دانشکده علوم

پایان نامه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی زیست شناسی سلولی – مولکولی

تعیین خصوصیات و توالی ژنهای کلاسهای Phi و Zeta از گلوتاتیون S- ترانسفراز در گندم و جو ایرانی

به وسیله‌ی

مریم اسماعیلی

استادان راهنما

دکتر حسن محبت کار

دکتر ساسان محسن زاده

مردادماه ۱۳۸۹

بسم الله الرحمن الرحیم

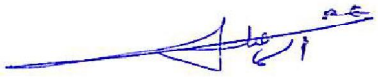
به نام خدا

اظهارنامه

اینجانب مریم اسماعیلی دانشجوی رشته ی زیست شناسی گرایش سلولی- مولکولی دانشکده علوم اظهار می کنم که این پایان نامه حاصل پژوهش خودم بوده و در جاهائی که از منابع دیگران استفاده کرده ام، نشانی دقیق و مشخصات کامل آن را نوشته ام. همچنین اظهار می کنم که تحقیق و موضوع پایان نامه ام تکراری نمی باشد و تعهد می نمایم که بدون مجوز دانشگاه دستاورد های آن را منتشر ننموده و یا در اختیار غیر قرار ندهم. کلیه حقوق این اثر مطابق با آیین نامه مالکیت فکری و معنوی متعلق به دانشگاه شیراز است.

نام و نام خانوادگی: مریم اسماعیلی

تاریخ و امضاء: ۱۳۹۰/۹/۲۱



به نام خدا

تعیین خصوصیات و توالی ژنهای کلاسهای Phi و Zeta از گلوتاتیون S- ترانسفراز در گندم و جو ایرانی

به کوشش

مریم اسماعیلی

پایان نامه

ارائه شده به تحصیلات تکمیلی دانشگاه شیراز به عنوان

بخشی از فعالیت های تحصیلی لازم برای اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته ی

زیست شناسی سلولی- مولکولی

از دانشگاه شیراز

شیراز

جمهوری اسلامی ایران

ارزیابی شده توسط کمیته ی پایان نامه، با درجه: **عالی**

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

دکتر ساسان محسن زاده ، دانشیار بخش زیست شناسی.....

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

دکتر علی مراد شاهی، دانشیار بخش زیست شناسی.....

دکتر حمید رضا کربلایی حیدری، استادیار بخش زیست شناسی.....

مرداد ۱۳۸۹

سپاسگزاری

سپاس بیکران خدایی را که شب تار زندگی را به فروغ علم و دانش روشنایی بخشید. یگانه‌ای که دل پویای حقیقت‌جو را به نور معرفت خویش بیافروخت. هم او که به قلم سوگند یاد کرد، انسان را به خواندن فرا خواند، و کلمه را به وی آموخت؛ هر چند سخن عشق او در کلام نگنجد.
کمال سپاس و امتنان تقدیم به پیشگاه جناب آقای دکتر حسن محبت کار و جناب آقای دکتر ساسان محسن زاده بزرگوارانی که در ساحت بلند اندیشه‌شان، لذّت اندیشیدن را درک کردم.
در پایان از زحمات بی دریغ خانواده ی عزیزم بسیار متشکرم

چکیده

تعیین خصوصیات و توالی ژنهای کلاسهای Phi و Zeta از گلوتاتیون S- ترانسفرازها در گندم و جو ایرانی

به کوشش
مریم اسماعیلی

گلوتاتیون S-ترانسفرازها یک فوق خانواده قدیمی از پروتئین های اتصالی و کاتالیزوری می باشند که در طیف بسیار متنوعی از موجودات هوازی از باکتری ها تا انسان موجود می باشند. این آنزیم ها در گیاهان به هشت کلاس طبقه بندی می شوند که هفت کلاس آن (Phi، Lambda، Theta، Zeta، Tau، دهیدروآسکوربات ردوکتاز و تتراکلروهیدروکینون دهالوژناز) محلول و یک کلاس آن میکروزومال می باشد. کلاس های Tau و Phi فراوانترین GST ها و ویژه گیاهان می باشند در حالیکه کلاس های Zeta و Theta در جانوران نیز یافت می شوند. این آنزیم ها از زمان شناسایی شان در گیاهان در دهه ۱۹۷۰ به عنوان آنزیم های فاز II سم زدایی معروف شدند که می توانند چندین عملکرد اساسی دیگر را نیز که مرتبط با رشد و تکامل گیاهان است انجام دهند.. در این پژوهش، بر پایه ترادف های موجود در بانک جهانی ژن انواع مختلفی از پرایمرها به منظور تکثیر GST های کلاس های Phi و Zeta در گندم و جو ایرانی طراحی شدند. پس از استخراج DNA ژن های GST مربوطه تکثیر و سپس تعیین توالی شدند. استخراج mRNA و سنتز cDNA ژن GST نیز صورت گرفت. ارتباط فیلوژنی توالی های یافت شده نیز با توالی های موجود در NCBI بررسی شد. در نهایت استخراج و تکثیر ژن GST کلاس Phi و همچنین سنتز cDNA مربوطه با موفقیت صورت گرفت و در بانک جهانی ژن به ثبت رسید.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- طبقه بندی ۵

