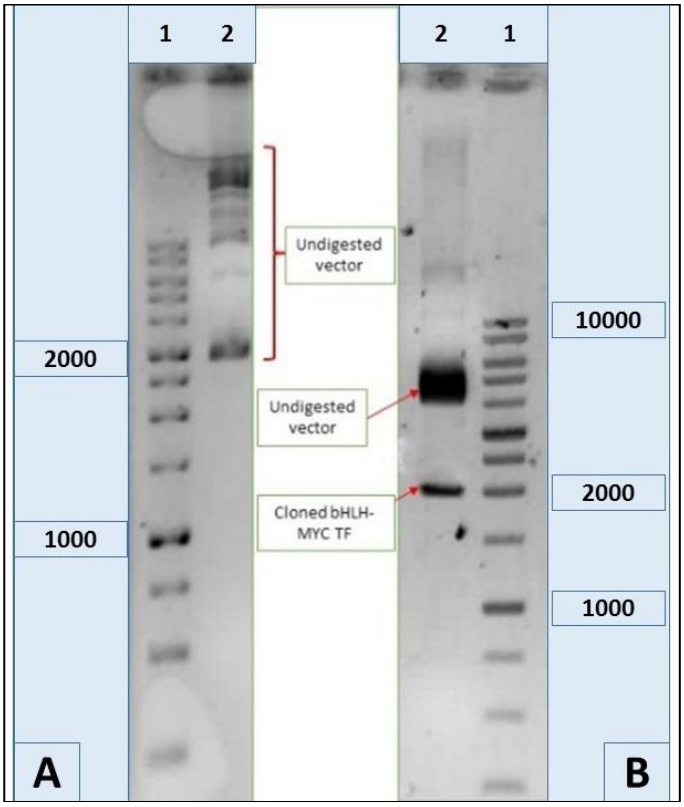
همسانه‌سازی قطعه تکثیر شده در پلاسمید pTG19

قطعه تکثیر شده به‌روش TA کلونینگ در پلاسمید PTG همسانه شد. پس از استخراج پلاسمید نوترکیب از کلنی‌های تراریخته (شکل ۴-A) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن اقدام به تکثیر قطعه شد. کلنی‌های مثبت از نظر تکثیر قطعه با PCR توسط اندونوکلئاز *Bam*H1 که سایت برشی آن در دو انتهای قطعه همسانه‌سازی شده و در داخل پلاسمید قرار دارد هضم شدند و قطعه ۲ کیلوبازی از پلاسمید خارج شد (شکل ۴-B). بعد از اطمینان از همسانه‌شدن این ژن داخل پلاسمید، از کلنی-های مثبت، پلاسمید استخراج و خالص‌سازی شد و برای توالی‌یابی توسط شرکت پیشگام بیوتکنولوژی به‌شرکت ماکروژن کره فرستاده شد. نتیجه توالی‌یابی بیش از ۹۹ درصد تشابه با ژن *TcJAMYC* را نشان داد. ژن جداسازی شده از سرخدار ایرانی (*Taxus baccata*) به‌صورت *TbJAMYC* نامگذاری و توسط BankIt در پایگاه NCBI به‌شماره دسترسی KY002060 در بانک ژنی (GenBank) ثبت شد.

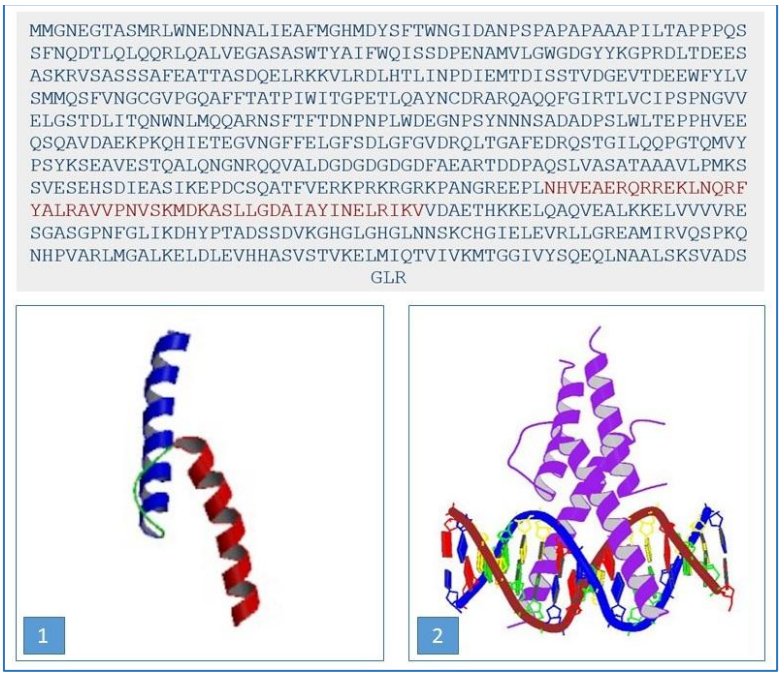
تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی

