مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۰، شماره ۱، بهار وتابستان ۱۴۰۰
صفحه ۹۲-۸۲

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

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)

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 پذیرندهٔ 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 درATG8 است، میانکنش دهند. هرگونه تغییر در جایگاه LDS و یا موتیف AIM، سبب برهم خوردن میانکنش 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 آرابیدوپسیس با ATG8B گیاه مارکانتیا، اسیدآمینه‌هایی 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 جهش‌یافتهٔ ATG8B اتصال یافت. به منظور حفظ شرایط یکسان با گیاهان حاوی ژن ATG8B وحشی موجود در آزمایشگاه، با طراحی آغازگرهای سازگار با گیت‌وی، پروتئین‌های جهش یافته درون سازهٔ بیانی pMpGWB303 وارد و پس از انتقال به اگروباکتری سویهٔ GWB303+pSOUP به گیاه انتقال داده شد. بررسی گیاهان تراریخته در آزمایشات وسترن بلات نشان داد که تنها فرم تغییر یافتهٔ 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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

مقدمه

بازیافت درون سلولی برای بسیاری از رخدادهای سلولی پدیدهٔ مهمی است. در فرآیند بازیافت، علاوه براینکه سطوح تنظیم‌کننده‌های کلیدی تعدیل می‌شود، بقایای سلولی حذف، و مواد غذایی ضروری مورد نیاز برای رشد مجدد، جمع‌آوری می‌شوند. پایداری و نمو سلول اغلب بر اساس اجزای بازیافت شده تعریف می‌شود (Marshal and Vierstra, 2018). مهم‌ترین سیستم بازیافت درون سلول، سیستم یوبی‌کوئتین (Ub)-پروتئازوم است که تنها محدود به کاتابولیز پروتئین‌هاست (Vierstra, 2009). مسیر جبرانی برای تکمیل مسیر پروتئازوم در گیاهان و سایر یوکاریوت‌ها، اتوفاژی است. اتوفاژی واژهٔ یونانی به معنی خودخواری است. این مسیر برای سامان‌دهی مواد سیتوپلاسمی، از جمله کمپلکس‌های پروتئین رسوب‌کرده، تجمع اسیدهای نوکلئیک و پروتئین، اجسام لیپیدی، و حتی کل اندامکی که صدمه دیده یا اضافی است، وارد عمل می‌شود (Masclaux-Daubresse *et al*. 2017). در اتوفاژی اجزای سیتوپلاسمی و بقایای سلولی برای تجزیه و تخریب به سمت واکوئل هدایت می‌شوند. برخلاف گذشته که تصور می‌شد اتوفاژی یک پدیدهٔ غیرانتخابی وتصادفی است، اخیرا معلوم شده است که مسیر اتوفاژی می‌تواند به صورت انتخابی و از طریق پذیرندهٔ محموله (Cargo receptor) به اجزایی که قرار است تجزیه شوند، متصل شده و پس از بسته‌بندی آنها درون یک وزیکول دو غشایی به نام اتوفاگوزوم، به سمت واکوئل هدایت کند (Marshal *et al*. 2015; Li *et al*. 2014). در مسیر اتوفاژی انتخابی، پروتئین‌های اختصاصی کمپلکس‌های ماکرومولکول‌ها مانند ریبوزوم و پروتئازوم، پروتئین‌های قطعات شبکه آندوپلاسمی یا کل اندامک از جمله میتوکندری، پراکسی‌زوم، کلروپلاست و هسته و حتی پاتوژن‌های مهاجم می‌توانند به صورت انتخابی حذف شوند (Marshal and Vierstra, 2018). بر طبق مطالعات انجام شده اتوفاژی انتخابی سه مرحلهٔ اصلی دارد:

شناسایی محمولهٔ اتوفاژیک (جزئی که قرار است برای تخریب به واکوئل فرستاده شود)، فرستادن محموله به درون فاگوفور که شکل اولیهٔ اتوفاگوزوم قبل از بسته‌بندی شدن وزیکول است، و حذف محمولهٔ وارد شده از طریق ورود اتوفاگوزوم به درون واکوئل (Stephani and Dagdas, 2020).

