مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۸۹-۷۹

دخالت متالوپروتئین MSD1 در مکانیسم مقاومت به شوری بوسیله میانکنش با SOS3

The involvement of MSD1 metalloprotein in the mechanism of resistance to salinity by interaction with SOS3

مینا خواجه دهی[۱]، مقصود پژوهنده[۲*]، فاطمه محمودی کردی[۳]
Mina Khajehdehi[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2*], Fatemeh Mahmoudi Kurdi[1]

۱- دانش آموخته ارشد بیولوژی سلولی و مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان
۳- دانشیار گروه بیولوژی سلولی مولکولی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

[1] Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran

[2] Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: pazhouhandeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۶/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۴/۵/۷)

چکیده

در بین تنش‌های مختلف، تنش شوری تهدید بزرگی برای گیاه محسوب می‌شود و مطالعه مکانیسم تحمل شوری در گیاه حائز اهمیت است. در یکی از مسیرهای تحمل شوری در گیاه مدل آرابیدوپسیس، پروتئین Salt Overly Sensitive3 (SOS3) که یک حسگر یونهای کلسیم و آغازگر مسیر تحمل شوری است با تشکیل کمپلکس SOS3-SOS2 موجب فعال سازی فرایندهای مختلف به منظور تحمل شوری می‌شود. از سوی دیگر، رادیکال‌های سوپراکسید که در تنش‌های مختلف ازجمله تنش شوری تولید می‌شود برای سلول مضر بوده و بایستی از بین بروند. چگونگی حذف این رادیکالهای سوپراکسید و حفظ سلول از آسیب‌های اکسیداتیو در گیاهان مقاوم به شوری مشخص نیست. در این تحقیق، با کارگیری روش Yeast Two Hybrid System (Y2HS) و دوبل تراریزش مخمر *Saccharomyces cerevisiae* سویه AH109 با ناقلهای pGBT9-SOS3 و pGADT10-AtcDNA میانکنش‌های پروتئینی SOS3 در میان کتابخانه cDNA آرابیدوپسیس جستجو گردید. از چهار کلنی بدست آمده در روی محیط کشت انتخابی SD-AHWL استخراج DNA انجام و پس از تکثیر ناقل pGADT10-AtcDNA آنها در *E. coli* توالی‌یابی صورت گرفت و در بانک اطلاعات آرابیدوپسیس BLAST شد. یکی از مهمترین میانکنش‌های یافت شده مربوط به پروتئین Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1) بود. MSD1 واکنش خنثی سازی رادیکال‌های سوپراکسید برای حفاظت گیاه از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از استرس‌ها را به عهده دارد. میانکنش و بکارگیری MSD1 توسط SOS3 در مسیر مقاومت به شوری موجب نجات گیاه از آسیب‌های اکسیداتیو می‌شود. در ادامه، میانکنش SOS3-MSD1 با جداسازی و همسانه سازی cDNA کامل MSD1 در ناقلهای دوبل هیبرید مخمر تایید شد. همچنین به کمک تکنیک GST-Pull Down نشان داده شد که پروتئین SOS3 تولید شده در باکتری از روی pGEX2TK-SOS3 و پروتئین نشاندار MSD1 تولید شده از روی pGBKT7-MSD1 بصورت مستقیم باهم میانکنش دارند. این اولین گزارش از برهمکنش مسیر تحمل به شوری (SOS3) با مسیر حذف یونهای مضر سوپراکسید (MSD1) می‌باشد که مکانیسم مولکولی این دو مسیر را بهم مرتبط می‌سازد.

واژه‌های کلیدی

سیستم دوبل هیبرید مخمر
SOS3
شوری
منگنزسوپراکسیددسموتاز
GST-Pull Down

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

مقدمه

برای این که یک سلول به طور کاملا هماهنگ رفتار کند، باید کلیه عملکردهای آن به نوعی به هم مرتبط شوند. از این رو، تنوع عملکرد و پیچیدگی در سیستم‌های بیولوژیکی نتیجه میانکنش‌های موجود مابین اجزاء بیولوژیکی است. پروتئین‌ها به عنوان فراوان-ترین اجزاء سیستم‌های زیستی، اساس بیشتر فرایندهای بیولوژیکی مهم را تشکیل می‌دهند و مطالعه میانکنش بین آنها می‌تواند کمک قابل توجهی در توضیح بخشی از یک مسیر عملکردی ارائه کند. این امر بر این فرض استوار است که عملکرد یک پروتئین، مرتبط با عملکرد شریک میانکنش‌گر آن است (Pawson, 2003). روش‌های مختلفی همانند GST Pull-down، Tandem Affinity Purification (TAP-tag)، Co-Immunoprecipitation (Co-IP)، Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) و Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy (FLIM) برای مطالعه میانکنش‌های پروتئینی وجود دارد. یکی از روش‌های کلاسیک جهت مطالعه این میانکنش‌ها، سیستم دوبل هیبرید مخمر یا Yeast two hybrid system (Y2HS) است که بر پایه ویژگی‌های پروتئین GAL4 مخمر که شامل دو بخش اتصال به DNA (DNA Binding Domain: BD) و فعال‌سازی رونویسی (Transcription Activating Domain: AD) می‌باشد، پایه‌ریزی شده است (Chien *et al*. 1991) (شکل ۱). این سیستم که در اوایل دهه ۹۰ توسط Fildes و Song در مخمر *Saccharomyces cerevisiae* ارائه شد، انقلابی را در آنالیز میانکنش پروتئینی ایجاد کرد و به تدریج به علت سادگی نسبی، تنوع و کارایی بالا، از جایگاه ویژه-ای برخوردار شد (Bruckner *et al*. 2009). لازم به یادآوری است که یافته های این روش لازم است به کمک سایر روشها مورد تایید قرار گیرد.

موجودات زنده برای بقا و رشدونمو، باید به طور ثابت، تغییرات محیط خود را درک کنند و به طور صحیح از طریق تنوعی از مکانیسم‌های مولکولی به آن پاسخ دهند (Silva, 2009). تنش‌های مختلف محیطی منجر به تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی بسیاری می‌شوند که به طرز نامطلوبی رشد و باردهی گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهند و مانع بروز پتانسیل ژنتیکی کامل گیاه می‌شوند (Rodriguez *et al*. 2005). از جمله تنش های مهم می‌توان به تنش شوری اشاره کرد که به واسطه تجمع نمک، رشد گیاه را مهار می کند (Zhu, 2007).

