بسم الله الرحمن الرحيم

١٠٧٥٥٦

دانشگاه شیراز

دانشکده علوم

پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته زیست شناسی سلولی-ملکولی

تعیین خصوصیات و توالی ژنهای Tau از Glutathione S-transferase در برخی از گیاهان زراعی و مرتعی

توسط

بابک صفاری

استاد راهنما:

دکتر حسن محبت کار

دکتر ساسان محسن زاده

شهریور ماه ۱۳۸۷

۱۳۸۷/۹/۲۳

۱۰۷۵۰۶

به نام خدا

تعیین خصوصیات و توالی کلاس Tau از ژنهای گلوتاتیون S-ترانسفراز در برخی از گیاهان زراعی و مرتعی

به وسیله ی

بابک صفاری

پایان نامه
ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه به عنوان بخشی
از فعالیت‌های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته‌ی:

زیست شناسی سلولی-ملکولی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی

دکتر حسن محبت کار استادیار بخش زیست شناسی (رئیس کمیته).....

دکتر ساسان محسن زاده استاد یار بخش زیست شناسی.....

دکتر مصطفی سعادت استاد بخش زیست شناسی.....

شهریور ماه ۱۳۸۷

سپاسگذاری

اکنون که به یاری خداوند متعال این رساله به پایان رسیده است بر خود لازم می دانم تا از همه عزیزانی که به نحوی با من همکاری کرده اند تشکر و قدر دانی نمایم. از خانواده عزیزم به خاطر همه حمایتها و فداکارهایشان صمیمانه سپاسگذاری می کنم. از اساتید راهنمای دلسوزم جناب آقای دکتر محبت کار و جناب آقای دکتر محسن زاده به دلیل کمکهای بیدرغشان قدر دانی می نمایم .از استاد مشاور این رساله جناب آقای دکتر سعادت تشکر می کنم. از دوستان عزیزم به ویژه آقایان پرتابیان، پاسالاری، کریمی و طیبی سپاسگذارم.

چکیده

تعیین خصوصیات و توالی ژنهای Tau از Glutathione S-transferase در برخی از گیاهان زراعی و مرتعی

به وسیله ی:

بابک صفاری

در گیاهان حیات سلولها مستلزم مدیریت گونه‌های فعال اکسیژن، مواد فیتوشیمیایی درون‌زا و سموم برون‌زایی است که شامل مواد شیمیایی خارجی (گزنوبیوتیکهای) مختلفی می‌شوند که توسط انسان وارد طبیعت شده اند. از سویی دیگر بسیاری از فرآیندهای سلولی تنها در یک بازه باریک از لحاظ پتانسیل احیایی عملکرد بهینه دارند. در این میان گلوتاتیون (GSH) که تری‌پپتیدی متشکل از γ-Glu-Cys-Gly می‌باشد نقش مرکزی را در فرآیندها و واکنشهای سمزدایی و برقراری تعادل احیایی عهده‌دار است. گیاهان دارای چندین آنزیم سم زدایی وابسته به گلوتاتیون می‌باشند که مهمترین آنها گلوتاتیون ترانسفرازها (GST) هستند. گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی به دو صورت محلول (سیتوپلاسمی) و میکروزومی یافت می‌شوند. آنزیمهای محلول شامل کلاسهای Phi، Tau، Zeta، Theta، Lambda، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (Dehydroascorbate reductase, DHAR) و تتراکلروهیدروکینون دهالوژناز (Tetrachlorohydroquinone dehalogenase, TCHQD) می‌گردند. در این میان دو کلاس Tau و Phi اختصاصی گیاهان هستند. با توجه به توالیهای موجود در بانک جهانی ژن، آغازگرهای مختلفی جهت تکثیر ژنهای GST کلاس Tau در برخی از گیاهان زراعی چون گندم، جو، ذرت و کلزا و نیز بعضی گیاهان مرتعی نظیر سالیکورنیا، هوهوبا، خارشتر، سوئدا، سالسولا، Haplophyllum و Matthiola طراحی و پس از استخراج DNA و انجام واکنش PCR، ژنهای گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau در گیاهان مورد نظر تکثیر و توالی یابی شدند. بررسی توالیهای به دست آمده برای نمونه های گندم، جو، خارشتر و *Haplophyllum tuberculatum* نشان داد که این توالیها جایگاه جدیدی از ژنهای گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau در گیاهان نامبرده می باشند.

فهرست مطالب

عنوان ..... صفحه

فصل اول : مقدمه

۱-۱- کلیات ۱
۱-۲- طبقه بندی ۴
۱-۳- نام گذاری ۵
۱-۴- ساختار ۶
۱-۵- عملکرد ۸
۱-۶- ساز و کار آنزیمی ۱۰
۱-۷- جایگاه سلولی ۱۱
۱-۸- میزان بیان ژن ۱۱
۱-۹- تکامل ۱۴
۱-۱۰- اهداف پروژه ۱۷

فصل دوم: **مروری بر تحقیقات گذشته**

۲-۱- پژوهشهای انجام شده در مورد گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Zeta و Theta ۱۸
۲-۲- گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاسهای DHAR و Lambda ۲۰
۲-۳- گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاسهای Tau و Phi ۲۱