بیش از ۳۰ پروتئین ATG (ژن‌های مرتبط به اتوفاژی Autophagy related genes:) برای فعالیت اتوفاژی مورد نیاز هستند. از میان ژن‌های ATG، ATG8 در تمام مراحل شکل‌گیری اتوفاژی دارای نقش اصلی است و به نوعی می‌توان این پروتئین را نشانگر اتوفاگوزوم و مسیر اتوفاژی تعریف کرد (Wang *et al*. 2017). ATG8 در نقش آداپتور با پذیرنده‌های محموله‌ای که دارای موتیف خطی کوتاه به نام موتیف واکنش دهنده با ATG8 (LIR/AIM: ATG8 interacting motif) هستند و برچسب‌های اتوفاژی (مانند زنجیره‌ی پلی‌یوبی‌کوئیتین یا لکتین‌های سیتوسولی) دارند، میانکنش می‌دهد (Noda *et al*. 2010; Stepahni and Dagdas, 2020). توالی مرکزی AIM در پذیرندهٔ محموله از یک آمینواسید آروماتیک تشکیل شده است (تریپتوفان، تیروزین یا فنیل آلانین) که به دنبال آن دو آمینواسیدی که می‌توانند از هر نوعی باشند، قرار می‌گیرند، سپس آمینواسیدهای شاخه‌دار (مانند لوسین، ایزولوسین و والین) قرار می‌گیرند که به طور کلی با اسیدهای‌آمینه با بار منفی احاطه شده‌اند: [W/F/Y-XX-L/I/V] (Noda *et al*. 2010؛ Birgisdottir *et al*. 2013؛ Maqbool *et al*. 2016). علیرغم تنوع ساختاری پذیرنده‌های محموله، اغلب پذیرنده‌های محموله جایگاه میانکنش مشابهی با ATG8 دارند که این جایگاه در مجاورت و بین اسیدآمینه [W/F/Y] و [L/I/V] قرار دارد. فسفوریلاسیون توالی AIM پذیرنده با اسیدهای‌آمینه‌ی مجاور، میانکنش آن را با ATG8 افزایش می‌دهد (Matsumoto *et al*. 2011). محل اتصال موتیف پذیرنده‌ها به ATG8، دو پاکت هیدروفوبیک تریپتوفان (W) و لوسین (L) است که به آن جایگاه اتصال LIR (LDS: LIR docking site) گفته می‌شود. این پاکت‌ها، جایگاه اتصال تریپتوفان و لوسین در موتیف AIM می‌باشند و به همین دلیل به ترتیب W و L نامگذاری شده‌اند. در *Saccharomyces cerevisiae* پاکت W در پروتئین ATG8 دارای زنجیره‌های جانبی اسید گلوتامیک، ایزولوسین، پرولین، لیزین، لوسین و فنیل‌آلانین (Glu، Ile، Pro، Lys، Leu و Phe) و پاکت L دارای زنجیره‌های جانبی تیروزین، والین، پرولین، لوسین، فنیل‌آلانین و والین (Tyr، Val، Pro، Leu، Phe و Val) هستند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

آمینواسیدهای نامبرده درون پاکت W و L، به خصوص پاکت W در بین اعضای خانواده ATG8 بسیار حفاظت شده‌اند. پاکت L دربین هومولوگ‌های 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 پذیرندهٔ محموله است.

گیاه *Marchantia polymorpha* گیاهی دو پایه از گونهٔ جگرواش (liverwort)، دارای هر دو چرخهٔ زندگی هاپلوئیدی و دیپلوئیدی است. با این حال چرخه زندگی هاپلوئیدی، فاز غالب چرخهٔ 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 مطالعهٔ 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 هومولوگ با پذیرنده‌های محمولهٔ 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 بر هم 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 درپاکت L 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 سازهٔ ورودی گرین‌گیت به نام pGGC000، همسانه‌سازی شده بود به عنوان نمونهٔ هدف در SDM استفاده شد. LDS جهش‌یافته به منظور اتصال به پروتئین فلورسنت GFP به طور مستقیم وارد واکنش گرین‌گیت شد. پس از همسانه‌سازی ATG8B جهش یافته درون سازهٔ مقصد گرین‌گیت، pGGSUN، با طراحی آغازگرهای دارای دنباله‌های سازگار با گیت‌وی، GFP به همراه ATG8B از pGGSUN جدا شده و با فناوری گیت‌وی درون سازهٔ 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 آرابیدوپسیس، جایگاه LDS در مارکانتیا شناسایی شد. دو جهش جداگانهٔ K51A و R70A برای تخریب جایگاه LDS در نظر گرفته شد. برای طراحی آغازگر حاوی جهش‌های مورد نظر cDNAی 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 سازهٔ ورودی pGGC000، از سازه‌های لازم در واکنش گرین‌گیت، به

