التراكيب الثانوية رباعية الكوانين وتحمل النبات للضغط البيئية

G-quadruplex structures and plant tolerance to stress

كريمة محمد وهيب * KM Wuhaib

*أستاذ متقاعد في تربية النبات، كلية الزراعة، جامعة بغداد، العراق.

بريد إلكتروني: azeki205@gmail.com Email:

ملخص

تُعد التراكيب الثانوية رباعية الكوانين G-quadruplex رتبة عليا من التراكيب الثانوية في الحموض الوراثية، لوجود نسبة كبيرة من الكوانين في بعض أجزاء الصبغيات، خاصة الأطراف (telomeres). ومن الوظائف المعروفة لهذه التراكيب المساهمة في إعادة تشكيل الكروماتين، وتنظيم التعبير الوراثي، واستقرار الجينوم، والاستجابة للظروف البيئية والأمراض الوراثية عند الإنسان والحيوان. أما في النبات، فلا تزال الأبحاث قليلة حول هذه التراكيب، ولكن تشير بعض الدراسات الحديثة إلى وجودها في بعض الأنواع النباتية، وأنه يمكن استخدامها في تحسين بعض الأصناف المزروعة من خلال دورها في تنظيم التعبير الوراثي تحت الضغوط البيئية، الحيوية واللاحيوية (ظروف الشد البيئي)، ودورها في تقليل الأضرار التي تصيب الحمض الوراثي.

كلمات مفتاحية: تراكيب ثانوية رباعية الكوانين، كروموسوم رباعي الخيط، تحمل الشد، كوانين رباعي، ضغوط بيئية حيوية ولاحيوية

Keywords: Quadruplex DNA, stress tolerance, G-tetrads, DNA secondary structure

مقدمة

يُعد التركيب الحلزوني ثنائي الجديلة Double-helix التركيب الأكثر شيوعاً للحمض الوراثي DNA، وقد تكون هناك أيضاً تراكيب ثانوية أخرى خارج إطار الهيكل الحلزوني، طبقاً لنوع وكمية النيوكليوتيدات التي تكونه (أدينين، كوانين¹، سيتوزين، ثايمين). وتشير بعض التقارير إلى وجود تراكيب ثانوية في كل الكائنات الحية، وتلعب أدواراً مهمة في تأدية الوظائف الحيوية (فسلجة) في تلك الكائنات [1]. وتعد التراكيب الثانوية رباعية الكوانين G-quadruplex (أو اختصاراً G4 DNA) إحدى تلك التراكيب، التي

¹ كوانين (Guanine): تكتب أيضاً بالعربي: جوانين أو غوانين

تتكون من التفافات أو طيات ناتجة عن وجود وتعاقب أربع قواعد كوانين [2] (لذا تسمى أيضاً G-tetrads) (أي "رباعيات كوانين"). وترتبط جزيئات الكوانين مع بعضها بعضاً بواسطة أوامر (روابط) هيدروجينية، مكونة بذلك مستويًا مربعاً وتركيباً مميزاً للحمض الوراثي، ومتصلة ببعضها بعضاً بواسطة حلقات ذات أحجام مختلفة (تتراوح ما بين 1-7 نيوكليوتيدات) وتتخذ اتجاهات مختلفة (متوازية أو غير متوازية). ويُعزى تثبيت التراكيب الثانوية واستقرارها في الجينوم إلى وجود أيونات موجبة الشحنة، تقوي تلك التراكيب، كالبوتاسيوم K^+ [3].

بالإضافة إلى وجود التراكيب رباعية الكوانين في الحمض الوراثي DNA، يمكن العثور عليها أيضاً في الحمض الريبي RNA (الحمض التعبيري)، وقد تكون داخل الجزيئات أو بين الجزيئات، اعتماداً على عدد خيوط الحمض الوراثي الداخلة في تشكيل تلك التركيب. وهناك الآن برامج حاسوبية وخوارزميات تساعد على حساب نسبة حدوث أو تشكل تلك التراكيب في الجينوم.

