

همساز سازی، شناسایی و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی و روند تکامل ژنتیکی یک ژن تیوردوکسین *h* از گیاه انگور بیدانه سفید

رضا حیدری جابلقی^۱، رحیم حداد^{۲*} و قاسمعلی گروسی^۳
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده فنی و مهندسی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین
(تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۳ - تاریخ تصویب: ۹۰/۱۰/۱۸)

چکیده

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک و مقاوم در برابر حرارت هستند که در حفظ تعادل شرایط اکسیداسیون-احیاء (Redox) سلولی دخالت داشته و در تمام موجودات زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی وجود دارند. در گیاهان عالی، تیوردوکسین‌ها به شش گروه مختلف، شامل تیوردوکسین‌های کلروپلاستی *f*، *m*، *x* و *y*؛ تیوردوکسین میتوکندریایی *o* و تیوردوکسین‌های *h* تقسیم‌بندی می‌شوند. تیوردوکسین‌های *h* با داشتن یک خانواده چند ژنی کوچک در فرآیندهای متعددی از جمله محافظت سلولی در برابر تنش اکسندگی دخالت می‌کنند. cDNA کدکننده ژن تیوردوکسین *h* (*VvTrxh3*) از بافت برگ گیاه انگور بیدانه سفید (*Vitis vinifera* L. Bidaneh Sefid)، با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) جداسازی و همساز سازی شده و خصوصیات بیوشیمیایی، ساختاری و روند تکامل ژنتیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. بررسی توالی نوکلئوتیدی نشان داد که چارچوب باز خواندنی ژن همساز سازی شده *VvTrxh3* به طول ۳۴۵ bp بوده و یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را کد می‌کند. همچنین بررسی توالی پروتئینی این ژن نشان داد که جایگاه فعال آن به صورت WCGPC بوده و وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه آیزوالکتریک پیش‌بینی شده آن به ترتیب برابر ۱۲/۷۹ کیلودالتون و ۵/۰۶ و دارای ساختار سه بعدی مختص پروتئین‌های تیوردوکسین، تحت عنوان Thioredoxin Fold می‌باشد. بررسی‌های فیلوژنتیکی و هم‌ردیف‌سازی چندگانه نشان داد که این ژن، تیوردوکسین نوع *h* و متعلق به زیرکلاس IA از زیرگروه I بوده و شباهت زیادی با تیوردوکسین‌های *h* گیاهان دیگر دارد.

واژه‌های کلیدی: تیوردوکسین ردوکتاز، تیوردوکسین، تنش اکسندگی، شاخص آب‌گریزی، ساختار سه بعدی.

مقدمه

زنده از پروکاریوت‌ها تا یوکاریوت‌های عالی وجود دارند. در گیاهان عالی، بر اساس تجزیه و تحلیل ساختار اولیه پروتئینی و موقعیت زیرسلولی، تیوردوکسین‌ها به شش گروه اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند که عبارتند از: تیوردوکسین‌های *f*، *h*، *m*، *o*، *x* و *y* (Gelhay et al.,

تیوردوکسین‌ها (Trxs) پروتئین‌هایی کوچک (۱۲ تا ۱۳ کیلودالتون) و مقاوم در برابر حرارت هستند که در حفظ تعادل شرایط اکسیداسیون-احیاء (Redox) سلولی دخالت داشته و به فراوانی در تمام موجودات

(Mousavi et al., 2010)، عمده مطالعات صورت گرفته در زمینه بررسی نقش حیاتی تیوردوکسین‌های نوع h در فرآیند جوانه‌زنی بذور غلات و القاء آن‌ها در واکنش به تنش‌های زنده، غیر زنده و بویژه تنش اکسید می‌باشد. پژوهش‌های انجام شده روی فرآیند جوانه‌زنی بذور غلات نشان داده است که این فرآیند با تغییرات گسترده در وضعیت اکسیداسیون- احیاء پروتئین‌های بذر همراه می‌باشد، به طوری که با دخالت تیوردوکسین‌های نوع h ، پروتئین‌های موجود به شکل اکسید شده در بذور خشک و رسیده، پس از جذب آب توسط بذر به حالت احیاء شده درآمده و موجب جوانه‌زنی بذر می‌شود (Serrato et al., 2001; Serrato & Cejudo, 2003; Alkhlfoui et al., 2007).

همچنین در بررسی‌های انجام شده روی گیاهان آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) و گندم (*Triticum aestivum*)، نشان داده شده است که ژن‌های تیوردوکسین نوع h در اثر زخم‌شدگی، پیری، آلودگی با عامل بیماریزای قارچی و تنش‌های شوری، گرمایی و اکسید به میزان زیادی در بافت‌های مختلف القا می‌شوند (Reichheld et al., 2002; Laloi et al., 2004; Cazalis et al., 2006; Park et al., 2009).

با توجه به تنوع، گستردگی و دخالت تیوردوکسین‌ها در فرآیندهای متعدد سلولی در گیاهان، شناسایی، همسانه‌سازی و بررسی فعالیت کاتالیتیکی آن‌ها در گیاهان زراعی و باغی توصیه شده تا به دیدگاه مناسبی از این پروتئین‌های کوچک، فراوان و مقاوم در برابر حرارت دست یافت و نهایتاً بتوان گیاهانی متحمل به تنش‌های محیطی تولید نمود. این تحقیق با هدف جداسازی و همسانه‌سازی یک توالی کامل cDNA رمز کننده تیوردوکسین نوع h ، تحت عنوان *VvTrxh3* از بافت برگ انگور بیدانه سفید، انجام گردید تا بتوان در پژوهش‌های آتی از آن در جهت تولید گیاهان زراعی و باغی متحمل به تنش‌های زنده و غیرزنده استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و نمونه برداری

بافت برگ در مرحله جوانی از گیاه انگور بیدانه سفید (*Vitis vinifera* L. cv. Bidaneh Sefid) از

(2005). تیوردوکسین‌های m ، x و y منشأ پروکاریوتی دارند، اما تیوردوکسین‌های f ، h و o ویژه موجودات یوکاریوتی می‌باشند (Gelhay et al., 2004a). تیوردوکسین‌های f ، m ، x و y درون کلروپلاست‌ها قرار داشته، در هسته کد شده و به وسیله آنزیم فردوکسین- تیوردوکسین ردوکتاز (FTR) احیاء می‌شوند (Lemaire et al., 2007). تیوردوکسین o درون میتوکندری قرار داشته و دارای یک انتهای آمینو با طول زیاد می‌باشد که به نظر می‌رسد به عنوان یک پپتید راهنما در انتقال به درون میتوکندری عمل می‌نماید (Laloi et al., 2001). تیوردوکسین h با داشتن انتهای آمینوی گسترده، درون سیتوزول، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی سلول قرار داشته و همانند تیوردوکسین o ، توسط آنزیم NADPH- تیوردوکسین ردوکتاز (NTR) احیاء می‌شوند (Gelhay et al., 2005; Meyer et al., 2008). تیوردوکسین‌های نوع h بر اساس ساختار اولیه پروتئینی به سه زیرگروه مختلف I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند (Gelhay et al., 2004a). زیرگروه‌های I و II توسط آنزیم NTR احیاء شده در حالی که احیاء زیرگروه III وابسته به سیستم گلوکاتایون/گلوکوتاردوکسین می‌باشد (Gelhay et al., 2003). مطالعات پروتئومیکس نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های نوع h در فرآیندهای متعدد سلولی دخالت دارند. علاوه بر نقش آن‌ها در محافظت سلولی در برابر تنش‌های زنده، غیر زنده و اکسید (Reichheld et al., 2002; Laloi et al., 2004; Cazalis et al., 2006)، این پروتئین‌ها در شکسته شدن منبع غذایی بذر، جوانه‌زنی بذور غلات، تغذیه و رشد گیاهک (Serrato et al., 2001; Serrato & Cejudo, 2003)، خودناسازگاری (Haffani et al., 2004)، توسعه سلولی (Juttner et al., 2000) و کاهش حساسیت و سمیت پروتئین‌های حساسیت‌زا و سمی (Joudrier et al., 2005) نقش دارند.