فصل سوم: مواد و روشها

۳-۱- تهیه بذر گیاهان زراعی و نمونه گیاهان مرتعی ۲۶

۳-۲- آماده سازی و کاشت بذر گیاهان زراعی در گلدانهای مجزای شاهد و تیمار ۲۶
۳-۳- دستگاه ها و وسایل استفاده شده ۲۷
۳-۴- مواد استفاده شده ۲۸
۳-۵- زمان القا تنش و روش آن ۲۸
۳-۶- استخراج DNA ۲۸
۳-۶-۱- مواد استفاده شده ۲۹
۳-۶-۲-روش کار ۳۰
۳-۷- طراحی پرایمر (آغازگر) ۳۱
۳-۸- واکنش PCR ۳۲
۳-۹- الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR ۳۳
۳-۱۰- استخراج RNA ۳۴
۳-۱۱- ساخت cDNA ۳۵
۳-۱۲- خالص سازی محصول PCR به کمک ستون ۳۶
۳-۱۳- استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک برای تجزیه و تحلیل توالیها ۳۷

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- استخراج DNA ۳۸
۴-۲- PCR محصول cDNA با آغازگر اکتین ۳۸
۴-۳- واکنش PCR ۳۹
۴-۴- توالیهای به دست آمده از ژن GstU ۴۰
۴-۵- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالیهای به دست آمده ۴۲
۴-۵-۱- تایید درستی توالیهای به دست آمده توسط بانکهای اطلاعاتی ۴۲
۴-۵-۲- BLAST توالیهای به دست آمده و مقایسه آنها با توالیهای موجود در بانک ژن ۴۵
۴-۵-۳- بررسی فیلوژنی توالیهای به دست آمده با سایر گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی ۵۲

۴-۵-۴- بررسی توالیهای حاصل از ترجمه ژنهای یافت شده و مقایسه آنها با سایر توالیهای گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Tau ۵۳
فصل پنجم: بحث

۵-۱- بررسی قطعات ژنی به دست آمده و مقایسه آنها با توالیهای موجود در بانک ژن ۵۸
۵-۲-ژن GstU یافت شده در گندمهای نان و خارشتر ۵۹
۵-۳- ژن GstU یافت شده در گیاه جو، رقم کارون ۶۱
۵-۴- ژن GstU یافت شده برای گیاه *Haplophyllum tuberculatum* ۶۳

نتیجه گیری ۶۴
پیشنهادات ۶۵
منابع ۶۶
پیوست ۱ (ژنهای ثبت شده در قسمت GSS بانک جهانی ژن، NCBI) ۷۳
پیوست ۲ (ژنهای ثبت شده در قسمت EST بانک جهانی ژن، NCBI) ۹۷

فهرست جدول ها

عنوان ..... صفحه

جدول ۲-۱- تعداد کلاسهای مختلف GST در گیاهان مختلف ۲۵
جدول۴-۱- توالیهای به دست آمده از ژن گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Tau ۴۱
جدول ۴-۲- توالی های بدست آمده از گیاهان سالیکورنیا، هوهوبا، *Haplophyllum tuberculatum*، *Matthiola flavida* و *Matthiola longipetala* ۴۱
جدول۴-۳- تایید Domain ژنهای GST توسط بانک اطلاعاتی ProDom ۴۲
جدول۴-۴- تایید ناحیه N-terminal و شباهت Block موجود در توالی GstU گندم الوند با Block گلوتاتیون ترانسفراز کلاس Omega و eEF-1γ ۴۵
جدول۴-۵- شماره دسترسی GSS و EST و نام توالیهای مربوط به ژنهای GST کلاس Tau گیاهان جو، خارشتر و ارقام مختلف گندم همراه با مشخصات نزدیکترین ژن مشابه موجود در بانک ژن و میزان شباهت محاسبه شده توسط نرم افزار BLAST ۵۱

فهرست شکلها

عنوان ..... صفحه

شکل ۱-۱- نامگذاری گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان بر گرفته از سیستم سیستم طبقه بندی گلوتاتیون ترانسفرازها در پستانداران..... ۶

شکل ۱-۲ ساختار دوم زیر واحدهای GST در پستانداران، گیاهان و باکتریها..... ۸

شکل ۱-۳ عملکردهای شناخته شده گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان..... ۱۳

شکل ۱-۴- فراوانی نسبی کلاسهای ژنی GST..... ۱۴

شکل ۱-۵ الگوی احتمالی divergence در فوق خانواده گلوتاتیون ترانسفرازها..... ۱۶

شکل ۱-۶ شکل شماتیک نشان دهنده نحوه تکامل تاخوردگی گلوتاتیون ترانسفرازها..... ۱۷

شکل ۴-۱ الکتروفورز DNA استخراج شده..... ۳۸

شکل ۴-۲- محصول cDNA PCR با پرایمر اکتین..... ۳۹

شکل ۴-۳- محصول DNA PCR..... ۴۰

شکل ۴-۴- تأیید نواحی N-treminal و C-terminal توسط بانک اطلاعاتی PROSITE..... ۴۳

شکل ۴-۵- تأیید ناحیه C-terminal توسط بانک اطلاعاتی SMART..... ۴۳

شکل ۴-۶- تأیید ناحیه C-terminal و Thioredoxin fold توسط بانک اطلاعاتی CDD..... ۴۴