در یکی از فرایندهای تحمل شوری در گیاه مدل *Arabidopsis thaliana* به نام مسیر Salt Overly Sensitive (SOS)، پروتئین SOS3، یک پروتئین با موتیف EF-hand است که قادر به درک سیگنال Ca^{2+} سیتوزولی ناشی از تنش شوری می‌باشد. SOS3 به محض درک سیگنال Ca^{2+}، باعث تجمع SOS2 در غشای سیتوپلاسمی و تشکیل کمپلکس SOS3-SOS2 شده و در ادامه موجب فعال سازی فرایندهای مختلف به منظور تحمل شوری می‌شود (Sanchez-Barrena *et al*. 2004). تاکنون مطالعات زیادی در مورد SOS3 صورت گرفته است، از جمله: بررسی تاثیر بیان همزمان ژن‌های مسیر SOS (*SOS1-3*) در افزایش تحمل گیاه نسبت به شوری (Yanga *et al*. 2009)، بیان، خالص سازی و کریستالیزاسیون SOS3 (Sanchez-Barrena *et al*. 2004)، تعیین ساختار SOS3 در حالت اتصال به Ca^{2+} و همچنین حالت اتصال به Ca^{2+} و یون منگنز (Sanchez-Barrena *et al*. 2005). در ادامه این تحقیقات، در پژوهش حاضر، به منظور درک بهتر مسیر مذکور و با توجه به نبود اطلاعات در زمینه میانکنش‌های مولکولی این پروتئین، با بکارگیری روش Y2HS و دوبل تراریزش مخمر *S. cerevisiae* با ناقل حاوی بانک AtcDNA و ناقل حاوی ژن *SOS3* میانکنش پروتئین SOS3 با دیگر پروتئینها بررسی شد و یافته ها با روش GST Pull-Dwon تایید گردید.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

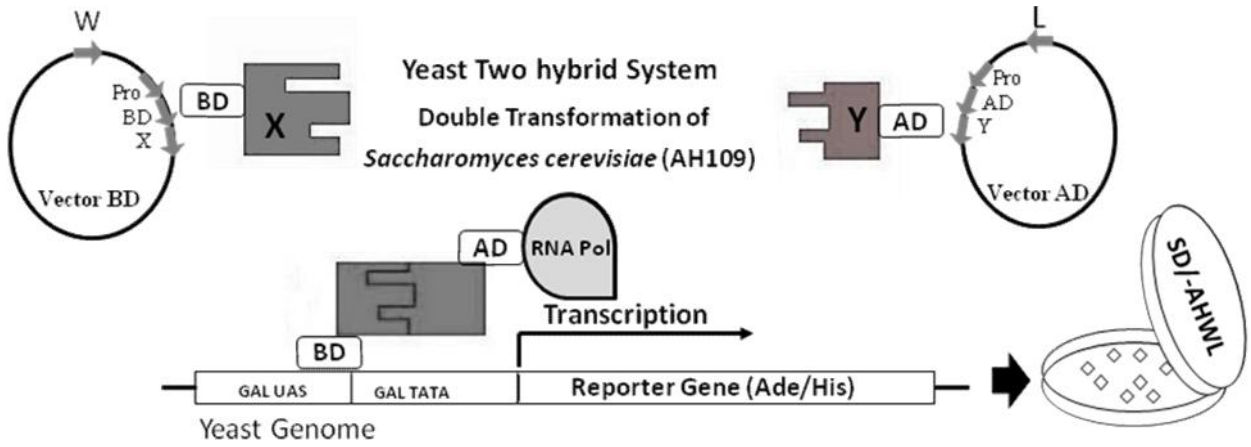


Figure 1. The schematic mechanism of Yeast two hybrid test.

شکل ۱- سازوکار مولکولی تست دوبل هیبرید مخمر. مخمر با دو ناقل بصورت همزمان تراریزش می شود. پروتئین های شیمر BD-X و AD-Y در مخمر تولید می‌شود. اگر بین دو پروتئین X و Y میانکنش وجود داشته باشد موجب کنار هم قرار گرفتن AD و BD برای اتصال BD-X به ناحیه اختصاصی روی پروموتور و همچنین فعال سازی آنزیم RNA pol II توسط AD-Y می‌شود تا رونویسی ژن گزارشگر صورت گیرد و پروتئین‌های مربوطه تولید شود که در نتیجه موجب رشد مخمر در محیط کشت فاقد A و H خواهد شد. AD: ناحیه فعال سازی آنزیم RNA پلیمراز (Activation Domain)، BD: ناحیه اتصال شونده به پروموتور (DNA Binding Domain)، X و Y نام فرضی دو ژن، GAT TATA: پروموتور ژن GAL4، GAL UAS: توالی بالادست پروموتور ژن GAL4، L: لوسین که از روی ناقل حاوی AD تولید می‌شود، W: تریپتوفان که از روی ناقل حاوی BD تولید می‌شود، A: ژن گزارشگر آدنین، H: ژن گزارشگر هیستیدین.

مواد و روش‌ها

تراریزش مخمر: به این منظور پس از تکثیر مخمر *Saccharomyces cerevisiae* سویه AH109 در محیط غنی Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)، تراریزش اول مخمر با ناقل pGBT9 حاوی ژن *SOS3* متصل به ناحیه GAL4-BD با روش شوک حرارتی شرکت Clontech انجام شد (Pazhouhandeh *et al*. 2006). برای این‌کار پس از تهیه سلولهای شایسته مخمر با کشت مایع در YPD و حصول OD_{600}=0.5 سانتریفیوژ ۱۵ دقیقه با ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق انجام و سلولهای مخمر در میکروتیوب دو میلی‌لیتر استریل، دو بار با آب مقطر استریل و یک بار با بافر LiAcTE (X1)، (10mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 0.1M LiAc) شستشو شدند. آنگاه در همین بافر معلق شده و برای تراریزش با ناقلها مورد استفاده قرار گرفتند. ۳۰ میکرولیتر بافر LiAcTE (X1)، ۵ میکرولیتر ssDNA با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میکرولیتر، ۲ میکرولیتر ناقل با غلظت یک میکروگرم بر میکرولیتر، ۲۵۰ میکرولیتر بافر PEG 50% استریل شده با فیلتر و ۵۰ میکرولیتر سلول مخمر در مخلوط هر تراریزش استفاده شد. نیم ساعت در ۳۰ درجه و سپس ۲۰ دقیقه در ۴۲ درجه سانتیگراد نگهداری و پس از شستشوی سلولها با آب روی محیط انتخابی پخش شدند. گزینش کلنی‌های تراژن بر روی محیط استاندارد پایه فاقد تریپتوفان (مارکر انتخابی ناقل pGBT9) (SD-W) یا در صورت دوبل تراریزش کردن بر روی محیط SD-WL (L: لوسین، مارکر انتخابی ناقل pGADT10) انجام پذیرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

