

شناسایی یکی از موتیف‌های موثر در پایداری پروتئین ATG8B در جایگاه LDS در گیاه *Marchantia polymorpha*

Identification of one of the efficient motifs on the stability of ATG8B protein in LDS in *Marchantia polymorpha*

آزاده محسنی، محمد فارسی*، علیرضا سیفی

Azadeh Mohseni, Mohammad Farsi*, Alireza Seifi

گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران

Department of crop biotechnology and breeding, Ferdowsi University of Mashhad,
Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farsi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۶/۱۹)

<https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6>

DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6

Genetic Engineering and Biosafety
Journal
Volume 10, Number 1
2021

<http://gebsj.ir/>

<https://ecc.isc.ac/showJournal/23064>

چکیده

اتوفاژی یکی از پاسخ‌های دفاعی در موجودات مختلف در شرایط تنش و غیرتنش است. در اتوفاژی، ترکیبات و اندامک‌های آسیب‌دیده درون وزیکول دو غشایی به نام اتوفاگوزوم قرار می‌گیرند و به سمت واکوئل هدایت می‌شوند تا توسط آنزیم‌های هیدرولیتیکی واکوئل تخریب و به مواد اولیه تجزیه شوند. پروتئین ATG8 مشخصه مسیر اتوفاژی است که در شکل‌گیری اتوفاگوزوم و قرارگیری محموله‌های هدف برای تخریب شدن درون اتوفاگوزوم نقش دارد. در مسیر اتوفاژی انتخابی، حضور پذیرنده محموله برای قرارگیری محموله درون اتوفاگوزوم نقش مهمی ایفا می‌کند. پذیرنده‌ها دارای موتیف اتصال به ATG8 به نام AIM یا LIR هستند که می‌توانند با دمین LDS که جایگاه اتصال AIM/LIR در ATG8 است، میانکشی دهند. هرگونه تغییر در جایگاه LDS و یا موتیف AIM، سبب برهم خوردن میانکشی ATG8 و پذیرنده می‌شود. در تحقیق حاضر، گیاه *Marchantia polymorpha* با ATG8B جهش‌یافته در جایگاه LDS از طریق جهش هدفمند در محل، ایجاد شدند تا برای مطالعات آتی برای شناسایی پذیرنده‌های احتمالی مورد استفاده قرار گیرند. بدین منظور از طریق بلاست پروتئینی، توالی پروتئین ATG8B در گیاه مارکانتیا در پایگاه اطلاعاتی Marchantia.info شناسایی شد. از طریق هم‌ردیفی پروتئین‌های ATG8A از گیاه آراییدوپسیس با ATG8B گیاه مارکانتیا، اسید آمینه‌هایی که در تاخوردگی ATG8 و شکل‌گیری جایگاه LDS نقش دارند، شناسایی شدند. دو آمینواسید لیزین ۵۱ و آرژنین ۷۰، جداگانه با روش جهش هدفمند در محل با آمینواسید آلانین جایگزین شدند. سپس پروتئین فلورسنت GFP با کمک فناوری گرین‌گیت به پروتئین جهش‌یافته ATG8B اتصال یافت. به منظور حفظ شرایط یکسان با گیاهان حاوی ژن ATG8B وحشی موجود در آزمایشگاه، با طراحی آغازگرهای سازگار با گیت‌وی، پروتئین‌های جهش‌یافته درون سازه بیانی pMpGWB303 وارد و پس از انتقال به آگروباکتری سویه GWB303+pSOUP به گیاه انتقال داده شد. بررسی گیاهان تراریخته در آزمایشات وسترن بلات نشان داد که تنها فرم تغییر یافته لیزین به آدنین قابلیت بیان شدن و تشکیل پروتئین پایدار را دارد، در حالیکه با تغییر آرژنین به آلانین، پروتئین پایداری خود را از دست داده و قابلیت بیان ندارد.

واژه‌های کلیدی

اتوفاژی،
گرین‌گیت،
گیت‌وی،
AIM
LDS

مقدمه

باز یافت درون سلولی برای بسیاری از رخداد های سلولی پدیده مهمی است. در فرآیند باز یافت، علاوه بر اینکه سطوح تنظیم کننده های کلیدی تعدیل می شود، بقایای سلولی حذف، و مواد غذایی ضروری مورد نیاز برای رشد مجدد، جمع آوری می شوند. پایداری و نمو سلول اغلب بر اساس اجزای باز یافت شده تعریف می شود (Marshall and Vierstra, 2018). مهم ترین سیستم باز یافت درون سلول، سیستم یوبی کوئتین (Ub)-پروتئازوم است که تنها محدود به کاتابولیز پروتئین هاست (Vierstra, 2009). مسیر جبرانی برای تکمیل مسیر پروتئازوم در گیاهان و سایر یوکاریوت ها، اتوفاژی است. اتوفاژی واژه یونانی به معنی خودخواری است. این مسیر برای سامان دهی مواد سیتوپلاسمی، از جمله کمپلکس های پروتئین رسوب کرده، تجمع اسید های نوکلئیک و پروتئین، اجسام لیپیدی، و حتی کل اندامکی که صدمه دیده یا اضافی است، وارد عمل می شود (Masclaux-Daubresse et al. 2017). در اتوفاژی اجزای سیتوپلاسمی و بقایای سلولی برای تجزیه و تخریب به سمت واکوئل هدایت می شوند. برخلاف گذشته که تصور می شد اتوفاژی یک پدیده غیرانتخابی و تصادفی است، اخیراً معلوم شده است که مسیر اتوفاژی می تواند به صورت انتخابی و از طریق پذیرنده محموله (Cargo receptor) به اجزایی که قرار است تجزیه شوند، متصل شده و پس از بسته بندی آنها درون یک وزیکول دو غشایی به نام اتوفاگوزوم، به سمت واکوئل هدایت کند (Marshall et al. 2015; Li et al. 2014). در مسیر اتوفاژی انتخابی، پروتئین های اختصاصی کمپلکس های ماکرومولکول ها مانند ریبوزوم و پروتئازوم، پروتئین های قطعات شبکه آندوپلاسمی یا کل اندامک از جمله میتوکندری، پراکسیزوم، کلروپلاست و هسته و حتی پاتوزن های مهاجم می توانند به صورت انتخابی حذف شوند (Marshall and Vierstra, 2018). بر طبق مطالعات انجام شده اتوفاژی انتخابی سه مرحله اصلی دارد:

شناسایی محموله اتوفاژیک (جزئی که قرار است برای تخریب به واکوئل فرستاده شود)، فرستادن محموله به درون فاگوفور که شکل اولیه اتوفاگوزوم قبل از بسته بندی شدن وزیکول است، و

حذف محموله وارد شده از طریق ورود اتوفاگوزوم به درون واکوئل (Stephani and Dagdas, 2020).