شکل ۴-۷- تأیید نواحی N-terminal و C-terminal توسط بانک اطلاعاتی CDART..... ۴۴

شکل ۴-۸- تأیید نواحی N-treminal و C-terminal توسط بانک اطلاعاتی Pfam..... ۴۳

شکل ۴-۹- نتیجه BLAST توالی GST گندم الوند به عنوان نمونه در بانک ژن..... ۴۶

شکل ۴-۱۰- نتیجه BLAST توالی GST خار شتر در بانک ژن..... ۴۷

شکل ۴-۱۱- نتیجه BLAST توالی GST گیاه جو در بانک ژن..... ۴۸

شکل ۴-۱۲- همردیفی توالی گلوتاتیون ترانسفرازهای گندم و خارشتر و ناحیه اینترونی ۹۹ نوکلئوتیدی..... ۴۹

شکل ۴-۱۳- درخت فیلوژنی انواع گلوتاتیون ترانسفرازهای مختلف گیاهی به
همراه توالیهای به دست آمده در این پژوهش به روش Neighbor Joining..... ۵۲
شکل ۴-۱۴- درخت فیلوژنی انواع گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Tau گندم
با توالیهای به دست آمده مربوط به ارقام مختلف گندم به روش
Neighbor Joining..... ۵۳
شکل ۴-۱۵- همردیفی توالیهای پروتئینی ژنهای گلوتاتیون ترانسفراز یافت شده
متعلق به خارشتر، جو و ارقام مختلف گندم..... ۵۴
شکل ۴-۱۶- همردیفی توالی پروتئینی جو رقم کارون با سه پروتئین GST
کلاس Tau جو..... ۵۵
شکل ۴-۱۷- درخت فیلوژنی گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Tau جو با توالی
پروتئینی قطعه یافت شده برای جو کارون و پروتئین GSTU3 گیاه
Aegilops tauschii به روش Neighbor Joining..... ۵۶
شکل ۴-۱۸- همردیفی قطعه یافت شده برای گیاه *H. tuberculatum*
با ژن TaGstU1A..... ۵۷
شکل ۵-۱- مقایسه درصد identity توالیهای پروتئینی ژنهای گلوتاتیون ترانسفراز
Tau گندمهای نان و خارشتر با همدیگر..... ۶۰
شکل ۵-۲- نمودار مقیاس آنتروپی مربوط به توالیهای پروتئینی گندمهای نان
و خارشتر..... ۶۱
شکل ۵-۳- ماتریس identity مربوط به پروتئینهای کلاس Tau جو با ترجمه
قطعه یافت شده جو رقم کارون..... ۶۲

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

هم اکنون مشخص شده است که گلوتاتیون ترانسفرازها (GSTs؛ که پیشتر با نام گلوتاتیون S- ترانسفراز شناخته می‌شدند) نقش کلیدی را در فاز دوم واکنش سم زدایی آنزیمی در درون سلولها ایفا می‌نمایند. از طرفی دیگر پیشرفتهای اخیر و گسترش میزان اطلاعات ما در زمینه ژنومیک و پروتئومیک موجب پیشبرد دانش ما در مورد نحوه ارتباط بین ساختار و عملکرد این فوق خانواده آنزیمی مهم شده است. در صورتی که گلوتاتیون ترانسفرازهای پستانداران بصورت گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته و بنابر مقیاسهای مورد توافق طبقه‌بندی شده‌اند تعدادی از کلاسهای این فوق‌خانواده برای اولین بار در موجودات غیرپستاندار یافت شده و پس از آن در پستانداران شناخته شدند. از سویی دیگر هم اکنون میزان قابل توجهی از ساختارهای کریستالوگرافی شده برای گلوتاتیون ترانسفرازهای موجودات غیرپستاندار به دست آمده که روی هم رفته این امکان را به ما داده است که عملکردهای شناخته نشده این دسته از آنزیمها را که اساساً و در ابتدا جزو کارکردهای گلوتاتیون ترانسفرازهای به شمار نمی‌آمدند را تعیین کنیم.

در گیاهان حیات سلولها مستلزم مدیریت گونه‌های فعال اکسیژن، مواد فیتوشیمیایی درون‌زا و سموم برون‌زایی است که شامل مواد شیمیایی خارجی (گزنوبیوتیکهای) مختلفی می‌شوند که توسط انسان وارد طبیعت شده اند. از سویی دیگر بسیاری از فرآیندهای سلولی تنها در یک بازه باریک از لحاظ پتانسیل احیایی عملکرد بهینه دارند. در این میان گلوتاتیون (GSH) که تری‌پپتیدی متشکل از γ-Glu-Cys-Gly می‌باشد نقش مرکزی را در فرآیندها و واکنشهای سمزدایی و برقراری تعادل احیایی عهده‌دار است (Noctor and Foyer, 1998). گیاهان دارای چندین آنزیم سم زدایی وابسته به گلوتاتیون می‌باشند (Dixon et al., 1998) که مهمترین آنها گلوتاتیون ترانسفرازها هستند که به عنوان نمونه مجموعاً یک درصد پروتئینهای محلول برگهای ذرت را تشکیل می‌دهند (Marrs, 1996).