تا کنون مطالعات گسترده‌ای روی خانواده چند ژنی تیوردوکسین‌های نوع h انجام شده است. علاوه بر جداسازی، همسانه‌سازی و بررسی ویژگی‌های کاتالیتیکی پروتئین‌های کد شده توسط ژن‌های تیوردوکسین نوع h در گیاهان مختلف (Juttner et al., 2000; Gelhay et al., 2003; Maeda et al., 2003;

سنتر cDNA واکنش RT-PCR

واکنش نسخه برداری معکوس با استفاده از ۵ µg محلول RNA کل تیمار شده با آنزیم DNase I (Fermentas)، آنزیم نسخه بردار معکوس RevertAid™ (Fermentas) M-MuiV و آغازگرهای (18 Oligo dT mer) (Qiagen) در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت انجام شده و پس از آن، عمل غیر فعال سازی آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. بدین ترتیب رشته اول مولکول cDNA ساخته شده و از این مولکول RNA-DNA به عنوان الگو در واکنش RT-PCR استفاده گردید. واکنش RT-PCR به منظور تکثیر ژن VvTrxh3 با استفاده از آنزیم Pfu (Fermentas) و آغازگرهای اولیگونوکلئوتیدی طراحی شده بر اساس توالی تظاهر یافته برچسب دار (EST: CB348011) شناسایی شده با برنامه BLAST انجام شد.

آغازگرهای اختصاصی با توالی‌های 5'-TACGGATCCATGGCGGAAGAGGGACAA-3' (آغازگر رفت، مطابق با توالی اسید آمینه ای MAEEGQ) و 5'-ATCGGATCCTCAAGCAGTTGCATGCTTCTC-3' (آغازگر برگشت، مطابق با توالی اسید آمینه ای TEKHATA) که شامل سه نوکلئوتید اضافی و جایگاه شناسایی آنزیم برشی BamHI در انتهای ۵' بودند، سنتر شدند. واکنش RT-PCR در ۳۵ چرخه دمایی انجام شد که شرایط دمایی و زمانی هر چرخه شامل: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه بود. همچنین مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت.

همسانه سازی و توالی یابی cDNA کدکننده VvTrxh3

پس از خالص سازی محصول RT-PCR از روی ژل با استفاده از کیت استخراج اسید نوکلئیک GF-1 PCR Clean Up Kit (Vivantis)، ژن مورد نظر و ناقل پلاسمیدی pUC19 (Fermentas) توسط آنزیم برشی BamHI (Fermentas) هضم گردیده و مجدداً

کلکسیون انگور در ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان، وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، جمع آوری و در همان محل، پس از توزین به مقدار ۱ گرم، درون ورقه های آلومینیومی بسته بندی شده و بلافاصله درون ازت مایع تثبیت گردید. نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده، نگهداری شدند.

استخراج RNA کل

جهت استخراج RNA کل از یک روش بهینه شده در مقیاس کوچک، مبتنی بر CTAB، که تغییر یافته روش Reid et al. (2006) می باشد، استفاده شد.

بافت مورد نظر با استفاده از هاون و ازت مایع به صورت پودر درآمده و به میزان ۰/۰۵ گرم به یک تیوب ۲ ml حاوی ۱ ml بافر استخراج (300mM Tris-HCl pH 8, 25mM EDTA pH 8, 2% PVP, 2% CTAB, 2M NaCl, 2% β-mercaptoethanol) اضافه گردید. تیوبها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (-Techne-FTE10AE، انگلستان) با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شده و هر ۵ دقیقه به آرامی ورتکس (-Techne-FVORTECE، انگلستان) گردیدند. سپس پروتئینها دو مرتبه با یک حجم برابر از کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) حذف گردیده و لایه بالایی به یک تیوب جدید منتقل گردیده و ۰/۱ حجم سدیم استات ۳ M و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. رسوب اسید نوکلئیک به وسیله سانتریفیوژ (Hettich-D78532، آلمان) با سرعت بیشینه جمع آوری و در آب DEPC شده حل گردید.

در مرحله بعد ۰/۳ حجم لیتیوم کلراید ۸ M به نمونه ها اضافه گردیده و تیوبها به مدت یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس RNA کل به وسیله سانتریفیوژ با سرعت بیشینه رسوب و با استفاده از الکل اتانول ۷۰٪ شسته شده و در مقدار مناسب آب DEPC شده حل گردید. در نهایت، کمیت و کیفیت RNA کل استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Labomed- UVD3200، انگلستان) در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲٪ مورد بررسی قرار گرفت.

خالص‌سازی شدند. سپس واکنش اتصال با استفاده از آنزیم DNA لیگاز T4 (Fermentas) به منظور تولید پلاسمید نوترکیب pUC19-VvTrxh3 انجام گرفت. پس از تهیه سلول‌های مستعد اشریشیاکلی (*Escherichia coli*) سویه DH5 α ، انتقال پلاسمید حاوی ژن با استفاده از تکنیک شوک حرارتی انجام گرفته و باکتری‌ها روی محیط کشت جامد SOB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به منظور انجام آزمون سفید-آبی کشت شدند (Sambrook & Russell, 2001). در مرحله بعد تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب، انتخاب و مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. در نهایت، استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از روش تحلیل قلیایی با SDS انجام شده (Sambrook & Russell, 2001) و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از دو تکنیک PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی DNA پلاسمید نوترکیب با استفاده از آغازگرهای راه‌انداز باکتروفاژ T7 در دو جهت رفت و برگشت توسط شرکت SeqLab (Sequence Laboratories Gottingen) آلمان، انجام شد.

بررسی توالی

توالی نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی با استفاده از برنامه Translate مورد ترجمه قرار گرفته و خصوصیات بیوشیمیایی و ساختاری توالی اسیدآمینه‌ای بدست آمده با استفاده از برنامه‌های ProtScale، ProtParam، PSIpred، TMHMM (لینک‌ها در تارنمای ExpASY) و YLOC (Briesemeister et al., 2010) مورد بررسی قرار گرفت. توالی پروتئینی بدست آمده به منظور یافتن پروتئین‌های مشابه در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از برنامه BLAST در مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مورد جستجو قرار گرفته و تعدادی توالی پروتئینی از منابع مختلف که بیشترین شباهت را با توالی مورد نظر داشتند، انتخاب و برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه و بررسی روابط فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار ClustalW مورد استفاده قرار گرفتند.

پیش‌بینی ساختار سه بعدی توالی پروتئینی ژن VvTrxh3

ساختار سه بعدی توالی پروتئینی ژن VvTrxh3 با استفاده از ساختار کریستالی پروتئین کد شده توسط ژن

شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی مورد استفاده

شماره دستیابی توالی‌های پروتئینی موجود در پایگاه‌های اطلاعات توالی NCBI، SwissProt و EMBL که برای بررسی‌های هم‌ردیف‌سازی چندگانه و روابط فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند، عبارتند از: آرابیدوپسیس (*A. thaliana*): Ath1 (At3g51030)، Ath2 (At5g39950)، Ath3 (At5g42980)، Ath4 (At1g19730)، Ath5 (At1g45145)، Ath7 (At1g59730)، Ath8 (At1g69880)، Ath9 (At3g08710)، AtCxxS1 (At1g11530)، AtCxxS2 (At2g40790)، AtCxxC2 (At3g56420)، Ato1 (At2g35010)، Ato2 (At1g31020)، Atm1 (At1g03680)، Atm2 (At4g03520)، Atm3 (At2g15570)، Atm4 (At3g15360)، Atf1 (At3g02730)، Atf2 (At5g16400)، Atx (At1g50320)، Aty1 (At1g76760)، Aty2 (At1g43560)؛ انگور (*V. vinifera*): Vvh1 (HM370524)، Vvh2 (HM370525)، Vvh3 (HM370526)، Vvh4 (HM370527)، Vvh5 (CF513794)، Vvh6 (CB004453)، VvCxxS1 (EU280164)؛ صنوبر (*Populus trichocarpa*): Pth3 (BU22062)؛ گندم (*T. aestivum*): Tah1 (CD886902)، Tah2 (CD892602)، Tah3 (BJ210524)؛ جو (*Hordeum*)

اشریشیاکلی (*E. coli*): (P0AA27).