بیش از ۳۰ پروتئین ATG (ژن های مرتبط به اتوفاژی Autophagy related genes) برای فعالیت اتوفاژی مورد نیاز هستند. از میان ژن های ATG، ATG8 در تمام مراحل شکل گیری اتوفاژی دارای نقش اصلی است و به نوعی می توان این پروتئین را نشانگر اتوفاگوزوم و مسیر اتوفاژی تعریف کرد (Wang et al. 2017). ATG8 در نقش آداپتور با پذیرنده های محموله ای که دارای موتیف خطی کوتاه به نام موتیف واکنش دهنده با ATG8 (LIR/AIM: ATG8 interacting motif) هستند و برچسب های اتوفاژی (مانند زنجیره ی پلی یوبی کوئتین یا لکترین های سیتوسولی) دارند، میانکنش می دهد (Noda et al. 2010; Stepahni and Dagdas, 2020). توالی مرکزی AIM در پذیرنده محموله از یک آمینو اسید آروماتیک تشکیل شده است (تریپتوفان، تیروزین یا فنیل آلانین) که به دنبال آن دو آمینو اسیدی که می توانند از هر نوعی باشند، قرار می گیرند، سپس آمینو اسید های شاخه دار (مانند لوسین، ایزولوسین و والین) قرار می گیرند که به طور کلی با اسید های آمینه با بار منفی احاطه شده اند: [W/F/Y-XX-L/I/V] (Noda et al. 2010; Birgisdottir et al. 2013; Maqbool et al. 2016). علیرغم تنوع ساختاری پذیرنده های محموله، اغلب پذیرنده های محموله جایگاه میانکنش مشابهی با ATG8 دارند که این جایگاه در مجاورت و بین اسید آمینه [W/F/Y] و [L/I/V] قرار دارد. فسفوریلاسیون توالی AIM پذیرنده با اسید های آمینه مجاور، میانکنش آن را با ATG8 افزایش می دهد (Matsumoto et al. 2011). محل اتصال موتیف پذیرنده ها به ATG8، دو پاکت هیدروفوبیک تریپتوفان (W) و لوسین (L) است که به آن جایگاه اتصال LIR (LIR docking site) گفته می شود. این پاکت ها، جایگاه اتصال تریپتوفان و لوسین در موتیف AIM می باشند و به همین دلیل به ترتیب W و L نامگذاری شده اند. در *Saccharomyces cerevisiae* پاکت W در پروتئین ATG8 دارای زنجیره های جانبی اسید گلوتامیک، ایزولوسین، پرولین، لیزین، لوسین و فنیل آلانین (Glu, Ile, Pro, Lys, Leu و Phe) و پاکت L دارای زنجیره های جانبی تیروزین، والین، پرولین، لوسین، فنیل آلانین و والین (Tyr, Val, Pro, Leu و Phe) هستند.

برای برهم زدن اتصال ATG8B و پذیرنده‌های احتمالی در نظر گرفته شد. این تغییرات به آسانی با فناوری جهش مستقیم در محل (SDM: site directed mutagenesis) قابل اجرا است. در این مطالعه از ATG8B وحشی که در سازه ورودی گرین گیت به نام pGGC000، همسانه‌سازی شده بود به عنوان نمونه هدف در SDM استفاده شد. LDS جهش یافته به منظور اتصال به پروتئین فلورسنت GFP به طور مستقیم وارد واکنش گرین گیت شد. پس از همسانه‌سازی ATG8B جهش یافته درون سازه مقصد گرین گیت، pGGSUN، با طراحی آغازگرهای دارای دنباله‌های سازگار با گیت‌وی، GFP به همراه ATG8B از pGGSUN جدا شده و با فناوری گیت‌وی درون سازه مقصد pMpGWB303 قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: جنس نر گیاه *M. polymorpha* TAK1، از طریق انتقال جمای (اندام بذر-مانند) به محیط 1/2 Gamborg's B5 (1/2GB5) حاوی ۱ درصد آگار در شرایط استریل تکثیر شد. اتاقک‌های رشد دارای نور سفید دائمی ۵۰ تا ۶۰ mmol فوتون $m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد شرایط بهینه برای رشد این گیاه است (Kubota et al. 2013).

تکثیر ژن ATG8B با تغییرات آمینواسیدی در جایگاه LDS با استفاده از فناوری جهش مستقیم در محل: توالی آمینواسیدی ژن ATG8B با روش بلاست پروتئینی در پایگاه اطلاعاتی Marchantia.info شناسایی شد. با بررسی توالی آمینواسیدی و هم‌ردیفی با پروتئین ATG8A گیاه آراییدوپسیس، جایگاه LDS در مارکانتیا شناسایی شد. دو جهش جداگانه K51A و R70A برای تخریب جایگاه LDS در نظر گرفته شد. برای طراحی آغازگر حاوی جهش‌های مورد نظر cDNA ATG8B در وبگاه <https://www.bioinformatics.org/primerx> قرار داده شد. از میان آغازگرهای پیشنهادی، یک جفت آغازگر رفت و برگشت جداگانه برای هر یک از تغییرات آمینواسیدی در نظر گرفته شد (جدول ۱). از ATG8B وحشی همسانه‌سازی شده در سازه ورودی pGGC000، از سازه‌های لازم در واکنش گرین گیت، به

آمینواسیدهای نامبرده درون پاکت W و L، به خصوص پاکت W در بین اعضای خانواده ATG8 بسیار حفاظت شده‌اند. پاکت L در بین همولوگ‌های ATG8 کمی تنوع نشان داده است (Noda et al. 2010). تغییرات در آمینواسیدهای واقع در این دو پاکت هیدروفوبی می‌تواند اتصال پذیرنده‌ها به LDS را مختل کرده و مانع از جریان اتوفاژی شود. تغییر در توالی آمینواسیدی جایگاه LDS ژن ATG8 و برهم زدن میانکنش ATG8 و پروتئین محموله، یکی از روش‌های تایید پذیرنده محموله است.