گلوتاتیون ترانسفرازها موجب کاتالیز واکنش اتصال هسته دوست شکل احیا گلوتاتیون به انواع گوناگون سوبستراهای هیدروفوبیک و الکتروفیلیک که اغلب موادی سمی هستند میگردند. اکثر این سوبستراهای سمی جزو مواد گزنوبیوتیک محسوب می‌شوند. پس از انجام واکنش اتصال یا کونژوگه شدن، محصول فرآیند یا به داخل واکوئل انتقال یافته تا در آنجا از دسترس سلول به دور باشد و یا به محیط بیرون سلولی ترشح می‌گردد.

محصولات واکنش کونژوگه شدن یا در داخل واکوئلهای سلولهای گیاهی باقی مانده و یا توسط فرآیندی بنام ترشح ذخیره‌ای به آپوپلاست منتقل می‌شوند (Marrs, 1996). علاوه بر این، این آنزیمها کارکردهای متعدد دیگری نیز دارند نظیر واکنشهای تعویضی آروماتیک هسته دوست، واکنش بازگشت‌پذیر میکائیل بر روی آلدهیدها و کتونهای غیر اشباع آلفا و بتا، ایزومریزاسیون، باز کردن حلقه اپوکساید، و در بعضی موارد واکنشهای پراکسیدازی. گلوتاتیون ترانسفرازها همراه با گلوتاتیون در موجودات هوازی بوجود آمده و در بسیاری از انواع موجودات زنده از جمله باکتریها، قارچها، انگلها، مخمرها، حشرات، پستانداران و گیاهان عالی دیده می‌شوند (Droog, 1997). آنها در تمامی مراحل تکوینی گیاهان دیده شده و در همه بافتهای گیاهی وجود دارند (McGonigle et al., 2000).

گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی عمدتاً در رابطه با نقششان در فرآیند سم زدایی علف‌کشها مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در واکنشهای سم زدایی علف‌کشها گلوتاتیون ترانسفرازها همراه با گلایکوزیل ترانسفرازها آنزیمهای اصلی فاز دوم سم زدایی را تشکیل می‌دهند. از آنجا که گلوتاتیون ترانسفرازها قابلیت شناسایی سوبستراهای گوناگونی را دارند، گیاهان نسبت به دامنه وسیعی از علف‌کشها مقاومت نشان می دهند. علاوه بر این بسیاری از گلوتاتیون ترانسفرازها به هورمونهای گیاهی نظیر اکسین و سیتوکینین، و نیز به آلودگی توسط پاتوژنها، تنشهای اکسیداتیو، و نیز به سایر شرایط و تیمارهای مختلف پاسخ می‌گویند. تنشهای اکسیداتیو منجر به تولید پروتئینهای S- تیوله شده توسط گلوتاتیون ترانسفرازها می‌گردند، علاوه براین برخی از ایزوفرمهای گلوتاتیون ترانسفرازها قابلیت اتصال به برخی لیگاندها و در نتیجه انتقال داخل سلولی برخی ترکیبات آبگریز و دوگانه دوست را دارا هستند (Listowski et al., 1988). بعضی از گلوتاتیون ترانسفرازهای ویژه به آنتوسیانین‌ها متصل شده و موجب نگهداری این مواد در داخل واکوئل‌ها می‌گردند. این آنتوسیانین‌ها سوبستراهای غیرآنزیمی گلوتاتیون ترانسفرازها بوده و با گلوتاتیون اتصالی برقرار نمی‌کنند. به چنین گلوتاتیون ترانسفرازهایی اصطلاحاً لیگاندین و به سوبستراهای آنها «لیگاندهای غیرسوبسترایی» اطلاق می‌شود (Mueller et al., 2000). از اینرو عملکردهای گلوتاتیون ترانسفرازها را می‌توان بدین ترتیب تقسیم‌بندی نمود:

۱- کاتالیز واکنشهای اتصال گلوتاتیون با محصولات طبیعی گیاهان و گزنوبیوتیکها

۲- دخالت در فرآیند هومئوستازی هورمونها و ۳- کاتالیز واکنشهای انتقالی برخی مواد زیستی که احتیاجی به گلوتاتیون ندارد.

اندازه فوق خانواده پروتئینی گلوتاتیون ترانسفرازها بسیار بزرگ است بطوریکه اکثر گونه‌ها ده ها ژن GST در کلاسهای مختلف دارند. با توجه به شباهت توالی آمینو اسیدها، سازماندهی ژنی، زیر واحدهای فعال در جایگاه فعال آنزیم یا همان Active Site و خصوصیات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی تاکنون ۸ کلاس GST در پستانداران شناسایی شده‌اند که عبارتند از: Alpha، Mu، Pi، Theta، Sigma، Zeta، Omega و نوع میتوکندریایی یا Kappa. گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان پس از کشف و مشاهده این آنزیمها در پستانداران یافت شدند. وجود چنین خانواده پروتئینی از آنزیمها در گیاهان نخستین بار در سال ۱۹۷۰ قطعی شد یعنی زمانی که مشاهده شد گلوتاتیون ترانسفرازهای موجود در ذرت موجب اتصال کلرو- S- تریازین آترازین به گلوتاتیون می‌شوند که این خود عاملی برای محافظت گیاه در برابر آسیبهای ناشی از این علف‌کش بود (Fear and Swanson, 1970). از آن زمان تا کنون عملکردهای متعددی برای این دسته از آنزیمها در گیاهان معرفی شده که در ادامه به آنها اشاره می شود. گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی به دو صورت محلول (سیتوپلاسمی) و میکروزومی یافت می‌شوند. آنزیمهای محلول شامل کلاسهای Phi، Tau، Zeta، Theta، Lambda، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (Dehydroascorbate reductase, DHAR) و تتراکلروهیدروکینون دهالوژناز (Tetrachlorohydroquinone dehalogenase, TCHQD) می‌گردند. از سویی دیگر گلوتاتیون ترانسفرازهای میکروزومی که مجزا از فوق خانواده اصلی این آنزیمها می‌باشند موجب راه‌اندازی یکسری واکنشهای وابسته به گلوتاتیون می‌شوند. اینها در واقع جزو اعضای متصل به غشای فوق خانواده پروتئینی MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) به حساب می آیند. مطالعات فیلوژنتیکی نشان داده‌اند که گلوتاتیون ترانسفرازهای محلول از یک ژن پیش‌ساز اولیه منشأ گرفته‌اند، با این وجود شباهت بین توالی آمینو اسیدهای کلاسهای مختلف معمولاً کمتر از ۲۵ درصد است. این رقم در مورد گلوتاتیون ترانسفرازها متعلق به یک کلاس (شباهت درون کلاسی) به حداقل ۳۰ درصد می‌رسد (Dixon et al., 2002b).