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

عنوان نمونهٔ هدف برای تکثیر با آغازگرهای تغییر یافته در واکنش PCR استفاده شد. بدین ترتیب در پایان واکنش ATG8B با تغییرات نوکلئوتیدی دلخواه درون سازهٔ ورودی گرین‌گیت به دست آمد. به منظور کاهش میزان خطاهای احتمالی در زمان واکنش PCR از آنزیم پلیمراز 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 نمونهٔ DNAی 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 سازهٔ بیانی شامل پروموتر، N–تگ، CDS، C–تگ، پایان‌دهنده و ژن مقاومت به طور جداگانه درون مودل‌های ورودی الحاق می‌شوند. ویژگی مشترک همهٔ این سازه‌ها، جایگاه شناسایی آنزیم *Bsa*I 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 مودل (Module) در نظر گرفت (شکل ۱، ب). هر مودل جداگانه با آنزیم *Bsa*I هضم شده و با قطعهٔ مورد نظر (پروموتر، N–تگ و ...) وارد واکنش اتصال می‌شود. سپس همهٔ مودل‌ها دارای قطعات ورودی به همراه سازهٔ بیانی مقصد در واکنش گرین‌گیت وارد شده و به ترتیب جایگاه، درون سازهٔ بیانی قرار می‌گیرند. برای قرارگیری به ترتیب مودل‌ها درون سازهٔ بیانی، انتهای ´۳ هر مودل دارای نوکلئوتیدهای مکمل با ابتدای ´۵ مودل بعدی است (Lampropoulos *et al*. 2013). پلاسمید ورودی حاوی ATG8B تغییریافته با توالی صحیح به همراه مودل حاوی پروموتر EF، مودل حاوی GFP برای انتهای N، مودل پایان‌دهندهٔ NOS، مودل حاوی ژن مقاومت کلروسولفورون و سازهٔ بیانی مقصد pGGSUN وارد واکنش گرین‌گیت شدند. برای قرارگیری صحیح هر جز درون سازهٔ مقصد، حضور همهٔ مودل‌ها 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 مودل‌ها و تغییرات ژن ATG8B توالی‌یابی شدند (جدول ۲).