تجزیه‌وتحلیل به‌وسیله نرم‌افزار MODELLER

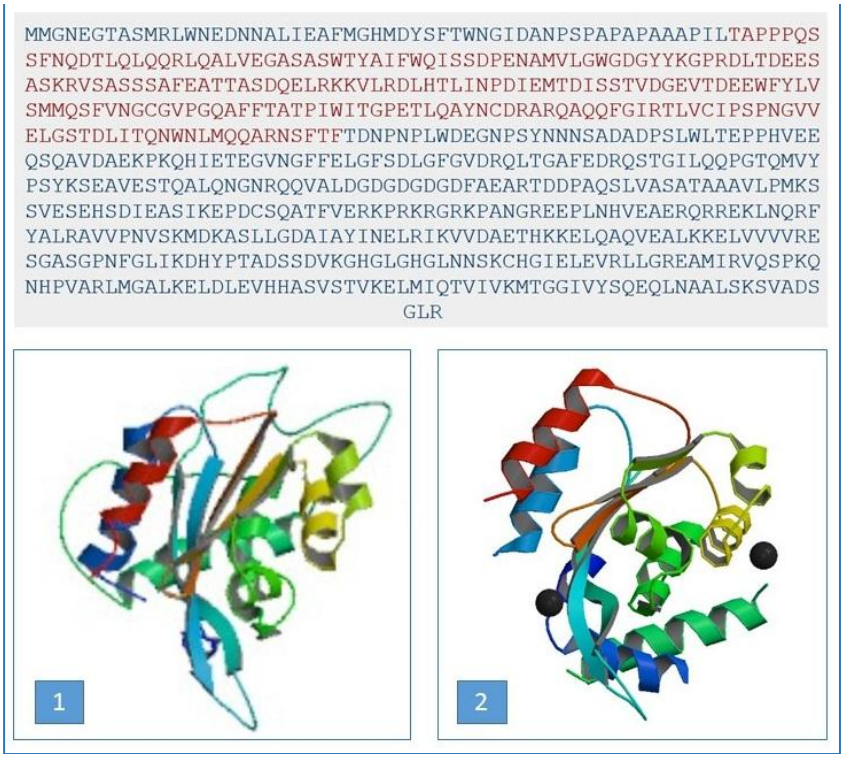
ساختار دو دمین به‌وسیله تجزیه‌وتحلیل‌های ساختار سوم دمین‌های مختلف عامل رونویسی TcJAMYC با نرم‌افزار MODELLER شناسایی شدند. یک دمین متصل شونده به DNA به‌نام HLH و دمین دیگر دمین متصل شونده به JAZ در عوامل رونویسی MYC است.



شکل ۴- همسانه‌سازی ژن TbJAMYC. A: پلاسمید نوترکیب pTG-TbJAMYC، B: پلاسمید نوترکیب pTG-TbJAMYC هضم شده توسط آنزیم BamHI و قطعه خارج شده به اندازه ۲ کیلوباز از داخل آن.

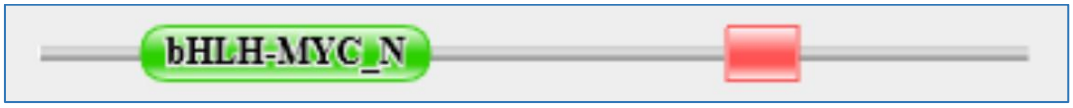


شکل ۵- ساختار دمین HLH. ۱: ساختار دمین HLH مدل‌سازی شده توسط MODELLER و ۲: مدل سه بعدی دمین HLH که از پایگاه PDB گرفته شده است.



شکل ۶- ساختار دمین متصل شونده به JAZ عوامل رونویسی MYC. ۱: ساختار سه بعدی bHLH مدل‌سازی شده با MODELLER و ۲: ساختار سه بعدی bHLH که از پایگاه PDB گرفته شده است.