گلوتاتیون ترانسفرازها پروتئینهایی محلول عموماً با وزن ملکولی تقریبی ۵۰ کیلو دالتون هستند که از دو زیر واحد ۲۷-۲۵ کیلو دالتونی تشکیل شده اند. این آنزیمها ممکن است به صورت هوموداِیمر یا هتروداِیمر باشند که نوع هتروداِیمر آنها محدود به زیر واحدهای متعلق به یک کلاس می‌شود.

۱-۲- طبقه‌بندی

پس از شناسایی اولین ژن GST در گیاهان در سال ۱۹۷۰ (Frear and Swanson, 1970) کلونینگ و توالی‌یابی ژنها و آنزیمهای GST درگیاهان در دهه ۱۹۸۰ ادامه یافت. ابتدا با توجه به مشاهده شباهت اندک بین توالی‌های اولیه شناسایی شده در گیاهان با آنچه که در انسان یافت شده بود یعنی کلاسهای Alpha، Mu و Pi تمامی گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی را در یک کلاس با نام کلاس Theta جای می‌دادند اما در سال ۱۹۹۰ با توالی‌یابی‌های انجام شده روی cDNA های گونه‌های مختلف گیاهی مشخص شد که گیاهان دارای چندین ژن مختلف GST می‌باشند. هم‌اکنون تخمین زده می‌شود که به طور متوسط در هرگونه گیاهی بین ۲۵ تا ۶۰ ژن مختلف GST وجود داشته باشد (Yuan et al., 2002). از آنجا که انواع گیاهی با آنچه که در مورد پستانداران یافت شده بود تفاوتهای اساسی نشان می‌دادند ایجاد یک سیستم طبقه‌بندی جدید شدیداً احساس می‌شد. طبقه‌بندی کنونی که ابتدا توسط Droog (Droog, 1997) مطرح شد و سپس توسط Edwards و همکارانش (Edwards et al., 2000) اصلاح گردید بر پایه سازماندهی ژنی (تعداد و جایگاه اینترونها) شباهت کلی توالی اسید آمینه‌ها، خصوصیات بیوشیمیایی و ایمونولوژیکی و حفظ شدگی برخی زیر واحدهای ویژه واقع در ساختار پروتئین در طی تکامل طراحی شده است. با توجه به این طبقه‌بندی ابتدا سه کلاس مختلف GST در گیاهان با نامهای نوع I (بعدها کلاس Phi نامیده شد) نوع II (بعدها کلاس Zeta نامیده شد) و نوع III (بعدها کلاس Tau نام گرفت) ایجاد شد کلاس چهارمی بنام نوع IV نیز کمی پس از طبقه‌بندی Droog توسط Dixon و همکارانش در سال ۱۹۹۸ (Dixon et al., 1998) به انواع قبلی اضافه شد که بعدها کلاس Theta نامیده شد (به خاطر شباهتش به کلاس Theta در جانوران). اخیراً (سال ۲۰۰۲) نیز دو کلاس دیگر با نامهای Lambda و DHAR توسط Dixon و همکارانش به طبقه‌بندی پیشین افزوده شده است (Dixon et al., 2002a).

Phi: کلاس Phi شامل بسیاری از گلوتاتیون ترانسفرازهای گیاهی است که دارای فعالیت سمزدایی برای علف‌کشها هستند. ژنهای آنها دارای دو اینترون در جایگاههای حفظ شده است.

Tau: گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Tau قابلیت القا بوسیله اکسینها را دارند و در پاسخ به شرایط نامطلوب خارجی و داخلی از جمله حمله پاتوژنها، آسیب فیزیکی، تیمار با مواد مختلف گزنوبیوتیک، منسومیت با یونهای فلزی سنگین و استرسهای دمایی و اکسیداتیو دخالت می کنند. ژنهای این دسته تنها از یک اینترون تشکیل یافته‌اند.

کلاسهای Tau و Phi اختصاصی گیاهان بوده و نسبت به سایر کلاسها در گیاهان فراوانترند.

Zeta: کلاس Zeta بوسیله اتیلن و همچنین در هنگام کهولت سلولها ،بیان می شوند. ژنهای این کلاس ۸ یا ۹ اینترون داشته و مشابه کلاس Zeta در پستانداران است.

