شناسایی یک میانکنش مولکولی در کنترل اپی‌ژنتیکی بیان ژن *FLC* در گیاه آرابیدوپسیس با استفاده از تکنیک دوبل هیبرید مخمر

مریم حسین پور[۱]، مقصود پژوهنده[۲*] و فاطمه محمودی کردی[۱]

[۱] **تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی**

[۲] **تبریز، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، دانشکده کشاورزی، گروه بیوتکنولوژی**

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۳

چکیده

گذر از مرحله رویشی به زایشی یکی از مهم ترین فرآیندهای تکاملی گیاهان است که سازوکار مولکولی آن هنوز به طور کامل شناخته نشده است. آغاز گلدهی در گیاهان توسط عوامل مختلفی از قبیل طول دوره نوری، دوره سرما، هورمونها و عوامل اپی ژنتیک کنترل می‌شود. یک مسیر مهم در این فرآیند، کنترل اپی‌ژنتیکی ژن *FLC* است که بیان آن موجب مهار گلدهی می گردد. حذف گروههای استیل از روی هیستونهای ژن *FLC* توسط پروتئین MSI4 باعث توقف بیان FLC شده و بنابراین، گلدهی آغاز می‌شود. با این حال، مکانیسم عمل این پروتئین هنوز تا حدود زیادی ناشناخته است. بنابراین، بررسی هر گونه میانکنش مولکولی با این پروتئین در شناخت مکانیسم عمل آن اهمیت دارد. در این تحقیق، برای یافتن شریک مولکولی پروتئین MSI4 در انجام فرآیند داستیلاسیون، از سیستم دوبل هیبرید مخمر که یکی از مهم ترین روشهای ردیابی میانکنشهای مولکولی می‌باشد، استفاده شد. برای این کار، ابتدا ژن *MSI4* در ناقل دوبل هیبرید مخمر همسانه‌سازی شد. سپس، MSI4 به عنوان طعمه برای غربال در کتابخانه cDNA گیاه آرابیدوپسیس به روش دوبل هیبرید مخمر استفاده شد. پروتئینی که با این روش به دام افتاد، PKT3 (Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA Thiolase 3) بود که یک استیل کوآسیل ترانسفراز است. وظیفه این پروتئین آزاد کردن و انتقال بنیانهای استیل به مولکولها است و از این رو در بسیاری از فرآیندهای حیاتی سلول نقش دارد. این میانکنش به وسیله همسانه سازی cDNA کامل پروتئین PKT3 و همچنین هومولوگ آن PKT4 به طور مستقل تأیید شد. گزارش میانکنش MSI4-PKT3 می‌تواند افقهای روشنی را برای مطالعات بیشتر در مورد مکانیسم عمل MSI4 پیش روی پژوهشگران قرار دهد. از این دستاورد مثلاً با تغییر بیان ژن *PKT4* می‌توان برای تنظیم زمان گلدهی در تولید محصولات زراعی و باغی استفاده کاربردی کرد.

واژه های کلیدی: گلدهی، دوبل هیبرید مخمر، MSI4، اپی ژنتیک، میانکنش مولکولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۴۴۰۸۴۰۷۴ ، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@azaruniv.edu

مقدمه

گذر از مرحله رویشی به زایشی و آغاز گلدهی، فرآیندی بسیار مهم و حیاتی در گیاهان است که بایستی در زمان مناسب از نظر فیزیولوژی گیاه و شرایط محیطی صورت گیرد. در گیاه آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) چندین مسیر مجزا شامل بهاره کردن (Vernalization)، طول دوره نوری (Photoperiod)، وضعیت اپی ژنتیک گیاه و میزان هورمونهایی از قبیل جیبرلین، برای پیشبرد فرآیند آغاز گلدهی شناسایی شده اند (۲ و ۴). مراحل رشد گیاه توسط شبکه منظمی متشکل از ژنهای مختلف کنترل می شود که بیان آنها در پاسخ گیاه به پیامهای محیطی مانند طول روز، کیفیت نور، دما و غیره تنظیم می‌شود تا تغییرات

لازم نسبت به شرایط محیطی در مراحل رشد اعمال گردد (۴).

در مرکز شبکه ژنی تنظیم کننده آغاز گلدهی، پروتئین Flowering Locus C (FLC) قرار دارد که یک عامل رونویسی از خانواده MADs box بوده و با مهار عوامل محرک گلدهی، از شروع گلدهی ممانعت می‌کند (۸ و ۲۰). در آرابیدوپسیس، ۵۰۵ ژن شناسایی شده اند که حاوی توالیهای متصل شونده به FLC (توالی CArG-box) در راه انداز خود بوده و در فرآیندهای مختلف نقش دارند. FLC علاوه بر گلدهی در تمام مراحل نمو گیاه از جوانه زنی بذر تا تشکیل میوه دخالت داشته و این عمل را غالباً از طریق مهار بیان ژنها و در برخی موارد، با افزایش بیان آنها انجام می‌دهد (۸). بیان ژن FLC نیز توسط عوامل متعددی کنترل می‌شود. ازجمله این عوامل می‌توان به فاکتورهای رونویسی مسیر بهاره کردن، عوامل مهارکننده کمپلکس polycomb و همچنین عوامل مهار کننده مستقل از قبیل پروتئین Multicopy Suppressor of Ira4 (MSI4) اشاره کرد. در تنظیم اپی‌ژنتیکی بیان ژنها، متیلاسیون DNA و یا هیستون و همچنین استیلاسیون هیستونها نقش دارند که به ترتیب موجب خاموش و روشن شدن ژنها می‌شوند. متیل‌ترانسفرازهای متعددی در کمپلکس polycomb بیان *FLC* را مهار کرده و گلدهی را تسریع می‌کنند (۲۳و۲۴). همچنین، پروتئین MSI4 (که FVE هم نامیده می‌شود)، از طریق حذف بنیانهای استیل از روی هیستونهای ژن *FLC*، موجب خاموشی این ژن می شود (۳). با مهار *FLC* اثر ممانعت کنندگی آن از روی Suppressor of Overexpression of Constant 1 (SOC1) که عامل پیشبرنده گلدهی است برداشته شده و گیاه از مرحله رویشی وارد مرحله زایشی می‌شود (۱۳، ۱۴ و ۱۶).

نتایج حاصل از مطالعات گذشته (۳) نشان می‌دهد که MSI4 به تنهایی عمل نکرده بلکه از پروتئینهای دیگری کمک می گیرد، اما روش عمل آن هنوز مشخص نیست و در دو تحقیق به مولتی کمپلکس بودن MSI4 در کنترل FLC اشاره کرده‌اند که از طریق تعامل با پروتئینهای مختلف مثلاً HDAC روی کروماتین عمل کرده و نقش داستیلاسیون خود را انجام می‌دهد (۱۲ و ۱۵). بنابراین، شناخت هر گونه میانکنش مولکولی با MSI4 در شناخت مکانیسم عمل آن مهم و مؤثر خواهد بود.