گیاه *Marchantia polymorpha* گیاهی دو پایه از گونه جگرواش (liverwort)، دارای هر دو چرخه زندگی هاپلوئیدی و دیپلوئیدی است. با این حال چرخه زندگی هاپلوئیدی، فاز غالب چرخه زندگی این گیاه است. مارکانتیا با ژنوم کوچک ۲۵۰ مگابازی جزء اولین ژنوم‌هایی بوده است که به طور کامل توالی‌یابی شده است. مهم‌ترین ویژگی مارکانتیا پایین بودن تکرارهای ژنتیکی است. از جمله می‌توان به وجود تنها دو ایزوفرم A و B از ATG8 در این گیاه در مقایسه با *Arabidopsis thaliana* که دارای نه ایزوفرم از این ژن است، اشاره نمود (Sauret-Güeto et al. 2020; Kohchi et al. 2021; Ishizaki et al. 2016).

در شناسایی پروتئین‌های پذیرنده محموله، علیرغم اینکه پیشرفت‌های قابل ملاحظه‌ای در مطالعه اتوفاژی در پستانداران حاصل شده است، در گیاهان چگونگی بازیافت ترکیبات صدمه دیده تا حد زیادی ناشناخته باقی مانده است. گیاهان اغلب فاقد پذیرنده‌های محموله همولوگ با پذیرنده‌های محموله شناخته شده در پستانداران هستند و بنابراین بازیافت ارگانل‌ها در مسیر اتوفاژی در گیاهان همچنان نیازمند شفاف‌سازی است (Stephani and Dagdas, 2020).

هدف از این مطالعه تولید گیاهان مارکانتیا با تغییرات آمینواسیدی در جایگاه LDS به منظور برهم زدن توانایی ATG8B برای اتصال به پذیرنده‌های محموله است. این گیاهان در مطالعات آتی همراه با گیاهان وحشی برای آزمایشات طیف‌سنجی جرمی (IP-MS) به منظور شناسایی و تایید پذیرنده‌های محموله مورد استفاده قرار خواهند گرفت. برای ایجاد لاین‌های LDS جهش یافته، دو تغییر در آمینواسیدهای لیزین در پاکت W و آرژنین در پاکت L

گرین‌گیت شدند. برای قرارگیری صحیح هر جز درون سازه مقصد، حضور همهٔ مدل‌ها که دارای زائده‌های چسبندهٔ متفاوت و مکمل هستند ضروری است. پس از انتقال محصولات واکنش به *E. coli* و تشکیل کلونی در محیط جامد انتخابی آنتی‌بیوتیک اسپکتینومایسین، با آغازگرهای میانی واکنش PCR انجام شد، سپس از کلونی‌های مثبت پلاسمید استخراج شده و برای تایید قرارگیری صحیح مدل‌ها و تغییرات ژن ATG8B توالی‌یابی شدند (جدول ۲).

همسانه‌سازی ATG8B متصل به پروتئین فلورسنت GFP درون سازه مقصد pMpGWB303 با فناوری گیت‌وی: یک پلاسمید از پلاسمیدهای حاوی GFP-ATG8B-K51A و GFP-ATG8B-R70A با توالی‌یابی صحیح، برای ورود به سازه بیانی گیت‌وی انتخاب شدند. ابتدا با آغازگرهای طراحی شده از ابتدای GFP و انتهای ATG8B و دارای دنباله‌های سازگار با گیت‌وی (جدول ۱)، GFP به همراه ATG8B از پلاسمید گرین‌گیت تکثیر شده و پس از خالص‌سازی، با کیت آنزیم BP کلوناز شرکت ترموفیشر (آمریکا) درون سازه ورودی گیت‌وی pDONR221 همسانه‌سازی شدند. از کلونی‌های مثبت تشکیل شده بر روی محیط جامد انتخابی کانامایسین در واکنش PCR، پلاسمید استخراج شده و توالی‌یابی شدند. پلاسمیدهای دارای توالی صحیح با کیت آنزیم LR کلوناز شرکت ترموفیشر در واکنش گیت‌وی وارد سازه مقصد pMpGWB303 حاوی ژن مقاومت به کلروسولفورون شدند. کلونی-PCR بر روی کلون‌های تشکیل شده در محیط جامد انتخابی اسپکتینومایسین انجام شده و پلاسمید کلونی‌های مثبت توالی‌یابی شدند. پس از تایید، با استفاده از روش الکتروپوریشن به *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101+pSoup انتقال داده شدند.

تراریختی و باززایی: جنس نر گیاه مارکانتیا، TAK1، در محیط 1/2GB5 به مدت دو هفته کشت داده شد. گیاهان بالغ به روش تراریختی تالوس که اندام برگ‌مانند گیاه است، (Kubota et al., 2013) تلقیح و در محیط 1/2GB5 حاوی آنتی بیوتیک‌های کلروسولفورون و تیکارسیلین بدون هورمون منتقل شدند. بعد از بازهٔ زمانی دو الی سه هفته گیاهان باززا ظاهر شده و به طور

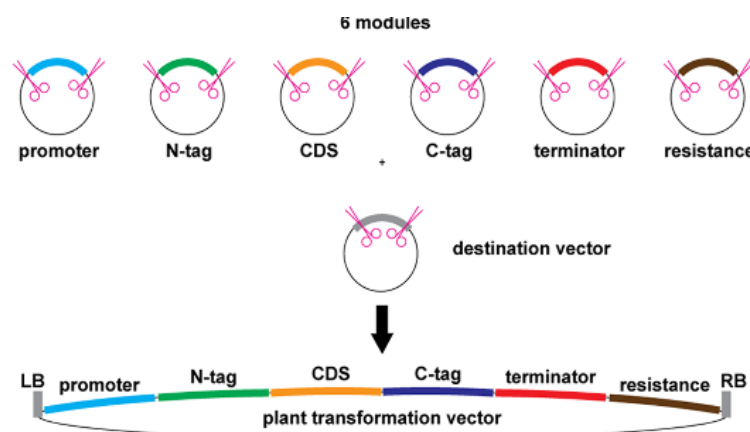
عنوان نمونه هدف برای تکثیر با آغازگرهای تغییر یافته در واکنش PCR استفاده شد. بدین ترتیب در پایان واکنش ATG8B با تغییرات نوکلئوتیدی دلخواه درون سازه ورودی گرین‌گیت به دست آمد. به منظور کاهش میزان خطاهای احتمالی در زمان واکنش PCR از آنزیم پلیمرز Q5 با قابلیت تصحیح اشتباه که دارای دقت بالا در همانندسازی قطعات بلند در زمانی کوتاه است، بهره بردیم. سپس به محصول PCR آنزیم *DpnI* اضافه شد تا نمونه DNA والدی که پس از انتقال به *E. coli* متیله شده‌اند، هضم شوند. محصول PCR بدون خالص‌سازی به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. از میان کلونی‌های تشکیل شده بر روی محیط جامد انتخابی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، ۵ کلونی برای استخراج پلاسمید به تصادف انتخاب و پلاسمیدهای حاصل از آنها توالی‌یابی شدند.