تست اتواکتیواسیون: این تست به منظور اطمینان از عدم توانایی پروتئین SOS3 در فعال‌سازی رونویسی بدون حضور شریک میانکنش‌گر آن و پس از انجام تراریزش اول مخمر، تنها بازکشت کلنی های تراژن بر روی محیط انتخابی SD-HW و SD-AHW (AH: ژنهای گزارشگر هیستیدین و آدنین در مخمر) صورت گرفت. سه کلنی مستقل به عنوان تکرار بازکشت شد.

استخراج DNA مخمر: یک کلنی مخمر تراریخته (حاصل از غربالگری) در ۱۰ میلی‌لیتر محیط SD-WL مایع تلقیح و کشت داده شد و به مدت سه روز روی شیکر با سرعت ۱۶۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸-۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شد. سپس برای استخراج DNA از مخمر ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه انجام و محیط کشت دور ریخته شد. سلولها در ۲۵۰ میکرولیتر بافر استخراج DNA (10mM Tris-HCl pH 8، EDTA 1mM، NaCl 100mM، SDS 1% و ۲٪ Triton×100) معلق شده و به تیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال یافتند. ۲۵۰ میکرولیتر ذرات بسیار ریز شیشه و ۲۵۰ میکرولیتر فنل/کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه و به مدت ۳ دقیقه ورتکس کامل انجام شد. سپس ۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام و محلول رویی به تیوب‌های جدید انتقال یافت. رسوب‌دهی DNA با استفاده از ۳ حجم اتانل ۱۰۰٪ و ۰/۱ حجم استات آمونیوم ۴ مولار صورت گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه و شستشوی رسوب حاصل با اتانل ۷۰٪ و خشک کردن رسوب، DNA در ۴۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد (Pazhouhandeh *et al*. 2006).

تراریزش باکتری: DNA استخراجی از کلنی‌های مخمر دوبل تراریزش شده با استفاده از روش الکتروپوراسیون با ۲/۵ کیلوولت به مدت ۵ میلی ثانیه در دستگاه مولتی پوراتور (Eppendorf) به باکتری *E.coli* سویه Top10، جهت تکثیر ناقل pGADT10 انتقال داده شد و روی محیط جامد Luria-Bertani (LB) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر آمپی‌سیلین (مارکر انتخابی ناقل pGADT10) گزینش شد.

بررسی و تعیین هویت ناقلهای بدست آمده pGADT10-AtcDNA: PCR برای بررسی پلاسمیدهای استخراجی از کلنی‌های باکتریایی تراریخت با استفاده از آغازگرهای اختصاصی pGADT10 (آغازگر رو به جلو F: TACCACTACAATGGATG و آغازگر برگشتی R: GTTGAAGTGAACTTGCGGGGT) صورت گرفت. این دو آغازگر به روی ناقل به دو طرف محل ورود اینزت متصل می‌شوند و در ناقل خالی باندی به طول حدود ۲۵۰ جفت باز تولید می‌کنند. تنوع قطعات cDNA بدست آمده از کلونها روی ژل آگارز الکتروفورز بررسی و تعدادی از آنها به مرکز توالی‌یابی انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی (IBMP) شهر استراسبورگ فرانسه ارسال شد. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار APE و پایگاه اطلاعاتی TAIR (http://www.arabidopsis.org/blast) مورد بررسی قرار گرفت.

جداسازی و همسانه سازی cDNA کامل ژن *MSD1* از آرابیدوپسیس: برای بررسی بیشتر و تایید برهمکنش بین SOS3 با MSD1 از روی RNA گیاه آرابیدوپسیس، cDNA سنتز و به کمک آغازگرهای اختصاصی F: ACCCGGGAATGGCGATTCGTTGTGTAGC حاوی سایت برشی *Sma*I و R: AAGAATTCTCAGTTGTTTTCCTTCTCATAAAC حاوی سایت برشی *Eco*RI واکنش PCR برای همسانه سازی در ناقل pGEX-2TK و به کمک آغازگرهای اختصاصی F: AAGAATTCATGGCGATTCGTTGTGTAGC حاوی سایت برشی *Eco*RI و R: AACCCGGGTCAGTTGTTTTCCTTCTCATAAAC حاوی سایت برشی *Sma*I واکنش PCR برای همسانه سازی در ناقل pGBKT7 انجام شد و با استفاده از آنزیم‌های برشی مربوطه همسانه‌سازی‌ها صورت گرفت و صحت توالی ناحیه کد کننده ژن *MSD1* (At3G10920) به طول ۶۹۶ جفت باز در ناقلهای نوترکیب حاصل با توالی‌یابی تایید گردید.

بررسی تعامل پروتئین‌های SOS3-MSD1 با GST-Pull Down: برای تایید میانکنش های یافت شده از تکنیک Y2HS، از روش Pull-Down استفاده شد. ناقل نوترکیب pGEX2TK-*MSD1* که از آن پروتئین MSD1 بصورت فیوژن با پروتئین Glutathione S-Transferases تولید می‌شود به باکتری *E. coli* سویه Roseta