ژن MSI4 با ۱۵۲۴ نوکلئوتید در روی کروموزوم شماره دو آرابیدوپسیس قرار دارد و یک پروتئین با ۵۰۷ اسیدآمینه را کد می‌کند که دارای یک ناحیه WD40 برای اتصال به پروتئینهای دیگر بوده و خصوصیت اتصال به یونهای فلزی و تشکیل کمپلکسهای مختلف دخیل در شکل‌گیری کروماتین، یوبی‌کوئیتیناسیون، فاکتورهای رونویسی و تعمیر DNA برای آن گزارش شده است (۳، ۱۷ و۱۸).

روشهای زیادی برای مطالعه میانکنشهای مولکولی وجود دارند (۵)، که بر اساس هدف مورد مطالعه شامل روشهای بیوشیمیایی، روشهای تصویرسازی مستقیم میانکنشها به صورت *In vivo*، روشهای کمی، روشهای ساختاری و مدل‌سازی مولکولی و روشهای ژنتیکی هستند (۶). از رایج‌ترین انواع این تکنیکها می‌توان به روش Affinity Purification و به دنبال آن طیف‌سنجی جرمی (Mass Spectrometry) اشاره کرد که در استخراج پروتئینها به صورت کمپلکس و نزدیک به شرایط فیزیولوژیک سلول به کار می‌رود. از دیگر روشهای بیوشیمیایی مهم می‌توان Pull down و Co-Immunoprecipitation را نام برد. در روش تصویرسازی مستقیم میانکنشها به شکل *in vivo*، امکان مشاهده مستقیم میانکنش بر اساس فلورسنت فراهم می شود، به طوری که میانکنش دو پروتئین باعث کامل شدن پروتئین گزارشگر و بروز نور خاص فلورسنس خواهد شد. نمونه‌هایی از این روشها عبارتند از: Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)، Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)، Bimolecular fluorescence complementation

و *in situ* hybridization (BiFC) Immunohistochemistry (۶). از جمله روشهای ژنتیکی، تکنیکهای مبتنی بر ریزآرایه‌های پروتئینها و مولکولهای کوچک و تکنیک دوبل هیبرید مخمر (Yeast Two Y2HS: Hybrid System) می‌باشند. روش دوبل هیبرید در سال ۱۹۸۹ برای مطالعه میانکنشهای پروتئین-پروتئین در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ابداع شد که نقطه عطفی در تجزیه و تحلیل میانکنش پروتئینها در شرایط *in vivo* به وجود آورد (۱۰و۱۹).

سیستم دوبل هیبرید مخمر Y2HS یک روش کلاسیک برای نشان دادن تعامل بین دو پروتئین است که بر پایه ویژگیهای پروتئین GAL4 مخمر که شامل دو بخش اتصال به DNA (DNA Binding Domain: BD) و فعال‌سازی رونویسی (Transcription Activating Domain: AD) است، پایه‌ریزی شده است. مخمر با دو وکتور به صورت همزمان ترانسفورم می شود. پروتئینهای شیمر BD-X و AD-Y در مخمر تولید می‌شود. اگر بین دو پروتئین X و Y میانکنش وجود داشته باشد موجب کنار هم قرار گرفتن AD و BD برای اتصال BD-X به ناحیه اختصاصی روی پروموتور و همچنین فعال سازی آنزیم RNA pol II توسط AD-Y می‌شود تا رونویسی ژن گزارشگر هیستیدین (H) و آدنین (A) صورت گیرد و پروتئینهای مربوطه تولید شود که در نتیجه موجب رشد مخمر در محیط کشت فاقد A و H خواهد شد (۵). هر کدام از پروتئینهای X و Y ابتدا بایستی از لحاظ نداشتن فعالیت BD یا AD بررسی شوند که نباید به تنهایی قادر به فعال کردن رونویسی ژن گزارشگر باشند. این بررسی تست اتواکتیواسیون نام دارد که پروتئینهای مورد آزمایش به اصطلاح نباید اتواکتیو باشند. در حال حاضر روش Y2HS به یک ابزار قدرتمند برای شناخت میانکنشهای پروتئینی در آزمایشگاههای بیولوژی مولکولی دنیا تبدیل شده است (۹ و۱۹). در این تحقیق، برای یافتن شریک مولکولی پروتئین MSI4 در انجام فرآیند هیستون داستیلاسیون، از سیستم کارآمد دوبل هیبرید مخمر استفاده شد. برای این منظور، ابتدا cDNA ژن *MSI4* (با کد دسترسی در TAIR و یا NCBI: At2g19520) از گیاه آرابیدوپسیس جداسازی، تکثیر و در ناقل طعمه سیستم دوبل هیبرید همسانه سازی گردید. سپس مخمر با ناقل حاوی *MSI4* و ناقل حاوی کتابخانه cDNA آرابیدوپسیس دوبل تراریزش شد. در ادامه غربالگری با قرار دادن MSI4 به عنوان طعمه انجام و ژنهایی که با MSI4 میانکنش مولکولی داشتند در مخمر شناسایی شدند.

مواد و روشها

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA کل از بافتهای مختلف گیاهان آرابیدوپسیس (اکوتیپ Colombia) در مراحل مختلف رشد با روش ترایزول (Trizol، میکروژن) انجام شد (۷ و۲۲). ابتدا ۰/۲ گرم بافت گیاهی در نیتروژن مایع پودر و با یک میلی لیتر ترایزول مخلوط شد. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر کلروفورم اضافه شده و پس از مخلوط شدن، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پس از انتقال فاز رویی به لوله جدید RNA کل به روش ایزوپروپانول رسوب داده شد و پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل گردید. کیفیت و کمیت نمونه‌ها به ترتیب با الکتروفورز در ژل آگارز (۱ درصد) و با اسپکتروفوتومتر تعیین شد. چهار میکروگرم RNA استخراج شده از گلها برای سنتز cDNA با استفاده از آغازگر الیگو dT و آغازگر معکوس (Reverse) اختصاصی برای ژن *MSI4* و بر اساس روش ذکر شده در کیت RT Superscript III (شرکت Invitrogen آمریکا) استفاده شد.

همسانه سازی cDNA ژن *AtMSI4* در ناقل pGBKT7: برای همسانه‌سازی ژن *MSI4* (At2g19520)، ابتدا cDNA این ژن با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به کمک یک جفت آغازگر اختصاصی (R-BamHI: ATG

GAT CCT TAA GGC TTG GAG GCA CAA GT و F-NdeI: ATC ATA TGG AGA GCG ACG AAG CAG CA) تکثیر گردید. سپس قطعه حاصل با استفاده از آنزیمهای برشی *Bam*HI و *Nde*I که در ساختار آغازگرها طراحی شده بودند، بریده شده و در ناقل pGBKT7 (شرکت Clontech آمریکا) قرار داده شد. ناقل حاصل به روش الکتروپوریشن (۲/۵ کیلو ولت به مدت ۵ هزارم ثانیه) به باکتری *E. coli* (سویه Top10) جهت تکثیر منتقل و روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ µg/l آنتی بیوتیک کانامایسین گزینش شدند. توالی ژن *MSI4* در ناقلها با روش PCR روی همسانه‌های رشد کرده بررسی شده و پلاسمیدهای استخراج شده از همسانه‌های مثبت پس از تیمار با آنزیم RNase در مرکز توالی‌یابی IBMP (Institut de Biologie Moleculaire des Plantes) دانشگاه استراسبورگ فرانسه توالی‌یابی گردیدند.