۱-۲- ساختار ۸

۱-۳- عملکرد ۱۰

۱-۴- تنظیم بیان ژن ۱۲

۱-۵- تکامل ۱۳

۱-۶- ژن های ITS ۱۵

۱-۷- اهداف پروژه ۱۶

فصل دوم: مروری بر تحقیقات گذشته ۱۸

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-۱- تهیه بذر گیاهان زراعی ۲۶

۳-۲- مواد استفاده شده ۲۶

۳-۳- دستگاه ها و وسایل استفاده شده ۲۷

۳-۴-آماده سازی و کاشت بذر گیاهان زراعی ۲۸

۳-۵- زمان القاء تنش و روش آن ۲۸

۳-۶- استخراج DNA ۲۹

عنوان **صفحه**

۳-۷- طراحی پرایمر ۳۱

۳-۸- واکنش PCR ۳۲

۳-۹- الکتروفورز ژل آگارز ۳۳

۳-۱۰- استخراج DNA از ژل ۳۴

۳-۱۱- استخراج RNA ۳۵

۳-۱۲- ساخت cDNA ۳۶

۳-۱۳- خالص سازی محصول PCR به کمک ستون ۳۷

۳-۱۴- استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک برای‌تجزیه‌و تحلیل توالی‌ها ۳۸

فصل چهارم: نتایج

۴-۱- استخراج DNA ۴۰

۴-۲- واکنش PCR ۴۰

۴-۳- ثبت توالی ها ۴۲

۴-۴- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی توالی های بدست آمده ۴۳

۴-۴-۱- BLAST توالی های بدست آمده ۴۳

۴-۴-۲- تأیید درستی توالی های بدست آمده ۴۵

۴-۴-۳- بررسی فیلوژنی توالی های بدست آمده با سایر گلوتاتیون
ترانسفرازهای گیاهی ۴۷

۴-۴-۴- بررسی توالی های حاصل از ترجمه ژن های بدست آمده ۴۷

فصل پنجم: بحث

۵-۱- بررسی قطعات ژنی بدست آمده و مقایسه آنها با توالی های موجود در بانک ژن ۵۱

۵-۲- وجود خانواده ژنی GST در گیاه جو ۵۳

عنوان **صفحه**

نتیجه گیری ۵۴
پیشنهادات ۵۵

فهرست منابع و مآخذ ۵۶

پیوست

پیوست ۱: (ژن های ثبت شده در بانک جهانی ژن، NCBI قسمت GSS) ۶۸
پیوست ۲: (ژن ثبت شده در بانک جهانی ژن، NCBI قسمتEST)..... ۷۲

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱- توالی های بدست آمده از ژن های GST و ITS ۴۲
جدول ۴-۲- تأیید domain ژن GST توسط بانک اطلاعاتی ProDom.....۴۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۲- درخت تکاملی نشان دهنده تنوع GST ها و ارتباط بین کلاس های مختلف GST. ۷

شکل ۱-۲- مقایسه منومرهای ساختاری کلاس های مختلف خانواده GST ۹

شکل ۴-۱- الکتروفورز DNA استخراج شده از برگ جو. ۴۰

شکل ۴-۲- محصول PCR جو رقم کارون با جفت پرایمر ۱. ۴۱

شکل ۴-۳- محصول PCR گندم رقم سرداری با جفت پرایمر۱ در دماهای مختلف. ۴۱

شکل ۴-۴- محصول PCR گندم رقم سرداری با جفت پرایمر ۳. ۴۱

شکل ۴-۵- محصول PCR جو رقم کارون با جفت پرایمر ۱ (cDNA). ۴۲

شکل ۴-۶- نتیجه BLAST توالی ژنومی GST جو کارون در بانک ژن. ۴۳

شکل ۴-۷- نتیجه BLAST توالی کد کننده GST جو کارون در بانک ژن. ۴۴

شکل ۴-۸- نتیجه BLAST توالی ITS گندم سرداری در بانک ژن. ۴۵

شکل ۴-۹- تأیید ناحیه N-terminal و کلاس توالی بدست آمده توسط بانک اطلاعاتی CDART. ۴۶

