

بررسی بیان ژنهای گیرنده نوری و ژنهای هدف مسیر پاسخ به تابش

UV-B در جلبک *Volvox carteri*

Study on the gene expression of photoreceptors and target genes of UV-B response pathway to UV-B radiation in alga *Volvox carteri*

سولماز اخطاری^۱، جعفر رازقی^{۱*}، کریم حسن پور^۲، آرش کیانیان مومنی^۳، علی موافقی^۱

Ekhtari Solmaz¹, Razeghi Jafar^{1*}, Hasanpur Karim², Kianianmomeni Arash³, Movafeghi Ali¹

۱- گروه زیست شناسی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، ۲- گروه ژنتیک و اصلاح نژاد دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

۳- گروه زیست شناسی سلولی و تکوینی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه بیله فلد، آلمان

1. Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, 2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
3. Department of Cellular and Developmental Biology of Plants, Faculty of Natural Sciences, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱)

چکیده

نور مهمترین منبع انرژی برای موجودات فتوسنتزی است. پروتئینهای گیرنده نور قادرند تا طول موجهای خاصی از نور را دریافت کرده و مسیر انتقال سیگنال را آغاز نمایند. *Volvox carteri* جلبک سبز پرسلولی ساده با داشتن ویژگیهای منحصر به فرد خود، به عنوان مدل یوکاریوتی کمتر تکامل یافته برای مطالعه تکامل و توسعه گیرندههای نوری بسیار مناسب است. در پژوهش حاضر، اثر تابش UV-B (0.056 mw.cm⁻²) بر بیان ۱۳ ژن گیرنده نوری با استفاده از دادههای RNA-Seq مورد بررسی قرار گرفت. این گیرندهها برای نظارت بر نور و سازگاری فعالیتهای فیزیولوژیکی جلبک با تغییرات محیطی مورد نیاز هستند. بر اساس نتایج بدست آمده، در شدت پایین اشعه ماوراء بنفش، بیان ژنهای گیرنده نوری در سلولهای جنسی و غیرجنسی، در مقایسه با گروههای کنترل، معنی دار نشد. با این حال، مقایسه بیان این ژنها در این دو نوع سلول نشان داد که گیرندههای نوری Phot، CRYp، ChR1-2، HKR1-4 و VOP (VR1) الگوی بیان ویژه نوع سلول را نمایش می دهند. در حالی که بیان گیرندههای نوری UVR8، CRYd1-2 و CRYa در هر دو نوع سلول مشابه بود. به نظر می رسد که به علت تجمع غالب رونوشت ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B در سلولهای غیرجنسی، احتمال دارد که UV-B به طور غیرمستقیم رونویسی ژن را در این موجود تحت تاثیر قراردادده باشد. الگوی پروفایل ترنسکرپتوم میان این دو نوع سلول که هم در مورد گیرندههای نوری و هم در بررسی ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B مشاهده شد؛ ماهیت متفاوت و تمایزبایی سلولی را در این جلبک نشان داد.

واژههای کلیدی

گیرندههای نوری،
Volvox carteri
اشعه UV-B،
RNA-Seq

مقدمه

در میان محرک‌های مختلف، نور از عوامل مهم محیطی است که فیزیولوژی و رفتار یوکاریوت‌های فتوسنتزی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. نور خورشید که به سطح زمین می‌رسد شامل اشعه UV-B (۲۸۰-۳۱۵ نانومتر)، اشعه UV-A (۳۱۵-۴۰۰ نانومتر)، تابش فعال فتوسنتزی (۴۰۰-۷۰۰ نانومتر) و اشعه مادون قرمز (بالا تر از ۷۰۰ نانومتر) است. به دنبال استفاده از آلاینده‌های زیستی و افزایش گازهای گلخانه‌ای، لایه اوزون در استراتوسفر کاهش یافته است و شدت بیشتری از UV-B وارد جو کره زمین شده است. افزایش تابش UV-B در سطح زمین باعث بی‌ثباتی اکوسیستم‌های طبیعی می‌شود. بنابراین، در میان انواع مختلف اشعه ماوراء بنفش UV-B، سال‌ها است که توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده است (Kollias et al., 2011). از آنجایی که نور خورشید برای فتوسنتز مورد نیاز است، شدت رو به افزایش اشعه ماوراء بنفش حیات گیاهان را تهدید می‌کند و سوال چالش برانگیز این است که در میان گیاهان غیرآوندی، جلبک‌ها چگونه به UV-B پاسخ می‌دهند. گروه تک‌نیایی volvocine شامل دامنه‌ای از جلبک‌ها از گونه‌های تک‌سلولی مانند *Chlamydomonas reinhardtii* تا جنس پرسلولی *Volvox* است. در میان اعضای این گروه تک‌نیایی *C. reinhardtii* مدلی است که به خوبی مطالعه شده است و به عنوان خویشاوند تک سلولی و مرجعی برای گونه‌های پرسلولی در نظر گرفته می‌شود (Suzuki et al., 2003). جلبک *Volvox carteri* موجودی فتواتوتروف در طبیعت است که در معرض محیط پیچیده نوری از جمله UV-B قرار دارد. با توجه به این که در آب از شدت UV-B به سرعت کاسته می‌شود، بنابراین انتظار می‌رود که موجودات زنده آبی کمتر از گیاهان خشکی در معرض تابش نور خورشید باشند. عمق نفوذ UV-B در محیط آبی به میزان ترکیبات محلول یا معلق جذب کننده UV-B بستگی دارد بنابراین می‌تواند از حدود چند سانتی‌متر تا چند متر از سطح آب شیرین تغییر کند (Häder, 2000). جلبک سبز پرسلولی *V. carteri* با داشتن ویژگی‌هایی مانند چرخه زندگی کوتاه ۴۸ ساعته، تعداد نسبتاً کم سلول و ژن، و ژنوم متراکم (17.2 MB) در مجموع مدل ایده‌آلی برای مطالعه پاسخ به محرک‌های نوری در سطح رونوشت‌برداری و سیستم‌های زیستی است. این جلبک

آب شیرین، فتواتوتروف و هاپلوئید با کلونی‌های بزرگ (تا ۱,۵ میلی‌متر)، دارای دوشکلی جنسی نر- ماده است که می‌تواند به دو روش جنسی و غیرجنسی (رویشی) تکثیر شود و تنها از دو نوع سلول تشکیل شده است که در اندازه، مورفولوژی، فیزیولوژی و پتانسیل نمو تفاوت دارند (Starr, 1969; Hallmann, 2011). سلول‌های جنسی به تعداد ۱۶-۱۲ عدد، فاقد تحرک هستند و با توانایی بالقوه تولیدمثل، برای رشد و تکثیر کلونی‌های جدید تخصص یافته‌اند. در مقابل، سلول‌های غیرجنسی به تعداد ۴۰۰۰-۲۰۰۰ عدد، به صورت نهایی تمایز یافته‌اند و با از دست دادن توانایی تکثیر و تقسیم، و با برخورداری از لکه چشمی به همراه فتوناکتیک تخصص یافته‌اند و در نهایت دستخوش پیری و مرگ می‌شوند. الگوی سازماندهی این دو نوع سلول به گونه‌ای است که سلول‌های غیرجنسی تک لایه‌ای را در سطح اسفروئید و پیرامون سلول‌های جنسی تشکیل می‌دهند؛ همه سلول‌ها در جسم کروی شفاف از ماتریکس خارج سلولی غنی از گلیکوپروتئین قرار می‌گیرند (Kirk, 2005). با توجه به مطالعات قبلی، این دو نوع سلول الگوهای متفاوت بیان ژن از کلاس‌های عملکردی مختلف را نشان می‌دهند (Nematollahi et al., 2006). انواع مختلف سلول، باید بر اساس نیازهایشان، قادر به راه اندازی مسیرهای سیگنالینگ نور متمایز باشند. اگر چه تنظیم پاسخ‌های نموی و سازشی به وسیله نور، پدیده‌ای است که به فراوانی مطالعه شده است و با وجود سال‌ها تحقیق گسترده در مورد اساس مولکولی واکنش‌های ناشی از UV-B در قلمرو گیاهی، درک ما از اثرهای مستقیم UV-B بر بیان گیرنده‌های نوری در جلبک سبز پرسلولی *V. carteri* در سطح ژنوم، بسیار محدود و ناچیز است. *V. carteri* مانند گیاهان عالی برای نظارت بر محیط نوری و تنظیم فرایندهای سلولی در پاسخ به تغییرات در شدت، جهت کیفیت نور از شبکه پیچیده گیرنده‌های نوری استفاده می‌کند که در اکثر موارد در روش ویژه نوع سلول بیان می‌شوند. این گیرنده‌ها شامل هفت فتورسپتور ردوپسین مانند (VR1, VChR1, VChR2, VcHKR1, VcHKR2, VcHKR3 and VcHKR4)، یک فتورسپتور UV-B (VcUVR8)، چهار کریپتوکروم (VcCRYd1, VcCRYp, VcCRYa, و VcCRYd2) و یک