تجزیه‌وتحلیل به‌وسیله نرم‌افزار Pfam



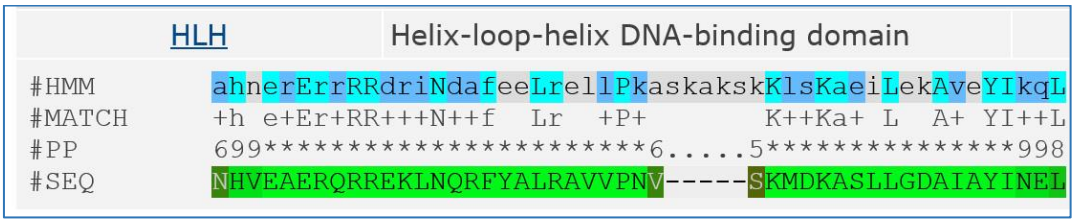
شکل ۷- موقعیت دمین‌های متصل شونده به DNA عامل رونویسی TbJAMYC حاصل از نرم‌افزار Pfam. جعبه قرمز رنگ در انتهای C پروتئین نشان‌دهنده دمین HLH و جعبه سبز رنگ در قسمت N پروتئین نشان‌دهنده bHLH-MYC می‌باشد.

نرم‌افزار Pfam دمین‌ها و خانواده‌های پروتئینی را توسط الگوریتم مدل مخفی مارکوف (HMM) پیش‌بینی و خانواده پروتئینی حاوی این دمین‌ها را معرفی می‌کند. طبق انتظار و با توجه به مدل‌سازی به‌وسیله نرم‌افزار MODELLER این نزم‌افزار نیز دو دمین را در این عامل رونویسی پیش‌بینی کرد (شکل ۸). دمین اول مربوط به دمین متصل شونده به JAZ در خانواده عوامل رونویسی bHLH-MYC و R2R3-MYB و دمین دوم، دمین اتصال به DNA در بسیاری از عوامل رونویسی می‌باشد (شکل ۸).

در شکل ۹ به‌عنوان نمونه جعبه همردیفی دمین HLH با پیش فرض نرم‌افزار توسط مدل مخفی مارکوف آورده شده است. قسمت Match اسیدهای‌آمینه همردیف و یکسان بین دمین HLH این عامل رونویسی و توالی استاندارد و توافقی دمین HLH را نشان می‌دهد.

Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value	Predicted active sites	Show/hide alignment
				Start	End	Start	End	From	To					
bHLH-MYC_N	bHLH-MYC and R2R3-MYB transcription fact ...	Family	n/a	69	262	69	262	1	175	175	192.4	6.4e-57	n/a	Show
HLH	Helix-loop-helix DNA-binding domain	Domain	n/a	463	510	464	509	4	54	55	39.0	5.4e-10	n/a	Show

شکل ۸- دمین‌های پیش‌بینی شده برای عامل رونویسی **TcJAMYC** به‌وسیله برنامه **Pfam**



شکل ۹- همردیفی دمین **HLH** عامل رونویسی **TcJAMYC** با توالی استاندارد دمین **HLH** در برنامه **Pfam** توسط مدل مخفی مارکوف