الحاق پروتئین فلورسنت GFP به ژن ATG8B با فناوری گرین‌گیت: به طور خلاصه فناوری گرین‌گیت بهره‌گیری از واکنش‌های هضم و اتصال در یک مرحله است. در این فناوری ابتدا اجزای سازه بیانی شامل پروموتر، N-تگ، CDS، C-تگ، پایان‌دهنده و ژن مقاومت به طور جداگانه درون مدل‌های ورودی الحاق می‌شوند. ویژگی مشترک همهٔ این سازه‌ها، جایگاه شناسایی آنزیم *BsaI* است (شکل ۱، الف). محل برش این آنزیم، نامتقارن و متفاوت از جایگاه شناسایی آن است. به همین دلیل انتهای چسبنده ایجاد می‌شود، علاوه بر این می‌توان نوکلئوتیدهای متفاوتی را در جایگاه برش هر مدل (Module) در نظر گرفت (شکل ۱، ب). هر مدل جداگانه با آنزیم *BsaI* هضم شده و با قطعه مورد نظر (پروموتر، N-تگ و ...) وارد واکنش اتصال می‌شود. سپس همهٔ مدل‌ها دارای قطعات ورودی به همراه سازه بیانی مقصد در واکنش گرین‌گیت وارد شده و به ترتیب جایگاه، درون سازه بیانی قرار می‌گیرند. برای قرارگیری به ترتیب مدل‌ها درون سازه بیانی، انتهای ۳' هر مدل دارای نوکلئوتیدهای مکمل با ابتدای ۵' مدل بعدی است (Lampropoulos et al. 2013). پلاسمید ورودی حاوی ATG8B تغییر یافته با توالی صحیح به همراه مدل حاوی پروموتر EF، مدل حاوی GFP برای انتهای N، مدل پایان‌دهنده NOS، مدل حاوی ژن مقاومت کلروسولفورون و سازه بیانی مقصد pGGSUN وارد واکنش

تقریبی بعد از ۶ هفته، برای آزمون‌های ارزیابی تراریختی آماده شدند.

وسترن بلات برای تأیید لاین‌های بیش‌بیا: گیاهان باززا شده در دو محیط مجزای 1/2GB5 جامد واکشت شدند. یک محیط برای نگهداری گیاهان احتمالی مثبت تراریخت و محیط دیگر برای رشد گیاهان برای آزمون وسترن بلات. ۷ الی ۱۰ روز پس از

واکشت، گیاهان کشت داده شده برای استخراج پروتئین و آزمون وسترن بلات جمع‌آوری شدند. استخراج پروتئین کل با بافر GTEN مطابق دستورالعمل انجام شده و از طریق الکتروفورز ژل پلی‌اکریل آمید ۱۲/۵ درصد (SDS-PAGE) و انتقال بر روی غشای نیتروسلولزی (BioRad) جدا سازی شد. برای آشکارسازی پروتئین از آنتی‌بادی GFP استفاده شد.



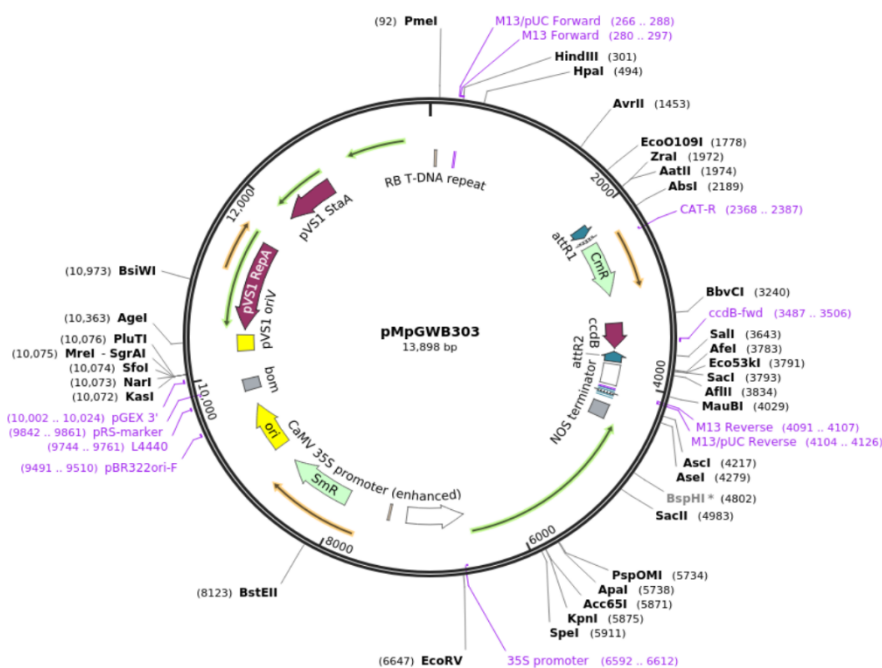
الف

"A"	ACCT- promoter -AACA	"B"
"B"	AACA- N-tag -GGCT	"C"
"C"	GGCT- CDS -TCAG	"D"
"D"	TCAG- C-tag -CTGC	"E"
"E"	CTGC- terminator -ACTA	"F"
"F"	ACTA- resistance -GTAT	"G"

ب

شکل ۱- الف، شش مدل ورودی متفاوت برای ورود به سازه مقصد. قیچی روی هر سازه محل برش توسط آنزیم *BsaI* است. هر مدل حاوی یک جز از اجزای لازم برای سازه بیانی است. این مدل‌ها در واکنش گرین‌گیت بین مرز راست و چپ سازه مقصد وارد می‌شوند. ب، ۷ زائده متفاوت برای به ترتیب قرار گرفتن مدل‌ها در سازه بیانی. هر مدل در انتهای ۵' خود با انتهای ۳' مدل بعدی جفت می‌شود. هر زائده حداقل دارای دو نوکلئوتید متفاوت از چهار نوکلئوتید است.