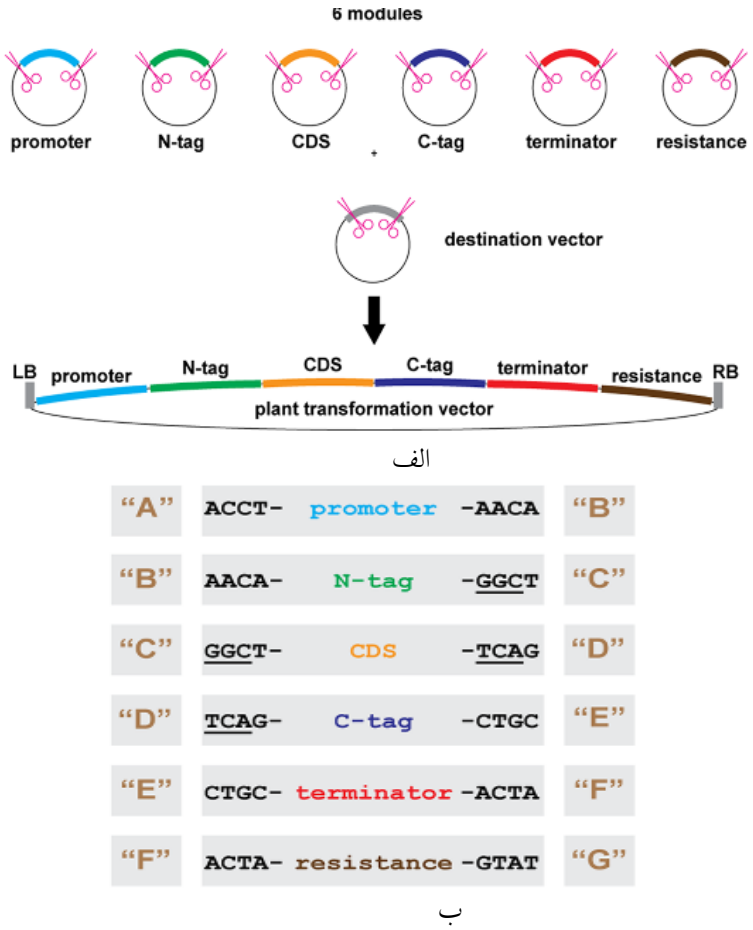
همسانه‌سازی ATG8B متصل به پروتئین فلورسنت GFP درون سازهٔ مقصد pMpGWB303 با فناوری گیت‌وی: یک پلاسمید از پلاسمیدهای حاوی GFP-ATG8B-K51A و GFP-ATG8B-R70A با توالی‌یابی صحیح، برای ورود به سازهٔ بیانی گیت‌وی انتخاب شدند. ابتدا با آغازگرهای طراحی شده از ابتدای GFP و انتهای ATG8B و دارای دنباله‌های سازگار 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 سازهٔ 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 سازهٔ 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* سویهٔ 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 بیوتیک های کلروسولفورون و تیکارسیلین بدون هورمون منتقل شدند. بعد از بازهٔ زمانی دو الی سه هفته گیاهان باززا ظاهر شده و به طور

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

تقریبی بعد از ٦ هفته، برای آزمون‌های ارزیابی تراریختی آماده شدند.

وسترن بلات برای تأیید لاین‌های بیش‌بیان: 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.

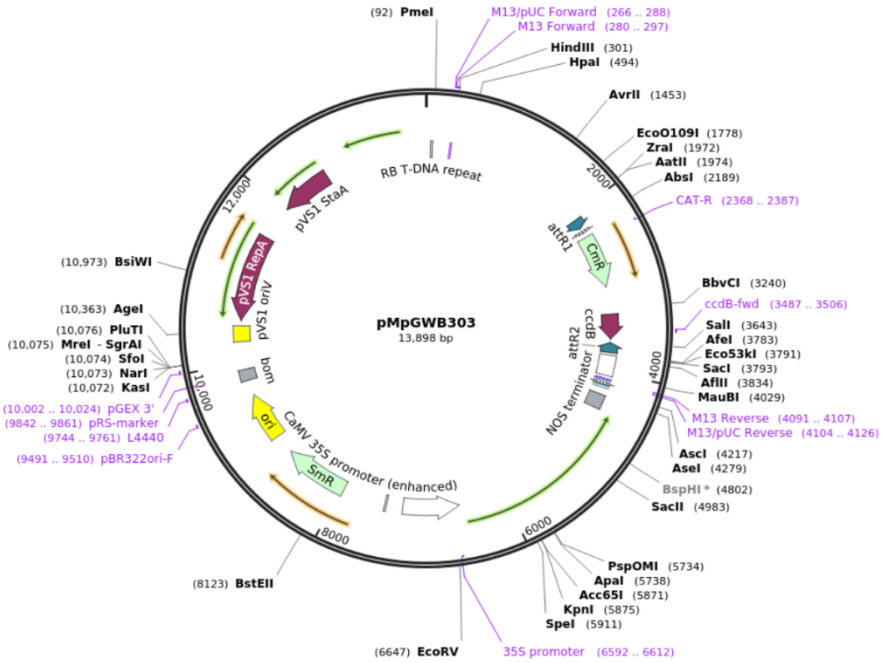


شکل ۱- الف، شش مودل ورودی متفاوت برای ورود به سازهٔ مقصد. قیچی روی هر سازه محل برش توسط آنزیم *BsaI* است. هر مودل حاوی یک جز از اجزای لازم برای سازهٔ بیانی است. این مودل‌ها در واکنش گرین‌گیت بین مرز راست و چپ سازهٔ مقصد وارد می‌شوند. ب، ۷ زائدهٔ متفاوت برای به ترتیب قرار گرفتن مودل‌ها در سازهٔ بیانی. هر مودل در انتهای ´۵ خود با انتهای ´۳ مودل 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 *Bsa*I 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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]