بحث

سرخدار منبع بسیار مهم داروی ضد سرطان است. تاکنون هیچ روشی برای سنتز آزمایشگاهی کامل این دارو توسط دانشمندان و محققان گزارش نشده است. البته پیش-سازهای مهم ضدسرطان دیگری نیز در این گیاه وجود دارند اما مهمترین آنها تاکسول یا پاکلی‌تاکسل است. وجود داروی با ارزشی به‌نام تاکسول در این گیاه تهدیدی برای آن است، زیرا به‌دلیل قطع بی‌رویه درخت سرخدار برای به‌دست آوردن و استخراج تاکسول، این گیاه در حال انقراض می-باشد. بنابراین بررسی مسیرهای بیوسنتزی تاکسول به‌منظور دستکاری ژنتیکی سرخدار و سایر موجودات به‌عنوان کارخانه‌های بیولوژیکی برای تولید بیشتر این ماده امری ضروری است تا علاوه بر جلوگیری از تهدید بقای این گونه، نیاز بازار به این دارو نیز برطرف شود. یکی از گزینه‌های موجود برای مهندسی متابولیت‌ها دستکاری عوامل رونویسی کنترل‌کننده مسیر بیوسنتزی است. در این رابطه TcJAMYC از گیاه سرخدار گونه کاسپیداتا به‌عنوان عامل رونویسی تنظیم‌کننده بیش از ۵ ژن در مسیر بیوسنتزی تاکسول در این گونه معرفی شده است (Nims *et al.*, 2009). مطالعات زیادی تاکنون در مورد عوامل رونویسی bHLH انجام شده است. در سال ۱۹۸۹ مور، مک‌کاو و بالتیمور بخشی را در پروتئین‌های متصل‌شونده به DNA در جانوران شناسایی کردند که در تعداد مشخصی از اسیدهای‌آمینه مشترک بودند. این قسمت را دامنه یا دمین بازی مارپیچ- لوپ – مارپیچ یا bHLH نامیدند. پروتئین‌های دارای این دامنه دارای نقش-های وسیعی در تنظیم تکثیر سلولی و مسیر تمایزیابی سلولی هستند و شامل c-Myc انسانی، عامل تعیین‌کننده میوبلاست یعنی MyoD و همچنین فاکتورهای رونویسی Achaete و Scite در مگس دروزوفیلا که تعیین‌کننده مراحل اولیه رشد نورون‌ها می‌باشد. همچنین Ludwig و همکاران (۱۹۸۹) مولکول Lc تنظیم‌کننده بیوسنتز آنتوسیانین در ذرت را شناسایی کردند و نشان دادند که پروتئین پیش‌بینی شده دارای دمین bHLH است (Ludwig *et al.*, 1989). با شناسایی پروتئین Ino4 از مخمر توسط Berben و همکاران (۱۹۹۰) مشخص شد که پروتئین‌های bHLH تنظیم‌کننده-هایی هستند که در همه موجودات یوکاریوتی وجود دارند و دمین bHLH این پروتئین‌ها یک قسمت حفاظت شده در تنظیم‌کننده‌های رونویسی می‌باشد. علاوه بر آن، توالی‌یابی ژنومی و برنامه‌های EST وجود تعداد فراوان پروتئین‌های bHLH را در گونه‌های یوکاریوتی ثابت کرده است (Berben *et al.*, 1990). یک دمین bHLH دارای ۱۸ اسیدآمینه بازی هیدروفیلیک در قسمت انتهای N دمین می-

باشد که به‌دنبال دو منطقه از اسیدهای‌آمینه هیدروفوبیک دو ناحیه مارپیچ آلفا را تشکیل می‌دهد که این دو ناحیه نیز توسط یک لوپ از هم جدا شده‌اند (Heim *et al.*, 2003). مطالعات روی پروتئین‌های bHLH پستانداران نشان داده است که ساختار حفاظت شده HLH نیاز به دایمریزه شدن بین دو پروتئین bHLH دارد (Ellenberger *et al.*, 1994). همچنین دمین bHLH در بین حیوانات و گیاهان حفاظت شده است. ساختار دایمریک کمپلکس متصل‌شونده به DNA در گیاهان فقط با یک توالی حفاظت شده از اسیدهای‌آمینه تعیین می‌شود. برخی از پروتئین‌های bHLH گیاهی مطالعه شده با اتصال به DNA بیان ژن‌ها را تنظیم می‌کنند. به‌طورکلی عوامل رونویسی یوکاریوتی دارای حداقل دو دمین جدا از هم شامل دمین متصل‌شونده به DNA و دمین فعال‌کننده یا بازدارنده می‌باشند. این دو دمین با همکاری هم باعث تنظیم بیان ژن‌ها از قسمت پروموتر ژن می‌شوند. دمین‌های غیر از bHLHهای متصل‌شونده به DNA نیز شناسایی شده‌اند که برای تنظیم بیان ژن‌ها توسط پروتئین‌های bHLH مهم می‌باشند. براساس تجزیه‌وتحلیل ژنتیکی بیوسنتز آنتوسیانین در ذرت، گروهی از ژن‌های bHLH در تولید رنگیزه بنفش آنتوسیانین نقش دارند (Neuffer *et al.*, 1997). پروتئین‌های bHLH با سایر گروه‌های عوامل رونویسی در ذرت ازجمله پروتئین‌های MYB برهم‌کنش دارند و با هم باعث کنترل تولید رنگیزه در یک بافت می‌شوند. در این تحقیق ژن *TcJAMYC* از گیاهچه‌های رشد کرده حاصل از نجات رویان گیاه سرخدار گونه باکاتا جداسازی و بعد همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. نتیجه توالی‌یابی بیش از ۹۹ درصد همولوژی را با ژن *TcJAMYC* نشان داد و به‌همین دلیل در پایگاه NCBI به‌عنوان ژن جدید با نام *TbJAMYC* ثبت شد. براساس تجزیه‌وتحلیل‌های بیوانفورماتیکی انجام شده در این تحقیق مشخص شد که این ژن متعلق به خانواده عوامل رونویسی MYC است که دارای موتیف اتصال به DNA با نام bHLH می‌باشد. براساس مطالعه Nims و همکاران (۲۰۰۹) روی گونه کاسپیداتا عامل رونویسی *TcJAMYC* تنظیم‌کننده تعدادی از ژن‌های مسیر بیوسنتزی تاکسول است. بنابراین احتمالا عامل رونویسی *TbJAMYC* نیز می‌تواند نقطه مهمی در مهندسی مسیر بیوسنتزی و افزایش میزان تولید تاکسول در سرخدار ایرانی باشد.