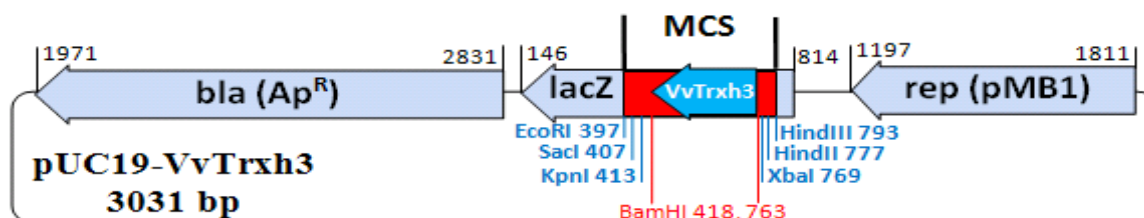
(*vulgare*) Hvh1 (AY245454)، Hvh2 (AY245455)؛
برنج (*Oryza sativa*): Osh1 (Q42443)، Osh2 (Q42443)؛
کرچک (*Ricinus communis*): Rch1 (Q9FRT3)؛
رتباجو (XP_002510456) Rch2، (XP_002534131)؛
(*Nicotiana spp.*): Nth1 (P29449)، Nth2 (Q07090)؛
سویا (*Glycine max*): Nbh1 (ACV52592)؛
یونجه (*Medicago sativa*): Msh (ABV71991)؛
رقم شیرانوهی (AAZ32865)؛
(*Citrus cv. Shiranuhi*): Csh (ABL67654)؛
گریپ فروت (*Citrus paradisi*): Cph (AY271308)؛
انسان (*H. sapiens*): (P10599) H.sapiens؛ باکتری

نتایج و بحث

همسانه سازی cDNA کد کننده VvTrxh3 و بررسی

خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده

cDNA کدکننده VvTrxh3 با استفاده از تکنیک RT-PCR از بافت برگ انگور بیدانه سفید، جداسازی و در ناقل پلاسمیدی pUC19 همسانه سازی شده (شکل ۱) و نتایج توالی یابی و بررسی با برنامه BLAST نشان داد که قطعه همسانه سازی شده در جهت معمولی، یک ژن تیوردوکسین می باشد.



شکل ۱- ساختار ناقل نوترکیب pUC19-VvTrxh3 حاوی ژن VvTrxh3 در جهت معمولی روی جایگاه چندگانه برای همسانه سازی (MCS). توالی مسئول رونوشت برداری ناقل نوترکیب (pMB1)، ژن های lacZ و مقاومت به آمپی سیلین (Ap^R) و جایگاه چندگانه برای همسانه سازی روی ناقل نوترکیب نشان داده شده اند.

نشان دهنده مقاوم بودن توالی پروتئینی این ژن ها در برابر حرارت می باشد (Gelhay et al., 2004a). همچنین شاخص ناپایداری آن در لوله آزمایش در حدود ۳۴/۴۷ بوده و در رسته پروتئین های پایدار تقسیم بندی می شود (Gasteiger et al., 2005).

ضریب خاموشی توالی پروتئینی ژن VvTrxh3 در طول موج ۲۸۰ nm در محیط آب، در وضعیت اکسید شده ۱/۳ و در حالت احیاء شده برابر ۱/۲۹ تعیین گردید (Gelhay et al., 2005). شاخص آب گریزی (Hydropathy) محاسبه شده به روش Kyte & Doolittle (1982)، نشان داد که توالی پروتئینی ژن VvTrxh3 همانند توالی پروتئینی ژن های Vvh4 و Vvh10، به دلیل خاصیت احیاء کنندگی بالا، به میزان زیادی آب گریز بوده (شکل ۲) و از مجموع کل اسیدهای آمینه، ۱۹ اسید آمینه با بار منفی (Asp+Glu) داشته، در حالی که تعداد کل اسیدهای آمینه با بار مثبت آن (Arg+Lys) برابر ۱۴ می باشد.

چارچوب باز خواندنی cDNA کدکننده VvTrxh3 ثبت شده در پایگاه توالی نوکلئوتیدی NCBI GenBank با شماره دستیابی HM370526، به طول ۳۴۵ bp بوده که با کدون ATG آغاز شده و با کدون TGA خاتمه یافته و یک پروتئین با ۱۱۴ اسید آمینه را کد می نماید (شکل ۲ الف).

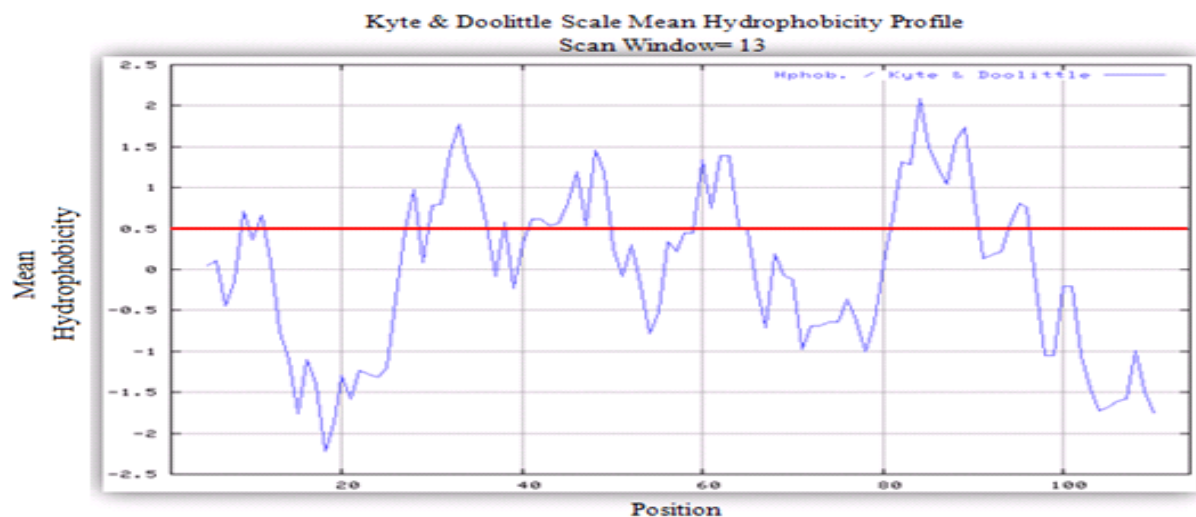
بررسی خصوصیات بیوشیمیایی پروتئین بدست آمده با استفاده از برنامه ProtParam نشان داد که وزن مولکولی محاسبه شده و نقطه ایزوالکتریک پیش بینی شده توالی پروتئینی ژن VvTrxh3 با فرمول مولکولی C₅₇₅H₉₀₆N₁₄₆O₁₆₉S₇، به ترتیب برابر ۱۲/۷۹ کیلودالتون و ۵/۰۶ می باشد.