شکل ۴-۱۰- تأیید ناحیه N-terminal توسط بانک اطلاعاتی Pfam (E-value=1). ۴۶

شکل ۴-۱۱- درخت فیلوژنی گلوتاتیون ترانسفرازهای کلاس های Phi، Tauو Zeta در گیاهان مختلف. ۴۷

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱۲- BLAST توالی پروتئینی ژن گلوتاتیون ترانسفراز
(حاصل از ترجمه DNA). ۴۸
شکل ۴-۱۳- BLAST توالی پروتئینی ژن گلوتاتیون ترانسفراز
(حاصل از ترجمه cDNA)..... ۴۹

فصل اول

مقدمه

گلوتاتیون S-ترانسفرازها (GSTs, EC ۲,۵,۱,۱۸) یک ابرخانواده از آنزیم های عمدتاً سیتوزولی و دایمر هستند که فعالیتشان در بیشتر یوکاریوت ها و پروکاریوت های آنالیز شده تا امروز شناخته شده است (Wongsantichon and Ketterman, 2005).

این آنزیم ها برای اولین بار در جانوران در دهه ۱۹۶۰ به خاطر اهمیتشان در متابولیسم و سم زدایی داروها در طی یک واکنش کاتالیزی اضافه شدن گلوتاتیون (GSH) به ۱و۲- دی کلرو -۴- نیترو بنزن در عصاره سیتوزولی کبد، شناسایی شدند (Dixon et al., 2002a). حضور GST ها در گیاهان نخستین بار به مدت کمی پس از شناسایی این دسته از آنزیم ها در جانوران در سال ۱۹۷۰ صورت گرفت زمانی که فعالیت یک GST از ذرت مسئول کنژوگه شدن کلرو-S-تریازین آتریازین با GSH در نظر گرفته شد که نتیجه آن حفظ محصولات ذرت از آسیب به وسیله این علف کش بود (Dixon et al., 2002a). GST ها در واقع آنزیم هایی هستند که اضافه شدن نوکلئوفیلی گلوتاتیون را به مراکز الکتروفیلی در مولکول های آلی کاتالیز می کنند (Pascal et al., 1998). این واکنش به منظور شکل دهی یک محصول قطبی تر است (Dixon et al., 2002a) که یا به واکوئل ها منتقل و در آنها تجزیه می شود (Kunieda et al., 2005) یا از سلول خارج می شود (Wilce and Parker, 1994). پس با این توصیف می توان گفت کنژوگه شدن با GSH معمولاً منجر به سم زدایی ترکیبات آنوتوکسیک و سیتوتوکسیک می شود (Mauch and Dudler, 1993). این خانواده قدیمی و متنوع پروتئینی حداقل در ۱۳ کلاس در رده های مختلف طی موجودات اعم از پستانداران، گیاهان، حشرات، انگل ها، قارچ ها، باکتری ها و حتی مخمرها تقسیم بندی شده است (Chelvanayagam et al., 2001). تنوع وسیع GST ها امکان فعالیت های وسیع آنزیمی و غیر آنزیمی را برای این

خانواده فراهم کرده است. به عنوان مثال GST ها تعداد قابل توجهی ایزوفرم را شامل می شوند که حداقل قابلیت شناسایی ۱۰۰ محصول زنوبیوتیک مختلف را دارند (Hayes and Pulford, 1995).