نتیجه گیری

متأسفانه به‌دلیل برخی مشکلات زندگی مدرنیته شیوع سرطان در بین جوامع مختلف به‌ویژه کشور ما ایران رشد به‌سزایی در سال‌های اخیر داشته است. درخت سرخدار یکی از ذخائر ژنتیکی ایران است که به‌دلیل داشتن داروی گران‌بهای ضد سرطان تاکسول در خطر انقراض جدی می‌باشد. به‌دلیل اینکه هنوز موفقیت‌های اساسی در سنتز کامل یا نیمه سنتز این ماده در آزمایشگاه انجام نشده است؛ به‌طوری‌که راهبرد مهندسی ژنتیک برای دستکاری مسیر بیوسنتزی این دارو ضروری به‌نظر می‌رسد. بنابراین برای نیل به این هدف باید تک تک آنزیم‌های این مسیر شناسایی و بررسی آزمایشگاهی شوند. علاوه بر آنزیم‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی، فاکتورهای رونویسی کنترل‌کننده مسیر نیز از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار می‌باشد. در این مطالعه ژن فاکتور رونویسی TbJAMYC از گیاه سرخدار ایرانی جداسازی و توالی‌یابی شد که نشان‌دهنده ارتولوگ بودن با فاکتور رونویسی TcJAMYC در گیاه سرخدار گونه کاسپیداتا می‌باشد که در مطالعات اخیر نشان داده شد که در کنترل مسیر بیوسنتزی تاکسول دخیل است. از این‌رو پیشنهاد می‌شود تأثیر این فاکتور رونویسی در تولید تاکسول در ریشه‌های موئین این گیاه بررسی شود.

منابع مورد استفاده :

– Arnal, I. and Wade, R.H., 1995. How does taxol stabilise microtubules? Biology of the Cell, 84: 224.
– Berben, G., Legrain, M., Gilliquet V. and Hilger, F., 1990. The yeast regulatory gene PHO4 encodes a helix-loop-helix motif. Yeast, 6: 451-454.
– Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi S. and Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Science, 161: 839-851.
– Croteau, R., Ketchum, R.E., Long, R.M., Kaspera