مشابه با ژن های همسانه سازی شده Vvh4 و Vvh10 از ارقام عسکری و یاقوتی (Mousavi et al., 2010)، شاخص Aliphatic ژن VvTrxh3، به عنوان یک عامل مهم به منظور برآورد مقاومت پروتئین ها در برابر حرارت (Kim et al., 2008)، ۸۷/۸۹ محاسبه گردید که

(الف)

1	ATGGCGGAAGAGGGACAAGTTCTCGGTTGCCACAGTGTGGAATCGTGGAGGAGCAATTCCAGCATGGA
1	M A E E G Q V L G C H S V E S W K E Q F Q H G
70	ATAGAGTCCAAGAAACTGGTGGTGGTGGATTTCACTGCTTCATGGTGTGGGCCATGTCGTGT CATTAGC
24	I E S K K L V V V D F T A S W C G P C R V I S
139	CCATTTATGGCAGAGCTTGCCAAGAAGATGCCTAATGTGCTATTTCTCAAGGTGGATGTGGATGAATTG
47	P F M A E L A K K M P N V V F L K V D V D E L
208	GAGACTGTTGCTAAGGAGTGGGAAGTTGAGGCCATGCCAACCTTTGTGTTCTCTGTTAGAAGGAAACGTA
70	E T V A K E W E V E A M P T F V F L L E G N V
277	GTGGACAAGTTGTGGGTGCAAAAAGAGAAGAACTGGTGCAGAAGACAGAGAAGCATGCAACTGCTTGA
93	V D K V V G A K R E E L V Q K T E K H A T A *

(ب)



شکل ۲- توالی نوکلئوتیدی، پروتئینی و شاخص آب‌گریزی (Hydropathy) ژن *VvTrxh3* (الف) توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی. اسیدهای آمینه قرمز رنگ نشان دهنده موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، اسیدهای آمینه آبی رنگ نشان دهنده توالی جایگاه فعال و اسیدآمینه نارنجی رنگ شامل اسیدآمینه تریپتوفان ویژه می‌باشند. همچنین کدون‌های آغاز و پایان چارچوب باز خواندنی به ترتیب با رنگ‌های سبز و قهوه‌ای نشان داده شده‌اند. (ب) بررسی شاخص Hydropathy توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3*. دومین‌های آب‌گریز در بالا و دومین‌های آب‌دوست در زیر خط قرمز رنگ قرار دارند.

بررسی توالی اسیدآمینه‌ای و موتیف‌های ساختاری توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3*

بررسی توالی اسیدآمینه‌ای نشان داد که برخلاف توالی پلی‌پپتیدی ژن *Vvh10* از انگور یاقوتی (Mousavi *et al.*, 2010)، توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* همانند ژن *Vvh4* از انگور عسکری، دارای یک جایگاه فعال معمول WCGPC (Trp-Cys₃₉-Gly-Pro-Cys₄₂) بوده که در هر سه زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* مشاهده می‌شود.

پیش‌بینی موقعیت زیرسلولی این پروتئین با برنامه YLOC نشان داد که برخلاف تعدادی از تیوردوکسین‌های نوع *h* که محل فعالیت آن‌ها درون میتوکندری، شبکه آندوپلاسمی و روی غشای پلاسمایی است (Gelhay et al., 2004b; Alkhalfioui et al., 2008; Meng et al., 2010)، ژن *VvTrxh3* مشابه با ژن‌های *Vvh4* و *Vvh10*، از نوع سیتوپلاسمی بوده و محل فعالیتش درون سیتوزول قرار دارد.

ژن های *Vvh4* و *Vvh10*، توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* با داشتن بخش های غشائی و خارج سلولی، می تواند انتقال پلاسمودسمایی داشته باشد، البته این فعالیت منحصر به فرد نیاز به بررسی های دقیق تری دارد. بررسی توالی اسیدآمینه ای بدست آمده با برنامه های ConSeq و PatchFinder منجر به شناسایی اسیده های آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت گردید که عبارتند از: Val7, Phe34, Ala36, Trp38, Cys39, Pro41, Cys42, Asp67, Val66, Asp65, Lys63, Phe61, Pro47, Met81, Thr83, Lys88, Val97, Gly98 و Ala99 (شکل ۴).

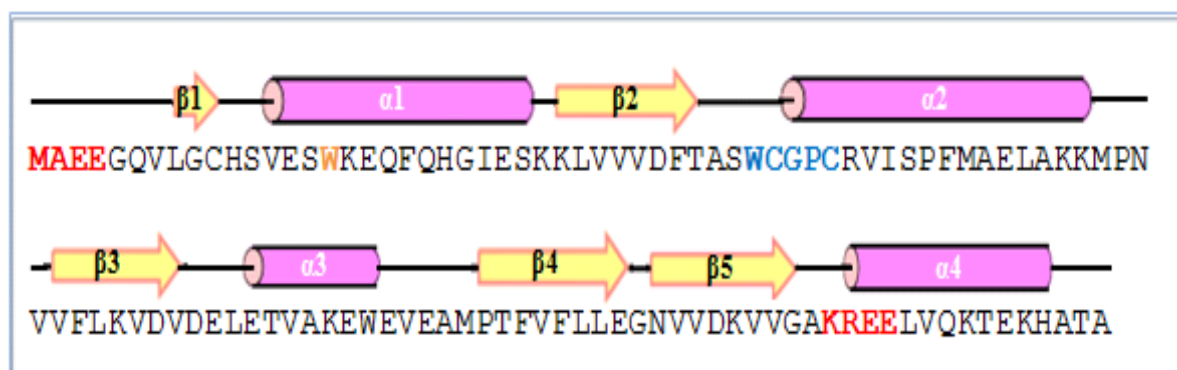
بررسی ساختار دوم و سوم توالی پروتئینی ژن

VvTrxh3

بررسی ساختار دوم توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* با استفاده از برنامه PSIPred نشان داد که این پروتئین و به طور کلی تیوردوکسین ها، حاوی ۵ صفحه β و ۴ مارپیچ α می باشند که به ترتیب $\beta1\alpha1\beta2\alpha2\beta3\alpha3\beta4\beta5\alpha4$ در ساختار دو بعدی پروتئین قرار می گیرند (Shahpiri et al., 2009)، به طوری که جایگاه فعال WCGPC مابین انتهای کربوکسیل صفحه $\beta2$ و انتهای آمینوی مارپیچ $\alpha2$ به شکلی قرار گرفته است که اسیده های آمینه Gly40, Pro41 و Cys42 در انتهای آمینوی مارپیچ $\alpha2$ واقع شده اند (شکل ۳).

به جزء تیوردوکسین *Osh1* از گیاه برنج (*O. sativa*)، تیوردوکسین انسانی (*H. sapiens*) و پروتئین تیوردوکسین از *E. coli*، تمام تیوردوکسین های نوع *h* که تاکنون شناسایی شده اند، دارای یک اسیدآمینه تریپتوفان ویژه می باشند که یک ضریب خاموشی در حدود ۲۹۰ nm را به تیوردوکسین ها می دهد (Gelhaye et al., 2004a). این اسیدآمینه تریپتوفان ویژه، در موقعیت ۱۶ توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* و ژن های *Vvh4* و *Vvh10* مشاهده می شود. Ishiwatari et al. (1998) یک تیوردوکسین نوع *h* تحت عنوان *Osh1* را از بافت آوند آبکش گیاه برنج شناسایی نمودند که برای انتقال در لوله های بافت آبکش از طریق پلاسمودسماتا به موتیف های ساختاری MAAEE و RKDD نیازمند می باشد.