تراریزش مخمر: ابتدا مخمر *S. cerevisiae* سویه AH109 (شرکت Clontech آمریکا) در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد روی محیط کشت YPD (۱۰ g/l عصاره مخمر، ۲۰ g/l پپتون و۲۰ g/l گلوکز) جامد کشت شده و یک همسانه تازه از آن در ۲۰ میلی لیتر محیط کشت مایع تلقیح شد. پس از یک شب کشت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، ده میلی لیتر از آن به عنوان مایه تلقیح به ۵۰ میلی لیتر محیط YPD مایع اضافه شده و تا OD_{600}=۰/۶ کشت گردید. سلولهای مخمر طبق دستورالعمل Clontech (آمریکا) با سانتریفیوژ کردن در سرعت ۴۰۰۰ rpm جمع آوری و پس از دوبار شست‌وشو با آب مقطر استریل، در ۳۵۰ میکرولیتر بافر یک برابر غلظت Lithium Acetate/Tris-EDTA (۱×LiAc/TE) حل شدند. برای هر تراریزش، ۵۰ میکرولیتر بافر حاوی سلول مخمر با دو میکروگرم ناقل، ۵ میکروگرم ssDNA اسپرم ماهی سالمون، ۴۰ میکرولیتر بافر ۱×LiAc/TE و ۲۵۰ میکرولیتر PEG50% مخلوط، و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد، بلافاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه شوک حرارتی داده شده و نگهداری گردید. سپس سلولها پس از یک سانتریفیوژ کوتاه مدت در ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و در محیط کشت انتخابی SD (۵/۷ g/l YNB، ۵ g/l سولفات آمونیوم و۲۰ g/l گلوکز) به همراه تمام اسیدآمینه ها به جز اسیدآمینه کد شونده از روی ناقل (تریپتوفان در ناقل pGBKT7) در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳ روز کشت شدند. روی این محیط کشت تنها مخمرهای تراریخت حاوی ناقل رشد می کنند (۲۱).

تست اتواکتیواسیون: این تست به منظور اطمینان از عدم توانایی پروتئین MSI4 در فعال‌سازی رونویسی بدون حضور شریک میانکنش‌گر آن و پس از انجام تراریزش اول مخمر صورت گرفت. برای اینکار سه تکرار کلنی بر روی محیط کشت انتخابی SD-HW و AHW SD- (ژنهای گزارشگر هیستیدین H و آدنین A در مخمر) کشت شدند.

غربالگری دوبل هیبرید مخمر: غربالگری دوبل هیبرید مخمر بر اساس دستورالعمل شرکت Clontech آمریکا انجام شد. به طور خلاصه، ابتدا سلولهای مخمر حاوی ناقل pGBKT7-MSI4 با کتابخانه cDNA آرابیدوپسیس تهیه شده در ناقل pGADT7 (به کمک سایت برشی *Bgl*II در دو طرف قطعات)، به روش شوک حرارتی تراریخت شده و روی محیط کشت SD حاوی تمام اسیدآمینه‌ها به جز سه اسیدآمینه لوسین، تریپتوفان و هیستیدین گزینش شدند (۲۱).

استخراج و شناسایی ژنهای به تله افتاده: برای شناسایی پروتئینهای دارای میانکنش با MSI4، ابتدا استخراج DNA از همسانه‌های مخمر گزینش شده (رشد کرده در محیط SD-LWH)، طبق دستورالعمل Clontech آمریکا انجام گرفت. سپس تراریزش باکتری *E. coli* با استفاده از این DNAها انجام شده و همسانه‌ها تنها برای pGADT7 بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین (100 µg/l) گزینش شدند. از همسانه‌های رشد کرده استخراج پلاسمید انجام شده و برای توالی‌یابی به مرکز IBMP

ارسال شدند. توالی یابی در دو جهت با آغازگرهای ناقل pGADT7 شامل (F: TAC CAC TAC AAT GGA TG و R: GTT GAA GTG AAC TTG CGG GGT) انجام شد و توالیهای به دست آمده برای شناسایی و شناخت ژنهای مرتبط ابتدا در وب سایت http://multalin.toulouse.inra.fr مقایسه و بعد در سایت اینترنتی منبع اطلاعاتی آرابیدوپسیس (www.arabidopsis.org, TAIR) با استفاده از ابزار بلاست (Blast) تجزیه و تحلیل شدند.

جداسازی و همسانه سازیcDNA کامل PKT3 و PKT4 : برای تأیید میانکنشهای مولکولی به دست آمده، ابتدا از روی cDNA آرابیدوپسیس توالی کامل ژن PKT3، با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی (F-NdeI: AAC ATA TGG AGA AAG CGA TCG AGA GAC AA و R-BamHI: AAG GAT CCC TAG CGA GCG TCC TTG GAC AA) تکثیر و به کمک مکانهای برش آنزیمی *Nde*I و *Bam*HI در ناقل pGADT7 همسانه‌سازی گردید. پس از تأیید توالی، ناقل به دست آمده (pGADT7-PKT3) به همراه ناقل pGBKT7-MSI4 به روش شوک حرارتی به مخمر منتقل شده و مخمرهای تراریخت پس از گزینش، به روی محیط فاقد هیستیدین بازکشت شدند.

هومولوگ نزدیک PKT3 یعنی PKT4 نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (F-NdeI: AAC ATA TGG AAA AAG CAA CGG AGA GAC AAA GGA و R-BamHI: AAG GAT CCT TAG ACT TTC CGG ACA TCA CAG) از روی cDNA آرابیدوپسیس به طور کامل در ناقل pGADT7 به کمک همان آنزیمهای برشی همسانه‌سازی و توالی یابی شد.