Figure 1. A, six entry modules for inserting to destination vector. The scissors represent *BsaI* recognition sites. Each module is one component of required components for the destination vector. In each GreenGate reaction, six modules are inserted between the left border (LB) and the right border (RB) sequences of the destination vector. B, each module is flanked at its 5'-end by the same overhang as the 3'-end of the next module. The individual overhangs are different from each other by at least two out of the four nucleotides.



شکل ۲- نقشه سازه بیانی pMpGWB303 اختصاصی گیاه مارکانتیا برای واکنش گیت‌وی و فاقد پروتئین فلورسنت GFP. این سازه دارای پروموتور اختصاصی EF و ژن مقاومت اسپیکتینومايسين برای باکتری و ژن مقاومت کلروسولفورون برای گیاه تراریخت است.

Figure 2. pMpGWB303, the Gateway destination vector lacking the GFP fluorescent. This vector includes the EF promoter, the specific promoter for *M. polymorpha* and Spectinomycin resistance marker for bacteria and chlorsulfuron for transformed plant.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدی آغازگرها به کار رفته در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای تکثیر ATG8B K51A و ATG8B R70A برای جهش مستقیم در محل و برای تکثیر GFP-ATG8B K51A و GFP-ATG8B R70A برای گیت‌وی. (ناحیه خط کشی در توالی دنباله اتصالی به سازه مقصد گیت‌وی است).

Table 1. List of primers used in PCR for amplification of ATG8B K51A and ATG8B R70A for site directed mutagenesis and amplification of GFP-ATG8B K51A and GFP-ATG8B R70A for Gateway.

هدف	توالی نوکلئوتیدی	آغازگر
SDM	5' CGACATCGACAAGAAGGCGTTTCTGGTGCCGGTG 3'	آغازگر رفت-K51A
SDM	5' CACCGGCACCAGAAACGCCTTCTTGTCGATGTCG 3'	آغازگر برگشت-K51A
SDM	5' GTGTTTCGTCATCCGCAAGGCAATGAAGCTGACGCCGGAG 3'	آغازگر رفت-R70A
SDM	5' CTCCGGCGTCAGCTTCATTGCCTTGCGGATGACGAACAC 3'	آغازگر برگشت-R70A
گیت‌وی	5' <u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3'	آغازگر رفت-GFP-ATG8B
گیت‌وی	5' <u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT</u> GCCAACGAGGGCGACCTCGTC 3'	آغازگر برگشت-GFP-ATG8B

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای به کار رفته برای کلونی-PCR و توالی‌یابی

Table 2. List of primers for colony-PCR and sequencing

هدف	توالی نوکلئوتیدی	آغازگر
گرین گیت و گیت‌وی	5' ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3'	آغازگر رفت-آنها-ATG8B
گرین گیت و گیت‌وی	5' GCCAACGAGGGCGACCTCGTC 3'	آغازگر برگشت-آنها-ATG8B
گرین گیت و گیت‌وی	5' AGCTGGAGTACAACACTACAAC 3'	آغازگر رفت-میانی-GFP
گرین گیت و گیت‌وی	5' GTTGTAGTTGTACTCCAGCT 3'	آغازگر برگشت-میانی-GFP
گیت‌وی	5' GCTGAGGCCAATCTGGAATAGC 3'	آغازگر برگشت-M13

نتایج و بحث

آماده‌سازی سازهٔ بیانی برای ورود **GFP-ATG8B-K51A** و **GFP-ATG8B-R70A** به درون گیاه: توالی نوکلئوتیدی **ATG8B** با بلاست پروتئینی از وبگاه Marchantia.info شناسایی شد. ژن **ATG8B** در گیاه مارکانتیا دارای ۳۹۳ جفت باز و وزن پروتئینی ۱۴/۸۱ کیلودالتون است. پس از هم‌ردیفی با پروتئین **ATG8A** از گیاه آرابیدوپسیس، باقی‌مانده‌های آمینواسیدی **LDS** در دو پاکت **W** و **L** مشخص شدند. پاکت **W** جایگاه **LDS** در آمینواسیدهای اسید گلوتامیک ۲۰، ایزولوسین ۲۴، پرولین ۳۳، ایزولوسین ۳۵، لیزین ۵۱، لوسین ۵۳ و فنیل آلانین ۱۰۷ (**E20**، **I24**، **P33**، **K51**، **L53** و **F107**) شناسایی شده است (شکل ۳، حروف قرمز). همچنین پاکت **L** جایگاه **LDS** در آمینواسیدهای والین ۳۶، فنیل آلانین ۵۲، والین ۵۴، پرولین ۵۵، لوسین ۵۸، فنیل آلانین ۶۳، والین ۶۶، ایزولوسین ۶۷ و آرژنین ۷۰ (**V36**، **F52**، **V54**، **P55**، **L58**، **F63**، **V66**، **I67** و **R70**) شناسایی شده است (شکل ۳، حروف سبز). از میان این باقی‌مانده‌ها، دو تغییر آمینواسیدی لیزین جایگاه ۵۱ به آلانین از پاکت **W** (**K51A**) و آرژنین جایگاه ۷۰ به آلانین از پاکت **L** (**R70A**) به عنوان دو احتمال برای از بین بردن جایگاه **LDS** انتخاب شدند. برای اعمال تغییرات در ژن مورد نظر، علاوه بر سنتز ژن، می‌توان از روش جهش‌زایی هدفمند در محل که روشی ساده و نسبتاً ارزانی است، بهره برد. اساس **SDM** بکارگیری سازهٔ حاوی **DNA** دو رشته‌ای قطعهٔ مورد نظر و دو آغازگر الیگونوکلئوتیدی است که هر دو آغازگر دارای جهش‌های دلخواه هستند. هر یک از آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی مکمل یک رشته از دو رشتهٔ سازهٔ **DNA** است و در طول واکنش **PCR** به رشتهٔ مکمل خود اتصال می‌یابد. در پایان واکنش قطعهٔ تکثیر یافته دارای جهش دلخواه در جایگاه مورد نظر است. آنزیم **DpnI** نیز که به محصول **PCR** اضافه می‌شود، آنزیم اندونوکلئازی با توالی هدف 5'-Gm6ATC-3' است و دارای عملکرد اختصاصی برای **DNA** متیله شده و نیمه متیله شده است. به همین دلیل **DNA** والدی که از قبل در باکتری *E. coli* متیله شده‌اند، حذف می‌شوند و در نتیجه می‌توان تنها نمونه‌های **DNA** تازه سنتز شده‌ای را که موتانت شده‌اند به باکتری *E. coli*