خانواده GST در گیاهان به ۸ کلاس تقسیم بندی شده است. ۷ کلاس از GST های گیاهی مشتمل بر Phi، Lambda، Theta، Zeta، Tau، دهیدروآسکوربات ردوکتاز (Dehydroascorbate reductase, DHAR) و تتراکلروهیدروکینون دهالوژناز (Tetrachlorohydroquinone dehalogenase, TCHQD) و یک کلاس میکروزومال است (Flury et al., 1996). GST های محلول در کلاس های مختلف بر اساس قرابت ترادف، واکنش های متقاطع ایمونولوژی، خصوصیات کینتیک و سازماندهی ژنوم تقسیم بندی می شوند. در گیاهان GST ها ۲ درصد پروتئین های محلول را تشکیل می دهند (Scalla and Roulet, 2002). آنالیز ژنی و پروژه های ژنومی نشان می دهد که بیش از ۴۰ ژن کد کننده GST وجود دارد که پروتئین های حاصل تشابه آمینواسیدی کمتر از ۱۰ درصد را نشان می دهند (McGonigle et al., 2000). باید خاطر نشان کرد که برخی منابع شباهت توالی آمینواسیدهای بین کلاس های مختلف را کمتر از ۲۵ درصد گزارش کرده اند. این رقم در مورد گلوتاتیون ترانسفرازهای متعلق به یک کلاس حداقل ۳۰ درصد اعلام شده است (Dixon et al., 2002a).

GST های کلاس های Phi و Tau ویژه گیاهان هستند و بیشترین و فراوانترین این آنزیم ها محسوب می شوند که عمدتاً در متابولیسم زنوبیوتیک ها نقش دارند و از شاخص های مهم انتخاب علف کش در محصولات و دانه ها محسوب می شوند (Marrs, 1996; Dixon et al., 2002b). این دو کلاس از GST ها همچنین به عنوان پروتئین های متصل شونده به فلاونوئید (Muller et al., 2000)، پروتئین های سیگنالی در زمان تنش (Loyall et al.,2000) و تنظیم کننده آپوپتوزیس (Kampranis et al., 2000) ایفای نقش می کنند. علاوه بر این GST های Tau و Phi بوسیله تیمارهایی که واکنش های دفاعی گیاهان را تحریک می کنند، نظیر تغییر فشار اسمزی یا استفاده از دماهای بالا، القا می شوند (Kunieda et al., 2005).

کلاس های کوچکتر Theta و Zeta عملکرد محدود شده ای در قبال زنوبیوتیک ها دارند و جزو آنزیم های حفاظت شده در گیاهان و جانوران در خلال فرآیند تکامل هستند (Edwards

GST های کلاس Theta در واقع گلوتاتیون پراکسیدازهایی هستند که (and Dixon, 2005). احیای لیپید هیدروپراکسیدازهای شکل گرفته در خلال استرس های اکسیداتیو به مونو هیدروکسی الکل های نظیرشان را کاتالیز می کنند (Roxas et al., 2000). در حالی که GSTهای Zeta به عنوان ایزومرازهای وابسته به گلوتاتیون تبدیل مالئیل استواستات به فوماریل استواستات را کاتالیز می کنند و همچنین در واکنش های دکلراسیون وابسته به گلوتاتیون نیز نقش دارند (Dixon et al., 2000). علاوه بر این GST های کلاس Zeta در کاتابولیسم تیروزین نیز نقش دارند. کلاس های دهیدروآسکوربات ردوکتاز و لامبدا از GST ها با ایفای نقش تیول ترانسفرازی امکان احیای دهیدروآسکوربات به آسکوربیک اسید را فراهم می کنند (Basantani and Srivastava, 2007).

GST های میکروزومال اعضای متصل به غشای یک ابر خانواده پروتئینی تحت عنوان MAPEG (membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism) هستند (Edwards et al., 2000).

GST دایمری با زیرواحدهای تقریباً ۲۶ کیلو دالتونی که معمولاً این زیرواحدها یک پروتئین هیدروفوب ۵۰ کیلو دالتونی با نقطه ایزوالکتریک ۴ یا ۵ را شکل می دهند. در موردGST های کلاس های Phi و Tau فقط زیرواحدهای کلاس های مشابه می توانند دایمریزه شوند. درون یک کلاس واحد حتی زیرواحدهایی که دارای اختلاف هایی در ترادف آمینواسیدی خود هستند می توانند با هم جفت شوند. GST هایی که در متابولیسم علف کش ها فعال هستند قادر به تشکیل هترودایمر نیز می باشند که این خود به طور چشمگیر تنوع GST ها را در گیاهان بالا می برد ولی تاثیر این ترکیب بر کیفیت عملکردGST ها هنوز مشخص نشده است Dixon et al., 2002a).

GST های کلاس Phi، Tau، Theta و Zeta پروتئین های دایمری هستند که در جایگاه فعال خود یک اسید آمینه سرین دارند این در حالی است که GST های کلاس های DHAR و Lambda منومری هستند که یک سیستئین کاتالیتیک در جایگاه فعال خود دارند. پروتئین TCHQD ممکن است حاوی یک سرین در جایگاه فعالش باشد. جزئیات ساختاری پروتئین های GST میکروزومال هنوز مشخص نشده است (Basantani and Srivastava, 2007).