وتقسم المتتاليات التي تساهم في تشكيل التراكيب الثانوية رباعية الكوانين G-quadruplex forming sequences (GQFS) إلى عدة أنواع، تبعاً لعدد مرات تكرار رباعيات الكوانين (فمثلاً التركيب G2 يحتوي على تكرارين من رباعي الكوانين، و G3 يحتوي على ثلاث تكرارات، و G4 يحتوي على أربع تكرارات). ويعتمد استقرار بنية التراكيب الثانوية على طول الحلقة التي تكونها: كلما كانت الحلقة أقصر كانت أكثر استقراراً وثباتاً، وكلما زاد طولها قل استقرارها. وهكذا، يعد التركيب G3 بطول 1-3 قاعدة نتروجينية أكثر استقراراً من التركيب G3 بطول 4-7 قاعدة نتروجينية [4].

أهمية التراكيب رباعية الكوانين في الحمض الوراثي

تكمن أهمية دراسة التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في فهم الأسس الجزيئية لبعض الأنشطة الحيوية والوظيفية والمرضية. ويترافق تكوين هذه المركبات مع عدم استقرار الجينوم وظهور بعض أنواع السرطانات. كما أن الارتباط عالي المعنوية في حالة السرطان بين المتتاليات المكونة للتركيب رباعي الكوانين ونقاط القطع في النقل الكروموسومي Chromosomal translocation breakpoints يوضح مدى العلاقة الحيوية بين السرطان وهذه التراكيب الثانوية في الحيوانات الثديية. وقد أظهرت دراسة على الخميرة، وهي من حقيقيات النوى، أن أنزيمات الحلزنة ("توبوازوميريز" topoisomerase) وأنزيمات فك الحلزنة ("هيليكيز" helicases) تعمل على كبح أو إيقاف التراكيب رباعية الكوانين المرتبطة بعدم استقرار الجينوم. كما أن وجود التراكيب الثانوية في مورثات سرطانية يشير إلى دور هذه التراكيب في نشوء وتطور السرطان. لذلك، فالعلاقة بين التراكيب الثانوية رباعية الكوانين ومناطق محددة في الجينوم توضح الدور التنظيمي لهذه التراكيب في مسارات حيوية أساسية.

التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في النباتات

على الرغم من قلة الدراسات حول التراكيب الثانوية في النباتات، مقارنة مع البشر والحيوانات، إلا أن دراسات حديثة تشير إلى وجود المتتاليات المرتبطة بتشكيل تراكيب رباعية الكوانين في بعض الأنواع النباتية من وحيدات الفلقة أو ثنائيات الفلقة. وتكمن أهمية دراسة هذه التراكيب في معرفة الدور التنظيمي لها في فهم آليات تنظيم التعبير الوراثي، التي يمكن أن تستثمر في تحسين بعض المحاصيل الزراعية. وقد أجريت حديثاً بعض الدراسات لتتبع وجود متتاليات التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في أصناف نباتية مهمة، فتبين أنها توجد في المناطق الصبغية/الوراثية التالية: أطراف الصبغيات telomeres، الحمض الوراثي الريبوزومي ribosomal DNA، المناطق غير المترجمة في الحمض المرسل micro and mini-UTR in mRNA، تكرارات صغيرة أو بالغة الصغر satellite repeats، مناطق التبديل في السلسلة الثقيلة للغلوبولين المناعي immunoglobulin heavy chain switch regions إلخ.

ويختلف وجود وانتشار المتتاليات المساهمة في تشكيل التراكيب رباعية الكوانين GQFS في جينومات وحيدات أو ثنائيات الفلقة. إذ يتواجد مثلاً التركيب ثنائي الكوانين G2 في المناطق الداخلية للمورثات genic regions، وله دور في نسخ ونقل بعض الأجزاء الوراثية، بينما يتواجد التركيب ثلاثي الكوانين G3 بين المورثات intergenic. كما تبلغ نسبة التركيب G2 ثنائي الكوانين حوالي 90 بالمئة من مجمل التراكيب الرباعية التي تم العثور عليها في النباتات المدروسة بينما يمثل التركيب ثلاثي الكوانين G3 حوالي 5% فقط. أما التركيب الثانوي رباعي الكوانين G4 (بشكله المتوازي أو غير المتوازي)، فيوجد في جينومات بعض النباتات، مثل رشاد أذن الفأر والرز وفول الصويا.