شکل ۲- نقشهٔ سازهٔ بیانی pMpGWB303 اختصاصی گیاه مارکانتیا برای واکنش گیت‌وی و فاقد پروتئین فلورسنت GFP. این سازه دارای پروموتر اختصاصی EF و ژن مقاومت اسپیکتینومایسین 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 پلیمراز برای تکثیر ATG8B K51A و ATG8B R70A برای جهش مستقیم در محل و برای تکثیر GFP-ATG8B K51A و GFP-ATG8B R70A برای گیت‌وی. (ناحیهٔ خط کشی در توالی دنبالهٔ اتصالی به سازهٔ 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´ GTGTTCGTCATCCGCAAGGCAATGAAGCTGACGCCGGAG 3´	آغازگر رفت-R70A
SDM	5´ CTCCGGCGTCAGCTTCATTGCCTTGCGGATGACGAACAC 3´	آغازگر برگشت-R70A
گیت‌وی	5´GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3´	آغازگر رفت-GFP-ATG8B
گیت‌وی	5´GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGCCAACGAGGGCGACCTCGTC 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
گرین‌گیت و گیت‌وی	5´ ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC 3´	آغازگر رفت ابتدا-ATG8B
گرین‌گیت و گیت‌وی	5´ GCCAACGAGGGCGACCTCGTC 3´	آغازگر برگشت انتها-ATG8B
گرین‌گیت و گیت‌وی	5´ AGCTGGAGTACAACTACAAC 3´	آغازگر رفت میانی-GFP
گرین‌گیت و گیت‌وی	5´ GTTGTAGTTGTACTCCAGCT 3´	آغازگر برگشت میانی-GFP
گیت‌وی	5´ GCTGAGGCCAATCTGGAATAGC 3´	آغازگر برگشت-M13

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

نتایج و بحث

آماده‌سازی سازۀ 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 ۱٤/۸۱ 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 ۲٤، پرولین ۳۳، ایزولوسین ۳۵، لیزین۵۱، لوسین ۵۳ و فنیل آلانین ۱۰۷ (E20، I24، P33، I35، K51، L53 و F107) شناسایی شده است (شکل ۳، حروف قرمز). همچنین پاکت L جایگاه LDS در آمینواسیدهای والین ۳٦، فنیل‌آلانین ۵۲، والین ٥٤، پرولین ۵۵، لوسین ۵۸، فنیل‌آلانین ٦۳، والین ٦٦، ایزولوسین ٦۷ 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 نسبتا ارزانی است، بهره برد. اساس SDM بکارگیری سازۀ حاوی DNA دو رشته‌ای قطعۀ مورد نظر و دو آغازگر الیگونوکلئوتیدی است که هر دو آغازگر دارای جهش‌های دلخواه هستند. هر یک از آغازگرهای الیگونوکلوئتیدی مکمل یک رشته از دو رشتۀ سازۀ DNA است و در طول واکنش PCR به رشتۀ مکمل خود اتصال می‌یابد. در پایان واکنش قطعۀ تکثیریافته 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 DNAی 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 سازۀ بیانی pMpGWB303 سازگار با فناوری گیت‌وی برای انتقال GFP-ATG8B استفاده شده است. سازۀ 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 سازۀ ورودی گرین‌گیت به نام pGGC000، به عنوان نمونۀ هدف در SDM استفاده شد. بنابراین با این روش، نیازی به همسانه‌سازی مجدد ATG8B درون سازۀ ورودی pGGC000 نخواهد بود و سازۀ ورودی به طور مستقیم می‌تواند وارد واکنش گرین‌گیت و پس از اتصال GFP، درون سازۀ گیت‌وی قرار گیرد. اساس تایید حضور ژن ATG8B با تغییرات اعمال شده، توالی‌یابی پلاسمید در هر مرحله بوده است.