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

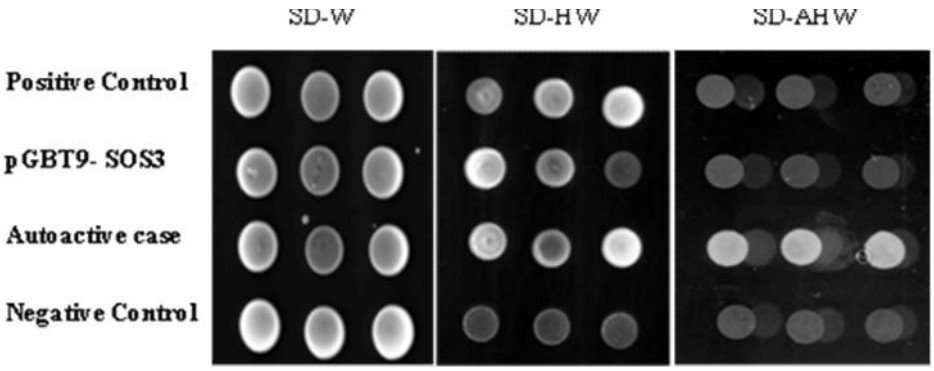
منتقل و باکتری پس از ۸ ساعت کشت مایع در LB به مدت ۱۰ ساعت با IPTG با غلظت ۱ میلی‌مولار القاء شد و پروتئین آن با سونیفیکاسیون و سانتریفیوژ در بافر حاوی 50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl2, 100mM NaCl, 0.2% Triton X100 (طبق پروتکل ذکر شده در Pazhouhandeh *et al*., 2006) استخراج و بر روی ذرات سفارز تثبیت گردید. پروتئین SOS3 نیز از روی ناقل pGBKT7-*SOS3* که تحت کنترل پروموتور T7 می‌باشد با کیت رونویسی و ترجمه همزمان (Promega, USA) و با کاربرد متیونین رادیواکتیو ^{35}S مطابق پروتکل کیت تولید شد. پروتئین SOS3 به تیوبهای حاوی سفارز که GST خالی یا GST-MSD1 روی آنها به مدت یک شب در ۴ درجه سانتیگراد تثبیت شده بود اضافه گردید و یک شب دیگر در همان شرایط روی چرخ غلطان گذاشته شد. روز بعد شستشو سه بار با بافر PBS حاوی 100mM NaCl انجام و سفارزها پس از گرم شدن در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه به چاهک های ژل SDS-PAGE با غلظت ۱۲٪ ریخته شد. ژل پس از رنگ آمیزی با کماسی بلو اسکن و تصویر برداری شد و به منظور اتورادیوگرافی به روی آن فیلم خام گذاشته شد و پس از ده روز فیلم ظاهر گردید.

آزمایش اتواکتیواسیون پروتئین SOS3: چون هدف از این تحقیق پیدا کردن یک شریک مولکولی برای SOS3 در تست دوبل هیبرید مخمر بود بنابراین ابتدا بایستی مطمئن شویم که خود SOS3 خاصیت فعال کردن رونویسی ژن گزارشگر را ندارد. برای اینکار پس از تهیه کلون های مخمر حاوی ناقل pGBT9-SOS3 و کشت آنها روی محیط انتخابی SD-AHW (شکل ۲)، اطمینان از عدم اتواکتیو بودن پروتئینSOS3 بدست آمد (W نشانگر تریپتوفان مارکر انتخابی pGBT9، H نشانگر هیستیدین و A نشانگر آدنین). این شکل نشان می‌دهد که سه کلنی مخمر حاوی pGBT9-SOS3 در محیط کشت کنترل SD-W رشد کرده ولی حتی پس از دو هفته در محیط کشت انتخابی SD-AHW قادر به رشد نبودند و برای رشد در این محیط کشت نیازمند یک شریک مولکولی هستند. بنابراین امکان غربالگری میانکنش این پروتئین در بانک cDNA آرابیدوپسیس بر روی محیط SD-AHWL (L نشانگر ژن لوسین، مارکر انتخابی pGADT10) که فاقد سه اسید آمینه لوسین، تریپتوفان و هیستیدین و همچنین آدنین است وجود دارد.

نتایج

غربالگری شریک مولکولی پروتئین SOS3 در بانک cDNA آرابیدوپسیس: یک کلنی مخمر حاوی pGBT9-SOS3 با ناقل pGADT10 حاوی قطعات مختلف بانک cDNA گیاه مدل آرابیدوپسیس تراریزش شد و کلنی‌ها بر روی محیط SD-AHWL گزینش شدند. تنها کلنی های مخمری می‌توانند در این محیط کشت رشد کنند که هم حاوی دو پلاسمید باشند و هم بین پروتئین‌های بیان شونده از این پلاسمیدها تعامل برقرار شود. تعامل باعث بیان ژنهای گزارشگر و تولید هستیدین و آدنین در مخمر شده و بنابراین کلنی توانست در عدم حضور این دو ماده در محیط کشت رشد نماید. چهار کلنی در روی این محیط کشت بدست آمد و DNA این کلنی‌ها استخراج شده و در باکتری *E. coli*، ناقلهای pGADT10 تکثیر و جداسازی شدند. برای بررسی ژنهای موجود در این ناقلها واکنش PCR به کمک دو آغازگر که به دو طرف محل ورود ژن در ناقل pGADT10 می‌چسبند انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز مشاهده شد. الکتروفورز محصول PCR نشان داد که چهار ژن متفاوت در این چهار کلون غربال شده اند (شکل ۳). هر چهار ناقل pGADT10 حاصل از غربالگری پس از تیمار RNase جهت تعیین هویت در دو جهت با آغازگرهای اختصاصی ناقل توالی‌یابی شدند. توالی-های حاصل پس از بررسی و اطمینان از فاز ترجمه‌ای صحیح آنها، در سایت http://www.arabidopsis.org/blast بلاست شده و توالی یکی از کلونها (شماره ۴ شکل ۳) با توالی مربوط به ژن *MSD1* (Manganese SuperOxide Dismutase 1: At3g10920) مطابقت کرد (شکل ۴). این ژن به نامهای *MnSOD1* و *SOD1* نیز نامیده می‌شود و ناحیه کد شونده آن دارای ۹۶۹ جفت باز بوده و شش اگزون و پنج انترون دارد. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود کلون بدست آمده از غربالگری ناقص بوده و ۱۲۹ نوکلوتید از ابتدای ژن را ندارد ولی از نوکلوتید ۱۳۰ تا انتها (نوکلوتید ۶۹۶) بجز در نوکلوتید ۶۵۹ کاملا منطبق به توالی ثبت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