وظائف التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في أحاديات وثنائيات الفلقة

تعمل التراكيب الثانوية المحتوية على الكوانين (G-DNA) في نباتات ثنائية الفلقة كمنظم للتعبير الوراثي في أنماط خلايا متعددة، ومسارات حيوية مهمة، مثل تحويل الكروماتين، وتنظيم الفسفرة وإرسال أو تلقي الإشارات الحيوية داخل الخلية، ونقل هرمون الأوكسين وتطور البذرة وفعالية أنزيم نقل الطاقة GTPase. أما في نباتات أحادية الفلقة، فتلعب التراكيب الثانوية أدواراً مهمة في النمو والتطور ونقل الأيونات وتنظيم الاستنساخ وتطوي البروتينات protein folding.

وأظهرت نتائج تحليل جينومات بعض النباتات أحادية وثنائية الفلقة أن التركيب الثانوي من طراز G2 غزير نوعاً ما، ويشكل ما يقارب 90% من التراكيب الثانوية الموجودة في الأنواع النباتية المدروسة. ويتراوح توزع المتتاليات المكونة للتراكيب الثانوية رباعية الكوانين في جينومات أحادية الفلقة ما بين كل 80 – 1500 Mb وما بين 10 – 20 Mb في ذوات الفلقتين. ويعود سبب هذا الاختلاف إلى احتواء

جينومات أحاديات الفلقة على نسبة عالية من السيتوزين والكوانين GC التي تعزز تشكيل التراكيب الثانوية بروابط هيدروجينية قوية.

التراكيب الثانوية رباعية الكوانين والضغط البيئية

من أجل الحصول على مردود زراعي جيد كماً ونوعاً، لا بد للنباتات من التكيف مع الظروف والعوامل البيئية اللاحيوية غير الملائمة، كالتراكيز المرتفعة للأملاح ودرجات الحرارة العالية أو المنخفضة والجفاف، وظروف الشد الحيوي الناجمة عن كائنات حية ممرضة، كالبكتريا والفطريات والحشرات أو الفيروسات (عوامل غير حية).

وخلال فترات الضغط اللاحيوي (الشد اللاحيوي)، كالجفاف والملوحة، تزداد تراكيز الأيونات الموجبة في العصارة الخلوية، كأيون البوتاسيوم K^+ [5] الذي يترافق مع ازدياد نسبة تكوين التراكيب الثانوية رباعية الكوانين G-quadruplex التي تساهم بدورها في تحمل النبات للضغوطات البيئية. ويعود ذلك إلى تنظيم وراثي تفضلي (أي إنتاج كمية أكبر من البروتينات) تساعد على تحمل النبات لظروف الجفاف والملوحة. ويعود سبب التعبير التفاضلي للمورثات إلى تأثير التركيب الثانوي من طراز G4 في الحمض الوراثي DNA أو الريبوي RNA [6]. وفي دراسة أخرى أجريت على نبات رشاد أذن الفأر [7] تبين أن ما يقارب 16% من مجمل المورثات استجابت للجفاف، وحوالي 45% منها تحتوي على تركيب ثانوي واحد على الأقل من التراكيب الثانوية رباعية الكوانين.

وأوضحت نتائج دراسات أخرى أن المورثات التي تستجيب لنقص التهوية في الذرا الصفراء [8] والمورثات التي تستجيب لبعض الضغوط البيئية وتنشط في مسارات تكوين الدهون في نبات الودك الصيني Chinese tallow (*Sapium sebiferum*) [9] تحتوي على نسبة كبيرة من التراكيب الثانوية رباعية الكوانين. كما وجد أيضاً أن التراكيب الثانوية تلعب دوراً مهماً في كثير من عمليات الاستقلاب ونقل إشارات الضغوط البيئية والاستجابة لها وتنظيم معدلات استهلاك الطاقة.

وبصورة عامة، فإن المورثات التي تعبر عن نفسها تفاضلياً (أي تلك التي تنتج كميات زائدة من البروتينات تحت ظروف الضغوط البيئية) تحتوي على تراكيب ثانوية رباعية الكوانين بنسب عالية، وأن هذه التراكيب ربما تكون إحدى الآليات الحيوية المتعددة في الخلايا النباتية للتكيف مع الضغوط البيئية. لذلك، فإن فهم مسارات الاستجابة الخلوية لهذه الضغوط قد يساعد على تطوير أو استنباط نباتات متحملة للضغوط البيئية وعالية الإنتاجية [9].