MGESEFQFKQTTNLESRQAESARILEKYPDRVPVIV
KRADKSSIPDIDKKKFLVPVDLAVGQFVFVIRKRMK
LTPEKAIFVFVKDVLPPTSAMMAQIYDEYKDQDGFL
YMTYSGENTFGSSHDDEVALVG

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

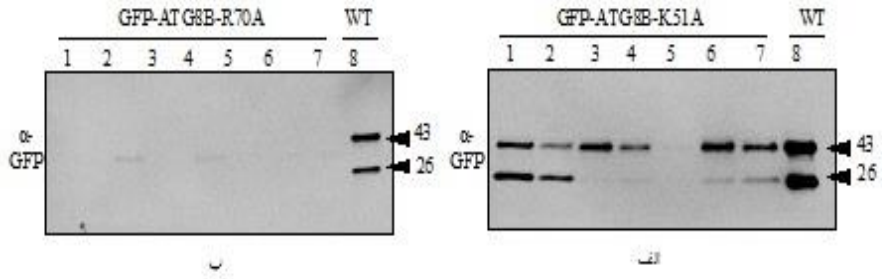
Figure 3. ATG8B amino acid sequence. The residues constituting W- and L-sites are colored red and green, respectively.

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

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 ٤٦ کیلودالتون (باند بالا) متعلق به ATG8B متصل شده به پروتئین GFP است (شکل ٤). از آنجایی که در لاین جهش یافتهٔ R70A، در گیاهان باززای شمارهٔ ۲ و ٤ باندی ضعیف کوچکتر از ٤۳ کیلو دالتون و بزرگتر از ۲٦ 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.



شکل ٤- نتایج وسترن بلات گیاهان تراریخت شده الف، GFP-ATG8B-K51A و ب، GFP-ATG8B-R70A. باندهای مشاهده شده در وزن مولکولی ۲٦ کیلودالتون، باند مربوط به GFP آزاد و باندهای مشاهده شده در وزن ٤۳ کیلودالتون، باند مربوط به GFP و ATG8 است. شماره‌های ۱ تا ۷ در هر تصویر، تعداد گیاهان باززای مورد ارزیابی است. ردیف شمارهٔ ۸، گیاه GFP-ATG8 بدون جهش است که به عنوان لاین وحشی و کنترل آورده شده است. ٤ 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 7of the regenerated plants, although there is no expression for R70A.

در مطالعهٔ حاضر دمین LDS که جایگاه اتصال پذیرندهٔ محموله در ژن ATG8B است، با روش جهش‌زایی هدفمند در محل در گیاه *M. polymorpah* جهش داده شد. ژن جهش یافته با عدم توانایی اتصال به پذیرندهٔ 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 پذیرندهٔ 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 ایجاد شده بعد از جهش باشد. اما تغییر در باقی‌ماندهٔ 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 اتوفاژی است. این روش هم در تایید پروتئین‌های احتمالی به عنوان پذیرنده‌های محموله و هم در مطالعات مربوط به طیف‌سنجی جرمی برای شناسایی اولیهٔ پروتئین‌های واکنش‌دهنده با ATG8 بسیار کاربرد دارد. از جمله در مطالعهٔ میانکنش ATG4B و LC3B (همولوگ ATG8) در مخمر، برای اثبات میانکنش بین این دو پروتئین، LC3B در دو

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

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 پذیرندهٔ 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 پذیرندهٔ 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 مطالعهٔ 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 (Marshal *et al*. 2019).

گیاه مورد مطالعه در این تحقیق گیاه *Marchantia polymorpha* است. در مقایسه با گیاه آرابیدوپسیس که دارای نه ایزوفرم ATG8 است، گیاه مارکانتیا با داشتن دو ایزوفرم از این ژن می‌تواند به مطالعهٔ 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 همسانه‌سازی ژن ATG8B جهش‌یافته استفاده شد. فناوری گرین‌گیت متشکل از سازه‌های ورودی مورد نیاز برای بیان ژن خارجی است که همهٔ آنها همراه با ژن مورد نظر در یک واکنش هضم و اتصال همزمان به سازهٔ 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 ناخواستهٔ 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).

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

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.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]

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

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1400.10.1.6.6]