فتوتروپین (VcPhot) می‌باشند. گیرنده‌های نوری براساس سطح رونوشت ویژه نوع سلول، در سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند: گیرنده‌های نوری غیرجنسی، گیرنده‌های نوری جنسی و گیرنده‌های نوری عمومی یا غیر اختصاصی که در هر دو نوع سلول بیان می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده‌است که الگوی رونوشت برداری (ترنسکریپتوم) هر نوع سلول می‌تواند به‌صورت متفاوتی در پاسخ به نور محیطی، تغییر کند (Kianianmomeni, 2014; Kianianmomeni and Hallmann, 2015). مطالعات پیشین با هدف بررسی گیرنده‌های نوری در *V. carteri* در محدوده نور فعال فتوسنتزی و اشعه مادون قرمز و با استفاده از روش پی‌سی - آر ریل‌تایم تمرکز یافته‌بود (Babinger et al., 2006; Nematollahi et al., 2006; Kianianmomeni et al., 2009, 2014, Kianianmomeni, 2012, 2015; Kianianmomeni and Hallmann, 2013).

این درحالی‌است که توسعه و تکوین مسیرهای سیگنالینگ نوری ویژه نوع سلول، تنها به نور مرئی محدود نمی‌شود بلکه نورهای نامرئی فرابنفش و فراقمرمز نیز در این پدیده موثر هستند. گیرنده‌های نوری و اجزای موجود در مسیر سیگنالینگ نور، به‌عنوان ابزارهای بالقوه اپتوژنتیک، مطرح می‌باشند (Kianianmomeni and Hallmann 2016; Kianianmomeni, 2014). بنابراین، بررسی و شناخت هر چه بیشتر واحدهای حساس به نور، منابع تولید ابزار اپتوژنتیک را گسترش می‌دهد. در این پژوهش با استفاده از تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم جامع به‌وسیله روش RNA-seq اثرهای مستقیم تابش UV-B با دوز پایین بر بیان گیرنده‌های نوری و برخی از ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B، در هر یک از سلول‌های جنسی و غیرجنسی تفکیک شده مورد بررسی قرارگرفت و همچنین پروفایل ترنسکریپتوم این دو نوع سلول، در چرخه زندگی رویشی جلبک سبز پرسلولی *V. carteri* مقایسه گردید.

مواد و روش‌ها

کشت جلبک: جلبک *Volvox carteri f. nagariensis female* strain Eve 10 تیپ وحشی از دانشگاه بیل فلد، آلمان به‌دست آمد. کشت‌ها در محیط کشت استاندارد ولووکس (Provasoli, 1959) در دمای ۲۸ درجه سانتیگراد، چرخه ۸ ساعت تاریکی/۱۶

ساعت نورسفید فلورسنت (۱۰۰۰۰ لوکس) با میانگین $100 \sim \mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ تابش فعال فتوسنتزی نگهداری شدند. به‌علت مرحله نسبتاً ساده نمو رویشی، کشت جلبک در این مرحله نمودی انجام شد.

جداسازی سلول‌های جنسی و غیرجنسی: سلول‌های جنسی و غیرجنسی، ۳ ساعت قبل از آغاز تقسیمات شکافتگی (کلیواژ) جداسازی شدند. برای به‌دست آوردن سلول‌های جنسی، اسفروئیدها در دستگاه (B. Braun, Melsungen, Germany) Dounce homogenizer $50 \mu\text{m}$ شکسته شد. سوسپانسیون سلولی به ترتیب از فیلترهای $100 \mu\text{m}$ و $40 \mu\text{m}$ عبور داده شد. در مرحله بعد برای جداسازی سلول‌های جنسی از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در 360 g در 7 Percoll (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo) (v/v) درصد استفاده شد. سلول‌های غیرجنسی منفردی که بعد از این فرایند باقی می‌مانند به‌وسیله فیلتراسیون با فیلتر $10 \mu\text{m}$ از سلول‌های جنسی جدا شد. در مرحله بعد سلول‌های جنسی باقی‌مانده بر روی فیلتر سه مرتبه با 1000 ml محیط کشت Volvox شسته شد و جهت آماده‌سازی RNA سلول جنسی مورد استفاده قرارگرفت. برای به‌دست آوردن سلول‌های غیرجنسی، اسفروئیدها در دستگاه Dounce homogenizer $50 \mu\text{m}$ شکسته شد. سوسپانسیون سلولی به دست آمده با محیط کشت رقیق شد و در دمای اتاق نگهداری شد. در این مدت سلول‌های جنسی و قطعات بزرگتر اسفروئیدها که محتوی سلول‌های جنسی ته نشین شده بودند، به وسیله سانتریفیوژرسوب کرد. پلیت سلول غیرجنسی به منظور آماده‌سازی RNA سلول‌های غیرجنسی جدا شد (Nematollahi, Kianianmomeni and Hallmann, 2006).

اعمال تیمارهای نوری بر سلول‌های تفکیک شده: پرتودهی اشعه ماوراء بنفش B (به مدت یک ساعت) با استفاده از لامپ های کم باند UV-B (Philips TL40W/12RS) و با شدت نور 0.056 mw/cm^2 انجام شد. با توجه به اینکه لامپ UV-B به میزان $0.8 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ با نور سفید همراه است، برای خنثی کردن تاثیر نور سفید، به همین میزان، نور سفید به مدت یک ساعت به‌عنوان کنترل اعمال شد.

(v2.0.1) با پارامترهای پیش فرض انجام شد. بیان ژن مقایسه‌ای بین گروه‌های کنترل و تیمار در هر یک از سلول‌های تفکیک شده، با استفاده از نرم افزار (Trapnell et al., Cuffdiff (v2) (2012) به‌طور جداگانه بررسی شد.

بررسی توالی ها و انوتیشن: فایل‌های انوتیشن از پلتفرم فیتوزوم نسخه ۱۲ به‌دست آمد. انوتیشن عملکردی گیرنده‌های نوری به-وسیله ترم‌های ریشه‌شناسی ژن با استفاده از برنامه تحت وب Blast2GO تجزیه و تحلیل شد (Conesa et al., 2005) و گیرنده‌های نوری در سه گروه مولفه سلولی (CC)، عملکرد مولکولی (MF) و فرایند بیولوژیکی (BP) طبقه‌بندی شدند. با توجه به اینکه در کل در *V. carteri* طبقه‌بندی RNA و ترنسکرپتوم انوتیشن ضعیفی دارد، برای تجزیه و تحلیل غنی-سازی مسیر، با استفاده از سایت

Algal Functional Annotation (Lopez et al., 2011) ترنسکرپت‌های *V. carteri* به ID ترنسکرپت‌های گونه مرجع *C. reinhardtii* تبدیل شدند، که نزدیکترین خویشاوند تک سلولی جلبک مذکور است. مراحل کار به شرح زیر است: برای به‌دست آوردن همولوگ‌های گیرنده‌های نوری در *C. reinhardtii* جست‌وجوی Blastx در برابر پایگاه داده غیر-تکراری NCBI با Evalue 10^{-8} انجام شد. سپس ترنسکرپت‌های به‌دست آمده از جست‌وجوی Blastx در سایت Algal Functional Annotation به IDهای *C. reinhardtii* تبدیل شدند. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر با استفاده از پایگاه داده‌های مسیر همچون KEGG، MetaCyc، Panther و Reactome انجام شد. ژن‌های گیرنده‌های نوری به شناساگرهای مورد نظر تبدیل شدند؛ شناساگرها به مسیرهای غنی شده با سطوح بالاتر ارجاع داده شدند. با این حال تنها به مسیرهای پایگاه داده KEGG با p-value < 0.05 اشاره می‌شود.