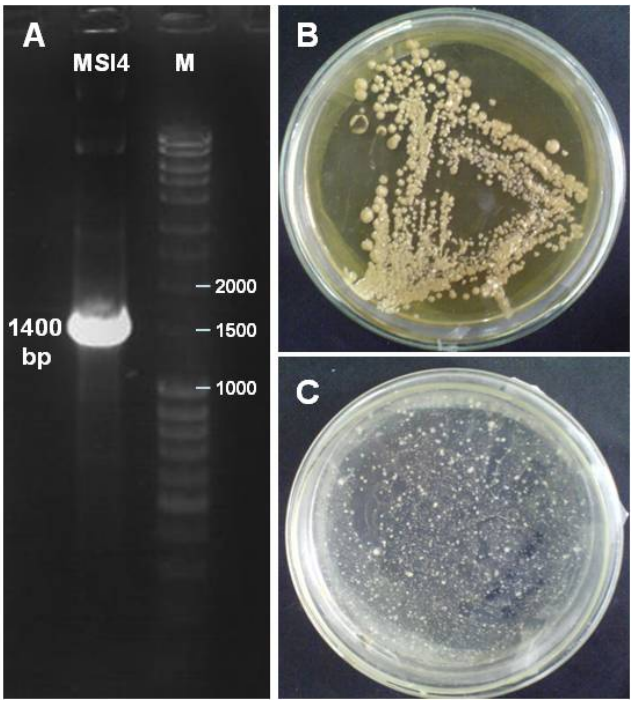
نتایج

در این تحقیق، برای درک بهتر نحوه عمل پروتئین MSI4 در دِاستیله کردن هیستونهای برخی مکانهای ژنی از قبیل FLC که یک عامل بازدارنده شروع گلدهی است، یک غربالگری در کتابخانه cDNA گیاه آرابیدوپسیس انجام گرفت. برای اینکار، ابتدا RNA کل این گیاه استخراج و cDNA آن تهیه گردید. سپس، به کمک آغازگرهای اختصاصی ژن *MSI4*، کل cDNA آن با روش PCR تکثیر (شکل ۱A) و با استفاده از سایتهای آنزیمهای برشی که روی آغازگرها طراحی شده بودند، در ناقل دوبل هیبرید مخمر pGBKT7 همسانه‌سازی گردید. پس از توالی یابی و اطمینان از درستی توالی همسانه حاصل، این ناقل به مخمر *S. cerevisiae* منتقل شد (شکل ۱B).

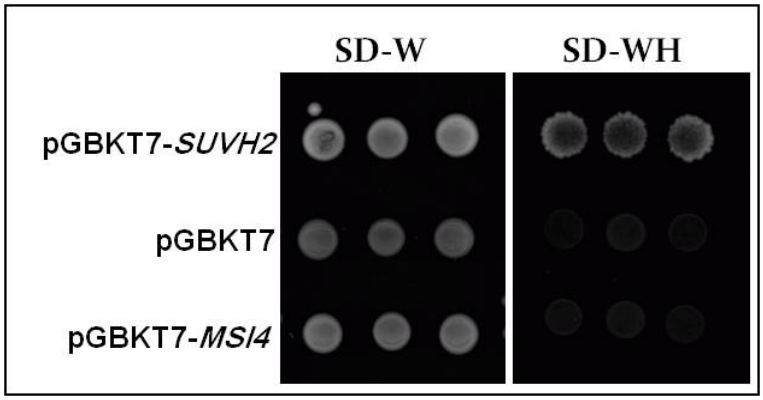
قبل از شروع غربالگری با این ژن، بررسی عدم وجود خاصیت اتواکتیواسیون رونویسی توسط پروتئین MSI4 تست اتواکتیواسیون انجام شد تا اطمینان حاصل شود که MSI4 به تنهایی قادر به عمل نبود و نیازمند شریک مولکولی برای فعال کردن رونویسی ژن گزارشگر می‌باشد. برای انجام این تست، سه کلنی مجزا از مخمر حاوی pGBKT7-*MSI4* به همراه کنترل منفی (مخمر حاوی pGBKT7 خالی) و همچنین کنترل مثبت (مخمر حاوی pGBKT7-*SUVH2* که دارای خاصیت اتواکتیواسیون رونویسی ژن گزارشگر است) به محیط کشت کنترل SD-W و همچنین محیط کشت انتخابیSD-HW منتقل شدند. پس از گذشت دو هفته، کلنیهای حاوی pGBKT7-*MSI4* قادر به رشد در محیط انتخابی نبودند که نشان دهنده عدم وجود خاصیت اتواکتیواسیون برای MSI4 می‌باشد و این پروتئین به تنهایی قادر به فعال کردن رونویسی نیست و خاصیت فاکتور رونویسی ندارد (شکل ۲).

در ادامه، تراریزش دوم با ناقل pGADT7 حاوی کتابخانه cDNA آرابیدوپسیس روی مخمرهای حاوی pGBKT7-*MSI4* انجام گرفت. مخمرهای دوبل تراریخت شده روی محیط کشت فاقد سه اسیدآمینه انتخاب شدند. اسیدآمینه-های لوسین و تریپتوفان به ترتیب توسط pGADT7 و pGBKT7 تولید می‌شوند و ژن هیستیدین، گزارشگر وجود میانکنش مولکولی بین دو پروتئین کدشونده از هر کدام از

این ناقلها است. بنابراین، هر همسانه مخمری که بتواند در فقدان این سه اسیدآمینه رشد کند، حتماً حاوی دو ناقل مذکور و همچنین نشانگر میانکنش بین دو پروتئین کد شونده از این ناقلها است. کلنیهای رشد کرده در روی محیط انتخابی SD-HWL، شماره گذاری شده و ۸۳ کلنی روی محیط جدید SD-HWL و همچنین محیط انتخابی قویتر SD-AHWL بازکشت شدند (شکل ۳).

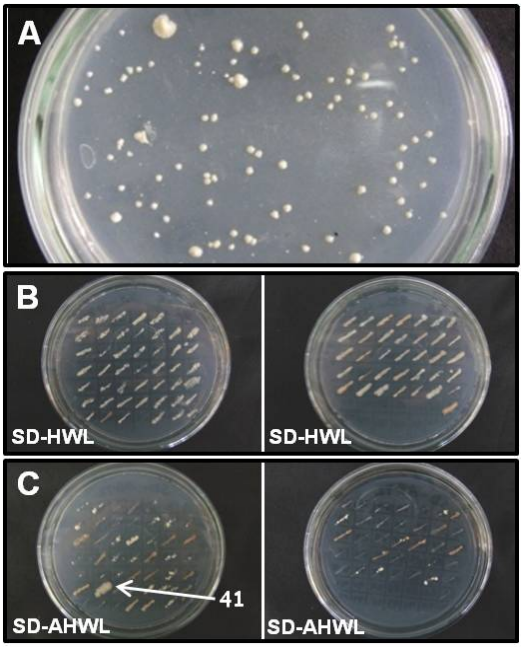


شکل ۱– A) الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر cDNA ژن *AtMSI4* روی ژل آگارز ۱ درصد. با استفاده از یک جفت آغازگر اختصاصی، قطعه bp ۱۴۰۰ حاصل از تکثیر cDNA ژن *AtMSI4* در لاین سمت چپ. لاین سمت راست M: نشانگر وزن مولکولی (Gene Ruler 1KB Plus Fermentase). B) کلنیهای مخمر *S. cerevisiae* سویه AH109 روی محیط YPD پس از سه روز کشت. **C**) کلنیهای مخمر تراریخت شده با ناقل pGBKT7-*MSI4* روی محیط انتخابی فاقد تریپتوفان (SD-W).