انتقال داد. اما برای اطمینان از نتایج حاصل از **IP-MS**، قدم اول، ایجاد شرایط انتقال مشابه برای هر دو لاین **GFP-ATG8B** وحشی و تغییر یافته است. در آزمایشگاه محل تحقیق، گیاهان تراریخت دارای ژن‌های وحشی **ATG8B**، گیاهان اهدایی از دپارتمان Basic biology ژاپن بوده است. در این گیاهان از سازهٔ بیانی **pMpGWB303** سازگار با فناوری گیت‌وی برای انتقال **GFP-ATG8B** استفاده شده است. سازهٔ مذکور فاقد پروتئین فلورسنت است که وجود آن برای آزمایشات **IP-MS** ضروری است، هر چند که به سازه مزیت انعطاف‌پذیری برای اضافه کردن هر نوع پروتئین فلورسنتی را می‌دهد. با بررسی‌های انجام شده معلوم شد که ساده‌ترین و سریع‌ترین راه اتصال **GFP** به **ATG8B** بکارگیری فناوری گرین‌گیت است. به این ترتیب از **ATG8B** وحشی از قبل همسانه‌سازی شده در سازهٔ ورودی گرین‌گیت به نام **pGGC000**، به عنوان نمونهٔ هدف در **SDM** استفاده شد. بنابراین با این روش، نیازی به همسانه‌سازی مجدد **ATG8B** درون سازهٔ ورودی **pGGC000** نخواهد بود و سازهٔ ورودی به طور مستقیم می‌تواند وارد واکنش گرین‌گیت و پس از اتصال **GFP**، درون سازهٔ گیت‌وی قرار گیرد. اساس تایید حضور ژن **ATG8B** با تغییرات اعمال شده، توالی‌یابی پلاسמיד در هر مرحله بوده است.

MGSEFQFKQTTNLESRQA**E**SAR**I**LEKYPDRV**P**V**I**V
KRADKSSIPDIDKK**K****F****L****V****P****V****D**LAVGQ**F**V**F****V**IRK**R****M****K**
LTPEKAIFV**F**V**K****D****V****L****P****P****T****S****A****M****M****A****Q****I****Y****D****E****Y****K****D****Q****D****G****F****L**
YMTYSGENTFGSSHDDEVALVG

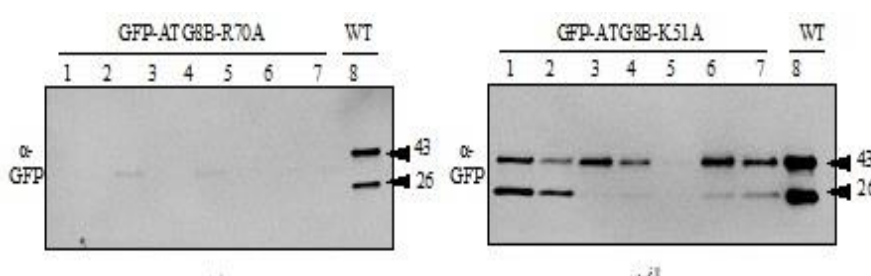
شکل ۳- توالی آمینواسیدی **ATG8B**. باقی‌مانده‌های موجود در پاکت **W** و **L** به ترتیب با رنگ‌های قرمز و سبز نشان داده شده است.

Figure 3. ATG8B amino acid sequence. The residues constituting W- and L-sites are colored red and green, respectively.

ارزیابی گیاهان تراریخت با وسترن بلات: پس از انتقال سازه به درون گیاه، ۷ گیاه باززا شده، برای استخراج پروتئین انتخاب شدند. برای اطمینان از حضور **ATG8B** در گیاه، از آنتی‌بادی **GFP** در آزمون وسترن بلات استفاده شد. علیرغم تغییر آمینواسیدی در پروتئین **ATG8** در عمل نباید هیچ‌گونه تغییری در

باززای شماره ۲ و ۴ باندی ضعیف کوچکتر از ۴۳ کیلو دالتون و بزرگتر از ۲۶ کیلودالتون مشاهده شد، ما را بر آن داشت که از حضور سازه درون گیاه اطمینان یابیم. استخراج DNA و به دنبال آن توالی‌یابی با آغازگرهای GFP و ATG8 اختصاصی حضور سازه را در سطح DNA تایید می‌کرد. اما با توجه به مشابه بودن تمام مراحل کار برای انتقال هر دو سازه، یکی از دلایلی را که می‌توان به عدم بیان ATG8 با تغییر مورد نظر ربط داد، عدم پایداری پروتئین است که این خود می‌تواند به دلیل تاخوردگی ناصحیح پروتئین ایجاد شود.

تاخوردگی و بیان مناسب این پروتئین ایجاد شود و انتظار می‌رود باندهای قابل مشاهده در نتایج وسترن بلات مشابه باندهای قابل مشاهده برای لاین وحشی باشد. در نتایج وسترن بلات، مطابق انتظار دو باند برای لاین وحشی مشاهده شد. در حالیکه از دو جهش ایجاد شده تنها یک جهش توانسته به خوبی بیان شود و تاخوردگی مناسب داشته باشد. لازم به توضیح است که از دو باند مشاهده شده، باند با وزن مولکولی حدود ۲۶ کیلودالتون (باند پایین) متعلق به GFP و باند با وزن مولکولی حدود ۴۶ کیلودالتون (باند بالا) متعلق به ATG8B متصل شده به پروتئین GFP است (شکل ۴). از آنجایی که در لاین جهش یافته R70A، در گیاهان



شکل ۴- نتایج وسترن بلات گیاهان تراریخت شده الف، GFP-ATG8B-K51A و ب، GFP-ATG8B-R70A. باندهای مشاهده شده در وزن مولکولی ۲۶ کیلودالتون، باند مربوط به GFP آزاد و باندهای مشاهده شده در وزن ۴۳ کیلودالتون، باند مربوط به GFP و ATG8 است. شماره‌های ۱ تا ۷ در هر تصویر، تعداد گیاهان باززای مورد ارزیابی است. ردیف شماره ۸، گیاه GFP-ATG8 بدون جهش است که به عنوان لاین وحشی و کنترل آورده شده است. ۴ گیاه از ۷ گیاه باززا برای K51A بیان GFP و ATG8 را به خوبی نشان داده‌اند، در حالیکه برای R70A هیچ گیاه باززایی بیان GFP-ATG8 را نشان نداده است.