مقایسه بیان ژن: بررسی و مقایسه بیان گیرنده‌های نوری و ژن-های هدف مسیر پاسخگو به UV-B در بین گروه‌های تیمار و کنترل در سلول‌های جنسی و غیرجنسی تفکیک شده و در مقایسه پروفایل ترنسکرپتوم میان این دو نوع سلول به دلیل عدم انوتیشن مناسب ژن‌های *V. carteri*، بررسی همزمان تمام ژن‌ها ممکن

استخراج RNA کل برای توالی‌یابی با توان بالا: در هر یک از سلول‌های جنسی و غیرجنسی، سه تکرار زیستی به ازای گروه‌های تیمار و کنترل در نظر گرفته شد (در مجموع ۱۲ نمونه) برای استخراج RNA از روش TRIzol Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده در هر یک از سلول‌های تفکیک شده با استفاده از ژل آگارز الکتروفورز ۱ درصد و اسپکتروفوتومتر Ultrospec 2100 pro UV/Visible spectrophotometer (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) بررسی شد.

آماده‌سازی کتابخانه و توالی‌یابی نسل بعد: RNA کل از ۱۲ نمونه برای آماده‌سازی و توالی‌یابی کتابخانه PolyA مبتنی بر ایلومینا به GATC Biotech (Konstanz, Germany) ارسال شد. به‌طور خلاصه، ۱ میکروگرم RNA کل برای هر نمونه در معرض انتخاب پلی A قرار گرفت. mRNA های واجد دم پلی A، قطعه-قطعه شدند. سپس cDNA های دو رشته‌ای در دو مرحله با استفاده از آغازگرهای تصادفی سنتز شد و بعد از آن، به آداپتورهای توالی یابی ایلومینا متصل شدند. اجراهای توالی یابی با پلتفرم Illumina HiSeq-2500 انجام شده و خوانش‌های تک-انتهایی به طول ۵۱ نوکلئوتید تولید شد. داده‌های RNA-seq مورد استفاده در این تحقیق در آرشیو SRA سایت NCBI با شماره دسترسی GSE124346 ثبت شده‌است.

تجزیه و تحلیل ترنسکرپتوم: کنترل کیفیت و پیش‌پردازش خوانش‌ها با استفاده از نرم افزار FastQC و Trimmomatics (v0.32) (Bolger et al., 2014) انجام شد. به‌طور خلاصه، آلودگی آداپتوری بررسی و حذف شد، خوانش‌هایی با بازهای ناشناخته یا کم کیفیت حذف شد (نمره کیفیت $> Q25$). علاوه بر این، خوانش‌هایی با میانگین نمره کیفیت زیر ۲۵ یا با طول کمتر از ۲۵ فیلتر شد. خوانش‌های ۱۲ نمونه بر روی ژنوم رفرنس *V. carteri* (v2) موجود در سایت فیتوزوم (https://phytozome.jgi.doe.gov) (Goodstein et al., 2011) با استفاده از نرم افزار TopHat2 (v2) (Kim et al., 2013) و پارامترهای پیش فرض مکان یابی شدند. سپس، اسمبلی رونوشت‌ها برای هر نمونه با استفاده از نرم افزار Cufflinks

معنی‌دار نبود. بر اساس مقایسه پروفایل ترنسکریپتوم میان این دو نوع سلول، گیرنده‌های نوری HKR1-4، ChR1-2، CRYp، Phot و Vop (VR1) بیان ویژه نوع سلول را نشان دادند. در حالی‌که گیرنده‌های نوری UVR8، CRYd1-2 و CRYa در هر دو نوع سلول حضور دارند. با توجه به اینکه بر اساس q -value هیچ ژن معنی‌داری در گیرنده‌های نوری مشاهده نشد، بنابراین گیرنده‌های نوری را بر اساس q -value مورد بررسی دقیق‌تر قرار دادیم. هیچ ژن دیگری با p -value < 0.05 مشاهده نشد که نشان می‌دهد این ژن‌ها هیچ گونه تفاوت بیانی حتی بر اساس p -value هم نداشتند.

بررسی ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B

بر اساس نتایج نمودار ستونی از میان هفتاد ژن کاندید مسیر پاسخگو به UV-B، سی ژن در این بررسی انتخاب شد. با این حال، تنها تعداد بسیار محدودی از آنها تحت تیمار UV-B بیان معنی‌دار را نشان دادند. بیان این سی ژن در سلول‌های جنسی میان گروه‌های تیمار و کنترل، معنی‌دار نبود. در تجزیه و تحلیل تفاوت بیان ژن در سلول‌های غیرجنسی گروه‌های تیمار و کنترل، بیان تعدادی از ژنهای هدف معنی‌دار بود. در سلول غیرجنسی بیان ژن *Vocar20009593m.g* (نام فیتوزومی) معادل ABC transporter family protein و بیان ژن *Vocar20005834m.g* که انوتیشنی برای این لوکوس وجود ندارد و تحت عنوان Express protein از آن یاد می‌شود، تحت تیمار UV-B القا شد. در مقایسه پروفایل ترنسکریپتوم میان سلول‌های جنسی با غیرجنسی نیز بیان برخی از ژنهای هدف، معنی‌دار بود. مقایسه بیان میان این دو نوع سلول نشان داد که بیان ژن *Vocar20010325m.g* معادل Early light-induced protein (ELIP1) در سلول جنسی نسبت به غیرجنسی بیشتر بود. بیان ژن *Vocar20015241m.g* معادل Protein kinase domain جنسی بیشتر بود. ژن *Vocar20010454m.g* معادل Cytochrome oxidase assembly protein یا Photosystem II reaction centre X protein (PsbX) بیان به شدت بالایی را در سلول غیرجنسی نشان داد در حالی‌که در سلول جنسی القا نشد. این ژن‌ها هیچ گونه تفاوت بیانی حتی بر اساس p -value نیز نداشتند.

نبود و بنابراین بررسی صرفاً روی ژنهای مربوط به گیرنده‌های نوری معطوف شد. برای این کار ابتدا توالی‌های گیرنده‌های نوری که در موجوداتی مانند *Arabidopsis* و *Chlamydomonas* شناسایی شده بود کاندید گردید و برای شناسایی اورتولوگ آنها در *V. carteri*، از Blast با موجودات زنده مذکور استفاده شد و ژن مربوطه (که با نام فیتوزومی در ژنوم و ترنسکریپتوم مرجع نامگذاری شده بود) از بقیه ژن‌ها جدا شد. با توجه به عدم وجود هر گونه گزارش در مورد بیان ژن به واسطه نور UV-B در *Volvox*، ژنهای کاندید بر اساس مشاهدات موجود در *Arabidopsis* انتخاب شدند. در مطالعه بر روی *Arabidopsis* (Brown et al., 2005; Favory et al., 2009) ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B بررسی شدند. ابتدا نمودار ستونی بیان ژنهای گیرنده‌های نوری و همچنین ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B با استفاده از بسته cummeRbund نرم افزار R ترسیم شد. سپس بیان ژنهای مورد نظر، در میان گروه‌های تیمار با کنترل در سلول‌های جنسی، غیرجنسی و سپس پروفایل ترنسکریپتوم میان این دو نوع سلول مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک: با استفاده از توالی پروتئینی تعدادی از گیرنده‌های نوری در *V. carteri* (به‌عنوان جستار)، جست‌وجوی BLASTP با Evaluate 10^{-5} در پایگاه داده NCBI برای شناسایی همولوگ‌های این گیرنده نوری در سایر موجودات صورت گرفت. سپس تجزیه و تحلیل فیلوژنی بر اساس هم‌ردیفی توالی‌های آمینواسید با استفاده از MUSCLE انجام گرفت (Edgar et al., 2008). درخت فیلوژنی با روش Maximum Likelihood و بر اساس مدل Poisson با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 و با بوت استرپ ۵۰۰ ترسیم شد.