شکل ۲– تست اتواکتیواسیون ژن *MSI4*. سه کلنی تراریخت شده به عنوان تکرار از روی محیط کشتهای مخمر حاوی pGBKT7-*MSI4*، pGBKT7 خالی (به عنوان کنترل منفی) و pGBKT7-*SUVH2* (به عنوان کنترل مثبت) جهت بررسی خاصیت فعال سازی رونویسی پروتئین MSI4 روی محیط شاهد SD-W و محیط انتخابی رونویسی H (هیستیدین)، یعنی SD-WH، کشت شدند. بر خلاف کنترل مثبت که با داشتن توانایی فعال سازی رونویسی H توانست در محیط انتخابی فاقد H رشد کند، کلنیهای مخمر حاوی pGBKT7-*MSI4* و pGBKT7 خالی قادر به رشد در محیط انتخابی نبودند. بنابراین MSI4 به تنهایی قادر به فعال سازی رونویسی نیست.

تعدادی از کلنیها در محیط انتخابی قوی تر رشد کردند که نشان دهنده وجود میانکنش بسیار قوی بین پروتئین MSI4 و پروتئین به تله افتاده از کتابخانه cDNA می باشد (شکل ۳). از این میان، کلنی شماره ۴۱ رشد بهتری در محیط انتخابی قویتر نشان داد.

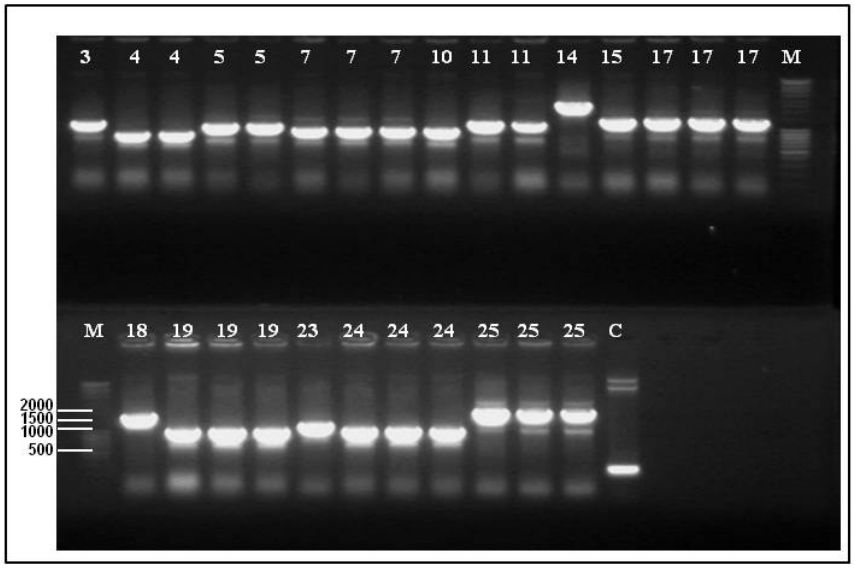


شکل ۳- نتیجه غربالگری. **A**) کلنیهای رشد یافته مخمر تراریخت شده با pGBKT7-*MSI4* و کتابخانه pGADT7-cDNA، پس از یک هفته رشد روی محیط کشت انتخابی SD-HWL. **BوC**) بازکشت کلنیهای گزینش شده، روی محیط SD-HWL (B) و SD-AHWL (C). تنها کلنی شماره ۴۱ در روی محیط SD-AHWL رشد خوبی نشان داد که نشان دهنده وجود میانکنش قوی بین پروتئینهای تولید شده از دو نوع ناقل می‌باشد.

در مرحله بعدی، ۸۳ کلنی به طور جداگانه در محیط مایع SD-WL کشت شده و DNA آنها استخراج گردید. سپس DNA ها به باکتری *E. coli* با الکتروپوریشن منتقل شده و باکتریهای تراریخت شده روی محیط کشت LB حاوی آمپی سیلین گزینش گردیدند. هر کدام از کلنیهای رشد یافته با سه تکرار در همان محیط کشت مایع کشت شده و متعاقب آن استخراج پلاسمید pGADT7-cDNA از آنها صورت گرفت. cDNAهای موجود در پلاسمید pGADT7 با استفاده از یک جفت آغازگر که از روی توالی پلاسمید pGADT7 و بلافاصله در بالادست و پایین دست محل قرار گرفتن cDNA، طراحی شده بودند، با تکنیک PCR تکثیر شدند (شکل۴). الکتروفورز محصول PCR نشان داد که ژنهای متفاوتی در این غربالگری صید شده‌اند.

پنجاه عدد از این پلاسمیدها توالی‌یابی و بلاست شدند تا هویت آنها از بین ژنهای آرابیدوپسیس مشخص شود. با بررسی توالی موجود در بالا دست محل ورود cDNAها در ناقل pGADT7، مشخص شد که تنها ۱۶ توالی در قالب درست برای ترجمه قرار دارند. یکی از توالیهای به دست آمده (توالی همسانه شماره ۴۱ که نسبت به بقیه شماره‌ها میانکنش قوی آن با MSI4 مشاهده شده بود، شکل (۳C) مربوط به ژن *Peroxisomal 3-KetoAcyl-COA Thiolase 3* (*PKT3*) با کد دسترسی AT2G33150 بود که یک استیل کوآ اسیل ترانسفراز است و در متابولیسم مواد مختلفی در سلول نقش حیاتی داشته و مسئول آزاد کردن و انتقال بنیانهای استیل به برخی مولکولها می‌باشد (۱۱). ژن خواهری آن *PKT4* با شماره ژنومی AT1G04710 دارای

وظیفه‌ای مشابه است. توالی به دست آمده در تست غربالگری در واقع بخش مشابهی از هر دو ژن مذکور بود. برای تأیید میانکنش پروتئین حاصل از این توالی با ژن MSI4، یک تست دوبل هیبرید مخمر دیگر با استفاده از پلاسمیدهای pGADT7 حاوی توالی *PKT3* (pGADT7-*PKT3*) و pGBKT7-*MSI4* انجام گرفت.