Theta: کلاس Theta مشابه کلاس Theta موجود در پستانداران بوده و ژنهای این کلاس از ۶ اینترون تشکیل یافته اند (کلاس Theta پستانداران تنها ۴ اینترون دارد).

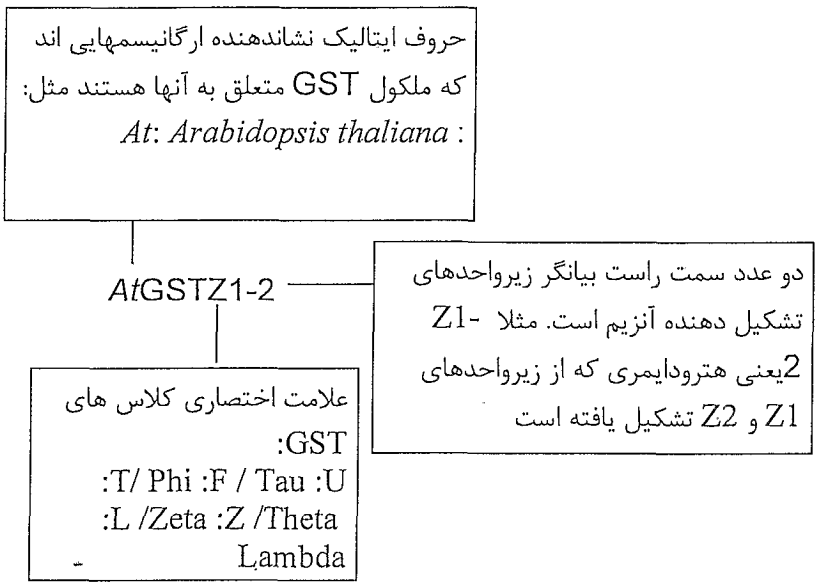
Lambda: تا مدتها تنها شامل دو عضو در *Arabidopsis thaliana* می‌شد ولی مطالعات اولیه نشان داده‌اند گیاهانی چون سویا، ذرت، برنج و گندم نیز دارای نمایندگانی متعلق به این کلاس GST می‌باشند. توالی‌های مطالعه شده در *A. thaliana* نشانگر وجود ۸ اینترون در ژن این کلاس از گلوتاتیون ترانسفرازهاست.

DHAR: پروتئینهای این دسته در *Arabidopsis* و سایر گونه‌های گیاهی وجود دارند ژن DHAR موجود در *Arabidopsis* شامل دو اینترون در جایگاههای حفظ شده است.

TCHQD: تا کنون تنها یک ژن متعلق به کلاس TCHQD در ژنوم *A. thaliana* (با شماره دسترسی At1g77290 در بانک ژن) شناسایی شده است. خصوصیات آنزیمی این پروتئین هنوز مورد بررسی قرار نگرفته ولی پیش‌بینی می‌شود دارای ویژگیهای آنزیمهای پروکاریوتیک باشد (Edwards and Dixon, 2005).

۱-۳- نامگذاری

امروزه نامگذاری ارائه شده توسط Edwards و همکارانش (Edwards et al,. 2000) مورد پذیرش عموم واقع شده است. برای هر ژن یا هر آنزیم نامگذاری بدین ترتیب است که ابتدا دو حرف که با حروف ایتالیک نوشته می‌شود مشخص کننده ارگانیسمی است که ژن یا آنزیم از آن بدست آمده، سپس حروف Gst برای ژنها و GST برای پروتئینها و بعد از آن حرفی که کلاس ژن یا پروتئین را مشخص می‌سازد (F برای Phi، U برای Tau، Z برای Zeta، T برای Theta و L برای Lambda) نوشته می‌شوند، در انتها نیز اعداد نوشته شده بیانگر ترتیب شناسایی ژنهای هر کلاس در هرگونه است. برای آنزیمها ترکیب زیر واحدها نیز مشخص می‌گردد بدین ترتیب که مثلاً AtGstZ1 و AtGstZ2 نشانگر اولین و دومین ژن کلاس Zeta در گیاه *Arabidopsis* و OsGSTU1-2 بیانگر پروتئین هترودایمر متشکل اززیرواحدهای Tau1 و Tau2 است (شکل ۱-۱).