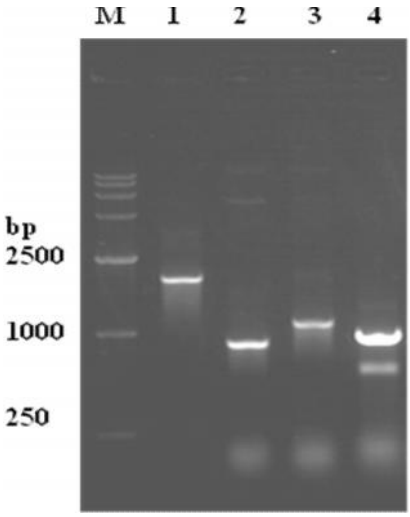


شکل ۲- تست اتواکتیواسیون. عدم رشد سلول های مخمری تراریخته با ناقل حاوی BD-SOS3 بر روی محیط SD-AHW نشانگر عدم توانایی پروتئین SOS3 در فعال سازی رونویسی ژنهای گزارشگر بدون حضور ناحیه فعال سازی پلیمراز است. کلنی های مخمر پس از دو روز از بین رفته و خشک شدند در حالیکه کلنی های کنترل (ردیف سوم) که خاصیت اتواکتیواسیون دارد توانستند در این محیط رشد نماید. محیط SD-W پس از سه روز، محیط SD-HW پس از پنج روز و محیط SD-AHW پس از دوهفته تصویر برداری شده است. سه قطره قابل مشاهده هر کدام نتیجه کشت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون یک کلنی مستقل تلقیح شده از محیط جامد پتری به داخل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر می باشد. سه قطره یعنی سه کلنی مستقل به عنوان تکرار.

Figure 2. The Autoactivation test.

شده این ژن در NCBI می‌باشد. نوکلوتید ۶۵۹ در کلون توالی‌یابی شده G و در NCBI نوکلوتید A می‌باشد.

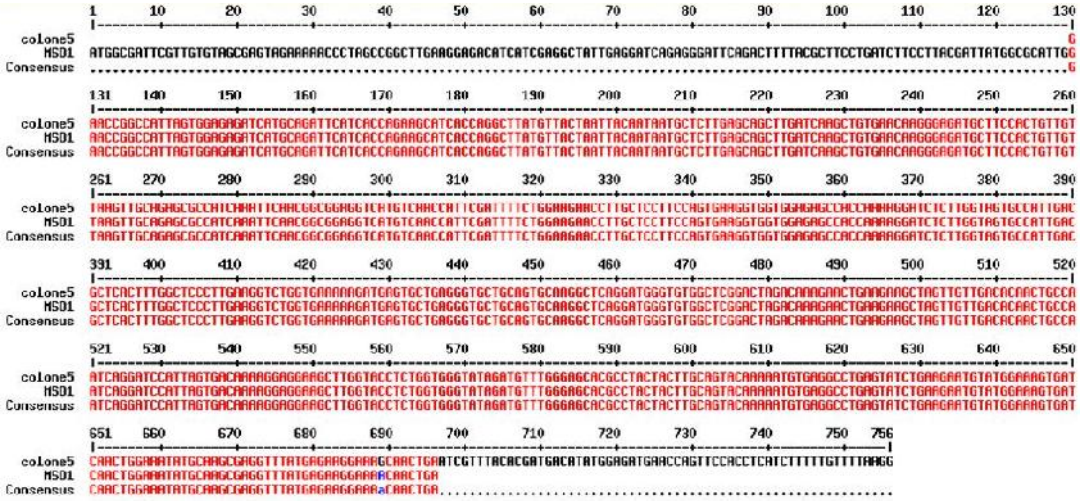
تایید میانکنش میان SOS3 با MSD1 بوسیله Y2HS: برای تایید نتیجه بدست آمده، cDNA کامل ژن *MSD1* (۶۹۶ باز) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آن از روی cDNA سنتز شده از RNA کلی گیاه آرابیدوپسیس تکثیر و این بار در ناقل pGBKT7 همسانه سازی گردید. توالی یابی نشان داد که توالی ثبت شده بدون هیچ گونه جهش همسانه‌سازی شده است. از طرف دیگر، *SOS3* نیز از روی ناقل موجود با روش PCR تکثیر و در ناقل pGADT7 همسانه‌سازی و توالی‌یابی شد. پس از اطمینان از درستی توالی‌ها، میانکنش پروتئین‌های کامل MSD1 با پروتئین SOS3 از ناقل pGADT7 بررسی شد. عوض نمودن جهت ناقلها یعنی این بار ناحیه چسبنده (DNA Binding Domain) به همراه MSD1 و ناحیه فعال کننده (Activating Domain) به همراه SOS3، برای اطمینان از وجود میانکنش قوی بین آنها انجام گرفت. نتایج نشان داد که در این جهت نیز میانکنش بین پروتئین-های کامل وجود دارد (شکل۵).



شکل ۳- بررسی حضور و اندازه ژنها در ناقلهای pGADT10 حاصل از غربالگری. الکتروفورز نتیجه PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل روی ژل آگارز ۱٪. لاین‌های ۱ تا ۴ مربوط به نتایج PCR روی ناقلهای استخراجی از چهار کلنی مخمر حاصل از تست میانکنش AtcDNA-SOS3 می‌باشد.

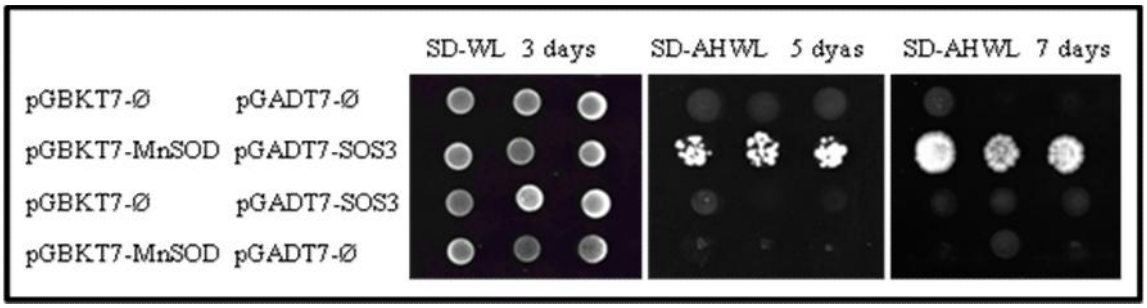
Figure 3. The Size of obtained genes in pGADT10.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]



شکل ۴- زیرهمچینی نتیجه توالی یابی و CDS ژن منگنز سوپراکسیددسموتاز (At3g10920). ردیف بالا: توالی حاصل از توالی یابی ناقل pGADT10-cDNA مربوط به کلون مورد آزمایش. ردیف دوم: CDS منگنز سوپراکسیددسموتاز. ردیف سوم نمایشگر توالی های یکسان (قرمز) یا متفاوت (آبی) در دو توالی مورد بررسی است.