نتایج و بحث

بررسی بیان گیرنده‌های نوری

در تجزیه و تحلیل تفاوت بیان ژن در سلول‌های جنسی و غیرجنسی میان گروه‌های تیمار با کنترل، بیان گیرنده‌های نوری

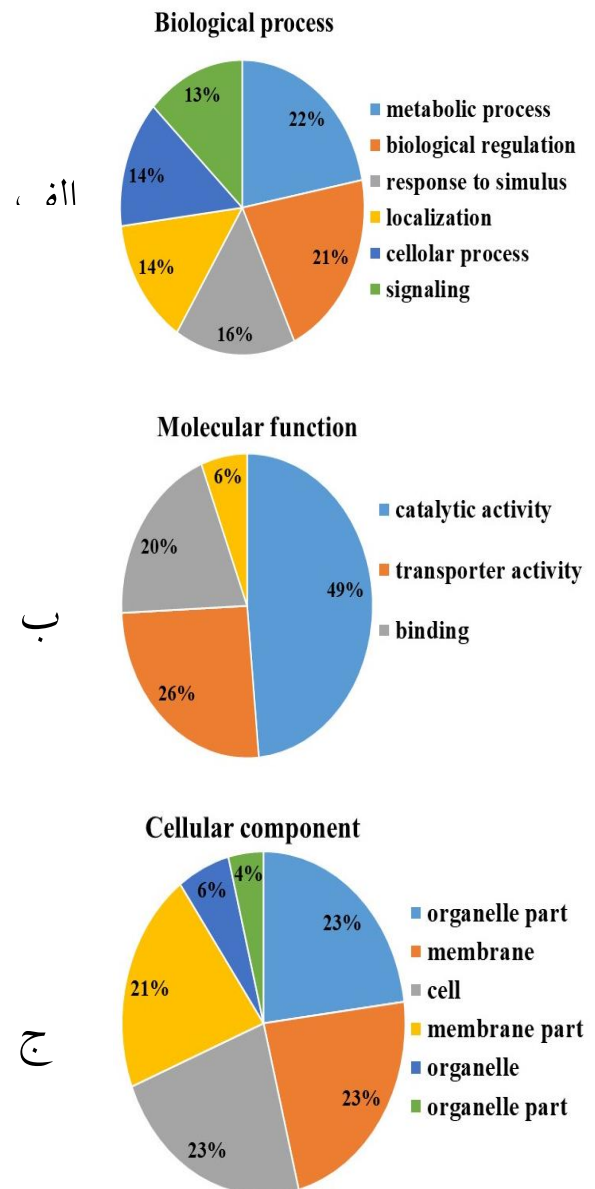
مولفه سلولی نشان داد که محصولات این ژن‌ها در غشا، سلول، فضای غشایی، اندامک و فضای اندامکی به‌طور معنی‌داری غنی بوده‌اند (شکل ۱-ج). در ریشه‌شناسی عملکرد مولکولی، فعالیت-های کاتالیزوری، انتقال و حمل و نقل، اتصال و ورا رسانی مولکولی غنی بوده‌اند (شکل ۱-ب). در فرایند بیولوژیکی گیرنده‌های نوری عمدتاً در فرایند متابولیسم، تنظیم زیستی، پاسخ به محرک، مکان‌یابی، فرایند سلولی و سیگنالینگ غنی بوده‌اند (شکل ۱-الف).

تجزیه و تحلیل غنی سازی مسیر در گیرنده‌های نوری

پس از تجزیه و تحلیل ریشه‌شناسی گیرنده‌های نوری، تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر برای شناسایی مسیرهای KEGG که به‌طور معنی‌داری با گیرنده‌های نوری غنی شده‌بودند، انجام شد. به دلیل انوتیشن ضعیف ژنوم *V. carteri*، انوتیشن *C. reinhardtii*، نزدیک‌ترین خویشاوند تک‌سلولی *V. carteri*، مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر برای گیرنده‌های نوری انجام شد و غنی‌سازی با استفاده از مسیر KEGG گزارش شد. ژن‌های گیرنده‌های نوری به ۲۱ مسیر KEGG اختصاص یافتند. ۱۲ مسیر، یعنی تثبیت کربن در موجودات فتوسنتزی، سوخت و ساز پیرووات، گلیکولیز/گلوکونوژنز، ریتم شبانه‌روزی، بیوسنتز آلکالوئیدهای مشتق شده از ترپنوئید و پلی‌کتید، بیوسنتز آلکالوئیدهای مشتق شده از مسیر شیکیمات، بیوسنتز فینیل پروپانوئیدها، بیوسنتز آلکالوئیدهای مشتق شده از آمیتین، لایزین و نیکوتینیک اسید، بیوسنتز آلکالوئیدهای مشتق شده از هیستیدین و پورین، بیوسنتز ترپنوئیدها و استروئیدها، بیوسنتز هورمون‌های گیاهی و سوخت و ساز پورین به‌ترتیب به‌طور معنی‌داری ($p < 0.05$) تحت تاثیر گیرنده‌های نوری قرار گرفته‌اند.

درخت فیلوژنتیکی تعدادی از گیرنده‌های نوری در *V. carteri*

درخت فیلوژنتیکی تعدادی از گیرنده‌های نوری با سایر پروتئین-های همتای خود در سایر جلبک‌ها و گیاهان موجود در بانک اطلاعاتی NCBI به روش Maximum Likelihood (ML) و به کمک نرم افزار MEGA 6 ترسیم شد. این گیرنده‌ها عبارتند از: CRYa، UVR8، CRYd2.