Figure 4. Western blot for genotyping of transformed plants, A, GFP-ATG8B-K51A and B, GFP-ATG8B-R70A. The band equal with 26 KD is referred to free GFP and 43 KD is referred to GFP+ATG8B. The number of 1 to 7 represents the number of regenerated plants tested for transforming. The lane of 8 is GFP+ATG8 without mutation representing the control. In K51A, GFP and ATG8 is well-expressed in 4 out of 7 of the regenerated plants, although there is no expression for R70A.

ایجاد شده بعد از جهش باشد. اما تغییر در باقی‌مانده لیزین ۵۰ و تبدیل آن به آلانین تغییری در بیان پروتئین ایجاد نکرده است و این پروتئین می‌تواند همانند پروتئین طبیعی، پایدار باشد و بیان شود.

جهش در جایگاه LDS در پروتئین ATG8 روشی متداول در مطالعات مرتبط به مسیر اتوفازای است. این روش هم در تایید پروتئین‌های احتمالی به عنوان پذیرنده‌های محموله و هم در مطالعات مربوط به طیف‌سنجی جرمی برای شناسایی اولیه پروتئین‌های واکنش‌دهنده با ATG8 بسیار کاربرد دارد. از جمله در مطالعه میانکنش ATG4B و LC3B (همولوگ ATG8) در مخمر، برای اثبات میانکنش بین این دو پروتئین، LC3B در دو

در مطالعه حاضر دمین LDS که جایگاه اتصال پذیرنده محموله در ژن ATG8B است، با روش جهش‌زایی هدفمند در محل در گیاه *M. polymorpha* جهش داده شد. ژن جهش یافته با عدم توانایی اتصال به پذیرنده محموله با فناوری گرین‌گیت به پروتئین GFP متصل شده و با فناوری گیت‌وی به گیاه *M. polymorpha* انتقال داده شد. گیاهان تراریخته برای انجام آزمایشات مس-اسپکترومتری مورد استفاده قرار خواهند گرفت تا به شناسایی پروتئین‌هایی که به عنوان پذیرنده محموله عمل می‌کنند، کمک کند. در این بررسی نشان داده شده است که تغییرات آمینواسیدی در جایگاه آرژنین ۷۰ و تبدیل آن به آلانین، قابلیت بیان شدن در گیاه مارکانتیا را ندارد که می‌تواند به دلیل عدم پایداری پروتئین

است، گیاه مارکانتیا با داشتن دو ایزوفرم از این ژن می‌تواند به مطالعه آسان‌تر و سریع‌تر برای یافتن پذیرنده‌های اتوفاژی و ارجاع نتایج آن به گیاهان عالی‌تر کمک شایانی کند.

در این تحقیق از دو فناوری گرین‌گیت و گیت‌وی برای همسازسازی ژن ATG8B جهش‌یافته استفاده شد. فناوری گرین‌گیت متشکل از سازه‌های ورودی مورد نیاز برای بیان ژن خارجی است که همه آنها همراه با ژن مورد نظر در یک واکنش هضم و اتصال همزمان به سازه مقصد وارد می‌شوند. ویژگی مهم این فناوری، به کارگیری آنزیم‌های هضم نوع II است که دارای هضم نامتقارن و جایگاه برشی خارج از جایگاه شناسایی است. برای اطمینان از کیفیت و صحت توالی هر سازه، می‌توان هر سازه را جداگانه توالی‌یابی کرد، که این خود مزیتی نسبت به روش‌های کلون‌سازی کلاسیک است. در روش‌های کلون‌سازی کلاسیک به دلیل پیچیدگی‌های توالی‌یابی، تغییرات ناخواسته ایجاد شده، درون سازه باقی می‌ماند و می‌تواند به درون گیاه نیز وارد شود. روش گیت‌وی نیز به عنوان یک روش مستقل از واکنش اتصال، فاقد انعطاف‌پذیری فناوری گرین‌گیت است. در این روش نیز در حین واکنش، امکان ایجاد تغییرات ناخواسته درون سازه وجود دارد که می‌تواند وارد گیاه شود. همچنین گیت‌وی در مقایسه با فناوری گرین‌گیت، به دلیل وجود آنزیم‌های کلوناز بسیار هزینه‌بر است (Lampropoulos et al. 2013).

جایگاه F80A و L82A جهش داده شد. مشاهدات نشان داد که میانکنش این دو پروتئین مختل شده است که استدلالی بر این واقعیت بود که ATG4B در جایگاه LDS با LC3B میانکنش می‌دهد (Rusmussen et al. 2017). همچنین می‌توان برای تعیین جایگاه دقیق میانکنش پروتئین پذیرنده محموله با پروتئین ATG8 از LDS تغییر یافته بهره برد. همچنانکه نشان داده شده است وجود جهش دوتایی YL49AA در پاکت W در پروتئین همولوگ ATG8 در سلول‌های انسانی، سبب برهم‌خوردن میانکنش آن با پروتئین C53 که پروتئین پذیرنده محموله در شرایط تنش شبکه آندوپلاسمی است، می‌شود. اما جهش P52A و R67A در پاکت L یا جهش دوتایی KK64AA تغییری در این میانکنش ایجاد نمی‌کند (Stephani et al. 2020). در مطالعه دیگری نشان داده شده است که بعضی از پروتئین‌ها مستقل از AIM/LIR عمل کرده و در جایگاه دیگری غیر از جایگاه LDS به ATG8 متصل می‌شوند. در این مطالعه یکی از ایزوفرم‌های ATG8 در آرابیدوپسیس، ATG8A، در دو جایگاه Y50A و L51A جهش داده شد. اما این جهش سبب از بین رفتن میانکنش میان پروتئین پذیرنده RPN10 و ATG8 نشده است. که در نهایت نشان داده شد که این پذیرنده در جایگاه دیگری به نام موتیف واکنش‌دهنده با یوبیکوئیتین (UIM: ubiquitin-interacting motif) با ATG8 میانکنش دارد (Marshall et al. 2019).