من ناحية أخرى، تبين أن "الأوليغونوكليوتيدات" الصناعية التي تساعد على تشكيل تراكيب ثانوية رباعية الكوانين تعيق نشاط أنزيم نسخ الحمض الوراثي في أنبوب الاختبار عند وجود أيون البوتاسيوم، والذي هو عامل استقرار للتركيب الثانوي [10]، مما يؤدي إلى احتمال توقف عملية تضاعف الحمض الوراثي داخل الخلايا وبالتالي إلى عدم استقرار الجينوم.

العناصر الوراثية النقلة والتراكيب الثانوية

تُعد العناصر الوراثية النقلة (أو "النقائل") transposable elements أجزاءً مهمة في جينومات حقيقيات النواة، لأنها تحتوي على متتاليات تنظيمية تساعد على انتقال المورثات التي تحتويها. ومن المثير للاهتمام، وجود تراكيب ثانوية رباعية الكوانين في التكرارات الطرفية الطويلة (LTR) long terminal repeats للنقائل transposons والنقائل الارتجاعية retrotransposons في النبات. ومن المحتمل أن تؤثر هذه التراكيب ليس فقط على عملية النسخ والترجمة، ولكن أيضاً على النسخ العكسي [11] [12]. بمعنى آخر، إن وجود تراكيب رباعية الكوانين يمكنه أن يمنع استنساخ العناصر النقلة التي تحتويها وتشكل نقاط تأشيب ساخنة. وبالمقابل، فإن العناصر النقلة نفسها يمكن أن تعمل على نقل تلك التراكيب في الجينوم. ولا يتم تشكيل البنى الثانوية داخل العناصر النقلة فقط، نتيجة وجود الكروماتين على هيئة مفتوحة أو حرة، ولكن يمكن أن تصبح هذه التراكيب أيضاً أهدافاً لإدخال عناصر نقيلة جديدة يتم التعرف من خلالها على تغيرات هيئة الحمض الوراثي من قبل أنزيمات النقائل (transposase) أو أنزيمات الحشر (integrase). كما أن تشكيل تراكيب ثانوية رباعية الكوانين في الحمض الريبسي الناتج عن عناصر نقيلة TE-derived RNA يمكنه المساهمة في أداء وظائف خلوية مهمة [13].

وتم تحديد امتدادات طويلة من الكوانين قبل وبعد منطقة المحضض (أو المحفز promoter) في النقائل الارتجاعية. وتبين أن هذه المناطق تتخذ تراكيب رباعية الكوانين على شكل جدائل متوازية أو متضادة [11].

بروتينات ربط التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في النبات

تم تحديد هوية العديد من البروتينات التي ترتبط بمناطق التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في الخميرة والحيوانات. وقد يؤدي هذا الارتباط إلى فك (أو حل) التراكيب الثانوية أو بالعكس إلى تعزيز استقرارها. ومن الأنزيمات التي تؤدي إلى حل التراكيب الثانوية أنزيمات فك الحلزنة helicases التي يوجد منها عدة عائلات في الإنسان والخمائر والنبات، مثل عائلة RecQ. ويوجد خمسة أنزيمات من هذه العائلة في الإنسان وأنزيم واحد فقط في كل من الخمائر والبكتريا. أما في النبات، فقد تبين أن المخزون الوراثي لنبات رشاد أذن الفأر يحتوي على سبعة مورثات تشفر لأنزيمات فك الحلزنة. وهناك بروتينات أخرى لا تنتمي إلى عائلة أنزيمات الحلزنة، ولكنها ترتبط أيضاً بالتراكيب الثانوية رباعية الكوانين، منها معامل النسخ Sub1 الموجود في الخميرة ويساهم في استقرار المناطق الوراثية المحتوية على تراكيب ثانوية [14]. أما في النباتات المهمة زراعياً، فلا تزال المعلومات قليلة حول البروتينات الرابطة للتراكيب الثانوية. ولكن في نبات الذرة *Zea mays* تبين وجود بروتين فسفرة يسمى ZmNDPK1 يتفاعل، عند تراكيز قليلة، مع أوليغو يحتوي على متتاليات رباعية الكوانين [15].

كما وُجد أيضاً أن مستخلصات بعض النباتات العطرية، كالشاي والزعفران، تحتوي على جزيئات صغيرة غير بروتينية لها القدرة على الارتباط بتراكيب رباعية الكوانين [16] [17].