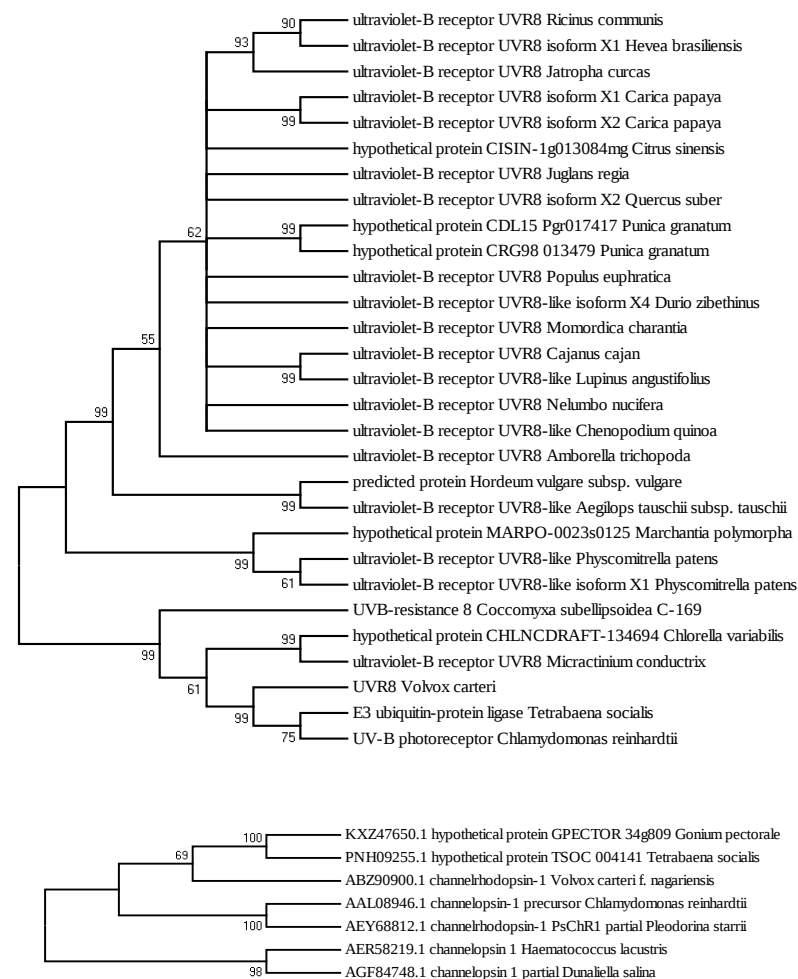
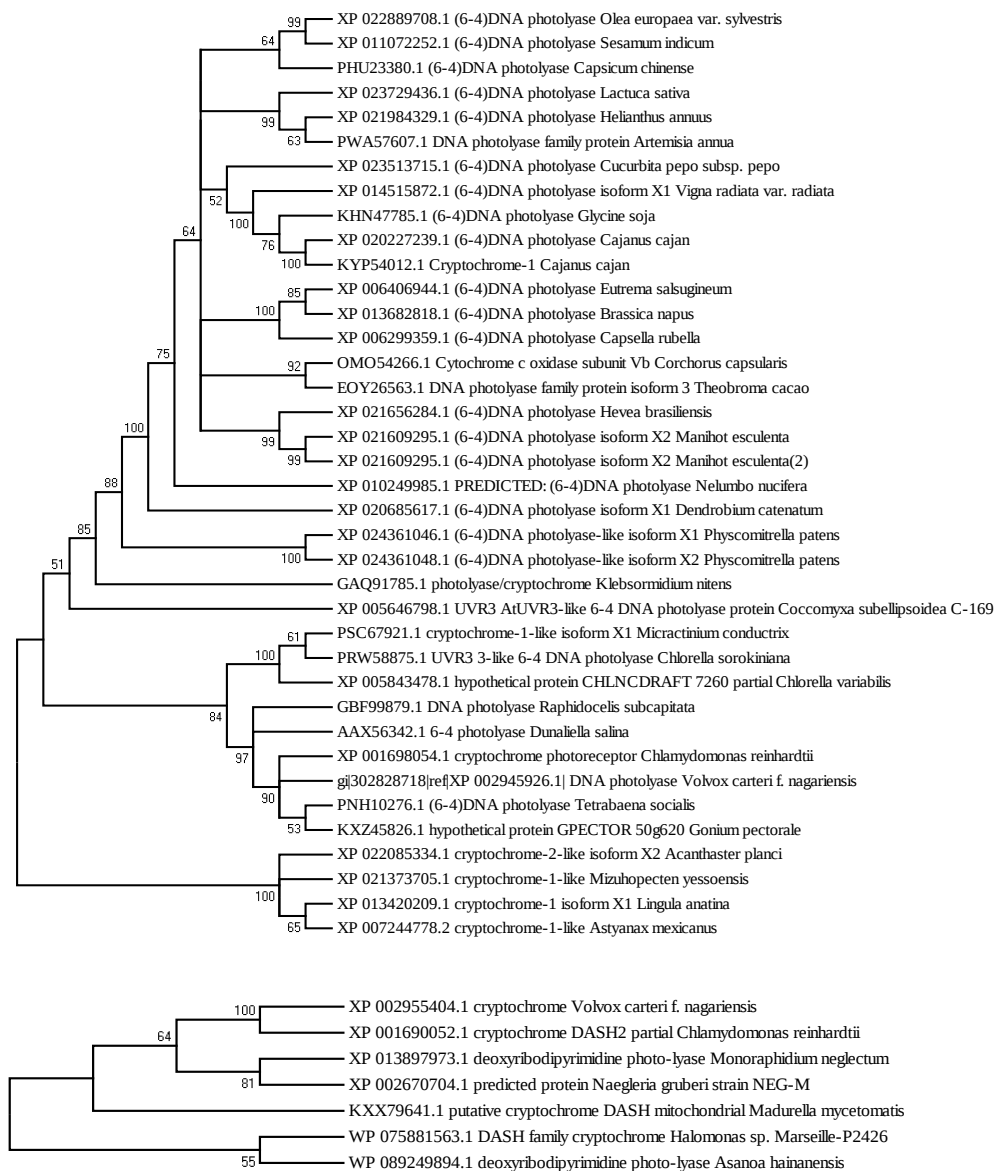


شکل ۱- تجزیه و تحلیل عملکردی گیرنده‌های نوری بر اساس ریشه‌شناسی ژن. طبقه‌بندی ریشه‌شناسی ژن برای سه دسته عملکردی مهم، یعنی فرایند بیولوژیکی (الف)، عملکرد مولکولی (ب) و مولفه سلولی (ج) ارائه شده‌است.

Figure 1. Functional analysis of photoreceptors based on Gene Ontology (GO). GO category was presented for three major functional categories, namely Biological process, Molecular function and Cellular component.

تجزیه و تحلیل ریشه‌شناسی ژن گیرنده‌های نوری

تجزیه و تحلیل غنی‌سازی عملکردی ژن انتولوژی برای گیرنده‌های نوری با استفاده از برنامه Blast2GO انجام شد. نتیجه انوتیشن ریشه‌شناسی گیرنده‌های نوری به شرح زیر است: ریشه‌شناسی



شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی گیرنده‌های نوری CRYa, UVR8, CRYd2 و ChR1 به روش Maximum Likelihood (ML) و به کمک نرم افزار MEGA 6 ترسیم شد. اعداد روی هر گره نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد. ضریب Bootstrap بر پایه ۵۰۰ تکرار انجام شد.

Figure 2. Phylogenetic tree of the CRYa, UVR8, CRYd2, and ChR1 photoreceptors was generated using the Maximum Likelihood (ML) method by MEGA 6 software. The bootstrap values are at the nodes. The Bootstrap coefficient was performed based on 500 replications.

می‌رسد که مسیر تکاملی این ژن در *Volvox* به صورت مستقل انجام شده است (شکل ۲، ChR1).

پژوهش حاضر با هدف بررسی پروفایل بیان ژنهای گیرنده‌های نوری و ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B در جلبک سبز پرسلولی *V. carteri* در طول چرخه زندگی رویشی، در سلول‌های تفکیک شده جنسی و غیرجنسی تحت یک ساعت تابش ماوراء بنفش با شدت پایین (0.056 mw.cm^{-2})، انجام شد. بر اساس نتایج این بررسی، گیرنده‌های نوری در سلول‌های جنسی و غیرجنسی در مقایسه با گروه‌های کنترل مربوط به آنها، بیان معنی‌داری را نشان ندادند. سطح رونوشت‌برداری گیرنده‌های نوری در پاسخ به محرک‌های متفاوت، تغییر می‌کند و هدف هر پروتئین گیرنده نور، جذب فوتون‌ها و تولید مستقیم یا غیرمستقیم یک اثر زیستی است. گیرنده‌های نوری پروتئین‌های درون غشایی یا محلول سیتوپلاسمی هستند که برای هماهنگ کردن بیان تعداد قابل توجهی از ژن‌ها در طول فتومورفوز در گیاهان نمو یافته‌اند (Kami et al., 2010) تا به امروز مطالعه بر روی بیان گیرنده‌های نوری در *V. carteri* در طیف نوری فعال از نظر فتوسنتزی انجام شده است و نتایج به دست آمده نشان داد که نور آبی بر تجمع رونوشت‌ها در سلول‌های غیرجنسی موثر است در حالی که نور قرمز منجر به تراکم بیشتر رونوشت‌ها در سلول جنسی شده است (Kianianmomeni, 2014). با این حال توسعه و تکوین مسیرهای سیگنالینگ نوری ویژه نوع سلول به نور مرئی محدود نمی‌شود. گیرنده‌های نوری مختلف درون لکه چشمی جلبک‌های *volvocine* مستقر شده اند لکه چشمی و ساختارهای مربوطه (Foster and Smyth, 1980) به عنوان اندامک‌های حسی عمومی عمل می‌کنند تا رفتار نوری مناسب و سایر پاسخ‌های نموی و سازشی بالقوه را تعدیل کنند. بنابراین دستگاه لکه چشمی برای نظارت دقیق نور و پاسخ حرکتی وابسته به نور برای بهینه‌سازی فعالیت‌های فتوسنتزی یا اجتناب از آسیب‌های نوری مورد نیاز