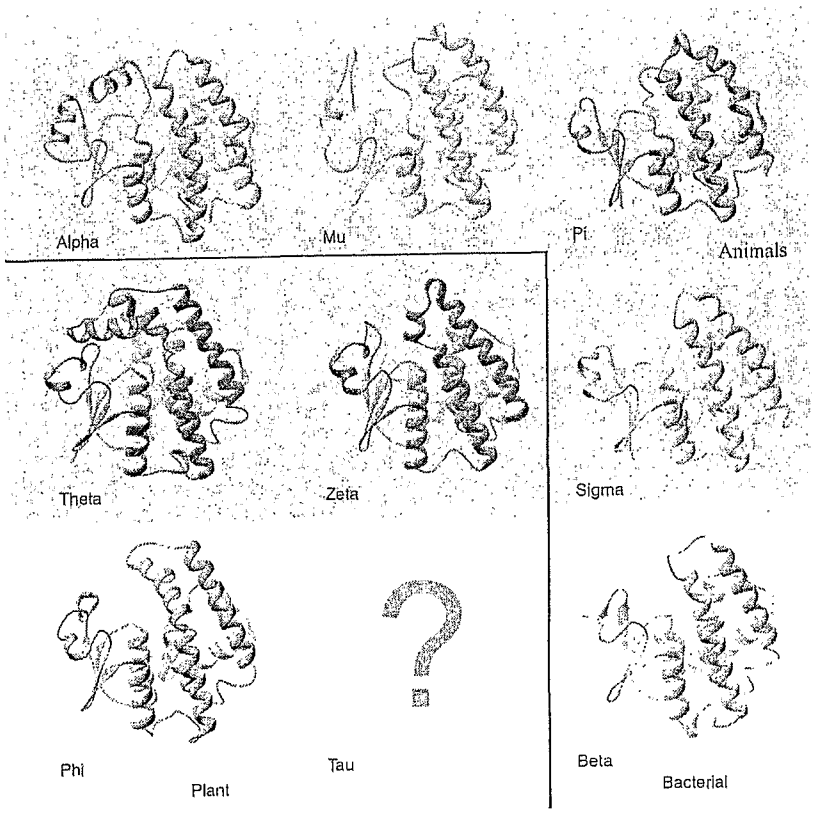
شکل ۱-۱- نامگذاری گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان برگرفته از سیستم طبقه بندی گلوتاتیون ترانسفرازها در پستانداران

۱-۴- ساختار

با وجود تنوع زیاد در توالی گلوتاتیون ترانسفرازها ساختار کلی این آنزیمها بسیار به هم شباهت دارند (شکل ۱-۲). برخی از مشخصات ساختاری گلوتاتیون ترانسفرازها در سایر پروتئینهای وابسته به گلوتاتیون نظیر گلوتاردوکسین نیز دیده می‌شود که بیانگر نوعی فشار تکاملی جهت حفظ موتیف‌های ساختاری دخیل در اتصال به گلوتاتیون در جایگاه فعال آنزیمهاست (Sheehan et al., 2001 ؛Armstrong, 1997 ؛Dirr et al., 1994). هر زیر واحد تشکیل دهنده GST دارای یک جایگاه کاتالیتیکی است که به صورت مستقل از زیر واحد دیگر عمل می‌کند این جایگاه کاتالیتیکی از دو جزء تشکیل یافته، جزء اول جایگاه اختصاصی جهت اتصال گلوتاتیون (یا G-Site) بوده و از گروهی از اسید آمینه‌های به شدت حفظ شده، واقع در ناحیه انتهای N پروتئین تشکیل شده که به دلیل شباهت ساختاری با پروتئین تیوردوکسین به ناحیه thioredoxin fold نیز مشهور است. ناحیه N-terminal از مارپیچهای آلفا و صفحات بتا تشکیل شده که ترتیب توپولوژیکی این عناصر معمولا به قرار βαβαββα میباشد یعنی نظیر آنچه که در thioredoxin fold سایر پروتئینهای متصل شونده به گلوتاتیون یا سیستئین دیده

می شود. و جزء دوم مکان اتصال سوبسترای هیدروفوبیک (یا H-Site) است که در مقایسه با G-Site از لحاظ ساختاری از تنوع بیشتری برخوردار بوده و از زیرواحدهای واقع در ناحیه انتهای C پروتئین ایجاد شده است. دامین انتهای C تماما از مارپیچهای آلفا تشکیل یافته و بنا به نوع گلوتاتیون ترانسفراز مورد نظر ۵ الی ۹ مارپیچ آلفا را می توان در ساختار گلوتاتیون ترانسفرازهای گوناگون شناسایی کرد. تنوع موجود در این ناحیه باعث می‌شود که مکان اتصال سوبستراها از انعطاف زیادی برخوردار باشند که این خود قابلیت اتصال آنزیم به سوبستراهای مختلف را افزایش می‌دهد. بین دو ناحیه هم یک منطقه Linker کوتاه و متغیر، متشکل از ۵ الی ۱۰ اسید آمینه وجود دارد (Frova, 2003)

جایگاه اتصال زیرواحدهای آنزیمهای GST در اکثر کلاسهای گلوتاتیون ترنسفرازها بر دو نوع است: ۱) نوع هیدروفوبیک یا ball-and socket (در مورد کلاسهای Pi , Mu, Alpha و Phi) و ۲) نوع هیدروفیلیک (در مورد کلاسهای Theta , Sigma و Beta) (Dixon et al, 2002b). به همین خاطر زیر واحدهای متعلق به کلاسهای مختلف قادر به ایجاد دایمر و در نتیجه آنزیم فعال نیستند. همانطور که ذکر شد جایگاههای فعال هر زیر واحد از یکدیگر مستقل‌اند و از لحاظ تئوریک گلوتاتیون ترانسفرازها باید به صورت مونومر نیز دارای عملکرد باشند. با این وجود دلیل اینکه تمامی کلاسهای GST – به غیر از گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس Lambda و DHAR در *A. thaliana* که به صورت مونومر عمل می کنند – جهت انجام فعالیت نیازمند ایجاد فرم دایمری هستند هنوز مشخص نشده است (Pemble and Taylor, 1992). شاید این دایمریزاسیون به خاطر افزایش قابلیت GSTها در اتصال به سوبستراهای مختلف باشد.