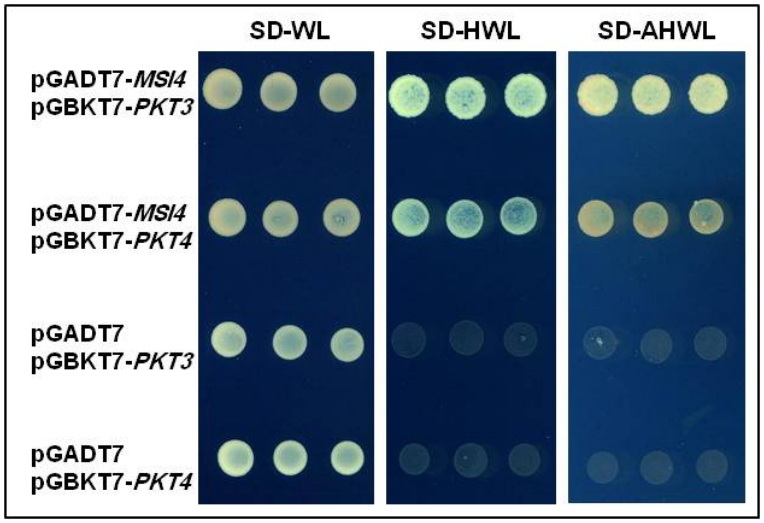
شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر DNA پلاسمیدهای pGADT7 استخراج شده از همسانه های رشد کرده در تست غربالگری. جفت آغازگر استفاده شده مکمل توالیهایی روی پلاسمید pGADT7 در بالادست و پایین دست محل قرار گرفتن cDNA، هستند. از بین ۸۳ همسانه حاصل، تنها نتیجه برخی شماره ها در این ژل نشان داده شده است. تعدادی از همسانه ها حاوی قطعاتی با اندازه متفاوت بودند. M: نشانگر وزن مولکولی، C: کنترل منفی (محصول PCR روی pGADT7 خالی که باند کوچک داشته و حاوی هیچ ژنی نمی‌باشد).

بر خلاف مخمرهایی که تنها حاوی یکی از دو ناقل بودند، مخمرهای حاوی هر دو ناقل توانستند در فقدان هیستیدین که گزارشگر وجود میانکنش است، رشد کنند. بدین وسیله، وجود ارتباط فیزیکی بین MSI4 و PKT3 شناسایی شد. برای تأیید نهایی نتایج به دست آمده، cDNA کامل دو ژن *PKT3* و *PKT4* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوطه، از گیاه آرابیدوپسیس تکثیر و این بار در ناقل pGBKT7 همسانه‌سازی گردید. توالی‌یابی آنها نشان داد که توالی ثبت شده بدون هیچ گونه جهش همسانه سازی شده است. از طرف دیگر، *MSI4* نیز از روی ناقل موجود با روش PCR تکثیر و در ناقل pGADT7 همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. پس از اطمینان از درستی توالیها، میانکنش پروتئینهای کامل PKT3 و PKT4 با پروتئین MSI4 در ناقل pGADT7 بررسی شد. چنین عوض نمودن جهت ناقلها یعنی این بار ناحیه چسبنده (DNA Binding Domain) به همراه PKT3 یا PKT4 و ناحیه فعال کننده (Activating Domain) به همراه MSI4، برای اطمینان از وجود میانکنش قوی بین آنها انجام گرفت. نتایج نشان داد که در این جهت نیز میانکنش بین پروتئینهای کامل وجود دارد (شکل۵). بنابراین، پروتئینهای PKT3 و PKT4 به صورت قوی با پروتئین MSI4 در هر دو جهت ناقل میانکنش دارند.

بحث

پروتئین MSI4 که در تسریع گلدهی دخیل است یکی از اجزای کمپلکسی است که رونویسی ژن *FLC* را از طریق حذف گروههای استیل (داستیلاسیون) هیستونهای موجود

در ساختار کروماتین این ژن مهار می‌کند. *FLC* یک ژن بازدارنده شروع گلدهی است و بنابراین، مهار بیان FLC توسط MSI4، باعث تسریع فرآیند گلدهی می‌شود (۳).



شکل ۵- تأیید میانکنش بین PKT3 یا PKT4 با MSI4 از طریق نحوه رشد کلنیهای مخمرهای تراریخت شده با pGADT7-MSI4 و pGBKT7-PKT3/4. همچنان که دیده می شود، پس از یک هفته کشت در ۳۰ درجه سانتیگراد، تنها مخمرهای تراریخت شده با هر دو ژن قادر به رشد در محیط‌های گزینش SD-HWL و SD-AHWL بودند، که تأیید کننده وجود میانکنش قوی بین PKT3 و PKT4 با MSI4 می‌باشد.

تحقیقات کاملی روی ژن *MSI4* صورت نگرفته و تاکنون میانکنشی با پروتئینهای دیگر برای MSI4 گزارش نشده است. اخیراً Gu و همکاران (۱۲) نشان دادند که MSI4 و همچنین MSI5 با یک هیستون داستیلازی به نام HDA6 (Histone Deacetylase 6) به صورت غیرمستقیم و از طریق تشکیل یک کمپلکس همکاری دارد. مطالعات دیگر نیز حاکی از دخالت MSI4 در کمپلکسهای پروتئینی متفاوت می باشد که در روی کروماتین باعث تغییراتی می-شوند (۱۶و۱۷). یافته تحقیق حاضر یک میانکنش جدید MSI4-PKT3/4 را به دامنه اطلاعات موجود اضافه می‌کند.

نحوه تهیه کتابخانه‌های cDNA در ناقلها متفاوت است. بانک cDNA به کار رفته در این تحقیق طوری ساخته شده است که ژنها شکسته شده اند تا همگی با اندازه حدود ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ نوکلوتید وارد ناقل شوند لذا مشاهده اندازه یکسان توالیها در نتیجه غربالگری امری معمول می‌باشد و به نحوه تهیه بانک cDNA مربوط می گردد. ممکن است بانک cDNA ای استفاده شود که چنین خصوصیتی نداشته باشد در این صورت قطعات با اندازه بزرگتر به خاطر احتمال کمتر تولید پروتئین، در مرحله غربالگری خود به خود حذف خواهند شد و دامنه نتایج غربالگری را محدود خواهد کرد.

در این تحقیق، برای اولین بار، MSI4 در یک آزمایش غربالگری قرار گرفت تا یک میانکنش مولکولی با آن گزارش شود. نتایج این تحقیق می‌تواند سرآغاز کشف کامل سازوکار مولکولی MSI4 در تغییر میزان استیلاسیون هیستونها باشد. یکی از نقاط قوت تحقیق حاضر بررسی مجدد تعامل یافته شده در هر دو جهت ناقلها است. با توجه به سیستم دوبل هیبرید مخمر، یکبار MSI4 به BD متصل شد و میانکنش آن با PKT3 متصل به AD تأیید شد و بار دیگر با تعویض جهت و همسانه‌سازی مجدد MSI4