اعداد روی هر گره نشان دهنده ضریب Bootstrapping می‌باشد. ضریب Bootstrap بر پایه ۵۰۰ تکرار انجام شد (شکل ۲). ژن CRYa بیشترین شباهت ژنتیکی را با ژن فتولیز در جلبک *Tetrabaena* و ژن *hypothetical* در *Gonium* نشان داد. هر چند که ژنهای گفته شده به همراه ژن گیرنده نوری کریپتوکروم از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند. بر این اساس تصور بر این است که ژن CRYa در دو جلبک *Volvox* و *Chlamydomonas* مسیر تکامل هماهنگی را طی کرده‌اند. جالب‌توجه است که مسیر تکامل ژن فتولیز در جلبک‌های *Volvox*, *Tetrabaena*, *Dunaliella* و *Raphidocelis* نیز با ژن CRYa به صورت هماهنگ انجام گرفته است (شکل ۲، CRYa). ژن UVR8 شباهت ژنتیکی بالایی به ژن‌های ubiquitin E3 در *Tetrabaena* و ژن UV-B photoreceptor در *Chlamydomonas* نشان داد. همچنین از نظر تکامل ژن UVR8 با دو ژن گفته شده، با اطمینان بالا (bootstrap value = 99%) یک منشأ تکاملی نشان می‌دهند (شکل ۲، UVR8). ژن CRYd2 با bootstrap value = 100% با ژن Cryptochrome DASH2 در *Chlamydomonas* کلاستر شد. هماهنگی با دیگر ژن‌های CRY, ژن CRYd2 نیز با ژن Photolyase در جلبک *Monoraphidium* مسیر تکاملی هماهنگی را نشان داد. در واقع با اطمینان نسبتاً بالا می‌توان گفت که ژن‌های CRYd2 و Photolyase در جلبک‌های *Volvox*, *Chlamydomonas* و *Monoraphidium* از یک جد مشترک منشأ گرفته‌اند (شکل ۲، CRYd2). ژن ChR1 این ژن شباهت نسبتاً بالایی با دو ژن *hypothetical* protein در *Tetrabaena* و *Gonium* نشان داد و از نظر تکاملی با این دو ژن هم منشأ است. البته، ژن ChR1 از نظر تکامل بیشترین تفاوت را با ژن ChR1 در دو جلبک *Hematococcus* و *Dunaliella* نشان داد. علاوه بر این، با توجه به اینکه ژن ChR1 در جلبک‌های *Chlamydomonas* و *Plodorina* شباهت بسیار بالایی با یکدیگر نشان می‌دهند، به نظر

است. در *Volvox* لکه چشمی مختص سلولهای غیرجنسی است که اغلب ژنهای گیرندههای نوری در آن بیان می‌شوند. همان‌طور که اشاره شد گیرندههای نوری بر اساس سطح رونوشت ویژه نوع سلول، در سه گروه طبقه‌بندی می‌شوند: گیرندههای نوری غیرجنسی، گیرندههای نوری جنسی و گیرندههای نوری عمومی که در هر دو نوع سلول بیان می‌شوند (Kianianmomeni, 2014; Kianianmomeni and Hallmann, 2015). مقایسه پروفایل ترنسکریپتوم بین این دو نوع سلول نشان داد که گیرندههای نوری *CRYp*, *Phot*, *ChR1-2*, *HKR1-4* و *VR1* (VOP) الگوی بیان ویژه نوع سلول را نشان می‌دهند؛ درحالی‌که گیرندههای نوری *CRYa* و *CRYd1-2* در هر دو نوع سلول حضور دارند. گیرندههای نوری *Phot*, *ChR1-2*, *HKR1-4* در سلول غیرجنسی بیان شدند که مطابق با گزارشات پیشین است. بر اساس مطالعات گذشته، تجمع رونوشت و بیان ژن *VR1* در سلول جنسی غالب است (Kianianmomeni, 2015). با این حال، نتایج ما برای اولین بار نشان داد که علاوه بر *VR1* بیان ژن گیرنده نوری *CRYp* نیز در سلول جنسی غالب است. نتایج تجزیه و تحلیل RNA-seq درستی این طبقه‌بندی را در *V. carteri* تأیید کرد. بررسی‌ها نشان داده‌است که الگوی رونوشت‌برداری (ترنسکریپتوم) هر نوع سلول می‌تواند به صورت متفاوتی در پاسخ به نور محیطی، تغییر کند (Kianianmomeni, 2014; Kianianmomeni and Hallmann, 2015) در بررسی حاضر، الگوی رونوشت‌برداری ژن کدکننده گیرندههای نوری تحت تیمار UV-B در سلولهای جنسی و غیرجنسی تغییر نکرده‌است. با توجه به اینکه بیان هر یک از گیرندههای نوری در طول موج ویژه خود به بیشترین میزان خود می‌رسد؛ بنابراین دور از انتظار نیست که ژن کدکننده گیرندههای نوری در این طول موج بیان معنی‌داری نداشته‌اند. این در حالی است که مطالعات گذشته نشان داده‌اند که پروتئین UVR8 در همه کیفیت‌های نوری مورد آزمایش (یعنی آبی / UV-A / قرمز / تاریکی) حضور داشته‌است (Kaiserli and Jenkins, 2007). این امر نشان می‌دهد این پروتئین یک گیرنده عمومی است که به سرعت در هر اندام و سلولی بیان می‌شود تا گیاه به سرعت به تابش UV-B پاسخ دهد (Rizzini et al., 2011). تا به امروز مطالعات نشان داده‌اند که اشعه UV-B باعث تغییر در فراوانی

کلی پروتئین UVR8 نشده‌است (Kaiserli and Jenkins, 2007) بلکه باعث مونومریزاسیون و تجمع هسته‌ای UVR8 در سلول‌ها می‌شود تا مسیر سیگنالینگ UV-B را فعال کند. UVR8 فعال شده به‌وسیله نور، می‌تواند سیگنال UV-B را از طریق مکانیسم‌های چندگانه برای تنظیم رونویسی و رشد گیاهان انتقال دهد (Liang et al., 2018). بیان بافتی یا تنظیم شده از نظر تکوینی گیرندههای نوری و/یا ترکیبات سیگنالینگ همراه، تغییراتی را در سطح رونوشت ژنهای هدف در روش ویژه نوع سلول آغاز می‌نماید و به این ترتیب، با همکاری یکدیگر سبب ایجاد پاسخ اختصاصی به سیگنال، در انواع مختلف سلول می‌شوند (Lopez-Juez et al., 2014; Schaefer et al., 2008). قرار گرفتن در معرض سطوح پایین غیرآسیب‌رسان UV-B اثرهای تنظیمی فراوانی بر مورفولوژی، نمو، فیزیولوژی و ترکیب بیوشیمیایی گیاه دارد. مقادیر پایین تابش UV-B باعث افزایش بیان دامنه‌ای از ژن‌ها می‌شود که در حفاظت از UV-B درگیرند. این ژن‌ها در بیشتر موارد متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که به‌عنوان ترکیبات ضدآفتاب و جاذب UV عمل می‌کنند. سایر ژنهای القا شده با UV-B به‌عنوان مثال در کاهش تنش اکسیداتیو و ترمیم آسیب DNA درگیر می‌شوند (Casati and Walbot, 2003; Frohnmeyer and Staiger, 2004; Ulm et al., 2003). UVR8 گیرنده UV-B در تنظیم ژن‌های مربوط به حفاظت از تنش اکسیداتیو و آسیب فتواکسیداتیو (به عنوان مثال پروتئین‌های کلروپلاستی مانند ELIP) و تعدادی از ژنهای کدکننده اجزای سیگنالینگ، عوامل رونویسی، ترنسپورترها، پروتئازها و چندین پروتئین با عملکرد ناشناخته نقش دارد. در واقع، UVR8 بیان دامنه‌ای از ترکیبات با عملکرد-های حیاتی در حفاظت از گیاهان در مقابل UV-B را تنظیم می‌کند (Hutin et al., 2003). از میان ژنهای هدف مسیر پاسخگو به UV-B، بیان خانواده پروتئینی ناقلین ABC در سلول غیرجنسی معنی‌دار بود. قرار گرفتن در معرض تابش UV منجر به تغییراتی در سوخت‌وساز لیپید، قند و ترکیبات ثانویه می‌شود. ژنهای خانواده پروتئینی ناقلین ABC دارای توانایی حمل و نقل ترکیبات حیاتی مانند هورمون‌های گیاهی (برای رشد و نمو هماهنگ)، فنول‌های متنوع (برای حفاظت از تابش UV-B) و متابولیت‌های ثانویه (برای دفاع) هستند. شواهد نشان می‌دهد که اعضای این