خلاصة

تلعب التراكيب الثانوية رباعية الكوانين G-Quadruplex أدواراً تنظيمية مهمة خلال الاستجابات الخلوية لأضرار الحمض الوراثي وإلى الإيعازات الداخلية أو الخارجية المتعلقة بتوفر الطاقة (السكر) والأبيض (الاستقلاب) والضغوط البيئية الحيوية وغير الحيوية.

وبما أن الإنتاج الزراعي يعتمد على عدة عوامل حيوية وغير حيوية، قد تؤدي إلى انخفاض كمية المحصول الزراعي، فإن فهم وتحليل وظائف التراكيب الثانوية رباعية الكوانين في النبات يبدو مهماً لتحديد مسارات الاستجابة الخلوية، المعتمدة على التراكيب الثانوية رباعية الكوانين، ثم العمل على تعزيز تلك الاستجابة لزيادة تحمل النبات للضغوط البيئية والحفاظ على مستوى انتاج زراعي مقبول تحت ظروف الشد الحيوي واللاحيوي.

References

مصادر

1. Yadav, V., et al., *G Quadruplex in Plants: A Ubiquitous Regulatory Element and Its Biological Relevance*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 1163.
2. Bochman, M.L., K. Paeschke, and V.A. Zakian, *DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(11): p. 770-80.
3. Largy, E., J.L. Mergny, and V. Gabelica, *Role of Alkali Metal Ions in G-Quadruplex Nucleic Acid Structure and Stability*. Met Ions Life Sci, 2016. **16**: p. 203-58.
4. Bugaut, A. and S. Balasubramanian, *A sequence-independent study of the influence of short loop lengths on the stability and topology of intramolecular DNA G-quadruplexes*. Biochemistry, 2008. **47**(2): p. 689-97.
5. Leigh, R.A. and R. Wyn Jones, *A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion in the plant cell*. New Phytologist, 1984. **97**(1): p. 1-13.
6. Mullen, M.A., et al., *RNA G-Quadruplexes in the model plant species Arabidopsis thaliana: prevalence and possible functional roles*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(22): p. 8149-63.
7. Matsui, A., et al., *Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array*. Plant and Cell Physiology, 2008. **49**(8): p. 1135-1149.
8. Bailey-Serres, J., et al., *Making sense of low oxygen sensing*. Trends in plant science, 2012. **17**(3): p. 129-138.
9. Yang, M., et al., *Flower bud transcriptome analysis of Sapium sebiferum (Linn.) Roxb. and primary investigation of drought induced flowering: pathway construction and*

- G-Quadruplex prediction based on transcriptome*. PloS one, 2015. **10**(3): p. e0118479.
10. Garg, R., J. Aggarwal, and B. Thakkar, *Genome-wide discovery of G-quadruplex forming sequences and their functional relevance in plants*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28211.
  11. Lexa, M., et al., *Quadruplex-forming sequences occupy discrete regions inside plant LTR retrotransposons*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(2): p. 968-78.
  12. Kejnovsky, E., V. Tokan, and M. Lexa, *Transposable elements and G-quadruplexes*. Chromosome Res, 2015. **23**(3): p. 615-23.
  13. Kapusta, A., et al., *Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs*. PLoS Genet, 2013. **9**(4): p. e1003470.
  14. Lopez, C.R., et al., *Yeast Sub1 and human PC4 are G-quadruplex binding proteins that suppress genome instability at co-transcriptionally formed G4 DNA*. Nucleic acids research, 2017. **45**(10): p. 5850-5862.
  15. Kopylov, M., H.W. Bass, and M.E. Stroupe, *The maize (Zea mays L.) nucleoside diphosphate kinase1 (ZmNDPK1) gene encodes a human NM23-H2 homologue that binds and stabilizes G-quadruplex DNA*. Biochemistry, 2015. **54**(9): p. 1743-57.
  16. Hoshyar, R., et al., *Is there any interaction between telomeric DNA structures, G-quadruplex and I-motif, with saffron active metabolites?* Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2012. **31**(11): p. 801-812.
  17. Mikutis, G., et al., *Phenolic promiscuity in the cell nucleus—epigallocatechingallate (EGCG) and theaflavin-3, 3'-digallate from green and black tea bind to model cell nuclear structures including histone proteins, double stranded DNA and telomeric quadruplex DNA*. Food & function, 2013. **4**(2): p. 328-337.