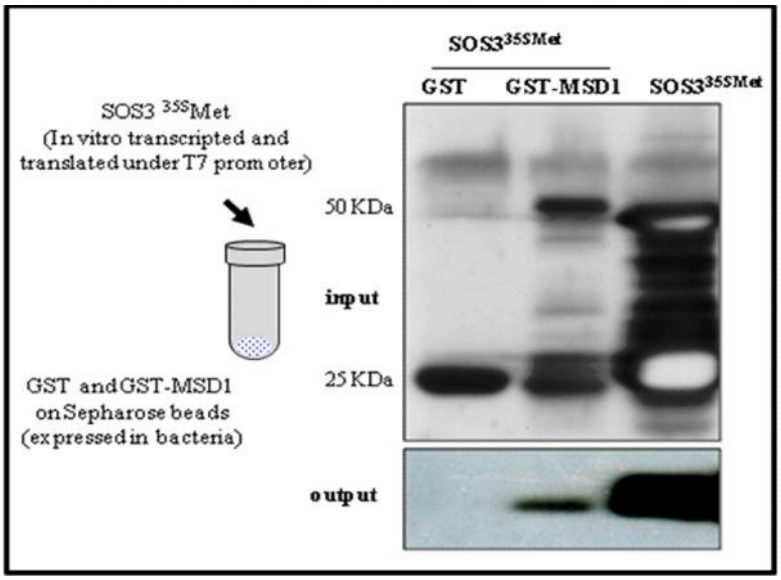
Figure 4. The Alignment of the CDS of MSD1 sequence (At3g10920) with obtained sequence.



شکل ۵- تایید برهمکنش بین SOS3 با MSD1 با تست دوبل هیبرید مخمر: سه کلنی مخمر تراریخته حاوی ناقلهای مذکور که پس از گزینش در دو محیط کشت SD-WL به عنوان کنترل و SD-AHWL به عنوان انتخابگر تعامل بین دو پروتئین کشت شده‌اند و پس از ۳، ۵ و ۷ روز اسکن محیط کشت صورت گرفته است. تنها کلنی‌های حاوی ناقلهای دارای ژن SOS3 و MSD1 توانستند در محیط انتخابی رشد نمایند. سه قطره قابل مشاهده هر کدام نتیجه کشت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسون یک کلنی مستقل تلقیح شده از محیط جامد پتری به داخل ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر می باشد. سه قطره یعنی سه کلنی مستقل به عنوان تکرار.

Figure 5. The confirmation of MSD1-SOS3 interaction by Y2HT.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]



شکل ۶- تایید میانکنش بین SOS3 با MSD1 با تکنیک GST-Pull Down: سمت چپ نشان دهنده شمای آزمایش است که پروتئین MSD1 ترکیب شده با GST از روی ناقل pGEX2TK-MSD1 در باکتری تولید و روی ذرات سفارز تثبیت شد. پروتئین SOS3 بصورت رادیواکتیو با متیونین S^{35} از روی ناقل pGBKT7 تولید و بر روی سفارز اضافه گردید. input نشان می‌دهد که GST خالی (به عنوان کنترل منفی) به اندازه تقریبی 25 KDaو GST-MSD1 با 50 KDa تولید شده اند اما SOS3 فقط توانسته روی MSD1 چسبیده و باقی بماند (output). پایین تصویر اسکن فیلم اتورادیوگرافی پس از گذاشته شدن روی ژل می‌باشد. SOS3 سمت راست ژل، ۵ میکرولیتر از محصول ترجمه است که مستقیما در ژل به عنوان کنترل مثبت ریخته شده است.

Figure 6. The confirmation of MSD1-SOS3 interaction by GST-Pull Down.

بنابراین، پروتئین MSD1 بصورت قوی با پروتئین SOS3 در هر دو جهت ناقل یعنی BD-SOS3…MSD1-AD و BD-MSD1…SOS3-AD در تست دوبل هیبرید مخمر میانکنش دارد.

تایید نهایی میانکنش میان SOS3 با MSD1 بوسیله GST-Pull Down:

برای تایید نهایی تعامل SOS3 با MSD1، cDNA کامل ژن *MSD1* (۶۹۶ باز) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی این بار در ناقل pGEX2TK همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردید. بیان MSD1 از این ناقل تحت پروموتور قابل القاء با IPTG و بصورت پروتئین ترکیبی در N-terminus با Glutathione S-Transferase (GST) می‌باشد. پروتئین GST-MSD1 در باکتری تولید، استخراج و بر روی میکروذرات سفارز تثبیت شد. سفارز میل ترکیبی اختصاصی با GST دارد. از طرف دیگر پروتئین SOS3 از روی ناقل pGBKT7 که تحت پروموتور T7 می‌باشد به کمک کیت رونویسی و ترجمه (Promega) به صورت رادیواکتیو با متیونین-های S^{35} تولید شد و بر روی ذرات سفارز حاوی GST-MSD1 اضافه گردید و پس از یک شب، شستشو انجام و نتیجه روی ژل SDS-PAGE بررسی شد (شکل۶). GST تنها به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. پس از رنگ آمیزی ژل، مشاهده شد که GST تنها (25 KDa) و GST-MSD1 (25+25=50 KDa) به-خوبی بیان شده اند (Input). نگهداری فیلم خام روی ژل و ظهور آن (output) نشان داد که پروتئین SOS3 رادیواکتیو فقط روی GST-MSD1 باقی مانده است و با GST تنها میل ترکیبی ندارد. بنابراین به کمک این تکنیک نتیجه حاصل از دوبل هیبرید مخمر تایید نهایی شد و نشان داده شد که تعامل این دو پروتئین مستقیم و بی‌واسطه است.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