خانواده پروتئینی در فرایندهای هموستازی پس از تابش UV-B نقش دارند (Zutz et al., 2009). در مقایسه پروفایل ترنسکریپتوم میان این دو نوع سلول، سه ژن یعنی Early light-induced Cytochrome و Protein kinase domain protein (ELIP1) Photosystem II reaction center یا oxidase assembly protein X protein (PsbX) بیان ویژه نوع سلول را نشان دادند که در حفاظت در برابر تنش اکسیداتیو نقش دارند (Hwang et al., 2016). برخی از ژنهای Early light-induced protein (ELIP) توسط UV-B در *Arabidopsis* فعال شده‌اند. ELIP به عنوان یک محافظت‌کننده نوری برای فتوسیستم II عمل می‌کند که باعث کاهش اثرهای مضر شدت بالای نور می‌شود. فعال‌سازی ELIP بخشی از پاسخ حفاظت فتوستتزی مربوط به مهار نوری است. به نظر می‌رسد که ELIP استفاده بیش از حد از سیستم انتقال الکترون فتوستتزی را کاهش می‌دهد و بنابراین برای بقا و رشد گیاهان تحت تنش مهم است (Hayami et al., 2015). بر اساس نتایج فیلوژنتیکی، گیرنده‌های نوری *Volvox* از نظر ژنتیکی و تکامل با گیرنده‌های نوری جلبک‌های *Chlamydomonas*، *Tetrahena* و *Gonium* شباهت و هماهنگی بالاتری نسبت به دیگر جلبک‌ها نشان می‌دهند. برای به‌دست آوردن انوتیشن عملکردی جامع‌تر ژن‌ها برای تجزیه و تحلیل مسیرهای زیستی، روش گونه مرجع خویشاوند تک سلولی نزدیک به *Volvox* یعنی *Chlamydomonas* در این مطالعه اتخاذ شد. یکپارچگی ژن‌های نقشه‌برداری شده از پایگاه داده‌های مختلف نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر را بهبود می‌بخشد. نتایج تجزیه و تحلیل غنی‌سازی مسیر نشان داد که گیرنده‌های نوری علاوه بر نقش اصلی خود در سیگنالینگ، در فرآیندهای متابولیک نیز به شدت درگیر هستند. ژن مشترک در اغلب این مسیرهای زیستی پیرووات‌کیناز بود که یک تنظیم‌کننده کلیدی در فرایندهای متابولیکی و سلولی است. مطالعات نشان داده‌است که هر دو نوع سلول *V. carteri* به‌طور فعال و موثری از فتوستتز حمایت می‌کنند که البته برای حمایت از رشد موثر سلول، فتوستتز در سلول‌های جنسی ظرفیت بالاتری دارد. اگرچه سلول‌های غیرجنسی برای پیر شدن و مرگ تعیین سرنوشت می‌شوند، با حفظ فتوستتز نسبتاً فعال، سبب تداوم و پیشرفت سوخت و ساز پایه، جنبش تازکی و فعالیت

ترشحی ماتریکس خارج سلولی می‌شوند. علاوه بر این، ژن‌های مربوط به فرایند تعدیل پس ترجمه‌ای مانند اغلب پروتئین کینازها و فسفاتازها به شدت در سلول‌های غیرجنسی بیان می‌شوند (Klein et al., 2017). نتایج این بررسی نشان داد که به علت تجمع غالب رونوشت ژن‌های هدف مسیر پاسخگو به UV-B در سلول‌های سوماتیک، احتمال دارد که UV-B به‌طور غیرمستقیم رونویسی ژن را در این موجود زنده تحت تاثیر قرار داده باشد. الگوی پروفایل ترنسکریپتوم میان این دو نوع سلول که هم در مورد گیرنده‌های نوری و هم در بررسی ژن‌های هدف مسیر پاسخگو به UV-B مشاهده شد؛ ماهیت متفاوت و تمایزیابی را میان این دو نوع سلول نشان می‌دهد. انواع مختلف سلول، ساختار متفاوتی دارند و برای انجام عملکرد ویژه‌ای تخصص یافته‌اند؛ بر همین اساس از نظر توازن انرژی متفاوت هستند به‌عنوان مثال بسته به فعالیت فتوستتزی‌شان، دارای ریتم‌های شبانه روزی، واکنش‌های تقسیم‌سلولی و پروفایل متابولیک مختص خود هستند (Matt and Umen, 2018). وجود مسیرهای سیگنالینگ نوری ویژه نوع سلول در موجودات پرسلولی مانند *Volvox* نشان‌دهنده توسعه اولیه واکنش‌های سیگنالینگ ویژه نوع سلولی در طول تکامل، برای اطمینان از حفظ تمایزیابی است (Kianianmomeni and Hallmann, 2015, 2016). تمایزیابی زایشی-رویشی مشخصه موجودات پیچیده پرسلولی است که هنوز منشأ تکاملی آنها به خوبی درک نشده است. بنابراین جلبک سبز پرسلولی *V. carteri* موجود مناسبی برای مطالعه تمایزیابی است که با بررسی تاثیر نور بر سیگنالینگ و تغییرات پروفایل‌های بیان در سلول‌های آن می‌تواند به حل معمای پیچیده انتقال تکاملی از موجودات تک‌سلولی به پرسلولی کمک کند. علاوه بر این، شناخت هر چه بیشتر گیرنده‌های نوری و اجزای مسیرهای سیگنالینگ نور به توسعه ابزار اپتوژنتیک کمک می‌کند. مطالعه حاضر می‌تواند با بررسی تاثیرات UV-B در شدت و مدت زمان در حال افزایش با هدف بررسی سازوکار سازش به تابش UV-B در موجود زنده *V. carteri* تداوم یابد.

تشکر و قدردانی: این پروژه با حمایت مالی مرکز مطالعات و همکاری‌های علمی بین‌المللی انجام شده است و از این طریق از مسوولین مربوطه تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Babinger, K., Hallmann, A. and Schmitt, R. 2006. Translational control of *regA*, a key gene controlling cell differentiation in *Volvox carteri*. *Development* 133(20): 4045–51.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114–2120.
- Brown, B. A., Cloix, C., Jiang, G. H., Kaiserli, E., Herzyk, P., Kliebenstein, D. J. and Jenkins, G. I. 2005. A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(50): 18225–18230.
- Casati, P. and Walbot, V. 2003. Gene expression profiling in response to ultraviolet radiation in maize genotypes with varying flavonoid content. *Plant Physiology* 132(4): 1739–1754.
- Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M. and Robles, M. 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21(18): 3674–3676.
- Davey, M. P., Susanti, N. I., Wargent, J. J., Findlay, J. E., Quick, W. P., Paul, N. D. and Jenkins, G. I. 2012. The UV-B photoreceptor UVR8 promotes photosynthetic efficiency in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated levels of UV-B. *Photosynthesis Research* 114(2): 121–131.
- Edgar, R. C., Drive, R. M. and Valley, M. 2008. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(9): 1792–1797.
- Favory, J.J., Stec, A., Gruber, H., Rizzini, L., Oravec, A., Funk, M., Albert, A., Cloix, C., Jenkins, G.I., Oakeley, E.J. and Seidlitz, H.K. 2009. Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV- B- induced photomorphogenesis and stress acclimation in *Arabidopsis*. *The EMBO journal* 28(5): 591-601.
- Foster, K. W. and Smyth, R. D. 1980. Light Antennas in phototactic algae. *American Society for Microbiology* 44(4): 572.
- Frohnmeier, H. and Staiger, D. 2003. Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. *Balancing damage and protection*. *Plant physiology* 133(4): 1420–1428.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten U., Putnam, N. 2011. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* 40(D1): D1178–D1186.
- Hader, D.P. 2000. Effects of solar UV-B radiation on aquatic ecosystems. *Advances in Space Research* 26(12): 2029–2040.
- Hallmann, A. 2011. Evolution of reproductive development in the volvocine algae. *Sexual Plant Reproduction* 24(2): 97–112.
- Hayami, N., Kimura, M., Tokizawa, M., Iuchi, S., Kurihara, Y., Matsui, M., Nomoto, M., Tada, Y., Sakai, Y. and Yamamoto, Y.Y. 2015. The responses of *Arabidopsis* ELIP2 to UV-B, high light, and cold stress are regulated by a transcriptional regulatory unit composed of two elements. *Plant Physiology* 169(1): 840–855.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K. and Havaux, M. 2003. Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(8): 4921–4926.
- Hwang, J.U., Song, W.Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K. and Palmgren, M. 2016. Plant ABC transporters enable many unique aspects of a terrestrial plant's lifestyle. *Molecular plant* 9(3): 338–355.
- Kaiserli, E. and Jenkins, G. I. 2007. UV-B promotes rapid nuclear translocation of the *Arabidopsis* UV-B specific signaling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *Plant Cell* 19(8): 2662–2673.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. and Fankhauser, C. 2010. Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology* 91: 29-66. Kianianmomeni, A. 2012. The rich world of applicable algal photoreceptors. *Journal of Physical Chemistry and Biophysics* 2(3): 2–3.
- Kianianmomeni, A. 2014. Cell-type specific light-mediated transcript regulation in the multicellular alga *Volvox carteri*. *BMC genomics* 15(1): 764.
- Kianianmomeni, A. 2015. Cell-type specific photoreceptors and light signaling pathways in the multicellular green alga *volvox carteri* and their potential role in cellular differentiation. *Plant Signaling and Behavior* 2324(4): 1–4.
- Kianianmomeni, A. and Hallmann, A. 2013. Validation of reference genes for quantitative gene expression studies in *Volvox carteri* using real-time RT-PCR. *Molecular Biology Reports* 40(12): 6691–6699.
- Kianianmomeni, A. and Hallmann, A. 2015. Transcriptional analysis of *Volvox* photoreceptors suggests the existence of different cell-type specific light-signaling pathways. *Current Genetics* 61(1): 3–18.