این موتیف ها تنها در تیوردوکسین های گیاهان عالی یافت شده و در تیوردوکسین های باکتری ها، پستانداران و جلبک ها دیده نشده اند (Peterson et al., 2005). در انتهای آمینوی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* و ژن های *Vvh4* و *Vvh10*، یک توالی MAEE مشاهده شد که مشابه با توالی موجود در انتهای آمینوی آیزوفرم *Osh1* است. همچنین در انتهای کربوکسیل آن ها یک موتیف KREE مشاهده شد، در حالی که این موتیف تنها در آیزوفرم *Ath1* و به صورت KKDE وجود دارد. بررسی ها با برنامه TMHMM نشان داد که مشابه با



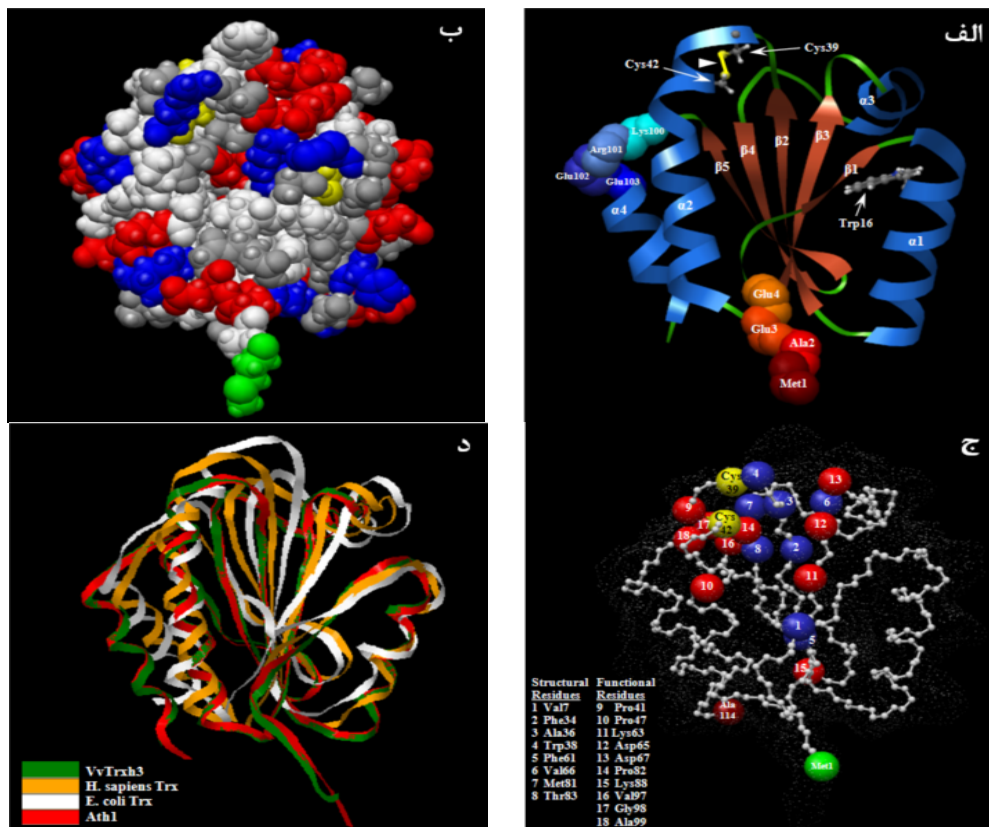
شکل ۳- ساختار دو بعدی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* با استفاده از برنامه PSIPred. اسیده های آمینه جایگاه فعال، موتیف های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینه تریپتوفان ویژه به ترتیب با رنگ های آبی، قرمز و نارنجی نشان داده شده اند.

تعیین گردیده به طوری که مشابه با ساختار سه بعدی ژن *Vvh4*، صفحات $\beta1$ ، $\beta2$ ، $\beta3$ و $\beta5$ به صورت موازی و صفحه $\beta4$ به صورت غیرموازی، طوری کنار هم قرار

ساختار سه بعدی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* بوسیله برنامه I-TASSER و با استفاده از ساختار کریستالی آیزوفرم *Ath1* از آرکیدوپسیس به عنوان الگو

که برای حضور و فعالیت جایگاه فعال WCGPC بسیار ضروری است (Jacquot et al., 1997).

می‌گیرند که یک صفحه چین‌داری را تشکیل داده و توسط مارپیچ‌های α احاطه می‌شوند (شکل ۴ج). این نوع سازمان‌دهی به عنوان پیچ و تاب‌خوردگی مختص تیوردوکسین‌ها (Thioredoxin Fold) شناخته می‌شود



شکل ۴- مدل‌های سه بعدی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3*. الف) مدل سه بعدی روبان (Ribbon) توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3*. مارپیچ‌های α ، صفحات β و نواحی مارپیچ پیچیده به طور مشخص در ساختار سه بعدی قابل مشاهده می‌باشند. اسیدهای آمینه سیستئین جایگاه فعال و اسیدآمینه تریپتوفان ویژه به شکل میله- توپ (Ball-stick) و با علامت فلش به همراه باند دی-سولفیدی بین دو اسیدآمینه سیستئین جایگاه فعال با علامت مثلث نشان داده شده‌اند. اسیدهای آمینه موجود در موتیف‌های ساختاری انتهایی آمینو و انتهایی کربوکسیل درگیر در انتقال سلول به سلول به شکل کروی (Sphere) و به ترتیب با رنگ‌های قرمز و آبی نشان داده شده‌اند. ب) توزیع اسیدهای آمینه یونی (آبی: اسیدهای آمینه با بار مثبت، قرمز: اسیدهای آمینه با بار منفی)، قطبی (خاکستری) و آب‌گریز (سفید) در سطح پروتئین *VvTrxh3*. اسیدآمینه متئونین آغازین و اسیدهای آمینه سیستئین به ترتیب با رنگ‌های سبز و زرد نشان داده شده‌اند. ج) نمایش اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت در سطح پروتئین به ترتیب با رنگ‌های آبی و قرمز به همراه سطح واندروالسی ۱۰٪. اسیدآمینه متئونین آغازین و اسیدهای آمینه سیستئین موجود در جایگاه فعال به ترتیب با رنگ‌های سبز و زرد نشان داده شده‌اند. د) مقایسه ساختار سه بعدی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* (سبز رنگ) با ساختارهای سه بعدی پروتئین تیوردوکسین انسانی (زرد رنگ)، پروتئین تیوردوکسین از *E. coli* (سفید رنگ) و *Ath1* از آرابیدوپسیس (قرمز رنگ).

انتهای آمینو، $\beta 1$ ، $\beta 2$ و $\beta 3$ ، به صورت موازی با هم قرار گرفته‌اند در حالی که صفحات β از موتیف انتهایی کربوکسیل، $\beta 4$ و $\beta 5$ ، به صورت غیرموازی در کنار هم واقع شده‌اند. این طرز قرارگیری صفحات β در دو ناحیه،

ساختار سه بعدی پروتئین می‌تواند به یک موتیف $\beta\alpha\beta\alpha$ انتهایی آمینو و یک موتیف $\beta\beta\alpha$ انتهایی کربوکسیل تقسیم‌بندی شود که توسط یک مارپیچ $\alpha 3$ به یکدیگر متصل می‌شوند. صفحات β از موتیف

نمایش می‌دهد. ساختار سه بعدی *VvTrxh3* با ساختارهای سه بعدی پروتئین تیوردوکسین انسانی، پروتئین تیوردوکسین از *E. coli* و پروتئین کد شده توسط ژن *Ath1* از گیاه مدل آرآیدوپسیس به طور کامل منطبق می‌باشد (شکل ۴د).