بحث

با اینکه اکسیژن جزء ضروری حیات برای موجودات هوازی است، اما گونه‌های اکسیژن فعال (Reactive oxygen species: ROS) که شامل رادیکال سوپراکسید (O_2^-)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^\bullet$) و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) است و در همه سلول‌های هوازی در طول فرایندهای متابولیکی ایجاد می‌شود، یکی از فاکتورهای مضر برای گیاهان در معرض استرس محیطی است. این پدیده که استرس اکسیداتیو نامیده می‌شود در نتیجه استرس‌های محیطی مختلف به ویژه شوری رخ می‌دهد و می‌تواند متابولیسم معمول سلول را از طریق آسیب اکسیداتیو به لیپیدهای غشایی، پروتئین‌ها و اسید نوکلئیک‌ها تغییر دهد (Joseph *et al.* 2011). سوپراکسیددسموتازها با دسموتاسیون و حذف رادیکال‌های سوپراکسید ایجاد شده در طی استرس اکسیداتیو و تبدیل آنها به اکسیژن و پراکسید هیدروژن، نقش مهمی را در حفاظت گیاهان علیه این استرس بازی می‌کند (Bowler *et al.* 1989). متالوپروتئین Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1) یک سوپراکسیددسموتاز است که اولین بار به عنوان یک آنزیم الکتریکی در آرابیدوپسیس شناسایی شد (Kliebenstein *et al.* 1998). این پروتئین به صورت هوموتترامر در میتوکندری سلول‌های یوکاریوتی و پراکسی‌زوم‌ها یافت می‌شود (Gill and Tuteja, 2010). هومولوگ این ژن نیز از کبد انسان شناسایی شد و تشابه توالی زیادی در انسان، گیاه، مخمر و باکتری دارد. این آنزیم مهم آنتی اکسیدان در سیتوپلاسم به عنوان یک پروتئین اولیه سنتز می‌شود و بعدا در اثر حذف توالی رهبر انتهای NH_2 به ماتریکس میتوکندری منتقل می‌گردد (Bowler *et al.* 1989). سوپراکسید‌دسموتازها (Superoxide dismutases: SOD) در خط مقدم دفاع علیه استرس اکسیداتیو واقع‌اند و جزء سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان آنزیمی گیاهان محسوب می‌شوند که در همه موجودات هوازی و در همه اندامک‌های مستعد استرس اکسیداتیو از جمله کلروپلاست‌ها، پراکسی‌زوم‌ها و میتوکندری‌ها حضور دارند (Gill and Tuteja, 2010).

استرس شوری در گیاهان به علت تولید ROS منجر به استرس اکسیداتیو می‌شود. افزایش فعالیت SOD تحت استرس شوری در گیاهان مختلف Viz mulberry، *Cicer arietinum*، *Lycopersicon esculentum* و القای فعالیت SOD در *Anabaena doiolum* تحت استرس‌های شوری و مس گزارش شده است (Joseph *et al.* 2011). چندین تحقیق دیگر ارتباط بین استرس شوری و اکسیداتیو را به اثبات رسانده‌اند که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: افزایش تحمل شوری در نتیجه افزایش بیان ژن *MSD1* در گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس (Martin *et al.* 2013)، افزایش فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و محتوای آنتی‌اکسیدان گیاهان مقاوم به شوری در پاسخ به تیمار شوری، اثبات رابطه بین تحمل شوری و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاهان مختلف، افزایش فعالیت این آنزیم‌ها در ریشه و جوانه تحت استرس شوری و افزایش فعالیت SOD و کاهش پراکسیداسیون لیپیدی در ارقام برنج مقاوم به شوری نسبت به واریته‌های حساس (Joseph *et al.* 2011). در گیاهان گوجه فرنگی نشان داده شده است که بیان ژن *MnSoD* در شرایط خشکی، ایجاد زخم در گیاه و دریافت اتانول افزایش یافته است (Perl-Treves and Galun, 1991). در گیاه آرابیدوپسیس نیز نشان داده شده است که با بیان بیشینه *MSD1* (دو برابر بیان نسبت به گیاه غیر تراژن) تحمل گیاه به شوری افزایش یافت و گیاهان تراژن توانستند ۱۵۰ میلی مولار نمک را بخوبی تحمل کنند درحالیکه گیاهان غیر تراژن زرد شده و از بین رفتند (Wang *et al.* 2004). در گیاه یونجه هم بیان MnSOD باعث افزایش پایداری گیاه و میزان بیوماس آن شده است (Samis *et al.* 2002). در گیاهان آرابیدوپسیس که بیان ژن *MSD1* توسط وارد کردن یک آنتی‌سنس به گیاه خاموش شده بود میزان رشد ریشه کاهش یافته و همچنین با تاخیر مواجه بود (Morgan *et al.* 2008). در این تحقیق به تبع غربالگری با روش دوبل هیبرید مخمر در بانک cDNA آرابیدوپسیس شریک مولکولی SOS3 بنام MSD1 شناسایی شد و سپس cDNA کامل آن از آرابیدوپسیس همسانه سازی و میانکنش آن با SOS3 دوباره در تست دوبل هیبرید مخمر تایید شد. آنگاه به کمک روش بیوشیمیایی GST-Pull Down این میانکنش مستقیم تایید نهایی گردید. به این ترتیب

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

نتایج چندین مطالعه حاکی از ارتباط نزدیک MSD1 با مکانیسم شوری بود و شناسایی میانکنش بین پروتئین SOS3 (پروتئین درگیر در تحمل شوری) و MSD1 (پروتئین درگیر در تحمل استرس اکسیداتیو) در این تحقیق رابطه مولکولی را بین این دو استرس آشکار ساخت. شناسایی رابطه مولکولی SOS3 با MSD1 نشان می‌دهد که در سلول این دو پروتئین باهم در یک کمپلکس بکار می‌روند تا گیاه در معرض شوری، ضمن مقاومت یا تحمل به شوری محیط باعث حذف یونهای پراکسید مضری شود که در اثر شوری درگیاه ایجاد شده است. این ارتباط ممکن است ما را در تولید گیاهان متحمل به تنش شوری و اکسیداتیو کمک و یاری کند. به عنوان مثال تلاش برای ایجاد گیاهی با بیان بیشینه SOS3 و MSD1 حائز اهمیت است زیرا بیان بیشینه SOS3 باعث مقاومت به شوری و بیان بیشینه MSD1 باعث مقاومت به استرسهای اکسیداتیو با منشا مختلف خواهد شد. از سوی دیگر چنین گیاهی خاصیت داروئی ضد سرطانی نیز خواهد داشت چراکه همچون تمامی آنتی اکسیدانها، مطالعات قبلی نشانگر این است که بیان بیشینه MSD1 در موش باعث درمان سلولهای سرطانی شده است (Oberley, 2001).