به AD متصل شد و میانکنش آن با PKT3 متصل به BD ثابت گردید. تعاملهایی که در هر دو جهت برقرار باشند تعاملات واقعی بین پروتئینها هستند. از سوی دیگر با وارد کردن ژن خواهری یعنی *PKT4* و بررسی و اثبات تعامل آن به *MSI4* احتمال تصادفی بودن تعامل یافته شده رد می گردد و نشانگر آن است که واقعا یک ناحیه حفاظت شده در PKT3 یا PKT4 با MSI4 تعامل برقرار می‌کند. ژنهای یافت شده یعنی *PKT4* و *PKT3* هر چند از یک خانواده‌اند اما تفاوتهایی باهم دارند (82% Identities) و تعامل MSI4 با آنها مطمئناً متفاوت خواهد بود. با توجه به اینکه کلنیهای مخمر همزمان کشت می‌شوند هر کدام تعامل قوی‌تری بین پروتئینها داشته باشد در محیط انتخابی زودتر رشد می کند. تجربه نشان می‌دهد که رشد از روز سوم یا چهارم شروع می شود ولی در برخی تعاملات از روز دهم هم می‌توان شاهد شروع رشد بود. با توجه به اینکه عکس برداری از همه محتویات پتری در یک روز خاص صورت گرفته لذا کلنیها تفاوت رشد نشان می‌دهند. این تفاوت اگر محسوس باشد نشان دهنده میزان تفاوت در تعامل MSI4 با PKT3 و PKT4 هست که می‌توان با انجام Y2HS کمّی با استفاده از استرین Y187 مخمر، آن را نشان داد (۲۱). در این تحقیق از روش شوک حرارتی برای انتقال ناقلها به مخمر استفاده شد. از روشهای دیگر مثل الکتروپوراسیون نیز می‌توان برای انتقال ژن و ناقل به مخمرها استفاده کرد که در مخمر *Pichia pastories* از این روش استفاده شده است (۱).

مطالعات قبلی نشان داده اند که گلدهی در گیاهان جهش یافته *msi4* بسیار دیرتر از گیاهان وحشی انجام می گیرد (۳). نکته جالب توجهی که وجود میانکنش شناخته شده را تا حدودی تأیید می‌کند این است که گیاهان جهش یافته *pkt3* نیز گلدهی نامنظمی دارند (۱۱). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق می‌توان گفت که PKT3 احتمالاً وظیفه تغییر بنیانهای استیل را به کمک MSI4 بر روی هیستونهای *FLC* بر عهده دارد که این فرضیه جای بررسی بیشتری دارد.

براساس مطالعات گذشته و آخرین یافته‌ها درخصوص MSI4 توسط پژوهنده و همکاران (۲۲)، پروتئین MSI4 با یک سیستم تجزیه‌کننده پروتئینی وابسته به یوبی-کوئیتیناسیون به نام CUL4-DDB1 در ارتباط است که همانند یک پل باعث ایفای نقش این کمپلکس تجزیه‌کننده بر روی هیستونها می‌شود. بر اساس یافته‌های تحقیق حاضر، MSI4 با PKT3 یا هومولوگ آن PKT4 نیز میانکنش دارد. با توجه به نتایج این دو تحقیق می‌توان یک کمپلکس به صورت CUL4-DDB1-MSI4-PKT3 تصور نمود که در آن پروتئین MSI4 با فراهم کردن ارتباط بین کمپلکس تجزیه کننده CUL4-DDB1 با پروتئین PKT3، موجب تنظیم مقدار آن می‌شود. در صورت صحت این موضوع، انتظار می رود مقدار PKT3 در گیاهان جهش یافته *msi4* افزایش یافته و در نتیجه تولید استیل کوآنزیم A زیاد شود. این عمل، افزایش انتقال استیل کوآنزیم A توسط ترانسفرازها بر روی هیستونها را به دنبال خواهد داشت و در نتیجه، در گیاهان جهش یافته *msi4* میزان استیلاسیون هیستونها بیشتر خواهد بود که این پدیده در مطالعات گذشته (۱۱) به طور کامل به اثبات رسیده است. یکی از ژنهای هدف MSI4 در مسیر گلدهی، *FLC* است. در گیاهان جهش یافته *msi4*، در اثر عدم تنظیم PKT3، استیلاسیون هیستونهای *FLC* بیشتر شده و رونویسی از آن فعال باقی می‌ماند. در نتیجه، از شروع گلدهی ممانعت شده و گیاهان جهش یافته شدیداً دیرگلده می‌شوند. در گیاهان تیپ وحشی، تجزیه پروتئین PKT3 با کمک MSI4 به صورت طبیعی انجام گرفته و میزان استیل کوآنزیم A در حد معمول نگه داشته می‌شود. بنابراین، استیلاسیون ژنها تعدیل شده و رونویسی ژنهایی از قبیل *FLC* به موقع توسط سازوکارهای دیگری مانند متیلاسیون مهار شده و نهایتاً گلدهی به موقع آغاز می‌شود. در میان غلظت متعادل

هورمونهای گیاهی نیز آغاز گلدهی را تعیین خواهند کرد (۲).

مطالعه ارگانیسمهای مدل راه را برای مطالعه و تحقیق در مورد موجودات زنده پیچیده تر باز می‌کند. به همین ترتیب می توان نتایج حاصل از مطالعه گیاه مدل آرابیدوپسیس را به گیاهان و حتی جانوران تعمیم داد. مطالعه قرابت و میزان حفظ شدن آن در میان گونه‌ها، جنسها، خانواده‌ها و حتی سلسله‌ها می‌تواند این تحقیق را جهت‌دار کند و علاوه بر این می‌توان با استفاده از روشهای *in silico* شبکه میانکنشی موجودات عالی‌تر را به کمک اطلاعات موجودات ابتدایی‌تر پیش‌بینی و تجزیه و تحلیل کرد. علاوه بر آن، شناخت مکانیسم مولکولی پدیده‌های حیاتی، پیش نیاز برنامه‌های اصلاح ژنتیکی گیاهان زراعی و درختان میوه می‌باشد و انجام تغییرات ژنتیکی در گیاهان بدون داشتن اطلاعات مولکولی کافی از مکانیسمها می‌تواند منجر به تغییرات نامطلوبی در محیط زیست گردد. همچنین، با داشتن اطلاعات مولکولی از مکانیسمها، تصمیم‌گیری در مورد نحوه اجرای برنامه اصلاحی آسان تر خواهد بود. برای مثال، در مورد گلدهی، از طریق اطلاعات موجود می‌توان تنها با خاموش کردن یک ژن در گیاه، از قبیل *MSI4*، باعث تأخیر در گلدهی و در نتیجه، ایجاد گیاهی با طول عمر و دوره رویشی طولانی‌تر و میزان شاخ و برگ بیشتر شد که در خصوص گیاهان علوفه‌ای و گیاهانی که قسمتهای رویشی آنها مورد مصرف قرار می‌گیرد حائز اهمیت است.

از آنجا که مطالعه میانکنشها به روشهای مختلف می‌تواند اعتبار نتیجه این تحقیق را بالا ببرد بنابراین می‌توان برای تأیید میانکنش شناخته شده در این تحقیق، از روشهای دیگری از قبیل روشهای بیوشیمیایی مثل Pull-Down و Co-IP بهره برد. همچنین، در تأیید میانکنش شناخت شده و پی بردن به میزان اهمیت آن، می‌توان از گیاهان جهش-یافته برای هر کدام از ژنهای *msi4* و *pkt3* استفاده کرده و با تلاقی آنها، گیاهان دوبل موتانت تهیه و تغییرات فنوتیپی نتاج را مورد مطالعه قرار داد.