شکل ۱-۲- ساختار دوم زیر واحدهای GST در پستانداران، گیاهان و باکتریها. هر چند شباهت اندکی بین توالی آمینو اسیدی آنزیمها ی کلاسهای مختلف دیده میشود ساختار کلی بین تمامی کلاسها حفظ شده است. برگرفته از (Dixon et al., 2002b).

۱-۵- عملکرد

اولین وظیفه‌ای که برای گلوتاتیون ترانسفرازها در گیاهان در نظر گرفته شد قابلیت آنها در کاتالیز واکنش تولید کونژوگه گزنوبیوتیکها با گلوتاتیون بود (شکل ۳a). این محصول S-گلوتاتیونه شده سپس توسط گروهی از ناقلین پروتئینی به نام ناقلین کلاس ATP- binding cassette (ABC) وارد واکوئل‌ها می‌شود (Edwards et al., 2000). علی‌رغم وجود این سامانه سم‌زدایی، شواهد چندی نیز وجود دارد که گلوتاتیون ترانسفرازها محصولات طبیعی را نیز متحمل چنین تغییراتی می‌سازند و این مسیر مختص سموم و گزنوبیوتیکها نیست. چنین یافته‌ای با فرض اینکه گلوتاتیون ترانسفرازها اصولاً جهت متابولیسم مواد طبیعی و نه مصنوعی

تکامل یافته‌اند نیز سازگار است ولی اینکه چرا کونژوگه‌های گلوتاتیون و مواد طبیعی سلولی به خوبی شناسایی نشده‌اند شاید به دلیل مقادیر اندک این محصولات و یا به علت سرعت بالای تغییر و تبدیل آنها باشد. از جمله این گلوتاتیون ترانسفرازهای دخیل در متابولیسم محصولات درونی و طبیعی سلولی می‌توان به محصولات ژنهای Bronze 2 (از GST های کلاس Tau) در ذرت و Ang (متعلق به کلاس Phi) در *Petunia hybrida* اشاره نمود که در فرآیند انتقال رنگدانه‌های مشتق شده از فلاوونوئیدها به واکوئل نقش دارند (Edwards et al., 2000). مطالعات اخیر روشن ساخته‌آند که محصولات ژنهای نامبرده با متصل شدن به مشتقات فلاوونوئیدی سبب پایداری آنها می‌شوند و بر خلاف واکنش معمول گلوتاتیون ترانسفرازها در اینجا واکنش اتصال به گلوتاتیون انجام نمی‌شود (Mueller et al., 2000). به این کارکرد گلوتاتیون ترانسفرازها اصطلاحا لیگاندین اطلاق می شود که در واقع نوعی فعالیت حمل پروتئینی برخی مواد ذخیره ای و همراهی آنها تا مقصد نهاییشان در سلول است (شکل ۳b) (Mueller et al., 2000).

این نظریه که GST ها دارای کارکردهای دیگری به غیر از کاتالیز واکنشهای کونژوگه سازی با گلوتاتیون نیز می‌باشند زمانی از پایگاه محکمتری برخوردار می‌شود که بدانیم مطالعات، وجود چندین GST قابل القا توسط تنشها را اثبات نموده‌اند که وظیفه‌شان محافظت از گیاهان در برابر آسیبهای حاصل از مسیرهای اکسیداتیو سلولی به واسطه فعالیت گلوتاتیون پراکسیدازی این آنزیمهاست (Roxas et al., 1997؛ Cummins et al., 1999). برخی از اعضای کلاسهای Tau، Theta و Phi می‌توانند با استفاده از گلوتاتیون منجر به کاهش هیدروپراکسیدهای آلی اسیدهای چرب و نوکلئیک اسیدها و تبدیل آنها به مونوهیدروکسی الکلهای مربوطه شوند (شکل ۳c). چنین واکنشی نقش حیاتی در جلوگیری از تجزیه هیدروپراکسیدهای آلی به مشتقات آلدهیدی سمی دارد.

پس از مشاهده اینکه بیان یک GST از کلاس Tau ی گیاه گوجه فرنگی در سلول مخمر باعث مهار آپاپتوز القا شده توسط پروتئین Bax می‌شود دخالت پروتئینهای GST در ایجاد تحمل نسبت به تنشهای اکسیداتیو محرز شد. مطالعات بعدی نشان داد که GST ها این کار را از طریق ممانعت از آسیب اکسیداتیو حاصل از آپاپتوز القا شده توسط پروتئین Bax انجام می‌دهند (شکل ۳d) (Kampranis et al., 2000). علاوه بر این، این احتمال نیز وجود دارد که گلوتاتیون ترانسفرازها در فرآیند ایجاد تحمل در برابر تنشها توسط "پیام رسانی در سلول" هم دارای نقش باشند (شکل ۳e) زیرا القای بیان ژنهای کد کننده آنزیمهای دخیل در بیوسنتز فلاوونوئیدها در گیاه جعفری توسط نور ماوراء بنفش مستلزم وجود گلوتاتیون و بیان نوع خاصی از GST کلاس Tau می‌باشد (Loyall et al., 2000). و در نهایت کارکرد دیگر گلوتاتیون ترانسفرازها دخالت در ایزومریزاسیون مالئیل استواستات (maleylacetoacetate) و تبدیل‌اش به فوماریل استواستات (fumarylacetoacetate) است. این واکنش، مرحله ماقبل