مقایسه ژن *VvTrxh3* با تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاهان دیگر

توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* با سایر تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاهان دیگر مورد مقایسه قرار گرفته و مشاهده شد که بالاترین شباهت را با آیزوفرم‌های *Pth3* از گیاه صنوبر (*P. trichocarpa*)، *Csh* از رقم *shiranuhi* متعلق به جنس مرکبات (*Citrus cv. shiranuhi*)، *Nbh1* از گیاه تنباکو (*N. benthamiana*) و *Rch1* از گیاه کرچک (*R. comunis*) به ترتیب به میزان ۸۹٪ (با ۷۱٪ یکسانی)، ۸۶٪ (با ۷۲٪ یکسانی)، ۸۵٪ (با ۷۲٪ یکسانی) و ۸۵٪ (با ۷۱٪ یکسانی) دارد (شکل ۵). همچنین *VvTrxh3*، ۸۲٪ شباهت و ۶۶٪ یکسانی را با ژن *Ath1* از آرآیدوپسیس که به عنوان یک الگو برای مدل‌سازی مقایسه‌ای ساختار سه بعدی پیش‌بینی شده *VvTrxh3* استفاده شد را نشان داد.

از خصوصیات بارز پروتئین‌ها با ساختار سه بعدی Thioredoxin Fold می‌باشد (Martin et al., 1995). ویژگی دیگر ساختار سه بعدی توالی پروتئینی ژن *VvTrxh3* و به طور کلی تیوردوکسین‌ها، نحوه آرایش مارپیچ‌های α در اطراف صفحات مرکزی β می‌باشد. مارپیچ‌های $\alpha 1$ ، $\alpha 2$ و $\alpha 4$ از موتیف‌های انتهای آمینو و کربوکسیل، در وضعیت موازی با یکدیگر و صفحات β قرار داشته در حالی که مارپیچ $\alpha 3$ به صورت عمود بر مارپیچ‌های α و صفحات β واقع شده است. مارپیچ‌های $\alpha 1$ و $\alpha 3$ در یک طرف و مارپیچ‌های $\alpha 2$ و $\alpha 4$ نیز در طرف دیگر صفحات β قرار دارند (Jacquot et al., 1997). اسیدهای آمینه جایگاه فعال به شکل بیرون‌زدگی در انتهای کربوکسیل صفحه $\beta 2$ و آغاز مارپیچ $\alpha 2$ قرار گرفته‌اند به طوری که اسیدآمینه سیستئین انتهای آمینوی جایگاه فعال (Cys_{39}) نسبت به اسیدآمینه سیستئین انتهای کربوکسیل جایگاه فعال (Cys_{42}) در واکنش دی‌تیول/دی‌سولفید، بیشتر در معرض حمله نوکلئوفیلی قرار دارد (Maeda et al., 2008). توزیع اسیدهای آمینه یونی، قطبی و آب‌گریز در سطح پروتئین در شکل ۴ب نشان داده شده است و شکل ۴ج نیز توزیع اسیدهای آمینه مهم از نظر ساختاری و فعالیت در سطح پروتئین *VvTrxh3* را



شکل ۵- هم‌دیف‌سازی چندگانه ژن *VvTrxh3* با آیزوفرم‌های نوع *h* انگور، سایر گیاهان و ژن‌های تیوردوکسین انسانی و *E. coli* با استفاده از نرم‌افزار ClustalW. جایگاه فعال، موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول و اسیدآمینه تریپتوفان ویژه به ترتیب با کادرهای آبی، قرمز رنگ و علامت مثلث نشان داده شده‌اند. نواحی تیره و نیمه روشن به ترتیب نشان دهنده اسیدهای آمینه کاملاً محافظت شده و نیمه محافظت شده می‌باشد. همچنین علامت * نشان دهنده اسیدهای آمینه کاملاً یکسان و علامت ۰ نمایان‌گر اسیدهای آمینه مشابه می‌باشد. شماره دستیابی ژن‌ها در بخش مواد و روش‌ها آورده شده است.

(hIII) به میزان ۶۰٪ تا ۶۸٪ دارد. از بین آیزوفرم‌های *hI*، بیشترین تشابه را با آیزوفرم‌های *Vvh2* و *Vvh4* به میزان ۹۹٪ (با ۹۶٪ یکسانی) و کمترین تشابه را با آیزوفرم‌های *Vvh1* و *Vvh10* به ترتیب به میزان ۸۰٪ و ۷۹٪ دارد. جدول ۱ میزان شباهت و یکسانی ژن *VvTrxh3* را در سطح DNA و پروتئین با سایر آیزوفرم‌های انگور نشان می‌دهد.

در مقایسه با تیوردوکسین‌های گیاهی، *VvTrxh3* شباهت کمتری را با پروتئین تیوردوکسین انسانی (۷۱٪) شباهت و ۵۲٪ یکسانی) و پروتئین تیوردوکسین از *E. coli* (۵۷٪ شباهت و ۲۹٪ یکسانی) نشان داد. ژن *VvTrxh3* در مقایسه با تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور، بیشترین تشابه را با آیزوفرم‌های زیرگروه I (*hI*)، از ۷۹٪ تا ۹۹٪ و کمترین تشابه را با آیزوفرم‌های زیرگروه III

جدول ۱- میزان یکسانی و شباهت ژن *VvTrxh3* در سطح پروتئین و DNA با سایر آیزوفرم‌های انگور.

DNA	پروتئین		آیزوفرم‌ها
	درصد تشابه	درصد یکسانی	
۷۰	۸۰	۶۶	<i>Vvh1</i>
۹۸	۹۹	۹۶	<i>Vvh2</i>
۹۹	۹۹	۹۶	<i>Vvh4</i>
۴۸	۷۰	۵۰	<i>Vvh5</i>
۴۱	۶۸	۴۳	<i>Vvh6</i>
۹۱	۷۹	۷۵	<i>Vvh10</i>
۴۵	۶۰	۴۰	<i>VvCxxS1</i>

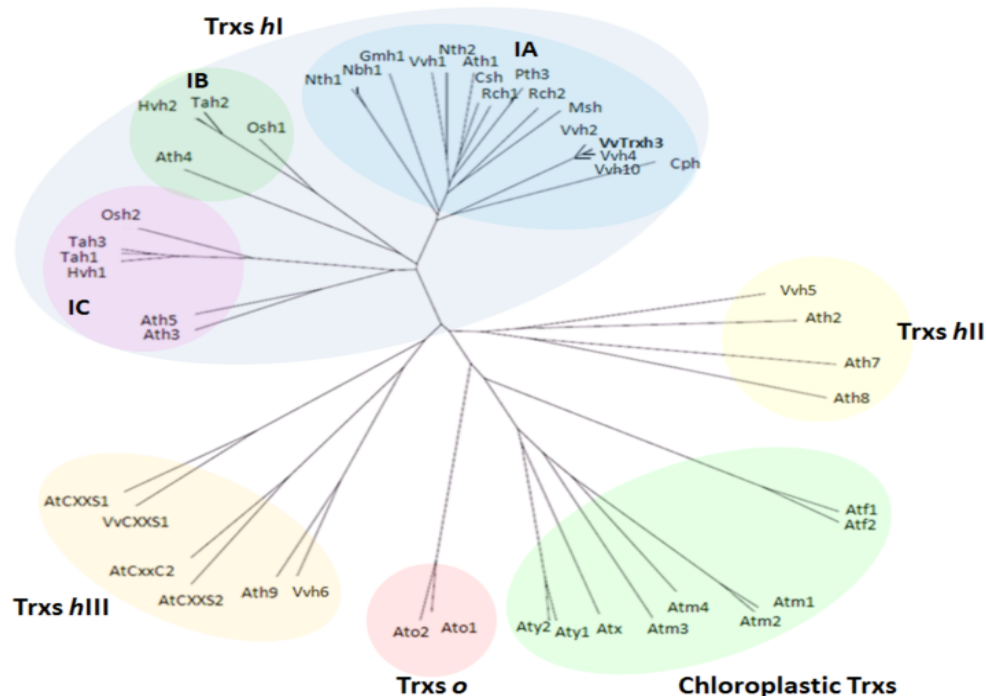
بررسی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های نوع *h* خود به سه زیرگروه I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند. تیوردوکسین‌های نوع *h*، زیرگروه I (*hI*) توسط آنزیم NTR احیاء شده و دارای جایگاه فعال WC[G/P]PC می‌باشند (Gelhay et al., 2004a). این زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h*، سیتوزولی بوده و با داشتن موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، در تنظیم ردوکس ترکیبات بافت آوندی دخالت داشته و قبل از انتقال از طریق پلاسمودسماتا به درون عناصر آوند آبکش، در سلول‌های جانبی بافت آوند آبکشی سنتز می‌شوند (Ishiwatari et al., 1998). تیوردوکسین‌های *hI* به سه زیرکلاس IA، IB و IC تقسیم‌بندی می‌شوند که ژن *VvTrxh3* به همراه ژن‌های *Vvh4* و *Vvh10* و سایر تیوردوکسین‌های مورد استفاده در تهیه همردیف‌سازی چندگانه، به زیرکلاس IA تعلق دارند. زیرکلاس‌های IB و IC نیز شامل تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاه آرابیدوپسیس و غلات می‌باشند. تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه II (*hII*) نیز همانند تیوردوکسین‌های *hI* توسط آنزیم NTR احیاء شده و دارای جایگاه فعال WCGPC می‌باشند. ویژگی اصلی آن‌ها، وجود یک انتهای آمینو با طول زیاد می-