گیاه مورد مطالعه در این تحقیق گیاه *Marchantia polymorpha* است. در مقایسه با گیاه آرابیدوپسیس که دارای نه ایزوفرم ATG8

منابع

- Birgisdottir, A. B., Lamark, T., & Johansen, T. 2013. The LIR motif—crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* 126(15):3237-3247.
- Ishizaki, K., Nishihama, R., Yamato, K.T. and Kohchi, T. 2016. Molecular genetic tools and techniques for *Marchantia polymorpha* research. *Plant and Cell Physiology* 57(2):262-270.
- Kohchi, T., Yamato, K.T., Ishizaki, K., Yamaoka, S. and Nishihama, R. 2021. Development and molecular genetics of *Marchantia polymorpha*. *Annual Review of Plant Biology* 72.
- Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M. and Kohchi, T. 2013. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of the liverwort *Marchantia polymorpha* using regenerating thalli. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 77(1):167-172.
- Lampropoulos, A., Sutikovic, Z., Wenzl, C., Maegele, I., Lohmann, J.U. and Forner, J. 2013. GreenGate—a novel, versatile, and efficient cloning system for plant transgenesis. *PloS one* 8(12):83043.
- Li F, Chung T, Vierstra RD. 2014. AUTOPHAGY-RELATED11 plays a critical role in general autophagy and senescence-induced mitophagy in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:788–807

- Maqbool, A., Hughes, R.K., Dagdas, Y.F., Tregidgo, N., Zess, E., Belhaj, K., Round, A., Bozkurt, T.O., Kamoun, S. and Banfield, M.J. 2016.** Structural basis of host autophagy-related protein 8 (ATG8) binding by the Irish potato famine pathogen effector protein PexRD54. *Journal of Biological Chemistry* 291(38):20270-20282.
- Marshall RS, Li F, Gemperline DC, Book AJ, Vierstra RD. 2015.** Autophagic degradation of the 26S proteasome is mediated by the dual ATG8/ubiquitin receptor RPN10 in Arabidopsis. *Mol.Cell* 58:1053-66
- Marshall, R.S. and Vierstra, R.D. 2018.** Autophagy: the master of bulk and selective recycling. *Annual Review of Plant Biology* 69:173-208.
- Marshall, R.S., Hua, Z., Mali, S., McLoughlin, F. and Vierstra, R.D. 2019.** ATG8-binding UIM proteins define a new class of autophagy adaptors and receptors. *Cell* 177(3):766-781.
- Masclaux-Daubresse, C., Chen, Q. and Havé, M. 2017.** Regulation of nutrient recycling via autophagy. *Current opinion in plant biology* 39:8-17.
- Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M., & Nukina, N. 2011.** Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Molecular cell* 44(2):279-289.
- Noda, N.N., Ohsumi, Y. and Inagaki, F. 2010.** Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS letters* 584(7):1379-1385.
- Sauret-Gueto, S., Frangedakis, E., Silvestri, L., Rebmann, M., Tomaselli, M., Markel, K., Delmans, M., West, A., Patron, N.J. and Haseloff, J. 2020.** Systematic Tools for Reprogramming Plant Gene Expression in a Simple Model, *Marchantia Polymorpha*. *BioRxiv*.
- Skytte Rasmussen, M., Mouilleron, S., Kumar Shrestha, B., Wirth, M., Lee, R., Bowitz Larsen, K., Abudu Princely, Y., O'Reilly, N., Sjøttem, E., Tooze, S.A. and Lamark, T., 2017.** ATG4B contains a C-terminal LIR motif important for binding and efficient cleavage of mammalian orthologs of yeast Atg8. *Autophagy* 13(5):834-853.
- Stephani, M. and Dagdas, Y. 2020.** Plant selective autophagy—still an uncharted territory with a lot of hidden gems. *Journal of molecular biology* 432(1):63-79.
- Stephani, M., Picchianti, L., Gajic, A., Beveridge, R., Skarwan, E., de Medina Hernandez, V.S., Mohseni, A., Clavel, M., Zeng, Y., Naumann, C. and Matuszkiewicz, M. 2020.** A cross-kingdom conserved ER-phagy receptor maintains endoplasmic reticulum homeostasis during stress. *Elife* 9:58396.
- Vierstra, R.D. 2009.** The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(6):385-397.
- Wang, W., Xu, M., Wang, G., & Galili, G. 2017.** Autophagy: an important biological process that protects plants from stressful environments. *Frontiers in plant science* 7:2030.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 10, Number 1
2021

Identification of one of the efficient motifs on the stability of ATG8B protein in LDS in *Marchantia polymorpha*

Azadeh Mohseni, Mohammad Farsi*, Alireza Seifi

Department of crop biotechnology and breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

*Corresponding author, Email: farsi@um.ac.ir

Abstract

Autophagy is one of the defensive response pathways under stress and non-stress conditions in different organisms. In autophagy, damaged compounds and organelles are sealed into double-membrane vesicles as an autophagosome. Autophagosome has been directed to the vacuole to be degraded by hydrolytic enzymes into initial substances. ATG8 proteins are the hallmark of this pathway. These proteins are involved in autophagosome formation and target cargo location inside the autophagosome. In selective autophagy, cargo receptors play an important role in trapping the cargo inside the autophagosome. There is the ATG8 binding motif called AIM or LIR in Cargo receptors. This motif makes able the cargo receptors interact with LDS, LIR docking site in ATG8. Any modification in the AIM motif or LDS could abolish the interaction between ATG8 and cargo receptors. In this study, ATG8B mutant in LDS has been generated in *Marchantia polymorpha* for future studies to identify the possible cargo receptors. In this order, the protein sequence of ATG8B has been identified in the marchntia.info database. Aligning ATG8A from Arabidopsis with ATG8B from Marchantia leads to identifying the residues involving in ATG8B folding and LDS formation. Two residues, Lysin 51 and Arginine 70, have been replaced with Alanine residue by site-directed mutagenesis. The GreenGate has been used for fusing the GFP to ATG8B mutant fragments. To consider the same condition with wild-type ATG8B lines presented in the lab, by using the Gateway adapted primers, ATG8B-LDS mutant has been cloned in the expression vector, pMpGWB303. After transforming to Agrobacterium GWB303+pSOUP strain, it has been transformed to the plants. Analyzing the transformed plants in western blot experiments has shown that the only form of modification that can express and fold as a stable protein is Lysine to Alanine modification, however, in the proteins with the mutation of Arginine to Alanine, protein is not stable, and it cannot be expressed.

Key words: AIM, Autophagy, Gateway, GreenGate, and LDS