R.and Wildung, M.R., 2006. Taxol biosynthesis and molecular genetics. Phytochemistry Reviews, 5: 75-97.
– Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk P.M., and Manners, J.M., 2007. MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. The Plant Cell, 19: 2225-2245.
– Ellenberger, T., Fass, D., Arnaud M. and Harrison, S.C., 1994. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. Genes & Development, 8: 970-980.
– Fett-Neto, A.G., Melanson, S.J., Nicholson, S.A., Pennington J.J. and DiCosmo, F., 1994. Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of Taxus cuspidata. Biotechnology and Bioengineering, 44: 967-971.
– Francis, P.A., Kris, M.G., Rigas, J.R., Grant S.C. and Miller, V.A., 1995. Paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere): active chemotherapeutic agents in lung cancer. Lung Cancer, 12: 163-172.
– Gill, P.S., Tulpule, A., Espina, B.M., Cabriales, S., Bresnahan, J., Ilaw, M., Louie, S., Gustafson, N.F., Brown M.A. and Orcutt, C., 1999. Paclitaxel is safe and effective in the treatment of advanced AIDS-related Kaposi's sarcoma. Journal of clinical Oncology, 17: 1876-1876.
– Giri, A. and Narasu, M.L., 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnology Advances, 18: 1-22.
– Hartzell, H., 1991. The Yew Tree. *Hulogosi Press*.
– He, L., Jagtap, P.G., Kingston, D.G., Shen, H.J., Orr G.A. and Horwitz, S.B., 2000. A common pharmacophore for Taxol and the epothilones based on the biological activity of a taxane molecule lacking a C-13 side chain. Biochemistry, 39: 3972-3978.
– Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar B. and Bailey, P.C., 2003. The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. Molecular Biology and Evolution, 20: 735-747.
– Kim, S.R., Choi, J.L., Costa M.A. and An, G., 1992. Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. Plant Physiology, 99: 627-631.
– Kolewe, M.E., Gaurav V. and Roberts, S.C., 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. Molecular Pharmaceutics, 5: 243-256.
– Ludwig, S.R., Habera, L.F., Dellaporta S.L. and Wessler, S.R., 1989. Lc, a member of the maize R gene family responsible for tissue-specific anthocyanin production, encodes a protein similar to transcriptional activators and contains the myc-homology region. Proceedings of the National Academy of Sciences, 86: 7092-7096.
– Neuffer, M., Coe E. and Wessler, S., 1997. Mutants of maize Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor New York, USA.
– Nims, E., Vongpaseuth, K., Roberts S.C. and Walker, E.L., 2009. TcJAMYC: A bHLH transcription factor that activates paclitaxel biosynthetic pathway genes in yew. Journal of Biological Chemistry: jbc. M109. 026195.
– Qian, W., Tan, G., Liu, H., He, S., Gao Y. and An, C., 2007. Identification of a bHLH-type G-box binding factor and its regulation activity with G-box and Box I elements of the PsCHS1 promoter. Plant cell Reports, 26: 85-93.
– Soto, M., Sanjurjo, M., González, M.T., Cruz D. and Giral, F., 2000. El tejo mexicano (*Taxus globosa* Sch.). Potencial de su aprovechamiento en taxol. CIENCIA ergo sum 7.
– Vongpaseuth, K. and Roberts, S.C., 2007. Advancements in the understanding of paclitaxel metabolism in tissue culture. Current pharmaceutical Biotechnology, 8: 219-236.

Isolation and bioinformatics study of TbJAMYC transcription factor involved in biosynthesis of Taxol from Iranian yew

D. Jafari[1], F. Dehghan Nayeri [2]*

1 - Ph.D student of medical biotechnology, Medical Biotechnology Department, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2* - Corresponding author, Assist. Prof., Faculty of Agricultural and Natural Sciences, Biotechnology Department, Imam Khumaini International University, Qazvin, I.R. Iran. Email: nayeri@alumni.ut.ac.ir,

Received: 22.04.2017 Accepted: 16.07.2017

Abstract

An anti-cancer drug called Taxol, or paclitaxel is one of the secondary metabolites of yew tree (*Taxus bacatta*). Taxol is one of the most important and most useful anticancer drugs in the treatment of lung cancer. Taxol prevents the depolymerization of microtubules and inhibits cell division in tumor tissues. JAMYC is a transcription factor from MYC family with a DNA-binding motif called bHLH. The gene involved in Taxol biosynthesis has been identified in other yew species. The aim of this study was isolation and cloning of *TbJAMYC* gene and bioinformatics analysis of its structure. Initially to obtain yew seedling, embryos were removed from seeds of the species and cultured on MS medium containing activated charcoal and ascorbic acid. Total RNA was extracted from the seedlings and cDNA was synthesized from extracted RNA. The gene of *TbJAMYC* was amplified by PCR from cDNA. Amplified fragment cloned in pTG 19 vector using TA cloning method and sequenced. Bioinformatics analysis was carried out by MODELLER and Pfam softwares. The cloning was confirmed by endonuclease digestion and sequencing. TbJAMYC bioinformatics analysis was carried out by Pfam and MODELLER softwares that revealed three-dimensional structure of the DNA binding domain. These analyzes showed that TbJAMYC protein is a member of MYC transcription factors family that binds to DNA and regulates gene expression by bHLH domain. TbJAMYC transcription factor involved in the biosynthesis of valuable anticancer Taxol drug. Hence Taxol biosynthesis pathway manipulation via genetic engineering can be a new way to increase production of the metabolite in yew plant.

Key words: bHLH, Bioinformatics analysis, MYC transcription factor, Taxol, Yew