ژن *VvTrxh3* به زیرکلاس ویژه‌ای از تیوردوکسین-های نوع *h* تعلق دارد

Gelhay et al. (2004b) با بررسی‌های فیلوژنتیکی روی انواع تیوردوکسین‌های آرابیدوپسیس نشان دادند که تیوردوکسین‌های این گیاه به سه گروه اصلی، شامل: ۴ نوع تیوردوکسین کلروپلاستی *f*، *m*، *x* و *y*، تیوردوکسین‌های *o* با موقعیت زیرسلولی میتوکندریایی و تیوردوکسین‌های نوع *h* تقسیم‌بندی می‌شوند.

بررسی‌های آن‌ها نشان داد که تیوردوکسین‌های نوع *h* نیز شامل سه زیرگروه بوده و هر زیرگروه خود به چند زیرکلاس تقسیم‌بندی می‌شود. Meyer et al. (2008) نیز طی بررسی‌های خود نتایج مشابهی را بدست آوردند. بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از انواع مختلف تیوردوکسین‌های آرابیدوپسیس و تیوردوکسین‌های نوع *h* سایر گیاهان به روش Unrooted-Neighbor Joining با استفاده از نرم افزار ClustalW نشان داد که تیوردوکسین‌ها به سه گروه اصلی کلروپلاستی، تیوردوکسین‌های *o* و تیوردوکسین‌های نوع *h* تقسیم‌بندی شده به طوری که ژن *VvTrxh3* به همراه سایر آیزوفرم‌های انگور در گروه تیوردوکسین‌های نوع *h* قرار می‌گیرد (شکل ۶).

باشد. تیوردوکسین‌های *hII* شامل آیزوفرم‌های *Vvh5*، *Ath2*، *Ath7* و *Ath8* می‌باشند.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از نرم‌افزار ClustalW به منظور نشان دادن نوع، زیرگروه و زیرکلاس ژن *VvTrxh3* با استفاده از انواع تیوردوکسین‌های آرابیدوپسیس، تیوردوکسین‌های نوع *h* انگور و سایر گیاهان. شماره دستیابی ژن‌ها در بخش مواد و روش‌ها آورده شده است.

تیوردوکسین‌های نوع *h* از گیاه آرابیدوپسیس و غلات می‌باشند. تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه II (*hII*) نیز همانند تیوردوکسین‌های *hI* توسط آنزیم NTR احیاء شده و دارای جایگاه فعال WCGPC می‌باشند. ویژگی اصلی آن‌ها، وجود یک انتهای آمینو با طول زیاد می‌باشد. تیوردوکسین‌های *hII* شامل آیزوفرم‌های *Vvh5*، *Ath2*، *Ath7* و *Ath8* می‌باشند. سومین زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* شامل تیوردوکسین‌هایی با جایگاه فعال معمول WCGPC و تیوردوکسین‌های ناهنجار CxxS می‌باشند که ویژگی اصلی آن‌ها واکنش با سیستم گلووتاردوکسین/گلووتاتیون (Grx/GSH) می‌باشد (Gelhay et al., 2003). از جمله این تیوردوکسین‌ها می‌توان به آیزوفرم‌های *Vvh6* و *VvCxxS1* انگور و *AtCxxS2*، *AtCxxS1*، *Ath9* و *AtCxxC2* آیزوفرم‌های انگور اشاره نمود. بررسی فیلوژنتیکی در مورد تقسیم‌بندی تیوردوکسین‌های آرابیدوپسیس و

بررسی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که تیوردوکسین‌های نوع *h* خود به سه زیرگروه I، II و III تقسیم‌بندی می‌شوند. تیوردوکسین‌های نوع *h*، زیرگروه I (*hI*) توسط آنزیم NTR احیاء شده و دارای جایگاه فعال WC[G/P]PC می‌باشند (Gelhay et al., 2004a). این زیرگروه از تیوردوکسین‌های نوع *h* سیتوزولی بوده و با داشتن موتیف‌های ساختاری درگیر در انتقال سلول به سلول، در تنظیم ردوکس ترکیبات بافت آوندی دخالت داشته و قبل از انتقال از طریق پلاسمودسماتا به درون عناصر آوند آبکش، در سلول‌های جانبی بافت آوند آبکشی سنتز می‌شوند (Ishiwatari et al., 1998). تیوردوکسین‌های *hI* به سه زیرکلاس IA، IB و IC تقسیم‌بندی می‌شوند که ژن *VvTrxh3* به همراه ژن‌های *Vvh4* و *Vvh10* و سایر تیوردوکسین‌های مورد استفاده در تهیه همردیف‌سازی چندگانه، به زیرکلاس IA تعلق دارند. زیرکلاس‌های IB و IC نیز شامل

تیوردوکسین‌های نوع *h* سایر گیاهان مشابه با نتایج موجود می‌باشد (Gelhay et al., 2004a, 2005).

نتیجه‌گیری کلی

در این بررسی یک cDNA کامل تیوردوکسین نوع *h* تحت عنوان *VvTrxh3*، از بافت برگ گیاه انگور (*V. vinifera*) یک رقم ایرانی (بیدانه سفید) با استفاده از واکنش RT-PCR جداسازی و همسانه‌سازی گردیده و ویژگی‌های بیوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از بررسی‌های مدل‌سازی ساختاری نشان داده شد که *VvTrxh3* مشابه با سایر تیوردوکسین‌ها، دارای ساختار Thioredoxin Fold بوده و بررسی‌های همولوژی و فیلوژنتیکی نشان داد که این ژن شباهت بالایی با

تیوردوکسین‌های نوع *h* گیاهان دیگر داشته و به زیرکلاس ویژه‌ای از تیوردوکسین‌های نوع *h* زیرگروه I تعلق دارد.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری صمیمانه مدیریت محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، جناب آقای دکتر نوری و همچنین جناب آقای دکتر نجاتیان، مدیریت محترم ایستگاه تحقیقات انگور تاکستان، جناب آقایان مهندس رسولی و مهندس فدائی که ما را در امر نمونه‌برداری یاری نمودند، ابراز می‌دارند.