سازماندهی ژنی GST های گیاهی به خوبی مشخص شده و جایگاه کروموزومی بسیاری از

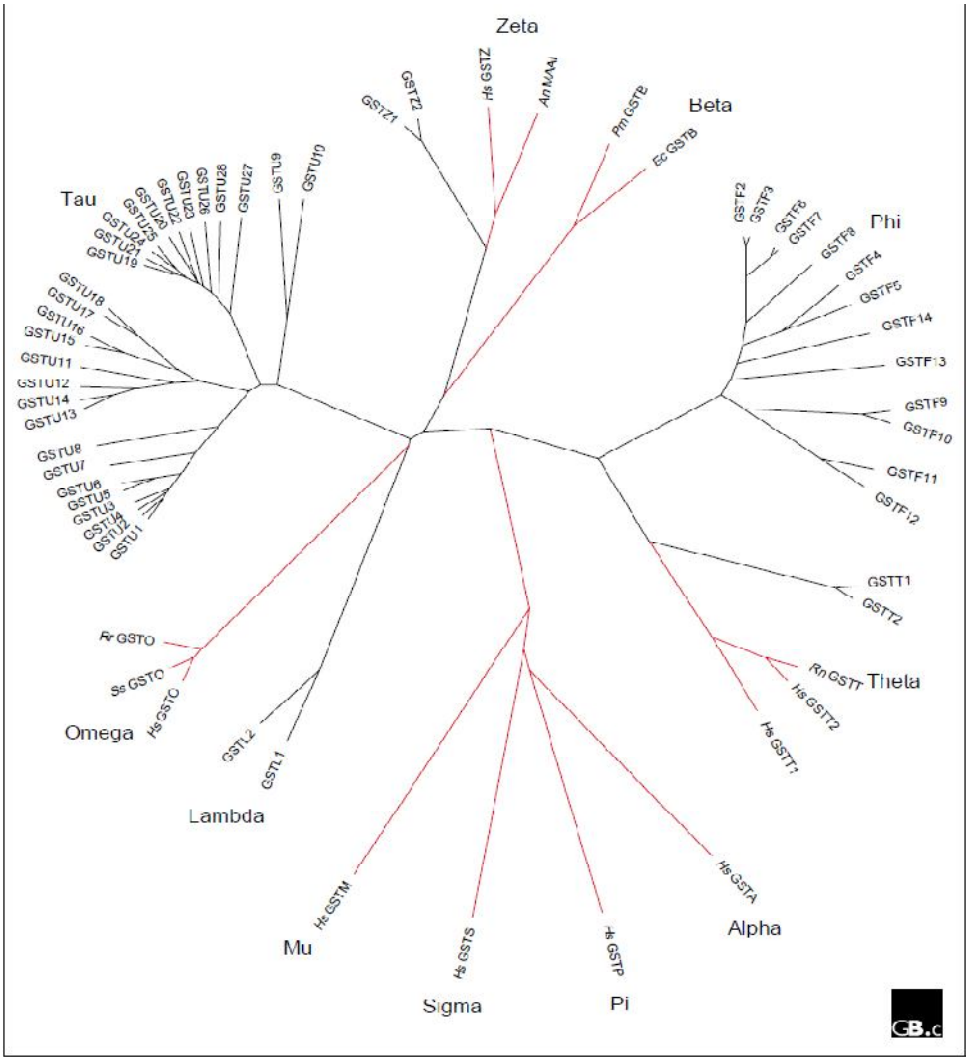
ژن های GST مشخص گردیده است. تعداد اگزون های هر کلاس از GST ها متفاوت می باشد به عنوان مثال ژن های GST کلاس Phi دارای ۳ اگزون و کلاس Tau دارای ۲ اگزون می باشند این در حالی است که ژن های GST های کلاس Zeta که واکنش های ایزومری را کاتالیز می کنند مشتمل بر ۱۰ اگزون می باشند. بسیاری از ژن های GST به صورت واحدهای تکرار شونده روی کروموزوم های گیاهی حضور دارند (Dean et al., 2003). GST های گیاهی بوسیله فاکتورهایی که باعث تخریب اکسیداتیو غشا می شوند نظیر زخمی شدن، حمله پاتوژن ها، پیری و زنوبیوتیک های ویژه القا می شوند. القای GST توسط این عوامل خود نشان دهنده عملکرد ایزوآنزیم های GST علیه تنش های اکسیداتیو و/یا واکنش های متقابل پاتوژن-گیاه می باشد (Flury et al., 1996). مقایسه بین میزان بیان و فراوانی نسبی هر کلاس از GST در گونه های مختلف این نتیجه را آشکار می کند که یک تفاوت بین گونه ای از نظر میزان بیان هر کلاس از GST دیده می شود بدون اینکه بتوان تفاوت بین تک لپه ای ها و دو لپه ای ها از این نظر قائل شد. از طرفی دیگر پراکنش و بیان GST در هر گونه لزوماً ربطی به فراوانی کلاس GST ندارد (Frova, 2003).