سپاسگزاری

از مشاورتهای آقای دکتر محمد احمدآبادی صمیمانه تشکر می گردد. این مقاله نتیجه تحقیقات پایان‌نامه کارشناسی-ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی خانم مریم حسین‌پور در دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تحت راهنمایی مشترک خانم دکتر فاطمه محمودی کردی و آقای دکتر مقصود پژوهنده می‌باشد که توسط معاونت پژوهشی دانشگاه حمایت مالی شده است. از کمکهای انستیتو IBMP فرانسه در زمینه توالی‌یابی و تأمین برخی مواد سپاسگذاری و قدردانی به عمل می آید.

منابع

۱- وفا، م.، یخچالی، ب.، حق نظری، ع.، رستگارجزی، ف.، کارخانه، ا.ع. و احمدی دانش، ح. ۱۳۹۰. کلونینگ و بیان ترشحی ژن لیپاز BTL2 باسیلوس ترموکاتنولاتوس در پیکیا پاستوریس با استفاده از توالیهای نشانه طبیعی و آلفا فاکتور مخمری. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۴ شماره ۵ صفحه ۶۴۰-۶۴۷.

۲- یاری، ف.، موسوی، ا.، مستوفی، ی.، سیدی، س.م.، زمانی، ذ و لایمر، م. ۱۳۹۲. اثر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی و نوع کلات آهن بر پرآوری و ریشه زایی درون شیشه ای سه رقم گل سرخ شاخه بریده Rosa hybrid L. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۲۶ شماره ۱ ص ۹۹-۱۱۰.

3. Ausín, I., Alonso-Blanco, C.A., Jarillo, J., Ruiz-Garcíaz, L. and Martínez-Zapater, J. 2004. Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein. Nature Genetics, 36(2): 162-165.

4. Baurle, I. and Dean, C. 2006. The timing of developmental transitions in plants. Cell, 125: 655-664.

5. Brückner, A., Polge, C., Lentze, N., Auerbach, D. and Schlattner, U. 2009. Yeast Two-Hybrid: a

Powerful Tool for Systems Biology. Int J Mol Sci, 10: 2763-2788.

6. Charbonnier, S., Gallego, O. and Gavin, A. 2008. The social network of a cell: Recent advances in interactome mapping. Biotechnology Annual Review, 14: 1387-2656.

7. Chomczynski, P. and Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162:156-9.

8. Deng, W., Ying, H., Helliwell, C.A., Taylor, J.M., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 2011. FLOWERING LOCUS C (FLC) regulates development pathways throughout the life cycle of Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci USA, 108(16): 6680-6685.

9. Fields, S. 2005. High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril. FEBS Journal, 272: 5391-5399.

10. Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature, 340: 245-246.

11. Footitt, S., Cornah, J.E., Pracharoenwattana, I., Bryce, J.H. and Smith, S.M. 2007. The Arabidopsis 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 (kat2-1) mutant exhibits increased flowering but reduced reproductive success. J Exp Bot, 58(11): 2959-68.

12. Gu, X., Jiang, D., Yang, W., Jacob, Y., Michaels, S.D. and He, Y. 2011. Arabidopsis Homologs of retinoblastoma-Associated protein 46/48 associate with a histone deacetylase to act redundantly in chromatin silencing. PLoS genetics, 7(11): e1002366.

13. He, Y. and Amasino, R.M. 2005. Role of chromatin modification in flowering-time control. TRENDS in Plant Science, 10(1): 30-35.

14. He, Y.H., Michaels, S.D. and Amasino, R.M. 2003. Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis. Science, 302:1751-1754.

15. Jeon, J. and Kim, J. 2011. FVE, an Arabidopsis homologue of the retinoblastoma-associated protein that regulates flowering time and cold response, binds to chromatin as a large multiprotein complex. Mol Cells. 32(3):227-34.

16. Jiang, D., Wang, Y., Wang, Y. and He, Y, 2008. Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by the Arabidopsis Polycomb Repressive Complex 2 Components. PLoS One, 3(10): e3404.

17. Kenzior, A. and Folk, W.R. 2015. Arabidopsis thaliana MSI4/FVE associates with members of a novel family of plant specific PWWP/RRM domain proteins. Plant Mol Biol, 87: 329-39.

18. Lee, J.H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.B., et al. 2008. Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. Plant Cell, 20(1): 152-167.

19. McAlister-Henn, L., Gibson, N. and Panisko, E. 1999. Applications of the Yeast Two-Hybrid System. Methods, 19: 330-337.

20. Michaels, S. and Amasino, R. 1999. FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. Plant Cell, 11: 949-956.

21. Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., et al. 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. PNAS, 103(6): 1994-1999.

22. Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A. and Genschik, P. 2011. MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. PNAS, 108(8):3430-5.

23. Schmitz, R.J., Sung, S. and Amasino, R.M. 2008. Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA, 105: 411-416.

24. Shilatifard, A. 2006. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. Annu Rev Biochem, 75: 243-269.

Detecting a novel molecular interaction involved in epigenetic control of *FLC* expression in Arabidopsis using yeast two hybrid system

Maryam Hosseinpour[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2]*, Fatemeh Mahmoudi kurdi[1]

[1]Biology Dept., Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

[2]Biotechnology Dept., Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, I.R. of Iran

Abstract

Transition of plant from the vegetative to the reproductive stage is one of the most important developmental processes whose molecular mechanism is not fully understood. Initiation of flowering in plants is controlled by various factors such as photoperiod, cold, hormones and epigenetic effects. A major pathway in this process is the epigenetic control of *FLC* gene, whose expression inhibits the flowering initiation. Removing acetyl groups from *FLC* gene histons, by MSI4 protein represses FLC expression, and thus, flowering is initiated. However, the molecular mechanism of this protein is largely unknown. Therefore, studing any molecular interaction with this protein can be helpful to better understand its mode of action. In this research, we used the Yeast Two Hybrid System (Y2HS) to study protein-protein interactions, to find proteins interacting with MSI4. Therefore, first, we cloned the *MSI4* gene in proper Y2HS vector. Then, cDNA bank of *Arabidopsis thaliana* was screened by MSI4 as bait to prey the interactors of MSI4. The protein trapped by this method was PKT3 (Peroxisomal 3-Ketoacyl-CoA Thiolase 3), which is an acetylcoacyl transferase. The function of this protein is to release acetyl groups and deliver them to other molecules, and therefore, it has significant role in many crucial cell processes. This interaction was confirmed by cloning the complete cDNA of *PKT3* as well as its homologue, *PKT4*. The interaction of MSI4-PKT3 is reported here for the first time and opens new horizons for more studies on MSI4 functional mechanism. This finding can be useful in regulation of flowering time in fruits and crops through genetic engineering of this pathway for example by alteration of PKT4 regulation.

Key words: Flowering, Yeast Two-Hybrid System, MSI4, Epigenetics, Molecular Interaction