REFERENCES

- Alkhalifioui, F., Renard, M., Vensel, W. H., Wong, J., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Buchanan, B. B. & Montrichard, F. (2007). Thioredoxin-linked proteins are reduced during germination of *Medicago truncatula* seeds. *Plant Physiology*, 144, 1559–1579.
- Alkhalifioui, F., Renard, M., Frendo, P., Keichinger, C., Meyer, Y., Gelhay, E., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Ritzenthaler, C. & Montrichard, F. (2008). A novel type of thioredoxin dedicated to symbiosis in legumes. *Plant Physiology*, 148, 424–435.
- Ashkenazy, H., Erez, E., Martz, E., Pupko, T. & Ben-Tal, N. (2010). *ConSurf 2010*: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. Retrieved May 16, 2010, from <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.5>
- Briesemeister, S., Rahnenführer, J. & Kohlbacher, O. (2010). Going from where to why. interpretable prediction of protein subcellular localization. *Bioinformatics*, 26(9), 1232–8.
- Cazalis, R., Pulido, P., Aussenac, T., Perez-Ruiz, J. M. & Cejudo, F. J. (2006). Cloning and characterization of three thioredoxin *h* isoforms from wheat showing differential expression in seeds. *Journal of Experimental Botany*, 57, 2165–2172.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: J. M. Walker (Ed), *The proteomics protocols handbook*. (pp. 571-607.) Humana Press.
- Gelhay, E., Rouhier, N. & Jacquot, J. P. (2003). Evidence for a subgroup of thioredoxin *h* that requires GSH/Grx for its reduction. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 555, 443–448.
- Gelhay, E., Rouhier, N. & Jacquot, J. P. (2004a). The thioredoxin *h* system of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 265–271.
- Gelhay, E., Rouhier, N., Gerard, J., Jolivet, Y., Gualberto, J., Navrot, N., Ohlsson, P. I., Wingsle, G., Hirasawa, M., Knaff, D. B., Wang, H., Dizengremel, P., Meyer, Y. & Jacquot, J. P. (2004b). A specific form of thioredoxin *h* occurs in plant mitochondria and regulates the alternative oxidase. *Plant Biology*, 101(40), 14545-14550.
- Gelhay, E., Rouhier, N., Navrot, N. & Jacquot, J. P. (2005). The plant thioredoxin system. *Cell Molecular and Life Science*, 62, 24–35.
- Haffani, Y. Z., Gaude, T., Cock, J. M. & Goring, D. R. (2004). Antisense suppression of thioredoxin *h* mRNA in *Brassica napus* cv. Westar pistils causes a low level constitutive pollen rejection response. *Plant Molecular Biology*, 55, 619–630.
- Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K. C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M. & Lucas, W. J. (1998). Rice phloem thioredoxin *h* has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta*, 205, 12–22.
- Jacquot, J. P., Lancelin, J. M. & Meyer, Y. (1997). Thioredoxin: structure and function in plant cells. *New Phytology*, 136, 543–570.
- Joudrier, P., Gautier, M. F., de Lamotte, F. & Kobrehel, K. (2005). The thioredoxin *h* system: potential applications. *Biotechnology Advances*, 23, 81–85.

15. Juttner, J., Olde, D., Langridge, P. & Baumann U. (2000). Cloning and expression of a distinct subclass of plant thioredoxins. *European Journal of Biochemistry*, 267, 7109–7117.
16. Katti, S., Le Master, D. & Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 212, 167–184.
17. Kim, Y. J., Shim, J. S., Krishna, P. R., Kim, S. Y., In, J. G., Kim, M. K. & Kim, D. C. (2008). Isolation and characterization of a glutaredoxin gene from *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Molecular Biology Report*, 26, 335–349.
18. Kyte, J. & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157, 105–32.
19. Laloi, C., Mestres, O. D., Marco, Y., Meyer, Y. & Reichheld, J. P. (2004). The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its w-box-mediated response to pathogen elicitor. *Plant Physiology*, 134, 1006–1016.
20. Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J. M., Bonnard, G. & Meyer, Y. (2001). Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 14144–14149.
21. Lemaire, S D., Michelet, L., Zaffagnini, M., Massot, V. & Issakidis-Bourguet, E. (2007). Thioredoxins in chloroplasts. *Current Genet*, 51, 343–365.
22. Maeda, K., Finnie, C., Ostergaard, O. & Svensson, B. (2003). Identification, cloning and characterization of two thioredoxin *h* isoforms, *HvTrxh1* and *HvTrxh2*, from the barley seed proteome. *European Journal of Biochemistry*, 270, 2633–43.
23. Maeda, K., Hagglund, P., Finnie, C., Svensson, B. & Henriksen, A. (2008). Crystal structures of barley thioredoxin *h* isoforms *HvTrxh1* and *HvTrxh2* reveal features involved in protein recognition and possibly in discriminating the isoform specificity. *Protein Science*, 17, 1015–1024.
24. Martin, J. L. (1995). Thioredoxin- a fold for all reasons: the thioredoxin fold is a characteristic protein structural motif that has been found in five distinct classes of proteins that have the common property of interacting with cysteine-containing substrates. *Current Biology*, 3, 245–250.
25. Meng, L., Wong, J. H., Feldman, L. J., Lemaux, P. G. & Buchanan, B. B. (2010). A membrane-associated thioredoxin required for plant growth moves from cell to cell, suggestive of a role in intercellular communication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3900–3905.
26. Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F. & Reichheld, J. P. (2008). Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1783, 589–600.
27. Moussavi, S. S., Haddad, R., Garousi, G. A. & Hosseini, R. (2010). Identification, cloning and characterization of a thioredoxin *h* (*VvTrxh10*) gene isolated from grape (*Vitis vinifera* L.) cv. Yaquiti berry tissue. *Agricultural Biotechnology*, 9(1), 17–26. (In Farsi)
28. Nimrod, G., Schushan, M., Steinberg, D. M. & Ben-Tal, N. (2008). Detection of functionally important regions in hypothetical proteins of known structure. *Structure*, 16, 1755–1763.
29. Park, S. K., Jung, Y. J., Lee, J. R., Lee, Y. M., Jang, H. H., Lee, S. S., Park, J. H., Kim, S. Y., Moon, J. C., Lee, S. Y., Chae, H. B., Shin, M. R., Jung, J. H., Kim, M. G., Kim, W. Y., Yun, D. J., Lee, K. O. & Lee, S. Y. (2009). Heat-shock and redox-dependent functional switching of an *h*-type *Arabidopsis* thioredoxin from a disulfide reductase to a molecular chaperone. *Plant Physiology*, 150, 552–561.
30. Peterson, F. C., Lytle, B. L., Sampath, S., Vinarov, D., Tyler, E., Shahan, M., Markley, J. L. & Volkman, B. F. (2005). Solution structure of thioredoxin *h1* from *Arabidopsis thaliana*. *Protein Structure Report*, 14, 2195–200.
31. Reichheld, J. P., Mestres-Ortega, D., Laloi, C. & Meyer, Y. (2002). The multigenic family of thioredoxin *h* in *Arabidopsis thaliana*: specific expression and stress response. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 685–690.
32. Reid, K. E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F. & Lund, S. T. (2006). An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BioMed Central Plant Biology*, 6, 27–37.
33. Russell, R. B., Breed, J. & Barton, G. J. (1992). Conservation analysis and secondary structure prediction of the SH₂ family of phosphotyrosine binding domains. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 304, 15–20.
34. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed. Vol:1-3.). Cold Spring Harbor.
35. Serrato, A. J. & Cejudo, F. J. (2003). Type-*h* thioredoxins accumulate in the nucleus of developing wheat seed tissues suffering oxidative stress. *Planta*, 217, 392–399.
36. Serrato, A. J., Crespo, J. L., Florencio, F. J. & Cejudo, F. J. (2001). Characterization of two thioredoxins *h* with predominant localization in the nucleus of aleurone and scutellum cells of germinating wheat seeds. *Plant Molecular Biology*, 46, 361–371.

37. Shahpiri, A., Svensson, B. & Finnie, C. (2009). From proteomics to structural studies of cytosolic/mitochondrial-type thioredoxin systems in barely seeds. *Molecular Plant*, 1–12.
38. Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G., Montfort, W. R. (1996). Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*, 4, 735–751
39. Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BioMed Central Bioinformatics*, 9, 40–26.