۱-۱- طبقه بندی

بر اساس واکنش های متقاطع ایمونولوژیکی و قرابت ترادف های آمینواسیدی، GST های محلول پستانداران به کلاس های Alpha، Mu، Pi، Sigma، Theta، Kappa و Zeta تقسیم بندی می شوند (Dixon et al., 1998). GST کلاس Delta ویژه حشرات می باشد (Chelvanayagam et al., 2001) و باکتری ها یک کلاس GST ویژه پروکاریوت ها، تحت عنوان Beta را شامل می شوند (Rossjohn et al., 1998). متعاقب خالص سازی و کلون کردن GST های فعال در سم زدایی علف کش ها در ذرت در دهه ۱۹۸۰ به سرعت آشکار شد که آنزیم های گیاهی از نظر ترادف به طور چشمگیری با همتای پستاندارانشان متفاوتند (Droog, 1997). در نخستین تلاش برای طبقه بندی GST های گیاهی، محققین بر اساس

تشابه ترادف پلی پپتیدی و ساختار اگزونی ۳ نوع GST پیشنهاد کردند (Droog et al., 1995). نوع اول GST ها مشتمل بر کل GST های گیاهی با فعالیت سم زدایی علف کش ها می شد این ژن ها ۳ اگزون و یک اینترون واحد را شامل می شدند. گروه بزرگ دوم GST های نوع سوم بودند که عمدتاً GST ها القا شده توسط اکسین را شامل می شدند ژن های این دسته از GSTها شامل ۲ اگزون و ۲ اینترون بودند این گروه بسیار متفاوت از ایزوآنزیم های نوع ۱ بودند و امروز نیز در کلاس جداگانه ای دسته بندی شده اند (Hayes and Mellelan, 1999). GSTهای نوع دوم شامل ۱۰ اگزون و ۹ اینترون بودند (Droog et al., 1995). در ادامه یک نوع چهارمی برای برخی ژن های آرابیدوپسیس (*Arabidopsis*) با ۵ اینترون پیشنهاد شد (Dixon et al., 1998).

امروزه در طبقه بندی جدید GST های نوع اول تحت عنوان Phi، GST های نوع دوم تحت عنوان Zeta، GST های نوع سوم تحت عنوان Tau و GST های نوع چهارم تحت عنوان Theta شناخته می شوند. منشأ مونوفیلیتیک پیشنهاد شده برای GST های Zeta و Theta کاملاً با حفظ تعداد اینترون ها، اسید آمینه اصلی جایگاه فعال و فعالیت این آنزیم ها در همه یوکاریوت ها همخوانی دارد (Frova, 2003). علاوه بر این ۴ گروه GST مشتمل بر Phi، Zeta، Tau و Theta اعضایی از این خانواده آنزیمی در آرابیدوپسیس یافت شدند که بر اساس تشابه ترادف در ۲ گروه مجزا قرار گرفتند. یکی شامل DHARs که اخیراً حضورش در گیاهان دیگر نیز شناسایی شده است (Jakobsson et al., 1999) و گروه دیگر GST هایی تحت عنوان Lambda هستند (Droog, 1997). در نهایت گیاهان همچنین شامل GST های میکروزومال می شوند که ارتباطی با دیگر گروه های اصلی این خانواده آنزیمی ندارد ولی واجد فعالیت هایی وابسته به گلوتاتیون می باشد (Jakobsson et al., 1999). درخت تکاملی انواع GST ها در پستانداران، گیاهان و باکتری ها در شکل ۱-۱ دیده می شود (Dixon et al., 2002a).



شکل ۱-۲- درخت تکاملی نشان دهنده تنوع GST ها و ارتباط بین کلاس های مختلف GST (Dixon et al., 2002a).