تشکر و قدردانی

با تشکر از حمایت مالی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان و همکاری موسسه انستیتو بیولوژی مولکولی گیاهی استراسبورگ فرانسه در تامین برخی مواد، توالی یابی و فراهم سازی امکانات آزمایش GST-Pull Down.

منابع

Bowler C, Alliotte T, Van den bulcke M, Bauw G, Vandekerckhove J, Vanmontagu M, Inze D. 1989. A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3237-3241.

Bruckner A, Polge C, Lentze N, Auerbach D, Schlattner U. 2009. Yeast Two-Hybrid, a powerful tool for systems biology. International Journal of Molecular Sciences 10: 2763-2788.

Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R. Fields S. 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. Proc. Nati. Acad. Sci USA 88: 9578-9582.

Gill SS, Tuteja N. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Joseph B, Jini D. 2011. Development of salt stress-tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. Asian Journal of Agricultural Research. 1: 17-27.

Kliebenstein DJ, Monde RA, Last RL. 1998. Superoxide dismutase in Arabidopsis: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. Plant Physiol. 118:637-50.

Martin MV, Distefano AM, Zabaleta EJ, Pagnussat GC. 2013. New insights into the functional roles of reactive oxygen species during embryo sac development and fertilization in Arabidopsis thaliana. Plant Signal Behav. 8(10): e25714.

Morgan MJ, Lehmann M, Schwarzländer M, Baxter CJ, Sienkiewicz-Porzucek A, Williams TC, Schauer N, Fernie AR, Fricker MD, Ratcliffe RG, Sweetlove LJ, Finkemeier I. 2008. Decrease in manganese superoxide dismutase leads to reduced root growth and affects tricarboxylic acid cycle flux and mitochondrial redox homeostasis. Plant Physiol. 147:101–14.

Oberley LW. 2001. Anticancer therapy by over-expression of superoxide dismutase. Antioxidants and Redox Signaling 3:461-72.

Pawson T. 2003. Organization of cell-regulatory systems through modular-protein-interaction domains. Philosophical Transactions of the Royal Society 361: 1251-1262.

Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, Lechner E, Berry B. 2006. F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 1994-1999.

Perl-Treves R, Galun E. 1991. The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. Plant Mol Biol. 17:745–60.

Rodriguez M, Canales E, Borras-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnologia Aplicada 22: 1-10.

Samis K, Bowley S, McKersie B. 2002. Pyramiding Mn-superoxide dismutase transgenes to improve

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

persistence and biomass production in alfalfa. J Exp Bot. 53:1343–50.

Sanchez-Barrena MJ, Martinez-Ripoll M, Zhu JK, Albert A. 2005. The structure of the *Arabidopsis thaliana* SOS3: molecular mechanism of sensing calcium for Salt Stress response. Journal of Molecular Biology 345: 1253-1264.

Sanchez-Barrena MJ, Martinez-Ripoll M, Zhu JK, Alberta A. 2004. SOS3 (salt overly sensitive 3) from *Arabidopsis thaliana*: expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis. Acta Crystallographica 60: 1272-1274.

Silva P, Hernani G. 2009. Regulation by salt of vacuolar H+-ATPase and H+-pyro-phosphatase activities and Na+/H+ exchange. Plant Signaling and Behavior 4: 718-726.

Wang Y, Ying Y, Chen J, Wang X. 2004. Transgenic Arabidopsis overexpressing Mn-SOD enhanced salt-tolerance. Plant Sci. 167:671–7.

Yanga Q, Chena ZZ, Zhoua XF, Yina HB, Lia X, Xina XF, Honga XH, Zhuc JK, Gonga Zh. 2009. Overexpression of *SOS* (*Salt Overly Sensitive*) genes increases salt tolerance in transgenic arabidopsis. Molecular Plant 2: 22-31.

Zhu JK. 2007. Plant salt stress. In: Encyclopedia of Life Sciences, ed. A. O'Daly,. Chichester, UK, John Wiley and Sons Ltd. pp. 1-3.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

The involvement of MSD1 metalloprotein in the mechanism of resistance to salinity by interaction with SOS3

Mina Khajehdehi[1], Maghsoud Pazhouhandeh[2*], Fatemeh Mahmoudi Kurdi[1]

1. Department of Cellular and Molecular Biology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran
2. Department of Agricultural Biotechnology, Azarbaijan Shahid Madani University, Km 35 Tabriz-Azarshahr Road, Iran.

* Corresponding Author, Email: pazhouhandeh@gmail.com

ABSTRACT

Among the various stresses, salinity is a great threat to plants and the study of the mechanism of salt tolerance in plants is important. In one of the salt tolerance pathways in the model plant Arabidopsis, Salt Overly Sensitive 3 (SOS3) protein, which is a sensor of calcium ions and the initiator of a salt tolerance pathway, activates various processes in order to tolerate salinity by the formation of an SOS3-SOS2 complex. On the other hand, superoxide radicals that are produced in response to various stresses such as salinity are harmful to the cell and must be eliminated. How to remove superoxide radicals and protect cells from oxidative damage in salt-tolerant plants is not clear. In this study, the SOS3 protein interactions in Arabidopsis cDNA library were investigated using the Yeast Two Hybrid System (Y2HS), and double transformation of *Saccharomyces cerevisiae* AH109 strain with pGBT9-SOS3 and pGADT10-AtcDNA. DNA extraction was performed on four selected yeast colonies on SD-AHWL and pGADT10-AtcDNA vectors were amplified in *E. coli*, sequenced and compared to the Arabidopsis data bank. One of the most important interactions was found on Manganese Superoxide Dismutase 1 (MSD1). MSD1 neutralizes superoxide radicals to protect plants from oxidative damage caused by stresses. The interaction and the recruitment of MSD1 by SOS3 in the salinity resistance pathway should save the plant from oxidative trauma. Afterward, the interaction of SOS3-MSD1 was confirmed by isolation of complete MSD1 cDNA and cloning in yeast two hybrid vectors. In parallel, using a GST-Pull Down assay, it was shown that the SOS3 protein produced in bacterium from pGEX2TK-SOS3 vector directly interacted with the radio-labeled MSD1 produced from pGBKT7-MSD1. This is the first report of the interaction of salinity tolerance pathway (SOS3) with the elimination pathway of harmful superoxide ions (MSD1) that shows interaction between these molecular mechanisms.

Key Words

Yeast two hybrid system, SOS3, salinity, Manganese superoxide dismutase, GST-Pull Down

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-07-15]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.1.1]