- Kianianmomeni, A. and Hallmann, A., 2016. Algal photobiology: a rich source of unusual light sensitive proteins for synthetic biology and optogenetics. Optogenetics. Humana Press, New York, USA, 37-54.
- Kianianmomeni, A., Ong, C., Ratsch, G. and Hallmann, A. 2014. Genome-wide analysis of alternative splicing in *Volvox carteri*. BMC Genomics 15(1): 1117.
- Kianianmomeni, A., Stehfest, K., Nematollahi, G., Hegemann, P. and Hallmann, A. 2009. Channelrhodopsins of *Volvox carteri* are photochromic proteins that are specifically expressed in somatic cells under control of light, temperature, and the sex inducer. Plant Physiology 151(1): 347-366.
- Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R. and Salzberg, S. L. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. Genome Biology 14(4): R36.
- Kirk, D. L. 2005. A twelve- step program for evolving multicellularity and a division of labor. BioEssays 27(3): 299-310.
- Klein, B., Wibberg, D. and Hallmann, A. 2017. Whole transcriptome RNA-Seq analysis reveals extensive cell type-specific compartmentalization in *Volvox carteri*. BMC biology 15(1): 111.
- Kollias, N., Ruvolo Jr, E. and Sayre, R. M. 2011. The value of the ratio of UVA to UVB in sunlight. Photochemistry and Photobiology 87(6): 1474-1475.
- Liang, T., Yang, Y. and Liu, H. 2018. Signal transduction mediated by the plant UV-B photoreceptor UVR8. New Phytologist 221: 247-1252.
- Lopez, D., Casero, D., Cokus, S. J., Merchant, S. S. and Pellegrini, M. 2011. Algal functional annotation tool: a web-based analysis suite to functionally interpret large gene lists using integrated annotation and expression data. BMC Bioinformatics 12(1): 282.
- Lopez-Juez, E., Dillon, E., Magyar, Z., Khan, S., Hazeldine, S., de Jager, S.M., Murray, J.A., Beemster, G.T., Bogre, L. and Shanahan, H. 2008. Distinct light-initiated gene expression and cell cycle programs in the shoot apex and cotyledons of *Arabidopsis*. Plant Cell 20(4): 947-968.
- Matt, G. Y. and Umen, J. G. 2018. Cell-type transcriptomes of the multicellular green alga *Volvox carteri* yield Insights into the evolutionary origins of germ and somatic differentiation programs. G3: Genes, Genomes, Genetics 8(2): 531-550.
- Nematollahi, G., Kianianmomeni, A. and Hallmann, A. 2006. Quantitative analysis of cell-type specific gene expression in the green alga *Volvox carteri*. BMC genomics 7(1): 321.
- Provasoli, L. 1959. Artificial media for fresh-water algae: problems and suggestions. The ecology of algae 2, 84-96.
- Rizzini, L., Favory, J.J., Cloix, C., Faggionato, D., O'Hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schafer, E., Nagy, F., Jenkins, G.I., and Ulm, R. 2011. Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. Science 332(6025): 103-106.
- Schaefer, M.H., Yang, J.S., Serrano, L. and Kiel, C. 2014. Protein conservation and variation suggest mechanisms of cell type-specific modulation of signaling pathways. PLOS Computational Biology 10(6): e1003659. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003659.
- Starr, R. C. 1969. Structure, reproduction and differentiation in *Volvox carteri* f. nagariensis Iyengar, strains HK 9 and 10. Arch Protistenkunde 111: 204-222.
- Suzuki, T., Yamasaki, K., Fujita, S., Oda, K., Iseki, M., Yoshida, K., Watanabe, M., Daiyasu, H., Toh, H., Asamizu, E. and Tabata, S. 2003. Archaeal-type rhodopsins in *Chlamydomonas*: model structure and intracellular localization. Biochemical and Biophysical Research Communications 301(3): 711-717.
- Trapnell C., Roberts A., Goff L., Pertea G., Kim D., Kelley D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L. and Pachter, L. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. Nature protocols 7(3): 562.
- Ulm, R., Baumann, A., Oravec, A., Mate, Z., Adam, E., Oakeley, E.J., Schafer, E. and Nagy, F. 2004. Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(5): 1397-1402.
- Zutz, A., Gompf, S., Schagger, H. and Tampe, R. 2009. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics 1787(6): 681-690.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 2

Study on the gene expression of photoreceptors and target genes of UV-B response pathway to UV-B radiation in alga *Volvox carteri*

Ekhtari Solmaz¹, Razeghi Jafar^{1*}, Hasanpur Karim², Kianianmomeni Arash³, Movafeghi Ali¹

1. Department of Plant Biology, Faculty of Natural Sciences, 2. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

3. Department of Cellular and Developmental Biology of Plants, Faculty of Natural Sciences, University of Bielefeld, Bielefeld, Germany

*Corresponding author Email: jafar_razeghi@tabrizu.ac.ir

Light is an important source of energy for the photosynthetic organisms. Photoreceptor proteins are able to perception of the specific wavelengths of light and initiate a signal transduction pathway. *Volvox carteri* is a simple multicellular green alga with many features that is recommended as a lower eukaryote model organism for studying the development of photoreception. In this research, the effect of UV-B radiation (0.056 mw.cm⁻²) was studied on gene expression of 13 photoreceptors using RNA-seq data. These photoreceptors are required for light-monitoring and adaptation of physiological activities to environmental changes. According to our results, under low intensity of UV-B radiation, the photoreceptors were differentially expressed neither in reproductive cells nor in somatic cells as compared to their corresponding control groups. However, comparing the transcriptome of somatic cells with reproductive cells revealed that Phot, CRYp, and ChR1-2, HKR1-4 and Vop (VR1) photoreceptors exhibited a cell-type specific expression pattern while photoreceptors such as UVR8, CRYd1-2 and CRYa were differentially expressed. However, it seems that due to dominantly transcript accumulations of target genes of UV-B response pathway in somatic cells, likely UV-B may indirectly affect gene transcription in this organism. The transcriptional profile pattern between two cell-types, both for photoreceptors and for target genes of UV-B response pathway, shows a different nature and differentiation between reproductive and somatic cells.

Keywords: Photoreceptors, *Volvox carteri*, UV-B radiation, RNA-Seq